磁螺菌(*Magnetospirillum gryphiswaldense*)氢酶基因 功能分析及对细胞生长的影响

班甲^①, 姜伟^①, 李颖^①, Yaoping Zhang^②, 李季伦^{①*}

① 农业生物技术国家重点实验室, 中国农业大学生物学院, 北京 100193;

② Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, WI 53706, USA

* 联系人, E-mail: lijilun@cau.edu.cn

2009-04-24 收稿, 2009-08-20 接受

国家自然科学基金(批准号: 30570023 和 30870043)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2007AA021805)资助项目

摘要 探讨了磁螺菌(*Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1)氢代谢与细胞生长、磁小体合成之间的关系. 分别构建了吸氢酶大亚基基因 *hupL* 缺失突变株 L206 和氢酶大亚基基因 *hyaB* 与 *hupL* 的双缺失突变株 B206. 比较了野生型菌株与突变株在摇瓶培养条件下的吸氢量、放氢量、细胞生长曲线和铁的吸收, 并结合电子显微镜观察了细胞内磁小体合成情况. 结果表明, 磁螺菌 HupSL 为专一性的吸氢酶, HyaAB 为专一性的放氢酶; L206 在磁小体合成过程中的放氢量相对较高, 其生长速度、铁吸收速度明显快于 MSR-1 及 B206. 推测磁螺菌可通过上述吸氢酶和放氢酶的作用适当调节细胞内还原力的平衡, 促进铁的吸收和磁小体合成.

关键词

M. gryphiswaldense

磁螺菌

吸氢酶

氢酶

还原力

磁小体合成

氢酶(hydrogenase)是微生物氢代谢过程中的重要酶类. 根据氢酶活性中心金属原子的组成, 可将其分为 NiFe-氢酶(某些氢酶中含有 Se)^[1], Fe-氢酶和无金属(metal-free)氢酶^[2,3]. 在3种氢酶中, NiFe-氢酶普遍存在, 该类氢酶为异源二聚体, 其活性中心位于其大亚基中, 活性中心的金属原子为 Ni 和 Fe (某些活性中心还含有 Se), 小亚基中含有 Fe-S 簇, 执行电子传递体的作用^[3]. 不同的氢酶在催化性质上存在差异, 但是大多数的氢酶都能够催化吸氢和放氢的可逆反应, 其效率因菌株不同而存在差异^[4], 也有一些氢酶只表现为吸氢, 一些只表现为放氢^[5]. 微生物通过放氢消耗代谢中过剩的还原力^[6], 通过吸氢将氢气转化为质子和电子并重新供给细胞代谢活动^[7].

趋磁细菌细胞内可自行合成纳米级磁颗粒, 其成分主要为氧化铁或硫化铁晶体, 外有质膜包被, 被

称为磁小体(magnetosome). 该类颗粒的合成机制及应用一直受到人们的关注. 本实验室前期以磁螺菌(*Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1)为材料, 在探讨其生理和遗传特点的过程中, 发现该细胞在摇瓶培养时可以吸收氢气. 曾有报道, 细胞内还原力的积累过多, 不但会抑制其胞内磁小体的合成, 细胞的生长也有所减弱^[8]. 微生物的吸、放氢与其胞内的还原力水平密切相关, 但细胞氢代谢与磁小体合成之间是否存在关联尚不明确.

目前已经完成基因组测序工作的磁细菌共有4种^[9]: *Magnetococcus* sp. MC-1, *M. magnetotacticum* MS-1, *M. magneticum* AMB-1 及 *M. gryphiswaldense* MSR-1. 经检索发现 MSR-1 基因组中存在两种 NiFe-氢酶基因: 吸氢酶基因 *hupSL* 和氢酶基因 *hyaAB*. 为此本实验拟通过分别构建吸氢酶缺失突变株及吸氢

英文版见: Ban J, Jiang W, Li Y, et al. Functional analysis of hydrogenases and their effects on cell growth and magnetosome synthesis in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Chinese Sci Bull, doi: 10.1007/s11434-010-0744-8

酶与氢酶双缺失突变株, 通过比较野生型菌株和两个突变菌株吸氢、放氢的特点, 分析氢代谢对细胞生长、铁吸收和磁小体合成的影响。

1 材料和方法

(i) 细菌菌株、质粒和培养基。所用菌株和质粒见表 1。野生型菌株 *M. gryphiswaldense* MSR-1 (DSM6361) 购自 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Brunswick, Germany)。在 LAY 培养基^[10]中培养 *M. gryphiswaldense*, 如不需要磁小体合成时, 将 LAY 培养基中的柠檬酸铁去除, 培养条件为 30℃ (100 r/min), 固体培养参照文献[11]中的方法。接合实验的培养基为 LG^[12]。克隆宿主 *Escherichia coli* DH5α 与接合实验供体菌株 *E. coli* S17-1 的培养基为 Luria-Bertani (LB), 培养温度 37℃。对 *M. gryphiswaldense*, 抗生素浓度为: 萘啶酮酸(Nx) 5 μg/mL; 庆大霉素(Gm) 5 μg/mL; 卡那霉素(Km) 5 μg/mL。对 *E. coli*, 抗生素浓度为: 氨苄青霉素(Ap) 100 μg/mL; 氯霉素(Cm) 25 μg/mL; 庆大霉素 10 μg/mL; 卡那霉素 50 μg/mL; 四环素(Tc) 12.5 μg/mL。

(ii) 吸氢酶缺失突变株和氢酶缺失突变株的构建。DNA 和质粒的提取、转化、连接、限制性酶切、DNA 片段回收及 PCR 均按照文献[13]所述进行。为了缺失吸氢酶亚基 *hupL*, 设计两对引物: pL1, 5'-CGGGGTACCCGCATCAACAATCTGGCGTTCG-3'; pL2, 5'-CCCAAGCTTTGGTTCGGTTGGGATGAAG-C-3'; pL3, 5'-CGCGGATCCCCTTCTCGGGATACTGCTCG-3'; pL4, 5'-CGGGGTACCCCCACCACTCCCATCCTGT-3', 分别扩增其 5'侧翼和 3'侧翼序列, 引物序列的下画线处为引入的酶切位点; 将通过 PCR 得到的两个片段酶切回收, 同时用 *Sac* I 酶切质粒 pUCGm 回收其 *aaaCl* 片段(编码 Gm^r), 将这 3 个片

段和已用 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切回收的 pSUP202 片段相连接, 得到突变 *hupL* 基因的自杀载体 pSUPL。将 pSUPL 转入 *E. coli* S17-1, 并通过接合转移方法将 pSUPL 转移到受体菌株 MSR-1 中。在 Nx^rGm^rLG 平板上培养 7~10 d, 挑取单菌落并影印到含有氯霉素的 Nx^rGm^rLG 平板上筛选 Cm^s 菌落。由于发生双交换而筛选得到的 Nx^rGm^rCm^s 菌落经 PCR 验证(Cm^r由载体 pSUP202 编码), 验证正确的 *hupL* 突变株命名为 L206 ($\Delta hupL::aaaCl$)。

为了缺失 *hupL* 突变株中的氢酶大亚基 *hyaB*, 设计两对引物: pB1, 5'-CGGATCCGGCCGCGTCATCG-TCCTTTA-3'; pB2, 5'-GCTGCAGGGCTGTCGCTCTC-CTTACGGAATGC-3'; pB3, 5'-GCTGCAGGGTGTGC-GAGGATGCGCTGAAGA-3'; pB4, 5'-CAAGCTTCG-CTGCCTAATCGTTCGACAGAAG-3', 分别扩增其 5'侧翼和 3'侧翼序列, 引物序列的下画线处为引入的酶切位点; 将通过 PCR 得到的两个片段酶切回收, 同时用 *Pst* I 酶切质粒 pUC4K 回收其卡那抗性基因片段(编码 Km^r), 将这 3 个片段和已用 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切回收的 pSUP202 片段相连接, 得到突变 *hyaB* 基因的自杀载体 pSUPB。将 pSUPB 转入 *E. coli* S17-1, 并通过接合转移方法将 pSUPB 转移到受体菌株 L206 中。在 Nx^rKm^rLG 平板上培养 7~10 d, 挑取单菌落并影印到含有氯霉素的 Nx^rKm^rLG 平板上筛选 Cm^s 菌落。由于发生双交换而筛选得到的 Nx^rKm^rCm^s 菌落经 PCR 验证(Cm^r由载体 pSUP202 编码), 验证正确的 *hupL* & *hyaB* 双缺失突变株命名为 B206 ($\Delta hyaB::Kan \Delta hupL::aaaCl$)。

(iii) 放氢检测。测定菌株生长时的放氢量在摇瓶中进行。在 2L 摇瓶中装入 1.5 L 的 LAY 培养基或无铁 LAY 培养基, 接种量为 10%, 接种后用橡胶塞密封, 培养 24 h 后用气相色谱法测定摇瓶气相中氢

表 1 菌株和质粒

菌株和质粒	相关描述	来源
<i>M. gryphiswaldense</i>	MSR-1	野生型, Nx ^r
	L206	$\Delta hupL::aaaCl$, Nx ^r Gm ^r
	B206	$\Delta hyaB::Kan \Delta hupL::aaaCl$, Nx ^r Gm ^r Km ^r
质粒	pSUP202	<i>M. gryphiswaldense</i> 自杀载体, Ap ^r Tc ^r Cm ^r
	pUCGm	含有 <i>aaaCl</i> 片段, Gm ^r
	pUC4K	含有 kanamycin resistance 片段, Km ^r
	pSUPL	pSUP202 带有 3.2 kb <i>Bam</i> H I 和 <i>Hind</i> III $\Delta hupL::aaaCl$ 片段, Ap ^r Cm ^r Gm ^r
	pSUPB	pSUP202 带有 3.2 kb <i>Bam</i> H I 和 <i>Hind</i> III $\Delta hyaB::Kan$ 片段, Ap ^r Cm ^r Km ^r

的浓度,注射器抽取 100 μL 气体样品直接进行测定,记录氢气的增加量.气相色谱仪 beifen SE-206,使用 2 m 的内装 5 $\text{\AA}$ 分子筛的色谱柱,氦气为载气,气压 0.07 MP,柱温 60 $^{\circ}\text{C}$,热丝温度为 150 $^{\circ}\text{C}$,检测器型号为 TCD;在上述条件下,100 μL 标准氢气的峰面积是 448546.根据此公式计算体积为 1 L, A_{600} 值为 1 的菌液的放氢量.

(iv) 吸氢检测. 在 250 mL 血清瓶中装入 100 mL LAY 培养基,接种量为 10%,接种后用橡胶塞密封,用注射器注入终浓度为 55% (体积比,瓶内氢气与空气的体积比)的纯氢气,定时取样用气相色谱法测定摇瓶里气相中氢的浓度,记录氢气的减少量.

(v) Fe^{3+} 浓度测定. 在 pH 8~11 的氨溶液中,三价铁与磺基水杨酸生成稳定的黄色络合物,其反应式: $\text{Fe}^{3+} + 3\text{SSal}^{2-} = [\text{Fe}(\text{SSal})_3]^{3-}$; 式中, SSal^{2-} 为磺基水杨酸根离子,最大吸收波长 420 nm,颜色强度与铁的含 量成正比^[14]. Fe^{3+} 在不同 pH 下可以与磺基水杨酸形成不同组成和颜色的几种络合物. 在 pH 1.8~2.5 的溶液中,形成红紫色的 $[\text{Fe}(\text{SSal})]^{+}$; 在 pH 4~8 的溶液中,形成褐色的 $[\text{Fe}(\text{SSal})_2]^{-}$; 在 pH 8~11.5 的氨性溶液中,形成黄色的 $[\text{Fe}(\text{SSal})_3]^{3-}$; 若 pH > 12, 则不能形成络合物而生成氢氧化铁沉淀.

(1) 标准曲线的制定. 依样品中铁浓度范围取 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 的柠檬酸铁溶液为标准的铁浓度梯度溶液,取 1 mL 标准液,加入 200 μL 20%的磺基水杨酸溶液和 400 μL 1:1 氢氧化铵溶液,混匀,10 min 后,用分光光度计(BECKMAN DU 640)在 420 nm 处测定吸光值.

(2) 样品的测定. 定时抽取菌液,12000 $\times g$ 离心

1 min,取 1 mL 上清进行测定,方法与标准曲线测定相同.通过检测培养基中铁含量的减少来确定细胞的铁吸收量.

(vi) 磁小体的电子显微镜观察. 将磁螺菌菌液离心收集细胞,用 PBS 洗涤两次,取 1 滴菌液置于铜网上,静置 1 min,用滤纸从铜网侧面将水吸干,如此法用水洗两次.晾干后即可直接用于透射电子显微镜(Hitachi) H-7500 观察并拍照.

2 结果

2.1 *hup* 基因簇与 *hya* 基因簇的分析

从 *M. gryphiswaldense* MSR-1 的基因组中检索到了 2 个与氢酶相关的基因簇(图 1),对基因簇中含有的 ORFs 进行了 BLAST 分析. 结果表明,在基因组中的位置为 nt1809278~1822888,含有 14 个 ORFs. 按照功能不同可以将 *hup* 基因簇分为 3 类: 第一类 ORFs 位于基因簇的上游,推测其功能为氢酶的结构亚基,包括 *hupS*, *hupL*, *hybA* 和 *hycB*; 其中 *hupS* 的蛋白序列与 *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 和 *M. magneticum* AMB-1 中吸氢的膜结合态 NiFe-氢酶小亚基的同源性皆为 77%, *hupL* 的蛋白序列与 *M. magnetotacticum* MS-1 和 *M. magneticum* AMB-1 中吸氢的膜结合态 NiFe-氢酶大亚基的同源性皆为 84%,推测其功能为吸氢的膜结合态 NiFe-氢酶的大小亚基,与细胞膜呼吸链上的醌蛋白相联系,吸收 H_2 为细胞生长提供能量; *hybA* 的蛋白序列与 *M. magnetotacticum* MS-1 和 *M. magneticum* AMB-1 中吸氢的 NiFeSe-氢酶亚基的同源性分别为 59%和 57%,推测其功能为吸氢的 NiFeSe-氢酶的结构亚基; *hybB* 的蛋白序列与 *M. magneticum* AMB-1 和 *Dechloromonas*

图 1 *M. gryphiswaldense* MSR-1 氢酶基因簇结构

(a) 与吸氢酶合成相关的基因; (b) 与氢酶合成相关的基因

aromatica RCB 中吸氢的 NiFeSe-氢酶细胞色素 b 亚基的同源性分别为 59%和 51%, 推测其功能为吸氢的 NiFeSe-氢酶中细胞色素 b 的结构亚基。第二类 ORFs 位于基因簇的中游, 推测功能为和氢酶组装、成熟、表达有关的蛋白, 包括 *hybD*, *hypC1*, *hupK*, *hypA*, *hypB*, *hypF*, *hypC2*, *hypD* 和 *hypE*。第三类 ORFs 即 *hoxX*, 推测该基因编码蛋白的功能为一种氢酶活性调节因子。

hya 基因簇在基因组中的位置为 nt3760338~3765023, 其中含有 6 个 ORFs: *hycA*, 推测该蛋白的功能为一种铁氧还蛋白; *crpA* 编码蛋白的功能为结合 cAMP 的转录调节激活蛋白; *fnrA* 编码与 FAD/NAD (P)结合的氧化蛋白; *hyaA* 和 *hyaB* 编码蛋白的功能为放氢的可溶性 NiFe-氢酶的两个结构亚基, 其中 *hyaA* 的蛋白序列与 *Azotobacter vinelandii* AvOP 和 *Nitrococcus mobilis* Nb-231 的 NiFe-氢酶结构亚基的同源性分别为 66%和 64%, *hyaB* 的蛋白序列与 *Cyanotherce* sp. PCC 7425 和 *Thioalkalivibrio* sp. HL-EbGR7 的 NiFe-氢酶结构亚基的同源性皆为 54%; *iclR* 编码一种转录调节因子, 阻遏细菌在厌氧状态下某些基因的表达

2.2 *hupL* 缺失突变株与 *hupL* & *hyaB* 双缺失突变株的验证

筛选得到的 $Nx^rGm^rCm^s$ 接合子通过菌落 PCR 验证其正确。设计两对引物验证双交换突变株: P_A (5'-CCAATGCCGACATCGTAG-3'), P_B (5'-TCGGTA-AAGCCCACACC-3'), P_C (5'-CTCTCTATACAAAGT-TGGGC-3')与 P_D (5'-ACAGGTGGCGTGCATCTC-3') (图 2(a)). P_A 与 P_B 分别位于 *hupL* 5'侧翼的 3'端与 *hupL* 3'侧翼的 5'端。由于野生型菌株未发生交换含有完整的 *hupL* 基因, 因此能够扩增出约 2.8 kb 的片段; 而缺失突变株由于 *hupL* 被 Gm 抗性片段所替代, 只能扩增出约 1.5 kb 的片段。 P_C 与 P_D 分别位于 Gm 抗性片段的 3'端与 *hupL* 3'侧翼外的下游染色体上。由于野生型菌株的染色体上不存在 Gm 抗性片段, 因此在野生型菌株中扩增无条带, 而 *hupL* 缺失突变株能扩增出 1.3 kb 的条带。由图 2(b)结果可知, 筛选得到的 $Nx^rGm^rCm^s$ 接合子为正确的 *hupL* 缺失突变株。

在 L206 的基础上构建 *hupL*&*hyaB* 双缺失突变株 B206, 其鉴定方法与 L206 相同(图 2(a)), PCR 验证引物为: P_E (5'-TCTGCAACAGCCGCAAAG-3'), P_F (5'-AAGGCCTTGACGAAGTCGC-3'), P_G (5'-CTCTC-

TACAAAGTTGGGC-3')与 P_H (5'-CTTACGAAAAAG CCGGCC-3'), 结果表明, 以 MSR-1 为模板, P_E 和 P_F 扩增能够得到 3.1 kb 的片段, 而 P_G 和 P_H 扩增无任何条带; 以 B206 为模板, P_E 和 P_F 和 P_G 和 P_H 扩增得到 1.3 和 1.1 kb 的片段(图 2(c))。

2.3 吸氢和放氢检测

根据 2.1 的分析, *hup* 基因簇中的 *hupS*, *hupL* 为 NiFe-吸氢酶的两个结构基因, *hya* 基因簇中的 *hyaA*, *hyaB* 为 NiFe-氢酶的两个结构基因, 通过构建 L206 和 B206, 测定 3 种菌株在摇瓶同步培养时的吸氢量和放氢量, 验证这两个氢酶的功能。

图 3 为 3 种菌株在摇瓶同步培养时的吸氢结果。可以看出, 在培养的过程中 MSR-1 持续地吸收摇瓶中的氢气, 其氢气含量从 55%下降到了 15%左右, 说明 MSR-1 的吸氢能力较强, 而 L206 摇瓶中的氢气含量基本上没有降低, 推测其丧失了吸氢能力; 此结果

图 2 L206 和 B206 的鉴定

(a) 引物设计; (b) L206 的鉴定; (c) B206 的鉴定。 (b) 中 1 和 2 为以 MSR-1 基因组 DNA 为模板, 以 P_A , P_B 和 P_C , P_D 为引物的扩增产物; 3 和 4 为以 L206 基因组 DNA 为模板, 以 P_A , P_B 和 P_C , P_D 为引物的扩增产物。 (c) 中 1 和 2 为以 MSR-1 基因组 DNA 为模板, 以 P_E , P_F 和 P_G , P_H 为引物的扩增产物; 3 和 4 为以 B206 基因组 DNA 为模板, 以 P_E , P_F 和 P_G , P_H 为引物的扩增产物。 M 为标准分子量

图3 *M. gryphiswaldens* WT, L206 和 B206 摇瓶同步培养时吸氢量的变化

证明了 *hupL* 基因是吸氢酶的结构亚基, 将其插入突变后导致菌株吸氢酶失活; 而 B206 的吸氢结果和 L206 的结果类似, 说明 *hyaB* 编码的 NiFe-氢酶并没有明显的吸氢活性, 它的缺失对菌株吸氢没有显著影响, 可能为专一的放氢酶。

表2为3个供试菌株在有柠檬酸铁或无柠檬酸铁 LAY 培养基中培养条件下的放氢结果。MSR-1 和 B206 在两种条件下无氢气的释放, 而 L206 则在两种条件下培养时均能释放一定量的氢气。MSR-1 在培养的过程中有氢气产生, 但由于吸氢酶的吸氢作用, 在培养 MSR-1 时检测无氢气的释放。B206 在培养的过程中同样无氢气释放, 说明 *hyaB* 和 *hyaA* 所组成的氢酶在野生菌株中的作用是释放氢气, 此氢酶为专一的放氢酶; L206 在磁小体合成时释放的氢气量要明显高于在磁小体不合成时的量。细胞释放氢气的量与合成磁小体之间似乎存在某种联系。磁小体的合成是一个还原力积累的过程, 胞内还原力的积累不利于磁小体合成; 推测 MSR-1 放氢的目的是释放生长过程中主要是磁小体合成所积累的多余还原力, 促进磁小体的合成, 所以在磁小体合成过程中的放氢量相对较高。

2.4 摇瓶培养及铁吸收

从摇瓶培养的结果来看, 3 个菌株在无氢和加氢 (在无氢条件下气相组分为氧气和氮气, 体积比为 1:4, 在加氢条件下气相组分为氢气、氧气、氮气, 体积比为 1:1:3) 为培养时的生长速度存在明显差异 (图 4(a)), 在无氢培养条件下, L206 的生长速度最快, 经过大约 6 h 便进入对数生长期, MSR-1 和 B206 大约需要 8 h 才进入对数生长期。3 个菌株在加氢培养条件下的生长速度的差别与在无氢条件下类似 (图 4(b)), 氢气的存在对于两个突变株的生长速度没有显著影响; 但野生菌株 MSR-1 的生长速度有所放缓。由此单独比较了 MSR-1 在无氢和加氢两种条件下同步培养的生长曲线, 从图 4(c) 中可以看出, MSR-1 在无氢条件下的生长速度较快, 培养 24 h 后 A_{600} 为 0.8173, 明显高于在加氢条件下的 0.6650, 说明 MSR-1 的生长受到了氢的抑制。从以上的结果可以看出, 野生型细胞对于氢气吸收和释放的变化可以显著地影响细胞的生长速度。

为探讨细胞氢代谢和铁吸收的关系, 测定了 3 种菌株在无氢和加氢摇瓶培养时的铁吸收变化曲线, 结果如图 5。从图中所示的结果来看: 在无氢和加氢两种条件下, L206 铁吸收速度最快, 铁吸收量在无氢条件为 $19.59\ \mu\text{m}$, 加氢条件下为 $13.75\ \mu\text{m}$, 是最高的; MSR-1 和 B206 在铁吸收速度和铁吸收量上的结果类似, 均低于 L206。MSR-1 的铁吸收量在无氢条件为 $14.79\ \mu\text{m}$, 加氢条件下为 $12.47\ \mu\text{m}$, 说明吸氢会影响 MSR-1 的铁吸收。从以上的结果可以看出, 磁螺菌的氢代谢情况的变化对铁吸收的影响和对其细胞生长的影响是类似的, 即吸氢对细胞生长和铁吸收存在抑制作用, 放氢对两者存在促进作用。

2.5 细胞内磁小体电子显微镜观察结果

定时取样经电子显微镜观察细胞合成磁颗粒的情况, 结果如图 6。L206 在培养 8 h 后细胞中已出现

表 2 *M. gryphiswaldens* MSR-1 及其突变株在磁小体合成与磁小体不合成条件下的氢产量^{a)}

菌株	基因型	氢产量 ^{b)} /mL		A_{600}	
		LAY 培养基	无柠檬酸铁 LAY 培养基	LAY 培养基	无柠檬酸铁 LAY 培养基
MSR-1	WT	ND ^{c)}	ND	0.1421	0.1390
L206	$\Delta hupL$	5.87	3.32	0.1387	0.1410
B206	$\Delta hupL\&\Delta hyaB$	ND	ND	0.1324	0.1293

a) 每个数据为 3 次重复的平均值; b) 体积为 1 L, A_{600} 值为 1 的菌液的放氢量; c) ND, 无氢气检出

图4 *M. gryphiswaldens* WT, L206 和 B206 无氢摇瓶同步培养生长曲线(a), 加氢摇瓶同步培养生长曲线(b)与 WT 无氢/加氢摇瓶同步培养生长曲线(c)

较多分散的磁小体, 12 h 时可观察到明显的磁小体个数增多但尚未排列成链. MSR-1 和 B206 合成磁颗粒的速度和磁小体成链的速度均低于 L206, 吸氢酶的缺失有利于磁小体的合成. 与其铁吸收速度的差异是相符的.

3 讨论

本研究成功构建了 *hupL* 缺失突变株 L206 和 *hupL&hyaB* 双缺失突变株 B206; 通过测定野生型菌株和突变株在摇瓶同步培养的吸氢量和放氢量, 证明了 HupSL 为专一性的吸氢酶, HyaAB 为专一性的放氢酶, 两者协同作用, 调节磁螺菌的氢代谢的平衡.

实验探讨了菌株氢代谢与磁小体合成之间的联系, 发现当吸氢酶缺失后, 其生长速度、铁吸收速度

加快, 铁吸收量有所提高, 磁小体链的成熟时间也有所提前; 当氢酶缺失后, 细胞不再放氢, 导致细胞生长、铁吸收和磁小体合成均受到抑制.

微生物的氢代谢与其胞内能量代谢和还原力水平密切相关, 厌氧的梭菌缺乏细胞色素系统和氧化磷酸化机制, NADH 的形成过程快于其氧化过程, 所以细胞通过氢酶释放氢气而解除细胞中过剩的还原力^[15,16]; 根瘤菌(*Rhizobium*)、深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)在固氮过程中会释放大量的氢气, 通过吸氢酶回收氢气, 回收能量和还原力供给固氮酶^[7,17]. 本室前期的研究证明, MSR-1 菌株为一典型微耗氧菌, 合成磁小体时需控制氧分压, 且细胞合成磁小体的过程中会产生大量的还原力, 检测到 MSR-1 在培养基铁浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胞内还原力的水

图5 *M. gryphiswaldens* WT, L206 和 B206 无氢(a)/加氢(b)摇瓶同步培养的铁吸收曲线

图6 透射电子显微镜观察磁螺菌不同培养时间的细胞

平比培养基仅含痕量铁时高 20%^[8], 细胞通过合成 PHB 和释放氢气来排解多余的还原力. L206 丧失了吸氢能力, 其胞内多余还原力会被快速释放, 从而有利于磁小体合成; 野生型菌株吸氢能力很强, 可以将生长过程中释放的氢气重新吸收回来, 而 B206 的氢酶基因被缺失后, 丧失了一条释放还原力的途径, 两者胞内多余的还原力不能及时得到释放, 从而导致磁小体合成受到抑制.

由此可见, 磁螺菌在磁小体合成过程中, 不仅需要直接参与磁小体合成的基因, 同时细胞内还原力水平的调节和铁吸收强度还受胞内其他酶类的影响, 该菌株吸氢酶和放氢酶可能是参与调节的蛋白之一.

随着对磁小体功能研究的深入, 人们发现磁小体除了能够赋予磁细菌微型磁针的特性, 使其具有趋磁趋氧的特点外, 可能还具有能量储存、氧化还原循环和铁储存等其他功能. Spring 等人^[18]提出磁小体膜上可能存在第二条呼吸链, 使磁小体的合成与 Fe(II) 的氧化相偶联, 同时产生的电子传递给氧, 在经过质子浓度梯度生成 ATP. 本实验证实了细胞氢代谢对于细胞生长、铁吸收有显著的影响; 细胞可能通过吸氢和放氢来调节胞内还原力的释放速度, 进而调节细胞内磁小体的合成所需的氧浓度, 从细胞氢代谢的角度间接表明了磁小体合成可能是一个还原力的积累过程, 与报道的磁小体合成与氧化还原循环有关这一结论吻合.

参考文献

- Teixeira M, Fauque G, Moura I, et al. Nickel-[iron-sulfur]-selenium-containing hydrogenases from *Desulfovibrio baculatus* (DSM 1743). Redox centers and catalytic properties. *Eur J Biochem*, 1987, 167: 47—58
- Vignais P M, Billoud B, Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, 25: 455—501
- Vignais P M, Colbeau A. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol*, 2004, 6: 159—188
- Kow Y W, Burris R H. Purification and properties of membrane-bound hydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol*, 1984, 159: 564—569
- Vignais P M, Billoud B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chem Rev*, 2007, 107: 4206—4272
- Stal L J, Moezelaar R. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 21: 179—211
- Maness P C, Weaver P F. Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57: 751—756
- 刘江宁. 格瑞菲斯瓦尔德磁螺菌磁小体高产菌株的构建及磁小体合成相关基因的研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学生物学院, 2008. 53—67
- Richter M, Bazylinski D A, Schüler D, et al. Comparative genome analysis of four magnetotactic bacteria reveals a complex set of group-specific genes implicated in magnetosome biomineralization and function. *J Bacteriol*, 2007, 189: 4899—4910
- 姜伟, 赵德华, 李颖, 等. 固氮条件下 Greifswald 磁螺菌的深层培养及其固氮活性的调节. *科学通报*, 2002, 47: 1722—1725
- 李峰, 李颖, 姜伟, 等. *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 磁小体缺失突变株 NM4 Tn5 侧翼序列的克隆及功能分析. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35: 349—358
- Liu J, Ding Y, Jiang W, et al. A mutation upstream of an ATPase gene significantly increases magnetosome production in *Magnetospirillum*

- lum gryphiswaldense*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 81:551—558
- 13 Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
 - 14 Park M V. Complexes of ferric ion with salicylic acid and related substances. Nature, 1963, 197: 283
 - 15 Santangelo J D, Dürre P, Woods D R, et al. Characterization and expression of the hydrogenase-encoding gene from *Clostridium acetobutylicum* P262. Microbiology, 1995, 141(Pt 1): 171—180
 - 16 Kaji M, Taniguchi Y, Matsushita O, et al. The *hydA* gene encoding the H₂ evolving hydrogenase of *Clostridium perfringens*: Molecular characterization and expression of the gene. FEMS Microbiol Lett, 1999, 181: 329—336
 - 17 Dixon R O. Nitrogenase-hydrogenase interrelationships in rhizobia. Biochimie, 1978, 60: 233—236
 - 18 Spring S R, Amann W, Petersen N, et al. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 2397—2403

· 动 态 ·

小鼠肝脏细胞中 UCP2 的靶向表达可提高对肝损伤的敏感性

虽然肝脏枯否细胞中表达解耦联蛋白-2(UCP2), 但成年人正常肝脏细胞并不表达内源性 UCP2, 而在脂肪肝和肥胖者体内肝细胞却被诱导表达 UCP2. UCP2 与肝脏病变和损伤发生的直接关系目前还不清楚. 中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室陈伦研究小组与合作者发现, 小鼠肝脏中 UCP2 的靶向表达可以提高其对脂多糖(LPS)和半乳糖胺(GalN)诱导的急性肝损伤的敏感性. UCP2 可以增强质子渗漏, 导致二磷酸鸟苷抑制方式的去耦联. 上述小鼠肝脏的线粒体可出现呼吸作用提高、呼吸控制率下降、三磷酸腺苷(ATP)水平下降等表征, 改变了

线粒体的生理状态. 进一步研究发现, 降低的 ATP 水平可以导致 5'AMP 激活蛋白激酶(AMPK)和下游效应分子 c-Jun N 端激酶的激活, 提高了对 LPS/GalN 诱导凋亡的敏感性. 更为重要的是, 研究人员发现抑制 UCP2 的活性可以阻止 LPS/GalN 诱导的 ATP 下降、AMPK 激活和凋亡; 而抑制 ATP 的产生在体内或体外可以促进 LPS/GalN 诱导的细胞死亡. 因此, 肝脏中 UCP2 的靶向表达可能导致有害的线粒体生理变化, 导致细胞死亡增加. 相关研究论文发表在 2009 年 10 月 *Hepatology*, 50(4): 1204—1216 上.

(信息来源: 科学技术部《基础科学研究快报》)