

M. hydrocarbonoclasticus NY4 中 *nosZ* 基因的克隆与异源表达

杨立志 王鹏胤 胡南

南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 211816

摘要 选取反硝化菌株 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* NY4 为试验对象, 首先通过反硝化气态产物分析, 证实了该菌株中 N_2OR 的存在; 随后设计特异性引物并通过 PCR 扩增获取了 *nosZ* 的全长基因(1 896 bp), 该基因与来源于 *Geobacillus thermodenitrificans* 的 *nosZ* 基因仅保持了 46.9% 的相似性; 实现了 *nosZ* 基因在大肠杆菌中的异源表达, 并成功检测到了 N_2OR 酶活, 其比活力达到 (0.2 ± 0.01) U/mg。

关键词 N_2O ; 氧化亚氮还原酶; *nosZ*; 异源表达

中图分类号 Q 89 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)02-0064-05

N_2O 是 6 种主要的温室气体之一, 单分子增温效应为 CO_2 的 298 倍, 在大气平流层中的存在寿命为 150 a, 目前大气中 N_2O 浓度的年增加率约为 0.25%。除了化工行业集中产生大量 N_2O 外, 全球超过 2/3 的 N_2O 排放源于土壤生态圈尤其是农田生态系统的氮素循环过程^[1]。 N_2O 是反硝化过程的中间气态产物, 它会被氧化亚氮还原酶(N_2OR)进一步还原为 N_2 , N_2OR 也是自然界目前证实的唯一能将 N_2O 还原成 N_2 的生物酶^[2]。 N_2OR 由 *nosZ* 基因编码, 目前仅在假单胞菌、芽胞杆菌以及海杆菌等少数几种细菌中证实了 *nosZ* 的存在^[3]。

关于 N_2OR 的研究目前主要集中在酶学性质及结构方面^[4-6]。关于其编码基因 *nosZ* 异源表达的报道仅有 2 例, 一是源自 *G. thermodenitrificans* NG80-2 的 *nosZ* 基因在大肠杆菌中的异源表达^[7], 二是源自 *Pseudomonas stutzeri* 的 *nosZ* 基因在烟草植物的异源表达, 将 *nosZ* 基因导入烟草植物中后使后者产生了较高的 N_2OR 酶活, 并降低了植物释放 N_2O 的能力^[8]。此外, Jones 等^[9] 在研究芽胞杆菌 *nosZ* 基因与 N_2O 释放关系时也发现, 当细胞存在 2 个 *nosZ* 拷贝时, 几乎没有 N_2O 产生。这些研究报道表明 *nosZ* 基因的存在与否以及拷贝数多少直接影响了 N_2O 的释放。如果将高效的 *nosZ* 基

因导入大范围种植的农田作物或者主要的栖居微生物, 或许能一定程度上改变农田土壤 N_2O 的释放量。基于此, 我们以 1 株具有较强 N_2OR 酶活的 *M. hydrocarbonoclasticus* NY4^[10] 为研究对象, 成功克隆了该菌株的 *nosZ* 基因, 实现了其在大肠杆菌中的异源表达, 旨在为此类基因后期的分子进化或潜在应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: *M. hydrocarbonoclasticus* NY4, 分离自江苏省盐城市新滩盐场, *E. coli* DH5 α 及 *E. coli* BL21 为南京工业大学应用微生物实验室保存。

培养基: LB 培养基(NaCl 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L)及反硝化产气培养基(NaCl 80 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、 Na_2NO_3 0.5 g/L)。

试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、高保真 PCR 酶 Prime STAR、DNA Maker TA 克隆载体及 pET28a 表达载体购自 TaKaRa 公司(大连); DNA Gel Extraction 试剂盒、质粒及总 DNA 提取试剂盒购自爱思进生物技术公司; His-Binding-Resin 分离柱购自上海点创生物科技有限公司; 引物合成及测序服务由南京金斯瑞生物科技有限公司提供。

收稿日期: 2016-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270162); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目(TAPP)

杨立志, 硕士研究生. 研究方向: 环境微生物学. E-mail: 1623047036@qq.com

通信作者: 胡南, 博士, 副教授. 研究方向: 环境微生物学. E-mail: hunan@njtech.edu.cn

1.2 反硝化气态产物的气相色谱分析

在液体反硝化产气培养基中活化菌株 NY4, 活化后的菌液按 1% 的接种量转接至装有 25 mL 的反硝化产气培养基的特制玻璃瓶, 硅胶塞密封(瓶塞设计有进气及出气软管)并涂抹凡士林封闭孔隙。在超净工作台上通过瓶塞上的软管向密封的玻璃瓶中反复抽真空并通入氦气, 驱尽瓶内及液体中的空气, 用铁夹封闭软管。将密闭完好的玻璃瓶置于 30 °C 培养箱静置培养 72 h; 随后, 使用双向直针和真空西林瓶采集玻璃瓶上方的气体样品(704 硅胶封住针孔保存), 并使用气相色谱进行 N₂O 和 N₂ 检测。气相色谱使用福立仪器 GC9720, 色谱柱使用 Porapak Q (孔径: 0.2~0.3 mm) 的填充柱(6 m); 载气为氦气, 载气流量为 20 mL/min; 热导池检测器的温度为 125 °C, 柱温 90 °C, 进样气温度 70 °C, 桥电流 100 mA。

1.3 基因扩增及表达载体构建

从 GenBank 数据库中下载 *M. hydrocarbonoclasticus* ATCC49840 全基因组序列 (ID: 107015115), 根据基因组注释信息找到预测的 *nosZ* 基因序列, 根据基因编码区设计 PCR 引物, 并在引物 5' 端引入合适的限制性酶切位点, 引物序列如下:

Primer 1 (*Bam* H I): 5'-CGCGGATCC-
ATGAAAAAAGAGATGATCTG-3';
Primer 2 (*Hind* III): 5'-CCCAAGCTT-
TCAGGCCTTTTCGACGAGCATC-3'。

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 NY4 的总 DNA, 以此为模板, 对 *nosZ* 基因进行 PCR 扩增, PCR 仪采用 Eppendorf 6331, PCR 体系: Prime STAR Max Premix 25 μ L, DNA 模板 1 μ L, Primer 1 (*Bam* H I) 1 μ L, Primer 2 (*Hind* III) 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 1 min, 98 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 15 s; 29 次重复, 共 30 个循环; 72 °C 彻底延伸 2 min。目的条带用 DNA Gel Extraction 试剂盒回收, 一部分回收片段经 TA 克隆后转化 *E. coli* DH5 α , 挑选阳性克隆子, 抽提其质粒后送交测序; 另一部分回收片段使用 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切, 并将其连接至同样酶切处理后的 pET28a 质粒, 连接产物转化 *E. coli* BL21, 挑取阳性克隆子, 并进行质粒酶切及 PCR 验证。

1.4 *nosZ* 基因的表达及蛋白的分离纯化

使用液体 LB 培养基活化携带有重组质粒

pET28a-*nosZ* 的 *E. coli* BL21, 然后以 1% 的接种量接种至 250 mL 新鲜 LB 液体培养基, 置于 3 °C 摇床 200 r/min 培养 2.5 h (D_{600} 约为 0.4~0.6), 加入 250 μ L 0.1 mol/L 的 IPTG 和 2.5 mL 80 mmol/L 的 CuSO₄ 诱导培养 4~5 h (Cu 为 N₂OR 的金属辅基)。蛋白提取采用超声波细胞破碎法, 粗蛋白使用 His-Binding-Resin 柱进行纯化, 纯化后的蛋白用透析袋厌氧透析后, 于氦气中保存。蛋白的分子质量及表达量通过 SDS-PAGE 电泳进行检测。

1.5 N₂OR 酶活测定

酶活测定采用 Dell'Acqua Simone 等^[5] 提出的甲基紫精法并在此基础上进行改进, 具体过程为: 向容量为 3.5 mL 的比色皿中依次加入 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 1.5 mL, 10 mmol/L 的甲基紫精溶液 0.2 mL, N₂OR 酶液 0.1 mL, 密封比色皿并使用针孔对其反复抽真空及氦气填充, 最后 704 胶封闭针孔。开始测定时, 使用微量注射器向比色皿中注入 50 μ L 现配浓度为 50 mmol/L 的连二亚硫酸钠溶液, 后者向甲基紫精提供还原性电子使其变成活性蓝色中间体, 同时使混合反应液的 D_{600} 稳定在 1.0~1.2; 随后, 同样使用微量注射器向比色皿中注入 0.1 mL 的 N₂O 饱和溶液, 启动酶学反应, 甲基紫精提供还原性电子将 N₂O 还原成 N₂, 并褪去蓝色, 这也导致混合反应液的 D_{600} 随之降低, 绘制 D_{600} 的变化曲线并计算平均斜率, 斜率大小反映 N₂OR 的酶活高低, 在数值上, 酶活力 (U) = 平均斜率/底物的摩尔消光系数, 在本试验中, 底物甲基紫精的摩尔消光系数为 11.4 mmol⁻¹ · cm⁻¹。

2 结果与分析

2.1 反硝化气态产物的气相色谱分析

根据本文“1.2”所描述的测试方法, 对菌株 NY4 的反硝化气态产物进行气相色谱分析, 通过标准品 (N₂ 与 N₂O 混合气体) 测试可知, N₂ 的保留时间在 2 min 附近, N₂O 的保留时间在 6 min 附近 (图 1A)。与标样相比, 测试样品仅出现了 N₂ 峰, 几乎检测不到 N₂O 的存在 (图 1B)。结果表明, 在菌株 NY4 中可能存在高效的氧化亚氮还原酶 (N₂OR) 及其编码基因 *nosZ*。

2.2 *nosZ* 基因的扩增及异源表达

通过 PCR 扩增, 获得 1 条特异性条带, 回收条带连接至 T 载体后转化 *E. coli* DH5 α , 测序结果显

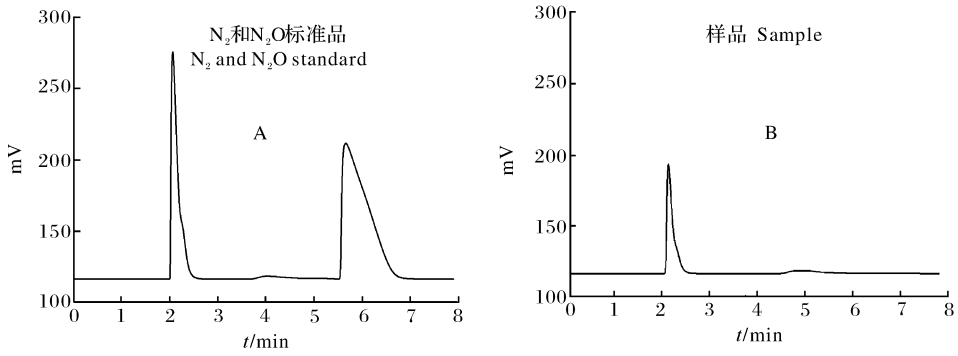


图 1 菌株 NY4 反硝化气态产物的气相分析

Fig.1 Gas chromatography analysis of gaseous products generated from denitrification in strain NY4

示,获得的 *nosZ* 基因全长 1 896 bp(KT877014.1)。同源性分析表明:与模板序列(*M. hydrocarbonoclasticus* ATCC49840)保持了 94.6%的同源性;与源自 *G. thermodenitrificans* NG80-2(NC009328.1)的 *nosZ* 基因仅有 46.9%核酸同源性^[7]。

将菌株 NY4 的 *nosZ* 基因片段连接至表达载体 pET28a,随后将重组质粒 pET28a::*nosZ* 转化 *E. coli* BL21,筛选获得阳性克隆子。*nosZ* 基因的异源表达按本文“1.4”方法进行,重组菌株经 IPTG 及 CuSO₄ 诱导后,通过超声波破碎,获取重组菌株的粗蛋白,同时以携带 pET28a 空载体的 *E. coli* BL21 及未经 CuSO₄ 诱导的重组菌为对照(图 2A),与携带 pET28a 空载体(泳道 1)的对照相比,携带 pET28a-*nosZ* 的重组菌(泳道 2)在 70 ku 处出现了特征性条带,与理论值(69.52 ku)相符。由于 Cu 是 *nosZ* 表达产物的金属辅基^[4],未经 CuSO₄ 诱导的重组菌

(泳道 3),其目的蛋白表达量较低。利用 pET28a 载体上设计的 His 标记,使用 His-binding-Resin 柱对表达产物 NosZ 进行纯化(图 2B),后者用于后续的 N₂OR 酶活分析。

2.3 N₂OR 酶活测定

N₂OR 酶活由反应体系 D₆₀₀ 变化的斜率决定,以携带 pET28a 空载体的 *E. coli* BL21 及菌株 NY4 的细胞裂解液为对照。从 D₆₀₀ 的斜率变化可以看出(图 3),反应体系注入 N₂O 以后(图中箭头表示

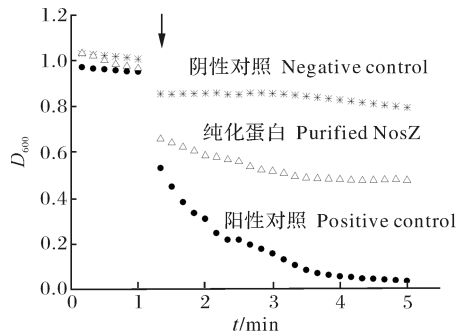
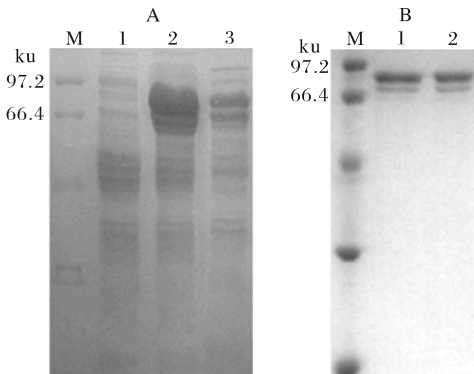


图 3 反应过程中 D₆₀₀ 的变化曲线

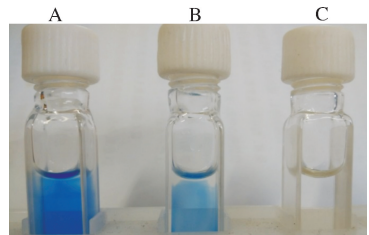
Fig.3 Variations of D₆₀₀ during the reaction processes



A.重组菌总蛋白电泳图(泳道 1:对照;泳道 2:Cu²⁺ 诱导;泳道 3:未经 Cu²⁺ 诱导);B.纯化后的 NosZ 蛋白电泳图。A.Electrophoresis gel of total proteins of the recombinant strain (Lane 1:Control; Lane 2:Induced with Cu²⁺; Lane 3:Induced without Cu²⁺); B.Electrophoresis gel of the purified NosZ.

图 2 NosZ 的异源表达与纯化

Fig.2 The heterologous expression and purification of NosZ



A.携带 pET28a 空载体的 *E. coli* BL21 的细胞裂解上清液; B.纯化后的 NosZ; C.菌株 NY4 的细胞裂解上清液。A.Supernatant of the lysed *E. coli* BL21 carrying the pET28a; B.The purified NosZ; C.The supernatant of the lysed strain NY4.

图 4 反应过程中样本的显色变化

Fig.4 Color changes of samples during the reaction processes

N_2O 加入时间点), 阳性对照(NY4 细胞裂解液)的斜率下降速度最快, 阴性对照(携带 pET28a 空载体的 *E. coli* BL21)的斜率变化不明显, *NosZ* 纯化蛋白的斜率下降明显但不如阳性对照组强烈。3 组体系反应 5 min 后显色情况(图 4)也直观地反映了它们 N_2OR 的酶活差异。本研究中纯化 *NosZ* 蛋白的氧化亚氮还原酶(N_2OR)的平均酶活力为 (0.20 ± 0.01) U/mg。

3 讨 论

由于氧化亚氮还原酶(N_2OR)在 N_2O 减量控制中具有潜在的应用前景, 引起了环境科学工作者的广泛关注, 目前相关研究主要集中在环境监测领域, 比如以 N_2OR 的编码基因 *nosZ* 作为分子探针, 探测环境样本中的 *nosZ* 的数量, 从而评价样本的反硝化细菌数量、反硝化能力以及氮素污染水平等等^[11-13], 关于 *nosZ* 全基因克隆及异源表达的研究甚少。

本研究以 1 株具有高效反硝化能力的 *M. hydrocarbonoclasticus* NY4 为试验材料, 成功扩增出 N_2OR 的全长编码基因 *nosZ*, 并通过在大肠杆菌的异源表达与酶活测定证实了该基因具有还原 N_2O 的功能。本研究获得的 *nosZ* 基因与 Liu 等^[7]报道的 *G. thermodenitrificans* 中 *nosZ* 基因的核酸同源性仅为 46.9%, 但二者在大肠杆菌中异源表达的酶活力基本相当, 前者为 (0.20 ± 0.01) U/mg, 后者为 (0.20 ± 0.03) U/mg。在利用 His-tag 融合蛋白的方法纯化 *NosZ* 蛋白时观察到, 目的蛋白在蛋白电泳图上存在 2 条带型, 这是由于该酶催化中心铜离子辅基的结合差异导致, 类似情况也发生在 *G. thermodenitrificans* 中 *nosZ* 的异源表达试验中^[7]。

N_2OR 是一种存在于细胞周质空间里的可溶性酶, 由 2 个相同的亚基(*NosZ*)构成的同源二聚体, 每个亚基都有 Cu_A 和 Cu_Z 2 个金属中心, 通过组氨酸连接到蛋白质上, 分别作为酶的电子转移中心 [$Cu^{2+} : Cu^+$] 和催化中心 [$Cu^+ : Cu^+$]。反应时, 细胞色素 C 将电子转移到 Cu_A , N_2O 结合到 Cu_Z 上, Cu_A 将电子传递到 Cu_Z , 催化 N_2O 的还原反应^[14]。 Cu^{2+} 的还原状态对于 *NosZ* 的 N_2OR 活性至关重要, Cu^{2+} 还原得越彻底, N_2OR 酶活就越高, Dell'Acqua 等^[6]通过实验指出, 如果 *NosZ* 蛋白催化中心的 4 个 Cu^{2+} 完全被甲基紫精(替代细胞色素 C)还原为 Cu^+ 后, 酶的结构会发生一定改变, 酶活

也将得到显著提高。当 Cu_Z 催化中心暴露于氧气中或接触一些过氧化物时, 会呈现一种氧化还原失活的状态, N_2OR 酶活也随之受到很大程度的影响^[15]。在本研究中, 虽然严格控制了菌株培养及酶活测定过程的厌氧环境, 但受条件限制, 在菌株超声波破碎及蛋白纯化的过程中无法提供严格的厌氧环境, 推测部分铜离子处于氧化状态, 从而导致了试验中所测出的 N_2OR 酶活相对较低, 其真实的 N_2OR 酶活应远高于测定值。

参 考 文 献

- [1] LASSEY K, HARVEY M. Nitrous oxide: the serious side of laughing gas [J]. *Water atmosphere*, 2007, 2(15): 10-11.
- [2] RICHARDSON D, FELGATE H, WATMOUGH N, et al. Mitigating release of the potent greenhouse gas N_2O from the nitrogen cycle - could enzymic regulation hold the key? [J]. *Trends in biotechnology*, 2009, 27(7): 388-397.
- [3] ZHANG X, HE L M, ZHANG F L. The different potential of sponge bacterial symbionts in N_2 release indicated by the phylogenetic diversity and abundance analyses of denitrification genes, *nirK* and *nosZ* [J]. *PLoS ONE*, 2013, 6(8): e65142.
- [4] BROWN K, TEGONI M, PRUD'ENCIO M, et al. A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. [J]. *Nature structural biology*, 2000, 3(7): 191-195.
- [5] DELL'ACQUA S, PAULETA S R, MONZANI E, et al. Electron transfer complex between nitrous oxide reductase and cytochrome [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(41): 10852-10862.
- [6] DELL'ACQUA S, PAULETA S R, MOURA J J, et al. Biochemical characterization of the purple form of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* nitrous oxide reductase [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, 367(1593): 1204-1212.
- [7] LIU X, GAO C, ZHANG A, et al. The *nos* gene cluster from gram-positive bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 and functional characterization of the recombinant *NosZ* [J]. *FEMS microbiology letters*, 2008, 289: 46-52.
- [8] WAN S, MOTTIAR Y, JOHNSON A M, et al. Expression of the *nos* operon proteins from *Pseudomonas stutzeri* in transgenic plants to assemble nitrous oxide reductase [J]. *Transgenic research*, 2012, 21(3): 593-603.
- [9] JONES C M, WELSH A, THROBÄCK I N, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity among closely related soil-borne N_2 and N_2O producing *Bacillus* isolates harboring the *nosZ* gene [J]. *FEMS microbiology ecology*, 2011, 76(3): 541-552.
- [10] LI R P, ZI X L, WANG X F, et al. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* NY4, a novel denitrifying, moderately halophilic marine bacterium [J]. *Springer plus*, 2013, 2: 346.
- [11] 王晓君, 陈少华, 张兆基, 等. 利用氧化亚氮还原酶基因(*nosZ*)评价人工湿地系统中的反硝化菌 [J]. *环境科学*, 2012, 33(4):

- 1306-1312.
- [12] 黄莹,李雅颖,姚槐应.强酸性茶园土壤中添加不同肥料氮后 N_2O 释放量变化[J].植物营养与肥料学报,2013(6):1533-1538.
- [13] 周汉昌,张文钊,刘毅,等.土壤团聚体 N_2O 释放与反硝化微生物丰度和组成的关系[J].土壤学报,2015(5):1144-1152.
- [14] ZUMFT W G.Biogenesis of the bacterial respiratory CuA,Cu-S enzyme nitrous oxide reductase.[J].J Mol Microbiol Biotechnol,2005,10(2/3/4):154-166.
- [15] FRUNZKE K,ZUMFT W G.Inhibition of nitrous-oxide respiration by nitric oxide in the denitrifying bacterium *Pseudomonas perfectomarina*[J].Biochimica et biophysica acta (bba)-bioenergetics,1986,852(1):119-125.

Cloning and heterologous expression of *nosZ* gene in *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* NY4

YANG Lizhi WANG Pengyin HU Nan

College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China

Abstract The *nosZ* gene encoded N_2OR was cloned and expressed heterologously. One denitrifying strain named as *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* NY4 was used in the experiment. The existence of N_2OR in strain NY4 was confirmed by analyzing gaseous products produced by denitrification. The full-length *nosZ* gene (1 896 bp) was obtained by PCR amplification with a pairs of specific primers, which only shared 46.9% similarity with the *nosZ* gene from *G. thermodenitrificans*. The heterologous expression of the *nosZ* gene in *Escherichia coli* was carried out. The *nosZ* gene from strain NY4 was further expressed in *E. coli*. The activity of N_2OR was successfully detected. The enzyme activity was (0.20 ± 0.01) U/mg.

Keywords N_2O ; N_2OR ; *nosZ*; heterologous expression

(责任编辑:张志钰)