

亚硝酸还原酶基因克隆、 表达与纯化

魏计东^{1,2}, 张庆芳^{1,2}, 窦少华^{1,2}, 于爽^{1,2}, 迟乃玉^{1,2}, 王晓辉^{1,2,*}

(1.大连大学生命科学与技术学院, 辽宁大连 116622;

2.辽宁省海洋微生物工程技术研究中心, 辽宁大连 116622)

摘要:该研究通过聚合酶链反应(PCR)方法从木糖氧化产碱菌(*Achromobacter xylosoxidans* DL-1)基因组 DNA 中成功克隆含铜亚硝酸还原酶基因。PCR 测序表明该基因全长 1083 个核苷酸, 编码 360 个氨基酸, 预测其理论分子质量约 38.924 kDa, 等电点(pI)4.83, 命名为 *CuNiR* (Genbank 登录号 KX674378)。结构域分析该蛋白编码区包含信号肽, 1 个铜离子结合位点, 1 个氧化还原酶催化域。将 *CuNiR* 基因构建到 pET22b 载体, 并转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) BL21 (DE3) 中诱导表达, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测显示目的蛋白可溶表达。利用镍柱亲和层析纯化重组蛋白, 酶活检测显示比活力为 123.82 U/mg, 为后期含铜亚硝酸还原酶(*CuNiR*)的生化性质表征奠定理论基础。

关键词:木糖氧化产碱菌 DL-1, 含铜亚硝酸还原酶(*CuNiR*), 克隆, 表达, 纯化

Cloning, expression and purification of copper nitrite reductase

WEI Ji-dong^{1,2}, ZHANG Qing-fang^{1,2}, DOU Shao-hua^{1,2}, YU Shuang^{1,2}, CHI Nai-yu^{1,2}, WANG Xiao-hui^{1,2,*}

(1.School of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, China;

2.Liaoning Technology of Marine Microbiological Engineering Research Center, Dalian 116622, China)

Abstract: In this study, a novel copper nitrite reductase gene was cloned from *Achromobacter xylosoxidans* DL-1 by using a PCR protocol. The gene contained a 1083 bp open reading frame encoding a 360 amino acid protein with an estimated molecular mass of 38.924 kDa and isoelectronic point (pI) of 4.83, named *CuNiR* (Genebank no. KX674378). Based on domains analysis, *CuNiR* had a signal peptide, a copper binding site classified as Cu-oxidase-3, and one nitrite reductase catalytic domain (Cu-oxidase). A recombinant plasmid, pET22b-*CuNiR* was constructed and transformed into *E.coli* BL21 (DE3). The cells were induced by addition of IPTG. *CuNiR* had been successfully expressed by the analysis of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The recombinant protein was purified by Ni-NTA resin, and the specific activity was 123.82 U/mg, which lay the theoretical basis for biochemical characterization of the copper nitrite reductase.

Key words: *Alcaligenes xylosoxidans* DL-1; copper nitrite reductase; cloning; expression; purification

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)14-0101-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.14.020

自然界中氮素循环是各个元素循环的中心, 几乎所有有机体都需要有机氮作为细胞的必需成分, 氮元素成为地球表面生物量增长的限制性因素^[1]。在氮素循环中, 固氮作用与脱氮作用是两个十分重要的环节, 生物圈中氮素的引入主要是通过固氮作用, 而最终实现对大气中蕴藏丰富的氮素的利用。与此同时, 生物圈中氮素的释放则离不开脱氮作用。脱氮作用是指通过一系列的厌氧电子传递反应把硝酸经由亚硝酸、一氧化氮、氧化亚氮等中间体还原为氮气或氨的过程^[2]。反硝化作用主要由反硝化细

菌^[3]在微氧或厌氧条件下完成。

亚硝酸还原酶是催化亚硝酸盐还原为一氧化氮(NO)的酶。反硝化途径^[4]由一系列的还原反应组成, 每一步都有特定的酶来催化完成。而亚硝酸还原酶最终实现了将溶液态的亚硝酸向气态 NO 的相变, 直接导致了氮素从陆表环境中的流失, 可以认为是反硝化途径中最为关键的一步^[5]; 其次, 利用亚硝酸还原酶降解发酵食品中的亚硝酸盐是应对亚硝酸盐污染的根本对策。对许多细菌中的亚硝酸还原酶分析表明它有两种类型: 以细胞色素 cd1 (cd1NiR) 和

收稿日期: 2016-12-14

作者简介: 魏计东(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物与酶工程, E-mail: weijidongsk@163.com。

* 通讯作者: 王晓辉(1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物与酶工程, E-mail: wangxiaohui@dlu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500039)。

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

PCR 引物	序列(5'→3')	用途
CuNiR-F1	ATGAACGCATTACGCGCCCACTTTGCTGGCGGCGG	正向引物,扩增全长目的基因保守片段
CuNiR-R1	TCAGCGCGGAATCGGCGCGGGCGCCTTGATCTG	反向引物,扩增全长目的基因保守片段
CuNiR-F2	CATATGCAGGACGCGGACAAGCTGCCCCATACC	去除信号肽,克隆 CuNiR 的正向引物,加 <i>Nde</i> I 位点
CuNiR-R2	AAGCTTGCGCGGAATCGGCGCGGGCGCCTTGAT	去除信号肽,克隆 CuNiR 的反向引物,加 <i>Hind</i> III 酶切位点

金属 Cu(*CuNiR*)为辅基,其中细胞色素 cd1NiR 更为经常的发生^[6]。两种类型的亚硝酸还原酶在结构和氧化还原中心的差异很大,但催化相同的单电子亚硝酸还原反应。第一个含铜亚硝酸还原酶是在 1955 年,由 Iwasaki^[7]等人于自名古屋大学的土壤中分离的 *Alcaligenes*(现在称为 *Achromobacter*) *xylosoxidans* NCIB11015 菌株中发现的。亚硝酸还原酶中 *CuNiR* 含量相对较少,但是表现了更广泛的环境、地域、种群等分布上的多样性。迄今为止,已在十几种具有反硝化作用的微生物中明确鉴定出 *CuNiR* 的存在^[8]。最新研究热点主要集中于亚硝酸还原酶催化作用的分子机理,具体涉及电子在两个类铜位点之间的传递,以及 *CuNiR* 结合于类型 2 铜位点(T2Cu)的亚硝酸还原反应发生情况^[9];而关于该酶的基因水平研究较少^[10]。

本文在分子水平上实现编码含铜亚硝酸还原酶基因的克隆、表达及纯化。含铜亚硝酸还原酶基因 *CuNiR* 的克隆、表达以及酶的纯化是重组基因工程菌生产亚硝酸还原酶(NiR)产业化应用的重要研究基础。通过对 *CuNiR* 基因克隆和表达的研究,有助于我们了解亚硝酸还原酶(NiR)基因结构与表达产物之间的关系,并为根据不同应用目的进行亚硝酸还原酶(NiR)分子工程化的改造奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

木糖氧化产碱菌(*Achromobacter xylosoxidans* DL-1) 由本实验室分离并保存;大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) JM109 和 BL21(DE3) 为本实验室保存,分别为基因克隆和表达宿主菌;表达载体 pET-22b(+) 购自 Novagen 公司;引物合成和基因测序 由宝生物工程(大连)有限公司完成;十二烷基硫酸钠(SDS)、琼脂糖、Tris Promega 公司;LA Taq DNA 聚合酶、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒、低分子量蛋白 Marker 宝生物(大连)工程有限公司;蛋白浓度测定试剂盒 碧云天公司;LB 培养基(1000 mL):胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, pH7.0;LB 固体培养基需向液体培养基内加入 2%(w/v)琼脂;LA 培养基:LB 液体或固体培养基中加入终浓度 100 μg/mL 氨苄青霉素。

PCR 扩增仪 TaKaRa 公司;GS-158 低温台式离心机 BECKMAN 公司;J21-M 高速冷冻离心机 BECKMAN 公司;台式冷冻离心机 Eppendorf 公司;CH1015 超级恒温水浴槽 上海恒平仪器厂;Inazge MlasterRVDS 电泳成像系统 Pharmacia Biotech 公司;DYY-III 形电泳槽 北京六一仪器厂;Milli-Q

Academic 超纯水器;pH 计 BECKMAN 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *CuNiR* 基因的克隆与序列分析 从平板上挑取菌株 *Achromobacter xylosoxidans* DL-1 单菌落,接种于 50 mL LB 液体培养基,37 ℃、160 r/min 振荡培养 12 h,12000 r/min 离心 10 min 收集菌体,按细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤提取基因组 DNA。

以基因组 DNA 为模板,根据 Kataoka K 等^[11]的方法设计含铜亚硝酸还原酶基因序列(AB013078)的两对引物,见表 1。PCR 反应条件为:94 ℃ 2 min, 1 个循环;94 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,68 ℃ 7 min,30 个循环;68 ℃ 15 min,1 个循环。PCR 扩增产物经 1%(w/v)琼脂糖电泳检测,将 PCR 产物大小正确的克隆送宝生物工程(大连)有限公司进行测序。采用 Vector NTI Suite 软件进行开放阅读框(open reading frames,ORF)分析。通过 NCBI 上的本地序列基本搜索工具(basic local alignment search tool,BLAST)分析序列同源性。采用在线的简单模块构架搜索工具(simple modular architecture research tool,SMART)进行序列结构域分析。

1.2.2 *CuNiR* 基因的表达与纯化 按实验方法构建 *CuNiR* 基因的表达载体,热转化至 *E.coli* Competent Cell JM109 中,涂布平板培养菌体。随机挑取的 12 个单菌落进行 PCR 鉴定,鉴定正确的质粒分别命名为 CuNiR-P-1 和 CuNiR-P-2,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。*CuNiR* 基因(去除信号肽)和原核表达载体 pET22b(+)的 PCR 产物经 *Nde*I/*Hind* III 双酶切后用 T4 DNA 连接酶连接,构建重组原核表达载体 pET22b-*CuNiR*,并转化至大肠杆菌感受态细胞 *E.coli* BL21(DE3)中。双酶切鉴定正确的阳性克隆接入含氨苄的 LB 培养基中,37 ℃培养 12 h。按 1%的接种量接种到含氨苄的 LB 培养基中。当 OD_{600 nm} 达到 0.6~0.8 左右,加入 1.0 mmol/L 的 IPTG,37 ℃, 100 r/min 诱导 2 h。4 ℃,6000 × g 离心 10 min,收集菌体,用适量 PBS 缓冲液(pH7.0)洗涤菌体并重悬。离心管置于冰上超声(400 W)破碎三次,每次 10 s,间隔 1 min,直至菌体透明。4 ℃,8000 × g 离心 20 min,收集上清液,即为粗蛋白。粗蛋白用 Ni²⁺-NTA 柱(Novagen)进行亲和层析纯化^[12],洗脱的蛋白液 4 ℃保存。蛋白样品经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测,其中浓缩胶浓度 5%,分离胶浓度 12%,用考马斯亮蓝 R-250 染色。低分子量蛋白 Marker 用于 SDS-PAGE。

1.2.3 蛋白质浓度测定 蛋白浓度通过 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(Bradford Protein Assay Kit)测定。

1.2.4 *CuNiR* 酶活性的测定 *CuNiR* 活性测定采用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -MV 法^[13]。测定酶活反应体系 250 μL : 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 125 μL , 0.1 mol/L NaNO_2 12.5 μL , 0.1 mol/L MV 7.5 μL , 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 40 μL , 酶液 50 μL 。30 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应 10 min, 剧烈振荡终止反应 (以磷酸缓冲液为空白)。取 10 μL 加格利斯试剂显色, 在波长 540 nm 处比色法测定亚硝酸盐的变化。

硝酸还原酶活力单位通过在 25 $^\circ\text{C}$ 下, 每分钟还原 1 μmol 亚硝酸盐所消耗的酶量来表示。比活力用 1 mg 蛋白质中酶的活力单位数来表示。

2 结果与分析

2.1 *CuNiR* 基因的扩增与序列分析

以 *Achromobacter xylosoxidans* DL-1 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到一条长度约 1083 bp 的 DNA 片段 (图 1)。DNA 测序结果表明: 该基因包含 1083 个核苷酸构成的开放阅读框架, 命名为 *CuNiR*, 该基因编码 360 个氨基酸, 理论分子量 38.924 kDa, 等电点为 4.83。本文首次报道从 *Achromobacter xylosoxidans* DL-1 中克隆亚硝酸还原酶基因。Blast 比对分析该序列同已发表的 *A. xylosoxidans* AU1011 亚硝酸还原酶 (GeneBank No. AB013078) 氨基酸同源性达 96%。但未见比对菌株中该蛋白表达纯化研究。结构域分析该基因包含一段 24 个氨基酸构成的信号肽, 1 个铜离子结合结构域和 1 个氧化还原酶催化域。

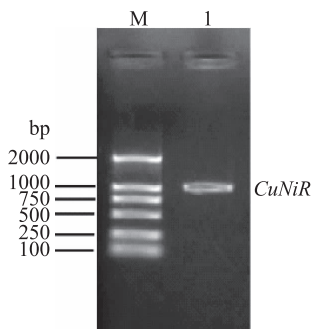


图 1 含铜亚硝酸还原酶基因的 PCR 扩增

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the *CuNiR* gene through PCR

注: M: DNA Marker DL2000; 1: *CuNiR* gene。

2.2 *CuNiR* 基因测序载体的鉴定

将以 *CuNiR*-F2/R2 为引物 PCR 扩增得到的目的片断 *CuNiR* 基因克隆至 pMD19-T simple 载体中, 构建了重组质粒 pMD19-T simple/*CuNiR*, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。由图 2 可见在约 3.7 kbp 处得到 4 条明亮清晰 DNA 条带, 其中去除信号肽 *CuNiR* 基因片段大小约 1011 bp, pMD19-T simple 载体大小为 2692 bp, 结果显示目的片断已经成功克隆至质粒载体中, 成功构建重组质粒 pMD19-T simple/*CuNiR*, 进一步测序验证正确的目的基因进行后续分析。

2.3 *CuNiR* 基因表达载体的构建与鉴定

提取重组表达质粒 *CuNiR*-P-1 和 *CuNiR*-P-2 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 3 所示, 重

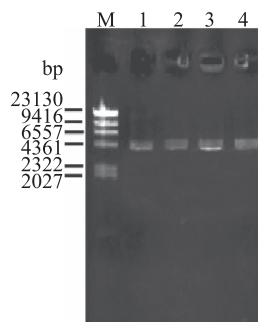


图 2 重组质粒 pMD19-T simple/*CuNiR* 的 PCR 电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pMD19-T simple/*CuNiR*

注: M: Lambda DNA/Hind III Marker; 1~4: 重组质粒 pMD19-T simple/*CuNiR*。

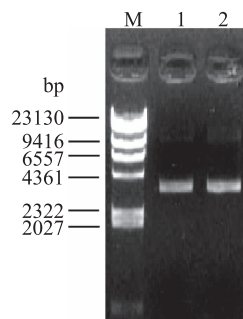


图 3 重组质粒 pET-22b-*CuNiR* 琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of pET-22b/*CuNiR* plasmid

注: M: λ -Hind III DNA Marker; 1: *CuNiR*-P-1; 2: *CuNiR*-P-2。组表达质粒与预期大小一致。

将质粒 *CuNiR*-P-1 和 *CuNiR*-P-2 分别用限制性内切酶 *Nde* I / *Hind* III 进行双酶切, 取 20 μL 酶解产物上样进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出, 两个重组质粒酶解产物片段大小分别约为 1 kbp 和 5.3 kbp 左右, 说明目的 *CuNiR* 基因已成功的亚克隆至表达载体 pET-22b (+) 中。

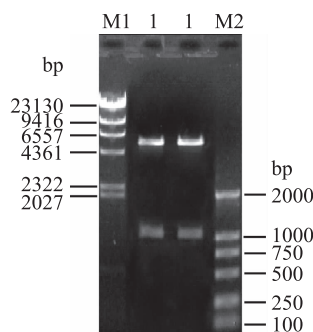


图 4 质粒 *CuNiR*-P-1 和 *CuNiR*-P-2 酶切产物回收

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of recombinant expression plasmid pET-22b(+) / *CuNiR* digested with restriction enzyme

注: M1: λ -Hind III DNA Marker; 1: *CuNiR*-P-1 *Nde* I / *Hind* III 酶切; 2: *CuNiR*-P-2 *Nde* I / *Hind* III 酶切; M2: DNA Marker DL2000。

2.4 CuNiR 目的蛋白诱导表达与检测

将经鉴定正确的原核重组表达质粒载体 pET-22b(+) / CuNiR (CuNiR-P-1) 转化至表达宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3) 中诱导表达。菌体裂解物进行 SDS-PAGE 电泳, 由图 5 可知, 泳道 1~3 空表达载体 pET-22b(+) 宿主菌 BL21 (DE3) 未见目的蛋白, 而泳道 4 和 5 约 36 kDa 位置处出现特异条带, 与预期表达的相对分子质量相符, 说明目的蛋白 CuNiR 在宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3) 中成功表达, 且在全细胞和细胞浆的可溶性蛋白中检测到目的蛋白。由此可知, 目的蛋白 CuNiR 在大肠杆菌中可溶表达。

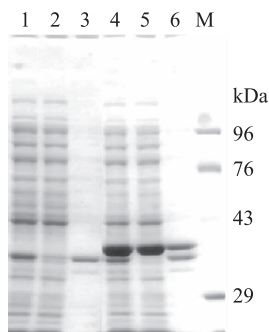


图5 目的蛋白 CuNiR 的 SDS-PAGE 检测结果

Fig.5 SDS-PAGE analysis of CuNiR protein

注: 1: pET-22b(+) 全细胞; 2: pET-22b(+) 上清;

3: pET-22b(+) 沉淀; 4: pET-22b(+) / CuNiR 全细胞;

5: pET-22b(+) / CuNiR 上清; 6: pET-22b(+) / CuNiR 沉淀;

M: TakaRa Protein Marker (Low)。

2.5 CuNiR 的纯化与酶活检测

在摇瓶水平, 1 L 发酵液经 1 mmol/L IPTG 诱导 2 h 离心收集菌体, 超声破碎后得到 CuNiR 上清液蛋白。破碎上清液经 Ni-NTA 纯化重组蛋白, SDS-PAGE 检测洗脱收集液, 如图 6 所示。目标蛋白被 120、300 mmol/L 咪唑溶液洗下收集, 获取纯度较高且浓度较大的目标蛋白。纯化后 CuNiR 总蛋白含量为 96 mg, 比活力为 123.82 U/mg, 总活力为 11887.08 U。

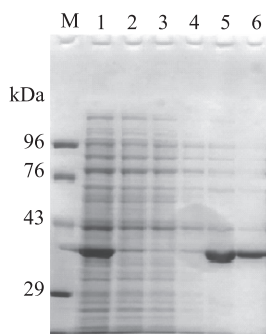


图6 重组含铜亚硝酸还原酶 CuNiR 的分离纯化

Fig.6 Purification of the recombinant CuNiR

注: M: 低分子量蛋白 Marker;

1: *E.coli* BL21 (DE3) / pET22b-CuNiR 细胞裂解液;

2: Ni-NTA 纯化后 CuNiR 过柱后洗脱液;

3: 磷酸缓冲液 (pH 7.5) 洗脱液; 4: 20 mmol/L 咪唑洗脱液;

5: 120 mmol/L 咪唑洗脱液; 6: 300 mmol/L 咪唑洗脱液。

3 结论

亚硝酸还原酶大多数为胞内酶, 受分离纯化技术的影响, 该酶的应用受到了极大限制^[14]。本研究所用的 pET 系列表达载体是有史以来在 *E.coli* 中克隆表达重组蛋白功能最强大的系统, 保证外源目的基因成功表达与纯化。本实验中我们选择了带有 *Nde* I 酶切位点的表达载体 pET-22b(+), 该表达载体多克隆位点 C 端有一个能编码 6 个组氨酸的融合标签 His-Tag, 6 × His 通常不影响表达产物的生物学活性, 因而不必通过酶水解获得目的蛋白, 使表达的整个过程更为简单, 同时该融合标签可用于目的蛋白的检测和纯化。在融合标签 His-Tag 后还相连一个终止密码子 TGA, 它保证了目的蛋白和 His-Tag 的完整表达^[15-16]。截至目前文献报道亚硝酸还原酶主要集中于甜菜、小麦、菠菜等植物中^[17-18], 而微生物亚硝酸还原酶报道较少^[19-20]。本研究将含铜亚硝酸还原酶基因成功克隆并构建表达载体 pET22b, 再转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) BL21 (DE3) 中诱导表达, 目的蛋白经 SDS-PAGE 检测显示为可溶表达, 随后利用镍柱亲和和层析纯化蛋白, 酶比活可达 123.82 U/mg, 为下一步酶学性质研究及工业化生产奠定基础。

参考文献

- [1] Orellana L H, Rodriguez-R L M, Higgins S, et al. Detecting nitrous oxide reductase (NosZ) genes in soil metagenomes: method development and implications for the nitrogen cycle [J]. *Mbio*, 2014, 5(3): 191-194.
- [2] Allen J W, Barker P D, Daltrop O, et al. Why isn't 'standard' heme good enough for c-type and d1-type cytochromes [J]. *Dalton Transactions*, 2005, 21(21): 3410-3418.
- [3] Sharma S, Szele Z, Schilling R, et al. Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 72(3): 2148-2154.
- [4] Antonyuk S V, Strange R W, Sawers G, et al. Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(34): 41-46.
- [5] Hallin S, Lindgren P E. PCR Detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1652-1657.
- [6] Tsuneda S, Miyauchi R, Ohno T, et al. Characterization of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge based on nitrite reductase gene [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(4): 403-408.
- [7] Yamaguchi K, Deligeer, Nakamura N, et al. Isolation and characterization of two distinct azurins from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* NCIB11015 or GIFU1051 [J]. *Chemistry Letters*, 1995, 89(5): 353-354.
- [8] Moura I, Moura J J. Structural aspects of denitrifying enzymes [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5(2): 168-175.

