

降解 2,4-二氯酚微生物的分离及其 2,4-二氯酚羟化酶基因的克隆和表达

钟文辉¹ 孙 明² 何国庆³ 冯孝善⁴ 喻子牛^{2*}

¹(南京师范大学化学与环境科学学院,南京 210097)

²(华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070)

³(浙江大学生物系统工程与食品科学学院,杭州 310029)

⁴(浙江大学环境与资源学院,杭州 310029)

摘 要 从土壤中分离到一株降解 2,4-二氯酚能力较强的细菌菌株 GT241-1,经鉴定该菌株属于假单胞菌属。菌株 GT241-1 在最适条件下能在 48h 内将 90mg/L 的 2,4-DCP 降解 91%,能利用 2,4-二氯酚、2,4-二氯苯氧乙酸、苯甲酸和儿茶酚为唯一碳源生长。采用 Southern 杂交对 2,4-二氯酚羟化酶基因(*dcpA*)定位后构建基因组文库,再用斑点杂交筛选目的转化子,克隆了该菌株的 *dcpA*。序列测定得知含 *dcpA* 的亚克隆片段全长 2389bp,其中 *dcpA* 基因编码区 1797bp。核苷酸和氨基酸序列分析表明,*dcpA* 与已在 GenBank 登记的相关基因有一定的差异。*dcpA* 基因能够在大肠杆菌转化子中成功地表达有生物活性的酶。

关键词 假单胞菌,2,4-二氯酚,2,4-二氯酚羟化酶基因,基因克隆

中图分类号 Q93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0209-06

2,4-二氯酚(2,4-DCP)通常用于生产五氯酚、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和 2,4,5-三氯苯氧乙酸等氯代芳香化合物,这些化合物被广泛用作木材防腐、防锈剂、杀真菌剂和一般杀虫剂等。2,4-DCP 广泛存在于以上氯代芳香化合物的生产废水中,此外也存在于染料和增塑剂等的生产废水中。2,4-DCP 及其衍生物都是有毒、难降解化合物,是环保中需要控制的一大类污染物。美国、中国等国家已把 2,4-DCP 列入水中有害物质或优先污染物“黑名单”。分离筛选降解 2,4-二氯酚的微生物,对其特性、降解基因直至构建基因工程菌的研究具有重要的理论和现实意义。目前国内外对 2,4-DCP 的厌氧生物降解进行了广泛的研究^[1-2],也有对 2,4-DCP 降解菌的特性和降解酶定域及活性的报道^[3-4],但对微生物的 2,4-DCP 降解基因的结构和分子特征的研究报道不多。在好氧生物降解过程中,2,4-DCP 先经 2,4-二氯酚羟化酶催化生成 3,5-二氯儿茶酚后,进一步由 3,5-二氯儿茶酚 1,2-双加氧酶催化将苯环裂开生成 2,4-二氯-顺,顺-粘康酸,此中间代谢产物再经其它三种

不同的酶先后催化生成 2-氯马来乙酸^[5]。其中 2,4-二氯酚羟化酶基因(本文取代号为 *dcpA*)是降解 2,4-DCP 的关键基因之一。2,4-二氯酚羟化酶也参与对 2,4-D 的降解。根据对 2,4-D 降解基因的研究^[5-7],编码 2,4-二氯酚羟化酶的基因(*tfdB*)长度约为 1.8kb。笔者从生产 2,4-DCP 的排污口土样中分离到几株具有降解 2,4-DCP 能力的微生物,对这些菌株的生物学特性和对氯代芳香化合物的降解和利用能力进行了研究,并从其中一株降解 2,4-DCP 能力最强的细菌菌株中克隆出降解 2,4-DCP 的几个关键基因,对所克隆的基因序列作了测序和分析,也对基因在大肠杆菌是否表达进行了研究。这些研究为后续进一步构建降解 2,4-DCP 的基因工程菌奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 微生物菌株

1.1.1 降解 2,4-DCP 细菌菌株的分离筛选和鉴定: 从生产 2,4-DCP 及 2,4-D 的化工厂的排污口取土

样,添加 2,4-DCP 驯化 3 个月后分离 2,4-DCP 降解菌株。根据细菌分类手册^[8]对分离到的细菌进行形态观察和生理生化试验,再根据《伯杰氏细菌鉴定手册》鉴定到属。

1.1.2 DNA 操作的受体菌株:大肠杆菌 DH5 α 。

1.2 培养基

无机盐培养基(MS)配方按文献[9],无机盐固体培养基则另添加优质琼脂 1.6%。生长试验培养基为添加 100mg/L 或 200mg/L 单一碳源的无机盐固体培养基。LB 培养基配方按文献[10],LA 培养基为固体 LB 培养基。用添加 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LA 培养基筛选转化子或培养重组菌株。

1.3 细菌菌株降解 2,4-DCP 能力的测定

细菌菌株于 LA 平板上培养后,接种于添加 2,4-DCP 的 MS 培养基,经培养后离心,测定清液在 286nm 处的吸光值。

1.4 基因克隆

1.4.1 克隆载体:先后使用两种载体:一是大肠杆菌克隆载体 pUC19(2.7kb),另一是大肠杆菌克隆表达载体 pRSET-B(2.8kb),均为氨苄青霉素抗性(Amp^r)。

1.4.2 总 DNA 制备和酶切:总 DNA 大量制备采用 SDS 裂解法^[10]。用 EcoRI/XbaI 对总 DNA 分别进行完全酶切。

1.4.3 从琼脂糖凝胶中回收和纯化 DNA:凝胶电泳结束后用 EB 染色,在长波紫外灯下迅速切下目的 DNA 带,装入 1.5 mL Eppendorf 离心管,用进口试剂盒回收和纯化 DNA。

1.4.4 DNA 的 PCR 扩增:从核苷酸序列资料库中检索序列,根据编码降解 2,4-D 等底物的几个 2,4-二氯酚羟化酶基因的保守区序列设计 1 对引物:上游引物(6853 #)序列为 GAG, AAC, ACC, ATC, TGC, GCC, TC;下游引物(6854 #)序列为 GCC, GGA, CCA, TTC, GGA, TCA, C。用该对引物扩增得 2,4-二氯酚羟化酶基因片段预计大小 490bp。扩增反应体系体积 25 μ L,首轮循环 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,接着以 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 25 个循环。

1.4.5 杂交探针制备、Southern 杂交和斑点杂交:用引物 6853 # - 6854 # 对菌株 GT241-1 的总 DNA 进行 PCR 扩增,回收 490bp 特异性 DNA 片段,经标记后作 Southern 杂交和斑点杂交的探针。采用德国 Boehringer Mannheim 地高辛试剂盒标记探针。Southern 杂交方法:将总 DNA 完全酶切和电泳后, Southern 印渍将 DNA 转移至尼龙膜上,紫外光下固定 5.5min,

68 $^{\circ}$ C 预杂交 8h,再加入探针于 68 $^{\circ}$ C 杂交 20h,再洗膜和显色。斑点杂交参照文献[10]。

1.4.6 大肠杆菌质粒的抽提、DNA 的体外重组操作、大肠杆菌的常规转化:均参照文献[10]。DNA 的酶切和连接等操作均按酶的供应商推荐的方法。

1.5 *dcpA* 基因序列及 Southern 杂交探针序列测定:请专业公司测定。

1.6 转化子的 2,4-二氯酚羟化酶活力测定

大肠杆菌转化子的扩培及用 2,4-DCP 诱导培养、细胞抽提物的制备及 2,4-二氯酚羟化酶活力的测定按照文献[11][12]。抽提物中蛋白质含量测定采用 Folin-酚法^[13]。

2 结果和分析

2.1 降解 2,4-DCP 菌株的分离和鉴定

经分离和筛选得到一株降解 2,4-DCP 能力较强、并能利用 2,4-DCP 为唯一碳源生长的细菌,取代号为 GT241-1。菌株 GT241-1 为杆菌,革兰氏染色阴性,鞭毛极生,葡萄糖氧化产酸,氧化酶试验阳性,接触酶试验阳性,硝酸盐还原阳性。由以上形态和生理生化特性将它鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

2.2 菌株 GT241-1 对 2,4-DCP 降解能力和对其它芳香化合物的利用能力

菌株 GT241-1 是笔者分离得到的几株微生物细菌和真菌菌株中降解 2,4-DCP 能力最强者。降解 2,4-DCP 的最适温度 25 ~ 30 $^{\circ}$ C;降解期为第 18 ~ 48h,在最适条件下能在 48h 内将 90mg/L 的 2,4-DCP 降解 91%。利用 2,4-DCP 的浓度范围:MS 液体培养基中为 400mg/L 以下;LA 平板上为 700mg/L 以下。

菌株 GT241-1 在分别添加 2,4-D、儿茶酚、苯酚、水杨酸、苯甲酸、2-氯苯甲酸、4-氯苯甲酸、2,4,6-三氯酚、五氯酚等几种芳香化合物作唯一碳源的生长试验培养基中的生长试验表明,该菌株可利用 2,4-D、苯甲酸、儿茶酚为唯一碳源生长,且长势都比利用 2,4-DCP 好,但不能利用其它几种为唯一碳源生长。

2.3 基因组文库的构建、目的转化子的筛选和验证

总 DNA 经酶切,用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳并转尼龙膜后进行 Southern 杂交,结果出现一条约 10kb 的杂交带(图 1)。回收约 10kb 的 EcoRI/XbaI 酶切片段,与克隆载体 pUC19 连接后转化大肠杆菌 DH5 α ,构建基因组文库,用快检法检测并筛选文库

中的重组子(重组子占 26% ~ 44%) ,采用斑点杂交(图谱见图 2)从约 1200 个重组子中筛选得到一个目的转化子 ,命名为 Z539。

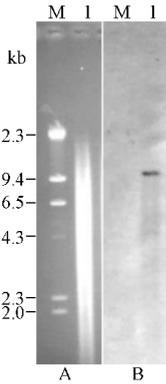


图 1 菌株 GT241-1 总 DNA 酶切及 Southern 杂交图谱

Fig.1 The enzyme digest spectrum of the total DNA from GT241-1(A) and its Southern blot(B)

M : Marker (λ *Hind* III)
1 : *Eco* R I / *Xba* I

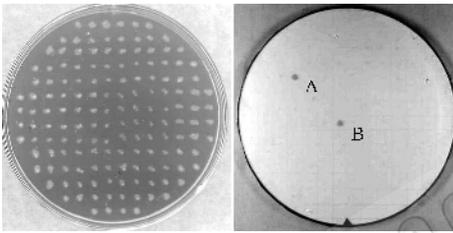


图 2 斑点印迹图谱

Fig.2 Dot blotting profile

A : the aim transformant blot
B : positive control blot

2.4 *dcpA* 基因克隆片段的缩短和亚克隆

用 *Eco* R I / *Xba* I 酶切 pZ539 并回收其 10kb 左右外源片段 ,分别用 *Sac* I 、 *Sma* I 、 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切得到 3、1、2、3 个片段(图 3)。用引物 6853 # - 6854 # 分别对 *Sac* I 、 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切片段进行 PCR 扩增 ,结果显示 *Hind* III 酶切得到的 2.4kb 左右的片段 (*Hind* III -B)及 *Sac* I 酶切得到的 3.8kb 左右的片段 (*Sac* I -B 片段)能分别扩增出预期大小的 DNA 片段 ,而对其它片段未能扩增出预期大小的 DNA 片段 ,此提示 *Hind* III -B 和 *Sac* I -B 两片段都可能含完整的 *dcpA* 基因。将大肠杆菌克隆表达载体 pRSET-B 分别用 *Hind* III -*Xba* I 、 *Hind* III -*Eco* R I 和 *Hind* III 酶切 ,再分别与回收的 *Hind* III -B 片段连接并转化大肠杆菌。结果其中用 *Hind* III -*Xba* I 酶切的载体成功地与 *Hind* III -B 片段连接 ,获得转化子 BS1-12。 *DcpA* 基因亚克隆片段 (*Hind* III -B 片段) λ pBS1-12 及 pBS1-12/*Hind* III 图谱见图 4。

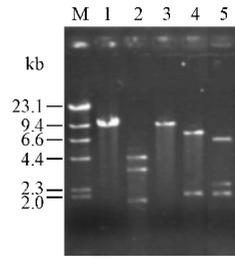


图 3 质粒 pZ539 携带外源片段经不同酶切图谱

Fig.3 The restriction pattern of cloning fragment

M : Marker (λ *Hind* III)

1 : fragment before enzyme digest

2 : *Sac* I digesting fragments (middle : *Sac* I -B)

3 : *Sma* I digesting fragment

4 : *Kpn* I digesting fragments

5 : *Hind* III digesting fragments (middle : *Hind* III -B)

2.5 *dcpA* 基因序列及分析

dcpA 基因的亚克隆片段全序列测定结果显示 ,该片段全长 2389bp ,其中 *dcpA* 编码区 1797bp。将 *dcpA* 基因序列向 GenBank 作了注册 ,注册号 AY496436。

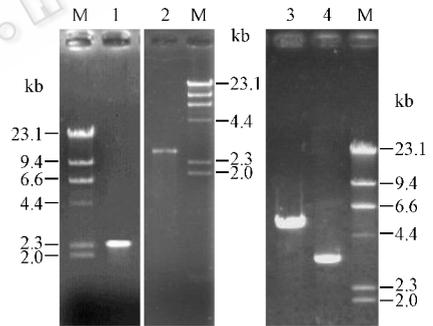


图 4 质粒 pBS1-12 及酶切图谱

Fig.4 Plasmid pBS1-12 and its enzyme digesting fragment

M : Marker (λ *Hind* III) ;

1 : *dcpA* subcloned fragment ;

2 : pRSET-B/*Hind* III ;

3 : pBS1-12/*Hind* III ;

4 : pBS1-12

基因库 BLAST 联网检索显示 ,*dcpA* 基因序列与基因库中相关基因有不同程度的差异。与真氧产碱杆菌质粒 pJP4 的 2,4-二氯酚羟化酶基因 *tfdB* (GenBank Accession No. M35097.1) 的差异最小 ,有 97% 的同源性 ;与其它相关基因的差异较大 ,例如与产碱杆菌 JD6 的 2,4-二氯酚羟化酶基因 *tfdB* (GenBank Accession No. AF068281.1) 及 *Burkholderia cepacia* 的 2,4-二氯酚羟化酶基因 *tfdB* (GenBank Accession No. AF068278.1) 只有部分片段是同源的。基因库 BLAST 联网检索也显示 ,推测的 *dcpA* 编码的氨基酸序列与相关基因编码的氨基酸序列也有不同程度的

差异。与 pJP4 的 2,4-二氯酚羟化酶的氨基酸序列 GenBank Accession No. AAA98266.1 的差异最小,其同源率为 97.5%。与其它相关酶的氨基酸序列的差异较大,例如与 *Burkholderia cepacia* 的 2,4-二氯酚羟化酶的氨基酸序列(GenBank Accession No.

Query: 1 MALTETDVLVVGTPGAGASAGALLARYGVRTMLINKYNWTAIPTRAHITNQRIMEILRD 180
 Sbjct1: 1 MALTETDVLVVGTPGAGASAGALLARYGVRTMLINKYNWTAIPTRAHITNQRIMEILRD 60
 Sbjct2: 1 MSARIEVDVLVVGSGPAGGAAALLARYGIKTMVNRKYGVANTPRAHITNQRIMEILRD 60
 Sbjct3: 5 ATVIEVDVLVVGSGPAGAASTLLLATYGVKTLVCSKYATTSTRIPRSHITNQRIMEIVMRD 63

Query: 181 LGLEAEARLYAAPNDLMGENTICASLAGEEFGRYRTWGTDVRRRDYDECSPTSMCDLPQ 360
 Sbjct1: 61 LGLEAEARLYAAPNDLMGENTICASLAGEEFGRIWGTDVRRRDYDECSPTSMCDLPQ 120
 Sbjct2: 61 LGLEKEVKLYATPNELMGENTICASVAGEEFGRIWGTDVRRRDYDESSPTAMCDLPQ 120
 Sbjct3: 64 LGLEECEAMASPAELMGENVYCTSLVGDELGRVLTWGTHPQRRADYELASPTHMCDLPQ 123

Query: 361 NYLEPILVKSAAALDGCKVRFDETYLGLDAJADGVSSRLDRNLGEEFTVRSKYLIGADGA 540
 Sbjct1: 121 NYLEPILVKSAAALDGCKVRFDETYLGHFQDADGVSSRLDRNLGEEFTVRSKYLIGADGA 180
 Sbjct2: 121 TYLEPILGSSARDGAKLRFDETYLITQDQNGVTAARLDGLSGEHEFVRAKYMGADGA 180
 Sbjct3: 124 NLLEPIMINHAARRGADVRFHTEFVSLKQDETGVATVRDHLDRQYDRAKYLIGADGA 183

Query: 541 NSRVVSDLLPLEATMGKSGSINLFEADLDRYVAHRPSVLNWIQPGSDIGLIGVLR 720
 Sbjct1: 181 NSRVVSDLLPLEGTMKSGSINLFEADLDRYVAHRPSVLYWVIQPGSDIGLIGVVR 240
 Sbjct2: 181 NSRVVSDLLPLEGEMGKSGSINLFEADLTKYVHRPSVLYWVIQPGSDIGLIGVVR 240
 Sbjct3: 184 NSQVVDQVGLPVEGKMGVSGSINVFEADLTKYVHRPSVLYWVIQPGSVGGLGIGVIR 243

Query: 721 MVRPWNKWLAIWGYDVEQGPPEISEFARRIVHNLIGDSDVPLKIEKISTWTVNNDMYATR 900
 Sbjct1: 241 MVRPWNKWLAIWGYDVEQGPPEISEFARRIVHNLIGDSDVPLKIEKISTWTVNNDMYATR 300
 Sbjct2: 241 MVRPWNKWLAIWGYDVEQGPPEIDTEEFARKIVHNLIGDHDVVKIEKISTWTVNNDMYATR 300
 Sbjct3: 244 MVRPWNKWLAIWGYDIAGPPDLENAHARQVHSLGDSITPVKIEKISTWTVNNDMYATR 303

AAB86805.1)同源率为 60%;与 *Deffluibacter lusatiensis* 的 2,4-二氯酚羟化酶的氨基酸序列(GenBank Accession No. CAD60255.1)同源率为 74%(见图 5)。以上情况表明, *dcpA* 不同于已在 GenBank 登记的降解其它相关底物的相关酶编码基因。

Query: 901 LQQGRVFCAGDAVHRHPTNGLGSNTSIQDSFNLAWKIAMVNLNGTADSELLDITYTERAP 1080
 Sbjct1: 301 LQQGRVFCAGDAVHRHPTNGLGSNTSIQDSFNLAWKIAMVNLNGTADSELLDITYTERAP 360
 Sbjct2: 301 LQKQVRFVAGDAIHRHPTNGLGSNTSIQDSFNLAWKIAMVNLKQADPSLLDITYTERAP 360
 Sbjct3: 304 LFDNRVFCMGDAVHRHPTNGLGSNTSIQDAPNLCWKLSHVLOGKAGPELLATYNEERAP 363

Query: 1081 IAKQVVCVRANKSLTDLRPKALALALPRATSHDDVKSNNMARRKEPGEPAEQQRTRLR/EAIA 1260
 Sbjct1: 361 IAKQVVCVRANKSLEDPPPIAMALGLPQAKSADMEKSNMARRKEPGEPAEQQRTRLR/EAIA 420
 Sbjct2: 361 VAKQVQRANKSLGDFPPIAAVAGLIPQAKSIDEAMYANMAKRKEAGHEGEAQREALR/AA 420
 Sbjct3: 364 VARQVQRANKSLGDFPPIAAVAGLFDITKDPQMQORNIARLKEQSP/EAQQRALRA/AAID 423

Query: 1261 GTNYVYNAHGVEMNQRYDSPAIVPDNSPDEVRDVELYHQASTRPGARMPHVWVYASGDG 1440
 Sbjct1: 421 GTNYVYNAHGVEMNQRYDSPAIVADNSPDEVRDVELYHQASTRPGAMPHVWVYASGDG 480
 Sbjct2: 421 GTDYVYNAHGVEMNQRYDSPAIVPDGSAEVEFADELEHYQASSRIPGAPVPHVWVYRNG-G 479
 Sbjct3: 424 GTQVYVYNAHGVEMNQRYQSAIVPDGTPDFGRRDSELYHAHSRGPAPVPHVWVYTRHG 482

Query: 1441 HRISTKDLCKGKGNFTLFTGIGGAAWQDAAAAVSRQLGVAVTVRIIGPQAYDDHYGDFAR 1620
 Sbjct1: 481 HRISTKDLCKGKGNFTLFTGIGGAAWQDAAAAVSRQLGVAVTVRIIGPQAYDDHYGDFAR 540
 Sbjct2: 480 HRISTKDLCKGGRFTLFTGIGGWDKDAAAAHEKELGVEDHVIHGTQALLEDQYGEFAA 539
 Sbjct3: 483 RRVSTLDLCKGRFSLI.SGIAHSGPVEAAAAHAEELGDI.DVHHIGPQLEEDLYGDFAR 542

Query: 1621 ISEIIDTGAILVRPDPFHVAAYRATSLPADAAGDLVAMRRILGRQSERSSALRVTSRAI 1794
 Sbjct1: 541 ISEIIDTGAILVRPDPFHVAAYRATSLPADAAGDLVAMRRILGRQSERSSALRVTSRAI 598
 Sbjct2: 540 MRGTTDSGALLVRPDPFHVAAYRATSLPADAAGDLVAMRRILGRQSERSSALRVTSRAI 598
 Sbjct3: 543 VREIEESGALLVRPDPNFICWRAMRWQEGSGDELRAALKRAL 583

图 5 *dcpA* 编码的氨基酸序列及与其它相关基因编码的氨基酸序列的比较

Fig.5 Comparison of the deduced amino acid sequences encoded by *dcpA* and relatives genes

Query : the deduced amino acid sequence encoded by *dcpA*
 Sbjct1 : amino acid sequence of 2,4-dichlorophenol hydroxylase of pJP4
 Sbjct2 : amino acid sequence of 2,4-dichlorophenol of *Deffluibacter lusatiensis*
 Sbjct3 : amino acid sequence of 2,4-dichlorophenol of *Burkholderia cepacia*

2.6 *dcpA* 基因在大肠杆菌中的表达

分别测定大肠杆菌转化子 Z539 及 BS1-12 的 2,4-二氯酚羟化酶活力,结果显示在经 2,4-DCP 诱导的情况下两转化子均具有 2,4-二氯酚羟化酶活力(表 1),说明 *dcpA* 基因能够在大肠杆菌中表达出有功能的蛋白质。但未经 2,4-二氯酚诱导的上述两转化子的 2,4-二氯酚羟化酶活力为零。表 1 还显示,转化子 Z539 及 BS1-12 所表达的 2,4-二氯酚羟化酶活力比原始菌株假单胞菌 GT241-1 的低。

表 1 转化子细胞抽提物中的 2,4-二氯酚羟化酶活力

Table 1 2,4-dichlorophenol hydroxylase activity in transformant cell extracts

Strain	Z539	BS1-12	GT241-1	<i>E. coli</i> pUC19	<i>E. coli</i> pRSET-B
Enzyme activity ($\mu\text{mol}/\text{min per mg of protein}$)	8.4	9.8	23.4	0	0

3 讨论

2,4-DCP 等氯代芳香化合物是有毒、难降解有机污染物。从国内外资料报道看,分离得到的 2,4-DCP 降解菌主要是假单胞菌^[3,4]。本文中的假单胞

菌 GT241-1 是我们分离的几株降解 2,4-DCP 细菌和霉菌中降解能力最强者,它能将 2,4-DCP 彻底降解,性能稳定,还可降解 2,4-D、苯甲酸和儿茶酚等有机物,是一株性能优良的 2,4-DCP 降解菌株。假单胞菌是有毒有机废水中的常见优势菌之一,但从土壤中分离到的假单胞菌不一定适用于有毒有机污水处理,因为它不一定能很好地生活于有毒有机污水处理的特殊环境中,在与有毒有机污水中土著菌进行生存竞争时不一定处于有利地位。本试验中分离的菌株 GT241-1 虽然降解 2,4-DCP 的能力较强,但在 18℃ 时基本无 COD 去除能力,而 18℃ 时处理农药废水的活性污泥中的两株优势细菌 S₁、S_B 的 COD 去除能力较强。这些情况说明将 2,4-DCP 降解能力较强的微生物的基因克隆至处理有毒有机废水活性污泥中的土著优势菌,所构建的工程菌可能在污水处理和环境修复中发挥更有效的作用。

参与 2,4-DCP 降解的多个基因中,编码起始几步降解酶的基因即 2,4-DCP 羟化酶基因、3,5-二氯儿茶酚 1,2-双加氧酶基因、氯粘康酸环异构酶基因、反式氯双烯内酯异构酶基因和氯双烯内酯水解酶基因是关键基因。大量研究表明,微生物降解有机污染物的基因通常与质粒有关。对很多氯代芳香化合物来说,往往是降解性质粒参与编码降解途径的一

部分, 剩余部分由染色体基因控制。根据对真氧产碱杆菌 JMP134 (pJP4) 对 2,4-D 的降解过程及其控制基因的研究^[5,14], 从 2,4-D 至氯代马来乙酸之间降解过程受质粒 pJP4 控制, 氯代马来乙酸及之后的降解过程受染色体控制。从这些情况来推测 *dcpA* 基因可能位于质粒上。笔者曾检出菌株 GT241-1 的两条大质粒带, 但未能成功地抽提出这些质粒。

本研究采用的基因克隆策略是用 Southern 杂交对 *dcpA* 基因进行定位后构建基因文库, 再用斑点杂交从基因文库中筛选目的转化子。对 *dcpA* 基因的定位参考了对 2,4-D 降解质粒 pJP4 的研究结果, 采用 *EcoR* I / *Xba* I 酶切总 DNA, Southern 杂交将 *dcpA* 基因定位于约 10kb 的 *EcoR* I / *Xba* I 酶切片段。Southern 杂交定位图中显示出一条杂交信号带, 说明菌株 GT241-1 的 DNA 在探针结合部位无 *EcoR* I / *Xba* I 位点, 即提示 *dcpA* 基因可能包含于该酶切片段上。在对 *dcpA* 基因的克隆时, 碰到了载体 pUC19 与外源 DNA 片段连接较困难(连接频率低), 转化子数量少、重组子在转化子中占的比例较小(百分率仅为 26% ~ 44%) 等诸多问题。笔者在进行斑点杂交之前用快检法对转化子中的重组子进行了筛选, 用斑点杂交从约 1200 个重组子中才筛选得到一个目的转化子。

质粒 pJP4 的长度为 7.9kb 的 *Hind* III - *Sst* I 片段, 包含了 2,4-二氯酚羟化酶基因(*tfdB*) 和二氯儿茶酚氧化操纵子(*tfdCDEF*)^[5]。笔者用与 3,5-二氯儿茶酚 1,2-双加氧酶基因(*tfdC*) 互补的引物 3313 # - 3314 # 对所克隆的 10kb 的 *dcpA* 基因片段进行了 PCR 扩增, 结果未扩增出预期大小的 DNA 片段, 提示所得到的克隆片段可能不含 3,5-二氯儿茶酚 1,2-双加氧酶基因。据资料报道 2,4-二氯酚羟化酶基因 *tfdB* 的长度为 1.8kb^[5], 故笔者将克隆片段作了缩短和亚克隆并将亚克隆片段作了序列测定。测序结果表明 *dcpA* 亚克隆片段全长 2389kb, 上下游两端分别为 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点。核苷酸序列和氨基酸序列分析表明, *dcpA* 与已在 GenBank 登记的相关基因有一定的差异; 与 pJP4 的 *tfdB* 差异最小, 它们之间的核苷酸序列有 97% 的同源性。

原核生物基因的启动子一般位于起始密码子上游几十至几百个核苷酸处, 本研究中克隆到的 *dcpA* 的起始密码子 GTG 上游有 275 个核苷酸, 推测该克隆片段带有启动子, 此为转化子的酶活力测定结果所证实。转化子 Z539 及 BS1-12 的 2,4-二氯酚羟化酶活力测定结果表明了所克隆的 *dcpA* 能够在大肠

杆菌中表达出有功能的蛋白质。但两转化子的酶活力都比原始菌株假单胞菌 GT241-1 的酶活力低, 其原因可能是复杂的, 基因表达调控的不同可能是主要原因之一。对 2,4-D 降解基因调控的研究表明, 2,4-二氯酚羟化酶基因的表达受调控基因 *tfdS* 的调控^[11]。假单胞菌 GT241-1 是笔者从受 2,4-二氯酚及 2,4-D 污染的土壤中分离和筛选得到的细菌菌株, 其降解 2,4-二氯酚能力较强, 说明包括 2,4-二氯酚羟化酶基因调控在内的代谢调节状态良好。而在大肠杆菌转化子 Z539 及 BS1-12 中不存在与假单胞菌 GT241-1 类似的调控作用, 2,4-二氯酚羟化酶基因虽能表达但不处于最佳状态, 2,4-二氯酚羟化酶活力就较低。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kohrong G-W, Rogers J E, Wiegel J. Anaerobic biodegradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater lake sediments at different temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **55**(2): 348 - 353
- [2] Boyd SA, Shelton DR. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, **47**(2): 272 - 277
- [3] He GQ (何国庆), Zhong WH (钟文辉), Hu SQ (胡申才) *et al.* Characteristics and location of 3,5-dichlorocatechol 1,2-dioxygenase gene of *pseudomonas* GT141-2. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2001, **9**(3): 219 - 222
- [4] Dai SQ (戴树桂), Zhuang YY (庄源益), Chen YS (陈勇生) *et al.* Study on enzyme activity and distribution in two strains of bacteria by dichlorophenol degradation. *Acta Scientiae Circumstantiae* (环境科学学报), 1996, **16**(2): 173 - 178
- [5] Perkins EJ, Gordon MP, Caceres D *et al.* Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J Bacteriol.*, 1990, **172**: 2351 - 2359
- [6] Koiv V, Marits R, Heinaru A. Sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase gene *tfdB* and 3,5-dichlorocatechol 1,2-dioxygenase gene *tfdC* of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading plasmid pEST4011. *Gene*, 1996, **174**(2): 293 - 297
- [7] Laemmli CM, Leveau JH, Zehnder AJB *et al.* Characterization of a second *tfd* gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J Bacteriol*, 2000, **182**(15): 4165 - 4172
- [8] Microbiology Institute of Academia Sinica (中科院微生物研究所). Normal Methods for Identifying General Bacteria (一般细菌常用鉴定方法). Beijing Science Press, 1978
- [9] Stanlake GJ, Finn RK. Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**(6): 1421 - 1427
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1989. cn

- [11] Kaphammer B, Olsen RH. Cloning and characterization of *tfdS*, the repressor-activator gene of *tfdB*, from the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid catabolic plasmid pJP4. *J Bacteriol*, 1990, **172**(10):5856 – 5862
- [12] Liu T, Chapman PJ. Purification and properties of plasmid-encoded 2,4-dichlorophenol hydroxylase. *FEBS Lett*, 1984, **173** 314 – 318
- [13] Zhang LX(张龙翔). Biochemistry experimental methods and technique(生物化学实验方法和技术). Beijing : Higher Education Press, 1997
- [14] Don RH, Weightman AJ, Knackntuss HJ *et al.* Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). *J Bacteriol*, 1985, **161** 85 – 90

Isolation of 2,4-Dichlorophenol Degrading Bacterium Strain and Cloning and Expression of Its 2,4-dichlorophenol Hydroxylase Gene

ZHONG Wen-Hui¹ SUN Ming² HE Guo-Qing³ FENG Xiao-Shan⁴ YU Zi-Niu^{2*}

¹(College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

²(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

³(College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

⁴(College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract 2,4-Dichlorophenol is toxic and biorefractory organic pollutant. A 2,4-dichlorophenol degrading bacterial strain GT241-1, identified as *Pseudomonas* sp., was isolated from soil samples which was collected from drainage area of several 2,4-dichlorophenol producing factories. Strain GT241-1 had strong 2,4-dichlorophenol degrading ability, it could decompose 91% 2,4-dichlorophenol of 90mg/L within 48 hours at 25 ~ 30°C, and could utilize 2,4-dichlorophenol, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), benzoate and catechol as sole carbon and energy source. Southern blot showed that 2,4-dichlorophenol hydroxylase gene (*dcpA*) of strain GT241-1 locates on the about 10kb *EcoR* I / *Xba* I fragment. This fragment was recovered, linked to the vector pUC19 and transformed into the *E. coli* DH5 α . A aim transformant, Z539, was obtained by dot blotting from about 1200 transformants. PCR and the sequencing results shew that the whole *dcpA* gene is contained within the 10kb *EcoR* I / *Xba* I fragment of pZ539. This fragment was shortened to about 2.4kb by *Hind* III. The shorted fragment was subcloned to vector pRSET-B to get a transformant BS1-12. The subcloned fragment was sequenced. Sequencing results showed that the whole length of the subcloned fragment containing *dcpA* is 2389bp and the nucleotide span of coding region is from number 276 to number 2072 (1797bp), with ATG and TAA as start and stop codon respectively. The sequence analysis of *dcpA* and the deduced amino acid encoded by *dcpA* showed that they are different from the relative sequences registered in the GenBank. The subcloned fragment carry the promoter of *dcpA*, this can deduce from the fact that the upflow length of *dcpA* coding region is 275bp, and further confirmed by the 2,4-dichlorophenol hydroxylase activity measurement results. The 2,4-dichlorophenol hydroxylase activity of transformant Z539 and BS1-12 were detected, the results showed these transformants have 2,4-dichlorophenol hydroxylase activity. By comparison, the activity of these transformants were lower than that of the strain GT241-1.

Key words *Pseudomonas*, 2,4-dichlorophenol, 2,4-dichlorophenol hydroxylase gene, gene cloning

Received : 08-26-2003

This work was supported by Grant from Chinese National Science Fund(No. 30080013) and from Open Fund of Key Laboratory of Agricultural Microbiology of Ministry of Education.

* Corresponding author. Tel : 86-27-87396030 ; E-mail : yz41@public.wb.hb.cn