

降解质粒及其遗传控制

林 稚 兰

(烟台大学生化系, 山东烟台)

随着农药、石油、化工工业的发展, 开发了一大批天然及合成有机化合物, 如脂肪烃、芳香烃、卤代芳烃、多环芳烃、有机磷、有机氯等。这些物质排放到环境中, 带来严重污染, 已发现有致癌作用的污染物就有 1100 种, 成为人们关注的主要问题。微生物对污染物的代谢、转化及降解作用, 是当今环境污染研究中最活跃的领域之一。1981 年 Tabak^[1] 等人就报道了 114 种单环、多环、卤代芳烃、有机氯杀虫剂等被微生物降解和转化。最近研究工作已从一般寻找降解、转化污染物的微生物, 转入微生物降解代谢途径、酶系的研究和遗传控制机制的探讨, 特别是证实了降解某些烃的酶系基因在质粒上后, 导入质粒, 构建具有特殊功能高效降解能力的遗传工程菌, 为降解菌的定向育种, 开辟了一个新的途径。这对利用微生物降解环境污染中的物质使环境自净, 无疑将起重要作用。本文就生物较难降解的芳烃化合物的微生物降解、降解质粒的遗传控制及遗传工程菌的构建作一简单介绍。

(一) 芳烃化合物的微生物降解

大多数微生物降解烃功能的研究, 集中在假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 上, 假单胞菌因含有编码降解复杂有机物酶的质粒, 故有众多类型的代谢途径, 可能是该菌在自然界分布广泛、对有机污染物有强降解力的一个原因。

含降解质粒, 分解难降解的有机污染物, 除假单胞菌外, 业已证实真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*)、争论产碱菌 (*Al. paradoxus*)、蓝黑色杆菌 (*Chromobacterium lividum*) 均是降解农药、除莠剂的有效菌株, 它们多数有降解质粒, 且降解氯代芳烃功能与恶臭假单胞菌 (*Ps. putida*) 相同。如争论产碱菌、真养产碱菌能降解氯代芳烃除莠剂 2,4-D (2,4-二氯苯氧基乙酸)、3-CBA (3-氯苯甲酸)、MCPA (2-甲基 4-氯苯氧基乙酸)。这种降解能力, 也在莫拉氏菌属 (*Moraxella*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 中得到证实。此外, 降解章鱼肉碱 (nopaline) 的农杆菌属 (*Agrobacterium*)、分解聚氯联苯的红酵母 (*Rhodotorula*)、克氏杆菌属 (*Klebsiella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、降解合成聚酯化合物的青霉 (*Penicillium* 14-3) 等等, 打破了高分子聚合物不能被生物降解的观点, 特别令人注目的是证实了上述大多

数细菌均含有质粒。

Woese^[2] 等学者对细菌的 16S rRNA 进行了研究, 对现流行的革兰氏阳性和阴性菌的伯杰 (Bergey's) 分类系统提出质疑。他们认为假单胞菌属、产碱杆菌属含有降解质粒, 又能降解多环芳烃、氯代芳烃, 其间必有微妙关系, 推测革兰氏阴性菌中存有大的降解功能的基因库。

(二) 降解质粒及其遗传控制

自 70 年代初, Chakrabarty 报道在假单胞菌中发现降解樟脑质粒以来, 相继发现了许多脂肪烃、芳香烃、多环芳烃以及它们的氧化产物、蒽烯、生物碱、氯代芳烃和聚氯联苯的降解, 都受质粒编码的基因控制, 这些质粒称为降解质粒 (Degradative Plasmid 或 Catabolic Plasmid)。已报道的降解质粒, 大都来自假单胞菌属, 且都有一个自身转移的重要特性^[2,3]。

细菌质粒, 可通过转导、转化、接合实现种内、种间转移。值得注意的是降解质粒上的降解基因, 在微生物菌群间不易通过转导、转化方式转移, 只能通过接合方式而实现种内或种间转移。原因之一是噬菌体转移 DNA 的量只有染色体 DNA 的 1—2%, 多数降解质粒较大, 只有恶臭假单胞菌中的 SAL 质粒, 能通过噬菌体 ϕ 16 转导, 且只在亲缘关系相近的菌株间发生。其次, 转化要求有感受态的受体细胞, 革兰氏阴性菌一般不易出现感受期, 即使高浓度 CaCl_2 诱导, 假单胞菌也不像大肠杆菌能被诱导实现转化。第三, 通过接合, 降解质粒的遗传信息, 可快速地转移到原来不具质粒的菌中, 既不受 DNA 量的限制, 又不需受体细胞必需有同源 DNA 才能重组的限制。由表 1 可见, 许多质粒有广泛的宿主范围。如 TOL 质粒和 2,4-D 质粒, 几乎在所有革兰氏阴性菌中不受限制的转移。这种土壤微生物菌群间降解能力的传播, 推动了土壤微生物菌群间的进化, 或许提供了土壤微生物革兰氏阴性菌群中降解基因库的扩大, 为天然或合成的各种有机污染物的降解和再循环, 提供了条件。

从代谢途径来看, 脂肪烃的代谢由正烷烃氧化为相应的醇、醛、酸、酯, 相应碳链的脂肪酸经 β 氧化形成乙酰 CoA, 进入三羧酸循环; 单环芳烃、多环芳烃的氧化, 都是首先形成关键的中间产物儿茶酚、原儿茶酚、间羟基苯甲酸, 其中儿茶酚、原儿茶酚, 既可经邻位裂解途径产生乙酰 CoA 及琥珀酸, 又可经间位裂解途径

表1 天然降解质粒^(3,4)

质粒	降解底物	寄主菌	质粒大小	传播方式	寄主范围
NAH	萘	恶臭假单胞菌 (<i>Ps. putida</i>)	70 kb	接合	广
SAL	水杨酸盐	恶臭假单胞菌	63.72.82 kb	接合	广
CAM	樟脑	恶臭假单胞菌	>200 kb	接合	广
OCT	正辛烷、己烷、癸烷	嗜油假单胞菌 (<i>Ps. oleovorans</i>)	>200 kb	非接合	?
XYL	甲苯、对位或间位二甲苯	小田假单胞菌 (<i>Ps. arvilla</i>)	117 kb	接合	广
TOL	甲苯、对位或间位二甲苯、3-乙基甲苯、1,2,4-三甲基苯及其醇、醛、酸衍生物	恶臭假单胞菌	117 kb	接合	广
FP	对位、间位或原位甲酚	铜绿假单胞菌 (<i>Ps. aeruginosa</i>)	?	接合	?
ETB	烷基苯(甲苯、乙苯、苯甲酸)	荧光假单胞菌 (<i>Ps. fluorescens</i>)	?	接合	?
pAC 21	二联苯、对氯联苯	克氏杆菌 (<i>Klebsiella (revisan)</i>)	65 M dal	接合	?
pKF 1	二联苯、对氯联苯	不动杆菌属 (<i>Acinetobacter</i> sp.) 节杆菌属 (<i>Arthrobacter</i> s.)	53.7 M dal	接合	?
pAC 35	3-CBA	恶臭假单胞菌	117 kb	接合	?
pB 13	3-CBA	恶臭假单胞菌	111 kb	接合	?
pAC 27	4-CBA	恶臭假单胞菌	110 kb	接合	?
未命名质粒	3,5-二甲苯酚	恶臭假单胞菌	>78 kb	接合	?
pAC 31	3,5-二氯苯甲酸	恶臭假单胞菌	72 kb	接合	?
pJP 1	2,4-D, 3-CBA MCPA	争论产碱菌 (<i>Alcaligenes paradoxus</i>)	88 kb	接合	广
pJP 3,4,5,7	2,4-D, 3-CBA MCPA	真养产碱菌 (<i>Al. eutrophus</i> B13)	78 kb	接合	广
pJP 2,9	2,4-D, MCPA	争论产碱菌	52 kb	接合	广
pUo 1	氯代乙酸盐	莫拉氏菌属 (<i>Moraxella</i> sp.)	43.7 kb	接合	?
pWR 1	3-CBA	假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	72 Mdal	接合	?
未命名质粒	2,6-二氯甲苯	洋葱假单胞菌 (<i>Ps. cepacia</i>)	63 Mdal	接合	?
pDG 3,4	2,4,5-T	洋葱假单胞菌	40 kb 170 kb	接合	?
pOAD	ACd	黄杆菌 (<i>Flavobacterium</i> sp. K172)	?	?	?
NIC	菸碱/菸碱盐	凸形假单胞菌 (<i>Ps. convexa</i>)	?	接合	?
Ti	章鱼(肉)碱	根癌土壤杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	150—200 kb	接合	窄
RAF	棉子糖	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	?	接合	?
SCR	蔗糖	大肠杆菌	?	接合	?
LAC	乳糖	小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	50 kb	接合	?

产生乙醛及丙酮酸；而卤代脂肪烃的脱卤素作用，依赖于对底物有特异性的卤代脱氢酶，卤代芳烃的代谢，则需经氧化酶的卤素取代反应，脱去卤素的芳烃，再进一步降解。

从遗传控制来说，微生物降解上述物质的能力，可能来自质粒 DNA 的遗传信息，也可能受染色体 DNA 调控，有三种类型。

大多数质粒不能编码整个降解途径，剩余部份由

染色体基因控制。如嗜油假单胞菌、恶臭假单胞菌降解脂肪烃 OCT 质粒, 编码脂肪烃化和初生醇脱氢酶的活性, 质粒编码的末端产物是辛醇, 其余部份由染色体控制, 异常大的 CAM 质粒编码降解萘烯、樟脑情况, 与 OCT 质粒相同^[2,4]。这种质粒与染色体连接方式控制降解功能的情况, 在降解 2,4-D、MCPA、2,4,5-T 的争论产碱菌和奇异产碱菌、以及降解 Acd (6-氨基己酸环状二聚物) 的黄杆菌中, 已被澳大利亚学者 Peimberton^[5] 和日本学者 Negroro^[6] 等证实。

第二种类型是质粒和染色体分别编码某一化合物不同降解途径的酶, 二者互相补充。降解芳烃的 TOL 质粒, 最为典型^[7]。Wong^[8]、Williams^[9]、Nakazawa^[10] 分别分离到有广泛寄主范围的 117 kb 的 TOL 质粒, 证实质粒编码降解甲苯、二甲苯、3-乙基苯和 1,2,4-三甲基苯以及它们的醇、醛、酸等衍生物的间位裂解途径, 丢失质粒的菌株, 仍能使上述物质降解, 进一步证明存在一条染色体控制的邻位裂解途径。

第三种类型是某些菌株中, 某种特殊物质的降解由质粒编码; 而另外一些种中, 同样降解途径, 由染色体编码。如恶臭假单胞菌中萘碱/萘碱盐的基因位于染色体上, 而凸形假单胞菌的降解基因位于 NIC 质粒上, 其质粒编码的末端产物为延胡索酸、顺丁烯酰胺酸, 进一步代谢由染色体 DNA 控制。

(三) 遗传工程菌的构建

受质粒控制的有机污染物的降解, 与染色体控制的育种方式不同, 降解质粒可以通过接合进行种内、种间转移; 或降解基因片段转座、染色体基因插入, 造成突变质粒; 也可将质粒作为外来基因的载体, 按人们的意愿, 把不同降解能力的基因克隆, 构建新的杂种质粒, 导入合适的受体。无论质粒转移, 突变质粒筛选、遗传工程技术应用, 在降解微生物育种方面, 均有不少成功的报道。为获得商业上有足够吸引力的工程菌, 提供了可喜的前景。

1. 质粒转移构建多质粒菌株: 通过天然质粒的转移, 实现育种的一个典型例子是采用连续杂交方法, 将降解芳烃、萘烯、多环芳烃的几个质粒, 经接合转移到一株降解脂肪烃的假单胞菌中^[11], 构建成一株同时可降解四种烃类的新菌株。它带有 XYL (消化甲苯、二甲苯)、NAH (消化萘)、和一个由 CAM (消化樟脑)、OCT (消化辛烷、己烷、癸烷) 质粒片段重组而成的杂种质粒, 它是获得美国专利法庭批准的第一个遗传工程菌。这种多质粒菌株在自然生态环境中, 能在几小时内把原油中 60% 烃消耗掉, 而野生菌株消耗浮油要一年以上。

接合转移构建多质粒“杂种”另一项有效工作是解烃抗汞质粒的构建。Chakrabarty 等人将嗜油假单胞菌 OCT 质粒和 MER 质粒(耐高浓度汞)一起, 转移给对汞敏感的恶臭假单胞菌。培养基中汞浓度超过

2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 敏感菌中毒死亡, 若细菌中含有 OCT 和 MER 质粒的结合体, 不但能降解辛烷, 且能在 50—70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 汞中生长, 清除环境中大量毒性有机汞。

2. 利用质粒突变筛选高效降解菌: 利用质粒突变株, 对顽固的卤代芳烃等农药的降解, 有不少成功的报道。最初是 Worsey 和 Kunz^[12,13] 等人对 TOL 质粒的研究, 该质粒由两个分离的操纵子构成, 56 kb 的大片段, 为携带抗性基因的转座子部分, 能精确摘除的 40 kb 小片段, 为隐蔽基因, 二片段间由 1.4 kb DNA 片段相连, 业已证实质粒上的转座基因, 既能转移到染色体上, 又能转移到 RP, 质粒上。Chakrabarty^[14] 利用 TOL 质粒基因转座的特性, 构建质粒突变株。如恶臭假单胞菌的 pAC 25、pWR 1 质粒, 带有编码 3-CBA (3-氯苯甲酸) 降解的全部酶系, 由于起始酶要求底物高度专一性, 不能降解 4-CBA (4-氯苯甲酸) 和 3,5-DCB (3,5-二氯苯甲酸), 但该二质粒能编码 4-氯儿茶酚氧化酶系 (4-氯儿茶酚为 4-CBA 氧化的产物)。他们利用 TOL 质粒带有非专一的苯甲酸氧化酶系特点, 在 4-CBA 存在条件下, 将含有 TOL 质粒的 4-CBA⁺ 细胞与带 pAC 25 质粒 4-CBA⁻ 细胞混合培养, 通过接合转移, TOL 质粒 117 kb 中 39 kb 的基因片段, 转座至 4-CBA⁻ 细胞的染色体上, 提供了苯甲酸氧化非特异的酶系, 帮助将 4-CBA 转化至 4-氯儿茶酚, pAC 25 质粒 (117 kb) 突变为 pAC 27 质粒 (110 kb), 保持全部 3-CBA 降解基因, 故可继续降解 4-氯儿茶酚。还用同样方法, 筛选到补充 TOL 质粒复制子/不亲和基因的突变质粒 pAC 29, 能在 3,5-DCB 上生长。TOL 质粒既提供了编码苯甲酸氧化酶系已转座于染色体的基因, 又提供了复制子。西德的 Reineke 和 Knackmuss 等转移 TOL 质粒至假单胞菌 B₁ 菌株, 也获得了同样的结果^[15,16]。Nakazawa 和 Yokota 转移 TOL 质粒至恶臭假单胞菌, 也使该菌获得了 3-甲基水杨酸的降解能力^[10]。

质粒相互作用, 扩展微生物降解能力的另一个例子是聚氯联苯降解菌的构建。Chakrabarty^[14,17] 将恶臭假单胞菌氯代苯甲酸降解质粒 pAC 27 (降解 3-CBA、4-CBA) 或 pAC 31 (降解 3-CBA 4-CBA 3,5-DCB) 和同化 pCB 质粒(将氯代二联苯转换为氯代苯甲酸)接合, 组建了突变质粒的菌株, 这种新筛选出来的不动杆菌属和节杆菌属单一菌株, 就能降解单氯二联苯和二氯二联苯。Sayler 等人也报道分离了一株降解多种聚氯联苯的菌株^[14]。众所周知, 降解 2,4-D 的微生物, 广泛分布于水和土壤中, 而降解致癌、致畸除莠剂 2,4,5-T (2,4,5-三氯苯氧乙酸) 的微生物, 却极为罕见。Chakrabarty^[14,17] 等人在 2,4,5-T 培养液中, 除接种农药污染的土样外, 有意识的接种具降解质粒 CAM、TOL、SAL、pAC 21、pAC 25 的微生物, 经 8—10 个月培养, 筛选到了降解 2,4,5-T 的洋葱假单胞菌 AC1100。

六周内使初始浓度为 10000 (20000) ppm. 的 2,4,5-T 污水, 下降至浓度为 500 (1500) ppm., 除菌后的水可供植物生长, 业已证实其中含 170 kb 的 pDG 3 和 40 kb 的 pDG 4 质粒^[20]。不仅能降解各种含氯芳烃 (2, 3, 4, 5 氯苯酚), 也能降解溴代、氟代同系物。表明降解酶是非专一性的。Don 和 Pemberton 也证实争论产碱杆菌能降解 2,4-D 和 2,4,5-T^[21]。

降解基因的转座和易位, 为土壤微生物降解质粒的演化或扩展, 创造了条件。已知水杨酸盐降解质粒 SAL 和萘降解质粒 NAH, 就有着密切的进化关系。NAH 质粒控制由萘经水杨酸、儿茶酚降解途径; SAL 质粒控制水杨酸、儿茶酚降解途径, 两个质粒均控制儿茶酚间位裂解途径, 相差两个相邻的 3 kb DNA 片段, 推测可能是小片段 DNA 插入形成 NAH 质粒^[22]。Chakrabarty 报道^[23]恶臭假单胞菌 pAC 25、pAC 27 质粒功能相同, 相差 7 kb DNA 片段; 产碱杆菌的 pJP 4 与假单胞菌 pWRI 质粒和 pAC 25 质粒在结构基因区同源; pAC 25、SAL、TOL 质粒在降解功能和抗性基因上, 有相当多的同源区。自然界中通过质粒基因扩增、质粒进化、质粒之间相互补充作用, 从而促使有毒农药分子进一步降解为无害的末端产物。

3. 基因克隆的遗传工程菌: 利用基因克隆构建具有特殊降解功能的菌株, 也有不少报道。假单胞菌特有基因克隆后, 可再转入假单胞菌中, 也可在其他菌中表达。1983 年 Schell 等人在大肠杆菌中成功地实现了 NAH 萘降解质粒中 nah 1 和 nah 2 两个操纵子重组基因的表达。众所周知, 大肠杆菌 K 12 是基因克隆、扩增的最理想菌株, 但降解基因功能在不能氧化碳氢化合物的微生物中表达, 多数呈现减弱情况, 称为种的壁垒。这种外来降解基因表达能力的丧失和差异, 在 TOL 质粒和 2,4-D 降解质粒中也得到证实。有人推测可能是大肠杆菌等遗传背景与原假单胞菌不同, 依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶和核糖体结合位点不同而引起的; 有人认为可能由于新菌株缺少染色体基因控制的某种膜结构, 这种膜结构是碳氢化合物获取或贮存的位点; 或缺少碳氢化合物降解功能表达所需要的由染色体基因编码的特殊调节蛋白所致。为避免种的壁垒, 现多集中研究假单胞菌降解功能调节控制工作。

克隆降解基因的载体, 可用假单胞菌属中的固有质粒 (分子量较大), 也可选用寄主范围广泛的小质粒^[24], 如带有多重抗性标记、多个内切酶插入缺失突变的 8—9 kb 的 RSF 1010、R300B、R 1162 小质粒, 这些小质粒, 能高效的将外来基因转化至假单胞菌、产碱杆菌等革兰氏阴性菌中, 形成的杂种质粒, 不但拷贝较多, 且性能稳定。如 RSF 1010 质粒, 嵌入大肠杆菌色氨酸的操纵子, 转移到假单胞菌后, 色氨酸合成酶产量比大肠杆菌原酶产量高 200 倍, RSF 1010 已成为革兰氏阴性菌中广泛应用的一个质粒。自 RSF 1010 质粒衍生

而来的 11.9 kb pKT 230 质粒, 也是有广泛寄主范围的“有效质粒”, TOL 质粒与 pKT 230 质粒部分基因克隆, 在大肠杆菌和恶臭假单胞菌中均可获得儿茶酚非诱导的 2,3-加氧酶活性高水平表达。选用假单胞菌作为质粒工程菌, 因不产毒素, 无致病性, 在 37℃ 体温下生长缓慢, 以及能在碳氢化合物、纤维素、木质素等廉价碳源上生长, 更有其优点。

从上面看到, 利用遗传工程进行降解菌的定向育种, 目前大多数处于实验室研究阶段, 但降解质粒的遗传学研究, 无疑将为降解菌的定向育种, 清除环境中石油、农药、重金属的污染, 开辟一条新的途径。

参 考 文 献

- [1] Tabak, H. H. et al.: *J. Water Pollut Control. Fed.*, 53: 1503, 1981.
- [2] Pemberton, J. M. et al.: "Degradative Plasmid" In "International Review of Cytology", 84: 155—181, Eds. Bourne, G. H. et al., New York, Academic Pr., 1983.
- [3] Chakrabarty, A. M. et al.: In "Genetic Control of Environmental Pollutants", 2—31, Eds. Ome nn, G, S. New York, Plenum Pr., 1984.
- [4] James, S. et al.: In "Genetics of Industrial. Microorganisms", 147—153, Eds. Sebex, O. K. Wash., ASM, Ref., 1979.
- [5] Pemberton, J. M.: *J. Bacteriol.*, 135: 798—804, 1978.
- [6] 专利号: AD/A117, 730/2, 1982.
- [7] Peter, J. C. et al.: *J. Bacteriol.*, 146: 952—964, 1981.
- [8] Wong, C. L. et al.: *Genet. Res.*, 23: 227—232, 1974.
- [9] Williams, P. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 120: 416—423, 1974.
- [10] Nakazawa, F. et al.: *Jpn J. Bacteriol.*, 28: 46—51, 1973.
- [11] Arnold, L. et al.: 科学(中译本)1: 1—42, 1982.
- [12] Worsey, M. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 124: 7—13, 1975.
- [13] Kunz, D. A. et al.: *J. Bacteriol.* 146: 179—191, 952—964, 1981.
- [14] Chakrabarty, A. M. et al.: In "Genetic Manipulation Impact on Man and Society", 43—54, Eds. Werner A. et al. Cambridge, The Univ. Pr., 1984.
- [15] Knackmuss, H. J. et al.: *Nature*, 277: 385—386, 1979.
- [16] Timmis, K. N. et al.: *Biochem. Soc. Cymp.*, 48: 191—219, 1983.
- [17] Chakrabarty, A. M. et al.: *Appl. Environ. Microb.*, 44(3): 619—626, 1982.
- [18] Sayler, G. S. et al.: *Appl. Environ. Microb.*, 46(3): 666—672, 1983.
- [19] Chakrabarty, A. M. et al.: *Science*, 214: 1133—1135, 1981.
- [20] Chakrabarty, A. M. et al.: In "Plasmid in Bacteria" 1—21, Eds. Helinski, D. et al., New York, Plenum Pr. 1986.
- [21] Pemberton, J. M. et al.: *J. Bacteriol.*, 145: 681—686, 1981.