

喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 的 ROS 防护机制

尤晓颜¹ 李兆周¹ 郑华军² 姜成英^{3*}

(1. 河南科技大学 食品与生物工程学院 河南 洛阳 471023)

(2. 上海人类基因组研究中心 上海 201203)

(3. 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101)

摘要:【目的】从基因组水平探讨生物冶金微生物——喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)的活性氧类物质(Reactive oxygen species, ROS)防护机制。【方法】采用罗氏 454 GS FLX 测序平台对喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 进行全基因组测序,利用 NCBI 非冗余蛋白数据库、Uniport 蛋白数据库对全基因组序列进行功能注释,并采用基因组百科全书数据库(KEGG)进行基因组代谢途径重构,通过比较基因组学方法分析 SM-1 基因组中参与 ROS 防护相关的基因及可能的分子机制。【结果】SM-1 细胞内的酶促抗氧化系统可用于清除细胞内产生的 ROS 物质,而非酶促抗氧化系统可用于维持细胞内的还原性内环境;细胞内的 DNA 损伤修复系统可用于修复 DNA 的氧化损伤从而保持个体遗传物质的稳定性。此外,SM-1 基因组中大量的转座元件可能会增加基因组的可塑性以适应极端冶金环境。【结论】SM-1 基因组序列的获得为从整体水平揭示喜温嗜酸硫杆菌适应生物冶金环境 ROS 氧化损伤的防护机制提供了帮助,对于 SM-1 的 ROS 防护机制的认知也为进一步通过遗传改造、提升其在高浓度重金属离子冶金环境中的抗性、提高冶金效率提供了理论指导。

关键词: 喜温嗜酸硫杆菌, 活性氧类物质, 基因组, 防护机制

Defense mechanisms of *Acidithiobacillus caldus* SM-1 responding to reactive oxygen species

YOU Xiao-Yan¹ LI Zhao-Zhou¹ ZHENG Hua-Jun² JIANG Cheng-Ying^{3*}

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

(2. Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai 201203, China)

(3. State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] To discover the defense mechanisms of *Acidithiobacillus caldus* SM-1 responding to reactive oxygen species at the whole genome level. [Methods] The genomic DNA of *At. caldus* SM-1 was sequenced by the Roche 454 Genome Sequencer FLX instrument. Gene function was annotated by homology searching in the NCBI NR (non-redundant) and UniProt protein database. The KEGG database was used to reconstruct the metabolism pathways in the cell. Genes

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31200035, 31171234); 河南科技大学博士启动基金项目(No. 090061608)

*通讯作者: Tel: 86-10-64807581; 信箱: jiangcy@mail.im.ac.cn

收稿日期: 2013-08-14; 接受日期: 2013-09-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-09-29

related to ROS defense mechanisms were identified through the comparative genomic analysis. **[Results]** Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems were both identified in the SM-1 genome. The former was used to eliminate the ROS and the latter was utilized to provide a reducing intracellular environment through maintaining the redox homeostasis in the cell. The robust DNA repair system was used to deal with DNA oxidative damage. In addition, whether the large number of transposable elements in the SM-1 genome might enhance the genome plasticity for adaptation to extreme bioleaching environments is still need further interpretation. **[Conclusion]** Genome sequence of SM-1 will help us to discover the ROS detoxification mechanisms of SM-1, and this will give us insights to construct the engineered strains with better bioleaching performance.

Keywords: *Acidithiobacillus caldus*, ROS, Genome, Defense mechanisms

生物冶金反应器通常含有高浓度的可溶性重金属, 根据统计, 在搅拌式反应器中重金属的浓度可达 19 g/L Cu、23 g/L Ni、65 g/L Zn、3 g/L Co、14 g/L As 以及 40 g/L Fe^[1]。研究表明, 长期暴露于高浓度过渡价态重金属离子(Fe²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Cd²⁺等)的环境中将会在冶金微生物细胞内引发芬顿反应, 从而导致细胞内活性氧类物质(ROS, H₂O₂、OH⁻和 O₂⁻)的累积^[2]。ROS 在细胞内的存在时间很短, 但是其氧化活性很强, 它们可引起自由基链式反应, 对细胞内的生物活性大分子(如脂膜、核酸和蛋白质等)造成氧化损伤, 如果 ROS 在细胞内大量累积可最终导致细胞死亡^[3]。最近一些研究指出, 在生物冶金反应器中会产生由矿石介导的细胞外 ROS, 其浓度随着矿石表面积以及 Fe²⁺浓度的增加而升高^[4-5], 表明冶金微生物在冶金环境中还会受到细胞外 ROS 的影响。因此, 冶金微生物必须采取相应的防御机制及时清除细胞内外产生的 ROS 以避免 ROS 的氧化损伤, 从而保持其冶金性能。

喜温嗜酸硫杆菌是一种重要的硫氧化冶金微生物, 也是生物冶金反应器中的优势菌种^[6-8]。它能够利用元素硫、硫代硫酸钠、硫化钠、连四硫酸钾等还原型无机硫化物为能源, 通过固定空气中的 CO₂ 作为碳源进行生长。当它和铁氧化冶金微生物共同浸矿时, 可以有效地促进金属离子的溶出, 提高冶金效率^[9-10]。喜温嗜酸硫杆菌在冶金工业中主要用于黄金和铜的生产, 在黄金生产中它可以氧化分解砷黄铁矿, 使矿物中包裹着的金粒暴

露, 提高氰化工艺中金的回收率。关于喜温嗜酸硫杆菌的砷抗性报道较早, 相应的对其抗性机制研究也较为透彻^[11-12]。随后, 研究人员对喜温嗜酸硫杆菌对于其它重金属的抗性也进行了测试, 结果表明喜温嗜酸硫杆菌对 Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Cd²⁺等均具有较强的抗性^[1,13]。作为生物冶金反应器中重要的硫氧化微生物, 喜温嗜酸硫杆菌是如何避免 ROS 的氧化损伤, 其相应的防御机制是什么, 目前还缺乏相关的研究。本文通过罗氏 454 GS FLX 测序平台对喜温嗜酸硫杆菌菌株 SM-1 进行全基因组测序, 并进一步探讨了 SM-1 的 ROS 防御系统可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 菌株

喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*) SM-1 菌株由中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室刘双江研究员课题组分离自含砷金精矿预氧化冶金反应器, 菌株采用改良 9K 培养基(加灭菌硫粉)进行连续传代培养。

1.2 培养基(1 L)

SM-1 菌株采用改良 9K 培养基(不加 FeSO₄)培养^[14], 加入微量元素溶液 1.0 mL (2×), 用硫酸调整 pH 至 2.5。接种前加入 10 g 的灭菌硫粉(采用常压间歇灭菌, 1 h/d, 连续 3 d), 45 °C 培养 5-7 d。

1.3 基因组测序与组装

基因组 DNA 提取后采用罗氏 454 GS FLX 测序平台完成全基因组测序, 基因组测序覆盖率为

38×, 利用 Newbler 软件对测序读长进行初始组装, 共生成 276 个 Contigs。通过 Paired-End、构建基因组文库(6–8 kb, Fosmid)、多引物 PCR 等策略, 以及使用序列拼接软件包 Phrap/Phred/Consed (www.phrap.org) 完成基因组补洞和组装, 获得 SM-1 完整基因组序列图谱。

1.4 基因注释与基因组学分析

采用 Glimmer3.01 和 FgeneSB (<http://linux1.softberry.com>) 程序进行开放阅读框(Open reading frames, ORFs)预测, 最小 ORF 设定为 60 个核苷酸^[15]。将预测得到的所有蛋白序列与 NCBI 非冗余蛋白数据库以及 Uniport 蛋白数据库(<http://www.uniprot.org>) 分别进行 BLASTp 比对(E 值设为 1×10^{-3}), 对全基因组序列进行功能注释; 采用基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)进行代谢途径重构; 膜蛋白预测采用 ConPred II (<http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/>)、Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 程序, 转运蛋白通过与转运蛋白分类数据库(TCDB)比对(BLASTp, E 值设为 1×10^{-5}) 确定; 转座酶分类根据注释结果和 IS Finder 数据库(<http://www-is.biotoul.fr/is.html>) 比对结果确定; 采用 tRNAScan-SE 程序确定基因组中的 tRNA 编码基因。比较基因组学分析所采用的参考序列为 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 (GenBank 登录号 NC_011761.1), *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 (GenBank 登录号: NC_011206.1), *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 基因组草图序列(GenBank 登录号: ACVD00000000.1)。

2 结果与讨论

2.1 喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 基因组的基本特征

喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 含有一条全长为 2 932 225 bp 的环状染色体, GC 含量 61% (图 1)。此外, 基因组还含有 4 个质粒(pLATc1、pLATc2、pLATc3 和 pLATcm), 大小分别为 9 778、14 110、

29 704 和 251 782 bp。染色体共编码 2 880 个 ORF, 平均长度为 1 017 bp, 其中有 1 938 个预测蛋白具有明确的功能注释结果, 744 个预测蛋白与其它微生物中未知功能的保守蛋白同源, 剩余的 198 个预测蛋白则与公共数据库中的蛋白无任何匹配, 属于新发现的蛋白。在功能明确的蛋白中, DNA 复制、重组及修复类别的蛋白含量最高(9.7%, 310 个), 其次为细胞包膜及外膜合成蛋白(5.7%, 181 个)、能量产生及转化蛋白(4.9%, 157 个)。基因组编码蛋白中膜蛋白占总蛋白数目的 14%, 分泌蛋白占总蛋白数目的 21%, 胞质蛋白含量为 65%。SM-1 基因组拥有两套核糖体 RNA 操纵元件, 47 个 tRNA 基因, 负责编码生长所需的 20 种必需氨基酸。所

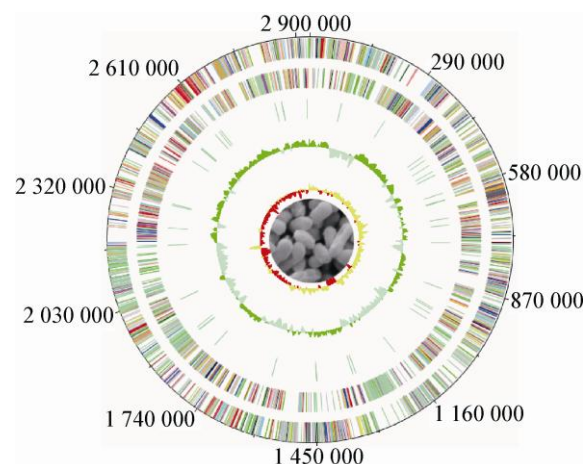


图 1 喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 染色体圈图^[16]

Figure 1 Graphic representation of the *At. caldus* SM-1 chromosome^[16]

注: 最外圈数字表示染色体的大小(bp), 从外向内: 第一圈和第二圈分别代表染色体正负链上的蛋白编码基因(Circle 1: 正链; Circle 2: 负链), 不同颜色表示不同的功能分类; 染色体圈图第三圈代表 tRNA genes (浅绿色); 第四圈代表(G+C)百分含量, 高于平均 GC 含量(绿色), 低于或等于(浅蓝色); 第五圈代表 GC skew $(G-C)/(G+C)$: 数值>0 (黄色), 数值<0 (红色)。Note: For the SM-1 chromosome, the first two outer circles represent the positions of genes in the chromosome (Circle 1: plus strand, Circle 2: minus strand), colored by functional categories according to COG classification; Circle 3 represents tRNA genes (pale green ticks); Circle 4 represents (G+C) percentage content: above median GC content (green), less than or equal to the median (pale blue); Circle 5 represents GC skew $(G-C)/(G+C)$ calculated using a 1 kb window: values>0 (yellow), values<0 (red).

有质粒的 GC 含量略低于基因组, 分别为: 60%、58%、59% 和 57%。基因组的收录序号为: CP002573, 质粒的收录序号分别为: CP002575、CP002576、CP002577 和 CP002574。

2.2 抗氧化系统

细胞内存在两类抗氧化系统用于消除细胞内产生的 ROS, 一类是酶促抗氧化系统, 包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等; 另一类是非酶促抗氧化系统, 如: 维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽等^[3,17]。通过基因组学分析, 发现喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 的基因组中存在着酶促抗氧化系统的相关基因, 包括一个锰超氧化物歧化酶 (SOD, *Atc_1008*)、一个谷胱甘肽过氧化物酶(*Atc_2782*)和一个血红素过氧化物酶(*Atc_1292*)编码基因。锰超氧化物歧化酶可以催化超氧化物发生歧化反应生成过氧化氢和分子氧, 过氧化氢进一步被谷胱甘肽过氧化物酶催化转变成为水分子, 或是被血红素过氧化物酶催化形成分子氧和水分子从而消除产生的 ROS。SM-1 的基因组中还编码有可能参与烷基氢过氧化物和脂质氢过氧化物还原的基因, 包括编码与烷基过氧化物酶家族 *ahpC* (*atc_0921* 和 *atc_2402*)和 *ahpD* (*atc_1807* 和 *atc_1328*)相类似的 4 个基因; 以及 2 个编码巯基过氧化物酶(*atc_1426* 和 *atc_1654*)的基因, 该酶可以利用细胞内的硫氧还蛋白提供的还原当量还原烷基氢过氧化物。在 SM-1 基因组中没有发现过氧化氢酶编码基因的存在。

与氧化亚铁硫杆菌 ATCC 23270 类似, 喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 也含有非酶促抗氧化系统, 该系统通过保持细胞内硫醇/二硫化物的平衡从而维持细胞内的还原性内环境, 避免蛋白质和脂类受到氧化损伤。构成该系统的基因包括 5 个硫氧还蛋白编码基因(*atc_0576*、*0811*、*0878*、*1083* 和 *1744*), 6 个谷氧还蛋白基因(*atc_0355*、*0557*、*1745*、*1896*、*2488* 和 *pLATcm_089*), 一个硫氧还蛋白还原酶编码基因(*atc_2479*)和一个谷胱甘肽还原酶编码基因(*atc_2489*)。此外, SM-1 基因组中还含有谷胱甘肽

合成所需的基因, 包括一个谷氨酸-半胱氨酸连接酶编码基因(*gshA*, *atc_0270*)和一个谷胱甘肽合成酶基因(*gshB*, *atc_0271*)。硫氧还蛋白和谷氧还蛋白通过半胱氨酸硫醇-二硫化物的相互作用还原细胞内其它蛋白, 被称之为细胞内的抗氧化剂。硫氧还蛋白充当电子供体将电子传递给过氧化物酶和核酸还原酶, 自身变为氧化态; 通过硫氧还蛋白还原酶将氧化态的硫氧还蛋白还原, 该反应需要 NADPH 的参与^[18]。谷氧还蛋白的功能与硫氧还蛋白类似, 但是其由谷胱甘肽所还原, 而非特异性的酶类。氧化态的谷胱甘肽由谷胱甘肽还原酶重新转变为还原态的谷胱甘肽, 以上组分构成了谷胱甘肽抗氧化系统^[19]。

2.3 DNA 损伤修复系统

冶金微生物处在活性氧和其它氧化剂不断地攻击之下, 经常会造成遗传物质 DNA 的氧化损伤^[20]。DNA 的氧化损伤包括碱基或核糖的修饰、串联损伤(Tandem lesions)、无碱基位点(AP)、DNA 单链或双链断裂以及形成 DNA-蛋白质的交联^[21-22]。如果这些损伤超出了 DNA 损伤修复系统的承受能力, 那么就会引起突变或是细胞死亡, 因此, 冶金微生物需要有一个高效的 DNA 修复系统以维持遗传物质的稳定。在 SM-1 基因组所编码蛋白的 COG (Cluster of orthologous groups of proteins) 功能分类中, DNA 复制、重组及修复类别的蛋白含量最高(9.7%), 表明 SM-1 可能拥有一个强有力的 DNA 损伤修复系统。基因组学分析发现 SM-1 存在以下 DNA 损伤修复机制。

2.3.1 碱基切除修复(Base excision repair, BER):

碱基切除修复由特异的 DNA 糖基化酶引发, 它们可以识别 DNA 分子中不正常的碱基并将其水解下来。喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 的基因组中有 6 个基因负责编码 4 种 DNA 糖基化酶, 它们用于识别和去除嘌呤和嘧啶引起的损伤。其中两个基因(*atc_0300* 和 *atc_0468*)编码 Formamidopyrimidine-DNA 糖基化酶, 一个基因(*atc_1154*)编码家族 4 的尿嘧啶-DNA 腺嘌呤糖基化酶, 还有一个基因(*atc_0403*)编码腺

嘌呤/鸟嘌呤特异的腺嘌呤糖基化酶, 剩下的两个基因(*atc_1519*和*atc_1926*)编码DNA-3-甲基腺嘌呤糖基化酶II。糖基化酶水解掉错误碱基后产生的AP位点将由AP核酸内切酶(*Atc_2850*和*Atc_2854*)进行切除, 产生的单链断裂将由短片段修复机制(Short-patch, 单个碱基)或是长片段修复机制(Long-patch, 2-10个碱基)进行修复^[23]。

2.3.2 核苷酸切除修复(Nucleotide excision repair, NER): 核苷酸切除修复可以分为两种途径: 全局性染色体核苷酸切除修复和转录偶联的核苷酸切除修复(Global genomic NER和Transcription coupled NER), 两者的区别在于识别DNA损伤位点的方式不同^[24-26]。喜温嗜酸硫杆菌基因组中有7个编码基因参与核苷酸切除修复机制中, 其中基因*atc_2468*编码了一个转录修复偶联因子MFD, 它参与转录偶联NER途径的DNA损伤识别。其余6个基因构成了一个完整的*uvrABC*核苷酸切除修复系统, 负责全局性染色体核苷酸切除修复。基因(*atc_0634*, *atc_1822*和*atc_1830*)负责编码UvrABC核酸外切酶复合体的A、B、C 3个亚基, 该酶复合体负责识别和切除损伤的DNA。UvrD (*Atc_0056*)具有DNA螺旋酶的功能, 负责清除受损伤的DNA片段。DNA聚合酶I (*Atc_2712*)和DNA连接酶(*Atc_1697*, NAD⁺-dependent)将修复DNA链的断裂。SM-1基因组中还含有腺嘌呤特异的甲基转移酶(*Atc_1248*, *Atc_1280*)和半胱氨酸特异的甲基转移酶(*Atc_2651*)编码基因, 推测它们可能与碱基或核苷酸修复有关。

2.3.3 错配修复: 喜温嗜酸硫杆菌SM-1的错配修复系统由17个基因组成。其中4个编码DNA错配修复蛋白MutS (*Atc_1502*)、MutS2 (*Atc_1767*和*Atc_2263*)和MutL (*Atc_1310*)^[27]。而MutH编码基因却没有在SM-1基因组中发现, MutH是一个活性非常低的内切核酸酶, 当其结合到MutL上后活性被激活, 它负责在非甲基化DNA双链或半甲基化的DNA双链中未甲基化的单链上引入缺口(Nicks)^[28-29]。*mutH*在氧化亚铁硫杆菌和喜温嗜酸

硫杆菌ATCC 51756中同样缺失, 表明嗜酸硫杆菌属微生物可能有其它的机制替代它的功能。受到损伤的DNA片段将由核酸外切酶X (*Atc_1504*)按照3'→5'的方向, 或是在核酸外切酶VII (*Atc_0788*和*Atc_2158*)和RecJ (*Atc_0313*和 *pLATcm_126*)的共同作用下按照5'→3'的方向进行切除。DNA螺旋酶II (*Atc_0056*)和单链结合蛋白(*Atc_0635/1152/2099*和*pLATcm_141*)在切除过程中帮助释放DNA链。最后, 由DNA聚合酶III (*Atc_0002*, *0419*, *0723*, *0858*, *1022*, *1302*, *2455*)和DNA连接酶填充和连接缺口。

2.3.4 同源重组: DNA链的断裂损伤(单链断裂, SSB; 双链断裂, DSB)对细胞往往会产生致死作用, 细胞常常通过同源重组的方式来修复氧化损伤造成的DNA链断裂。通过基因组学分析发现喜温嗜酸硫杆菌SM-1可通过RecFOR和RecBCD重组途径修复DNA链的断裂损伤。RecFOR途径主要用于单链断裂损伤的修复, RecBCD途径主要用于双链断裂修复。在RecFOR途径中, 解旋酶RecQ (*Atc_0733*)首先展开受损的DNA链, 然后核酸酶 RecJ (*Atc_0313*, *pLATcm_126*)降解掉DNA单链的5'末端, 留下完整的3'末端。RecA (*Atc_1685*)蛋白结合到单链上稳定单链, 或是借助于重组蛋白RecF (*Atc_0003*)、RecO (*Atc_2297*)和RecR (*Atc_1304*)的帮助稳定单链DNA。接下来RecA核蛋白纤维寻找到同源DNA并进行同源交换, 从而将受损伤的DNA替换成与原来相一致的或是近乎一致的同源DNA^[30]。

RecBCD重组途径通常被用于双链DNA断裂损伤修复^[31]。在这条途径中, 基因 *recB* (*atc_0256*)、*recC* (*atc_0257*)和 *recD* (*atc_0255*)的编码产物组成了多功能的复合体蛋白 RecBCD (外切核酸酶 V), 它可以松弛DNA双链并在 *chi* 位点切割DNA链。然后, RecA (*Atc_1685*)结合到单链DNA上替换掉同源区域的双链DNA(dsDNA)产生异源的双链DNA链。Holliday 联会DNA解旋酶 RuvAB (*Atc_2796*, *Atc_2797*)和 RuvC (*Atc_2795*)推动分支迁移并最终完成 Holliday 联会, 最后引发酶复合体

重启 DNA 的复制。

2.4 转座元件

与喜温嗜酸硫杆菌 ATCC 51756 相比, SM-1 基因组含有大量的转座元件(表 1)。SM-1 基因组中含有 144 个编码转座酶的基因, 根据 IS 家族分类可以将其中 144 个划分至 10 个 IS 家族。其中, ISL3 家族数目最多(49 个), 包括 37 个拷贝的 ISAc1 和 12 个拷贝的 ISAtfe, ISAc1 和 ISAtfe 最早在喜温嗜酸硫杆菌质粒 pTC-F14 (菌株 f) 和 pTcM1 (菌株 MNG) 中发现^[32-34]。通过与 ATCC 51756 基因组进行比较, 发现可能由于 ISAc1 和 ISAtfe 的转座导致了 SM-1 基因组中部分基因的失活、缺失和获得: ISAc1 (*atc_0494*, *0510*, *0681*, *0777*, *0995*, *1563* 和 *pLATcm_190*) 的插入造成 7 个基因断裂为两个部分; SOR 基因由于 ISAc1 (*atc_1436*) 的取代发生缺失; 两个编码与汞抗性和硝酸盐/亚硝酸盐还原相关的基因簇(*atc_1057-1059* 和 *atc_1057-1059*) 可能由于 ISAc1 (*atc_1032*, *atc_1074*, *atc_1112*) 和 ISAtfe (*atc_1138*) 的转座而获得。尽管转座的机制还需要

进一步阐释, 但是这些转座事件表明 ISAc1 和 ISAtfe 可能是 SM-1 基因组中活跃的转座元件。在质粒 pLATcm 上编码了一个完整的 Tn7 转座子 (*pLATcm_097-101*), 而在 ATCC 51756 则没有发现该转座子的存在。此外, SM-1 基因组还含有 38 个整合酶相关的 ORFs, 其中 10 个为噬菌体整合酶, 但在基因组中没有发现原噬菌体的存在。基因组中大量的转座元件可能会增加 SM-1 基因组的可塑性, 这种可塑性是否成为 SM-1 适应极端环境的一种策略, 还需要进一步的研究。

3 结论

喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 是分离自含砷金精矿预氧化冶金反应器中的一株硫氧化微生物, 通过荧光定量 PCR 分析, 显示它是该反应器中的优势菌种^[35]。本研究通过基因组学方法对喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 可能的 ROS 防护机制进行了分析, 结果表明 SM-1 可以借助于细胞内的酶抗氧化系统清除细胞内产生的 ROS 物质, 采用非酶抗氧化系统维持细胞内的还原性环境, 而 DNA 损伤修复系统则用于保持个体遗传物质的稳定性, SM-1 通过上述机制的联合作用以消除(或减轻) ROS 的氧化损伤以适应含有高浓度重金属离子的生物冶金环境。

与喜温嗜酸硫杆菌 ATCC 51756 相比, SM-1 基因组中含有大量的转座元件, 其中 ISL3 家族的插入序列 ISAc1 导致了 SM-1 基因组中部分基因的缺失和失活: 如 SOR 基因在初始分离的 SM-1 菌株中克隆得到^[35], 经过 3 年实验室的连续传代培养, 通过全基因组测序后与 51756 比较, 发现在 51756 基因组中 SOR 基因相对应的位置, SM-1 中由一个 ISAc1 (*atc_1436*) 所代替, 而通过实验手段 (PCR 和 RT-PCR) 也没有检测到 SOR 基因的存在。大量的转座元件可能会增加 SM-1 基因组的可塑性, 是否这种可塑性是 SM-1 适应冶金环境的一种策略, 还需要进一步的研究。对于 SM-1 的 ROS 防御系统分子机制的研究, 将为通过遗传改造进一步提高其对冶金环境的适应能力、提升冶金效率提

表 1 喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 与 ATCC 51756 基因组中的转座元件统计

Table 1 Transposable elements in *At. caldus* SM-1 and *At. caldus* ATCC 51756

转座酶家族 IS family	喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 <i>At. caldus</i> SM-1	喜温嗜酸硫杆菌 ATCC 51756 <i>At. caldus</i> ATCC 51756
ISL3	49	7
IS5	27	26
IS3	4	2
IS21	14	2
IS110	6	1
IS66	11	4
IS4	27	21
IS605	0	1
IS200/IS60	6	0
IS481	0	1
Tn7	1	0
Total	145	65

供理论指导,同时也为研究其它冶金微生物的 ROS 防护机制提供参考和借鉴。

致谢: 本文撰写与试验过程中得到中国科学院微生物研究所刘双江研究员课题组的悉心指导和帮助,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Watkin ELJ, Keeling SE, Perrot FA, et al. Metals tolerance in moderately thermophilic isolates from a spent copper sulfide heap, closely related to *Acidithiobacillus caldus*, *Acidimicrobium ferrooxidans* and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(3): 461-465.
- [2] Moriwaki H, Osborne M, Phillips D. Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction[J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22(1): 36-44.
- [3] Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide[J]. Annual Review of Biochemistry, 2008, 77: 755-776.
- [4] Jones GC, van Hille RP, Harrison ST. Reactive oxygen species generated in the presence of fine pyrite particles and its implication in thermophilic mineral bioleaching[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(6): 2735-2742.
- [5] Jones GC, Corin KC, van Hille RP, et al. The generation of toxic reactive oxygen species (ROS) from mechanically activated sulphide concentrates and its effect on thermophilic bioleaching[J]. Minerals Engineering, 2011, 24(11): 1198-1208.
- [6] Spolaore P, Joulain C, Gouin J, et al. Relationship between bioleaching performance, bacterial community structure and mineralogy in the bioleaching of a copper concentrate in stirred-tank reactors[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(2): 441-448.
- [7] Zeng W, Qiu G, Zhou H, et al. Community structure and dynamics of the free and attached microorganisms during moderately thermophilic bioleaching of chalcopyrite concentrate[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7079-7086.
- [8] Zhou HB, Zeng WM, Yang ZF, et al. Bioleaching of chalcopyrite concentrate by a moderately thermophilic culture in a stirred tank reactor[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 515-520.
- [9] Chen L, Ren Y, Lin J, et al. *Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant[J]. PLoS One, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0039470.
- [10] Mangold S, Valdes J, Holmes DS, et al. Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2011. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00017.
- [11] Tuffin IM, de Groot P, Deane SM, et al. An unusual Tn21-like transposon containing an ars operon is present in highly arsenic-resistant strains of the biomining bacterium *Acidithiobacillus caldus*[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 9): 3027-3039.
- [12] Kotze AA, Tuffin IM, Deane SM, et al. Cloning and characterization of the chromosomal arsenic resistance genes from *Acidithiobacillus caldus* and enhanced arsenic resistance on conjugal transfer of ars genes located on transposon TnAtcArs[J]. Microbiology, 2006, 152(Pt 12): 3551-3560.
- [13] 丁建南, 朱若林, 康健, 等. 喜温嗜酸硫杆菌 YN12菌株的鉴定及其镉抗性[J]. 中国有色金属学报, 2008, 18(2): 342-348.
- [14] Melvin PS, Donald GL. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of Bacteriology, 1959, 77(5): 642-647.
- [15] Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. Bioinformatics, 2007, 23(6): 673-679.
- [16] You XY, Guo X, Zheng HJ, et al. Unraveling the *Acidithiobacillus caldus* complete genome and its central metabolisms for carbon assimilation[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2011, 38(6): 243-252.
- [17] Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species[J]. International Microbiol, 2000, 3(1): 3-8.
- [18] Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase[J]. Biochemical Journal, 2000, 346(Pt 1): 1-8.
- [19] Fernandes AP, Holmgren A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2004, 6(1): 63-74.
- [20] Cárdenas JP, Moya F, Covarrubias P, et al. Comparative genomics of the oxidative stress response in bioleaching microorganisms[J]. Hydrometallurgy, 2012, 127-128: 162-167.
- [21] Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis[J]. Mutation Research, 2011, 711(1/2): 193-201.
- [22] Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, et al. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis[J]. Mutation Research, 2010, 704(1/3): 152-159.
- [23] Liu Y, Prasad R, Beard WA, et al. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(18): 13532-13541.
- [24] Hanawalt PC, Crowley DJ, Ford JM, et al. Regulation of nucleotide excision repair in bacteria and mammalian cells[J]. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2000, 65: 183-191.
- [25] de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair[J]. Genes & Development, 1999, 13(7): 768-785.
- [26] Grossman L, Thiagalingam S. Nucleotide excision repair, a tracking mechanism in search of damage[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(23): 16871-16874.
- [27] Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2008, 129(7/8): 391-407.
- [28] Joseph N, Duppatla V, Rao DN. Prokaryotic DNA mismatch repair[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 81: 1-49.

- [29] Jun SH, Kim TG, Ban C. DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles[J]. FEBS Journal, 2006, 273(8): 1609-1619.
- [30] Rocha EP, Cornet E, Michel B. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems[J]. PLoS Genetics, 2005. DOI: 10.1371/journal.pgen.0010015.
- [31] Dillingham MS, Kowalczykowski SC. RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72(4): 642-671.
- [32] Rawlings DE. The evolution of pTF-FC2 and pTC-F14, two related plasmids of the IncQ-family[J]. Plasmid, 2005, 53(2): 137-147.
- [33] Gardner MN, Rawlings DE. Evolution of compatible replicons of the related IncQ-like plasmids, pTC-F14 and pTF-FC2[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 6): 1797-1808.
- [34] van Zyl LJ, Deane SM, Louw LA, et al. Presence of a family of plasmids (29 to 65 kilobases) with a 26-kilobase common region in different strains of the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus caldus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(14): 4300-4308.
- [35] Chen ZW, Liu YY, Wu JF, et al. Novel bacterial sulfur oxygenase reductases from bioreactors treating gold-bearing concentrates[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(3): 688-698.

~~~~~  
(上接 p.242)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

### 4 特别说明

#### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

#### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

#### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>