

# PCR Amplification and Bioinformatics Analysis of AMO from a Heterotrophic Nitrifier, *Alcaligenes faecalis* NR

Yuansheng Huang, Bin Zhao\*, Danyang Cheng, Qiang An

Faculty of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing  
Email: \*binzhao11@cqu.edu.cn

Received: May 23<sup>rd</sup>, 2017; accepted: Jun. 11<sup>th</sup>, 2017; published: Jun. 14<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

Ammonia monooxygenase (AMO) is one of the key enzymes related to nitrification process, and the corresponding gene is amo. In this study, two pairs of primers were designed according to the amo gene sequence in the NCBI database. The amo gene of *Alcaligenes faecalis* strain NR was amplified successfully, and 1639 bp length DNA sequence was obtained. This sequence contained a complete open reading frame (ORF), which encodes a 346 aa length polypeptide chain. BLAST analysis results showed that this polypeptide was AMO protein sequences. This protein belonged to hydrophobic and basic protein, and the molecular weight was 36.7 kDa. In addition, AMO was transmembrane protein which contained 12 transmembrane regions. Tertiary structure model of AMO was built successfully by using threading method, and the confidence of this model was 98.6%. AMO contained a nickel atom binding sites. The conformation was good according to Ramachandran plot. This investigation offers reference for further understanding the key enzymes relating to heterotrophic nitrification.

## Keywords

Heterotrophic Nitrification, *Alcaligenes faecalis* NR, Ammonia Monooxygenase, Tertiary Structure

# 异养硝化菌 *Alcaligenes faecalis* NR 氨单加氧酶 PCR 扩增及生物信息学分析

黄源生, 赵彬\*, 程丹阳, 安强

重庆大学城市建设与环境工程学院, 重庆  
Email: \*binzhao11@cqu.edu.cn

\*通讯作者。

收稿日期：2017年5月23日；录用日期：2017年6月11日；发布日期：2017年6月14日

## 摘要

氨单加氧酶(AMO)是异养硝化过程中起催化作用的关键酶之一，其相应的基因为amo。本研究根据NCBI数据库中amo基因序列设计引物，成功扩增粪产碱杆菌*Alcaligenes faecalis* NR基因组DNA中amo基因序列，得到长度为1639 bp的DNA序列。该段序列包含1个完整的开放阅读框(ORF)，编码长度为346 aa的多肽链。经过BLAST在线比对分析，该序列为AMO蛋白质序列。该蛋白序列分子量大小为36.7 kDa，是碱性蛋白也是疏水性蛋白。此外，AMO也是跨膜蛋白，有12个跨膜区。采用串线法成功构建AMO三级结构模型，模型置信度为98.6%。模型显示AMO含有一个镍原子结合位点。拉氏图表明，AMO模型位于最佳区域的氨基酸残基所占比例为94.9%，这说明模型构象良好。上述研究可为深入了解异养硝化过程中的关键酶提供参考。

## 关键词

异养硝化，粪产碱杆菌，氨单加氧酶，三级结构

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

氮素污染是引起水体富营养化的原因之一。生物脱氮被公认为是经济有效的污水脱氮方法之一。硝化作用是污水生物脱氮处理过程中的一个重要环节。传统的硝化作用是由自养型微生物完成的。然而，自养硝化细菌存在着生长缓慢，对高浓度有机物耐受性较差等问题。随着研究的深入，人们发现异养硝化现象广泛地存在于不同的环境中。异养硝化[1]作用一般是指异养微生物在好氧条件下将氨/铵或化合价为-3的有机氮化合物转化为羟胺，进而转化为亚硝酸盐和硝酸盐的过程[2]。与传统自养硝化微生物相比，异养硝化微生物具有生长快速、适应能力强等特点。异养硝化微生物在高氨氮和高C/N废水处理中有较大的应用前景。

目前对于异养硝化的研究多集中于菌株的分离鉴定、性能测试[3] [4] [5]以及异养硝化菌株在反应器中的应用[6] [7] [8]，而对于异养硝化过程中关键酶的研究相对较少。异养硝化过程中的关键酶有氨氮加氧酶(AMO)、羟胺氧化酶(HAO) [9] [10] [11]等。AMO是异养硝化过程中第一个关键酶，起着将 $\text{NH}_4^+$ 转化为 $\text{NH}_2\text{OH}$ 的作用，常被用作硝化过程的功能标记基因[12]。由于AMO为膜结合型酶[13] [14]，其分离纯化难度较大。因此，目前关于AMO酶纯化及三维结晶的报道很少。

本实验室在前期研究中分离纯化出一株具有异养硝化功能的细菌*Alcaligenes faecalis* (粪产碱杆菌) NR [15]。在本研究中，采用PCR技术以及生物信息学方法，对粪产碱杆菌NR的AMO的基础理化性质以及三级结构进行分析，以期深入了解异养硝化过程中的关键酶提供参考。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 菌株培养

本研究所使用菌株为实验室分离的粪产碱杆菌NR，NCBI数据库登录号为FJ151629。将储存于4℃

条件下的粪产碱杆菌 NR 接种于灭菌后 LB 培养基中, 于 30°C、120 rpm 条件下隔夜培养后用于提取基因组 DNA。

LB 培养基: 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L。

## 2.2. PCR 扩增

取 1 mL 隔夜培养的粪产碱杆菌 NR 菌悬液, 使用 Omega 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 按照操作说明提取细菌基因组 DNA, 作为 PCR 扩增所用模板。采用 DNAMAN 7 软件根据 NCBI 数据库中检索到的 *Alcaligenes faecalis* ZD02 氨单加氧酶基因序列 (GenBank 登录号为 NZ-CP013119) 设计引物 A1 (表 1), 根据 *Alcaligenes faecalis* ZD02 氨单加氧酶基因序列向 3' 和 5' 端分别延伸 500 bp 后所得序列设计引物 A2 (表 1)。PCR 反应采用 25 $\mu$ L 体系, 体系包含以下溶液、试剂: 2 $\times$  Premix Ex Taq 12.5  $\mu$ L, 正、反向引物各 1  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), DNA 模板 1  $\mu$ L (40 ng/ $\mu$ L), RNase-free water 9.5  $\mu$ L。PCR 扩增条件如下: 94°C 预变性 5 min, 接着进行 30 循环: 94°C 变性 30 S, 退火 30 S (引物 A1 退火温度 52°C, A2 退火温度 55°C), 72°C 延伸 1 min, 最后 72°C 下补充延伸 7 min。PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖电泳进行分析检测, 对符合预期的条带运用 Omega 胶回收试剂盒回收, 并 AT 克隆测序。

## 2.3. AMO 基因序列分析

对测序得到的基因序列先采用 NCBI 在线比对工具 BLASTN 进行比对分析, 确认该段序列是否为 AMO 基因序列。确定为目标基因序列后, 使用 NCBI 在线开放阅读框(ORF)预测工具 ORF finder 预测该段序列可能编码的 AMO 氨基酸序列。所得 AMO 氨基酸序列运用在线软件 ProtParam 和 ProtScale 对其等电点、分子量以及亲疏水性进行分析[16]。采用在线跨膜分析软件 TMHMM-2.0 [17]对 AMO 跨膜区进行分析预测。

## 2.4. AMO 高级结构分析

使用在线蛋白质三维结构预测工具 Phyre 2 [18]对 AMO 的三维结构进行分析预测, 并采用 3DligandSite [19]服务器对模型可能存在的结合位点进行预测, 运用 PDBsum Generation 对所得模型进行评估。最后使用 Chimera 1.11 对模型进行可视化操作。

# 3. 结果与讨论

## 3.1. PCR 结果

采用 Primer BLAST 工具以数据库中粪产碱杆菌基因组 DNA 为模板, 对引物 A1 和 A2 进行进一步的验证, 结果显示两对引物均只有一种特异性产物, 且长短与预期相当, 这说明引物 A1 和 A2 对粪产碱杆菌都具有较好的特异性, 可以用于后续 PCR 扩增实验。然而 PCR 结果显示(图 1), 引物 A1 的产物具有多条条带, 且目标条带亮度很低; 而 A2 引物虽然产物条带单一, 特异性也好, 但是其长度约为 1700 bp 比预期长 500 bp (表 1)。然而 A2 产物单一且特异性良好, 可以排除引物错配的可能。经测序该段 PCR 产物长度为 1639 bp。

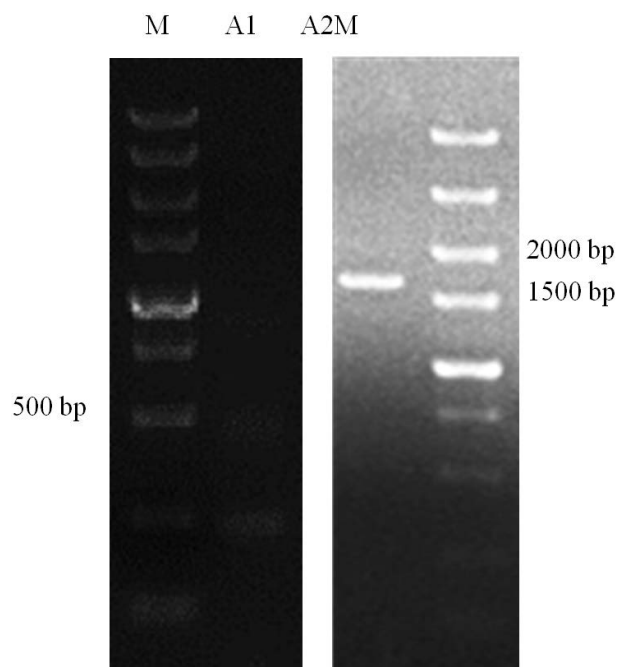
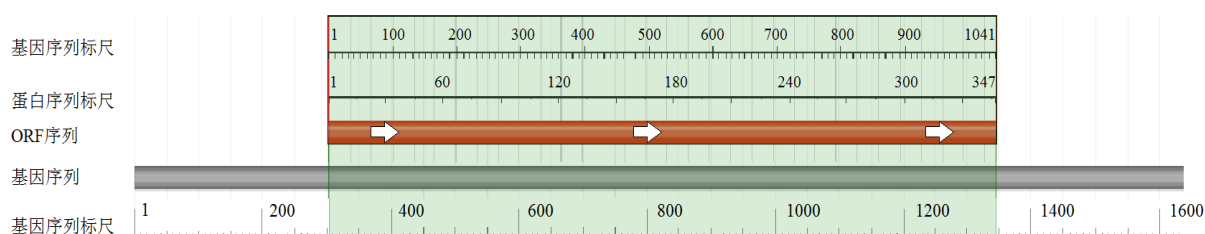
## 3.2. 序列分析

经 BLAST 比对, 本研究得到基因序列为 amoA 基因。ORF finder 预测结果显示(图 2), 该段基因序列有一长度为 1041 bp 的阅读框(304-1344 bp)。这个阅读框编码总共编码 346 个氨基酸, 该阅读框包含初始密码和终止密码, 并且阅读框 5' 和 3' 还余有约 300 bp 碱基。因此, 认为该阅读框所编码的是一条完整的肽链。此外, ExPASy 工具预测的蛋白质的理论等电点为 9.38, 属于碱性蛋白。其分子量大小为 36.7 kDa,

**Table 1.** Primers for amo gene PCR amplification**表 1.** 氨单加氧酶基因引物序列

编号	引物名称	引物序列(5' → 3')	产物长度
A1	amo F619	TGGTCTTGCTGTATCGG	557 bp
	amo R1176	GTAGGCAAAGCCAAATGC	
A2	amo F040	GCAAGATGAATGTGCCTATG	1203 bp
	amo R1244	GCAATACCACCAGGACTGA	

注: F 为正向引物, R 为反向引物。

**Figure 1.** PCR product agarose electrophoresis figure of amo gene**图 1.** 氨单加氧酶基因 PCR 产物琼脂糖电泳图**Figure 2.** ORF analysis results of amoA**图 2.** 氨单加氧酶基因 ORF 分析结果

比自养硝化菌 AmoA 大 6-8 kDa [20], 与从异养硝化菌 *Paracoccus denitrificans* 胞内分离纯化得到 AmoA 分子量大小相近(38 kDa) [13]。

运用 ExPASy 网站的在线分析工具 ProtScale 对 Amo 序列的亲疏水性进行分析, 结果显示该段氨基酸序列的最大亲水性指数(hydropath)为 2.658, 最小亲水性为-0.8, 总平均亲水性(GRAVY, Grand average of hydropathicity)为 0.972, 总平均亲水性的数值越大说明该蛋白疏水性越强。此外, 预测结果图显示, AmoA 蛋白大部分区域是疏水的(图 3)。因此, 该蛋白是疏水性蛋白。

在线跨膜预测软件 TMHMM-2.0 预测显示(图 4(a)), AmoA 蛋白的氨基酸非跨膜螺旋指数为 195.86 (> 18, 当大于 18 时该蛋白分有可能是跨膜蛋白, 或者有信号肽), 首端 60 个氨基酸的跨膜指数为 34.98 (> 10, 当大于 10 时 N 端存在信号肽)。因此可断定, AmoA 的 N 端可能存在信号肽, 且该蛋白为跨膜蛋白, 这与 Moir [13]等和 Klotz 等[20]得研究结果一致。如图 4(b)所示该蛋白总共存在 12 个跨膜螺旋区, 且该蛋白的 N-端和 C-端均位于膜外细胞周质一侧。

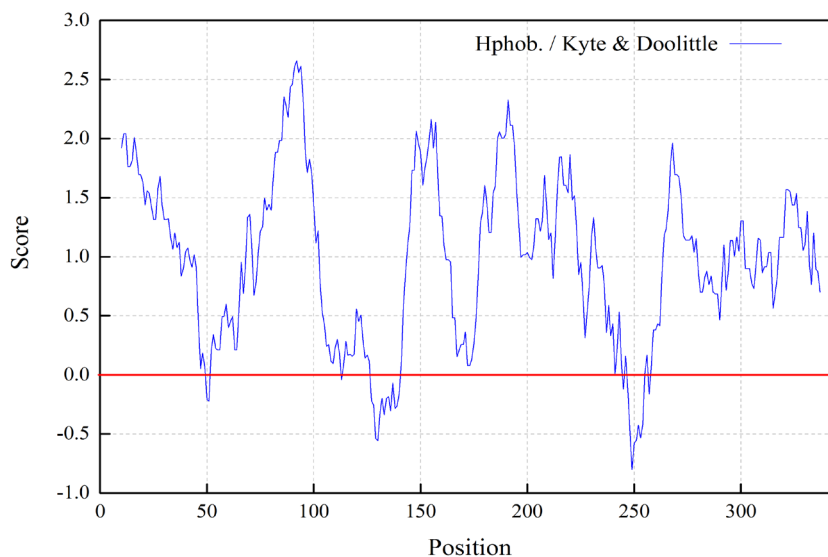


Figure 3. Curve: system result of standard experiment

图 3. 标准试验系统结果曲线

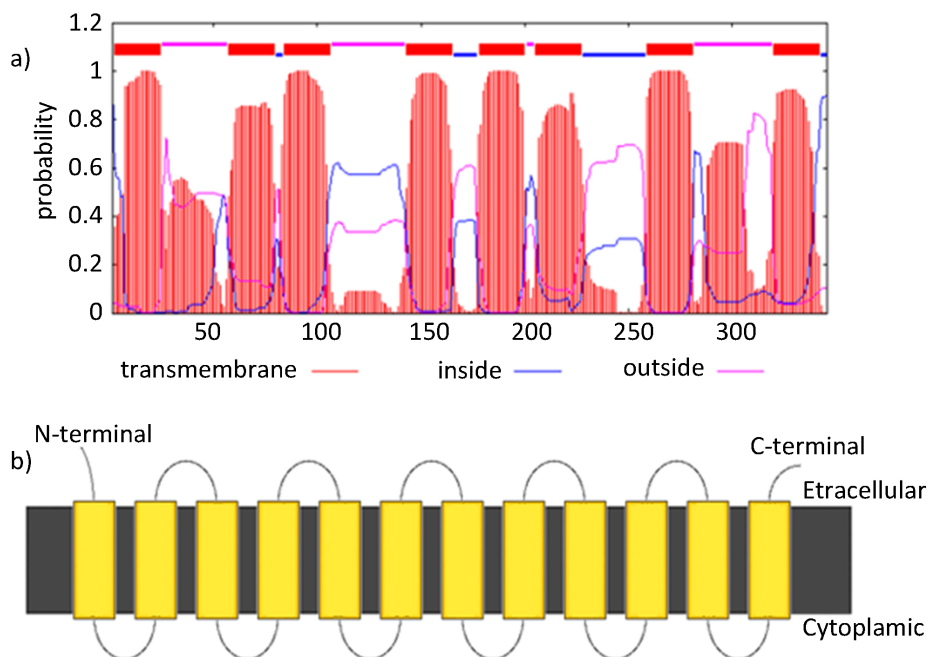
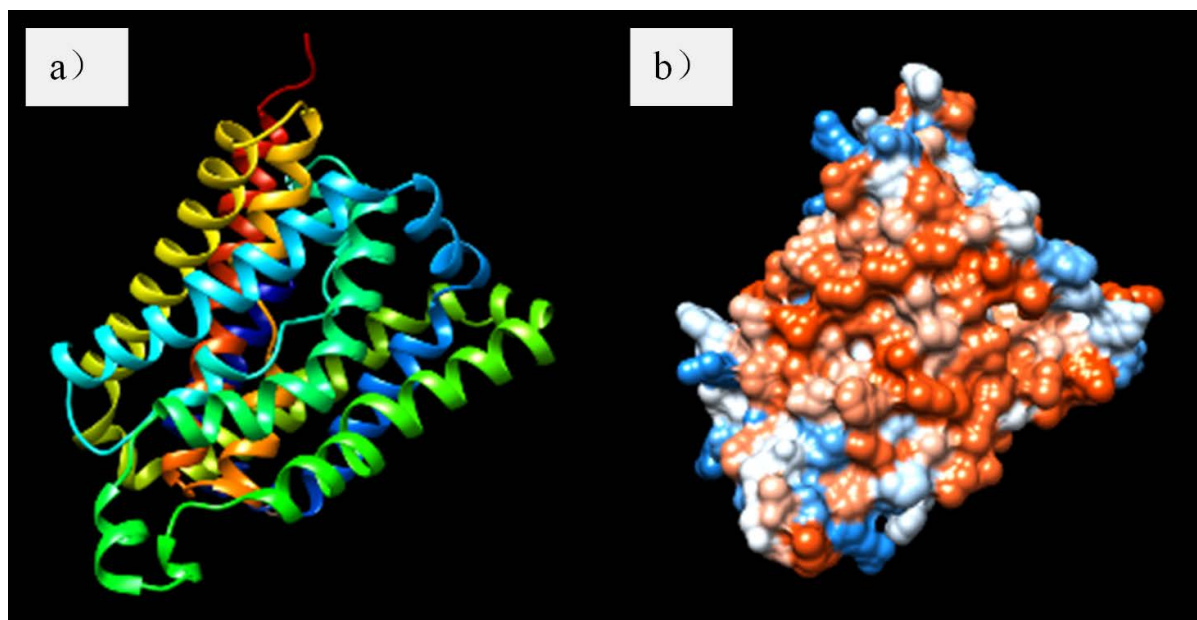


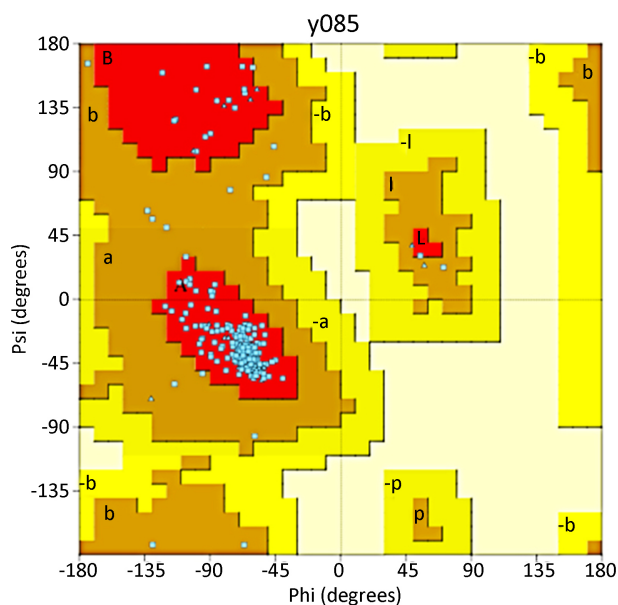
Figure 4. Transmembrane analysis results of AmoA amino acid sequence. (a) Results of TMHMM, the red shades were transmembrane ranges; (b) Results of Phyre 2, black was cell membrane, yellow was transmembrane structure

图 4. 氨单加氧酶氨基酸序列跨膜预测结果。(a) TMHMM 跨膜预测结果, 红色阴影为跨膜区; (b) Phyre 2 跨膜预测结果, 黑色表示细胞膜, 黄色表示跨膜结构



**Figure 5.** Tertiary structure prediction results of AmoA, (a) ribbon of AMO; (b) hydrophobic surface of AMO, red means hydrophobic, blue means hydrophilic

**图 5.** 氨单加氧酶三级结构预测结果, (a) AMO 三级结构骨架; (b) AMO 三级结构亲疏水表面, 红色表示疏水, 蓝色表示亲水



**Figure 6.** Ramachandran plot of Amo tertiary structure model

**图 6.** 氨单加氧酶三级结构模型拉氏图

### 3.3. AMO 三级结构

由于 PDB 数据库中未找到现有的 AMO 模型, 也未找到同源性 > 30% 的模型。因此, 使用 Phyre 2 采用串线法对 AMO 的三维结构进行预测。模型以 c4n7wA 为模板构建, 目标序列与模板序列的覆盖率为 85%, 最终得出的模型的置信度为 98.6%。使用 Chimera 1.11 软件对预测结果进行可视化操作, 所得结果如图 5 所示。如图 5(a) 所示, AMO 绝大部分区域为  $\alpha$  螺旋结构, 一般而言  $\alpha$  螺旋区域也是跨膜区域[21]。

如图 5(b)所示, 该蛋白表面大部分为疏水区域(红色为疏水区域, 蓝色为亲水区域), 特别是中间部分, 这与前面跨膜结构预测及亲疏水性分析相吻合。此外, 3DLigandSite 预测结果显示 AMO 具有一个镍原子结合位点, 然而有报道认为 AMO 含有的是 Cu 原子结合位点[14]。

拉氏图常用于指明蛋白质或多肽高级结构中允许和不允许的构象, 一共分为最佳区域(红色)、次允许区(褐色)、最大允许区域(黄色)和不允许区域(浅黄色)四个区域。当位于最佳区域的氨基酸残基所占比例大于 90%, 且位于不允许区域的氨基酸比例不超过 1%时所得模型的稳定性较好[21]。图 6 为 AMO 模型所对应拉氏图。如图 6 所示, 所得模型中位于红色区域的残基所占比例为 94.9%, 余下 5.1%位于褐色区域, 没有残基位于黄色和浅黄色区域, 这说明预测所得 AMO 模型构象良好。

#### 4. 结论

采用 PCR 技术成功扩增粪产碱杆菌 NR 基因组 DNA 中 AMO 基因序列, 得到长度为 1639 bp 的 DNA 序列。经 BLAST 比对所得基因序列为 amoA 序列, 包含编码 AMO 活性位点序列。该段序列包含 1 个完整的开放阅读框(ORF), 编码长度为 346 aa 的多肽链。经比对分析该序列为 AMO 蛋白质序列。该蛋白序列分子量大小为 36.7 kDa, 是碱性蛋白(pI = 9.38)也是疏水性蛋白(GRAVY = 0.972)。此外, AMO 也是跨膜蛋白, 有 12 个跨膜区, C 端和 N 端均位于膜外细胞周质一侧。成功构建 AMO 三级结构模型, 模型置信度为 98.6%, 含有一个金属镍原子结合位点。拉氏图表明, AMO 模型位于最佳区域的氨基酸残基所占比例为 94.9%, 该模型构象良好。

#### 基金项目

中央高校基本科研业务费(106112016CDJXY210007)。

#### 参考文献 (References)

- [1] Robertson, L.A., Van Niel, E.W., Torremans, R.A. and Kuenen, J.G. (1988) Simultaneous Nitrification and Denitrification Inaerobic Chemostat Cultures of *Thiosphaerapantotropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 2812-2818.
- [2] Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M. and Strous, M. (2003) New Concepts of Microbial Treatment Processes for the Nitrogen Removal in Wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**, 481-492. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00039-1)
- [3] Li, Y., Wang, Y., Fu, L., Gao, Y., Zhao, H. and Zhou, W. (2017) Aerobic-Heterotrophic Nitrogen Removal through Nitrate Reduction and Ammonium Assimilation by Marine Bacterium *Vibrio* sp. Y1-5. *Bioresource Technology*, **230**, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.049>
- [4] Ye, J., Zhao, B., An, Q. and Huang, Y. (2016) Nitrogen Removal by *Providencia rettgeri* strain YL with Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification. *Environmental Technology*, **37**, 2206-2213. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1146338>
- [5] Lv, Y., Wang, X., Liu, B., Liu, Y. and Yang, X. (2012) Isolation and Characterization of Heterotrophic Nitrifying Strain W1. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **20**, 995-1002. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(12\)60428-5](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(12)60428-5)
- [6] Duan, J., Fang, H., Su, B., Chen, J. and Lin, J. (2015) Characterization of a Halophilic Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacterium and Its Application on Treatment of Saline Wastewater. *Bioresource Technology*, **179**, 421-428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.057>
- [7] Chen, Q., Ni, J., Ma, T., Liu, T. and Zheng, M. (2015) Bioaugmentation Treatment of Municipal Wastewater with Heterotrophic-Aerobic Nitrogen Removal Bacteria in a Pilot-Scale SBR. *Bioresource Technology*, **183**, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.022>
- [8] Yang, X., Wang, S., Zhang, D. and Zhou, L. (2011) Isolation and Nitrogen Removal Characteristics of an Aerobic Heterotrophic Nitrifying-Denitrifying Bacterium, *Bacillus Subtilis* A1. *Bioresource Technology*, **102**, 854-862. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.007>
- [9] 宋琴, 许雷. 异养硝化作用酶学研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(5): 60-62.
- [10] 何霞, 吕剑, 何义亮, 赵彬, 李春杰. 异养硝化机理的研究进展[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 844-847.

- [11] 赵彬, 林燕, 何义亮. 异养硝化及其在脱氮工艺中的研究[C]//第二届全国环境化学学术报告会. 第二届全国环境化学学术报告会论文集: 2014年卷. 上海, 2004.
- [12] Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P. and Liesack, W. (1997) The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 4704-4712.
- [13] Moir, J.W., Crossman, L.C., Spiro, S. and Richardson, D.J. (1996) The Purification of Ammonia Monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Letters*, **387**, 71-74. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00463-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00463-2)
- [14] 王一明, 彭光浩. 异养硝化微生物的分子生物学研究进展[J]. 土壤, 2003, 35(5): 378-386.
- [15] Zhao, B., An, Q., He, Y.L. and Guo, J.S. (2012) N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> Production during Heterotrophic Nitrification by *Alcaligenes faecalis* Strain NR. *Bioresource Technology*, **116**, 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.113>
- [16] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker, J.M., Ed., *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, New York, 571-607.
- [17] Moller, S., Croning, M. and Apweiler, R. (2002) Evaluation of Methods for the Prediction of Membrane Spanning Regions. *Bioinformatics*, **18**, 218. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.1.218>
- [18] Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. and Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis. *Nature Protocols*, **10**, 845-858.
- [19] Wass, M.N., Kelley, L.A. and Sternberg, M.J.E. (2010) 3DLigandSite: Predicting Ligand-Binding Sites Using Similar Structures. *Nucleic Acids Research*, **38**, W469-W473. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq406>
- [20] Klotz, M.G., Alzerreca, J. and Norton, J.M. (1997) A Gene Encoding a Membrane Protein Exists Upstream of the *amoA/amoB* Genes in Ammonia Oxidizing Bacteria: A Third Member of the *amo* Operon? *FEMS Microbiology Letters*, **150**, 65-73. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00098-0)
- [21] 薛庆中. DNA 和蛋白质序列数据分析工具[M]. 北京: 科学出版社, 2012.

#### 期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [amb@hanspub.org](mailto:amb@hanspub.org)