

# 土壤宏基因组中硫氧还蛋白还原 酶部分序列的克隆

李亚楠, 刘晶晶, 胡美英\*, 范继巧

(天然源农药与生物化学教育部重点实验室, 华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

**摘要:**为探明硫氧还蛋白还原酶(TrxR)在微生物中的保守性,利用宏基因组技术从农药厂废水淤泥中提取环境DNA,并以其为模板直接采用PCR方法进行TrxR基因克隆,最终获得了硫氧还蛋白还原酶基因的部分序列片段。该片段全长476 bp,通过多序列比对及进化树分析,发现其与海杆菌、假单胞菌硫氧还蛋白还原酶基因序列的同源性高达80%以上,氨基酸序列同源性达98%以上,在进化中具有高度的保守性。

**关键词:**硫氧还蛋白还原酶;基因克隆;土壤宏基因组;进化树

中图分类号:S481.8;X172 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2012)03-0585-05

## Partial Cloning of Thioredoxin Reductase Gene from Soil Metagenomic DNA

LI Ya-nan, LIU Jing-jing, HU Mei-ying\*, FAN Ji-qiao

(Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** To prove whether thioredoxin reductase(TrxR) is conservative in the microorganisms, metagenomic technique was used for extraction of the soil metagenomic DNA and cloning of TrxR gene from soil metagenomic DNA by PCR technique in this study. Partial TrxR gene with 476 bp was obtained and analysed by multiple sequence comparison and phylogenetic tree analysis. The results showed that it was more than 80% in homology with TrxR genes from Marine bacterium and Pseudomonas, and more than 98% in amino acid homologous alignments. This shows that TrxR has a high degree of conservativeness in the evolution of microorganisms.

**Key Words:** thioredoxin reductase; gene cloning; soil metagenomic DNA; phylogenetic tree

硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)是一种NADPH依赖的包含FAD结构域的二聚体酶,属于吡啶核苷酸-二硫化物氧化还原酶家族成员<sup>[1]</sup>,在NADPH参与下调节多种底物的氧化还原反应,在氧化还原调节和抗氧化防御中起重要作用<sup>[2]</sup>。在哺乳动物体内,TrxR具有一定的保守性,TrxR1的调节与细胞的表型、生长及信号转导有密切的关系<sup>[3]</sup>。TrxR有助于细胞的正常生长和功能的发挥,阻止细胞凋亡,参与细胞的抗氧化应激反应,在肿瘤出现的早期阶段起到了抗肿瘤发生的作用<sup>[4]</sup>。在大肠杆菌中,TrxR的催化氧化还原的活性也得到证实<sup>[5]</sup>。目前,人们多研究哺乳动物硫氧还蛋白还原酶与各种人类疾病尤其是癌症的关系,在微生物中也只是研究模式生物体内的硫氧还蛋白还原酶,而对极端环境微生物硫氧还蛋白还原酶的研究极少。

由于土壤中微生物种类繁多,但只有极少一部分微生物(1%~10%)在目前条件下是可培养的<sup>[6-7]</sup>,因

收稿日期:2012-01-06 修回日期:2012-04-06

基金项目:国家自然科学基金项目(30871660)和广东省博士启动基金项目(9451064201003679)

作者简介:李亚楠(1986—),女,硕士生,主要从事天然源农药及农药残留降解研究,E-mail:rainlyn198610@163.com;\*

通讯作者:胡美英,教授,E-mail:humy@scau.edu.cn.

此本研究绕过了菌种纯培养障碍,利用宏基因组技术直接从农药厂废水淤泥中提取环境 DNA 直接进行 TrxR 基因克隆,探求在极端环境下,TrxR 在未知微生物进化过程中的保守性,为极端环境微生物中的硫氧还蛋白还原酶的功能研究奠定一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 土样 采用五点取样法采取农药厂排污处废水淤泥。

1.1.2 培养基组成 LB 培养基:胰蛋白胨 10.0 g/L,NaCl 10.0 g/L,酵母粉 5.0 g/L,去离子水定容至 1 000 mL, pH 7.2, 高压蒸汽灭菌后备用(固体平板含 1.5% Agar)。抗生素 Amp: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.3 引物和测序 引物和测序由上海英俊生物技术有限公司完成。

1.1.4 菌株、质粒和试剂 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH<sub>5 $\alpha$</sub> 、质粒小提试剂盒购自北京天根生物技术有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒、pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶及缓冲液购自 TaKaRa 公司, DNA 分子量标准、TqDNA Polymerase 及缓冲液、dNTP 购自东盛生物公司, 琼脂糖购自基因公司, 土壤 DNA 提取试剂盒 PowerSoil™ DNA Isolation Kit 购自 MO BIO 公司。

1.1.5 主要仪器 RC-2C 高速低温离心机购自 Sorvall 公司, My Cyclor 梯度 PCR 仪、Pow Pac1000 电泳仪、Gel Doc2000 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司, 超净工作台购自苏州净化设备厂, H.S.G II C-4 电热恒温水浴锅购自临海市东方仪器厂, LRH-250A 生化培养箱购自广东省医疗仪器厂。

### 1.2 实验方法

1.2.1 土壤总 DNA 的提取纯化 土壤总 DNA 的提取采用 PowerSoil™ DNA Isolation Kit, 部分步骤略有改进, 改进部分如下: 最后洗脱时, 将灭菌水加热到 50  $^{\circ}\text{C}$ , 然后加至滤膜的中央。37  $^{\circ}\text{C}$  静置温育 2 min 后离心, 并将离心后的液体再次加入 Spin Filter 上静置 2 min 后离心。

土壤总 DNA 提取后, 采用如下方法对 DNA 进行抽提纯化: 500  $\mu\text{L}$  DNA 加入等体积氯仿, 混匀, 12 000 r/min 离心 2 min; 取上层液体, 加入 1/10 体积 3 mol/L 的醋酸钠溶液, 2 倍体积的无水乙醇, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  静置 1 h 以上; 12 000 r/min 离心 15 min, 沉淀用 70%乙醇洗涤 2 次, 晾干后加适量无菌去离子水 (ddH<sub>2</sub>O) 溶解, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

总 DNA 提取纯化后用 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 引物设计 利用 Primer5.0 引物设计工具, 根据已知的硫氧还蛋白还原酶基因设计引物, 序列如下:

Primer 5' : AGATTAATCGTGACGGGTGGTGGC

Primer 3' : GCGCCATGC AGCCGA

1.2.3 土壤总 DNA 的 PCR 扩增 以提取纯化的宏基因组 DNA 为模板分别以 6 对引物进行 PCR 扩增, 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系为: DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , dNTP (2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , 引物(25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ Buffer 5  $\mu\text{L}$ , Taq 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 超纯水 37  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 进入热循环: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。反应后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PCR 产物的克隆与鉴定 (1)重组质粒的构建与筛选鉴定。PCR 产物用 TaKaRa 公司生产的凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化后, 与载体 pMD19-T 连接。10  $\mu\text{L}$  连接体系为: 纯化的 PCR 产物 6  $\mu\text{L}$ , pMD19-T 0.5  $\mu\text{L}$ , Solution I 2.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足至 10  $\mu\text{L}$ 。混匀后, 4  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。

取 5  $\mu\text{L}$  连接产物转入 50  $\mu\text{L}$  大肠杆菌 DH<sub>5 $\alpha$</sub>  感受态细胞, 涂布于含 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养过夜后进行蓝白斑筛选。

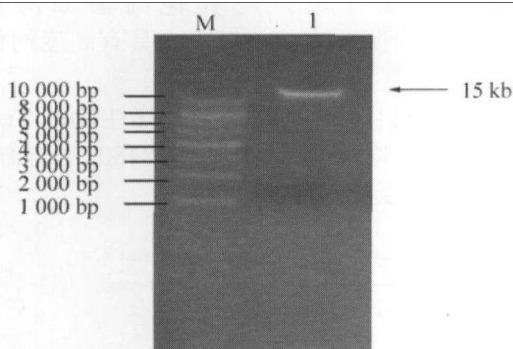
从平板上筛选出白色阳性克隆子接种于 3 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、230 r/min 振荡培养过夜, 分别提取质粒用于 PCR 鉴定。PCR 反应体系及程序如前。PCR 结束后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

(2)序列测定与分析。选择经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送上海英俊生物技术有限公司测序。测序结果在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 上用 BLAST 软件进行多序列比对分析, 并用 MEGA 5.0 构建该基因的进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤微生物总 DNA 的提取与纯化

提取农药污染土壤所得粗制宏基因组 DNA 片段大小与国内外土壤微生物 DNA 提取相吻合。经纯化后, 其条带单一, 未发生明显降解 (图 1)。

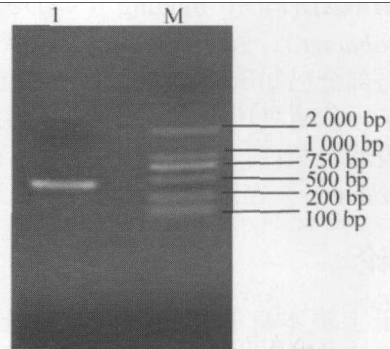


M: 1 kb DNA Ladder; 1: 土壤总 DNA 纯化产物

M: 1 kb DNA Ladder; 1: Purification product of total soil DNA

图 1 土壤总 DNA 的纯化

Fig.1 Purification of total soil DNA



M: DL2000; 1: PCR 产物

M: DL2000; 1: PCR product of soil DNA

图 2 土壤总 DNA PCR 电泳图

Fig.2 PCR product of total soil DNA

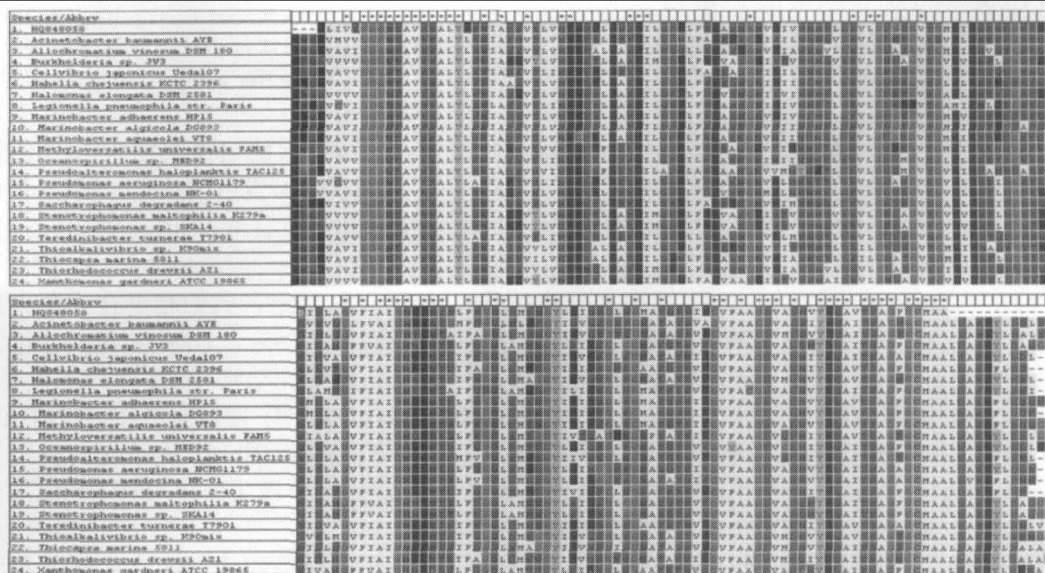
### 2.2 PCR 扩增及克隆

以纯化的土壤总 DNA 为模板进行 PCR, 扩增出大小约为 480 bp 的 DNA 片段, 如图 2 所示。经纯化克隆后, 以质粒为模板进行 PCR 扩增, 得到一条与预期大小相当的条带。

### 2.3 序列测定与分析

阳性克隆测序结果如下:

AGATTAATCGTGACGGGTGGTGGCAACACCGCCGTTGAAGAAGCCCTGTACCCGTCGAACATTGCCGATGAAGTGACCCTGGTGCACC  
 GCCGTGACAAGCTGCGCTCCGAGAAAATCCTGCAGGACAAGCTGTTGAAAAGGCCGAGAACGGCAACGTGAAGATCGTCTGGAACCA  
 CACCCTGGATGAAGTACTGGGCGACGGTACCGGGCTAACCGGCATGCGCATCAAGAGCACCGAAGACGGCAGCACCCGGGACATCGAC  
 CTGGCCGGGTATTTCATCGCCATCGGCCACAAGCCGAACACCAGCCTGTTGAAAGCCAGCTCGACATGGACAACGGCTATCTGCGCA  
 TCCAGTCCGGCCTGAACGGCATGGCCACCCAGACCAGCATTCCGGGCGTATTGCGCCGGCGGACGTAGCCGACCAGTTTATCGCCA  
 GGCTGTCACCTCCGCCGTTTCGGCTGCATGGCCG



带\*列表示保守氨基酸位点。The column with \* represents a conservative amino acid site.

图 3 硫氧还蛋白还原酶部分序列同源性分析

Fig.3 Partial sequence homology analysis of thioredoxin reductase

该序列片段全长 476 bp, Genbank 登陆号为 HQ848058, GC 含量达 61.55%。利用 NCBI 上的 BLAST 程序对测序结果进行同源性分析, 发现该片段属于硫氧还蛋白还原酶的部分序列, 与海杆菌硫氧还蛋白还原酶的部分基因序列具有较高的同源性, 同源性达 85%, 与假单胞菌硫氧还蛋白还原酶 I 同源性达 81%。对该片段编码的氨基酸序列分析发现, 该片段含有 Rossmann NADB (Rossmann-fold NAD(P)H/NAD(P)(+) binding (NADB) domain) 超家族的保守域, 与其他细菌如海杆菌属 (*Marinobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等的相应部分同源性达 98% 以上, 具有高度的保守性。该片段与部分已知硫氧还蛋白还原酶氨基酸比对结果如图 3。

为了弄清硫氧还蛋白还原酶在微生物进化上的详细情况, 对目前已知的不同种微生物的 TrxR 进行了系统发育分析(图 4)。从图 4 可以看出, 从土壤宏基因组克隆得到的片段 HQ848058 与海杆菌属 (*Marinobacter*) 在进化上亲缘关系最近。

### 3 讨论

由于土壤本身的复杂性以及传统方法分离培养微生物的局限性, 从土壤中提取微生物的基因组进行研究受到国内外的关注。能否简单、快速获得大片段及纯度高的 DNA 是利用宏基因组研究成败的关键。此外, 环境中一些金属离子、土壤中腐殖酸、各种抑制剂等物质, 会强烈抑制分子操作过程中酶的活性, 进而影响 DNA 酶切、转化、PCR 扩增等操作<sup>[8]</sup>。笔者在试剂盒的基础上稍加改进提取土壤总 DNA。提取的 DNA 完整性强, 纯度高, 只需简单纯化就可以进行 PCR 扩增、酶切等后续工作, 且提取前无需特别处理, 操作简单, 提取时间短, 是一种理想的土壤微生物 DNA 的提取方法。

硫氧还蛋白系统包括硫氧还蛋白 (Trx)、硫氧还蛋白还原酶 (TrxR)、NADPH, 是一个有效的蛋白还原系统。它能够稳定细胞内环境, 调节细胞生长及信号传导过程来保护细胞不受病毒感染、电离辐射等外界刺激引起的活性氧损害<sup>[3]</sup>; 还能还原 DNA 合成必需的核糖核苷酸还原酶等多种具有重要功能的蛋白质, 对蛋白-蛋白的表达, 蛋白-核酸的表达起重要的调节作用<sup>[9]</sup>。其中, 二聚体硒酶硫氧还蛋白还原酶属于吡啶核苷酸-二硫化物氧化还原酶家族成员, 主要功能是维持 Trx 的还原性。

自 1977 年 TrxR 第一次从牛的组织中被分离纯化出来后<sup>[10]</sup>, 目前, 人们相继在大肠杆菌等原核生物、酵母菌、昆虫、植物和多种哺乳动物的正常组织及肿瘤组织中发现了 TrxR 并对其功能进行了研究<sup>[11-15]</sup>。原核生物和真核生物中的硫氧还蛋白还原酶差异比较大。哺乳动物 TrxR 的分子量是 55~65 ku, 原核生物、植物和酵母 TrxR 的分子量是 35 ku。人的 TrxR 的 cDNA 序列与原核生物的 TrxR 相似性很低, 仅为 31%。本实验首次从极端环境土壤中克隆了 TrxR 的部分基因序列, 序列比对显示该片段与原核生物 TrxR 相似性较高, 与哺乳动物相似性极低, 这与笔者从土壤微生物中获得 TrxR 基因的设想是一致的, 说明土壤微生物中 TrxR 具有高度的保守性。

极端环境微生物为了适应极端条件往往具有特殊的习性和特别的功能基因。如刘万利等<sup>[16]</sup>从新疆一号冰川土壤来源的低温细菌中获得了低温脂肪酶 LipDB5; 李文等<sup>[17]</sup>从生产硫丹的农药厂的活性污泥中分离到一株能以硫丹为唯一碳源生长的细菌 C7, 在 8 d 内对 50 mg/L 硫丹的降解率达 90.2% 以上; 胡婷婷等<sup>[18]</sup>从碱性土壤样品中获得了一个完整的碱性蛋白酶基因和一个新型  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因

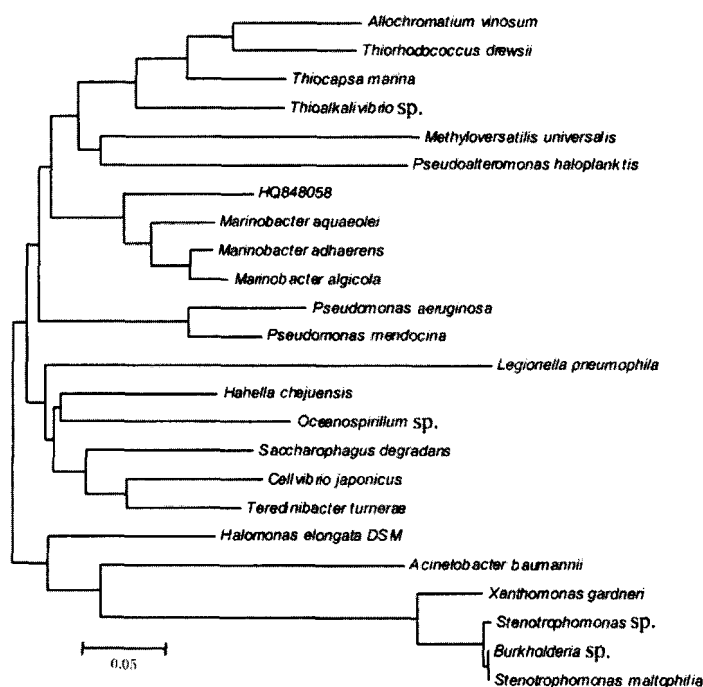


图 4 HQ848058 的系统进化树分析  
Fig.4 Phylogenetic tree analysis of HQ848058

unglu01。受农药污染的土壤中的 TrxR 是否有不同于哺乳动物和其他原核生物的其他功能,是否与微生物的耐受性及应激反应相关尚不清楚。另外,LaVallie<sup>[19]</sup>报道了大肠杆菌的硫氧还蛋白很适合作为一种融合伴侣,促进外源蛋白的大量可溶性表达。受农药污染的土壤中的微生物的硫氧还蛋白系统是否与农药降解酶的分泌相关也有待研究。目前笔者获得的 TrxR 的部分基因序列,为研究农药污染土壤中的 TrxR 的功能及作用机制奠定了基础,对研究极端环境微生物新资源必将起到积极的推动作用。

#### 参考文献:

- [1] 张笑天,熊咏民.硫氧还蛋白还原酶研究进展[J].国外医学医学地理分册,2004,25(4):148-151.
- [2] Takizawa M, Komori K, Tampo Y, et al. Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of cellular redox systems including antioxidative defense enzymes glutathione peroxidase and thioredoxin reductase[J]. Toxicology in Vitro, 2007, 21(3): 355-363.
- [3] Rundlöf A K, Arnér E S J. Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events[J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2004, 6(1): 41-52.
- [4] Patrick L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature[J]. Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic, 2004, 9(3): 239-258.
- [5] Xia L, Nordman T, Olsson J M, et al. The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone a novel mechanism for defense against oxidative stress[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(4): 2141-2146.
- [6] Amann R I, Ludwig E, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detecting of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiology Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [7] Borneman J, Skroch P W, O'Sullivan K M, et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(6): 1935-1943.
- [8] 沈菊培,张丽梅,郑表明.土壤宏基因组学技术及其应用[J].应用生态学报,2007,18(1):212-218.
- [9] 赵燕秋,樊代明.人硫氧化还原蛋白系统生物学意义的研究进展[J].生命科学,2001,13:67-69.
- [10] Holmgren A. Bovine thioredoxin system: purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction[J]. Journal of Biology Chemistry, 1977, 252(13): 4600-4606.
- [11] Williams C H. Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*[J]. The FASEB Journal, 1995, 9(13): 1267-1276.
- [12] Lim C J, Kim W B, Lee B S, et al. Silencing of *SIFTR-c*, the catalytic subunit of ferredoxin:thioredoxin reductase, induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tomato plants[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 399(4): 750-754.
- [13] Bauer H, Gromer S, Urbani A, et al. Thioredoxin reductase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(21): 4272-4281.
- [14] Yang HF, Kang MJ, Guo XQ, et al. Cloning, structural features, and expression analysis of the gene encoding thioredoxin reductase 1 from *Apis cerana cerana*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 156(3): 229-236.
- [15] Li SR, Zhang JS, Li J, et al. Inhibition of both thioredoxin reductase and glutathione reductase may contribute to the anticancer mechanism of TH-302[J]. Biological Trace Element Research, 2010, 36(3): 294-301.
- [16] 刘万利,张国华,陈强,等.冰川土壤来源 *Brachybacterium* sp. DB5 低温脂肪酶基因的克隆与表达[J].中国农业科技导报,2009,11(6):55-62.
- [17] 胡婷婷,蒋承建,梁璇,等.碱性土壤微生物基因的克隆和多样性分析[J].遗传,2006,28(10):1287-1293.
- [18] 李文,彭香,张京顺,等.硫丹降解菌的筛选及降解性能研究[J].山东农业科学,2009,1:67-70.
- [19] LaVallie E R, DiBlasio E A, Kovacic S, et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm[J]. Nature Biotechnology, 1993, 11(2): 187-193.