

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54(9):1063–1072; 4 September 2014  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicroen  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.011

## 柴油食烷菌 B-5 及其卤代烷烃脱卤酶 DadA 对卤代化合物的降解

李安章<sup>1,2</sup>, 邵宗泽<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005

<sup>2</sup>国家海洋局第三海洋研究所, 厦门市海洋生物遗传资源重点实验室——省部共建重点实验室培育基地; 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室; 福建省海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005

**摘要:**【目的】柴油食烷菌(*Alcanivorax dieselolei*) B-5 是重要的石油降解菌。为研究其对卤代化合物的降解范围和降解机制,【方法】以不同的卤代化合物作为唯一碳源, 观察菌株 B-5 在其中的生长情况; 通过多重序列比对、系统发育分析和三维结构同源建模, 分析该菌株基因组内一个假定的卤代烷烃脱卤酶(Haloalkane dehalogenase, HLD) DadA; 利用大肠杆菌异源表达、纯化 DadA, 并测定了其对 46 个卤代底物的酶活。【结果】菌株 B-5 能够利用 C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> 链长范围的多种卤代化合物为唯一碳源生长; 在系统进化树中, DadA 相对独立于其他 HLD-II 亚家族成员, 但具有典型的 HLD-II 亚家族的催化五联体残基; DadA 确实具有脱卤活性, 但该酶特异性高, 底物范围明显小于其他已鉴定的 HLDs, 仅对 1,2,3-三溴丙烷、1,2-二溴-3-氯丙烷和 2,3-二氯-1-丙烯有脱卤酶活。【结论】因为 DadA 对很多 B-5 菌株可以利用做碳源的卤代底物没有脱卤酶活, 所以推测 B-5 菌中可能还有其他脱卤酶参与了卤代烷烃的降解。菌株 B-5 及其卤代烷烃脱卤酶 DadA 在卤代烷烃污染物的生物降解方面具有应用潜力。

**关键词:** 生物降解, 石油降解菌, 柴油食烷菌 B-5, 卤代化合物, 卤代烷烃脱卤酶

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209(2014)09-1063-10

卤代烷烃是重要的环境污染物<sup>[1]</sup>。食烷菌(*Alcanivorax*) 是一类重要的海洋石油烃降解菌<sup>[2]</sup>。最近发现, 食烷菌是北冰洋表层海水中降解 1-氯代十六烷的优势种属之一<sup>[3]</sup>。初步试验表明, 多株食烷菌都能够在以氯代十六烷为唯一碳源的天然海水培养基中生长<sup>[4]</sup>。目前其对卤代化合物的利用范围和代谢途径尚不清楚。

脱卤是微生物利用卤代烃的重要步骤。卤代烷烃脱卤酶(Haloalkane dehalogenase, HLD) 属于  $\alpha/\beta$ -水解酶超家族, 利用由 5 个残基组成的催化五联体来水解卤代化合物的碳卤键, 是降解卤代脂肪族污染物的关键酶类<sup>[5]</sup>。目前已经从上百个物种的基因组中发现了假定的 HLD 序列, 但是实验鉴定过的 HLDs 全部来自于细菌。某些 HLDs 分离自被卤代

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(41106151, 41176154); 海洋公益性项目(201005032)

\* 通信作者。Tel: + 86-592-2195321; Fax: + 86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

**作者简介:** 李安章(1984-), 男, 山东青岛人, 博士研究生, 研究方向为海洋环境微生物。E-mail: anzhangL@163.com

**收稿日期:** 2013-12-10; **修回日期:** 2014-03-26

底物污染过的土壤中的细菌,已被证明参与了这些重要的环境污染物的生物降解途径,并使其宿主菌能够利用这些化合物作为碳源<sup>[6-9]</sup>,而更多的 HLDs 在宿主菌内的生物学功能和所参与的代谢途径仍然未知<sup>[10-13]</sup>。

根据系统发育分析,HLD 家族被划分为 3 个进化亚家族 HLD-I, HLD-II 和 HLD-III,它们采用不同的催化五联体残基<sup>[14]</sup>。目前大多数已鉴定的 HLDs 都属于 HLD-II 亚家族。已鉴定的 HLDs 的底物范围普遍较广,包括氯代、溴代和碘代的链长范围从 C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> 之间的烷烃、环烷烃、烯烃、醇、醚、腈、酮、酯、环二烯和氨基化合物等<sup>[15]</sup>。Koudelakova 等选择了 30 种典型底物来对 HLD 的底物特异性进行统计学分析,并将 HLD 划分为 4 个酶活特异性亚家族<sup>[16]</sup>。HLD 的酶活特异性亚家族和进化亚家族之间并不匹配,事实上,影响 HLD 的底物特异性的因素非常复杂,包括活性位点和底物进出通道的大小和结构、蛋白质表面电荷分布、蛋白质在水相溶液中的稳定性和蛋白质动力学等<sup>[15]</sup>。

柴油食烷菌 (*Alcanivorax dieselolei*) B-5 是本课题组从渤海表层海水中分离鉴定的一株石油烃降解菌<sup>[17]</sup>。前期的全基因组测序草图中有一个开放阅读框 B5T\_02249 被注释为卤代烷烃脱卤酶<sup>[18]</sup>。此基因由 885 个核苷酸组成,编码一个含有 294 个氨基酸残基的蛋白质,本文中将其命名为 *dadA*。

本文初步研究了 B-5 对卤代化合物的利用范围,通过生物信息学方法分析了 *DadA* 的催化机制及其在 HLD 家族中的分类地位,并使用大肠杆菌异源表达纯化 *DadA* 以进行酶活测定实验。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和引物:** *A. dieselolei* B-5<sup>T</sup> (MCCC1A00001) 保存于中国海洋微生物菌种保藏管理中心 (MCCC)。*Escherichia coli* 菌株 DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3) 购自天根公司。表达载体质粒 pGEX-4T-1 购自 GE Healthcare 公司。根据 *dadA* 序列 (NCBI YP\_006820866.1) 设计如下引物以扩增 *dadA* 基因: 上游引物, 5'-AAGGAGATATACATATGCTCAGAGAACAACCTCCCC-3'; 下游引物, 5'-GGTGGTGGTGCTCGAGCGAATTGGATAGGGCCT-3'。

**1.1.2 溶液和培养基:** (1) 乳糖自诱导培养基: 酵母膏 24 g, 蛋白胨 12 g, NaCl 5 g, 琥珀酸钠 5 g, 甘油 20 mL, 乳糖 5 g, 二水柠檬酸钠 5.88 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.8 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 17.91 g, 加超纯水至 1 L, pH 7.4, 121℃ 湿热灭菌 15 min, 使用前添加 0.2% (V/V) 的葡萄糖/MgSO<sub>4</sub> 母液。(2) 葡萄糖/MgSO<sub>4</sub> 母液: 葡萄糖 25 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 12.3 g, 加超纯水至 100 mL, 过滤除菌。(3) 人工海水培养基 (MMC): NaCl 24 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g, KCl 0.7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g, 加超纯水至 1 L, pH 7.4, 121℃ 湿热灭菌 20 min, 使用前添加适量的微量元素混合液。(4) 微量元素混合液: CaCl<sub>2</sub> 2 mg, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 50 mg, CuSO<sub>4</sub> 0.5 mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.5 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg, 加超纯水至 1 L, 过滤除菌。(5) 硫氰酸汞溶液: 硫氰酸汞 0.3 g, 溶于 100 mL 95% 的乙醇。(6) 硫酸铁铵溶液: 硫酸铁铵 6 g, 溶于 100 mL 6 mol/L 的硝酸中。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 酶活测定所用卤代底物详见表 1。Exonuclease III 核酸外切酶、*Bam*H I、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (高保真酶) 购自 TaKaRa 公司; Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 购自 GE Healthcare。主要仪器包括 SpectraMax M5 型酶标仪 (Molecular Devices)、GS-800 光密度分析仪/扫描仪 (Bio-Rad)。

### 1.2 B-5 菌对卤代底物的利用情况

在 MMC 液体培养基中,按 0.5% (V/V) 的比例添加不同卤代烷烃作为唯一碳源,接种制备好的 B-5 菌液,28℃ 恒温摇床中振荡培养 14 d,期间对挥发太快的某些底物根据其残余量进行了补加。

在含 MMC 固体培养基的培养皿上涂布制备的 B-5 菌液,在倒翻过来的培养皿盖子上放置一片滴加了 200  $\mu$ L 不同卤代底物的无菌滤纸片,用封口膜不完全密闭后以倒置状态放于 28℃ 培养箱内培养 14 d,期间对某些明显干掉的滤纸片补加了底物。

### 1.3 表达载体构建

提取 B-5 菌的基因组并以之为模板扩增 *dadA* 基因。使用 *Bam*HI 对 pGEX-4T-1 进行酶切线性化。将 *dadA* 基因和线性化质粒进行琼脂糖凝胶电泳和胶回收纯化。使用 LIC 法 (ligation-independent cloning) 构建表达载体。DNA 测序表明表达载体中阅读框未发生突变。

表 1. DadA 酶活测定所用的 46 种卤代底物

Table 1. 46 halogenated substrates used in activity determination of DadA

substrates	brand	purity/%	substrates	brand	purity/%
1-chlorohexane	Aldrich	99	1-bromo-2-chloroethane	Aldrich	98
1-bromohexane	Aldrich	98	4-bromobutanenitrile	Alfa Aesar	97
1-iodopropane	Aldrich	99	1,2,3-tribromopropane	Aldrich	97
1-iodobutane	Aldrich	99	1,2-dibromo-3-chloropropane	TCI	>98 (GC)
1-iodohexane	Aldrich	≥98	3-chloro-2-methylprop-1-ene	Aldrich	98
1,2-dichloroethane	Fluka	≥99.5	2,3-dichloroprop-1-ene	Aldrich	98
1,3-dichloropropane	Aldrich	99	1,2,3-trichloropropane	Aldrich	99
1,5-dichloropentane	Aldrich	99	1-chloro-2-methylpropane	TCI	>95.0 (GC)
1,2-dibromoethane	TCI	>99	1,3-dichloropropene	TCI	>92.0 (GC)
1,3-diiodopropane	Aldrich	99	1,2,3-trichloropropene	TCI	>95.0 (GC)
2-iodobutane	Aldrich	99	1-chlorododecane	Aldrich	≥97 (GC)
1,2-dichloropropane	Fluka	≥99	trichloromethane	SCRC	≥99.8
1,2-dibromopropane	Aldrich	97	1-chloro-3-nitrobenzene	Aldrich	>98
chlorocyclohexane	Aldrich	99	4-bromodiphenyl ether	Aldrich	99
bromocyclohexane	Aldrich	98	decabromodiphenyl	Aldrich	98
dichloromethane	SCRC	≥99.9	trichloroacetic acid	Sigma	>99
chlorocyclopentane	Aldrich	99	1-chloro-2-(2-chloroethoxy) ethane	Fluka	≥99 (GC)
1-chlorooctane	Aldrich	99	1-bromo-3-chloropropane	Sigma	99
1-chlorodecane	Aldrich	98	1,3-dibromopropane	Dr. Ehrenstorfer	100
1-chlorotetradecane	Aldrich	98	2-bromo-1-chloropropane	Dr. Ehrenstorfer	99
1-chlorohexadecane	Aldrich	95	(bromomethyl) cyclohexane	Aldrich	99
1-bromohexadecane	Aldrich	97	1-chlorobutane	Sigma-Aldrich	99.5
1-chlorooctadecane	Aldrich	96	1-bromobutane	Sigma-Aldrich	99

1.4 蛋白质表达与纯化

将 pGEX-4T-1 和 pGEX-4T-1-*dadA* 分别转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 在 LB 培养基中培养过夜, 种子液接入 1 L 乳糖自诱导培养基中, 250 r/min 培养 6 h 后, 降低温度至 8℃, 继续培养 28 h。4℃, 3500 × g, 离心 15 min 收集菌体, 使用预冷的 0.9% 硝酸钠溶液重悬洗涤菌体 1 次, 再次离心沉淀。按 1 g 湿重菌体加 10 mL 的比例加入预冷的结合缓冲液 (50 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10% 甘油, pH 7.5) 重悬菌体。超声破碎, 4℃, 30000 g, 离心 40 min, 收集上清。加入用结合缓冲液预先平衡过的 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 凝胶, 在 4℃ 孵育 30 min, 转移到重力流层析柱中, 待上清流穿。使用洗涤缓冲液 (50 mmol/L Tris, 100 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) 冲洗数次, 然后使用洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris, 100 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mmol/L 还原性谷胱甘肽, pH 8.5) 洗脱目标蛋白, 并于 50 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5 中透析 4 次。超滤浓缩后, 使用 Bradford 法测定目标蛋白浓度。最终 GST 蛋白和 DadA 酶的保存液为 50 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mmol/L β-巯基乙醇, 10% 甘油, pH7.5。上述所有

步骤均在 4℃ 或冰上完成。

1.5 酶活测定

酶活力的大小可用在一定条件下酶催化某一反应的速率来表示。在西林瓶中配制 5 mL 酶促反应体系, 缓冲液是在 37℃ 预热过的 100 mmol/L 甘氨酸, pH 8.6, 添加卤代底物和 DadA 酶液至终浓度分别为 10 mmol/L 和 0.01 mg/mL。迅速密闭, 置于 37℃ 水浴振荡摇床中开始反应。使用注射器在不同的反应时间后取样, 每次 500 μL, 立即加入到盛有 50 μL 30% 硝酸的离心管中以终止反应。依次加入 55 μL 硫氰酸汞溶液和 110 μL 硫酸铁铵溶液, 混匀, 反应 10 min 以上, 使用酶标仪检测 460 nm 处吸光值。根据卤离子标准曲线计算出样品中卤离子的浓度, 对反应时间作图。以含同样浓度 GST 的反应体系作为对照组, 测定底物在反应条件下的自脱卤速率。酶活按照公式(1)计算。其中 v 表示酶活, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> 分别为酶促反应曲线和对照组自脱卤反应曲线的线性区的斜率, C<sub>p</sub> 表示反应体系中的蛋白质浓度, 一般为 0.01 mg/mL。

$$v = \frac{(S1 - S2) \frac{\mu\text{mol/L}}{\text{min}}}{\text{Cp mg/mL}} = \frac{(S1 - S2) \frac{1000\text{nmol/L}}{60\text{s}}}{\text{Cp}1000\text{mg/L}}$$

$$= \frac{(S1 - S2)}{60 \cdot \text{Cp}} \text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \quad \text{公式(1)}$$

## 2 结果

### 2.1 B-5 菌株对卤代底物的利用情况

使用液体培养和熏蒸培养研究了 B-5 在卤代化合物中的生长情况。如表 2 所示, B-5 菌能够在以多种不同卤代化合物为唯一碳源的 MMC 培养基中

生长。B-5 菌株能利用单取代的卤代底物,却不能利用多取代的卤代底物,一个例外是 B-5 不能利用氯代环己烷。

B-5 菌能够利用  $C_3$ - $C_{18}$  链长范围的卤代化合物,包括 1-氯代的  $C_4$ 、 $C_6$ 、 $C_8$ 、 $C_{10}$ 、 $C_{12}$ 、 $C_{14}$ 、 $C_{16}$  和  $C_{18}$  烷烃、1-溴丁烷、1-溴己烷、1-溴十六烷、1-碘丙烷、1-碘丁烷、1-碘己烷、2-碘丁烷、氯代环戊烷、溴代环己烷、溴甲基环己烷和 3-氯-2-甲基丙烯等。其中, B-5 菌在中长链卤代烷烃例如 1-氯代辛烷、1-氯代癸烷、1-氯代十二烷、1-氯代十四烷、1-氯代十六烷、1-氯代十八烷和 1-溴代十六烷中长势良好。

表 2. B-5 菌在不同的卤代有机物中的生长情况

Table 2. Growth of B-5 in some halogenated organic compounds

substrates	growing status	substrates	growing status
sodium acetate	growing normally	1,2,3-trichloropropane	no growth
n-hexane	growing normally	1,2,3-tribromopropane	no growth
1-chlorobutane	growing normally	1,2-dichloroethane	no growth
1-chlorohexane	growing normally	1,3-dichloropropane	no growth
1-bromohexadecane	growing slowly	1-bromo-3-chloropropane	no growth
1-chlorododecane	growing normally	1-bromo-2-chloroethane	no growth
1-chlorodecane	growing normally	1,3-diiodopropane	no growth
1-chlorohexadecane	growing normally	1,2-dichloropropane	no growth
1-chlorooctadecane	growing normally	1,2-dibromopropane	no growth
1-chlorodecane	growing normally	2,3-dichloroprop-1-ene	no growth
1-chlorotetradecane	growing slowly	1,2-dibromo-3-chloropropane	no growth
1-bromohexane	growing slowly	1,3-dibromopropane	no growth
chlorocyclopentane	growing slowly	2-bromo-1-chloropropane	no growth
2-iodobutane	growing slowly	1,5-dichloropentane	no growth
1-iodohexane	growing slowly	1,2-dibromoethane	no growth
1-iodopropane	growing slowly	1-chloro-2-(2-chloroethoxy) ethane	no growth
1-iodobutane	growing slowly	ethanol	no growth
bromocyclohexane	growing slowly	4-bromobutanenitrile	no growth
(bromomethyl) cyclohexane	growing slowly	4-bromodiphenyl ether	no growth
1-bromobutane	growing slowly	chlorocyclohexane	no growth
3-chloro-2-methylprop-1-ene	growing slowly	1-chloro-3-nitrobenzene	no growth

### 2.2 DadA 的生物信息学分析

将 DadA 在 NCBI 的 nr 数据库中进行 BLAST 搜索,能找到大量的全长匹配的相似序列,其中大部分被注释为“卤代烷烃脱卤酶”或“ $\alpha/\beta$ -水解酶”,包括多个已经经过生化鉴定的 HLDs,如 LinB、DhaA、DhlA、DmbA 等。DadA 的氨基酸序列与来自 *Myxococcus stipitatus* DSM 14675 中的假定的卤代烷烃脱卤酶(YP\_007362382)具有 44% 的一致性。

DadA 与目前已鉴定的全部 18 个 HLDs 都具有一定的序列相似性。最高与 DhaA、DbeA、Dmma 的

相似性分别为 37%、36%、36%,最低与 DrbA 的相似性仅为 24%。HLD 家族成员序列差异性比较大,互相之间的相似性低于 30% 的现象较为普遍。DadA 与已鉴定的 HLDs 的相似性在正常的区间之内。

系统发育分析表明 DadA 与其他已鉴定的 HLDs 具有明显的同源性。图 1 中的 HLD 进化树整体上与 Chovancova 等对 HLD 进行的进化分析结果相似<sup>[14]</sup>。DadA 与目前定义的 HLD-II 亚家族的亲缘关系较近,但又相对独立,可能代表了一个新的进化分支。

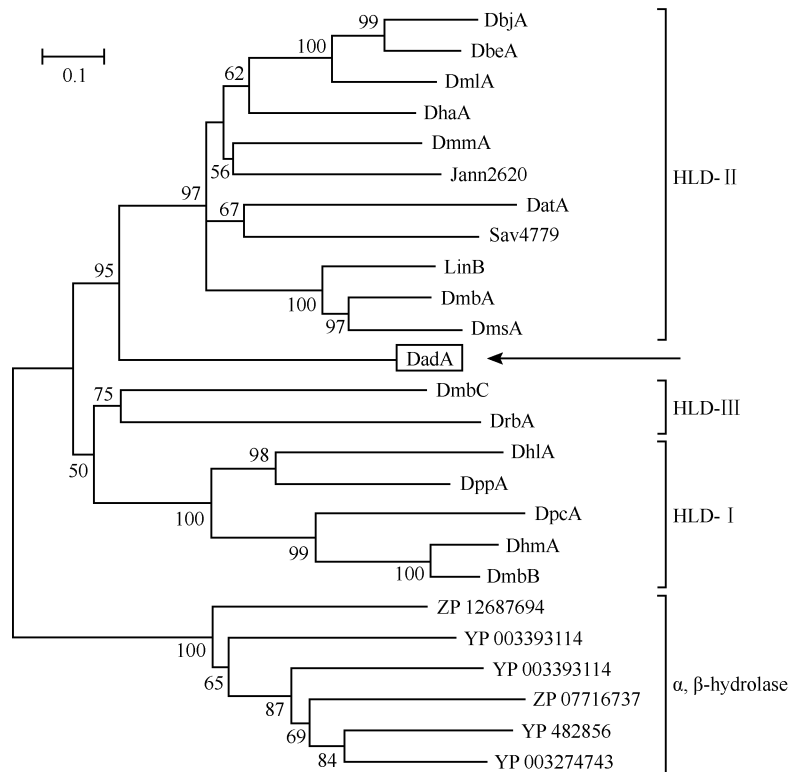


图 1. DadA 与已鉴定的 HLDs 的系统发育分析

Figure 1. Phylogenetic analyses of DadA and identified HLDs. This NJ (Neighbor-Joining) tree was constructed by MEGA 5.05. Statistical confidence of the tree was estimated by bootstrap (1,000 replicates). The outgroup contains six  $\alpha/\beta$ -hydrolases which are homologous sequences of HLDs. LinB (P51698), *Spinghobium japonicum* UT26<sup>[9]</sup>; DmbA (AJ784272), DmbB (AJ784273) and DmbC (AM696288), *Mycobacterium bovis* 5033/66<sup>[11-12]</sup>; DbjA (NP\_767727), *Bradyrhizobium japonicum* USDA110<sup>[13]</sup>; DbeA (BAJ23986), *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 (Prudnikova et al., unpublished data); DmlA (NP\_106032), *Mesorhizobium loti* MAFF303099<sup>[13]</sup>; DhaA (AAC15838), *Rhodococcus rhodochromus* NCIMB 13064<sup>[6]</sup>; DmmA (AAT70109), the metagenomic DNA of a marine microbial consortium<sup>[19]</sup>; DatA (AB478945), *Agrobacterium tumefaciens* C58<sup>[10]</sup>; DhIA (AAA88691), *Xanthobacter autotrophicus* GJ10<sup>[7]</sup>; DppA (ZP\_01908831), *Plesiocystis pacifica* SIR-1<sup>[20]</sup>; DhmA (AJ314789), *Mycobacterium avium* N85<sup>[21]</sup>; DpcA (YP\_580518), *Psychrobacter cryohalolentis* K5<sup>[22]</sup>; DrbA (AM696289), *Rhodopirellula baltica* SH1<sup>[11]</sup>; DmsA (AAL17946), *Mycobacterium smegmatis* ATCC700084<sup>[15]</sup>; Jann2620 (YP\_510562), *Jannaschia* sp. CCS1<sup>[23]</sup>; Sav4779 (NP\_825956), *Streptomyces avermitilis* MA-4680<sup>[23]</sup>.

DadA 具有典型的 HLD-II 亚家族的催化五联体残基。对 DadA 和已鉴定的 12 个 HLD-II 成员进行多重序列比对 (图 2), 共发现 38 个完全一致的残基, 其中包括 DadA 中的亲核攻击残基 D102 (▲ 位置), 酸性催化残基 E126 (■ 位置), 碱性催化残基 H268 (● 位置) 和第二个卤素结合残基 N37 (★ 位置)。另外, DadA 的第一个卤素结合残基 W103 (◆ 位置) 也与除了 DatA 之外的所有 HLD-II 成员一致<sup>[10]</sup>。

使用 SWISS-MODEL 对 DadA 进行同源建模, 该软件为 DadA 选择的模板是 DhaA (PDB:2v9z)。三

维结构 (图 3) 和二级结构预测 (图 2) 都表明, DadA 含有 8 个  $\beta$  片, 12 个  $\alpha$  螺旋, 在结构上属于  $\alpha, \beta$ -水解酶超家族, 其三维结构由 2 个结构域组成: (1)  $\alpha, \beta$ -水解酶核心结构域, 其中心是八个扭曲的  $\beta$  折叠片, 两侧则分别是 4 个和 3 个  $\alpha$  螺旋组成的侧翼。(2) 覆盖在核心结构域顶上的帽子结构域, 由 5 个  $\alpha$  螺旋组成。活性位点位于核心结构域的顶部, 被帽子结构域覆盖住。根据结构模型, DadA 的催化五联体残基的拓扑结构与已解析结构的 HLDs 完全一致。因此推断, DadA 与其他 HLDs 一样, 采用水解型脱卤机制。

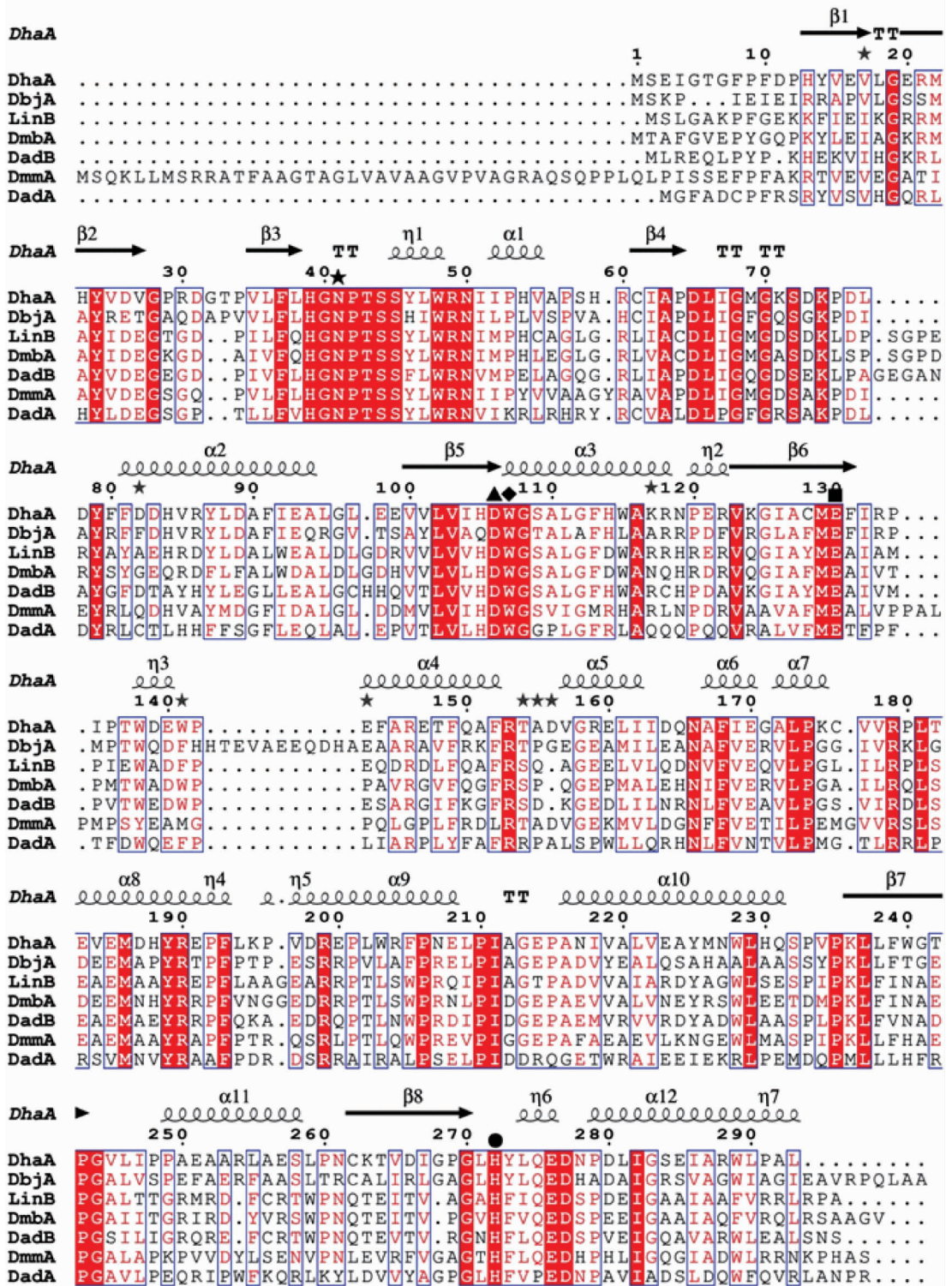


图 2. DadA 与已鉴定的 HLD-II 成员的多重序列比对

Figure 2. Multiple sequence alignment of DadA and other identified HLD-II members. The white letters in red background represent identical residues in all 13 HLDs in the alignment. The red letters in white background indicate similar residues. The secondary structure elements above the sequences come from DhaA (1BN6)<sup>[24]</sup>. Residues of catalytic pentad are labeled at the top(▲, the nucleophile residue D; ■, the catalytic acid residue E; ●, the catalytic base residue H; ◆, the halide-binding residue W or Y; ★, another halide-binding residue N). The multiple sequence alignment was conducted by ClustalX2.1 and printed by ESript 2.2.



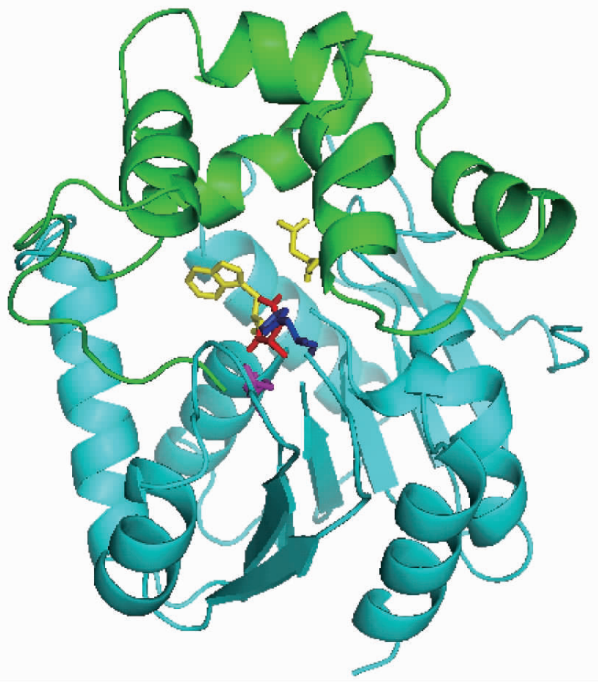


图 3. DadA 三维结构模型

Figure 3. Three-dimensional structure model of DadA. The green and cyan elements constitute the cap domain and the main domain, respectively. The yellow, red, magenta, blue represent the halide-binding residues, the nucleophilic residue, the acid residue, and the base residue, respectively.

### 2.3 DadA 的表达与纯化

根据生物信息学分析的结果, DadA 可能是 HLD 家族的新成员, 具有水解型的脱卤活性。通过异源表达、纯化, 我们制备了 DadA 粗提物以验证其脱卤活性。

使用亲和层析介质分别纯化 DadA 和 GST(图 4), 可见(1) GST 标签蛋白的可溶性表达和纯化效果很好, 最终制备的 GST 纯度可达 96.6%。(2) pGEX-4T-1-*dadA* 在大肠杆菌中的可溶性表达效果较差, 大部分 DadA 形成包涵体, 出现在沉淀中, 上清中的 DadA 仅占可溶性蛋白含量的 8% 左右。(3) 经过亲和纯化后, DadA 的纯度约为 81.2%, 再经过透析、浓缩等步骤后最终制备的 DadA 纯度为 72.5%。(4) 使用 Quantity One 软件(Bio-Rad)对 DadA 和蛋白质 Marker 的迁移率进行对比分析, DadA 单体的分子量约为 35.8 kDa, 与理论分子量(35.4 kDa)基本一致。

### 2.4 DadA 的酶活特征

在酶活测定所用的 46 种卤代化合物中, DadA

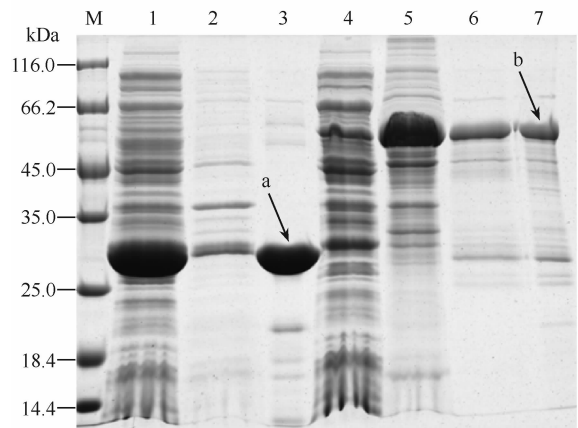


图 4. 亲和层析法纯化制备 DadA 和 GST 蛋白

Figure 4. Preparation of DadA and GST by affinity chromatography. M, marker; lane 1, supernatant of *E. coli* BL21 (DE3) expressed pGEX-4T-1; lane 2, precipitate of *E. coli* BL21 (DE3) expressed pGEX-4T-1; lane 3, GST protein prepared at last; lane 4, supernatant of *E. coli* BL21 (DE3) expressed *dadA*; lane 5, precipitate of *E. coli* BL21 (DE3) expressed *dadA*; lane 6, eluted DadA; lane 7, DadA prepared at last. Arrow a and arrow b respectively indicate GST and DadA.

粗提物仅对其中 3 种具有可检测的脱卤活性(表 4), 这 3 种底物都是多卤代的  $C_3$  化合物。DadA 对 1,2,3-三溴丙烷、1,2-二溴-3-氯丙烷和 2,3-二氯-1-丙烯的酶活分别是  $73.01 \text{ nmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ 、 $1.57 \text{ nmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ 、 $178.19 \text{ nmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ 。

表 4. DadA 的对 3 种多卤代底物的脱卤酶活\*

Table 4. Dehalogenation activity of DadA against three multiple halogenated compounds

substrates	activity/[ $\text{nmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ ]
1,2,3-tribromopropane	$73.01 \pm 10.97$
1,2-dibromo-3-chloropropane	$1.57 \pm 0.01$
2,3-dichloroprop-1-ene	$178.19 \pm 37.10$

\* 100 mmol/L glycine, pH 8.6, 37°C, measured in triplicate.

DadA 的底物范围明显小于其他已鉴定的 HLDs。图 5 中将 DadA 与其他 5 个 HLDs 的酶活数据进行了简单对比, 可见, 不同于其他 HLDs 的宽广的底物特异性, DadA 的专一性较高, 底物范围较窄, 只对 3 个多卤代的  $C_3$  底物具有酶活。

## 3 讨论

本文首次研究了食烷菌对卤代化合物的利用范围, 发现 B-5 菌株能够利用多种卤代烷烃、烯烃和环烷烃, 链长范围宽; 然而, 该菌株不能利用氯代环己

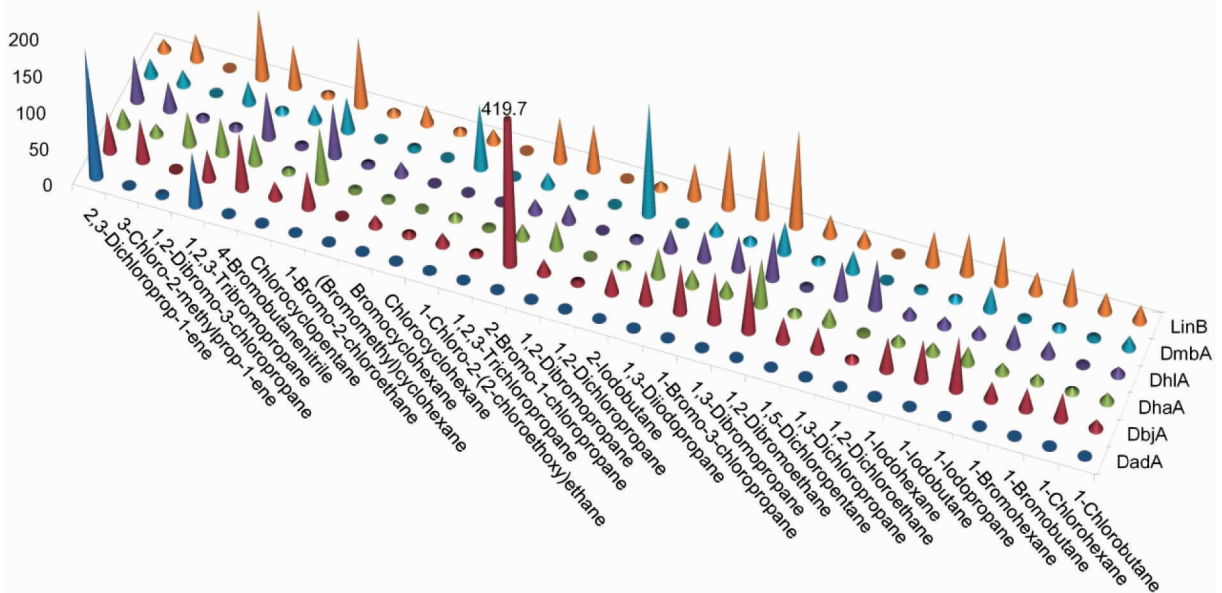


图 5. DadA 与其他 HLDs 的底物范围

Figure 5. Substrates range of DadA and other HLDs. The values except DadA are collected from the results published by Koudelakova et al. [16]. The activity of DbjA against 2-bromo-1-chloropropane was cut off and labeled.

烷, DadA 对氯代环己烷没有脱卤活性。同时, B-5 也不能在多取代的卤代底物中生长。有趣的是, DadA 对 3 种多取代卤代底物有着明显的酶活。实验发现, 在加入了多卤代底物的天然海水培养基中, B-5 菌不能存活。推测多取代卤代底物对 B-5 菌毒性较强。

B-5 菌可以降解 1-氯十六烷, 但 DadA 对其没有脱卤活性。因此, 推测可能有其他酶来负责 B-5 对长链卤代底物的降解。 *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 降解小的卤代底物 ( $C_{10}$  及以下) 主要是通过 HLD (DhaA) 攻击其卤代末端来开始的, 而它降解长链卤代烷烃 ( $C_{12}$  及以上) 则起始于加氧酶对底物的非卤代末端的攻击 [6]。B-5 菌的基因组中含有 4 个烷烃羟化酶, 能够对  $C_3$ - $C_{36}$  链长范围内的烷烃进行末端加氧 [25], 它们可能在长链卤代烷烃降解中起着重要作用。

前期研究发现, B-5 菌不能利用正丙烷和正丁烷等进行生长 [17], 其烷烃羟化酶系统也不能对  $C_3$ 、 $C_4$  链长的底物进行末端加氧 [25]。本文发现, B-5 菌能够在 1-碘丙烷、1-氯丁烷、1-溴丁烷和 1-碘丁烷中生长。在某些含 HLD 的细菌中, 小分子的卤代底物的降解途径是先由 HLD 将其催化脱卤转化成对应的醇, 然后被依次氧化成醛和酸, 最终通过  $\beta$  氧化

彻底代谢 [6-8]。所以, B-5 降解上述小分子卤代底物应该是从脱卤开始的。然而, DadA 对这些底物没有脱卤活性, 我们推测 B-5 应该还含有 DadA 以外的脱卤酶对 1-碘丙烷、1-氯丁烷、1-溴丁烷和 1-碘丁烷进行脱卤。

尽管 DadA 具有典型的 HLD-II 亚家族的催化五联体, 但是从图 1 中可以看出, DadA 相对独立于目前定义的 HLD-II 亚家族, 可能代表了一个新的系统发育分支, 这也可能是 DadA 底物范围较窄的原因。根据序列相似性和系统发育树可以看出, DadA、DrbA 和 DmbC 是 20 个 HLDs 中相似性最差的 3 个酶, 与其他 HLDs 的相似性都低于 40%, 而 DrbA 和 DmbC 也分别代表了一个相对独立的系统发育分支 [14]。异源表达的 DadA 容易发生聚集。已鉴定的 HLD 中, DrbA、DmbC 也表现出类似的易聚集的现象, 这 2 个酶的酶活比其他典型 HLD 要低上大约两个数量级 [11]。Koudelakova 等发现疏水性带来的不稳定很可能是导致 DrbA 和 DmbC 酶活较低的原因 [16]。

综上, 菌株 B-5 能够对  $C_3$ - $C_{18}$  链长范围内的多种卤代烷烃进行脱卤, 可能在卤代脂肪族污染物的生物降解方面具有较好的应用潜力。由于 DadA 仅对少数短链卤代烃具有脱卤活性, B-5 菌对长链卤代烃的降解可能是由其他酶介导的。



## 参考文献

- [ 1 ] McConnell G, Ferguson D, Pearson C. Chlorinated hydrocarbons and the environment. *Endeavour*, 1975, 34 (121): 13-18.
- [ 2 ] Wang L, Wang W, Lai Q, Shao Z. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1230-1242.
- [ 3 ] Wang J, Dong C, Lai Q, Lin L, Shao Z. Diversity of C<sub>16</sub> H<sub>33</sub>Cl-degrading bacteria in surface seawater of the Arctic Ocean. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(8): 1011-1020. (in Chinese)  
王建宁, 董纯明, 赖其良, 林龙山, 邵宗泽. 北极表层海水中氯代十六烷降解菌的多样性. *微生物学报*, 2012, 52(8): 1011-1020.
- [ 4 ] 王建宁. 北极表层海水中氯代十六烷降解菌的多样性分析及 *Alteromonas* sp. P127 的基因组和多环芳烃降解机制研究. 国家海洋局第三海洋研究所硕士学位论文, 2012.
- [ 5 ] Janssen DB. Evolving haloalkane dehalogenases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, 8: 150-159.
- [ 6 ] Curragh H, Orla Flynn, Michael J L, Thomas M. Stafford, John T. G. Hamilton, Harper DB. Haloalkane degradation and assimilation by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 *Microbiology (Reading, England)*, 1994, 140: 1433-1442.
- [ 7 ] Keuning S, Janssen DB, Witholt B. Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Journal of Bacteriology*, 1985, 163(2): 635-639.
- [ 8 ] Kulakova AN, Larkin MJ, Kulakov LA. The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. *Microbiology (Reading, England)*, 1997, 143 (Pt 1): 109-115.
- [ 9 ] Nagata Y, Miyauchi K, Damborsky J, Manova K, Ansorgova A, Takagi M. Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3707-3710.
- [ 10 ] Hasan K, Fortova A, Koudelakova T, Chaloupkova R, Ishitsuka M, Nagata Y, Damborsky J, Prokop Z. Biochemical characteristics of the novel haloalkane dehalogenase DatA, isolated from the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1881-1884.
- [ 11 ] Jesenska A, Monincova M, Koudelakova T, Hasan K, Chaloupkova R, Prokop Z, Geerlof A, Damborsky J. Biochemical characterization of haloalkane dehalogenases DrbA and DmbC, representatives of a novel subfamily. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5157-5160.
- [ 12 ] Jesenska A, Pavlova M, Strouhal M, Chaloupkova R, Tesinska I, Monincova M, Prokop Z, Bartos M, Pavlik I, Rychlik I, Mobius P, Nagata Y, Damborsky J. Cloning, biochemical properties, and distribution of mycobacterial haloalkane dehalogenases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6736-6745.
- [ 13 ] Sato Y, Monincova M, Chaloupkova R, Prokop Z, Ohtsubo Y, Minamisawa K, Tsuda M, Damborsky J, Nagata Y. Two rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(8): 4372-4379.
- [ 14 ] Chovancova E, Kosinski J, Bujnicki JM, Damborsky J. Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases. *Proteins*, 2007, 67(2): 305-316.
- [ 15 ] Chovancova E. Bioinformatic analysis and design of haloalkane dehalogenases. PhD thesis of Masaryk University, 2011.
- [ 16 ] Koudelakova T, Chovancova E, Brezovsky J, Monincova M, Fortova A, Jarkovsky J, Damborsky J. Substrate specificity of haloalkane dehalogenases. *Biochemical Journal*, 2011, 435(2): 345-354.
- [ 17 ] Liu C, Shao Z. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1181-1186.
- [ 18 ] Lai Q, Li W, Shao Z. Complete Genome Sequence of *Alcanivorax dieselolei* Type Strain B5. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(23): 6674-6674.
- [ 19 ] Gehret JJ, Gu L, Geders TW, Brown WC, Gerwick L, Gerwick WH, Sherman DH, Smith JL. Structure and activity of DmmA, a marine haloalkane dehalogenase. *Protein Science*, 2011, 21: 239-248.
- [ 20 ] Hesseler M, Bogdanovic X, Hidalgo A, Berenguer J, Palm GJ, Hinrichs W, Bornscheuer UT. Cloning, functional expression, biochemical characterization, and structural analysis of a haloalkane dehalogenase from *Plesiocystis pacifica* SIR-1. *Applied Microbiology and*

*Biotechnology*, 2011, 91(4): 1049-1060.

- [21] Jesenska A, Bartos M, Czernekova V, Rychlik I, Pavlik I, Damborsky J. Cloning and expression of the haloalkane dehalogenase gene *dhmA* from *Mycobacterium avium* N85 and preliminary characterization of DhmA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3724-3730.
- [22] Drienovska I, Chovancova E, Koudelakova T, Damborsky J, Chaloupkova R. Biochemical characterization of a novel haloalkane dehalogenase from a cold-adapted bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(14): 4995-4998.
- [23] Chan WY, Wong M, Guthrie J, Savchenko AV, Yakunin

AF, Pai EF, Edwards EA. Sequence- and activity-based screening of microbial genomes for novel dehalogenases. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3(1): 107-120.

- [24] Newman J, Peat TS, Richard R, Kan L, Swanson PE, Affholter JA, Holmes IH, Schindler JF, Unkefer CJ, Terwilliger TC. Haloalkane dehalogenases: structure of a *Rhodococcus* enzyme. *Biochemistry*, 1999, 38(49): 16105-16114.
- [25] Liu C, Wang W, Wu Y, Zhou Z, Lai Q, Shao Z. Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(5): 1168-1178.

## Degradation of halogenated compounds by haloalkane dehalogenase DadA from *Alcanivorax dieselolei* B-5

Anzhang Li<sup>1,2</sup>, Zongze Shao<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

<sup>2</sup>Key Laboratory of Marine Genetic Resources- State Key Laboratory Breeding Base, the Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen City; Key Laboratory of Marine Genetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration; Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Genetic Resources; Xiamen 361005, Fujian Province, China

**Abstract:** [ **Objective** ] *Alcanivorax dieselolei* B-5 is an important oil-degrading bacterium. We studied its substrate range and degradation of halogenated compounds. [ **Methods** ] Growth capability of B-5 was examined with different halogenated substrates as sole carbon source. A putative haloalkane dehalogenase (HLD) gene named *dadA* was found from the genome of strain B-5 and analyzed by sequence alignment, phylogenetic analysis and homologous modeling. After heterologous expression in *Escherichia coli* and purification, the activity of DadA towards 46 substrates was determined. [ **Results** ] Strain B-5 was capable of utilizing various halogenated compounds (C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>) as the sole carbon source. DadA had typical catalytic pentad residues of HLD-II subfamily, but it was independent from other members of this subfamily according to phylogenetic analysis. Activity assay showed that DadA has higher specificity and narrower substrate range than other characterized HLDs and it only showed activity toward 1,2,3-tribromopropane, 1,2-dibromo-3-chloropropane and 2,3-dichloroprop-1-ene among 46 tested substrates. [ **Conclusions** ] Strain B-5 and its HLD DadA can degrade halogenated aliphatic pollutants although.

**Keywords:** biodegradation, oil-degrading bacterium, *Alcanivorax dieselolei* B-5, halogenated compounds, haloalkane dehalogenase

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41106151, 41176154) and by the Public Welfare Project of State Oceanic Administration (201005032)

\* Corresponding author. Tel: + 86-592-2195321; Fax: + 86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

Received: 10 December 2013/Revised: 26 March 2014