

转座元件介导的苯胺代谢基因簇的筛选和鉴定

梁泉峰 陈明 徐玉泉 张维 平淑珍 陆伟 宋先龙
王薇薇 耿立召 Masahiro Takeo 林敏*

(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; Department of Materials Science and Chemistry Graduate School of Engineering, University of Hyogo, Shosha Himeji 2167, Japan. * 联系人, E-mail: linmin57@vip.163.com)

摘要 利用苯胺不完全降解时中间代谢产物, 如邻苯二酚等的显色反应, 建立了简便快速的苯胺代谢途径相关基因的功能筛选方法. 从苯胺降解菌株 AD9 的基因组文库中筛选得到 3 个阳性重组子 pDA1, pDB2 和 pDB11. AD 和 C23O 酶活测定结果表明, pDA1 和 pDB11 分别含有功能完整的苯胺双加氧酶或邻苯二酚双加氧酶编码基因. 经核苷酸序列分析和拼接获得一个大小为 24.7 kb, 含 25 个可读框的苯胺代谢基因簇, 其中含有 17 个基因与苯胺代谢有关, 包括调控基因 *tadR*, 苯胺双加氧酶基因簇 *tadQTA1A2B*, 邻苯二酚间位裂解途径酶系基因簇 *tadD1C1D2C2EFGIJKL*. 苯胺代谢基因簇两侧含有转座酶和 IS1071 序列.

关键词 苯胺 生物降解 转座元件 基因簇

苯胺是一种重要的化工原料和精细化工中间体, 广泛应用于染料、农药、制药、橡胶等行业^[1,2]. 环境中许多微生物具有降解苯胺及其衍生物的代谢能力^[3~5]. 苯胺双加氧酶(aniline dioxygenase, AD)是苯胺代谢过程中的关键酶, 目前其基因的克隆方法主要采用苯胺双加氧酶缺失突变株筛选^[6]或利用PCR产物作为探针进行Southern blot筛选^[7,8], 但都有一定的局限性, 而且操作较复杂. 由于克隆方法的局限, 迄今为止仅在 *Pseudomonas putida* UCC22^[6], *Acinetobacter* sp. YAA^[9], *Frateriuria* sp. ANA-18^[7]和 *Delftia acidovorans* 7N^[8]等少数几个微生物中克隆到苯胺双加氧酶基因簇, 其中仅 *P. putida* UCC22 的质粒 pTDN1^[10]和 *Acinetobacter* sp. YAA 的质粒 pYA1^[11]携带完整的基因簇. 我们从印染厂活性污泥中分离到的一株能高效降解苯胺的细菌菌株AD9, 该菌株最高耐受苯胺浓度为 4500 mg/L, 在 18 h 内将起始浓度为 1000 mg/L 的苯胺完全降解. 本研究以AD9 菌株为材料, 建立了简便快速的苯胺代谢途径相关基因的功能筛选方法, 开展了苯胺代谢基因簇的筛选和鉴定工作.

1 材料与方法

() 实验材料. 苯胺降解菌分离于广东某印染厂的活性污泥中.

() AD9 基因文库的构建. 菌株AD9 的基因组DNA的提取采用Wilson^[12]的方法, 用 *Hind* 或 *EcoR*

部分酶切AD9 基因组DNA, QIAE Gel Extraction Kit (QIAE)回收 10~20 kb的片段, 去磷酸化后与 *Hind* 或 *EcoR* 酶切的pUC19 载体连接. 连接产物电击转化 *E. coli* JM109 感受态细胞.

() 酶活测定. 苯胺双加氧酶酶活测定和邻苯二酚 2,3 双加氧酶酶活测定分别采用Clark-type氧化电极方法^[9]和比色法^[13].

2 结果与讨论

为了得到 AD9 的苯胺降解基因簇, 采用 *Hind* 部分酶切 AD9 总 DNA, 与 *Hind* 酶切的 pUC19 载体连接. 连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 涂布于含 X-gal, IPTG 和 Amp(50 µg/mL)的 LB 固体培养基上, 获得约 10000 个含外源插入片段的白色重组子, 由此构建了 *Hind* 部分酶切的 AD9 总 DNA 文库.

利用苯胺不完全降解时中间产物的显色反应如当邻苯二酚(Catechol)代谢被阻断时, 邻苯二酚累积后自身氧化成棕色; 或 2-羟粘康酸半醛(HMS)代谢被阻断或邻苯二酚双加氧酶过量表达时, 因 HMS 累积而呈现现金黄色, 建立了快速简便的苯胺降解基因的功能筛选方法. 利用该方法从基因文库中筛选含参与苯胺代谢基因(簇), 获得 3 个阳性克隆. 筛选过程分别简述如下:

() 将前面构建的基因文库中的重组子转接在含有苯胺(300 mg/L)和 Amp(50 µg/mL)的 LB 固体培养基上, 20 h 后观察菌落的颜色变化, 从中获得阳性

重组子 pDA1, 其外源插入片段携带功能完整的苯胺双加氧酶基因, 但缺乏邻苯二酚双加氧酶基因, 结果导致邻苯二酚累积, 自身氧化成棕色(图 1(a)). 阳性克隆 pDA1 含大小为 9.3 kb 的 *Hind* 插入片段.

() 将前面构建的基因文库中的重组子转接在含有苯胺(300 mg/L)和 Amp(50 μ g/mL)的 LB 固体培养基上, 20 h 后喷涂 0.1 mol/L 邻苯二酚(10 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0)溶液, 菌落变为金黄色表明为含有邻苯二酚双加氧酶基因的克隆(图 1(b)). 阳性克隆含大小为 15.4 kb 的 *Hind* 插入片段. 该重组克隆命名为 pDB11. 限制性酶切分析表明, pDB11 的插入片段与 pDA1 的插入片段没有重叠部分.

() 由于 2 个阳性重组子所携带的 *Hind* 插入片段没有重叠部分, 为获得完整的苯胺代谢基因(簇), 我们构建了 *EcoR* 部分酶切的 AD9 总 DNA 文库, 采用喷涂邻苯二酚显色的方法从中得到一个菌落为金黄色的阳性克隆 pDB2, 含一段 8.2 kb *EcoR* 插入

片段. 该片段分别与 pDA1 和 pDB11 携带的 *Hind* 插入片段部分重叠(图 2).

对阳性重组子 pDA1 和 pDB11 进行了 AD 和 C23O 酶活测定, 600 mg/L 苯胺诱导 4 h, 重组子 pDA1 有明显的苯胺双加氧酶活性($32 \pm 3 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g干重}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), 而重组子 pDB2 的邻苯二酚双加氧酶活性为 3.2 U/mg 蛋白, 表明阳性重组子 pDA1 和 pDB11 分别含有功能完整的苯胺双加氧酶或邻苯二酚双加氧酶编码基因.

对 3 个阳性克隆 pDA1, pDB2 和 pDB11 进行核苷酸序列分析, 经拼接获得一段大小为 24.7 kb 的序列(GenBank 登录号: AY940090), 包含 25 个可读框, 其中至少含有 17 个与苯胺代谢有关的基因, 两侧含转座酶和 IS1071 序列(图 2, 表 1). 调控基因 *tadR* 编码赖氨酸型调控蛋白. *tadQTA1A2B* 基因簇的表达由一个启动子控制, 编码多组分的苯胺双加氧酶. *tadD1C1D2C2EFGIJKL* 基因簇的表达由一个启动子

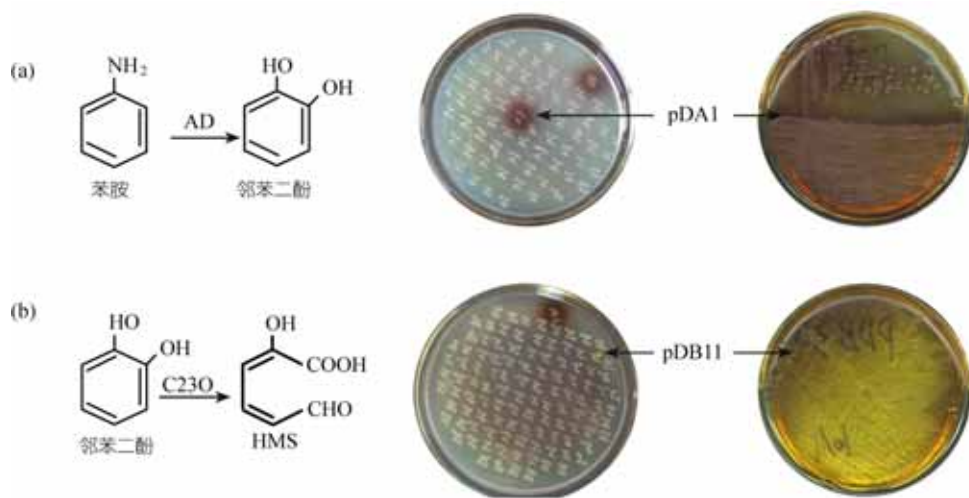


图 1 AD9 中苯胺代谢途径基因簇的功能筛选克隆

(a) pDA1, 含有编码苯胺双加氧酶(AD)基因的阳性克隆, 在含苯胺筛选平板上显棕色; (b) pDB11, 含有编码邻苯二酚双加氧酶(C23O)基因的阳性克隆, 在喷涂邻苯二酚后显金黄色

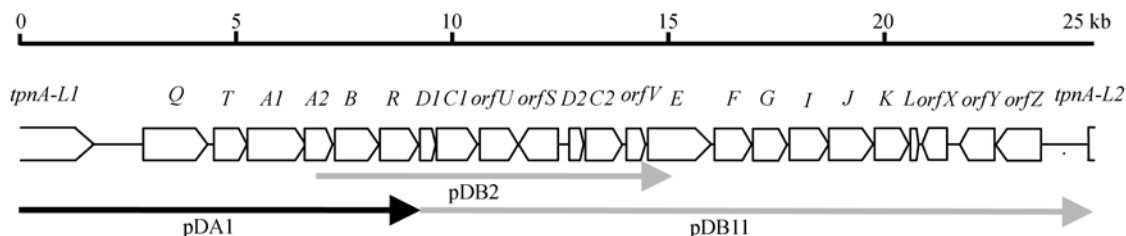


图 2 苯胺代谢基因簇的遗传组成

pDA1, 携带含有 AD 基因的 *Hind* 插入片段; pDB11, 携带含有 C23O 基因的 *Hind* 插入片段; pDB2, 携带含有 C23O 基因的 *EcoR* 插入片段

控制, 编码参与邻苯二酚间位裂解途径所有的酶系, 其中 *tadD1* 和 *tadD2* 编码的两组植物型铁氧化还原蛋白, *tadC1* 和 *tadC2* 编码的两组邻苯二酚双加氧酶, 功能是催化邻苯二酚的开环反应. 余下的 *tadEFGIJKL* 基因簇编码 2-羟粘康酸半醛脱氢酶(HMSD)和水解酶(HMSH)、2-酮-4-烯戊酸水解酶(OEH)、乙醛脱氢酶(ADA)、4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶(HOA)、4-草酰巴豆酸脱羧酶(OCD)和变构酶(OCT), 将邻苯二酚开环所产生的中间代谢产物 2-羟粘康酸半醛降解为丙酮酸和乙酰辅酶 A.

AD9 苯胺代谢基因簇与模式菌 *P. putita* UCC22^[10] 的苯胺代谢基因簇同源性比较见表 1. 在推测的 25 个可读框(ORF)中, 20 个 ORF 与模式菌 *P. putita* UCC22 的苯胺代谢功能基因高度同源, 其余 5 个 ORF 在模式菌苯胺代谢基因簇中没有发现. *orf11* 编码一个 LysR-type 调控蛋白, 但是否参与苯胺代谢尚不清楚. *orf10* 编码一个未知蛋白. 在 *tadL* 的下游的 3

表 1 AD9 的苯胺降解基因(簇)与模式菌 *P. putita* UCC22 的同源性比较

ORF	推测功能	同源蛋白(序列一致性)
1	转座酶	TnpA(96%)
2	氨基转运	TdnQ(94%)
3	氨基转运	TdnT(84%)
4	双加氧酶大亚基	TdnA1(96%)
5	双加氧酶小亚基	TdnA2(92%)
6	电子传递蛋白	TdnB(84%)
7	赖氨酸型调控蛋白	TdnR(91%)
8	植物型铁还原蛋白	TdnD(73%)
9	邻苯二酚 2, 3 双加氧酶	TdnC(97%)
10	产物未知	
11	赖氨酸型调控蛋白	
12	植物型铁还原蛋白	TdnD2(83%)
13	邻苯二酚 2, 3 双加氧酶	TdnC2(93%)
14	产物未知	ORF4(76%)
15	2-羟粘康酸半醛脱氢酶	TdnE(94%)
16	2-羟粘康酸半醛水解酶	TdnF(89%)
17	2-酮-4-烯戊酸水解酶	TdnG(87%)
18	乙醛脱氢酶	TdnI(93%)
19	4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶	TdnE(93%)
20	4-草酰巴豆酸脱羧酶	TdnK(93%)
21	4-草酰巴豆酸变构酶	TdnL(100%)
22	MarR-type 调控蛋白	
23	β -keto adipate enol-lactone 水解酶	
24	粘康酸盐环化异构酶	
25	转座酶	TnpA (100%)

个可读框 *orf22*, *23*, *24* 编码的基因产物分别与 MarR-type 调控蛋白, β -keto adipate enol-lactone 水解酶和粘康酸盐环化异构酶有很高的同源性(表 1).

AD9 苯胺代谢过程中 2-羟粘康酸半醛(HMS)转化生成 2-酮-4-烯戊酸(OE)的途径有 2 条: (1) 水解分支, 直接由 2-羟粘康酸半醛水解酶(HMSH)催化 HMS 生成 OE; (2) 4-草酰巴豆酸(OC)分支, 经 2-羟粘康酸半醛脱氢酶(HMSD), 4-草酰巴豆酸变构酶(OCT)和脱羧酶(OCD)催化 HMS 生成 OE. 中间代谢产物 OE 经 2-酮-4-烯戊酸水解酶(OEH)、4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶(HOA)和乙醛脱氢酶(ADA)催化被降解为丙酮酸和乙酰辅酶 A, 进入三羧酸循环(图 3).

目前在许多细菌菌种中都发现能够降解苯胺及其衍生物菌株, 如 *Alcaligenes*^[14], *Pseudomonas*^[15~17], *Acinetobacter*^[18], *Rhodococcus*^[19,20], *Frateridia*^[21], *Moraxella*^[22], *Nocardia*^[23], 和 *Delftia*^[24~26]. 本实验室所分离高效降解苯胺的 AD9 菌株经传统菌株表型比较、16s rDNA 序列同源性比对 (GenBank 登录号: AY89912)、GC 含量测定以及标准菌株 DNA-DNA 杂交分析, 将该菌鉴定为 *Delftia tsuruhatensis* AD9, 同时我们采用脉冲场电泳和 Southern 杂交实验结果表明, AD9 的苯胺降解基因簇位于染色体上(结果待发表). *Delftia tsuruhatensis* 是由 Shigematsu 等人^[27] 分离鉴定的一个新种, 模式菌株 *D. tsuruhatensis* T7 没有苯胺降解能力^[27]. 目前已报道的苯胺降解性基因簇均位于大质粒上^[10,11].

转座子在外源生物物质的生物降解研究中普遍存在, 并且在微生物对环境污染物的适应性进化中起着关键的作用. 转座子以不同形式在微生物种群间进行水平的基因转移, 介导遗传物质的重排, 如插入、缺失、倒序等, 进而产生新的分解代谢途径以适应环境中新出现的人工合成化合物的变化. 这种基因适应性机制极大地扩大了微生物的底物范围, 对分解途径的进化也起到很大作用^[28]. AD9 中苯胺代谢基因簇与 *P. putida* UCC22 质粒编码的苯胺代谢基因簇在序列和遗传组织上有很高的同源性(表 1), 两侧由转座酶和 IS 序列环绕, 这可以作为苯胺代谢基因定位于转座子上的证据之一.

Masahiro 等人^[11] 在研究 *Acinetobacter* sp. strain YAA 中苯胺代谢途径基因簇时, 曾发现在含有苯胺的培养基上携带 AD 基因的亚克隆显示棕色的现象.

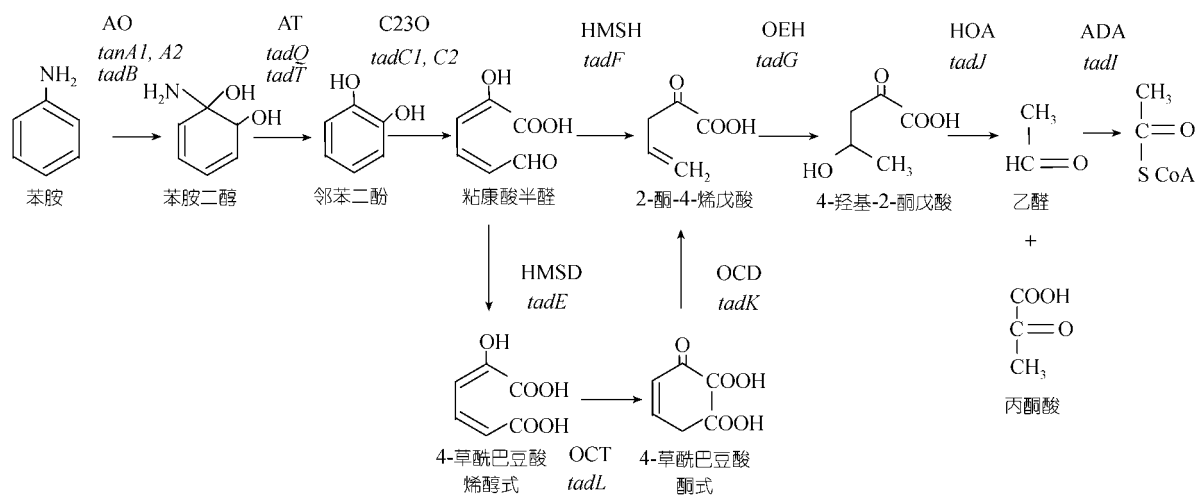


图 3 菌株 AD9 中推测的苯胺代谢相关酶系和代谢途径

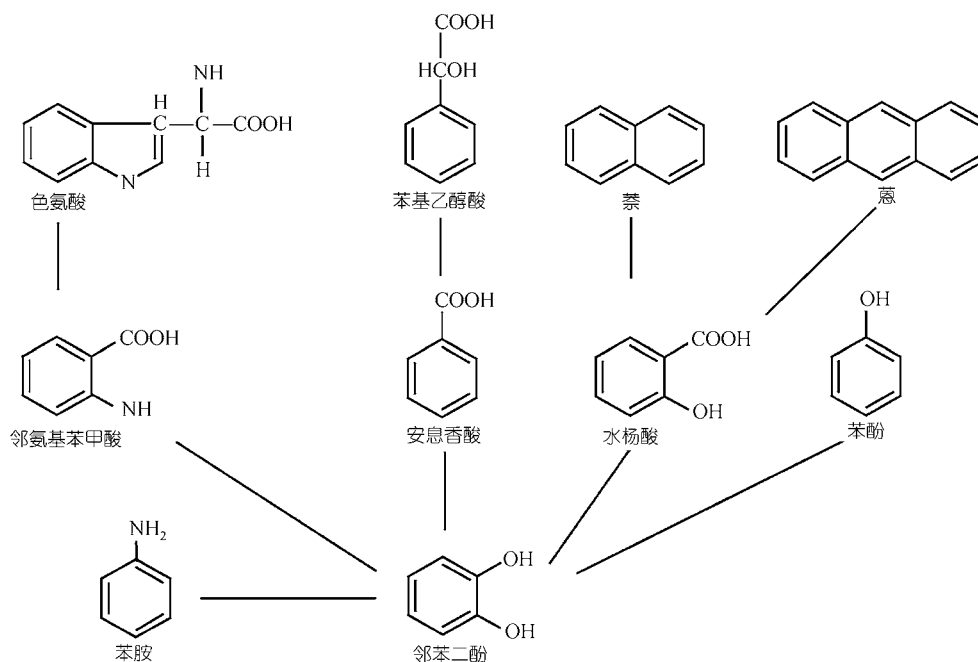


图 4 邻苯二酚是多种芳烃化合物降解途径的共同中间产物

本研究利用苯胺不完全降解时中间代谢产物如邻苯二酚等的显色反应, 建立了苯胺代谢途径相关基因的功能筛选方法, 具有适用范围广, 方法简便的特点。在许多芳烃污染物如苯酚(phenol)、萘(naphthalene)、苯基乙醇酸(mandelic acid)和水杨酸(salicylic acid)等的降解途径中, 邻苯二酚是它们的共同中间产物(图 4)^[29,30], 本研究也为其他芳烃化合物代谢的关键酶, 如苯酚羟化酶、萘双加氧酶等的编码基因, 提供了一条可能的简便可行, 适用范围广的功能筛选策略。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30470047 和 30200007)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2005AA226030)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Meyer U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: Leisinger T, Hütter R, Cook A M, eds. Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds. London: Academic Press, 1981. 371~385
- 2 Kearney P C, Kaufman D D. Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 1975

- 3 Bollog J M, Blattmann P, Laanio T. Adsorption and transformation of four substituted anilines in soil. *J Agric Food Chem*, 1978, 26: 1302~1306
- 4 Lyons C D, Katz S, Bartha R. Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environment. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48: 491~496
- 5 Lyons C D, Katz S, Bartha R. Persistence and mutagenic potential of herbicide-derived aniline residues in pond water. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1985, 35: 696~703[DOI]
- 6 Fukymori F, Saint C P. Nucleotide sequences and regulational analysis of involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1). *J Bacteriol*, 1997, 179: 399~408
- 7 Murakami S, Hayashi T, Maeda T, et al. Cloning and functional analysis of aniline dioxygenase gene cluster, from *Frateuria species* ANA-18, that metabolizes aniline via an *ortho*-cleavage pathway of catechol. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67: 2351~2358[DOI]
- 8 Urata M, Uchida E, Nojiri H, et al. Genes involved in aniline degradation by *Delftia acidovorans* strain 7N and its distribution in the natural environment. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68: 2457~2465[DOI]
- 9 Fujii T, Takeo M, Maeda Y. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. *Microbiology*, 1997, 143: 93~99
- 10 Fukymori F, Saint C P. Complete nucleotide sequence of the catechol metabolic region of plasmid pTDN1. *J Gen Appl Microbiol*, 2001, 47: 329~333
- 11 Takeo M, Fujii T, Maeda Y. Sequence analysis of the genes encoding a multicomponent dioxygenase involved in oxidation of aniline and *o*-toluidine in *Acinetobacter* sp. strain YAA. *J Ferment Bioeng*, 1998, 85: 17~24[DOI]
- 12 Wilson, K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubul F M, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: J Wiley & Sons, 1987. 2.10~2.12
- 13 Nakazawa T, Yokota T. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2, demonstration of two benzoate pathways. *J Microbiol*, 1973, 115: 262~267
- 14 Rhodes M E. Aniline utilization by *Alcaligenes faecalis*: A taxonomic reappraisal. *J Appl Bacteriol*, 1970, 33: 714~720
- 15 Anson J G, Mackinnon G. Novel *Pseudomonas* plasmid involved in aniline degradation. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48: 868~869
- 16 Aoki K, Kodama N, Murakami S, et al. A high level of accumulation of 2-hydroxymuconic 6-semialdehyde from aniline by the transpositional mutant Y-2 of *Pseudomonas species* AW-2. *Microbiol Res*, 1997, 152: 129~35
- 17 Travkin V M, Solyanikova I P, Rietjens I M, et al. Degradation of 3,4-dichloro- and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K. *J Environ Sci Health B*, 2003, 38: 121~132
- 18 Kim S I, Leem S H, Choi J S, et al. Cloning and characterization of two *catA* Genes in *Acinetobacter lwoffii* K24. *J Bacteriol*, 1997, 179: 5226~5231
- 19 Aoki K, Shinke R, Nishira H. Metabolism of aniline by *Rhodococcus erythropolis* AN-13. *Agri Biol Chem*, 1983, 47: 1611~1616
- 20 Fuchs K, Schreiner A, Lingens F. Degradation of 2-methylaniline and chlorinated isomers of 2-methylaniline by *Rhodococcus rhodochrous* strain CTM. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 2033~2039
- 21 Aoki K, Ohtsuka K, Shinke R, et al. Rapid biodegradation of aniline by *Frateuria species* ANA-18. *Agri Biol Chem*, 1984, 48: 856~872
- 22 Zeyer J, Wasserfallen A, Timmis KN. Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an *ortho*-cleavage pathway. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 50: 447~453
- 23 Bachofer R, Lingens F, Schafer W. Conversion of aniline into pyrocatechol by a *Nocardia* sp.: Incorporation of oxygen-18. *FEBS Lett*, 1975, 50: 288~290
- 24 Boon N J, Goris P D V, Verstraete W, et al. Genetic diversity among 3-chloroaniline- and aniline-degrading strains of the *Comamonadaceae*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 1107~1115[DOI]
- 25 Liu Z, Yang H, Huang Z, et al. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58: 679~682[DOI]
- 26 Kahng H Y, Kukor J J, Oh K H. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 190: 215~221[DOI]
- 27 Shigematsu T, Yumihara K, Ueda Y, et al. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov, a terephthalate assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Bacteriol*, 2003, 53: 1479~1483
- 28 Top E M, Springael D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14: 262~269[DOI]
- 29 Dagley S. Microbial metabolism of aromatic compounds. In: Moo-Young M, Bull A T, Dalton H, eds. *Comprehensive Biotechnology*. Oxford: Pergamon Press, 1985. 483~505,
- 30 徐满, 张爱茜, 韩朔睽, 等. 取代硝基苯类化合物的 3D-QSAR 研究. *科学通报*, 2001, 46(19): 1614~1618

(2005-05-10 收稿, 2005-07-04 收修改稿)