

Acidianus manzaensis 菌硫氧化相关膜蛋白基因的筛选及鉴定

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2018.01.010

朱薇^{1,2} 马亚龙^{1,2}
杨云²

1. 湖南工业大学
理学院
湖南 株洲 412000
2. 中南大学
资源加工与生物工程学院
湖南 长沙 410083

摘要: 基于比较蛋白质组学的方法, 筛选和鉴定了嗜酸热古菌 *A. manzaensis* 中与硫氧化相关的膜蛋白。首先利用温度诱导 Triton X-114 两相分离萃取技术分别对以单质硫 (S^0) 和亚铁 (Fe^{2+}) 为能源底物生长的 *A. manzaensis* 菌的膜蛋白进行选择分离, 再用聚丙烯酰胺凝胶电泳和双向电泳对所提取的膜蛋白作进一步分析, 最后利用基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱对以 S^0 为能源底物下的差异表达膜蛋白斑点进行鉴定, 并通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术进行初步验证。实验结果表明: *A. manzaensis* 菌在 2 种不同能源底物下生长时所提取的膜蛋白存在明显的差异, 并发现 8 个与 S^0 氧化相关的膜蛋白, 其中, 一个未知功能的膜蛋白富含巯基 ($-SH$) 及 $-CXXC-$ 功能域, 该膜蛋白可能通过巯基对 S^0 进行键和并生成 $Pr-SS_nH$ ($n \geq 2$) 化合物, 以协助 S^0 跨膜转运; 实验还筛选得到了硫醌氧化还原酶、电子传递蛋白、转录激活蛋白和与细胞生长相关的蛋白, 这些膜蛋白在嗜热古菌 *A. manzaensis* 氧化 S^0 的过程中起重要作用。

关键词: *Acidianus manzaensis*; 硫氧化; 膜蛋白; 比较蛋白质组学

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2018)01-0067-09

0 引言

微生物的硫氧化对元素硫的生物地球化学循环具有重要的作用。对于嗜酸硫氧化微生物而言, 元素硫不仅是其细胞体的重要组成成分, 而且还是它们生长代谢的重要能量来源^[1]。嗜酸硫氧化微生物对硫具有氧化作用, 因而被广泛应用于复杂低品位原生硫化矿物浸出、金矿表面的氧化预处理、硫化矿尾矿的治理等有色金属回收方面^[2-3]。这类浸矿微生物主要

是一些嗜酸细菌和古菌, 其中以中温细菌的研究和应用最多, 然而, 中温细菌对黄铜矿类原生硫化矿的浸出效果尚不能令人满意。由于嗜酸热古菌 (*Acidianus manzaensis*) 与细菌在细胞结构、适宜生长环境、硫氧化能力、硫氧化代谢系统、基因结构及其功能等方面存在着显著差异, 因此它们具有不同的硫氧化机制。研究表明, 嗜酸热古菌具有耐高温的特点, 能解决大量黄铜矿类原生硫化矿用细菌难以浸出的问题, 并能显著改善生物浸出速率和浸出率, 是工业应用最

收稿日期: 2017-11-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51404104), 湖南省自然科学基金资助项目 (2015JJ3062), 湖南省教育厅基金资助项目 (14C0341)

作者简介: 朱薇 (1976-), 女, 湖南道县人, 湖南工业大学副教授, 博士, 主要研究方向为生物冶金及新能源环保技术, E-mail: greatcsu@163.com

具潜力的一类浸矿微生物^[4-5]。目前关于极端嗜酸热古菌的氧化过程研究较少,导致人们对极端嗜酸热古菌硫氧化过程与高温生物浸出的关系缺乏清晰的认识和了解^[6-9]。

S. Mangold 和 J. Kucera 等^[10-11]利用典型嗜酸硫杆菌属 *Acidithiobacillus .spp* 对单质硫(S^0)进行生物氧化时发现,疏水性的 S^0 必须先经过嗜酸硫氧化细菌的有效吸附和外膜蛋白对其的活化作用,再经膜蛋白的转运进入细胞周质空间后,才能被细菌有效地氧化利用。而作为同样能够氧化 S^0 的嗜酸热古菌而言,它们具有独特的生理生化特性,尤其是它们的细胞结构、基因组的硫代谢与细菌相比存在巨大的差异,其 S^0 的氧化机制与氧化亚铁硫杆菌(*A. ferrooxidans*)等中温细菌有哪些区别与联系还不清楚。有关研究表明,嗜热古菌氧化 S^0 所需的硫氧化还原酶(sulfur oxygenase reductase, SOR)只存在于细胞质中,胞外的 S^0 首先要经过跨膜转运进入细胞质中,才能被 SOR 进一步氧化^[12]。然而 S^0 的生物氧化过程十分复杂,在有氧条件下, SOR 能以 S^0 为底物催化其发生歧化反应,生成亚硫酸盐、硫代硫酸盐和硫化氢,这些中间产物进而被相应的硫氧化酶氧化,最终生成硫酸盐,并不断伴随有电子传递至相应的末端氧化酶为细胞生长提供能量。另外, S^0 主要以环状形态且不溶于水的 S_8 形式存在。从 SOR 蛋白质的晶体结构可知, S^0 只能以线性硫的形式(即主要是多聚硫化物(polysulfides(S_n^{2-}))的形式)才能被 SOR 催化反应。因此,胞外疏水性的环状硫 S_8 首先要进行开环,形成线状硫,进而被转运至细胞质中被 SOR 催化反应^[13]。然而,目前对于嗜酸热古菌如何将环状硫 S_8 开环并转运至细胞质中的作用机理鲜有报道。因此,开展嗜酸热古菌硫氧化相关膜蛋白质的筛选和鉴定研究,有助于揭示和阐明嗜酸热古菌氧化硫的分子机制。

综上所述,本文以典型的嗜酸热古菌 *A. manzaensis* 为研究对象,采用比较蛋白质组学的方法筛选并鉴定与硫氧化相关的膜蛋白,并利用温度诱导 Triton X-114 两相分离萃取技术、聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)、双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)、基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry/time of flight mass spectrometry, MALDI-

TOF/TOF)、实时荧光定量 PCR 技术(real time-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)等对筛选得到的膜蛋白基因进行转录水平验证,以期找到更多与硫氧化相关的膜蛋白,为阐明嗜酸热古菌硫氧化机制的相关研究奠定基础。

1 实验部分

1.1 试剂与设备

硫粉、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、聚氧乙烯单叔辛基苯基醚(Triton X-114)、聚丙烯酰胺、苯甲基磺酰氟(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)、十二烷基磺酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)、考马斯亮蓝 R-250、二流苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺、Tris-碱、盐酸(HCl)、壬基酚聚氧乙烯醚(polyoxyethylene nonylphenyl ether, NP-40)、溴酚蓝、尿素、硫脲、丙酮、磷酸盐缓冲液、过硫酸铵、四甲基乙二胺(N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine, TEMED)、透析袋(截留分子量 3~5 kDa),均由北京鼎国昌盛生物技术有限公司生产;

胰蛋白酶(trypsin), Sigma-T7409, 由美国 Sigma 公司生产;

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、细菌总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)提取试剂盒,均由天根生化科技(北京)有限公司生产;

固相 pH 梯度(immobilized pH gradients, IPG)干胶条(pH 3~10, 24 cm)、IPG 缓冲液(pH 3~10)、Ettan IPGphor 3 等电聚焦系统和电泳系统,均由通用电气公司生产;

ReverTra Ace- α -第一链 cDNA 合成试剂盒、SYBR Green 荧光定量 qPCR Mix (QPK-201 型),均由日本东洋纺株式会社生产;

iCycler iQTM Real-Time PCR 仪,由伯乐生命医学产品公司生产;

Uniscan Scanner 图像透射扫描仪, C10880 型,由清华紫光股份有限公司生产;

MALDI-TOF/TOF, 5800 型,由 AB Sciex 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 菌株及培养基

菌株 *A. manzaensis* YN-25 由中南大学生物冶金重点实验室提供。培养基的配方(单位为质量浓度)为: 0.5 g/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/L 的 K_2HPO_4 ,

3.0 g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 g/L 的 HCl, 0.01 g/L 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 。将 *A. manzaensis* 菌置于装有培养基的 500 mL 三角瓶中, 并添加质量分数为 0.02% 的酵母提取物作为生长因子, 再分别加入质量浓度为 10 g/L 的 S^0 和质量浓度为 20 g/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作为能源底物, 在 65 °C、170 r/min 的空气浴摇床中培养。初始接种菌浓度均为 10^7 个/mL。

1.2.2 S^0 和 Fe^{2+} 能源底物中生长的 *A. manzaensis* 菌的膜蛋白提取

本文用温度诱导的 Triton X-114 两相分离萃取技术选择性分离 *A. manzaensis* 菌的膜蛋白。具体步骤^[14]如下: 1) 先将 2 种不同能源底物下培养至对数中期的 *A. manzaensis* 菌于 4 °C、8 000 r/min 下离心 10 min 进行收集, 再用 pH 值为 7.3 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤细胞后, 离心再次收集菌体; 2) 向浓度为 2 mmol/L 的 PBS 溶液中添加质量分数为 10% 的 Triton X-114 后, 将菌体悬浮于 PBS 溶液中, 并添加浓度为 1 mmol/L 的 PMSF 溶液, 以防止膜蛋白降解, 再将细胞悬液置于冰浴下缓慢摇动 1 h 后, 10 000 r/min 下离心 15 min, 收集上清液; 3) 将收集得到的上清液在 37 °C 的水浴锅中静置 15 min, 诱导溶液分相, 再在 37 °C、1 500 r/min 下离心 10 min, 促进相分离得到上层水相和下层 Triton X-114 相; 4) 向下层含有膜蛋白的 Triton X-114 相中加入 4 倍体积的冷丙酮, 置于 -20 °C 下过夜, 静置沉淀膜蛋白; 5) 将沉淀得到的膜蛋白重新悬浮于去离子水中, 并置于截留分子量为 3~5 kDa 的透析袋中透析 72 h (每 12 h 换一次去离子水); 6) 将透析后的膜蛋白经冷冻干燥后, 置于 -20 °C 保存备用。

1.2.3 SDS-PAGE 分析

将 *A. manzaensis* 菌在以 S^0 和 Fe^{2+} 为能源底物中生长时所提取的膜蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 初步分析。采用质量分数为 5% 的浓缩胶与质量分数为 12% 的分离胶, 用 Bradford 法测定膜蛋白浓度后, 取 15 μg 膜蛋白与 3 μL 的上样缓冲液充分混匀并煮沸 10 min 后上样, 待电泳结束后, 采用考马斯亮蓝 R-250 对凝胶进行染色, 再用 Uniscan Scanner 图像透射扫描仪透射扫描, 光学分辨率为 300 dpi。

1.2.4 2-DE 分离膜蛋白

2-DE 的第一向等电聚焦采用 pH 值为 3~10、24 cm 的固相 pH 梯度干胶条, 上样量为 350 mg, 聚焦

总伏时为 80 kV·h。先分别将 *A. manzaensis* 菌在以 S^0 和 Fe^{2+} 为能源底物时提取得到的膜蛋白溶解于裂解液中, 用 Bradford 法测定膜蛋白浓度后, 取含有 350 mg 膜蛋白的裂解液与 600 μL 水化液 (配方为: 浓度为 7 mol/L 的尿素、2 mol/L 的硫脲、18 mmol/L 的 DTT, 质量分数为 2% 的 CHAPS、1% 的 NP-40、0.5% 的 IPG 缓冲液、0.002% 的溴酚蓝) 充分混匀, 采用胶内水化上样方式将膜蛋白加到预制干胶条中上样, 聚焦结束后取出胶条, 进行 IPG 胶条平衡 2 次, 第一次在平衡缓冲液 (配方为: 浓度为 6 mol/L 的尿素, 质量分数为 2% 的 SDS、0.002% 的溴酚蓝, 浓度为 50 mmol/L、pH 值为 8.8 的 Tris-HCl, 体积分数为 30% 的甘油) 中加入质量分数为 1% 的 DTT, 第二次在平衡缓冲液中加入质量分数为 2.5% 的碘乙酰胺, 每次平衡的时间均为 15 min。

2-DE 的第二向电泳步骤为: 首先, 用电泳缓冲液润洗平衡后的胶条, 以去除多余的平衡缓冲液; 其次, 转入事先制备好的 SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶的质量分数为 12.5%) 上, 并用 2 mL 质量分数为 0.5% 的低熔点琼脂糖封胶; 再次, 利用 Ettan DALT six 垂直电泳系统进行第二向电泳; 最后, 采用考马斯亮蓝 R-250 对凝胶进行染色, 并采集凝胶图像。

1.2.5 *A. manzaensis* 硫氧化相关膜蛋白的质谱分析

本文采用 Image Master 2D 软件对分离得到的 *A. manzaensis* 菌在以 S^0 和 Fe^{2+} 为能源底物下生长的膜蛋白图谱进行分析。以 Fe^{2+} 为能源底物的电泳图谱作为对照, 筛选以 S^0 为能源底物时差异表达的斑点, 选择挖取膜蛋白点, 转入离心管, 加入 200~400 μL 脱色液 (即添加体积分数为 30% 乙腈的 100 mmol/L NH_4HCO_3), 冷冻干燥后加入 5 μL 质量浓度为 10 mg/L 的测序级 Trypsin 溶液, 酶解反应在 37 °C 下进行 20 h; 在原离心管内加入 100 μL 的乙腈/三氟乙酸混合液 (体积分数为 60% 的乙腈、0.1% 的三氟乙酸), 超声 15 min, 将上述样品冻干, 加入 2 μL 体积分数为 20% 的乙腈复溶, 混匀后取 1 μL , 点至样品靶上, 待其干燥后, 再点入 0.5 μL 过饱和 α -氰基-4-羟基肉桂酸溶液 (体积分数为 50% 的乙腈、0.1% 的三氟乙酸) 并干燥, 样品靶经氮气吹净后放入仪器进靶槽, 并用 MALDI-TOF/TOF 进行测试分析。

1.2.6 数据库检索鉴定膜蛋白

质谱分析结束后, 采用 Mascot 2.2 软件将膜蛋白的肽指纹图谱在美国国立生物技术信息中心

(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 和 Swiss-Prot 数据库进行鉴定, 再采用 ProtParam 工具 (<http://web.expasy.org/protparam>) 在线分析膜蛋白的理论等电点与分子量^[15], 并用已有文献报道的方法预测膜蛋白的亚细胞定位^[16]。

1.2.7 RT-qPCR 验证筛选膜蛋白

通过 NCBI 检索鉴定得到 *A. manzaensis* 菌在以 S^0 为能源底物时表达量明显上调的膜蛋白基因, 再采用 Primer 3 (v.0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) 在线设计引物, 并经湖南擎科生物技术有限公司合成。

用于 RT-qPCR 的细胞收集于对数中期, 先用细菌总 RNA 提取试剂盒和细菌基因组 DNA 提取试剂盒分别提取总 RNA 和基因组 DNA, 以总 RNA 为模板, 采用 ReverTra Ace- α -第一链 cDNA 合成试剂盒进行反转录反应, 合成相应的 cDNA; 再以 cDNA 为模板, 使用 SYBR Green 高效率荧光定量 PCR Mix QPK-201 配置反应体系, 利用 iCycler iQTM Real-Time PCR 仪进行分析, 每个反应设 3 个重复。对 RT-qPCR 采集的数据, 用 16S rDNA 作为内参基因进行校正, 采用相对定量法分析各个基因在不同能源底物培养时的相对表达量^[17], 即

$$F=(1+E)^{-\Delta\Delta Cq}, \quad (1)$$

式中: E 为扩增效率; $\Delta\Delta Cq$ 为荧光信号达到阈值时的循环次数。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE

采用温度诱导的 Triton X-114 两相分离萃取技术对 *A. manzaensis* 菌在 2 种不同能源底物 Fe^{2+} 和 S^0 下生长所提取的膜蛋白进行选择分离后, 再利用 SDS-PAGE 进行初步分析, 结果如图 1 所示。图中 M 为预染蛋白 Marker。由图可知: 两相分离萃取技术能够有效提取 *A. manzaensis* 菌的膜蛋白, 而且不同能源底物下培养的 *A. manzaensis* 菌的膜蛋白表达种类有很大的差异, 这说明能源底物的差异诱导 *A. manzaensis* 菌能够成功地合成不同的膜蛋白, 换言之, 不同的膜蛋白条带与对应的能源底物密切相关。当以 Fe^{2+} 为能源底物时, *A. manzaensis* 菌的膜蛋白条带主要集中于 55 kDa 以上的部分; 而以 S^0 为能源底物时, *A. manzaensis* 菌的膜蛋白条带主要集中于 43 kDa 以下的部分。从图 1 中还可发现, 在 2 种不

同能源底物下, *A. manzaensis* 菌也有相同的膜蛋白条带, 其可能为 *A. manzaensis* 菌的结构蛋白。考虑到 SDS-PAGE 的分辨率有限, 对相对分子量差异较小的膜蛋白无法进行有效地分离, 本文随后采用了分辨率更高的 2-DE 对相关膜蛋白作进一步分析。

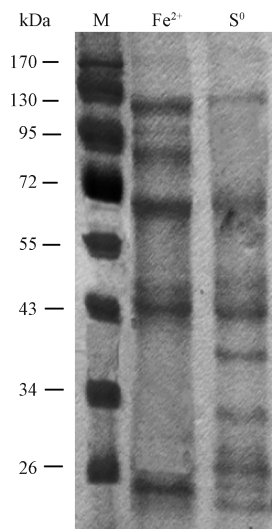


图 1 以 Fe^{2+} 和 S^0 为能源底物下 *A. manzaensis* 菌的膜蛋白 SDS-PAGE 结果图

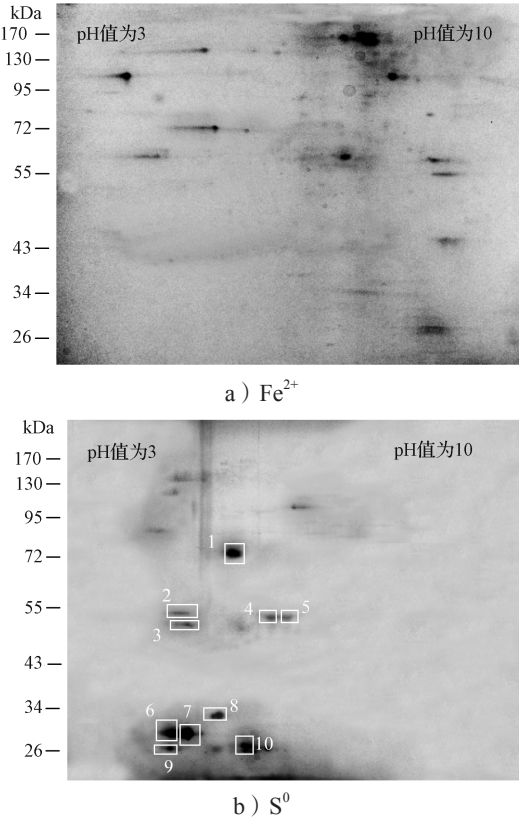
Fig. 1 SDS-PAGE of *A. manzaensis* membrane proteins grown on Fe^{2+} and S^0 substrate

2.2 *A. manzaensis* 菌在 Fe^{2+} 和 S^0 能源底物下膜蛋白的 2-DE 差异图谱和筛选

A. manzaensis 菌在 Fe^{2+} 和 S^0 能源底物下膜蛋白的 2-DE 差异图谱如图 2 所示。由图可知, 总电压为 80 kV·h 下, 等电聚焦可以得到较为清晰的膜蛋白斑点, 但是膜蛋白斑点出现拖尾现象, 这是因为膜蛋白具有非常强的疏水性, 等电聚焦时, 膜蛋白容易在 IPG 胶条内形成沉淀, 导致部分膜蛋白聚焦不完全。该 2-DE 差异图谱可以进一步用于后续比较蛋白质组学的差异膜蛋白斑点的筛选和质谱鉴定, 从而获得与 S^0 氧化相关的膜蛋白信息。

利用 Image Master 2D 软件对 2-DE 图谱进行分析可知: *A. manzaensis* 菌在 2 种不同的能源底物下生长的膜蛋白的 2-DE 图谱存在显著的差异; 与相应的 SDS-PAGE 结果 (见图 1) 相比, 2-DE 可以分离得到更多的膜蛋白, 如在 S^0 为能源底物下, 在相对分子量较小且酸性端 (pH 值为 3) 附近, 膜蛋白斑点展现较多, 但在 Fe^{2+} 为能源底物下却没有出现膜蛋白斑点, 这说明这部分膜蛋白与 *A. manzaensis* 菌对 S^0 的氧化利用密切相关。通过比较分析在 2 种不同能

源底物下膜蛋白的 2-DE 差异图谱后, 选择性挖取 10 个只有在 S^0 能源底物中表达和表达显著上调的膜蛋白斑点进行胶内水解与 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定。



注: 图中方框为用于质谱鉴定的膜蛋白斑点, 数字为斑点序号。

图 2 以 Fe^{2+} 和 S^0 为能源底物下 *A. manzaensis* 菌的膜蛋白 2-DE 差异图谱

Fig. 2 Two-dimensional electrophoresis gels of *A. manzaensis* membrane proteins grown on Fe^{2+} and S^0 substrates

2.3 与 S^0 氧化相关的膜蛋白质质谱鉴定

通过比较蛋白质组学方法筛选的 *A. manzaensis* 菌与 S^0 氧化相关的膜蛋白斑点经过胶内酶切, 再进行 MALDI-TOF/TOF 分析和对应膜蛋白的肽指纹图谱鉴定, 结果如表 1 所示。由表可知: 挖取的 10 个膜蛋白斑点只鉴定了 8 个 (吡啶核苷酸-二硫键氧化还原酶、Rieske 铁硫蛋白 SoxL2、TenA 家族的转录激活因子、赤鲜素蛋白以及 2 个假定蛋白), 其原因是 4 号和 5 号膜蛋白斑点为过氧化物酶, 6 号和 7 号膜蛋白斑点为乙/丙酰辅酶 A 羧化酶, 这表明上述 2 种膜蛋白有不同的构象异构体存在, 构象异构体的差异导致了等电点的轻微不同, 即斑点等电点位置发生漂移; 对鉴定的膜蛋白进行亚细胞定位预测发现, 通过筛选得到的与 S^0 氧化相关的膜蛋白大部分位于细胞膜,

其中 2 个假定蛋白和转录激活蛋白 (TenA 家族) 预测为未知的亚细胞定位, 这说明筛选鉴定得到的膜蛋白与采用温度诱导的 Triton X-114 两相分离萃取技术提取的膜蛋白基本吻合; 对鉴定的膜蛋白序列进行分析可知, 8 号斑点所对应的未知功能的膜蛋白富含巯基 ($-SH$) 且含有一个及以上的一CXXC—功能域。

表 1 S^0 能源底物下差异蛋白斑点的 MALDI-TOF/TOF 鉴定结果

Table 1 Identification of proteins spots of *A. manzaensis* grown on S^0 substrate by MALDI-TOF/TOF

序号	NCBI 登录号	膜蛋白的功能注释	分子量 (kDa) / 等电点	亚细胞定位预测
1	ARM75236	吡啶核苷酸-二硫键氧化还原酶	43.14/6.64	细胞膜
2	ARM76749	Rieske 铁硫蛋白 SoxL2	34.53/7.67	细胞膜
3	ARM74962	转录激活蛋白 (TenA 家族)	24.96/6.22	未知
4~5	ARM74880	过氧化物酶	25.06/5.83	细胞膜
6~7	ARM74890	乙/丙酰辅酶 A 羧化酶	18.57/5.06	细胞膜
8	ARM77057	假定蛋白 *	22.16/4.80	未知
9	ARM77007	赤鲜素蛋白	16.08/5.15	细胞膜
10	ARM74598	假定蛋白	15.29/4.84	未知

注: “*” 表示富含巯基和含有一个及以上一CXXC—功能域。

2.4 RT-qPCR 对 S^0 氧化相关膜蛋白的验证

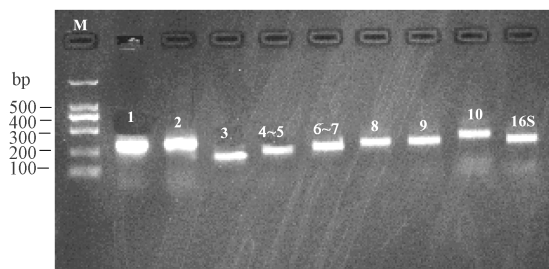
在 NCBI 数据库中, 检索上文得到的与 S^0 氧化相关的膜蛋白, 查找其基因序列, 再根据基因序列设计相应的引物, 引物相关信息如表 2 所示。

表 2 RT-qPCR 引物序列信息

Table 2 Primers used in RT-qPCR

序号	引物序列 (5' → 3')	退火温度 / 产物大小 / ℃	bp
1	F: TTGCTTTCGAGGAAGGAAAA R: GGTCGCAAACGCTATAACC	59	205
2	F: AGAGCGCAAATGTACCTGCT R: CGGCTGTTGGATCTTTTGAT	59	222
3	F: AAATGGGCCGAATTTTATGC R: ATTTAGTGCCGATTTCCAGA	59	153
4~5	F: TGGTGGCATAAAAGCAAAA R: TTGGTTTCAGGTATTTTCGTC	59	170
6~7	F: GCCGAACCTCCAACCTCAAGA R: CAATGCCTGCTATAGGAGCTG	58	200
8	F: CCTGCAATGCCCTTAGGTTA R: CCTGCAATGCCCTTAGGTTA	59	234
9	F: GCATTGCAGAAGGTGAAACA R: GCAGCTTCGTCAAATCCTTC	58	211
10	F: GGATGAAGTTTATAGGAATA R: CGTTGCGAGTATCGAAGAAA	58	264
内参基因 16S	F: AGAGGGCTTTTCCTACTGC R: GCCCTACTCTGGGAGTACC	58	232

将提取的细菌基因组 DNA 模板进行 PCR 扩增，再对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析，分析结果如图 3 所示。由图可知，所有设计的基因引物的 PCR 扩增产物均为单一明亮的条带，且未生成引物二聚体，这说明所设计的引物特异性较好，片段大小也和设计引物的理论扩增长度相一致；将扩增产物进行测序后，再经 BLAST 进行序列比对，结果为目的基因，这说明所设计的引物序列可用于后续的 RT-qPCR 验证实验。



注：数字为膜蛋白的序号，M 为 DNA Marker。

图 3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis analysis of the PCR products based on the primers

实验采用 RT-qPCR 技术对筛选得到的膜蛋白进行转录水平验证，验证结果用式 (1) 表示，并采用 t 检验进行差异性分析，分析结果如表 3 所示。

表 3 基于比较蛋白质组学方法筛选的膜蛋白基因 RT-qPCR 结果

Table 3 RT-qPCR results of the identified membrane protein genes based on comparative proteomics

序号	膜蛋白功能注释	相对表达量	p
1	吡啶核苷酸 - 二硫键氧化还原酶	39.83 ± 1.05	≤ 0.05
2	Rieske 铁硫蛋白 SoxL2	20.69 ± 0.40	≤ 0.05
3	转录激活蛋白 (TenA 家族)	5.48 ± 0.74	≤ 0.05
4~5	过氧化物酶	2.88 ± 0.15	≤ 0.05
6~7	乙 / 丙酰辅酶 A 羧化酶	17.16 ± 1.98	≤ 0.05
8	假定蛋白	16.92 ± 0.57	≤ 0.05
9	赤鲜素蛋白	13.93 ± 0.98	≤ 0.05
10	假定蛋白	1.20 ± 0.53	≤ 0.05

注： p 为显著性。

由表 3 可知，通过比较蛋白质组学方法筛选在 S^0 能源底物中 *A. manzaensis* 菌的膜蛋白的基因表达量均显著高于在 Fe^{2+} 能源底物中的，这说明筛选得到的膜蛋白所对应的基因在转录水平上均显著表达上调。据资料显示，微生物中的铁硫蛋白和赤鲜素蛋白是重要的电子传递体，是微生物呼吸链上的重要组成蛋白。因此，本实验筛选得到的 Rieske 铁硫蛋白 SoxL2 和赤鲜素蛋白可以视为嗜酸热古菌呼吸

链上的电子传递体，它们对 S^0 氧化过程中的能量产生具有重要的作用^[18]。转录激活蛋白 (TenA 家族) 可能对细胞氧化 S^0 相关的膜蛋白的转录起调控作用，乙酰 / 丙酰辅酶 A 羧化酶在微生物生长和脂肪合成中发挥着重要的作用，这些酶都可能与嗜酸热古菌 *A. manzaensis* 氧化 S^0 密切相关。此外，实验筛选出来的膜蛋白中还有 1 个属于未知功能蛋白 (蛋白斑点序号为 10)，它与嗜酸热古菌 *A. manzaensis* 氧化 S^0 的作用还有待进一步研究。

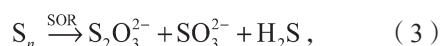
3 讨论

众所周知，自然环境下 S^0 主要以环状形态且不溶于水的 S_8 形式存在，细胞对疏水性 S^0 的氧化过程十分复杂^[19-20]。对于古菌而言， S^0 的初始氧化酶 SOR 只存在于细胞质中，因此胞外 S^0 的氧化需要经跨膜转运进入细胞质中才能进行。当 *A. manzaensis* 菌在 S^0 中生长时，会在细胞表面形成大量胞外多聚物 (extracellular polymeric substances, EPS)，EPS 可以介导细胞对疏水性 S^0 的吸附过程，而被细胞吸附后的 S^0 还需经外膜富含巯基 (—SH) 蛋白的转运，才能被进一步氧化^[21-23]。T. Rohwerder 等^[24] 研究发现， S^0 可能会在外膜富含巯基和 S_8 的作用下，形成类似的 $Pr-SS_nH$ ($n \geq 2$) 结构化合物，即

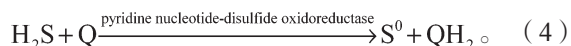


该化合物会被外膜蛋白转运至细胞周质空间中进行氧化。P. RamiRez 等^[25] 研究发现，将在 Fe^{2+} 为能源底物下生长的 *A. ferrooxidans* 细胞转移至 S^0 中培养时，细胞会有一个分子量为 44 kDa 的膜蛋白明显表达上调，且该蛋白属于外膜蛋白。

目前对于古菌中起转运 S^0 的膜蛋白还未有报道。因此本实验基于比较蛋白质组学方法筛选了 8 个与嗜酸热古菌 *A. manzaensis* 氧化 S^0 相关的膜蛋白，再对膜蛋白斑点 8 号即未知功能膜蛋白的序列进行生物信息学分析后，发现该未知功能的膜蛋白富含 —SH 且含有一 CXXC—功能域，而且 RT-qPCR 结果显示其在 S^0 的表达量较高 (相对表达量为 16.92 ± 0.57)，由此推测该蛋白可能通过巯基与 S^0 进行结合，形成 $Pr-SS_nH$ ($n \geq 2$) 复合物，再对 S^0 进行跨膜转运。转运到细胞质中的 S^0 被嗜酸热古菌的 SOR 催化同时发生氧化和还原反应，生成 $S_2O_3^{2-}$ 离子、 SO_3^{2-} 离子和 H_2S ，即



但是该反应不能与电子传递进行耦合, 这说明该反应不能为细胞生长提供能量。因此, 当嗜酸热古菌在以 S^0 作为能源底物生长时, 还需要其他的酶对 $S_2O_3^{2-}$ 离子、 SO_3^{2-} 离子和 H_2S 进行氧化并与电子传递进行耦合来产生能量^[26]。已有文献报道, 在与 *A. manzaensis* 菌同一个 *Acidianus* 属的不同种 *A. hospitalis* W1 中的吡啶核苷酸-二硫键氧化还原酶具有氧化 H_2S 的功能^[27], 该酶是硫醌氧化还原酶, 其氧化过程与电子传递耦合产生还原性醌 (QH_2), 即



还原性醌被氧化产生腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP)^[28]。因此, 本实验通过比较蛋白质组学筛选得到了吡啶核苷酸-二硫键氧化还原酶, 其 RT-qPCR 结果显示该酶在以 S^0 为能源底物时的表达量较高 (相对表达量为 39.83 ± 1.05), 这说明该酶在 *A. manzaensis* 菌中具有氧化 H_2S 的作用。

4 结语

本文通过比较蛋白质组学方法对嗜酸热古菌 *A. manzaensis* 中硫氧化相关的膜蛋白基因进行了筛选和鉴定, 发现了 8 个与硫氧化相关的膜蛋白, 并从转录水平对其进行了验证。实验结果表明, 一个未知功能的膜蛋白富含巯基及—CXXC—功能域, 该膜蛋白可能通过巯基 (—SH) 对 S^0 进行键和并生成 $Pr-SS_nH$ ($n \geq 2$) 化合物, 该化合物能协助单质硫跨膜转运; 实验还筛选得到了硫醌氧化还原酶、电子传递蛋白、转录激活蛋白和与细胞生长相关的蛋白, 这些膜蛋白在嗜酸热古菌 *A. manzaensis* 氧化 S^0 的过程中起非常重要的作用。

参考文献:

- [1] ROHWERDER T, SAND W. Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds in Acidophilic Prokaryotes[J]. Engineering in Life Sciences, 2007, 7(4): 301–309.
- [2] 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 & Biotechnology, 2003, 63(3): 239–248.
- [3] VERA M, SCHIPPERS A, SAND W. Progress in Bioleaching: Fundamentals and Mechanisms of Bacterial Metal Sulfide Oxidation: Part A[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2013, 97(17): 7529–7541.
- [4] 朱 薇. 嗜酸热古菌浸出黄铜矿的硫氧化活性与群落结构及硫形态关联性研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
ZHU Wei. Research on the Correlations Among Sulfur Oxidation Activity, Community Structure and Sulfur Speciation in Bioleaching Chalcopyrite with Thermophilic Archaea[D]. Changsha: Central South University, 2012.
- [5] ZHU Wei, XIA Jinlan, PENG Anan, et al. Characterization of Apparent Sulfur Oxidation Activity of Thermophilic Archaea in Bioleaching of Chalcopyrite [J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2013(8): 2383–2388.
- [6] 彭安安. 嗜酸硫氧化细菌元素硫活化氧化机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
PENG Anan. Study on the Sulfur Activity and Oxidation Mechanism of Acidophilic Sulfur-Oxidizing Bacteria[D]. Changsha: Central South University, 2012.
- [7] LITTLE B J, POPE R K, RAY R I. Relationship Between Corrosion and the Biological Sulfur Cycle: A Review[J]. Corrosion, 2000, 56(4): 433–443.
- [8] KLETZIN A, URICH T, MÜLLER F, et al. Dissimilatory Oxidation and Reduction of Elemental Sulfur in Thermophilic Archaea[J]. Journal of Bioenergetics, 2004, 36(1): 77–91.
- [9] FASHOLA M O, NGOLEJEME V M, BABALOLA O O. Diversity of Acidophilic Bacteria and Archaea and Their Roles in Bioremediation of Acid Mine Drainage[J]. British Microbiology Research Journal, 2015, 8(3): 443–456.
- [10] MANGOLD S, VALDÉS J, HOLMES D S, et al. Sulfur Metabolism in the Extreme Acidophile Acidithiobacillus Caldus[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2(1): 1–18.
- [11] KUCERA J, SEDO O, POTESIL D, et al. Comparative Proteomic Analysis of Sulfur-Oxidizing Acidithiobacillus Ferrooxidans CCM 4253 Cultures Having Lost the Ability to Couple Anaerobic Elemental Sulfur Oxidation with Ferric Iron Reduction[J]. Research in Microbiology, 2016, 167(7): 587–594.
- [12] ZHANG Ruiyong, NEU T R, ZHANG Yutong, et al. Visualization and Analysis of EPS Glycoconjugates of the Thermoacidophilic Archaeon Sulfolobus Metallicus[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015,

- 99(17): 7343–7356.
- [13] URICH T, GOMES C M, KLETZIN A, et al. X-Ray Structure of a Self-Compartmentalizing Sulfur Cycle Metalloenzyme[J]. *Science*, 2006, 311(5763): 996–1000.
- [14] 夏金兰, 欧阳叙东, 张成桂, 等. 大肠杆菌外膜蛋白的分离及其双向电泳图谱的建立[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(2): 201–204.
XIA Jinlan, OUYANG Xudong, ZHANG Chenggui, et al. Rapid and Efficient Extraction of Outer Membrane Proteins from *Escherichia Coli* and Establishment of the Two-Dimensional Electrophoresis Maps[J]. *Process in Modern Biomedicine*, 2009, 9(2): 201–204.
- [15] ALMÁRCEGUI R J, NAVARRO C A, PARADELA A, et al. Response to Copper of *Acidithiobacillus Ferrooxidans* ATCC 23270 Grown in Elemental Sulfur[J]. *Research in Microbiology*, 2014, 165(9): 761–772.
- [16] YU N Y, WAGNER J R, LAIRD M R, et al. PSORTb 3.0: Improved Protein Subcellular Localization Prediction with Refined Localization Subcategories and Predictive Capabilities for All Prokaryotes[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(13): 1608–1615.
- [17] KUCERA J, ŠEDO O, POTESIL D, et al. Comparative Proteomic Analysis of Sulfur-Oxidizing *Acidithiobacillus Ferrooxidans* CCM 4253 Cultures Having Lost the Ability to Couple Anaerobic Elemental Sulfur Oxidation with Ferric Iron Reduction[J]. *Research in Microbiology*, 2016, 167(7): 587–594.
- [18] AUERNIK K S, KELLY R M. Identification of Components of Electron Transport Chains in the Extremely Thermoacidophilic Crenarchaeon *Metallosphaera Sedula* Through Iron and Sulfur Compound Oxidation Transcriptomes[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 74(24): 7723–7732.
- [19] 马亚龙, 刘红昌, 夏金兰, 等. 极端嗜酸热古菌 *Acidianus manzaensis* 胞外硫活化蛋白质基因的筛选及鉴定[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(12): 143–151.
MA Yalong, LIU Hongchang, XIA Jinlan, et al. Screening and Identification of Extracellular Protein Genes Relevant to Sulfur Activation of Extremely Thermoacidophilic Archaea *Acidianus manzaensis*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(12): 143–151.
- [20] 杨云, 刘红昌, 夏金兰, 等. 极端嗜酸热古菌 *Acidianus manzaensis* 膜蛋白提取方法的建立及应用[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(11): 130–136.
YANG Yun, LIU Hongchang, XIA Jinlan, et al. Establishment of Extraction Methods of Membrane Proteins from Extremely Thermoacidophilic *Acidianus manzaensis* and Its Preliminary Application[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(11): 130–136.
- [21] SAND W, GEHRKE T. Extracellular Polymeric Substances Mediate Bioleaching/Biocorrosion Via Interfacial Processes Involving Iron(III) Ions and Acidophilic Bacteria[J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157(1): 49–56.
- [22] PENG Anan, XIA Jinlan, LIU Hongchang, et al. Thiol-Rich Proteins Play Important Role in Adhesion and Sulfur Oxidation Process of *Acidithiobacillus Ferrooxidans*[J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 825(23): 137–140.
- [23] LIU Hongchang, XIA Jinlan, NIE Zhenyuan, et al. Differential Expression of Extracellular Thiol Groups of Moderately Thermophilic *Sulfobacillus Thermosulfidooxidans* and Extremely Thermophilic *Acidianus Manzaensis* Grown on S^0 and Fe^{2+} [J]. *Archives of Microbiology*, 2015, 197(6): 823–831.
- [24] ROHWERDER T, SAND W. Properties of Thiols Required for Sulfur Dioxygenase Activity at Acidic pH[J]. *Journal of Sulfur Chemistry*, 2011, 29(3/4): 293–302.
- [25] RAMÍREZ 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 & Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4491–4498.
- [26] KLETZIN A. Oxidation of Sulfur and Inorganic Sulfur Compounds in *Acidianus ambivalens*[M]//[Anon]. *Microbial Sulfur Metabolism*. Berlin: Springer, 2008: 184–201.
- [27] YOU Xiaoyu, LIU Chao, WANG Shengyue, et al. Genomic Analysis of *Acidianus Hospitalis* W1 a Host for Studying Crenarchaeal Virus and Plasmid Life Cycles[J]. *Extremophiles*, 2011, 15(4): 487–497.
- [28] 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, & Biochemistry*, 2014, 68(12): 2519–2528.

Screening and Identification of Related Sulfur Oxidation Membrane Protein Gene of *Acidianus manzaensis*

ZHU Wei^{1,2}, MA Yalong^{1,2}, YANG Yun²

(1. School of Science, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China;

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

Abstract: The related sulfur oxidation membrane protein genes of extremely thermophilic archaea *Acidianus manzaensis* were screened and identified based on comparative proteomics methods. Firstly, membrane proteins of *A. manzaensis* grown on two energy sources, elemental sulfur (S^0) and ferrous ions (Fe^{2+}) were selectively extracted and primitively validated by temperature-induced two-phase separation technique of Triton X-114 and real time polymerase chain reaction (RT-PCR). The extracted membrane proteins were further analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and two-dimensional electrophoresis (2-DE). Finally the membrane proteins expressed spots under S^0 substrate were selected to identify by tandem time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) and then were verified by RT-qPCR. The results of the present study indicated that the membrane proteins extracted from the two energy sources were significantly different. One hypothetical protein was found rich in cysteine residues and had one —CXXC— functional motif in eight related sulfur oxidation membrane protein genes, which might play an important role in the sulfur transportation by forming the $Pr-SS_nH$ ($n \geq 2$) complex using the thiol groups (—SH) to bind the S^0 . Sulphide-quinone oxidoreductas, electrons transportation proteins, transcriptional regulation proteins and grown relevant proteins were also identified, these membrane proteins might play important roles with thermophilic archaea *Acidianus manzaensis* during S^0 oxidation process.

Keywords: *Acidianus manzaensis*; sulfur oxidation; membrane protein; comparative proteomics