

恶臭假单胞菌 ND6 菌株 *catA* 基因的克隆和表达 及其儿茶酚裂解途径探讨

赵化冰^{1 2 3} 陈 威² 蔡宝立^{1 3*}

(南开大学¹ 生命科学学院² 环境科学与工程学院³ 生物活性材料教育部重点实验室 天津 300071)

摘 要 恶臭假单胞菌 ND6 菌株的萘降解质粒 pND6-1 中编码儿茶酚 1,2-双加氧酶的 *catA* 基因在大肠杆菌中进行了克隆和表达,并研究表达产物的酶学性质。结果表明,酶的 K_m 为 $0.019 \mu\text{mol/L}$, V_{\max} 为 $1.434 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$;具有很好的耐热性,在 50°C 保温 45min 后仍能够保留酶活力的 93.7%, Fe^{2+} 对酶活性有显著的促进作用,其比活力是对照反应的 292%。酶对 4-氯儿茶酚的催化活性非常低,属于 I 型儿茶酚 1,2-双加氧酶。以萘为底物生长时,ND6 菌株的细胞提取液中既存在催化邻位裂解途径的儿茶酚 1,2-双加氧酶活性,也存在催化间位裂解途径的儿茶酚 2,3-双加氧酶活性。以苯甲酸、对羟基苯甲酸和苯乙酸为唯一碳源生长时,ND6 菌株细胞提取液的儿茶酚 1,2-双加氧酶活性远远大于儿茶酚 2,3-双加氧酶活性。表明 ND6 菌株既能通过儿茶酚间位裂解途径降解萘,也能通过儿茶酚邻位裂解途径降解萘,而以苯甲酸、对羟基苯甲酸和苯乙酸为诱导物时只利用儿茶酚邻位裂解途径。

关键词: 恶臭假单胞菌 ND6; 儿茶酚 1,2-双加氧酶; *catA*; 儿茶酚邻位裂解途径

中图分类号: Q786, Q93 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-6209(2007)03-0387-05

萘是一种环境中普遍存在的双环芳香烃污染物,具有致癌、致突变作用。因此,研究萘生物降解的分子机理和萘污染的生物修复,具有十分重要的理论和现实意义。研究表明,萘降解细菌的 20 余个降解基因组成两个操纵子,上游操纵子(*nahAaAbAcAdBFCE*)编码的酶将萘降解成水杨酸,下游操纵子(*nahGTHINLOMKJ*)编码的酶将水杨酸降解成可进入三羧酸循环的小分子物质,调节基因 *nahR* 的产物对两个操纵子的表达进行正调控^[1]。下游操纵子中 *nahH* 基因编码的儿茶酚 2,3-双加氧酶(C23O)催化儿茶酚的间位开环,生成 2-羟基粘康酸半醛,所以上述萘降解途径也称儿茶酚间位(*meta*)裂解途径^[2]。在某些细菌中还存在另外一条萘降解途径,萘被降解成儿茶酚以后,*catA* 基因编码的儿茶酚 1,2-双加氧酶(C12O)催化儿茶酚的邻位开环,生成顺,顺-粘康酸,即所谓儿茶酚邻位(*ortho*)裂解途径^[3]。间位裂解途径基因多数情况下位于质粒中,有时也位于染色体上,但邻位裂解途径基因一般位于染色体上^[4]。

我们从恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)ND6 菌株中分离和鉴定了萘降解质粒 pND6-1^[5],测定了质粒的全序列(101858bp),注释了 102 个编码序列(CDSs)。这是第一个测定全序列的萘降解质粒^[6]。

在 pND6-1 中除了下游操纵子中编码 C23O 的 *nahH* 基因以外,在两个萘操纵子的外面还存在一个编码 C12O 的 *catA* 基因。这一现象在另外两个已经测序的萘降解质粒 pDTG1 和 NAH7 中并未发现^[7,8]。因此, pND6-1 中的 *catA* 基因是否编码有活性的 C12O,以及该酶在 ND6 菌株的萘和其它芳香烃代谢中的作用,是一个很值得探究的问题。本文报道 ND6 菌株中 *catA* 基因的克隆、表达和酶鉴定结果,同时探讨了 ND6 菌株萘和其它芳香烃降解过程中儿茶酚裂解途径与生长底物诱导的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)ND6 为本实验室分离和鉴定的萘降解菌株^[5]。儿茶酚 1,2-双加氧酶基因 *catA* 和儿茶酚 2,3-双加氧酶基因 *nahH* 位于 ND6 菌株的萘降解质粒 pND6-1 中^[6]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)是用于高效表达重组蛋白的受体菌株,表达载体为 pET-21b(+),该载体含有 amp^R 基因和 T7 *lac* 启动子,重组蛋白 C-端带有 His-Tag。受体菌 *E. coli* DH5 α 用于保存重组质粒。

1.1.2 试剂和仪器:ExTaq DNA 聚合酶、限制性内

基金项目:国家自然科学基金(30270274)

* 通讯作者。Tel: 86-22-23503617; E-mail: caibaoli@nankai.edu.cn

作者简介:赵化冰(1977-),女,河北石家庄人,博士后,主要从事生物降解与环境生物技术研究。E-mail: mellticezhb@hotmail.com

收稿日期:2006-09-15;接受日期:2006-10-20;修回日期:2007-01-15

切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司。DNA 凝胶抽提试剂盒购自北京鼎国生物技术公司。IPTG 购自 Promega 公司。蛋白质分子量标准购自北京天根生化科技有限公司。4-甲基儿茶酚、4-氯儿茶酚、顺、顺-粘康酸购自 Sigma 公司。其他化学试剂为国产分析纯;SIGMA 2-16K 台式高速冷冻离心机购自 Sigma 公司。PC-320 型基因扩增仪购自 ASTEC 公司。UV-VIS Spectrophotometer Cary 100 购自 VARAN 公司。JY9-II 超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.1.3 培养基和培养条件 ND6 菌株使用以萘为唯一碳源的 MM 培养基^[9], pH 值 7.2, 高压灭菌冷却后加入萘粉末至 2g/L, 30℃、150 r/min 振荡培养。BL21 (DE3) 和 DH5 α 菌株使用 LB 培养基^[10], 高压灭菌, 需要时加入氨卞青霉素至 100 μ g/mL, 37℃、150r/min 振荡培养。

1.2 *catA* 基因在 *E. coli* 中的克隆、表达和酶纯化

根据 pND6-1 的 *catA* 基因序列 (GenBank 注册号 AY589689) 设计引物扩增该基因的 PCR 引物: *catA*-f, 5'-GGAGACATCATATGCGGATCACTATTTCGAACC-3'; *catA*-r, 5'-CCAATCTCGAGTGCAGATTGCAGGGCA CG-3' (斜体部分为保护碱基, 下划线部分为 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点)。以质粒 pND6-1 为模板, 用上述 PCR 引物扩增 *catA* 基因, PCR 产物回收后分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切, 插入表达载体 pET-21K (+), 用形成的重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 测序验证 *catA* 序列。提取重组质粒, 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 表达 C12O。*catA* 基因的克隆和表达方法以及酶的纯化见文献 [11]。

1.3 C12O 的酶学性质分析

1.3.1 表达蛋白的 SDS-PAGE 检测 采用 12% 分离胶、5% 积层胶的不连续 SDS-PAGE 检测 *catA* 基因表达的 C12O 蛋白, 电泳条件和蛋白染色液配方见文献 [10]。

1.3.2 C12O 活性检测 C12O 催化儿茶酚生成的产物顺、顺-粘康酸在 260nm 下有特异吸收峰, 其吸光系数 ϵ [L/(mol \cdot cm)] = 16800^[12]。500 μ L 标准测定体系包括 80mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.4) 0.6mmol/L 儿茶酚和适量酶液, 测定温度为 25℃。酶活力定义 25℃时, 每分钟催化 1 μ mol 顺、顺-粘康酸生成所需要的酶量为一个酶活单位 (U)。比活力定义: 每毫克蛋白所含有的酶活力单位 (U/mg)。酶液蛋白浓度测定采用 Bradford 法^[13]。

1.3.3 C12O 的酶动力学常数测定 采用 Lineweaver-Burk 双倒数法求得米氏常数 K_m 和最大反应速率

V_{max} ^[14]。

1.3.4 酶的耐热性测定 将纯化的 C12O 用缓冲液稀释, 在 30℃、50℃、60℃和 70℃水浴保温 45min (对照样品在 0℃保温), 然后冰水浴冷却, 25℃下与底物溶液混合进行酶促反应。

1.4 C23O 和粘康酸环化异构酶活性检测

C23O 催化活性测定见文献 [2]。粘康酸环异构酶活性检测见文献 [15]。

1.5 ND6 菌株 *catA* 基因的序列分析

采用 DNASTAR 软件 EditSeq 功能对 *catA* 基因序列进行分析, 不同菌株的 C12O 系统进化树采用 DNAMAN 软件中多重序列比较程序绘制。

2 结果和分析

2.1 儿茶酚 1,2-双加氧酶的序列分析

恶臭假单胞菌 ND6 菌株 pND6-1 质粒的儿茶酚 1,2-双加氧酶基因 *catA* 位于萘降解下游操纵子转录单元之外的 15119 ~ 16057bp 处^[6]。用 DNASTAR 软件对其进行分析, 结果表明 *catA* 全长 939bp, 编码的儿茶酚 1,2-双加氧酶由 313 个氨基酸构成, 分子量为 34517Da, 等电点为 4.94。在 GenBank 中对不同来源的 C12O 进行检索, 用 DNASTAR 软件的 CLUSTAL W 算法将 ND6 菌株和其它相关菌株的 C12O 氨基酸序列进行同源性比较, 结果表明, ND6 菌株与其它假单胞菌属菌株的 C12O 氨基酸序列同源性较高, 在 63% 到 73% 之间, 在系统分类树中聚为一类 (图 1); 与其它非假单胞菌属菌株的 C12O 同源性较低, 在 23.9% 到 51.8% 之间。

2.2 *catA* 基因在大肠杆菌中的表达和酶纯化

含有 *catA* 基因的重组子在 37℃表达时, 产生的 C12O 几乎全部是不可溶的包涵体, 上清液中的 C12O 活性很低, 20℃低温表达可以有效地解决这个问题。这可能是因为低温能够减少蛋白分子之间的聚集, 降低蛋白质合成的速率, 使肽链能够正确折叠^[16]。经过 Ni-NTA His Bind 树脂柱纯化的 C12O, 经 SDS-PAGE 检测得到一条纯净的蛋白条带 (图 2), 其分子量为 34.5kDa。

2.3 儿茶酚 1,2-双加氧酶的酶学性质分析

2.3.1 K_m 和 V_{max} 测定 以不同浓度的儿茶酚为底物测定纯化的 C12O 活力, 用 Lineweaver-Burk 作图法, 计算得出 ND6 菌株 C12O 的 K_m 为 0.019 μ mol/L, V_{max} 为 1.434 μ mol/(min \cdot mg)。ND6 菌株 C12O 的 K_m 值比多数前人报道的结果偏小^[17-19], 表明该菌株中的 C12O 对儿茶酚的亲和力更高, 在底物浓度较低时亦可灵敏地催化反应进行。

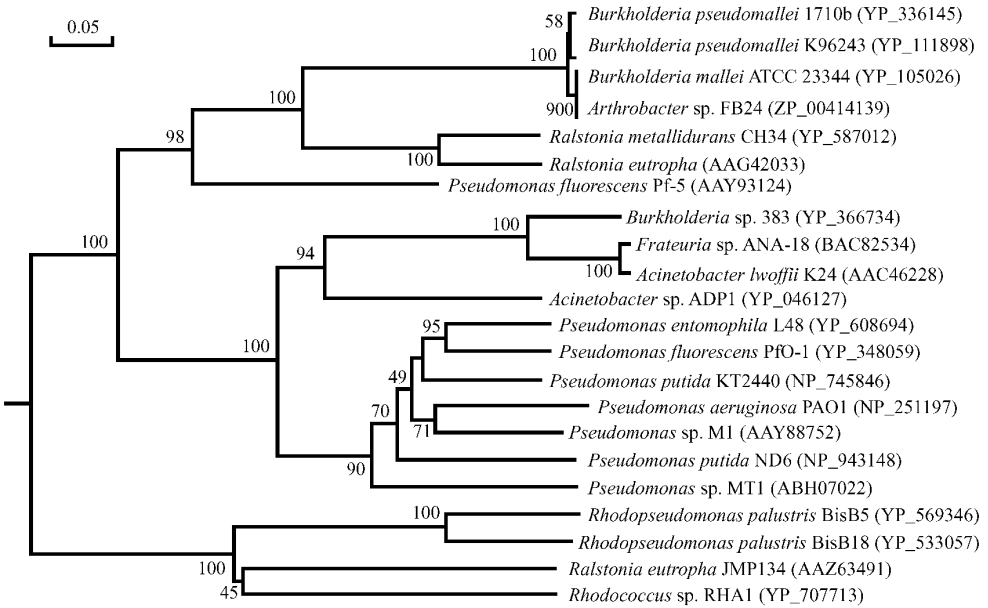


图 1 恶臭假单胞菌 ND6 和其它相关菌株的儿茶酚 1,2-双加氧酶系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of catechol 1,2-dioxygenases from *P. putida* ND6 and related strains.

Evolutionary distances were calculated by Multiple Sequence Alignment of DNAMAN 4.0. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

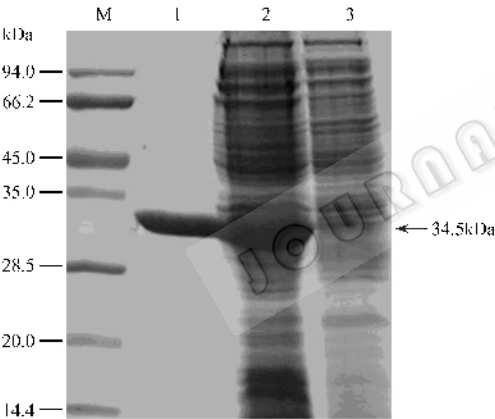


图 2 恶臭假单胞菌 ND6 的儿茶酚 1,2-双加氧酶 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE of catechol 1,2-dioxygenase of *P. putida* ND6. M. Protein molecular weight markers ;1. Purified C12O ;2. Crude extract of *E. coli* BL21(DE3) pET-21(+)-*catA* ;3. Crude extract of *E. coli* BL21(DE3) pET-21(+).

2.3.2 酶的耐热性 :ND6 菌株的 C12O 具有很好的耐热性 ,50℃ 保温 45min 后酶活力仅丧失 6.3% ,60℃ 保温 45min 后能保留酶活力的 28.5% ,70℃ 45min 仍可测到微弱活力[35.7μmol/(min·mg)]。此结果与 An 等^[19] 的报道十分接近 ,他们从 *Streptomyces setonii* 菌株中克隆表达的 C12O 在 25℃ 至 65℃ 范围都有活性 ,在 45℃ 酶活性最高。Chai^[20] 也报道 *Rhodococcus rhodochrous* N75 菌株的 C12O 具有很高的热稳定性 ,在 50℃ 保温 60min 酶活力并未下降 ,反而有所升高。可见 ,较好的热稳定性并非

ND6 菌株中的 C12O 所特有 ,而是许多细菌 C12O 的共同性质。

2.3.3 金属离子对酶的作用 :在标准反应体系中添加终浓度为 1mmol/L 的各种无机离子 ,考察这些金属离子对 ND6 菌株 C12O 活性的影响。终浓度为 1mmol/L 的 Fe²⁺ 对 ND6 菌株的 C12O 酶活力有显著的促进作用 ,其活力是对照样品的 292%。其它的测试离子(Al³⁺、Ba²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、Cs⁺、Cu²⁺)对 ND6 菌株的 C12O 酶活力有不同程度的抑制作用 ,特别是 Cu²⁺ 的添加使比活力丧失 90%。

2.3.4 C12O 的底物特异性 :ND6 菌株的 C12O 除了能够催化儿茶酚开环以外 ,还能催化儿茶酚的衍生物裂解 ,如 4-甲基儿茶酚和 4-氯儿茶酚 ,其催化活力见表 1。已有研究表明 ,根据底物特异性的不同可以将 C12O 分为两种类型 :不能裂解氯代儿茶酚或对氯儿茶酚催化活性很低的为 I 型酶 ,能够裂解氯代儿茶酚的为 II 型酶^[21]。ND6 菌株的 C12O 虽然能

表 1 恶臭假单胞菌 ND6 菌株儿茶酚 1,2-双加氧酶的底物特异性

Table 1 Substrate specificity of catechol 1,2-dioxygenase of *P. putida* ND6

Substrate (0.6 mmol/L)	C12O Specific activity [μmol/(min·mg)]
Catechol	7.7 (100)
4-methyl catechol	4.1 (52)
4-chlorocatechol	0.4 (5)

够以 4-氯儿茶酚为底物进行反应,但是活性非常低,比活力仅为 $0.4\mu\text{mol}(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ 。因此,ND6 菌株的 C12O 应归为 I 型酶。

2.4 ND6 的儿茶酚邻位裂解途径分析

萘生物降解的儿茶酚邻位裂解途径中,儿茶酚经过以下 4 个酶的催化被最终降解成小分子物质进入三羧酸循环:儿茶酚 1,2-双加氧酶、粘康酸环化异构酶、粘康酸内酯异构酶和 3-氧乙二酸烯醇内酯水解酶,编码基因为 *catABCD*。为了探讨 ND6 菌株中是否存在儿茶酚邻位裂解途径,除了进行 *catA* 基因的克隆、表达和酶活力检测以外,我们还以顺,顺-粘康酸为底物,对该菌株细胞粗提液中是否存在粘康酸环化异构酶(*catB* 编码)活性进行了检测。结果显示,ND6 菌株细胞粗提液中粘康酸环异构酶的比活力为 $19.28\text{nmol}(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ 。因为没有合适的底物,没有对 *catCD* 编码的酶进行活力检测。根据以上试验,我们初步推断 ND6 菌株除了具有萘的儿茶酚间位裂解途径的酶以外,还存在萘的儿茶酚邻位裂解途径的酶。除了 *catA* 基因外,其它邻位裂解途径基因可能位于 ND6 菌株的染色体上。

分别用以萘、苯甲酸、对羟基苯甲酸、苯乙酸为唯一碳源的 MM 培养基培养 ND6 菌株,然后制备粗酶液,并进行儿茶酚 1,2-双加氧酶和儿茶酚 2,3-双加氧酶活力测定。结果表明,以萘为底物培养时,ND6 菌株的 C12O 比活力为 $19.3\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$,C23O 比活力为 $22.1\text{nmol}(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$,这可能暗示 ND6 菌株既能通过儿茶酚间位裂解途径降解萘,也能通过儿茶酚邻位裂解途径降解萘。但是,以苯甲酸、对羟基苯甲酸和苯乙酸为唯一碳源生长时,ND6 菌株细胞提取液的 C12O 比活力远远大于 C23O 的比活力(表 2),这说明 ND6 菌株对这 3 种底物的降解通过儿茶酚邻位裂解途径进行。

表 2 不同底物诱导时恶臭假单胞菌 ND6 的 C12O 和 C23O 比活力

Table 2 The C12O and C23O activities of <i>P. putida</i> ND6 induced by different substrates		
Inducer	C12O activity [$\mu\text{mol}(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$]	C23O activity [$\mu\text{mol}(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$]
Naphthalene	19.3 (100)	22.1 (100)
Benzoate	49.8 (258)	4.8 (22)
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	32.0 (166)	6.4 (29)
Phenylacetic acid	56.6 (293)	2.2 (10)

Numbers in parenthesis are relative activities (%)

3 讨论

到目前为止,对萘降解菌株的儿茶酚间位裂解途径报道的比较多,而邻位裂解途径的报道比较少。

Williams 等^[2]发现恶臭假单胞菌 NCIB 9816-1 菌株在含萘培养基上生长时,表达儿茶酚间位裂解酶 C23O,而在水杨酸诱导的情况下表达儿茶酚邻位裂解酶 C12O。NCIB 9816-2 和 NCIB 9816-3 菌株的降解主要为邻位裂解途径,间位裂解酶则在很低的水平上进行组成型表达。Dennis 等^[6]通过萘降解质粒 pDTG1 的全序列分析证明,恶臭假单胞菌 NCIB 9816-4 菌株的萘降解下游操纵子的 *nahG* 和 *nahT* 基因之间插入了 IS 因子,使 *nahT* 以后的基因不能表达,所以该菌株萘到水杨酸的降解由质粒基因控制,水杨酸以后的降解途径由染色体基因编码。我们根据试验结果推断,恶臭假单胞菌 ND6 菌株的萘降解既可采取儿茶酚间位裂解途径,也可采取儿茶酚邻位裂解途径。ND6 菌株的这一特性体现了进化的优势,这是因为儿茶酚邻位裂解途径和儿茶酚间位裂解途径的酶系在底物特异性、耐热性、pH 耐受性等方面存在的差异能够提高细菌的适应性,使寄主菌株在复杂环境下更具有竞争力。而且,当某一途径降解基因发生突变时,同时存在的另一条降解途径有助于细菌的存活。

参 考 文 献

[1] Yen KM, Serder CM. Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonas*. *CRC Crit Rev Microbiol*, 1988, **15**(1):247–267.

[2] Jiang Y, Yang X, Liu B, et al. Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. ND6: gene sequence and enzyme characterization. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**(8):1798–1800.

[3] Uz I, Duan YP, Ogram A. Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **185**(2):231–238.

[4] Harwood CS, Parales RE. The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol*, 1996, **50**:553–590.

[5] 张心平,岳晓含,黄今勇,等. 萘降解质粒 pND6 的分离和鉴定. 应用与环境生物学报, 2000, **6**(2):187–190.

[6] Li W, Shi J, Wang X, et al. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Gene*, 2004, **336**(2):231–240.

[7] Dennis JJ, Zylstra GJ. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *J Mol Biol*, **341**(3):753–768.

[8] Sota M, Yano H, Ono A, et al. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. *J Bacteriol*, 2006, **188**(11):4057–4067.

[9] 蔡宝立,王淑芳,黄今勇,等. 黄杆菌 ND3 菌株的分离和降解萘的研究. 环境化学, 1998, **17**(5):434–438.

[10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Press,

- [11] Zhao H , Chen D , Li Y , *et al.* Overexpression , purification and characterization of a new salicylate hydroxylase from naphthalene-degrading *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Microbiol Res* , 2005 , **160** (3) 307 – 313.
- [12] Dorn E , Knackmuss HJ. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. *Biochem J* , 1978 , **174** (1) 85 – 94.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* , 1976 , **72** (1) 248 – 254.
- [14] Wiseman A. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2nd ed. England , Chichester : Ellis Horwood Limited , 1985.
- [15] Eulberg D , Golovleva LA , Schlomann M. Characterization of catechol catabolic genes from *Rhodococcus erythropolis* 1CP. *J Bacteriol* , 1997 , **179** (2) 370 – 381.
- [16] Georgiou G , Valax P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* , 1996 , **7** (2) 190 – 197.
- [17] Shen XH , Liu ZP , Liu SJ. Functional identification of the gene locus *ncg12319* and characterization of catechol 1,2-dioxygenase in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Lett* , 2004 , **26** (7) 575 – 580.
- [18] Strachan PD , Freer AA , Fewson CA. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its *catA* gene. *Biochem J* , 1998 , **333** (3) 741 – 747.
- [19] An HR , Park HJ , Kim ES. Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (*catA*) from *Streptomyces setonii*. *FEMS Microbiol Lett* , 2001 , **193** (1) 17 – 22.
- [20] Cha CJ. Catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* N75 capable of metabolizing alkyl-substituted catechols. *J Microbiol Biotechnol* , 2006 , **16** (5) 778 – 785.
- [21] Ngai K-L , Neidle EL , Ormston LN. Catechol and chlorocatechol 1,2-dioxygenases , *Methods Enzymol* , 1990 , **188** :122 – 126.
- [22] Williams PA , Catterall FA , Murray K. Metabolism of naphthalene , 2-methyl-naphthalene , salicylate , and benzoate by *Pseudomonas* PG : regulation of tangential pathways. *J Bacteriol* , 1975 , **124** (2) : 679 – 685.

Cloning and expression of *catA* gene from *Pseudomonas putida* ND6 and study on the catechol cleavage pathway

ZHAO Hua-bing^{1 2 3} , CHEN Wei² , CAI Bao-li^{1 3*}

(¹ College of Life Sciences , ² College of Environmental Science and Engineering , ³ Key Laboratory of Bioactive Materials of Ministry of Education , Nankai University , Tianjin 300071 , China)

Abstract :Catechol 1,2-dioxygenase gene , *catA* , from naphthalene-degrading plasmid pND6-1 of *Pseudomonas putida* ND6 , was cloned and expressed in *Escherichia coli* . Enzymic properties of the expressed product were investigated. The results indicated that the K_m and V_{max} of the enzyme are 0.019 mol/L and 1.434 mol/(min · mg) , respectively. The enzyme possessed a thermal stability and 93.7% activity was retained after incubating at 50℃ for 45min. Fe^{2+} could enhance the enzyme activity by 292% . The enzyme displayed a lower activity against 4-chlorocatechol and belongs to group I of catechol 1,2-dioxygenases. When naphthalene was used as a substrate for growth of strain ND6 , catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase activities were both detected in their crude extract. However , when strain ND6 was grown on benzoate , ρ -hydroxybenzoic acid or phenylacetic acid as a sole source of carbon the activity of catechol 1,2-dioxygenase was much higher than that of catechol 2,3-dioxygenase. These indicated that strain ND6 is able to metabolize naphthalene by catechol *meta*- and *ortho*-cleavage pathways. When benzoate , ρ -hydroxybenzoic acid and phenylacetic acid were used as growth substrates , strain ND6 degrades these compounds only by catechol *ortho*-cleavage pathway .

Keywords : *Pseudomonas putida* ND6 ; catechol 1,2-dioxygenase ; *catA* ; catechol *ortho*-cleavage pathway