

研究报告

联苯利用节杆菌 YC-RL1 中 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶
BphC 功能验证

乔铖 任磊 樊双虎 贾阳 赵百锁 闫艳春*

(中国农业科学院研究生院 北京 100081)

摘要:【目的】通过节杆菌(*Arthrobacter* sp.) YC-RL1 对多氯联苯降解过程中关键基因 *bphC* 的克隆与原核表达, 鉴定其编码的 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶 BphC 的酶活特性与功能。【方法】以菌株 YC-RL1 全基因组为模板进行 PCR 扩增获得 *bphC* 基因, 将该基因转入 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞后进行原核表达; 利用镍柱亲和层析法对 BphC 酶进行纯化并分别测定该酶在不同条件下对底物 2,3-DHBP 的催化特性, 确定其最适反应 pH、温度及不同金属离子对酶活特性的影响; 进一步根据米氏方程对该酶的动力学参数进行测定与分析。【结果】通过 PCR 扩增获得了 *bphC* 基因, 其大小为 930 bp; 对该基因进行原核表达, 所得重组蛋白 BphC 携带有 6 个组氨酸标签, 经纯化后体外仍具有活性, 该酶作用于 2,3-DHBP 时的最适 pH 与温度分别为 pH 7.4 和 30 °C, 且在最适条件下, Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 及 Cd^{2+} 等金属离子可明显促进其酶活作用, 但多数金属离子对该酶有不同程度的抑制作用; 该酶在与底物 2,3-DHBP 作用过程中, 酶促动力学常数分别为 K_m : 8.67 mmol/L, V_{\max} : 27.32 $\mu\text{mol/s}$, k_{cat} : 15.55 s^{-1} , k_{cat}/K_m : 1.79 L/(mmol·s), 其催化效率同有关报道中同类酶的动力学特性比较均有所提高。【结论】菌株 YC-RL 中的 *bphC* 基因对于多氯联苯的生物降解具有至关重要的作用, 其编码的 BphC 是重要的芳香环裂解酶, 该酶对其底物具有较高的亲和性, 可在体外环境中发挥高效的酶促作用, 具有良好的应用价值。

关键词: 多氯联苯, 生物降解, 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶, 酶促动力学

Characterization of 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase BphC
from biphenyl degrader *Arthrobacter* sp. YC-RL1

QIAO Cheng REN Lei FAN Shuang-Hu JIA Yang ZHAO Bai-Suo YAN Yan-Chun*

(Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] This study focused on gene cloning, expression and functional characterization of 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase BphC encoded by *bphC* gene from

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31170119, 31540067); Basic Research Fund of CAAS (No. 0042012003, 0042014011)

*Corresponding author: E-mail: yanyanchun@caas.cn

Received: February 17, 2017; **Accepted:** May 17, 2017; **Published online** (www.cnki.net): May 25, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31170119, 31540067); 中国农业科学院基本科研业务基金项目 (No. 0042012003, 0042014011)

*通讯作者: E-mail: yanyanchun@caas.cn

收稿日期: 2017-02-17; **接受日期:** 2017-05-17; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-05-25

Arthrobacter sp. strain YC-RL1 in the biodegradation process of polychlorinated biphenyls (PCBs).

[Methods] Cloning *bphC* gene using the whole genome of YC-RL1 as a template and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for prokaryotic expression. The recombinant enzyme BphC was purified through Ni^{2+} column based on affinity chromatography and its activity was measured in different ranges of pH and temperatures using 2,3-dihydroxybiphenyl as a substrate. We also assayed effects of different metal-ion on the enzyme and further detected the kinetic parameters according to the Michaelis equation. **[Results]** The *bphC* gene, size of 930 bp, was cloned by PCR and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The 6-His tagged recombinant BphC was then purified and the optimum pH and temperature were pH 7.4 and 30 °C *in vitro*, respectively. Effects of metal ions on BphC differed from each other as Fe^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} promoted the activity while others inhibited in varying degrees. Kinetic parameters of BphC acting on 2,3-DHBP were measured as below: K_m : 8.67 mmol/L, V_{\max} : 27.32 $\mu\text{mol/s}$, k_{cat} : 15.55 s^{-1} , k_{cat}/K_m : 1.79 L/(mmol·s), respectively, of which the catalytic efficiency was much higher than some other homogeneous enzymes. **[Conclusion]** The gene *bphC* of strain YC-RL1 is vital in the process of PCBs biodegradation and the encoded enzyme BphC was revealed to be a very important aromatic ring lyase, which had high affinity to its substrates and could efficiently degrade them *in vitro*. This study showed a very good applicable value of *bphC* gene from *Arthrobacter* sp. strain YC-RL1.

Keywords: PCBs, Biodegradation, 2,3-Dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase, Enzyme kinetics

近几十年来, 科研工作者长期致力于改善环境污染问题, 证明了生物降解法在污染物清除方面较通常的物理或化学性策略具有更好的应用潜力。由于一些传统的物理或化学降解法通常需要更多花费且会形成一些技术性难题, 而应用微生物对污染物进行降解则不仅具有无二次污染、成本低廉的特点, 而且具有生态安全及环境友好等优势^[1-3], 因而生物降解作为可替代传统修复手段的新兴技术已成为广受青睐的环境污染治理方法。

多氯联苯是一类有毒的持久性环境有机污染物, 广泛存在于自然环境中。这一类化合物由于具有优良的化学稳定性、较强的绝缘性及高导热性能而被大量应用于工业原料及除草剂等的生产中^[4]。然而, 多氯联苯对生物体具有致癌、致畸和致突变的“三致效应”, 可在自然环境中引起严重的污染问题^[5]。有研究报道称^[6-7], 自 1929 年首次被人工合成以来, 迄今全球已有约 200 万 t 多氯联苯生产量, 尽管 20 世纪 70 年代多氯联苯已被世界范围内禁止使用, 然而地球上部分地区仍存在较高浓度水平的多氯联苯污染物。因此, 对这类化合物的生物降解研究仍然具有至关重要的意义。

联苯作为重要的多氯联苯前体物, 其生物降解已得到了广泛的研究, 为了解多氯联苯的降解提供了有效的科学基础。通常认为, 细菌是经由联苯降解途径来完成对多氯联苯的好氧性代谢的^[8]。已有研究报道^[9-10], 联苯的上游降解途径(图 1)中, 其代谢终产物分别是苯甲酸与 2-羟基戊-2,4-二烯酸, 参与其中的四类酶主要为联苯双加氧酶(BphA)、二氢二醇脱氢酶(BphB)、2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶(BphC)以及 2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-己二烯水解酶(BphD), 其相应的中间产物分别为 2,3-二氢二醇联苯、2,3-二羟基联苯(2,3-DHBP)、2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-己二烯(HOPDA)以及苯甲酸等。其中, 羟基联苯类双加氧酶通常根据其裂解苯环上 C-C 键位置的不同被分为内二醇与外二醇类双加氧酶。外二醇类双加氧酶根据其独立进化单元又可分为三种类型, 据报道^[11], 多数外二醇类双加氧酶属于第一种类型, 即为邻氧螯合超家族; 第二种类型属于非邻氧螯合超家族且含有同源寡聚或杂低聚复合物; 第三种类型则属于 Cupin 超家族。在联苯降解的几类酶中, 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶多为外二醇类双加氧酶, 是实现多氯联苯完全降解的关键

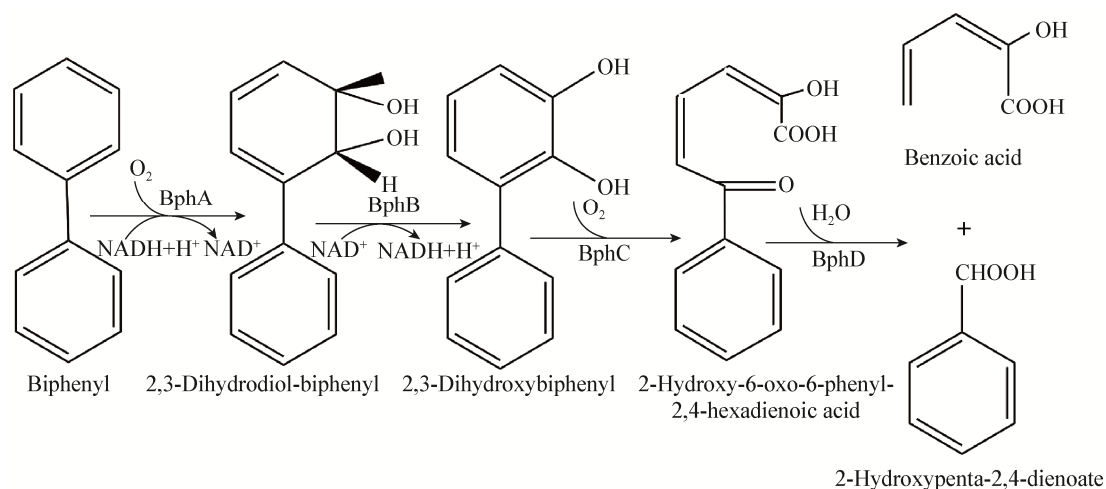


图 1 联苯的生物降解上游途径

Figure 1 The upstream biodegradation pathway of biphenyl

注: 有氧条件下, 联苯的上游降解途径分别由联苯双加氧酶(BphA)、二氢二醇脱氢酶(BphB)、2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶(BphC)以及 2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-己二烯水解酶(BphD)在不同条件下催化进行, 其相应产物分别为 2,3-二氢二醇联苯、2,3-二羟基联苯、2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-己二烯以及苯甲酸等。

Note: The upstream biodegradation pathway of biphenyl was catalyzed by BphA, BphB, BphC and BphD under aerobic conditions while the metabolites were 2,3-dihydrodiol-biphenyl, 2,3-dihydroxybiphenyl, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-2,4-hexadienoic acid, benzoic acid and 2-hydroxypenta-2,4-dienoate, respectively.

酶, 对环境中多氯联苯以及一些芳香族化合物的生物降解具有至关重要的作用^[12-13]。目前, 相关报道中多氯联苯降解菌主要有红球菌属^[14]、伯克氏菌属^[15]、假单胞菌属^[16]等, 节杆菌则鲜有报道。因此, 对该酶的研究将有助于进一步理解多氯联苯的微生物代谢途径。

从长期受芳香族化合物污染的活性淤泥中分离并筛选到了一株可高效利用联苯为唯一碳源和能源生长的细菌, 通过全基因组测序手段鉴定其为节杆菌属, 命名 YC-RL1, 其 16S rRNA 基因序列已递交至 GenBank, 登录号为 EU266494^[17]。从 YC-RL1 基因组中经 PCR 扩增获得 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶的编码基因 *bphC*, 利用携带有 6 个组氨酸标签的 pET32a(+)质粒构建表达载体并在 *E. coli* BL21(DE3)中进行了原核表达。根据亲和凝胶层析法利用 ÄKTA avant25 蛋白质纯化系统将该基因的表达产物 BphC 从细胞粗提物中进行纯化, 研究了不同 pH、温度及金属离子等对该酶活性的影响, 进一步对其酶促动力学特性进行了探究。研究表明, 该酶对 2,3-DHBP 具有较强的催化活

性, 能够在体外环境中对多氯联苯化合物的生物降解发挥至关重要的作用, 对污染环境的生物修复具有较高的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基: 节杆菌 YC-RL1 由本实验室分离并保存; pET32a(+)载体与 *E. coli* DH5α 和 *E. coli* BL21(DE3)为本实验室保存, 分别用以载体构建与蛋白质表达, 在 37 °C 生长于含 100 mg/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基^[18]中。节杆菌 YC-RL1 细胞在 30 °C 生长于无机盐培养基 BM^[19]或 LB 培养基中。固体 BM 与 LB 中均添加 15 g/L 琼脂。所有新鲜配制的培养基均在 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min 后备用。

1.1.2 主要试剂和仪器: 联苯与 2,3-二羟基联苯购自美国 Sigma 公司, 溶于甲醇后分别制成终浓度为 2×10⁴ mg/L 和 100 mg/mL 的母液, 经 0.22 μm 滤器过滤除菌后备用。所有 DNA 操作中的酶均购自大连 TaKaRa 生物技术有限公司。甲醇与乙腈购自美国 Fisher 公司, 均为色谱级纯, 其他药品均为分析

纯, 购自国药集团。PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司, 高效液相色谱仪 1200 购自美国 Agilent 公司, 分光光度计 Nifinite 200 购自瑞士 Tecan 公司, ÄKTA avant25 蛋白质纯化仪购自美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 *bphC* 的基因克隆与生物信息学分析: 采用细菌基因组提取试剂盒获得菌株 YC-RL1 基因组 DNA, 以此为模板进行 PCR 扩增目的基因片段。基于基因组测序结果^[17], 利用 Primer Premier 6.0 软件设计 PCR 扩增引物序列, 分别为: *bphC*-F: 5'-GCGCGGATCCATGACTCACATCCGTGGAC TT-3'; *bphC*-R: 5'-GCGCCTCGAGGTTTGCCGC GGCGAC-3'; 其中下划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I 相应的酶切位点。25 μ L 反应体系: Premix TaqTM 12.5 μ L, 引物 *bphC*-F/*bphC*-R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 1 μ L, 补加超纯水至 25 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 扩增产物根据 DNA 片段纯化试剂盒操作步骤进行纯化。利用 *Bam*H I 与 *Xho* I 酶对 DNA 纯化产物与 pET32a(+)质粒分别进行双酶切后 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物经 42 $^{\circ}$ C 热激转化至 *E. coli* DH5 α , 筛选重组质粒并经双酶切后经生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证, 测序正确后将重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 在含 100 mg/mL Amp 的 LB 固体培养基中挑选阳性克隆, 用于下一步原核表达。

同时, 根据该基因所编码的氨基酸序列, 通过 BLASTp 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源序列比对, 并使用 MEGA 6.0 软件基于 Neighbor-Joining 方法^[20], 将 Bootstrap 值设为 1 000, 构建系统发育树。此外, 以 BphC_2zyq.1.A^[21]的 3D 结构为模板, 利用 SWISS-MODEL 及 PyMOL 软件对该酶的三维结构进行同源建模分析。

1.2.2 基因表达与 BphC 酶的纯化: 重组 *E. coli* BL21(DE3)细胞 37 $^{\circ}$ C 在含 100 mg/mL Amp 的 LB 培养基中生长至 OD_{600} 为 0.8 时转接 1%菌液至

400 mL LB 中, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 后添加诱导剂异丙基 - β -D- 硫代吡喃半乳糖苷 (Isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)至终浓度为 2 mmol/L 并在 30 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h, 固定摇床转速均为 180 r/min。收集菌体并在 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 用适量结合缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠, 0.5 mol/L 氯化钠, 30 mmol/L 咪唑, pH 7.4)冲洗沉淀 3 次后重悬浮, 悬浮细胞经超声破碎至澄清, 4 $^{\circ}$ C、14 000 \times g 离心 30 min, 弃沉淀即可得可溶性重组蛋白粗提液。进一步通过蛋白质纯化仪 ÄKTA avant25 利用 His-TrapTM HP (1 mL)镍柱根据亲和层析方法对含有 6 个组氨酸标签的重组蛋白进行纯化, 纯化过程中上样量 50 mL, 系统流速 1 mL/min, 等度洗脱体积 10 mL, 洗脱收集液每管 1 mL, 洗脱缓冲液组成为: 20 mmol/L 磷酸钠, 0.5 mol/L 氯化钠, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4, 纯化后所得酶液 4 $^{\circ}$ C 保存备用, 保存时间不超过 48 h。根据 Bradford 法^[22]利用 BCA 蛋白检测试剂盒以牛血清白蛋白为标准品对所得蛋白质进行浓度测定。通过 SDS-PAGE (12%分离胶和 5%浓缩胶)检测相应蛋白的纯度与大小, 利用考马斯亮蓝 R-250 对蛋白胶进行染色。

1.2.3 酶活实验: BphC 的酶活特性测定是以 2,3-DHBP 为底物, 利用分光光度计检测 2,3-DHBP 裂解产物 HOPDA 在 $\lambda_{\max}=434$ nm [摩尔消光系数=13 200 L/(mol \cdot cm)]时的吸光值所得^[11]。酶活反应是在 30 $^{\circ}$ C、1 mL 50 mmol PBS 缓冲液(pH 7.4)中进行, 反应由体系中加入 20 μ g 30 $^{\circ}$ C 预热 10 min 的 BphC 酶起始, 其中反应底物 2,3-DHBP 起始浓度为 5 mmol/L。一个酶活单位被定义为该酶在 30 $^{\circ}$ C 每分钟催化 2,3-DHBP 裂解形成 1 μ mol 产物 HOPDA 时的用量。

通过分光光度法在 50 mmol/L 不同 pH 的缓冲液[HAc-NaAc (pH 3.6–4.5), Na₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 4.2–6.6), PBS (pH 6.2–7.4), Tris-HCl (pH 7.0–8.8) 和 Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 8.0–10.5)]中对该酶的最适 pH 进行测定, 同时在最适 pH 条件下检测该酶在

10–50 °C 范围内每 5 °C 的相对酶活, 确定该酶最适温度。金属离子对酶活的影响则是在最适 pH 与温度条件下, 向反应体系中添加不同金属离子 (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+}) 至终浓度为 2 mmol/L 时测得, 由于 EDTA 作为金属离子螯合剂可能会去除酶活中心的金属离子, 因此也检测了其对于酶活的影响。以上实验反应时间均为 10 min, 至少 3 次重复。

1.2.4 酶促动力学实验: 为研究该酶的酶促动力学特性, 计算了其在 30 °C、1 mL 50 mmol/L 的 PBS (pH 7.4) 缓冲体系中以 2,3-DHBP 底物浓度范围为 0.5–10 mmol/L 时反应 1 min 后的底物降解率, 体系中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ NaOH 以终止反应。底物降解率利用高效液相色谱仪基于外标法进行检测所得, 其中, HPLC 色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 mm \times 150 mm \times 5 μm), 流动相为甲醇与水 (70:30, 体积比), 流速为 1 mL/min, 进样量 10 μL , 检测波长为 260 nm。

该酶的动力学参数 K_m 、 V_{\max} 、 k_{cat} 及 k_{cat}/K_m 根据 Lineweaver-Burk 双倒数法^[23]利用 BphC 对不同浓度底物的降解计算所得。相关酶活反应均如上所述为 BphC 酶 30 °C 温育 10 min 后进行。以上所有实验至少重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *bphC* 的基因克隆与生物信息学分析

2.1.1 *bphC* 的基因克隆与验证: 以菌株 YC-RL1 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示, 得到与预期大小相符的 DNA 目的片段 (930 bp)。扩增产物纯化后经 *Bam*HI 与 *Xho*I 酶切, 连接到同样处理的 pET32a(+) 载体上。连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 筛选重组质粒并进行测序验证, 测序结果与 GenBank (登录号: CP013297.1) 中报道的序列大小一致, 可用于下一步重组蛋白表达。

2.1.2 BphC 氨基酸序列的生物信息学分析: 菌株 YC-RL1 中的 *bphC* 基因编码 309 个氨基酸, 通过在线程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 计算其分子

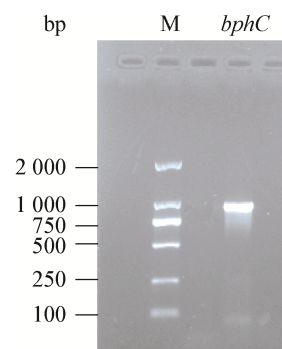


图 2 *bphC* 扩增基因琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of *bphC* gene

注: M: Marker DL2000; *bphC*: PCR 克隆基因。

Note: M: Marker DL2000; *bphC*: The gene cloned by PCR.

量为 34.14 kD, pI 值为 4.97。利用其氨基酸序列通过 BLASTp 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源序列比对, 基于 Neighbor-Joining 方法, 使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树如图 3 所示。结果表明, 菌株 YC-RL1 中 BphC 的氨基酸序列在进化水平上处于一个相对独立的分支, 且与一株节杆菌 LS16 中的外二醇类双加氧酶聚为一支, 二者具有较高的相似性, 因此推测该酶的编码序列是较为新颖的一段基因。

此外, 以 BphC_2zyq.1.A 的 3D 结构为模板, 利用 SWISS-MODEL 及 PyMOL 软件对该酶的三维结构进行同源建模。结果如图 4A 所示, BphC 酶具有 5 个 α -螺旋 (以红色显示) 与 14 个 β -折叠 (以黄色显示) 二级结构, 其中 17Ile-28Leu、72Gln-85Ala、94Glu-100Arg、154Met-165Leu 及 219Leu-232Met 氨基酸残基形成 5 个 α -螺旋结构, 均分布在蛋白质外侧, 其余部分构成 β -折叠结构以及 Loop 结构 (以绿色显示) 等。其中, 在该酶活性中心位置处含有一个 Fe(II) 原子 (图 4 中绿色圆点), 该原子被 8 个 β -折叠结构所包围 (图 4B)。据报道^[24], 绝大多数内二醇类双加氧酶活性中心含有一个非血红素 Fe(III), 催化邻位碳碳键断裂; 外二醇类双加氧酶活性中心则通常含有一个非血红素 Fe(II), 催化苯环上间位碳碳键的断裂。因此推测该酶为 Fe(II) 依赖型外二醇类双加氧酶。

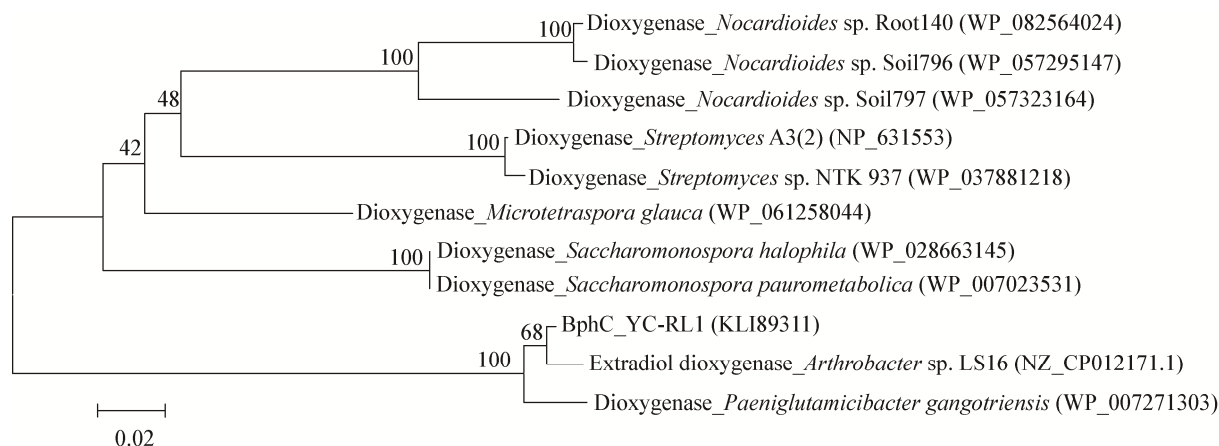


图3 BphC 的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic analysis of BphC

注：括号内数字为 GenBank 登录号；分支点上数字代表每 1 000 次抽样分析的置信度；标尺代表碱基替代率。

Note: The numbers in the bracket denote the GenBank accession number; Numbers at branch points represent the confidence level of each 1 000 sampling analysis; Scale represents base substitution rate.

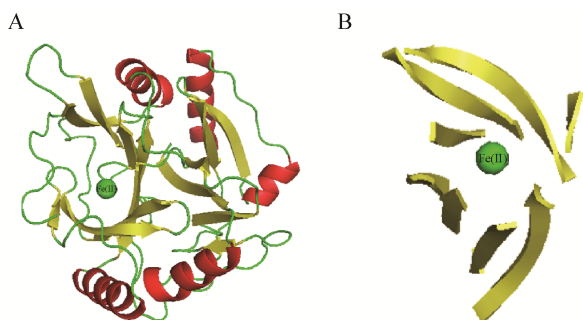


图4 BphC 酶三维结构预测与分析

Figure 4 3D structure predicted and analysis of BphC

注：A：以 BphC_2zyq.1.A 为模板 BphC 的三维预测结构；B：BphC 酶活中心 Fe(II) 原子及其他二级结构。

Note: A: The 3D structure of BphC predicted using BphC_2zyq.1.A as a template; B: The positions of Fe(II) in the active site with other secondary structures.

2.2 基因表达与 BphC 酶的纯化

菌株 YC-RL1 中的 *bphC* 基因被克隆至含有 6 个组氨酸标签的 pET32a(+) 载体上，转入 *E. coli* BL21(DE3) 细胞后经 2 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h 进行原核表达。重组蛋白经超声破碎法后离心，再利用 ÄKTA avant25 蛋白质纯化仪进一步对细胞裂解物进行亲和层析纯化，详细纯化步骤参照操作

指南进行适当调整。纯化所得蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析，结果显示两次洗脱蛋白条带均出现在 50–60 kD 之间(图 5A)，与该酶本身大小为 34.14 kD 且携带有 6 个组氨酸标签的结果相一致。同时，细胞外液中未检测到蛋白质条带，经 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 程序分析，该酶不含信号肽结构，表明其为胞内分泌蛋白。第二次洗脱所得蛋白含量明显高于第一次，且第二次洗脱后蛋白质纯度更高，经检测第二次纯化后蛋白浓度约为 3 000 $\mu\text{g/mL}$ ，是第一次纯化所得蛋白浓度的 1.7 倍。

实验中 ÄKTA avant25 在线检测图谱如图 5B 所示，其中，蓝色曲线为 280 nm 时蛋白质检测曲线，红色部分为收集液对应的收集管位置，其中 3A1–3A5 对应于粗酶液上样过程，3B1–3C4 为蛋白质洗脱液收集过程，洗脱液收集体积为每管 1 mL，可见，事实上纯化后较高浓度的蛋白质主要集中在 3B3–3B4 收集管中，280 nm 时的最高吸收值约为 2 000 mAU，为上样总蛋白的 62.5%，蛋白纯化效率较高，有利于进一步的实验研究。

2.3 酶活实验

2.3.1 BphC 酶活的最适反应 pH 与温度: BphC 酶与底物 2,3-DHBP 反应生成的产物 HOPDA 呈黄色(图 6A), 这为实验结果的检测提供了良好的筛选标记。同时, 经 HPLC 检测显示, 不完全反应时, 在 260 nm 处可同时检测到 2,3-DHBP 和 HOPDA 的吸收峰(图 6B), 后者保留时间较 2,3-DHBP 提前约 1.41 min, 两种物质具有良好的分离度, 且随着反应的进行 HOPDA 含量明显提高, 2,3-DHBP 含量

则逐渐减少。

以 2,3-DHBP 为底物在不同条件下分别测定 BphC 的酶活并确定其最适反应 pH 与温度。根据各溶液的缓冲能力不同设置了不同的 pH 缓冲体系, 各体系间 pH 均设有重复区域。结果显示, 在相对较小的范围内不同缓冲液 pH 的变化未引起 BphC 酶活的明显改变, 且不同 pH 缓冲液对酶活的影响基本与图 7A 中黑色虚线所示的趋势一致。因此推测, 不同 pH 的缓冲体系并非影响酶活的主要因

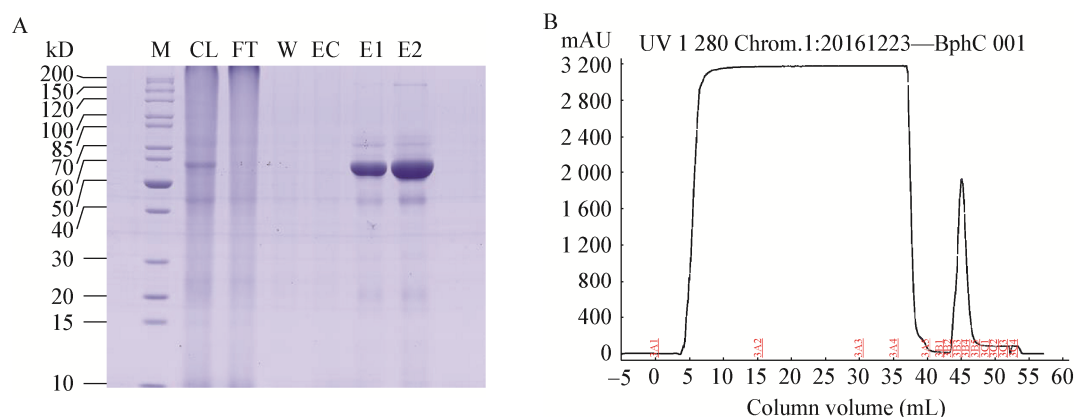


图 5 BphC 酶的 SDS-PAGE 结果与蛋白纯化在线检测图谱

Figure 5 SDS-PAGE for BphC and online detection of protein purification from ÄKTA avant25

注: A 为 BphC 酶的 SDS-PAGE 结果, M: 蛋白质 Marker; CL: 细胞裂解液; FT: 流穿液; W: 洗涤液; EC: 细胞外液; E1, E2: 洗脱液 1 和洗脱液 2; 上样量为 5 μ L. B 为 ÄKTA avant25 蛋白质纯化曲线, 蓝色曲线为 280 nm 时蛋白质检测曲线; 红色部分为收集液位置; 其中 3A1–3A5 为细胞裂解液上样过程, 3B1–3C4 为蛋白质洗脱液收集过程。

Note: A is SDS-PAGE for BphC. M: Protein marker; CL: Cell lysate; FT: Flow-through fraction; W: Wash fractions; EC: Extracellular fraction; E1, E2: Elution fractions 1, 2; 5 μ L of each fraction was loaded on to the gel. B is online detection of BphC from ÄKTA avant25 in which blue curves are detection of protein at 280 nm while red ones are for the positions of collected fractions, where 3A1–3A5 are sampling process and 3B1–3C4 are collections for elution fractions.

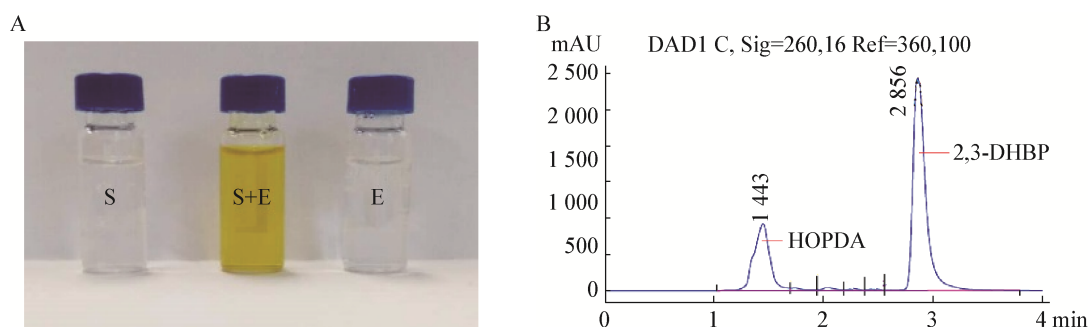


图 6 BphC 与 2,3-DHBP 反应结果及 HPLC 检测图谱

Figure 6 Results of reaction for BphC and 2,3-DHBP and HPLC detection

注: A: 2,3-DHBP 在 BphC 作用下生成黄色产物, 图中 S 代表底物与缓冲液混合物, E 为酶与缓冲液混合物, S+E 为完整的反应体系; B: 不完全反应时 HPLC 检测结果。

Note: A is for 2,3-DHBP turned to be yellow under BphC, where S is for substrate with buffer, E is for the enzyme with buffer while S+E is for the complete system of the reaction; B is for the HPLC results for the incomplete reaction.

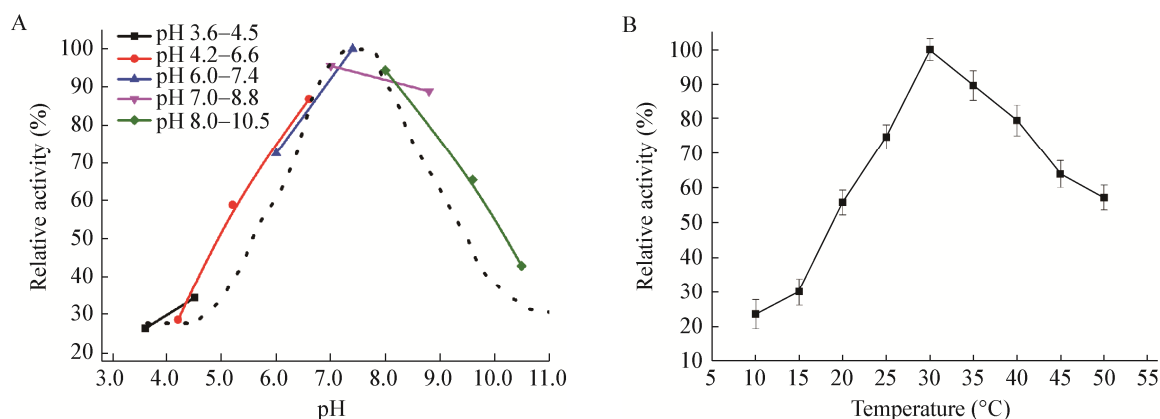


图 7 BphC 与 2,3-DHBP 反应时 pH 和温度对酶活的影响

Figure 7 Effects of pH and temperatures on BphC activity

注：A：30 °C 时 BphC 在不同 pH 范围内的酶活；B：pH 7.4 时 BphC 在不同温度下的酶活。

Note：A: The realative activity of BphC at 30 °C in different pH; B: The relative activity at different temperatures in pH 7.4.

素。实验表明，BphC 在 pH 7.4 时表现出最高酶活力，在 pH 6.6–8.8 时其相对酶活均高于 85%，表明该酶可在较宽的 pH 范围内实现对底物 2,3-DHBP 的环裂解作用。然而，pH 低于 4.5 或高于 9.2 时其酶活明显下降。事实上，当 pH 低于 4.5 或高于 9.2 时，反应体系中加入酶液后迅速有白色沉淀出现，推测可能是过酸或过碱条件下蛋白质已发生变性，从而失活，不能催化底物降解。

在 pH 7.4 时，以 2,3-DHBP 为底物在不同温度条件下分别测定 BphC 的酶活并确定其最适反应温度。结果显示，30 °C 时该酶表现出最高酶活力，当反应温度高于或低于 30 °C 时酶活均呈现下降趋势(图 7B)。然而，当温度在 25–40 °C 范围内时，其相对酶活仍保持在 70% 以上，表明该酶具有较宽的耐受温度范围。

2.3.2 金属离子对 BphC 酶活的影响：通常，外二醇类双加氧酶活性中心含有非血红素 Fe(II)，然而一定条件下部分该类酶中的 Fe(II) 可被其他金属离子所取代，从而影响酶的催化活性。为探究不同金属离子对 BphC 酶活力的影响，在其最适反应条件下反应前分别加入不同金属离子至 2 mmol/L，以不加任何金属离子时酶活为 100% 作对照，利用分光光度计检测其相对酶活。结果如表 1 所示，添加 Fe²⁺、Cu²⁺ 与 Cd²⁺ 均可提高 BphC 酶的催化活

力，其中 Cu²⁺ 对该酶活力稍有提高，Fe²⁺ 与 Cd²⁺ 对 BphC 酶活促进作用明显，约提高 2.4–3.2 倍。Fe³⁺ 则对该酶活力影响不大，其余金属离子均明显抑制该酶活性。同时，EDTA 抑制酶活力作用明显，推测 EDTA 对酶活中心的 Fe(II) 具有较强的螯合作用。事实表明，BphC 酶活力受其他金属离子及金属离子螯合剂等影响较为明显，且该酶的催化活性需要 Fe²⁺ 参与。同时，根据实验结果推测，在部分金属离子(如 Cu²⁺、Cd²⁺ 等)污染环境中，该酶仍可能发挥较好的酶促作用，在环境污染物的修复作用中具有一定的应用价值。

表 1 不同金属离子对 BphC 酶活的影响
Table 1 Effects of different metal ions on BphC activity

金属离子 Metal ions	相对酶活 Relative activity (%)
Fe ²⁺	322.87±7.62
Fe ³⁺	98.56±10.43
Cu ²⁺	178.72±4.32
Mg ²⁺	71.15±1.25
Ca ²⁺	59.19±2.43
Mn ²⁺	54.77±5.87
Zn ²⁺	65.34±6.90
Ni ²⁺	62.14±0.95
Cd ²⁺	239.86±2.16
Co ²⁺	49.09±4.58
EDTA	43.52±6.02

2.3.3 BphC 酶促动力学实验: 由于 HOPDA 不易从 2,3-DHBP 酶解产物中直接提取或进行检测, 因此利用 HPLC 法首先测得 2,3-DHBP 经 BphC 酶解后的降解率, 再根据酶解反应式转换为 HOPDA 的生成率。利用不同浓度的 2,3-DHBP 与 BphC 在最适条件下反应 1 min 后, 根据 Lineweaver-Burk 双倒数法, 以 $1/[S]$ 为横坐标、 $1/[v]$ 为纵坐标计算 BphC 酶的酶促动力学参数。结果显示, BphC 酶的米氏常数 K_m 为 8.67 mmol/L, 表明该酶对底物具有较高的亲和力。当底物浓度 $[S]$ 达到一定值时其反应速度可达最大值为 27.32 $\mu\text{mol/s}$, 且当酶被底物所饱和时, 其每秒钟可转换底物 2,3-DHBP 的分子数为 15.55; 同时, 该酶催化效率 k_{cat}/K_m 较部分已报道同类酶的催化效率更高^[25-26], 如表 2 所示。

表 2 BphC_YC-RL1 与其他酶的动力学参数比较
Table 2 Comparison of kinetic parameters between BphC_YC-RL1 and other enzymes

菌株 Strains	K_m (mmol/L)	V_{max} ($\mu\text{mol/s}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
BphC_YC-RL1	8.67	27.32	15.55	1 790
BphC_P6	29.40	—	9.80	330
BphC_R04	60.00	—	17.00	280

注: —: 参考文献中未给出数据。

Note: —: No data given in the references.

3 结论

微生物在环境污染治理中扮演着非常重要的角色, 因此对环境尤其是多氯联苯化合物的生物修复作用被认为是最有前景的一项应用技术^[27]。目前, 已有诸多报道从多氯联苯污染环境分离到的降解菌株可经过联苯降解的上游途径实现对污染物的清除。其中, 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶在这一过程中起到了至关重要的作用^[28-30], 可使羟基苯环发生断裂从而进入下游代谢途径, 该酶是微生物对联苯等有氧代谢的关键限速酶。然而, 目前多氯联苯类化合物的生物降解研究仍存在降解菌种单一、降解基因不够丰富及降解底物谱不够广泛等问题^[31], 因此对该类化合物的生物降解研究仍然具有重要意义。

本实验利用节杆菌 YC-RL1 通过相关基因克隆与蛋白质的原核表达获得了重组蛋白, 通过亲和层析等方法对其进行纯化并检测了相关的酶活性。结果表明, 该酶与底物 2,3-DHBP 作用时的最适反应条件为 pH 7.4、30 $^{\circ}\text{C}$, 且其活性受不同金属离子的影响明显, 其中 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 及 Cd^{2+} 均可明显促进其酶反应活性。此外, 生物信息学等分析显示, 该酶是一类含有一个非血红素 Fe(II) 为单一辅因子的外二醇类双加氧酶, 对其作用底物具有较高的亲和性。

研究表明, 菌株 YC-RL1 中 *bphC* 基因对于多氯联苯类化合物的生物降解具有至关重要的作用, 其编码的 BphC 酶是重要的芳香环裂解酶, 不仅在环境污染治理中具有良好的应用前景, 同时对于该类化合物降解途径等的深入研究也具有重要的参考和指导意义。

参 考 文 献

- [1] Pandey G, Chauhan A, Samanta SK, et al. Chemotaxis of a *Ralstonia* sp. SJ98 toward co-metabolizable nitroaromatic compounds[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 299(3): 404-409
- [2] Hu JX, Wang YL, Su XM, et al. Effects of RAMEB and/or mechanical mixing on the bioavailability and biodegradation of PCBs in soil/slurry[J]. Chemosphere, 2016, 155: 479-487
- [3] Stella T, Covino S, Čvančarová M, et al. Bioremediation of long-term PCB-contaminated soil by white-rot fungi[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 324: 701-710
- [4] Leewis MC, Uhlik O, Leigh MB. Synergistic processing of biphenyl and benzoate: carbon flow through the bacterial community in polychlorinated-biphenyl-contaminated soil[J]. Scientific Reports, 2016, 6, 22145
- [5] Yang JM, Salmon AG, Marty MA. Development of TEFs for PCB congeners by using an alternative biomarker-thyroid hormone levels[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2010, 56(2): 225-236
- [6] Leewis MC, Reynolds CM, Leigh MB. Long-term effects of nutrient addition and phytoremediation on diesel and crude oil contaminated soils in subarctic Alaska[J]. Cold Regions Science and Technology, 2013, 96: 129-137
- [7] Zhao QQ, Bai JH, Lu QQ, et al. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments/soils of different wetlands along 100-year coastal reclamation chronosequence in the Pearl River Estuary, China[J]. Environmental Pollution, 2016, 213: 860-869
- [8] Pieper DH. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(2): 170-191
- [9] Gilbert ES, Crowley DE, et al. Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997,

- 63(5): 1933-1938
- [10] Dhindwal S, Gomez-Gil L, Neau DB, et al. Structural basis of the enhanced pollutant-degrading capabilities of an engineered biphenyl dioxygenase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(10): 1499-1512
- [11] Kotake T, Matsuzawa J, Suzuki-Minakuchi C, et al. Purification and partial characterization of the extradiol dioxygenase, 2'-carboxy-2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase, in the fluorene degradation pathway from *Rhodococcus* sp. strain DFA3[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(4): 719-725
- [12] Vaillancourt FH, Haro MA, Drouin NM, et al. Characterization of extradiol dioxygenases from a polychlorinated biphenyl-degrading strain that possess higher specificities for chlorinated metabolites[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(4): 1253-1260
- [13] Ishida T, Senda T, Tanaka H, et al. Single-turnover kinetics of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase reacting with 3-formylcatechol[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338(1): 223-229
- [14] Hauschild JE, Masai E, Sugiyama K, et al. Identification of an Alternative 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 and Cloning of the Gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 2940-2946
- [15] Yi L, Meggo R, Hu DF, et al. Enhanced polychlorinated biphenyl removal in a switchgrass rhizosphere by bioaugmentation with *Burkholderia xenovorans* LB400[J]. *Ecological Engineering*, 2014, 71: 215-222
- [16] Xiong F, Shuai JJ, Jin XF, et al. Expression and characterization of a recombinant 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*[J]. *Molecular & Cellular Toxicology*, 2012, 8(4): 375-382
- [17] Ren L, Jia Y, Ruth N, et al. Complete genome sequence of an aromatic compound degrader *Arthrobacter* sp. YC-RL1[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 219: 34-35
- [18] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[J]. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [19] Qiao C, Ren L, Jia Y, et al. Chemotaxis of *Arthrobacter* sp. CN2 towards *p*-nitrophenol[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(10): 1945-1952 (in Chinese)
乔铖, 任磊, 贾阳, 等. 节杆菌(*Arthrobacter* sp.) CN2对对硝基苯酚的趋化性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35(10): 1945-1952
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [21] Yam KC, D'Angelo I, Kalscheuer R, et al. Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(3): e1000344
- [22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254
- [23] Ghim YS, Chang HN. Diffusional falsification of kinetic constants on Lineweaver-Burk plots[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1983, 105(1): 91-102
- [24] Vaillancourt FH, Bolin JT, Eltis LD. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 41(4): 241-267
- [25] McKay DB, Prucha M, Reineke W, et al. Substrate specificity and expression of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases from *Rhodococcus globerulus* strain P6[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(9): 2944-2951
- [26] Yang XQ, 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[J]. *Biochimie*, 2008, 90(10): 1530-1538
- [27] Field JA, Sierra-Alvarez R. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 155(1): 1-12
- [28] Fukuda K, Hosoyama A, Tsuchikane K, et al. Complete genome sequence of polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 (NBRC 109938)[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(5): e00865-14
- [29] Sun Y, Qian SJ. Characterization and identification of a biphenyl degrading strain[J]. *Microbiology China*, 2004, 31(6): 23-26 (in Chinese)
孙艳, 钱世钧. 一株联苯降解菌的特性及鉴定[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(6): 23-26
- [30] Li C, Yuan G, Wu G, et al. Cloning of three 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes from *Achromobacter* sp. BP3 and the analysis of their roles in the biodegradation of biphenyl[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 261: 246-252
- [31] Li A, Qu YY, Zhou JT, et al. Enzymatic biodegradation of 2,3-dihydroxybiphenyl and amplification of encoding enzyme gene[J]. *Journal of Dalian University of Technology*, 2009, 49(4): 494-498 (in Chinese)
李昂, 曲媛媛, 周集体, 等. 2,3-二羟基联苯酶促降解及编码酶基因扩增[J]. *大连理工大学学报*, 2009, 49(4): 494-498