

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (4) :448 - 456; 4 April 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140451

## N 端缺失的锰过氧化氢酶生理生化特性

杨秀清, 王洋

山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

**摘要:** 【目的】在红球菌 (*Rhodococcus* sp.) R04 中发现了一种高表达, N 端缺失的锰过氧化氢酶 (Mn-CAT), 为了明确其在活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 清除与多氯联苯 (Polychlorinated biphenyls, PCBs) 代谢中所起的作用, 本文对其生理生化特性进行了研究。【方法】利用 DNAMAN 对 *Rhodococcus* sp. R04 与 *Rhodococcus* sp. R1101Mn-CAT 的核酸和蛋白序列进行比对。化学合成和 PCR 搭桥法获取 Mn-CAT 全长基因。分别构建了原核表达载体 pETm3c-Mn-CAT, pETm3c-MnCAT-C, 转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21, 得到重组菌 pETm3c-Mn-CAT/BL21, pETm3c-MnCAT-C/BL21。工程菌诱导表达后, 粗酶液经 Q-sepharose 和硫酸铵沉淀进行纯化。构建了锰过氧化氢酶 C 端 (MnCAT-C) 基因的敲除载体 pK18mobsacB- $\Delta$ MnCAT-C, 电击法转入 *Rhodococcus* sp. R04。荧光极化测定 ROS 的含量, HPLC 分析多氯联苯的降解率。【结果】与 *Rhodococcus* sp. R1101Mn-CAT 基因序列相比, *Rhodococcus* sp. R04Mn-CAT 缺少 N 端 (R1101 的 Mn-CAT 序列长度为 915bp, R04 的 MnCAT-C 序列长度为 468bp)。获得了纯度较高的 MnCAT-C, SDS-PAGE 分析表明分子量约为 23 kDa。以  $H_2O_2$  为底物时, MnCAT-CKm 比 Mn-CATKm 大, 约为 0.02357mol/L。通过基因同源重组的方式, 得到菌株 R04 的 MnCAT-C 敲除菌株, 与野生菌株相比, 敲除菌株体内 ROS 浓度显著增高, 生长速率和多氯联苯降解速率明显下降。【结论】发现了一种 N 端缺失的锰过氧化氢酶, 该酶具有原酶的大部分活性, 且可以清除体内的 ROS。MnCAT-C 基因的缺失影响了菌株的生长速率和多氯联苯的降解速率。

**关键词:** 红球菌 (*Rhodococcus* sp.) R04, 锰过氧化氢酶, 多氯联苯, 活性氧

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 04-0448-09

过氧化氢酶 (Hydrogen Peroxidase EC1.11.1.6) 又称触酶 (Catalase, 简称 CAT)<sup>[1]</sup>, 是生物防御系统的关键酶之一, 其主要的功能是参与 ROS (包括  $H_2O_2$ 、羟自由基、超氧阴离子等几种) 的清除<sup>[2]</sup>。这些活性氧是在物质代谢途径中产生的, 低浓度的活性氧并不会影响菌株的生理代谢, 并且在细胞信号传导中起着重要作用。但是当生物体处于恶劣环

境时, 体内会因代谢紊乱等原因而存在活性氧爆发现象, 导致生物体内 ROS 浓度升高, 高浓度的 ROS 会通过氧化蛋白质的巯基和断裂核酸单链对组织和细胞造成破坏, 这也是细胞衰老及凋亡的直接原因之一<sup>[3]</sup>。

按照催化中心结构差异, 过氧化氢酶又可分为两类: (1) 含铁卟啉结构 CAT, 又称铁卟啉酶, 典型

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (3080030); 山西省自然科学基金 (2014011030-3)

**作者简介:** 杨秀清 (1975 -), 男, 山西代县人, 副教授, 主要从事微生物生物转化与生物催化方面的研究工作。Tel/Fax: +86-351-7010215;

E-mail: xiuqiang@sxu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-22; 修回日期: 2014-12-10

性 CAT 和 CAT-POD 属于此类; (2) 含锰离子代替铁的卟啉结构, 又称为锰过氧化氢酶 (Mn-Cat)<sup>[4]</sup>。目前为止, 只发现了少数几种锰过氧化氢酶, 由 Kono 等<sup>[5]</sup> 和 Barynin 等<sup>[6]</sup> 分别从乳酸菌和嗜热生物组织中发现。

多氯联苯 (Polychlorinated biphenyls, PCBs) 是一种无色或淡黄色的黏稠液体<sup>[7]</sup>, Schmidt 和 Schults 于 1881 年首次合成。多氯联苯对环境和人类健康的危害很大, 较难降解, 目前国际上已经禁止工业化合成多氯联苯。最新研究表明, HELF 细胞在高浓度多氯联苯存在下, 会生成一系列有毒的小分子, 使体内的 ROS 浓度上升, 对 HELF 细胞的生长, 代谢造成抑制<sup>[8]</sup>。但是多氯联苯对于微生物是否有此影响却没有文献报道, 细菌能否通过锰过氧化氢酶及其他氧化酶清除 ROS 来减缓这种抑制也不得而知。

红球菌 (*Rhodococcus* sp.) R04 是一种高效降解多氯联苯的微生物<sup>[9]</sup>, 本课题组已对该菌降解多氯

联苯的特性及代谢相关基因和酶系进行了大量研究<sup>[10-11]</sup>。从 *Rhodococcus* sp. R04 的转录组差示分析得知, 与葡萄糖为碳源的 Mn-CAT 基因表达相比, 以联苯为碳源的 Mn-CAT 基因上调表达 76 倍。本研究对红球菌 R04Mn-CAT 进行了表达与纯化, 并检测其过氧化氢酶的活性。构建了 MnCAT-C 基因敲除载体, 电转入红球菌 R04 中, 筛选缺陷菌株, 通过对红球菌 R04 及其突变株的一系列生理特性的研究, 分析锰过氧化氢酶对细菌的生长, ROS 清除, 多氯联苯降解速率的影响, 为深入研究锰过氧化氢酶在细菌体内的氧化应激反应提供了依据。

## 1 材料

**1.1.1 菌株和载体:** *Rhodococcus* sp. R04、*E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21 (DE3) 和 pETm3c 质粒, pK18mobsacB 质粒由本实验室保存。

**1.1.2 培养基:** 所需培养基如表 1 所示

表 1. 本实验所用培养基  
Table 1. Medium used in this research

Medium	Medium components
LB (1L)	peptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 5 g
LBP (1L)	peptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g
LBG (1L)	peptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 5 g, Glucose 10 g
Basal medium (1L)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.93 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O 5.85 g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.3 g, NaCl 0.2 g, CaCl <sub>2</sub> 0.03 g, NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.6 mg, trace elements

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶 *EcoR* I, *Hind* III, *Bam* H I, *Xba* I 购自大连宝生物工程有 限 公 司; pEASY-T3 Cloning Kit, FastPfu DNA Polymerase 购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自北京中科瑞泰生 工 科 有 限 公 司; 氨 苄 青 霉 素 (Amp), 卡 那 霉 素 (Kan) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 酵母提取物, 胰 蛋 白 胨 购 自 Oxoid 公 司; 蛋 白 质 分 子 质 量 标 准 及 T4 DNALigase 购自 Fermentas 公司; 实时荧光 PCR 仪购 自 ABI 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA), QuantiFast SYBR Green PCR Kit 购自德国 QIAGEN 公司; 日立 UV-201 分光光度计及日立 F-2500 荧光光谱仪购自 Hitachi Instruments 公司; 高 效 液 相 色 谱 仪 购 自 美 国 Waters 公 司; 色 谱 纯 甲 醇 购 自 Dikma 公 司。

## 1.2 锰过氧化氢酶核酸序列分析

将 *Rhodococcus* sp. R04 的锰过氧化氢酶核酸序 列 提 交 NCBI 数 据 库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 搜 索 同 源 序 列 并 分 析 相 似 性。

## 1.3 表达载体的构建

**1.3.1 MnCAT-C 基因的 PCR 扩增:** 分别以表 2 中 F1 和 R1 为上下游引物, *R. R04* 的基因组作模 板, PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

**1.3.2 Mn-CAT 基因的获取:** 根据核酸序列比 对 结 果, 化 学 合 成 红 球 菌 R04MnCAT-C 基 因 序 列 缺 失 的 部 分, 做 为 PCR 模 板, 以 表 2 中 F2 和 R2 为 上 下 游 引 物 扩 增, PCR 反 应 条 件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。 获 得 MnCATN PCR 产 物。 以 F3 和 R3 为 引 物, 红 球 菌 R04 基 因 组 为 模 板, PCR 条 件 如 上 所 示, 获 得

MnCATC PCR 产物。再用 PCR 搭桥法扩增: MnCATC, MnCATN 为模板, F2 和 R3 为上下游引物。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 扩增 Mn-CAT 全长基因。

表 2. 引物序列

Table 2. Primer sequences

Primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')
F0	C G C G A C A C T A C C A C C A G
R0	T G C G G C G A G G A A C G A C A T
F1	T A G G A T C C A T G A C G G A C G A T C C G G G C G T
R1	T A G A A T T C T C A G G G A G T C T C G G G G T C G
F2	T A G A A T T C A T G T T T C G T C A C A C A G A C
R2	T C C G T C A T G T T G T A C A G G C G T G C G G T
F3	T G T A C A A C A T G A C G G A C G A T C C G G G C
R3	T A A A G C T T T C A G G G A T T G T C G G G G T C
F4	T A G A A T T C T G G C A A T C C C C A G G C G T T T
R4	T A G G A T C C C G G G C T G T C T G C A C T C T G C
F5	T A T C T A G A C C T T C C G A T A C A A C C G C C C C
R5	T A A A G C T T A G T G G G C G A T G A T C C C G T C C
16sRNAF	C A C A C T G G G A C T G A G A C A C G
16sRNAR	T C T C C C A C T A C C G T C A C T T G

F0, R0: MnCAT-C Real Time Q-PCR primers; F1, R1: MnCAT-C primers; F2, R2: Total length of Mn-CAT gene N-terminal primers; F3, R3: Total length of Mn-CAT gene C-terminal primers; F4, R4: MnCAT-C upstream gene primers; F5, R5: MnCAT-C downstream gene primers.

**1.3.3 表达载体构建:** 将 MnCAT-C, Mn-CAT, pETm3c 双酶切, 连接。通过酶切筛选 pETm3c-Mn-CAT 和 pETm3c-MnCAT-C 阳性重组质粒<sup>[6]</sup>。

#### 1.4 重组蛋白表达, 纯化及酶活性测定

**1.4.1 重组蛋白表达与纯化:** 将 pETm3c-MnCAT-C, pETm3c-Mn-CAT 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株中, 分别取一环菌接种于 3 mL LB 试管中, 生长 12h, 再以 1% 的接种量接种于 500 mL 三角瓶中。待  $OD_{600} = 0.8$  时, 加入诱导剂 IPTG (终浓度为 0.1 mmol/L), 22℃ 过夜诱导表达。8000 × g, 10 min 离心收集菌体, 20 mmol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗菌体 2 次后, 以 30 mL 相同的缓冲液洗重悬菌体后进行超声波破碎 (工作 4 s, 间歇 6 s, 工作 50 个循环)。上清上样于 Q-sepharose 柱, 将收集到的活性部分以 30% 硫酸铵进行沉淀, 12000 × g, 30 min 收集蛋白后, 6 mL 20 mmol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液溶解沉淀。

**1.4.2 重组蛋白酶活性测定:** 反应总体系为 3 mL, 将 30 μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液溶于 3 mL 20 mmol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 加入适量的酶, 测定方法

按照改进的 Beers and Sizlers 方法<sup>[12]</sup>, 将 1 min 内能转化 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的酶量定义为一个酶活单位。取不同体积的底物溶液, 加入 50 μL 酶, 剩余体积用 Tris-HCl 缓冲液补足, 记录  $OD_{240}$  变化。分别取 9 组数据, 以 1/V 对 1/S 双倒数作图, 计算两种蛋白的  $K_m$  值与  $V_{max}$ 。

#### 1.5 MnCAT-C 基因的转录表达

分别提取联苯为唯一碳源和葡萄糖为唯一碳源的红球菌 R04 的 cDNA, 将其浓度都调整到 60 ng/μL。以两种 cDNA 为模板, 以 F0, R0 和 16 s RNAF, 16 s RNAR (表 2) 为引物进行实时荧光定量 PCR 扩增。PCR 条件如下: 95℃ 5 min; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 反应结束后对各组样本的溶解曲线进行监测, 得到到达阈值时的循环数 Ct 值, 并运用 Ct 值定量比较, 即  $\Delta\Delta Ct$  法分析两种样品的表达差异。以上数据均通过软件 StepOne Software v2.2 (Applied Biosystems) 分析得出。

#### 1.6 基因敲除

**1.6.1 基因克隆:** 根据 MnCAT-C 上游基因序列和下游基因序列分别设计引物, 以 F4/R4 和 F5/R5 为引物 (表 2), 红球菌 R04 的基因组作为 PCR 模板扩增, PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。获得 MnCATY, MnCATR PCR 产物。

**1.6.2 敲除载体构建:** 将敲除载体 pK18mobsacB 先与 MnCATY 基因双酶切, 连接, 筛选得到阳性重组质粒命名为 pK18mobsacB-MnCATY。再将 pK18mobsacB-MnCATY 与 MnCATR 基因双酶切, 连接, 筛选得到阳性重组质粒命名为 pK18mobsacB- $\Delta$ MnCAT-C<sup>[6]</sup>。

**1.6.3 MnCAT-C 的基因敲除:** 将 pK18mobsacB- $\Delta$ MnCAT-C 电转 *Rhodococcus* sp. R04 感受态, 电阻条件为 2.5 kV、25 μF、800 Ω, 放电时间为 10 ms, 电转后加入 800 μL LBP 培养基, 30℃ 培养 4 h, 涂在终浓度为 50 μg/mL 卡那霉素抗性的 LB 平板上, 生长 72 h。将平板所得到的转化子, 接种于 LBG 试管中, 培养 24 h, 取 20 μL 涂在含 10% 蔗糖的 LBP 平板上, 30℃ 培养 48 h, 挑取单菌落进行菌落 PCR 筛选。

#### 1.7 红球菌 R04 与敲除菌株的生理特性研究

**1.7.1 野生菌株与敲除菌株的荧光极化实验:** 将红球菌 R04 和敲除菌株分别接种于不同浓度联苯和

葡萄糖(终浓度分别为 5、10、15、20 mmol/L)的基础培养基中,培养 48h,离心收菌,调节  $OD_{600}$  值为 0.06,加入指示剂二氯荧光黄双乙酸(DCFH-DA),30℃避光染色 30 min。在荧光分光光度计下测量荧光极化值,荧光池光径为 1 cm,激发波长为 488 nm,GF 值为 0.9786。

**1.7.2 野生菌株与敲除菌株生物量实验:**将红球菌 R04 野生菌株和敲除菌株分别接种于不同联苯浓度(终浓度分别为 5 mmol/L,10 mmol/L,15 mmol/L)的基础培养基中,至培养基中菌体浓度达到  $OD_{600}$  值为 0.1。继续培养,每隔 4 h 取样,紫外可见分光光度计测定 600 nm 处野生菌株和敲除菌株在不同时期的生物量。

**1.7.3 野生菌株与敲除菌株降解多氯联苯:**红球菌 R04 野生菌株和敲除菌株在含有 0.1% 联苯的基础培养基中培养,当  $OD_{600}$  达到 1.0 时,经玻璃棉过滤除去联苯固体颗粒,8000 r/min 离心 5 min 收集菌体,20 mmol/L, pH 8.0 PBS 缓冲液洗涤 2 次,接着以 5 mL 上述缓冲液重新悬浮菌体,菌悬液室温放置 2-3 h 后分别加入到 4-氯联苯,3,3'-二氯联苯,3,3',4,4'-四氯联苯的基础培养基中,至培养基中菌体浓度达到  $OD_{600}$  值为 0.3。每种多氯联苯的终浓

度为 400  $\mu$ mol/L。HPLC 分析按照文献<sup>[13]</sup>进行。色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD C18 液相色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm)流动相为甲醇-水(体积比 9:1),流速 1.0 mL/min,检测波长为每种多氯联苯的最大吸收波长,柱温 25℃,进样量为 20  $\mu$ L。每隔 5h 取含有多氯联苯的培养液,加入等体积色谱纯甲醇,旋涡混合 2 min,充分混匀后取 1 mL 离心(12000  $\times$  g,10 min),取上清作为待测样品,取 20  $\mu$ L 进行 HPLC 分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 锰过氧化氢酶序列分析

将 *Rhodococcus* sp. R04Mn-CAT 的核酸序列上传到 NCBI 的数据库,发现该序列与 *Rhodococcus* sp. R1101Mn-CAT (NCBI Reference Sequence: WP\_016931903.1)的核酸序列同源性最高,结果如图 1 所示:红球菌 R04 Mn-CAT 的核酸序列长度为 611bp,5'端 143bp 与红球菌 R1101 Mn-CAT 的核酸序列的前半段几乎完全匹配,定义为红球菌 R04MnCAT-N,而 3'端 468bp 与红球菌 R1101 Mn-CAT 的核酸序列的 448 到 915 相匹配,定义为红球

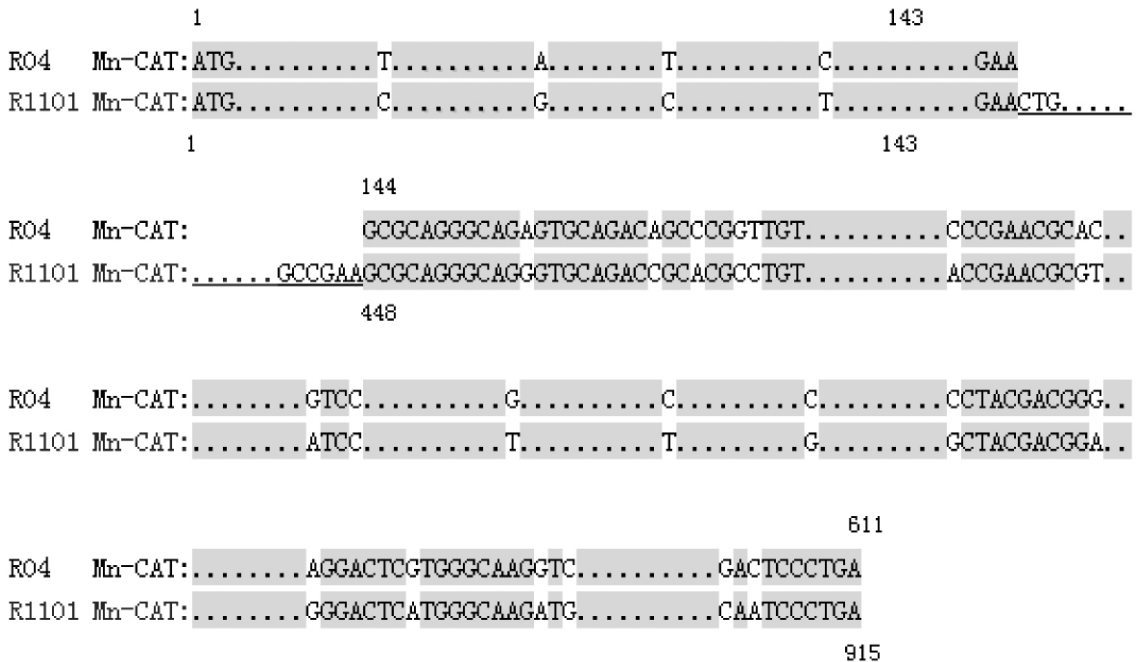


图 1. *Rhodococcus* sp. R04 Mn-CAT 和 *Rhodococcus* sp. R1101 Mn-CAT 核酸序列同源性比对

Figure 1. The nucleic acid sequence alignment of *Rhodococcus* sp. R04 Mn-CAT and *Rhodococcus* sp. R1101 Mn-CAT. ■ A T C G : The same sequence; A T C G : Different sequence; A T C G : R1101 sequence but R04 sequence does not exist.

菌 R04MnCAT-C, 红球菌 R04 锰过氧化氢酶缺少了红球菌 R1101 Mn-CAT 144 到 447 的核酸序列。本实验选择较长的 MnCAT-C 序列作为实验对象。利用 DNAMAN 分析发现 MnCAT-C 蛋白序列与 *Rhodococcus* sp. R1101 的 Mn-CAT 蛋白序列有 99% 的相似性。

## 2.2 表达载体的构建, 蛋白纯化与酶活性测定

**2.2.1 表达载体构建:** 分别用双酶切鉴定 pETm3c-MnCAT-C, pETm3c-Mn-CAT 重组质粒, 发现均能酶切出目的基因大小相当的条带(结果未显示), 表明所得到的重组质粒含有外源基因, 为阳性重组质粒。测序结果显示 pETm3c-MnCAT-C, pETm3c-Mn-CAT 表达载体构建成功。

**2.2.2 蛋白纯化:** 经 Q-sepharose 柱和 30% 硫酸铵沉淀分别对 MnCAT-C, Mn-CAT 蛋白进行纯化。纯化后的蛋白经过 SDS-PAGE 分析, MnCAT-C 蛋白分子量为 23kDa (图 2), Mn-CAT 蛋白分子量在 39kDa (结果未显示), 二者均与核酸序列所推导的分子量一致。

**2.2.3 酶活性测定:** 纯化后的 Mn-CAT 蛋白的酶活性为 5900 U/mg, MnCAT-C 蛋白的酶活性为 3155 U/mg。根据双倒数作图法, 算出 MnCAT-C 蛋白的  $K_m$  值为 0.02357 mol/L,  $V_{max} = 29.2$  nmol/min, Mn-CAT 蛋白的  $K_m$  值为 0.0126 mol/L,  $V_{max} = 46.8$  nmol/min。由此可见, N 端的缺失对锰过氧化氢酶的酶学性质造成了一定的影响。

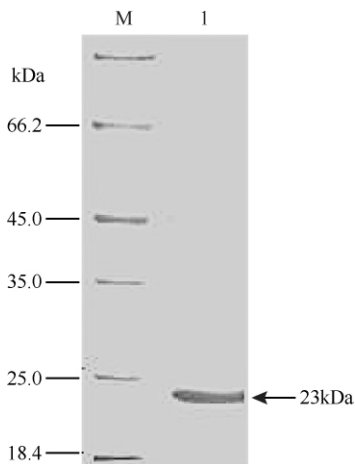


图 2. 重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) /pETm3c-MnCAT-C 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of *E. coli* BL21 (DE3) /pETm3c-MnCAT-C. Lane 1, MnCAT-C protein; M, Mark.

## 2.3 MnCAT-C 基因的转录表达

以联苯和葡萄糖中培养的 *Rhodococcus* sp. R04 cDNA 为模板, 进行 16S RNA、MnCAT-C 基因的实时荧光 PCR 扩增。以 16S RNA 为内参, MnCAT-C 基因表达量如图 3 所示, 与葡萄糖为碳源的 MnCAT-C 基因表达相比, 以联苯为碳源的 MnCAT-C 基因上调表达 112 倍, 这与转录组测序所得数据基本相符。

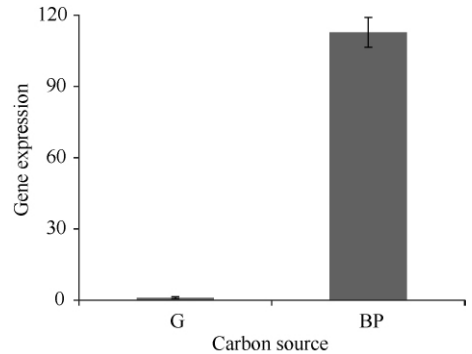


图 3. *Rhodococcus* sp. R04 MnCAT-C 基因表达量

Figure 3. Gene expression quantity of MnCAT-C gene from *Rhodococcus* sp. R04.

## 2.4 MnCAT-C 基因敲除

pK18mobsacB- $\Delta$ MnCAT-C 重组质粒用 *Eco*RI 和 *Hind*III 进行双酶切鉴定, 发现可以酶切出目的基因大小相当的条带(结果未显示), 由此可以确定, 所得到的重组质粒中含有目的基因片段, 为阳性重组质粒, 测序结果显示 pK18mobsacB- $\Delta$ MnCAT-C 敲除载体构建成功。将 pK18mobsacB- $\Delta$ MnCAT-C 电转入 *Rhodococcus* sp. R04, 挑取单菌落在 LBG 试管中培养 24 h, 取 20  $\mu$ L 涂在含 10% 蔗糖的 LBP 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 初步获得 MnCAT-C 基因敲除菌株, 从平板上挑取单菌落进行 PCR 验证, 结果如图 3 所示, 8 泳道为以质粒为模板的阳性对照, 2、4、5 和 6 泳道是质粒进入红球菌体内未发生基因敲除, 但敲除质粒仍在菌株中, 可以扩增出两条带, 大小分别为 1.2 kb 和 750 bp。1 泳道只能扩增出 750bp 左右的条带, 与质粒对照相同, 由此可以确定 1 泳道菌株 MnCAT-C 基因敲除成功。提取 1 泳道菌株的基因组, 以此作为模板, F4 和 R5 (表 2) 为引物, PCR 扩增。只能扩增出 750 bp 左右的片段(结果未显示), 与阳性对照结果相同, 将 PCR 扩增所得到的条带, 与 pEASY-T3 Cloning Kit 连接送去公司测序, 测序结果显示敲除成功。

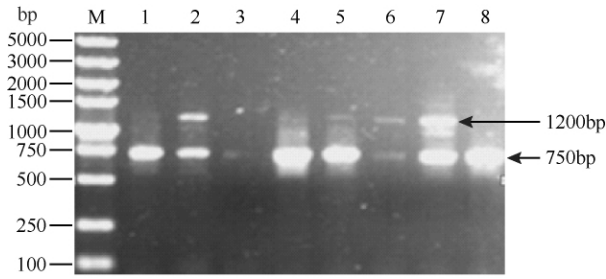


图 4. 敲除菌株菌落 PCR 的琼脂糖凝胶电泳

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of Knockout strains Colony PCR. Lane 1,2,3,4,5, 6,7: suspected Knockout strains; lane 8: positive control; M: Mark.

## 2.5 红球菌 R04 与敲除菌株的生理特性

**2.5.1 野生菌株与敲除菌株荧光极化实验:** 分别对不同联苯浓度和葡萄糖浓度 (5、10、15、20 mmol/L) 培养条件下生长的野生菌株和敲除菌株, 进行荧光极化测定。实验结果表明, 随着联苯浓度的增加, 野生菌株与敲除菌株荧光极化值均在增加, 但在同一联苯浓度的条件下, 敲除菌株极化值要比野生菌株的极化值大 (例如: 在 20 mmol/L 的联苯浓度下, 敲除菌株的荧光极化值是野生菌株的 2.35 倍)。而野生菌株与敲除菌株随着葡萄糖浓度的增加, 荧光极化值几乎没有变化, 在同一浓度下, 联苯培养的菌株要比葡萄糖培养的菌株的荧光极化值高很多, 荧光极化值的高低意味着细菌体内 ROS 浓度的高低。当细菌以葡萄糖为碳源时, 代谢只产生少量的 ROS, 对细菌的生长影响不大, 当细菌以联苯为碳源时, 代谢联苯会产生大量的 ROS, 会对细菌的生长造成抑制, 然而, 细菌会通过自身的氧化酶系来清除这些 ROS<sup>[14]</sup>。由于过氧化氢酶是细菌体内清除 ROS 的主要氧化酶<sup>[15]</sup>, 本实验将 R04 体内高表达的 MnCAT-C 基因敲除, 无法合成锰

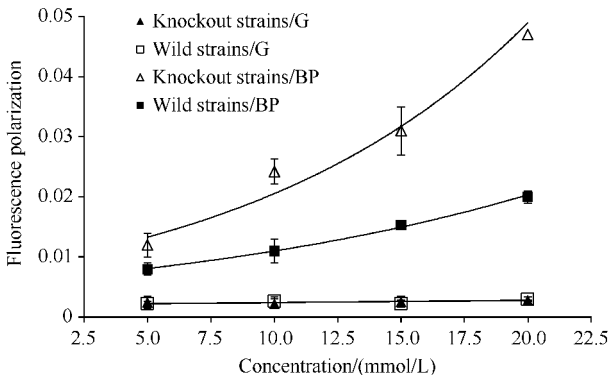


图 5. 野生菌株与敲除菌株的荧光极化值

Figure 5. The Fluorescence polarization value by Wild strains and Knockout strains.

过氧化氢酶, 从而影响到细菌对 ROS 的清除, 最终导致敲除菌株体内 ROS 浓度的上升。

**2.5.2 野生菌株与敲除菌株的生物量:** 野生菌株与敲除菌株每隔 4h 取样, 测定  $OD_{600}$  吸收值, 随着联苯浓度的增加, 野生菌株与敲除菌株的最大生物量均在增加, 在同一联苯浓度下, 野生菌株的生长速率要比敲除菌株快很多, 这种趋势随着联苯浓度的增加越来越大。本实验选择野生菌株与敲除菌株在 16 h 与 32 h 的生物量作图 (图 6), 在 16 h, 细菌处于对数前期, 可以看到菌株随着联苯浓度的增加, 生物量在减小。敲除菌株相对于野生菌株的生物量减少更多。在 32h, 细菌处于对数中期, 可以看到野生菌株随着联苯浓度的增加, 生物量在增加。而敲除菌株随着联苯浓度的增加, 生物量在减少。从上面的结果可以看出, MnCAT-C 基因的敲除对于菌株在联苯中的生长造成了一定的影响, 随着联苯浓度的增加, 表现最明显的时期是对数中期, 这是由于对数中期菌株生长快, 相应的代谢联苯的速度也快, 联苯的代谢造成了 ROS 浓度的上升。文献报道, 高浓度的 ROS 直接诱导凋亡或影响与凋亡有关的细胞内信号转导和基因表达, 对细胞造成损伤, 细胞本身会通过氧化酶系和生物抗氧化剂清除体内多余的 ROS, 来避免这种损伤<sup>[16-18]</sup>。但是由于锰过氧化氢酶是 *Rhodococcus* sp. R04 体内一种高表达的清除 ROS 的酶, MnCAT-C 基因的敲除

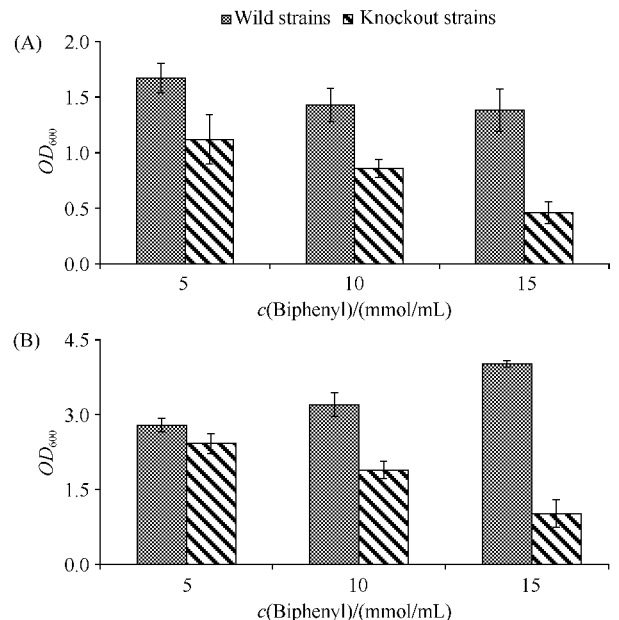


图 6. 野生菌株和敲除菌株在不同联苯浓度的生物量

Figure 6. Biomass of the Wild strains and the Knockout strains under different concentration of biphenyl. A: 16 hours; B: 32 hours.

破坏了细菌体内的这种平衡,造成了 ROS 在细菌体内的积累,从而抑制了细菌的生长。

**2.5.3 野生型菌株与缺陷菌株降解多氯联苯:**将野生菌株和敲除菌株的静息细胞分别加入到含有 400  $\mu\text{mol/L}$  4-CL、3,3'-2CL 和 3,3',4,4'-4CL 联苯的基础培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养,多氯联苯的降解率随取代元素数量的增加而降低,其中敲除菌株的降解率要比野生菌株的降解率低。如图 7 所示,对于 4-CL 联苯,野生菌株 5 h 以后降解率就能达到 100%,而敲除菌株在 5h 降解率只能达到 76.24%,在 15 h 才能完全降解完。对于 3,3'-2CL 联苯,野生菌株 5 h 以后的降解率为 62.13%,而敲除菌株 5 h 后的降解率仅为 1.76%,而培养 20 h 以后,野生菌株的降解率为 82.31%,而缺陷菌株的降解率为 76.61%。对于

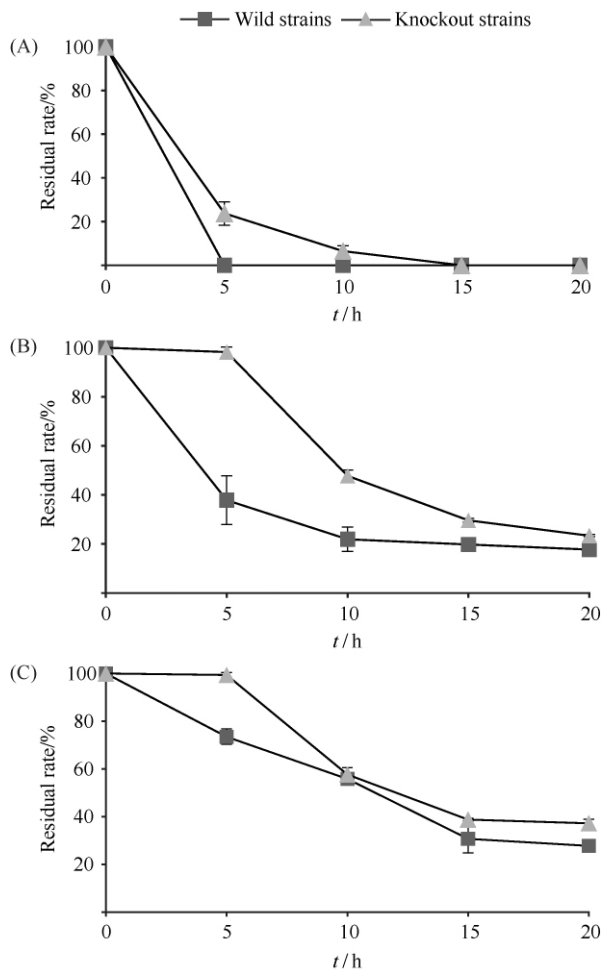


图 7. 野生菌株与敲除菌株对 4-CL、3,3'-2CL 和 3,3',4,4'-4CL 的生物降解动力学过程

Figure 7. Degradation kinetics of 4-CL, 3,3'-2CL, 3,3',4,4'-4CL by Wild strains and Knockout strains. A: 4-CL; B: 3,3'-2CL; C: 3,3',4,4'-4CL.

3,3',4,4'-4CL 联苯,野生菌株 5h 的降解率为 26.52%,而敲除菌株 5 h 后的降解率仅为 0.61%,而培养 20 h 以后,野生菌株的降解率为 72.24%,而缺陷菌株的降解率为 62.8%。由此可知,敲除菌株与野生菌株相比,在代谢多氯联苯的过程中,发生了降解速率降低(4-CL 联苯),降解滞后(3,3'-2CL 联苯,3,3',4,4'-4CL 联苯)的现象,这可能是由于将 MnCAT-C 基因敲除,对 *Rhodococcus* sp. R04 清除体内 ROS 的能力造成了一定影响,ROS 的积累对菌株的生长造成了抑制,从而影响到菌株降解多氯联苯的能力。

### 3 讨论

过氧化氢酶作为生物体内重要物质,具有非常重要的生理功能,其中最为主要的就是参与活性氧代谢过程<sup>[19]</sup>。作为生物抗氧化保护剂,过氧化氢酶催化效率很高,可确保活性氧一旦形成就迅速被分解而不会对生物体造成伤害<sup>[20]</sup>。

本研究发现了一种 N 端缺失的锰过氧化氢酶,理论的蛋白分子量只有完整过氧化氢酶蛋白分子量的一半左右,这种缺失可能会对蛋白的活性造成影响。实验结果也表明,这种缺陷性蛋白具有完整过氧化氢酶的大部分活性,但是与 N 端完整的 Mn-CAT 相比较,与底物结合的能力相对要弱,这可能是由于 N 端的缺失造成的。N 端的缺失使蛋白失去了一些关键氨基酸残基,导致其与过氧化氢结合的位点减少,从而影响了活性。表明这种缺陷性过氧化氢酶与完整过氧化氢酶的催化机制可能是不同的,进一步确定哪些结构影响酶与底物的结合位点,这些结构对于活性的影响到底有多大,这对于 Mn-CAT 的结构研究具有重要意义。这种 N 端缺失的锰过氧化氢酶的结构相对简单,为合成 Mn-CAT 功能相似的模拟物,提高模拟物的活性,稳定性,降低化学合成成本提供了依据。

细菌在正常生长的时候,代谢几乎不产生 ROS,但是加入多氯联苯等化合物会导致体内 ROS 浓度急速升高(本文检测野生菌株与敲除菌株的荧光极化值可以验证这点)。在以葡萄糖为碳源的培养基中,ROS 浓度低,MnCAT-C 基因表达少,而以联苯为碳源的培养基中,ROS 浓度高,MnCAT-C 基因大量表达来清除 ROS。高浓度的 ROS 会通过改变细胞内的还原状态和对蛋白的氧化修饰两种方式,诱导细胞衰老与死亡<sup>[21]</sup>。降低细菌体内 ROS 的浓

度,有利于延长细菌的生长<sup>[22]</sup>,而本实验中的锰过氧化氢酶正是 *Rhodococcus* sp. R04 中一种重要的,高表达的,清除 ROS 的过氧化物酶系。

在本文降解多氯联苯速率的实验中,随着取代元素数量的增加,多氯联苯越来越难降解,降解率降低。尤其是在 5h 以前,这种趋势很明显,由于 MnCAT-C 基因的敲除,野生菌株与敲除菌株降解率差距明显。但是到了 20h,野生菌株与敲除菌株的多氯联苯的剩余量相差不大,这可能是由于随着菌株的生长,红球菌 R04 体内其他的氧化应激酶发生作用,使体内 ROS 浓度下降,使菌株恢复了一定的代谢多氯联苯的能力。而在测量野生菌株与敲除菌株生物量的实验中也呈现这个趋势,在 60h 以后(本文未显示),菌株处于稳定期,此时细菌不再分裂,随着联苯浓度的增加,菌株的生物量都在增加,同一联苯浓度下,野生菌株与敲除菌株的生物量差别不大,这也从侧面验证了 HoYs 的观点<sup>[23]</sup>:过氧化氢酶只是在一些特定条件下才是必不可少的。这可能是随着菌量的增加,菌株代谢联苯的能力越来越强,加上体内其他氧化酶发挥作用,将 ROS 的浓度降低,减缓了对细菌生长的抑制作用,菌株可以加快生长,这也是稳定期野生菌株与敲除菌株生物量差别不大的原因。转录组测序的结果也印证了这个假设,在联苯培养基中上调表达的氧化应激基因上调倍数最高的是 Mn-CAT,但是也存在着好几种上调表达的氧化酶基因。在缺少锰过氧化氢酶的情况下,别的氧化酶基因大量表达来弥补这种损失,降低细菌体内的 ROS 浓度,尽量使细菌处于正常的状态。下一步可以提取缺陷菌株和野生菌株在降解多氯联苯过程中的 cDNA,通过实时荧光定量 PCR 检测表达量,相互比较作为实验验证。

本研究通过基因敲除菌株的生理生化实验表明,锰过氧化氢酶通过清除细菌体内的 ROS,降低体内 ROS 浓度,使细菌得以正常生长,代谢。证明了 ROS 对于细菌的损伤和锰过氧化氢酶在细菌代谢多氯联苯中的重要作用,为研究 *Rhodococcus* sp. R04 代谢多氯联苯过程中的氧化应急反应提供依据,对于研究 *Rhodococcus* sp. R04 代谢多氯联苯过程中的氧化应急途径具有重要意义。

## 参考文献

[1] Loshchagin OV, Kovalenko RI, Nozdrachev AD, Ianvareva IN, Krivoruchko BI. Possible role of catalase in

adaptation to diving of semi-aquatic rodents *ondata zibethica*. *Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2002, 38:90-95.

- [2] Loew O. A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*, 1900, 11 (279) :701-2.
- [3] Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 1996, 87 (4) : 1595-1599.
- [4] Loewen PC, Klotz MG, Hassett DJ. Catalase—an ‘old’ enzyme that continues to surprise US. *ASM News*, 2000, 66 (2) :76-82.
- [5] Kono Y, Fridovich I. Isolation and characterization of the pseudo-catalase of *Lactobacillus plantarum*—A new manganese containing enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258 (10) :6015-6019.
- [6] Barynin VV, Grebenko AI. T-catalase is a nonheme catalase of extremely thermophilic bacterium *Thermusthermophilu*. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 1986, 286 (2) : 461-464.
- [7] Blakemore RP, Carey AE. Effects of polychlorinated biphenyls on growth and respiration of heterotrophic marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 35 (2) : 323-328.
- [8] Hashmi MZ, Khan KY, Hu J, Naveedullah, Su X, Abbas G, Yu C, Shen C. Hormetic effects of noncoplanar PCB exposed to human lung fibroblast cells (HEL F) and possible role of oxidative stress. *Environmental Toxicology*, 2014, doi: 10.1002/tox.2008.
- [9] Yang X, Sun Y, Qian S. Biodegradation of seven polychlorinated biphenyls by a newly isolated aerobic bacterium (*Rhodococcus* sp. R04). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2004, 31 (9) : 415-420.
- [10] Yang X, Liu X, Song L, Xie F, Zhang G, Qian S. Characterization and functional analysis of a novel gene cluster involved in biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain R04. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103 (6) : 2214-2224.
- [11] Yang X, Xue R, Shen C, Li S, Gao C, Wang Q, Zhao X. Genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain R04, a polychlorinated-biphenyl biodegrader. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (18) : 5032-5033.
- [12] Stellmach B. 酶的测定方法. 钱嘉源译. 北京:中国轻工业出版社,1992:76-78.
- [13] Hayteas DL, Duffield DA. The determination by HPLC of PCB and P, p'-DDE residues in marine mammals stranded on the Oregon Coast. *Marine Pollution Bulletin*, 1997, 34 (10) : 844-848.
- [14] Song Y, Buettner GR, Parkin S, Wagner BA, Robertson LW, Lehmler HJ. Chlorination increases the persistence of semiquinone free radicals derived from polychlorinated



- biphenyl hydroquinones and quinones. *The Journal of Organic Chemistry*, 2008, 73 (21) : 8296-8304.
- [15] Hu P, Tirelli N. Scavenging ROS: superoxide dismutase/catalase mimetics by the use of an oxidation-sensitive nanocarrier/enzyme conjugate. *Bioconjugate Chemistry*, 2012, 23 (3) : 438-449.
- [16] Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu JL, Huckelhoven R, Stein M, Freialdenhoven A, Somerville SC, Schulze-Lefert P. SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, 2003, 425 (6961) : 973-977.
- [17] Hsieh CC, Papaconstantinou J. Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2006, 20 (2) : 259-268.
- [18] Karimpour S, Lou J, Lin LL, Rene LM, Lagunas L, Ma X, Karra S, Bradbury CM, Markovina S, Goswami PC, Spitz DR, Hirota K, Kalvakolanu DV, Yodoi J, Gius D. Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene*, 2002, 21 (41) : 6317-6327.
- [19] Noble PG, Antel JP, Yong VW. Astrocytes and catalase prevent the toxicity of catecholamines to oligodendrocytes. *Brain Research*, 1994, 633 (1-2) : 83-90.
- [20] Su S, Panmanee W, Wilson JJ, Mahtani HK, Li Q, Vanderwielen BD, Makris TM, Rogers M, McDaniel C, Lipscomb JD, Irvin RT, Schurr MJ, Lancaster JR, Kovall RA, Hassett DJ. Catalase (KatA) plays a role in protection against anaerobic nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 2014, 9 (3) : e91813.
- [21] Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Reviews*, 2006, 25 (4) : 695-705.
- [22] Chavez FP, Lunsdorf H, Jerez CA. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (5) : 3064-3072.
- [23] Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (31) : 32804-812.

## Physiological and biochemical characteristics of a manganese catalase lacking n-terminal

Xiuqing Yang<sup>\*</sup>, Yang Wang

Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China

**Abstract:** [Objective] We characterized a manganese catalase lacking n-terminal (MnCAT-C), to reveal its roles in bacterial growth, reactive oxygen species (ROS) removal and degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in *Rhodococcus* sp. R04. [Methods] Manganese catalase (Mn-CAT) sequence of the strain R04 was aligned with that of *Rhodococcus* sp. R1101. Mn-CAT and MnCAT-C were expressed in *E. coli* BL21 (DE3), and the target protein was purified with Q-sepharose and ammonium sulphate precipitation. Knockout strain was obtained by homologous recombination. ROS was measured by fluorescence polarization, and the degradation rate of PCBs was measured by HPLC. [Results] MnCAT-C protein was purified, and SDS-PAGE analysis showed that its molecular weight was 23 kDa. Compared with wild strains, the ROS concentration increased, and the growth rate was inhibited in knockout strains. Moreover, the degradation rate of PCBs decreased. [Conclusion] MnCAT-C retained the majority of the active properties of the original enzyme, including ROS clearance. The lack of MnCAT-C gene affected the growth rate and the PCBs degradation rate in strain R04.

**Keywords:** *Rhodococcus* sp. R04, manganese catalase, polychlorinated biphenyls (PCBs), reactive oxygen species (ROS)

(本文责编:王晋芳)