

氧化硫硫杆菌质粒的分离

金松谟 颜望明

(山东大学微生物研究所, 济南)

摘要 用碱法对分离到的 7 株氧化硫硫杆菌进行质粒检测, 在 6 株中分离到了 18 个质粒, 质粒 DNA 的分子量为 $1.3 \times 10^6 - 98 \times 10^6$ 。

关键词 氧化硫硫杆菌; 质粒

氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 是一种以元素硫和其他还原态硫化物作为能源, 以二氧化碳作为主要碳源进行生长的专性能自养细菌, 在酸性条件下生长, 氧化元素硫可产生高达 5—10% 硫酸 (W/V), 在 pH0.5—1 时仍能存活。该菌可参与多种硫化矿物的浸出, 如锰、镉、钒等的浸出。由于它的特殊生理性状及其在浸矿中的作用, 越来越引起人们的重视。

关于硫杆菌遗传学的研究报道甚少, 现在已发现硫杆菌的某些菌株能抗多种重金属离子, 有些菌株对有机酸具有较高的耐性, 这些性状的遗传基础还不清楚。1980 年以来报道了从氧化亚铁硫杆菌以及一些兼性自养硫细菌中分离得到了质粒^[1-3]。但是从氧化硫硫杆菌中分离到质粒, 至今尚未见报道。

本实验从不同来源的氧化硫硫杆菌的菌株中分离得到了质粒, 并进行了分子量的测定和比较。

材料和方法

(一) 菌种及菌种培养

本实验所用的氧化硫硫杆菌菌株及其来源: Tt-1、Tt-2 菌株分离自山东泰安地区煤矿堆积物; Tt-3 由中国科学院微生物研究所提供; Tt-4、Tt-5、Tt-6 分离自广东酸性土壤中; Tt-7 分离自山东招远金矿酸性矿水。

氧化硫硫杆菌培养采用 Starky 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2g, KH_2PO_4 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, 蒸馏水

1000 ml, 硫磺粉 10—20g, pH2.5—3.0。先将无机盐配成溶液, 分装 (2000 ml 三角瓶装液 400ml) 高压灭菌。硫磺粉分别常压蒸煮后, 在接种前加入无机盐培养基中, 接种量为 5%, 30℃ 静置培养 7 天。

(二) 质粒的提取

氧化硫硫杆菌培养至对数期后期, 离心收集菌体, 用 Starky 无机盐液洗涤 2 次, 去除残存的硫粒, 再用 TE 缓冲液 (0.05 M Tris-0.02 M EDTA, pH8.0) 洗 2 次, 离心后悬浮于一定量的 TE 液中。按照 Casse^[4] 的方法提取质粒。

(三) 琼脂糖凝胶电泳

采用 Tris-醋酸缓冲液 (40m M Tris, 2m M EDTA, 20m M 醋酸钠, pH8.0), 琼脂糖浓度为 0.7%, 电压 40V, 12 小时, 凝胶用溴化乙锭染色, 在紫外光灯下观察和照相, 相机上加橙红色滤光片, 根据条带深浅, 选择曝光时间。

(四) 质粒 DNA 分子量测定

质粒 DNA 分子量是根据 Meyers (1979 年) 等人^[5] 的方法进行测定的。用 *E. Coli* V 517 作为标准。重复三次, 取其平均值, 误差大约为 $\pm 0.5 - \pm 6 \times 10^6$ 。

结果与讨论

本实验对已分离和收集的不同来源的 7 个菌株进行了质粒检测及分子量的测定, 结果列于表 1, 电泳结果见图 1。

为了排除开环构型的干扰, 我们按照 Mao 等人的方法, 在电泳前用 95℃ 预处理, 并经多

表1 氧化硫硫杆菌及质粒分子量

菌 株	质 粒		
	数目	名 称	分子量 ($\times 10^6$)
Tt-1	3	pTt10	63
		pTt11	52.5
		pTt12	7.6
Tt-2	2	pTt20	63
		pTt21	7.6
Tt-3	1	pTt30	4.6
Tt-4	3	pTt40	98
		pTt41	9.5
		pTt42	7.8
Tt-5	5	pTt50	46.8
		pTt51	14
		pTt52	3.8
		pTt53	1.53
		pTt54	1.3
Tt-6	4	pTt60	57
		pTt61	31
		pTt62	5.5
		pTt63	2.3
Tt-7	0	/	

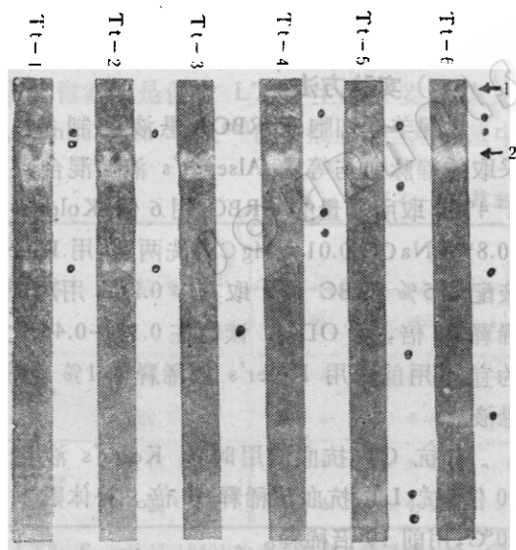


图1 氧化硫硫杆菌质粒电泳图谱

1. 加样口 (origin), 2. 染色体 DNA (chrom.),
黑点表示质粒带的位置

次抽提,电泳检测证明,这些质粒带是可以重复出现的,也是稳定的。另外,我们选择了 pTt52, pTt53 和 pTt54 三个质粒,用 EcoRI、HindIII、Pst I、Xho I、BamHI 及 Sall 等限制性内切酶酶切,证明了这三个质粒是不同的。

从图表看来,大部分氧化硫硫杆菌菌株都含有质粒,有的菌株如 Tt-5 具有 5 个大小不同的质粒,其分子量从 1.3×10^6 — 46.8×10^6 。有的菌株如 Tt-3 只含有 1 个质粒。个别菌株如 Tt-7 未发现有质粒。缺乏质粒菌株的存在,间接地说明了在硫杆菌中硫氧化机能不是由质粒所编码的。Tt-4, Tt-5 和 Tt-6 菌株,虽然分离自同一地区,但不同菌株所含质粒在数量和大小上则各不相同,说明了质粒的分布、数量与菌株的来源并没有必然的联系。

Tt-1 和 Tt-2 菌株是从山东泰安地区含硫煤矿堆积物中分离得到的。前者具有生长速度快和耐丙酮酸 (2mM) 的特性;后者生长速度慢,并且对丙酮酸敏感(当丙酮酸浓度达到 0.2 mM 时就可完全抑制其生长)。比较 Tt-1 和 Tt-2 菌株所含质粒(图 1),它们之间有 2 个质粒(即 pTt10 与 pTt20, pTt12 与 pTt21) 完全相同。所不同的是 Tt-1 菌多了一个质粒(pTt11, 分子量为 52.5×10^6),这个质粒是否与上述性状有关,有待进一步证明。

从以上结果看来,质粒在氧化硫硫杆菌中是普遍存在的。在已分离的质粒中,最大的分子量为 98×10^6 ,最小的为 1.3×10^6 。这些质粒目前还不了解它们所编码的具体性状,但它们的存在对于开展自养细菌的遗传学研究具有重要的意义。我们可以以硫杆菌的原始质粒为起点,与大肠杆菌 pBR325 等具有标记的质粒重组成新的质粒载体,以便使它能在大肠杆菌和硫杆菌中都能复制和表达遗传信息,这将大大丰富了自养细菌的遗传学研究内容,为用基因工程方法改造硫杆菌的性状提供了必备的基因载体。

参 考 文 献

- [1] Mao, M. W. H. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 8: 121—125, 1980.
- [2] Martin, P. A. W. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 27: 850—853, 1981.
- [3] Martin, P. A. W. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 392—395, 1983.
- [4] Casse, F. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 113: 229—242, 1979.
- [5] Meyers, J. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 127: 1529—1537, 1976.