

# 氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成相关基因 *mpsA* 在不同铁源刺激下的差异表达

刘新星, 刘文斌, 闫颖, 武海艳, 邱冠周

(中南大学 资源加工与生物工程学院, 湖南 长沙, 410083)

**摘要:** 为研究氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)在胞内形成的电子致密的磁性颗粒的相关基因, 对氧化亚铁硫杆菌标准菌株 ATCC23270 的全基因组的生物信息学进行分析, 在 ATCC23270 的全基因组上查找与趋磁细菌中 *mpsA* 基因的同源基因 ORF1622, 并对其保守结构域、氨基酸序列比对以及蛋白质同源性分析。利用反转录 PCR 技术从转录水平研究 *mpsA* 基因在硫培养条件下分别用 20 mmol/L FeCl<sub>3</sub> 和 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 刺激时的差异表达以验证它们在磁小体形成过程中的作用。研究结果表明: ORF1622 编码的蛋白含有 PRK05724 结构域, 与 *mpsA* 序列相同度为 48%, 与 acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha 同源; 氧化亚铁硫杆菌中的 *mpsA* 基因在转录层面的表达与亚铁有直接关系, 并且氧化亚铁硫杆菌仅在亚铁培养下生成磁小体, 因此, 它与氧化亚铁硫杆菌中磁小体的形成相关。

**关键词:** 氧化亚铁硫杆菌; *mpsA* 基因; 生物信息学分析; 反转录 PCR

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1672-7207(2009)06-1471-05

## Real-time PCR analysis of different Fe ion shock responses of *mpsA* gene in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270

LIU Xin-xing, LIU Wen-bin, YAN Ying, WU Hai-yan, QIU Guan-zhou

(School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China)

**Abstract:** The whole genome of the type strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 and the conserved domain and amino acid sequences as well as the protein identity of the target gene were analyzed. To obtain further knowledge of the magnetosomes formation mechanisms of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in response to different kinds of Fe ions, temporal gene expression profiles were examined in cells subjected to 20 mmol/L FeCl<sub>3</sub> and FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O shock by using reserved transcript PCR. The results indicate that ORF 1622 of the ATCC 23270 is homologous with *mpsA* gene in magnetotactic bacteria and the expressions of ORF 1622 is related to Fe<sup>2+</sup>. According to the fact that the *Acidithiobacillus ferrooxidans* is able to synthesize intracellular magnetosomes when it grows on FeSO<sub>4</sub>, it can be supposed that the *mpsA* gene is related with the magnetosome formation in *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

**Key words:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *mpsA* gene; bioinformatics analysis; RT-PCR

氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)由 Temple 等<sup>[1]</sup>在 20 世纪 50 年代初发现并命名的。它是生物冶金中的重要细菌之一。它可利用黄铁矿等矿物

中的硫和铁, 从而使矿物分解, 释放出包裹在其中的贵金属, 因此, 广泛用于浸出各种金属硫化矿。刘新星等<sup>[2]</sup>在氧化亚铁硫杆菌中发现了磁性颗粒。磁小体微

收稿日期: 2008-11-23; 修回日期: 2009-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50774102); 国家自然科学基金创新群体基金资助项目(50321402); 国家重点基础研究发展规划项目(2004CB619201); 中南大学研究生教育创新工程资助项目(1343-77341)

通信作者: 刘新星(1955-), 女, 湖南长沙人, 教授, 从事生物冶金和生物信息学研究; 电话: 0731-88876697; E-mail: x-mine@mail.csu.edu.cn

细,化学纯度高,结晶完美,大小均匀,且来自活体细胞,具有良好的生物相容性,所以,它是一种理想的生物纳米材料<sup>[3-6]</sup>。目前,Grünberg 等<sup>[7-13]</sup>从蛋白质和基因角度研究了磁小体的形成机理。Matsunaga 等<sup>[14]</sup>采用 SDS-PAGE 方法在 *Magnetospirillum* sp. AMB-1 分离得到 *mpsA* 基因编码的蛋白。该基因编码为 1 个长 317 氨基酸的不含 N 末端细胞传输信号序列的蛋白质,同源分析表明 *mpsA* 蛋白与大肠杆菌乙酰-CoA 羧化酶的  $\alpha$  亚基具有 52% 的同源性,并且具有 CoA 的结合域。尽管没有直接证据表明磁小体膜与细胞质膜相连,但由于磁小体膜与细胞质膜组成大致相同,而据 Pfanner 等<sup>[15]</sup>的报道,真核生物膜上 ADP-核糖基化作用因子的酰基化引发膜内陷,并且脂酰-CoA 能够刺激细胞外高尔基泡出芽形成小囊泡,因此, Matsunaga 等<sup>[14]</sup>推测 *MpsA* 利用酰基 CoA 作为羧基受体从而转移酰基给受体分子,通过酰基化引发细胞质内陷形成磁小体膜包裹细胞内的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒。

由于对氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成相关基因的研究尚少,因此,本文作者通过生物信息学方法,在氧化亚铁硫杆菌 ATCC23270 菌株中寻找得到与 AMB-1 菌株中 *mpsA* 基因的同源基因,并利用反转录 PCR 方法研究该基因在硫单质培养条件下用  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  刺激的差异表达,探索氧化亚铁硫杆菌形成磁小体相关基因,以便为研究氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成的相关机理打下基础。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与培养基

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

采用美国模式菌种保藏中心 ATCC medium 2039 培养基配方。

能源是质量浓度为 10 g/L 的硫粉,铁源分别为  $\text{FeSO}_4$  和  $\text{FeCl}_3$ 。所有试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 其他试剂

RNA 提取试剂为 Trizol(Invitrogen),RNA 纯化试剂盒为 SV Total RNA Isolation System(Promega),RNA 反转录试剂为 SuperScript<sup>TM</sup> 反转录酶(Invitrogen)和随机引物(Invitrogen)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 氧化亚铁硫杆菌中 *mpsA* 基因的生物信息学分析

*A.ferrooxidans* ATCC 23270 全基因组序列及其部分注释从 The institute for genome research(tigr)网获得,采用 tigr 网基因组分析工具 BLAST 寻找 *A.ferrooxidans* ATCC 23270 上与趋磁细菌中 *mpsA* 基因的同源基因。采用 Gene Runner 软件分析获得目标基因的开放阅读框(ORF),进行目标蛋白保守结构域分析。目标蛋白与趋磁细菌中同源蛋白氨基酸序列比对结果通过 Gene Doc 软件获得。在 National Center for Biotechnology Information(NCBI)进行两序列的同源性分析。

#### 1.2.2 氧化亚铁硫杆菌中 *mpsA* 基因的引物设计

根据 BlastN 比对得到同源基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计基因特异引物 *mpsA1* 5'-GGCTATTATCGGCGGTCTGGC-3'和 *mpsA2* 5'-GCTCCGGGCGTATCAATGAAC-3'。两引物间重叠区为 201bp。

#### 1.2.3 ATCC23270 培养条件及生长曲线测定

取对数期 ATCC23270 菌种接种于 2 L 培养基中,调至 pH=2.0,以 1%(质量分数)硫单质为能源,在转速为 180 r/min 的摇床中培养,温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。用血球计数板在光学显微镜下直接观察计数菌液中细菌浓度,如未有特别说明,所有实验均重复 3 次。

#### 1.2.4 不同铁源处理后 RNA 的提取纯化及反转录

当细菌培养至对数期后,将培养好的细菌等量分成 3 组,其中:第 1 和第 2 组分别加入  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (终浓度为 20 mmol/L)在培养条件下进行刺激;第 3 组以无铁刺激硫培养细菌作为空白对照,刺激 1 h 后,每组取 300 mL 培养液(温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ )过滤除去硫粉后,立即冷冻、离心,收集菌体,剩余培养液继续培养至稳定期收集菌体,以备透射电子显微镜观察磁小体颗粒形成情况所用。采用 Trizol 一步法提取总 RNA,用 RNA 纯化试剂盒(Promega)纯化粗 RNA,用 NanoDrop 微量分光光度计(NanoDrop Technologies)检测 RNA 浓度和纯度。以总 RNA 中 mRNA 为模板,反转录合成 cDNA,用 NanoDrop 微量分光光度计测定其浓度,将 3 个 cDNA 样品浓度均调至 200 mg/L,于 -20 $^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。反转录采用 Invitrogen 公司 SuperScript<sup>TM</sup> 反转录酶和随机引物,具体反应条件参见试剂盒操作手册。

#### 1.2.5 反转录 PCR 反应检测硫培养时不同铁源刺激下的差异表达

分别以 3 组样品的 cDNA 为模板,采用本文设计引物对扩增基因片段。PCR 程序为:于 94 $^{\circ}\text{C}$  解链

4 min ;于 94 °C 解链 20 s ,于 60 °C 退火 20 s ,于 72 °C 延伸 30 s ,共 30 个循环 ;于 72 °C 解链 8 min 。采用纯化后 RNA 作为模板为阴性对照。PCR 反应后 ,用 1%琼脂糖凝胶电泳检验不同铁源胁迫下各基因的表达情况。

1.2.6 不同培养条件下磁小体形成情况

用异戊醛固定收集后的菌体 ,并进行超薄切片(70 nm) ,将切片置于透射电镜下(JEM1230 ,电压 80 kV) ,观察比较不同铁源刺激后和缺铁条件下单质硫培养时菌体内磁小体颗粒数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 ATCC23270 与 AMB-1*mpsA* 基因编码蛋白比对结果

用 AMB-1 菌株的 *mpsA* 基因与 ATCC23270 的全基因组进行比对得到同源的核酸序列 ,为 tigr 网站 ATCC23270 的全基因组上编号为第 1622 号的基因。该基因全长 951bp ,编码 1 个长 316 氨基酸的蛋白质。对该基因编码的蛋白质进行保守结构与分析 ,结果如图 1 所示。用此蛋白与 AMB-1 *mpsA* 基因编码的蛋白质进行同源性比较 ,结果显示 :同源性为 48%(图 2) 与 acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha 同源。

### 2.2 ATCC23270 硫单质培养生长曲线的测定

*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 硫单质

培养生长曲线如图 3 所示。图 3 表明 :ATCC23270 在以硫单质为能源时对数期较长。在接种后第 8 d 提取总 RNA ,以研究 *mpsA* 基因在不同铁源刺激下的差异表达。

### 2.3 总 RNA 质量

细菌总 RNA 电泳分析结果如图 4 所示。23S rRNA 与 16S rRNA 条带完整、清晰 ,表明总 RNA 提取纯化过程中无明显的 RNase 作用导致的降解 ,经 NanoDrop 微量分光光度计检测 ,在波长为 260 nm 和 280 nm 处的消光系数 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 比值为 1.90~2.00 ,样品的纯度较高。总 RNA 的纯度与完整性均良好 ,mRNA 无降解。

### 2.4 不同铁源刺激下氧化亚铁硫杆菌 *mpsA* 基因的差异表达情况

反转录 PCR 产物的琼脂糖电泳图谱如图 5 所示。从图 5 可知 :当 ATCC23270 在以硫单质为能源时 ,*mpsA* 基因在不同铁源刺激下具有表达差异 ;*mpsA* 基因在 Fe<sup>2+</sup>刺激下于 cDNA 上有表达 ,而 Fe<sup>3+</sup>刺激以及不加铁刺激时均无表达。PCR 产物约为 200bp ,与引物设计的 201bp 重叠区长度一致 ,所得 PCR 产物为目标产物。这说明氧化亚铁硫杆菌中 *mpsA* 基因的表达是与 Fe<sup>2+</sup>相关的 ,与硫单质以及 Fe<sup>3+</sup>无关。

### 2.5 不同培养条件下磁小体生成情况

透射电子显微镜结果如图 6 所示。从图 6 可知 :*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 在 Fe<sup>2+</sup>刺激硫培养时能生成电子致密的磁性颗粒(图 6(c)) ,而在无铁刺激硫培养(图 6(a))和 Fe<sup>3+</sup>刺激硫培养时(图 6(b)) 均没有电子致密颗粒形成。



图 1 与 *mpsA* 同源的 ORF1622 保守结构域分析

Fig.1 Conserved domain analysis of ORF1622

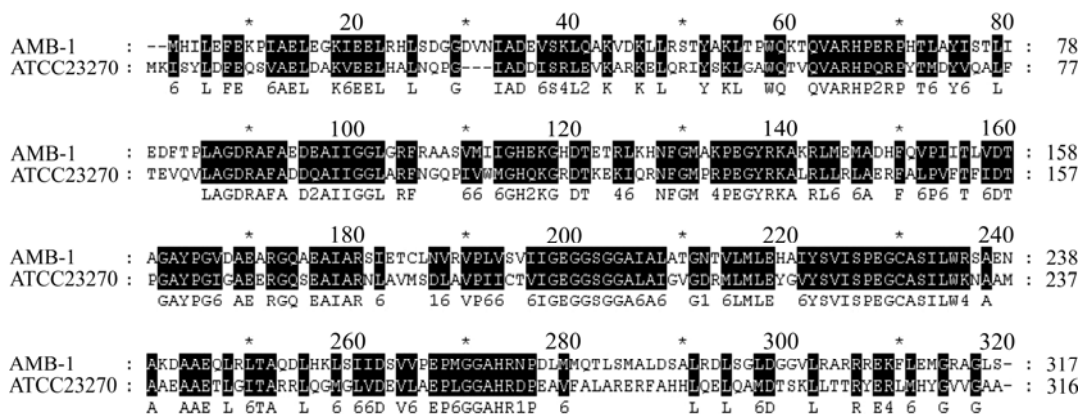


图 2 ATCC23270 中 ORF1622 编码蛋白与 AMB-1 *mpsA* 蛋白氨基酸序列比对结果

Fig.2 Amino acid sequences alignment between ORF1622 and *mpsA* in ATCC23270

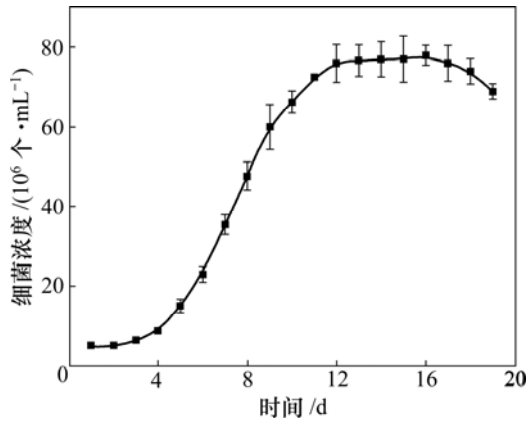
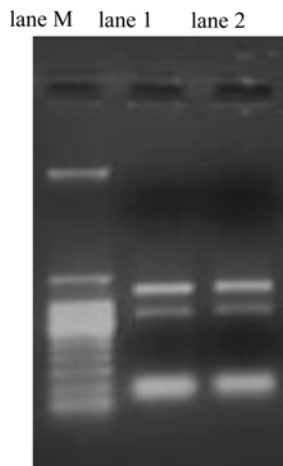


图 3 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 硫单质培养生长曲线

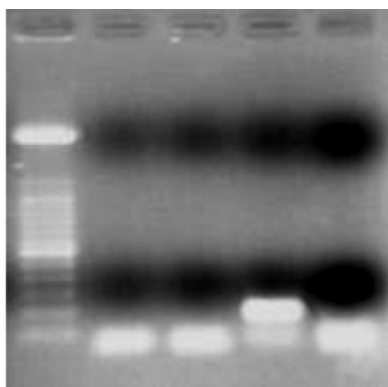
Fig.3 Growth curve of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270



lane M 为 marker, lane 1 为  $Fe^{2+}$  刺激 1 h 总 RNA, lane 2 为  $Fe^{3+}$  刺激 1 h 总 RNA

图 4 总 RNA 电泳图

Fig.4 Gel analysis of total RNA

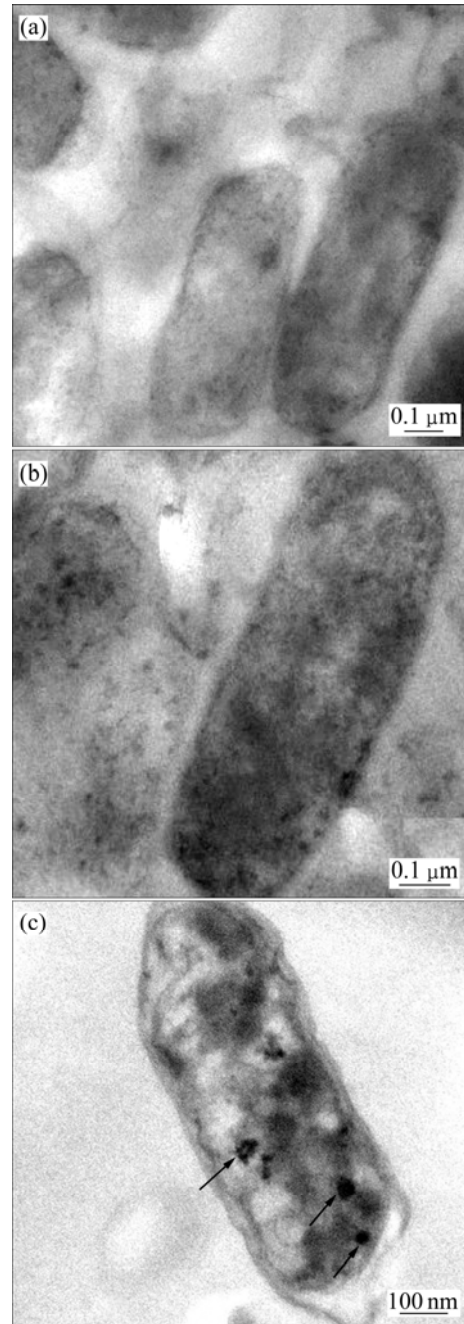


lane M lane 1 lane 2 lane 3 lane 4

lane1 为无铁刺激硫培养, lane 2 为  $Fe^{3+}$  刺激, lane 3 为  $Fe^{2+}$  刺激, lane 4 为阴性对照, lane M 为 100bp marker, 目标片段长度为 200bp

图 5 *mpsA* 基因 RT-PCR 产物电泳图谱

Fig.5 RT-PCR analysis of different Fe ion shock response of *mpsA* gene



(a) 无铁刺激硫; (b)  $Fe^{3+}$  刺激硫; (c)  $Fe^{2+}$  刺激硫; 箭头所示黑色电子致密颗粒为磁小体

图 6 不同铁源刺激硫培养条件下 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 超薄切片透射电镜照片

Fig.6 Transmission electron micrograph images of thin-sectioned *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 cells under different Fe ion shocks

### 3 结 论

a. 在氧化亚铁流杆菌 ATCC23270 的全基因组上找到了趋磁细菌 *Magnetospirillum* sp.AMB-1 菌株中磁

小体合成基因 *mpsA* 的同源基因,并将两基因编码的蛋白进行比对,相似性高达 48%。

b. ATCC23270 菌株中 *mpsA* 基因在硫单质培养条件下,在  $\text{Fe}^{2+}$  刺激下有表达,而  $\text{Fe}^{3+}$  刺激以及不加铁刺激时均无表达。这说明 *mpsA* 基因与氧化亚铁硫杆菌中亚铁的代谢相关,这与 ATCC23270 中磁小体的形成与亚铁相关而与硫单质及三价铁无关的现象相一致。

c. 由于 *mpsA* 基因在趋磁细菌中为磁小体合成的重要基因,该基因在氧化亚铁硫杆菌的磁小体形成过程中也发挥了重大作用,其可能与磁小体膜内陷相关,具体的作用方式及调控机理将有待于进一步研究。

d. 利用生物信息学方法结合 RT-PCR 技术,能够在氧化亚铁硫杆菌中找到更多的可能与磁小体形成相关的基因,这将为研究氧化亚铁硫杆菌中磁小体的形成提供一种有效手段,也将为探索氧化亚铁硫杆菌中磁小体形成机理以及构建相关基因蛋白的调控网络打下基础。

#### 参考文献:

- [1] Colmer A R, Hinkle. The role of microorganisms in acid mining drainage: a preliminary report[J]. Science, 1947, 106: 253-256.
- [2] 刘新星,刘文斌,闫颖,等. 固体平板磁泳分离细菌新方法的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(3): 79-83.  
LIU Xin-xing, LIU Wen-bin, YAN Ying, et al. Isolation of acidithiobacillus ferrooxidans by using solid-plate magnetophoresis[J]. China Biotechnology, 2008, 28(3): 79-83.
- [3] Matsunaga T, Nakayama H, Okochi M, et al. Fluorescent detection of cyanobacterial DNA using bacterial magnetic particles on a MAG-microarray[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 73(5): 400-405.
- [4] Yoza B, Matsumoto M, Matsunaga T. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 94(3): 217-224.
- [5] Herborn C U, Papanikolaou N, Reszka R. Magnetosomes as biological model for iron binding: Relaxivity determination with MRI[J]. Rofo-Fortschritte Auf Dem Gebiet Der Rontgenstrahlen Und Der Bildgebenden Verfahren, 2003, 175(6): 830-834.
- [6] Schuler D, Frankel R B. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(4): 464-473.
- [7] Grunberg K, Wawer C, Tebo B M. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4573-4582.
- [8] Matsunaga T, Okamura Y. Genes and proteins involved in bacterial magnetic particle formation[J]. Trends in Microbiology, 2003, 11(11): 536-541.
- [9] Grunberg K, Muller, E C, Otto A. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in Magnetospirillum gryphiswaldense[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 1040-1050.
- [10] Heyen U, Schuler D. Growth and magnetosome formation by microaerophilic magnetospirillum strains in an oxygen-controlled fermentor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(5/6): 536-544.
- [11] Schuler D, Baeuerlein E. Iron transport and magnetite crystal formation of the magnetic bacterium magnetospirillum gryphiswaldense[J]. Journal De Physique Iv, 1997, 7(C1): 647-650.
- [12] Matsunaga T, Sakaguchi T. Molecular mechanism of magnet formation in bacteria[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(1): 1-13.
- [13] Ullrich S, Kube M, Schubbe S. A hypervariable 130-kilobase genomic region of Magnetospirillum gryphiswaldense comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(21): 7176-7184.
- [14] Matsunaga T, Noriyuki T, Okamura Y. Cloning and characterization of a Gene, *mpsA*, encoding a protein associated with intracellular magnetic particles from magnetospirillum sp. strain AMB-1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 268(3): 932-937.
- [15] Pfanner N, Glick B S, Arden S R. Fatty acylation promotes fusion of transport vesicles with Golgi cisternae[J]. J Cell Biol, 1990, 110(4): 955-961.