



一株 MAs(III)脱甲基菌株的分离及功能基因的研究

李小龙, 吴亦飞, 张隽*

南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095

摘要: 【目的】分离并鉴定三价单甲基砷(MAs(III))脱甲基菌株, 对MAs(III)脱甲基菌FJ-6中 $arsI$ 基因进行克隆表达, 并对 $arsI$ 基因表达蛋白进行功能鉴定。【方法】利用富集培养的方法分离MAs(III)脱甲基菌株, 并通过形态学、生理生化特征和16S rDNA基因进化分析进行鉴定; HPLC-ICP-MS鉴定菌株转化MAs(III)的产物为三价砷(As(III)), 对菌株FJ-6的基因组进行生物信息学分析, 寻找潜在的MAs(III)脱甲基酶编码基因, 通过PCR扩增获得 $arsI$ 全长基因, 构建重组质粒pET29a- $arsI$, 转化大肠杆菌BL21(DE3)菌株进行异源表达, 通过 Ni^{2+} -NTA亲和层析柱纯化异源表达的蛋白, 以MAs(III)为反应底物, 检测MAs(III)脱甲基酶ArsI的酶学特性。通过实时定量PCR观察 $arsI$ 的表达类型。【结果】*Bacillus aryabhatai* FJ-6在12 h内能将1 $\mu\text{mol/L}$ MAs(III)完全转化为As(III)。克隆得到MAs(III)脱甲基酶表达基因 $arsI$, 构建了pET29a- $arsI$ 重组质粒并进行了表达, ArsI蛋白分子量为17.4 kDa。ArsI纯化蛋白具有较高的MAs(III)脱甲基酶的活性; 荧光定量PCR实验结果表明 $arsI$ 受砷诱导表达。【结论】明确了ArsI蛋白具有MAs(III)脱甲基酶活性。

关键词: 芽孢杆菌, 脱甲基, 三价单甲基砷, 三价砷, 三价单甲基砷脱甲基酶

微生物在砷的地球化学循环中扮演着重要角色。由于砷的毒性, 所有能存活的微生物都有独特的代谢机制来应对其破坏机制^[1]。一些微生物能将无机砷甲基化来作为其抵抗机制^[2]。除了微生物参与的甲基化过程形成甲基砷外, 大量的有机砷通过人为活动被引入到环境中。由于它们的毒性比无机砷低, 五价单甲基砷如 MSMA 在

世界范围内被广泛用作除草剂^[3], 仅美国每年消费的 MSMA 高达 1360000 kg, 持续不断的 MSMA 的使用造成了土壤的砷污染。有机砷降解在自然界中广泛发生, 将影响有机砷的生物地球循环。研究人员在不同生境, 例如土壤^[4]和海水^[5], 均发现脱甲基现象, 而且已经从土壤中分离出能进行脱甲基过程的微生物^[3-4]。Yoshinaga 等在经过

基金项目: 国家自然科学基金(31970108)

*通信作者。Tel/Fax: +86-25-84399551; E-mail: zhangjun1208@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-12-10; 修回日期: 2021-03-08; 网络出版日期: 2021-03-19

除草剂 MAs(V)处理的高尔夫球场土壤中,发现了一种能将五价单甲基砷(MAs(V))还原为 MAs(III)的伯克氏菌和一种能将三价单甲基砷(MAs(III))脱甲基化为三价砷(As(III))的链霉菌,两种微生物混合培养能完成从 MAs(V)到 As(III)的整个脱甲基过程^[3]。MAs(V)降解途径的第一步是 MAs(V)被还原为 MAs(III),其相对毒性急剧增加,但 MAs(V)还原的分子机制仍然未知。研究人员对 MAs(III)脱甲基菌的分子机制进行了研究,发现微生物在抵抗 MAs(III)毒性过程中, MAs(III)脱甲基酶 ArsI 发挥了重要的作用^[2-3,6]。目前已经从 *Bacillus* sp. MD1 和 *Nostoc* sp. PCC7120 中发现并鉴定了催化 MAs(III)去甲基化的 ArsI 酶^[6-7]。ArsI 是一种非血红素铁依赖的双加氧酶,可裂解 MAs(III)的 C-As 键生成 As(III),使高毒的 MAs(III)通过脱甲基转化为低毒的 As(III)^[7]。

作者从我国砷污染水稻土中分离筛选了一株 MAs(III)脱甲基细菌 *Bacillus aryabhatai* FJ-6,通过底物转化实验和酶活检测结果证实,菌株 FJ-6 能够将 MAs(III)脱甲基生成 As(III)。通过生物信息学分析,寻找出一个疑似的 MAs(III)脱甲基酶编码基因 *arsI*,并在分子和生化水平上研究了该 MAs(III)脱甲基酶的酶学特性。本研究为稻田土壤中细菌参与的 MAs(III)抗性机制的进一步深入研究打下了基础,为研究有机砷在环境中的行为和归趋提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与培养基

MAs(III)的配制方法:首先配制 0.328 mol/L H₂SO₄ 溶液(A)、0.264 mol/L Na₂S₂O₅ 溶液(B)、0.108 mol/L Na₂S₂O₃·5H₂O 溶液(C)、0.8 mmol/L

MAs(V)溶液(D);试剂 A、B、C 现用现配,在试剂 A 中缓慢加入试剂 B,轻柔混匀后依次加入试剂 C 和 D,立即用 10 mol/L NaOH 调 pH 至 6.0,反应即得 0.2 mmol/L MAs(III)溶液。

20×ST 培养基(g/L):酵母膏 1.0,蛋白胨 10.0,葡萄糖 2.0,去离子水 1 L, pH 7.2±0.2。

LB 培养基(g/L):酵母膏 5.0,蛋白胨 10.0,氯化钠 10.0, pH 7.0 (固体培养基加入 1%的琼脂)。

1.2 MAs(III)脱甲基菌的筛选

称取 0.5 g 土壤样品加入 100 mL 无菌水中,同时加入过滤除菌的 MAs(III)溶液(终浓度为 2 μmol/L)于 30 °C 静置培养 3 d,吸取上清液,梯度稀释后涂布含有 1.0%琼脂的 20×ST 固体平板,置于 30 °C 恒温培养箱中培养 3 d,长出的菌株为 MAs(III)抗性菌,挑取不同形态的菌落在 20×ST 平板划线,挑取单菌落至含 1 μmol/L MAs(III)的 20×ST 液体培养基中,培养 12 h 通过高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)验证单菌对 MAs(III)的转化效果。

1.3 MAs(III)脱甲基菌的鉴定

挑选具有 MAs(III)脱甲基效果的菌株,根据《常见细菌系统鉴定手册》对菌株的形态与生理生化特性进行鉴定^[8]。通过碱裂解法提取菌株 FJ-6 的基因组 DNA^[9],以细菌总 DNA 为模板,用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rDNA 基因的扩增^[10]。PCR 产物纯化后由上海生工生物技术公司测序。测序结果通过在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),与 GenBank 中的 16S rDNA 基因序列进行相似性比较,采用 MEGA 6.0 软件构建进化树^[11],预测菌株 FJ-6 的进化关系。

1.4 菌株 FJ-6 对 MAs(III)的抗性和 MAs(III)脱甲基能力

将菌株 FJ-6 在 20×ST 液体培养基中培养 12 h, 按培养基体系的 1%接种于 25 mL 20×ST 液体培养基中, 添加不同浓度的 MAs(III) (终浓度分别是 0、0.1、0.5、1、2 和 3 μmol/L), 每个处理设置 3 个重复。将这些培养基放置于 37 °C、180 r/min 的摇床中培养 12 h, 紫外分光光度计检测菌株的生长状态。在不同的时间段, 在 1 μmol/L MAs(III)的处理中, 取 1 mL 菌液离心, 用 0.22 μm 滤膜过滤后取上清液测定砷形态。

1.5 MAs(III)脱甲基酶功能基因的克隆和表达

首先对菌株 FJ-6 基因组进行测序, 而后对其基因组序列进行生物信息学分析, 以细菌 MAs(III)脱甲基酶(AIA09488)为参考, 发现了潜在的 MAs(III)脱甲基酶, 将其编码基因命名为 *arsI*。使用 NCBI 中的 BLAST 在线软件以及 ClustalX 软件对 *ArsI* 氨基酸序列同源性和保守序列进行分析。

以菌株 FJ-6 基因组 DNA 为模板, 以 FJ-6-*arsI*F (5'-GGGAATTCCATATGATGAAATATGTTTCATGTAGGAATTAATG-3', *Nde* I 酶切位点用下划线标注)和 FJ-6R-*arsI*R (5'-CCGCTCGAGGCAACATGAGTTGCTTGCGAG-3', *Xho* I 酶切位点用下划线标注)为引物, 扩增 *arsI* 基因并将该基因片段连接到 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切的表达质粒 pET29a 上, 将重组质粒 pET29a-*arsI* 转入砷敏感大肠杆菌表达宿主 AW3110 (Δ *arsRBC*)中。

1.6 表达 *arsI* 基因的 *E. coli* AW3110 对 MAs(III)的抗性实验和体内转化

制备菌株 AW3110 (pET29a) 和 AW3110 (pET29a-*arsI*)的转接种子液, 取 1 mL 种子液转接到新鲜的 100 mL 含有 50 μg/mL 卡那霉素、

0.3 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)和指定浓度 MAs(III)的 20×ST 液体培养基中, 设置 3 个重复, 将这些培养基放置于 37 °C、180 r/min 的摇床中培养 12 h 后, 测定培养液的 OD_{600} 值。

1.7 *ArsI* 对 MAs(III)脱甲基的体外活性实验

将含有 *arsI* 基因重组体 BL21 (pET29a-*arsI*) 在含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 °C 培养至 $OD_{600} \approx 0.5$ 时, 加入 0.3 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导表达 4 h, 6000 r/min 离心 15 min, 弃上清液收集菌体, 用缓冲液(50 mmol/L MOPS; 20% 甘油; 500 mmol/L NaCl; 20 mmol/L 咪唑)悬浮洗涤细胞, 然后在冰浴中超声破碎 10 min, 细胞破碎液于 4 °C、20000 r/min 离心 1 h 后收集上清液, 上清液用 0.45 μmol/L 滤膜过滤后, 通过 Ni-NTA Resin (Novagen)纯化。蛋白质浓度用考马斯亮蓝法测定^[12]。

ArsI 体外反应体系: MOPS 缓冲液(0.1 mol/L MOPS; 0.15 mol/L KCl; pH 7.0), 0.1 mmol/L Fe^{2+} ($Fe(NH_4)_2 \cdot (SO_4)_2 \cdot 6H_2O$); 3 mmol/L Tris(2-carboxyethyl)phosphine(TCEP); 1 mmol/L 半胱氨酸; 2 μmol/L MAs(III)和 0.4 μmol/L *ArsI*。37 °C 恒温反应, 每隔 10 min 取样, 12000 ×g 离心 10 min, 用 0.45 μm 滤膜过滤后, 通过 HPLC-ICP-MS 测定砷形态。

1.8 利用 HPLC-ICP-MS 检测分析底物或产物

采用 HPLC-ICP-MS 测定砷的形态, 所用的分离柱为 Hamilton PRP-X100 (250 mm×4.6 mm) 阴离子交换柱, 采用 8.5 mmol/L 的 NH_4NO_3 和 8.5 mmol/L 的 $NH_4H_2PO_4$ 溶液(用氨水调 pH 至 6.0)作为流动相, 流速为 1.2 mL/min, 形态分析所用的标准物质包括了以下 4 种物质: As(III)、MAs(III)、MAs(V)和 As(V)。根据出峰面积的大小, 定量样品中每个形态砷的含量。

1.9 实时定量 PCR

为确定菌株 FJ-6 转化 MAs(III) 过程中 MAs(III) 脱甲基酶基因为组成型转录表达还是诱导型转录表达。本研究将 MAs(III) 脱甲基酶基因 *arsI* 进行实时定量 PCR, 以 1% 的接种量将菌株 FJ-6 接种到 20×ST 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养至 $OD_{600} \approx 0.5$, 加入 1 $\mu\text{mol/L}$ MAs(III)、10 $\mu\text{mol/L}$ As(III) 和 10 $\mu\text{mol/L}$ As(V), 同时设置不加底物作为对照, 继续培养约 8 h。利用试剂盒提取 RNA 并反转录成 cDNA, 以菌株 FJ-6 的 DNA 旋转酶 B 亚单位编码基因 *gyrB* 作为内参基因(对照), 以 *gyrBf* (5'-CGGTGTAGGTGCCTCAGTT-3') 和 *gyrBr* (5'-TTCCGCCTTCGTAATGGT-3') 作为 *gyrB* 基因的引物, 以 *arsIf1* (5'-TCAACCTGTGAAACGAAAAT-3') 和 *arsIr1* (5'-TCTACTTGGAA GCCGAAATG-3') 作为扩增 *arsI* 基因的引物, 根据 TaKaRa 试剂盒 SYBR[®] Premix ExTaq[™] 说明进行实时定量 PCR 测定。检测在 MAs(III) 脱甲基过程中 *arsI* 的转录类型和转录水平。对加入 As(III)、

As(V) 和 MAs(III) 诱导后 *arsI* 基因的相对转录表达量利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析^[13]。

2 结果和分析

2.1 MAs(III) 脱甲基菌的分离、鉴定及 MAs(III) 抗性研究

MAs(III) 脱甲基菌 FJ-6 在 20×ST 培养基上菌落形态为圆形, 培养 24 h 菌落大小约为 1.0–2 mm, 表面凸起, 较湿润, 微黄色, 不透明, 产芽孢。生理生化实验结果表明, 菌株 FJ-6 为革兰氏阳性菌, 柠檬酸盐试验阳性, 脲酶试验阳性, 甲基红试验阴性, 吡啶试验阴性。

通过 MAs(III) 抗性培养试验, 菌株 FJ-6 对 MAs(III) 的最大抗性为 2 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ MAs(III) 已经对菌株的生长产生了抑制(图 1-A), MAs(III) 对 FJ-6 生长的 50% 抑制浓度 $EC_{50} = 1.4 \mu\text{mol/L}$ 。通过 HPLC-ICP-MS 检测出菌株 FJ-6 具有 MAs(III) 脱甲基能力, 能够将 1 $\mu\text{mol/L}$ MAs(III) 脱甲基成 As(III) (图 1-B)。

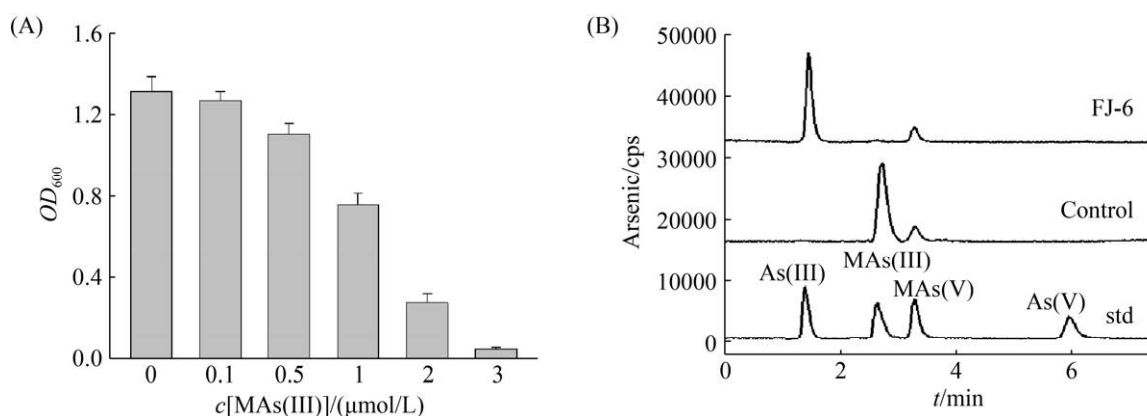


图 1. 菌株 FJ-6 对 MAs(III) 的抗性(A)及转化 MAs(III) 的 HPLC-ICP-MS 图(B)

Figure 1. The resistance to different concentrations of MAs(III) (A), and HPLC-ICP-MS spectrums of MAs(III) demethylation (B) by *Bacillus aryabhatai* FJ-6. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

以菌株 FJ-6 的总 DNA 为模板, 扩增得到总长为 1404 bp 的 16S rDNA 基因序列, GenBank 数据库比对结果表明, 菌株 FJ-6 和 *Bacillus aryabhatai* B8W22^T 的同源性最高, 为 99.9%, 通过 Neighbor-Joining 法构建菌株 FJ-6 与芽孢杆菌内模式菌株的系统进化树表明(图 2), 菌株 FJ-6 位于芽孢杆菌属进化树内部。故根据形态、生理生化和 16S rDNA 基因系统进化分析, 将菌株 FJ-6 鉴定为芽孢杆菌属, 命名为 *Bacillus aryabhatai* FJ-6。

2.2 MAs(III)脱甲基菌 FJ-6 对 MAs(III)转化特性研究

好氧条件下在 20×ST 培养基中加入 1 μmol/L MAs(III), 实验结果表明(图 3), 菌株在培养基中生长 1.5 h, 培养液中的 MAs(III)浓度开始降低, 同时 As(III)的浓度开始升高。从 1.5 h, 菌株 FJ-6

对 MAs(III)的脱甲基速率大幅提高, 至第 12 小时溶液中约 80% 的 MAs(III)被转化为 As(III), 培养液中检测了占总砷浓度约 15% 的 MAs(V)。在不添加菌株的对照组中, 部分 MAs(III)被氧化, MAs(V)占总砷浓度的 15% 左右。

2.3 表达 *arsI* 基因的 *E. coli* 对 MAs(III)的抗性实验

用已经报道的首个来自 *Bacillus* sp. MD1 的 MAs(III)去甲基酶 ArsI 序列在菌株 FJ-6 基因组中 BLAST 得到假定的 ArsI 序列。并对已经鉴定的 ArsI 序列同源性比对分析, 结果表明 ArsI 的保守区域包括假定的 Fe²⁺结合位点(His5-His62-Glu114)和砷结合位点(Cys95-Cys96) ArsI 与 *Bacillus* sp. MD1 的 MAs(III)脱甲基酶(AIA09488)蛋白序列一致性为 63.2%, 与 *Nostoc* sp. PCC 7120 的 MAs(III)脱甲基酶(BAB73061)蛋白序列一致性为

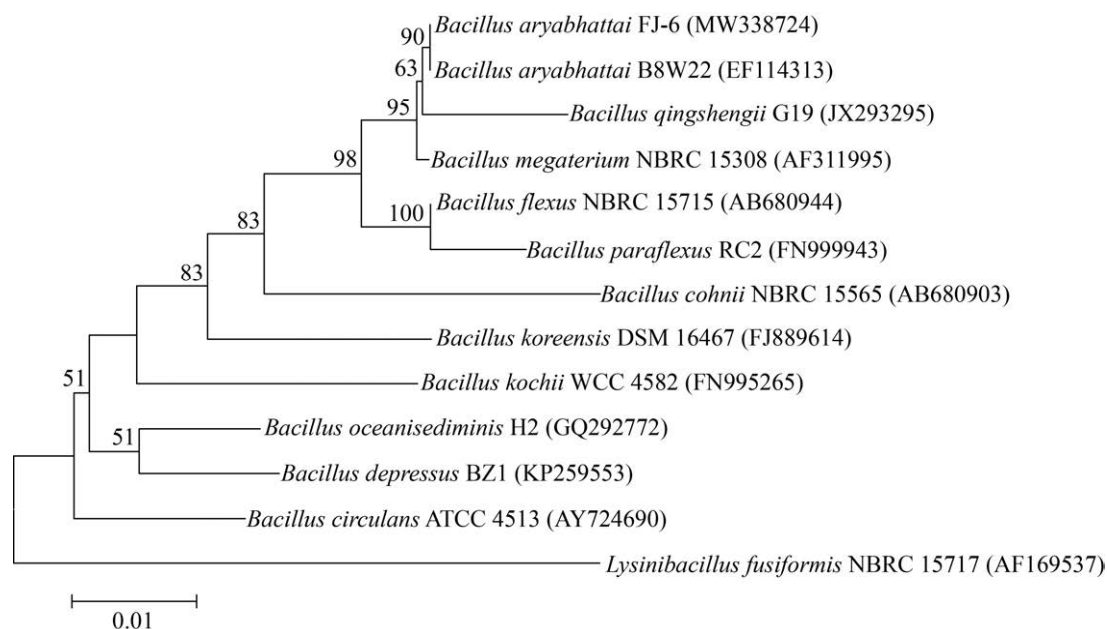


图 2. 菌株 FJ-6 系统发育分析

Figure 2. Phylogenetic analysis of the strain FJ-6 with the related species by Neighbor-Joining method. Numbers at branch points are bootstrap values (based on 1000 replications), only values >50% are shown. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. GenBank accession number is shown in bracket.

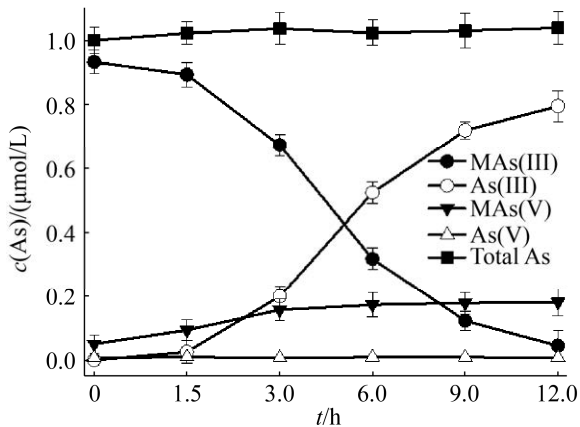


图3. 菌株 FJ-6 在 1 μmol/L MAs(III) 处理下的生物转化
Figure 3. Demethylation of 1 μmol/L MAs(III) by *Bacillus aryabhattai* FJ-6. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing ± standard error.

43.8%。为了研究芽孢杆菌属中 ArsI 的进化关系, 利用 MEGA 6.0 绘制出 ArsI 蛋白的系统进化树。从图 4 可以看出, 菌株 FJ-6 的 ArsI 蛋白与 *Bacillus aryabhattai* 亲缘关系最近(相似性 100%)。

为了检测 *arsI* 是否赋予了砷敏感大肠杆菌 AW3110 对 MAs(III) 的抗性, 将 *arsI* 连接到 pET29a 载体上, 并转入 AW3110 中进行异源表达。实验结果表明, 1 μmol/L MAs(III) 抑制了 AW3110 (pET29a) 的生长, *arsI* 基因的表达可显著提高 MAs(III) 的抗性, AW3110 (pET29a-*arsI*) 对 MAs(III) 最大耐受浓度为 10 μmol/L (图 5-A)。MAs(III) 对 AW3110 (pET29a) 和 AW3110 (pET29a-*arsI*) 生长的 50% 抑制浓度 EC₅₀ 分别为 1.8 μmol/L 和 5.5 μmol/L。在 MAs(III) 浓度为 1、2、3 μmol/L 时, 分别有 85%、74%、60% 的 MAs(III) 脱甲基为 As(III); 当 MAs(III) 浓度为 5 和 7 μmol/L 时, 分别有 35%、16% 的 MAs(III) 脱甲基为 As(III)。在 MAs(III) 浓度为 1–7 μmol/L 时, 约占总砷含量 16%–85% 的 MAs(III) 脱甲基为 As(III)。10 μmol/L MAs(III) 抑制了 AW3110 (pET29a-*arsI*) 的生长, 重组菌丧失了 MAs(III) 脱甲基能力(图 5-B)。

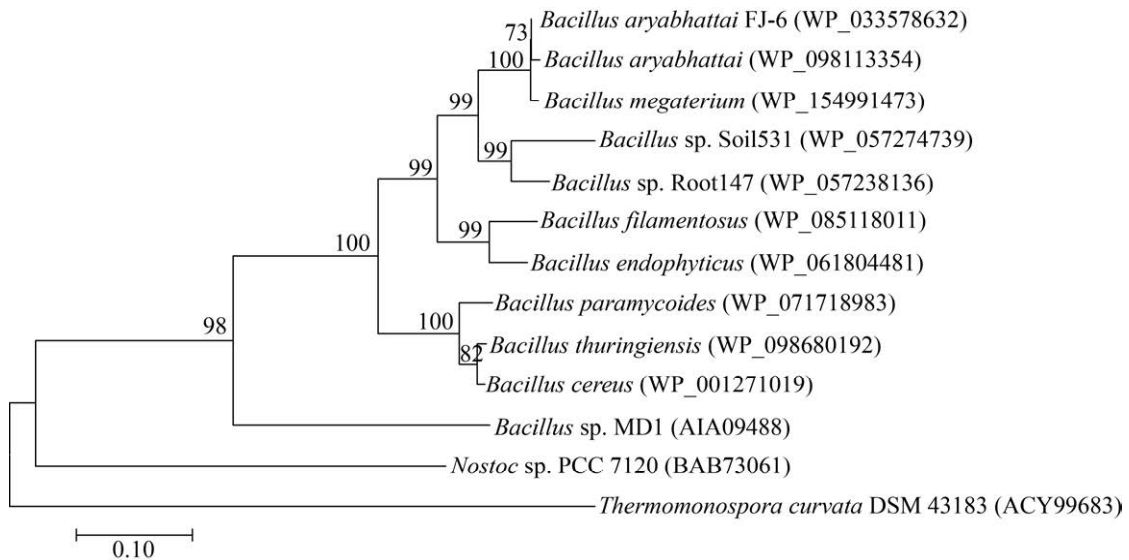


图4. ArsI 进化分析

Figure 4. Phylogenetic analysis of methylarsenite demethylation enzymes (ArsIs). Numbers at branch points are bootstrap values (based on 1000 replications), only values >50% are shown. Bar, 0.1 substitutions per amino acid position. GenBank accession number is showed in bracket.

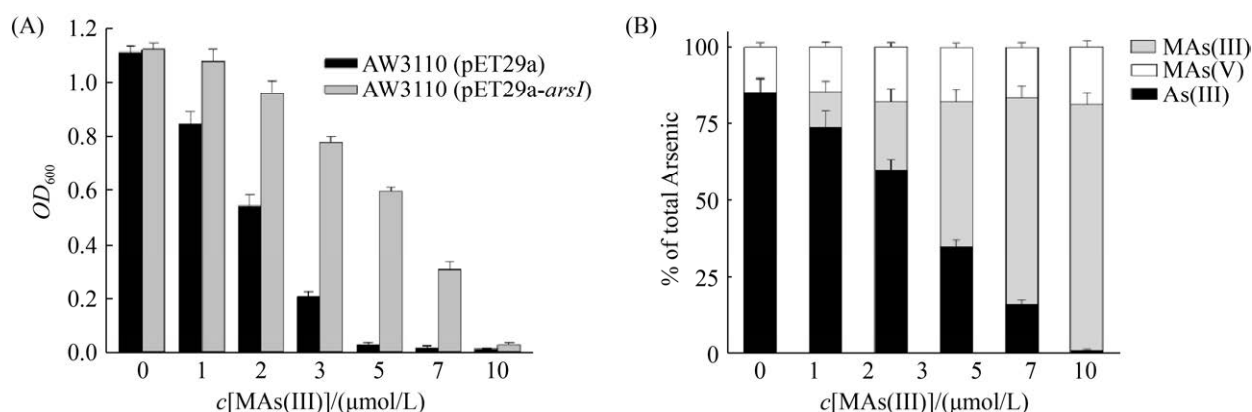


图 5. *arsI* 的异源表达使 AW3110 对 MAs(III) 产生了抗性(A)以及 AW3110 (pET29a-*arsI*) 对 MAs(III) 的转化(B)
 Figure 5. *ArsI* protein confers resistance to MAs(III) in *E. coli* AW3110 (A) and demethylation of MAs(III) by AW3110 expressing *arsI* (B). Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

2.4 *ArsI* 对 MAs(III) 的体外酶活转化实验

用纯化的 *ArsI* 蛋白进行酶促反应, 分别测定酶促反应 0、10、20、30 min 时 MAs(III) 脱甲基生成 As(III) 的浓度。结果如图 6 所示, 随着酶促反应的进行, MAs(III) 浓度降低, 伴随着 As(III) 浓度的升高, 反应 30 min 转化率达到 89.19%。表明 *ArsI* 蛋白具有催化 MAs(III) 脱甲基的酶活特性。

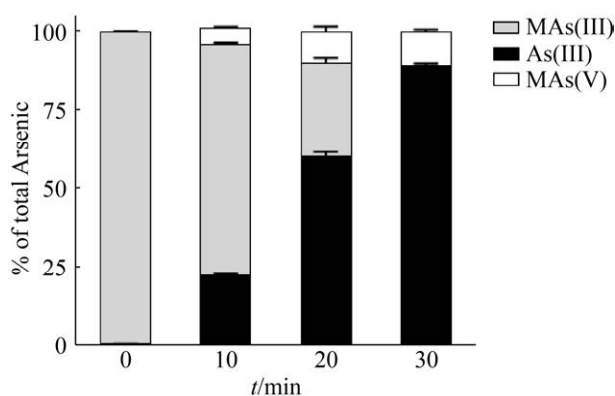


图 6. 纯化蛋白 *ArsI* 对 MAs(III) 的脱甲基活性分析
 Figure 6. Demethylation of MAs(III) by purified *ArsI*. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

2.5 MAs(III) 编码基因的转录分析

采用实时定量 PCR 技术来检测菌株 FJ-6 中的 *arsI* 基因是否受 As(III)、As(V) 或 MAs(III) 的诱导。实验结果表明菌株 FJ-6 中的 *arsI* 基因强烈受砷的诱导(图 7), 1 $\mu\text{mol/L}$ MAs(III)、10 $\mu\text{mol/L}$ As(III) 和 10 $\mu\text{mol/L}$ As(V) 可以使 *arsI* 基因的转录水平分别提高 35 倍、15 倍和 12 倍。

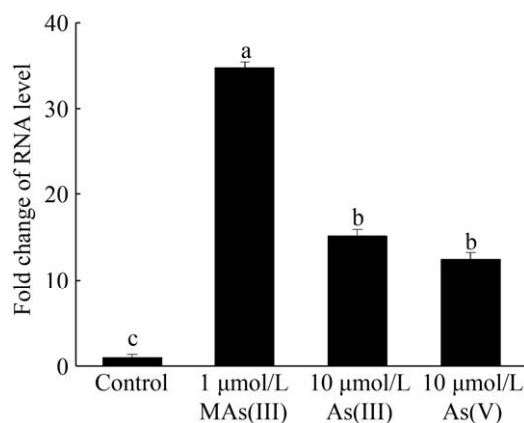


图 7. 菌株 FJ-6 的 *arsI* 基因的相对定量分析
 Figure 7. Relative expression of *arsI* in *Bacillus aryabhattai* FJ-6. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

微生物参与的砷的地球循环是砷迁移转化的主要方式,在早期地球环境中,MA_s(III)主要是由砷甲基转移酶(ArsM)经过甲基化过程产生^[14],早期地球是无氧环境,这使得MA_s(III)能够稳定存在。因此,为了在富含MA_s(III)的环境中生存,厌氧微生物进化出了MA_s(III)的解毒机制^[15]。尽管在地球好氧环境中,MA_s(III)可迅速被大气中的氧分子氧化为MA_s(V),但由于MA_s(V)还原微生物的广泛存在,MA_s(III)在淡水、地下水等自然环境中仍可被检测出来^[16]。MA_s(III)具有很强的毒性,所以ArsI催化完成的MA_s(III)去甲基化作用,是一个强有力的解毒途径,使得MA_s(III)脱甲基菌株可以在自然环境中得以生存。

本研究从福建漳平砷污染水稻土壤中分离了一株MA_s(III)脱甲基菌株,通过16S rDNA基因鉴定命名为*Bacillus aryabhatai* FJ-6。菌株FJ-6具有很强的MA_s(III)脱甲基能力,可在12 h内将1 μmol/L MA_s(III)脱甲基为As(III)。通过基因组比对分析,对菌株FJ-6中的一个MA_s(III)脱甲基酶基因*arsI*进行克隆和功能研究,该基因编码的氨基酸序列与*Bacillus* sp. MD1中ArsI蛋白氨基酸序列具有63.2%的相似度,与*Nostoc* sp. PCC7120中ArsI蛋白氨基酸序列具有43.8%的相似度。比较分析ArsI的进化树发现进化关系相近的芽孢杆菌属的细菌,它们的ArsI蛋白进化也相近,很可能它们早期就获得*arsI*基因并伴随进化

而稳定进化。菌株FJ-6的MA_s(III)脱甲基过程是由C-As键裂解酶ArsI参与的。ArsI为依赖于Fe²⁺的双加氧酶,具有Fe²⁺结合位点和砷结合位点。在砷敏感大肠杆菌AW3110对ArsI异源表达,可显著提高其对MA_s(III)的抗性,并迅速将MA_s(III)在细胞内脱甲基为As(III)。纯化的ArsI蛋白在体外也具有MA_s(III)脱甲基活性。

细菌中的*ars*操纵子(arsenic-resistance operon)编码多种砷抗性基因,并具有多种不同的基因编排方式,从而构成了微生物中分布最广泛和最重要的砷抗性机制^[17]。*ars*操纵子对砷具有抗性的机理如下:当细菌细胞中的金属或类金属浓度很低的时候,ArsR结合于操纵序列的位置,抑制*ars*操纵子的表达。当金属或类金属被吸收到细胞中并结合ArsR时,ArsR的构象发生变化,ArsR蛋白与DNA解离,下游基因得到表达,砷即可通过不同的砷代谢途径解毒,然后被排出体外,从而对砷产生抗性^[18]。菌株FJ-6的*arsI*基因紧邻*arsR*基因,暗示它可能受*arsR*的调控,参与微生物的砷解毒过程。FJ-6中的ArsR与大肠杆菌*Escherichia coli* plasmid R773的ArsR是同源基因,都是受MA_s(III)和As(III)调控的阻遏蛋白。荧光定量PCR的结果表明,*arsI*基因受砷的强烈诱导。前期研究表明,As(V)不能直接诱导*arsR*基因的表达,所以菌株FJ-6先将As(V)还原为As(III)后,As(III)诱导了*arsR*及下游基因*arsI*基因的表达。

参 考 文 献

- [1] Zhu YG, Xue XM, Kappler A, Rosen BP, Meharg AA. Linking genes to microbial biogeochemical cycling: lessons from arsenic. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(13): 7326–7339.
- [2] Chen J, Rosen BP. The arsenic methylation cycle: how microbial communities adapted *methylarsenicals* for use as weapons in the continuing war for dominance. *Frontiers in Environmental Science*, 2020, 8: 43. DOI: 10.3389/fevns.2020.00043.
- [3] Yoshinaga M, Cai Y, Rosen BP. Demethylation of methylarsonic acid by a microbial community. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(5): 1205–1215.
- [4] Maki T, Hasegawa H, Watarai H, Ueda K. Classification for dimethylarsenate-decomposing bacteria using a restrict fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *Analytical Sciences*, 2004, 20(1): 61–68.
- [5] Sanders JG. Microbial role in the demethylation and oxidation of methylated arsenicals in seawater. *Chemosphere*, 1979, 8(3): 135–137.
- [6] Yan Y, Ye J, Xue XM, Zhu YG. Arsenic demethylation by a C·As lyase in cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(24): 14350–14358.
- [7] Yoshinaga M, Rosen BP. A C·As lyase for degradation of environmental organoarsenical herbicides and animal husbandry growth promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(21): 7701–7706.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] Sambrook J, Russel I D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2011.
- [10] Lane DL. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Stackebrandt, E. R. and Goodfellow, M. Editors, Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Wiley, Chichester, United Kingdom. 1991: 115–175.
- [11] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [13] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [14] Thomas DJ, Rosen BP. Arsenic methyltransferases. In *Encyclopedia of Metalloproteins*; Uversky, VN, Kretsinger RH., Permyakov EA., Eds.; Springer Science+Business Media. 2012.
- [15] Chen SC, Sun GX, Yan Y, Konstantinidis KT, Zhang SY, Deng Y, Li XM, Cui HL, Musat F, Popp D, Rosen BP, Zhu YG. The Great Oxidation Event expanded the genetic repertoire of arsenic metabolism and cycling. *Proceedings of National Academy of sciences. USA*, 2020, 117(19): 10414–10421.
- [16] Mcknight-Whitford A, Chen BW, Naranmandura H, Zhu C, Le XC. New method and detection of high concentrations of monomethylarsonous acid detected in contaminated groundwater. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(15): 5875–5880.
- [17] Páez-Espino D, Tamames J, de Lorenzo V, Cánovas D. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*, 2009, 22(1): 117–130.
- [18] Chen J, Sun S, Li CZ, Zhu YG, Rosen BP. Biosensor for organoarsenical herbicides and growth promoters. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(2): 1141–1147.

Identification of an methylarsenite demethylation bacterium *Bacillus aryabhatai* FJ-6 and characterization of methylarsenite demethylation gene

Xiaolong Li, Yifei Wu, Jun Zhang*

College of Resources and Environment Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to isolate and identify the MAs(III) demethylation strains. We cloned and expressed the *arsI* gene involved in MAs(III)-demethylation in *Bacillus aryabhatai* FJ-6 and characterized the ArsI protein. [Methods] The *arsI* gene fragment (432 bp) was amplified with PCR. Recombinant plasmid pET29a-*arsI* 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 ArsI was determined by using HPLC-ICP-MS. [Results] The *arsI* gene was cloned and the recombinant plasmid pET29a-*arsI* was expressed. The molecular weight of the recombinant protein was 17.4 kDa. [Conclusion] The activity of ArsI protein with MAs(III) demethylation was clarified.

Keywords: *Bacillus*, demethylation, methylarsenite, arsenite, ArsI

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(31970108)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84399551; E-mail: zhangjun1208@njau.edu.cn

Received: 10 December 2020; Revised: 8 March 2021; Published online: 19 March 2021