

多功能降解菌 *Pseudomonas putida* KT2440-DOP 的构建 与降解特性研究

顾立锋, 何 健, 黄 星, 贾开志, 李顺鹏*

(南京农业大学生命科学学院微生物学系 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要: 三唑磷水解酶基因为研究发现的一个新的广谱有机磷水解酶基因, 通过 PCR 从有机磷降解菌株 *Ochrobactrum* sp. mp-4 总 DNA 扩增了 *tpd*, 将 *tpd* 定向克隆到 pBBRMCS-5 载体上, 构建重组质粒 pTPD, 在辅助质粒 pRK2013 的帮助下, 通过三亲接合将 pTPD 转移到模式菌株 *Pseudomonas putida* KT2440 中, 获得的工程菌 *Pseudomonas putida* KT2440-DOP 可以降解多种有机磷农药及芳香烃化合物, KT2440-DOP 的有机磷水解酶活较出发菌株 MP-4 提高了一倍左右, 且遗传性状稳定。

关键词: 有机磷农药; *tpd*; KT2440; 工程菌构建

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)05-0763-04

农药残留、有毒化合物严重污染了我国生态环境, 给人民身体健康带来危害^[1]; 生物修复 (Bioremediation) 是一项消除环境污染的新型技术, 其原理是通过添加人工降解性微生物并给予一定的条件刺激其大量生长, 使之能够在自然条件下将有机污染物消除^[1,2]。通常环境污染多为复合污染, 污染物种多, 这要求接种微生物具有降解多种污染物的能力, 而现代基因工程和代谢工程技术的发展使构建“超级工程菌”, 扩大降解菌降解谱和降解能力成为可能。

大量的研究表明恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 具有强大的代谢能力, 在生物修复中具有广泛的应用前景。 *Pseudomonas putida* KT2440 是一株在全世界范围内得到详尽研究和应用的菌株, 是第一个被美国卫生部重组 DNA 委员会 (Recombinant DNA Advisory Committee, RAC) 认定为对环境安全的格兰氏阴性细菌 (1982 年), 并许可 KT2440 作为基因工程的宿主菌^[3]。本文将能降解多种有机磷农药的有机磷水解酶基因 *tpd* 克隆到 KT2440 中, 成功构建了能够降解多种有机磷农药的工程菌株 KT2440-DOP, 从而扩大了 KT2440 的降解谱。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所用菌株和质粒参见

表 1。

1.1.2 试剂和仪器: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶及 DNA 凝胶回收试剂盒 Ver. 2.0 DV805A 为 TaKaRa 公司产品。农药测定采用岛津 UV-PC2401 紫外可见连续光谱扫描仪及岛津 GC-14B 气相色谱仪。

1.1.3 培养基: LB 培养基成分为每升含 Tryptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 10g; 基础培养基 (MM) 成分为每升含 NH_4NO_3 4g, K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 5mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mg, 添加适当的有机磷农药作为碳源, pH 7.2; 庆大霉素 (Gm) 使用浓度为 60mg/L, 氨苄青霉素 (Amp) 使用浓度为 100mg/L。

1.2 三唑磷的检测与分析

1.2.1 紫外扫描测定: 水样经两倍体积的三氯甲烷提取, 弃去上层水样, 下层有机层加入少量无水硫酸钠吸去残余水分后进行紫外扫描, 测定条件为 $\lambda_{200\text{nm}} \sim \lambda_{350\text{nm}}$ 连续光谱扫描, 在 $\lambda_{248\text{nm}}$ 条件下进行定量分析。

1.2.2 气相色谱测定: 气相色谱测定条件为 OV101 1.5m/3.2mm 玻璃柱; 检测器: FID; 进样口温度: 250℃; 检测器温度: 250℃; 三唑磷保留时间为 10.4min。

1.3 有机磷水解酶基因 *tpd* 的 PCR 扩增

mp-4 菌体总 DNA 的提取参考文献 [4] 进行。根

基金项目: 国家“863 计划” (2003AA241150); 江苏省科技攻关项目 (BE2003345, BE2003343)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396314; E-mail: lisp@njau.edu.cn

作者简介: 顾立锋 (1979 -) 男, 江苏宜兴人, 博士研究生, 主要从事环境微生物学和分子生物学研究。E-mail: microglf@mailme.cn

收稿日期: 2005-10-20; 接受日期: 2005-11-23; 修回日期: 2006-03-01

表 1 供试菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids in this study

Strains and plasmids	Genotype and phenotype	Source or reference
Plasmid		
pBBRMCS-5	Gm ^r , broad host range plasmid	From Dr. Zhu Jun
pTPD	Gm ^r , Triazophos degrading gene(tpd)fragment inserted into MCS of pBBRMCS-5	This work
pRK2013	Km ^r , mob ⁺ , tra ⁺ , helper plasmid	Laboratory stored
Strain		
<i>Ochrobactrum</i> sp. mp-4	Organophosphate degrading strain G ⁻	Laboratory stored
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>Pseudomonas</i> sp. type strain	From Dr. Wang Shiming
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ , supE44, hsdR17, △ lacU169, recA1, endA1, gryA96, thi-1, relA1	Laboratory stored
<i>E. coli</i> DH5α-DOP	<i>E. coli</i> DH5α harboring plasmid pTPD	This work
KT2440- DOP	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 harboring plasmid pTPD	This work

据 *tpd* 序列(GenBank Accession Number :AY627036)设计引物,上游引物为 5'-ACTTAAAGCTTTGGCCC AGGCTTTGG-3';下游引物为 5'-AGCTTTGGATCCCC AGTCACTTGGGG-3',引物两端分别添加 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*HⅠ 酶切位点(酶切位点以下划线标出)。引物由上海博亚公司合成。PCR 扩增,25μL 体系:模板 DNA 1μL,dNTP(2.5mmol/L)2μL,引物(1mmol/L)各 1μL,10 × PCR Buffer 2.5μL,Mg²⁺(2.0mmol/L) 1.5μL,*Taq* 酶(5U/μL) 0.3μL,超纯水 15.7μL。PCR 条件:95℃ 5min,94℃ 1min,61℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环,72℃ 10min。产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收,回收产物进行琼脂糖电泳和 PCR 验证。

1.4 表达质粒的构建和转化

将上述回收产物用 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*HⅠ 双酶切后连接到经同样酶切的质粒 pBBRMCS-5 上,构建表达质粒 pTPD,转化 *E. coli* DH5α,验证后的阳性转化子,命名为 *E. coli*-DOP。感受态细胞的制备和转化及质粒纯化均参照文献[4]进行。

1.5 基因工程菌的构建

采用三亲接合的方法^[5]将供体菌 *E. coli*-DOP 中表达质粒 pTPD 转移到受体菌 *Pseudomonas putida* KT2440,辅助菌为 *E. coli* HB101(pRK2013),供体菌、辅助菌、受体菌在含相应的抗生素的 LB 培养基中培养 10h,8000r/min 离心 10min,用无菌水洗涤菌体 2 遍,以去除残留抗生素,最后将供体菌、辅助菌、受体菌按照 2:1:1 的比例混合,于 30℃ 静止培养 12h 后涂布添加有机磷农药和庆大霉素的基础盐培养基平板,培养 36h,挑选有水解圈的菌落进行验证,阳性克隆命名为 KT2440-DOP。

1.6 KT2440-DOP 对有机磷农药的降解实验

KT2440-DOP 在含 50mg/L 庆大霉素(Gm)的液体 LB 中培养至对数前期(*OD*₆₀₀ ≈ 0.6)时加入三唑磷

(200mg/L),定期取样,按上述方法处理后检测。对照为 KT2440 和 MP-4 的相同处理,每个处理 3 个重复。

1.7 KT2440-DOP 对芳香族化合物的降解实验

将上述试验中的有机磷改为各种芳香烃化合物,对照为 KT2440 的相同处理,每个处理 3 个重复,检测方法参考文献[6]。

1.8 粗酶的制备及对有机磷农药的降解

KT2440-DOP 以 1% 接种量接入 50mL LB 中,培养至对数期,3000r/min 离心收集菌体,用 5mL pH7.0 的磷酸盐缓冲液悬浮,超声波破碎,12000r/min 离心 10min,取上清,得粗酶。设接种 MP-4 的同样处理为对照。粗酶液反应体系:在 4.5mL 粗酶液中加入三唑磷使其终浓度为 40mg/L,30℃ 振荡并定时取样,最后加入 0.5mL 浓度为 10% 的 HNO₃ 终止反应,测定三唑磷含量。蛋白含量测定参考文献[7]的方法。

2 结果和分析

2.1 *tpd* 基因克隆和表达载体 pTPD 构建

以菌株 MP-4 总 DNA 为模板,PCR 扩增成功得到 *tpd* 基因,大小为 1067bp,将 PCR 产物经 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*HⅠ 双酶切后克隆到广宿主质粒 pBBRMCS-5 上,构建了表达质粒 pTPD,并成功转化到 *E. coli* DH5α。

2.2 工程菌 KT2440-DOP 的构建

通过三亲接合将重组质粒 pTPD 转移到 *P. putida* KT2440 中,获得工程菌 KT2440-DOP,提取重组质粒,经 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*HⅠ 双酶切后取 3μL 进行琼脂糖凝胶电泳验证,得到与理论产物大小一致的条带,初步表明 KT2440-DOP 构建成功。

2.3 KT2440-DOP 对有机磷农药的降解

KT2440-DOP 在含有 Gm(50mg/L)和三唑磷(200mg/L)的 LB 平板上划线培养,挑取有透明水解圈的单克隆,转接含有三唑磷(200mg/L)的基础盐液

体培养基,30℃、170r/min 振荡培养 24h 后,进行三唑磷检测。结果表明 KT2440-DOP 对三唑磷的降解率达到 91.5% 从连续扫描图谱(图 1)上可以看到模式菌株 KT2440 不能利用三唑磷,而 KT2440-DOP 降解三唑磷后未产生苯环类物质,初步表明 KT2440-DOP 可以矿化三唑磷,而用 *E. coli*-DOP 同样处理的样品却产生了其他苯环类物质,经液质联机分析后证明为 1-苯基-3-羟基-1,2,4-三唑(分析数据未列出),表明作为基因工程宿主菌,*P. putida* KT2440 比 *E. coli* DH5 α 具有更加丰富而完善的代谢网络,应用于环境污染物的生物修复,将具有更广泛的应用前景和实际意义。对有机磷农药的降解谱试验(表 2)表明 KT2440-DOP 能降解供试的 5 种有机磷农药,只有甲胺磷不能降解,且对各种有机磷农药的降解率比出发菌株 MP-4 提高了约 1 倍,这可能是在 KT2440-DOP 中 *tpd* 基因拷贝数比 MP-4 高,使得三唑磷水解酶表达量更大的缘故;而出发菌株 KT2440 不能降解供试的 6 种有机磷农药。

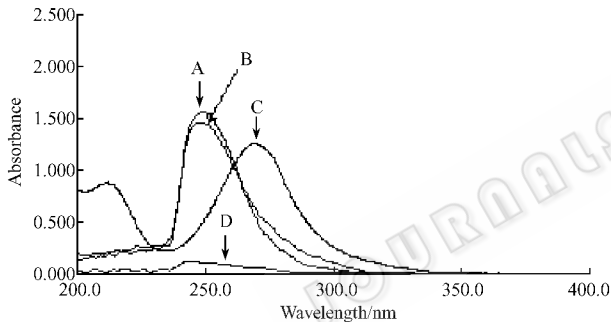


图 1 三唑磷降解的紫外扫描图谱

Fig.1 UV Scanning of degradation of Triazophos. A :CK 100mg/L Triazophos ; B :Treat with KT2440 ; C : Treat with *E. coli*-DOP ; D : Treat with KT2440-DOP.

表 2 KT2440-DOP 对不同有机磷农药的降解

Table 2 Degradation of different organic phosphorous pesticide by KT2440-DOP

Organophosphate tested	Ratio of degradation(%)		
	KT2440-DOP	MP-4	KT2440
Triazophos	91.5	41.3	0
Phoxim	95.3	42.5	0
Parathio	98.0	43.1	0
Malathion	93.4	40.8	0
Parathion-methyl	99.0	45.1	0
Methamidop	0	0	0

2.4 工程菌 KT2440-DOP 对芳烃化合物的降解

工程菌 KT2440-DOP 能降解供试的大多数芳烃化合物(表 3),但不能降解对硝基酚,与 Jimenez^[8]报道的 KT2440 降解结果一致,值得注意的是由于 KT2440 不能利用对硝基酚,所以我们构建的工程菌

KT2440-DOP 不能完全矿化对硫磷和甲基对硫磷等对硝基酚类有机磷类农药。

表 3 KT2440-DOP 对芳烃化合物的降解

Table 3 Degradation of different aromatic compounds by KT2440-DOP

Aromatic compounds tested	Ratio of degradation(%)	
	KT2440-DOP	KT2440
Hydroquinone	92.4	92.4
Toluene	94.8	94.9
Catechol	98.8	98.1
Salicylate	90.56	93.4
p-Quinone	93.7	99.1
p-Nitrophenol	3.1	2.1

2.5 工程菌的遗传稳定性

分别在 LB 平板和含 Gm 的 LB 平板上转接工程菌 KT2440-DOP,考察菌株降解性状的稳定性。发现 LB 平板转接,工程菌 KT2440-DOP 转接 18 次(450 代)性能丢失,而在含 Gm 的 LB 平板上转接 30 次时,没有发生性能丢失现象。取抗性平板转接的 0、10、20、30 次的菌株,进行小量发酵实验,培养 16h,收集菌体, French press 破碎后,测定甲基对硫磷水解酶酶活,以野生菌株 MP-4 为对照。结果表明,转接 20 次(500 代)左右,工程菌酶活无明显下降,但转接到 30 次(750 代)后,与原始菌株 MP-4 相比,酶活有明显下降(图 2)。

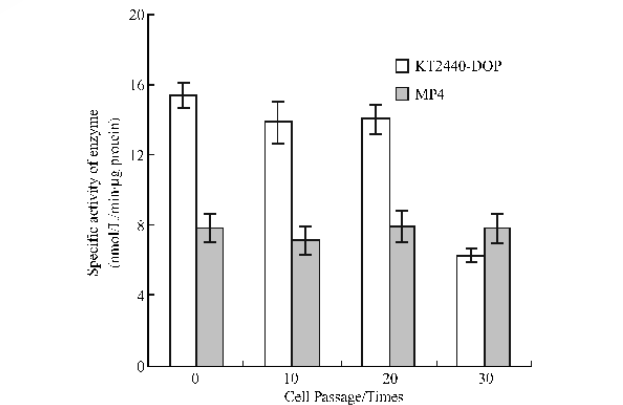


图 2 工程菌 KT2440-DOP 的有机磷水解酶活

Fig.2 OP hydrolase activity of GEM KT2440-DOP.

3 讨论

研究表明三唑磷水解酶基因 *tpd* 和甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 同源性高达 98% 结构基因只有 16 个碱基的差异,但降解谱试验表明 TPD 蛋白比 MPD 蛋白具有更加广谱的底物范围,TPD 能水解三唑磷,但 MPD 不能,所以本文选择 *tpd* 作为目标基因。

由于 *Ochrobactrum* sp. mp-4 是苍白杆菌属,该属细菌大多是条件致病菌,对其生物学特性、发酵条件和田间存活条件了解较少,且对其他几种有毒

有机污染物的降解能力有限;而 *P. putida* KT2440 的基因组学研究表明其存在广泛的代谢途径^[8], 可以将大部分常见的芳香族化合物代谢成 TCA 循环中间物质为菌体生长利用。大部分有机磷农药在磷酸酯酶的作用下水解成简单烷烃和芳香烃类物质, 其中芳香烃类物质经常是一些有毒难降解物质, 如硝基苯、多氯联苯、卤代杂环等, 所以对这类芳香烃类物质的后续降解和代谢成为完全矿化有机磷农药的关键。本文构建的工程菌 KT2440-DOP 能矿化三唑磷、辛硫磷、马拉硫磷等有机磷农药, 但不能矿化对硫磷、甲基对硫磷等对硝基酚类农药, 原因是 KT2440 缺乏对硝基酚降解基因, 关于对硝基酚降解基因的克隆我们正在进行中, 下一步将对硝基酚降解基因通过分子生物学的手段转入工程菌 KT2440-DOP, 这样我们将会获得一株能完全矿化三唑磷、对硫磷、甲基对硫磷、辛硫磷等有机磷农药的基因工程菌株, 为以后有机磷农药污染的控制和生物修复提

供一个更好的材料。

参 考 文 献

- [1] 李顺鹏主编. 环境生物学. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] 王家玲主编. 环境微生物学. 北京: 高等教育出版社, 1991.
- [3] Timmis KN. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental Microbiology* 2002, 4(12): 779–781.
- [4] Joseph S, David WR. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂, 王嘉宝, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [5] 刘智洪, 青, 徐剑宏, 等. 耐盐及苯乙酸、甲基对硫磷降解基因工程菌的构建. *微生物学报* 2003, 43(5): 554–559.
- [6] 邱珊莲, 崔中利, 樊奔, 等. 甲基对硫磷降解菌 GFP 标记菌株的构建. *应用与环境生物学报* 2004, 10(6): 778–781.
- [7] 程树培. 环境生物技术实验指南. 南京: 南京大学出版社, 1995, 61.
- [8] Jimenez JI, Minambres B, Garcia JL, et al. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 2002, 4(12): 824–841.

Construction of a versatile degrading bacteria *Pseudomonas putida* KT2440-DOP and its degrading characteristics

GU Li-feng, HE Jian, HUANG Xing, JIA Kai-zhi, LI Shun-peng*

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Triazophos is a kind of organophosphorous pesticide which was widely used by farmers all over the world in 1990's. It is effective in controlling pesticide but harmful to human beings. Bioremediation is an effective and economic method to treat environment that has been polluted by hazardous organic compounds, so researchers paid much attention in this area. Most of which focused on isolating functional bacteria, studying its degrading mechanism, and cloning degradation-related genes. MP-4 was isolated from soil polluted by Triazophos for a long time and identified as *Ochrobactrum* sp.. The triazophos hydrolase (*tpd*) gene was cloned by the method of shotgun cloning, and the sequences were determined and analyzed. In the former tests it was found that there was only 18 base pairs different in *tpd* gene from *mpd* gene, which was isolated from methyl parathion degrading strain *Pseudomonas putida* DLL-1. Enzyme TPD can hydrolyze triazophos and methyl parathion while MPD cannot hydrolyze triazophos. *Pseudomonas putida* KT2440 is a metabolically versatile saprophytic soil bacterium that has been certified as a biosafety host for the cloning of foreign genes. This bacterium is known for its diverse metabolism and potential for development of biopesticides and plant growth promoters because of its ability to colonize rhizosphere of crop plants. *Tpd* gene was isolated from the genomic DNA of *Ochrobactrum* sp. MP-4 by PCR amplification. Recombinant plasmids pTPD was constructed by ligating *tpd* gene into broad host vector pBBRMCS-5. With the help of plasmid pRK2013, pTPD was transferred into *Pseudomonas putida* KT2440 to construct KT2440-DOP. KT2440-DOP can degrade many organophosphate pesticides and aromatics compounds. The specific activity of organophosphate hydrolase of KT2440-DOP was approximately 2 times of MP-4. Later, parameters affecting bioremediation of Organophosphate pesticide in soil using KT2440-DOP will be studied.

Keywords: Organophosphate pesticide; *tpd*; KT2440; GEM