

2-萘酸加单氧酶基因及 NADH 黄素还原酶基因的克隆与分析

李小波^{1,2,3} 岑英华³ 孙国萍^{3*}

(¹中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430062)

(²中国科学院研究生院 北京 100049)

(³广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

摘 要 伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.)JT1500 对 2-萘酸(2-naphthoate)生物降解的关键步骤之一是通过 2-萘酸加单氧酶羟化 2-萘酸生成 1-羟基-2-萘酸(1-hydroxy-2-naphthoate)。在已确定 2-萘酸加单氧酶基因及其功能的基础上对含有该基因的一个 4.8kb 长度的基因簇进行了克隆测序。该序列上含有 4 个可能的阅读框 *orfB*、*orfC*、*orfD*、*orfA*。序列比对发现 *orfA* 序列与 *Japonicum* USDA 110 和 *Ralstonia eutropha* HF 39 中的加单氧酶基因同源性较高,*orfB* 序列与 *Bordetella pertussis* Tohama I、*Ralstonia solanacearum* GMI1000 和 *Bordetella bronchiseptica* RB50 等菌中的黄素还原酶基因有一定的同源性。酶活分析发现只含基因 *orfA* 的重组大肠杆菌 *S_A* 细胞提取液有很低的加氧活性,含基因 *orfB* 的重组子 *S_B* 细胞提取液没有加氧活性,但在反应体系中同时加入 *S_A* 和 *S_B* 的细胞提取液后,其加氧活性显著增强,包含片段 *orfB* + *orfA* 的重组子 *S_{B+A}* 在黄素(FMN、FAD)存在的条件下也表现出很强的加氧活性,在厌氧条件下,能检测出 *S_B* 细胞提取液黄素还原活性。基于以上信息,认为 2-萘酸加单氧酶基因簇含有两个重要的组分:黄素还原酶基因(*nmoB*)和加单氧酶基因(*nmoA*)。2-萘酸加单氧酶 Nmo 羟化 2-萘酸的过程为先由黄素还原酶(NmoB)在 NADH 存在的条件下将黄素(FMN、FAD)还原为还原型黄素(FMNH₂、FADH₂) ,然后加单氧酶(NmoA)利用还原型黄素和 O₂ 羟化底物 2-萘酸,生成 1-羟基-2-萘酸。NmoB 是 NmoA 的偶联蛋白。

关键词 2-萘酸 加单氧酶 黄素还原酶

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)04-0556-05

2-萘酸是双环芳烃萘、萘酚的降解中间产物,同时也是重要的环境污染物质^[1]。研究微生物对 2-萘酸的降解途径,确定其代谢过程中的酶系及其对应的基因组织,对环境的净化修复有积极的科学意义。Morawski 等^[1]通过氧吸收试验、酶活分析、中间代谢物检测等手段研究 *Burkholderia* sp. JT1500 的 2-萘酸代谢途径,只检测出加单氧的中间产物 1-羟基-2-萘酸,而检测不到加双氧中间产物,推测该菌降解 2-萘酸的关键一步为通过加单氧酶羟化 2-萘酸生成 1-羟基-2-萘酸。通过该菌株的转化作用,1mol 的 2-萘酸可被转化为 1mol 的丙酮酸、1mol 的琥珀酸、1mol 的乙酰 CoA 和 2mol 的 CO₂^[1]。方向平等^[2]对菌株 *Burkholderia* sp. JT1500 的一段 20kb 长度的片段进行了研究,基本确定编码 2-萘酸代谢关键一步的基因——2-萘酸加单氧酶基因(*nmo*)位于该片段上的一段约 4.8kb 长的 DNA 上。

本文对这一含有 2-萘酸加单氧酶基因的 4.8kb DNA 进行了深入的研究,发现该段 DNA 可合理地读

出 4 个阅读框 *orfB*、*orfC*、*orfD*、*orfA*, 3' 端为一个 1158bp 的正向阅读框 *orfA*, 其编码产物 NmoA 含 386 个氨基酸,具加单氧酶活性^[2],位于上游区的为一个 747bp 的反向阅读框 *orfB*, 编码产物 NmoB 具黄素还原酶活性,在 *orfB* 和 *orfA* 之间存在 2 个功能尚不清楚的阅读框 *orfC*、*orfD*。本文报道对这 4 个阅读框编码产物进行的功能分析。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养基

本研究用到的质粒 pUC18、pUC19 购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*) HB101 作为受体菌,在 LB^[3]液体培养基或 LB 琼脂平板上 37℃ 培养。氨苄青霉素(Amp)使用浓度为 100mg/L。

1.2 试剂

限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶等均购自 TaKaRa 公司,质粒纯化试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷

基金项目 国家自然科学基金项目(30370779);广东省基金项目(015017 032318)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-87684471 E-mail ebitech@gdas.ac.cn

作者简介 李小波(1979-)男,湖北孝感人,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。

收稿日期 2004-11-08,修回日期 2005-04-10

(IPTG) 二甲替甲酰胺(DMF)购自华美生物工程公司 2-萘酸购自 Aldrich, 其他试剂均为分析纯。

1.3 序列分析和基因克隆

含有 2-萘酸加单氧酶基因的 4.8kb DNA 片段已完成了测序并被欧洲 EMBL 基因库接受, 序列号为 AJ566333。序列分析采用软件 BioEdit 和 DNAMAN, 引物设计采用软件 Primer5.0。

质粒载体 pUC18 用 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切, 质粒 pEK123^[21] 也用 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切, 回收大片段与双酶切的 pUC18 重组, 转化大肠杆菌 HB101, 获重组子 pUCEK; 质粒 pEK123 用 *Sal* I 酶切, 回收 3.0kb 的片段, 该片段与同样经 *Sal* I 切割并去磷酸化的载体 pUC18 连接, 转化大肠杆菌 HB101, 获重组子 18Sal; 质粒 pEK123 用 *EcoR* I、*Xba* I 双酶切, 回收 2.6kb 的片段, 与同样经过 *EcoR* I、*Xba* I 双酶切并纯化的载体 pUC18 连接, 转化大肠杆菌 HB101 获重组子 pEX12^[21]。

设计引物 BF: 5'-GTGTAAGCTTATTTCGTCGGA GACCAGCGTG-3' 和 BR: 5'-GGGCCTGCAGCCAAGCG ATTCCGGCGCAAG-3' 扩增 *orfB*, 上游引物 5' 端引入 *Hind* III 位点和合适的保护碱基; 下游引物 5' 端引入 *Pst* I 位点和合适的保护碱基, PCR 反应体系: P1, P2 (均为 20 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板(90mmol/L) 1 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP (各 2.5mmol/L) 4 μ L, LA *Taq* (3U/L) 1 μ L, ddH₂O 37 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 60s, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 30 次循环, 72 $^{\circ}$ C 2min。扩增产物定向克隆到载体 pUC18 上并转化大肠杆菌 HB101 获得重组子 S_B, 其包含有一反向阅读, 747bp 的基因。设计引物 AF: 5'-AACTGCAGCCGGA CATCTGATGAAT-3' 和 AR: 5'-AAGGTACCCTTGTGCT CCGTAACAAG-3' 扩增 *orfA*, 上游引物 5' 端引入 *Pst* I 位点和合适的保护碱基; 下游引物 5' 端引入 *Kpn* I 位点和合适的保护碱基, PCR 体系与扩增 *orfB* 相同, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 60s, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 30 次循环, 72 $^{\circ}$ C 2min。扩增产物克隆到 pUC18 上并转化大肠杆菌 HB101 获得重组子 S_A, 其包含有一正向阅读, 1158bp 的基因。从重组子 S_B 提取质粒, 用 *Hind* III、*Pst* I 双酶切, 回收小片段, 定向插入到质粒 S_A 中, 转化大肠杆菌 HB101 获得重组子 S_{B+A}, 其包含有序列 *orfB* + *orfA*。

1.4 加氧活性测定

1.4.1 2-萘酸加单氧酶的活性测定: 细胞提取液的制备参照文献 [4] 进行, 靛蓝生成实验和 2-萘酸加单

氧酶活性的测定方法参照文献 [2]。

1.4.2 黄素还原酶的活性检测: 操作方法参照文献 [5] 进行。

1.4.3 底物 2-萘酸的转化: 重组大肠杆菌 S_{B+A} 对 2-萘酸的转化采用 HPLC 检测。含有 S_{B+A} 细胞提取液和 100 μ g 底物 2-萘酸的反应体系直接注入 C₁₈ 柱 (Hyperclone 5 μ ODS 250 \times 4.60mm), 用异丙醇-甲醇-1% 磷酸 (体积比 1:5:4) 平衡, 254nm 检测。

1.4.4 蛋白浓度的测定: 采用二喹啉甲酸 (BCA) 检测法^[21]。

2 结果

2.1 序列分析结果

2.1.1 序列分析: 软件分析以上 4.8kb DNA 发现, 其包含 4 个可能的阅读框 *orfB*、*orfC*、*orfD*、*orfA*, 其中 *orfB* 为反向阅读, 其余为正向阅读。

2.1.2 *orfB* 核苷酸序列比对: 利用 NCBI 上 BLAST^[3] 软件进行序列比对发现, *orfB* 核苷酸序列和基因库中的 3 个基因有一段完全相同的 53 个碱基序列, 其中基因 *nmoB* 编码 *Bordetella pertussis* Tohama I 菌株的一段加单氧酶组分 NmoB (Accession NC_002929.2); *moP* 编码 *Ralstonia solanacearum* GMI1000 菌株一段加单氧酶组分 MoP (Accession NC_003295.1); *moC* 编码 *Bordetella bronchiseptica* RB50 菌株一段预期加单氧酶组分 MoC。

4 段基因中 53 个碱基的相同序列为: ATGACGTGGTCACCTTCGTCGTAGCGGCTCGCGTTGTG GCATTCCAACCAGGC。利用软件 DNAMAN 对以上基因对应的氨基酸序列多重比对发现, *orfB* 预计编码产物与 NmoB 有 36.2% 的序列同源性, 与 MoP 有 42.6% 的序列同源性, 与 MoC 有 36.2% 的序列同源性。

2.1.3 *orfA* 核苷酸序列比对: *orfA* 核苷酸序列与菌株 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 中一段羟化酶基因 *bec* gene (Accession NC_004463.1) 的一段 380bp 序列有 89% 的同源性, 与菌株 *Ralstonia eutropha* HF39 中一加单氧酶基因 *bec* (Accession AF306552.1) 的一段 780bp 序列有 84% 的同源性 (该基因编码羟化吲哚生成靛蓝的加单氧酶^[6])。氨基酸序列多重比对发现: NmoA 与 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 中的羟化酶 BEC protein 有 59% 的序列同源性, 而与 *Ralstonia eutropha* HF39 的加单氧酶 BEC 有 64% 的同源性, 已被推断为加单氧酶组

分^[2]。序列 *orfC*、*orfD* 与 GenBank 中其他序列同源性较低。

2.2 相关重组子的克隆

基于已有的 4.8kb 序列 利用酶切、连接的方法构建重组子 pUCEK、18Sal、pEX12,设计引物分别扩增 *orfA*、*orfB*,引物上分别设计酶切位点和适当的保护碱基,定向克隆到载体上,转化大肠杆菌 HB101,获得重组子 S_A 、 S_B 及 S_{B+A} (图 1)。

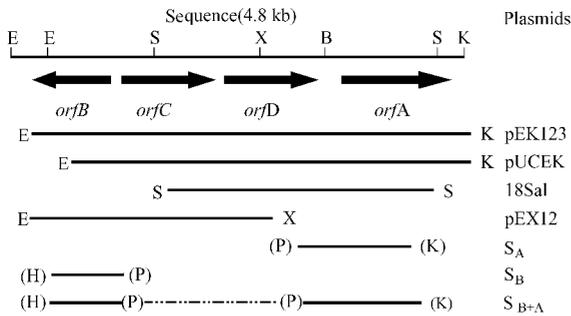


图 1 4.8kb 序列上基因分布

Fig.1 The distribution of genes in the sequence of 4.8kb

2.3 酶活性测定结果

由靛蓝实验^[2]的结果看,含有完全 4.8kb *Burkholderia* sp. JT1500 DNA 片段的重组菌 pEK123 具有较强的转化吲哚生成靛蓝能力,在反应 8h 后,就将 3.5 μ g 的底物吲哚完全转化(图 2)相同条件下包含序列 *orfB* + *orfA* 的重组子 S_{B+A} 也转化了约 3.5 μ g 的吲哚,仅破坏了 *orfB* 的重组子 pUCEK 的靛蓝生成能力却降低很多,只转化了 1.2 μ g 的吲哚,包含片段 *orfD* + *orfA* 的重组子 18Sal 和包含片段 *orfA* 的重组子 S_A 在 8h 内转化了 1.8 μ g 的吲哚,不含片段 *orfA* 的重组子 pEX12 和 S_B 则无任何转化吲哚的能力。

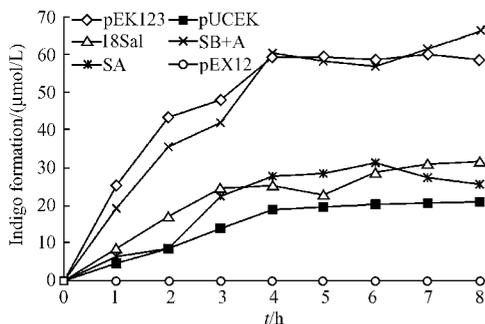


图 2 各重组大肠杆菌生成靛蓝的情况

Fig.2 Indigo production by recombinant *E. coli* HB101

利用 NADH 浓度变化可标定加氧酶活性^[7](图 3)。实验发现:阴性对照 pUC18 细胞提取液基本无加氧活性;只含 *orfA* 片段的重组菌株 S_A 细胞提取液

具有较低的加氧活性,在 30min 内转化了 14.8nmol 的 NADH,平均转化速率约为 0.5nmol/min,在加入 50 μ mol/L 黄素(FMN 或 FAD)后加氧活性基本不变;包含片段 *orfB* + *orfA* 的重组子 S_{B+A} 细胞提取液加氧活性较强,转化 NADH 速率为 0.62nmol/min,加入黄素 FMN 后其转化速率为 1.74nmol/min,加入黄素 FAD 后转化速率为 2.12nmol/min; S_B 和 S_A 的细胞提取液混合后转化 NADH 速率为 0.72nmol/min,在 FMN 存在条件下为 1.54nmol/min,在 FAD 存在条件下为 1.88nmol/min,也能很好地利用黄素提高加氧活性。用 NADPH 代替 NADH 后能检测到很低的加氧活性,其活性比 NADH 存在时降低了两个数量级以上。含总蛋白 4mg/mL 的 S_B 细胞提取液在厌氧条件下能检测到较弱的还原活性。

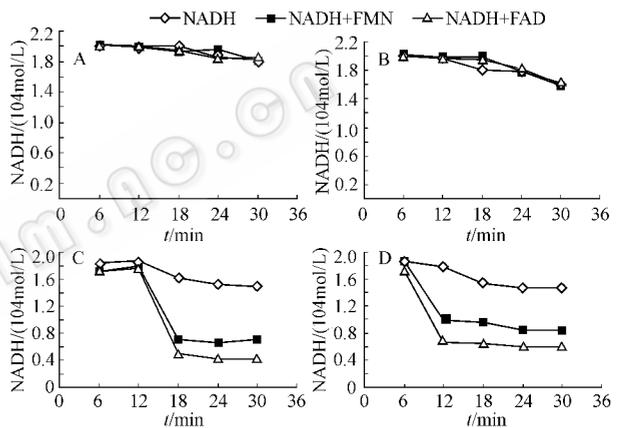


图 3 各重组大肠杆菌细胞提取液加氧活性情况

Fig.3 Oxidation activity of the cell extracts of recombinant *E. coli* HB101

A pUC18; B S_A ; C S_{B+A} ; D S_B + S_A .

利用 HPLC 检测重组大肠杆菌对 2-萘酸的转化,2-萘酸的保留时间为 9.719min,1-羟基-2-萘酸的保留时间为 19.251min(图 4)。反应 60min 后,含有 S_{B+A} 细胞提取液的反应体系转化了 27.5 μ g 2-萘酸,同时检测到 1-羟基-2-萘酸生成,而重组子 S_A 及 pUC18 均无转化 2-萘酸的功能。

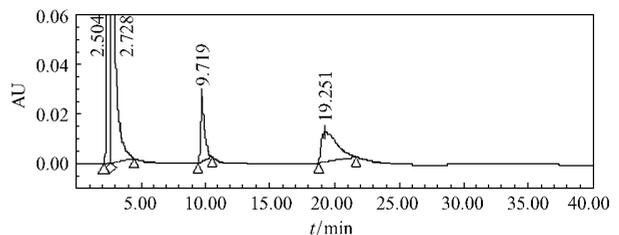


图 4 反应 60min 后 HPLC 检测 2-萘酸降解情况

Fig.4 HPLC elution profiles of 2-naphthoate degradation after 60minutes' reaction

3 讨论

对加氧酶基因相关特征的研究证实,在好氧条件下催化芳香族化合物降解的酶有的通过对底物加两原子的分子氧(加双氧酶),有的加单个原子的分子氧(加单氧酶)^[5,8]。由于加单氧酶需要 NAD(P)H 作为辅助因子(Cofactor),反应分两步(a)NAD(P)H 的加氧(b)底物的羟化。大多数的羟化芳环的加单氧酶都是黄素蛋白酶,将以上两步在同一多肽链上完成^[5]。近年来越来越多的多组分加单氧酶被报道,多组分的加单氧酶 NAD(P)H 的加氧和底物的羟化反应在分开的多肽链上催化,这些多肽链由电子传递链连接^[9]。双组分非亚铁血红素型黄素离散加单氧酶(TC-FDM)家族已有几个成员有文献报道^[5]。其还原酶组分利用 NAD(P)H 催化黄素的还原,然后还原型黄素扩散到加氧酶组分催化分子氧对底物的羟化。Beatriz 等^[5]研究大肠杆菌 W 降解 4-羟基苯乙酸时发现,将 4-羟基苯乙酸转化为 3,4-双羟基苯乙酸的 4-羟基苯乙酸 3-加单氧酶由两个组分组成, HpaB (58.7kD) 为加氧酶组分, HpaC (18.6kD) 推断为增强 HpaB 功能的偶联蛋白,并可阻止在底物缺乏时 NADH 的消耗。Gisi^[10]研究 *Burkholderia cepacia* AC1100 降解 2,4,5-三氯苯乙酸时发现,以前认为是由两个组分 TftC 和 TftD 组成的氯酚 4-加单氧酶在通过进一步研究后发现, TftC 和 TftD 是两种酶。其中 TftC 是一种 NADH:FAD 氧化还原酶, TftD 是一种利用还原型黄素 FADH₂ 的加单氧酶^[10]。

本文研究的基因为编码 2-萘酸好氧代谢关键步骤的 2-萘酸加单氧酶基因^[2,41]。序列比对发现, *orfB* 和 *nmoB*、*moP*、*moC* 等 4 段加单氧酶的核苷酸序列有一 53bp 的相同序列,推断为该类加单氧酶基因的保守序列。由靛蓝实验^[2,42]看出,包含有基因 *orfA* 的重组子 S_A、S_{B+A}、18Sa1、pUCEK、pEK123 等都有靛蓝生成活性,而不含基因 *orfA* 的重组子 S_B、pEX12 等都无靛蓝生成活性。自 1983 年 Ensley^[12]发现克隆的加氧酶基因的表达可使重组大肠杆菌积累靛蓝的现象以来,这种使吲哚羟化生成靛蓝已广泛被采用作克隆各种细菌加氧酶基因的直观指标^[2,42]。由实验结果可推断片段 *orfA* 是 2-萘酸加单氧酶基因最重要的部分。在相同条件下重组子 pUCEK 转化吲哚的能力只有 pEK123 的 1/3(图 2)。根据 Velasco 等^[13]的报道,用靛蓝的生成量可以表示加氧酶的酶活水平,由此推断 *orfB* 片段对加氧酶

活性有强烈的促进作用。

测定重组菌株细胞提取液的加氧酶活性发现(图 3),以 pUC18 细胞提取液为对照,含有 *orfA* 的重组子 S_A 细胞提取液只有很低的加氧活性,加入黄素 FMN 或 FAD 后加氧酶活性并无多大变化,相同条件下含有片段 *orfB* + *orfA* 的重组子 S_{B+A} 的细胞提取液加氧活性较强,并且能很好地利用黄素(FMN、FAD)大大提高加氧酶的酶活水平,重组子 S_B 和 S_A 的细胞提取液混合后也有较高的加氧酶活性,并且加入黄素(FMN、FAD)后加氧活性增强很多;只含 *orfB* 的重组菌株 S_B 细胞提取液无加氧酶活性,在厌氧条件下能检测到黄素还原活性^[5]。

据已有实验结果推断:本研究的 2-萘酸加单氧酶基因簇含有两个重要组分,上游为一黄素还原酶基因(*nmoB*),其编码产物黄素还原酶(NmoB)在 NADH 存在的条件下将黄素(FMN、FAD)还原为还原型黄素(FMNH₂、FADH₂);下游为一加单氧酶基因(*nmoA*),其编码产物加单氧酶(NmoA)利用还原型黄素和 O₂ 羟化底物 2-萘酸,生成 1-羟基-2-萘酸(图 5)。

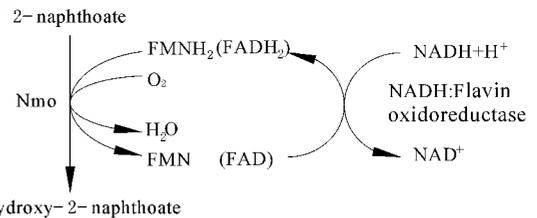


图 5 推断 2-萘酸加单氧酶羟化 2-萘酸作用机理

Fig.5 Deduced mechanism of 2-naphthoate monooxygenase hydroxylating 2-naphthoate

根据软件分析结果,在 *nmoB*、*nmoA* 之间有两段正向阅读框,跟 GenBank 中其他序列同源性较低,不含这些片段的重组子 S_{B+A} 氧化活性与 pEK123^[2] 几无差别,因此推测其编码产物对 2-萘酸降解过程中的其他步骤起催化作用,相关工作还在进一步深入。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 方向平,丘晓颖,岑英华,等.伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.) 2-萘酸加单氧酶基因(*nmo*)的克隆及表达. *微生物学报*, 2003, **43**:599-605.
- [3] Xu Y R, Michael W M, Tim S F, et al. Cloning, sequencing, and analysis of a gene cluster from *Chelatobacter heintzii* ATCC29600 encoding nitrotriacetate monooxygenase and NADH:Flavin

- mononucleotide oxoreductase. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 1112 – 1116.
- [4] Kohler H P, Kohler S D, Focht D D. Degradation of 2-hydroxybiphenyl and 2,2'-dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas* sp. strain HBP1. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(11):2683 – 2688.
- [5] Beatriz G, Eduardo D, María A P, et al. Functional analysis of the small component of the 4-Hydroxyphenylacetate 3-Monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 627 – 636.
- [6] Sascha D, Christian O B, Mohamed 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] Xun L Y, Erik R S. Characterization of 4-Hydroxyphenylacetate 3-Hydroxylase (HpaB) of *Escherichia coli* as a reduced flavin adeninedinucleotide-utilizing monooxygenase. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(2):481 – 486.
- [8] Harayama S, Kok M, Neidle E L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu Rev Microbiol*, 1992, **46**: 565 – 601.
- [9] Harayama S, Timmis K N. Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In *Metal Ions In Biological Systems*, 1992, **28**: 99 – 155.
- [10] Gisi M R, Xun L Y. Characterization of chlorophenol 4-monooxygenase(Tf1D) and NADH:Flavin adenine dinucleotide oxidoreductase(Tf1C) of *Burkholderia cepacia* AC1100. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 2786 – 2792.
- [11] 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.
- [12] Burt D, Ensley B J, Ratzkin T D, et al. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science*, 1983, **222**: 167 – 169.
- [13] Ana V, Sergio A, José L G, et al. Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J Bacteriol*, 1998, **180**(5):1063 – 1071.

Cloning and analysis of genes encoding 2-naphthoate monooxygenase and NADH flavin oxidoreductase

LI Xiao-bo^{1,2,3} CEN Ying-hua³ SUN Guo-ping^{3*}

(¹ Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

(² Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(³ Guangdong Institute of Microbiology Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China)

Abstract: In *Burkholderia* sp. JT1500, a key step of 2-naphthoate biodegradation pathway is carried out by 2-naphthoate monooxygenase(Nmo) in which 2-naphthoate is oxidized to 1-hydroxy-2-naphthoate. A gene cluster of 4.8kb from *Burkholderia* sp. JT1500 was cloned and sequenced, four open reading frames named *orfB*, *orfC*, *orfD* and *orfA* were identified in this region. Sequence alignment showed that *orfA* had a high homology of nucleotide acid composition to monooxygenase genes from both *Japonicum* USDA 110 and *Ralstonia eutropha* HF 39, *orfB* had some homology to the component of flavin reductase genes from *Bordetella pertussis* Tohama I, *Ralstonia solanacearum* GMI1000 and *Bordetella bronchiseptica* RB50. Enzyme activity analysis showed that the cell extracts of recombinant *E. coli* S_A (only harboring *orfA*) showed very low oxygenase oxidation activity as detected by NADH decreasing, while the cell extracts of recombinant S_B (only harboring *orfB*) did not show any oxidation activity at all. But when the cell extracts of S_B and S_A were mixed, which showed very strong oxidation activity when flavin (FMN or FAD) provided; the recombinant S_{B+A} cells harboring both *orfB* and *orfA* genes also showed strong oxidation activity when flavin provided; weak flavin deoxidization activity could be detected from the cell extracts of *E. coli* S_B under anaerobic conditions. Based on above message, a conclusion was drawn that Nmo is consisted of two components: a flavin oxidoreductase (NmoB) and a monooxygenase (NmoA). First NmoB uses NADH to reduce flavin and supplies reduced flavin to NmoA to catalyze O₂ oxidizing 2-NAT. NmoB is NmoA's coupling protein.

Key words: 2-naphthoate, Monooxygenase, Flavin oxidoreductase

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30370779); Natural Science Foundation of Guangdong Province (015017 032318)

* Corresponding author. Tel: 86-20-87684471; E-mail: ebiotech@gd.ac.cn

Received date: 11-08-2004