科学通报 2009 年 第 54 卷 第 1 期: 41 ~ 45
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

腾冲嗜酸两性菌硫氧化还原酶分子结构中铁原子结合位点的新特征

陈志伟, 姜成英, 刘双江*

中国科学院微生物研究所, 北京 100101
* 联系人, E-mail: liusj@im.ac.cn

2008-10-01 收稿, 2008-12-11 接受
国家自然科学基金(批准号: 30670018, 30621005)资助项目

Chen Z W, Jiang C Y, Liu S J. Site-directed mutagenesis reveals new and essential elements for iron-coordination of the sulfur oxygenase reductase from the acidothermophilic *Acidianus tengchongensis*. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(4): 652—657
doi: 10.1007/s11434-009-0060-3

摘要 前期研究表明, 铁原子对于嗜酸两性菌中硫氧化还原酶(SOR)的活性至关重要. 本研究表明, 2,2′-联吡啶、1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸钠、8-羟基喹啉等特异性铁离子螯合剂强烈抑制腾冲嗜酸两性菌 SOR 酶活性, 进一步表明铁原子是 SOR 酶活必需. 对目前基因组数据库中的 SOR 基因或者 SOR 类似基因进行序列比对, 发现了一个潜在的铁原子结合模体(H^{86}-X_3-H^{90}-X_n-E^{114}-X_n-E^{129}). 据此, 本研究采用定点突变技术, 将氨基酸残基 H^{86}, H^{90} 和 E^{129} 分别突变为苯丙氨酸或者丙氨酸, 圆二色光谱测定发现突变体(H^{86}F, H^{90}F 和 E^{129}A)的二级结构没有明显改变, 但是这 3 个突变体全部丧失了酶活性. 突变体蛋白中铁原子含量测定结果表明, 3 个突变体全部或者部分丢失了铁原子, 而之前研究中获得的 3 个半胱氨酸突变体(完全丧失了酶活)铁原子含量没有变化. 根据本研究并结合前期实验结果可知, SOR 分子中模体 C^{31}-X_n-C^{101}-X_2-C^{104} 是底物硫分子活化区域; 而模体 H^{86}-X_3-H^{90}-X_{23}-E^{114}-X_{14}-(E/D)^{129} 是 SOR 分子中铁原子的结合区域, 与铁原子结合形成一个非卟啉铁中心, 是 SOR 的氧化还原中心; 这两个区域均是 SOR 酶活性的必需部分.

关键词
嗜酸嗜热古菌
腾冲嗜酸两性菌
硫氧化还原酶
硫代谢
非卟啉铁中心

元素硫(S^0)的生物氧化还原作用是地球上硫元素生物地质化学循环中的重要反应. 在富含硫元素的陆地或深海热泉中经常可以检测并分离到与元素硫代谢相关的嗜热酸古菌, 如硫化叶菌(*Sulfolobus*)和嗜酸两性菌(*Acidianus*)[1~4], 说明这些微生物在环境中扮演着重要的角色. 硫化叶菌属和嗜酸两性菌属的物种通过氧化元素硫获得能量, 这一过程的第一步反应——元素硫氧化是通过硫氧化还原酶(sulfur oxygenase reductase, SOR)完成的. 至今, 研究人员已在*Acidianus ambivalens*[5,6], *Acidianus tengchongensis* (同*Acidianus* sp. strain S5)[7~9], *Acidianus brieleyi*[10] 以及*Sulfolobus tokodai*[11]发现并证实了SOR的存在.

在分子氧存在的条件下, SOR催化元素硫歧化生成亚硫酸、硫代硫酸和硫化氢[5,10]. 这个酶是一个含有 24 个相同亚基的多聚体, 单体分子量为 35 kD[5,9], 不需辅酶或电子供体/受体参与反应[12,13]. 鉴于元素硫的特殊性质(疏水性和难溶性, 5 μg/L, 20℃)[12], 以及此酶在嗜热酸古菌硫氧化代谢的关键性, 人们越来越关注硫氧化还原酶的反应机理. 本实验室的前期研究表明, SOR中的 3 个半胱氨酸残基(C^{31}, C^{101} 和 C^{104}, 编号参考腾冲嗜酸两性菌的SOR序列)为酶的必需氨基酸残基[14].

通过对已知或推测的SOR分子的氨基酸序列进

行比对，发现了一个潜在的铁离子结合位点——H^{86}-X_3-H^{90}和E^{129}模体. 近期的研究表明，H^{86}，H^{90}和E^{114}为*Acidianus ambivalens*硫氧化还原酶中铁离子的结合位点[15]. 在本研究中，我们进一步证实了在腾冲嗜酸两性菌的SOR中 129 位的谷氨酸残基(E^{129})也为铁离子的结合位点和酶活性的必需基团.

1 材料与方法

(ⅰ) 菌株、质粒和培养条件. 本研究所使用的菌株和质粒见表 1，大肠杆菌菌株在 37℃条件下用 LB 液体或固体培养基进行培养，对于含有质粒的菌株则添加 100 μg/mL 的氨苄青霉素. 菌株的生长通过可见分光光度计进行测定(A_{600nm}). 硫氧化还原酶及其突变基因克隆于 pBV220 载体并于 HB101 菌株中表达. 重组菌株先在 30℃条件下培养至 A_{600nm} 约为 0.6，马上转入 42℃水浴摇床中继续震荡表达 8 h. 表达的菌体离心收集(8000×*g*)后保存于−73℃.

(ⅱ) DNA 聚合酶、限制性内切酶和其他化合物. Pyrobest DNA 聚合酶(高保真 DNA 聚合酶)和 dNTPs 购于 TaKaRa，限制性内切酶购于 TaKaRa 或 NEB. 2,2′-联吡啶、1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸钠、8-羟基喹啉和 BCA 蛋白检测试剂盒购于 Sigma. 碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗购于北京中山生物科技.

(ⅲ) 蛋白提取和纯化. 蛋白粗提物的制备如文献[9,13]所述. 含有SOR或其突变体的蛋白粗提物先置于 75℃水浴中热处理 15 min，然后高速离心(15000×*g*) 10 min以去除大部分变性的大肠杆菌蛋白. 所得的上清液(含有大部分的重组蛋白)导入Hitrap™ Q HR 5 mL的阴离子交换柱(用 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 预平衡)进行纯化，重组蛋白通过氯化钠梯度(0~1 mol/L)洗脱，收集洗脱组分，野生型测定酶活性，SOR突变体则通过SDS-PAGE和Western blotting检测[9]. 所得的重组蛋白组分合并，用超滤管(Vivaspin-20，100 kD，Sartarius)浓缩，然后用Superdex™ 200 HR(用 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 预平衡)进一步纯化. 所用的蛋白纯化步骤均于FPLC系统上运行(Äkta FPLC，GE Healthcare). 纯化所得的蛋白超滤浓缩后保存于−20℃.

(ⅳ) 定点突变和常规DNA操作. 用于定点突变的引物序列均列于表 1. H^{86}，H^{90}和E^{129}位点的突变通过全质粒扩增和*Dpn* Ⅰ筛选的方法进行[16]. 突变的基因通过活性测定并进一步测序鉴定. 常规的DNA操作，如质粒提取、酶切和转化等，参考文献[16].

(ⅴ) 蛋白浓度和 SOR 酶活性测定. 蛋白浓度通过 BCA 蛋白测定试剂盒测定(BCA1, Sigma). 硫氧

表 1 本研究中使用的菌株、质粒和引物

引物	性质或序列	来源或参考文献
菌株		
HB101	硫氧化还原酶及其突变体的表达菌株	
XL1-blue	用于一般转化和定点突变	Stratagene 公司
质粒		
pBV220*sor*	野生型硫氧化还原酶表达质粒	[7]
pBV220*sor*/H86F	硫氧化还原酶突变体(H86F)表达质粒	本研究
pBV220*sor*/H90F	硫氧化还原酶突变体(H90F)表达质粒	本研究
pBV220*sor*/E129A	硫氧化还原酶突变体(E129A)表达质粒	本研究
pBV220*sor*/C31S	硫氧化还原酶突变体(C31S)表达质粒	本研究
pBV220*sor*/C101S	硫氧化还原酶突变体(C101S)表达质粒	本研究
pBV220*sor*/C104S	硫氧化还原酶突变体(C104S)表达质粒	本研究
引物 a)		
H1F	GTGGAAAGATTGGAAAGATTTTGAAGAAATGCACAGACAAAAC，用于H86F突变	本研究
H1R	GTTTTGTCTGTGCATTTCTTCAAAATCTTTCCAATCTTTCCAC，用于H86F突变	本研究
H2F	GGAAAGATCATGAAGAAATGTTCAGACAAAACTGGAGTTACC，用于H90F突变	本研究
H2R	GGTAACTCCAGTTTTGTCTGAACATTTCTTCATGATCTTTCC，用于H90F突变	本研究
E-F	GACATGCCAATAAACACTGCGATGACAGATTTCACTGC，用于E129A突变	本研究
E-R	GCAGTGAAATCTGTCATCGCAGTGTTTATTGGCATGTC，用于E129A突变	本研究

a) 突变位点用下画线标示

化还原酶的氧化酶活性测定如之前所述[14]. 酶活单位为 1 min产生 1 μmol/L氧化产物(亚硫酸和硫代硫酸)所需的酶量. 亚硫酸和硫代硫酸的浓度分别通过碱性品红和亚甲基蓝方法测定[14].

(vi) SDS-PAGE和Western blotting. 重组蛋白的SDS-PAGE电泳参照Laemmli[17]的方法, Western blotting参照文献[9].

(vii) 铁离子及其他化合物对SOR酶活性的影响. 2,2′-联吡啶(2,2′-dipyridyl)是二价铁离子的特异螯合剂, 而三价铁离子则为 1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸钠(4,5-dihydroxy-*m*-benzenedisulfonic acid, Tiron)和 8-羟基喹啉 (8-hydroxyquinoline, 8-HQ)所特异螯合. 为了检测铁离子和这些铁离子特异螯合剂对 SOR 酶活性的影响, 在酶反应体系中加入不同浓度的这些离子和化合物(表 2), SOR 蛋白量为 10 μg(5 mL 反应体系). 在室温下放置 15 min, 然后转入 75℃水浴中反应 30 min. 对照为不加化合物或不加酶的反应体系.

表 2 铁离子(二价和三价)及其特异螯合剂对硫氧化还原酶活性的影响 a)

化合物	浓度/mmol·L^{-1}	残留活性(%)
对照	–	100.0
Fe^{2+}	1.0	31.5
Fe^{3+}	1.0	0.3
2,2'-联吡啶	0.04	21.1
	0.2	0.0
Tiron b)	0.1	55.0
	1.0	52.8
8-羟基喹啉	0.1	44.0
	1.0	17.8
2,2'-联吡啶/超滤	10.0	199.4
Tiron/超滤	10.0	239.7

a) 2,2′-联吡啶(200 mmol/L)、1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸钠(Tiron)(500 mmol/L)和 8-羟基喹啉(500 mmol/L)分别溶解于二甲基亚砜(DMSO)、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)和乙醇. 每一个测定做 3 个平行. b) Tiron 对酶活性测定有影响

(viii) SOR 及其突变体铁含量测定. SOR 及其突变体的纯化如前所述, 但需特别注意防止外源铁离子的污染. 缓冲液使用超纯 Tris (Cat. No. 75825, USB)和色谱纯的盐酸(北京益利)配制, 所有的玻璃容器均用色谱纯的硝酸(50%, 用超纯水稀释)洗 3 遍. 重组蛋白超滤浓缩后以透过液作为空白对照.

蛋白和缓冲液的铁离子浓度通过原子发射光谱(ICP-AES, IRIS Advantage, Thermo Jarrell Ash Co.)测定(北京普尼物化分析中心). 3 mg 的蛋白用色谱纯硝酸消化, 得到 10 mL 消化液. 取 3 mL 消化液进行测定, 每个样品设 3 个平行组. 仪器测定的参数: 蠕动泵流速为 1.85 mL/min; 功率为 1150 W; CID 检测器温度为–50.2℃; 喷雾器压力为 22 psi (1 psi = 0.155 cm^{-2}); 铁离子的检测波长为 259.94 nm. 此条件下的仪器检测极限为 2 ppb (parts per billion).

2 实验结果

2.1 铁离子及其特异螯合剂对 SOR 酶活性的影响

从表 2 可以看出, 二价和三价铁离子对硫氧化还原酶的活性都有强烈的抑制作用, 尤其是三价铁离子, 在浓度为 1 mmol/L 时就能使 SOR 几乎完全失活(仅剩余 0.3%的酶活性). 二价铁离子的特异螯合剂 2,2′-联吡啶能在低浓度下(0.2 mmol/L)使 SOR 完全失活; 而对于三价铁离子的特异螯合剂, 1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸钠和 8-羟基喹啉, 在 0.1 或者 1 mmol/L 的浓度下能够使 SOR 活性下降 45%~83.3%. 当这些特异螯合剂通过反复超滤和稀释清除以后, SOR 的活性得到恢复, 甚至提高.

2.2 SOR 及其突变体的构建和表达

通过定点突变(全质粒扩增和 *Dpn* Ⅰ筛选)的方法得到 SOR 的 3 个突变体 $H^{86}F$, $H^{90}F$ 和 $E^{129}A$, 这些突变基因转入大肠杆菌后, 热诱导重组大肠杆菌细胞可以有效表达这些 SOR 或者 SOR 突变体(30~42℃). 经纯化后, 利用 SOR 蛋白特异性抗体, 经 Western blotting 证明表达的蛋白是 SOR 蛋白(图 1).

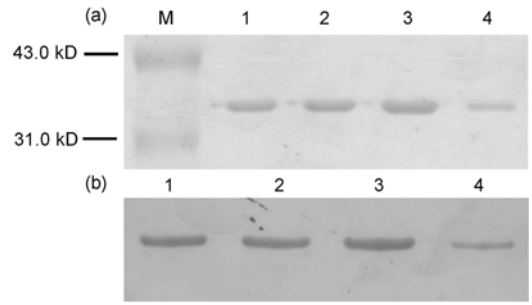

图 1 硫氧化还原酶及其突变体的 SDS-PAGE(a)和 Western blotting 检测(b)

M, 蛋白标准物; 1, 硫氧化还原酶; 2, $H^{86}F$; 3, $H^{90}F$; 4, $E^{129}A$

2.3 SOR 及其突变体的酶活性和铁含量

如表 3 所示, SOR 分子的 H^{86}, H^{90} 和 E^{129} 分别被苯丙氨酸或丙氨酸取代后完全丧失了酶活性. 对比

表 3 硫氧化还原酶及其突变体的活性和铁原子含量

酶	铁原子含量/ mol·mol^{-1} 亚基	铁原子残留率 (%±相对标准偏差)	相对活性残留率(%)
SOR	1.86	100 ± 0.89	100
$C^{31}S$	1.95	105 ± 1.10	0
$C^{101}S$	2.40	129 ± 0.95	1.6
$C^{104}S$	2.65	142 ± 0.98	0.8
$H^{86}F$	0	0 ± 0.96	0
$H^{90}F$	0.60	32.2 ± 0.89	0
$E^{129}A$	0.81	43.5 ± 0.88	0

SOR 及其突变体的圆二色光谱(图 2), 表明其二级结构没有发生明显变化, 说明这些突变体丧失酶活性的原因不是由于蛋白分子结果变化引起的.

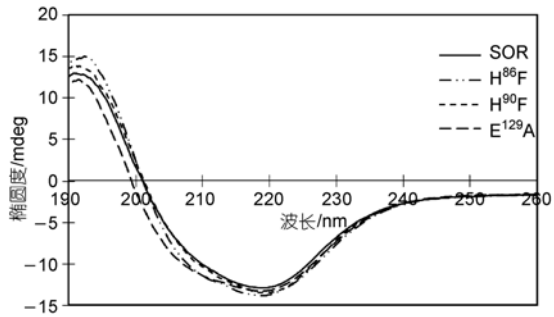

图 2 硫氧化还原酶及其突变体的圆二色光谱

这些突变体的二级结构没有明显变化. 蛋白浓度为 100 μg/mL, 扫描范围为 190~260 nm

SOR及其 6 个突变体($H^{86}F$, $H^{90}F$, $E^{129}A$, $C^{31}S$, $C^{101}S$和$C^{104}S$, 后 3 个突变体在之前的研究中获得[14])的铁原子含量的测定结果表明(表 3), 半胱氨酸残基突变体的铁原子含量与野生型基本一致, 但$H^{86}F$完全不含铁原子, 而$H^{90}F$和$E^{129}A$的铁原子含量则有不同程度的下降(分别仅为野生型的 32.2%和 43.5%).

3 讨论

以前的研究表明, SOR中可能含有一个低能量单核的非卟啉铁中心, 而且这个非卟啉铁中心为SOR活性所必需; 同时, 在复性SOR的包涵体时必须加入铁离子(二价或三价)才能得到有活性的酶分子[12]. 本研究结果表明铁离子(二价和三价)及其特异性螯合剂对SOR酶活性有很强的抑制作用, 所以进一步对其铁离子结合的必需氨基酸位点进行了研究. Urich等人[12]研究表明, 从*A. ambivalens*野生菌株中纯化和在大肠杆菌重组表达的SOR中亚基的铁原子含量分别为 1 和 2.2. 本研究结果表明, 重组的腾冲嗜酸两性菌的SOR每摩尔亚基中含有 1.86 mol铁离子. 铁离子(二价和三价)对SOR活性的结果表明, 过量的二价和三价铁离子均对酶活性有明显抑制作用(表 2). 同时, 通过数次超滤和稀释去除过量的铁离子后SOR的活性得到恢复, 表明铁离子的抑制作用并非铁离子对SOR的修饰, 可能是过量的铁离子与SOR中的铁离子中心发生竞争性抑制作用. 铁离子的特异性抑制剂(2,2′-联吡啶、1,2-二羟基苯-3,5-二磺酸钠和 8-羟基喹啉)实验结果证实了酶分子中结合的铁原子为SOR活性所必需, 但外加的过量铁离子则对酶活性有明显抑制作用. 在反应体系中加入上述铁离子特异螯合剂使SOR活性下降 45%~100%, 在随后实验中去除这些铁离子特异螯合剂之后SOR的活性得到恢复甚至提高.

非卟啉铁中心(H-X_3-H-X_n-E/D)在邻苯二酚双加氧酶、rieske铁硫蛋白双加氧酶、α-酮戊二酸依赖酶、喋呤依赖水解酶以及其他一些氧化酶中广泛存在[18]. 本研究和前期工作中对SOR及其相似基因的氨基酸序列进行比对和分析结果表明, SOR分子中存在一个潜在的铁结合模体H^{86}-E-E-M-H^{90}, E^{114} 和E^{129}[13~15]. 对来源于*A. ambivalens*硫氧化还原酶定点突变研究表明, 这个非卟啉铁中心包括H^{86}, H^{90}和E^{114}[13,15], 然而E^{129} 的功能并没有得到证实. 在嗜酸两性菌和硫化叶菌属的SOR基因中, 129 位的谷氨酸残基(E^{129})是非常保守的; 而在与嗜酸两性菌和硫化叶菌属亲缘较远的*Ferroplasma*和*Aquifex*属中的SOR基因中, E^{129} 则被与其性质相似的天冬氨酸残基所取代. 在本研究中, E^{129} 和其他两个组氨酸残基(H^{86} 和H^{90})分别被取代为丙氨酸或苯丙氨酸. 得到的 3 个突变体, $H^{86}F$, $H^{90}F$和$E^{129}A$, 都完全丧失了酶活性, 但它们对于铁离子的结合作用却不尽相同: $H^{86}F$完全不含铁离子, 而另外两个突变体——$H^{90}F$和$E^{129}A$则还残留 32.2%和 43.5%的铁离子含量. SOR以这些突变体的圆二色光谱(图 2)比较表明, 这些位点的突变没有改变SOR的二级结构, 所以这些突变体失活的原因, 可能是由于改变了SOR分子中与催化相关的氨基酸残基. 假如铁离子(二价或者三价)的结合位点是这些氨基酸残基, 那么就很容易理解如果这些氨基酸残基被不含电荷的其他氨基酸残基所取代的话, 相应的这些突变体的铁离子含量就会下降甚至丧失. 本研究也表明与SOR活性密切相关的三个半胱氨酸残基(C^{31}, C^{101} 和C^{104})并没有参与铁离子的结合, 这是由于这 3 个突变体的铁离子含量与野生型相比并没有明显变

化.

本研究及前期研究表明, 3 个半胱氨酸残基(C^{31}, C^{101}和C^{104}), H^{86}, H^{90}和E^{129}为SOR活性所必需. 如同*Acidithiobacillus*和*Acidiphilium*中的硫氧化酶[19], 腾冲嗜酸两性菌的SOR中 3 个半胱氨酸残基可能是底物元素硫活化和结合的位点. 而保守模体H^{86}-X_3-H^{90}-X_{23}-E^{114}-X_{14}-E^{129}则可能作为单核亚铁的配基形成非卟啉铁中心, 就像恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)甲苯双加氧酶的非卟啉铁中心(E^{214}, D^{219}, H^{222}和H^{228})一样, 活化分子氧, 催化底物氧化反应进行[20]. 结合三维结构解析[21], SOR的催化机理还有待进一步详细研究.

参考文献

1 Brock T D, Brock K M, Belly R T, et al. *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Arch Mikrobiol, 1972, 84(1): 54—68[doi]

2 Burton N P, Norris P R. Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: Environmental rDNA analysis. Extremophiles, 2000, 4(5): 315—320 [doi]

3 Segerer A, Neuner A M, Kristjansson J M, et al. Acidianus infernus gen. nov., sp. nov., and Acidianus brierleyi comb. nov.: Facultatively aerobic extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaebacteria. Int J Sys Bacteriol, 1986, 36(4): 559—564

4 Simmons S, Norris R. Acidophiles of saline water at thermal vents of Vulcano, Italy. Extremophiles, 2002, 6(3): 201—207 [doi]

5 Kletzin A. Coupled enzymatic production of sulfite, thiosulfate, and hydrogen sulfide from sulfur: Purification and properties of a sulfur oxygenase reductase from the facultatively anaerobic archaebacterium *Desulfurolobus ambivalens*. J Bacteriol, 1989, 171(3): 1638—1643

6 Kletzin A. Molecular characterization of the *sor* gene, which encodes the sulfur oxygenase/reductase of the thermoacidophilic Archaeum *Desulfurolobus ambivalens*. J Bacteriol, 1992, 174(18): 5854—5859

7 He Z, Li Y, Zhou P, et al. Cloning and heterologous expression of a sulfur oxygenase/reductase gene from the thermoacidophilic archaeon *Acidianus* sp. S5 in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 2000, 193(2): 217—221 [doi]

8 He Z, Zhong H, Li Y. *Acidianus tengchongensis* sp. nov., a new species of acidothermophilic archaeon isolated from an acidothermal spring. Curr Microbiol, 2004, 48(2): 159—163 [doi]

9 Sun C W, Chen Z W, He Z G, et al. Purification and properties of the sulfur oxygenase/reductase from the acidothermophilic archaeon, *Acidianus* strain S5. Extremophiles, 2003, 7(2): 131—134

10 Emmel T, Sand W, Koenig W A, et al. Evidence for the existence of a sulfur oxygenase in *Sulfolobus brierleyi*. J Gen Microbiol, 1986, 132: 3415—3420

11 Liu S J. Archaeal and bacterial sulfur oxygenase reductase: Genetic diversity and physiological function. In: Dahl C, Friedrich C G, eds. Microbial Sulfur Metabolism. Heidelberg: Springer, 2008. 217—224

12 Urich T, Banerras T M, Leal S S, et al. The sulphur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is a multimeric protein containing a low-potential mononuclear non-haem iron center. Biochem J, 2004, 381(1): 137—146 [doi]

13 Urich T, Coelho R, Kletzin A, et al. The sulfur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is an icosatetramer as shown by crystallization and Patterson analysis. Biochim Biophys Acta, 2005, 1747(2): 267—270

14 Chen Z W, Jiang C Y, She Q X, et al. Key role of cysteine residues in catalysis and subcellular localization of sulfur oxygenase reductase of *Acidianus tengchongensis*. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(2): 621—628 [doi]

15 Urich T, Kroke A, Bauer C, et al. Identification of core active site residues of the sulfur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* by site-directed mutagenesis. FEMS Microbiol Lett, 2005, 248(2): 171—176 [doi]

16 Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

17 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227(5259): 680—685 [doi]

18 Koehntop K D, Emerson J P, Que L J. The 2-His-1-carboxylate facial triad: A versatile platform for dioxygen activation by mononuclear non-heme iron (II) enzymes. J Biol Inorg Chem, 2005, 10(2): 87—93 [doi]

19 Rohwerder T, Sand W. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. Microbiology, 2003, 149(7): 1699—1709 [doi]

20 Jiang H, Parales R E, Lynch N A, et al. Site-directed mutagensis of conserved amino acids in the alpha subunit of toluene dioxygenase: Potential mononuclear non-heme iron coordination sites. J Bacteriol, 1996, 178(11): 3133—3139

21 Li M, Chen Z W, Zhang P, et al. Crystal structure studies on sulfur oxygenase reductase from *Acidianus tengchongensis*. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 396(3): 919—923