

苯胺双加氧酶基因的克隆与序列分析*

毕洪凯¹ 武波^{2**}

(威海职业学院生物与化学工程系 威海 264200)¹

(广西大学生命科学与技术学院微生物及植物遗传工程教育部重点实验室 南宁 530005)²

摘要: 通过设计苯胺双加氧酶基因特异引物, 以苯胺降解菌株 ANA5 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出目的基因片段。然后利用粘粒 pLAFR3 作为载体, 以 *E. coli* EPH100 作为受体, 构建了菌株 ANA5 的基因组粘粒文库。以 PCR 扩增产物作为探针, 通过菌落原位杂交筛选得到两个阳性克隆, 经 Southern 杂交及亚克隆测序分析, 初步确认克隆到苯胺双加氧酶基因。同时完成了苯胺双加氧酶基因 *aidA3A4A5* 序列的测定, 并对其核苷酸及其推导的氨基酸序列进行分析, 结果表明克隆到的苯胺双加氧酶基因与 GenBank 报道的基因有一定的差异, 同时体现了该基因在进化上的保守性。

关键词: 苯胺, 基因组文库, 苯胺双加氧酶基因

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0083-06

Cloning and Sequence Analysis of Aniline Dioxygenase Gene*

BI Hong-Kai¹ WU Bo^{2**}

(Department of Biological and Chemical Engineering, Weihai Vocational College, Weihai 264200)¹

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Key Laboratory of Microbiology and Plant Genetics Engineering, Ministry of Education, Nanning 530005)²

Abstract: With specific primers designed, the aimed DNA fragment was amplified by PCR from aniline-degrading strain ANA5. A genomic library of strain ANA5 was constructed in the cosmid vector pLAFR3 using *E. coli* EPH100 as the host strain. Two recombinants were identified from the genomic library using in situ hybridization and Southern blotting probed with the PCR product. By the analysis of subclone sequencing, it was sure that the aniline dioxygenase gene of strain ANA5 was cloned. The sequence analysis and the deduced amino acid showed that they were different from the relative sequences registered in the GenBank and revealed that aniline dioxygenase gene was conserved through evolution.

Key words: Aniline, Genomic library, Aniline dioxygenase gene

苯胺 (aniline) 是一种重要的化工原料, 广泛应用于国防、印染、塑料、油漆、农药和医药工业等, 同时也是严重污染环境和危害人体健康的有害物质, 是一种“三致”物质。由于苯胺对生态生物的高度毒性, 已经被列入“中国环境优先污染物黑名单”中, 在工业排水中要求严格控制。如何减少苯胺对环境的污染, 已经逐渐引起了人们的注意。因此, 对苯胺的特性、作用机理、降解基因、微生物筛选及基因工程的研究受到广泛的关注^[1]。

苯胺的微生物降解是先经过外围酶苯胺双加氧酶的催化, 转化为邻苯二酚, 然后

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 计划项目) (No. 2003AA214040)

** 通讯作者 Tel: 0771-3239403, E-mail: wubo@public.nn.gx.cn

收稿日期: 2005-02-23, 修回日期: 2005-04-19

经邻位 (ortho)^[2] 或间位 (meta)^[3] 途径开环裂解。编码苯胺双加氧酶和邻位或间位开环裂解酶的基因不在同一操纵子上, 它具有单独的转录和调控系统。苯胺双加氧酶基因编码苯胺降解途径的第一个酶, 负责将苯胺转化成为邻苯二酚, 它是微生物降解苯胺的关键酶基因。已在 *P. putida* UCC22 菌株^[4]、*Acinetobacter* sp. YAA 菌株^[5,6]、*Delfia acidovorans* 菌株^[7,8] 及 *Frateruia* ANA-18 菌株中^[9,10], 克隆到苯胺双加氧酶基因簇并做功能分析。四种菌中基因 *tdnQTA1A2BR* (*atdA1A2A3A4A5R*) 顺序位于同一操纵元上, 其编码的是一类多组分的复合酶, 基因 *tdnQT* (*atdA1A2*) 与苯胺的氨基转换及氨的释放有关, *tdnA1A2* (*atdA3A4*) 编码苯胺双加氧酶基因的大小两个亚基, *tdnB* (*atdA5*) 编码苯胺双加氧酶基因的还原酶组分, 根据氨基酸序列同源性分析, TdnR (AtdR) 蛋白可列入原核 LysR 转录调控蛋白家族^[11], 在转录水平上对 *tdnQTA1A2B* (*atdA1A2A3A4A5*) 进行调控。推断出的苯胺转化首先是由 TdnA1 和 TdnA2 将分子氧两原子结合到苯胺苯环的 1 和 2 号位形成二酚, 氨基转移到 TdnQ, 然后 TdnT 可进一步将氨基转化为一种未知底物或者释放氨^[4,12]。笔者通过构建苯胺降解细菌不动杆菌 ANA7 的基因组文库, 克隆到苯胺双加氧酶基因, 对所克隆的基因序列做了测序和分析, 这些工作为以后构建包括降解苯胺在内的芳香化合物的工程菌株打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

不动杆菌 ANA5, DNA 操作的受体菌株 DH5 α 和基因克隆载体 pLAFR3 为本实验室保存, 质粒载体 pGEM T-easy (Amp^r), pGEM-3zf (+) (Amp^r) 购自 Promega 公司, 丰富培养基 Luria-Bertani (LB) 和无机盐培养基 M9, 根据需要添加氨苄青霉素 Amp^r 100mg/L。

1.2 生化试剂

Taq 酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, RNaseA、溶菌酶、氨苄青霉素购自上海生工生物公司。

1.3 基因克隆方法

1.3.1 克隆载体与宿主: 本实验采用能够自主携带不同大小片段的粘粒 pLAFR3 作为载体, 以大肠杆菌 EPI100 为宿主构建菌株 ANA5 的基因组粘粒文库。

1.3.2 DNA 的 PCR 扩增: 我们以 GenBank 中不动杆菌 YAA 菌株苯胺双加氧酶基因 *atdA3* 部分核苷酸序列 (Accession number: D86080) 设计引物, 上游引物为 5'-CCTGGT-GCGAATGCCTATGGAGAG-3', 下游引物为 5'-TCGATCCATTCGATTTCGGCATG-3', 对苯胺降解细菌 ANA5 基因组进行扩增。反应条件: 95℃ 预变性 5min, 95℃ 变性 30s, 57℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1min, 30 个循环后于 72℃ 继续延伸 10min。该对引物扩增的苯胺苯胺双加氧酶基因片段预计大小 788bp。回收 788bp 特异性片段, 经同位素³²P 标记后作为原位杂交的探针, 经 Rache 地高辛试剂盒标记后作为 Southern 杂交的探针。

1.3.3 DNA 插入片段的制备: 以蛋白酶/SDS 法提取细菌基因组 DNA, 小量部分酶切确定内切酶 *EcoRI* 的最适浓度, 使插入 DNA/*EcoRI* 片段大小范围在 15~35kb 之间。按确定的最适的酶量, 对基因组 DNA 进行大量部分酶切, 低熔点琼脂糖凝胶法回收 DNA 片段。

1.3.4 基因组文库的构建: 将回收的外源片段与经去磷酸化处理的粘粒 pLAFR3/

EcoRI 进行连接, 经体外包装、转染 *E. coli* EPI100, 构建文库。采用 EPICENTRE 公司包装试剂盒 MaxPlax™ Lambda Packing Extracts Kit 包装转染。

1.3.5 文库的筛选: 将基因组文库中菌落转移到尼龙膜上, 原位裂解使核酸结合于膜上。使用经 ^{32}P 标记的探针, 参照文献 [13] 同位素标记及原位方法杂交, 高严谨条件洗膜, 压磷屏, 用 Amersham Biosciences 公司的 Typhoon9410 扫描成像。

1.4 序列测定及分析

DNA 序列测定由宝生物工程 (大连) 有限公司测定。引物设计用 Vector NTI; DNA 及蛋白序列分析采用 Dna man4.0 及 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 程序。

2 结果与分析

2.1 探针 DNA 片段的克隆和序列分析

以菌株 ANA5 基因组为模板, 按材料方法所述引物和反应条件进行 PCR 反应, 将片段回收后, 克隆到 pGEM T-easy 载体上后, 电脉冲导入到 DH5 α 感受态细胞中, 经质粒提取和酶切鉴定后, 送至大连宝生物公司测序。测序结果经过 VectorNTI 软件比较, PCR 产物 atd788 与 GenBank 中报道的 *Acinetobacter* sp. YAA 菌株苯胺双加氧酶基因 (Accession number: D86080) 在核苷酸水平上有 93% 的同源性 (结果未显示)。初步确定从 ANA5 中扩增到的为部分苯胺双加氧酶基因片段, 作为筛选苯胺双加氧酶基因的探针。

2.2 ANA5 菌株基因组文库的构建、阳性转化子的筛选与验证

利用粘粒 pLAFR3 作为载体, 制备菌株 ANA5 基因组 DNA 部分酶切片断, 经体外包装、转染 *E. coli* EPI100, 在选择培养基平板上获得 1 万多个重组克隆子, 构建了菌株 ANA5 的基因组粘粒文库。我们随机挑取 6, 144 个菌落作为文库克隆保存, 随机挑 14 个克隆子进行分析, 每个克隆子均携带外源 DNA 片段, 平均长度为 23.6kb, 根据 L. Clarke-J. Carbon 公式 $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$ [14], 该文库含有 ANA5 基因组中任一基因的概率 P 为 99.9% 以上, 文库有效克隆子数和插入 DNA 片段均达到建库要求。

以经 ^{32}P 标记的 PCR 扩增产物 atd788 作为探针, 从 2,000 个重组子通过菌落原位杂交, 筛选到 5 个可能的阳性克隆 (图 1, 只显示 2 个可能的阳性克隆), 然后经 Southern blotting 验证, 转化子 pGXA240 及 pGXA310 为阳性克隆 (图 2), 携带外源片段大小分别为 24kb、31kb 左右, 且含有两条共同 *EcoRI* 片段。

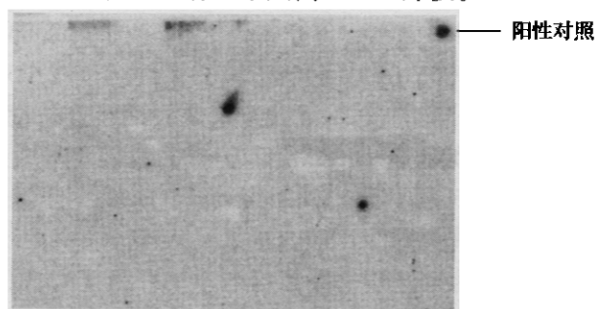


图 1 ANA5 基因组文库的菌落原位杂交放射性自显影图

2.3 基因克隆片段的亚克隆与测序

用 *EcoRI* 酶切重组质粒 pGXA240, 获得 4 个外源片断, 大小分别为 15kb、5kb、

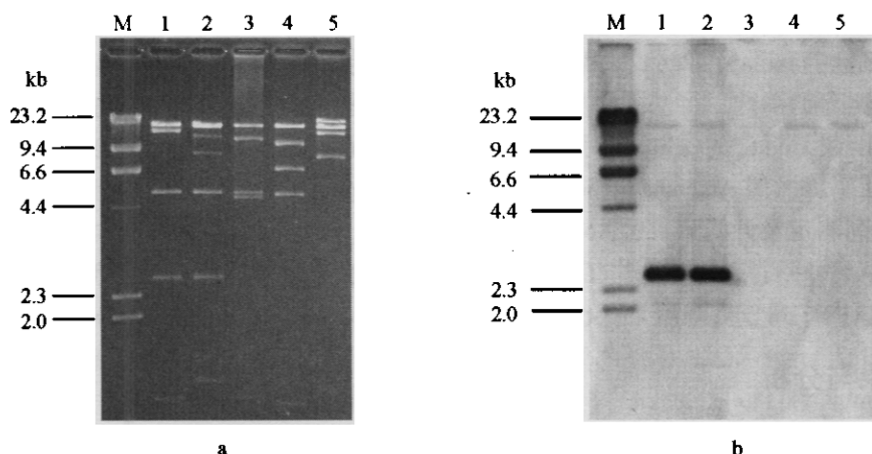


图 2 5 个克隆的 *EcoRI* 片段与 ^{32}P 标记的探针的杂交

a 5 个克隆的 *EcoRI* 酶切电泳, b 以 *atd788* 为探针的杂交

M λ DNA/*Hind*III, 1 pGXA240/*EcoRI*, 2 pGXA310/*EcoRI*, 3, 4, 5 假阳性克隆

2.5kb 及 1.2kb 左右。分别回收各片段并克隆到质粒载体 pGEM-3zf (+) 上, 获得重组质粒 pGXA501, pGXA502, pGXA503, pGXA504。

将重组质粒送至大连宝生物公司, 分别对质粒的 T7 和 SP6 两端测序。经过亚克隆测序分析, 重组质粒 pGXA502 3' 端序列与 *Acinetobacter* sp. YAA 苯胺双加氧酶基因 *atdA2* 有 90% 的同源性, 重组质粒 pGXA503 两端序列分别与 *Acinetobacter* sp. YAA 苯胺双加氧酶基因 *atdA2* 和 *atdA5* 有 98% 和 81% 的同源性 (结果未显示)。结合亚克隆测序分析, 我们初步确认克隆到苯胺双加氧酶基因。

2.4 2.5kb *EcoRI* 片段的核苷酸序列分析

重组质粒 pGXA503 含有 2.5kb 外源 *EcoRI* 片段, 且两端序列分别与苯胺双加氧酶基因簇具有很高的同源性, 我们进行核苷酸序列测定, 在 GenBank 的登录号为 AY877266。

将测序获得的 2.5kb 核苷酸序列输入计算机, 通过软件 Vector NTI 及 blast 分析, 结果显示, 该 DNA 实际长度为 2,560bp, 主要含有两个完整的 ORF1 和 ORF2 (开放阅读框架) 及一个不完整的 ORF3: ORF1 全长 1,281bp, 起始密码子 *atg* 位于第 162 个核苷酸, 终止密码子 *taa* 位于第 1,440 个核苷酸, G + C 含量 43.3%; ORF2 全长 633bp, 起始密码子 *atg* 位于第 1,408 个核苷酸, 终止密码子 *tag* 位于第 2,038 个核苷酸, G + C 含量 41.4%; 不完整 ORF3 全长 510bp, 起始密码子 *atg* 位于第 2,051 个核苷酸。

开放阅读编码框 ORF1 由 426 个氨基酸残基组成, 预计分子量为 48,419 道尔顿, 等电点 *pI* 为 5.30; 开放阅读编码框 ORF2 由 210 个氨基酸残基组成, 预计分子量为 24,120 道尔顿, 等电点 *pI* 为 5.52。我们利用 Vector NTI 软件分析蛋白质的氨基酸序列, 与已报道的氨基酸序列进行同源比较, 结果见表 1, 表明: 2.5kb *EcoRI* 片段中 ORF1 和 ORF2 编码的蛋白质的氨基酸一级结构与不动杆菌 YAA 菌株苯胺双加氧酶 α 亚基 β 亚基氨基酸同源性最高, 分别为 87% 和 79%, 同时系统发育树分析验证了本工作得到的苯胺双加氧酶 *AtdA3A4A5* 与 *Acinetobacter* sp. YAA 亲缘关系较近, 表明其在进化上的保守性, 本工作克隆得到的是一种新的苯胺双加氧酶基因。

表 1 ANA5 苯胺双加氧酶基因 2.5kb EcoRI 片断编码的氨基酸序列与其它苯胺降解菌同源性比较

	Identity (%)	Gene	Product of function	Strain
ORF1	87	<i>atdA3</i>	α - subunit of aniline dioxygenase	<i>Acinetobacter</i> sp. YAA
	55	<i>tdnA1</i>	Large subunit of aniline dioxygenase	<i>P. putida</i> UCC22
	54	<i>tdnA1</i>	Large subunit of aniline dioxygenase	<i>Delfia acidovorans</i>
	53	<i>tdnA1</i>	Large subunit of aniline dioxygenase	<i>Frateruia</i> sp. ANA-18
ORF2	79	<i>atdA4</i>	β - subunit of aniline dioxygenase	<i>Acinetobacter</i> sp. YAA
	48	<i>tdnA2</i>	Small subunit of aniline dioxygenase	<i>P. putida</i> UCC22
	46	<i>tdnA2</i>	Small subunit of terminal dioxygenase in aniline dioxygenase	<i>Frateruia</i> sp. ANA-18
	45	<i>tdnA2</i>	Small subunit of aniline dioxygenase	<i>Delfia acidovorans</i>
ORF3	78	<i>atdA5</i>	Reductase component of aniline dioxygenase	<i>Acinetobacter</i> sp. YAA
	33	<i>tdnB</i>	Reductase component of aniline dioxygenase	<i>Delfia acidovorans</i>
	31	<i>tdnB</i>	Reductase component of aniline dioxygenase	<i>P. putida</i> UCC22
	28	<i>tdnB</i>	Reductase component of aniline dioxygenase	<i>Frateruia</i> sp. ANA-18

研究表明,好氧菌对芳香簇化合物的降解通常从对底物的双羟化开始,参与转化过程的 α 亚基与 β 亚基相互作用构成环状结构,与可溶性蛋白还原酶组分相互作用形成电子传递链,电子从 NADH 途径黄素蛋白转移到 [2Fe-2S] 中心,使其中的铁原子发生 3 价 (Fe^{3+}) 和 2 价 (Fe^{2+}) 的价态变化,最终传递至终端双加氧酶^[15]。对 ANA5 苯胺双加氧酶氨基酸序列分析表明, α 亚基 AtdA3 N-末端含有 Rieske 型 [2Fe-2S] 结合保守域,N-末端依次含有氧化还原酶 FAD 和 NAD 核糖结合保守域。甲苯、苯甲酸等多组分双加氧酶的氨基酸序列分析表明,其 α 亚基都结合了 2Fe-2S 聚簇和一个铁原子,其中 N-末端 Cys 和 His 残基与 2Fe-2S 配位相连,His 和 Tyr 残基配位铁原子。这些 Rieske 型 [2Fe-2S] 结合保守域中能有 40 多个氨基酸残基不变,表明可能来自一个共同祖先^[16]。AtdA5 N-末端 [2Fe-2S] 结合保守域之后,是一段催化域,与其他苯胺降解菌苯胺双加氧酶及萘、苯甲酸、甲苯等的双加氧酶 α 亚基的催化域都具有一定的保守性。这些结果表明双加氧酶基因在漫长的进化历程中被不同的宿主修饰或改变,但是决定其共有活性的局部区域还是保持了高度的保守性。

3 讨论

本工作克隆基因的策略采用寻找基因保守区,设计特异性引物,以 PCR 扩增的 DNA 片段标记为探针,从基因组文库中钓出目的基因。但在 GenBank 报道的苯胺双加氧酶基因序列中,不动杆菌属与其它革兰氏阴性菌的同源性比较相差较大,Urata M 等根据保守 AtdA1 (TdnQ) 氨基酸序列将降解苯胺的革兰氏阴性菌分成两组,不动杆菌属为一组,其他如假单胞菌、弗拉特氏菌、丛毛单胞菌等列为一组^[8]。笔者尝试设计几对引物进行 PCR 扩增,要么特异性不强,要么扩增出的片段没有同源性,最后用与 ANA5 菌株同一属的不动杆菌 YAA 菌株的基因部分序列来设计引物,才扩增出高达 93% 的同源性 DNA 片段。

众多研究表明,降解性质粒参与芳香簇化合物的微生物降解。在已克隆到苯胺双加氧酶基因的菌株中,*P. putida* UCC22 与 *Acinetobacter* sp. YAA 的苯胺降解基因由质粒

编码^[4,5], 根据对不动杆菌 YAA 菌株的降解过程及控制基因的研究, 猜测苯胺降解菌株 *Acinetobacter* sp. ANA5 的苯胺双加氧酶基因位于质粒上, 笔者曾检测出菌株 ANA5 的两条质粒带, 并成功用碱裂解法提取到质粒, 通过内切酶 *EcoRI* 完全消化质粒电泳分析, 得到其中一条大小在 120kb 左右的大质粒带。通过 Southern blotting 验证, PCR 产物 788bp 核苷酸片段能够与 ANA5 质粒 2.5kb *EcoRI* 片段杂交 (结果未显示), 初步证明了菌株 ANA5 降解苯胺的关键步骤即由苯胺转化为邻苯二酚这一过程由质粒控制。

根据已有报道, 苯胺双加氧酶基因簇全长约 6kb, 本实验从 ANA 5 基因组文库中筛选到的阳性转化子携带外源片段大小分别为 24kb、31kb 左右, 因此可以从阳性转化子中继续缩短外源片段及测序。笔者对 2.5kb *EcoRI* 片断的测序分析表明, *atdA3A4A5* 与 GenBank 登记的相关基因有一定的差别, 氨基酸一级结构与不动杆菌 YAA 相似性最高, 表明基因在进化上的保守性。后续的工作一方面继续研究与苯胺降解相关基因及其表达调控, 阐述微生物降解苯胺的详细机制, 另一方面利用克隆到的苯胺双加氧酶基因构建具有高效降解性能的污染物降解基因工程菌, 对其进一步应用。

参考文献

- [1] Amador J A, Alexander M, Zika R G. *Anviron Toxicol Chem*, 1991, **10**: 475 ~ 482.
- [2] Aoki K, Ohtsuka K, Shinke R, *et al.* *Agric Biol Chem*, 1984, **48**: 865 ~ 872.
- [3] Zeyer J, Wasserfallen A, Timmis K. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **50**: 447 ~ 453.
- [4] Fukumori F, Saint C P. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 399 ~ 408.
- [5] Fujii T, Takeo M, Macda Y. *Microbiology*, 1997, **143**: 93 ~ 99.
- [6] Fujii T, Takeo M, Macda Y. *J Ferment Bioeng*, 1998, **85**: 17 ~ 24.
- [7] Kim H J, Kim S E, Kim J G, *et al.* *Hanguk Misaengmul Saengmyong Konghakhoe Chi*, 2003, **31** (1): 25 ~ 31.
- [8] Urata M, Uehida E, Nojiri H, *et al.* *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68** (12): 2457 ~ 2465.
- [9] Aoki K, Ohtsuka K, Shinke R, *et al.* *Agric Biol Chem*, 1984, **48**: 865 ~ 872.
- [10] Murakami S, Hayashi M, Aoki K, *et al.* *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, **67**: 2351 ~ 2358.
- [11] Henikoff S, Huang G W, Calvo J A. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1988, **85**: 6602 ~ 6606.
- [12] Boon N, Goris J, Top E M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 1107 ~ 1115.
- [13] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [14] Clarke L, Carbon J. *Cell*, 1976, **9**: 91.
- [15] Mason J R, Cammack R. *Annu Rev Microbiol*, 1992, **46**: 277 ~ 305.
- [16] Neidle E L, Hartnett C L, Ormston N A, *et al.* *J Bacteriol*, 1991, **173**: 5385 ~ 5395.