

嗜热解烃基因工程菌 SL-21 的构建

宋永亭^{1,2}

(1. 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266100; 2. 中国石化股份胜利油田分公司 采油工艺研究院, 山东 东营 257000)

摘要: 从以 C₁₅—C₃₆ 直链烷烃为惟一碳源生长的解烃菌——地芽孢杆菌 MD-2 细胞中获得了 1 个新的烃降解基因——烷烃单加氧酶基因 *slad A*。将基因 *slad A* 克隆到质粒 pSTE33 上, 构建了重组质粒 pSTalk。通过电转化将 pSTalk 转化入嗜热脱氮土壤芽孢杆菌 ZJ-3 内, 构建了基因工程菌 SL-21。SL-21 兼具嗜热和解烃的功能, 在 70℃ 条件下, 14d 后对原油的降解率达 75.08%。研究表明, 可以通过体外重组的方式向嗜热菌中引入烃降解基因, 从而构建嗜热解烃基因工程菌。

关键词: 微生物采油; 烃类降解菌; 嗜热解烃基因; 质粒; 基因工程菌

中图分类号: TE357.9

文献标识码: A

文章编号: 1009-9603(2010)01-0080-03

微生物降解原油是微生物提高原油采收率的主要机理之一。研究表明, 在解烃菌作用下原油的族组分发生变化, 轻质组分增加, 粘度下降, 改善了原油的流动性^[1-6]; 同时, 解烃菌还可以将烃类分子转化成有机溶剂、表面活性剂、酸和气体等驱油物质^[7-10]。迄今为止, 从自然界筛选的高效解烃菌绝大多数为嗜温微生物, 最适合生长温度一般为 20~45℃, 很难适应油藏的高温环境^[11-12]。笔者从 1 株解烃菌细胞中分离出 1 个新的烃降解基因——烷烃单加氧酶基因 *slad A*, 并采用基因工程手段将此基因转化到另外 1 株最适合生长温度为 70℃ 的嗜热菌体内, 构建了嗜热解烃基因工程菌 SL-21。该基因工程菌既具有高效的解烃功能, 又能适应油藏高温环境, 在微生物采油中具有良好的应用前景。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

实验材料包括限制性内切酶 *EcoR I* 和 *Xho I*; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、PCR 片断回收试剂盒; 大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* DH5 α ; pGEM-T easy 载体; 质粒 pSTE33 kan^r, Amp^r, *EcoR I* / *Xho I*; 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan)。

LB 培养基按文献^[5]配制。

无机盐培养基组成: Na₂HPO₄ 0.06g; KH₂PO₄ 0.02g; NaNO₃ 0.2g; CaCl₂ 0.001g; FeSO₄ 0.001g; MgSO₄ 0.03g; 蒸馏水 100mL; pH 值为 7.2。

嗜热脱氮土壤芽孢杆菌 ZJ-3, 分离自胜利油区孤岛油田中一区馆 3 区块采出液, 最适合生长温度为 70℃; 地芽孢杆菌 MD-2, 以 C₁₅—C₃₆ 直链烷烃为惟一碳源生长, 分离自胜利油区原油污染土壤。

1.2 实验方法

DNA 的操作 基因组 DNA 小量提取, 利用聚合酶链式反应 (PCR) 对 DNA 扩增、PCR 产物的回收、酶切与连接, 质粒 DNA 提取和基因序列测定等均按文献^[13-14]方法进行。

菌株培养 所涉及到的菌株培养均在温度为 70℃, 转速为 180r/min 的条件下进行振荡培养。

基因工程菌的构建和筛选方法 ZJ-3 感受态细胞的制备按文献^[13-14]方法进行。用构建的重组质粒 pSTalk 在最佳条件下电转化 ZJ-3 感受态细胞构建基因工程菌。在含有 50 μ g/mL Kan 的 LB 琼脂平板上挑选 10 个阳性克隆接种到 5mL LB 培养基中, 培养过夜, 获得种子液。将该种子液接种到 200mL 以液蜡为惟一碳源的无机盐培养基中, 培养 5d 后用 CCl₄ 抽提剩余的液蜡, 用红外测油仪测定烃的剩余量, 根据菌株降解液蜡的速率筛选出目的基因工程菌。

基因工程菌的诱导表达及 SDS-PAGE 检测 挑

收稿日期: 2009-11-09; 改回日期: 2009-12-21。

作者简介: 宋永亭, 男, 工程师, 在读博士研究生, 从事石油微生物技术研究。联系电话: (0546)8558999, E-mail: s1976@slof.com。

基金项目: 中国石化科技攻关项目“高含水油藏微生物驱油技术研究”(P05076)和中国石化股份胜利油田分公司科技攻关项目“石油微生物基因工程菌研究”(YKS0604)

取阳性克隆接种于含 100 μg/mL Amp 的 10 mL 的 LB 液体培养基中, 180 r/min 下振荡培养至光密度值达到 0.6 (检测光波波长为 600 nm), 加诱导物 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 振荡培养 8 h, 收集表达菌体, 加 SDS 上样缓冲液, 于 100 °C 水浴 10 min 后上样, 用 12% 的 SDS-PAGE 电泳检测。

基因工程菌降油能力测试 将基因工程菌接入 20 mL LB 培养基中, 培养 12 h, 以 5 000 r/min 的速度离心 5 min 收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤菌体 1 次, 加 20 mL 无菌生理盐水悬浮, 作为菌株利用烷烃生长的种子液。取菌悬液按 1% 接种量接入 200 mL 无机盐培养基中, 加入 2% 孤岛油田中一区馆 3 区块原油或 2% 的液体石蜡作为惟一碳源培养, 取样稀释涂布计数。

原油降解实验 在无机盐培养基中添加 2% 的原油, 按 1% 接种量接入基因工程菌, 培养 14 d。用正己烷萃取降解后的原油, 用气相色谱仪测定原油饱和烃组分的降解情况。原油降解率为菌株降解前、后原油量的差值与菌株降解前原油量的比值。

2 实验结果与分析

2.1 MD-2 基因组 DNA 的检测

对 MD-2 基因组进行提取和纯化。提取后的染色体 DNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 相对分子质量不小于 23 kb, 说明提取的 DNA 完好。在检测光波波长为 260 与 280 nm 条件下分别测出 DNA 的光密度, 其比值为 1.95, 换算出 DNA 的质量浓度为 1 400 μg/mL, 表明 DNA 纯度较好, 无蛋白、RNA、酚和多糖物质的干扰。

2.2 烷烃单加氧酶基因的克隆与序列分析

依据美国国立卫生研究院基因序列数据库 (Genbank) 中的烷烃单加氧酶基因开放阅读框两端保守序列, 设计了一对兼并引物以 MD-2 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将约 1.3 kb 的 PCR 产物回收后连接到 pGEM-T easy 载体上, 转入 E. coli DH5α, 挑取阳性克隆质粒进行测序。测序结果经 Genbank 检索, 表明该 DNA 序列是个新的烷烃单加氧酶基因, 命名为 *slad A*。

2.3 基因工程菌的构建及筛选

通过 PCR 扩增 *slad A* 后, 将 PCR 产物用 *EcoR* I 或 *Xho* I 消化, 分离纯化出 1 329 bp 的片断, 与经 *EcoR* I 或 *Xho* I 消化的 pSTE33 质粒连接, 构建含 *slad A* 的重组质粒 pSTalk。经电泳鉴定表明

(图 1), 重组质粒构建成功。

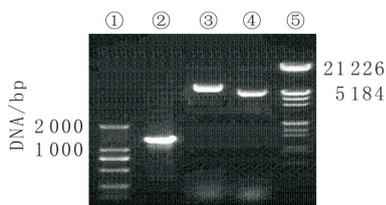


图 1 pSTalk 质粒的电泳鉴定

①—DL2000 DNA Marker; ②—MD-2 基因组的 PCR 产物; ③—pSTalk 质粒; ④—pSTE33 质粒; ⑤—λDNA/EcoRI + HindIII DNA Marker

分别测试各阳性克隆对液蜡的降解速率 (表 1), 从中挑选出对液蜡降解速率最高的基因工程菌 SL-21。

表 1 基因工程菌株对液蜡的降解速率

菌株编号	液蜡加入量/ (g · L ⁻¹)	液蜡剩余量/ (g · L ⁻¹)	菌体质量浓度/ (g · L ⁻¹)	平均降解速率/ (g(液蜡) · g(菌体) ⁻¹ · d ⁻¹)
SL-21	5	1.2	1.65	0.461
SL-22	5	2.6	1.71	0.281
SL-23	5	1.5	1.69	0.414
SL-24	5	1.6	1.73	0.393
SL-25	5	1.3	1.68	0.440
SL-26	5	2.4	1.73	0.300
SL-27	5	1.7	1.71	0.385
SL-28	5	1.6	1.71	0.397
SL-29	5	2.8	1.75	0.251
SL-210	5	1.3	1.66	0.445

2.4 基因 *slad A* 在基因工程菌 SL-21 中的诱导表达

由基因工程菌 SL-21 全蛋白的 SDS-PAGE 图谱可见 (图 2), 在烷烃单加氧酶基因 *slad A* 对应蛋白大小的地方扫描到高信号强度, 表明 *slad A* 基因在 SL-21 中得以表达。

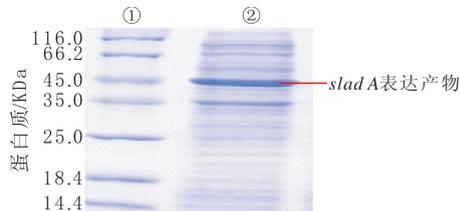


图 2 基因工程菌 SL-21 全蛋白的 SDS-PAGE 图谱
①—蛋白相对分子质量标准; ②—SL-21 全蛋白图谱

2.5 基因工程菌 SL-21 碳源生长

基因工程菌 SL-21 在以原油和液体石蜡为惟一碳源的无机盐培养基中培养, 在 70 °C 和 180 r/min 条件下, 经过 3 d 的延滞期后进入对数期, 菌体数增加。17 d 后, 菌体数为接菌初期的 5 倍, 表明 SL-21 能够利用原油或液体石蜡作为惟一碳源生长。

2.6 对原油的降解作用

由原油饱和烃组分的降解情况可看出(图 3), 基因工程菌对原油有很明显的降解效果, 几乎将饱和烃降解完全。经对气相色谱各峰面积对比, 计算出各峰面积的含量和饱和烃组分降解率(表 2)。基因工程菌 SL-21 对原油的降解率为 75.08%。

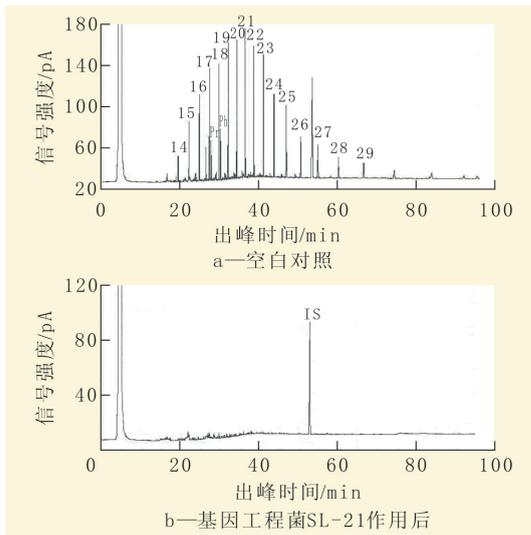


图 3 基因工程菌 SL-21 降解前后原油的气相色谱

表 2 基因工程菌 SL-21 降解原油的气相色谱分析

碳峰	对照面积/pA	经 SL-21 降解后的面积/pA	降解率, %
C ₁₂	158.03	34.30	78.30
C ₁₃	216.69	51.41	76.27
C ₁₄	210.03	72.89	65.30
C ₁₅	274.26	63.67	76.78
C ₁₆	191.28	58.26	69.54
C ₁₇	176.45	44.80	74.61
C ₁₈	130.50	40.96	68.61
C ₁₉	111.22	38.70	65.20
C ₂₀	90.01	22.86	74.60
C ₂₁	70.19	12.56	82.11
C ₂₂	60.63	9.52	84.30
C ₂₃	50.71	5.27	89.61
C ₂₄	39.39	4.05	89.72
C ₂₅	32.27	4.98	84.57
C ₂₆	23.94	3.81	84.09
C ₂₇	17.96	3.22	82.07
C ₂₈	11.98	3.31	72.37
C ₂₉	9.24	2.23	75.87
总计	1 953.12	486.8	75.08

实验结果表明, 烃类降解菌地芽孢杆菌 MD-2 细胞提取的烷烃单加氧酶基因 *slad A* 可以在嗜热脱氮土壤芽孢杆菌 ZJ-3 中表达。但不同的基因工程菌株中烷烃单加氧酶基因 *slad A* 表达的效率不同, 需要通过菌株对原油的降解评价进一步筛选。获得的对原油降解速率最高的基因工程菌 SL-21 能

在 70℃ 高温条件下生长, 并且对原油降解效果明显。因此以体外重组方式向嗜热菌中引入烃类降解基因构建嗜热解烃基因工程菌在技术上是可行的。

3 结论

以地芽孢杆菌 MD-2 为目标菌株, 克隆和表达了降解长链烷烃的单加氧酶基因 *slad A*, 并在嗜热脱氮土壤芽孢杆菌 ZJ-3 中正确表达了基因 *slad A*, 构建了基因工程菌 SL-21。基因工程菌 SL-21 在 70℃ 条件下, 能以原油或液体石蜡为惟一碳源生长。14d 对原油的降解率为 75.08%, 对原油饱和烃组分均有明显的降解效果。该基因工程菌既可以用于微生物驱油技术, 又可以用于高温油田污水的生物处理。利用基因工程的方法可以获得既能耐受极端环境, 又具有良好功能的基因工程菌株, 是石油微生物种选育的重要方向。

参考文献:

- [1] 周金葵, 王大威, 廖明清, 等. 一株石油降解菌的筛选及性能研究[J]. 大庆石油地质与开发, 2007, 26(6): 119-123.
- [2] 汪卫东, 汪竹, 耿雪丽, 等. 美国微生物采油技术现场应用效果分析[J]. 油气地质与采收率, 2002, 9(6): 75-76.
- [3] 袁长忠, 宋永亭, 段传慧. 微生物采油用营养物质在石英砂上的静态和动态吸附规律[J]. 油气地质与采收率, 2009, 16(4): 74-76.
- [4] 修建龙, 董汉平, 俞理, 等. 微生物提高采收率数值模拟研究现状[J]. 油气地质与采收率, 2009, 16(4): 86-89.
- [5] 路璐, 向廷生, 黑花丽. 本源微生物降解原油的饱和烃色谱分析[J]. 油气地质与采收率, 2008, 15(1): 77-79.
- [6] 宋智勇, 张君, 马继业, 等. 微生物菌液的界面特性[J]. 油气地质与采收率, 2008, 15(3): 73-75.
- [7] 蒋焱, 曹功泽, 赵凤敏, 等. 聚合物驱后微生物提高采收率的可行性分析[J]. 油气地质与采收率, 2008, 15(5): 63-65, 68.
- [8] 陈爱华, 方新湘, 吕秀荣, 等. 克拉玛依油田内源微生物驱油机理探索[J]. 油气地质与采收率, 2008, 15(5): 75-77.
- [9] 宋绍富, 刘菊荣, 张忠智. 微生物采油替代营养源的研究[J]. 油气地质与采收率, 2007, 14(2): 96-98.
- [10] 李希明. 微生物驱替盲端类剩余油的微观实验[J]. 油气地质与采收率, 2008, 15(3): 91-92.
- [11] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 143.
- [12] 唐赞, 冯露, 刘沐之, 等. 嗜热解烃菌 NG80-2 的鉴定及其特性[J]. 南开大学学报, 2006, 39(2): 46-50, 70.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [14] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1993.