

## 研究报告

### Research Report

# 土壤粪产碱菌亚磷酸盐脱氢酶基因的克隆及原核表达

陶瑶 周宏景 纪沈丽 袁航 吴娇 龚明 邹竹荣\*

云南师范大学生命科学学院, 云南省生物质能源和环境生物技术重点实验室, 教育部生物质能源持续发展和应用工程研究中心, 昆明, 650500

\* 通信作者, zouzr09@sina.com

**摘要** 亚磷酸盐脱氢酶(PTDH/PtxD)在基于亚磷酸盐的磷利用和辅酶再生等方面有着巨大的应用潜力。本研究直接从土壤宏基因组中扩增得到粪产碱菌亚磷酸盐脱氢酶全长基因 *AfPtxD*, 由其推导出的 AfPtxD 蛋白含有辅酶 NAD<sup>+</sup> 的结合位点和关键的酶催化残基, 并经保守结构域预测属于 PTDH 家族成员。在同家族的系统进化树上, AfPtxD 蛋白与脓杆菌 PtxD 几乎完全相同, 而与已具晶体结构分析的罗尔斯顿菌 PtxD 和施氏假单胞菌 PtxD 的同源性并不很高, 亲缘关系相对较远; 但同源建模结果表明 AfPtxD 蛋白在高级结构与罗尔斯顿菌 PtxD 几乎完全相同, 与施氏假单胞菌 PtxD 也很相似, 且都以二聚体形式存在。另外 *AfPtxD* 基因经 IPTG 诱导能在大肠杆菌中获得高效表达, 但可溶性不高。进一步用 His 标签亲和层析对重组蛋白 AfPtxD 纯化, 经测定, 其以亚磷酸钠盐为底物的酶比活性为 4.285 U/mg。该 *AfPtxD* 功能基因的获得为其后续应用研究打下了必要的基础。

**关键词** 粪产碱菌; 亚磷酸盐脱氢酶; 基因克隆; 原核表达; 生物信息学分析

## Cloning and Prokaryotic Expression of the Gene Encoding Phosphite Dehydrogenase from the Soil Bacterium *Alcaligenes faecalis*

Tao Yao Zhou Hongjing Ji Shenli Yuan Hang Wu Jiao Gong Ming Zou Zhurong\*

Engineering Research Center of Ministry of Education for Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology of Yunnan Province, School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming, 650500

\* Corresponding author, zouzr09@sina.com

DOI: 10.13417/j.gab.040.002666

**Abstract** Phosphite dehydrogenase (PTDH/PtxD) has large application potentials in the aspects of phosphite-based phosphorus utilization, coenzyme regeneration etc. Herein, the full-length gene of *Alcaligenes faecalis* PtxD (AfPtxD) was directly amplified from the soil metagenome. Its deduced AfPtxD protein contains the binding site for coenzyme NAD<sup>+</sup> and key catalytic residues, and also belongs to a member of PTDH family via conserved domain predictions. Meanwhile, phylogenetic tree analysis showed that in PTDH family the AfPtxD protein was almost identical to *Pusillimonas* PtxD, but clearly different from *Ralstonia* PtxD and *Pseudomonas stutzeri* PtxD already with crystal structural analysis. However, the results of homology modelling demonstrated that the AfPtxD protein was almost the same as *Ralstonia* PtxD in high-level structure and also very similar to *P. stutzeri* PtxD, existing in dimer form. We also found that the *AfPtxD* gene could be efficiently expressed in *Escherichia coli* by IPTG induction, despite poor solubility. The recombinant AfPtxD protein was further purified by His-tag affinity chromatography, and detected with a specific enzymatic activity of 4.285 U/mg towards its substrate, sodium phos-

基金项目 本研究由国家自然科学基金项目(31760077)资助

引用格式 :Tao Y., Zhou H.J., Ji S.L., Yuan H., Wu J., Gong M., and Zou Z.R., 2021, Cloning and prokaryotic expression of the gene encoding phosphite dehydrogenase from the soil bacterium *Alcaligenes faecalis*, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 40(7-8 combined issue): 2666-2676. (陶瑶, 周宏景, 纪沈丽, 袁航, 吴娇, 龚明, 邹竹荣, 2021, 土壤粪产碱菌亚磷酸盐脱氢酶基因的克隆及原核表达, *基因组学与应用生物学*, 40(第 7-8 期合刊): 2666-2676.)

phite. Prospectively, this cloned *AfPtxD* gene with verified activity should be of fundamental significance for its future application studies.

**Keywords** *Alcaligenes faecalis*; Phosphite dehydrogenase; Gene cloning; Prokaryotic expression; Bioinformatic analysis

磷是所有生物必需的大量营养元素之一,其最强氧化形式即正磷酸盐(Pi)又是绝大多数生物磷营养的主要甚至是唯一形式。Pi的可利用性是决定作物生产力的一个关键因素,因为土壤中Pi容易被转化为不可利用的有机形式或难溶性磷酸盐而使其不能被植物很好吸收,从而降低了有效磷的浓度(黄沅等, 2008; 杨玉梅等, 2015; Achary et al., 2017), 杂草对这种主营养素的竞争使用又进一步降低了其生物利用率。为了补偿作物低的Pi使用效率和解决杂草危害,经常过量使用Pi肥和除草剂便成为常态,这不仅加剧磷资源耗竭以及增加农业成本,而且还导致土壤退化、环境水体富营养化以及耐除草剂超级杂草的进化(Achary et al., 2017)。因此,农业生产中存在的磷利用和杂草控制这两个主要问题就需要一个合适的解决方案。

亚磷酸盐(Phi)作为地球上除Pi之外的第二大磷源,有可能成为传统磷肥的替代。研究发现,Phi与Pi结构相似,在很多方面比Pi具有优势,如稳定安全,溶解性高,化学反应活性低,以致于与土壤成分反应较少,使得它对植物的可利用性比Pi更好(Achary et al., 2017)。但是,Phi却不能直接用作磷肥,因为植物细胞缺少将Phi转化为Pi的代谢机制。相反,Phi可能会干扰植物对Pi(特别在Pi不足情况下)的吸收利用,从而抑制植物的生长发育并表现出除草剂特性(Achary et al., 2017)。Phi的这些特性及其潜在价值率先被墨西哥 Herrera-Estrella 研究组充分认识和实现, López-Arredondo 和 Herrera-Estrella (2012)首次报道通过转基因手段向植物引入一种细菌亚磷代谢机制,建立了一种新型磷肥和杂草控制双元系统,即转基因植物能将有毒的Phi转化为可利用的Pi素营养,从而发挥出Phi真正作为磷肥的角色,同时Phi对非转基因植物譬如杂草又起着除草剂的功效,这种双重作用对转基因植物的竞争生长无疑是最有利的。这套系统又被进一步延伸用作植物(拟南芥,烟草)遗传转化的选择标记(López-Arredondo and Herrera-Estrella, 2013),后来在玉米(Nahampun et al., 2016)、水稻(Manna et al., 2016)和棉花(Pandeya et al., 2017)等作物中也陆续得到检验,目前已在转基因作物研究领域展现出广阔的应用前景(Achary et al., 2017)。

这套名为Phi/PtxD的系统由Phi和另一个核心组分即来自细菌的亚磷酸盐脱氢酶(PTDH/PtxD)共同组成(López-Arredondo and Herrera-Estrella, 2012)。PTDH以 $\text{NAD}^+$ 作为辅酶催化Phi氧化为Pi,同时伴随NADH的产生。该酶对底物的 $K_m$ 值小,氧化Phi反应基本不可逆,而且Pi产物在高浓度下也不产生抑制效应(Relyea and van der Donk, 2005)。PTDH的这些特性再加上其底物Phi具有专一性的特点,决定了它从最初到现在就一直用作重要的辅酶再生系统(Relyea and van der Donk, 2005),显然它也非常适合转基因农业生物技术方面的应用。而且,创建对辅酶 $\text{NADP}^+$ 也具高亲和力和/或对热稳定的改良突变体更是进一步拓展了该酶的应用范围(Johannes et al., 2007; McLachlan et al., 2008)。

自然界中,仅少数能利用Phi的土壤和海洋细菌含有专一性的PTDH(White and Metcalf, 2007),其基因*PtxD*目前已从某些特定分离菌株中得到克隆,其天然或重组表达蛋白PtxD也得到纯化和生化分析(Metcalf and Wolfe, 1998; Costas et al., 2001; Wilson and Metcalf, 2005; Hirota et al., 2012; Liu et al., 2012),其中就包括施氏假单胞菌、罗尔斯顿菌、粪产碱菌等。施氏假单胞菌PtxD目前已广泛用于植物转基因研究,但受专利保护,假单胞菌属各种PtxD序列同源性又很高(Metcalf and Wolfe, 1998; Liu et al., 2012; 袁航等, 2018),因此有必要寻找与其序列有较大差异并来自其他属菌种的功能替代。研究发现,粪产碱菌PtxD与施氏假单胞菌PtxD的序列同源性不高(不到54%), $V_{max}$ 较小,但底物的 $K_m$ 也较小,两者酶活整体上很相似(Wilson and Metcalf, 2005)。同时,粪产碱菌与假单胞菌一样在土壤中都有分布,其*PtxD*基因获取相对容易。这些因素使得粪产碱菌PtxD可成为替代施氏假单胞菌PtxD的理想选择。

本研究直接以土壤宏基因组DNA为模板扩增粪产碱菌的亚磷酸盐脱氢酶基因*AfPtxD*,接着对其及其编码蛋白进行较系统的生物信息学分析,然后检测它在大肠杆菌中的诱导表达,并分析其重组蛋白AfPtxD纯化后的酶活性,为其后续应用研究打下一定基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 *AfPtxD* 基因的克隆

土壤中微生物菌种众多,本研究采集校园内植物根际潮湿土壤并用试剂盒提取其宏基因组 DNA,取 1  $\mu$ L 电泳检测显示其浓度较低(图 1A)。直接取 2  $\mu$ L 作为模板,用基因编码区外的上下游引物 AfPtxD-Fw、AfPtxD-Rv 和 DreamTaq DNA 聚合酶进行第一轮 PCR 扩增,取 1  $\mu$ L 进行电泳检测,结果仅能看出微弱的基因特异性扩增产物(约 1.35 kb)(图 1B)。将第一轮扩增产物稀释 10 倍后取 1  $\mu$ L 作为模板,利用高保真 Phanta DNA 聚合酶和匹配基因编码区两末端的特异性引物 AfPtxD-5Nd、AfPtxD-3Xh 进行第二轮 PCR 扩增,取 1  $\mu$ L 进行电泳检测,发现有比较明亮的目标基因扩增条带 AfPtxD,大小正确(约 1 kb)(图 1C)。将其纯化后,通过 *Nde* 和 *Xho* 酶切直接克隆到原核表达质粒 pET32a(+)上。用载体上游引物 Pt7Up-Fw 和基因特异性下游引物 AfPtxD-3Xh 进行菌落 PCR 鉴定,阳性重组克隆的扩增条带明亮且大小正确(图 1D),表明已构建成功土壤 *AfPtxD* 基因的原核表达载体 pET(*AfPtxD*)。

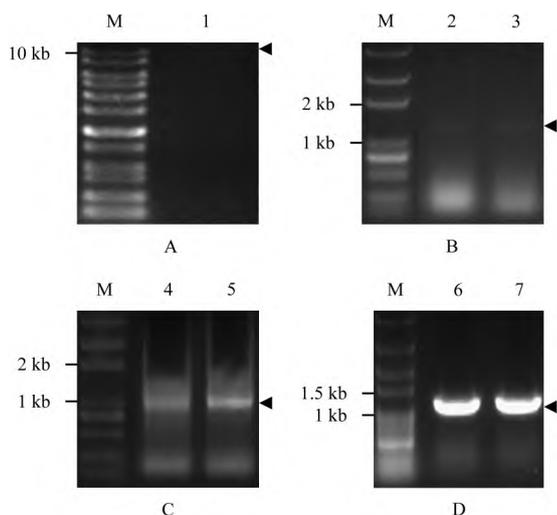


图 1 *AfPtxD* 基因的克隆

注: M: DNA 分子量标准; A: 土壤宏基因组 DNA 1; B: 第一轮 PCR 产物 2,3; C: 第二轮 PCR 产物 4,5; D: 重组克隆的菌落 PCR 鉴定 6,7; 箭头表示目的 DNA 条带

Figure 1 Gene cloning of *AfPtxD*

Note: M: DNA Marker; A: Soil metagenomic DNA 1; B: Product of the first round of PCR; 2,3; C: Product of the second round of PCR 4,5; D: Colony PCR identification of recombinant clones 6,7; Arrows indicate the target DNA bands

### 1.2 *AfPtxD* 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

对构建的 pET(*AfPtxD*)载体用 T7 启动子和 T7 终止子引物进行双向测序。结果表明,克隆的 *AfPtxD* 基因含有 1 个完整的 ORF,全长 1 002 bp,编码 1 个含 333 个氨基酸(aa)的蛋白序列,理论分子量大小为 36.6 kDa。与参照序列——粪产碱菌 *htx/ptx* 操纵子序列(GenBank 登录号: AY548382)或其基因组序列(CP-021079)相比,仅仅有 1 个碱基的差异即 A→G,造成其编码蛋白上 1 个氨基酸的改变即 Met (M)→Val (V)(图 2),这说明本研究克隆的 *AfPtxD* 基因可被认为来自土壤中分布的粪产碱菌。另外,利用 NCBI 的 Blastn 工具比对非冗余核酸数据库,结果显示 *AfPtxD* 基因还跟木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、水生产碱杆菌(*Alcaligenes aquatilis*)、脓杆菌属(*Pusillimonas*)的相关基因(HE798385, CP0-32153, CP002663)几乎完全同源,推测是可能由细菌间广泛存在的水平基因转移造成的,但是它跟研究较多的施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) *PtxD* 基因(AF061070)同源性不高,亲缘关系相对较远。

从 NCBI 蛋白数据库中搜索亚磷酸脱氢酶,选择有文献出处的匹配项,提取其序列并与克隆基因推导的 *AfPtxD* 蛋白一起用 ClustalW 程序进行同源性比较分析,比对结果用 GeneDoc 程序进行编排和展示(图 3)。可以看出, *AfPtxD* 蛋白具有亚磷酸脱氢酶保守的 3 个催化氨基酸残基即 Arg 237、Glu 266 和 His 293 (# 标示),含有辅酶 NAD<sup>+</sup> 的结合基序 Gx-GxxG(17x)E(实线箭头标示,其中:保守残基用+标示,非保守残基用·标示),并具有 2-羟酸脱氢酶的保守特征序列(虚线箭头标示)(Metcalf and Wolfe, 1998)。另外,亚磷酸脱氢酶家族成员在其 C 末端(约 20 个 aa)以及 NAD<sup>+</sup> 结合基序后一段序列(约 50 aa)差异非常明显,同源性不高。

以 *AfPtxD* 蛋白作为检索序列,利用 NCBI 的 CDD 工具搜索保守结构域数据库(CDD),得到其保守结构域信息(图 4;表 1)。从 E-value 数值可以看出, *AfPtxD* 蛋白属于 PTDH 家族成员,含保守结构域 cd12157,依次与乳酸脱氢酶(LDH)、乙醛酸还原酶、3-磷酸甘油脱氢酶(PGDH)的保守结构域(分别为 COG1052, PRK13243, TIGR01327)有较高和递减的相似度,并且都属于 2-羟酸脱氢酶(保守结构域为 pfam00389)。另外, CDD 工具也预测出了 *AfPtxD* 蛋白上的辅酶 NAD<sup>+</sup> 结合位点、保守催化位点以及二聚体形成界面。

```

1  ATTGTGAGCGGTACATTCCTCCCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATA
   Hde I
61  CATATGGCTAAACCAAGAATCGTAAACAACGCATCGAATCCACCCTGCACCGCTGGCCCTC
      M A K P R I V T T H R I H P D T L A L
121  CTTGAGACCGCCCTGAAGTAATTTCCAATCAGTCCGATTAACCATGTCGCGGGAAGAG
      L E T A A E V I S N Q S D S T M S R E E
181  GTACTGTTGCGCAACCAATGATGCGGACGGGATGATGTTGTTATGCCGGATAGCATAGAT
      V L L R T N D A D G M M V F M P D S I D
241  GCGGATTTCTATCCCGCTGCCCAATCTGAAGGTCATCGGCGCCGCGCTTAAAGGATAT
      A D F L S A C P N L K V I G A A L K G Y
301  GACAACTTTGATGTCGAGGCATGTACCCGCCATGGGATTTGGTTTACGATGTTTCTGAT
      D N F D V E A C T R H G I W F T I V P D
361  TTGCTTACGATGCCACAGTGAACATGATGGCTGTGTGCTGAGCATCACACGGAAAT
      L L T S P T A E L T I G L L L S I T R N
421  ATGCTGCAAGGTGATAATTACATTCGATCAGCCAGTTCATGGTTGGACCCCGCGGTTT
      M L Q G D N Y I R S R Q F N G W T P R F
481  TATGGCACAGGTTGACGGGTAAACCGCCGATCATGGGACGGGAGCGGTGGCGGG
      Y G T G L T G K T A G I G L T G A V G R
541  GCGGTGCAAAAGCGGCTGGCCGCTTCGATATGCAAATTCAGTACCGGATCCGACGCT
      A V A K R L A A F D M Q I Q Y T D P Q P
601  TTGCGCAAGAGTGGAAAGGGCATGGAATCGAGCAGAACATCGCTGGACCACTATTG
      L P Q E S E R A W N A S R T S L D Q L L
661  GCGACAAGCGAATTCATCATTCCCATGCTGCCGATGTCGTCAGATACCCACCACCCATA
      A T S D F I I P M L P M S S D T H H T I
721  AATGCTCGGGCATTAGACCCGATGAGCCCGGTCGCTACCTCGTCAATGCTGTCCGCGG
      N A R A L D R M K P G A Y L V N A C R G
781  TCCATCGTAGATGAGCGGGCGTGGTGCATGCGCTTCGGACGGGGCATCGGGCGTTAC
      S I V D E R A V V H A L R T G H L G G Y
841  GCCGACAGCTCTTCGAGCTGGAGGAATGGGCGCTCCCGACAGGCCGCAATTCATTCCT
      A A D V F E V E E W A R P D R P H S I P
901  GACGAATGCTTGTATCCTGCTTTACCCACATTTTACGCTCACTGGGTTTCGGCGGTC
      D E L L D P A L P T F F T P H L G S A V
961  AAATCGGTACGGATGGAAATCGAGGTGAAGCCGCCCTCAGTATCTCGAAGCGTTGCAA
      K S V R M E I E R E A A L S I L E A L Q
   Xho I
1 021  GGGCGCAITCCACGCGGAGCGGTCAACCATGTTGGAGCGGGAGACTCGAGCAACCAC
      G R I P R G A V N H V G A G R L E H H H
1 081  CACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAG
      H H H *

```

图2 *AfPtxD* 基因的 DNA 序列及其推导的蛋白质序列

注:下划线标示 PCR 引物;波浪线标示引物上酶切位点;加框标示单突变碱基(A→G,导致 Met (M)→Val (V));阴影标示翻译起始密码子

Figure 2 The sequences of the *AfPtxD* gene and its deduced protein

Note: Underlines denote PCR primers; Wavy lines denote restriction enzyme sites on primers; Frame denotes the single base mutation (A→G, resulting in Met (M)→Val (V)); Shadows denote translation initiation codon

在 CDD 预测结果基础上,进一步以 AfPtxD 蛋白作为检索序列,利用 NCBI 服务器上的 Blastp 工具搜索非冗余蛋白质数据库。选用 Query Cover>90% 且描述出现 PtxD 或 phosphite/phosphonate dehydrogenase 字样的匹配项,通过 MEGA 7.0 程序采用近邻相接法建立其系统进化树(图 5)。结果显示,AfPtxD 蛋白跟粪产碱菌 PtxD (AAT12779)和脓杆菌属 PtxD (AEC21371)几乎完全同源,而与其他假单胞菌属 PtxD 的亲缘关系一般,包括研究较多的施氏假单胞菌 PtxD (O69054),甚至低于罗尔斯顿菌属 PtxD (BAV60262)的同源性。另外,还可以看出 PtxD 主要来源于各种环境下的细菌类,包括海洋杆菌和蓝藻。

同时,我们还利用 Blastp 工具搜索了 NCBI 的蛋白质结构数据库(pdb)。选取与检索序列 AfPtxD 蛋白在 Query Cover>90% 条件下的匹配项,通过 MEGA 程序建立其系统进化树(图 6A)。结果显示,在 pdb 蛋白数据库中与 AfPtxD 同源、具有晶体结构信息的匹配项并不多,但涵盖了 PTDH (PtxD)、乙醛酸还原酶和 3-磷酸甘油脱氢酶(PGDH)家族成员。我们选取了与 AfPtxD 蛋白同源性最高、同属于 PTDH 家族的二个匹配项——罗尔斯顿菌 PtxD (6IH2\_A)和施氏假单胞菌 PtxD (4EBF\_A)以及同源性最低的一个匹配项即人 PGDH (6PLF\_A) (\* 标示)为模板,利用在线工具 SWISS-MODEL 进行 AfPtxD 高级结构的同源建模分析(图 6B)。可以看出,AfPtxD 建模结构与模板的一致性虽不完全取决于与模板蛋白的同源性但也与其呈现正相关。AfPtxD 与罗尔斯顿菌 PtxD (6IH2\_A)模板的同源性仅为 62.5%,但以此生成的建模结构与模板几乎完全相同,Ramachandran Plot 置信率达到 96.01%,与模板在局部结构相似曲线(Local quality estimate)上也非常拟合,同时与非冗余组 PDB 结构的比较(Comparison with non-redundant set of PDB structures)也只是很轻微偏离归一化 QMEAN4 值的中心轴。相比较 AfPtxD 以施氏假单胞菌 PtxD (4EBF\_A,同源性为 53.47%)为模板进行同源建模时,Ramachandran Plot 置信率(94.01%)以及与模板局部结构相似曲线的拟合程度都有轻度降低,同时明显偏离 QMEAN4 值的中心轴,反映出生成的建模结构与模板相似。而当以不属于 PTDH 家族、同源性仅为 26.9%的人 PGDH (6PLF\_A)为“负对照”模板进行同源建模时,Ramachandran Plot 置信率(88.68%)和局部结构相似曲线拟合程度的下降以及与 QMEAN4 值中心轴的偏离都十分明显,显然由此生成的 AfPtxD 建模结构与模板有一定偏差。但无论是哪种形式建模,都能演示出 AfPtxD 蛋白是以同源二聚体的四级结构功能形式存在(图 6C)。

### 1.3 重组蛋白 AfPtxD 的诱导表达

将测序正确的载体 pET (AfPtxD)转入大肠杆菌 BL21 (DE3)中,在 3 种条件下(按先后顺序:37 °C/4 h, 25 °C/过夜,18 °C/过夜)经 IPTG 诱导表达后,进行 SDS-PAGE 检测分析。结果显示,无论是 37 °C (图 7A)、25 °C (图 7B)还是 18 °C (图 7C)诱导,AfPtxD 重组蛋白在大肠杆菌中都获得了高水平表达。与未诱导菌样品(UI)相比,诱导后细菌总蛋白(T)以及 T 的两个分相组分——沉淀(P)和上清液(S)样品在蛋白分子量标

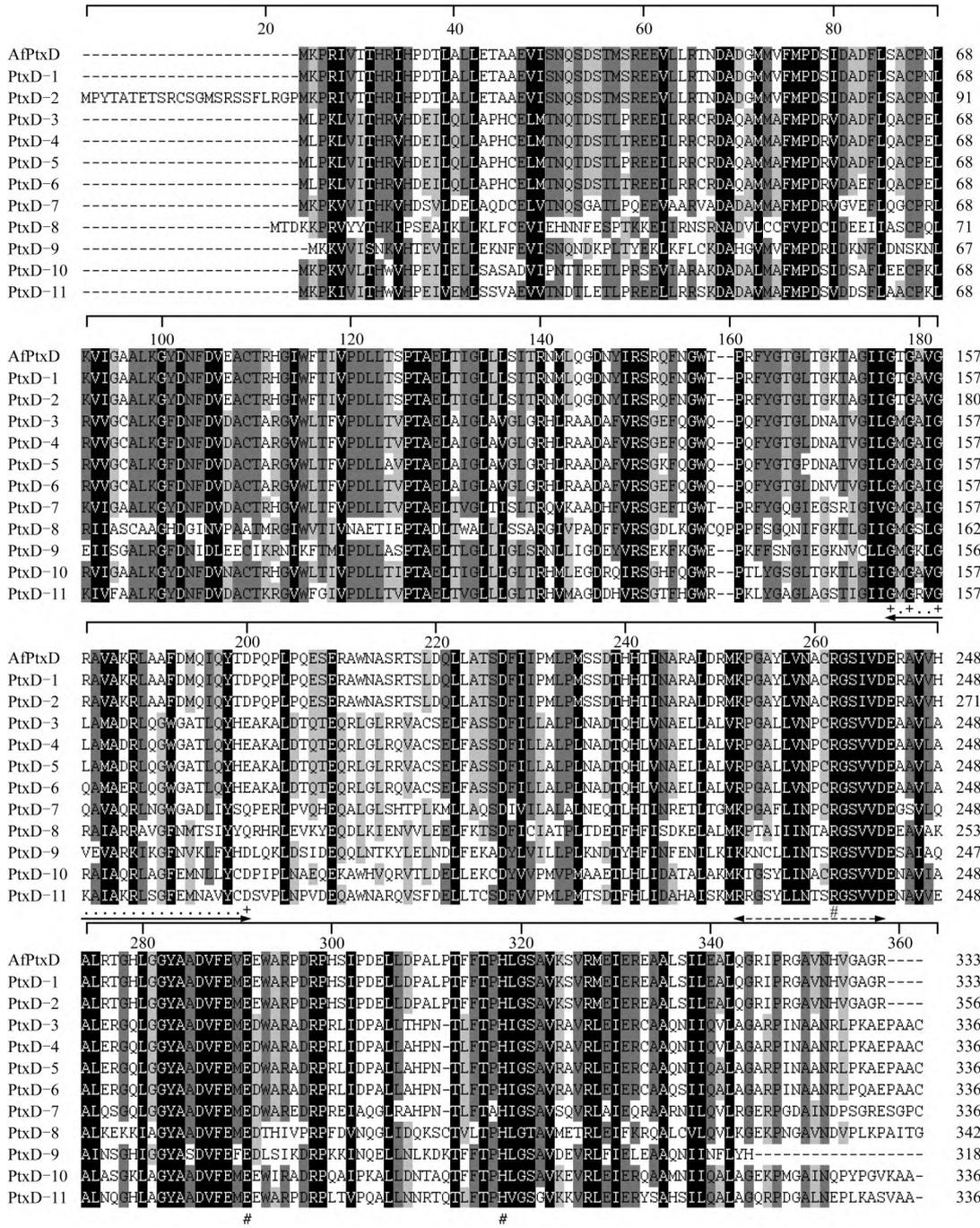


图 3 AfPtxD 与其同源蛋白的同源性比较分析  
 注: PtxD-1: AAT12779, 粪产碱菌; PtxD-2: AEC21371, 脓杆菌 T7-7; PtxD-3: ACL72000, 嗜硫硫碱弧菌; PtxD-4: O69054, 施氏假单胞菌; PtxD-5: ADZ52866, 假单胞菌 K; PtxD-6: EIE43372, 铜绿假单胞菌; PtxD-7: KUJ86346, 嗜盐单胞菌 54\_146; PtxD-8: ADB92513, 亚磷氧化脱硫菌; PtxD-9: KGF97637, 海洋原绿球藻; PtxD-10: BAV60262, 罗尔斯顿菌 4506; PtxD-11: CAL63322, 砷氧化赫米单胞菌; # 表示保守的催化残基; 实线箭头表示辅酶 NAD<sup>+</sup>的结合位点; 虚线箭头表示 2- 羟酸脱氢酶的保守特征序列

Figure 3 Comparative analysis of the homology between AfPtxD and its orthologues  
 Note: PtxD-1: AAT12779, *Alcaligenes faecalis*; PtxD-2: AEC21371, *Pusillimonas* sp. T7-7; PtxD-3: ACL72000, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*; PtxD-4: O69054, *Pseudomonas stutzeri*; PtxD-5: ADZ52866, *Pseudomonas* sp. K; PtxD-6: EIE43372, *Pseudomonas aeruginosa*; PtxD-7: KUJ86346, *Halomonas* sp. 54\_146; PtxD-8: ADB92513, *Desulfotignum phosphitoxidans*; PtxD-9: KGF97637, *Prochlorococcus marinus*; PtxD-10: BAV60262, *Ralstonia* sp. 4506; PtxD-11: CAL63322, *Herminiimonas arsenicoxydans*; # marks the conserved catalytic residues; The solid arrow delineates the binding site of NAD<sup>+</sup>; The dashed arrow indicates the conserved signature sequence of 2-hydroxyacid dehydrogenase

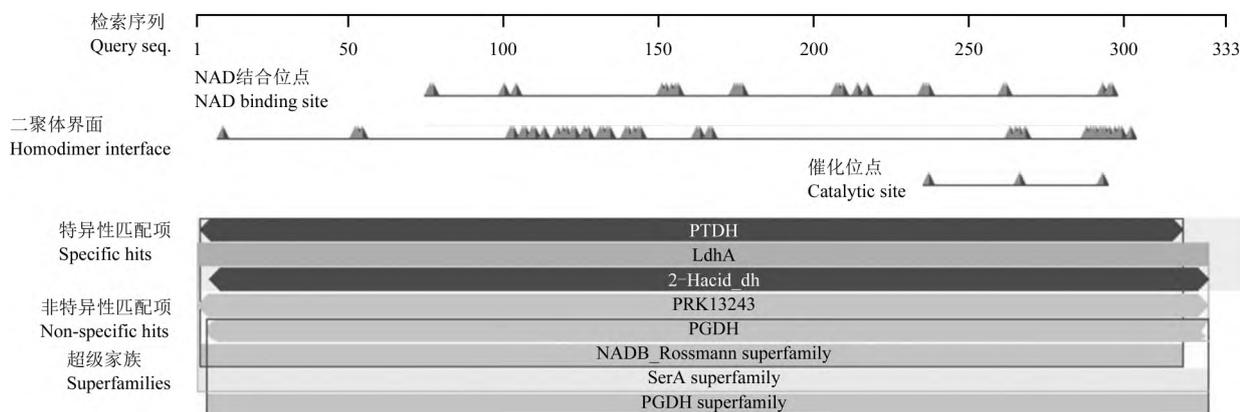


图4 AfPtxD蛋白的保守结构域预测

Figure 4 Prediction of the conserved domains of protein AfPtxD

表1 结构域匹配项

Table 1 Domain hits

名称	登录号	描述	范围	E 值
Name	Accession	Description	Interval	E-value
PTDH	cd12157	亚磷酸盐脱氢酶 Phosphite dehydrogenase	2~319	0e+00
LdhA	COG1052	乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase	1~327	5.08e-105
PRK13243	PRK13243	乙醛酸还原酶 Glyoxylate reductase	1~327	3.77e-76
PGDH	TIGR01327	3-磷酸甘油脱氢酶 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	4~327	7.31e-71
2-Hacid_dh	pfam00389	2-羟酸脱氢酶 2-hydroxyacid dehydrogenase	5~327	1.07e-69

准 40 kDa 下方都多出 1 条明亮清晰的蛋白条带(箭头标示),且与 AfPtxD 蛋白的理论分子量大小(36.6 kDa)相一致。另外,还可以看到这三种(高、中、低)温度条件下诱导表达的重组 AfPtxD 蛋白可溶性均不高,大部分聚集在沉淀中,看来 AfPtxD 蛋白难以在大肠杆菌系统中获得高可溶性表达,通常有效的低温诱导方式也不能对其促进。

#### 1.4 重组蛋白 AfPtxD 的纯化及酶活测定

基于上面表达结果(图 7),本研究选择 25℃ 过夜表达的 AfPtxD 蛋白进行纯化。将表达菌进行超声裂解,离心后取上清液经 His 标签亲和柱纯化,然后将纯化各步的收集样品(上样流出液(LF)、清洗流穿液(WF)以及 100、150、200 mmol/L 咪唑的洗脱液(EF))一起进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析。结果显示(图 8),重组蛋白 AfPtxD 与 His 标签亲和柱的结合效果较好,在 LF 中仅能检测到很弱的残余条带。3 种咪唑浓度(100, 150, 200 mmol/L)的洗脱液都可以洗脱下目的

蛋白(分子量约为 36.5 kDa),但前两者洗脱不够彻底,只有高浓度的咪唑(200 mmol/L)才能洗脱完全。由于重组表达 AfPtxD 蛋白的可溶性不高,因此得到的纯化蛋白浓度较低。

将纯化后的 AfPtxD 酶液加入其反应体系(含 6 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和 1.2 mmol/L  $\text{NAD}^+$ ),在 25℃ 保温 10 min 后,通过分光光度计测定  $OD_{340}$  吸光值的变化并以此计算出其酶活性为 0.085 7 U/mL。由于纯化酶液中的蛋白含量经 BCA 法测定约为 0.02 mg/mL,最终得出重组 AfPtxD 蛋白的酶比活力为 4.285 U/mg。

## 2 讨论

当前亚磷酸盐及其脱氢酶 PTDH (PtxD)组合而成的 Phi/PtxD 系统已在辅酶再生(Relyea and van der Donk, 2005)和植物转基因研究领域(Achary et al., 2017)展现出广阔的应用前景,其中普遍使用的施氏

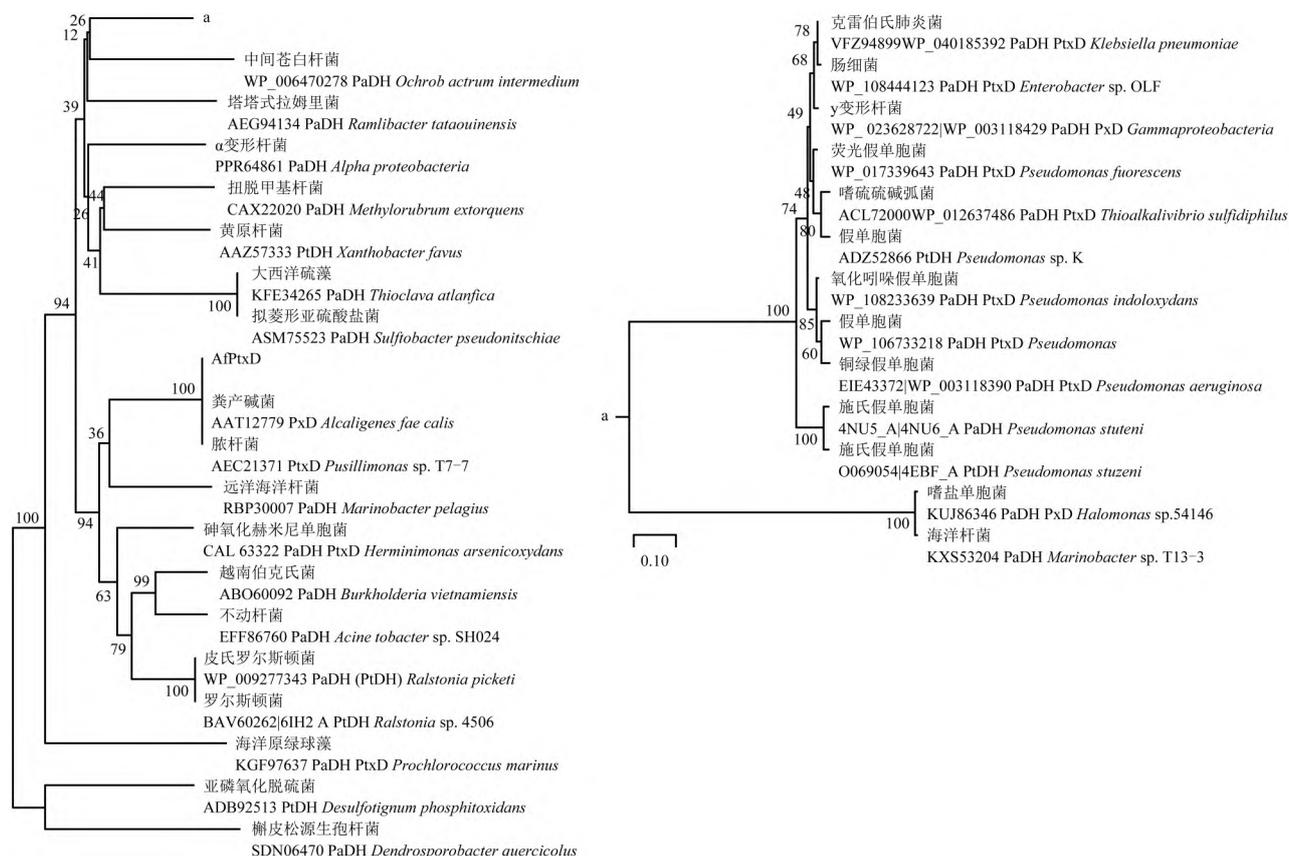


图 5 AfPtxD 蛋白的系统进化树分析

注: PaDH: 磷酸盐脱氢酶; PtDH: 亚磷酸盐脱氢酶

Figure 5 Phylogenetic tree analysis of protein AfPtxD

Note: PaDH: Phosphonate dehydrogenase; PtDH: Phosphite dehydrogenase

假单胞菌 PtxD 酶仍处于专利有效保护期,因而有必要找寻与其序列有明显差异且最好来自其他属菌种的功能替代。经分析,粪产碱菌 PtxD 可成为其理想选择。本研究首次从土壤宏基因组中获取粪产碱菌 PTDH 基因 *AfPtxD*,较系统化地对其进行生物信息学分析并验证了其重组表达蛋白的酶活,为进一步应用打下了必要基础。

目前,PTDH 基因几乎都是从分离菌株中得到克隆和分析(Metcalf and Wolfe, 1998; Costas et al., 2001; Wilson and Metcalf, 2005; Hirota et al., 2012; Liu et al., 2012),其中某些菌株因其特定生长环境并不容易分离和培养。粪产碱菌在多数土壤中都有分布,因而土壤实际上是其 PTDH 基因获取的最简捷来源。本研究采用两轮 PCR 直接从新鲜土壤宏基因组中扩增粪产碱菌 PTDH 基因 *AfPtxD*,但仅仅采用高保真的 Phanta DNA 聚合酶是不行的。于是,我们在首轮 PCR 改用对模板适用性更广和高扩增效率的 DreamTaq、第二轮 PCR 使用高保真 Phanta 便获得成功(图 1)。基因 *AfPtxD* 测序结果显示仅出现 1 个可能由 Dre-

amTaq 引发的碱基突变,并导致 1 个同类型疏水性氨基酸的改变(Met→Val),但推测可能不影响其编码蛋白 AfPtxD 的酶活性。另外,还可以看出,首轮 PCR 扩增产物很弱,但这可能是个普遍现象,因为第一次扩增对应模板 DNA 在整个宏基因组中的含量是极其低的。显然,这种从其环境中直接获取靶基因的策略是值得借鉴的,它不需要分离特定生物体(特别是一些难以培养的微生物菌株)。我们之前也采用同样方法分别从富营养化水体和土壤的宏基因组中成功分离到蓝藻橙色类胡萝卜素蛋白(OCP)和假单胞菌属亚磷酸脱氢酶(PtxD)的基因(刘畅等, 2016; 袁航等, 2018)。

生物信息学分析显示 *AfPtxD* 基因的编码蛋白属于典型的 PTDH 家族成员,含有辅酶 NAD<sup>+</sup>的结合基序 GxGxxG (17x)E 和保守的催化功能残基(Arg 237, Glu 266 和 His 293)(图 3; 图 4)。系统进化树分析结果显示 *AfPtxD* 基因就是来源于土壤中的粪产碱菌,其编码蛋白在亲缘关系上与脓杆菌属 PtxD 几乎完全同源,而与假单胞菌属 PtxD 的亲缘关系一般,包

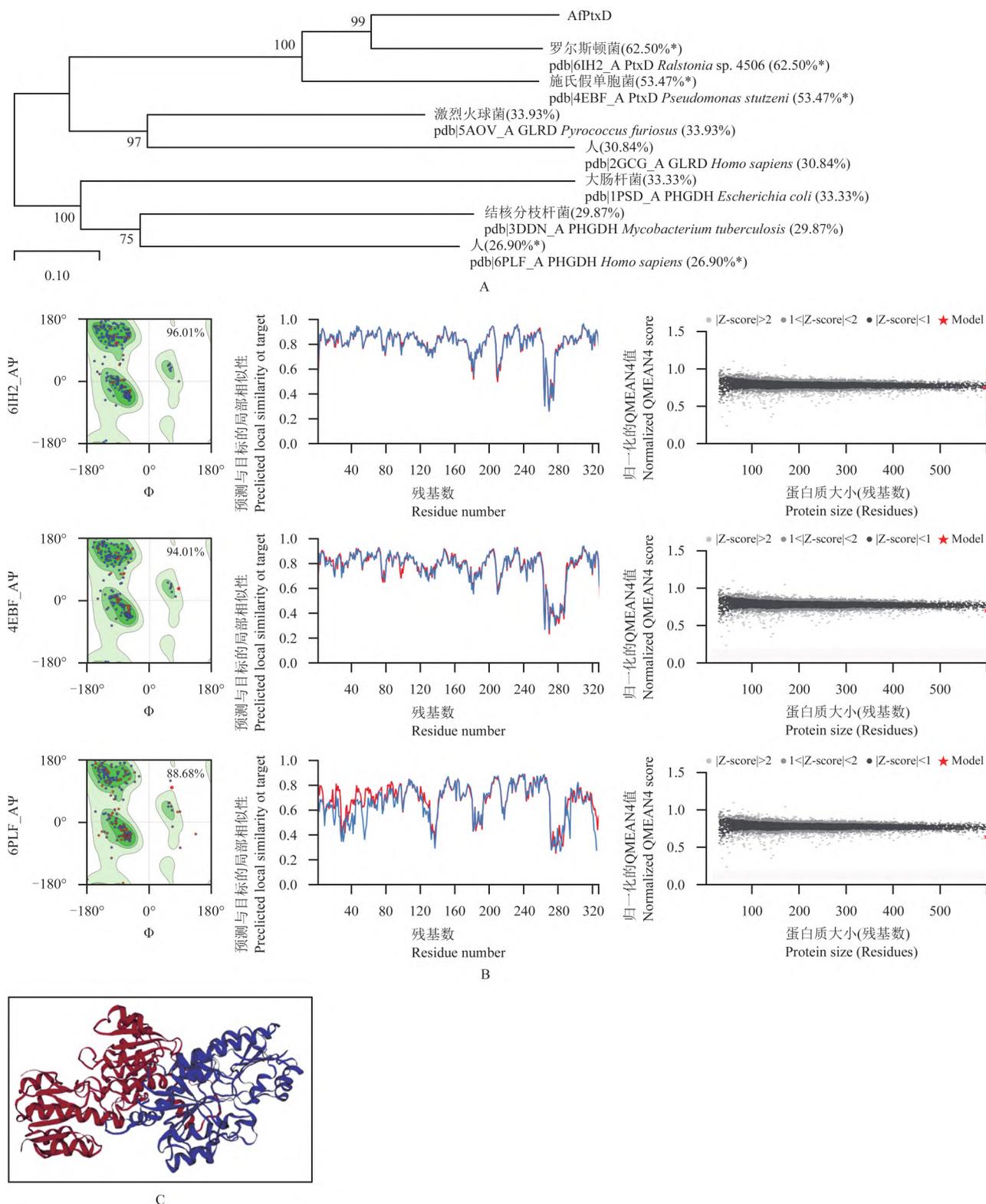


图6 AfPtxD 蛋白高级结构的同源建模

注: A: AfPtxD 比对蛋白质结构数据库(pdb)建立的系统进化树; B: 利用 SWISS-MODEL 服务器进行 AfPtxD 高级结构的同源建模; C: 同源建模预测的 AfPtxD 高级结构

Figure 6 Homologous modelling of the high-level structure of protein AfPtxD

Note: A: Phylogenetic tree based on the alignments of AfPtxD against protein structure database (pdb); B: Homologous modelling of the high-level structure of AfPtxD on the SWISS-MODEL server; C: The high-level structure of AfPtxD predicted by homologous modelling

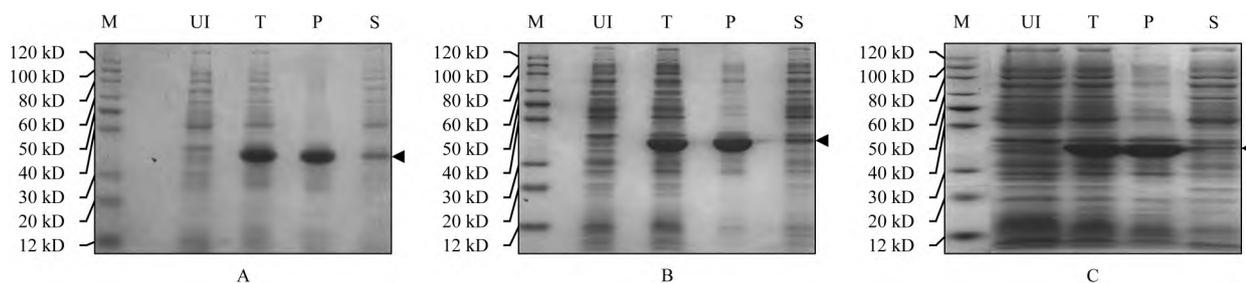


图 7 *AfPtxD* 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的重组表达

注: A: 37 °C 诱导 4 h; B: 25 °C 诱导过夜; C: 18 °C 诱导过夜; M: 蛋白质分子量标准; UI: 未诱导细菌的裂解物; T: 诱导细菌的裂解物; P: “T”的沉淀; S: “T”的上清液; 箭头表示重组蛋白 AfPtxD

Figure 7 Recombinant expression of the *AfPtxD* gene in *E. coli* BL21 (DE3)

Note: A: Induction at 37 °C for 4 h; B: Induction at 25 °C overnight; C: Induction at 18 °C overnight; M: Protein Marker; UI: The lysate of uninduced bacteria; T: The lysate of induced bacteria; P: The pellet of “T”; S: The supernatant of “T”; Arrows indicate the recombinant protein AfPtxD

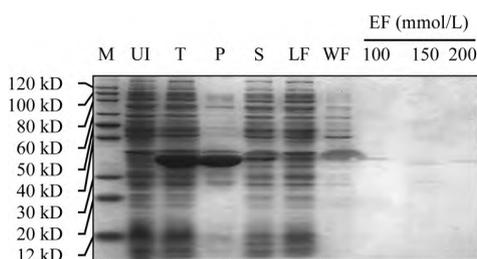


图 8 大肠杆菌重组表达蛋白 AfPtxD 的纯化

注: M: 蛋白质分子量标准; UI: 未诱导细菌的裂解物; T: 诱导细菌的裂解物; P: “T”的沉淀; S: “T”的上清液; LF: 上样流出液; WF: 清洗流穿液; EF: 咪唑洗脱流出液; 箭头表示重组蛋白 AfPtxD

Figure 8 Purification of the recombinant protein AfPtxD expressed in *E. coli*

Note: M: Protein Marker; UI: The lysate of uninduced bacteria; T: The lysate of induced bacteria; P: The pellet of “T”; S: The supernatant of “T”; LF: The flow-through of loading sample; WF: The flow-through of washing; EF: The flow-through of imidazole elution; Arrows indicate the recombinant protein AfPtxD

括研究较多的施氏假单胞菌 PtxD, 甚至低于与罗尔斯顿菌属 PtxD 的同源性(图 5; 图 6)。另外, 以罗尔斯顿菌和施氏假单胞菌 PtxD 以及人 PGDH 晶体结构为模板的同源建模结果显示, AfPtxD 的建模结构与模板的一致性不完全取决于与模板蛋白的同源性, 但也与其呈现一定的正相关, 它与罗尔斯顿菌 PtxD 模板几乎完全相同, 并以同源二聚体的四级结构功能形式存在(图 6)。

另外, 本研究还发现, 无论是 18 °C、25 °C 还是 37 °C 诱导 *AfPtxD* 基因在大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中都能获得高水平表达, 但重组蛋白在这三种温度条件下的可溶性都比较差(图 7), 通常有效的低温诱

导方式也不能促进它的可溶性表达。该结果说明 AfPtxD 蛋白是一个极易聚集或热不稳定蛋白, 其不溶性甚至超过所有先前重组表达过的各种 PtxD (Hirota et al., 2012; Liu et al., 2012; 袁航等, 2018)。显然, 这种特性加之很方便测酶活使得 AfPtxD 可成为蛋白可溶性表达研究中的理想靶蛋白。

尽管可溶性表达差, 我们最后还是检测了重组 AfPtxD 蛋白纯化后的酶活性。通过 His 标签亲和层析, 大肠杆菌重组表达的 AfPtxD 蛋白可在 200 mmol/L 咪唑浓度下几乎完全被洗脱(图 8)。由产物 NADH 的  $OD_{340}$  吸光值变化测出 AfPtxD 重组蛋白的酶比活性为 4.285 U/mg, 这已很接近于以前报道的其他 PtxD 酶活结果(Costas et al., 2001; Wilson and Metcalf, 2005; Hirota et al., 2012; Liu et al., 2012; 袁航等, 2018)。因此, 该酶活性得到检验的 *AfPtxD* 基因应该适合其后续各方面的应用研究。

### 3 材料与方法

#### 3.1 材料

载体 pET32a(+) 和大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 均为实验室保存。潮湿土壤取自校园绿化植物的根际下面 5 cm 处。土壤基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 回收试剂盒、DNA 和蛋白质分子量标准购于北京 Tiangen 生化科技有限公司; 限制性内切酶 *Nde*、*Xho* 和 DreamTaq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购于 Thermo Fisher Scientific 公司 2×Taq Master Mix、Phanta Super-Fidelity DNA 聚合酶购于南京诺唯赞生物科技有限公司; 其他生化试剂(如 NAD<sup>+</sup>, MOPS, Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O)均为国产分析纯以上级别。DNA 测序和引物(表 2)合成均由昆明硕攀科技有限公司完成。

表 2 本研究中所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence (5'-3')
AfPtxD-Fw	GTCTGATCGAGTTCGGGATTG
AfPtxD-Rv	GCTTCGCACGATCACTTCCATC
AfPtxD-5Nd	GCACTCATATGGCTAAACCAAGAATCGTA ACAACG
AfPtxD-3Xh	GTATTCTCGAGTCTCCCCGCTCCAACATG
Pt7Up-Fw	ACCGCGAAATTAATACGACTCAC

### 3.2 *AfPtxD* 基因的克隆

参照 GenBank 中粪产碱菌 *htx/ptx* 操纵子序列 (AY548382) 设计两对引物 AfPtxD-Fw/AfPtxD-Rv 和 AfPtxD-5Nd/AfPtxD-3Xh。从新采集的植物根际土壤中通过试剂盒提取其宏基因组 DNA。取 1 L 作模板, 用 DreamTaq DNA 聚合酶和引物 AfPtxD-Fw、AfPtxD-Rv 进行第一轮 PCR, 程序为 95 °C 3 min; (94 °C 30 s, 57.5 °C 30 s, 72 °C 80 s)×30; 72 °C 15 min。然后, 将第一轮产物稀释 10 倍后取 1 L 作为模板, 使用 Pha-nta Super-Fidelity DNA 聚合酶和引物 AfPtxD-5Nd、AfPtxD-3Xh 进行第二轮 PCR, 程序为: 95 °C 5 min (94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 62 s)×1 (94 °C 30 s, 60.2 °C 30 s, 72 °C 62 s)×30; 72 °C 15 min。AfPtxD PCR 产物纯化后用 *Nde* 和 *Xho* 双酶切, 再与 pET32a(+) 质粒经同样酶切和回收的大片段连接, 构建成其原核表达载体 pET (AfPtxD)。重组克隆用引物 Pt7Up-Fw、AfPtxD-3Xh 通过菌落 PCR 初步鉴定, 并进一步使用载体上的 T7 通用引物进行测序验证。

### 3.3 *AfPtxD* 的生物信息学分析

DNA 和蛋白质序列的常规分析采用 Vector NTI Suite 11 软件。利用 ClustalW 程序对同源蛋白质进行序列比对, 其结果进一步用 GeneDoc 程序进行编排和展示。蛋白质保守结构域的预测采用 NCBI 服务器的 CDD 工具。同时, 利用 NCBI 的 Blastp 工具搜索非冗余蛋白质数据库(nr), 选取符合要求的检索序列匹配项, 提取其序列并统一生成 fasta 文件格式, 然后用 MEGA 7.0 软件以近邻相接法建立其系统进化树。另外, 同样利用 Blastp 工具搜索蛋白质结构数据库(pdb), 选取目标匹配项后采用在线工具 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质的同源建模。

### 3.4 重组蛋白 AfPtxD 的诱导表达、纯化及酶活测定

载体 pET(AfPtxD) 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的

诱导表达过程以及对重组蛋白 AfPtxD 的 SDS-PAGE 检测分析参照我们之前的工作(袁航等, 2018)。采用 HisTrap FF crude 柱子(GE Healthcare 产品)进行重组蛋白 AfPtxD 的纯化, 具体过程如下: 用 5 mL 无菌水洗柱子, 再用 5 mL 40 mmol/L 咪唑缓冲液平衡柱子; 接着将 pET (AfPtxD) 诱导表达菌超声裂解物离心后的上清液上柱子, 收集上样流出液(LF); 然后用 15~20 mL 40 mmol/L 咪唑缓冲液洗柱, 收集流穿液(WF); 最后依次用 100、150、200 mmol/L 的咪唑洗脱缓冲液上柱并分别收集洗脱流出液(EF)。所有样品分别取 8 μL, 加入 2 μL 5×蛋白上样缓冲液, 混匀后煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE 分析。样品中的蛋白含量通过 BCA 法测定。AfPtxD 纯化酶液对底物 NAD<sup>+</sup>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> 的酶活测定依照袁航等(2018)给出的实验步骤, 最后再根据酶液中的蛋白含量计算出其比活性。

### 作者贡献

陶瑶负责主要实验和初稿写作; 周宏景、纪沈丽参与实验; 袁航、吴娇参与数据整理和分析; 龚明指导实验和数据分析; 邹竹荣负责实验设计、文章修改和校对。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31760077)资助。

### 参考文献

- Achary V.M.M., Ram B., Manna M., Datta D., Bhatt A., Reddy M.K., and Agrawal P.K., 2017, Phosphite: a novel P fertilizer for weed management and pathogen control, *Plant Biotechnol. J.*, 15(12): 1493-1508.
- Costas A.M., White A.K., and Metcalf W.W., 2001, Purification and characterization of a novel phosphorus-oxidizing enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88, *J. Biol. Chem.*, 276 (20): 17429-17436.
- Hirota R., Yamane S.T., Fujibuchi T., Motomura K., Ishida T., Ikeda T., and Kuroda A., 2012, Isolation and characterization of a soluble and thermostable phosphite dehydrogenase from *Ralstonia* sp. strain 4506, *J. Biosci. Bioeng.*, 113 (4): 445-450.
- Huang H., Fu C.Y., Zhou D.G., Chen G.H., and Zhou S.C., 2008, Progress in research of molecular mechanism of phosphorus absorption in plants, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 6(1): 117-122. (黄沅, 付崇允, 周德贵, 陈光辉, 周少川, 2008, 植物磷吸收的分子机理研究进展,

- 分子植物育种, 6(1): 117-122.)
- Johannes T.W., Woodyer R.D., and Zhao H.M., 2007, Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase, *Biotechnol. Bioeng.*, 96(1): 18-26.
- Liu C., Luo Z., Zhang M.R., Yang Y.M., Liu X., Gong M., and Zou Z.R., 2016, Gene cloning of the orange carotenoid protein from cyanobacteria, and its ectopic expression and functional evaluation in *Escherichia coli*, *Shengwu Jishu Tongbao* (Biotechnology Bulletin), 32(7): 138-145. (刘畅, 罗著, 张梦如, 杨玉梅, 刘娴, 龚明, 邹竹荣, 2016, 蓝藻橙色类胡萝卜素蛋白的基因克隆及在大肠杆菌中的异源表达和功能分析, *生物技术通报*, 32(7): 138-145.)
- Liu D.F., Ding H.T., Du Y.Q., Zhao Y.H., and Jia X.M., 2012, Cloning, expression, and characterization of a wide-pH-range stable phosphite dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. K in *Escherichia coli*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 166(5): 1301-1313.
- López-Arredondo D.L., and Herrera-Estrella L., 2012, Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system, *Nat. Biotechnol.*, 30(9): 889-893.
- López-Arredondo D.L., and Herrera-Estrella L., 2013, A novel dominant selectable system for the selection of transgenic plants under *in vitro* and greenhouse conditions based on phosphite metabolism, *Plant Biotechnol. J.*, 11(4): 516-525.
- Manna M., Achary V.M., Islam T., Agrawal P.K., and Reddy M. K., 2016, The development of a phosphite-mediated fertilization and weed control system for rice, *Sci. Rep.*, 6: 24941.
- McLachlan M.J., Johannes T.W., and Zhao H.M., 2008, Further improvement of phosphite dehydrogenase thermostability by saturation mutagenesis, *Biotechnol. Bioeng.*, 99(2): 268-274.
- Metcalf W.W., and Wolfe R.S., 1998, Molecular genetic analysis of phosphite and hypophosphite oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88, *J. Bacteriol.*, 180(21): 5547-5558.
- Nahampun H.N., López-Arredondo D., Xu X., Herrera-Estrella L., and Wang K., 2016, Assessment of *ptxD* gene as an alternative selectable marker for *Agrobacterium*-mediated maize transformation, *Plant Cell Rep.*, 35(5): 1121-1132.
- Pandeya D., Campbell L.M., Nunes E., Lopez-Arredondo D.L., Janga M.R., Herrera-Estrella L., and Rathore K.S., 2017, *ptxD* gene in combination with phosphite serves as a highly effective selection system to generate transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Plant Mol. Biol.*, 95(6): 567-577.
- Relyea H.A., and van der Donk W.A., 2005, Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase, *Bioorg. Chem.*, 33(3): 171-189.
- White A.K., and Metcalf W.W., 2007, Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds, *Annual Review of Microbiology*, 61(1): 379-400.
- Wilson M.M., and Metcalf W.W., 2005, Genetic diversity and horizontal transfer of genes involved in oxidation of reduced phosphorus compounds by *Alcaligenes faecalis* WM20-72, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(1): 290-296.
- Yang Y.M., Zhang M.R., Luo Z., Liu C., Gong M., and Zou Z.R., 2015, The research progress of H<sup>+</sup>-pyrophosphatase-mediated enhancements on plant phosphorus use, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 13(5): 1157-1168. (杨玉梅, 张梦如, 罗著, 刘畅, 龚明, 邹竹荣, 2015, H<sup>+</sup> 焦磷酸酶促进植物磷利用的研究进展, *分子植物育种*, 13(5): 1157-1168.)
- Yuan H., Luo Z., Yang Y.M., Liu Y.J., Gao Y.X., Liu X., Gong M., and Zou Z.R., 2018, Gene cloning, prokaryotic expression and enzymatic analysis of the phosphite dehydrogenase from soil *Pseudomonas* species, *Shengwu Jishu Tongbao* (Biotechnology Bulletin), 34(8): 130-137. (袁航, 罗著, 杨玉梅, 刘延娟, 高艳秀, 刘娴, 龚明, 邹竹荣, 2018, 土壤假单胞菌亚磷酸盐脱氢酶的基因克隆和原核表达及其酶活分析, *生物技术通报*, 34(8): 130-137.)

(责任编辑 罗厚枚)