

Acidiphilium cryptum DX1-1 CO₂ 固定相关基因的克隆及在不同营养方式下的差异表达研究*

刘可可 聂珍媛 徐爱玲 夏金兰[△]

(中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

摘要 目的 研究 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 CO₂ 固定相关基因的克隆及在不同营养方式下的差异表达。方法 以 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 (CCTCC M 208056) 的 DNA 为模板, 基于 *A. cryptum* JF-5 同源功能基因序列 (JGI, http://genome.ornl.gov/cgi-bin/JGI_microbial/kegg_categories.cgi) 设计引物, 对菌株 DX1-1 中的 CO₂ 固定相关基因 *Acry_0824*, *Acry_082*, *Acry_1067*, *Acry_1272*, *Acry_0022* 和 *Acry_0827* 进行了克隆和序列比对分析; 并对它们在不同营养条件下的基因差异表达进行了分析。结果: 从菌株 DX1-1 成功克隆了所选择的 CO₂ 固定相关基因, 其序列与菌株 JF 的同源功能基因序列一致性分别达到了 99.8%, 99.6%, 99.6%, 99.5%, 99.3% 和 99.8%; *Acry_0824*, *Acry_1272* 和 *Acry_0827* 三个基因在各种混合养条件下表达均上调, 说明它们在 DX1-1 CO₂ 固定中起较关键的作用。在加入 0.1% 的葡萄糖混合养条件下, DX1-1 细胞明显利用空气中的 CO₂ 来生长和累积 PHB。结论 限制性葡萄糖可以促进细胞自养生长和累积 PHB。

关键词 隐藏性嗜酸菌; CO₂ 固定基因; RT-qPCR; 克隆

中图分类号: Q75, Q78, Q939 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)18-3408-05

Cloning and Differential Expression of *Acidiphilium Cryptum* DX1-1 CO₂ Fixed -Related Gene*

LIU Ke-ke, NIE Zhen-yuan, XU Ai-ling, XIA Jin-lan[△]

(School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the energy substrates impact on the expression of genes related with CO₂ fixed in *Acidiphilium cryptum* DX1-1. **Methods:** DNA of *Acidiphilium* DX1-1 (CCTCC M 208056) was used as template. The annotation of *A. cryptum* DX1-1 genes and their putative cellular functions were from Comprehensive Microbial Resource (CMR) of *A. cryptum* JF-5 (JGI, http://genome.ornl.gov/cgi-bin/JGI_microbial/kegg_categories.cgi). **Results:** The genes related with CO₂ fixed -*Acry_0824*, *Acry_082*, *Acry_1067*, *Acry_1272*, *Acry_0022* and *Acry_0827* were cloned successfully. The RT-qPCR result shows that in mixotrophy with addition of limited 0.1% glucose, the expression of *Acry_0824*, *Acry_1272*, *Acry_0827*, were significantly upregulated in the mixotrophy comparing to that in heterotrophy and autotrophy. **Conclusion:** PHB metabolism of DX1-1 is more activated in mixotrophy and utilizing CO₂ to accumulate PHB.

Key word: *Acidiphilium*; Fixation of CO₂; RT-qPCR; Clone

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78, Q939 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)18-3408-05

前言

Acidiphilium spp. 多存在于有机营养极为缺乏极端的酸性矿坑(AMD)水环境中^[1-3]。Yukiko M 曾报道一株好氧光合细菌 *Acidiphilium rubrum*, 能积累一种近年来研究广泛的生物可降解塑料 PHB(聚-羟基丁酸酯)^[4]。最近发现兼氧菌 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 能以无机硫为能源或 / 和有机碳源中生长, 同时兼备铁(III)还原的能力。在葡萄糖过剩的培养基中累积 PHB 达到细胞干重的 88%^[2], 在以单质硫或者 Fe(III)为能源的培养基进行培养, 生长速率缓慢, 检测不到 PHB 的生成。尽管如此, 当在以硫为能源的培养基中加入少量葡萄糖时, 便能大量生长和累积 PHB。由于培养基中给予的碳源有限, 但依然能

产生 PHB, 所以极有可能少量的葡萄糖能诱导该菌通过自养代谢固定空气中的 CO₂ 来生长和累积 PHB。与现在大多数异养产 PHB 细菌相比^[4-7], 这显示出它能利用少量有机碳源但主要通过自养来生长和累积 PHB 的优势, 同时也显示了它在生长和 PHB 累积相关的基因资源的开发和应用方面的独特优势及生物学意义。

与 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 同种属的另一菌株 *A. cryptum* JF-5 全基因组序列测定已经完成, 其大部分功能基因也得到了注解(JGI, http://genome.ornl.gov/cgi-bin/JGI_microbial/kegg_categories.cgi)。最近我们通过 JF-5 菌株的相关功能基因组信息设计引物, 成功从菌株 DX1-1 中克隆了 PHB 代谢途径相关的功能基因, 并通过研究其在不同 C/N 比的培养基培养下

* 基金项目 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2004CB619201) 国家创新研究群体自然科学基金资助项目(50321402)

作者简介 刘可可(1984-), 女, 硕士研究生, 现从事生物材料研究, 84326678@qq.com

[△]通讯作者 夏金兰 电子邮箱 jlxia@mail.csu.edu.cn

(收稿日期 2011-05-06 接受日期 2011-05-30)

的差异表达和可能的启动区共有序列,构建了 PHB 代谢途径及其主要调控步骤^[8]。本文拟在此基础上,对菌株 DX1-1 CO₂ 固定相关基因进行克隆,并通过研究它们在异养、自养和混合培养条件下的差异表达来验证和分析其在 CO₂ 固定中的表现和功能。该研究对于找出菌株 DX1-1 的 CO₂ 固定基因表达与菌株生长的关联性,进而指导降低生物质生产的成本具有明显的意义,同时也为进一步通过现代生物技术手段对 CO₂ 固定相关酶进行基因改造,获得高酸性有机营养缺乏性环境中的高活性 CO₂ 固定相关酶基因资源奠定一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *A. cryptum* DX1-1 (CCTCC M208056),中南大学生物冶金教育部重点实验室从取自江西德兴铜矿的酸性矿坑废水中分离得到,保藏于武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)。

1.2.1 培养基及测定方法 9K 基础培养基^[10]: (NH₄)₂SO₄ 30 g/L, KCl : 0.1 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, Ca(NO₃)₂ 0.01 g/L。通过往基础培养基中,加入一定量的葡萄糖、单质硫和 / 或 Fe₂(SO₄)₃ 制备不同能源底物的培养基,分别将它们编号,详见表 1。

表 1 不同能源底物的培养基及其缩写符号(列于括号中)

Table 1 Culture media of different energy substrates in 9K basal medium and their abbreviations

Media	Substrates and their abbreviations in the brackets			
Heterotrophy	0.01%Glc	0.1%Glc	0.5%Glc	1%Glc (G*)
Autotrophy	0.5%S (S)	0.5%Fe (F)		0.5%S+0.1%Fe (SF)
Mixotrophy	0.1%Glc +0.5%S (GS)	0.1%Glc +0.5%Fe (GF)		0.1%Glc +0.5%S+0.1%Fe (GSF)

1.2 方法

1.2.1 相关代谢功能基因的选择及其 PCR 引物设计 一般 Calvin 循环一般可以分三部分 (1)CO₂ 的固定 (2)固定的 CO₂ 的还原 (3)CO₂ 受体分子的重新行程。其中 CO₂ 固定是整个循环的关键环节,它受到 CO₂ 固定的关键酶核酮糖二磷酸羧化酶(Rubiscase)的控制^[9],同时也受到核酮糖 -5 磷酸的来源状况的影响,后者则受到核糖 5 磷酸异构酶和核酮糖 -5- 磷酸差向异构酶的控制和调节。因此本研究选择核酮糖二磷酸羧化酶、核糖 5 磷酸异构酶和核酮糖 -5- 磷酸差向异构酶等三种 CO₂ 固定相关关键酶进行研究。参照早期对 *Acidiphilium cryptum*

DX1-1 的研究^[8],我们通过 *A. cryptum* JF-5 全基因组信息(JGI, http://genome.ornl.gov/cgi-bin/JGI_microbial/kegg_categories.cgi) 找寻相关同源功能基因序列,然后采用 Primer Premier 5.0 对这些基因序列设计 Real-time PCR 引物,由上海生工公司进行合成。所涉及到的相关基因及其引物序列与退火温度和扩增长度等列于表 2。下划线部分为酶切位点。其中 SalI(MBI)酶切位点 5'GTCGAC, BamHI (MBI) 酶切位点 5'GATCC3', EcoRI (MBI)酶切位点 5'GAATTC3',下划线部分分别为它们的酶切位点。(注 :DQ529311 是为后续差异表达中作归一化处理)。

表 2 CO₂ 固定相关基因及其引物情况

Table 2 CO₂ fixed -related genes and their primers

Locus	Annotated function	Primer sequence	Annealing Temp.(°C)	Amplicon length (bp)
DQ529311	16S rRNA	F: TGGTAGTCCACGCTGTAA R: AAATCCTGGTAAGGTTTC TG	55	195
Acry_0824	ribulose bisphosphate carboxylase	F:G'TCGACAACCCCTAACATCACCAACG R:G'GATCCGGCCCGGTATTCTCACAG	58	262
Acry_0825	ribulose-bisphosphate carboxylase	F: G'TCGACCTGACCCAGGGCTGCTTT R:G'GATCCATTTCAGTAGGTATTCCGC	58	143
Acry_1067	ribulose-bisphosphate carboxylase	F: G'TCGACCACCATCGTCAAGCCC R: G'GATCCCTGCAACTCGTCGTCC	50	106
Acry_1272	ribose 5-phosphate isomerase	F:G'TCGACTCAAGGGGCTGGGTGGTG R:G'AATTCTCCGAAACGAAGGGACTGC	62	226
Acry_0022	ribulose-phosphate 3-epimerase	F: G'TCGACATTTGCACCGCTCGCT R: G'GATCCTGCCCATCCGTCTC	58	246
Acry_0827	ribulose-phosphate 3-epimerase	F:G'TCGACATTTCTCCCAACCTCA R:G'GATCCTCGAGCACGTAGGACAGC	55	268

1.2.2 总 DNA 的提取及目的基因的 PCR 扩增和克隆 液体培养一定数量的 DX1-1 菌株, 6 000 r/min 离心收集菌体后, 采用细菌基因组提取试剂盒(上海生工, BS473)提取基因组 DNA。具体的片段扩增、纯化使用 QIAquick 96-孔纯化试剂盒(Qiagen GmbH, Hilden, 德国)。PCR 反应体系(50 μL): 10× PCR 缓冲液 5 μL, MgCl₂ (20 mmol/L) 4 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 表 2 引物 F (10 pmol/μL)和引物 R (10 pmol/μL)各 2.5 μL, 模板 DNA (约 100 ng/μL) 1 μL, Taq DNA 聚合酶 (MBI, 5 U/μL) 各 0.5 μL。程序为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物用 EB 染色的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。PCR 产物用 E.Z.N.A.TM 胶提取试剂盒(Omega)回收后, 使用 Sal I 和 Bam H I 双酶切(体系)或者 Sal I 和 EcoR I 双酶切(体系)。酶切体系 为: PCR 产物 30 l, Sa I 5 l, Bam H I 5ul, 缓冲溶液 10ul。双酶切体系 为: PCR 产物 30 l, Sal I 5 l, EcoR I 5 l, 缓冲溶液 10 l。载体 pLM1 分别使用 Sal I 和 Bam H I, Sal I 和 EcoR I 双酶切, 体系同上, 37℃ 过夜。

经过过夜酶切后的 PCR 产物和载体分别电泳, 用 E.Z.N.A.TM 凝胶提取试剂盒(Omega)切胶回收, 连接体系为: PCR 产物 18 l, 载体 8 l, T4 DNA 连接酶(MBI) 1 l, 连接酶缓冲溶液 3 l。室温连接过夜。转化至感受态细胞(TOP 10, Tiangen)。通过双酶切及 PCR 扩增鉴定后, 得 6 组阳性重组质粒, 由上海生工测序, 再经由 BLAST 进行比对序列。

1.2.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成 用 TRIzol® 试剂盒 (Invitrogen 公司, Carlsbad, 美国), RNeasy® 微型试剂盒 (Qiagen GmbH, Hilden, 德国)分别按照说明书步骤进行总 RNA 的提取及纯化。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 再用紫外分光光度计测定其纯度和浓度。之后使用 SuperScript™ RNase H- 反转录酶(Invitrogen 公司, Carlsbad, 美国)试剂盒进行 cDNA 的合成, 用于 Real-time PCR 分析。

1.2.4 RT-PCR 检测及数据分析 总体积为 25 l 的 RT-PCR 样品中含 12.5 μl SYBR® Green Real-time PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, 日本), 其中包含 Taq DNA 聚合酶, dNTP, 氯化镁, 和 SYBR Green I, 浓度为 10mM 正义 / 反义引物, 5 l 的 cDNA 模板, 5.5 l 不含核酸酶的水。利用 iCycler iQ 的 Real-time PCR 仪进行定量 RT-PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)。相关程序条件依次为: 95℃ 30s, 40 个循环: 95℃ 15s, 55℃ - 60℃ (根据不同引物退火温度不同而变化) 30s, 72℃ 30s, 95℃ 60s, 55℃ 10s, 80 个循环: 55℃ 10s, 每个循环时按 0.5℃ 递增, 直到 95℃ 结束循环。

通过查看 PCR 产物溶解曲线的对称性和非特异性峰, 判断引物的特异性是否良好。并对 10⁷ 至 10² 拷贝 / μL 的 PCR 产物样品浓度制作对应的标准曲线。

对参照基因 16S rRNA 的表达量进行归一化处理, 得到其它功能基因表达量, 之后计算每个功能基因的表达量与该基因在只含葡萄糖能源基质中的表达量的比值, 得到每个功能基因相对于葡萄糖能源基质条件下的差异表达。

2 结果

2.1 阳性质粒的 PCR 鉴定和序列分析

以 *A. cryptum* DX1-1 基因组 DNA 为模板, 以 CO₂ 固定相关 6 个基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 最后用 EB 染色的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。阳性质粒菌体 PCR 产物结果见图 1。图 1 表明 PCR 产物的片段大小符合所设计引物 PCR 产物的大小(参照表 2)。序列分析证实, 此 3 组 DNA 基因序列与 *A. cryptum* JF-5 中的 *A cry_0824*, *Acry_0825*, *Acry_1067*, *A cry_1272*, *A cry_0022*, *Acry_0827* 的同源性分别达到 99.8%, 99.6%, 99.6%, 99.5%, 99.3% 和 99.8%。而与之所编码的氨基酸序列上, 两者无差异, 同源性都达到 100%, 可见 CO₂ 固定相关基因在 *A. cryptum* 属的菌种中十分保守。

2.2 总 RNA 质量鉴定及引物测试

2.2.1 总 RNA 质量分析 细菌总 RNA 电泳分析结果如图 2 所

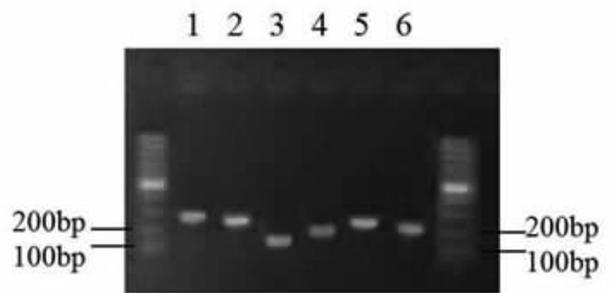


图 1 相关基因阳性质粒菌体 PCR 产物电泳结果, CO₂ 固定相关基因: 1: *Acry_0827*; 2: *Acry_0022*; 3: *Acry_1067*; 4: *Acry_0825*; 5: *Acry_0824*; 6: *Acry_1272*;

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products from positive plasmid with the designed primers for genes

示。图 2 结果表明 23S rRNA 与 16S rRNA 条带完整、清晰, 表明总 RNA 提取纯化过程中无明显的 RNase 作用导致的降解, 经 NanoDrop 微量分光光度计检测, 在波长为 260 nm 和 280 nm 处的消光系数 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 比值为 1.90~2.00, 样品的纯度较高。23S rRNA 与 16S rRNA 电泳条带含量接近 2:1 (GeneScope V1.73 图像分析结果显示), 小片段的 5S rRNA 在纯化过程中得以基本去除。因 rRNA 稳定性比 mRNA 高, 故可采用 23S rRNA 与 16S rRNA 条带及含量比值表征 mRNA 完整性。图示表明总 RNA 提取纯化过程中无明显的 RNase 作用导致的降解。说明总 RNA 的纯度与完整性均良好, 提取得到的 mRNA 质量良好, 可用于后续 Real-time PCR 定量分析。

2.2.2 相关基因表达差异 表 3 列出了所选择的 3 个基因(表 2)相对于严格异养(1% Glc)时的混合养和自养条件下的差异表达, 表 4 则进一步列出了所选择的 3 个基因在混合养相对于严格自养("S" 为唯一能源基质)条件下的差异表达, 其中 16S rRNA 作为内标以校准来自过程中的系统和偶然误差。由于菌株 DX1-1 在仅含铁的基础培养基中基本不能生长, 因此, 本实验部分未对该情况进行比较。

从表 3 结果可知, 相比严格异养条件下, 自养条件 CO₂ 代谢相关基因总体均呈下调趋势。但在限制性 0.1% 的葡萄糖加

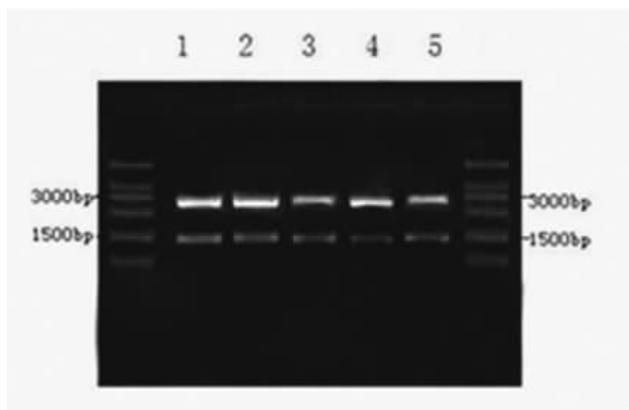


图 2 总 RNA 电泳图 样品来自 :1. 1%葡萄糖培养基 ;2. 0.5%单质硫 + 0.1%葡萄糖培养基 ;3. 0.5%单质硫 + 0.1%硫酸铁培养基; 4. 0.5%单质硫 + 0.1%葡萄糖 +0.1%硫酸铁 ;5. 0.5%单质硫培养基

Fig. 2 Electrophoresis of total RNA, samples are from cells incubated in culture medium: 1 with 0.5%S0+0.1% glucose; 2 with 0.5%S0+0.1% ferric sulfate; 3 with 0.5%S0+0.1% glucose+0.1% ferric sulfate

入后,而各混合养条件下相关基因变化上调趋势十分明显。在限制性 0.1%的葡萄糖加入后的混合养条件下:相关基因总体也呈上调趋势,Acry_0824, Acry_0825, Acry_1067(编码核酮糖二磷酸羧化酶)中,只有 Acry_0824 在不同培养条件下明显上调;Acry_0022, Acry_0827 所编码的核酮糖-3-磷酸差向异构酶中也只有 Acry_0827 在各种混合养条件下上调明显。因此 Acry_0824(编码核酮糖二磷酸羧化酶), Acry_1272(编码核酮糖二磷酸羧化酶)、Acry_0827 (编码核酮糖-3-磷酸异构酶)上调明显,尤其是 Acry_0824 和 Acry_1272,在铁硫混合养中基因表达量分别达到了 12,800,000,000 倍和 107,000 倍。

从表 4 可以尤为明显的看出硫铁混合养的各代谢相关基因的表达量远远大于硫单独作为能源时的相关基因表达量。其中 Acry_0824 和 Acry_0827 在 GSF 培养条件下达到了 14,269,788 和 109,360。

3 讨论

表 3 不同能源培养条件下 DX1-1 菌株中 CO₂ 相关基因的差异表达比较,16S rRNA 作为内标,表中数据均为该基因表达的绝对量与该基因不同条件时的表达绝对量的比值

Table 3 Comparison of differential expressions of genes related to CO₂ genes in strain DX1-1 grown on autotrophy and mixotrophy from the strict heterotrophy with 1% glucose concentration, where 16S rRNA as the internal control gene is used to normalize the expressions of all other genes chosen to correct sample-to-sample variation

Locus	Annotated function	G*	S	GSF	GF	GS
DQ529311	16S rRNA	1	1	1	1	1
Acry_0824	Ribulose bisophosphate carboxylase	1	897	12,800,000,000	18,300	86
Acry_0825	Ribulose-bisphosphate carboxylase	1	0	94	94	55
Acry_1067	Ribulose-bisphosphate carboxylase	1	0	91	985	73
Acry_1272	Ribose 5-phosphate isomerase	1	13	107,000	4,710	217
Acry_0022	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1	0	0	36,800	2
Acry_0827	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1	0	22,200	4,990	2

表 4 自养与混合养条件下 DX1-1 菌株中 CO₂ 相关基因的差异表达比较,16S rRNA 作为内标,表中数据均为该基因表达的绝对量与该基因不同条件时的表达绝对量的比值

Table 4 Comparison of differential expressions of genes related to PHB, carbon, sulfur and ferrum metabolisms in strain DX1-1 grown on mixotrophy from that on strict autotrophy "S", where expression of 16S rRNA as the internal control gene was used to normalize the expressions of all other genes chosen to correct sample-to-sample variation.

Locus	Annotated function	S	GSF	GS
DQ529311	16S rRNA	1	1	1
Acry_0824	Ribulose bisophosphate carboxylase	1	14,269,788	0
Acry_0825	Ribulose-bisphosphate carboxylase	1	7,825	4,600
Acry_1067	Ribulose-bisphosphate carboxylase	1	327	264
Acry_1272	Ribose 5-phosphate isomerase	1	8,168	17
Acry_0022	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1	0	5,421
Acry_0827	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1	109,360	12

本文以 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 DNA 为模板 PCR 扩增 CO₂ 固定相关的 Calvin 循环中三种相关酶编码的六个基因 Acry_0824, Acry_082, Acry_1067, Acry_1272, Acry_0022 和

Acry_0827, 选用了载体 pLM 1 克隆了 6 个基因,通过酶切鉴定和 PCR 鉴定,证实了所克隆的基因与目的基因大小一致,通过序列测定及 Blast 比对分析发现,所克隆的 CO₂ 固定相关基因

序列和其同源菌 *A. cryptum* JF-5 的 CO₂ 固定基因序列同源性高达 99.8%、99.6%、99.6%、99.5%、99.3% 和 99.8% ,而与之所编码的氨基酸序列上,两者无差异,同源性都达到 100%,可见 CO₂ 固定相关基因在 *A. cryptum* 属的菌种中十分保守。由于现在国内外都以细胞异养或是植物生长生产 PHB^[11-14],而此基因的研究,对探索菌株固定 CO₂ 基因,改变发酵底物或降低成本有一定意义。

根据 RT-qPCR 结果,在严格异养条件下,二氧化碳固定相关基因成下调,可推断异养时细胞完全利用葡萄糖的能量产生 PHB,在加入限定量的葡萄糖进行混合养时,所有的混合养组合(GS.GF.GSF)的二氧化碳固定相关基因显著表达上调,细胞生长曲线也和异养条件下培养的细菌相差无几(见图 3)。在培养基中无其他 C 源的情况下我们可以推断细胞通过固定空气中的二氧化碳实现其生长和生产物质。研究还表明,在 0.1% 葡萄糖起始浓度条件下,相对于严格异养条件下,自养和限制性异养的混合养等几种情况下相关基因表达差异显示:Rubisc 基因均有各种幅度的上调,但由于可能存在的同功酶,只有 Acry_0824 在不管何种条件下上调明显,这也说明了限制性葡萄糖(0.1%)的混合养条件下,确实激活了 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 的 CO₂ 代谢系统,使之在工业大量生长或者是 PHB 积累方面拥有一定优势。其次,在通过表 4 得出,其中 GSF 培养基中相关基因表达量为最高,由于在前期实验中得出 *Acidiphilium* DX1-1 只能在单质硫中生长而不能在 Fe³⁺ 中生长,而能够在有葡萄糖的条件下还原 Fe³⁺ 进行呼吸作用,与类似 *Acidiphilium* 属菌株报道相符^[15]。这可以解释在限定葡萄糖培养下,为什么 GSF 培养基 CO₂ 基因表达量最为突出,这极有可能是硫代谢、铁代谢和葡萄糖代谢共同作用下的结果。

综上所述,在异养条件下 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 完全利用了葡萄糖进行生长,但是并没有机制能够促进 DX1-1 的自养代谢,而在严格自养条件下,细胞生长缓慢。只有加入了限制性葡萄糖的混合培养下,表达差异结果都有大幅度增加,且 CO₂ 固定相关基因 Acry_0824、Acry_1272 和 Acry_0827 变化明显,由此可判定此三基因在 DX1-1 的 CO₂ 固定代谢系统中较之其他相关基因起关键作用。再次还说明在葡萄糖诱导下,细胞启动了它的自养生长机制,使得细胞不仅仅利用葡萄糖,而更主要地利用了空气中的二氧化碳来生长,这对工业上降低 PHB 成本,低碳环保有着一定的促进意义和研究价值。

参考文献(References)

- [1] Yukiko M, Toshio K, Jiro S, and Akira H. Ultrastructure of the acidophilic aerobic photosynthetic bacterium *Acidiphilium rubrum* [J]. *Curr. Microbiol*, 2000, 40(6): 398-401
- [2] 徐爱玲, 历丽, 张帅, 等. 隐藏嗜酸菌 DX1-1 产 PHB 条件的优化[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2008, 54(6): 702-712
Xu Ai-ling, Li Li, Zhang Shuai, et al. The optimization of culture condition for PHB accumulating by *Acidiphilium cryptum* DX1-1 [J]. *J. Wuhan Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 2008, 54 (6): 702-712
- [3] Kusel K, Roth U, and Drake HL. Microbial reduction of Fe (III) in the presence of oxygen under low pH conditions [J]. *Environ. Microbiol*. 2002, 4(7): 414-421
- [4] 于慧敏, 沈忠耀. 可生物降解塑料聚-β-羟基丁酸酯(PHB)的研究与发展[J]. *生物化工*, 2001, 9(8): 11-16
Yu Hui-min, Shen Zhong-yao. Research and Development of Biodegradable Plastics Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) [J]. *Fine and specialty chemicals*, 2001, 9(8): 11-16
- [5] 田杰生, 吴柏和, 李季伦, 等. 自养黄杆菌合成羟基丁酸和羟基戊酸共聚体的发酵研究[J]. *微生物学报*, 1996, 36(5): 351-359
Tian Jie-sheng, Wu Bo-he, Li Ji-lun, et al. Studies on fermentation of synthesizing poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by xanthobacter autotrophicus [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1996, 36(5): 351-359
- [6] 陈琦, 易祖华, 黄和容. 利用葡萄糖发酵产聚 B-羟基丁酸菌株的选育[J]. *微生物学通报*, 1994, 21(6): 333-335
Chen Qi, Yi Zu-hua, Huang He-rong. Breeding of glucose utilizing mutants for poly-B-hydroxybutyrate fermentations [J]. *Microbiology*, 1994, 21(6): 333-335
- [7] 张晓瑞, 黄建新, 罗莎, 等. He-Ne 激光和紫外线对 PHB 产生菌的复合诱变效应[J]. *光子学报*, 2005, 34(5): 683-684
Zhang Xiao-rui, Huang Jian-xin, Luo Sha, et al. The mutagenic effect on a strain producing PHB by cooperation of UV and He-Ne Laser [J]. *Acta photonica Sinica*, 2005, 34(5): 683-684
- [8] Xu AL, Xia JL, Liu KK, et al. Real-time PCR Analysis of metabolic pathway of PHB in *Acidiphilium cryptum* DX1-1 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(1): 71-77
- [9] Robert FT. Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganism [J]. *Microbiological Review*, 1988, 52(2): 155-189
- [10] Purushothaman M, Anderson RKL, Narayana S. Industrial byproducts as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) - biodegradable plastics [J]. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 2001, 24(3): 131-136
- [11] Santhanam A, Sasidharan S. Microbial production of polyhydroxy alkanotes (PHA) from *Alcaligenes* spp. and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources [J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, 9: 3144-3150
- [12] Shen XW, Yang Y, Jian J, Wu Q. Production and characterization of homopolymer poly (3-hydroxyvalerate) (PHV) accumulated by wild type and recombinant *Aeromonas hydrophila* strain 4AK4 [J]. *Biore-sour Technol*, 2009, 100: 4296-4299
- [13] Budde CF, Riedel SL, Hubner F, et al. Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89: 1611-1619
- [14] Chen GQ, Luo RC, Xu J, et al. Microbial PHA Based Eco-material Industry [M]. Chemical Industry Press, Beijing. 2008, 203-212
- [15] Toghrol F, Southerland WM. Purification of *Thiobacillus novellus* sulfite oxidase. Evidence for the presence of heme and molybdenum [J]. *Biol. Chem*, 1983, 258(11): 6762-6766