

同源重组法构建多功能农药降解基因工程菌研究

Construction of Multifunctional Genetically Engineered Pesticides-degrading Bacteria by Homologous Recombination

蒋建东, 顾立锋, 孙纪全, 代先祝, 文 阳, 李顺鹏*

JIANG Jian-Dong, GU Li-Feng, SUN Ji-Quan, DAI Xian-Zhu, WEN Yang and LI Shun-Peng*

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

College of Life Sciences, Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

摘 要 构建遗传稳定的多功能农药降解基因工程菌可以为农药污染的生物修复提供良好的菌种资源, 然而, 构建遗传稳定且不带入外源抗性的基因工程菌是一个难点。通过以受体菌的 16S rDNA 为同源重组指导序列、*sacB* 基因为双交换正筛选标记构建同源重组载体, 二亲结合的方法将甲基对硫磷水解酶基因(*mpd*)整合到呋喃丹降解菌 *Sphingomonas* sp. CDS-1 染色体的 16S rDNA 位点, 分别成功构建了含 1 个和 2 个 *mpd* 基因插入到 rDNA 位点且不带入外源抗性的基因工程菌株 CDS-mpd 和 CDS-2mpd。同源重组单交换的效率为 $3.7 \times 10^{-7} \sim 6.8 \times 10^{-7}$ 。通过 PCR 和 Southern 杂交的方法验证了同源重组事件。基因工程菌遗传稳定, 能同时降解甲基对硫磷和呋喃丹。甲基对硫磷水解酶(MPH)的比活在各生长时期均高于原始出发菌株, 比活最高达 6.22 mu/ μ g。

关键词 同源重组, rDNA, *sacB*, 基因工程菌, 农药降解, 生物修复

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0884-08

Abstract Construction of multifunctional pesticides-degrading genetically engineered microorganisms (GEMs) is increasing important in the bioremediation of various pesticides contaminants in environment. However, construction of genetically stable GEMs without any exogenous antibiotic resistance is thought to be one of the bottlenecks in GEMs construction. In this article, homologous recombination vectors with the recipient's 16S rDNA as homologous recombination directing sequence (HRDS) and *sacB* gene as double crossover recombinants positive selective marker were firstly constructed. The methyl parathion hydrolyase gene (*mpd*) was inserted into the 16S rDNA site of the carbofuran degrading strain *Sphingomonas* sp. CDS-1 by homologous recombination single crossover in the level of about $3.7 \times 10^{-7} \sim 6.8 \times 10^{-7}$. Multifunctional pesticides-degrading GEMs with one or two *mpd* genes inserted into the chromosome without any antibiotic marker were successfully constructed. The homologous recombination events were confirmed by PCR and southern blot methods. The obtained GEMs were genetically stable and could

Received: June 7, 2005; Accepted: July 12, 2005.

This work was supported by the grants from The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2004BA516A02), National Programs for High Technology Research and Development of China (2004AA246070, 2004AA21410) and the Programme of Postgraduate Creative Plan in Jiangsu Province.

* Corresponding Author. Tel/Fax: 86-25-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

国家“十五”科技攻关重点项目(No. 2004BA516A02), 国家高技术发展计划“863”(No. 2004AA246070, 2004AA21410)和江苏省研究生创新计划项目资助。

degrade methyl parathion and carbofuran simultaneously. The insertion of *mpd* gene into *rrn* site did not have any significant effect on recipient's physiological and original degrading characteristics. The methyl parathion hydrolase (MPH) was expressed at a relatively high level in the recombinants and the recombinant MPH specific activity in cell lysate was higher than that of original bacterium (DLL-1) in every growth phase tested. The highest recombinant MPH specific activity was 6.22 mu/ μ g. In this article, we describe a first attempt to use rRNA-encoding regions of *Sphingomonas* strains as target site for expression of exogenous MPH, and constructed multifunctional pesticides degrading GEMs, which are genetically stable and promising for developing bioremediation strategies for the decontamination of pesticides polluted soils.

Key words homologous recombination, rDNA, *sacB*, genetically engineered microorganisms, pesticides degradation, bioremediation

化学农药是一类重要的环境异生物(xenobiotic compounds),其在环境中的生态学行为以及修复一直是国内外研究的重点^[1]。目前,科研工作者已经分离筛选了大量降解农药的微生物,并成功地将降解性微生物应用于污染环境的修复^[2]。然而农药品种繁多,环境中农药污染情况复杂,降解单一农药的微生物菌株已经不能满足生物修复的需求,通过生物学手段构建多功能的农药降解基因工程菌株成为新的研究热点^[3,4]。

由于质粒的不稳定性且含有抗性所带来的环境释放潜在风险,将外源基因构建于质粒载体而获得的基因工程菌的应用越来越受到限制。因此,目前迫切需要发展一种能将外源目的基因整合到受体菌的染色体上且不带入抗性的整合系统。尽管依赖于插入序列(IS)介导的整合方法也能获得遗传稳定的工程菌株,然而,同源重组可以按照人们所预期的基因位置甚至碱基序列位置进行染色体整合而倍受青睐。16S rRNA基因(rDNA)存在于所有的细菌中,作为分子进化钟在微生物的系统分类进化及分子生态学研究得到了广泛的应用,而且rDNA一般以多拷贝(~15个拷贝)的形式存在,因此,若以此作为同源重组整合位点,则会提高整合几率,而且不会因为插入失活掉一个rDNA操纵元(*rrn*)而将受体菌致死^[5-11]。国内外一般是将克隆到的某个非致死基因作为同源重组指导序列(Homologous Recombination Directing Sequence, HRDS)而以rDNA为同源重组整合位点稳定表达外源基因的研究相对较少。

甲基对硫磷(MP)和呋喃丹为两种剧毒农药,虽然使用受到限制,但其造成的环境污染问题仍很严重。世界各地的科研工作者分别从 *Pseudomonas* 属、*Brucella* 属、*Flavobacterium* 属、*Alcaligenes* 属和 *Ochrobactrum* 分离筛选到一些 MP 降解菌株,本实验室的崔中利博士用鸟枪法从 MP 降解菌株从克隆到一个新的甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*(GenBank

AF338729),它与其它报道的有机磷水解酶基因 *opd* 和 *ophc2* 同源性很低。*mpd* 基因编码的酶 MPH 能够高效水解 MP 为对硝基苯酚(PNP)和 O,O-二甲基硫代磷酸^[12,13]。MPH 虽然不能完全矿化 MP,但水解生成的 PNP 的毒性比 MP 低 100~120 倍。呋喃丹的微生物降解研究相对较少,本实验室的武俊从活性污泥中分离到一株能够高效、快速降解呋喃丹的鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp. CDS-1^[14],该菌株能完全矿化呋喃丹,通过气质联机分析发现呋喃丹首先是断开氨基甲酸酯链,形成呋喃酚,实验中还检测到有红色中间代谢产物 2,4-二叔丁基苯醌的存在,其余代谢途径还未见报道。本文以高效呋喃丹降解菌 *Sphingomonas* sp. CDS-1 的 16S rDNA 为同源重组位点整合甲基对硫磷水解酶 *mpd* 基因,获得不带抗性标记的能同时高效降解 MP 和呋喃丹的工程菌株,为基因工程菌的环境释放以及生物修复应用打下坚实的基础,并且为遗传稳定基因工程菌的构建提供了一种新的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本实验中使用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 试剂与试剂盒 限制酶、碱性磷酸酶、T4 DNA 连接酶、随机引物标记试剂盒(Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2)购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa Biotechnology(Dalian) Co. Ltd),抗生素购自江苏创瑞公司,DNA 片段纯化回收试剂盒购自 Genbase 公司,其它试剂均为分析纯。50%的 MP 乳油和 98%呋喃丹原药分别购自镇江农药厂和太仓鲍利葛化工有限公司。(α-³²P)标记的 dCTP 购自北京市福瑞生物工程公司,所用引物由大连宝生物工程有限公司合成。

表 1 菌株和质粒的基本特性

Table 1 Basic characteristics of strains and plasmids

Strains or plasmids	Relevant property(ies)	Source or reference
<i>Sphingomonas</i> sp. CDS-1	carbofuran degrading strain, wt, Str ^r ,	[14]
<i>Pseudomonas putida</i> DLL-1	high efficient methyl parathion degrading strain	[15]
<i>E. coli</i> DH5 α	$\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ \Delta M15$)	Laboratory stored
<i>E. coli</i> DH5 α_{pir}	RP4-2-tet :Mu-kan ::Tn7 integrant leu-63 ::IS10 recA1 creC510 hsdR17 endA1 zbf-5 uidA($\Delta mlul$);pir + thi	From Dr. Zhu Jun of Harvard Medical School
<i>E. coli</i> SM10 $_{pir}$	Km ^r , thi-1, thr, leu, tonA, acy, supE, recA ::RP4-2-Tc ::Mu, pir	From Dr. Zhu Jun of Harvard Medical School
pDT3	Amp ^r , 2.2kb methyl parathion hydrolase gene (mpd) fragment inserted into MCS of pUC19	[12, 13]
pMD 18-T	Amp ^r	Brought from Takara, Dalian
pBluescript II SK(+ + -)	Amp ^r	Brought from Sangon, Shanghai
pIB279	Km ^r , with Km-sacB fragment	From Prof. Ian Blomfield of KENT university ^[16]
pWM91	Amp ^r , f1(+)ori lacZa of pBluescript II (SK ⁺); oriR _{6K} , oriT _{RP4} , sacB, Sucs	From Dr. Zhu Jun of Harvard Medical School ^[17]
pMDR	Amp ^r , with 16S rDNA fragment inserted into the MCS of pMD 18-T	This study
pMRP-1	Amp ^r , with a mpd gene inserted into the Nhe I site of pMDR	This study
pMRP-T	Amp ^r , with two mpd genes inserted into the Nhe I site of pMDR	This study
PBRP	Amp ^r , with 16S rDNA and mpd fragment in pBluescript II SK(+ + -)	This study
pWSM-1	Amp ^r , with 2.5kb fragment from pBRP inserted into pWM91	This study
pWSMK-1	Amp ^r , Km ^r , with Km-sacB inserted into pWSM-1 BamH I site	This study
pWSMK-T	Amp ^r , Km ^r , same with pWSMK-1 but with two mpd genes	This study

1.1.3 培养基 :无机盐、LB 培养基配方见参考文献 [18];1/3 LB 培养基为稀释 3 倍的 LB ;LBM 培养基中为 LB 中添加 100 μ g/mL 浓度的 MP ;SLB 培养基中为 LB 中添加 5% 的蔗糖。根据实验需要添加相应的抗生素,氨苄青霉素(Amp)为 50 μ g/mL,卡那霉素(Km)为 25 μ g/mL,链霉素(Str)为 100 μ g/mL。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 :*Escherichia coli* 为 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C

培养,*Sphingomonas* sp. CDS-1 为 1/3 LB 培养基 30 $^{\circ}$ C 培养。

1.2.2 分子生物学操作 :细菌总 DNA 的制备、酶切、酶连、载体脱磷、*E. coli* 普通感受态制备、转化、质粒提取、Southern 杂交等操作见参考文献 [18]; DNA 的回收纯化按照试剂盒说明书进行 ;DNA 测序委托大连宝生物公司完成 ;实验中所用的引物及 PCR 扩增条件列于表 2。

表 2 引物及 PCR 扩增条件

Table 2 PCR primers and reaction conditions

Primers names	Sequences of primers(5'-3')	Denatural temperature($^{\circ}$ C)	Annealing temperature($^{\circ}$ C)	Remarks
16S	F27 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	94	50	[19]
	R1492 TACCTTGTTACGACTT			
	F1 ATGCTAGCTCCGTCCA ATCTCC	96	60	<i>Nhe</i> I
mpd	R1 CAGCTAGCTATCACTTGGGGTTG			
HR confirmation	P1 TTTCCTTGTCCCTTGTGGG	95	62	stop codons
	P1' CCCACAAGGACAAGGAAA			
	P2 CCTGCCTCCTTGGGTTA			

1.2.3 二亲结合 :将供、受体菌在各自培养基中培养至对数后期,5000 r/min 离心回收菌体,用无菌水洗涤 1 次,浓缩后混合两种菌液于微孔滤膜(0.25 μ m)上,置于不含抗生素的 LB 培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养,24h 后用无菌水洗下菌体,直接涂布于含 50 μ g/mL Amp、25 μ g/mL Km 和 100 μ g/mL Str 的 1/3 LB 平板上。同时,另取一部分混合菌体稀释涂布于含 100 μ g/mL Str 的 1/3 LB 平板上,计数受体菌数,用于

计算同源重组单交换的效率。

1.2.4 甲基对硫磷水解酶(MPH)酶活测定及吡喃丹的检测 :MPH 酶活测定 :取 20 μ L 酶液样品(对照中加入 20 μ L 培养基)于含 974 μ L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液(0.2 mol/L, pH8.0)的 1.5mL 的 eppendorf 管中,再加入 6 μ L MP(10mg/L),立即摇匀,迅速置于 35 $^{\circ}$ C 中水浴 5min,立即加入 0.2mL 硝酸溶液(0%)摇匀终止反应,10000 r/min 离心 5min,取上

清 0.5mL 于试管中,加入 4.5mL 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.5mol/L, pH10.0)混匀稀释,紫外 399.5nm 处测定 PNP 吸光值(A)。1 个酶活力单位(u)定义为 35℃时 1min 内水解 MP 产生 1 μ mol PNP 所需的酶量。酶的比活(u/ μ g)为单位蛋白的酶活。

呋喃丹的检测:取 5mL 待测样品 10000 r/min 离心 5min,收集上清,加入等体积二氯甲烷,剧烈震荡 1min,静置,去水相,过无水 Na₂SO₄ 柱,收集流出的二氯甲烷液,紫外 200~400nm 扫描定性检测,定量检测时取 282 nm 处的吸光值。

2 结果与分析

2.1 同源重组载体的构建

同源重组载体具体构建路线见图 1。用通用引物 F27 和 R1492 从 CDS-1 染色体 DNA 中扩增出 1.5kb 左右的 16S rDNA 与 pMD18-T 载体连接,挑取阳性克隆命名为 pMDR,测序发现 16S rDNA 片段中游含有一 *Nhe*I 单酶切位点(AY506539)。以 pDT3 为模板,引物 F1 和 R1 扩增出含自身启动子的甲基对硫磷水解酶 *mpd* 基因,两端分别引入 *Nhe*I 酶切位点和终止密码子(见表 2)插入到 pMDR 的 *Nhe*I 单酶切位点,在含 100 μ g/mL Amp 的 LBM 平板上筛

选能水解 MP 成 PNP 产生黄色水解圈的阳性转化子,提取质粒验证大小,获得分别有 1 个 *mpd* 基因和 2 个 *mpd* 基因顺向串联插入的阳性转化子,分别命名为 pMRP-1 和 pMRP-T。用 *Pst*I 和 *Xho*I 双酶切 pMRP-1,将 2.6kb 左右的 16S rDNA 和 *mpd* 片段酶连到同样酶切的 pBluescript II SK(+ + -)载体上,获得阳性转化子 pBRP,再用 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切,最终将 16S rDNA 和 *mpd* 序列连到 pWM91 上,转化 *E. coli* DH5 α _{pir} 获得 pWSM。用 *Bam*HI 和 *Nde*I 酶切 pIB279,回收 3.8kb 的 *Km-sacB* 片段,酶连到 pWSM 的 *Bam*HI 位点,获得 pWSMK-1。pWSMK-T 的构建类似于 pWSMK-1,但其 *Nhe*I 位点间含有 2 个 *mpd* 基因。最终将同源重组载体转入 *E. coli* SM10_{pir} 直接用于二亲结合。构建的同源重组载体具有以下特点:Ⅰ.复制起始位点为 *ori*R_{6K7},只有在宿主菌提供 Π 蛋白(λ _{pir} 基因编码)的情况下才能正常复制(该载体在 CDS-1 中为自杀质粒),因此在载体构建过程中涉及到此复制子需在含 λ _{pir} 基因的 *E. coli* 中操作;Ⅱ.含有两个拷贝的 *sacB* 基因,该基因编码的果糖蔗糖酶,能将蔗糖水解为果糖并生成大分子量的果聚糖,在 G⁻ 细菌周质空间(极少数

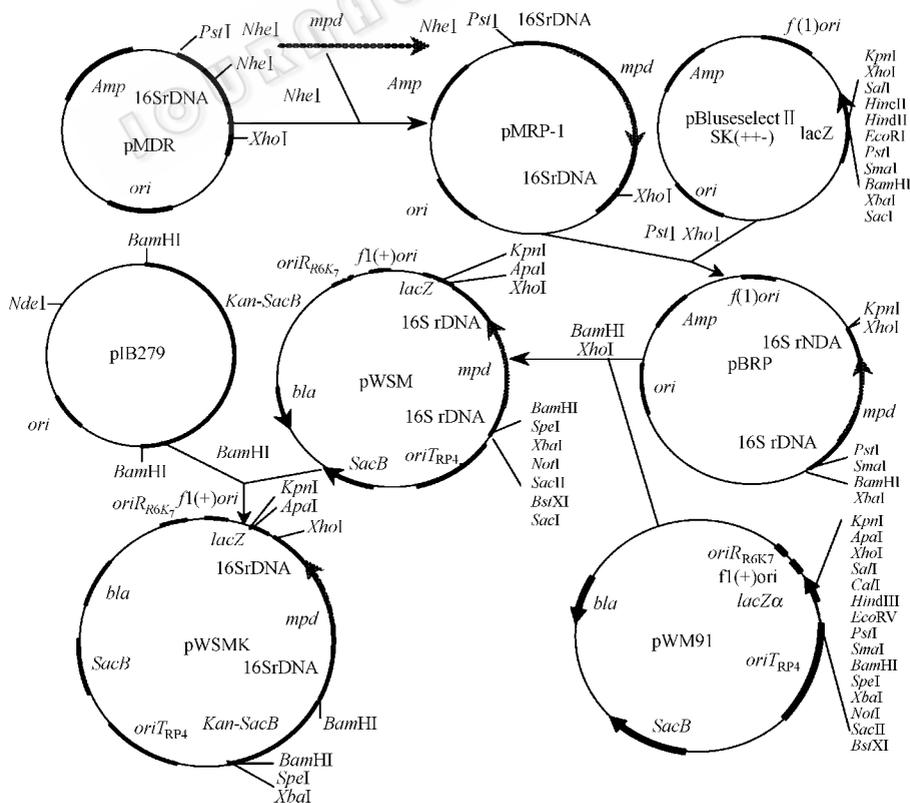


图 1 同源重组载体构建路线图

Fig. 1 Construction of the homologous recombination vectors

G^+ 细菌的假周质空间结构)累积,导致细胞停止生长或死亡,因此,含有该基因的 G^- 宿主菌对蔗糖高度敏感,可以用来作为同源重组双交换的正筛选标记^[20,21];III.含有 *oriT_{RP4}* 位点,可以在宿主 *E. coli* SM10_{*λ*pir} 染色体上 *tra* 基因的作用下直接进行二亲结合转移;IV.含有 Amp 和 Km 两种抗性,便于同源重组单交换子的筛选。

2.2 同源重组子的筛选策略

由于同源重组载体不能在 CDS-1 中自主复制,因此转入受体菌细胞内的同源重组载体只有整合到染色体上才能随着染色体的复制而存在。载体上含有 Km、Amp 和 *mpd* 等基因,受体菌为 Str 抗性,因此在 Str、Km 和 Amp 三抗平板上长出来的能水解 MP 产生黄色水解圈的即为同源重组单交换子。

由于单交换是 HRDS 一侧发生重组,整个载体序列(含抗性和 *sacB*)都插入到染色体上,因此,我们必需筛选仅有 *mpd* 基因整合到染色体上的双交换子。将获得的同源重组单交换子液体培养过夜,涂布于添加 Str 和 MP 的 SLB 平板上,挑取能产生黄色水解圈的单菌落即为阳性同源重组双交换子。因为如果 CDS-1 染色体上存在 *sacB* 基因等载体序列,在蔗糖存在的情况下将会导致细菌死亡,只有在 SLB 培养基上生长的菌落才是发生二次重组的双交换子(丢失 *sacB* 基因和抗性载体序列)。如果双交换发生在 HRDS 的同一侧,则载体重新原封不动的从染色体上缺失(回复突变),如果双交换发生在 HRDS 的另一侧,则 HRDS 之间的目的基因 *mpd* 会整合到 rDNA 位点(能产黄色水解圈),而 HRDS 两侧的载体序列丢失,即为我们所需要的阳性同源重组双交换子(基因工程菌)。

2.3 同源重组子的获得及同源重组事件的 PCR、Southern 杂交验证

二亲结合后培养 3~4d,在三抗平板获得一些结合子,验证发现均能水解 MP,插入 1 个或 2 个 *mpd* 基因的同源重组单交换的效率都在 3.7×10^{-7} ~ 6.8×10^{-7} 范围内,HRDS 之间的序列长度(1.3 或 2.6kb)对同源重组单交换的效率没有显著影响。将单交换子培养过夜后涂布蔗糖平板,发生双交换的效率约为 10^{-3} ~ 10^{-5} ,而且在蔗糖平板上生长的菌落 100% 丢失 Amp 和 Km 抗性,而阳性双交换子(*mpd* 基因插入到 rDNA 位点)约占双交换子的 1% ~ 10%。CDS-1 染色体 rDNA 位点插入 1 个和 2 个 *mpd* 基因的双交换子(工程菌)分别命名为 CDS-*mpd* 和 CDS-2*mpd*。

随机选取工程菌,提取总 DNA,用引物 P1 和 P2 扩增,扩增结果如图 2。由于引物 P1 设计在 *mpd* 基因片段上,引物 P2 在染色体 16S rDNA 序列上,因此,只有当 *mpd* 基因插入到受体菌的 16S rDNA 位点,才能用这对引物扩增出特异性的 1.3kb 条带,PCR 结果证明了 *mpd* 基因在 16S rDNA 位点发生了同源重组。

*Hind*III 酶切 pDT3,回收 2kb 左右大小片段,用随机引物标记试剂盒合成 ³²P 标记 *mpd* 基因探针,与 *Xho*I 完全酶切的工程菌总 DNA(*mpd* 基因中没有 *Xho*I 酶切位点)杂交,杂交结果如图 3,表明 *mpd* 基因已经整合到 CDS-1 的 16S rDNA 位点,只出现 1 处杂交信号,说明 *mpd* 基因可能只在 1 个 *rrn* 操纵元发生了同源重组。

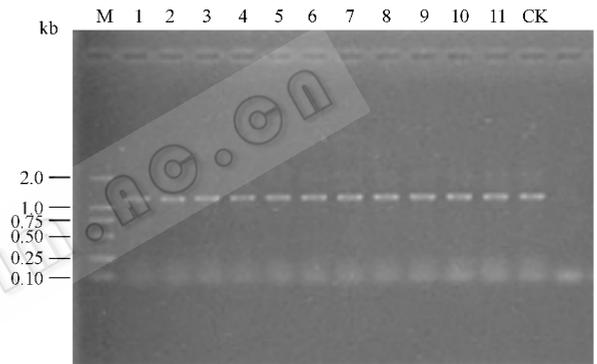


图 2 同源重组事件的 PCR 验证

Fig. 2 Homologous recombination events confirmed by PCR method
M: marker; 1~11: the random selected recombinants; CK: CDS-1.

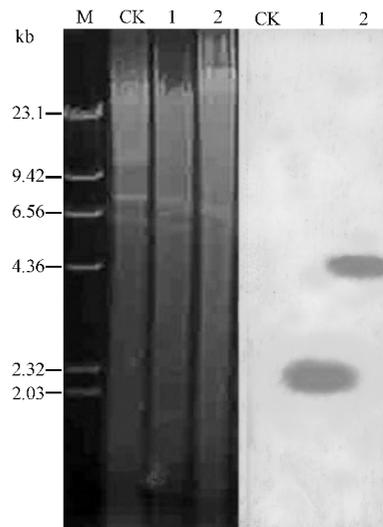


图 3 同源重组事件的 Southern 杂交验证

Fig. 3 Homologous recombination events confirmed by Southern hybridization of total DNA of recombinants
M: marker; CK: CDS-1; 1: CDS-*mpd*; 2: CDS-2*mpd*.

2.4 基因工程菌的遗传稳定性

将基因工程菌在不含抗性的 1/3 LB 平板上连

续划线传代 20 次,分别转接培养至稳定期(OD 值一致),测定细胞破碎液 MPH 酶活,发现降解 MP 的性状稳定,而且水解酶酶活保持稳定高效(如图 4)。

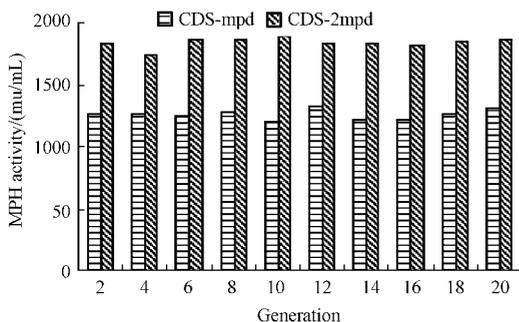


图 4 工程菌不同传代次数时 MPH 酶活

Fig. 4 MPH activity of GEMs at different generations

2.5 基因工程菌 MPH 在不同生长时期的表达

0.5%的接种量将 CDS-mpd、CDS-2mpd 和 DLL-1 接种于各自培养基中,分别在 16h、36h 和 56h 取样,测上清和细胞破碎液和细胞壁 MPH 酶活,并比较细胞破碎液酶的比活(如图 5、6)。

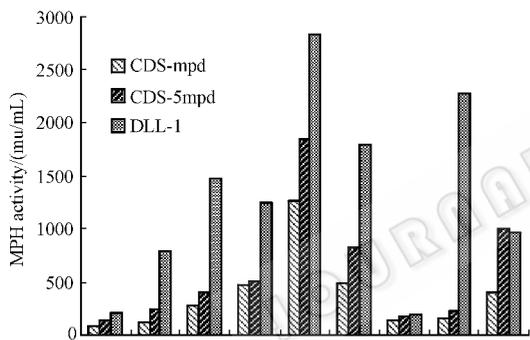


图 5 工程菌与 DLL-1 不同生长时间不同组分的酶活

Fig. 5 MPH activities of GEMs and DLL-1 in different parts and phases

1: supernatant (16h); 2: supernatant (36h); 3: supernatant (56h); 4: cell lysate (16h); 5: cell lysate (36h); 6: cell lysate (56h); 7: cell wall (16h); 8: cell wall (36h); 9: cell wall (56h)。

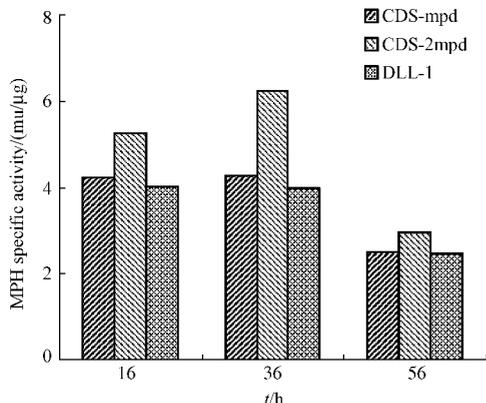


图 6 工程菌与 DLL-1 细胞破碎液酶的比活

Fig. 6 Specific activities in cell lysate of GEMs and DLL-1 in different phases

从图 5 中可以看出工程菌细胞破碎液中酶活最高,并且在细胞生长稳定期(36h)酶活达到最大,表明 MPH 在稳定期的表达量最高。CDS-2mpd 在各个时期、不同组分的 MPH 酶活均比 CDS-mpd 高,表明染色体上插入 2 个 mpd 基因的降解活性高于 1 个 mpd 基因。MPH 主要以胞内酶的形式存在,在细胞生长后期,一部分 MPH 会分泌到胞外或结合在细胞壁上。由于 DLL-1 生长势强,酶活较高,而工程菌属于 *Sphingomonas* sp., 其生长势较弱,细胞浓度低(为 DLL-1 的 1/2 左右),因此决定了酶活较 DLL-1 低。然而工程菌细胞破碎液酶的比活却不比 DLL-1 低(图 6),尤其是 CDS-2mpd 酶的比活明显高于 DLL-1,最高达到 6.22mu/μg,表明单位蛋白中 MPH 含量高于 DLL-1,尤其在生长前期。我们推测工程菌中 mpd 基因可能受 *rrn* 转录的影响维持较高的转录与表达水平^[25]。

2.6 工程菌与出发菌株生长的比较以及对 MP 和 咪喃丹的降解

将培养至对数期的野生受体菌 CDS-1、工程菌 CDS-mpd 和 CDS-2mpd 分别以 1% 接种于含有 100 μg/mL 咪喃丹和 MP 的 1/3 LB 培养基中培养,间隔取样分别检测菌体 OD₆₀₀ 值以及咪喃丹和 PNP 的含量,结果见图 7。从图中可以看出受体菌 CDS-1 不能降解 MP,几乎检测不到 PNP。工程菌与受体菌在 1/3 LB 培养基中的生长和降解情况基本一致,表明 mpd 基因插入到 *rrn* 位点对受体菌的生长速率与原始降解能力没有显著影响。工程菌 CDS-mpd 和 CDS-2mpd 菌能快速(1~2h 内)水解 MP 成 PNP,随着 MP 的降解,PNP 的含量逐渐增加。而咪喃丹前期降解较慢,随着工程菌的生长,咪喃丹在 30h 时被完全降解。

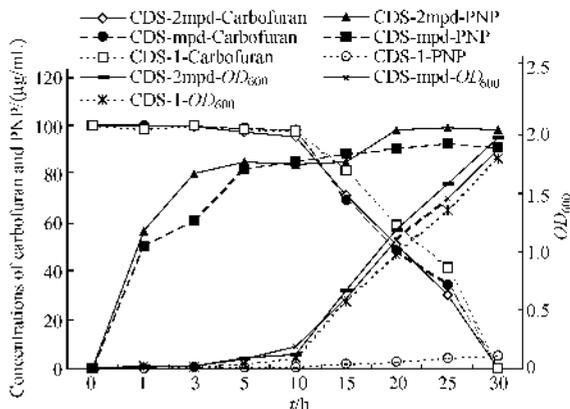


图 7 CDS-1 和工程菌的生长与两种农药的降解

Fig. 7 Growth and pesticides degradation of CDS-1 and GEMs

3 讨论

构建农药降解谱广的多功能基因工程菌进行生物修复是解决农药污染的有效途径之一,然而,构建遗传稳定、符合环境释放要求的基因工程菌是一个难点。本文选择呋喃丹降解菌的 16S rDNA 为同源重组位点稳定高效地表达外源 *mpd* 基因,构建的基因工程菌株已经获得国家农业转基因生物安全管理委员会批准在江苏省进行环境释放的中间试验(农基安办字 2003-T285)。16S rDNA 一般以多拷贝形式存在,为同源重组提供更多的几率。前人已有研究结果表明 rRNA 合成存在反馈调节,当 rDNA 的拷贝数减少或增加,其余的 rDNA 的转录会相应调节,最终保持 rRNA 总量的平衡,因此,一个 rDNA 的失活也不会对受体菌的生长造成显著影响(见图 7),更不会使受体菌致死。另外, rDNA 可以通过通用引物扩增简便易得,省去了克隆非必需基因的烦琐工作,这对遗传背景不清楚的野生型受体菌尤为重要。16S rRNA 在细菌的各生长周期都要合成,因此其编码基因在各个时期都在转录,外源基因插入到这一位点受 *rrn* 中启动子的影响其转录与表达水平也会相应较高(图 6)。因此,16S rDNA 是一类比较理想的整合位点。

为了获得不带抗性标记的工程菌株,必须筛选双交换子,如果用抗性基因作为负筛选标记,必须逐个验证是否丢失抗性,工作烦琐而容易出现假阳性。我们用 *sacB* 基因作为正筛选标记,由于只要在蔗糖上生长的细菌即为丢失抗性的双交换子,工作简便可靠,而且用双拷贝的 *sacB* 基因,增加对蔗糖的敏感性,筛选到的菌落 100% 为二次交换重组子。

将同源重组载体转入受体菌是发生同源重组的第一步,也是影响同源重组效率的主要因素。由于本实验中所选择的 *Sphingomonas* 菌产大量胞外多聚化合物(多糖),而且其细胞壁结构特殊^[26],加上 *Sphingomonas* 菌为寡营养型细菌生长较慢,易受污染,其生长易受其它菌的抑制,而且电转化感受态制备技术不成熟,我们曾尝试用普通转化、电转化、三亲结合等方法均未能获得成功,原因是同源重组载体转入 *Sphingomonas* sp. 菌中的效率太低,这成为同源重组成功的重要制约因素。我们应用二亲结合的方法,提高转移效率,并在同源载体上引入双重抗性加大筛选压力,最终才获得了成功,因此,在进行同源重组时同源重组载体转入受体菌中的效率也应考虑。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Sudip KS, Om VS, Rakesh KJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnol*, 2002, **20**: 243 ~ 248
- [2] Home I, Sutherland TD, Harcourt RL *et al.* Identification of an *opd*(organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3371 ~ 3376
- [3] Pieper DH, Reineke W. Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11**: 262 ~ 270
- [4] Walter M, Philip CK. Degradation of pesticides by microorganisms and the potential for genetic manipulation. *Crop Protection*, 1991, **10**: 334 ~ 346
- [5] Condon C, Liveris D, Squires C *et al.* rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 4152 ~ 4156
- [6] Pisabarro A, Correia A, Martin JF. Characterization of the *rrnB* operon of the plant pathogen *Rhodococcus fascians* and targeted integrations of exogenous genes at *rrn* loci. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **6**: 1276 ~ 1282
- [7] Rossolini GM, Riccio ML, Gallo E *et al.* *Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination. *Gene*, 1992, **119**(1): 75 ~ 81
- [8] Amador E, Martin JF, Castro JM. A *Brevibacterium lactofermentum* 16S rRNA gene used as target site for homologous recombination. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **185**(2): 199 ~ 204
- [9] Beatriz RD, Joaquin VMS. Electrotransformation of the human pathogenic fungus *Scedosporium prolificans* mediated by repetitive rDNA sequences. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999, **25**: 275 ~ 282
- [10] Takashi T, Syoyo N, Hirokazu K. Efficient integrative transformation of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* mediated by the repetitive rDNA sequences. *Gene*, 1990, **90**: 207 ~ 214
- [11] Teresa S L, Jacobus K, Annemarie EV *et al.* High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene*, 1989, **79**: 199 ~ 206
- [12] Liu X(刘智), Hong X(洪青), Xu JH(徐剑宏) *et al.* Cloning, analysis and fusion expression of methyl parathion hydrolase. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 2003, **30**(11): 1020 ~ 1026
- [13] Cui ZL, Li SP, Fu GP. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 4922 ~ 4925
- [14] Wu J(武俊), Xu JH(徐剑宏), Hong X(洪青) *et al.* Isolation of a carbofuran degrading bacterium (CDS-1) and its characterization. *Acta Scientiae Circumstantiae*(环境科学学报), 2004, **24**(2): 338 ~ 342
- [15] Liu X(刘智), Sun JC(孙建春), Li SP(李顺鹏). Isolation, identification and characters of methyl parathion degrading bacterium. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报),

- [16] Blomfield IC , Vaughn V , Rest RF *et al.* Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol Microbiol* , 1991 , **5** (6): 1447 - 1457
- [17] Metcalf WW , Jiang WH , Daniels LL *et al.* Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying *lacZ* for cloning , mutagenesis , and allele replacement in bacteria. *Plasmid* , 1996 , **35** : 1 - 13
- [18] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [19] Wilson K H , Blitchington RB , Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* , 1990 , **28** : 1942 - 1946
- [20] Hynes MF , Quandt J , O'Connell MP *et al.* Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Gene* , 1989 , **78** : 111 - 120
- [21] Oswald W , Tonpitak W , Ohrt G *et al.* A single-step transconjugation system for the introduction of unmarked deletions into *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using a sucrose sensitivity marker. *FEMS Microbiol Lett* , 1999 , **179** (1): 153 - 160
- [22] Asai T , Condon CN , Voulgaris J *et al.* Construction and initial characterization of *Escherichia coli* strains with few or no intact chromosomal rna operons. *J Bacteriol* , 1999 , **181** (12): 3803 - 3809
- [23] Condon C , French S , Squires C *et al.* Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *The EMBO Journal* , 1993 , **12** : 4305 - 4315
- [24] Justina V , Sarah F , Richard LG *et al.* Increased rrm gene dosage causes intermittent transcription of rRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* , 1999 , **181** (14): 4170 - 4175
- [25] Ana M , Jeremy C M , Peter O *et al.* Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania amastigotes*. *Molecular and Biochemical Parasitology* , 2000 , **107** : 251 - 261
- [26] Martins LO , Fialho AM , Rodrigues PL *et al.* Gellan gum production and activity of biosynthetic enzymes in *Sphingomonas paucimobilis* mucoid and non-mucoid variants. *Biotechnol Appl Biochem* , 1996 , **24** : 47 - 54