

深海热液区化能自养菌 *Caminibacter profundus* 氢酶及其对 H₂ 的响应特点

岳文娟^{1,2} 何培青² 刘同军¹ 黄晓航^{2*}

(1. 山东轻工业学院 食品与生物工程学院 山东省微生物工程重点实验室 山东 济南 250353)

(2. 国家海洋局第一海洋研究所 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室 山东 青岛 266061)

摘要: 化能自养菌中的氢酶在深海热液区生态系统的物质和能量转化中具有重要作用。以 *Caminibacter profundus* 为研究对象, 通过设计 PCR 引物, 克隆编码膜结合的类型 I NiFe-氢酶大亚基基因序列 *hynL* 并进行生物信息学分析; 研究 *hynL* 相对表达、甲基紫晶(MV)还原氢酶活性以及菌株生长对 H₂ 浓度变化的响应特点。结果表明, 从 *C. profundus* 克隆获得 864 bp 的 *hynL* 基因片段, 其编码的氨基端序列与 *Lebetimonas acidiphila* 的相似性为 99%, 与热液区化能自养的 *Epsilonproteobacteria* D 类群的类型 I NiFe 氢酶大亚基属同一分支。*hynL* 相对表达量和 MV 还原的氢酶活性分别于 12 h 和 24 h 达到最高, 此时菌体处于指数生长期; *hynL* 相对表达量和 MV 还原的氢酶活性和菌株生长的最适 H₂ 浓度均为 60%。提示 *C. profundus* 通过调控 *hynL* 的表达, 响应环境中 H₂ 浓度的变化, 以影响菌株能量代谢的催化过程和生长繁殖。

关键词: 深海热液, 化能自养菌, 氢酶

Hydrogenase of deep-sea hydrothermal chemoautotrophic *Caminibacter profundus* and its response to H₂

YUE Wen-Juan^{1,2} HE Pei-Qing² LIU Tong-Jun¹ HUANG Xiao-Hang^{2*}

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Microbial Engineering, School of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan, Shandong 250353, China)

(2. Key Laboratory of Marine Bioactive Substance, The First Institute of Oceanography (SOA), Qingdao, Shandong 266061, China)

Abstract: Hydrogenases of chemolithoautotrophic bacteria play important roles in material and energy transfer in deep-sea hydrothermal ecosystem. By designing PCR primers, a *hynL* gene encoding large subunit of membrane-bound group I NiFe hydrogenase from *Caminibacter profundus* was cloned and

基金项目: 中国大洋协会—深海热液区微生物的营养和生存策略研究(No. DYXM-115-02); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(No. 2011T04)

* 通讯作者: Tel: 86-532-88969292; ✉ xiaohanghuang@fio.org.cn

收稿日期: 2010-12-17; 接受日期: 2011-02-23

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

bioinformatically analyzed. The relative expressions of *hynL*, methyl viologen (MV)-reducing hydrogenase activities and bacterial growth in response to different H₂ concentration were also studied. The results showed that a 864 bp *hynL* gene segment was obtained, predicted amino acid sequence had a 99% similarity with that of *Lebetimonas acidiphila*, and it belongs to the same phylogenetic branch with group I NiFe hydrogenase large subunit of hydrothermal chemolithoautotrophic Epsilonproteobacteria D group. Both *hynL* relative expression and MV-reducing hydrogenase activity reached the highest level at 12 h and 24 h respectively, when the strain was in the exponential growth phase. Sixty per cent of H₂ concentration was optimal for *hynL* expression, MV-reducing hydrogenase activity and bacterial growth. All these results suggested that *C. profundus* regulates *hynL* expression in response to H₂ changes in hydrothermal environment, thereby affecting the catalytic energy process, as well as the growth and propagation.

Keywords: Hydrothermal vent, Chemolithoautotrophic, Hydrogenase

1977 年, 太平洋底首次发现深海热液喷口及其周边生物活动, 揭示原始生产力完全依赖于化能自养微生物的海底热液生态系统的存在。以溶于热液流中的 H₂ 为能源的完全自养氢细菌广泛分布于深海热液区, 目前已报道的热液区氢细菌包括: *Caminibacter profundus*、*Caminibacter mediatlanticus*、*Lebetimonas acidiphila*、*Hydrogenimonas thermophila*、*Nitratiruptor tergarcus*、*Thioreductor micantisoli* 和 *Nitratifractor salsuginis* 等。它们通过氢酶催化、氧化 H₂ 获得能量, 将 CO₂ 转化为简单的有机质供自身和其他生物的生存需要, 因此在深海热液生态系统碳循环中承担着举足轻重的角色。氢酶是一类氧化还原蛋白, 多数含有金属原子, 能可逆的催化分子氢的形成以及氢的氧化: $H_2 \leftrightarrow 2H + 2e^-$ 。氢酶家族的成员包括 NiFe-氢酶、Fe-氢酶和不含金属的氢酶^[1]。NiFe-氢酶的研究较多, 至少分为 3 种类型, 其中类型 I 通常锚定在膜上, 两个催化亚基 HynS 和 HynL, 将催化 H₂ 产生的电子传递到各种醌和细胞色素而形成离子泵, 进而产生 ATP; 而类型 III 氢酶位于细胞质内, 与 CO₂ 固定相关, 可以产生 NADH 还原力, 驱动还原性三羧酸循环(rTCA 循环)。

Ken Takai 等^[2]系统研究了深海热液区多种氢细菌的可溶性氢酶活性、类型 I NiFe-氢酶的大亚基基因的多样性及其与 16S rDNA 的进化关系, Hiroshi 等^[3]进一步分离纯化了其中的一株氢细菌 *H. thermophila* 的类型 I NiFe-氢酶, 并研究了其生化特性及基因结构特征。我们对热液区 *C. mediatlanticus*

全基因组序列的分析发现该菌株至少含有 Ni 依赖的氢酶和类型 I、II、III 和 IV NiFe-氢酶, 说明热液区同一菌种的氢酶具有多种结构特征, 这可能与环境的适应性密切相关。McCollom TM 等^[4]采用热力学模式计算了深海热液区化能自养菌初级生产所需的潜在代谢能量, 认为在可溶性底物中, H₂ 的氧化提供了最多的代谢能量, 该结果说明, H₂ 是制约热液区初级生产的重要因素。目前, 关于深海热液区氢细菌的氢酶如何响应环境中 H₂ 变化的研究在国内外仍然是空白。

Caminibacter profundus strain DSMZ 15016 为大西洋中脊热液区分离得到的一株中度嗜热氢细菌, 属于 ϵ -变形细菌, Miroshnichenko ML 等^[5]研究了其生理生化特性。本文进一步通过分子生物学手段扩增了 *C. profundus* 的类型 I NiFe 氢酶基因(*hynL*), 采用荧光实时定量方法测定了底物 H₂ 浓度对 *hynL* 基因表达的影响, 阐明 *hynL* 表达与 MV 还原氢酶酶活和菌株生长的关系。本研究将为揭示海底热液区化能自养菌的物质能量代谢与环境因子的相互关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

菌株 *Caminibacter profundus* strain DSMZ 15016, 来源于德国微生物菌种保藏中心 DSMZ。

1.2 培养基

培养基的组成和配置方法由德国微生物菌种保

藏中心 DSMZ 提供^[6]。DSMZ829 培养基(g/L): 海盐 (Sigma Chemical Co.) 30, NH_4Cl 1, NH_2PO_4 0.35, 2-N-吗啉乙烷磺酸(MES) 1.95, 刃天青 0.000 5。微量元素 SL-10 1 mL, 维生素 1 mL, NaHCO_3 1 g, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 20 mg, 促生长因子 1 mL。

1.3 培养条件

100 mL Hungate-type 型厌氧瓶中加入 0.25 g 升华硫, 间歇灭菌后加入 25 mL Medium 829 培养液, 厌氧瓶气体空间充以 $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{N}_2$ (V/V/V, 200 kPa) 的混合气体, 比例分别为 80:20:0、60:20:20、40:20:40、20:20:60 和 0:20:80, H_2 浓度分别为 80%、60%、40%、20%和 0%; 菌株接种量为 10% (V/V), 培养基终 pH 6.0, 培养温度为 45 °C, 以 40% H_2 浓度为 基础培养条件。所有操作过程均在上海新苗医疗器械仪器制造有限公司 YQX-II 型厌氧培养箱中进行。菌株生物量的测定采用光学显微镜(10×100)直接计数, 辅以 DAPI 染色法验证。

1.4 氢酶基因的克隆

1.4.1 引物设计: 通过比对 *C. mediatlanticus* TB-2 (AY691430), *Caminibacter hydrogeniphilus* AM1116 (AJ309655), *Nautilia lithotrophica* 525 (AJ404370), *Nautilia* sp. Am-H (AF357197), *L. acidiphila* Pd55 (AB167820) 5 种深海热液区化能自养菌氢酶类型 I 的大亚基(*hynL*)基因序列, 设计 *hynL* 1 引物 (5'-TATTTTAGTAGTGGCAGG-3', 5'-CACCTGATGTTCTCTGTATG-3')。

1.4.2 *hynL* 基因片段的 PCR 扩增: 以菌株 *C. profundus* 的基因组 DNA 为模板, 采用设计的引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 96 °C 1 min; 96 °C 25 s, 50 °C 45 s, 72 °C 2 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化、连接 pBS-T 载体后, 转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 由上海桑尼完成测序。

1.4.3 序列分析: 测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行比对分析, 通过 DNA Star 软件的 Clustal W 方法, 对扩增序列编码的氨基酸和 GenBank 中近源种的序列进行比对, 并使用软件 MEGA 4.1, 采用相邻连接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。

1.5 *hynL* 的基因表达

1.5.1 总 RNA 的抽提及纯化: 收集菌液 20 mL, 采

用 Trizol 法(Invitrogen, USA)提取细菌总 RNA。使用 DNase I (TaKaRa)去除总 RNA 中含有的微量基因组 DNA。通过电泳和 OD_{260}/OD_{280} 比色检测 RNA 纯度。

1.5.2 反转录: 取 0.25–0.50 μg RNA, 按照 TaKaRa (大连)公司反转录试剂盒(PrimerScript TMRT Reagent Kit)说明书进行反转录。反转录引物: Random 6 mers 25 pmol 和 Oligo dT Primer 50 pmol, 反转录条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。得到的 cDNA 溶液可直接用于荧光实时定量 PCR 定量实验。

1.5.3 荧光实时定量标准曲线的绘制: 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 得到 16S rRNA 引物 (5'-AGAACCTTACCTGGGCTTGA-3', 5'-TCTTTGTCTCGCCATTGTA-3')和 *hynL* 2 引物(5'-AGAACC TCCTCTAAAT-3', 5'-TATCCACCCAGTCAAGC-3')。实验采用 MJ Research 公司的 PTC-100 型荧光实时定量 PCR 仪。将反转录的 cDNA 产物样品按 10 倍稀释 6 个梯度进行荧光定量反应, 以模板不同起始拷贝数的对数为横坐标, 以 PCR 反应过程中出现荧光信号的初始循环数 CT 为纵坐标绘制 16S rRNA 和 *hynL* 的标准曲线。荧光实时定量 PCR 反应体系依据 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM II 说明书, 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 40 个循环; 对应的溶解曲线反应条件为: 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 95 °C 15 s。所有的 PCR 反应均做 3 个重复, 以验证每个样品扩增的重复性。

1.5.4 荧光实时定量 PCR 检测 H_2 对 *hynL* 基因表达的影响: 取不同 H_2 浓度条件下培养的菌液各 20 mL, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体于 -80 °C 保存。提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 用于分析 *hynL* 相对表达。以 16S rRNA 作为内参, 不添加逆转录酶的 RNA 为模板作为荧光实时定量 PCR 反应的对照^[7]。CT 法($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)^[8]分析 *hynL* 的相对变化。以基础培养条件下培养 12 h 菌体的 *hynL* 表达量作为参照, 即 CT=1。3 次独立实验的结果取平均值 \pm 标准误。

1.6 甲基紫晶(MV)还原的氢酶酶活测定

参照 Ken Takai 等^[2]的方法进行。于厌氧箱内将菌液振荡混匀, 取 4.0 mL 菌体悬浮液于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 加入 200 μL 洗

脱液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8; 500 mmol/L NaCl; 1 mmol/L DTT), 于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 加入 1.0 mL 裂解液(100 mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 1 mmol/L DTT)。混匀后取出 800 μ L, 加入 5 mmol/L 甲基紫晶(MV) 200 μ L 后于 45 °C 的 H₂ 中反应 20 min, 立即用分光光度计测定 OD₅₇₈, 在 N₂ 中的反应作为对照。剩余 200 μ L 采用 Folin-酚法测定蛋白含量, 以酪蛋白为标准。由于每还原 2 个 MV 需要转化一个含氧酸, MV 还原的氢酶活力以每克蛋白每分钟生成的还原态 MV 含量表示, 还原态 MV 含量 (MV)₅₇₈=(OD₅₇₈-OD₅₇₈CK)/(9.8 \times 10³) L/(mol \cdot cm)^[2,9], U=nmol (MV)₅₇₈/(min \cdot g cell protein)。

2 结果

2.1 类型 I NiFe-氢酶大亚基基因 *hynL* 的系统进化分析与蛋白比对

采用设计的引物, 克隆 *C. profundus* 基因组 DNA, 获得 864 bp 基因片段(图 1), NCBI 比对结果为类型 I NiFe-氢酶大亚基基因 *hynL*。NCBI BLAST 分析其编码的氨基酸与 *Lebetimonas acidiphila*

(BAE44403)的序列相似性最高, 为 99%; 与 16S rRNA 进化关系最近的 *C. mediatlanticus* 只有 86% 的相似性。

将翻译的氨基酸序列与 12 株化能自养菌类型 I NiFe-氢酶大亚基的 *hynL* 基因序列进行比对并生成系统进化树(图 2), 可以看出, *C. profundus* 的 *HynL* 氨基酸序列(ADF59499)与 *Lebetimonas acidiphila* 的 *HynL* (BAE44403)的进化距离最近, 而与 16S rRNA 种属关系最近的 *C. mediatlanticus* 的 *HynL* 氨基酸(ZP01871474)进化距离较远。而

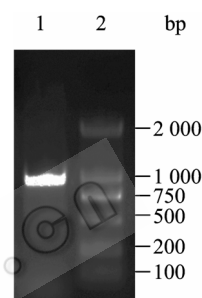


图 1 *Caminibacter profundus* 菌株 *hynL* 基因片段 PCR 扩增

Fig. 1 The PCR product of *hynL* of *Caminibacter profundus*

Note: 1: PCR product of *hynL*; 2: 2 000 bp DNA ladder.

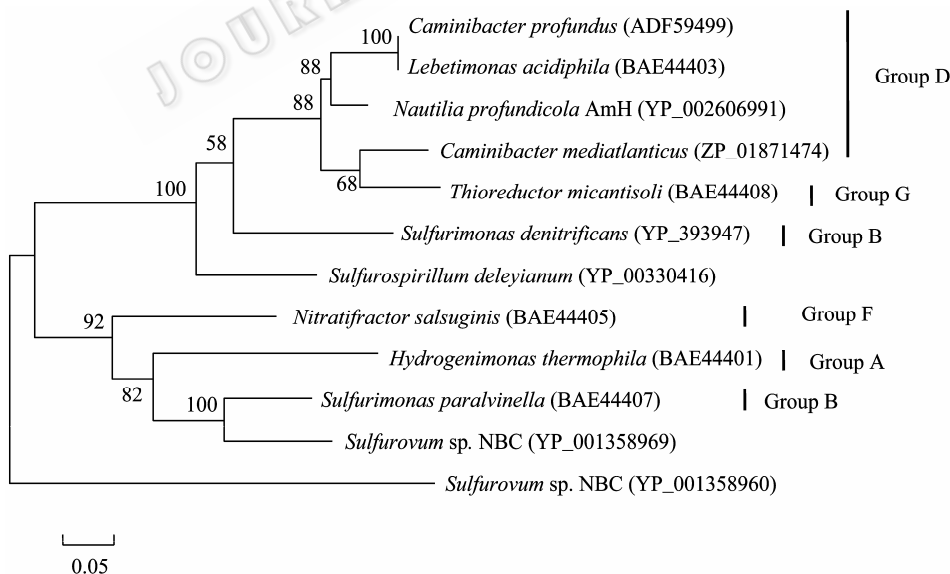


图 2 *Caminibacter profundus* 菌株 *hynL* 基因部分氨基酸序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of *hynL* fragment of *Caminibacter profundus*

Note: Neighbor-Joining distance trees were generated on the basis of alignment of 276 translated amino acids (minus insertions and deletions). The numbers at the nodes indicate the percentages of occurrence in 1 000 boot-strapped trees. The scale bar represents the calculated number of changes per amino acid position. Accession numbers are shown in parentheses.

从 *Epsilonproteobacteria* 的类群来看, *C. profundus*、*Lebetimonas acidiphila* 与 *C. mediatlanticus* 同属于 *Epsilonproteobacteria* D 类群, 在进化树上 *HynL* 也属同一分支。

2.2 荧光实时定量特异性扩增分析与标准曲线的建立

荧光实时定量 PCR 后, 获得循环数与荧光相对强度的 S 型动力学曲线。*hynL* 和 16S rRNA 基因的指数扩增期和平台期均十分明显, 从 1–40 个循环都能检测出荧光强度, 为理想的扩增曲线, 表明定量 PCR 实验数据适用于 *hynL* 基因的相对定量分析。通过熔解曲线分析, 发现 *hynL* 基因和 16S rRNA 分别在 83 °C 和 89 °C 左右出现单一峰, 表明其均被特异扩增。16S rRNA 基因和 *hynL* 基因标准曲线的斜率分别为 -3.129 和 -3.083, 两标准曲线的相关系数 RSq 分别为 0.999 和 0.992, 反应效率分别为 108.7% 和 113.4%。说明该体系可以用于荧光实时定量 PCR 分析。

2.3 *hynL* 基因表达分析

C. profundus 在 H₂ 浓度为 40% 的基础培养条件下, 6 h *hynL* 基因已有较高的相对表达量, 6–12 h *hynL* 的表达量迅速上升, 培养 12 h, 表达量达到最大值, 此后迅速降低, 24 h 时下降到最大值的 1/2 (图 3),

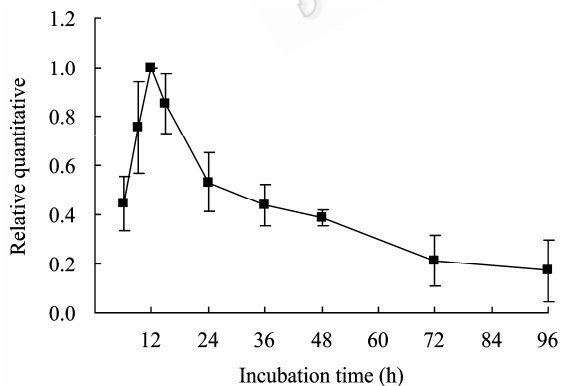


图3 *Caminibacter profundus* 菌株 *hynL* 基因表达量随不同培养时间的变化

Fig. 3 Time course of relative expressions of *hynL* of *Caminibacter profundus*

Note: The expressions of *hynL* of *Caminibacter profundus* were determined under basic growth condition by using real time PCR. The 16S rRNA was as internal control. Mean values were obtained from three independent experiments, and the results were shown as $x \pm s$ ($n=3$).

因此选择在 12 h 收集菌体来检测 H₂ 浓度对 *hynL* 表达的影响。

培养 12 h *hynL* 的表达随 H₂ 浓度的提高而增加, 其中 H₂ 浓度为 60% 时表达量最高, 为基础培养条件时的 2.88 倍, H₂ 浓度 80% 时, *hynL* 表达量有所下降 (图 4)。说明 *hynL* 基因表达受底物 H₂ 浓度的调控。

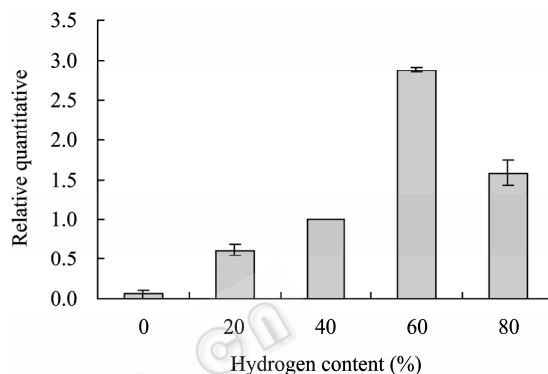


图4 H₂ 浓度对 *Caminibacter profundus* 菌株 *hynL* 基因表达量的影响

Fig. 4 Relative expressions of *hynL* of *Caminibacter profundus* in response to different hydrogen concentration

Note: The expressions of *hynL* of *Caminibacter profundus* were determined by using real time PCR. The 16S rRNA was as internal control. Mean values were obtained from three independent experiments, and the results were shown as $x \pm s$ ($n=3$).

2.4 甲基紫晶 MV 还原的 NiFe 氢酶活性分析

据报道, 类型 I–类型 IV 的 NiFe 氢酶均可以催化还原人工电子受体甲基紫晶 (MV), 因此菌株的 MV 还原氢酶活性可以表示这几种类型的 NiFe 氢酶总活性^[2,10]。*C. profundus* 培养 6–12 h 时, 不同 H₂ 浓度下的 MV 还原氢酶活性无明显差异; 培养 15 h 时, 随 H₂ 浓度的增加, 氢酶活性也相应提高。H₂ 浓度为 0% 时, 氢酶活性在 15 h 的最高值仅为 0.86 nmol/(min·g cell protein), 且在 24 h 已出现下降趋势。H₂ 浓度为 20%–80% 时, 氢酶活性均在 24 h 达到最高值 (图 5), 此时 H₂ 浓度为 60% 时酶活最高, 达到 6.0 nmol/(min·g cell protein)。此后氢酶活性随时间延长大幅下降 (图 5)。通过对比还可以看出, 不同 H₂ 浓度下 MV 还原的 NiFe 氢酶活性的变化规律与 *hynL* 基因表达的趋势一致, 且氢酶活性的峰值比 *hynL* 的最高表达量有明显滞后。

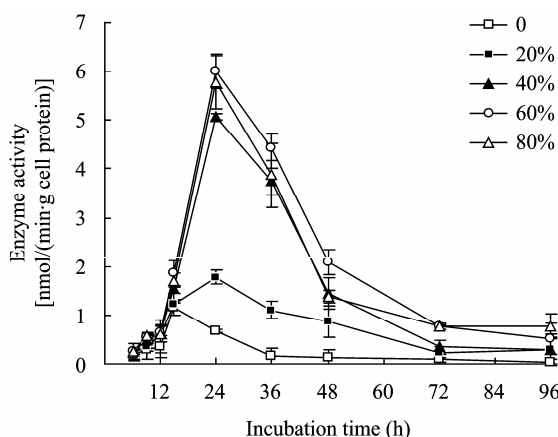


图5 *Caminibacter profundus* 菌株 MV 还原的氢酶活性随不同 H₂ 浓度的变化

Fig. 5 MV-reducing hydrogenase activity of *Caminibacter profundus* under different H₂ concentration

Note: The hydrogenase activity was determined by measuring the reduction of methyl viologen (MV) at 578 nm spectrophotometrically. All the enzyme activities were measured in triplicate and each values was expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

2.5 菌株生长量

研究了 *hynL* 表达, 氢酶活性与菌株生长的关系, 结果表明 H₂ 浓度为 40% 的基础培养条件下, 培养 12 h 时菌株进入指数生长期, 生物量迅速达到 9.3×10^6 cell/mL, 此时 *hynL* 的基因表达量达到最高值, 氢酶活性迅速上升并在 24 h 时达到峰值(图 3、5、6)。12 h 后菌株迅速生长, 48 h 时生长开始趋缓进入平台期, 72 h 时菌体量最高为 4.58×10^7 cell/mL; 之后菌体生物量开始下降, 96 h 时 *hynL* 表达量仅为 12 h 表达最高值的 17.2% (图 3、6)。菌株生物量在不同 H₂ 浓度下表现明显不同, H₂ 浓度为 0 和 20% 时, 菌株生物量始终保持较低的水平, 而在该 H₂ 浓度下, *hynL* 基因的表达量和 MV 还原的氢酶活性也较低; H₂ 浓度为 60% 和 80% 时, 菌株生物量增长速度与基础培养条件下的趋势相一致, 并且在 12–72 h 时, 60% H₂ 浓度下, 菌体生长量略显优势, 这与 12 h 时 H₂ 浓度为 60% 时表达量最高相一致。

比对 *hynL* 基因的表达和菌株的生长可以明显看出, 当 *hynL* 基因的表达量最高时, 菌株的能量代谢处于旺盛期, 菌株的生长也同时进入活跃期; 而当 *hynL* 基因的表达量下降时, 菌株生物量的增加也

趋于平缓, 甚至下降(图 3、6)。上述结果说明菌株通过调控 *hynL* 表达来响应环境中 H₂ 浓度的变化, 来影响能量代谢的催化过程, 进而影响菌株的生长和繁殖。

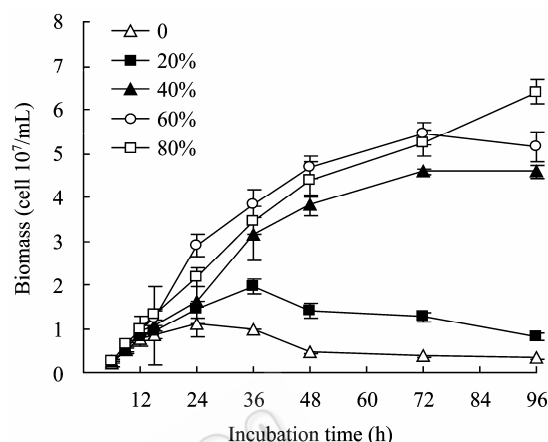


图6 *Caminibacter profundus* 菌株生长量随不同 H₂ 浓度的变化

Fig. 6 Growth of *Caminibacter profundus* under different H₂ concentration

Note: Mean values were obtained from three independent experiments. Values are shown as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

3 讨论

氢酶分为结构复杂和功能多样的不同类型, 在进化关系上形成完全不同的类群和亚类群^[1]。本研究发现 *C. profundus* 的 *HynL* 氨基酸序列与 *Lebetimonas acidiphila* 的进化距离最近, 而与 16S rRNA 种属关系最近的 *C. mediatlanticus* 的 *HynL* 进化距离较远, 说明深海热液自养菌氢酶 *hynL* 基因的系统发育关系与 16S rRNA 的有所不同, 这与 Ken Takai 等^[2]的研究结论一致。我们还比对了 *C. profundus*、*Lebetimonas acidiphila*、*Nautilia profundicola* AmH 和 *C. mediatlanticus* 的 *HynL* 序列, 首次发现这些 *Epsilonproteobacteria* D 类群的 *HynL* 在进化树上仍属于同一分支, 说明 *Epsilonproteobacteria* 各个类群可能与 *HynL* 的系统发育密切相关。

微生物具有多种不同类型的氢酶, 其表达受到生长条件和环境信号的影响, 如底物 H₂、O₂、电子供体或电子受体等^[11]。热泉化能自养氢细菌 *H.*

thermophilus TK-6 菌株的 *hox*、*hup1* 和 *hup2* 氢酶基因簇为组成型表达, 而 *hynL* 仅在高于 45% 的 H_2 浓度下表达^[12]。好氧的兼性自养氢细菌 *Ralstonia eutropha* 的膜锚定氢酶也仅在高浓度 H_2 的外部环境下转录^[11]; 我们通过对 *C. profundus* 相对定量分析发现, *hynL* 在 H_2 浓度为 0–80% 时均可以表达; 而在 60% H_2 浓度时的表达量最高, 是 40% H_2 浓度时的 2.88 倍; 在 H_2 浓度为 0 时, 培养液中仅含有微量的可溶 H_2 时 *hynL* 有微量表达, 说明 *C. profundus hynL* 表达特征和响应机制与 *H. thermophilus* TK-6 *hynL* 和 *R. eutropha* 的不同。*hynL* 的表达随 H_2 浓度的增加而提高, 而 H_2 浓度为 80% 时反而低于 60% 时的 *hynL* 的表达量, 这也提示 *hynL* 的转录水平可能通过特定的调控体系进行正或者负调控。MV 还原氢酶活性可以表示菌株的类型 I–类型 IV 的 NiFe 总氢酶活性, 不同 H_2 浓度下, NiFe 总氢酶活性与 *hynL* 基因表达的趋势一致, 也提示这几种类型的 NiFe 氢酶在表达上可能具有一致性。

综上, 通过我们的研究可以看出, *C. profundus hynL* 表达量、MV 还原氢酶活性和菌体生长量均受到环境 H_2 浓度的制约, 且趋势一致。说明, *C. profundus* 通过调控 *hynL* 表达来响应环境中 H_2 浓度的变化, 从而影响能量代谢的催化过程, 并最终影响菌株的生长和繁殖。*C. profundus* 对氢酶合成的调控作用, 可能是其在极端环境下对能量需求和环境变化的迅速、高效的响应方式。

参 考 文 献

- [1] Vignais PM, Billoud B, Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases[J]. FEMS Microbiol Rev, 2001, 25(4): 455–501.
- [2] Takai K, Campbell BJ, Cary SC, et al. Enzymatic and genetic characterization of carbon and energy metabolisms by deep-sea hydrothermal chemolithoautotrophic isolates of *epsilonproteobacteria*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 7310–7320.
- [3] Nishimura H, Kitano Y, Inoue T, et al. Purification and characterization of membrane-associated hydrogenase from the deep-sea epsilonproteobacterium *Hydrogenimonas thermophila*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(8): 1624–1630.
- [4] McCollom TM. Geochemical constraints on primary productivity in submarine hydrothermal vent plumes[J]. Oceanographic Research Papers, 2000, 47(1): 85–101.
- [5] Miroshnichenko ML, Haridon SL, Schumann P, et al. *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of Nautiliales ord. nov. within the class 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal vent[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(1): 41–45.
- [6] DSMZ GmbH. Desulfurobacterium medium[EB/OL]. http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium829.pdf. 2007.
- [7] Chen Y, Moiseyev G, Takahashi Y, et al. Impacts of two point mutations of RPE65 from Leber's congenital amaurosis on the stability, subcellular localization and isomerohydrolase activity of RPE65[J]. FEBS Letters, 2006, 580(17): 4200–4204.
- [8] Livaka KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [9] Hügler M, Wirsén CO, Fuchs G, et al. Evidence for autotrophic CO_2 fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the ϵ subdivision of proteobacteria[J]. Journal of bacteriology, 2005, 187(9): 3020–3027.
- [10] Shiba H, Kawasumi T, Igarashi Y, et al. The CO_2 assimilation via the reductive tricarboxylic acid cycle in an obligately autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*[J]. Arch Microbiol, 1985, 141(3): 198–203.
- [11] Vignais PM, Colbeau A. Molecular biology of microbial hydrogenases[J]. Curr Issues Mol Biol, 2004, 6(2): 159–188.
- [12] Ueda Y, Yamamoto M, Urasaki T, et al. Sequencing and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of four hydrogenase gene clusters from an obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, *hydrogenobacter thermophilus* TK-6[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(6): 470–475.