

不少汞抗性微生物^[6-7]。已报道大肠杆菌、变形杆菌及酵母菌等都具有较高的抗汞活性^[8]。虽然目前已分离到不少汞抗性菌株,但真正能够大规模直接用于汞污染土壤生物修复的却不多。随着分子生物学技术的快速发展,汞抗性基因的研究成为热点,目的是通过基因工程技术构建具有超强汞富集能力的转基因植物或微生物,以实现汞污染的生物修复。本研究在分离鉴定高抗重金属汞细菌的基础上,进一步对其汞抗性基因进行了克隆及重组表达研究,旨在为治理土壤重金属污染源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样来源 :采自北京量为 5.29 mg/kg,超过国家标准中的二级标准限值 5 倍多。

1.1.2 菌株和质粒 :*E. coli* 迈德生物公司, pET-30a (存 pGEM-T Easy Vector system 公司)。

1.1.3 培养基 :基础培养: 浓度的 HgCl₂ 母液 (25 mm 体培养基加入 1.5% 的琼脂)

1.1.4 主要试剂和仪器 : 切酶均购自 TaKaRa 公司, 试剂盒购自北京天根生化式金公司。实验中所用的程技术服务有限公司合成进口分析纯。实验中主要台式离心机 (德国 Eppendorf 型 PCR 仪 (美国伯乐公司)

伯乐公司), DYY-6B 型稳压稳流电泳仪 (北京市六一仪器厂), 凝胶成像系统-GDS-8000 (美国基因公司)。

1.2 抗汞细菌的筛选

称取土样 5.00 g 加入含有玻璃珠的 45 mL 无菌水中, 37℃, 150 r/min, 振荡 2h 后取出静置 5 min, 取上清液 1 mL 制备 10⁻¹ ~ 10⁻⁴ 稀释梯度的菌悬液, 各取 100 μL 于含 HgCl₂ 终浓度为 25、30、40、45、50、55、60、65、70 mg/L 的 LB 选择平板表面, 均匀涂布, 于 37℃ 倒置培养 1 d, 待菌落长出后, 选取在含汞浓度高的平板上生长、菌落形态不同的单菌落反复划线纯化, 纯化菌株于 -70℃ 保存。

1.3 抗汞细菌的鉴定

1.3.1 菌落及菌体形态观察 :菌株在固体培养基平板上, 培养 24 h, 观察菌落形态和颜色, 菌体涂片, 革兰氏染色后, 在普通光学显微镜下观察菌体形态。

1.3.2 生理生化特征测定 :参照文献 [10-11] 的方法进行生理生化特征测定, 包括: 接触酶试验, D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露醇发酵产酸、产气试验, 明胶液化试验, 伴胞晶体观察, 硝酸盐还原试验, 淀粉水解试验, V-P 试验, 初始生长 pH 测定 (pH 为 6.8 和 5.7 NaCl 的耐受 0%、5%、7%

分析: 采用试剂盒 (离心 NA, 操作步骤为公司提供) 模板, 采用细菌通用引物 (TTTGATCCTGGCTCAG-3' / 5'ACTT-3'), 进行 16S rRNA 用 20 μL 反应体系, 扩增程序: 52℃ 1 min, 72℃ 2 min; PCR 扩增产物送上海生工 nBank。最后将所测定的 //ncbi.nlm.nih.gov/blast 在源性分析和相关信息检索中进行多序列比对, 用 NA 基因系统发育树。

1.3.3 PCR 扩增

merA 是编码汞还原酶基因, 存在于所有耐汞细菌的基因组中, 因此从 GenBank 中检索 *merA* 基因序列, 采用软件 DNAMAN Primer5.0 在其保守区设计引物如下: *merA-z3*: 5'-AAAATCACCGG-3' / *merA-z4*: 5'-CCCAAGCTTAGCAGGAAAGCTGCTTCACAT-3' (引物中下划线部分在 *merA-z3* 中为 *Hind* III 酶切位点, 在 *merA-z4* 中为 *Bam* HI 的酶切位点); 以供试菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 采用 20 μL 反应体系, 扩增程序为: 94℃ 5 min, 94℃ 45 s, 68 ~ 53℃ 1 min, 72℃ 2 min, 72℃ 10 min; 前 15 个循环为每个循环降 1℃, 53℃ 维持后 15 个循环。凝胶回收试剂盒回收扩增产物, 克隆于 pGEM-T Easy 后送 TaKaRa 测序, 用 Blastx 在 GenBank 中搜索, 分析所得的序列。

1.5 汞抗性基因 *merA* 的克隆

对回收的 PCR 扩增产物与 pET-30a (+) 质粒分别进行 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切。酶切体系 (20 μ L) 为 :DNA/pET-30a (+) 5 μ L ;*Hind* III 1 μ L ;*Bam* H I 1 μ L ;10 \times K Buffer 2 μ L ;ddH₂O 11 μ L ,37 $^{\circ}$ C ,20 h 酶切。对双酶切产物进行胶回收 ,然后加入酶切产物 4 μ L ,pET-30a (+) 1 μ L ,0.5 μ L T4 DNA Ligase 和 1 μ L 10 \times Buffer 和 ddH₂O 3.5 μ L (10 μ L 体系) ,16 $^{\circ}$ C 连接过夜 (10 h 以上) 。将连接产物转入预先制备的 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。

Kan (50 mg/L) 抗生素的 LB 培养 (10 ~ 14 h) ,在含卡那随机挑取单菌落 ,接入含 1% 葡萄糖的 LB 培养液 ,提取质粒 ,用 PCR 扩增验证 ,方法同上。克隆质粒提取、阳性克隆的筛选等。

1.6 *MerA* 基因的重组表达

1.6.1 诱导表达

将含有 *merA* 基因的重组质粒 pET-30a (+) 的表达菌株接种于 LB 培养基中 ,培养至 OD_{600} 为 0.5 左右 ,加入 1 mmol/L 的 IPTG ,37 $^{\circ}$ C ,150 rpm 振荡培养 2616.1 \times g 离心保存。

1.6.2 SDS-PAGE 检测

将培养于 -20 $^{\circ}$ C 的菌体 ,取 40 μ L 菌液 ,加入 10 倍上样缓冲液 ,沸水中裂解 ,进行 SDS-PAGE 电泳 ,考马斯亮蓝染色 ,7% 乙醇固定 ,紫外照相。

1.7 *MerA* 基因的抗汞特性

将含有 *merA* 基因的重组质粒 pET-30a (+) 的表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 接种于 LB 培养基中 ,浓度为 20 mg/L 的 HgCl₂ 的 100 mL 培养基中 ,150 rpm 振荡培养 28 h ,每隔 4 h 测定菌液在波长 600 nm 处的光密度 (OD_{600}) 以确定其生长情况。

2 结果和分析

2.1 抗汞细菌的分离与筛选

在低浓度 HgCl₂ 的 LB 平板上 ,生长了较多的菌。随着 HgCl₂ 浓度的升高 ,生长的菌数减少 ,在含 HgCl₂ 为 70 mg/L 的平板上分离得到一株生长良好的高抗汞细菌 ,编号为 KHg2。

2.2 抗汞细菌的鉴定

2.2.1 菌落及菌体形态观察结果

:KHg2 菌落圆形 ,

边缘整齐 ,表面凸起 ,透明 ,湿润 ,菌落直径为 0.5 ~ 1.5 mm ,在光学显微镜下观察菌体为革兰氏阳性细杆状 ,产芽孢 (图 1)。

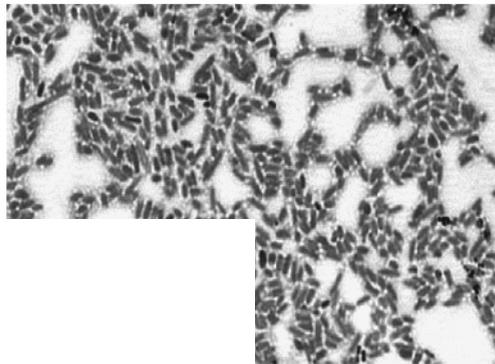


图 1 KHg2 菌体形态图 (1000 \times)
under optical microscope (1000 \times) .

结果 :菌株 KHg2 产生接合 ,但不发酵 D-木糖和甘露胶 ;不水解淀粉 ;V-P 试验汤中生长 ;pH5.7 中不生长 ;培养基中生长 ,但在 7% 和原硝酸盐 ,这些都与文献一致。

序列分析结果 :KHg2 菌株扩增 16S rDNA 基因 ,经测序得到长 1686 bp 的 16S rDNA 基因序列 (序列注册号 :KF012223) 。用 BLAST 软件和 MEGA 软件对扩增的 16S rDNA 基因序列进行比对 ,结果表明 ,菌株 KHg2 与已报道菌株 DSM12223^T 亲缘关系最

密切。根据 16S rDNA 基因序列分析结果及表型特征鉴定结果 ,确定菌株 KHg2 与 *Bacillus silvestris* DSM12223^T 关系密切 ,KHg2 在分类地位上属于 *Bacillus* sp.。

2.3 *merA* 基因的 PCR 扩增及序列分析

通过 PCR 扩增 ,得到一个约 1.7 kb 大小的片段 ,与预测的大小基本一致 ,切下目的片段 ,连接于 pEMGT-Easy 载体后测序 ,获得全长为 1686 bp 的序列 ,DNAMAN 分析 ,有一个完整的 ORF ,编码 560 个氨基酸残基 (GenBank 登录号为 :FJ643467) 。在 GenBank 中搜索发现 ,该序列与 *Ralstonia metallidurans*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas*

aeruginosa、*Ralstonia eutropha*、*Burkholderia cepacia*、和 *Proteus mirabilis* 等不同细菌的完整的汞还原酶基因

merA 相似性均达到 99%。由此可确定从 KHg2 中扩增得到的是编码汞还原酶的 *merA* 基因。

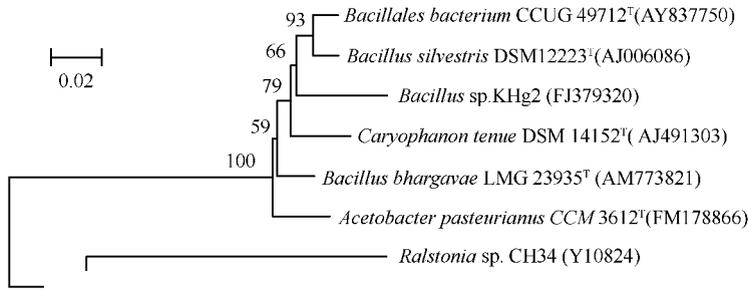


Fig.2 Phylogenetic tree of strain K in GenBank. The number at each br

2.4 重组质粒的酶切鉴定

为进一步验证所得的先以 *merA*-z3 和 *merA*-z4 为进行 PCR 扩增,电泳检测的条带,与原 PCR 产物大进行 *Hind*III 和 *Bam*HI 双约 5 kp 的 2 条带,与空质道相比,约 5 kp 条带为正条带与目的基因大小一致粒为将 *merA* 基因成功克隆性重组质粒,并将其命名为粒 pZY2 和空质粒载体 pE *coli* BL21 (DE3) 分别命名 pZY2 和 *E. coli* BL21 (DE3)

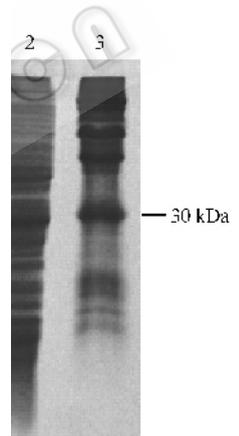
2.5 merA 基因的重组表

表达菌株 *E. coli* BL 照菌 *E. coli* BL21 (DE3) 的 IPTG 诱导,37°C,150 r/min 菌体 SDS-PAGE 电泳检测,结果见图 3。

merA 基因编码汞还原酶,该酶常以二聚体形式在细胞质内与内膜呈疏松的结合,其分子量为 66 kDa。图 3 中表达蛋白分子量约 33 kDa,可能由于二聚体解聚所致。本实验中,用沸水裂解法处理样品,使其中的蛋白质变性,用 SDS-PAGE 变性胶电泳检测,使得该基因所表达汞还原酶的二聚体在 SDS 和沸水作用下完全解聚,因此,图中与含有空质粒的表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3)·pET-30a (+) 相比,转入目的基因的表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3)·pZY2 的蛋白电泳图谱在 30 kDa 附近有明显的特异性条

3)

sent the sequences accession number



SDS-PAGE 电泳检测

merA protein expressed in *E. coli* (DE3). pZY2; 2. *E. coli* BL21 protein ruler III.

基因已在 *E. coli* BL21

性

表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)·pZY2 和 *E. coli* BL21 (DE3)·pET-30a (+) 在含 $HgCl_2$ 为 20 mg/L 的培养基中生长情况如图 4。

表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)·pZY2 可以在含 $HgCl_2$ 为 20 mg/L 的培养基中生长,而转入空载体 pET-30a (+) 的阴性对照菌株 *E. coli* BL21 (DE3)·pET-30a (+) 则不能在含 $HgCl_2$ 为 20 mg/L 的培养基中生长。

3 讨论

文献报道的抗汞菌的抗汞 ($HgCl_2$) 浓度为

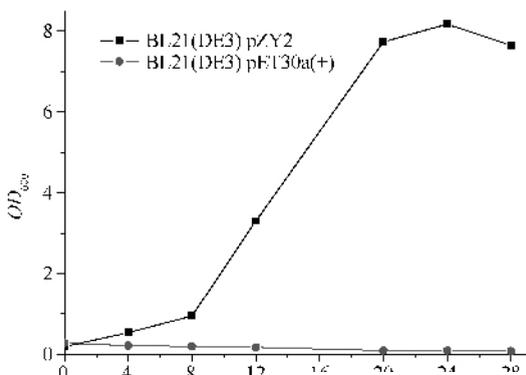


Fig. 4 表达菌株在含 HgCl_2 为

20 mg/L HgCl_2 .

35 mg/L^[7], 本研究中分离自 HgCl_2 的 LB 平板上生长的抗汞菌的抗汞浓度高的土壤样品来自北京排污含量较高, 处于其中的土壤选择进化可能产生出了一些是自然界广泛存在的细菌利用它进行污染农田治理造成危害。本研究中分离金属汞污染治理方面具有分类鉴定研究也为该菌株

自 1993 年 Brunke 等^[1] 汞菌, 证明了利用微生物修复的可行性后, 随后对基因植物研究也有一些: Mer 操纵子的组成基因之间的进化主要是由基因间的插入元件 (Is) 整合、基因插入、融合、缺失而形成的假单胞菌属的进化

merA 基因的可转移性, 本研究中从芽孢杆菌属所克隆得到的 merA 基因与假单胞菌属的 merA 基因高度同源可能是自然界 merA 基因自发水平转移的结果。重金属汞抗性测定结果表明, 转入来自菌株 KHg2 的 merA 基因的大肠杆菌表达菌株 E. coli BL21 (DE3) · pZY2 可以在含 HgCl_2 为 20 mg/L 的培养基中生长, 而转入空载体 pET-30a (+) 的阴性对照菌株 E. coli BL21 (DE3) · pET-30a (+) 则不能在含 HgCl_2 为 20 mg/L 的培养基中生长, 证明了该 merA 基因在大肠杆菌活体内具有抗汞功能。本研究为进一步利用抗汞基因工程菌或抗汞转基因植物修复重金属污

染农田奠定了一定工作基础。

参考文献

- [1] 周启星, 宋玉芳. 污染土壤修复原理与方法. 北京: 科学出版社, 2004: 15 - 18.
- [2] 王发园. 土壤重金属污染对微生物多样性的影响. 安徽农业科学 (Journal of Anhui Agricultural Sciences), 2008, 36 (18): 7827 - 7828.
- [3] 崔德杰, 张玉龙. 土壤重金属污染现状与修复技术研究进展. 土壤通报 (Chinese Journal of Soil Science) 2004,

, 等. 土壤重金属对白菜种子生态毒性效应. 环境科学 (Environmental Science), 2002, 23 (1):

害化学物质的污染与监测. 北方环境 (Northern Environment), 2001: 13 - 14.

高耐汞菌株的筛选及其生防医学杂志 (Strait Journal of Preventive Medicine), 12 (1): 5 - 7.

, 等. 细菌抗汞分子机制与进化. 微生物学通报 (Microbiology) 2006, 33

al Y, et al. Waste water bacterial resistance to mercury, antibiotics, and heavy metals and antibiotics. Current Microbiology, 2006, 52: 151 - 156.

质量标准. 1995.

细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1990: 390.

umann P, et al. Bacillus silvestris of the genus Bacillus that contains mercury resistance. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45: 802.

土壤微生物总 DNA 的提取. 微生物学通报 (Acta Microbiologica Sinica), 2004,

汞抗性基因及其在生物修复中的应用. 海峡预防医学杂志 (Strait Journal of Preventive Medicine) 2006, 12 (1): 16 - 18.

- [14] Nascimento AM, Chartone-Souza E. Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. Genetics and Molecular Research, 2003, 2 (1): 92 - 101.
- [15] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 27 - 30.
- [16] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000: 77 - 108.
- [17] 陈宏伟, 张志, 张虹. 抗汞菌株的筛选及质粒的研究. 高师理科学刊 (Journal of Science of Teachers' College and University), 1996, 16 (1): 47 - 49.

- [18] Brunke M, Deckwer WD, Frischmuth A, et al. Microbial retention of mercury from waste streams in a laboratory column containing *merA* gene bacteria. FEMS microbiology reviews, 1993, 11: 145 – 152.
- [19] Rugh CL, Senecoff JF, Meagher RB, et al. Development of transgenic yellow-poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnology*, 1998, 33: 616 – 621.
- [20] Bizily SP, Rugh CL, Meagher RB. Phytodetoxification of hazardous organo mercurials by genetically engineered plants. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 213 – 217.
- [21] Liebert C A, Wireman J, Smith T, et al. Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 63 (3): 1066 – 1076.

Isolation and identification of a bacterial strain KHg2 with high resistance to mercury and cloning

Yan Zeng^{1,2}, Qiang Chen²
 (Agro-Biotechnology Research
 Department of Microbiology
 China)
 Institute of Agricultural Resc
 Nutrition and Fertilization of M

97, China)
 ral University, Ya'an 625014,
 iences, Key Laboratory of Crop

Abstract : [Objective] The air mercury. [Methods] A bacter Beijing, The strain was identifi properties. A pair of PCR pri GeneBank to amplify the comp was expressed in *Escherichia c* strain which could grow on LB shares 96% sequence identity results of physiological and bio of 1680 bp was obtained from t amplified DNA fragment was cl transformed into *E. coli* host : by the expression strain after showed that the expression stra BL21 (DE3), harbouring pET-3 strain KHg2 was closely relat successfully in *E. coli*. The expression strain *E. coli* BL21 (DE3)-pZY2 has resistance to heavy metal mercury.

al strain with high resistance to sediment of Liangshui river in physiological and biochemical me bacteria published in the e PCR-amplified DNA fragment tested. [Results] A bacterial ed as KHg2. The strain KHg2 ological characteristics and the *us silvestris*. One PCR fragment *seudomonas putida*. The PCR- 2. The expression plasmid was rotein of 33 kDa was expressed of heavy metal resistance test ile a negative control, *E. coli* 2. [Conclusion] The isolated ain KHg2 and was expressed

Keywords : soil contamination by heavy metal ; bacteria with resistance to mercury ; isolation and identification ; sequences analysis of 16S rRNA gene ; clone and expression of *merA* gene

(本文责编：王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Beijing (5062010) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA06Z386)

* Corresponding authors. Junlian Gao, Tel : + 86-10-51503834, E-mail : gaojunlian@baafs.net.cn ; Jianguang Sun, Tel : + 86-10-82106239, E-mail : jgsun@caas.ac.cn

Received 4 May 2009/Revised : 17 July 2009