

斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)A1501 反硝化相关基因结构及功能分析*

燕永亮^{①②} 杨 剑^② 陈立宏^② 杨 帆^② 董 杰^② 薛 颖^② 徐星晔^②
朱雅芳^② 姚志健^③ 林 敏^{④**} 王忆平^{⑤**} 金 奇^{①②**}

(① 中国农业大学生物学院, 北京 100094; ② 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100176; ③ 国家人类基因组北方研究中心, 北京 100176; ④ 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; ⑤ 北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 在 A1501 株的基因组上鉴定了 4 个反硝化相关的基因簇: *nar*, *nir*, *nor* 和 *nos*, 共 40 个基因, 基因的转录产物与其他种群中物质运输、基因调控以及还原酶类蛋白高度同源. *nir*, *nor* 和 *nos* 基因簇在染色体上位置靠近, 与 *nar* 基因簇相隔较远. 与其他反硝化细菌比对的结果表明, A1501 株中的 40 个反硝化基因组成了一套完整的反硝化催化系统. 在 A1501 株中, 该系统有以下特点: (i) *nar* 基因簇中, *narK* 基因只发现一个拷贝. (ii) 在 *narK* 与 *narG* 之间有一个 *narM* 基因. (iii) 在 *narX*, *narL* 基因的下游鉴定了两个基因 *dnrE* 和 *orf1*, 其中 *dnrE* 基因是一个属于 FNR 家族的转录因子. (iv) A1501 株中 *nir* 基因有 16 个, 是所有已知反硝化细菌 *nir* 基因数量最多的. (v) 在 A1501 株中, 同时也是在假单胞杆菌属中首次报道 *norR* 基因. (vi) *nos* 基因簇相对保守, 无论在基因组成还是排列方式与参照的菌株都完全一致.

关键词 斯氏假单胞菌 反硝化反应 硝酸盐还原酶 亚硝酸盐还原酶 一氧化氮还原酶类 一氧化二氮还原酶

反硝化作用指在微生物作用下将化合态的氮转变为游离态氮气的过程, 从细胞的生物能学角度来讲反硝化作用是指细菌在无氧状态下进行呼吸作用的一种方式. 在此过程中氧化态的氮代替氧作为细胞膜上的电子传递的最终受体, 在一系列氧化还原

酶的作用下, 产生电位梯度, 最终将硝酸盐转变为氮气^[1]. 反硝化微生物在自然界的存在非常广泛, 反硝化相关基因的研究也是本领域的研究热点之一^[2~4].

斯氏假单胞菌 A1501 株(*Pseudomonas stutzeri* A1501)是一种革兰氏阴性菌. 最初从分类学上被命

2005-02-01 收稿, 2005-03-18 收修稿稿

* 国家“973”计划(批准号: 001CB108904)和国家“863”计划(批准号: 2001AA214021)资助项目

** 联系人, E-mail: zdsys@sina.com, linmin57@vip.163.com, wangyp@pku.edu.cn

名为粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*), 后来根据对该菌的 16S rRNA 的研究, 将该菌定为斯氏假单胞菌^[1]. 该菌在自然环境和微好氧条件下具有很好的固氮能力, 并作为一种作物生长促生菌得以开发利用, 相应地, 固氮基因的研究一直是该领域的研究热点^[6]. 在绝对厌氧条件下, 该菌能以乳酸为碳源、铵为氮源、硝酸盐为最终电子受体进行反硝化作用, 同时还表现出需硝酸盐的固氮酶活性^[2]. 在此基础上, 我们对该菌株的基因组进行了研究, 并绘制出了它的基因组草图. 我们对所获得的信息进行了初步的分析, 在染色体序列中鉴定出参与硝酸盐反硝化途径中相关酶类的编码区, 并对这些区域进行了深入的分析.

从基因组水平对 A1501 株染色体上所有反硝化基因进行研究, 不仅可以深化微生物反硝化过程的研究, 阐明反硝化过程中的基因调控机制以及蛋白间的互作机制, 从而建立反硝化反应在细胞体内的催化反应模型, 而且通过比较反硝化菌株相关基因的组成与结构, 可以为研究功能基因在不同种群之间的差异变化提供一个研究模型.

1 材料与方法

1.1 菌株与载体

斯氏假单胞菌 A1501 株为中国农业科学院生物技术研究所提供, 该菌分离自中国南方水稻根际土壤.

载体 pUC19 为经限制性内切酶 *Sma*I, 去磷酸化酶处理过的线性化载体, 购自 Promega 公司. *E. coli* DH5 α 为用于质粒的扩增与转化的宿主菌株.

1.2 各种试剂盒

质粒提取试剂盒以及 DNA 凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; 大规模测序模板提取试剂盒购自 Millipore 公司; DNA 测序试剂盒(BIG-DIY kit)购自 PE 公司.

1.3 各种化学试剂

X-gal, IPTG 等购于 Promega 公司; Tris, EDTA, SDS 购于 Gibco 公司; Agarose 购于上海仪涛公司; 溴化乙锭、氨苄青霉素购于 Sigma 公司. Tryptone, Yeast

extract 购自 OXIOD 公司; 其他实验常用的化学试剂为国产试剂, 均为分析纯.

1.4 实验方法

采用全基因组“shotgun”的方法^[8], 序列的拼接工作使用 WASHINGTON 大学基因组中心的 Phil Green 和 Brent Ewing 等开发的 Phred-Phrap 软件包进行. ORFs 的预测以及与现有的 COGs 和 NR 蛋白序列库进行 BLASTP 比对使用 Glimmer 软件 2.01 版.

1.5 核酸序列登记号

nar, *nir*, *nor* 和 *nos* 基因簇的核苷酸序列已分别提交 GenBank, 登记号为: *nar*, AY957387; *nir*, AY957388; *nor*, AY957389; *nos*, AY957390.

2 结果与讨论

采用全基因组“shotgun”的方法, 我们绘制了 A1501 菌的基因组草图, 大规模测序获得了 50408 个有效 reads, 平均有效长度为 609 bp, 总长度 30.7 Mb, 约 6 倍基因组覆盖率, 覆盖了全基因组 97.5% 的区域, 计算机拼接成 126 个 contigs, contigs 之间的平均间距约为 100 bp. 对获得的序列进行了分析, 在 A1501 株的基因组上鉴定了 40 个反硝化相关基因, 这些基因呈明显的簇状分布. 按照催化底物的不同分为硝酸盐还原酶类(*nar*)、亚硝酸盐还原酶类(*nir*)、一氧化氮还原酶类(*nor*)和一氧化二氮还原酶类(*nos*)基因.

nir, *nor* 和 *nos* 基因簇在染色体上相互靠近, 位于 contig118 上, 占据了约 36 kb 的染色体空间, 该区域共编码 42 个 ORFs, 其中有 30 个 ORFs 属于反硝化反应基因, 另外 12 个 ORFs 位于 6.6 kb 的 *nos-nir* 间隔区域. *nar* 基因簇位于 contig99 上, 该基因簇长度约为 15.1 kb, 编码 10 个 ORFs.

2.1 *nar* 基因

硝酸盐经反硝化催化转变为氮气的第一步是由硝酸盐还原酶系统完成的, 在 A1501 株中, 该系统的基因呈簇状分布在长 15.1 kb 的染色体区域, 共编码 10 个 ORFs, 按顺序分别鉴定为 *dnrE*, *orf1*, *narL*, *narX*, *narK*, *narM*, *narG*, *narH*, *narJ*, 以及 *narI*. 这 10 个 ORFs 中, 编码区最大的是 *narG*, 长 3756 bp, 编码一

个 1252 个氨基酸的蛋白, 最小的为 *narL*, 长 606 bp, 编码一个 202 个氨基酸的蛋白. 在染色体上, 这些基因按不同的方向进行转录(图 1). 基因在染色体上排列非常紧密, 编码区之间甚至互相交迭, 其中 *narL* 与 *narX* 编码区交迭 19 个碱基, *narJ* 与 *narI* 的编码区交迭 4 个碱基, *narG*, *narH* 和 *narJ* 基因之间的间距分别仅有 15, 7 个碱基.

多种微生物中的硝酸盐还原酶基因已被克隆并进行了相关研究, 与 A1501 株上 *nar* 基因簇的分布相似, 这些基因也呈簇状分布在染色体上(图 2).

与其他几株细菌相比, A1501 株在 *nar* 基因的分布和组成上具有一些特点: (i) A1501 株上只发现一个 *narK* 基因拷贝. (ii) *narK* 与 *narG* 之间有一个 *narM* 基因. (iii) *narL* 和 *narX* 基因的下游鉴定了两个基因 *dnrE* 和 *orf1*.

narG, *narH*, *narJ*, *narI*, *narL* 和 *narX* 基因在菌株 *P. stutzeri* A1501, *P. aeruginosa* PAO1^[4,9], *Burkholderia pseudomallei* K96243^[4]和 *Pseudomonas fluorescens*^[4,10]中都存在, 它们呈不同的转录方向. *narG*, *narH*, *narJ*,

以及 *narI* 基因分别编码硝酸盐还原酶的组成蛋白^[11,12]. *narL* 和 *narX* 基因的编码蛋白组成一个二元调控系统, 分别负责信号的传递和接收, 从而激发 *narG* 等基因的转录^[13,14].

在 A1501 株和 K96243 株中, *narK* 只发现一个拷贝, 而在另外 2 株菌里, *narK* 都是两个拷贝, 由于 A1501 基因组草图中 contigs 之间的平均间距为 100 bp, 所以在未知区域存在另外一个长 1599 bp 的 *narK* 基因的可能性很小. 在 A1501 中, *narK* 基因编码蛋白在 14~237 和 314~526 区间的氨基酸序列与硝酸盐/亚硝酸盐转运蛋白同源性很高. *narM* 编码一个 495 个氨基酸的蛋白, 在 7~215 区间的氨基酸序列与硝酸盐/亚硝酸盐转运蛋白同源性很高, 而 302~478 区间的氨基酸序列与糖磷酸盐透性酶有很高的同源性. 由此推断 *NarK*, *NarM* 可能是 A1501 中硝酸盐/亚硝酸盐的运输蛋白, 但是 *NarM* 中与糖磷酸盐透性酶同源的区域的作用还有待于研究.

在 *narL* 和 *narX* 的下游方向鉴定了两个基因 *dnrE* 和 *orf1*. *dnrE* 基因编码一个有 229 个氨基酸的蛋白,



图 1 A1501 株中 *nar* 基因簇中基因的组成及排列方式示意图
箭头示基因转录方向

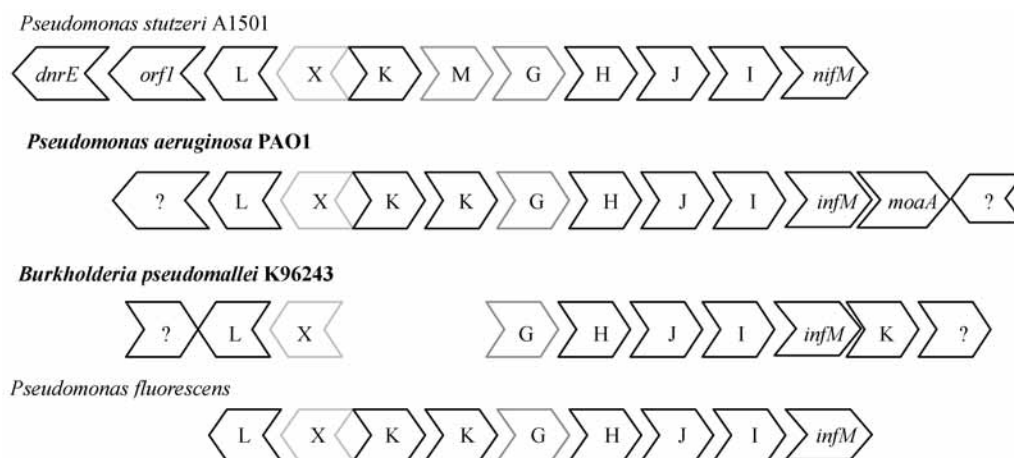


图 2 A1501 株与其他几株反硝化细菌硝酸盐还原酶基因簇中的基因的组成以及排列比较
箭头方向示该基因的转录方向; 粗体字示该菌的基因组测序已完成

在 16~131 区域可以与 CAP 家族转录因子结合, 155~217 区域可以形成一个螺旋-转角-螺旋结构, 可能与 DNA 的结合有关. *orf1* 编码一个 261 个氨基酸的蛋白, 功能未知.

2.2 *nir* 基因

在 A1501 株中的染色体上, *nor*, *nir* 和 *nos* 基因簇按照一定的顺序在染色体上相邻排列, 形成一个“岛”状区域. *nir* 基因簇全长 13053 bp, 编码 16 个 ORFs. 按照这些基因在染色体上的排列分别鉴定为 *nirH*, *nirG*, *nirL*, *nirD*, *nirF*, *nirC*, *nirM*, *nirB*, *nirT*, *nirS*, *nirQ*, *nirO*, *nirP*, *nirJ*, *nirE* 和 *nirN*(图 3).

根据转录方向的不同可以将 *nir* 基因簇分成两部分, 以基因 *nirS* 和 *nirQ* 中间的 449 个核苷酸的非编

码区向外延伸; *nir* 基因之间排列紧密, 其中 *nirH* 和 *nirG* 交迭 22 个碱基, *nirG* 和 *nirL* 的交迭 4 个碱基, *nirE* 和 *nirN* 基因编码区交迭 6 个碱基.

与 *P. stutzeri* ZoBell^[2,15]相比, A1501 株中的 *nir* 基因在排列方式上基本相同, 但是 ZoBell 株中缺少 *nirO* 和 *nirP* 基因(图 4). 这两个基因编码两个跨膜蛋白, 可能与能量的保持有关. 无氧条件下, 缺失 *nirO* 和 *nirP* 基因的 *P. aeruginosa* PAO1 株虽然可以利用硝酸盐/亚硝酸盐生长, 但是它的无氧呼吸产生能量的效率要明显的低于含有这两个基因的菌株^[16].

在 A1501 株中 *nirS* 和 *nirC* 之间分布着 *nirT*, *nirB*, *nirM* 三个基因, 而在 PAO1^[9]株仅有 *nirM* 一个基因, 而且它们的共有基因的排列和转录方向上也有很大区别(图 4).

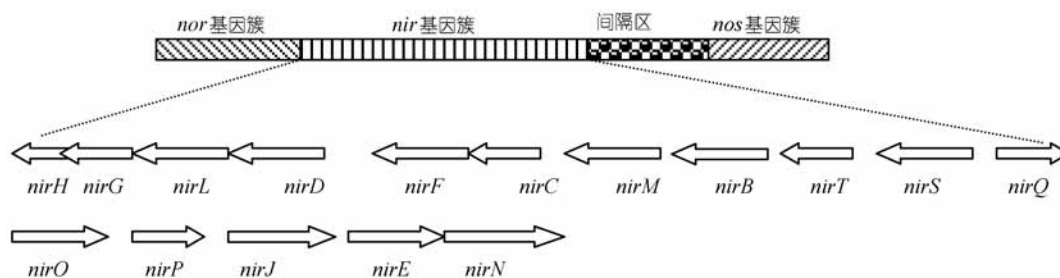


图 3 A1501 株 *nir* 基因簇在 *nor-nir-nos* 中的位置以及 *nir* 基因簇内部各基因的排列方式示意图
箭头方向示转录方向

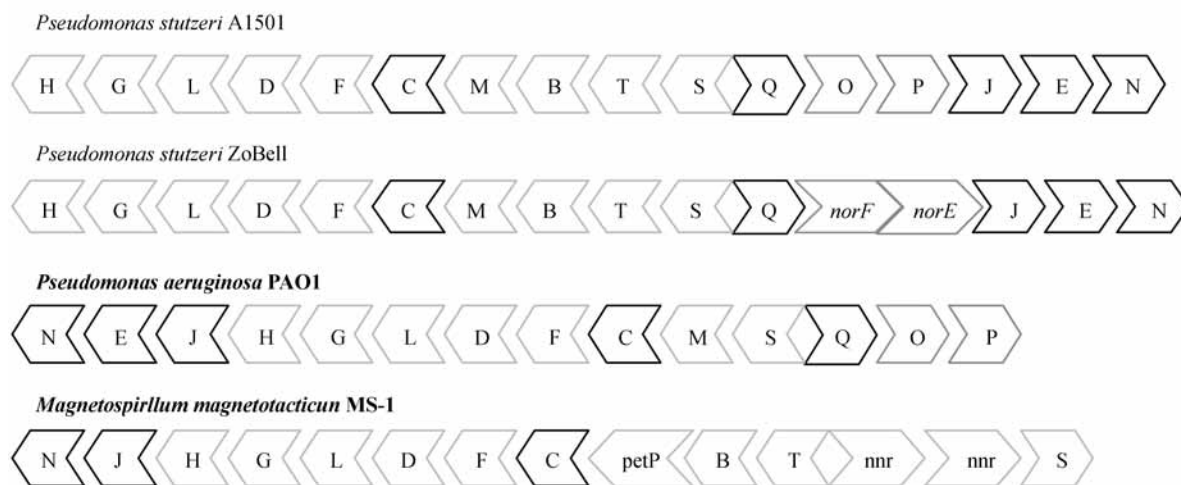


图 4 A1501 株与其他几株反硝化细菌亚硝酸盐还原酶基因簇中的基因的组成以及排列比较
箭头方向示该基因的转录方向; 粗体字示该菌的基因组测序已完成

M. magnetotacticun MS-1^[4]的基因组中,发现了 11 个 *nir* 基因,与 A1501 相比,缺少 *nirS*, *nirO* 和 *nirP* 等基因(图 4). *nirE* 编码一个 278 个氨基酸的蛋白,该蛋白为尿卟啉 III 甲基转移酶,是亚铁血红素 d1 生物合成的核心酶^[17]. 在 *M. magnetotacticun* MS-1 中是否有其他的蛋白代替 NirE 行使功能还不清楚.

nirS 基因是亚硝酸盐还原酶的结构基因,在 A1501 株中,该基因长 1680 bp,编码一个 560 个氨基酸残基的蛋白,紧随其后的 *nirT* 基因编码一个有 202 个氨基酸残基的蛋白,是催化反应中的电子供体^[18]. *nirB*, *nirM* 和 *nirC* 基因分别编码细胞色素蛋白^[17,18]. *nirFDLGHJE* 基因是亚铁血红素 d1 的生物合成过程中所必需的,它们通过对尿卟啉进行甲基化、氧化脱氢等多个环节参与亚铁血红素 d1 的生物合成^[17,19].

2.3 *nor* 基因

A1501 株中, *nor* 基因簇全长 8069 bp, 编码 8 个基因,位于 *nor-nir-nos* “岛”的一端,这 8 个基因分为两种类型, *nor* 和 *dnr*, 分别鉴定为 *norC*, *norB*, *norD*, *norR* 和 *dnrN*, *dnrO*, *dnrD*, *dnrP*. *norR* 基因位于 *norC*, *norB*, *norD*, *norR* 基因的最下游,在 *norD*, *norR* 之间分布着 *dnrN*, *dnrO*, *dnrD*, *dnrP*(图 5). *norC* 基因与 *nir* 基因簇的 *nirH* 基因相连,中间有 258 bp 的非编码区. *nor* 和 *dnr* 两种类型的基因分别以相反的方向转录. 基因之间分布非常紧密,其中 *dnrN*, *dnrO*, *dnrD*, *dnrP* 间的间距只有 0, 138 和 5 bp, 而 *dorD*, *norB*, *norC* 之间的间距只有 87 和 47 bp.

norC, *norB*, *norD* 基因在所有 3 株反硝化细菌中都存在,而且转录方向相同(图 6). *norB*, *norC* 基因编码一氧化氮还原酶的结构蛋白, *norD* 基因的具体功能还不清楚,该基因的突变株只能保存野生型菌株

16%~23%的一氧化氮还原酶活性^[20].

在 A1501 株中鉴定了 *norR* 基因. *norR* 基因编码一个有 518 个氨基酸的蛋白. 在核苷酸水平上, *norR* 基因全长 1554 bp 的序列中只有从 613~1157 处的区域与 *Ralstonia eutropha* H16 有 80%的同源性,两端的序列在数据库中没有同源. NorR 蛋白与 *R. eutropha* H16 中的 NorR 蛋白有 67%的同源性,包括主要的结构域在内. 在 *R. eutropha* H16 中, NorR 蛋白为依赖于 RpoN 的转录激活蛋白,该蛋白具有典型的类 NtrC 分子结构,如与核酸结合的结构域以及 C 末端的螺旋-转角-螺旋结构,在 N 末端,该蛋白有一个保守的 GAF 结构域,可能是信号接收或者传递的结构^[21].

DnrD 是一种转录激活蛋白,属于 FNR 家族,为亚硝酸盐和一氧化氮还原酶的表达所必需^[22]. 它与 *dnrNOP* 等 3 个基因一起转录, *dnrNO* 位于它的上游, *dnrP* 位于它的下游. 在 A1501 株中,这 4 个基因分别编码 287, 172, 227 和 85 个氨基酸的蛋白, DnrN 与 *R. eutropha* 以及 *Cupriavidus necator* 中发现的 NorA 有 58%的同源性. 研究发现 *dnrD* 基因可以通过与自己启动子区域的 FNR 结合区结合而进行自我调控,而 *dnrNOP* 等基因的编码蛋白的具体作用还不是很清楚^[22].

2.4 *nos* 基因

在反硝化细菌将硝酸盐经过亚硝酸盐、一氧化氮和一氧化二氮逐级还原为氮气的过程中,一氧化二氮还原酶催化最后一个阶段. 在 A1501 株的染色体上鉴定了 6 个 *nos* 基因(图 7),分别为 *nosL*, *nosY*, *nosF*, *nosD*, *nosZ*, *nosR*, 这些基因以相同的方向转录,组成长度为 7924 bp 的一氧化二氮还原酶类基因簇,基因之间排列紧密,其中 *nosY*, *nosF* 和 *nosD* 的编码区按

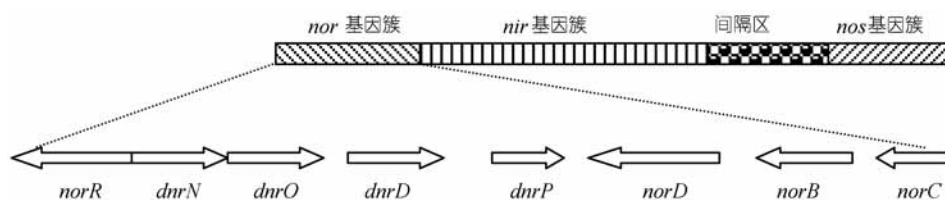
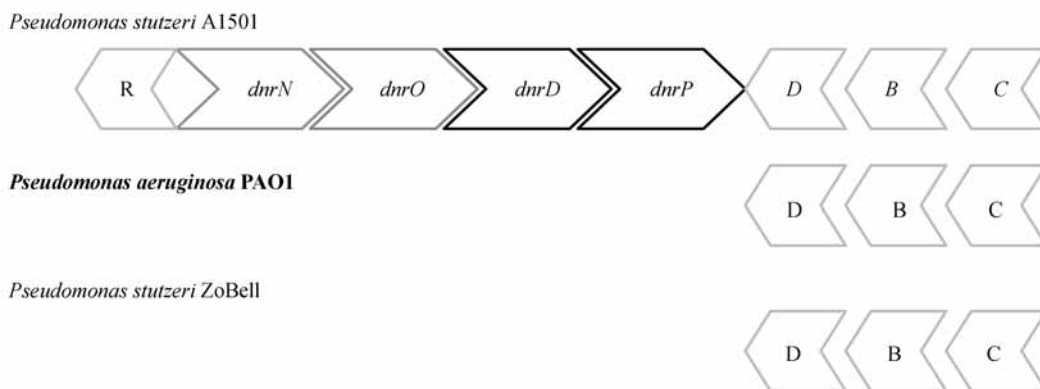
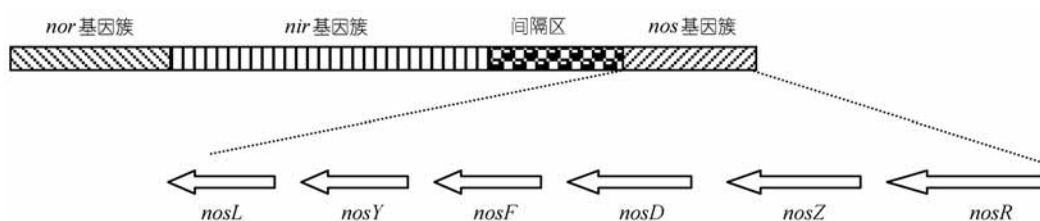


图 5 A1501 株 *nor* 基因簇在 *nor-nir-nos* 中的位置以及 *nor* 基因簇内部各基因的排列方式示意图
箭头方向示转录方向

图 6 A1501 株与其他几株反硝化细菌 *nor* 基因簇中的基因的组成以及排列比较

箭头方向示该基因的转录方向; 粗体字示该菌的基因组测序已完成

图 7 A1501 株 *nos* 基因簇在 *nor-nir-nos* 中的位置以及 *nos* 基因簇内部各基因的排列方式示意图

箭头方向示转录方向

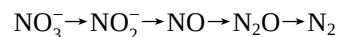
次序直接相连, *nosL*, *nosY* 之间的基因间距为 29 bp, *nosD*, *nosZ* 之间的基因间距为 234 bp, *nosZ*, *nosR* 之间的间距为 71 bp. 这些基因分别编码 190, 276, 308, 396, 637 和 725 个氨基酸的蛋白.

不同的反硝化细菌之间 *nos* 基因变化不大, 在 A1501, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* 等 3 株细菌中, *nos* 基因簇都是由 *nosL*, *nosY*, *nosF*, *nosD*, *nosZ*, *nosR* 六个基因组成^[4,9,10], 而且在染色体上的排列顺序是完全相同的, 转录方向也一致.

P. aeruginosa PAO1 中, *nosZ* 基因与上游的 *nosR* 基因共同转录, 并受 *nosR* 基因的调控^[23]. *nosR* 的产物是一种膜蛋白, 对 N_2O 敏感, 是一氧化二氮还原酶表达所必需的调节蛋白^[24]. *nosZ* 编码一氧化二氮还原酶, 该酶是二聚体蛋白, 每个亚基上含有两个铜结合中心. *nosY*, *nosF*, *nosD* 的产物与铜的处理有关, 协助将铜插入到一氧化二氮还原酶中^[25].

3 讨论

反硝化反应是微生物在无氧状态下的一种应急呼吸方式, 广泛存在与革兰氏阴性、革兰氏阳性细菌以及真菌中. 微生物的反硝化是一个完整的生理生化过程, 包括硝酸盐还原、亚硝酸盐及 NO 的还原和 N_2O 还原四个相对独立又密切联系的过程:



在这个过程中的每个阶段都由多个不同的酶和辅助因子参与催化, 主要的酶类有硝酸盐还原酶类(*nar*)、亚硝酸盐还原酶类(*nir*)、一氧化氮还原酶类(*nor*)和一氧化二氮还原酶类(*nos*), 这些基因在染色体上形成四个相对独立的基因簇^[1,2,4].

采用全基因组“shotgun”的方法, 我们绘制出了 A1501 菌的基因组草图, 覆盖全基因组 97.5% 的区域, 拼接形成 126 个 contigs. 数据分析表明: 在 A1501 株

中至少有 40 个基因参与了反硝化过程, 这些基因在染色体上的分布上有以下特点: (i) 根据参与的催化阶段的不同呈现出明显的簇状分布, 形成 *nar*, *nir*, *nor* 和 *nos* 基因簇. (ii) *nir*, *nor* 和 *nos* 基因簇存在于染色体上位置相互靠近的区域, *nir* 和 *nor* 两个基因簇是紧密相连的, *nos* 位于 *nir* 基因簇的上游约 6.6 kb 的区域, 而 *nar* 基因簇与它们 3 个之间在染色体上位置相隔很远, 单独存在于另外一个位置上. (iii) 基因簇内部基因的排列非常紧密, 基因编码区之间交迭现象常见.

与其他反硝化细菌比对的结果表明, A1501 株中的 40 个反硝化基因组成了一套完整的反硝化催化系统. 这些基因分别承担着信号转导、转录调控以及催化反应等不同的功能.

A1501 株与其他反硝化细菌相比在基因的组成和排列上有以下特点: (i) *nar* 基因簇中, *narK* 基因只发现一个拷贝. (ii) 在 *narK* 与 *narG* 之间有一个 *narM* 基因. (iii) 在 *narX*, *narL* 基因的下游方向鉴定了两个基因 *dnrE* 和 *orf1*, 其中 *dnrE* 基因可能是一个属于 FNR 家族的转录因子. (iv) A1501 株中 *nir* 基因有 16 个, 是所有已知反硝化细菌 *nir* 基因数量最多的. (v) 在 A1501 株中, 同时也是在假单胞杆菌属中首次发现 *norR* 基因. (vi) *nos* 基因簇相对保守, 无论在基因组成还是排列方式与参照的假单胞菌株都完全一致.

传统的基因克隆方法是根据已知基因设计探针, 然后从基因组文库中“钓”取目的基因, 这样只能获得同源性比较高的基因, 难以发现新的未知基因, 造成系统的不完整性. 从基因组水平研究所有反硝化相关基因可以为我们进一步在 mRNA 水平上研究包括 *narG*, *narH*, *narI*, *nirS*, *norB*, *norC* 和 *nosZ* 等编码还原酶类的结构基因在不同时相、不同供氧状况、不同的底物诱导等多种状态下的表达水平, 同时为我们在同一体系内研究蛋白之间的互作、以及不同蛋白之间错综复杂的调控机制提供最原始的理论数据, 在此基础上建立反硝化反应在细胞体内的反应体系模型, 为充分利用和改造反硝化途径建立基础.

参 考 文 献

- Walter G Z. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, 61: 533~616
- Cornelia B, Walter G Z. The structural genes of the nitric oxide reductase complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kilobase gene cluster for denitrification. *J Bacteriol*, 1992, 174: 2394~2397
- Philippot L, Clays-Josserand A, Lensi R, et al. Purification of the dissimilative nitrate reductase of *Pseudomonas fluorescens* and the cloning and sequencing of its corresponding genes. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1350: 272~276
- Philippot L. Denitrifying genes in bacteria and archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1577: 355~375
- Vermeiren H, Willems A, Schoofs G, et al. The rice inoculant strain A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri* strain. *Syst Appl Microbiol*, 1999, 22: 215~224
- Desnoves N, Lin M, Guo X, et al. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology*, 2003, 149: 2251~2262[DOI]
- Lin M, You C B. Denitrification and nitrogen fixation by *Alcaligenes faecalis*. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 1987, 1: 1~7
- Kaiser O, Bartels D, Bekel T, et al. Whole genome shotgun sequencing guided by bioinformatics pipelines--an optimized approach for an established technique. *J Biotechnol*, 2003, 106: 121~133[DOI]
- Vollack K U, Xie J, Hartig E, et al. Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 1998, 144: 441~448
- Philippot L, Mirleau P, Mzurier S, et al. Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nir* and *nos* gene. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1517: 436~440
- Philippot L, Clays-Josserand A, Lensi R, et al. Purification of the dissimilative nitrate reductase of *Pseudomonas fluorescens* and the cloning and sequencing of its corresponding genes. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1350: 272~276
- Blasco F, Iobbi C, Giordano G, et al. Nitrate reductase of *Escherichia coli*: completion of the nucleotide sequence of the *nar* operon and reassessment of the role of the *a* and *b* subunits in iron binding and electron transfer. *Mol Gen Genet*, 1989, 218: 249~256[DOI]
- Stewart V, Parales J Jr. Identification and expression of genes *narL* and *narX* of the *nar* nitrate reductase locus in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1988, 170: 1589~1597
- Nohn T, Noji S, Taniguchi S, et al. The *narX* and *narL* genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two component regulatory genes. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 2947~2957
- Palmedo G, Seither P, Korner H, et al. Resolution of the *nirD* locus for heme d1 synthesis of cytochrome cd1 (respiratory nitrite reductase) from *Pseudomonas stutzeri*. *Eur J Biochem*, 1995, 232: 737~746
- Arai H, Kodama T, Igarashi Y. The role of the *nirQOP* genes in

- energy conservation during anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62: 1995~1999[DOI]
- 17 Kawasaki S, Arai H, Kodama T, et al. Gene cluster for dissimilatory nitrite reductase (*nir*) from *Pseudomonas aeruginosa*: sequencing and identification of a locus for heme d1 biosynthesis. J Bacteriol, 1997, 179: 235~242
- 18 Jungst A, Wakabayashi S, Matsubara H, et al. The *nirSTBM* region coding for cytochrome *cd1*-dependent nitrite respiration of *Pseudomonas stutzeri* consists of a cluster of mono-, di-, and tetraheme proteins. FEBS Lett, 1991, 279: 205~209[DOI]
- 19 Kawasaki S, Arai H, Igarashi Y, et al. Sequencing and characterization of the downstream region of the genes encoding nitrite reductase and cytochrome *c-551* (*nirSM*) from *Pseudomonas aeruginosa*: identification of the gene necessary for biosynthesis of heme d1. Gene, 1995, 167: 87~91[DOI]
- 20 de Boer A P, van der Oost J, Reijnders W N, et al. Mutational analysis of the *nor* gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. Eur J Biochem, 1996, 242: 592~600[DOI]
- 21 Pohlmann A, Cramm R, Schmelz K, et al. A novel NO-responding regulator controls the reduction of nitric oxide in *Ralstonia eutropha*. Mol Microbiol, 2000, 38: 626~638[DOI]
- 22 Arai H, Igarashi Y, Kodama T. Expression of *nir* and *nor* genes of denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. FEBS Lett, 1995, 371: 73~76[DOI]
- 23 Arai H, Mizutani M, Igarashi Y. Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, 2003, 149: 29~36[DOI]
- 24 Cuypers H, Viebrock-Sambale A, Zumft W G. NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. J Bacteriol, 1992, 174: 5332~5339
- 25 Zumft W G, Viebrock-Sambale A, Braun C. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins. Eur J Biochem, 1990, 192: 591~599[DOI]