

构建一种检测水中 As^{3+} 的敏感型大肠杆菌

王伍*, 纪松军*, 黄招竹, 卢彬彬, 吕建新

温州医科大学 检验医学院 生命科学学院 浙江省模式生物技术与应用重点实验室, 浙江 温州 325000

王伍, 纪松军, 黄招竹, 等. 构建一种检测水中 As^{3+} 的敏感型大肠杆菌. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1081–1092.

Wang W, Ji SJ, Huang ZZ, et al. Construction of an *Escherichia coli* strain for sensitive detection of arsenite ion in water. Chin J Biotech, 2016, 32(8): 1081–1092.

摘要: 为构建一种敏感性高、特异性好的检测砷离子的大肠杆菌荧光报告菌株, 本研究利用基因敲除技术, 敲除了大肠杆菌中负责向外转运砷离子的 *arsB* 基因, 构建对 As^{3+} 敏感的菌株; 利用 *egfp* 基因作为报告基因, 构建融合检测载体 pET28b-Pars-*arsR-egfp*。然后将检测载体 pET28b-Pars-*arsR-egfp* 转化至 *arsB* 基因敲除菌中完成敏感型 As^{3+} 检测菌株的构建。接着对此微生物传感器进行了检测条件的优化, 以及线性检测范围、最低检出限、特异性等性能的确。研究结果表明, 与利用野生大肠杆菌作为检测宿主相比, 此敏感型砷检测菌株对检测 As^{3+} 的灵敏度有显著提高, 最适检测 As^{3+} 浓度范围为 0.013–42.71 $\mu\text{mol/L}$, 最低检出下限为 5.13 nmol/L 。因此, 本研究利用基因敲除技术对大肠杆菌进行改造, 成功地提高了砷检测微生物传感器的灵敏度, 为重金属微生物传感器的优化研究工作提供了有用方案。

关键词: As^{3+} 检测, 大肠杆菌, *arsB* 基因, 基因敲除, 敏感性

Construction of an *Escherichia coli* strain for sensitive detection of arsenite ion in water

Wu Wang*, Songjun Ji*, Zhaozhu Huang, Binbin Lu, and Jianxin Lü

Zhejiang Provincial Key Laboratory for Technology and Application of Model Organisms, School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Abstract: In order to construct an *Escherichia coli* strain with high sensitivity and specificity to detect arsenic ion using fluorescence as reporter, a sensitive strain to arsenic ion was obtained by knocking out the gene *arsB* that acts as an arsenic

Received: January 7, 2016; **Accepted:** March 24, 2016

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA06A514), Special Research Fund for Non-profit Sector of Zhejiang Province (No. 2016C33027).

Corresponding author: Jianxin Lü. Tel/Fax: +86-577-8668-9805; E-mail: jxlu313@163.com

*These authors contributed equally to this study.

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA06A514), 浙江省公益技术研究项目 (No. 2016C33027) 资助。

efflux pump. The pET28b vector containing arsenite detecting cassette *Pars-arsR-egfp* was constructed and then transformed into *arsB* deleted mutant. Measuring conditions of this constructed whole-cell biosensor were optimized and its linear concentration range, limit of detection and specificity were determined. This modified biosensor was much more sensitive than that using wild-type strain as host. The optimal detection range of As^{3+} concentration was 0.013 to 42.71 $\mu\text{mol/L}$, and the limit concentration of detection was as low as 5.13 nmol/L . Thus we successfully improved the sensitivity of arsenite detecting biosensor by modification of *E. coli* genome, which may provide useful strategies for development and optimization of microbial sensors to detect heavy metals.

Keywords: arsenite ion detection, *Escherichia coli*, *arsB* gene, gene knock-out, sensitivity

砷 (As) 是环境中常见的污染物,能通过多种途径进入人体,对人体的多种组织和器官都能造成明显的损伤^[1]。IARC (国际癌症研究机构) 和 WHO 将砷列为人类致癌物。砷污染的主要来源是开采、焙烧、冶炼含砷矿石以及生产含砷产品过程中产生的含砷“三废”排放,另外农业上大量使用含砷农药也对环境造成威胁。砷的毒性主要取决于它的化学形态,形态不同毒性差异很大^[2],所以选择适当、简便和快速的测定方法是现代分析技术取得发展的必要条件。最常用的砷检测分析技术,如原子荧光光谱法、气相色谱-质谱联用分析法 (GC-MS)^[3]、高效液相色谱分析-质谱法 (HPLC-MS)^[4-5]和电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS)^[6]等。这些传统的分析方法虽然具备高精度、低检测限,但是均需要使用昂贵的仪器设备和专业操作人员,因此阻碍了大规模推广应用。

全细胞微生物传感器 (Whole-cell biosensor) 是一种便捷、快速、低成本的环境重金属检测工具,它采用基因工程技术对活体微生物进行改造,使其能够对重金属污染物进行定量分析^[7-8]。但是其特异性欠佳、灵敏度不高一直是限制其广泛应用的瓶颈问题。灵敏度不高是因为细菌体内存在一套对自我耐受保护机制,当重金属

进入细菌体内以后,细菌会启动表达“外排泵”基因以泵出重金属,使菌体内重金属浓度维持在较低水平,导致检测灵敏度不高。例如大肠杆菌体内存在一套砷耐受操纵子 *ars*, 表达 *ArsR*、*ArsB*、*ArsC* 三个相关蛋白,*ArsR* 与 $As(III)$ 结合后,从启动子 *Pars* 位置处解离出来,从而启动下游 *ArsB* 和 *ArsC* 的表达,其中 *ArsB* 属于 ATPase 家族,能够通过消耗 ATP,将胞内 $As(III)$ 泵到胞外,*ArsC* 负责将 $As(V)$ 还原成 $As(III)$,并被 *ArsB* 泵出胞外^[9-10]。

目前已经报道的砷检测微生物传感器,大都是利用细菌体内本身的砷耐受操纵子,如转录调控因子 *ArsR* 来控制报告基因的表达来响应亚砷酸盐^[11-12]。Stocker 等构建了带有两个启动子的位点的检测元件,降低了报告基因的本底表达,改善砷反应生物传感器的灵敏度^[12]。

本研究利用基因敲除技术^[13],获得 1 株 *arsB* 基因敲除菌株,将 As^{3+} 检测元件导入到敲除菌株中,构建出特异性强、敏感性好的 As^{3+} 检测大肠杆菌报告菌株。与利用野生型大肠杆菌作为检测菌株相比,敲除菌株提高了对砷的敏感性,具有更低的检测下限,其在亚砷酸盐检测实验中表现出良好的性能,为目前重金属微生物传感器的优化研究工作提供了有用方案。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株

E. coli DH5 α [F⁻ λ ⁻ *endA1* *hsdR17* *hsdM*⁺, *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*argF*, *lacZYA*), U169, ϕ 80d, Δ (*lacZ*), M15], 由本实验室保存; *E. coli* MC4100 [F⁻, *araD139*, Δ (*argF-lac*), U169, *rspL150*, *relA1*, *flbB5301*, *fruA25*, *deoC1*, *pstF25*], 由本实验室保存。

1.1.2 质粒

pKD46[*oriR101* *repA101ts* *P_{arab-gam-bet-exo}* Amp^r]为同源重组的协助质粒,阿拉伯糖诱导后表达 Bet、Exo 和 Gam 三个 λ 噬菌体重组酶,完成抗性基因与待敲除基因的替换,高于 37 °C 该质粒会丢失。

pKD3 [*oriR γ* *cat* *bla* Cm^r], 线性打靶载体模板,含氯霉素抗性基因 (*cat*) 和特异性同源重组位点 (FRT), 为重组转化体提供筛选标志, 由本实验室保存。

pCP20 [Amp^r, Cm^r] 为 Flp 重组酶的表达质粒,复制子为温度敏感型,42 °C 诱导 Flp 重组酶表达消除 FRT 位点间的氯霉素抗性基因,质粒也逐渐丢失,由本实验室保存。

pET28b [Kana^r], 含有 His 标签和 T7 终止子,由本实验室保存。

pEGFP, 含有增强型绿色荧光蛋白基因,由本实验室保存。

1.1.3 LB 培养基

1.1.4 主要试剂

2 \times phanta, 购于 Vazyme 公司; DL 5 000 DNA ladder marker, 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、

PCR 产物纯化试剂盒, 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; NaAsO₂、砷标准溶液, 购于阿拉丁试剂网-上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 无缝克隆反应试剂盒购于和元生物技术 (上海) 有限公司; 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计

用于同源重组的引物,5'端为 50 bp 的 *arsB* 基因两侧的同源臂,3'端为 22 bp 的用于扩增氯霉素抗性基因 (两侧有 FRT 位点) 的引物,以 pKD3 为模板,常规 PCR 方法扩增氯霉素抗性基因,产物片段长 1 149 bp,胶回收后用于电转化上游同源臂引物 *H₁-P₁*。敲除后鉴定上游引物 *arsB-jianding-F* 位于 *arsB* 基因上游 108 bp,下游引物 *arsB-jianding-R* 位于 *arsB* 基因下游 101 bp。

启动子和调节基因 *arsR* 序列源于大肠杆菌 *E. coli* MC4100 基因 *egfp*^[14]来源于 *Aequoreavictoria* 的水母 *gfp* 的突变体根据文献公布序列合成获得,设计基因融合引物,具体引物信息见表 1。

1.2.2 *arsB* 基因敲除菌株构建

以 pKD3 质粒为模板,利用 P₁ 和 P₂ 扩增含有 *arsB* 基因上下游 50 bp 同源臂的氯霉素基因片段,PCR 反应体系为: 2 \times phanta *Taq* 50 μ L, 正反引物各 1.0 μ L, 模板 1 μ L, 用 dd H₂O 补齐到 100 μ L。PCR 反应条件位: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 50 °C 40 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物以 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定并胶回收试剂盒进行胶回收。

细菌培养,电转化方法参见文献[15],基因敲除方法参见文献[13]和[16]。

表 1 基因敲除和融合引物信息

Table 1 Primers of gene knockout and fusion

Primers	Sequences (5'-3')
P ₁ (<i>arsB-H₁-P₁</i>)	ATGTTACTGGCAGGCGCTATCTTTGTCCTGACCATCGTATTGGTTATCTGTGTGTA GGCTGGAGCTGCTTCG
P ₂ (<i>arsB-H₂-P₂</i>)	CTTCTGCGAAAAGTACGTGCAGCCAGAGTAGCGTAGCCAGGCTACCAATTGCATA TGAATATCCTCCTTA
P ₃ (<i>arsB-jianding-F</i>)	CCGCAACCTGGCTCGACAAAAGCTG
P ₄ (<i>arsB-jianding-R</i>)	GTCGGTTCTGTGCCGCTGTTGCGG
P ₅ (pET- <i>Pars-arsR-egfp-F</i>)	TTTAAGAAGGAGATATACCCCGACGCAAAGTCGGTTTTTTTTACGTCCTG AACTCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATAATGCCTCCCGGATAAAAACAC ATCTG
P ₆ (<i>Pars-arsR-R</i>)	AACTCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATAATGCCTCCCGGATAAAAACAC ATCTG
P ₇ (<i>egfp-F</i>)	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTT
P ₈ (pET- <i>Pars-arsR-egfp-R</i>)	TGCTCGAGTGCGGCCGCAAGTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATC

1.2.3 砷检测元件及检测菌株的构建

以野生型 *E. coli* MC4100 和含 *egfp* 质粒为模板, 利用 P₅ 和 P₆ 扩增启动子和调节基因 *Pars-arsR*, P₇ 和 P₈ 扩增增强型绿色荧光蛋白基因 *egfp*, PCR 反应体系为: 2×phanta *Taq* 50 μL, 正反引物各 1.0 μL, 模板 1 μL, 用 dd H₂O 补齐到 100 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 52 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物以 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定并胶回收试剂盒进行胶回收。

Pars-arsR、*egfp* 胶回收片段分别测浓度, 按照公式 $C_1V_1/bp_1=C_2V_2/bp_2$, 计算 *Pars-arsR* 和 *egfp* 加入的体积。因为设计引物时, *Pars-arsR* 的反向引物 P₆ 含有 *egfp* 的 5' 端的同源臂单片段的同源臂序列, 所以扩增的单片段 *Pars-arsR* 下游含有 *egfp* 上游同源臂序列, 可通过不加引物 PCR 反应 8 个循环, 将 2 个基因片段连接起来, 交叉 PCR 反应体系为: 2×phanta *Taq* 15 μL, 模板 *Pars-arsR* 和 *egfp* 分别为 1.5 μL 和 2.4 μL, 用 dd H₂O 补齐到 30 μL。反应条件为: 94 °C

3 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 8 个循环; 72 °C、10 min, 4 °C 保存。

再以上述 30 μL PCR 产物为模板, 再加入正反引物各 0.5 μL 和 2×phanta *Taq* 10 μL, 用 dd H₂O 补齐到总体积为 50 μL。PCR 反应条件与扩增各元件单片段条件相同。产物以 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定并胶回收试剂盒进行胶回收。

胶回收的融合基因片段 *Pars-arsR-egfp* 与 pET28b 载体进行无缝克隆连接后, 转化到超级感受菌株 *E. coli* DH5α 后挑取阳性克隆鉴定并测序 (上海桑尼生物科技有限公司), 测序正确的克隆扩大培养后提质粒, 再转化至野生型菌和 *arsB* 敲除菌, 分别命名为 pET28b-*Pars-arsR-egfp/arsB* 和 pET28b-*Pars-arsR-egfp/MC4100*。

1.2.4 *arsB* 基因敲除菌株的生长曲线和最低抑菌浓度 (MIC) 的测定

生长曲线的测定: 取 5–10 μL, –80 °C 保存的转化有 pBAD 空质粒的 *arsB* 基因敲除菌和 MC4100 野生菌 (pBAD/*arsB* 和 pBAD/MC4100) 接种于 5 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 并分别加入

终浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素, 37°C 、 250 r/min 恒温振荡培养过夜。吸取过夜菌液稀释 10 倍后取 $500 \mu\text{L}$ 加入比色皿中, 用空白 LB 液体培养基调零, 使用 Beckman DU 730 测定 OD_{600} 值。按照公式 $V=1/10 \times OD_{600}$, 吸取适量菌液加入到 15 mL LB 液体培养基中, 并加入氨苄青霉素, 使起始菌液 OD_{600} 值约为 0.02。每种菌株各做 3 个平行管, 同时分别吸取菌液 $400 \mu\text{L}$, 测定 OD_{600} 值, 作为 0 h OD_{600} 值。其余菌液于 37°C 、 250 r/min 恒温振荡培养。每隔 1 h 取 $400 \mu\text{L}$ 菌液测定 OD_{600} 值, 监测 12 h 内浊度变化。对浓度大的菌悬液用 LB 液体培养基适当稀释后测定, 使其 OD_{600} 值在 1.0 以内, 培养液实际的 OD_{600} 值为稀释后测得的 OD_{600} 值乘以相应的稀释倍数。实验结果为 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。

最低抑菌浓度的测定: 吸取适量过夜菌液 pBAD/MC4100 和 pBAD/*arsB*⁻ 加入到 50 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 使起始菌液 OD_{600} 值为 0.02, 并分别加入氨苄青霉素, 分装 (5 mL/管), 加入 As^{3+} 溶液, 使其终浓度分别为 0.5、2、8、32、128、512、1 024、2 048、4 096、5 000 ($\times 10^{-6} \text{ mol/L}$), 另加等体积无菌 MilliQ H_2O 作为阴性对照, 37°C 、 250 r/min 振荡培养, 监测其 9 h 内浊度改变, 测量各管菌液 OD_{600} 值。重复试验 3 次, 每个浓度各做 3 个平行管。数据处理: 汇总至少 3 次细菌对 As^{3+} 的敏感性结果, 得出 2 种细菌各自的最小抑菌浓度 (MIC)。10 h 后由于培养基营养成分耗尽, 部分细菌吸光度有所下降, 故以 0–9 h 作为细菌生长情况的监测时段。并且规定: 9 h 后, 使试验管 OD_{600} 值与对照管 OD_{600} 值之比不大于 10% 的最低 As^{3+} 浓度为细菌的最低抑菌浓度 (MIC)。实验结果为 3

次独立实验的 $\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。

1.2.5 传感器对 As^{3+} 的孵育时间实验

取 pET28b-*Pars-arsR-egfp*/MC4100 和 pET28b-*Pars-arsR-egfp/arsB*⁻ 过夜菌加入到 50 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 使起始菌液 OD_{600} 值为 0.02, 并分别加入终浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素, 扩大培养至 OD_{600} 值为 0.5 左右 (OD_{600} 值为 0.5 左右大肠杆菌处于对数生长期), 加入 As^{3+} 溶液使终浓度为 0.1、1.0、5.0、 $10 (\times 10^{-6} \text{ mol/L})$, 每个浓度各做 3 个平行管, 另加等体积无菌 MilliQ H_2O 作为阴性对照。将以上菌液于 37°C 、 250 r/min 振荡培养, 分别在 0、1、2、3、4、5、6、7 h 时间点收集菌液 1 mL , $8 000 \text{ r/min}$ 离心 2 min, 弃上清。收获的菌体用蛋白纯化脱盐缓冲液 (Desalting buffer, DB) 重悬, 然后取重悬菌液稀释 20 倍后 (根据菌液浓度稀释不同倍数, 使得 OD_{600} 值相差不大), 分别测量其稀释液荧光值与 OD_{600} 值。激发光波长为 481 nm , 发射光波长为 511 nm 。重复试验 3 次, 每个浓度各做 3 个平行管。

1.2.6 传感器检测 As^{3+} 的线性范围确定

分别取 pET28b-*Pars-arsR-egfp/arsB*⁻ 和 pET28b-*Pars-arsR-egfp*/MC4100 过夜菌以 $1:50$ 接到新鲜 LB 培养基中, 37°C 、 250 r/min 扩大培养至 OD_{600} 值为 0.5 左右, 分装至试管 0.99 mL/管 , 加入 $10 \mu\text{L}$ 不同浓度的 As^{3+} 溶液至各管菌液终浓度分别为 0、 0.013×10^{-6} 、 0.13×10^{-6} 、 0.27×10^{-6} 、 0.53×10^{-6} 、 0.67×10^{-6} 、 1.07×10^{-6} 、 2.14×10^{-6} 、 2.67×10^{-6} 、 4.27×10^{-6} 、 8.54×10^{-6} 、 10.68×10^{-6} 、 17.09×10^{-6} 、 34.18×10^{-6} 、 $42.71 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 各做 3 个平行管。将以上菌液于 37°C 、 250 r/min 振荡培养 4 h 后, 进行样品处理, 处理步骤同上, 完成传感器对 As^{3+} 的

检测线性范围的确定。

1.2.7 传感器对 As^{3+} 的最低检测限 (The limit of detection, LOD) 的确定

将 pET28b-*Pars-arsR-egfp*/MC4100 和 pET28b-*Pars-arsR-egfp/arsB⁻* 过夜菌种子液加入到 20 mL 新鲜 LB 液体培养基中,使起始菌液 OD_{600} 值为 0.02, 37 °C、250 r/min 扩大培养至 OD_{600} 为 0.5 左右,分装 (0.99 mL/管),每管加入 10 μ L 无菌 MilliQ H_2O ,做 10 个平行管,37 °C、250 r/min 振荡培养 3 h 后,4 000 r/min 水平离心 10 min,弃上清,收获的菌体重悬于 1 mL DB 中,然后取 50 μ L 重悬菌液 20 倍稀释于 0.95 mL DB 中,混匀,分别测量其稀释液荧光值与 OD_{600} 值。实验数据处理^[17]:

$$LOD_{AFU} = 2 \frac{\bar{X}_w + 3SD}{\bar{X}_w}$$

\bar{X}_w 为报告菌株背景荧光值的平均值 (10 个平行管),SD 值为报告菌株背景荧光值的标准差。由 LOD_{AFU} 代入 As^{3+} 标准曲线计算出的 LOD 值的单位为 mol/L As^{3+} 。

1.2.8 传感器对 As^{3+} 的特异性实验

吸取 pET28b-*Pars-arsR-egfp/arsB⁻* 过夜菌加入到 50 mL 新鲜 LB 液体培养基中,使起始菌液 OD_{600} 值为 0.02, 37 °C、250 r/min 扩大培养至 OD_{600} 值为 0.5 左右,分装至试管 0.99 mL/管,分别加入 10 μ L 不同种类的金属离子 (As^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+}) 使其终浓度分别为 0.5、5、10 μ mol/L,另加等体积无菌 MilliQ H_2O 作为阴性对照,各做 3 个平行管。将以上菌液于 37 °C、250 r/min 振荡培养 4 h 后 (Pb^{2+} 离子为避光孵育),处理步骤同上。

1.2.9 传感器对检测样品中 As^{3+} 的回收实验

从实验室附近采集河水样品,经孔径为 0.22 μ m 的过滤器对杂质和细菌进行过滤。用移

液枪吸取计算好的 pET28b-*Pars-arsR-egfp/arsB⁻* 过夜菌种子液加入到上述 90 mL 新鲜 LB 液体培养基中,使起始菌液 OD_{600} 值约为 0.5,分装 (0.9 mL/管),加入等体积不同浓度的砷单元素标准溶液至各管菌液,使其终浓度分别为 0、0.13、1.07、4.27、10.68、17.09 μ mol/L,然后再分别加入 100 μ L 过滤后的湖水至每管菌液,每种浓度各做 3 个平行管。将以上菌液于 37 °C、250 r/min 振荡培养 4 h 后,8 000 r/min 水平离心 2 min,弃上清,收获的菌体重悬于 1 mL DB 中,然后取 50 μ L 重悬菌液 20 倍稀释于 0.95 mL DB 中,混匀,分别测量其稀释液荧光值与 OD_{600} 值。然后根据上述标准曲线的回归方程计算样品中 As^{3+} 的浓度,并利用电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) 对待测样品溶液的 As^{3+} 进行验证,最后计算加标回收率。实验结果为 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。

2 结果与分析

2.1 *arsB* 基因敲除菌株的构建

以 *E. coli* MC4100 基因组 DNA 为模板,用引物 P_3 和 P_4 扩增出 *arsB* 基因,以 *arsB::cat*/MC4100 基因组 DNA 为模板,用引物 P_3 和 P_4 扩增出 *arsB::cat* 基因和用引物 P_1 和 P_2 扩增出 *arsB::cat* 基因;以及以 *arsB⁻* 基因组 DNA 为模板,用引物 P_3 和 P_4 进行扩增,PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,如图 1 所示,说明成功制备 *arsB* 基因敲除菌株 *arsB⁻*。

2.2 砷检测元件及检测菌株的构建

根据测序结果显示,砷检测元件已经成功构建,融合基因片段 *Pars-arsR-egfp* 大小为 1 298 bp,碱基序列与理论完全匹配。挑取测序鉴定正确的质粒 pET28b-*Pars-arsR-egfp*,转化

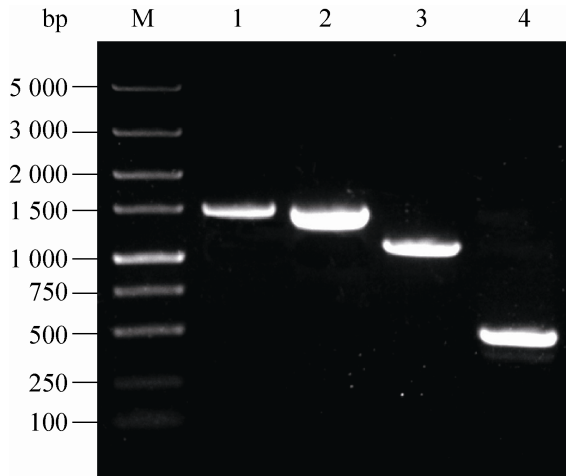


图1 *arsB* 基因敲除菌株的构建过程及 PCR 鉴定
Fig. 1 Construction and verification of *arsB* deletion mutant. Primers P₁ and P₂ were used to amplify the *cat* gene fragment with 50 bp extensions that are homologous to regions adjacent to the *arsB* gene (Lane 3: 115 bp). Primers P₃ and P₄ were used for PCR verification. Lane 1: wild-type (*arsB* gene, 1505 bp); Lane 2: *arsB*⁻ mutant with *cat* gene (1435 bp); Lane 4: *arsB*⁻ mutant in which the *cat* gene was eliminated.

至 *E. coli* MC4100 和 *arsB*⁻感受态细胞中, 从而成功构建 As^{3+} 检测菌株。

2.3 *arsB* 基因敲除菌株的生长曲线和最低抑菌浓度 (MIC) 的测定

由于将砷外泵基因 *arsB* 敲除, 为了验证对其生长是否产生影响, 我们首先进行了生长曲线测定。生长曲线结果如图 2A 所示, 在 LB 培养基中, *arsB* 基因敲除菌与野生型生长速率一致, 说明对大肠杆菌的 *arsB* 基因进行敲除不会影响其生长状态和稳定性。

为验证 *arsB* 缺失以后, 大肠杆菌对 As^{3+} 的敏感性是否增强。我们对敲除菌进行了最低抑菌浓度的测定。如图 2B 所示, 我们发现 *arsB* 敲除菌株在培养基 As^{3+} 浓度为 125 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其生长已基本被抑制。而野生型菌株需要达到 4 mmol/L 时才受到抑制。这表明 *arsB* 基因敲除后, 大肠杆菌对培养基中 As^{3+} 的敏感性显著增强。

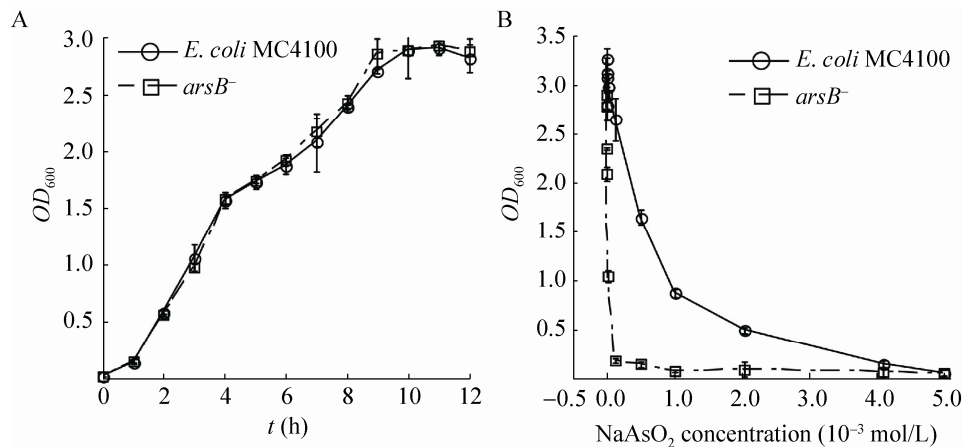


图2 *arsB* 基因敲除菌株的生长曲线和最小抑菌浓度测定

Fig. 2 Comparison of growth and minimal inhibitory concentration between *arsB* mutant strain and wild strain *E. coli* MC4100. (A) Comparison of growth between *arsB* mutant strain and wild strain. The *arsB* mutant (square) and the wild strain *E. coli* MC4100 (circle) were grown in LB medium. The cell density of each was measured every other hour. (B) Determination of minimal inhibitory concentration. The *arsB* mutant (square) and the wild strain *E. coli* MC4100 (circle) were grown in LB medium containing various concentrations of arsenite. The cell density of each was measured after 9 hours and the OD values at 600 nm were plotted. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least three independent measurements.

2.4 检测菌株对 As^{3+} 的孵育时间实验

蛋白表达和成熟需要经过一系列的转录、翻译以及翻译后修饰过程,而且荧光蛋白发出荧光信号需要经过荧光信号的成熟过程,所以有必要对传感器的最佳孵育时间进行摸索。用不同终浓度的 As^{3+} 溶液诱导此传感器,在不同时间点测定 EGFP 荧光信号。图 3 结果表明,在 0–6 h 内,随着诱导时间的延长,无论是低浓度还是高浓度的 As^{3+} ,其诱导的 EGFP 荧光信号都逐渐增强,在 6 h 时基本达到最高点后,荧

光强度逐渐减弱。由于传感器在实际应用中检测时间的长短是一个重要考虑因素,本研究采用 4 h 作为诱导时间,因为诱导 4 h 的荧光信号强度也已达最强荧光信号的 70%–80%以上,基本满足检测需求。

2.5 检测菌株检测 As^{3+} 的线性范围确定

arsB 砷外排泵基因敲除之后,能够减少细菌内砷离子的主动胞外转运,可以增加对砷的敏感性(图 2B)。因此,我们进行检测菌株检测 As^{3+} 的线性范围的摸索和确定。如图 4 所示,

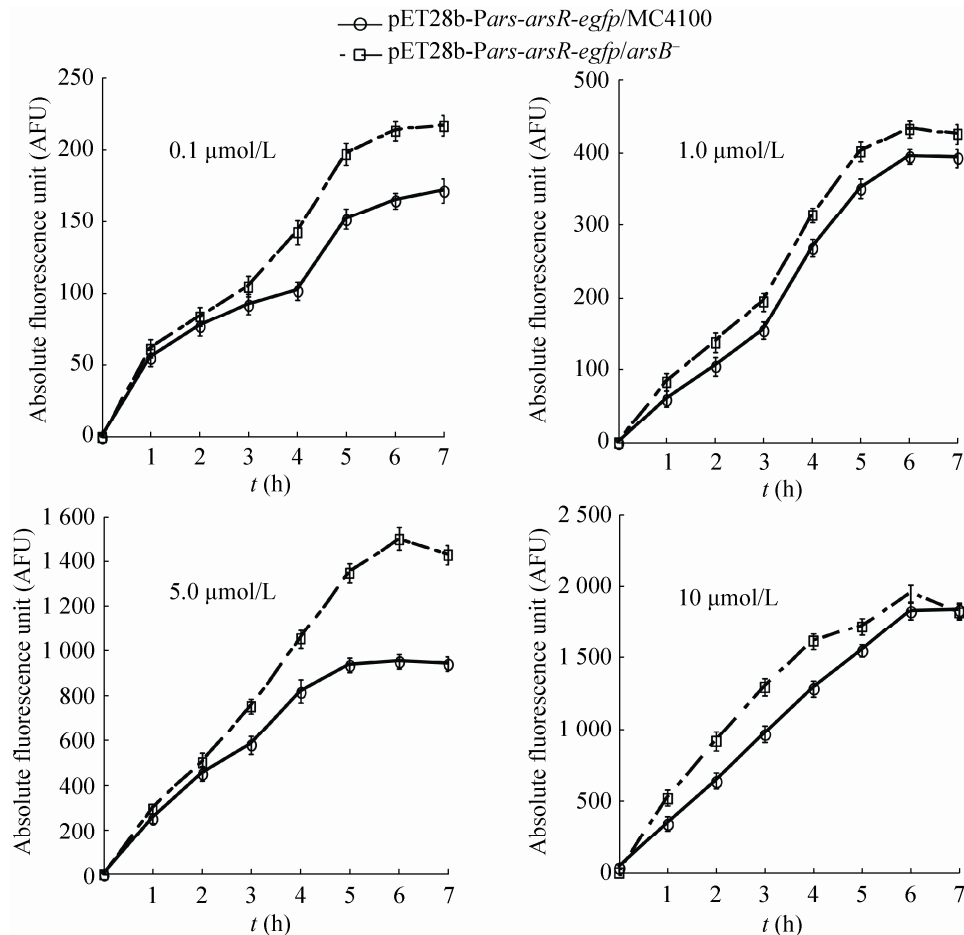


图 3 As^{3+} 检测菌株的孵育时间实验

Fig. 3 Optimization of incubation time for the strains induced by arsenite in LB medium.

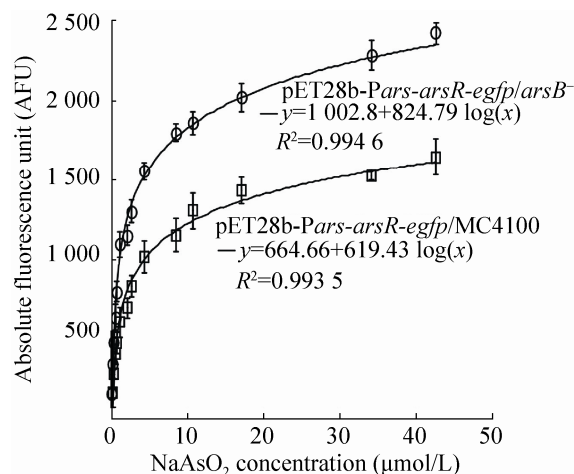


图4 检测菌株检测 As^{3+} 的线性范围

Fig. 4 The linear range of *arsB* mutant strain (circle) and wild strain *E. coli* MC4100 (square) detecting arsenite ions. After 4 h incubation with various concentration of arsenite ions in LB medium, the linear equations and concentration range were obtained.

以 As^{3+} 浓度为横坐标, AFU 值为纵坐标作图, 并进行曲线拟合。结果显示, 经过 4 h 诱导后, 野生型砷检测菌株的线性回归方程为 $y = 664.66 + 619.43 \log(x)$, $R^2 = 0.9935$, 此时检测线性范围为 $0.13 \times 10^{-6} - 42.71 \times 10^{-6}$ mol/L。相比之下, *arsB* 基因敲除型检测菌株的线性回归方程为 $y = 1002.8 + 824.79 \log(x)$, $R^2 = 0.9946$, 对应的线性检测范围为 $0.013 \times 10^{-6} - 42.71 \times 10^{-6}$ mol/L。这表明在保证良好的线性拟合条件下, *arsB* 基因敲除型检测菌株具有更低的检测下限。图中也可以看出 *arsB* 基因敲除型检测菌株对 As^{3+} 具有更高的荧光信号响应度。

2.6 检测菌株对 As^{3+} 的最低检测限 (LOD) 的确定

为进一步验证 *arsB* 基因敲除的检测菌株是否对 As^{3+} 具有更低的检测极限 (LOD), 我们检测了两种菌株的最低检测限。根据实验结果计算

得出, pET28b-*Pars-arsR-egfp/arsB*⁻ 菌株对 As^{3+} 的 LOD 值为 5.13×10^{-9} mol/L 或 3.843×10^{-4} mg/L, pET28b-*Pars-arsR-egfp/MC4100* 菌株对 As^{3+} 的 LOD 值为 126.1×10^{-9} mol/L 或 94.47×10^{-4} mg/L。如图 5 所示, *arsB* 基因敲除型检测菌株对 As^{3+} 具有更低的检测下限, 其最低检测限大约只有野生型检测菌株的 4%, 证明 *arsB* 基因敲除型检测菌株在实际应用中能够检测到更低的 As^{3+} 浓度。

2.7 检测菌株对 As^{3+} 的特异性实验

从以上结果得知, *arsB* 基因敲除型检测菌株对 As^{3+} 的检测具有更低的检测下限和响应度, 具有更好的实际应用前景。考虑到传感器对待测物质的特异性检测是其实际应用的前提, 为验证我们构建的 *arsB* 基因敲除型检测菌株是否具有较高的特异性, 我们加入等体积 (10 μ L) 不同种类金属离子 (As^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、

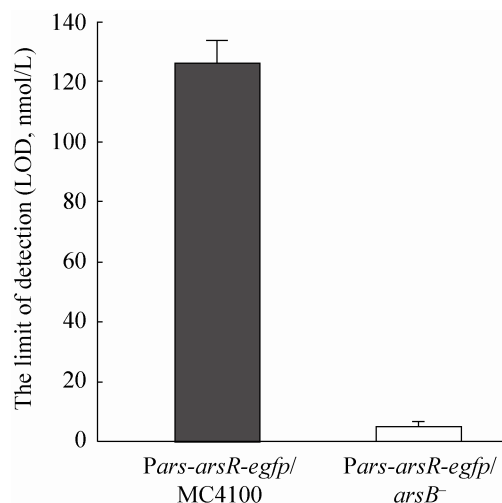


图5 检测菌株的最低检测限对比图

Fig. 5 Comparison of the limit of detection between *arsB* mutant strain (white column) and wild strain *E. coli* MC4100 (grey column) containing the arsenite induced *egfp* expression plasmid.

Mn²⁺、Fe²⁺、Hg²⁺、Ni²⁺、Co²⁺), 终浓度分别为 0.5、5、10 μmol/L, 对构建成功的检测 As³⁺ 微生物传感器进行诱导, 并用等体积无菌 MilliQ H₂O 作为阴性对照, 检测其特异性。将 As³⁺ 的 AFU 值定义为 100%, 并以其他各金属离子的 AFU 值与 As³⁺ AFU 值的百分比表示对各金属离子选择的特异性。结果表明 (图 6), 无论是高浓度还是低浓度的金属离子, 只有 As³⁺ 能诱导此传感器产生荧光, 其他金属对其荧光表达的干扰性非常弱 (均低于 10%), 证明此传感器特异性良好。

2.8 传感器对检测样品中 As³⁺ 的回收实验

微生物传感器的构建和优化的最终目的是将其运用到实际应用中, 所以我们将构建的 As³⁺ 检测菌株进行了河水样品的加标回收率评估实验。表 2 可以看出, 以电感耦合等离子体

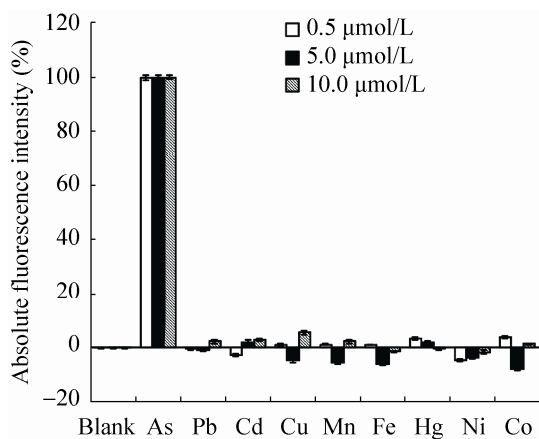


图 6 检测菌株的特异性实验

Fig. 6 Specificity test of arsenite detecting strain. Fluorescence intensity of *arsB* mutant strain containing the arsenite induced *egfp* expression plasmid were measured after incubation with various metals at the concentration of 0.5, 5, 10 μmol/L for each. All of the cell numbers were normalized to $OD_{600}=0.2$ before the tests.

表 2 传感器对检测样品中 As³⁺ 的加标回收率

Table 2 Spike-recovery tests of arsenite detecting strain

Sample	As ³⁺ added (μmol/L)	As ³⁺ found (μmol/L)	Recovery (%)
1	0.002	ND	ND
2	0.120	0.10±0.14	83.33
3	1.020	1.01±0.21	99.02
4	4.350	4.18±0.21	96.09
5	10.660	8.91±1.13	83.58
6	17.180	16.02±1.11	93.25

ND: not detectable (Below the limit of determination of the arsenite detecting strain). Sample 1: no exogenous arsenite was added. The baseline concentration of arsenite was 0.002 μmol/L measured by ICP-MS. The results in the “As³⁺ added” and “As³⁺ found” columns were the arsenite concentrations measured by ICP-MS and arsenite detecting strain respectively.

质谱仪 (ICP-MS) 检测的结果作为金标准, 构建的 As³⁺ 检测菌株对河水样品中的 As³⁺ 检测回收率基本在 80% 以上, 表明此传感器具有较为良好的检测水体中砷离子的应用前景。

3 讨论

随着工农业的快速发展, 水体中砷污染问题日趋严重, 因此砷离子的检测尤为重要。传统的重金属检测方法如 ICP-MS、冷原子吸收法等, 需要专业设备, 成本高, 且操作比较繁琐, 由于微生物传感器因其简便、快速、低廉、易推广等优点, 近年来得到快速发展, 例如检测铅^[18]、砷^[19]。本研究构建的生物传感器可通过荧光信号强度直观、特异地反映水体中的 As³⁺ 浓度, 操作简便, 是传统检测方法的一个有力补充。

近年来, 研发理想的砷离子检测微生物传感器一直处于探索之中^[19-20], 然而均存在敏感性差、检测限高的瓶颈问题。Li 等^[20]通过将 *arsR*

操纵子突变和高通量筛选提高其活性,但其检测下限较高。胡春霞等^[20]以绿色荧光蛋白为报告基因构建的环境砷离子生物检测体系的检测范围为 0.2–1.0 $\mu\text{mol/L}$,还有 Huang 等构建的传感器^[21],检测范围为 10–500 $\mu\text{g/L}$ 。Francisco 等构建了带有两个启动子的位点的检测元件,降低了报告基因的背景值,改善了砷反应生物传感器的灵敏度^[12]。

很多微生物具有一套消除重金属毒害的抗性机制,如通过酶参与的氧化还原反应将重金属转化为毒性较弱的形态(如借助细胞质还原酶的催化将汞离子还原成毒性较弱的金属汞)^[22]。但是微生物对砷的利用是通过氧化还原反应将其从砷酸盐转化为毒性更强的亚砷酸盐,然后借助特殊的砷转运蛋白将其从细胞中转运出去,导致野生型大肠杆菌对砷离子检测的敏感度不高^[10]。本研究通过基因敲除技术将大肠杆菌基因组上合成砷外排泵的基因 *arsB* 敲除,从而使进入菌体内的砷离子不能有效排出,其敏感性提高了 30 多倍(图 2B)。而且,利用 *arsB* 敲除菌株作为砷检测元件的宿主菌体,其对 As^{3+} 的最低检出下限是野生型菌株最低检出限的 1/25,可低至 $5.13 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ ($3.843 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$)。

自然界水体环境中,砷离子主要以三价砷(As^{3+})和五价砷(As^{5+})的形式存在,其中三价砷的毒性更大^[23],故本文主要采用 As^{3+} 为检测对象,对构建的砷离子传感器进行优化和评估。事实上,本文构建的砷离子传感器同样能够对 As^{5+} 进行有效检测(数据未呈现),只是达到最高荧光信号强度的孵育时间比 As^{3+} 略久。这主要是因为进入菌体中的 As^{5+} 需要先通过 *ArsC* 还原成 As^{3+} 才能被砷离子检测元件检测到。我们将进一步对其检测 As^{5+} 或总砷的条件和参数进

行优化和确定,使其能得到更广泛的应用。

本研究构建的 As^{3+} 检测传感器的线性检测范围为 0.013–42.71 $\mu\text{mol/L}$ 。相比以往的砷检测微生物传感器,此传感器检测限更低,检测范围更宽,准确性良好,在检测重度砷污染环境具有较大优势,呈现出较好的应用前景。后续还需不断的深入探索,对该传感器进行进一步优化,比如在已经构建好的质粒上,进行多个完整检测元件的串联,以极大提高传感器检测灵敏度,从而进一步缩短相应的检测时间,以推进微生物传感器在环境监测领域的应用。

REFERENCES

- [1] Debashis C, Dipti H, Santanu M. Assessment of arsenic exposure from groundwater and rice in Bengal Delta Region, West Bengal, India. *Water Res*, 2010, 44 (19): 5803–5812.
- [2] Zhou B, Liu LY, Li XC, et al. Analysis of different forms of arsenic content in kelp. *Stud Trace Elem Health*, 2005, 22(4): 33–34 (in Chinese).
- [3] Takeuchi A, Namera A, Kawasumi Y, et al. Development of an analytical method for the determination of arsenic in urine by gas chromatography-mass spectrometry for biological monitoring of exposure to inorganic arsenic. *J Occup Health*, 2012, 54(6): 434–440.
- [4] Guerin T, Astruc A, Astruc M. Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors: a review of the main separation techniques. *Talanta*, 1999, 50(1): 1–24.
- [5] Gong ZL, Lu XF, Ma MS, et al. Arsenic speciation analysis. *Talanta*, 2002, 58(1): 77–96.
- [6] Klaue B, Blum JD. Trace analyses of arsenic in drinking water by inductively coupled plasma mass spectrometry: high resolution versus hydride generation. *Anal Chem*, 1999, 71(7): 1408–1414.
- [7] Hynninen A, Virta M. Whole-cell bioreporters for the detection of bioavailable metals. *Adv Biochem*

- Eng Biotechnol, 2009, 118: 31–63.
- [8] Scott DL, Ramanathan S, Shi WP, et al. Genetically engineered bacteria: electrochemical sensing systems for antimonite and arsenite. *Anal Chem*, 1997, 69(1): 16–20.
- [9] Xu C, Rosen BP. Dimerization is essential for DNA binding and repression by the ArsR metalloregulatory protein of *Escherichia coli*. *J Bio Chem*, 1997, 272(25): 15734–15738.
- [10] Meng YL, Liu ZJ, Rosen BP. As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J Bio Chem*, 2004, 279(18): 18334–18341.
- [11] Francisco MJS, Hope CL, Owolabi JB, et al. Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(3): 619–624.
- [12] Judith S, Denisa B, Monika G, et al. Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(20): 4743–4750.
- [13] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [14] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, 173(1): 33–38.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [16] Bai GX, Sun ZW, Huang Y, et al. Deletion of *clpP* in chromosome of *E. coli* by red recombination. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2005, 21(1): 35–38.
白光兴, 孙志伟, 黄莺, 等. 利用 Red 重组系统
对大肠杆菌 *ClpP* 基因的敲除. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21(1): 35–38.
- [17] Ivask A, Rõlova T, Kahru A. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. *BMC Biotechnology*, 2009, 9(1): 1–15.
- [18] Wei W, Liu X, Sun P, et al. Simple whole-cell biodetection and bioremediation of heavy metals based on an engineered lead-specific operon. *Environ Sci Technol*, 2014, 48(6): 3363–3371.
- [19] Li LZ, Liang JT, Hong W, et al. Evolved bacterial biosensor for arsenite detection in environmental water. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(10): 6149–6155.
- [20] Hu CX, Ye MQ, Cen YC, et al. Construction of method for detection of environmental arsenic based on green fluorescent protein as reporting gene. *J Environ Health*, 2013, 30(7): 634–636 (in Chinese).
胡春霞, 叶梦情, 岑益超, 等. 以绿色荧光蛋白为报告基因的环境砷离子生物检测体系的构建. *环境与健康杂志*, 2013, 30(7): 634–636.
- Huang CW, Wei CC, Liao HC. A low cost color-based bacterial biosensor for measuring arsenic in groundwater. *Chemosphere*, 2015, 141: 44–49.
- [21] Silver SA, Misra TK. Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annu Rev Microbiol*, 1988, 42: 717–743.
- [22] Geng WH, Komine R, Ohta T, et al. Arsenic speciation in marine product samples: comparison of extraction–HPLC method and digestion–cryogenic trap method. *Talanta*, 2009, 79(2): 369–375.

(本文责编 陈宏宇)