

# 伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.) 2-萘酸单加氧酶基因(*nmo*)的克隆及表达

方向平 丘晓颖 岑英华 孙国萍\*

(广东省微生物研究所 广州 510070)

**摘 要** 通过酶切连接将 *Burkholderia* sp. JT1500 的一段 DNA 片段(4.8kb)亚克隆到表达载体 pUC18 上,得到重组子 pEK123。测序后的 pEK123 重组子 4.8kb 插入片段的序列已经登陆欧洲 EMBL 基因库,序列接受号为 AJ566333。对这一 DNA 片段的序列分析显示,此 DNA 片段含有 3 个阅读框,且在这 3 个阅读框 5'端发现一启动子特异序列。再用酶切连接方法得到仅含一个阅读框的重组子 pXK3,其阅读框长度为 1158bp,编码 386 个氨基酸,与已报道的 *Ralstonia eutropha* HF39 羟化酶(单加氧酶, *bec*)氨基酸序列有 64% 的同源性。pEK123 对 2-萘酸代谢途径中 4 个关键底物的转化实验结果显示,其基因产物仅对 2-萘酸发生加氧转化反应,而且 2-萘酸浓度有明显的降低,证实此基因是 2-萘酸单加氧酶基因(*nmo*)。同时发现其基因产物也可以转化苯甲酸钠。该酶对苯甲酸的加氧转化途径正在研究中。

SDS-PAGE 结果表明, pXK3、pEK123 两重组子中 2-萘酸单加氧酶表达量并没明显区别,但加氧酶酶活却存在显著的差别。推测在启动子后,单加氧酶阅读框前的两个阅读框的基因产物,对单加氧酶活有促进作用。

**关键词** 2-萘酸,单加氧酶,底物

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)05-0599-08

2-萘酸是具有两个苯环结构的化合物,研究细菌降解 2-萘酸(2-naphthoate)的代谢途径的主要意义是因为 2-萘酸的化学结构与印染行业广泛使用的偶氮染料的骨干单元结构类似。研究 2-萘酸的微生物代谢途径、确定其代谢过程中的酶系统以及对应的代谢基因,可以为偶氮染料的微生物降解提供理论依据,为通过生物工程技术构建多功能高效的环境污染物降解菌创造条件<sup>[1]</sup>。

苯环类化合物的微生物降解途径中,加氧酶(Monooxygenase)基因起着重要的作用。自 1983 年 Ensley 等<sup>[2]</sup>发现克隆的加氧酶基因的表达可使大肠杆菌积累靛蓝的现象以来,这种使吲哚羟化生成靛蓝的直观指标已经被广泛用于克隆各种细菌加氧酶基因。吲哚可被各种羟化酶(单、双加氧酶)羟化生成靛蓝的普遍性,已成为最简单的加氧酶检测方法<sup>[2,3]</sup>。伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.) JT1500 是一株 2-萘酸降解菌,其 2-萘酸代谢途径已由 Morawski 等<sup>[4]</sup>报道,发现 2-萘酸的降解涉及多个加氧酶的反应,其中 2-萘酸代谢途

基金项目: 国家自然科学基金(30270056); 广东省自然科学基金(团队项目)(E2001501)

\* 通讯作者。Tel: 86-20-87782471; Fax: 86-20-87601587; E-mail: ebiotech@gis.sti.gd.cn

作者简介: 方向平(1975-),女,助理研究员,硕士,研究方向为环境微生物。E-mail: ebiotech@gis.sti.gd.cn

收稿日期: 2002-11-25, 修回日期: 2003-06-19

径第一步是由单加氧酶羟化 2-萘酸产生 1-羟基-2-萘酸。通过粘粒 pLARF1 构建了 JT1500 的 DNA 文库,获得 6 个在 LB 平板上积累靛蓝的菌落。取其中一个菌落 B6 检测,发现含有一段 20kb 左右的 JT1500DNA 片段,本文报道对此段 DNA 做逐级亚克隆,探求其具有加氧酶活的最短 DNA 序列的结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、菌株和培养基

宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) HB101、JM109,质粒载体 pUC18、pUC19 由本实验室保存。伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.) JT1500 是一株 2-萘酸降解菌,B6 质粒为粘粒载体 pLARF1 含有 20kb 左右的 JT1500 DNA 片段,均由本实验室保存。丰富培养基 Luria-Bertan(LB)和无机盐培养基 M9 含葡萄糖,根据需要添加氨苄青霉素(Amp)100mg/L。

### 1.2 酶和试剂

所有限制性内切酶及连接酶购自 TaKaRa 公司,质粒抽提试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司,NADH、IPTG、二甲替甲酰胺(DMF)购自华美生物工程公司,2-萘酸、1-羟基-2-萘酸、原儿茶酸、邻苯二酸购自 Aldrich 公司。其它化学试剂均为分析纯。

### 1.3 基因克隆和序列分析

首先从 B6 质粒的 20kb 供体 DNA 作亚克隆,分别将各酶切片段连接到 pUC18 中,得到一个能使 *E. coli* 转化子细胞积累靛蓝的亚克隆。内含 8kb 供体 DNA。通过 *Eco*R I / *Kpn* I 酶切连接将此 8kb DNA 片段中具有 3 个阅读框 DNA 片段(4.8kb)亚克隆到 pUC18 上,并转化 *E. coli* HB101 得到重组子 pEK123。将 4.8kb 的片段用 *Xba* I / *Kpn* I 酶切得到仅含一个阅读框的 DNA 片段(2.2kb),亚克隆到 pUC19 上获得重组子 pXK3。*Eco*R I / *Xba* I 酶切得一段 DNA 片段(2.6kb),连接到表达载体 pUC18 得重组子 pEX12(图 1)。由 TaKaRa 公司对 pEK123 进行 DNA 序列测定,DNA 序列分析和蛋白分析采用 DNAssist 软件。

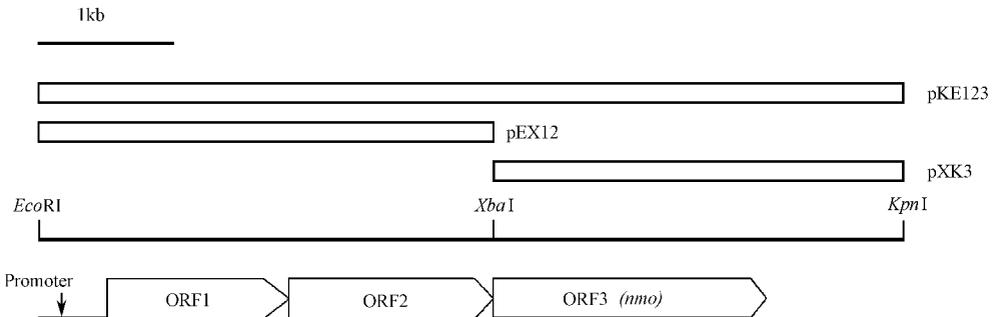


图 1 pEK123 重组子中阅读框的排列

Fig. 1 Organization of the open reading frame in pEK123

### 1.4 底物转化实验

#### 1.4.1 羟化酶的靛蓝生成实验:参照文献 [3]

#### 1.4.2 制备细胞提取液<sup>[4]</sup>:分别将含 pEX12、pXK3、pEK123 质粒的 *E. coli* JM109,接种在

含 100mg/L 氨基青霉素的 500mL LB 培养液中, 37℃ 过夜振荡培养。4℃ 离心收集菌体, 用水洗涤两次, 再悬浮在 50mmol/L 磷酸缓冲液( pH7.0 )中。超声波破碎细胞( 破碎 3 次, 每次 1min, 间隔 1min )后, 4℃ 下 20000r/min 离心 30min, 回收上清, 再于 4℃ 下 38000 r/min 离心 2h, 上清液即为细胞提取液。

**1.4.3 酶活测定**<sup>[4]</sup>: 反应体系为 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液( 50mmol/L, pH7.0 ) 940  $\mu$ L, 细胞提取液 50 $\mu$ L, NADH( 25mmol/L ) 7 $\mu$ L, 反应底物 3 $\mu$ L( 0.5mol/L )。选取 2-萘酸、1-羟基-2-萘酸、原儿茶酸、邻苯二酸、吡啶、喹啉和苯甲酸钠为反应底物。NADH 的吸收峰位于 340nm 处。反应混合物在 37℃ 水浴中反应 1h, 每隔 15min 取部分反应混合物测  $OD_{340}$  值。蛋白浓度的测定采用二喹啉甲酸( BCA )检测法<sup>[5]</sup>。取反应混合物做适当稀释, 用紫外-可见分光光度扫描分析重组大肠杆菌对底物的利用。

## 1.5 SDS-PAGE

细菌总蛋白的提取和 SDS-PAGE 参照文献 [5] 进行操作。

## 2 结果和讨论

### 2.1 2-萘酸单加氧酶基因(*nmo*)的克隆和序列分析

从 B6 质粒的 20kb 供体 DNA 作亚克隆, 分别将各切段连接到 pUC18 中, 得到一个能使 *E. coli* 转化子细胞积累靛蓝的亚克隆, 内含 8kb 供体 DNA。再用此 8kb DNA 片段作 *EcoR* I / *Kpn* I 酶切连接, 其中一段 4.8kb DNA 亚克隆到 pUC18 上, 命名为 pEK123, 能使 *E. coli* 转化子在 LB 平板呈现靛蓝生成的蓝色菌落, 因此推断这一 DNA 片段中含有加氧酶基因。这一段 4.8kb 的 DNA 已完成了测序并被欧洲 EMBL 基因库接受, 接受号为 AJ566333。序列分析显示, 此 DNA 片段含有 3 个同向的阅读框, 其中一个 1158bp 阅读框( ORF3 )编码 386 个氨基酸, 与已报道的 *Ralstonia eutropha* HF39 羟化酶基因( 单加氧酶基因, *bec* ) 3' 末端的 780bp DNA 序列有 86% 的同源性, 与 *bec* 的氨基酸序列具有 64% 的同源性<sup>[6]</sup>。在此 1158bp 阅读框前还存在两个阅读框( ORF1、2 ), 且在这 3 个阅读框前端发现一启动子特异序列。 *Xba* I / *Kpn* I 酶切得到仅含上述 1158bp 阅读框的 DNA 片段( 2.2kb ), 亚克隆到表达载体 pUC19 上, 获得的重组子 pXK3, 同样能在 LB 平板形成蓝色菌落。而 *EcoR* I / *Xba* I 酶切得到仅含前两个阅读框( ORF1、ORF2 )的 DNA 片段( 2.6kb ), 连接 pUC18 得重组子 pEX12, 在 LB 平板上尽管培养时间到 4~5d 仍不能形成蓝色菌落( 图 1 )。初步确定 1158bp 阅读框为具羟化酶( 单加氧酶 ) 功能的基因( *nmo* )。

### 2.2 靛蓝生成实验

靛蓝溶解在二甲替甲酰胺( DMF )中, 在  $OD_{610}$  处有特异的吸收峰。观察  $OD_{610}$  处光吸收值的升高, 可计算出靛蓝的生成量。紫外分光光度计的靛蓝摩尔吸光系数为 17200  $\text{liters} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。在含葡萄糖的 M9 液体培养基中( Amp100mg/L ), 添加吲哚 60 $\mu$ mol/L 为底物, 用重组大肠杆菌做靛蓝生成实验。每 30min 取一定量培养液, 将被加氧酶羟化吲哚生成的靛蓝溶解在 DMF 中, 测定在  $OD_{610}$  处的光吸收值, 即可测定重组细胞中加氧酶的活性。分别对含 pUC18、pEX12、pEK123 和 pXK3 质粒的 *E. coli* HB101 做靛蓝生成实验( 图 2 )。结果表明, 含 pEK123 与 pXK3 质粒的 *E. coli* HB101 都能产生靛蓝, 含质粒 pUC18、pEX12 的 *E. coli* HB101 无靛蓝产生, 含 pEK123 质粒的大肠杆菌在反应 8h 后, 就将

60  $\mu\text{mol/L}$  的底物吲哚完全转化,而 pXK3 质粒即使在反应 12h 后,仍只转化了少量的吲哚底物。因此 pEK123 无论在靛蓝的生成速度或生成量方面都远高于 pXK3。

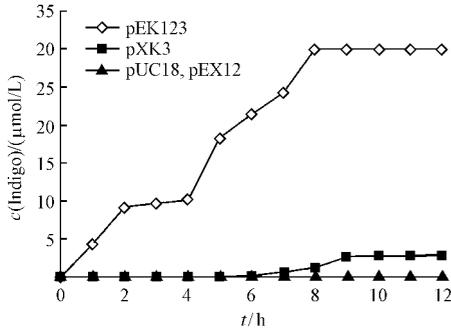


图 2 靛蓝生成实验

Fig. 2 Indigo formation assays

根据 Velasco 等<sup>[7]</sup>报道,用靛蓝的生成量可以表示加氧酶的酶活水平。从靛蓝生成实验结果分析,重组质粒 pEK123 与 pXK3 中都含有 1158kb 的 ORF3,都能生成靛蓝,二者的差异是前者比后者多含有两个阅读框和一启动子序列。由于 pXK3 质粒仅含一个阅读框(ORF3),所以确定此阅读框基因(*nmo*)的产物具加氧酶基因功能。含 pEX12 重组子的大肠杆菌不能将吲哚转化成靛蓝,说明位于 *nmo* 阅读框前的两个阅读框(ORF1、ORF2)和特异启动子序列缺乏构成加氧酶活性的必须成份。从靛蓝生成实验结果中还

发现,含有 3 个阅读框和启动子序列的 pEK123 无论在靛蓝的生成速度或生成量方面都远高于仅含一个阅读框(*nmo*)的 pXK3。根据靛蓝生成量和生成速度的显著差异,推测单加氧酶阅读框(*nmo*)前的两个阅读框(ORF1、ORF2)的基因产物和启动子特异序列可能对单加氧酶的酶活有很强的正调节作用。

### 2.3 底物转化实验

在加氧酶的酶活测定反应中,NADH 浓度的降低表示有加氧反应进行,紫外分光光度计的 NADH 摩尔吸光系数为  $3300 \text{ liters} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。酶活以每毫克蛋白每分钟催化  $1 \mu\text{mol}$  NADH 的氧化反应表示。将分别含 pUC18、pEK123、pXK3 质粒的 *E. coli* JM109 细胞提取液对 7 种底物的酶活见表 1。同时进行  $OD_{200} \sim OD_{400}$  范围的紫外-可见分光光度扫描,检查底物的消减。发现以 2-萘酸为底物的含 pEK123 细胞提取液的反应混合物,氧化反应 60min 后 2-萘酸的浓度有明显的降解(图 3)。而 2-萘酸代谢途径中其它 3 个加氧酶反应底物(1-羟基-2-萘酸、原儿茶酸、邻苯二酸)的浓度没有变化(表 1)。

表 1 2-萘酸单加氧酶的酶活分析

Table 1 Activity analysis of 2-naphthoate monooxygenase

Substrate	pUC18	pEK123	pXK3	pEX12
	[ $\mu\text{mol}(\text{mg} \cdot \text{min})$ ]			
2-naphthoate	-	17	-	-
1-OH-2-naphthoate	-	-	-	-
Procatechoate	-	-	-	-
Phthalate	-	-	-	-
Pyridine	-	-	-	-
Quinoline	-	-	-	-
Benzoate	-	14	-	-

- . Not detectable.

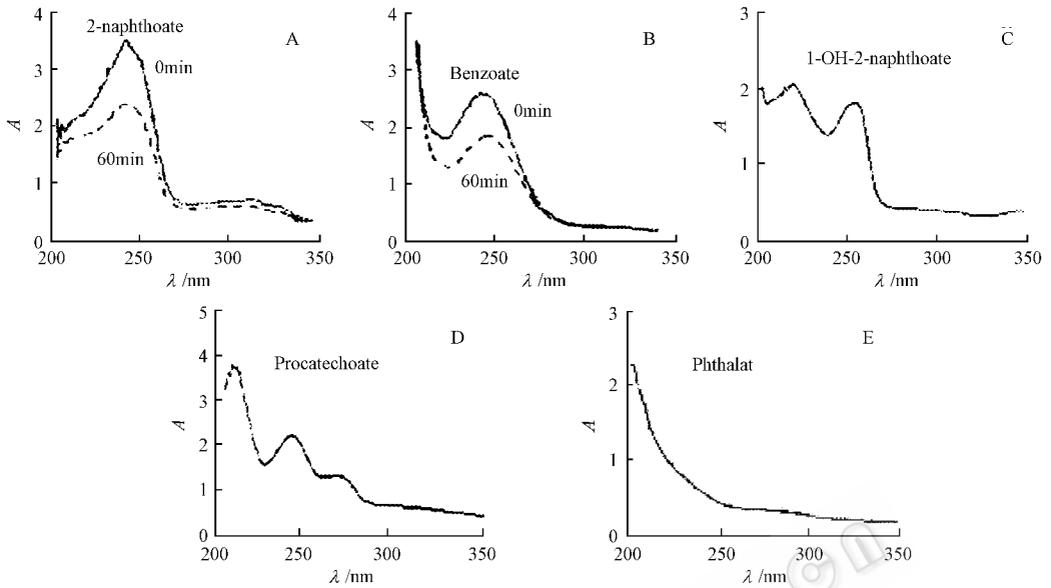


图3 反应混合物紫外-可见分光光度扫描图

Fig.3 UV-Vis spectram of the mixture containing substrates

由于采用 NADH 法测定含 pEK123 的基因产物对不同底物的氧化反应实验证明了 2-萘酸的加入与 NADH 消减成正相关,进而在底物消减实验中证明了仅仅只有 2-萘酸的消减。综合以上实验结果和上述靛蓝生成实验结果,确定 pEK123 重组质粒的插入片段的基因产物仅对 2-萘酸降解途径中的 2-萘酸有降解作用<sup>[4]</sup>,此酶的作用底物为 2-萘酸,即插入片段中存在的羟化酶(单加氧酶)功能的基因是编码 2-萘酸代谢途径中第一个关键酶 2-萘酸单加氧酶的基因(*nmo*)。但实验结果也显示,含 pXK3 质粒的大肠杆菌,即插入片段仅含 *nmo* 基因的细胞提取物对 2-萘酸不显降解作用。这是因为靛蓝生成实验的灵敏度比底物转化实验的要高,而且插入片段仅有一个阅读框的重组子 pKE3 的外源基因组成和表达调控与插入片段中含有 3 个阅读框的 pEK123 不同所致。从上述靛蓝生成实验结果可以发现, pEK123 无论在靛蓝的生成速度或生成量方面都远高于 pXK3,即 pEK123 的加氧酶活性要远远高于 pXK3。当加氧酶活性相对高得多的 pEK123 的基因产物表现出对 2-萘酸的降解作用时,加氧酶活性相对低的 pXK3 在灵敏度不高的底物转化实验中,就检测不出对底物的转化作用。下一步实验有必要将 *nmo* 基因以及另外两个阅读框产物进行纯化,研究 *nmo* 基因产物对 2-萘酸的加氧作用机制和另外两个阅读框产物对加氧酶酶活的调节作用。

已有报道发现,加氧酶基因的其它组分基因产物,调节基因产物以及所处操纵元(Operon)的启动子对加氧酶的酶活都有显著的调节作用。4-羟基苯醋酸羟化酶(4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase)就是一个双组分酶,在同一启动子序列后有两个基因阅读框。大组分蛋白 HpaB 单独存在时可进行羟化作用,如果小组分蛋白 HpaC 同时存在,羟化酶酶活可增强数十倍。而且在启动子前还有一个调节基因 *HpaA* 对这一双组分羟化酶进行调控<sup>[8]</sup>。假单胞菌 Gpo1 的链烷羟化酶(Alkane hydroxylase)则是一个三组份蛋白。

*AlkB* 基因产物是羟化酶, *AlkF*、*AlkG* 基因产物是红氧还蛋白 1、红氧还蛋白 2, *AlkG* 基因产物对羟化酶作用是必需的<sup>[9]</sup>。

在 2-萘酸降解途径研究中发现<sup>[4]</sup> 2-萘酸先经单加氧酶作用形成 1-羟基-2-萘酸。由于无法检测到双加氧产物 1,2-双羟基-2-萘酸( *Cis*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-2-naphthoate) 的存在,而且该菌株也不能利用和转化 1,2-双羟基-2-萘酸,因此 2-萘酸代谢途径与 Barnsley<sup>[10]</sup>报导的 *Flavobacteria* 的 2,6-双甲基萘的代谢途径相似,其代谢中间产物 6-甲基-2-萘酸是经单加氧羟化反应生成 1-羟基-6-甲基-2-萘酸。这种在萘酸羧基邻位加单羟基的加氧酶作用非常罕见,2-萘酸单加氧酶(*nmo*)基因更是未见报道,因此 2-萘酸单加氧酶究竟是单组分还是多组分蛋白,其基因的调节机制和对底物的作用机制如何都未见报道。本研究中发现 2-萘酸单加氧酶基因 *nmo* 的酶活受到另外两个阅读框产物和启动子的调节作用,另外两个阅读框产物是否为单加氧酶的组分蛋白,启动子序列对羟化酶的调节作用如何,还需要进行更深入的研究。

另外,挑选吡啶、喹啉及苯甲酸钠为底物,研究 *nmo* 基因对其它芳香族化合物的降解作用。发现 pEK123 细胞提取液对苯甲酸钠也发生氧化反应(表 1),因此认为 *nmo* 基因产物对苯甲酸钠也有加氧功能。苯甲酸的代谢途径早已有报道,第一步是通过苯甲酸双加氧酶(*benABC*)或甲苯甲酸双加氧酶(*XylXYZ*)对苯环羟基化,生成 1,2-二羟基苯甲酸<sup>[11-15]</sup>。从现已报道的上述两种双加氧酶系统来看,两者的组成是相同的,都含有氧化酶  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基(Oxygenase alpha, beta component)和还原酶(Reductase component) 3 个组分,而且不同菌株的 3 个组分蛋白具有较高的同源性<sup>[11]</sup>。1993 年 Altenschmidt 等<sup>[16]</sup>发现了苯甲酸氧化代谢的新途径,证实苯甲酸先经 CoA 连接酶作用生成苯甲酸辅酶 A (Benzoyl-CoA),再通过苯甲酸辅酶 A 加氧酶(Benzoyl-CoA oxygenase)对苯甲酸辅酶 A 进行羟基化,生成 3-羟基苯甲酸。本研究发现的 *nmo* 基因无论在核酸序列还是蛋白质一级结构上,与已报道的苯甲酸加氧酶组分都不存在同源性,另外 *nmo* 基因前的两个阅读框产物(ORF1, ORF2)与苯甲酸加氧酶也都没有同源性,这说明本研究发现的 *nmo* 基因不是苯甲酸或甲苯甲酸双加氧酶基因。而 *nmo* 基因却与 Christian 等<sup>[6]</sup>报道的羟化酶基因(单加氧酶基因, *bec*)的氨基酸序列具有 64% 的同源性。这些研究结果提示了 *nmo* 基因对苯甲酸的加氧反应可能

与前两种途径中的苯甲酸加氧反应不同,进一步的研究工作正在进行中。

## 2.4 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 检测蛋白发现, pXK3、pEK123 两重组子均能表达与预期分子量(43kD)相符合的蛋白带(图 4 短箭头所示),但该带所反映的表达量并没明显区别,而含 pEK123 的重组子比 pXK3 多了一条蛋白带(图 4B 长箭头所示)。推测两者在底物转化作用上的差异,不是由于 2-萘酸单加氧酶存在表达量的不同,因此认为两者的差异不在单加氧酶的转录、翻译过程。由于在 3 个阅

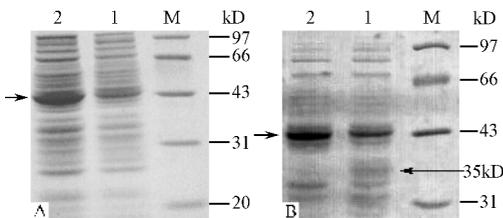


图 4 SDS-PAGE 蛋白检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis

A: 1. pUC19 plasmid;

2. pXK3 plasmid; M. Marker.

B: 1. pEK123 plasmid;

2. pXK3 plasmid; M. Marker.

Arrows: Locations of target proteins.

读框前端发现一启动子特异序列,所以推断单加氧酶阅读框前的启动子和两个阅读框的基因产物可能对单加氧酶酶活有促进作用。这两个阅读框的基因产物的进一步纯化和定性研究将有助于阐明 2-萘酸单加氧酶的组成及表达调控机制。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 孙国萍, Theophilous S, Ribbons D W. 2-萘酸细菌代谢途径的研究. 微生物学报, 1995, **35**( 6 ): 421 ~ 426.
- [ 2 ] Ensley B D, Ratzkin B J, Oslund T D, *et al.* Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science*, 1983, **222**: 167 ~ 169.
- [ 3 ] O'Connor K E, Dobson A D W, Hartmans S, *et al.* Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**( 11 ): 4287 ~ 4291.
- [ 4 ] Morawski B, Eaton R W, Rossiter J T, *et al.* 2-Naphthoate catabolic pathway in *Burkholderia* strain JT1500. *J Bacteriol*, 1997, **179**( 1 ): 115 ~ 121.
- [ 5 ] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [ 6 ] Drewlo S, Bramer C O, Madkour M, *et al.* Cloning and expression of a *Ralstonia eutropha* HF39 gene mediating indigo formation in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**( 4 ): 1964 ~ 1969.
- [ 7 ] Velasco A, Alonso S, Garcia J L, *et al.* Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J Bacteriol*, 1998, **180**( 5 ): 1063 ~ 1071.
- [ 8 ] Prieto M A, Garcia J L. Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1994, **269**( 36 ): 22823 ~ 22829.
- [ 9 ] Beilen J B V, Panke S, Lucchini S, *et al.* Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene cluster and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology*, 2001, **147**: 1621 ~ 1630.
- [ 10 ] Barnsley, E A. Metabolism of 2,6-dimethylnaphthalene by Flavobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 428 ~ 433.
- [ 11 ] Haddad S, Eby D M, Neidle E L. Cloning and expression of the benzoate dioxygenases genes from *Rhodococcus* sp. strain 19070. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**( 6 ): 2507 ~ 2514.
- [ 12 ] Neidle E L, Shapiro M K, Ormston L N. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. *J Bacteriol*, 1987, **169**( 12 ): 5496 ~ 5503.
- [ 13 ] Kitagawa W, Miyauchi K, Masai E, *et al.* Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J Bacteriol*, 2001, **183**( 22 ): 6598 ~ 6606.
- [ 14 ] Neidle E L, Hartnett C, Ormston L N, *et al.* Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* *benABC* genes from benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. *J Bacteriol*, 1991, **173**( 17 ): 5385 ~ 5395.
- [ 15 ] Wolfe M D, Altier D J, Stubna A, *et al.* Benzoate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida*: single turnover kinetics and regulation of a two-component rieske dioxygenase. *Biochemistry*, 2002, **41**( 30 ): 9611 ~ 9626.
- [ 16 ] Altenschmidt U, Oswald B, Steiner E, *et al.* New aerobic benzoate oxidation pathway via benzyl-coenzyme a and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme a in a denitrifying *Pseudomonas* sp.. *J Bacteriol*, 1993, **175**( 15 ): 4851 ~ 4858.

## Cloning and Expression of a 2-Naphthoate Monooxygenase Gene ( *nmo* ) in *Burkholderia* sp. JT1500

Fang Xiangping Qiu Xiaoying Cen Yinghua Sun Guoping\*

( *Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China* )

**Abstract** : A 4.8kb DNA fragment from one blue colony of the pLARF1 gene library of *Burkholderia* sp. JT1500 was subcloned to pUC18, designated as pEK123. The sequence of the inserted 4.8kb DNA of pEK123 was analyzed and submitted to EMBL nucleotide database, the accession # is AJ566333. The transformants of pEK123 could also become blue in LB agar and sequence analysis showed that three open reading frames and a putative promoter sequence were located in this inserted fragment. Then the 4.4kb insert fragment of pEK123 was double digested with *Xba* I / *Kpn* I and *Eco* R I / *Xba* I respectively to construct plasmids pXK3 and pEX12. The pXK3 contained only one 1158bp open reading frame (ORF) and pEX12 with other two ORFs. Unlike pEK123, the colonies of pEX12 did not show any blue color even incubated for 72h in LB agar, but the transformants of pXK3 did oxidize indole into indigo. The deduced 43kD protein of 1158bp ORF showed 64% homology of amino acid composition to *Ralstonia eutropha* HF39 hydroxylase( *bec* ). Results of substrate transformation analysis showed that the transformants of pEK123 was able to catalyze the oxidation of 2-naphthoate but not other key intermediates in 2-naphthoate metabolic pathway. These results confirmed that the product of 1158bp ORF is 2-naphthoate monooxygenase.

Though the oxygenase activity of pEK123 is much higher than that of pXK3, SDS-PAGE analysis found no difference between the amount of the band of monooxygenase produced by pXK3 or pEK123, but one more band was found produced by pEK123. According to the difference of substrate analysis between pXK3 and pEK123, it is supposed that the products of two open reading frames up stream of *nmo* gene had strong influence on the activity of the monooxygenase.

Benzoate was oxidized by free-cell extracts of the transformants of pEK123 in the transformation experiment with different aromatic substrates. As the DNA sequence and amino acid sequence of 2-naphthoate monooxygenase( *nmo* ) did no show any homology with the DNA sequence and amino acid sequence of benzoate oxygenases reported, the pathway of benzoate oxidation conducted by *nmo* is on the investigation.

**Key words** 2-naphthoate, Monooxygenase, Substrates

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation( 30270056 ) ; Natural Science Foundation of Guangdong Province ( E2001501 )

\* Corresponding author : Tel : 86-20-87782471 ; Fax : 86-20-87601587 ; E-mail : ebiotech@gis.sti.gd.cn

Received date : 11-25-2002