文章编号：1000-8608(2009)04-0494-05

2,3-二羟基联苯酶促降解及编码酶基因扩增

李 昂，曲媛媛*，周集体，谭 靓，贾玉红

（大连理工大学 环境与生命学院，辽宁 大连 116024）

摘要： 一株新分离的联苯降解菌 *Dyella ginsengisoli* LA-4 的细胞粗提物可以降解邻苯二酚类化合物生成间位开环产物. 实验证明菌株 LA-4 中的 2,3-二羟基联苯 1,2-双加氧酶(BphC)为组成酶. 以 2,3-二羟基联苯、邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚为底物时，酶的比活分别是 7.37、0.2和 0.06 U/mg. 考察了金属离子及抑制剂对酶活性的影响. 金属离子对酶活性影响的结果表明 Fe^{2+} 能促进粗酶对邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚的降解，但对 2,3-二羟基联苯却起到抑制作用. 当氧化性抑制剂 H_2O_2 的浓度大于 1 mmol/L 时酶活完全丧失，说明其属于 Fe(Ⅱ)依赖型外二醇双加氧酶类. 通过 PCR 方法扩增出菌株 LA-4 中 *bphC* 基因的保守区，其序列与已知 *bphC* 基因相似性约为 73%.

关键词： *Dyella ginsengisoli*；酶促降解；2,3-二羟基联苯 1,2-双加氧酶

中图分类号： X172 **文献标志码：** A

0 引 言

联苯和多氯联苯(PCBs)是一类典型的、分布广泛的有机污染物，其中 PCBs 是目前国际关注的 12 种持久性有机污染物之一. 在环境体系中，PCBs 具有低浓度、高毒性和高生物富集性等特点，微量的 PCBs 就可对生物产生致癌、致畸和致突变等作用. 鉴于 PCBs 类物质对人类的巨大危害，对这类化合物的微生物降解一直是国内外研究的热点[1]. Lunt 等和 Catelani 等在 1970 年首次报道分离出能以联苯为惟一碳源和能源生长的微生物[2,3]. 目前，PCBs 生物降解方面的研究主要存在降解菌种单一、降解基因不够丰富及菌株降解底物范围窄等问题. 因此，筛选新颖的 PCBs 降解菌株并获取相应的降解基因成为 PCBs 生物降解研究的重点.

研究表明，细菌对联苯/多氯联苯的好氧降解途径较为相似，主要是指联苯/多氯联苯在联苯 2,3-双加氧酶(BphA)、联苯二氢二醇脱氢酶(BphB)、2,3-二羟基联苯 1,2- 双加氧酶(BphC)及 HOPDA 水解酶(BphD)的作用下，最终生成苯甲酸，这一系列反应称为联苯降解的上游途径[1]. 其中 BphC 是一种外二醇双加氧酶，对联苯和多氯联苯的开环降解起到了关键作用[4].

目前，本实验室已分离出 1 株能以 4-氯联苯和联苯为其惟一碳源和能源生长的新菌株 *Dyella ginsengisoli* LA-4. 本文详细研究菌株 LA-4 细胞粗提物对 2,3-二羟基联苯的降解，并通过 PCR 方法从菌株 LA-4 的基因组 DNA 中扩增出 *bphC* 基因的保守区片断，旨在为联苯/多氯联苯的生物修复提供宝贵的微生物资源及相关的基因材料.

1 材料和方法

1.1 试 剂

联苯、2,3-二羟基联苯、邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚购于 Sigma-Aldrich，Bovine serum albumin (BSA)购自 TaKaRa，其他实验药品均为分析纯.

1.2 培养基

无机盐培养基：0.5 g/L NaCl，0.5 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$，0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$，pH 7.0，联苯 100 mg/L；富集培养基：在无机盐培养基中加入 2 g/L蛋白胨和 0.5 g/L 联苯；LB 培养基：10 g/L 蛋白胨，5 g/L 酵母膏，10 g/L NaCl.

1.3 粗酶的制备

将在无机盐培养基中培养的菌体投入富集培

收稿日期： 2007-12-11； **修回日期：** 2009-05-27.
基金项目： 国家自然科学基金资助项目(50608011).
作者简介： 李 昂(1980-)，男，博士；曲媛媛*(1976-)，女，博士，副教授；周集体(1956-)，男，教授，博士生导师.

养基 100 mL 中，30 ℃、150 r/min 培养 48 h；4 ℃条件下，8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，菌体用 Tris-HCl 缓冲溶液（50 mmol/L，pH 8.0）震荡清洗 2 次后悬浮，在冰浴中用超声破碎仪（Ultrasonic processor CPX 750，USA）破碎细胞 30 min，脉冲 1.0；最后，4 ℃、22 000 r/min 离心 20 min，超滤浓缩上清液，所得即为粗酶液.

1.4　酶促降解实验

酶活力用紫外-可见分光光度计（V-560，JASCO，Japan）检测. 测定系统总体积为 2 mL，Tris-HCl 缓冲溶液（50 mmol/L，pH 8.0），粗酶 50 μL，20 ℃反应. 如无特殊说明，反应底物分别为 2,3- 二羟基联苯（250 μmol/L）、邻苯二酚（180 μmol/L）、4-氯邻苯二酚（75 μmol/L）. 酶活力单位（U）定义[5]为 20 ℃下，每 min 内生成 1 μmol 开环产物所需的酶量. 在上述条件下，反应产物的摩尔消光系数分别为 2,3- 二羟基联苯，ε_{434} = 17 900 L·mol^{-1}·cm^{-1}；邻苯二酚，ε_{375} = 67 800 L·mol^{-1}·cm^{-1}；4-氯邻苯二酚，ε_{379} = 40 000 L·mol^{-1}·cm^{-1}[5,6]. 酶的比活为单位蛋白的酶活力. 蛋白浓度用考马斯亮蓝法测定[7]. 在考察不同影响因素对酶活的影响时，用相对酶活表示对酶活性的影响程度. 以 pH 8.0、20 ℃不加任何金属离子及抑制剂条件下测定的酶活为对照，其他条件下测定的酶活与其相比得到的百分率为相对酶活.

1.5　组成酶或诱导酶的初步判定

将用无机盐培养基培养的菌体投入不含联苯的 LB 培养基中培养至对数生长后期，收集菌体，制备粗酶，测定其酶活力. 若粗酶有酶活性，说明此酶为组成酶，反之为诱导酶[8].

1.6　BphC 动力学常数的测定

以酶的反应速度对不同底物浓度作图，按 Lineweaver-Burk 作图法计算出此酶对不同底物的动力学米式常数 K_m 及最大反应速率 v_{max}. 底物浓度范围分别是 2,3-二羟基联苯 125～625 μmol/L，邻苯二酚 90～910 μmol/L，4-氯邻苯二酚 12.5～125 μmol/L.

1.7　pH 和温度对活性的影响

实验 pH 范围为 3～11，所用的缓冲溶液为 200 mmol/L 醋酸/醋酸钠缓冲溶液（pH 3～5）、50 mmol/L K_2HPO_4/ NaOH 缓冲溶液（pH 5～7）、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液（pH 7～9）和 100 mmol/L Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 缓冲溶液（pH 9～11）. 温度影响实验中，温度的范围为 1.5～80 ℃.

1.8　金属离子及抑制剂对酶活性的影响

在 Tris-HCl 缓冲溶液（pH 8.0）中加入 50 μL 粗酶和终浓度 1 mmol/L 的金属离子，在室温下反应 15 min. 之后，加入底物开始反应，分析其对酶活性的影响.

在以 2,3- 二羟基联苯为底物的反应体系中加入不同的抑制剂，分析其对酶活性的影响.

1.9　菌株 LA-4 的 BphC 编码基因（*bphC*）保守区序列的扩增与分析

细菌基因组 DNA 采用宝生物 TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit 提取. 参照文献[9]进行简并引物设计：bphBA1（5′-TGTAAAACGACGGCCAGTGGA-TCCGARTAYACNGGNGCNTAYGT-3′）和 bphC-R（5′-GAGGCATAGAACGACACCATR-TGRTCRTTNGTRTG-3′）. 以菌株 LA-4 的基因组 DNA 为模板，使用 TaKaRa *LA Taq* 酶进行扩增，PCR 条件：30 个循环，95 ℃变性 45 s，53 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 4 min. 所得到的 PCR 产物经琼脂糖电泳检测后，使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 切胶回收后，进行测序，基因测序工作由宝生物工程（大连）有限公司完成.

将得到的基因序列用 BLAST 软件与 GenBank中已知的 *bphC* 基因序列进行相似性比较. 用 Clustal X 1.8 和 MEGA 2.0 软件进行系统发育树的构建，分析其系统进化关系.

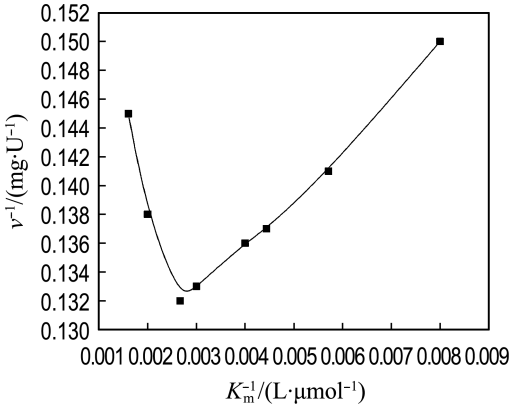
2　结果与讨论

2.1　酶促降解实验

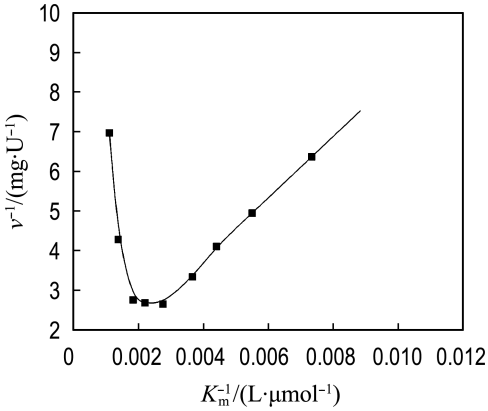
菌株 *Dyella ginsengisoli* LA-4 粗酶可以降解 2,3-二羟基联苯、邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚，生成相应的间位开环裂解产物. 经联苯诱导后菌株的粗酶酶活性高于未诱导，其比酶活为未诱导的 4.6 倍；但未经底物诱导的菌株提取的粗酶仍有较高的酶活性，酶的比活为 1.60 U/mg，说明菌株 LA-4 含有的 BphC 为组成酶. 在 pH 8.0 和 20 °C 下，以 2,3-二羟基联苯、邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚为底物时，酶的比活分别是 7.37、0.2 和 0.06 U/mg. 酶动力学常数测定结果表明，在酶浓度不变的情况下，酶促反应初速度与底物浓度之间呈典型的双曲线关系，说明该酶催化反应遵循米氏方程[10].

通过 Lineweaver-Burk 作图（如图 1），计算粗酶对 3 种底物的动力学常数列于表 1. 由表 1 可以看出，对于 3 种底物，菌株 LA-4 的粗酶对 2,3-二羟基联苯的 K_m 最小，证明它与 2,3-二羟基联苯的亲和力最大；邻苯二酚的 K_m 最大，说明粗酶

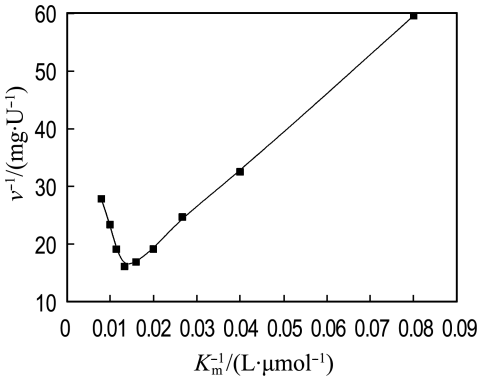
与邻苯二酚的亲和力最小[11]. 同时,通过比较 v_{max}/K_m 的大小,可以看出 3 种底物中 2,3-二羟基联苯为菌株 LA-4 中 BphC 的最适底物;邻苯二酚的 v_{max} 大于 4-氯邻苯二酚的 v_{max},但 v_{max}/K_m 小于 4-氯邻苯二酚.



(a) 2,3-二羟基联苯



(b) 邻苯二酚



(c) 4-氯邻苯二酚

图 1 菌株 LA-4 粗酶对 3 种底物的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 1 Double reciprocal Lineweaver-Burk curve of crude extracts of strain LA-4 for three substrates

表 1 菌株 LA-4 粗酶动力学常数

Tab. 1 Kinetic parameters of the crude extracts of strain LA-4

底物	K_m/(μmol·L^{-1})	v_{max}/(U·mg^{-1})	(v_{max}/K_m)/10^{-3}
2,3-二羟基联苯	26.48	8.12	306
邻苯二酚	1 540.81	1.94	1.26
4-氯邻苯二酚	101.05	0.15	1.48

pH 和温度对酶活性有重要影响,菌株 LA-4 对 3 种底物降解的最适 pH 为 8.0～9.0,最佳温度为 20 ℃.

2.2 金属离子及抑制剂对酶活性的影响

金属离子对酶活性的影响如表 2 所示,从中可以看出,Ba^{2+}、Ca^{2+}、K^+、Mg^{2+} 和 Na^+ 等金属离子对酶活性的影响较小;Al^{3+}、Co^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+}、Ni^{2+}、Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 等金属离子对酶的活性具有强烈的抑制作用;而对于 Fe^{2+} 离子,以邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚为底物时可以提高酶的活性,但以 2,3-二羟基联苯为底物时酶的活性受到抑制.

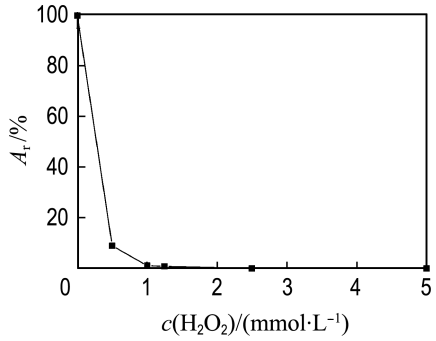
表 2 金属离子对酶活性的影响

Tab. 2 Effects of metal ions on the enzyme activity

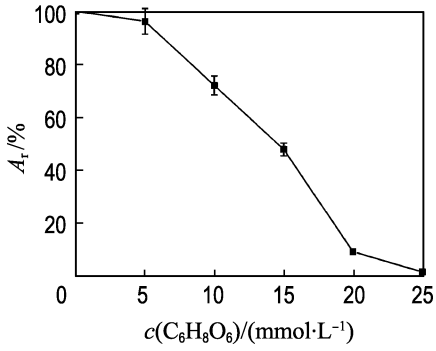
金属离子 (1 mmol/L)	A_r/%		
	2,3-二羟基联苯	邻苯二酚	4-氯邻苯二酚
—	100	100	100
$AlCl_3$	0.16	13.81	0
$BaCl_2$	96.76	100.18	98.16
$CaCl_2$	98.48	97.94	101.75
$CoCl_2$	0.49	2.63	26.77
$CuCl_2$	0.43	6.65	16.23
$FeCl_2$	15.55	251.36	761.13
$FeCl_3$	2.41	42.37	18.43
KCl	98.00	101.97	109.75
$MgCl_2$	94.08	91.61	83.48
$MnCl_2$	77.44	69.25	62.45
NaCl	98.00	110.91	103.79
$NiCl_2$	0.32	17.99	18.25
$PbCl_2$	3.51	20.62	20.21
$ZnCl_2$	1.20	17.67	23.41

注:A_r 为相对酶活

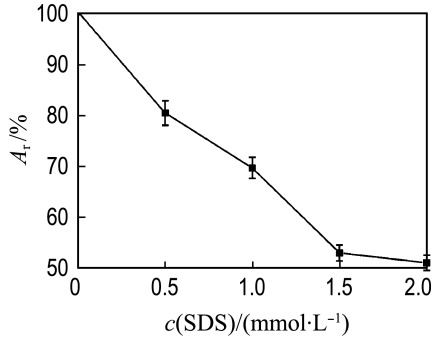
此外,一些抑制剂对酶活性的影响结果表明:随着 H_2O_2、抗坏血酸和 SDS 浓度的逐渐增加,酶的活性逐渐降低(如图 2 所示). 当 H_2O_2 的浓度达到 1 mmol/L 时,酶完全失活(如图 2(a)). 目前已报道的外二醇双加氧酶有两种类型:Fe(Ⅱ)依赖型和 Mn(Ⅱ)依赖型. 当反应体系中 H_2O_2 的浓度大于 1 mmol/L 时,Fe(Ⅱ)依赖型外二醇双加氧酶酶活性将被完全抑制;而在相同情况下,



(a) H_2O_2 对酶活的影响



(b) 抗坏血酸对酶活的影响



(c) SDS 对酶活的影响

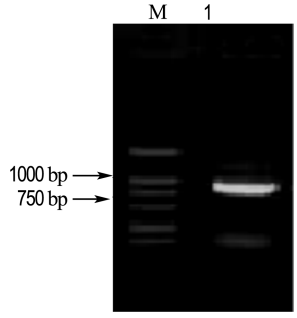
图 2　抑制剂对酶活性的影响

Fig. 2　Effects of inhibitors on the enzyme activity

H_2O_2 对 Mn(Ⅱ)依赖型外二醇双加氧酶的酶活性抑制较小[12]. 因此，可以推测菌株 LA-4 中所含有的外二醇双加氧酶为 Fe(Ⅱ) 依赖型.

2.3　*bphC* 保守区序列的扩增与分析

PCR 结果如图 3 所示，目的基因约为 900 bp. 经测序分析，得到全长为 916 bp 的基因序列，登录 GenBank，登录号为 EU391619；经过序列分析，发现该序列为 *bphC* 基因的保守区序列，其中包括 *bphC* 基因的起始密码子 ATG（碱基 177-179），但无终止密码子. 将此序列通过 BLAST 软件与 GenBank 中的已知序列进行相似性比较，发现其与菌株 *Pseudomonas putida* OU83 (X91876) 中的 *bphC* 基因相似性最高，约为 73%. 将其与其他已知的 *bphC* 基因进行系统进化分析，构建进化树所用的微生物及 *bphC* 基因的 GenBank 登录号如图 4 所示. 从进化角度分析，菌株 LA-4 中的 *bphC* 基因在系统发育中处于相对独立的位置，与已知的革兰氏阴性菌中同种基因有很大差别，是一段比较新颖的基因.



M：DL2000 DNA Marker；1：*bphC* PCR 产物

图 3　*bphC* 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 3　Agarose gel electrophoresis of the *bphC* PCR product

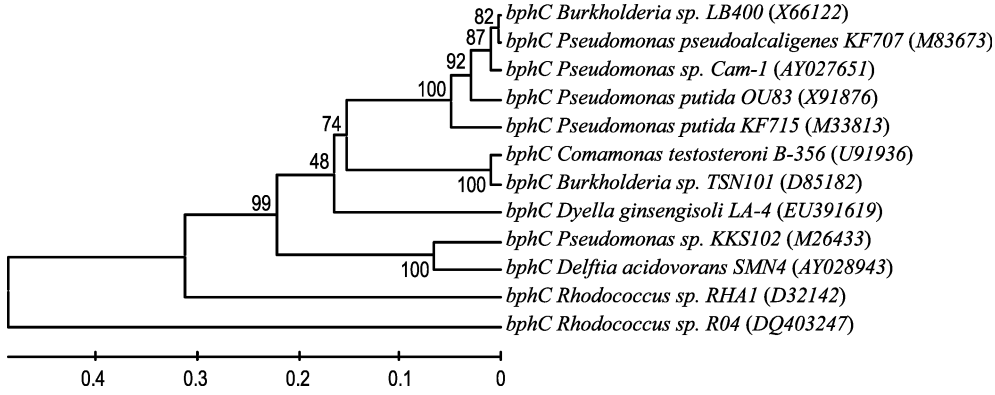


图 4　*bphC* 基因的系统进化树

Fig. 4　Phylogenetic tree of *bphC* gene

3 结 论

(1)菌株 *Dyella ginsengisoli* LA-4 的粗酶具有 2,3-二羟基联苯 1,2-双加氧酶活性,以 2,3-二羟基联苯、邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚为底物时,酶的比活分别是 7.37、0.2 和 0.06 U/mg.

(2)粗酶动力学常数分析表明 2,3-二羟基联苯与酶的亲和力较大,是此酶的最适底物.

(3)菌株 *Dyella ginsengisoli* LA-4 所含有的 BphC 为组成酶,属于 Fe(Ⅱ) 依赖型外二醇双加氧酶.

(4)通过 PCR 方法扩增出菌株 *Dyella ginsengisoli* LA-4 中 *bphC* 基因的部分序列,经过序列分析和系统进化分析,说明所获得的基因与已知 *bphC* 基因的相似性仅为 73%,且基因进化位置相对独立,是一段较为新颖的基因.

参考文献:

[1] PIEPER D H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005, **67**(2):170-191

[2] LUNT D, EVANS W C. The microbial metabolism of biphenyl [J]. **Biochemical Journal**, 1970, **118**(3):54-55

[3] CATELANI D, MOSSELMANS G, NIENHAUS J, *et al*. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons used as reactor coolants [J]. **Experientia**, 1970, **26**(8):922-923

[4] ELTIS L D, BOLIN J T. Evolutionary relationships among extradiol dioxygenase [J]. **Journal of Bacteriology**, 1996, **178**(20):5930-5937

[5] ELTIS L D, HOFMANN B, HECHT H, *et al*. Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1993, **268**(4):2727-2732

[6] HATTA T, MUKERJEE-DHAR G, DAMBORSKY J, *et al*. Characterization of a novel thermostable Mn(Ⅱ)-dependent 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from a polychlorinated biphenyl - and naphthalene-degrading *Bacillus sp*. JF8 [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2003, **278**(24):21483-21492

[7] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, **72**:248-254

[8] MATSUMURA E, OOI S, MURAKAMI S, *et al*. Constitutive synthesis, purification, and characterization of catechol 1, 2-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Rhodococcus sp*. AN-22 [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2004, **98**(2):71-76

[9] OHNISHI K, OKUTA A, JU J S, *et al*. Molecular breeding of 2, 3-dihydroxybiphenyl 1, 2-dioxygenase for enhanced resistance to 3-chlorocatechol [J]. **Journal of Biochemistry**, 2004, **135**(3):305-317

[10] 罗贵民. 酶工程[M]. 北京:化学工业出版社, 2003

[11] 吕 鹏. 洋葱伯克霍尔德氏菌 L68 菌株邻苯二酚 2,3-双加氧酶分离纯化、酶学性质、基因筛选及应用的研究[D]. 济南:山东大学, 2006

[12] BOLDT Y R, SADOWSKY M J, ELLIS L B M, *et al*. A manganese-dependent dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2 belongs to the major extradiol dioxygenase family [J]. **Journal of Bacteriology**, 1995, **177**(5):1225-1232

Enzymatic biodegradation of 2,3-dihydroxybiphenyl and amplification of encoding enzyme gene

LI Ang, QU Yuan-yuan*, ZHOU Ji-ti, TAN Liang, JIA Yu-hong

(School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The crude extracts of a novel biphenyl-degrading bacterium, *Dyella ginsengisoli* LA-4, can transform 2,3-dihydroxybiphenyl, catechol and 4-chlorocatechol into the corresponding ring meta-cleavage products. And it was proved that the enzyme was a constitutive 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. The specific activities were 7.37, 0.2 and 0.06 U/mg, respectively. The effects on enzyme activities by metal ions and some inhibitors were observed. The results indicate that Fe^{2+} can enhance the transformation of catechol and 4-chlorocatechol, but it inhibits the transformation of 2,3-dihydroxybiphenyl. Because the enzyme activities were completely inhibited in the presence of over 1 mmol/L H_2O_2, it is determined that the enzyme is an Fe(Ⅱ)-dependent extradiol dioxygenase. A conserved region of the 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase gene *bphC* was amplified by PCR, which shows 73% similarity with that of known *bphC* gene.

Key words: *Dyella ginsengisoli*; enzymatic biodegradation; 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase