

# 细菌抗汞分子机制与进化的研究及应用\*

陈丹丹 林建强 刘相梅 林建群\*\* 颜望明

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘要:** 微生物中存在一类抗汞细菌, 操纵子 Mer 中的 MerRTPA 参与细菌抗汞的调控、转运及还原。汞通过 MerTP 所表达的蛋白由细胞外转运至细胞内, 经还原酶 MerA 将其还原为毒性小的可挥发的金属汞。细菌抗汞基因的形成有着古老的起源, 基因间的整合、转移进化形成了 Mer 操纵子结构与功能的多样性。抗汞细菌对汞的吸附具有高选择性及专一性, 可利用此特性对汞污染环境进行修复, 也可作为分子遗传操作中稳定的抗性筛选标记。

**关键词:** 细菌抗汞机理, 抗汞机制进化, 抗汞特性应用

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0129-05

## Study and Application of Bacterial Mercury-resistance Mechanism and Evolution\*

CHEN Dan-Dan LIN Jian-Qiang LIU Xiang-Mei LIN Jian-Qun\*\* YAN Wang-Ming

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

**Abstract:** There exist a number of mercury-resistant bacterial in environment, Mer operon is involved in the resistant mechanism, MerRTPA of Mer operon encodes the proteins related to the regulation, transport and reduction of mercury ion, respectively. The toxic mercury ion is transported by MerTP from medium to cytoplasmic mercuric reductase, MerA, and deoxidized to non-toxic and volatile element mercury, Hg (0). Bacterial mercury-resistant system originated from ancient times, and evolved into the Mer operon with diversity by gene integration and insertion. Mercury-resistant bacteria highly specifically absorb mercury ion, and can be used in recovering the mercury-polluted environment as well as the genetic selective marker.

**Key words:** Mercury-resistant mechanism, Mercury-resistant evolution, Mercury-resistant application

自然界中存在的重金属, 可通过食物链进行传播, 其中汞因其对蛋白质中的巯醇基有强亲和性而对人体有很大的毒性, 其存在范围广, 如岩石、土壤、空气和水中。地球中存在的汞主要来源于地质演变及现代工业过程中的人为释放。伴随着自然界中汞的增加, 一些微生物进化表现出对汞及其化合物产生抗性的特性。细菌降低汞及其化合物的毒性有 5 种机制<sup>[1]</sup>: (1) 减少细胞对汞离子的渗透; (2) 将甲基汞脱甲基转化为不可溶的汞的硫化物; (3) 甲基汞与硫化氢不断作用形成汞的硫化物而螯合汞离子; (4) 有些细菌如 *Desulfivibrio desulfuricans* LS, 甲基汞对它的毒性比汞离子小, 这类细菌通过两步生化反应将甲基传递至汞离子形成甲基汞, 减少汞离子的毒性; (5) 通过细胞中的汞还原酶将汞离子还原为毒性小、易挥发的金属汞, 从细胞溢出而减少毒性。第 5 种汞还原机制存在于来自不同环境的 G<sup>+</sup>、G<sup>-</sup> 细菌中, 也是重金属抗性机制中

\* 国家重点基础研究发展规划 973 项目 (No. 2004CB619202)

国家自然科学基金项目 (No. 30170026, 50174034)

山东省优秀青年科学基金 (No. 03BS142)

\*\* 通讯作者 Tel: 86-531-88364429, E-mail: jianqunlin@sdu.edu.cn

收稿日期: 2005-10-19, 修回日期: 2005-12-19

研究的较为全面、透彻的一类。本文着重对细菌的这种抗汞机制、基因差异与进化及在环境污染的生物治理等方面的应用进行了概括与展望。

## 1 细菌抗汞机理

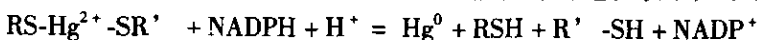
微生物对汞的抗性可分为两类，一类为窄谱抗性，即只对  $\text{HgCl}_2$  等无机汞盐有抗性；一类为广谱抗性，包括对无机汞、有机汞如甲基汞均有抗性。操纵子 *Mer* 参与编码与细菌抗汞有关的蛋白。*Mer* 可存在于细菌质粒，转座子及染色体上，如来自 *Acinetobacter* 中的  $\text{pKLH}_2$ 、*Pseudomonas* 中的  $\text{Tn5037}$  及位于 *Acidithiobacillus ferrooxidans* E-15 染色体上的 *Mer* 操纵子。

**1.1 细菌抗汞所涉及的基因结构元件** 细菌抗汞机制包括对汞的捕获、转运及还原，*Mer* 操纵子在不同微生物中其结构并不完全一致，但大多数包括调节基因 *MerR* (*MerD*)，操纵子启动序列 (O/P) 及有关的四个结构基因即 *MerT* (*MerC*)、*MerP*、*MerA*、*MerB*<sup>[2]</sup>。*Mer* 操纵子的表达大多是可调节性的，调节基因 *MerR* 所编码的蛋白二聚体结合在启动子 (O/P) 的 DNA 区域，起正调控作用。当环境中存在汞时，与 DNA 结合的 *MerR* 产物构象发生改变，可允许 RNA 聚合酶与之结合并启动 *MerTPA* 的转录；而当没有汞存在时阻碍结构基因的转录。也有例外，如在 *S. lividans* 1326<sup>[1]</sup> 中，*MerR* 结合在启动子的操纵部位，抑制其转录，汞的存在可阻碍其产物与 DNA 的结合，从而促进操纵子的转录，即为负调控作用。此外在很多 *Mer* 操纵子中还存在着 *MerD* 元件，它协调参与 *MerR* 的调控作用。

*MerT* (*MerC*)、*MerP* 编码的蛋白参与汞离子由细胞外向细胞内的转运。*MerP* 编码的蛋白为二聚体，位于细胞周质，*MerT* 编码一个蛋白三聚体，位于细胞膜内，共同构成运输汞离子由细胞周质到细胞内的通道。有的 *Mer* 中以 *MerC* 代替 *MerT* 或两者共存，*MerC* 对汞的转运能力比 *MerTP* 弱。*MerA* 编码的汞还原酶位于细胞内，为蛋白二聚体，可依靠 NADPH 为电子供体将二价汞离子还原为金属汞。

在广谱抗性细菌中还存在着 *MerB*，它参与有机汞的降解<sup>[3]</sup>。*MerB* 的产物可将有机汞中的 C-Hg 键打断，降解为二价汞，二价汞再经 *MerA* 还原为金属汞。*MerB* 可降解的有机汞种类很多，核磁共振分析结果表明<sup>[4]</sup>，其结构中有 3 个反向平行的  $\beta$  折叠，四周有 6 个  $\alpha$  螺旋缠绕，存在 4 个半胱氨酸，与其活性有关，尤其是活性位置处的 Cys96，Cys159，Cys160，在空间上很近，且可以很自由的伸展，这些都使 *MerB* 很容易和不同有机汞中的有机部分结合，打断 C-Hg 键，释放出二价汞以供 *MerA* 还原。

**1.2 细菌抗汞过程中汞的转运与降解** 当细胞外有汞离子存在时，正调控因子 *MerR* 的产物在与操纵子结合的部位扭曲折叠，允许 RNA 聚合酶进入使 *MerTPA* 转录。以  $\text{Tn501}$  为例<sup>[3]</sup>，位于质膜外的 *MerP* 的 Cys17、Cys33 将汞离子捕获，与汞形成 S-Hg 中间体，Cys33 中的硫基与 *MerT* 上位于细胞膜外侧的 Cys24 和 Cys25 共同构成一个过渡的共价结构，将 Hg 转运到 *MerT* 上，中间不经过自由汞离子阶段。研究表明 *MerA* N 端的 100 个氨基酸与 *MerT* 在序列上很相似，汞由 *MerT* 上的半胱氨酸对直接传递至细胞膜内 *MerA* N 端，紧接着经分子间的传递，汞到达 *MerA* 蛋白 C 端的底物结合部位，由 Cys558、Cys559 的硫醇基与汞形成中间体，*MerA* 以 NADPH 为电子供体，将二价汞还原为金属汞释放到细胞质内并挥发到细胞外。整个催化降解过程表示如下：



有机汞因其疏水性,不须经 MerTP 转运而直接进入细胞质内。Gregory<sup>[4]</sup>通过 NMR 及 X 衍射分析得出, MerB/Hg/DTT 的混合物可直接作为 MerA 的底物并将 Hg 挥发出来,并提出了 MerB 催化释放出汞并直接传递至 MerA 的作用机理:有机汞首先与 MerB 的 Cys159 结合,然后由 Cys96 提供质子将 C-Hg 键打开,释放出有机部分,而汞与 Cys96 位的硫醇基及两个来自于胞质溶液中的硫醇基(如 DTT)形成以汞为中心的三角形的中间物质,随后其 S-Hg 键被临近的 MerA C 端的 Cys559 与 Cys558 取代,使 Hg 快速传递至 MerA 的活性部位,进而还原为金属汞。汞在细胞中的运输及降解过程见图 1<sup>[5]</sup>。

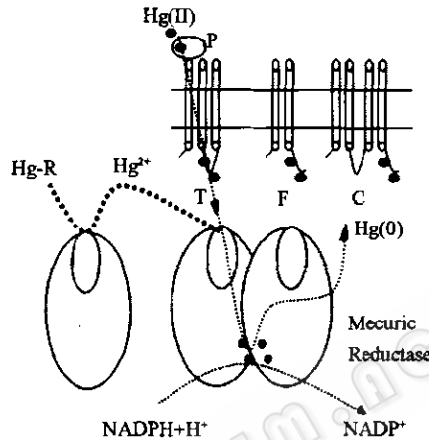


图1 汞在细胞中的传递与降解<sup>[5]</sup>

Kenji 对近一百株来源不同的铁氧化细菌进行汞挥发的分析发现,培养基中二价铁离子的存在可不同程度提高这些铁氧化细菌对汞的挥发,并以 *Acidithiobacillus ferrooxidans* SUG2-2 为例从 3 个方面论证了该结论<sup>[6]</sup>: (1) 由 *A. ferrooxidans* SUG2-2 制备的细胞质膜并不具有还原汞的能力,但加入二价铁离子却具有挥发汞的能力; (2) 有助于提高细菌氧化铁离子能力的铁硫菌蓝蛋白也可促进对汞的挥发; (3) 氰化钠可抑制细菌对铁的氧化及呼吸链中细胞色素 C 氧化酶的活性,当加入氰化钠时, *A. ferrooxidans* SUG2-2 对汞的挥发能力也完全被抑制。作者由此提出,铁氧化细菌对汞的挥发很可能是由细胞色素 C 氧化酶与汞还原酶协同作用来完成的。至于其它抗汞细菌中是否也存在这种协同作用还有待进一步研究。

## 2 细菌抗汞机制的进化

细菌抗汞特性是细菌在环境中汞的压力下形成的一种抗性机制。早在 3、4 亿年前,因火山爆发向自然界中释放了越来越多的汞,此时就有些细菌可能进化形成了一套抗汞基因,也就是说细菌抗汞特性是一个古老的进化系统。Petrova 等对永冻层沉积物中分离出的细菌进行汞抗性检测,约 3% 的细菌具有抗汞特性,这些细菌大概存在于 5 千年至 2 亿年之前,有 G<sup>-</sup>也有 G<sup>+</sup>,且它们都含有与现今发现的抗汞细菌中存在的 Mer 操纵子相似的基因<sup>[7]</sup>。此外,对来源于 G<sup>-</sup>中 Tn21 与 G<sup>+</sup>中 Tn501 中的 MerR 的序列比较显示,细菌对汞的抗性可能形成于 G<sup>-</sup>与 G<sup>+</sup>细菌的分化之前;通过对 G<sup>-</sup>与 G<sup>+</sup>中 MerA 蛋白的免疫分析也得知, G<sup>-</sup>与 G<sup>+</sup>细菌中的抗汞基因在进化中并没有发生很大变化<sup>[8]</sup>。

有关 Mer 操纵子的起源争议很多,近年来对 MerA 的序列分析表明它与细胞中吡啶核苷酸二硫键氧化还原酶家族的序列有着高度的相似性<sup>[8]</sup>,如谷胱甘肽还原酶、硫辛酰胺脱氢酶等,推测 MerA 是由这类细胞中染色体上的这类古老家族进化而来。同样 MerR 序列也与转录过程有关的调控基因家族有着很高的同源性,如 *glnR*、*blzR* 等,这也从另一个方面证明了 Mer 起源于一个很古老的系统。Petrova<sup>[7]</sup>通过对不同地表的细菌进行汞抗性分析结果表明:地表层由下至上,抗汞菌株的比例也逐渐有所升高;对汞含量越高的环境,抗汞菌株的存在比例也越高;有机汞存在的环境中,细菌 Mer 操纵子中大多也存在有活性的 MerB。由此推测 Mer 操纵子是在很早之前细菌因环境中的汞达到一定的量时,为适应这种压力而产生的一种机制,后来随着工业、农业及医药上汞使用量的增多,环境中汞的含量也不断提高,抗汞细菌的数目因此也有所增加,而 Mer 操纵子也经进化在结构及功能上呈现出了多样性。

目前认为 Mer 操纵子的进化主要是由基因间的水平转移即通过一些转座子 (Tn)、插入元件 (IS)、整合子 (Integron) 等所介导的基因插入、融合、缺失而实现的<sup>[9]</sup>。对铁、硫氧化细菌中的一些存在于染色体上的特殊 Mer 操纵子序列分析得知,编码其 MerA 的通用密码子与这些铁、硫氧化细菌染色体上的密码子有很大差别,但与 Tn501、质粒 R100 却很相似,即很有可能是 Tn501 等转座子插入到这些细菌的染色体中形成的。另外,Shoemaker 也证明了细菌抗汞基因的进化中确实有整合事件的发生<sup>[10]</sup>,尤其是很多 Mer 操纵子中抗生素基因簇的串联存在,也反应了进化中基因插入事件的存在。

以 G<sup>-</sup>细菌中 Mer 操纵子的进化为例,Mer 进化的大致路线为<sup>[11]</sup>(见图 2):MerRTP 及还原酶从细菌染色体上分化出来,MerR 通过复制、倒位分化为 MerR 与 MerD,在这步进化过程中还伴随着 MerD 向 MerA 3 端的移位,MerTP 及还原酶序列通过整合插入 MerR 与 MerD 之间,MerTP 再经复制后,MerP 从启动子一端开始与还原酶序列融合形成了 MerA,而 MerT 分化成 MerC (蛋白序列分析也证明 MerT、MerC 的相似性),至此就进化得到了 Tn21 或 pKLH2 的 Mer 操纵子,而当 MerC 缺失时即形成了 Tn501 的 Mer 结构。

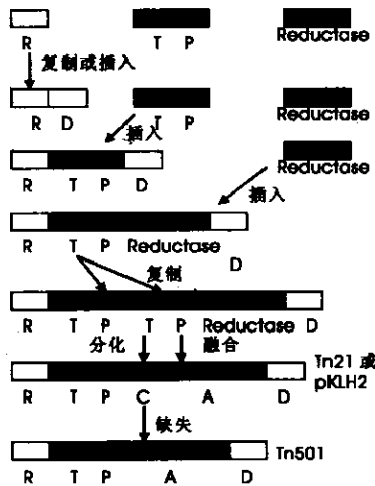


图 2 G<sup>-</sup>细菌中 Mer 操纵子进化的推测<sup>[11]</sup>

### 3 细菌抗汞特性的应用

重金属在环境中的存在严重威胁着人类的健康,运用分子生物学技术构建对重金属具有强吸附能力、高选择性和高耐受力的微生物,可广泛应用于重金属资源合理利用和重金属废水废渣生物治理等方面。细菌抗汞特性广泛存在于自然界中不同生活环境中的许多细菌中,且抗汞细菌在对汞及化合物的选择性、富集容量及对pH值、离子强度等环境因素的适应方面,较传统的生物吸附法都有很大的提高。这是因为抗汞菌株对汞的吸附作用是基于MerTP等所编码的特异性蛋白与汞之间的存在的生物亲和力,具有很高的排它性,不仅能够吸附降解废水中的汞金属、对其进行回收,还可以从海水中富集汞金属、修复汞污染环境等<sup>[11]</sup>。

Weno成功地在大肠杆菌中将MerR与冰核蛋白的C端形成一种可分泌至胞外的融合蛋白,构建的大肠杆菌基因工程菌可有效、专一地将外界汞离子富集到细胞外,并且不受外界pH值、温度及各种离子的影响<sup>[12]</sup>。作者还合成了一种植物螯合物,它以一种重复的能与金属结合的(Glu-Cys)nGly序列组成,它比金属硫蛋白更能有效的结合金属汞,通过基因工程将这些短肽在细胞外或细胞内表达,都明显增加了微生物对汞离子的积累<sup>[13]</sup>。

细菌抗汞特性表达稳定,且受PH、温度等影响小,在分子生物学中可作为一种稳定的抗性、筛选标记。如大多数金矿中存在有一定量的汞及其硫化物,对浸矿细菌的生长有很强的抑制作用,但因其生长环境是嗜酸的,抗生素表达不稳定,因此可尝事将来源于相似环境的细菌如铁细菌中的抗汞基因作为一种筛选标记建立这些细菌的遗传转移系统,同时也可构建高效抗汞的浸矿菌株,提高这些细菌对含汞金矿的浸矿能力。

此外,对细菌抗汞基因进化中基因整合及其转移模式系统的研究,可为研究细菌因适应其它压力而发展出的抗性机制的进化提供依据,如抗生素抗性基因等。

### 参考文献

- [1] Osborn A M, Bruce K D, Strike P, *et al.* FEMS Microbiol Rev, 1997, **19**: 239 ~ 262.
- [2] Barkay T, Miller S M, Summers A O, *et al.* FEMS Microbiol Rev, 2003, **27**: 355 ~ 384.
- [3] Benison G C, Shokes J E, Cosper N J, *et al.* Biochemistry, 2004, **43** (26): 8333 ~ 8345.
- [4] Paola D L, Gregory C B, Homayoun V K, *et al.* Biochemistry, 2004, **43**: 8322 ~ 8332.
- [5] Brown N L, Shih Y C, Leang C, *et al.* Biometals, 2002, **33** (4): 715 ~ 718.
- [6] Kenji I, Fumiaki T, Kazuo K, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, **66**: 3823 ~ 3827.
- [7] Petrova M A, Mindlin S Z, Gorlenko Z M, *et al.* Russia J of Genetics, 2002, **38**: 1569 ~ 1574.
- [8] Barkey T, Wagner D I. Adv Appl Microbiol, 2005, **57**: 1 ~ 52.
- [9] Liebert C A, Wireman J, Smith T, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2001, **63** (3): 1066 ~ 1076.
- [10] Shoemaker N B, Vlamakis H, Hayes K, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2001, **67** (2): 561 ~ 568.
- [11] Nascimento A M, Chartone-Souza E. Genet Mol Res, 2003, **2** (1): 92 ~ 101.
- [12] Weon B, Wu C H, Kostal J, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2003, **69** (6): 3176 ~ 3180.
- [13] Weon B, Rajesh K M, Ashok M, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2001, **67** (11): 5335 ~ 5338.