

嗜盐古菌 *Haloferax volcanii* WFD11 中龙胆酸 1,2-双加氧酶 HagA 的研究

巩红云¹ 周羽² 许楹^{1*} 周宁一^{1,2}

(1. 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)

(2. 中国科学院武汉病毒研究所 湖北 武汉 430071)

摘要:【目的】研究嗜盐古菌 *Haloferax volcanii* WFD11 菌株以不同芳香酸作为碳源的生长情况; 鉴定其通过龙胆酸途径代谢芳香酸过程中的开环酶龙胆酸 1,2-双加氧酶的基因, 并对其进行生化水平的研究; 初步揭示古菌和细菌代谢芳香酸的可能差异。【方法】分别以 4 mmol/L 的 6 种不同芳香酸为唯一碳源培养菌株 WFD11, 利用全自动生长曲线分析仪测定菌株生长情况并绘制生长曲线; 利用高效液相色谱检测菌株 WFD11 代谢 3-羟基苯甲酸的中间产物; 对菌株 WFD11 的基因组进行生物信息学分析, 寻找潜在的龙胆酸 1,2-双加氧酶编码基因, 并在 *Haloferax volcanii* H1424 中异源表达; 通过快速纯化系统(采用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱)纯化异源表达的蛋白, 以龙胆酸为底物通过紫外分光光度计检测粗酶液和纯化后的龙胆酸 1,2-双加氧酶和相关酶学特性; 通过实时定量 PCR 观察 *hagA* 的表达类型。【结果】菌株 WFD11 能以 4 mmol/L 的 3-羟基苯甲酸和 3-羟基苯丙酸为唯一碳源和能源生长; 高效液相色谱检测证明菌株 WFD11 通过龙胆酸代谢 3-羟基苯甲酸(3HBA); 克隆和异源表达了龙胆酸 1,2-双加氧酶基因 *hagA*; HagA 粗酶液和纯化蛋白均具龙胆酸 1,2-双加氧酶的活性, 催化龙胆酸开环生成顺丁二酸单酰丙酮酸; HagA 的龙胆酸 1,2-双加氧酶比活力为 0.024 8 U/mg, 且其活性不依赖于 Fe²⁺; 荧光定量 PCR 实验结果证明 *hagA* 是组成型表达。【结论】嗜盐古菌 *H. volcanii* WFD11 可能是通过龙胆酸途径代谢芳香酸类物质, 为进一步研究古菌和细菌代谢芳香酸的可能差异打下了基础。

关键词: 嗜盐古菌, 富盐菌 WFD11, 富盐菌 H1424, 龙胆酸, 龙胆酸 1,2-双加氧酶, 顺丁烯二酸单酰丙酮酸

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

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

Received: March 01, 2017; **Accepted:** April 28, 2017; **Published online** (www.cnki.net): May 17, 2017

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

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

收稿日期: 2017-03-01; **接受日期:** 2017-04-28; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-05-17

Characterization of gentisate 1,2-dioxygenase HagA from *Haloferax volcanii* WFD11

GONG Hong-Yun¹ ZHOU Yu² XU Ying^{1*} ZHOU Ning-Yi^{1,2}

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

(2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: [Objective] We studied the growth characteristics of *Haloferax volcanii* WFD11 cultivated on a number of aromatic acids as carbon sources to reveal the possible difference between bacteria and archaea in aromatic acids degradation. [Methods] The putative gentisate 1,2-dioxygenase gene was cloned and the enzyme heterologously expressed, purified and functionally identified before determining its key enzyme parameters. We measured the growth of *H. volcanii* WFD11 in halophile growth medium minimal medium containing one of the six aromatic acids (4 mmol/L) separately as sole carbon source. The intermediate from 3-hydroxybenzoic acid catabolism was determined using high performance liquid chromatography. The putative gentisate 1,2-dioxygenase gene, designated *hagA*, was heterologously expressed in *H. volcanii* H1424, and HagA was purified by affinity chromatography on an Ni²⁺ chelating column of rapid purification system. HagA was functionally identified based on its specific activity to catalyze the ring cleavage of gentisate using ultraviolet spectrophotometer. The expression type of *hagA* was revealed by real-time PCR. [Results] Strain WFD11 could use 4 mmol/L 3-hydroxybenzoic acid (3HBA) and 3-hydroxyphenylpropionic acid (3HPP) as sole carbon source for growth, but not on 4 mmol/L benzoic acid (BA), 2-hydroxybenzoic acid (2HBA), 4-hydroxybenzoic acid (4HBA), 3-phenylpropionic (3PP). Gentisate was determined as the intermediate during 3HBA catabolism. The cell extract of *H. volcanii* WFD11 catalyzed the ring cleavage of gentisate to maleylpyruvate. Purified HagA exhibited a specific activity of 0.024 8 U/mg of gentisate 1,2-dioxygenase, without Fe²⁺. Real-time PCR proved that *hagA* was constitutively expressed in strain WFD11. [Conclusion] This study provides the basis to further explore the difference between bacteria and archaea in aromatic acids degradation.

Keywords: Halophilic archaea, *Haloferax volcanii* WFD11, *Haloferax volcanii* H1424, Gentisate, Gentisate 1,2-dioxygenase, Maleylpyruvate

芳烃化合物是一类分子中含有一个或多个苯环的碳氢化合物及其衍生物。迄今为止,细菌在厌氧条件^[1-2]和好氧条件^[3-6]下代谢芳烃化合物的研究已有大量的报道。有氧条件下,芳烃化合物通过外周代谢生成包含一个苯环和两个羟基的化合物及其衍生物作为开环底物,进而进入中心代谢^[7]。根据开环底物的类型,微生物代谢芳烃化合物可以分为以下3种主要的代谢途径:邻苯二酚代谢途径、原儿茶酸代谢途径和龙胆酸代谢途径^[8-10]。在龙胆酸代谢途径中,龙胆酸1,2-双加氧酶(Gentisate 1,2-dioxygenase, GDO)催化龙胆酸开环生成顺丁烯二酸单酰丙酮酸(Maleylpyruvate, MP),随后MP

经水解途径直接水解为顺丁烯二酸(Maleate)和丙酮酸^[11]或MP异构反应生成反丁烯二酸单酰丙酮酸(Fumarylpyruvate, FP)^[12],再进一步经水解酶(Fumarylpyruvate hydrolase, FPH)催化形成反丁烯二酸(又称延胡索酸, Fumarate)和丙酮酸(Pyruvate)从而进入三羧酸循环^[12-13](图1)。龙胆酸1,2-双加氧酶在催化机制分类上属于间位类型的开环双加氧酶^[7],龙胆酸1,2-双加氧酶以非血红素Fe²⁺作为辅基,Fe²⁺对龙胆酸1,2-双加氧酶的活性和稳定性是必需的^[14-18]。目前经功能鉴定的细菌的龙胆酸1,2-双加氧酶通常以同源多聚体的形式存在,其单个亚基的分子量40 kD左右^[14-15]。

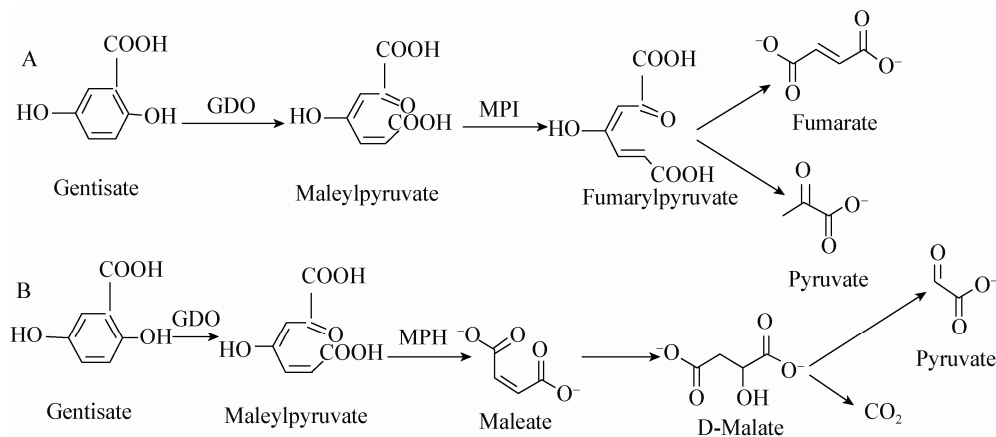


图 1 龙胆酸代谢的两条分支途径

Figure 1 Two alternative routes for maleylpyruvate catabolism in the gentisate pathway

注：A：异构途径；B：水解途径。

Note: A: Isomerization route; B: Direct hydrolysis route.

古菌是生命中重要的一个分支，其分解代谢芳香化合物的研究很少，仅局限于嗜盐古菌分解代谢芳香化合物的初步研究，尚无完整代谢途径在分子水平的研究报道。目前仅有两株嗜盐古菌 *Haloferax* sp. strain D1227^[19-20] 和 *Haloarcula* sp. strain D1^[19,21] 报道具有分解代谢芳香酸的能力。*H. volcanii* WFD11 是一株富盐菌属的古菌，是常用的古菌的表达宿主。迄今为止，该菌并没有被报道可以利用芳香烃为唯一碳源和能源生长，早期研究报道 WFD11 菌株没有龙胆酸 1,2-双加氧酶的活力^[20]。

本研究通过底物生长实验和酶活检测结果证实，*H. volcanii* WFD11 能够利用 3-羟基苯甲酸和 3-羟基苯丙酸为唯一碳源和能源生长。通过生物信

息学分析，寻找出一个疑似的龙胆酸 1,2-双加氧酶编码基因 *hagA*，并在分子和生化水平上研究了该龙胆酸 1,2-双加氧酶的相关特性。本研究初步证实了菌株 WFD11 是继菌株 D1227 和菌株 D1 之后，第三株能够利用芳香烃为唯一碳源和能源生长的纯培养的嗜盐古菌，该菌株具有组成型表达的龙胆酸 1,2-双加氧酶编码基因。本研究为古菌中龙胆酸代谢途径的进一步深入研究打下了基础。

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。

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	特征	来源
Strains/Plasmids	Characteristics	Source
<i>H. volcanii</i> H1424	富盐菌属菌株，常用作古菌的表达宿主， $\Delta pyrE2 \Delta hdrB Nph-pitA \Delta mrr cdc48d-Ct$	[22]
<i>H. volcanii</i> WFD11	富盐菌属菌株，可以代谢芳香酸，常用作古菌的表达宿主	[20]
pTA1228	古菌表达载体，pBluescript II with <i>H. volcanii</i> 3 299 bp <i>Sal I</i> / <i>BspH I</i> genomic fragment containing <i>cdc48d</i> gene, Ap ^R	[22]

注：Ap^R：氨苄青霉素抗性。

Note: Ap^R: Ampicillin-resistant.

1.1.2 培养基和缓冲液: HGM 基本培养基^[21]和 HGM 丰富培养基^[21], Hv-YPC 培养基^[23]和 Hv-Ca 培养基^[23], 古菌蛋白表达纯化专用 HEPES 缓冲液: 20 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) (pH 7.5), 2 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟。普通磷酸缓冲液(PB 缓冲液, 50 mmol/L pH 7.4): 77.4 mL 1 mol/L Na₂HPO₄, 22.6 mL 1 mol/L NaH₂PO₄, 蒸馏水定容至 1 L。

1.1.3 主要试剂和仪器: 内切酶均购自 New England BioLabs; 胶回收和纯化以及提取质粒和基因组所用的试剂盒均购自 OMEGA; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天试剂公司; 实时定量 PCR 提取 RNA 的试剂盒为 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa 公司。Ni-DA Resin FF Prepacked 亲和层析柱, 金斯瑞生物科技有限公司; Perkin Elmer 紫外分光光度计、Gene Company 酶标仪(EPOCH2)、AKTA 蛋白纯化系统, 美国通用电气公司; 全自动生长曲线分析仪, 芬兰 Oy Growth Curves Ab Ltd 公司; 高压液相色谱仪(HPLC), 美国沃特世公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株底物生长实验: 菌株 WFD11 生长于 HGM 固体丰富培养基中, 在 45 °C 条件下, 菌株培养 3–5 d 后挑取单菌落转接到 HGM 液体丰富培养基中生长。当 OD₆₀₀ 值约为 0.5 时, 以 1% (体积比) 的接种量接种到 5 mL HGM 液体丰富培养基中, 45 °C、160 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.5。然后 5 500×g 离心 10 min 收集菌体, 并用 HGM 液体基本培养基清洗菌体 2 次, 收集菌体重悬于 5 mL HGM 液体基本培养基中。将菌株 WFD11 重悬菌液以 1% (体积比) 接种量分别接种到含有 4 mmol/L 的苯甲酸 (Benzoic acid, BA)、2-羟基苯甲酸 (2-Hydroxybenzoic acid, 2HBA)、3-羟基苯甲酸 (3-Hydroxybenzoic acid, 3HBA)、4-羟基苯甲酸 (4-Hydroxybenzoic acid, 4HBA)、3 苯丙酸 (3-Phenylpropionic acid, 3PP) 和 3-羟基苯丙酸 (3-Hydroxyphenylpropionic acid, 3HPP) 的 HGM 液

体基本培养基中, 对照组菌株接种到不加底物的 HGM 液体基本培养基中, 45 °C、175 r/min 振荡培养 7–14 d, 并利用全自动生长曲线分析仪测定菌株生长情况, 绘制生长曲线。

1.2.2 龙胆酸 1,2-双加氧酶功能基因的克隆和表达: 首先对 *H. volcanii* WFD11 基因组进行测序, 而后对其基因组序列进行生物信息学分析, 以细菌龙胆酸 1,2-双加氧酶(AAD_12619.1, AAD_49427.1, AAQ_91293.1, AAW_63413.1, AAZ_93402.1, ABH_01038.1, ABW_22836.1, ADT_78164.1, BAC_78375.1, CAA_12267.1, NP_602217.1, YP_164947.1) 和古菌龙胆酸 1,2-双加氧酶(AAQ_62856.1, AAQ_79814.1) 为参考, 发现了潜在的龙胆酸 1,2-双加氧酶, 将其编码基因命名为 *hagA* (KY678395)。HagA 与已知功能的 *H. volcanii* D1227 的龙胆酸 1,2-双加氧酶(AAQ_62856.1) 蛋白序列一致性为 84.2%, 与已知功能的菌株 D1 的龙胆酸 1,2-双加氧酶(AAQ_79814.1) 蛋白序列一致性为 80.5%。以 WFD11 菌株基因组 DNA 为模板, 以 *hagA* (5'-CCGGAATTCCGATGGGCCACGTCTTAGAC G-3', *EcoR* I 酶切位点用下划线标注) 和 *hagAr* (5'-CGGGATCCCGTTACTGTGGTGCCGCCTCG-3', *Bam*HI 酶切位点用下划线标注) 为引物, 扩增 *hagA* 基因并测序验证扩增无误。随后将目的片段 *hagA* 基因连接到表达质粒 pTA1228 上, 参照操作手册《Halohandbook》^[23] 中外源重组质粒转入古菌的操作方法, 将重组质粒 pTA1228-*hagA* 转入表达宿主 *H. volcanii* H1424 中, 涂布到 Hv-Ca 筛选培养基中 (加入生物素和硫胺素), 筛选包含重组质粒的 *H. volcanii* H1424 [pTA1228-*hagA*] 转化子。

1.2.3 野生菌和重组菌粗酶液制备及 HagA 蛋白纯化: 以 1% (体积比) 接种量将 *H. volcanii* WFD11 接种到含有 2 mmol/L 3HBA 的 200 mL HGM 液体丰富培养基中, 45 °C、175 r/min 振荡培养至对数生长中后期, 4 000×g 离心 10 min 收集菌体, 用冰上预冷的 HEPES 缓冲液洗涤细胞 2 次, 重悬于 5 mL 用冰预冷的相同的缓冲液中, 超声破碎并离心取上清, 并加入 20% 甘油, 4 °C 保存 *H. volcanii* WFD11 粗酶液。

将 *H. volcanii* H1424 [pTA1228-hagA]转接至 5 mL Hv-Ca (加入生物素和硫胺素)中活化培养,然后转接至 33 mL 的 Hv-Ca 培养基中培养至 OD_{600} 的吸光值在 0.5 左右后转接到 333 mL 的 Hv-YPG 培养基中,同时加入 1.3 mmol/L 的诱导剂色氨酸进行诱导,45 °C 培养约 16 h 后至对数后期,再加入 3 mmol/L 诱导剂色氨酸再次诱导 4 h 后 4 °C 条件下收集菌液。制备细胞裂解液,将在 45 °C 诱导结束的古菌放冰上静置 0.5 h 之后,4 000×g 离心 10 min 收集菌体,用预冷的 PB (Phosphate buffer)缓冲液洗涤细胞 2 次,重悬于 5 mL 预冷的相同缓冲液中。在冰浴中进行超声破碎(破碎 3 s,停 7 s),破碎 10 min 至清澈。最后 4 °C、13 000×g 离心 60 min 收集上清液,用于粗酶液酶活分析和蛋白纯化。采用 Ni-DA Resin FF Prepacked 亲和层析柱纯化蛋白。首先用 5–10 倍柱体积的平衡缓冲液即 PB 缓冲液平衡层析柱(必要时可在缓冲液中加入 5%甘油)。然后将制备的细胞裂解液加入层析柱,上样完毕后继续加入平衡缓冲液清洗镍柱,除去未与 Ni^{2+} 柱结合的蛋白和杂质。最后依次提高平衡缓冲液中咪唑的浓度(40、80、120、160、250、320、500 mmol/L)进行梯度洗脱,通过记录仪记录出峰时间,收集出峰样品。

1.2.4 SDS-PAGE 及蛋白浓度的测定: 采用分离胶浓度 12.5%和浓缩胶浓度 5%的 SDS-PAGE。将 10 μ L 的上样缓冲液与样品混匀后沸水煮 10 min,12 000×g 离心 10 min 后待用。上样量为 10 μ L,电泳条件为 12 mA 电泳 30 min,18 mA 电泳 1 h。取出凝胶放入考马斯亮蓝 R-250 染液中煮沸染色 5 min。换成脱色液,煮沸脱色直至背景清晰。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.5 龙胆酸 1,2-双加氧酶酶学测定: 通过 Perkin Elmer 双波长分光光度计,以龙胆酸为底物,对 *H. volcanii* WFD11 的粗酶液和纯化蛋白 HagA 进行酶活力测定^[12]。酶活单位(U)定义为每分钟 1 μ mol 底物的减少或产物的生成所需的酶量。龙胆酸 1,2-双加氧酶催化龙胆酸开环反应,其产物顺丁烯

二酸单酰丙酮酸的摩尔消光系数在 330 nm 为 10 800 mol/(L·cm)。此开环反应在分光光度计上表现为特征吸收峰由 320 nm 向 330 nm 偏移。所以,龙胆酸 1,2-双加氧酶活性可以通过产物顺丁烯二酸单酰丙酮酸在 330 nm 光吸收值的增加来测定。反应体系:在 HEPES 缓冲液中加入适量细胞裂解液或者纯化蛋白 HagA,龙胆酸的浓度为 0.125 mmol/L,反应温度为 30 °C,对照杯中不加龙胆酸。

1.2.6 生物转化方法和利用 HPLC 检测分析底物或产物: 生物转化方法:以 1% (体积比)接种量将菌株 WFD11 接种在 Hv-YPG 液体丰富培养基中,45 °C、175 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.5,用 HGM 液体基本培养基清洗菌体 3 遍后将菌体再重悬于 HGM 液体基本培养基中,加入 1 mmol/L 2,2'-联吡啶孵育 10 min,然后加入 2 mmol/L 3HBA 进行生物转化反应,反应时间为 2 h,并定时取样。样品经 50%浓硫酸酸化处理后,用乙酸乙酯萃取后烘干,最后溶于蒸馏水中用 HPLC 检测底物和产物。

利用 HPLC 对龙胆酸和 3HBA 等芳香酸进行定性定量分析,色谱柱为 Agilent ZORBAX 300SB-C₁₈ (5 μ m, 250 mm×4.6 mm),洗脱溶剂包括乙酸铵 (50 mmol/L pH 4.2, 80%)和甲醇(20%),检测波长 287 nm (3HBA)及 320 nm (龙胆酸),流速为 1.0 mL/min,进样量 20 μ L。

1.2.7 实时定量 PCR: 在 25 mL 的无菌培养瓶中,以 1% (体积比)的接种量将菌株 WFD11 接种到 10 mL Hv-YPG 液体培养基,45 °C、175 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.6,用磷酸盐缓冲液清洗 2 次菌体,再重悬于 3 mL HGM 液体基本培养基中,加入 2 mmol/L 3HBA,其中一瓶不加底物作为对照。45 °C、175 r/min 振荡培养约 8 h。利用试剂盒提取 RNA 并反转录成 cDNA,以菌株 WFD11 的 16S rRNA 基因作为内参基因,以 16Sf (5'-TTGATC CTGCCGGAGGTCATTG-3')和 16Sr (5'-CAGCATG ACTCCCGTATGAAGT-3')作为 16S rRNA 基因的引物,以 hagAf1 (5'-CCTAGAAGCACTCCGTCA-3')和 hagAr1 (5'-TGTTGTGGAAGTGTGGG-3')作为

hagA 基因的引物, 根据 TaKaRa 试剂盒 SYBR[®] Premix ExTaq[™] 说明进行实时定量 PCR 测定。

2 结果与分析

2.1 WFD11 菌株底物生长实验

迄今为止尚未有研究报道 *H. volcanii* WFD11 可以利用芳香化合物为碳源生长, 早期研究报道 WFD11 菌株没有龙胆酸 1,2-双加氧酶的活力^[20]。研究分别以 4 mmol/L 的 BA、2HBA、3HBA、4HBA、3PP 和 3HPP 等 6 种芳香酸为唯一碳源和能源, 45 °C、175 r/min 振荡培养条件下, 对野生型 *H. volcanii* WFD11 进行生长实验, 结果如图 2 所示: 野生型 WFD11 菌株可以分别以 4 mmol/L 3HBA 和 3HPP 为唯一碳源和能源生长, 但是不能利用 BA、2HBA、4HBA 和 3PP 为唯一碳源和能源生长。

2.2 *H. volcanii* WFD11 生物转化 3-羟基苯甲酸生成龙胆酸

以 2 mmol/L 3HBA 为底物进行菌株 WFD11 全细胞生物转化实验。通过 HPLC 检测反应液, 结果显示: 图 3A 和 3B 分别显示 3HBA 和龙胆酸的标准品; 图 3C 和 3D 显示反应体系中 1 h 和 2 h 的样

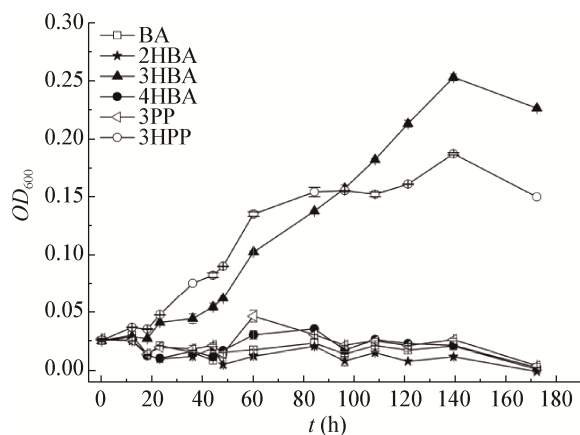


图 2 嗜盐古菌 *H. volcanii* WFD11 利用不同芳香酸的生长曲线

Figure 2 Growth curves of *H. volcanii* WFD11 on different aromatic acids

注: BA: 苯甲酸; 2HBA: 2-羟基苯甲酸; 3HBA: 3-羟基苯甲酸; 4HBA: 4-羟基苯甲酸; 3PP: 3-苯基丙酸; 3HPP: 3-羟基苯基丙酸。

Note: BA: Benzoic acid; 2HBA: 2-Hydroxybenzoic acid; 3HBA: 3-Hydroxybenzoic acid; 4HBA: 4-Hydroxybenzoic acid; 3PP: 3-Phenylpropionic acid; 3HPP: 3-Hydroxyphenylpropionic acid.

品, 图 3D 是图 3C 隆起的龙胆酸出峰处的放大图。反应液中能检测到生成的龙胆酸以及尚未降解完全的 3HBA (图 3C); 随着时间的推移底物 3HBA 逐渐减少(图 3C)而产物龙胆酸逐渐累积(图 3D)。结果证实菌株 WFD11 具有催化 3HBA 生成龙胆酸的能力, 并推测该菌株是通过龙胆酸途径降解 3HBA。以 2 mmol/L 3HBA 为底物, 不加入菌株 WFD11, 随时间推移 3HBA 没有减少, 同时也没有产物龙胆酸的生成(该 HPLC 检测结果图未展示)。

2.3 *H. volcanii* WFD11 粗酶液具有龙胆酸 1,2-双加氧酶活力

以 1% (体积比)接种量将 *H. volcanii* WFD11 接种于 Hv-YPG 液体丰富培养基中, 培养至 OD_{600} 的吸光值在 0.5 左右。4 000×g 离心 10 min 收集菌体, 用冰上预冷的 HEPES 缓冲液洗涤细胞两次, 重悬于 5 mL 用冰预冷的相同的缓冲液中。超声破碎后收集上清液, 获得菌株 WFD11 粗酶液。通过 Perkin Elmer 双波长分光光度计, 以 0.25 mmol/L 龙胆酸为底物, 检测到吸收波长由底物龙胆酸 ($\lambda_{max}=320$ nm) 向产物顺丁烯二酸单酰丙酮酸 ($\lambda_{max}=330$ nm) 偏移(图 4A), 确定菌株 WFD11 粗酶液具有龙胆酸 1,2-双加氧酶活力。当加入 1 mmol/L 2,2'-联吡啶^[21]后菌株 WFD11 粗酶液丧失了龙胆酸 1,2-双加氧酶的活力; 菌株 WFD11 粗酶液 4 °C 放置 6 d, 其中的龙胆酸 1,2-双加氧酶会逐渐失活, 如果添加 5 mmol/L 的抗坏血酸^[20]可以减小龙胆酸 1,2-双加氧酶失活的速率, 使龙胆酸 1,2-双加氧酶活力呈缓慢下降的状态。

2.4 龙胆酸 1,2-双加氧酶酶学特性研究

将龙胆酸 1,2-双加氧酶基因 *hagA* 和古菌的穿梭表达载体 pTA1228 连接后, 在古菌表达宿主 H1424 菌株中表达并纯化。通过紫外分光光度计检测纯化的 HagA 蛋白的酶活力, 如图 4B 所示, 以龙胆酸为底物时 320 nm 吸收峰上升, 轻微地向 330 nm 处偏移。证明 HagA 催化龙胆酸($\lambda_{max}=320$ nm)开环反应生成顺丁烯二酸单酰丙酮酸($\lambda_{max}=330$ nm), 具有龙胆酸 1,2-双加氧酶活力, 计算出 HagA 比活力为 0.024 8 U/g (图 4B)。在反应液中加入终浓度为

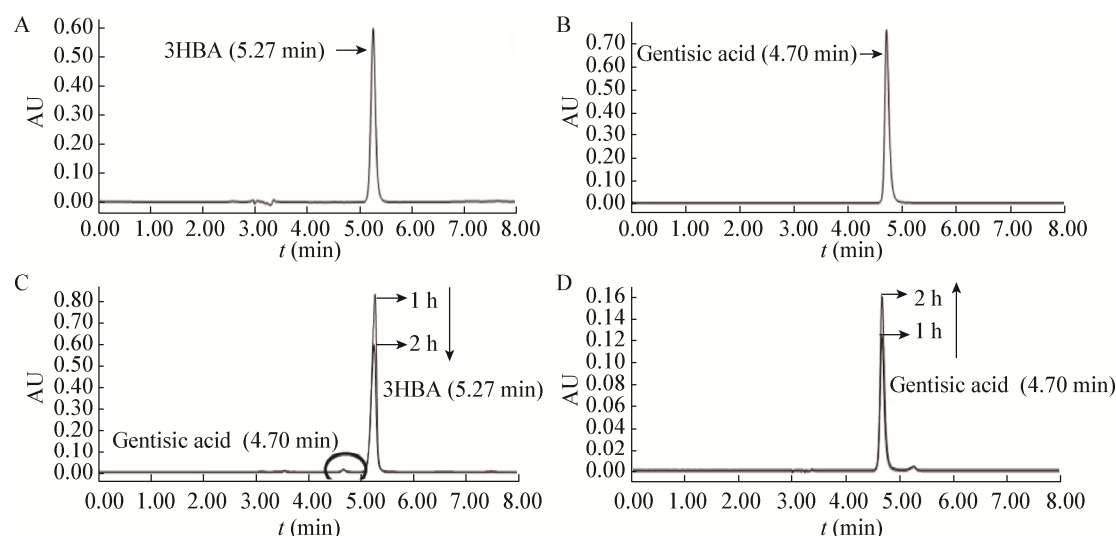


图3 菌株 WFD11 生物转化 3-羟基苯甲酸高效液相色谱图

Figure 3 The 3-hydroxybenzoic acid biotransformation using strain WFD11 monitored by HPLC

注: A: 3-羟基苯甲酸标准品; B: 龙胆酸标准品; C: 底物 3-羟基苯甲酸的下降; D: 产物龙胆酸的积累(图 D 是图 C 处龙胆酸的放大图).

Note: A: The standard of 3-hydroxybenzoic acid; B: The standard of gentisic acid; C: The decline of 3-hydroxybenzoic acid; D: The accumulation of gentisate.

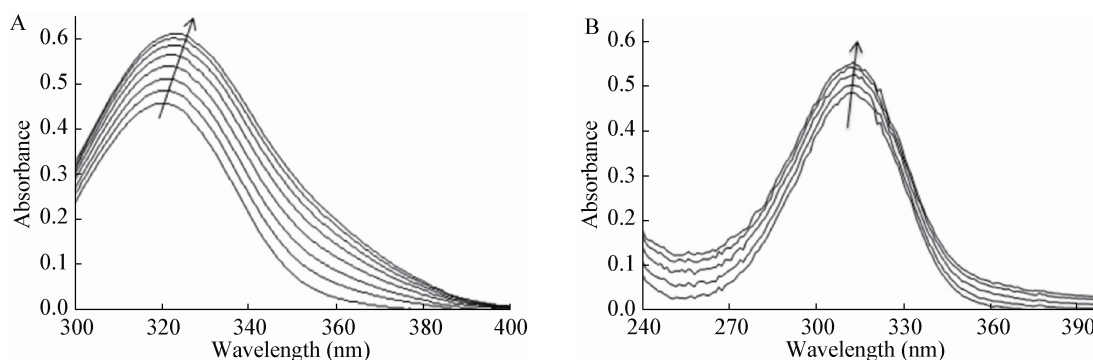

 图4 *H. volcanii* WFD11 粗酶液(A)和纯化蛋白 HagA (B)均催化龙胆酸开环反应

Figure 4 Cell extract of *H. volcanii* WFD11 (A) and HagA (B) both catalyzed the ring cleavage of gentisate

0.1 mmol/L Fe^{2+} (Fe_2SO_4), 酶活力变化不明显, 可能与该龙胆酸 1,2-双加氧酶活力很低有关。

上述实验都是利用 HEPES 缓冲液对 HagA 进行纯化和相关酶学检测。将 HEPES 缓冲液换成普通 PB 缓冲液, 以同样方法将 HagA 进行纯化和检测其酶活力, 此时 HagA 丧失了龙胆酸 1,2-双加氧酶活力。从而证明菌株 WFD11 中的龙胆酸 1,2-双加氧酶 HagA 是依赖高盐环境来维持其活力和稳定性的。

2.5 龙胆酸 1,2-双加氧酶编码基因的转录分析

为确定 *H. volcanii* WFD11 降解芳香酸过程中龙胆酸 1,2-双加氧酶基因为组成型转录表达还是诱

导型转录表达, 并进一步探索古菌中龙胆酸代谢芳香化合物的机制。本研究将体外证明具有功能的龙胆酸 1,2-双加氧酶基因 *hagA* 进行实时定量 PCR, 以菌株 WFD11 的 16S rRNA 基因作为内参基因 (Control), 以 3HBA、3HPP 和龙胆酸为底物, 检测在代谢过程中 *hagA* 的转录类型和转录水平。对加入 3HBA、3HPP 和龙胆酸诱导前后 *hagA* 基因的相对转录表达量利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[24]进行分析, 如图 5 所示, 相对转录表达都小于 1, 有下调趋势。从而判断该龙胆酸 1,2-双加氧酶基因 *hagA* 在代谢 3HBA、3HPP 和龙胆酸过程中是组成型转录表达。

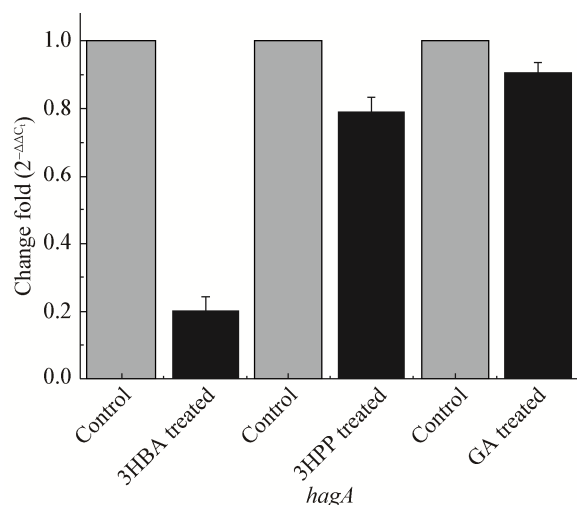


图5 龙胆酸 1,2-双加氧酶编码基因 *hagA* 相对转录表达量
Figure 5 The relative expression of gentisate 1,2-dioxygenase-encoding gene *hagA*

注: GA: 龙胆酸。

Note: GA: Gentisic acid.

3 讨论

本研究证明 *H. volcanii* WFD11 是一株能够以芳香酸类物质为唯一碳源和能源生长的嗜盐古菌, 是继菌株 D1227 和菌株 D1 之后, 第三株能够利用芳香化合物为唯一碳源和能源生长的纯培养的嗜盐古菌, 而且该菌株中龙胆酸 1,2-双加氧酶为组成型表达。1998 年研究报道通过层析的方法获得嗜盐古菌 D1227 中的蛋白, 随后检测到龙胆酸 1,2-双加氧酶的活力, 该研究报道中 WFD11 菌株没有龙胆酸 1,2-双加氧酶的活力^[20], 但本研究证明 WFD11 菌株能够利用 3HBA 和 3HPP 为唯一碳源和能源生长, 野生型 WFD11 菌株具有龙胆酸 1,2-双加氧酶活力, 且纯化蛋白 HagA 也检测到龙胆酸 1,2-双加氧酶活力。

在进化上古菌与真细菌距离较远, 目前古菌中得到功能验证的龙胆酸 1,2-双加氧酶分别来自菌株 D1^[19,21]和菌株 D1227^[19-20]。*H. volcanii* WFD11 中的 HagA 与菌株 D1 和菌株 D1227 中的龙胆酸 1,2-双加氧酶相比较, 相同点是分子大小相似, 均为 40 kD 左右, 且都需要高盐环境来维持酶的活力和稳定性, 在低盐环境下其酶活力丧失。不同点是 HagA 的活性不依赖于 Fe^{2+} , 并且体外纯化后稳定性低, 活力微弱。本研究纯化蛋白 HagA 的酶活力很低, 可能是由于该蛋白表达量低, 最终纯化得到的蛋白浓度很低导致酶活力微弱; 也可能是体外模拟的高盐环境与古菌 WFD11 细胞内环境存在差异, 导致 HagA 在体外稳定性差, 容易失活, 所以只能检测到微弱的活力。

细菌的龙胆酸 1,2-双加氧酶是不需要高盐环境的, 其蛋白活性依赖于 Fe^{2+} 。将 HagA 的蛋白序列与已研究功能的细菌和古菌的龙胆酸 1,2-双加氧酶序列进行亲缘性比对(表 2): HagA 与已做过功能验证的细菌的龙胆酸 1,2-双加氧酶的蛋白序列一致性在 24.7%–31.7%之间; 与已知功能的嗜盐古菌 *H. volcanii* D1227 的龙胆酸 1,2-双加氧酶蛋白序列(AAQ62856.1)一致性为 84.2%; 与已知功能的嗜盐菌株 D1 的龙胆酸 1,2-双加氧酶蛋白序列(AAQ79814.1)一致性为 80.5%, 可以看出, HagA 与已功能验证的来源于古菌的龙胆酸 1,2-双加氧酶的亲缘性最为相近, 其次是与细菌中的龙胆酸 1,2-双加氧酶有亲缘性。以上说明古菌和真细菌中的龙胆酸 1,2-双加氧酶是有区别的, 而且推测古菌和真细菌中的龙胆酸代谢基因簇也可能是有差异的。

表2 HagA 与其它龙胆酸 1,2-双加氧酶序列一致性
Table 2 The identities of HagA with other gentisate 1,2-dioxygenases

Functional identified gentisate 1,2-dioxygenases	HagA (%)
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>H. sp.</i> D1227] [AAQ62856.1]	84.2
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Haloarcula sp.</i> D1] [AAQ79814.1]	80.5
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Sphingomonas sp.</i> RW5] [CAA12267.1]	26.4
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Streptomyces sp.</i> WA46] [BAC78375.1]	27.7
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Rhodococcus sp.</i> NCIMB 12038] [ADT78164.1]	24.7
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Burkholderia sp.</i> NCIMB 10467] [ABW22836]	30.7
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Rhodococcus opacus</i>] [ABH01038.1]	25.3
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2] [AAZ93402.1]	27.3
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Klebsiella pneumoniae</i>] [AAW63413.1]	31.7
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Pseudaminobacter salicylatoxidans</i>] [AAQ91293.1]	27.6
Gentisate 1,2-dioxygenase [<i>Ralstonia sp.</i> U2] [AAD12619.1]	26.3

致谢: 感谢武汉大学陈向东教授提供的菌株 *H. volcanii* WFD11, 感谢英国 Nottingham 大学 Thorstern Allers 教授和上海交通大学刘喜朋副教授提供的菌株 *H. volcanii* H1424 和质粒 pTA1228, 感谢陈向东教授和刘喜朋副教授在嗜盐古菌培养方面提供的帮助。

参 考 文 献

- [1] Philipp B, Schink B. Two distinct pathways for anaerobic degradation of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* strain AR-1[J]. Archives of Microbiology, 2000, 173(2): 91-96
- [2] Porter AW, Young LY. Benzoyl-CoA, a universal biomarker for anaerobic degradation of aromatic compounds[J]. Advances in Applied Microbiology, 2014, 88: 167-203
- [3] Esteve-Núñez A, Caballero A, Ramos JL. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(3): 335-352
- [4] Häggblom MM. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 103(1): 29-71
- [5] Reineke W. Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly[J]. Annual Review of Microbiology, 1998, 52: 287-331
- [6] Shen XH, Zhou NY, Liu SJ. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium?[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(1): 77-89
- [7] 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
- [8] Pérez-Pantoja D, Donoso R, Agulló L, et al. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(5): 1091-1117
- [9] Hayaishi O, Hashimoto K. Pyrocatecase a new enzyme catalyzing oxidative breakdown of pyrocatechin[J]. The Journal of Biochemistry, 1950, 37(3): 371-374
- [10] Stanier RY, Ingraham JL. Protocatechuic acid oxidase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1954, 210(2): 799-808
- [11] Hopper DJ, Chapman PJ, Dagley S. Enzymic formation of D-malate[J]. Biochemical Journal, 1968, 110(4): 798-800
- [12] Lack L. The enzymic oxidation of gentisic acid[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1959, 34: 117-123
- [13] Lack L. Enzymic *Cis-trans* isomerization of maleylpyruvic acid[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1961, 236(11): 2835-2840
- [14] Suárez M, Ferrer E, Martín M. Purification and biochemical characterization of gentisate 1,2-dioxygenase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1[J]. FEMS Microbiology Letters, 1996, 143(1): 89-95
- [15] Crawford RL, Hutton SW, Chapman PJ. Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis*[J]. Journal of Bacteriology, 1975, 121(3): 794-799
- [16] Harpel MR, Lipscomb JD. Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*. Substrate coordination to active site Fe²⁺ and mechanism of turnover[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(36): 22187-22196
- [17] Kierner P, Tshisuaka B, Fetzner S, et al. Degradation of benzoate via benzoyl-coenzyme A and gentisate by *Bacillus stearothermophilus* PK1, and purification of gentisate 1,2-dioxygenase[J]. Biology and Fertility of Soils, 1996, 23(3): 307-313
- [18] Sugiyama SI, Yano K, Tanaka H, et al. Metabolism of aromatic compounds by bacteria. I. Gentisic acid oxidase and protocatechuic acid oxidase of *Pseudomonas ovalis* S-5[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1958, 4(4): 223-240
- [19] Fairley DJ, Wang G, Rensing C, et al. Expression of gentisate 1,2-dioxygenase (*gdoA*) genes involved in aromatic degradation in two haloarchaeal genera[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(3): 691-695
- [20] Fu W, Oriel P. Gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax* sp. D1227[J]. Extremophiles, 1998, 2(4): 439-446
- [21] Fairley DJ, Boyd DR, Sharma ND, et al. Aerobic metabolism of 4-hydroxybenzoic acid in Archaea via an unusual pathway involving an intramolecular migration (NIH shift)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6246-6255
- [22] Stroud A, Liddell S, Allers T. Genetic and biochemical identification of a novel single-stranded DNA-binding complex in *Haloferax volcanii*[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 224
- [23] Dyall-Smith M. The Halo handbook: Protocols for Haloarchaeal Genetics[M]. Melbourne: Haloarchaeal Genetics Laboratory, 2008
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408