



Burkholderia xenovorans LB400 联苯双加氧酶及突变体对 DDTs 的降解

孙成成^{1,2,3}, 王媛^{1,4}, 李俊德^{1,2,3}, 陈卫卫^{1,2,3}, 闵军^{1,2}, 胡晓珂^{1,2,3*}

¹中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003

²青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237

³中国科学院大学, 北京 100049

⁴烟台大学海洋学院, 山东 烟台 264003

摘要: DDTs (dichlorodiphenyltrichloroethane, 1,1,1-三氯-2,2-双氯苯基乙烷)是一种典型的持久性有机污染物,曾在疟疾防治和农业除虫方面被广泛应用。虽然包括我国在内的很多国家已经禁止使用 DDTs,但目前对环境中 DDTs 的检测发现它仍然广泛存在且具有新的输入源。DDTs 的持续存在对近海生态系统和人类健康具有一定危害,因此它所造成的环境污染问题仍然值得关注。由于 Rieske 型芳香羟化双加氧酶能够起始多种持久性污染物的降解,过去的几十年里一直是芳香化合物降解领域的焦点。【目的】为探讨联苯双加氧酶对 DDTs 的降解特性及机制,本研究选取了食异生素伯克霍尔德氏菌 LB400 (*Burkholderia xenovorans*)联苯双加氧酶及突变体对 *p,p'*-DDT 和 *o,p'*-DDT 的降解过程进行研究。【方法】以 BphAE_{LB400} 为亲本,通过两步定点突变将 283 位的丝氨酸突变为蛋氨酸,获得突变体 BphAE_{S283M}。通过比较亲本酶与突变体对 DDTs 的催化性能,模拟突变蛋白结构和分子对接等方法,探究其降解特性及机制。【结果】BphAE_{LB400} 和突变体 BphAE_{S283M} 都无法降解对位的 *p,p'*-DDT,但突变体 BphAE_{S283M} 可以代谢 *o,p'*-DDT 并产生 2 个立体异构体。对接 *p,p'*-DDT 的 BphAE_{LB400} 和 BphAE_{S283M} 的结构分析表明, BphAE_{LB400} 和 BphAE_{S283M} 中 *p,p'*-DDT 的反应环均不与原晶体结构中的联苯反应环重合。而对接 *o,p'*-DDT 的 BphAE_{S283M} 的结构分析表明 *o,p'*-DDT 的反应环与晶体结构中的联苯反应环距离很近,且 2、3 位的碳原子与单核铁原子催化中心的距离在 0.5 nm 以内,此外, BphAE_{S283M} 的催化腔表面积和体积比 BphAE_{LB400} 更大,这很可能有助于 BphAE_{S283M} 与 *o,p'*-DDT 的结合。【结论】283 位氨基酸是影响

基金项目: 国家自然科学基金(32070112, 32070102, 92051119, 42077305); 国家重点研发计划(2020YFD0901003); 河北省重点研发计划(19273802D)

*通信作者。Tel: +86-535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

收稿日期: 2021-01-23; 修回日期: 2021-03-18; 网络出版日期: 2021-04-07

BphAE_{LB400} 对 DDTs 的催化代谢能力的关键氨基酸残基, 它可以通过调节反应碳原子与催化中心的距离以及催化腔的大小来影响底物特异性。本次研究进一步阐明了 283 位氨基酸残基的影响机理, 为更有效修复 DDTs 污染提供理论依据和技术支持。

关键词: DDTs, 联苯双加氧酶, *Burkholderia xenovorans* LB400, 底物特异性

DDTs (dichlorodiphenyltrichloroethane, 1,1,1-三氯-2,2-双氯苯基乙烷) 是最常见和最有效的有机氯杀虫剂之一, 自 1945 年以来一直用于农业抗虫, 后期也用于疟疾等病媒传播疾病的控制^[1]。2001 年, DDTs 成为斯德哥尔摩公约首批公布的 12 种持久性有机污染物之一, 继而被大多数国家禁止使用。然而, 世界卫生组织在 2006 年允许在一些热带国家重新引入 DDTs, 以控制虫媒传播的疾病^[2]。由于其特殊的物理化学性质, 特别是长达 30 年的半衰期使得 DDTs 仍对近海生态系统和人类健康具有潜在威胁^[3-5]。尽管 DDTs 自 1983 年起在中国被禁止用作农业化学品, 但在各种环境介质中都监测到了高浓度的 DDTs。Chen 等 2014 年对黄海北部沿岸的环境调查中发现部分软体动物体内 DDTs 含量超过食用标准(200 ng/gd-w) 2 倍^[6]。其他几项研究也证明了沉积物或动物组织中的 DDTs 残留量很高, 并且国内 DDTs 具有新的输入源^[7-10]。因此, DDTs 所造成的环境污染问题仍然值得关注。

DDTs 作为工业化的产物, 在自然界中缺乏有效的酶降解系统。在过去的几十年里, Rieske 型芳香羟化双加氧酶 (RHDs, rieske-type aryl hydroxylating dioxygenases) 是芳香化合物降解领域的焦点。Rieske 型芳香羟化双加氧酶包括联苯双加氧酶 (BPDO, biphenyl dioxygenase)、萘双加氧酶 (NDO, naphthalene dioxygenase) 等, 这些酶是多种持久性有机污染物好氧降解途径的起始降解酶。Nadeau 等通过产碱杆菌 A5 好氧降解 DDTs

阐明了其好氧降解途径, 在 A5 联苯双加氧酶催化下, 在 DDTs 邻位加入两个氧原子生成 2,3-二氢二醇-DDT (图 1), 后者进一步降解为 4-氯苯甲酸^[11]。在 Kamanavalli 和 Ninekar 的一项研究中, 发现假单胞菌可以在添加了 0.05% (W/V) DDTs 的联苯中生长。该菌将 DDTs 降解生成 2,3-二羟基 DDT, 再通过间位裂解途径生成 4-氯苯甲酸^[12]。众多研究表明, DDTs 与多氯联苯好氧降解的中心途径基本相同, 可以通过联苯双加氧酶起始降解^[11-14]。

Burkholderia xenovorans LB400 联苯双加氧酶 (图 2) 是底物范围最广的 RHD 之一。它是由末端氧化酶 (BphAE)、铁氧还蛋白 (BphF, Mr=12000) 和铁氧还蛋白还原酶 (BphG, Mr=43000) 组成的多组分酶^[15-16]。其中, 末端氧化酶 BphAE 与底物直接相互作用, 催化底物的氧化反应。*Pandoraea pnomenus* B356 与 *Burkholderia xenovorans* LB400 联苯双加氧酶都是底物范围较广的降解酶, 本实验室初步实验结果显示 BphAE_{B356} 在 DDTs 降解方面比 BphAE_{LB400} 更加优异。这两种联苯双加氧酶在 DDTs 降解过程中所表现出的差异可能与末端氧化酶的 α 亚基有关。之前的许多研究表明, 底物范围和区域特异性主要由位于末端氧化酶 α 亚基 C 末端的残基决定, 总共分为 4 个区域^[17]。有学者对 III、IV 区域氨基酸的功能进行了研究, 但目前对 I、II 区域氨基酸残基功能研究较少。确定影响底物分子与酶相互作用的氨基酸残基, 了解其作用机理, 有助于阐明联苯双

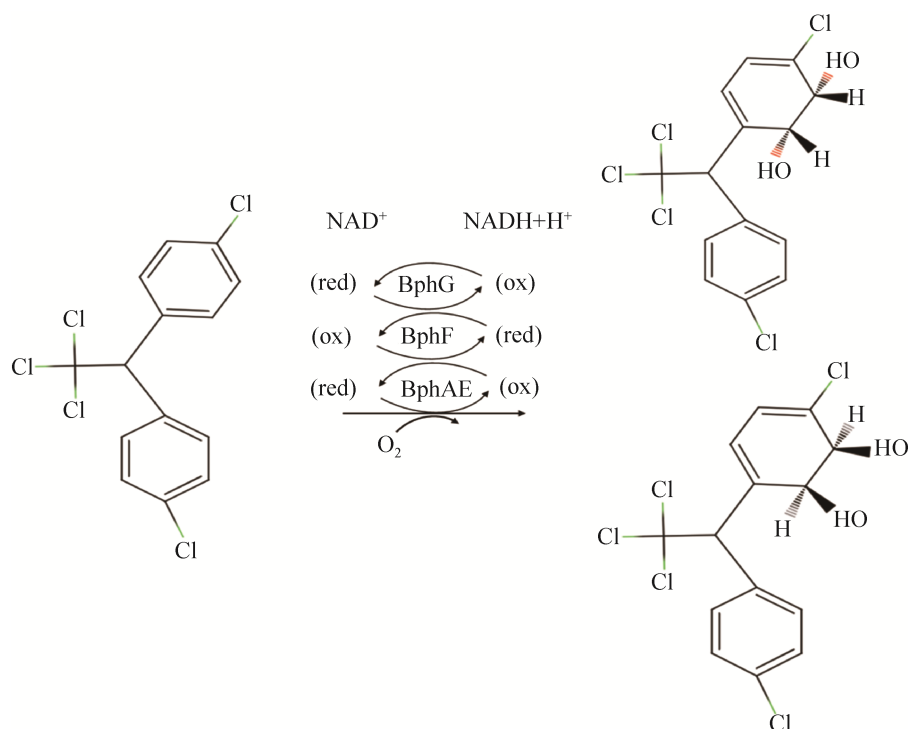


图 1. 联苯双加氧酶催化 DDTs 的氧化图

Figure 1. The oxidation of DDTs catalyzed by biphenyl dioxygenase.

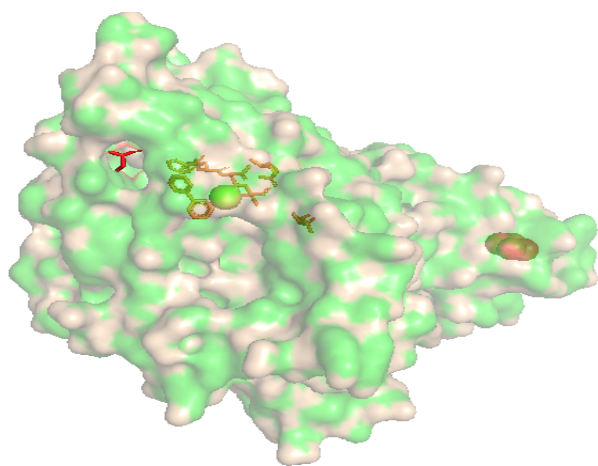


图 2. 联苯结合形式的联苯双加氧酶三维模型图

Figure 2. The model of biphenyl-bound forms of BPDO.

加氧酶与底物有效结合的机制。因此, 本研究选取了多氯联苯降解模式菌株 *Burkholderia*

xenovorans LB400 的联苯双加氧酶作为研究对象, 并通过晶体结构解析确定位于酶催化口袋入口处 II 区域的 283 位氨基酸为影响 BphAE_{LB400} 与 DDTs 结合的关键氨基酸残基, 将 BphAE_{LB400} 283 位的 Ser 突变为 BphAE_{B356} 283 位的 Met, 获得了酶突变体 BphAE_{S283M}。通过比较 BphAE_{LB400} 和 BphAE_{S283M} 分别以 *p,p'*-DDT 和 *o,p'*-DDT 为底物时的代谢产物、酶动力学参数、结构分析以及分子对接分析, 试图探讨联苯双加氧酶对 DDTs 的催化机理即 283 位氨基酸残基的影响机理并以此提高 BphAE_{LB400} 的底物范围和对 DDTs 的催化代谢能力。同时为如何扩大其他 BPDO 的底物范围和提高降解率的机制研究奠定理论基础, 进而为更有效修复 DDTs 污染提供理论依据和技术支持。

1 材料和方法

1.1 突变体构建和酶纯化

利用两步位点定向突变方案^[18], 以 BphAE_{LB400} 为亲本, 构建其 Ser283Met 单突变的突变体。突变体构建过程中, 利用上游引物 a (5' GAGCCGGG CACGCTCCTGGCG 3') 和突变引物 b (5' GGGGTA CCCCCTAGAAGAACATGCT 3') 扩增含有突变位点及其上游序列的 DNA 片段; 利用下游引物 d (5' CGGGATCCGATGAGTTCAGCAATCA3') 和突变引物 c (5' GGGGTACCCCCTAGAAGAA CATGCT 3') 扩增含有突变位点及其下游序列的 DNA 片段; 利用上游引物 a 和下游引物 d 对上述扩增片段进行第 3 次 PCR, 得到目标突变基因。将获得的目标突变基因片段和表达载体 pET14b 分别进行双酶切 (*Mlu* I 和 *Avr* II), 选取酶切成功的片段进行进一步纯化^[18]。将酶切后的目标突变基因片段和 pET14b 进行连接, 最后导入感受态 *Escherichia coli* C41 细胞进行异源表达。

为获得足量的酶, 将含有表达载体的 *Escherichia coli* C41 细胞依次进行活化、扩增培养和 IPTG 诱导。首先, 将冻存于 -80 °C 的工程菌接种至 100 mL 含有氨苄的 LB 液体培养基中进行活化, 然后将活化的菌液进行摇床培养 (37 °C, 200 r/min)。培养 12 h 后, 取 7-8 mL 菌液至 500 mL 新的含有氨苄的 LB 液体培养基中继续进行扩增培养。培养 3 h 后, 加入 1 mmol/L IPTG 诱导表达 16-18 h (温度为 20 °C, 转速为 120 r/min)。诱导结束后, 在 4 °C 条件下离心 (8000 r/min, 15 min) 收集菌体。收集后的菌体使用 Hepes 缓冲液 (pH 7.0, 50 mmol/L) 清洗 2 次。然后加入溶菌酶裂解, 超声破碎获得破裂液。在 11000 r/min 和 4 °C 条件下离心 1 h, 然后将上清转移至 50 mL 离心管中, 加入镍柱, 利用镍柱

进行吸附 (4 °C, 1 h), 后离心 (4 °C, 2000 r/min) 收集镍柱。分别用 20 mmol/L 和 40 mmol/L 咪唑洗去镍柱中的杂质, 后用 300 mmol/L 咪唑进行洗脱。将得到的酶液按照用量, 一部分分装到 PCR 管中, 以便后续实验使用; 另一部分进行 SDS-PAGE 实验。

1.2 代谢产物测定

在含有 500 nmol 底物的 50 mmol/L 吗啉磺酸 [MES, 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate] 缓冲液中依次加入 4.8 nmol FeSO₄(NH₄)₂、400 nmol NADH、1.2 nmol BphG、2.4 nmol BphF 以及 2.4 nmol 重组的 His 标记的 BphAE, 补加 MES 缓冲液, 至总体积为 1 mL。实验组中加入相应的丙酮溶解的底物, 对照组加入丙酮作为对照。将实验组和对照组置于 37 °C 摇床中缓慢转速孵育 30 min。孵育完成后, 将 EP 管中溶液转移至 5 mL 玻璃试管中。用乙酸乙酯萃取 3 次, 然后将乙酸乙酯萃取液于氮气低温环境下挥发, 氮吹至 500 μL。吸取 500 μL 乙酸乙酯溶液转移至装有内衬管的色谱瓶中, 氮气低温环境下吹干。然后向内衬管中加入 250 μL 丙酮和 10 μL 25 mmol/L 的硼酸耦合剂, 室温下摇床中缓慢转速孵育 1 h^[19]。利用氮吹仪将内衬管吹干, 加入 50 μL 正己烷, 轻轻混匀^[13]。最后, 利用 GC-TOF-MS 和安捷伦 7890A 气相色谱进行代谢产物分析。

1.3 酶动力学参数测定

联苯双加氧酶由铁氧还蛋白还原酶、铁氧还蛋白和末端氧化酶三部分组成。在反应时, 由 NADH 作为电子供体, 电子依次由 BphG 和 BphF 传递到 BphAE, 进而结合氧气与底物发生催化反应。本研究利用液相氧电极测定联苯双加氧酶催化过程中对氧气的消耗, 继而测定联苯双加氧酶的动力学参数, 并参考 Michel 等的研究^[20]建立了

氧谱法来研究联苯双加氧酶对 DDTs 的特异性及其对 O₂ 的稳态利用。在 Oxygraph 反应室中模拟特定温度下酶体系的反应, 通过液相氧电极测定氧化还原反应的参数。具体步骤为: 组装 Oxygraph 仪器, 并连接水浴装置, 保持恒温。后向反应室中加入超纯水, 建立空气线。设置转子转速为 900 r/min, 待信号线稳定后, 吸出超纯水, 向反应室中缓缓充入氮气, 使信号值下降至 10 左右建立零氧线, 保存校正结果。再按照反应体系依次加入 MES、Fe²⁺、NADH、铁氧还原蛋白还原酶、铁氧还原蛋白和底物, 观察信号变化; 待信号线平稳后, 记录最大耗氧速率, 最终根据不同底物浓度测定的最大反应速率利用米氏方程来计算动力学参数 V_{\max} 和 K_m ^[20]。在双加氧酶的反应中, 1 mol 的底物与双加氧酶反应, 将消耗 1 mol 的氧气。因此, 可以通过液相氧电极监测氧气的消耗, 来确定酶和底物的最大反应速率。

1.4 分子对接和结构分析

去除共结晶的配体和水后, 以 BphAE_{LB400} (PDB:2XRX) 的二聚体 AB 为对接靶标。利用 PRODRG server (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrng/>) 上的 JME 编辑器绘制了 DDTs, 并对其结构进行了优化^[21-22]。在 AutoDockTools 中, 配体被随机放置在单核铁附近的活性位置作为起始位置。配体的搜索空间以单核铁为中心, x、y、z 方向均设置为 1.8 nm (18 Å)^[21-23]。然后用拉马克遗传算法(LGA, Lamarckian genetic algorithm)作为搜索方法, 在 Autodock4.2 中实现了自动对接。同时增加 LGA 运行的数量, 以产生 20 个对接结果, 用于进一步的结构分析。利用软件 Pymol 准备移除了 Fe²⁺ 的 BphAEs 三维结构文件, 利用软件 Discovery Studio 2019 准备底物 DDTs 的三维结构文件, 将 BphAEs 的结构及底物三维结构文件导入

DoGSiteScorer 工具(<https://proteins.plus/#dogsitesite>), 计算 BphAE_{LB400} 和 BphAE_{S283M} 的催化活性空腔体积。

2 结果和分析

2.1 突变体构建和酶纯化

将载有 pET14b[LB400-S283M-bphAE] 的 *Escherichia coli* C41 培养富集过夜, 转接后诱导表达, 纯化蛋白。将纯化的蛋白按照 30 倍稀释, 利用 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3。结果表明, 凝胶中存在两条条带, 它们分别与 α 亚基(BphA, Mr=51000)和 β 亚基(BphE, Mr=22000)相对应。另外, 分别载有 pET14b[LB400-S283M-bphAE]、pET14b[LB400-bphG] 和 pET14b[LB400-bphF] 的 *Escherichia coli* C41 经多次诱导表达, 蛋白表达比较稳定, 这表明构建的含有 bphAE、bphF、bphG 的 *Escherichia coli* C41 可以为后续大量的酶学实验提供保障。同时, 本次实验结果与 Mahmood 等用 *Escherichia coli* C41 以相同方法表达的 BphAE_{P4}、BphAE_{RR41}、BphAE_{T335A/F336M/N338Q} 等突变体^[24] 的条带大小相似。这表明在 IPTG 诱导的所有表达这些突变体的大肠杆菌克隆中, BphAE 的表达水平相似。

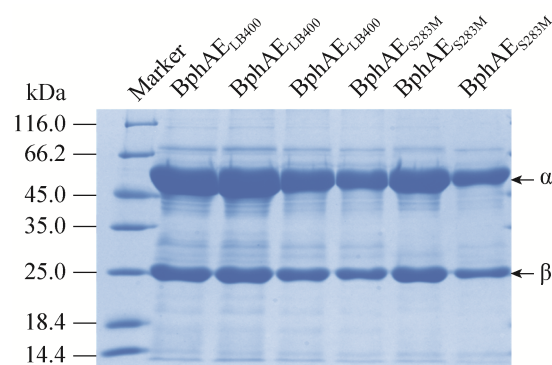


图 3. BphAE_{LB400} 及其突变蛋白 SDS-PAGE 图

Figure 3. SDS-PAGE of BphAE_{LB400} and BphAE_{S283M}.

2.2 代谢产物测定与分析

本次实验中分别以 p,p' -DDT 和 o,p' -DDT 为底物, 通过酶与单底物实验得到产物色谱质谱峰图如图 4 所示。在 BphAE_{LB400} 和突变体 BphAE_{S283M} 对 p,p' -DDT 的降解产物色谱质谱峰图中, 未发现二羟基产物的特征离子峰和特定保留时间的色谱峰, 这与之前学者的研究结果一致^[24]。从分子构型来看, p,p' -DDT 两个苯环间以三氯乙基连接, 这意味着相较于联苯以及多氯联苯, p,p' -DDT 对酶催化口袋的体积提出了更高的要求。另外, 郭莉等在多氯联苯降解过程中发现对称结构的单体不利于降解^[25], 这说明 p,p' -DDT 难以被降解可能与其对称性也密切相关。对于 o,p' -DDT, BphAE_{LB400} 仍然无法降解, 然而突变体 BphAE_{S283M} 可以产生 2 种二羟基的产物且 2 种产物的峰面积基本相同。这与 *C. oxalaticus* A5 对 DDTs 的降解明显不同, 该菌株降解 DDTs 往往只

产生一种代谢产物^[26]。通过对产物质谱进行分析, 发现在 $m/z=454$ 处有一个分子离子峰, 产物硼酸化衍生物的重要碎片离子峰在 335 处为 M-HCCl₃、299 处为 M-HCCl₄、235 处为 M-HCCl₃-nBuBO₂、199 处为 M-HCCl₄-nBuBO₂。代谢物 I 的质谱特征与代谢物 II 非常相似, 但其 GC 保留时间不同。通过 Bruno L'Abbée 等对 BphAE_{B356} 降解 DDTs 的研究^[24], 可以推测代谢物 I 与代谢物 II 应互为手性对映体。

2.3 酶动力学参数测定与分析

BphAE_{LB400} 及其突变蛋白对于 DDTs 的动力学参数通过液相氧电极对氧气的消耗来测定。BphAE_{LB400} 及其突变蛋白对 o,p' -DDT 的动力学参数测定结果归纳总结于表 1。实验结果显示, 以 o,p' -DDT 为底物时, 亲本 BphAE_{LB400} 并不能测得相关参数, 说明 BphAE_{LB400} 不能降解 o,p' -DDT 或反应极其微弱, 这与代谢产物分析结果一致。经

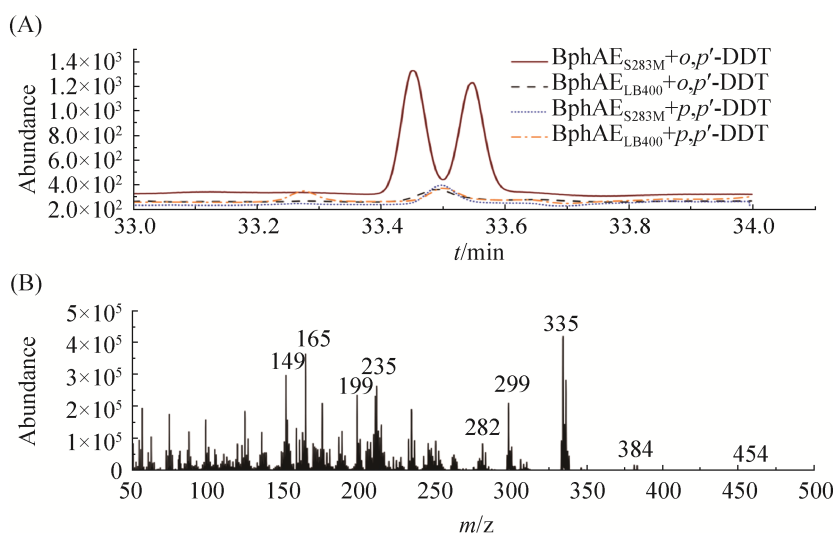


图 4. DDTs 代谢产物色谱质谱合图

Figure 4. Total ion chromatograms and mass spectra of metabolites produced from DDTs. A: Chromatogram of metabolites: BphAE_{S283M}- p,p' -DDT, BphAE_{S283M}- o,p' -DDT, BphAE_{LB400}- p,p' -DDT, BphAE_{LB400}- o,p' -DDT; B: Mass spectrum of metabolites: BphAE_{S283M}- o,p' -DDT.

Ser283Met 替换的突变体 K_m 值约为 $4.6 \mu\text{mol/L}$, k_{cat} 值为 $0.1/\text{s}$, 说明突变体与 DDTs 间的结合能力增强, 同时实现了催化效率的突破; 从整体 k_{cat}/K_m 来看, 突变体约为 $24.3 \text{ L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{s})$ (表 1), 这表明 283 位的突变增强了联苯双加氧酶对 *o,p'*-DDT 的催化代谢能力。此外, Dhindwal 和 Bruno L'Abbée 等利用突变体 BphAE_{II9} 和 BphAE_{III52} 降解 DDTs 时, 测得 k_{cat}/K_m 值分别约为 2.2 和 $6 \text{ L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{s})$ ^[24,27], 该值远低于 $24.3 \text{ L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{s})$ 。BphAE_{S283M} 较同类催化酶催化效率更高, 进一步说明 283 位氨基酸残基是 BphAE_{LB400} 催化代谢 DDTs 的关键氨基酸残基。

2.4 分子对接和结构分析

以 BphAE_{LB400} 的晶体结构为模板, 通过建模

软件构建 BphAE_{S283M} 的三级结构, 结果如图 5 所示。BphAE 是由 3 个 α 亚基 ($M_r=51000$) 和 3 个 β 亚基 ($M_r=22000$) 组成的异源多聚体^[24], 同时由静电势图可知该蛋白表面有多处负电势位点。如前文所述, α 亚基被认为是影响底物特异性的关键亚基。它由两个结构域组成, 一个是从 BphF 接收电子的 2Fe-2S Rieske 结构域, 另一个是包含单核铁原子催化中心的催化结构域。

同源建模结果表明, BphAE 催化口袋如图 6 所示。Kumar 等研究发现 BphAE_{LB400} 的 Thr335 可以通过控制与底物接触的蛋白质氨基酸残基的空间分布来限制该酶可以氧化的多氯联苯的范围; 将 Thr335 突变为 Ala 解除了对 Gly321 的限制, 使这种残基在底物与酶结合时发生偏移, 从而增加

表 1. BphAEs 对 *o,p'*-DDT 的动力学参数分析

Table 1. Steady-state kinetic parameters of BphAE *o,p'*-DDT

Substrate/Enzymes	$K_m/(\mu\text{mol/L})$	$k_{\text{cat}}(1/\text{s})$	$(k_{\text{cat}}/K_m)/(\text{L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{s}))$
BphAE _{LB400}	ND	ND	ND
BphAE _{S283M}	4.6 ± 0.9	0.1 ± 0.0	24.3 ± 0.5
BphAE _{III52} ^a	16 ± 1^a	0.1 ± 0.01^a	6 ± 2^a
BphAE _{II9} ^b	—	—	2.2 ± 0.5^b

ND: not determined; ^a: The kinetic parameters were from [24]; ^b: The kinetic parameters were from [27]; —: means no corresponding data.

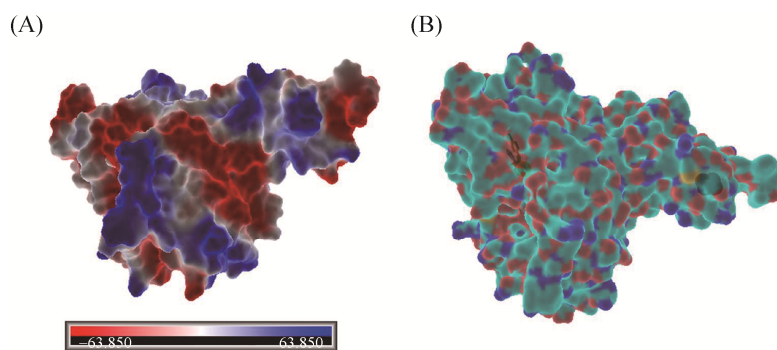


图 5. BphAE_{S283M} 表面静电势图和 BphAE_{S283M}-*o,p'*-DDT 嵌合模型图

Figure 5. The electrostatic potential diagram and model diagram of BphAE_{S283M}. A: The electrostatic potential diagram of BphAE_{S283M}; B: The model of *o,p'*-DDT-bound forms of BphAE_{S283M}.

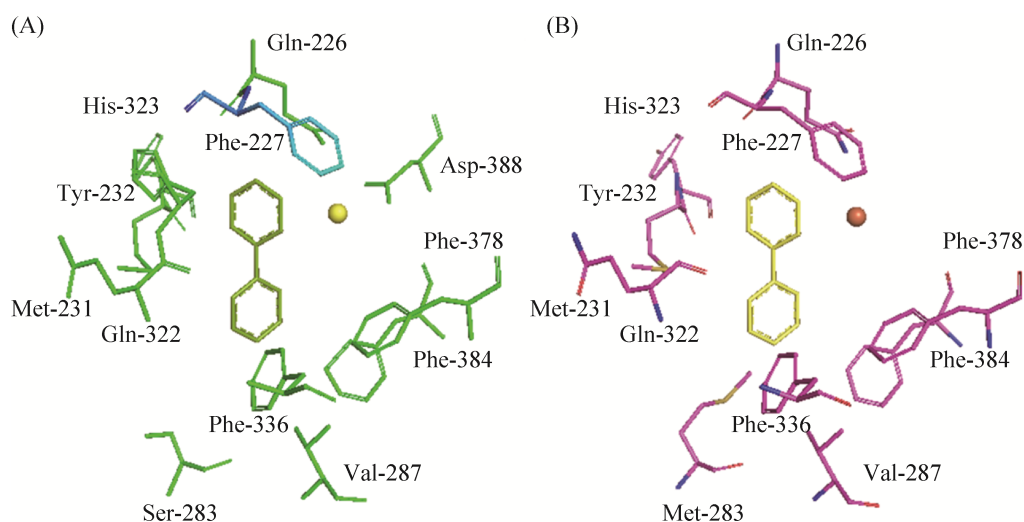


图 6. BphAE 催化腔入口图

Figure 6. The catalytic chamber entrance of BphAE. A: BphAE_{LB400}; B: BphAE_{S283M}.

了容纳较大底物如 2,6-二氯联苯的空间^[18-19]。而远离催化中心的 338 位可以通过影响蛋白的组装调整联苯双加氧酶的底物范围^[18]。本研究发现, 283 位于催化口袋入口处, Ser283Met 的突变可能影响 DDTs 反应环到酶催化中心的距离, 进而影响联苯双加氧酶的底物专一性。

整个联苯双加氧酶与底物反应中, 电子是从 NAD(P)H 传至 BphG, 再由 BphG 传至 BphF 最后传至 BphAE^[15]。值得注意的是, 在同一个 α 亚基内部, Rieske 结构域和催化结构域由于距离较远而无法相互作用, 因此催化反应中的电子转移是从铁氧还蛋白到联苯双加氧酶一个 α 亚基的 Rieske 结构域, 然后再到邻近 α 亚基的催化结构域。这意味着电子通过两个 α 亚基的界面进行转移, 同时也要求 Rieske 结构域的反应临界原子必须与邻近催化结构域的反应临界原子正确对准。在本次实验分子对接分析中, 这就要求 DDTs 分子必须尽可能地与晶体中的联苯分子重合。

当把 *p,p'*-DDT 叠加到联苯结合的 BphAE_{LB400}

上时, 在催化空腔内观察到两个构象簇, 但在所有情况下, 最接近催化中心 Fe^{2+} 的反应环的取向与晶体结构中联苯的反应环取向明显不同。图 7-A 显示了对接在 BphAE_{LB400} 中的 DDT 分子的取向。在最容易发生反应的构象中, 底物分子 *p,p'*-DDT 的反应环与联苯分子反应环形成超过 45° 的夹角, 且更加远离催化中心; 而三氯乙基中的 3 个氯原子靠近催化中心, 这使得 BphAE_{LB400} 不能代谢 *p,p'*-DDT。同时也将 *p,p'*-DDT 通过对接插入到联苯结合的 BphAE_{S283M} 中。当它们被叠加到联苯结合的 BphAE_{S283M} 上时, *p,p'*-DDT 的反应环与联苯分子的反应环也不重合, 如图 7-B。

然而, 当把 *o,p'*-DDT 叠加到联苯结合的 BphAE_{S283M} 上时, 在排名靠前的对接分子构象中的反应环也不与联苯反应环重合, 但它朝向催化中心方向反应环的两个邻近碳原子与单核铁原子催化中心的距离分别为 0.44 nm (4.4 Å) 和 0.46 nm (4.6 Å) (图 8-B)。这满足催化反应所需的距离并且两个反应碳原子与单核铁原子催化中心的距

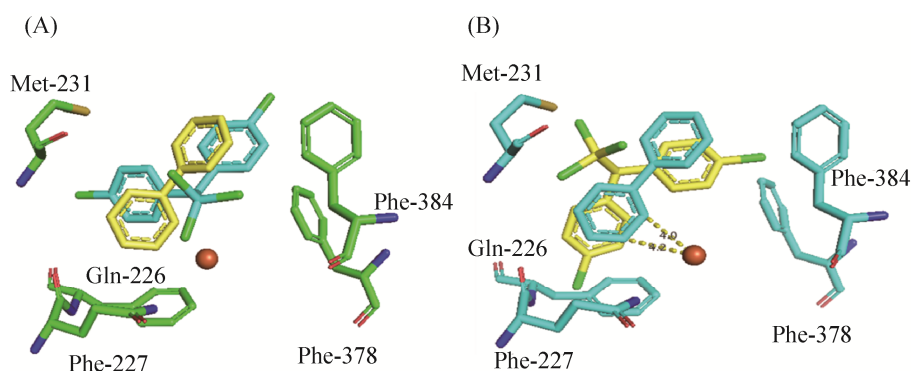
图 7. p,p' -DDT 分子对接分析

Figure 7. Superposition of catalytic center residues of the p,p' -DDT-docked. A: p,p' -DDT-BphAE_{LB400}; B: p,p' -DDT-BphAE_{S283M}.

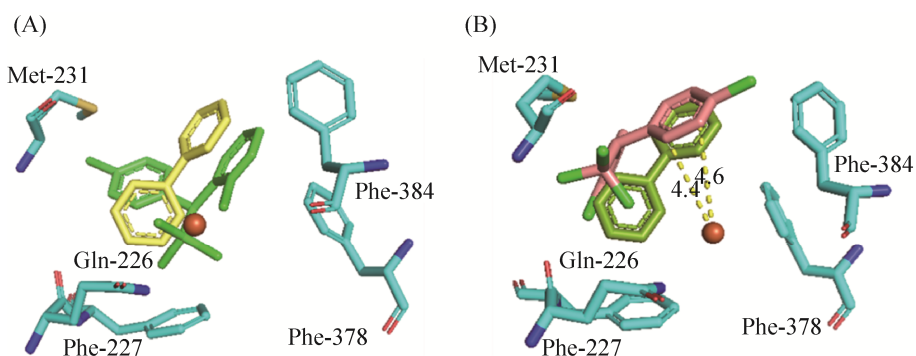
图 8 o,p' -DDT 分子对接分析

Figure 8. Superposition of catalytic center residues of the o,p' -DDT-docked. A: o,p' -DDT-BphAE_{LB400}; B: o,p' -DDT-BphAE_{S283M}.

离差也很小。而把 o,p' -DDT 叠加到联苯结合的 BphAE_{LB400} 上时, 可以观察到苯环上的氯原子影响了 2、3 位的羟基化反应(图 8-A), 这使得 BphAE_{LB400} 仍然无法降解 o,p' -DDT。

通过 DoGSiteScorer 工具计算 BphAE_{LB400} 和 BphAE_{S283M} 催化活性空腔体积。BphAE 催化活性空腔示意图见图 9。实验数据显示, 相比于 BphAE_{LB400} (图 9-A), BphAE_{S283M} (图 9-B) 的催化活性口袋体积增大。催化口袋体积的增大有助于 BphAE_{S283M} 结合不同分子构型或者分子构象所占空间体积较大的底物。联苯双加氧酶的催化反应

十分复杂, 不仅受三组分体系对电子传递的影响, 还受到末端氧化酶本身结构域的分布、催化腔的大小以及亚基组装等因素的影响。因此, 在探究联苯双加氧酶的催化机制时, 要在结合生理生化数据的基础上, 进行结构方面的综合分析。

3 结论

通过比较野生型联苯双加氧酶与突变体对 DDTs 的催化性能、模拟突变蛋白结构和分子对接分析, 得到的结论主要如下: (1) 对于对位的 p,p' -DDT, BphAE_{LB400} 和突变体 BphAE_{S283M} 都无

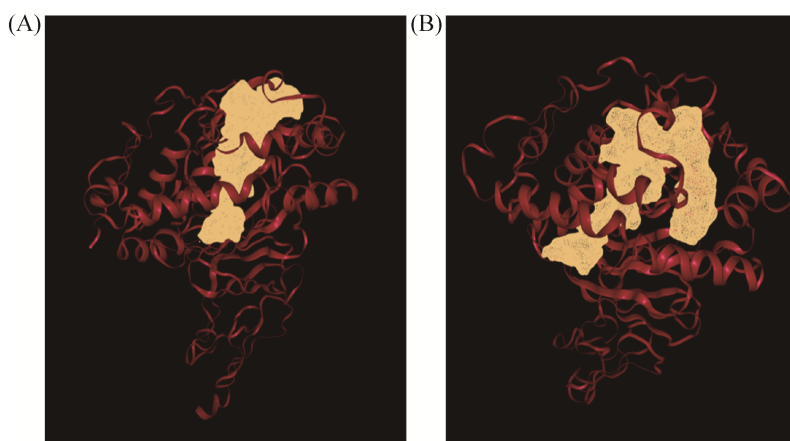


图 9. BphAEs 催化活性空腔。

Figure 9. The catalytic cavity of BphAEs. A: BphAE_{LB400}; B: BphAE_{S283M}.

法降解。然而对于 *o,p'*-DDT 的降解二者明显不同，BphAE_{LB400} 仍然无法找到代谢产物；突变体 BphAE_{S283M} 可以产生 2 种二羟基的产物且 2 种产物的峰面积基本相同，这可以证明 283 位氨基酸残基是影响联苯双加氧酶降解 DDTs 的原因之一。(2) 通过酶动力学实验可以发现 283 位的突变增强了联苯双加氧酶对 *o,p'*-DDT 的催化代谢能力，突变体与 *o,p'*-DDT 间的结合能力增强，同时实现了催化效率的突破。(3) 当把 *p,p'*-DDT 对接到 BphAE_{LB400} 和 BphAE_{S283M} 上时，BphAE_{LB400} 和 BphAE_{S283M} 中 *p,p'*-DDT 的反应环均不与原晶体结构中的联苯反应环重合。而对接 *o,p'*-DDT 的 BphAE_{S283M} 的结构分析表明 *o,p'*-DDT 的反应环与晶体结构中的联苯反应环距离很近且 2、3 位的碳原子与单核铁原子催化中心的距离在 0.5 nm(5 Å) 以内。同时，相比于 BphAE_{LB400}，BphAE_{S283M} 的催化活性空腔体积增大，这很可能有助于 BphAE_{S283M} 与 *o,p'*-DDT 的有效结合。

目前，有关联苯双加氧酶降解 DDTs 的研究较少，但由于 DDTs 与多氯联苯等芳香化合物结构类似，联苯双加氧酶也是 DDTs 降解酶系的重

要补充。本研究首次揭示了末端氧化酶(BphAE) II 区域氨基酸残基的突变对 BPDO 催化降解 DDTs 的影响及可能的机制，确定了 283 位氨基酸残基是影响联苯双加氧酶对 DDTs 降解的关键氨基酸残基。这为增强其他 Rieske 型芳香羟化双加氧酶对 DDTs 的降解能力提供了借鉴，为更有效修复 DDTs 污染提供了理论依据和技术支持。对于与 BphAE_{LB400} 结构特征相似的 DDTs 降解酶以及联苯双加氧酶，结合晶体结构解析将其 II 区域关键氨基酸残基如 283 位点进行定点突变或将是进一步增强其 DDTs 催化活性的有效策略。

参考文献

- [1] Mansouri A, Cregut M, Abbas C, Durand MJ, Landoulsi A, Thouand G. The environmental issues of DDT pollution and bioremediation: a multidisciplinary review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 181(1): 309–339.
- [2] Purnomo AS, Mori T, Kamei I, Kondo R. Basic studies and applications on bioremediation of DDT: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(7): 921–930.
- [3] Aislabie JM, Richards NK, Boul HL. Microbial degradation of DDT and its residues—A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1997, 40(2): 269–282.
- [4] Adeleye AO, Sosan MB, Oyekunle JAO. Occurrence and human health risk of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)

- and hexachlorocyclohexane (HCH) pesticide residues in commonly consumed vegetables in southwestern Nigeria. *Journal of Health & Pollution*, 2019, 9(23): 190909.
- [5] Jayaseelan VP, Ramesh A, Arumugam P. Breast cancer and DDT: putative interactions, associated gene alterations, and molecular pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021: 1–12.
- [6] Chen J, Chen LL, Liu DY, Zhang GS. Organochlorine pesticide contamination in marine organisms of Yantai Coast, northern Yellow Sea of China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2014, 186(3): 1561–1568.
- [7] Luan XL, Qiao TF, Lyu M, Liao CY, Wang DQ, Liu DY, Chen LX. Sediment records of DDTs in intertidal sediment core of Daliao River Estuary and their responses to anthropogenic activities in the past century. *Environmental Chemistry*, 2020, 39(1): 119–127. (in Chinese)
栾晓琳, 乔田峰, 吕敏, 廖春阳, 王东启, 刘东艳, 陈令新. 近百年来大辽河口潮间带中滴滴涕(DDTs)的沉积记录及其对人类活动的响应. *环境化学*, 2020, 39(1): 119–127.
- [8] Klumpp DW, Hong HS, Humphrey C, Wang XH, Codi S. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China.: I. Organic pollutants in mussel and fish tissues. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 44(8): 752–760.
- [9] Wong MH, Leung AOW, Chan JKY, Choi MPK. A review on the usage of POP pesticides in China, with emphasis on DDT loadings in human milk. *Chemosphere*, 2005, 60(6): 740–752.
- [10] Ma Y, Yun XT, Ruan ZY, Lu CJ, Shi Y, Qin Q, Men ZM, Zou DZ, Du XM, Xing BS, Xie YF. Review of hexachlorocyclohexane (HCH) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) contamination in Chinese soils. *Science of the Total Environment*, 2020, 749: 141212.
- [11] Nadeau LJ, Menn FM, Breen A, Saylor GS. Aerobic degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(1): 51–55.
- [12] Kamanavalli CM, Ninnekar HZ. Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* species. *Current Microbiology*, 2004, 48(1): 10–13.
- [13] Ito K, Mahmood A, Kataoka R, Takagi K. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) degradation by *Streptomyces* sp. isolated from DDT contaminated soil. *Bioremediation Journal*, 2021, 3: 1–14.
- [14] Al-Rashed S, Marraiki N, Syed A, Elgorban AM, Prasad KS, Shivamallu C, Bahkali AH. Bioremediation characteristics, influencing factors of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) removal by using non-indigenous *Paracoccus* sp.. *Chemosphere*, 2021, 270: 129474.
- [15] Ferraro DJ, Gakhar L, Ramaswamy S. Rieske business: Structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338(1): 175–190.
- [16] Overwin H, Standfuß-Gabisch C, González M, Méndez V, Seeger M, Reichelt J, Wray V, Hofer B. Permissivity of the biphenyl-specific aerobic bacterial metabolic pathway towards analogues with various steric requirements. *Microbiology: Reading, England*, 2015, 161(9): 1844–1856.
- [17] Mondello FJ, Turcich MP, Lobos JH, Erickson BD. Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8): 3096–3103.
- [18] Vézina J, Barriault D, Sylvestre M. Family shuffling of soil DNA to change the regiospecificity of *Burkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(3): 779–788.
- [19] Kumar P, Mohammadi M, Viger JF, Barriault D, Gomez-Gil L, Eltis LD, Bolin JT, Sylvestre M. Structural insight into the expanded PCB-degrading abilities of a biphenyl dioxygenase obtained by directed evolution. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 405(2): 531–547.
- [20] Sylvestre M, Massé R, Ayotte C, Messier F, Fauteux J. Total biodegradation of 4-chlorobiphenyl (4 CB) by a two-membered bacterial culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1985, 21(3/4): 192–195.
- [21] Schüttelkopf AW, van Aalten DMF. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D*, 2004, 60(8): 1355–1363.
- [22] Dalal V, Dhankhar P, Singh V, Singh V, Rakhaminov G, Golemi-Kotra D, Kumar P. Structure-based identification of potential drugs against FmtA of *Staphylococcus aureus*: virtual screening, molecular dynamics, MM-GBSA, and QM/MM. *The Protein Journal*, 2021: 1–18.
- [23] L'Abbée JB, Tu YB, Barriault D, Sylvestre M. Insight into the metabolism of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) by biphenyl dioxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 516(1): 35–44.
- [24] Mohammadi M, Viger JF, Kumar P, Barriault D, Bolin JT, Sylvestre M. Retuning Rieske-type oxygenases to expand substrate range. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(31): 27612–27621.
- [25] 郭莉. *Rhodococcus biphenylivorans* TG9 对多氯联苯的降解特性研究. 浙江大学硕士学位论文, 2018.
- [26] Nadeau LJ, Saylor GS, Spain JC. Oxidation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Archives of Microbiology*, 1998, 171(1): 44–49.
- [27] Dhindwal S, Gomez-Gil L, Neau DB, Pham TTM, Sylvestre M, Eltis LD, Bolin JT, Kumar P. Structural basis of the enhanced pollutant-degrading capabilities of an engineered biphenyl dioxygenase. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(10): 1499–1512.

The degradation of DDTs by *Burkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase and mutants

Chengcheng Sun^{1,2,3}, Yuan Wang^{1,4}, Junde Li^{1,2,3}, Weiwei Chen^{1,2,3}, Jun Min^{1,2}, Xiaoke Hu^{1,2,3*}

¹ Key Laboratory of Coastal Biology and Bio-resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

² Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, Shandong Province, China

³ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

⁴ Ocean School, Yantai University, Yantai 264003, Shandong Province, China

Abstract: Dichlorodiphenyltrichloroethanes (DDTs) is probably the best known and typical persistent organic pollutant in the world, which has been widely used in malaria control and agricultural deworming. They are still detected in various environmental matrices and has new input sources although their usage in agriculture has been banned in China and others. Numerous concerns have arisen over the past decades about the adverse environmental impacts (including harm to offshore ecosystem and human health) of DDTs. There has been a considerable interest over the last decades for the Rieske-type arylhydroxylating dioxygenases (RHDs) as they are seen as potentially capable of initiating their degradation. **[Objective]** In order to explore the degradation characteristics and mechanism of biphenyl dioxygenase (BPDO) on DDTs, we selected *Burkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase and its mutants to explore the degradation process of *p,p'*-DDT and *o,p'*-DDT. **[Methods]** Using BphAE_{LB400} as parent, the mutant BphAE_{S283M} was obtained by two-step site-directed mutagenesis from Ser to Met. The degradation characteristics and mechanism of wild type and mutant were explored by comparing the catalytic performance of wild type and mutant to DDTs, simulating the structure of mutant protein and molecular docking. **[Results]** The data showed that BphAE_{LB400} and BphAE_{S283M} could not be degraded *p,p'*-DDT, but BphAE_{S283M} metabolized *o,p'*-DDT and produced two stereoisomers. The structural analysis of BphAE_{LB400} and BphAE_{S283M} showed that the reaction ring of *p,p'*-DDT did not coincide with the biphenyl reaction ring in the original crystal structure. In the *o,p'*-DDT- BphAE_{S283M} conformation, the proximal ring did not fit the biphenyl reactive ring as well, but its orientation toward the catalytic Fe²⁺ places two vicinal atoms at a distance (within 0.5 nm) that would allow a catalytic reaction. In addition, the surface area and volume of the catalytic cavity of BphAE_{S283M} is larger than that of BphAE_{LB400}, which is likely to contribute to the combination of BphAE_{S283M} and *o,p'*-DDT. **[Conclusion]** 283 is the key amino acid residue that affects the catalytic metabolism of BPDO to DDTs. It can affect the substrate specificity by adjusting the distance between the reaction carbon atom and the catalytic center and the size of the catalytic cavity. This will provide better insights about the bases for BPDO broad substrate range and about the mechanisms by which the enzyme evolves to change or expand its substrate range and its stereo- and regiospecificity.

Keywords: DDTs, BPDO, *Burkholderia xenovorans* LB400, substrate specificity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32070112, 32070102, 92051119, 42077305), by the National Key Research and Development Program (2020YFD0901003) and by the Key Research and Development Program of Hebei Province (19273802D)

*Corresponding author. Tel: +86-535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

Received: 23 January 2021; Revised: 18 March 2021; Published online: 7 April 2021