

## 一种 pH 和热稳定的联苯水解酶的纯化及其特征

杨秀清, 李鹏丽, 郑媛, 沈翀

(山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

**摘要:**【目的】通过联苯水解酶的表达, 纯化, 化学修饰以及酶学性质研究, 以期了解水解酶的结构和功能, 为其定向改造, 获得高效的和能够拓宽底物范围的新突变酶奠定基础。【方法】将水解酶基因在大肠杆菌 BL21 (*Escherichia coli* BL21) 中进行异源表达, 表达产物经离子交换层析以及凝胶层析后进行酶学特性研究, 同时通过圆二色谱法对该酶二级结构与热稳定性之间的关系进行分析。【结果】经 Q Sepharose 和 Sephacryl S-300 两步纯化获得了电泳纯的联苯水解酶 (biphenyl hydrolase, BphD), SDS-PAGE 鉴定其单体为 31 kDa, Sepharose 12 凝胶柱层析分析其为四聚体。该酶最适反应温度和最适 pH 分别为 80°C 和 9, 在 pH 4-11 的缓冲液中酶活相对稳定。该酶在 60°C 温浴 1 h, 酶活剩余 90%, 而在 70°C 温浴时, 半衰期为 1 h, 是迄今为止在红球菌中报道的唯一一例热稳定性高的水解酶。圆二色谱显示该酶以  $\alpha$ -helix 占主导地位, 当温度升高到 70°C 时, 其二级结构发生了明显的变化, 75°C 和 80°C 时 BphD 的结构已经遭到严重的破坏。序列比对表明: Ser, His, Asp 以及 Trp 残基在几种同源水解酶中相对保守。化学修饰表明 Ser, His, Asp 在 R04 水解酶催化底物水解过程中担任重要角色, Trp 残基可能位于酶的活性中心, 并作为关键氨基酸参与底物的水解过程。【结论】获得了电泳纯的 BphD, 其 pH 稳定性以及耐高温特性在同源水解酶中较为罕见, 色氨酸关键氨基酸的地位也为进一步了解该酶转化底物的机制奠定了一定的基础。

**关键词:** 联苯水解酶; 热稳定性; 二级结构; 化学修饰

**中图分类号:** Q814      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1633-09

多氯联苯 (PCBs) 是联苯的衍生物, 具有化学性质稳定, 绝缘性能优良, 抗热抗酸碱等特点, 被广泛应用于电工业、塑料加工业、化工业以及印刷等许多领域。但是由于其具有亲脂性、生物难降解性以及环境持久性和远距离输送性, 极易通过食物链被生物富集、放大, 又被公认为全球性环境污染物之一。与化学和物理处理方法相比, 多氯联苯的微生物治理具有环境破坏小, 经济有效, 而且不会形成二次污染等特点, 是目前治理 PCBs 污染最具有吸引力和广阔发展前景的环境策略<sup>[1-3]</sup>。研究发现 *bph* 途径是典型的微生物体内酶系催化联苯以及多氯联苯的有氧代谢途径, 联苯水解酶 (biphenyl hydrolase,

BphD) 是 *bph* 途径中的第 4 个酶。该酶主要负责催化黄色开环化合物 2-羟基, 6-氧, 6-苯基-2, 4-己二烯酸 (HOPDA) C-C 键断裂生成 2-羟基-2, 4-己二烯酸 (HPD) 以及苯甲酸<sup>[4-5]</sup> (图 1)。

然而, 最近的研究发现, 某些 PCBs 在降解过程中会积累大量的黄色物质, 分析表明它们是 HOPDA 的氯代衍生物。Seeger 的研究表明, 当联苯降解菌洋葱伯克霍尔德菌 LB400 (*Burkholderia cepacia* LB400) 同一定量的 PCB 同源物共同培养后黄色物质大量积累<sup>[6]</sup>。我们在研究红球菌 R04 (*Rhodococcus* sp. R04) 对 7 种 PCB 的转化时, 也发现黄色物质积累在培养液中<sup>[7]</sup>。对此人们提出在

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30800030); 山西省青年科技基金 (207021030); 山西省基金 (2007031003)

**作者简介:** 杨秀清 (1975 -), 男, 山西代县人, 副教授, 博士, 专业方向为生物化学与分子生物学。Tel: +86-351-7017661; Fax: +86-351-7018268; E-mail: xiuqyang@sxu.edu.cn

**收稿日期:** 2010-05-24; **修回日期:** 2010-06-21

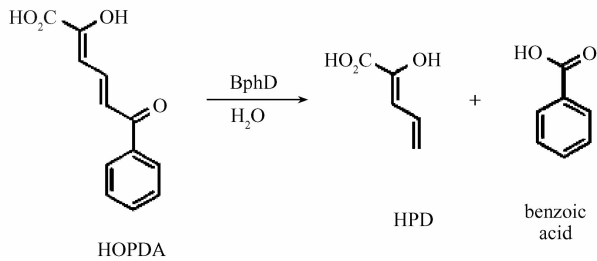


图1 BphD 水解 HOPDA 生成 HPD 和苯甲酸

Fig. 1 HOPDA is decomposed into HPD and benzoic acid by BphD.

降解体系中加入表面活性剂以增加多氯联苯的生物可利用度<sup>[8]</sup>,或是改变多氯联苯降解酶基因的调控系统以提高这些相关酶的活性等<sup>[9]</sup>来解决黄色物质积累的问题。但是这些方法并未使得该现象得到根本上的改观,因此我们推测 HOPDA 积累的现象可能与 BphD 的结构以及其底物特异性有一定的联系。目前基于对水解酶 BphD 结构和功能的研究以及其阻抑 HOPDA 转化机制的探讨等问题也成为了人们研究的焦点。Seah 和 Eltist 的研究表明 BphD 对不同的底物具有选择性<sup>[4]</sup>,BphD 催化底物时受底物空间位阻影响,且 HOPDA 在被水解之前其结构受 His 调控经历烯醇式和酮式的互变<sup>[10]</sup>。Bugg 对 MhpC (BphD 的同源水解酶)的催化机制进行研究时表明:Ser110 在催化过程中起重要作用,且 His263 负责底物的酮式化<sup>[11]</sup>。本实验室从 *Rhodococcus* sp. R04 基因组中克隆得到水解酶基因 bphD,并在大肠杆菌中成功表达。为了进一步分析该酶的性质以及其动力学特征,对 BphD 进行了分离纯化,同时对其一般性质和关键氨基酸残基进行初步研究,为定向改造水解酶和分析其转化底物的动力学机制奠定一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:**菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BL21(DE3)和质粒 pBV220 由本实验室保存。

**1.1.2 培养基:**LB 培养基用于大肠杆菌培养,固体培养基中加入 1.5% (m/v)的琼脂粉。氨苄青霉素使用终浓度为 50 mg/L。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**限制性内切酶, *Taq* DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, DNA 分子质量标准等购自 TaKaRa 公司;蛋白质分子质量标准购自 Fermentas 公司;酵母提取物,胰蛋白胨购自 Oxoid 公司;2,3-二羟基联苯购自 Wako 株式会社,其他试剂均为国

产分析纯。日立 UV-2010 分光光度计购自 Hitachi Instruments 公司, AKTA Explorer 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司, JY-II 超声波细胞粉碎机购自宁波新芝科器研究所,圆二色谱仪购自 Biologic Science Instruments 公司,高效液相色谱仪购自美国 Waters 公司。

### 1.2 *Rhodococcus* sp. R04 水解酶基因 bphD 的克隆

根据水解酶基因 bphD 基因序列<sup>[12]</sup>设计引物用于构建重组质粒,上游:5'-ACGAATTCATGATGGCGATACGCATAT-3' (*Eco*R I 酶切位点),下游:5'-TGCTGCAGGACGAACAGGTTTCT-3' (*Pst* I 酶切位点),由赛百盛基因技术公司合成。以红球菌 R04 基因组为模版,扩增 bphD 基因序列。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;98 $^{\circ}$ C 10 s,68 $^{\circ}$ C 4 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.3 水解酶的表达

**1.3.1 水解酶基因 bphD 表达载体的构建:**PCR 产物与 pMD19-T 进行连接,筛选阳性克隆并测序。将 bphD 基因和载体 pBV220 分别用 *Eco* RI 和 *Pst* I 进行双酶切,在体外进行连接,转化感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆。将该阳性克隆命名为 pBV220-bphD。

**1.3.2 水解酶在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的诱导表达:**pBV220-bphD 重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3),挑取单菌落到含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后以 2% 的接种量转接入新鲜的 LB 培养基中,30 $^{\circ}$ C 培养至菌体光密度值  $OD_{600}$  约为 0.6-0.8 时,于 38 $^{\circ}$ C 继续培养 5 h,取适量菌液进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.4 BphD 的纯化

将发酵液(1L)于 4 $^{\circ}$ C,8228  $\times$  g 离心 10 min 收集菌体,最后用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液悬浮,冰浴中超声破碎细胞。4 $^{\circ}$ C,16000  $\times$  g 离心 30 min,收集上清液,上清液即为粗酶液。粗酶液首先上样于预先以 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液平衡的 Q Sepharose,在 AKTA Explorer 上进行离子交换层析,以 0 mol/L-0.5 mol/L NaCl $\cdot$ Tris-HCl (pH 7.5) 进行线性梯度洗脱并收集活性部分。活性部分浓缩后,将其上样于预先以 150 mmol/L NaCl,20 mmol/L PBS (pH 7.5) 缓冲液平衡的 Sephacryl S-300,接着用同样的缓冲液洗脱目的蛋白。收集活性部分并进行 SDS-PAGE 鉴定,纯化样品于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。Bradford<sup>[13]</sup>法测定每一步纯

化收集液的蛋白浓度,以牛血清白蛋白(BSA)为标准,绘制标准曲线。

### 1.5 底物 HOPDA 的制备及分离纯化

2,3-二羟基联苯双加氧酶基因 *bphC* 在 *E. coli* TG1 中进行表达,产物按相关文献进行纯化<sup>[14]</sup>。在 2 mL 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 的缓冲体系中加入 10 $\mu$ L 10 mmol/L 的 2,3-二羟基联苯 (DHB) 溶液,并加入一定量的上述 BphC,435nm 处检测反应液吸光值不再变化,认为反应已经全部完成<sup>[4]</sup>。用 12 mol/L HCl 调 HOPDA 溶液 pH 至 2-3,然后用 0.5 倍体积的乙酸乙酯抽提 3 次。向抽提到的有机提取物中加入无水 MgSO<sub>4</sub>,旋转蒸发至其干燥。将干燥的干粉用己烷溶解,进行 HPLC 分析鉴定。色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD C18 液相色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm),流动相为甲醇:水 (0.5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) = 80:20,流速 1 mL/min<sup>[5]</sup>。

### 1.6 BphD 的酶活测定

反应体系为 20 mmol/L, pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲体系中,加入适量酶液及一定浓度的 HOPDA ( $\epsilon = 25.7 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),反应温度为室温,反应时间为 10 s,435 nm 处测定底物 HOPDA 吸光值的变化。酶活单位定义:每分钟转化 1  $\mu$ mol 底物所需的酶量定义为一个酶活单位<sup>[4]</sup>。

### 1.7 酶学性质的研究

**1.7.1 最适酶促反应温度及 pH 测定:**反应体系于 30 $^{\circ}\text{C}$  - 90 $^{\circ}\text{C}$  温度梯度 (间隔 10 $^{\circ}\text{C}$ ) 下反应。pH 梯度选定为 6 - 11, pH 6, 7, 8 的 100 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8, 9 的 100 mmol/L Tris-HCl 以及 pH 9, 10, 11 的 100 mmol/L Gly-NaOH。测定不同温度或 pH 条件下的酶活性,以最高的酶活为 100 %,不同温度或 pH 处理下相对酶活 (%) = (各温度或 pH 条件下的酶活/最高酶活)  $\times$  100%。

**1.7.2 pH 稳定性:**BphD 置于不同 pH 值的缓冲液中,4 $^{\circ}\text{C}$  温浴 24 h,测定 BphD 的剩余酶活。pH 3, 4, 5 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸, pH 6, 7 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8, 9 的 Tris-HCl 以及 pH 10, 11 的 Gly-NaOH。以未处理酶液的酶活力为 100 %,剩余酶活 (%) = (各 pH 条件下的剩余酶活/最初酶活)  $\times$  100%。

**1.7.3 热稳定性:**将 BphD 置于不同温度 (40 $^{\circ}\text{C}$  - 70 $^{\circ}\text{C}$ ) 分别温浴 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、90 min 和 120 min,样品冷却至室温测剩余酶活力。以未处理酶液的酶活力为 100 %,剩余酶活 (%) = (各温度条件下的剩余酶活/最

初酶活)  $\times$  100%。

对该酶不同温度 (25 $^{\circ}\text{C}$  - 80 $^{\circ}\text{C}$ ) 下的圆二色谱进行了检测。升温时,温度以 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  加热,并在到达温度点后保温 7 - 8 min。CD 数据以平均残基摩尔椭圆值 [ $\theta$ ] 表示<sup>[15]</sup>。

**1.7.4 天然分子量的测定:**以 catalase (230 kDa), lactate dehydrogenase (140 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumin (45 kDa) 做标准分子量,用 Superose 12 (HR) 凝胶柱测定 BphD 的分子量。

**1.7.5 金属离子以及一些化学试剂对 BphD 酶活性的影响:**配制终浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L 的金属离子和抑制剂的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液,与一定量的 BphD 酶液在 25 $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 30 min 后,测量 BphD 剩余酶活力。以 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液作为对照。每种金属离子的两个剂量都设 3 个平行,结果以平均值  $\pm$  标准偏差计。

**1.7.6 BphD 的化学修饰:**将终浓度分别为 0.1 mmol/L 和 0.5 mmol/L 的二乙基焦碳酸酯 (DEPC), 溴-2-羟-5-硝基苯 (BHN), N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS), 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 二环己基碳二亚胺 (DCC) 以及二硫苏糖醇 (DTT) 与适量 BphD 在 25 $^{\circ}\text{C}$  保温 30 min 后测量剩余酶活力。以 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液代替化学修饰剂测得的酶活力为 100 %,计算加入不同化学修饰剂后的相对酶活力。实验重复 3 次,取平均值。

**1.7.7  $K_m$  的测定:**配制一系列浓度梯度的 HOPDA 溶液,在 pH 7.5, 25 $^{\circ}\text{C}$  的条件下反应,测定 BphD 反应的初速度,按照 Eadie-Hofstee 法作图,得到  $K_m$  值。实验重复 3 次测定底物动力学参数,取平均值,结果以平均值  $\pm$  标准偏差计。

## 2 结果

### 2.1 *Rhodococcus* sp. R04 水解酶基因扩增及重组子 pBV220-bphD 鉴定

以 *Rhodococcus* sp. R04 基因组 DNA 为模板扩增出一条约 850 bp 大小的 DNA 片段。将目的基因与质粒 pBV220 进行体外连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 进行抗性筛选获得重组子 pBV220-bphD。对该重组质粒进行单、双酶切验证,电泳显示重组质粒 pBV220-bphD 构建正确。

### 2.2 BphD 在大肠杆菌中的表达及纯化

将重组质粒 pBV220-bphD 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 经 38 $^{\circ}\text{C}$  诱导后,超声破碎细胞。取全细胞裂解液、全细胞裂解液上清及沉淀进行 SDS-PAGE

电泳分析,结果显示目的蛋白主要为可溶状态,并大量存在于破碎上清中,其分子量大小与核酸序列推导分子量 31 kDa 相符。

粗酶液经 Q Sepharose 和 Sephacryl S-300 纯化

后得到比活为 5.40 U/mg, 纯化倍数为 5.02 的 BphD, 回收率达到 50 % 以上(表 1)。纯化后的 BphD 经 SDS-PAGE 分析为一条带(图 2), 表明该酶已达到电泳纯。

表 1 *Rhodococcus* sp. R04 HOPDA 水解酶的纯化 (1L)

Table 1 Purification of HOPDA hydrolase from *Rhodococcus* sp. R04

Purification step	Total protein/mg	Activity/U	Specific activity/(U/mg)	Purification (fold)	Yield/%
Supernatants	456.95	493.51	1.08	1.00	100
Q Sepharose	115.12	386.81	3.36	3.12	78.54
Sephacryl S-300	46.24	249.70	5.40	5.02	50.73

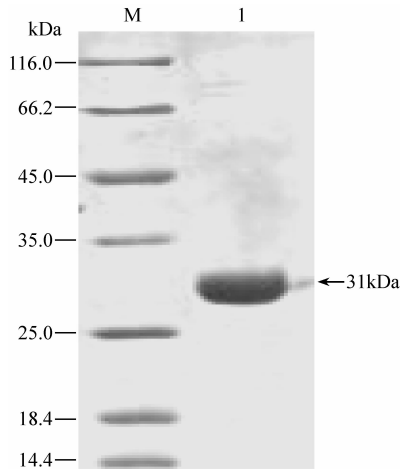


图 2 BphD 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified BphD. M. Molecular weight markers; I. Purified BphD.

## 2.3 BphD 的酶学性质

**2.3.1 最适温度和最适 pH:** 在不同温度梯度和不同的 pH 梯度下测定酶活性, 结果显示: BphD 最适温度为 80°C, 最适 pH 为 9 (Tris-HCl)。

**2.3.2 pH 稳定性:** BphD 在 pH 3 的缓冲液中温浴 24 h 后, 其酶活力几乎全部丧失, 在 pH 3.5 的缓冲液中温浴后酶活力还剩余 60 %, 而在 pH 4 - 11 的缓冲液中温浴 24 h, 酶活损失不大, 与处理前相比

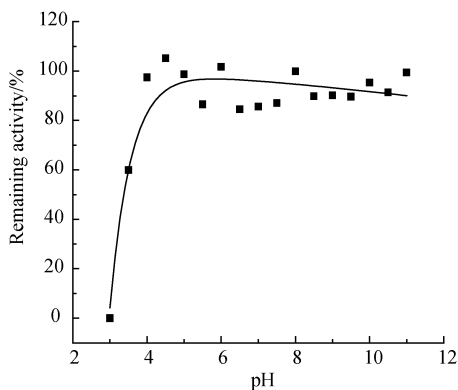


图 3 *Rhodococcus* sp. R04 BphD 的 pH 稳定性

Fig. 3 The pH stability of *Rhodococcus* sp. R04 BphD.

酶活大部分在 90 % 以上, 如图 3 所示, 表明该酶是一种 pH 稳定的水解酶。

**2.3.3 热稳定性:** BphD 分别在 40°C, 50°C 温浴 2 h, 酶活没有明显变化, 在 60°C 温浴 1 h, 酶活剩余 90 %, 2 h 后, 酶活仍剩余 50%。在 70°C 温浴时, 半衰期为 1 h, 2 h 后酶活几乎全部损失(图 4)。表明该酶是一个热稳定性比较高的酶, 也是迄今为止在红球菌中报道的唯一一例热稳定性高的水解酶。

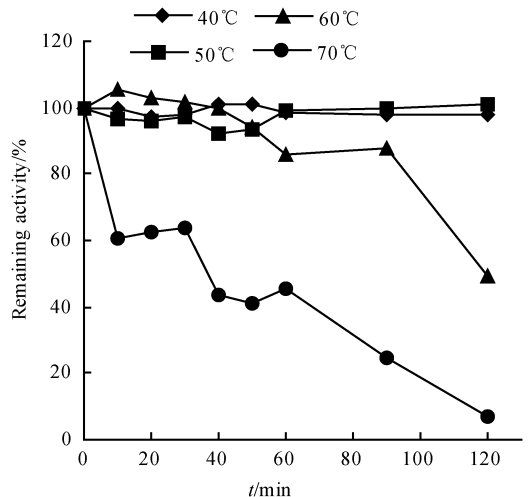


图 4 *Rhodococcus* sp. R04 BphD 的热稳定性

Fig. 4 The thermostability of *Rhodococcus* sp. R04 BphD.

为了探讨该酶热稳定性高的机制, 对该酶不同温度下的圆二色谱进行了检测, 结果见图 5。室温下, *Rhodococcus* sp. R04 BphD 的圆二色谱在 208 nm 和 222 nm 为典型的双负峰, 表明该酶是一个以  $\alpha$ -helix 占主导的蛋白。随着温度升高, 从室温到 60°C, 该酶的二级结构几乎没有太大的变化, 但是, 当温度达到 65°C 时, 222 nm 的负峰开始有向上的位移, 70°C 时, 208 nm 和 222 nm 的负峰都脱离了原来的位置并上移, 此时, 水解酶的二级结构发生了很大的变化(图 5)。75°C 和 80°C 时, 208 nm 和 222 nm 的负峰继续上移, 直到不再发生明显的变化, 说明此时 BphD 的二级结构已经遭到严重的破

坏。这与以酶活为表征的 BphD 的热稳定性实验结果相符。以温度为横坐标,不同温度下 BphD 圆二色谱 222 nm 处的摩尔椭圆值  $[\theta]$  为纵坐标,绘制温度对该酶残基椭圆率影响曲线,结果见图 6。由图可知,该酶椭圆率在 40℃ 时开始发生变化,随着温度的逐渐升高,椭圆率值不断增大,当温度达到 75℃ 时椭圆率不再变化,在此条件下,该酶二级结构已经严重破坏,活性丧失也特别快。

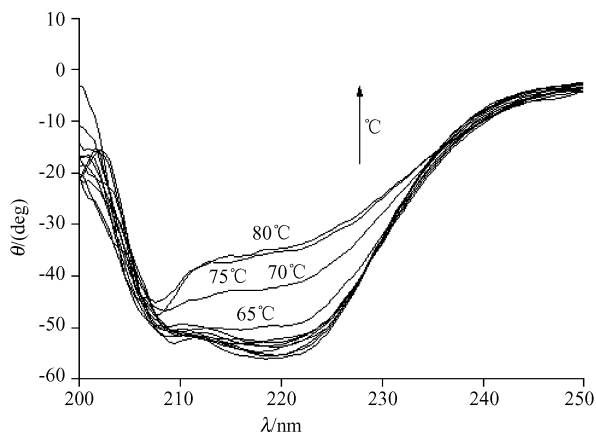


图 5 不同温度下 *R. R04* BphD 的圆二色谱

Fig. 5 The circular dichroism of *R. R04* BphD at the different temperature.

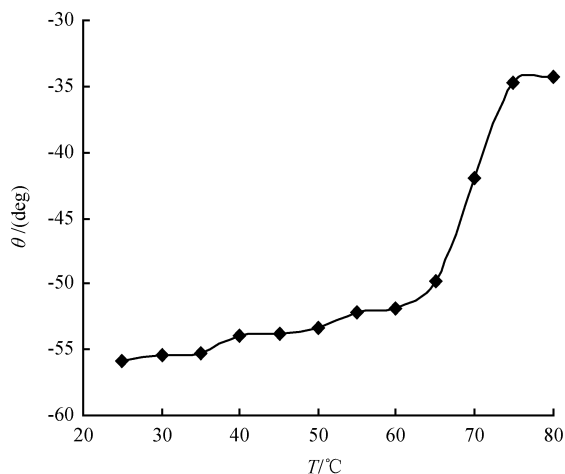


图 6 温度对 *R. R04* BphD 残基椭圆率的影响

Fig. 6 Effects of temperature on residue ellipticity of *R. R04* BphD.

**2.3.4 天然分子量的测定:** BphD 经 Superose 12 分子凝胶柱层析,与标准分子量比较计算得出 BphD 天然分子量为  $120 \pm 5$  kDa。

**2.3.5 金属离子以及化学试剂对 BphD 活性的影响:** 二价金属离子,螯合剂 EDTA,氧化剂  $H_2O_2$  以及变性剂 SDS 分别与 BphD 于 25℃ 保温 30 min 进行酶活力测定。实验结果如表 2 所示:低浓度 (1 mmol/L) 的金属离子除  $Mn^{2+}$  对 BphD 的活性有微

弱促进作用外,其它的对其活性均有一定的抑制,其中以  $Cu^{2+}$  的抑制作用最为明显。高浓度 (5 mmol/L) 的  $Ni^{2+}$  和  $Co^{2+}$  强烈抑制 BphD 酶活。SDS 对 BphD 强烈抑制,即使是 1 mmol/L 即可抑制该酶 90% 的活性。EDTA 对酶活性影响不明显,表明该酶的金属依赖性不强。另外,1 mmol/L 的  $H_2O_2$  并不影响 BphD 酶活,表明该酶的抗氧化能力较强。

表 2 金属离子和抑制剂对 BphD 活性的影响

Table 2 Effects of some metal ions and inhibitors

Metal ions	Relative activities		Inhibitors	Relative activities	
	1 mmol/L	5 mmol/L		1 mmol/L	5 mmol/L
Control	100		SDS	$9 \pm 0.2$	$3 \pm 0.1$
$Cu^{2+}$	$38 \pm 1.8$	ND	EDTA	$109 \pm 4.7$	$109 \pm 4.6$
$Zn^{2+}$	$62 \pm 1.9$	ND	$H_2O_2$	$103 \pm 4.2$	$17 \pm 1.3$
$Mn^{2+}$	$107 \pm 3.1$	$84 \pm 2.1$			
$Fe^{3+}$	$74 \pm 2.3$	ND			
$Ni^{2+}$	$84 \pm 2.8$	$16 \pm 0.9$			
$Ca^{2+}$	$81 \pm 2.2$	ND			
$Mg^{2+}$	$83 \pm 4.1$	ND			
$Co^{2+}$	$89 \pm 3.5$	$38 \pm 1.3$			

ND, not determined.

**2.3.6 BphD 的序列比对:** 将 *R. R04* BphD 基因序列与已报道的几种水解酶一级结构序列进行比对,结果如图 7,几种不同来源的水解酶的总相似性为 67.09%。*R. R04* BphD 与 *E. coli* MhpC 的相似性最低,为 30.69%。在红球菌中与 *R. RHA1* BphD 的同源性最高,为 47.85%,与目前研究最热的 *P. LB400* BphD 相似度也不高,仅为 36.46%。此外,它们都有相似的保守氨基酸,特别是 His47, Ser119, Asp244 和 His272 和 Trp273 (以 *E. coli* MhpC 一级结构序列为序)在所有的环裂水解酶中完全保守,表明这些氨基酸在底物水解过程中扮演着重要的角色。

**2.3.7 BphD 的化学修饰:** DEPC 等 6 种化学修饰剂对 BphD 进行修饰的结果见表 3。实验中用苯甲基磺酰氟 (PMSF) 对丝氨酸进行修饰,当 PMSF 浓度为 0.1 mmol/L 的时候,酶的相对活力剩余 3%,表明 *Rhodococcus* sp. R04 联苯水解酶和其它联苯水解酶一样,丝氨酸残基是催化所需的关键氨基酸。用二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 对组氨酸进行修饰,当 DEPC 浓度为 0.1 mmol/L 时酶活几乎没有变化,当 DEPC 浓度增加至 0.5 mmol/L,剩余酶活约为 56%,推测组氨酸残基可能位于酶的活性中心。用二环己基碳二亚胺 (DCC) 对水解酶羧基进行修饰,当 DCC 的浓度为 0.1 mmol/L 时,活性剩余为 60%,当 DCC 浓度达到 0.5 mmol/L 时,剩余活性约为 55%,推测

<i>E. coli</i> -MhpC	MQEKMMSYQPQTEAATSRLNVEEAGKTLRIHFNDGCGQDETIVVILHGGSPGPTGWANFSR	61
<i>M. agy99</i> -bphD	MTVTQSKTAEHFFESTSRYAEDVDGFLKLYHEAGVGNDDQIVVILHGGSPGASWSNFAR	61
<i>N. IFM</i> -BphD	...MTSTAELTYESTSRYAQ..VRPDLKLYHEAGVNGPITIVVILHGGSPGASWSNFAR	55
<i>P. LB400</i> -BphD	.....MTADTESSTSKFVKINEKGFSDENIHYNEAGNGETIVVILHGGSPGAGGSNYR	54
<i>R. RHA1</i> -BphD	...MTTTEEALTYESTSKFAQ..VRPHLKLYHEAGVGNDDTIVVILHGGSPGASWSNFAR	56
<i>R. PR4</i> -BphD	...MTTTEEALTYESTSRFAQ..VRPDLKLYHEAGVGNDDTIVVILHGGSPGASWSNFAR	56
<i>R. R04</i> -BphD	..MMGDTHIGFTINLASRTVAVQGT...KLHFHEAGVGE..TLVILHGGSPGASGSNFRGG	53
Consensus	t t lhg gpga w n	
<i>E. coli</i> -MhpC	NIDPVEAGYRVIILDCPGNGKSDSVVNSGFSFDLNARILKSVVDQLDI.AKIHLLGNMVG	121
<i>M. agy99</i> -bphD	NIEVLAQQFHVLAVDQPGYGHSDKRAEHGQFNHYAARALKELFDQLGL.GRVPVVGNSLIG	120
<i>N. IFM</i> -BphD	NIPVLAQNFIHVAVDQPGYGRSDKDFVDHPQYFVSHSAALKDLDLTLGVTERVHLLGNLSIG	115
<i>P. LB400</i> -BphD	NVGPVVDAGYRVIILKSPGFNKSDAVVMDEQFGLVNAARAVKGLMDALDI.DRAHIVGNMVG	114
<i>R. RHA1</i> -BphD	NIPVLAQKFIHVAVDQPGYGLSDKFTPEHPQYFVHSASALKDLDLTLGVGGRVHLLGNLSIG	116
<i>R. PR4</i> -BphD	NIPVLAQKFIHVAVDQPGYGLSDKFTPEHPQYFVHSASALNDLDTLTLTAGRVHLLGNLSIG	116
<i>R. R04</i> -BphD	NVAALAEQLHVVVVDQPGYGLADKFEFDGDTYWFARCIADLLSSIGVEKA.FEIVGNMVG	112
Consensus	n v d pg d a l gns g	
<i>E. coli</i> -MhpC	GHSSVAFTLKWPERVGVKLVLMGGGIGGMSLFTFTEGTRRNQLYRQ..FTIENLKLMD	180
<i>M. agy99</i> -bphD	CGTAVRFALDYEDRAGRIVLMGPGGLSINLFAFDFTEGVRLGKFSVA..FTRENLEAFRL	179
<i>N. IFM</i> -BphD	CGAAVRFALDYEDRAGKIVLMGPGGLSMNAYAFDFTEGVRLSRENFE..FTRQNLEAFRL	174
<i>P. LB400</i> -BphD	GATAINFALEYEDRIGKILMGPGLGSPMFAEMEGELKLLFKLYAE..FSYETLQKMLQ	173
<i>R. RHA1</i> -BphD	CGAAVRFALDYEDRAGRIVLMGPGGLSVNLFAPDFTEGVKNIGKFGYQ..FTRENLEAFRL	175
<i>R. PR4</i> -BphD	CGAAVRFALDYEDRAGRIVLMGPGGLSVNLFAPDFTEGVKNIGKFSYQ..FTRENLEAFRL	175
<i>R. R04</i> -BphD	CGTTVRLALDREDICIDRMILMGPAGVSVNVVTFEESGLKILSSFYDAPGESRDRMAAFIR	173
Consensus	g l p lmg p p eg k l p	
<i>E. coli</i> -MhpC	IFVFDTSDDLIDALFEARLNMLSRDHLENFVK...SLEANPKQFFDFGPRLAETKAQTLI	238
<i>M. agy99</i> -bphD	VMVYDQKLIIDPELVDQRFELA.RTPESLAATRAMGKSFAAADFELGMMWREYVKLRQPVLL	239
<i>N. IFM</i> -BphD	IMVFDQKLIIDDELIDBRFASA.ATPEALAAATRAMGKSFAAGPDFELGMLWRDAYKLRQPVLL	234
<i>P. LB400</i> -BphD	VELYDQSLIDTEELLQGRWEAICRQPEHKNFELI...SAQKAPLSTWDVTARLGEIKAKTFI	231
<i>R. RHA1</i> -BphD	IMVFDQKLIIDDELIDBRFAAA.STPESLAAAAMGKSFSADDFELGMLWRDAYKLRQPVLL	235
<i>R. PR4</i> -BphD	IMVFDQKLIIDPELVDBRFAAA.STPESLAAAAMGKSFSGDFELGMLWRDAYKLRQPVLL	235
<i>R. R04</i> -BphD	MMVFDQFAMVIDELITERLEAA.MDPE..ARAGALRAVRSIMSSPDAELWRHLHEVQHETLL	231
Consensus	d t l r	
<i>E. coli</i> -MhpC	VWGRDRFVEMDAGIRLLSGIAGSDELHIERDCGHWAQWHDADFNQLVINFLARF....	293
<i>M. agy99</i> -bphD	IWGRDRVNEIDGALVALKTIIPRAQLHVFGCCGHWAQVBFKDFENRLTIIDFLGGAR...	295
<i>N. IFM</i> -BphD	IWGRDRVNEIDGALVATKMIIPRVQLHVFGCCGHWAQLEKDFENRLTIIDFLSGPGKES	293
<i>P. LB400</i> -BphD	TWGRDRFVEMDHGKLIWNIDDAHLVFSKCGHWAQWHDADFNRLVIDFLRHA....	286
<i>R. RHA1</i> -BphD	IWGRDRVNEIDGALVALKMIIPRAQLHVFGCCGHWAQLEKDFENRLTIIDFLDGGK..	292
<i>R. PR4</i> -BphD	IWGRDRVNEIDGALVALKMIIPRAQLHVFGCCGHWAQLEKDFENRLTIIDFLDGGK..	292
<i>R. R04</i> -BphD	VWGRDRVNEIDGGIFALQRMPNADLHVFSRCGHWAQWDRDFENRLTIIDFFTR....	285
Consensus	wgr dr p d lh f cghwaq e d fn l f	

图7 *R. R04* BphD 同已报道的 HOPDA 水解酶的氨基酸序列比对

Fig. 7 Alignment of the amino acid sequences between *R. R04* BphD and other HOPDA hydrolases.

羧基残基也可能位于酶的活性中心。用溴-2-羟-5-硝基苯(BHN)作为巯基修饰剂对该酶进行修饰,当BHN的浓度为0.5 mmol/L时,酶活力仍没有明显的变化,表明活性中心无巯基。用N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)特异地修饰色氨酸残基结果显示:当NBS浓度为0.1 mmol/L时,酶剩余活力为12%,当浓度达到0.5 mmol/L时,活力剩余6%,表明色氨酸残基也可能位于酶的活性中心,并处于一个关键的位置。本实验中,DTT并没有使酶活力明显下降,在浓度为0.5 mmol/L时,酶活力还保持107%,表

明该水解酶不存在链内二硫键。

表3 化学修饰剂对水解酶 BphD 活性的影响

Table 3 Effects of chemical modifier on BphD activity

Chemical modifier	Relative activities	
	0.1 mmol/L	0.5 mmol/L
Control	100	100
DEPC	98 ± 3.2	56 ± 1.6
NBS	12 ± 1.3	6 ± 0.8
PMSF	3 ± 0.7	3 ± 0.6
DCC	60 ± 2.6	55 ± 1.8
BHN	98 ± 3.8	102 ± 5.0
DTT	102 ± 4.1	107 ± 4.7

**2.3.8 动力学参数的测定:**以 HOPDA 作底物时, *R. sp.* R04 BphD 的  $K_m$  值为  $0.44 \pm 0.09 \mu\text{mol/L}$ ,  $k_{\text{cat}}$  为  $2.8 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$ 。与已知的 *B. cepacia* LB400 BphD 的  $K_m$  值 ( $0.19 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ ) 和  $k_{\text{cat}}$  值 ( $4.18 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$ )<sup>[16]</sup> 相比较,二者在数量级上一致,数值也相差不大,说明它们催化 HOPDA 的能力基本相同。

### 3 讨论

本文质粒构建过程中选用的原核表达载体为 pBV220。选用此质粒鉴于其分子量小,易转化;含 PRPL 双启动子,使外源基因的表达受温敏诱导系统的调控,并且其表达产物为非融合蛋白<sup>[17-18]</sup>,在高温诱导表达时,大肠杆菌内源蛋白不易表达,而目的蛋白则在热诱导表达载体的启动下大量表达,为后续目的蛋白的快速纯化奠定了良好的基础。本文选择离子交换层析结合凝胶层析即获得了电泳纯的蛋白,步骤简单,操作方便,大大减少酶的损失,而且回收率高,有利于 BphD 的进一步利用。

酶学性质研究表明 *Rhodococcus sp.* R04 BphD 最适酶促反应温度为  $80^\circ\text{C}$ 。该酶在  $40^\circ\text{C}$  和  $50^\circ\text{C}$  温浴 2 h,酶活没有任何损失,在  $60^\circ\text{C}$  温浴 1 h,酶活剩余 90%,2 h 后活性仍可剩余 50%,在  $70^\circ\text{C}$  温浴时的半衰期为 1 h。相比之下,红球菌 RHA1 HOPDA 水解酶 BphD 和 EtbD1 的热稳定性则相对较低,在  $60^\circ\text{C}$  温浴 30 min 后酶已全部失活。即使是嗜热菌 *Bacillus sp.* JF8 水解酶 BphD,它在  $60^\circ\text{C}$  温浴 30 min 酶活即剩余 80%,而在  $70^\circ\text{C}$  温浴相同时间后其剩余酶活不足 50%<sup>[19]</sup>。可见, *Rhodococcus sp.* R04 BphD 具有较高的热稳定性,是迄今为止在红球菌中报道的唯一一例热稳定性高的水解酶。本文采用圆二色谱法对该酶二级结构随温度升高的变化情况进行跟踪扫描,并对 BphD 二级结构完整性与酶活性之间的关系进行了探讨。结果显示当二级结构保持完整时, BphD 活性不会受到加热的影响而有所损失。随着温度升高,二级结构发生明显变化,此时酶活有所下降,而当其二级结构遭到破坏后, BphD 活性则急剧降低。应用该方法分析蛋白二级结构特征变化对酶活性的影响,以及与热稳定性的关系,既直观明了又快速准确,使得本实验结果更具有说服力。此外,在 pH 4-11 的范围内 BphD 的活性也保持相对稳定。该酶较高的热稳定性以及 pH 稳定性均说明酶对反应催化条件要求较低,因此可在高温或偏酸偏碱的条件下作用不同的底物,应用

范围也就更为广泛。

对几种同源的联苯水解酶编码基因进行序列比对发现,它们的总相似性为 67.09%,在进化地位上相对保守,且它们都有相似的保守氨基酸,特别是 His47、Ser119、Asp244、和 His272 和 Trp273 在所有的环裂水解酶中完全保守。对该酶不同氨基酸残基进行化学修饰后发现 Ser, His, Asp 以及 Trp 在催化过程中担任重要角色。据文献报道, Ser, His, Asp 在底物催化过程中为催化关键氨基酸。例如 Diaz 报道水解酶 XylF 的 Ser-His-Asp 参与催化过程<sup>[20]</sup>; Dunn 认为水解酶 MhpC 的 Ser110, His263, Asp235, His114 以及 Ser40 可能参与底物催化过程<sup>[21]</sup>; Horsman 的研究表明, His265 在催化过程中参与底物结构烯醇式和酮式的互变,且 Ser-His-Asp 与典型的丝氨酸蛋白酶水解机制相关<sup>[22]</sup>。Trp 在催化过程中的关键作用目前尚未报道。Trp 参与催化反应对于我们进一步研究酶的结构,特征以及其催化底物的动力学性质具有较高的价值,另外 *Rhodococcus sp.* R04 基因中 85 位, 219 位以及 266 位等位置均有 Trp 存在,究竟哪些位置的色氨酸为关键氨基酸以及这些关键氨基酸在酶催化底物过程中的作用还有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 孙立波,张兰英,赵喆,任何军,李爽,周佳欣.一株多氯联苯降解菌的分离鉴定及基因分型.吉林大学学报(*Journal of Jln University of Science Edition*),2007,45(4):691-695.
- [2] 刘亚云,孙红斌,陈桂珠.多氯联苯(PCBs)污染对桐花树幼苗生长的影响.中山大学学报(*Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*),2006,45(5):108-112.
- [3] 马绍赛,周明莹.黄渤海沿海贝类体内多氯联苯(PCBs)残留量评价与分析.海洋环境科学(*Marine Environmental Science*),2009,28(3):261-263.
- [4] Seah SYK, Terracina G, Bolin JT, Riebel P, Snieckus V, Eltis LD. Purification and Preliminary Characterization of a Serine Hydrolase Involved in the Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(36):22943-22949.
- [5] Horsman GP, Ke JY, Dai SD, Seah SYK, Bolin JT, Eltis LD. Kinetic and Structural Insight into the Mechanism of BphD, a C-C Bond Hydrolase from the Biphenyl Degradation Pathway. *Biochemistry*, 2006, 45: 11071-11086.

- [ 6 ] Seeger M, Timmis KN, Hofer B. Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorinated biphenyl degradation encoded by the bph locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(7) : 2654-2658.
- [ 7 ] Yang XQ, Sun Y, Qian SJ. Biodegradation of seven polychlorinated biphenyls by a new isolated aerobic bacterial (*Rhodococcus* sp. R04). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2004, 31(9) : 415-420.
- [ 8 ] Makkar RS, Rockne KJ. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology Chemistry*, 2003, 22(10) : 2280-2292.
- [ 9 ] Shingler V. Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(12) : 1226-1241.
- [ 10 ] Bhowmik S, Horsman GP, Bolin JT, Eltis LD. The Molecular Basis for Inhibition of BphD, a C-C Bond Hydrolase Involved in Polychlorinated Biphenyls Degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(50) : 36377-36385.
- [ 11 ] Li C, Montgomery MG, Mohammed F, Li JJ, Wood SP, Bugg TDH. Catalytic Mechanism of C-C Hydrolase MhpC from *Escherichia coli*: Kinetic Analysis of His263 and Ser110 Site-directed Mutants. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 346(1) : 241-251.
- [ 12 ] Yang XQ, Liu XQ, Song LY. et al. Characterization and functional analysis of a novel gene cluster involved in biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. Strain R04. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(6) : 2214-2224.
- [ 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 ] Yang XY, Xie FH, Zhang GQ, et al. Purification, characterization, and substrate specificity of two 2, 3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. R04, showing their distinct stability at various temperature. *Biochimie*, 2008, 90(10) : 1530-1538.
- [ 15 ] 陶勇, 冉永禄. 湖南尖吻蝮蛇毒出血毒素的圆二色性和化学修饰. *生物化学杂志 (Chinese Biochemical Journal)*, 1995, 11(2) : 195-200.
- [ 16 ] Seah SYK, Labbe G, Nerdinger S, Johnson MR, Snieckus V, Eltis LD. Identification of a Serine Hydrolase as a Key Determinant in the Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 275(21) : 15701-15708.
- [ 17 ] 张智清, 姚立红, 侯云德. 含 PRPL 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*, 1990, 6(2) : 111-116.
- [ 18 ] 谭洁莹, 付欣, 李冰. 金属硫蛋白非融合性原核表达载体的构建. *实用医学杂志 (The Journal of Practical medicine)*, 2008, 24(14) : 2370-2372.
- [ 19 ] Mukerjee-Dhar M, Shimura M, Miyazawa D, Kimbara K, Hatta T. bph genes of the thermophilic PCB degrader, *Bacillus* sp. JF8: characterization of the divergent ring-hydroxylating dioxygenase and hydrolase genes upstream of the Mn-dependent BphC. *Microbiology*, 2005, 151(12) : 4139-51.
- [ 20 ] Diaz E, Timmis KN. Identification of functional residues in a 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase: a new member of the  $\alpha/\beta$  hydrolase-fold family of enzymes which cleaves carbon - carbon-bonds. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(11) : 6403-6411.
- [ 21 ] Dunn G, Montgomery MG, Mohammed F, Coker A, Cooper JB, Robertson T, Garcia JL, Bugg TD, Wood SP. The structure of the C - C bond hydrolase MhpC provides insights into its catalytic mechanism. *Journal of molecular Biology*, 2005, 346(1) : 253-265.
- [ 22 ] Hoesman GP, Bhowmik S, Seah SYK, Kumar P, Bolin JT, Eltis LD. The tautomeric half-reaction of BphD, a C-C bond hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(27) : 19854-19904.



# Purification and characterization of a pH-stable and thermostable biphenyl hydrolase from *Rhodococcus* sp. R04

Xiuqing Yang<sup>\*</sup>, Pengli Li, Yuan Zheng, Chong Shen

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] Biphenyl hydrolase (BphD) is an enzyme of the biphenyl biodegradation pathway in *Rhodococcus* sp. R04. Expression, purification and properties of BphD, together with chemical modification were investigated. [ **Method** ] Using heat-induced expression vector pBV220, we expressed bphD heterologously in *E. coli* BL21 (DE3). The products were purified by chromatography, and the purified enzyme was used to study its functions and properties by circular dichroism. [ **Results** ] BphD has been purified to homogeneity with a final purification fold of 5.02. With 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA) as a substrate, the optimum pH and temperature of BphD are 9 and 80°C, respectively and the  $K_m$  is 0.44  $\mu\text{mol/L}$ . The enzyme had remaining 90% of activity incubating for 1 hour at 60°C, and had a half-life of 1 hour at 70°C, making it the most thermostable biphenyl hydrolase reported in *Rhodococcus*. Secondary structure of BphD has undergone great changes with the temperature up to 70°C, and has been severely damaged at 80°C. The sequence alignment between BphD and other homologous hydrolases as well as chemical modification of BphD indicated that Ser, His and Asp play important roles in the hydrolysis of HOPDA. In addition, Trp residue may be near the active center of enzyme as the key amino acid involved in substrate hydrolysis, which is not previously reported in the literature. [ **Conclusion** ] BphD with pH stability and thermostability is quite rare in the homologous hydrolases in *Rhodococcus*. The key status of Ser, His, Asp and Trp will build a basis for more learnings of the transformation mechanism of BphD.

**Keywords:** Biphenyl hydrolase; thermostability; secondary structure; chemical modification

(本文责编:王晋芳)