

青海弧菌 Q67 荧光素酶基因 luxAB 与 luxCDABE 在大肠杆菌中表达与发光特性比较

罗爱红¹, 冯 忻¹, 宁保安², 白家磊², 彭 媛², 高志贤^{2*}

(1. 天津理工大学环境科学与安全工程学院, 天津 300384; 2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津市环境与食品安全风险监控技术重点实验室, 天津 300050)

摘 要: **目的** 对比淡水发光细菌——青海弧菌 Q67 荧光素酶基因 luxAB 和 luxCDABE 在新的表达体系中的表达, 为构建特异性检测毒性的重组菌提供基础。**方法** 设计引物扩增得到青海弧菌 Q67 荧光素酶基因 luxAB 和 luxCDABE, 将其分别与表达载体 pET-22b 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 测序, 阳性质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)进行表达。检测两种重组菌的发光特性及重金属离子对其毒性影响。**结果** 通过测定重组菌的相对发光强度(RLU)和 OD₆₀₀ 值可知: luxAB 和 luxCDABE 重组菌在癸醛和 IPTG 浓度均为 1 μ L/mL 培养基里培养第 1 小时后达到最大 RLU, 值分别为 750618.5 和 140901.5。检测重金属离子 Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺对重组菌的毒性, EC₅₀(半有效浓度)值分别为: luxAB 重组菌: 5.160、5.129、7.097 mg/L; luxCDABE 重组菌: 6.137、7.643、7.736 mg/L。**结论** 在相同培养条件下, luxAB 重组菌比 luxCDABE 重组菌获得了更大的 RLU, 说明 luxAB 表达效果更好。重金属对重组菌的毒性影响检测, luxAB 重组菌得到了更低的 EC₅₀ 值, 进一步论证了这个观点。

关键词: 青海弧菌; 荧光素酶基因; 重组菌; 发光特性

Comparison of the expression and luminescence of luxAB and luxCDABE genes from *Vibrio qinghaiensis* sp.—Q67 in *Escherichia coli*

LUO Ai-Hong¹, FENG Xin¹, NING Bao-An², BAI Jia-Lei², PENG Yuan², GAO Zhi-Xian^{2*}

(1. College of Environmental Science and Safety Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China;
2. Key Laboratory of Risk Assessment and Control Technology for Environment and Food Safety, Institute of Health and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

ABSTRACT: Objective To compare the expression of luxAB and luxCDABE genes from “freshwater luminescent bacteria” *Vibrio qinghaiensis* sp.—Q67 in *Escherichia coli*, and to make preparations for the construction of recombinant bacteria which could especially detect heavy metals. **Methods** Primers were designed in order to obtain the homologous fragments of luxAB and luxCDABE, then got the product through polymerase chain reaction (PCR). As the next process, the product was cloned into vector pET-22b and then transferred into *Escherichia coli* DH5 α for genetic sequencing. The positive clones were propagated and the plasmids extracted were transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE3). Performance of bioluminescence of recombinant *Escherichia coli* encoding thermostable luciferase from *Vibrio qinghaiensis* was detected. **Results**

基金项目: 军队重点项目(BWS11J019)

Fund: Supported by Key Project of PLA (BWS11J019)

*通讯作者: 高志贤, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全风险监控技术。E-mail: gaozhx@163.com

*Corresponding author: GAO Zhi-Xian, Professor, Institute of Health and Environmental Medicine, No.1, Dali Road, Tianjin 300050, China. E-mail: gaozhx@163.com

After about 1 h culture with 1 $\mu\text{L/mL}$ decanal and 1 $\mu\text{L/mL}$ IPTG, the luxAB and luxCDABE recombinant bacteria got the highest RLU: 750618.5 and 140901.5 respectively. EC_{50} of luxAB and luxCDABE recombinant bacteria of Cd^{2+} , Hg^{2+} , and Cr^{6+} are 5.160, 5.129, 7.097 mg/L and 6.137, 7.643, 7.736 mg/L respectively.

Conclusion The expression of luxAB is more effective than luxCDABE in *E. Coli*. LuxAB recombinant bacteria have lower EC_{50} values, and the luxAB recombinant bacterias are more sensitive towards heavy metals.

KEY WORDS: *Vibrio qinghaiensis*; luciferase genes; recombinant bacterias; performance

1 引言

发光细菌毒性检测法作为一种廉价、简便、快速的方法^[1], 在水质毒性检测、重大恐怖袭击化学毒物应急监测体系^[2]、食品安全检测^[3]、饮用水水质检测^[4]等方面得到了广泛的应用。发光菌应用于水质检测最开始是海洋细菌, 其中以费氏弧菌最为典型。青海弧菌(淡水发光细菌)由我国朱文杰教授发现并分离^[5], 之后便得到了迅速的发展。其优势在于相比于海洋发光菌, 其培养不依赖于 NaCl, 且 pH 耐受范围更广, 这就避免了在检测过程中盐离子对被检测物的干扰, 从而在农药、重金属、PFOA(全氟辛酸铵)和 PFOS(全氟辛烷磺酰基化合物)^[6]、苯并噻唑类^[7]、吡啶类离子液体^[8]等检测中得到了广泛的应用。

但是, 其培养温度范围较窄(20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$), 不能适应不同外界环境下的检测。淡水发光细菌与海洋发光细菌毒性检测的比较已经有过报道^[9], 但是淡水发光细菌的荧光素酶基因作为外源基因在细菌内的表达与海洋细菌的荧光素酶基因的表达存在哪些区别, 发光菌荧光素酶基因的应用集中在 luxAB^[10]和 luxCDABE^[11], 作为整体异源表达, 其表达又存在哪些差异, 这些问题鲜有相关文献进行报道。随着现代分子生物技术的突飞猛进, 荧光素酶基因^[12,13]的应用也得到了极大的关注, 利用荧光素酶基因作为外来基因在其他细菌中表达从而实现检测的技术也已经相对成熟^[14]。

本文分别将 luxAB 和 luxCDABE 作为整体构建重组质粒在大肠杆菌中表达, 并对比二者的发光表达效果以及重金属离子对重组菌毒性影响从而表征两种荧光素酶基因表达效果。

2 材料与方法

2.1 实验材料

青海弧菌 Q67, 滨松光子技术股份有限公司; 大

肠杆菌 DH5 α , 大肠杆菌 BL21(DE3), 天根生化科技(北京)有限公司; 载体 pET-22b, 宝生物工程有限公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, 美国 Thermo 公司; Plasmid Mini Kit(200)、Gel Extract Kit(200), 美国 Omega 生物技术公司; TIANamp Bacteria DNA Kit, 天根生化科技(北京)有限公司; Yeast Extract(酵母提取物)、Tryptone(胰蛋白胨), 英国 Oxoid 公司; Agar Powder、LA Taq 酶, 北京索莱宝科技有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

2.2 实验仪器

BHP9511 水质毒性检测仪, 滨松光子技术股份有限公司; Mastercycler personal PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; DYY-11 型电泳仪, 北京六一仪器厂; WD-9403F 紫外分析仪, 北京六一仪器厂; TGL-16C 飞鸽牌离心机, 上海安亭科学仪器厂; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; HH-B11 电热恒温培养箱, 天津市实验仪器厂; II 级生物安全柜, ESCO 公司; ZWY-240 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; DZKW-S-4 电热恒温水浴锅, 北京市永光明医疗仪器有限公司; MS3 数显型漩涡混合器, 德国 IKA 公司。

2.3 试验方法

2.3.1 配制培养基

青海弧菌 Q67 培养基采用可以获得高的菌生长量和菌内荧光酶含量的培养基^[15]: 胰蛋白胨 5 g, 酵母膏 5 g, MgCl_2 3.2g, KBr 0.2 g, CaSO_4 0.1 g, NaCl 4 g, KCl 4 g, 甘油 3 mL, 固态培养基加入 2%的琼脂糖, 加蒸馏水至 1000 mL, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min 备用。
LB 培养基: Yeast Extract 5 g, Tryptone 10 g, NaCl 10 g, 固态培养基加入 15 g Agar, 加蒸馏水至 1000 mL, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min 备用。

2.3.2 青海弧菌 Q67 平板培养

挑取暗室可见蓝绿色荧光的单菌落, 接于 5 mL

液体培养基中, 22 °C, 180 r/min 震荡过夜培养。

2.3.3 青海弧菌基因组 DNA 提取

取培养过夜菌液, 使用 TIANamp Bacteria DNA Kit 试剂盒提取, 方法参照说明书。

2.3.4 luxAB 和 luxCDABE 基因的克隆

分别设计 luxAB 引物 Fab:CGCCATATGAAATT TGGAAATTTCTT、Rab:CTTCTCGAGTGTGGTATC CATTGTTTATTC; luxCDABE 引物 Fce:CTTGGATC CGATGAAAAACACATGCCATT、Rce:GCGCTCG AGCATTTTCTTATTTCCTATTCTTA, 华大基因合成。用青海弧菌基因组 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。扩增产物电泳验证并进行胶回收纯化, 纯化产物连 p MD18-T, 转化入 DH5 α 感受态细胞。转化后菌株平板培养, 挑单菌落进行菌落 PCR, 阳性菌株送华大基因测序, 得到各自的拼接结果, 进行序列比对。

2.3.5 荧光素酶基因表达菌的构建

取测序正确的菌株过夜培养活化, 用 Plasmid Mini Kit(200)试剂盒提取质粒, 提取结果电泳验证, 并进行胶回收。取胶回收产物与表达载体 pET-22b 分别进行双酶切, 酶切位点为 luxAB: Nde I, Xho I; luxCDABE: BamH I, Xho I。酶切产物电泳验证并胶回收, 回收产物通过 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。在含有氨苄西林(Amp)的固体培养基上 37 °C、过夜培养, 挑单菌落进行菌落 PCR, 阳性菌株 37 °C 液体培养基培养, 测定 OD600 值和 RLU。

2.3.6 重组菌性质测定

选癸醛作为发光底物, 用无水乙醇配成体积分数为 5% 的癸醛溶液。取阳性重组菌株平板培养, 挑单菌落于加入了 5 μ L 癸醛溶液的 5 mL LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养 2 h, 然后按 2% 接种量接种至含 5 μ L 癸醛溶液的 5 mL LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养, 2 h 后加入 5 μ L 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导, 继续培养。用 BHP9511 水质毒性检测仪和 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计检测 RLU 和 OD600 值。

2.3.7 重金属离子对重组菌毒性分析

用 CdCl₂·2.5H₂O、K₂Cr₂O₇、HgCl₂(均为分析纯)配制不同浓度的溶液。依照水质检测国标检出限设置重金属浓度。Cd²⁺浓度设置为: 0.005、0.025、0.05、0.1、0.5、1、10 mg/L, Cr⁶⁺浓度设置为: 0.025、0.05、0.1、1、5、10 mg/L, Hg²⁺浓度设置为: 0.0001、0.005、

0.01、0.05、0.1、1、5、10 mg/L。用水做对照, 设置 3 个平行样。测试组每个浓度取 2 mL 被检测溶液, 加入诱导培养 1 h 后的菌液 100 μ L 菌液混合均匀, 15 min 后检测相对发光强度, 计算相对发光强度(测试组发光强度/对照组发光强度)和 EC₅₀ 值(半有效浓度, 发光强度抑制率为 50% 对应的被测物浓度)。

3 结果与分析

3.1 青海弧菌基因组 DNA 提取

用 TIANamp Bacteria DNA Kit 试剂盒提取培养 15 h 的菌液的基因组 DNA, 提取结果琼脂糖凝胶电泳验证表明, 青海弧菌 Q67 基因组 DNA 大小介于 1008~11849 bp 之间。

3.2 青海弧菌 LuxAB、luxCDABE 基因的克隆

luxAB 和 luxCDABE 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳验证结果如图 1 和图 2。由图 1 和图 2 可知, luxAB PCR 产物大小约为 2000 bp, luxCDABE PCR 产物大小约为 6000 bp, 与预期大小相符。PCR 产物连接 pMD18-T, 转化入 DH5 α 感受态细胞, 测序得到完整序列。

3.3 重组菌性质测定

随着培养时间的延长, 重组菌在 600 nm 波长处的吸光度及对应发光量如图 3 和图 4 所示。由图 3 和图 4 可知, 重组菌随着菌密度的增大, 在诱导培养后的第一个小时左右相对发光强度就已经达到了最大值, 分别是 750618.5 和 140901.5(单位为 1), luxAB 重组菌的最大相对发光强度是 luxCDABE 重组菌的 5 倍多。约 1 h 后迅速下降到一个非常低的水平。这可能是发光底物或者诱导剂的浓度影响了发光。此外, 次级代谢产物的积累也会造成一定影响。

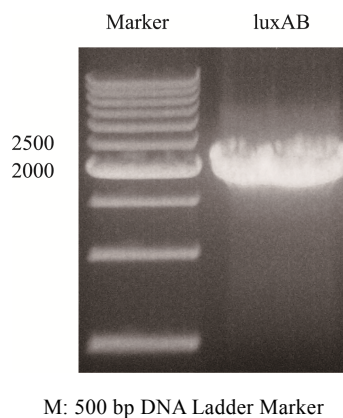


图 1 luxAB PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic results of PCR products of luxAB

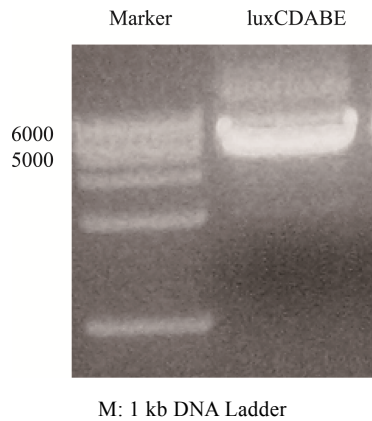


图 2 luxCDABE PCR 扩增产物电泳结果
Fig. 2 Electrophoretic results of pcr products of luxCDABE

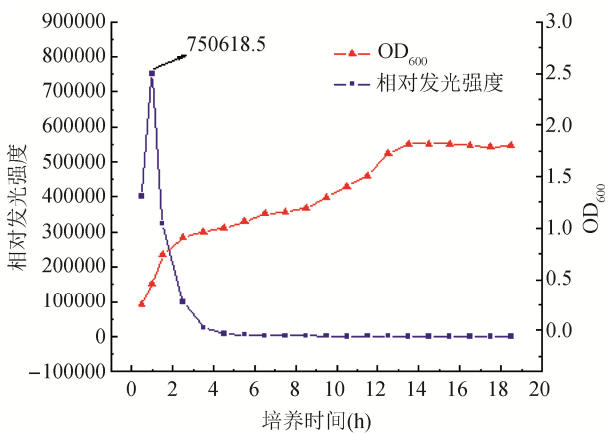


图 3 luxAB 重组菌性质测定
Fig. 3 Characteristics of luxAB Recombinant bacteria

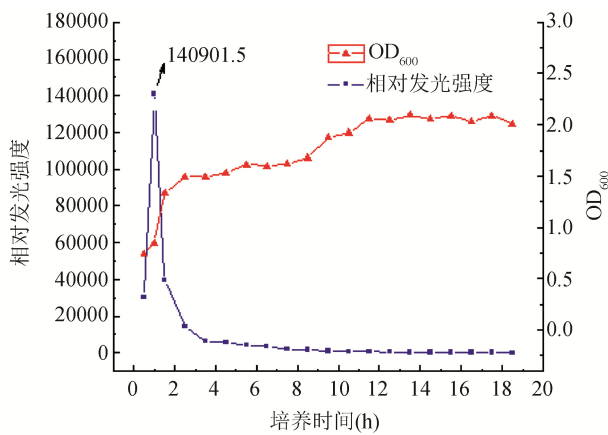


图 4 luxCDABE 重组菌性质测定
Fig. 4 Characteristics of LuxCDABE Recombinant bacteria

3.4 重金属离子对重组菌毒性分析

重金属离子对重组菌的影响如图 5、图 6 和图 7 所示, 根据拟合直线算出相应的 EC₅₀ 值如表 1 所示。

表 1 各金属离子对重组菌的毒性效应 Table 1 Toxic effects of heavy metals on recombinant bacteria		
重金属离子	重组菌	EC ₅₀ (mg/L)
Cd ²⁺	luxAB	5.160
	luxCDABE	6.137
Hg ²⁺	luxAB	5.129
	luxCDABE	7.643
Cr ⁶⁺	luxAB	7.097
	luxCDABE	7.736

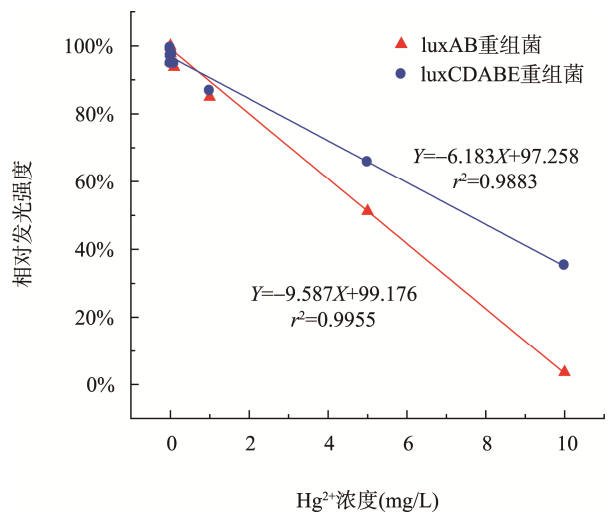


图 5 Hg²⁺对重组发光细菌的毒性影响
Fig.5 Toxic effects of Hg²⁺ on recombinant bacteria

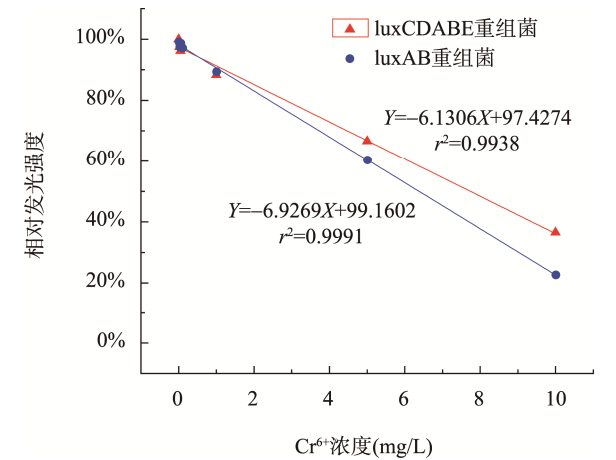


图 6 Cr⁶⁺对重组发光细菌的毒性影响
Fig.6 Toxic effects of Cr⁶⁺ on recombinant bacteria

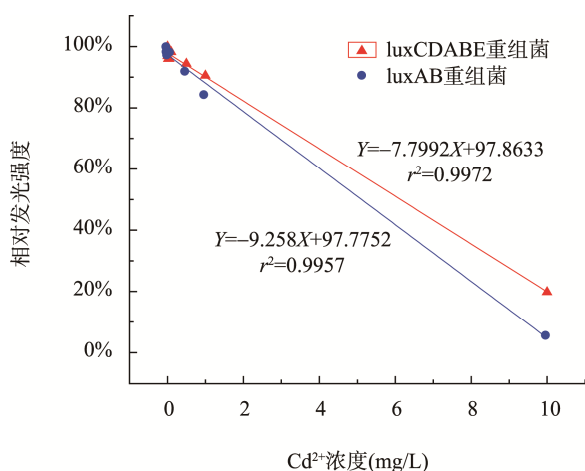


图7 Cd^{2+} 对重组发光细菌的毒性影响

Fig.7 Toxic effects of Cd^{2+} on recombinant bacteria

从表1可以看出, luxAB重组菌对于三种重金属离子的 EC_{50} 值均低 luxCDABE重组菌。说明对于重金属离子的毒性检测, luxAB重组菌比 luxCDABE重组菌更灵敏。可能是因为 luxAB 基因序列相对较短, 在这个表达系统里更易表达。

4 结论

本文将青海弧菌荧光素酶基因主要部分 luxAB 和 luxCDABE 作为整体在大肠杆菌中原核表达。为比较二者表达效果, 检测了重组菌的发光性质及重金属离子对其毒性影响。结果显示 luxAB 重组菌得到了更大的最大发光强度, 重金属毒性检测得到了更低的 EC_{50} 值, 表现出了更好的灵敏性。从而论证了 luxAB 作为荧光素酶基因的主要元件, 在这个表达系统内达到了更好的表达效果。luxAB 基因在这个表达体系中表达的最优条件有待进一步研究, 包括温度、菌密度、培养基组分、发光底物成分和浓度以及诱导物的浓度等。

本文的研究对比了 luxAB 和 luxCDABE 作为外源基因在大肠杆菌中的表达, 为后续荧光素酶基因作为外源基因的表达提供了一个新的表达体系, 为荧光素酶的进一步研究提供了基础。

参考文献

- [1] 陈洁, 袁琳, 叶丹, 等. 不同重金属污染物对两种发光菌的毒性测试研究[J]. 人民长江, 2014, 45(18): 77–81.
Chen J, Yuan L, Ye D. Test and study of toxicity of two photogenic bacteria affected by different heavy metal contaminants [J]. Yangtze River, 2014, 45(18): 77–81.
- [2] 张建江, 贾继民, 马永红, 等. 发光菌在重大恐怖袭击化学毒物应急监测体系中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(5): 1151–1157.
Zhang JJ, Jia JM, Ma YH, et al. The application of luminescent bacteria in heavy terrorist attacks of chemical poisons emergency monitoring system [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(5): 1151–1157.
- [3] 邹勇平, 张林, 张鹏, 等. 发光细菌法测定碳酸饮料中苯甲酸钠的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(6): 826–828.
Zou YP, Zhang L, Zhang P, et al. Determination of sodium benzoate level in sodas by luminescent bacteria *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67 [J]. Chin J Health Lab Tec, 2014, 24(6): 826–828.
- [4] 黄灿克, 刘婷婷, 汤晓畏. 发光细菌毒性法在饮用水水质评估与预警中的应用[J]. 环境监控与预警, 2015, 7(3): 4–7.
Huang CK, Liu TT, Tang XW. Application of the photobacteria toxicity detection method in water quality assessment and early warning of drinking water [J]. Environ Monit Forewarn, 2015, 7(3): 4–7.
- [5] 朱文杰, 汪杰, 陈晓耘, 等. 发光细菌一新种_青海弧菌[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(3): 273–279.
Zhu WJ, Wang J, Chen XY, et al. A new species of luminous bacteria *Vibrio qinghaiensis* sp. Nov. [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 1994, 25(3): 273–279.
- [6] 刘红艳, 秦光军, 莫凌云, 等. PFOA 和 PFOS 对青海弧菌 Q67 的毒性作用评估[J]. 桂林理工大学学报, 2015, 35(1): 121–5.
Liu HY, Qin GJ, Mo LY, et al. Evaluation of aquatic toxicity of PFOA and PFOS to *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67 [J]. J Guilin Univ Technol, 2015, 35(1): 121–125.
- [7] 李晓, 李娜, 饶凯锋, 等. 苯并噻唑类污染物对青海弧菌 Q67 毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2): 167–172.
Li X, Li N, Rao KF, et al. Toxicities of benzothiazole and benzothiazole derivatives (BTs) to *Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67 [J]. Asian J Ecotoxicol, 2015, 10(2): 167–172.
- [8] 张瑾, 刘树深, 邓慧萍, 等. 吡啶类离子液体对青海弧菌 Q67 的混合毒性评估[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(6): 955–962.
Zhang J, Liu S S, Deng HP, et al. Evaluation on the combined toxicity of pyridium-based Ionic liquids to *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67 [J]. Asian J Ecotoxicol, 2013, 8(6): 955–962.
- [9] Nora Kováts MR, Varanka B. Comparison of conventional and vibrio fischeri bioassays for the assessment of municipal wastewater toxicity [J]. Environ Eng Manag J, 2012, 11(11): 2073–2076.
- [10] 王妍稳, 丁武, 李璠, 等. 青海弧菌荧光素酶基因 LuxAB 的原核表达[J]. 中国食品学报, 2015, 15(1): 60–65.

- Wang YW, Ding W, Li F, *et al*, Prokaryotic Expression of Luciferase Gene LuxAB of *Vibrio qinghaiensis* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2015, 15(1): 60–65.
- [11] 张莉丽, 丁武, 王妍稳. 青海弧菌 lux 基因在大肠杆菌中的异源表达[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(6): 1086–1090.
Zhang LL, Ding W, Wang YW, *et al*. Heterologous expression of lux gene from *Vibrio qinghaiensis* in *E. coli* [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2014, 20(6): 1086–1090
- [12] Meighen EA. Bacterial bioluminescence: organisation, regulation, and application of the lux genes [J]. FASEB, 1993, 7(11): 1016–22.
- [13] 夏铁骑, 常慧萍. 发光细菌 Lux 基因系统的遗传学研究及应用[J]. 淮阳职业技术学院学报, 2008, 21(18): 1–5.
Xia TJ, Chang HP. Investigation and application of Lux genes from luminous bacteria [J]. J Puyang Vocat Tech Coll, 2008, 21(4): 1–5.
- [14] 蒋爱民, 杨公明, 李元瑞, 等. lux 基因发光乳球菌构建方法的研究[J]. 中国食品学报, 2003, 3(3): 18–23.
Jiang AM, Yang GM, Li YR, *et al*, Studies on the construction method of luminescent *Lactococcus* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2003, 3(3): 18–23.
- [15] 郑敬民, 赵曙霞, 朱文杰, 等. 环境因子对青海弧菌生长和发光的影响[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 1999, 1: 98–102
Zheng JM, Zhao SX, Zhu WJ, *et al*. The Influence of Environmental Factors on the Growth and Luminescence of *Vibrio qinghaiensis* sp. nov [J]. J East China Norm Univ (Nat Sci), 1999, 1: 98–102.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



罗爱红, 硕士研究生, 主要研究方向为水与食品中有毒物质的快速检测。
E-mail: aihongluo1201@163.com



高志贤, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全风险监控技术研究。
E-mail: gaozhx@163.com