

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (2) :187 - 192; 4 February 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140226

趋磁细菌 AMB-1 生物矿化相关蛋白 Mms6 参与磁小体的合成

王宽^{1,2}, 葛欣^{1,3}, 刘巍峰¹, 陈冠军^{1*}

¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100

² 国家知识产权局专利局专利审查协作北京中心, 北京 100190

³ 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002

摘要: 【目的】研究趋磁细菌 AMB-1 生物矿化相关蛋白 Mms6 与磁小体合成的关系。【方法】在液体静置培养条件和好氧条件下对 AMB-1 进行培养, 分析基因 *mms6* 在不同培养条件下转录水平的变化; 对基因 *mms6* 进行基因敲除, 分析突变株的生长和产磁变化。【结果】基因 *mms6* 的转录水平随着磁小体的合成逐渐升高; *mms6* 的突变导致菌株在液体静置培养条件下趋磁性降低约 50%, 但不会影响菌株的生长水平。【结论】基因 *mms6* 参与了趋磁细菌 AMB-1 胞内磁小体的合成。

关键词: 趋磁细菌 AMB-1, 生物矿化, Mms6, 磁小体

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 02-0187-06

趋磁细菌是一类能够沿着地球磁场运动或排列的原核生物^[1], 胞内含有一种独特的细胞器—磁小体。大多数趋磁细菌的磁小体是由磁铁矿 (Fe_3O_4) 组成, 一些海洋生境菌株的磁小体由硫铁矿 (Fe_3S_4) 组成。磁小体在细胞中可以排列成一条或多条链, 使菌体产生趋磁性^[2]。

磁小体的合成是一个复杂的过程, 主要包括: 铁的吸收, 细胞质膜内陷形成磁小体囊泡, 铁的转运以及磁铁矿的生物矿化等步骤, 这几个步骤不是独立的, 而是相互联系的, 受到基因组的严格控制^[3]。磁小体的合成与组装是一个“步进式”的过程, 包括细胞质膜内陷成为磁小体囊泡、磁小体蛋白的定位、磁小体排列成链、磁铁矿的生物矿化等步骤, 每个步骤分别有独立的基因控制^[4]。研究表明, MagA 有助于趋磁细菌从外界环境中吸收铁^[5], 膜蛋白

MamB, MamQ, MamI 和 MamL 在细胞质膜内陷成为磁小体囊泡的过程中发挥作用^[4], 磁小体可以沿着 MamK 蛋白所形成的纤维结构在胞内排列成链^[6], 酸性蛋白 MamJ 可以控制磁小体链的形成^[7]。

磁铁矿的生物矿化涉及了晶核的形成以及晶体成熟的过程, MamA 蛋白可以激活磁小体囊泡开始合成磁铁矿^[8]; 磁小体的数量、晶体形状、尺寸大小以及颗粒长宽比等性质均受到基因组的严格控制。研究发现趋磁细菌 AMB-1 中, 紧密结合在磁铁矿上的小蛋白 Mms6 在体外能够介导合成磁铁矿, 这种体外形成的磁铁矿呈现出立方八面体的晶体形态, 晶体颗粒尺寸均匀, 与 AMB-1 中的磁铁矿非常相似, 并且表现出相似的尺寸分布范围^[9-10]; 据此可以推测 Mms6 蛋白在胞内可能会控制趋磁细菌 AMB-1 所形成磁铁矿的形态, 从而参与磁铁矿的生

基金项目: 山东省 2013 年第二批海洋经济创新发展区域资源平台“海洋微生物菌种资源库平台”项目 (2150299)

* 通信作者。Tel: +86-631-5688199; Fax: +86-631-5681492; E-mail: guanjun@sdu.edu.cn

作者简介: 王宽 (1985 -), 男, 山东聊城人, 助理研究员, 博士。E-mail: wkuan1985@163.com

收稿日期: 2014-05-03; **修回日期:** 2014-09-25

物矿化过程。本文将在转录水平和基因水平上揭示生物矿化蛋白 Mms6 与胞内磁小体合成的关系, 从而为 Mms6 蛋白参与磁小体的合成提供直接的体内证据; 此外, Mms6 作为一种典型的生物矿化蛋白, 揭示该蛋白的体内作用也将有助于研究趋磁细菌在磁小体合成过程中的生物矿化机制。

1 材料和方法

1.1 菌株

本文所用的菌株和质粒见表 1。

表 1. 本文所用的菌株和质粒

Table 1. The bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Source or references
pAKO	pWM91 with kanamycin resistance cassette inserting into ampicillin-resistant gene, Km ^r	[8]
pAKO-mms6	pAKO with the internal fragment of mms6 to disrupt mms6, Km ^r	This study
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	Wild-type strain	ATCC 700264
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-Δmms6	Insertion mutagenesis of mms6 in AMB-1, Km ^r	This study
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 λ-thi ⁻¹ gyrA96 relA1	Laboratory stock
<i>E. coli</i> DH5α λpir	λpir lysogen of DH5α	Laboratory stock
<i>E. coli</i> WM3064	thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZΔM15 RP4 - 1360Δ(araBAD) 567ΔdapA1341:: [erm pir (wt)]	[8]

1.2 主要仪器设备

培养箱: 宁波江南仪器厂 Spx 智能型。摇床: 哈东联 HZQ-QX。分光光度计: Unic 7200。

PCR 仪: Bio Rad S1000 Thermal Cycler。荧光定量 PCR 仪: Bio Rad MyiQ。

1.3 培养方法

利用 LB 培养基在 37°C 对大肠杆菌进行培养, 采用加强的 MSGM 培养基^[11] 对趋磁细菌 AMB-1 在 26°C 进行培养, 采用下述两种不同的培养方式对 AMB-1 进行培养。

液体静置培养: 以 10⁶ cells/mL 的初始接菌量接种于 300 mL 血清瓶 (含 250 mL 培养基), 用橡胶塞密闭, 于 26°C 静置培养, 不通气, 不搅拌; 随着菌体的生长, 培养基中的溶氧会逐渐降到微好氧状态^[12]。

好氧培养: 以 10⁶ cells/mL 的初始接菌量接种于 300 mL 三角瓶 (含 200 mL 培养基), 用棉塞封口, 120 r/min 摇床培养。

1.4 趋磁细菌 AMB-1 生长与磁性测定方法

通过测定培养物在 600 nm 处的光吸收以检测细胞浓度。利用磁分光光度计测定菌体的趋磁性^[13], 最大光吸收和最小光吸收的比值定义为 C_{mag} (C_{mag} = E_{max}/E_{min} - 1), 无趋磁性菌体的 C_{mag} 值为零。

1.5 荧光定量 PCR 技术

通过荧光定量 PCR 技术测定不同培养条件下随着菌株的生长和产磁变化基因 mms6 转录水平的变化趋势; 基因 mms6 的荧光定量 PCR 所用引物 Q-6-F 和 Q-6-R, 16S rDNA (作为内参) 的荧光定量 PCR 所用引物 Q-16S-F 和 Q-16S-R, 引物序列如下。Q-6-F: 5'-GGTCGTCGGTGAACCATCTG-3', Q-6-R: 5'-CGACTTCCTCGCTCGCTCTGC-3', Q-16S-F: 5'-GCTCGTGTCTGAGATGTTG-3', Q-16S-R: 5'-TCCGAACTGAGATGGCTTT-3'。

1.6 基因 mms6 插入突变载体 pAKO-mms6 的构建

根据 AMB-1 基因组序列, 设计引物 K-6-F 和 K-6-R 扩增基因 mms6 内部基因片段, 将扩增的基因片段连接至基因敲除所用载体 pAKO。引物序列如下。K-6-F: 5'-GACTAGTGCTGCTCGTCATGCTTGATCTTTG-3', K-6-R: 5'-CCGCTCGAGACCGCCCCGGCCCAACAACGCCG-3'。

1.7 突变菌株 AMB-Δmms6 的获得及验证

将重组载体 pAKO-mms6 通过接合方法^[8] 转移到趋磁细菌 AMB-1 中, 得到基因 mms6 插入突变失活菌株 AMB-Δmms6。对突变株进行基因组 PCR 验证, 所用引物包括: 扩增质粒 pAKO 自身卡那霉素抗性基因的引物 Ka-F 和 Ka-R; 扩增 pAKO 自身携带

的耐受蔗糖基因 *SacB* 的引物 *Sac-F* 和 *Sac-R*; 以及扩增基因 *mms6* 两翼区域的引物 *M6L-F* 和 *M6L-R*。引物序列见表 2。

表 2. PCR 验证突变菌株 AMB- Δ *mms6* 所用引物

Table 2. Primers to identify the strain of AMB- Δ *mms6*

Primers	Sequence of primers
Ka-F	5'-CGCGTCGAATTAATTCGGCTAGC-3'
Ka-R	5'-CGCGTACCCAGAGTCCCGCTCAG-3'
Sac-F	5'-ATGAACATCAAAAAGTTTGCA AAC-3'
Sac-R	5'-TTATTGTTAAGTCTTAATTGTCC-3'
M6L-F	5'-TAATTGAAACAAGAGCCAGGC-3'
M6L-R	5'-TGACCCTCGTCGCCACCCAGCGT-3'

2 结果

2.1 AMB-1 的液体培养特征

液体静置培养时, 在 6 个生长点即培养至 28、32、37、40、42、48 h 后进行取样 (图 1) 并检测其趋磁性。培养 28 h 时菌体无趋磁性; 在 32、37 和 40 h 时菌体处于指数生长期, 而在同一时期, 菌体的趋磁性也处于指数增长阶段; 在菌体生长达到稳定期时 (培养至 42 h 和 48 h) 菌体的趋磁性也趋于稳定。图 2 显示了在好氧培养时菌体的生长曲线, 好氧培养时 AMB-1 不合成磁小体, 无趋磁性; 由图 2 可知, 菌体在好氧培养时的最大菌浓约为液体静置培养时的两倍以上, 在指数生长期的 3 个生长点即培养至 36 h、44 h、52 h 后进行取样。

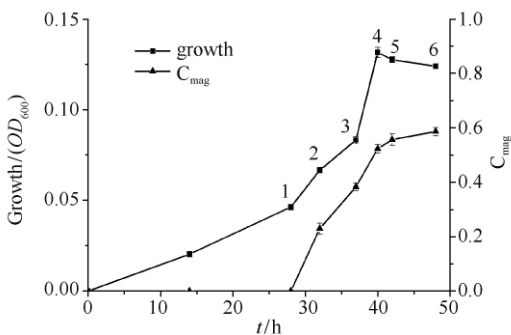


图 1. 液体静置培养条件下趋磁细菌 AMB-1 生长 (growth) 和产磁 (C_{mag}) 曲线

Figure 1. The growth and magnetism of AMB-1 under static conditions.

2.2 *mms6* 转录水平的变化

将上述取样点得到的细胞提取 RNA, 分别进行 RT-PCR, 反转录为 cDNA; 以反转录 PCR 反应得到

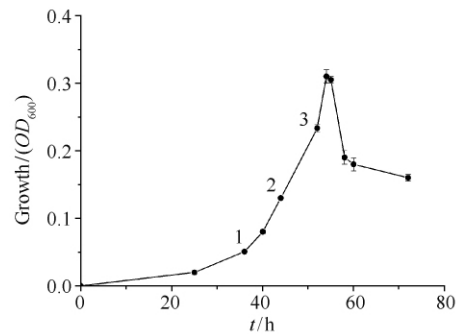


图 2. 好氧培养条件下趋磁细菌 AMB-1 生长曲线

Figure 2. The growth of AMB-1 under aerobic conditions.

的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应, 得到在液体静置和好氧培养时基因 *mms6* 在不同取样点转录水平的变化 (图 3)。

由图 3 可知, 在液体静置培养时, 基因 *mms6* 的转录水平在不同的取样点表现出明显的变化趋势, 其转录水平的高低与菌体产磁水平的变化有关; 在取样点 1 基因 *mms6* 的转录水平较低, 随着菌体表现出趋磁性 (取样点 2-4) *mms6* 的转录水平开始上升; 在 C_{mag} 值升高到最高值时 (取样点 4) *mms6* 的转录达到最大值, 而菌体产磁水平一旦趋于稳定 (取样点 5 和 6) *mms6* 的转录又逐渐下降。在好氧条件下培养时, 基因 *mms6* 的转录水平要远低于在液体静置培养时的转录水平, 随着菌体生长 *mms6* 的转录水平也没有产生剧烈的波动, 这可能是由于在好氧培养时菌体不合成磁小体, 也就不需要 *mms6* 参与生物矿化过程。

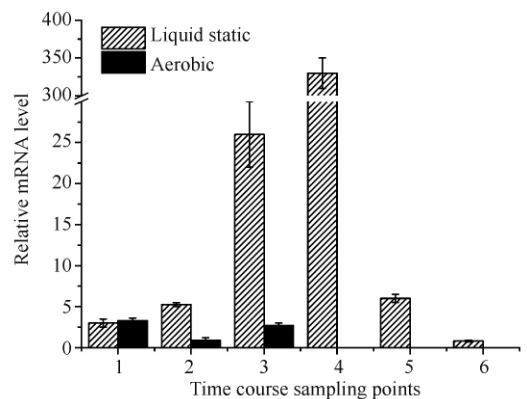


图 3. 液体静置培养和好氧培养条件下各生长点 *mms6* 转录水平分析

Figure 3. Analysis of transcript of *mms6* under static conditions and aerobic conditions.

2.3 突变株 AMB- Δ mms6 的获得

将重组载体 pAKO-mms6 通过接合的方式转移到趋磁细菌 AMB-1 中, 得到抗性接合子, 用 1.7 所示的引物对接合子进行 PCR 验证, PCR 扩增 AMB-1 基因 *mms6* 两翼片段时, 以野生型 AMB-1 为模板能扩增出特异性的目的条带, 但以突变株为模板时不能扩增出目的条带; PCR 扩增载体 pAKO 上的片段 (卡那霉素抗性基因和不耐受蔗糖基因 *SacB*) 时, 以突变株为模板能扩增出特异性目的条带, 但以野生型 AMB-1 为模板时不能扩增出目的条带 (图 4)。这说明通过同源重组, 载体 pAKO-mms6 交换到了基因 *mms6* 的特定区域, 成功得到了插入突变失活基因 *mms6* 的突变株 AMB- Δ mms6。

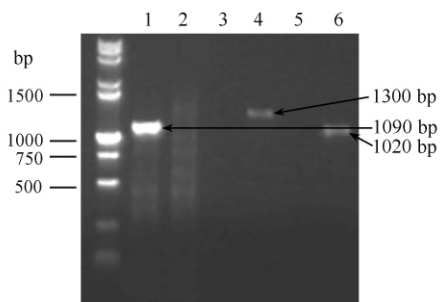


图 4. PCR 验证突变株 AMB- Δ mms6 电泳图谱

Figure 4. PCR verification of AMB- Δ mms6 strains. Lane 1 - 2: PCR for flank fragment of gene *mms6*; lane 3 - 4: PCR for kanamycin of pAKO; lane 5 - 6 PCR for *SacB* of pAKO; lane 1, 3, 5: PCR with template of AMB-1 wild-type strains; lane 2, 4, 6: PCR with template of AMB- Δ mms6 strains.

2.4 突变株 AMB- Δ mms6 生长特性的研究

对突变株 AMB- Δ mms6 的生长和产磁状况进行测量。结果发现, 在液体静置培养条件下与野生型 AMB-1 相比, 突变株的生长没有发生变化, 但 C_{mag} 值发生了明显的变化, 降低约 50% (图 5)。

3 讨论

磁小体的合成是一个复杂的过程, 受到基因的严格调控; 趋磁细菌基因组上有一段特殊的区域—“磁小体岛”, 该基因岛与磁小体的合成密切相关^[14-16]。磁小体合成是一个步进式的过程, 某个基因的缺失可能会影响某个步骤, 但并不会完全阻断磁小体的组装; 比如: 蛋白 MamK 的缺失导致胞内无法形成纤维结构, 磁小体无法成链排列, 但没有影

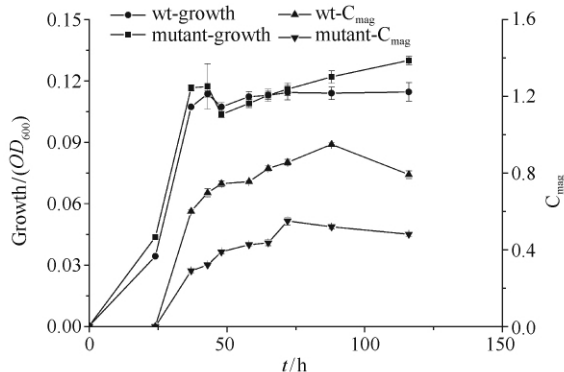


图 5. 液体静置培养条件下趋磁细菌 AMB-1 野生型 (wt) 和 AMB- Δ mms6 (mutant) 生长 (growth) 和产磁 (C_{mag}) 曲线

Figure 5. The growth and magnetism of AMB-1 wild-type strains (wt) and AMB- Δ mms6 strains (mutant) under static conditions.

响磁铁矿的合成^[6]; 除了 MamK 蛋白, 酸性蛋白 MamJ 也可以控制磁小体链的形成, 但磁铁矿的形成并没有受到影响, 磁小体聚集成簇而不会排列成有规则的链状^[7]; 对趋磁细菌 AMB-1 “磁小体岛”区域分段缺失发现只有 *mamAB* 基因簇的缺失才会导致菌体完全不合成磁小体^[4]。磁小体的成熟需要生物矿化作用控制磁铁矿的晶体成核、晶体生长并调控晶体形状以及颗粒大小, 体外实验发现蛋白 Mms6 在生物矿化作用中发挥重要作用^[9-10]。

溶氧是影响趋磁细菌 AMB-1 磁小体合成重要的环境因素, AMB-1 在好氧条件不合成磁小体; 在液体静置培养初期不合成磁小体, 随着溶氧的消耗逐渐表现出趋磁性; 这与 Yang 的研究结果一致^[11], 溶氧超过阈值将导致菌体不合成磁小体。本文通过荧光定量 PCR 发现 *mms6* 的转录与磁小体的合成密切相关, 在转录水平上揭示了 *mms6* 在胞内参与了磁小体的合成过程; 溶氧可能是影响 *mms6* 转录水平变化的重要因素, 适宜的溶氧条件将“激活”基因 *mms6* 的转录从而参与磁铁矿的生物矿化过程。

蛋白 Mms6 在体外可以介导合成磁铁矿^[9-10], 本文通过体内实验发现基因 *mms6* 的突变影响了磁小体的合成, 在基因水平上提供了证据表明 *mms6* 参与了生物矿化过程。生物矿化过程涉及了晶体成核、晶体生长和晶形调控等方面, *mms6* 的突变并没有导致磁小体合成的完全丧失表明该基因不会影响晶体的成核过程, 而是影响了晶体形状以及颗粒大小, 从而导致 AMB-1 的趋磁性发生变化。另一方

面, *mms6* 的突变影响了生物矿化过程但并未导致磁小体合成能力的完全丧失, 表明可能还有其他基因参与生物矿化过程, 我们可以从 *mms6* 出发寻找更多影响磁铁矿成核、生长和晶形的基因从而揭示磁小体胞内的生物矿化过程。

参考文献

- [1] Blakemore RP. Magnetotactic bacteria. *Science*, 1975, 190(4212): 377-379.
- [2] Bazylinski DA, Lefevre CT, Schuler D. Magnetotactic bacteria. *The Prokaryotes*, 2013: 453-494.
- [3] Jogler C, Schuler D. Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 501-521.
- [4] Murat D, Quinlan A, Vali H, Komeili A. Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(12): 5593-5598.
- [5] Nakamura C, Burgess JG, Sode K, Matsunaga T. An iron-regulated gene, *magA*, encoding an iron transport protein of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(47): 28392-28396.
- [6] Komeili A, Li Z, Newman DK, Jensen GJ. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science*, 2006, 311(5758): 242-245.
- [7] Scheffel A, Gruska M, Faivre D, Linaroudis A, Plitzko JM, Schuler D. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature*, 2006, 440(7080): 110-114.
- [8] Komeili A, Vali H, Beveridge TJ, Newman DK. Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(11): 3839-3844.
- [9] Amemiya Y, Arakaki A, Staniland SS, Tanaka T, Matsunaga T. Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6. *Biomaterials*, 2007, 28(35): 5381-5389.
- [10] Arakaki A, Webb J, Matsunaga T. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(10): 8745-8750.
- [11] Yang C, Takeyama H, Tanaka T, Matsunaga T. Effects of growth medium composition, iron sources and atmospheric oxygen concentrations on production of luciferase-bacterial magnetic particle complex by a recombinant *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 29(1): 13-19.
- [12] Sun JB, Zhao F, Tang T, Jiang W, Tian JS, Li Y, Li JL. High-yield growth and magnetosome formation by *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 in an oxygen-controlled fermentor supplied solely with air. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(3): 389-397.
- [13] Zhao L, Wu D, Wu LF, Song T. A simple and accurate method for quantification of magnetosomes in magnetotactic bacteria by common spectrophotometer. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007(3), 70: 377-383.
- [14] Ullrich S, Kube M, Schubbe S, Reinhardt R, Schuler D. A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(21): 7176-7184.
- [15] Fukuda Y, Okamura Y, Takeyama H, Matsunaga T. Dynamic analysis of a genomic island in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 reveals how magnetosome synthesis developed. *FEBS Letters*, 2006, 580(3): 801-812.
- [16] Komeili A. Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(1): 232-255.

Function of Mms6 related to biomineralization in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 with magnetosomes formation

Kuan Wang^{1,2}, Xin Ge^{1,3}, Weifeng Liu¹, Guanjun Chen^{1*}

¹ The State Key Laboratory of Microbial Technology, School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, Shandong Province, China

² Patent Examination Cooperation Center of the Patent Office, SIPO, Beijing 100190, China

³ Life Science School of Hebei University, Baoding 071002, Hebei Province, China

Abstract: [Objective] The function of Mms6 related to biomineralization on the magnetosome formation in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 was studied. [Methods] The transcript of *mms6* was analyzed under static and aerobic conditions with Real-time RT-PCR. We observed the cell growth and magnetism of the mutation in which *mms6* was mutated. [Results] The transcript of *mms6* increased with the formation of magnetosomes. Mutation of *mms6* caused about 50% decrease of magnetism in AMB-1 under static conditions, however, the cell growth of mutant was similar as to that of the wild type. [Conclusion] Gene *mms6* is involved in the magnetosome formation of AMB-1.

Keywords: *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, biomineralization, Mms6, magnetosomes

(本文责编:张晓丽)

Supported by 2013 Shandong Provincial Second Group Projects on Resource Platforms for Marine Economic and Innovative Development Regions: Marine Microorganisms Preservation Platform (2150299)

* Corresponding author. Tel: +86-631-5688199; Fax: +86-631-5681492; E-mail: guanjun@sdu.edu.cn

Received: 3 May 2014 / Revised: 25 September 2014