

文章编号: 0253-9993(2006)01-0104-04

脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌遗传特性的分子生物学试验

张东晨¹, 张明旭¹, 陈清如², 王 健¹

(1. 安徽理工大学 材料科学与工程系, 安徽 淮南 232001; 2. 中国矿业大学 化学工程学院, 江苏 徐州 221008)

摘 要: 利用现代生物学研究方法和手段, 对煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌的遗传特性进行了质粒抽提和琼脂糖凝胶电泳等分子生物学水平的基础性探索试验, 对于质粒在硫杆菌中普遍存在的观点提出了质疑. 研究结果表明, 氧化亚铁硫杆菌对 Fe^{2+} , S 等的氧化能力可能只是与拟核染色体 DNA 有关, 而氧化亚铁硫杆菌的遗传物质就是拟核染色体 DNA.

关键词: 脱硫; 氧化亚铁硫杆菌; 遗传特性; 分子生物学

中图分类号: TQ546.5 文献标识码: A

Experimental of the desulphurization microorganism *Thiobacillus ferrooxidans* hereditary property molecular biology

ZHANG Dong-chen¹, ZHANG Ming-xu¹, CHEN Qing-ru², WANG Jian¹

(1. Department of Material Science and Engineering, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China; 2. School of Chemical Engineering, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: Using modern biology research technique and means, plasmid extract and agarose gel electrophoresis of molecular biology level explore test were carried out for coal with not coal department the hereditary property of *Thiobacillus ferrooxidans*. The query was put forward for the viewpoint for quality grain exists generally in sulphur bacillus. Experimental results indicated that the oxidizing ability of *Thiobacillus ferrooxidans* to Fe^{2+} , S etc. may be only related with the nuclear chromosome DNA, and the heredity substance of *Thiobacillus ferrooxidans* is the nuclear chromosome DNA.

Key words: desulphurization; *Thiobacillus ferrooxidans*; hereditary property; molecular biology

脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*, 简称 T. f 菌) 由于具有的特殊生物代谢机制, 因此在煤炭脱硫和细菌冶金等方面具有巨大的潜在应用价值. 但是, 该菌生长缓慢, 7~11 d 达到一个生长周期, 代期长、细胞得率低以及酸性培养和代谢产酸等, 使其在工业上的应用受到了限制^[1]. 利用现代分子生物学研究方法和手段, 对氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 的遗传学特性进行研究, 目的是对 T. f 菌种进行遗传改良, 以改善该菌种的各种品质, 从而使其既具有 T. f 菌优良的降硫特性, 又具有生长繁殖快速和适应中性生长环境等优点, 更好地适应实际应用的要求. 作为生物遗传的物质基础, DNA (脱氧核糖核酸) 是生物遗传信息的基因分子载体. 原核生物细菌的遗传物质由双链环状分子的拟核大环染色体 DNA 和附加体小环质粒 DNA 组成. 自从 Mao (1980 年)^[2] 和 Holmes (1984 年) 等^[3] 报道了从氧化亚铁硫杆菌和兼性自养嗜酸硫杆菌中发现并分离到质粒以来, 虽然对硫杆菌中质粒 DNA 的具体功能还不完全

收稿日期: 2005-08-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50344037); 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题 (20020290006)

作者简介: 张东晨 (1965-), 男, 安徽合肥人, 博士, 教授. Tel: 0554-6668510, E-mail: dchzhang@aust.edu.cn

了解, 但有人据此认为, 质粒 DNA 在硫杆菌中存在较为普遍。

为了对氧化亚铁硫杆菌菌种进行遗传改良研究, 本文利用现代分子生物学的有关试验研究手段, 对氧化亚铁硫杆菌进行了质粒 DNA 抽提试验, 并进行了抽提物的琼脂糖凝胶电泳试验与分析等分子生物学水平的基础性探索试验研究。传统的碱变性抽提法(碱裂解法)和煮沸裂解法抽提质粒 DNA, 虽然方法成熟可靠, 但费时^[4~6]。本研究采用的是柱式质粒小量抽提试剂盒进行质粒 DNA 的抽提。该方法的优点是经济快速, 每个抽提可以在 20 min 内完成, 且无需酚抽提、乙醇沉淀、C₅Cl 离心, 洗脱体积小。抽提物的琼脂糖凝胶电泳, 选择在水平式凝胶电泳仪上进行。利用紫外数码图像分析仪及其附带的 GSM 凝胶电泳图像分析系统 2.0, 对凝胶电泳结果进行拍照与分析。

1 氧化亚铁硫杆菌的来源及其生物学特征

试验中所用非煤系氧化亚铁硫杆菌取自中南大学矿物工程系生物实验室保存菌种, 该菌种原采自广东某铜矿。煤系氧化亚铁硫杆菌采自四川南桐矿务局干坝子选煤厂和砚石台煤矿。

氧化亚铁硫杆菌主要生物特性^[7]: 短杆菌, 0.5 × 1.0 μm, 具有圆钝的末端, 单生或对生, 成短链者较少。严格化能自养, 好氧嗜酸, 革兰氏阴性。代时约为 6.5 ~ 15 h。一般利用氨作为氮源, 当利用硝酸盐作为氮源时细菌生长缓慢。

氧化亚铁硫杆菌以培养基中的亚铁离子 Fe²⁺ 或硫化物作为能源。靠氧化基质中的 Fe²⁺ 为 Fe³⁺ 和低价态硫为硫酸根而获取能量, 同时以空气中的 CO₂ 为碳源。利用空气中的 CO₂, 并吸收培养基中的 N, P, K 等无机营养, 合成菌体细胞。氧化亚铁硫杆菌的亚铁液体培养基开始保持清澈, 在培养过程中由于三价铁的产生, 使液体培养基迅速由琥珀色转变为红褐色, 并产生高铁水合物沉淀。

该菌最适宜生长的 pH = 2.5 ~ 3.5, 适宜的生长温度为 28 ~ 35 °C。

2 氧化亚铁硫杆菌质粒 DNA 的抽提试验

2.1 质粒小量抽提试剂盒组成与试验菌样的培养

采用现代分子生物学的试验研究手段, 对脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌菌种从分子生物学水平上进行基础性探索研究。主要是对所获取的煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌(T. f)脱硫遗传物质的遗传背景进行研究, 重点放在对 T. f 菌质粒 DNA 进行抽提试验。氧化亚铁硫杆菌质粒 DNA 的抽提, 采用的是上海生工生物工程有限公司编号为 SK1191 的 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒。具体组成见表 1。

使用前对试剂盒中的试剂加以配制: ① 先将 Boiled rnase A 全部加入到 Solution I 中, 充分混匀实验后 4 °C 保存; ② 在低温下会有沉淀出现, 37 °C 加温溶解后使用; ③ 首次使用前, 必须在 Wash solution 瓶中加入 4 倍体积的无水乙醇, 充分混匀后使用; ④ Elution buffer 为 2.0 mmol/L 的 Tris-HCl, pH = 8.0 ~ 8.5, 实验后 4 °C 保存。试验所用菌样采用的是煤系氧化亚铁硫杆菌(干坝子 T. f 菌、砚石台 T. f 菌)与非煤系氧化亚铁硫杆菌(中南 T. f 菌)。试验前, 对各菌样采用 Silverman 液体培养基进行 30 °C 恒温、140 r/min 旋回振荡培养。选择氧化亚铁硫杆菌对数生长后期至稳定生长期的菌体细胞作为质粒 DNA 抽提试验对象。

2.2 氧化亚铁硫杆菌质粒 DNA 抽提试验步骤与试验过程

① 将培养好的 1 ~ 2 mL 细菌, 12 000 r/min 离心 15 s, 去掉上清液。② 加 100 μL Solution I, 用枪头或振荡器充分悬浮细菌。③ 加入 200 μL Solution II, 立即上下颠倒 10 次, 使之充分中和, 室温放置 2 min。④ 加入 350 μL Solution III, 立即上下颠倒 10 次, 使之充分中和, 室温放置 2 min。⑤

表 1 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒组成

Table 1 The composition of UNIQ-10 pillar plasmid small amount extraction reagent box

组 成	SK1191
质粒抽提柱 (Column)	50
收集管 (2 mL collection tube)	50
煮沸核糖核酸酶 A [Ⓐ] (Boiled rnase)	1 mg/mL · 支
溶液 I (Solution)	6 mL
溶液 II [Ⓑ] (Solution)	12 mL
溶液 III (Solution)	25 mL
洗液 [Ⓒ] (Wash solution)	12 mL
缓冲液 [Ⓓ] (Elution buffer)	5 mL

12 000 r/min, 离心 5 min. ⑥ 将⑤中上清移至套放于 2.0 mL 收集管内的 UNIQ-10 柱中, 10 000 r/min, 室温离心 15 s. ⑦ 弃收集管中的废液, 将 UNIQ-10 柱放入同一支收集管中, 吸取 500 μ L Wash solution 到 UNIQ-10 柱, 10 000 r/min, 室温离心 30 s. ⑧ 重复步骤⑦. ⑨ 弃收集管中的废液, 将 UNIQ-10 柱放入同一支收集管中, 10 000 r/min, 室温离心 30 s, 以彻底去除 Wash solution. ⑩ 将 UNIQ-10 柱放入新的洁净 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μ L Elution buffer, 室温放置 2 min 后, 10 000 r/min, 室温离心 1 min. 离心管中溶液即为质粒 DNA 的抽提物.

3 氧化亚铁硫杆菌质粒 DNA 抽提物的琼脂糖凝胶电泳试验

带电物质在电场中向相反电极移动的现象称为电泳. 自从琼脂糖凝胶被引入核酸研究以来, 按分子量大小分离 DNA 的凝胶电泳技术, 已发展成为现代分子生物学研究方法的一种基础性技术.

3.1 琼脂糖凝胶电泳试验的试剂类型与试验过程

3.1.1 试验用试剂类型及特性

(1) λ DNA Marker (标示物) 氧化亚铁硫杆菌质粒 DNA 抽提物琼脂糖凝胶电泳的 DNA 标准品 (λ DNA Marker), 采用的是上海生工生物工程有限公司编号为 SM0191 的 Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker. 其基本特性: λ DNA 完全地含有 EcoRI 和 Hind III 片段, 采用酚抽提, 乙醇沉淀获得, 并溶于 10 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.6), 1 mmol/L EDTA 缓冲液中. 该 DNA Marker 包含以下 13 种碱基片段: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125. 碱基片段电泳带分布如图 1 所示.

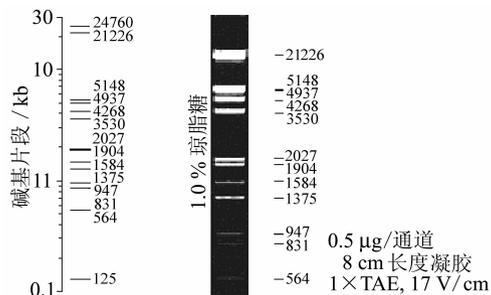


图 1 Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker 碱基片段电泳带分布

Fig. 1 The distribution of Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker base pairs part electrophoresis band

(2) 琼脂糖 (Agarose) 凝胶琼脂糖采用的是上海生工生物工程有限公司编号为 AX0174 的琼脂糖 III (Agarose III), 其基本特性: 1.5% 凝胶分离产物为 10 ~ 40 kb; 凝胶强度大于 2 000 g/cm²; 胶凝温度为 37 ~ 39 °C; 融化温度为 90 ~ 94 °C.

3.1.2 水平式琼脂糖凝胶电泳试验

氧化亚铁硫杆菌质粒抽提物的琼脂糖凝胶电泳, 我们选择在 DY-1 型水平式凝胶电泳仪上进行, 电泳电场为 10 ~ 12.5 V/cm.

3.2 氧化亚铁硫杆菌质粒抽提物的琼脂糖凝胶电泳试验结果

利用 Hema 紫外数码图像分析仪及其附带的 GSM 凝胶电泳图像分析系统 2.0 对凝胶电泳结果进行拍照与分析, 结果如图 2 所示, 2 张照片分别为 2 次重复试验结果.

凝胶电泳结果紫外分析照片中, 从右至左所示各电泳道的标号依次为: 1. Marker; 2. 中南 T. f (培养菌液); 3. 干坝子 T. f; 4. 砚石台 T. f; 5. 中南 T. f (原始菌液).

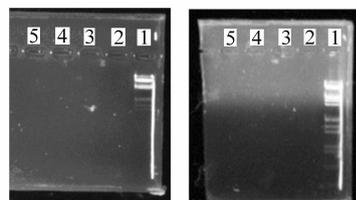


图 2 凝胶电泳紫外分析照片

Fig. 2 The gel electrophoresis ultraviolet analysis photograph

4 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 分子生物学试验结果分析

自从 Mao (1980 年) 和 Holmes (1984 年) 等报道了从硫杆菌中发现质粒以来, 陆续有从 T. f 菌和 T. t 菌中发现并分离到质粒的报道^[8-10], 据此有人认为质粒在硫杆菌中存在较为普遍.

本研究通过对相同类型不同生长环境下的 T. f 菌进行的质粒抽提试验, 结果在煤系 (干坝子、砚石台) 与非煤系 (中南) 几种氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 中均未发现有质粒. 琼脂糖凝胶电泳结果表明,

电泳中除了标示物 (Λ DNA/EcoRI + Hind III Marker) 有电泳带, 结果为阳性外, 其余各菌株均未出现质粒电泳带, 结果均为阴性. 由于用于质粒 DNA 抽提试验的几种细菌菌液, 在试验前均采用离心沉降的方法进行富集, 因此排除了可能由于细菌浓度过低、抽提试验的菌量较少而造成的试验菌体数量的不足, 且重复试验的结果相同. 结果有两种可能: ① 由于试验菌株中存在的质粒较少, 而使质粒抽提物的量不足以其在凝胶电泳中显现. 对此, 可以采用分子生物学中 PCR 技术^[11], 在分析氧化亚铁硫杆菌质粒 DNA 碱基序列的基础上, 通过设计引物, 再对抽提物中可能存在的质粒 DNA 片段进行扩增来加以试验验证. 由于条件所限, 该试验暂无法进行. ② 所试验的几种氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 中不含有质粒, 表明氧化亚铁硫杆菌中尽管可能存在质粒, 但并不普遍. 因此并非像有些报道的“氧化亚铁硫杆菌中质粒普遍存在”. 同时, 可以认为 T. f 菌的遗传物质只是拟核染色体 DNA, 而且 T. f 菌对 Fe^{2+} , S 的氧化能力只与拟核染色体 DNA 有关.

5 结 语

脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 由于其所具有的特殊生物代谢机制, 因此在煤炭脱硫和细菌冶金等方面具有较大的潜在应用价值. 但是该菌也有生长缓慢、代期长、细胞得率低, 以及酸性培养和代谢产酸等缺点. 利用包括基因工程技术在内的现代分子生物学研究方法和手段, 对氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 的遗传特性进行研究, 就是对 T. f 菌种进行遗传改良, 以改善菌种的生长特性, 并使其具有更好的脱硫效能, 从而更好地适应实际工业应用的要求. 作为生物遗传的物质基础, DNA (脱氧核糖核酸) 是生物遗传信息的基因分子载体, 原核生物细胞的遗传物质由拟核染色体 DNA 和附加体质粒 DNA 组成. 根据资料报道, 在氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌和兼性自养嗜酸硫杆菌中存在质粒, 因此有人认为质粒 DNA 在硫杆菌中的存在较为普遍.

运用现代分子生物学的试验方法和手段, 对氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 的遗传特性进行了分子生物学水平的基础性探索研究. 在所做的质粒抽提及其琼脂糖凝胶电泳的试验中并没有发现质粒, 因此, 对于质粒在硫杆菌中普遍存在的这一观点提出了质疑. 研究结果表明, 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 对 Fe^{2+} , S 等的氧化能力可能只与拟核染色体 DNA 有关, 而 T. f 菌的遗传物质就是拟核染色体 DNA.

参考文献:

- [1] 邱冠周, 王 军, 钟康年. 浸矿细菌的育种及工业应用 [J]. 国外金属矿选矿, 1998 (6): 29 ~ 33.
- [2] 颜望明. 浸矿细菌的遗传工程 [J]. 微生物通报, 1987, 16 (3): 173 ~ 175.
- [3] Holmes D S, Lobos J H, Bopp L H, et al. Cloning of a Thiobacillus ferrooxidans plasmid in Escherichiacoli (abstract) [J]. J. Bacteriol, 1984, 157 (1): 324 ~ 326.
- [4] 马建岗. 基因工程学原理 [M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2001.
- [5] 冯 斌, 谢先芝. 基因工程技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [6] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 (第 8 版) [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [8] 金松谟, 颜望明. 氧化硫硫杆菌质粒的分离 [J]. 微生物学通报, 1988, 15 (1): 20 ~ 21.
- [9] 金松谟, 颜望明. 氧化硫硫杆菌 pTt54 质粒的限制性酶切分析及其在大肠杆菌中的克隆 [J]. 微生物学通报, 1990, 17 (3): 141 ~ 144.
- [10] 颜望明. 氧化硫硫杆菌启动子功能片段在大肠杆菌中的克隆和表达 [J]. 遗传学报, 1990, 17 (2): 143 ~ 147.
- [11] 黄秀梨. 微生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.