

受水杨酸盐浓度调控的细菌遏制系统

王红萍, 马昱澍

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室生物化学研究室, 上海 200237

摘要: 由于存在基因工程微生物(GEMs)不受控制地在环境中释放的风险, 利用 GEMs 的生物降解能力治理环境污染的方法受到了限制。在大肠杆菌 JM109 中构建了一个受环境污染物调控的细菌遏制系统, 该系统是由杀伤元件和调控元件组成的双质粒体系, 使细菌的存活受环境中水杨酸盐浓度的调控。当培养基含水杨酸盐时, 阻遏蛋白 LacI 合成, 阻止自杀基因 *gef* 表达, 细菌快速繁殖; 当水杨酸盐不存在时, 自杀基因 *gef* 的表达导致细胞杀伤, 菌体大量死亡。该遏制系统可作为模型用于具有生物修复功能的基因工程菌的构建。

关键词: 细菌遏制系统, *gef*, *nahR*, 细胞杀伤

Bacterial Containment System Regulated by the Concentration of Salicylate

Hongping Wang, and Yushu Ma

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for pollution abatement has been limited because of the risks associated with their uncontrolled release in environment. In this study, a pollutant-dependent bacterial containment system was constructed in *E. coli* JM109. The system consisted of two plasmids containing a killing element and a regulatory element respectively. The survival of strains can be regulated by the concentration of salicylate in environment. In the presence of salicylate, the expression of the suicide gene *gef* was inhibited with the synthesis of LacI protein, leading to the normal proliferation of the strain. While in the absence of salicylate, the expression of the regulatory element was cancelled, and the expression of the suicide gene *gef* led to a high rate of cell killing. This containment system can be used as a model during the construction of genetically engineered strains for bioremediation.

Keywords: bacterial containment system, *gef*, *nahR*, cell killing

近年来由于危险性化合物的不合理储存与排放, 大量外源化合物被释放到环境中, 造成了严重的环境污染。针对污染环境的生物修复技术是一项蓬勃发展的环境污染治理技术, 通过构建高效的基因工程微生物可显著提高污染物的降解效率。然而现有系统无法保证有效遏制完成了生物修复使命的微生物

[1], 其不受控制的存在会导致一系列环境问题, 如扰乱现有的生态、增加对替代能源的竞争等。

过去十年里, 人们探索了多种“杀手”基因和众多代谢调控基因, 并开始构建一种被称为“细菌遏制系统”(bacterial containment system)的微生物自我控制系统。该系统的目的是使脱离所述具体环

境的微生物被可诱导的受控制的“自杀”系统杀死^[2]。含有该系统的基因的被修饰的微生物也称为“自杀性基因工程微生物”(S-GEMs)^[3]。这样的微生物能把可预见的环境风险降到最低,从而使得对污染区的生物修复有效且安全。

遏制系统通常建立在一个“杀手”基因和一个“调控环路”的基础上。其中调控环路能通过对其具体环境信号的响应来控制杀手基因的表达^[4,5,6]。杀手基因的表达受负调控,即杀手基因被预设成关闭,只有当环境中污染物浓度低于可检测限时才被激活。调控环路由可诱导的启动子和调控基因组成,其中调控基因能在适当浓度的效应分子存在的情况下控制启动子的活性。目前已有一些调控环路可用于基因工程微生物^[7,8]。

芳香族化合物因其持久性和毒性在大量环境污染中最受人们重视。本文所采用的调控基因 $nahR$ 及其可激活的启动子 $Psal$ 位于萘降解菌株 *Pseudomonas stutzeri*染色体上^[9]。 $NahR$ 作为LysR调控子家族一员,是*Pseudomonas sp.*萘降解途径基因的正转录调控子。诱导物水杨酸盐(萘/菲降解途径的中间代谢物)存在时,调控基因 $nahR$ 编码的蛋白 $NahR$ 结合到启动子 $Psal$ 上,激活萘代谢操纵子 sal 的转录。 sal 操纵子包含一组编码代谢水杨酸盐为三羧酸循环中间物的酶的基因簇。 $nahR$ 有自身表达的启动子 Pr , Pr 与 $Psal$ 部分重叠,两者以不同的DNA链彼此反方向进行转录。在调控元件中,将阻遏蛋白基因 $lacI$ 与 $Psal$ 启动子融合,使 $lacI$ 的表达受 $Psal$ 控制。

位于另一质粒上的杀伤元件由 lac 启动子和杀手基因 gef 组成。 gef 存在于大肠杆菌K12菌株中,受反义RNA机制的调控,是构建遏制系统常用的杀手基因,其作用的细胞靶点为细胞膜,杀伤活性并不局限于大肠杆菌^[5]。对于含有该遏制系统的细菌,当环境中存在一定浓度的水杨酸盐时, $NahR$ 激活启动子 $Psal$,转录表达 $LacI$,导致 gef 被阻遏;当环境中水杨酸盐浓度降至0时,阻遏蛋白 $LacI$ 不表达, gef 基因的表达导致细胞杀伤。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; dNTP 购自美季公司; PCR 试剂、聚合酶、pMD19-T 载体购自申能博彩公司; PCR 片段回收盒、胶回收试剂盒购自博大泰克公司; 水杨酸钠购自生工公司。其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。PCR 扩增仪为 Biometra 公司产品。引物由英骏公司合成。所用菌株 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* JM109 和载体 pUC18、pBR322 为本实验室保存。5 株降解萘的菌株由华东理工大学资环学院方芳提供。抗性培养基中氨苄青霉素终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 四环素终浓度为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

本文所用引物见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 常规 DNA 操作

采用碱抽法抽提质粒, CaCl_2 法转化大肠杆菌。

表 1 引物
Table 1 Primers

Primer	Sequence(5'→3')
gefPf	5'-AAAGAATTCAAGGAGAAGAGAGCAATGAAGCAGC-3'
gefPr	5'-AAAAAGCTTTTACTCGGATTCGTAAGCCGTGAAAAC-3'
JD1	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
JD2	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
PR1	5'-GTACGCTCGCTGGTCAGCGGA-3'
PR2	5'-ATGGAAGTGCCTGACCTGGATTTA-3'
Ps1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
Ps2	5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3'
Pn1	5'-AAAAGTACTTCAATCCGAAAACAGCTCGAA-3'
Pn2	5'-CCGGAATTCGCAATACCTGTCATGACTTTATTA-3'
PI1	5'-CCGGAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAAC-3'
PI2	5'-CCGGAATTCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA-3'

常规操作均遵循《Molecular Cloning》^[10]。

1.2.2 PCR 扩增 *nahR/Psal*

根据 *nahR* 基因保守序列设计引物 PR1、PR2, 以筛选得到的 5 株萘降解菌作为模板, 通过 PCR 反应扩增 *nahR* 基因保守序列。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。通过琼脂糖凝胶电泳分析发现, 以编号为 Z2 的萘降解菌为模板的 PCR 反应扩增得到分子量约为 290 bp 的片段, 与 *nahR* 基因保守序列大小相当。扩增片段回收后与 pMD19-T 载体连接, 测序确定序列正确性。以 Z2 菌为模板, 细菌 16sRNA 通用引物 Ps1、Ps2 进行 PCR, PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 59 °C 50 s, 72 °C 1 min30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。扩增得到的片段回收后与 pMD19-T 载体连接, 测序后的结果进行 BLAST 比对, 确定 Z2 菌为 *P. stutzeri*。根据 *P. stutzeri* AN10 序列设计引物 Pn1、Pn2, Z2 菌体作模板, PCR 扩增得到 *nahR/Psal* 序列。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。

1.2.3 构建含 *Psal lacI* 融合的质粒

扩增得到的 *nahR/Psal* 序列两端分别含 *EcoR* I 和 *Sca* I 酶切位点, 用这两种酶双切后, 与 *EcoR* I 和 *Sca* I 双酶切的载体 pBR322 连接后转化四环素抗性平板, 通过菌落 PCR 鉴定重组子, 并测序验证重组质粒序列正确性, 命名为 pNR4。

E. coli DH5 α 菌体作模板, PI1、PI2 为引物, PCR 扩增不含启动子的 *lacI* 基因。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。扩增片段回收后经 *EcoR* I 酶切, 与用 *EcoR* I 酶切的 pNR4 连接后转化四环素抗性平板, 通过菌落 PCR(引物 Pn1、PI2) 鉴定重组子, 测序确定重组质粒序列正确性, 命名为 pRI6。

1.2.4 自杀基因 *gef* 的克隆

E. coli DH5 α 菌体作模板, *gef*Pf、*gef*Pr 为引物进行 PCR。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。扩增片段回收后用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 与 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的载体 pUC18 连接, 转化氨苄抗性平板。PCR 鉴定重组子(引物 JD1、JD2), 测序确定重组质粒, 命名为 pG1。

1.2.5 遏制系统功能检测

将重组质粒 pRI6 和 pG1 共转化 *E. coli* JM109,

四环素和氨苄双抗平板(含 0.2 mmol/L 水杨酸钠)培养。取过夜培养菌液 1 mL 移至 50 mL LB 培养基(Ap^r, Tet^r), 培养至 OD₆₀₀=0.3~0.4, 收集菌体, 去上清, 用 LB 洗涤一次后菌体重悬于含不同浓度(0, 0.02 mmol/L, 0.2 mmol/L)水杨酸钠的双抗性(Ap^r, Tet^r)LB 培养基中, 不同时间点取样, 稀释 10⁵ 或 10⁶ 倍后涂板(含相应浓度水杨酸钠的双抗性平板), 培养过夜后记录菌落数。

2 结果与讨论

2.1 遏制系统的构建

NahR 调控蛋白在水杨酸盐存在的情况下能结合到 *Psal* 启动子上, 从而激活分解代谢萘的操纵子。目前已经对多种假单胞菌中萘的降解进行了广泛研究, 相关操纵子位于 *Pseudomonas putida* G7 的 NAH7 质粒、*P. putida* NCIB9816 的 NAH 质粒 pWW60-1、以及 *P. stutzeri* 菌 AN10 的染色体上^[11]。通过对 GenBank 数据库所公布的多种菌株中 *nahR* 基因序列的分析, 选择长度为 293 bp 的高度同源的保守序列作为探针序列, 设计两端引物, 以筛选得到的 5 种萘降解菌为模板, 通过菌落 PCR 对保守探针序列进行扩增。结果显示, 以编号为 Z2 的菌体为模板的 PCR 反应后, 获得了大小约为 290 bp 的特异序列, 该序列的测序结果表明, 扩增得到的片段与探针序列完全吻合。随后以细菌 16S RNA 通用引物对 Z2 进行菌落 PCR, 将扩增得到的片段(约 1.5 kb) 序列进行 BLAST 分析, 发现其与 *P. stutzeri* AN10(GenBank Accession No. AF039534) 相同性高达 98%, 确定 Z2 为 *P. stutzeri*。

根据 *P. stutzeri* AN10 的 *nahR/Psal* 序列, 设计引物 Pn1、Pn2, 引物 5' 端分别含有 *Sca* I 和 *EcoR* I 酶切位点, 与作为调控元件载体的 pBR322 上的酶切位点相对应。PCR 产物(约 1 kb) 与载体经 *Sca* I 和 *EcoR* I 双切后连接。由于插入片段大于 1 kb, 可以空载体作对照, 通过电泳对重组转化子进行初步鉴定。随后以引物 Pn1、Pn2 做进一步的 PCR 鉴定。最后的测序结果表明, 所获得的 pNR4 是具有四环素抗性的、含 *nahR/Psal* 的正确重组质粒。扩增得到的 *nahR/Psal* 序列与 *P. stutzeri* AN10 的 *nahR/Psal* 序列相比, 仅在 *Psal* 上有 2 个碱基不同, BLAST 分析结果两者相同性为 99%。

为使阻遏蛋白基因 *lacI* 表达受启动子 *Psal* 的控

制,以 *E. coli* DH5 α 为模板,经 PCR 获得不含自身启动子的 *lacI* 基因(约 1.1 kb)。引物 PI1、PI2 的 5' 端含 *EcoR* I 酶切位点,可插入 pNR4 质粒 *Psal* 启动子下游。此处由于是单酶切连接,连接产物存在正向插入和反向插入两种情况,电泳初鉴后用引物 Pn1、PI2 进行 PCR 鉴定,扩增出约 2 kb 调控元件片段的为正向插入的重组子,测序结果得到的重组质粒 pRI6(图 1)包含所需的调控元件 *nahR/Psal lacI*。

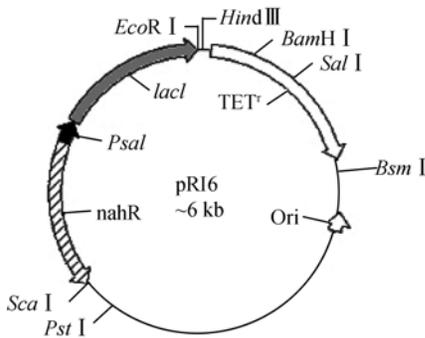


图 1 重组质粒 pRI6
Fig. 1 Recombinant plasmid pRI6

自杀基因 *gef* 广泛存在于大肠杆菌 K12 菌株中,属于 *gef* 基因家族,该编码细胞杀伤功能的基因家族在革兰氏阴性菌中高度保守。现已在多种不同菌中证实了 Gef 蛋白的高度毒性,即便少量也有很强的杀伤作用。但实验也发现,各种菌对 Gef 敏感程度不同。选择氨苄抗性带 *lac* 启动子的 pUC18 作为杀伤元件的载体,利用载体多克隆位点中的 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点插入经 PCR 扩增的 *gef* 基因(含 RBS, 约 170 bp)。连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 由于 *E. coli* DH5 α 对 Gef 不敏感,氨苄抗性平板上有正常数目的转化子。PCR 鉴定重组子,用引物 JD1、JD2,空载体作对照,以重组子为模板能获得 250 bp 左右片段,测序正确后命名为 pG1(图 2)。

E. coli JM109 对 Gef 敏感,将 pG1 转化 JM109,氨苄抗性平板上没有转化子长出,该结果是由于 *lac* 启动子下游的 *gef* 基因有本底水平表达,pUC18 载体上的 *lacI* 基因产物不能完全阻遏 *lac* 启动子,而这些少量的 Gef 蛋白也能有效执行杀伤功能,使对 Gef 敏感的 *E. coli* JM109 因为细胞膜被破坏而死亡。而本底水平表达的 Gef 不足以影响到 *E. coli* DH5 α 的存活,推测可能由于两者基因型的不同造成了对 Gef 敏感程度的差异。

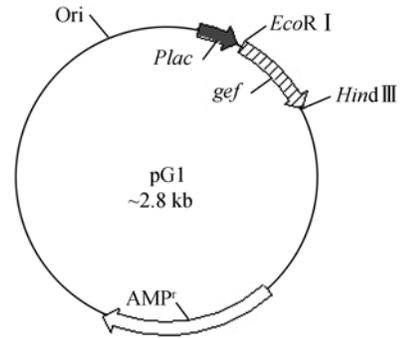


图 2 重组质粒 pG1
Fig. 2 Recombinant plasmid pG1

2.2 检测遏制系统的有效性

将重组质粒 pRI6 和 pG1 共转化 *E. coli* JM109,在含 2 mmol/L 水杨酸钠的双抗平板(Ap^r和 Tet^r)转化子生长情况正常,而不含水杨酸钠的双抗平板上也有少量转化子生长,这可能是由于 *Psal* 在没有水杨酸盐的情况下也转录表达了一定量的阻遏蛋白,使 *gef* 基因的表达受到一定程度的抑制,未能完全抑制转化子的生长。为证实该推测,在将重组质粒 pRI6 和 pG1 共转化 *E. coli* JM109 时加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 以消除 LacI 的存在对 *gef* 表达的影响,结果表明,在这种情况下,不含水杨酸钠的双抗平板上没有观察到转化子的生长。

为检测 *lacI* 基因表达是否受到水杨酸钠的调控,待重组 *E. coli* JM109(pG1, pRI6) 在含 2 mmol/L 水杨酸钠及双抗的培养基中培养至对数生长期后,将菌液平均分成两管,其中一管加入 0.5 mmol/L IPTG,以解除水杨酸钠的影响,培养 2h 后测 OD₆₀₀,用 LB 稀释以保证两管 OD 值相同,随后稀释 10⁵ 倍后涂板。实验表明,培养 2 h 后两管 OD 值已有明显差异,未加 IPTG 的 OD 值为 0.968,而加了 IPTG 的 OD 值为 0.582,稀释到相同 OD 值的情况下,两管的活菌数相差近一半,可见 *lacI* 基因表达受到水杨酸钠的调控。

为检测该遏制系统能否在环境污染物浓度逐渐下降的情况下逐步开启杀伤功能,选择在不同浓度水杨酸钠(0, 0.02 mmol/L, 0.2 mmol/L)的条件下,于不同时间点(0, 1, 2, 3 h)取样,稀释后记录活菌数。结果见图 3。

由图可见,培养基中含 0.2 mmol/L 水杨酸钠时,合成的 LacI 阻遏蛋白阻止自杀基因 *gef* 表达,菌体

生长迅速。当水杨酸钠浓度降低 10 倍时, 有少量 Gef 蛋白表达, 活菌数有所下降, 但仍保持较高的数量, 这说明 NahR 蛋白与水杨酸钠有较高亲和性。在 0.02 mmol/L 水杨酸钠条件下较高的菌体存活率有利于该遏制系统在基因工程菌构建中的应用, 即当工程菌没有完成对环境中的菲和萘等污染源的完全降解时, 其仍能以较高存活率在受污染环境中增殖。当水杨酸钠浓度降至 0 时, 杀伤元件开启, 大量菌体被杀伤, 活菌数维持在一个极低的水平上。值得注意的是, 在不含水杨酸钠的培养基中, 遏制系统的杀伤元件并未能杀死所有细菌, 阻遏蛋白的本底水平表达是造成这一现象的可能原因之一。另外, 存活的细菌中可能有一部分发生了突变, 从而逃脱了 *gef* 基因产物对细胞的杀伤。为了提高自杀基因表达产物对菌体的杀伤率, 尽量降低逃逸杀伤的存活细菌数, 可以考虑将杀伤元件加倍, 提高其表达产量; 或是构建两套不同的杀伤元件, 形成双重致死系统; 也可以将杀伤元件整合到微生物染色体上, 以提高其在细菌增殖过程中的稳定性。

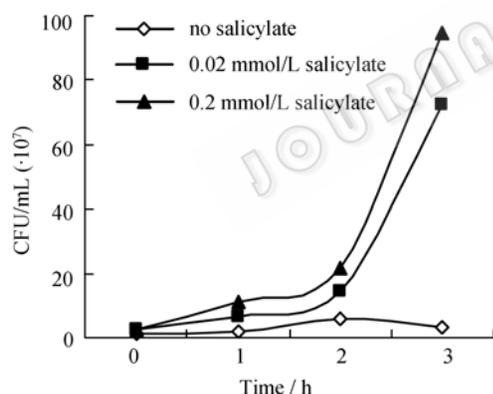


图 3 不同浓度水杨酸盐下活菌数

Fig. 3 The number of survival cells under different concentrations of salicylate

本文所构建的细菌遏制系统能较好地受水杨酸盐浓度调控, 在水杨酸盐有/无的条件下关闭/开启

自杀基因的表达, 从而控制菌的存亡, 具有在构建基因工程菌中应用的价值, 从而达到对环境污染进行生物修复的目的。

REFERENCES

- [1] Kolata G. How safe are engineered organisms? *Science*, 1985, **229**: 34–35.
- [2] Debarati Paul, Gunjan Pandey, Janmejy Pandey, *et al.* Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends in Biotechnology*, 2005, **23**(3): 135–142.
- [3] Gunjan Pandey, Debarati Paul, Rakesh K Jain. Conceptualizing “suicidal genetically engineered microorganisms” for bioremediation applications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **327**: 637–639.
- [4] Molin S. Environmental potential of suicide genes. *Curr Opin Biotechnol*, 1993, **4**: 299–305.
- [5] Molin S, Boe L, Jensen IB, *et al.* Suicidal genetic elements and their use in biological containment of bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 1993, **47**: 139–166.
- [6] Ramos JL, Diaz E, Dowling D, *et al.* The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Bio/Technology*, 1994, **12**: 1349–1356.
- [7] Cases I, de Lorenzo V. Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 1998, **1**: 303–310.
- [8] Diaz E, Prieto MA. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11**: 467–475.
- [9] Rafael Bosch, Elena Garí'a-Valde's, Edward RB Moore. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene*, 2000, **245**: 65–74.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Hoo Hwi Park, Woon Ki Lim, Hae Ja Shin. *In vitro* binding of purified NahR regulatory protein with promoter *Psal*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1725**: 247–255.