

研究报告

柴油降解基因工程菌的构建及降解特性

罗群 何颖 侯登勇 王庆蓉 刘琼 蒋定文 沈先荣*

(海军医学研究所 上海 200433)

摘要:【目的】构建柴油降解基因工程菌,提高柴油降解速率,研究 p450 基因在柴油降解过程中的作用。【方法】将 *Alcanivorax borkumensis* SK2 的 p450 基因合成后,连接至烷烃响应表达载体 pCom8 中,构建该基因的表达载体 p450-SK2/pCom8,并将其转入大肠杆菌 DH5 α 中,通过 SDS-PAGE 检测该基因在大肠杆菌 DH5 α 中的表达,并将重组质粒 p450-SK2/pCom8 转入柴油降解菌 *Acinetobacter* sp. Y9 中,构建基因工程菌 p450-SK2/Y9,研究工程菌 p450-SK2/Y9 对柴油的降解特性及 p450 基因在构建的工程菌 p450-SK2/Y9 中的表达。【结果】PCR、酶切及测序结果表明重组质粒 p450-SK2/pCom8 构建正确。当柴油诱导浓度大于 1% 时,目的基因在大肠杆菌 DH5 α 中的蛋白表达量较大,且随着诱导时间的延长而呈增加趋势。通过 PCR 检测构建的基因工程菌 p450-SK2/Y9 中的 p450 基因表明,工程菌构建正确,利用单菌株降解柴油时,宿主菌 Y9 与工程菌 p450-SK2/Y9 的柴油降解效率未见明显差异,但工程菌 p450-SK2/Y9 在构建的菌群中对柴油降解的促进效果明显。SDS-PAGE 结果表明,p450 基因在构建的工程菌 p450-SK2/Y9 中能得到准确表达,在混合菌中的表达量高于单菌株。【结论】柴油降解基因工程菌在混合菌群中对柴油降解具有促进作用,而在单菌株情况下未见促进作用,且 p450 基因的蛋白表达在混合菌中也高于单菌株,这对于提高柴油的降解速率及研究 p450 基因在柴油降解过程中的作用机理具有一定意义。

关键词: 柴油,降解,基因工程菌,蛋白表达

Construction and characterization of engineered diesel-degrading bacterium

LUO Qun HE Ying HOU Deng-Yong WANG Qing-Rong LIU Qiong
JIANG Ding-Wen SHEN Xian-Rong*

(Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract: [Objective] We constructed engineered bacterium to improve diesel biodegradation and to study the effect of p450 gene on diesel biodegradation. [Methods] The p450 gene of *Alcanivorax borkumensis* SK2 was constructed in pCom8 and the p450-SK2/pCom8 plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH5 α . The expression of AlkB protein in *E. coli* DH5 α was detected using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The recombinant plasmids expressed rightly were

*Corresponding author: Tel: 86-21-81883171; E-mail: xianrong_sh@163.com

Received: September 28, 2016; Accepted: December 27, 2016; Published online (www.cnki.net): December 27, 2016

*通讯作者: Tel: 86-21-81883171; E-mail: xianrong_sh@163.com

收稿日期: 2016-09-28; 接受日期: 2016-12-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-27

transformed into diesel-degrading *Acinetobacter* sp. strain Y9. The degrading characteristics and the expression of p450 in engineered bacterium p450-SK2/Y9 were studied. **[Results]** The identifying results by PCR and digestion with *Sal* I and *Nde* I indicated that the recombinant plasmids and the engineered bacterium p450-SK2/Y9 were constructed rightly. When the induction concentration of diesel was above 1% (V/V), the expression level of p450 gene was higher and increased slightly with the increasing of induction time. Diesel degradation ratios of p450-SK2/Y9 were not higher than that of Y9 when it was inoculated solely, but the p450-SK2/Y9 could facilitate the biodegradation of diesel in bacterial consortium. The results of SDS-PAGE showed that p450 gene could be expressed p450-SK2/Y9, and the expression level was higher in the bacterial consortium than that of single bacterium. **[Conclusion]** The engineered bacterium p450-SK2/Y9 could facilitate the biodegradation of diesel in bacterial consortium, and the expression level was higher in the bacterial consortium than that of single bacterium. These results are useful to improve diesel biodegradation and study on the mechanism of p450 gene for diesel biodegradation.

Keywords: Diesel, Biodegradation, Engineering bacterium, Protein expression

海洋石油污染在全世界范围内正引起广泛关注。海洋石油污染不仅给生态环境带来巨大破坏,而且对人类健康也带来不利影响^[1]。近些年,随着环境生物技术的发展,生物修复作为一种可持续发展的治理手段给海洋石油污染提供了一种有效的治理方法。由于微生物对于持久性的有毒物质有多种代谢途径,同时不产生二次污染,所以,生物降解对污染治理具有巨大的应用潜力^[2]。

土著及外来石油降解微生物对环境中的石油污染物的净化能力有限,通过采用基因工程技术手段,定向地构建高效的工程菌研究则显示出了重要的实际意义。随着分子生物学和分析化学的发展,石油烃的生物降解途径的神秘面纱已被揭开。石油烃具有很强的化学惰性,需要多步代谢才能完成降解。烷烃的生物降解是由氧化酶系统酶促进行的,氧化作用的加氧酶有两种类型:单加氧酶和双加氧酶。单加氧酶的氧化产物为醇,双加氧酶的氧化产物为烷基氢过氧化物^[3-4]。单末端氧化,首先是烷烃在末端的甲基被氧化,经醇、醛的氧化生成脂肪酸,脂肪酸经 β -氧化生成乙酰辅酶A,乙酰辅酶A在有氧的条件下进入TCA循环而最终被完全氧化成 CO_2 和 H_2O ,如图1所示,这是一种烷烃最为常见的代谢途径^[5]。编码这些酶的基因主要分为两簇:*alkBFGHJKL*和*alkST*(图1B)。*alkS*基因为转录调控因子,在烷烃的诱导下激活

启动子 *PalkB*,从而使得 *alkBFGHJKL* 在操纵子作用下得到表达^[6-7]。

在烷烃降解过程中最关键的一步是在烷烃羟化酶(Alkane hydroxylases)作用下末端的甲基被氧化成醇,烷烃羟化酶是烷烃降解过程中第一步所需要的最重要的酶,因此正引起研究者的广泛关注^[8]。从生物技术角度来看,烷烃羟化酶是多功能的生物催化剂,能够参与很多氧化反应。研究表明不同的酶系统可以参与烷烃的第一步氧化。烷烃羟化酶主要分为三类:*Pseudomonas putida* Gp1 AlkB 相关

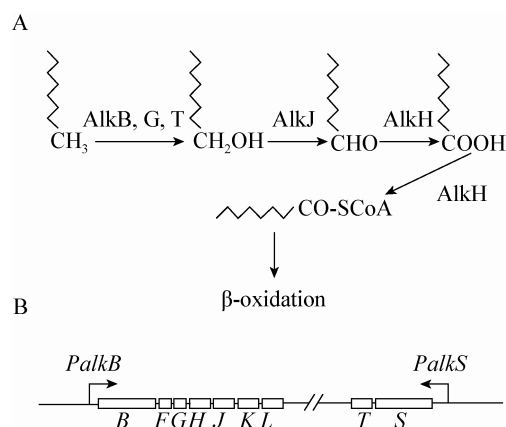


图1 烷烃代谢途径(A)及相关基因(B)

Figure 1 The metabolic pathways of alkanes (A) and relevant genes (B)

的内膜铁酶、细胞色素 P450 酶(CYP)及一些甲烷、丙烷、丁烷的单加氧酶^[9]。细胞色素 P450 酶(CYP)是在所有生命体中普遍存在的一种酶^[10]，在微生物中，CYP 主要用于合成次级代谢产物(如抗生素等)和降解疏水性的低分子量化合物(如烷烃、芳香烃等)。CYP 能将单个氧原子以特定的方式加到未激活的碳原子上，所以其能被用于生产一些以化学方法很难或无法合成的物质及降解环境中难分解的污染物^[11]。微生物中最著名的 CYP 是 P450cam (CYP101A)^[12]和 P450BM3 (CYP102A)^[13]。近来，研究发现在许多石油降解菌中存在的 CYP 主要是 CYP153，包括在石油污染海洋环境中大量存在的 *Alcanivorax borkumensis*，以及烷烃降解菌 *Sphingomonas* sp. HXN-200、*Oleomonas sagaranensis* HXN-1400 和几株 *Mycobacterium* sp.，其含有一种或是几种属于 P450 酶的 CYP153^[14]。van Beilen 等^[15]克隆了 11 种与脂烷烃降解相关的 CYP153 基因，其中 8 种 CYP153 基因与 CYP153 家族中的铁氧化还原蛋白及铁氧化还原蛋白还原酶都在 *Pseudomonas putida* 和 *Pseudomonas fluorescens* 得到了功能表达，使得其宿主菌能够利用戊烷到十二烷作为唯一的碳源和能源。

本实验室前期从石油污染的海水中分离获得了石油烃降解菌 *Acinetobacter* sp. Y9、W3、F9 及一株产表面活性剂菌 *Gordonia* sp. X1^[16-19]，利用此

4 株菌构建了高效的柴油降解菌群，并对菌株 Y9 的烷烃羟化酶基因进行了检测。为进一步研究烷烃羟化酶基因在柴油降解过程中的作用及提高柴油的生物降解速率，选取 *Alcanivorax borkumensis* SK2 的 p450 基因^[20]作为目的基因，菌株 Y9 作为宿主菌，构建 p450 基因的表达载体 p450-SK2/pCom8，并将其转化至大肠杆菌 DH5 α 中，优化诱导条件，通过 SDS-PAGE 检测该基因在大肠杆菌 DH5 α 中的表达，再利用构建正确的重组质粒转入石油降解菌 *Acinetobacter* sp. Y9 中，构建基因工程菌 p450-SK2/Y9，比较工程菌与宿主菌对柴油的降解速率，研究工程菌在混合菌群中对柴油降解的促进作用，以及 p450 基因在工程菌中的表达对柴油降解的影响。

1 材料

1.1 质粒和菌种

研究中利用的菌株和质粒如表 1 所示。

pCom8 质粒(7 639 bp)由国家海洋局第三海洋研究所海洋生物基因资源研究室邵宗泽教授提供，其结构及多克隆位点如图 2 和图 3 所示。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶(*Sal* I、*Nde* I)、T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒、PCR 试剂，宝生物工程(大连)有限公司。PCR 仪、电泳仪，Bio-Rad 公司。测序及引物合成均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

表 1 实验用菌株及质粒
Table 1 Strains and plasmid used in this study

菌株和质粒 Strain and plasmid	特征 Characteristic	来源 Source
Y9	<i>Acinetobacter</i> sp.	Laboratory collection
W3	<i>Acinetobacter</i> sp.	Laboratory collection
F9	<i>Acinetobacter</i> sp.	Laboratory collection
X1	<i>Gordonia</i> sp. biosurfactant-producing strain	Laboratory collection
<i>E. coli</i> DH5 α	recA1 endA1 hsdR17 D lacU169	Laboratory collection
pCom8	<i>alkB</i> genes expression vector, <i>PalkB</i> ; Gm ^r (gentamicin); <i>oriT</i> ; <i>alkS</i> ; broad host range	Smits et al. 2001 ^[21]

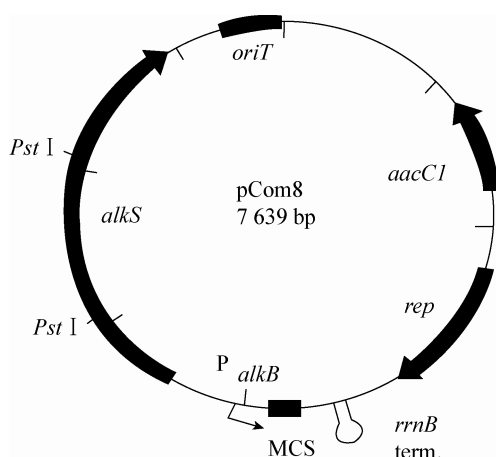


图2 pCom8 图谱

Figure 2 Physical map of pCom8

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

SOB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 20.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 0.5, 每升培养基中加 10 mL 250 mmol/L KCl 溶液, 用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0。在溶液使用前, 加入 5 mL 灭菌的 2 mol/L MgCl₂。

SOC 培养基: 除含有 20 mmol/L 葡萄糖外, 其它成分与 SOB 培养基相同, 葡萄糖溶液采用 0.22 μm 滤器过滤除菌, 其余均在 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

人工海水培养基(MMC, g/L): NaCl 24.0, MgSO₄·7H₂O 0.7, NH₄NO₃ 1.0, KCl 0.7, KH₂PO₄ 2.0, Na₂HPO₄·12H₂O 3.0, pH 7.5, 灭菌后补加 0.2% 微量元素混合液, 微量元素经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 其余在 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

MMC 微量元素混合液(g/L): CaCl₂ 2.0, FeCl₃·6H₂O 50.0, CuSO₄ 0.5, MnCl₂·4H₂O 0.5,

ZnSO₄·7H₂O 10.0。

2 方法

2.1 目的基因的设计及合成

据 Nature Biotechnology 杂志 2006 年报道, *Alcanivorax borkumensis* SK2 的基因组全长及其分析已经全部完成^[20]。该菌主要作用于中长链的烷烃, 选取其中的 p450 基因作为目的基因。通过 DNA Club、ClustalX 等软件对该基因进行比对, 发现其内部不含表达载体 pCom8 两端的酶切位点(*Nde* I 和 *Sal* I)。在目的基因的两端加上 *Sal* I 和 *Nde* I 的酶切位点, 然后送上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

2.2 重组质粒 p450-SK2/pCom8 的构建及鉴定

将合成的目的基因及 pCom8 载体用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切, 分别回收目的基因和 pCom8 酶切片段。用微量进样器在灭菌处理的 1.5 mL Eppendorf 管中依次加入 ddH₂O、连接缓冲液、*alkB* 片段、pCom8 载体片段, 最后加 T4 DNA 连接酶(放于冰浴中)。盖紧盖子混匀试剂, 离心 2 s 以集中样品。16 °C 连接过夜, 用 CaCl₂ 法将连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞中, 取阳性克隆菌提取质粒, 进行 PCR 和双酶切鉴定。根据目的基因序列设计 PCR 特异性引物 5'-CCCAAGAACCTGAAAGAAA-3' 和 5'-TAACAGTGAGGCGAGCAT-3'。以提取的质粒为模板进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系: 104.8 mg/L 质粒 2 μL, 10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL, 10×Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, dNTPs 2 μL (各 10 mmol/L), 5 U/μL *ExTaq* 酶 0.5 μL, 加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 的反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 终止。最后对 PCR 扩增产物进行电泳, 用凝胶成像系统进行紫外检测。



图3 pCom8 的多克隆位点

Figure 3 Multiple cloning site of pCom8

2.3 p450 基因在大肠杆菌 DH5 α 中的诱导表达

将转化菌株 p450-SK2/DH5 α 以及 DH5 α 分别接种至 LB 培养基中, 在 30 °C、180 r/min 条件下培养过夜后, 转接 1% 菌液至新鲜的 LB 培养基中, 相同条件下培养, 当菌株 OD₆₀₀ 约为 0.4 时, 加入 1% (体积比) 的柴油诱导 0、2、4、6、8 h 后, 分别取 3 mL 菌液, 5 000×g 离心 5 min, 收集菌体。研究柴油浓度对蛋白表达影响时, 分别加入 0、0.5%、1%、2%、3%、4% (体积比) 的柴油诱导 4 h 后, 采用相同的方法收集菌体。用灭菌蒸馏水重悬菌体后, 煮沸 5 min, 12 000×g 离心 5 min, 取上清, 利用 Bradford 法定量蛋白, 根据样品蛋白浓度确定电泳上样量, 使得上样蛋白总量相同(20 μ g), 采用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达, SDS-PAGE 分离胶为 10%, 积层胶为 5%。

2.4 重组质粒转化土著降解菌 Y9 (*Acinetobacter* sp.)

2.4.1 感受态的制备: 将 OD₆₀₀ 为 0.4 的菌液转移到用冰预冷的 50 mL 聚丙烯管中, 于冰浴放置 10 min 使培养物冷却至 0 °C, 4 °C、4 100 r/min 离心 10 min, 弃培养液, 收集菌体; 每 50 mL 初始培养液的菌体用 30 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂-MgCl₂ 溶液(80 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L CaCl₂)重悬细胞沉淀, 4 °C、4 100 r/min 离心 10 min, 弃培养液, 收集菌体; 用 2 mL 冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬每份细胞沉淀。使菌液浓缩 15 倍(30 mL→2 mL), 每 200 μ L 分装于 Eppendorf 管, 新鲜制备的感受态直接做转化实验, 其余加 15% 甘油保存于-70 °C 备用。

2.4.2 转化反应: 依次加入预冷的重组质粒 p450-SK2/pCom8 (不超过 10 μ L, 质粒小于 50 ng) 及灭菌重蒸水于制备好的感受态细胞菌液 200 μ L 中; 将各组 Eppendorf 管用手轻弹均匀, 于冰水浴放置 30–60 min; 将各组转化的 Eppendorf 管转入 42 °C 水浴 90 s; 然后立即放于冰浴上 1–2 min; 结束后在每管中加入 900 μ L SOC 液体培养基溶液并混匀, 置 37 °C 水浴加温后转移到摇床中 37 °C、

40 r/min 振荡 45–60 min; 将适当体积(每个 90 mm 平板达 200 μ L)已转化的感受态细胞转移到含 20 mmol/L MgSO₄ 和相应抗生素的 SOB 琼脂培养基上, 37 °C 培养过夜。

2.5 工程菌 p450-SK2/Y9 中 p450 基因的检测

用无菌牙签挑取阳性转化子单菌落接种于含硫酸庆大霉素 50 mg/L 的 15 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 20 h。以菌液为模板进行 PCR 扩增反应, 引物与 PCR 反应条件同 2.2 所述。

2.6 工程菌 p450-SK2/Y9 对柴油的降解

将工程菌 p450-SK2/Y9 在含硫酸庆大霉素 (50 mg/L) 的 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 振荡培养 20 h, 同时土著菌 Y9 在 LB 液体培养基中相同条件下培养一定时间, 使得其与工程菌菌液的 OD₆₀₀ 相等, 各取 3 mL 菌液, 4 000 r/min 离心 5 min 后, 收集菌体, 接种至含 1% (体积比) 柴油的 50 mL MMC 中, 30 °C、180 r/min 培养。每株菌设置 3 个重复, 以未接菌组作为空白对照。每隔 48 h 测量 MMC 中残余柴油量, 计算柴油降解率。比较工程菌与宿主菌的柴油降解率。

将菌株 Y9、W3、F9、X1 及 p450-SK2/Y9 分别在 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 振荡培养 20 h, 设置两组混合菌: Y9+W3+F9+X1 和 p450SK2/Y9+W3+F9+X1, 混合菌中各单菌株的接种比例相等(各 1 mL), 总接菌量为 4 mL。在柴油浓度为 1% (体积比) 的 50 mL MMC 中, 30 °C、180 r/min 培养, 每组设置 3 个平行, 测量连续 3 d 的柴油降解率, 检测工程菌对混合菌群柴油降解能力的提高。柴油降解率根据《海洋监测规范-海水分析》(GB17378.4-2007)中紫外分光光度法测定柴油的残留量, 以未接菌的含相同柴油浓度的组别作为对照, 计算降解率。实验设 3 个重复。柴油降解率 $\eta_{\text{降解}}$ 计算公式为:

$$\eta_{\text{降解}} = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%$$

其中, C_0 和 C_1 分别为对照组柴油浓度和接菌组柴油浓度。

2.7 p450 基因在工程菌 p450-SK2/Y9 中的表达

宿主菌 Y9、工程菌 p450-SK2/Y9、两组混合菌 (Y9+W3+F9+X1 和 p450SK2/Y9+W3+F9+X1) 分别接种至柴油浓度为 1% (体积比) 的 MMC 培养基中, 接种量为 4% (体积比), 在 30 °C、180 r/min 培养 24 h, 而大肠杆菌 DH5 α 及 p450-SK2/DH5 α 在柴油浓度为 1% 的 LB 培养基中相同条件下培养 24 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用灭菌纯水洗两遍后, 加入适量灭菌纯水, 用组织匀浆机以 4.0 m/s 破碎 20 s, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 利用 Bradford 法蛋白定量, 根据样品蛋白浓度确定电泳上样量, 使得上样蛋白总量相同(20 μ g), 采用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达, SDS-PAGE 分离胶为 10%, 积层胶为 5%。

3 结果与分析

3.1 重组质粒 p450-SK2/pCom8 的构建及鉴定

构建的重组质粒 p450-SK2/pCom8 物理图谱见图 4。 *Alcanivorax borkumensis* SK2 中的 p450 基因全长为 1 410 bp, 由于其内部不含表达载体 pCom8 两端的酶切位点(*Nde* I 和 *Sal* I)。在 p450-SK2 基因的两端加上 *Sal* I 和 *Nde* I 的酶切位点后, 合成的目的基因全长为 1 422 bp。合成的目的基因及 pCom8 载体经 *Nde* I/*Sal* I 双酶切后, 将目的基因连接至 pCom8 载体的多克隆位点 *Nde* I 和 *Sal* I 处, 重组

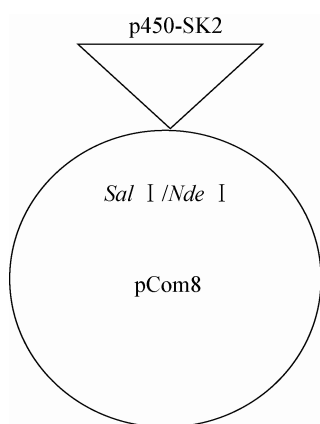


图 4 重组质粒的物理图谱

Figure 4 Physical map of recombinant plasmid

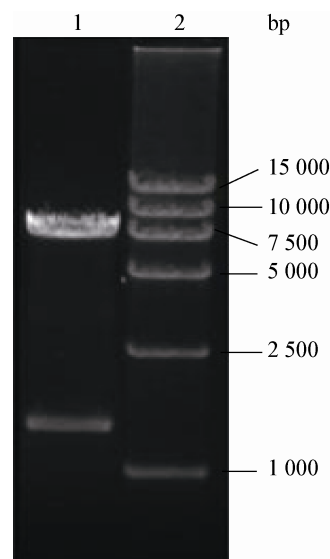


图 5 p450-SK2/pCom8 的酶切鉴定

Figure 5 Enzyme digestion of p450-SK2/pCom8

Note: 1: p450-SK2/pCom8; 2: DL15000 marker.

质粒经 *Sal* I/*Nde* I 双酶切后, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测到大小约为 7.6 kb 和 1 416 bp 的片段 (图 5), 片段大小与质粒 pCom8 及目的基因实际大小一致。PCR 鉴定结果表明, 使用特异性引物进行 PCR 扩增时, 空质粒 pCom8 没有扩增出任何条带, 而重组质粒 p450-SK2/pCom8 扩增出相应大小的片段 (图 6), 进一步测序表明序列和读码框都正确。

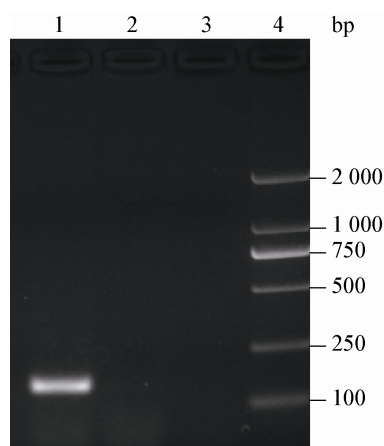


图 6 p450-SK2/pCom8 的 PCR 鉴定

Figure 6 PCR detection of pCom8 and p450-SK2/pCom8

Note: 1: p450-SK2/pCom8; 2: pCom8; 3: Blank control; 4: DL2000 marker.

3.2 p450-SK2 基因在大肠杆菌 DH5 α 中的表达

将制得的蛋白样品利用 Bradford 法定量, 根据样品蛋白浓度确定电泳蛋白上样量, 使得上样蛋白总量相同(20 μ g), 采用 10% SDS-PAGE 分离胶和 5% 的积层胶进行电泳。不同柴油浓度诱导的样品电泳结果如图 7 所示, 不同时间诱导的样品电泳结果如图 8 所示。合成的目的基因全长为 1 410 bp, 其表达蛋白大小约为 57 kD。SDS-PAGE 分析结果表明, p450-SK2/DH5 α 在 57 kD 处有目的条带表达, 未转化的 DH5 α 却未观察到, 因此, 认为 p450 基因在大肠杆菌 DH5 α 中得到了表达; 在诱导柴油浓度大于 1% 时, 目的条带表达量较大, 而不同诱导时间的蛋白电泳表明, 目的蛋白随着诱导时间的延长而呈增加趋势, 在 6 h 时蛋白表达量最大。

3.3 工程菌 p450-SK2/Y9 中 p450 基因的检测

以宿主菌 Y9、工程菌 p450-SK2/Y9、大肠杆菌 DH5 α 及 p450-SK2/DH5 α 菌液为模板进行 PCR 扩增反应, 反应产物的电泳图如图 9 所示, 以工程菌 p450-SK2/Y9 和 p450-SK2/DH5 α 菌液为模板时, 扩增出相同大小的条带, 而宿主菌 Y9 和大肠杆菌 DH5 α 却没有扩增出相应大小的条带。结果表明重组质粒 p450-SK2/pCom8 被转入宿主菌 Y9 中, 工程菌 p450-SK2/Y9 构建成功。

3.4 工程菌 p450-SK2/Y9 对柴油的降解

宿主菌 Y9 及工程菌 p450-SK2/Y9 柴油降解率随时间的变化如图 10 所示, 工程菌与宿主菌的柴油降解未见明显差异, 在第 4 天时, 工程菌的降解率稍比宿主菌高, 而在第 2、6 天两者的柴油降解

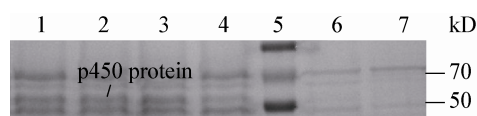


图 7 不同柴油浓度诱导 p450-SK2 蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳图

Figure 7 SDS-PAGE electrophoresis of p450-SK2 protein induction with different concentrations of diesel oil

注: 1: 4%柴油; 2: 3%柴油; 3: 2%柴油; 4: 1%柴油; 5: 蛋白 Marker; 6: 未诱导; 7: DH5 α 。

Note: 1: 4% diesel oil; 2: 3% diesel oil; 3: 2% diesel oil; 4: 1% diesel oil; 5: Protein marker; 6: No induction; 7: DH5 α 。

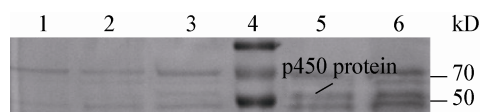


图 8 p450-SK2 基因在不同诱导时间表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Figure 8 Protein SDS-PAGE electrophoresis of p450-SK2 gene induction different time

注: 1: DH5 α ; 2: 未诱导; 3: 诱导 2 h; 4: 蛋白 Marker; 5: 诱导 4 h; 6: 诱导 6 h。

Note: 1: DH5 α ; 2: No induction; 3: 2 h; 4: Protein marker; 5: 4 h; 6: 6 h。

率基本相等。本实验室前期采用 PCR 从宿主菌 Y9 的基因组 DNA 和质粒中分别扩增出了大小分别为 544 bp 和 864 bp 的 *alkB* 和 CYP153A 基因, 分别与 *Acinetobacter* sp. M-1 和 *Acinetobacter* sp. OC4 具有 84% 和 98% 的相似性, 并且宿主菌 Y9 几乎可高效地降解柴油中 C11-C22 所有组分^[17]。因此, 在宿主菌中含有多种烷烃羟化酶(Alkane hydroxylases)基因时, 烷烃羟化酶并不是烷烃降解过程中的限速酶, 再导入新的烷烃羟化酶基因, 该基因并不能得到过量表达, 构建的基因工程菌也不能显著提高宿主菌的烷烃降解速率。

为考察工程菌 p450-SK2/Y9 在混合菌群中对柴油降解的效果, 在实验室构建的优势菌群(Y9+W3+F9+X1)中^[18], 以工程菌 p450-SK2/Y9 代替宿主菌 Y9, 构建新的菌群(p450-SK2/Y9+W3+F9+X1), 比较两个菌群对柴油的降解效果,

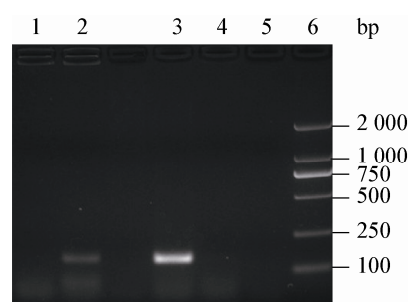


图 9 p450 基因的 PCR 鉴定

Figure 9 PCR detection of p450 gene

注: 1: Y9; 2: p450-SK2/Y9; 3: p450-SK2/DH5 α ; 4: DH5 α ; 5: 空白对照; 6: DNA marker。

Note: 1: Y9; 2: p450-SK2/Y9; 3: p450-SK2/DH5 α ; 4: DH5 α ; 5: Blank control; 6: DNA marker。

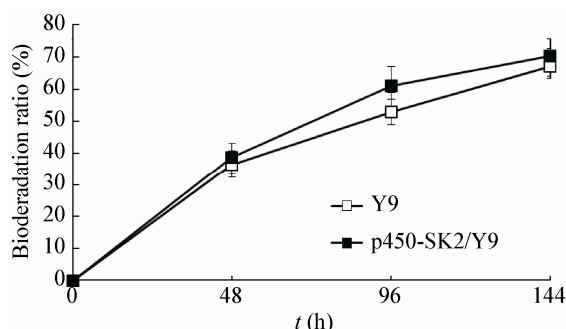


图 10 宿主菌 Y9 及工程菌 p450-SK2/Y9 柴油降解率随时间的变化

Figure 10 Changes of diesel oil biodegradation ratio of Y9 and p450-SK2/Y9 with incubation time

其降解率随时间的变化如图 11 所示, 含有工程菌的菌群柴油降解率始终明显要高于含宿主菌的菌群。石油是由上千种化学性质不同的化合物组成的复杂混合物, 相同条件下微生物对不同种类石油烃的降解能力是不同的, 不同种类的石油烃的降解也需要含有多种降解酶的微生物参与, 利用能降解不同种类化合物的降解菌构建降解菌群, 菌株之间的协同作用不仅可以扩大降解底物的范围, 而且可以提高降解速率^[22]。由于在混合菌群中, 各菌株所含有的降解酶基因不同, 而且菌株之间也具有协同作用, 可以利用各自的降解底物来增加降解速率, 因此在石油烃降解过程中起关键作用的烷烃羟化酶成为了限速酶, 含有工程菌的菌群由于烷烃羟化酶基因的导入, 使得烷烃羟化酶可以得到大量表达, 因此, 提高了原有菌群的柴油降解效率。

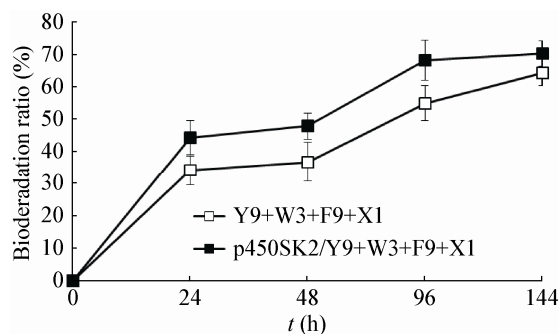


图 11 工程菌 p450-SK2/Y9 构建菌群的柴油降解率随时间的变化

Figure 11 Changes of diesel oil biodegradation ratio of bacterial consortium with incubation time

3.5 p450 基因在工程菌 p450-SK2/Y9 中的表达

为检测 p450 基因在工程菌 p450-SK2/Y9 中的诱导表达, 将宿主菌 Y9、工程菌 p450-SK2/Y9、两组混合菌 (Y9+W3+F9+X1 和 p450SK2/Y9+W3+F9+X1) 利用 1% 的柴油在 MMC 培养基诱导 24 h, 而 p450-SK2/DH5 α 利用 1% 的柴油在 LB 培养基中诱导 24 h, 比较各自的蛋白表达情况, 其 SDS-PAGE 电泳图如图 12 所示, DH5 α 与 p450-SK2/DH5 α 在目的蛋白大小处的差异条带为目的蛋白, 宿主菌 Y9 及混合菌 Y9+W3+F9+X1 在该蛋白大小处都未见条带, 而工程菌 p450-SK2/Y9 及混合菌 p450SK2/Y9+W3+F9+X1 都有明显条带, 且混合菌 p450SK2/Y9+W3+F9+X1 的目的蛋白表达量相对单菌株 p450SK2/Y9 更大, 这也与工程菌 p450-SK2/Y9 在混合菌 p450SK2/Y9+W3+F9+X1 中对柴油降解促进更大相符。结果表明, p450 基因在构建的工程菌 p450-SK2/Y9 中能得到准确表达, 且表达量越大, 对柴油降解的促进作用越明显。

4 结论

本文将 *Alcanivorax borkumensis* SK2 的 p450 基因扩增后, 连接至烷烃响应表达载体 pCom8 中, 构建该基因的表达载体 p450-SK2/pCom8, 并将其

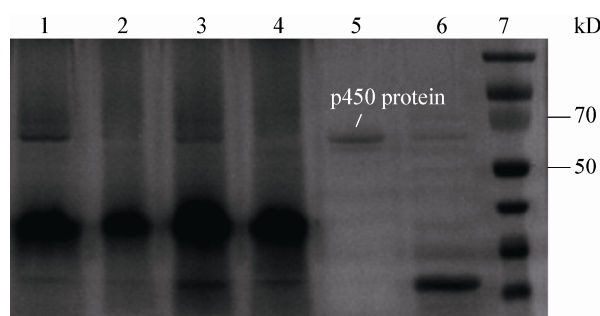


图 12 p450-SK2 基因在工程菌 p450-SK2/Y9 中表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Figure 12 Protein SDS-PAGE electrophoresis of p450 gene in p450-SK2/Y9

Note: 1: p450-SK2/Y9+W3+F9+X1; 2: Y9+W3+F9+X1; 3: p450-SK2/Y9; 4: Y9; 5: p450-SK2/DH5 α ; 6: p450-SK2/DH5 α (no induction); 7: Protein marker.

转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 经 PCR、酶切及测序鉴定, 重组质粒构建准确, 优化诱导条件, 通过 SDS-PAGE 检测, 该基因在大肠杆菌 DH5 α 中得到准确表达, 利用能正确表达的重组子转入石油降解菌 *Acinetobacter* sp. Y9 中, 构建了基因工程菌 p450-SK2/Y9, 研究工程菌 p450-SK2/Y9 对柴油的降解特性表明, 工程菌在混合菌群中对柴油降解的促进作用明显。p450 基因在构建的工程菌 p450-SK2/Y9 中能得到正确表达, 在混合菌中的表达量高于单菌株, 这对于提高柴油的降解速率及研究 p450 基因在柴油降解过程中的作用机理具有一定意义。

参考文献

- [1] Jeong WG, Cho SM. Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Aquaculture, 2007, 265(1/4): 343-350
- [2] Venosa AD, Zhu XQ. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands[J]. Spill Science & Technology Bulletin, 2003, 8(2): 163-178
- [3] Ren NQ, Ma F, Yang JX, et al. Pollution Control of Microbiology[M]. Harbin: Harbin Industrial University Press, 2002: 34-45 (in Chinese)
任南琪, 马放, 杨基先, 等. 污染控制微生物学[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2002: 34-45
- [4] Xia BC. Environmental Pollutants Biodegradation[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 56-75 (in Chinese)
夏北成. 环境污染生物降解[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 56-75
- [5] van Beilen JB, Wubbolts MG, Witholt B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*[J]. Biodegradation, 1994, 5(3/4): 161-174
- [6] Kok M, Oldenhuis R, van der Linden MP, et al. The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene. Sequence and expression[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(10): 5435-5441
- [7] Panke S, Meyer A, Huber CM, et al. An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2324-2332
- [8] Smits THM, Balada SB, Witholt B, et al. Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(6): 1733-1742
- [9] Koch DJ, Chen MM, van Beilen JB, et al. *In vivo* evolution of butane oxidation by terminal alkane hydroxylases AlkB and CYP153A6[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(2): 337-344
- [10] van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, et al. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment[J]. Oil & Gas Science and Technology, 2003, 58(4): 427-440
- [11] Funhoff EG, Salzmann J, Bauer U, et al. Hydroxylation and epoxidation reactions catalyzed by CYP153 enzymes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(4): 806-812
- [12] Grogan G, Roberts G, Parsons S, et al. P450_{cam}, a cytochrome P450 catalysing the stereospecific 6-*endo*-hydroxylation of (1*R*)-(+)-camphor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4/5): 449-454
- [13] Narhi LO, Fulco AJ. Characterization of a catalytically self-sufficient 119000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(16): 7160-7169
- [14] Maier T, Förster HH, Asperger O, et al. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 286(3): 652-658
- [15] van Beilen JB, Funhoff EG, van Loon A, et al. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 59-65
- [16] Sun M, Luo Q, Shen XR, et al. Isolation and identification of biodegradation ability of alkane-degrading bacteria: molecular detection and analysis of alkane hydroxylase genes[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(17): 3936-3943
- [17] Hou DY, Shen XR, Luo Q, et al. Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material[J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 67(1/2): 146-151
- [18] Yu Y, Zhang ZJ, Song BH, et al. Isolation, identification and culture conditions optimization of a high efficiency biosurfactant producing bacterium[J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2012, 51(4): 501-506, 528 (in Chinese)
余焱, 张志坚, 宋柏函, 等. 一株高效生物表面活性剂产生菌的分离、鉴定及培养条件的优化[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2012, 51(4): 501-506, 528
- [19] Shi Z, Hou DY, Shen XR, et al. Construction of a marine diesel-degrading bacterial consortium and study of its degradation features[J]. Chinese Journal of Nautical Medicine and Hyperbaric Medicine, 2012, 19(2): 95-97 (in Chinese)
施展, 侯登勇, 沈先荣, 等. 海洋柴油降解菌群的构建及其降解性能研究[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2012, 19(2): 95-97
- [20] Schneiker S, dos Santos VAPM, Bartels D, et al. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(8): 997-1004
- [21] Smits THM, Seeger MA, Witholt B, et al. New Alkane-responsive expression vectors for *Escherichia coli* and *Pseudomonas*[J]. Plasmid, 2001, 46(1): 16-24
- [22] Rahman KSM, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, et al. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium[J]. Bioresource technology, 2002, 85(3): 257-261