

多能硫杆菌 RubisCO 基因同源性分析*

刘振盈 颜望明 徐海岩 郑雷 罗小平

(山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 以氧化亚铁硫杆菌 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RubisCO)基因为探针,与氧化硫硫杆菌和多能硫杆菌的染色体 DNA 杂交。结果表明,氧化硫硫杆菌的染色体 DNA 能够与氧化亚铁硫杆菌 RubisCO 基因探针杂交。而多能硫杆菌不能与其杂交,然而却能够与球形红杆菌 RubisCO 基因探针杂交,同源性高。由于 RubisCO 在进化上的高度保守性,因此认为它们在 RubisCO 进化关系上应属于不同的类群。

关键词 硫杆菌属, 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RubisCO)

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(简称 RubisCO)是催化 CO_2 固定反应的关键酶。在高等植物以及大部分原核生物中,由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成,大亚基具有进化上的高度同源性^[1],因此 RubisCO 是研究自养生物基因组相互作用和进化作用的特殊遗传标记^[2]。对于形态简单、资料匮乏的自养微生物来说,可作为分类信息的一个来源。

硫杆菌属是分布最广、研究得最多、经济意义很大的硫氧化细菌^[3]。它们能利用一种或多种还原态或部分还原态的硫化合物作为能源,极端嗜酸性的氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*, 简称 Tf)和氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans* 简称 Tt)以及兼性的多能硫杆菌(*Thiobacillus versutus*, 简称 TA2),由于在利用能源上的相似性,因此在《伯杰细菌鉴定手册》第九版中^[4]仍列为同一属,然而它们在生长条件、能源利用方面、G+C mol % 含量上存在着较大的不同。

作者以氧化亚铁硫杆菌和球形红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides* 简称 Rs)的 RubisCO 酶基因(*rbcL-rbcS*)为探针,分别与 Tt, TA2 染色体 DNA 酶切片段杂交。结果表明, Tt 与 Tf 的 *rbcL-rbcS* 探针杂交,同源性高; TA2 不能与其杂交,然而却能与光合细菌 Rs 的 *rbcL-rbcS* 探针杂交,具有高的同源性,表明 TA2 在 RubisCO 进化关系上与 Tf 和 Tt 差距较大。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

TA2(Cm^rAs^rHg^r), 由英国 Kelly 实验室提供^[5]; Tf-55 和 Tt-7 由本室分离和保存; pUC18-29N, 编码 Rs *rbcL-rbcS* 3.4kb 片段, 克隆在 pUC18 Sma I 位点, 由 Tabita

* 国家及山东省自然科学基金资助课题。

本文于 1996 年 3 月 11 日收到。

F. R. 提供¹⁵ pRQ52 编码 Rs rpL 基因片段, 由 Tabita F. R. 提供¹⁵ pTR11 编码 Tf 4.0kb Pst I 片段, 克隆在 pUC18, 由 Kusano T. 提供¹⁶。

1.2 培养基和培养条件

TA2 异养培养采用 LB 培养基⁷, 37 °C 培养; 自养生长时采用无机盐培养基¹⁸, 30 °C 培养。Tt 培养采用 Starkey 培养基¹⁹。

1.3 生化试剂

所用的限制性内切酶、连接酶、尼龙膜购自 Promega 公司, 分子杂交所用试剂购自 Amersham 的 ECMTM direct nucleic acid labelling and detection systems。

1.4 DNA 操作技术

质粒提取、酶切均参照 Maniatis T. 的方法⁷; TA2 染色体 DNA 的提取参见文献[9] Tt-7 染色体提取参见文献[10] 氧化亚铁硫杆菌染色体的提取参见文献[11]。

1.5 分子杂交

Southern 转移、探针标记以及杂交后探针的检测, 均按 Amersham 产品说明书进行。

2 结果

2.1 TA2 染色体 DNA Southern 杂交分析

2.1.1 TA2 染色体 DNA 的提取: 先将 TA2 接种到自养培养基斜面, 然后转接到 LB 培养液, 培养至对数生长中后期, 收集菌体, 用溶菌酶和 SDS 裂解细胞。提取的 TA2 染色体 DNA 分子量(图 1)大于 λ DNA 分子量(λ DNA 分子量为 48.5kb), 且染色体的带型集中, 无小 DNA 片段。



2.1.2 TA2 染色体 DNA 酶切片段与 Tf rbcL-rbcS 基因探针杂交: 将 TA2 染色体 DNA 用限制性内切酶 Sal I, Hind III, Pst I, BamH I 彻底酶切(图 2), 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用毛细管转移方法将 DNA 转移到尼龙膜上。由于 TA2 与 Tf 在种属亲缘关系上最近, 因此我们首先选用 Tf rbcL-rbcS 基因作为探针与之杂交, 没有显示出任何杂交带型。将洗膜条件降至最低, 也未显示出杂交带型。因此从杂交结果上看, TA2 与 Tf 在 RubisCO 基因序列、结构上差异较大, 同源性低。

2.1.3 TA2 染色体 DNA 酶切片段与光合细菌 Rs rbcL-rbcS 基因探针杂交: Rs 属于紫色非硫光合细菌, 含有两种结构和免疫特性不同的 RubisCO: 类型 I 是由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成的 16 聚体(L8S8), 而类型 II 是由 6 个大亚基组成的,

图 1 TA2 染色体 DNA 的琼脂糖凝胶电泳
A. λ DNA; B. TA2 染色体 DNA; C. λ DNA / Hind III.

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of chromosomal DNA from *T. versutus*

1. λ DNA; 2. Chromosomal DNA of *T. versutus*
3. λ DNA / Hind III.

缺乏小亚基; 类型 I (L8S8) 基因片段(*rbcL-rbcS*)和类型 II (L6)的基因片段(*rbpL*)均已被克隆^[9]。以 *rbpL* 基因片段为探针, 与 TA2 染色体酶切片段杂交, 无杂交带, 说明 TA2 可能不存在着类型 II *RubisCO* 基因; 而以类型 I *rbcL-rbcS* 为探针, 与 TA2 染色体酶切片段杂交出现了杂交带型(图 2)。

TA2 能与光合细菌 *Rs* 类型 I 的 *rbcL-rbcS* 杂交, 而不与 *Tf* *rbcL-rbcS* 基因探针杂交, 表明 TA2 与 *Tf* 在 *RubisCO* 基因序列上差异较大, 而与 *Rs* 类型 I *RubisCO* 相似。

2.2 Tt 染色体的 Southern 杂交分析

2.2.1 Tt 染色体 DNA 的提取:

将 Tt-7 在 Starkey 培养基上培养至对数中后期, 收集菌体, 由于 Tt 对溶菌酶不敏感, 所以用提高裂解液 pH 的方法裂解细胞。此方法虽然不如溶菌酶破壁方法温和, 但用此方法提取的染色体 DNA, 基本上能满足 Southern 杂交的要求, 提取的 Tt-7 染色体 DNA 分子量大于 λ DNA 的分子量(图 3)。

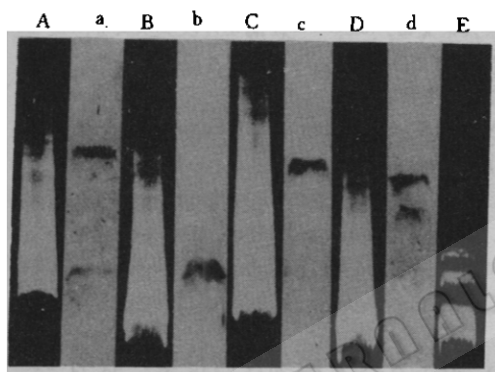


图 2 TA2 染色体 DNA 与 *Rs* *rbcL-rbcS* 基因探针的杂交

A. a. *Sal* I 酶切片段和杂交带; B. b. *Hind* III 酶切片段和杂交带; C. c. *Pst* I 酶切片段和杂交带; D. d. *Bam*H I 酶切片段和杂交带; E. λ DNA / *Hind* III。

Fig. 2 Hybridization of chromosomal DNA of *T. versutus* with the probe *rbcL-rbcS* from *R. sphaeroides*

A.a. *Sal* I fragments and hybridization patterns B.b. *Hind* III fragments and hybridization patterns C.c. *Pst* I fragments and hybridization patterns D.d. *Bam*H I fragments and hybridization patterns E. λ DNA / *Hind* III.

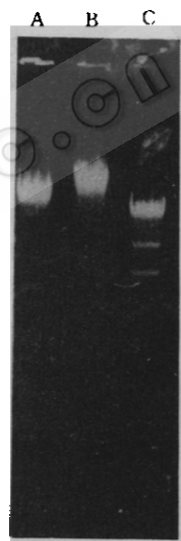


图 3 Tt-7 染色体 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

A. λ DNA; B. Tt-7 染色体 DNA; C. λ DNA / *Hind* III。

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of chromosomal DNA from *T. thiooxidans*

1. λ DNA; 2. chromosomal DNA of *T. thiooxidans* 3. λ DNA / *Hind* III.

2.2.2 Tt-7 染色体 DNA 酶切片段与 Tf *RubisCO* 基因探针的杂交:

以 pTR11 质粒上 *Tf* 的 4.0kb *rbcL-rbcS* 基因片段为探针, 与转移至尼龙膜上的 Tt-7 染色体 DNA 酶切片段杂交, 显示出杂交带型(图 4)。Tt-7 染色体 DNA 能与 *Tf* *rbcL-rbcS* 基因片段杂交, 表明它们在基因序列上较为接近。

2.2.3 Tt-7 染色体 DNA 酶切片段与光合细菌 *Rs* *RubisCO* 基因探针杂交:

在与上述杂交条件相同的情况下, 将 Tt-7 染色体 DNA 酶切片段与光合细菌 *Rs* 两种类型的

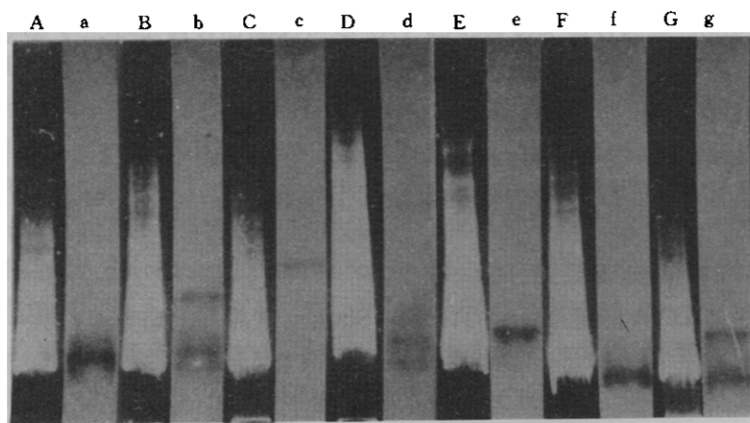


图4 Tt-7 染色体 DNA 与 Tt *rbcL-rbcS* 基因探针的杂交

A, a. *Bgl* II 酶切片段及杂交带; B, b. *Eco*R I 酶切片段及杂交带; C, c. *Pst* I 酶切片段及杂交带;
D, d. *Pvu* II 酶切片段及杂交带; E, e. *Hind* III 酶切片段及杂交带; F, f. *Sal* I 酶切片段及杂交带;
G, g. *Xho* I 酶切片段及杂交带。

Fig. 4 Hybridization pattern of chromosomal DNA from *T. thiooxidans* with the gene probe
rbcL-rbcS from *T. ferrooxidans*

A, a. *Bgl* II fragments and hybridization patterns B, b. *Eco*R I fragments and hybridization patterns
C, c. *Pst* I fragments and hybridization patterns D, d. *Pvu* II fragments and hybridization patterns
E, e. *Hind* III fragments and hybridization patterns F, f. *Sal* I fragments and hybridization patterns
G, g. *Xho* I fragments and hybridization patterns.

RubisCO 基因(*rbCL-rbcS*; *rbpL*)片段进行杂交, 结果并没有出现任何带型, 表明 Tt-7 RubisCO 基因与 Rs 的基因同源性较低。

进一步以光合细菌 Rs *rbcS-rbcL* 和 *rbpL* 片段为探针, 与 Tf-55 染色体 DNA 各种酶切片段进行杂交, 没有出现任何带型。

3 讨论

从以上杂交结果上可以看出, Tf、Tt 和 TA2 虽同属于硫杆菌属, 但它们在 RubisCO 基因结构上存在着明显差异, Tt 与 Tf 在基因结构上较为相近; 而 TA2 与兼性的光合细菌 Rs 相似, 而与种属关系相近的 Tt 和 Tf 同源性差。

RubisCO 具有功能上的高度保守性, 特别是 RubisCO 大亚基比较保守, 不同生物来源的大亚基氨基酸序列中有 85% 以上的同一性, 所以对于形态简单的自养微生物来说, 可以作为分类信息的来源。通过杂交分析, 我们发现 TA2 与 Tf 及 Tt 在 RubisCO 进化关系上相差较远, 另外我们从硫杆菌 16S RNA 同源性分析^[12] 也可以看到, TA2 与 Tf 及 Tt 位于不同的亚群, TA2 位于 *Proteobacteria* 的 δ 亚群, 与 Rs 在同一亚群; 而 Tf 及 Tt 位于的 γ/β 亚群, 这说明 TA2 在 16S RNA 序列上也与 Tf 及 Tt 相距较远。此外这三株菌在 G+C mol % 含量^[3] 上不同, TA2 为 65% ~ 68%, Tf 为 56% ~ 57%, Tt 为 50% ~ 52%, 因此无论是从 RubisCO 基因结构, 还是从 16S RNA 序列, G+C mol %

含量上看, TA2 与硫杆菌属的 Tf 及 Tt 不同, 故建议列为新属。

另外, 从 TA2 与光合细菌 Rs 两种类型的 RubisCO 基因探针(rbcL-rbcS, rbpL) 杂交结果上可以看到, TA2 只与 Rs rbcL-rbcS 基因探针杂交, 而不与 rbpL 探针杂交, 说明在 TA2 细胞内可能不存在着与 Rs 结构类似的类型 II 基因, 这说明 TA2 与 Rs 在 RubisCO 的类型、种类上并不完全一致, 也许 TA2 在 RubisCO 进化上是光合细菌与自养细菌之间的一种过渡类型。

参 考 文 献

- [1] 刘振盈, 颜望明. 微生物学通报, 1993, 20(2): 110 ~ 114.
- [2] Wu Ray, Lin E D, Kung S D *et al* (张大达, 丁 勇, 宋未等译). 基因工程新进展. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1985.
- [3] 郑士民, 颜望明, 钱新明编著. 自养微生物. 北京: 科学出版社, 1983.
- [4] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1994.
- [5] Quivey R G, Tabita F R. *Gene*, 1984, 31: 91 ~ 101.
- [6] Kusano T, Sugawara K, Inoue C *et al*. *Current Microbiology*, 1991, 22: 35 ~ 41.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Smith A L, Kelly D P, Wood A P. *J Gen Microbiol*, 1980, 121: 127 ~ 138.
- [9] 刘振盈, 颜望明. 山东大学学报(自然科学版), 1996, 31(1): 102 ~ 107.
- [10] 颜望明. 生物工程学报, 1990, 6(4): 338 ~ 340.
- [11] 刘振盈, 颜望明. 山东大学学报(自然科学版), 1993, 28(3): 358 ~ 364.
- [12] Lane D J, Harnison A P, Stahl D *et al*. *J Bacteriol*, 1992, 174(1): 269 ~ 278.

HOMOLOGY ANALYSIS OF RUBISCO GENE OF *THIOBACILLUS VERSUTUS* WITH EXTREMELY ACIDOPHILIC THIOBACILLI

Liu Zhenying Yan Wangming Xu Haiyan Zheng Lei Luo Xiaoping

(State Key Laboratory of Microbial Technology Shandong University, Jinan 250100)

Abstract The chromosomal DNA of *Thiobacillus thiooxidans* and *T. versutus* was digested with restriction enzymes, blotted to nylon membrane by the way of Southern, and hybridized with the gene probe of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase /oxygenase (RubisCO) from *T. ferrooxidans*. The result showed that *T. thiooxidans* exhibited high homology with the probe and *T. versutus* was less homology with it. However *T. versutus* can hybridize with the gene probe of RubisCO from *Rhodobacter sphaeroides*, which indicated that they had high homology with each other. As RubisCO was highly reserved in the evolutionary, they should be divided into different group.

Key words *Thiobacillus versutus*, Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase /oxygenase