

根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解代谢中 *agnH* 基因的克隆表达与纯化

姚家成 夏珍珍 黄粤 皮婷
梅枫 何冬兰 程国军 刘涛 李晓华

中南民族大学生命科学院/微生物资源与利用湖北省工程技术研究中心, 武汉 430074

摘要 对从湖北省襄阳市烟草种植土壤中分离筛选得到的尼古丁降解菌根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株中 *agnH* 基因进行克隆表达, 并对 AgnH 蛋白的表达和纯化条件进行优化, 为解析 *agnH* 基因的功能和揭示根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解的分子机制提供理论依据。通过 PCR 扩增获得 *agnH* 全长基因(585 bp), 构建重组质粒 pET28a(+)-*agnH*, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株进行异源表达, 研究不同 IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间对重组质粒 pET28a(+)-*agnH* 诱导表达的影响, 用不同浓度的咪唑洗脱液洗脱重组蛋白, 采用 SDS-PAGE 检测重组蛋白。结果表明: 在 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L、诱导温度为 25 °C 且诱导时间为 25 h 条件下, AgnH 蛋白表达量较高; 在 250 mmol/L 的咪唑洗脱液洗脱下, 得到浓度较高的 AgnH 蛋白。

关键词 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株; 尼古丁降解代谢; *agnH* 基因; 基因克隆; 蛋白表达与纯化

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)02-0081-07

尼古丁(1-methyl-2-[3-pyridyl-pyrrolidine])是一种存在于茄科植物中的生物碱, 也是烟草的重要成分, 占烟叶质量的 2%~8%^[1-2]。尼古丁由一个吡啶环和一个吡咯环组成, 是一种化学结构稳定且有剧毒的杂环化合物, 而且尼古丁对人体和动物可产生多种致癌、致突变效应^[2-6]。根据欧盟标准, 烟草废弃物中尼古丁含量不能超过 500 mg/kg, 由于其化学结构稳定、不易自然降解, 利用微生物降解尼古丁是效率高、成本低且对环境友好的方法^[5-9]。

富马酸是一种天然存在的有机酸, 也被称为延胡索酸或反丁烯二酸, 因其无毒、具有 C-C 双键和两个羧基团而被广泛应用于食品、药品行业^[10-11]。因富马酸转化效率低且副产物多, 用化学的方法合成富马酸成本高且效率低^[12-14]。马来酸顺反异构酶属于天冬氨酸/谷氨酸消旋酶超家族^[15], 能够在不破坏 C-C 双键的情况下将马来酸(顺丁烯二酸)转化为富马酸(反丁烯二酸), 以此改善富马酸的生产过程, 故大量表达马来酸顺反异构酶是大量生产富马酸的关键。许多微生物都能产生马来酸顺反异构

酶, 包括假单胞菌属^[16]、粪产碱杆菌^[17]、荧光假单胞菌^[18]、嗜热芽胞杆菌、芽胞杆菌以及短芽胞杆菌^[19]。

具有尼古丁降解能力的根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株是从湖北省襄阳市烟草种植土壤中分离筛选得到的^[20], 菌株全基因测序所得基因簇经在线比对, 与中间苍白杆菌 SJY1 菌株中尼古丁降解基因 *vppH* 及恶臭假单胞菌 S16 菌株中 *iso* 基因均有较高同源性, 推测 *agnH* 基因编码的蛋白 AgnH 为马来酸顺反异构酶^[21-23]。本研究通过克隆 *agnH* 基因, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株进行异源表达, 并对 AgnH 蛋白的表达和纯化条件进行优化, 为明确 *agnH* 基因的功能和揭示根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解的分子机制奠定基础, 同时也为生物医药行业原料制备提供参考方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Escherichia coli BL21(DE3)、根癌土壤杆菌

收稿日期: 2018-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070087, 30570046); 湖北省自然科学基金重点项目(2011CDA079, 2008CDB076); 中央高校基本科研业务费专项(CZW16005, YCZW15104)

姚家成, 硕士研究生, 研究方向: 分子微生物学与生化制药. E-mail: yao931321250@163.com

通信作者: 李晓华, 博士, 教授, 研究方向: 环境微生物与微生物代谢. E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

SCUEC1 菌株为中南民族大学生命科学院分子微生物实验室保藏。

载体为 pET28a(+). 培养基为 LB 液体培养基(胰蛋白胨 10.0 g、氯化钠 10.0 g、酵母提取物 5.0 g, 定容至 1.0 L, pH 7.0)及 LA 固体培养基(胰蛋白胨 10.0 g、氯化钠 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、琼脂 18.0 g, 定容至 1.0 L, pH 7.0)。

1.2 *agnH* 基因克隆与 pET28a(+)-*agnH* 重组质粒构建

按照 TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 说明书提取根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株总 DNA。结合尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株中 *agnH* 基因核苷酸序列和载体 pET28a(+)的多克隆位点,使用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计上下游引物,引物序列如下:

上游引物 Primer-F: 5'-CGCGGATCC ATGA-CAGAAAAGATATAT -3'(下划线处为 *Bam*HI 酶切位点);下游引物 Primer-R: 5'-CCCAAGCTTTTA-AGCGGTGTCCTTCATA-3'(下划线处为 *Hind*III 酶切位点)。PCR 反应体系:DNA 1.0 μ L, Primer-F 1.0 μ L, Primer-R 1.0 μ L, dNTP Mixture 1.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 无菌水 18.2 μ L, 总体积 25.0 μ L。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60.8 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 25 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。切胶回收目的片段,经 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后与载体 pET28a(+)连接,转化感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3)。挑取单菌落,提取质粒进行 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切鉴定,将酶切鉴定正确的阳性克隆进一步进行 DNA 测序鉴定。

1.3 *agnH* 基因的表达与 SDS-PAGE 分析

在 50 mL DNA 测序正确的阳性克隆菌液中加入 IPTG 至终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L,设置诱导温度分别为 20、25、30、35、40 $^{\circ}$ C,诱导时间分别设置为 10、15、20、25、30 h。将诱导表达的菌液于 4 $^{\circ}$ C 4 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,重悬于 5 mL 裂解液中,超声破碎 15 min(超声 1 s,间隔 2 s)。4 $^{\circ}$ C 4 000 r/min 离心 10 min,分别收集全菌液、上清液、沉淀。利用 Ni-NTA His \cdot Bind Resin 纯化蛋白,分别用含 200、250、300、350、400、450、500 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱蛋白。12% SDS-PAGE 检测,电压 80 V。

1.4 基因的生物信息学分析

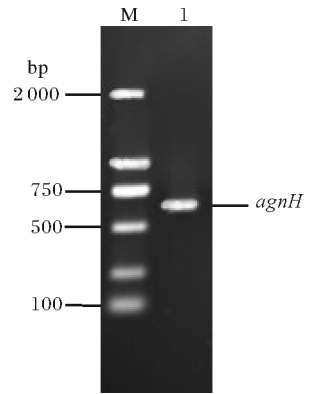
使用 NCBI 中的 Blast 在线软件以及 ClustalX

软件对 *AgnH* 氨基酸序列同源性和保守序列进行分析,采用 MEGA7.0 软件构建系统进化树,预测进化关系;利用 BioEdit 软件和 ProtParam 在线软件对蛋白理化性质进行预测,采用 PROSITE、NCBI Blastp 在线软件对保守结构域(CD)进行预测,pHD 在线预测蛋白质的二级结构^[24-25]。

2 结果与分析

2.1 *agnH* 基因的克隆及重组质粒 pET28a(+)-*agnH* 的构建

以根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株总 DNA 为模板,Primer-F 和 Primer-R 为引物,通过 PCR 扩增得到与 *agnH* 基因大小一致约 600 bp 的片段(图 1)。用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切扩增片段,再与载体 pET28a(+)连接,转化 *E. coli* BL21(DE3),挑取转化子,提取质粒,用 *Bam*HI 和 *Hind*III 进行双酶切得到 2 个片段,分别对应 *agnH* 基因双酶切片段和 pET28a(+)载体双酶切片段(图 2),对克隆片段进行核酸序列测定,与 *agnH* 基因序列一致。



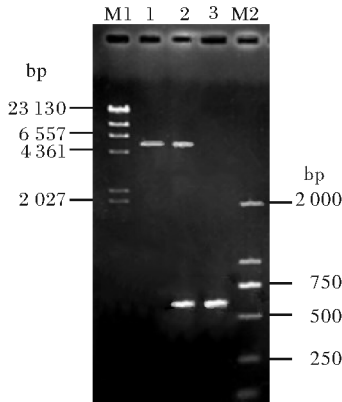
M:DL2000 DNA marker; 1:*agnH* 基因 PCR 扩增产物 *agnH* gene fragment.

图 1 *agnH* 基因 PCR 扩增

Fig.1 *agnH* gene amplified by PCR

2.2 *agnH* 基因编码的氨基酸序列分析

利用 MEGA7.0 软件构建 *AgnH* 蛋白的系统进化树,从图 3 可以看出,*AgnH* 蛋白与来源于 *Ochrobactrum* sp.SJY1 中的 Maleate isomerase 具有 100% 相似性, Maleate isomerase 可将马来酸转化为富马酸。同样也与来源于 *Loktanella pyoseonensis* 中的 Asp/Glu racemase 和来源于 *Agrobacterium rosae* 中的 Asp/Glu racemase 具有 100% 相似性。



M1: λ -Hind III DNA marker; M2: DL2000 DNA marker; 1: pET28a(+)质粒双酶切; 2: pET28a(+)-*agnH* 重组质粒双酶切; 3: *agnH* 基因双酶切。M1: λ -Hind III DNA marker; M2: DL2000 DNA marker; 1: Plasmid pET28a(+) DNA digested with BamHI and HindIII; 2: Recombinant plasmid pET28a(+)-*agnH* DNA digested with BamHI and HindIII; 3: Gene *agnH* DNA fragment digested with BamHI and HindIII.

图 2 质粒 pET28a(+)-*agnH* 的构建

Fig.2 Construction of plasmid pET28a(+)-*agnH*

根据 ExPASy ProtParam 在线分析得出: AgnH 蛋白由 194 个氨基酸组成, pI 5.34, 带负电荷的氨基酸残基 (Asp + Glu) 为 23 个, 带正电荷的氨基酸残基 (Arg + Lys) 为 18 个, 不稳定指数为 29.41, 平均亲水系数 (GRVAY) 为 0.223。

采用 PROSITE、NCBI Blastp 对保守结构域 (CD) 进行在线预测, AgnH 蛋白具有马来酸顺反异构酶的功能位点, 属于天冬氨酸/谷氨酸乙内酰胺消旋酶超家族, 这个家族包含天冬氨酸消旋酶、马来酸异构酶、谷氨酸消旋酶、乙内酰胺消旋酶和芳基丙二酸脱羧酶。

综上, AgnH 蛋白不稳定指数低于阈值 40, 推测 AgnH 蛋白为稳定蛋白。带负电荷氨基酸数多于带正电荷氨基酸数, 推断为酸性蛋白质。根据 GRVAY 数值推测 AgnH 蛋白为疏水性蛋白。利用 SignalP 4.1 Server 在线预测 AgnH 蛋白不含信号肽序列, 推测 AgnH 蛋白为非分泌性蛋白, pHD 在线预测蛋白质的二级结构, 预测 AgnH 蛋白含有 9 个 α -螺旋、6 个 β -折叠。

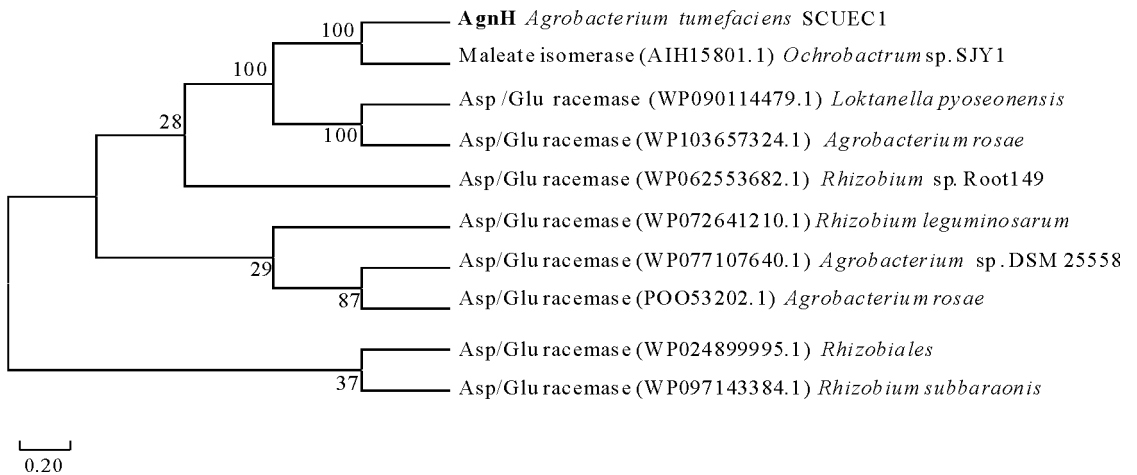


图 3 基于氨基酸序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on amino acid sequence

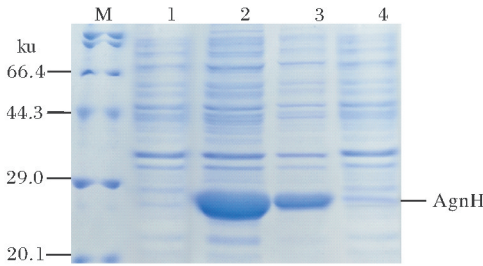
2.3 AgnH 蛋白的可溶性分析

将 pET28a(+)-*agnH* 重组质粒转化的大肠杆菌在 0.2 mmol/L IPTG 条件下于 20 °C 诱导表达 20 h, SDS-PAGE 检测结果如图 4 所示, 与 pET28a(+)质粒菌体混合液对比, 结果显示: 20.1~29.0 ku 之间有大量融合蛋白表达。上清液中 AgnH 蛋白浓度较低, 沉淀中 AgnH 蛋白浓度较高, 大部分 AgnH 蛋白存在于沉淀中。

2.4 不同浓度的 IPTG 对 AgnH 蛋白表达的影响

设置 IPTG 浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L, 对 pET28a(+)-*agnH* 重组质粒转化的大肠杆菌于 20 °C 诱导表达 20 h, SDS-PAGE 检测结果如图 5 所示, 与 pET28a(+)质粒菌体混合液对比, 在不同浓度 IPTG 的诱导下, 可以看出 20.1~29.0 ku 之间有大量融合蛋白表达。IPTG 浓度在 0.2~0.4 mmol/L 范围内, IPTG 对诱导 AgnH 蛋

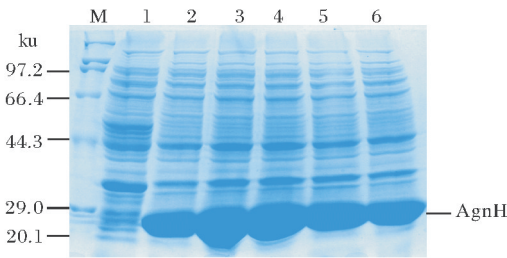
白呈现上升趋势, IPTG 浓度在 0.4~1.0 mmol/L 时, IPTG 对诱导 AgnH 蛋白呈现下降趋势, 0.4 mmol/L IPTG 诱导 AgnH 蛋白表达量较大。



M: Protein marker; 1: pET28a(+) 质粒菌体裂解混合液; 2: pET28a(+)-agnH 重组质粒菌体裂解混合液; 3: pET28a(+)-agnH 重组质粒菌体裂解沉淀; 4: pET28a(+)-agnH 重组质粒菌体裂解上清液。M: Protein marker; 1: Lysed *E. coli* BL21 carrying the recombinant plasmid pET28a(+); 2: Lysed *E. coli* BL21 carrying the plasmid pET28a(+)-agnH; 3: Precipitate of the lysed *E. coli* BL21 carrying the recombinant plasmid pET28a(+)-agnH; 4: Supernatant of the lysed *E. coli* BL21 carrying the recombinant plasmid pET28a(+)-agnH.

图 4 AgnH 蛋白的可溶性分析

Fig.4 Solubility analysis of AgnH protein



M: Protein marker; 1: pET28a(+) 质粒菌体混合液; 2: 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达蛋白; 3: 0.4 mmol/L IPTG 诱导表达蛋白; 4: 0.6 mmol/L IPTG 诱导表达蛋白; 5: 0.8 mmol/L IPTG 诱导表达蛋白; 6: 1.0 mmol/L IPTG 诱导表达蛋白。M: Protein marker; 1: Lysed *E. coli* BL21 carrying the plasmid pET28a(+); 2: Induced expression of protein for 0.2 mmol/L IPTG; 3: Induced expression of protein for 0.4 mmol/L IPTG; 4: Induced expression of protein for 0.6 mmol/L IPTG; 5: Induced expression of protein for 0.8 mmol/L IPTG; 6: Induced expression of protein for 1.0 mmol/L IPTG.

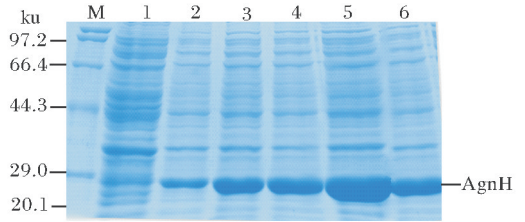
图 5 不同 IPTG 浓度对 AgnH 蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of IPTG concentrations on the expression of AgnH protein

2.5 不同诱导时间对 AgnH 蛋白表达的影响

在温度为 20 °C、IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 的条件下, 将诱导时间分别设置为 10、15、20、25、30 h, 对 pET28a(+)-agnH 重组质粒转化的大肠

杆菌进行诱导表达, SDS-PAGE 检测结果(图 6)显示, 与 pET28a(+) 质粒菌体混合液对比, 在不同的诱导时间下, 20.1~29.0 ku 之间有大量融合蛋白表达。在 10~25 h 时间段, 表达量随时间增加而增大; 在 25~30 h 时间段, 表达量随时间增加而减少, 诱导 25 h 表达量较大。



M: Protein marker; 1: pET28a(+) 质粒菌体混合液; 2: 诱导表达 10 h 的蛋白; 3: 诱导表达 15 h 的蛋白; 4: 诱导表达 20 h 的蛋白; 5: 诱导表达 25 h 的蛋白; 6: 诱导表达 30 h 的蛋白。M: Protein marker; 1: Lysed *E. coli* BL21 carrying the plasmid pET28a(+); 2: Induced expression of protein for 10 h; 3: Induced expression of protein for 15 h; 4: Induced expression of protein for 20 h; 5: Induced expression of protein for 25 h; 6: Induced expression of protein for 30 h.

图 6 不同诱导时间对 AgnH 蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of induction time on the expression of AgnH protein

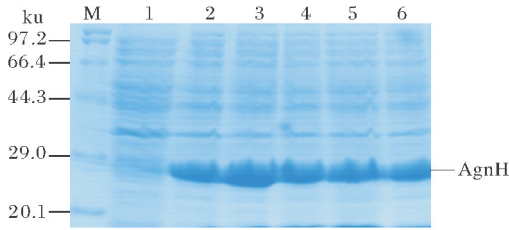
2.6 不同诱导温度对 AgnH 蛋白表达的影响

在 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 的条件下, 设置诱导温度分别为 20、25、30、35、40 °C, 对 pET28a(+)-agnH 重组质粒转化的大肠杆菌诱导表达 20 h, SDS-PAGE 检测结果如图 7 所示, 与 pET28a(+) 质粒菌体混合液对比, 在不同的诱导温度下, 可以看到 20.1~29.0 ku 之间有大量融合蛋白表达。在 20~25 °C 诱导温度范围内, 温度越高, 表达量越大; 在 25~40 °C 的诱导温度范围内, 温度越高, 表达量无明显影响, 25 °C 时表达量较大。

2.7 AgnH 蛋白的纯化

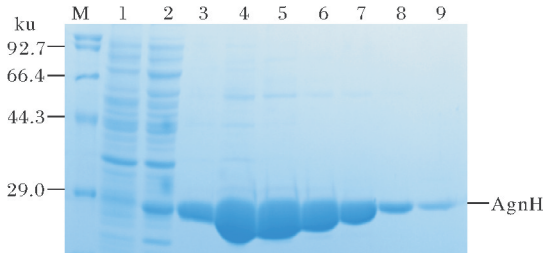
在 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L、温度为 25 °C 的条件下, 对 pET28a(+)-agnH 重组质粒转化的大肠杆菌诱导表达 25 h, 利用 Ni-NTA His · Bind Resin 纯化蛋白, 分别用 200、250、300、350、400、450、500 mmol/L 的咪唑洗脱液进行洗脱, SDS-PAGE 检测结果(图 8)显示: 与 pET28a(+)-agnH 质粒菌体上清液对比, 在不同浓度的咪唑洗脱下, 20.1~29.0 ku 处有大量的融合蛋白表达。咪唑浓度为 200~250 mmol/L 时, 咪唑对 AgnH 蛋白洗脱

呈现上升趋势;在 250~500 mmol/L 时,咪唑对 AgnH 蛋白洗脱呈现下降趋势。咪唑浓度为 250 mmol/L 时洗脱 AgnH 蛋白可得到浓度较高的目的蛋白。



M: Protein marker; 1: pET28a(+) 质粒菌体混合液; 2: 诱导温度为 20 °C 的表达蛋白; 3: 诱导温度为 25 °C 的表达蛋白; 4: 诱导温度为 30 °C 的表达蛋白; 5: 诱导温度为 35 °C 的表达蛋白; 6: 诱导温度为 40 °C 的表达蛋白。M: Protein marker; 1: Lysed *E. coli* BL21 carrying the plasmid pET28a(+); 2: Expression protein with induction temperature of 20 °C; 3: Expression protein with induction temperature of 25 °C; 4: Expression protein with induction temperature of 30 °C; 5: Expression protein with induction temperature of 35 °C; 6: Expression protein with induction temperature of 40 °C.

图7 不同诱导温度对 AgnH 蛋白表达的影响
Fig.7 Effect of induction temperatures on the expression of AgnH protein



M: Protein marker; 1: pET28a(+) 质粒菌体混合液; 2: pET28a(+)-*agnH* 质粒菌体混合液; 3: 200 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱蛋白; 4: 250 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱蛋白; 5: 300 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱蛋白; 6: 350 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱蛋白; 7: 400 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱蛋白; 8: 450 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱蛋白; 9: 500 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱蛋白。M: Protein marker; 1: Lysed *E. coli* BL21 carrying the plasmid pET28a(+); 2: Lysed *E. coli* BL21 carrying the plasmid pET28a(+)-*agnH*; 3: 200 mmol/L imidazole eluate eluted protein; 4: 250 mmol/L imidazole eluate eluted protein; 5: 300 mmol/L imidazole eluate eluted protein; 6: 350 mmol/L imidazole eluate eluted protein; 7: 400 mmol/L imidazole eluate eluted protein; 8: 450 mmol/L imidazole eluate eluted protein; 9: 500 mmol/L imidazole eluate eluted protein.

图8 不同浓度的咪唑对 AgnH 蛋白洗脱的影响
Fig.8 Effect of imidazole concentrations on the elution of AgnH protein

3 讨论

本研究对从湖北省襄阳市烟草种植土壤中分离筛选得到的尼古丁降解菌根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株进行全基因组测序及 NCBI 在线比对,发现尼古丁降解基因分布在基因簇 *cotig18* 和 *cotig25* 上,编码马来酸顺反异构酶 AgnH 氨基酸序列的 *agnH* 基因位于 *cotig18* 上^[21]。本研究克隆了 *agnH* 基因,构建了 pET28a(+)-*agnH* 重组质粒并进行表达。在 IPTG 浓度 0.4 mmol/L、诱导温度 25 °C、诱导时间 25 h 的条件下,AgnH 蛋白表达量较高。在 250 mmol/L 的咪唑洗脱液洗脱下,得到浓度较高的 AgnH 蛋白。

马来酸顺反异构酶能将尼古丁降解代谢途中产生的马来酸迅速转化为可进入 TCA 循环的富马酸,这个过程不需要金属离子参与;但是加入 Ca^{2+} 可以增加马来酸顺反异构酶的稳定性,因为该酶在中等温度下不稳定^[26]。Fisch 等^[27] 研究表明,马来酸顺反异构酶催化马来酸盐中 C2-C3 双键的顺反异构化以产生富马酸盐。马来酸顺反异构酶催化马来酸的几何异构化是在没有经过键迁移的情况下将其转化为富马酸的,这种类型顺反异构酶酶活需要一种或多种巯基基团维持,巯基基团以半胱氨酸残基的形式成为酶不可分割的一部分,或者以谷胱甘肽的形式作为辅酶修饰异构酶^[28-29]。马来酸顺反异构酶在微量的谷胱甘肽或半胱氨酸作用下可诱导全酶活性^[16]。由于马来酸顺反异构酶酶活与酶内的巯基基团有关,在一些巯基化合物,如二巯苏糖醇(DTT)存在下能保持稳定,当其酶活性受到各种抑制剂(如氯汞苯甲酸)的作用时,也可通过加入 DTT 或 2-巯基乙醇恢复酶活^[30]。

本研究为进一步解析 *agnH* 基因的功能和揭示根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解的分子机制奠定了基础,为下一步马来酸顺反异构酶改良和工业化提供潜在的材料,也可为利用微生物清除环境中尼古丁污染及生产生物医药相关产品提供一定的参考。

参 考 文 献

- [1] GURUSAMY R, NATARAJAN S. Current status on biochemistry and molecular biology of microbial degradation of nicotine

- [J]. The scientific world journal, 2013, 125385. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/125385>.
- [2] 皮婷, 姚家成, 黄粤, 等. 根瘤土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解代谢中 *agnE* 基因的克隆与功能鉴定[J]. 微生物学报, 2018, 58(5): 907-914.
- [3] KIM H S, JEFFREY G A. The crystal structure of a 1 : 1 nicotine-salicylic acid complex (nicotinyl salicylate)[J]. Acta crystallographica, 1971, 27(6): 1123-1131.
- [4] HAWKINS B T, ABBRUSCATO T J, EGLETON R D, et al. Nicotine increases *in vivo* blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution[J]. Brain research, 2004, 1027(1): 48-58.
- [5] CIVILINI M, DOMENIS C, SEBASTIANUTTO N, et al. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms[J]. Waste management and research, 1997, 15(4): 349-358.
- [6] FAN J, PING J, XIANG J, et al. Effects of prenatal and lactation nicotine exposure on glucose homeostasis, lipogenesis and lipid metabolic profiles in mothers and offspring[J]. Toxicology research, 2016, 5(5): 1318-1328.
- [7] 李晓华, 杨晓潼, 翟贵发, 等. 烟碱降解菌 DAB2 菌株的筛选、鉴定和降解特性[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2013, 32(3): 18-21.
- [8] 李晓华, 梅枫, 孔雯, 等. 尼古丁微生物降解代谢机制和应用的研究进展[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2017, 36(4): 27-35.
- [9] 李阳, 杨振飞, 马婷婷, 等. 烟碱降解菌 SCUEC2 菌株的分离及其降解特性[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(7): 1586-1589.
- [10] ENGEL C A R, STRAATHOF A J J, ZIJLMANS T W, et al. Fumaric acid production by fermentation[J]. Applied microbiology and biotechnol, 2008, 78(3): 379-389.
- [11] MROWIETZ U, CHRISTOPHERS E, ALTMAYER P. Treatment of psoriasis with fumaric acid esters: results of a prospective multicentre study[J]. British journal of dermatology, 1998, 138(3): 456-460.
- [12] KENEALY W, ZAADY E, DU-PREEZ J C, et al. Biochemical aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus*[J]. Applied and environmental microbiology, 1986, 52(1): 128-133.
- [13] ZHANG K, YANG S T. *In situ* recovery of fumaric acid by intermittent adsorption with IRA-900 ion exchange resin for enhanced fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*[J]. Biochemical engineering journal, 2015, 96(4): 38-45.
- [14] ABBOTT D A, ZELLE R M, PRONK J T, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges[J]. FEMS yeast research, 2009, 9(8): 1123-1136.
- [15] KATO Y, YAMAGISHI J, ASANO Y. Maleate *cis*-trans isomerase from *Arthrobacter* sp. TPU 5446[J]. Journal of fermentation and bioengineering, 1995, 80(6): 610-612.
- [16] OTSUKA K. *Cis*-Trans isomerase: isomerisation from maleic acid to fumaric acid[J]. Agricultural and biological chemistry, 2011, 25(9): 726-730.
- [17] TAKAMURA Y, TAKAMURA T, SOEJIMA M, et al. Studies on the induced synthesis of maleate *cis*-trans isomerase by malonate: Part III. Purification and properties of maleate *cis*-trans isomerase induced by malonate[J]. Agricultural and biological chemistry, 1969, 33(5): 718-728.
- [18] SCHER W, JAKOBY W B. Maleate isomerase[J]. Journal of biological chemistry, 1969, 244(7): 1878-1882.
- [19] GOTO M, NARA T, TOKUMARU I, et al. Method of producing fumaric acid; The United States. 5783428[P]. 1998-07-21.
- [20] 孔雯. 烟碱降解菌的分离鉴定、降解特性及其降解途径的初步研究[D]. 武汉: 中南民族大学, 2011.
- [21] 梅枫, 孔雯, 李阳, 等. 尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株的分离及其降解基因[J]. 微生物学报, 2017, 57(5): 701-709.
- [22] YU H, TANG H Z, ZHU X Y, et al. Molecular mechanism of nicotine degradation by a newly isolated strain, *Ochrobactrum* sp. strain SJY1[J]. Applied and environmental microbiology, 2015, 81(1): 272-281.
- [23] TANG H Z, YAO Y X, WANG L J, et al. Genomic analysis of *Pseudomonas putida*: genes in a genome island are crucial for nicotine degradation[J]. Scientific reports, 2012, 2: 1-8.
- [24] 李晓华, 马婷婷, 郭佳, 等. 具有抗农作物病原真菌活性链霉菌 I β 1 菌株的筛选鉴定及其聚酮合酶基因分析[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2017, 36(3): 22-26.
- [25] 范小芳, 王俊生, 刘红占, 等. 小麦 COXVIIa 基因克隆及其蛋白序列分析[J]. 分子植物育种, 2016, 14(2): 271-279.
- [26] LCHIKAWA S, LINO T, SATO S, et al. Improvement of production rate and yield of fumaric acid from maleic acid by heat treatment of *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1[J]. Biochemical engineering journal, 2003, 13(1): 7-13.
- [27] FISCH F, FLEITES C M, DELENNE M, et al. A covalent succinylcysteine-like intermediate in the enzyme-catalyzed transformation of maleate to fumarate by maleate isomerase[J]. Journal of the American chemical society, 2010, 132(33): 11455-11457.
- [28] KNOX W E. Enzyme involved in conversion of tyrosine to acetoacetate: A. L-tyrosine-oxidizing system of liver[J]. Methods in enzymology, 1955, 2: 287-298.
- [29] LACK L. Enzymic *cis*-*trans* isomerization of maleylpyruvic acid[J]. Journal of biological chemistry, 1961, 236(4): 2835-2840.
- [30] HATAKEYAMA K, GOYO M, UCHIDA Y, et al. Molecular analysis of maleate *cis*-*trans* isomerase from Thermophilic Bacteria[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2000, 64(3): 569-576.

Cloning, expression and purification of *agnH* gene in nicotine degradation and metabolism of *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1 strain

YAO Jiacheng XIA Zhenzhen HUANG Yue PI Ting MEI Feng
HE Donglan CHENG Guojun LIU Tao LI Xiaohua

*Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for
Resources and Utilization of Microbiology/College of Life Science,
South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China*

Abstract The *agnH* gene was cloned and expressed in the nicotine-degrading *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1 strain, and the conditions of expressing and purifying AgnH protein were optimized. The full-length *agnH* gene (585 bp) was amplified by PCR, and the recombinant plasmid pET28a(+)-*agnH* was constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3) strain for heterologous expression. The effect of different IPTG concentration, induction temperature and induction time on the expression of recombinant plasmid pET28a(+)-*agnH* was studied. The recombinant protein was eluted with different concentrations of imidazole eluant, and the expressed protein was detected with SDS-PAGE. The results showed that the *agnH* gene was cloned and the recombinant plasmid pET28a(+)-*agnH* was constructed. The expression of AgnH protein was higher under the conditions of IPTG concentration of 0.4 mmol/L, induction temperature of 25 °C and induction time of 25 h. A higher concentration of AgnH protein was obtained by elution with a 250 mmol/L imidazole eluant.

Keywords *Agrobacterium tumefaciens* strain SCUEC1; nicotine degrading metabolism; *agnH* gene; gene cloning; expression and purification of protein

(责任编辑:张志钰)