

生物修复中细菌的遗传修饰*

潘学冬 虞云龙

(浙江大学农业与生物技术学院植物保护系 杭州 310029)

Genetic Modification of Bacteria for Bioremediation

Pan Xuedong Yu Yunlong

(Department of Plant Protection, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

关键词: 生物修复, 细菌, 遗传修饰

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2002) 01-0121-04

有机污染的土壤过去常用物理修复或化学修复, 成本较高, 易引起二次污染, 还可能危害微生物区系和动物区系。生物修复技术以其独到的优势迅速兴起。土壤中“*Magic Six*”(水分、氧气、氧化还原电势、pH 值、营养状态、温度)对微生物降解的影响^[1]或者土著菌(indigenous bacteria)缺少编码某一降解酶基因成为污染物生物降解的限制因子, 土著菌常常难以适应处理环境, 达不到环境治理工程的目的。

细菌对有机污染物适应性的遗传机制研究表明, 细菌为了在污染地区环境中生存, 细菌之间可发生水平基因转移或细菌的染色体内进行基因重排、突变、复制以形成能够降解有机污染物的优势菌, 从而充分利用有机污染物作为生长基质或者共代谢有机污染物^[2]。因各种环境条件和生物因子的限制, 细菌的进化是相当缓慢的而且没有一定的方向, 因此需通过基因工程促进细菌的遗传进化满足生物修复工程的需要。基因工程菌的构建常用代谢途径工程和蛋白质工程。代谢途径工程是将编码不同降解功能的质粒转入同一细菌内或进行 DNA 重组, 扩大细菌的降解谱。蛋白质工程是通过 X 射线晶体衍射测定降解酶的三级结构, 对活性位点的一个或若干个氨基酸的编码碱基进行定点突变、或对未知三级结构降解酶的编码基因进行随机诱变、DNA 重排(DNA shuffling)及其它技术改变某些碱基, 表达出所需的降解酶, 有效的降解靶标化合物。本文综述了基因工程菌构建的常用技术及其进展。

1 质粒转移

1.1 质粒接合转移

一些编码有机污染物降解酶基因位于自我转移性质粒上, 这些质粒可以通过接合、转化、转导的方式进行自我转移^[3], 加强受体菌的代谢能力和代谢多样性。许多编码有机污染物降解酶基因位于非自我转移性质粒上, 这些质粒在环境中自我进行转移的频率极低。人们通过接合或电穿孔将携带降解性基因的非自我转移性质粒转入受体菌株细胞内, 扩大受体菌株的底物谱。多氯联苯(PCBs)的生物降解通常是降解菌群以共代谢的方式进行, 混合菌群中的各菌株很难都处于最佳状况, 多氯联苯的降解率较

* 国家自然科学基金项目(39870504), 浙江省自然科学基金项目(399487)

作者简介: 潘学冬(1975-), 男, 浙江大学农业与生物技术学院硕士研究生, 主要从事农药污染生物修复研究。

收稿日期: 2001-01-11, 修回日期: 2001-04-02

低。如 *Pseudomonas* sp. 菌株 HF1 能以氯苯甲酸为生长基质, *Acinetobacter* sp. 菌株 P6 能依靠联苯生长, 但两者都不能矿化 PCBs, Adams 及合作者使用连续混合装置将 *Acinetobacter* sp. 菌株 P6 中的质粒转入 *Pseudomonas* sp. 得到能够依靠 PCBs 生长的重组子 *Pseudomonas* sp. 菌株 CB15^[4]。

质粒转移的缺点是缺乏选择压时, 质粒常常发生丢失或发生重排丧失降解表型; 另一个缺点是质粒的拷贝数多会增加寄主的新陈代谢负荷, 质粒发生丢失。在这两种情况下, 未丢失质粒的细菌与丢失质粒的细菌竞争时处于劣势而逐渐衰减, 从而导致有机污染物质的降解率下降。

1.2 质粒分子育种

质粒分子育种(Plasmid-assisted molecular breeding PAMB)是美国 Kellogg 等人提出的一种培育新功能菌株的方法。它是在一定选择压下将分别携带有 TOL 质粒(具甲苯、二甲苯降解功能)、CAM 质粒(具萘酮降解能力)、SAL 质粒(具水杨酸酯降解能力)、pAC21 质粒、pAC25 质粒(具 3-氯苯甲酸酯降解能力)的细菌置于恒化器中, 混合培养一段时间后, 获得能降解 2,4,5-T 的新菌株^[5]。特点在于将携带各种降解性质粒的细菌接种到恒化器中, 通过菌株间的质粒自然传递, 也可能伴随同源质粒的融合形成大的降解性质粒, 来达到培育新菌株的目的。其缺点在于属同一不亲和群的质粒不能在同一细胞中共存; 携带多质粒菌株比单质粒菌株更容易丢失质粒; 多个不同亲和群的质粒引入同一菌株, 由于要承受较高的生理负担, 竞争不过亲本菌株或者其丢失质粒的后代。

2 DNA 重组

DNA 重组首先从环境中筛选出具降解功能的菌株, 再从具有降解功能的菌株中分离出降解靶标污染物的功能性基因片段, 克隆进合适的载体, 转入受体菌内, 使受体菌获得新的降解表型, 然后使用不同的方法(生物标记如抗性或报道基因)筛选出转化成功的细胞。

2.1 以质粒为载体的 DNA 重组

根据基因片段大小和寄主的生物学特性选择合适的非接合性质粒载体, 将目的基因克隆进载体内, 构建成基因文库, 然后转入受体菌, 筛选出转化子。在不同污染环境中, 如何选用合适的质粒为载体进行重组 DNA 以及合适的启动子使外源基因获得最佳表达, 已有综述进行讨论^[6]。特别是饥饿启动子(starvation promoter)的研究, 可用于营养限制地区的基因工程菌的构建^[6], 其缺陷同质粒转移。

2.2 以噬菌体为载体的 DNA 重组

先把降解性基因克隆进 λ 噬菌体内, 将重组 DNA 经体外包装成成熟噬菌体颗粒, 从而能够按照正常的噬菌体感染过程导入寄主细胞。其优点在于克隆效率较高, 降解性基因整合进寄主染色体后比较稳定。缺点是包装限制问题, 对于 DNA 片段大于 23kb 降解性基因则不能成功地被克隆。

2.3 以转座元为载体的 DNA 重组

它以外源代谢基因代替转座元中非转位基因部分, 整合入寄主的染色体。由于转座元能在同一细胞的不同染色体之间, 或同一染色体内部不同的位点之间转移及在不同细菌的染色体间转移, 使外源基因扩散; 转座元的转位作用还经常伴随着缺失作用, 这种缺失可以从转座元内部一直延伸到它外部的两边侧翼序列, 其结果可能导致选择标记的缺失, 甚至可能使克隆的 DNA 丧失或重排。

Herrero 对转座元进行遗传改造, 设计了一种没有抗性选择标记, 能携带外源基因并能稳定的整合进革兰氏阴性细菌染色体中的自杀性转座元载体-微转座元 Tn5(Tn5-based minitransposon)。它的特点是编码转位酶基因位于转位区域之外, 外源基因整合入染色体后不会发生重转位, 有效的防止了外源基因的扩散^[7]。微转座元 Tn5 已成功用于构建基因工程菌, 扩大了某些降解菌的底物范围^[8]。

以转座元为载体的缺点是如果转结合子的外源代谢基因拷贝数量少, 降解酶的表达量低, 仍然不能有效降解靶标化合物^[8]。可选择在染色体内部设计多个整合位点来增加外源代谢基因拷贝数^[10], 表达出足够的基因产物将降解靶标化合物有效的进行降解。另外, 转座元插入染色体后, 可能影响其附近基因的表达和寄主的表型, 其表达还依赖于插入的位置。

3 基因诱变

基因诱变分为定点诱变、随机突变和 DNA 重排。通过基因诱变改变编码一个或多个氨基酸的碱基序列,扩大酶的降解谱或提高酶降解活力或者避免进入产生抑制性中间代谢物的代谢途径;或改变代谢操纵子中基因转录的启动、基因表达调控系统中限速的步骤,使之有效的表达出代谢酶。

3.1 定点突变

利用 X-射线晶体衍射测定降解酶或者调控蛋白质的三维结构,分析分子中序列-结构-功能的相关性后,按照设计功能定点突变编码所需氨基酸的碱基进行,进而使基因表达及调控、基因产物发生相应改变。Parles 等根据萘双加氧酶(NDO)的 X-射线晶体结构分析鉴定出 α 亚基催化结构域活性的氨基酸,利用定点突变替换了 NDO 的 α 亚基活性位点附近的氨基酸,分析了控制 NDO 区域选择性和对称选择性的残基。结果发现,以 Leu、Val 代替 Phe-352 后,改变了 NDO 的区域选择性和对称选择性,其中突变体的区域选择性与野生酶区域选择性相反,使萘的降解方式发生了改变^[11]。这意味着,对活性位点的残基进行定点突变可以赋予代谢酶以新的代谢能力,避免进入产生有毒中间代谢物的代谢途径。有的降解菌具有降解途径多样性,其中一种途径的中间产物对细胞有毒害作用使其它有效降解途径被抑制^[12],亦可通过定点突变消除产生有毒中间产物的途径,将底物彻底矿化。

3.2 随机突变

适用因不知其 X-射线结构和催化机制而不能用定点诱变技术的那些酶,对编码这些酶的基因以预测突变方向,使工作量非常大,不易分离出所需的阳性克隆。DNA 倾向差错修复基因(DNA error-prone repair gene)对突变频率的影响有助于提高菌株代谢多样性和分离出新菌株的机率。McBeth 以质粒 CAM-OCT 为材料,分离出一个具有倾向差错修复功能的基因,克隆进广宿主载体 pUK100 并转入 *P. putida* PpS338。菌株 PpS338 及其转化子经过 UV 照射后,倾向修复基因的存在提高 *P. putida* 转化子阳性分离机率。与对照相比,携带倾向修复基因的突变菌株利用乙基乳酸和 3-甲基-2-丁烯-1-醇的能力分别增强了 8 倍、15 倍。DNA 倾向修复基因还提高了表达出新的胞内水解酶的乙基乳酸代谢菌株的分离机率^[13]。质粒中的 UV 反应基因可以提高细菌的存活率和突变率^[14-17]。

R46 的衍生质粒 pKM101 上的编码基因 *mucA*、*mucB*,其作用类似于 *E. coli* 两个基因 *umuC*、*umuD*。*mucA*、*mucB* 的产物能提高受 UV 照射的 *E. coli*、*Salmonella typhimurium* 和其它 enterobacteria 的存活率和突变率^[14,15]。另外一个质粒 pMG2(属 *Pseudomonas* IncP2 不亲和群)编码了一个新的聚合酶,其活性能够提高寄主细胞的存活率和突变率^[16,17]。因此,Sedgwick 认为质粒上的 UV 抗性基因可以使寄主具有生存优势,UV 损伤引起的突变和抗性的增强可使细菌更好的适应选择性栖息环境^[18]。

3.3 DNA 重排

DNA 重排是选择突变体基因通过随机片段和 PCR 拼接在体外同源重组的方法。它是 Stemmer 于 1994 年发明的一项改造酶的新技术,特别适用那些因不知其 X-射线结构和催化机制而不能用定点诱变技术的那些酶。大略过程是:(1)用标准化 PCR 反应扩增基因;(2)用 Dnase I 消化基因,分离纯化 100~300 bp 消化片段;(3)用无引物类 PCR 反应拼接这些片段;(4)用标准 PCR 反应,以上述拼接片段为模板,合成突变基因;(5)通过基因克隆和表达筛选含理想突变基因的突变菌株;(6)重复上述过程的更好的突变基因。通过三个循环的 DNA 重排和同野生 DNA 的两次回交消除不重要突变,一般可使突变酶的反应速率或抗性提高 1~2 个数量级^[14]。DNA 重排已被建议用来进行阿特拉津降解菌的遗传改造^[15]。

4 原生质体融合

原生质体融合(Protoplast fusion)指在一定选择条件下,使遗传性状不同的两细胞的原生质体发生融合,并进而发生遗传重组以产生同时带有双亲性状的、遗传性稳定的融合子。通过原生质体融合可使具有互补代谢途径的两种菌株得到一种具有完整代谢途径的新菌株,从而能够彻底降解某种有机污染

物^[16]。原生质融合时不能直接操作特定降解基因,融合子是否具有了亲本的优点则需依赖实验手段进行筛选。因此,遗传标记在鉴定原生质体融合时显得十分重要。

5 结束语

现代分子生物学的发展,人们可以根据有机污染物的降解途径,构建出高效的基因工程菌应用于污染地区的生物修复。基因工程菌应用问题主要集中在存活、繁殖及降解活性的保持和生态安全性上。近年来,田间应用载体(field application vector)^[22,23]、细菌-植物根围系统与基因工程的结合^[24,25]在生物修复研究中较好的维持基因工程菌的存活、繁殖及降解活性。那么基因工程菌的生态安全性成为了关注的焦点,基因工程菌应用之前,对其在自然环境中存活、繁殖、定殖及自然界中细菌对有机污染物的遗传进化机制和细菌间的水平基因转移进行深入研究是非常重要的。

参 考 文 献

- [1] Holden P A, Firestone M K. *J Environ Qual*, 1997, **26**: 32 ~ 40.
- [2] van der Meer J R, De Vos W M., Harayama S, et al. *Microbiol Rev*, 1990, **56**: 677 ~ 694.
- [3] Kwong S M, Yeo C C, Suwanto A, et al. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 81 ~ 90.
- [4] Adams R H, Huang C M. *Appli Environ Microbiol*, 1992, **58**: 647 ~ 654.
- [5] Kellogg S T, Chatterjee D K, Chakrabarty A M. *Science*, 1981, **214**: 1133 ~ 1135.
- [6] Keasling J D. *Trends Biotech*, 1999, **17**: 452 ~ 460.
- [7] Herrero M, de Lorenzo V, Timmis K N. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 6557 ~ 6567.
- [8] Klemba M, Jakobs B, Wittich R-M, et al. *Appli Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3255 ~ 3261.
- [9] Ravari R, Studer S, Springae D, et al. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 4360 ~ 4369.
- [10] Kiel J A K, Berge A M T, Borger P, et al. *Appli Environ Microbiol*, 1995, **61**: 4244 ~ 4250.
- [11] Parales R E, Lee K, Resnick S M, et al. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 1641 ~ 1649.
- [12] Bolognese F, Lecce C D, Galli E, et al. *Appli Environ Microbiol*, 1999, **65**: 1876 ~ 1882.
- [13] Mcbeth D L, Hauer B. *Appli Environ Microbiol*, 1995, **62**: 3538 ~ 3543.
- [14] Sedgwick S G, Goodwin P A. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1985, **82**: 4172 ~ 4176.
- [15] Alker G C. *Microbiol Rev*, 1984, **48**: 60 ~ 93.
- [16] Lehrbach P, Kung A H C, Lee B T O. *J Gen Microbiol*, 1977, **101**: 135 ~ 141.
- [17] Lehrbach P, Kung A H C, Lee B T O, et al. *J Gen Microbiol*, 1977, **98**: 167 ~ 176.
- [18] Sedgwick S G, Thomas S M, Hughes V M, et al. *Mol Gen Genet*, 1989, **218**: 323 ~ 329.
- [19] Stemmer W P C. *Nature*, 1994, **370**: 389 ~ 391.
- [20] 蔡可立, 黄今勇. 生物工程学报, 1999, **19**: 7 ~ 11.
- [21] Chen W, Ohmiyu K, Shimi S. *Appli Environ Microbiol*, 1987, **53**: 542 ~ 549.
- [22] Lajoie C A, Chen S-Y, Oh K-C, et al. *Appli Environ Microbiol*, 1992, **58**: 655 ~ 663.
- [23] Lajoie C A, Lyton A. C, Saykler G S. *Appli Environ Microbiol*, 1994, **60**: 2826 ~ 2833.
- [24] Brazil G M, Kenefick L, Callanan M, et al. *Appli Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1946 ~ 1952.
- [25] Yee D C, Maynard J A, Wood T K. *Appli Environ Microbiol*, 1998, **64**: 112 ~ 118.