

偶氮染料脱色菌株 AZR 偶氮还原酶基因的克隆及其序列分析

杜翠红^{1*} 高体琪¹ 张稚兰¹ 周集体²

(1. 集美大学生物工程学院 福建 厦门 361021)

(2. 大连理工大学环境与生命学院 辽宁 大连 116023)

摘要: 利用 16S rRNA 鉴定偶氮染料脱色菌株 AZR 属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*)中的科氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*), 根据 GenBank 上登录的葡萄球菌属的 3 个偶氮还原酶基因序列设计扩增引物, 从菌株 AZR 的基因组中扩增出偶氮还原酶基因, 其大小为 567 bp, 编码 188 个氨基酸。GenBank 搜索表明其为新基因, 递交 GenBank 数据库, 获得登录号为 EU849488。通过互联网数据库及生物信息学分析工具进行初步分析表明, 该基因编码的蛋白属于黄素蛋白家族, 是一种依赖 NADPH 的 FMN 还原酶; 是一种等电点为 5.75 的稳定蛋白, 定位于细胞质中; 由 α 螺旋、延伸带和随机卷曲 3 种形式组成; 具有蛋白激酶 C 磷酸化等多个位点, 并具有一个强跨膜疏水区。
关键词: 科氏葡萄球菌, 偶氮还原酶, 基因克隆, 生物信息学

Cloning and Sequence Analysis of Azoreductase Gene from the Strain AZR

DU Cui-Hong^{1*} GAO Ti-Qi¹ ZHANG Zhi-Lan¹ ZHOU Ji-Ti²

(1. College of Biological Engineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

(2. Institute of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: The result of 16S rRNA analysis showed the strain AZR belonged to *Staphylococcus cohnii*. According to three azoreductase's gene sequences from *Staphylococcus* in GenBank, a pair of primers were designed and the azoreductase's gene was amplified from the strain AZR's genome successfully. The sequence contained a complete 567 bp ORF (Open Reading Frame) encoding the azoreductase, consisting of 188 amino acids. Blast in GenBank indicated that it is a novel gene, and it has been deposited with the GenBank Data Libraries under accession number EU849488. The characteristics of the protein coded by this gene were analyzed by bioinformatics. The result showed that this protein belonged to the flavin protein family and was a kind of NADPH-depedent FMN reductase, and it was stable, pI 5.75, located in cytoplasm, and composed of Alpha helix, extrended strand random coil. There was a srong transmembrane domain and contained some conserved sites such as protein dinase C-phosphorylation.

Keywords: *Staphylococcus cohnii*, Azoreductase, Gene cloning, Bioinformatics

基金项目: 集美大学中青年创新团队专项基金资助项目(No. 2006A002); 集美大学科研启动基金资助项目(No. C60610)

* 通讯作者: Tel: 86-592-6183587; ✉: cuihongdu@jmu.edu.cn

收稿日期: 2009-03-26; 接受日期: 2009-06-01

偶氮染料广泛应用于印染、食品、化妆品等行业, 每年全球染料总产量的一半为偶氮染料。绝大多数偶氮染料以废物形式排入环境, 由于其数量和种类的不断增长, 造成的环境污染日趋严重。目前处理偶氮染料废水的工艺主要利用物理/化学方法, 如吸附、沉淀、化学氧化、光降解和膜过滤等。这些方法对染料废水的处理能力有限, 能耗大、成本高, 且容易造成二次污染。而利用微生物处理偶氮染料废水是相对直接且副作用小的方法, 因而引起人们的广泛关注。

近年来, 国内外对细菌降解偶氮染料的研究越来越多。偶氮染料脱色菌种类多样, 有好氧性细菌, 也有厌氧性细菌, 同时还有兼性厌氧菌。其中以假单胞菌、芽孢杆菌和肠杆菌数量最多^[1]。这些菌株多数是从染料废水处理厂污泥或土壤中获得; 还有一部分是来源于人类肠道菌群。本实验所采用的菌株就是由染料废水处理厂污泥中筛选得到的一株耐盐性偶氮染料脱色菌(命名为 AZR)。前期对菌株 AZR 的驯化培养实验结果表明, 该菌株对偶氮染料酸性红 B 具有较强的降解作用, 降解速度与菌体生长对应关系, 菌株 AZR 在 24 h 内对酸性红 B 的脱色率可达到 95%以上。菌株 AZR 与目前已知的偶氮染料脱色菌株相比, 其优势在于它可以在较高的盐浓度下(15% NaCl)对偶氮染料进行脱色, 从而更有利于高盐度染料废水的应用^[2]。但自然界分离到的细菌中偶氮还原酶表达量较低, 酶活不高, 应用于废水处理时效果不理想。而有研究表明, 在大肠杆菌中表达重组的偶氮还原酶的酶活是自然状态下的 10~50 倍^[3]。因此, 本研究首先通过 16S rRNA 对耐盐偶氮染料脱色菌株进行初步鉴定, 然后根据鉴定结果, 结合 GenBank 上登录同一菌属的偶氮还原酶基因序列设计 PCR 引物, 通过 PCR 法扩增出该菌株的偶氮还原酶基因。并对该偶氮还原酶进行生物信息学分析, 以获取更多关于该酶家族信息, 获得耐盐偶氮染料脱色菌中偶氮还原酶的特征, 为其基因改造及其外源表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

16S rRNA 细菌鉴定 PCR 试剂盒、*Taq* 酶、DNA 连接试剂盒、限制性内切酶及 DNA Marker 均购自大连 TaKaRa 公司; 快速质粒小量提取试剂盒、DNA

凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; PCR 引物合成和 DNA 测序是由上海英俊生物技术有限公司完成; 其他生化试剂主要购自厦门鹭隆生物科技发展有限公司; 普通化学试剂主要购自厦门市绿茵试剂有限公司, 均为分析纯。

1.2 质粒与菌株

偶氮染料脱色菌株 AZR 从染料废水处理厂污泥中筛选得到, 来源于大连理工大学环境与生命学院环境工程研究所。pMD-18-T Vector 购自大连 TaKaRa 公司, 大肠杆菌菌株 DH5 α 为本室保存, 用作目的片段 T-克隆过程中的质粒扩增。

1.3 菌株 AZR 的 16S rRNA 鉴定

1.3.1 基因组 DNA 的提取: 将甘油保存的菌株经过培养驯化后, 恢复其对偶氮染料的脱色能力。然后收集菌体, 提取基因组 DNA, 提取方法是在文献 [4] 的基础上加以改进: 取一定量培养到对数生长期的菌液, 8000 r/min 离心 45 s 收集菌体; 在 -20°C 与 37°C 之间反复冻融几次; 按每克湿菌体加入 25 mL TE 缓冲液, 抽吸使菌体充分悬浮菌体; 加入溶菌酶至 1 mg/mL, 37°C 水浴 1 h, 加入 10% SDS 至终浓度 1.6%, 55°C 轻摇 15 min; 加入 5 mol/L KAc 至终浓度 0.5 mol/L, 置于冰浴 2 h; 加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 混匀, 4°C、12000 r/min 离心 10 min; 移出上清, 往上清液中加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 混匀, 4°C、12000 r/min 离心 10 min; 移出上清, 加入等体积的氯仿/异戊醇, 混匀, 4°C、12000 r/min 离心 10 min; 移出上清, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, -20°C 过夜; 4°C、12000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 沉淀自然晾干(约 10 min~20 min); 加入 50 μ L 无菌超纯水, 加入 1 μ L 1 mg/mL RNase, 充分混匀, 37°C 水浴反应 30 min; 4°C、12000 r/min 离心 10 min, 取上清, -20°C 保存备用。吸取 5 μ L 样品进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳验证。

1.3.2 16S rRNA PCR 扩增及测序: 以菌株 AZR 的基因组为模板, 以 16S rRNA 细菌鉴定 PCR 试剂盒中的 Forward Primer 和 Reverse Primer 2 为引物, 扩增该菌株 16S rRNA 的全长序列。PCR 条件为: 94°C 4 min; 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 90 s, 共 30 个循环; 72°C 5 min。反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物后, 送至上海英俊科技有限公司进行测序, 测序引物为 16S rRNA 细菌鉴定 PCR 试剂盒中的 Seq forward 和 Seq re-

verse。

1.3.3 16S rRNA 的序列比对及系统进化树构建: 测序结果用 NCBI 网站上的 Blast 搜索工具进行序列相似搜索^[5], 得到相似性较高的 16S rRNA 序列, 应用 Primer-Premier 5.0、DNA Star、seqtool、Clustal X、MEGA 4.1 等软件进行序列比对及系统进化树构建^[6,7]。

1.4 菌株 AZR 的偶氮还原酶基因的克隆及测序

1.4.1 引物设计: 根据耐盐菌株 AZR 的 16S rRNA 鉴定结果, 结合 GenBank 上登录的同一菌属的偶氮还原酶基因序列进行引物设计。利用 Genedoc 软件对不同核苷酸序列进行比对, 找到保守性较高的区域, 将其初步确定为引物设计区。再利用 Primer Premier 5 软件和 DNASTar 软件对预设计的引物进行评价后, 最终确定上、下游引物序列。引物由上海英骏生物技术有限公司广州合成部合成。

1.4.2 PCR 扩增: 以菌株 AZR 的基因组 DNA 为模板, 采用 2.2.1 中设计的上、下游引物进行 TD-PCR 扩增^[8]。扩增条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 50°C ~40°C 45 s, 72°C 1 min, 共 20 个循环, 每个循环降 0.5°C; 72°C 7 min, 94°C 30 s, 50°C 45 s, 72°C 1 min, 10 个循环; 72°C 5 min。反应结束后取 5 μL PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 检测 PCR 结果。

1.4.3 T-克隆及测序: 将 2.2.2 中获得的 PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒回收后, 根据 DNA 浓度及其片段长度, 取 PCR 回收片段 2 μL 与 1 μL 的载体 pMD-18-T 用 DNA 连接试剂盒进行连接, 16°C 连接过夜。连接液采用热激法转入大肠杆菌 DH5α 的感受态细胞中。在含 IPTG、X-gal 及氨苄青霉素的 LB 平板上挑选白色菌落, 37°C 过夜培养后, 用快速质粒小量提取试剂盒提取质粒, 经 PCR 验证成功后, 获得重组克隆质粒 pMD18-T-AZR。将相应菌体递交上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 菌株 AZR 的偶氮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 上发表的序列进行核苷酸及推导氨基酸的比较分析, 并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该偶氮还原酶的结构和性质进行预测^[9,10]。

2 结果

2.1 菌株 AZR 的 16S rRNA 鉴定

2.1.1 基因组 DNA 的提取: 将恢复脱色能力的菌株 AZR 进行 DNA 提取, 结果见图 1。电泳结果表明提取的菌株 AZR 基因组 DNA 片段大小在 23 kb 左右, 完全达到 PCR 反应模版的要求。

2.1.2 PCR 扩增菌株 AZR 的 16S rRNA 及测序: 利用 16S rRNA 细菌鉴定 PCR 试剂盒, 按照其说明进行 16S rRNA 的 PCR 扩增, 结果见图 2。将该 PCR 产物送往上海英骏生物技术有限公司进行测序, 测序结果递交 GenBank 数据库, 获得登录号为 FJ908085。

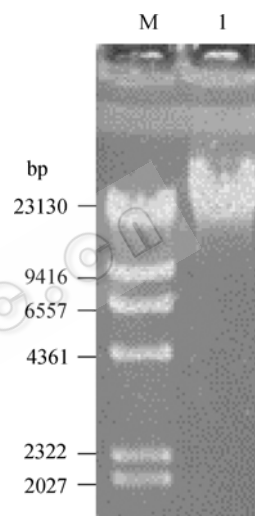


图 1 菌株 AZR 基因组 DNA 提取结果

Fig. 1 Genome DNA of the strain AZR

Note: M: λ -Hind III digest DNA marker; I: Genome DNA.

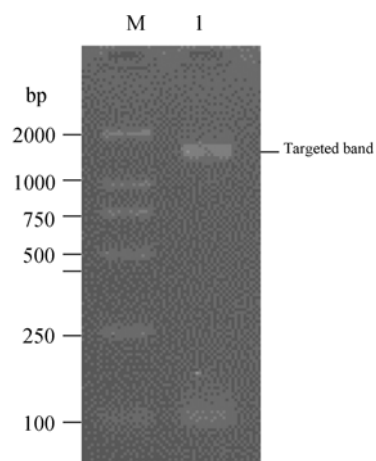


图 2 菌株 AZR 的 16S rRNA

Fig. 2 16S rRNA of the strain AZR

Note: M: DNA marker DL2000; I: 16S rRNA.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2.1.3 16S rRNA 的序列系统进化树构建: 利用 NCBI 上的 Blast 搜索工具对 16S rRNA 进行序列相似性搜索, 根据 Blast 搜索的结果, 挑选 13 株与菌株 AZR 的 16S rRNA 序列相似性都达到 97% 以上的菌株进行系统发育树的构建。构建结果见图 3。由该系统发育树显示, 菌株 AZR 与葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 内的科氏葡萄球菌 (*cohnii*) 进化关系最近, 而且与其中进化位置最近的 *Staphylococcus cohnii* 的 16S rRNA 序列相似性可达到 100%, 可确定该菌为科氏葡萄球菌 (*Staphylococcus cohnii*)。

2.2 菌株 AZR 的偶氮还原酶基因的克隆及测序

2.2.1 偶氮还原酶基因 PCR 扩增的引物设计: 根

据以上 16S rRNA 鉴定结果可知菌株 AZR 为科氏葡萄球菌, 结合 GenBank 上登录的该菌属的偶氮还原酶基因序列 (GeneID: 2860138, 3236352, 3242986) 进行引物设计。利用 Genedoc 软件对这 3 条核苷酸序列进行比对, 发现其 5' 端和 3' 端的 20 bp 左右的序列相似性可达到 95% 左右 (见图 5), 将其初步确定为引物设计区。再利用 Primer Premier 5 软件和 DNASTar 软件对预设计的引物进行评价后, 最终确定上、下游引物序列如下:

GF(上游引物): 5'-CATGAAAGGATTAATTATTA

T-3';

GR(下游引物): 5'-TTATTTTAAATGTTTCAT-3'.

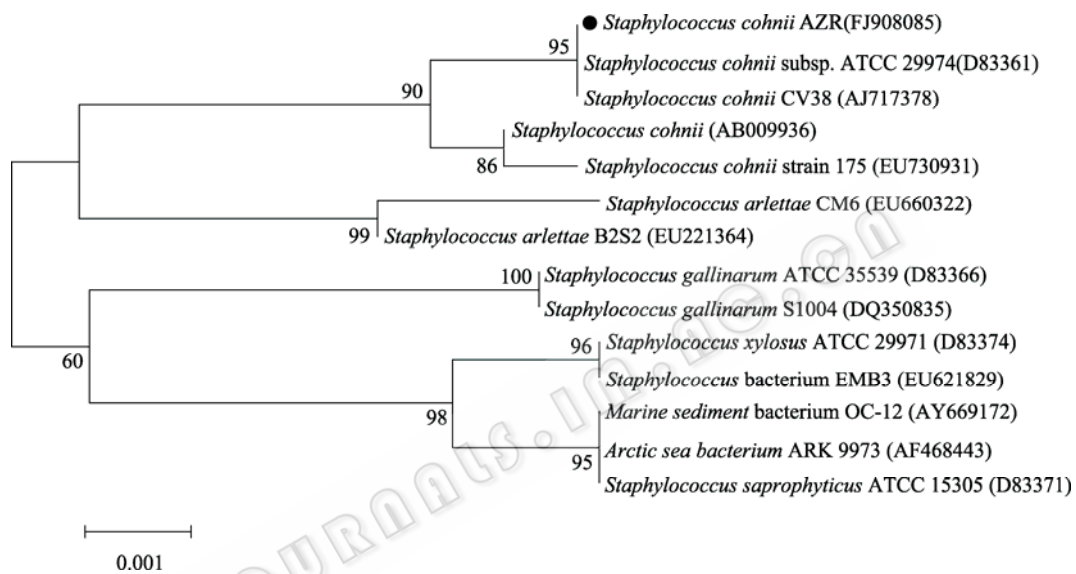


图 3 根据 16S rRNA 序列构建的系统发育树(NJ 法, 1000 次)

Fig. 3 The phylogenetic tree of 16S rRNA sequences showing the position of the strain AZR based on neighbor-joining (NJ) with 1000 bootstrap replication

Note: The numbers at the nodes indicate the bootstrap values. Bar (0.001), 1 nucleotide substitution per 1000 nucleotides of 16S rRNA sequence. Strain names are shown next to the organism names and GenBank accession numbers for the 16S rRNA sequences used are given in parentheses.

2.2.2 PCR 扩增偶氮还原酶基因(AZR): 利用 TD-PCR 法扩增偶氮还原酶基因, 电泳结果显示 PCR 产物的大小在 570 bp 附近, 这与预期的 567 bp 相符(见图 5), 电泳结果如图 4。

2.2.3 偶氮还原酶基因重组克隆质粒鉴定及测序: 重组克隆质粒 pMD18-T-AZR, 经过 PCR 验证后(图略), 进行测序。测序结果表明, 该 PCR 产物长度为 567 bp, 这与预计的相同, 而且阅读框正确。将测序结果递交 GenBank 数据库, 获得登录号为 EU849488, 对应的氨基酸序列号为 ACF54629。

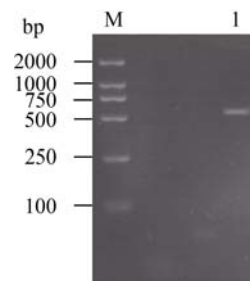


图 4 PCR 扩增偶氮还原酶基因

Fig. 4 The result of PCR

Note: M: DNA marker DL2000; I: PCR product.

2.3 菌株 AZR 的偶氮还原酶基因的生物信息学分析

利用 Genedoc 软件将本实验菌株 AZR 的偶氮还原酶基因序列与 GenBank 上登录的该菌属的偶氮还原酶基因序列进行序列比对。由比对结果(见图 5)发现, 测序结果与已知 3 条序列(分别来自 *Staphylococcus aureus* subsp. aureus MRSA252, GeneID: 2860138; *Staphylococcus aureus* subsp. aureus COL, GeneID: 3236352; *Staphylococcus epidermidis* RP62A, GeneID: 3242986)的相似性分别为 82%、75%、87%。由此推断, PCR 的扩增产物是一种新的偶氮还原酶基因。

利用网络上的一些工具对该基因进行一些预测, 希望获取更多关于该酶家族信息, 并奠定将来基因改造的基础, 以便探索高效处理偶氮染料废水的新方法。

Protparam(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)分析该蛋白分子式 $C_{938}H_{1466}N_{248}O_{285}S_3$; 分子量

20873.6; 等电点 pI 5.75; 理论推导半衰期为大于 10 h, 推算不稳参数为 23.32, 属于稳定蛋白。

PSORT 服务器 (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>)定位分析显示该蛋白定位于细胞质。

Seanprosite(<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>)数据库查询, azoreductase 存在有 9~11 和 58~60 位的 PKC_PHOSPHO_SITE (蛋白激酶 C 磷酸化位点); 13~18、85~90、89~94、109~114、112~117、115~120、116~121 MYRISTYL(N 端豆蔻酰化位点); 54~57、99~102、182~185 位 CK2_PHOSPHO_SITE(酪蛋白激酶 II 磷酸化位点); 62~65 位 ASN_GLYCOSYLATION (N 端糖基化位点); 150~158 位 TYR_PHOSPHO_SITE(酪氨酸激酶磷酸化位点)。

DAS Transmembrane Prediction server (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>)分析该蛋白的强跨膜区域由 130~136 位的氨基酸序列组成。

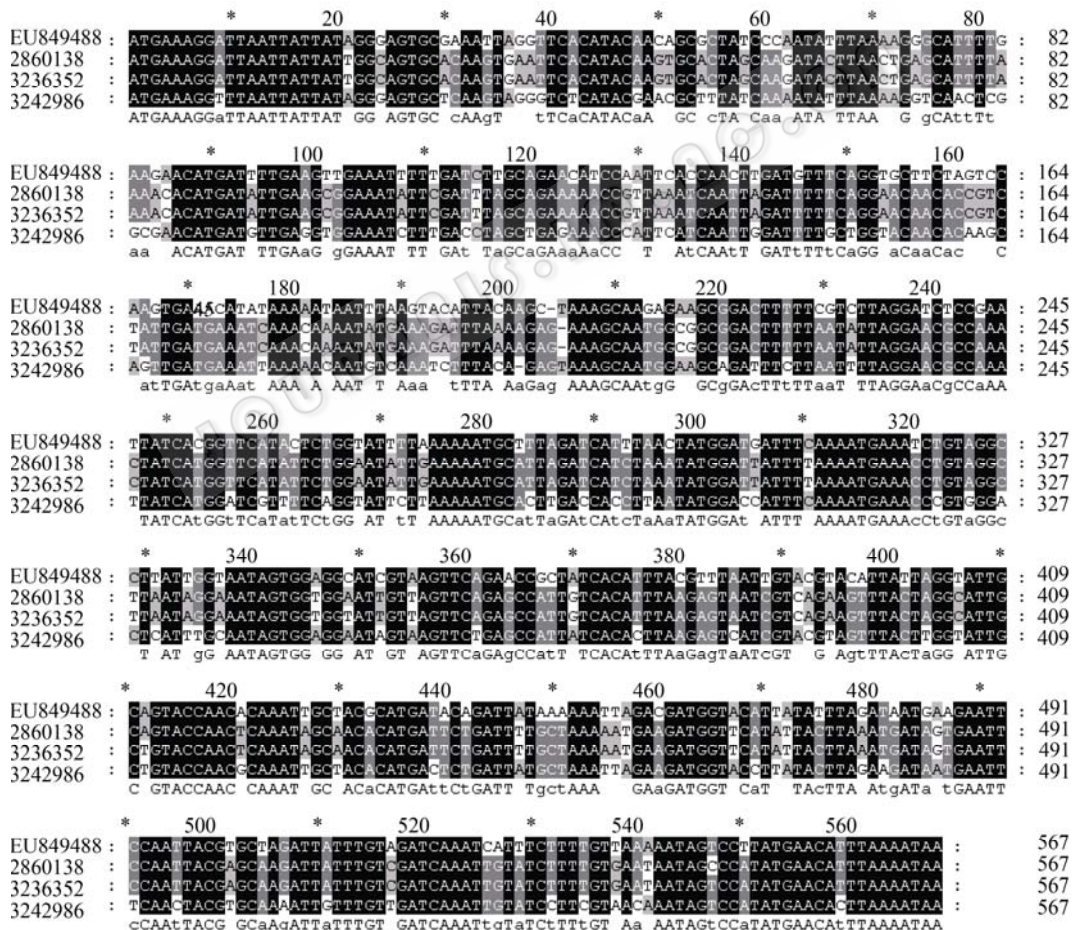


图 5 偶氮还原酶基因的序列比对

Fig. 5 Alignment of azoreductase genes

Note: EU849488: *Staphylococcus cohnii* str. AZR (This study); 2860138: *Staphylococcus aureus* subsp. aureus MRSA252; 3236352: *Staphylococcus aureus* subsp. aureus COL; 3242986: *Staphylococcus epidermidis* RP62A.

GOR IV (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl)进行分析,表明该蛋白二级结构中包含 α 螺旋(Alpha helix)、延伸带(Extended strand)和随机卷曲(Random coil)三种形式,分别占39.89%、13.83%、46.28%比例。

InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>)分析该蛋白属于黄素蛋白家族,是一种依赖NADPH的FMN还原酶。

为了进一步获得该偶氮还原酶的结构与功能的信息,从该蛋白的氨基酸序列(ACF54629)出发,在蛋白数据库(PDB)中进行Blast搜索结果表明,该蛋白(*Staphylococcus cohnii* str. AZR)与来自*Bacillus subtilis* str. 168(2GSW-A),*Bacillus subtilis*(1NNI-A),*Pseudomonas aeruginosa*(1X77)和*Saccharomyces cerevisiae*YLR011wp(1TOI-A)的黄素氧化还原蛋白

分别有30%、30%、27%和23%的序列一致性。将该蛋白与已知功能的黄素氧化还原蛋白的序列进行对齐分析显示(如图6),Pro⁸¹-Asp⁹⁶之间的氨基酸残基具有较高的相似性,根据文献报道^[11, 12]该区域为1个新的黄素氧化还原蛋白家族的特征序列(P-X-Y-H/N-6X-L-K-N-S/A-L/I-D),该段特征序列形成了*S. cerevisiae*黄素氧化还原蛋白YLR011wp(PDB 1TOI)中 β 3与 α 3之间的环状结构,位于活性中心辅基FMN附近^[13]。另外,根据*S. cerevisiae*黄素氧化还原蛋白YLR011wp(PDB 1TOI)的结构与功能研究^[13]及该偶氮还原酶与其氨基酸序列的对齐分析结果显示,在该偶氮还原酶中也可能存在着相应的FMN的结合位点(图6中用*标记)和NAD(P)H结合位点(图6中用<NAD>标记)。

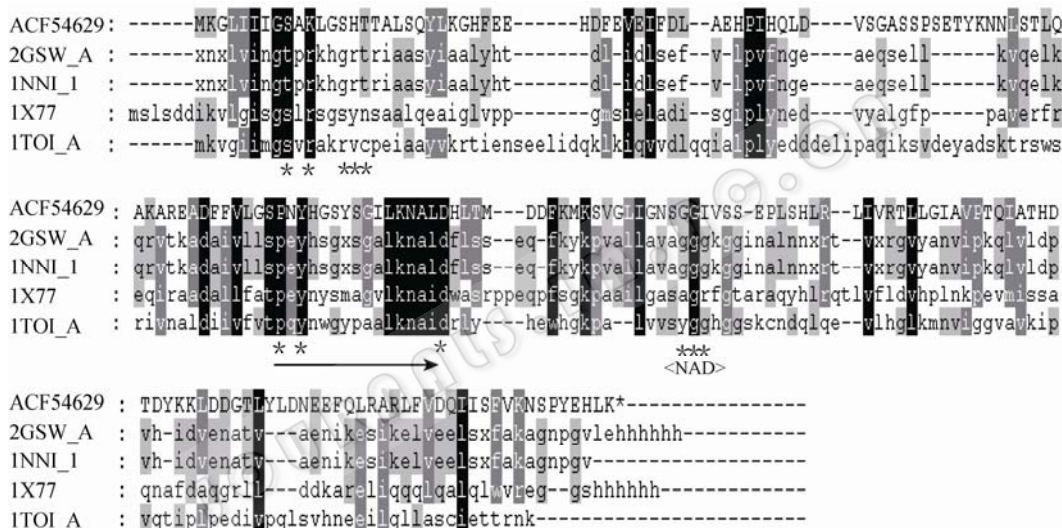


图6 偶氮还原酶AZR与相似黄素氧化还原蛋白氨基酸序列的对齐分析

Fig. 6 Multiple sequence alignment of AZR with other similar flavodoxins

注:具有相似性的残基以阴影表示;可能的NAD(P)H结合位点标记为<NAD>;FMN结合位点标记为*;箭头区域内为该家族的保守特征序列。

Note: ACF54629: *Staphylococcus cohnii* str. AZR (This study); 2GSW-A: *Bacillus subtilis* str.168; 1NNI-A: *Bacillus subtilis*; 1X77: *Pseudomonas aeruginosa*; 1TOI-A: *Saccharomyces cerevisiae*.

3 讨论

近年来,偶氮还原酶基因的克隆和表达方面已取得了不少进展^[14-16],其中包括链霉菌、芽胞杆菌、大肠杆菌、假单胞菌及葡萄球菌等。但由于偶氮还原酶的基因大多来源于自然界土壤中或人类肠道菌群中,在自然环境下的生长并不令人满意,尤其大多数染料废水中无机盐含量较高,不适宜一些染料

降解菌株的生长和繁殖,因此,有必要借助基因工程的手段改变偶氮还原酶基因结构和功能,提高其降解能力。作为基因工程改造的前提,需要获得大量不同来源的偶氮还原酶基因序列和氨基酸组成的信息,通过同源性比较,推测其活性中心,为定点突变奠定基础。

本研究所采用的菌株是从染料废水处理厂的污泥中筛选得到的一株耐盐性偶氮染料脱色菌。为了

获得该菌株偶氮还原酶的结构信息, 需要对其基因进行克隆和测序。本研究试图在已报道的偶氮还原酶基因序列的基础上, 设计特异性引物, 采用 PCR 技术克隆得到该菌株偶氮还原酶基因。但通过对 GenBank 数据库搜索得知, 不同菌属的偶氮还原酶基因序列相似性很差, 且基因大小也相差很大。因此, 在设计引物之前, 需要对该实验菌株进行 16S rRNA 鉴定, 结果表明, 该菌株属于葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 内的科氏葡萄球菌。结合 GeneBank 上登录的葡萄球菌属的 3 条偶氮还原酶基因序列进行引物设计, 采用 PCR 技术克隆得到了该菌株偶氮还原酶基因。测序结果表明, 该菌株的偶氮还原酶基因序列与已知同菌属的 3 条偶氮还原酶基因序列的相似性分别为 82%、75%、87%。由此推断, PCR 的扩增产物是一种新的偶氮还原酶基因。利用 NCBI 的 Blast 工具搜索对所获得的蛋白序列进行相似性搜索, 发现该蛋白序列与 *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305 的偶氮还原酶的相似性高达 92%, 由此断定所扩增的确实是偶氮还原酶基因。

为了获得该菌株偶氮还原酶的结构信息, 利用现代生物信息学手段对该偶氮还原酶的性质与结构进行预测, 获取更多关于该酶家族的信息, 并奠定将来基因改造的基础, 以便探索高率处理偶氮染料废水的新方法。

参 考 文 献

- [1] 洪义国, 许玫英, 郭 俊, 等. 细菌偶氮还原研究进展. 应用与环境生物学报, 2005, **11**(5): 642-647.
- [2] 柳广飞, 周集体, 王 竞, 等. 细菌对偶氮染料的降解及偶氮还原酶的研究进展. 环境科学与技术, 2006, **29**(4): 112-114.
- [3] 徐文东, 文湘华, 付莉燕. 偶氮染料派拉丁蓝 RRN 脱色细菌的选育与研究. 环境科学学报, 2001, **21**: 127-132.
- [4] 孙克非, 郑 平, 钱新民, 等. 沼泽红假单胞菌染色体的提取. 生物技术, 2000, **10**(3): 47-48.
- [5] 蒋 彦, 王小行, 曹 毅, 等. 基础生物信息学及应用. 北京: 清华大学出版社, 2003, pp.40-47.
- [6] Larsen JB, Larsen A, Bratbak G, *et al.* Phylogenetic analysis of members of the phycodnaviridae virus family, using amplified fragments of the major capsid protein gene. *Appli Environ Microbiol*, 2008, **74**(10): 3048-3057.
- [7] 张稚兰, 刘静雯, 董双林, 等. 海洋球石藻 *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae) 病毒主要外壳蛋白基因的克隆与序列分析. 海洋与湖沼, 2009, **40**(2): 152-157.
- [8] 迪芬巴赫 CW, 德维克斯勒 GS. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 1999, p.35.
- [9] 欧阳平. 生物信息学数据库与序列分析. 生物学通报, 2007, **42**(1): 24-25.
- [10] Park JH, Aravind L, Wolff EC, *et al.* Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: A HEAT-repeat-containing metalloenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(1): 51-56.
- [11] 柳广飞, 周集体, 周 冕, 等. 偶氮还原酶 AZR 的结构及其 K¹⁰⁹ 的定点突变研究. 微生物学通报, 2008, **35**(5): 661-665.
- [12] Liu G, Zhou J, Lv H, *et al.* Azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737 is a flavodoxin that also functions as nitroreductase and flavin mononucleotide reductase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**(6): 1271-1279.
- [13] Liger D, Graille M, Zhou CZ, *et al.* Crystal structure and functional characterization of yeast YLR011wp, an enzyme with NAD(P)H-FMN and ferric iron reductase activities. *J Biol Chem*, 2004, **279**(33): 34890-34897.
- [14] Yasuhiko S, Tomoko Y, Amin R, *et al.* Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from Soi. *J Biol Chem*, 2001, **276**(12): 9059-9065.
- [15] Yan B, Zhou JT, Wang J, *et al.* Expression and characteristics of the gene encoding azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.173. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **236**: 129-136.
- [16] 李 可, 张肇铭, 刘晓辉, 等. 沼泽红假单胞菌偶氮还原酶相关基因的克隆及其生物信息学分析. 生物技术, 2004, **14**(5): 1-3.