

沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* 2-8 的亚硝酸盐还原酶基因克隆和序列分析

陈燕红 程萍 喻国辉* 潘丽晶

(珠海市农业科学研究中心 广东 珠海 519075)

摘要: 沼泽红假单胞菌 2-8 具有亚硝酸盐还原能力, 根据不同类型亚硝酸盐还原酶保守序列设计引物, 通过 PCR 扩增的方法对 2-8 菌株的亚硝酸盐还原酶类型进行鉴定, 发现该菌株的亚硝酸盐还原酶为 Cu 型亚硝酸盐还原酶。从 2-8 菌株基因组中克隆出编码该 Cu 型亚硝酸盐还原酶的基因(*nirK*), 该基因由 1 154 个碱基对组成, 在 GenBank 数据库的登录号为 GU332847, 与沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* TIE 和 CGA009 的 *nirK* 序列相似性为 90%。互联网数据库及生物信息学分析工具分析显示, 该基因编码的由 370 个氨基酸残基组成的蛋白是铜型亚硝酸盐还原酶, 属于一型多铜氧化酶, pI 6.2, 是一种稳定蛋白, 定位于膜外或周质; 由 α 螺旋、延伸带、随机卷曲和模糊状态组成; 有 4 个 2Fe-2S 氧化还原蛋白型铁硫结合结构域和一个 4Fe-4S 氧化还原蛋白型铁硫结合结构域。经 Northern 杂交分析显示 *nirK* 基因在沼泽红假单胞菌 2-8 中以单拷贝的形式存在并表达。

关键词: 沼泽红假单胞菌, 亚硝酸盐还原酶, Cu 型亚硝酸盐还原酶, 基因克隆, 生物信息学

Cloning and sequence analysis of nitrite reductase gene from the *Rhodopseudomonas palustris* strain 2-8

CHEN Yan-Hong CHENG Ping YU Guo-Hui* PAN Li-Jing

(Zhuhai Agricultural Scientific Research Center, Zhuhai, Guangdong 519075, China)

Abstract: The nitrite reductase type of *Rhodopseudomonas palustris* strain 2-8, a denitrifying bacteria, was identified by polymerase chain reaction (PCR) and bioinformatics analysis as Cu-containing nitrite reductase (CuNiR). The gene encoding Cu-containing nitrite reductase, *nirK*, has been cloned and sequenced. The *nirK* gene was 1 154 bases in length and has significant identity with the *nirK* sequences of *Rhodopseudomonas palustris* TIE and *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, their identity were both 90%, and it has been deposited with the GenBank Data Libraries under accession number

基金项目: 广东省自然科学基金项目(No. 07009702)

* 通讯作者: Tel: 86-756-8508971; 信箱: ygh76411@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-07-26; 接受日期: 2011-02-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

GU332847. Bioinformatics analysis showed it coded a protein consisting of 370 amino acids, this protein was a kind of Cu-containing dissimilatory nitrite reductase, and it was stable, pI 6.2, located in periplasmic or out of membrane, composed of alpha helix, extended strand, random coil and ambiguous states. There were four 2Fe-2S ferredoxin-type iron-sulfur binding region signatures and one 4Fe-4S ferredoxin-type iron-sulfur binding region signature. Northern hybridization result showed this *nirK* gene presented as a single copy and has been transcribed in the cell of *Rhodopseudomonas palustris* 2-8.

Keywords: *Rhodopseudomonas palustris*, Nitrite reductase, Cu-containing nitrite reductase, Gene cloning, Bioinformatics

随着集约型养殖业的迅猛发展,我国水产养殖环境迅速恶化,养殖水体中过量的硝酸盐和亚硝酸盐严重影响水产动物的健康。尤其是过量的亚硝酸盐,严重威胁着水生生物的生命^[1-2],制约水产经济的发展;另外,亚硝酸盐的积累还会增加温室气体氧化亚氮(N_2O)的排放,破坏平流层的臭氧进而危害人类健康^[3]。亚硝酸盐在自然界主要通过同化还原和异化还原的方式被微生物降解,其中亚硝酸盐还原酶是此过程的限速酶,制约着亚硝酸盐还原的速率,并引起人们的广泛关注。

迄今为止人类共发现了4种类型的亚硝酸盐还原酶,其中 *nirK* 基因编码的可溶性含铜酶和 *nirS* 基因编码的细胞色素 cd1 还原酶被广泛研究。这两种酶在限氧和厌氧条件下以 NO_2^- 代替 O_2 作为电子受体构成氧化呼吸链,使 NO_2^- 接受电子被还原为 NO ,这两种酶虽然在结构上有差异,但是在功能和生理上并不存在任何差异^[4-5]。另外, *nrfA* 编码的细胞色素 C 亚硝酸盐还原酶和 *nasB* 编码的亚硝酸盐同化还原酶催化 NO_2^- 还原为 NH_4^+ ,两者的主要差别在于前者将 NH_4^+ 排放到细胞外,后者利用 NH_4^+ 合成氨基酸^[6-7]。不同类型亚硝酸盐还原酶的分布不存在物种专一性,同一种类型的酶可能存在于不同的物种中,不同类型的酶可能同一物种的不同个体间存在,如铜型亚硝酸盐还原酶和细胞色素 cd1 亚硝酸盐还原酶在同种微生物的不同菌株中和在不同种类的微生物中都存在,不同种类微生物中的同一类型还原酶在基因序列方面存在差异^[8],因此要研究菌株的亚硝酸盐还原酶必须首先确定其类型。

笔者在研究对虾养殖水体脱氮过程中,获得

一株高效亚硝酸盐消除沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* 2-8 菌株,将该菌株的发酵产物用于控制田间高密度凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 养殖水体的亚硝酸盐,取得良好的效果^[9]。本文通过 PCR 的方法初步确定该菌株的亚硝酸盐还原酶类型,克隆其基因并对基因序列进行生物信息学分析,为该菌株及其亚硝酸盐还原酶基因的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Taq 酶、DNA 连接酶、限制性内切酶及 DNA Marker DL10000 购自 TaKaRa 公司;质粒小量抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 生物技术有限公司;RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit)购自 QIAGEN;DIG Northern Starter Kit 购自 Roche Applied Science;PCR 引物合成和 DNA 测序均由上海英俊生物技术有限公司完成。

1.2 质粒与菌株

沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* 2-8 菌株由珠海市农业科学研究中心农业微生物学实验室从虾塘淤泥中分离筛选得到,保藏于本实验室。pMD-19-T Vector 购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存,用于质粒扩增。

1.3 PCR 引物

1.4 2-8 菌株的亚硝酸盐还原酶基因克隆和测序

1.4.1 亚硝酸盐还原酶类型确定: 根据文献报道及 4 种已知类型的亚硝酸盐还原酶保守序列设计引物(引物序列见表 1),用 TaKaRa 细菌基因组 DNA 提取

表 1 扩增所用引物
Table 1 Primers used in this paper

引物 Primers	核酸序列 Sequence (5'→3')	目的基因 Target gene	来源或参考文献 Source or reference
NirS1F	CCTAYTGGCCGCCRCART	<i>nirS</i>	[8]
NirS6R	CGTTGAACTTRCCGGTSG	<i>nirS</i>	[8] and revised
NirKF	<u>GGATCCTGCACAGCATCGACTTCCAC</u>	<i>nirK</i>	[10] and revised
NirKR	<u>GAGCTCCAGGTTGTGATTACGTACGC</u>	<i>nirK</i>	[10]and revised
NasBF	<u>GGATCCTAACCGCAATGGAAAGACTTG</u>	<i>nasB</i>	[7] and revised
NasBR	<u>GAGCTCCAGGAAACAGCGATGACCAGG</u>	<i>nasB</i>	[7] and revised
NrfAF	<u>GGATCCGCNTGYTGGWSNTGYAA</u>	<i>nrfA</i>	[11] and revised
NrfAR	<u>GAGCTCTWNGGCATRTGRCARTC</u>	<i>nrfA</i>	[11] and revised
KF	<u>GGATCCGCAAGGACCTCTACTATGATGACCC</u>	<i>nirK</i>	This study
KR	<u>GAGCTCCACAAACGTGAGCCTCGGAAA</u>	<i>nirK</i>	This study

Note: Restriction sites (*Bam*H I 和 *Sac* I) used for cloning are underlined.

试剂盒提取 2-8 菌株基因组 DNA, 琼脂糖电泳检测后-20 °C 保存备用。分别利用上述几种引物以基因组 DNA 为模板, 采用梯度 PCR (TD-PCR)^[12]的方式进行基因克隆。回收目的片段后进行 T-克隆, 蓝白斑筛选阳性克隆子并酶切鉴定后将目的克隆交与上海英俊生物技术有限公司测序。测序结果在 NCBI 网站用 BLAST 工具进行序列相似性搜索。

1.4.2 亚硝酸盐还原酶全基因序列扩增: 根据沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 基因组中 *nirK* 及其前后序列进行引物设计, 用 Primer Premier 5 软件和 DNASTar 软件对其进行评价后确定上下游引物分别为 KF 和 KR (序列见表 1), 之后交由上海英俊生物技术有限公司广州合成部合成。以 2-8 菌株的基因组 DNA 为模板, 采用上述引物进行 TD-PCR 扩增。扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 58.5 °C-68.0 °C 50 s, 72 °C 80 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后取 6 μL 反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 检测 PCR 结果。

1.4.3 全基因序列 T-克隆及测序: 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 1.4.2 中 PCR 扩增所获得的约 1.2 kb 片段, 根据 DNA 浓度及其片段长度, 取 4.5 μL 回收片段与 0.5 μL pMD-19-T, 加入 5 μL 连接缓冲液, 混匀后 16 °C 连接过夜。取 5 μL 连接液采用热击法转化大肠杆菌 DH5α, 在含 IPTG、X-gal 及氨苄青霉素的 LB 平板上挑选白色菌落, 菌落 PCR 验证成功后将

相应菌体递交上海英俊生物技术有限公司进行测序。

1.5 2-8 菌株亚硝酸盐还原酶基因的生物信息学分析

利用 GeneDoc、BLAST 等软件对测序结果进行分析, 并与 GenBank 上登录的序列进行核苷酸及推导氨基酸的比较分析, 应用互联网相关蛋白分析软件及生物信息学网站对所获得的亚硝酸盐还原酶的结构和性质进行预测分析^[13-14]。

1.6 Northern 检测 2-8 菌株亚硝酸盐还原酶基因的转录情况

利用 RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit)对 2-8 菌株的 RNA 进行提取, 以本实验克隆的 *nirK* 基因片段为模板采用地高辛标记制备探针, 探针制备方法参照 DIG Northern Starter Kit 的描述, 将此标记的探针与经甲醛变性胶的 RNA 进行杂交, 采用化学发光法以 NBT/BCIP 为发光底物对其进行检测, 具体方法参照 DIG Northern Starter Kit 的描述。

2 结果与分析

2.1 亚硝酸盐还原酶类型鉴定

分别以根据四种亚硝酸盐还原酶基因保守序列设计的 4 对引物为引物、2-8 菌株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 电泳结果(图 1)显示只有根据 *nirS* 和 *nirK* 基因保守序列设计的引物才可以扩增出片段。分别回收 *nirS* 和 *nirK* 对应的约 1.2 kb 和

0.6 kb 大小的片段, 克隆测序后在 NCBI 网站上利用 BLAST 搜索工具进行比对, 结果显示, 用 *nirS* 基因的保守引物扩增获得的 1.2 kb 片段与嗜水气单胞菌嗜水亚种 *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* 的磷酸-N-乙酰胞壁酰基五肽转移酶(Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase) 基因序列的相似性较高, 属于假阳性。用 *nirK* 基因的保守引物获得的 0.6 kb 片段与产碱粪杆菌产碱亚种 *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*, 以及其它菌株的 *nirK* 基因片段相似性达 88%。由此可以推测该菌株带有 Cu 型亚硝酸盐还原酶基因。

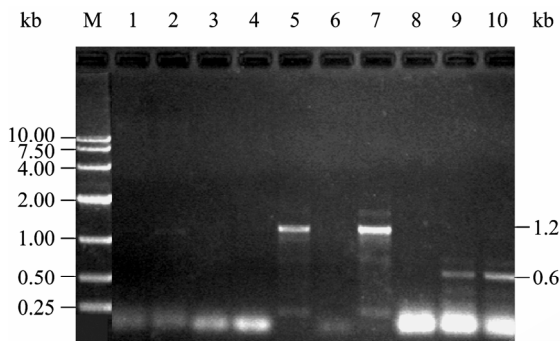


图 1 2-8 菌株 4 种亚硝酸盐还原酶基因扩增结果
Fig. 1 The PCR results of the genes of the four nitrite reductase genes

注: M: Marker DL10000; 1,2: *nasB* 基因保守引物温度梯度 PCR 扩增产物; 3,4: *nrfA* 基因保守引物温度梯度扩增产物; 5-7: *nirS* 基因保守引物温度梯度扩增产物; 8-10: *nirK* 基因保守引物温度梯度扩增产物, 目的片段大小约为 0.6 kb。

Note: M: Marker DL10000; 1,2: PCR results of *nasB*; 3,4: PCR results of *nrfA*; 5-7: PCR results of *nirS*; 8-10: PCR results of *nirK*, the size of this sequence is about 0.6 kb.

2.2 亚硝酸盐还原酶 *nirK* 全基因克隆

利用 TD-PCR 法扩增铜型亚硝酸盐还原酶基因 (*nirK*) 序列, 电泳结果(图 2)显示 PCR 产物大小约为 1.2 kb, 与预期的 1 158 bp 大小相符。

2.3 全基因序列 T-克隆及测序

回收 1.2 kb 片段后与 pMD19-T 载体连接, 获得重组克隆质粒 pMD19-T-*nirK*, 经 PCR 扩增和琼脂糖电泳检测后送往上海英俊生物技术有限公司测序。测序结果表明该片段为 1 158 bp, 与预计相符。将测序结果递交 GenBank 数据库, 获得登录号为 GU332847, 对应的氨基酸序列号为 ADA82553.1。

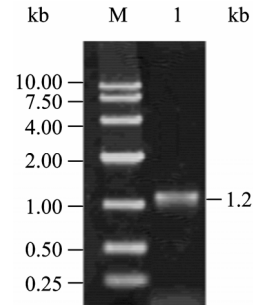


图 2 PCR 扩增铜型亚硝酸盐还原酶基因

Fig. 2 The PCR result of *nirK*

注: M: Marker DL10000; 1: PCR 产物。

Note: M: Marker DL10000; 1: PCR product.

2.4 2-8 菌株亚硝酸盐还原酶(*nirK*)基因的生物信息学分析

将 2-8 的 Cu 型亚硝酸盐还原酶基因序列与 GenBank 上登录的序列进行比对, 比对部分结果见表 2。结果发现 2-8 的 *nirK* 序列与已知 3 株沼泽红假单胞菌的相应序列(分别为 *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, Gene ID BX572606; *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1, Gene ID CP001096; *Rhodopseudomonas palustris* BisA53, Gene ID CP000463)的相似性分别为 90%、90%和 87%。

表 2 2-8 菌株与其它菌株 *nirK* 基因同源性比较不同碳源对酶活和生物量的影响

Table 2 Effect of different carbon sources on enzyme activity and cell weight of yeast			
GenBank 登录号 GenBank accession No.	来源菌株 Source	覆盖率 Query coverage	最大相似性 Max identity
BX572606	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	100%	90%
CP001096	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> TIE-1	100%	90%
CP000463	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53	85%	87%
CU234118	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	87%	84%
AB046603	<i>Alcaligenes</i> sp. STC1	83%	81%

利用 Genedoc 将该序列与 BLAST 结果相似性较高的 3 株沼泽红假单胞菌亚硝酸盐还原酶基因序列进行比对, 比对结果见图 3。结果显示, 2-8 菌株的 *nirK* 基因序列确实与 *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (BX572606)和 *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 (CP001096)的亚硝酸盐还原酶序列存在极高的相似性。

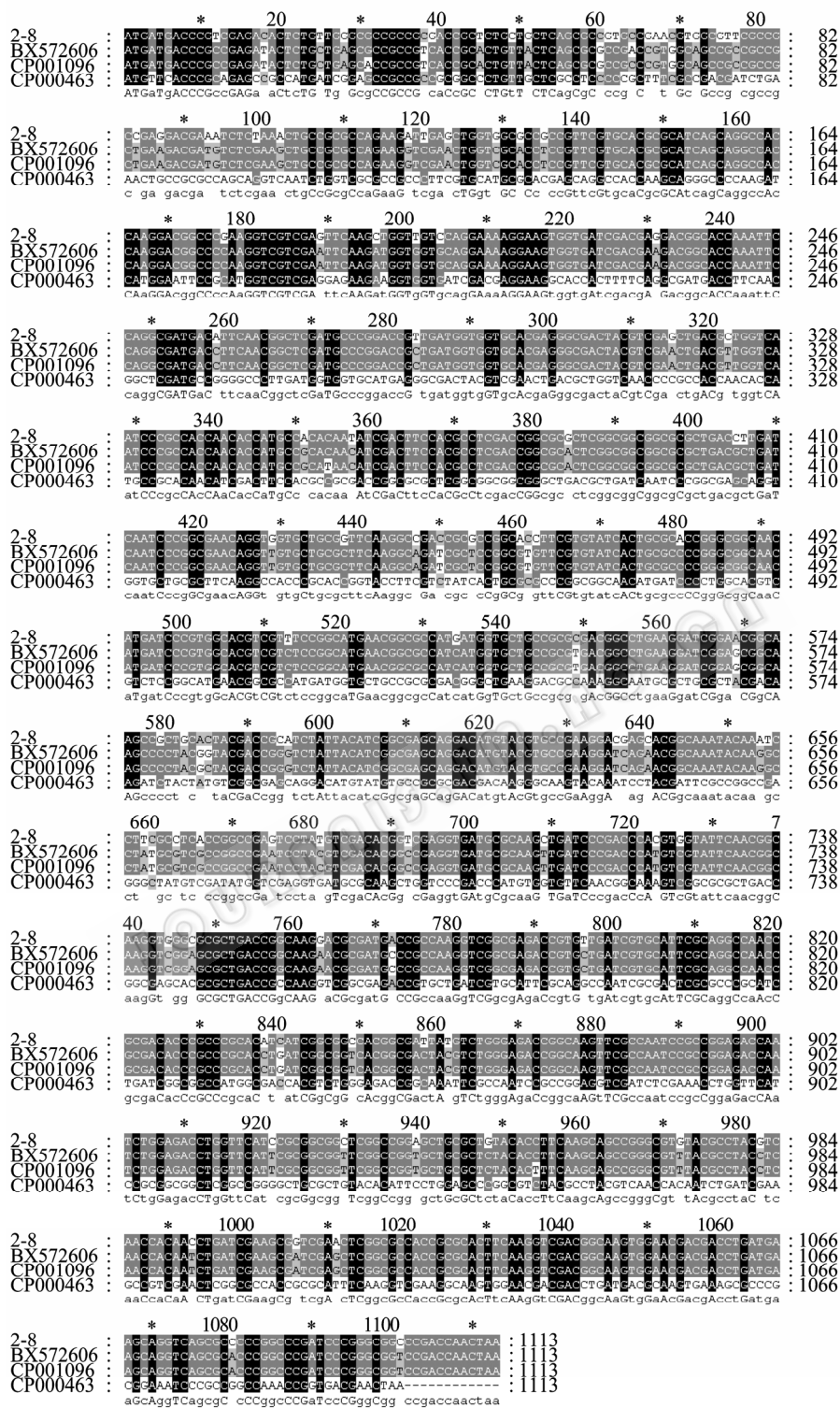


图 3 铜型亚硝酸盐还原酶基因序列比对结果

Fig. 3 Alignment of Copper-containing nitrite reductase genes

Note: 2-8: This study; BX572606: *Rhodopseudomonas palustris* CGA009; CP001096: *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1; CP000463: *Rhodopseudomonas palustris* BisA53.

利用 ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)开展的分析发现该蛋白包括 370 个氨基酸, 蛋白的分子式为 $C_{1802}H_{2801}N_{489}O_{525}S_{15}$, 分子量为 40 196.9 D; 等电点 pI 为 6.2; 其理论推导半衰期大于 10 h, 推算其不稳定参数为 24.05, 属于稳定蛋白。

PROST 服务器 (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>)定位分析发现该蛋白是一种膜外或者周质蛋白(Outer membrane or periplasmic protein)。

利用 Scanprosite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>)服务器分析预测其编码蛋白的功能域, 发现该基因编码的蛋白带有 2FE2S_FER_1 (2Fe-2S ferredoxin-type iron-sulfur binding region signature)、4FE4S_FER_1 (4Fe-4S ferredoxin-type iron-sulfur binding region signature)、EGF_1 [EGF-like domain signature 1, EGF (Epidermal growth factor)]、DEFENSIN (Mammalian defensins signature)、INTEGRIN_BETA (Integrins beta chain cysteine-rich domain signature) 等功能域。

利用 GOR IV (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred-gor4.pl>) 服务器对编码蛋白的次级结构进行分析, 结果表明该蛋白二级结构中包含 α 螺旋 (Alpha helix) 11.89%、延伸带 (Extended strand) 31.35%、随机卷曲 (Random coil) 54.86%、模糊状态 (Ambiguous states) 1.89%。利用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan>) 服务器对编码蛋白的功能分析发现该蛋白是铜型亚硝酸盐还原酶, 属于一型多铜氧化酶。

2.5 *nirK* 基因表达情况检测

利用 RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit)对 2-8 菌株的总 RNA 进行提取(图 4A), 结果显示总 RNA 是完整的。利用此 RNA 进行 Northern 杂交(图 4B), 结果显示本菌株的 *nirK* 基因以单一拷贝的形式存在, 而且能被转录。

3 讨论

环境中反硝化细菌的基因多样性可以通过多种不同的方法来确定, 二乙基二硫代氨基甲酸化合物 (Diethyldithiocarbamate)常被用于鉴别带 *nirK* 基因

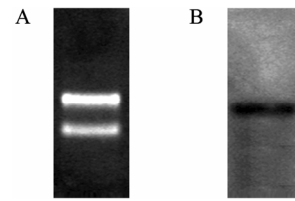


图 4 *nirK* 基因的 Northern 检测

Fig. 4 Northern result of *nirK* gene

注: A: RNA 提取结果; B: Northern 杂交结果.

Note: A: The result of RNA extraction; B: The result of northern hybrid.

的反硝化细菌; 更特异的检测可以通过抗血清的方法完成, 比如 dNirS 和 dNirK^[15], 但是某种特定菌株的亚硝酸盐还原酶血清(dNir)只与其关系比较近的细菌 DNA 反应; *nirK*^[16-17]和 *nirS*^[16,18]DNA 探针可以用于检测某一特定菌株的亚硝酸盐还原酶基因, 但是 *nirK* 基因探针与其它菌株的 DNA 序列反应较弱^[17], *nirS* 基因探针也只有有限的几个菌株的 DNA 反应^[19]。Braker 等应用 *nirK* 和 *nirS* 两套引物对几种已知反硝化细菌的亚硝酸盐还原酶基因类型进行鉴定, 确定了其有效性, 并利用这些引物检测环境样品中的反硝化细菌^[8]。本实验利用 4 种已知亚硝酸盐还原酶基因的保守引物对 2-8 的亚硝酸盐还原酶基因进行鉴定, 结果与预期一致, 在扩增 *nirS* 片段时出现了假阳性, 但可以通过序列分析排除。

以往对亚硝酸盐还原酶基因的克隆多通过基因文库筛选^[10]、Southern blot^[16]等方法, 本文用 PCR 的方法以基因组 DNA 为模板, 克隆出 *nirK* 基因。基因序列比对显示该序列与已知 *nirK* 基因相似性仅为 90%, 它们对应的氨基酸序列也只有 92%的相似性, 由此可以推测该基因编码的蛋白为一种新的蛋白, 其功能可能与已知蛋白存在一定的差异。

亚硝酸盐还原酶(*nir*)基因的保守度是不一样的, 比如 8 株人苍白杆菌 *Ochrobactrum anthropi* 的 *nirK* 片段间的相似性在 98%–100%间, 其中的 2 个片段却与粪产碱菌 *Alcaligenes faecalis* 的 *nirK* 片段 100%相似^[4]。另外 *nirS* 和 *nirK* 可以同时存在 RNAI 类型的假单胞菌 *Pseudomonas* (RNA group I) 和产碱杆菌 *Alcaligenes specie* 中^[4], 在粪产碱菌的不同菌株中都分布有这 2 种酶^[17]。本研究也发现

Rhodopseudomonas palustris TIE-1、*Rhodopseudomonas palustris* CGA009 以及 *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 BisA53 间 *nirK* 的相似性也只在 86%–100% 之间; 16S rDNA 序列进化树分析显示, 本菌株与 *Rhodopseudomonas* sp. TUT3625 菌株相似性最高, 为 99%, 但是该菌株的 *nirK* 序列与 *Rhodopseudomonas* sp. RO3 菌株的部分序列只有 91% 的相似性。通过 Northern 杂交分析, 本研究菌株的 *nirK* 基因以单拷贝的形式存在, 并在没有底物存在的情况下表达。本文利用现代生物信息学手段对该菌株 *nir* 基因编码的蛋白的性质和结构进行分析, 获得更多相关知识并为将来基因改造奠定基础, 以便探索高效处理亚硝酸盐的方法。

参 考 文 献

- [1] Jensen FB. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Part A, 2003, 135(1): 9–24.
- [2] Dave G, Nilsson E. Increased reproductive toxicity of landfill leachate after degradation was caused by nitrite[J]. Aquatic Toxicology, 2005, 73(1): 11–30.
- [3] Addiscott TM, Benjamin N. Nitrate and human health[J]. Soil Use and Management, 2004, 20(2): 98–104.
- [4] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 533–616.
- [5] Glockner AB, Jüngst A, Zumft WG. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. Archives of Microbiology, 1993, 160(1): 18–26.
- [6] Einsle O. Structure and function of cytochrome c nitrite reductase[D]. Konstanz: Universität Konstanz, 1999.
- [7] Olmo-Mira MF, Cabello P, Pino C, et al. Expression and characterization of the assimilatory NADH-nitrite reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1[J]. Archives of Microbiology, 2006, 186(4): 339–344.
- [8] Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples[P]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3769–3775.
- [9] 喻国辉, 陈远凤, 陈燕红, 等. 一株高效利用亚硝态氮的沼泽红假单胞菌及其应用[P]. 中国: ZL200710089906.5. [2007-10-10].
- [10] Tosques IE, Kwiatkowski AV, Shi J, et al. Characterization and regulation of the gene encoding nitrite reductase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3.[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(4): 1090–1095.
- [11] Smith CJ, Nedwell DB, Dong LF, et al. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(11): 3612–3622.
- [12] 迪芬巴赫 CW, 德维克斯勒 GS. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 35.
- [13] 欧阳平. 生物信息学数据库与序列分析[J]. 生物学通报, 2007, 42(1): 24–25.
- [14] Park JH, Aravind L, Wolff EC, et al. Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: A HEAT-repeat-containing metalloenzyme[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(1): 51–56.
- [15] Ward BB, Cockcroft AR, Kilpatrick KA. Antibody and DNA probes for detection of nitrite reductase in seawater[J]. Journal of general microbiology, 1993, 139(9): 2285–2293.
- [16] Ye RW, Fries MR, Bezborodnikov SG, et al. Characterization of the structural gene encoding a copper-containing nitrite reductase and homology of this gene to DNA of other denitrifiers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 59(1): 250–254.
- [17] Kloos K, Fesefeldt A, Gliesche CG, et al. DNA-probing indicates the occurrence of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium*. Distribution of denitrifying and nitrogen fixing isolates of *Hyphomicrobium* in a sewage treatment plant[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, 18(3): 205–213.
- [18] Von Berg KHL, Bothe H. The distribution of denitrifying bacteria in soils monitored by DNA-probing[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 86(4): 331–340.
- [19] Ward BB. Diversity of culturable denitrifying bacteria: limits of rDNA RFLP analysis and probes for the functional gene, nitrite reductase[J]. Archives of Microbiology, 1995, 163(3): 167–175.