

浸矿细菌的遗传工程

颜 望 明

(山东大学微生物研究所, 济南)

硫杆菌属 (*Thiobacillus*) 的一些种, 氧化硫硫杆菌 (*T. thiooxidans*) 和氧化亚铁硫杆菌 (*T. ferrooxidans*), 广泛分布于硫化矿床的酸性矿水中, 最适生长 pH 为 2.0—2.5, 是一类革兰氏阴性专性自养细菌。这类细菌广泛应用于有用金属的浸出, 特别适合于从低品位的矿石中浸出稀有贵金属。它们的主要作用是通过氧化 FeSO_4 或 FeS_2 产生 Fe^{3+} 氧化剂, 氧化金属硫化物使之变成可溶性的硫酸盐形式, 从而通过置换回收有用的金属。近年来已证明这类细菌还可以用于煤的脱硫以及含硫废水的处理, 在环境保护方面发挥着重要的作用, 因此越来越引起人们的注意。

但是, 这类细菌生长缓慢, 代期长, 细胞得率低, 这些因素限制了它们的工业应用。同时由于不能提供足够的细胞材料, 也给生化检测, 蛋白质和酶的分离和质粒 DNA 的提取等带来困难。这就需要用遗传学方法改良这些菌种, 使之适合于实际应用的要求。

对这类细菌的遗传学研究刚刚开始, 对它们的遗传背景了解得很少。在文献上有关把遗传信息引入细菌有三种方法: 即转导、接合和转化。就目前所知在嗜酸性硫杆菌中尚未发现噬菌体。通过广泛寄主的 R 质粒接合转移已有一些报道^[1-3], 但都在中性硫杆菌中, 在嗜酸性硫杆菌中尚未获得成功。因此选择转化途径比较现实。选择转化系统是以硫杆菌的原始质粒为起点, 建立重组质粒载体, 目的是建造一个质粒, 使它既能在大肠杆菌中也能在硫杆菌中复制和表达遗传信息, 构建这种质粒的主要意义有以下几点:

1. 上面已提到, 硫杆菌生长缓慢, 细胞得率低, 用于提取 DNA 和分离基因要获得大量的菌体很困难。有了这种载体, 硫杆菌的基因可

以在大肠杆菌中扩增, 简化了质粒纯化过程, 提高了质粒的产量。为进一步研究自养的硫杆菌基因和基因产物提供了机会。

2. 通过选择硫杆菌质粒成分, 在大肠杆菌或硫杆菌中表达, 为研究硫杆菌质粒的生物功能提供了机会。

3. 为研究来自大肠杆菌或其它异养细菌的基因在自养的硫杆菌中表达的可能性提供了机会。

(一) 专性自养嗜酸性硫杆菌质粒的分离

选择转化系统必须要有合适的载体。1980 年 Mao^[4] 首先报导从氧化亚铁硫杆菌和兼性自养嗜酸性硫杆菌中分离得到了质粒, 其大小不同, 分子量为 2.53×10^6 — 40×10^6 。

1981 年 Martin 等^[5] 对不同来源的 15 株氧化亚铁硫杆菌进行了质粒的检测, 除了四个菌株不含质粒外, 其它 11 个菌株都含有质粒, 分子量范围为 4.9×10^6 — 50×10^6 。

1986 年金松谟等^[6] 首次从氧化硫硫杆菌中分离得到质粒, 在不同来源的 7 个菌株中, 有 6 个菌株含有不同大小的质粒, 分子量从 1.3×10^6 — 98×10^6 。其中只有一个菌株不含有质粒。

从文献报导看来, 质粒在硫杆菌中是普遍存在的。某些氧化硫硫杆菌和氧化亚铁硫杆菌菌株缺乏质粒, 间接地说明了在硫杆菌中硫和亚铁的氧化机能不是由质粒所编码的。已分离的硫杆菌质粒, 虽然目前还不了解它们所编码的具体性状, 但是, 它们的存在对于开展自养细菌遗传学研究具有重要意义, 为用基因工程方法改造硫杆菌的性状提供了必备的基因载体。

(二) 硫杆菌质粒的改造

众所周知, 作为基因的载体必须具备: (1) 是一个复制子, 能自我复制; (2) 要有可供选择的遗传标记; (3) 要有尽可能多的单一的限制

性内切酶的切点,以便于克隆外源 DNA。

但是目前已分离的硫杆菌质粒还不了解其所编码的具体性状,也不具有可供选择的选择性标记,要构建符合上述要求的载体必须加以改造,改造的简便方法,就是从大肠杆菌引入,也即利用大肠杆菌现有的质粒如 pBR 322 和 pBR 325 等与硫杆菌质粒进行重组,目的是将硫杆菌质粒的复制原点完整地组合进去,构建一个在大肠杆菌和硫杆菌中都能复制又携带有选择性标记和多个单一限制性内切酶酶切位点的质粒载体。

1984 年 Holmes 等^[7]从氧化亚铁硫杆菌中分离得到大小分别为 6.9 Kb、16 Kb 和 23 Kb 的三个质粒,他们选择了质粒 pTf1(6.9Kb),通过 HindIII 或 BamHI 和 Bgl III 酶切位点,酶切后与大肠杆菌 pBR 322 质粒重组,分别构成分子量为 11.26 Kb 命名为 pTf100 和 pTf110 质粒,前者是通过 Hind III 酶切位点与 pBR 322 重组而成,后者是通过 BamHI 和 Bgl II 酶切位点重组而成(图 1),建造成的杂合质粒同时含有 pBR 322 和 pTf1 质粒两个复制原点,还保留了 Ap^r 选择性标记。

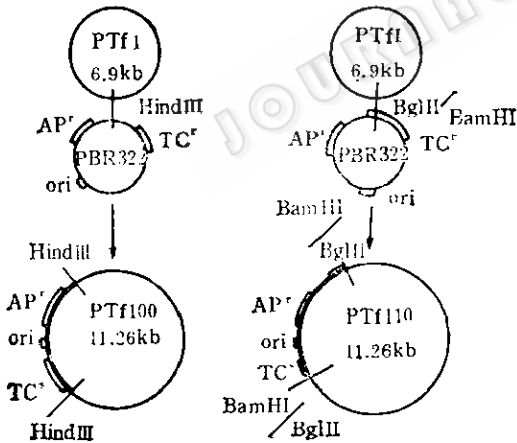


图 1 氧化亚铁硫杆菌质粒 pTf1 与大肠杆菌 pBR 322 重组示意图

(三) 专性自养硫杆菌的基因在异养大肠杆菌中表达

按照获得能量和合成细胞成份的方式,细菌可以分为两类:自养细菌和异养细菌。自养与异养的区别和关系,在生理学和生物化学方

面已进行了比较深入的研究,但从遗传学角度研究还刚刚开始,自养细菌的基因能否在异养细菌中复制和表达?反之,异养细菌的基因能否在自养细菌中复制和表达?研究这些问题可以从基因水平上来阐明这类细菌的特殊生理性状。

1. 氧化亚铁硫杆菌质粒复制原点在大肠杆菌中表达:1984 年 Rawlings 等^[8],构建了一个重组质粒,他们以氧化亚铁硫杆菌的一个隐蔽质粒 pTf-Fc2 为原始材料,大小为 12.4 Kb,通过 pst I 内切酶位点与 pBR 325 重组,构成了一个大小为 17.8 Kb 的重组质粒,命名为 pDR 401,这个质粒带有二个抗药性遗传标记 Cm^r、Tc^r。这个重组质粒还含有 pBR 325 的复制原点,同时还含有 pTf-Fc2 质粒的复制原点。Rawlings 等还根据酶切分析,巧妙地再用 SalI-xhoI 内切酶,删除了重组质粒的大约 3.1 Kb 片段,在删去的这个片段中含有 pBR 325 的复制原点和接近一半的抗四环素基因,并且含有氧化亚铁硫杆菌 pTf-Fc2 质粒的大约 0.3 Kb 的 DNA 片段。实际上保留了氧化亚铁硫杆菌质粒绝大部分,也即保持了 pTf-Fc2 质粒复制原点的完整性(图 2)。连接后形成了一个含有 Cm^r 标记的质粒,再转入大肠杆菌。证明了把大肠杆菌质粒的复制原点删除后,仍具有氯霉素抗性,表明了氧化亚铁硫杆菌质粒的复制原点,能在大肠杆菌中表达。

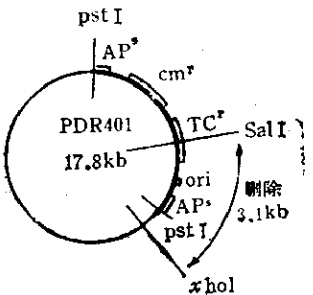


图 2 重组质粒 pDR401 删除 pBR325 复制原点过程示意图
粗线 来自 pBR325 细线 来自 pT5-Fc2

1985 年 Rawlings 等^[9]又把上述质粒成功地转入了氧化亚铁硫杆菌中,进一步证明了他们所组建的这个质粒既可以在大肠杆菌中复制

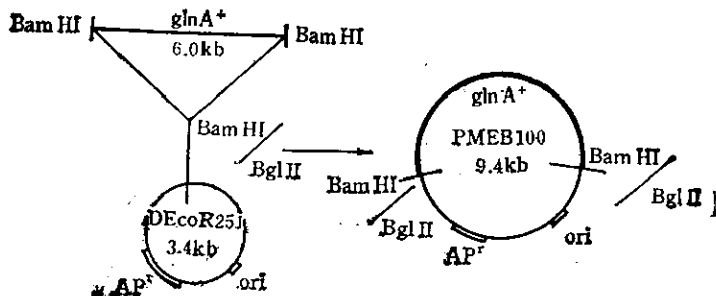
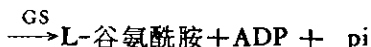
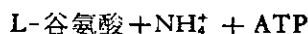


图3 含有氧化亚铁谷氨酰胺合成酶基因的载体构建过程

表达,又可以在氧化亚铁硫杆菌中复制和表达。这个穿梭质粒的构建成功,大大地丰富了自养细菌遗传学研究内容,对于自养与异养细菌之间在基因信息表达的研究具有重要的意义,而且为用基因工程改造在细菌浸矿、环境保护中使用工业菌株成为可能。

2. 氧化亚铁硫杆菌谷氨酰胺合成酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达: 谷氨酰胺合成酶(GS),在氮的同化过程中起着重要的作用,它催化如下反应:



谷氨酰胺合成酶(GS)是由结构基因 glnA 编码的。

1985年 Barros 等^[10]用 BamHI 内切酶酶切从氧化亚铁硫杆菌中分离得到一个含有谷氨酰胺合成酶基因(glnA^+)的染色体 DNA 片段,其大小为 6 Kb。这个片段又通过 Bgl II 酶切位点与质粒 pEcoR 251 重组而形成一个重组载体 pMEB 100 (Ap^rgluA^+) (图 3)。再将 pMEB 100 转入谷氨酰胺合成酶缺失突变型的受体细菌: ET 8051 和 YMC 11 菌株,当 pMEB 100 质粒转入大肠杆菌受体菌后可以使受体菌利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为唯一氮源,并且来自氧化亚铁硫杆菌的 glnA^+ 基因在大肠杆菌(受体菌)中表现了高特异活性。用 Southern blot DNA 分子杂交表明,氧化亚铁硫杆菌 glnA^+ 基因与大肠杆菌 glnA^+ 基因之间并没有发现 DNA 的同源性。

氧化亚铁硫杆菌谷氨酰胺合成酶基因在大肠杆菌中的表达,第一次证明了一个专性自养

细菌的结构基因在异养细菌中表达。

(四) 用遗传工程方法改造硫杆菌的实例——氧化亚铁硫杆菌抗砷载体的构建

在金精矿中常常含有砷杂质,用火法冶炼含严重污染环境,用氰化物提取,提取率较低,因此利用氧化亚铁硫杆菌浸出,洗除去砷后再用氰化物提金,可大大提高金的提取率,但有些金精矿中含砷较高,抑制了氧化亚铁硫杆菌的生长,必须选育抗砷的菌株。

1985年6月英国专利公布了一项发明^[11],南非开普顿大学的 Rawling 和 wood 利用前面已提到的一个氧化亚铁硫杆菌质粒与 pBR 325 质粒的重组体 pDR 401。通过 clal 酶切位点,将 pDR 401 质粒的一个大小为 8.8 Kb 的片段删除(这一片段含有 pBR 325 质粒的复制

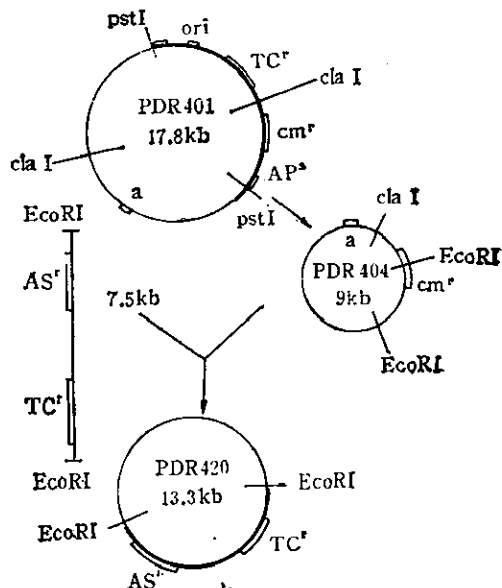


图4 氧化亚铁硫杆菌抗砷载体的构建过程

(下转第 190 页)

(上接第 175 页)

原点),形成了一个大小为 9 Kb 的 pDR 404 质粒,然后将来自大肠杆菌质粒 R 46 的一个含抗砷基因的 DNA 片段 (7.5Kb) 通过 EcoRI 酶切位点,完全消化后去置换 pDR 404 质粒的相应片段,组建成一个大小为 13.3 Kb 的具有 As^r 和 Tc^r 的 pDR 420 质粒(图 4)。它既可以在大肠杆菌中复制,也可以在氧化亚铁硫杆菌中复制。这种抗砷菌株用于金精矿浸出,可以提高金的提取率。

参 考 文 献

[1] Charles, F. K. et al.: *J. Bacteriol*, **156**(1): 434—436,

1983.

- [2] Plasota, M.: *Acta. Microbio. Pol.*, **34**(1): 81—83, 1985.
- [3] Davidson, M. S. et al.: *Appl. Environ Microbiol*, **49**(6): 1436—1441, 1985.
- [4] Mao, M. W. H.: *FEMS Microbiology Letters*, **8**: 121—125, 1980.
- [5] Martin, P. A. W. et al.: *Can. J. Microbiol*, **27**(8): 852—853, 1981.
- [6] 金松谟、颜望明: *微生物学通报*, **15**(1): 20—21, 1988.
- [7] Holmes, D. S. et al.: *J. Bacteriol*, **157**(1): 324—326, 1984.
- [8] Rawlings, D. E. et al.: *J. Bacteriol*, **158**: 737—738, 1984.
- [9] UK Patent Application GB 2 148 300 A, 1985.
- [10] Barros, M. E. C. et al.: *J. Bacteriol*, **164**(3): 1386—1389, 1985.
- [11] UK Patent Application GB 2 149 798 A, 1985.