

富集液中六六六(γ -BHC)脱氯基因的克隆、 表达及降解试验

张国顺 洪青 马爱芝 张晓舟 李顺鹏*

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

摘 要 从长期受六六六污染的土壤中获得高效降解六六六的富集液,其对六六六 4 种异构体的降解效果均为 100%,但至今未能获得纯培养。根据国外报道的六六六脱氯基因 *linA* 序列,设计并合成一对引物,通过 PCR 技术从富集液总 DNA 中扩增了 471bp 的基因片段,命名为 *linN*,测序结果表明 *linN* 与报道的脱氯基因 *linA* 和 *linA2* 的同源性达 99%,与 *linA1* 的同源性达 97%。将 *linN* 定向克隆到 pET-29 α 表达载体中,转化至 *E. coli* BL21 经 IPTG 诱导后可表达分子量约 17kD 的蛋白,表达产物占菌体总蛋白的 30% 左右;诱导后转化子的降解能力明显提高,粗酶也有很好的降解效果,为进一步分离纯培养和构建多功能农药残留降解菌提供了基础。

关键词 富集液,六六六脱氯基因,克隆和表达

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)01-0044-04

六六六又称六氯环己烷(Hexachlorocyclohexane, BHC),是一种耐热、耐酸、脂溶性大、残效期长的有机氯杀虫剂,主要有 4 种异构体,其中仅有 γ 异构体具有杀虫效力,而其它 3 种异构体(α -BHC、 β -BHC、 δ -BHC)杀虫效力极低或无效^[1,2],由于其用量大已造成极其严重的污染,威胁着人类的健康^[3]。生物修复是消除环境污染的一个很好措施^[4],但首要条件是获得降解目标污染物的高效菌株,我国六六六污染严重,目前尚未见到降解性能很好的纯培养的报道,因此对受六六六污染的土壤进行修复迫在眉睫。国外已有降解六六六单菌的报道,主要是日本学者报道的 *S. paucimobilis* UT26^[5],印度学者报道的 *S. paucimobilis* B90^[6],法国学者报道的 *S. paucimobilis*^[7]。研究较多的是前两者,B90 对 4 种异构体均能降解,而 UT26 不能降解 β -BHC。它们的降解基因均已被克隆,均涉及到 5 个基因:*linA*、*linB*、*linC*、*linD*、*linE*,其中 *linA* 负责降解的第一步,是限速步骤,经过五氯苯最终脱去三分子氯化氢,生成较容易降解的 1,2,4-三氯苯^[8],有利于其被土壤微生物进一步降解^[9]。两株菌的第一步脱氯基因序列不完全相同:UT26 为 471bp 的 *linA*;B90 由 462bp 的 *linA1* 和 474bp 的 *linA2* 组成,但二者的功能都相当于 *linA*,也不能脱去 β -BHC 上的氯。*linA* 已被成功克隆到烟草中并表达^[5],对六六六降解基因研究已

进行到基因水平转移阶段^[10],关于 β -BHC 脱氯基因的报道还没有。

本文在驯化长期受六六六污染的土壤时获得了高效富集液,在常规方法不能获得纯培养的情况下,根据报道的脱氯基因 *linA* 设计引物,通过 PCR 从富集液总 DNA 中扩增到目的基因片段,测序后在大肠杆菌中进行了高效表达,并有很好的降解效果。为进一步分离纯培养和构建多功能农药残留降解菌提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 富集液和质粒 富集液为本实验室分离和保存 *Escherichia coli* BL21(DE3)和质粒 pET-29 α 为本实验室保存。

1.1.2 酶和引物 限制性内切酶、T4 连接酶、Taq 酶为 TaKaRa 公司产品,引物由博亚公司合成。

1.1.3 培养基 LB 培养基:每升含 Tryptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 10g, Kan 使用浓度 50mg/L。基础培养基(MM):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, pH 7.2。

1.2 六六六检测

定期取样,用正己烷 1/2(V/V)提取两次,分层

基金项目 国家自然科学基金(40471073,30400013) 国家 863 计划(2004AA214102) 江苏省科技厅资助项目(BE2002345, BE2003343)

* 通讯作者。Tel/ Fax 86-25-84396314; E-mail 4sp@njau.edu.cn

作者简介 张国顺(1979-)男,江苏盐城人,硕士研究生,主要从事环境微生物学和分子生物学研究。E-mail: sheyangzhang@sohu.com

收稿日期 2004-06-07, 修回日期 2004-09-03

过无水硫酸钠后用正己烷稀释 2 倍后气相测定。测定条件参考文献 [11]。

1.3 富集液总 DNA 的 PCR 扩增

富集液总 DNA 的提取参考文献 [12] 进行。根据 GenBank 已登录的 *linA* 序列 (NO. D90355) 设计一对引物:上游引物 5'-CGCGCATATGAGTGATCTAGACAGACTTGC-3'; 5'-GCCAAGCTTCATCATTATGCGCCGACGGTGCG-3', 引物两端分别添加 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点。PCR 扩增体系 (25 μ L):模板 DNA 50ng, dNTP (2.5mmol/L) 2 μ L, 引物 (1mmol/L) 各 1 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg^{2+} (2.0mmol/L) 1.5 μ L, *Taq* 酶 (5U/ μ L) 0.3 μ L, 超纯水 15.7 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 61 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳后用试剂盒回收, TA 克隆后测序。

1.4 表达质粒的构建和转化

测序后将 PCR 产物用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后连接到经同样酶切的 pET-29 α 上, 构建表达质粒 pLINEN, 然后转化 *E. coli* BL21(DE3), 获得转化子, 命名为 *E. coli* BL21(pLINEN)。感受态细胞的制备和转化参考文献 [12] 进行。

1.5 *E. coli* BL21(pLINEN) 对六六六的降解实验

E. coli BL21(pLINEN) 在含 50mg/L Kan 的液体 LB 中培养至对数前期 ($OD_{600} \approx 0.6$) 用 IPTG (终浓度为 1mmol/L) 诱导, 同时加入 BHC (5mg/L), 定期取样, 按上述方法处理后检测。对照为未诱导的相同处理, 每个处理 3 个重复。

1.6 粗酶的制备及对六六六的降解

粗酶的制备及对六六六的降解参考文献 [6] 的方法进行。粗酶的制备: *E. coli* BL21(pLINEN) 以 1% 接种量接入 50mL LB 中, 培养至对数前期, 加 IPTG (终浓度为 1mmol) 诱导 4h, 对照为未诱导的相同处理, 然后离心用 5mL pH7.0 缓冲液悬浮, 超声波破碎后取上清, 得粗酶。粗酶对六六六的降解: 在 5mL 粗酶液中加入农药使浓度为 5mg/L, 30 $^{\circ}$ C 震荡并定时取样, 提取测定含量。蛋白含量测定参考文献 [13] 的方法。

1.7 SDS-PAGE 鉴定表达产物

挑单菌落接种 LB 培养基中 (含 50mg/mL Kan), 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 2~4h, 当菌体 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 加 IPTG (终浓度为 1mmol/L), 37 $^{\circ}$ C 继续剧烈振荡培养, 定期取样 (1、2、4h), 6000r/min 离心 5min, 沉淀用 pH 值 7.2 浓度 10mmol/L 的 PBS 洗涤 3 次, 加等体积的电泳上样缓冲液煮沸 10min, SDS-PAGE 检测。含空

pET-29 α 的 *E. coli* BL21 亦同样经 IPTG 诱导处理后 SDS-PAGE 检测表达情况。参照文献 [12] 的方法进行蛋白电泳, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 15%。

2 结果

2.1 富集液的获得和降解效果

通过富集和不断转接获得了六六六 4 种异构体降解效果达 100% 的高效富集液, 与 30% 甘油 1:1 (V/V) 混合后保存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱。从图 1 (5% 接种量, 对照均未消失, 未列出, 下同) 可以看到, 富集液对六六六的 4 种异构体均能完全降解, 且速度很快。相比之下, β -BHC 最难降解, γ -BHC 最易降解。

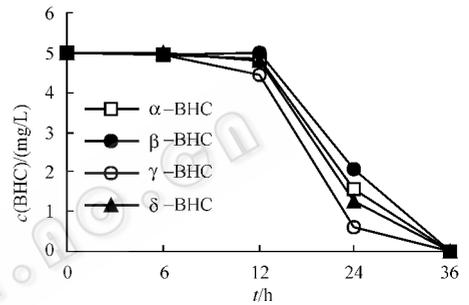


图 1 富集液对六六六的降解

Fig.1 Degradation of different isomer of BHC by enrichment

2.2 PCR 扩增结果和重组质粒的鉴定

以富集液总 DNA 为模板, 经 PCR 扩增得到碱基数为 471bp 的片段, 命名为 *linN*。将其克隆到 T 载体后经博亚公司测序, BLAST 发现与报道的 *linA* 和 *linA2* 的同源性达 99%。将 PCR 产物经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后克隆到表达质粒 pET-29 α 上得到转化子, 命名为 *E. coli* BL21(pLINEN)。提取重组质粒, 双酶切后得到与 PCR 产物大小一致的片段, 说明该片段已成功克隆。

2.3 *E. coli* BL21(pLINEN) 及其粗酶对六六六的降解

未经 IPTG 诱导的转化子能在 90h 内基本降解六六六 (γ -BHC), 而经诱导后转化子完全降解 5mg/L 的 γ -BHC 仅需要 24h (图 2), 降解能力大大提高, 已超过富集液的降解效果; 不管诱导还是不诱导, 转化子均不能降解 β -BHC, 转化子对 α -BHC 和 δ -BHC 的降解效果与 γ -BHC 类似 (图 2 未列出)。粗酶降解试验结果 (图 3) 表明, 经 IPTG 诱导的转化子细胞破碎后获得的粗酶液 (蛋白含量为 4.02mg/mL) 对 γ -BHC 有较高的降解活性, 但在 24h 内不能完全降解, 与 Rekha 等 [6] 的报道一致。

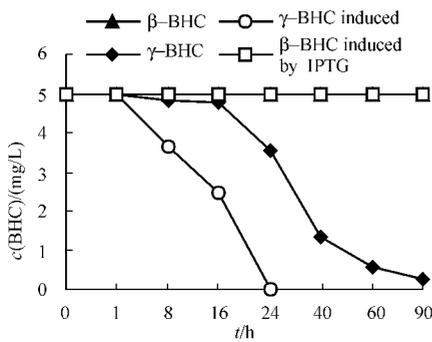


图2 转化子对六六六的降解

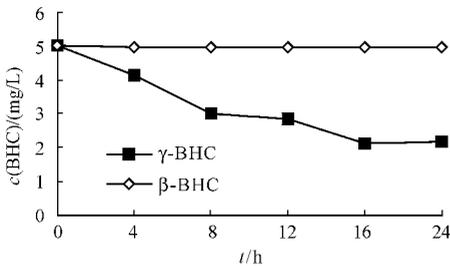
Fig.2 Degradation of β -BHC and γ -BHC by *E. coli* BL21(pLINEN)

图3 转化子粗酶对六六六的降解

Fig.3 Degradation of β -BHC and γ -BHC by cell extracts of *E. coli* BL21(pLINEN)

2.4 *linN* 在 *E. coli* BL21(pLINEN) 中的表达

含空载体 pET-29 α 的 *E. coli* BL21(A) 在 17kD 左右无特异性条带,未诱导的 *E. coli* BL21(pLINEN) (C) 在 17kD 左右有明显的蛋白条带,而诱导后表达量明显增加,占菌体总蛋白的 30% 左右(图 4)。由此可见,经过 IPTG 诱导的转化子对六六六降解能力的提高是由于 *linN* 基因表达增强所导致的。

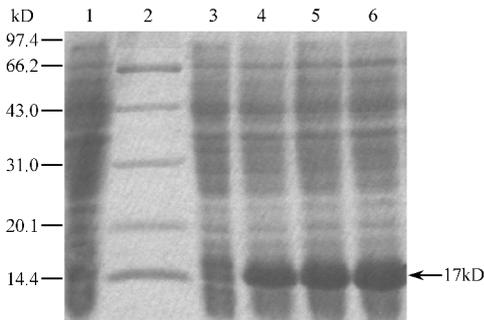


图4 表达产物 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE of expression products

1. *E. coli* BL21 harboring pET-29 α ; 2. Protein molecular weight marker; 3. *E. coli* BL21(pLINEN); 4~6. *E. coli* BL21(pLINEN) induced by IPTG for 1h 2h 4h.

3 讨论

linA 是微生物降解六六六的关键基因,为第一步脱氯所必需。通过 PCR 获得的产物 *linN* 与报道

的 *linA* 和 *linA2* 同源性达 99%, 具有高度保守性。*linA* 基因不能脱去 β -BHC 上的氯原子的报道与 *E. coli* BL21(pLINEN) 不能降解 β -BHC 的事实吻合,表明它们应该是相同基因。而有趣的是富集液对 β -BHC 有很好的降解效果,与报道的纯培养 B90 的降解效果相同。据此推断,富集液中应存在与 UT26 和 B90 相似的两种乃至两种以上纯培养,为纯培养的进一步分离提供了理论依据。当然也不排除富集液中的 *linN* 是在某种未知调控下具备了降解 β -BHC 的能力,因为在有机磷降解菌中有类似的情况存在,即结构基因序列完全相同,但调控差异导致了降解谱的不同(未发表)。

微生物对农药等污染物的降解主要集中在纯培养的分离上,尤其是获得具高效降解能力的纯培养。在分离的过程中一般采用富集驯化的方法,但往往在得到富集液后利用传统的方法很难得到目的纯培养,有的效果很不理想,只有部分降解效果,有的甚至是不可培养微生物,该步骤一度成为污染物降解菌分离的瓶颈。目前 PCR 技术已被成功的用于基因工程菌的构建^[4],也为纯培养的分离提供了崭新的思路。利用报道的基因设计引物克隆目的基因,构建出具有多种降解功能的基因工程菌。关于多功能降解工程菌的成功构建报道有很多,如 Kellogg 等^[15]构建的能降解多种碳氢化合物的“超级菌”,它在几小时内可将原油中 60% 的烃类分解,这也是美国专利局第一个批准的基因工程菌专利;Sharon 等^[16]将 *opd* 基因片段导入链霉菌(*Streptomyces lividans*)中,得到了稳定产生对硫磷水解酶的转化菌株,该菌株生产的水解酶已经在农药厂废水处理中得到了应用;本实验室刘智等^[17]构建了耐盐及苯乙酸、甲基对硫磷降解基因工程菌。因此在不能获得纯培养的条件下,采用 PCR 技术将 *linN* 等基因克隆到降解其它农药的降解菌中以构建高效多功能工程菌是目前对六六六污染土壤进行修复的一个好方法。而 *linA* 在烟草中的成功表达报道和本实验中 *linN* 在大肠杆菌中的表达及降解效果为降解六六六基因工程菌的构建和生物修复提供了理论基础和可行性。

参 考 文 献

- [1] 张文吉主编. 新农药应用指南. 中国林业出版社, 2000 66-67.
- [2] 唐除痴, 李煜昶, 陈 彬, 等. 农药化学. 南开大学出版社, 1998 34-35.

- [3] Colborn T, Smolen M G, Rolland R. Environmental neurotoxic effects :The search for new protocols in functional teratology. *Toxicol Ind Health* ,1998 ,**14** :9 – 13.
- [4] Singh N. Enhanced degradation of hexachlorocyclohexane isomers in rhizosphere soil of *Kochia* sp. . *Bull Environ Contam Toxicol* 2003 , **70**(4) :775 – 782.
- [5] Nagata Y , Miyauchi K , Takagi M. Complete analysis of genes and enzymes for γ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J Ind Microbiol Biotechnol* , 1999 ,**23** :380 – 390.
- [6] Rekha K , Sanjukta S , Mrutyunjay S , et al. Cloning and characterization of *lin* genes responsible for the degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas paucimobilis* strain B90. *Appl Environ Microbiol* ,2002 **68** :6021 – 6028.
- [7] Thomas J C , Berger F , Jacquier M , et al. Isolation and characterization of a novel γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *J Bacteriol* ,1996 **178** :6049 – 6055.
- [8] Trantirek L , Hynkova K , Nagata Y , et al. Reaction mechanism and stereochemistry of γ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase LinA. *J Biol Chem* ,2001 **276** :7734 – 7740.
- [9] 何耀武,孙铁珩,区自清. 1,2,4-三氯苯在土壤中的降解. *应用生态学报*,1996 **7**(4):429 – 434.
- [10] Charu D , Vishakha R , Rinku P , et al. Organization of *lin* genes and IS6100 among different strains of hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas paucimobilis* : evidence for horizontal gene transfer. *J Bacteriol* 2004 **186** :2225 – 2235.
- [11] Imai R , Nagata Y , Fukuda M , et al. Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from γ -hexachlorocyclohexane. *J Bacteriol* ,1991 **173** :6811 – 6819.
- [12] Joseph S , David W R. 分子克隆实验指南. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译. 第三版. 北京 科学出版社 2002.
- [13] Lowry O H , Rosebrough N J , Farr A L , et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* ,1951 **193** :265 – 275.
- [14] Keasling J D , Bang S W. Recombinant DNA techniques for bioremediation and environmentally friendly synthesis. *Current Opininion in Biotechnology* ,1998 **9**(20) :135 – 140.
- [15] Kellogg S T , Chatterjee D K , Chakrabarty A M. Plasmid-assisted molecular breeding :New technique for enhanced biodegradation of persisted toxic chemicals. *Science* ,1981 **214** :1133 – 1135.
- [16] Sharon S R , Marilyn K S , Burton M P , et al. Purification and characterization of a recombinant phosphotriesterase (parathionhydrolase) from *Streptomyces lividans* . *Appl Environ Microbiol* ,1991 **57**(2) :440 – 444.
- [17] 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) :518 – 522.

Cloning , expression of the gene of dehydrochlorination of BHC from enrichment and its degradation experiment

ZHANG Guo-shun HONG Qing MA Ai-zhi ZHANG Xiao-zhou LI Shun-peng*

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

Abstract : A high effective enrichment that could degrade four isomers of BHC completely was got from the soil polluted by γ -BHC , but the pure culture was not obtained yet. The 471bp sequence of *linN* was amplified from the total DNA of enrichment by polymerase chain reaction(PCR). The nucleotide sequence analysis showed that the *linN* gene had high homology with reported *linA* up to 99% . Then the amplified fragment *linN* was cloned in the proper orientation into the site between *Nde* I and *Hind* III of pET-29 α via restriction endonuclease *Nde* I and *Hind* III . The recombinant was transformed into its host *E. coli* strain BL21 and a recombinant protein of about 17kD was highly expressed and showed high ability of degrading γ -BHC after induced by IPTG. The expressed protein occupied about 30% of the total bacterial protein. The cell extracts also showed some ability of degradation of γ -BHC. It offered basic theory for the isolation of pure culture and the construction of genetic engineering microorganisms.

Key words : Enrichment , Gene of dehydrochlorination of BHC , Cloning and Expression