

四溴双酚 A 胁迫响应分子元件的功能

白雪^{1,2}, 许玫英², 姚晖², 郑晓丹², 汪伦记^{1*}, 陈杏娟^{2*}

1 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳

2 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州

白雪, 许玫英, 姚晖, 郑晓丹, 汪伦记, 陈杏娟. 四溴双酚 A 胁迫响应分子元件的功能[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3150-3164.
BAI Xue, XU Meiyang, YAO Hui, ZHENG Xiaodan, WANG Lunji, CHEN Xingjuan. Functional characteristics of the gene cluster in response to tetrabromobisphenol A stress[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 3150-3164.

摘要:【目的】为了解析四溴双酚 A (tetrabromobisphenol A, TBBPA)胁迫响应显著上调的 *chr1_2605-chr1_2604* 基因簇的分子功能及应用潜力, 分别研究了 *chr1_2605* 及 *chr1_2604* 分子元件在 TBBPA 特异性识别及降解中的作用。【方法】利用合成生物学方法构建传感细胞食异源物鞘氨醇菌(*Sphingobium xenophagum*) C1 (pBBR-2605-HiBiT)和降解细胞大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3, pET30b-2604)。通过荧光素酶活性检测方法分析底盘细胞中 *chr1_2605* 元件对不同污染物的响应特征, 并采用高效液相色谱法测定降解细胞中 *chr1_2604* 元件对 TBBPA 的降解效率。【结果】异生物质响应转录因子 Chr1_2605 仅对 TBBPA 表现出高度特异性的响应功能, 基于其构建的传感细胞 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT)对 TBBPA 具有良好的线性响应范围与灵敏度, 最低检测限为 0.010–0.050 $\mu\text{mol/L}$; α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 Chr1_2604 对 TBBPA 具有高效的降解功能, 基于其构建的降解细胞 *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604)在 3 d 内对 2.0 mg/L TBBPA 的降解率可达 44.415% [0.296 mg/(L·d)], 显著高于目前报道的大部分天然菌株在非共代谢条件下对 TBBPA 的降解率。【结论】本研究发现并证实了 *chr1_2605-chr1_2604* 分子元件可以特异性识别并高效降解 TBBPA, 其中异生物质响应转录因子 Chr1_2605 能够精准识别 TBBPA, α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 Chr1_2604 可以高效降解 TBBPA。

关键词: 四溴双酚 A; 异生物质响应转录因子; α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶; 特异性识别; 高效降解

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0910300); 广东省海洋经济发展(海洋六大产业)专项(粤自然资合[2024]38号); 广东省科学院发展专项资金(2022GDASZH-2022010101); 广东特支计划杰出人才项目(2023JC07L096)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0910300), the Special Project for Marine Economic Development of Guangdong Province (Six Major Marine Industries) (GDNRC[2024]38), the GDAS' Project for Science and Technology Development (2022GDASZH-2022010101), and the Guangdong Special Support Plan for Outstanding Talents Project (2023JC07L096).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Xingjuan, chenxj@gdim.cn; WANG Lunji, wanglunji7215@163.com

Received: 2025-01-13; Accepted: 2025-01-24; Published online: 2025-03-28

Functional characteristics of the gene cluster in response to tetrabromobisphenol A stress

BAI Xue^{1,2}, XU Meiyang², YAO Hui², ZHENG Xiaodan², WANG Lunji^{1*}, CHEN Xingjuan^{2*}

1 College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China

2 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To understand the molecular functions and potential applications of the significantly up-regulated gene cluster *chr1_2605-chr1_2604* in response to tetrabromobisphenol A (TBBPA) stress, we investigated the roles of *chr1_2605* and *chr1_2604* in the specific recognition and efficient degradation of TBBPA. [Methods] Synthetic biology methods were employed to construct *Sphingobium xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) and *Escherichia coli* BL21(DE3, pET30b-2604) as chassis cells for biosensing and degrading, respectively. The response characteristics of Chr1_2605 in the chassis cells to different pollutants were analyzed by the luciferase activity assay. Additionally, the degradation activity of TBBPA by Chr1_2604 in the chassis cells was determined by high-performance liquid chromatography. [Results] The xenobiotic-responsive element Chr1_2605 exhibited a highly specific response to TBBPA. The Chr1_2605-based chassis cell of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) demonstrated high responsivity and sensitivity to TBBPA, with a limit of detection ranging from 0.010 to 0.050 $\mu\text{mol/L}$. The 2-oxoglutarate/Fe-dependent dioxygenase Chr1_2604 in the chassis cell of *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604) displayed the degradation rate of 44.415% for 2.0 mg/L TBBPA within 3 d [0.296 mg/(L·d)], which was significantly higher than those of most reported microbial strains under non-co-metabolic conditions. [Conclusion] The *chr1_2605-chr1_2604* gene cluster can accurately recognize and degrade TBBPA. Specifically, the xenobiotic-responsive element Chr1_2605 specifically recognizes TBBPA, whereas the 2-oxoglutarate/Fe-dependent dioxygenase Chr1_2604 efficiently degrades TBBPA.

Keywords: tetrabromobisphenol A; xenobiotic-responsive element; 2-oxoglutarate/Fe-dependent dioxygenase; specific recognition; efficient degradation

四溴双酚 A (tetrabromobisphenol A, TBBPA) 是一种重要的溴代阻燃剂, 广泛应用于电子产品、塑料、泡沫材料以及纺织品中, 以提高材料的防火性能^[1]。随着全球范围内对多溴二苯醚类阻燃剂禁用政策的实施, TBBPA 的产量与使用率逐年上升^[2]。由于 TBBPA 结构稳定, 难以被生物降解, 且极难溶于水, 属于疏水亲脂性

物质, 因此能够在环境中长期积累, 并通过食物链在生物体内不断富集, 对生态系统和人类健康构成潜在威胁。目前, TBBPA 已被发现广泛分布于多种环境介质中^[3-4], 并在生物体内乃至母乳中积累^[5-6]。大量研究表明, TBBPA 对生物体具有广泛的毒性效应, 包括肝毒性、生殖毒性、神经毒性、细胞毒性以及内分泌干扰毒

性等^[7-10]。然而, 由于缺乏有效的管控措施, TBBPA 在环境中的积累问题日益严重, 正逐步成为威胁生态安全和人类健康的重要隐患之一。

生物法因其安全、经济且无二次污染等优势, 在环境污染治理中占据重要地位。微生物作为生态系统中的分解者, 在驱动 TBBPA 污染降解方面发挥重要作用。目前已有研究表明, 微生物能够在好氧和厌氧条件下降解 TBBPA, 常见的降解菌包括假单胞菌^[11-13]、乳白耙齿菌^[14]、节杆菌属^[15]、苍白杆菌^[16]、土壤杆菌^[17]、希瓦氏菌^[18]等。然而, 多数菌株对 TBBPA 的降解效率仍然较低。例如, 假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) JDT 菌株在好氧共代谢条件下 40 d 内对 10.0 mg/L 的 TBBPA 降解率仅为 51.9% [0.129 mg/(L·d)]^[13], 希瓦氏菌属(*Shewanella* sp.) XB 菌株在厌氧条件下 7 d 内对 1.0 mg/L 的 TBBPA 降解率为 85% [0.121 mg/(L·d)]^[18]。微生物降解效率低的原因, 一方面是由于其体内缺少高效的 TBBPA 降解酶元件, 且 TBBPA 对细胞的毒性较高, 导致微生物的降解性和抗逆性减弱; 另一方面是由于微生物缺少 TBBPA 降解的完整代谢途径, 往往需要共代谢过程才能实现 TBBPA 的高效降解。现有研究报道与 TBBPA 降解相关的酶类主要有锰过氧化物酶^[14]、细胞色素 P450 单加氧酶^[19]、O-甲基转移酶^[20]等, 但这类分子元件仍然极其匮乏, 相关的响应和调控机制更鲜有报道。

本课题组在前期研究中发现, TBBPA 污染胁迫诱导了食异源物鞘氨醇菌(*Sphingobium xenophagum*) C1 的 *chr1_2605-chr1_2604* 基因簇显著上调表达。其中 *chr1_2604* 基因(NCBI 登录号为 ASY45240.1)编码 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶, 可能对 TBBPA 具有降解作用; *chr1_2605* 基因(NCBI 登录号为 ASY45241.1)编码异生物质响应转录因子, 可能直接响应 TBBPA 并调控 *Chr1_2604* 蛋白的表达^[21]。为了解析 *chr1_2605-chr1_2604* 基因簇的分子功能及应用潜力, 本研究通过构建基于异生物质响应转录因子 *Chr1_2605* 和萤光素酶小标签的传感细胞 *S.*

xenophagum C1 (pBBR-2605-HiBiT), 研究异生物质响应转录因子对 TBBPA 的特异性响应功能; 同时通过在大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3, pET30b-2604)中诱导表达 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 *Chr1_2604*, 研究其对 TBBPA 的降解功能, 旨在阐明 *chr1_2605-chr1_2604* 基因簇在 TBBPA 响应和降解中的核心功能, 为深入理解微生物对 TBBPA 的降解代谢过程提供重要参考, 同时也为基于 TBBPA 响应元件的污染治理绿色高效生物技术研发和应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

TBBPA (纯度 $\geq 98.0\%$)、双酚 A (bisphenol A, BPA)(纯度 $\geq 99.0\%$)均购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 十溴联苯醚(decabromodiphenyl ether, BDE-209) (纯度 $\geq 96.3\%$)、溴萘(bromonaphthalene, BrN)(纯度 $\geq 97.0\%$)、30% 过氧化氢溶液(hydrogen peroxide solution, H_2O_2)、全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)(纯度 $\geq 98.0\%$)、全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonic acid, PFOS)(纯度 $\geq 71.7\%$)均购自广州文度科学仪器有限公司; 全氟己基磺酸(perfluorohexane sulfonic acid, PFHxS)(纯度 $\geq 82.1\%$)、五氯苯酚(pentachlorophenol, PCP)(纯度 $\geq 98.0\%$)、十氯联苯(decachlorobiphenyl, PCB-209)(纯度 $\geq 96.0\%$)、六氯-1,3-丁二烯(hexachlorobutadiene, HCBd)(纯度 $\geq 97.6\%$)、三氯杀螨醇(dicofol)(纯度 $\geq 87.1\%$)、丙基苯酚(n-propylphenol, n-PMP)(纯度 $\geq 98.0\%$)、异丙基苯酚(isopropylphenol, i-PMP)(纯度 $\geq 98.5\%$)均购自上海安谱实验科技股份有限公司。

Nano-Glo[®] HiBiT 裂解检测试剂盒购自广州致邦生物科技有限公司; 蛋白 marker、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、卡那霉素(kanamycin, Kan)、庆大霉素(gentamicin, GM)、异丙基- β -D-硫代半

乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG, 纯度 $\geq 99.0\%$)、三羟甲基氨基甲烷[tris (hydroxymethyl)aminomethane, Tris, 纯度 $\geq 99.0\%$]、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT, 纯度 $\geq 99.0\%$)、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS, 纯度 $\geq 99.5\%$)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 菌株和培养条件

S. xenophagum C1 (pBBR-2605-HiBiT): 通过基因合成方法在 *chr1_2605* 基因 3' 端加入萤火虫萤光素酶小亚基编码序列(5'-GTGAGCGGCTGGCGGCTGTTCAAGAAGATTAGC-3'), 合成包括 *chr1_2605* 基因上游启动子序列(5'-TTC CCGCGATTGCGATTTTTCGCAAATGTAAATT-3')在内的融合基因片段, 并在融合基因片段两端分别设计 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。提取广宿主载体 pBBR1MCS-5 的 DNA, 使用 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶在 37 °C 条件下处理融合基因片段以及 pBBR1MCS-5 质粒 DNA 并纯化回收。利用重组酶进行融合基因片段与线性化载体的连接, 并热击转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。挑取阳性克隆子提取重组质粒 pBBR-2605-HiBiT 并电击转化至 *S. xenophagum* C1 感受态细胞中; *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604): 对 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶基因 *chr1_2604* 进行匹配 *E. coli* 密码子使用频率的优化, 通过基因合成方法对密码子优化的 *chr1_2604* 基因进行合成, 并在优化基因片段两端分别设计 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。提取 *E. coli* 表达载体 pET30b 的 DNA, 使用 *Nde* I 和 *Xho* I 限制性内切酶在 37 °C 条件下处理基因片段以及 pET30b 质粒 DNA 并纯化回收。利用重组酶进行基因片段与线性化载体的连接, 并热击转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。*E. coli* BL21(DE3, pET30b): 提取 *E. coli* 表达载体 pET30b 质粒, 并热击转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。

S. xenophagum C1 (pBBR-2605-HiBiT) 生长无机盐培养基详见文献[22]; *E. coli* BL21(DE3,

pET30b-2604) 生长无机盐培养基(g/L): (NH_4) $_2$ SO $_4$ 0.5, NaCl 0.5, KH $_2$ PO $_4$ 1.0, NH $_4$ NO $_3$ 0.1, Na $_2$ HPO $_4$ 3.0, CaCl $_2$ 0.01, MgSO $_4$ 0.5, 维生素母液 1 mL/L, 无机微量元素母液(上海源叶生物科技有限公司) 1 mL/L。维生素母液(mg/L): 生物素 2.0, 叶酸 2.0, 维生素 B $_6$ 10.0, 核黄素 5.0, 维生素 B $_1$ 5.0, 烟酸 5.0, 维生素 B $_3$ 5.0, 泛酸 5.0, 维生素 B $_5$ 5.0, 维生素 B $_{12}$ 50.0, 对氨基苯甲酸 5.0, 硫辛酸 5.0。

1.2 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 对不同卤代有机物的响应分析

将 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 接种到含有 50 μ g/mL GM 的 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜, 直至菌体 OD $_{600}$ 值约为 1.0。菌体培养液 10 000 $\times$ g 离心 10 min 后弃上清, 收集菌体。用无机盐培养基洗涤菌体 2 次后, 用一定体积无机盐培养基重悬菌体。按照 2% 的接种量将菌体接种至无机盐培养基中。在 8 mL 体积的棕色玻璃瓶中分别加入 50 μ L 不同浓度的 TBBPA、PFOA、PFOS、PFHxS、PCP、HCBd、Dicofol、PCB-209、2-BrNP、BDE-209 母液(溶于有机溶剂中), 置黑暗中挥发干有机溶剂后, 加入 200 μ L 无机盐培养基, 30 °C、200 r/min 避光培养 14 h, 直至菌体 OD $_{600}$ 值达到 0.4。取 50 μ L 菌体培养液添加 50 μ L 的 Nano-Glo $^{\text{®}}$ HiBiT 裂解检测试剂, 在化学发光仪上进行萤光素酶活性分析, 同时取 150 μ L 培养液样品测定 OD $_{600}$ 值以校准相对荧光值。

1.3 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 对 TBBPA 代谢产物的响应分析

将 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 接种到含有 50 μ g/mL GM 的 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养过夜, 直至菌体 OD $_{600}$ 值约为 1.0。菌体培养液 10 000 $\times$ g 离心 10 min 后弃上清, 收集菌体。用无机盐培养基洗涤菌体 2 次后, 用一定体积无机盐培养基重悬菌体。将菌体按 2% 的接种量接种至无机盐培养基中。在

8 mL 体积的棕色玻璃瓶中分别加入 50 μ L 不同浓度的 H_2O_2 、BPA、i-PMP、n-PMP 母液, 挥发干有机溶剂后, 加入 200 μ L 无机盐培养基, 30 $^{\circ}C$ 、200 r/min 避光培养 14 h, 直至菌体 OD_{600} 值达到 0.4。取 50 μ L 培养液样品添加 50 μ L 的 Nano-Glo[®] HiBiT 裂解检测试剂, 在化学发光仪上进行荧光素酶活性分析, 同时取 150 μ L 培养液样品测定 OD_{600} 值以校准相对荧光值。

1.4 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT)对 TBBPA 的响应性能分析

将 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 接种到含 50 μ g/mL GM 的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养过夜至 OD_{600} 值约为 1.0。10 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体。用无机盐培养基洗涤菌体 2 次后重悬于相同培养基中, 再按 2% 的接种量接种至新无机盐培养基中。在 8 mL 体积的棕色玻璃瓶中分别加入 50 μ L 的 TBBPA 母液(0.00、0.04、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、12.00、20.00、28.00、32.00、40.00 μ mol/L, 溶解于二氯甲烷中), 于黑暗中挥发干二氯甲烷溶剂后, 加入 200 μ L 无机盐培养基, 使 TBBPA 的终浓度分别为 0.000、0.010、0.050、0.125、0.250、0.500、1.250、3.000、5.000、7.000、8.000、10.000 μ mol/L。所有样品均置于 200 r/min 的摇床中, 30 $^{\circ}C$ 避光培养 14 h, 直至菌体细胞 OD_{600} 值达到 0.4。此外, 还通过改变培养时间和接种量进一步研究菌体对 TBBPA 的荧光响应: 在接种量为 2% 的条件下, 在 8 mL 体积的棕色玻璃瓶中加入 50 μ L 的 TBBPA 母液(0 μ mol/L 和 28 μ mol/L, 溶解于二氯甲烷中), 30 $^{\circ}C$ 、200 r/min 分别培养 8、11、14、17、20 h; 在 8 mL 体积的棕色玻璃瓶中加入 50 μ L 的 TBBPA 母液(0 μ mol/L 和 28 μ mol/L, 溶解于二氯甲烷中), 使接种量分别为 1%、2%、3%、5%、7%, 30 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养 14 h。最后取 50 μ L 培养液样品添加 50 μ L 的 Nano-Glo[®] HiBiT 裂解检测试剂, 在化学发光仪上进行荧光

素酶活性分析, 另取 150 μ L 培养液样品测定 OD_{600} 值以校准相对荧光值。

1.5 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 Chr1_2604 蛋白的表达优化

在 *E. coli* 中表达外源蛋白通常受到温度、IPTG 浓度及菌体浓度的影响^[23]。为实现 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 Chr1_2604 的最大积累, 需探究其最优的表达条件。首先确定最佳诱导温度及菌体浓度, 将 *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604) 过夜培养物按 0.5% 的接种比例接种至新鲜 LB 培养基中, 37 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养至 OD_{600} 分别为 0.4、0.6 和 0.8, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 在 20 $^{\circ}C$ (20 h)、30 $^{\circ}C$ (10 h)、37 $^{\circ}C$ (3 h) 条件下进行诱导表达。其次确定最佳的 IPTG 诱导浓度, 在不同菌体浓度下分别加入终浓度为 0.25、0.5、1 mmol/L 的 IPTG, 将 OD_{600} 为 0.4 的菌液置于 20 $^{\circ}C$ 、200 r/min 下诱导 20 h; OD_{600} 为 0.6 的菌液置于 30 $^{\circ}C$ 、200 r/min 下诱导 10 h; OD_{600} 为 0.8 的菌液置于 37 $^{\circ}C$ 、200 r/min 下诱导 3 h。诱导结束后, 室温、5 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, 使用裂解缓冲液(300 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris)洗涤细胞沉淀, 后加入上样缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L DTT、2% SDS、0.1% 溴酚蓝、10% 甘油)重悬菌体, 置于 100 $^{\circ}C$ 下煮沸 10 min, 10 000 r/min 离心 3 min 后取上清液进行 SDS-PAGE 分析, 电泳条件: 150 V, 50 min, 上样量 20 μ L。

1.6 *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604)对 TBBPA 的降解性能分析

将 *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604) 接种至含有 50 μ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养过夜。次日按 0.5% 的接种量将过夜培养物接种至新鲜 LB 培养基, 37 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养至菌体 OD_{600} 值约为 0.8, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 在 37 $^{\circ}C$ 、200 r/min 条件下诱导培养 3 h。诱导结束后, 室温 5 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 并用无机盐缓冲液洗涤 2 次,

再以相同体积的无机盐缓冲液重悬菌体。在实验组培养基中加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG、0.06 mg/L 的 α -酮戊二酸、0.05 mg/L 的 FeSO_4 以及 2.0 mg/L 的 TBBPA, 于 37 °C、200 r/min 培养 3 d, 设置不同对照组[无底盘细胞 *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604)、无 IPTG 诱导、有 IPTG 诱导但无 FeSO_4 、有 IPTG 诱导但无 α -酮戊二酸]。在特定时间点(0、1、3 d)分别取出样品均置于-80 °C 冷冻保存, 随后在冷冻干燥机中进行培养液的冻干处理。在冻干样品中加入 0.5 mg/L 的内标物[2,2'-二(4-羟基苯基)-六氟丙烷], 使用等体积甲醇进行冻融提取后, 用 0.22 μm 滤膜过滤样品。最终, 利用高效液相色谱(HPLC)法测定 TBBPA 的浓度。其色谱条件如下, 柱温: 40 °C; 流动相: 0.05% 磷酸/乙腈(D/B); 梯度 0 min, 70% B→4 min, 95% B→4.5 min, 95% B→5 min, 70% B→8 min, 70% B; 流速 1 mL/min; 进样量 15 μL ; 检测波长 208 nm。

2 结果与分析

2.1 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT)对 TBBPA 的响应特征

2.1.1 对不同卤代有机物的响应特征

利用 BPROM (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) 和 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)对 *chr1_2605-chr1_2604* 基因簇进行生物信息学分析, 以全面了解该基因簇的结构

特征及其潜在的调控机制。首先, 通过 BPROM 网站预测基因簇中每个基因的启动子序列, 随后利用 MEME 网站对启动子区域的保守性进行分析。结果显示, 在 *chr1_2605* 基因与 *chr1_2604* 基因的启动子区域均发现了一个保守基序(TTGC GAT)(图 1)。启动子区域存在共同的保守基序, 提示这些基因具有相同的转录调控模式及功能相关性^[24]。这表明 *chr1_2605* 和 *chr1_2604* 的转录调控至少受一个相同的转录因子调控, 很可能受异生物质响应转录因子 Chr1_2605 的自身调控, 且 Chr1_2605 蛋白的响应配体可能同时激活 *chr1_2605* 和 *chr1_2604* 的表达。

卤代有机物已被证实能够作为响应配体被多种转录因子识别并调控基因表达^[22,25-27]。作为一种卤代有机物, TBBPA 很可能被异生物质响应转录因子 Chr1_2605 识别, 并调控 *chr1_2605-chr1_2604* 基因簇的表达。为了探究 Chr1_2605 蛋白的识别配体及其特异性, 本研究选择了 10 种卤代有机化合物作为测试对象。除目标化合物 TBBPA 外, 还包括氟代化合物(PFHxS、PFOA、PFOS)、氯代化合物(Dicofol、PCP、HCBd、PCB-209)以及溴代化合物(BDE-209、BrN)。对不同浓度卤代有机物胁迫下 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞的荧光素酶活性进行分析, 结果表明传感细胞仅对不同浓度的溴代化合物 TBBPA 表现出显著增强的相对荧光信号(图 2A), 而其他卤代有机物中的氟代物、氯代物以及溴代物中的 BDE-209、BrN 处理组相较于对照组, 均未观察到明显的

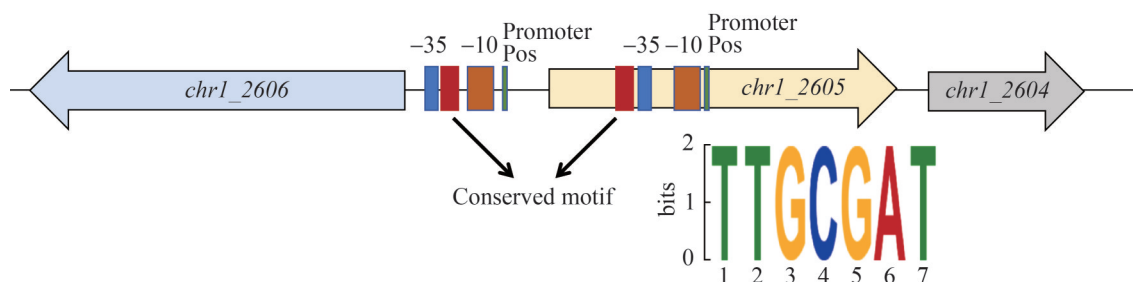


图1 *chr1_2605-chr1_2604*基因簇结构

Figure 1 Structure of the *chr1_2605-chr1_2604* gene cluster.

荧光信号强度增加(图 2B、2C)。这表明 TBBPA 是 Chr1_2605 转录因子的特异性识别配体, *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞能够有效区分 TBBPA 与其他卤代化合物, 展现出对 TBBPA 显著的特异性识别能力。

2.1.2 对 TBBPA 代谢产物的响应特征

Chr1_2605 转录因子表现出对 TBBPA 的特

异性响应, 其机制可能有 2 种: 一是 Chr1_2605 蛋白直接识别 TBBPA; 二是 Chr1_2605 蛋白直接识别 TBBPA 的代谢产物, 从而表现出对 TBBPA 的特异性响应。因此, 本研究选取了 TBBPA 的 3 种主要降解产物: BPA、n-PMP 和 i-PMP^[28], 以进一步验证 Chr1_2605 的响应配体。结果显示, 在不同浓度的降解产物实验组

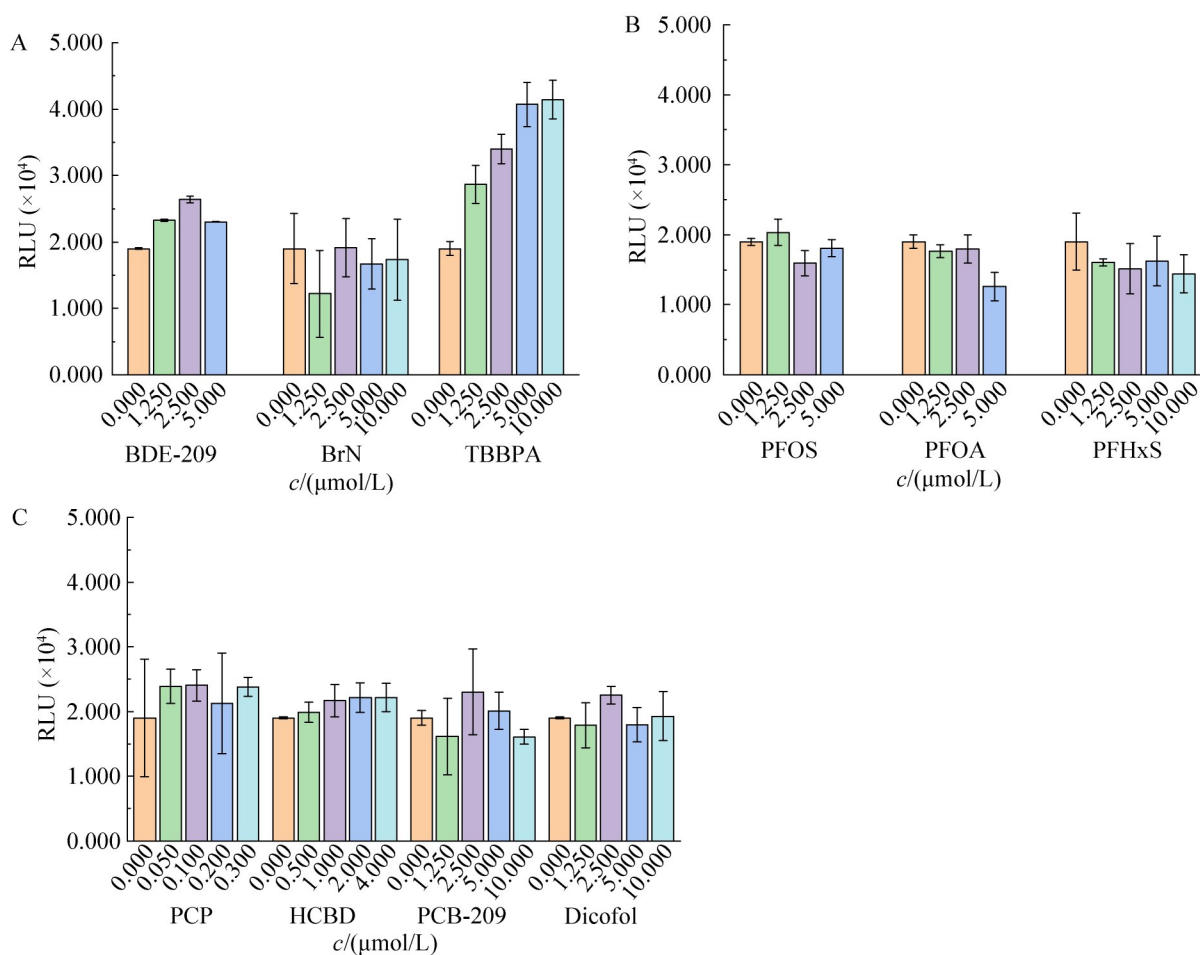


图2 *Sphingobium xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对卤代有机物的萤光素酶响应活性。A: *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对溴代有机物的萤光素酶响应活性; B: *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对氟代有机物的萤光素酶响应活性; C: *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对氯代有机物的萤光素酶响应活性。

Figure 2 Luminescence response of *Sphingobium xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to the halogenated compounds. A: Luminescence response of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to the brominated compounds; B: Luminescence response of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to the fluorinated compounds; C: Luminescence response of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to the chlorinated compounds.

中, 荧光信号强度与对照组相比无显著差异(图 3A)。这表明 BPA、n-PMP 和 i-PMP 并非 Chr1_2605 蛋白的识别配体。由此可知, Chr1_2605 蛋白对 TBBPA 的特异性响应是由于其直接识别 TBBPA。

此外, 细菌在异生物质胁迫下通常会诱导胞内活性氧水平的增加^[29-30]。Feng 等^[31]研究表明, TBBPA 会导致菌体内产生活性氧。与此同时, 许多与异生物质应答相关的转录因子在氧化应激条件下, 尤其是 H_2O_2 存在的情况下, 会产生非特异性响应^[32-33]。为验证此类非特异性响应是否会对 Chr1_2605 识别配体产生干扰, 本研究还设计了 Chr1_2605 对 H_2O_2 的响应活性分析。如图 3B 所示, 当 H_2O_2 浓度为 0.001% 时, 处理组与对照组的响应荧光信号无显著差异; 当 H_2O_2 浓度增加至 0.010% 后, 相对荧光信号强度显著下降, 表明 0.010% H_2O_2 对底盘细胞产生了生物毒性。当 H_2O_2 浓度进一步增加至 0.100% 时菌体死亡, 未测得萤光素酶信号。这说明 H_2O_2 不会诱导 *S. xenophagum* C1 (pBBR-

2605-HiBiT) 传感细胞产生与 TBBPA 相同程度的高强度荧光信号, 也证实了 Chr1_2605 蛋白对 TBBPA 的响应并非由于 TBBPA 诱导的细胞氧化应激所致。

2.2 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 对 TBBPA 的响应性能

S. xenophagum C1 (pBBR-2605-HiBiT) 对 TBBPA 的响应特征实验结果表明, TBBPA 是异生物质响应转录因子 Chr1_2605 的特异性识别配体。为进一步明确 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对 TBBPA 的响应范围, 本研究设计并分析了不同浓度梯度的 TBBPA、不同接种量以及不同培养时间条件下的传感细胞响应性能。结果表明, 在 TBBPA 浓度范围为 0.125–7.000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 底盘细胞表现出良好的线性响应, 并在 7.000 $\mu\text{mol/L}$ 的 TBBPA 时达到最高响应值(图 4A、4B)。随着 TBBPA 浓度增加到 7.000 $\mu\text{mol/L}$ 以上, 萤光素酶信号缓慢下降, 但并非急剧下降, 说明高浓度的 TBBPA 对传感

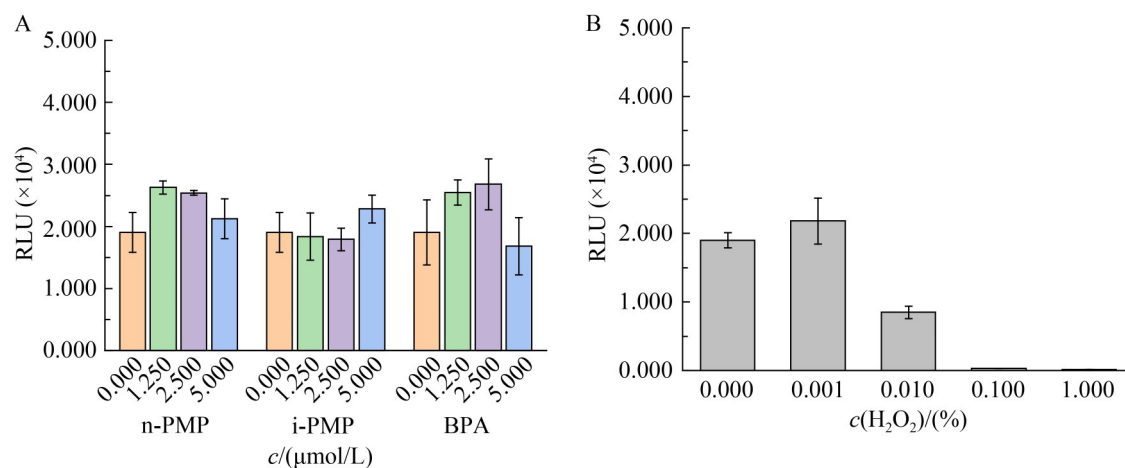


图3 *Sphingobium xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对 TBBPA 降解产物及 H_2O_2 的萤光素酶响应活性。A: *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对 TBBPA 降解产物的萤光素酶响应活性; B: *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对 H_2O_2 的萤光素酶响应活性。

Figure 3 Luminescence response of *Sphingobium xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to the degradation products of TBBPA and H_2O_2 . A: Luminescence response of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to the degradation products of TBBPA; B: Luminescence response of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to the degradation products of H_2O_2 .

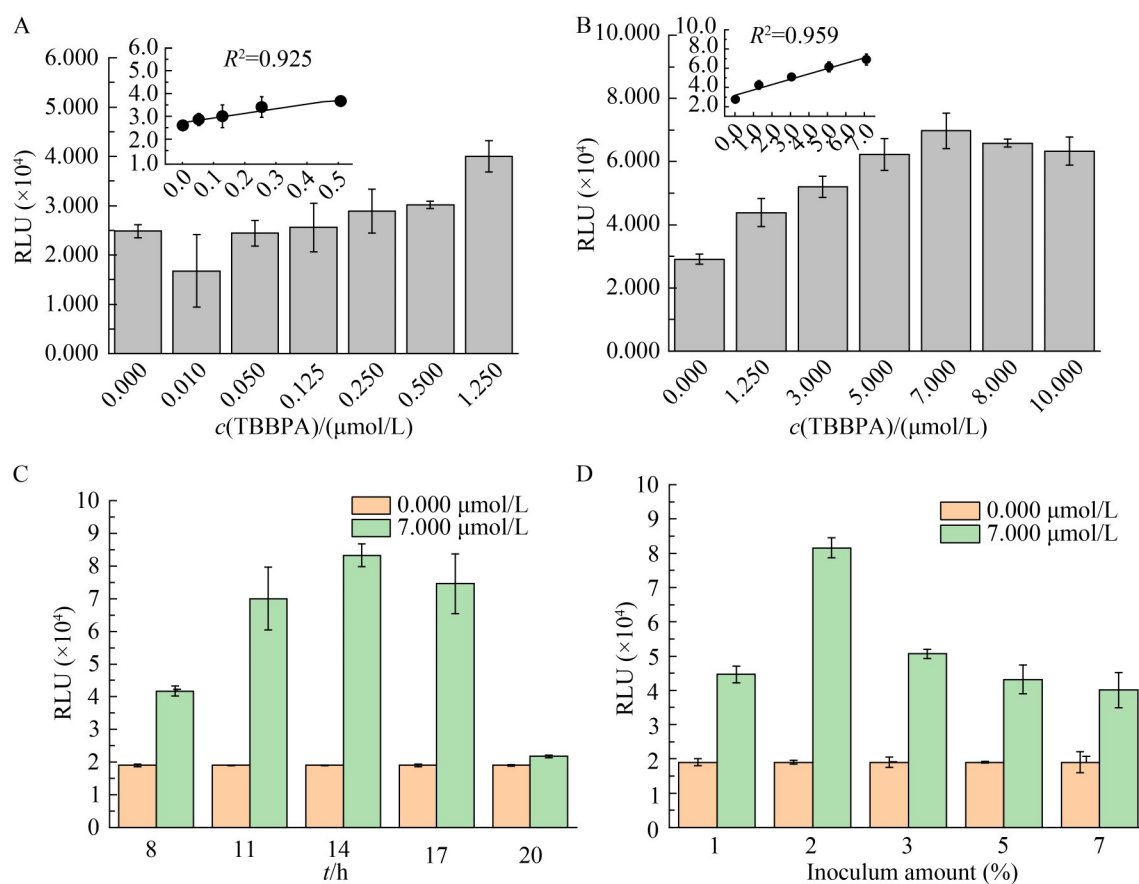


图4 *Sphingobium xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞的响应性能分析。A: *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对低浓度TBBPA的荧光素酶响应活性(0.000、0.010、0.005、0.125、0.250、0.500、1.250 μmol/L); B: *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对较高浓度TBBPA的荧光素酶响应活性(0.000、1.250、3.000、5.000、7.000、8.000、10.000 μmol/L); C: 不同培养时间下, *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对0.000 μmol/L和7.000 μmol/L TBBPA的荧光素酶响应活性; D: 不同接种量条件下, *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) 传感细胞对0.000 μmol/L和7.000 μmol/L TBBPA的荧光素酶响应活性。

Figure 4 Response characterization of *Sphingobium xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor. A: Luminescence response of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to low concentrations of TBBPA (0.000, 0.010, 0.050, 0.125, 0.250, 0.500, 1.250 μmol/L); B: Luminescence response of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to higher concentrations of TBBPA (0.000, 1.250, 3.000, 5.000, 7.000, 8.000, 10.000 μmol/L); C: Luminescence response of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to 0.000 μmol/L and 7.000 μmol/L TBBPA at different incubation times; D: Luminescence response of *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT) biosensor to 0.000 μmol/L and 7.000 μmol/L TBBPA under different inoculum conditions.

细胞活性产生了影响, 但非致死性影响。在此基础上, 目标物浓度为 7.000 μmol/L、接种量为 2% 的条件下, 研究了不同培养时间对传感细胞响应的影响。实验结果显示, 培养时

间为 14 h 时, 传感细胞的响应强度达到最大(图 4C)。随后, 在目标浓度为 7.000 μmol/L、培养时间 14 h 的条件下, 研究了不同接种量对传感细胞检测性能的影响。结果表明, 接种

量为 2% 时, 响应灵敏度达到最佳水平且显著高于其他组(图 4D)。在接种量为 1% 时, 菌体密度增长缓慢且未达到荧光素酶诱导表达的有效水平; 而在高接种量(3%、5%、7%)条件下, 菌体密度较高, 菌体间可能存在对营养物的竞争, 影响胞内酶的合成。在接种量为 2%、培养时间为 14 h 的最优条件下, 传感细胞对 TBBPA 的最低检测限介于 0.010–0.050 $\mu\text{mol/L}$ (图 4A), 为 5.439–27.195 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 Chr1_2604 蛋白的表达优化

S. xenophagum C1 (pBBR-2605-HiBiT) 对 TBBPA 的响应特征实验结果表明 Chr1-2605 可以特异性识别 TBBPA, 且通过生物信息学分析初步确定基因簇 *chr1_2605-chr1_2604* 的功能与 TBBPA 密切相关。*chr1_2604* 编码的 Chr1_2604 蛋白属于 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶, 很可能具有重要的 TBBPA 降解功能。为探究 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 Chr1_2604 蛋白的功能, 将 *chr1_2604* 基因元件插入高拷贝表达质粒 pET30b 载体中, 并导入 *E. coli* BL21(DE3) 中进行蛋白诱导表达。同时将空载体 pET30b 导入 *E. coli* BL21(DE3) 中, 用于观察质粒背景下的蛋白表达情况。如图 5 所示, 在泳道 3 中显示出明显的蛋白诱导表达条带, 位于蛋白分子量标记的约 25 kDa 处。Chr1_2604 蛋白长度为 238 个氨基酸, 预测单体分子量为 26 kDa, 与泳道 3 表达的蛋白大小一致。相比之下, 阴性对照泳道 2 在对应位置无明显蛋白条带, 且该条带的强度较大, 表明该条件下蛋白表达量较高。

为优化 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 Chr1_2604 的表达条件, 本研究设计了在不同诱导条件(温度、IPTG 浓度、菌株 OD_{600} 值)下进行蛋白表达分析。结果显示: 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 蛋白表达量高于 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的蛋白表达量(图 6A); 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, OD_{600} 为 0.4 的实验组的蛋白表达量高于同温度下 OD_{600} 分别为

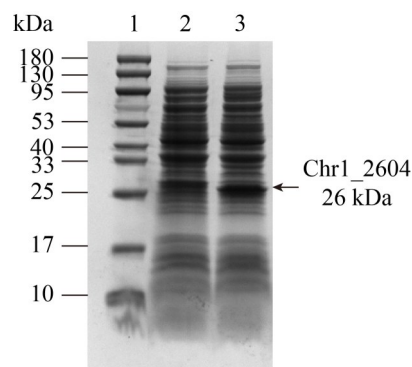


图5 α -酮戊二酸/Fe依赖性双加氧酶Chr1_2604蛋白表达产物的SDS-PAGE分析

Figure 5 SDS-PAGE analysis of Chr1_2604 protein. Lane 1: Protein molecular weight marker (marker); Lane 2: *E. coli* BL21(DE3, pET30b); Lane 3: *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604).

0.6 和 0.8 的实验组; 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 不同实验组的蛋白表达量基本一致。此外不同 IPTG 浓度对 Chr1_2604 蛋白表达的影响结果显示, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 mmol/L 的 IPTG 诱导条件下蛋白表达量最高(图 6B)。因此, 本研究最终选择处于对数生长期后期(即 OD_{600} 为 0.8)的菌体, 将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 mmol/L 的 IPTG 诱导条件下培养 3 h, 以实现 Chr1_2604 双加氧酶的最大积累。

2.4 *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604)底盘细胞对 TBBPA 的降解性能

依据上述最佳条件诱导表达 Chr1_2604 双加氧酶, 并在无机盐培养基中进行降解实验。尽管 *E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604)底盘细胞在接种至无机盐培养基前已积累了一定量的 Chr1_2604 双加氧酶, 为确保在较长实验周期内维持较高的蛋白表达量, 实验组中仍加入了 IPTG 进行诱导表达。结果显示, 底盘细胞 *E. coli* BL21 (DE3, pET30b-2604)对 TBBPA 表现出显著的降解效果(图 7), 在 3 d 内对初始浓度为 2.0 mg/L 的 TBBPA 的降解率达到 44.415%。在不同对照组中, TBBPA 的损失率分别为: 无底盘细胞组 3.970%、无 IPTG 诱导组 9.882%、有 IPTG 诱导

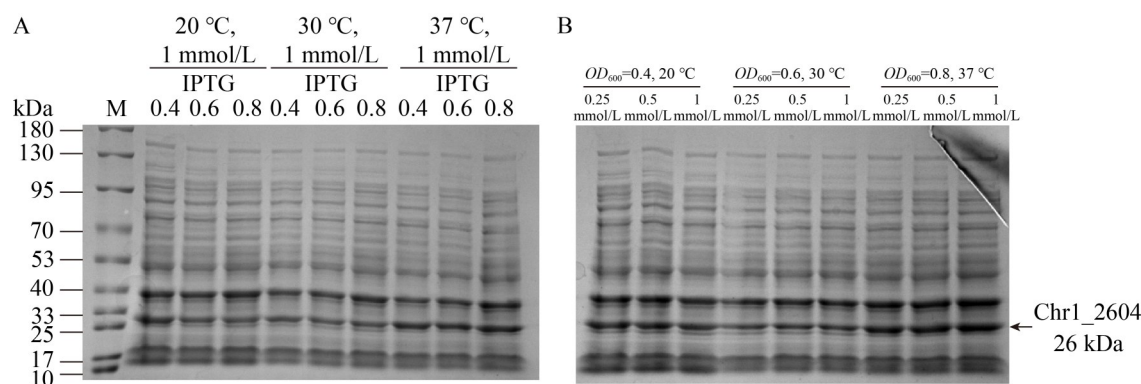


图6 不同温度、 OD_{600} 及IPTG浓度条件下Chr1_2604蛋白表达的SDS-PAGE分析。A: 不同温度及不同 OD_{600} 对Chr1_2604蛋白表达的影响; B: 不同IPTG浓度对Chr1_2604蛋白表达的影响。

Figure 6 SDS-PAGE analysis of Chr1_2604 protein under different conditions of temperature, OD_{600} value, and IPTG concentration. A: The effects of different temperatures and OD_{600} values on Chr1_2604 protein expression; B: The effects of different IPTG concentrations on Chr1_2604 protein expression.

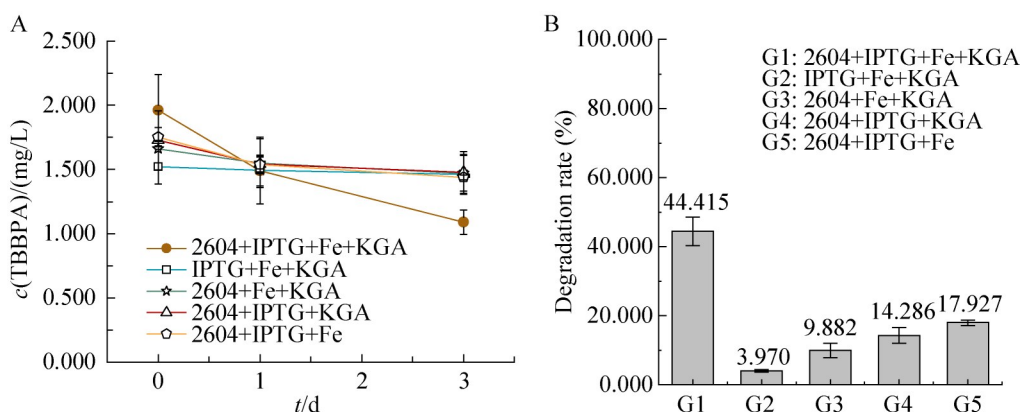


图7 *Escherichia coli* BL21(DE3, pET30b-2604)底盘细胞对TBBPA的降解。A: TBBPA的降解曲线; B: TBBPA的降解率。

Figure 7 Degradation of TBBPA by the chassis cells of *Escherichia coli* BL21(DE3, pET30b-2604). A: Degradation curve of TBBPA; B: Degradation rate of TBBPA.

但无 FeSO_4 组 14.286%、有 IPTG 诱导但无 α -酮戊二酸组 17.927%，均远低于实验组的降解率。在未添加菌体的空白对照组中，TBBPA 的 3.970% 减少率可能与操作过程中的光降解有关；而无 IPTG 诱导组的 9.882% 降解率可能是由于底盘细胞在接种前已在 LB 培养基中积累了一定量的 Chr1_2604 双加氧酶活性。进一步分析表明， α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶的功能依赖于 α -酮戊二酸和 Fe(II) 的协同作用。在 2 种辅因

子同时存在的条件下，TBBPA 降解率(44.415%)显著高于单一辅因子存在时的降解率(14.286% 和 17.927%)。这表明 2 种辅因子在酶催化机制中分别发挥关键作用，缺失任何一个都会显著限制 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 Chr1_2604 对 TBBPA 的降解活性。

3 讨论与结论

微生物驱动的 TBBPA 高效降解是治理

TBBPA 环境污染问题的重要方法。微生物体内含有多种酶系统和调控网络,能够高效响应外界污染物,从而对污染物进行有效地摄入、外排、代谢或转化。深入挖掘并研究微生物响应或降解 TBBPA 的分子元件,将有利于 TBBPA 污染治理绿色高效生物技术的研发与应用。

目前,关于 TBBPA 生物降解的研究大多集中于天然菌株的筛选,并且主要关注培养条件对降解效果的影响,例如 pH、温度、初始 TBBPA 浓度及共代谢基质种类等条件^[11,14,34],而关于 TBBPA 降解酶元件的研究则极其匮乏。在为数不多的相关文献中,TBBPA 降解酶多为非特异性酶类。例如,陈捷等^[14]发现乳白耙齿菌(*Irpex lacteus*) F17 对 TBBPA 的降解率及脱溴率与锰过氧化物酶的活力密切相关;Liang 等^[35]发现基于溴苯酚脱卤酶构建的底盘细胞在 4 d 内对 6.0 mg/L TBBPA 的降解率可达 78% [1.170 mg/(L·d)];Feng 等^[36]发现不同浓度的木质素过氧化物酶及辣根过氧化物酶(0.005–0.100 U/mL)在体外对 10.0 nmol/L TBBPA 的酶促降解率可达 6.5%–65.0% [0.177–1.770 mg/(L·h)]。然而,这类非特异性酶在完整细胞体内对 TBBPA 的底物特异性相对较差,降解效果有限,严重限制了这些酶类在 TBBPA 污染治理中的实际应用。在本研究中,通过在 *E. coli* BL21 (DE3, pET30b-2604)中诱导表达 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶元件 Chr1_2604 并研究其对 TBBPA 的降解功能,发现并证实了一种新的 TBBPA 降解酶 Chr1_2604。在培养基中补充降解酶作用所需的辅因子 α -酮戊二酸和 Fe(II)后,*E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604)底盘细胞在 3 d 内对 2.0 mg/L 的 TBBPA 降解率可达 44.415% [0.296 mg/(L·d)] (图 7),与目前筛选的天然菌株在共代谢条件下的平均降解率相当甚至更高。当在培养基中加入共代谢基质葡萄糖后,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 在 7 d 内对 2.0 mg/L TBBPA 的降解率为 50% [0.142 mg/(L·d)]^[11],*I. lacteus* F17 菌株在 12 d

内对 5.0 mg/L 的 TBBPA 的降解率为 78.4% [0.326 mg/(L·d)]^[14]。在非共代谢条件下,微生物菌株对 TBBPA 的降解率会更低,例如丛毛单胞菌属(*Comamonas* sp.) JXS-2-02 菌株在 10 d 内对 0.5 mg/L 的 TBBPA 降解率仅为 86% [0.043 mg/(L·d)]^[37],*Shewanella* sp. XB 菌株在 7 d 内对 1.0 mg/L 的 TBBPA 降解率仅为 85% [0.121 mg/(L·d)]^[18]。少数高效降解菌株如苍白杆菌属(*Ochrobactrum* sp.) T, 在 3 d 内对 3.0 mg/L 的 TBBPA 的降解率可达 91.8% [0.918 mg/(L·d)]^[34]。相较于上述天然降解菌株,本研究中构建的降解底盘细胞在实现对 TBBPA 高效降解的同时,不需要额外补充高浓度碳源共代谢物,在实际应用中表现出更强的环境适应性和降解稳定性。此外,通过进一步优化 α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶 Chr1_2604 的表达条件,还可能通过增大降解酶的积累量进一步提高底盘细胞对 TBBPA 的降解效果。

α -酮戊二酸/Fe 依赖性双加氧酶基因 *chr1_2604* 的上游基因 *chr1_2605* 编码异生物质响应转录因子。对这 2 个基因的启动子区域进行保守性分析发现,两者的启动子区域均含有 1 个保守基序 TTGCGAT (图 1),提示这 2 个基因具有相同的转录调控模式及功能相关性。事实上,在本研究中基于 *chr1_2605* 分子元件构建的 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT)传感细胞仅对 TBBPA 表现出高度特异性的荧光响应,而对其他卤代有机物均无明显响应(图 2)。这与 *chr1_2604* 基因编码 TBBPA 降解酶具有明显的功能相关性。此外,TBBPA 的 3 种主要降解产物 BPA、n-PMP 和 i-PMP 均无法诱导 *S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT)传感细胞的荧光响应(图 3),说明异生物质响应转录因子 Chr1_2605 蛋白对 TBBPA 的特异性响应并非由降解产物引起,而是通过直接识别 TBBPA 分子而产生。异生物质响应转录因子能够在识别自身配体后与特定的 DNA 序列结合,进而调控相关基因的表达^[38–40],从而实现外源有毒物质的

脱毒与降解。其中,部分异生物质响应转录因子具有底物特异性。例如,XylR能够特异性识别并响应环境中的二甲苯^[41],从而调控菌体实现二甲苯的降解;AhR能够特异性结合二噁英,可用于环境中二噁英的检测^[42]。然而,目前尚未见TBBPA作为配体的异生物质响应转录因子的研究报道。本研究发现的异生物质响应转录因子Chr1_2605蛋白在特异性识别TBBPA后,很可能同时激活chr1_2605和chr1_2604基因的表达。这为研究TBBPA降解酶的调控机制提供了一个良好的突破口。

此外,异生物质响应转录因子元件还可用于污染物的环境监测^[41,43]。本研究基于异生物质响应转录因子chr1_2605元件构建的*S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT)传感细胞在TBBPA浓度范围为0.125–7.000 $\mu\text{mol/L}$ 时表现出良好的线性响应,并在7.000 $\mu\text{mol/L}$ 的TBBPA污染胁迫下诱导出最高的荧光响应信号。在实验受试浓度中,*S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT)传感细胞的最低检测限介于0.010–0.050 $\mu\text{mol/L}$,为5.439–27.195 $\mu\text{g/L}$ (图4)。目前,TBBPA环境浓度的监测多依赖高精度仪器分析方法,如气相色谱-质谱法(GC-MS)^[44–45]、超高效液相色谱法(UPLC)^[46]、液相色谱-串联质谱法(LC/MS-MS)^[47]等。这些方法在TBBPA的定性和定量方面具有高灵敏度的优点。例如,HPLC-MS/MS对厌氧污泥中TBBPA的检测限为2 ng/g^[44];HPLC-MS检测商品牛奶中的TBBPA含量的检测限为0.02 $\mu\text{g/L}$ ^[48]。然而,这些检测技术的检测限受限于复杂繁琐的前处理技术,而且仅局限于实验室分析,不支持现场监测。相比之下,尽管*S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT)传感细胞不适用于痕量TBBPA的检测,但其具备快速、便携、现场实时监测的显著优势,展现了在环境监测领域实际应用中的潜力。

综上所述,本研究发现并证实了对TBBPA具有特异性响应功能的异生物质响应转录因子Chr1_2605以及对TBBPA具有高效降解功能的

α -酮戊二酸/Fe依赖性双加氧酶Chr1_2604分子元件。利用这2个新型基因簇元件,分别构建了降解底盘细胞*E. coli* BL21(DE3, pET30b-2604)和传感底盘细胞*S. xenophagum* C1 (pBBR-2605-HiBiT),实现了TBBPA的高效降解与高灵敏度监测。其中,降解底盘细胞通过高效表达 α -酮戊二酸/Fe依赖性双加氧酶Chr1_2604,显著提升了TBBPA的降解效率,在3 d内对2.0 mg/L的TBBPA降解率达到44.415% [0.296 mg/(L·d)]。传感底盘细胞能够精准识别并响应TBBPA,表现出较高的灵敏度,其最低检测限达到0.010–0.050 $\mu\text{mol/L}$ 。

本研究明确了chr1_2605-chr1_2604基因簇在TBBPA响应与降解中的核心功能:异生物质响应转录因子Chr1_2605能够特异性识别TBBPA,而 α -酮戊二酸/Fe依赖性双加氧酶Chr1_2604可以高效降解TBBPA。这不仅为深入理解微生物对TBBPA的降解代谢过程提供了重要参考,同时也为基于TBBPA响应元件的污染治理绿色高效生物技术研发与应用提供了理论支持。

作者贡献声明

白雪:实验数据收集和处理,论文的撰写;许玫英:提供专业见解和意见;姚晖:参与荧光素酶响应实验;郑晓丹:参与蛋白表达实验;汪伦记:论文格式校对;陈杏娟:研究构思和设计,对论文进行修改和补充。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] HAN Q, DONG WY, WANG HJ, YU BP, LIU P, XIE LS, DAI ZG. Efficacy of the toxicity control during the degradation of TBBPA by ozonation[J]. Water, 2022, 14(16): 2543.
- [2] CHEN P, MA ST, YANG Y, QI ZH, WANG YJ, LI GY, TANG JH, YU YX. Organophosphate flame retardants, tetrabromobisphenol A, and their transformation products

- in sediment of e-waste dismantling areas and the flame-retardant production base[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 225: 112717.
- [3] PITTINGER CA, PECQUET AM. Review of historical aquatic toxicity and bioconcentration data for the brominated flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA): effects to fish, invertebrates, algae, and microbial communities[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(15): 14361-14372.
- [4] HU LQ, ZHOU TT, LUO D, FENG JW, TAO Y, ZHOU YS, MEI SR. Bioaccumulation of tetrabromobisphenol A in a laboratory-based fish-water system based on selective magnetic molecularly imprinted solid-phase extraction[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 1356-1362.
- [5] TAY JH, SELLSTRÖM U, PAPADOPOULOU E, PADILLA-SÁNCHEZ JA, HAUG LS, de WIT CA. Serum concentrations of legacy and emerging halogenated flame retardants in a Norwegian cohort: Relationship to external exposure[J]. *Environmental Research*, 2019, 178: 108731.
- [6] FUJII Y, NISHIMURA E, KATO Y, HARADA KH, KOIZUMI A, HARAGUCHI K. Dietary exposure to phenolic and methoxylated organohalogen contaminants in relation to their concentrations in breast milk and serum in Japan[J]. *Environment International*, 2014, 63: 19-25.
- [7] SAEGUSA Y, FUJIMOTO H, WOO GH, INOUE K, TAKAHASHI M, MITSUMORI K, HIROSE M, NISHIKAWA A, SHIBUTANI M. Developmental toxicity of brominated flame retardants, tetrabromobisphenol A and 1, 2, 5, 6, 9, 10-hexabromocyclododecane, in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation[J]. *Reproductive Toxicology*, 2009, 28(4): 456-467.
- [8] WOJTOWICZ AK, SZYCHOWSKI KA, KAJTA M. PPAR- γ agonist GW1929 but not antagonist GW9662 reduces TBBPA-induced neurotoxicity in primary neocortical cells[J]. *Neurotoxicity Research*, 2014, 25(3): 311-322.
- [9] YIN NY, LIANG SJ, LIANG SX, YANG RJ, HU BW, QIN ZF, LIU AF, FAIOLA F. TBBPA and its alternatives disturb the early stages of neural development by interfering with the NOTCH and WNT pathways[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(9): 5459-5468.
- [10] PANG SC, GAO Y, LI AJ, YAO XL, QU GB, HU LG, LIANG Y, SONG MY, JIANG GB. Tetrabromobisphenol A perturbs erythropoiesis and impairs blood circulation in zebrafish embryos[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(20): 12998-13007.
- [11] HUANG WT, YIN H, YU YY, LU GN, DANG Z, CHEN ZH. Co-metabolic degradation of tetrabromobisphenol A by *Pseudomonas aeruginosa* and its auto-poisoning effect caused during degradation process[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 202: 110919.
- [12] MA YN, ZHAO YY, WANG YF, LI XZ, SUN FF, CORVINI PF, JI R. Effects of Cu²⁺ and humic acids on degradation and fate of TBBPA in pure culture of *Pseudomonas* sp. strain CDT[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 62: 60-67.
- [13] 赵莹莹, 王永峰, 孙斐斐, 郭红岩, 季荣. 四溴双酚 A (TBBPA) 好氧降解菌 *Pseudomonas* sp. JDT 的筛选及其对 TBBPA 的降解转化[J]. *南京大学学报(自然科学)*, 2017, 53(2): 218-226.
- ZHAO YY, WANG YF, SUN FF, GUO HY, JI R. Aerobic degradation of tetrabromobisphenol A (TBBPA) by *Pseudomonas* sp. JDT isolated from an activated sludge[J]. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 2017, 53(2): 218-226 (in Chinese).
- [14] 陈婕, 吴涓. 乳白耙齿菌 F17 好氧降解四溴双酚 A 的特性及机理研究[J]. *微生物学报*, 2021, 61(10): 3328-3339.
- CHEN J, WU J. Characteristics and mechanism of aerobic biodegradation of tetrabromobisphenol A by *Irpex lacteus* F17[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(10): 3328-3339 (in Chinese).
- [15] REN L, JIA Y, RUTH N, SHI YH, WANG JH, QIAO C, YAN YC. Biotransformations of bisphenols mediated by a novel *Arthrobacter* sp. strain YC-RL1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(4): 1967-1976.
- [16] WANG SF, LING XH, WU X, WANG LH, LI GY, CORVINI PF, SUN FF, JI R. Release of tetrabromobisphenol A (TBBPA)-derived non-extractable residues in oxic soil and the effects of the TBBPA-degrading bacterium *Ochrobactrum* sp. strain T[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 378: 120666.
- [17] MU Y, KE Z, FENG CX, WANG XW, WANG XW, WANG HM, CHEN Q, HE J. *Pedobacter pollutisoli* sp. nov., isolated from tetrabromobisphenol A-contaminated soil[J]. *Current Microbiology*, 2019, 76(4): 442-447.
- [18] WANG J, FU ZZ, LIU GF, GUO N, LU H, ZHAN YY. Mediators-assisted reductive biotransformation of tetrabromobisphenol-A by *Shewanella* sp. XB[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 192-197.
- [19] CHEN ZH, YIN H, PENG H, LU GN, LIU ZH, DANG Z. Identification of novel pathways for biotransformation of tetrabromobisphenol A by *Phanerochaete chrysosporium*, combined with mechanism analysis at proteome level[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 659: 1352-1361.
- [20] XU S, WANG YF, YANG LY, JI R, MIAO AJ. Transformation of tetrabromobisphenol A by *Rhodococcus jostii* RHA1: effects of heavy metals[J]. *Chemosphere*, 2018, 196: 206-213.
- [21] 许玫英, 陈杏娟, 郑晓丹. 一种微生物对毒害性难降解有机污染物胁迫响应的分子元件高通量挖掘方法与应用: CN202411840863.X[P]. 2024-12-13.
- [22] CHEN XJ, YAO H, SONG D, SUN GP, XU MY. Extracellular chemoreceptor of deca-brominated diphenyl ether and its engineering in the hydrophobic chassis cell for organics biosensing[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 433: 133266.
- [23] MIAO BJ, YAKUBU S, ZHU QS, ISSAKA E, ZHANG YH, ADAMS M. A review on tetrabromobisphenol A: human biomonitoring, toxicity, detection and treatment in the environment[J]. *Molecules*, 2023, 28(6): 2505.
- [24] OEZGUEN N, KUMAR S, HINDUPUR A, BRAUN W, MURALIDHARA BK, HALPERT JR. Identification and analysis of conserved sequence motifs in cytochrome P450 family 2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008,

- 283(31): 21808-21816.
- [25] LAYTON AC, MUCCINI M, GHOSH MM, SAYLER GS. Construction of a bioluminescent reporter strain to detect polychlorinated biphenyls[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 5023-5026.
- [26] TURNER K, XU SF, PASINI P, DEO S, BACHAS L, DAUNERT S. Hydroxylated polychlorinated biphenyl detection based on a genetically engineered bioluminescent whole-cell sensing system[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(15): 5740-5745.
- [27] MANN MM, BERGER BW. A genetically-encoded biosensor for direct detection of perfluorooctanoic acid[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 15186.
- [28] PENG XX, WANG ZN, WEI DY, HUANG QY, JIA XS. Biodegradation of tetrabromobisphenol A in the sewage sludge process[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 61: 39-48.
- [29] LIU X, CHEN RB, PENG YT, ZHOU YY, XIA MZ, WU XY, WANG YC, YIN WJ, HAN YY, YU M. Perfluorooctanoic acid (PFOA) induces cardiotoxicity by activating the Keap1/Nrf2 pathway in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2024, 285: 117098.
- [30] WU SJ, WU M, QI MT, ZHONG L, QIU LQ. Effects of novel brominated flame retardant TBBPA on human airway epithelial cell (A549) *in vitro* and proteome profiling[J]. *Environmental Toxicology*, 2018, 33(12): 1245-1253.
- [31] FENG M, LI HX, YOU SH, ZHANG J, LIN H, WANG MQ, ZHOU JH. Effect of hexavalent chromium on the biodegradation of tetrabromobisphenol A (TBBPA) by *Pycnoporus sanguineus*[J]. *Chemosphere*, 2019, 235: 995-1006.
- [32] BAUMEL-ALTERZON S, KATZ LS, BRILL G, GARCIA-OCANA A, SCOTT DK. Nrf2: the master and captain of beta cell fate[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2021, 32(1): 7-19.
- [33] CHOI HJ, KIM SJ, MUKHOPADHYAY P, CHO S, WOO JR, STORZ G, RYU SE. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor[J]. *Cell*, 2001, 105(1): 103-113.
- [34] AN TC, ZU L, LI GY, WAN SG, MAI BX, WONG PK. One-step process for debromination and aerobic mineralization of tetrabromobisphenol-A by a novel *Ochrobactrum* sp. T isolated from an e-waste recycling site[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 9148-9154.
- [35] LIANG ZS, LI GY, MAI BX, MA HM, AN TC. Application of a novel gene encoding bromophenol dehalogenase from *Ochrobactrum* sp. T in TBBPA degradation[J]. *Chemosphere*, 2019, 217: 507-515.
- [36] FENG YP, LU K, GAO SX, MAO L. The fate and transformation of tetrabromobisphenol A in natural waters, mediated by oxidoreductase enzymes[J]. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2017, 19(4): 596-604.
- [37] PENG XX, ZHANG ZL, LUO WS, JIA XS. Biodegradation of tetrabromobisphenol A by a novel *Comamonas* sp. strain, JXS-2-02, isolated from anaerobic sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 173-179.
- [38] LU HZ, WANG LY, LI SJ, PAN CM, CHENG KY, LUO YX, XU H, TIAN B, ZHAO Y, HUA YJ. Structure and DNA damage-dependent derepression mechanism for the XRE family member DG-DdrO[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(18): 9925-9933.
- [39] SI MR, CHEN C, ZHONG JY, LI XN, LIU Y, SU T, YANG G. MsrR is a thiol-based oxidation-sensing regulator of the XRE family that modulates *C. glutamicum* oxidative stress resistance[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 189.
- [40] HOLLEY CL, DHULIPALA V, MAURAKIS SA, GREENAWALT AN, READ TD, CORNELISSEN CN, SHAFER WM. Transcriptional activation of *ompA* in *Neisseria gonorrhoeae* mediated by the XRE family member protein NceR[J]. *mBio*, 2023, 14(4): e0124423.
- [41] TROPEL D, BÄHLER A, GLOBIG K, van der MEER JR. Design of new promoters and of a dual-bioreporter based on cross-activation by the two regulatory proteins XylR and HbpR[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(11): 1186-1196.
- [42] SUZUKI G, NAKAMURA M, MICHINAKA C, TUE NM, HANDA H, TAKIGAMI H. Dioxin-like activity of brominated dioxins as individual compounds or mixtures in *in vitro* reporter gene assays with rat and mouse hepatoma cell lines[J]. *Toxicology in Vitro*, 2017, 44: 134-141.
- [43] ESPINOSA-URGEL M, SERRANO L, RAMOS JL, FERNÁNDEZ-ESCAMILLA AM. Engineering biological approaches for detection of toxic compounds: a new microbial biosensor based on the *Pseudomonas putida* TtgR repressor[J]. *Molecular Biotechnology*, 2015, 57(6): 558-564.
- [44] MACÊDO WV, BERNEGOSSI AC, SABATINI CA, CORBI JJ, ZAIAT M. Application of dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis to determine tetrabromobisphenol A in complex matrices[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2020, 39(11): 2147-2157.
- [45] PASEIRO-CERRATO R, ACKERMAN L, de JAGER L, BEGLEY T. Brominated flame retardants (BFRs) in contaminated food contact articles: identification using DART-HRMS and GC-MS[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2021, 38(2): 350-359.
- [46] XIAO ZM, WANG RG, SUO DC, LI T, SU XO. Trace analysis of bisphenol A and its analogues in eggs by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2020, 327: 126882.
- [47] GAO GW, CHEN HP, ZHU L, CHAI YF, MA GC, WANG C, HAO ZX, LIU X, LU CY. Simultaneous determination of bisphenol A and tetrabromobisphenol A in tea using a modified QuEChERS sample preparation method coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(48): 6769-6776.
- [48] KANG HY, WANG XL, ZHANG Y, WU JF, WANG HQ. Simultaneous extraction of bisphenol A and tetrabromobisphenol A from milk by microwave-assisted ionic liquid microextraction[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(19): 14631-14636.