

嗜酸氧化亚铁硫杆菌中锌离子转运基因的鉴定与分析

侯冬梅¹, 苗 博¹, 王洋洋¹, 张云静¹, 刘代刚¹, 吴学玲²

(1. 中南大学 资源加工与生物工程学院, 长沙 410083;

2. 中南大学 教育部生物冶金重点实验室, 长沙 410083)

摘 要: 鉴定了 *Acidithiobacillus ferrooxidans* DC (*At. ferrooxidans* DC) 中与锌离子转运相关的 4 个 ATP-binding cassette (ABC) transporter 基因, 并采用 Reverse Transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) 技术分析在不同浓度的锌离子胁迫下这 4 个 ATP-binding cassette (ABC) transporter 基因在转录水平上的差异表达情况。然后利用 Vector NTI、cluster X、BLAST、ORF Finder 等生物信息学软件对各基因做进一步的生物信息学分析。结果表明: 在锌离子胁迫下, 4 个 ABC transporter 基因(AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438)的表达量均有所上调, 说明这 4 个基因对于锌离子的胁迫具有很强的敏感性。经生物信息学分析可知, 基因 AFE_2435 和 AFE_2436 编码位于细胞质膜上的透性酶, AFE_2437 编码位于细胞质膜上的 ATP 结合蛋白, AFE_2438 编码位于周质空间的锌离子结合蛋白, 这 4 个基因共同组成了一个与锌离子转运有关的 ABC 转运子。这些结果都表明这 4 个 ABC transporter 基因与 DC 菌中锌离子的转运有着密切的关系。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; ABC transporter; RT-qPCR; 锌离子胁迫; 生物信息学分析

中图分类号: Q819

文献标志码: A

Identification and analysis of zinc transport genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans*

HOU Dong-mei¹, MIAO Bo¹, WANG Yang-yang¹, ZHANG Yun-jing¹, LIU Dai-gang¹, WU Xue-ling²

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Changsha 410083, China;

2. Key Laboratory of Biometallurgy, Ministry of Education, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: In this study, four ATP-binding cassette (ABC) transporter genes of *Acidithiobacillus ferrooxidans* DC (*At. ferrooxidans* DC) were identified, and differential transcription of these genes during zinc ion stress were investigated by Reverse Transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). And then, the genes involved in zinc ion transport were analyzed by bioinformatics software. The results show that the expressions of the four ABC transporter genes are increased differently under zinc ion stress, indicating that these genes are sensitive to zinc levels. Bioinformatics analysis shows that the proteins encode by AFE_2435, AFE_2436 are predicted to be permease proteins, whereas the protein encode by AFE_2437 is a putative ATP-binding protein and AFE_2438 encoded a putative periplasmic cation-binding protein. The four genes together form an ABC transporter for zinc ion transport. These results strongly suggest that the four ABC transporter genes might be directly involved in zinc transport in *Acidithiobacillus ferrooxidans* DC.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; ABC transporter; RT-qPCR; zinc ion stress; bioinformatics analysis

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)^[1] 是一种重要的浸矿菌种, 在工业上经常被用作还原金、银、铜、铀等重金属^[2]。在这些菌种

生活的环境中, 通常都含有较高浓度的重金属, 因此, 像大部分的浸矿菌一样, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*At. ferrooxidans*) 对很多重金属都具有很高的耐受能

力^[3]。近年来, *At. ferrooxidans* 对重金属的这种高耐受能力越来越引起人们的关注^[4]。尽管 *At. ferrooxidans* 标准菌 ATCC23270 的全基因组序列已在 2007 年被全部测出, 但是却很少有基因^[5-8]被证明与这种高抗性能的体现有直接关系。

锌对于生物体来说是一种必须的微量元素, 许多重要的功能蛋白和酶都需要锌作为其结构或者是辅助因子^[9-10]。但是, 一旦体内的锌离子浓度过高, 将会对呼吸链产生抑制从而对细胞造成毒害作用^[11-12]。因此, 细胞需要调节其体内的锌离子含量在一个合适的水平。近年来有研究报道 *At. ferrooxidans* 对锌离子具有很高的耐受能力, 它可以在 30 g/L 的锌离子环境中生存^[13]。然而, 什么机制使 *At. ferrooxidans* 具有如此高的抗锌能力, 至今仍不清楚。关于锌离子的转运机制, 研究较多的是一种存在于大肠杆菌中的依赖于 ATPase 的 ABC 转运子—ZnuABC^[14-15], 它主要负责从外界环境中摄取锌离子。通常来说, 这种 ABC 转运子^[14]主要由绑定在周质空间上的锌离子结合蛋白 ZnuA、两个透性酶 ZnuB 以及为此过程提供能量的 ATP 结合蛋白 ZnuC 组成。锌离子的这种转运机制在其他的菌种中也普遍存在^[16-17], 例如: 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), 格氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*), 肠道沙门氏杆菌 (*Salmonella enterica*)。

2007 年 CHI 等^[18]对可能存在于 *At. ferrooxidans* ATCC2327 周质空间上的蛋白进行了鉴定, 推测 AFE_2438 所编码的蛋白是一种位于周质空间上的锌离子转运蛋白, 它的功能可能类似与 ZnuABC 中的锌离子绑定蛋白 ZnuA。而位于其下游的基因 AFE_2437、AFE_2436、AFE_2435 与其一起共同组成一个 ABC 转运子, 完成锌离子的转运。尽管如此, 至今仍没有任何实验数据证明这 4 个基因与 *At. ferrooxidans* 中的锌离子转运有关。

本文作者以这 4 个基因(AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438)作为研究对象, 利用实时荧光定量 PCR 技术^[19]验证在不同浓度的锌离子刺激下它们在基因转录水平上差异表达情况, 并通过生物信息学手段对这 4 个基因及其编码的蛋白进行结构和功能的预测。

1 实验

1.1 材料

1.1.1 菌种与培养基

At. ferrooxidans DC 由中南大学生物冶金教育部

重点实验室从取自广西大厂铜矿的酸性矿坑废水中分离得到。

At. ferrooxidans DC 生长于 9K 基础培养基^[20], 30 °C, 170 r/min 摇床无菌培养。能源物质为单质硫: 10 g/L。

1.1.2 其他试剂

DNA 提取试剂为 EZ-10 spin column genomic DNA isolation kit (BioBasic Inc.), DNA 凝胶回收试剂盒为(E. Z. N. A. TM Gel Extraction Kit. Promega), RNA 提取试剂为 Trizol(Invitrogen), RNA 纯化试剂盒为 SV Total RNA Isolation System(Promega); RNA 反转录试剂为 SuperScriptTM II 反转录酶(Invitrogen)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种收集

前期预实验表明 *At. ferrooxidans* strain DC 能够耐受较高浓度的锌离子, 但是其生长繁殖情况会受到一定的抑制, 本实验中选用 1、10 和 100 mmol/L Zn²⁺ 作为锌离子刺激环境。首先将 *At. ferrooxidans* strain DC 接种至不含锌离子的标准培养基, 培养至对数期时离心收集菌种(4 °C, 10 min, 12 000 r/min), 再将所收集的菌种等量接种于含有 0、1、10 和 100 mmol/L Zn²⁺ 的 9K 培养基中, 分别培养 24 h 后, 再次离心收集菌种, 马上进行 DNA 和 RNA 提取步骤。

1.2.2 DNA 提取及 *Znu_{AF}* 基因的克隆测序

细菌基因组提取使用 EZ-10 spin column genomic DNA isolation kit。以提取后的 DC 基因组为模板扩增基因 AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438。PCR 扩增条件为: 预变性: 94 °C, 3 min; 变性: 94 °C, 45 s, 退火: 60 °C, 45 s, 延伸: 72 °C, 90 s, 共 30 个循环; 延伸: 72 °C, 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后切胶, 回收, 送去上海生物工程公司测序。实验中所用到的引物如表 1 所列。

1.2.3 RNA 提取与 cDNA 的合成

采用 Trizol 一步法提取总 RNA, 用 RNA 纯化试剂盒(Promega)纯化粗 RNA, 用 NanoDrop 微量分光光度计(NanoDrop Technologies)检测 RNA 的浓度和纯度。取等量的 RNA 进行反转录, 反转录采用 Invitrogen 公司 SuperScriptTM II 反转录酶和随机引物, 以总 RNA 中 mRNA 为模板, 反转录合成 cDNA, 反转录后用 NanoDrop 微量分光光度计测定每一个 cDNA 的浓度, 然后将 cDNA 样品浓度均调至 200 mg/L, 于 -20 °C 冷藏备用。

1.2.4 Real-time qPCR

1.2.4.1 标准样品的制备

分别以目标基因及内参基因为样品, 以 cDNA 为模板进行普通 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。然后将 PCR 产物进行 10 倍梯度稀释, 取 10^{-3} ~ 10^{-7} 做标准品用于制备标准曲线, 做 5 个点。普通 PCR 程序如下: 预变性: 94 ℃, 3 min; 变性: 94 ℃, 30 s, 退火: 55 ℃, 30 s, 延伸: 72 ℃, 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 补平 5 min。

1.2.4.2 实时定量 PCR

Real-time qPCR 反应程序如下: 预变性: 95 ℃, 3 min ; 变性: 95 ℃, 30 s, 退火: 59 ℃, 20 s, 延伸 72 ℃, 20 s, 共 40 个循环; 55~95 ℃, 10 s, 每循环一次温度增加 0.5 ℃, 共 80 个循环。每组实验设置 3 个平行, 选用 16S rRNA 为内参基因^[5], 阴性对照不加任何模板。

表 1 常规 PCR 引物

Table 1 Primers used in Taq PCR

Loci	Annotated function	Primer sequence (5'-3')	Amplicon length/bp
AFE_2435	Cation ABC transporter, permease protein, putative	F ₁ :CCACACCCTCTATGAAAACG R ₁ :GTTACTACTGGTTTTCCGGT	1 266
AFE_2436	Cation ABC transporter, permease protein, putative	F ₁ :CAAAAACCAGCAACCCGATC R ₁ :GATGTCGCTGCTGAAGATGC	1 175
AFE_2437	Cation ABC transporter, ATP-binding protein, putative	F ₁ :TCCACCGCCATCAACATCAT R ₁ :TCTTGGATGCTGGCGGAGGT	1 429
AFE_2438	Cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative	F ₁ :CCCGCACCATTTCTACCGAT R ₁ :TGACCGAGATAGACCGTGAC	1 531

F1 and R1 are Taq-PCR primers for cloning AFE_2435, AFE_2436 AFE_2437 and AFE_2438 genes from chromosomal DNA preparations of *At. ferrooxidans* DC.

表 2 RT-qPCR 引物

Table 2 Primers used in RT-qPCR

Loci	Annotated function	Primer sequence (5'-3')	Amplicon length/bp
AFE_2435	Cation ABC transporter, permease protein, putative	F ₂ :CAGTATGACCAGTGCGTATGC R ₂ : AGAGCGATGCCACAACCA	126
AFE_2436	Cation ABC transporter, permease protein, putative	F ₂ : TGACGACCACCAGCACTAC R ₂ : GACCCACCAGCAAGAACAC	123
AFE_2437	Cation ABC transporter, ATP-binding protein, putative	F ₂ : GTTGTGTTGGGAGATTGACGC R ₂ :CCACCAGATAGACCAGACGG	104
AFE_2437	Cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative	F ₂ :TTGACGGCTTCTTTCCTGAGT R ₂ : TACCTCCGCCAGCATCCAA	111
AFE_0254	16S rRNA	F:AGAACCTTACCTGGGCTTGA R: GCTCGTTGCGGGACTTA	135

F2 and R2 are RT-qPCR primers for cloning oligonucleotide of AFE_2435, AFE_2436 AFE_2437 and AFE_2438 genes from cDNA.

F and R are RT-qPCR primers for cloning oligonucleotide of 16S rRNA gene from cDNA.

实验结束后, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[7, 21]处理数据, 即通过与对照组基因表达量的对比计算出每个基因的相对表达量, 且每个基因都以 16S rRNA 作为内参基因进行了校正。实验中所用到的引物如表 2 所列。

1.2.5 生物信息学分析

用 Vector NTI (version 7.1)做一般序列操作。用 cluster X 做序列比对。BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 做相似性搜索。ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找基因的开放阅读框。ExPASy Proteomics Server (http://expasy.org/cgi-bin/pi_tool) 进行蛋白质等电点以及相对分子量的计算。PSORTb v.3.0 (<http://www.psort.org/psortb>) 做蛋白亚细胞结构定位。TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk//serve-s/>)

TMHMM-2.0)做蛋白质的跨膜分析。NCBI conserved domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 找寻蛋白的保守区域。

2 结果

2.1 *Znu_{Af}* 基因的克隆测序

以 *At. ferrooxidans* DC 基因组为模板扩增得到 AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438 的基因片段,电泳检测结果如图 1 所示,扩增产物长度与目标基因长度基本相同,且均无杂带,引物特异性较好。4 个基因的测序结果经 BLAST 进行序列比对,结果与嗜酸氧化亚铁硫杆菌标准菌株 ATCC 23270 中的这 4 个基因的序列完全相同。

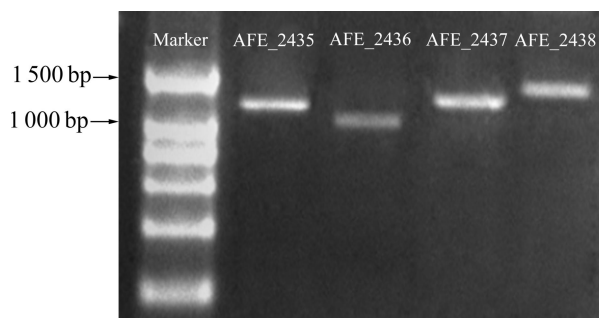


图 1 目的基因 AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438 的 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis analyses of PCR products of AFE_2435, AFE_2436, AFE_2437 and AFE_2438

2.2 不同浓度 Zn^{2+} 刺激下相关基因的差异表达

实时荧光定量 PCR 后,溶解曲线峰带单一,没有杂峰出现,说明特异性较好;标准曲线 R^2 值均接近于 1,说明 Ct 值与其起始拷贝数的对数值之间的关系性好;内参基因 16S rRNA 在不同环境中的表达量均较为恒定,无显著性差异。经内参基因校正,各基因在转录水平上的相对表达量如图 2 所示。在不同浓度的锌离子刺激下,4 个基因(AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438)的表达量均有所上调,且随着锌离子浓度的增加,各基因上调的倍数也有所增加。AFE_2435 和 AFE_2436 上调最为明显,1 mmol/L Zn^{2+} 刺激时,AFE_2435 上调了 16 倍,AFE_2436 上调了 33 倍,而此时 AFE_2438 仅上调了 9 倍,AFE_2437 仅上调了 3 倍。当锌离子浓度增加到 10 mmol/L 时,AFE_2435 上调的倍数高达 230 倍,AFE_2436 上调的倍数为 270 倍,AFE_2438 上调的倍数为 77 倍,虽然

此时 AFE_2437 的表达量也有所增加,但是与其他 3 个基因相比较,AFE_2437 的上调幅度较小,当锌离子浓度为 10 mmol/L 时仅上调了 5 倍。当锌离子浓度为 100 mmol/L 时,4 个基因的表达量与未加锌离子刺激的基因表达量相比较,均呈现出明显的上调趋势,AFE_2435 上调了 442 倍,AFE_2436 上调了 512 倍,AFE_2437 上调了 22 倍,AFE_2438 上调了 321 倍。

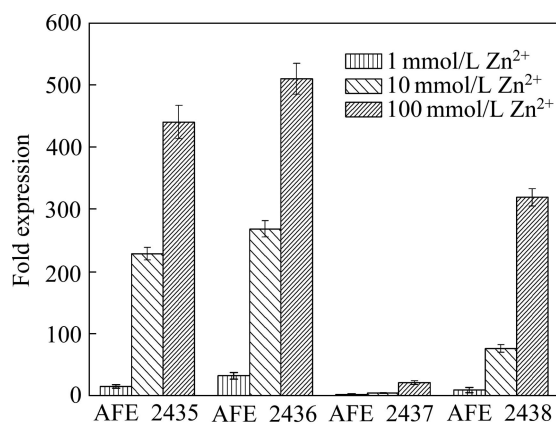


图 2 不同锌离子刺激条件下 AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438 的差异表达

Fig. 2 Differential expressions of genes (AFE_2435, AFE_2436, AFE_2437 and AFE_2438) under different Zn^{2+} concentrations

2.3 生物信息学分析

本研究对实验中涉及到的 4 个基因(AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438) 以及其编码的蛋白进行了相关的生物信息学分析。在此将它们所编码的蛋白分别命名为: *ZnuB1_{Af}*、*ZnuB2_{Af}*、*ZnuC_{Af}* 和 *ZnuA_{Af}*。通过对 4 个基因进行开放阅读框的找寻以及等电点和分子量的计算可知:基因 AFE_2435 的开放阅读框的长 810 bp;它所编码的蛋白 *ZnuB1_{Af}* 的相对分子质量为 28 572.27 Da,等电点为 10.1。基因 AFE_2436 含有一个长为 891 bp 开放阅读框;它所编码的蛋白 *ZnuB2_{Af}* 的相对分子质量为 30 704.72 Da,等电点为 9.04。基因 AFE_2437 的开放阅读框长 825 bp, *ZnuC_{Af}* 的相对分子质量为 29 068.60 Da,等电点为 6.66。而基因 AFE_2438 的开放阅读框的长度为 513 bp,其编码的蛋白 *ZnuA_{Af}* 的相对分子质量为 31 739.21 Da,等电点为 8.51。

为了更进一步了解这 4 个蛋白所行使的功能,还对 *ZnuB1_{Af}* 等 4 个蛋白进行了亚细胞结构定位、跨膜结构域分析以及保守区域的分析。结果表明: *ZnuB1_{Af}* 与 *ZnuB2_{Af}* 均位于质膜上,其中 *ZnuB1_{Af}* 有 6 次跨膜, *ZnuB2_{Af}* 有 7 次跨膜,保守区域分析表明 *ZnuB1_{Af}* 与

*ZnuB2_{Af}*含有相同的保守区域 cd06550, 该保守区域是 TM_ABC_iron-siderophores_like super family 所特有的; *ZnuC_{Af}*也位于细胞质膜上, 但是它并不存在跨膜结构域, 经比对发现 *ZnuC_{Af}* 的保守区域与 P-loop NTPase surper family 家族中的蛋白高度相似, 而且 *ZnuC_{Af}* 还具有与该家族蛋白相同的保守基序 (-LSGGQ); *ZnuA_{Af}* 是 4 个蛋白中唯一一个位于周质空间上的蛋白, 它也不存在跨膜结构域, 它的保守区域与 TroA-like family 中的保守区 cd01020 高度相似。

3 讨论与分析

本实验中, 对 *At. ferrooxidans* DC 中 4 个与锌离子转运相关的基因(AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438)进行了克隆、测序, 并应用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)^[22-24]技术来检测不同浓度锌离子刺激下这 4 个基因的相对表达量。实验中所选用的内参基因为 16S rRNA。虽然近年来有研究认为, 在某些情况下以 16S rRNA 作为内参基因校正基因的相对表达量时可能存在误差^[25], 但是在本实验中 16S rRNA 在不同锌离子环境中的表达量均相对稳定, 因此可以作为内参基因。RT-qPCR 结果表明, 对于锌离子的胁迫, 这 4 个基因都具有很强的敏感性, 在较低浓度(1 mmol/L)刺激时, AFE_2435 和 AFE_2436 的反应较大, 分别上调了 16 倍和 33 倍数; 随着锌离子浓度的升高, 其它两个基因的表达量也出现了明显的上调趋势, 当锌离子刺激浓度达到 100 mmol/L 时, AFE_2437 上调了 22 倍, AFE_2438 上调了 321 倍, 而此时 AFE_2435 和 AFE_2436 的上调倍数分别达到了 442 倍和 512 倍。此实验数据表明, *At. ferrooxidans* DC 中的这 4 个基因(AFE_2435, AFE_2436, AFE_2437, AFE_2438) 对于锌离子的胁迫非常敏感。这 4 个基因可能与其能够耐受较高浓度的锌离子有着密切的关系。

生物信息学的分析结果表明: 基因 AFE_2435 和 AFE_2436 所编码的蛋白 *ZnuB1_{Af}*与 *ZnuB2_{Af}*与位于质膜上的铁载体蛋白有着相同的保守区域, 这个家族中的蛋白通常是作为 ABC 转运子^[26]的一个组件而存在。*ZnuC_{Af}* 的保守区域属于 P-loop NTPase surper family, 该家族中的蛋白含有 ATP 或者 GTP 的结合位点, 它们与 iron-siderophores uptake family 拥有共同的祖先, 这两个家族中的蛋白都与锌离子、锰离子、铁离子的转运密切相关。*ZnuA_{Af}*属于 TroA-like family, 这个家族中的蛋白在 ABC 转运子转运金属离子的过程中担当金属离子的受体。综上所述, 可以推断在 *At.*

ferrooxidans DC 转运锌离子的过程中, *ZnuB1_{Af}*、*ZnuB2_{Af}*、*ZnuC_{Af}*、*ZnuA_{Af}*共同组成了一个转运 Zn^{2+} 的 ABC 转运子, 其中 *ZnuA_{Af}*主要负责在周质空间中绑定锌离子, *ZnuB1_{Af}*和 *ZnuB2_{Af}*作为透性酶负责锌离子向细胞内的运输, *ZnuC_{Af}*作为 ATP 结合蛋白为此过程提供能量。

4 结论

1) 首次鉴定了 *At. ferrooxidans* DC 中与 Zn^{2+} 转运相关的 4 个 ATP-binding cassette (ABC) transporter 基因。

2) 在不同浓度锌离子刺激下, *At. ferrooxidans* DC 中的这 4 个 ABC transporter 基因(AFE_2435, AFE_2436, AFE_2437, AFE_2438)的相对表达量均呈上调趋势, 说明这 4 个 ABC transporter 基因对于锌离子的胁迫非常敏感。

3) 经生物信息学分析可知基因 AFE_2435 和 AFE_2436 所编码的蛋白是位于细胞质膜上的透性酶, 基因 AFE_2437 编码的蛋白也位于细胞质膜上, 是一种 ATP 结合蛋白, 而基因 AFE_2438 编码位于周质空间的锌离子结合蛋白, 这 4 个基因共同组成了一个与锌离子转运有关的 ABC 转运子。

4) 推断 *At. ferrooxidans* DC 中的这 4 个 ABC transporter 基因(AFE_2435、AFE_2436、AFE_2437、AFE_2438)对于其能够耐受较高浓度的锌离子刺激有着密切的关系。

REFERENCES

- [1] INGLEDEW W J. *Thiobacillus ferrooxidans*: The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph[J]. Biochim Biophys Acta, 1982, 683(2): 89-117.
- [2] RAWLINGS D E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4: 13.
- [3] DOPSON M, BAKER-AUSTIN C, KOPPINEEDI P R, BOND P L. Growth in sulfidic mineral environments: Metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms[J]. Microbiology, 2003, 149: 1959-1970.
- [4] RAWLINGS D E, KUSANO T. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1994, 58(1): 39-55.
- [5] NAVARRO C A, ORELLANA L H, MAURIACA C, JEREZ C A. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus*

- ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper[J]. Applied Environmental Microbiology, 2009, 75: 6102–6109.
- [6] LUO Y J, LIU Y D, ZHANG C G, LUO H L, GUAN H, LIAO H H, QIU G Z, LIU X D. Insights into two high homogenous genes involved in copper homeostasis in *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Current Microbiology, 2008, 57: 274–280.
- [7] FERRAZ L F C, VERDE L C L, REIS F C, ALEXANDRINO I F, FELI'CIO A P, NOVO M T M, GARCIA O Jr, OTTOBONI L M M. Gene expression modulation by chalcopyrite and bornite in *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Archives of Microbiology, 2010, 192: 513–540.
- [8] PAULINO L C, de MELLO M P, OTTOBONI L M M. Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction[J]. Electrophoresis, 2002, 23: 520–527.
- [9] VALLEE B L, AULD D S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins[J]. Biochemistry, 1990, 29(24): 5647–5659.
- [10] PATZER S I, HANTKE K. The *ZnuABC* high-affinity zinc uptake system and its regulator *Zur* in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 1998, 28(6): 1199–1210.
- [11] KASAHARA M, ANRAKU Y. Succinate- and NADH oxidase systems of *Escherichia coli* membrane vesicles: Mechanism of selective inhibition of the systems by zinc ions[J]. The journal of Biochemistry, 1974, 76(5): 967–976.
- [12] BEARD S J, HUGHES M N, POOLE R K. Inhibition of the cytochrome bd-terminated NADH oxidase system in *Escherichia coli* K-12 by divalent metal cations[J]. FEMS Microbiol Letters, 1995, 131(2): 205–210.
- [13] CABRERA G, GO'MEZ J M, CANTERO D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 2683–2697.
- [14] PATZER S I, HANTKE K. The zinc-responsive regulator *Zur* and its control of the *znu* gene cluster encoding the *ZnuABC* zinc uptake system in *Escherichia coli*[J]. The journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 24321–24332.
- [15] GRASS G, WONG M D, ROSEN B P, SMITH R L, RENSING C. *ZupT* is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184: 864–866.
- [16] NIES D H. Microbial heavy-metal resistance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51: 730–750.
- [17] CAMPOY S, JARA M, BUSQUETS N, PE'REZ de ROZAS A M, BADIOLA I, BARBE J. Role of the high-affinity zinc uptake *znuABC* system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence[J]. Infection and Immunity, 2002, 70: 4721–4725.
- [18] CHI A, VALENZUELA L, BEARD S, MACKEY A J, SHABANOWITZ J, HUNT D F, JEREZ C A. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Molecular and Cellular Proteomics, 2007, 6(12): 2239–2251.
- [19] ZAMMINT C M, MUTCH L A, WATLING H R, WATKIN E L J. Evaluation of quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of biomining microorganisms in culture[J]. Hydrometallurgy, 2008, 94: 185–189.
- [20] WU Xue-ling, DING Jian-nan, GAO Jian, LIU Xing-xing, QIU Guan-zhou. Isolation and identification of metal-resistant iron-oxidizing bacteria[J]. Minerals and Metallurgical Processing, 2007, 24: 57–60.
- [21] XU Ai-ling, XIA Jin-lan, LIU Ke-ke, LI Li, YU Yang, NIE Zhen-yuan. Real-time PCR analysis of metabolic pathway of PHB in *acidiphilium cryptum* DX1-1[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20: 71–77.
- [22] 刘小荣, 张 笠, 王勇平. 实时荧光定量 PCR 技术的理论研究及其医学应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(2): 329–332.
- LIU Xiao-rong, ZHANG Li, WANG Yong-ping. Theory study and medical application of real-time quantitative polymerase chain reaction[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(2): 329–332.
- [23] 徐小刚, 刘雅婷. 实时荧光定量 PCR 在植物病害中的应用[J]. 中国农学通报, 2009, 25(7): 52–56.
- XU Xiao-gang, LIU Ya-ting. Application of real-time fluorescence quantitative PCR in plant disease[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(7): 52–56.
- [24] SCHMITTGEN T D, ZAKRAJSEK B A, MILLS A G, GORN V, SINGER M J, REED M W. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: Comparison of endpoint and real-time methods[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 285: 194–204.
- [25] NIETO P A, COVARRUBIAS P C, JEDLICKIL E, HOLMES D S, QUATRINI R. Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: Case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. BMC Molecular Biology, 2009, 10: 63. doi:10.1186/1471-2199/10/63.
- [26] LOCHER K P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters[J]. Philosophical Transaction of the Royal Society, 2009, 364: 239–245.

(编辑 何学锋)