

Delftia tsuruhatensis AD9 苯胺双加氧酶基因的过量表达及多功能降解工程菌的构建

耿立召, 梁泉峰, 张维, 平淑珍, 陆伟, 林敏, 陈明

(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: *Delftia tsuruhatensis* AD9 和 *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2 分别能利用苯胺和苯酚作为唯一碳源生长, 降解的第一个中间产物均为邻苯二酚, 随后裂解为参与三羧酸循环的中间产物。通过 PCR 方法克隆到苯胺高效降解菌 AD9 的苯胺双加氧酶基因, 并构建表达苯胺双加氧酶的广宿主质粒载体 pVD, 通过三亲接合, 导入到 AD9 和 PHEA-2 中。对两种重组菌中苯胺双加氧酶基因的表达及苯胺降解特性的分析结果表明, 增加苯胺双加氧酶基因的拷贝数可以提高野生型 AD9 的苯胺降解速率, 同时该基因的表达使 PHEA-2 菌获得苯胺降解能力。

关键词: 苯胺双加氧酶; *Delftia tsuruhatensis* AD9; *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0864(2008)04-0095-05

Over-expression of Aniline Dioxygenase Gene in *Delftia tsuruhatensis* AD9 and Construction of Engineering Strain of Multi-substrate Utilization

GENG Li-zhao, LIANG Quan-feng, ZHANG Wei, PING Shu-zhen, LU Wei, LIN Min, CHEN Ming

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: *Delftia tsuruhatensis* AD9 and *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2 can utilize aniline and phenol as the sole carbon source, respectively. Catechol is the first mid-metabolites through the degradation of aromatic compounds, which is degraded by certain enzymes to TCA-cycle intermediates. A complete aniline dioxygenase gene from AD9 strain was cloned into a broad host range plasmid, the resulting plasmid pVD was introduced by triparental mating into wild type strain AD9 and a phenol-degrading bacterium, *A. calcoaceticus* PHEA-2, respectively. The over-expression of aniline dioxygenase gene enhanced the aniline degradation of AD9 strain and conferred the capable of aniline utilization to the PHEA-2 strain.

Key words: aniline dioxygenase; *Delftia tsuruhatensis* AD9; *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2

苯胺及其衍生物是制药、染料和纺织等工业的重要原料^[1,2], 同时也是严重污染环境和危害人体健康的有害物质^[3-5], 因此世界各国政府和科学家十分重视苯胺降解研究。微生物降解苯胺具有速度快、消耗低、效率高、成本低、反应条件温和以及无二次污染等显著优点, 越来越多地引起人们的重视^[6-8]。

目前已经分离到多种降解苯胺及其衍生物的细菌^[9-16]。研究表明, 苯胺和苯酚的微生物降解

分别通过苯胺双加氧酶(aniline dioxygenase, AD)和苯酚单加氧酶(phenol monooxygenase)催化, 形成共同的中间代谢产物—邻苯二酚, 然后经邻苯二酚间位或邻位裂解途径进入三羧酸循环。目前只有少数几个菌株中苯胺双加氧酶基因簇得到真正克隆并注释, 这些菌株包括 *Pseudomonas putida* UCC22^[17], *Acinetobacter* sp. YAA^[18], *Frateriuria* sp. ANA-18^[19], *Delftia acidovorans* 7N^[20] 和 *Delftia tsuruhatensis* AD9^[21]。所克隆的苯胺降解基因簇都

收稿日期: 2008-04-09; 修回日期: 2008-06-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470047, 30770076)资助。

作者简介: 耿立召, 博士研究生, 主要从事环境微生物基因工程研究。Tel: 010-68919861; E-mail: luckyglz@163.com。通讯作者: 陈明, 研究员, 主要从事环境微生物的分子生物学研究。Tel: 010-68975038; E-mail: chenmingbio@hotmail.com

含有一个编码多组分苯胺双加氧酶的 *AD* 基因, 一个 *LysR*-type 的调控基因, 以及下游多个邻苯二酚间位或邻位裂解途径相关的酶。*AD9* 的苯胺双加氧酶基因是由 *tadQTA1A2B* 基因编码。

本实验构建了苯胺双加氧酶基因的广宿主载体, 通过三亲接合导入野生型菌株 *AD9* 和以苯酚为唯一碳源生长的 *A. calcoaceticus* PHEA-2 菌株^[22] 中, 分析苯胺双加氧酶基因的过量表达对宿主菌苯胺降解能力的影响, 以及对苯酚降解菌的苯胺降解能力的影响。为构建高效降解苯胺工程菌和多底物降解工程菌奠定了良好基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *JM109*, *D. tsuruhatensis AD9*, *A. calcoaceticus* PHEA-2, 广宿主载体 *pVK100*, *pRK2013* 均为本实验室保存, *pGEM-T* 载体购于 *Promega* 公司。

1.2 培养基及生长条件

LB 培养基^[23] 用于大肠杆菌菌株的培养和保存。medium K 培养基^[24] 用于野生型菌株 *D. tsuruhatensis AD9* 和 *A. calcoaceticus* PHEA-2 的培养。大肠杆菌于 37℃ 培养。*D. tsuruhatensis AD9* 和 *A. calcoaceticus* PHEA-2 于 30℃ 培养。根据实验的要求, 在培养基中加入终浓度为 50 μg/mL 的卡那霉素, 100 μg/mL 的四环素。

1.3 试剂

限制性内切酶, *Ex-Taq* DNA 聚合酶和 *LA-Taq* DNA 聚合酶购自 *TaKaRa* 生物工程公司; *T4* DNA 连接酶购自 *Promega* 公司; DNA 纯化试剂盒购自 *QIAGEN* 公司; 生化与分子生物学试剂购自上海生物工程公司; 化学试剂均为分析纯; 引物合成及测序由上海生物工程公司完成。

1.4 质粒和基因组 DNA 提取

质粒和基因组 DNA 的提取方法均按常规方法操作^[23]。

1.5 广宿主载体的构建

根据苯胺降解基因簇序列 (*GenBank* 登录号 *AY940090*) 设计合成苯胺双加氧酶基因引物, *LF*: 5'-GCCAAGCTTTATATCTCAAAGGATCC -3' (下划线表示 *Hind* III 酶切位点); *LR*: 5'-CAG-

CAAGCTTTCTCCGGGG-3' (下划线表示 *Hind* III 酶切位点)。用 *TaKaRa* 公司的 *LA-Taq* DNA 聚合酶进行两步法扩增, PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 30s, 68℃ 15min, 30 次循环; 72℃ 延伸 10 min。通过 *Hind*III 分别酶切 PCR 产物和广宿主载体 *pVK100*, 利用 DNA 回收试剂盒从琼脂糖凝胶中分别回收相应的目的片段。在 *T4* DNA 连接酶作用下, 将苯胺双加氧酶基因片段定向克隆至 *pVK100* 的 *Hind*III 位点, 获得重组质粒 *pVD*。将 *pVD* 转入大肠杆菌 *JM109*, 然后接种到含四环素的 *LB* 培养基平板培养并挑取单菌落, 进行酶切和 PCR 验证。根据苯胺降解基因簇序列 (*GenBank* 登录号 *AY940090*), 设计合成引物, *QF*: 5'-TCCCTGCCTGGAGCCCCGAAAC-3' 和 *QR*: 5'-TCCCCGCGCCGTGAGTGAAGT-3'。PCR 扩增条件为: 95℃ 预变性 10 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 次循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.6 重组菌的构建

采用三亲接合的方法, 将含有广宿主质粒 *pVD* 的 *E. coli JM109* 细胞分别和 *D. tsuruhatensis AD9* 野生型细胞或 *A. calcoaceticus* PHEA-2 以及帮助质粒 *pRK2013* 按 2:2:1 的比例混合, 进行接合反应。在含 100 μg/mL 四环素的 medium K 培养基上筛选具有四环素抗性的接合子, 经过数次抗性转接筛选后, 选取抗性稳定的重组子进行酶切验证。

1.7 苯胺含量的测定

苯胺含量的测定采用偶氮比色法^[25]。测定野生型 *D. tsuruhatensis AD9* 和 *A. calcoaceticus* PHEA-2 及其重组菌的生长曲线和苯胺降解率时, 用苯胺为碳源的 medium K 无碳液体培养基, 200 rpm, 30℃ 摇床培养。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 *pVD* 的构建及其转化

PCR 扩增得到 9.3 kb 的苯胺双加氧酶基因片段, 和载体 *pVK100* 用 *Hind* III 酶切后连接, 挑选抗性克隆进行质粒提取, 进行酶切鉴定, 证明苯胺双加氧酶基因已定向插入载体 *Hind* III 位点处 (图 1a)。同时采用 *QF* 和 *QR* 引物进行 PCR 验证, 扩增得到 384 bp 片段, 符合预期结果。将该阳性重组质粒命名为 *pVD*。通过三亲接合法将

pVD 分别转移至 *D. tsuruhatensis* AD9 和 *A. calcoaceticus* PHEA-2 中, 形成重组菌 AD9A 和 PHEA-2A。

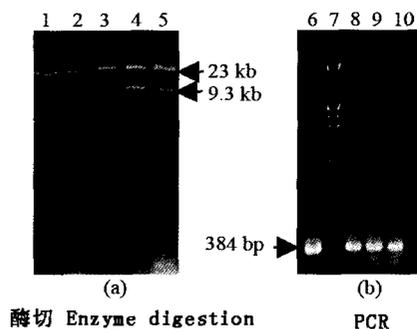


图1 pVD 苯胺双加氧酶基因的酶切和 PCR 检测

Fig.1 The verification of aniline dioxygenase gene of pVD by PCR and *Hind*III digestion.

1: λ DNA/*Hind*III marker; 2: pVK100/*Hind* III; 3: *E. coli*, pVD/*Hind* III; 4: AD9A, pVD/*Hind* III; 5: PHEA-2A, pVD/*Hind* III; 6: AD9QF/QR PCR; 7: λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III marker; 8: *E. coli*, pVD QF/QR PCR; 9: AD9A genomic DNA, QF/QR dPCR; 10: PHEA-2A genomic DNA, QF/QR PCR.

2.2 苯胺双加氧酶基因在苯胺降解菌 *D. tsuruhatensis* AD9 中的表达

从野生型 *D. tsuruhatensis* AD9 和重组接合子 AD9A 的平板上, 挑取单菌落分别接种在 20 mL LB 培养液中, 30 $^{\circ}$ C, 200 rpm 过夜培养, 分别以 2% 接种量接种到 100 mL 含 600 mg/L 苯胺的 medium K 无碳液体培养基中, 同时以不加菌的相同培养基做对照, 每隔 2 h 取 5 mL 样品测定苯胺的含量。溶液中苯胺浓度的测定结果如图 2 所示, 苯胺初始浓度为 600 mg/L, 重组菌 AD9A 在 18 h 内基本将苯胺全部降解, 而野生型 AD9 需 20 h 才能完全降解溶液中的苯胺, 这表明增加苯胺双加氧酶基因的拷贝数可提高苯胺降解的速率。

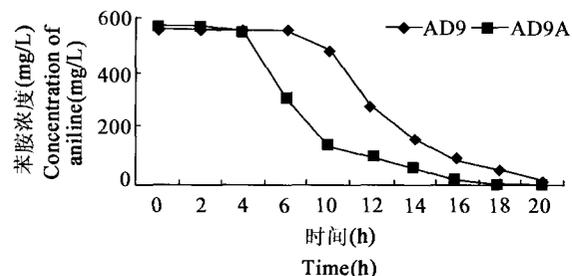


图2 AD9 和 AD9A 中苯胺的降解曲线

Fig.2 The degrading curve of aniline in AD9 and AD9A.

若同时接种野生型 AD9 和重组接合子 AD9A 于含有 600 mg/L 苯胺的平板上培养, 重组接合子 AD9A 生长 24 h 后, 即将苯胺转化为中间产物邻苯二酚, 菌落和无色培养基变为棕色, 36 h 后棕色逐渐消失, 表明苯胺被完全降解后, 没有新的邻苯二酚产生, 积累的邻苯二酚也逐渐被邻苯二酚双加氧酶所降解, 棕色消失。而野生型 AD9 则需要培养 42h 棕色才消失, 这也表明增加苯胺双加氧酶基因的拷贝数可加速苯胺的降解。

2.3 苯胺双加氧酶基因在苯酚降解菌 *A. calcoaceticus* PHEA-2 中的表达

通过三亲接合, 将质粒 pVD 导入到 *A. calcoaceticus* PHEA-2 中, 在 medium K 选择性培养基上筛选, 分别得到 15 株含苯胺双加氧酶基因的重组菌, 所有的重组菌均可以用 PCR 检测到苯胺双加氧酶基因。重组菌命名为 PHEA-2A。将重组菌 PHEA-2A 和野生菌 PHEA-2 分别在含有 600 mg/L 苯胺的 medium K 培养基的平板上划线培养 24 h 后, 重组菌 PHEA-2A 菌落处培养基显示棕色, 而 PHEA-2 菌落处培养基没有变化(见图 3), 表明在重组菌 PHEA-2A 中, 苯胺双加氧酶基因在苯酚降解菌 PHEA-2 得到表达, 在该酶的作用下, 苯胺降解生成邻苯二酚, 邻苯二酚氧化为醌类物质呈现棕色。

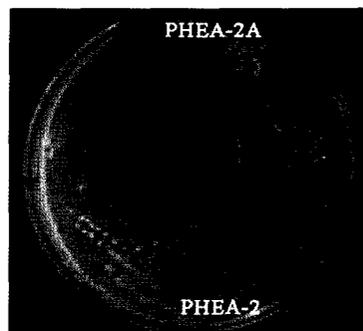


图3 苯胺双加氧酶基因在 PHEA-2A 中的表达

Fig.3 The expression of aniline dioxygenase genes in PHEA-2A.

同时, 为了进一步验证苯胺双加氧酶基因的表达, 从野生型 *D. tsuruhatensis* AD9, *A. calcoaceticus* PHEA-2 和重组接合子 PHEA-2A 的平板上, 分别挑取单菌落接种在 20 mL LB 培养液中, 30 $^{\circ}$ C, 200 rpm 过夜培养, 分别以 2% 的接种量转接到 100 mL 含 600 mg/L 苯胺的 medium K 无碳

液体培养基中,每隔 2 h 取 5 mL 样品测定苯胺的含量。溶液中苯胺浓度的测定结果见图 4。苯胺初始浓度为 600 mg/L,重组菌 PHEA-2A 在 20 h 内能将苯胺浓度降解到 380 mg/L,而野生型苯酚降解菌 *A. calcoaceticus* PHEA-2 培养基中的苯胺浓度没有变化。苯胺降解菌 *D. tsuruhatensis* AD9 则可在 20 h 内将苯胺全部降解,说明重组菌 PHEA-2A 获得了降解苯胺的能力,但仍然远远低于野生菌 AD9 苯胺降解效率。也说明导入的 *D. tsuruhatensis* AD9 的苯胺双加氧酶基因在 *A. calcoaceticus* PHEA-2 中得到了表达,但表达水平较低。

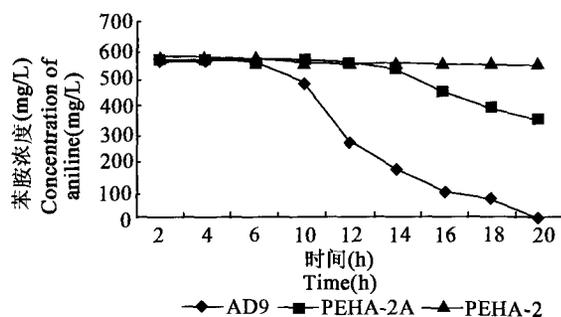


图 4 在苯酚降解菌 *A. calcoaceticus* PHEA-2 中的苯胺降解曲线

Fig. 4 The degrading curve of aniline in phenol-degrading bacterium *A. calcoaceticus* PHEA-2.

3 讨论

微生物降解芳香族化合物是通过外围酶将底物转化为中心中间产物邻苯二酚或原邻苯二酚,然后经邻位或间位进行开环降解,*D. tsuruhatensis* AD9 对苯胺的降解是通过间位裂解途径开环的。

将苯胺双加氧酶基因转入野生型 *D. tsuruhatensis* AD9 后,重组菌 AD9A 降解能力得到提高,说明在苯胺降解中,苯胺的降解效率主要由苯胺转化为邻苯二酚这一步决定。但在苯胺存在的情况下,重组菌的棕色中间产物积累,表明邻苯二酚双加氧酶基因的表达在 AD9 的苯胺代谢途径中同样重要。

本研究中,向苯酚降解菌 *A. calcoaceticus* PHEA-2 导入苯胺双加氧酶基因后,在以苯胺为唯一碳源和氮源的 medium K 培养基中,重组的苯酚降解菌 PHEA-2A 能够生长,但培养液中苯胺的降解率较野生菌 AD9 低,说明 *D. tsuruhatensis*

AD9 苯胺双加氧酶基因在 *A. calcoaceticus* PHEA-2 得到表达,但表达量较低。苯胺双加氧酶基因在 *A. calcoaceticus* 中表达量较低的原因可能是由于 *D. tsuruhatensis* 和 *A. calcoaceticus* 的遗传距离较远,*D. tsuruhatensis* 菌株 DNA 的 G + C 含量为 63%,而 *A. calcoaceticus* DNA 的 G + C 含量为 41% ~ 45%;或者可能由于 *D. tsuruhatensis* AD9 苯胺双加氧酶基因的启动子在 *A. calcoaceticus* 中不能得到有效的表达。本工作为今后高效降解苯胺工程菌和多底物降解工程菌的构建奠定了良好的工作基础。

参 考 文 献

- [1] Meyer U. Biodegradation of synthetic organic colorants [A]. In: Leisinger T, Hütter R, Cook A M, et al. (eds). Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds [M]. London: Academic Press, 1981, 371 - 385.
- [2] Kearney P C, Kaufman D D. Herbicides: chemistry, degradation, and mode of action [M]. (2nd ed.) New York: Marcel Dekker, Inc., 1975.
- [3] Bhinia F, Saha N C, Kaviraj A. Effects of aniline an aromatic amine to some freshwater organisms [J]. Ecotoxicology, 2003, 12: 397 - 404.
- [4] Crabtree H C, Hart D, Thomas M C, et al. Carcinogenic ranking of aromatic amines and nitro compounds [J]. Mutation Res., 1991, 264: 155 - 162.
- [5] Chung K T, Kirkovsky L, Kirkovsky A, et al. Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure-activity relationships [J]. Mutation Res., 1997, 387: 1 - 16.
- [6] Bollog J M, Blattmann P, Laanio T. Adsorption and transformation of four substituted anilines in soil [J]. J. Agric. Food Chem., 1978, 26: 1302 - 1306.
- [7] Lyons C D, Katz S, Bartha R. Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environment [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1984, 48: 491 - 496.
- [8] Lyons C D, Katz S, Bartha R. Persistence and mutagenic potential of herbicide-derived aniline residues in pond water [J]. Bull Environ. Contam. Toxicol., 1985, 35: 696 - 703.
- [9] 刘志培. 一株利用苯胺的细菌的分离筛选 [J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 221 - 223.
- [10] McClure N C, Venables W A. pTND1, a catabolic plasmid involved in aromatic amine catabolism in *Pseudomonas putida* mt-2 [J]. J. Gen. Microbiol., 1987, 133: 2073 - 2077.
- [12] Fujii T, Takeo M, Macda Y. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA [J]. Microbiology, 1997, 143: 93 - 99.
- [13] Aoki K, Ohtsuka K, Shinke R, et al. Rapid biodegradation of aniline by *Frateria* species ANA-18 [J]. Agri. Biol. Chem., 1984, 48: 856 - 872.
- [14] Aoki K, Kodama N, Murakami S, et al. A high level of accumulation of 2-hydroxyruconic 6-semialdehyde from aniline by

- the transpositional mutant Y-2 of *Pseudomonas* species AW-2 [J]. *Microbiol. Res.*, 1997, 152: 129 - 135.
- [15] Kim S I, Leem S H, Choi J S, *et al.*. Cloning and characterization of two *catA* genes in *Acinetobacter lwoffii* K24 [J]. *J. Bacteriol.*, 1997, 179: 5226 - 5231.
- [16] 梁泉峰, 陈明, 徐玉泉, 等. 一株新高效苯胺降解菌的分离、生理生化特性和分子鉴定 [J]. *高技术通讯*, 2005, 15(11): 69 - 73.
- [17] Fukumori F, Saint C P. Nucleotide sequences and regulational analysis involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1) [J]. *J. Bacteriol.*, 1997, 179: 399 - 408.
- [18] Fujii T, Takeo M, Macda Y. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA [J]. *Microbiology*, 1997, 143: 93 - 99.
- [19] Murakami S, Hayashi T, Maeda T, *et al.*. Cloning and functional analysis of aniline dioxygenase gene cluster, from *Frateriaspecies* ANA-18, that metabolizes aniline via an ortho-cleavage pathway of catechol [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, 67: 2351 - 2358.
- [20] 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 [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004, 68: 2457 - 2465.
- [21] Liang Q F, Takeo M, Chen M, *et al.*. Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in *Delftia tsuruhatensis* AD9 [J]. *Microbiology*, 2005, 151: 3435 - 3446.
- [22] Xu Y, Chen M, Zhang W, *et al.*. Genetic organization of genes encoding phenol hydroxylase, benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit and its regulatory proteins in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2 [J]. *Curr. Microbiol.*, 2003, 46: 235 - 240.
- [23] Sambrook J, Russell D W 著. 黄培堂等译. 分子克隆试验指南 [M]. (第 3 版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [24] Galimand M, Perroud B, Delorme F, *et al.*. Identification of DNA region homologous to nitrogen fixation genes *nifE*, *nifUS* and *fixABC* in *Azospirillum brasilense* Sp7 [J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1989, 135: 1047 - 1059.
- [25] Snell F D. *Colorimetric Methods of Analysis* [M]. IV; Amsterdam: Van Nostrand (3rd), 1954, 198 - 199.

【新书推介】



《城市污水处理系统运行及过程控制》

马勇, 彭永臻, 等 编著 科学出版社

出版日期: 2007. 12

I S B N: 978-7-03-020833-0

定 价: 86.00 元

开 本: B5

页 数: 542 页

本书基于我国污水处理现状以及污水处理系统特性, 强调了加强城市污水处理系统过程控制的必要性和重要性, 系统地介绍了过程控制的理论、方法与技术, 城市污水处理系统的常用仪表、过程控制系统及控制策略, 生物脱氮除磷的过程控制、运行中存在的问题, 厌氧处理系统的过程控制以及运行优化, 污水处理系统智能控制, 数据处理和污泥种群优化等内容。另外结合作者在城市污水处理系统运行与过程控制的多

年科研成果和技术改造实践, 对于城市污水处理系统运行与过程控制的前沿技术也进行了论述和介绍。

本书具有系统全面、内容新颖、实践性强的特点, 由国家科学技术学术著作出版基金资助出版。可作为城市污水处理系统运行管理人员的指导教材, 也可作为给水排水、环境工程专业的科研、设计人员及大专院校相关专业的师生参考书。