

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 ISC 铁硫簇系统的合成

钱林 郑春丽 柳建设*

(东华大学 环境科学与工程学院 上海 201620)

摘要: 【目的】铁硫簇是最古老的一种氧化还原中心,它普遍存在于所有生命体内,在光合作用、呼吸作用和固氮作用这三个地球生命最基本的代谢途径中扮演着重要的角色。【方法】以嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*A. ferrooxidans* ATCC 23270)基因组为模板,克隆表达其 ISC 铁硫簇组装的 3 个核心蛋白, IscS (半胱氨酸脱硫酶蛋白)、IscU (支架蛋白)和 IscA (铁供体蛋白)。【结果】研究发现 IscS 能催化半胱氨酸脱硫,为铁硫簇的组装提供硫,支架蛋白 IscU 不具备结合铁的能力, IscA 具有较强的铁结合能力。【结论】铁硫簇体外组装证明 Fe-IscA 在体外能将结合的铁传递给 IscS,并在 IscU 上进行铁硫簇的组装。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌, 铁硫簇, 生物合成, IscA

Biogenesis of iron sulfur cluster of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

QIAN Lin ZHENG Chun-Li LIU Jian-She*

(College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: [Objective] Iron sulfur cluster are one of the most ancient and ubiquitous redox centre in almost all living organism and play an important role in photosynthesis, respiration and nitrogen fixation. [Methods] In this study, three key proteins (IscS, IscU, IscA) involved in iron sulfur cluster assembly from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 was cloned and expressed in *Escherichia coli*. [Results] IscS is a cysteine desulfurase, IscU is a scaffold protein, IscA has

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 50374075, 41073060); 上海市重点学科资助项目(No. B604); 高等学校博士点专项科研基金(No. 20100075110010)

*通讯作者: Tel: 86-21-67792973; 信箱: liujianshe@dhu.edu.cn

收稿日期: 2011-11-24; 接受日期: 2012-02-09

strong iron binding activity which acts an iron chaperon. **[Conclusion]** The Fe-IscA can provide iron for the assembly of transient iron sulfur cluster in IscU in the presence of IscS and L-cysteine *in vitro*.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Iron sulfur cluster, Biogenesis, IscA

铁硫簇是普遍存在于生物体内的最古老的生命物质之一,其最主要的功能是作为电子传递蛋白的辅助基因参与能量的转移,同时它在 DNA 的合成与修饰、底物的结合与激活、基因表达的调控、酶活的调控等方面也起着重要的作用^[1-3]。

ISC 铁硫簇系统包含 IscS、IscU 和 IscA 三个组装的核心蛋白。其中 IscS 是一种半胱氨酸脱硫酶,能催化半胱氨酸脱硫为铁硫簇的组装提供硫^[4-5]; IscU 是一个支架蛋白,能够提供铁硫簇组装的平台,使没结合铁硫簇的铁硫蛋白成熟^[6-7]; 目前关于 IscA 的功能尚存在一定争议:一种观点认为 IscA 的作用是为铁硫簇组装提供铁^[8-10],另一种观点认为 IscA 可能作为候选的支架或者载体蛋白结合暂时组装的铁硫簇^[11-12]。关于 ISC 铁硫簇系统生物合成的组装机理以及在此过程中各个蛋白之间的相互作用还有待进一步研究。

嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, 简称 *A. ferrooxidans*)是一种典型的化能自养菌,属于革兰氏阴性细菌,好氧嗜酸,广泛存在于金属矿区场地以及生物浸矿体系之中^[13]。*A. ferrooxidans* 具有氧化亚铁和还原态硫化物的能力,在生物湿法冶金、煤炭脱硫、重金属污染防治和生物修复等方面都有着广泛的应用^[14-16]。

本文以 *A. ferrooxidans* ATCC23270 基因组为模板,通过基因重组技术克隆并在大肠杆菌中高效表达了 *A. ferrooxidans* ISC 铁硫簇系统生物合成关键蛋白 IscA、IscS 和 IscU,并对关键蛋白的性质、功能和铁硫簇生物组装进行了研究。该研究对于深入了解 *A. ferrooxidans* 铁硫氧化过程中的电子传递原理,进一步揭示 *A. ferrooxidans* 铁

硫氧化的代谢途径具有重要的理论意义。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜酸氧化亚铁硫杆菌标准菌株 ATCC 23270 购自美国模式菌种保藏中心(American Type Culture Collection)。质粒采用 pET28b 表达载体。化学试剂均为分析纯,购自上海国药集团及上海生工公司;分子生物学试剂购自 NEB 公司,引物的合成与测序由上海生工公司完成。

1.2 重组蛋白的克隆

根据 GenBank 公布的 ATCC 23270 的全基因组序列(www.tigr.org)设计引物,具体引物如表 1 所示。

以 *A. ferrooxidans* ATCC23270 的基因组为模板,分别进行 PCR 扩增。PCR 反应体系如下(50 μ L): 10 \times PCR buffer 5 μ L, MgCl₂ (20 mmol/L) 4 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, 正向引物 F (10 pmol/ μ L) 和反向引物 R (10 pmol/ μ L) 各 2.5 μ L, 模板 DNA (约 100 ng/ μ L) 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L。扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 61 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

PCR 产物经纯化试剂盒纯化后用 Hind III 和 Noc I 双酶解,克隆到同样酶解的质粒 pET28b,转化入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑选转化子抽提质粒后进一步通过 PCR 筛选阳性克隆,阳性克隆送上海生工公司进行 PCR 测序。重组表达质粒分别命名为 pET28b-IscA、pET28b-IscU 和 pET28b-IscS。

表 1 本实验所用引物
Table 1 The primers used in this study

引物 Primer	序列 Primer sequence (5'→3')	大小 Size (bp)
IscA-F	CATGCCATGGCTTTGACCTTATCGGAAAGT	30
IscA-R	GAGTAAGCTTGGTCGTAAAGCTCTCACCGC	30
IscU-F	CATGCCATGGCATAACAGTGAAAAGGTGATC	30
IscU-R	TGACAAGCTTGTGTGCCGCCTGGGCACT	28
IscS-F	CATGCCATGGACATGACGCGCAGCATTATC	31
IscS-R	GCAGAAGCTTCGGTGCGCAAGAAATCGGG	29

1.3 重组蛋白的表达与纯化

将阳性克隆质粒 10 μL 转入大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3) 中, 将转化产物接种至含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中培养过夜后, 按 1:50 比例稀释后转到 500 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中扩大培养 OD_{600} 接近 0.6, 加入 0.5 mmol/L IPTG 后室温诱导蛋白过夜。离心收集菌体后重悬细胞于缓冲溶液 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0), 用匀浆器均匀分散沉淀, 倒入细胞机械破碎仪破碎细菌。将得到的细胞悬液离心收集上清, 利用 GE 公司的 AKTA 蛋白纯化仪的镍亲和层析柱进行分离纯化。纯化结束后用 SDS-PAGE 检测蛋白的纯度及大致分子量。

1.4 蛋白体外结合铁的实验

在纯化后的 IscA 中加入 10 mmol/L 的 EDTA 和 2 mmol/L 的 L-半胱氨酸, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后用 GE 公司的脱盐柱脱盐制备 apo 形式的 IscA (apo-IscA)。将 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 apo 形式的 IscA 和 2 mmol/L 的 DTT 混合均匀, 在体系中加入不同浓度的硫酸亚铁铵 (0、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$), 在室温放置 30 min 后用脱盐柱进行脱盐除去体系中的 DTT 和未结合的硫酸亚铁铵。结合了铁的 IscA 命名为 (Fe-IscA)。通过 IscA 在

315 nm 的特征吸收峰来表征 IscA 对铁的特异性结合^[8]。

1.5 铁硫簇在 IscU 上的体外组装

将 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 IscU、1 $\mu\text{mol/L}$ 的 IscS 和 2 mmol/L 的 DTT 加入到含 500 mmol/L 氯化钠和 20 mmol/L Tris (pH 8.0) 的缓冲溶液中。加入硫酸亚铁铵或 Fe-IscA 作为铁硫簇组装的铁供体。反应体系在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min 后加入 1 mmol/L 的 L-半胱氨酸催化 IscS 脱硫开始铁硫簇的组装。设定反应温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行紫外可见分光光度计扫描, 间隔 2 min, 共扫描 10 次。通过 IscU 在 456 nm 的特征吸收峰来表征铁硫簇在 IscU 上的组装^[9]。

2 结果与讨论

2.1 重组蛋白的诱导表达及纯化

将构建好的重组表达质粒 pET28b-IscA、pET28b-IscU 和 pET28b-IscS 分别转入宿主菌 *E.coli* BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达。将表达后的菌体离心经细胞机械破碎仪破碎后, 离心取上清利用 GE 公司的 AKTA 蛋白纯化仪进行纯化。

经纯化之后的 IscA 呈现棕红色, SDS-PAGE 电泳显示其相对蛋白分子量约为 11 kD (图 1A), 紫外扫描图谱发现其在 315 nm 和 420 nm 处各有一个特征吸收峰(图 1B)。

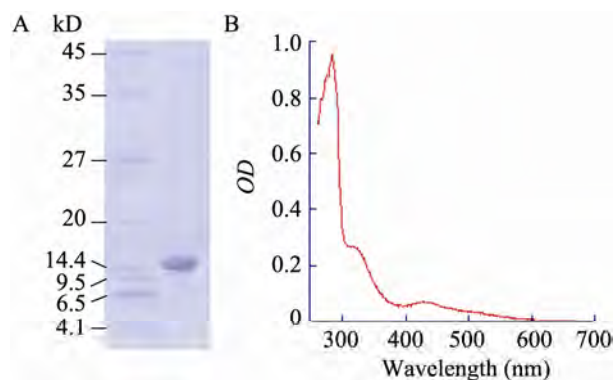


图1 IscA 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图和紫外扫描图谱
Fig. 1 Coomassie blue-stained SDS-PAGE and UV-vis spectrum of IscA

经纯化之后的 IscS 呈现亮黄色, SDS-PAGE 电泳显示其相对蛋白分子量约为 46 kD (图 2A), 紫外扫描图谱发现其在 416 nm 处有一个特征吸收峰(图 2B), 证明纯化的 IscS 是一个含 PLP 辅基蛋白的特征吸收峰^[19]。

经纯化之后的 IscU 蛋白没有颜色, SDS-PAGE 电泳显示其相对蛋白分子量为 16 kD (图 3A), 同时紫外扫描图谱证实由 LB 纯化出来的 IscU 上没有铁硫簇形式的存在(图 3B)。

2.2 蛋白体外结合铁的实验

为了考察 IscA 和 IscU 对铁的结合能力, 我们对其进行体外铁的结合实验, 利用蛋白在 315 nm 处的特征吸收峰来表征蛋白对铁的结合能力^[10,20]。发现 Apo-IscA 蛋白在 315 nm 仅有一个很小的吸

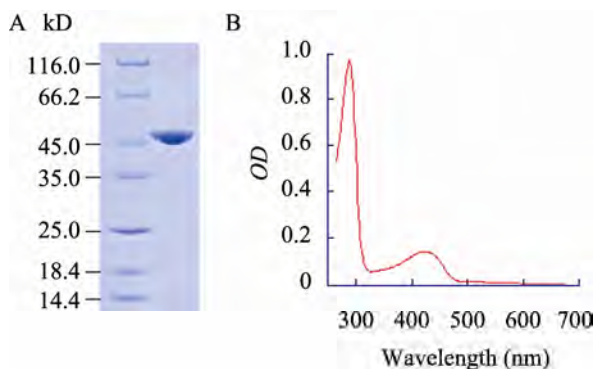


图2 IscS 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图和紫外扫描图谱
Fig. 2 Coomassie blue-stained SDS-PAGE and UV-vis spectrum of IscS

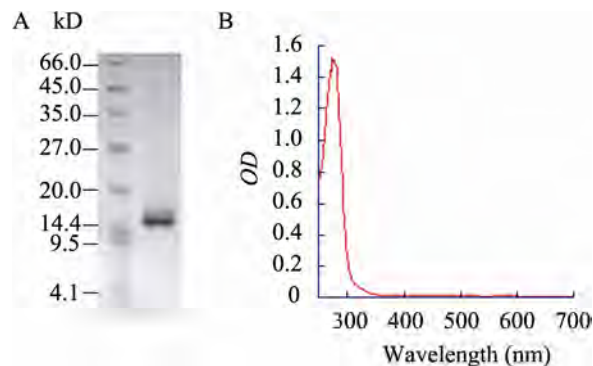


图3 IscU 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图和紫外扫描图谱
Fig. 3 Coomassie blue-stained SDS-PAGE and UV-vis spectrum of IscU

收峰, 说明它体内含有极少量的铁。把 Apo-IscA 和 DTT 混匀之后, 在反应体系中加入不同浓度的硫酸亚铁铵在室温反应 30 min, 反应体系脱盐后的紫外扫描图谱如图 4A 所示, 可知 IscA 在体外具有较强的铁结合能力。随着反应体系中亚铁浓度的增加, 蛋白在 315 nm 处的吸收峰也不断增加。当加入的亚铁浓度(25 $\mu\text{mol/L}$)达到 apo-IscA 浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)的 1/2 时, IscA 对铁的结合基本达到饱和。图 4B 中的 1 号曲线为 50 $\mu\text{mol/L}$ IscU 反应体系中不加硫酸亚铁铵的紫外扫描图谱, 2 号曲线为 50 $\mu\text{mol/L}$ IscU 反应体系中 100 $\mu\text{mol/L}$ 硫酸亚铁铵的紫外扫描图谱, IscU 反应前后图谱并没有出现明显变化, 分析可知纯化出的 IscU 没有结合铁的能力。这与大肠杆菌中 IscA 和 IscU 对铁的结合能力结果是一致的^[20]。

2.3 铁硫簇在 IscU 上的体外组装

从上面的实验中我们发现 ISC 铁硫簇合成系统中 IscU 不具备结合铁的能力, 而 IscA 则具备较强的铁结合能力, 因此推测 IscU 可能作为铁硫簇组装的支架蛋白, 而 IscA 可能作为铁的供体参与铁硫簇的组装。为了验证这一推论, 我们对 IscU 进行了体外铁硫簇组装的实验。在 LB 培养基中纯化的 IscU 不带有铁硫簇结构, 但可以作为铁硫簇组装的支架蛋白参与铁硫簇的组装。在图 5A

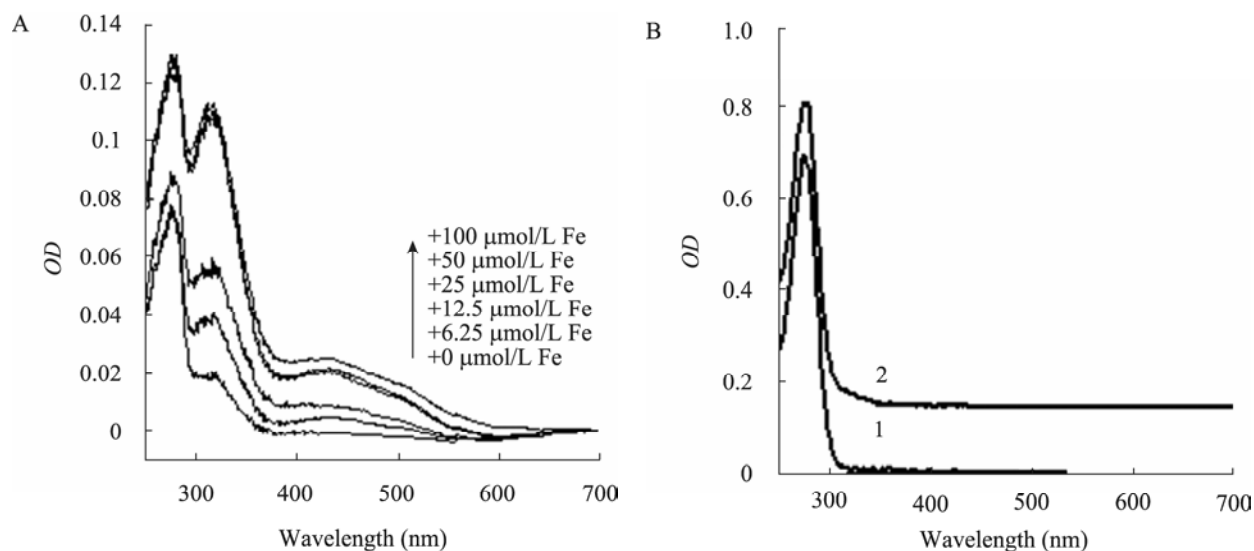


图 4 IscA 和 IscU 体外结合铁的能力

Fig. 4 Iron binding activity of IscA and IscU *in vitro*

Note: A: IscA; B: IscU.

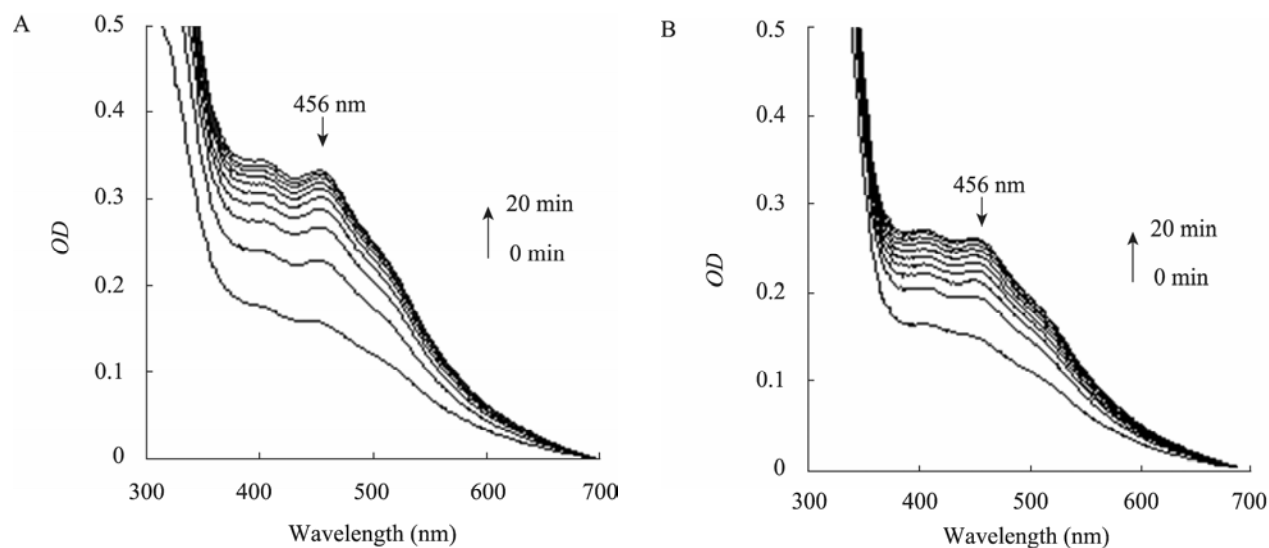


图 5 不同铁供体条件下铁硫簇在 IscU 上的组装

Fig. 5 Iron sulfur cluster assembly in IscU

Note: A: 50 μmol/L Ferrous ammonium sulfate; B: 100 μmol/L Fe-IscA.

中, 50 μmol/L 的 IscU 中加入 50 μmol/L 的硫酸亚铁铵做为铁硫簇组装的铁供体, 利用 IscS 在 L-半胱氨酸作用下催化脱硫为铁硫簇的组装提供硫。随着反应时间的增加, IscU 在 456 nm 出现一个逐渐升高的吸收峰。456 nm 是 [2Fe-2S] 蛋白的

一个特异性吸收峰, 说明铁硫簇成功地在 IscU 上形成了组装^[9,21]。图 5B 是以 100 μmol/L 的 Fe-IscA 作为 IscU 铁硫簇组装的铁供体的紫外图谱, 研究发现 Fe-IscA 在体外也能将结合的铁传递给 IscS, 并在 IscU 上合成铁硫簇, 具体表现在 456 nm 位

置的 IscU 上铁硫簇特异吸收峰的逐渐增高。但是和外加的游离状的硫酸亚铁铵相比, 与 IscA 结合的铁由于蛋白的储存和缓冲作用, 提供给铁硫簇合成的速度更慢。

3 结论

本文成功地克隆表达了嗜酸氧化亚铁硫杆菌 ISC 铁硫簇组装系统的 3 个关键蛋白 IscS、IscU 和 IscA, 发现 IscS 在 L-半胱氨酸作用下催化脱硫为铁硫簇的组装提供硫, IscA 具有较强的铁结合能力, 在体外能结合硫酸亚铁铵形成担铁的铁 IscA, 同时担铁的铁 IscA 能将结合的铁传递给 IscS, 并在支架蛋白 IscU 上完成铁硫簇的生物合成。以上结果为下一步研究 *A. ferrooxidans* 铁硫簇的表达调控机制和电子传递模型提供了依据, 对进一步揭示 *A. ferrooxidans* 铁硫代谢途径的运行机制具有重要的理论意义。

参考文献

- [1] Beinert H, Holm RH, Münck E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures[J]. *Science*, 1997, 277(5326): 653–659.
- [2] Xu XM, Møller SG. Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance[J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2011, 15(1): 271–307.
- [3] Lill R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins[J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 831–838.
- [4] Eric MS, Eric SB, Joan BB, et al. Biosynthesis of complex iron-sulfur enzymes[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15(2): 319–327.
- [5] Zeng J, Zhang YF, Liu DY, et al. Expression, purification and characterization of a cysteine desulfurase, IscS, from *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(12): 1983–1990.
- [6] Kim JH, Fuzery AK, Tonelli M, et al. Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(26): 6062–6071.
- [7] Zeng J, Zhao WJ, Liu YD, et al. Expression, purification and characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein, IscU, from *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(12): 1965–1972.
- [8] Ding HG, Clark RJ, Ding BJ. IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(36): 37499–37504.
- [9] Wang W, Huang H, Tan GQ, et al. *In vivo* evidence for the iron-binding activity of an iron-sulfur cluster assembly protein IscA in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Journal*, 2010, 432(3): 429–436.
- [10] Tan GQ, Lu JX, Bitoun JP, et al. IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in *Escherichia coli* under aerobic growth conditions[J]. *Biochemical Journal*, 2009, 420(3): 463–472.
- [11] Krebs C, Agar JN, Smith AD, et al. IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(46): 14069–14080.
- [12] Ollagnier-de-Choudens S, Mattioli T, Takahashi Y, et al. Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(25): 22604–22607.
- [13] 杨显万, 沈庆峰, 郭玉霞. 微生物湿法冶金[M]. 北京: 冶金工业出版社, 2003: 3–6.
- [14] Brierley CL. Biohydrometallurgical prospects[J]. *Hydrometallurgy*, 2010, 104(3/4): 324–328.
- [15] Quatrini R, Appia-Ayme C, Denis Y, et al. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 394–413.
- [16] Duan N, Zhou CB, Chen B, et al. Bioleaching of Mn from manganese residues by the mixed culture of *Acidithiobacillus* and mechanism[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2011, 86(6): 832–837.
- [17] 周立祥, 方迪, 周顺桂, 等. 利用嗜酸性硫杆菌

- 去除制革污泥中铬的研究[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 62-66.
- [18] 陈桂秋, 曾光明, 袁兴中, 等. 治理重金属污染河流底泥的生物淋滤技术[J]. 生态学杂志, 2008, 27(4): 639-644.
- [19] Urbina HD, Silberg JJ, Hoff KG, et al. Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(48): 44521-44526.
- [20] Ding HG, Yang JJ, Coleman LC, et al. Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(11): 7997-8004.
- [21] Yang JJ, Bitoun JP, Ding HG. Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(38): 27956-27963.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华珞等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2012-00-00; 接受日期: 2012-00-00

(下转 p.1126)