

研究报告

三氯卡班降解菌株 *Sphingomonas* sp. YL-JM2C 中多个
邻苯二酚双加氧酶的功能

李朔 许楹* 周宁一

(上海交通大学生命科学技术学院微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【目的】研究 *Sphingomonas* sp. YL-JM2C 菌株的生长特性, 确定以三氯卡班作为碳源的生长情况。挖掘菌株 YL-JM2C 潜在的邻苯二酚 1,2-双加氧酶及邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中异源表达邻苯二酚双加氧酶基因并研究其酶学性质。【方法】优化 *S. sp.* YL-JM2C 菌株以三氯卡班作为碳源时的培养条件, 并利用全自动生长曲线测定仪测定菌株生长情况, 绘制生长曲线。通过生物信息学方法挖掘潜在的邻苯二酚双加氧酶基因, 并分别在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中进行异源表达, 通过 AKTA 快速纯化系统纯化蛋白, 分别以邻苯二酚、3-和 4-氯邻苯二酚为底物检测重组蛋白的酶学特性。【结果】菌株在 pH 为 7.0–7.5 时生长最优。在以浓度为 4–8 mg/L 的三氯卡班做为底物时, 菌株适宜生长。当 R2A 培养基仅含有 0.01% 酵母提取物和无机盐时, 加入终浓度为 4 mg/L 的三氯卡班可促进菌株生长。挖掘到 6 个潜在的邻苯二酚双加氧酶基因 *stcA1*、*stcA2*、*stcA3*、*stcE1*、*stcE2* 和 *stcE3*, 表达并通过粗酶液分析证明其中 5 个基因 *stcA1*、*stcA2*、*stcA3*、*stcE1* 和 *stcE2* 编码的酶均具有邻苯二酚双加氧酶和氯邻苯二酚双加氧酶的活性; 纯化酶的底物范围研究揭示了 *StcA1*、*StcA2* 和 *StcA3* 均属于 II 型邻苯二酚 1,2-双加氧酶, *StcE1* 和 *StcE2* 为两个新型邻苯二酚 2,3-双加氧酶; 它们酶动力学分析研究证明了 5 个酶对邻苯二酚的亲力和催化效率最高, 4-氯邻苯二酚次之。【结论】在同一菌株中发现了 5 个具有功能的邻苯二酚双加氧酶基因, *stcA1*、*stcA2* 和 *stcA3* 编码的酶均属于 II 型邻苯二酚 1,2-双加氧酶, *stcE1* 和 *stcE2* 为两个新型邻苯二酚 2,3-双加氧酶编码基因。5 个酶均具有催化邻苯二酚和氯邻苯二酚开环反应的功能, 这为更好地理解微生物基因组内代谢邻苯二酚及其衍生物氯代邻苯二酚基因的多样性奠定了基础。

关键词: 鞘氨醇单胞菌 YL-JM2C, 三氯卡班, 邻苯二酚, 3-氯邻苯二酚, 4-氯邻苯二酚, 邻苯二酚 1,2-双加氧酶, 邻苯二酚 2,3-双加氧酶

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31370094, 31570100)

***Corresponding author:** Tel/Fax: 86-21-34208261; E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

Received: February 08, 2016; **Accepted:** March 22, 2017; **Published online** (www.cnki.net): April 05, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370094, 31570100)

***通讯作者:** Tel/Fax: 86-21-34208261; E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-02-08; 接受日期: 2017-03-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-04-05

Functional characterization of multiple catechol dioxygenases in triclocarban degrader *Sphingomonas* sp. YL-JM2C

LI Shuo XU Ying* ZHOU Ning-Yi

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism and School of Life Sciences & Biotechnology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] We are aiming to study the growth characteristics of *Sphingomonas* sp. YL-JM2C when triclocarban acts as carbon source; to mine putative genes encoding catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase from strain YL-JM2C; and to express, purify and functionally identify the putative catechol dioxygenase, then revealing the characters of catechol dioxygenases in this strain. [Methods] The growth of *S. sp.* YL-JM2C was measured at different pH values with different triclocarban concentrations on the optimized R2A medium containing extremely low amount of single carbon source. The putative catechol dioxygenase genes were cloned and heterologous expressed in *E. coli* BL21(DE3), and purified through AKTA purifier system. The purified proteins were functionally identified based on their abilities to catalyze the ring cleavage of catechol as well as its derivatives 3-chlorocatechol and 4-chlorocatechol. Their enzymatic characters were also determined through enzyme kinetics parameters. [Results] The optimal pH value was 7.0–7.5 for the growth of strain YL-JM2C, and this strain was able to utilize triclocarban as the carbon source and the optimum concentration for its growth was in the range of 4–8 mg/L. With adding 4 mg/L triclocarban, the biomass of strain YL-JM2C increased over time when this strain grew in the optimized R2A medium containing 0.01% of yeast extract and mineral salts. Six putative catechol dioxygenase genes (*stcA1*, *stcA2*, *stcA3*, *stcE1*, *stcE2* and *stcE3*) were found through bioinformatics analysis. All exhibited catechol dioxygenase activities through assay using crude enzymes expressed in *E. coli*, except *StcE3*. Further, after purification, the substrate range analyses revealed that *StcA1*, *StcA2* and *StcA3* belonged to type II catechol 1,2-dioxygenase while *StcE1* and *StcE2* were identified as the novel type catechol 2,3-dioxygenase, which were all able to catalyze the ring cleavage of catechol and chlorocatechol. The kinetics parameters obtained from purified enzymes revealed that the enzymes exhibited highest affinity and catalytic efficiency to catechol, followed by 4-chlorocatechol. [Conclusion] In this research, five active catechol dioxygenase genes are functionally identified from a single strain, which all have the ability to catalyze the ring cleavage of catechol and chlorocatechol. Among them, *StcA1*, *StcA2*, and *StcA3* belong to type II catechol 1,2-dioxygenase, and *StcE1* and *StcE2* are new type catechol 2,3-dioxygenase. This study will be greatly helpful to explore the diverse capability for the microbial aromatic degradation of microbes using catechol and chlorocatechol as ring-cleavage substrates.

Keywords: *Sphingomonas* sp. YL-JM2C, Triclocarban, Catechol, 3-chlorocatechol, 4-chlorocatechol, Catechol 1,2-dioxygenase, Catechol 2,3-dioxygenase

随着现代化学工业的发展,大量自然界原本不存在的异生物质涌现出来,对生态环境造成了严重污染。其中含有一个或多个苯环的芳烃污染物,因其种类繁多、结构多样、难降解的化学本质和广泛的使用性,成为环境污染物的典型代表。三氯卡班(Triclocarban)是多氯联苯的芳烃化合物,近年来频繁在污水、污泥排放中被大量检测出来。美国粮食

药物管理局(FDA)认为三氯卡班对于人体抗炎症作用有所影响^[1]。目前细菌降解三氯卡班的代谢途径尚未研究透彻,这无疑得到科学家们的广泛关注。

细菌代谢芳烃化合物通常经过一系列外周代谢转化为原儿茶酸、龙胆酸和邻苯二酚或其衍生物作为开环底物,进一步开环代谢并最终进入三羧酸

循环^[2]。芳烃化合物代谢的开环反应是微生物能否进一步代谢的关键步骤,因此,催化芳烃开环的双加氧酶是研究其代谢的焦点之一。其中,原儿茶酸开环反应的研究最为丰富,目前已有研究报道催化其开环的有原儿茶酸 3,4-双加氧酶^[3]、原儿茶酸 2,3-双加氧酶^[3]、原儿茶酸 4,5-双加氧酶^[4],部分芳烃化合物也可通过原儿茶酸衍生物由其同源的原儿茶酸双加氧酶进行开环代谢并最终进入三羧酸循环;龙胆酸由龙胆酸 1,2-双加氧酶催化其开环反应,随后可通过异构途径或水解途径代谢并最终进入三羧酸循环^[5];邻苯二酚的开环反应则分为邻位开环和间位开环两种,分别由邻苯二酚 1,2-双加氧酶或邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化其生成顺,顺-粘糠酸或 2-羟基粘糠酸半醛,随后通过一系列反应最终进入三羧酸循环^[6]。

Sphingomonas sp. YL-JM2C 是从工业废水中分离得到的一株纯培养革兰氏阴性菌,对磺胺莫托辛、新诺明和磺胺嘧啶这 3 种磺胺类抗生素具有抗性。该菌株初步被认为可代谢新型污染物三氯卡班,并通过检测部分代谢中间产物,推测了其可能的降解途径^[7]。如图 1 所示,三氯卡班首先通过水解生成 3,4-二氯苯胺和 4-氯苯胺,4-氯苯胺经过羟基化脱氨生成 4-氯邻苯二酚,随后经过一系列反应进入三羧酸循环。该菌株在三氯卡班途径中的相关研究目前尚未透彻,尚无功能基因的研究报道。

本文研究了 *S. sp.* YL-JM2C 的相关生长特性,通过生物信息学挖掘了 3 个潜在的邻苯二酚 1,2-双

加氧酶基因和 2 个潜在的邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因,其可能催化三氯卡班降解中间产物 4-氯邻苯二酚的开环反应;并在分子和生化水平上研究了上述 5 个有活力的邻苯二酚双加氧酶。初步揭示了单个微生物菌种代谢邻苯二酚及其衍生物氯代邻苯二酚的多样性,进而探索微生物代谢芳烃污染物代谢机理的多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒: 实验所用菌株及相关质粒如表 1 所示。

1.1.2 培养基、缓冲液和抗生素: R2A 培养基参照文献[8]配制;LB 培养基参照文献[9]配制。50 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液:0.2 mol/L 磷酸氢二钠 40.5 mL,0.2 mol/L 磷酸二氢钠 9.5 mL,加水定容至 1 L;100 mmol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液:0.2 mol/L 磷酸氢二钠 94.7 mL,0.2 mol/L 磷酸二氢钠 5.3 mL,加水定容至 1 L。卡那霉素的终浓度为 50 mg/L。

1.1.3 试剂及药品: 实验所用内切酶购自 New England BioLabs 公司;蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天试剂公司;用于回收胶、纯化、质粒提取以及基因组所用试剂盒均购自 Omega 公司。

1.1.4 主要仪器: Perkin Elmer 紫外分光光度计、Gene Company 酶标仪(型号 EPOCH2)、AKTA 蛋白纯化系统购自 GE 公司;Ni-DA Resin FF Prepacked 亲和层析柱购自金斯瑞生物科技公司。

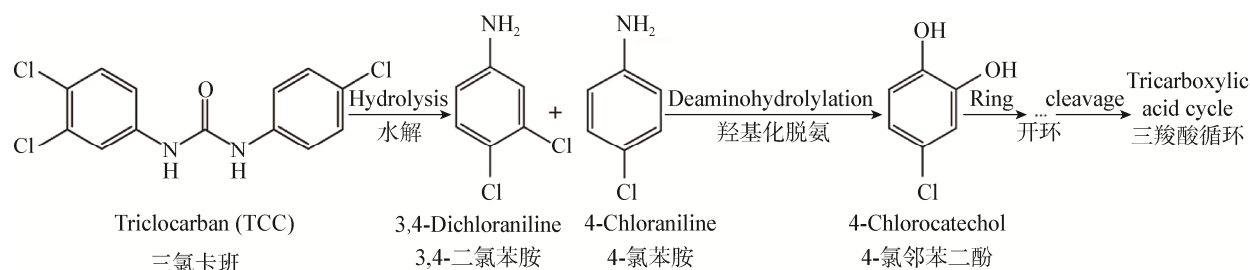


图 1 *S. sp.* YL-JM2C 降解三氯卡班可能的代谢途径^[7]

Figure 1 The putative pathway of triclorcarban catabolism by *S. sp.* YL-JM2C^[7]

表 1 实验中所用菌株及质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

| 菌株/质粒 Strains/Plasmids | 特征 Characteristics | 来源 Source |
|---------------------------|--|--------------|
| <i>S. sp.</i> YL-JM2C | 野生菌株, 可彻底降解三氯卡班 | 详见参考文献[7] |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | <i>F⁻ompT hsdS (r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1</i> (DE3) | Novagen |
| pET28a | 表达载体 K_m^R | Promega |

Note: K_m^R : Kanamycin-resistant.

1.2 方法

1.2.1 菌株生长特性研究及优化: 30 °C 条件下, 含有 4 mg/L 三氯卡班的 R2A 固体培养基中培养 *S. sp.* YL-JM2C。挑取单菌落转接到 R2A 液体培养基生长, 在 30 °C、160 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.5, 以 5 500 r/min 离心 10 min 收集菌体, 并用 100 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液清洗菌体重悬于 R2A 培养基中。进行以下 3 组实验: (1) 加入不同配比浓度氯化钠溶液; (2) 加入不同浓度三氯卡班溶液; (3) 调节 R2A 液体培养基酸碱度, 对菌株在三氯卡班条件下的生长情况进行监测。除此以外, 为更好地研究菌株降解三氯卡班过程中相关功能基因的酶学与表达特性, 减少培养基内碳源干扰, 在实验中将培养基进行优化。将 R2A 培养基中碳源去除, 向仅含无机盐的培养基中分别加入以下单一碳源: 0.01%胰蛋白胨、0.01%酪蛋白氨基酸、0.01%葡萄糖、0.01%可溶性淀粉、0.01%的酵母提取物、4.0 mg/L 的三氯卡班。利用全自动生长曲线测定仪分别检测菌株 YL-JM2C 利用三氯卡班的生长曲线。

1.2.2 邻苯二酚双加氧酶基因克隆及转化: 对 *S. sp.* YL-JM2C 基因组序列 (GenBank 登录号: ASTM00000000) 进行生物信息学分析, 将菌株的全基因组蛋白序列与已研究过功能的邻苯二酚 1,2-双加氧酶序列 (CAM86609.1, CDF83097.1, NP_251197.1) 及邻苯二酚 2,3-双加氧酶序列 (NP_049202.1, AAD02148.1, EUJ14558.1, EZP74038.1) 通过 BLASTp 进行比对, 找到 3 个潜在的邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因编码的蛋白 StcA1 (WP_029994301.1, 蛋白分子量 28.3 kD)、StcA2 (WP_029995212.1, 蛋白分子量 34.6 kD) 和 StcA3 (WP_029995453.1, 蛋白分

子量 31.4 kD), 以及 3 个潜在的邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因编码的蛋白 StcE1 (WP_029992749.1, 蛋白分子量 33.1 kD)、StcE2 (WP_029995332.1, 蛋白分子量 33.1 kD) 和 StcE3 (WP_029993321.1 蛋白分子量 33.5 kD)。以菌株 YL-JM2C 基因组为模板分别扩增以上 6 个邻苯二酚双加氧酶基因并进行基因克隆及转化。

序列引物设计及酶切位点如表 2 所示。

1.2.3 邻苯二酚双加氧酶的纯化: 将构建的大肠杆菌 BL21(DE3)[pET28a-*stcA1*]、BL21(DE3)[pET28a-*stcA2*]、BL21(DE3)[pET28a-*stcA3*]、BL21(DE3)[pET28a-*stcE1*] 和 BL21(DE3)[pET28a-*stcE2*] 接入 LB 液体培养基培养至 OD_{600} 约为 0.5 时, 加入终浓度 0.1 μ mol/L 的 IPTG 诱导 4 h 后收集菌体。大肠杆菌 BL21(DE3)[pET28a-*stcA1*]、BL21(DE3)[pET28a-*stcA2*] 和 BL21(DE3)[pET28a-*stcA3*] 分别重悬于 20 mL 50 mmol/L pH 7.4 的含有 10% 甘油的磷酸缓冲液中, 大肠杆菌 BL21(DE3)[pET28a-*stcE1*] 和 BL21(DE3)[pET28a-*stcE2*] 分别重悬于 20 mL 100 mmol/L pH 8.0 的含有 10% 甘油的磷酸缓冲液中, 超声破碎后离心收集上清液。利用加装 Ni-DA Resin FF Prepacked 亲和层析柱的 AKTA 蛋白纯化系统对破碎上清液进行纯化。利用超滤离心柱对纯化的蛋白溶液进行浓缩, 纯化的蛋白浓度利用蛋白浓度测定试剂盒通过酶标仪测定。

1.2.4 邻苯二酚双加氧酶酶学测定: 通过 Perkin Elmer 双波长分光光度计, 分别以邻苯二酚、3-氯邻苯二酚、4-氯邻苯二酚作为底物, 对粗酶液和纯化蛋白进行酶活力测定。粗酶液和纯化蛋白酶活检测及反应体系参考相关的研究报道^[10], 邻苯二酚

表 2 实验中所用引物
Table 2 Primers used in the study

| 引物名称 Primers | 引物序列 Primers sequence (5'→3') | 限制酶酶切位点 Restriction sites |
|-----------------|---|------------------------------|
| stcA1f | GGAATTCC <u>CATATG</u> ATGTCGGATGCTGAACG | <i>Nde</i> I |
| stcA1r | CGGAATTC <u>CGTAAATCCTCCACCTCAGG</u> | <i>EcoR</i> I |
| stcA2f | ATTCCATATG <u>GCATCCGA</u> ACTGGTGCA | <i>EcoR</i> I |
| stcA2r | CCC <u>AAGCTT</u> CGGAGGCGATTGCTTCGTTCT | <i>Hind</i> III |
| stcA3f | GGAATTCC <u>CATATG</u> ATCATCGACCACCAGGCC | <i>Nde</i> I |
| stcA3r | CCGGAATTC <u>TCATGGGATCGGCGCCTT</u> | <i>EcoR</i> I |
| stcE1f | GGAATTCCATATG <u>TCCGGA</u> ACCCAGC | <i>Nde</i> I |
| stcE1r | CGGAATTC <u>TCAGGTCCACTCGT</u> GATACCAG | <i>EcoR</i> I |
| stcE2f | CGGAATTCATCTCGCCTATCCGCTTTG | <i>EcoR</i> I |
| stcE2r | CCC <u>AAGCTT</u> CCGAATCTTTTCCGCCAT | <i>Hind</i> III |
| stcE3f | CGGAATTCAGCGGATATGCCCATCCAGG | <i>EcoR</i> I |
| stcE3r | CCC <u>AAGCTT</u> AGGAAGACATCGTCGCTCCTG | <i>Hind</i> III |

注：下划线标注为限制性酶切位点。

Note: Underline marked restriction enzyme sites.

1,2-双加氧酶催化邻苯二酚、3-氯邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚开环反应，其产物的摩尔消光系数分别为 16 800、17 100 和 12 400 mol/(L·cm)^[10]；邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚开环反应，其产物的摩尔消光系数为 36 000 mol/(L·cm)和 42 000 mol/(L·cm)^[11]。

1.2.5 实时定量 PCR：*S. sp.* YL-JM2C 接种于 100 mL R2A 液体培养基中，在 30 °C、160 r/min 振荡培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.3 时，培养液平均分装入两个三角瓶中，其中一瓶加入 4 mg/L 三氯卡班。两瓶培养液继续振荡培养，*OD*₆₀₀ 约 0.5 时分别用 50 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液清洗菌体，再分别重悬于 50 mL 相同的磷酸缓冲液中。在含有 4 mg/L 三氯卡班的菌悬液中再加入 4 mg/L 三氯卡班再诱导 6 h 后收集菌体，另一瓶菌体为对照组。以菌株 YL-JM2C 的 16S rRNA 基因作为内参基因，以 *stcA1*、*stcA2*、*stcA3*、*stcE1* 和 *stcE2* 为模板设计实时定量 PCR 引物(表 3)，利用 TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒提取 RNA 并反转录成 cDNA 根据 TaKaRa 试剂盒 SYBR®Premix ExTaq™说明进行实时定量 PCR 测定。

表 3 实时定量 PCR 实验中所用引物
Table 3 Primers used in the study of Real-time PCR

| 引物名称 Primers | 引物序列 Primers sequence (5'→3') |
|-----------------|----------------------------------|
| qstcA1f | TCGGATGCTGAACGACTGG |
| qstcA1r | CGAGAAATTGCACGCCCTC |
| qstcA2f | CAACACCAAGGGCGGCTATTC |
| qstcA2r | ACGACGCTGCGGAAGACATAG |
| qstcA3f | AGCAGGACCGCCTCGAAAC |
| qstcA3r | CCGCCTCAAGCACGAAGTC |
| qstcE1f | TCGAACTCGACACGCAGGAC |
| qstcE1r | CGCGGACGTAGATGAACAGC |
| qstcE2f | GACCGTCTTCATGCCAGCAC |
| qstcE2r | CCAACCGAACTCCGTCTGC |
| qYL16sf | AAGAACACCAAGTGGCGAAGGC |
| qYL16sr | ATCATCGTTTACGGCGTGGACTAC |

2 结果与分析

2.1 *S. sp.* YL-JM2C 生长特性研究

R2A 液体培养基中 30 °C、160 r/min 培养条件下，通过全自动生长曲线测定仪对菌株 YL-JM2C 在不同 pH、氯化钠和三氯卡班浓度时的

生长进行实时监测,得到以下结论:菌株 YL-JM2C 在中性条件 pH 为 7.0–7.5 时生长最优;菌株 YL-JM2C 耐盐范围在 0–2%,在培养基配比 1.5% 氯化钠条件下菌株生长最优;在以三氯卡班做为底物时,浓度在 4–8 mg/L 范围内菌株生长情况最好。

R2A 培养基中碳源丰富,菌株 YL-JM2C 可以在其中生长。为了更好地研究菌株 YL-JM2C 降解三氯卡班的遗传特性,减少培养基中其他碳源的干扰,并为研究降解基因的分子机理和酶学特性奠定基础,进行 R2A 培养基优化。在加入 4 mg/L 的三氯卡班条件下优化 R2A 培养基,降低培养基中其它碳源含量,检测菌株 YL-JM2C 的生长情况。如图 2 所示,通过 Logistic 生长曲线模型拟合^[12],当优化的 R2A 培养基中仅含无机盐和 0.01% 酵母提取物时,30 °C 条件下,菌株 YL-JM2C 能以终浓度为 4 mg/L 的三氯卡班为底物生长。图 2 中加入三氯卡班的菌株进入对数期的时间较不加入三氯卡班的对数期滞后,分析可能是由于培养基中酵母提取物与三氯卡班碳源的竞争性抑制导致。

2.2 邻苯二酚双加氧酶基因生物信息学分析

利用生物信息学进一步分析 *S. sp.* YL-JM2C 中 3 个潜在的邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *stcA1*、*stcA2* 和 *stcA3* 及两个潜在的邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因 *stcE1* 和 *stcE2*。*StcA1*、*StcA2* 和 *StcA3* 三者相互间

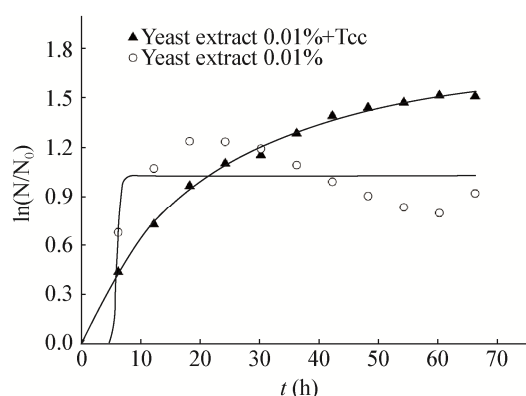


图 2 菌株 YL-JM2C 利用三氯卡班的生长曲线

Figure 2 Growth curve of strain YL-JM2C on triclocarban

一致性在 27%–30%;*StcE1* 和 *StcE2* 的蛋白序列一致性为 14.6%。从构建的系统发育树结果分析(图 3):*StcA1*、*StcA2* 和 *StcA3* 与已有功能研究的邻苯二酚 1,2-双加氧酶或氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶亲缘最相近,而 *StcE1* 和 *StcE2* 与其它邻苯二酚 2,3-双加氧酶建立的发育树自举值在 50% 以下,亲缘性较远。

将 *StcA1*、*StcA2* 和 *StcA3* 与已研究功能的邻苯二酚 1,2-双加氧酶序列进行一致性比对(表 4),*StcA1* 与来自 *Delftia acidovorans* 和 *Pseudomonas sp.* GT241-1 的氯邻苯二酚 1,2-双加氧酶一致性最高,均为 61.9%;*StcA2* 与 *P. knackmussii* B13 的邻苯二酚 1,2-双加氧酶蛋白序列一致性最高,为 51.4%;*StcA3* 与 *Variovorax sp.* WDL1 的邻苯二酚 1,2-双加氧酶蛋白序列一致性最高,为 63.1%。*StcE1* 和 *StcE2* 与已研究过功能的邻苯二酚 2,3-双加氧酶蛋白序列一致性比对(表 5),*StcE1* 与来自 *Geobacillus genomos sp.* 3 的邻苯二酚 2,3-双加氧酶蛋白序列一致性最高,为 27.4%,而 *StcE2* 与来自 *Beijerinckia sp.* strain B1 的邻苯二酚 2,3-双加氧酶序列一致性最高,为 24.1%。

综上所述,初步推测 *S. sp.* YL-JM2C 中同时存在 3 个潜在的有功能的邻苯二酚 1,2-双加氧酶 *StcA1*、*StcA2* 和 *StcA3* 以及两个潜在的邻苯二酚 2,3-双加氧酶 *StcE1* 和 *StcE2*,而且 *StcE1* 和 *StcE2* 与已研究报道过的邻苯二酚 2,3-双加氧酶序列一致性差异较大,可能是一类新型的邻苯二酚 2,3-双加氧酶。

2.3 邻苯二酚 1,2-双加氧酶酶学特性研究

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证 *StcA1*、*StcA2* 和 *StcA3* 表达和纯化结果,如图 4 所示纯化蛋白的条带清晰且蛋白分子量正确。利用分光光度计分别检验纯化蛋白 *StcA1*、*StcA2* 和 *StcA3* 的酶活力,如图 5 所示。加入底物为邻苯二酚时,275 nm 处邻苯二酚吸收峰上升,随后向催化反应中产物顺,顺-粘糠酸 260 nm 出峰处偏移,证明邻苯二

酚 1,2-双加氧酶催化底物的开环(图 5A)。在加入邻苯二酚衍生物 3-氯邻苯二酚(图 5B)和 4-氯邻苯二酚(图 5C)后,产物氯代粘糠酸产物峰上升,证明构建的邻苯二酚 1,2-双加氧酶可催化氯代邻苯二酚开环。经过酶活测定证明邻苯二酚 1,2-双加氧酶

StcA1、StcA2 和 StcA3 均成功表达,并可催化邻苯二酚及其衍生物氯代邻苯二酚生成顺,顺-粘糠酸和氯代顺,顺-粘糠酸的反应。图 5 显示的反应是以 StcA1 催化的,而 StcA2 和 StcA3 分别催化的反应与图 5 相似。

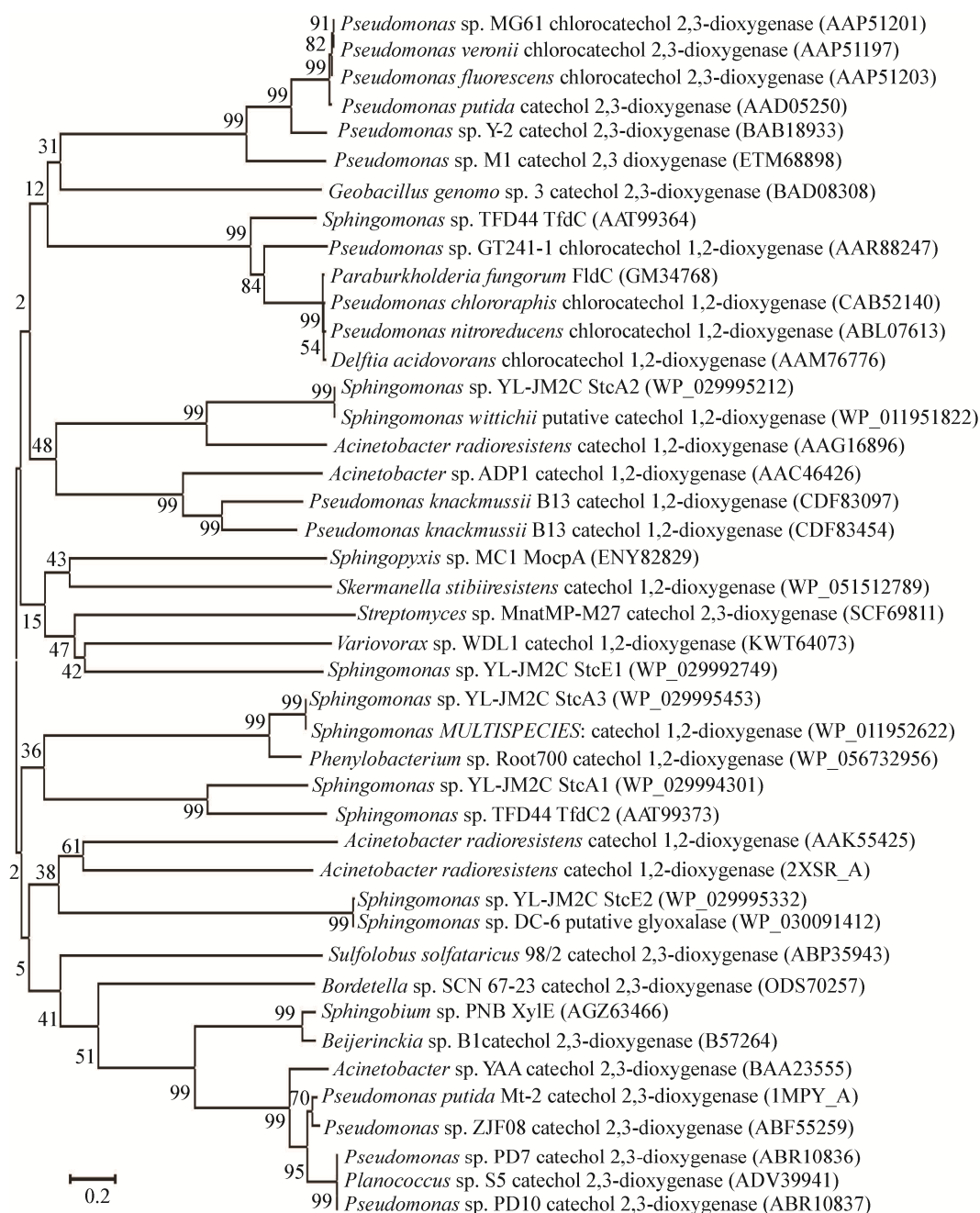


图 3 邻苯二酚双加氧酶系统发育树

Figure 3 The phylogenetic tree of catechol dioxygenases

表 4 邻苯二酚 1,2-双加氧酶序列一致性
Table 4 Identity of catechol 1,2-dioxygenases (%)

| Functional identified catechol dioxygenases | Enzymes | | |
|--|---------|-------|-------|
| | StcA1 | StcA2 | StcA3 |
| TfdC2 [<i>S. sp.</i> TFD44][AAT99373] | 58.9 | 31.7 | 30.5 |
| Catechol 1,2-dioxygenase [<i>P. knackmussii</i> B13][CDF83097] | 22.3 | 51.4 | 28.8 |
| TfdC [<i>S. sp.</i> TFD44][AAT99364] | 60.2 | 32.0 | 32.7 |
| Catechol 1,2-dioxygenase [<i>Acinetobacter radioresistens</i>][AAG16896] | 38.1 | 48.7 | 27.2 |
| Catechol 1,2-dioxygenase [<i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8][CAD56206] | 61.1 | 30.1 | 34.8 |
| Catechol 1,2-dioxygenase [<i>A. sp.</i> ADP1][AAC46426] | 34.6 | 50.7 | 24.7 |
| Catechol 1,2-dioxygenase [<i>V. sp.</i> WDL1][KWT64073] | 45.8 | 31.5 | 63.1 |
| Catechol 1,2-dioxygenase [<i>A. Radioresistens</i>][AAK55425] | 36.5 | 47.9 | 27.0 |
| Chlorocatechol 1,2-dioxygenase [<i>P. chlororaphis</i>][CAB52140] | 61.5 | 29.7 | 34.8 |
| Chlorocatechol 1,2-dioxygenase [<i>D. acidovorans</i>][AAC35836] | 61.9 | 30.3 | 35.1 |
| Chlorocatechol 1,2-dioxygenase [<i>P. nitroreducens</i>][ABL07613] | 61.8 | 30.0 | 34.8 |
| Chlorocatechol 1,2-dioxygenase [<i>P. sp.</i> GT241-1][AAR88247] | 61.9 | 30.0 | 28.7 |
| Catechol 1,2-dioxygenase [<i>A. radioresistens</i>][2XSR_A] | 34.6 | 51.3 | 24.7 |

表 5 邻苯二酚 2,3-双加氧酶序列一致性
Table 5 Identity of catechol 2,3-dioxygenases (%)

| Functional identified catechol dioxygenases | Enzymes | |
|---|---------|-------|
| | StcE1 | StcE2 |
| XylE [<i>Sphingobium sp.</i> PNB][AGZ63466] | 23.5 | 23.0 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>Bordetella sp.</i> SCN 67-23][ODS70257] | 27.2 | 22.3 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>G. genomus sp.</i> 3][BAD08308] | 27.4 | 19.6 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>P. putida</i>][AAD05250] | 22.7 | 21.0 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>Planococcus sp.</i> S5][ADV39941] | 25.3 | 20.5 |
| Chlorocatechol 2,3-dioxygenase [<i>P. veronii</i>][AAP51197] | 22.7 | 21.4 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>Burkholderia sp.</i> JS667][ACO92651] | 24.7 | 20.6 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>B. strain</i> B1][B57264] | 23.9 | 24.1 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>P. sp.</i> PD7][ABR10836] | 25.6 | 20.2 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>P. sp.</i> PD10][ABR10837] | 25.6 | 20.5 |
| Chlorocatechol 2,3-dioxygenase [<i>P. fluorescens</i>][AAP51203] | 22.7 | 21.7 |
| Chlorocatechol 2,3-dioxygenase [<i>P. sp.</i> MG61][AAP51201] | 22.7 | 21.4 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>P. sp.</i> K128][AAP92388] | 22.8 | 19.7 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>P. sp.</i> M1][ETM68898] | 23.7 | 19.0 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>P. putida</i> Mt-2][1MPY_A] | 23.2 | 22.7 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>A. sp.</i> YAA][BAA23555] | 24.9 | 19.9 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>P. sp.</i> Y-2][BAB18933] | 24.4 | 21.8 |
| Catechol 2,3-dioxygenase [<i>P. sp.</i> ZJF08][ABF55259] | 24.9 | 22.3 |

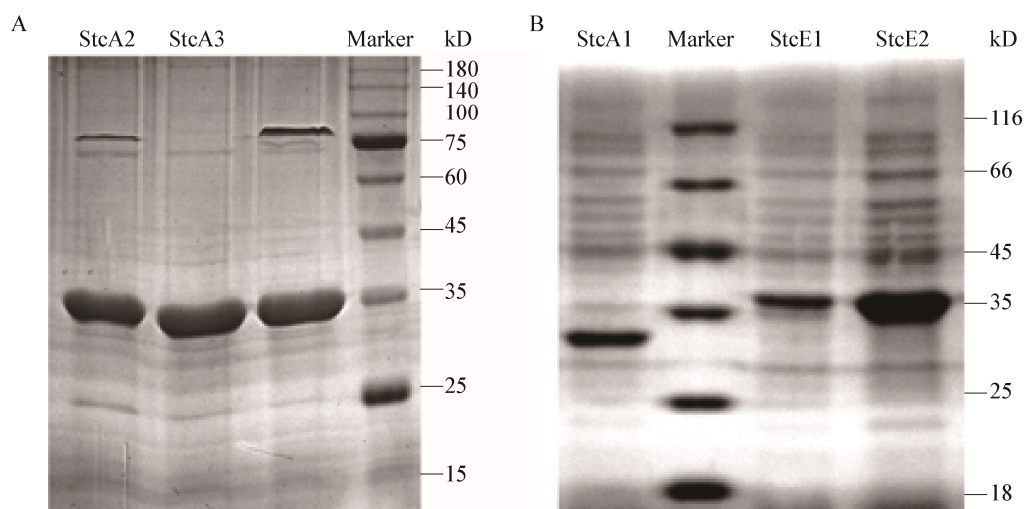


图4 纯化蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳
Figure 4 SDS-PAGE of purified proteins

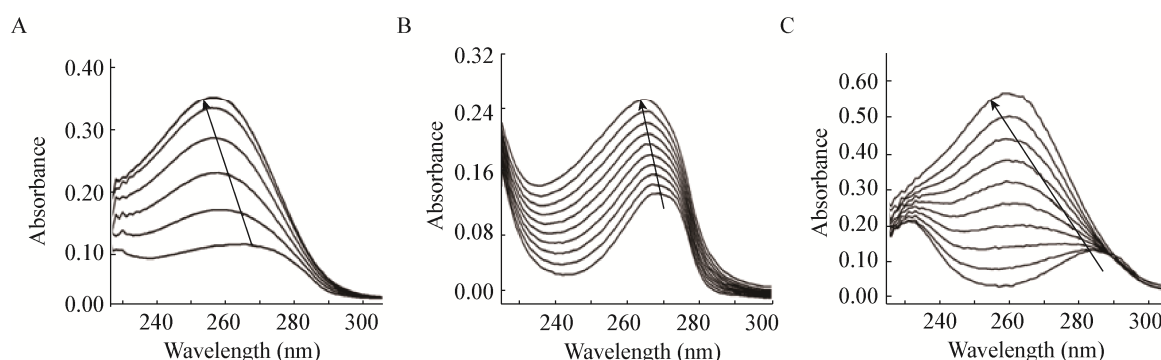


图5 邻苯二酚 1,2-双加氧酶 StcA1 催化邻苯二酚(A)、3-氯邻苯二酚(B)和 4-氯邻苯二酚开环反应(C)
Figure 5 Catechol 1,2-dioxygenase StcA1 catalyzed the ring cleavages of catechol (A), 3-chlorocatechol (B) and 4-chlorocatechol (C)

酶学动力学参数如表 6 所示: StcA1、StcA2 和 StcA3 与邻苯二酚亲和性最好, 其 K_m 值分别为以 3-氯邻苯二酚或 4-氯邻苯二酚为底物时 K_m 值的 30%–40%, 其中 StcA2 以邻苯二酚为底物时的 K_m 值最小, 底物亲和性最好; 以邻苯二酚为底物时 StcA1、StcA2 和 StcA3 的催化效率(k_{cat}/K_m)高于 3-氯邻苯二酚或 4-氯邻苯二酚为底物时; 以 4-氯邻苯二酚为底物时, StcA1、StcA2 和 StcA3 的催化效率又均高于以 3-氯邻苯二酚为底物时。以邻苯二酚为底物时, StcA2 的催化效率最高, 分别是 StcA1 和 StcA3 的 4.6 倍和 19.5 倍; 以 3-氯邻苯二酚为底物时, StcA2 的催化效率最高, 分别是 StcA1 和 StcA3

的 7.3 倍和 26.0 倍。以 4-氯邻苯二酚为底物时, StcA3 的催化效率最高, 分别是 StcA1 和 StcA2 的 1.7 倍和 5.2 倍。

2.4 邻苯二酚 2,3-双加氧酶酶学特性研究

通过粗酶液酶活检测, 仅有 StcE1 和 StcE2 具有邻苯二酚 2,3-双加氧酶的功能, StcE3 通过多次检测均未检测到产物峰, 确认没有邻苯二酚 2,3-双加氧酶的功能。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 验证 StcE1 和 StcE2 表达和纯化结果, 如图 4 所示纯化蛋白的条带清晰且蛋白分子量正确。通过紫外分光光度计检测纯化的 StcE2 蛋白的酶活力, 如图 6A 所示, 以邻苯二酚为底物时 375 nm

表 6 邻苯二酚双加氧酶动力学参数
Table 6 Enzymatic kinetics of the catechol dioxygenases

| Enzymes | Item | Substrates | | |
|---------|------------------------------|-------------|------------------|------------------|
| | | Catechol | 3-Cholorcatechol | 4-Cholorcatechol |
| StcA1 | K_m (mmol/L) | 0.035±0.042 | 0.092±0.059 | 0.082±0.025 |
| | k_{cat} (s ⁻¹) | 1.422±0.642 | 0.185±0.042 | 0.404±0.058 |
| | k_{cat}/K_m (L/(mmol·s)) | 40.207 | 2.011 | 4.927 |
| StcA2 | K_m (mmol/L) | 0.022±0.006 | 0.090±0.097 | 0.073±0.043 |
| | k_{cat} (s ⁻¹) | 4.081±0.299 | 1.322±0.800 | 0.121±0.028 |
| | k_{cat}/K_m (L/(mmol·s)) | 185.455 | 14.667 | 1.658 |
| StcA3 | K_m (mmol/L) | 0.039±0.035 | 0.143±0.067 | 0.126±0.054 |
| | k_{cat} (s ⁻¹) | 0.375±0.087 | 0.080±0.022 | 1.073±0.023 |
| | k_{cat}/K_m (L/(mmol·s)) | 9.615 | 0.559 | 8.492 |
| StcE2 | K_m (mmol/L) | 0.404±0.229 | — | 0.042±0.028 |
| | k_{cat} (s ⁻¹) | 6.160±1.647 | — | 0.332±0.077 |
| | k_{cat}/K_m (L/(mmol·s)) | 15.248 | — | 7.905 |

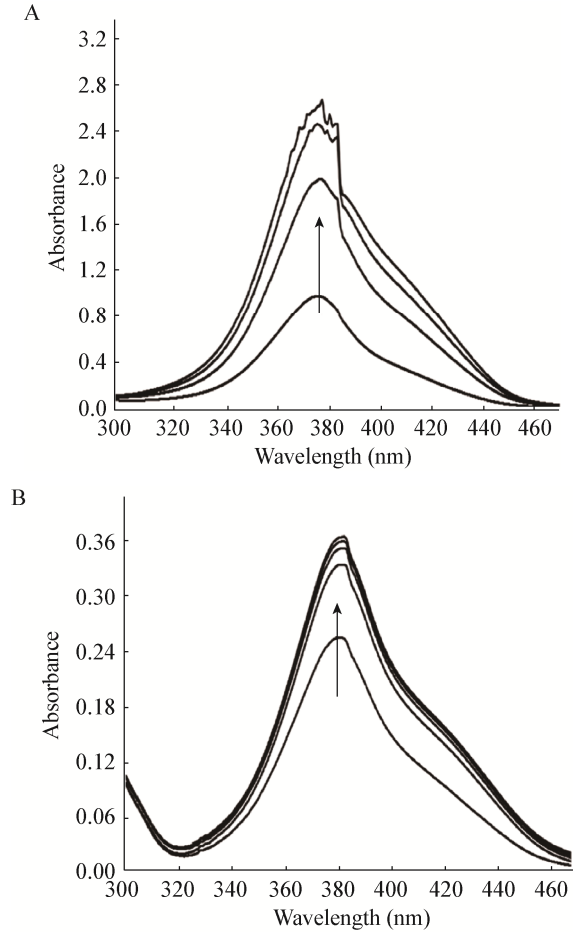


图 6 邻苯二酚 2,3-双加氧酶 StcE2 催化邻苯二酚(A)和 4-氯邻苯二酚开环反应(B)
Figure 6 Catechol 2,3-dioxygenase StcE2 catalyzed the ring cleavage of catechol (A) and 4-chlorocatechol (B)

吸收峰上升，证明 StcE2 催化邻苯二酚开环反应生成顺,顺-粘糠酸半醛($\lambda_{max}=375\text{ nm}$)，具有邻苯二酚 2,3-双加氧酶活力；以 4-氯邻苯二酚为底物时，在 380 nm 吸收峰上升，证明 StcE2 催化 4-氯邻苯二酚开环反应生成 3-氯-粘糠酸半醛($\lambda_{max}=380\text{ nm}$)，具有 4-氯邻苯二酚 2,3-双加氧酶活力(6B)；以 3-氯邻苯二酚为底物时未检测到酶活。酶动力学参数如表 6 所示，以邻苯二酚为底物时 StcE2 的 K_m 值约为以 4-氯邻苯二酚为底物时的 10 倍，StcE2 与 4-氯邻苯二酚的亲合性远高于邻苯二酚；但以邻苯二酚为底物时 StcE2 的催化效率约为以 4-氯邻苯二酚为底物时的 2 倍。StcE1 在测定粗酶液酶活时酶活性较低，测得分别以浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的邻苯二酚、3-氯邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚为底物时，比活力分别为 3.97×10^{-4} 、 4.75×10^{-5} 和 $2.35\times10^{-5}\text{ U/mg}$ 。由于酶活较低无法测量 StcE1 酶动力学参数。

2.5 邻苯二酚双加氧酶编码基因的转录研究

S. sp. YL-JM2C 降解三氯卡班过程中，其中间开环底物被推断可能为 4-氯邻苯二酚^[7]。为探究哪一个邻苯二酚双加氧酶参与了 4-氯邻苯二酚的开环反应，将上述体外证明具有功能的 5 个邻苯二酚双加氧酶基因分别进行 qPCR，检测在代谢过程中 5 个基因的转录类型和转录水平。对加入三氯卡班诱导前后 5 个基因的相对转录表达量利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[13]进行分析，如图 7 所示。以菌株 16S rRNA

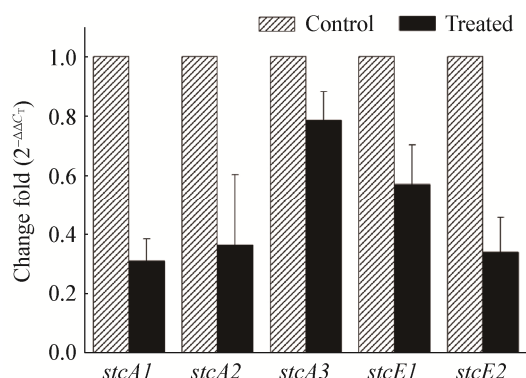


图 7 邻苯二酚双加氧酶编码基因相对转录表达量

Figure 7 The relative expression of catechol dioxygenase genes

基因作为内参基因(Control), 5 个基因经过诱导后无显著变化, 相对转录表达均小于 1, 有下调趋势。由此推测该 5 个基因可能均是组成型表达, 或者虽然该菌株可以降解三氯卡班, 但是三氯卡班不是代谢途径的诱导物, 从而不能成功诱导 5 个邻苯二酚双加氧酶基因的转录量增加。

3 结论与讨论

本研究在同一菌株中发现 5 个有功能的邻苯二酚双加氧酶基因 *stcA1*、*stcA2*、*stcA3*、*stcE1* 和 *stcE2*。通过相关酶学研究证明邻苯二酚 1,2-双加氧酶 StcA1、StcA2 和 StcA3 以及邻苯二酚 2,3-双加氧酶 StcE1 和 StcE2 均具有催化邻苯二酚和氯邻苯二酚开环反应的功能。StcE3 蛋白表达后, 通过多次粗酶液酶活检测未检测到产物峰, 认为该潜在蛋白不具有邻苯二酚 2,3-双加氧酶功能。

根据目前的国内外研究报道, I 型邻苯二酚 1,2-双加氧酶几乎不能催化氯代邻苯二酚进行开环反应^[14-15], II 型邻苯二酚 1,2-双加氧酶则可同时催化邻苯二酚和氯代邻苯二酚的开环反应^[14-15]。本研究报告的邻苯二酚 1,2-双加氧酶 StcA1、StcA2 和 StcA3 均可催化 3-氯邻苯二酚和 4-氯邻苯二酚开环反应, 可认为其均属于 II 型邻苯二酚 1,2-双加氧酶。氯原子所在苯环的位置可影响邻苯二酚 1,2-双加氧酶催化效率和底物亲和性, 本研究中 StcA1、StcA2 和 StcA3 均与邻苯二酚亲和性高于氯代邻苯二酚; 而在催化氯代邻苯二酚开环反应时, 三者皆对 4-氯

邻苯二酚的亲和性和催化效率更高。S. sp.TFD44 的氯邻苯二酚 1,2-双加氧酶 TfdC 和 TfdC2^[16]以及 *Pseudomonas chlororaphis* 的氯邻苯二酚 1,2-双加氧酶 TctA^[17]同样可催化氯代邻苯二酚开环, 其中 *Pseudomonas chlororaphis* 的 TctA 对 4-氯邻苯二酚底物结合性较高, 而 TfdC 和 TfdC2 对 3-氯邻苯二酚底物亲和性更高且对氯代邻苯二酚亲和性高于邻苯二酚。除上述的 TfdC、TfdC2^[16]和 TctA^[17]外, 在 *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2^[18]和 *A. sp. Y64*^[19]均存在邻苯二酚 1,2-双加氧酶可催化邻苯二酚及甲基化邻苯二酚开环反应, 在 *A. sp. DS002* 中邻苯二酚 1,2-双加氧酶 CatA 可催化邻苯二酚和 4-硝基邻苯二酚开环反应^[20], 在 *Achromobacter xylosoxidans* A8 中邻苯二酚 1,2-双加氧酶 MocpA 可催化开环 4-氯邻苯二酚^[21]。然而, 目前在同菌株中最多找到两个邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因并进行过相关功能验证^[16], 而在本实验中所用的 S. sp. YL-JM2C 中存在 3 个有功能的邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *stcA1*、*stcA2* 和 *stcA3*, 且 3 个基因编码的蛋白经过酶学检测证明均可以催化邻苯二酚和氯邻苯二酚的开环反应, 在进行粗酶液酶活测定中也检测出三者皆可催化甲基邻苯二酚的开环反应。

本研究中邻苯二酚 2,3-双加氧酶 StcE1 和 StcE2 可催化邻苯二酚及其氯代衍生物 3-氯邻苯二酚 (StcE2 无功能) 和 4-氯邻苯二酚开环反应, 在进行粗酶液酶活检测时, StcE1 和 StcE2 同样可催化 3-甲基邻苯二酚和 4-甲基邻苯二酚。目前关于氯邻苯二酚 2,3-双加氧酶的功能研究鲜有报道, 但可催化甲基邻苯二酚开环反应的邻苯二酚 2,3-双加氧酶的研究较多。例如, *Pseudomonas* sp. KL2 可催化甲基邻苯二酚开环反应^[22]; 来自 *Planococcus* sp. S5^[23]、*Pseudomonas* sp. S-47^[24]和 *Pseudomonas* AW-2^[25]的邻苯二酚 2,3-双加氧酶可催化邻苯二酚、4-氯邻苯二酚、3-甲基邻苯二酚和 4-甲基邻苯二酚, 其底物范围与 StcE2 相似, 来自 *Pseudomonas putida* mt-2^[26]和 *Pseudomonas putida* GJ31^[27]的氯邻苯二酚 2,3-双加氧酶 CbzE 与 StcE1 底物范围相似, 可催化 3-甲基邻苯二酚、4-甲基邻苯二酚、3-氯邻苯二酚和 4-

氯邻苯二酚开环反应。但通过亲缘性比对, StcE1 和 StcE2 与上述报道的邻苯二酚 2,3-双加氧酶亲缘性非常低, 可能属于一类新型邻苯二酚 2,3-双加氧酶。

本研究中 *S. sp.* YL-JM2C 降解三氯卡班的过程中, 其中间开环底物推测可能是 4-氯邻苯二酚^[7], 但实时定量 PCR 检测三氯卡班诱导前后 5 个邻苯二酚双加氧酶基因的转录量均未出现变化, 推测该 5 个基因可能均是组成型表达。在后续研究中会进行深入探究, 了解其下游产物 4-氯邻苯二酚在三氯卡班代谢过程中是通过邻苯二酚 1,2-双加氧酶催化进行邻位开环反应, 还是通过邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化的间位开环反应进一步降解, 从而初步揭示菌株 YL-JM2C 降解三氯卡班途径中 4-氯邻苯二酚代谢的分子机理, 并探索微生物代谢新型污染物的代谢机理及其多样性。

致谢: 感谢中国科学院城市环境研究所于昌平研究员提供 *S. sp.* YL-JM2C 并在菌种培养方面提供的帮助。

参 考 文 献

- [1] Halden RU. On the need and speed of regulating triclosan and triclocarban in the United States[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(7): 3603-3611
- [2] 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
- [3] Dagley S, Geary PJ, Wood JM. The metabolism of protocatechuate by *Pseudomonas testosteroni*[J]. *Biochemical Journal*, 1968, 109(4): 559-568
- [4] Wolgel SA, Dege JE, Perkins-Olson PE, et al. Purification and characterization of protocatechuate 2,3-dioxygenase from *Bacillus macerans*: a new extradiol catechol dioxygenase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(14): 4414-4426
- [5] Zhou NY, Fuenmayor SL, Williams PA. *nag* genes of *Ralstonia* (Formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(2): 700-708
- [6] Sala-trepat JM, Evans WC. The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1971, 20(3): 400-413
- [7] Mulla SI, Hu AY, Wang YW, et al. Degradation of triclocarban by a triclosan-degrading *Sphingomonas* sp. strain YL-JM2C[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 292-296
- [8] Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(23): 8746-8749
- [9] Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(1): 1-7
- [10] Liu H, Wang SJ, Zhang JJ, et al. Patchwork assembly of *nag*-like nitroarene dioxygenase genes and the 3-chlorocatechol degradation cluster for evolution of the 2-chloronitrobenzene catabolism pathway in *Pseudomonas stutzeri* ZWLR2-1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13): 4547-4552
- [11] Kaschabek SR, Kasberg T, Müller D, et al. Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2, 3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(2): 296-302
- [12] Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, et al. Modeling of the bacterial growth curve[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(6): 1875-1881
- [13] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [14] Harayama S, Kok M, Neidle EL. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases[J]. *Annual Review in Microbiology*, 1992, 46(1): 565-601
- [15] Patel RN, Hou CT, Felix A, et al. Catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: purification and properties[J]. *Journal of Bacteriology*, 1976, 127(1): 536-544
- [16] Lang GH, Ogawa N, Tanaka Y, et al. Two kinds of chlorocatechol 1,2-dioxygenase from 2,4-dichlorophen oxyacetate-degrading *Sphingomonas* sp. strain TFD44[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 332(4): 941-948
- [17] Potrawfke T, Armengaud J, Wittich RM. Chlorocatechols substituted at positions 4 and 5 are substrates of the broad-spectrum chlorocatechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas chlororaphis* RW71[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(3): 997-1011
- [18] Wojcieszynska D, Hupert-Kocurek K, Greń I, et al. High activity catechol 2,3-dioxygenase from the cresols-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(6): 853-858
- [19] Lin J, Milase RN. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. Y64 strain and *Escherichia coli* transformants[J]. *The Protein Journal*, 2015, 34(6): 421-433
- [20] Pandeeti EVP, Siddavattam D. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. DS002 and cloning, sequencing of partial *catA* gene[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2011, 51(3): 312-318
- [21] Jencova V, Strnad H, Chodora Z, et al. Chlorocatechol catabolic enzymes from *Achromobacter xylosoxidans* A8[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2004, 54(2/3): 175-181
- [22] Jeong JJ, Kim JH, Kim CK, et al. 3- and 4-alkylphenol degradation pathway in *Pseudomonas* sp. strain KL28: genetic organization of the *lap* gene cluster and substrate specificities of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase[J]. *Microbiology*, 2003, 149(11): 3265-3277
- [23] Hupert-Kocurek K, Guzik U, Wojcieszynska D. Characterization of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. strain S5 induced by high phenol concentration[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2012, 59(3): 345-351
- [24] Noh SJ, Kim Y, Min KH, et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of *xylE* gene responsible for *meta*-cleavage of 4-chlorocatechol from *Pseudomonas* sp. S-47[J]. *Molecules and Cells*, 2000, 10(4): 475-479
- [25] Murakami S, Nakanishi Y, Kodama N, et al. Purification, characterization, and gene analysis of catechol 2,3-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Pseudomonas* species AW-2[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1998, 62(4): 747-752
- [26] Bartels I, Knackmuss HJ, Reineke W. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47(3): 500-505
- [27] Mars AE, Kingma J, Kaschabek SR, et al. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(4): 1309-1318