



根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解代谢中 *agnE* 基因的克隆与功能鉴定

皮婷, 姚家成, 黄粤, 夏珍珍, 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, 湖北 武汉 430074

摘要:【目的】本研究对尼古丁降解菌根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株中 *agnE* 基因进行克隆表达, 并对 *agnE* 基因表达蛋白进行功能鉴定。【方法】通过 PCR 扩增获得 *agnE* 全长基因(1029 bp), 构建重组质粒 pET28a-*agnE*, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株进行异源表达, 采用 SDS-PAGE 检测重组蛋白。以 2,5-二羟基吡啶作为反应底物, 在检测波长 320 nm 下测定反应液吸光度值, 进一步研究温度、pH 值和金属离子对 AgnE 蛋白酶活性的影响。【结果】克隆得到基因 *agnE*, 构建了 pET28a-*agnE* 重组质粒并进行了表达, AgnE 蛋白分子量为 42.0 kDa, 表达蛋白以包涵体形式存在于细胞中。酶促反应 0、5、10、20 min 时反应液吸光度分别为 0.6170、0.2273、0.0907、0.0667。在 pH 8.0、温度 20 °C 下, AgnE 蛋白具有较高的 2,5-二羟基吡啶双加氧酶活性, 且 Fe²⁺对酶活性具有明显的促进作用。【结论】明确了 AgnE 蛋白具有 2,5-二羟基吡啶双加氧酶活性。

关键词: 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株, 尼古丁降解代谢, *agnE* 基因功能, 2,5-二羟基吡啶

尼古丁是一种存在于茄科植物中的生物碱, 是烟草生物碱的主要成分, 占烟叶干重的 2%–8%, 也是烟草生产废弃物中的主要物质^[1]。尼古丁是由吡啶环与吡咯环组成的结构稳定的有毒杂环化合物, 在自然条件下不易被降解^[2–3]。尼古丁对人或动物可产生多种致癌、致畸、致突变效应, 是恶性环境污染物之一, 欧盟已将每千克尼古丁含量超过 500 mg 的烟草废弃物列入有毒有害物清单,

利用微生物降解尼古丁是低成本、高效率且对环境影响小的尼古丁降解方法^[4–5]。尼古丁降解菌株中大约一半以上的细菌属于节杆菌(*Arthrobacter*)^[6–10]和假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[11–15], 其他的分布于产碱菌(*Alicalicoccus*)^[16]、无色杆菌属(*Achromobacter*)^[17]、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[18]、纤维单胞菌(*Cellulomonas*)^[19]和中间苍白杆菌(*Ochrobactrum intermedium*)^[20]。微生物降解尼古丁

基金项目: 国家自然科学基金(31070087, 30570046); 湖北省自然科学基金(2011CDA079, 2008CDB076); 中央科研基本业务费(CZW16005, YCZW15104)

*通信作者。Tel: +86-27-67843541; Fax: +86-27-67842689; E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

收稿日期: 2017-10-22; 修回日期: 2017-12-26; 网络出版日期: 2018-01-24

主要途径有存在于节杆菌属中的吡啶途径^[6-8]、存在于假单胞菌属中的吡咯途径^[11-15]、存在于真菌中的脱甲基途径^[21]。此外,许平等发现存在于中间苍白杆菌 SJY1 菌株中的吡啶与吡咯途径的混合途径^[22]。

目前,研究较多的双加氧酶为芳香烃双加氧酶,是参与芳香烃化合物生物降解的主要酶类,它能活化空气中的氧分子,使羟基化的芳香烃在活性氧作用下发生双氧化开环反应,可以清除环境中难以降解的芳香烃化合物。在酶的生物学系统分类中,一般将能催化芳香烃类化合物的双加氧酶都归属于非血红素类铁氧化-还原蛋白,按照酶的俗名命名法,根据其产物的基本结构,可把它们区分为双羟基化酶和开环酶^[23]。

根癌土壤杆菌 SCUEC1 全基因测序所得基因簇经在线比对, *agnE* 与中间苍白杆菌 SJY1 中 *vppE* 具有同源性,推测 *agnE* 基因编码 2,5-二羟基吡啶双加氧酶^[22,24]。本研究通过克隆表达 *AgnE* 蛋白,以 2,5-二羟基吡啶为底物进行功能验证,试图明确 *agnE* 基因的功能,为根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株降解尼古丁分子机制的揭示奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

原核表达载体 pET28a、*Escherichia coli* BL21(DE3)、根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株为本实验室保藏。

1.2 培养基

液体培养基 LB (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.0。

固体培养基 LA (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, 琼脂 18.0, pH 7.0。

1.3 *agnE* 基因克隆与重组质粒构建

按照 TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 中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 中 *agnE* 基因的核酸序列和表达载体 pET28a 的多克隆位点,使用 Primer Premier 5.0 设计上下游引物,通过 PCR 反应克隆基因片段。设计的上游引物 Primer-F: 5'-CGCGAGCTCATGGACCACACGAGTTTCACCGAAATC-3' (下划线处为 *Sac* I 酶切位点); 下游引物 Primer-R: 5'-CCC AAGCTTTTATCGTTCCATTTTCATGTCCG-3' (下划线处为 *Hind* III 酶切位点)。PCR 反应体系: 模板 DNA 1 μ L, Primer-F 1 μ L, Primer-R 1 μ L, dNTPs 1 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, *Taq* 酶 0.3 μ L, ddH₂O 18.2 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。回收目的片段,与 pET28a 载体连接,转化感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3)。挑取单菌落,利用 *Sac* I 和 *Hind* III 对提取质粒进行双酶切鉴定,将鉴定正确的阳性克隆进行 DNA 测序鉴定。

1.4 *agnE* 基因的表达与 SDS-PAGE 分析

在 DNA 测序鉴定正确的阳性克隆菌液中加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 16 $^{\circ}$ C 下诱导表达 20 h。将诱导表达的菌液离心,收集菌体,在 5 mL 裂解液中重悬,超声破碎 15 min (超声 1 s, 间隔 2 s)。4 $^{\circ}$ C 离心,分别收集全菌液、上清液、沉淀。采用镍柱对上清液中 *AgnE* 蛋白进行纯化,依次用含 80、100、150、250、500 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱蛋白。12% SDS-PAGE 检测,电压为 80 V。

1.5 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 AgnE 氨基酸序列同源性和保守序列进行分析, 采用 MEGA 6.0 软件构建进化树, 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。

1.6 AgnE 酶活的测定

2,5-二羟基吡啶双加氧酶能将 2,5-二羟基吡啶转化为 *N*-甲酰马来酰胺酸。2,5-二羟基吡啶在 320 nm 有特异吸收峰, 随着酶促反应的进行, 320 nm 处的吸光度随之减少。酶催化反应体系: pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液(含 0.025 mmol/L Fe^{2+}), 0.1 g/L 2,5-二羟基吡啶, 催化反应温度为 20 °C。500 μ L 反应体系中加入 50 μ L 的酶样品溶液。两倍体积乙醇终止酶促反应, 离心收集上清, 测定上清液在 320 nm 处吸光度值。

1.7 温度、金属离子及 pH 对酶活性的影响

温度对酶活性的影响测定: 将底物处于 pH 8.0 缓冲溶液(含 0.025 mmol/L Fe^{2+})中, 分别在不同温度下进行酶促反应。金属离子对酶活性的影响测定: 在 20 °C、pH 8.0 条件下, 酶促反应分别在不同金属离子条件下进行。pH 对酶活性的影响测定: 在 20 °C 下, 酶促反应分别在不同 pH 值缓冲溶液(含 0.025 mmol/L Fe^{2+})中进行。将最高酶活性设为 100%, 计算其他条件下的相对酶活。

2 结果和分析

2.1 *agnE* 基因的克隆与重组质粒 pET28a-*agnE* 的构建

以根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株总 DNA 为模

板, Primer-F、Primer-R 为引物, 通过 PCR 扩增得到与 *agnE* 基因大小一致的约 1.0 kb 的片段。将扩增得到的片段与 pET28a 载体连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3)后挑取转化子, 提取质粒, *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切得到 2 个片段, 分别对应 *agnE* 基因双酶切片段和 pET28a 载体双酶切片段(图 1), 对克隆片段进行核酸序列测定, 与基因 *agnE* 序列(图 2)一致。

2.2 *agnE* 基因表达与 SDS-PAGE 分析

重组 pET28a-AgnE 蛋白通过 IPTG 在 16 °C 诱导 20 h, 用镍柱纯化, 12% SDS-PAGE 检测结果如图 3 所示, 上清液中 AgnE 蛋白浓度较低, 沉淀中 AgnE 蛋白浓度较高, 大部分 AgnE 蛋白存在于沉淀中。用 250 mmol/L 咪唑对上清液中 AgnE 蛋白进行洗脱, 得到较纯的 AgnE 蛋白。与蛋白分子量标准比较, AgnE 蛋白分子量约为 42.0 kDa, 与目的蛋白理论计算值(42.0 kDa)相符。

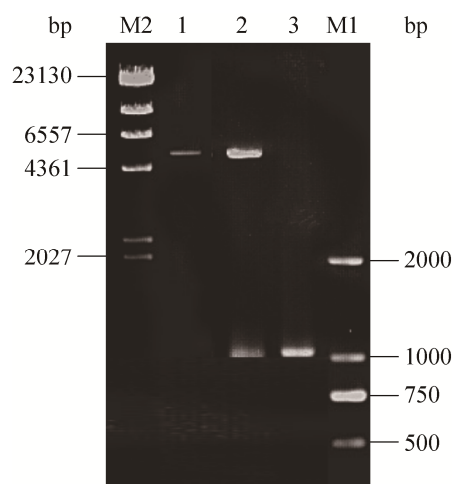


图 1. 质粒 pET28a-*agnE* 的构建

Figure 1. Construction of plasmid pET28a-*agnE*. M1: DL2000 DNA marker; M2: λ -*Hind* III DNA marker; 1: plasmid pET28a DNA digested with *Sac* I and *Hind* III; 2: plasmid pET28a-*agnE* DNA digested with *Sac* I and *Hind* III; 3: gene *agnE* DNA fragment digested with *Sac* I and *Hind* III.

ATGGACCACACGAGTTTCACCGAAATCTGCCTCCACCAGTTGAAGATGTCCGGCGTGCGCGACGGCGAGCGCCTTGTCGT
 GCTCACGCAGGGCAATGAACGACTGGACTATGCAAATGCGTTTCTTGCCGCTGGCCAACGTCTTGCGCGAACATGTACC
 ACATGCGCCTGCCGGCGCCCTTGCCGACGGGTGGCTGGAATGTTGGCGTCACCGGCCTTGCCGCGATGCCAGATGCCGTT
 GAGGCCCTCAAGAACTGCGACATGTTGATCGACTGCATCTTCTGCTGTTCTCACCGGAGCAGATGGCGATCCAGGCCGC
 CGGTACGCGCGTGTGACAGCGGTTGAGCCGCCTGAACTTCTGGCTCGCATGCTTCTTACAAGGAACTGCGGGGAGAAGG
 TGGAAATTGGTGGCGAGATCCTCTCGAGAGCCAAGGTTATGCGGATCACGTTCGACGACGGGACCGACGTTACATACAAG
 CTGAACACCTATCCCACGATCACGGAGTACGCGTGCACGGACCAACCAGGCCGGTGGGACCACTGGCCGTCTGGCTTTGT
 CTTACCGGCGCGGACGACGATGGCGTGCACGGCCAGATCGTAGTCGCGCCGGGCGATATCTTATTGCCGAAAACACCTA
 TGTGCGTGAGCCATCATTACACAATCGAGAAGGGCTGGATCACCGACATCCGTGGCGGCCTCGATGCCGAAATCGTCA
 AGTCTTACATGCAGTCTTTCGCGGATCCGAAAGGTTACGGCATGAGCCATGTCGGCTGGGGCATGAATCCCCAGGCAAAT
 GGCATAACTTCGTGCCGGGCGCCTTCCAGGCGGCATGGGCATGGAGCCGCGTTCGTTCTACGAAACGTTATGTTCTCGA
 CCGGCCCTAATAACGAGCTTGGCGGTCCAAACGACACACACTGCCACCTCGACATCCCGATGCGCAACTGCTCGCTCTTC
 CTTGATGACGCACCGATCGTCATCGATGGGGATATCGTCGTGCCGGACATGAAAATGGAACGATAA

图 2. 基因 *agnE* 的核苷酸序列

Figure 2. Nucleotide sequence of gene *agnE*.

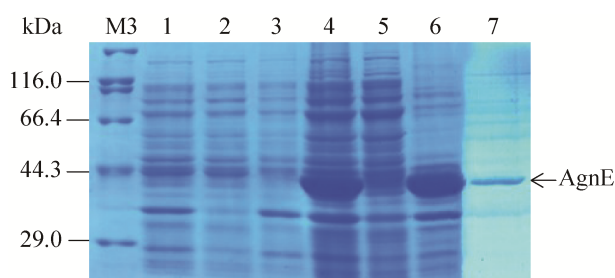


图 3. *AgnE* 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 3. SDS-PAGE analysis of the protein *AgnE* in *E. coli* BL21(DE3). Lane 1: lysed *E. coli* BL21 carrying the plasmid pET28a; lane 2: supernatant of the lysed *E. coli* BL21 carrying the plasmid pET28a; lane 3: precipitate of the lysed *E. coli* BL21 carrying the plasmid pET28a; lane 4: lysed *E. coli* BL21 carrying the recombinant plasmid pET28a-*agnE*; lane 5: supernatant of the lysed *E. coli* BL21 carrying the recombinant plasmid pET28a-*agnE*; lane 6: precipitate of the lysed *E. coli* BL21 carrying the recombinant plasmid pET28a-*agnE*; lane 7: purified protein *AgnE*.

2.3 *agnE* 基因编码的氨基酸序列分析

利用 NCBI BLASTp 在线软件在 GenBank 中进行检索, 选择相似度较高的氨基酸序列进行比对分析, 采用 N-J 法构建进化树, Bootstrap 值为 1000, 用 MEGA 6.0 构建进化树(图 4)。AgnE 氨基酸序列与中间苍白杆菌 SJY1 中 2,5-二羟基吡啶

双加氧酶和根瘤菌中亮氨酸氨基肽酶氨基酸序列均具有 100% 的同源性。中间苍白杆菌 SJY1 中 2,5-二羟基吡啶双加氧酶能将 2,5-二羟基吡啶转化为 *N*-乙酰马来酰胺酸。根瘤菌中亮氨酸氨基肽酶是水解以亮氨酸残基为氨基末端的蛋白质或多肽的酶类。

根据 ExPASy ProtParam 在线分析得出, *AgnE* 的氨基酸组成个数为 342, 理论分子量 37.7 kDa, pI 4.97, 带负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu)为 42, 带正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys)为 27, 不稳定指数 42.82, 平均亲水系数(GRVAY) -0.167。

采用 PROSITE、NCBI BLASTp 在线对保守结构域(CD)进行预测, *AgnE* 蛋白属于肽酶 M29 超家族。pHD 在线预测蛋白质的二级结构, 有 8 个 α -螺旋, 有 4 个蛋白结合区域, 分别为氨基酸序列中第 1 位点的甲硫氨酸、第 46 位点的谷酰胺、第 110 位点的精氨酸以及第 133 位点的赖氨酸。

综上所述, *AgnE* 不稳定指数高于阈值 40, 推测 *AgnE* 为不稳定蛋白。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 *AgnE* 为亲水性蛋白。利用 SignalP 4.1 Server 在线预测 *AgnE* 不含信号肽序列, 推测 *AgnE* 为非分泌性蛋白。

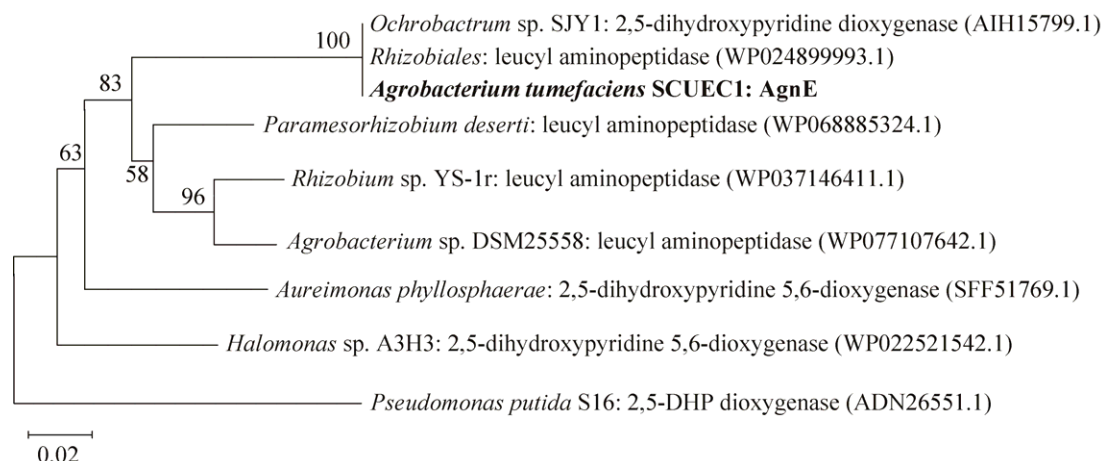


图 4. 基于氨基酸序列 AgnE 蛋白的进化树构建

Figure 4. Phylogenetic tree of AgnE protein based on amino acid sequence. The GenBank accession numbers are given in parentheses. Posterior probabilities are denoted at nodes. Numbers at branching points are bootstrap values. Bar 0.02 at the bottom is the sequence divergence.

2.4 AgnE 蛋白酶活性的检测

在温度为 20 °C、pH 8.0 缓冲溶液(含 0.025 mmol/L Fe²⁺)中,用纯化的 AgnE 蛋白进行酶促反应。分别测定酶促反应 0、5、10、20 min 时体系吸光度值。结果如图 5 所示,320 nm 处吸光度值随着酶促反应的进行而降低,反应 20 min 转化率达到 89.19%。而对照在 0、5、10、20 min 吸光度值保持不变。表明 AgnE 蛋白具有催化 2,5-二羟基吡啶转化的酶活性。

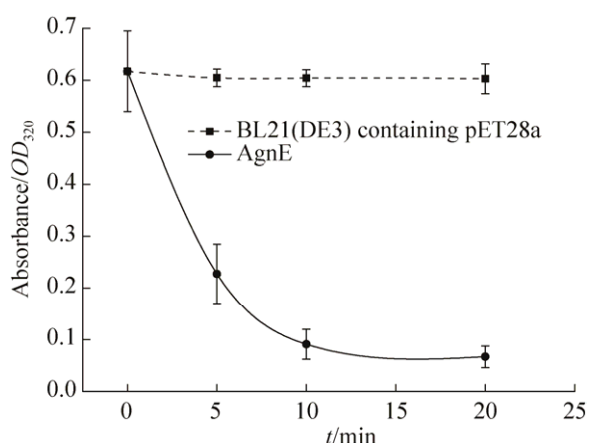


图 5. 不同反应时间反应体系的紫外吸光度值

Figure 5. The ultraviolet absorbance of the reaction system at different reaction time.

2.5 温度对 AgnE 蛋白酶活性的影响

在 pH 8.0 缓冲溶液(含 0.025 mmol/L Fe²⁺)条件下,分别测定 15、20、25、30、35、40、50、60、70 °C 不同温度对 AgnE 蛋白酶活性影响,结果如图 6 所示。在温度为 20–70 °C 的范围内,随温度升高, AgnE 蛋白酶活性逐渐下降, AgnE 蛋白酶活性的最适反应温度为 20 °C。

2.6 pH 对 AgnE 蛋白酶活性的影响

在温度为 20 °C,分别测定 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 时缓冲溶液(含 0.025 mmol/L

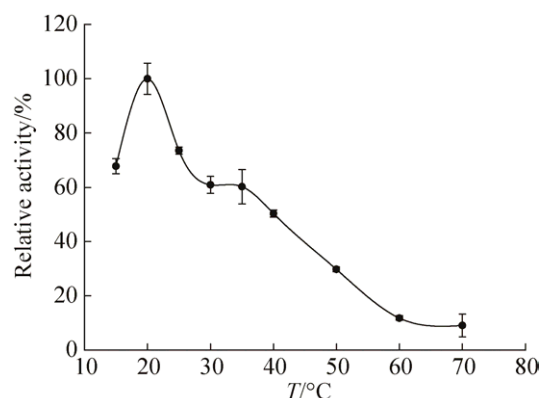


图 6. 温度对 AgnE 蛋白酶活的影响

Figure 6. The effects of temperature on the enzyme activity of AgnE protein.

Fe²⁺)条件下 AgnE 蛋白酶的催化活性,结果如图 7 所示。在 pH 为 3.0–8.0 的范围内,随 pH 增加, AgnE 蛋白酶活性逐渐上升;在 pH 为 8.0–10.0 的范围内,随 pH 增加, AgnE 蛋白酶活性逐渐下降, AgnE 酶的最适反应 pH 为 8.0。

2.7 金属离子对 AgnE 蛋白酶活性的影响

在温度为 20 °C、pH 8.0 缓冲溶液(不含金属离子)条件下,分别测定终浓度为 0.025 mmol/L 的 Fe²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺对 AgnE 蛋白酶活性的影响。结果如图 8 所示, Ni²⁺和 Cu²⁺

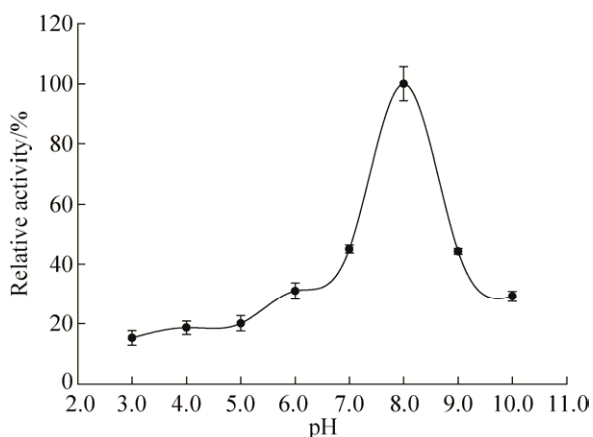


图 7. pH 对 AgnE 蛋白酶活的影响

Figure 7. The effects of metal ion on the enzyme activity of AgnE protein.

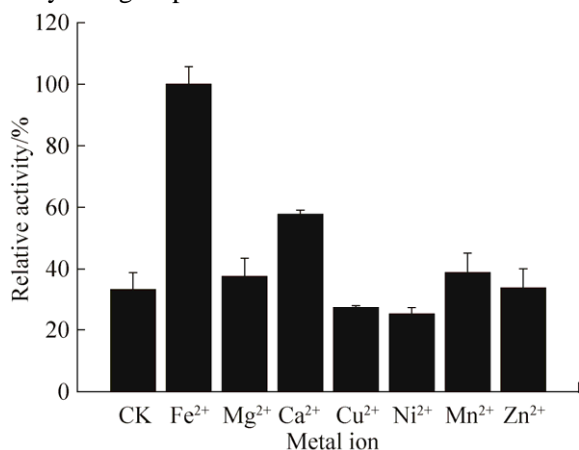


图 8. 金属离子对 AgnE 蛋白酶活的影响

Figure 8. The effects of metal ion on the enzyme activity of AgnE protein. CK: No metal ions were added.

对 AgnE 蛋白酶活性有一定的抑制作用,而 Ca²⁺和 Fe²⁺对 AgnE 蛋白酶活性有一定的促进作用, Fe²⁺对 AgnE 蛋白酶活性的促进作用较高。

3 讨论

氮杂环是许多天然分子化合物和人造化学活性物质中共同的结构单元,吡咯、吡啶以及吡嗪衍生物可以用作药物、除草剂、杀虫剂、油漆等^[25–26],有些是环境污染物,如烟草中的尼古丁。微生物代谢在清除环境中尼古丁残物起到重要作用,进行尼古丁降解菌代谢途径的探究,对被尼古丁污染的环境中的生物修复具有潜在应用价值^[10]。

本研究对根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株中的一个尼古丁降解相关基因 *agnE* 进行克隆和功能研究,该基因编码的氨基酸序列与中间苍白杆菌 SJY1 中 VppE 蛋白氨基酸序列具有 100%的相似度^[22],与恶臭假单胞杆菌中 Hpo 蛋白氨基酸序列具有 82%的相似度^[27]。*agnE* 基因编码 AgnE 蛋白的功能为 2,5-二羟基吡啶双加氧酶。2,5-二羟基吡啶中吡啶环在自然条件下不易降解开环,2,5-二羟基吡啶双加氧酶是尼古丁降解途径中关键酶。

AgnE 蛋白的氨基酸序列与氨基肽酶(AmpS)具有较高同源性, AgnE 蛋白中含有一个与氨基肽酶(AmpS)类似的保守结构域。黄色葡萄球菌的 AmpS 中含有 2 个高效的 Co²⁺结合位点^[28]。将 AgnE 的结构模型与 AmpS 的晶体结构比较后发现, AgnE 中与 AmpS 2 个 Co²⁺结合位点相对应位置的氨基酸残基不同,这可能导致 AgnE 失去了结合 Co²⁺的能力,推测 AgnE 蛋白可能不具备氨基肽酶活性,在尼古丁降解基因蛋白 Hpo、NicX 等也存在类似现象^[27,29–30]。

参考文献

- [1] Armstrong DW, Wang X, Ercal N. Enantiomeric composition of nicotine in smokeless tobacco, medicinal products, and commercial reagents. *Chirality*, 1998, 10: 587–591.
- [2] Kim HS, Jeffrey GA. The crystal structure of a 1:1 nicotine-salicylic acid complex (nicotinyl salicylate). *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, 1971, 27(6): 1123–1131.
- [3] Hawkins BT, Abbruscato TJ, Egleton RD, Brown RC, Huber JD, Campos CR, Davis TP. Nicotine increases *in vivo* blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution. *Brain Research*, 2004, 1027(1/2): 48–58.
- [4] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, de Bertoldi M. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms. *Waste Management & Research*, 1997, 15(4): 349–358.
- [5] Brandsch R, Decker K. Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxidans*. *Archives of Microbiology*, 1984, 138(1): 15–17.
- [6] Kaiser JP, Feng Y, Bollag JM. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60(3): 483–498.
- [7] Baitsch D, Sandu C, Brandsch R, Igloi GL. Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2,6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(18): 5262–5267.
- [8] Igloi GL, Brandsch R. Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(6): 1976–1986.
- [9] Kong W, Xian F, Li CY, Wang JX, Li XH. Isolation and characterization of a high nicotine-degradation bacterium. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2011, 30(1): 30–33. (in Chinese)
孔雯, 先锋, 李长影, 王家昕, 李晓华. 1 株烟碱降解菌的筛选、鉴定及其降解性能的初步研究. *华中农业大学学报*, 2011, 30(1): 30–33.
- [10] Li XH, Mei F, Kong W, Li Y, Ma TT, Pi T. Research development of nicotine degrading mechanism in microorganisms and their applications. *Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2017, 36(4): 27–35. (in Chinese)
李晓华, 梅枫, 孔雯, 李阳, 马婷婷, 皮婷. 尼古丁微生物降解代谢机制和应用的研究进展. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2017, 36(4): 27–35.
- [11] Ruan AD, Min H, Peng XH, Huang Z. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine. *Research in Microbiology*, 2005, 156(5/6): 700–706.
- [12] Tang HZ, Wang LJ, Meng XZ, Ma LY, Wang SN, He XF, Wu G, Xu P. Novel nicotine oxidoreductase-encoding gene involved in nicotine degradation by *Pseudomonas putida* strain S16. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(3): 772–778.
- [13] Tang HZ, Wang SN, Ma LY, Meng XZ, Deng ZX, Zhang DK, Ma CQ, Xu P. A novel gene, encoding 6-hydroxy-3-succinoylpyridine hydroxylase, involved in nicotine degradation by *Pseudomonas putida* strain S16. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5): 1567–1574.
- [14] Wang LJ, Tang HZ, Yu H, Yao YX, Xu P. An unusual repressor controls the expression of a crucial nicotine-degrading gene cluster in *Pseudomonas putida* S16. *Molecular Microbiology*, 2014, 91(6): 1252–1269.
- [15] Wang SN, Liu Z, Tang HZ, Meng J, Xu P. Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16. *Microbiology*, 2007, 153(5): 1556–1565.
- [16] Uchida S, Maeda S, Masubuchi K, Shinohara T, Kasaki T. Isolation of nicotine-degrading bacteria and degradation of nicotine in shredded tobacco and tobacco extract. *Nippon Sembai Kosha Chou Kenkyusho Kenkyu Hokoku*, 1976, 18: 197–201.
- [17] Hylin JW. The microbial degradation of nicotine. II. The mode of action of *Achromobacter nicotinophagum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, 83(2): 528–537.
- [18] Brandsch R. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(5): 493–498.
- [19] Kolenbrander PE, Weinberger M. 2-Hydroxypyridine metabolism and pigment formation in three *Arthrobacter* species. *Journal of Bacteriology*, 1977, 132(1): 51–59.
- [20] Yuan YJ, Lu ZX, Huang LJ, Bie XM, Lü FX, Li Y. Optimization of a medium for enhancing nicotine biodegradation by *Ochrobactrum intermedium* DN2. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(3): 691–697.
- [21] Kyerematen GA, Vesell ES. Metabolism of nicotine. *Drug Metabolism Reviews*, 1991, 23(1/2): 3–41.
- [22] Yu H, Tang HZ, Zhu XY, Li YY, Xu P. Molecular mechanism of nicotine degradation by a newly isolated strain, *Ochrobactrum* sp. Strain SJY1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 272–281.
- [23] Zhang J, Xia CG. Studies of structure and function of aromatic hydrocarbon dioxygenases. *Progress in Chemistry*, 2004, 16(1): 116–122. (in Chinese)
章俭, 夏春谷. 芳香烃双加氧酶的结构与功能研究. *化学进展*, 2004, 16(1): 116–122.
- [24] Mei F, Kong W, Li Y, Ma TT, Pi T, He DL, Cheng GJ, Liu T, Li XH. Isolation and gene characterization of a nicotine-degradation strain *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(5): 701–709. (in Chinese)
梅枫, 孔雯, 李阳, 马婷婷, 皮婷, 何冬兰, 程国军, 刘涛, 李晓华. 尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株的分离及其降解基因.

- 微生物学报, 2017, 57(5): 701–709.
- [25] Scriven EFV, Murugan R. Pyridine and pyridine derivatives. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2005, 20: 1–33.
- [26] O'Hagan D. Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine and tropane alkaloids. *Natural Product Reports*, 2000, 17(5): 435–446.
- [27] Tang HZ, Yao YX, Wang LJ, Yu H, Ren YL, Wu G, Xu P. Genomic analysis of *Pseudomonas putida*: genes in a genome island are crucial for nicotine degradation. *Scientific Reports*, 2012, 2: 377.
- [28] Odintsov SG, Sabala I, Bourenkov G, Rybin V, Bochtler M. *Staphylococcus aureus* aminopeptidase S is a founding member of a new peptidase clan. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(30): 27792–27799.
- [29] Yao YX, Tang HZ, Ren HX, Yu H, Wang LJ, Zhang W, Behrman EJ, Xu P. Iron(II)-dependent dioxygenase and *N*-formylamide deformylase catalyze the reactions from 5-hydroxy-2-pyridone to maleamate. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3235.
- [30] Jiménez JI, Acebrón I, García JL, Díaz E, Mancheño JM. A preliminary crystallographic study of recombinant NicX, an Fe²⁺-dependent 2,5-dihydroxypyridine dioxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications*, 2010, 66(5): 549–553.

Cloning and characterization of the *agnE* gene for nicotine degradation in *Agrobacterium tumefaciens* strain SCUEC1

Ting Pi, Jiacheng Yao, Yue Huang, Zhenzhen Xia, Feng Mei, Donglan He, Guojun Cheng, Tao Liu, Xiaohua Li*

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

Abstract: [Objective] We cloned and expressed the *agnE* gene involved in nicotine-degrading in *Agrobacterium tumefaciens* and characterized the AgnE protein. [Methods] The *agnE* gene fragment (1029 bp) was amplified with PCR. Recombinant plasmid pET28a-*agnE* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for heterologous expression, and the expressed protein was detected with SDS-PAGE. The enzyme activity of AgnE was determined spectrophotometrically by monitoring the decrease of 2,5-dihydroxy pyridine at 320 nm. The effect of temperature, pH and metal ion on enzyme activity was investigated. [Results] The *agnE* gene was cloned and the recombinant plasmid pET28a-*agnE* was expressed. The molecular weight of the recombinant protein was 42.0 kDa, and the protein was expressed in the form of inclusion bodies in cells. The AgnE protein had high enzyme activity at pH 8.0 and 20 °C. In addition, Fe²⁺ showed significant promoting effect on enzyme activity. [Conclusion] The activity of AgnE protein with 2,5-dihydroxy pyridine dioxygenase was clarified.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1 strain, nicotine degrading metabolism, the function of the *agnE* gene, 2,5-dihydroxy pyridine

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070087, 30570046), by the Natural Science Foundation of Hubei Province, China (2011CDA079, 2008CDB076) and by the Central Science Research Study Basic Expenses (CZW16005, YCZW15104)

*Corresponding author. Tel: +86-27-67843541; Fax: +86-27-67842689; E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

Received: 22 October 2017; Revised: 26 December 2017; Published online: 24 January 2018