

粪便微生物宏基因组来源的热稳定性邻苯二酚 1,2-双加氧酶异源表达及酶学性质

邓梦¹ 杨正凤¹ 黄遵锡^{1,2,3,4} 戴利铭⁵ 沈骥冬¹ 李俊俊^{1,2,3,4} 唐湘华^{1,2,3,4}
慕跃林^{1,2,3,4} 周峻沛^{1,2,3,4} 丁俊美^{1,2,3,4} 韩楠玉^{1,2,3,4} 吴倩^{1,2,3,4} 许波^{1,2,3,4*}

(1. 云南师范大学生命科学学院 云南 昆明 650500)

(2. 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 云南 昆明 650500)

(3. 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室 云南 昆明 650500)

(4. 云南师范大学 酶工程重点实验室 云南 昆明 650500)

(5. 云南省热带作物科学研究所 云南 景洪 666100)

摘要:【目的】克隆倭蜂猴粪便微生物宏基因组的邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *catPLCgl*, 并对该酶进行异源表达及酶学特性研究。【方法】利用宏基因组高通量测序技术获得 *catPLCgl*, 并对其氨基酸序列进行分析。将 *catPLCgl* 重组到载体 *pEASY-E2* 中并转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中异源表达, 研究其酶学性质。【结果】*catPLCgl* 全长 852 bp, G+C 含量 48%, 编码 283 个氨基酸, 理论分子量为 33.56 kD。重组 CatPLCgl 酶学性质分析显示最适作用 pH 为 7.0, 其中在 pH 7.0–10.0 范围内处理 1 h 后, 酶活剩余 90% 以上; 最适作用温度为 40 °C, 在 25 °C 和 40 °C 条件下稳定性较好, 耐受 210 h 酶活性几乎不变。重组酶在最适条件下的动力学参数 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 分别为 24.9 $\mu\text{mol/L}$ 、8.3 $\text{mmol}/(\text{min}\cdot\text{g})$ 和 13.7 s^{-1} ; Fe^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、Triton X-100、SDS、 Ag^+ 强烈抑制该酶活性, 而其它金属离子及有机试剂影响较小。【结论】从倭蜂猴粪便微生物宏基因组中克隆得到邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *catPLCgl*, 并对重组 CatPLCgl 酶学性质进行研究, 该酶具有较好的热稳定性和耐碱性, 在降解环境中的邻苯二酚和生产顺,顺-己二烯二酸方面具有应用潜力。

关键词: 邻苯二酚 1,2-双加氧酶, 粪便微生物宏基因组, 异源表达, 热稳定性

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31360268, 31560305)

***Corresponding author:** Tel: 86-871-5920830; E-mail: xubo128028@163.com

Received: October 31, 2016; **Accepted:** January 10, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 11, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31360268, 31560305)

***通讯作者:** Tel: 86-871-5920830; E-mail: xubo128028@163.com

收稿日期: 2016-10-31; 接受日期: 2017-01-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-01-11

Expression and characterization of thermostable catechol 1,2-dioxygenase from a fecal microbial metagenome of *Nycticebus pygmaeus*

DENG Meng¹ YANG Zheng-Feng¹ HUANG Zun-Xi^{1,2,3,4} DAI Li-Ming⁵ SHEN Ji-Dong¹
LI Jun-Jun^{1,2,3,4} TANG Xiang-Hua^{1,2,3,4} MU Yue-Lin^{1,2,3,4} ZHOU Jun-Pei^{1,2,3,4}
DING Jun-Mei^{1,2,3,4} HAN Nan-Yu^{1,2,3,4} WU Qian^{1,2,3,4} XU Bo^{1,2,3,4*}

(1. School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China)

(2. Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650500, China)

(3. Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming, Yunnan 650500, China)

(4. Key Laboratory of Enzyme Engineering, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China)

(5. Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100, China)

Abstract: [Objective] The gene (*catPLCgl*) coding for catechol 1,2-dioxygenase from a fecal microbial metagenome of *Nycticebus pygmaeus* was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), and the purified recombinant CatPLCgl was characterized. [Methods] The full-length *catPLCgl* was obtained based on the metagenomic high-throughput sequencing technology, and its amino acid sequence was analyzed. Then *catPLCgl* was cloned into the *pEASY-E2* vector, and characterized by the heterologous expression in *Escherichia coli* BL21(DE3). [Results] The gene full-length of *catPLCgl* is 852 bp with a G+C content of 48% and encodes 283 amino acids, with a theoretical molecular weight of 33.56 kD. Characterization shows that the optimal pH was 7.0, and the enzyme activity remained more than 90% after being processed for 1 h at pH between 7.0 and 10.0. The thermal activity of purified recombinant CatPLCgl was optimal at 40 °C at pH 7.0. The enzyme was stable at 25 °C and 40 °C, retaining nearly 100% activity after pre-incubation for 210 h. The kinetic parameters K_m , V_{max} and k_{cat} values were 24.9 $\mu\text{mol/L}$, 8.3 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$ and 13.7 s^{-1} respectively. Fe^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Triton X-100, SDS and Ag^+ dramatically reduced the enzymatic activity, and other metal ions or organic reagents have less effect. [Conclusion] Recombinant CatPLCgl has good temperature stability and alkali resistance.

Keywords: Catechol 1,2-dioxygenase, Fecal microbial metagenome, Heterologous expression, Thermal stability

芳香族化合物普遍存在于自然界中,是煤、石油等化石燃料的天然组成成分,植物体也可产生多种酚类次生代谢产物;此外,工业生产过程中也会产生大量结构复杂的芳香烃类化合物^[1]。芳香族化合物化学性质较稳定,难溶于水,因此一般很难消除,而且极低的含量即可对人体造成潜在、甚至强效的危害^[2]。目前,微生物降解是沉积环境中多环芳烃去除最主要的途径。芳香族化合物的微生物降解是逐级降解的过程,首先多环芳烃在加氧酶的作用下开环形成单环芳烃,如邻苯二酚、原儿茶酸和龙胆酸等中间代谢物;而单环芳烃又在加氧酶的作用下进一步开环降解;催化单环芳香烃氧化的双加氧酶主要包括邻苯二酚 1,2-

双加氧酶、邻苯二酚 2,3-双加氧酶、甲苯双加氧酶、苯甲酸 P 苯甲酸盐双加氧酶和原儿茶酸双加氧酶等,它们的主要作用是进一步降解苯的衍生物^[3]。

邻苯二酚作为其中一种重要的中间代谢产物,其生物降解主要通过邻苯二酚双加氧酶催化^[4]。邻苯二酚 1,2-双加氧酶属于内二元醇双加氧酶,它催化邻苯二酚转化为顺,顺-己二烯二酸,使其在后续酶促反应中可进一步被降解为琥珀酸和乙酰辅酶 A,并进入三羧酸循环,最终被降解为 H_2O 和 CO_2 ,因此邻苯二酚 1,2-双加氧酶在微生物降解多种芳香族化合物的过程中有着重要作用^[5]。此外,邻苯二酚的降解产物顺,顺-己二烯二酸可作为精细化工原

料用于生产特殊性能的工程塑料、树脂、尼龙等,以及合成抗菌素、抗阻胺剂、乳化剂等。目前,顺,顺-己二烯二酸的商业化生产主要是以芳香族化合物出发,通过有机化学合成获得,对环境会造成污染^[6]。可见,邻苯二酚 1,2-双加氧酶的开发利用具有重要意义。热稳定性的邻苯二酚 1,2-双加氧酶在一定温度条件下可长时间保持较高的酶活,在用于多环芳烃的降解及顺,顺-己二烯二酸的酶法生产方面有其优势。然而,目前利用常规微生物培养法获得的热稳定性好的邻苯二酚 1,2-双加氧酶较少,如来源于 *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2^[7]、*Candida albicans* TL3^[8]、*Acinetobacter* sp. Y64^[9]等的邻苯二酚 1,2-双加氧酶。

传统的微生物纯培养技术使得占微生物种类 99% 以上的不可培养微生物无法分离获得,因此通过分离培养微生物来筛选新型酶的传统方法大大限制了筛选的广泛性和有效性^[10-11]。宏基因组学避开了微生物分离培养的问题,极大地扩展了微生物资源的利用空间,为寻找和发现新的功能基因及生物催化剂——酶提供了新的研究策略^[12]。前期研究发现,与其他动物相比倭蜂猴粪便微生物宏基因组中存在更高丰度和多样性的芳香化合物代谢系统^[13]。本研究中,我们对已构建的宏基因组文库进行高通量测序,从中克隆得到一条邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *catPLCgl*,成功在大肠杆菌中进行异源表达,并研究其酶学性质。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

2×GC buffer I、LA-Taq 酶、dNTP Mix, 宝生物工程有限公司; Ni-NTA Agarose、Large-Construct Kit, QIAGEN 公司; 质粒提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; Zymo Genomic DNA Clean & Concentration Kit、Zymoclean Gel DNA Recovery KitTM, 北京天漠科技开发有限公司; 顺,顺-己二烯二酸标品、邻苯二酚标品, Sigma-Aldrich 公司。NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit、层析柱, NEB 有限公司; HiSeq 2000 高通量二代测序仪, Illumina

公司; 非接触式超声打断仪 Biorupter, 北京景晟科技有限公司; Agilent2100 生物分析仪, 安捷伦科技有限公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计、Qubit 荧光定量仪、Qubit DNA Quantification Kit, 赛默飞世尔科技有限公司; 纯水仪, 锐思捷科学仪器有限公司; 细胞超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 离心机, Eppendorf 公司; PCR 仪、核酸电泳仪、蛋白电泳仪及凝胶成像仪, 伯乐生命医学产品有限公司; 紫外分光光度计, 德国耶拿分析仪器股份公司; 超高效液相色谱仪, 沃特世科技有限公司。

1.2 样品、菌株和载体

菌株 *Escherichia coli* EPI300 和载体 pCC1FOS, EPICENTRE 公司; *Escherichia coli* BL21(DE3), Novagen 公司; 大肠杆菌表达载体 *pEASY-E2*, 北京全式金生物技术有限公司。

1.3 基因克隆

利用 QIAGEN Large-Construct Kit, 按试剂盒说明书步骤提取已构建的宏基因组文库的 Fosmid 混合质粒。用 NanoDrop 2000 对基因组文库进行质量鉴定, 初步检测其浓度及纯度; 用 Qubit 对基因组浓度进行准确定量。将 5 μg 的基因组 DNA 用非接触式超声打断仪 Biorupter 进行超声打断, 用 Zymo Genomic DNA Clean & Concentration Kit 对打断的 DNA 片段进行纯化, 纯化后用 NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit 将 DNA 片段的末端补平; 3'端加 A 碱基; DNA 片段末端加接头 Adapter; 终止反应; 对末端加过 A 碱基和接头的 DNA 片段进行纯化; 用 2% 的核酸电泳进行检测, 并对 400–600 bp 的 DNA 片段进行切胶回收, 选择片段大小为 500 bp 左右的 DNA 片段进行 PCR 扩增(操作按试剂盒说明书进行)。用 Agilent 2100 和 Qubit 对文库片段进行大小和浓度定量, -20 °C 保存备用。用 HiSeq 2000 DNA 测序仪对上述制备好的文库进行基因组测序。将基因组测序得到的数据用 Seqprep 和 Sickle 软件分别去除接头和质量剪切优化数据, 再使用 SOAPdenovo 1.05 (<http://soap.genomics.org.cn/>)

soapdenovo.html)对处理后的优化序列进行拼接组装,获得 Contig 和 Scaffold, 组装后的序列经开放读码框预测和本地 BLAST 比对, 将预测得到的结果与 NR 数据库进行比对得到注释信息, 从而可得到邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *catPLCgl*。

以上述宏基因组 Fosmid 文库混合质粒为模板, 使用引物对 WFCgl-C12OF (5'-ATGACTACGGGTA CAGACAATC-3')和 WFCgl-C12OR (5'-GTCCTCCT TGTCCAGTGCGAAG-3')进行 Touch-down PCR 扩增获得目的基因 *catPLCgl*。PCR 反应体系: 宏基因组文库的 Fosmid 混合质粒 0.5 μ L, 2 \times GC buffer I 25.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTP Mix 4.0 μ L, LA-Taq DNA Polymerase 1 U, 10 μ mol/L WFCgl-C12OF 1.0 μ L, 10 μ mol/L WFCgl-C12OR 1.0 μ L, ddH₂O 补足 50.0 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s (每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 1 min, 20 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 10 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。

1.4 序列分析

DNA 之间和蛋白质之间的在线比对分别使用 BLASTn 和 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。信号肽的预测使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)^[14]。蛋白二级结构分析使用 NPS@:SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)^[15]。蛋白分子 3D 同源建模使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)^[16-18]。多序列比对使用 MEGA 6.0, 多序列比对结果美化使用 ESPript 3.0 (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)^[19]。

1.5 酶重组表达系统的构建

以宏基因组文库 Fosmid 混合质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将 PCR 扩增得到的基因 *catPLCgl* 与表达载体 *pEASY-E2* 连接得到重组质粒 *pEASY-E2/catPLCgl*, 然后转化大肠杆菌 BL21(DE3) 获得重组大肠杆菌菌株 BL21(DE3)/*catPLCgl*。将获得的重组大肠杆菌菌株 BL21(DE3)/*catPLCgl* 送至金唯智基因测序中心测序验证序列。

1.6 蛋白的表达与纯化

取含有重组表达载体 *pEASY-E2/catPLCgl* 的大肠杆菌菌株 BL21(DE3)/*catPLCgl*, 以 0.1% 的接种量接种于 LB (含 100 mg/L Amp) 培养液中^[20], 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 16 h。然后将活化的菌液以 1% 接种量接种到新鲜的 LB (含 100 mg/L Amp) 培养液中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养约 2–3 h (OD_{600} 达到 0.6–1.0) 后, 加入终浓度 0.7 mmol/L 的 IPTG 诱导, 于 20 $^{\circ}$ C、160 r/min 继续振荡培养约 20 h。9 500 r/min 离心 5 min, 收集菌体。用适量的 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液悬浮菌体后, 于冰浴条件下超声波破碎菌体(300 W, 超声 5 s, 间隔 7 s)。经 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 后, 吸取上清并用 Ni-NTA Agarose 纯化含 6 \times His-tag 的目的蛋白邻苯二酚 1,2-双加氧酶, 将纯化后的蛋白进行 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.7 邻苯二酚的降解产物分析

取 20 μ L 150 mmol/L 的邻苯二酚底物溶液和 2.93 mL 50 mmol/L 缓冲液, 加入 50 μ L 适当稀释的纯化酶, 混匀。以不加酶反应体系作为对照组, 间隔 5 min 扫描反应体系在 230 nm–300 nm 波长范围内的吸光值, 检测反应体系吸光值的变化。

在 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度为 10 g/L 的邻苯二酚和 50 μ L 纯化的重组酶, 总反应体积 3 mL, 以不加酶相同处理作为对照组。在 37 $^{\circ}$ C 的水浴锅中反应 1 h 后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 3 kD 的滤膜超滤, 去除杂质后进行 UPLC 分析。UPLC 检测条件: 色谱柱选用 Agilent zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇/水溶液(2/8), 进样量 2 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 0.4 mL/min, PDA 检测器, 检测波长 270 nm。

1.8 酶学性质分析

1.8.1 酶活性测定方法采用分光光度法^[21]: 取 10 μ L 150 mmol/L 邻苯二酚底物溶液(终浓度为 0.5 mmol/L) 和 2.94 mL 50 mmol/L 缓冲液在反应温度下预热 3 min, 加入 50 μ L 适当稀释的酶液反应 5 min, 立即在 260 nm 波长下测定 OD 值。1 个酶活单位(U)定义

为在给定的条件下每分钟催化底物生成 1 μmol 相应产物所需的酶量, 产物顺,顺-己二烯二酸在 260 nm 处的摩尔消光系数为 16 800 L/(mol·cm)。

1.8.2 酶最适底物测定: 将纯化的重组酶分别与 0.5 mmol/L 的邻苯二酚[260 nm, 16 800 L/(mol·cm)]、3-甲基邻苯二酚[260 nm, 18 000 L/(mol·cm)]、4-甲基邻苯二酚[255 nm, 14 300 L/(mol·cm)]、4-氯基邻苯二酚[259 nm, 12 500 L/(mol·cm)]、对苯二酚[320 nm, 11 000 L/(mol·cm)]进行反应, 分别测定不同浓度的底物(5–50 $\mu\text{mol/L}$)的酶活, 计算比活。

1.8.3 酶最适 pH 及 pH 稳定性测定: 将纯化的重组酶在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下和 pH 2.2–10.0 的缓冲液中进行酶促反应, 测定最适 pH。将纯化的酶液置于 pH 4.0–10.0 的缓冲液中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 1 h, 然后在 pH 7.0 及 40 $^{\circ}\text{C}$ 下进行酶促反应, 以未处理的酶液作为对照, 测定 pH 稳定性。缓冲液为: 50 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 2.2–8.0); 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0–9.0); 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH (pH 9.0–10.0)。

1.8.4 酶最适温度及热稳定性测定: 在 pH 7.0 的缓冲液中, 于 0–60 $^{\circ}\text{C}$ 下进行酶促反应, 测定最适温度。将同样酶量的酶液置于设定的温度(30、40、50 或 60 $^{\circ}\text{C}$)中处理 1 h, 或置于设定的温度(25 $^{\circ}\text{C}$ 和 40 $^{\circ}\text{C}$)中处理 210 h 后, 在 pH 7.0 及 40 $^{\circ}\text{C}$ 下进行酶促反应, 以未处理的酶液作为对照, 测定热稳定性。

1.8.5 动力学参数测定: 在 pH 7.0、温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 和一级反应时间下以不同浓度的邻苯二酚为底物(5–50 $\mu\text{mol/L}$)进行测定, 根据 Lineweaver-Burk 法计算出 K_m 、 V_{\max} 和 k_{cat} 值。

1.8.6 酶的金属离子和化学试剂抗性测定: 在酶促反应体系中加入终浓度为 1 mmol/L 的 Ag^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Al^{3+} 、EDTA、SDS、 β -Mercaptoethanol 和终浓度为 0.5% (体积比)的 Triton X-100、Tween-80 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 和 pH 7.0 条件下, 测定酶活, 以不含金属离子和有机试剂的反应体系作为对照。

1.9 基因登录号

catPLCgl 收录于 GenBank 数据库, 登录号为

KU971297。

2 结果与分析

2.1 基因克隆和序列分析

含有重组表达载体 *pEASY-E2/catPLCgl* 的大肠杆菌菌株 BL21(DE3)/*catPLCgl*, 基因全长 852 bp, 初始密码子 ATG, 终止密码子 TGA, G+C 含量 48%, 编码 283 个氨基酸, 理论分子量为 33.56 kD, 理论等电点 6.06, 不含信号肽, 序列分析结果显示与 NCBI 收录的邻苯二酚 1,2-双加氧酶氨基酸序列 (WP_038549328) 最高相似性为 95%, 但未见其酶学性质报道。氨基酸序列预测显示 *CatPLCgl* 中 α -螺旋、 β -折叠以及无规则卷曲含量分别为 21.91%、22.26% 和 43.46%, 与 NCBI 数据库收录的部分邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因进行多序列比对分析(图 1), *CatPLCgl* 含有 5 个 α -螺旋的 N-末端结构域和含 β -折叠的 C-末端结构域的邻苯二酚 1,2-双加氧酶典型结构, 以及典型的 Fe^{3+} 结合位点 Tyr-165、Tyr-199、His-223 和 His-225。

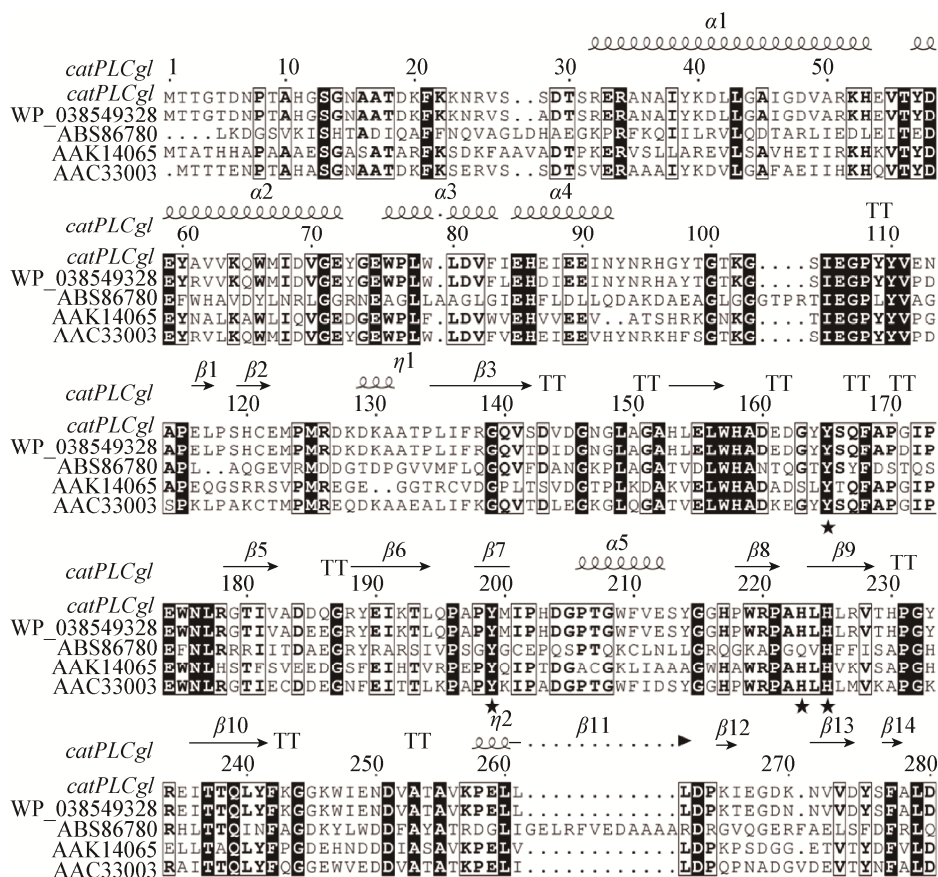
2.2 重组酶的异源表达与纯化

重组质粒 *pEASY-E2/catPLCgl* 成功转化大肠杆菌 BL21(DE3), 阳性克隆子经测序验证正确并在超声波破碎细胞液中得到含有重组 *CatPLCgl* 的上清粗酶液。经 Ni-NTA Agarose 树脂纯化后, 纯化的重组 *CatPLCgl* 达到 SDS-PAGE 电泳纯, 并具有邻苯二酚 1,2-双加氧酶酶活(图 2), 重组 *CatPLCgl* 理论分子量为 33.56 kD, 实际分子量和理论分子量大小相符。

2.3 重组酶氧化邻苯二酚产物分析

将纯化得到的目的蛋白与含有邻苯二酚的缓冲液混合, 在 230–300 nm 波长范围内进行扫描; 随着反应的进行, 吸收峰在 255–260 nm 处不断增加, 与理论一致, 初步确定邻苯二酚的氧化产物为顺,顺-己二烯二酸(图 3A)。

UPLC 分析结果显示反应体系中有两个明显的峰(图 3D), 分别与邻苯二酚标品(图 3B)和顺,顺-己二烯二酸标品(图 3C)的峰相对应, 表明邻苯二酚的氧化产物确为顺,顺-己二烯二酸。

图1 *catPLCgl* 的多序列比对分析Figure 1 Multiple sequence alignment analysis of *catPLCgl*

注：图中的序列来自于 NCBI 相似性比对的结果，并使用 ClustalW 排列，再用 ESPrnt 软件输出。其中 WP_038549328 来自于 *Corynebacterium glyciniphilum*；ABS86780 来自于 *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2；AAK14065 来自于 *Streptomyces griseus*；AAC33003 来自于 *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13259；五角星标记的位置属于 Fe^{3+} 结合位点。

Note: Sequences retrieved from the NCBI server were aligned in ClustalW and rendered using ESPrnt output. WP_038549328 stem from *Corynebacterium glyciniphilum*; ABS86780 stem from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2; AAK14065 stem from *Streptomyces griseus*; AAC33003 stem from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13259; Five-pointed star indicate amino acid residues belonging to the Fe^{3+} binding site.

2.4 重组酶学性质

2.4.1 最适底物：在 pH 7.0 及 40 °C 下，重组 CatPLCgl 对邻苯二酚的比活为 8.3 U/mg，对 4-甲基邻苯二酚和 3-甲基邻苯二酚的比活分别为 1.5 U/mg 和 6.9 U/mg，对 4-氯基邻苯二酚和对苯二酚无酶活。

2.4.2 最适 pH 及 pH 稳定性：以邻苯二酚为底物，重组 CatPLCgl 的最适 pH 为 7.0，在 pH 6.0–9.0 之间可以保持 58% 以上酶活(图 4A)；经 pH 7.0–10.0 的缓冲液处理 1 h 后，酶活剩余 90% 以上(图 4C)。

2.4.3 最适温度及热稳定性：最适温度为 40 °C，在 0–60 °C 范围内有活性，在 0 °C 和 10 °C 分别具有约 12% 和 20% 的酶活(图 4B)；在 30 °C 和

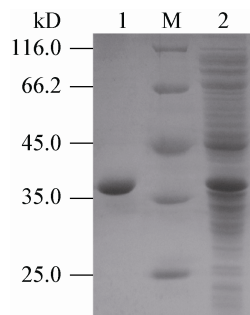


图2 大肠杆菌中表达的重组酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of recombinant CatPLCgl

注：1：重组 CatPLCgl 纯化蛋白；M：蛋白 Marker；2：重组质粒表达。

Note: 1: Recombinant CatPLCgl purified protein; M: Protein molecular weight marker; 2: Total proteins of *E. coli* BL21(DE3) harboring the recombinant plasmid *pEASY-E2/catPLCgl*.

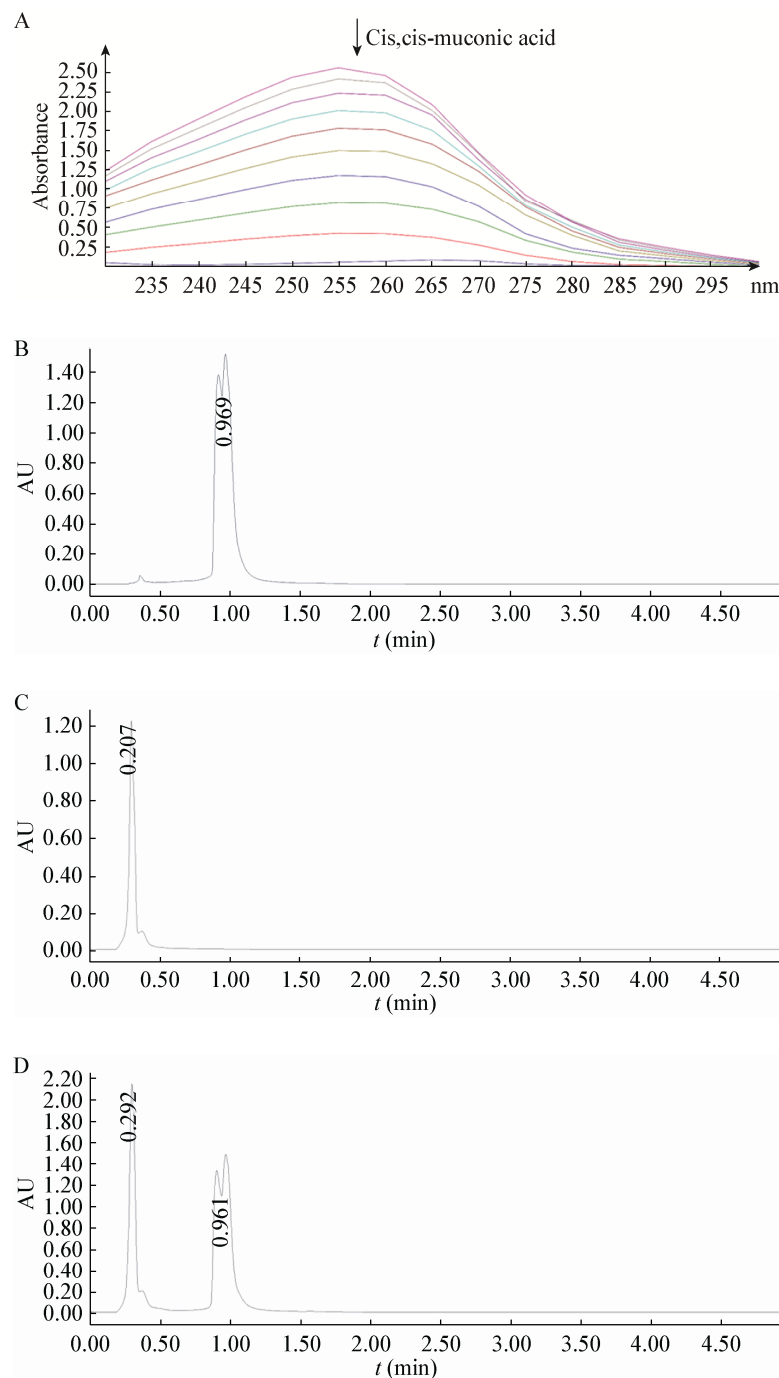


图3 重组酶降解产物分析

Figure 3 The analysis of degradation product of recombinant CatPLCgl

注: A: 邻苯二酚在重组 CatPLCgl 作用下转化为顺,顺-己二烯二酸, 每间隔 5 min 在 260 nm 处测定一次产物顺,顺-己二烯二酸的吸光值; B: 邻苯二酚标品; C: 顺,顺-己二烯二酸标品; D: 邻苯二酚被重组 CatPLCgl 转化为顺,顺-己二烯二酸.

Note: A: With the effect of recombinant CatPLCgl, catechol was transformed into cis,cis-muconic acid. The reaction was initiated by the addition of 1 mmol/L catechol, followed by measuring the absorbance at 260 nm at time intervals of 5 min (up to 50 min). The black arrows point to the cis,cis-muconic acid; B: The results of UPLC analyses catechol standard sample; C: The results of UPLC analyses cis,cis-muconic acid standard sample; D: The results of catechol was degraded into cis,cis-muconic acid after incubation with recombinant CatPLCgl.

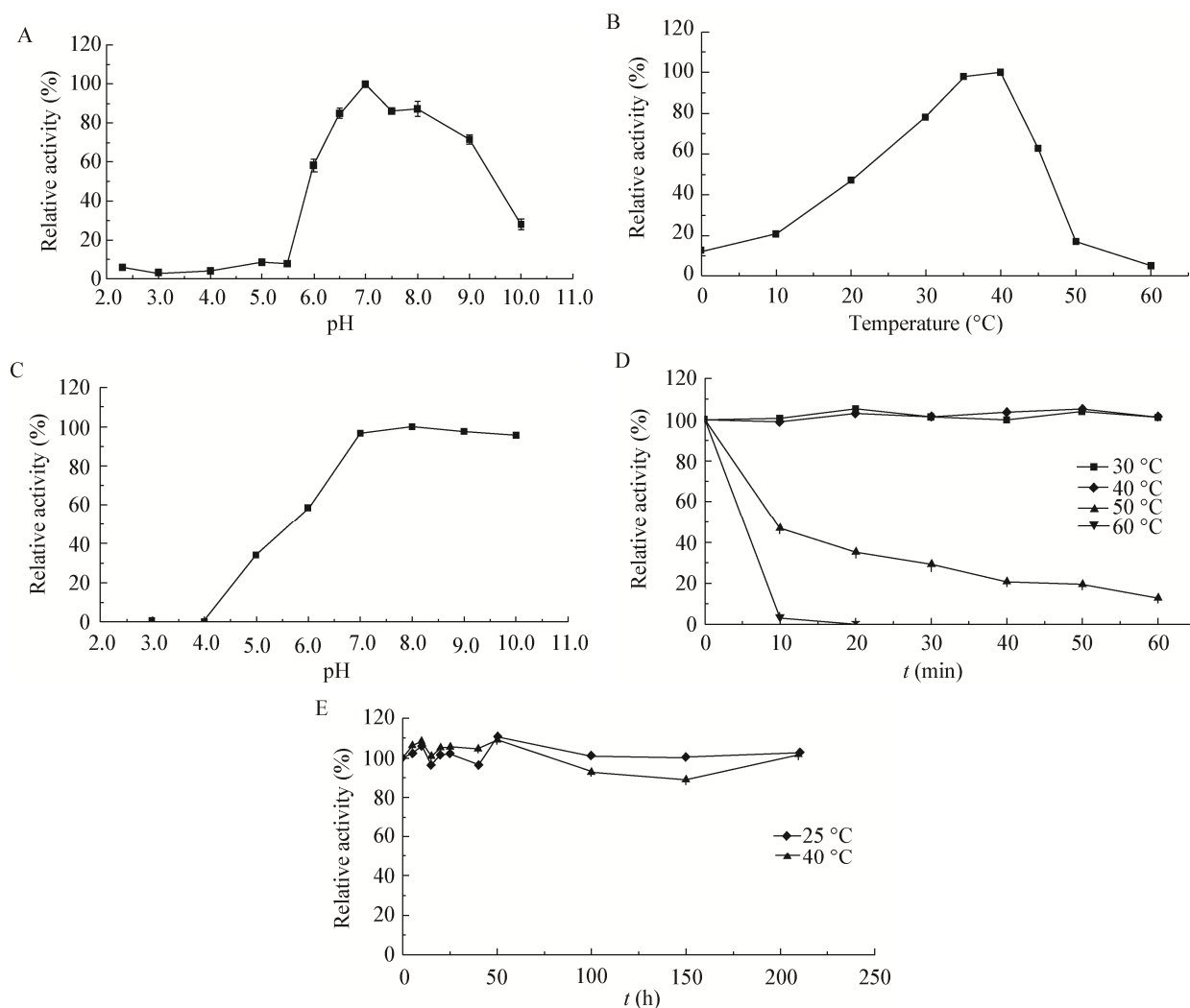


图4 重组酶酶学性质分析

Figure 4 Characterization analysis of recombinant CatPLCgl

注: A: 最适 pH; B: 最适温度; C: pH 稳定性; D: 温度稳定性; E: 温度稳定性, 重组酶在 25 °C 和 40 °C 分别耐受 210 h.

Note: A: Effect of pH on recombinant CatPLCgl; B: Effect of temperature on recombinant CatPLCgl; C: pH stability of recombinant CatPLCgl; D: Thermostability of recombinant CatPLCgl; E: Thermostability of recombinant CatPLCgl. The enzyme was incubated for 210 h at 25 °C and 40 °C.

40 °C 条件下耐受 1 h, 仍保持 100%酶活; 50 °C 条件下耐受 10 min, 剩余酶活约 46% (图 4D); 在 25 °C 和 40 °C 条件下耐受 210 h 对酶活性基本无影响 (图 4E)。

2.4.4 动力学参数: 在 pH 7.0 及温度 40 °C 条件下, 该酶的 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 分别为 24.9 $\mu\text{mol/L}$ 、8.3 $\text{mmol}/(\text{min}\cdot\text{g})$ 和 13.7 s^{-1} 。

2.4.5 金属离子和化学试剂抗性: 1 mmol/L SDS 和 Ag^+ 完全抑制重组 CatPLCgl 的酶活性, Fe^{2+} 、

Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、Triton X-100 对该酶有很强的抑制作用, 其余金属离子和化学试剂对重组酶的影响较小 (表 1)。

3 讨论

本研究得到了来自倭蜂猴粪便宏基因组文库的邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *catPLCgl*, 并研究其重组酶酶学性质。获得的重组 CatPLCgl 对邻苯二酚类污染物表现出了较强活性, 并可促使邻苯二酚开环生成顺,顺-己二烯二酸。序列分析显示, 酶具

表 1 金属离子及化学试剂对重组酶的活力影响
Table 1 Effect of various metal ions and chemical agents on enzyme activity

离子 Reagent	相对酶活 Relative activity (%)
None	100.0±3.7
Fe ³⁺	118.6±5.7
Mg ²⁺	113.0±4.0
Na ⁺	112.7±1.9
K ⁺	111.8±5.8
Ca ²⁺	111.6±4.2
Li ⁺	109.7±4.4
Pb ²⁺	108.5±6.3
Zn ²⁺	107.5±4.5
Co ²⁺	105.8±0.3
Al ³⁺	103.7±7.5
Ni ²⁺	103.1±7.3
Mn ²⁺	93.4±1.2
Fe ²⁺	32.2±4.7
Hg ²⁺	18.4±3.0
Cu ²⁺	11.5±5.0
Ag ⁺	0.0±0.0
β-Mercaptoethanol	110.3±1.3
EDTA	98.4±2.4
Tween-80 (0.5%, V/V)	81.1±5.0
Triton X-100 (0.5%, V/V)	9.4±1.3
SDS	0.0±0.0

有典型的含 5 个 α-螺旋的 N-末端结构域和 β-折叠的 C 末端结构域的邻苯二酚 1,2-双加氧酶结构, NCBI 比对结果显示最高序列一致性为 95%, 但未见酶学性质研究报道。底物动力学参数显示, 重组酶对 3-甲基邻苯二酚和 4-甲基邻苯二酚有较高活性, 而对 4-氯基邻苯二酚几乎没有活性; 已报道的研究显示^[12], 邻苯二酚 1,2-双加氧酶可分为 I 型和 II 型两种类型, II 型基因主要出现在氯代芳香族化

合物的降解途径中, 而 I 型基因几乎对氯代邻苯二酚没有降解能力, 因此所获得的重组酶为 I 型邻苯二酚 1,2-双加氧酶。

与其它微生物来源的邻苯二酚 1,2-双加氧酶进行比较(表 2), 重组 CatPLCgl 最适 pH 为 7.0, 与已报道的 *Pseudomonas aeruginosa*^[22]、*Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2^[7]、*Candida albicans* TL3^[8]等来源的邻苯二酚 1,2-双加氧酶最适 pH 相似; 最适温度为 40 °C, 与已报道的 *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 和 *Pseudomonas aeruginosa* 相似, 但比 *Candida albicans* TL3、*Rhodococcus* sp. NCIM 2891^[23]来源的邻苯二酚 1,2-双加氧酶相对较高; 在 0–60 °C 范围内有酶活, 具有中低温酶活性, 温度范围与 *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 相似, 但比 *Streptomyces setonii*^[24]温度范围广。温度稳定性研究发现, 重组 CatPLCgl 表现出了较好的耐热性, 在 40 °C 条件处理 210 h 后酶活性几乎不变, 与 *Candida albicans* TL3 和 *Rhodococcus* sp. NCIM 2891 相似, 而 *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 在 30 °C 半衰期为 3 h, *Acinetobacter* sp. Y64^[9]在 37 °C 处理 2 h 酶活损失 10%。此外重组 CatPLCgl 还表现出了较好的耐碱性, 在 pH 7.0–10.0 的碱性条件下处理 1 h, 酶活剩余 90%以上, 比来源于 *Candida albicans* TL3 和 *Rhodococcus* sp. NCIM 2891 的具有温度稳定性的邻苯二酚 1,2-双加氧酶具有更强的耐碱性(表 2)。

综上所述, 宏基因组来源的重组 CatPLCgl 兼有温度稳定性和耐碱特性。结合重组 CatPLCgl 表现出的热稳定性和耐碱性可将其尝试用于芳香烃环境污染物的进一步降解和工业化生产顺,顺-己二烯二酸, 然而目前得到的重组 CatPLCgl 耐酸性不够好。因此, 可通过分子定向进化技术改造出耐受范围更广、可降解底物范围更广、稳定性更好、降解效率更高的邻苯二酚 1,2-双加氧酶, 以扩大其实际应用领域。

表 2 不同来源的邻苯二酚 1,2-双加氧酶学性质
Table 2 Characterizations of partial catechol 1,2-dioxygenase from various sources

名称 Name	来源 Origin	革兰氏 Gram	理论分子量 Molecular mass (kD)	米氏常数 K_m ($\mu\text{mol/L}$)	最适温度 Optimal temperature ($^{\circ}\text{C}$)	最适 pH Optimal pH	温度特性 Temperature characteristic	pH 特性 pH characteristic	底物特异性 Substrate specificity	文献 Reference
C120	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain KB2	G ⁻	34.50	12.8	40 (4-60)	8.0	Half-life of the enzyme at 40 $^{\circ}\text{C}$ was 3 h	—	Catechol 3-Methylcatechol 4-Methylcatechol	[7]
C120	<i>Candida albicans</i> TL3	—	31.00	9.3	25	8.0	Stable when temperature lower than 40 $^{\circ}\text{C}$ after activity at least 30 min	Maintaining >85% activity at least 30 min at the pH range of 7.0-9.0	Catechol 4-Methylcatechol	[8]
C120	<i>Acinetobacter</i> sp. Y64	G ⁻	36.00	17.5	37	7.7	Stable at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 5 h and lost 10% activity after 2 h	Stable at pH 7.0 and 8.0 and lost only 18% of its activity after 6 h	Catechol 3-Methylcatechol 4-Methylcatechol 4-Nitrocatechol 1,2,4-Benzenetriol	[9]
C120	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TKU002	G ⁻	22.00	5.9	40	7.0	Stable at 40 $^{\circ}\text{C}$ after 1 h and retained 10% after treatment at 50 $^{\circ}\text{C}$	Stable at the pH range of 7.0-9.0 after treatment at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h	Catechol 3-Methylcatechol 4-Methylcatechol 4-Chlorocatechol Pyrogallol	[22]
C120	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIM 2891	G ⁺	30.00	5.0	30	7.5	Stable when temperature lower than 40 $^{\circ}\text{C}$	Activity remains up to >80% for 30 min between pH range of 7.0-9.0	—	[23]
<i>catA</i>	<i>Streptomyces setonii</i> ATCC 39116	G ⁺	—	1.8	45 (25-65)	—	—	—	Catechol 3-Methylcatechol 4-Methylcatechol	[24]
CatPLCgl	Uncultured microorganisms	—	33.56	24.9	40 (0-60)	7.0	Stable at 25 $^{\circ}\text{C}$ and 40 $^{\circ}\text{C}$ after 210 h	Activity remains up to >90% for 1 h between pH range of 7.0-10.0	Catechol 3-Methylcatechol 4-Methylcatechol	This study

参 考 文 献

- [1] Zhang J, Xia CG. Studies of structure and function of aromatic hydrocarbon dioxygenases[J]. Progress in Chemistry, 2004, 16(1): 116-122 (in Chinese)
章俭, 夏春谷. 芳香烃双加氧酶的结构与功能研究[J]. 化学进展, 2004, 16(1): 116-122
- [2] Xu BW, Li SY, Zhang Q, et al. Advance in research on bacterial aromatic extradiol dioxygenase[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(5): 873-879 (in Chinese)
许炳雯, 李诗阳, 张强, 等. 细菌芳烃外二醇双加氧酶研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(5): 873-879
- [3] Guo CL, Zheng TL. Biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Marine Environmental Science, 2000, 19(3): 24-29 (in Chinese)
郭楚玲, 郑天凌. 多环芳烃的微生物降解与生物修复[J]. 海洋环境科学, 2000, 19(3): 24-29
- [4] Zhou XM, Chen JJ, Geng LZ, et al. Advances in study on structure and function of catechol 2,3-dioxygenase[J]. Biotechnology Bulletin, 2007(4): 51-54 (in Chinese)
周鑫森, 陈洁君, 耿立召, 等. 邻苯二酚 2,3-双加氧酶的结构和功能研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(4): 51-54
- [5] Yoon JH, Kang SS, Cho YG, et al. *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(6): 2173-2180
- [6] Polen T, Spelberg M, Bott M. Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(2): 75-84
- [7] Guzik U, Hupert-Kocurek K, Sitnik M, et al. High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in *cis*, *cis*-muconic acid production[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2013, 103(6): 1297-1307
- [8] Tsai SC, Li YK. Purification and characterization of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Candida albicans* TL3[J]. Archives of Microbiology, 2007, 187(3): 199-206
- [9] 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
- [10] Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics—the key to the uncultured microbes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7(5): 492-498
- [11] Schmeisser C, Steele H, Streit WR. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(5): 955-962
- [12] Harayama S, Kok M, Neidle EL. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases[J]. Annual Review of Microbiology, 1992, 46(1): 565-601
- [13] Xiong CY, Xu B, Dai LM, et al. Analysis gene diversity of phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase from fecal microbiome of *Nycticebus pygmaeus*[J]. Microbiology China, 2015, 42(11): 2189-2197 (in Chinese)
熊彩云, 许波, 戴利铭, 等. 倭蜂猴粪便微生物苯酚羟化酶和邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因多样性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2189-2197
- [14] Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786
- [15] Sapay N, Guermeur Y, Deléage G. Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7(1): 255
- [16] Berman HM, Westbrook J, Feng ZK, et al. The protein data bank[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 235-242
- [17] Guex N, Peitsch MC, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective[J]. Electrophoresis, 2009, 30(S1): S162-S173
- [18] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1): W252-W258
- [19] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1): W320-W324
- [20] Sambrook J, Russell DW, Maccallum P, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [21] Wojcieszynska D, Guzik U, Greń I, et al. Induction of aromatic ring: cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(4): 805-811
- [22] Wang CL, You SL, Wang SL. Purification and characterization of a novel catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(7): 1594-1601
- [23] Nadaf NH, Ghosh JS. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. NCIM 2891[J]. Research Journal of Environmental and Earth Sciences, 2011, 3(5): 608-613
- [24] An HR, Park HJ, Kim ES. Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (*catA*) from *Streptomyces setonii*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 195(1): 17-22