

研究报告

## 玉米联合固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 转座突变体系的构建

孙帅欣 程杰杰 陈云鹏\*

(上海交通大学农业与生物学院 农业部都市农业重点实验室 上海 200240)

**摘要:**【背景】长期以来,农业生产上过度施用化学氮肥造成了农田生态环境的破坏,引起土壤板结、次生盐渍化和重金属污染。此外,由于田间大量的氮素流失和淋溶导致水体富营养化和地下水污染,使得农产品硝酸盐含量超标,最终可能通过食物链危及人类的健康。因此,通过合理地开发和利用生物固氮菌,从而减少化学氮肥施用量,对于保护生态环境,促进农业的可持续生产具有十分重要的意义。【目的】对从玉米根部分离得到的联合固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 进行 Tn5 转座突变,从而创制大量的突变体,经筛选后应用于对固氮及其调控的分子机制和氮代谢调控网络解析等研究。【方法】以固氮菌 *K. radicincitans* GXGL-4A 为研究对象,通过 PCR 法克隆得到 GXGL-4A 菌株的亚硝酸还原酶基因 *nirBD*。通过构建重组质粒 pMOD-*egfp-tet*,并利用电击转化法将转座复合体导入 GXGL-4A 野生株,进行 Tn5 转座突变,从而获得大量突变菌株。【结果】筛选到 4 株亚硝酸盐还原酶活性显著降低的突变株,并克隆了突变株 M36 突变位点的侧翼序列。【结论】对玉米联合固氮菌 *K. radicincitans* GXGL-4A 进行 Tn5 转座突变是可行的,初步建立了该菌株稳定有效的插入突变技术体系。

**关键词:** *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A, 亚硝酸还原酶, Tn5 转座突变

## Generation of Tn5 insertion mutations in nitrogen-fixing bacterium *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A associated with maize

SUN Shuai-Xin CHENG Jie-Jie CHEN Yun-Peng\*

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Key Laboratory of Urban Agriculture, Ministry of Agriculture, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** [Background] The long-term excessive use of chemical nitrogen fertilizers in agriculture has already caused ecological destruction of farmland. The direct consequences are soil compaction, secondary salinization and heavy metal pollution. Moreover, a large amount of nitrogen leaching loss of field could lead to eutrophication and groundwater pollution. The nitrate

**Foundation item:** National Basic Research Program of China (973 Program) (2015CB755702)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34206620; E-mail: ypchen7274@sjtu.edu.cn

**Received:** November 02, 2017; **Accepted:** December 11, 2017; **Published online** (www.cnki.net): December 20, 2017  
**基金项目:** 国家重点基础研究发展规划(973 计划) (2015CB755702)

\*通信作者: Tel: 86-21-34206620; E-mail: ypchen7274@sjtu.edu.cn

**收稿日期:** 2017-11-02; **接受日期:** 2017-12-11; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-12-20

content of agricultural products may exceed standard, and eventually human health would be threatened due to the food chain. Thus, developing the biological nitrogen-fixing (NF) bacterial agents to reduce the use of chemical nitrogen fertilizer is of great significance for environmental protection and sustainable agriculture. **[Objective]** This study aims at creating abundant mutants of an associative NF bacterial strain, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A, isolated from maize root by Tn5 insertional mutagenesis and the results will benefit for further exploration of nitrogen fixation mechanism, nitrogen metabolism and related regulatory network, and lay a solid foundation for the application of GXGL-4A in agricultural production. **[Methods]** The nitrite reductase gene *nirBD* was cloned from *K. radicincitans* GXGL-4A by PCR. Meanwhile, a Tn5 transposon plasmid pMOD-egfp-tet was constructed and then transferred into the wild type GXGL-4A bacterial cells by electroporation to generate Tn5 insertional mutants. **[Results]** Large quantities of mutants were obtained, and four mutants with significant decrease in nitrite reductase activities comparing with the wild type strain GXGL-4A were identified. Subsequently, DNA sequence flanking integration site in the genome of mutant M36 were also isolated. **[Conclusion]** It is feasible and applicable for Tn5 transposon mutagenesis in the associative NF *K. radicincitans* strain GXGL-4A, and an effective and stable insertional mutagenesis system of this microorganism has been successfully established in this study.

**Keywords:** *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A, Nitrite reductase, Tn5 insertional mutagenesis

氮循环作为重要的地球生物循环之一, 与生物的生命活动息息相关<sup>[1]</sup>, 其在农业生态系统中的重要地位更是不言而喻。早在 19 世纪科学家就提出了氮循环理论, 同时发现了生物的反硝化作用<sup>[2]</sup>, 并证实了生物固氮的存在<sup>[3]</sup>。这两大氮素循环过程一直是固氮菌和反硝化细菌研究领域的热点课题。反硝化作用包括四步反应( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ), 其中  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  这一步由亚硝酸还原酶(Nir)催化, 该酶主要包括两种类型, 分别为由 *nirS* 编码的细胞色素 cd1 型亚硝酸还原酶和由 *nirK* 编码的 Cu 型亚硝酸还原酶<sup>[4-6]</sup>。然而, 反硝化作用仅是硝酸盐异化还原过程的途径之一, 硝酸盐异化还原过程的另一种途径是硝酸盐异化还原成铵(Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA), 与之相对的有硝酸盐同化还原过程<sup>[7-8]</sup>。在硝酸盐异化还原成铵途径中将  $\text{NO}_2^-$  还原为终产物  $\text{NH}_4^+$  这一步同样是由 Nir 催化的, 但不同于反硝化过程中的 Nir<sup>[9-10]</sup>。研究证实, 由 *nirBD* 编码的依赖于 NADH 的亚硝酸还原酶在硝酸盐还原过程(包括硝酸盐同化过程和异化成铵)中起到重要的催化作用<sup>[11-13]</sup>。目前, 对硝酸盐还原过程及其机理的研究较少, 对其催化过

程中的亚硝酸还原酶 Nir 的研究更是少之又少, 亟待进一步研究。

*Kosakonia* 属是新近从肠杆菌科(Enterobacteriaceae)肠杆菌属(*Enterobacter*)独立出来的新属<sup>[14-15]</sup>。早期, 我们从玉米根部分离出一株具有高效固氮能力的联合固氮菌株 GXGL-4A, 经鉴定归属于 *Kosakonia radicincitans*<sup>[16]</sup>。本文以 *K. radicincitans* GXGL-4A 为研究对象, 通过构建重组质粒 pMOD-egfp-tet, 建立 Tn5 随机插入突变体系, 筛选亚硝酸还原酶突变体, 克隆侧翼序列等手段, 以期研究在农业生态系统中 *nirBD* 基因的作用机制及亚硝酸还原酶 NirBD 在维持氮循环内稳态中的调控作用奠定坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

实验所用菌株及质粒见表 1。其中, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 是本实验室从玉米根部分离出的一株具有高效固氮能力的联合固氮菌株。目前该菌株已完成全基因组测序, GenBank 登录号为 CP015113.1。

表 1 供试菌株及质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strains/Plasmids	特性 Characteristics	来源 Source
<i>K. radicincitans</i> GXGL-4A	Wild type, Amp resistance	Isolated by this lab
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ :: <i>egfp</i>	Contain pMOD- <i>egfp</i> plasmid	Reserved by this lab
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ :: <i>tet</i>	Contain pMOD- <i>tet</i> plasmid	Reserved by this lab
pMOD- <i>egfp</i>	Contain <i>egfp</i> gene, Amp resistance	Reserved by this lab
pMOD- <i>tet</i>	Contain <i>tet</i> gene, Tet resistance	Reserved by this lab
pMOD- <i>egfp-tet</i>	Contain <i>egfp</i> and <i>tet</i> gene, Amp and Tet resistance	Constructed by this study

1.1.2 主要试剂和仪器

PCR 引物及相关分子生物学试剂均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成或购得; *Bam*H I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶购自赛默飞世尔科技公司; 细菌 DNA 抽提试剂盒(Hipure Bacterial DNA Kit)购自美基(Magen)生物公司; 亚硝酸还原酶试剂盒购自苏州科铭生物技术有限公司; PCR 产物回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; 侧翼序列克隆试剂盒(LA PCR<sup>TM</sup> *in vitro* Cloning Kit)购自宝生物工程有限公司。

96 孔酶标板, 上海少辛生物有限公司; 热循环 PCR 仪、MicroPulser 电击仪, Bio-Rad 公司; 酶标仪, Molecular Devices 公司; 超声波破碎仪, 宁波新芝科器研究所。

1.2 方法

1.2.1 GXGL-4A 亚硝酸还原酶基因克隆

从平板上挑取 *K. radicincitans* GXGL-4A 野生菌单菌落接种于含 100  $\mu$ g/mL 氨苄抗生素的 LB 液体培养基<sup>[16]</sup>中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜。参照细菌 DNA 抽提试剂盒的方法提取细菌总基因组 DNA, 提取的总 DNA 采用 1.2% (质量体积比)琼脂糖凝胶电泳检测其浓度与质量。依据 *K. radicincitans* GXGL-4A 的全基因组测序结果, 利用 Primer3web version 4.1.0 设计引物(表 2), 并以 GXGL-4A 基因组 DNA 为模板, 扩增出亚硝酸还原酶基因。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模

表 2 亚硝酸还原酶基因扩增引物

Table 2 The PCR primers used for the amplification of nitrite reductase gene

引物 Primers	核酸序列 Nucleotide sequences (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
Nir18800-F	ATTGGGCACGGCATGGTC	2 838
Nir18800-R	ATGAACCCAGATATGCCCGT	
Nir22885-F	TTGTGAAGAGCCCGCGTAAAG	2 406
Nir22885-R	ATACGTTCATAGGGCGTTGC	
Nir22890-F	GACCCGAATGTGCAAGTGG	502
Nir22890-R	GTTCGACGTAGCATACCAGC	

板 DNA (100  $\mu$ g/L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 10 min; 94  $^{\circ}$ C 1.5 min, 58  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物于 1.2% (质量体积比)琼脂糖凝胶电泳上进行检测, 产物回收纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 载体构建

出发质粒 pMOD-*egfp* 和 pMOD-*tet* 由本实验室早期构建<sup>[17]</sup>, 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 分别回收 3.5 kb 的带有增强型绿色荧光蛋白基因表达元件(*egfp*)和 1.8 kb 的四环素抗性基因片段(*tet*), 再用 T4 DNA 连接酶连接, 构建 Tn5 转座载体 pMOD-*egfp-tet*。将过夜酶连后的产物通过热激转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 恢复生长后涂布于加入氨苄(Amp)和四环素(Tet)的抗性平板上, 于 37  $^{\circ}$ C 暗培养, 12 h 后挑取单菌落进行 PCR 检测和

酶切验证。

### 1.2.3 转座复合体的制备

以质粒 pMOD-egfp-tet DNA 为模板, 采用 PCR 法扩增 Tn5 转座元件。其中, 正向引物序列为: 5'-ATTGAGGCTGCGCAACTGT-3'; 反向引物序列为: 5'-GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG-3'。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 DNA (100  $\mu$ g/L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 10 min; 94  $^{\circ}$ C 1.5 min, 57  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物采用 1.2% (质量体积比)琼脂糖凝胶电泳检测, 再用胶回收试剂盒纯化回收, 所得产物即为 Transposon DNA (100  $\mu$ g/mL)。取 2  $\mu$ L Transposon DNA、4  $\mu$ L Tn5 转座酶和 2  $\mu$ L 无菌甘油充分混匀后室温静置 30 min, 产物于-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.2.4 电击转化

制备 GXGL-4A 电转感受态细胞。在 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养 GXGL-4A 野生型菌株至 OD<sub>600</sub> 约为 0.8, 冰浴 20 min 后于 4  $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 10 min, 无菌条件下弃上清, 用等量的无菌水重悬, 再次离心, 重复 2 次。最后, 用 2 mL 电击缓冲液重悬沉淀, 分装至 1.5 mL 的离心管中备用。随后, 将 4  $\mu$ L 的转座复合体与 100  $\mu$ L 的 GXGL-4A 电转感受态细胞在离心管中混匀, 加入到预冷的电击杯中, 在电转仪上进行电击转化。电击条件为电压 2.5 kV, 时间 4 ms。电击后加入 700  $\mu$ L 的 LB 培养基于 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 恢复培养 4 h。取 200  $\mu$ L 菌液涂布于含 100  $\mu$ g/mL 氨苄、10  $\mu$ g/mL 四环素的 LB 双抗平板上, 37  $^{\circ}$ C 暗培养 24 h 后挑取转化子、鉴定并验证。

### 1.2.5 PCR 检测

以质粒 pMOD-egfp-tet 为阳性对照, 挑取转化子进行菌液 PCR。根据 Tn5 转座元件设计筛选引物, 正向引物序列为: 5'-CGGGTGTTCCTCGCATA TTGG-3'; 反向引物序列为: 5'-GTCTTGTAGTTG CCGTCGTC-3', PCR 扩增程序同 1.2.3, 目标产物

大小为 537 bp。

### 1.2.6 亚硝酸还原酶活性测定

以 GXGL-4A 野生株为对照, 从平板上挑取 Tn5 突变株单菌落接种于含 100  $\mu$ g/mL 氨苄(Amp)和 10  $\mu$ g/mL 四环素(Tet)的 LB 液体培养基中, 于 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 24 h 后, 按 1% (体积比)的接种量将活化菌株分别接种于 20 mL 含抗生素的 LB 液体培养基和 A15 限制性无氮培养基<sup>[4]</sup>中。待培养至对数生长期后, 于 6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 PBS 缓冲液重悬, 重复 2 次。冰浴条件下超声破碎细胞, 每个样品破碎 6 s, 间隔 14 s, 破碎 99 次, 功率 300 W, 获得粗酶液。酶活的测定按照亚硝酸还原酶试剂盒的说明书进行。用无菌水调零, 于 96 孔酶标板中测定各样品在 540 nm 下的吸光值, 每个处理重复 3 次。

### 1.2.7 侧翼序列克隆

提取 Tn5 突变株的基因组 DNA 后, 根据 TaKaRa 公司的 LA PCR<sup>TM</sup> *in vitro* Cloning Kit 说明书进行侧翼序列的克隆。

## 2 结果与分析

### 2.1 GXGL-4A 亚硝酸还原酶相关基因克隆

如图 1 所示, 根据 GXGL-4A 菌株全基因组设计的 3 对引物均扩增出 1 条明亮且清晰的条带。其中, Nir18800 基因对应于泳道 1 的扩增片段, 大小约为 2 800 bp; Nir22885 基因对应于泳道 2 的扩增片段, 大小约为 2 400 bp; Nir22890 基因对应于泳道 3 的扩增片段, 大小约为 500 bp, 均与预期大小一致。将各 PCR 产物回收测序, 并进行 BLAST 比对。结果表明, 克隆到的 Nir18800、Nir22885 及 Nir22890 这 3 个 GXGL-4A 菌株的亚硝酸还原酶基因序列, 与标准株 *K. radicincitans* DSM 16656 及 *K. oryzae* D4 菌株对应基因的序列相似性均达到 99%, 与标准株 *K. oryzae* Ola 51 序列相似性分别为 96%、97%、97%。由此推断 GXGL-4A 菌株的亚硝酸还原酶是由 nirBD 基因编码的、依赖于 NADH 的功能蛋白。

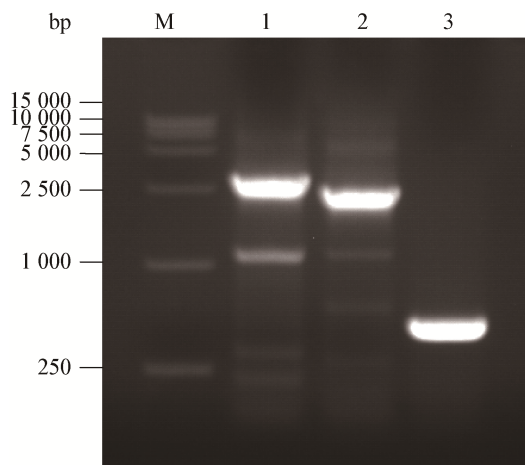


图1 固氮菌 GXGL-4A 亚硝酸还原酶基因的 PCR 扩增  
Figure 1 PCR amplification of nitrite reductase gene from nitrogen-fixing bacterial strain GXGL-4A

Note: M: DL15000 DNA marker; 1: Nir18800; 2: Nir22885; 3: Nir22890.

## 2.2 载体构建

从加入氨苄(Amp)和四环素(Tet)抗性平板上随机挑取 3 个阳性转化子 4 号、5 号、6 号菌株, 培养过夜后提取质粒进行单酶切验证, 结果如图 2 所示。同时对阳性转化子提取的质粒进行 PCR 检测, 以 *E. coli* DH5 $\alpha$  为阴性对照, 以 pMOD-*egfp* 质

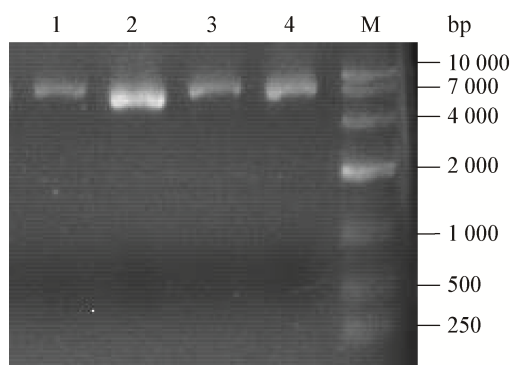


图2 重组质粒 pMOD-*egfp-tet* 单酶切验证  
Figure 2 Restriction analysis of the recombinant plasmid pMOD-*egfp-tet*

注: M: DL10000 DNA marker; 1-4: 携带 pMOD-*egfp-tet* 质粒的 DH5 $\alpha$  菌株阳性转化子。

Note: M: DL10000 DNA marker; 1-4: Positive transformants of DH5 $\alpha$  carrying plasmid pMOD-*egfp-tet*.

粒为阳性对照, 通过 *egfp* 以及 pMOD 两对引物进行 PCR 扩增。如图 3 所示, 所提取的质粒均分别通过 *egfp* 引物扩增出约 750 bp 的 *egfp* 基因片段, 以及通过 pMOD 引物扩增出约 3 kb 的 Tn5 转座元件。结果表明重组质粒 pMOD-*egfp-tet* 已构建完成并成功转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株。

## 2.3 Tn5 转座突变株的获得

将转座复合体通过电击转化到 GXGL-4A 野生菌株感受态细胞中, 24 h 后从加入氨苄(Amp)和四环素(Tet)抗性平板上挑取单菌落, 采用 PCR 法筛选阳性转化子。经多轮筛选后初步得到候选转座突变株。如图 4 所示, M11、M30、M36、M108 这

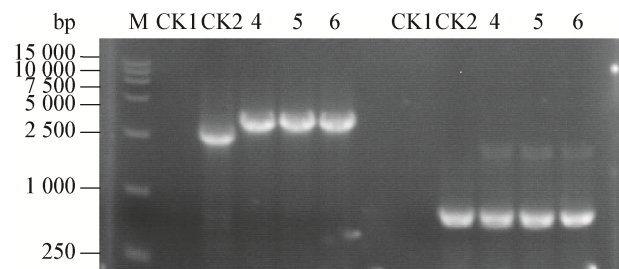


图3 阳性转化子 PCR 扩增检测

Figure 3 PCR detection of positive transformants carrying different plasmids

Note: M: DL15000 DNA marker; CK1: *E. coli* DH5 $\alpha$ ; CK2: Plasmid pMOD-*egfp*; 4-6: Plasmid pMOD-*egfp-tet*.

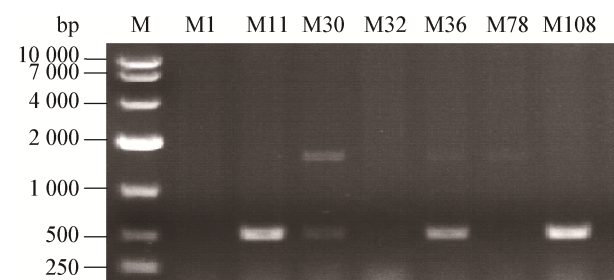


图4 转座突变株的 PCR 法筛选

Figure 4 PCR detection of putative Tn5 insertional transformants of the nitrogen-fixing strain GXGL-4A

注: M: DL10000 DNA marker; M1、M11、M30、M32、M36、M78 和 M108: 候选转化子。

Note: M: DL10000 DNA marker; M1, M11, M30, M32, M36, M78 and M108: Tn5 mutants.

4个菌株均可特异扩增出 Tn5 转座元件中的 537 bp 目标片段,产物大小与预期完全一致,表明转座元件已整合到这4个菌株的基因组中。

为进一步确定所得突变株为固氮菌野生株 GXGL-4A 突变而来,采用表 2 中的 3 对特定引物扩增该菌的亚硝酸还原酶基因片段,如图 5 所示,利用引物 Nir18800、Nir22885 和 Nir22890 分别扩增出大小为 2.8 kb、2.4 kb 及 502 bp 的目的片段,所有产物与预期大小完全一致。检测结果表明 M30、M36、M108 这 3 个转化子确为出发菌 GXGL-4A 的突变株,而并非杂菌污染。

## 2.4 亚硝酸还原酶活性测定

以 GXGL-4A 野生株为对照,分别测定 Tn5 转座突变株在富氮(LB 培养基)和无氮(A15 限制性培

养基)培养条件下的亚硝酸还原酶活性。从图 6 可以看出,除 M481 在 LB 培养基(富氮)中的亚硝酸还原酶活性与 GXGL-4A 野生株无显著性差异外,其他 3 株突变株 M36、M108 和 M386 的亚硝酸还原酶活性均显著降低。其中,突变株 M108、M386 的亚硝酸还原酶活性与 GXGL-4A 野生株差异更是达到极显著水平( $P<0.01$ )。

从图 7 可以看出,在 A15 限制性培养基(无氮)中, GXGL-4A 野生株的亚硝酸还原酶活性仍是最大,但与富氮培养条件下相比,其与突变株酶活性差异倍数明显增大。与 GXGL-4A 野生株相比,4 株突变株 M36、M108、M386、M481 的亚硝酸还原酶活性均显著降低,并且该差异达到极显著水平( $P<0.01$ )。

综合看来,除突变株 M481 外,其他菌株在 A15 限制性培养基(无氮)中的亚硝酸还原酶活性较 LB 培养基(富氮)均急剧升高,大约为 5–10 倍,而突变株 M481 在两种培养基中的酶活性差别不大。这些结果表明 Tn5 转座突变导致了固氮菌 GXGL-4A 的亚硝酸还原酶活性改变,突变株 M481 表现尤其特殊,值得进一步研究。

## 2.5 侧翼序列克隆

提取 M36 突变株基因组 DNA,对其目标基因插入位点的侧翼序列进行了克隆,并对测序结果

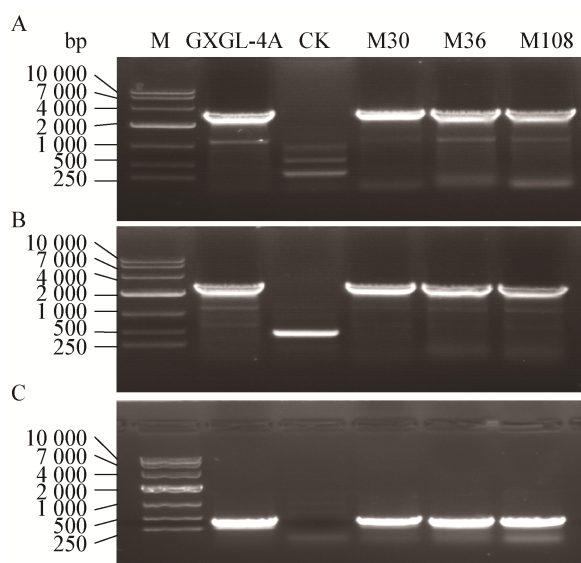


图 5 GXGL-4A Tn5 转座突变株的 PCR 验证

Figure 5 The confirmation of Tn5 insertional mutants of GXGL-4A by using PCR amplification

注: A、B、C: 分别为固氮菌 GXGL-4A 验证引物对 Nir18800、Nir22885 和 Nir22890 的扩增。M: DL10000 DNA marker; GXGL-4A: 野生型 GXGL-4A 菌株; CK: 携带 pMOD-egfp-tet 质粒的 *E. coli* DH5 $\alpha$ ; M30、M36、M108: 转座突变株。

Note: A, B, and C: The PCR amplicons using primer pairs of Nir18800, Nir22885 and Nir22890, respectively. M: DL10000 DNA marker; GXGL-4A: Wildtype strain GXGL-4A; CK: *E. coli* DH5 $\alpha$  carrying plasmid pMOD-egfp-tet; M30, M36, and M108: Tn5 mutants of GXGL-4A.

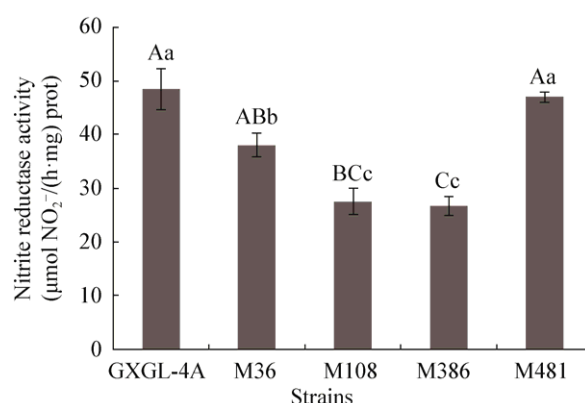


图 6 固氮菌 GXGL-4A 及其突变株在 LB 培养基中的亚硝酸还原酶活性

Figure 6 Nitrite reductase activities of GXGL-4A and its Tn5 insertional mutants cultured in LB medium



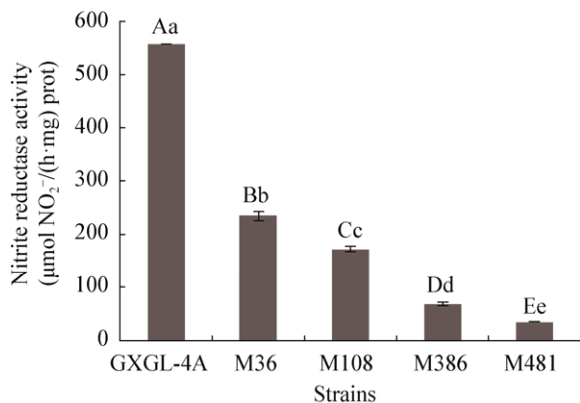


图7 固氮菌 GXGL-4A 及其突变株在 A15 无氮培养基中的亚硝酸还原酶活性

**Figure 7** Nitrite reductase activities of GXGL-4A and its Tn5 insertional mutants cultured in A15 nitrogen-free medium

进行 BLAST 比对。根据我们已经得到的玉米联合固氮菌 *K. radicincitans* GXGL-4A 的全基因组序列信息, 确认 Tn5 转座位点位于基因组上的 tRNA 2-selenouridine(34) synthase MnmH 基因内。由于该基因的插入突变, 导致了突变株 M36 亚硝酸还原酶活性的显著变化, 无论是在富氮还是无氮培养条件下, M36 与野生株 GXGL-4A 的酶活性差异均达到极显著水平( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论与结论

在无氧条件下, *nirBD* 基因能够在大肠杆菌中编码亚硝酸还原酶, 该酶通过将硝酸盐呼吸过程中产生的  $\text{NO}_2^-$  还原, 从而减缓因亚硝酸盐积累而产生的毒害作用<sup>[18]</sup>, 同时生成  $\text{NAD}^+$ <sup>[19]</sup>。在许多细菌和真菌中, NirBD 也能够参与硝酸盐同化过程, 将  $\text{NO}_2^-$  还原为  $\text{NH}_4^+$ , 进而作为氮源供微生物代谢利用<sup>[13,20]</sup>。另有研究表明, 参与硝酸盐同化还原过程由 *nasB* 基因编码的同化型亚硝酸还原酶, 与大肠杆菌细胞质内依赖于 NADH 的亚硝酸还原酶具有高度的相似性<sup>[19]</sup>。本文克隆了固氮菌 *K. radicincitans* GXGL-4A 的亚硝酸还原酶基因, 并通过 BLAST 比对后, 推测 GXGL-4A 菌株的亚硝酸还原酶是由 *nirBD* 基因编码的依赖于 NADH 的

NirBD。同时, 通过分析发现, Nir18800 基因序列分别与 Nir22885 基因和 Nir22890 基因具有高度的相似性, 但结构不同, 表明 GXGL-4A 菌株中存在两种不同结构的亚硝酸还原酶, 但其功能是否一致, 是仅作为异化型亚硝酸还原酶参与 DNRA 过程? 还是仅作为同化型亚硝酸还原酶参与硝酸盐同化过程? 抑或两种功能并存? 这都有待今后通过相关实验进一步研究。目前, 尚未发现关于 tRNA 2-selenouridine(34) synthase MnmH 调控细菌亚硝酸还原酶活性的相关报道, 该基因的突变对亚硝酸还原酶是否有调控作用, 为何会引起亚硝酸还原酶活性的显著降低等问题需要通过互补实验等加以验证和解析。

Tn5 转座突变在革兰氏阴性菌中的研究已相对成熟<sup>[21-22]</sup>, 结合电击转化法能够快速筛选到大量的突变菌株, 进而构建突变文库。同时, 由于 Tn5 插入突变的随机性, 能够获得类型多样的突变株, 这为今后研究不同基因之间的作用机制等提供了可能。本文初步建立了固氮菌 GXGL-4A 的转座突变体系, 并成功获得了多株亚硝酸还原酶突变株, 所得结果为深入阐明固氮菌 GXGL-4A 的生物固氮机制, 剖析其氮素合成及循环利用途径等打下良好的基础。

### REFERENCES

- [1] Denk TRA, Mohn J, Decock C, et al. The nitrogen cycle: a review of isotope effects and isotope modeling approaches[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 105: 121-137
- [2] Elmerich C, Newton WE. Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations[M]. Dordrecht: Springer, 2007: 1-16
- [3] Jodin M. Du rôle physiologique de l'azote, faisant suite à un précédent travail présenté à l'Académie dans la séance du 28 Avril 1862[J]. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, 1862, 55: 612-615
- [4] Gong P, Wang LY, Shang LG, et al. The transcriptional regulation and functional identification of nitrite reductase *nirS* in *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 93-100 (in Chinese)  
弓湃, 王丽英, 尚立国, 等. 固氮施氏假单胞菌亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 转录特性及功能鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 93-100
- [5] Silver WL, Herman DJ, Firestone MK. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils[J]. Ecology, 2001, 82(9): 2410-2416

- [6] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiology and Molecular Biology Review, 1997, 61(4): 533-616
- [7] Yin SX, Shen QR. Physiological and biochemical characteristics of nitrate reducers in anaerobic soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(4): 624-630 (in Chinese)  
殷士学, 沈其荣. 缺氧土壤中硝态氮还原菌的生理生化特征[J]. 土壤学报, 2003, 40(4): 624-630
- [8] Yoon S, Cruz-García C, Sanford R, et al. Denitrification versus respiratory ammonification: environmental controls of two competing dissimilatory  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  reduction pathways in *Shewanella loihica* strain PV-4[J]. The ISME Journal, 2015, 9(5): 1093-1104
- [9] Woods DD. The reduction of nitrate to ammonia by *Clostridium welchii*[J]. Biochemical Journal, 1938, 32(11): 2000-2012
- [10] van den Berg EM, Rombouts JL, Kuenen JG, et al. Role of nitrite in the competition between denitrification and DNRA in a chemostat enrichment culture[J]. AMB Express, 2017, 7: 91
- [11] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence[J]. Nature, 1998, 393(6685): 537-544
- [12] Lin JT, Stewart V. Nitrate assimilation by bacteria[J]. Advances in Microbial Physiology, 1997, 39: 1-30
- [13] Malm S, Tiffert Y, Micklinghoff J, et al. The roles of the nitrate reductase NarGHJ, the nitrite reductase NirBD and the response regulator GlnR in nitrate assimilation of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Microbiology, 2009, 155(4): 1332-1339
- [14] Brady C, Cleenwerck I, Venter S, et al. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(5): 309-319
- [15] Li YY. Systematic taxonomy of bacteria belonging to the genus *Kosakonia* based on the whole genome sequences[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)  
李媛媛. 基于全基因组序列系统分类 *Kosakonia* 属的细菌[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016
- [16] Li QJ, Cheng JJ, Sun SX, et al. Isolation, identification and characterization of associative nitrogen-fixing endophytic bacterium *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A in maize[J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2456-2463 (in Chinese)  
李琼洁, 程杰杰, 孙帅欣, 等. 玉米联合固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 的分离鉴定与固氮特性研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2456-2463
- [17] Shen XQ, Hu XL, Liu T, et al. Construction of GFP-labeled Tn5 insertion mutants of *Bacillus pumilus* and *gfp* expression analysis[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2012, 30(4): 15-20 (in Chinese)  
沈新迁, 胡晓璐, 刘通, 等. GFP 标记的短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*)转座突变株的构建初探[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30(4): 15-20
- [18] Stewart V. Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1994, 66(1/3): 37-45
- [19] Page L, Griffiths L, Cole JA. Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria[J]. Archives of Microbiology, 1990, 154(4): 349-354
- [20] Yukioka Y, Tanahashi T, Shida K, et al. A role of nitrite reductase (NirBD) for NO homeostatic regulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(1): fnw241
- [21] de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, et al. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(11): 6568-6572
- [22] Nian HJ, Chen LM, Li KZ. Application of Tn5 transposon mutagenesis technology in molecular and genetic researches of gram-negative bacteria[J]. China Biotechnology, 2009, 29(12): 114-118 (in Chinese)  
年洪娟, 陈丽梅, 李昆志. Tn5 转座突变技术在革兰氏阴性细菌分子遗传研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12): 114-118