

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *doxDA* 操纵元的鉴定与分析

张成桂 彭安安 罗炎杰 张瑞永 夏金兰* 邱冠周

(中南大学资源加工与生物工程学院 生物冶金教育部重点实验室 长沙 410083)

摘要: 本文利用 RT-PCR 方法从转录水平上分别对 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 基因组中可能编码硫酸盐-硫代硫酸盐结合蛋白基因 *sbp*、膜结合硫代硫酸盐-辅酶 Q 氧化还原酶基因 *doxDA* 以及类硫氰酸酶基因 *p21* 等开放阅读框所在的基因座之间的联系进行了鉴定和分析, 结果表明它们分别从属于预测的 *doxDA*-1 操纵元和 *doxDA*-2 操纵元。在此基础上, 本文对 *doxDA* 操纵元的可能启动子序列也进行了预测和分析。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌, *doxDA* 操纵元, 硫氧化

Characterization of the *doxDA* Operons of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

ZHANG Cheng-Gui PENG An-An LUO Yan-Jie ZHANG Rui-Yong
XIA Jin-Lan* QIU Guan-Zhou

(Key Laboratory of Biometallurgy of Ministry of Education of China, School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083)

Abstract: Reverse transcriptase-PCR experiments suggest that the two clusters of genes potentially involved in the oxidation of reduced sulfur compounds are organized as operons in strain of the acidophilic, chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, the two clusters of genes including such the ORF of putative sulfate-thiosulfate-molybdate binding proteins, the ORF of putative thiosulfate: quinone oxidoreductase and the ORF of the rhodanese-like protein (P21). Bioinformatic analyses have predicted the possible promoters sequences and the possible +1 start site of transcription for the *doxDA* operons.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *doxDA* operons, Sulfur oxidation

近年来由于金属硫化矿生物浸出对资源利用的重要性以及金属硫化矿废堆酸性渗流液引起的环境问题, 有关金属硫化矿生物氧化和生物浸出机制的研究引起了相关科学工作者的重视。目前, 对重要的硫化矿生物浸出功能菌嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*A. ferrooxidans*) 为代表的嗜酸硫杆菌属的能量代谢

机制方面的研究最为广泛和深入^[1]。嗜酸氧化亚铁硫杆菌是一种硫杆菌属化能自养菌, 属于革兰氏阴性细菌, 好氧嗜酸, 主要生长在 pH 1~3 的环境中, 是迄今已报道的 20 多种浸矿细菌中研究最多的浸矿细菌。浸矿酸性环境中, *A. ferrooxidans* 在有氧条件下依靠 Fe²⁺、金属硫化矿分解产生的元素硫以及

基金项目: 国家“973 计划”项目(No. 2004CB619201); 国家自然科学基金创新研究群体科学基金项目(No. 50621063); 国家自然科学基金项目(No. 50674101)

* 通讯作者: Tel: 0731-8836944; ✉ jlxia@mail.csu.edu.cn

收稿日期: 2007-11-08; 接受日期: 2008-01-03

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

其它各种还原性硫化物氧化来提供生长能量,促进嗜酸硫氧化细菌自身生长;同时维持浸矿环境中金属离子不断浸出所需要的高铁离子和质子^[2,3]。相对于亚铁氧化系统^[4],硫氧化系统更加复杂,相关研究还有许多悬而未决的问题。

嗜酸硫氧化细菌对元素硫的氧化是一个错综复杂的过程。在该过程中,细菌的胞外物质介导着细菌对元素硫的吸附,细菌外膜蛋白进而将吸附硫转运到细胞周质空间,元素硫经过一系列生物氧化途径,最终被氧化为硫酸根离子,并被释放至胞外介质中。对 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 全基因组基因功能注释(www.tigr.com)分析发现,没有与元素硫氧化系统相关的功能基因的详细注解。尽管人们对硫还原功能基因以及硫还原途径有了较深入的了解,但至今对硫生物氧化途径的了解仍然是零星和不完整的(<http://biocyc.org>)。

Ramírez P等^[5]研究 *A. ferrooxidans* 在不同能量基质中生长的细菌的双向电泳蛋白质差异展示时发现,在元素硫基质中生长的细菌细胞体内有一类硫氰酸酶P21 高度表达,而该蛋白质在亚铁基质中几乎没有表达。并推测该类硫氰酸酶P21 位于细胞周质空间中。对 *p21* 基因所在基因座进行分析,发现 *p21* 基因前后存在一些和硫氧化相关的可能的开放阅读框(ORF),编码诸如类硫酸盐-硫代硫酸盐结合蛋白(sulfate-thiosulfate-molybdate binding proteins: SBP-1 和 SBP-2)的 *shp-1* 和 *shp-2*、编码膜结合类硫代硫酸盐-辅酶Q氧化还原酶(thiosulfate: quinone oxidoreductase: TQO-1 和 TQO-2)的 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 等开放阅读框。推测这些基因的编码产物和硫氧化有密切关系。在高通量的生物芯片研究亚铁氧化和硫氧化的结果中也验证 *p21* 所在基因座中的上述一些ORF和硫氧化相关,在硫氧化基质中的表达水平相对于在亚铁基质中的表达水平成显著性增加^[6],由于它们在 *A. ferrooxidans* 基因组中依次排列,预测这些基因在转录时属于共转录,分别属于预测的 *doxDA-1* 操纵元和 *doxDA-2* 操纵元。本文在已有研究结果的基础上,利用RT-PCR方法从转录水平上分别鉴定了 *p21* 基因所在的 *doxDA-1* 操纵元,以及和 *doxDA-1* 操纵元在编码顺序上相对的 *doxDA-2* 操纵元,并利用生物信息学的知识对 *doxDA* 操纵元

可能的启动子序列进行了预测和分析。

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基和培养条件

菌株 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 来源于美国模式菌种收集中心。实验使用 9K 培养基进行液体培养,对菌种进行活化和传代,在含 5.0 g/L 元素硫的 9K 培养基中,成分分别为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L; KCl, 0.1 g/L; K_2HPO_4 , 0.5 g/L; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.01 g/L 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 44.5 g/L。培养液初始 pH 值用 5 mol/L 的 H_2SO_4 来调整至 2.5。细菌用 250 mL 锥形瓶于 30、160 r/min 摇床中恒温振荡培养。

1.2 细菌 DNA 和 RNA 提取以及 cDNA 合成

培养至对数中后期生长的菌液,滤去元素硫颗粒,滤液经离心收集细胞沉淀,用 5 mmol/L H_2SO_4 洗涤细胞 2 次后,低温冷冻保存,作为提取细菌 DNA 和 RNA 的样品。

细菌 DNA 的提取:用 400 μL TE 重悬细胞沉淀,再加入 80 μL 20% SDS, 3 μL 20 g/L 蛋白酶 K 混匀后,55℃ 放置 1 h;依次加入 100 μL 5 mol/L NaCl 和 80 μL 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)-NaCl 溶液(0.7 mol/L NaCl 中含 10% CTAB),充分混匀,65℃ 放置 10 min;加入等体积的氯仿/异丙醇-乙醇后漩涡振荡混合均匀;12000 r/min 离心 15 min;转移上层液至一新管后加入 2~3 倍体积的异丙醇沉淀 DNA;12000 r/min 离心 10 min 收集 DNA 沉淀;70%乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次;真空干燥后加入 100 μL 已灭菌双蒸水溶解备用。

细菌 RNA 的提取:总 RNA 提取采用 Trizol 试剂盒(GIBCO, Life Technologies),按 Trizol 试剂盒说明书上的方法进行。最后用无 RNase 的水溶解 RNA,于 -70℃ 保存备用。

cDNA 的合成:总 RNA 用 DNase 室温处理 30 min 后用于 cDNA 合成。以总 RNA (1 μg ~3 μg) 为模板,利用 cDNA 合成试剂盒(MBI)中的随机引物六聚体反转录获得 cDNA,反转录方法参照说明书。

1.3 引物设计与 PCR 反应

根据 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 全基因组开放阅读框序列(www.tigr.com)来设计引物。*doxDA-1* 和 *doxDA-2* 操纵元中可能的开放阅读框基因序列在 *A. ferrooxidans* 全基因组中的基因座位序列编号分

别为 :AFE_2973、AFE_2974、AFE_2975、AFE_2976、AFE_2977、AFE_2978、AFE_2979、AFE_2980、AFE_2981、AFE_2982 和 AFE_2983。根据这些序列设计的引物如表 1 所示。寡聚核苷酸引物的合成由上海生工生物工程有限公司完成。

表 1 本文中所用的 PCR 引物
Table 1 The oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence(5' to 3')
73-74-1	TTGCCGTTTATCTGGAC
73-74-2	CGACTTCAAAACGGTTC
74-75-1	GATGGCGGCCGAGTTTAC
74-75-2	GGGCCAGCCGTAGTGTG
75-76-1	CAGAGGCGTGGGTAAAC
75-76-2	GCCCCAGTAAATCCAAC
76-77-1	GGTAAATGGCAGCGTCTG
76-77-2	CGTTGCCACATCGGACT
77-78-1	GTGCAGTGGGCGGAATC
77-78-2	AACGTCGTCGGCGGTAT
78-79-1	GCTCGGTTATGACGCCTAC
78-79-2	TATTCCTCCTGGCATCGC
79-80-1	CCTGCCGTCAACGATGC
79-80-2	GGAGGCCACCGATAACGA
80-81-1	TGCTTCCGCCGTAGTCAAGG
80-81-2	CGGCAAGAAGGGCGATGG
81-82-1	GTTGCAGTTGGCGGGCTAT
81-82-2	TGATGGATCGCGGGATTG
82-83-1	GCGGCATGTGGGTCGG
82-83-2	CGGTGGGCAACAGGTTGG
83-84-1	CCATGTTTCGCGGCAAAC
83-84-2	CTGGAGAAACAGGGCGA

PCR 扩增反应体系(50 μ L): 1.0 μ L (10 mmol/L) 引物, 2.0 U(2.0 μ L) Taq DNA 聚合酶 (Fermentas),

5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 1 μ L (10 mmol/L) dNTPs, 4 μ L (25 mmol/L) MgCl₂, 0.5 μ L 模板(DNA模板和 cDNA模板), 加水补至 50 μ L。DNA 扩增过程: 93 3 min; 93 30 s, 56 30 s, 72 30 s, 32 个循环; 72 10 min; 程序结束后 4 保存。将 PCR 产物于 2.0%的加入溴化乙锭的琼脂糖凝胶检测, 紫外检测仪下观察结果。

1.4 序列分析

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 的全基因组数据库中的基因序列来自 TIGR 数据库(www.tigr.com)。针对拟分析的开放阅读框序列所编码的蛋白质, 分别采用 Protparam 模块 (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam.htm>) 分析蛋白质分子量和等电点、TMPRED (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED>) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 模块预测蛋白质跨膜螺旋序列、以及 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)模块分析蛋白质的信号肽序列。原核生物启动子的预测分析软件模块为 BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)。

2 结果

2.1 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 操纵元中开放阅读框编码多肽的生物信息学分析

doxDA-1 和 *doxDA-2* 操纵元中开放阅读框以及其相邻开放阅读框的序列的一些基本生物学信息如表 2 所示, 它们在 *A. ferrooxidans* ATCC23270 全基因组中的基因座位排列顺序如图 1 所示。

表 2 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 操纵元中的开放阅读框以及其相邻开放阅读框所编码多肽的特征
Table 2 Some properties of the putative ORFs present in putative *doxDA-1* and *doxDA-2* operons region and the adjacent putative ORFs

Locus	Gene symbol	Common name	MW kD	pI	No. of TM	SignalP
AFE_2973	<i>unknown</i>	Hypothetical protein	19.2	10.3	0	
AFE_2974	<i>tat-2</i>	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	29.5	6.2	3	
AFE_2975	<i>sbp-2</i>	Sulfate-thiosulfate-molybdate binding proteins, putative	36.6	8.7	1	yes
AFE_2976	<i>doxDA-2</i>	DoxD-like family protein	39.0	9.5	6	
AFE_2977	<i>unknown</i>	Conserved hypothetical protein	17.8	8.6	0	
AFE_2978	<i>unknown</i>	Conserved hypothetical protein	14.3	4.8	0	
AFE_2979	<i>P21</i>	Sulfur/pyrite/thiosulfate/sulfide-induced protein	23.8	9.4	0	yes
AFE_2980	<i>doxDA-1</i>	DoxD-like family protein	38.4	9.3	5	
AFE_2981	<i>sbp-1</i>	Sulfate-thiosulfate-molybdate binding proteins, putative	36.6	9.1	0	yes
AFE_2982	<i>tat-1</i>	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	29.5	6.5	2	
AFE_2983	<i>cdt</i>	C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport protein	44.6	6.5	9	



图 1 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 操纵元中开放阅读框以及其相邻开放阅读框序列在 *A. ferrooxidans* 基因组中的排列顺序

Fig. 1 Schematic map of the putative *doxDA-1* and *doxDA-2* operons region containing the putative gene cluster context from *A. ferrooxidans*

2.2 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 操纵元中开放阅读框的共转录分析

利用表 1 中的引物, 分别以基因组 DNA 和对 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增目的产物。结果如图 2 所示。

2.3 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 操纵元中启动子序列分析

包含在 *doxDA-1* 操纵元中的开放阅读框 AFE_2978、AFE_2979、AFE_2980、AFE_2981、AFE_2982 和 AFE_2983 所代表的可能基因分别为

unknown、*P21*、*doxDA-1*、*sbp-1*、*tat-1* 和 *cdt* 基因。根据其序列设计的引物分别以基因组 DNA 和对 RNA 反转录得到的 cDNA 模板进行 PCR 反应时得到了大小与预期相一致的产物, 如图 2 所示, 而 *cdt* 与其临近的开放阅读框 AFE_2984 之间能以基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应得到反应产物, 而以 cDNA 为模板时没有扩增产物。这说明 *unknown*、*P21*、*doxDA-1*、*sbp-1*、*tat-1* 和 *cdt* 六个开放阅读框的基因转录应该属于共用一个启动子序列的共转

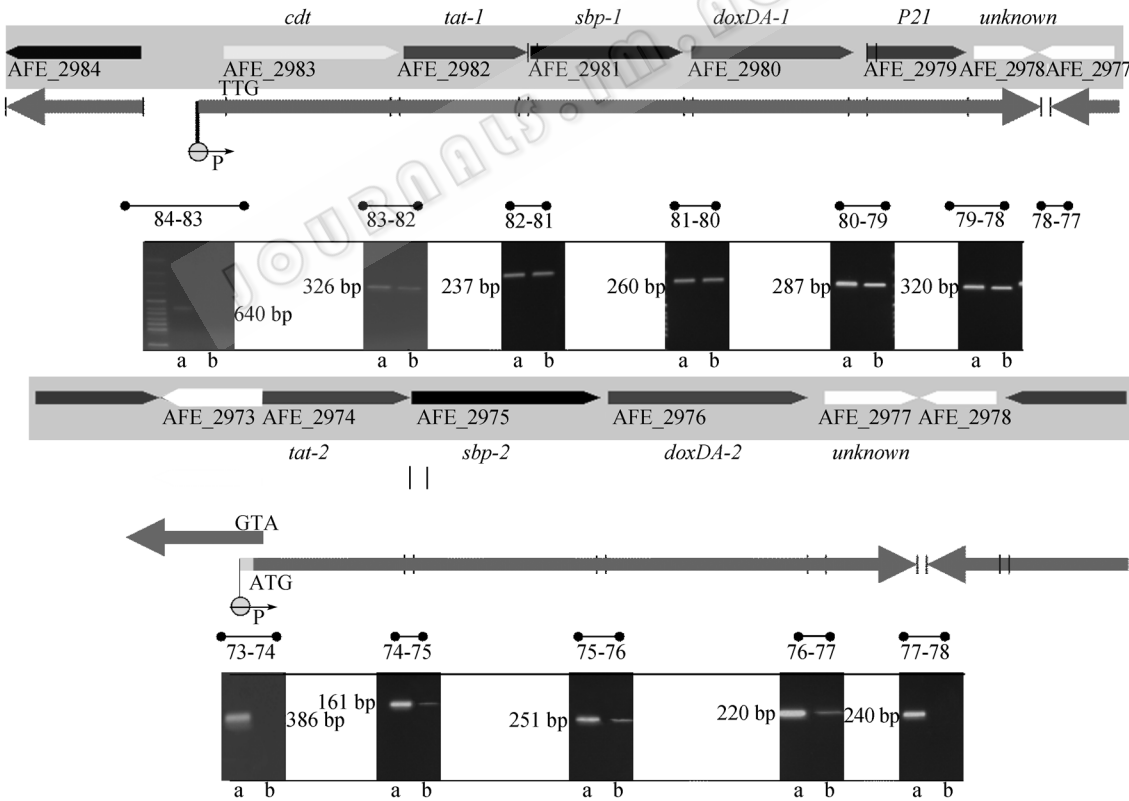


图 2 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 操纵元中的开放阅读框以及其相邻开放阅读框的 PCR 和 RT-PCR 产物电泳效果图

Fig.2 The agarose gel electrophoresis of PCR products by PCR and RT-PCR of the putative ORFs present in putative *doxDA-1* and *doxDA-2* operons region and the adjacent putative ORFs

a: 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应得到的产物; b: 以总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 反应得到的产物
a: PCR amplification of the DNA to determine the expected size of the fragment between the respective primer pairs; b: RT-PCR amplification of the RNA

录。对 *cdt* 开放阅读框上游进行有关启动子序列信息分析时, 发现有一段与原核生物启动子特征十分相似的核苷酸序列, 有典型的-10 序列和-35 序列保守区域, 如图 3 所示。

包含在 *doxDA-2* 操纵元中的开放阅读框 AFE_2974、AFE_2975、AFE_2976 和 AFE_2977 所代表的基因分别代表 *tat-2*、*sbp-2*、*doxDA-2* 和 *unknown*。根据其序列设计的引物分别以基因组 DNA 和对 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 反应时得到了大小与预期相一致的产物, 如图 2 所示, 而 *tat-2* 与其临近的开放阅读框 AFE_2973 之间能以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 而以 cDNA 为模板时没有扩增产物。这说明 *tat-2*、*sbp-2*、*doxDA-2* 和 *unknown* 四个开放阅读框在基因转录时应该属于共转录。

应该特别说明的是, 在模板浓度、酶量和循环

数等反应条件完全相同的条件下以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增时, 发现操纵子 *doxDA-2* 中的序列的 PCR 产物浓度明显低于操纵子 *doxDA-1* 中的序列 PCR 产物浓度, 如图 2 所示。说明 *doxDA-2* 操纵元中的 *tat-2*、*sbp-2*、*doxDA-2* 和 *unknown* 基因所属的转录单元在元素硫生长基质中的转录量相对于 *doxDA-1* 操纵子转录单元的转录量相差显著。

doxDA-1 操纵元中 *tat-2* 开放阅读框和与之临近的开放阅读框 AFE_2974 之间没有间隔的核苷酸序列, *tat-2* 开放阅读框的翻译起始密码子 ATG 与开放阅读框 AFE_2974 的翻译起始密码子 ATG 之间形成重叠, 如图 4 所示。在对开放阅读框 AFE_2974 进行启动子序列信息分析时, 预测到 2 个可能的启动子序列, 如图 4 所示。但 2 个可能启动子序列都没有明显符合-35 序列和-10 序列的原核生物启动子特征的寡聚核苷酸片段。

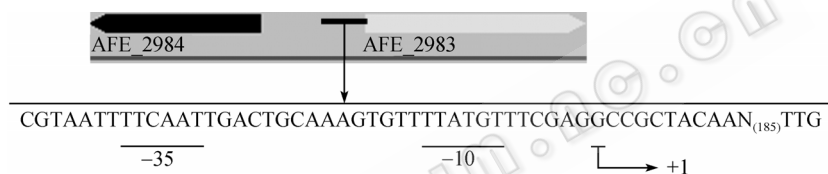


图 3 *doxDA-1* 操纵元中 *cdt* 开放阅读框上游的启动子序列信息

Fig. 3 Schematic diagram of the promoter in the upstream of *cdt*. Possible +1 start site of transcription and possible -10 and -35 promoter sites for the *doxDA-1* operon are indicated

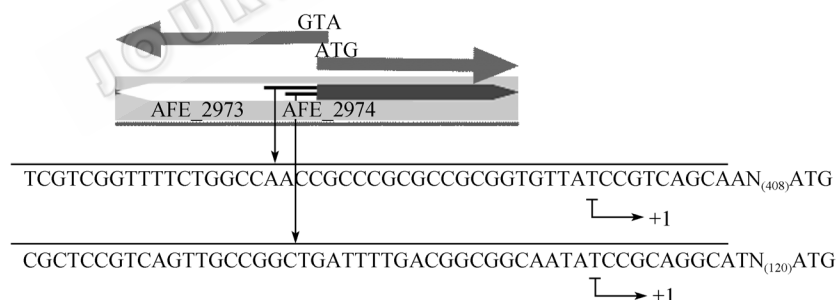


图 4 *doxDA-2* 操纵元中 *tat-2* 开放阅读框上游的核苷酸序列中可能存在的启动子序列

Fig. 4 DNA sequences of the upstream of *tat-2*. Possible +1 start site of transcription and the possible promoters for the *doxDA-2* operon are indicated

3 讨论

嗜酸氧化亚铁硫杆菌在不同的环境条件下, 能量代谢主要由体内的亚铁氧化系统和硫氧化系统来完成。Quatrini R等^[6]采用基因组芯片技术开展了亚铁和还原性硫化物氧化过程中的NAD(P)还原途径相关的酶系统和电子传递链上的一些开放阅读框的转录差异谱研究, 发现在还原性硫化物基质中,

doxDA-1 操纵元中的开放阅读框 *doxDA-1* 和 *P21* 的表达水平明显高些, 也高于 *doxDA-2* 操纵元中的开放阅读框 *doxDA-2* 的表达水平。在基因组中找到与古生菌 *A. ambivalens* 编码硫代硫酸盐-辅酶 Q 氧化还原酶基因相似的双拷贝基因 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 基因^[7], 分布于编码顺序相对的操纵元 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 中。有趣的现象是分别在 *doxDA-1* 和 *doxDA-2* 基因的上游同时存在 2 个类硫

酸盐-硫代硫酸盐结合蛋白编码双拷贝基因 $sbp-1$ 和 $sbp-2$,在进一步对SBP-1和SBP-2的结构进行模拟分析时,发现SBP-1和SBP-2在三维结构上与*E. coli*的ModA蛋白的结构在硫酸盐、硫代硫酸盐和钼原子的关键结合位点都十分相似^[8]。类硫代硫酸盐-辅酶Q氧化还原酶和类硫酸盐-硫代硫酸盐结合蛋白的存在可能与硫酸盐、硫代硫酸盐的转运和氧化利用密切相关。在 $doxDA-1$ 操纵元中 $doxDA-1$ 下游有1个类硫氰酸水解酶编码基因 $p21$,P21在硫化物、硫和硫代硫酸盐基质中高度表达,这说明P21和硫代谢有重要的相关性,但是通过体外大量表达的P21,未能检测到硫氰酸水解酶活性^[5]。 $doxDA-1$ 操纵元上游的 $tat-1$ 和 cdt 至今未见任何研究,它们与 $sbp-1$ 、 $doxDA-1$ 和 $p21$ 一起组成 $doxDA-1$ 操纵元,它们编码的蛋白质之间可能存在相互作用,或和体内的其它蛋白质组成复合体系,在*A. ferrooxidans*的硫氧化系统中可能扮演着和硫化物的获取、转运和吸收有关的角色。

在 $doxDA-2$ 操纵元中,由于 $tat-2$ 开放阅读框的翻译起始密码子ATG与开放阅读框AFE_2974的翻译起始密码子ATG之间形成重叠,使得它们在转录顺序上产生竞争,从而导致转录量的区别。其实,这种转录量的区别主要是由转录调节控制的。在细胞生长和发育过程中,基因的表达可按一定时间顺序发生,而且随着细胞内外环境条件的改变而变化,形成时序调控和适应调控。原核生物的转录和翻译几乎同时进行,转录水平的调控就显得更为重要。Quatrini R等^[6]和Acosta M等^[9]在分析硫氧化相关基因表达时,都曾以 $doxDA-1$ 和 $p21$ 作为参照对象,而不以 $doxDA-2$ 操纵元中的 $doxDA-2$ 为参照对象,这可能是由于 $doxDA-2$ 操纵元中的基因表达水平太低的缘故,这与我们前面所述的 $doxDA-2$ 操纵元中各个基因的整体转录水平低的情况相一致。这种现象也可能和 $doxDA-1$ 操纵元分别所拥有的启动子序列有关,原核生物的转录过程需要有 σ 因子引导RNA聚合酶正确识别和稳定结合到DNA启动子上,启动子序列的区别导致 σ 因子所引导RNA聚合酶正确识别和稳定结合到DNA启动子上形成差异,造成转录水平上的差异。 $doxDA-1$ 操纵元中 cdt 开放阅读框上游的核苷酸序列中具有 σ 因子特异性识别的-35序列以及-10序列,但是 $doxDA-2$ 操纵元可能的启动子

序列中却没有-35序列和-10序列特征的核苷酸片段。为什么双拷贝的 $doxDA$ 基因,双拷贝的 sbp 基因分别呈现不同的转录量,双拷贝基因各自编码的产物功能是否相同等问题,还有待进一步的研究。这些问题的解决,以及硫氧化系统中一些关键酶的分离和基因的鉴定,各种含硫化合物在酶系统作用下的酶催化机制的阐述都将为嗜酸硫氧化细菌硫氧化系统的完善提供有利帮助。

参考文献

- [1] Rawlings DE. 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. (<http://www.microbialcell-factories.com/content/4/1/13>).
- [2] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, et al. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 63(3): 239–248.
- [3] Sand W, Gehrke T, Jozsa PG, et al. (Bio) chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 2001, 59(2-3): 159–175.
- [4] 张成桂, 夏金兰, 邱冠周. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌亚铁氧化系统研究进展. 中国有色金属学报, 2006, 16(7): 1239–1249.
- [5] Ramirez P, Toledo H, Guiliani N, et al. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1837–1845.
- [6] 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(1-4): 263–272.
- [7] Müller FH, Bandejas TM, Urich T, et al. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(4): 1147–1160.
- [8] Valenzuela L, Beard S, Guiliani N, et al. Differential expression proteomics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* growth in different oxidizable substrates: study of the sulfate/thiosulfate/molybdate binding proteins. Proceedings of the 16th international biohydrometallurgy symposium. Editors: STL Harrison, DE Rawlings and J Petersen, ISBN: 1-920051-17-1. 2005, pp. 773–780.
- [9] Acosta M, Beard S, Ponce J, et al. Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2005, 9(1): 13–29.