

分类号_____

密级_____

UDC _____

编号_____

中南大学

CENTRAL SOUTH UNIVERSITY

硕士学位论文

论文题目 嗜酸氧化亚铁硫杆菌铜抗

性相关基因的鉴定及分析

学科、专业 生物工程

研究生姓名 罗焱杰

导师姓名及

专业技术职称 邱冠周教授、刘学端教授

中南大学

二〇〇八年五月

分类号 VDC_____

密级_____

硕士学位论文

嗜酸氧化亚铁硫杆菌铜抗性

相关基因的鉴定及分析

Identification and analysis of copper resistance related
genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans*

作者姓名： 罗焱杰
学科专业： 生物工程
学院（系、所）： 资源加工与生物工程学院
指导教师： 邱冠周教授、刘学端教授

论文答辩日期_____

答辩委员会主席_____

中 南 大 学
2008 年 5 月

摘要

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 是生物冶金工业中十分重要的一种细菌,也是目前生物冶金的微生物菌群中研究得最多的细菌之一。尽管与大多数中性细菌相比, *A. ferrooxidans* 能耐受更高浓度的铜离子,但是其抗铜的分子遗传学机理仍不清楚。

最近, *A. ferrooxidans* ATCC23270 的全基因组已被测序,其全基因组注释信息中,有四个基因被注释为与铜抗性有关,但仍需实验的证实。序列同源性分析结果显示其中的两个基因, *Afe0329* 和 *Afe0663* (在 TIGR 网站上的登录号分别为 AFE-0329 和 AFE-0663) 有非常高的同源性 (94.43%)。本文以此两个高同源性基因为对象,研究了它们与细菌铜抗性之间的关系,并鉴定了 *Afe0329* 与 *Afe0663* 在这一过程中所表现出来的差别。实时定量 PCR 结果显示基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 对铜胁迫的应答非常敏感;使用 PCR-RFLP 策略,首次成功的鉴定了这两个位于同一基因组中的高同源性基因之间的表达差异,结果显示与 *Afe0663* 相比,基因 *Afe0329* 在铜离子环境中表达更多的 RNA, RFLP 图谱表明 96% 的酶切泳道为 *Afe0329* 基因表达的产物;生物信息学分析结果表明 *Afe0329* 表达的蛋白质具有 P1b3 型 ATP 酶的所有特征序列, P1b3 型 ATP 酶是一种定位于膜上的离子泵,分子模建的结果进一步显示参与决定离子泵泵出何种重金属的保守氨基酸残基位于跨膜结构域的一个狭小区域内;功能互补实验的结果显示基因 *Afe0329* 能提高铜敏感的 *Escherichia coli* 菌株的铜抗性;采用 Reverse transcriptase PCR 技术,研究了 *A. ferrooxidans* 标准菌株 ATCC23270 中 *Afe0329* 的转录子情况,结果表明基因 *Afe0329*, *Afe0330* 和 *Afe0331* 一起转录,处于同一个转录子;用 Vector NTI, Blast, TMHMM Server, PSORTb 等软件对此转录子中的 *Afe0330* 和 *Afe0331* 做了进一步的生物信息学分析,表明 *Afe0330* 为编码定位于细胞质中的蛋白基因, *Afe0330* 和 *Afe0331* 的 Blast 分析都没有意义的同源性序列,其在铜抗性中的作用有待进一步研究;用此转录子的引物扩增多种细菌 DNA,结果显示此转录元件普遍存在于 *A. ferrooxidans* 菌株基因组中。

所有以上结果表明相比 *Afe0663*,与 *Afe0330* 和 *Afe0331* 共转录的

基因 *Afe0329* 在细菌铜抗性中发挥着十分重要的作用，这为进一步研究这种极端环境下生长的细菌的抗铜机理，通过基因工程的手段提高 *A. ferrooxidans* 的铜抗性以改良优化生物冶金工艺奠定了理论基础。

关键词 氧化亚铁硫杆菌，P 型 ATP 酶，抗铜，实时定量 PCR，PCR-RFLP

ABSTRACT

Acidithiobacillus ferrooxidans, as an important microorganism in bioleaching industry, is also one of the most studied organisms in the bioleaching microbial community. Although *A. ferrooxidans* can survive in a higher concentration of copper ion compared with most other germs, the underlying genetic mechanism is still unknown.

Recently, the genome of *A. ferrooxidans* has been sequenced by Integrated Genomics Inc, and from the annotated information, there are four genes involved in copper homeostasis. The result of sequence alignment suggested that two of them, *Afe0329* and *Afe0663* (the Locus is AFE-0329 and AFE-0663 respectively), were high homologous (94.43% identity). In this article, we focus on these two high homologous genes, study the relationship between them and copper homeostasis, and identify the differences between them. To test these two genes relationship with copper homeostasis, Real-time PCR was carried out, it showed that genes *Afe0329* and *Afe0663* were intensive response to copper; with PCR-RFLP cloning approach, the differential gene expression between these high homologous genes in a genome was successfully identified for the first time, it revealed that compared with *Afe0663*, *Afe0329* expressed more RNA in presence of copper ion medium, RFLP profile showed that 96% of lanes were products of *Afe0329*; analyzed by bioinformatics, the sequence of protein expressed by *Afe0329* had all conserved domains of P1b3-type ATPase which was a kind of heavy metal pump, and to be unexpected, the Molecular modeling revealed that the amino acids, which were supported to participated in determination which kind of heavy metal the protein pumped were responsible for the gate of copper ion channel in the transmembrane area of the protein; the P1b-type ATPase disrupted *Escherichia coli* could be partially rescued by complementation by plasmid carrying *Afe0329*. With Reverse transcriptase PCR, the transcripton of copper homeostasis relative gene *Afe0329* in *A. ferrooxidans* standard strain ATCC23270 was investigated, the results

showed that gene *Afe0330* and *Afe0331* were cotranscribed with *Afe0329*, they were in a single transcript; the further analysis of genes in this transcript was analyzed employed by Vector NTI, Blast, TMHMM Server, PSORTb software and so on, it showed protein AFE0330 which expressed by gene *Afe0330* was a cytoplasmic protein, no significant homologous sequences of *Afe0330* or *Afe0331* had been obtained by Blast analysis, the function of *Afe0330* or *Afe0331* should be more studied; from the DNA of different strains, the transcript of *Afe0329* was amplified using special primer pairs to identify the universality of it in the genome of *A. ferrooxidans* strains, the results showed the transcript of *Afe0329* was universal in genome of *A. ferrooxidans* strains.

All of these results confirm that compared with *Afe0663*, gene *Afe0329* which cotranscribed with *Afe0330* and *Afe0331*, have more important role in copper homeostasis. The results lead us to a further step for understanding the copper homeostasis mechanism in this extremophilic microorganism, and lay a theoretical foundation for us to upgrade the bioleaching technique through improving copper resistance of *A. ferrooxidans*.

KEY WORDS *Acidithiobacillus ferrooxidans*, P-type ATPase, Copper resistance, Real-time PCR, PCR-RFLP

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
目录.....	V
第一章 绪论.....	1
1.1 生物冶金概述.....	1
1.1.1 生物冶金产业化现状.....	1
1.1.2 生物冶金细菌学概述.....	5
1.2 微生物抗重金属研究进展.....	6
1.2.1 微生物抗重金属的机理概述.....	6
1.2.2 微生物抗铜研究现状.....	8
1.3 课题的研究目的和研究内容.....	8
1.3.1 依据和目的.....	9
1.3.2 论文课题受资助情况.....	9
1.3.3 论文的主要研究内容.....	10
第二章 不同基质下铜抗性基因的差异表达.....	11
2.1 引言.....	11
2.2 材料与方法.....	12
2.2.1 菌株、引物和生长条件.....	12
2.2.2 最佳铜离子浓度的鉴定.....	13
2.2.3 RNA 提取.....	14
2.2.4 cDNA 合成.....	15
2.2.5 实时定量 (Real-time) PCR.....	15
2.3 结果与讨论.....	17
第三章 铜环境中高同源性的铜抗性基因之间的表达差异.....	19
3.1 引言.....	19
3.2 材料与方法.....	19
3.2.1 菌株、质粒、引物和生长条件.....	19
3.2.2 RNA 提取.....	19
3.2.3 cDNA 合成.....	21
3.2.4 PCR-RFLP 克隆策略.....	22

3.3 结果	24
3.4 讨论	25
第四章 铜抗性基因及所表达的蛋白质的生物信息学分析	27
4.1 引言	27
4.2 材料与方法	27
4.2.1 AFE0329 蛋白序列的一般性分析	27
4.2.2 AFE0329 蛋白的三维分子模建	27
4.3 结果与讨论	28
4.3.1 AFE0329 蛋白序列的一般性分析	28
4.3.2 AFE0329 蛋白的三维分子模建	29
第五章 大肠杆菌突变体的功能互补实验	31
5.1 引言	31
5.2 材料与方法	31
5.2.1 菌株、质粒、引物和生长条件	31
5.2.2 p <i>Afe0329</i> 质粒构建	31
5.2.3 重组子铜抗性鉴定	32
5.3 结果与讨论	32
第六章 铜抗性基因转录元件的鉴定及分析	35
6.1 材料与方法	35
6.1.1 菌株和生长条件	35
6.1.2 材料	35
6.1.3 DNA 的提取, PCR 和 RNA 的提取	36
6.1.4 Reverse transcriptase PCR	38
6.1.5 生物信息学分析	39
6.2 结果	39
6.2.1 <i>Afe0329</i> , <i>Afe0330</i> 和 <i>Afe0331</i> 在同一个转录子中	39
6.2.2 <i>Afe0329</i> 转录元件广泛分布在 <i>A. ferrooxidans</i> 菌株基因组中	40
6.2.3 转录子的生物信息学分析	41
6.3 讨论	41
第七章 结论	43
参考文献	45
研究成果	52
致 谢	53

第一章 绪论

1.1 生物冶金概述

生物冶金是利用以矿物为营养基质的微生物,将矿物中金属溶解,进而分离、富集、纯化而提取金属的湿法冶金技术。该技术因其流程短、成本低、低污染等优点而十分适于处理贫矿、废矿、表外矿及难采、难选、难冶矿的堆浸和就地浸出^[1-2],它是综合了湿法冶金,矿物加工,化学工程,环境工程和微生物学的多学科交叉领域^[3]。

据文献记载,中国是世界上最早采用生物冶金技术的国家,早在公元前六、七世纪,就在采铜、铁过程中不自觉地利用了自发生长的某些自养细菌,唐朝时起,就有了官办的湿法炼铜生产,到宋朝则发展更盛,北宋时的年产量最高时达到 100 多万斤^[1]。而在欧洲,这种技术的应用至少始于公元二世纪,从 1687 年开始,瑞典中部 Falun 矿山的铜矿已经浸出了 2 百万吨铜^[4]。

开始人们对生物冶金反应机理不清楚,仅凭经验,并不知道有细菌存在,浸矿技术发展十分缓慢。直到 1947 年,Colmer 和 Hinckle^[5]首先发现酸性矿坑水中含有一种可将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 的细菌,指出这种细菌在金属硫化矿的氧化和矿山坑道水酸化过程中起着重要作用。其后, Temple 和 Leathen 对这种细菌的生理特性进行了研究,发现这种细菌能将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,并能将矿物中的硫化物氧化为硫酸^[6-7]。1954 年, L. C. Bryer 与 J. V. Beck 在 Utah Bingham Vanyon 铜矿坑水中发现氧化亚铁硫杆菌与氧化硫硫杆菌。他们的实验室研究结果表明氧化亚铁硫杆菌能够浸出各种硫化铜矿及辉钼矿,但浸出辉钼矿则必须要有黄铁矿的存在^[8]。1955 年, Zimmerley S R 等^{[2][9]}首次申请了生物堆浸专利并将该专利授权给 Kennecott 铜业公司,该公司于 1958 年取得了第一个有关细菌浸出技术的专利^[9],标志着生物冶金技术现代工业应用的开端。

1.1.1 生物冶金产业化现状

目前世界范围内,生物冶金成功应用于工业化生产的主要是铜、铀和金银等矿山,使用范围从堆浸法逐步扩展到了地浸法和原地破碎浸矿法,正在向铜、铀、

金、锰、铅、镍、铬、钴、铁、砷、锌、铝等几乎所有硫化矿的浸出扩大^{[4][10]}。产业化相对领先的国家有智利、澳大利亚、美国、南非、日本等，中国、欧盟也从近几年先后投入大量资金开展生物冶金领域的研究^[11-12]。纵观全球，生物冶金产业化主要在两个方面取得主要进展，并形成了三大主要浸出工艺。

两个方面取得的主要进展是：

（一）难处理金矿的生物预氧化处理

全球黄金矿藏资源有约 1/3 属于用传统氰化浸出不能有效提取的难处理金矿^[1]。鉴于此，必须对其进行预处理，使载金矿体发生变化，将包裹其中的金解离出来，为下一步氰化浸出提供条件，传统的预处理方法包括：氧化焙烧和加氧浸出等，而生物氧化以其投资成本低，环境友好成为优选技术。从 20 世纪 80 年代以来，难处理金矿的生物预氧化在产业方面取得了很大的进展，并形成了 BIOX[®]、BacTech、Newmont 和 Geobiotics 四大工艺^[13-14]。

（二）低品位硫化铜矿的生物浸出

目前，用生物法提取的铜约占世界总铜产量的 25%，在美国、加拿大、澳大利亚、智利等 20 多个国家实现了生物提铜产业化。我国已开采的铜矿中 85% 属于硫化矿，在开采过程中受当时选矿技术和经济成本的限制产生了大量的表外矿和废石，废石含铜通常为 0.05 %~0.3 %。因此生物法提铜近年来也得到很大发展，例如江西德兴铜矿建成的湿法铜厂于 1997 年 5 月投产，已正常运转了几年，生产的阴极铜质量达到 A 级^[15]。福建紫金山铜矿也已建立了年产 300 t 阴极铜的试验厂。表 1-1 列出了迄今为止世界上主要的生物浸铜厂矿^[16]。

三大主要浸出工艺是：

（一）堆浸法

堆浸法是从硫化矿矿石中快速提取金属的有效方法。按原料不同可以分为原矿堆浸（heap leaching）与废石堆浸（dump leaching）。随着大量低品位铜矿的堆积，近年来生物浸铜越来越吸引人们的注意力^[17]。此法是指把矿石堆积在矿坑外浸出的一种方法。为提高浸出后的浸出液的集水率，堆积场的地表需具有不透水性。把低品位块矿从底部开始以阶梯形式堆积起来，并弄平其上部。从上部喷射浸出液，随着浸出的进行，浸出液的金属离子含量逐渐下降，此时在上部重新设置堆积层继续进行浸出。美国等国家实施大规格浸出的矿山中，有的堆积阶梯总高度可达 300m。

表1-1生物浸铜厂矿一览表
Tab. 1-1 Factory of bioleaching of copper

厂矿名称	国家	矿石特点	工艺	规模 (t/d)	服务时间
Lo Aguirre	智利	辉铜矿, 含 Cu1.4%	堆浸	3500(14000~15000t/a Cu)	1980~1996
Gnndpowder, Mammoth	澳大利亚	辉铜矿与斑铜矿, 含 Cu2.2%	原位浸出	设计能力为 13000t/a	1991 至今
Leyshon	澳大利亚	含金辉铜矿, 含 Cu1750g/t, 含金 1.739g/t		1370	1992~1997
Colorado	智利	辉铜矿, 含 Cu0.25%	堆浸	16000(60000t/a Cu)	1993 至今
Girilambone	澳大利亚	辉铜矿, 含 Cu2.5%	堆浸	2000(14000t/a Cu)	1993 至今
Ivan-Zar	澳大利亚	辉铜矿, 含 Cu2.5%	堆浸	1500(10000~12000t/a Cu)	1994 至今
Queered Blanca	智利	辉铜矿, 含 Cu1.3%	堆浸	17300(75000t/a Cu)	1994 至今
Sulfuros Bajalay	智利	原生硫化铜矿, 含 Cu 0.35%		14000~15000	1994 至今
Toquepala	秘鲁	次生与原生, 含 Cu 0.17%		60000~120000	1995 至今
Mt Cuthbert	澳大利亚	次生硫化铜矿		16000	1996 至今
Andacollo	智利	辉铜矿		10000	1996 至今
Zaldivar	智利	次生硫化铜矿		约 20000	1998 至今
德兴铜矿	江西	含铜废石堆浸, 原生硫化铜矿, 含 Cu0.09%	废石堆浸	设计年产电铜 2000t	1997 至今
紫金山铜矿	福建	矿含铜 0.6%, 辉铜矿占 60%		设计年产电铜 10000t	2004 至今
官房铜矿	云南	矿含铜 0.9%, 含 Ag50g/t, 原生硫化铜矿占 20%, 次生硫化铜矿占 70%		年产 2000t 电铜	2003 至今
Chuquicamata	智利	硫化铜精矿	BIOCOP™	年产 20000t 电铜	2003 至今

低品位铜矿石的微生物堆浸工艺目前具有很大的吸引力, 对许多老铜矿矿山

的生存起着极其重要的作用。铜矿的堆浸的商业化应用始于 1980 年。智利的 Lo Aguirre 矿从 1980-1996 采用生物浸出的技术每天处理 16000 吨的矿物^[18]。从那以后,越来越多的铜矿采用堆浸浸出铜矿物^[19]。美国、智利、澳大利亚、加拿大、墨西哥、西班牙、巴西、秘鲁、保加利亚、前苏联、南斯拉夫、印度、日本都曾进行细菌堆浸回收低品位矿石和地下难采矿石中铜的生产。据称在美国至少有 19 个难采难选铜矿采用细菌堆浸或井下就地浸出提取其中的铜,处理矿石量从数百万吨至数亿吨不等,所产铜产量占美国年产总铜量的 11%以上,总产值已逾 5 亿美元。智利近年进展也较快,从低品位矿石中堆浸产出铜量已达 30 万吨,占全国产铜量的 20 %。

(二) 槽浸法

槽浸的工作方式分为连续式与半连续式两种,一般用于大型冶炼厂,矿石需进行预加工,此法的成本比堆浸高,但反应速度快,金属回收率高,控制比较容易。槽浸的浸出设备是搅拌反应器,反应器的搅拌可通过机械或空气搅拌方式达到。槽浸的方法主要是应用于难处理金矿的预处理以及铜硫化矿精矿的浸出。

近年来,用细菌氧化法处理难处理金矿发展迅速,目前世界上已建起了 20 多个不同规模的高砷金矿石的微生物氧化提金试验厂和生产厂,南非有 3 个工厂,其中金科(Gencon)公司的 Fairview 金矿是世界上第一个细菌氧化提金厂,1986 年投产以来,效益越来越好,金矿的浸出率稳定在 95%以上,氧化时间由原来的 5 到 6 天缩至 3 到 4 天,使原建浸出槽处理金精矿量由 12t/d 增至 20t/d^[20]。加拿大有一个厂处理含金、银的尾矿,氧化处理时间 40h,金浸出率达 74 %。美国 Tomkin Spring 金矿,槽浸容量最大(槽高 13m,内径 17m),1990 年初处理能力达 500t/d。西澳 Youanmi 矿山运用澳大利亚 BacTech 公司开发出的 BacTech 工艺,建成了世界第一个中等嗜热菌处理难浸金矿的生产厂。该厂处理浮选精矿含 50-60g/t 金,日处理能力达 120t/d 精矿,反应周期为 3.8 天金的回收率是 88%-90%。

运用槽浸的方法回收铜的浮选精矿中的铜的研究始于20世纪90年代末,采用中温菌浸出以次生硫化矿为主的铜精矿在工业上是可行的。而黄铜矿精矿的搅拌槽浸出需要采用高温菌在较高的温度下进行连续浸出方可以得到较好的浸出效果。Codelco与BHP Bringfon两家公司共同投资在智利Chuquicamata建设的一座年产电极铜20000t的湿法提铜厂于2003年投产,该厂采用高温菌连续搅拌浸出黄铜矿精矿,操作温度为70℃。

(三) 原位浸出法

此法还可称为原位置浸出或矿床内浸出法,是从低品位残留矿床或未开采的

矿床中不用采矿作业回收金属的一种方法。这种浸出在矿体中直接进行,在矿体上按设计好的位置钻孔,将浸矿菌液注入孔中,在一定的位置上设置集液孔收集浸出液。有时为了提高浸出液的流动性和浸出液与矿石的接触面积,根据需要有时把矿体进行破碎,多数矿堆是利用地面的自然形状在矿场附近就地堆成的。可用喷淋、浸渍或竖管的方式将浸液引入矿堆,方式的选择取决于气候条件、矿物组成、矿堆高度和表面积以及生产规模。喷淋法可使浸液在矿物表面均匀分布,然而却造成很大的蒸发损失,特别是在干燥的地区。

美国亚历桑那州的San Manuel矿山(BHP铜业公司)从1988年就开始矿床中铜的就地浸出,1995年靠原位浸出每年生产2万t阴极铜^[1]。法国也有一些铀矿用细菌进行地下浸出,1983年,成功地以原位浸出的方法从Dension矿中回收了大约250t U²⁰³。日本小阪铜矿用细菌就地浸出已生产多年。

1.1.2 生物冶金细菌学概述

生物冶金体系中所涉及到的微生物种类多种多样,有化能自养菌、异养菌和真菌,其中主要是化能自养微生物,此类微生物可从无机物的氧化过程中获得能量,并以CO₂为主要碳源和以无机含氮化合物作为氮源合成细胞物。表1-2中列出生物冶金中常见的细菌。

生物冶金细菌学早期研究主要集中在不同性能的高效浸矿菌的选育,随着分离到的细菌的种类和数目的增加,以及对细菌生理和浸矿特性研究的深入,研究人员开始关注不同环境中的浸矿微生物的群落间的关系。主要集中在酸性矿坑水(Acid Mine Drainage, AMD)环境中的微生物群落组成和浸矿体系中的微生物组合的研究^[21-23]。并且有很多关于生物冶金细菌的生长代谢机制和产物的报道。近年来,更多的学者致力于中等嗜热菌、高温菌和耐金属离子菌等高效浸矿菌种的驯化和选育^[24],在实际应用中也有复合菌种浸矿的情况,浸矿效果大多好于纯细菌浸矿。

在硫化矿生物浸出中应用最多的为硫化细菌,在有空气、一定的pH、温度及一定的含氮无机物情况下,硫化细菌就能生长繁殖,并将元素S和某些还原态的硫化物氧化成SO₄²⁻从中获得能量。其中氧化亚铁硫杆菌可以氧化Fe²⁺、元素硫(S⁰)和还原态硫化物;氧化硫硫杆菌能氧化元素硫,不能氧化Fe²⁺;氧化亚铁微螺菌能氧化Fe²⁺,但不能氧化元素硫。在矿物浸出过程中,氧化亚铁硫杆菌和氧化亚铁微螺菌通常与其他菌种混合使用,以提高矿物中有价金属的浸出率^[25]。在有关生物冶金的论文中,报道氧化亚铁硫杆菌为浸矿菌种的论文占大多数^[26-27]。

表 1—2 常见的浸矿微生物生理生化特性
Tab.1-2 Characters of some bioleaching microorganisms

微生物名称	生长温度 (最佳)°C	生长 pH (最佳)	形态学特征	生理学特性
嗜酸氧化亚铁硫杆菌 <i>A. ferrooxidans</i>	5~40 (28~35)	1.2~6.0 (1.5~2.8)	革兰氏阴性, 短杆状, 两头钝圆 1~15×0.5~0.8 μm 单鞭毛可动	严格好氧, 严格无机化能自养, 可氧化亚铁, 还原态硫 (S^0, S_2O_3), 及金属硫化矿
氧化硫硫杆菌 <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	5~40 (28~30)	0.5~0.6 (2.0~3.5)	革兰阴性, 杆状, 0.5×1.0~2.0 μm , 鞭毛可动	同上, 但不能氧化亚铁及硫化矿
氧化亚铁钩端螺旋菌 <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	30~50 (30)	0.5~4.0 (2.5~3.0)	革兰氏阴性, 螺旋状, 0.2~0.4×0.9~1.1 μm , 鞭毛可动	兼性好氧, 严格无机化能自养, 可利用亚铁和黄铁矿为能源, 但不能氧化硫
氧化铁铁杆菌 <i>Ferrobacillus ferrooxidans</i>	45~70	2~3	多形态, 1.0~1.5 μm , 不运动	兼性好氧, 严格无机化能自养, 可氧化亚铁, 还原态硫 (S^0, S_2O_3), 酵母汁及硫化矿

1.2 微生物抗重金属研究进展

随着经济的快速发展, 重金属的用途日趋广泛, 用量日益增加, 因此, 提高重金属的有效开采率与副矿利用率显得尤其重要。但同时由于重金属所具有的毒性, 进入环境中的重金属会导致生态系统的严重破坏。目前, 利用微生物治理重金属污染已经被人们认为是一种有效的手段, 并被广泛应用。微生物抗重金属机理的研究也已成为当今的热点。这为我们对微生物冶金中浸矿微生物的抗重金属研究提供了一定的理论基础。

1.2.1 微生物抗重金属的机理概述

微生物抗重金属的高低除了与微生物生长环境的化学因素有关, 更重要的是由微生物本身的生理结构与遗传特性决定的。其主要表现在以下三个方面:

(一) 细胞吸附沉积

细菌表面载负电荷,并存在多种极性官能团,可通过静电吸附和各种官能团的络合作用固定重金属离子。微生物吸附重金属的机理十分复杂,它们对金属的作用可分为微生物吸着和微生物累积两个不同的生物化学阶段。微生物吸着是重金属在细胞表面吸附和吸收即微生物吸着阶段,主要是指重金属离子与生物体细胞壁表面的一些基团如 $-COOH$ 、 $-H$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-PO_4^{3-}$ 等通过络合、整合、离子交换、静电吸附、共价吸附等作用中的一种或几种相结合的过程^[28]。这一过程是细胞成分对金属的被动吸收,其特点是快速、可逆、不依赖于生物细胞的能量代谢,典型的生物吸着过程在几分钟内就可以完成。微生物累积是一种主动过程,它仅发生在活细胞内。当活细胞生存在环境中时,它可以通过多种机理,包括运输以及细胞内外的吸附来提高本身的金属含量。已提出的金属运送的机制有:脂类过度氧化、复合物渗透、载体协助、离子泵等。微生物累积过程是通过微生物的新陈代谢伴随着能量的消耗进行的,它比微生物吸着慢得多^[29]。

金属硫蛋白是一种研究的比较多的金属结合蛋白,它是一种低分子量、富含半胱氨酸但不含芳香族氨基酸和组氨酸的蛋白质,广泛存在于哺乳动物、植物和微生物中^[30]。金属离子通过和金属硫蛋白中半胱氨酸的巯基结合形成生物学上稳定的形式沉积下来^[31-32]。

随着分子生物学研究手段的发展,采用人工合成物对重金属进行吸附已经成为一种快速、有效的方法。已发现人工合成Hexa-His能插入信号序列N-末端和 α -凝集素序列一半的C-末端之间,此结构使合成产物表达于细胞表面^[33],能提高机体吸附重金属的能力。

(二) 重金属的转化作用

微生物能通过氧化还原、甲基化和去甲基化作用转化重金属,将有毒物质转化成无毒或低毒物质。其中微生物对汞的转化作用最常见且研究得最清楚,它主要有两种作用方式:汞的甲基化和将 Hg^{2+} 还原为 Hg^0 ^[34]。

微生物通过有机汞裂解酶催化有机汞的碳汞键断裂,再由依赖NADPH和FAD为辅酶的二聚体酶—汞还原酶把无机 Hg^{2+} 还原为 Hg^0 ,使之挥发离开菌体细胞,这一过程是可诱导的,有机汞裂解酶和汞还原酶的底物都是其酶的诱导剂。与运输汞有关的基因组成的调控、吸收和转运系统,能将 Hg^{2+} 在特定的时期快速地还原成 Hg^0 ,降低 Hg^{2+} 对细胞的毒性。

(三) 输出输入系统对重金属的作用

某些二价金属离子由于没有足够的还原酶所需的NADPH,又缺乏甲基化或其他共价修饰机制,因此不能像 Hg^0 那样挥发出细胞,但可以借助于输出系统完

成这一任务，其中有三种典型的系统（RND、CDF 和 P 型 ATP 酶）介导二价金属阳离子排出细胞^[35]，目前这种输出机制主要用于抗镉和抗铜系统。

重金属输出系统往往包含几种运输蛋白家族，这些能够通过生物膜运输带电金属离子的蛋白质大都出现在生命早期，有的利用 ATP 水解产生能量，像 ABC-运输子^[36-37]、P 型 ATP 酶^{[34][38]} 和 A 型 ATP 酶；有的利用质子梯度作为驱动金属离子运输的动力，例如 RND-运输子^[39-40]；还有的金属离子运输的驱动力不很清楚，例如 HoxN-家族和 CDF-家族^[41]。

1.2.2 微生物抗铜研究现状

对所有的细胞来说，铜是一种必不可少的微量元素^[42]。它作为许多氧化还原酶的辅因子，如细胞色素氧化酶、超氧化物歧化酶、多巴胺 β-羟化酶等，在生物体的新陈代谢中，发挥着十分重要的作用^[43]。但是，过高浓度的铜离子却对生物有毒害作用，这主要是因为铜离子能使脂类和蛋白质氧化，产生过多的自由基，这对生物体是非常不利的^[44-45]。因此，维持机体铜的平衡对所有生物体来说就显得十分重要^[46]。研究生物体维持铜平衡的机理也一直是基础研究中的重要领域^[47-48]。

到目前为止，已经鉴定并克隆了多个抗铜基因。其中，有三种细菌是研究的比较多的，它们是 *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas syringae* 和 *Escherichia coli*。其中革兰氏阳性病原菌 *Enterococcus hirae* 是研究的最多的细菌之一，他包含了铜转运和抗性系统^[49]，其中有两个基因 *copA* 和 *copB* 分别属于离子泵入和泵出的 P 型 ATP 酶。在 *Pseudomonas syringae*，有两个调控基因 *copR* 和 *copS*，和 4 个结构基因 *copABCD*，它们是由质粒控制的^[50]。而在 *Escherichia coli* 中，基因 *PcoABCDS* 和染色体上的基因 *cutABCDEF* 也被认为与铜抗性有关^[51]，Christopher 等也报道了 *copA* 是 *Escherichia coli* 中的一种 Cu 转运 P 型 ATP 酶^[52]。

对于氧化亚铁硫杆菌，尽管已经得到了多株抗铜菌株^[53-55]，但是，*A. ferrooxidans* 铜抗性机理的遗传学研究，目前报导还比较少^[55-56]。Boyer 的研究显示铜可能是通过一种可诱导的泵出系统泵出细胞外的^[57]。Chisholm^[56] 和 Ahmod^[58]的结果都说明 *A. ferrooxidans* 的铜抗性基因定位与染色体而不是质粒。Paulino 等^[59]通过 RNA arbitrarily primed PCR 的方法鉴定出了许多被铜离子诱导或抑制的基因，但是这些基因在铜抗性中的作用仍然不清楚。

1.3 课题的研究目的和研究内容

1.3.1 依据和目的

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*A. ferrooxidans*)，作为一种在微生物冶金中起着重要作用的细菌，已广泛应用于低品位硫化铜矿的生物浸出。由于其特殊的生长环境，与其它大多细菌相比，它能在更高浓度的铜离子环境中生长^[60]。研究这种在极端环境下生长的细菌的抗铜机理，对整个生物维持铜平衡机理的研究有着十分特别的意义，而且能为通过基因工程的手段提高*A. ferrooxidans*的铜抗性以改良优化生物冶金工艺奠定理论基础。

但是，*A. ferrooxidans* 铜抗性的分子机理仍然不清楚，用实验的方法克隆到的抗铜基因还没有见有报导。庆幸的是，近来 *A. ferrooxidans* ATCC23270 全基因组已经被测序并且在网上公布(<http://www.tigr.org>) (CMR Version Number: Version 18.0)。其中，有四个基因被注释与铜抗性有关，它们的登录号分别是 AFE-0329, AFE-0454, AFE-0663, 和 AFE-1073 (在此文中，我们分别将其表示为基因 *Afe0329*, *Afe0454*, *Afe0663* 和 *Afe1073*，将其表达的蛋白质分别表示为 AFE0329, AFE0454, AFE0663 和 AFE107)。经序列对比分析可知，不像 *Afe0454* 或 *Afe1073*，基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 有着非常高的同源性 (94.43%)。

位于同一基因组中不同基因座的高同源性基因，必定存在着结构和功能上的差别。研究这些高同源性基因之间的联系和区别，对于揭示整个基因组的结构和功能，高同源性基因的表达调控和它们之间的分子进化关系都有十分重要的意义。本文以 *A. ferrooxidans* ATCC23270 全基因组中的两个高同源性的基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 为研究对象，采用一系列的方法研究了它们在机体铜抗性中的作用，并使用 PCR-RFLP 方法巧妙的鉴定了这两个高同源性基因之间的表达差异，这不仅能使我们进一步开展这两个基因的表达调控研究，更好的理解这种生长在极端环境下的，在工业生产中有重要应用的细菌的铜抗性机理，而且有利于我们为通过基因工程的手段得到高抗铜的 *A. ferrooxidans* 菌株以改造生物冶金工艺奠定理论基础。

1.3.2 论文课题受资助情况

本论文课题受以下项目资助：

国家重点基础研究发展计划项目(No.2004CB619201)。

国家自然科学基金项目 (No. 50321402, 30428014, 30670044, 50621063)

1.3.3 论文的主要研究内容

- (一) *A. ferrooxidans* 铜抗性基因的实验鉴定；
- (二) 铜抗性基因的转录子鉴定及转录子成分的生物信息学分析；
- (三) 铜抗性基因的转录子的普遍性分析；
- (四) PCR-RFLP 方法在鉴定基因差异表达中的新应用。

第二章 不同基质下铜抗性基因的差异表达

2.1 引言

在 *A. ferrooxidans* ATCC23270 全基因组序列中, 有 4 个基因被注释与铜抗性有关, 经序列比对可知, 其中, *Afe0329* 与 *Afe0663* 有着非常高的同源性 (如图 2-1), 同源性高达 94.43%。为了鉴定这两个基因与铜离子胁迫的关系, 本

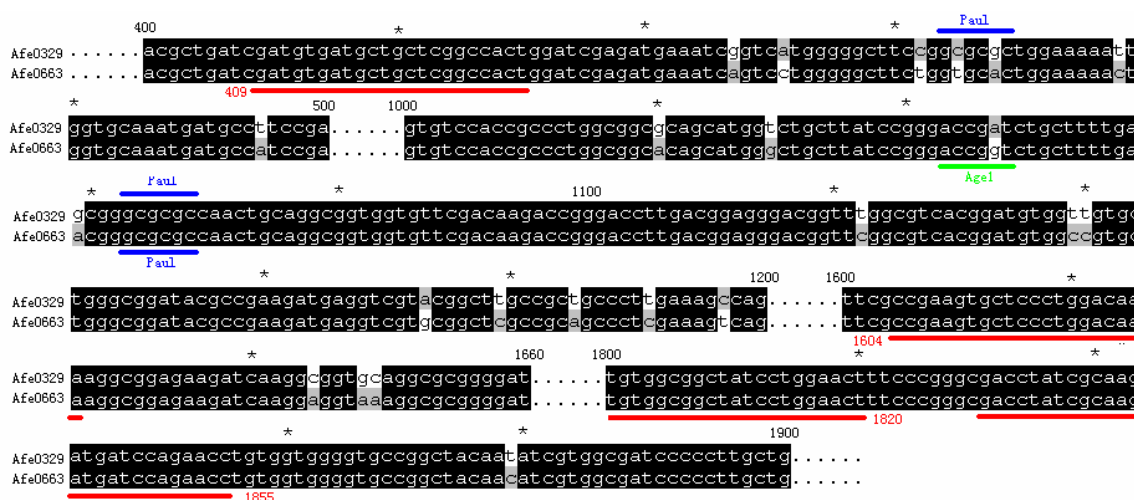


图 2-1 *Afe0329* 和 *Afe0663* 序列比对 (同源性为 94.43%)

左边为基因名字。两条基因序列都为 2025bp, 序列上部显示核苷酸位置, 每 20bp 用星号 (*) 标识。图中只显示部分比对区域, 其它区域用省略号表示, 黑色背景为两条序列的核苷酸完全相同。引物对 409 和 1855, 1604 和 1820, 如图用红色显示, 能完全与两条序列互补配对。

限制性内切酶 *PauI* 和 *AgeI* 酶切位点分别用蓝色和绿色标识

Fig.2-1 Alignment of *Afe0329* and *Afe0663* (94.43%identity)

The gene names are listed in left column. Both of genes are 2025bp, numbers at top indicate the position of nucleotides of the genes, every 20bp shows an asterisk. The picture shows only partial regions alignment, other regions indicate by ellipsis, dark grey back ground means that the nucleotides in that column are identical in both sequences in the alignment. Primer pairs 409 and 1855, 1604 and 1820, which can bind to both gene sequences with no gap nucleotide, are indicated in red. The digested position of restriction endonucleases *PauI* and *AgeI* are indicated in blue and green respectively

文采用实时定量 PCR 技术鉴定了它们在不含铜的亚铁培养基和含铜离子的亚铁培养基中基因表达差异, 为了测定基因差异表达的最佳铜离子浓度, 我们采用了

测定氧化亚铁硫杆菌的亚铁氧化率的方法。基因差异表达的最佳铜离子浓度选择为既对菌株生长有足够的胁迫作用，又不能过于毒害菌株以完全抑制其生长。

实时定量 PCR 技术，是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号累积实时监测整个 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。实时定量 PCR 的应用范围很广泛，包括 mRNA 表达的研究、DNA 拷贝数的检测、单核苷酸多态性 (SNPs) 的测定等，其中研究基因在不同环境下的差异表达是最重要的应用之一。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌株、引物和生长条件

本章中所用的菌株、引物见表 2-1。引物以 Institute for Genomic Research (TIGR) 网站上的 *A. ferrooxidans* ATCC23270 全基因组序列为模板由 Primer Premier 5 软件设计而成。

表 2-1 菌株和引物

Tab.2-1 Strains and primers

菌株和引物	描述	来源 ^a
菌株		
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	Wild type	ATCC
引物		
457F16S	5'-AATCCAAGAAGAAGCACCG-3'	This study
695R16S	5'- CCACTGATGTTCTCCAG-3'	This study
1604	5'- CCGAAGTGCTCCCTGGACAAA -3'	This study
1820	5'- AGTTCCAGGATAGCCGCCACA -3'	This study

a. ATCC, American Type Culture Collection.

A. ferrooxidans ATCC23270 在 30°C, 170rpm 摇床条件下 Fe(II)培养基中培养^[61]。为测定铜离子对细胞生长的影响，培养基中加入 Cu²⁺终浓度分别为 10g/L、20g/L、30g/L、40g/L 的经过滤灭菌的 CuSO₄·5H₂O。*Escherichia coli* 培养在如文

献所述的 LB 培养基中^[62]。

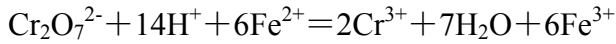
2.2.2 最佳铜离子浓度的鉴定

取新配制的亚铁培养基于 100mL 锥形瓶中，加入经过滤灭菌 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的至 Cu^{2+} 终浓度分别为 10g/L、20g/L、30g/L、40g/L，按 10% 接种量接种菌株后于 30℃ 震荡培养，如文献所述用重铬酸钾法滴定亚铁氧化率^[63]。具体原理和操作步骤如下：

重铬酸钾滴定法：

A. 原理

酸性溶液 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 可以将溶液中的 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ，并在指示剂二苯胺磺酸钠的作用下显示紫色，指示终点。反应过程如下：



B. 试剂

1. $1.67 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 标准液；
2. 硫磷酸— H_2SO_4 、 H_3PO_4 、 dH_2O 的体积比为 150：150：700，配制时先将 H_3PO_4 倒入蒸馏水中，再缓慢加入 H_2SO_4 ，边加边搅拌；
3. 指示剂：2% 二苯胺磺酸钠。

C. 步骤

1. 取样 1 mL，加入 10 mL 左右 $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 混合液；
2. 加入指示剂 2-3 滴；
3. 记录初始的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 体积；
4. 进行滴定，直至菌液变紫，紫色要维持 30 秒以上才算到达终点；
5. 记录此时的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 体积，进行数据处理。

D. 数据处理

对实验所得的数据进行如下处理，便可得出菌株的亚铁氧化率：

$$C_{\text{Fe}^{2+}} = \frac{C_{\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}} \times V_{\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}}}{V_{\text{Fe}^{2+}}}$$

（式中， $C_{\text{Fe}^{2+}}$ 单位：mol/mL， $C_{\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}}$ 的单位：mol/L。）

$$\text{Fe}^{2+}\text{氧化率}(\%) = \frac{C'_{\text{Fe}^{2+}}}{C^0_{\text{Fe}^{2+}}} \times 100$$

(式中, $C_{Fe^{2+}}^0$: 培养基刚接种时 Fe_{2+} 的浓度, 即 Fe_{2+} 的初始浓度; $C_{Fe^{2+}}'$: 测定的菌液中 Fe^{2+} 的浓度。)

2.2.3 RNA 提取

4℃收集对数生长中期的细菌并立即提取 RNA。用稀硫酸洗涤收集的细菌以去除铁离子。RNA 提取中所用的器具使用 0.1% 焦碳酸二乙脂 (DEPC) 水浸泡过夜并高压蒸汽灭菌。使用 TRIZOL 试剂 (Invitrogen) 提取总 RNA, RNeasy Mini Kit 试剂盒 (Qiagen) 纯化, RNase-free DNase set 试剂盒 (Qiagen) 去掉基因组 DNA 的污染。所有操作按操作说明书, 稍加修改操作, 具体操作步骤如下:

1. 4℃迅速收集 250ml 长至对数生长中期的细菌, 并立即提取 RNA;
2. 加 TRIZOL 1ml, 充分混匀, 15~30℃ 暖育 5min;
3. 加 0.2ml 氯仿, 用力摇晃 15s, 30℃暖育 2~3min, 2~8℃ 12000g 离心 15min;
4. 取上清, 加 0.5ml 异丙醇, 混匀, 15~30℃暖育 10min, 2~8℃ 12000g 离心 10min;
5. 弃液体, 加无 RNase 水 100μL, 加 350μL RLT Buffer, 充分混匀;
(注意: 确保 1ml RLT Buffer 在使用之前加了 10μL β-ME)
6. 加 250 μL 乙醇 (96~100%), 用枪头吸打充分混匀。不要离心。立即进行第 7 步;
7. 将样品 (700μL) 移至 RNeasy mini column, 并将其放入 2ml 的收集管 (collection tube) 中, 12000rpm 离心 15s, 弃收集管中液体;
8. (DNase 处理) Qiagen 提供的 RNase-free DNase set 可方便的在 RNA 纯化过程中进行 DNase 消化。一般来说, 因为 RNeasy 硅胶膜技术在不需要进行 DNase 处理时能够有效的去除 DNA, 所以不需要进行 DNase 消化。但对某些微量的 DNA 就敏感的 RNA 应用, 进一步的 DNA 去除是必要的。
 - (1) 加 350μL RW1 buffer 至 RNeasy mini column, 以不小于 10000rpm 离心 15s, 弃掉收集管中的液体;
 - (2) 取另一新的离心管, 加入 10μL DNase1 stock solution, 70μL RDD buffer, 轻轻上下颠倒混匀。RDD buffer 是为 DNase1 准备的;
(注意: DNase1 对物理环境敏感, 混匀时轻轻的上下颠倒, 不要涡旋)
 - (3) 用移液枪将 DNase1 (80μL) 混合液直接加到 RNeasy 硅胶膜正中间。室温 (20~30℃) 放置 15min。如果混合液粘在管壁上, 消化可能会不完全;
 - (4) 加入 350μL RW1 Buffer 至 RNeasy mini column, 不小于 8000g 离心 15s, 弃去收集管中的液体;

9. 将 RNeasy column 移至新的收集管中, 加入 500 μ L RPE Buffer, 轻轻盖上管盖, 12000rpm 离心 15s, 弃去收集管中液体;
(注意: 在使用前确保乙醇已加入到 RPE Buffer)
10. 再次加入 500 μ L RPE Buffer, 轻轻盖上管盖, 12000rpm 离心 2min;
11. 将 RNeasy column 移入一新的 2ml 的收集管, 丢弃老的收集管及里面的液体。
最大转速离心 1min;
12. 将 RNeasy column 移入一新的 1.5ml 的离心管中, 加入 20 μ L 无 RNase 的水至 RNeasy 硅胶膜上。轻轻盖上管盖。静置数分钟。12000rpm 离心 1min。
收集到的 20 μ L 无 RNase 的水中即溶解到了所提的 RNA。

2.2.4 cDNA 合成

cDNA 的合成使用 Superscript III RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen), 以 random hexamers (Invitrogen)按操作说明书合成。具体操作步骤如下:
反转录 (总共 20 μ L 体系)

1. 体系

上述所提 RNA	10 μ L
随机引物 (60ng/ μ L)	2 μ L
dNTP(10uM)	1 μ L

2. 65 $^{\circ}$ C 5min, 然后冰上至少 1min;

3. 简短离心, 加入

5 \times First-strand Buffer	4 μ L
0.1M DTT	1 μ L
RNase 抑制剂 (40U/ μ L)	1 μ L
SupperScriptIII RT	1 μ L

4. 用移液枪吸打混匀, 25 $^{\circ}$ C 5min;

5. 50 $^{\circ}$ C 30~60min;

6. 70 $^{\circ}$ C, 15min。

总共下来, 有 cDNA 20 μ L, 以后每次操作用约 1 μ L。

2.2.5 实时定量 (Real-time) PCR

使用 MyiQTM single color Real-Time PCR Detection system (BIO-Rad)和 SYBR Green Realtime PCR MasterMix 试剂盒 (YOBO CO.LTD), 鉴定了目标基因在不含铜离子的培养基和含 10g/L 的铜离子的培养基中的差异表达。以持家基

因 *rrs* (16s rRNA) 基因为参照基因。所有引物对所得的 PCR 产物均在 100~250bp 的范围内：引物对 1604 和 1820（如表 2-1）可同时完全结合在基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 上；引物 695R16S 和 457F16S（如表 2-1）可结合在 *rrs* 基因上（如图 2-1）。实时定量（Real-time）PCR 数据使用 Optical system software (Version 1.0) 按操作说明书处理。

所有实时定量（Real-time）PCR 操作使用独立来源的 RNA 样品重复三次。

实时定量 PCR 具体操作步骤如下：

1. 设计、订购引物；
2. 打开仪器，预热 30 分钟；
3. 打开 MyiQ 软件，设置参数；
 - (1) 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: 我们实验中所用的实验步骤如下：

Step 1:	95°C	30s	
Step 2:	95°C	15s	
	55°C	30s	}
	72°C	30s	
			40 循环
Step 3:	95°C	1min	
Step 4:	55°C	10s	
Step 5:	55°C	10s	80 循环
Step 6:	4°C	∞	
- (2) 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。
- (3) 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):

- a: 用 ddH₂O 将“Well Factor solution”稀释 10 倍, 对于 50 μ L 的体系而言即“Well Factor solution”5 μ L, ddH₂O 45 μ L, 配制 5100 μ L 的稀释液;
- b: 将 96 孔板每个孔加入 50 μ L 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”。

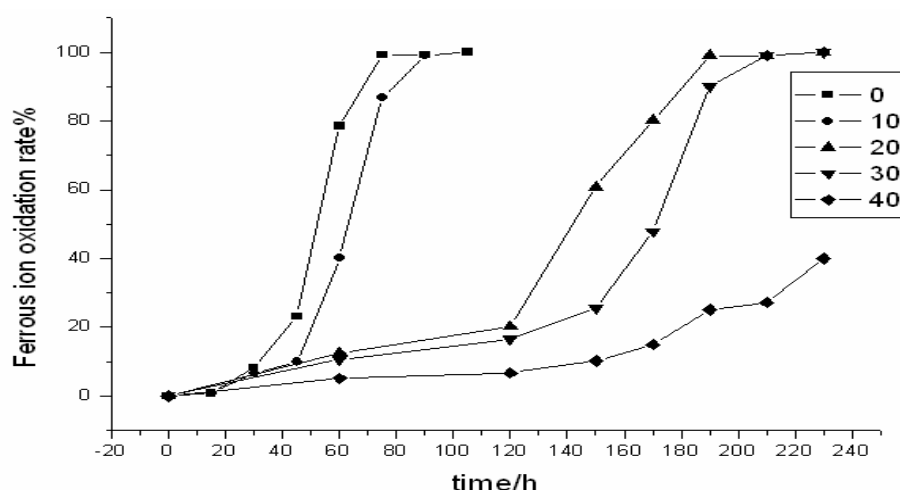
4. 配制反应体系(25 μ L 体系):

MasterMix 试剂	12.5 μ L
正向引物	1 μ L
反向引物	1 μ L
cDNA	1 μ L
ddH ₂ O	9.5 μ L

5. 将 PCR 管按照设定的“Plate Setup”放入仪器, 关盖;
6. 在软件的操作界面上点击“Run Protocol with Selected Plate Setup”, 将“Sample Volume”设为 50 μ L, 然后点击“BEGIN RUN”;
7. 收集、处理数据。

2.3 结果与讨论

为了测定基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 对铜离子胁迫应答的最佳铜离子浓度, 本章采用重铬酸钾滴定法, 测定了 0、10、20、30、40g/L 的不同铜离子浓度下氧化亚铁硫杆菌的亚铁氧化率, 结果如图 2—2, 铜离子对菌株亚铁氧化活性有较大影响, 当铜离子浓度大于 10g/L 时, 细菌亚铁氧化活性降低直至完全抑制。据此本文选定 10g/L 铜离子作为研究基因差异表达的最佳铜离子浓度。

图 2-2 Cu^{2+} 浓度对菌株亚铁氧化活性的影响

图中标注数值为铜离子浓度

Fig.2-2 Effect of Cu^{2+} concentration on ferrous ion oxidationThe number of X axis is the Cu^{2+} concentration

为了测定基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 对铜离子胁迫的应答, 采用实时定量 (Real-time) PCR 技术测定了这两个基因在不含铜和含 10g/L 的铜离子的培养基中的差异表达。

基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 序列比较的结果显示, 此两个基因有着十分高的同源性(94.43% identity) (图 2-1), 很难设计它们两个中的任何一个基因特异的引物。因此特殊的引物对 1604 和 1820 被设计出来能与 *Afe0329* 和 *Afe0663* 完全结合(图 2-1)。用此引物对做实时定量 (Real-time) PCR, 结果反映的是这两个基因之和在无铜和含铜培养基中的表达差异。结果显示, 持家基因 *rrs* 基因在这两种环境中的表达没有明显差异, 而 *Afe0329* 和 *Afe0663* 表达的 RNA 之和在含铜的培养基中是不含铜的培养基中的 32.5 倍, 此结果说明 *Afe0329* 和 *Afe0663* 这两个基因或者其中的某个基因的表达对铜离子胁迫是十分敏感的。

第三章 铜环境中高同源性的铜抗性基因之间的表达差异

3.1 引言

实时定量 PCR 的结果显示 *Afe0329* 和（或）*Afe0663* 对铜离子的胁迫应答非常敏感。但由于这两个基因的同源性非常高，引物 1604 和 1860 同时结合在这两个基因的两条序列上（图 2-1），这两个基因之间本身的表达差异无法用实时定量 PCR 区分。

为了鉴定 *Afe0329* 和 *Afe0663* 对铜离子的应答，本章采用了 PCR-RFLP 策略成功的区分了这两个基因在铜环境中的表达差异。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌株、质粒、引物和生长条件

本章中所用的菌株、质粒和引物见表 3-1。

A. ferrooxidans ATCC23270 在 30°C，有氧条件下，170rpm 摇床条件下培养在如文献所述的含 Fe(II)培养基中^[61]。*Escherichia coli* 培养在如文献所述的 LB 培养基中^[62]。

3.2.2 RNA 提取

4°C 收集对数生长中期的细菌并立即提取 RNA。用稀硫酸洗涤收集的细菌以去除铁离子。RNA 提取中所用的器具使用 0.1% DEPC 水浸泡过夜并高压蒸汽灭菌。使用 TRIZOL 试剂(Invitrogen)提取总 RNA，RNeasy Mini Kit 试剂盒(Qiagen)纯化，RNase-free DNase set 试剂盒(Qiagen)去掉基因组 DNA 的污染。所有操作按操作说明书，稍加修改操作，具体操作步骤如下：

1. 在 4°C 迅速收集 250ml 长至对数生长中期的细菌，并立即提取 RNA；

表 3—1 菌株、质粒和引物

Tab.3-1 Strains, plasmids and primers

菌株、质粒和引物	描述	来源 ^a
菌株		
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	Wild type	ATCC
<i>E. coli</i> TOP10	F' competent cells	Invitrogen.
质粒		
pGEM ^R -T	T Vector Systems	Promega.
引物		
409	5'- GATGTGATGCTGCTCGGCCACT -3'	This study
1855	5'- GGTTCTGGATCATCTTGCGATAGGTC -3'	This study
T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'	Sangon.LTD.
SP6	5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3'	Sangon.LTD.

a. ATCC, American Type Culture Collection.

2. 加 TRIZOL 1ml, 充分混匀, 15~30℃ 暖育 5min;
3. 加 0.2ml 氯仿, 用力摇晃 15s, 30℃暖育 2~3min, 2~8℃ 12000g 离心 15min;
4. 取上清, 加 0.5ml 异丙醇, 混匀, 15~30℃暖育 10min, 2~8℃ 12000g 离心 10min;
5. 弃液体, 加无 RNase 水 100μL, 加 350μL RLT Buffer, 充分混匀;
(注意: 确保 1ml RLT Buffer 在使用之前加了 10μL β-ME)
6. 加 250 μL 乙醇 (96~100%), 用枪头吸打充分混匀。不要离心。立即进行第 7 步;
7. 将样品 (700μL) 移至 RNeasy mini column, 并将其放入 2ml 的收集管 (collection tube) 中, 12000rpm 离心 15s, 弃收集管中液体;
8. (DNase 处理) Qiagen 提供的 RNase-free DNase set 可方便的在 RNA 纯化过程中进行 DNase 消化。一般来说, 因为 RNeasy 硅胶膜技术在不需进行 DNase 处理时能够有效的去除 DNA, 所以不需进行 DNase 消化。但对某些微量的 DNA 就敏感的 RNA 应用, 进一步的 DNA 去除是必要的;
 - (1) 加 350μL RW1 buffer 至 RNeasy mini column, 以不小于 10000rpm 离心 15s, 弃掉收集管中的液体;
 - (2) 取另一新的离心管, 加入 10μL DNase1 stock solution, 70μL RDD buffer, 轻轻上下颠倒混匀。RDD buffer 是为 DNase1 准备的;

- (注意: DNase1 对物理环境敏感, 混匀时轻轻的上下颠倒, 不要涡旋)
- (3) 用移液枪将 DNase1 (80 μ L) 混合液直接加到 RNeasy 硅胶膜正中间。室温(20~30 $^{\circ}$ C) 放置 15min。如果混合液粘在管壁上, 消化可能会不完全;
- (4) 加入 350 μ L RW1 Buffer 至 RNeasy mini column, 不小于 8000g 离心 15s, 弃去收集管中的液体;
9. 将 RNeasy column 移至新的收集管中, 加入 500 μ L RPE Buffer, 轻轻盖上管盖, 12000rpm 离心 15s, 弃去收集管中液体;
- (注意: 在使用前确保乙醇已加入到 RPE Buffer)
10. 再次加入 500 μ L RPE Buffer, 轻轻盖上管盖, 12000rpm 离心 2min;
11. 将 RNeasy column 移入一新的 2ml 的收集管, 丢弃老的收集管及里面的液体。最大转速离心 1min;
12. 将 RNeasy column 移入一新的 1.5ml 的离心管中, 加入 20 μ L 无 RNase 的水至 RNeasy 硅胶膜上。轻轻盖上管盖。静置数分钟。12000rpm 离心 1min。收集到的 20 μ L 无 RNase 的水中即溶解到了所提的 RNA。

3.2.3 cDNA 合成

cDNA 的合成使用 Superscript III RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen), 以 random hexamers (Invitrogen) 按操作说明书合成。具体操作步骤如下:
反转录 (总共 20 μ L 体系)

1. 体系

上述所提 RNA	10 μ L
随机引物 (60ng/ μ L)	2 μ L
dNTP(10uM)	1 μ L

2. 65 $^{\circ}$ C 5min, 然后冰上至少 1min;

3. 简短离心, 加入

5 \times First-strand Buffer	4 μ L
0.1M DTT	1 μ L
RNase 抑制剂 (40U/ μ L)	1 μ L
SupperScriptIII RT	1 μ L

4. 用移液枪吸打混匀, 25 $^{\circ}$ C 5min;

5. 50 $^{\circ}$ C 30~60min;

6. 70 $^{\circ}$ C, 15min。

总共下来, 有 cDNA 20 μ L, 以后每次操作作用约 1 μ L。

3.2.4 PCR-RFLP 克隆策略

(1) PCR

以上述步骤合成的 cDNA 为模板, 用引物 409 和 1855 扩增铜抗性基因。引物 409 和 1855 能同时结合到 *Afe0329* 和 *Afe0663* 基因序列上。

PCR 反应体系如下(50.0 μ L 体系):

ddH ₂ O	31.0 μ L
10 \times PCR Buffer	5.0 μ L
MgCl ₂ (25mM)	5.0 μ L
dNTP (2mM)	5.0 μ L
引物 409 (10mM)	1.0 μ L
引物 1855 (10mM)	1.0 μ L
<i>Taq</i> 酶 (5 unit/ μ L)	1.0 μ L
cDNA	1.0 μ L

PCR 扩增的程序如:

1. 94 $^{\circ}$ C 解链 4min;
2. 94 $^{\circ}$ C 解链 40s;
3. 55 $^{\circ}$ C 退火 30s;
4. 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s;
5. 72 $^{\circ}$ C 延伸; (2—5 步, 共 32 个循环)
6. 4 $^{\circ}$ C ∞ 。

(2) 连接

1. 简短离心 pGEM-T (promega) 载体, 使溶液位于底部;
2. 取 200 μ L 离心管, 配体系:

注: 2 \times rapid ligation buffer 在使用前涡旋混匀。

2 \times rapid ligation buffer	5 μ L
PCR product	2 μ L
T4 DNA ligase	1 μ L
补水至	10 μ L

3. 吸打混匀, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。(或者室温放置 1h, 但连接效率较低)

注: 连接液可-20 $^{\circ}$ C 保存。

(3) 转化

1. 准备 LB/ampicillin/IPTG/X-Gal 平板;

2. 简短离心连接液。冰上加 2 μ L 连接液至一 1.5ml 离心管；
3. 冰上溶解感受态细胞（约 5min）（天根 Top10, 目录号为 CB-104），轻轻弹打混匀细胞；
4. 加 50 μ L 感受态至第二步 2 μ L 连接液中。轻轻弹打混匀后冰上放置 20min；
5. 42 $^{\circ}$ C 水浴 45—50s，不要摇晃。立即将离心管于冰上放 2min；
6. 室温加 950 μ L SOC. 37 $^{\circ}$ C 150rpm 培养 1.5h；
7. 取 100 μ L 涂平板。做重复；（可选：第 6 步培养后，1000g 离心 10min，去上清，200 μ L SOC 重悬）
8. 37 $^{\circ}$ C，倒置培养，过夜。

（4）重组子鉴定

将平板中长好的菌落用牙签随机挑取，加 50 μ L TE (ph7.0~7.5)，在 PCR 仪中 99.9 $^{\circ}$ C 破壁 5min，冷冻于冰箱备用。

T7 和 SP6 扩增：（50 μ L 体系）

PCR 反应体系如下(50.0 μ L 体系)：

ddH ₂ O	31.0 μ L
10 \times PCR Buffer	5.0 μ L
MgCl ₂ (25mM)	5.0 μ L
dNTP (2mM)	5.0 μ L
引物 T7 (10mM)	1.0 μ L
引物 SP6 (10mM)	1.0 μ L
Taq 酶 (5 unit/ μ L)	1.0 μ L
cDNA	1.0 μ L

PCR 扩增的程序如：

1. 94 $^{\circ}$ C 解链 4min；
2. 94 $^{\circ}$ C 解链 40s；
3. 55 $^{\circ}$ C 退火 30s；
4. 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s；
5. 72 $^{\circ}$ C 延伸；（2~5 步，共 32 个循环）
6. 4 $^{\circ}$ C ∞ 。

扩增产物凝胶电泳，以确定阳性克隆。剩下的冰箱保存，做 RFLP 酶切备用。

（5）RFLP 酶切

取上述步骤阳性克隆 PCR 做酶切，分别使用内切酶 *PauI* 或 *ageI*（Promega 产品）酶切 PCR 产物。按操作说明书进行，具体步骤如下：

RFLP 酶切体系：（10 μ L）

PCR 产物	3 μ L
ddH ₂ O	5.5 μ L
10 \times Buffer	1.0 μ L
<i>Pau</i> I 或 <i>age</i> I	0.5 μ L

适合的温度下酶切过夜。

3.3 结果

为了鉴定基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 的表达差异,我们使用了 PCR-RFLP 策略:提取在铜离子环境中生长至对数生长中期的 *A. ferrooxidans* 细菌的 RNA,并合成 cDNA,用能同时结合到 *Afe0329* 和 *Afe0663* 的引物对 405 和 1899 PCR 扩增(图 2-1),克隆,转化,挑克隆子,用 T7 和 SP6 扩增后用 *Pau*I 酶切,并用 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

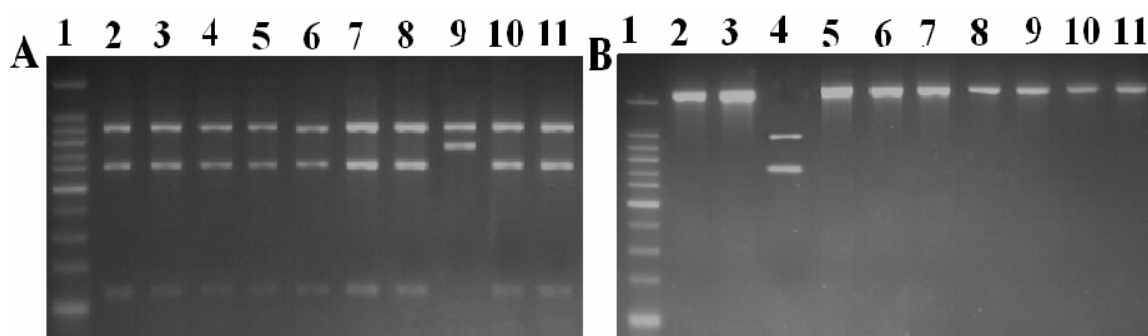


图 3-1 RFLP 酶切图 (1.5%琼脂糖凝胶)

(A)限制性内切酶 *Pau*I 酶切图; (B) 限制性内切酶 *Age*I 酶切图。Lane1 为 DNA marker(Dongsheng)。96%的 Lane 为 *Afe0329* 基因片段产物。此图显示 10 个 RFLP 产物。(A)中 Lane9 和 (B)中 Lane4 为 *Afe0663* 产物, 其它 Lane 为 *Afe0329* 产物

Fig.3-1 RFLP profiles on 1.5% agarose gel electrophoresis

(A) digested with *Pau*I. (B) digested with *Age*I. Lane1 is DNA mass markers (Dongsheng). The RFLP pattern analysis was performed three times, using independent cDNA samples, about 96% lanes were *Afe0329* fragments. Ten RFLP products were shown here. Lane 9 in picture (A) and lane 4 in picture (B) are products of *Afe0663*, others are products of *Afe0329*

在基因 *Afe0329* 的 PCR 产物中, *Pau*I 内切酶有两个酶切位点,而在 *Afe0663* 的 PCR 产物中只有一个酶切位点,所以 *Afe0329* 的 PCR 产物酶切产物琼脂糖凝胶电泳有 3 条带(大小分别为 126bp, 601bp, 927bp),而 *Afe0663* 的 PCR 产物酶切产物琼脂糖凝胶电泳只有 2 条带(大小分别为 727bp, 927bp)。RFLP 图结果表

明, 约 96% 的电泳泳道 (总共 40 个克隆子) 为 *Afe0329* 的 PCR 产物, 只有约 4% 的为 *Afe0663* 的 PCR 产物 (图 3-1)。此结果说明在铜环境中 *Afe0329* 比 *Afe0663* 表达的 RNA 更多。

使用内切酶 *AgeI*, 我们也做了同样的实验。*AgeI* 在 *Afe0663* 的 PCR 产物中有一个酶切位点, 而在 *Afe00329* 的 PCR 产物中没有酶切位点。其结果与内切酶 *PauI* 的一致。

3.4 讨论

本章中, PCR-RFLP 策略被首次用来鉴定同一基因组中两个高同源性基因之间的差异表达, 结果也说明此方法用在此领域是可行的和有效的。实际上, PCR-RFLP 作为一种有效的区别高同源性序列的方法已经应用在许多领域^[64-65], 如微生物生态分析^{[49][66-68]}, 其步骤如下: 首先, 提取环境微生物混合菌群的 DNA, 用通用引物对 (如 1387R 和 63F) PCR 扩增 16S rRNA 基因; 然后, PCR 产物纯化并 T-A 克隆; 其后, 挑克隆子用引物 PCR 扩增重组子中插入的 16S rRNA 基因片段, 并用特异限制性内切酶酶切 PCR 产物; 最后, 凝胶电泳得到特异的 RFLP 酶切图, 对图进行生态分析^[69]。本章中, 我们以此步骤为参考研究 *Afe0329* 与 *Afe0663* 之间的差异表达, 只是用合成的 cDNA 代替环境微生物混合菌群的 DNA; 用能同时完全结合到两条基因序列上的引物对代替通用引物; 研究目标也由微生物生态分析改为 *Afe0329* 和 *Afe0663* 之间表达的 RNA 的差异。

RFLP 酶切图的结果显示在有铜离子存在的培养基中 *Afe0329* 的表达量明显多于 *Afe0663*。为什么会有这样的结果? 这可能是由于它们不同的转录调控和不同的转录方式造成的。例如, *Afe0329* 是和位于它旁边的两个基因 *Afe0330* 和 *Afe0331* 一起转录的, 它们位于同一个转录子中 (见第六章)。而 *Afe0663* 是单独转录的。另外, *Afe0329* 和 *Afe0663* 表达的蛋白质 AFE0329、AFE0663 也可能不同。尽管它们有如此高的同源性, 但是当用软件 THMM Severs V2.0 分析它们的跨膜序列时 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), 我们仍发现了它们之间的细微差别 (图 3-2): 结果显示 AFE0329 有 8 次跨膜, N 末端在细胞质侧的可能性为 0.99, 而 AFE0663 的这个值小的多 (0.77), AFE0663 更有可能是 N 末端出于细胞外侧的 7 次跨膜的蛋白。考虑到 Histidine-rich 序列作为金属结合区域位于序列的 N 末端 (图 3-2)^[70], 我们推测 AFE0329 是一种跨膜的重金属离子泵出蛋白, 而 AFE0663 是一种跨膜的重金属离子泵入蛋白, 就像在 *Enterococcus hiare* 菌中研究得比较多的 *copA* 和 *copB* 一样, *copA* 是一种重金属

离子泵出的 P 型 ATP 酶，而 *copB* 是一种重金属离子泵入的 P 型 ATP 酶^{[49][66]}。这也很好的解释了为什么 *Afe0329* 在铜离子胁迫环境中比 *Afe0663* 表达的 RNA 多，因为在铜胁迫环境中需要更多的离子泵出系统将有毒的重金属离子泵出细胞外以维持细胞的重金属离子平衡。当然，此推测还需要进一步的实验证实。

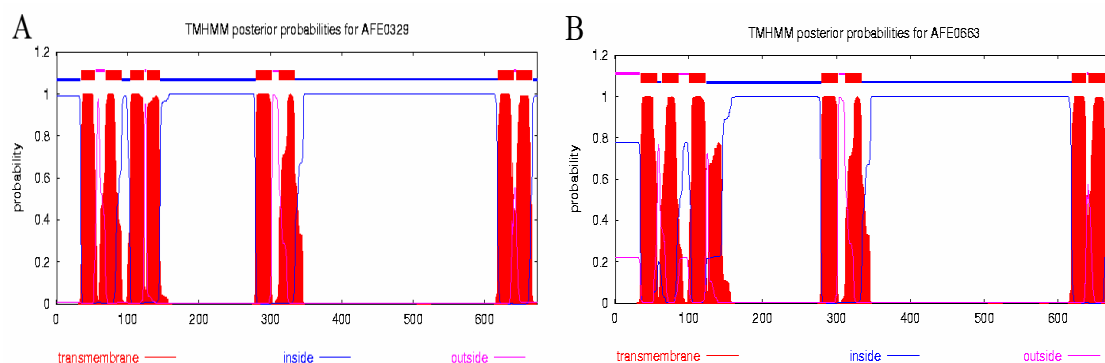


图 3—2 使用 THMM Severs V2.0 软件对 AFE0329 (A)和 AFE0663 (B)跨膜区预测结果
所有参数为默认参数。AFE0329 和 AFE0663 的跨膜螺旋数不同，AFE0329 N-term 在细胞质
侧的可能性大于 AFE0663

Fig.3-2 Prediction of transmembrane helices of AFE0329 (A) and AFE0663 (B) with THMM
Severs V2.0

All the parameters were default. The number of predicted transmembrane helices of AFE0329 and AFE0663 was different, and the probability of the N-term of AFE0329 in the cytoplasmic side of the membrane was larger than that of AFE0663

第四章 铜抗性基因及所表达的蛋白质的生物信息学分析

4.1 引言

由于基因 *Afe0329* 表达的 RNA 量明显多于 *Afe0663*, 本章对蛋白质 AFE0329 的序列特征和结构进行了进一步的分析。

4.2 材料与方法

4.2.1 AFE0329 蛋白序列的一般性分析

A. ferrooxidans ATCC23270 蛋白质 AFE0329 序列从 Institute for Genomic Research (TIGR) 基因组数据库 (<http://www.tigr.org>) 获得。Vector NTI (version 7.1) 用来做一般的序列操作。ClusterX 用来做序列比对。用 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 做相似性搜索。用 PSORTb v.2.0 (<http://www.psort.org>) 做蛋白质的亚细胞定位。TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 用来做跨膜分析。

4.2.2 AFE0329 蛋白的三维分子模建

同源模型用来构建 AFE0329 蛋白质的初始模型, 构建步骤如下: 首先, 用 BLAST 软件在 Protein Data Bank (PDB) 数据库中进行相似性搜索, 作为蛋白质结构的模板。然后, 用分子模建软件进行 3D 模建。最后, 使用 Discover_3 module 对初始模型进行进一步优化。在此过程中, 使用了一个水溶性模型, 此模型在蛋白质的跨膜区域具有 20 Å 的磷脂双层膜并在距此蛋白质剩余部分的中心具有 20 Å 的亲水端, 并且选择了 consistent-valence forcefield (CVFF)。运行 1500 步的配对梯度最小化 (CG minimization) 之后, 在恒定的 298k 温度条件下通过运行 90 ps 模拟使用分子动力学模拟 (MD simulation) 检测其稳定性。最后, 直到根值均值平方 (RMS) 梯度能量小于 $0.001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ Å}^{-1}$, 进行了完全溶解模型配对梯度能量

最小化。最终模型在 ProStat 上运行，此程序能鉴定出结构特征明显不同于根据已知蛋白计算出来的平均值的模型的数目。

所有的模拟在 Dell Precision 470 工作站上 Redhat Linux 系统中使用 Insight II 软件包(Accelrys Software Inc.)运行。Vector NTI (version7.1) 用来做一般的序列操作。

4.3 结果与讨论

4.3.1 AFE0329 蛋白序列的一般性分析

TIGR 数据库中的注释信息显示, *Afe0329* 为编码 P 型 ATP 酶的抗铜基因。使用 clusterX 和 TMHMM Server 等进一步发现, *Afe0329* 编码的蛋白质 AFE0329 是一种 P1b3 型 ATP 酶。如图 4-1 所示, H1-10 表示跨膜螺旋, 其中 H6-H8 被认为是构成跨膜亚结构域的离子通道。TGES 为 phosphatase domain; DKTGT 为 aspartyl kinase domain; GDGxNDxP 为 ATP-binding domain; HP 为 histidine-proline dipeptide; CPH 为 cysteine-proline-histidine sequence; His-rich 即多 histidine 区域, 被认为是重金属结合区域。所有这些特征序列都是 P1b3 型 ATP 酶典型的特征序列。

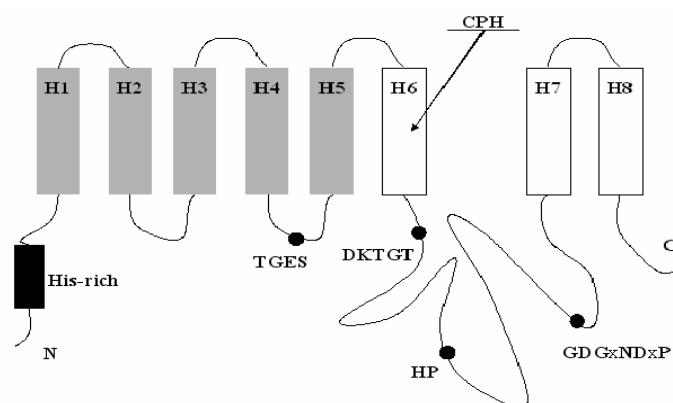


图 4-1 图 3 AFE0329 蛋白示意图

Fig.4-1 Schematic diagram of protein AFE0329

P1b 型 ATP 酶 (以前被称作 CPx 型 ATP 酶) 被认为是一种跨膜的重金属离子泵。位于第 6 次跨膜的 CPx 序列是其特征序列^[71-73]。它能转运 Zn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{+} , Cu^{+} , Cd^{2+} 等多种重金属离子^[70], 是在细胞的重金属

代谢中一种典型的, 普遍存在于很多生物中的蛋白质^[74-76]。J.M. Arguello 通过对许多 P 型 ATP 酶的序列对比, 根据其特征将其分成五个亚族^[77]。其中第三个亚族 P1b3 型 ATP 酶被认为是转运 Cu^{2+} , Cu^+ , Ag^+ 的。在此文章中, 根据序列分析, 基因 *Afe0329* 具有所有 P1b3 型 ATP 酶的序列特征(如图 4-1), 是一种典型的 P1b3 型 ATP 酶。

4.3.2 AFE0329 蛋白的三维分子模建

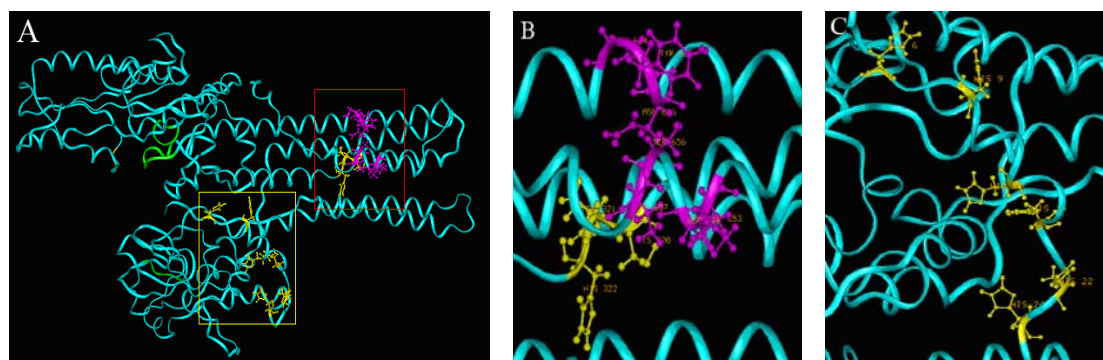


图 4-2 (A) AFE0329 三维模建的 3D 结构图

P 型 ATP 酶的特征序列用绿色显示, P1b 型 ATP 酶的特征序列用黄色表示, P1b3 型 ATP 酶的特征序列用粉红色表示。(B)显示保守氨基酸残基在一个狭窄的通道内, (B)图是(A)中红色矩形扩大图片。(C)表示蛋白质 N 末端保守残基, (C)是(A)中黄色区域扩大图片

Fig.4-2 (A) the modelled overall 3D-structure of AFE0329 protein

The special domains of P-type ATPase are indicated in green, and that of P1b-type ATPase in yellow, and the pink colored the conserved amino acid of P1b3-type ATPase. (B) the modeled molecular structure showing the conserved amino acids [C(320), P(321), H(322)] indicated in yellow and G(624), Y(625), N(626), M(653), S(654), S(656), T(657) indicated in pink] were responsible for the gate of copper ion channel in the transmembrane area of the protein, it was gained by zooming in the red box in (A). (C) the conserved histidine residues in N-terminal of the protein, it was gained by zooming in the yellow box in (A)

在PDB数据库中使用AFE0329序列搜索结果显示, *Archaeoglobus fulgidus*的一个 Cu^+ transporting ATPase(PDB code 2B8E)与此蛋白有最高的同源性(44%), 所以使用2B8E为此结构的3D结构模型。当使用此模型运行ProStat程序时, 与2B8E相比, 81.7%的 Φ - Ψ 角位于Ramachandran plot的核心区, Φ - Ψ 骨架的百分比为83.8%。当显著差异删除值为标准值的6倍方差时, 在模型蛋白和AFE0329蛋白之间没有显著的不同, ProStat程序结果表明此模型是可用的。

分子模建结果表明AFE0329单体可分为两个亚域, 跨膜结构域和可溶结构域(图4-2)。模建结果显示, 保守氨基酸C(320), P(321), H(322) (图4-2. B, 黄色)和 G(624), Y(625), N(626), M(653), S(654), S(656), T(657) (图4-2. B, 橘红色)

位于由H6-H8构成的跨膜亚结构域离子通道的一个狭窄区域内（图4—2. C）。这个结果很好的说明了这些保守氨基酸是参与决定离子泵泵出何种重金属的氨基酸^[77]。

第五章 大肠杆菌突变体的功能互补实验

5.1 引言

本章将基因 *Afe0329* 导入敲除了铜转运基因 P 型 ATP 酶基因的铜敏感型大肠杆菌菌株 DW3110 中, 鉴定其铜抗性是否提高以进一步证实 *Afe0329* 基因与铜抗性的关系。

5.2 材料与方法

5.2.1 菌株、质粒、引物和生长条件

本文中所用的菌株、质粒、引物和生长条件见表 5-1。

A. ferrooxidans ATCC23270 在 30°C, 有氧条件下, 170rpm 摇床条件下培养在如文献所述的含 Fe(II)培养基中^[61]。*Escherichia coli* 培养在如文献所述的 LB 培养基中^[62], 在 LB 培养基中按比例分别加入终浓度为 0、1、2、3mM 经过滤灭菌的 CuSO₄。

5.2.2 p*Afe0329* 质粒构建

质粒 p*Afe0329* 是通过以下步骤构建得到的: 首先使用正向引物 f0329hb 和反向引物 r0329hb 扩增 *A. ferrooxidans* ATCC23270 基因组片段得到 *Afe0329* 基因片段; 用内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 分别酶切 PCR 产物(经测序检验)和表达载体 pLM1; 最后将此经酶切的 PCR 产物克隆到同样经酶切的表达载体 pLM1 中得到 p*Afe0329*, 在质粒 p*Afe0329* 中, *Afe0329* 处在 T7 启动子下, 并且连接着六个组氨酸核苷酸序列。

表 5-1 菌株、质粒和引物

Tab.5-1 Strains, plasmids and primers

菌株、质粒和引物	描述	参考文献或来源 ^a
菌株		
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	Wild type	ATCC
<i>E. coli</i> W3110	Wild type	Rensing et al.
<i>E. coli</i> DW3110	W3110 <i>copA</i> ::km	Rensing et al.
<i>E. coli</i> DW3110p <i>Afe0329</i>	DW3110/ p <i>Afe0329</i>	This study
质粒		
p <i>Afe0329</i>	PCR product obtained with f0329hb and r0329hb, cloned into pLM1	This study
引物		
f0329hb	5'-CGCGCGGATCCAGGAGGAATTAAAATGAGAGG ATCGGTAGTGGTAGTGGTAGTGGACCACGCGCGAC ATCAGGAACATGGGATG-3'	This study
r0329hb	5'- CTGCAGAAGCTTTTAGGCGGTGAG CCGAACCCTCTGGAGGAGCTTG -3'	This study

a. Rensing et al.,^[78]; Sodeoka et al.,^[79]; ATCC, American Type Culture Collection.

5.2.3 重组子铜抗性鉴定

将质粒 p*Afe0329* 转化到 *E. coli* DW3110 感受态细胞中得到 *E. coli* DW3110p*Afe0329*。将新构建的重组菌株培养在 Luria broth (LB)培养基中，过夜培养后按 1: 100 的比例分别稀释到含 0、1、2、3mM CuSO₄ 浓度的 LB 培养液中 37℃ 培养 6 小时，加入 0.5mM IPTG 用来诱导蛋白表达。600 nm 处紫外分光光度测定其生长情况。*E. coli* W3110 和 *E. coli* DW3110 用来做对照。

每个样品平行做 3 次。

5.3 结果与讨论

本章将 *Afe0329* 克隆到 *E. coli* 菌株 DW3110 得到了 DW3110p*Afe0329*, DW3110 是一株 P 型 ATP 酶敲除的对铜敏感的 *E. coli* 菌株^[52]。液体 LB 培养基中 CuSO₄ 对 DW3110p*Afe0329* 生长的影响与 DW3110 和 W3110 做了比较。结果显示, *Afe0329* 能提高 DW3110 对铜的抗性(图 5—2)。当 CuSO₄ 浓度为 1mM 时, DW3110p*Afe0329* 的光吸收值甚至达到了 W3110。尽管此值在其它 CuSO₄ 浓度时低于 W3110 的光吸收值,这可能是由于 *A. ferrooxidans* 和 *E. coli* 不同的生理性质造成的,但此结果还是很好的说明了 *Afe0329* 在铜抗性中发挥着重要的作用。

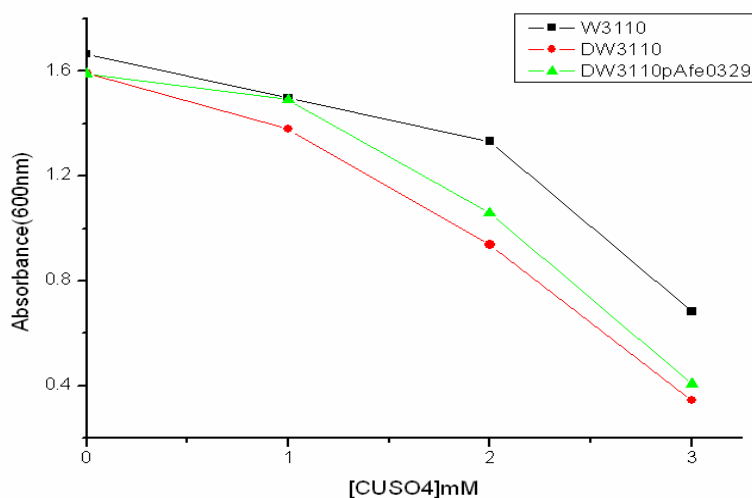


图 5—2 功能互补实验

铜敏感性菌株 *E. coli* DW3110 能被 *Afe0329* 部分提高铜抗性

Fig.5-2 *Afe0329* confers copper resistance

The copper sensitive phenotype of *E. coli* DW3110 could be partially rescued by complementation by plasmid carrying *Afe0329* from *A. ferrooxidans*

关于 *A. ferrooxidans* 的铜抗性机理, Alvarez 等认为存在着一种多磷酸盐调节的机制^[55]。另外, 从 TIGR 全基因组数据库的注释信息和 Barreto 等用生物信息学预测的结果显示有一种像其它大多数微生物中都存在的包含铜摄入和泵出的 P 型 ATP 酶转运系统^{[77][80]}, 但是, 目前, 还没有实验的结果证实这一假设。因为 *A. ferrooxidans* 很难进行常规的遗传学操作, 基因敲除变得非常困难^[81]。因此, 在本论文中, 第二章和第三章, 我们采用实时定量 PCR 和 PCR-RFLP 得出了有着 P 型 ATP 酶所有序列特征的 *Afe0329* 对铜的应答非常敏感, 本章中的结果显示 *Afe0329* 能提高 P 型 ATP 酶敲除的对铜敏感的 *E. coli* 菌株 DW3110 的铜抗性。我们还不能下结论说 *Afe0329* 就是一种 P 型 ATP 酶, 进一步的研究仍然是必要的。但是, 这些都很好的说明了 *A. ferrooxidans* 可能存在着一种包含 P 型 ATP

酶的铜抗性机制。

第六章 铜抗性基因转录元件的鉴定及分析

6.1 材料与方法

6.1.1 菌株和生长条件

A. ferrooxidans ATCC23270, *Leptospirillum ferrooxidans* ATCC53992, *Acidobacterium capsulatum* ATCC51757 均购自美国 ATCC 菌种保藏中心。*A. ferrooxidans* F1, *A. ferrooxidans* F3, *A. ferrooxidans* F15, *A. ferrooxidans* F16 为本实验室自不同地域分离的 *A. ferrooxidans* 菌株。

A. ferrooxidans 生长于普通 9K 培养基中, 30 °C, 170 rpm 摇床无菌培养^[61]。9K 含铜培养基为在普通 9K 的基础上加入 Cu^{2+} 离子终浓度为 10 g/L 的经过滤灭菌 Cu_2SO_4 。

Leptospirillum ferrooxidans, *Acidobacterium capsulatum* 按照 ATCC 菌种保藏中心官方网站 (<http://www.atcc.org>) 的要求分别于 ATCC medium2039 培养基, 30 °C 和 ATCC medium1995 培养基, 45 °C 无菌培养。

6.1.2 材料

基因组提取试剂盒使用 BioBasic Inc. 的 EZ-10 spin column genomic DNA isolation kit。TRIZOL 试剂购自 Invitrogen。RNeasy^R mini kit 和 RNase-free DNase set 购自 Qiagen。SuperscriptTM III RNaseH- reverse transcriptase 和 random hexamers 购自 Invitrogen。Taq DNA polymerase 购自 TOYOBO CO.LTD。所有其它试剂都为分析纯及以上产品。

本实验所用引物见表 6-1, 均以 TIGR 网站上的 *A. ferrooxidans* ATCC23270 全基因组序列为模板序列 (<http://www.tigr.org>) (CMR Version Number: Version 18.0) 设计而成, 引物合成由上海生工完成。

表 6-1 本实验所用到的引物

Tab.6-1 Primers in present study

序号	引物	序列
①	0328-0329F	5'-TCCAAGGCAGCAGTAGAAGCAAG-3'
②	0328-0329R	5'-ATGAGCGGTACCCATCCCATGTT-3'
③	0329-0330F	5'-CAAGCTCCTCCAGAGGGTTCG-3'
④	0329-0330R	5'-CTCAAATGGTACTTTCACCTACGCACA-3'
⑤	0330-0331F	5'-CAGGCAAATCTGAATGCGTGAC-3'
⑥	0330-0331R	5'-TTAGGCCATCGGAAGTGGTGA-3'
⑦	0331-0332F	5'-TCTTGGATAGCCACAGTCAG-3'
⑧	0331-0332R	5'-GGAACCAGGATTACCCACAAT-3'

6.1.3 DNA 的提取, PCR 和 RNA 的提取

(1) DNA 的提取

细菌基因组 DNA 使用 EZ-10spin column genomic DNA isolation kit, 按操作说明书提取。具体操作步骤如下:

1. 各菌液用滤纸过滤;
2. 4000rpm, 10min 离心收集菌体 (重复操作 3 到 5 次, 以得到足够的菌体);
3. 8000rpm, 2min 离心上面得到的产物;
4. 500μl TE 悬浮洗涤一次, 8000rpm 离心 2min;
5. 200μl TE 悬浮后, 加入 400μl Digestion Solution 混匀;
6. 加入 3~4μl 蛋白酶 K 混匀, 55℃ 恒温水浴 5min 左右;
7. 加入 260μl 无水乙醇混匀;
8. 将样品转移至 EZ-10 柱中;
9. 8000rpm 离心 1min;
10. 弃废液, 加入 500μl Wash Solution, 10000rpm 离心 30s;
11. 重复步骤 10 一次, 弃废液;
12. 10000rpm 离心 30s, 彻底去除 Wash Solution;
13. 将 EZ-10 柱置于新的离心管 (1.5mL) 中;
14. 加入 50μl Elution Buffer, 55℃ 水浴 5min;
15. 10000rpm 离心 1min, 收集的液体中即含有基因组 DNA。将所得的基因组 DNA 进行电泳, 所使用的 DNA Marker 是 0.05 mg/mL 的 λDNA/E.coR1+HindIII,

以确定所提取基因组 DNA 的完整性。

(2) PCR

以 0329-0330F 和 0330-0331R (见表 6-1) 为引物, 各细菌基因组 DNA 为模板, 用 *Taq* DNA polymerase 做 PCR 扩增以确定 *Afe0329* 转录子是否广泛存在其它菌株中。反应体系为: 10×dNTPs (2 mmol/l each) 5 μ l, 10×PCR buffer 5 μ l, 模板 DNA(0.1 μ g/ μ l) 2 μ l, *Taq* DNA polymerase 1 μ l, primers(10 pmol each), 补 H₂O 至 50 μ l。PCR 扩增的程序为: 94 °C 解链 5 min; 94 °C 解链 40 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s (共 32 个循环); 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物均经测序检验为预期的扩增片段。

(3) RNA 的提取

细菌总 RNA 使用 RNeasy^R mini kit 和 RNase-free DNase set, 按操作说明书提取。具体操作步骤如下:

1. 4 °C 迅速收集 250ml 长至对数生长中期的细菌, 并立即提取 RNA;
2. 加 TRIZOL 1ml, 充分混匀, 15~30 °C 暖育 5min;
3. 加 0.2ml 氯仿, 用力摇晃 15s, 30 °C 暖育 2~3min, 2~8 °C 12000g 离心 15min;
4. 取上清, 加 0.5ml 异丙醇, 混匀, 15~30 °C 暖育 10min, 2~8 °C 12000g 离心 10min;
5. 弃液体, 加无 Rnase 水 100 μ L, 加 350 μ L RLT Buffer, 充分混匀;
(注意: 确保 1ml RLT Buffer 在使用之前加了 10 μ L β -ME)
6. 加 250 μ L 乙醇 (96-100%), 用枪头吸打充分混匀。不要离心。立即进行第 7 步;
7. 将样品 (700 μ L) 移至 RNeasy mini column, 并将其放入 2ml 的收集管 (collection tube) 中, 12000rpm 离心 15s, 弃收集管中液体;
8. (DNase 处理) Qiagen 提供的 RNase-free DNase set 可方便的在 RNA 纯化过程中进行 DNase 消化。一般来说, 因为 RNeasy 硅胶膜技术在不需要进行 DNase 处理时能够有效的去除 DNA, 所以不需要进行 DNase 消化。但对某些微量的 DNA 就敏感的 RNA 应用, 进一步的 DNA 去除是必要的;

(1) 加 350 μ L RW1 buffer 至 RNeasy mini column, 以不小于 10000rpm 离心 15s, 弃掉收集管中的液体;

(2) 取另一新的离心管, 加入 10 μ L DNase1 stock solution, 70 μ L RDD buffer, 轻轻上下颠倒混匀。RDD buffer 是为 DNase1 准备的;

(注意: DNase1 对物理环境敏感, 混匀时轻轻的上下颠倒, 不要涡旋)

(3) 用移液枪将 DNase1 (80 μ L) 混合液直接加到 RNeasy 硅胶膜正中间。室温(20-30 °C) 放置 15min。如果混合液粘在管壁上, 消化可能会不完

全;

(4) 加入 350 μ L RW1 Buffer 至 RNeasy mini column, 不小于 8000g 离心 15s, 弃去收集管中的液体;

9. 将 RNeasy column 移至新的收集管中, 加入 500 μ L RPE Buffer, 轻轻盖上管盖, 12000rpm 离心 15s, 弃去收集管中液体;

(注意: 在使用前确保乙醇已加入到 RPE Buffer)

10. 再次加入 500 μ L RPE Buffer, 轻轻盖上管盖, 12000rpm 离心 2min;

11. 将 RNeasy column 移入一新的 2ml 的收集管, 丢弃老的收集管及里面的液体。最大转速离心 1min;

12. 将 RNeasy column 移入一新的 1.5ml 的离心管中, 加入 20 μ L 无 RNase 的水至 RNeasy 硅胶膜上。轻轻盖上管盖。静置数分钟。12000rpm 离心 1min。收集到的 20 μ L 无 RNase 的水中即溶解到了所提的 RNA。

6.1.4 Reverse transcriptase PCR

Reverse transcriptase PCR是用来鉴定*Afe0329*的共转录的。

以random hexamers为引物, 在9K含铜培养基中生长至对数中期的*A. ferrooxidans* ATCC23270菌株收集的总RNA为模板, 用Superscript III RNase H⁻ reverse transcriptase按操作说明书合成cDNA。具体操作步骤如下:

反转录 (总共 20 μ L 体系)

1. 体系

上述所提 RNA	10 μ L
随机引物 (60ng/ μ L)	2 μ L
dNTP(10uM)	1 μ L

2. 65 $^{\circ}$ C 5min, 然后冰上至少 1min;

3. 简短离心, 加入

5 \times First-strand Buffer	4 μ L
0.1M DTT	1 μ L
RNase 抑制剂 (40U/ μ L)	1 μ L
SupperScriptIII RT	1 μ L

4. 用移液枪吸打混匀, 25 $^{\circ}$ C 5min;

5. 50 $^{\circ}$ C 30~60min;

6. 70 $^{\circ}$ C, 15min。

总共下来, 有 cDNA 20 μ L, 以后每次操作用约 1 μ L。

以合成的 cDNA 为模板, 用不同的引物 (如表 6-1) 做 PCR。PCR 扩增的

程序为：94 °C 解链 5 min；94 °C 解链 40 s，引物特异退火温度退火 30 s，72 °C 延伸（45 个或 60 个循环）；72 °C 延伸 7 min。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测。并经测序检验为预期的扩增片段。

每一个 Reverse transcriptase PCR 做 3 个对照：一个加基因组 DNA 为模板的阳性对照（如图 6—1 Lane1）；一个加未经过反转录的 RNA 为模板以检验 RNA 样品中是否有 DNA 污染的阴性对照（如图 6—1 Lane3）；一个不加任何模板以检验是否有污染的阴性对照（如图 6—1 Lane4）。

6.1.5 生物信息学分析

Vector NTI (version7.1) 用来做一般的序列操作。ClusterX 用来做序列比对。用 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 做相似性搜索。用 PSORTb v.2.0 (<http://www.psort.org>) 做蛋白质的亚细胞定位。TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 用来做跨膜分析。使用 Primer Premier 5 软件设计引物。

6.2 结果

6.2.1 *Afe0329*, *Afe0330* 和 *Afe0331* 在同一个转录子中

为了测定基因 *Afe0329* 的转录情况，我们使用了 Reverse transcriptase PCR。用随机引物 random hexamers 将在 9K 含铜培养基中生长至对数生长中期的 *A. ferrooxidans* ATCC23270 提取的总 RNA 反转录成 cDNA，以此 cDNA 为模板，设计不同的引物做 PCR 扩增。

TIGR 数据库中基因 *Afe0329* 在 *A. ferrooxidans* 基因组序列中的分布情况及 PCR 扩增结果如图 6—1 所示，图 6—1 上半部分为 TIGR 数据库中 *Afe0329* 在 *A. ferrooxidans* ATCC23270 基因组序列中的分布情况。可看出 *Afe0329*, *Afe0330*, *Afe0331* 的有义链在同一条链上，基因有相同的转录方向。①—⑧显示出各引物（如表 6—1）在基因组中的结合位点。A—F 为使用以下引物的 PCR 产物电泳图，A：①②（产物 290bp，60 个循环，2.5%琼脂糖凝胶），B：③④（产物 287bp，60 个循环，2.5%琼脂糖凝胶），C：⑤⑥（产物 118bp，45 个循环，3%琼脂糖凝胶），D：⑦⑧（产物 387bp，60 个循环，2.5%琼脂糖凝胶），E：③⑥（产物 613bp，45 个循环，2%琼脂糖凝胶），F：③⑧（产物 1487bp，60 个循环，1%

琼脂糖凝胶)。M: 东盛 DNA Marker, Lane1: 以 DNA 为模板的阳性对照, Lane2: 以 cDNA 为模板的样品, Lane3: 以 RNA 为模板的阴性对照, Lane4: 不加模板的阴性对照。

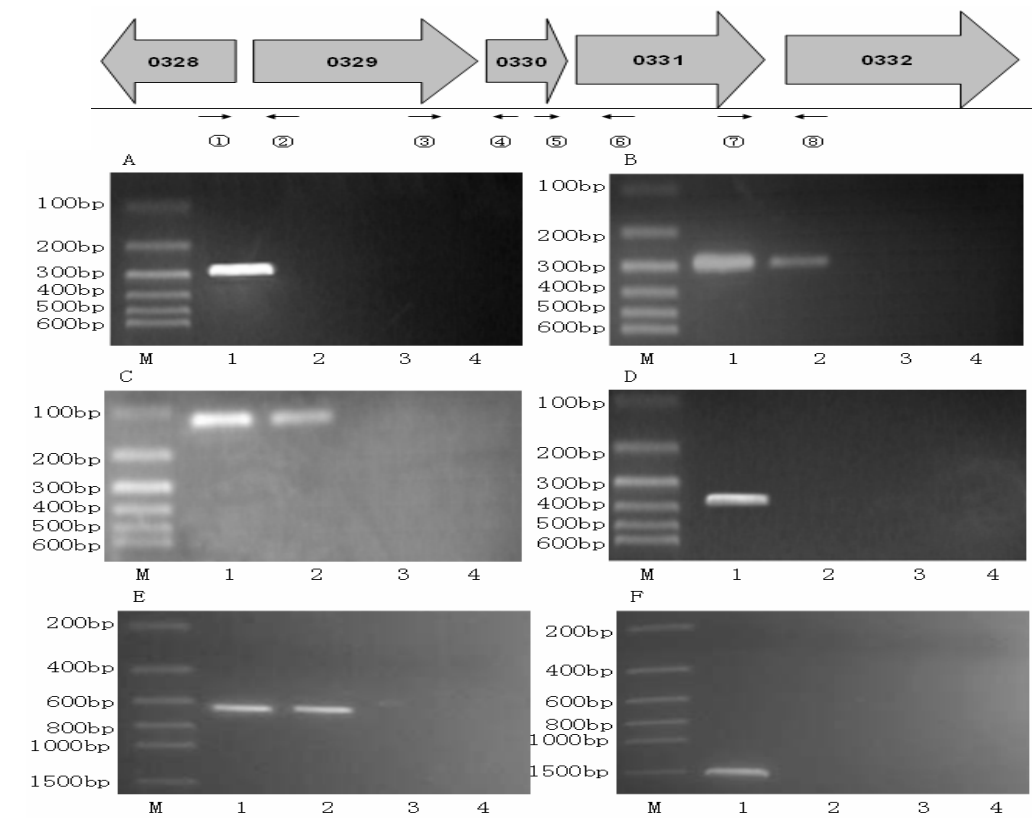


图 6—1 基因 *Afe0329* 在基因组中的位置及 Reverse transcriptase PCR 产物电泳图
Fig.6-1 Region review of *Afe0329* in the genome of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and electrophoresis analysis of products of Reverse transcriptase PCR

由图可知，所有的阳性对照 Lane1 都出现了预期大小的扩增条带，所有的阴性对照 Lane3, Lane4 都未出现扩增产物。B 中 Lane2 出现扩增条带，说明基因 *Afe0329*, *Afe0330*（登陆号为 AFE_0330）一起转录；C 中 Lane2 出现扩增条带，说明 *Afe0330*, *Afe0331*（登陆号为 AFE_0331）一起转录；E 中 Lane2 出现扩增条带，进一步说明了 *Afe0329*, *Afe0330* 和 *Afe0331* 处于同一个转录子中。其它 Lane2 甚至在 PCR 60 个循环后都没有出现扩增条带，说明没有其它基因一起转录。

6.2.2 *Afe0329* 转录元件广泛分布在 *A. ferrooxidans* 菌株基因组中

为了测定 *Afe0329* 转录元件是否广泛存在于 *A. ferrooxidans* 菌株基因组中，

我们使用引物③ 0329-0330F 和⑥ 0330-0331R（见表 6—1）（在基因组上的结合位点见图 6—1），分别以 *A. ferrooxidans* ATCC23270, *A. ferrooxidans* F1, *A. ferrooxidans* F3, *A. ferrooxidans* F15, *A. ferrooxidans* F16, *Leptospirillum ferrooxidans* ATCC53992, *Acidobacterium capsulatum* ATCC51757 的基因组 DNA 为模做 PCR，PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳。结果如图 6—2 所示。

在以 5 株来自不同地域的 *A. ferrooxidans* DNA 为模板的 PCR 产物中都出现了预期大小的扩增条带，而 *Leptospirillum ferrooxidans* ATCC53992, *Acidobacterium capsulatum* ATCC51757 没有条带。说明 *Afe0329* 转录元件广泛存在于 *A. ferrooxidans* 菌株基因组中。

6.2.3 转录子的生物信息学分析

TIGR 数据库中的注释信息显示，*Afe0329* 为编码 P 型 ATP 酶的抗铜基因，*Afe0330* 和 *Afe0331* 都是功能未知的基因。*Afe0329* 生物信息学分析具体见第四章。

用 PSORTb 发现 AFE0330 蛋白为定位在细胞质中的蛋白，而 AFE0331 蛋白用 PSORTb 没有分析出有意义的定位结果。Blast 分析也没有搜索出这两个基因有意义的同源序列。所以，基因 *Afe0330*, *Afe0331* 在铜抗性中的具体作用还有待进一步研究。

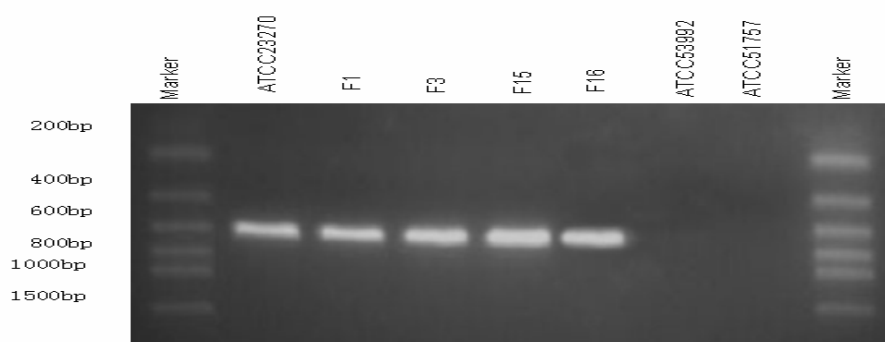


图 6—2 *Afe0329* 转录子普遍性的鉴定（2% 琼脂糖凝胶）

引物为③ 0329-0330F, ⑥ 0330-0331R（结合位点见图 6—1 ③⑥）

Fig.6-2 Identification the universality of *Afe0329* transcripton (2% agarose gel)

Primer pair was ③ 0329-0330F and ⑥ 0330-0331R（the binding sites in Fig.6-1 were ③⑥）

6.3 讨论

原核生物中，功能相同的基因往往位于基因组的相邻位置，成簇出现，甚至一同转录。如乳糖操纵子^[82-84]和色氨酸操纵子^[85-88]都是研究的比较清楚的操纵

子。所以,我们用 Reverse transcriptase PCR 对 *Afe0329* 的共转录情况进行了研究,发现 *Afe0329*, *Afe0330*, *Afe0331* 位于同一个转录子中。在 TIGR 数据库中的注释信息显示 *Afe0330*, *Afe0331* 是功能未知的基因 (<http://www.tigr.org>)。所以共转录的实验结果说明了基因 *Afe0330* 和 *Afe0331* 也可能参与了 *A. ferrooxidans* 抗铜生理过程。但是,利用 Blast 分析没有得到有生物学意义的同源性序列。

实际上,在研究的比较清楚的 *Enterococcus hirae* 菌中的转运铜的 P 型 ATP 酶也与其它几个基因构成 *cop* 操纵子^[89-90],其中,*copA*, *copB* 是编码铜离子泵的 P 型 ATP 酶基因,而 *copZ*, *copY* 是调控基因^{[49][66]}。而 *Afe0330*, *Afe0331* 与 *copY*, *copZ* 的序列分析显示也没有相关性。所以,*A. ferrooxidans* 中 *Afe0329* 转录子是不同于 *Enterococcus hirae* 菌 *cop* 操纵子的。其基因 *Afe0330*, *Afe0331* 在机体抗铜中的具体作用还有待进一步研究。

本文中的结果显示,*Afe0329*, *Afe0330*, *Afe0331* 转录子结构是普遍存在于 *A. ferrooxidans* 菌株基因组中的。此研究通过 Reverse transcriptase PCR 的方式,鉴定出普遍存在于 *A. ferrooxidans* 菌株中的基因 *Afe0330*, *Afe0331* 功能的铜抗性相关性,为进一步研究这种生长在极端环境下的,在工业生产中有着重要应用的细菌的抗铜机理打下了基础。

第七章 结论

本文主要研究了嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *A. ferrooxidans* ATCC23270 全基因组数据库中(<http://www.tigr.org>) (CMR Version Number: Version 18.0)注释信息为铜转运 P 型 ATP 酶的两个高同源性基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 与铜抗性的关系,并鉴定了这两个基因在表达量、表达方式之间的不同。论文采用了实时定量 PCR, PCR-RFLP, 蛋白分子模建, 抗性互补实验, Reverse transcriptase PCR 等实验手段。主要得出了如下结论:

1. 序列同源性分析可知, 基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 有着非常高的同源性, 所以无法设计非特异性引物与这两个基因中的任何一个基因特异结合, 本文设计了一对引物 1604 和 1820 能同时完全与 *Afe0329* 和 *Afe0663* 结合, 并以此引物做实时定量 PCR。实时定量 PCR 结果显示基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 对铜离子胁迫有着十分敏感的应答, 此两个基因在含 10g/L 的铜离子培养基中表达的 RNA 量是不含铜离子的培养基表达的 32.5 倍。

2. 基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 是位于同一基因组中的两个高同源性基因。为了鉴定这两个基因在铜抗性过程中发挥的作用之间的差异, 本文采取了 PCR-RFLP 策略鉴定了这两个基因的差异表达。结果显示, 与 *Afe0663* 相比, 基因 *Afe0329* 在铜环境中表达的 RNA 量更多, 在它们表达的总 RNA 中, 96% 是基因 *Afe0329* 表达的产物。此结果说明相比于 *Afe0663*, *Afe0329* 在铜抗性中所发挥的作用更大。造成如此高同源性的两个基因之间的表达差异的原因可能是它们之间的转录方式和表达调控模式之间的不同, 这也为进一步研究基因 *Afe0329* 和 *Afe0663* 的表达调控模式奠定了基础。此外, 本文中 PCR-RFLP 策略成功的鉴定了同一基因组中的两个高同源性基因之间的差异表达, 目前还没有见此策略用于此类研究的报道, 本文结果也说明了此策略用于此类研究是可行和有效的。

3. 生物信息学分析可知, 基因 *Afe0329* 的蛋白序列 AFE0329 包含所有 P1b3 型 ATP 酶的序列特征, 这些序列包括 phosphatase domain, aspartyl kinase domain, ATP-binding domain, histidine-proline dipeptide, cysteine- proline- histidine sequence, His-rich 区域等。P1b3 型 ATP 酶是一种 Cu^{2+} , Cu^{+} , Ag^{+} 的膜转运蛋白。Insight II 软件分子模建结果显示, AFE0329 单体可分为两个亚域, 跨膜结构域和

可溶结构域;参与决定离子泵泵出何种重金属的保守氨基酸残基位于跨膜结构域离子通道的一个狭小区域内。

4. 本文通过功能互补实验,将基因序列 *Afe0329* 克隆到表达载体 pLM1 中,并转化到 P 型 ATP 酶敲除的 *E. coli* 菌株 DW3110 中,使用紫外分光光度法测定其生长情况。结果显示,基因 *Afe0329* 能部分提高对铜离子敏感的 *E. coli* 菌株 DW3110 的铜抗性,说明基因 *Afe0329* 在菌体铜抗性中发挥着重要作用。造成基因 *Afe0329* 不能完全恢复 *E. coli* 菌株 DW3110 铜抗性达到其野生型菌株 W3110 的铜抗性水平的原因可能是由于 *A. ferrooxidans* 和 *E. coli* 的不同生理特性造成的。

5. 通过 Reverse transcriptase PCR 技术,鉴定了 *A. ferrooxidans* ATCC23270 菌株基因 *Afe0329* 的共转录情况,结果显示,基因 *Afe0329* 是与位于其基因组旁边的基因 *Afe0330*, *Afe0331* 一起转录的。在原核生物中,功能相同的基因经常在基因组中成簇出现构成操纵子或者共转录,由此推测基因 *Afe0330*, *Afe0331* 可能也与细菌抗铜有关,生物信息学分析结果未得出这两个基因有意义的同源序列,其在铜抗性中的具体作用还有待进一步研究。对其它菌株 DNA 分析可知, *Afe0329*、*Afe0330* 和 *Afe0331* 构成的共转录元件普遍存在于不同来源的 *A. ferrooxidans* 菌株中。

参考文献

- [1] 杨显万, 沈庆峰, 郭玉霞. 微生物湿法冶金. 北京: 冶金工业出版社, 2003
- [2] Olson G J, Brierley J A, and Brierley C L. Bioleaching review part B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63: 249-257
- [3] Akcil A. Potential bioleaching developments towards commercial reality: Turkish metal mining's future. *Minerals Engineering*, 2004, 17: 477-480
- [4] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, et al. Bioleaching review part A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63: 239-248
- [5] Colmer A R, and Hinkle M E. The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage A Preliminary Report. *Science*, 1947, 106: 253-256
- [6] Temple K L, and Delchamps E W. Autotrophic bacteria and the formation of acid in bituminous coal mines. *Applied Microbiology*, 1953, 1: 255-258
- [7] Leathen W W, Kinsell N A, and Braley Sr S A. *Ferrobacillus ferrooxidans*: A chemosynthetic autotrophic bacterium. *Journal of Bacteriology*, 1956, 72: 700
- [8] Bryner L C, Beck J V, Davis D B, et al. Microorganisms in Leaching Sulfide Minerals. *Industrial & Engineering Chemistry*, 1954, 46: 2587-2592
- [9] Zimmerley S R, Wilson D G, Prater J D. Cyclic leaching process employing iron oxidizing bacteria. US patent2, 1958, 829-964
- [10] Suzuki I. Microbial leaching of metals from sulfide minerals. *Biotechnology Advances*, 2001, 19: 119-132
- [11] Morin D, Lips A, Pinches A, et al. Integrated Project For The Development Of Biotechnology For Metal-Bearing Materials In Europe. In Harrison S.T.L, Rawlings D.E. and Petersen J. (editors), *Proceedings of 16th IBS*, 2005
- [12] Ruan Renman, Wen Jiankang. Bacterial Heap-Leaching: Practice In Zijinshan Copper Mine. In: S.T.L.Harrison, D.E.Rawlings and J.Petersen (editors), *Proceedings of 16th IBS*: 2005. 137-144
- [13] Rawlings D E, Dew D, and du Plessis C. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21: 38-44
- [14] Clark M.E., J. Batty, C. van Buuren, et al. Eamon. *Biotechnology In Minerals Processing: Technological Breakthroughs Creating Value*. In Harrison

S.T.L., Rawlings D.E. and Petersen J. (editors), Proceedings of 16th IBS, 2005

[15] Songrong Y, Jiyuan X, Guanzhou Q, et al. Research and application of bioleaching and biooxidation technologies in China. *Minerals Engineering*, 2002, 15: 361-363

[16] 邓敬石. 中等嗜热菌强化镍黄铁矿浸出的研究. [博士学位论文]. 昆明: 昆明理工大学, 2002

[17] Brierley J A, and Brierley C L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 2001, 59: 233-239

[18] Bustos S, Castro S, and Montealegre R. The Sociedad Minera Pudahuel bacterial thin-layer leaching process at Lo Aguirre. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 11: 231-235

[19] Brierley C L. Bacterial succession in bioheap leaching. *Hydrometallurgy*, 2001, 59: 249-255

[20] 魏德洲. 资源微生物技术. 冶金工业出版社, 1999

[21] Baker B J, and Banfield J F. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44: 139-152

[22] Schippers A, Hallmann R, Wentzien S, et al. Microbial Diversity in Uranium Mine Waste Heaps. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 2930

[23] Bond P L, Druschel G K, and Banfield J F. Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 4962-4971

[24] Deveci H, Akcil A, and Alp I. Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: comparative importance of pH and iron. *Hydrometallurgy*, 2004, 73: 293-303

[25] Rawlings D E. Biomining: theory, microbes and industrial processes. Landes Bioscience Berlin: Springer, Georgetown, Tex. 1997

[26] Ingledew W J. *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 683: 89-117

[27] Rawlings D E. Characteristics and adaptability of iron-and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4: 13

[28] Strandberg G W, and Shumate S E. Microbial Cells as Biosorbents for Heavy Metals: Accumulation of Uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and

Pseudomonas aeruginosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 41: 237

[29] 张慧, 李宁, 戴友芝. 重金属污染的生物修复. *化工进展*, 2000, 23(5): 562-574

[30] Bridge T A M, White C, and Gadd G M. Extracellular metal-binding activity of the sulphate-reducing bacterium *Desulfococcus multivorans*. 1999, 145: 2987-2995

[31] Ma M, Lau P S, Jia Y T, et al. The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Sci*, 2003, 164: 51-60

[32] Valls M, Atrian S, de Lorenzo V, et al. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 661-665

[33] Bae W, Mehra R K, Mulchandani A, et al. Genetic Engineering of *Escherichia coli* for Enhanced Uptake and Bioaccumulation of Mercury. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 5335-5338

[34] Caguiat J J, Watson A L, and Summers A O. Cd (II)-Responsive and Constitutive Mutants Implicate a Novel Domain in MerR. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 3462

[35] Nies D H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27: 313-339

[36] Saier Jr M H. Computer-aided analyses of transport protein sequences: Gleaning evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiological reviews*. Baltimore, 1994, 58: 71-93

[37] Fath M J, and Kolter R. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1993, 57: 995

[38] Crupper S S, Worrell V, Stewart G C, et al. Cloning and Expression of *cadD*, a New Cadmium Resistance Gene of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 4071

[39] Liu J, and Rosen B P. Ligand Interactions of the ArsC Arsenate Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 21084-21089

[40] Rensing C, Pribyl T, and Nies D H. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179: 6871-6879

[41] Nies D H. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177: 2707-2712

- [42] Finney L A, and O'Halloran T V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science*, 2003, 300: 931-936
- [43] Crichton R R, and Pierre J L. Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals*, 2001, 14: 99-112
- [44] Ohsumi Y, Kitamoto K, and Anraku Y. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J Bacteriol*, 1988, 170: 2676-2682
- [45] Lippert B. From cisplatin to artificial nucleases--the role of metal ion-nucleic acid interactions in biology. *Biometals*, 1992, 5: 195-208
- [46] Gross C, Kelleher M, Iyer V R, et al. Identification of the Copper Regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA Microarrays. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 32310-32316
- [47] Weiss K H, Merle U, Schaefer M, et al. Copper toxicosis gene MURR1 is not changed in Wilson disease patients with normal blood ceruloplasmin levels. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 2239-2242
- [48] Rutherford J C, and Bird A J. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell*, 2004, 3: 1-13
- [49] Solioz M, and Stoyanov J V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27: 183-195
- [50] Cooksey D A. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, 14: 381-386
- [51] Brown N L, Lee B T O, and Silver S. Bacterial transport of and resistance to copper. *Metal ions in biological systems*, 1994, 30: 405-434
- [52] Rensing C, Fan B, Sharma R, et al. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 652-656
- [53] Das A, Modak J M, and Natarajan K A. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 215-222
- [54] Natarajan K A, Sudeesha K, and Rao G R. Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1994, 66: 303-306
- [55] Alvarez S, and Jerez C A. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 5177-5182

- [56] Chisholm I A, Leduc L G, and Ferroni G D. Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 245-254
- [57] Boyer A, Magnin J P, and Ozil P. Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass. *Biotechnology Letters*, 1998, 20: 187-190
- [58] Ahmad Z, Ghauri M A, Anwar M A, et al. Transformation of plasmids of *Acidithiobacillus ferrooxidans* encoding ampicillin resistance to *Escherichia coli* strain DH 5- α for detecting copper tolerance genes on such plasmids. *Resource and environmental biotechnology*, 2002, 3: 185-191
- [59] Paulino L C, de Mello M P, and Ottoboni L M. Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 2002, 23: 520-527
- [60] Dopson M, Baker-Austin C, Koppineedi P R, et al. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology*, 2003, 149: 1959-1970
- [61] Silverman M P, and Lundgren D G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J Bacteriol*, 1959, 77: 642-647
- [62] Sambrook J. Fritsch, EF, and Maniatis, T.(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 267: 9289-9293
- [63] Rawlings D E. Heavy metal mining microbes. *Ann Rev Microbiol*, 2002, 56: 65-91
- [64] Nomura N, Ota M, Tsuji K, et al. HLA-DQB1 genotyping by a modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens*, 1991, 38: 53-59
- [65] Iwahori H, Tsuda K, Kanzaki N, et al. PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. *Fundamental and applied nematology*, 1998, 21: 655-666
- [66] Pecou E, Maass A, Remenik D, et al. A mathematical model for copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *Math Biosci*, 2006, 203: 222-239
- [67] Yin H, Cao L, Qiu G, et al. Molecular diversity of 16S rRNA and gyr B genes in copper mines. *Archives of Microbiology*, 2008, 189: 101-110
- [68] Yin H, Qiu G, Wu L, et al. Microbial community diversity and changes associated with a mine drainage gradient at the Dexing copper mine, China. *Aquat*

Microb Ecol, 2008, 51: 67-76

[69] Hiraishi A, Kamagata Y, and Nakamura K. Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 79: 523-529

[70] Solioz M, and Vulpe C. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 237-241

[71] Rensing C, Mitra B, and Rosen B P. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn (II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94: 14326

[72] Gupta A, Matsui K, Lo J F, et al. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nature Medicine*, 1999, 5: 183-188

[73] Wernimont A K, Huffman D L, Lamb A L, et al. Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nature Structural Biology*, 2000, 7: 766-771

[74] Silver S, and Phung L T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol*, 1996, 50: 753-789

[75] Axelsen K B, and Palmgren M G. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 2001, 126: 696-706

[76] Sharma R, Rensing C, Rosen B P, et al. The ATP Hydrolytic Activity of Purified *ZntA*, a Pb (II)/Cd (II)/Zn (II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 3873-3878

[77] Arguello J M. Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol*, 2003, 195: 93-108

[78] Rensing C, Fan B, Sharma R, et al. *CopA*: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 652-656

[79] Sodeoka M, Larson C, Chen L, et al. A multifunctional plasmid for protein expression by ECPCR: overproduction of the p50 subunit of NF- κ B. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 1993, 3: 1095-1100

[80] Barreto M, Quatrini R, Bueno S, et al. Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome sequence. *Hydrometallurgy*, 2003, 71: 97-105

[81] Quatrini R, Appia-Ayme C, Denis Y, et al. Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome

profiling. *Hydrometallurgy*, 2006, 83: 263-272

[82] Kuhlman T, Zhang Z, Saier M H, Jr., et al. Combinatorial transcriptional control of the lactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 6043-6048

[83] Garner M M, and Revzin A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9: 3047-3060

[84] Mellon I, and Hanawalt P C. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature*, 1989, 342: 95-98

[85] Santillan M, and Zeron E S. Analytical study of the multiplicity of regulatory mechanisms in the tryptophan operon. *Bull Math Biol*, 2006, 68: 343-359

[86] Yanofsky C, Platt T, Crawford I P, et al. The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 1981, 9: 6647

[87] Platt T. Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon of *E. coli*. *Cell*, 1981, 24: 10-23

[88] Santillan M, and Mackey M C. Dynamic regulation of the tryptophan operon: A modeling study and comparison with experimental data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98: 1364

[89] Cobine P, Wickramasinghe W A, Harrison M D, et al. The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper (I) to the CopY repressor. *FEBS Letters*, 1999, 445: 27-30

[90] Bissig K D, Wunderli-Ye H, Duda P W, et al. Structure-function analysis of purified *Enterococcus hirae* CopB copper ATPase: effect of Menkes/Wilson disease mutation homologues. *Biochemical Journal*, 2001, 357: 217

研究成果

发表论文情况：

1. 第一作者 Insights into two high homogenous genes involved in copper homeostasis in *Acidithiobacillus ferrooxidans* CURR MICROBIOL 已接收
2. 第一作者 Identification of the differences between two copper related genes in the genome of *Acidithiobacillus ferrooxidans* 审稿中
3. 第一作者 氧化亚铁硫杆菌铜代谢基因 *Afe0329* 的转录子鉴定及分析 审稿中
4. 第三作者 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 已接收
5. 第四作者 不同培养条件下镍选择压力对浸矿微生物群落的影响 审稿中
6. 第六作者 Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* using whole genome DNA microarrays 审稿中

科研情况：

在读期间参与了：

1. 973 国家项目：微生物冶金的基础研究课题（2004CB619204）；
2. 国家自然科学基金创新研究群体资助项目：硫化矿生物提取的基础研究（50321402）；
3. 国家自然科学基金项目（30428014, 30670044, 50621063）。

致 谢

时光飞逝，挥袖间七年的长沙求学生涯即将结束。在这毕业论文完成之际谨向一上路悉心指导我的老师和关心我的同学，表达最诚挚的谢意！

首先，要感谢我的导师邱冠周教授，邱老师是一位为人和蔼可亲、处事十分有魄力的老师，至今他的谆谆教诲仍记忆犹在耳、对学习生活的关切之情仍历历在目，邱老师的鼓励和教导将永远是我不断前进和奋斗的动力；本论文从选题、文献查阅、实验方案确定和论文撰写，都得到了刘学端教授的悉心指导，刘老师待人随和、治学严谨，他在指导我实验的同时，更教会了我如何思考、使我坚定了自己人生的信念。借此我向两位导师表示最崇高的敬意和最衷心的感谢！

在研究过程中，还得到了吴学玲老师、柳建设老师、周洪波老师、刘新星老师、夏金兰老师、杨宇老师、夏乐先老师、程海娜老师、张成桂博士、刘元东博士、尹华群博士、高健博士、丁建南博士、刘宏伟博士、戴志敏博士、张燕飞博士以及曹林辉、郑璐、罗海浪、陈琪炯、肖水明、管昊、晁婧、王玮、赵文杰、王铎泰、曾伟民、黄芝英、李寿朋、胡培磊、张汝兵、王晶、刘文斌、张可、钱林、欧阳旭东、孟昊、高风玲、黄霞、闫颖、吴海艳、王秀美、李庆华、徐爱玲、蒋惠丹、李莹、王敏、蒋莹、张瑞永、廖立琴、刘熠、李乾、谢明、廖荷欢等同学的支持和帮助，在此一并表示感谢！

忠心感谢我的父母和家人对我无私的付出和支持，因为有你们做我坚实的后盾，才使我顺利完成学业，你们对我的爱是我一生中最宝贵的财富！祝你们永远健康快乐！

谨向所有评阅本论文和参加论文答辩的各位专家、教授表示诚挚的敬意。

罗焱杰

2008.05