**极端嗜酸古菌嗜酸性铁质体的代谢和进化模式**

撰文：August 中南大学

责编：

原文连接：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5473848/?report=classic

Metabolic and evolutionary patterns in the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum* YT

Published online 2017 Jun 16. doi: 10.1038/s41598-017-03904-5

Scientific Reports [IF 4.011]

一作兼通讯：Olga V. Golyshina，

单位：英国班戈大学（School of Biological Sciences, Bangor University）

**导读**

*Ferroplasma*是极端酸性环境中极难分离培养的古菌，该研究首次获得*Ferroplasma acidiphilum*的全基因组完成图，并且通过基因组分析表明*F. acidiphilum* YT具有专性的蛋白分解营养型的生活方式，同时具有回补型（anaplerotic）碳同化途径，与生理学结果一致。在实验室培养经过550代后，该菌株的单核苷酸取代率大于1.3×10−8，是单细胞生物中已有记录中的最高值。

**摘要**

铁质体科（Ferroplasmaceae）是一种普遍存在的铁氧化极端嗜酸菌，具有许多独特的生理特性。作者在长期的培养实验中基于基因组学分析了嗜酸铁质体*Ferroplasma acidiphilum* YT的代谢途径和基因组稳定性。与生理学一致，基因组分析表明*F. acidiphilum* YT具有专性的蛋白分解营养型的生活方式，同时具有回补型（anaplerotic）碳同化途径。尽管在基因组中检测出糖酵解和糖异生途径的所有基因，包括双功能单向果糖1,6-二磷酸醛缩酶/磷酸酶，此外，丙酮酸/2-氧戊二酸脱氢酶被原始辅酶A依赖型丙酮酸/酮戊二酸铁氧还原酶取代。在实验室培养经过550代后，该菌株每代每个位点的单核苷酸取代率≥1.3×10−8，是单细胞生物中已有记录中的最高值。除了一个碱基替换外，其余碱基突变均为G:C至A:T，它们在编码区与非编码区之间的分布以及同义/非同义突变比表明，中性漂移是实验室培养中基因组进化的一种普遍模式。此外，地理上相隔遥远的*F. acidiphilum*群体中显著的基因组保守性说明自然界中的突变似乎以较低的频率发生。

**背景**

*Ferroplasma acidiphilum* YT是属于广古菌门（Euryarchaeota），Thermoplasmatales目，Ferroplasmaceae科的铁氧化极端嗜酸微生物，需要少量的酵母提取物（0.02%）和较低pH值和富含金属硫化物的环境才能培养。前人已经对美国加利福尼亚州铁山（Iron Mountain）酸性矿山排水（acid mine drainage, AMD）生物膜的微生物群落进行了深入的宏基因组和宏蛋白组学研究，对酸性AMD生物膜的代谢和生理机制提供一些见解。早前研究还发现了*F. acidiphilum*有一些不寻常的生化特征，如蛋白质组中含铁蛋白的比例异常高、酶发挥体外活性最佳pH值较低。目前仍有必要进一步研究嗜酸菌*Ferroplasma acidiphilum* YT的代谢功能，特别是碳同化的主要机制，以及*Ferroplasma*在环境中所起的主要作用，这对其实际应用和对其生活方式的基本机制的理解方面具有重要意义。因此，从类似环境中分离出的具有特征分离物中提取DNA，并通过测序获得高质量基因组完成图是一个很好的研究*Ferroplasma*的机会。本文从嗜酸菌的生态位适应、营养物质获取、能量和碳代谢途径及其与系统发育邻域的关系等方面对嗜酸菌进行了基因组和实验分析。此外，作者还分析了该菌株在实验室培养中长期维持的基因组进化模式。

**结果与讨论**

**1. 基因组稳定性与进化**

**1.1 一般的基因组特性**

嗜酸菌YT基因组大小为1,826,943 bp, G + C含量为36.49%，预计总基因数为1773个（不含19个假基因），编码密度为86.4%；508个基因被编码假设的蛋白质。5S、16S和23S rRNA的位点不排列在一个操纵子中，而是分散在染色体中，还预测出了46个tRNA。

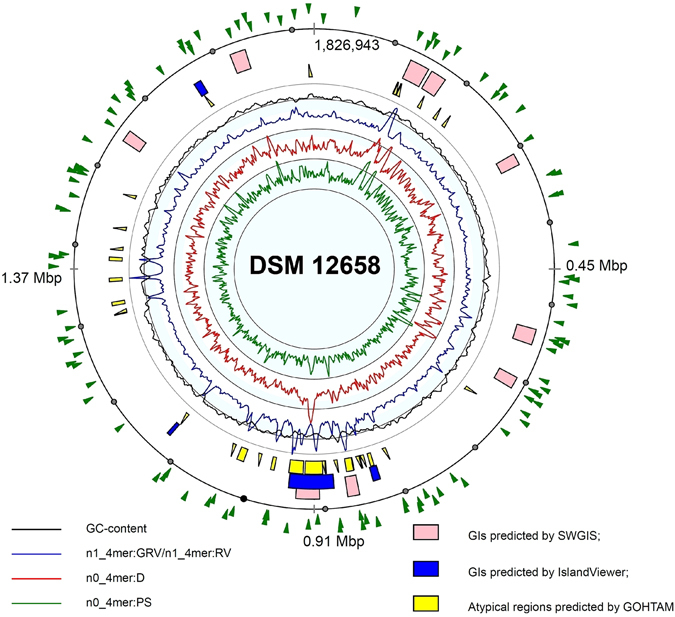
**1.2 *F. acidiphilum* YT 与 *F. acidarmanus* fer1基因组的比较**

*F. acidiphilum* YT 与 *F. acidarmanus* fer1在其16S rRNA基因序列一致度为100%，但这并不能证明它们属于同一物种。因此，有必要使用平均核苷酸识别（ANI）分析来评估它们之间的相关性（http://enve- omics.ce.gatech.edu/ani/）。分析表明，ANI值中值为98.7%，远高于基于全基因组比较的两种物种分化的普遍阈值（95%）。除此之外,应用基因组距离计算器（GGDC 2.0，http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php）使用所有计算公式提出DNA-DNA杂交值（DDH）为73.1%、85.5%和85.80%，相应DDH值≥70%的概率为83.97%、97.3%和98.38%。这两种分析都表明，基于基因组序列，*F. acidiphilum* YT和*F. acidarmanus* fer1属于同一物种，尽管存在一些先前报道的生理差异。有趣的是，地理分离对这两种生物以及许多其他生物（可以从公共序列数据库中的宏基因组数据判断）并没有导致显著的物种分化。这也可能表明，它们的地理分离发生得相对较晚。尽管这些古菌属于一个非常特殊的生态位，但它们也必须在非酸性环境中生长，并能在非酸性环境中持久生存，这使得它们能够定殖硫化物含量低的生态位，研究在全球范围内传播。可能在自然条件下，拥有如此小的基因组（因此具有一个狭窄的代谢功能库）以及较为缓慢的代谢，使得*F. acidiphilum*的进化进行速度较低，这限制了分化和物种形成。这也是符合小而紧凑的基因组的特征，以及单拷贝核糖体RNA基因代谢成本最小化以及不需要大量的同源蛋白质的特点，以适应在非常恒定和停滞的环境条件中生长。

**1.3 在*F. acidiphilum* YT中水平转移的基因组岛**

采用Seqword基因岛（Genomic Island，GI）探测程序（SWGIS）、由三种不同的GI预测算法组成的IslandViewer程序包和GOHTAM工具对*F. acidiphilum* YT的全基因组序列进行水平转移基因组岛（GIs）鉴定。不同方法进行GI识别的联合结果如**图1**所示。SWGIS和IslandViewer程序预测出了三个较短的GIs。GOHTAM预测出许多较短区域具有非典型的四核苷酸频率和/或密码子使用偏好性；然而，并非所有这些区域都是基因横向转移起源的。

预测GIs大多含有未知功能的基因、转座酶和酶编码基因包括编码古菌铜蓝蛋白（sulfocyanin）及相关呼吸链系统和beta-内酰胺酶的基因簇[126000-156681]和包含CRISPR-相关蛋白编码基因的七号GI（905732-938099）。研究结果表明，水平基因转移可能在嗜酸菌YT代谢途径的进化和获得抗病毒能力方面发挥重要作用。



**图1 F. acidiphilum YT的基因组和基因组岛（GI）。**SWGIS（粉红色方框）、IslandViewer（蓝色方框）和GOTHAM（黄色方框）预测了GIs在*F. acidiphilum* YT染色体上的定位。图谱内圈的直方图描述了以下寡核苷酸使用参数的变化：GC含量（黑色曲线；使用GC含量归一化的四核苷酸使用模式，即计算的广义相对方差与局部相对方差之比（蓝色曲线）；未归一化的局部四核苷酸使用模式与完整染色体计算的全局四核苷酸使用模式之间的距离（红色曲线）；计算直接DNA链和补体DNA链的非标准化四核苷酸使用模式之间的不对称性（绿色曲线）。绿色箭头（外圆）表示在实验室培养的*F. acidiphilum* YT基因组中，经过约550代后，基因组中存在的单核苷酸取代情况

对数据库中1639个细菌染色体序列中检测到的17984个GIs（见数据库：www.bi.up.ac.za/SeqWord/sniffer/gidb/index.php）进行四核苷酸模式相似性搜索。结果表明，*F. acidiphilum* YT的GIs与其他许多古菌和远缘分类学单位的GIs具有显著的成分相似性。

然而，嗜酸古菌*F. acidiphilum* 的GIs与另一种嗜酸古菌*Thermoplasma volcanium* GSS1的相似性最高。值得注意的是，在其他极端微生物GIs受体种群中有拟杆菌属的成员。

在基因组进化和基因横向转移中起重要作用的因子是转座酶。基因组分析共预测出了转座酶80个，其中28个属于IS4家族蛋白，10个属于MutS转座酶突变子家族蛋白（COG3328）。

早前就有研究表明，广古菌（Euryarchaeota）中含有丰富的MutS同源基因，可能是细菌向古菌转移基因的标志。*F. acidiphilum* YT基因组中还存在其他编码转座酶的基因家族，包括IS605 OrfB家族和ISA0963转座酶，IS2000家族蛋白、MULE、OrfA等，与之前的报道一致，即Thermoplasmatales目的成员通常携带多个IS家族。

**1.4 错配修复与重组**

*F. acidiphilum*基因组中存在重组和错配修复蛋白，如DNA解离酶（FAD\_0665），其与产甲烷菌和细菌的对应蛋白相似性较低。DNA修复解旋酶FAD\_1466与古菌Rad25蛋白相似，FAD\_1503与硫化叶菌目（Sulfolobales）XPD/ rad3相关的DNA解旋酶和另一种DNA修复蛋白FAD\_1564具有30%的同源性。FAD\_0550和FAD\_0559基因分别编码DNA修复和重组蛋白RadA和RadB, RecA和Rad51的同源基因，后者被认为是广古菌特有的。错配修复蛋白、类MutS ATP酶（FAD\_0765-0766）与细菌和Thermoplasmatales目中的MutS蛋白最相似。*F. acidiphilum*基因组编码的内切酶，即II型的限制性内切核酸酶FAD\_0313，与细菌的同源蛋白包括内切酶III（FAD\_1157, 1370）、第四（FAD\_0129, 1301）和V型（FAD\_0403）以及Fen1（FAD\_0558）和PolX（FAD\_1333）内切酶表现出高相似度。

**1.5 规律间隔成簇短回文重复序列（CRISPR）**

*F. acidiphilum* YT基因组存在两个CRISPR，它们中间隔着一个编码CRISPR相关蛋白（Cas）的操纵子和十个基因 （**图2**）。CRISPRs和Cas蛋白代表了大多数古菌和细菌中发现的小型RNA-based干涉系统。CRISPR-Cas系统作为对抗入侵病毒和质粒的适应性微生物免疫系统，在微生物发病机制、DNA修复和生物膜等方面也发挥着重要作用。*F. acidiphilum* YT的1号CRISPR相当大，包含133相同的和3退化的直接重复序列（30 bp），由135个类似大小的不同间隔子（34-39 bp）（**图2**）。2号CRISPR较小，含有31直接重复序列（每条31bp） ，被30种不同间隔子分隔（每个35-38 bp, 其中5号间隔子有62bp）。这些CRISPR簇中的间隔子和重复序列彼此之间没有任何序列相似性，较大的CRISPR1和CRISPR2阵列可能表明*F. acidiphilum* YT d CRISPR系统具有较高的活性。对*F. acidiphilum* YT CRISPR间隔子的NCBI Blast分析显示，在现有的病毒基因组或质粒中没有同源序列，这表明其CRISPR靶向病毒尚未被发现。*F. acidarmanus*的基因组还编码两个CRISPR簇和八个Cas蛋白，它们的重复序列彼此之间没有相似性，这表明它们的CRISPR系统并不相关。

*F. acidiphilum* YT的8个cas基因可能与1号CRISPR簇（cas6、cas10 cas7, cas5, cas3, cas4, cas1,和cas2）共转录（**图2**）。基于cas基因排列和cas10，*F. acidiphilum* YT的CRISPR-Cas系统被归为CRISPR亚型I-D，类似于III型CRISPR系统。这与大多数古菌包含CRISPR亚型A、B或D的事实相一致。在大多数I型和III型CRISPR系统中，Cas6蛋白可以裂解长pre-CRISPR RNA （crRNA）转录本，生成成熟的crRNA，其中包含一个侧翼有重复序列的间隔子。根据预测， I-D型CRISPR重复序列将形成发夹结构，由Cas6蛋白识别并在茎环的3 ' -碱基处裂解。对*F. acidiphilum* YT CRISPR重复序列的分析表明，它们可以形成类似的发夹结构，这表明单*F. acidiphilum* YT的 Cas6蛋白可以处理1号和2号CRISPR 的pre-crRNAs。*F. acidiphilum* YT中Cas蛋白的氨基酸序列与GenBank数据库中的嗜酸古菌*Picrophilus torridus*的Cas1和Cas2蛋白序列同源性最高，分别为50%和46%。然而，*F. acidiphilum* YT的其他Cas蛋白与从宏基因组中组装的*Ferroplasma* sp. Type II相应Cas蛋白更为相似（58%到75%的序列一致性）。

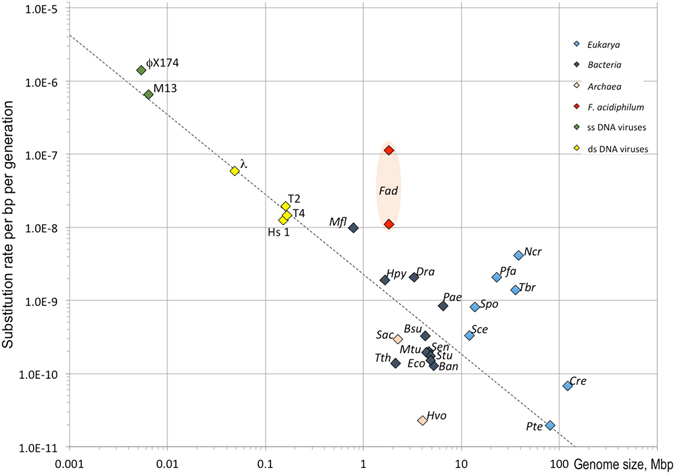
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5473848/bin/41598_2017_3904_Fig2_HTML.jpg

**图2** 在*F. acidiphilum* YT中的CRISPR位点与一个编码CRISPR相关（Cas）蛋白的操纵子（红色箭头）聚集在一起，其CRISPR系统属于I-D亚型。灰色部分为10个与CRISPR无关的基因。

**1.6 长期体外培养及突变分析**

两个*F. acidiphilum* YT变体，即1998年的原始保藏菌株DSMZ（DSM 12658T）和不断生长在实验室传代（间隔为24.5天，11年）的菌株的比较基因组分析发现了116个单核苷酸替换，它们随机分布在染色体上（**图1**,外圆上绿色箭头）。116个单核苷酸替换中有115个是GC到AT的颠换，这种核苷酸的转移是自发单碱基取代突变的一种常见趋势，这表明具有较低GC含量的*F. acidiphilum* YT基因组还倾向于进一步富集AT碱基。其中，非编码序列中检测到12个碱基突变（约11%）。从编码序列中的碱基替换来看，103个碱基中有34个（即33%）是同义的。69个非同义碱基取代中，绝大多数发生非保守性氨基酸变化，只有7个发生保守性氨基酸变化，此外11个基因有两个替代位点。编码区域的替换主要发生在具有已知功能的基因中，也发生在17个编码假定蛋白质的基因中（几乎所有这些蛋白质都包含一个或多个保守域）。一些碱基替换发生在基因组岛1、2和4，特别是GI 1，它包含编码核糖体蛋白的基因簇。在单细胞生物范围内计算出的每核苷酸/每位点/每一代的碱基突变率中，*F. acidiphilum* YT的是最高的，即相似或高于之前最高纪录的保持者支原体*Mesoplasma florum*。

原核生物、病毒和大多数单细胞真核生物的碱基替代率符合对数回归曲线（**图3**）。然而*F. acidiphilum*每一代基因组的突变率为0.02，在这方面占有突出地位，作为对比大肠杆菌的突变率大约是0.001。产生如此之高的突变率原因之一可能是*F. acidiphilum* YT细胞内铁的异常丰度，这可能与氧化应激条件下Fenton反应对DNA的损伤有关。另一个可能导致高突变率的因素是易出错的DNA聚合酶IV（FAD\_1298），它诱导突变的能力以比其他聚合酶高7倍。上述假设还有待进行实验验证。



**图3 嗜酸菌*F. acidiphilum* YT在培养过程中积累的单核苷酸突变。**每个位点每代的碱基取代突变率与基因组大小的相关性。单细胞生物和病毒突变率的数据和回归图（其中U和G分别为突变数和基因组大小），粉红色区域反映出变异率的分布与更高的点值对应于在所有550代的菌株与原来的基因组相比检测到碱基替换，较低的值代表比较保守。

**2 能量和碳代谢**

**2.1 氧呼吸和铁氧化**

本文对*F. acidiphilum* YT的呼吸链进行了详细的生化研究。有趣的是, 铁氧化*F. acidiphilum* YT编码电子传递链的基因都位于识别出的基因组岛GI 1上（126000 - 156681），类似于在*P. torridus*和*Cuniculiplasma divulgatum*中的情况，它们呼吸链复合物的获得也被归因于基因横向转移。作者检测到了与铁-硫体系合成相关的半胱氨酸脱硫酶基因（FAD\_0633）、共簇基因*sufC*和*sufB*基因以及与细菌*sufD*相似度较低的假定基因（FAD\_1089-1087）。基因组中有6个ORF与铁氧还蛋白合成相关, 其中大部分含有4Fe-4S簇，为*F. acidiphilum* YT的氧化还原过程提供了低电位的电子给体。

**2.2氨基酸代谢**

*F. acidiphilum* YT组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸的合成途径不完全，这表明*F. acidiphilum*需要从外部获得这些氨基酸，这也说明*F. acidiphilum*是环境中的铁氧化型的蛋白清道夫（scavengers）。*F. acidiphilum* YT基因组编码氨基酸降解相关蛋白，如以尿酸盐为中间产物降解组氨酸的基因（FAD\_1379），以及以犬尿氨酸为中间产物降解色氨酸到邻氨基苯甲酸盐（FAD\_0101-0104）和2-草酸脱氢酶复合物（FAD\_1290-1291）的基因。天冬氨酸和谷氨酸通过天冬氨酸氨基转移酶（FAD\_0393、0538和1098）和谷氨酸脱氢酶（FAD\_0434）通过转胺反应生成相应的支链2-草酸、草酰乙酸和2-草酸戊二酸，它们都是柠檬酸循环的中间产物。从分离出嗜酸菌*F. acidiphilum* YT的生物浸出中试装置中含有不同大小的矿石颗粒，该古菌可能在其中遇到缺氧的微环境。嗜酸菌*F. acidiphilum* YT的生理研究表明，该菌株为兼性厌氧菌，在酵母提取物上能够化能有机营养生长，并还原铁离子。

作者在厌氧条件下寻找与*F. acidiphilum* YT菌株一定代谢活性相关的基因。丙酮酸可通过铁氧还蛋白依赖的丙酮酸氧化还原酶（POR, FAD\_0567-0568）转化为乙酰辅酶A。所得到的产物可以通过乙酰辅酶A合成酶消耗ATP转化为乙酸酯，从而提供丙酮酸发酵的磷酸化底物。此外，*F. acidiphilum* YT基因组具有完成精氨酸发酵所必需的全部基因，即精氨酸脱亚酶途径。这种原始的分解代谢途径能够将精氨酸转化为鸟氨酸、二氧化碳、ATP和氨，是一些专性厌氧菌和发酵型古菌的主要能量来源。产生的氨会增加细胞内的pH值，这对原核生物适应酸性环境是十分重要的。

精氨酸脱亚胺酶通路可能存在于最后一个普遍共同祖先（LUCA）中，其基因独立进化，经历复杂的进化变化，最终形成一个功能相互依赖的单一基因簇。需要注意的是*F. acidiphilum* YT基因组中精氨酸脱亚酶途径的三个基因，即精氨酸脱亚酶（FAD\_0428）、鸟氨酸氨甲酰转移酶（FAD\_1523）和氨基甲酸激酶（FAD\_0067）并不在一个操纵子中，而是在彼此相距较远。到目前为止，还没有在任何其他相近极端嗜酸古菌中发现上述基因。

精氨酸发酵途径并不是古菌LUCA厌氧代谢的唯一特征，它存在于*F. acidiphilum* YT基因组中。作者确定了其他几个古老的代谢的核心，包括6个甲基转移酶基因、5个SAM依赖型甲基转移酶和一个铁氧还蛋白，以及几个H+/Na+逆向转运型Mrp /氢化酶相关复合物，在生物能量演化的早期阶段，获得这种可与[NiFe]氢化酶相媲美的反向转运体被认为是一个关键步骤，它使地球化学pH梯度转变为生物学上更有用的Na+梯度。值得注意的是，这些蛋白家族之前只在典型的严格厌氧菌中存在，很少出现在含有血红素-铜氧还原酶的耐氧或兼性厌氧原核生物的基因组中。*F. acidiphilium* YT可能是这种罕见生物的一个例子，它同时具有LUCA候选基因蛋白家族和细胞色素氧化酶。

**2.3 嗜酸菌*F. acidiphilium* YT中的TCA循环**

大量研究发现，要成功分离许多原核生物（尤其是古菌），酵母提取物不仅是培养基中必不可少的成分，而且是众多辅因子和营养物质包括寡肽和氨基酸的来源。这些营养物质是许多代谢途径的基础底物，包括三羧酸循环。这个循环可能是*F. acidiphilium* YT的代谢中心枢纽，除了2-酮戊二酸（2-OG）脱氢酶复合体其基因组中包含大部分参与三羧酸循环的蛋白（**图4**）。与其他古菌相似，丙酮酸到乙酰辅酶A的转化以及2-酮戊二酸到琥珀酰辅酶A的转化是相应的丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶催化（POR，FAD\_0567-0568）和alpha-酮戊二酸:铁氧还蛋白氧化还原酶（KOR，FAD\_0712-0713）。尽管最初认为这两种酶对氧极其敏感，但已在一些专性需氧的生物体中得到证实了POR和KOR活性。与厌氧酶相比，这些酶具有耐氧性、低催化速率和不寻常的亚基结构。值得注意的是，已有研究表明，为了支持生物合成反应，一些需氧原核生物可能利用KOR来将琥珀酰辅酶A羧化还原为2-OG。

鉴于琥珀酰辅酶A合成酶、琥珀酸脱氢酶、延胡索酸水解酶和苹果酸脱氢酶催化可逆反应，通过草酰乙酸经由苹果酸、延胡索酸酯、琥珀酸和琥珀酰辅酶形成2-OG的代谢过程可能存于*F. acidiphilium* YT中（**图4**）。这一调查结果表明，虽然*F. acidiphilium* YT的碳代谢主要依赖于氨基酸分解代谢，*F. acidiphilium* YT也可以完成部分还原或可逆反应。TCA循环还可以附加合成其他代谢过程的重要前体，这一策略已在许多古菌和嗜酸菌中得到证实。

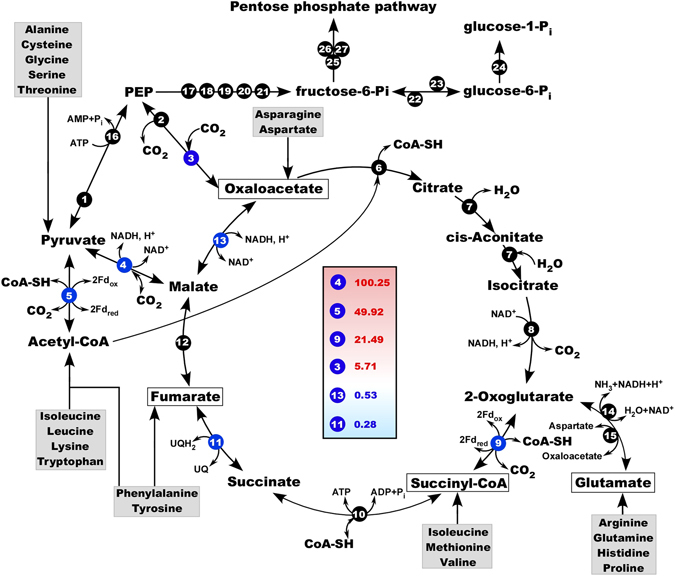


图4 *F. acidiphilium* YT的三羧酸循环及相关酶反应。

尽管作者没有量化所有参与三羧酸循环的基因的表达，琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的转录分析显示，这两种酶表达程度相当（**图4**）。最近的蛋白质组研究表明，这些酶在*Ferroplasma*三价铁还原偶联型厌氧生长中被诱导表达。因此，很可能在这些条件下，为了给终端电子受体铁离子（Fe3+）提供还原能力，TCA循环的分解代谢功能优于合成代谢。在没有铁作为电子供体的酵母提取物中，没有检测到*F. acidiphilium* YT的生长。

*F. acidiphilium*不能使用乙酸盐作为唯一的碳源，对应地其基因组中鉴定不出乙醛酸酯循环的关键酶、异柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶。2-OG可以作为氮代谢的一部分通过谷氨酸脱氢酶（FAD\_0434）与氨发生同化作用直接转化为氨基酸。此外，2-OG还可以通过生成草酰乙酸的天冬氨酸氨基转移酶（FAD\_1098）生成谷氨酸（**图4**）。

**2.4 糖酵解和糖异生**

氨基酸的生长需要糖异生途径来合成碳水化合物，与此同时，所有反式糖酵解途径的基因都存在于*F. acidiphilium*基因组中。有趣的是，*Ferroplasma*拥有一个编码双功能葡萄糖异生果糖1,6-二磷酸醛缩酶/磷酸酶的基因，这是一种古老的合成代谢酶。*F. acidiphilium*基因组中缺失典型糖酵解中的果糖1,6-二磷酸醛缩酶同系物。虽然*F. acidiphilium* YT被报道不能使用糖作为唯一的碳源，但是编码糖酵解一些本质上不可逆反应的基因如葡萄糖激酶（FAD\_0277）、磷酸果糖激酶（FAD\_0353）似乎存在于基因组中。此外，缺乏相应的转运体可能阻碍了外部葡萄糖的摄取，然而*F. acidiphilium* YT可以通过磷酸糖和戊糖中代谢从头合成葡萄糖。与其他古菌的研究结果一致，*F. acidiphilium* YT缺乏氧化戊糖磷酸途径，但其还原部分完全存在且可能发挥作用（**图4**）。

**2.5 通过基因表达分析推测*F. acidiphilium* YT的CO2同化机制**

有报道称，*F. acidiphilium* YT能够将无机碳以CO2的形式加入到其生物量中。然而，基因组分析并没有找到完整的同化途径，而一些羧基化反应可能导致了二氧化碳进入生物量。除了上面提到的KOR可以将琥珀酰辅酶A还原为2-OG外，POR酶也可以用于合成代谢。此外，*F. acidiphilium* YT的基因组中含有两种酶即磷酸烯醇丙酮酸羧化酶（PEPC）（FAD\_1044）和NADH依赖型苹果酸氧化还原酶（FAD\_0703）拥有羧基化活性，可能与CO2固定有关（**图4**）。采用实时荧光定量PCR技术检测了这四种酶以及琥珀酸和苹果酸脱氢酶基因的表达。在进行RT-PCR检测之前，作者估计了*F. acidiphilium* YT培养4天后的核酸比例，这与后期的指数增长/早期的平稳增长相对应。这个值可以指示细胞RNA水平，即代谢状态，这与检测的细胞数量无关。预测的RNA / DNA比值为7.81，表明*F. acidiphilium* YT细胞处于积极代谢状态。

选择两个组成性表达的管家基因*gyrB*和*rpl2*作为标准，量化*F. acidiphilum* YT参与TCA循环和回补型CO2同化途径转录本的相对丰度。与*gyrB*转录本相比，作者检测到*rpl2*（大50 S核糖体亚单位的结构成分）的转录水平略高，这反映了*F. acidiphilum* YT的活跃代谢状态。值得注意的是，与参考基因的表达水平相比较，*sdhA、sdhD*和*mdhI*的转录本与POR、KOR和苹果酸酶相比的相对数量要少得多（40-200倍）。检测到的PEPC与gyrB转录产物的数量相似（**图4**）。RT-PCR数据证实，只有PEPC催化不可逆的羧化反应，才会促进*F. acidiphilum* YT细胞同化无机碳。但要确认POR、KOR和苹果酸酶对细胞总碳形成的贡献，需要对回补反应进行更深入的生化研究。

**2.5 *F. acidiphilum* YT的转运机制是生境特异性的**

*F. acidiphilum* YT必须具有相应的转运机制，才能在含有较高浓度金属/类金属（铁、铜、镉、锌和砷）的环境中生长。在嗜酸菌YT基因组中检测到多种基因编码阳离子扩散促进蛋白家族（CDF）、锰/二价阳离子和碲抗性ABC转运体。这些转运体增强了对镉、钴、碲和锌等二价金属离子的耐受性。此外，它们也可为多种酶提供必要的辅助因子，如钼酸盐和钨。*F. acidiphilum* Y分离于于含砷丰富的环境中，为了抵抗亚砷酸盐的胁迫，其基因组编码依赖ATP的亚砷酸盐外排泵。而且发现亚砷酸盐敏感调节蛋白（FAD\_1795）和亚砷酸盐外排泵渗透酶（FAD\_1796）的同源基因位于一个操纵子中。此外，染色体上距*ars*操纵子较远的地方还存在编码亚砷酸盐外排泵ATP酶的基因（FAD\_1514）。

在磷代谢方面，*F. acidiphilum* YT基因组具有一个钠依赖型磷酸盐转运体FAD\_1510和三个无机磷酸盐:H+共转运酶（FAD\_1260,1738,1753）。在此之前，作者描述了*F. acidiphilum* YT在有机底物摄取方面的特异性，强调该菌株不能在如有机酸、醇和单一氨基酸、普通糖类的化合物上生长。而酵母提取物的添加对*F. acidiphilum*的生长至关重要，其最佳浓度为200 mg/L。与这些观察结果一致的是，*F. acidiphilum* YT基因组缺乏除氨基酸外的其他常见有机化合物的转运和同化相关的基因，只有一个完整的碳水化合物ABC转运体（FAD\_1026-1028），但至少发现7个寡肽/肽ABC转运体和17个氨基酸转运体。除了这些转运蛋白外，*F. acidiphilum* YT基因组还含有48个转运蛋白基因，这些转运蛋白属于主要促进因子超家族（MFS）。虽然还没有证实，但这个庞大而多样的次级转运体群可能也参与了结构和功能上无关化合物的排出，以及包括离子、氨基酸和肽等多种底物的摄取。这些MFS相关基因与位于膜上的和转座酶IS4家族蛋白、氨基酸转运体或维生素生物合成的相关基因在染色体上相邻，说明他们的功能可能存在关联性。

*F. acidiphilum* YT 的MFS相关蛋白与Thermoplasmatales目对应的蛋白表现出显著的相似性。根据数据库（http://supfam.org/SUPERFAMILY）Thermoplasmatales目在已知广古菌中拥有最多MFS蛋白（每个基因组平均13个）。与寡肽/肽转运体的丰度一致，嗜酸菌*F. acidiphilium* YT基因组编码16个胞质膜相关蛋白酶和氨基酸肽酶，包括具有氨基酸肽酶活性的三角（tricorn）蛋白酶FAD\_0691及其整合因子F2（FAD\_0645）和F3（FAD\_0317），三角蛋白酶可以依次降解寡肽，产生游离氨基酸。除了这种复杂的蛋白水解机制外，嗜酸菌YT的基因组还编码三种分泌型酸性蛋白酶（FAD\_0679、0833和1292）。基因组分析表明，*F. acidiphilum* YT具有特殊的代谢能力，可以有效地将蛋白质和多肽转化为氨基酸，这与生理学结果一致。值得注意的是，当酵母提取物浓度大于200mg/L时，*F. acidiphilum* YT的生长受到强烈影响，当浓度大于2g/L时，生长完全受到抑制。从基因组分析中作者可以看出，嗜酸菌YT的细胞膜上很可能含有大量的蛋白质和氨基酸转运复合物，这些复合物决定了其独特的分解蛋白类营养物质的能力。但大量营养物质突然进入细胞质，可能会破坏呼吸链的代谢平衡，产生有害活性氧分子，如羟基自由基和过氧化物。此外，*F. acidiphilum* YT细胞质会被有机化合物充满，导致细胞脱水死亡。综上所述，这些结果表明*F. acidiphilium* YT古菌是一种专性的蛋白降解营养型以及化能混合营养型古菌。

*F. acidiphilium* YT的基因组中不存在已知的CO2固定途径，这表明*F. acidiphilium* YT同化无机碳的能力可能是回补型CO2同化的结果。值得一提的是嗜酸杆菌的普遍性和它们基因组的显著保守性。铁的氧化能力是迄今为止所培养和研究的Thermoplasmatales目古菌成员独有的特征，这代表了一定的优势以及生态位中的物种特征，可能与这些古菌的广泛分布有关。这与迄今为止只在日本岛屿上发现的*Picrophilus*属或*Thermogymnomonas*属形成了鲜明对比。

另外一个有趣的发现是，在实验室培养约550代后，*F. acidiphilum* YT的基因组中出现了相对较多的单核苷酸取代。作者假设，造成如此高的突变率的原因可能是在最佳的培养条件下*F. acidiphilum* YT生长速度更快，这对于这些古菌来说是非典型的，因为它们在自然栖息地的真实生活中往往表现出显著的基因组保守性，即使在地理位置遥远的种群中也是如此。核苷酸取代分析表明，*F. acidiphilum* YT的基因组倾向于进一步降低GC含量。同义氨基酸取代与非同义氨基酸取代的比值以及编码区与非编码区之间单核苷酸取代的分布表明，在最优的培养条件下，中性漂移是*F. acidiphilum* YT基因组进化的普遍模式。这一假设的验证还需要对在连续生物反应器中运行的平行细胞系进行更深入的实验分析，以及更多的代时的基因组进行分析。

**方法**

**3.1参考菌株和生长条件**

*F. acidiphilum* YT（DSM 12658T）于1998年保存于DSMZ，并于2008年对DSMZ中原始分离株进行基因组测序。*F. acidiphilum* YT在含有25 g/L FeSO4.7H2O以及0.02%（w/vol）酵母提取物。为了计算单代突变率，自1998年该菌株存放到DSMZ菌株培养库后，在最优条件下，在100 ml Erlenmeyer烧瓶中培养。每次接种10ml，重复生长实验164次。对最终培养物（2008）进行DNA提取测序。利用基因组DNA提取试剂盒对两种突变体进行DNA分离提取。

**3.2 测序和组装**

*F. acidiphilum* YT的从头测序是在利物浦大学基因组中心的454 FLX Ti（布兰福德，美国）上使用标准库（34x覆盖率）进行的。基因组组装和Gap的闭合由公司Fidelity Systems Ltd.（美国马里兰州盖瑟斯堡市）使用Phred/Phrap以及Consed完成，操作完成最终的序列组装。DupFinisher用于纠正重复的错误装配，384个Sanger端序列fosmids用于生成scaffold （覆盖率为0.98 x）。基因组在Fidelity Systems公司（USA）使用Fgenesb:2.0自动注释，并使用GenDB v. 2.2.1注释系统手动整理。核糖体RNA基因通过BLAST比对公共核苷酸数据库进行识别，使用tRNAScan-SE v. 1.2163识别tRNA基因。CRISPRFinder 在线服务器用于标识CRISPRs。利用Illumina（平均覆盖面积233）对实验室培养约550代嗜酸菌YT变异株的基因组进行测序，并将测序结果与组装型菌株基因组进行比对。将嗜酸菌YT的基因组序列存入GenBank/EMBL/DDBJ数据库，登录号为CP015363。

**3.3 RNA分离与定量逆转录PCR分析（Q-RT-PCR）**

采用Q-RT-PCR方法对10个靶基因转录本的丰度进行估计。*F. acidiphilum* YT细胞培养4天后（从对应静止期相开始），将15-25 ml培养物在9000 rpm下离心15 min，用miRVANA kit （Ambion）快速纯化总RNA。RNA样品采用Turbo去DNA试剂盒（Ambion Austin, TX, USA）处理。为了消除RNA制剂中残留的DNA污染，在互补DNA（cDNA）生产之前，加入第二次DNA酶进行处理（DNase I, Invitrogen）。cDNA合成采用上标II逆转录酶（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA），总RNA为100ng，使用随机六聚体引物（Thermo Fisher Scientific）2pmol，按照说明书进行。所有RT-PCR实验均使用ABI 7500快速实时PCR系统进行循环反应。采用Primer Express软件v.2.0（Applied Biosystems, USA）设计基因特异性引物和TaqMan探针。RNA样品与对照同时进行三次检测。反应条件为：50℃反应2 min, 95℃反应10 min, 95℃反应15 s循环40次，60℃反应1 min。

通过检测PCR产物的温度依赖性熔融曲线和克隆扩增子测序，检测PCR特异性和产物量。

基于放大产生的荧光达到特定检测阈值（Ct值）所需要的周期数生成RT-PCR定量数据。RT-PCR扩增采用自动设置基线和阈值以及相对标准曲线法进行分析。所有放大的标准都是基于已知数量的克隆目标模板。通过从基因组DNAPCR扩增目标基因产生扩增子。然后使用Wizard SV凝胶和PCR净化系统试剂盒（Promega, Madison, WI, USA）纯化得到的扩增子，并在pGEM-T Easy Vector System I（Promega）中克隆。使用QIAprep Spin Miniprep试剂盒（Qiagen, Hilden, Germany）提取质粒，使用Nanodroprd-1000分光光度计测定DNA浓度。标准曲线基于107 ~ 101个基因拷贝的序列的梯度稀释。然后用软件自动生成Ct值，计算三次的平均Ct值和标准差（SD）值。

**译者简介**

黎亮志，18级生物工程硕士，中南大学资源加工与生物工程学院本硕，研究方向为环境微生物组学，目前主攻极端嗜酸微生物的基因组学研究，曾在微生物学国际学术期刊《Applied and environmental microbiology》发表一作论文。欢迎批评、指正和交流。邮箱：185611025@csu.edu.cn