

对硝基苯酚降解菌 *Pseudomonas* sp. PDS-7 的降解特性及其降解相关基因的克隆

董小军, 洪青*, 李恋, 李顺鹏

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要:【目的】本研究的目的是分离对硝基苯酚(PNP)降解菌, 研究其对 PNP 的降解特性; 克隆其降解相关基因, 并进行表达。【方法】本研究通过富集培养法和系列稀释平板涂布法分离 PNP 降解菌株; 采用形态观察、生理生化特征测定和 16S rDNA 分析对菌株进行初步鉴定; 通过摇瓶试验研究菌株降解特性; 利用 SEFA-PCR 技术克隆降解相关基因, 并亚克隆到表达载体 pET29a 中, 构建重组表达质粒 pETpnpC, 再转入受体菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行诱导表达; 通过分光光度法测定表达产物的酶活力。【结果】分离到一株 PNP 降解菌 PDS-7, 将该菌株鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.); 该菌株能够以 PNP 作为唯一碳源、氮源和能源生长, 菌株对 PNP 的最高耐受浓度为 80 mg/L, 最适降解温度为 30°C, 偏碱性条件有利于菌株对 PNP 的降解; 克隆了 PNP 降解过程中的偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因 *pnpC* 及马来酰醋酸还原酶基因 *pnpD* (GenBank 登陆号 EU233791); 将 *pnpC* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株进行了诱导表达, 表达产物对偏苯三酚和邻苯二酚均有邻位开环活性, 比活力分别为 0.45 U/mg protein 和 0.37 U/mg protein, 表明偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因 *pnpC* 得到了活性表达。【结论】分离鉴定了一株 PNP 降解菌 *Pseudomonas* sp. PDS-7, 研究了该菌株的降解特性, 克隆和表达了降解相关基因。

关键词: 对硝基苯酚; *Pseudomonas* sp. PDS-7; 降解特性; 基因克隆

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1486-07

对硝基苯酚 (PNP) 是一种在环境中广泛分布的硝基芳香族化合物 (NACs) [1], 它主要来源于有机磷农药, 如: 对硫磷、甲基对硫磷的水解以及医药、炸药、农药、染料等生产企业的排放[2, 3]。由于 PNP 对植物、微生物、动物都有毒性, 已被美国国家环保署列为优先控制污染物, 限制其水体中浓度必须小于 10 ng/L[4]。PNP 的生物降解一直是环境科学研究领域关注课题之一。

近年来, 国内外学者分离报道了多株 PNP 降解菌, 主要分布在假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)、红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)、伯克氏菌属 (*Burkholderia* sp.)、莫拉克斯氏菌

属 (*Moraxella* sp.) 及芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。这些菌株中存在的 PNP 降解途径主要有两条: 对苯二酚 (hydroquinone) 途径和偏苯三酚 (hydroxyquinol) 途径 (图 1), 前者在革兰氏阴性菌中较多[5, 6], 而后者普遍存在于革兰氏阳性菌[2, 7, 8]。但是, PNP 降解基因克隆相关报道还较少。Bang 等从 *Pseudomonas* sp. ENV2030 中克隆了通过对苯二酚途径降解 PNP 的相关基因[9]。关于通过偏苯三酚途径降解 PNP 及其相关的基因克隆方面的报道共有 3 例[2, 8, 10], 这些途径中的单加氧酶基因均属于二组分扩散性黄素蛋白单加氧酶 (two-component flavin-diffusile monooxygenase, TC-FDM) 家族。在

基金项目: 国家“863 计划”(2007AA061101); 科技部自然科技资源平台项目(2005DKA21201-2)

*通讯作者。Tel: +86-25-84396685; Fax: +86-25-84396314; E-mail: hongqingnjau@yahoo.com.cn

作者简介: 董小军(1983-), 男, 江苏宜兴人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail: dxj2006@hotmail.com

收稿日期: 2008-05-05; 修回日期: 2008-07-18

Rhodococcus sp. strain PN1 中, *nphA₁* 和 *nphA₂* 编码的酶共同负责将 PNP 转化为 4-硝基邻苯二酚^[10]。在 *Rhodococcus opacus* SAO101 中, NpcA 和 NpcB 共同将 PNP 和 4-硝基邻苯二酚均转化为偏苯三酚, 而 NpcC 编码的偏苯三酚 1,2-双加氧酶将偏苯三酚进一步降解^[8]。在 *Arthrobacter* sp. strain JS443 中 NpdA₁A₂ 将 PNP 通过 1,4-对苯二醌及羟基-1,4-对苯二醌途径转变为偏苯三酚, NpdB 编码偏苯三酚 1,2-双加氧酶, 将偏苯三酚转化为马来酰醋酸, 再被 NpcC 还原成 β -酮己二酸^[2]。

本文从农药污染的土壤中分离到一株对硝基苯酚 (PNP) 降解菌 *Pseudomonas* sp. PDS-7, 对其降解特性进行了初步研究, 并对其 PNP 降解相关基因进行了克隆和表达, 以期阐明该菌株降解对硝基苯酚的机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 表 1 为本研究所用菌株和质粒。

1.1.2 引物: 表 2 为本研究中所用引物。

1.1.3 培养基和菌体培养条件: LB 培养基参照《分子克隆实验指南》^[11] 配制。基础盐培养基 MSM (g/L): NH₄Cl 1.0, K₂HPO₄ 1.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.2, NaCl 1.0, 加入适量 PNP 作为唯一碳源, pH7.0, 此为 PNP 唯一碳源培养基。MSM 中不添加 NH₄Cl, 其余组分相同, 即为 PNP 唯一碳源培养基。*Pseudomonas* sp. PDS-7 在 LB 中 30 °C 培养; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 及 BL21 (DE3) 在 37 °C 培养, 抗生素使用浓度为卡那霉素 (Km) 50 μ g/mL, 氨苄青霉素 (Amp) 100 μ g/mL。

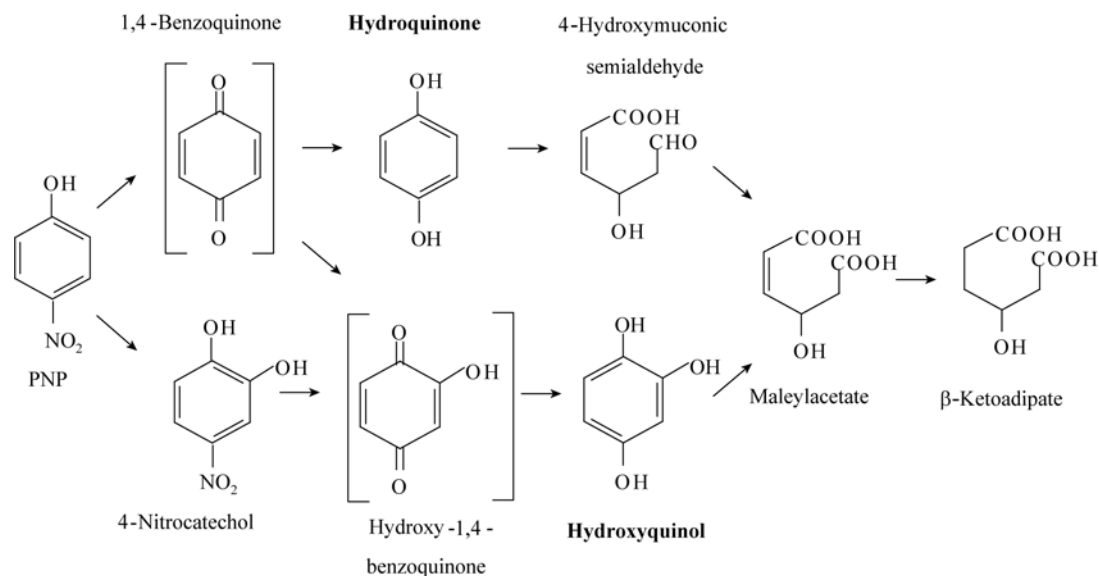


图 1 PNP 降解途径

Fig. 1 Proposed pathway for degradation of PNP^[2, 5-8].

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids | Characteristics | Source |
|------------------------------|--|------------|
| Bacterial strains | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. PDS-7 | PNP degrader, wild type | This study |
| <i>E. coli</i> DH5 α | Host strain, <i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> | TaKaRa |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | Host strain, <i>ompT hsdS_B gal (λ c I 857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1) dcm</i> (DE3) | TaKaRa |
| Plasmids | | |
| pMD18-T | Cloning vector, Amp ^r | TaKaRa |
| pMD548 | pMD18-T with a 548 bp PCR product containing <i>pnpC</i> partial sequence | This study |
| pHQ23 | pMD18-T with a 2.3 kb PCR product obtained from SEFA-PCR for the <i>pnpC</i> 5' end amplification | This study |
| pHQ27 | pMD18-T with a 2.7 kb PCR product obtained from SEFA-PCR for the <i>pnpC</i> 3' end amplification | This study |
| pET29a | Expression vector containing T7 promoter, Km ^r | Novagen |
| pETpnpC | pET29a derivative carrying the <i>pnpC</i> gene | This study |

表 2 本研究所用引物
Table 2 The primers used in this study

| PCR primers | Sequence(5' 3') | Size/bp |
|-------------|---|---------|
| pnpCp-FP | CGGCAGGAGTTCATCCTG | 18 |
| pnpCp-RP | GAGTCCTTCACGCCGAACAC | 20 |
| 7uSP1 | ATAAGGATCGTCACTGTTGAACAGGT | 26 |
| 7uSP2 | ATGACGATTGGCCGCGTCAAGCATCT | 26 |
| 7uSP3 | TAGCACACGGGCACCNNNNNNNNATGGCG | 30 |
| 7dSP1 | GCCCTGGTCTATGGCCGAGTGCTCGATG | 28 |
| 7dSP2 | ATGTACTCGGGACAAGATCCCGATCAGC | 28 |
| 7dSP3 | CCCGTGTGTACCCGNNNNNNNNGATGGC | 30 |
| pnpC-FP | CGGCATATGACCGATCATTACAAAG (<i>Nde</i> I site underlined) | 25 |
| pnpC-RP | TCGCTCGAGTTATCCGCCTCCATG (<i>Xho</i> I site underlined) | 25 |

1.1.4 主要试剂和仪器：对硝基苯酚 (PNP) 为分析纯, 购自上海化学试剂有限公司。邻苯二酚(catechol)、偏苯三酚(hydroxyquinol)购自 Sigma 公司。其他试剂未经特别说明, 均为分析纯。所用紫外分光光度计型号为岛津 UV2401 (SHIMADZU, Japan)。

1.2 菌株的分离、鉴定

取农药污染土壤 2.0 g 加入到 MSM (PNP 浓度为 100 mg/L) 中, 180 r/min, 30 振荡培养, 当培养基由黄色变为澄清时, 表明 PNP 已发生降解。连续转接几代, 获得有活性的富集液。将活性富集液梯度稀释后涂布于含有 100 mg/L PNP 的固体 MSM, 30 培养 4 d, 挑取菌落周围黄色已消失的单菌落接至 PNP 浓度为 100 mg/L 的液体 MSM 中, 通过颜色变化及其检测验证其降解能力。通过形态学、生理生化实验及其 16S rDNA 的相似性分析, 参照文献[12]将菌株初步鉴定到属。

基因组 DNA 采用 CTAB 法提取^[13]。16S rDNA 扩增引物为细菌 16S rDNA 通用引物, 正向引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 (*E.coli* 27F), 反向引物: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3 (*E.coli* 1492R)。PCR 产物(1.5 kb 左右)采用 V-Gene 公司的凝胶回收试剂盒切胶回收, 连接至 pMD18-T Vector, 转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆测序, 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。将测序结果与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 及其 Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>) 上的相关 16S rDNA 序列进行同源性比对分析, 采用 BioEdit、Mega3.0 等软件进行系统进化分析, Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用 neighbor-joining 法构建系统发育树, 1000 次随机抽样, 计算自引导值 (bootstrap) 以评估系统发育树的置信度。

1.3 PNP 降解相关基因的克隆

用 BioEdit 软件对已经报道的编码偏苯三酚 1,2-双加氧酶 (hydroxyquinol 1,2-dioxygenase) 的基因序

列^[8,14-17]进行分析, 根据保守区设计一对引物 pnpCp-FP 和 pnpCp-RP (表 2) 扩增其部分序列。PCR 反应条件为: 95 2 min; 94 30 s, 60 30 s, 72 45 s, 30 个循环; 72 10 min。将获得的产物进行 TA 克隆后测序。再根据获得的序列设计引物 7uSP1、7uSP2、7uSP3、7dSP1、7dSP2、7dSP3 (表 2), 然后利用 SEFA-PCR^[18] 进行染色体步移 (chromosome walking), 对已知序列两端进行 PCR 扩增, 将获得的产物测序拼接后在 NCBI 网站上采用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>) 进行 ORF 在线分析。

SEFA-PCR 扩增体系和反应条件如下: 第一轮扩增体系: 15 μL 2 × GC buffer I, 4 μL 2.5 mmol/L dNTP, 1 μL 5 μmol/L SP3, 0.3 μL LA-Taq, 1 μL 模板 (约 50 ng/μL), 总体积 30 μL。PCR 反应条件: 95 1 min; 94 30 s, 30 3 min, 以每秒增加 0.2 的速度升至 70, 70 5 min。取出 PCR 管加入 1 μL 25 μmol/L SP1 引物后继续进行 PCR, 反应条件: 94 30 s, 70 5 min, 25 个循环。接下来进行 8 轮不对称 PCR: 94 30 s, 50 30 s, 70 5 min, 1 个循环; 94 30 s, 70 5 min, 2 个循环。8 轮不对称 PCR 完成后 70 延伸 5 min。取 0.5 ~ 1.0 μL 电泳检测, 看有无拖尾状扩增产物, 如果有则继续进行第二轮扩增。第二轮扩增体系: 5 μL 2 × GC buffer I, 4 μL 2.5 mmol/L dNTP, 2 μL 5 μmol/L SP2, 0.3 μL LA-Taq, 1 μL 上轮 SEFA-PCR 扩增产物 (稀释 1000 倍作为模板), 总体积 30 μL。PCR 条件: 95 2 min; 94 30 s, 70 5 min, 30 个循环; 72 10 min。第二轮完成后, 取 0.2 ~ 1 μL 上样电泳检测。

1.4 偏苯三酚双加氧酶基因在大肠杆菌中的表达及其酶活检测

偏苯三酚双加氧酶基因 *pnpC* 通过表 2 中的引物 pnpC-FP 和 pnpC-RP 进行扩增 (其中 pnpC-FP 和 pnpC-RP 分别引入了 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切位点), PCR

反应条件为：95 2 min；94 30 s，58 30 s，72 45 s，30 个循环；72 10 min。将 PCR 产物克隆至 pET29a 质粒相应酶切位点上得到 pETpnpC，转化 *E. coli* BL21 (DE3)，形成表达菌株 BL21/pETpnpC。表达产物的 SDS-PAGE 分析参照文献[11]进行。蛋白理论分子量采用 ExPASy 在线分析软件计算(http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)。

离心收集表达菌株 *E. coli* BL21/pETpnpC (培养温度 37 °C, 150 r/min, 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h) 用 0.2 mol/L 的 PBS (pH 7.5) 缓冲液洗涤并悬浮，冰浴上超声破碎 6 min (其中破碎时间和间隔时间均为 3 s)，12000×g 离心 20 min，上清即为偏苯三酚双加氧酶 PnpC 粗酶液。酶反应体系如下：底物 0.2 mmol/L，PBS 50 mmol/L，粗酶 10~20 μg。30 °C 反应 10 min 后，加 1 mol/L 盐酸终止反应，调 pH 至 7.5 后经紫外扫描测定。底物为偏苯三酚、邻苯二酚，酶活力分别参照文献[19~21]测定，蛋白浓度采用考马斯亮蓝法测定^[13]。酶活力单位定义：在 30 °C pH 7.5 条件下，1 min 生成 1 μmol 产物所需要的酶量定义为一个活力单位 (1U)。

1.5 分析方法

PNP 浓度测定采用紫外分光光度法^[22]，NO₂⁻测定采用格里斯试剂法^[23]，生物量用 OD₆₀₀ 表示。

2 结果和分析

2.1 菌株 PDS-7 的分离及鉴定

分离到一株 PNP 降解菌，命名为 PDS-7。该菌株在 LB 培养基上生长 1 d 后，菌落呈圆形，直径 1.5 mm，表面凸起、光滑，透明，边缘整齐。菌体形态为短杆状，菌体大小 0.8~1.0 μm × 1.5~2.0 μm，端生多根鞭毛，革兰氏染色阴性，不产芽孢。PDS-7 菌株利用葡萄糖产酸，不发酵葡萄糖，过氧化氢酶、氧化酶及硝酸盐还原反应为阳性，甲基红反应、VP 反应、明胶液化及吲哚实验为阴性。

通过将菌株 16S rDNA 序列 (GenBank 登陆号 DQ860087) 与 GenBank 上的其它 16S rDNA 序列进行 Blast 分析，发现与 PDS-7 序列同源性最高的绝大多数为假单胞菌属的菌株，选取相关菌株的 16S rDNA 序列用 neighbour-joining method 构建系统发育树 (图 2)。由图可见，菌株 PDS-7 位于 *Pseudomonas* 分支上，与假单胞菌属模式种 *P. monteilii* 及 *P. plecoglossicida* 16S rDNA 序列相似性均为 99.8%，与 *P. mosselii* 16S rDNA 序列相似性 99.4%。结合表型特征、生理生化特性，可确定 PDS-7 归属于 *Proteobacteria* (变形菌门)、*γ-Proteobacteri* (*γ*-变形菌纲) 中的 *Pseudomonas* sp. (假单胞菌属)。

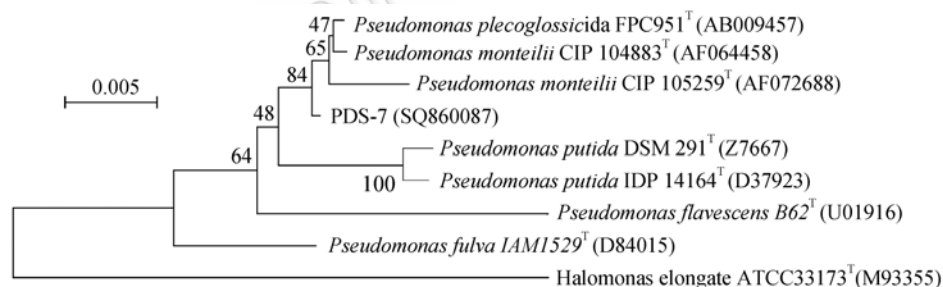


图 2 基于菌株 PDS-7 和亲缘关系相近菌株的 16S rDNA 序列的无根系统发育树

Fig. 2 Unrooted neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences of strain PDS-7 and related species. Bootstrap values obtained with 1000 repetitions are indicated as percentages at the nodes. The scale bar represents 0.005 substitution per nucleotide site and GenBank accession numbers are in parentheses. *Halomonas elongate* ATCC 33173^T is selected as outgroup for tree construction.

2.2 菌株 PDS-7 对 PNP 的降解特性

分别研究了 PNP 作为唯一碳源和唯一碳氮源时菌株 PDS-7 对 PNP 的降解情况，结果表明 PDS-7 不仅可以利用 PNP 作为唯一碳源生长，还能利用它作为唯一碳氮源生长 (图 3)。如图 3-A 所示，当以 80 mg/L PNP (0.57 mmol/L) 作为唯一碳氮源时，PNP 约在 20h 时开始被降解，约 30 h 后基本完全降解；当 PNP 开始降解时，NO₂⁻随之释放，到 30 h 时浓度

达到 0.37 mmol/L，随后浓度维持在 0.28 mmol/L 左右，远远低于理论值 (0.57 mmol/L)，因为 PNP 所释放的部分 NO₂⁻ 被菌株用作氮源来维持生长。而当以 PNP 作为唯一碳源时 (图 3-B)，PNP 降解延滞期大约 36 h，到 46 h 时降解完全；而期间 NO₂⁻ 几乎以化学计量释放，到 46 h 时浓度达到 0.57 mmol/L，随后浓度基本保持不变。

研究了初始 pH、温度、初始浓度、外加葡萄糖

对菌株 PDS-7 降解 PNP 的影响。结果表明, pH 值偏碱性 (pH7.0~9.0) 时更利于 PNP 的降解, 且 pH 越高菌株完全 PNP 降解所用时间越短, 而酸性条件 (pH<7.0) 抑制 PNP 的降解(图 4-A)。菌株降解 PNP 的温度范围较广, 在 20 ~ 37 内均能较好地降解 PNP, 45 下菌株生长和 PNP 降解均受到抑制(图 4-B)。随着初始 PNP 浓度增加, PDS-7 降解 PNP 的延滞期也相应增加, 菌株对的最高耐受浓度为 80 mg/L (0.57 mmol/L), 当 PNP 浓度为 0.72 mmol/L 时, 菌株不再表现出降解能力(图 4-C)。添加低浓度的葡萄糖 (0.01%, 0.05%, 0.1%) 能够明显缩短延滞期、促进 PNP 的降解; 添加高浓度的葡萄糖 (0.3%), 在前期能促进 PNP 的降解, 但到降解中后期, 由于菌株利用葡萄糖产酸, 导致培养基 pH 值急剧下降(图 4-E), 菌株的生长和 PNP 降解均受到抑制(图 4-D 及图 4-F)。

2.3 PNP 降解相关基因的克隆

通过引物 pnpCp-FP 和 pnpCp-RP (表 2), 从 PDS-7 的基因组 DNA 中成功扩增出了大小为 548 bp 的基因片段。序列测定和分析显示, 它与偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因 *hadC*^[14]、*tftH*^[15]、*dxnF*^[16]、*npcC*^[8] 和 *orf2*^[17] 相似性为 59%~62%, 推测所克隆的基因片段为 *Pseudomonas* sp. PDS-7 偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因的一部分。利用根据该序列设计的六条引物(表 2), 通过 SEFA-PCR 的方法向该片段两端进行“染色体步

移”。成功地向上下游分别扩增出 2.3kb、2.7kb 左右的片段, 分别克隆至 pMD18-T 载体, 形成 pHQ23、pHQ27 质粒(表 1), 对其中的插入片段分别进行测序。结果显示, 上游片段大小为 2,327 bp、下游片段大小为 2,716 bp, 将它们和已知片段 548 bp 拼接后得到大小为 4,668 bp 的片段, 其 GenBank 登陆号为 EU233791。

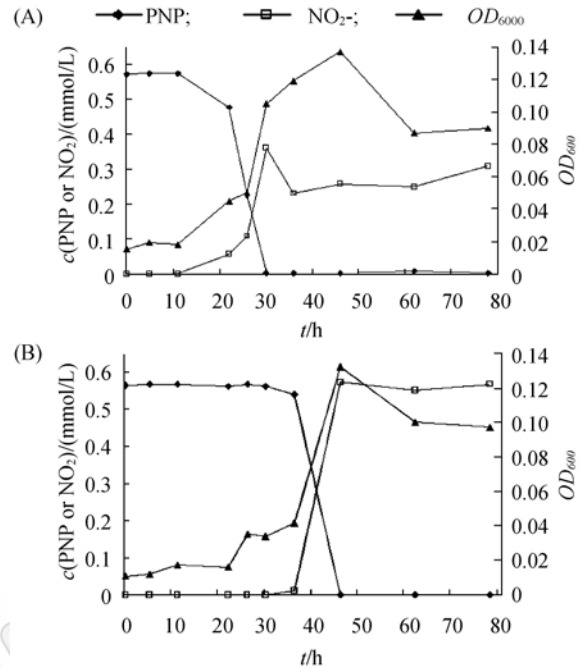


图 3 PDS-7 对 PNP 的降解、NO₂⁻ 的释放及其菌株生长情况
Fig. 3 Degradation of PNP, release of nitrite and the growth of PDS-7. A: PNP as the sole carbon and nitrogen sources; B: PNP as the sole carbon source.

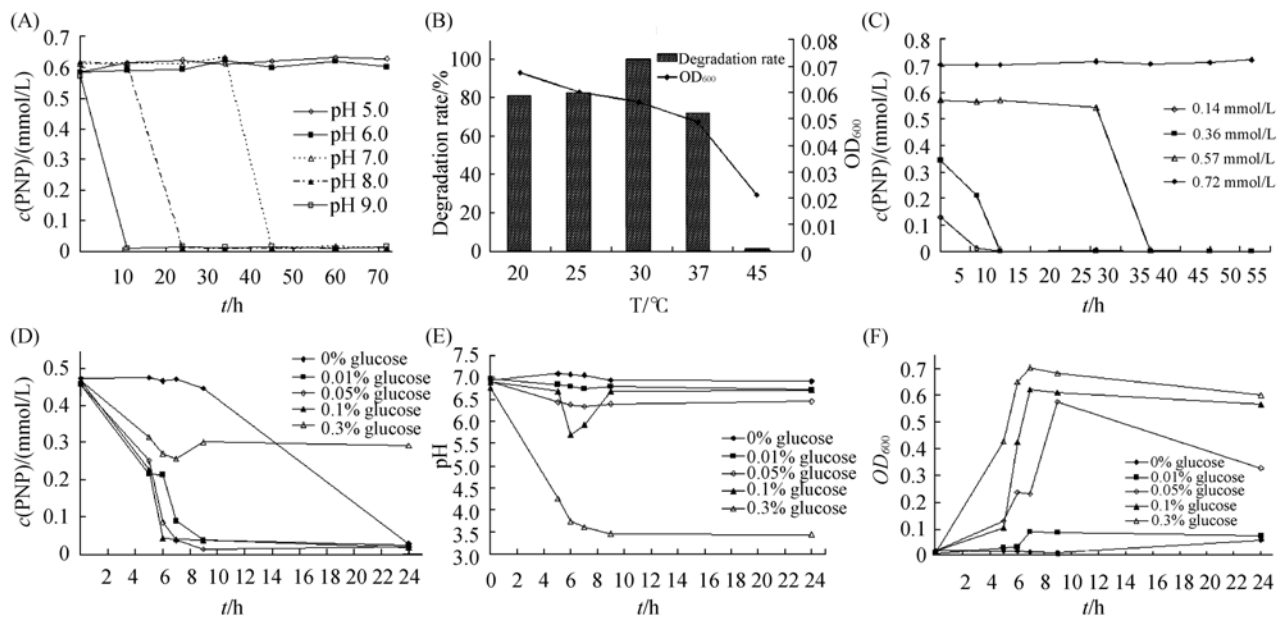


图 4 初始 pH、温度、初始 PNP 浓度及添加葡萄糖对菌株 PDS-7 降解 PNP 的影响

Fig. 4 Effect of initial pH, temperature, initial PNP concentration and addition of glucose on the degradation of PNP by strain PDS-7. A, B, C: effect of initial pH, temperature and initial PNP concentration on the degradation of PNP, respectively; D, E, F: adding glucose on the degradation of PNP, medium pH value and growth of PDS-7, respectively.

将 EU233791 片段在 NCBI 上采用 ORF Finder 程序进行 ORF 分析, 分析结果表明, 该片段上存在着 6 个大于 500 bp 的 ORF, 经过 protein blast (blastp) 程序分析发现其中有两个 ORF 可能编码 PNP 降解相关基因。ORF1, 位于正链 471~1535 bp, 全长 1065 bp, 编码 355 个氨基酸残基, 理论分子量 37718Da, 氨基酸序列与马来酰醋酸还原酶相似性较高, 最高的达到 75%, 初步推测 ORF1 编码马来酰醋酸还原酶, 将其命名为 *pnpD*。ORF2, 位于正链 1607~2476, 经过序列比对发现, 最初 PCR 克隆的偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因片段(548 bp)处于 ORF2 内。ORF2 全长 870 bp, 编码 290 个氨基酸残基, 理论分子量 32457Da, 氨基酸序列与偏苯三酚 1,2-双加氧酶 (1,2-HQD) 有很高的同源性, 最高达到 68%, 将 ORF2 命名为 *pnpC*, 推测该基因编码偏苯三酚 1,2-双加氧酶, 催化偏苯三酚 1 位与 2 位之间的加氧开环, 最终形成马来酰醋酸。

2.4 偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因 *pnpC* 的克隆及其在大肠杆菌中的表达

将 *pnpC* 基因在 *E. coli* BL21/pETpnpC 中进行表达和 SDS-PAGE 分析, 结果显示(图 5), 经过 IPTG 诱导后在约 33.4 kDa 处出现了明显的特异表达条带(箭头所示), 并且大小与理论值 32.5 kDa 相符, 表明 *pnpC* 在 IPTG 的诱导下得到了正确表达。

测定了偏苯三酚 1,2-双加氧酶粗酶 PnpC 对不同底物(偏苯三酚和邻苯二酚)的开环活性, 设立 *E. coli* BL21/pET29a 作为对照。结果表明, 对照对两种底物无开环活性, 而 PnpC 粗酶液对偏苯三酚和邻苯二酚均具有邻位开环活性, 比活力分别为

0.45 U/mg protein 和 0.37 U/mg protein, 表明偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因得到了活性表达。

3 讨论

PNP 是一种分布广泛的污染物, 它的生物降解是环境科学研究的热点之一。国内外学者已从多个属中分离到 PNP 降解菌, 对其降解特性、降解途径等进行了深入研究。PNP 降解途径研究得已较为透彻, 主要有两条: 对苯二酚 (hydroquinone) 途径和偏苯三酚 (hydroxyquinol) 途径, 前者在革兰氏阴性菌中较多^[5, 6], 而后者普遍存在于革兰氏阳性菌^[2, 7, 8]。但是降解基因的克隆一直都没有显著进展。直到近几年, 国外学者才分别从 *Arthrobacter*^[2]和 *Rhodococcus*^[8]这两个属中克隆到 PNP 降解基因簇。本研究分离到一株 PNP 降解菌 *Pseudomonas* sp. PDS-7, 对其降解特性进行了初步研究。克隆了该菌株降解 PNP 途径中的偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因 *pnpC* 及马来酰醋酸还原酶基因 *pnpD* (GenBank 登陆号 EU233791), 将 *pnpC* 在 *E. coli* BL21(DE3)菌株进行了表达, 表达产物对偏苯三酚和邻苯二酚均有邻位开环活性, 表明偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因 *pnpC* 得到了活性表达。但是, 对于 *Pseudomonas* sp. PDS-7 降解 PNP 途径中的完整基因簇的解析还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Spain JC. Biodegradation of nitro-aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 523-555.
- [2] Perry LL, Zylstra GJ. Cloning of a gene cluster involved in the catabolism of *p*-nitrophenol by *Arthrobacter* sp. strain JS443 and characterization of the *p*-nitrophenol monooxygenase. *J Bacteriol*, 2007, 189 (21): 7563-7572.
- [3] 崔中利, 张瑞福, 何健, 等. 对硝基苯酚降解菌 P3 的分离、降解特性及基因工程菌的构建. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2002, 42(1): 19-26.
- [4] Wan NS, Gu JD, Yan Y. Degradation of *p*-nitrophenol by *Achromobacter xylosoxidans* Ns isolated from wetland sediment. *Int Biodeter Biodegr*, 2007, 59 (2): 90-96
- [5] Prakash D, Chauhan A, Jain RK. Plasmid encoded degradation of *p*-nitrophenol by *P. cepacia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224 (2): 375-381.
- [6] Spain JC, Gibson DT. Pathway for biodegradation of *para*-nitrophenol in a *Moraxella* sp.. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57 (3): 812-819.
- [7] Kadiyala V, Spain JC. A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of *p*-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(7): 2479-2484.
- [8] Kitagawa W, Kimura N, Kamagata Y. A novel *p*-nitrophenol degradation gene cluster from a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101. *J Bacteriol*, 2004, 186(15): 4894-4902.

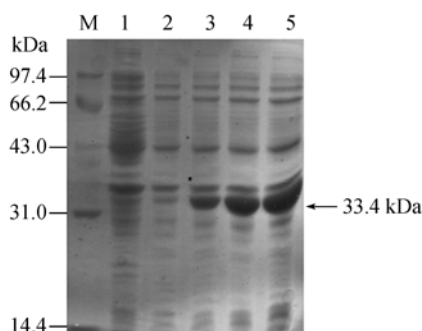


图 5 偏苯三酚 1,2-双加氧酶基因 *pnpC* 在 *E. coli* BL21 (DE3)中表达的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE of *pnpC* expression in *E. coli* BL21 (DE3). M. Marker; 1. protein extracts of *E. coli* BL21/pET29a cells; 2. protein extracts prepared from the uninduced *E. coli* BL21/pETpnpC cells; 3-5. protein extracts prepared from the induced *E. coli* BL21/pETpnpC cells for 1, 2 and 3 h, respectively. Expression product of *pnpC* gene is indicated by the arrow.

- [9] Bang SW. Molecular analysis of *p*-nitrophenol degradation by *Pseudomonas* sp. strain ENV2030. Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, NJ. Ph.D. thesis. 1997.
- [10] Takeo M, Yasukawa T, Abe Y, *et al.* Cloning and characterization of a 4-nitrophenol hydroxylase gene cluster from *Rhodococcus* sp. PN1. *J Biosci Bioeng*, 2003, 95(2): 139–145.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [12] Holt SG, Krieger NR, Sneath PHA, *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. New York: Williams and Wilkins, 1998.
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, 1995.
- [14] Hatta T, Nakano O, Imai N, *et al.* Cloning and sequence analysis of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase gene in 2,4,6-trichlorophenol-degrading *Ralstonia pickettii* DTP0602 and characterization of its product. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87 (3): 267–272.
- [15] Daubaras DL, Saido K, Chakrabarty AM. Purification of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase and maleylacetate reductase: the lower pathway of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism by *Burkholderia cepacia* AC1100. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(11): 4276–4279.
- [16] Armengaud J, Timmis KN, Wittich RM. A functional 4-hydroxysalicylate/ hydroxyquinol degradative pathway gene cluster is linked to the initial dibenzo-*p*-dioxin pathway genes in *Sphingomonas* sp. strain RW1. *J Bacteriol*, 1999, 181(11): 3452–3461.
- [17] Murakami S, Okuno T, Matsumura E, *et al.* Cloning of a gene encoding hydroxyquinol 1,2-dioxygenase that catalyzes both intradiol and extradiol ring cleavage of catechol. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(5): 859–865.
- [18] Wang S, He J, Cui Z, *et al.* Self-formed adaptor PCR: a simple and efficient method for chromosome walking. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(15): 5048–5051.
- [19] Latus M, Seitz H-J, Eberspächer J, *et al.* Purification and characterization of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Azotobacter* sp. strain GP1. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(7): 2453–2460.
- [20] Hegeman GD. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes of the wild type. *J Bacteriol*, 1966, 91(3): 1140–1154.
- [21] Feist CF, Hegeman GD. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. *J Bacteriol*, 1969, 100(2): 869–877.
- [22] 郭坤梅, 邓友军. 紫外分光光度法测定对硝基苯酚的适宜条件的探讨. *环境污染与防治* (*Environmental Pollution & Control*), 1998, 20 (1): 47–48.
- [23] White GF, Snape JR, Nicklin S. Biodegradation of glycerol trinitrate and pentaerythritol tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 637–642.

Characterization of a *p*-nitrophenol degrading bacterium *Pseudomonas* sp. PDS-7 and cloning of degradation relevant genes

Xiaojun Dong, Qing Hong*, Lian Li, Shunpeng Li

(Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to (i) isolate and characterize bacteria capable of degrading *p*-nitrophenol (PNP); (ii) determine the kinetics of biodegradation, (iii) clone and express the PNP-degrading related genes. [Methods] Enrichment method and serial dilution spread-plate method were employed to isolate PNP-degrading strain. Morphological, physiological & biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis were used to identify the isolate. Degradation kinetics was studied by flask test. PNP-degrading related genes were cloned by SEFA-PCR method. Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase encoding gene *pnpC* was cloned into pET29a to construct the recombinant plasmid pETpnpC and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The activity of the expressed product was determined by spectrophotometric method. [Results] Strain PDS-7 capable of utilizing PNP as the sole carbon, nitrogen and energy source was isolated and identified as *Pseudomonas* sp. It could tolerate the PNP concentration up to 80 mg/L, the optimal temperature for degradation was about 30°C and alkaline pH benefited PNP degradation. Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase and maleylacetate reductase encoding gene *pnpC* and *pnpD* were cloned and sequenced respectively, the sequence was deposited in GenBank with the accession number EU233791. *pnpC* was expressed in *E. coli* BL21 (DE3), the expressed product in cell-free crude extracts showed *ortho* ring cleavage activity to hydroxyquinol and catechol, with the special activity 0.45 U/mg protein and 0.37 U/mg protein, respectively, indicating *pnpC* gene encoding hydroxyquinol 1,2-dioxygenase was actively expressed. [Conclusion] One PNP-degrading strain *Pseudomonas* sp. PDS-7 was isolated and identified. Its degradation kinetics was studied. Its degradation relevant genes were cloned and expressed.

Keywords: *p*-nitrophenol; *Pseudomonas* sp. PDS-7; degradation kinetics; gene cloning

Supported by the Chinese National Programs for High Technology and Development (2007AA061101) and the Natural Resources Collecting Project of MOST(2005DKA21201-2)

*Corresponding author. Tel: +86-25-84396685; Fax: Tel: +86-25-84396314; E-mail: hongqingnjau@yahoo.com.cn

Received: 5 May 2008/ Revised: 18 July 2008