

双烯内酯水解酶基因的克隆和序列分析*

钟文辉¹ 孙明² 何国庆³ 冯孝善³ 喻子牛^{2* *}

(南京师范大学化学与环境科学学院 南京 210097)¹

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)²

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310029)³

摘要: 从土壤中分离到一株降解2,4-二氯酚能力较强的假单胞菌菌株 GT241-1, 从中克隆出参与降解2,4-二氯酚的双烯内酯水解酶基因 (*dcpD*)。该基因编码的双烯内酯水解酶可将顺式-2-氯双烯内酯水解成2-氯马来乙酸。采用的基因克隆策略是用 Southern 杂交对其邻近基因进行定位后构建基因组文库, 再用斑点杂交筛选目的转化子。经序列测定得知 *dcpD* 基因编码区 702bp。核苷酸和推测编码的氨基酸序列分析表明, *dcpD* 与已在 GenBank 登记的相关基因有一定的差异。

关键词: 假单胞菌, 2,4-二氯酚, 双烯内酯水解酶基因, 基因克隆

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0079-06

Cloning and Sequence Analysis of Dienelactone Hydrolase Gene

ZHONG Wen-Hui¹ SUN Ming² HE Guo-Qing³ FENG Xiao-Shan³ YU Zi-Niu²

(College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)¹

(State key Lab of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)²

(College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029)³.

Abstract: A 2,4-dichlorophenol degrading *Pseudomonas* strain GT241-1 was isolated from a soil sample. The dienelactone hydrolase gene, designated as *dcpD* which encodes dienelactone hydrolase involved in transforming *cis*-2-chlorodienelactone into 2-chloromaleylacetic acid, was cloned from this bacterium strain. The gene cloning strategy was to construct genomic library after location of its neighbouring gene by Southern blot and to screen the aim transformant by dot blotting. Sequencing results showed that length of *dcpD* is 702bp. The sequence of *dcpD* and the deduced amino acid are different from the relative sequences registered in the GenBank.

Key words: *Pseudomonas*, 2,4-Dichlorophenol, Dienelactone hydrolase gene, Gene cloning

2,4-二氯酚(2,4-DCP)通常用于生产五氯酚、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和2,4,5-三氯苯氧乙酸等氯代芳香化合物,这些化合物被广泛用作木材防腐、防锈剂、杀真菌剂和一般杀虫剂等。2,4-二氯酚广泛存在于以上氯代芳香化合物的生产废水中,此外也存在于染料和增塑剂等的生产废水中。2,4-二氯酚及其衍生物都是有毒、难降解化合物,是环保中需要控制的一大类污染物。美国、中国等国家已把2,4-DCP列入水中有害物质或优先污染物“黑名单”。分离筛选降解2,4-二氯酚的微生物,对其特

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30080013)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No.30080013)

农业微生物学国家重点开放实验室开放基金资助项目

** 联系人 E-mail: yz41@public.wb.hb.cn

收稿日期: 2003-08-26, 修回日期: 2003-11-16

性、降解基因直至构建基因工程菌的研究具有重要的理论和现实意义。目前国内外对2,4-DCP的厌氧生物降解进行了广泛的研究^[1,2],也有对2,4-DCP降解菌的特性和降解酶定域及活性的报道^[3-5],但对微生物的2,4-DCP降解基因的结构和分子特征的研究报道不多。2,4-DCP的好氧生物降解过程是2,4-DCP先经2,4-二氯酚羟化酶催化生成3,5-二氯儿茶酚后,进一步由3,5-二氯儿茶酚1,2-双加氧酶催化将苯环裂开生成2,4-二氯-顺,顺-粘康酸,此中间代谢产物再先后经氯粘康酸环异构酶、反式氯双烯内酯异构酶和双烯内酯水解酶(dienelactone hydrolase)3步催化作用,最后生成2-氯马来乙酸。其中双烯内酯水解酶基因(本文取代号为*dcpD*)是降解2,4-DCP的关键基因之一,*dcpD*编码的双烯内酯水解酶可将顺式-2-氯双烯内酯水解成2-氯马来乙酸。双烯内酯水解酶也参与对2,4-D的降解。根据对2,4-D降解基因的研究^[6,7],编码氯双烯内酯水解酶的基因(*tdE*)与编码3,5-二氯儿茶酚1,2-双加氧酶(*tdC*)、氯粘康酸环异构酶和反式氯双烯内酯异构酶的基因紧密连系在一起构成大小约3.7kb的二氯儿茶酚氧化操纵子,*tdE*与*tdC*间隔区长约1.1kb。笔者从生产2,4-DCP的排污口土样中分离到几株具有降解2,4-DCP能力的微生物,对这些菌株的生物学特性和对氯代芳香化合物的降解和利用能力进行了研究,并从其中一株降解2,4-DCP能力最强的细菌菌株中克隆出降解2,4-DCP的关键基因,对所克隆的基因序列作了测序和分析。这些工作了解了2,4-二氯酚降解基因的结构和特性,也为后续构建高效降解2,4-二氯酚的基因工程菌奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 微生物菌株

1.1.1 假单胞菌 GT241-1: 从生产2,4-二氯酚及2,4-D化工厂的排污口取土样,添加2,4-二氯酚驯化3个月后分离到的一株降解2,4-二氯酚能力较强、并能利用2,4-二氯酚为唯一碳源生长的细菌菌株。根据文献[8]对该菌株进行形态结构、生长特性和生理生化方面的试验,最后根据《伯杰氏细菌鉴定手册》将之鉴定为假单胞菌属^[9]。

1.1.2 DNA操作的受体菌株: 大肠杆菌 DH5 α 。

1.2 培养基

LB培养基配方按文献[10], LA培养基是固体LB培养基。用添加20 μ g/mL硫酸卡那霉素的LA培养基筛选转化子或培养重组菌株。

1.3 基因克隆方法

1.3.1 克隆载体: 大肠杆菌克隆载体 pDG780, 大小4,445 bp, 为硫酸卡那霉素抗性(Km^r)。

1.3.2 总DNA制备和酶切: 总DNA大量制备采用SDS裂解法^[10]。用EcoRI、XbaI、EcoRI/XbaI对总DNA分别进行完全酶切。

1.3.3 从琼脂糖凝胶中回收和纯化DNA: 凝胶电泳结束后用EB染色, 在长波紫外灯下迅速切下目的DNA带, 装入Eppendorf离心管, 用进口试剂盒回收和纯化DNA。

1.3.4 DNA的PCR扩增: 从核苷酸序列资料库中检索序列, 根据降解2,4-D等底物的几个3,5-二氯儿茶酚1,2-双加氧酶基因的保守区序列设计1对引物: 上游引物(3313#)序列为GTCAAGGATGTTGTCGATGC; 下游引物(3314#)序列为CGAAGTAGTACT-GCGTGGTC。用该对引物扩增得3,5-二氯儿茶酚1,2-双加氧酶基因片段预计大小610bp。

扩增反应体系体积 25 μ L, 首轮循环 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 接着以 94 $^{\circ}$ C 1 min, 63 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 25 个循环。

1.3.5 杂交探针制备、Southern 和斑点杂交: 用引物 3313 # ~ 3314 # 对菌株 GT241-1 的总 DNA 进行 PCR 扩增, 获得在空间位置上临近于 *depD* 的 610bp 特异性 DNA 片段, 经标记后作 Southern 杂交和斑点杂交的探针。采用德国 Boehringer Mannheim 地高辛试剂盒标记探针。Southern 杂交方法: 将总 DNA 完全酶切和电泳, 以 Southern 印渍将 DNA 转移至尼龙膜上, 紫外光下固定 5.5min, 68 $^{\circ}$ C 预杂交 8h, 加入探针于 68 $^{\circ}$ C 杂交 20h, 再洗膜和显色。斑点杂交参照文献 [10]。

1.3.6 大肠杆菌质粒的抽提制备、质粒大小的检查、DNA 的体外重组操作、大肠杆菌的常规转化: 均参照文献 [10]。DNA 的酶切和连接等操作均按供应商推荐的方法。

1.4 DNA 序列测定

请上海申友生物技术有限责任公司测定。

2 结果与分析

2.1 菌株 GT241-1 基因文库的构建、目的转化子的筛选和验证

总 DNA 分别经 *EcoRI*、*XbaI*、*EcoRI/XbaI* 酶切, 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳并转尼龙膜后进行 Southern 杂交, 结果显示经该 3 组酶切均得到一条杂交带, 其大小分别为 12kb、16kb 和 11kb 左右。回收 11kb 左右的酶切片段, 与克隆载体 pDG780 连接后转化大肠杆菌 DH5 α 构建基因组文库。通过检查 DH5 α 中质粒大小^[10] 筛选文库中的重组子 (重组子占转化子的比例为 30% ~ 45%), 采用斑点杂交 (图 1) 从约 1,000 个重组子中筛选得到一个目的转化子, 命名为 Z8122。抽提该目的转化子的质粒 pZ8122, 用 *EcoRI/XbaI*、*EcoRI* 酶切验证 (图 2) 及用引物 3313 # -3314 # 对 pZ8122 进行 PCR 扩增验证, 均显示转化子 Z8122 携带有外源目的片段。

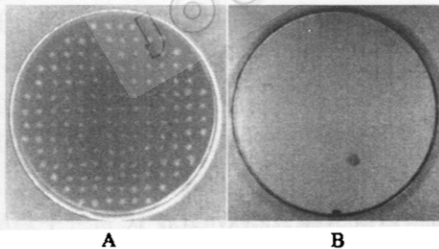


图 1 斑点印迹图谱

A 点种的转化子, B 斑点印迹图

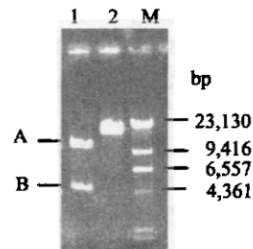


图 2 质粒 pZ8122 及其酶切图谱

M Marker (λ DNA/*HindIII*), 1 *EcoRI/XbaI* 酶切 (A 外源片段, B 载体 pDG780), 2 *EcoRI* 酶切

2.2 基因克隆片段的缩短和亚克隆

将 pZ8122 酶切并回收其外源片段, 用 *PstI*、*KpnI*、*SacI*、*BamHI* 和 *SmaI* 单酶切可分别得到 3、4、2、2 和 1 个片段, 其中大于 3.7kb 的酶切片段共 5 个。用引物 3313 # ~ 3314 # 对大于 3.7kb 的 5 个酶切片段分别进行 PCR 扩增, 结果该对引物对 *BamHI* 酶切得到的 4.3kb 左右的片段 (*BamHI*-B) 及 *SacI* 酶切得到的 5kb 左右的片段 (*SacI*-A) 能扩增出预期的 610bp DNA 片段。将载体 pDG780 分别用 *BamHI-XbaI*、*BamHI-EcoRI* 和 *BamHI* 酶切后, 再分别与 *BamHI*-B 片段连接并转化大肠杆菌 DH5 α , 结果用 *BamHI*-

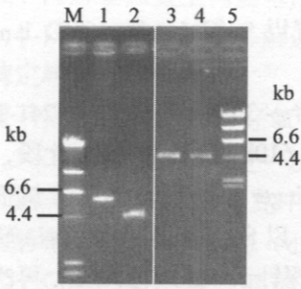


图3 质粒 pBCDE4-6 及酶切图谱

M Marker (λ DNA/*Hind*III), 1 pBCDE4-6,
 2 pBCDE4-6 经 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切得到几
 乎重叠的 4.3kb 外源片段和 4.4kb 载体片
 断, 3 载体 pDG780, 4 亚克隆片段

*Eco*RI 酶切的载体成功地与 *Bam*HI-B 片段连接, 获得转化子 BCDE4-6。 *dcpD* 基因的亚克隆片段 (*Bam*HI-B 片段)、pBCDE4-6 及 pBCDE4-6/*Bam*HI-*Eco*RI 图谱如图 3 所示, pBCDE4-6 经 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切, 得到几乎重叠的 4.3kb 亚克隆片段和 4.4kb 载体片段。

2.3 *dcpD* 基因序列及分析

将经缩短的 *dcpD* 基因的亚克隆片段作序列测定, 结果显示该片段全长 4,303 bp, 其中含 *dcpD* 的部分序列见图 4。图 4 中大写字母区 (序列中第 2,256 ~ 2,957 位, 702bp) 为推测的 *dcpD* 编码区; 起始密码子和终止密码子用黑体标出; 小写字母区为非编码区。

```

gcaaaacgcgagcgcaggccgctgtggatcgccctgaatgcaact 2230
ggcatgtgtaactggagactaaatATGTTATCAGACGGCGTTGAGATCACGTCGCGCTCGGGTGGTCCG 2300
TTTGGTGCTACTCTCGAAAGCCGACGACGGACTCCGACCCATCGTCTGATCGCGCAGGAGATTTTTG 2370
G GATCACGCCCTTTCATAAGAGAAACCGTGAATGGCTCGTTGCTGCGGGCTTTGGTTCGCTGTGTCGGGA 2440
T CTGTA CTGAGACAGGCGCCGAATATCGAGCTTGATGCAAAACGTACCATCGGAACGGGAACAGGCGCTT 2510
G CGTTGTTTCGCGACTTTGACATGGAGGCAGGACTCAATGACCTTTCATGCACCATTTGAATACGCTCGTG 2580
CGCTCCCTTTTTCGAACGGTCTGCTGCTGTACTCGGGTACTGCCTGGGATGTGCGCTGGCGTTTGTATGT 2640
GCGCGCGGATCATTGGCCGATTGCTCAATCGGCTATTACGGCTGGGACTTGAAAAAAGGTCTCACTG 2720
GCGCCAGCTATTACAGACCGCGGATGTTCCACATGGCTACCAAAGATCACTATGTCACAGAAGAGGCC 2790
GTAGCATTCTCGAAGAGCATTTCCGGTGCAAAACAAAATCTGAGTCTGCACTGGTATCCAGTGGGGCATT 2860
ATTGCACGGTCAATCCAGCCAAATTTCCGATCAGCGCGCGCAACTGTGGCCAATGCTCGGACGCTCGAA 2930
C TGC TC GC AATGTTGAAGACCC TTC ATGA 2960
  
```

图4 *dcpD* 基因序列

```

Query: 1  MLSDGVEITSRSCGRFGAYLGKPTTDSAPIVIVAQEIFGHPFIRETVEWLVGAGFGVCV 180
Sbjct1: 1  MLSDGVEITSRSCGRFGAYLGKPTTDSAPIVIVAQEIFGHPFIRETVEWLVGAGFGVCV 60
Sbjct2: 1  MLTEGLSIDAKGGFRFGAHLQLPARGRGPVVIVAQEIFGVNPFMTEVLAWLASEGFVGLC 60

Query: 181 PDLYWRQAPNIELDANVPSEREQALALFRDFDMEAGVNDLSCITEYARALPFSNGRVAVV 360
Sbjct1: 61 PDLYWRQAPNIELDANVPSEREQALALFRDFDMEAGVNDLSCAIEYARALPFSNGRVAVV 120
Sbjct2: 61 PDLYWRHGPGIEFDPNDEVQRARALGMFRDYKLEDGVADLRATVAYAAQPFCDGGVAVI 120

Query: 361  GYCLGCALAFDVAARSLADCSIGYYGVGLEKKVSLVPAITRPAMFHMGIKDHYVTEEAR 540
Sbjct1: 121 GYCLGCALAFDVAARSLADCSIGYYGVGLEKKVSLVPAITRPAMFHMGIKDHYVTEEAR 180
Sbjct2: 121 GYCLGCALAYEVAEFGAQCVCVGYGVGFKEKRLERARLVKTPSMFHMGTNDHFVTAEARQ 180

Query: 541  ILEEHFGRNKNSLHWYPVGHFARSSSPNFDQAAATVANARTLELLAMLKDP 699
Sbjct1: 181 ILEEHFGRNKNSLHWYPVGHFARSSSPNFDQAAATVANARTLELLAMLKDP 233
Sbjct2: 181 LITNAFEANPAIALHWDAGHSFARSSPNFSPEATRTANARTLEMLKRMK 231
  
```

图5 *dcpD* 编码的氨基酸序列及与其它相关基因编码的氨基酸序列的比较

Query *dcpD* 编码的氨基酸序列, Sbjct1 pJ4 的双烯内酯水解酶基因产物序列 (GenBank 登记号 M35097),
 Sbjct2 *Pseudomonas chlororaphis* 的氯双烯内酯水解酶序列 (GenBank 登记号 AJ271325)

经基因库 BLAST 联网检索显示, *dcpD* 与真氧产碱杆菌质粒 pJP4 的双烯内酯水解酶基因 (GenBank Accession No. M35097) 有 98% 的同源性。 *dcpD* 编码的氨基酸序列与 pJP4 的双烯内酯水解酶基因产物序列 (GenBank Accession No. M35097) 有 98% 的同源性; 与 *Pseudomonas chlororaphis* 的氯双烯内酯水解酶序列 (GenBank Accession No. AJ271325) 有 52% 的同源性 (图 5)。这些情况表明, *dcpD* 不同于已在 GenBank 登记的双烯内酯水解酶基因。

3 讨论

2,4-二氯酚等氯代芳香化合物是有毒、难降解有机污染物。从国内外资料报道看, 分离得到的 2,4-二氯酚降解菌主要是假单胞菌^[3-5]。本文中的假单胞菌 GT241-1 是我们分离的几株降解 2,4-二氯酚的细菌和霉菌中降解能力最强者, 它能将 2,4-二氯酚彻底降解, 性能稳定, 还可降解 2,4-D、苯甲酸和儿茶酚等有机物^[3], 是一株性能优良的 2,4-二氯酚降解菌株, 故笔者一方面对它作应用研究, 另一方面从中克隆 2,4-二氯酚降解基因和拟做构建工程菌研究, 以便对其进一步利用。

参与 2,4-二氯酚降解的多个基因中, 编码起始几步降解酶的基因即 2,4-二氯酚羟化酶基因、3,5-二氯儿茶酚 1,2-双加氧酶基因、氯粘康酸环异构酶基因、反式氯双烯内酯异构酶基因和双烯内酯水解酶基因是关键基因。根据对氯代芳香化合物的生物降解及其降解基因的研究结果, 大多数细菌通过修饰邻位裂解途径、经由氯代儿茶酚降解氯代芳香化合物。修饰邻位裂解途径编码基因通常位于降解性质粒上, 且它们组成操纵子结构, 如在恶臭假单胞菌 (pAC27)、真氧产碱杆菌 JMP134 (pJP4) 和假单胞菌 P51 (pP51) 这 3 细菌中, 氯儿茶酚 1,2-双加氧酶基因与后续几步降解酶编码基因紧密连接, 分别组成 *clcABDC* 操纵子、*tydCDEF* 操纵子和 *tcbCDEF* 操纵子^[11-13]。鉴于此, 本研究采用的基因克隆策略是用 Southern 杂交对在空间位置上邻近于 *dcpD* 的 3,5-二氯儿茶酚 1,2-双加氧酶基因进行定位, 通过构建基因文库并用斑点杂交筛选目的转化子。在实验中遇到载体 pDG780 与外源 DNA 片段连接较困难 (连接频率低)、转化子数量少、重组子在转化子中占的比例较小 (30% ~ 45%) 等问题, 但采用斑点杂交还是从约 1,000 个重组子中筛选到一个目的转化子。

目的转化子的质粒 pZ8122 所携带的外源片断约 11kb, 而据资料报道二氯儿茶酚氧化操纵子长度为 3.7kb^[6], 为测序和后续构建基因工程菌方便将它作了缩短和亚克隆。测序结果得知 *dcpD* 亚克隆片段全长 4303bp, 上下游两端分别为 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点。核苷酸序列和氨基酸序列分析表明, *dcpD* 与已在 GenBank 登记的相关基因有一定的差异; 相比之下与 pJP4 的二氯儿茶酚氧化操纵子中的 *tydE* 差异最小, 它们之间的核苷酸序列有 98% 的同源性。*dcpD* 编码氨基酸序列与相关基因的差异要大一些。对菌株 GT241-1 的 *dcpD* 基因及编码氯儿茶酚开环后的其它后续几步降解酶的基因的测序和分析得知, 它们几个基因也紧密相连, 推测也构成操纵子。

参 考 文 献

- [1] Kohrion G W, Rogers J E, Wiegel J. Appl Environ Microbiol, 1989, 55 (2): 348 ~ 353.
- [2] Boyd S A, Shelton D R. Appl Environ Microbiol, 1984, 47 (2): 272 ~ 277.
- [3] 钟文辉, 何国庆, 郑平, 等. 浙江大学学报 (农业与生物技术版), 2001, 9 (3): 269 ~ 272.
- [4] 何国庆, 钟文辉, 胡申才, 等. 农业生物技术学报, 2001, 9 (3): 219 ~ 222.

- [5] 戴树桂, 庄源益, 陈勇生, 等. 环境科学学报, 1996, **16** (2): 173 ~ 178.
- [6] Perkins E J, Gordon M P, Caceres D, *et al.* J Bacteriol, 1990, **172**: 2351 ~ 2359.
- [7] Jan Roelof Van Der Meer, Villem M De VOS, Shigeaki H, *et al.* Microbiol Rev. 1992, **56** (4): 677 ~ 694.
- [8] 中国科学院微生物研究所. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [9] 钟文辉, 何国庆, 郑平, 等. 浙江大学学报(农业与生物技术版), 2003, **29** (5): 550 ~ 555.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd). New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [11] Chatterjee D K, Chakrabarty A M. Gene, 1984, **27**: 173 ~ 181.
- [12] Don R H, Weightman A J, Knackntuss H-J, *et al.* J Bacteriol, 1985, **161**: 85 ~ 90.
- [13] van der Meer J R, Eggen R I L, Zehnder A J B, *et al.* J Bacteriol. 1991, **173**: 2425 ~ 2434.