

构建一种基于双启动子模型的特异性检测镉离子的大肠杆菌传感器

吕攀攀, 肖芳兰, 严锡娟, 卢彬彬, 林炜炜, 许清清, 张珍珍, 王伍, 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

吕攀攀, 肖芳兰, 严锡娟, 等. 构建一种基于双启动子模型的特异性检测镉离子的大肠杆菌传感器. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1601–1611.
Lü PP, Xiao FL, Yan XJ, et al. Detection of cadmium by a double-promoters based *Escherichia coli* biosensor. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1601–1611.

摘 要: 为构建一种能够特异性检测镉离子的大肠杆菌荧光报告菌株, 本研究通过对检测元件模式和荧光蛋白的筛选后, 以蓝色荧光蛋白 *mTagBFP2* 基因作为报告基因, 使用双启动子模式, 构建融合报告载体 *Pmer::merR-m-Pmer::mTagBFP2-pMD19-T*。然后将报告载体转化至 *E. coli* MC4100 菌中, 构建特异性检测镉离子的微生物传感器, 并对此微生物传感器进行了最佳培养基、起始诱导浓度和时间、最适检测范围等相关参数的确定, 以及对特异性进行了测定。研究表明, 此微生物传感器检测镉离子背景信号低, 选定起始菌液浓度为 $OD_{600}=0.1$, 于 IHMM 培养基中诱导 2 h 为最佳检测条件, 检测镉离子线性浓度范围为 0.1–75 $\mu\text{mol/L}$, 并且只对 Cd^{2+} 响应, 特异性较高。因此, 本研究成功构建了能够特异性检测镉离子的生物传感器, 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: 微生物传感器, 镉离子检测, 双启动子, 蓝色荧光蛋白

Received: April 9, 2015; **Accepted:** June 18, 2015

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA06A514), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY13B070012).

Corresponding authors: Jianxin Lü. Tel/Fax: +86-577-86689805; E-mail: jxlu313@163.com

Wu Wang. Tel: +86-577-86699385; E-mail: wayne55555@163.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA06A514), 浙江省自然科学基金 (No. LY13B070012) 资助。

Detection of cadmium by a double-promoters based *Escherichia coli* biosensor

Panpan Lü, Fanglan Xiao, Xijuan Yan, Binbin Lu, Weiwei Lin, Qingqing Xu, Zhenzhen Zhang, Wu Wang, 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: To detect cadmium ions, we constructed a specific microbial sensor and screened detecting cassettes and different fluorescence proteins. Blue fluorescence protein *mTagBFP2* was selected as a reporter and a double-promoters model was used in the construction of the fusion reporter vector *Pmer::merR-m-Pmer::mTagBFP2*-pMD19-T. The reporter vector was then transformed into *Escherichia coli* MC4100 wild type strain. The medium, incubation time, initial density for induction, and the optimal detection range were determined. The specificity of the biosensor was also checked. The biosensor responded specifically to cadmium ions with low background, and the linear concentration range detection ranged from 0.1 to 75 $\mu\text{mol/L}$ at the initial $OD_{600}=0.1$ with 2 h incubation in IHMM medium. Thus we successfully constructed a specific biosensor to detect cadmium ions and provided useful strategies for development and optimization of microbial sensors to detect heavy metals.

Keywords: microbial sensor, cadmium detection, double-promoters, blue fluorescence protein

重金属污染的潜在危害已引起国内外学者的广泛关注。其中镉 (Cadmium) 具有高毒性、难降解、易残留等特点, 并且具有致癌、致畸和致突变作用。镉在体内的生物半衰期长达 10–30 年, 为目前已知最易在体内蓄积的毒物之一。镉作为环境中重要的污染物, 主要来源于锌、铜、铅矿的冶炼, 电镀、蓄电池、合金、油漆和塑料等工业生产^[1]。随着工农业的发展, 水体、土壤镉污染日趋加重, 严重威胁人体健康, 因此加强对镉的检测十分必要^[2]。

目前检测水体重金属污染物主要为物理化学方法, 如: 原子吸收分光光度法 (AAS)、电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 等, 这些方法虽然具备高灵敏度、高精度、低检测限, 但是均需要用仪器设备、专业操作人员, 操作复杂、样品分析周期长、不易在基层和现场应

用, 难以实现便捷、快速等要求。20 世纪 70 年代以来, 微生物传感器为环境中重金属的检测提供诸多便利, 但是特异性差、灵敏度不高一直是限制其广泛应用的瓶颈问题, 也是研究人员需要攻克的方向^[3]。

重金属检测元件的构建大多利用微生物本身的重金属耐受操纵子 (Resistant operon), 即事先将重金属诱导的耐受操纵子下游“外排泵”基因替换成能够被检测到的信号分子编码基因, 当外界金属离子与转录调节蛋白结合, 使调节蛋白构象发生改变而从启动子序列上脱落, 解除了对下游基因的转录阻滞作用, 从而启动下游信号分子的表达并被检测。所以影响重金属检测微生物传感器特异性的关键因素主要取决于转录调节蛋白是否特异地与待测重金属结合, 而不结合其他金属。此外, 转录调节

蛋白对下游报告基因的调控严密程度,也是影响传感器灵敏度、线性检测范围的重要因素^[3]。

本研究利用增强的蓝色荧光蛋白作为报告物,采用双启动子模式,将启动子、调节蛋白基因、启动子和蓝色荧光蛋白基因进行基因融合,构建出本底低、特异性高的镉离子检测大肠杆菌报告菌株,同时使用改进的检测培养基,提高了检测灵敏度,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

Escherichia coli MC4100 [F⁻, araD139, Δ(argF-lac), U169, rspL150, relA1, flbB5301, fruA25, deoC1, pstF25], 由本实验室保存。

E. coli DH5α [F⁻, λ⁻, endA1, hsdR17, hsdM⁺, supE44, thi1, recA1, gyrA96, relA1, Δ(argF, lacZYA), U169, φ80d, Δ(lacZ), M15], 由本实验室保存。

1.1.2 质粒

pMD19-T [Amp^r, T-A cloning vector, pUC origin], 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 IHMM 培养基

IHMM (Improved HMM) 培养基是在 HMM 培养基(配方来源于参考文献[4])基础上添加了 20 种天然氨基酸混合水溶液(10 mg/L/种)、维生素 B1 水溶液(5 μg/mL)以及氯化钙溶液(0.1 mol/L)。4℃保存备用。

1.1.4 主要试剂与材料

PCR 扩增试剂 2 × phanta Taq 体系购自南京诺唯赞生物科技有限公司;硫酸镉购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;无缝克隆反应试剂盒购自和元生物技术(上海)有限公司;其他常用试

剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 基因序列和引物设计

调节蛋白基因序列 *merR-m* 由 Hakkila 等^[5]报道的 B_DB10 型突变体 (MerR-m) 氨基酸序列,按照大肠杆菌中偏好使用的密码子优化而来,启动子序列来源于福氏志贺菌 Tn21 转座子汞启动子 *Pmer*。两者基因序列连接构建成镉操纵子 *merR-m-O\P* 后送南京金斯瑞生物有限公司进行合成。荧光蛋白编码基因 *gfpmut2*^[6]、*Venus*^[7]、*mTagBFP2*^[8]和 *DsRed-Express2*^[9]基因根据文献公布的序列,由南京金斯瑞生物有限公司合成获得。设计基因融合引物,具体引物信息见表 1。

1.2.2 构建含有 *gfpmut2* 的单启动子融合报告基因的菌株

以合成的含 *merR-m-O\P* 和 *gfpmut2* 质粒为模板,利用引物 P₁ 和 P₂ 扩增调节基因和启动子 *merR-m::Pmer*, P₃ 和 P₄ 扩增基因 *gfpmut2*, PCR 反应条件: 95℃预变性 5 min; 95℃ 40 s、50℃ 40 s、72℃ 2 min, 共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。反应结束后,电泳胶回收目的基因并分别测浓度,计算 *merR-m::Pmer* 和 *gfpmut2* 加入体积,使其物质的量的比为 1:1。通过交叉 PCR 反应将两片段连接起来,构建融合基因 *merR-m::Pmer::gfpmut2*, 为将两片段先搭起来,在体系中先不加入引物,使用 8 个循环搭起片段,PCR 反应条件: 95℃预变性 3 min, 95℃ 40 s、62℃ 40 s-1℃、72℃ 2 min, 共 8 个循环,最后 72℃延伸 3 min, 反应结束后,以其 PCR 产物为模板,再加入引物和 2 × phanta Taq 体系,进行 PCR 反应,条件同未加引物,共 35 个循环。电泳胶回收融合基因,与 pMD19-T simple 载体连接,构建融合报告载体 *merR-m::Pmer::gfpmut2-T*,

表 1 基因融合引物信息

Table 1 Primers of gene fusion

Primer name	Primer sequence (5'-3')
P ₁ (<i>merR-m-F</i>)	CGGCATAGCGGAACCGCCAGCGAAGCA
P ₂ (<i>merR-m-R</i>)	AACTCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATACGTTGGCCCTTTTGAATTTG
P ₃ (<i>gfpmut2-F</i>)	GGGCCAACGTATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGGAGTT
P ₄ (<i>gfpmut2-R</i>)	TTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATC
P ₅ (<i>merR-m-double-F</i>)	ACGTTGGCCCTTTTGAATTTGGATTGG
P ₆ (<i>merR-m-double-R</i>)	TTCCGTACTCATGTACGGAGTCAAGCGATTACGGCATAGCGGAACCGCAGCGAAGC
P ₇ (<i>gfpmut2-double-F</i>)	GCCGTGAATCGCTTGACTCCGTACATGAGTACGGAA
P ₈ (<i>Wufeng-pMD-F</i>)	TGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAA
P ₉ (<i>Wufeng-pMD-R</i>)	ACGTTGGCCCTTTTGAATTTGGATTGGATAGCGTAACCTTACTTCCGTACTCATGTA
P ₁₀ (<i>Wufeng-BFP2-F</i>)	AAATTCAAAAAGGGCCAACGTATGAGCGAACTGATCAAAGAAAACATGCA
P ₁₁ (<i>Wufeng-BFP2-R</i>)	TTATTTGTATAGTTCATCCATTAAATTCAGTTTGTGACCCAGTTTGCTCGGCAGGT
P ₁₂ (<i>Wufeng-DsRed-Express2-F</i>)	AAATTCAAAAAGGGCCAACGTATGGACTCAACCGAAAATGTTATCAAA
P ₁₃ (<i>Wufeng-DsRed-Express2-R</i>)	TTATTTGTATAGTTCATCCATTATTGAAACAGGTGATGGCGAGCTTCCGCACGTT
P ₁₄ (<i>Wufeng-VENUS-F</i>)	AAATTCAAAAAGGGCCAACGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
P ₁₅ (<i>Wufeng-VENUS-R</i>)	TTATTTGTATAGTTCATCCATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGAT

转化入感受态 *E. coli* DH5 α , 进行菌落 PCR 后挑取阳性克隆, 测序分析 (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取质粒 *merR-m::Pmer::gfpmut2-T* 热击转化至野生型菌 *E. coli* MC4100 中, 报告菌株命名为 MPG。

1.2.3 构建含有 *gfpmut2* 的双启动子融合报告基因的菌株

以质粒 *merR-m::Pmer::gfpmut2-T* 为模板, 用引物 P₅ 和 P₆ 扩增单片段 *merR-m::Pmer*, 以及 P₇ 和 P₄ 扩增单片段 *Pmer::gfpmut2*。两片段胶回收后进行交叉反应, 用引物 P₅ 和 P₄ 扩增融合基因 *Pmer::merR-m-Pmer::gfpmut2*。最终完成报告载体 *Pmer::merR-m-Pmer::gfpmut2-T* 的构建。并将报告载体热击转化至野生型菌 *E. coli*

MC4100 中, 命名为 PMPG。

1.2.4 构建含有不同颜色荧光基因的双启动子融合报告基因的菌株

以质粒 *Pmer::merR-m-Pmer::gfpmut2-T* 为模板。用引物 P₈ 和 P₉ 扩增线性化载体; 用引物 P₁₀ 和 P₁₁ 扩增 *mTagBFP2*; 用引物 P₁₂ 和 P₁₃ 扩增 *DsRed-Express2* 以及引物 P₁₄ 和 P₁₅ 扩增 *Venus* 基因。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 40 s、50 °C 40 s、72 °C 6 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。电泳回收目的片段后, 根据和元生物技术有限公司无缝克隆反应试剂盒说明书操作, 构建融合报告载体 *Pmer::merR-m-Pmer::mTagBFP2-T*、*Pmer::merR-m-Pmer::DsRed-T* 和 *Pmer::merR-m-Pmer::Venus-T* 转化

至感受态 *E. coli* DH5 α , 挑取阳性克隆鉴定并进行测序分析, 测序正确的克隆提取质粒, 分别转化至 *E. coli* MC4100 中, 分别命名为 PMPB、PMPR、PMPV, 完成双启动子融合报告基因的不同颜色荧光蛋白基因的替换。

1.2.5 检测元件模式的筛选

吸取一定体积的 MPG、PMPG 过夜菌种子液接种至新鲜 50 mL LB 培养基中, 使起始 OD_{600} 值约为 0.02, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 扩大培养至 OD_{600} 值为 0.2 左右, 分装 (1 mL/管), 各做 3 个平行管, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养, 5 h 后进行样品处理, 8 000 r/min 水平离心 6 min, 弃上清, 收获的菌体重悬于 1 mL DB 中, 并将其 OD_{600} 值调至 0.2 左右, 分别测量其稀释液荧光值与 OD_{600} 值。实验结果为 3 次平行实验的 $\bar{x} \pm s$ 。

1.2.6 荧光蛋白和培养基的筛选

吸取适量 PMPG、PMPB、PMPR 和 PMPV 过夜菌液加入到 50 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 使起始菌液 OD_{600} 值为 0.02, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 扩大培养至 OD_{600} 为 0.2 左右, 分装 (0.5 mL/管), 加入不同浓度的 Cd^{2+} 溶液至各管菌液, 使其终浓度分别为 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 5.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-4} 、 2.0×10^{-4} 、 4.0×10^{-4} mol/L, 另加等体积无菌 MilliQ 水作为阴性对照, 每种浓度各做 3 个平行管。将以上菌液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养 5 h 后, 处理同步骤 1.2.5, 完成荧光蛋白的筛选实验。PMPG 以激发光波长为 481 nm, 发射光波长为 510 nm; PMPV 以激发光波长为 502 nm, 发射光波长为 530 nm; PMPB 以激发光波长为 394 nm, 发射光波长为 456 nm; PMPR 以激发光波长为 548 nm, 发射光波长为 581 nm。

另吸取一定体积的 PMPB 过夜菌种子液接种至新鲜 LB 和 IHMM 培养基中, 使起始 OD_{600} 值约为 0.02, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 扩大培养至菌液 OD_{600} 约为 0.2, 分装 (1 mL/管), 加入等体积不同浓度的 Cd^{2+} 溶液至各管菌液, 使其终浓度分别为 1.0×10^{-9} 、 1.0×10^{-8} 、 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-3} mol/L, 另加等体积无菌 MilliQ 水作为阴性对照, 每种浓度各做 3 个平行管。37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡孵育 2 h 后处理同步骤 1.2.5, 完成培养基的筛选实验。

1.2.7 传感器对镉离子起始诱导浓度和时间依赖性实验

吸取一定体积的 PMPB 过夜菌种子液接种至新鲜 50 mL IHMM 培养基中, 使起始 OD_{600} 值约为 0.02, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 扩大培养至 OD_{600} 值为 0.1、0.2、0.3, 加入镉离子溶液使其终浓度均为 50 $\mu\text{mol/L}$, 另加等体积无菌 MilliQ 水作为阴性对照, 各做 3 个平行管。将以上菌液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养, 分别于 0、1、2、3、4、5 h 时间点收集菌液, 进行样品处理, 同步骤 1.2.5。

1.2.8 传感器对镉离子的特异性实验

吸取一定体积的 PMPB 过夜菌种子液接种至新鲜 50 mL IHMM 培养基中, 使起始 OD_{600} 值约为 0.02, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 扩大培养至 OD_{600} 值为 0.1 左右, 分装至试管 (1 mL/管), 分别加入 20 μL 不同金属离子 (Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+}) 使其终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 另加等体积无菌 MilliQ 水作为阴性对照, 各做 3 个平行管。将以上菌液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养 2 h 后, 处理同步骤 1.2.5。

1.2.9 传感器对镉离子浓度依赖性实验以及镉离子的检测线性范围的确定

吸取一定体积的 PMPB 过夜菌种子液接种至新鲜 50 mL IHMM 培养基中,使起始 OD_{600} 值约为 0.02, 37 °C、250 r/min 扩大培养至 OD_{600} 值为 0.1 左右,分装 (1 mL/管),加入等体积不同浓度的镉离子溶液至各管菌液至终浓度分别为 0 、 1.0×10^{-8} 、 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-6} 、 5.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 5.0×10^{-5} 、 7.5×10^{-5} mol/L,各做 3 个平行管。将以上菌液于 37 °C、250 r/min 振荡培养 2 h 后,进行样品处理,处理同步步骤 1.2.5,完成传感器对镉离子浓度依赖性实验以及镉离子的检测线性范围的确定。

2 结果与分析

2.1 融合基因、报告载体以及报告菌株的构建

测序结果显示成功构建了单、双启动子不同颜色荧光蛋白融合报告菌株。构建的含有 *gfpmut2* 的单启动子融合报告基因菌株 MPG, 包含有 500 bp 的调节基因和启动子

merR-m::Pmer 以及 720 bp 的绿色荧光蛋白基因 *gfpmut2*。构建的含有 *gfpmut2* 的双启动子融合报告基因菌株 PMPG, 包含有 500 bp 的调节基因和启动子 *merR-m::Pmer* 以及 780 bp 的绿色荧光蛋白基因和启动子 *Pmer::gfpmut2*。PMPV/PMPR/PMPB 的构建则是对 PMPG 中 *gfpmut2* 基因的替换,分别替换为 720 bp 的黄色 *Venus* 基因、678 bp 的红色 *DsRed-Express2* 基因和 702 bp 的蓝色 *mTagBFP2* 基因。条带大小均与理论值吻合,结果表明 5 种单、双启动子不同颜色荧光蛋白融合报告菌株均构建成功。

2.2 检测元件模式的筛选

由于含有单启动子检测报告元件的菌株,能够同时启动调节蛋白基因和荧光蛋白基因的表达。在无金属诱导的情况下,具有较高的背景信号。而双启动子检测元件含有两个独立的启动子,各自分别负责启动调节蛋白基因和荧光蛋白基因的表达,能够有效降低本底值。如图 1 所示,单启动子报告菌株的本底值较高,双启动子报告菌株本底较低,相比之下降低

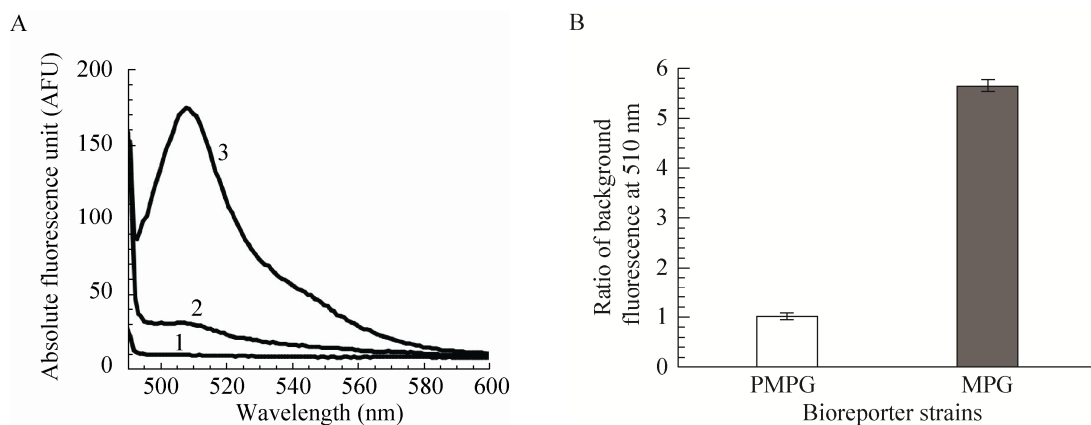


图 1 单双启动子荧光本底强度对比图

Fig. 1 Comparison of background intensity between single and double promoters report strains. (A) Fluorescence scanning. 1: background intensity of blank buffer DB; 2: background intensity of double promoters report strain PMPG; 3: background intensity of single promoter report strain MPG. (B) Histogram comparison. Grey column: single promoter report strain MPG; white column: double promoters report strain PMPG.

80%以上。因此,双启动子报告菌株具备本底值低的优点,有利于提高检测灵敏度。

2.3 荧光蛋白和培养基的筛选

不同颜色荧光蛋白具有不同的荧光强度,为了提高目的菌株在相同条件下的荧光强度,从而提高检测的信噪比。因此部分构建了含有蓝色荧光蛋白基因 *mTagBFP2*、红色荧光蛋白基因 *DsRed-Express2* 和黄色荧光蛋白基因 *Venus* 的双启动子融合报告菌株,以寻找理想的荧光蛋白作为传感器的报告物。如图 2A 所示,上述构建菌株中不同颜色荧光蛋白信号强度对镉离子的剂量依赖反应曲线中可以看出 PMPB 相对于其他 3 种颜色荧光蛋白作为报告物的菌株,具有荧光信号强和信噪比高的特性,可以有效提高报告菌株对 Cd^{2+} 检测的响应度,表现为在

相同浓度下 PMPB 的峰值更高,说明此菌株具备作为后续实验菌株的条件。

此外,传感器的检测准确度往往受到培养基的影响,所以我们对培养基的选择进行了摸索,分别在 IHMM 培养基和 LB 培养基进行了浓度依赖的反应实验。如图 2B 所示,在相同的实验条件下,PMPB 在 IHMM 培养基中比在 LB 培养基中具有更高的灵敏度。

2.4 传感器对镉离子起始诱导菌液浓度和时间依赖性荧光产生的优化实验

荧光蛋白发出荧光信号需要经过一系列的蛋白表达和荧光成熟过程,所以有必要对传感器的最佳孵育时间和起始诱导菌液浓度进行摸索。用浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 诱导此生物传感器,测其不同诱导菌液浓度和不用时间点的

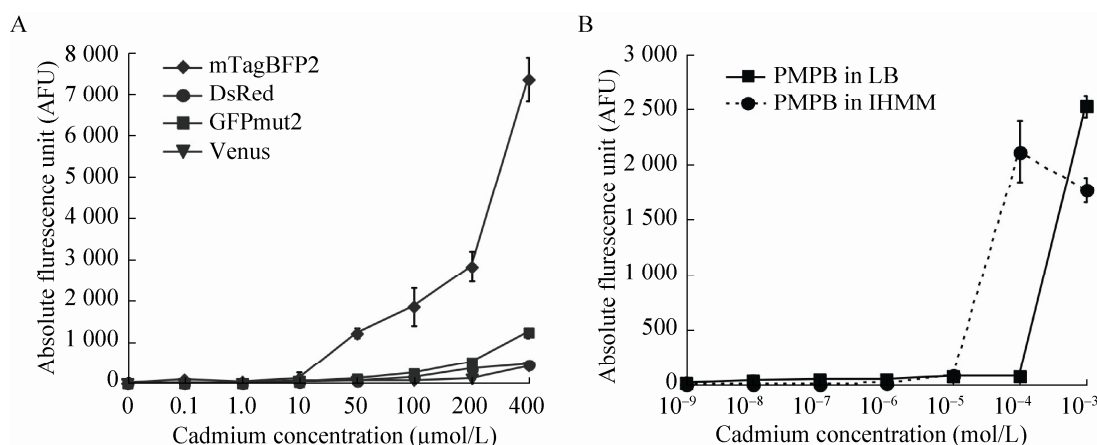


图 2 筛选荧光蛋白和培养基曲线图

Fig. 2 Screening of report strains and culture mediums. (A) Comparison of report strains with different fluorescence proteins. The *E. coli* bacteria (PMPB/PMPD/PMPG/PMPV strain) containing the *mTagBFP2* (rhombus solid) or the *DsRed-Express2* (circle solid) or *GFPmut2* (square solid) or the *Venus* (triangle solid) were grown in LB medium containing various concentrations of cadmium ions. The mean values of three independently performed experiments are reported. Error bars correspond to the standard deviations. (B) Comparison of report strain PMPB in different mediums. The *E. coli* bacteria (PMPB strain) containing the *mTagBFP2* was grown in LB medium (square solid) or IHMM medium (circle solid) containing various concentrations of cadmium ions. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements.

荧光表达量,如图 3 所示,以诱导时间为横坐标,AFU 值为纵坐标作图,并进行曲线拟合。结果表明:当起始诱导 OD_{600} 约 0.1 时,在相同的诱导时间条件下,荧光蛋白的表达量明显高于其他诱导浓度。当诱导时间为 2 h 时,其荧光强度达到最高,之后在一系列因素的影响下,荧光强度逐渐减弱。所以我们选用当菌液 OD_{600} 约 0.1 时,镉诱导 2 h 作为含有蓝色荧光蛋白的双启动子报告菌株的最佳培养条件。

2.5 确定传感器检测镉离子的线性范围

荧光蛋白的表达量不仅与细菌培养时间有关,还与镉离子浓度的相关。当未添加外源性镉离子时,报告质粒中 *merR-m* 基因编码产生的 MerR-m 调节蛋白结合于 *Pmer* 序列区,阻止 *mTagBFP2* 表达;当外源性 Cd^{2+} 进入大肠杆菌胞内后,MerR-m 蛋白与 Cd^{2+} 特异性结合使其空

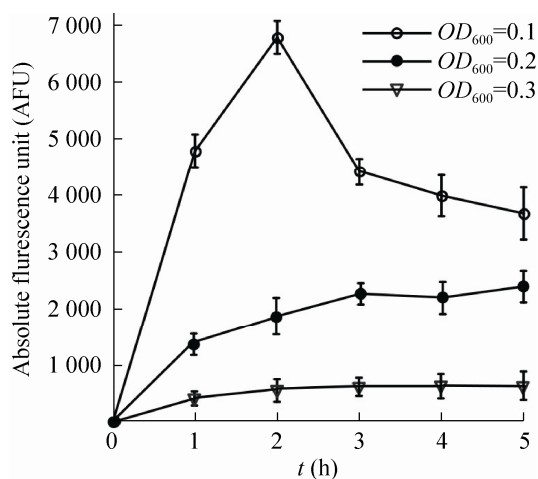


图 3 起始诱导菌液浓度和孵育时间的优化

Fig. 3 Optimization of incubation time and initial OD_{600} for induction. The effect of induction time and initial OD_{600} in IHMM medium after various time incubation with 50 $\mu\text{mol/L}$ cadmium.

间构象发生改变,从 *Pmer* 序列上脱落,启动 *mTagBFP2* 报告基因的表达,产生蓝色荧光蛋白,并且 mTagBFP2 蛋白的表达量与 Cd^{2+} 浓度呈剂量依赖关系。如图 4 所示,以 Cd^{2+} 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 2 h 诱导后,回归方程为 $y = -604.41 + 182.79x$,相关系数 R^2 为 0.982 7,相关性强,曲线拟合度高,此时检测线性范围为 $1.0 \times 10^{-7} - 7.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

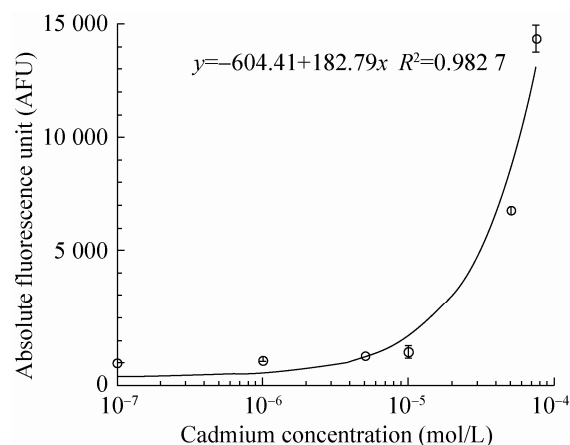


图 4 报告菌株检测镉离子的线性范围曲线图

Fig. 4 The linear range of report strain detecting cadmium ions. After 2 h incubation with various concentration of cadmium ions in IHMM medium, it shows a linear fit of the concentration range between $1 \times 10^{-7} - 7.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

2.6 传感器对镉离子的特异性实验

传感器对待测物质的单一性检测是其实际应用的前提,为验证我们构建的传感器是否具有较高的特异性,我们加入等体积不同金属离子 (Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+}) 对构建的镉离子微生物传感器进行诱导。将 Cd^{2+} 的 AFU 值定义为

100%，并以其他各金属离子的 AFU 值与 Cd^{2+} AFU 值的百分比表示启动子对各金属离子选择的特异性。结果表明 (图 5)，浓度为 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 对镉离子传感器的荧光表达干扰比较弱 (均小于 20%)，说明在此条件下，报告菌株对镉离子具有较好的特异性。

3 讨论

微生物传感器因其简便、快速、低廉、易推广等优点，将必然成为今后的发展趋势。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镉离子浓度，操作简便且稳定性好，是传统检测方法的一个有力补充。

近 20 多年来，研发理想的镉离子检测微生物传感器一直处于探索之中^[10-13]，然而均存在特异性差的瓶颈问题。Tao 等^[13]通过分别截

断 *cadR* 基因 (镉抗性操纵子调节基因) C 末端 10、20 个氨基酸而构建的报告菌株 COG-TC10 和 COG-TC21，其特异性虽然相对于野生型有所提高，但对 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 仍有较强的响应，特异性不够高。王妍^[14]构建的携带 *PcadA-gfp* 质粒的枯草芽胞菌株，证明其对镉离子具备较好的特异性，但仅在 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的低浓度条件下进行了初步比较，并未给出较高浓度下的特异性实验数据。本研究对镉检测传感器进行了优化性的探索，分别对检测元件模式、荧光蛋白和培养基进行了优化。

由于大肠杆菌中缺少能够特异响应镉的基因^[15]，利用大肠杆菌自身的镉调控操纵子无法构建出特异性的检测元件^[16]。如前言所述，影响微生物传感器检测特异性的主要取决于转录调节蛋白是否单一性地与待测重金属结合，与启动子序列关系不大。本研究使用的启动子序列来自于福氏志贺菌 Tn21 转座子中的汞启动子 *Pmer*，但是采用 Hakkila 等^[5]筛选得到的 B_DB10 型突变体 (MerR-m) 作为镉检测元件中的调节蛋白，它是由汞离子调节蛋白 MerR 利用定点突变技术衍生而来，丢失了对汞离子的相应能力，却能特异性识别镉离子，显著提高了传感器的特异性 (图 5)。

传统的报告元件大多是基于单启动子模式的，即调节蛋白编码基因和报告基因受到同一个启动子的调控。在外源性镉离子加入之前的背景条件下，镉调节蛋白基因 *merR-m* 和荧光报告基因 *gfpmut2* 都位于单一启动子 *Pmer* 的下游，所以 *Pmer* 能够同时启动 *merR-m* 和 *gfpmut2* 的表达，使得传感器在无镉离子诱导时也有较多的绿色荧光生成，产生较高的背景信

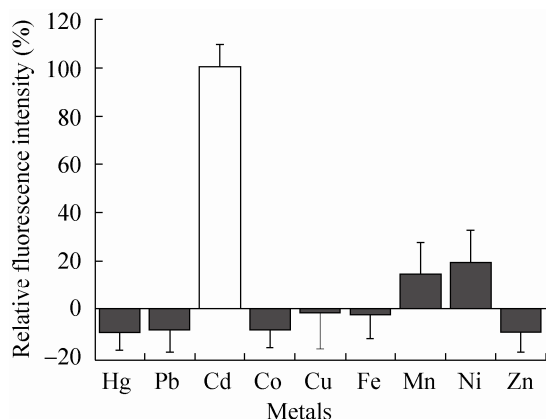


图 5 报告菌株的特异性实验

Fig. 5 Specificity test of report strain. Fluorescence measurement of *E. coli* cells containing the cadmium induced mTagBFP2 expression plasmid with concentrations of $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ each metal ions. All of the cell numbers were normalized to $OD_{600}=0.2$ before the tests.

号。本研究同时构建了双启动子模型元件,即将 *merR-m* 和 *gfpmut2* 分别构建到两个 *Pmer* 下游。在背景环境下,前面一个启动子 *Pmer* 启动表达 MerR-m 蛋白后,此调节蛋白能够和后面的 *Pmer* 启动子结合,使 RNA 聚合酶在转录 *merR-m* 基因的同时,不能继续对 *gfpmut2* 基因进行转录,能够明显降低检测本底值。事实上,Wei 等^[17]也采用了双启动子模式报告菌株用于检测 Pb^{2+} ,但并没有在文中详细说明采用双启动子模型的理由。本文采用双启动子模型后,其对镉离子的检测本底值比单启动子模型降低了 80% 以上,具有显著优势。

目前微生物传感器的生长培养和检测大多是在 LB 培养基中完成,然而 LB 培养基成分复杂,富含蛋白和各种金属螯合物质,样品中的待检测金属十分容易与这些物质非特异性结合,降低了样品中的可测金属含量,影响了检测的准确性。HMM 培养基 (Heavy metal MOPS medium)^[4]由于成分纯净、不易与金属形成螯合物,从而增加了检测的准确性。本研究则对 HMM 培养基作了改良,另外添加了 20 种天然氨基酸、维生素 B1 和氯化钙,能够明显缩短大肠杆菌的培养时间和荧光蛋白的表达时间。结果显示,传感器于 IHMM 培养基中检测镉的灵敏度明显高于 LB 培养基。此外,本研究也对不同的荧光蛋白进行了摸索,本研究结果显示蓝色荧光蛋白作为报告基因,相对于红色、绿色和黄色荧光蛋白,在相同的条件下具有更强的荧光值,因此被选作目的报告物。

本研究以蓝色荧光蛋白为报告物的双启动子大肠杆菌检测传感器在改良的 HMM 培养基中进行培养和检测。结果显示,此报告菌株起始孵育浊度在报告菌株 OD_{600} 值为 0.1 时,2 h

即能达到较高荧光蛋白表达量,对镉离子呈现较好的选择性 (图 5),检测线性范围为 $1.0 \times 10^{-7} - 7.5 \times 10^{-5}$ mol/L (图 4),线性相关系数接近 1 (图 4)。且该方法具有特异、灵敏、快速、廉价、稳定及能定量检测水体中镉离子浓度等特点。因此呈现出了很好的应用前景。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;另外,野生型大肠杆菌在自然进化过程中由于长期处于高重金属离子的环境中,形成了一套耐受重金属的保护机制,表达“外排泵”基因以泵出重金属,导致野生型大肠杆菌对重金属检测的敏感度不高。因此,我们可以采用基因敲除技术,逐一敲除影响大肠杆菌对重金属敏感性的耐受基因,如选择性针对镉、铅的耐受基因 *zntA*、*zntR* 等。*zntA* 可以将胞质内锌、镉、铅离子通过消耗 ATP 的方式泵出,从而维持细胞内 3 种金属在一个较低浓度。敲除此类耐受基因,将显著提高细胞内对应金属的浓度,以提高检测灵敏度,从而缩短检测时间等^[18-19],以推进微生物传感器在环境监测领域的应用。

REFERENCES

- [1] Ramos L, Ferná'ndez MA, Gonzá'lez MJ, et al. Heavy metal pollution in water, sediments, and earthworms from the Ebro River, Spain. Bull Environ Contam Toxicol, 1999, 63(3): 305-311.
- [2] Liu Y. Research progress on health and hazards of cadmium. Chin J Urban Rural Indust Hygiene, 2003, 4: 12-13 (in Chinese). 刘毅. 镉的健康危害及其研究进展. 中国城乡企业卫生, 2003, 4: 12-13.
- [3] Hynninen A, Virta M. Whole-cell bioreporters for

- the detection of bioavailable metals. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2010, 118: 31–63.
- [4] Robert A, Larossa, Dana R, et al. Interaction K-12 of lead nitrate and cadmium chloride with *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* global regulatory mutants. *J Indust Microbiol*, 1995, 14(3/4): 252–258.
- [5] Hakkila KM, Nikander PA, Junttila SM, et al. Cd-specific mutants of mercury-sensing regulatory protein MerR, generated by directed evolution. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(17): 6215–6224.
- [6] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996(173): 33–38.
- [7] Nagai T, Ibata K, Park ES, et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(1): 87–90.
- [8] Subach OM, Cranfill PJ, Davidson MW, et al. An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e28674.
- [9] Strack RL, Hein B, Bhattacharyya D, et al. A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *Biochemistry*, 2009, 48(35): 8279–8281.
- [10] Riether K, Dollard MA, Billard P. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli* *zntAp::lux* and *copAp::lux*-based biosensors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(5/6): 712–716.
- [11] Biran I, Babai R, Levkov K, et al. Online and in situ monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium. *Environ Microbiol*, 2000, 2(3): 285–290.
- [12] Ivask A, Rõlova T, Kahru A. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. *BMC Biotechnol*, 2009, 9(1): 1–15.
- [13] Tao HC, Peng ZW, Li PS, et al. Optimizing cadmium and mercury specificity of CadR-based *E. coli* biosensors by redesign of CadR. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(8): 1253–1258.
- [14] Wang Y. Construction and preliminary application of bio-engineered bacteria for detection of environmental cadmium[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2008 (in Chinese).
王妍. 重金属镉生物检测工程菌株的构建及应用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [15] Binet MR, Poole RK. Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 2000, 473(1): 67–70.
- [16] Gireesh-Babu P, Chaudhari A. Development of a broad-spectrum fluorescent heavy metal bacterial biosensor. *Mol Biol Reports*, 2012, 39(12): 11225–11229.
- [17] 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.
- [18] Sharma R, Rensing C, Rosen BP, et al. The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000, 275(6): 3873–3878.
- [19] Brocklehurst KR, Hobman JL, Lawley B, et al. ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1999, 31(3): 893–902.

(本文责编 陈宏宇)