

研究快报

嗜盐古菌 *Haloferax* sp. D1227 中超氧化物歧化酶功能鉴定及其增强细菌耐盐性的研究

冯莉 许楹* 周宁一

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【背景】细菌、酵母或植物来源的超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)编码基因在异源宿主中表达并提高宿主耐盐性的研究已有一些报道,其异源宿主也多为植物,而古菌来源的超氧化物歧化酶编码基因在细菌中成功表达并提高其耐盐性的研究尚无报道。【目的】寻找嗜盐古菌 *Haloferax* sp. D1227 中的超氧化物歧化酶编码基因并鉴定其功能,将其在 4-硝基苯酚降解细菌 *Burkholderia* sp. SJ98 中表达,研究该古菌的超氧化物歧化酶对菌株 SJ98 耐盐性和降解 4-硝基苯酚功能的影响。【方法】通过生物信息学方法寻找嗜盐古菌 D1227 中潜在的超氧化物歧化酶编码基因,利用表达载体 pET-28a 和广泛宿主载体 pBBR1MCS-2 将其分别在 *E. coli* BL21(DE3)和 4-硝基苯酚的降解菌株 SJ98 中异源表达,检测细胞抽提液和纯化蛋白的超氧化物歧化酶比活力。分别以葡萄糖和 4-硝基苯酚为碳源,在 M9 培养基和添加 500 mmol/L NaCl (NaCl 含量约 3%)的 M9 培养基中分别培养细菌 SJ98 的重组菌株和空载体重组菌株,利用全自动生长曲线分析仪和高效液相色谱等方法检测重组菌株的生长能力和对 4-硝基苯酚的降解能力。【结果】通过生物信息学分析,在嗜盐古菌 D1227 基因组中发现了潜在的超氧化物歧化酶编码基因 *sodA*,其在 *E. coli* BL21(DE3)和菌株 SJ98 中分别异源表达均具有超氧化物歧化酶活力[细胞抽提液的比活力分别为 21.07 ± 0.02 U/mg 和 84.56 ± 0.16 U/mg,从 BL21(DE3)菌株纯化的蛋白 SodA_{D1227} 比活力为 179.46 ± 3.43 U/mg]。在添加 500 mmol/L NaCl 的 M9 培养基中培养时,以葡萄糖为碳源,重组菌株 SJ98[pBBR-*sodA*]仍可正常生长,而空载体对照菌株 SJ98[pBBR1MCS-2]几乎丧失了生长能力;以 4-硝基苯酚为碳源,菌株 SJ98[pBBR-*sodA*]保持了利用底物生长和降解底物的能力,而菌株 SJ98[pBBR1MCS-2]的生长和降解能力几乎丧失。用软件 Phyre2 模拟分析 SodA_{D1227} 的单体结构,该蛋白拥有 Fe/Mn-SOD 家族的典型结构特征,推测其属于 Fe/Mn-SOD 家族。【结论】本研究为利用古菌 SOD 对细菌进行改造以适应高盐环境中降解有机污染物的应用提供了潜在的可行性。

关键词: 嗜盐古菌 *Haloferax* sp. D1227, 超氧化物歧化酶, *Burkholderia* sp. SJ98, 耐盐, 4-硝基苯酚

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31570100)

***Corresponding author:** Tel/Fax: 86-21-34208261; E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

Received: March 23, 2018; **Accepted:** April 12, 2018; **Published online** (www.cnki.net): May 29, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31570100)

***通信作者:** Tel/Fax: 86-21-34208261; E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-23; **接受日期:** 2018-04-12; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-05-29

Enhancement of bacterial salt tolerance by a newly identified superoxide dismutase from archaea *Haloferax* sp. D1227

FENG Li XU Ying* ZHOU Ning-Yi

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Background] Heterologous expression of many superoxide dismutases (SODs) from bacteria, yeast or plants have been reported to improve the salt tolerance of the host, but few from archaea. In particular, no SODs from archaea has been expressed in bacteria to improve their salt tolerance. [Objective] We are aiming to mine putative SODs encoding genes in archaea *Haloferax* sp. D1227, and to identify its biochemical function. It is also our intention to see possible enhancement of salt tolerance in *para*-nitrophenol utilizer *Burkholderia* sp. SJ98, by introducing the newly identified SOD. [Methods] The putative SOD encoding gene from strain D1227 was mined by bioinformatics analysis before its heterologous expression in *E. coli* BL21(DE3) and strain SJ98, which was further purified through AKTA purifier system. The specific activity of cell extracts and purified enzyme were measured by a spectrophotometry. Cells of strain SJ98 with the SOD gene and with vector only were cultured in M9 medium (with 0 and 500 mmol/L NaCl) with glucose or PNP as carbon source, respectively. Subsequently, the growth and degradation of these strains were detected by automatic growth curve analyzer and high-performance liquid chromatography. [Results] A putative SOD encoding gene from *Haloferax* sp. D1227 was found and designated *sodA*. *SodA*_{D1227} heterologous expressed in both *E. coli* BL21(DE3) and strain SJ98 exhibited SOD activity (with specific activities of 21.07±0.02 U/mg and 84.56±0.16 U/mg respectively in cell extracts). The specific activity of purified protein from *E. coli* was 179.46±3.43 U/mg. Strain SJ98[pBBR-*sodA*] grew well in M9 containing 500 mmol/L NaCl with glucose as carbon source, while strain SJ98[pBBR1MCS-2] almost lost its growth ability. When *para*-nitrophenol (PNP) was used as carbon source, strain SJ98[pBBR-*sodA*] still had a normal growth with a proper PNP degradation ability, while the growth and degradation ability of strain SJ98[pBBR1MCS-2] was almost lost. The structural analysis of *SodA*_{D1227} simulated by Phyre2 showed that *SodA*_{D1227} has the typical structural characteristics of the Fe/Mn-SOD family. [Conclusion] This study provides a potential feasibility for the use of archaeal SODs in transforming bacteria to adapt to the degradation of organic pollutants in high salinity environment.

Keywords: *Haloferax* sp. D1227, Superoxide dismutase, *Burkholderia* sp. SJ98, Salt tolerance, *para*-nitrophenol

自然界中存在许多极端环境如热泉、盐湖和火山等,这些栖息地上生活着许多“极端微生物”。极端微生物由于能在极端环境下生存而受到关注,以嗜盐微生物为例,因为其巨大的潜力被誉为“工业生物科技的未来之星”^[1]。*Haloferax* sp. D1227 是一株嗜盐古菌,分离自受油盐水污染的土地。古菌 D1227 的最适生长条件为含有 1.7–2.6 mol/L NaCl 的丰富培养基且最适生长温度为 45 °C^[2]。4-硝基苯酚(*para*-nitrophenol, PNP)被广泛应用于除草剂、染料和农药的生产中,被美国环境保护署(U.S.

environmental protection agency)列为“优先污染物”。*Burkholderia* sp. SJ98 可以利用 PNP 作为唯一碳源和能源进行生长^[3],其降解 PNP 的代谢途径也已被阐明^[4]。

高盐废水是指总含盐质量分数至少为 1% 的废水,主要来自化工厂及石油和天然气的采集加工等,这种废水往往含有多种有机污染物质,去除其中的有机污染物避免对环境造成污染至关重要。目前,利用微生物降解有机污染物已有许多研究报道^[5–6],但是因为高浓度的盐类物质对微生物具有抑

制作用, 因此, 高盐环境中利用微生物降解有机污染物是研究的难点之一, 特别是高盐环境中微生物降解 PNP 尚无研究报道。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD, EC:1.15.1.1)是一类广泛存在于动植物和微生物体内的金属酶, 按其金属辅基的不同主要分为 4 类: Fe-SOD、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、Ni-SOD^[7]。SOD 是生物体防御氧化损伤的关键酶, 通过歧化反应催化超氧阴离子(O₂⁻)转化为氧气(O₂)和过氧化氢(H₂O₂), 是生物体内不可或缺的超氧阴离子自由基清除剂^[8], 在生物体的生长、发育和衰老等方面有重要作用^[9]。干旱、高温、高盐和极寒天气等许多恶劣的生存环境会对生物造成氧化损伤。已有研究报道通过提高小麦来源 SOD^[10]、麻风树来源 SOD^[11]以及盐生藻来源 SOD^[12]的表达从而提高转基因酵母^[10]、拟南芥^[11]和大肠杆菌^[12]的抗盐能力以及对其他逆境的耐受力。但是利用嗜盐古菌 SOD 提高耐盐性的研究很少, 目前仅有一例报道是将嗜盐古菌 *Natrinema* sp. 的 SOD 在水稻中过表达从而提高了其耐盐性^[13], 尚无嗜盐古菌 SOD 在细菌中表达并提高其耐盐性的报道, 而且在细菌中过表达的外源 SOD 也多是来自嗜热古菌^[14]。

本研究通过分析嗜盐古菌 D1227 基因组获得了潜在的 SOD 编码基因 *sodA*, 并在体外证明了其产物具有超氧化物歧化酶活力; 同时发现 SodA_{D1227} 在细菌菌株 SJ98 中的跨域异源表达既保持了其降解 4-硝基苯酚的能力, 又赋予细菌 SJ98 耐受高盐的能力。本研究不仅有利于更好地理解 SOD 的多样性, 还为利用古菌 SOD 对细菌进行改造以适应高盐环境中降解有机污染物的应用提供了潜在的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验所用菌株及相关质粒如表 1 所示。

1.1.2 培养基、主要缓冲液和抗生素

LB 培养基的配制参照文献[18]; BSYT 丰富培养基的配制参照文献[19]; M9 培养基参照《分子克隆实验指南》配制, 使用时加入终浓度为 2 mmol/L 的葡萄糖溶液与 0.1% 的微量元素。微量元素溶液: MnCl₂·4H₂O 36 mg, CuSO₄·5H₂O 5 mg, 加水定容至 100 mL, 用孔径为 0.22 μm 的聚醚砜微孔滤膜过滤除菌后 4 °C 保存。50 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液: 1 mol/L Na₂HPO₄ 77.4 mL, 1 mol/L NaH₂PO₄ 22.6 mL, 蒸馏水定容至 1 000 mL。20 mmol/L pH 7.4

表 1 实验中所用菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	来源 Reference or source
Strains		
<i>Burkholderia</i> sp. SJ98	Wild type, 4-nitrophenol (PNP) and 2-chloro-4-nitrophenol (2C4NP) utilizer	[15]
<i>Haloferax</i> sp. D1227	Wild type, isolated from soil contaminated with highly saline oil brine	[16]
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 lacU169</i> (φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Novagen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> WM3064	Donor strain for conjugation, 2,6-diaminopimelic acid auxotroph, <i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> Δ <i>M15</i> RP4-1360 Δ(<i>araBAD</i>)567 Δ <i>dapA1341::</i> (<i>erm pir</i> [wild type])	Novagen
Plasmids		
pET-28a(+)	Kan ^r , overexpression vector	Novagen
pUC19	Amp ^r , cloning vector	Novagen
pBBR1MCS-2	Kan ^r , broad-host-range vector	[17]
pET-28a- <i>sodA</i>	Kan ^r , <i>sodA</i> cloned into pET-28a	This study
pUC19- <i>sodA</i>	Amp ^r , <i>sodA</i> cloned into pUC19	This study
pBBR- <i>sodA</i>	Kan ^r , <i>sodA</i> cloned into pBBR1MCS-2	This study

的磷酸缓冲液: 1 mol/L Na_2HPO_4 30.96 mL, 1 mol/L NaH_2PO_4 9.04 mL, 蒸馏水定容至 1 000 mL。卡那霉素和氨苄霉素的终浓度分别为 50 mg/L 和 100 mg/L。PNP 诱导和生长的终浓度均为 0.3 mmol/L。

1.1.3 主要试剂及药品

实验所用内切酶购自 New England BioLabs 公司; 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天试剂公司; 用于回收胶、纯化、质粒提取以及基因组所用试剂盒均购自 Omega 公司; 超氧化物歧化酶活力测定试剂盒购自南京建成生物科技公司。

1.1.4 主要仪器

Perkin Elmer 紫外分光光度计、Gene Company 酶标仪、AKTA 蛋白纯化系统, GE 公司; Ni-DA Resin FF Prepacked 亲和层析柱, 金斯瑞生物科技公司; 全自动生长曲线分析仪, Bioscreen 公司; 高压液相色谱仪(HPLC), Waters 公司。

1.2 方法

1.2.1 古菌基因组 DNA 的提取和基因组测序

嗜盐古菌 D1227 在 BSYT 丰富培养基中 45 °C、200 r/min 培养 5–7 d, 收集对数期(OD_{650} 值约为 0.6–0.8)菌液, 参照文献[20]提取古菌 D1227 的基因组 DNA, 用做基因组测序(上海南方基因科技有限公司)或储存于–20 °C 作为基因扩增模板。

1.2.2 超氧化物歧化酶编码基因的克隆和跨域异源表达

对古菌 D1227 基因组序列进行生物信息学分析, 将其与已验证功能超氧化物歧化酶的序列 AAA73375.1 [*Haloferax volcanii* DS2]^[21]、AAA73374.1

[*Haloarcula marismortui*]^[21]、AAA73373.1 [*Halobacterium* sp. GRB]^[21]、P09737.3 [*Halobacterium cutirubrum* NRC-1]^[21]、AAF36989.1 [*Acidianus ambivalens*]^[22]、AAD34161 [*Aquifex pyrophilus*]^[23] 和 AFF59218 [*Dunaliella salina*]^[12] 进行 BLASTp 比对, 找到了古菌 D1227 中潜在的超氧化物歧化酶编码基因并命名为 *sodA* (GenBank 登录号为 MH101809)。以古菌 D1227 基因组 DNA 为模板, 扩增 *sodA* 基因并测序验证。序列引物设计及酶切位点如表 2 所示。

重组质粒 pUC19-*sodA* 和 pET-28a-*sodA* 转入大肠杆菌 DH5 α 或 BL21(DE3)使用化学转化法。重组质粒 pBBR-*sodA* 转入 *Burkholderia* sp. SJ98 需要在大肠杆菌 WM3064 的辅助下使用双亲结合的方法^[4]。

1.2.3 超氧化物歧化酶编码基因的表达和蛋白纯化

将菌株 BL21(DE3)[pET-28a-*sodA*]在 LB 培养基中 37 °C、175 r/min 培养, 菌株 SJ98[pBBR-*sodA*]在含有 2 mmol/L 葡萄糖的 M9 培养基中 30 °C 培养。当菌液 OD_{600} 约为 0.5 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 30 °C 诱导 5 h 后, 8 000 \times g 离心 20 min 收集菌体, 重悬于 50 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液中, 超声(40 W 功率, 工作 3 s 停 7 s, 总时间 10 min)破碎离心(10 000 r/min, 1 h)后收集上清液, 直接进行酶活力检测分析或加入 20% 甘油保存于 4 °C。

利用 HisTrap HP 亲和层析柱和 AKTA 蛋白纯化系统对 BL21(DE3)[pET-28a-*sodA*]细胞抽提液进行蛋白纯化, 其中 His 标签连接在表达蛋白的 N 端。首先用 10 倍柱体积的磷酸缓冲液平衡层析柱; 然后向层析柱中加入已过滤的细胞抽提液, 上样结束

表 2 实验中所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Purposes
<i>sodA-F</i>	CCCAAGCTTATGTCAGACTACGAACTTGACCCC	Amplification of <i>sodA</i> gene for clone with pUC19 and expression with pBBR1MCS-2
<i>sodA-R</i>	CGCGGATCCTTACTCGAAGAGTTCGACGGCCTGG	Amplification of <i>sodA</i> gene for clone with pUC19 and expression with pBBR1MCS-2
<i>sodA-EF</i>	CGCGGATCCATGTCAGACTACGAACTTGACCCC	Amplification of <i>sodA</i> gene for expression with pET-28a(+)
<i>sodA-ER</i>	CCCAAGCTTTTACTCGAAGAGTTCGACGGCCTGG	Amplification of <i>sodA</i> gene for expression with pET-28a(+)

注: 下划线为酶切位点。

Note: Specified restriction sites are underlined.

后加入缓冲液冲洗镍柱,除去未结合的蛋白和杂质;最后逐渐提高缓冲液中的咪唑浓度(40、80、150、200、250、300、500 mmol/L)对样品进行梯度洗脱,通过记录仪记录最适咪唑浓度和出峰时间,收集洗脱的蛋白样品。

1.2.4 总超氧化物歧化酶活力检测

细胞抽提液和纯化蛋白中的 SOD 活力检测使用 SOD 活力检测试剂盒。通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化反应系统产生超氧阴离子自由基,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色,当被测样品中含有 SOD 时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度值低于对照管,通过公式可计算出被测样品中的 SOD 活力。蛋白浓度检测使用 BCA (Bicinchoninic acid)蛋白浓度测定试剂盒。此处定义 1 个 SOD 活力单位(U)为 1 mg 蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量。

1.2.5 耐盐生长实验及利用高效液相色谱检测底物降解情况

重组菌株 SJ98[pBBR-*sodA*]与对照菌株 SJ98[pBBR1MCS-2]均在含有葡萄糖的 M9 培养基中 30 °C、175 r/min 培养至 *OD*₆₀₀ 值约为 0.5,然后加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 与 0.3 mmol/L 的 PNP 诱导 5 h。收集菌体并重悬于 M9 培养基中至 *OD*₆₀₀ 值约为 1.0 制成种子液。然后将种子液接种于新的含有 2 mmol/L 葡萄糖的 M9 培养基中,培养基中另加入不同浓度梯度(0、200、500、800 mmol/L)的 NaCl,每个样品 3 个重复。使用全自动生长曲线分析仪检测菌株生长情况。在检测生长与底物降解实验时,将上述种子液接入含

有 0.3 mmol/L PNP 的 M9 培养基中培养并进行生长曲线的测定。同时向取得的样品(0.4 mL)中加入等体积的甲醇后剧烈振荡 5 min 裂解细胞,然后 10 000×*g* 离心 30 min 后取上清液进行高效液相色谱分析,检测底物 PNP 的含量。色谱柱为 Agilent ZORBAX 300SB-C18 (5 μm, 250 mm×4.6 mm),流动相组成为 0.1% (体积比)的冰乙酸水溶液(A)和甲醇(B)。采用梯度洗脱程序:0–10 min, 30% B 线性增加至 80% B,并保持 5 min;然后在 0.1 min 内回到 30% B,保持 2.9 min。流速为 1.0 mL/min,进样量为 10 μL。检测波长为 254 nm。上述条件下 PNP 的保留时间为 8.5 min。

1.2.6 超氧化物歧化酶 SodA_{D1227} 结构模拟

利用软件 Phyre2 模拟 SodA_{D1227} 的单体结构。

2 结果与分析

2.1 超氧化物歧化酶编码基因的生物信息学分析

利用生物信息学分析嗜盐古菌 D1227 基因组,获得潜在的 SOD 编码基因 *sodA*,其开放阅读框全长 603 bp,预测编码 200 个氨基酸,蛋白分子量约为 22.3 kD, pI 为 4.09。将其编码的蛋白质序列分别与其他古菌中已知功能的 SOD 蛋白序列(AAA73375.1 [*Haloferax volcanii* DS2]^[21], AAA73374.1 [*Haloarcula marismortui*]^[21], AAA73373.1 [*Halobacterium* sp. GRB]^[21], P09737.3 [*Halobacterium cutirubrum* NRC-1]^[21], AAF36989.1 [*Acidianus ambivalens*]^[22]、细菌中的 SOD 蛋白序列(AAD34161 [*Aquifex pyrophilus*]^[23]及真核藻类中的 SOD 蛋白序列(AFF59218 [*Dunaliella salina*]^[12])进行序列一致性比对(表 3),可知古菌中的 SOD 是高度保守的。

表 3 超氧化物歧化酶蛋白序列一致性

Table 3 Identity of superoxide dismutases

Functional identified superoxide dismutase	SodA _{D1227} identity (%)
Superoxide dismutase [<i>Haloferax volcanii</i> DS2] [AAA73375.1]	94.0
Superoxide dismutase [<i>Haloarcula marismortui</i>] [AAA73374.1]	76.9
Superoxide dismutase [<i>Halobacterium</i> sp. GRB] [AAA73373.1]	81.0
Superoxide dismutase [<i>Halobacterium cutirubrum</i> NRC-1] [P09737.3]	81.5
Superoxide dismutase [<i>Acidianus ambivalens</i>] [AAF36989.1]	34.1
Superoxide dismutase [<i>Aquifex pyrophilus</i>] [AAD34161]	30.5
Superoxide dismutase [<i>Dunaliella salina</i>] [AFF59218]	33.5

SodA_{D1227}与 *Haloferax volcanii* DS2 中的超氧化物歧化酶(AAA73375.1)蛋白序列一致性最高,为 94%;推测 *sodA* 是嗜盐古菌 D1227 中潜在的超氧化物歧化酶编码基因。与其他已知的嗜盐古菌超氧化物歧化酶(AAA73375.1、AAA73374.1、AAA73373.1、P09737.3)进行蛋白序列比对(图 1),发现整个蛋白序列包含 Fe/Mn-SOD 家族 5 个典型的 Motif,其中 Motif II、III和 V 分别提供活性金属连接位点 His 28、His 76、His 162 和 ASP 158。

Motif V 提供主要活性位点,基本组成为 D-x-[WF]-E-H-[STA]-[FY], D 和 H 结合金属离子,具有典型的 Fe/Mn-SOD 家族蛋白结构特征^[24]。利用 MEGA 5.0 软件,采用邻位相连法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测,自举数集 1 000 次。构建的系统发育树结果显示(图 2),与 SodA_{D1227} 亲缘关系最近的是盐杆菌属 *Halobacterium* 中的 Mn-SOD,由此推测 SodA_{D1227} 隶属于 Mn-SOD 家族。

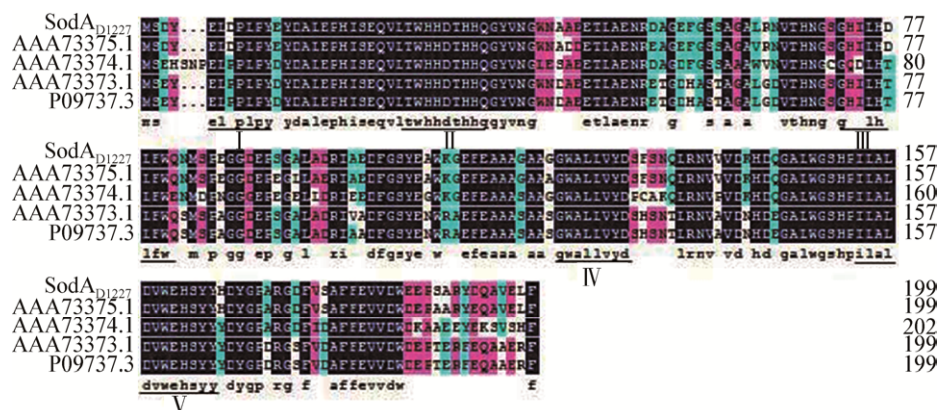


图 1 SodA_{D1227}与其他嗜盐古菌的 SOD 蛋白序列比对

Figure 1 The protein sequence alignment of SodA_{D1227} and other SODs from halophilic archaea using the DNAMAN

注:图中蛋白序列的 GenBank 登录号以及含义如下: SodA_{D1227}: *Haloferax* sp. D1227 中的 SOD; AAA73375.1: *Haloferax volcanii* DS2 中的 SOD; AAA73374.1: *Haloarcula marismortui* 中的 SOD; AAA73373.1: *Halobacterium* sp. GRB 中的 SOD; P09737.3: *Halobacterium cutirubrum* NRC-1 中的 SOD。

Note: The GenBank accession number and meaning of these sequences are as follows: SodA_{D1227}: SOD from *Haloferax* sp. D1227; AAA73375.1: superoxide dismutase [*Haloferax volcanii* DS2]; AAA73374.1: superoxide dismutase [*Haloarcula marismortui*]; AAA73373.1: superoxide dismutase [*Halobacterium* sp. GRB]; P09737.3: superoxide dismutase [*Halobacterium cutirubrum* NRC-1].

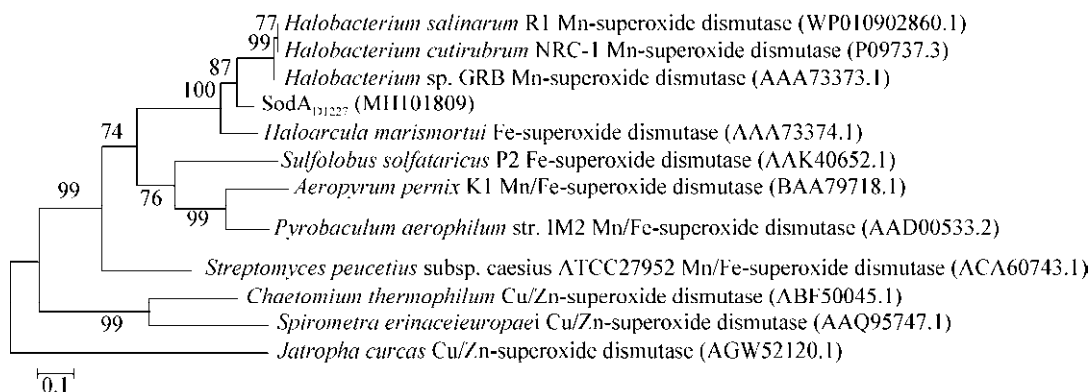


图 2 超氧化物歧化酶系统发育树

Figure 2 The phylogenetic tree of superoxide dismutases

注:括号中的序列号代表相关蛋白的 GenBank 登录号;分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类至同一分支概率;标尺刻度代表 10% 的序列差异。

Note: Numbers in parenthesis represent the sequence's accession number in GenBank; The numbers at each branch point in the percentage supported by bootstrap; Bar: 10% sequence divergence.

2.2 SodA_{D1227} 在细菌中表达检测超氧化物歧化酶活力

使用 SOD 活力检测试剂盒检测异源表达 SodA_{D1227} 的比活力,菌株 BL21(DE3)[pET-28a-*sodA*] 与菌株 SJ98[pBBR-*sodA*] 细胞抽提液的 SOD 比活力分别为 21.07 ± 0.02 U/mg 和 84.56 ± 0.16 U/mg, 分别约为对照组菌株 BL21(DE3)[pET-28a] (比活力为 11.86 ± 0.06 U/mg) 与菌株 SJ98[pBBR1MCS-2] (比活力为 28.07 ± 0.09 U/mg) 的 2 倍和 3 倍, 由此可知在大肠杆菌 BL21(DE3) 与菌株 SJ98 中异源表达的 SodA_{D1227} 均表现出超氧化物歧化酶活力。菌株 BL21(DE3)[pET-28a-*sodA*] 表达的 SodA_{D1227} 经纯化后, 该蛋白具有的 SOD 比活力为 179.46 ± 3.43 U/mg, 约为细胞抽提液比活力的 18 倍。纯化的 SodA_{D1227} 蛋白进行 SDS-PAGE (图 3), 可看到 SodA_{D1227} 在 150 mmol/L 咪唑洗脱下可得到较多蛋白, 分子量大约为 27 kD。

2.3 重组菌株 SJ98[pBBR-*sodA*] 在高盐环境中的生长

以葡萄糖为碳源, 菌株 SJ98[pBBR-*sodA*] 与对照菌 SJ98[pBBR1MCS-2] 在 M9 培养基中生长, 不额外添加 NaCl 和添加 200 mmol/L NaCl 时, 2 种菌

没有明显的差异(图 4A、B); 添加 500 mmol/L NaCl 时, 重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*] 的生长明显优于对照菌 SJ98[pBBR1MCS-2] (图 4C)。相较于低浓度 NaCl 条件, 添加 500 mmol/L NaCl 时二者生长均变迟缓, 对数期延长, 但重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*] 仅需 20 h 到达稳定期, OD_{600} 值约为 0.4; 而对照菌 SJ98[pBBR1MCS-2] 同时段生长受到抑制, 仅有微弱生长; 添加 800 mmol/L NaCl 时, 两者均不能生长(图 4D)。

2.4 重组菌株 SJ98[pBBR-*sodA*] 在高盐环境中利用 4-硝基酚生长并降解该污染物

在 M9 培养基(添加 0.01% 酵母粉)中以 PNP 为碳源进行生长和底物降解实验。不添加 NaCl 时, 菌株 SJ98[pBBR-*sodA*] 的生长略差于菌株 SJ98[pBBR1MCS-2], 2 株菌降解 PNP 没有明显差异, 均在 8.5–9.0 h 降解完毕(图 5A)。添加 500 mmol/L NaCl 时, 重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*] 的生长与降解均优于对照菌 SJ98[pBBR1MCS-2] (初始 OD_{600} 值均约为 0.09), 其中重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*] 在 48 h 后 OD_{600} 值可达 0.18, PNP 被完全降解; 而对照菌株 SJ98[pBBR1MCS-2] 利用 PNP 生长的能力受到严重影响, 几乎丧失了降解该底物的能力(图 5B)。

2.5 超氧化物歧化酶的结构

Fe/Mn-SOD 家族包含 Fe-SOD、Mn-SOD 和“可变”SOD (Cambialistic SOD), Cambialistic SOD 可利用 Fe、Mn 作为金属辅因子。Fe/Mn-SOD 通常是以二聚体或四聚体的形式存在于机体内, 不同来源的 Fe/Mn-SOD 单亚基含有保守的结构域, 与金属离子结合的活性位点高度保守^[24], 包括 3 个保守的组氨酸、1 个天冬氨酸和 1 个水分子。使用结构模拟软件 Phyre2 可模拟 SodA_{D1227} 单亚基的结构(图 6), 单亚基的 3–90 氨基酸组成 N 端 α 螺旋结构域, 95–198 氨基酸组成 C 端结构域。其中 Motif V 保守区域组成结构“DVWEHSYY”, 说明 SodA_{D1227} 是典型的 Fe/Mn-SOD 家族成员。

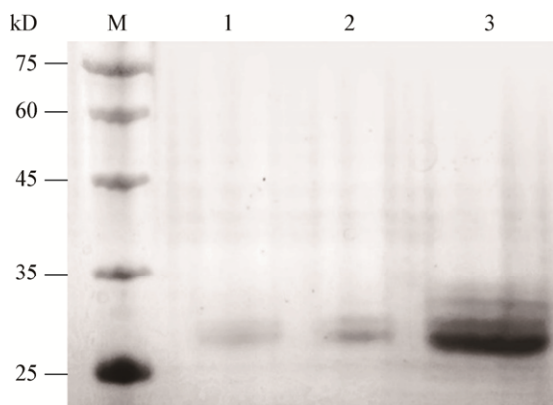


图 3 SodA_{D1227} 纯化蛋白的 SDS-PAGE 图

Figure 3 SDS-PAGE of purified SodA_{D1227}

注: M: 标准蛋白; 1: 40 mmol/L 咪唑洗脱下的蛋白; 2: 80 mmol/L 咪唑洗脱下的蛋白; 3: 150 mmol/L 咪唑洗脱下的蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: SodA_{D1227} washed from 40 mmol/L imidazole; 2: SodA_{D1227} washed from 80 mmol/L imidazole; 3: SodA_{D1227} washed from 150 mmol/L imidazole.

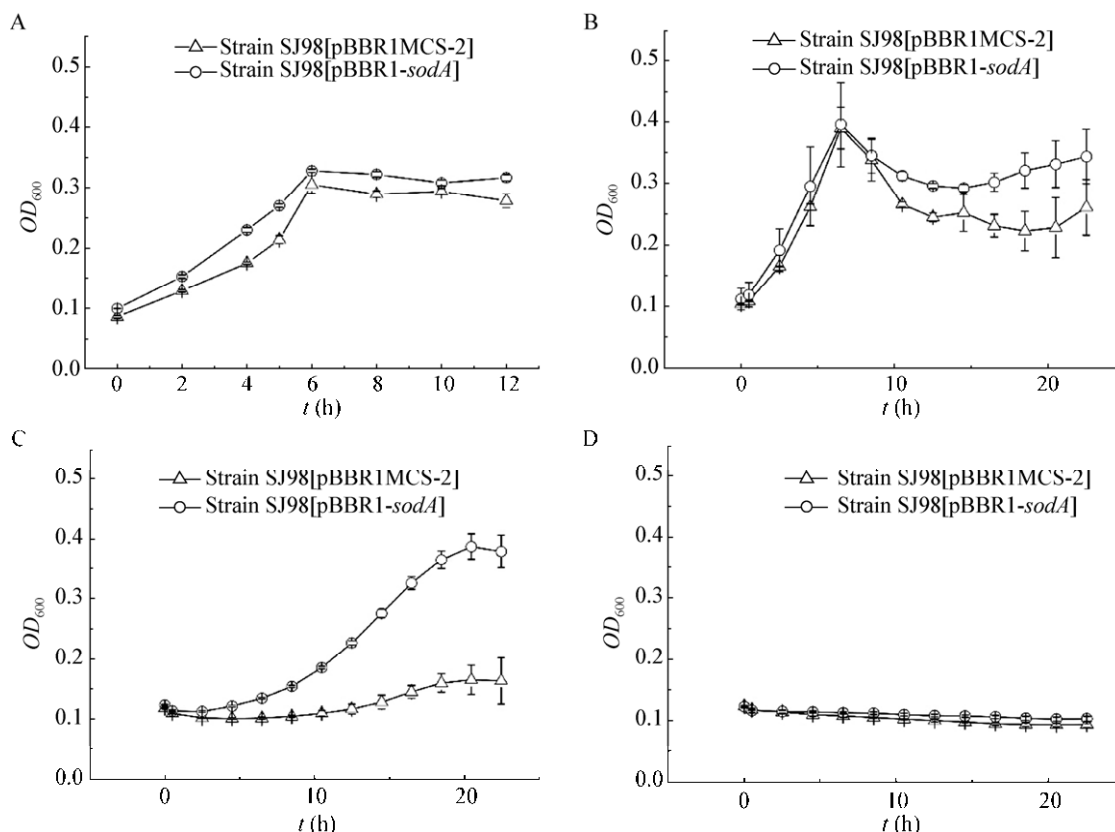


图4 菌株 SJ98[pBBR-*sodA*]与 SJ98[pBBR1MCS-2]在不同 NaCl 浓度下的生长情况

Figure 4 Growth curves of strains SJ98[pBBR-*sodA*] and SJ98[pBBR1MCS-2] at various NaCl concentrations

注: 培养基为含有 2 mmol/L 葡萄糖的 M9 培养基. A: 0 mmol/L NaCl; B: 200 mmol/L NaCl; C: 500 mmol/L NaCl; D: 800 mmol/L NaCl.

Note: Culture medium is M9 medium with 2 mmol/L glucose. A: 0 mmol/L NaCl; B: 200 mmol/L NaCl; C: 500 mmol/L NaCl; D: 800 mmol/L NaCl.

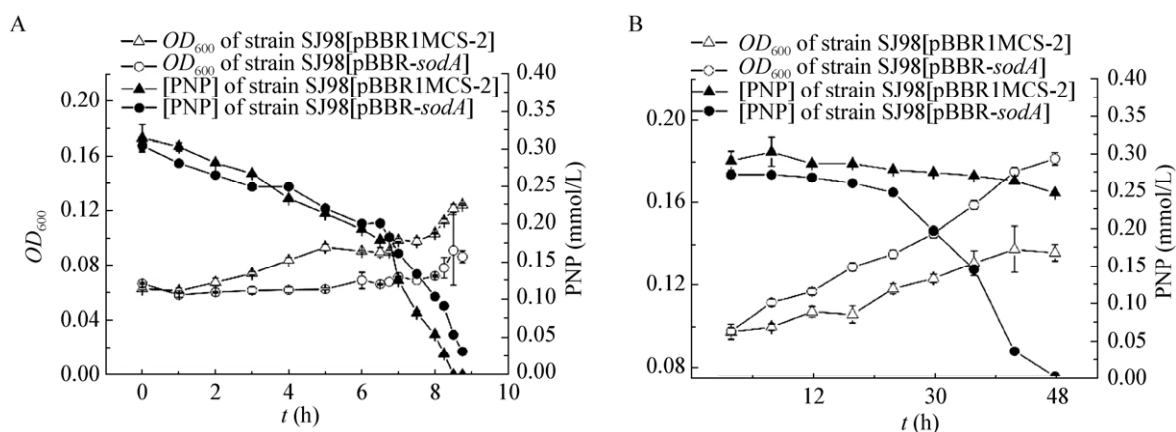


图5 菌株 SJ98[pBBR-*sodA*]与 SJ98[pBBR1MCS-2]以 PNP 为底物在 M9 培养基(含有 0.01%酵母提取物)中的生长曲线与 PNP 降解情况

Figure 5 Growth curves and PNP degradation of strains SJ98[pBBR-*sodA*] and SJ98[pBBR1MCS-2] in M9 with 0.01% yeast extract

注: A: 不额外加入 NaCl; B: 500 mmol/L NaCl.

Note: A: No NaCl added; B: 500 mmol/L NaCl.

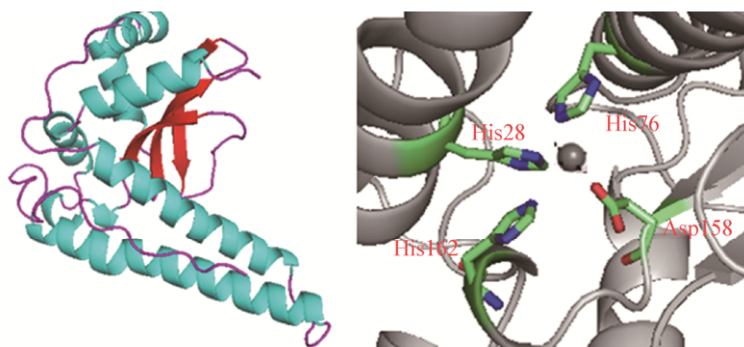


图 6 模拟 SodA_{D1227} 单体的结构和活性位点

Figure 6 The putative structure and active sites of SodA_{D1227} monomer

3 讨论与结论

20 世纪 70 年代, Woese 等根据核糖体 RNA 的序列特点, 提出了三域分类观点, 即真核生物域 (Eucarya)、细菌域 (Bacteria) 与古菌域 (Archaea)^[25]。由于古菌与细菌在生理生化代谢方面和遗传操作方面存在巨大差异, 从而使很多古菌蛋白在细菌中的表达可能会丧失活性甚至不表达, 迄今为止关于古菌分子水平研究及蛋白利用的研究比较有限。本研究中来自嗜盐古菌的超氧化物歧化酶基因不仅可以在细菌中跨域异源表达有活力的超氧化物歧化酶, 还能提高芳烃污染物降解菌株的耐盐能力且对细菌降解芳烃污染物的能力无明显影响。

根据目前研究可知嗜盐古菌 SOD 中酸性氨基酸含量较高, 这些酸性氨基酸通常位于蛋白表面, 推测可能是形成水化层以保护高强度离子环境中蛋白功能的实现^[26]。本研究通过序列比对(图 1)发现古菌来源的 Fe/Mn-SOD 序列高度保守, 5 个 Motif 提供与金属离子结合的活性位点也高度保守, 由此我们推测与 SodA_{D1227} 蛋白序列一致性非常高的其他嗜盐古菌来源超氧化物歧化酶(AAA73375.1, AAA73374.1, AAA73373.1, P09737.3)可能在细菌中也能表达且具有活力, 并提供相应的抗逆能力, 这也为其他功能未验证同类酶的鉴定以及细菌耐盐性的改造利用提供了参考。早期研究推测 Fe-SOD 和 Mn-SOD 可能进化自同一个祖先^[27]。我们通过构建进化树(图 2)分析发现, 不同来源的 Fe-SOD 与

Mn-SOD 均与 Cu/Zn-SOD 亲缘关系较远, 从而进一步印证了前 2 种 SOD 可能具有共同的进化起源。

许多研究表明过表达 SOD 可有效克服逆境引起的氧化胁迫, 从而提高机体抗逆能力^[28]。对于 SodA_{D1227} 在细菌中表达后提高了其耐盐能力, 我们推测可能有以下 2 种原因: (1) 早期研究曾报道耐盐生物来源的 SOD 可能会赋予宿主相对耐盐的能力^[12-13], 因此嗜盐古菌来源的 SodA_{D1227} 可能赋予了细菌宿主 SJ98 菌株耐受高盐的能力; (2) SodA_{D1227} 在细菌中过量表达可能减少了一部分活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的积累, 从而提高了细菌宿主的耐盐能力。

有研究表明, 氧化胁迫应激基因在铬酸盐处理后被检测到其表达上调^[29], 但具体机制并不清楚。本研究中重组菌株 SJ98[pBBR-sodA]在不含盐条件下生长略差于对照, 推测可能因为 H₂O₂ 清除酶的酶活力没有大量提高, 过表达 SodA_{D1227} 后生成的过量 H₂O₂ 不能进一步加快转化, 有害物质 H₂O₂ 的积累导致个体细胞受损^[30], 表现出略差的生长情况。在高盐浓度条件下, 重组菌株 SJ98[pBBR-sodA]不仅生长状况更优, 也仍然保持较强的降解能力, 根据研究报道 H₂O₂ 可以作为信号分子存在^[31], 因此我们推测另一种可能是过量表达的 SodA_{D1227} 引起了底物降解相关代谢基因的表达上调, 但具体机制并不清楚。本研究有利于更好地理解古菌 SOD 的多样性, 也为今后利用合成生物学在高盐环境下应用微生物降解有机污染物提供参考。

REFERENCES

- [1] Yin J, Chen JC, Wu Q, et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(7): 1433-1442
- [2] Fu W, Oriel P. Gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax* sp. D1227[J]. *Extremophiles*, 1998, 2(4): 439-446
- [3] Chauhan A, Pandey G, Sharma NK, et al. *p*-nitrophenol degradation via 4-nitrocatechol in *Burkholderia* sp. SJ98 and cloning of some of the lower pathway genes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(9): 3435-3441
- [4] Min J, Zhang JJ, Zhou NY. The gene cluster for *para*-nitrophenol catabolism is responsible for 2-chloro-4-nitrophenol degradation in *Burkholderia* sp. strain SJ98[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2014, 80(19): 6212-6222
- [5] Varjani SJ, Gnansounou E, Pandey A. Comprehensive review on toxicity of persistent organic pollutants from petroleum refinery waste and their degradation by microorganisms[J]. *Chemosphere*, 2017, 188: 280-291
- [6] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 169(1/3): 1-15
- [7] Youn HD, Kim EJ, Roe JH, et al. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp.[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 318(3): 889-896
- [8] Mccord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244(22): 6049-6055
- [9] Hekimi S, Guarente L. Genetics and the specificity of the aging process[J]. *Science*, 2003, 299(5611): 1351-1354
- [10] Kaouthar F, Ameny FK, Yosra K, et al. Responses of transgenic *Arabidopsis* plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide dismutase *TdMnSOD* to various abiotic stresses[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2016, 198: 56-68
- [11] Liu ZB, Zhang WJ, Gong XD, et al. A Cu/Zn superoxide dismutase from *Jatropha curcas* enhances salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 2086-2098
- [12] Zhang S, Li XR, Xu H, et al. Molecular cloning and functional characterization of *MnSOD* from *Dunaliella salina*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(5): 438-447
- [13] Chen Z, Pan YH, An LY, et al. Heterologous expression of a halophilic archaeon manganese superoxide dismutase enhances salt tolerance in transgenic rice[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2013, 60(3): 359-366
- [14] Lee HJ, Kwon HW, Koh JU, et al. An efficient method for the expression and reconstitution of thermostable Mn/Fe superoxide dismutase from *Aeropyrum pernix* K1[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(4): 727-731
- [15] Pandey J, Heipieper HJ, Chauhan A, et al. Reductive dehalogenation mediated initiation of aerobic degradation of 2-chloro-4-nitrophenol (2C4NP) by *Burkholderia* sp. strain SJ98[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(3): 597-607
- [16] Emerson D, Chauhan S, Oriel P, et al. *Haloferax* sp. D1227, a halophilic Archaeon capable of growth on aromatic compounds[J]. *Archives of Microbiology*, 1994, 161(6): 445-452
- [17] Hao LK, Liu XM, Wang HY, et al. Detection and validation of a small broad-host-range plasmid pBBR1MCS-2 for use in genetic manipulation of the extremely acidophilic *Acidithiobacillus* sp.[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 90(3): 309-314
- [18] Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1985, 49(1): 1-7
- [19] Fu W, Oriel P. Degradation of 3-phenylpropionic acid by *Haloferax* sp. D1227[J]. *Extremophiles*, 1999, 3(1): 45-53
- [20] Nuttall S, Bath C, Pfeiffer M, et al. The Halohandbook[J]. *Genetics*, 2008: 1-140
- [21] Joshi P, Dennis PP. Characterization of paralogous and orthologous members of the superoxide dismutase gene family from genera of the halophilic archaeobacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(6): 1561-1571
- [22] Kardinahl S, Anemüller S, Schäfer G. The hyper-thermostable Fe-superoxide dismutase from the Archaeon *Acidianus ambivalens*: characterization, recombinant expression, crystallization and effects of metal exchange[J]. *Biological Chemistry*, 2000, 381(11): 1089-1101
- [23] Lim JH, Yu YG, Choi IG, et al. Cloning and expression of superoxide dismutase from *Aquifex pyrophilus*, a hyperthermophilic bacterium[J]. *FEBS Letters*, 1997, 406(1/2): 142-146
- [24] Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2010, 1804(2): 263-274
- [25] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(11): 5088-5090
- [26] Joshi P, Dennis PP. Structure, function, and evolution of the family of superoxide dismutase proteins from halophilic archaeobacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(6): 1572-1579
- [27] Beyer W, Imlay J, Fridovich I. Superoxide dismutases[J]. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1991, 40: 221-253
- [28] Bowler C, And MVM, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2003, 43: 83-116
- [29] Branco R, Morais PV. Two superoxide dismutases from *TnOthr* are involved in detoxification of reactive oxygen species induced by chromate[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 27
- [30] Pitcher LH, Brennan E, Hurley A, et al. Overproduction of petunia chloroplastic Copper/Zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic Tobacco[J]. *Plant Physiology*, 1991, 97(1): 452-455
- [31] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373-399