

一株高抗汞细菌的分离鉴定及其抗性基因的克隆与表达

曾艳^{1,2}, 陈强², 王敏¹, 孙建光^{3*}, 高俊莲^{1*}

(¹北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

(²四川农业大学资源环境学院微生物学系, 雅安 625014)

(³中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业部作物营养与施肥重点实验室, 北京 100081)

摘要:【目的】本研究旨在从重金属汞抗性细菌中分离鉴定汞抗性基因【方法】从北京凉水河河床底泥中分离抗汞细菌, 采用 16S rRNA 基因序列分析结合生理生化特征对菌株进行鉴定。根据 GenBank 中已发表的多种抗汞细菌的 *merA* 基因序列设计引物, 以抗性细菌基因组 DNA 为模板, 扩增 *merA* 基因, 并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 表达。同时对表达菌株的重金属汞抗性进行测定。【结果】分离得到一株能在含 HgCl_2 为 70 mg/L 的平板上生长良好的高抗汞细菌, 编号为 KHg2。16S rRNA 基因序列分析结果表明, 菌株 KHg2 与 *Bacillus silvestris* 的模式菌株 DSM12223^T 有 96% 的同源性, 其形态特征及生理生化特性与文献报道的 *Bacillus silvestris* 一致。从菌株 KHg2 中扩增得到 1687bp DNA 片断, 其序列与 *Pseudomonas putida* 的 *merA* 基因序列同源性达到 99%, 将该 DNA 片断克隆于 pET-30a(+) 得到重组质粒 pZY2, 转化宿主菌获得表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pZY2, 经 IPTG 诱导后产生相对分子量约为 33kD 的蛋白。重金属汞抗性测定结果表明, 表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pZY2 可以在含 HgCl_2 为 20 mg/L 的培养基中生长, 而转入空载体 pET-30a(+) 的阴性对照菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pET-30a(+) 则不能在含 HgCl_2 为 20 mg/L 的培养基中生长。【结论】分离的抗汞菌株 KHg2 与 *Bacillus silvestris* 关系密切; 从菌株 KHg2 中克隆到汞抗性基因 *merA*, 并在大肠杆菌中得到了成功表达; 表达 *merA* 基因的大肠杆菌具有抗重金属汞的特性。

关键词: 重金属污染土壤; 抗汞细菌; 分离鉴定; 16S rRNA 基因序列分析; *merA* 基因克隆与表达

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 12-1628-06

农田土壤重金属污染已成为全球关注的环境问题之一。当前我国部分地区农田重金属污染现象已经十分严重, 大多数城市近郊农田土壤都受到了不同程度的污染。据报道, 目前我国受重金属污染的耕地面积近 2500 万公顷, 约占总耕地面积的 1/5; 其中工业“三废”污染耕地 1000 万公顷, 污水灌溉的农田面积已达 330 多万公顷。每年被直接污染的粮食达 1200 万吨^[1-2]。和其他类型的污染物相比, 重金属污染具有隐蔽性, 长期性, 不能被降解, 易积累, 毒

性大^[3]等特点, 因此很难治理。国外研究者曾提出多种修复土壤重金属污染的物理或化学方法, 如客土法、热处理法、电循环法等^[4], 但这些方法都非常昂贵并可能造成二次污染。生物修复技术被认为是最有前景的治理方法, 它不仅廉价而且对环境友好^[5]。重金属抗性微生物及其抗性基因在重金属污染土壤的生物修复中起着重要的作用。汞抗性微生物的研究已有较长的历史, 上世纪 60 年代首次报道从自然界中分离到汞抗性菌株, 随后的研究发现了

基金项目: 北京市自然科学基金 (5062010); 国家“863 计划” (2006AA06Z386)

*通信作者。高俊莲, Tel: +86-10-51503834, Fax: +86-10-51503834, E-mail: gaojunlian@baafs.net.cn; 孙建光, Tel: +86-10-82108701, Fax: +86-10-82106239, E-mail: jgsun@caas.ac.cn

作者简介: 曾艳 (1983-), 女, 四川人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物基因资源研究。E-mail: zengyan20060207@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-04; 修回日期: 2009-07-17

不少汞抗性微生物^[6-7]。已报道大肠杆菌、变形杆菌及酵母菌等都具有较高的抗汞活性^[8]。虽然目前已分离到不少汞抗性菌株,但真正能够大规模直接用于汞污染土壤生物修复的却不多。随着分子生物学技术的快速发展,汞抗性基因的研究成为热点,目的是通过基因工程技术构建具有超强汞富集能力的转基因植物或微生物,以实现汞污染的生物修复。本研究在分离鉴定高抗重金属汞细菌的基础上,进一步对其汞抗性基因进行了克隆及重组表达研究,旨在为治理土壤重金属污染提供候选微生物及基因资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样来源:采自北京市凉水河床,其全汞含量为:5.29 mg/kg,超过国家《土壤环境质量标准》^[9]中的二级标准限值5倍多。

1.1.2 菌株和质粒:*E. coli* BL21 (DE3) 购自北京博迈德生物公司,pET-30a(+) Vector 为本实验室保存,pGEM-T Easy Vector system I 试剂盒购自 Promega 公司。

1.1.3 培养基:基础培养基为 LB 培养基,加入不同浓度的 HgCl₂ 母液(25 mmol/L)作为分离培养基,固体培养基加入 1.5% 的琼脂,121 °C 灭菌 20 min。

1.1.4 主要试剂和仪器:T4 DNA 连接酶、限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司,2 ×PCR Mix、总 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化公司,marker 购自北京全式金公司。实验中所用的引物均为上海生工生物工程技术服务有限公司合成,其它常规试剂为国产或进口分析纯。实验中主要使用的仪器有:5417C 型台式离心机(德国 Eppendorf 公司);Bio-RAD PTC-100 型 PCR 仪(美国伯乐公司);Bio-RAD 电转化仪(美国伯乐公司);DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂);凝胶成像系统-GDS-8000(美国基因公司)。

1.2 抗汞细菌的筛选

称取土样 5.00 g 加入含有玻璃珠的 45 mL 无菌水中,37 °C,150 r/min,振荡 2h 后取出静置 5 min,取上清液 1 mL 制备 10⁻¹ ~ 10⁻⁴ 稀释梯度的菌悬液,各取 100 μL 于含 HgCl₂ 终浓度为 25、30、40、45、50、55、60、65、70 mg/L 的 LB 选择平板表面,均匀涂布,于 37 °C 倒置培养 1 d,待菌落长出后,选取在含汞浓度高的平板上生长、菌落形态不同的单菌落反复划线纯化,纯化菌株于 -70 °C 保存。

1.3 抗汞细菌的鉴定

1.3.1 菌落及菌体形态观察:菌株在固体培养基平板上,培养 24 h,观察菌落形态和颜色;菌体涂片,革兰氏染色后,在普通光学显微镜下观察菌体形态。

1.3.2 生理生化特征测定:参照文献[10-11]的方法进行生理生化特征测定,包括:接触酶试验,D-葡萄糖、D-木糖、D-甘露醇发酵产酸、产气试验,明胶液化试验,伴胞晶体观察,硝酸盐还原试验,淀粉水解试验,V-P 试验,初始生长 pH 测定(pH 为 6.8 和 5.7 的营养肉汤培养基)和对 NaCl 的耐受(2%、5%、7% 和 10%) 生长试验。

1.3.3 16S rRNA 基因序列分析:采用试剂盒(离心柱型)提取细菌基因组 DNA,操作步骤为公司提供的说明。以基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物对^[12]: F27: 5-AGA GTTT GATCCTGGCTCA G 3 / R1492: 5-TACCTTGTTACGACTF-3,进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增。PCR 采用 20 μL 反应体系,扩增程序为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,52 °C 1 min,72 °C 2 min;72 °C 10 min;30 个循环。PCR 扩增产物送上海生工测序。测序结果提交 GenBank。最后将所测定的 16S rRNA 序列,通过 <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast> 在 GenBank 数据库中进行同源性分析和相关信息检索,采用 clustX1.81 软件进行多序列比对,用 MEGA4.0 软件构建 16S rRNA 基因系统发育树。

1.4 汞抗性基因 merA 的 PCR 扩增

据文献报道^[13-14],*merA* 是编码汞还原酶(mercury reductases)的基因,存在于所有耐汞细菌中,是 *mer operon* 中最大的基因,因此从 GenBank 中下载细菌中的 *merA* 基因序列,采用软件 DNAMAN 比对后,用引物设计软件 Primer5.0 在其保守区设计了一对引物,其序列如下:*merA*-z3: 5-CGCGGATCC GACCCATCTA AAAATCACCGG-3 / *merA*-z4: 5-CCCAAGCTTAGCAGGAAA GCTGCTTCACAT-3,(引物中下划线部分在 *merA*-z3 中为 *Hind* 酶切位点,在 *merA*-z4 中为 *Bam*H 的酶切位点);以供试菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 采用 20 μL 反应体系,扩增程序为:94 °C 5 min;94 °C 45 s,68 ~ 53 °C 1 min,72 °C 2 min;72 °C 10 min;前 15 个循环为每个循环降 1 °C,53 °C 维持后 15 个循环。凝胶回收试剂盒回收扩增产物,克隆于 pGEM-T Easy 后送 TaKaRa 测序,用 Blastx 在 GenBank 中搜索,分析所得的序列。

1.5 汞抗性基因 *merA* 的克隆

对回收的 PCR 扩增产物与 pET-30a (+) 质粒分别进行 *Hind* 和 *Bam*H 双酶切,酶切体系 (20 μ L) 为:DNA/pET-30a (+) 5 μ L; *Hind* 1 μ L; *Bam*H 1 μ L; 10 \times K Buffer 2 μ L; ddH₂O 11 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 20 h 酶切。对双酶切产物进行胶回收,然后加入酶切产物 4 μ L, pET-30a (+) 1 μ L, 0.5 μ L T4 DNA Ligase 和 1 μ L 10 \times Buffer 和 ddH₂O 3.5 μ L (10 μ L 体系), 16 $^{\circ}$ C 连接过夜 (10 h 以上)。将连接产物转入预先制备的 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中,涂布到含有卡那霉素 Kan (50 mg/L) 抗生素的 LB 培养基平板中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养 (10 ~ 14 h), 在含卡那霉素 (Kan) 的 LB 平板上随机挑取单菌落,接入含 Kan 的液体培养基过夜培养,提取质粒,用 PCR 扩增和双酶切的方法双重验证,方法同上。克隆中所进行的连接、转化、质粒提取、阳性克隆的筛选等参考文献^[15]进行。

1.6 *MerA* 基因的重组表达

1.6.1 诱导表达:将含有阳性重组质粒和空质粒载体 pET-30a (+) 的表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 按文献^[12]培养至 OD_{600} 为 0.8 ~ 1.0, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min 振荡诱导 12 h, 取 500 μ L 菌液, 2616.1 \times g 离心, 收集菌体于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6.2 SDS-PAGE 检测:用 200 μ L 无菌水重悬保存于 -20 $^{\circ}$ C 的菌体, 取 40 μ L 菌体悬浮液, 加入 10 μ L 5 倍上样缓冲液, 沸水中裂解 5 min, 用 SDS-PAGE 胶电泳, 考马斯亮蓝染色, 7% 的乙酸脱色^[16]后观察并照相。

1.7 *MerA* 基因的抗汞特性测定

接种携带阳性重组质粒和空质粒载体 pET-30a (+) 的表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 于含 HgCl₂ 终浓度为 20 mg/L 的 100 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min 振荡培养 28 h, 每隔 4 h 测定菌液在波长 600 nm 处的光密度 (OD_{600}) 以确定其生长情况。

2 结果和分析

2.1 抗汞细菌的分离与筛选

在低浓度 HgCl₂ 的 LB 平板上, 生长了较多的菌, 随着 HgCl₂ 浓度的升高, 生长的菌数减少, 在含 HgCl₂ 为 70 mg/L 的平板上分离得到一株生长良好的高抗汞细菌, 编号为 KHg2。

2.2 抗汞细菌的鉴定

2.2.1 菌落及菌体形态观察结果: KHg2 菌落圆形,

边缘整齐, 表面凸起, 透明, 湿润, 菌落直径为 0.5 ~ 1.5 mm, 在光学显微镜下观察菌体为革兰氏阳性细杆状, 产芽孢 (图 1)。

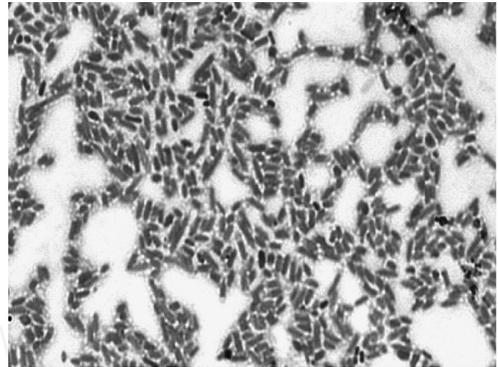


图 1 光学显微镜下菌株 KHg2 菌体形态图 (1000 \times)

Fig. 1 Morphology of strain KHg2 under optical microscope (1000 \times).

2.2.2 生理生化特征测定结果:菌株 KHg2 产生接触酶; 发酵 D-葡萄糖产酸, 但不发酵 D-木糖和甘露醇产酸, 不产气; 不液化明胶; 不水解淀粉; V-P 试验为阴性; 在 pH 6.8 营养肉汤中生长; pH 5.7 中不生长; 在含 0.2、5% 时 NaCl 培养基中生长, 但在 7% 和 10% NaCl 中不生长; 不还原硝酸盐, 这些都与文献^[11]报道的 *Bacillus silvestris* 一致。

2.2.3 16S rRNA 基因序列分析结果: KHg2 菌株扩增出的 16S rRNA 基因片断条带单一, 经测序得到长度为 1464 bp 的 16S rRNA 基因序列 (序列注册号: FJ379320)。将此序列用 BLAST 软件和 MEGA 软件处理, 并与 GenBank 中已发表的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, 选取同源性较高的多株细菌构建系统发育树 (图 2)。结果表明, 菌株 KHg2 与已报道的 *Bacillus silvestris* 模式菌株 DSM12223^T 亲缘关系最近, 有 96% 的相似性。

综合以上 16S rRNA 基因序列分析结果及表型特征鉴定结果, 确定菌株 KHg2 与 *Bacillus silvestris* DSM12223^T 关系密切, KHg2 在分类地位上属于 *Bacillus* sp.。

2.3 *merA* 基因的 PCR 扩增及序列分析

通过 PCR 扩增, 得到一个约 1.7 kb 大小的片段, 与预测的大小基本一致, 切下目的片段, 连接于 pEMGF Easy 载体后测序, 获得全长为 1686 bp 的序列, DNAMAN 分析, 有一个完整的 ORF, 编码 560 个氨基酸残基 (GenBank 登录号为: FJ643467)。在 GenBank 中搜索发现, 该序列与 *Ralstonia metallidurans*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas*

aeruginosa、*Ralstonia eutropha*、*Burkholderia cepacia*、和 *Proteus mirabilis* 等不同细菌的完整的汞还原酶基因

merA 相似性均达到 99 %。由此可确定从 KHg2 中扩增得到的是编码汞还原酶的 *merA* 基因。

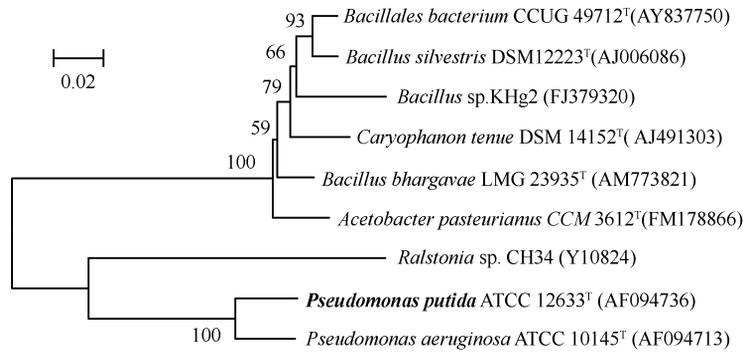


图2 菌株 KHg2 的 16S rRNA 基因全序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain KHg2 based on complete sequences of 16S rRNA gene. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 2% sequence divergence.

2.4 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

为进一步验证所得的重组质粒是否为阳性,首先以 *merA*-z3 和 *merA*-z4 为引物,以重组质粒为模板进行 PCR 扩增,电泳检测得到了一条约 1.7 kbp 左右的条带,与原 PCR 产物大小一致;然后对重组质粒进行 *Hind* 和 *Bam*H 双酶切,得到了 1.7 kbp 和大约 5 kbp 的 2 条带,与空质粒载体 pET-30a(+) 的泳道相比,约 5 kbp 条带为正确的质粒载体,而 1.7 kbp 条带与目的基因大小一致,由此证明所获得重组质粒为将 *merA* 基因成功克隆于 pET-30a(+) 载体的阳性重组质粒,并将其命名为 pZY2。转入阳性重组质粒 pZY2 和空质粒载体 pET-30a(+) 的表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 分别命名为 *E. coli* BL21 (DE3) · pZY2 和 *E. coli* BL21 (DE3) pET-30a(+)

2.5 *merA* 基因的重组表达

表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pZY2 和阴性对照菌 *E. coli* BL21 (DE3) pET-30a(+), 经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导, 37 °C, 150 r/min 振荡培养 12 h 后收集菌体, SDS-PAGE 电泳检测, 结果见图 3。

merA 基因编码汞还原酶, 该酶常以二聚体形式在细胞质内与内膜呈疏松的结合, 其分子量为 66 kDa。图 3 中表达蛋白分子量约 33 kDa, 可能由于二聚体解聚所致。本实验中, 用沸水裂解法处理样品, 使其中的蛋白质变性, 用 SDS-PAGE 变性胶电泳检测, 使得该基因所表达汞还原酶的二聚体在 SDS 和沸水作用下完全解聚, 因此, 图中与含有空质粒的表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) pET-30a(+) 相比, 转入目的基因的表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) pZY2 的蛋白电泳图谱在 30 kDa 附近有明显的特异性条

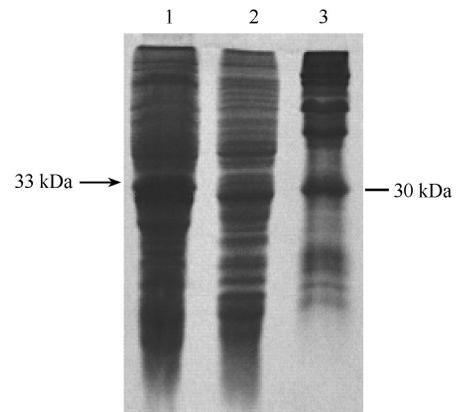


图3 *merA* 基因重组表达的 SDS-PAGE 电泳检测

Fig. 3 The SDS-PAGE analysis of *merA* protein expressed in *E. coli* BL21 (DE3). 1. *E. coli* BL21 (DE3) · pZY2; 2. *E. coli* BL21 (DE3) · pET-30a(+); 3. marker/protein ruler.

带, 这表明克隆的 *merA* 基因已在 *E. coli* BL21 (DE3) 中得到成功表达。

2.6 *merA* 基因的抗汞特性

表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pZY2 和 *E. coli* BL21 (DE3) pET-30a(+) 在含 $HgCl_2$ 为 20 mg/L 的培养基中生长情况如图 4。

表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pZY2 可以在含 $HgCl_2$ 为 20 mg/L 的培养基中生长, 而转入空载体 pET-30a(+) 的阴性对照菌株 *E. coli* BL21 (DE3) · pET-30a(+) 则不能在含 $HgCl_2$ 为 20 mg/L 的培养基中生长。

3 讨论

文献报道的抗汞菌的抗汞 ($HgCl_2$) 浓度为

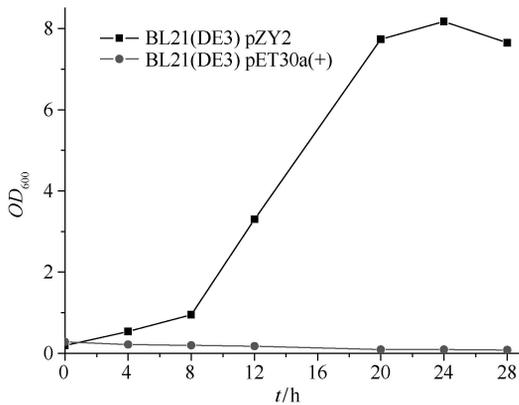


图4 表达菌株在含 HgCl_2 为 20 mg/L 的培养基中生长曲线

Fig. 4 Growth curve of the expression strains in LB medium containing 20mg/L HgCl_2 .

35 mg/L^[17], 本研究中分离到一株能在含 70 mg/L HgCl_2 的 LB 平板上生长的细菌菌株 K $\text{Hg}2$, 比以往报道的抗汞菌的抗汞浓度高出很多。分离该菌株所用的土壤样品来自北京排污河 - 凉水河床底泥, 其汞含量较高, 处于其中的土壤微生物经过长期自然选择进化可能产生出了一些高耐汞的菌株。芽孢杆菌是自然界广泛存在的细菌, 也是土壤中的优势菌群, 利用它进行污染农田治理不会对环境、人畜或植物造成危害。本研究中分离到高抗汞菌株 K $\text{Hg}2$ 在重金属汞污染治理方面具有很好应用潜力, 对其进行分类鉴定研究也为该菌株的开发利用奠定了基础。

自 1993 年 Brunke 等^[18] 初次尝试构建重组的耐汞菌, 证明了利用微生物汞抗性基因进行汞污染生物修复的可行性后, 随后对于 *merA* 基因的克隆和转基因植物研究也有一些报道^[19-20]。*merA* 基因是 Mer 操纵子的组成基因之一, 目前认为 Mer 操纵子的进化主要是由基因间的水平转移即通过一些转座子 (Tn)、插入元件 (Is)、整合子 (Integron) 等所介导的基因插入、融合、缺失而实现的^[21]。虽然芽孢杆菌属和假单胞菌属的进化亲缘关系很远, 但是由于 *merA* 基因的可转移性, 本研究中从芽孢杆菌属所克隆得到的 *merA* 基因与假单胞菌属的 *merA* 基因高度同源可能是自然界 *merA* 基因自发水平转移的结果。重金属汞抗性测定结果表明, 转入来自菌株 K $\text{Hg}2$ 的 *merA* 基因的大肠杆菌表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pZY2 可以在含 HgCl_2 为 20 mg/L 的培养基中生长, 而转入空载体 pET-30a (+) 的阴性对照菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pET-30a (+) 则不能在含 HgCl_2 为 20 mg/L 的培养基中生长, 证明了该 *merA* 基因在大肠杆菌活体内具有抗汞功能。本研究为进一步利用抗汞基因工程菌或抗汞转基因植物修复重金属污

染农田奠定了一定工作基础。

参考文献

- [1] 周启星, 宋玉芳. 污染土壤修复原理与方法. 北京: 科学出版社, 2004: 15 - 18.
- [2] 王发园. 土壤重金属污染对微生物多样性的影响. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2008, 36(18): 7827 - 7828.
- [3] 崔德杰, 张玉龙. 土壤重金属污染现状与修复技术研究进展. 土壤通报 (*Chinese Journal of Soil Science*), 2004, 36(3): 762 - 766.
- [4] 宋玉芳, 许华夏, 任丽萍, 等. 土壤重金属对白菜种子发芽与根伸长抑制的生态毒性效应. 环境科学 (*Chinese Journal of Environmental Science*), 2002, 23(1): 103 - 107.
- [5] 杨若明. 环境中有毒有害化学物质的污染与监测. 北京: 中央民族大学出版社, 2001: 13 - 14.
- [6] 阳菊花, 詹丽钦, 陈凌, 等. 高耐汞菌株的筛选及其生物学特性研究. 海峡预防医学杂志 (*Strait Journal of Preventive Medicine*), 2006, 12(1): 5 - 7.
- [7] 陈丹丹, 林建强, 刘相梅, 等. 细菌抗汞分子机制与进化的研究及应用. 微生物学通报 (*Microbiology*) 2006, 33(5): 129 - 133.
- [8] Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, et al. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Current Microbiology*, 2000, 41(3): 151 - 156.
- [9] GB15618-1995, 土壤环境质量标准. 1995.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp. 364 ~ 390.
- [11] Rheims H, Fühling A, Schumann P, et al. *Bacillus silvestris* sp. nov., a new member of the genus *Bacillus* that contains lysine in its cell wall. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49: 795 - 802.
- [12] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 43(2): 276 - 282.
- [13] 林宇岚, 陈贻错. 细菌的汞抗性基因及其在生物修复中的应用. 海峡预防医学杂志 (*Strait Journal of Preventive Medicine*), 2006, 12(1): 16 - 18.
- [14] Nascimento AM, Chartone-Souza E. Operon *mer*: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research*, 2003, 2(1): 92 - 101.
- [15] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 27 - 30.
- [16] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000: 77 - 108.
- [17] 陈宏伟, 张志, 张虹. 抗汞菌株的筛选及质粒的研究. 高师理科学刊 (*Journal of Science of Teachers' College and University*), 1996, 16(1): 47 - 49.

- [18] Brunke M, Deckwer WD, Frischmuth A, et al. Microbial retention of mercury from waste streams in a laboratory column containing *merA* gene bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 1993, 11: 145 - 152.
- [19] Rugh CL, Senecoft JF, Meagher RB, et al. Development of transgenic yellow-poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnology*, 1998, 33: 616 - 621.
- [20] Bizily SP, Rugh CL, Meagher RB. Phytodetoxification of hazardous organo mercurials by genetically engineered plants. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 213 - 217.
- [21] Liebert C A, Wireman J, Smith T, et al. Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 63(3): 1066 - 1076.

Isolation and identification of a bacterial strain KHg2 with high resistance to mercury and cloning and expression of its *merA* gene

Yan Zeng^{1,2}, Qiang Chen², Min Wang¹, Jianguang Sun^{3*}, Junlian Gao^{1*}

(¹Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry, Beijing 100097, China)

(²Department of Microbiology, College of Resources and Environment Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

(³Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization of Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] The aim of our study was to isolate and identify *merA* gene from a bacterial strain with high resistance to mercury. [Methods] A bacterial strain with resistance to mercury was isolated from the river sediment of Liangshui river in Beijing, The strain was identified according to the sequence analysis of 16S rRNA gene and its physiological and biochemical properties. A pair of PCR primers was designed according to the *merA* gene sequences of some bacteria published in the GeneBank to amplify the complete *merA* gene using the genomic DNA of KHg2 as a template. The PCR-amplified DNA fragment was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Mercury resistance of the expression strain was tested. [Results] A bacterial strain which could grow on LB medium plate containing 70 mg/L HgCl₂ was isolated, it was named as KHg2. The strain KHg2 shares 96 % sequence identity with the type strain DSM12223^T of *Bacillus silvestris*. The morphological characteristics and the results of physiological and biochemical properties of the strain were agreement with that of *Bacillus silvestris*. One PCR fragment of 1680 bp was obtained from the strain, which shares 99 % sequence identity with *merA* gene of *Pseudomonas putida*. The PCR-amplified DNA fragment was cloned into a pET-30a(+) vector to obtain an expression plasmid pZY2. The expression plasmid was transformed into *E. coli* host strain to obtain an expression strain *E. coli* BL21 (DE3) pZY2, a protein of 33 kDa was expressed by the expression strain after induced with isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). The result of heavy metal resistance test showed that the expression strain could grow on LB medium containing 20 mg/L HgCl₂, meanwhile a negative control, *E. coli* BL21 (DE3), harbouring pET-30a(+), could not grow on LB medium containing 20 mg/L HgCl₂. [Conclusion] The isolated strain KHg2 was closely related to *Bacillus silvestris*. A *merA* gene was cloned from the strain KHg2 and was expressed successfully in *E. coli*. The expression strain *E. coli* BL21 (DE3) pZY2 has resistance to heavy metal mercury.

Keywords: soil contamination by heavy metal; bacteria with resistance to mercury; isolation and identification; sequences analysis of 16S rRNA gene; clone and expression of *merA* gene

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Beijing (5062010) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA06Z386)

* Corresponding authors. Junlian Gao, Tel: + 86-10-51503834, E-mail: gaojunlian@baafs.net.cn; Jianguang Sun, Tel: + 86-10-82106239, E-mail: jgsun@caas.ac.cn

Received: 4 May 2009/Revised: 17 July 2009