

三价砷氧化细菌 *Acidovorax* sp. GW2 中 As(Ⅲ) 氧化酶基因和调控序列的克隆鉴定

赵 凯 黄银燕 王 倩 王革娇

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 通过反向 PCR 和细菌 Fosmid 文库筛选, 克隆得到 1 株三价砷[As(Ⅲ)]氧化细菌 *Acidovorax* sp. GW2 的 As(Ⅲ)氧化酶 Aox 基因簇, 包括 *aoxRSXABCD* 7 个基因, 分别预测编码双组分信号传导系统转录调控子 AoxR(同源性 68%), 周质感应组氨酸激酶 AoxS(同源性 55%), 周质结合蛋白 AoxX(同源性 55%), 砷氧化酶 AoxAB(同源性分别为 74% 和 71%), 硝基还原酶 AoxC(同源性 46%), 细胞色素 c AoxD(同源性 63%)。反转录 PCR 结果显示, 编码双组分系统的 *aoxRS* 基因共转录, 而与之转录方向相反的结构基因 *aoxABCD* 处于同一操纵子中, *aoxX* 基因和 *aoxRS* 基因不在同一操纵子中。通过对 *aoxS*、*aoxX*、*aoxD* 的基因敲除功能研究发现 *aoxS* 和 *aoxX* 基因为 GW2 三价砷氧化的必需基因, *aoxD* 的功能丧失减慢了 三价砷的氧化速率, 但非关键基因。

关键词 *Acidovorax* sp. GW2; 三价砷; 三价砷氧化菌; 三价砷氧化酶基因簇; 双组分系统
中图分类号 Q 939.96 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0023-07

砷污染对环境造成了严重危害, 引起人们越来越多的关注^[1]。三价砷氧化菌将 As(Ⅲ)氧化为 As(V), 在环境中具有重要作用, 人们对其的研究也越来越多; 同时由于 As(V)能被具有吸附作用的物质固定, 所以将 As(Ⅲ)氧化为 As(V)有助于缓解砷污染^[2]。目前已经分离得到许多三价砷氧化菌, 对其三价砷氧化酶基因的功能和结构以及氧化机理等进行了广泛的研究^[3]。关于 *Agrobacterium* 和 *Ochrobactrum* 中的 As(Ⅲ)氧化酶基因的表达调控机制, 研究认为该基因表达的调控可能包括典型的双组分信号传导系统 AoxSR 和细胞色素 c^[4-5], 但细菌砷氧化的信号转导系统和多途径调控机理研究尚比较缺乏。

笔者通过对 *Acidovorax* 属的三价砷氧化菌 GW2 进行三价砷氧化酶相关基因的序列分析, 构建不同基因的突变菌株以阐明功能基因, 并结合反转录 PCR 来研究其表达。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究用到的菌株和质粒见表 1。

1.2 培养条件和抗生素

GW2 菌 28℃培养于不加 NaCl 的 LB(Luria-Bertani)培养基^[10]以及 CDM 培养基中^[11]。大肠杆菌 37℃培养于 LB 培养基中。所用抗生素的质量浓度为卡那霉素(Km)50 μg/mL、利福平(Rif)40 μg/mL、四环素(Tc)10 μg/mL、氯霉素(Cm)25 μg/mL。

1.3 三价砷氧化酶基因簇完整序列的克隆

通过 GW2 菌的 *aoxB* 基因的部分已知序列^[6]设计反向引物 42-7IPF: 5'-CACATCGCCACGG-GACATT-3' 和 42-7IPR: 5'-GTTGGTTCATGGT-GAGGTTGCCGA-3'。利用反向 PCR 的方法得到已知序列侧翼序列: (1)抽提 GW2 菌总 DNA 并测定其浓度(NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer); (2)用 fermentas 的 *Bam*HI, *Eco*R I, *Hind*III, *Kpn*I, *Pae*I, *Pst*I, *Nco*I 分别过夜酶切总 DNA (5 μg 总 DNA, 50 μL 酶切体系, 2 μL 酶); (3)加入 450 μL ddH₂O 于酶切体系中, 加入 500 μL 氯仿混匀后 12 000 r/min 离心 5 min; (4)取上层水相, 加入 2.5 倍体积的乙醇, 混匀后 12 000 r/min 离心 10 min; (5)用 70% 的乙醇清洗沉淀; (6)空气中干燥后用

收稿日期: 2010-04-28
基金项目: 国家自然科学基金项目(30970075)和“863”计划(2007AA06Z332)
赵 凯, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物学. E-mail: litozk@126.com
通讯作者: 王革娇, 博士, 教授, 研究方向: 环境微生物学和分子生物学. E-mail: gejiao@mail.hzau.edu.cn

表 1 菌株及质粒¹⁾

Table 1 Bacterial strains and plasmids

| 菌株或质粒 Strain or plasmid | 特征 Characteristics | 来源或文献 Source or reference |
|----------------------------|--|------------------------------|
| Acidovorax | | |
| GW2 | 野生型 Wild type Rif ^s , Km ^s , Tc ^s | [6] |
| GW2(Rif) | 具有利福平抗性的突变株 Rif ^r derivative Rif ^r , Km ^s , Tc ^s | A |
| GW2Δ <i>aoxS</i> | Δ <i>aoxS</i> <i>Acidovorax</i> sp. GW2 | A |
| GW2Δ <i>aoxX</i> | Δ <i>aoxX</i> <i>Acidovorax</i> sp. GW2 | A |
| GW2Δ <i>aoxD</i> | Δ <i>aoxD</i> <i>Acidovorax</i> sp. GW2 | A |
| Escherichia coli | | |
| S17-1(λ <i>pir</i>) | <i>Tpr Smr recA thi pro hsdR⁻ hsdM⁺</i> . RP4; 2Tc; Mu; Km T7, λ <i>pir</i> | B |
| EPI300 TM | Fosmid 文库宿主菌 Fosmid cloning host strain | Epicenter |
| DH5α | F ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 deoR gyrA96 relA1Δ (argF-lacZYA)U169 Φ80dlacZM15 λ⁻</i> | B |
| Plasmids | | |
| pTnMod-RKm ⁺ | Transposon vector , <i>ori</i> R6K, Km ^r | [7] |
| pCM184 | <i>ori</i> ColE1, Km ^r , Amp ^r , Tet ^r | [8] |
| pCMR6K | <i>ori</i> R6K, Km ^r | A |
| pCMR6KS | 来源于 pCM184 的 <i>aoxS</i> 基因敲除质粒 Originated from pCM184 for <i>aoxS</i> deletion | A |
| pCMR6KX | 来源于 pCM184 的 <i>aoxX</i> 基因敲除质粒 Originated from pCM184 for <i>aoxX</i> deletion | A |
| pCMR6KD | 来源于 pCM184 的 <i>aoxD</i> 基因敲除质粒 Originated from pCM184 for <i>aoxD</i> deletion | A |
| pCPP30 | Broad host range, <i>tetA</i> | [9] |
| pCPPX | 来源于 pCPP30 的 <i>aoxX</i> 基因互补质粒 Originated from pCPP30 for <i>aoxX</i> complementation | A |
| pGEM-T | 测序质粒 Sequencing vector | Promega |

1)A. 本研究 This work; B. 笔者所在实验室保藏 Collected in this lab.

30 μL ddH₂O 溶解,并测定其浓度;(7)酶切后 DNA 过夜,16 ℃ 自连(500 μg,500 μL 连接体系,4 μL 的 Takara 连接酶);(8)纯化产物方法如上述(3)到(6)步所述。PCR 模板为连接纯化后产物 1 μL,使用 Takara 的 LA *Taq* 酶进行反应。得到的 PCR 产物分别连接到 Promega 的 pGEM-T 载体后测序。

使用 CopyControlTM 的 Fosmid Library Kit 构建 GW2 菌株的 Fosimd 文库,方法参见 <http://www.EpiBio.com>。利用已知序列设计引物 FosF:5'-CGT-TCGGATTCATTTCCAGGTAGG -3' 和 FosR: 5'-GAACGCCGTGCGCTCCCT-3'作为探针筛选阳性克隆,筛选到的阳性克隆抽提质粒作为 PCR 扩增模板,用 Fosmid 载体引物 pCC1FOS F 和 pCC1FOS R 与 GW2 菌株已知序列设计的引物 *aoxFosF*:5'-CCT-GTCGTCCTTTAATGGAGGC -3'和引物 *aoxFosR*:5'-CCGCTCTATCGCTCCTACCT -3'两两配对,使用 Takara 的 LA *Taq* 酶进行扩增,扩增产物纯化后直接用于序列测定。

1.4 GW2 菌三价砷氧化相关基因的敲除

1)构建敲除载体。利用引物 R6KF^{Nhe} I :5'-AAAGCTAGCCCCATGTCAGCCGTTAA-3' 和 R6KRB^{Bgl} II : 5'-AAAAGATCTCACAACGTG-GCTTTCC-3'从质粒 pTnMod-RKm⁺中 PCR 扩增

得到 R6K 复制子,并带有 *Nhe* I 和 *Bgl II 酶切位点,分别用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Bgl II 对上述扩增产物和 pCM184 质粒进行双酶切,连接后转化大肠杆菌 S17-1(λ*pir*)感受态细胞得到质粒 pCMR6K (图 1)。**

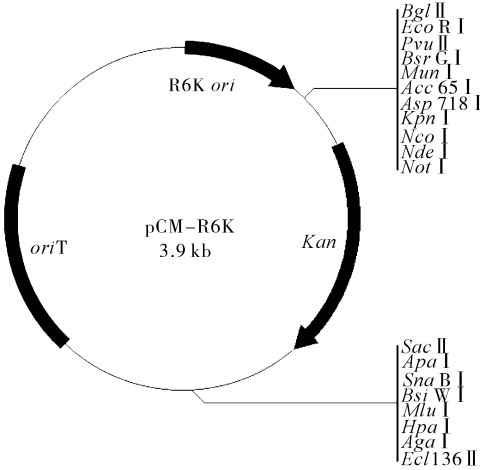


图 1 pCMR6K 图谱

Fig.1 The map of pCMR6K

根据得到的 GW2 菌三价砷氧化酶基因序列设计了带有酶切位点的引物(表 2),将待敲除区域两侧同源片段依次连接到载体 pCM-R6K 中卡那霉素抗性基因 2 次的多克隆位点中,分别构建了 *aoxS*、

表 2 引物及其特征
Table 2 Description of primers

| 引物 Primers | 序列 Sequences | 特征 Characteristics |
|------------|-------------------------------------|--|
| GWSF1 | 5'-AAAGAATTCGAAAGCGACCAACCAACC-3' | <i>aoxS</i> 部分片段和上游片段 |
| GWSR1 | 5'-AAACATATGCCAACCCGAAGCACAGC-3' | <i>aoxS</i> partial and upstream fragment |
| GWSF2 | 5'-AAACGCGGCCTGGCGCACGGTGGTCAAT-3' | <i>aoxS</i> 部分片段和下游片段 |
| GWSR2 | 5'-AAAGTTAACCCATGCGCCGCCAGGGTATG-3' | <i>aoxS</i> partial and downstream fragment |
| GWXF1 | 5'-AAAGAATTCCGAACCCGTCCAGATTGAG-3' | <i>aoxX</i> 内部部分片段 |
| GWXR1 | 5'-AAACCATGGCGACGCAGGGTGCATAGA-3' | <i>aoxX</i> internal partial fragment |
| GWXF2 | 5'-AAAACGCGTCAGGTAGGAGCGATAGAGCG-3' | <i>aoxX</i> 部分片段和下游片段 |
| GWXR2 | 5'-AAAACCGGTCCACGGGTATGTCCGAATT-3' | <i>aoxX</i> partial fragment and downstream fragment |
| GWDF1 | 5'-AAAGAATTCGCGCACCGTGTCTCTCA-3' | <i>aoxD</i> 部分片段和上游片段 |
| GWDR1 | 5'-AAACATATGTTGGGAGATGAAACGAAGCA-3' | <i>aoxD</i> partial fragment and upstream fragment |

aoxX、*aoxD* 基因的双交换敲除载体，分别为 pC-MR6KS、pCMR6KX、pCMR6KD，并且转化于大肠杆菌 S17-1(*λpir*)中。

2)GW2 菌具有利福平抗性的突变菌株筛选。取 1 mL 的 GW2 菌液离心后去掉大部分上清后，吹散，并涂布于含有利福平的平板上，几天后挑取单菌落，并用 PCR 验证，确定其为 GW2 菌株，该菌株命名为 GW2(Rif)。

3)三价砷氧化相关基因的敲除菌株筛选。将本文“1.4 1)”中构建好的质粒通过二亲本杂交的方法分别转化到 GW2(Rif)中，利用利福平和卡那霉素进行筛选。挑取单菌落，用 PCR 验证，所用引物如表 3 所示。

表 3 引物及其特征
Table 3 Description of primers

| 引物 Primers | 序列 Sequences | 特征 Characteristics |
|------------|-----------------------------|--|
| Kan-up | 5'-GCGAGCCCATTTATACCCA-3' | Km 抗性基因上游反向引物 Km resistance gene upstream reverse primer |
| Kan-dn | 5'-CATTTGATGCTCGATGAG-3' | Km 抗性基因上游正向引物 Km resistance gene upstream forward primer |
| YGWSF | 5'-CGCTGATGACCACGGACC-3' | 片段 GWSF1R1 上游引物 Fragment GWSF1R1 upstream primer |
| YGWSR | 5'-CGCTCTATCGCTCCTACCTGA-3' | 片段 GWSF2R2 下游引物 Fragment GWSF2R2 downstream primer |
| YGWXF | 5'-CGAATCCCAGCAACCCA-3' | 片段 GWXF1R1 上游引物 Fragment GWXF1R1 upstream primer |
| YGWXR | 5'-TGCCTGCACTGGAAAGCAA-3' | 片段 GWXF2R2 下游引物 Fragment GWXF2R2 downstream primer |
| YGWDF | 5'-CCAGCGATTGGACGGAT-3' | 片段 GWDF1R1 上游引物 Fragment GWDF1R1 upstream primer |
| YGWDR | 5'-GGACTCACGGCGTACATCA-3' | 片段 GWDF2R2 下游引物 Fragment GWDF2R2 downstream primer |

1.5 互补试验

使用分别含有 *Eco*RI 和 *Xba*II 酶切位点的引物 CGWXF-Eco: 5'-AAAGAATTCCTGGAATCGG-TAGGGAAGC -3' 和 CGWXR-Xba-2: 5'-AAATCTA-GATTTCAAGCACTTAGCGGAGA -3', PCR 扩增得到 *aoxX* 基因完整序列，分别用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Xba*I 对上述扩增产物和 pCPP30 质粒进行双酶切，连接后转化大肠杆菌 S17-1(*λpir*)感受态细胞得到质粒 pCPPX。构建好的质粒通过二亲本杂交的方法分别转化到 GW2Δ*aoxX* 中，利用利福平和卡那霉素和四环素进行筛选。

1.6 GW2Δ*aoxD* 三价砷氧化能力测定

分别挑取 GW2Δ*aoxD* 和 GW2 的单菌落，在液体 CDM 培养基中活化后，接种于 100 mL CDM 中并加入 800 μmol 的 NaAsO₂ 于摇床中 180 r/min，28 ℃ 培养。每 3 h 取样，使用 BECKMAN DU800 分光光度计测量 *D* 值。每 1 h 取样，离心，稀释到适当浓度后使用北京吉天的 SA-10 原子荧光形态分

析仪测量样品中三价砷的浓度。

1.7 三价砷氧化酶基因簇的表达

用反转录 PCR(RT-PCR)研究分析三价砷氧化酶基因簇的表达。分别使用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'，P1: GAAAGC-GACCACCGAACC-3' 和 P2: 5'-CCAACCCGAAG-CACAGC-3'，P3: 5'-CCTGGCGCACGGTGGT-CAAT-3' 和 P4: 5'-CCATGCGCCGCCAGGG-TATG-3'，P5: 5'-AGCCGTTACGTTCAAC-TATCC-3' 和 P6: 5'-ACCCAGGGCGTTCTCG -3'，P7: 5'-ACCCTGCCAAGTCGATCAAG-3' 和 P8: 5'-CATAAAGTGCCACGGAACCA-3'，P9: 5'-GGCTGGAACCTCATCAACG-3' 和 P10: 5'-GT-GCTGCTGATTACCCTCGT-3' 研究 16S rRNA 基因，*aoxR*-*aoxS*，*aoxS*-*aoxX*，*aoxA*-*aoxB*，*aoxB*-*aoxC*，*aoxC*-*aoxD* 之间的转录调控，在基因簇中的位置如图 2 所示。

为了检测 GW2 基因的表达,将 GW2 接种于 CDM 液体培养基中 28 ℃ 摇床培养约 1 周,在抽提总 RNA 之前 3 h 在其中一瓶培养基中加入 100 μmol 的 NaAsO₂ 进行诱导,另一瓶中不加入 NaAsO₂。

总 RNA 使用 Invitrogen 的 Trizol 试剂盒,按照说明 (<http://www.invitrogen.com>) 进行抽提。然后使用 Takara 的 DNase I(<http://www.takara.com.cn>) 进行 DNA 的去除;使用 Takara 的 Prime-Script™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit(<http://www.takara.com.cn>) 进行第 1 链的 cDNA 合成。该 cDNA 模板使用以下程序 PCR 进行扩增:预变性 94 ℃,5 min;变性 94 ℃,45 S;退火 50 ℃,45 S,72 ℃,1.5 min。循环次数 32 次,最后 72 ℃ 延伸 5 min。

1.8 基因注释及序列分析

使用 CntigExpress 软件对序列进行拼接,利用 NCBI 的 ORF Finder 和 BlastX(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对基因进行注释和序列分析。*aoxRSXABCD* 的 Genbank 注册号为 GU937734。

2 结果与分析

2.1 三价砷氧化酶基因簇注释与分析

通过反向 PCR 使用引物 42-7IPF 和 42-7IPR PCR 扩增得到用 *Pst* I 和 *Pae* I 酶切连接后作为模板的 4 kb 和 3 kb 大小的片段,片段拼接以后得到 6 kb 大小的序列,没有完全包括三价砷氧化酶基因簇。因此,构建了 GW2 菌的 Fosmid 文库,筛选到包含 *aoxB* 基因片段的阳性克隆 3 个。利用引物 pCC1FOSF 和 pCC1FOSR 与引物 *aoxFosF* 和引物 *aoxFosR* 两两配对,以抽提的阳性克隆质粒为模板,最终引物 pCC1FOSF 和 *aoxFosF* 在阳性克隆 1 中扩增出 *aoxB* 基因上游约 7 kb 的片段,引物 pCC1FOSF 和 *aoxFosR* 在阳性克隆 3 中扩增出 *aoxB* 基因下游约 10 kb 的片段。

对 GW2 菌株的三价砷氧化酶相关基因进行测序拼接后得到大小约为 8 kb 的完整序列。经过 NCBI 的 ORF finder 和 BlastX 分析后发现其中包含了 7 个基因的 *aox* 基因簇 (*aoxRSXABCD*)。*aox* 基因簇物理图谱如图 2 所示。其中,AoxR(450 aa) 的氨基酸序列与 *Rhodofera x ferrireducens* T118 的 Fis 家族转录调控子(YP_524329)有 68% 的同源性,含有 sigma54 因子特异性结合的结构,具

有双组分信号传导系统的转录调控子的氨基酸结构特征。AoxS(484 aa)与 *R. ferrireducens* T118 的周质感受器信号传导组氨酸激酶(YP_524329)有 55% 的同源性,具有双组分信号传导系统的组氨酸激酶的氨基酸机构特征。AoxX(284 aa)与 *R. ferrireducens* T118 的磷酸结合周质蛋白(YP_524327)有 55% 的同源性。AoxA(174 aa)和 AoxB(827 aa)分别和目前已知的三价砷氧化菌 *Herminiimonas arsenicoxydans* 和 *Alcaligenes faecalis* 的三价砷氧化酶小亚基和大亚基有 74% 和 71% 的同源性。在 *aoxAB* 基因下游的 *aoxC* 基因产物(186 aa)与 *Polynucleobacter* sp. QWL-P1DMWA-1 的硝基还原酶(YP_001155788)有 46% 的同源性,AoxD(105 aa)与 *Comamonas testosteroni* KF-1 二型的细胞色素 c(ZP_03543835)有 63% 的同源性。

目前已知的几种三价砷氧化菌的三价砷氧化酶基因簇的物理图见图 2。GW2 菌与它们比较可以发现,GW2 菌同样具有典型的反应调控子基因 *aoxR* 和组氨酸激酶基因 *aoxS* 所组成的双组分调控系统。当组氨酸激酶接收到外界信号后,由反应调控子激活三价砷氧化酶基因的表达。而在三价砷氧化酶 *aoxAB* 基因下游存在着钼生物合成辅因子基因 *moaA*^[12] 或 *chlE*^[4] 以及二型的细胞色素 c, *aoxD* 基因。到目前为止,*aoxAB* 基因下游的 *aoxC* 所代表的硝基还原酶基因只在 *H. arsenicoxydans*^[13] 中发现,然而在 GW2 菌中也同样存在着硝基还原酶同源基因。可以看出 *aoxAB* 基因的上游都存在

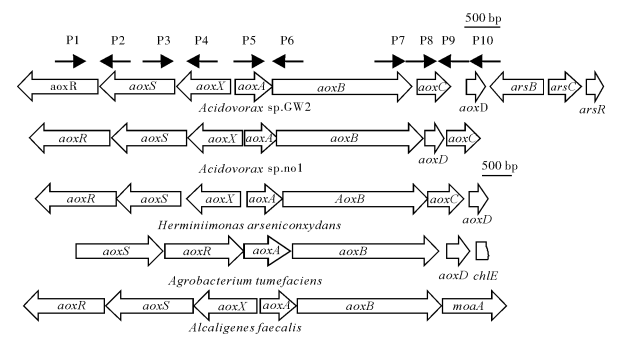
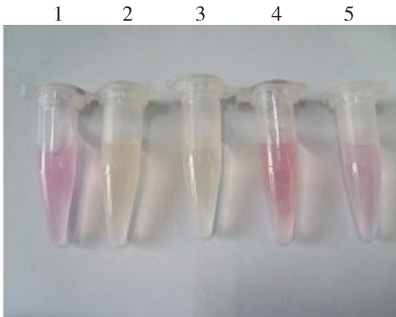


图 2 GW2 三价砷氧化基因物理图谱,共转录引物位置图及其他已报道的三价砷氧化基因簇物理图谱
Fig.2 Physical maps of arsenite oxidase gene cluster of strain GW2,primers designed to detect the cotranscription of genes and physical maps of other reported *aox* clusters (accession numbers in NCBI are NC009138,DQ151549 and AY297781 respectively)

着和三价砷氧化调控相关的基因,而下游基因却没有较大的相似性。

2.2 三价砷氧化相关基因的敲除

利用抗性平板筛选和 PCR 验证(如果 2 对引物都能扩增出相应大小的 PCR 产物,为双敲除菌株,如果只有 1 对引物能够扩增出片段则为单敲除菌株)后,最后得到了 *aoxS* 基因双敲除菌株 GW2Δ*aoxS*,*aoxX* 基因的单敲除菌株 GW2Δ*aoxX* (由于敲除片段是在 *aoxX* 基因内部,因单敲除同样使得 *aoxX* 基因被中断)以及 *aoxD* 基因的双敲除菌株 GW2Δ*aoxD*。将上述 3 种突变菌株和野生型菌株培养在 CDM 培养基中,并且加入 500 μmol 的 NaAsO₂,使用高锰酸钾法^[14]检测其三价砷氧化能力。如图 3 所示,2 d 后野生型和 GW2Δ*aoxD* 已经将 As(Ⅲ)完全氧化为 As(V),而在 10 d 后 GW2Δ*aoxS* 和 GW2Δ*aoxX* 仍然不能将 As(Ⅲ)氧化完全,GW2Δ*aoxS* 和 GW2Δ*aoxX* 丧失了三价砷的氧化能力。说明 *aoxS* 基因和 *aoxX* 基因在三价砷氧化过程中起到了重要作用,而 *aoxD* 基因没有起到关键作用。



1. 野生型 Wild type; 2. GW2Δ*aoxS*; 3. GW2Δ*aoxX*; 4. GW2-Δ*aoxD*; 5. *aoxX* 基因互补菌株 *aoxX* complementation strain.

图 3 各突变菌株以及 *aoxX* 基因互补菌株三价砷氧化表型验证结果

Fig. 3 Arsenite oxidation phenotypes of the mutants and *aoxX* complementation strain

2.3 互补试验

将通过平板筛选的菌株进行三价砷氧化表型的试验,如图 3 所示,对菌株 GW2Δ*aoxX* 进行基因互补后,其三价砷氧化能力得到了恢复,2 d 后 As(Ⅲ)完全氧化为了 As(V)。菌株 GW2Δ*aoxX* 的确是因为 *aoxX* 基因敲除而引起其表型变化的。

2.4 GW2 菌野生型和 *aoxD* 基因突变型三价砷氧化曲线

如图 4 所示,GW2Δ*aoxD* 的三价砷氧化速率要

慢于野生型,在 26 h 时野生型的三价砷已经完全被氧化了,而 GW2Δ*aoxD* 的三价砷还有 140 μmol 未能氧化。结果表明,虽然 *aoxD* 基因对于三价砷的氧化起不到关键的作用,*aoxD* 基因敲除后三价砷的氧化表型还是存在,但是仍然对于其氧化速率有一定的影响。

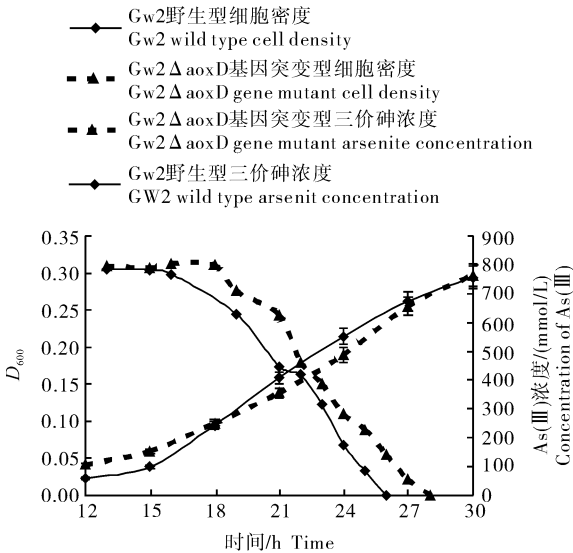


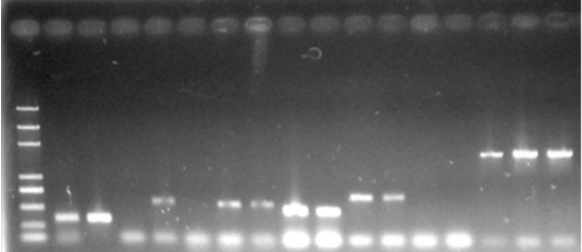
图 4 野生型和 GW2Δ*aoxD* 的三价砷氧化和生长曲线

Fig. 4 Arsenite oxidation and growth curves of wild type GW2 and GW2Δ*aoxD*

2.5 基因表达分析

图 5 为本文“1.7”中的 5 对引物检测的 RT-PCR 结果,从结果中可以看出引物对 P1P2、P5P6、

| | | | | | |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| <i>aoxRS</i> | <i>aoxSR</i> | <i>aoxAB</i> | <i>aoxBC</i> | <i>aoxCD</i> | 16S rRNA |
| P1P2 | P3P4 | P5P6 | P7P8 | P9P10 | 27F1492R |
| b | c | b | c | b | c |
| b' | c' | a | b | c | b' |
| b' | c' | a | b | c | b' |



a: 以不加入 As(Ⅲ)诱导后合成的第 1 链 cDNA 为模板 Template of first strand cDNA induced by no addition; b: 以加入 As(Ⅲ)诱导后合成的第 1 链 cDNA 为模板 Template of first strand cDNA induced by As(Ⅲ); c: 以 GW2 总 DNA 为模板 Template of total DNA of GW2; b': 以不加入 As(Ⅲ)诱导后的总 RNA 为模板 Template of total RNA induced by no addition; c': 以加入 As(Ⅲ)诱导后的总 RNA 为模板 Template of total RNA induced by As(Ⅲ).

图 5 三价砷氧化酶基因簇表达的 RT-PCR 电泳结果

Fig. 5 An agarose gel electrophoresis of RT-PCR products showing gene expression of the *aox* gene cluster

P7P8、P9P10 以及阳性对照 27F1492R 都扩增出了相应大小的条带,而 P3P4 以及抽提的 RNA 作为模板(使用 27F1492R 作为引物扩增,用以检测是否存在 DNA 污染)的对照没有扩增出条带。说明抽提出的 RNA 没有 DNA 的污染,*aoxR* 基因和 *aoxS* 基因共转录,而 *aoxX* 基因却和它们不在同一个操纵子中,*aoxABCD* 4 个基因共转录。

3 讨 论

GW2 菌株是 1 株分离于山西省大同盆地的山阴县的三价砷氧化细菌,经过 16S rRNA 基因的分析,初步判定其属于 *Acidovorax* 属^[6]。通过反向 PCR 和构建 GW2 菌株的总 DNA Fosmid 文库,得到了其三价砷氧化酶完整的基因簇。该基因簇包含了编码双组分信号传导系统 *aoxRS* 基因,在下游存在与之转录的方向相反的结构基因 *aoxABCD*,使得 GW2 具有了完整的三价砷氧化途径和信号传导途径。通过生物信息学的分析,对以上基因进行了功能分析。然而对于 *aoxX* 基因,虽然在很多的三价砷氧化酶基因簇中(图 2)都有与之同源的基因,但是它的功能却还没有得到验证,通过 BlastX 比对后分析,它可能位于细胞的周质空间中,与氧阴离子的转运有关。GW2 菌株有别于大多数已知的三价砷氧化细菌,在其 *aoxAB* 基因的下游没有钼生物合成辅因子基因,而与 *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAsl 一样,具有硝基还原酶同源基因^[13]。

为进一步研究 GW2 菌三价砷氧化的相关基因,笔者对于其中 3 个基因的功能进行了研究。GW2 菌株的 *aoxS* 基因的突变引起了其三价砷氧化表型的丧失,AoxS 的失活可能阻断了外界环境信号的接收,从而使得 *aoxAB* 基因的表达受到了抑制。在对 *Agrobacterium* 的研究中证实了 *aoxAB* 的作用^[4],而笔者的研究中发现,对于 *aoxX* 基因的缺失,GW2 菌也完全丧失了三价砷的氧化能力,说明 AoxX 同样也是三价砷氧化过程中不可缺少的关键酶之一,它可能同样在外界砷环境信号的传导方面具有重要的作用,如砷结合蛋白的作用。对于 *aoxD* 基因敲除后其三价砷氧化能力受到了影响,较之野生型氧化速率减慢,但仍然具有三价砷的氧化能力,这与已研究的三价砷氧化菌 NT-26 菌株结果相似^[15],而另一报道^[5]中,*aoxD* 基因的敲除使得其研究菌株的三价砷氧化表型完全丧失了,其作用

与 *aoxAB* 基因的作用同样重要。

RT-PCR 的结果表明,*aoxR* 和 *aoxS* 基因虽然是共转录的,然而与以前的研究结果^[16]不同的是,*aoxX* 基因与它们并不在同一操纵子之中,*aoxAB-CD* 4 个基因共转录。

目前,对于三价砷氧化细菌的三价砷氧化调控机理的研究还不够深入,GW2 菌三价砷氧化酶基因簇的分离丰富了这个领域的知识。同时对于 *aoxX* 基因的功能进行了初步的探讨,对其功能进行了验证,为进一步的研究提供了基础。

参 考 文 献

- [1] HARVEY C F, SWARTZ C H, BADRUZZAMAN A B M, et al. Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh [J]. Science, 2002, 298: 1602.
- [2] BATTAGLIA-BRUNET F, DICTOR M C, GARRIDO F, et al. An As(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in bioreactors [J]. J Appl Microbiol, 2002, 93: 656-667.
- [3] SANTINI J M, VANDEN HOVEN R N. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26 [J]. J Bacteriol, 2004, 186: 1614-1619.
- [4] KASHYAP D R, BOTERO L M, FRANCK W L, et al. Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. J Bacteriol, 2006, 188: 1081-1088.
- [5] BRANCO R, FRANCISCO R, CHUNG A P, et al. Identification of *anaox* system that requires cytochrome c in the highly arsenic-resistant bacterium *Ochrobactrum tritici* SCH24 [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(15): 5141-5147.
- [6] FAN H X, SU C L, WANG Y, et al. Sedimentary arsenite oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with the geological arsenic groundwater contamination in Shanyin, Datong Basin, China [J]. J Appl Microbiol, 2008, 105(2): 529-539.
- [7] DENNIS J J, ZYLSTRA G J. Plasmids: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 2710-2715.
- [8] MARX C J, LIDSTROM M E. Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria [J]. Bio Techniques, 2002, 33: 1062-1067.
- [9] HUANG H C, HE S Y, BAUER D W, et al. The *pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrpH* product, an envelop protein required for elicitation of the hypersensitive response in plants [J]. J Bacteriol, 1992, 174(21): 6878-6885.
- [10] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 69-77, 251-266.
- [11] WEEGER, W D, LIEVREMONT M, PERRET F, et al. Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment [J]. Biometals, 1999, 12: 141-149.

[12] ELLIS P, CONRAD S T, HILLE R, et al. Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å[J]. *Structure*, 2001, 9: 125-132.

[13] MULLER D, ME DIGUE C, KOECHLER S, et al. A tale of two oxidation states; bacterial colonization of arsenic-rich environments[J]. *PLoS Genetics*, 2007, 3(4): 518-530.

[14] SALMASSI T M, VENKATESWARAN K, SATOMI M, et al. Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2002, 19: 53-66.

[15] SANTINI M J, KAPPLER U, WARD S A, et al. The NT-26 cytochrome *c*₅₅₂ and its role in arsenite oxidation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767: 189-196.

[16] CAI L, RENSING C, LI X Y, et al. Novel gene clusters involved in arsenite oxidation and resistance in two arsenite oxidizers: *Achromobacter* sp. SY8 and *Pseudomonas* sp. TS44[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(4): 715-725.

Isolation and identification of arsenite oxidase gene and regulatory sequences in an arsenite-oxidizing bacterium *Acidovorax* sp. GW2

ZHAO Kai HUANG Yin-yan WANG Qian WANG Ge-jiao

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Using reverse transcriptase PCR method and a bacterial fosmid library screening, an arsenite oxidase gene cluster were isolated from an arsenite-oxidizing bacterium *Acidovorax* sp. GW2. There are seven genes including *aoxRSXABCD* putatively encoding the transcriptional regulator AoxR of a two-component signal transduction system (68% identity), a periplasmic sensor histidine kinase AoxS (55% identity), a periplasmic binding protein AoxX (55% identity), arsenite oxidase AoxAB (74% and 71% identity, respectively), nitroreductase AoxC (46% identity) and cytochrome c AoxD (63% identity) respectively. According to the reverse transcriptase PCR experiments, *aoxR* and *aoxS* encoding for a two-component system proteins are co-transcribed and located in opposite to structural genes *aoxABCD*. *aoxX* and *aoxRS* are not in the same operon. Functional analyses through gene knock-out of *aoxS*, *aoxX* and *aoxD* showed that *aoxS* and *aoxX* are the essential genes in arsenite oxidation of GW2, and the loss of *aoxD* did not show significant effects on arsenite oxidation.

Key words *Acidovorax* sp. GW2; arsenite; arsenite-oxidizing bacterium; arsenite oxidase gene cluster; two-component system

(责任编辑:陆文昌)