摘要

金属硫化矿的生物浸出过程中,元素硫的累积形成钝化膜,阻碍了金属离子的进一步浸出。嗜酸氧化亚铁硫杆菌(Acidithiobacillus ferrooxidans,A. ferrooxidans)能通过生物氧化有效消解和利用硫化矿分解过程中产生的元素硫,同时不断补充浸出过程消耗的质子促进金属离子的不断浸出。嗜酸氧化亚铁硫杆菌对元素硫的氧化是一个错综复杂的过程,包括对元素硫的活化、转运与生物氧化等。这里,嗜酸硫杆菌的对元素硫的活化是硫氧化系统中的首要步骤,也是开展硫氧化系统研究必须要解决的瓶颈问题。

因此本文开展嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞胞外蛋白质的筛选、鉴定与活化功能验证的研究。通过这些研究,找到嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外与元素硫作用的巯基蛋白,为阐明硫的生物氧化过程和金属硫化矿的生物浸出机理提供基础数据。具体内容包括以下三个内容:

(1) 不同基质(S^0/Fe^{2+})中嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外蛋白质差异表达谱研究:

通过水浴加热法分别提取元素硫和亚铁基质中 A. ferrooxidans 胞外蛋白质,利用 2-D 电泳建立了元素硫和亚铁能源基质中 A. ferrooxidans 胞外蛋白质差异电泳图谱,采用 MALDI-TOF/MS 鉴定了 18 个在元素硫中表达上调的胞外蛋白质。通过与 A. ferrooxidans ATCC 23270 基因库中蛋白和基因信息比对发现其中 12 个是属于未知蛋白质,以及 6 个分子量较小的多肽序列中含有相对丰富的半胱氨酸残基(Cys)。

(2) 嗜酸氧化亚铁硫杆菌硫活化相关胞外蛋白质基因的分析和 验证:

结合已有的研究结果和 A. ferrooxidans 全基因组基因信息,采用实时定量 PCR(Real-time PCR)方法对 10 个可能与硫活化相关的基因进行转录水平表达差异研究。结果表明,与亚铁中生长的 A. ferrooxidans 菌相比,元素硫中生长细菌硫活化相关基因的相对表达量明显上调,其中 AFE_2537 和 AFE_0927 的表达量分别达到 141.1 和 214.3 倍,其他基因的表达量也明显有所上调。这证明了 A. ferrooxidans 中这些基因与元素硫的活化氧化的关联性。

- (3) 嗜酸氧化亚铁硫杆菌硫活化相关胞外蛋白质表达纯化及功能验证:
- 对 A. ferrooxidans 与吸附相关的菌毛蛋白(AFE_2621: pilin, putative)基因 AFE_2621 进行克隆与原核表达。利用硫的 K 边 XANES 光谱对胞外蛋白样品及纯化表达的菌毛蛋白样品进行分析,结果表明样品中富含巯基的氨基酸主要是半胱氨酸。这是在国内外首次从蛋白质和硫的化学形态层面证明了富含巯基蛋白在单质硫的活化氧化过程中扮演重要角色。

关键词:嗜酸氧化亚铁硫杆菌,硫活化,胞外蛋白质组学,实时定量PCR,菌毛蛋白

ABSTRACT

Elemental sulfur may accumulate in the course of metal sulfide dissolution and can form a layer on the metal sulfide surface, which diffusion for reduces rates ions. Acidophilic consequently sulfur-oxidizing bacteria can efficiently eliminate the insert sulfur and replenish the supply of the protons required for bioleaching processes, and so improve the leaching rate of iron. In natural acidic environment, the pathway for element sulfur dissolution is sulfur biooxidation. The sulfur biooxidation is a complex process that involves the attachment/activation of cells to sulfur particles, the transportation of sulfur through the outer membrane and the oxidation of sulfur in the periplasmic space. Sulfur-activated is the principal step of the sulfur biooxidation, However, the exact mechanism underlying sulfur-activated is not well understood.

The present work focuses on isolation, identification and functional investigation of extracellular proteins and genes of *Acidithiobacillus* ferrooxidans, in order to provide basic data on sulfur biooxidation. The primary subjects of which include three parts as follows:

(1) Research on comparative extracellular proteomics of A. ferrooxidans grown under different energy (Fe²⁺/S⁰)

The extracellular proteins were extracted by stearming method and two-dimensional electrophoresis profiles was established. By using Matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectroscopy (MALDI-TOF/MS) analysis, we identified a total of 18 extracellular proteins with apparent higher abundance grown in element sulfur than in ferrous sulfate. 12 of these proteins are unknown functions. In addition, six hypothetical proteins (or peptides) of which contain abundant of the cysteine residues.

(2) Validate the sulfur-activated extracellular proteins and genes of A. ferrooxidans

According to the information of A. ferrooxidans genome and the published research results, we chose 10 extracellular proteins genes

responding to sulfur-activated and examine their expression analysis by real-time PCR. The results showed that the constitutive expression of all those genes was highly upregulated by growth on element sulfur compounds (and downregulated by growth on ferrous iron). What's more, Genes *AFE_2537* and *AFE_0927* were upgradulated 141.1 and 214.3-fold, respectively.

(3) Expression, purification and functional investigation of the sulfur-activated extracellular proteins from A. ferrooxidans

The gene AFE_2621 encoding putative pilin from A. ferrooxidans was cloned and expressed in E. coli. The extracellular proteins of A. ferrooxidans grown on elemental sulfur and the purified AFE_2621 (pinlin) were characterized with sulfur K-edge XANES spectroscopy. The results showed that the thiol-containing amino acid mainly cysteine play an important role in elemental sulfur activation and oxidation.

KEY WORDS: Acidithiobacillus ferrooxidans, sulfur activation, extracellular proteomics, Real-time PCR, pilin protein

原创性声明

本人声明,所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究 工作及取得的研究成果。尽我所知,除了论文中特别加以标注和致谢 的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不 包含为获得中南大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我 共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在在论文中作了明确的说 明。

作者签名: 16 1年 日期: 101 年 5月 日日

关于学位论文使用授权说明

本人了解中南大学有关保留、使用学位论文的规定,即:学校有权保留学位论文并根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文,允许学位论文被查阅和借阅;学校可以公布学位论文的全部或部分内容,可以采用复印、缩印或其它手段保存学位论文。同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》,并通过网络向社会公众提供信息服务。

作者签名: 16 3年 早师签名 日期: 29年5月19日

第一章 绪 论

1.1 微生物冶金

1.1.1 微生物冶金的定义

微生物冶金,也叫生物浸出(bio-leaching),通常是指将矿物(主要是指硫化矿,包括原生硫化矿和次生硫化矿)中所含有的各种非溶性有价金属转变成可溶性的形式并加以回收利用^[1,2]。尽管这个过程涉及到如生物学,表面化学,电化学,物理化学,矿物学等各种学科的交叉联系,但归根结底离不开微生物对各种金属的氧化作用,因此,上述过程又叫做生物氧化作用(bio-oxidation)。然而,生物氧化作用这个术语,往往是指这样一个过程,即通过微生物对矿物的分解作用来提高各种目的金属的回收率的过程。一个最典型的例子就是从含砷黄铁矿中提取贵重金属-金。金的提取往往要通过氰化物的预处理等一系列步骤。尽管砷、铁和硫在这个过程也被浸出,但对于金的整个回收过程来说,生物浸出这个术语就显得不太合适。因此,为适应于上述两个不同的概念,采用生物采矿(bio-mining)这个术语也许是比较合适的^[3]。

1.1.2 微生物冶金的特点

现有的常规物理、化学选冶方法由于回收率低、资源损耗大、生产成本高和 对环境污染严重等问题已不适应社会经济可持续发展要求。在此情况下,微生物 在矿物分离方面的作用逐渐引起人们的重视。

微生物冶金的特点[4-6]:

- ①微生物冶金既可用于矿物的就地浸出,也可用于工厂矿物处理、废水废渣处理。
- ②微生物冶金具有生产成本低、投资少、工艺流程短、设备简单、环境友好、 能处理复杂多金属矿物等优点,因此细菌浸矿的广泛应用,将引起传统矿物加工 产业的重大变革,为人类、资源与环境的可持续发展开辟广阔的前景。

细菌氧化处理难选冶硫化物金精矿的工艺与另两种氧化(焙烧、加压)法相比,基建投资省(设焙烧法的投资是100,则加压法要66,而细菌法只需35),生产成本低(设焙烧法的生产成本为100,则加压法为111,细菌法只需95),而金的回收率与焙烧法相当或还高一点。

③由于微生物冶金适合储量小、低品位、成分复杂的硫化矿的冶金,而我国的矿大多符合这个条件。所以,微生物冶金在我国有很大的发展前景。

④微生物冶金的主要缺点是过程的反应速度慢。在生物湿法冶金方面的主要任务,是研究开发能提高反应速度的菌种。工程的挑战在于如何用最短的时间,对大量的矿石同时进行固相、液相、气相反应,而且能控制其它的可变因素,特别是把温度控制在最佳水平上加速细菌的作用。即一个非常重要的任务就是通过遗传工程的技术,培育出对高含量的重金属更有耐力,用于提取特定金属的浸出生物。

1.1.3 微生物冶金的反应机理

学术界认为金属硫化物的溶解存在两种机制,即直接作用和间接作用。在直接作用机制中,细菌与矿物直接发生氧化还原作用而溶出金属,不需要铁或铁离子的存在^[7],目前,这种机制的合理性遭到了很大质疑^[8];而在间接作用机制中,金属硫化物在质子攻击和Fe³⁺氧化作用下,晶格受到破坏,继而经过硫代硫酸盐途径或多聚硫化物途径而溶解^[9-11]。

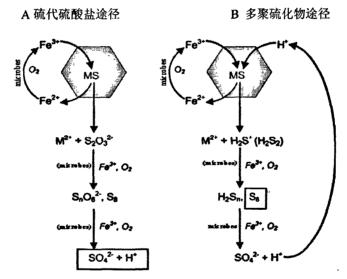


图 1-1 金属硫化矿生物浸出的 (A) 硫代硫酸盐途径和 (B) 多聚硫化物途径

Fig. 1-1 Diagrams of thiosulfate and polysulfide pathways involved in bioleaching of metal sulfide minerals

可从金属硫化矿中浸出金属元素的微生物种类虽然很多,包括古生菌和真细菌中的许多嗜酸种类,但金属元素从矿石中溶出的基本途径只有两条,即硫代硫酸盐途径和多聚硫化物途径^[8]。黄铜矿(CuFeS₂)的微生物浸矿遵循多聚硫化物途径,它基于 Fe³⁺和 H⁺的共同作用,将黄铜矿溶解。在这一过程中,从黄铜矿释放出来的硫,有90%以上经由多聚硫化物,最后转化成元素硫,只有少量的硫代硫酸盐、连多硫酸盐和硫酸盐生成(图 1-1),如没有硫氧化菌参与,这些元素硫

将累积在浸矿体系中,并很快在在矿物表面形成钝化层,严重阻碍矿物的浸出。 浸矿微生物在这一途径中的作用是氧化元素硫,生成硫酸,为矿物水解提供足够的 H⁺,并及时消除元素硫对矿物浸出的钝化作用,保持氧化剂、菌体和矿物之间的传质作用畅通;同时保证 Fe³⁺和 Fe²⁺的正常循环,为矿物的氧化提供充足的 Fe³⁺氧化剂。因此,黄铜矿的浸出必须有硫氧化菌和铁氧化菌的共同参与。

Fe³⁺从矿物中夺取电子,还原成 Fe²⁺,矿物晶体释放出金属阳离子(M²⁺)和硫化物中间产物,Fe²⁺氧化菌在酸性溶液中将 Fe²⁺氧化成 Fe³⁺,保证 Fe²⁺和 Fe³⁺ 正常循环。在多聚硫化物途径(图 1-1B),除 Fe³⁺外,H⁺通过绑定矿物中的价电子,也对矿物进行氧化。硫化物中间产物被非生物的化学氧化作用和硫氧化菌共同氧化。图中以化学氧化为主,生物氧化为辅的位置,硫氧化菌就标在括号内,主要的非 Fe³⁺电子受体标在箭头右边。没有硫氧化菌参与时,累积的主要反应产物,在硫代硫酸盐途径(图 1-1A)是硫酸,在多聚硫化物途径是 S₈,分别标于方格内。当有硫氧化菌存在时,两途径的主要反应产物均为硫酸。

硫代硫酸盐溶解途径适用于 FeS_2 、 $MoS_2和WS_2$ 等金属硫化物的溶解,它完全基于 Fe^{3+} 对元素S的氧化作用直至元素硫中的六个电子全部被转移,形成 $S_2O_3^{2-}$,将金属元素分离到溶液中去。这个化学反应中还伴随单质S的产生,金属硫化物中大约有20%的硫变成单质S。

多聚硫化物溶解途径则适用于ZnS、PbS、FeAsS、 $CuFeS_2$ 、 MnS_2 、CuS、 Cu_2S 、NiS、CoS和CdS等众多金属硫化物的溶解,它基于 Fe^{3+} 在 H^+ 的协助下的对金属硫化物的氧化作用,将金属硫化物溶解,其中金属硫化物中大约90%硫元素转变为多聚硫(图1-2),其余则生成少量的 $S_2O_3^{2-}$ 和单质 $S^{[11,12]}$ 。

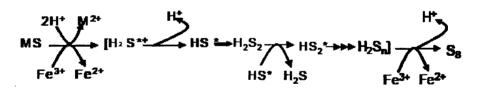


图 1-2 多聚硫化物溶解途径示意图

Fig. 1-2 Diagram of polysulfide dissolution pathway

图1-2中强酸 H_2S^{**} 电离产生自由基 HS^{*} ,后者容易形成 H_2S_2 及后续的多聚硫化氢;多聚硫化氢不稳定,大多数分解产生单质 S_8 ,少量被 O_2 或 Fe^{3+} 氧化成 $H_2S_2O_3$ 和单质 $S^{[12]}$ 。这个氧化反应在没有 Fe^{3+} 存在的情况下也能进行,电子经过导电的硫化物MS传递到 O_2 , O_2 通过形成超氧自由基和过氧化氢而被还原成 $H_2O^{[13]}$ 。然而,在浸矿生物群落中 Fe^{3+} 的存在, Fe^{3+} 更容易从MS晶格中夺取电子。

上述两种反应机制都是属于化学反应的范畴,但是,在有微生物参与的情况下, Fe^{3+} 主要由细菌胞外的多聚体供应,这种多聚体附合在葡萄醛酸残基上[9],亚铁氧化细菌(如A. ferrooxidans,Leptospirillum ferrooxidans等)能够保持 Fe^{3+} 氧化状态,硫氧化细菌(如A. ferrooxidans,A. thiooxidans等)能够参与单质元素S和其他还原性硫化合物的氧化,产生 H^+ 保持溶液的酸性环境。

1.2 元素硫的化学特性与生物浸出的关联性

金属硫化矿微生物浸出过程中,嗜酸亚铁氧化细菌是浸矿溶液氧化还原电位 的主导者, 嗜酸硫氧化微生物负责着转化各种含硫化合物为硫酸, 保持酸性浸矿 环境。但在酸性环境下,元素硫的化学性质十分稳定,其消解的唯一途径是通过 嗜酸硫氧化细菌对它的氧化[14]。在这里,嗜酸硫氧化细菌能够通过对各种形态 的含硫化合物的氧化产生多聚硫途径所消耗的质子,以这种独特的方式来影响生 物浸出的动力学。当环境中缺少嗜酸硫氧化细菌或嗜酸硫氧化细菌的生长活性受 到抑制时, 金属硫化矿分解产生的元素硫以晶态或聚集体悬浮在溶液中, 或进而 累积在浸矿体系中,并在矿物表面形成钝化层,导致金属硫化矿表面的电化学性 质发生改变,阻碍高价铁离子对矿物的氧化攻击,减慢金属离子的溶出速度。 Schippers A 等[15]采用 L. ferrooxidans 浸出黄铁矿时,发现积累的中间硫化合物主 要是元素硫,但采用 L. ferrooxidans 和 A. thiooxidans 混合培养浸出黄铁矿时,黄 铁矿中的硫全被氧化,转化为硫酸盐。Fowler TA 和 Crundwell FK^[16]研究了 A. ferrooxidans 对高铁溶液浸出闪锌矿效果的影响,发现接种细菌的体系中,锌离 子的浸出率明显高于未接种细菌的体系: 而未接种细菌的体系, 随着锌离子的浸 出,矿物表面形成一层多孔硫膜,该膜的存在阻止了 Fe³⁺对闪锌矿的氧化攻击和 锌离子浸出。Falco L 和 Pogliani C[17]用化学浸出或 L. ferrooxidans 浸出靛铜矿时, 发现矿物表面均有硫层形成,影响浸出效果;而利用 Fe^{3+} 和 A. thiooxidans 组合 浸出靛铜矿却得到了较好的浸出效果。这些研究结果表明,金属硫化矿浸出过程 中,如果有元素硫累积形成的硫层,将会阻碍了金属离子的浸出,而嗜酸硫氧化 细菌对元素硫的消解能够明显提高浸出效率。嗜酸硫氧化细菌对元素硫的有效消 解和利用,既能预防元素硫层形成,也能促进嗜酸硫氧化细菌自身生长,为浸矿 环境提供更多质子,对优化金属硫化矿生物浸出动力学、保证金属离子的高效浸 出具有十分重要的作用。

1.3 嗜酸硫氧化细菌系统多样性

尽管自然界能够氧化元素硫的微生物种类十分丰富,硫氧化细菌在能量生产、硫元素循环以及维持环境中微生物群落多样性等方面起着重要作用。但是到目前为止只知道为数不多的微生物种属在极端酸性环境下氧化元素硫。这些嗜酸

硫氧化微生物可以通过它们各自的最适生长温度而得以区别。一般根据生存环境温度,它们可分为中温(<40 ℃)、高温(中度嗜热(40~60 ℃)和嗜高温(>60 ℃)嗜酸硫氧化菌^[8, 18, 19]。如表 1-1 所示,在极端酸性环境下,尽管能源物质相对贫瘠,生存 pH 一般低于 3,但微生物群落同样具有多样性。

在生物浸出酸性环境或酸性矿坑水中,中温硫氧化细菌主要是嗜酸硫杆菌属(Acidithiobacillus)细菌,包括 A. ferrooxidans、A. thiooxidans、A. albertensis [20] 等。这类菌中,除 A. ferrooxidans 能利用亚铁和还原性硫化合物外,其余的细菌只能利用还原性性化合物生长。A. ferrooxidans 是最早分离到的嗜酸硫氧化细菌。早期研究人员认为该细菌是主要浸矿功能菌,因此相关研究比较全面;目前关于 A. ferrooxidans 亚铁和硫代谢途径正成为研究热点[21,22]。

生物浸出过程中,由于微生物生长代谢和矿物氧化分解,浸矿体系不断放热,温度可快速上升至 40 ℃以上,一些中温嗜酸细菌难以生存,而高温嗜酸细菌却可以很好生长。这些细菌主要是一些亚铁或硫氧化专性或兼性自养细菌,其中亚铁氧化细菌主要为 L. ferrooxidans 和铁质菌属(Ferroplasma)[23]。硫氧化菌则主要包括硫化杆菌(Sulfobacillus spp.)和喜温嗜酸硫杆菌(A. caldus)。Sulfobacillus属的细菌为革兰氏阳性杆状菌,好氧,嗜酸,无机化能营养型,在混合营养条件下生长良好,在一定的生长阶段和环境条件下产生内孢子,不仅够能以亚铁、金属硫化物等还原性硫化合物化能自养生长,还能够利用有机底物进行兼性异养生长[24-26]。A. caldus 是 Acidithiobacillus 属中唯一的嗜热浸矿菌种,根据其生长温度(45℃左右)而和其它硫杆菌分别开来。A. caldus 好氧生长,能氧化元素硫和其它还原性含硫化合物,具有多种生理类型,部分菌株在有酵母提取物存在的情况下,生长速度和硫氧化活性会大大增加。一般认为,A. caldus 不能单独浸出有价金属,是重要的金属浸出辅助菌,和其它菌株的有效组合,能有效促进金属硫化矿的生物浸出[27.28]。

表 1-1 目前分离纯化到能够利用还原性硫化合物的嗜酸硫氧化细菌 Table 1-1 The isolated acidophilic sulfur-oxidizing bacteria

			<u> </u>	
生存温度	微生物属	微生物种	生理特征、最适宜温度、pH	参考
			和革兰氏染色特征	文献
中温	Acidithiobacillus	ferrooxidans	30 °C, pH 1.8∼2.0, G ⁻ ,	[18]
<40℃		thiooxidans	28~30 °C, pH 2.0~2.8, G⁻	[29]
		albertensis	30 °C, pH 3.5∼4.0, G	[30]
高温	Acidithiobacillus	caldus	40°C, pH 2.5, G	[28]
(中度 嗜热)	Sulfobacillus	sibricus	55 ℃, pH 1.7, G ⁺	[26]
40∼60℃		thermosulfidooxid	50℃, pH 1.6, G ⁺	[31]
		ans disulfidooxidans	35~40 ℃, pH 1.5~2.5, G ⁺	[24]
		acidophilus	50 ℃, pH 1.7,	[24]
		thermotolerans	40 ℃, pH 2.0	[32]
高温	Sulfolobus	shibatae	80℃, pH3.7	[33]
(嗜高温) >60℃		solfataricus	80 ℃, pH 2.0~4.0	[34]
		metallicus	65∼70 °C, pH 1.5	[35]
		acidocaldarius	75∼80 ℃, pH 2.0∼3.0	[36]
		tokodaii	80 °C, pH 2.5∼3.0	[37]
	Metallosphaera	sedula	75 ℃, pH 2.8	[38]
		prunae	55∼80 ℃, pH 3.0	[39]
		hakonensis	70 ℃, pH 3.0	[40]
	Acidianus	brierleyi	65 ℃, pH 1.5	[41]
		infernus	88 ℃, pH 2.5	[42]
				

		ambivalens	80℃,	pH 2.5	[43, 44]
		sulfidivorans	74°C,	рН 0.8~1.4 , G	[45]
		manzaensis	80 °C,	pH 1.2~1.5, G	[46]
		tengchongensis	70°C,	pH 2.5, G	[47]
S	Sulfurisphaera	ohwakuensis	85 ℃,	pH 2.0, G	[48]
S	Stygiolobus	azoricus	80°C,	pH 2.5~3.0	[49]

极端酸热条件下生长的多为古细菌,它们能够在厌氧或需氧条件下利用还原性硫化合物或元素硫。目前已分离纯化到五个菌属,如表 1-1 所示,它们分别是硫化叶菌(Sulfolobus)、金属球菌(Metallosphaera)、嗜酸两面菌(Acidianus)、憎叶菌属(Stygiolobus)和硫磺球形菌属(Sulfurisphaera)。硫化叶菌 Sulfolobus属革兰氏阴性菌,细胞壁缺失肽聚糖,兼性自养,严格好氧,生存温度 $55\sim80$ °C,生存 pH $0.9\sim5.8$,能利用亚铁和/或还原性硫化合物作能源化能自养,也可以利用酵母提取物、胰蛋白胨和数种糖类作为碳源和能源进行异养生长[50]。

嗜酸两面菌 *Acidianus* 为典型的嗜热喜酸古细菌,该属的各种古细菌的生长温度范围为 50-95 ℃,生长 pH 为 1.0-6.0,最适生长 pH 为 1.2-2.5。其中 *Acidianus brierleyi* 具有较好的工业应用前景^[41,51]。它不但能通过氧化亚铁或元素硫进行自养生长,而且也能够在复杂的有机基质上进行异养生长。

Stygiolobus 和 Sulfurisphaera 目前均仅有一个种,分别为 azoricus 和 ohwakuensis,其中 Stygiolobus azoricus 为专性厌氧生长,而 Sulfurisphaera ohwakuensis 能够进行兼性厌氧生长,并且厌氧条件下必须添加元素硫^[42,48]。

1.4 嗜酸硫氧化细菌的硫氧化系统

1.4.1 硫的化学形态

硫在自然界的存在形式有无机硫和有机硫。如表 1-2 和图 1-3 所示,无机硫形式多样,以元素硫和含硫化合物等多种不同的形态存在。有机硫则主要是含硫氨基酸:如半胱氨酸、甲硫氨酸、蛋氨酸、谷胱苷肽及其衍生物,主要分布在原油、煤和生物体内。

嗜酸硫氧化细菌在所处环境(如高温温泉、酸性矿水和深海热喷口中)的硫循环中发挥着重要作用。还原性硫化合物在硫氧化细菌(包括光合硫氧化细菌)

嗜酸硫氧化细菌等)作用下,会产生大量的元素硫和含硫化合物。这些含硫物质赋存形态多样,有的直接以硫球形式形成聚集体存在于细菌体内或体外;有的在金属硫化矿表面形成疏水的硫层;大部分硫元素以各种离子形式进入溶液中。

去	1 2	元素硫和	主亚开机	化人物及	甘业人价
<i>T</i> R.	I-Z	フレ 糸 かんかい	生 モルルル	いしてそのス	ようしつづか

Table 1-2 Elemantal sulfur and the main sulfur compounds and their oxidation star

化学式	表观价态
SO ₄ ²⁻	+6
$S_2O_6^{2-}$	+5
SO ₃ ²⁻	+4
$S_2O_4^{2-}$	+3
$S_2O_3^{2-}$	+2
⁻ O ₃ S(S) _n SO ₃ ⁻	0, +2
S_2Cl_2	+1
S_n (环状硫或聚合硫)	0
S_n^{2-}	-1
HS ⁻ /S ²⁻	-2
	SO ₄ ²⁻ S ₂ O ₆ ²⁻ SO ₃ ²⁻ S ₂ O ₄ ²⁻ S ₂ O ₃ ²⁻ -O ₃ S(S) _n SO ₃ ⁻ S ₂ Cl ₂ S _n (环状硫或聚合硫) S _n ²⁻

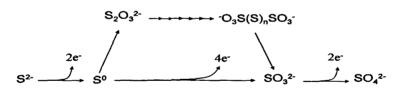


图 1-3 无机硫化学存在形式的转变

Fig. 1-3 The schematic of transformation among elemental sulfur and sulfide compounds

1.4.2 嗜酸硫氧化细菌硫氧化系统的特点

硫在氧化过程中化学形态的多样性,决定了元素硫及含硫化合物的生物化学氧化过程中,硫代谢底物作用酶的多样性和整个过程的复杂性。尽管中性菌如光合细菌中关于硫的氧化系统Sox系统已经得到较为详细的阐释,Sox系统中相应的酶的性质和在硫氧化过程中的分子机理基本确定^[52]。但研究表明,嗜酸硫氧化细菌硫氧化系统与中性菌如光合细菌中的硫氧化系统(Sox系统)完全不同,这就使得在开展同功同源基因研究硫氧化系统方面没有借鉴性。

自从1986年以前分离到嗜酸氧化硫硫杆菌Thiobacillus thiooxidans (现在改名

为Acidithiobacillus thiooxidans)以来,关于嗜酸硫氧化细菌的研究一直没有间断,但是关于中常温嗜酸硫氧化细菌硫氧化的生物化学过程有待进一步的补充和完善。在嗜酸硫氧化细菌的作用下,元素硫通过硫氧化酶系的作用氧化分解并生成最终产物硫酸。元素硫必须经过嗜酸硫氧化细菌的有效吸附和转运,进入细胞周质空间后,才能有效地被细菌氧化。这里,嗜酸硫氧化细菌的胞外物质介导着细菌对元素硫的吸附与活化过程,外膜蛋白担当着对硫转运的作用,细胞周质空间的硫氧化首步反应的酶---硫双加氧酶则起着关键氧化酶的作用,承担着对转运到细胞周质区域的元素硫进行分流以及为硫氧化酶系中的其它酶提供底物的双重功能^[53]。显然,嗜酸硫氧化细菌对元素硫的有效利用,取决于嗜酸硫氧化细菌对元素硫的有效吸附/活化、转运和首步氧化反应。

1.4.3 嗜酸硫氧化细菌对元素硫的吸附

嗜酸硫氧化细菌对元素硫的氧化,首先要求细菌和元素硫之间相互接触吸附。Gourdon R 和 Funtowicz $N^{[54]}$ 以及 Konishi Y 等 $^{[55]}$ 通过对 A. ferrooxidans 和 A. thiooxidans 在元素硫基质中的生长动力学研究,发现元素硫的氧化由吸附在其表面的细菌来完成,细菌吸附的有效性决定了其氧化利用硫微粒的高效性。

Sampson MI 等以及 Gehrke T 等^[56,57]的研究表明,胞外多聚物的形成和成份取决于细菌所处的生长环境,属于诱导表达。比较元素硫与黄铁矿培养基质中细菌胞外多聚物成份,发现前者含有较高的脂肪酸和油脂类化合物,但糖和糖醛酸含量较少,这种胞外多聚物的组成可能有利于细菌通过疏水作用吸附在元素硫表面;而在可溶性无机含硫化合物基质培养的细菌表面几乎没有胞外多聚物的形成。

Sharma PK 等^[58]把从亚铁基质中生长的 A. ferrooxidans 转移到元素硫和黄铁矿中生长时,发现细菌细胞表面蛋白质的含量明显提高,这些蛋白质可能作为有机表面活性成分参与细菌与固体之间的界面反应。另有研究发现,以元素硫为能源基质的硫氧化细菌细胞表面释放出大量的外膜泡^[14,59],该外膜泡可能在细菌与元素硫之间起到"桥梁"作用。根据硫的生物活化模式推测,元素硫是在与细菌外膜蛋白发生键合作用后被转运至细胞周质空间,其中,细菌外膜蛋白分子中的巯基在硫键合中发挥着重要作用。Ohmura N 等^[60]发现在硫基质中生长的 A. ferrooxidans 的鞭毛上有一种硫结合蛋白,该蛋白可与元素硫形成二硫键,它可能在 A. ferrooxidans 特异地吸附到元素硫表面上起作用。

1.4.4 元素硫活化转运模式的提出

Prange A 等[61]报道 A. vinosum 在氧化硫化物和硫代硫酸盐的过程中,元素硫

和有些蛋白质形成中间产物 RS_n -R 或 R- S_n -H, 这些中间体短时间的存在于细胞 周质空间。

已有的研究工作认为元素硫的活化依赖于低分子量硫醇(如谷胱苷肽: GSH)的作用,硫醇将元素硫活化为 GS_nH ($GSH+S_8\rightarrow GS_9H\rightarrow...\rightarrow GS_nH$),以作为硫双加氧酶的底物 [62,63]。

Rohwerer T 和 Sand W^[53]用嗜酸细菌 *A. ferrooxidans*,*A. thiooxidans* 和 *Acidiphilium* acidophilium 细胞提取物研究依赖于 GSH 的硫双加氧酶的真正底物,发现 GS_nH 能作为酶反应底物,但是 GS_nH 十分的不稳定,能快速分解为元素硫和较稳定的 GS_2H 。 GS_2H 在酶促(细胞提取物)条件下或非酶促条件下发生如下反应:

 GS_nG 单独不能作为酶反应底物,但是 GS_nG 在有 GSH 的情况下能作为底物,原因是发生了如下反应;

$$GS_nG + GSH \rightarrow GS_xH + GS_vG$$
 (n>2, x>1, y>1)

早期 Sugio $T^{[64]}$ 的试验结果表明 H_2S 在 GS_2G 存在的情况下也能直接氧化成 $SO_3^{2^*}$ 。其原因是因为 H_2S 和 GS_2G 发生反应产生了 GSSH ($H_2S+GSSG \rightarrow GSSH + GSH$),GSSH 为硫双加氧酶的底物而被催化氧化生成 $SO_3^{2^*}$ 。

这些研究结果肯定了 GS_nH (或 GS_2H) 而非 GS_nG 是酶促反应底物。既然 GSSH 中含有硫烷硫,是不是所有含有硫烷硫的物质都能发生此反应呢? 但研究 发现如 $S_2O_3^2$, $S_nO_3^2$ 等都不能替代 GS_nH (或 GS_2H) 作为酶促反应底物。

依据试验结果,Rohwerer T 和 Sand W^[53]提出了元素硫先被活化然后被催化氧化的模式,其中,活化反应首先由亲核反应试剂打开环状结构的 S₈,即细胞外的元素硫与外膜蛋白上的硫醇基团 RSH(功能类似于大量的 GSH)相互接触后被活化,形成线状的无机硫与有机物结合的 RSnH($n\geq 2$),然后转运到细胞周质后被硫双加氧酶氧化,产物为 SO_3^{2-} 。

但是,到目前为止,真正的硫转运外膜蛋白还仍然在寻找的过程中。

Ramírez P 等 $^{[65]}$ 比较研究 A. ferrooxidans ATCC 19859 在元素硫和 Fe^{2+} 基质中生长时细胞体内总蛋白质表达的差异,发现在元素硫基质中生长的细胞内有一分子量为 44 kDa 的外膜蛋白明显表达上调。Buonfiglio V 等 $^{[66]}$ 将 A. ferrooxidans 从

Fe²⁺生长基质转入到以元素硫或硫代硫酸盐基质中时,发现 A. ferrooxidans 特异性地表达一分子量为 55 kDa 的外膜蛋白,同时另有一分子量为 47 kDa 的组成性表达外膜蛋白表达上调,说明这两种外膜蛋白都可能与 A. ferrooxidans 元素硫基质的氧化相关,但这两种蛋白与元素硫或硫代硫酸盐转运的关系仍未能确定。Buonfiglio V 等^[67]通过单向电泳发现 A. ferrooxidans MSR 外膜蛋白中有一分子量为 50 kDa 的外膜蛋白只在元素硫基质中生长的细菌细胞中高度表达,但在 Fe²⁺基质中生长的细菌细胞中不表达,该研究仍然未能确定该蛋白便是硫转运蛋白,更重要的是,该作者前后分离到的表达上调的外膜蛋白分子量互不相同,与Ramírez P 等^[65]分离到的表达上调蛋白的分子量也不一致。

尽管目前嗜酸硫杆菌属中一些硫氧化相关基因和蛋白已经被鉴定或者分离纯化得到,其中一些蛋白的功能也得到验证,但仍然存在许多悬而未决的问题,如:细菌胞外多聚物和元素硫之间的相互接触时具体的分子机制;细胞外膜结合酶是否参与各种含硫化合物的催化氧化;单质硫及其它代谢中间产物的转运及转运模式;硫氧化系统中一些关键酶的分离和基因的鉴定;各种含硫化合物在不同硫氧化酶系作用下的酶催化机制;硫的氧化与 NAD⁺的还原偶联的反应机制等。随着嗜酸硫氧化菌中一些模式菌株如 A. ferrooxidans ATCC 23270 和 Acidiphilium acidophilium 全基因测序完成,结合它们的全基因组信息,从生物信息学和蛋白质学层面展开广泛的研究工作,相信将会有更多研究结果从不同层面上来阐释嗜酸硫氧化菌硫氧化系统,进一步修正和完善硫氧化代谢模型。

1.4.5 硫氧化酶系的研究

硫氧化酶系蛋白主要包括: 硫双加氧酶 (sulfur dioxygenase)、硫加氧还原酶 (sulfur oxygenase reductase: SOR)、硫化物-辅酶 Q 氧化还原酶 (sulfide:quinone reductase: SQR)、硫代硫酸盐—硫转移酶 (thiosulfate thiotransferase, TST)、亚硫酸受体氧化还原酶 (sulfite acceptor oxidoreductase: SAR)、硫代硫酸盐-辅酶 Q 氧化还原酶 (thiosulfate:quinone oxidoreductase: TQO)、连四硫酸盐水解酶 (tetrathionate hydrolase) 和硫代硫酸盐脱氢酶 (thiosulfate dehydrogenase)。

1、硫双加氧酶:

硫双加氧酶(sulfur dioxygenase)是嗜酸硫杆菌转化元素硫过程中首步氧化酶。Suzuki I 和 Silver M 等分别对 A. thiooxidans 和 A. ferrooxidans 的硫氧化酶进行了研究^[62,63],认为其中硫双加氧酶的硫氧化活性依赖于 GSH 的参与,硫从零价态转变为多聚硫化物之后直接氧化成 SO_3^{2-} 。

最近 Sugio T 等^[68]首次从 A. thiooxidans 中分离纯化出硫双加氧酶,对其分子

量、最适 pH 以及金属离子对活性的影响作了简单的研究。该研究报道硫双加氧酶为单聚体酶,分子量为 19.5 kDa,最适 pH 为 7.5。而其它细菌体内的硫氧化(还原)酶,如嗜酸菌(Acidianus spp.)体内的硫加氧还原酶(sulfur oxygenase reductase)、硫叶菌(Sulfolobus brierleyi)的硫加氧酶(sulfur oxygenase)等都是大分子量多亚基蛋白^[69,70],与 Sugio T 等^[68]报道的结果相差甚远;并且,嗜酸硫杆菌氧化元素硫发生在 pH 为 3-4 的细胞周质空间内,而 Sugio T 等报道的硫双加氧酶最适 pH 为 7.5,与细胞周质空间 pH 范围不符。采用物理学的方法分析,发现该酶没有典型氧化还原酶的辅助因子(如细胞色素和核黄素)参与催化反应。嗜酸硫杆菌的硫双加氧酶究竟是单聚体酶还是多聚体酶,最适 pH 值是在中性还是与其反应环境一致的酸性,值得进一步研究和确证。另外,因为缺乏有关环境因素尤其是不同能源基质对硫双加氧酶活性和表达的影响、硫双加氧酶的反应活性中心或催化作用位点等的研究,有关硫双加氧酶活性与表达的调节机制仍不清楚。

在高温有氧条件下,从古生菌 Acidianus ambivalens 中发现的唯一能氧化元素硫的硫加氧还原酶(sulfur oxygenase reductase: SOR)位于细胞质液中,兼具硫的氧化和还原活性,不需要其他辅助因子的协助,其有氧条件下催化氧化和还原元素硫的产物是 SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$ 和 $H_2S^{[71]}$ 。 Acidianus ambivalens 中的 sor 基因已经被克隆测序^[72],但在 A. ferrooxidans 中没有与古生菌 Acidianus ambivalens 中 sor 同源相似的基因。

2、硫加氧还原酶(SOR)

硫加氧还原酶(SOR)是从古生菌 Acidianus ambivalens 中发现的唯一能氧化单质硫的酶,该酶位于细胞质液中,兼具硫的氧化和还原活性,不需要其他辅助因子的协助,其有氧条件下催化氧化和还原单质 S 的产物是 SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$ 和 $H_2S^{[73,74]}$,通过对该酶进行原核表达后对其进行功能研究发现该酶含有一个低电位的非铁血红素中心^[70]。Chen Z W ^[75]等对 Acidianus tengchongensis 中 SOR 酶活性进行了研究,发现半胱氨酸残基对该酶的催化活性具有重要作用。

3、硫化物-辅酶 Q 氧化还原酶:

硫活化过程中,可能产生少量的 H_2S 成为质膜上硫化物-辅酶 Q 氧化还原酶 (sulfide:quinone reductase: SQR) 的底物,催化生成元素硫,元素硫在细胞周质被活化后进一步被氧化。Wakai S 等 $^{[76]}$ 在 A. ferrooxidans NASF-1 中,以辅酶 Q 作为电子受体时,能检测到 SQR 活性,且在 S^0 基质中生长的细胞的 SQR 活性 是 Fe^{2+} 基质生长细胞中的 18 倍,但是在转录水平上,在 S^0 基质生长的细胞的 sqr

转录量是 Fe²⁺基质生长细胞中的 3 倍,相对于 18 倍的酶活性水平上的差异,相差较大,推测功能性 SQR 的活性差异可能是缘于翻译后修饰或者辅助因子的参与。

4、硫代硫酸盐-硫转移酶 (硫氰酸酶):

硫氰酸酶是一种硫代硫酸盐硫转移酶(thiosulfate thiotransferase: TST),专门打断 $S_2O_3^2$ -中的 S-S 化学键,产生 S 和 $SO_3^{2^2-[77]}$ 。Gardner MN 和 Rawlings $DE^{[78]}$ 在 A. thiooxidans 和 A. caldus 细胞内和细胞提取物中都检测到了 TST 活性,然而,在能氧化亚铁而不能氧化含硫化合物的细菌 L. ferrooxidans 中没有检测到有 TST 活性。A. ferrooxidans 在以黄铁矿和 S^0 为基质的酸性环境中生长时有 $S_2O_3^2$ 的生成,而且 $S_2O_3^2$ -是黄铁矿中硫元素生物浸出的主要中间物质(硫代硫酸盐金属溶出途径) $S_2O_3^2$ -是黄铁矿中硫元素生物浸出的主要中间物质(硫代硫酸盐金属溶出途径) $S_2O_3^2$ -是黄铁矿中硫元素生物浸出的主要中间物质(硫代硫酸盐金属溶出途径) $S_2O_3^2$ -是黄铁矿中硫元素生物浸出的主要中间物质(硫代硫酸盐金属溶品、其中的蛋白质表达差异时发现,在 S^0 基质中生长的细胞体内有几种蛋白质被诱导表达,其中就有一种类 $S_2O_3^2$ - SO_4^2 -结合蛋白,推测这些蛋白的高量表达显然是和硫的氧化代谢相关。Ramírez $S_2O_3^2$ -为 SO_4^2 -结合蛋白,推测这些蛋白的高量表达是和硫的氧化代谢相关。Ramírez $S_2O_3^2$ -为 SO_4^2 -结合蛋白,推测这些蛋白的高量表达是和硫化物的溶解。

5、亚硫酸受体氧化还原酶:

元素硫在硫双加氧酶从零价态转变为多聚硫化物之后直接氧化成 SO_3^2 。如果 SO_3^2 ·没有被快速消化而在体内积累,就会对细胞产生毒害作用,影响细胞生长。因此,细胞体内需要有解除 SO_3^2 ·毒性的氧化系统。一般 SO_3^2 ·主要经由亚硫酸-受体氧化还原酶(sulfite acceptor oxidoreductase: SAR)氧化成 SO_4^2 -。

研究发现,Thiobacillus novellus,Thiobacillus thioparus,Thiobacillus versutus 和 Thiobacillus concretivorus 中存在亚硫酸盐氧化酶,这些酶含有钼元素,具有和哺乳动物亚硫酸盐氧化酶相似的特性,利用细胞色素 c 或铁氰化物作为 SO_3^{2-1} 氧化后的电子受体 [80]; Vestal JR 等 [81] 发现 A. ferrooxidans 中的亚硫酸盐氧化酶含有细胞色素 c,但是不含血红素和非血红素铁中心。Sugio T 等 [64] 从 A. ferrooxidans AP19-3 中分离到了一种膜结合亚硫酸盐氧化酶,其催化活性位点部位位于细胞周质,分子量为 650 KDa,含有分子量分别为 59 KDa 和 61 KDa 的两个亚基,该酶以 Fe^{3+} 为电子受体,而不是以细胞色素 c 或铁氰化物作为 SO_3^{2-1} 氧化后的电子受体,这种亚硫酸氧化酶在有氧和无氧条件下都能快速地氧化 SO_3^{2-1} 。

Nakamura K 等^[82]和 de Jong GAH 等^[83]分别从 A. thiooxidans 和 Thiobacillus

acidophilus 中分离到了利用细胞色素 c 的亚硫酸盐氧化酶膜蛋白,体外试验表明其活性最优 pH 值为中性,暗示其活性中心位于细胞质液中。亚硫酸受体氧化还原酶途径中能量产生靠电子传递来实现,电子经 SOR 传递给细胞色素 c,最后由细胞色素氧化酶接受。至今还没有关于亚硫酸盐氧化和细胞色 b、辅酶 Q 相偶联的证据^[84]。

6、硫酸盐-辅酶 O 氧化还原酶:

嗜酸硫杆菌 $S_2O_3^2$ -的氧化是以连四硫酸盐为中间产物的反应途径。从古生菌 *A. ambivalens* 中 分 离 的 膜 结 合 硫 代 硫 酸 盐 - 辅 酶 Q 氧 化 还 原 酶 (thiosulfate:quinone oxidoreductase: TQO) 在铁氰化物和癸基一泛醌做为电子受体时能氧化 $S_2O_3^{2-}$ 成为 $S_4O_6^{2-}$ 。TQO 含有两个由含双顺反子的 doxDA 操纵子编码而来的亚基 DoxA 和 DoxD(28 KDa 和 16 KDa)^[85]。二级结构预测 DoxD 含有五个跨膜螺旋,DoxA 含有一个跨膜螺旋。TQO 活性能被巯基结合试剂(如乙基马来酰亚胺)所抑制。

在A. ferrooxidans 有与A. ambivalens 中编码 TQO 的基因相似的双拷贝 doxDA 基因。doxDA 在嗜酸硫杆菌 $S_2O_3^{2-}$ 氧化中的作用机制虽然还不清楚,推测 doxDA 基因编码的产物在嗜酸硫杆菌硫氧化过程中可能起到十分重要的作用。

7、连四硫酸盐水解酶:

Meulenberg R 等^[86]发现连四硫酸盐水解酶在细胞内的浓度足够催化硫氧化过程中产生的连四硫酸盐,认为连四硫酸盐水解酶是硫氧化系统中硫代硫酸盐氧化为硫酸盐的关键酶。已经证明在 A. thiooxidans、A. ferrooxidans 和 A. acidophilum中连四硫酸盐水解酶参与了硫的氧化反应过程^[83,87]。

但有关嗜酸硫杆菌连四硫酸盐水解酶作用模式的报导先后不尽一致。例如,Steudel R 等 $^{[88]}$ 于 1987 年针对 Thiobacillus ferrooxidans (后改名为 $^{A.}$ ferrooxidans)提出了连四硫酸盐水解酶作用模式,他们发现水解的主要产物为 HS_2SO_3 和 SO_4 ,其中, HS_2SO_3 不稳定,但可能在硫原子形成长环状 S_8 过程中发挥关键作用。Meulenberg R 等 $^{[86]}$ 于 1992 年针对 Thiobacillus acidithiobacillus sp.) 发现连四硫酸盐水解酶水解的产物为 S_2O_3 , SO_4 , SO_4 , S_2O_3 , SO_4 S_2O_3 S_2O_3

解或水解产物是什么,除了从 A. ferrooxidans Funis 2-1 分离到的连四硫酸盐水解酶是单体形式的细胞膜结合蛋白外,从上述 A. acidophilum, A. ferrooxidans 和 A. thiooxidans 中分离到的连四硫酸盐水解酶都是二聚体形式的细胞周质蛋白,最适 pH 值都接近 3.0。

8、硫代硫酸盐脱氢酶:

Nakamura K 等^[82]从 *A. thiooxidans* JCM7814 分离纯化到了硫代硫酸盐脱氢酶 (thiosulfate dehydrogenase),该酶属单体结构,含有血红素 c,分子量为 27.9 KDa,位于细胞周质,最适 pH 为 3.5。这与早期 Silver M 等^[91]从 *A. ferrooxidans* 分离到的硫代硫酸盐脱氢酶性质相似。但与 Visser JM 等^[92]从 *Thiobacillus* sp. W5 中分离到的硫代硫酸盐脱氢酶组成不同,后者含有两个亚基,分子量分别为 33 KDa和 27 KDa,含有细胞色素 c,而不是血红素 c。

1.5 本论文的研究目的和意义

嗜酸硫杆菌是重要的硫化矿生物浸出功能菌,目前已应用于传统选冶工艺不能经济、绿色和有效提取的低品位和伴生硫化矿资源的生物浸出工业实践中。浸矿环境中的硫杆菌主要是嗜酸氧化亚铁硫杆菌(A. ferrooxidans)、嗜酸氧化硫硫杆菌(A. thiooxidans)和喜温硫杆菌(A. caldus)等,它们不仅在地球硫循环系统和维持浸矿环境中微生物群落多样性等方面起着重要作用,还在消解生物浸出过程金属硫化矿分解产生的各种含硫化合物,预防阻碍生物浸出的元素硫层钝化膜的形成,保持浸矿所需的酸性环境等方面扮演十分重要的角色。

在自然酸性环境下,元素硫消解的唯一途径是通过生物氧化嗜酸硫杆菌对元素硫的氧化是一个错综复杂的过程,包括对元素硫的活化、转运与生物氧化等。这里,嗜酸氧化亚铁硫杆菌的对元素硫的活化是硫氧化系统中的首要步骤,也是开展硫氧化系统研究必须要解决的瓶颈问题。已有的研究认为嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外物质在硫的活化过程中起到十分重要的作用,推测其中巯基蛋白质的活性巯基将环状的S₈转变为能被细菌利用的线状硫,但有待进一步研究。

因此本课题的研究目的为:针对嗜酸硫杆菌消解元素硫过程的首要步骤---元素硫活化的过程,开展嗜酸硫杆菌细胞胞外巯基蛋白质的筛选、鉴定与活化功能验证的研究。通过这些研究,找到嗜酸硫杆菌胞外与元素硫作用的巯基蛋白,为进一步研究和阐明嗜酸硫氧化菌硫的活化与代谢途径奠定基础。

1.6 本论文的主要研究内容

(1) 硫基质中嗜酸氧化业铁硫杆菌胞外蛋白质的分离与表达谱展示

- (2) 硫基质中嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外高表达蛋白质组学的初步研究
- (3) 嗜酸氧化亚铁硫杆菌元素硫吸附/活化相关基因的分析验证
- (4) 嗜酸氧化亚铁硫杆菌元素硫吸附/活化相关蛋白的表达、纯化及功能验证

1.7 本论文课题资助情况

- (1) 国家重大基础研究发展计划项目(No.2004CB619201)
- (2) 国家自然科学基金创新研究群体项目(No.50621063)
- (3) 国家自然科学基金(No.50674101)
- (4) 国家自然科学基金(No.10775150)
- (5) 北京正负电子对撞机国家同步辐射实验室开放性课题

第二章 元素硫基质中嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外蛋白质表达 图谱

关于细菌胞外物质的提取方法有多种^[93-96],大致可归纳为物理方法和化学试剂法。物理提取法主要是利用各种外力,如超声波提供的冲击力,离心提供的重力场力,加热和震荡等来实现胞外成分同细胞相分离,使胞外物质溶解在溶液中;化学提取过程是利用胞外物质在化学试剂的作用下从细胞上分离开来,如EDTA和热碱法属于化学提取方法。这些化学方法使试剂离子或分子与菌体接触,胞外成分中的大分子在试剂离子或分子的作用下成为水溶性物质,从而被提取出来。物理方法相对于化学试剂法来说,更能保持胞外成分的活性和原始特征,而化学试剂法有可能改变胞外成分的生物化学特性。

元素硫的适应/活化由嗜酸硫氧化细菌细胞胞外蛋白质完成。研究特化空间蛋白质的种类和数量与其所处的特定细胞空间环境及作用密切相关。由于特化细胞空间的蛋白质的数量相对整个细胞体系大大降低,以及同一细胞空间蛋白质的亲疏水性相近,在蛋白质的提取与分离过程中具有较强的操作性,将更易于发现特定功能的蛋白质。

本章实验将研究对象确定为 A. ferrooxidans 细胞胞外蛋白质,开展细菌胞外蛋白的提取与分离,通过适当的缓冲体系进行高效的电泳分离,获得高分辨率的蛋白质展示谱,以期为寻找元素硫适应/活化相关功能蛋白质奠定基础。

2.1 实验材料

2.1.1 菌株与培养基

嗜酸氧化亚铁硫杆菌模式菌株 ATCC 23270, 即 A. ferrooxidans ATCC 23270, 购自美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。

采用改进的 9K 培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 3.0 g,KCl 0.1 g,K₂HPO₄ 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,Ca(NO₃)₂ 0.01 g,蒸馏水 1000 mL,pH 2.0,能源为元素硫(5.0 g/L)。培养基初始 pH 使用稀硫酸调至 2.5。采用 5 L 放水瓶,于 30 °C恒温箱中,通过曝气培养细菌。

2.1.2 Bradford 法测定蛋白质浓度和二苯胺测定 DNA 含量

Bradford 储存液: 20%(v/v) 乙醇, 34%磷酸和 0.7 g/L 考马斯亮蓝 G-250。
Bradford 工作液: 3%(v/v) 乙醇, 5%磷酸, 6%(v/v)。

1 g/L 的牛血清蛋白(BSA)。

小牛胸腺 DNA: 小牛胸腺 DNA10 mg,以 0.1 mol/L NaOH 溶液溶解,转移至 50 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L NaOH 溶液稀释至刻度。浓度为 200 μg/mL。

二苯胺试剂:使用前称取1g结晶二苯胺,溶于100mL分析纯冰醋酸中,加60%过氯酸10mL混匀。临用前加入1mL1.6%乙醛溶液。此溶剂应为无色。

2.1.3 蛋白质双向电泳

尿素、二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)、CHAPS、碘乙酰胺、硫脲、低熔点琼脂糖、矿物油(Mineral Oil)、考马斯亮兰 R-250 均为 GE Healthcare 公司产品。

固相 pH 梯度干胶条(IPG 胶条 pH 3~10 24 cm)、IPG 缓冲液(pH 3~10)为 Amershma Phmaraeia 公司产品,蛋白质分子量标准为 MBI Ferments 公司产品。

裂解液 1: 8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4 % CHAPS、65 mmol/L DTT、0.5 mmol/L 苯胺基磺酰氟 (PMSF)、0.5 %等电聚焦缓冲液 (IPG buffer)。

水化液为: 8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、2 % CHAPS、18 mmol/L DTT、0.5 mmol/L PMSF、0.5 % IPG buffer、0.002 % 溴酚蓝。

4×分离胶缓冲液: 1.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.8 和 0.4 % (w/v) SDS。

平衡缓冲液: 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30 % (w/v) 甘油和 2 % (w/v) SDS。

溴酚蓝溶液: 0.25 % (w/v) 溴酚蓝溶于分离胶缓冲液中。

染色液: 在 490 mL 含 2 %(w/v)的 H_3PO_4 中加 50 g (NH₄) $_2SO_4$ 直至完全溶解,再加 0.5 g CBB R-250(已溶于 10 mL H_2O 中)。

固定液: 10%(v/v)乙酸,40%(v/v)乙醇。

双向电泳的第一向 IEF 电泳采用 GE 公司的 IPGphor 等电聚焦系统。IPGphor 包括半导体温控系统($18\sim25$ °C)和程序化电源(8000 V,1.5 mA)。

第二向 SDS-PAGE 采用 GE 公司的 Ettan DALT six 电泳系统。

2.2 实验方法

2.2.1 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的提取与分离

1、A. ferrooxidans 胞外蛋白质的提取

过滤处于对数生长中期的 A. ferrooxidans 细胞,去除元素硫颗粒;滤液经离心收集细胞沉淀;于4℃下10000 rmp 离心15 min 收菌,利用 pH 为 2.0 的双蒸水洗 2 次。采用水浴加热法、超声破碎法和热碱法分别提取 A. ferrooxidans 胞外蛋白质。

水浴加热法操作步骤: 用 5 mL 灭菌双蒸水悬浮菌体, 轻轻混匀。置于 60 ℃ 水浴 40 min, 每隔两分钟轻轻颠倒菌体溶液。于 4 ℃、12000 rpm 离心 30 min 收集上清,即为含胞外蛋白溶液。

超声破碎法操作步骤:用 5 mL 灭菌双蒸水悬浮菌体,轻轻混匀。菌悬液在超声波谷中超声处理 10 min,超声功率为 18 W。于 4 ℃、12000 rpm 离心 30 min 收集上清,即为含胞外蛋白溶液。

热碱法操作步骤: 用 5.0 mL pH 11 的 NaOH 溶液悬浮菌体,轻轻混匀。在 80 ℃下加热 30 min。然后于 4℃、12000 rpm 下,离心 30 min,收集上清,即为 含胞外蛋白溶液。

2、A. ferrooxidans 胞外蛋白质提取方法的比较

细胞 DNA 的含量可以作为提取胞外蛋白质方法优劣的指标^[94]。测定水浴加热法、超声破碎法和 EDTA 法三种方法所得胞外蛋白质溶液中所含 DNA 含量,与胞外蛋白质的总量综合比较,可以确定三种方法哪种更适合于本研究。

DNA 含量的测定采用二苯胺比色法^[97],以小牛胸腺 DNA 的碱液作标准溶液。该方法实验原理:DNA 中 2-脱氧核糖在 H⁺中可转化为 w-羟基-r-酮基戊醛,与二苯胺一起加热产生蓝色化合物,在 595 nm 处有最大吸收,在 DNA 浓度为40~400 μg/mL 内,光密度与 DNA 浓度成正比。在反应液加入一些乙醛,可减少一些物质的干扰,提高灵敏度。

利用 200 μ g/mL 的小牛胸腺 DNA 制作标准曲线,在 595 nm 波长下计量光 吸收值。如图 2-1,不同浓度的 DNA 与吸光值呈良好的线性关系,标准曲线方程为: Y = 0.02081 + 0.03396 * X。

蛋白质浓度采用 Bradford 法测定^[98]。该方法测定原理: 考马斯亮蓝 G-250 是一种染料,在游离状态下呈红色,最大吸收峰在 465 nm。当它与蛋白质结合后变成深蓝色,最大吸收峰变为 595 nm。蛋白质含量在 1-1000 μg 范围内,蛋白质-染料复合物在 595 nm 处的吸光度与蛋白质含量成正比,故可检测 595 nm 的光吸收值的大小计算蛋白的含量。

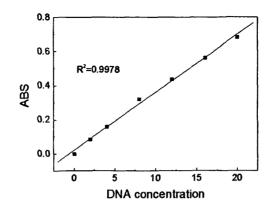


图 2-1 DNA 浓度测定标准曲线

Fig. 2-1 Determination of a standard curve for DNA concentration

利用 Bradford 工作液和 1 g/L 牛血清蛋白制作标准曲线,在 595 nm 波长下 计量光吸收值。如图 2-2。通过对工作曲线的回归分析可知:不同浓度的蛋白质与吸光度呈良好的线性关系,标准曲线方程为:Y=0.02457+0.01564*X。

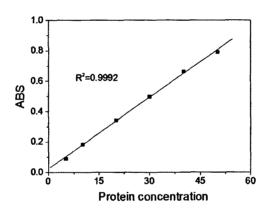


图 2-2 蛋白质浓度测定标准曲线

Fig. 2-2 Determination of a standard curve for protein concentration

2.2.2 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的双向电泳

1、样品水化

以胶内上样方式按每根胶条总上样量为 300 μg 蛋白质的要求上样。吸取 350 μL 水化上样缓冲液,加入 500 μL 样品,充分混匀放入标准型胶条槽中。

取出-20 ℃保存的固相 pH 梯度干胶条,在室温中放置 10 min。去除预制 IPG 胶条上的保护层,轻轻地将 IPG 胶条胶面朝下置于胶条槽中样品溶液上,使得胶条的正极(标有+)对应于胶条槽的正极。

慢慢下压胶条,使水化液浸湿整个胶条,并确保胶条的两端与槽的两端的电

极接触。每根胶条上覆盖 $2\sim3$ mL 矿物油,防止胶条水化过程中液体的蒸发。 IPGphor 运行参数为:步骤 1,50 V,12~16 h,作用为主动水化;步骤 2,500 V,2 h,作用为除盐;步骤 3,1000 V,0.5 h,作用为除盐;步骤 4,3000 V,0.5 h;步骤 5,5000 V,0.5 h;步骤 6,7000 V,1 h;步骤 7,8000 V,3~6 h;步骤 8,50 V。选择所放置的胶条数;设置每根胶条的极限电流(50 μ A/根)。

3、IPG 胶条的平衡

IPG 胶条平衡两次,每次 15 min。IPG 胶条平衡会减少电内渗,有利于蛋白从第一向到第二向的转移。

第一步平衡在 10 mL 平衡缓冲液中加入 1 % DTT,振荡平衡 15 min,使变性的非烷基化的蛋白处于还原状态:

第二步平衡步骤在 10 mL 平衡缓冲液中加入 2.5%碘乙酰胺,振荡平衡 15 min,使蛋白质巯基烷基化,防止它们在电泳过程中重新氧化,碘乙酰胺并且能使残留的 DTT 烷基化。

4、IPG 胶条的转移

将 IPG 胶条用电泳缓冲液轻轻润洗,并去除多余的平衡缓冲液,放在位于玻璃板之间的凝胶面上,使胶条支持膜贴着其中的一块玻璃板,用一薄尺将 IPG 胶条轻轻地向下推,使整个胶条下部边缘与板胶的上表面完全接触。确保在 IPG 胶条与板胶之间以及玻璃板与塑料支持膜间无气泡产生。上面覆盖 2 mL 热的低熔点琼脂糖溶胶。将胶盒插入电泳槽中,开始电泳。采用垂直的 12.5%的 SDS-PAGE 电泳,当溴酚蓝染料迁移到胶的底部边缘即可结束电泳。

5、考马斯亮兰染色

电泳结束后,蛋白质凝胶通过考马斯亮兰(Coomassie Brilliant Blue: CBB)染色成像。首先将蛋白质凝胶放入固定液中固定 1 h,然后转入染色液中染色 6 h以上,搅拌混合。使用前摇匀,另加入 125 mL 甲醇。染色结束后,用双蒸水漂洗直至背景清晰干净。

6、凝胶扫描与软件分析

双向电泳凝胶用 Uniscan scanner (清华紫光) 图像透射扫描仪透射扫描,光学分辨率为 300 dpi,存储为 TIF 格式。采用 2-D Imagemaster 7.2 专业分析软件 (GE)对 2-DE 图像进行参数设置(设置凝胶背景,最弱点,最小点和最强点等),得到胶点图谱 (GelSpot)。

2.3 结果与讨论

提取方法

招声法

热碱法

水浴加热法

2.3.1 A. ferrooxidans 胞外蛋白质提取方法比较

表 2-2 对水浴加热法、超声破碎法和热碱法提取胞外蛋白质的总量和及其含 DNA 量做了比较。水浴加热法提取 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的产量比较高,该提取方法总蛋白与 DNA 比值为最高,DNA 含量也比较低。热碱提取法所得胞外蛋白质的产量很高,但是提取液中的 DNA 含量也较高,该方法可能对细胞膜产生较大的破坏,以致会影响胞外蛋白质的纯度。超声法提取液中的 DNA 含量较低,但其总蛋白得率较低。综合三种方法,选取水浴加热法为 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的提取方法。

 蛋白质(mg/g)
 DNA(mg/g)
 蛋白质/DNA

 15.8
 0.05
 316.0

 8.5
 0.03
 283.3

0.22

167.7

表 2-1 三种胞外蛋白质提取方法比较

2.3.2 A. ferrooxidans 胞外蛋白质电泳展示

36.9

通过水浴加热提取法分离 A. ferrooxidans 胞外蛋白质,样品经过透析处理,单向分离和双向电泳展示结果分别如图 2-3, 2-4 所示。

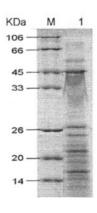


图 2-3 元素硫基质中 A. ferrooxidans 胞外蛋白质电泳图:泳道 M 参照分子量蛋白质; 泳道
1 A. ferrooxidans 胞外蛋白质

Fig. 2-3 SDS-PAGE of the *A. ferrooxidans* extracellular proteins: Lane M protein molecular mass markers; Lane 1 the extracellular proteins of *A. ferrooxidans*

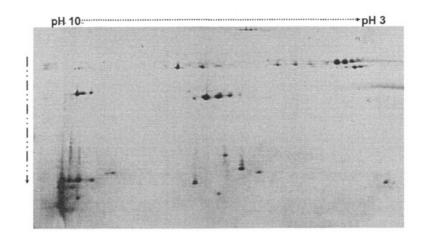


图 2-4 A. ferrooxidans 胞外蛋白质双向电泳图.

Fig. 2-4 The 2-D electrophoregram of A. ferrooxidans extracellular proteins

从图 2-3 可以看出,*A. ferrooxidans* 胞外蛋白主要组成为小分子量蛋白质,组成较为简单,表现为电泳条带清晰且不复杂。在图 2-4 中有些表达量相对较高的胞外蛋白斑点在双向电泳图上清晰的表现出来,这些蛋白质可能在元素硫的吸附与活化过程中起一定的作用。

元素硫的吸附与活化发生在细胞外,元素硫的氧化发生在细胞周质空间中。由于嗜酸硫杆菌与研究较为透彻的光合硫细菌的硫氧化系统完全不同^[52],因此在开展硫氧化同功同源基因的研究方面,在这两种不同类别的细菌之间没有相互借鉴性,细胞周质空间蛋白质的分离,将为周质空间中硫氧化系统的一些关键酶的分离和鉴定提供清晰的研究对象。硫的吸附与活化是硫氧化的前提,细胞胞外蛋白质的分离和鉴定,将为研究硫的吸附与活化蛋白质提供最基本的素材。

2.4 本章小结

- 1. 比较了水浴加热法、超声破碎法和热碱法三种胞外蛋白质提取方法,确定了 A. ferrooxidans 胞外蛋白质分离方法,即水浴加热法。
- 2. 建立了 A. ferrooxidans 胞外蛋白质双向电泳图谱,清晰展示了胞外蛋白质的数量。这种分离体系将总细胞蛋白质组系转变为简单的特化空间蛋白质组系,为寻找元素硫吸附/活化相关蛋白质奠定了基础。

第三章 硫基质中嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外高表达蛋白 质组的初步研究

嗜酸氧化亚铁硫杆菌在元素硫基质中生长时,细菌主动分泌的大量胞外物质,在硫的吸附与活化过程中起到了十分重要的作用^[99]。我们将研究对象进一步缩小为细胞特化空间蛋白质。特别是通过物理的方法获得元素硫基质中生长的细菌胞外蛋白质,通过双向电泳展示了为数不多的胞外蛋白质斑点。为寻找与元素硫吸附/活化相关蛋白质奠定基础。

在本章中,通过比较在可溶性基质硫酸亚铁和非可溶性固体硫粉中生长的嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外蛋白质差异,特别是选取元素硫基质中生长细菌的主要胞外蛋白质斑点的进行相关分析,为研究细菌吸附与活化元素硫的机理提供材料。

3.1 实验材料

3.1.1 菌株、培养基和培养条件

嗜酸氧化亚铁硫杆菌模式菌株 ATCC 23270。

采用改进的 9K 培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 3.0 g,KCl 0.1 g,K₂HPO₄ 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,Ca(NO₃)₂ 0.01 g,蒸馏水 1000 ml,pH 2.0,能源为元素硫 (5.0 g/L) 或硫酸亚铁 (44.2 g/L),培养基初始 pH 使用稀硫酸分别调至 2.5 和 2.0。采用 5 L 放水瓶,于 30 °C恒温箱中,通过曝气培养细菌。

3.1.2 蛋白质双向电泳

尿素、二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)、CHAPS、碘乙酰胺、硫脲、低熔点琼脂糖、矿物油(Mineral Oil)、考马斯亮兰 R-250 均为 GE Healthcare 公司产品。

固相 pH 梯度干胶条 (IPG 胶条 pH 3~10, 24 cm)、IPG 缓冲液 (pH 3~10)为 Amershma Phmaraeia 公司产品,蛋白质分子量标准为 MBI Ferments 公司产品。

裂解液 1: 8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4 % CHAPS、65 mmol/L DTT、0.5 mmol/L 苯胺基磺酰氟 (PMSF)、0.5 %等电聚焦缓冲液 (IPG buffer)。

水化液为: 8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、2 % CHAPS、18 mmol/L DTT、0.5 mmol/L PMSF、0.5 % IPG buffer、0.002 % 溴酚蓝。

4×分离胶缓冲液: 1.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.8 和 0.4%(w/v) SDS。

平衡缓冲液: 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30 % (w/v) 甘油和 2 % (w/v) SDS。

溴酚蓝溶液: 0.25% (w/v) 溴酚蓝溶于分离胶缓冲液中。

染色液: 在 490 mL 含 2 %(w/v)的 H_3PO_4 中加 50 g (NH₄) $_2SO_4$ 直至完全溶解,再加 0.5 g CBB R-250(已溶于 10 mL H_2O 中)。

固定液: 10%(v/v)乙酸, 40%(v/v)乙醇。

双向电泳的第一向 IEF 电泳采用 GE 公司的 IPGphor 等电聚焦系统。IPGphor 包括半导体温控系统(18~25 ℃)和程序化电源(8000 V,1.5 mA)。

第二向 SDS-PAGE 采用 GE 公司的 Ettan DALT six 电泳系统。

3.2 实验方法

3.2.1 不同能源基质生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的提取

分别收集元素硫和硫酸亚铁培养基质中处于对数生长中期的 A. ferrooxidans 细胞,过滤去除杂质;滤液经离心收集细胞沉淀;于 4 ℃下 10000 rmp 离心 15 min 收菌,使用 pH 为 2 的双蒸水洗 2 次。用 5.0 mL 灭菌双蒸水悬浮菌体,轻轻混匀。置于 60 ℃水浴 45 min,每隔 2 min 轻轻颠倒菌体溶液。于 4 ℃下 12000 rpm 离心 30 min 收集上清,即为含胞外蛋白溶液。置于双蒸水中透析 72 h,中途换水三次,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度后,冷冻干燥,于-80 ℃保存。

3.2.2 不同能源基质生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质差异展示

- 1、等电聚焦、SDS-PAGE、凝胶染色等操作步骤与第二章相同
- 2、蛋白质斑点的获得: 用剪刀将 1000 μL 的吸头尖端剪掉约 0.3 cm, 孔的 直径约为 2~3 mm, 选择在图谱上的一个目的点, 用修剪后的吸头从凝胶上戳取蛋白质点, 再转入 1.5 mL 的离心管中, 用双蒸水反复清洗几次。

3.2.3 胶内酶解与质谱分析

将从 2-DE 上分离后经考马斯亮蓝染色的斑点切下,用 100 μ L 50 %乙腈, 100 μ L 70 %乙腈, 100 μ L NH₄HCO₃ 泡洗至胶粒完全脱色,于真空干燥器中干燥 20 μ L 加入 10 μ L 的胰蛋白酶液(25 μ L NH₄HCO₃, μ L 的胰蛋白酶液(25 μ L NH₄HCO₃, μ L 分 で i 一 で 極切 40 μ L 25 μ L 25 μ L 25 μ C 过夜。

用 50~100 µL 5 %的三氟乙酸于 40 ℃提取肽段 1 h,再用相同体积的 50 % CAN, 2.5 % TFA 于 30 ℃提取 1 h,最后用 50 µL 乙腈超声提取,真空干燥,用

3~5 μL 0.5 %三氟乙酸溶解备质谱检测用。

酶切后的样品与基质 (α-氰基-4-羟基苯丙烯酸: HCCA) 混合,点样 0.5 μL 于不锈钢板样品板上,室温自然干燥后,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF/TOF) 技术,测定肽质量指纹谱。

采用反射模式正离子谱测定,离子源加速电压 20~kV,反射电压比 1.12, N_2 激光波长 337~nm,脉冲宽度 3~ns,离子延迟提取 100~ns,真空度 $4\times10^{-7}~Torr$,质谱信号单次扫描累加 50~次,获得肽质量指纹图谱。内标采用胰蛋白酶的自切峰(MH^+ : 2211.10~Da~和 2283.18~Da~或 2299.18~Da~和 842.51~Da)进行两点或单点校正。

3.2.4 数据库检索鉴定蛋白质

用 Mascot 检 索 鉴 定 目 的 蛋 白 质 , 网 址 为 : http://mascot.proteomics.com.cn/search_form_PMF.html, 数 据 库 为 NCBInr、SwissProt 和中国生物医学分析中心自建的特有的数据库。

质谱测定与分析委托中国科学院上海生命科学研究院生化与细胞学研究所 蛋白质组学研究分析中心完成。

3.3 结果与讨论

3.3.1 在 Fe²⁺和 S⁰中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的电泳展示

通过水浴加热法分离在不同能源基质(元素硫和硫酸亚铁)中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质,其单向 SDS-PAGE 电泳图如图 3-1 所示。

从电泳图谱可以看出,在固态元素硫中生长的细菌胞外蛋白质的种类较多,主条带分明,小分子蛋白种类较多;在硫酸亚铁中生长的细菌胞外蛋白质电泳条带数较少。这也反映了细菌在固态元素硫中生长时被诱导产生更多种类的蛋白质来克服元素硫的疏水性。

将提取的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质,经透析处理、等电聚焦和 SDS-PAGE 展示后的双向电泳图如图 3-2 所示。

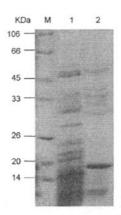


图 3-1 在 S^0 和 Fe^{2+} 基质中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的 SDS-PAGE 图: 泳道 M 蛋白质参照分子量; 泳道 1 在元素硫中生长的 A. ferrooxidans 的胞外蛋白质; 泳道 2 在亚铁中生长的 A. ferrooxidans 的胞外蛋白质

Fig. 3-1 SDS-PAGE of extracellular proteins of *A. ferrooxidans* grown on sulfur energy substrate (Lane 1) and sulfate ferrous energy substrate (Lane 2); Lane M, protein molecular mass markers

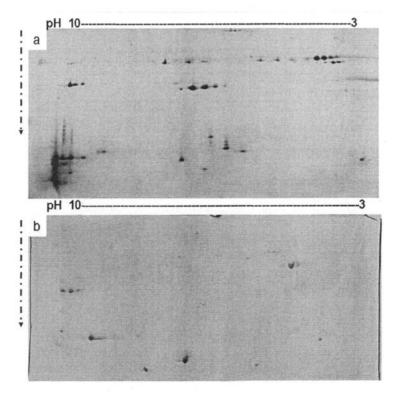


图 3-2 在 S⁰ (a)和 Fe²⁺(b)基质中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质双向电泳图 Fig. 3-2 The 2-D electrophoregram of the extracellular proteins of A. ferrooxidans grown on sulfur substate (a) and sulfate ferrous (b) substrates, respectively

双向电泳较为清晰地展示了在 S^0 (图 3-2a)和 Fe^{2+} (图 3-2b)中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质概况。在元素硫和硫酸亚铁中的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质各自都有一些高度表达的蛋白质斑点;其中在元素硫中生长的细菌胞外蛋白质的斑点数较多,在凝胶的碱性端还存在有一团小分子量蛋白质斑点没有清晰地分开,可能和其蛋白质的性质相关。在亚铁基质中的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的双向电泳展示结果表明,在可溶性能量基质中生长的细菌表达胞外蛋白质种类较少。

依据以上结果可认为不同的能源基质诱导表达不同的胞外蛋白质。其中,在固态能源一元素硫基质中生长的细菌表达较多种类的蛋白质,克服硫粉的疏水的表面性质,同时可能通过直接键合作用改变元素硫的化学存在形态。

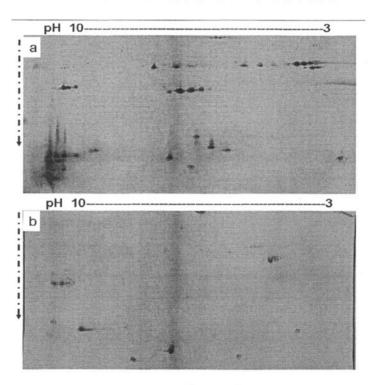


图 3-3 通过 2-D Imagemaster 软件分析在 S⁰ (a)和 Fe²⁺(b)中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质双向电泳图

Fig. 3-3 Using the 2-D Imagemaster software to detect electrophoregram of the extracellular proteins of A. ferrooxidans grown on S⁰ (a) and Fe²⁺ (b) substrates, respectively

通过 2-D Imagemaster 7.2 专业分析软件(GE)对 2-DE 图像进行参数设置(设置凝胶背景、最弱点、最小点和最强点等)、灰度计算、斑点检测等技术处理,得到胶圈点图谱,如图 3-3 所示。

比较元素硫(图 3-3a)和亚铁(图 3-3b)生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的双向电泳差异,主要目的是了解细菌在元素硫基质中生长过程中,参与细菌硫氧化系统中硫氧化的初始步骤---硫粒吸附/活化改性的蛋白质种类和性质,推导相关蛋白质参与硫粒吸附、活化改性的过程。

3.3.2 MALDI-TOF/TOF 分析及数据库查询

在元素硫中生长的 A. ferrooxidans 特异性表达的胞外蛋白质,通过胶内原位酶解后进行 MALDI-TOF/TOF 指纹的鉴定,并以酶自动降解峰进行校正,共获得 18 个蛋白质斑点的肽质量指纹图谱。蛋白点按识别的顺序依次编号为 1~18,如图 3-4 所示。

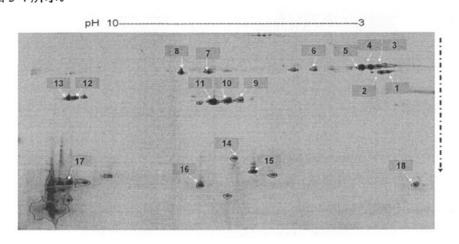


图 3-4 元素硫基质中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的主要斑点

Fig. 3-4 The extracellular proteins spots of A. ferrooxidans grown on sulfur energy substrate

肽质量指纹图谱分析是蛋白质组研究中最重要的蛋白鉴定手段之一,将质谱鉴定所得的肽质量指纹图谱(PMF)数据通过 Mascot 软件搜索相应的数据库。 Mascot 软件是最常用的检索工具(能够整合 NCBInr、SwissProt)和通过生物信息学自建的数据库进行信息检索。将所获得蛋白质斑点的 MALDI-TOF/MS 数据导入 Mascot 软件进行数据库检索的工作界面如图 3-5 所示,对选取的 18 个蛋白质斑点,结合 MALDI-TOF/MS 信息分析,结合 SwissPort 数据库和特有的 AFE-3217 数据库,蛋白质的结果鉴定如表 3-1 所示。



图 3-5 Mascot 软件数据库检索界面示例

Fig. 3-5 The schematic interface of Mascot software

表 3-1 元素硫基质中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的主要斑点酶解后肽质量指纹数 据库(SwissPort 和 AFE-3217)检索结果

Table 3-1 The identification and predication of extracellular proteins spots of *A. ferrooxidans* grown on sulfur energy substrate by MALDI-TOF/MS followed by database searches against

Spot	Locus	Function/similarity	Molecular weight	CELLO Prediction
No.			(KDa)/pI	Localization
1	AFE0859	Hypothetical protein	36.71/4.63	Extracellular or
				Outer Membrane
2	AFE0206	Conserved hypothetical protein	28.36/5.04	Cytoplasmic or Extracellular
3	AFE1932	Ser/Thr protein phosphatase family protein	32.31/5.06	Cytoplasmic or
		Enzymes of unknown specificity		Extracellular
4	AFE1511	Hypothetical protein	37.46/5.94	Cytoplasmic or Extracellular
5	AFE1006	Hypothetical protein	27.91/9.51	Periplasmic or Extracellular
6	AFE0982	VacJ lipoprotein	30.04/6.97	Periplasmic or Extracellular
7	AFE0927	Polysaccharide deacetylase family protein	28.84/9.3	InnerMembrane or
		Energy metabolism, biosynthesis		Extracellular
		and degradation of polysaccharides		
8	AFE2857	Hypothetical protein	30.95/10.41	OuterMembrane or
				Extracellular
9	AFE2770	Hypothetical protein	19.91/5.04	Extracellular or Cytoplasmic
10	AFE2621	Pilin, putative	17.68/5.09	Extracellular or Periplasmic

11	AFE1391	Conjugal transfer protein,	24.35/7.14	Periplasmic or Extracellular
		Cellular processes, Conjugation		
12	AFE1857	Hypothetical protein	21.42/9.17	Extracellular or Periplasmic
13	AFE1336	Hypothetical protein	20.85/10.2	Periplasmic or Extracellular
14	AFE1847	Lipoprotein, putative	10.15/7.72	Extracellular or Periplasmic
15	AFE2537	Conserved hypothetical protein	14.69/6.87	Periplasmic or Extracellular
16	AFE1043	Hypothetical protein	7.31/9.93	Periplasmic or Extracellular
	AFE1774	Hypothetical protein	13.82/11.01	Periplasmic or Extracellular
17				
18	AFE1922	Hypothetical protein	11.96/7.76	Cytoplasmic or Extracellular

A. ferrooxidans ATCC 23270 的全基因组数据库中的基因序列来自 TIGR 数据库(www.tigr.com)。针对拟分析的开放阅读框序列所编码的蛋白质,采用Protparam 模块分析蛋白质分子量和等电点,THUMBUP 和 TMHMM 模块预测蛋白质跨膜螺旋序列,以及采用 SignalP、TatP 和 LipoP 模块分析蛋白质的信号肽序列特征。目前可参考的基于信号肽的蛋白质运输途径主要有 Sec 途径(Sec machinery)和 Tat 途径(twin-arginine translocation)。某些蛋白质还可以由脂蛋白信号肽、纤毛信号肽、细菌素和生物信息素信号肽介导或者经未知的非经典途径分泌[100]。

3.3.3 在元素硫基质中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的分类与分析

根据在细菌细胞生长过程中扮演的角色,将质谱分析得到的 18 个蛋白质(多肽)进行分类,如表 3-2 所示。具体比例及功能见图 3-6。

表 3-2 鉴定的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质类别分类

Table 3-2 The classification of of the identified extracellular proteins of A. ferrooxidans

名称	数量
hypothetical protein	10
conserved hypothetical protein	2
Ser/Thr protein phosphatase family protein	1
conjugal transfer protein	1
pilin, putative	1
vacJ lipoprotein	1
polysaccharide deacetylase family protein	1
lipoprotein, putative	1

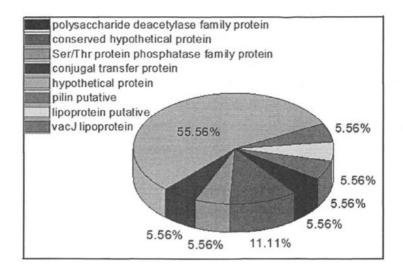


图 3-6 在元素硫基质中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质分类

Fig. 3-6 Functional classification of the identified extracellular proteins of *A. ferrooxidans* grown on sulfur energy substrate

根据实验结果分析可知,已鉴定的在元素硫基质中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质,基本都属于预测的细胞胞外蛋白质(表 3-1),这与在元素硫基质中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白质的实验设计基本吻合,这也说明了所选取的胞外蛋白质的提取方法--水浴加热法的合理性。但是根据鉴定的结果发现,绝大部分是属于未知功能蛋白质(18 个中的 12 个都属于未知蛋白质),且在 TIGR 数据库(www.tigr.com)中这些蛋白质(多肽)都没进行功能归类。

所鉴定 A. ferrooxidans 胞外蛋白质中有两种含量相对较高的蛋白质 (AFE_1847: lipoprotein, putative, Cell envelope; AFE_0982: vacJ lipoprotein, Cell envelope)。这两个蛋白质都有典型的脂蛋白信号肽结构特征(LipoP),即脂质与蛋白质结合在一起形成的脂质-蛋白质复合物。分析 AFE_1847 和 AFE_0982 的多肽序列,发现两者都没有典型的跨膜序列,可能存在于胞外的几率较高(见表 5-1)。vacJ 脂蛋白(病毒基因 vacJ 的编码产物)是 Shigella flexneri 在宿主细胞之间的传递所必须的外膜锚定蛋白[101]。在元素硫中生长的 A. ferrooxidans 产生类 vacJ 脂蛋白,其在元素硫的吸附过程中的作用有待进一步确证。

类多聚糖脱乙酰基家族蛋白(AFE_0927: polysaccharide deacetylase family protein)和类丝氨酸/苏氨酸磷酸酶水解家族蛋白(AFE_1932: Ser/Thr protein phosphatase family protein)通过在线软件分析蛋白质的信号肽序列特征,没有相关信号肽特征的短肽片段,但每个多肽都有一段跨膜的肽片段,亚细胞定位预测显示其有存在于胞外的可能性。

其中的接合转移蛋白质(conjugal transfer protein: AFE_1391)分布在细胞表面,接合转移蛋白质在通过细菌细胞的直接接触而产生遗传信息转移和重组过程中发挥重要作用,特别是带有抗性的质粒在接合转移蛋白质的作用下的传递,导致受体细菌在逆境环境(如重金属等环境)中的生存能力获得提高。

A. ferrooxidans 胞外蛋白质中有一种可能的菌毛蛋白(AFE_2621: pilin, putative, Cell envelope, Surface structures),在功能的预测上分属于细胞表面包被蛋白质,参与细胞表面结构构成。在许多革兰氏阴性菌菌体表面遍布有细、短、直、硬、多的丝状蛋白附属器,称为菌毛(Pilus),或叫为纤毛(Fimbriae)。其化学组成是菌毛蛋白(Pilin)。菌毛与运动无关,在光镜下看不见,使用电镜才能观察到。菌毛可分为性菌毛(Sexpilus)和普通菌毛(Commonpilus)两种。在细菌接合的时候,性菌毛负责在两个细菌之间传递 DNA。细菌的致病力、抗性及耐药性等即可通过这种方式传递^[102]。

细菌在元素硫基质中生长,硫粉属于疏水的固体颗粒物质,在实验中分离检测到有菌毛蛋白(AFE_2621)的存在,其高量表达可能与细菌对元素硫的吸附和活化。

有趣的是,18个蛋白质中有 12个是属于未知蛋白质。这些未知功能的蛋白质有一部分既没有信号肽序列特征也没有跨膜特征,这些定位在胞外的短肽可能是由非经典途径分泌到细胞外。其中 6 个分子量较小的多肽序列(AFE_1336、AFE_1847、AFE_2537、AFE_1043、AFE_1774 和 AFE_1922)中含有相对丰富的半胱氨酸残基(Cys)。含有丰富的半胱氨酸残基就意味着拥有巯基基团,巯基基团属于多肽分子中的重要活性功能基团。胞外的小分子量的亲水性多肽能通过巯基之间形成二硫键,起到稳定蛋白质的作用。多肽也能通过巯基对金属的螯合来维持其稳定性,行使其生物学功能。另外,小分子量的亲水性多肽也能通过巯基在抗重金属、蛋白修饰、胁迫耐受、信号转导、维持还原势等功能方面都起到十分重要的作用。

另外,在 AFE_1336、AFE_1043 和 AFE_1922 序列中分别含有 1 个 Cys-Gly-Pro-Cys (CXXC) 结构域,在 AFE_2537 中甚至含有 2 个 CXXC 结构域。 CXXC 结构域属于硫氧化还原蛋白、锌指蛋白等的特征结构域。生物体中的很多氧化还原反应主要由含有 CXXC 功能区作为活性位点的巯基氧化还原酶介导完成,它们可以在其活性位点和对应二硫化物的半胱氨酸之间快速完成可逆的巯基-二硫键交换反应。通过巯基(-SH)和二硫键(-S-S-)形式的转换,引起蛋白质分子构型的改变,从而影响蛋白质分子的活性,实现对蛋白功能的调控^[103]。

就元素硫氧化来说,嗜酸硫氧化细菌对元素硫的氧化首先要求细菌和元素硫之间相互接触吸附。细菌的有效吸附决定了其氧化利用硫微粒的高效性。细菌在硫基质中主动产生的胞外物质不仅介导细菌吸附在硫粒上,更为重要的是细菌胞外物质和元素硫之间的生物化学反应,将元素硫活化后转化为可利用的能量物质。细菌胞外物质和元素硫之间的生物化学反应是由胞外蛋白质主导的。已有的研究报道,元素硫被利用的前提是元素硫的活化,但是这一步骤依赖于低分子量硫醇(如谷胱苷肽: GSH)的存在^[62,63]。

3.4 本章小结

通过比较 S^0 和 Fe^{2+} 基质中 A. ferrooxidans 胞外蛋白质双向电泳表达谱的差异,获得了硫吸附/活化相关的胞外高表达蛋白质斑点。

- 1. 通过双向电泳展示了在亚铁和元素硫基质中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白。对硫活化相关的胞外高表达蛋白质斑点进行了 MALDI-TOF/TOF 鉴定、归类和生物信息学分析,结果表明这些蛋白质基本都是胞外蛋白质,包括接合转移蛋白质、吸附相关的菌毛蛋白、脂蛋白、类多聚糖脱乙酰基酶家族蛋白和丝氨酸/苏氨酸磷酸水解蛋白,及一些未知功能蛋白。这些在元素硫中生长的 A. ferrooxidans 表达量相对较高的胞外蛋白质(或多肽)推测它们与元素硫吸附或活化相关,但其具体功能还需要深入而细致的功能验证和分析。
- 2. 在未知功能的蛋白中有 6 个蛋白质(或多肽)序列中含有较高丰度的半胱氨酸残基,其中有四个序列中还有 CXXC 功能模体,推测它们在 A. ferrooxidans 对 S^0 的吸附或活化中起重要作用。

第四章 嗜酸氧化亚铁硫杆菌硫活化相关胞外蛋白质基因的 分析和验证

实时定量 PCR(Real-time PCR)技术是一种具有革命性意义的定量 PCR 技术。所谓实时定量 PCR 是指在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量,并据此推断目的基因的初始量。

Real-time PCR 技术在 PCR 反应体系中加入荧光基因,利用荧光信号实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法,避免了传统 PCR 以终产物检测定量产生的偏差,提高实验的重复性。实时荧光定量 PCR 是迄今为止定量最准确、重现性最好的定量方法,已广泛用于基因表达、转基因研究,药物疗效检测、病原体检测等诸多领域[104-106]。

本章选取在元素硫培养基质中高量表达的 10 个蛋白质基因,应用 Real-time PCR 对双向电泳展示胞外蛋白质差异图谱结果进行验证,研究了硫活化/氧化相 关基因表达水平随培养基质不同的变化情况。

4.1 实验材料

4.1.1 菌株与培养基

嗜酸氧化亚铁硫杆菌模式菌株 ATCC 23270。

采用改进的 9K 培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 3.0 g, KCl 0.1 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.5 g, $Ca(NO_3)_2$ 0.01 g,蒸馏水 1000 mL,pH 2.0,能源为硫酸亚铁 (44.2 g/L) 或元素硫(5.0 g/L)。

4.1.2 主要试剂与仪器

①主要试剂: Trizol[®]试剂 (InvitrogenTM Corporation, 15596-026), RNeasy[®] RNA 纯化试剂盒 (Qiagen GmbH, 74104), QIAquick[®] PCR 产物纯化试剂盒 (Qiagen GmbH, 28106), SuperScriptTMIII反转录酶试剂盒 (InvitrogenTM Corporation, 18064-014), DNase[®]试剂盒 (Qiagen GmbH, 79254), 随机引物 (InvitrogenTM Corporation, 48190-011), E.Z.N.A.[®]凝胶回收试剂盒 (Omega Bio-tek, Inc.., D2501-01), 2×PCR 混合体系试剂盒 (Fermentas, K0171), SYBR[®] Green 定量 PCR 混合体系(Toyobo Co., Ltd., QPK -201), Cy3/Cy5 dUTP, dNTP, 无水乙醇,氯仿,DEPC,异丙醇,FeSO₄·7H₂O 等。

②低温恒温槽(宁波市海曙天恒仪器厂,DCW-2008),高速离心机(Eppendorf

AG, 5804R、5415D),超级恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司,DKB-501A),电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,PL303),普通 PCR 仪(Applied Biosystems,2720),立式双层小容量恒温培养摇床(上海苏坤实业有限公司),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.),水平电泳仪(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),GenePix 4100 芯片扫描仪(AXON instruments, Inc, USA),Eppendorf Concentrator 5301 真空旋转干燥器(Eppendorf Inc., Hamburg, Germany),高压灭菌锅,移液器,量筒,三角瓶,培养皿,烧杯,计时器等。

4.2 实验方法

4. 2. 1 总 RNA 的提取及纯化

- 1、RNA 提取
- ①细胞裂解: 离心收集细胞,每 10^7 个细菌细胞加 1 mL 的 Trizol 试剂,在 Trizol 试剂中用移液枪反复吹打,充分裂解细胞。加 Trizol 前避免洗涤细胞,防止降解 mRNA。
 - ②将匀浆样品在 15~30℃温育 5 min, 使核酸蛋白复合物完全分离。
 - ③可选步骤: 4 ℃, 10000 rpm 离心 10 min, 收集上清。
- ④每 1 mL 的 Trizol 加 0.2 mL 氯仿,盖好离心管盖,剧烈振荡 15 s,室温温育 3 min。如不能旋涡振荡,可手动颠倒混匀 2 min 代替。
- ⑤4 $^{\circ}$ C,10000 rpm 离心 10~15 min,样品分成三层: 黄色的有机相,中间层和上层无色的水相,RNA 主要在水相中,小心把水相(约 600 μ L)转移到新离心管中。
 - ⑥在水相溶液中加入等体积异丙醇,混匀,-20℃放置 20~30 min。
 - ①4 ℃, 10000 rpm 离心 10 min, 弃上清。
- ⑧加入1 mL75%乙醇洗涤沉淀。每使用1 mL 的 Trizol 至少加1 mL 的 75% 乙醇。
- ⑨4 $^{\circ}$ C,10000 rpm 离心 5 min, 弃上清; 短暂快速离心,用移液器小心吸取上清。室温放置晾干 2 $^{\circ}$ 3 min, 加入适量无 RNase 水(根据实验需要,可加 30 $^{\circ}$ 100 $^{\circ}$ LL),60 $^{\circ}$ C水浴 10 min, 充分溶解 RNA。
 - ⑩电泳检测 mRNA 的完整性, NanoDrop®微量分光光度计检测总 RNA 浓度

及纯度。

- 2、RNA 纯化(RNeasy® RNA 纯化试剂盒,Qiagen GmbH,74104)
- ①RNA 样品加无 RNase 水至总体积为 100 μL, 加 350 μL RLT 缓冲液, 充分混匀。(注意:确保 RLT 缓冲液在使用之前已加入 β-巯基乙醇)
 - ②加 250 μL 乙醇 (96~100%), 移液枪吸打充分混匀。
- ③将样品(700 μ L)移至 RNeasy 纯化柱中,将 RNeasy 纯化柱放入 2 mL 的收集管中,12000 mp 离心 15 s,弃收集液。
- ④ (DNase 处理,可选)对某些微量的 DNA 敏感的 RNA 应用,进一步的 DNA 去除是必要的。
- a) 加 350 μL RW1 缓冲液至 RNeasy 纯化柱, 10000 rpm 离心 15 s, 弃收集液。
- b) 取另一新的离心管,加入 10 μL 的 DNase I 贮存液,70 μLRDD 缓冲液,轻轻上下颠倒混匀。(注意: DNase I 对物理环境敏感,混匀时轻轻的上下颠倒,避免旋涡振荡)
- c) 将 DNase I(80 μ L)混合液直接加到 RNeasy 纯化柱硅胶膜正中间。室 温(20~30 $^{\circ}$)温育 15 min。如果混合液粘在管壁上,消化可能会不完全。
- d) 加入 350 μL RW1 缓冲液至 RNeasy 纯化柱中, 8000 rpm 离心 15 s, 弃收集液。
- ⑤将 RNeasy 纯化柱移至新的收集管中,加入 500 μL 的 RPE 缓冲液,12000 rpm 离心 15 s,弃收集液。(注意:确保在使用前 RPE 缓冲液已加入无水乙醇)
 - ⑥再次加入 500 μL RPE 缓冲液,轻轻盖上管盖,12000 rpm 离心 2 min。
 - ⑦(可选)将 RNeasy 纯化柱移入一新的 2 mL 的收集管,最大转速离心 1 min。
- ®将 RNeasy 纯化柱移入新的 1.5 mL 的离心管中, 加入 30~50 μL 无 RNase 水至 RNeasy 硅胶膜上。12000 rmp 离心 1 min。
 - ⑨如果收率过低,从第①步开始重复上述操作。检测 RNA 纯度及完整性。

4. 2. 2 反转录 cDNA 合成

1、配制反应体系(13.0 μL):

向 PCR 管内依次加入: 1.0 μL 随机引物(100 ng/μL), 5.0 μL 总 RNA(约 200 ng/μL), 2.0 μL dNTP(10 mmol/L), 5.0 μL ddH₂O。

- 2、轻轻混匀反应体系后,70 ℃水浴 5 min,然后置于冰上至少 1 min,充分冷却后,短暂低速离心。
- 3、反应体系中再依次加入: 4.0 μL 5×第一链合成缓冲液, 1.0 μL DTT (0.1 mol/L), 1.0 μL RNaseOUTTM RNase 抑制剂, 1.0 μL SuperScriptTM III反转录酶。
 - 4、轻轻上下吸打均匀, 25 ℃水浴 5 min。
 - 5、50 ℃温育 60 min。
 - 6、70 ℃水浴 15 min,终止反应。
- 7、NanoDrop[®]微量分光光度计检测 cDNA 质量,将样品 cDNA 稀释成 200 ng/μL, Real-time PCR 检测待用。
- 4.2.3 PCR 引物设计及标准曲线的制作
 - 1、引物设计

本研究中Real-time PCR采用非特异性DNA嵌合染料,对引物的各项要求更高。PCR引物采用"Primer Premier 5.0"软件设计,使用"Oligo 6.0"软件对引物评价,遵循下列引物设计基本原则,择优选用。将序列送上海生工生物公司合成,溶解为5 pmol/μL使用液。实验所用引物序列及相关信息如表4-1所示。

引物设计基本原则如下:

- ①引物与模板的序列要紧密互补,使用BLAST检索,确保引物特异性。
- ②引物与引物之间避免形成稳定的二聚体或发夹结构。
- ③引物不能在模板的非目的位点引发DNA聚合反应(即错配)。
- ④引物长度通常在18~23 bp, Tm值在55~65 ℃, 且引物对的2个Tm尽量接近, GC含量在40%~60%, PCR扩增产物大小尽量在100~200 bp之间。
 - ⑤引物的3′端避免使用碱基A,避免出现3个以上连续相同的碱基。

表 4-1 Real-time PCR 检测用引物

Table 4-1 Primers used for Real-time PCR detection

	引物序列			
基因座	Fordward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	物 大 小 (bp)	退 火 温 度 (℃)
AFE_0982	TATGTGCTGAAGCCCGTAG	ATCCTCCATTCCCTGTCG	150	58
AFE_2621	TCCGCAGTATGAGCAG	ATCCCATCGTGTAGGC	194	58
AFE_2537	GGCTGGAACTTTAGATGA	CTTTGTGCTGACCCTTT	120	60
AFE_0859	CAAACTCCCGACCCTG	TGTTGACGGCATTCTCC	98	60
AFE_0206	GAGGCGGCGGATTAT	CCCACCGAGTATGAAGG	105	57
AFE_1006	AGCCCGACCAATACCG	ATCCCAGAAGTAGTTGACGAA	153	61
AFE_0927	GCAAACGGTGTCTTTACTC	CGTGCGAACGGTCAT	130	59
AFE_2857	CTGGGTGTTGCTGCTTCTG	TGACGGTCGGGTGGTTG	193	62
AFE_2770	GCACCTTCCAGTTTCGT	TAAGTCAGCAGCACCTCAT	139	60
AFE_1391	CACCTGGCTCGCTTTCAC	TGTTGCCCTGCGTCTTGT	161	60
16s	AGAACCTTACCTGGGCTTGA	GCTCGTTGCGGGACTTA	135	60

2、引物检测

①引物常规 PCR 扩增,反应体系 (25.0 μ L) 如下: 12.5 μ L 2×Taq PCR Master Mix, 0.5 μ L 正向/反向引物(10 μ mol/L),0.5 μ L 模板 DNA,11.0 μ L ddH₂O。

由以下循环条件扩增: 95 ℃变性 5 min, 95 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 1.0 min, 72 ℃延伸 1.0 min, 40 个循环, 75 ℃延伸 7 min, 4 ℃。

②若需要更为严格的引物检验,可进行测序比对。具体方法为: PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳分离,切胶纯化回收。

③连接反应体系(10.0 µL)为: 5.0 µL 2×T4 连接酶缓冲液,1.0 µL pGEM-T Easy 载体(50 ng/µL),1.0 µL T4 DNA 连接酶(3.0 U/µL),3.0 µLPCR 产物,于 16 ℃连接过夜。

④连接产物转化:将连接产物加入到200 μL的DH5α感受态细胞中,混匀,置冰上3 min。42 ℃ 热激90 s,冰浴5 min。加入800 μL LB液体培养基,37 ℃振动培养1 h。3500 rpm离心5 min,弃去800 μL上清,剩余物涂布于含Amp的LB平板上。37 ℃避光培养过夜,12 h后观察转化效率。挑取阳性单克隆,进行菌体PCR检测。

⑤核酸序列测定、同源性比较。经鉴定为阳性重组克隆的菌株送往上海生工有限公司测序,采用BLAST软件搜索NCBI数据库内进行同源性分析。

3、标准品制备

阳性定量标准模板的建立:将换算得到的 10^{13} 拷贝数/ μ L 浓度的重组质粒按 $10^9 \sim 10^2$ 拷贝/ μ L 梯度稀释,作为阳性定量标准模板,用于 Real-time PCR 反应条件的优化、标准曲线的建立和样品的检测。

拷贝数换算公式:

拷贝数(copies/
$$\mu$$
L)= $\frac{6.02 \times 10^{23} \times c}{MW}$ (方程式 3-1)

其中 c 为浓度,单位 $ng/\mu L$; MW=碱基数目 (bp) ×660 (daltons/bp)。

- 4、Real-time PCR 检测
- ①MyIQ 的校正:
- (1) 打开仪器, 预热 30 min;
- (2) 打开 MyIQ 软件,设置参数:

A. i: 选择合适的实验步骤: 在"Library"项目中点"View Protocol"查看已有的步骤,在"Protocol Files"中显示想选的步骤。ii: 编辑实验步骤: 从以下途径开始编辑步骤: 在"Library"项目中的"View Protocol"中点击"Edit This Protocol"或者"Create a New Protocol"或者是"Workshop"项目中的"Edit Protocol",然后根据界面的图标、选项来编辑步骤,设定完后键入"Protocol Filename"保存。iii: 实验中所用的实验参数如下:

Step 5: 55 ℃ 10 s 80 循环 + 0.5 ℃/cycle Step 6: 4 ℃ ∞

- B. i: 选择合适的反应平台设计: 在"Library"项目中点"View Plate Setup"查看已有的平台设计,在"Plate Setup Files"中显示想选的平台设计。ii: 编辑平台设计: 从以下途径开始编辑平台: 在"Library"项目中的"View Plate Setup"中点击"Edit This Plate Setup"或者"Create a New Plate Setup"或者是"Workshop"项目中的"Edit Plate Setup",然后根据界面的图标、选项来编辑步骤,设定完后键入"Plate Setup Filename"保存。iii: 根据每次的实验设定平台。
- C. Aligning the Mask (不是每次实验前都需要做的,做一次将数据保存即可持续一个月):
- a: 用 ddH₂O 将"Well Factor solution"稀释 10 倍,对于 25 μL 的体系而言即 "Well Factor solution"2.5 μL, ddH₂O 22.5 μL, 配制 2550 μL 的稀释液;
 - b: 将 96 孔板每个孔加入 50 µL 的稀释液, 然后用专门的膜覆盖上;
 - c:将96孔板放入仪器,在"Run-Time Central"项目中点击"Imaging Services";
 - d: 点击"Optimize Bias";
 - e: 点击"Calibrate", 再点击"Open";
- f: 点击"Make an Exposure", 查看粉红色的影像,如果有粉红色的点存在,就减少曝光时间,再点击"Make an Exposure",如有需要继续重复以上步骤;
 - g: 点击"Show Masks";
 - h: 点击"Optimize Mask Positions";
 - i: 点击"Save Optimized Masks"。
 - j:点击"Collect Persistent Well Factors",之后就进入到运行的准备状态界面。
 - k: 输入 "25 或者 50" 微升体积。
 - 1: 点击"Begin Run", 仪器自动运行预热程序, 大概约 3 min。
- m: 信息提示一个"自动校正"的程序文件生成了,下次运行是只要选择第一个选择项,即: "Collect Persistent Well Factors",系统就会自动调如文件自动较正了。
- ②按照反应前 MyIQTM 单色实时定量 PCR 检测系统的分析软件 Optical System Software (Version 1.0) 所设定的样品检测系统位置排列, 往 96 孔板中依次加入下列各种试剂: 0.5 μL cDNA 模板, 0.5 μL 正向/反向引物 (5 pmol/μL), 12.5 μL 2×SYBR[®] Green 实时定量 PCR 混合体系, 11.0 μL ddH₂O, 总体系为 25.0 μL。
- ③将光学膜覆盖在 96 孔板上,先沿着 96 孔板的纵向压膜,然后横向,最后沿着 96 孔板的边缘按压使之密封。上述过程注意避光。

④反应条件: 95 ℃预变性 30 s; 95 ℃变性 15 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 实时荧光检测,共 42 个循环。熔解曲线分析: 95 ℃ 1 min, 60 ℃ 10 s, 每个循环后温度上升 0.5 ℃,时间 10 s, 产物特异性分析,共 80 个循环。

⑤反应结束,由溶解曲线判定 PCR 反应的特异性,根据荧光曲线的 Ct 值以及标准曲线计算定量结果,以管家基因 16S 为校正因子,计算分析各基因相对表达量。

4.3 结果与讨论

4.3.1 引物特异性

常规PCR产物经2.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,发现每对引物的PCR产物均是一条片段并且片段的大小也是与设计的引物扩增大小相一致的,如图4-1所示。PCR产物经克隆后送与北京三博远志生物技术有限责任公司测序,再把测得的序列与要扩增的DNA片段序列比对,结果表明PCR产物片段是与所要扩增的目的DNA片段序列具有100%的序列一致性。

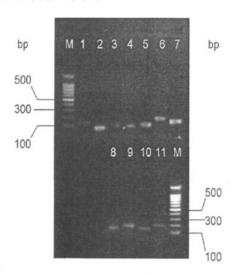


图 4-1 阳性质粒 PCR 产物电泳图: M 分子量标准物; 1 AFE_1006; 2 AFE_0859; 3 AFE_0927; 4 AFE_0206; 5 AFE_2537; 6 AFE_2621; 7 AFE_0982; 8 16S; 9 AFE_1391; 10 AFE_2770; 11 AFE_2857

Fig. 4-1 Electrophoresis analysis of PCR products from positive plasmid: M molecular weight marker; 1 AFE_1006; 2 AFE_0859; 3 AFE_0927; 4 AFE_0206; 5 AFE_2537; 6 AFE_2621; 7 AFE_0982; 8 16S; 9 AFE_1391; 10 AFE_2770; 11 AFE_2857

4.3.2 总 RNA 质量分析

Real-time PCR 是检测样本中特定基因表达量的有效方法,包含逆转录步骤和定量 PCR 步骤。获得高质量的、能正确反应样品中各个基因转录情况的 RNA,对于其后的定量结果非常重要的。RNA 质量包含两个方面:样品的纯度和 RNA的完整性。

提取元素硫和亚铁中处于生长对数期的细菌总 RNA, 经 NanoDrop[®]微量分光光度计检测,吸光光谱曲线平滑,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.90~2.05 之间,另一纯度指标 OD₂₆₀/OD₂₃₀,评估脱盐程度,比值总体略大于 OD₂₆₀/OD₂₈₀,在 1.90~2.15,数据表明样品的纯度高。电泳分析如图 4-2,23S rRNA 与 16S rRNA 条带完整、清晰,含量接近 2:1 (GeneScope V1.73 图像分析结果显示),表明总 RNA 提取纯化过程中无明显的 RNase 作用导致的降解,mRNA 在琼脂糖胶上按相对分子质量由大到小连续分布,无明显条带出现。综上,总 RNA 的纯度与完整性均良好,提取得到的 mRNA 质量良好,可用于后续 Real-time PCR 定量分析。

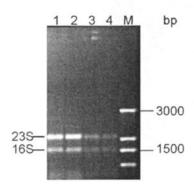


图 4-2 细菌总 RNA 电泳图: 泳道 M 参照分子量 DNA; 泳道 1、2 元素硫培养基质; 泳道 3、4 硫酸亚铁培养基质

Fig. 4-2 Electrophoresis of total RNA: M molecular weight marker; Lane 1 and 2 S⁰ media; Lane
3 and 4 Fe²⁺ media

4.3.3 cDNA 质量分析

在逆转录反应中经常加入RNase抑制剂以增加cDNA合成的长度和产量。逆转录酶催化RNA转化成cDNA。反转录酶在本身的聚合酶活性之外,具有内源RNase H活性。RNase H活性同聚合酶活性相互竞争RNA模板与DNA引物或cDNA延伸链间形成的杂合链,并降解RNA-DNA复合物中的RNA链。被RNase H活性所降解的RNA模板不能再作为合成cDNA的有效底物,降低了cDNA合成的产量和长度。因此消除或大大降低逆转录酶的RNase H活性将会大有裨益。

较高的保温温度有助于RNA二级结构的打开,增加了反应的产量。包括甘油和DMSO在内的添加剂加到第一链合成反应中,可以减低核酸双链的稳定并解

开RNA二级结构,使用较好的RNA分离方法,如Trizol Reagent,会减少RNA制备物中沾染的基因组DNA。为了避免产生于基因组DNA的产物,可以在逆转录之前使用扩增级的DNase I 对RNA进行处理以除去沾染的DNA。经NanoDrop[®]微量分光光度计检测,吸光光谱曲线平滑,260 nm处最大吸收峰,OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.75~1.85之间,另一纯度指标OD₂₆₀/OD₂₃₀比值总体略大于OD₂₆₀/OD₂₈₀,约为1.90~2.20,数据表明cDNA样品的纯度较高,可用于后续试验。

4.3.4 Real-time PCR 用于对硫活化相关功能基因的验证结果分析

以不同拷贝数的阳性模板的对数为横坐标,以PCR反应过程中到达荧光阈值的初始循环数(Ct)为纵坐标得到所挑选的10个相关功能基因的标准曲线(图4-3,以基因 AFE_2621 为例),各标准曲线Real-time PCR扩增的动力学方程相关系数0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,在0.993,在0.993,PCR扩增效率为0.993,在0.993,在0.993,PCR扩增效率为0.993,在0.993,PCR扩增效率为0.993,在0.993,在0.993,PCR扩增效率为0.993,在0.993,在0.993,PCR扩增效率为0.993,在0.993,在0.993,PCR扩增效率为0.993,在0.993,PCR扩增效率为0.993,在0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩增效率为0.993,PCR扩射效率为0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和0.993,PCR扩度和

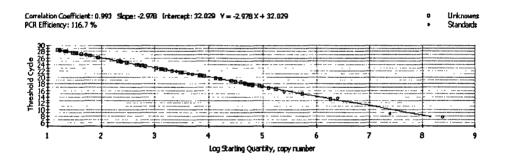


图 4-3 AFE_ 2621 基因目的片段实时定量 PCR 的标准曲线

Fig. 4-3 The standard curve for real-time PCR measurement of gene AFE_2621

各样品的溶解曲线均为单一吸收峰,无非特异性产物及引物二聚体等生成,表明引物特异性良好,以基因*AFE_2621*为例,如图4-4。Real-time PCR结果准确反映样品初始浓度。

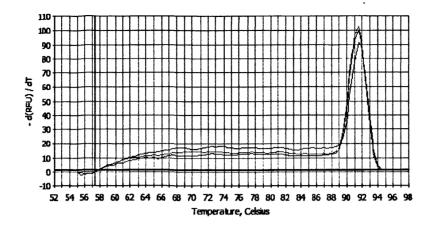


图 4-4 基因 AFE_2621 扩增产物的熔解曲线 Fig. 4-4 Dissolution curve of gene AFE 2621

所选10个硫活化相关基因的在元素硫和亚铁基质中表达差异结果见表4-2。由表中结果可知,与亚铁中生长的A. ferrooxidans菌相比,元素基质硫中生长细菌相关基因的相对表达量明显高于亚铁中生长细菌的表达量。其中AFE_2537和AFE_0927的表达量分别达到141.1和214.3倍,其他基因的表达量也明显有所上调,编码菌毛蛋白的基因AFE_2621、编码vacJ脂蛋白的基因AFE_0982、编码类多聚糖脱乙酰基家族蛋白的基因AFE_0927和两个保守未知基因AFE_2537、AFE_0206 上调倍数分别为24.5,12.3,214.3,141.1,4.9。另外两个位置基因AFE_2857和AFE_2770上调倍数分别为8.2和19.9。这说明挑选出的这10个基因与元素硫的活化转运存在明显的关联性。

表 4-2 所挑选的基因在元素硫和亚铁基质中表达情况

Table 4-2 Selected Acidithiobacillus ferrooxidans genes upregulated in response to S⁰ and Fe²⁺

基因座	名称	倍数变化 S ⁰ / Fe ²⁺
AFE_0982	vacJ lipoprotein	12.3
AFE_2621	pilin, putative	24.5
AFE_2537	conserved hypothetical protein	141.1
AFE_0859	hypothetical protein	19.5
AFE_0206	conserved hypothetical protein	4.9

AFE_1006	hypothetical protein	23.97
AFE_0927	polysaccharide deacetylase family protein	214.3
AFE_2857	hypothetical protein	8.2
AFE_2770	hypothetical protein	19.9
AFE_1932	Ser-Thr protein phosphatase family protein	51.0

由第三章内容知挑选的 10 个基因所合成蛋白质在元素硫培养基质中较亚铁基质中为高量表达,我们初步推测这些基因与硫活化相关。结合已有的研究结果和 A. ferrooxidans 全基因组基因信息,采用 Real-time PCR 方法对 10 个可能与硫活化相关的基因进行转录水平表达差异研究,结果表明所挑选的基因与在元素硫基质中相比亚铁基质中表达量明显上调,这有力的证实了第三章双向电泳结果,也支持了这些基因与硫活化相关的推测。

4.4 本章小结

本章采用实时定量 PCR(Real-time PCR)方法对 10 个可能与硫活化相关的基因进行转录水平表达差异研究。结果表明,与亚铁中生长的 A. ferrooxidans 菌相比,元素硫中生长细菌相关基因的相对表达量明显上调,其中 AFE_2537 和 AFE_0927 的表达量分别达到 141.1 和 214.3 倍,其他基因的表达量也明显有所上调。这证明了 A. ferrooxidans 中这些基因与元素硫的活化氧化的关联性。

第五章 硫活化相关胞外蛋白质的原核表达、纯化及其功能 验证

嗜酸硫氧化细菌对元素硫的吸附/活化过程是整个氧化过程的第一步,细菌对元素硫的吸附与活化由胞外蛋白质完成^[99],前面章节对元素硫基质中高量表达的蛋白质进行了分离、鉴定,对其在细菌活化与吸附元素硫的作用进行了推测,并采用 Real-time PCR 方法对硫活化相关基因进行了验证。本章选取了可能与硫氧化相关的典型胞外蛋白质(AFE_2621)进行了原核表达与纯化,并对其特征与功能进行了研究,以期为更好的研究细菌对元素硫的活化、氧化提供依据。

5.1 实验材料

5.1.1 菌种

实验所用菌株为嗜酸氧化亚铁硫杆菌标准菌株ATCC 23270。菌株在含有硫酸亚铁为能源的基质中传代培养,将达到对数生长期的细菌培养物10000 rpm离心15 min。收集所得菌体用pH 2.0的稀硫酸溶液洗涤3次,以除去细胞表面的铁沉淀物。

所需质粒来源菌株为大肠杆菌(Escherichia coli, E. coli)标准菌株。菌株在LB培养基中传代培养,将达到对数生长期的细菌培养物5000 rpm离心15 min。得到的菌体用去离子水(或灭菌单蒸水)洗涤3次,以去掉细胞表面的沉淀物和杂质。

5.1.2 培养基

1、培养基

采用改进的 9K 培养基: $(NH_4)_2SO_4$ 3.0 g,KCl 0.1 g,K₂HPO₄ 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,Ca(NO₃)₂ 0.01 g,蒸馏水 1000 mL,pH 2.0。在改进的 9K 培养基的基础上,添加硫酸亚铁 44.2 g/L。

2、LB培养基

将下列组分溶解在 0.9 L 水中:蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g。如果需要用 NaOH 调整 pH 至 7.0,再补水至 1 L,121 ℃灭菌 20 min。

LB 固体培养基琼脂平板需添加琼脂粉 12 g/L (也可以使用购自上海生工生物工程公司的 LB 培养基)。

3、TB 培养基

将下列组分溶解在 0.9 L 水中:蛋白胨 12 g,酵母提取物 24 g,甘油 4 mL。各组分溶解后 121 ℃灭菌 20 min。冷却到 60 ℃,再加 100 mL 灭菌的 170 mmol/L $KH_2PO_4/0.72$ mol/L K_2HPO_4 的溶液(2.31 g 的 KH_2PO_4 和 12.54 g K_2HPO_4 溶在足量的水中,使最终体积为 100 mL。高压灭菌或用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌)。

4、SOB, SOC 培养基

SOB 培养基: 下列组分溶解在 0.9 L 水中: 蛋白胨 20 g ,酵母提取物 5 g , 氯化钠 0.5 g, 1 mol/L 氯化钾 2.5 mL。用水补足体积到 1 L。分成 100 mL 的小份,高压灭菌。培养基冷却到室温后,在每 100 mL的小份中加 1 mL灭菌的 1 mol/L 氯化镁。

SOC 培养基方法同 SOB 培养基的配制,只是在培养基冷却到室温后,除了在每100 mL的小份中加1 mL灭菌的1 mol/L 氯化镁外,再加2 mL灭菌的1 mol/L 葡萄糖(18 g 葡萄糖溶于足够水中,再用水补足到100 mL,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌)。

培养基所用试剂购自上海生工生物公司,均为分析纯。

5.1.3 A. ferrooxidans 菌基因组抽提试剂

EZ-10 Spin Colum Genomic DNA Isolation Kit 柱式 DNA 抽提试剂盒(含有TE, Digestion Buffer, Washing Solution, Elution Buffer),蛋白酶 K, 无水乙醇。 试剂盒购自生工生物公司。

5.1.4 PCR 产物回收

UNIQ-10柱式 PCR 产物回收试剂盒(含有 UNIQ-10 Column, Collection Tube, Binding Buffer I, Washing Solution, Elution Buffer),无水乙醇(Alcohol)。

试剂盒购自生工生物公司。

5.1.5 DNA 快速纯化回收

普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(含有平衡液,溶胶液,漂洗液,洗脱缓冲液,吸附柱,收集管),无水乙醇。试剂盒购自天根生物公司。

5.1.6 质粒提取试剂

1、质粒提取试剂盒:

EZ-10 Spin Colum Genomic DNA Isolation Kit 柱式质粒抽提试剂盒(含有 Solution I , Solution II , Solution III , Washing Solution, Elution Buffer),无水 乙醇 (Alcohol)。

2、煮沸法提取质粒试剂:

STET: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 5% (V/V) Triton X-100; 乙酸钠 3.0 mol/L, pH 5.2; TE (pH 8.0), 含有 20 μg/mL 的 RNase A。

5.1.7 不连续体系 SDS-PAGE 电泳

1、10% (W/V) SDS 溶液

称取 SDS 5 g, 加重蒸水至 50 mL, 微热使其溶解,置试剂瓶中,室温储存。 SDS 容易形成结晶,用前摇匀,使其完全溶解。

2、10%过硫酸铵

称取过硫酸铵 0.1 g,加重蒸水至 1 mL。新鲜配置使用,4 ℃储存。

3、样品溶解液

内含 1% SDS, 1%巯基乙醇, 40%蔗糖或者 20%甘油, 0.02%溴酚兰, 0.01 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液。

先配置 0.05 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 称取 Tris 0.6 g, 加入 50 mL 双 蒸水, 再加入 3 mL 1 mol/L HCl, 调节 pH 至 8.0, 最后用双蒸水定容 100 mL。

4、30%凝胶贮存液

称取 30 g 丙烯酰胺 (Acr), 0.8 g 甲叉双丙烯酰胺 (Bis), 溶于双蒸水中最后定容 100 mL, 过滤后置于棕色瓶中, 4 ℃储存。

5、电泳缓冲液

浓缩胶缓冲液(0.5 mol/L pH 6.7 Tirs-HCl 缓冲液)。 称取 Tris 6.0 g,加入少许双蒸水使其溶解,再加入 1 mol/L HCl 约 48 mL 调节 pH 至 6.7,最后加双蒸水定容 100 mL,4 $^{\circ}$ C储存。

电极缓冲液(内含 0.1% SDS, 0.05 mol/L Tirs-0.384 mol/L 甘氨酸缓冲液 pH 8.3): 称取 Tris 6.0 g, 甘氨酸 28.8 g, 加入 SDS 1 g, 加双蒸水使其溶解最后定容至 1000 mL。

6、染色液

0.25 g 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 溶于 90 mL (甲醇:水=1:9)及 10 mL 冰醋酸。

7、脱色液

方法一: 300 mL 甲醇, 100 mL 冰醋酸,加双蒸水定容 1000 mL。

方法二: 50 mL 乙醇, 70 mL 冰醋酸, 加双蒸水定容 1000 mL。

所有试剂购自天恒化学试剂公司,均为化学纯,水为双蒸水。

5.1.8 蛋白亲和纯化试剂

1、0.2 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(作为母液 I)

方法一: 称取 5.3 g K_2HPO_4 (分子量 228.22),1.4 g KH_2PO_4 (分子量) 定容至 200 mL 双蒸水中,4 $\mathbb C$ 储存。

方法二: 0.2 mol/L KH₂PO₄ 190 mL 加 0.2 mol/L K₂HPO₄ 810 mL 混合得到母液 I 。

母液 I 稀释 10 倍后得到母液 II。

2、Start Buffer (作为母液III)

方法一: 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液, 0.5 mol/L NaCl (分子量 58.5), 4 ℃储存。

方法二: 母液 II 100 mL 加入 29.25 g NaCl 再加双蒸水定容到 1 L 得到母液 III。

0.5 mol/L NiSO₄ (分子量 262.85): 称取 NiSO₄ 131.4 g 定容 1000 mL 蒸馏水中, 4 ℃储存。

3. Washing Buffer

方法一: 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液,0.5 mol/L NaCl,0.05 mol/L we (Midaxole,化学名称: 1,3-二氮杂环戊二烯,别称为 1,3-二氮唑间二氮茂,分子式: C_3 HaN₂,分子量 68.08),4 %

方法二: 母液Ⅲ 100 mL 加 0.34 g 咪唑。

4. Elution Buffer

方法一: 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L 咪唑, 4 ℃储存。

方法二: 母液III100 mL 加 3.4 g 咪唑。

5、EDTA 洗脱液

方法一: 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液, 0.5 mol/L NaCl, 0.05 mol/L EDTA (英文名: EDTA-2Na, EDTA Disodium Salt; 分子式: CH₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O, 分子量 373.2), 4 ℃储存。

方法二: 母液III 100 mL 加 1.46 g EDTA。

Hitrap chealting HP 柱购自 Amersham,规格为 1 mL。

所有试剂购自天恒化学试剂公司,均为化学纯,水为双蒸水。

5.2 实验方法

5. 2. 1 DNA 提取

细菌基因组提取参照 EZ-10 Spin Colum Genomic DNA Isolation Kit 柱式 DNA 抽提试剂盒说明书进行。

5.2.2 引物和 PCR 扩增

寡聚合苷酸引物购于上海生物工程有限公司,引物设计的序列是根据 A. ferrooxidans ATCC 23270 (http://www.tigr.org) 基因组相关开放阅读框 AEF_2621 推断而来。应用 PCR 技术从 A. ferrooxidans ATCC 23270 基因组中扩增目的基因。

设计引物分正向引物(Forward)和反向引物(Reverse)两部分。

Forward 为:保护碱基 CGCGC+酶切位点+核糖体结合为点 AGGAGGA+ATTTAAA + 起始密码子 ATGAGAGGATCG + 编码六个组氨酸CATCACCATCACCATCAC+所需片段。所需片段为编码所需蛋白的基因序列去掉前三个起始位点后,选择33个碱基。

Reverse 为: 所需片段为编码所需蛋白的基因序列,反向去掉最后三个起始位点后,选择 33 个碱基。

AFE 2621 的引物设计结果如下:

Forward (2621-F) 为

5'-CGCGCGAATTCAGGAGGAATTTAAAATGAGAGGGATCGCATCACCAT CACCATCACAGCATGCTTGTCAAGAAGGCGCAGGCCC-3';

Reverse (2621-R) 为

5'-CTGCAGGTCGACTTAGCTAACTCCACCATTGGGGGACACGCTGACC3'.

其中 5'G'TCGAC 为 Sal I 的酶切位点, 5'G'AATTC3'为 Eco R I 的酶切位点, CATCACCATCACCATCAC 为六个组氨酸标签。所有酶购自生工生物公司。

PCR 扩增反应体系 (50 μ L): 1.0 μ L (20 μ mol) 引物,1.5 U (1.5 μ L) *Taq* DNA 聚合酶 (Fermentas),5 μ L10×PCR 缓冲液,1 μ L (10 μ mol/L) dNTPs,4 μ L (25 μ mmol/L) MgCl₂,1 μ L DNA 模板,加入已灭菌双蒸水补至 50 μ L。DNA 扩增过程: 93 μ C加热 3 μ min 后,进入 29 个编程循环过程(较少循环次数有利于减少碱基错配),如下:93 μ C,30 s 变性;65 μ C,30 s 退火;72 μ C,30 s 延伸,然后72 μ C,7 μ min 延伸:循环完成后 4 μ C保存。

以 A. ferrooxidans ATCC 23270 的基因组作为模板,在 Bio-Rad PCR 仪上进行扩增。获得 PCR 产物后,取部分反应混合物用 1 %琼脂糖凝胶电泳检测。

5.2.3 表达载体的构建和目标蛋白质的表达

1、酶切 PCR 产物及载体 pLM1

PCR 产物用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物回收试剂盒回收后,进行双酶切。

AFE_2621 的 PCR 纯化产物和载体 pLM1 使用 Sal I 和 EcoR I 双酶切, 酶切体系为: PCR Product 30 μL, Sal I 5 μL, EcoR I 5 μL, Buffer O 10 μL, 37 ℃酶切 2-3 h。

2、载体和目的片段连接反应

经过过夜酶切后的 PCR 产物和载体 pLM1 分别电泳,用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物回收试剂盒切胶回收后进行连接。

连接体系为: PCR 产物 18 μL, 载体 pLM1 8 μL, T4 DNA Ligase 1 μL, Ligase Buffer 3 μL。室温连接过夜。

3、转化

①短暂离心连接产物(pLM1-2621),并置于冰上。

- ②冰上融解感受态细胞(DH5α, TIANGEN, 10 μL)一支。
- ③将 10 µL 连接产物加入感受态细胞中, 冰上混匀。
- ④冰上放置 30 min, 剩余连接产物-70 ℃保存。
- ⑤42 ℃水浴热激 90 s, 迅速转移到冰上放置 3~5 min。
- ⑥加入 300 µL SOC, 37 ℃, 220 rpm, 培养 45 min~1 h。
- ⑦将 37 ℃培养的转化产物取 20 μL 涂布含有 50 μg/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 固体平板, 37 ℃正置 1 h 后倒置培养过夜。

4、阳性克隆的筛选

- ①从过夜培养的平板中挑选单克隆(10 个,编好号码)至 10 mL LB(含有 50 μg/ml Amp)中,37 ℃,220 rpm 培养过夜。
 - ②取 1 mL 菌液至 1.5 mL 离心管中, 10000 rpm,离心 2 min, 彻底除去上清。
- ③菌体重新悬浮于 350 μL STET 缓冲液中,加入 25 μL 新鲜配制的溶菌酶溶液, 旋转混匀。EP 管于沸水中精确放置 40 s。
 - ④12000 rpm, 离心 10 min, 将上清倒入洁净的离心管中。
- ⑤在上清中加入 $40 \, \mu L$, $2.5 \, mol/L$ 乙酸钠 (pH 5.2) 和 $420 \, \mu L$ 异丙醇以沉淀核酸。震荡混匀,并在室温下放置 $5 \, min$ 。
 - ⑥12000 rpm, 离心 10 min, 回收核酸。
- ⑦用 50 μL 含有 RNase A 的 TE (pH 8.0)溶解核酸,轻轻漩涡混匀。置-20 ℃ 保存。
- ⑧将提取出的质粒取出 8 μL,进行双酶切,37 ℃,酶切 2 h 后进行 1 %琼脂糖凝胶电泳,以鉴定是否插入了所需片段,确定阳性克隆。
- ⑨将确定的阳性克隆送样测序,测序结果正确的克隆为最终所需的阳性克隆。
 - 5、蛋白质表达转化
 - ①取阳性克隆质粒 10 µL,置于冰上。
 - ②冰上融解感受态细胞(BL21)一支。
 - ③将 10 μL 连接产物加入感受态细胞中,冰上混匀。冰上放置 30 min。

- ④42 ℃水浴热激 90 s, 立即放在冰上 3-5 min。
- ⑤加入 300 μL SOC, 37 ℃, 220rpm, 培养 45 min。
- ⑥将转化产物倒入含有 100 μg/mL Amp 的 10 mL LB 中, 37 ℃振荡培养过 夜。

6、蛋白质的条件表达

将过夜活化的转化产物分别接种至 10 mL LB(含有 100 μg/mL Amp)中,37 ℃,220 rpm,培养至 OD 值 0.6 后,加入不同浓度的 IPTG (0 m mol/L, 0.5 m mol/L, 1.0 mmol/L, 2.0 mmol/L),分别在室温及 37 ℃下培养 6 小时以上,然后 10000 rpm 离心 2 min 收集细菌,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白质表达情况 [107-109]

7、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

①凝胶的配制[110]及凝胶板的准备

表 5-1 SDS-不连续体系胶配制

Table 5-1 The gel composition of SDS-PAGE

	配制		配制	
试剂	10 ml 5%浓缩胶	试剂	10 ml 15 %分离胶	
	所用各种试剂		所用各种试剂	
30%凝胶贮存液	1.7 mL	30%凝胶贮存液	5.1 mL	
水	5.7 mL	水	2.3 mL	
浓缩胶缓冲液	2.5 mL	分离胶缓冲液	2.5 mL	
10%过硫酸铵	50 μL	10%过硫酸铵	50 μL	
10 % SDS	100 μL	10 % SDS	100 μL	
TEMED	5 μL	TEMED	5 μL	

按上表配制 15 mL 分离胶,混匀后缓慢加入凝胶板中,约 15 cm 高。尽量避免气泡。取少许蒸馏水,沿凝胶板板壁缓慢加入,约 2 cm 高,以水封胶。约 40 min 后,凝胶与水封层间出现折射率不同的界线,则表示凝胶完全聚合。倾去水封层的蒸馏水,再用滤纸吸去多余水分。再按上表配制 5 mL 浓缩胶,混匀后用缓慢加入凝胶板中,直至距离凝胶短板上沿 0.5 cm 处,轻轻将梳子插入胶中,约 40 min 后,胶凝固。放置 30 min 使胶充分聚合,小心拔去梳子,将凝胶板放入电泳槽中,并将 pH 8.3 的电泳缓冲液倒入电泳槽内,应没过短板 0.5 cm 以上,即可准备加样。

②样品的处理与加样

按照 1:1 的比例加上样缓冲液和蛋白质样品于 EP 管中,100 ℃沸水中煮 5 min。剩余或未及时使用的处理好的样品可于-20 ℃长期保存,使用前在沸水中加热 5 min,以除去亚稳态聚合。一般蛋白质电泳加样为 15 μL。(如果样品槽中有气泡,应尽量赶出。)

③电泳及染色脱色

开始时电流为 15 mA, 待样品进入分离胶 1 cm 处后, 恒定电流 20 到 30 mA, 继续电泳。当染料前沿跑至距凝胶板底部时, 停止电泳。

电泳结束后取出凝胶板,用刀片小心切去上层浓缩胶,然后将下层分离胶放入染料中进行染色,40 min 后,染色结束,倒出染色液,加入配制好的脱色液,进行脱色。

4)凝胶的保存

- a) 将充分脱色的凝胶放在配制好的胶保存液中 3~5 min。
- b) 取一张胶保存膜充分浸泡在胶保存液中,时间不能超过30 s。
- c) 把胶保存架放置在干净平整处,将浸泡在胶保存液中的膜平整的铺在架子上,尽量避免气泡。然后将胶小心放在膜上,赶走所有气泡。
- d) 另取一张膜浸泡在胶保存液中,30 s 后将此膜覆盖在胶上,使两张膜充分对齐,并赶走所有气泡。此时若有气泡存在,会引起胶的破裂。
- e) 用夹子固定好胶保存架,然后放在通风厨内,待膜干燥后,剪去凝胶周 围多余地方,即得封好的凝胶。

8、紫外分光光度计(UV Scanning)

紫外可见光谱扫描仪为 Techcomp UV-2300 分光光度计。波长为 220~700 nm 处全波长扫描,扫描温度为室温。

5.2.4 蛋白质的纯化

确定蛋白质最佳表达条件,即诱导剂 IPTG 浓度 0.5 mmol/L,表达温度为室温,然后进行蛋白的大规模表达及纯化。

将含有目标蛋白与载体正确连接质粒的菌液接种至 $400\,\text{ mL}$ LB 培养基($100\,\text{mg/L}$ Amp), $37\,^{\circ}$ ℃, $225\,\text{rpm}$ 培养至 OD 值 0.6,然后加入 $0.5\,\text{mmol/L}$ IPTG,室温下诱导培养过夜。

分别以 5000 rpm 离心 15 min 收集培养过夜的细胞, 弃去上清, 细胞沉淀用

蒸馏水洗 2 到 3 次,弃去上清。用 Start Buffer 悬浮得到的沉淀,充分混匀,加入 5 mg 溶菌酶,室温下裂解细胞 30 min。超声破碎室温裂解后的细胞悬液,以工作时间 2 s,间隔时间 3 s,工作次数 10 次为一组,共计超声 20 组,每组间隔 30 s,超声裂解后,4 $^{\circ}$ C,8500 rpm 离心 15 min,收集上清,即得粗蛋白。

使用 Hitrap chealting HP 柱纯化蛋白。首先用 5 mL 水洗柱一次,然后均匀打入 5 mL NiSO4,柱内的凝胶与 NiSO4 结合柱子变成蓝色。水洗去未结合的多余 Ni²⁺,然后用 5~7 mL Start Buffer 平衡柱子。柱子平衡后,将粗蛋白均匀打入柱内,然后用 5 mL Washing Buffer 洗柱子,此时不含有六个组氨酸标签的蛋白质因为结合能力不强,随着 Washing Buffer 被洗下。用 Elution Buffer 洗蛋白,Elution Buffer 内含有高浓度的咪唑,破坏了组氨酸标签与金属 Ni²⁺离子的结合,目标蛋白随着 Elution Buffer 洗下。收集此时洗下的 3 mL 样品,1 mL/管,共计三管分别命名为 Elution1,Elution2,Elution3,用于分析。Elution 2 取出 0.5 mL 进行透析过夜后取出,用于分析。

透析液的成分 (500 mL): 50 mL PBS, 2.5 mL 甘油,200 μ L β -- 巯基乙醇, 450 mL 双蒸水。

5.2.5 含硫模式化合物

参照George G N^[111]和Dahl C^[112]课题组研究中所选择含硫模式化合物,一系列含硫化合物包括:过硫酸钾,硫酸锌,连四硫酸钾,硫代硫酸钠,亚硫酸钠,甲硫氨酸,还原型谷胱甘肽,氧化型谷胱甘肽,胱氨酸,半胱氨酸,单质硫,黄铁矿被选为模式化合物。所有试剂均为分析纯,实验操作时,所有粉末样品均涂抹在样品架上不含硫的自吸附真空导电胶带上(SPI),再置于样品窗中分析检测。

5.2.6 XANES 光谱测定

XANES 光谱测量在北京同步辐射装置中能软 X 射线站(4B-7A)实验站完成。实验运行条件如下: 同步辐射储存环能量为 2.5 GeV, 实验线站能量覆盖为 2100 eV~6000 eV, 电子流强度为 80~180 mA; 从储存环中引出同步辐射光经 Si (111) 平面双晶单色器获取实验所需能量,为了减少空气对 X 射线的吸收,中能站的整个光路都保持在超真空状态;鉴于我们样品中含硫化合物浓度较低,实验模式为荧光模式;荧光信号由具有能量分辨的 Si (Li) (PGT) 固体探测器收集,探测器垂直于束流入射方向;利用硫酸锌在高能端 2480.4 eV 所出峰来校准测量系统(因为从同步辐射储存环引出光在能量强度上会有一些变化,这可能导致不同批次实验结果能量峰会发生一定的偏移,因此我们在每一批次样品中均加入了硫酸锌样品,作为整个实验的能量参照标准);能量扫描范围为 2420~2520 eV,扫

描步长区间为 $2420\sim2460$ eV 为 0.6 eV, $2460\sim2490$ eV 为 0.2 eV; $2490\sim2520$ eV 为 0.6 eV,根据样品情况,我们在不同能量段会适当调整扫描步长。

5.3 结果与讨论

5.3.1 A. ferrooxidans 中菌毛蛋白 AFE 2621 基因的克隆

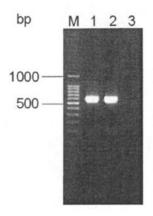


图 5-1 菌毛蛋白 AFE_2621 基因 PCR 产物电泳图:琼脂糖凝胶电泳-泳道 1、2 基因 AFE 2621 的 PCR 扩增产物;泳道 M 参照分子量 DNA;泳道 3 空白对照

Fig. 5-1 Agarose gel electrophoresis of the PCR product of AFE_2621 gene cloned from A. ferrooxidans genome by PCR: Lane 1 and 2, AFE 2621; Lane M, DNA markers; Lane 3, Blank

图 5-1 为菌毛蛋白 PCR 产物电泳图, PCR 扩增产物经 1 %的琼脂糖凝胶电泳分析, 有 500 bp \sim 600 bp 的条带出现, 为基因 *AFE 2621* 的 PCR 产物。

5.3.2 连接反应及阳性克隆的筛选

连接反应后,从平板上挑选 8 个克隆,于 37 °C, 200 rpm 振荡培养过夜。 分别提取这 8 个克隆的质粒进行双酶切分析,重组载体 pLM1-2621 成功地转入 $E.\ coli\ BL21$ 后,经提取重组质粒 pLM1-2621 及用 $Sal\ I$ 和 $EcoR\ I$ 双酶切产物的电泳,证实了目的基因的成功插入(图 5-2),又经测序验证序列在克隆过程中没有发生碱基突变,在插入到表达载体中没有发生移码突变。

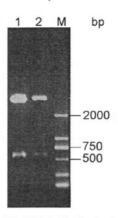


图 5-2 pLM1-2621 质粒的双酶切产物电泳图: 泳道 1、2 pLM1-2621 质粒的双酶切产物; 泳道 M 参照分子量 DNA

Fig. 5-2 Agarose gel electrophoresis the *AFE-2621* gene cut out from pLM1-2621 plasmid by *Sal* I and *EcoR* I double enzyme digestion: Lane 1 and 2, *AFE-2621* gene cut out from pLM1-2621 plasmid by double enzyme digestion; Lane M, DNA markers

5.3.3 表达产物的 SDS-PAGE

对已成功插入目的基因的E. coli BL21进行诱导后,将收集到的蛋白样品经一步亲和层析法分离,得到纯化的菌毛蛋白,纯度较高。图5-3为菌毛蛋白电泳图,其中左侧为蛋白质Marker,右侧为样品。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白质表达情况时,在18 kDa左右有明显表达带。电泳分析可以观察到菌毛蛋白在大肠杆菌中的表达量很高,而且分子量大小与预期结果相同。大规模表达及纯化并经超声裂解细菌后,超声上清中含有可溶性的天然表达菌毛蛋白。

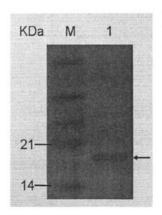


图 5-3 菌毛蛋白 AFE_2621 SDS-PSGE 电泳图: 泳道 M 蛋白质参照分子量; 泳道 1 菌毛蛋白 AFE_2621 Fig.5-3 SDS-PAGE of the purified pilin AFE_2621: Lane M molecular weight Maker; Lane 1 pilin AFE_2621

5.3.4 UV/Vis 分析菌毛蛋白

取纯化后的菌毛蛋白 10 μL 用双蒸水稀释至 500 μL,在室温下用紫外可见光谱扫描仪进行紫外可见分光光度分析,扫描结果如图 5-4 所示,在 280 nm 处有特征峰,在其它波段无吸收峰,推测该蛋白质没有明显的显色辅基。

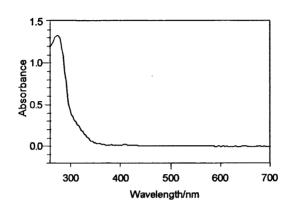


图 5-4 菌毛蛋白的紫外扫描图 Fig.5-4 UV-vis scanning of pilin

5.3.5 亚铁和单质硫中生长细胞及两种培养基质中细胞胞外蛋白中硫的 XANES 光谱

由亚铁(图 5-5A)和单质硫(图 5-5B)中生长细胞硫的 X 射线吸收近边结 构(XANES)光谱可知, 亚铁中生长细胞中硫的吸收光谱主要源于含硫氨基酸如甲 硫氨酸和半胱氨酸的吸收,因为在 2.4714 KeV 处吸收峰为这些含硫氨酸中 C-S 键合的特征吸收峰。单质硫中牛长细胞在 2.4705 KeV 和 2.4741KeV 处出现吸收 峰,这说明在单质硫中生长时细胞胞内有硫颗粒的累积[113,114],但是这种累积过 程与 Prange 等[113]所报道的光合硫细菌不同,后者在硫化钠中厌氧生长时会有硫 的累积过程和硫球的分解过程。我们的实验结果发现在细胞的整个生长过程中细 胞胞内一直有硫颗粒的出现,因为在 2.4705 KeV 处一直有单质硫中 S-S 键合的 特征吸收峰,并且在该处也一直存在吸收峰,这属于巯基的 Rydberg[113]吸收峰, 这说明细胞在单质硫中生长时富含巯基的蛋白或酶参与了硫的氧化过程。将亚铁 和单质硫中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白样品冷冻干燥后,在 X 射线实验站收 集样品中硫的 XANES 光谱 (图 5-6)。通过比较两种培养基中生长时收获胞外蛋 白样品中硫的吸收光谱与半胱氨酸的吸收光谱发现,单质硫中生长细胞胞外蛋白 在 2.4711KeV 处具有强的吸收峰, 这是半胱氨酸和甲硫氨酸中 C-S 键合的特征 吸收峰,并且在单质硫中生长细胞胞外蛋白的吸收峰在峰的高度和宽度和半胱氨 酸的特征吸收峰都较为相近,这说明其特征吸收峰主要是源于半胱氨酸;而相比

之下亚铁中生长细胞胞外蛋白在此处吸收峰较弱,这说明单质硫中生长细胞胞外蛋白中半胱氨酸的相对含量明显增加;因为胞外蛋白样品未经透析处理,所以亚铁和单质硫中生长的细胞胞外蛋白在 2.4804 KeV 处有硫酸盐的特征吸收峰。

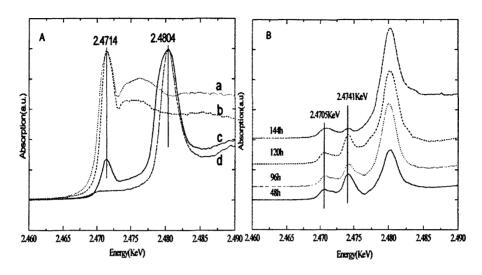


图 5-5 (A) a 甲硫氨酸, b 半胱氨酸, c 亚铁中生长细胞, d 硫酸盐; (B)单质硫中生 长不同时期的 A. ferrooxidans 细胞中硫的 K 边 XANES 光谱

Fig.5-5 The sulfur K-edge XANES of (A) a, methionine, b cysteine, c, the cells grown on ferrous sulfate, d, sulfuate) (B) the cells in different growth period in elemental sulfur

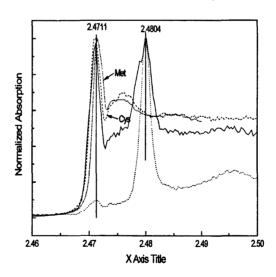


图 5-6 半胱氨酸 (虚线)、A. ferrooxidans 在亚铁 (点线)和单质硫 (实线)中生长的细胞胞 外蛋白硫的 K 边 XANES 光谱

Fig.5-6 The sulfur K-edge XANES of cysteine(dashed line) and extracellular protein of cells grown on ferrous sulfate(dotted line) and elemental sulfur(solid line)

5.3.6 A. ferrooxidans 胞外菌毛蛋白的硫的 XANES 光谱

将纯化的菌毛蛋白样品冷冻干燥后在 X 射线光谱站收集硫的 XANES 光谱,其谱图与半胱氨酸吸收谱比较发现(图 5-7a),菌毛蛋白中富含硫的氨基酸的吸收峰与半胱氨酸的吸收峰形状在吸收边前较为相似,我们利用半胱氨酸和甲硫氨酸对样品光谱进行拟合(图 5-7b),从拟合光谱来看甲硫氨酸和半胱氨酸对样品光谱贡献分别占 17.5% 和 82.5%,拟合光谱和实验光谱之间的差异为 0.84。

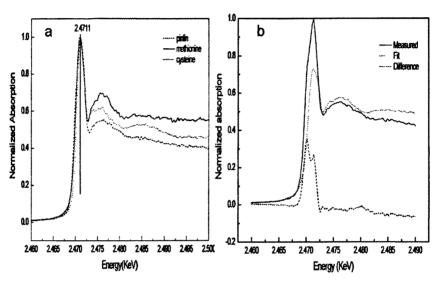


图 5-7 a, 半胱氨酸(点线)、甲硫氨酸(实线)和 A. ferrooxidans 的菌毛蛋白 AFE_2621 (虚线)硫的 K 边 XANES 光谱; b, A. ferrooxidans 的菌毛蛋白 AFE_2621 的测量谱和拟合谱及测量谱和拟合谱之间的差减谱

Fig.5-7 a, Sulfur K-edge XANES of cystein (dotted line) methionine (solid line) and the pilin (dashed line) AFE_2621 of *A. ferrooxidans*, b, the spectra of the measured pilin (solid line) AFE_2621 of *A. ferrooxidans*, the fitted spectrum and the difference between the measured and the fitted spectra.

尽管拟合结果不是很理想,但是从目前结果来看鞭毛蛋白中含硫氨基酸的吸收峰主要也是来自于半胱氨酸中硫的吸收。

5.3.7 菌毛蛋白序列的同源比对

对来源不同的菌毛蛋白序列进行同源比对,结果如图 5-8 所示。其中 Vp 为来自于 Variovorax paradoxus 的菌毛蛋白; Js 为来自于 Jeanthinobactrium sp. Marseille 的菌毛蛋白; Ps 为来自于 Pseudomonas syringae 的菌毛蛋白; Vs 为来自于 Vibrio splendidus 的菌毛蛋白; Vr 为来自于 Vibrio parahaemolyticus 的菌毛蛋白; Vv 为来自于 Vibrio vulnificus 的菌毛蛋白; Af 为来自于 Acidithiobacillus

ferrooxidans 的菌毛蛋白; Sf 为来自于 Syntrophobacter fumaroxidans 的菌毛蛋白。

其中完全相同的氨基酸用*标出,根据序列相似的程度分别用:或.标出。使用 ClustalX 软件^[105]进行序列比对。

来源于A. ferrooxidans 的菌毛蛋白与其它细菌的菌毛蛋白在前50个氨基酸有一定的同源性,之后同源性很低。

```
Vp : --MNVRTLRSRAQAGFTLIELMIVVAIIGILAAVALPAYQDYTAKA-QIT : 47
Js: ----MKMMKKAQSGFTLIELMIVVAIIGILAAVALPAYQDYTVKA-KVQ: 44
Ps: -----MNAQKGFTLIELMIVVAIVGILAAVAIPSYQNYAKKA-AYT: 40
Vs: ---MNNKNKRMNQKGFTLIELMIVVAIIGVLSAIAVPAYKDYVSKS-EAS: 46
Vr : ---MKHS-KQKKQQGFTLIELMIVVAIIGVLAAAAIPAYONYVTRS-EVT : 45
Vv : --MMKKLNKTKKQQGFTLIELMIVVAVIGVLAAIAIPQYQNYVKKS-EAA : 47
Af: MSMLVKKAQARAEAGFTLIELMIVIAIIGILAAIAIPQYEQYIVTS-KAS: 49
Sf: ----MFIKMRESKGFTLVELMIVVAIIGILAAVAVPYYQKYIQKSRMVS: 45
                . ****:****:*:*:*:* *:* *:.*
Vp : EAITLADGVKKN--IELSFPODNTCPANASAAVGDIGIKTDINGKYILSV : 95
Js: EAVSLSSPARTA--VGMACSEAALSAASTSNTTLQLAQDTEYSGKYTDKV: 92
Ps : EVLAAMASVKTA--VGVCAAQOGTVADCDTAAKVGVTLPSGATTGAVNKM : 88
Vs : SALATLKSLOTP--AELTFOEEGKLSTA--LSTLGISSGSNTLG--TLRV : 90
Vr : SGLATVKALITP--AELHYOENGIAAAAT-LAOLGVDVAANDLG--AIDS : 90
Vv : AGLATLRALTTN--IDTFIADTGSFPVDTDAATLGASLNMNKLG--TLSF : 93
Af: GVVANFKNALSQSTAAVAAAQAGQVTDLNTALNIAGSQDPAAAGNPAYTM: 99
Sf: KVFPGMHAIETN--MGTYFSFKNTLLDVGSTATFGQFVQDADTKCFSPSW: 93
Vp : ESAGTAA----TTGGCTVKSTFRGTGVNPKLVSKTITYALVYSVNGSK : 139
Js: AVTATSA----SEA--LVTITMKNGSISAIPNGATIVYTGTCGDGGLK: 134
Ps : EITATSA----AIT--ATPNAFKG---ILTTDTCSLTPAIAAAGSPVT : 127
Vs : SAQGSTG-----ANP-TSPAIEFKFVG-G-SLDQQTLTLSRDATTG--- : 128
Vv : ADSG-----ASG-ATATFTFNGTA-SALQSTDTVVLSKDATTGL-- : 120
Af: GSSPSFCGQVGVDTGGTLNPTGTVNSTFTSQATGIIINVDSKDCASTNLK: 149
Sf: AGEYLLI-----TIKDPTLCQELKALTGMTLSATPRMDTSRTKIRG---: 134
```

图 5-8 各种来源的菌毛蛋白的序列比对

Fig.5-8 The sequences alignment of pilin protein from various sources

Vp: Variovorax paradoxus S110; Js: Jeanthinobactrium sp. Marseille; Ps: Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000; Vs: Vibrio splendidus 12B01; Vr: Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633; Vv: Vibrio vulnificus; Af: Acidithiobacillus ferrooxidans; Sf: Syntrophobacter fumaroxidans MPOB. Residues conserved in all sequences are marked with*. Residues not conserved in all sequences but conserved in some sequences are marked with: or . based on the degree of conservation. The sequence alignment was made using ClustalX.

5.4 本章小结

首次利用硫的 K 边 XANES 光谱对单质硫中生长的 A. ferrooxidans 胞外蛋白进行分析,发现胞外蛋白的 XANES 光谱与半胱氨酸的 XANES 光谱较为接近,

这说明样品中含有大量含巯基的蛋白。

将分离鉴定的菌毛蛋白进行原核表达,利用最小二乘线形组合法对蛋白样品中硫的吸收光谱拟合发现,构成菌毛蛋白样品中的含硫氨基酸主要是半胱氨酸,从蛋白质层面证明了前面章节中得到的结果。这也是首次从蛋白质和硫的化学形态层面证明富含巯基的蛋白在单质硫活化氧化中扮演重要角色。

第六章 全文结论

本文通过水浴加热法分别提取元素硫和亚铁基质中A. ferrooxidans 胞外蛋白质,开展嗜酸氧化亚铁硫杆菌细胞胞外蛋白质的筛选、鉴定与活化功能验证的研究。通过这些研究,找到嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外与元素硫作用的巯基蛋白,为阐明硫的生物氧化过程和金属硫化矿的生物浸出机理提供基础数据。全文结论如下:

(1) 不同基质 (S^0/Fe^{2+}) 中嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外蛋白质差异表达谱研究

通过水浴加热法分别提取元素硫和亚铁基质中 A. ferrooxidans 胞外蛋白质,采用双向电泳方法对不同能源底物中蛋白质表达差异进行表征。对差异斑点进行分析,找出主要蛋白差异点。通过胶内原位酶解后进行 MALDI-TOF/MS 指纹的鉴定,并以酶自动降解峰进行校正,共获得 18 个蛋白质斑点的肽质量指纹图谱。对选取的 18 个蛋白质斑点,结合 MALDI-TOF/MS 信息分析,发现 18 个蛋白质中有 12 个是属于未知蛋白质。其中 6 个分子量较小的多肽序列中含有相对丰富的半胱氨酸残基(Cys)。

(2) 嗜酸氧化亚铁硫杆菌硫活化相关胞外蛋白质基因的分析和验证

结合已有的研究结果和 A. ferrooxidans 全基因组基因信息,采用实时定量 PCR(Real-time PCR)方法对 10 个可能与硫活化相关的基因进行转录水平表达 差异研究。结果表明,与亚铁中生长的 A. ferrooxidans 菌相比,元素硫中生长细菌相关基因的相对表达量明显上调,其中 AFE_2537 和 AFE_0927 的表达量分别达到 141.1 和 214.3 倍,其他基因的表达量也明显有所上调。这证明了 A. ferrooxidans 中这些基因与元素硫的活化氧化的关联性。

(3) 嗜酸氧化亚铁硫杆菌硫活化相关胞外蛋白质表达纯化及功能验证

对 A. ferrooxidans 与吸附相关的菌毛蛋白(AFE_2621: pilin, putative)基因 AFE_2621 进行克隆与原核表达。利用硫的 K 边 XANES 光谱对胞外蛋白样品及 纯化表达的菌毛蛋白样品进行分析,结果表明样品中富含巯基的氨基酸主要是半胱氨酸。这是在国内外首次从蛋白质、基因和硫的化学形态层面证明了富含巯基蛋白在单质硫的活化氧化过程中扮演重要角色。

参考文献

- [1] 杨显万, 沈庆峰, 郭玉霞. 微生物湿法冶金[M]. 北京: 冶金工业出版社, 2003.
- [2] Torma A E. The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydro-metallurgical processes. In *Advances in Biochemical Engineering*, ed. TK Ghose, A Fretcher, N Blackebrough, New York: Springer, 1977, 6: 1-37.
- [3] Rawlings D E. Heavy metal mining using microbes[J]. Annual Review of Microbiology, 2002, 56: 65-91.
- [4] 龚文琪, 魏鹏, 雷绍民. 微生物技术及21世纪矿产资源开发[J]. 中国非金属矿工业导刊, 2000, (5): 25-28.
- [5] 张晓云. 微生物在矿物与金属工业中的应用[J]. 矿业快报, 2002, (4): 19-21.
- [6] 李浩然, 冯雅丽. 微生物冶金的新进展[J]. 冶金信息导刊, 1999, (3): 29-33.
- [7] Sand W, Gehrke T, Hallmann R, et al. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism-a critical evaluation of bacterial leaching[J]. Applied microbiology and biotechnology, 1995, 43: 961-966.
- [8] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, et al. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2003, 63: 239-248.
- [9] Fowler T A, Crundwell F K. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus* ferrooxidans: experiments with a controlled redox potential indicate no direct bacterial mechanism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 3570-3575.
- [10] Sand W, Gehrke T, Jozsa P G, et al. (Bio) chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59: 159-175.
- [11] Schippers A, Sand W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 319-321.
- [12] Steudel R. Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. Industrial and engineering chemistry research, 1996, 35: 1417-1423.
- [13] Tributsch H, Gerischer H. The oxidation and self-heating of metal sulphides

- as an electrochemical corrosion phenomenon[J]. Journal of Applied Chemistry and Biotechnology, 1976, 26: 747-761.
- [14] Knickerbocker C, Nordstrom D K, Southam G. The role of "blebbing" in overcoming the hydrophobic barrier during biooxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*[J]. Chemical Geology, 2000, 169: 425-433.
- [15] Schippers A, Jozsa P G, Sand W. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 62: 3424-3431.
- [16] Fowler T A, Crundwell F K. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus* ferrooxidans: bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 12: 5285-5295.
- [17] Falco L, Pogliani C. A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* or a mixed culture of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. Hydrometallurgy, 2003, 71: 31-36.
- [18] Johnson D B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. FEMS Microbiology Ecology, 1998; 27: 307-317.
- [19] Schippers A, Rohwerder T, Sand W. Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52: 106-110.
- [20] Donovan P K, Ann P W. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov., and *Thermithiobacillus* gen. nov[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 511-516.
- [21] 张成桂, 夏金兰, 王晶, 等. 嗜酸硫氧化细菌硫氧化进展[J]. 生物技术通报, 2007, 1: 59-65.
- [22] 张成桂,夏金兰,邱冠周. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌亚铁氧化系统研究进展. 中国中国有色金属学报[J], 2006, 16: 1239-1249.
- [23] Rawlings D E, Tributsch H, Hansford G S. Reasons why "Leptospirillum"-like species rather than Thiobacillus ferrooxidans are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores[J]. Microbiology, 1999, 145: 5-13.
- [24] Melamud V S, Pivovarova T A, Tourova T P, et al. *Sulfobacillus sibiricus* sp. nov., a new moderately Thermophilic bacterium[J]. Microbiology, 2003, 72:

605-612.

[25] Dufresne S, Bousquet J, Boissinot M, et al. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium[J]. International Journal of System Bacteriology, 1996, 46: 1056-1064.

- [26] Muhammad A G, Ahmad M K, Susan G, et al. Phylogenetic analysis of different isolates of *Sulfobacillus* spp. isolated from uranium-rich environments and recovery of genes using integron-specific primers[J]. Extremophile's, 2003, 7: 341-345.
- [27] Qiu G Z, Fu B, Zhou H B. Isolation of a strain of *Acidithiobacillus caldus* and its role in bioleaching of chalcopyrite[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23: 1217-1225.
- [28] Hallberg K B, Dopson M, Lindstro E B. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178: 6-11.
- [29] Suzuki I, Chan C W, Takeuchi T L. Oxidation of elemental sulfur to sulfite by *Thiobacillus thiooxidans* cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58: 3767-3769.
- [30] Xia J L, Peng A A, He H, et al. A new strain *Acidithiobacillus albertensis* BY-05 for bioleaching of metal sulfides ores[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2007, 17: 168-175.
- [31] 邓敬石. 影响 Sulfobacillus thermosulfidooxidans 生长及亚铁氧化的因素研究[J]. 矿产综合利用, 2002, 3: 38-41.
- [32] Bogdanova T I, Tsaplina I A, Kondrat'eva T F. *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 1039-1042.
- [33] Dennis G, Peter P. Isolate B12, which harbours a virus-like element, represents a new species of the archaebacterial genus *Sulfolobus*, *Sulfolobus shibatae*, sp. nov[J]. Archives of Microbiology, 1992, 154: 594-599.
- [34] She Q X, Singh R K, Confalonierib F, et al. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98: 7835-7840.
- [35] Dopson M, Sundkvist J E, Lindstrom E B. Toxicity of metal extraction and flotation chemicals to *Sulfolobus metallicus* and chalcopyrite bioleaching[J]. Hydrometallurgy, 2006, 81: 205-213.

- [36] Chen L M, Brugger K, Skovgaard M. The Genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the *Crenarchaeota*[J]. Joural of Bacteriology, 2005, 187: 4992-4994.
- [37] Toshiharu S, Toshio I, Taketoshi U, et al. *Sulfolobus tokodaii* sp. nov. (*Sulfolobus* sp. strain 7), a new member of the genus *Sulfolobus* isolated from Beppu Hot Springs, Japan[J]. Extremophiles, 2002, 6: 39-44.
- [38] Yuko I, Kurosawa N, Uda I, et al. *Metallosphaera sedula* TA-2, a calditoglycerocaldarchaeol deletion strain of a thermoacidophilic Archaeon[J]. Extremophiles, 2001, 5: 241-245.
- [39] Fuchs T, Huber H, Burggraf S, et al. *Metallosphaera prunae* sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic Archaeum, isolated from a uranium-mine in Germany[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007, 18: 560-566.
- [40] Kurosawa N, Itoh Y H, Itoh T. Reclassification of *Sulfolobus hakonensis* Takayanagi et al. 1996 as *Metallosphaera hakonensis* comb. nov. based on phylogenetic evidence and DNA G+C content[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53: 1607-1608.
- [41] Konishi Y, Tokushige M, Asai S, et al. Copper recovery from chalcopyrite concentrate by acidophilic thermophile *Acidianus brierleyi* in batch and continuous-flow stirred tank reactors[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59: 271-282.
- [42] Segerer A, Neuner A, Kristjansson J K, et al. *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaebacteria[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1986, 36(4): 559-564.
- [43] Fuchs T, Huber H, Burggraf S, et al. 16S rDNA-based phylogeny of the archaeal order *Sulfolobales* and reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb. nov[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1996, 19: 56-60.
- [44] Zillig W, Yeats S, Holz I, et al. *Desulfurolobus ambivalens*, gen. nov., sp. nov., an autotrophic archaebacterium facultatively oxidizing or reducing sulfur[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1986, 8: 197-203.
- [45] Plumb J J, Haddad C M, Gibson J A E, et al. *Acidianus sulfidivorans* sp. nov., an extremely acidophilic, thermophilic archaeon isolated from a solfatara on Lihir Island, Papua New Guinea, and emendation of the genus description[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 2007, 57: 1414-1423.

[46] Yoshida N, Nakasato M, Ohmura N, et al. *Acidianus manzaensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon growing autotrophically by the oxidation of H₂ with the reduction of Fe³⁺[J]. Current Microbiology, 2006, 53: 406-411.

- [47] He Z G, Zhong H, Li Y. *Acidianus tengchongensis* sp. nov., a new species of acidothermophilic archaeon isolated from an acidothermal spring[J]. Current Microbiology, 2004, 48: 159-163.
- [48] Kurosawa N, Itoh Y H, Iwai T. *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order *Sulfolobales*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48: 451-456.
- [49] Segerer A H, Trincone A, Gahrtz M, et al. *Stygiolobus azoricus* gen. nov., sp. nov. represents a novel genus of anaerobic, extremely thermoacidophilic archaebacteria of the order *Sulfolobales*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, 41: 495-501.
- [50] Brock T D, Brock K M, Belly R T, et al. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature[J]. Archives of Microbiology, 1972, 84: 54-68.
- [51] 赵月峰, 方兆衍. 极度嗜热菌 Acidianus brierleyi 浸出镊铜化矿精矿[J]. 过程生物工程学报, 2003, 3: 161-164.
- [52] Friedrich C G, Brasischewsky F, Rother D, et al. Prokaryotic sulfur oxidation[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8: 253-259.
- [53] Rohwerder T, Sand W. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp[J]. Microbiology, 2003, 149: 1699-1710.
- [54] Gourdon R, Funtowicz N. Kinetic model of elemental sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans* in batch slurry reactors[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1998, 18: 241-249.
- [55] Konishi Y, Asai S, Yoshida N. Growth kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the surface of elemental sulfur[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 3617-3622.
- [56] Sampson M I, Phillips C V, Blake R C. Influence of the attachment of acidophilic bacteria during the oxidation of mineral sulfides[J]. Minerals Engineering, 2000, 13: 373-389.
- [57] Gehrke T, Telegdi J, Thierry D, et al. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching[J]. Applied and

- Environmental Microbiology, 1998, 64: 2743-2747.
- [58] Sharma P K, Dasb A, Raoa K H. Surface characterization of *Acidithiobacillus* ferrooxidans cells grown under different conditions[J]. Hydrometallurgy, 2003, 71: 285-292.
- [59] 傅建华, 邱冠周, 胡岳华. 浸矿细菌表面性质研究[J]. 金属矿山, 2004, 39: 19-24.
- [60] Ohmura N, Tsugita K, Koizumi J I, et al. Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. The Journal of Bacteriology, 1996, 178: 5776-5780.
- [61] Prange A, Engelhardt H, Truper H G, et al. The role of the sulfur globule proteins of *Allochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real time RT-PCR[J]. Archives of Microbiology, 2004, 182: 165-174.
- [62] Silver M, Lundgren D G. Sulfur-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus* ferrooxidans (*Thiobacillus ferrooxidans*)[J]. Canadian Journal of Chemistry, 1968, 46: 457-461.
- [63] Suzuki I. Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacillus* thiooxidans[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1965, 104: 359-371.
- [64] Sugio T, Katagiri T, Moriyama M, et al. Existence of a new type of sulfite oxidase which utilizes ferric ions as an electron acceptor in *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1988, 54: 153-157.
- [65] Ramirez P, Guiliani N, Valenzuela L, et al. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004; 70: 4491-4498.
- [66] Buonfiglio V, Polidoro M, Flora L, et al. Identification of two surface proteins involved in the oxidation of sulphur compounds in *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. FEMS Microbiology Review, 1993, 11: 43-50.
- [67] Buonfiglio V, Polidoro M, Soyer F, et al. A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of Biotechnology, 1999; 72: 85-93.
- [68] Sugio T, Ochi K, Muraoka T, et al. Isolation and some properties of sulfur dioxygenase from *Acidithiobacillus thiooxidans* NB1-3[M]. Eds: Harrison STL, Rawlings DE and Petersen J, Cape Town, South Africa. Produced by

Compress. Proceedings of the 16th international biohydrometallurgy symposium, 2005, 25-29.

- [69] Emmel T, Sand W, Kuig W A, et al. Evidence for the existence of a sulphur oxygenase in *Sulfolobus brierleyi*[J]. Journal of General Microbiology, 1986, 132: 3415-3420.
- [70] Urich T, Bandeiras T M, Leal S S, et al. The sulphur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is a multimeric protein containing a low-potential mononuclear non-haem iron centre[J]. Biochemical Journal, 2004, 381: 137-146.
- [71] Kletzin A. Coupled enzymatic production of sulfite, thiosulfate, and hydrogen sulfide from sulfur: purification and properties of a sulfur oxygenase reductase from the facultatively anaerobic archaebacterium *Desulfurolobus* ambivalens[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171: 1638-1643.
- [72] Kletzin A. Molecular characterization of the *sor* gene, which encodes the sulfur oxygenase/reductase of the thermoacidophilic Archaeum *Desulfurolobus ambivalens*[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174: 5854-5859.
- [73] Kletzin A, Molecular characterization of the sor gene, which encodes the sulfur oxygenase/reductase of the thermoacidophilic Archaeum Desulfurolobus *ambivalens*[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171: 1638-1641.
- [74] Sun C W, Chen Z W, He Z G, et al, Purification and properties of the sulfur oxygenase/reductase from the acidothermophilic archaeon, *Acidianus* strain S5[J]. Extremophiles, 2003, 7: 131-134.
- [75] Chen Z W, Jiang C Y, She Q X, et al. Key Role of Cysteine Residues in Catalysis and Subcellular Localization of Sulfur Oxygenase-Reductase of *Acidianus tengchongensis*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2005, 71: 621-628.
- [76] Wakai S, Kikumoto M, Kanao T, et al. Involvement of sulfide quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2004, 68: 2519-2528.
- [77] Tabita R, Silver M, Lundgren D G. The rhodanese enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*)[J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1969, 47: 1140-1145.
- [78] Gardner M N, Rawlings D E. Production of rhodanese by bacteria present in

- bio-oxidation plants to recover gold from arsenopyrite concentrates[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89: 185-190.
- [79] Ramirez P, Toledo H, Giliani N, et al. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 1837-1845.
- [80] Friedrich C G, Rother D, Bradischewsky F, et al. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism?
 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 2873-2882.
- [81] Vestal J R, Lundgren D G. The sulfite oxidase of *Thiobacillus ferrooxidans* (*Ferrobacillus ferrooxidans*) [J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1971, 49: 1125-1130.
- [82] Nakamura K, Yoskikawa H, Okubo S, et al. Purification and properties of membrane-bound sulfite dehydrogenase from *Thiobacillus thiooxidans* JCM7814[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1995, 59: 11-15.
- [83] De Jong G A H, Tang J A, Bos P, et al. Purification and characterization of a sulfite: cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus acidophilus*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 8: 61-67.
- [84] Kappler U, Dahl C. Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 203: 1-9.
- [85] Muller F H, Bandeiras T M, Urich T, et al. Coupling of the pathway of sulfur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulfate:quinone oxidoreductase[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53: 1147-1160.
- [86] Meulenberg R, Pronk J T, Hazeu W, et al. Oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus acidophilus*[J]. Archives of Microbiology, 1992, 157: 161-168.
- [87] Kelly D P, Shergill J K, Lu W P, et al. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1997, 71: 95-107.
- [88] Steudel R, Holdt G, Gobel T, et al. Chromatographic separation of higher polythionates SnO₆²⁻ and their detection in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*; molecular composition of bacterial sulfur secretion[J]. Angewandte Chemie International Edition, 1987, 26: 153-158.

[89] Sugio T, Kanao T, Furukawa H, et al. Isolation and identification of an iron-oxidizing bacterium which can grow on tetrathionate medium and the properties of a tetrathionate-decomposing enzyme isolated from the bacterium[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82: 233-238.

- [90] Bugaytsova Z, Lindstrom E B. Localization, purification and properties of a tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus caldus*[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271: 272-280.
- [91] Silver M, Lundgren D G. The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus* ferrooxidans (*Thiobacillus ferrooxidans*). Canadian Journal of Biochemistry, 1968, 46: 1215-1220.
- [92] Visser J M, De Jong G A H, Robertson L A, et al. Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp. W5[J]. Archives of Microbiology, 1996, 166: 372-378.
- [93] McSwain B S, Irvine R L, Hausner M, et al. Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge[J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 2: 1051-1057.
- [94] Liu H, Fang H H P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 95: 249-256.
- [95] Adav S S, Lee D J. Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge[J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 2: 1051-1057.
- [96] 张丽丽,姜理英,方芳,等. 好氧颗粒污泥胞外多聚物的提取及成分分析 [J]. 环境工程学报,2007,1:127-130.
- [97] Sun Y, Clinkenbeard K D, Clarke C, et al. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induced apoptosis of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation[J]. Veterinary Microbiology, 1999, 65: 153-166.
- [98] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [99] Zhang C G, Zhang R Y, Xia J L, et al. The key sulfur oxidation-related extracellular proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18: 1398-1402.
- [100] Driessen A J, Fekkes P, van der Wolk J P. The Sec. system[J]. Current Opinion

- in Microbiology, 1998, 1: 216-222.
- [101] Suzuki T, Murai T, Fukuda I, et al. Identification and characterization of a chromosomal virulence gene, *vacJ*, required for intercellular spreading of *Shigella flexneri*[J]. Molecular Microbiology, 1994, 11: 31-41.
- [102] Johnson J R, Stell A L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patiens with urosepsis in relation to phylogency and host compromise[J]. Journal of Infectious Diseases, 2000, 181: 261-272.
- [103] Raina S, Missiakas D. Making and breaking disulfide bonds[J]. Annual Review of Microbiology, 1997, 51: 179-202.
- [104] Lewin S R, Vesanen M, Kostrikis L, et al. Use of Real-Time PCR and Molecular Beacons To Detect Virus Replication in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals on Prolonged Effective Antiretroviral Therapy[J]. Journal of Virology, 1999, 73(7): 6099-6103.
- [105] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}_{T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [106] Van Eiden L J R, Nijhuis M, Schipper P, et al. Simultaneous Detection of Influenza Viruses A and B Using Real-Time Quantitative PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(1): 196-200.
- [107] Zeng J, Li D. Expression and purification of his-tagged rat peroxisomal acyl-CoA oxidase I wild-type and E421 mutant proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 38: 153-160.
- [108] Zeng J, Li D. Expression and purification of His-tagged rat mitochondrial medium-chain acyl-CoA dehydrogenase wild-type and Arg256 mutant proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 37: 472-478.
- [109] Zeng J, Li D. Expression and purification of His-tagged rat mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase wild-type and His352 mutant proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 35: 320-326.
- [110] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999: 132-144.
- [111] Pickering I J, George G N, Yu E Y, et al. Analysis of sulfur biochemistry of sulfur bacteria using X-ray absorption spectroscopy[J]. Biochemistry, 2001, 40: 8138-8145.
- [112] Prange A, Chauvistré R, Modrow H, et al. Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three

- different species of sulfur[J]. Microbiology, 2002, 248: 267-276.
- [113] Prange A, Arzberger I, Engemann C, et al. *In situ* analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy[J]. Biochimica Biophysica Acta, 1999, 1428: 446-454.
- [114] Prange A, Dahl C, Behnke M, et al. Investigation of S-H bonds in biologically important compounds by sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy[J]. The European Physical Journal D, 2002, 20: 589-596.

致 谢

论文终可付梓! 回首往事,光阴似箭,人生最宝贵的青春年华一挥而过,下一个人生征程即将启程。

本论文研究工作是在导师夏金兰教授的悉心指导下完成的。夏老师慈祥而严格,治学严谨、待人和蔼、生性淡泊,扎实的学术功底,精湛的实验技术,敏捷 开阔的思维使我受益良多。三年来,从选题立意到论文写作,从实验设计到实验 操作,夏老师都反复斟酌,细心指导。对导师传道、授业、解惑之恩衷心地表示 感激,谢谢!

张成桂老师对本论文也倾注了大量的精力和热情。对试验中遇到的各种具体问题给予细致指点,生活中对我也是关心之至,在此对他表示衷心的感谢!

衷心地感谢周洪波老师、聂珍媛老师、刘学端老师、余润兰老师、刘新星老师、吴学玲老师、夏乐先老师、尹华群老师、申丽老师、程海娜老师等在课堂上的倾心传授,实验中的细致指点,对我的学习、工作和生活的指导、关心和帮助。

衷心地感谢何环博士、丁建南博士、彭安安博士、万民熙博士、徐爱玲博士、曾伟民博士、朱薇博士、梁长利博士、王晶、欧阳旭东、孟浩、肖波等师兄师姐 对我的帮助、指导和各位切中肯綮的建议。

衷心地感谢彭娟花、张倩、熊晶、武顺、张晓健、王亿平、吴安娜、漆辉洲、 谭建锡、廖立琴、刑庆华、金德才、蔡重阳、杨鹏、陈晨、刘凯等同窗的帮助和 支持。讨论、交流、帮助伴随着我实验、论文撰写进行的每一天,使我受益匪浅, 同窗之谊,终生难忘。

衷心地感谢杨益、赵小娟、汤露、王润民、李丽、刘鹏、黄斌、艾晨兵、张 立民、王玉光、赵建纯、安哲宇等师弟师妹们的帮助和支持,还有诸多不在身边 的朋友们,谢谢你们一直的鼓励与支持,信任与宽容。

感谢中南大学、资源加工与生物工程院、生物系及生物冶金教育部重点实验 室提供的良好的学习与研究平台,让我不断汲取知识,充实自己。

最后,要深深感谢我的父母家人,你们是我坚强的后盾,一生的牵挂。

张瑞永 2009 年 5 月

攻读学位期间主要的研究成果

- [1] 夏金兰, 张瑞永, 张倩, 彭娟花, 张成桂, 熊晶, 武顺, 金德才. 一株纤维素 降解菌的分离、鉴定及降解特性初步研究. 湖南师范大学自然科学学报, 2008, 31(4): 86-90.
- [2] ZHANG Rui-yong, XIA Jin-lan, PENG Juan-hua, ZHANG Qian, XIONG Jing, TAN Jian-xi, NIE Zhen-yuan, QIU Guan-zhou. A new strain *Leptospirillum ferriphilum* YTW315 for bioleaching. Transactions of Nonferrous Metals Society of China. (In press)
- [3] ZHANG Cheng-gui, **ZHANG Rui-yong**, XIA Jin-lan, ZHANG Qian, NIE Zhen-yuan. The key sulfur oxidation-related extracellular proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18(6): 1398-1402.
- [4] PENG Juan-hua, **ZHANG Rui-yong**, ZHANG Qian, ZHANG Li-min, ZHOU Hong-bo. Screening and characterization of *Acidiphilium* sp. PJH and its role in bioleaching. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18(6): 1443-1449.
- [5] ZHANG Cheng-gui, XIA Jin-lan, **ZHANG Rui-yong**, Peng An-an, NIE Zhen-yuan, QIU Guan-zhou. Comparative Study on the Effects of Tween-80 and sodium isobutyl-xanthate on the growth and sulfur-oxidizing activities of *Acidithiobacillus albertensis* BY-05. Trans Nonferrous Met Soc China, 2008, 18(4): 1003-1007.
- [6] ZHANG Qian, XIA Jin-lan, ZHANG Rui-yong, PENG Juan-hua, PENG An-an, ZHANG Cheng-gui, ZHAO Xiao-juan, NIE Zhen-yuan, QIU Guan-zhou. Isolation and characterization of acidophilic bacterium from DongXiangShan mine in XinJiang province. Journal of Central South University of Technology. (Accepted)
- [7] 周洪波, 彭娟花, 张瑞永, 陈晨, 张汝兵, 顾帼华, 邱冠周. 嗜中高温嗜酸古菌 *Ferroplasma thermophilum* 的培养条件优化. 生物工程学报, 2008, 24(6): 1040-1045.
- [8] 张成桂,彭安安,罗炎杰,张瑞永,夏金兰,邱冠周.嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *doxDA*操纵元的鉴定与分析. 微生物学通报,2008,35(7):1001-1006.
- [9] 夏金兰, 王晶, 张倩, 张瑞永, 张成桂, 欧阳叙东, 邱冠周. 浸矿细菌周质蛋白的选择性提取及生长期差异表达双向电泳谱的对比分析. 中南大学学报. (Accepted)

- [10] 张成桂, 王晶, 张倩, 张瑞永, 夏金兰, 邱冠周. 几种阴离子对嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长和硫氧化活性的影响. 中国有色金属学报. (Accepted)
- [11] XIA Jin-lan, XIONG Jing, XU Tao, ZHANG Cheng-gui, ZHANG Rui-yong, ZHANG Qian, WU Shun, QIU Guan-zhou. Purification and characterization of extracellular chitinase from a novel strain *Aspergillus fumigatus* CS-01. Journal of Central South University of Technology. (Accepted)
- [12] Ruiyong Zhang, Jinlan Xia, Qian Zhang, Chenggui Zhang, Huan He, Juanhua Peng, Hongchen Jiang, Zhenyuan Nie, Guanzhou Qiu. Differential Extracellular Protein Expression during Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on Ferrous Iron and Element Sulfur. (In submitting)
- [13] Qian Zhang, Jinlan Xia, **Ruiyong Zhang**, Chenggui Zhang, Shun Wu, Anan Peng, Huan He, Hongchen Jiang, Guanzhou Qiu. The key periplasmic proteins related to sulfur oxidation in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (In submitting)
- [14] XIA Jin-lan, XIONG Jing, LIU Ke-ke, **ZHANG Rui-yong**, LI Hong-yan, HE Huan, NIE Zhen-yuan. Production chitinase and its optimization from a novel isolate *Serratia marcescens*. (In submitting)
- [15] 夏金兰, 邱冠周, 孟浩, 张成桂, 张瑞永, 王润民, 聂珍媛. 专利申请: 一株 黑曲霉 Aspergillus niger CD-01 在果胶提取中的应用. 申请号/专利号: 200910043038.6