

植物乳杆菌 DMDL 9010 中亚硝酸盐还原酶的 基因克隆、表达和纯化

王盼, 费永涛, 刘冬梅, 黄娟, 吴晖, 余以刚, 唐语谦, 肖性龙
(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641)

摘要: 研究了植物乳杆菌 DMDL 9010 亚硝酸盐还原酶基因克隆、表达及表达产物的纯化。首先以植物乳杆菌 DMDL 9010 的 DNA 为模板, 利用 PCR 扩增亚硝酸盐还原酶基因, 扩增后 nir 编码序列大小为 1638 bp, 再将其编码序列克隆到原核表达载体 pET-32a(+) 上, 转化到感受态细胞 DH5 α , 成功构建重组质粒 pET-32a(+)-nir。将重组质粒转化到大肠杆菌表达菌株 *E. coli* BL21 中, 在 IPTG 浓度为 1 mmol/L 和诱导温度为 25 $^{\circ}$ C 的条件下诱导 4 h 后诱导表达 NiR 蛋白, 经诱导后的工程菌能将 50 μ g/mL 的亚硝酸盐降解 90% 以上, 利用亲和层析柱 Ni sepharose 6 Fast flow 进行纯化得到重组蛋白, 该重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后的分子量约为 60 kDa。总之, 经由植物乳杆菌 DMDL 9010 克隆出亚硝酸还原酶基因, 并成功构建了重组质粒 pET-32a(+)-nir, 利用基因工程方法得到的工程菌能有效降解亚硝酸盐, 并能利用亲和层析得到高纯度的 NiR。

关键词: 亚硝酸盐还原酶; 植物乳杆菌; 基因克隆; 蛋白表达; 工程菌

文章编号: 1673-9078(2015)6-150-155

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.024

Cloning, Expression, and Purification of the Nitrite Reductase Gene from *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010

WANG Pan, FEI Yong-tao, LIU Dong-mei, HUANG Juan, WU Hui, YU Yi-gang, TANG Yu-qian, XIAO Xing-long
(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: The nitrate reductase gene (*nir*), encoding the nitrite reductase enzyme (NiR) in *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010, was cloned, and the expressed product was purified. The *nir* fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using *L. plantarum* DMDL 9010 DNA as template. Sequencing studies revealed that the *nir* fragment was 1638 bp in size. The gene was cloned into plasmid pET-32a(+) and was transferred into competent *Escherichia coli* DH5 α cells in order to construct the pET-32a(+)-nir-DH5 α recombinant plasmid. pET-32a(+)-nir was transferred into the expression strain *E. coli* BL21 to construct the denitrification recombinant bacterium, pET-32a(+)-nir-BL21. The recombinant bacterium was induced by 1 mmol/L IPTG to produce NiR protein when the induction temperature was maintained at 30 $^{\circ}$ C for 4 h, and more than 90% of NaNO₂ (50 μ g/ml) was degraded. High-purity NiR was obtained by His-Tag nickel affinity chromatography (Ni Sepharose 6 Fast Flow), and the molecular weight of NiR, as measured by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), was approximately 60 kDa. In summary, *nir* from *L. plantarum* DMDL 9010 was successfully cloned, and the recombinant bacterium pET-32a (+)-nir-BL21 effectively degraded nitrite. High-purity NiR can be obtained by affinity chromatography.

Key words: nitrite reductase; *Lactobacillus plantarum*; gene cloning; protein expression; engineered bacteria

亚硝酸盐是一种潜在的致癌物质, 在蔬菜发酵过程中极易积累, 给产品带来潜在的食品安全问题, 且

收稿日期: 2014-10-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101254); 广东省自然科学基金 (2011010005679); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (D2116760); 广东省科技攻关 (2013B020312002); 广东省科技攻关项目 (412051029089)

作者简介: 王盼 (1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品质量与安全的研究

通讯作者: 刘冬梅 (1972-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事食品微生物的利用与控制研究

过量摄入亚硝酸盐可诱发高铁血红蛋白症, 因此严格控制食品中亚硝酸盐的含量非常重要^[1]。许多研究表明亚硝酸盐是亚硝胺的前体物, 亚硝胺是一种强致癌物, 可以诱发消化系统中的多种癌变, 如胃癌、肠癌和肝癌。鉴于食品可能存在亚硝酸盐污染和肉制品中含有亚硝酸盐的潜在食品安全问题, 寻求有效控制或降解亚硝酸盐的方法势在必行, 除了加入食用安全的乳酸菌^[2]外, 还可利用亚硝酸盐还原酶 (nitrite reductase, 简称为NiR) 进行生物降解^[2], NiR是一种脱氮反应中的关键酶, 它脱氮过程有两种: (1) 在能催

化亚硝酸盐(NO_2^-)失去电子生成一氧化氮(NO)^[3]; (2) 催化亚硝酸盐(NO_2^-)进行氨合并生成铵根离子(NH_4^+)^[4]。NIR根据结构类型可以分为细胞色素cd1型和铜型,其编码基因分别为nirS和nirK^[5]。Nir可以从菌株皮氏罗尔斯顿氏菌(*Ralstonia pickettii*)^[5]和乳酸菌^[6]中提取出来,笔者在前期研究中也曾尝试从植物乳杆菌DMDL 9010^[7]中提取NIR,但较高粘度的发酵液给后续的离心分离带来了很大的困难,因此,寻求能得到食用安全的且能大量生产NIR的方法非常必要。与常规蛋白分离技术相比,固定金属离子亲和层析技术(Immobilized metal ion affinity chromatography,简称IMAC)用于酶蛋白的分离纯化,具有选择性高、高通量、高吸附的优点,主要是利用蛋白质表面的组氨酸、色氨酸、半胱氨酸等和固定金属离子发生亲和作用实现酶蛋白的分离。因此,设计聚组氨酸、色氨酸、半胱氨酸、精氨酸等为亲和标签与目的酶蛋白质融合后再用IMAC进行纯化,可达到预期的分离效果。利用基因工程技术得到大量NIR有报道,例如经由嗜热地芽孢杆菌(*Geobacillus kaustophilus*)^[8],苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)^[9],疮疱丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)^[10]等菌种表达NIR,并利用亲和层析纯化得到高纯度的NIR^[11],由此可以根据这个方法来进行实验。在NCBI中已收录的8种乳酸菌NIR蛋白序列,其GB编号为ZP_08573977、ZP_08477038、NZ_AELK01000000、ZP_03938231、NZ_ACGG01000000等,而且NCBI中已经收录有植物乳杆菌NIR蛋白序列,已收录的8个亚种的植物乳杆菌NIR蛋白序列,这8个亚种中的NIR蛋白序列菌相似度高达99%,说明植物乳杆菌各亚种中的NIR序列几乎是相同的,由此可以根据其中任意一个亚种的NIR序列进行克隆表达等。但是国外尚未有文章利用这些序列将植物乳杆菌中的NIR蛋白进行克隆并得到大量表达,虽然国内文献^[12]中将植物乳杆菌中的NIR进行克隆表达,但是没有纯化的方法,也没有说明测定蛋白活性的具体方法,因为大肠杆菌自身就能降解亚硝酸盐^[13],但是在振荡培养过程中是没有降解活力的,所以需要通过振荡培养来检测重组蛋白酶活。

本研究通过以植物乳杆菌DMDL 9010的全基因组为模板,利用PCR得到nir基因,并定向地将扩增得到的nir基因克隆到pET-32a(+)上,成功构建表达载体pET-32a(+)-nir;再将表达载体转化到*E. coli* BL21中,利用IPTG进行诱导表达,研究其表达的重组蛋白的降解能力,并进行纯化得到高浓度的NIR。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌种与载体

E. coli BL21、*E. coli* DH 5 α 、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) DMDL 9010, pET-32a(+),由本实验室甘油保存于-80℃冰箱中。

1.1.2 主要试剂与仪器

MRS培养基,琼脂,购自广东环凯微生物科技有限公司;Taq DNA聚合酶,限制性内切酶EcoRI、XhoI, DNA连接酶, DNA提取试剂盒,购自大连宝生物公司;双丙烯酰胺、2-巯基乙醇、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、PEG20000,丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS),购自健阳公司;其余试剂均为国产分析纯。

主要仪器:电泳仪,北京六一仪器厂生产;快速基因PCR扩增仪,购自德国Biometra。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计与合成

在NCBI中查找植物乳杆菌中NIR的蛋白序列(GB编号为AF084709),然后根据蛋白序列的位点在植物乳杆菌的全基因组中找到其编码基因的序列,根据找到的NIR的编码序列设计一对引物,即上游引物P1:5'-CCGGAATTCATGAGTCAAAGCTTATGGCA-3',下游引物P2:5'-CCGCTCGAGTTAATTCCTGACACTGTTTG-3',分别从其中引入EcoRI和XhoI的酶切位点及保护性碱基,扩增片段的长度为1638bp。引物由英潍捷基上海有限公司合成。

1.2.2 植物乳杆菌DMDL 9010基因组DNA的提取和其nir基因的扩增

用基因组DNA提取试剂盒抽提植物乳杆菌的基因组DNA(方法详见试剂盒说明书),然后以植物乳杆菌的基因组DNA为模板扩增nir片段。

PCR反应体系: Taq DNA聚合酶(5 U/ μL) 0.25 μL , 10 \times PCR Buffer 5 μL , dNTP Mix 4 μL , 引物P1(20 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 引物P2(20 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) DMDL 9010 DNA 4 μL , 无菌超纯水 34.75 μL , 总反应体积为 50 μL 。

nir的PCR反应条件: 94℃预变性4 min; 94℃变性30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸2 min, 共30个循环,最后72℃延伸10 min。

配置1%的琼脂糖凝胶,将PCR产物上样至琼脂糖凝胶中,在电压120 V下进行电泳,然后在紫外灯下观察结果,并利用QIAquick PCR Purification kit试剂盒对PCR产物进行回收。

1.2.3 重组质粒pET-32a(+)-nir及重组表达工

工程菌 pET-32a(+)-nir-BL21 的构建

将回收的 nir 片段、pET-32a(+)载体质粒经 EcoR I 和 XhoI 限制性内切酶进行双酶切, 酶切反应体系如表 1。将 PCR 回收片段双酶切体系与 pET-32a(+)质粒双酶切体系置于 37 °C 条件下反应 14 h, PCR 回收片段双酶切产物与 pET-32a(+)质粒双酶切产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 然后利用 QIAquick PCR Purification kit 试剂盒对 PCR 产物进行回收。

表 1 双酶切反应体系

Table 1 The double-enzyme reaction system

	PCR 回收片段双酶切	pET-32a(+)质粒双酶切
EcoR I	1.5 μ L	1.5 μ L
XhoI	1.5 μ L	1.5 μ L
10 \times H Buffer	5 μ L	5 μ L
PCR 回收片段	25 μ L	-
pET-32a(+)质粒	-	25 μ L
无菌超纯水	17 μ L	17 μ L
总体积	50 μ L	50 μ L

利用 T4-DNA 连接酶将 PCR 回收片段双酶切产物定向克隆到 pET-32a(+)质粒双酶切产物上, 反应体系: PCR 回收片段双酶切产物 2.5 μ L, pET-32a(+)质粒双酶切产物 19 μ L, T4-DNA 连接酶 1 μ L, T4-DNA 连接酶 Buffer 2.5 μ L, 总体积为 25 μ L。将该连接体系置于 4 °C 条件下反应 14 h。分别取感受态的大肠杆菌 DH 5 α 200 μ L 置于无菌的 1.5 mL 离心管中, 向离心管中加入连接反应后的溶液 12.5 μ L, 同时向另两个装有感受态的大肠杆菌 DH 5 α 的离心管中分别加入质粒 pET-32a(+)和无菌水 (作为空白对照), 小心混匀, 冰浴 30 min, 然后立即置于 42 °C 的水浴中热击 90 s, 接着置于冰上冰浴 30 min。然后加入 800 mL 的 LB 液体培养基, 于 37 °C 培养箱中培养 45 min。取 200 μ L 的 LB 培养液于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上涂布培养, 待菌液干后, 置于 37 °C 培养箱中培养 14 h。

从含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基中随机挑取单菌落, 接种于 100 mL LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL 氨苄青霉素) 中, 37 °C、180 r/min 培养 12 h 后, 利用 TaKaRa 的质粒提取试剂盒提取质粒, 然后将该质粒利用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增和利用 EcoRI、XhoI 做双酶切实验, 将这些产物分别利用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。将成功连接的重组表达载体命名为 pET-32a(+)-nir, 然后按上述的方法将 pET-32a(+)-nir 转化到感受态的大肠杆菌 BL21 中, 用氨苄青霉素抗性平板筛选转化成功的工程菌 pET-32a(+)-nir-BL21,

挑选 3 个单菌落, 37 °C 增菌培养后-85 °C 保存菌种。

1.2.4 工程菌中 NIR 的降解亚硝酸盐的活性

利用盐酸萘乙二胺法测定重组菌的降解亚硝酸盐的能力, 分别将工程菌 (重组组)、不含质粒的 *E. coli* BL21 (无质粒组) 接种到 LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL 氨苄青霉素和 50 μ g/mL 的 NaNO₂) 中, 同时以不接种菌株的 LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL 氨苄青霉素和 50 μ g/mL 的 NaNO₂) 作为空白对照, 于 37 °C 和 180 r/min 摇床培养 12 h 后, 取 1 mL 菌液 12000 r/min 离心 1 min 后取上清液 100 μ L, 测 NaNO₂ 含量, 其 NaNO₂ 测定方法^[8]为: 取样品 100 μ L 于 25 mL 的比色管中, 加入蒸馏水 20 mL, 再加入 2 mL 对氨基苯磺酸 (浓度为 4 g/L), 混匀后避光反应 3 min, 然后加入 1 mL 盐酸萘乙二胺 (浓度为 2g/L), 加水定容至 25 mL 后混匀, 避光反应 15 min 后, 在 540 nm 处测吸光值, 吸光值越高, 亚硝酸盐的含量越高, 反之越低。

1.2.5 工程菌中粗蛋白的提取

将工程菌 pET-32a(+)-nir-BL21 涂平板于 LB 固体培养基 (含 50 μ g/mL 氨苄青霉素) 上, 于 37 °C 培养箱中过夜培养, 然后从固体培养基 (含 50 μ g/mL 氨苄青霉素) 上挑取单菌落接种到液体培养基 (含 50 μ g/mL 氨苄青霉素) 中, 于 37 °C 和 180 r/min 下过夜培养; 然后以 2% 接种量接种 LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL 氨苄青霉素), 于 37 °C 和 180 r/min 下培养至对数生长期 (OD₆₀₀≈0.5) 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 于 30 °C 和 180 r/min 下诱导培养 4 h 后, 得培养液, 离心收集培养液菌体, 提取粗蛋白液, 其具体步骤如下: 将培养液用 7000 r/min、5 min 离心收集菌体, 用无菌水清洗两次, 每 100 mL 培养液得到的菌泥中加入 10 mL 于 4 °C 预冷的缓冲液 A (20 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 8 mol/L 的尿素溶液, pH=7.4), 冰浴超声波破碎菌体, 超声条件是 55w, 2 s/2 s, 10 min, 超声后取出, 静置于 4 °C 冰箱 12 h 后, 在 4 °C、9000 r/min 离心 15 min, 取其上清液为 NiR 的粗蛋白液, 于 4 °C 保存备用。

1.2.6 工程菌中 NIR 的纯化

利用亲和层析柱 Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE 公司) 纯化蛋白, 纯化操作如下: (1) 装柱, 将用 20% 酒精浸泡的填料倒入玻璃柱中, 之后用 5 倍柱体积的蒸馏水冲洗, 速度约 2 mL/min。(2) 用 5~10 倍柱体积的结合缓冲液 B (20 mmol/L 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液, 500 mmol/L 的 NaCl 溶液, 8 mol/L 的尿素溶液, 20 mmol/L 的咪唑溶液, pH=7.4) 平衡柱, 速度约 2 mL/min。(3) 上粗酶液, 用结合缓冲液 B 冲洗, 速度约 1 mL/min, 用 2 mL 离心管收集冲洗后的溶液,

每管 1.5 mL; 同时用酶标仪检测每管溶液在 280 nm 处的吸光值, 直至吸光值达到基线。(4) 用洗脱缓冲液 C(20 mmol/L 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液, 500 mmol/L 的 NaCl 溶液, 8 mol/L 的尿素溶液, 500 mmol/L 咪唑溶液, pH=7.4) 洗脱, 速度约 1 mL/min, 用 2 mL 离心管收集冲洗后的溶液, 每管 1.5 mL; 同时用酶标仪检测每管溶液在 280 nm 处的吸光值, 直至吸光值达到基线。同时设立对照组为将空白质粒 pET-32a(+) 的 *E. coli* BL21(空质粒组) 和不含质粒的 *E. coli* BL21 (野生型组) 按上述诱导表达方法进行诱导表达, 并进行蛋白纯化。收集到的溶液在酶标仪 280 nm 处紫外检测, 绘制吸收峰, 比较三组的区别, 收集蛋白, 然后将收集得到的重组 NiR 蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。

2 结果与讨论

2.1 nir 基因的 PCR 扩增

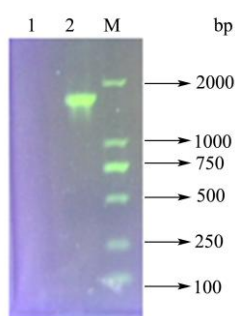


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis of PCR-amplified *nir* from *Escherichia coli* strain DMDL 9010

注: M为DNA分子量标准; 1为阴性对照; 2为PCR扩增产物。

用 DNA 提取试剂盒提取植物乳杆菌的基因组 DNA, 并以此为模板利用 PCR 扩增得到的 DNA 产物, 经过 1% 琼脂糖凝胶电泳后结果如图 1, 扩增出的条带约 1700 bp 左右, 条带单一, 明亮清晰。将该条带从琼脂糖凝胶中纯化得到的 DNA 的片段送到 Takara 公司进行测序, 测序结果如图 2。本序列只测得部分的碱基序列, 碱基共 1574 个, 将该序列在 NCBI 中进行 Blast, 得出该序列位于全基因组的 1215467-1217040, 而 *nir* 编码基因共 1638 个碱基, 位于 1215436-1217073, 该序列与 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ST-III 的相似度最高 1571/1574(99%), 与其他亚种的植物乳杆菌如 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* P-8 *Lactobacillus plantarum* ZJ316 的相似度分别有 1557/1574(99%)、1557/1574(99%)等,

由此可以得出植物乳杆菌 DMDL 9010 与 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ST-III 最为类似。

```

TTATCACCGTCACAAACGAAGCAGGCCGTATTAATTC
TTGGGAGTGGCCGTTCCGGAACATCGGTAATGACTAAGTG
TGTTAATTTGATGGGCATTTCTCTCGGGACTGATAACCTGT
TGGCACCTAGTAAGCGGATCAATCCGAAAGGCTATTTTGA
AAATAAAGATGTCATCAATATTCACAAGTCACTTGGAAGT
CGCATCCGGTACCGGCCAGCCTTCAAGGGTTACTATGATA
GCCCCAAGATTA AAAAGGACCGGGCGGCGTTAACACGT
ATCTACGAAATTTTTTTGAGAATGAACAGTATCTGGCGATA
AAAGACCCACGGATGAATGATTATATCGAATTGTGGCAAC
GTGTTTTGGCTGACGTTGAGGTTTCAGCCGGCTGAAATCGT
CTTGCTACGTAATCGATGGACGTGGTCAATTGCAATGAGC
GCGCCTGGCACCGCGATACCACGCTCGCAATGCGTCAGTG
GCAAGTCCGGACGTTGCTTTTATTACGTGATACCGACCGT
GAGCACCGCATTTTAGTCACGTACGAAGATTTGTTTGGTC
AGACGTTGACGACGTTGAAACGAATCGCGACCCAATTTAA
CTTACCGTGGACGAGCGACGAGGCGGCCCTCCAAGCGCA
AATCGATGACTTCATCGATCCAGCACTCCAAAAGAGTGAT
AGCGGTGAAAATTTAGCTGATTTTGAAGCTCGAACGGACG
TGGAACCCGATGTTAAGGCACTTTACTTACTAGGCCGTCA
AGCTGCGGCTGACCCGGATTACTTTGCCTCGGCTGAATTT
CAACAGCGCATCGACGAGATGACTGACGAGTATTTAGCCA
AGTATGGCGCTTTATATCGGGACTTTAACGTCAAGATCAAT
AGTAAAACGTTCTTTGTATTTCGGCGAAGATCAGGCCCAAG
TTGATCAGGTCAACACGACTTTACGAAATGGTCAAGTCAA
GATGGTCCGCACAGAAGCTGACAGTCATGAGGTTGCTGA
AGATTTGAGCGAACGGTTGAATAATAACGATTGCCATTC
AGACGTACCCCTTGGACTATTTAGTGGTTCGAGCAAAAAGGA
AGCCCTGAATAATTATCTCCGTAAAAACGCGAAACGCGAG
ACGTTATGGGGGATTGGGGATGCTAAAAACAATGAAATCG
TTGAAATGTTAACGACGGTCAGTGCCGAGTTAGGTGCGGA
TACGCACAACGTGGTGATTGCAGATGACTTAACAGCCATC
ATTGATGAACGTGAGCGCCGATTAGCGATTCAACATTTAGT
ACGGACGTTGCACGCGGTTGAACAGCCACCATACTTGGTC
CTGATGGCTGACGAACTGGGAACCCCTGCGTCGCAAAGT
GCGGTGACGGCTTTTATTGCTGCTGAACCGACTAAGGCAG
CACCATTACGAGATGAACAACCGGACGAAACGTTCAAGC
TGCGGACCCCGCTAGACATGGATGAGGTGGCGGCAACTTT
AACAGCGTTGTGTGCGAGTGCAGTCAAGATGAACAACA
GCAAGCCGCAATTGAACCATTTTGTAAAGTCTTAATTATGATG
AAATTTAAACGTGAAA
    
```

图 2 PCR 扩增产物的部分测序结果

Fig.2 Partial sequencing results of the PCR amplification product

PCR 得到的片段大小与植物乳杆菌中的 nir 编码基因相一致，并且该片段的被测得的序列与植物乳杆菌中的 nir 编码基因相似度也很高。由此，该引物设计成功，能够克隆出目的片段。

2.2 重组克隆载体的 PCR 鉴定和双酶切鉴定

重组质粒双酶切后进行电泳，结果如图 3，从图中可以明显看到槽 1、2 均有两个明显清晰的条带，而槽 3、4 却只有一个明显清晰的条带，由此说明在 GAATTC、CTCGAG 的位点处，重组的质粒能够成功地经 EcoRI 和 XhoI 分别双酶切成两条片段，而空白质粒（阴性对照）却在 GAATTC、CTCGAG 的位点处只能切成一条片段，说明重组质粒 pET-32a(+)-Nir 构建成功；同时，本文也通过 PCR 再次验证该重组质粒是否构建成功，由重组质粒进行 PCR 后的结果（图 4）看出以重组质粒 pET-32a(+)-Nir 为模板可以扩增出 DNA 片段，而以空白质粒 pET-32a(+)（阴性对照）则扩增不出 DNA 片段，再次说明重组质粒 pET-32a(+)-Nir 构建成功。

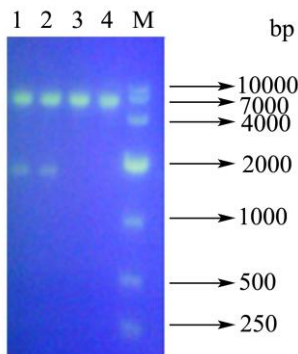


图 3 重组质粒进行双酶切鉴定电泳图

Fig.3 Gel electrophoresis of double-enzyme verification of recombinant plasmid

注：M为DNA分子量标准；1，2为双酶切重组质粒；3，4为阴性对照。

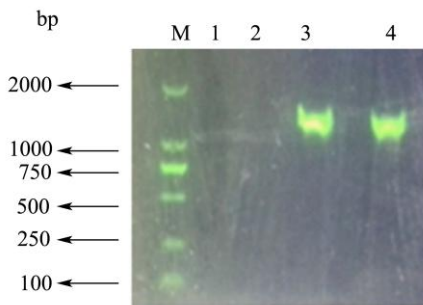


图 4 重组质粒进行 PCR 产物鉴定电泳图

Fig.4 Gel electrophoresis of PCR verification of recombinant plasmid

注：M为DNA分子量标准；1，2为阴性对照；3，4为PCR

扩增产物。

表 2 重组菌降解亚硝酸盐的效果^a

Table 2 Nitrite degradation by the recombinant bacterial strain

样品	1	2	3	平均值
重组组	0.051	0.067	0.045	0.054
无质粒组	0.525	0.543	0.525	0.531
不加菌组	0.567	0.592	0.582	0.580

注：a表2中的1、2、3指实验的三组平行；利用盐酸萘乙二胺的方法测定亚硝酸盐的含量，表中数值为540 nm处的吸光值。

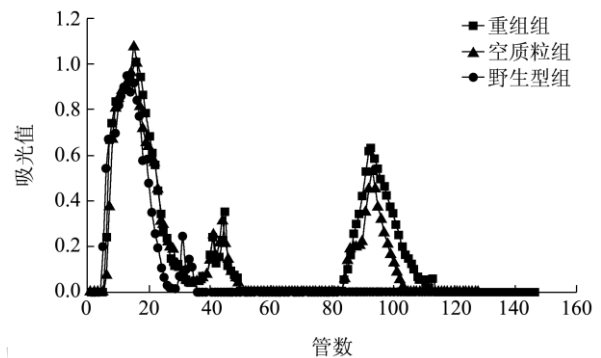


图 5 不同菌株的粗酶液通过亲和层析柱的过程中的蛋白质分离层析图

Fig.5 Protein content after purification of total protein by affinity chromatography of different strains

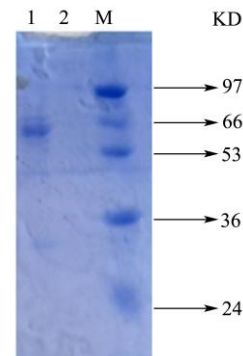


图 6 亲和层析纯化后 NiR 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.6 SDS-PAGE pattern of NiR purified by affinity chromatography

注：M为蛋白质分子量标准；1为纯化后的蛋白；2为阴性对照。

2.3 工程菌中 NiR 降解活性的比较

下表2为重组组、无质粒组和不加菌组三组培养液中未被降解的NaNO₂在540 nm处的吸光值的结果，从中可以看出加入了重组工程菌（重组组）的NaNO₂被降解了90%，而无质粒组和不加菌组的两组对照组中，NaNO₂含量无降解。由此可得，工程菌 pET-32a(+)-Nir-BL21能够表达重组蛋白NiR，且该蛋白能够有效的降解NaNO₂。

2.4 工程菌中 NiR 的纯化

重组组、空质粒组和野生型组三组试验洗脱得到的蛋白含量变化表如图5所示,所有的试验组诱导得到的粗蛋白液分别在20 mM咪唑下洗脱至基线,即将不能粘附至亲和层析柱上的蛋白质均洗脱下来,然后用500 mM咪唑将亲和层析柱上粘附的蛋白洗脱下来。从图中可以看出,不含质粒的*E.coli* BL21(野生型组)洗脱液中不含有蛋白,说明*E. coli* BL21表达的蛋白不能粘附在亲和层析柱Ni Sepharose 6 Fast Flow上,而含重组质粒pET-32a(+)-Nir的*E. coli* BL21(重组组)和含空白质粒pET-32a(+)-Nir的*E. coli* BL21(空质粒组)洗脱液能洗脱得到蛋白,说明质粒能在*E. coli* BL21中成功表达,即工程菌pET-32a(+)-Nir-BL21中的表达载体pET-32a(+)-Nir在IPTG诱导下能够成功表达重组蛋白,该重组蛋白的N端会带有一个HIS标签,该HIS标签中的组氨酸能高度亲和到亲和层析柱Ni Sepharose 6 Fast Flow上的Ni²⁺。因此,工程菌诱导表达得到的重组蛋白能粘附到亲和层析柱Ni Sepharose 6 Fast Flow上,并能利用咪唑洗脱下来。对纯化后的重组蛋白经12.5%分离胶的SDS-PAGE检测,同时从空质粒组中洗脱得到的蛋白为电泳的阴性对照,其电泳图见图6,从图中可见,得到纯度较高的重组菌中目的蛋白为亚硝酸盐还原酶,其单体分子量约为60 kDa,与文献[11、14]的报道的cd1型的大小相近,文献^[5]指出铜型NIR的编码序列是高度保守的,但是植物乳杆菌NIR的编码序列与其他乳酸菌的全基因进行Blast时,其相似度不高,因而推测来自植物乳杆菌DMDL 9010的NiR可能为cd1型的,而不是铜型。

3 结论

本研究成功地将植物乳杆菌的NiR基因连接到了原核表达载体pET-32a(+)上,然后将重组载体pET-32a(+)-Nir转化到表达载体*E. coli* BL21中,利用IPTG进行诱导表达后纯化。通过研究可知重组工程菌能降解培养基中90%的NaNO₂,说明工程菌的降解能力很高。当OD₆₀₀≈0.5时,用终浓度为1 mmol/L的IPTG在30℃下诱导培养4 h, NiR能在细胞内得到大量表达,同时利用超声破碎法得到工程菌的粗蛋白液。将粗蛋白液利用镍亲和层析法纯化,得到了纯度较高的NiR。本研究利用基因重组技术成功地构建了重组质粒pET-32a(+)-Nir和工程菌pET-32a(+)-BL21,该工程菌能有效降解NaNO₂,并利用亲和层析的方法纯化得到高纯度的NiR。在以后的研究将在NiR蛋白结构、酶学性质等方面展开,从而更详细地了解植物乳杆菌

DMDL 9010中的NiR,为其工业化应用奠定基础。

参考文献

- [1] 赵建平.蔬菜硝酸盐积累生理机制研究进展[J].中国农学通报,2005,21(1):93-96
ZHAO Jian-ping. Progress in physiological mechanism of nitrate accumulation in vegetable [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(1): 93-96
- [2] 马鹏飞,马林,孙君社,等.减少食品中亚硝酸盐危害的研究进展[J].食品科学,2005,26(z1):170-172
MA Peng-fei, MA Lin, SUN Jun-she, et al. Development of reducing the hazard of the nitrite in food [J]. Food Science, 26(z1): 170-172
- [3] Marzia A, Zumft WF, Cutruzzia F. Expression of a fully functional cd1 nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas stutzeri* [J]. Protein Expression and Purification, 2003, 27(1): 42-48
- [4] Zumft WG. Cell Biology and molecular basis of denitrification [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 533-616
- [5] Han C, Wright GS, Fisher K, et al. Characterization of a novel copper-haem c dissimilatory nitrite reductase from *Ralstonia pickettii* [J]. The Biochemical Journal, 2012, 444(2): 219-226
- [6] 张馨月,刘冬梅,许喜林,等.LCR6013降解亚硝酸盐的途径及其亚硝酸盐还原酶的初步定位[J].现代食品科技, 2013, 29(11):2627-2632,2662.
ZHANG Xin-yue, LIU Dong-mei, XU Xi-lin, et al. The degradation pathway of nitrite by LCR 6013 and the primary localization of its nitrite reductase [J]. Modern Food Sciences and Technology, 2013, 29(11): 2627-2632, 2662
- [7] 刘冬梅,费永涛,王盼,等.通过L-乳酸脱氢酶1的上下游DNA序列鉴定*Lactobacillus* sp. DMDL9010[J].华南理工大学学报(自然科学版),2014,42(3):137-144
LIU Dong-mei, FEI Yong-tao, WANG Pan, et al. Identification of *Lactobacillus* sp. DMDL 9010 by upstream and downstream DNA sequences of L-lactate dehydrogenase 1 [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2014, 42(3): 137-144
- [8] Fukuda Y, Tamada T, Takami H, et al. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of GK0767, the copper-containing nitrite reductase from *Geobacillus kaustophilus* [J]. Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications, 2011, 67(6): 692-695
- [9] Ferroni FM, Guerrero SA, Rizzi AC, et al. Over-expression,

- purification, and biochemical and spectroscopic characterization of copper-containing nitrite reductase from *Sinorhizobium meliloti* 2011. Study of the interaction of the catalytic copper center with nitrite and NO [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2012, 114(9): 8-14
- [10] Nojiri M, Shirota F, Hira D, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the soluble domain of PPA0092, a putative nitrite reductase from *Propionibacterium acnes* [J]. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications, 2009, 65(2): 123-127
- [11] Hirasawa M, Tripathy JN, Sommer F, et al. Enzymatic properties of the ferredoxin-dependent nitrite reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for hydroxylamine as a late intermediate in ammonia production [J]. Photosynthesis Research, 2010, 103(2): 67-77
- [12] 何婷婷. 植物乳杆菌亚硝酸盐还原酶编码基因的研究[D]. 上海:上海师范大学,2012
- HE Ting-ting. Sequence Analysis of nitrite reductase Gene of *Lactobacillus Plantarum* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2012
- [13] Coleman KJ, Cornish-Bowden A, Cole JA. Purification and properties of nitrite reductase from *Escherichia coli* K12 [J]. Biochemical Journal, 1997, 175(2): 483-493
- [14] Vigara J, Garcia-Sanchez MI, Garbayo I, et al. Purification and characterization of ferredoxin-nitrite reductase from the eukaryotic microalga *Monoraphidium braunii* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40(5): 401-405