

# 采用苯酚羟化酶基因特异引物检测苯酚降解菌\*

徐玉泉<sup>1,2,3</sup> 方宣钧<sup>2</sup> 陈 明<sup>3</sup> 张 维<sup>3</sup> 李浚明<sup>1</sup> 林 敏<sup>3\*\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学生物学院 北京 100094)

(<sup>2</sup> 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

(<sup>3</sup> 中国农业科学院原子能利用研究所 北京 100094)

**摘 要:**根据苯酚羟化酶基因高度保守序列设计了一对该基因的特异 PCR 引物。采用该特异引物从苯酚降解菌醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)PHEA-2 的总 DNA 中扩增到唯一一条大小为 684bp 的片段。该 DNA 片段与已知的 *A. calcoaceticus* NCIB8250 的苯酚羟化酶基因具有高度的同源性,其核苷酸序列的同源性为 84%,推导的氨基酸序列的同源性为 98%。对苯酚和非苯酚降解菌株的 PCR 扩增结果表明:所有苯酚降解菌均能扩增出 684bp 的特征片段,而非苯酚降解菌则无 PCR 条带。对炼焦废水中的细菌群落进行 PCR 扩增和生化特性检测表明:显示 684bp 特征片段的菌株均具有苯酚降解特性。上述结果表明,利用苯酚羟化酶基因的特异引物可对环境中的苯酚降解菌株进行准确快速的 PCR 检测。

**关键词:**苯酚降解菌,苯酚羟化酶基因,PCR 检测,炼焦废水

**中图分类号:**Q789 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 03-0298-06

苯酚是工业废水中主要的污染物,利用微生物降解苯酚受到广泛关注。传统的苯酚降解菌的筛选主要使用富集培养技术,即将土壤、污水或活性污泥等样品接种到特定的培养基中,只有那些表现出某种特殊表现型的菌株才能生长,经过数次转接后,分离到一种或少数几种微生物,而非目标微生物经过数次的排降和稀释最后消失。虽然富集培养技术在菌株筛选上很有效果<sup>[1-4]</sup>,但它主要的局限性是选择效率低,不能正确地反映代谢类型的多样性。为了克服富集培养的不足,人们尝试各种技术从环境样品中直接检测和分离生物降解菌,如利用放射自显影技术从油泥中直接分离到苯甲酸盐降解菌<sup>[5]</sup>和利用血清法从炼油废水的活性污泥中分离酚降解菌<sup>[6]</sup>等。

苯酚羟化酶是催化苯酚代谢途径第一个反应步骤的关键酶,本研究根据环境中苯酚降解菌苯酚羟化酶基因的保守序列设计 PCR 引物,扩增该基因保守片段,作为苯酚降解菌的特征片段,用于快速、准确地检测和分离苯酚降解菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

本实验所采用的菌株和质粒列于表 1。

\* 863 计划资助项目(863-SZ-03-01)

\*\* 联系人

作者简介:徐玉泉,男(1971-),河南镇平人,中国农业大学博士生。

收稿日期:2000-07-19,修回日期:2000-11-20

表 1 供试菌株与质粒  
Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source of references
Strains		
<i>A. calcoaceticus</i> PHEA-2	P <sup>+</sup>	[7]
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A08	P <sup>+</sup>	This laboratory
JA	P <sup>+</sup>	Shanxi University
A23	P <sup>+</sup>	This laboratory
A1	R <sup>+</sup>	This laboratory
A3	TOL <sup>+</sup>	This laboratory
A4	Cb <sup>+</sup>	This laboratory
A5	Cat <sup>+</sup>	This laboratory
A6	2,4CP <sup>+</sup>	This laboratory
11 testing strains		This laboratory
Plasmids		
pGEM-T easy	Ap <sup>r</sup>	Promega

<sup>a</sup>Designations used for genotypes and phenotypes are as follows: P<sup>+</sup>, Phenol-degrading; R<sup>+</sup>, Resorcinol; TOL<sup>+</sup>, Toluene; Cb<sup>+</sup>, Chlorobenzene; Cat<sup>+</sup>, Catechol; 2,4CP<sup>+</sup>, 2,4-dichlorophenol; Ap<sup>r</sup>, Ampicillin resistance.

1.2 酶和寡核苷酸

Taq 酶和 dNTP 为上海生工产品, *Eco*RI 为美国 Promega 公司产品, PCR 引物由上海生工合成。

1.3 培养基

LB 固体培养基(10g 蛋白胨, 5g 酵母提取膏, 10g NaCl, 15g 琼脂, 加蒸馏水至 1000mL, pH6.8); MS 培养基(0.5g NaNO<sub>3</sub>, 0.65g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.17g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1g MgSO<sub>4</sub>, 加蒸馏水至 1000mL, pH6.8)

1.4 细菌 DNA 的提取

苯酚降解菌 PHEA-2、A08、JA 和 A23 DNA 的提取: 参见文献[8]。  
菌株 A1、A3、A4、A5 和 A6 以及炼焦厂废水中划取的 11 个菌落的 DNA 用煮沸法提取。即挑取平板上的菌体放入盛有超纯水的离心管中煮沸 1min, 直接用来 PCR 扩增。

1.5 PCR 反应

使用 Idaho 毛细管 PCR 仪扩增。反应体系为: 超纯水 7μL, 10 × Buffer 1μL, 2.0mmol/L dNTP 0.25μL, 50pmol/μL 引物 Lph1 1μL, 50pmol/μL 引物 Lph2 1μL, 5u/μL 的 Taq 酶 0.25μL, 模板 DNA1μL, 吸入毛细管, 封口。反应为 30 个循环, 其中, 94℃变性 5s, 52℃退火 5s, 72℃延伸 15s, 30 个循环后延伸 5min, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后紫外分析仪检测。

1.6 苯酚的含量测定

用 4-氨基安替比啉法<sup>[9]</sup>。

2 结果

2.1 苯酚羟化酶基因特异引物的设计及 PCR 产物的克隆与序列分析

*Pseudomonas. putida* H 的 *phlD*<sup>[10]</sup>、*Pseudomonas* sp. CF600 的 *dmpN*<sup>[11]</sup>、*Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250 的 *mopN*<sup>[12]</sup> 和 *Ralstonia eutropha* E2 的 *poxD*<sup>[13]</sup> 是编码苯酚羟化酶大亚基

的基因,通过比较它们核苷酸序列的同源性,设计合成了两个苯酚羟化酶基因特异引物 Lph1(5'-AGG CAT CAA GAT CAC CGA CTG-3')和 Lph2(5'-CGC CAG AAC CAT TTA TCG ATC-3'),如图 1。

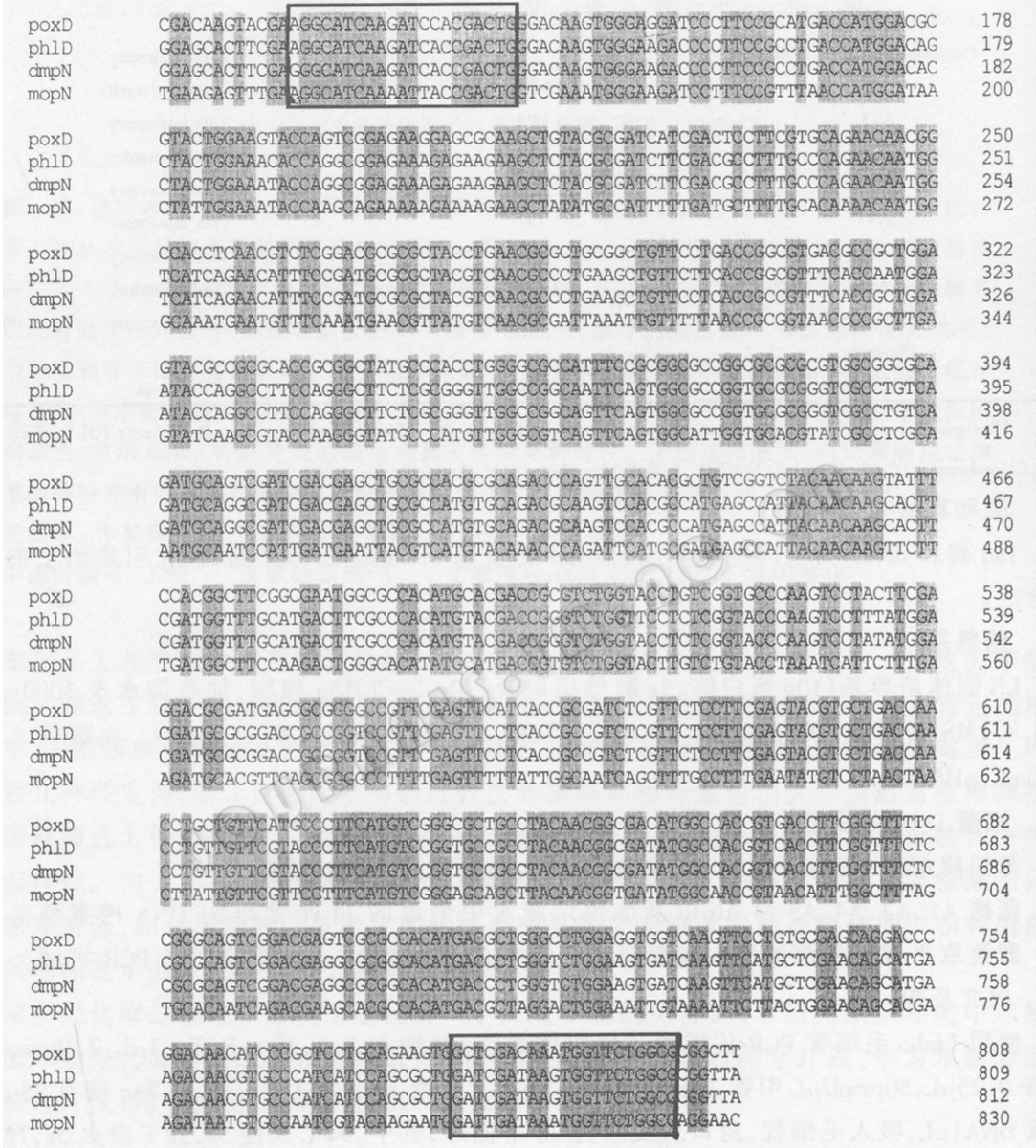


图 1 多组分苯酚羟化酶大亚基编码基因部分核苷酸同源性比较及特异引物的设计

Fig.1 Partial nucleotide sequence alignment of gene encoding the largest subunit of multicomponent phenol hydroxylase from different strains and the design of specific PCR primers(PCR primers designed based on the sequences in the two boxes)

以 PHEA-2 的总 DNA 为模板,30 个反应后电泳检测 PCR 产物,在 684bp 处有一明显的条带(图 2)。采用 Promega 公司的 pGEM - T Easy 克隆载体对 PCR 反应产物进行克隆,通过兰白斑筛选后,得到阳性转化子,抽提质粒 DNA,采用限制性内切酶 *Eco*R I 酶切,结果与预期相符。该 684bp PCR 产物的核苷酸序列已在 Genbank 中登记,(登录号: AF228346)。Blast 软件分析结果表明,684bp 核苷酸序列与醋酸钙不动杆菌 *Acinetobacter*

*calcoaceticus* NCIB8250 苯酚羟化酶基因的相关序列有 84% 的同源性,二者推导的氨基酸序列有 98% 的同源性,由此证明所克隆的基因片段为醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 苯酚羟化酶基因的一部分,将此克隆命名为 pGEM-684(图 3)。

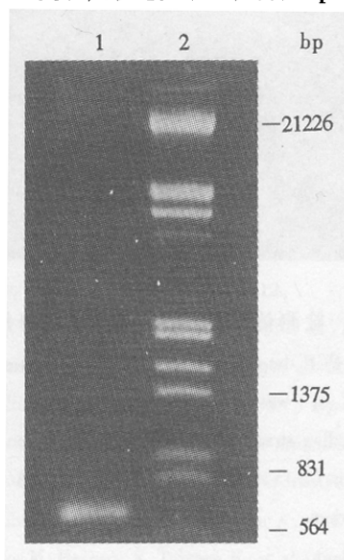


图 2 PHEA-2 PCR 产物电泳检测结果

Fig.2 The PCR amplification from PHEA-2 with primer  
lph1 and lph2

1. PCR product; 2.  $\lambda$ DNA/ *Eco*R I + *Hind* III Marker.

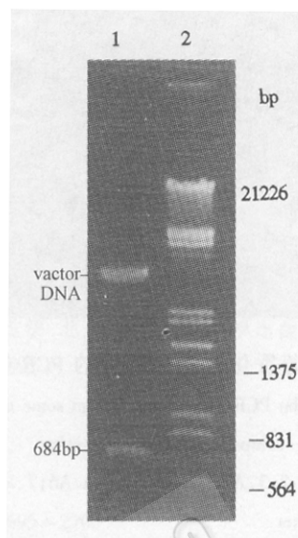


图 3 pGEM-684 酶切图谱

Fig.3 The digestion map of pGEM-684 by *Eco*RI

1. *Eco*R I restriction; 2.  $\lambda$ DNA/ *Eco*R I + *Hind* III Marker.

## 2.2 不同环境中苯酚降解菌的 PCR 检测

苯酚降解菌 PHEA-2、JA、A08 和 A23 来源于不同的环境中,其中 PHEA-2 为醋酸钙不动杆菌,A08 为假单胞菌,以 Lph1 和 Lph2 为引物的 PCR 结果表明,JA、A08、A23 和 PHEA-2 一样都能扩增出 684bp 的产物,说明该引物对苯酚羟化酶基因有特异性。

为验证引物 Lph1 和 Lph2 对降解其它芳香化合物细菌的降解基因是否具有特异性,以 PHEA-2 为对照,利用该对引物对本实验室分离到的几株芳香化合物降解菌 A1、A3、A4、A5、A6 进行了 PCR 扩增。结果表明,只有菌株 PHEA-2 扩增出 684bp 的产物(图 4),进一步验证了 684bp 条带是苯酚降解菌特有的。

## 2.3 炼焦废水中的苯酚降解菌的 PCR 检测

将从炼焦厂排出的废水样品倍比稀释后,涂在 LB 平板上过夜培养,用引物 Lph1 和 Lph2 PCR 检测随机挑取的 10 个单菌落的苯酚降解特性。结果表明 7 个菌落有 684bp 的苯酚降解菌的特征条带,3 个菌落没有扩增到苯酚降解菌的特征条带(图 5)。将供试的 10 株菌接种到 5mL 液体 LB 培养基中,过夜培养后,按 1% 接种到 20mL 含 2mmol/L 苯酚的 MS 培养基中,20h 后观察培养基中菌的生长和检测苯酚的浓度:具有苯酚降解菌特征条带的菌,都能够在培养基中生长,培养基变混浊,检测不到苯酚,具有降解苯酚的能力;不具有苯酚降解菌特征条带的菌,不能在培养基中生长,使培养基仍保持清亮,苯酚的浓度维持在 1.9mmol/L 左右。这说明用 PCR 扩增的 684bp 条带可以作为苯酚降解菌以 Lph1 和 Lph2 为引物的特征条带,用来检测和分离苯酚降解菌。

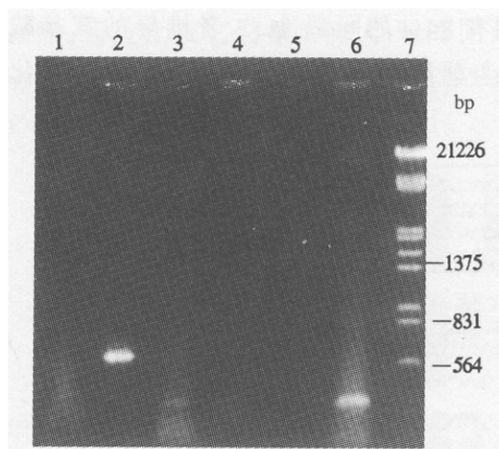


图4 几种芳香化合物降解菌的PCR扩增结果

Fig.4 The PCR amplification from some aromatic compounds-degrading strains

1. A1; 2. PHEA-2; 3. A3; 4. A4; 5. A5; 6. A6; 7.  $\lambda$ DNA/*Eco*RI + *Hind*III Marker.

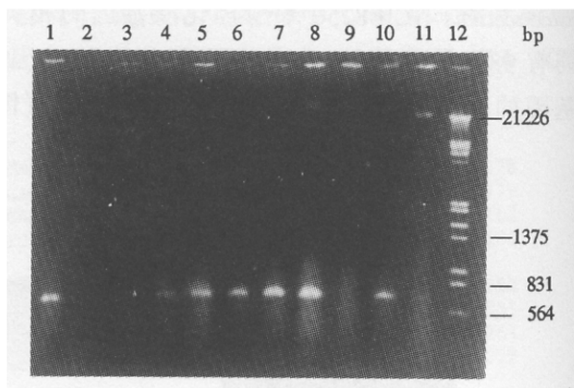


图5 PCR检测炼焦厂废水中的苯酚降解菌

Fig.5 The PCR detection of phenol-degrading strains from the wastewater of coking plant

Phenol degrading strains (1, 4, 5, 6, 7, 8, 10), Non-phenol degrading strains (2, 3, 9); 11. PHEA-2; 12.  $\lambda$ DNA/*Eco*RI + *Hind*III Marker.

### 3 讨论

苯酚羟化酶是环境中占优势的酶<sup>[14,15]</sup>,一般情况下,苯酚降解菌通过这种酶将苯酚转化为邻苯二酚,然后邻位开环,经过一系列生化反应将苯酚氧化为二氧化碳和水<sup>[16]</sup>。本研究通过比较不同种属苯酚降解菌的苯酚羟化酶大亚基的基因,发现它们有很高的同源性。Watanabe 等根据多组分苯酚羟化酶基因的保守序列设计 PCR 引物,从活性污泥中分离到的 27 个苯酚降解菌中有 17 个能扩增出苯酚羟化酶基因的部分序列,并不能检测出活性污泥中存在的所有的苯酚羟化酶基因<sup>[17]</sup>。本研究根据多组分苯酚羟化酶基因的保守序列所设计的 PCR 引物具有很高的特异性,在供试的所有苯酚降解菌中都能扩增出目的片段,并且在炼焦废水中成功地检测到苯酚降解菌。

苯酚降解菌株分离于不同的环境中,如假单胞菌 CF600 分离于英国的活性污泥中,假单胞菌 H 分离于德国的河水中<sup>[17]</sup>,*Ralstonia eutropha* E2 分离于日本的炼油废水中<sup>[13]</sup>,醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 分离于我国炼油废水中,通过不同的途径地苯酚进行降解,如醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 和本实验室所分离的另一株苯酚降解菌假单胞菌 A08 虽然同属于变形细菌的  $\gamma$  亚类,但它们的苯酚降解途径却不同,PHEA-2 是通过邻苯二酚的邻位开环途径进行降解,而 A08 却不能利用邻苯二酚,可能是通过另一途径对苯酚进行降解。尽管苯酚降解菌之间在代谢途径和降解效率上有差异,但不同环境和种属苯酚降解菌的苯酚羟化酶基因核苷酸序列却有高度同源性,说明苯酚羟化酶基因在进化上有共同的起源。

采用传统的富集培养技术分离苯酚降解菌不仅效率低,而且不能反映酚降解菌代谢类型的生物多样性。本研究所设计的 PCR 引物适用于不同种属(斯氏假单胞菌、醋酸钙不动杆菌)和不同环境(炼焦废水、炼油废水、纺织废水)中的苯酚降解菌,通过对炼焦废水中苯酚降解菌的检测和分离,说明这种方法克服了传统的富集培养的局限性,可快速、准确、方便地从酚污染的环境中检测和分离苯酚降解菌。

## 参 考 文 献

- [1] 牛世全,胡正嘉.环境科学与技术,1991,53(2):44~47.
- [2] Alfizar P A, Mercadier C, Vega D, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**:3216~3220.
- [3] Hinteregger C, Leitner R, Loidl M, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **37**:252~259.
- [4] Li D-Y, Eberspacher J, Wagner B, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**:1920~1928.
- [5] Dunbar J, Wong D C L, Yarus M J, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**:4180~4185.
- [6] Watanabe K, Sanae H. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**:3901~3904.
- [7] 徐玉泉,张维,陈明,等.环境科学学报,2000,20(4):450~455.
- [8] Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In: Ausubul F M. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley & Sons J, 1987. 2.10~2.12.
- [9] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法.北京:中国环境科学出版社,1997.408.
- [10] Herrmann H, Muller C, Schmidt I, et al. *Mol Gen Genet*, 1995, **247**:240~246.
- [11] Nordlund I, Powlowski J, Shingler V. *J Bacteriol*, 1990, **172**:6826~6833.
- [12] Ehrst S, Schirmer F, Hillen W. *Mol Microbiol*, 1995, **18**:13~20.
- [13] Hino H, Watanabe K, Takahashi N. *Microbiology*, 1998, **144**:1765~1772.
- [14] Nordlund I, Powlowski J, Hagstrom A, et al. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**:2695~2703.
- [15] Peters M, Heinaru E, Talpsep E, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**:4899~4906.
- [16] van der Meer J R, De VOS W M, Harayama S, et al. *Microbiological review*, 1992, **56**:677~694.
- [17] Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**:4396~4402.

## THE DETECTION OF PHENOL DEGRADING STRAIN IN ENVIRONMENT WITH SPECIFIC PRIMER OF PHENOL HYDROXYLASE GENE\*

Xu Yuquan<sup>1,2,3</sup> Fang Xuanjun<sup>2</sup> Chen Ming<sup>3</sup> Zhang Wei<sup>3</sup> Li Junming<sup>1</sup> Lin Min<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(<sup>2</sup> Institute of Biotechnology Research, CAAS, Beijing 100081, China)

(<sup>3</sup> Institute for Application of Atomic Energy, CAAS, Beijing 100094, China)

**Abstract:** A 684bp oligonucleotide fragment was produced by PCR amplification from phenol-degrading strain *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2 with the specific primers of gene encoding phenol hydroxylase. The nucleotide sequence of this fragment and its deduced amino acid sequence share 84% and 98% homology with the phenol hydroxylase gene and its deduced amino acid sequences of phenol-degrading strain *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. Sets of different aromatic compounds degrading strains were used to test this specific prime. The 684bp-fragments were amplified only from phenol-degrading strains by PCR. When using this pair of primers to detect the bacterial isolates from wastewater discharged from coking plant, all the tested strains, which possess 684bp characteristic fragment, showed the ability to degrade phenol in this study.

**Key words:** Phenol-degrading strains, Phenol Hydroxylase gene, PCR detection, Coking wastewater

\* Financed by National High Technology Project (863-SZ-03-01)