

氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成相关基因在不同亚铁浓度刺激下的差异表达

刘新星, 武海艳, 刘文斌, 李寿朋

中南大学资源加工与生物工程学院, 长沙 410083

摘要: 氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)的生物控制矿化作用可以使其在胞内形成黑色电子致密颗粒——磁小体。本研究利用生物信息学方法对氧化亚铁硫杆菌标准菌株 ATCC 23270 的全基因组进行分析, 并通过 Real-time PCR 技术研究氧化亚铁硫杆菌中与磁小体形成相关的 *mpsA*、*magA*、*thy* 和 *mamB* 四个基因在不同亚铁浓度刺激下的差异表达, 结果发现它们在转录层面的表达量受亚铁浓度的影响, 当亚铁浓度达到 150~200 mmol/L 范围内达到最高表达, 这对进一步深入研究氧化亚铁硫杆菌中磁小体的形成机理有积极的意义。

关键词: 氧化亚铁硫杆菌, 磁小体, 生物信息学, 实时定量 PCR

Response of genes for synthesizing the magnetic of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to different concentration of Fe²⁺ stress

Xinxing Liu, Haiyan Wu, Wenbin Liu, and Shoupeng Li

Department of Bioengineering, School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China

Abstract: *Acidithiobacillus ferrooxidans* is able to synthesize intra-cellular electron-dense magnetite, which formed by BCM method in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. The whole genome of the type strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 was analyzed by bioinformatics and some homolog genes of functional ones in magnetotactic bacteria were available. This study analyzed the different concentration of Fe²⁺ stress response of *mpsA*, *magA*, *thy* and *mamB* gene by using real-time PCR analysis. Temporal genes expression profiles were examined in cells subjected to different concentration of FeSO₄·7H₂O stress, they reached to high expression under 150~200 mmol/L FeSO₄·7H₂O stress. With this new method study, it is possible that we could do deeper research to generate a comprehensive description of the mechanism that how *Acidithiobacillus ferrooxidans* synthesize the magnetic particles.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, magnetosome, bioinformatics, real-time PCR

生物控制矿化作用所产生的磁性颗粒具有粒度特、无细胞毒性等特点, 是一种理想的生物纳米磁小而均匀、不团聚、纯度高、结晶完美、磁性质独特性材料^[1-4]。氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus*

Received: May 7, 2008; **Accepted:** October 20, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 50774102), the National Basic Research Program (No. 2004CB619201), and Innovative Group of Education of Graduation Student of Central South University (No. 1343-77341).

Corresponding author: Xinxing Liu. Tel: +86-731-8876697; E-mail: whyyj1982@gmail.com

国家自然科学基金项目(No. 50774102), 国家重点基础研究发展规划项目(No. 2004CB619201), 中南大学研究生教育创新工程(No. 1343-77341)资助。

ferrooxidans)是生物冶金中的重要细菌之一^[5], 栖生于金属矿山酸性矿坑水(Acid mine drainage, AMD)中, 是一种嗜温、嗜酸、化能自养的革兰氏阴性细菌, 能以亚铁、硫元素以及低价硫化物作为能源^[6]。由于它的生长环境中富含 Fe 和 S 元素, 自身的生物控制矿化作用使其能够在胞内形成电子致密的磁性颗粒^[7,8]。通常对氧化亚铁硫杆菌的研究主要集中在其浸矿能力方面, 对其形成胞内磁小体能力的研究尚属空白。

在前期的研究中对氧化亚铁硫杆菌标准菌株 ATCC 23270 的全基因组的生物信息学分析^[9-11], 对其中与趋磁细菌中基因 *mpsA*、*thy*、*magA*、*mamB* 具有较高相似度的 ORF1622、0276、1124、2572 为目标基因进行了半定量 PCR 技术研究结果表明氧化亚铁硫杆菌中的 *mpsA*、*magA* 和 *mamB* 基因在转录层面的表达与亚铁有着直接关系, 而氧化亚铁硫杆菌仅在亚铁培养下生成磁小体, 并且这 3 个基因在趋磁细菌磁小体形成过程中在铁转运成核方面都发挥了重要作用, 本研究将通过 Real-time PCR 对其与亚铁浓度的关系进行更深入的研究, 为氧化亚铁硫杆菌中生成磁小体机理的研究提供进一步的理论依据。

1 实验材料

1.1 菌种与培养基

A. ferrooxidans ATCC 23270, 购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

采用美国模式菌种保藏中心 ATCC medium 2039 培养基配方:

A 液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, K_2HPO_4 0.4 g, 矿质元素液 5 mL, 蒸馏水 800 mL, pH 2.3;

B 液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 g, 蒸馏水 200 mL, 用微孔滤膜(Φ 0.22 μm)过滤灭菌;

矿质元素液: 氨三乙酸 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CaCl_2 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, H_3BO_3 0.01 g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 蒸馏水 1 L, 先用 500 mL 蒸馏水溶解氨三乙酸, 并用 KOH 调整 pH 到 6.5, 后加水至 1 L 溶解其他药品。

1.2 试剂与仪器

RNA 提取试剂: Trizol 试剂 (InvitrogenTM

Corporation, 15596-026)、氯仿(分析纯)、异丙醇(分析纯)、DEPC 水(0.1%)、75%乙醇(无水乙醇与 DEPC 水配制);

RNA 纯化试剂盒: SV Total RNA Isolation System(Promega);

RNA 反转录试剂: SuperScriptTM II 反转录酶 (InvitrogenTM Corporation, 18064-014)、随机引物 (InvitrogenTM Corporation, 48190-011);

RT-PCR 试剂: E.Z.N.A.凝胶回收试剂盒(Omega Bio-tek, Inc., D2501-01)、QIAquick PCR 产物纯化试剂盒 (Qiagen GmbH, 28106)、 $2 \times$ PCR 混合体系 (Fermentas, K0171)、SYBR Green 定量 PCR 混合体系 (Toyobo Co., LTD., QPK -201)。

NanoDrop 微量分光光度计(NanoDrop Technologies, Inc., ND-1000), MyIQTM 单色实时定量 PCR 检测系统(Bio-Rad Laboratories, Inc.), 电泳仪(北京市六一仪器厂, DYY-12 型), BioSense 凝胶成像系统(上海山富科学仪器有限公司, SC810)。

2 实验方法

2.1 细菌生长曲线的测定

取对数期 ATCC 23270 菌种接于 2 L 培养基中, 接种后终浓度为 5×10^6 个/mL, 置于 3 L 锥形瓶, 调 pH 2.0, 以 1% (W/V)硫单质为能源, 180 r/min 摇床培养, 温度为 30°C。用血球计数板在光学显微镜下直接观察计数。

2.2 不同亚铁浓度刺激处理

当细菌培养至对数期后, 将培养好的细菌 4°C 过滤除去硫粉, 分装 500 mL 锥形瓶, 每个 300 mL, 然后分别加入不同浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 刺激(表 1), 本试验分 2 组进行, 1 组加入 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度依次为 0.05(对照)、2、50、100、150、200 mmol/L, 2 组加入 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度依次为 2(对照)、150、250、300、350 mmol/L, 刺激 1 h 后 10 000 r/min, 4°C 冷冻离心收集菌体。同样的方法做 3 组平行试验, 以确保数据的可信度。

2.3 RNA 提取、纯化及 cDNA 合成

将收集到的菌体分别采用 Trizol 一步法提取总 RNA, 用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒纯化。通过电泳和 NanoDrop 微量分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。以总 RNA 中 mRNA 为模板, 用反转录试

剂盒合成 cDNA, 并用 NanoDrop 微量分光光度计测定其浓度, 将所有 cDNA 样品浓度均调至 100 ng/ μ L, -20°C 冷藏备用。具体步骤参见各试剂使用说明。

表 1 实施刺激的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度

Table 1 Concentration of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ stress

Group	Concentration of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mmol/L)					
1	0.05	2	50	100	150	200
2	2	150	250	300	350	

2.4 目标基因的确定及定量标准品的制备

根据氧化亚铁硫杆菌中各基因编码蛋白质与趋磁细菌中蛋白质相似度^[12], 以及蛋白有关功能预测分析, 选取 *mpsA*、*Thy*、*magA* 和 *mamB* 四个基因在 ATCC 23270 中的同源基因进行不同亚铁浓度刺激下差异表达分析, 引物序列及预计 PCR 产物大小如下表 2。

采用上述引物, 以 cDNA 为模板, PCR 扩增产物片段经琼脂糖凝胶回收后, 连接、转化、蓝白筛选、挑选阳性克隆子测序。测序结果序列于 TIGR 数据库内对 ATCC 23270 全基因组序列进行 BLASTN 同源性比对分析。测序结果与目标基因序列一致的引物用于基因表达差异研究。

PCR 产物 DNA 纯化后经 NanoDrop 微量分光光度计检测, 将 DNA 浓度换算为拷贝数, 10 倍系列梯度稀释成 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^2$ 拷贝/ μ L 的定量检测标准品, -20°C 保存备用。

2.5 Real-time PCR 检测

依次加入 cDNA 模板 10 μ L, 5 pmol/ μ L 正义引物(Sense primer)、反义引物(Anti-sense primer)各 2 μ L, 2 \times SYBR Green 实时定量 PCR 混合体系 25 μ L, 去离子水 11 μ L, 总体系为 50 μ L。

反应条件: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 15 s,

57°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 实时荧光检测, 共 40 个循环。以 $0.5^{\circ}\text{C}/10$ s 的速度从 55°C 缓慢递增至 94°C , 进行熔解曲线分析, 根据荧光曲线的 Ct 值以及标准曲线计算定量结果, 以参照基因 16S rDNA 为校正因子, 计算分析各基因相对表达量。

3 结果与分析

3.1 生长对数期的确定

本课题组通过细菌血平板计数法测定其生长曲线(图 1), 分析表明 ATCC 23270 在以硫单质为能源时对数期比较长, 为接种后第 4~11 天。本试验采用在接种后第 9 天进行不同浓度的亚铁刺激。

3.2 总 RNA 质量和阳性质粒的 PCR 鉴定

将提取的 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳分析(图 2), 5S、16S、23S 条带清晰可见, 且 23S 条带的亮度接近 16S 条带亮度的 2 倍, 带与带之间无明显拖尾现象, 表明总 RNA 分子完整、无降解、无明显的 DNA 污染、均一性比较好。经 NanoDrop 微量分光光度计检测, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.90~2.00 之间, 说明 RNA 未被蛋白质、酚污染, 是高纯度的。阳性质粒 PCR 产物电泳结果发现其片段符合所设计引物 PCR 扩增产物的大小。证明引物特异性良好, 可用于后续定量检测。

3.3 目标蛋白与趋磁细菌中同源蛋白序列分析

通过生物信息学方法对氧化亚铁硫杆菌标准菌株 ATCC 23270 中与磁小体形成相关基因的研究, 并对其中与趋磁细菌中基因 *mpsA*、*thy*、*magA*、*mamB* 具有较高相似度的 ORF1622、0276、1124、2572 为目标基因进行了保守结构域、氨基酸序列比对、蛋白质同源性分析(图 3~6), 发现他们具有较高的序列同源性, 通过保守结构域的分析对其相应的功能进行了预测(表 3)。

表 2 引物序列及预计 PCR 产物大小

Table 2 Primers used for real-time PCR

Gene symbol	Primer sequence (5'-3')		Size of product (bp)
	Sense primer	Anti-sense primer	
<i>mpsA</i>	GGCTATTATCGGCGGTCTGGC	GCTCCGGGCGTATCAATGAAC	201
<i>thy</i>	TCGGAAGCTGGAGGGGAACA	GCACCGTAGGCACGCATCA	241
<i>magA</i>	CATGCGCTCAGCCATTGTAC	AACCTACCGTTACGCTCCAC	168
<i>mamB</i>	ATCGTACCGACGCCATTTCCA	CCCTTCACAGCCGAGAATCACTT	220
16S rDNA	AATCCAAGAAGAAGCACCG	CCACTGATGTTCTCCAG	238

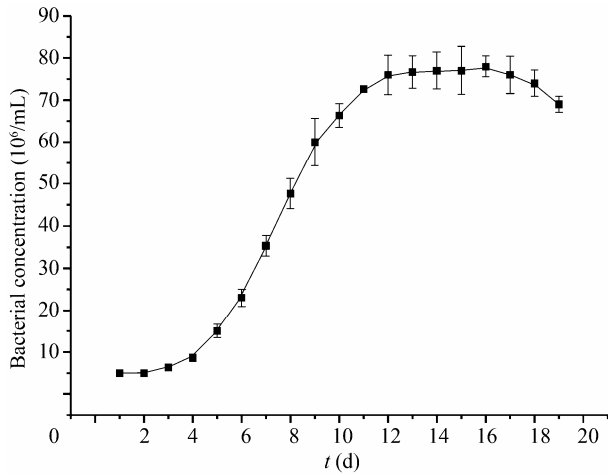


图 1 ATCC 23270 硫单质培养生长曲线

Fig. 1 Growth curves of cell number.

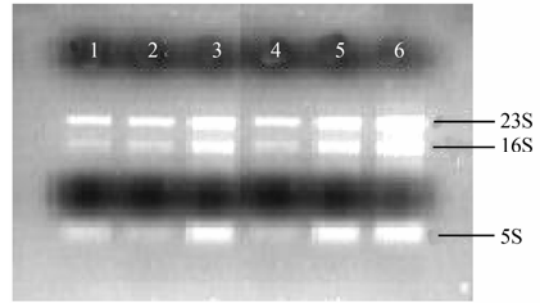


图 2 总 RNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of total RNA. 1: 0.05 mmol/L Fe²⁺ shock; 2: 2 mmol/L Fe²⁺ shock; 3: 50 mmol/L Fe²⁺ shock; 4: 100 mmol/L Fe²⁺ shock; 5: 150 mmol/L Fe²⁺ shock; 6: 200 mmol/L Fe²⁺ shock.

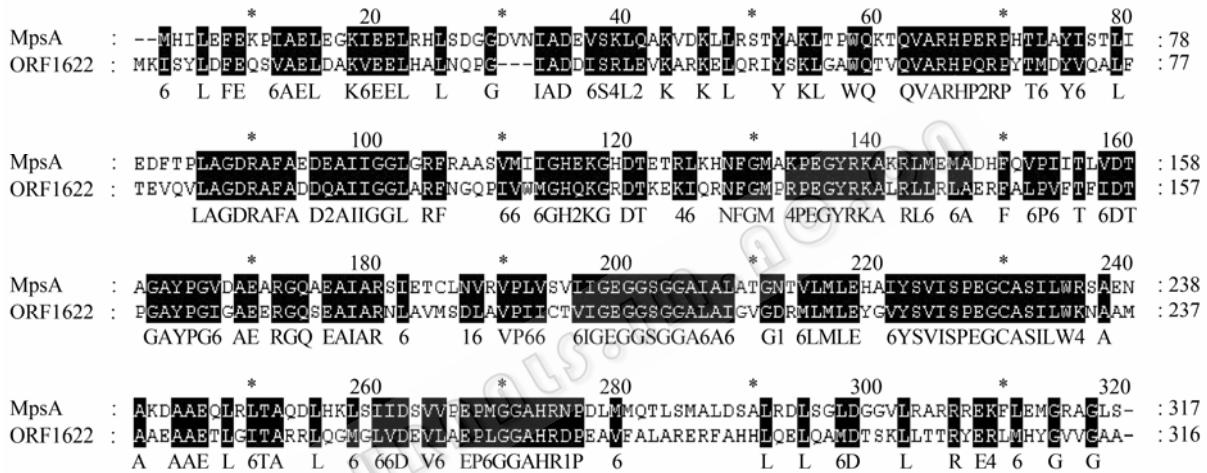


图 3 MpsA 与 ORF1622 氨基酸序列比对结果

Fig. 3 Sequences alignment of ORF1622 from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and MpsA from magnetotactic bacteria.

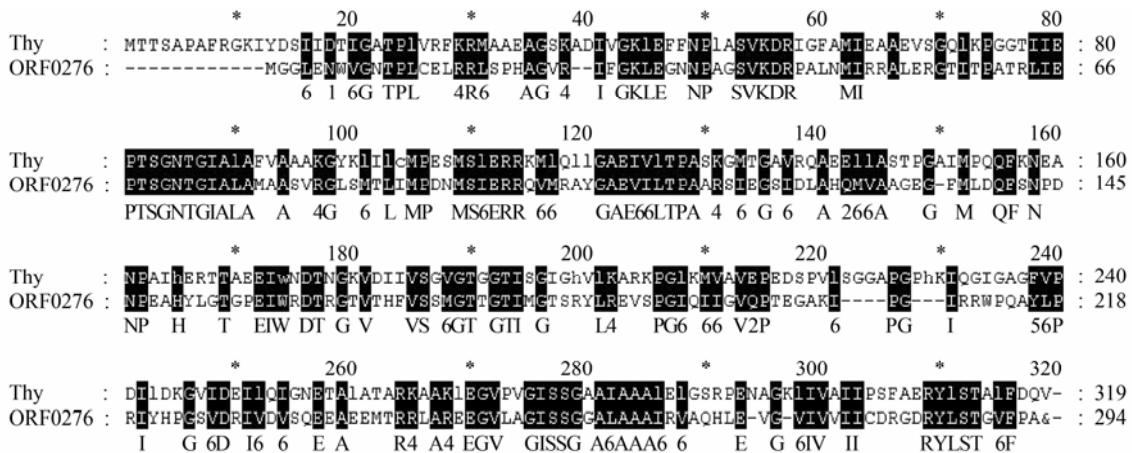


图 4 Thy 与 ORF0276 氨基酸序列比对结果

Fig. 4 Sequences alignment of ORF0276 from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and Thy from magnetotactic bacteria.

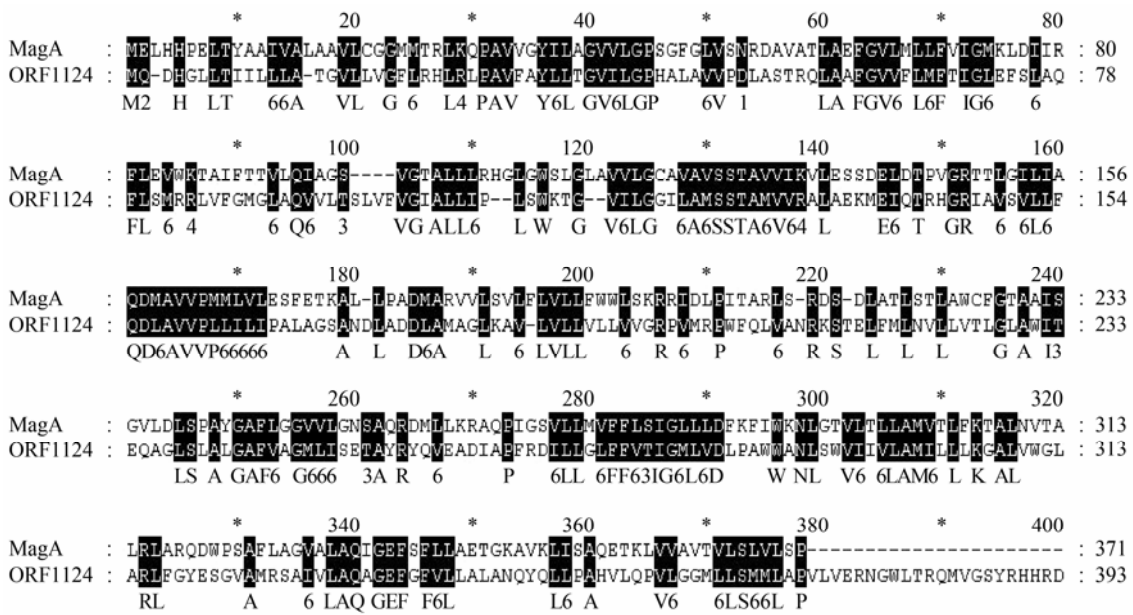


图 5 MagA 与 ORF1124 氨基酸序列比对结果

Fig. 5 Sequences alignment of ORF1124 from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and MagA from magnetotactic bacteria.

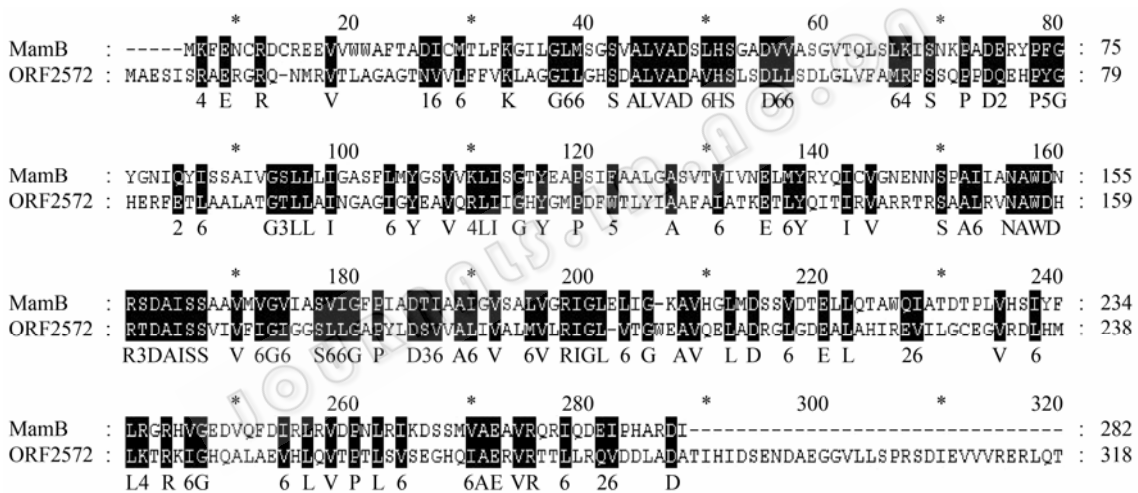


图 6 MamB 与 ORF2572 氨基酸序列比对结果

Fig. 6 Sequences alignment of ORF2572 from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and MamB from magnetotactic bacteria.

表 3 基因基本信息

Table 3 Information of genes

Gene symbol	Serial number	Conserved domain	Gene commentary	Function	Identity
<i>mpsA</i>	1622	PRK05724	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, alpha subunit	Relate to cell membrane invagination form MS membrane	48%
<i>thy</i>	0276	cycM	cysteine synthase B	Iron Reductase	40%
<i>magA</i>	1124	KefB, TrkA_N and TrkA_	potassium-efflux system protein	proton-driving H ⁺ /Fe (II) antiporter	32%
<i>mamB</i>	2572	MMT1	cation efflux family protein	Relation with iron transfer	29%

研究还发现其中 *mpsA* 基因、*thy* 基因、*magA* 基因均不在趋磁细菌的磁小体合成基因岛^[13,14]上,在 ATCC 23270 的全基因组上也未发现与趋磁细菌中磁

小体合成基因岛类似的染色体区域。趋磁细菌中较为保守的 *mamAB* cluster、*mamDC* cluster 和 Mms 系列蛋白(磁小体膜蛋白)在 ATCC 23270 的全基因组上均没

有发现匹配的序列。因此, 可以认为虽然浸矿细菌和趋磁细菌有一些相似之处^[7,15,16], 但是氧化亚铁硫杆菌中磁小体的形成机制与趋磁细菌可能是不同的, 仅是其中部分与铁转运成核相关的途径具有相似之处。

3.4 不同亚铁浓度刺激下各基因的差异表达情况

本实验通过多次重复的 real-time PCR 对 *mpsA*、*magA*、*thy* 和 *mamB* 这 4 个基因在不同浓度 Fe^{2+} 的刺激下的差异表达作了进一步的研究, 研究结果显示, 各标准曲线 real-time PCR 扩增的动力学方程相关系数 ≥ 0.98 , PCR 扩增效率为 86.5%~103.0%, 在 80%~120% 要求范围内, 标准曲线的标准方程是理想的, 结果可信度较高。溶解度曲线分析显示出 PCR 产物只有一个特异性峰, 无引物二聚体及非特异性扩增出现, 说明设计的引物具有良好的特异性, 在此仅选择 *mpsA* 基因的图谱列于文中(图 7)。

各基因在不同浓度 Fe^{2+} 的刺激下的相对表达量结果(图 8)表明: 当 Fe^{2+} 浓度低于 200 mmol/L 时, 氧化亚铁硫杆菌中的 *mpsA*、*thy*、*magA* 和 *mamB* 基因

在转录水平的表达量随 Fe^{2+} 浓度的增加而增加, 在 150~200 mmol/L 范围内达到最高表达量, 而当 Fe^{2+} 浓度达到 200 mmol/L 后, 这 4 个基因的表达量随 Fe^{2+} 浓度的增加而降低, 可以证实这些基因的表达量与铁离子的浓度相关, 而氧化亚铁硫杆菌只有在亚铁培养下生成磁小体, 亚铁是氧化亚铁硫杆菌形成磁小体的必要条件, 因而推测它们与铁离子的转运系统有密切的关系, 因此它们在氧化亚铁硫杆菌磁小体形成过程中起到了极其重要的作用。

4 讨论

氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成研究尚属起步阶段, 磁小体形成相关机理尚不清楚, 为了构建氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成相关的基因网络, 进一步探索氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成的相关机理, 本文利用 real-time PCR 方法, 从转录水平研究了氧化亚铁硫杆菌中 4 个与趋磁细菌功能基因同源的基因进行了不同亚铁浓度刺激下的表达情况, 得到结论如下:

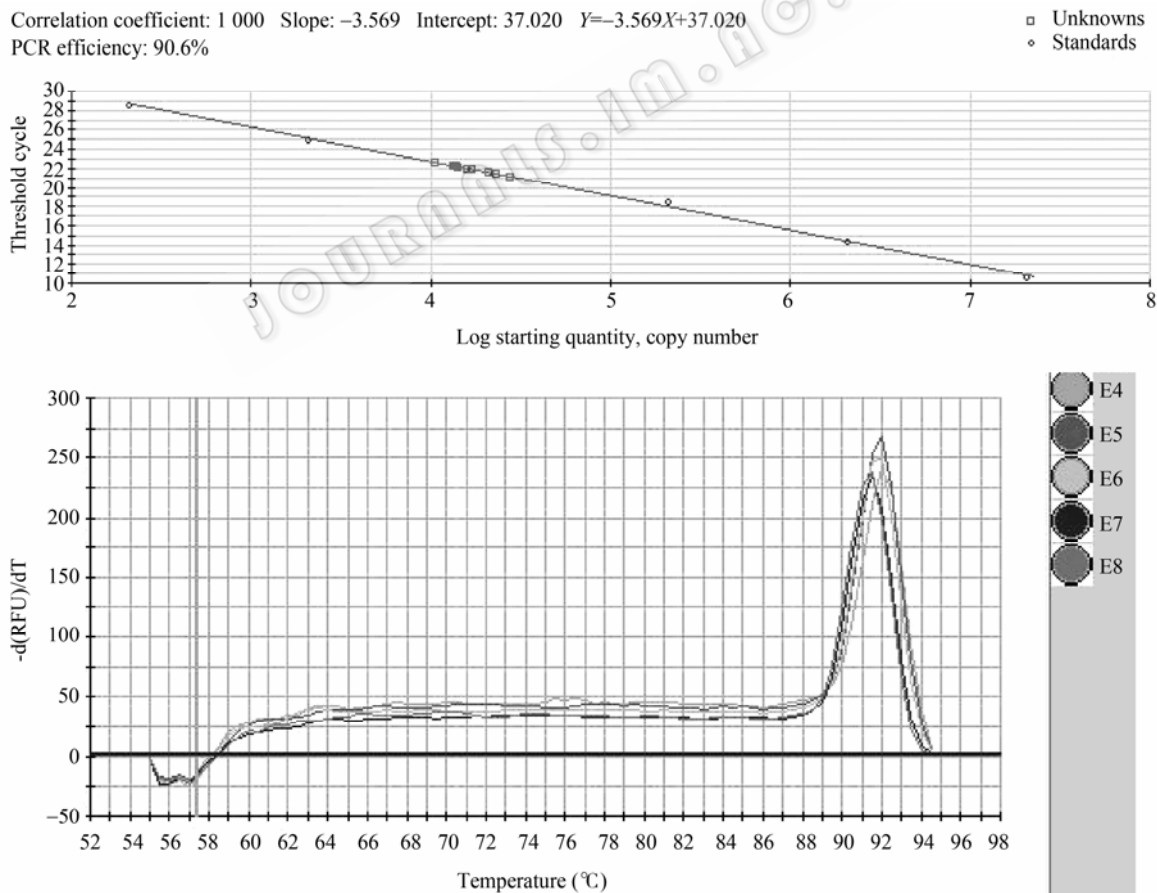


图 7 *mpsA* 基因的标准曲线和溶解度曲线

Fig. 7 Standard curves and melting curves of *mpsA* in real-time PCR.

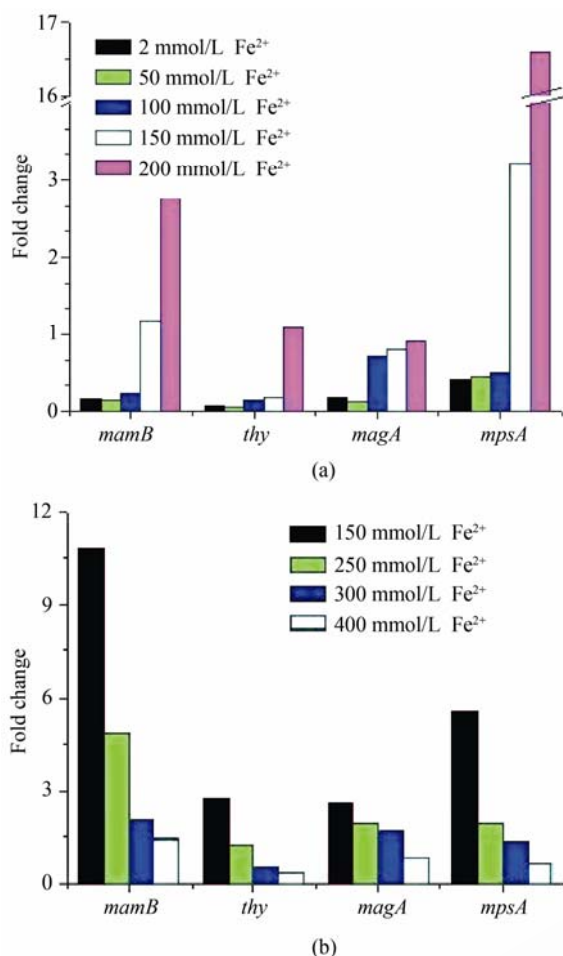


图 8 四个基因在不同铁离子浓度下的相对表达量
Fig. 8 Expression ratio of genes to $FeSO_4$ shock at different concentration. a: ferrous concentration lower than 200 mmol/L; b: ferrous concentration higher than 200 mmol/L.

各个基因的相对表达量显示, 当 Fe^{2+} 浓度低于 200 mmol/L 时, 氧化亚铁硫杆菌中的 *mpsA*、*thy*、*magA* 和 *mamB* 基因在转录水平的表达量随 Fe^{2+} 浓度的增加而增加, 在 150~200 mmol/L 范围内达到最高表达量, 而当 Fe^{2+} 浓度高于 200 mmol/L 时, 这 4 个基因的表达量随 Fe^{2+} 浓度的增加而降低。

氧化亚铁硫杆菌生长的最佳初始 Fe^{2+} 浓度为 44.7 g/L 的 $FeSO_4$ ^[7, 14], 可以推测在氧化亚铁硫杆菌处于最佳生长条件时, 有利于氧化亚铁硫杆菌中磁小体生长的 Fe^{2+} 浓度范围为 150~200 mmol/L。这一发现为进一步提高氧化亚铁硫杆菌中磁小体的产率提供了实验依据, 从而为以后磁小体的规模化生产奠定了良好的前期工作基础。

REFERENCES

[1] Schuler D, Frankel RB. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological

- applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**(4): 464–473.
- [2] Lowenstam HA. Minerals formed by organisms. *Science*, 1981, **211**(4487): 1126–1131.
- [3] Moskowitz BM, Frankel RB, Bazylinski DA. Rock magnetic criteria for the detection of biogenic magnetite. *Earth Planet Sci Lett*, 1993, **120**(3/4): 283–300.
- [4] Frankel RB, Bazylinski DA, Schuler D. Biomineralization of magnetic iron minerals in bacteria. *Supermole Sci*, 1998, **5**(3): 383–390.
- [5] Kelly DP, Wood AP. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(2): 511–516.
- [6] Temple KL, Colmer AR. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol*, 1951, **62**(5): 605–611.
- [7] Liu XX, Xie JP, Liu WB, et al. Isolation bacteria by use the principle of magnetic separation-isolate the bioleaching bacteria by biomagnetic separation. *Prog Mod Biomed*, 2005, **5**(4): 5–8.
刘新星, 谢建平, 刘文斌, 等. 磁选育浸矿菌种新方法的研究—磁泳分离菌种. *生物磁学*, 2005, **5** (4): 5–8.
- [8] Liu Y, Dai S, Gao M, et al. Characterization of magnetotactic bacteria and their magnetosomes isolated from tieshan iron ore in Hubei province of China. *Mater Sci Eng: C*, 2006, **26**(4): 597–601.
- [9] Matsunaga T, Tsujimura N, Okamura Y, et al. Cloning and characterization of a gene, *mpsA*, encoding a protein associated with intracellular magnetic particles from *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **268**(3): 932–937.
- [10] Matsunaga T, Nakamura C, Burgess JG, et al. Gene-transfer in magnetic bacteria-transposon mutagenesis and cloning of genomic DNA fragments required for magnetosome synthesis. *J Bacteriol*, 1992, **174**(9): 2748–2753.
- [11] Matsunaga T, Sakaguchi T. Molecular mechanism of magnet formation in bacteria. *J Biosci Bioeng*, 2000, **90**(1): 1–13.
- [12] Li F. Cloning and functional analysis of genes related to the magnetosome biosynthesis in *Magnetospirillum Gryphiswaldense* MSR-1. Beijing: China Agricultural University, 2002.
李峰. 格瑞菲斯瓦尔德磁螺菌 (*Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1) 磁小体合成相关基因的克隆及其功能分析. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2002.
- [13] Fukuda Y, Okamura Y, Takeyama H, et al. Dynamic analysis of a genomic island in *Magnetospirillum* sp. Strain AMB-1 reveals how magnetosome synthesis developed. *FEBS Lett*, 2006, **580**(3): 801–812.
- [14] Matsunaga T, Okamura Y. Genes and proteins involved in bacterial magnetic particle formation. *Trends Microbiol*, 2003, **11**(11): 536–541.
- [15] Bazylinski DA, Garratt-Reed AJ, Frankel RB. Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microsc Res Tech*, 1994, **27**(5): 389–401.
- [16] Spring S, Schleifer KH. Diversity of magnetotactic bacteria. *Syst Appl Microbiol*, 1995, **18**(2): 147–153.