

鞘氨醇单胞菌 PY3 菲降解基因的克隆及序列分析*

张小凡¹ 小柳津广志²

(¹ 上海交通大学环境科学与工程学院 上海 200240)

(² 日本东京大学农学生命科学研究科 东京 113-8657)

摘 要 将菲降解菌鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.) PY3 的 DNA 片段与 pUC119 质粒连接后, 转化大肠杆菌 JM109 经筛选得到两个质粒, 分别命名为 pUp1(带有 2.3kb 外源 DNA 片段)和 pUp2(带有 3.9kb 外源 DNA 片段)。pUp1 的 DNA 含有 2 个 ORF。ORF 1 由 275 个氨基酸组成, 与恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) F1 的甲苯水解酶及菌株 *Pseudomonas* CF600 的甲苯水解酶在氨基酸水平上有 47% 的同源性。ORF 2 由 327 个氨基酸组成, 与嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) 的邻苯二酚双加氧酶(phe B)及紫红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*) CTM 的邻苯二酚双加氧酶(C23O)在氨基酸水平上分别有 57% 和 44% 的同源性。

关键词 菲, 双加氧酶, 基因

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)06-0680-06

多环芳烃是一类含有二个苯环以上的有机化学污染物, 主要来源于人类生产活动和能源利用过程, 如石油、煤、木材等燃烧过程, 以及石油及石油化工产品生产过程。此外, 多环芳烃还存在于汽车、飞机等交通运输工具以及采暖锅炉和家庭炉灶排气中。由于多环芳烃的潜在毒性、致癌性及致突变作用, 将严重影响到人类健康, 因此, 多环芳烃在环境中的能否被微生物快速地降解引起了人们的重视。通常微生物降解芳烃化合物的途径是在芳香环相邻的两个碳原子上分别导入两个氧原子形成邻苯二酚类化合物, 然后经 *meta*- 或 *ortho*- 开裂, 进入下一步代谢^[1, 2]。邻苯二酚类化合物 *meta*- 开裂时, 在 420nm 处有一个极大的吸收峰, 因此在基因工程菌对多环芳烃的降解试验中, 常利用这一特点^[3-5]。作者利用菲为唯一的碳源, 从石油污染土壤中分离出具有降解多种芳烃化合物的 2 株鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.) PY3 和 PH2 菌株。根据这些菌株能使 2, 3-二羟基联苯氧化变色这一特性, 对菲降解菌(*Sphingomonas* sp.) PY3 的 *meta*- 开裂基因进行克隆和研究。

1 材料和方法

1.1 菌株 质粒、培养基、及培养条件

本实验使用的供体菌为芳香族化合物菲降解菌(*Sphingomonas* sp.) PY3, 载体为质粒 pUC119(*lacZ* Ap^r)^[6], 受体菌为 *E. coli* JM109。菌株 *Sphingomonas* sp. PY3 在 LB 培养基培养; *E. coli* JM109 在 2 × YT 培养基^[7]培养。氨苄青霉素(最终浓度为 50 μg/mL)用于大肠杆

* 国家教委留学回国启动基金的资助(B3237A)

作者简介 张小凡(1960-)男, 黑龙江哈尔滨市人, 上海交通大学讲师, 博士, 2000年毕业于日本东京大学, 主要从事有毒有害物质生物降解的研究。

收稿日期 2002-01-14, 修回日期 2002-05-27

菌液体培养及在固体培养基上的选择。

1.2 药品及试剂

2,3-二羟基联苯和苯甲酸从 Katayama 化学工业有限公司(日本)购入。碱性磷酸酶(CIAP)、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶从 Wako 纯化学工业有限公司(日本)购入。

1.3 DNA 制备

质粒 pUC119 用碱法从大肠杆菌中抽提^[8]。菌株 *Sphingomanas* sp. PY3 的总 DNA 用苄基氯法^[9]从培养 18 h 后的菌体中抽提。

1.4 基因克隆

菌株 *Sphingomanas* sp. PY3 DNA 和质粒 pUC119 DNA 分别用 *Eco*R I 酶切。质粒 DNA 用碱性磷酸酶(CIAP)去除 5'端磷酸。用 T4 DNA 连接酶连接。JM109 转化菌的筛选用含有氨苄青霉素的 2 × YT 选择培养基。酶活性根据 2,3-二羟基联-乙醚溶液(0.5mg/mL)喷雾后,固体培养基的菌落是否变黄判定^[10]。

1.5 核酸序列的测定与分析

核酸序列的测定用 Sanger 双脱氧链终止法,使用测序仪为 ABI PRISM™ 310 基因分析仪(数据收集采用 1.0.2 版本,序列分析采用 3.0 版本)。核酸序列的分析及氨基酸相同性比较通过 DDBJ、EBI 及 GenBank 数据库和 CLUSTAL W 分析软件(1.6 版本)完成。

1.6 静止细胞反应

将带有质粒的 *E. coli* JM109 菌株接种于氨苄青霉素选择培养基,37℃培养到 OD_{560} 为 0.9 时回收菌体,用 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH7.5)洗净后,加原培养液 1/10 体积的磷酸缓冲液制成静止细胞溶液。将 2,3-二羟基联苯溶于乙醇制成 1% 溶液后加入休眠细胞溶液中,振荡反应 2h。用 1 mol/L HCl 调反应液 pH 至 3,并用醋酸乙酯抽提。抽出的中间代谢产物用 TLC 及质谱仪分析。TLC 分离:TLC 用 0.25mm 荧光硅胶板(Whatman 滤纸有限公司,德国),分离液为己烷-乙酸乙酯-醋酸混合液(10:10:1, v/v)。用不含质粒的大肠杆菌 JM109 菌株作对照。

1.7 质谱分析

质谱 GC-MS-QP5000 系统(Shimadzu, Ltd.),谱柱 Fused-silica chemical bonded capillary column DB-1(直径 0.25 mm,长 30 m),汽化室温度 230℃,离子电压 70eV,载气(氦气)流率 100kPa,升温程序为起始温度 60℃(2 min),升温速率 A 为 4℃/min,最终温度 A 为 72℃,升温速率 B 为 16℃/min,最终温度 B 为 280℃。

2 结果和讨论

2.1 基因克隆

菌株 *Sphingomanas* sp. PY3 的总 DNA 经限制性内切酶处理,与质粒 DNA 连接后,转化到 *E. coli* JM109。生长在氨苄青霉素选择培养基上的 *E. coli* JM109 经 2,3-二羟基联苯-乙醚溶液(0.5mg/mL)喷雾后,黄变菌落被初步判定为转化子。提取转化子质粒 DNA,用 *Eco*R I 进行酶切。经琼脂糖凝胶电泳分离,得到两种类型的外源 DNA 片段。这两种质粒分别命名为 pUp 1(2.3kb *Eco*R I 插入片段)和 pUp 2(3.9 kb *Eco*R I 插入片段)。

2.2 目的片段的内切酶图谱

用十种限制性内切酶对 pUp 1 的 DNA 片段进行处理 ,并用琼脂糖凝胶电泳对它们进行了分离 ,结果如图 1 所示。图 1 表明 ,pUp 1 有 *Pst* I 和 *Hind* III 两个酶切位点。经分析这个 DNA 片段的限制性酶切片段排列顺序为图 2 所示。

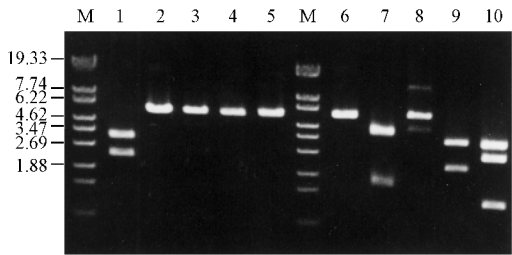


图 1 限制性内切酶酶切后的
pUp 1 琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel (0.9%) electrophoresis of
restriction enzyme-digested pUp 1

1. *Eco*R I ; 2. *Sac* I ; 3. *Kpn* I ; 4. *Sma* I ; 5. *Bam*H I ;
6. *Xba* I ; 7. *Sal* I ; 8. *Pst* I ; 9. *Sph* I ;
10. *hind* III ; M. λ DNA/ *Sty* I .

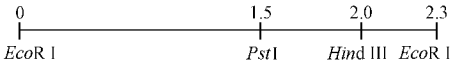


图 2 2.3kb *Eco*R I 插入片段的物理图谱

Fig.2 Physical map of the 2.3kb *Eco*R I insert

2.3 静止细胞反应

用携带 pUp 1 质粒的 *E. coli* JM109 进行静止细胞反应 ,经抽提、分离及 GC-MS 分析 ,发现在反应液中存在 2,3-二羟基联苯的代谢产物苯甲酸(图 3)。因而推断 :pUp 1 质粒内含有编码芳香环分解酶的基因 ,它们不仅可使 2,3-二羟基联苯变黄 ,还可催化 2,3-二羟基联苯生成苯甲酸。

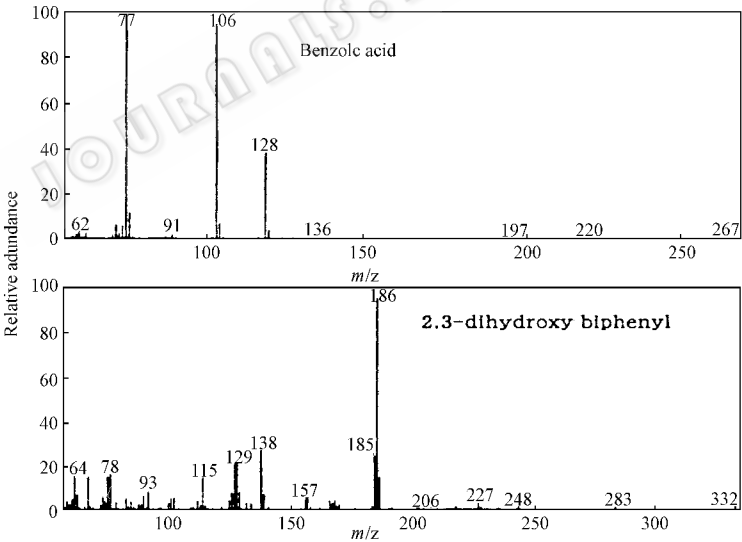


图 3 2,3-二羟基联苯及代谢产物苯甲酸的质谱图

Fig.3 mass spectra of 2,3-dihydroxy biphenyl and benzoic acid

2.4 序列分析

在测定基因图谱的基础上 ,对 pUp 1 的外源 DNA 片段进行了测序(图略)。pUp 1 的 DNA 片段含有 2 个开放读框(ORF)。ORF 1 由 275 个氨基酸组成 ;ORF 2 由 327 个氨基酸组成。在每个 ORF 的上游区都存在与转录起始有关的 SD 序列^[11]。ORF 1 含有铁硫蛋白(plant type[2Fe-2S])的 Motif 及水解酶的 Motif ;ORF 2 含有铁硫蛋白(plant type[2Fe-2S])的 Motif 及

双氧化酶的 Motif。

2.5 ORF 1 序列分析

根据同源性数据库检索 ,发现 ORF 1 与菌株恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) F1^[12] 的甲苯水解酶及菌株假单胞菌(*Pseudomonas*) CF600^[13] 的甲苯水解酶在氨基酸水平上有 47% 的同源性。同时 ,通过 Motif 检索 ,还发现在 ORF 1 的 DNA 序列里含有“ C- $\{C\}$ - $\{C\}$ - $[GA]$ - $\{C\}$ -C- $[GAST]$ - $\{CPDEKRHFYW\}$ -C ”铁硫蛋白(plant type $[2Fe-2S]$)的 motif 及“ Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly ”水解酶的 Motif^[14]。因此 ,推断菌株 *Sphingomonas* sp. PY3 的 ORF 1 是编码菲水解酶的基因。ORF 1 的基因序列与其它菌株的水解酶基因序列比较如图 4 所示。图中所有的水解酶基因都含有“ Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly ”序列(灰色底纹)。

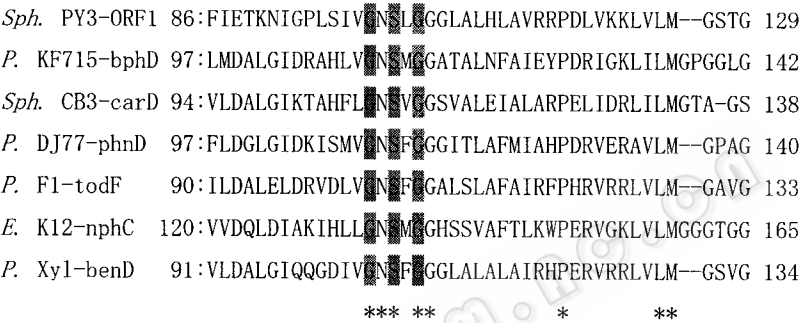


图 4 2.3 kb 插入片段的核苷酸序列和推断的氨基酸序列

Fig.4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Eco*R I fragment of 2.3kb

2.6 ORF 2 序列分析

氨基酸序列同源性检索的结果表明 ,ORF 2 与菌株嗜热脂肪假单胞菌(*Bacillus stearo-thermophilus*)^[15] 的邻苯二酚双加氧酶(phe B)及菌株紫红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous* CTM^[16])的邻苯二酚双加氧酶(C230)在氨基酸水平上分别有 57% 和 44% 的相同性。此外 ,ORF 2 的 DNA 序列里含有双加氧酶 $[GNTIV]$ -x-H-x $(5,7)$ $[LIVMF]$ -Y-x (2) $[DENTA]$ -P-x- $[GP]$ -x $(2,3)$ -E ”的 Motif 及铁硫蛋白 $([4Fe-4S])$ C-x (2) -C-x (2) -C-x (3) -C- $[PEG]$ ”的 motif (黑色底纹)。ORF 2 的基因序列与其它菌株的双加氧酶基因序列比较如图 5 所示。由以上结果可以推断 ORF 2 是编码菲双加氧酶的基因。



图 5 ORF 1 与来自其他菌株水解酶基因的氨基酸序列比较

Fig.5 Multiple amino acid sequence alignment of ORF 1 and other extradiol hydrolases

3 结论

本研究并根据 2,3-二羟基联苯氧化变色这一特性,对菲降解菌 *Sphingomonas* sp. PY3 的 *meta*-开裂基因进行克隆和研究。通过酶切、连接、及转化,得到两个质粒 pUp 1 和 pUp 2。经 DNA 测序及数据库检索,发现 pUp 1 含有 2 个 ORF。ORF 1 含有铁硫蛋白(plant type [2Fe-2S])及水解酶的 Motif; ORF 2 含有双加氧酶及铁硫蛋白([4Fe-4S])的 Motif。经与其它菌的芳香化合物水解酶及双加氧酶的比较,证明 ORF 1 是编码菲水解酶的基因; ORF 2 是编码菲双加氧酶的基因。根据 Mason 和 Cammack 的分类,芳烃环双加氧酶可分为三大类:第一大类由两个酶组成:第一个酶是含 flavin 和 plant type [2Fe-2S] 氧化还原中心的还原酶,第二个酶是氧化酶;第二大类由三个酶组成:既铁氧化还原酶、plant type [2Fe-2S] 氧化还原酶和氧化酶;第三大类也由三个酶组成:它们是 plant type [2Fe-2S] 氧化还原酶、rieske type [2Fe-2S] 氧化还原酶和氧化酶^[17]。菌株 *Sphingomonas* sp. PY3 的双加氧酶属于哪一类,还有待于进一步研究。

致谢 本研究为日本石油产业活性化中心(JPEC)和科威特国家科学院(KISR)共同研究项目的一部分。本文在完成过程中得到国家教委留学回国启动基金的赞助及日本东京大学农学生命科学研究科的大力支持,特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Dagley S. Biochemistry of Aromatic Hydrocarbon Degradation in Pseudomonas. In: Sokatch J R ed. The Bacteria, vol. 10. The Biology of Pseudomonas. Orlando Fla: Academic Press Inc, 1986. 527 ~ 555.
- [2] van der Meer J R, de Vos W M, Harayama S, et al. Microbiol Rev, 1992, **56**: 677 ~ 694.
- [3] Asturias J A, Timmis K N. J Bacteriol, 1993, **5**: 4631 ~ 4640.
- [4] Ensley B D, Ratzkin B J, Osslund T D, et al. Science, 1983, **222**: 167 ~ 169.
- [5] Harayama S, Rekik M. J Biol Chem, 1989, **4**: 15328 ~ 15333.
- [6] Vieira J, Messing J. methods Enzymol, 1987, **3**: 3 ~ 11.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Birnboim H C, Doly J. Nucleic Acids Res, 1979, **7**: 1513 ~ 1523.
- [9] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Nucleic Acids Res, 1993, **21**: 5279 ~ 5280.
- [10] Furukawa K, Miyazaki T. J Bacteriol, 1986, **166**: 392 ~ 398.
- [11] Shine J, Dalgarno L. Nature, 1975, **254**: 34 ~ 38.
- [12] Menn F M, Zylstra G J, Gibson D T. Gene, 1991, **104**: 91 ~ 94.
- [13] Nordlund I, Shingler V. Biochim Biophys Acta, 1990, **1049**: 227 ~ 230.
- [14] Hofer B, Eltis L, Dowling D N, et al. Gene, 1993, **130**: 47 ~ 55.
- [15] He Z Q, Mao Y M, Sheng Z J, et al. Chinese Biochem J, 1995, **11**: 114 ~ 116.
- [16] Candidus S, van Pee K H, Lingens F. Microbiology, 1994, **140**: 321 ~ 330.
- [17] Mason J R, Cammack R. Annu Rev Microbiol, 1992, **46**: 277 ~ 305.

Cloning and Sequence Analysis of Phenanthrene Degradation Genes from *Sphingomonas* sp. Strain PY3

Zhang Xiaofan¹ Hiroshi Oyaizu²

(¹ School of Environmental Science and Engineering Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200240 ,China)

(² Graduate School of Agriculture and Agriculture Life Sciences , University of Tokyo , Tokyo 113 - 8657 , Japan)

Abstract : The DNA fragment encoding *meta*-cleavage enzymes , involved in phenanthrene degradation , was cloned from the phenanthrene-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strains PY3. On the basis of restriction mapping analyses , these clones were classified into two types of plasmids , designated pUp 1(2.3 kb *Eco*R I insert) and pUp 2(3.9 kb *Eco*R I insert). DNA sequence analysis of 2.3-kb *Eco*R I fragment revealed that were two open reading frames(ORF 1 and ORF 2). The deduced amino acid sequence of ORF 1 showed 47% identity with toluene hydrolase of *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* CF600 , respectively. The deduced amino acid sequence of ORF 2 showed 57 and 44% identity with catechol 2 β -dioxygenase(phe B) of *Bacillus stearothermophilus* and catechol 2 β -dioxygenase(C230) of *Rhodococcus rhodochrous* CTM , respectively.

Key words :Phenanthrene , Dioxygenase , Gene.

《微生物学报》入选“ 中国科技期刊方阵 ”

近期 中国科学技术部公布了我国期刊进入“ 中国期刊方阵 ”的名单。全国共有 716 种期刊进入了“ 中国期刊方阵 ” ,其中“ 双高 ”期刊 40 种 ;“ 双奖 ”期刊 58 种 ;“ 双百 ”期刊 122 种 ;“ 双效 ”期刊 496 种。《微生物学报》入选“ 双百 ”期刊方阵。

“ 中国期刊方阵 ”的建设是现阶段我国期刊出版事业发展的需要 ,是推进新世纪我国期刊发展的战略性举措 ,它将促进我国期刊“ 精品战略 ”的实施。

《微生物学报》编委会感谢各级领导的关心 ,感谢广大作者、读者对本刊办刊工作的大力支持。我们将更好地贯彻国家有关办刊工作的各项政策、法规和法令 ,进一步提高刊物质量 ,为我国的经济建设服务 ,为使期刊尽快走向世界做出积极贡献。