

红球菌 *Rhodococcus* sp. DS-3 *dszABC* 基因和 *dszD* 基因 在大肠杆菌中的共表达

李国强, 马挺, 李京浩, 李红, 刘如林*

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘 要: 二苯并噻吩 (DBT) 及其衍生物微生物脱硫的 4S 途径需要 4 个酶 (*DszA*, *DszB*, *DszC* and *DszD*) 参与催化。其中 DBT 单加氧酶 (*DszC* or DBT-MO) 和 DBT-砷单加氧酶 (*DszA* or DBTO₂-MO) 都是黄素依赖型氧化酶, 它们的催化反应需要菌体中还原型的黄素单核苷酸 (FMNH₂), FMNH₂ 由辅酶黄素还原酶 (*DszD*) 再生。因此, 共表达 *DszA*, *DszB*, *DszC* 和 *DszD* 可以提高整个脱硫途径的速率。构建了两个不相容性表达载体 pBADD 和 paN2 并在大肠杆菌中实现了 4 个脱硫酶基因的共表达。*DszA*, *DszB*, *DszC* 和 *DszD* 的可溶性蛋白表达量分别占菌体总蛋白质的 7.6%, 3.5%, 3.1% 和 18%。共表达时的脱硫活性是单独用 paN2 表达时的 5.4 倍, 并对工程菌休止细胞脱除模拟柴油中 DBT 的活性进行了研究。

关键词: 红球菌; 二苯并噻吩; 脱硫基因; 不相容质粒; 共表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0275-05

化石燃料中含硫化化合物的燃烧是环境污染的一个重要来源, 降低油品中的硫含量是世界各国急需解决的问题。生物脱硫 (Bio-Desulfurization, BDS) 作为传统加氢脱硫 (Hydro-Desulfurization, HDS) 工艺的补充, 近年来一直是脱硫工业的热点^[1,2]。1992 年, 美国能源部从土壤中分离得到的 *Rhodococcus rhodocrous* IGTS8 是最具代表性的脱硫菌株, 它能以 DBT 为唯一硫源生长, 依靠 4 步脱硫反应 (4S 途径) 将 DBT 中的硫脱除。其中 DBT 单加氧酶 *DszC* 和 DBTO₂ 单加氧酶 *DszA* 是黄素依赖型氧化酶^[3]。已证明 *Rhodococcus erythropolis* D-1 的无细胞抽提物需要 NADH 和 FMN 的加入才有脱硫活性, 其中 0 ~ 10 μmol/L 的 FMN 能增加脱硫活性, 超过 10 μmol/L 的 FMN 则降低活性, 推断 FMN 扮演催化角色。但是即使 NADH 和 FMN 存在的情况下, *DszC* 和 *DszA* 都没有发现有氧化酶活性, 后经证实在黄素氧化还原酶 (FRP) 的存在下, 氧化 NADH 同时还原 FMN 作为 *DszC* 和 *DszA* 参与的氧化反应的电子受体^[4,5]。Reichmuth 等^[6] 在大肠杆菌中高表达了 *Vibrio harveyi* 氧化还原酶, Galan 等^[7] 在假单胞菌中高表达了 HpaC 氧化还原酶, 尽管这两个黄素还原酶都是由外

源基因编码的, 但是两者都能提高工程菌的脱硫活性。因此, 证明黄素还原酶也是微生物脱硫的一个限速酶。2001 年, Matsubara 等^[5] 通过测定纯化的 *DszD* N 末端氨基酸序列, 设计引物从 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 中克隆、表达了 *dszD* 基因, 该基因编码一个大约 20kDa 的蛋白质。本文通过构建两个不相容的原核表达载体共表达了 *Rhodococcus* sp. DS-3 *dszABC* 和 *dszD* 基因, 提高了工程菌的脱硫活性。对它们的稳定性及表达情况进行了研究, 还对工程菌与红球菌的脱硫特性进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基和试剂: BSM 培养基见文献 [8], LB、M9 培养基见文献 [10], FMN、NADH 和黄素氧化还原酶 (FRP from *Vibrio harveyi*) 购自 Sigma 公司, DBT、DBT Sulfone 和 2-HBP 购自 Acros 公司, 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Klenow 酶、PCR 所用的高保真 *Taq* 酶、dNTPs、X-Gal 及 IPTG 均购自 TaKaRa 公司, 其余试剂均为进口或国产分析纯。

基金项目: 天津市自然科学基金资助 (05YMJFJC00700)

* 通讯作者。Tel: 86-22-23505967; E-mail: meor@nankai.edu.cn

作者简介: 李国强 (1978 -), 男, 河北邯郸人, 博士研究生, 主要从事资源微生物研究。E-mail: coolrain@mail.nankai.edu.cn

其他作者: 梁凤来

收稿日期: 2005-07-27; 接受日期: 2005-08-23; 修回日期: 2005-12-01

表 1 供试用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strains and Plasmids	Characteristics	Source
Strain		
<i>Rhodococcus</i> DS-3	Wild, <i>dsz</i> ⁺ , Cm ^r	[8]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B(r_Br_B) gal denK</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>hsdR17(r_Km_K) recA1 endA1(lac-proAB) gyrA96 thi-1 relA1 supE44</i> [F' <i>traD36 proAB lacI^qZ M15</i>]	TaKaRa
<i>E. coli</i> BL21-pBADD	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pBADD	This study
<i>E. coli</i> BL21-paD1	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with paD1	This study
<i>E. coli</i> BL21- paN2	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with paN2	This study
<i>E. coli</i> BL21-pBADD + paN2	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pBADD and paN2	This study
Plasmid		
pET28a	Expression vector, Kan ^r , <i>lac</i> promoter, pBR322 <i>ori</i>	Novagen
pBAD30	Expression vector, Amp ^r , arabinose promoter, p15A <i>ori</i>	[9]
pBADD	<i>dszD</i> from <i>Rhodococcus</i> DS-3 in pBAD30, Amp ^r	This study
paN2	<i>dszABC</i> from <i>Rhodococcus</i> DS-3 in pET28a, Kan ^r	This study
paD1	<i>dszD</i> from <i>Rhodococcus</i> DS-3 in pET28a, Kan ^r	This study
paA2	<i>dszA</i> from <i>Rhodococcus</i> DS-3 in pET28a, Kan ^r	This study
paB3	<i>dszB</i> from <i>Rhodococcus</i> DS-3 in pET28a, Kan ^r	This study
paC4	<i>dszC</i> from <i>Rhodococcus</i> DS-3 in pET28a, Kan ^r	This study

Cm^r, Amp^r and Kan^r indicate resistance to chloromycetin (34 μ g/mL), ampicillin (50 μ g/mL) and Kanacillin (34 μ g/mL) respectively.

1.2 红球菌基因组的提取及基因扩增

红球菌基因组 DNA 的提取参照文献 [11], 依据 GenBank 中已报道的 DBT 脱硫酶 *dszABC* 及 *dszD* 基因开放阅读框(序列登录号为 U08850 和 AY569038)序列的两端保守序列,设计以下引物:上游引物 pABC1: 5'-GACGCATACCATATG(*Nde* I) ACTCAACAAC-3';下游引物 pABC2: 5'-CTGAATTC(*Eco*R I)ACTTGCGCACTAC-3';上游引物 pD1: 5'-AAAAGATCT(*Xba* I)AGTAA GCGAGAGGA ACTCC-3';下游引物 pD2: 5'-AATGAATTC(*Eco*R I)AGCTTTTCACCTCTCCGA-3'。其中 *dszD* 基因的引物包括了它的核糖体结合位点(*rbs*)。PCR 反应条件: 96 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 58 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 60s(*dszD*)或 3min(*dszABC*), 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 终止。PCR 产物由大连 TaKaRa 公司测序。并提交 GenBank 进行 DNA 序列比对, 蛋白序列采用 DNAMAN4.0 和 ClustalX1.8 以及 NCBI 相关数据库软件进行分析。

1.3 细胞裂解及酶活性测定

不同体积的培养物 14000g 离心 2min 收集菌体, 将菌体重悬在 1/10 体积的裂解缓冲液中 [50mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 10% 蔗糖, 300mmol/L NaCl, 3mg/mL 溶菌酶], 室温 2h, 超声波破碎细胞, 16000g 离心 30min 弃沉淀, 上清 - 20 $^{\circ}$ C 备用。

在 3mL 5mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH7.5)中加入 10 μ mol/L *DszABC*, 50 μ mol/L DBT, 0.01 μ mol/L FRP, 50 μ mol/L FMN 和 30 μ mol/L NADH, 25 $^{\circ}$ C 不同时间取 100 μ L, 等体积正己烷抽提, 离心, 有机相取 5 μ L

进样, 由 HPLC 定量测定 DBT 含量。酶活定义(U)为每小时每毫克蛋白降解 DBT 的量(μ mol)。由于 NADH 被 FRP 氧化成 NAD, 所以 FRP 活性由每分钟 A_{340} 吸光度的减少量来计量。在 3mL 20mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.0)中加入 10 μ mol/L *DszD*, 500 μ mol/L FMN 和 200 μ mol/L NADH。吸光度值转化成 NADH 浓度的公式 $\epsilon = 6.22 \times 10^3 (\text{mol/L})^{-1} \text{cm}^{-1}$, 酶活定义(U)为每分钟每毫克蛋白氧化 NADH 的量(μ mol)。

1.4 *dszD* 基因表达

将重组质粒 pBADD 转化 *E. coli* BL21(DE3)宿主菌, 筛选转化子, 获得工程菌 *E. coli* BL21-pBADD。挑取单菌落接种至 M9 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。将此种子液以 2% 的接种量接种至 50mL 补加 0.2% 葡萄糖的 M9 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 约 1.0 左右, 5000g 无菌离心 10min, 用 M9 培养基洗涤菌体一次, 将沉淀转移至补加 0.2% 阿拉伯糖(因为此菌株不是阿拉伯糖缺陷型, 所以应把阿拉伯糖的浓度从 0.02% 提高到 0.2%)的 M9 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 继续培养, 定时取样做 SDS-PAGE 分析。

1.5 双质粒在大肠杆菌中的共表达

为了验证共表达蛋白的可溶性, 收集按蛋白最大表达量时的条件(即 0.2% arabinose, 0.2mmol/L IPTG, 16 $^{\circ}$ C 过夜)培养的菌体, 5000g 离心 10min, 菌体沉淀用生理盐水洗涤 2 次, 重悬在 100mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH7.5)中, 超声波破壁后 15000g 离心 30min 去除菌体碎片和包涵体蛋白, 取少量上清加入等体积 2 \times SDS 加样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 加热 5min 后立即点样, SDS-PAGE 分析。

1.6 Western blot 分析

脱硫酶纯化后送晶美生物工程有限公司免疫家兔,制备 DszA、DszB 和 DszC 的多克隆抗体。Western blot 分析参考文献 [12]。

1.7 DBT 脱硫实验及脱硫产物的测定

1.7.1 生长细胞^[8]分析 DBT 和 2-HBP 存在下的细胞培养物,生长细胞取培养液 450 μ L,加 50 μ L 80% 磷酸终止反应,等体积正己烷充分抽提,离心,上清进行 HPLC 检测(休止细胞直接取上层有机相 5 μ L 进样)。

1.7.2 休止细胞 5000g 离心 10min 收集菌体,重悬于 25mL 磷酸盐缓冲液中(pH7.4,含 20 μ mol/L FMN 和 30 μ mol/L NADH),加入 75mL 正十六烷(含 0.6wt% DBT),30 $^{\circ}$ C 200r/min 振荡培养,不同时间取有机相 1.5mL 进行 HPLC 检测 DBT 和产物。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

pBAD30 和 pET28a(+) 是两个含有不同的复制区的原核表达载体,前者含有 P15A 复制子和氨苄青霉素抗性基因,后者含有 ColE1 复制子和卡那霉素抗性基因。FRP 基因 *dszD* 的 PCR 产物经回收纯化、*Xba*I 和 *Eco*R I 双酶切,再回收纯化后与经相同酶切的 pBAD30 相连,构建表达质粒 pBADD,其中 *dszD* 基因受阿拉伯糖操纵子调控;FRP 基因 *dszD* 和 DBT 脱硫酶基因 *dszA*、*dszB*、*dszC*、*dszABC* 的 PCR 产物经回收纯化、*Nde*I 和 *Eco*R I 双酶切,再回收纯化后与经相同酶切的 pET28a(+) 相连,构建表达载体 paD1、paA2、paB3、paC4 和 paN2,载体上的外源基因都受 T7 启动子调控。

2.2 *dszD* 基因表达条件的确定

不同情况下 *E. coli* BL21-pBADD 表达的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示(图略)。经阿拉伯糖诱导的菌体在 5min 就能诱导出目的带,且大小和用 IPTG 诱导 *E. coli* BL21-paD1 所表达的 DszD 一致。经 Pharmacia master Imager 扫描分析得知在 20min 表达的目的带就占整个蛋白总量的 21.4%,随着诱导时间的延长,表达的目的蛋白就会越多。此外由图 2 得知,*E. coli* BL21-pBADD 过量表达的 DszD 也是高度可溶性的。实验表明,大量表达 DszD 酶的大肠杆菌无细胞抽提物酶活性 25 倍于野生型红球菌的酶活,最大活性可达 9.58 μ mol/min/mg。

2.3 重组质粒共转化大肠杆菌 BL21(DE3)

质粒的不相容性使两种复制区不同的质粒能在

一起共存、表达,同时由于它们有不同的启动子和抗性标记,便于筛选和分别控制表达。等量 paN2 和 pBADD 共转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,在同时含有 100mg/L 氨苄青霉素和 34mg/L 卡那霉素的双抗性 LB 平板上筛选单菌落,获得工程菌 *E. coli* BL21-pBADD + paN2。37 $^{\circ}$ C 过夜培养后,抽提质粒,进行 PCR 分析,结果均为阳性,这表明在持续双抗选择压力存在下,质粒 paN2 和 pBADD 确实能在宿主菌中共存。将含有 paN2 和 pBADD 表达质粒的共转化子在氨苄青霉素-卡那霉素双抗 LB 培养基中,以不含任何抗生素的 LB 培养基为对照。隔时取样,分别涂布含双抗性和不含抗性的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,数各平板上的菌落数,计算双抗性板上菌落数与无抗性板上菌落数之比(即总活菌中同时含有两种质粒的工程菌的比例),结果表明共转化子在无抗性培养基中连续培养 16h,仅 10% 的后代菌体还能同时耐受两种抗性,说明此时大部分菌体中质粒之一已经丢失;在双抗性培养基中连续培养 16h,仍有 85% 以上的后代菌能同时含有两种质粒。同样传代培养 4 代后仍有 85% 以上的后代菌能同时抗两种抗生素。

2.4 双质粒在大肠杆菌中的共表达

由共表达蛋白的 SDS-PAGE 图谱(图 1)可以看出,在 48kDa、45kDa、38kDa 和 23kDa 处有新增蛋白质带,经 Western blot(图 2)验证,表明 48kDa、45kDa、38kDa 处的新增蛋白带分别为脱硫酶 DszA、DszC 和 DszB,说明实现了 DszABC 和 DszD 的共表达。经 Pharmacia master Imager 扫描分析得知,可溶性的 DszD

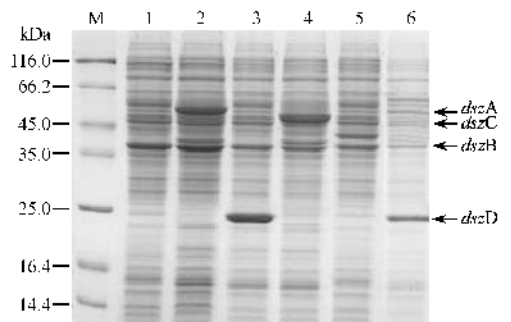


图 1 共表达可溶性产物的 SDS-PAGE 图

Fig. 1 SDS-PAGE of *E. coli* BL21-pBADD + paN2 induced by arabinose and IPTG. M. Protein molecular weight marker; 1. *E. coli* BL21 (DE3); 2. *E. coli* BL21-paA2 induced by 0.2mmol/L IPTG; 3. *E. coli* BL21-pBADD induced by 0.2% arabinose; 4. *E. coli* BL21-paC4 induced by 0.2mmol/L IPTG; 5. *E. coli* BL21-paB3 induced by 0.2mmol/L IPTG; 6. *E. coli* BL21-pBADD + paN2 induced by 0.2% arabinose and 0.2mmol/L IPTG at 16 $^{\circ}$ C.

占总蛋白总量的 18% ,比单独表达时(21.4%)偏小 ,而 DszA、DszB 和 DszC 的可溶性蛋白分别占表达总量的 7.6%、3.5% 和 3.1% ,大量的 DszA、DszB 和 DszC 以包涵体的形式存在 ,这可能是由于启动子过强所致。经测定全蛋白浓度为 4.98mg/mL。

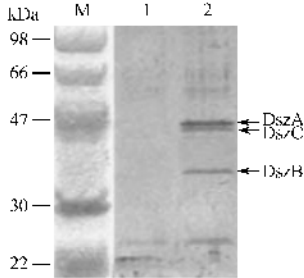


图 2 共表达可溶性产物的 Western blot

Fig.2 Western blot of *E. coli* BL21-pBADD + paN2 induced by arabinose and IPTG. M. Protein molecular weight marker; 1. *E. coli* BL21 (DE3) induced by 0.2% arabinose and 0.2mmol/L IPTG at 16°C; 2. *E. coli* BL21-pBADD + paN2 induced by 0.2% arabinose and 0.2mmol/L IPTG at 16°C.

2.5 蛋白的酶活性分析

按照“实验方法”中的酶活性测定方法取 100 μ L 无细胞抽提液测定酶活性,反应时间为 1h ,IPTG 的诱导浓度为 0.2mmol/L ,阿拉伯糖的诱导浓度为 20mg/L。对不同培养条件下共表达质粒菌株的酶活性进行了测定(表 2)。结果表明:共表达 dszD 和 dszABC 时,反应体系的脱硫活性比单独表达 dszABC 时提高了 4.4 倍,说明 *E. coli* 细胞内所提供的 FMNH₂ 很有限。从表 2 可知,虽然 pBADD 和 paN2 有一定水平的本底表达,但是其表达量很低。只用 IPTG 诱导或只用阿拉伯糖诱导的菌体所产生的酶的活性(5.681U 或 6.219U)与同时用 IPTG 和阿拉伯糖诱导的菌体所产生的酶的活性(12.03U)相差

表 2 DszABC 和 DszD 共表达菌株的酶活性分析

Table 2 Activity analysis of DszABC and DszD

Strain (plasmid)	Protein (mg/mL)	The production of 2-HBP/ μ mol	DszABC activity/U
<i>E. coli</i> BL21 (DE3, paN2, pBADD), induced by 0.2% ara and 0.2mmol/L IPTG	2.38	96.1	12.03
<i>E. coli</i> BL21 (DE3, paN2, pBADD), induced only by 0.2mmol/L IPTG	2.29	78.06	5.681
<i>E. coli</i> BL21 (DE3, paN2, pBADD), induced only by 0.2% ara	3.46	129.21	6.219
<i>E. coli</i> BL21 (DE3, paN2, pBADD), not induced	4.84	134.76	4.64
<i>E. coli</i> BL21 (DE3, paN2), induced by 0.2% ara and 0.2mmol/L IPTG	2.56	34.01	2.214
<i>E. coli</i> BL21 (DE3), induced by 0.2% ara and 0.2mmol/L IPTG	3.511	0	0

一倍。同时,由于 T7 启动子太强,IPTG 在 37°C 诱导时有大量的蛋白以包涵体的形式产生,其实不利于菌体的生长和酶活性的发挥。所以,在下面菌体脱硫的试验中,首先在低温条件诱导导出可溶性酶,再采用休止细胞脱硫的方法去除 DBT 中的有机硫。

2.6 重组菌体的脱硫活性

由于 *E. coli* 不以 DBT 为唯一硫源进行生长繁殖,其携带脱硫基因的质粒也不受硫酸根等产物的抑制,因此可以先将菌体按上述探索的最佳产酶条件培养产生大量可溶的脱硫酶,然后采用休止细胞(Resting Cells)法去除 DBT 中的有机硫。此时,高浓度的菌体相当于脱硫酶的载体。*E. coli* BL21-pBADD + paN2 命名为 *E. coli* M25。将 0.5mmol/L 的 DBT 溶解在正十六烷中制成模拟柴油,以产物 2-HBP 的生成量为标准比较了 *E. coli* BL21-paN2、*E. coli* M25 与红球菌 DS-3 对模拟柴油的脱硫能力。从图 3 可以看出,采用休止细胞法脱硫时,红球菌 DS-3 脱硫速率最大,12h 即可生成 0.45mmol/L 的 2-HBP,推算脱硫率接近 100%;*E. coli* M25 脱硫速率较小,需要 24h 脱硫率才能接近 100%;但是,*E. coli* BL21-paN2 脱硫速率最小,且反应 24h 只能去除约 20% 的硫。

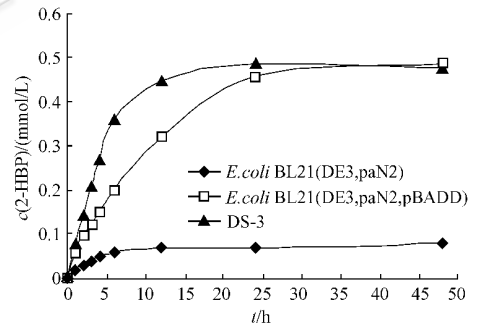


图 3 *E. coli* M25 和 DS-3 休止细胞脱模拟柴油的效果比较

Fig.3 Comparing of simulated diesel oil desulfurization of *E. coli* M25 and DS-3 resting cells.

3 讨论

随着对菌体脱硫代谢原理研究的深入和基因工程菌的开发,结合最佳脱硫工艺来进行脱硫实验有可能成为将来生物脱硫领域的热点。本文发现共表达菌株 *E. coli* M25 比单独表达菌株 *E. coli* BL21-paN2 的脱硫活力提高了 4.4 倍。说明脱硫酶的活性依赖于 FMNH₂ 作为辅酶进行电子传递,而 *E. coli* 中这种辅酶不足。因此,不仅脱硫酶的表达量是决定工程菌脱硫速率的关键,细胞中 FMNH₂ 的量也是影响脱硫活力的重要因素。

红球菌 DS-3 产生的脱硫酶是胞内酶,且该酶的量远远不及经过诱导的工程菌 *E. coli* M25,然而 *E. coli* M25 的脱硫速率远没有红球菌 DS-3 那么快。

定有一种机制制约着重组菌 *E. coli* M25 的脱硫反应。结合以往的实验发现,红球菌 DS-3 细胞有强烈的疏水特性,菌体大部分集中在油相中,模拟柴油的乳化效果较好,而 *E. coli* M25 细胞呈亲水性,大部分集中在水相脱硫,只是借助振荡作用偶尔接触有机相中的 DBT。此外,与红球菌相比革兰氏阴性菌(如 *E. coli*)的细胞壁薄,且没有肽聚糖层,也没有利于接触有机相的枝菌酸和吸收大分子有机物的细胞通道^[13]。这说明影响脱硫率的因素除了脱硫酶和 FMNH₂ 的量,还与菌体细胞对 DBT 的转运机制有关。因此,DBT 向细胞的转运机制也是限制脱硫效果的重要因素。

综上所述,要想提高工程菌的脱硫活性,除了提高脱硫基因在异源宿主中的可溶性表达量外,还有必要选择带有以下特征的宿主菌:① 生长速度快;② 表面疏水、能吸收利用大分子有机物;③ 能产生表面活性物质以有利于菌体细胞接触有机相;④ 遗传背景清楚,有一系列成熟的表达载体系统;⑤ 宿主菌具有黄素还原蛋白活性或有条件进行黄素还原蛋白基因的共表达。

参 考 文 献

- [1] Monticello DJ. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11**: 540 - 546.
 [2] McFarland BL. Biodesulfurization. *Curr Opin Microbiol*, 1999, **2**: 257 - 264.
 [3] Kilbance JJ, Jackowski K. Biodesulfurization of water-soluble coal-

derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **40**: 1107 - 1114.

- [4] Gray KA, Pogrebinsky OS, Mrachko GT, et al. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 1705 - 1709.
 [5] Matsubara T, Ohshiro T, Nishina Y, et al. Purification, characterization, and overexpression of flavin reductase involved in dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 1179 - 1184.
 [6] Reichmuth DS, Hittle JL, Blanch HW, et al. Biodesulfurization of dibenzothiophene in *Escherichia coli* is enhanced by expression of a *Vibrio harveyi* oxidoreductase gene. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **67**: 72 - 79.
 [7] Galan B, Diaz E, Garcia JL. Enhancing desulphurization by engineering a flavin-reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ Microbiol*, 2000, **2**: 687 - 694.
 [8] 马挺,刘健,佟明友,等.红球菌 DS-3 脱除二苯并噻吩中有机硫的性能初探. *微生物学报* 2002, **42**(5): 126 - 131.
 [9] Guzman LM, Belin D, Carson MJ, et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 4121 - 4130.
 [10] Sambrook J, Lasael DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂,等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
 [11] Denome SA, Olson ES, Young KD. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. IGTS8. *Appl Environ Microb*, 1993, **59**: 2837 - 2843.
 [12] Tanaka Y, Yoshikawa O, Maruhashi K, et al. The cbsmutant strain of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 expresses high levels of Dsz enzymes in the presence of sulfate. *Arch Microbiol*, 2002, **178**: 351 - 357.
 [13] Abhijeet PB, Eric NK, Matthew JG, et al. Comparison of the emulsion characteristics of *Rhodococcus erythropolis* and *Escherichia coli* SOXC-5 cells expressing biodesulfurization genes. *Biotechnol Prog*, 2002, **18**: 88 - 93.

Co-expression of *Rhodococcus* sp. DS-3 *dszABC* and *dszD* gene with incompatible plasmids in *Escherichia coli*

LI Guo-qiang, MA Ting, LI Jing-hao, LI Hong, LIU Ru-lin*

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Biological desulfurization of petroleum feedstocks and products may offer an attractive alternative to reduce sulfur oxide emissions that cause serious environmental pollution. Dibenzothiophene (DBT), a model of organic sulfur compound in petroleum, can be microbially desulfurized without degradation of the organic structure by 4S pathway. Three desulfurization enzymes (DszA, DszB and DszC) and flavin reductase (DszD) are involved in sulfur-specific DBT desulfurization. DszA and DszC are FMNH₂-dependent monooxygenases, FMNH₂ is provided from the freely diffusible FMNH₂ pool in the cell, and is replenished by DszD. So, co-expression of the desulfurization enzymes and flavin reductase can enhance the rate of sulfur removal. In the present work two incompatible plasmids: pBADD and paN2 were constructed. The paN2 allows *Escherichia coli* to liberate the sulfur of DBT and DBTs and pBADD produces a flavin reductase. They were co-expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The soluble products of DszA, DszB, DszC and DszD accounted for 7.6%, 3.5%, 3.1% and 18% of the total proteins in co-expressed system. The desulfurization rate of lysate of *E. coli* BL21-pBADD + paN2 is 12.03 μmol/(h·mg) Dsz protein and about 5.4-fold of that of *E. coli* BL21-paN2. Experiment were also conducted using resting cell with the 0.6wt% DBT in n-hexadecane as model diesel oil. After 24 hours reaction, 0.42mmol/L (about 84%) DBT was converted to 2-HBP by *E. coli* BL21-pBADD + paN2, however, there was only 0.08mmol/L (about 16%) DBT was desulfurized by *E. coli* BL21-paN2. The maximum desulfurization rate of *E. coli* BL21-pBADD + paN2 is about 67 μmol/h. The result shows that DszD enhances the rate of 2-HBP production when co-expressed in vivo with the desulfurization enzymes.

Keywords: *Rhodococcus* sp.; Dibenzothiophene; Desulfurization gene; Incompatible plasmids; Co-expression

Foundation item: Tianjin Nature Science Fund (05YMJFJC00700)

* Corresponding author. Tel: 86-22-23505967; E-mail: meor@nankai.edu.cn

Other author: LIANG Feng-lai

Received 27 July 2005/Accepted 23 August 2005/Revised 1 December 2005