

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(10):1323-1331; 4 October 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

脱色希瓦氏菌 S12 非特异性偶氮还原酶基因表达及特性

陈杏娟^{1a,1b,2,3}, 许玫英^{1b,2*}, 李光飞^{1b,2}, 孙国萍^{1b,2}

(^{1a}中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

(^{1b}广东省微生物研究所, 广州 510070)

(²广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070)

(³中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 【目的】对脱色希瓦氏菌 S12 (*Shewanella decolorationis* S12) 的 *acpD* 基因(登录号 EF198254)及其表达活性进行研究。【方法】采用 DNAMAN 软件对该基因进行序列分析。利用 PCR 技术克隆含原有启动子的目的基因, 与 pGM-T 载体连接后转化仅有微弱偶氮还原活性的大肠杆菌 TOP10 (*Escherichia coli* TOP10) 中进行表达。通过分光光度法测定偶氮染料的还原活性。【结果】序列分析表明, 该基因编码 198 个氨基酸残基组成的多肽, 与希瓦氏菌 ANA-3 (*Shewanella* sp. ANA-3) 的 NAD(P)H-醌氧化还原酶基因(登录号 CP000469)、奥奈达希瓦氏菌 MR-1 (*Shewanella oneidensis* MR-1) 的 *acpD* 基因(登录号 AE014299) 编码多肽的氨基酸序列同源性分别高达 97% 和 96%, 与 *E. coli* JM109 中 FMN 依赖的 NADH-偶氮还原酶(登录号 NP_415930) 氨基酸序列同源性为 61%。它们在蛋白质二级结构排列上非常相似, 尤其在活性中心 FMN 的结合位点(L7、L11 环和 L3 环)上十分保守。同时, *acpD* 基因在 *E. coli* TOP10 中的表达赋予了重组菌高效的偶氮还原活性。重组菌完整细胞能快速还原低极性无磷酸基团的甲基红, 却不能对强极性多磷酸基团的苋菜红脱色; 而当使用细胞粗酶液排除细胞膜屏障以后, 强极性多磷酸基团的苋菜红亦能被高效还原。实验中还发现, 该酶需要以 NADH 为电子供体, FMN 的添加可显著提高其偶氮还原活性, 而氧气的存在则明显抑制其活性。【结论】在 *E. coli* TOP10 中表达的偶氮还原酶定位在重组菌胞内, 在体内或体外条件下都具有很强的还原不同极性偶氮染料的活性。脱色希瓦氏菌 S12 的 *acpD* 基因表达产物是一种非特异性的 FMN 依赖型的 NADH-偶氮还原酶。该酶以 NADH 为电子供体, 通过 FMN 结合位点的活性中心把电子传递给偶氮染料, 最终实现染料的还原脱色。

关键词: 非特异性偶氮还原酶; FMN 依赖的 NADH-偶氮还原酶; 脱色希瓦氏菌 S12; 偶氮还原

中图分类号: Q814 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)10-1323-09

近年来, 随着偶氮染料的广泛使用, 其合成及降解过程带来“三致”作用, 引起的环境污染问题日渐严重, 有关偶氮染料降解的研究也越来越引起人们的重视。自 20 世纪 70 年代末发现某些肠道细菌可以还原降解偶氮染料以来^[1], 到目前为止已发现多

种细菌具有此功能, 其中以假单胞菌、芽孢杆菌和肠道杆菌数量最多。细菌对偶氮染料的还原降解主要是通过还原酶催化偶氮键的打开, 这是偶氮染料降解的第一步也是最关键的一步, 这一类具有催化偶氮键打开使偶氮化合物还原生成芳香胺化合物功能

基金项目: 国家自然科学基金(3050009, 30670020); 国家“863 计划”(2006AA06Z322); 广东省自然科学基金项目(06020226)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-87684471; E-mail: xumy@gdim.cn

作者简介: 陈杏娟(1981-), 女, 广州市人, 博士研究生, 主要从事微生物生理学研究。E-mail: xingjuan_chen@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-01; 修回日期: 2009-05-14

的酶称为偶氮还原酶(azoreductase, AzoR)。

目前已分离纯化鉴定的偶氮还原酶大多是在厌氧情况下起作用的^[2-10],它们在辅酶、电子供体、底物专一性和氨基酸序列上都有很大差别。总的来说,对于细菌的厌氧偶氮还原,现在普遍认为是由非特异性的酶催化完成的。细胞质的偶氮还原酶通过水溶性的黄素将电子传递给偶氮染料,这是一类依赖黄素的还原酶^[11]。近年来在不同菌株中重组表达黄素类还原酶还原偶氮染料的研究已多见报道,充分证明了黄素类还原酶具有偶氮还原酶活性。但是,定位在胞质的黄素类还原酶在完整细胞条件下对强极性偶氮染料的厌氧还原作用很弱。这主要是由于强极性偶氮染料几乎不能透过细胞膜进入细胞内部。因此,许多文献报道的黄素类还原酶的偶氮还原活性大多是通过采用细胞抽提液添加 NADH 进行实验来判断。对于胞外偶氮还原酶,不要求偶氮染料或还原型黄素通过细胞膜,偶氮染料是在膜外被一些由细胞合成并分泌到胞外或者细胞膜表面的氧化还原中间体所催化,这些氧化还原介质使电子从细胞膜传递到位于膜外的偶氮染料成为可能,氧化还原这些介质的酶是与细胞膜呼吸链相关的一套酶系统^[12-13]。

在对脱色希瓦氏菌 S12(*Shewanella decolorationis* S12)进行厌氧偶氮还原研究时发现,其厌氧偶氮还原可以耦联能量生成以支持细菌生长,这是一种新的细菌呼吸方式^[14]。与偶氮呼吸相关的酶系定位在细胞膜上,包括脱氢酶/氢酶或 NADH-甲基萘醌氧化还原酶和细胞色素类还原酶。除了细胞膜呼吸链上特异性的末端偶氮还原酶以外,脱色希瓦氏菌 S12 还可以利用细胞质的非特异性还原酶进行厌氧偶氮还原,但对这种非特异性还原酶的催化机理及特性尚不清楚。本研究前期对脱色希瓦氏菌 S12 进行基因文库构建,通过染料脱色功能筛选获得了能对偶氮染料进行脱色的 DNA 大片段,对该 DNA 大片段进行序列测定,获得了 1 个完整基因读码框,与多种细菌的酰基载体蛋白磷酸二酯酶(ACP phosphodiesterase, ACP 磷酸二酯酶)基因同源性较高,故当时根据序列同源性将其命名为 *acpD* 基因。本文着重对脱色希瓦氏菌 S12 的 *acpD* 基因进行序列分析和体外表达,发现这是一种非特异性的 FMN 依赖的 NADH-偶氮还原酶,与大肠杆菌 JM109(*Escherichia coli* JM109)的 NADH-偶氮还原酶(AzoR)氨基酸序列同源性为 61%,二级结构非常相似^[15]。这是希瓦氏菌厌氧偶氮还原研究中首次发现和报道

的非特异性 FMN 依赖的 NADH-偶氮还原酶。该酶的发现及其特性的阐明不仅丰富和补充了希瓦氏菌厌氧偶氮还原机理的研究,也是细菌偶氮还原酶学基础研究的重要组成部分。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 脱色希瓦氏菌 S12 是本实验室分离纯化得到的 1 株具有强的染料脱色能力的希瓦氏菌^[16],该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心(保藏号为 CCTCC M203093^T)和日本东京大学应用微生物研究所(保藏号为 IAM 15094^T)。pGM-T 载体和大肠杆菌(*Escherichia coli*)TOP10 均购自天根生化(北京)有限公司。其余大肠杆菌为本实验室保存。

1.1.2 培养基 好氧生长 LB 培养基成分为胰蛋白胍 10 g/L;酵母抽提物 5 g/L;NaCl 5 g/L。厌氧还原确定培养基成分为 Na₂HPO₄·12H₂O 5.7 mmol/L;KH₂PO₄ 3.3 mmol/L;NH₄Cl 18.0 mmol/L;琥珀酸钠 10 mmol/L;半胱氨酸 0.02 g/L;矿质元素和维生素各 10 mL/L^[17];10 mmol/L 甲酸钠或 1 mmol/L NADH 为电子供体,0.1 mmol/L 苋菜红或甲基红为电子受体。

1.1.3 主要试剂 偶氮染料苋菜红(Amaranth):C.I. 16185,最大吸收峰为 520 nm;甲基红(Methyl Red):C.I.13020,特征吸收峰为 430 nm(图 1)。鱼藤酮(Rotenone),分析纯,购自 Sigma 公司。高保真 PCR 反应试剂和 Bradford 蛋白质定量试剂盒均购自天根生化(北京)有限公司。

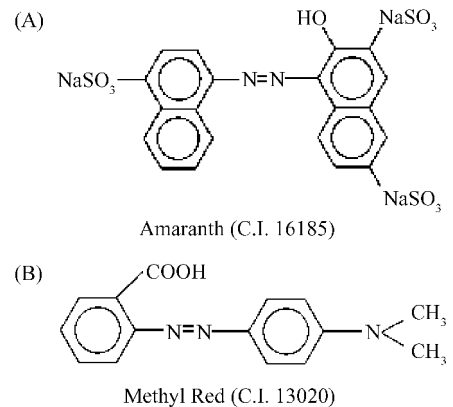


图 1 苋菜红(A)和甲基红(B)的化学结构

Fig. 1 Molecule structure of amaranth (A) and methyl red (B).

1.1.4 主要仪器 DU640 紫外分光光度计(BECKMAN 公司),Bugbox 厌氧工作站(RUSKINN 公司),One Shot 高压细胞破碎仪(CONSTANT 公司)。

1.2 非特异性偶氮还原酶的序列分析与表达

脱色希瓦氏菌 S12 的非特异性偶氮还原酶基因 (*acpD*) 在 GenBank 的登录号为 EF198254, 其上游强启动子序列的登录号为 EF647586。

序列分析采用 DNAMAN 软件进行。根据测序结果设计引物, 上游引物 P1 序列为: 5'-TCCGCTTT-TTTTCTTTTTTATGGGC-3'; 下游引物 P2 序列为: 5'-TACTATTAACAGCTAACTTATCGA-3'。以脱色希瓦氏菌 S12 基因组 DNA 为模板, 用 PCR 技术获取含原有启动子的目的基因。高保真 PCR 反应条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 40 s, 50℃ 40 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 72℃ 10 min。目的基因片段加 A 后与 pGM-T 载体连接, 转化 *E. coli* TOP10, 采用限制性内切酶酶切及测序两种方法双重鉴定重组质粒。

1.3 完整细胞偶氮还原活性测定

离心收集 LB 过夜培养的细菌, 用 0.07 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.4) 洗涤 2 次后重悬于其中制成相同 OD_{600} 值的菌悬液 ($OD_{600} \approx 0.4$), 然后以 1% (V/V) 的接种量分别接种相同 OD_{600} 值的菌悬液于含有染料的确定培养基中, 添加 FMN 使其终浓度为 0.05 mmol/L, 充入氮气 5 min 后置于厌氧工作站中 37℃ 静置培养。

每间隔一定时间取出一定量的培养液于 12000 × g 离心 1 min 去除菌体, 然后测定苋菜红在 520 nm 或甲基红在 430 nm 处的吸光值, 并以不加菌的染料培养基为对照, 计算染料的还原率。

$$\text{染料还原率} = (A - B) / A$$

A: 不加菌的培养基上清液的吸光值; B: 培养一定时间的培养基上清液的吸光值。

$$\text{偶氮还原比活性} = \text{染料还原的量} / \text{h} / OD_{600}$$

1.4 细胞粗酶液及膜蛋白的制备、蛋白浓度定量

离心收集 LB 过夜培养的细菌, 用 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.5) 洗涤 2 次后重悬于其中。用高压细胞破碎仪于 80 MPa 破碎细胞, 然后于 100000 × g、4℃ 离心 30 min 去除细胞碎片, 上清液即为细胞粗酶液。为了得到较纯的膜蛋白, 细胞破碎液先于 6000 × g、4℃ 离心 30 min 去除未破碎细胞后, 再经

100000 × g、4℃ 离心 2 h, 沉淀部分即为膜蛋白。蛋白浓度定量按照天根生化(北京)有限公司的 Bradford 蛋白质定量试剂盒进行。

1.5 细胞粗酶液偶氮还原活性测定

在以 1 mmol/L NADH 为电子供体的染料确定培养基中加入适量粗酶液使蛋白终浓度分别都为 100 μg/mL, 添加 FMN 使其终浓度为 0.05 mmol/L, 充入氮气 5 min 后置于厌氧工作站中 37℃ 反应。每间隔一定时间取出一定量的反应液于 12000 × g 离心 1 min, 然后取上清测定苋菜红在 520 nm 或甲基红在 430 nm 处的吸光值, 并以不加细胞粗酶液的染料培养基为对照, 计算染料的还原率。偶氮还原比活性 = 染料还原的量/h/mg 蛋白。

1.6 电子传递抑制剂鱼藤酮对脱色希瓦氏菌 S12 厌氧偶氮还原的作用效果

按不同浓度添加 NAD(P)H-醌氧化还原酶的专一性抑制剂鱼藤酮于含有染料的确定培养基中, 并以加入电子传递抑制剂的助溶剂而不含电子传递抑制剂的培养基为对照, 按上述 1.3 和 1.5 的方法测定偶氮还原率, 以扣除了对照组的还原率为最终还原率计算偶氮还原活性, 以此来反映鱼藤酮的作用效果。

2 结果

2.1 不同大肠杆菌菌株的厌氧偶氮还原活性

在 LB 和确定培养基中加入 0.1 mmol/L 苋菜红作为电子受体进行厌氧培养, 按照 1% (V/V) 的接种量分别加入相同 OD_{600} 值菌悬液的脱色希瓦氏菌 S12 和不同类型的大肠杆菌菌株, 观察其对苋菜红的还原速率。结果发现, 在 LB 培养基中, 实验所用大肠杆菌菌株都具有明显的偶氮还原活性, 相同细胞浓度的大肠杆菌 C1757 (*Escherichia coli* C1757) 的偶氮还原活性是脱色希瓦氏菌 S12 的 1.66 倍, *E. coli* TOP10 则与脱色希瓦氏菌 S12 相差无几。而在确定培养基中, *E. coli* TOP10 只能检测到微弱的偶氮还原活性, 其余大肠杆菌菌株的偶氮还原活性则大约是脱色希瓦氏菌 S12 的一半(表 1)。由此可

表 1 不同大肠杆菌在 LB 和确定培养基中的偶氮还原活性

Table 1 Azoreduction of different strain of *E. coli* in LB and defined medium

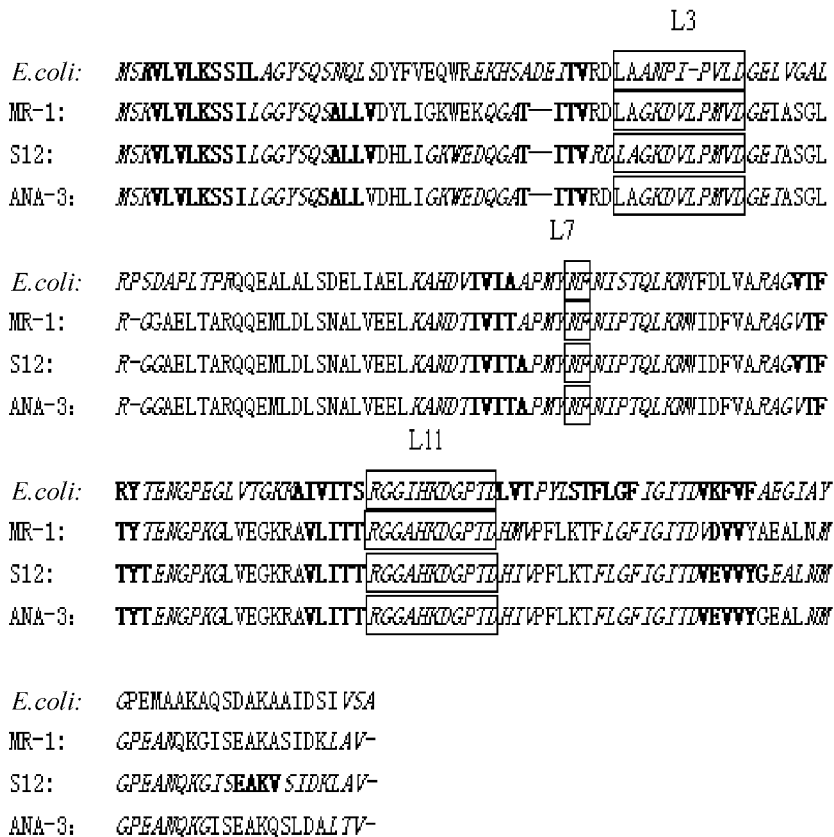
Medium	<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> C1757	<i>E. coli</i> C834	<i>E. coli</i> DH5α	<i>E. coli</i> G1698	<i>E. coli</i> G1724	<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> W620	<i>E. coli</i> S. decolorationis S12
Azoreduction	BL21	C1757	C834	DH5α	G1698	G1724	S17-1	TOP10	W620	S12
LB medium (μmol/h/OD)	64.6	125.3	44.7	63.8	52.9	52.4	64.3	65.2	52.1	75.6
Defined medium (μmol/h/OD)	15.6	15.3	14.2	15.5	15.1	15.5	15.7	3.2	15.4	25.2

见,在营养丰富的 LB 培养基中大肠杆菌都具有明显的偶氮还原活性,这与菌体细胞量大而且细菌体内存在丰富的氧化还原中间物质有关。相对而言,在营养贫乏的确定培养基中,大部分大肠杆菌的偶氮还原活性仍然较强,而 *E. coli* TOP10 的偶氮还原活性则非常微弱,可以用作脱色希瓦氏菌 S12 非特异性偶氮还原酶基因的表达宿主。

2.2 非特异性偶氮还原酶基因序列分析及其在 *E. coli* TOP10 中的表达

以 P1、P2 为上下游引物,通过 PCR 方法从脱色希瓦氏菌 S12 基因组 DNA 中获得含有强启动子(登录号 EF647586)和 *acpD* 基因(登录号 EF198254)的 DNA 片段。将目的基因片段与 pGM-T 载体连接,转化 *E. coli* TOP10,得到重组载体,命名为 pGMT-N。酶切鉴定证实片段已插入载体,测序结果表明,该重组载体上插入的目的基因序列与 GenBank 基因库中发表的序列完全一致。脱色希瓦氏菌 S12 的偶氮还原酶基因 *acpD* 编码 198 个氨基酸残基组成的多肽,

与希瓦氏菌 ANA-3(*Shewanella* sp. ANA-3)的 NAD(P)H-醌氧化还原酶基因(登录号 CP000469)奥奈达希瓦氏菌 MR-1(*Shewanella oneidensis* MR-1)的 *acpD* 基因(登录号 AE014299)编码的氨基酸序列同源性分别高达 97% 和 96%,与 *E. coli* JM109 的 *acpD* 基因编码的 AzoR(登录号 NP_415930)同源性为 61%。研究表明 *E. coli* JM109 的 *acpD* 基因编码的是一种依赖黄素的 NADH-偶氮还原酶(AzoR),而没有 ACP 磷酸二酯酶活性^[15],其活性中心位于蛋白二级结构中的 L7、L11 环和 L3 环,这是 FMN 的结合位点,其中 L3 环 FMN 结合位点也是该酶结合偶氮染料的活性位点^[18-19]。通过 DNAMAN 软件分析发现,脱色希瓦氏菌 S12 *acpD* 基因编码的偶氮还原酶与 *E. coli* JM109 的 AzoR 的蛋白二级结构很相似,其折叠片、 α -螺旋和环结构排列非常相似,活性中心 FMN 结合位点的结构域(L7、L11 环和 L3 环)十分保守(图 2),说明脱色希瓦氏菌 S12 的偶氮还原酶也同样具有两个 FMN 结合位点。



2 希瓦氏菌基因(登录号分别为 EF198254、ABK46559、AAN57363)编码产物与大肠杆菌 JM109 AzoR 的蛋白序列对比及二级结构分析

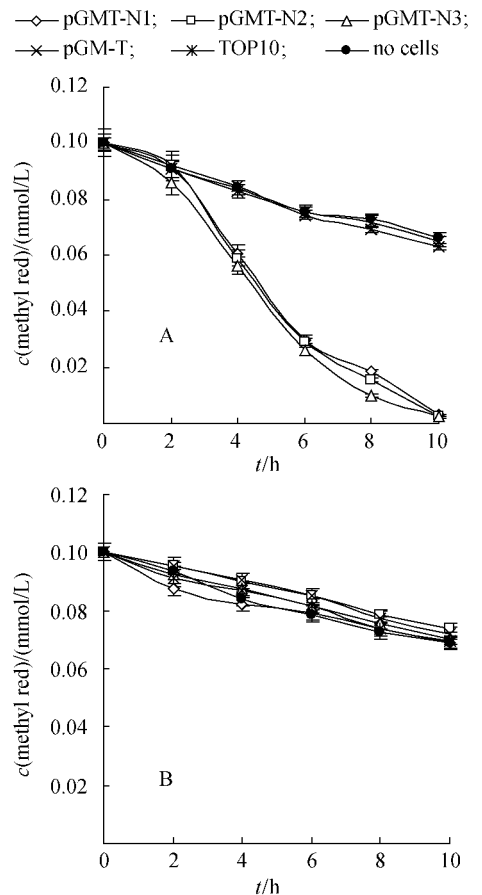
Fig.2 Amino acid sequence homology and the secondary structure of the protein by *Shewanella* sp. genes of which accession numbers are EF198254, ABK46559 and AAN57363 and AzoR of *E. coli* JM109. Elements of secondary structure are color coded: strands, overstriking; loops, incline; α -helices, generic.

2.3 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 完整细胞的厌氧偶氮还原活性

随机挑取 3 株转化了重组载体的 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 菌株、空载体 *E. coli* TOP10 (pGM-T) 菌株及 *E. coli* TOP10 菌株, 在 LB 培养基中过夜培养, 用 0.07 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.4) 洗涤两次后制成相同 OD_{600} 值的菌悬液, 以相同菌悬液量接种到含有 1 mmol/L NADH 和 0.1 mmol/L 苋菜红或甲基红的确定培养基中进行厌氧培养, 研究其对苋菜红和甲基红的还原活性。结果发现, 3 株转化重组载体的 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 菌株的完整细胞都能快速地还原低极性的甲基红, 在 10 h 内对 0.1 mmol/L 甲基红基本还原完全。没有添加菌体的阴性对照也观察到微弱的脱色现象, 这只是 NADH 与甲基红发生的部分化学反应。添加空载体 *E. coli* TOP10 (pGM-T) 和 *E. coli* TOP10 菌株的对照组所表现的脱色现象与阴性对照相似。但含有 3 个磺基团极性强的苋菜红在相同条件下经过 10 h 培养后, 基本上没有检测到由细胞活性引起的染料脱色现象 (图 3)。说明强极性的苋菜红由于难于透过细胞膜而不能与菌体内表达的脱色酶接触, 相反, 低极性的甲基红能透过细胞膜在菌体内被快速还原。由此可见, 重组载体 pGMT-N 在 *E. coli* TOP10 体内表达较强的偶氮还原活性, 这种活性的体现与决定偶氮染料能否透过细胞膜的极性程度有关。

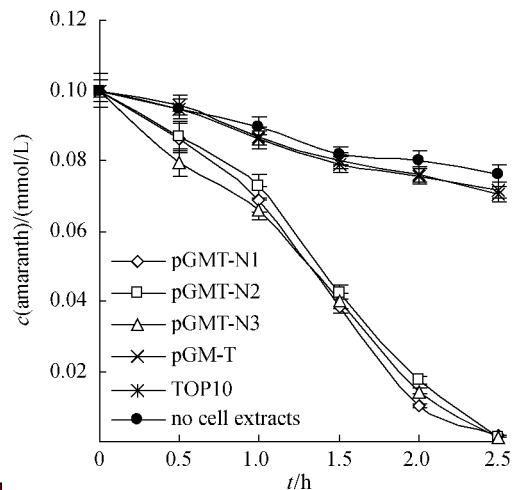
2.4 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 细胞粗酶液的厌氧偶氮还原活性

鉴于极性强的偶氮染料较难透过细菌细胞膜进入细胞内, 为了进一步明确 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 对极性强的偶氮染料苋菜红的还原活性, 采用在 LB 中过夜培养的 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 细胞制备粗酶液, 并以同样经过过夜培养的 *E. coli* TOP10 (pGM-T) 和 *E. coli* TOP10 细胞制备的相同蛋白浓度的细胞粗酶液为对照, 分别测定它们对苋菜红的还原活性。结果发现, 与完整细胞不能还原苋菜红的现象完全不同, *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 的细胞粗酶液具有高效的苋菜红还原能力, 在 2.5 h 内 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的蛋白就能对 0.1 mmol/L 苋菜红还原完全, 而携带空载体及亲株 *E. coli* TOP10 细胞粗酶液则没有观察到偶氮还原活性, 反应中呈现的苋菜红脱色也仅仅局限在与 NADH 的部分化学反应 (图 4)。这说明 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 的偶氮还原活性是来自脱色希瓦氏菌 S12 的偶氮还原酶基因表达的结果。



3 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 对甲基红 (A) 和苋菜红 (B) 的厌氧偶氮还原活性

Fig. 3 Anaerobic azoreduction of methyl red (A) and amaranth (B) by whole cells of *E. coli* TOP10 (pGMT-N).

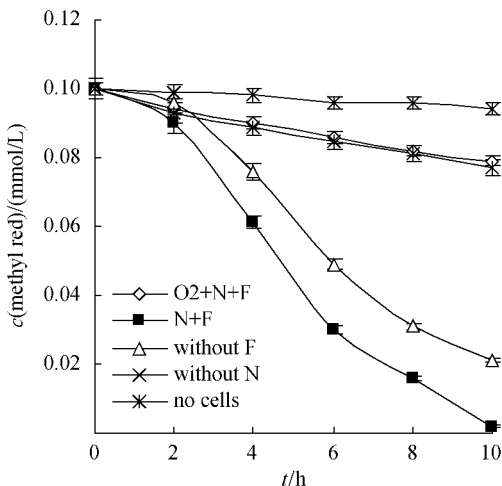


4 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 细胞粗酶液对苋菜红的厌氧偶氮还原活性

Fig. 4 Anaerobic azoreduction of amaranth by cell extracts of *E. coli* TOP10 (pGMT-N).

2.5 NADH、FMN 和 O₂ 对 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 厌氧偶氮还原的影响

在分别添加辅酶 FMN、NADH, 以及氧气存在的条件下, 研究影响 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 完整细胞偶氮还原活性的因素, 结果如图 5 所示。在没有添加 NADH 为电子供体时偶氮还原不能进行, 经过 10 h 培养后基本没有检测到完整细胞的偶氮还原活性, 而添加 1 mmol/L 的 NADH 为电子供体的实验组偶氮还原能快速进行, 说明该偶氮还原酶需要以 NADH 为电子供体。另一方面, 在确定培养基中没有添加 FMN 的条件下, *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 的厌氧偶氮还原也能进行, 只是相对于添加 0.05 mol/L FMN 时的还原速率慢, 这说明了 *E. coli* TOP10 体内能合成相当的 FMN, 而体外添加的 FMN 可进一步加强还原活性。对于氧气存在的条件下, 除了检测到较弱的由于 NADH 化学反应引起的染料脱色外, 无法检测到由细胞活性引起的染料脱色现象, 酶催化的偶氮还原活性受到明显抑制, 这说明该偶氮还原酶只能在厌氧情况下催化偶氮键的还原。利用 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 细胞粗酶液的实验结果与上述结果相似。



2.5 NADH、FMN 和 O₂ 对 *E. coli* TOP10 (pGMT-N) 厌氧偶氮还原的影响

Fig.5 Effect of NADH, FMN and O₂ on anaerobic azoreduction by intact cells of *E. coli* TOP10 (pGMT-N). O₂ + N + F: NADH and FMN were added in the defined medium without removal of O₂; N + F: NADH and FMN were added in the defined medium with purging nitrogen gas to remove the O₂; without F: There was no FMN added in the defined medium; without N: There was no NADH added in the defined medium; no cells: There was no cells in the defined medium.

2.6 NADH 作为脱色希瓦氏菌 S12 厌氧偶氮还原电子供体及鱼藤酮抑制的研究

脱色希瓦氏菌 S12 的 *acpD* 基因在 *E. coli* TOP10 中表达厌氧偶氮还原活性时需要以 NDAH 为电子供体, 该基因编码产物的氨基酸序列与 *Shewanella* sp. ANA-3 细胞质膜上的 NAD(P)H-醌氧化还原酶的同源性高达 97%, 它很可能就是一种 NAD(P)H-醌氧化还原酶。因此, 为了更深入探讨 *acpD* 基因在脱色希瓦氏菌 S12 厌氧偶氮还原中的作用, 本文还研究了 NADH 作为脱色希瓦氏菌 S12 膜蛋白的厌氧偶氮还原电子供体的情况, 以及 NAD(P)H-醌氧化还原酶的专一性抑制剂鱼藤酮对其厌氧偶氮还原活性的影响。结果发现, 在脱色希瓦氏菌 S12 的膜蛋白制备物中, 除甲酸钠之外, NADH 也可以作为有效的电子供体支持偶氮还原的进行。在相同时间、相同蛋白浓度条件下, 使用 NADH 为电子供体时的厌氧偶氮还原活性是以甲酸钠为电子供体时的 4 倍(表 2), 说明 NADH 作为电子供体对偶氮还原更为有效。另外, 电子传递抑制剂鱼藤酮对以 NADH 为电子供体情况下的偶氮还原表现明显的抑制作用, 随着鱼藤酮浓度的增加其抑制作用相应地加强(表 2), 说明在以 NADH 为电子供体进行偶氮还原时细胞质膜上的 NAD(P)H-醌氧化还原酶起着重要作用。相反, 在以甲酸钠为电子供体的情况下, S12 菌的膜蛋白利用的脱氢酶是甲酸脱氢酶, 此时酶不受鱼藤酮的抑制, 厌氧偶氮还原活性不受影响。

表 2 不同浓度鱼藤酮对使用不同电子供体时脱色希瓦氏菌 S12 膜蛋白偶氮还原的影响

Table 2 Effect of rotenone on azoreduction by membrane fractions of *S. decolorationis* S12 using different electron donors

c(rotenone) (μmol/L)	Azoreduction activity (μmol/h/mg protein)	
	formate as electron donor	NADH as electron donor
0	100.5	409.8
10	99.7	388.6
50	100.2	301.3
100	99.9	198.3

3 讨论

有关细菌对偶氮染料还原降解中酶的催化机理研究以 *E. coli* JM109 的偶氮还原酶(AzoR)最为清晰, 2001 年 Nakanishi 等人在对该酶研究时发现其氨基酸序列可归附于 ACP 磷酸二酯酶家族的一种^[15]。ACP 磷酸二酯酶是一种水解酶, 催化 holo-ACP 和 H₂O 生成 apo-ACP 和 4-磷酸泛酰巯基乙胺, 参与生

物体内泛酸和辅酶 A 的合成,在脂肪酸代谢中发挥重要作用。1967 年 Vagelos 和 Larrabee^[20]首次发现大肠杆菌具有去 4-磷酸泛酰巯基乙胺作用的酶,并命名为 ACP 水解酶(现为 ACP 磷酸二酯酶),Fischl 等^[21]和 Thomas 等^[22]先后分别分离纯化了大肠杆菌的 ACP 磷酸二酯酶并对其酶学特征和编码基因进行研究。有意思的是,Nakanishi 等人发现 *E. coli* JM109 的偶氮还原酶(AzoR)在 N 末端具有 ACP 磷酸二酯酶的典型特征 NH₂-Ser-Lys-Val-Leu-Val-Leu-Lys-,但却只有依赖黄素的 NADH-偶氮还原酶活性而没有磷酸二酯酶活性,在体内及体外实验均不能把 holo-ACP 转化为 apo-ACP^[15]。Nakanishi 实验室的 Ito 等人先后于 2005^[23]和 2006^[18]年得到该 AzoR 酶的晶体和三维结构,准确发现该酶二级结构上 L7、L11 环和 L3 环就是 FMN 的结合位点,是酶的活性中心,与哺乳动物 FAD 依赖的 NAD(P)H-醌氧化还原酶和酵母 YLR011wp 的 FMN 依赖的 NAD(P)H-Fe(III)氧化还原酶二级结构非常相似,尽管彼此在氨基酸序列上相似性较低。Ito 等人更于 2008 年得到该酶还原型以及其结合醌类似物时的三维结构,准确发现了该酶立体结构中醌的两个结合位点,一个位于 L3 环 FMN 结合位点的异咯嗪和 Phe-162 的苯基团,这也是该酶结合偶氮染料甲基红的活性位点,另一个位于 Tyr-120 和 Tyr-178 的酚基团^[19]。至此关于大肠杆菌 AzoR 的催化机理已十分清楚,这是一种 FMN 依赖的 NADH-偶氮还原酶,仅在氨基酸序列上归为 ACP 磷酸二酯酶家族却没有 ACP 磷酸二酯酶活性。

本实验从脱色希瓦氏菌 S12 中获得的 *acpD* 基因同样具有偶氮还原酶活性,其编码产物氨基酸序列与 *Shewanella* sp. ANA-3 的 NAD(P)H-醌氧化还原酶同源性高达 97%,与 *Shewanella oneidensis* MR-1 的 ACP 磷酸二酯酶同源性达到 96%。与上述来自 *E. coli* JM109 的 AzoR 同源性虽然为 61%,但是两者蛋白质的二级结构却非常相似,其折叠片、 α -螺旋和环结构排列十分相似,尤其在 FMN 的结合位点(L7、L11 环和 L3 环)上非常保守。对于 *E. coli* JM109 的 AzoR 来说,L3 环上的 FMN 结合位点就是结合偶氮染料甲基红的活性位点^[18-19],从这一点来看,推测脱色希瓦氏菌 S12 *acpD* 基因编码的偶氮还原酶蛋白二级结构 L3 环上的 FMN 结合位点也很可能是结合偶氮染料的活性位点。

鉴于 *acp* 基因在大肠杆菌中的组成型表达,大部分大肠杆菌细胞质中都可能含有具偶氮还原活性

的 AzoR 类似酶。但是正如上文所述,*acp* 基因产物在某些大肠杆菌中仅表现 ACP 磷酸二酯酶作用,这可能与该酶在氨基酸序列上的进化改变造成二级结构的变化有关。我们对不同菌株类型的大肠杆菌进行偶氮还原功能筛选,寻找合适的可用于表达脱色希瓦氏菌 S12 偶氮还原酶基因的宿主。实验中发现,在营养丰富的 LB 培养基中实验所用大肠杆菌各菌株都具有很强的偶氮还原活性,这可能与在营养丰富条件下细胞量大而且细菌体内存在丰富的氧化还原中间物质有关;在营养贫乏的确定培养基中,大部分大肠杆菌的偶氮还原活性仍然较强,只有 *E. coli* TOP10 菌株对染料脱色微弱,仅为 LB 培养时的 1/20,因而可用作脱色希瓦氏菌 S12 偶氮还原酶基因的表达宿主。

对脱色希瓦氏菌 S12 具有偶氮染料还原活性的基因及其启动子连接到 T 载体并转化 *E. coli* TOP10 随机挑取的 3 株阳性克隆都具有明显强于亲株的偶氮还原活性,说明 *E. coli* TOP10 能很好地识别脱色希瓦氏菌 S12 的启动子,并能不需要 IPTG 诱导的情况下实现有活性的组成型表达。对于转化的阳性克隆进行偶氮还原活性研究时发现,在 *E. coli* TOP10(pGMT-N)体内表达的偶氮还原酶定位在细胞质中,对不同极性的偶氮染料作用不完全相同,完整细胞对于能透过细胞膜的甲基红具有很强的偶氮还原活性,但是却不能还原截留在细胞膜外的苋菜红。而当使用 *E. coli* TOP10(pGMT-N)的细胞粗酶液(100 μ g/mL)时,0.1 mmol/L 苋菜红在 2.5 h 内即能被快速还原。由于甲基红分子中不含有磺酸基团,而苋菜红分子中则含有 3 个磺酸基团(图 1),这些磺酸基团赋予了偶氮染料不同的极性。无磺酸基团的甲基红仅具有低极性容易透过细胞膜进入细胞内,从而被细胞质中的偶氮还原酶还原脱色。而含有 3 个磺酸基团的苋菜红由于极性增强而难以透过细胞膜,不能接触到细胞质中的偶氮还原酶。而当排除细胞膜屏障以后,强极性的苋菜红与细胞粗酶液中的酶分子直接接触就表现出同样高效的还原脱色现象。这说明了在 *E. coli* TOP10 中表达的 S12 菌偶氮还原酶在完整细胞状态或破碎细胞状态都具有很强的偶氮还原活性。

实验中还发现,S12 菌的偶氮还原酶需要以 NADH 为电子供体,这与已报道文献一致。另一方面,没有添加 FMN 时偶氮还原也能顺利进行,但是添加 FMN 以后偶氮还原活性明显加强,说明 *E. coli* TOP10 体内能合成相当的 FMN,而体外添加的

FMN 可进一步加强还原活性。再者,氧气的存在明显抑制该酶的偶氮还原活性,这也从另一方面验证了 FMN 作为该酶辅酶的结果,因为还原型的黄素在有氧情况下迅速与氧气发生反应而失去把电子传递到偶氮染料的能力^[11]。这说明了脱色希瓦氏菌 S12 的 *acpD* 基因编码产物偶氮还原酶是一种依赖黄素的 NADH-偶氮还原酶。另外,在脱色希瓦氏菌 S12 的膜蛋白中,NADH 是有效的电子供体支持偶氮还原的进行,NAD(P)H-醌氧化还原酶的专一性抑制剂鱼藤酮对以 NADH 为电子供体条件下的偶氮还原表现明显的抑制作用,说明对于脱色希瓦氏菌 S12 来说,细胞膜上的 NAD(P)H-醌氧化还原酶参与了细菌的厌氧偶氮还原。另外,序列分析表明该偶氮还原酶氨基酸序列与 *Shewanella* sp. ANA-3 细胞膜上的 NAD(P)H-醌氧化还原酶同源性高达 97%,推测该偶氮还原酶很可能就是一种 NAD(P)H-醌氧化还原酶,定位在细胞质膜内侧。

相对于细胞膜表面特异性的偶氮呼吸末端还原酶来说,*acpD* 基因产物在脱色希瓦氏菌 S12 的厌氧偶氮还原中同样发挥了非常重要的作用。这是一种非特异性的 FMN 依赖的 NADH-偶氮还原酶,以 NADH 为电子供体,通过 FMN 结合位点的活性中心把电子传递给偶氮染料最终实现染料的还原脱色。本文首次在大肠杆菌中重组表达脱色希瓦氏菌 S12 的偶氮还原酶,实现了该酶对不同极性偶氮染料的高效还原能力,这将为更深入开展细菌偶氮还原酶学研究打下理论基础,并为利用基因工程技术开展染料脱色降解及环境污染修复研究提供重要理论指导。

参考文献

- [1] Horitsu H, Takada M, Idaka E, et al. Degradation of *p*-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1977, 4(3): 217 - 224.
- [2] Zimmermann T, Kulla HG, Leisinger T. Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of Biochemistry*, 1982, 129(1): 197 - 203.
- [3] Zimmermann T, Gasser F, Kulla HG, et al. Comparison of two bacterial azoreductases acquired during adaptation to growth on azo dyes. *Archives of Microbiology*, 1984, 138(1): 37 - 43.
- [4] Ghosh DK, Mandal A, Chaudhuri J. Purification and partial characterization of two azoreductases from *Shigella dysenteriae* type 1. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 77(1-3): 229 - 233.
- [5] Ghosh DK, Ghosh S, Sadhukhan P, et al. Purification of two azoreductases from *Escherichia coli* K12. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1993, 31(12): 951 - 954.
- [6] Rafii F, and Cerniglia CE. Comparison of the azoreductase and nitroreductase from *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(6): 1731 - 1734.
- [7] Suzuki Y, Yoda T, Ruhul A, et al. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(12): 9059 - 9065.
- [8] Moutaouakkil A, Zeroual Y, Zohra-Dzayri F, et al. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 413(1): 139 - 146.
- [9] Maier J, Kandelbauer A, Erlacher A, et al. A new Alkali-Thermostable azoreductase from *Bacillus* sp. strain SF. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 837 - 844.
- [10] Ramalho PA, Paiva S, Cavaco-Paulo A, et al. Azo reductase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells is dependent on the Fre1p component of plasma membrane ferric reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2): 3882 - 3888.
- [11] Russ R, Rau J, Stolz A. The function of cytoplasmatic flavin reductases in the bacterial reduction of azo dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1429 - 1434.
- [12] Kudlich M, Keck A, Klein J, et al. Localization of the enzyme system involved in the anaerobic degradation of azo dyes by *Sphingomonas* sp. BN6 and effect of artificial redoxmediators on the rate of azo reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3691 - 3694.
- [13] Rafii F, Franklin W, and Cerniglia CE. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(7): 2146 - 2151.
- [14] Hong YG, Xu MY, Guo J, et al. Respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12 with azo compound as sole electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1): 64 - 72.
- [15] Nakanishi M, Yatome C, Ishida N, et al. Putative ACP phosphodiesterase gene (*acpD*) encodes an azoreductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(49): 46394 - 46399.
- [16] Xu MY, Guo J, Cen YH, et al. *Shewanella decolorationis* sp. nov., a dye-decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 363 - 368.

- [17] Wolin EA , Wolin MJ , Wolfe RS. Formation of methane by bacterial extracts. *The Journal of Biological Chemistry* , 1963 , 238 (8) : 2882 – 2886 .
- [18] Ito K , Nakanishi M , Lee WC. et al. Three-dimensional structure of azoR from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* , 2006 , 281 (29) : 20567 – 20576 .
- [19] Ito K , Nakanishi M , Lee WC. et al. Expansion of substrate specificity and catalytic mechanism of azoreductase by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* , 2008 , 283 (20) : 13889 – 13896 .
- [20] Vagelos PR , Larrabee AR. Acyl carrier protein. IX. Acyl carrier protein hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry* , 1967 , 242 (8) : 1776 – 1781 .
- [21] Fischl AS , Kennedy EP. Isolation and properties of acyl carrier protein phosphodiesterase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* , 1990 , 172 (9) : 5445 – 5449 .
- [22] Thomas J , Cronan , JE. The enigmatic acyl carrier protein phosphodiesterase of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* , 2005 , 280 (41) : 34675 – 34683 .
- [23] Ito K , Nakanishi M , Lee WC. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of azoR (azoreductase) from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica . Section F , Structural Biology and Crystallization Communications* , 2005 , 6(4) : 399 – 402 .

Expression and characterization of the nonspecific azoreductase of *Shewanella decolorationis* S12

Xingjuan Chen^{1a, 1b, 2, 3} , Meiyang Xu^{1b, 2*} , Guangfei Li^{1b, 2} , Guoping Sun^{1b, 2}

(^{1a}South China Sea Institute of Oceanology , Chinese Academy of Sciences , Guangzhou 510301 , China)

(^{1b}Guangdong Institute of Microbiology , Guangzhou 510070 , China)

(²Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application , Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology , Guangzhou 510070 , China)

(³Graduate University of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

Abstract [Objective] In order to identify the function of *acpD* in azoreduction , the gene was obtained from *Shewanella decolorationis* S12 and expressed in *Escherichia coli* TOP10 which showed little azoreduction activity. **[Methods]** Gene cloning and expression of *acpD* were performed by pGM-T vector. Sequences were analyzed by DNAMAN software and azoreduction activity was assayed spectrophotometrically. **[Results]** The deduced amino acid sequences from *acpD* of *S. decolorationis* S12 showed 61% identity to FMN-dependent NADH-azoreductase from *E. coli* JM109 with extremely conservative amino acid sequences at FMN binding sites. Moreover , the resulting recombinant *E. coli* TOP10 (pGMT-N) exhibited high azoreduction activity for azo dyes of different polarity by intact cells and their extracts. On the other hand , NADH was used as electron donor to drive azoreduction and FMN could enhance the reduction activity. **[Conclusion]** The product of *acpD* from *S. decolorationis* S12 is a nonspecific FMN-dependent NADH-azoreductase , which transfers electrons from NADH via FMN to azo bond , and exhibits high azoreduction activity under *in vivo* or *in vitro* conditions.

Keywords : nonspecific azoreductase ; FMN-dependent NADH-azoreductase ; *Shewanella decolorationis* S12 ; azoreduction

(本文责编 : 王晋芳)