

氧化亚铁硫杆菌的铁和硫化物氧化系统及其分子遗传学*

何正国 李雅芹 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

Fe²⁺-OXIDATION AND SULPHUR-OXIDATION SYSTEM OF *THIOBACILLUS FERROOXIDANS* AND ITS MOLECULAR GENETICS*

He Zhengguo Li Yaqin Zhou Peijin

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

关键词 氧化亚铁硫杆菌, 硫化物氧化酶, 铁氧化系统, 分子遗传学

中图分类号 Q939.14 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2000)05-0563-66

氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)是典型的化能自养菌,由于能生长在亚铁,元素硫和硫化物矿物上,因而成为生物湿法冶金(Biohydrometallurgy)中最有应用价值的一个种。目前南非,美国,加拿大等国应用它提取铜,铀,金等已获得工业生产,另外它在煤和原油的脱硫方面也展现了广阔的应用前景^[1]。多年来,我们对氧化亚铁硫杆菌在冶金和煤脱硫方面的应用研究也取得一定进展,如铜,铀,锰,金等金属提取,有的已进行了扩大试验或半工业试验^[2,3]。

但是,该菌是典型的无机化能自养细菌,其生长速率缓慢常使生物浸矿时停留时间太长,给寻找适宜的工业处理循环方式带来困难。因此必须增强对这种细菌在进行化能自养生活方式中能量再生机制的理解。这包括必需发展其遗传操作系统,从而能对商业菌株进行必要的遗传改造。经过近二十年的努力,已经对该菌浸矿中的关键酶—铁和硫化物氧化酶及其分子遗传学有了较深入的了解,从而使这种细菌具有更重要的工业应用价值。

1 氧化亚铁硫杆菌的遗传系统

1.1 质粒

内源质粒在硫杆菌中存在相当普遍,p^{TF1}和 p^{TF-FC2}是分别从日本和南非分离的两个质粒,研究发现,它们都与 IncQ 质粒有相似之处,特别是 p^{TF-FC2}呈现出一种天然的杂合物,它同时拥有类似 IncQ 质粒的复制功能区和 IncP 质粒的运动区,目前至少有三个来源于氧化亚铁硫杆菌的质粒被用来构建载体开展该菌株的基因转移研究。

1.2 异源基因表达和筛选标记

用大肠杆菌克隆的氧化亚铁硫杆菌的基因表达研究证实,它的绝大多数持家基因能够与大肠杆菌中的相应基因互补。尽管有迹象表明,异养菌的基因在氧化亚铁硫杆菌中表达不应该是很难的,但在遗传操作中寻找适合的遗传标记仍然存在困难。原因之一是该菌在硫培养基上生长时产生过低的 pH

* 本研究得到国家自然科学基金重点项目(59834150)

作者简介 何正国(1969—),男,湖北武汉人,讲师,硕士,1998 年 9 月到中国科学院微生物研究所攻读博士学位,主要从事极端环境的微生物学研究

收稿日期:1999-04-13,修回日期:1999-08-30

和在铁培养基上生长时过高的金属离子浓度使绝大多数的抗生素失活;另一个原因是这类细菌生长缓慢,当经过 10~14d 菌落在固体培养基上长出时,所用的抗生素已经失活了。目前卡那霉素是唯一能在硫培养基上成功应用的抗性标记^[4],汞抗性则是在铁培养基上唯一获得成功的选择标记。

1.3 基因转移系统的研究

在原核生物中引入外源基因的方式主要有转化,转导和接合三种。但在氧化亚铁硫杆菌中尚未发现噬菌体,因此转导无法实施。在参与生物浸出的常温型细菌中,仅有氧化亚铁硫杆菌和氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)中有关于基因转移系统的报道。

1992 年 Kusano^[5]等人报道了通过电转化的方式以汞抗性为标记转化氧化亚铁硫杆菌 Y-4-3 株取得成功。但是转化频率相当低,因此这种方法是否有效也有待进一步探索。

1994 年 Peng 等人利用大肠杆菌 IncP 族质粒能够转移到氧化亚铁硫杆菌中并表达其功能的特性,他们选用 pJRD215 作为氧化亚铁硫杆菌基因工程载体,通过整合在大肠杆菌 SM10 染色体上的 RP4 质粒 Tra 基因的作用被带动转移到氧化亚铁硫杆菌中,使得该质粒上的两个抗性基因(卡那霉素和链霉素基因)和抗砷基因(As^r)被成功地转移到氧化亚铁硫杆菌中并获得表达^[6,7]。

2 氧化亚铁硫杆菌中铁和硫氧化系统

2.1 铁氧化系统

由于分子生物学技术的应用,氧化亚铁硫杆菌铁氧化系统中的绝大多数功能成份已得到了鉴定。它主要包括一个 92kD 的外膜蛋白,一个称为铁质兰素的小兰铜蛋白,许多 c 和 a 型细胞色素及铁(II)氧化酶等。铁(II)氧化酶定位在周质空间,它是电子从 Fe^{2+} 开始传递链途径中的一个组分,是一个位于铁质兰素和各种细胞色素前面的电子传递体^[8]。

2.2 硫氧化系统

硫杆菌对无机硫化物的氧化可归纳为图 1^[9]。

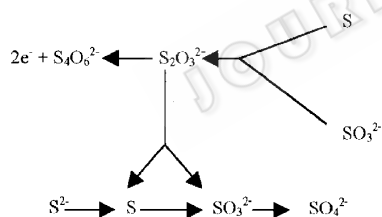


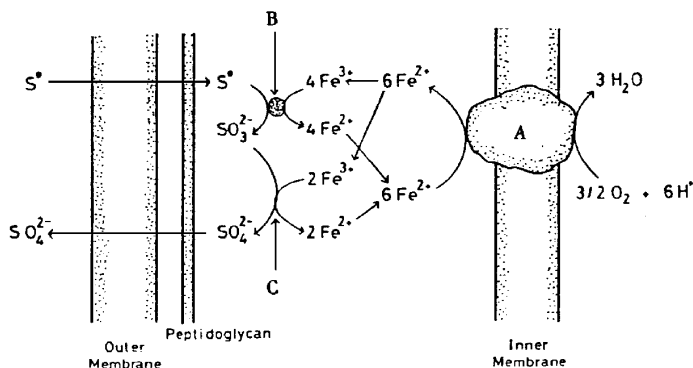
图 1 硫杆菌的无机硫氧化机制

以亚铁基上生长的氧化亚铁硫杆菌中纯化到一种性质独特的酶,即在好氧条件下它依反应式(a)反应,而在厌氧条件下 Fe^{3+} 可以取代 O_2 作为电子受体使硫发生氧化(图 2)。它的这种酶需要 GSH,被称为硫化氢- Fe^{3+} 氧化还原酶^[10]。

因此,在氧化亚铁硫杆菌中,关于元素硫的氧化已证实存在两种机制:(1)在硫基础盐培养基中有氧生长时硫氧化以氧为最终电子受体;(2)在铁基础盐培养基中厌氧生长时,它利用三个酶即硫化氢- Fe^{3+} 氧化还原酶,亚硫酸- Fe^{3+} 氧化还原酶及铁(II)氧化酶,共同将元素硫氧化为硫酸。其中硫化氢- Fe^{3+} 氧化还原酶以 Fe^{3+} 为最终电子受体将元素硫氧化成亚硫酸^[11]。上述两种情况下的硫氧化酶均定位于周质空间。

3 氧化亚铁硫杆菌中基因克隆的策略及应用前景

由于氧化亚铁硫杆菌特殊的生理性质,所以开展其分子遗传学研究始终面临着选择合适的克隆载体,合适的筛选标记和将 DNA 导入细胞的有效方法等方面的挑战。尽管如此,人们还是采取多种方法从该菌中克隆了许多基因。这些方法包括(1)根据蛋白质氨基酸合成探针,通过 PCR 方法,如兰铜蛋

图2 Fe^{3+} 为电子受体氧化元素硫示意图A. 铁氧化系统 B. 硫化氢- Fe^{3+} 氧化还原酶 C. 化学反应

白基因^[12],铁(II)氧化酶基因(iro)^[8];(2)与大肠杆菌相应突变株互补克隆基因,如酪氨酸氨酰 tRNA 合成酶基因(tyz)^[13];(3)利用异源基因为探针,通过分子杂交的方法克隆基因,如 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶基因^[14]和固氮酶基因^[15]等。

目前,已有许多关于自养嗜酸硫氧化细菌生理,遗传及能量代谢机制方面研究的报道^[16~19]。从商业的角度来说,氧化亚铁硫杆菌的铁和硫氧化能力是其具有重要实用价值的原因。相对来说,其绝大多数铁氧化系统基因得到鉴定。最近,定位于自养硫杆菌周质空间中的还原型硫化物氧化途径中的一些酶已开始纯化,如硫代硫酸氧化酶^[20]等。并有一个硫氧化途径的调节基因(其序列存取号为 gbAF005208)被克隆测序。另外,一个嗜热古菌(*Acidianus ambivalens*)的硫氧化酶已被纯化^[21],对其研究发现,该酶不需要任何辅因子即可表现出酶活性,这与氧化亚铁硫杆菌的复杂多组份硫氧化系统相比更有希望尽快得到应用。能否通过遗传工程对这个酶基因进行改造,然后再应用于浸矿,目前尚未见有报道,我们正在进行此方面的尝试。

参 考 文 献

- [1] Rawlings D E. *J Industrial Microbiol Biotech*, 1998, **20** :268~274.
- [2] 张树政,王修垣. 工业微生物学成就. 北京: 科学出版社, 1988. 163~176.
- [3] 李雅芹,夏伟,钟慧芳. 微生物学报, 1996, **36** (1) :42~47.
- [4] Jin S M, Wangming Y, Zhouning W. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58** :427~430.
- [5] Kuano T, sugawara K, Inoue C, et al. *J Bacteriol*, 1992, **174** :6617~6623.
- [6] Peng J B, Wangming Y, Xuezhou B. *J Bacteriol*, 1994, **176** :2892~2897.
- [7] Jibin P, Wangming Y, Xuezhou B. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** :2653~2656.
- [8] Yamanaka T, Yano T, Kai M, et al. The Electron Transfer System in An Acidophilic Iron-Oxidizing Bacterium. In: Mutohata Y ed. New Area of Bioenergetics. Tokyo: Academic Press, 1991. 223~246.
- [9] 徐海岩,颜望明. 微生物学通报, 1994, **21** (3), 167~171.
- [10] Suzuki I. *Methods in Enzymology*, 1994, **243** :455~462.
- [11] Sugio T, Takayaki K, Miki M, et al. *J Bacteriol*, 1987, **169** :4916.
- [12] Hall J F, Hasnain S S, Ingedew W J. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **137** :85~89.
- [13] Salazar O, Sagred O, Takamiya M, et al. *J Bacteriol*, 1994, **176** :4409~4415.
- [14] Kusano T, Takeshima T, Inoue C, et al. *J Bacteriol*, 1991, **173** :7313~7323.
- [15] Rawlings D E. *Gene*, 1988, **69** :337~343.
- [16] Friedrich G C. *Adv Microbiol Physiol*, 1998, **39** :235~289.

-
- [17] Zimmermann P, Laska S, Kletzin A, *et al.* *Arch Microbiol*, 1999, **172**: 76~82.
- [18] Kelly D P. *Arch Microbiol*, 1999, **171**: 219~229.
- [19] Kisker C. *Cell*, 1997, **91**: 973~983.
- [20] Visser J M, Goardus A, Jong H, *et al.* *Arch Microbiol*, 1997, **166**: 372~378.
- [21] Kletzin A. *Sys Appl Microbiol*, 1994, **16**: 534~543.
-

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(59834150)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>