

光合菌 *Rhodovulum sulfidophilum* 固氮基因之選殖

吳育甄、林峰右、黃致中、葉信利

水產試驗所海水繁養殖研究中心

前言

養殖池水體環境經長時間養殖累積氮及其化合物等物質導致水質不佳，使魚隻容易產生疾病。一般養殖生物主要的排泄物為氨 (ammonia, NH_3^+)，在有氧的環境下，需經由氮循環，由氧化作用轉換為毒性較低的解離氨 (NH_4^+)，再經由硝化作用轉換為亞硝酸 (NO_2^-)，再轉換成較無毒性的硝酸 (NO_3^-)，最終轉成氮或氮氧化物，經植物吸收利用或散溢於大氣中，這個過程所需耗費的時間較長，如要使水質更為穩定，則需藉由有益的微生物協助。

光合菌為養殖常使用的益生菌，是一種可以利用光產生能量的微生物，生長在厭氧及兼性厭氧的環境下，具有固氮、脫氮、固碳及氧化硫化物能力 (Madigan, 2004)，添加在養殖池水環境中，可降低水中的氨、亞硝酸及硫化氫濃度，改善水質 (Chien and Liang, 1994)。因此，也常被應用在農業廢水的處理，以生物降解的方式分解有機質。

光合菌在固氮作用的過程，是藉由固氮酶 (nitrogenase) 和氫化酶 (hydrogenase) 兩種酶抑制細菌細胞膜中氧的存在，使光合菌在無氧狀態下進行反應，固氮酶的活性促使氫化酶被激活而產生氫和吸收氮，進而使光

合菌有充足的氫進行固氮作用 (Tan, 2009)。

固氮作用 (nitrogen fixation) 為將分子態氮還原成含氮化合物的過程，化學式為 $\text{N}_2 + 6\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow 2\text{NH}_3$ 。在一般環境的固氮方式有非生物固氮及生物固氮兩種。非生物固氮是在自然環境中通過閃電、高溫放電進行固氮，此種機制所形成的氮化物很少。生物固氮則是藉由特定種類微生物將氮轉為解離氨和亞硝酸，依其固氮的方式還可分共生性的固氮作用及自生性 (單棲) 的固氮作用。共生性固氮作用，就如根瘤菌與豆科植物需共生互依後，才有固氮能力。自生性固氮作用，則細菌本身即可進行，以分子態氮為營養來源，轉化合成胺基酸及蛋白質。具固氮能力的微生物包括好氧性細菌、兼性厭氧菌及厭氧菌。光合細菌中的紅螺菌屬、綠菌屬及藍細菌 (藍藻) 屬此固氮方式。

光合菌的基因組中含有固氮基因 (nitrogen fixation gene, nif)，目前已知的固氮基因型態分為 21 種，其中仍有多種的功能尚未證實，而大部分的基因型在固氮作用機制中扮演酵素酶的催化及電子的傳遞角色，過程中多需要金屬離子鐵 (Fe) 和鉬 (Mo) 的存在，部分需要化學元素硫 (S)。本試驗針對本所海水繁養殖研究中心所分離出的光合菌 *Rhodovulum sulfidophilum*，希望能選殖出含有鉬金屬之固

氮酶，證實具有固氮能力。

研究方法

一、光合菌培養與分析

取自本中心分離之 *R. sulfidophilum*，以 NS 培養液 [(yeast extract 0.05 g, sodium malate (sodium succinate) 0.5 g, NH₄Cl 0.1 g, mineral salts solution 10 ml, distilled water 90 ml, adjust pH to 7.0–7.5)]，於 28°C 進行培養。

二、光合菌 DNA 的萃取

菌液 DNA 萃取是使用 HiYield™ Plasmid Mini Kit，以管柱純化萃取 DNA。取 3 ml 之菌液 ($A_{600} \leq 4.0$) 至 1.5 ml 微量離心管，14,000 rpm 離心 30 秒，將多餘上清液移出，添加 40 ul Lysis buffer 和菌體均勻混合，添加 10 ul Proteinase K (20 mg/ml)，再添加 5 ul RNase A (20 mg/ml)，最後再添加 500 ul Lysis buffer 混合，將樣本經管柱過濾，離心 14,000 rpm 1 分鐘後，將過濾管柱移至新的離心管，再添加 500 ul Wash buffer 至過濾管柱中，14,000 rpm 1 分鐘，將廢液倒掉，去除雜質後，過濾管柱添加 elution buffer 回溶 DNA，放置-20°C 保存備用。

三、聚合酶連鎖反應

目標為選殖 *R. sulfidophilum* 基因組中的鉬和鐵蛋白酶 (nifD)，及含鐵還原蛋白酶 (nifH)，兩組引子對序列分別為 nifD : 5'-TGCTACCGCTCGA TGAAGTA-3' (forward) 和 nifD : 5'-AACCCGCTGCCATGATA-3' (reverse)；nifH : 5'-ACTCCACCCGTCTGAT CCTC-3' (forward) 和 nifH: 5'-CCGAGCACG TCAGAGAC-3' (reverse) (Tan et al., 2009)。兩

組引子分別進行 PCR 光合菌 DNA 片段增幅，反應液成分如下：萃取出的基因 DNA 樣本 5 ul、引子對 (100 um) 各 0.5 ul、dNTP 2 ul、10X reaction buffer 2 ul、Polymers (10X) 0.5 ul，加入無菌水至總體積為 25 ul。將 PCR 反應液至於溫度循環機 (ABI) 中進行 PCR 反應。反應條件：94°C 預熱 5 分鐘，再以 94°C 變性 30 秒，50°C 煉合 30 秒，72°C 延展 30 秒，共經 30 個循環，結束後以 72°C 延展 5 分鐘始作用完全，再以 4°C 終止反應。

四、電泳分析及目標基因選殖

將反應完成物取 9 ul 加入 1 ul 10X 染劑 (dye)，利用微量吸管均勻混和，進行非變性聚丙烯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)，均使用 1.5% 的 PAGE。電泳緩衝液使用 1X TAE Buffer，電泳時電壓以 100 伏特 60 分鐘，電泳後的膠體浸泡在 EtBr 染色 30 秒，再以自來水退染 5 分鐘，退染後膠體以 UV 電顯影像分析系統觀察 PCR 產物。

將預定之分子量大小的顏色帶切下，以 HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 粹取電泳膠片中的 DNA，再以 pGem®-T Easy Vector Systems 進行選殖。選殖的菌落委託明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech Co. Ltd., Taipei, Taiwan) 進行定序。

結果與討論

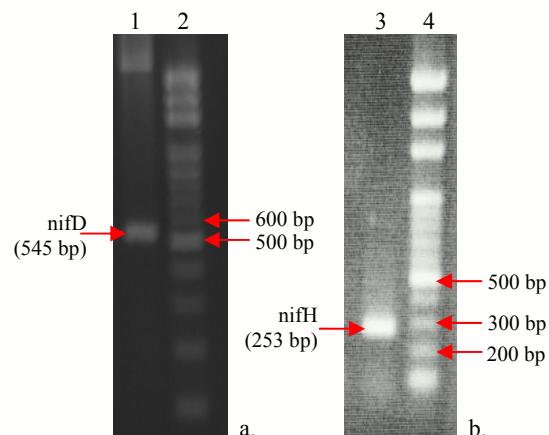
以 nifD 及 nifH 兩組引子對本中心分離培養之光合菌 *R. sulfidophilum* 進行 PCR 擴增部分片段，大小分別約為 545 bp 及 253 bp (如圖)。與 Tan 等 (2009) 文獻中所發表之光合

菌 *Rhodopseudomonas palustris* 的 nifD 及 nifH 兩基因序列長度一致。固氮基因 nifD 引子對所增幅之 PCR 產物定序後的核苷酸序列，以 BLAST 軟體比對基因庫 (GenBank) 之序列，得到的結果發現與多株不同菌種之 nif 有高度的相似性 (81–87%) (如表)，可以證實 *R. sulfidophilum* 具有固氮酶，可進行固氮作用，且此基因型的固氮酶由兩個金屬蛋白酶組成，一種是同時含有鉬和鐵的蛋白酶 (nifD)，另一種含鐵的還原蛋白酶 (nifH)。

Tan et al. (2009) 研究指出，光合菌 *R. palustris* 具有消耗分解有機底質，淨化工業廢水能力，此外還具有產氫能力。這個結果也能間接證實本試驗所用之光合菌種亦可能同時具有生物產氫 (biohydrogen) 的能力，在往後能進一步朝向生質能源方向進行研發，以提高光合菌之利用價值。

另外固氮基因 nifD 常被用來分析多種菌屬及藻類之固氮能力，也應用於基礎系統學各個層面的分類或某一特徵在生物發育過程中的進化，對於種與種之間的鑑定也有很大

的助益。根據相關研究，已得知許多菌種參與固氮作用之重要複合還原酵素核苷酸序列，且相關的分子生物操作技術也已經相當純熟，由此可證明對於固氮基因的相關研究應該持續進行，不但有助海水中心所分離培養之光合菌 *R. sulfidophilum* 在基因層次上的研究，也加速固氮基因在其他種類菌種之相關應用研究。



光合菌 *R. sulfidophilum* 核苷酸經 nifD 及 nifH 兩組引子 PCR 增幅產物，以電泳膠片分析結果 (固氮基因片段 a. nifD 為 545 bp 及 b. nifH 253 bp)

選殖光合菌 *R. sulfidophilum* nifD 核苷酸與其他物種之相似度比較

物種	相似度	基因庫編碼
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	473/544 (87%)	CP001312.1
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	472/546 (86%)	CP001150.1
<i>Methylobacterium</i> sp.	458/552 (83%)	CP000943.1
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	451/545 (83%)	AP012320.1
<i>Azospirillum</i> sp.	417/507 (82%)	AY423869.1
<i>Gluconacetobacter</i>	437/538 (81%)	AY624583.1