

1,2,4-三氯苯双加氧酶和脱氢酶基因克隆与序列分析

姜健^{1,2}, 王慧^{1*}, 高静思¹, 宋蕾¹, 宁大亮¹

(1. 清华大学环境科学与工程系环境生物学研究所, 北京 100084; 2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要:通过 *Pseudomonas nitroreducens* J5-1 对不同氯苯类底物的降解实验, 发现其降解能力大小顺序为: 1,2,4-三氯苯 > 1,3-二氯苯 > 1,2-二氯苯 > 氯苯, 与已报道的 1,2,4-三氯苯降解菌株在底物利用的特性方面存在差异. 采用 PCR 技术从 J5-1 中扩增获得氯苯降解过程中的关键酶——氯苯双加氧酶和脱氢酶的基因序列, 分别命名为 *tcbA* 和 *tcbB*, 序列比对发现其与 *Burkholderia* sp. PS12 的氯苯双加氧酶和脱氢酶的基因序列同源性最高. 通过 J5-1 的氯苯双加氧酶 α 亚基 (TcbAa) 与 PS12 的氯苯双加氧酶 α 亚基 (TecA1) 的氨基酸序列比对发现, 在 307~310 位置有连续 4 个氨基酸残基的差异 (I307L、M308T、I309V、Q310E), 这可能是造成 2 株菌对 1,2,4,5-四氯苯降解偏好性差异的原因. 此外, 通过催化芳香化合物降解的双加氧酶 α 亚基的系统进化分析, 认为 TcbAa 属于甲苯/联苯亚科, 且与多取代氯苯双加氧酶 α 亚基的同源性最大.

关键词:1,2,4-三氯苯; 生物降解; 硝基还原假单胞菌 J5-1; 氯苯双加氧酶基因; 脱氢酶基因

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)06-1655-05

Cloning and Sequence Analysis of 1, 2, 4-Trichlorobenzene Dioxygenase and Dehydrogenase Genes

JIANG Jian^{1,2}, WANG Hui¹, GAO Jing-si¹, SONG Lei¹, NING Da-liang¹

(1. Institute of Environmental Biology, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: *Pseudomonas nitroreducens* J5-1 is able to use monochlorobenzene, 1, 2-dichlorobenzene, 1, 3-dichlorobenzene and 1, 2, 4-trichlorobenzene as sole carbon and energy sources, and it differs from those 1, 2, 4-trichlorobenzene degrading bacteria reported in substrate utilizing characters. PCR technique was used to amplify the genes of chlorobenzene dioxygenase and dehydrogenase of J5-1, and they were named as *tcbA* and *tcbB*, respectively. Homology analysis indicated that these genes and gene products were most closely related to those of *Burkholderia* sp. PS12. By alignment of the amino acid sequences of the α subunits of TcbAa (from J5-1) and TecA1 (from PS12), four amino acid residues from site 307 to site 310 were found to be different (I307L, M308T, I309V, Q310E), which probably retarded the preference for the substrate 1, 2, 4, 5-tetrachlorobenzene. Furthermore, the phylogenetic analysis of the dioxygenase α subunits showed that TcbAa was belong to the toluene/diphenyl subfamily, and was most closely related to the poly-chlorinated benzene dioxygenase α subunit.

Key words: 1,2,4-trichlorobenzene; biodegradation; *Pseudomonas nitroreducens* J5-1; chlorobenzene dioxygenase gene; dehydrogenase gene

1,2,4-三氯苯 (1,2,4-Trichlorobenzene, 1,2,4-TCB) 是美国环保署 (EPA) 优先控制污染物之一^[1], 因其化学性质稳定, 采用物化方法较难将其去除, 故而生物降解成为去除 1,2,4-三氯苯的主要手段. 目前国内外关于氯苯类化合物降解菌株的研究主要集中在氯苯和二氯苯^[2,3], 对三氯苯降解菌株的研究也较多关注其降解能力及降解途径等方面^[4,5], 仅有国外少数学者^[6,7]对氯苯降解基因进行了研究.

氯苯双加氧酶是 1,2,4-三氯苯好氧降解途径的第 1 个酶. 它通过羟基化作用使 1,2,4-三氯苯转化为芳香醇类化合物, 增大了底物的水溶性, 从而促使下一步反应顺利进行; 同时, 产物经过脱氢酶作用生成的氯代邻苯二酚, 在环境中存在很多细菌可以将其彻底矿化. 因此, 氯苯双加氧酶和脱氢酶在氯苯类化合物的好氧降解中起着重要作用.

本研究采用分段 PCR 法获得了 1,2,4-三氯苯

降解菌 *Pseudomonas nitroreducens* J5-1 的氯苯双加氧酶和脱氢酶基因的全序列, 并进行了序列比较分析, 同时结合 J5-1 的降解底物实验, 分析了氯苯双加氧酶 α 亚基的结构与降解底物范围的相关性, 及其在芳香化合物双加氧酶 α 亚基进化系统中的位置, 以期对 1,2,4-三氯苯污染的治理及相关研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 化学试剂与培养基

氯苯 (购自北京益利精细化学品有限公司),

收稿日期: 2007-06-04; 修订日期: 2007-10-04

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418506); 清华大学基础研究基金项目 (JC2003011)

作者简介: 姜健 (1982~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物学和分子生物学, E-mail: jiangjian00@tsinghua.org.cn

* 通讯联系人, E-mail: wanghui@tsinghua.edu.cn

1,2-二氯苯、1,3-二氯苯、1,2,4-三氯苯(购自北京化学试剂公司),1,4-二氯苯(购自中国医药集团上海化学试剂公司),1,2,3,4-四氯苯、1,2,4,5-四氯苯(购自美国 Aldrich 公司),均为分析纯.

培养基选用 LB 培养基、无机盐培养基和无机盐 + 酵母粉培养基. LB 培养基和无机盐培养基的组分参见文献[8,9]. 无机盐 + 酵母粉培养基组分: 酵母提取物 1 g, 加无机盐培养基至 1 L, pH 7.0.

1.2 降解底物测定

将 10 μ L 甘油冻存的 J5-1 菌液, 接种至 10 mL 的 LB 培养基活化, 30℃、150 r/min 振荡培养 12 ~ 14 h, 从中取 400 μ L 菌液接种至 40 mL 含 16 μ L 1,2,4-三氯苯的无机盐培养基, 30℃、150 r/min 振荡培养 2 ~ 3 d 至 D_{600} 为 0.2 ~ 0.3, 将菌液分装到 1.5 mL 离心管中离心弃上清, 用无机盐培养基洗涤 2 ~ 3 遍, 将菌体转移到数个 100 mL 无机盐培养基中, 分别加入 25 mg/L 的氯苯类化合物, 并定期取样监测其细菌生长量和氯离子浓度(试验中每种底物均有平行样和空白样).

1.3 细菌生长和氯离子浓度测定

细菌生长量通过测定 D_{600} 表征. 氯离子浓度测定采用离子色谱, 样品需经 0.45 μ m 滤膜过滤预处理. 在降解过程中, 氯离子随着氯苯类化合物的最终

矿化而得到释放, 因此可以通过测定氯离子来监测菌株 J5-1 对氯苯类化合物的降解.

1.4 基因组 DNA 的提取

用无机盐 + 酵母粉培养基培养菌株 12 ~ 14 h, 取 1.5 mL 培养物离心, 提取基因组 DNA. 提取方法采用 CTAB 法^[10].

1.5 降解基因克隆

从 GenBank 上检索序列, 根据降解氯苯类化合物的几个氯苯双加氧酶和脱氢酶基因的保守区序列设计引物^[11]. 设计了 3 对引物 PT2 和 RT2, P1 和 P2, B1 和 B2, 扩增氯苯双加氧酶和脱氢酶的基因片段, 引物序列详见表 1. 降解基因 PCR 反应体系为: 0.5 μ L 10 μ mol/L 正向引物、0.5 μ L 10 μ mol/L 反向引物、2.5 μ L 10 $\times$ 扩增缓冲液、1.5 μ L 25 mmol/L $MgCl_2$ 、2.5 μ L 2.5 mmol/L dNTP、0.2 μ L 2.5 U/ μ L ExTaq 酶、1 μ L DNA 模板, 补充灭菌高纯水至 25 μ L. PCR 反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 1 min, 56.5℃ 1 min, 72℃ 4min (35 个循环); 72℃ 7min. PCR 产物经纯化后与 T 载体连接, 转化到大肠杆菌中, 通过蓝白斑筛选和菌落 PCR 确定含有目的基因的克隆转化子, 最终通过测序确定目的基因序列. 菌落 PCR 采用通用引物 T7 和 SP6, 反应体系和反应条件同上.

1.6 生化试剂和服务

表 1 本研究中所用引物
Table 1 Primers used in this article

引物名称	扩增片段大小/bp	扩增基因	引物序列
PT2	1 021	氯苯双加氧酶部分基因、脱氢酶部分基因	5'-GCA TTT CGG CAA GTT CTG-3'
RT2			5'-GCT GYG CGT TCA TRT AGG TTT-3'
P1	3 644	2-羟基-6-氧-2,4-庚二烯酸盐水解酶基因、氯苯双加氧酶部分基因	5'-GGC GTG AAG TGG AGG GTC GT-3'
P2			5'-GGG CAG ATG CGG TTC GTT-3'
B1	2 163	氯苯双加氧酶部分基因、脱氢酶基因	5'-ATC AAG GTG TTT CCC ATC AA-3'
B2			5'-TAG CCV ARY CTT TKR ATG CTC A-3'

rTaq(包含 $MgCl_2$ 和 buffer)、DNA Marker 和感受态细胞 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司; ExTaq(包含 dNTP、 $MgCl_2$ 和 buffer)购自 TaKaRa 公司; pGEM-T easy 载体试剂盒购自美国 Promega 公司; 引物合成、PCR 产物的纯化和测序由北京三博远志生物公司完成, 功能基因的测序由北京华大基因研究中心完成; 测序结果提交 GenBank 进行同源性比较分析.

2 结果与讨论

2.1 J5-1 的降解底物特性研究

通过测定 J5-1 的降解底物范围, 并与部分已知的 1,2,4-三氯苯降解菌的降解底物范围进行比较,

结果如表 2 所示. 由表 2 可知, 4 株菌均不能利用苯, 但可利用氯苯、1,2-二氯苯和 1,2,4-三氯苯则均可利用; 同时, 不同菌株对 1,3-二氯苯、1,4-二氯苯、1,2,3,4-四氯苯和 1,2,4,5-四氯苯的利用情况有所差别. 由于对不同菌株而言, 其降解底物范围的差异主要与降解酶的底物结合区域有关, 即由表达降解酶的基因的特异性所决定, 故而有必要研究 J5-1 的氯苯降解基因, 并与已知降解基因序列进行比对, 试图找出决定其底物特异性的关键位点.

J5-1 对不同氯苯类底物的降解如图 1 所示, 其降解能力大小顺序为: 1,2,4-三氯苯 > 1,3-二氯苯 > 1,2-二氯苯 > 氯苯. 与此相比, *Pseudomonas* sp. P51 对 1,2-二氯苯的降解能力略强于 1,4-二氯苯和

表2 4株1,2,4-三氯苯降解菌在不同底物条件下的生长情况比较

底物	Comparison of four 1,2,4-TCB degrading bacteria growth using different substrates			
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>nitroreducens</i> J5-1	sp. PS12 ^[5,11]	sp. PS14 ^[11]	sp. P51 ^[4]
苯 ¹⁾	- ³⁾	-	-	-
氯苯	+ ⁴⁾	+	+	+
1,2-二氯苯	+	+	+	+
1,3-二氯苯	+	+	+	-
1,4-二氯苯 ²⁾	-	+	+	+
1,2,4-三氯苯	+	+	+	+
1,2,3,4-四氯苯 ²⁾	-	-	+	⁵⁾
1,2,4,5-四氯苯 ²⁾	-	+	+	/

1) 用作1,4-二氯苯、1,2,3,4-四氯苯和1,2,4,5-四氯苯的溶剂,并做单独投加苯的对照样; 2) 分别做直接投加固体和溶于苯后再投加的对照样; 3) -表示不能利用该底物; 4) +表示能够利用该底物; 5) 未提及该底物可否被利用

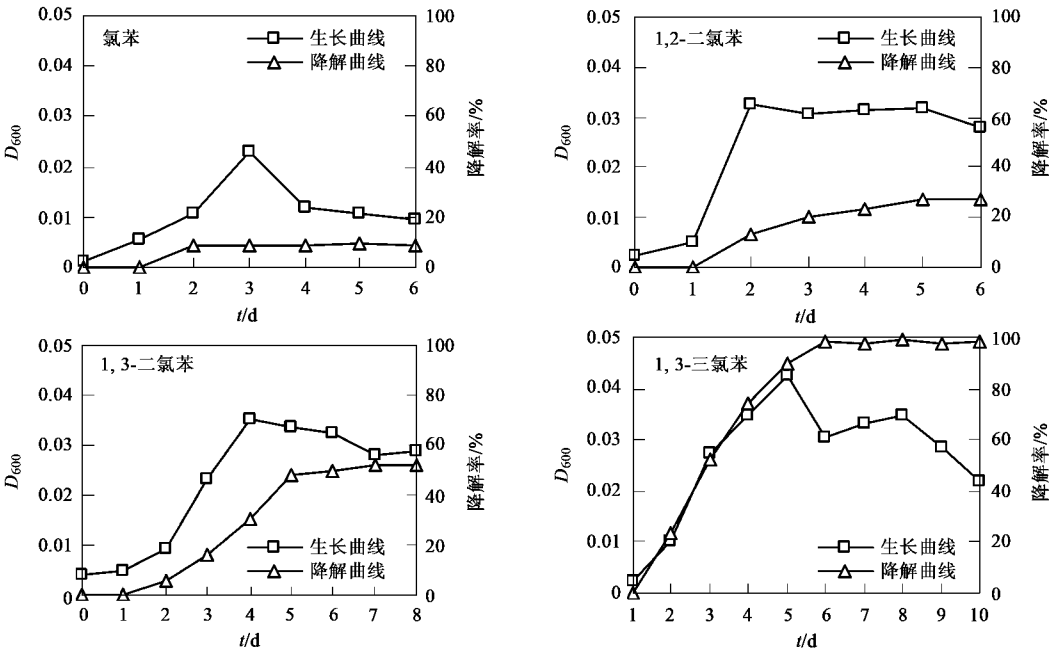


图1 J5-1 对不同氯苯类底物的降解

Fig.1 Degradation of different chlorinated benzene substrates by J5-1

根据对已有氯苯类化合物降解基因序列的比对结果分析,发现其同源性达到90%以上,因此尝试使用PCR方法克隆J5-1的相关降解基因.由于氯苯双加氧酶和脱氢酶基因片段长度大、GC含量高且存在复杂二级结构,在引物设计和PCR扩增等方面存在困难,故采用P1和P2、B1和B2这2对引物分段扩增氯苯双加氧酶的部分基因片段和脱氢酶的基因片段,且两者存在重叠序列,可拼接成长全基因序列.

PCR电泳分析图如图2所示,分别得到长度为3644bp和2163bp的2个片段.PCR产物经克隆测序后,用DNAMAN软件将2个片段进行序列拼接,

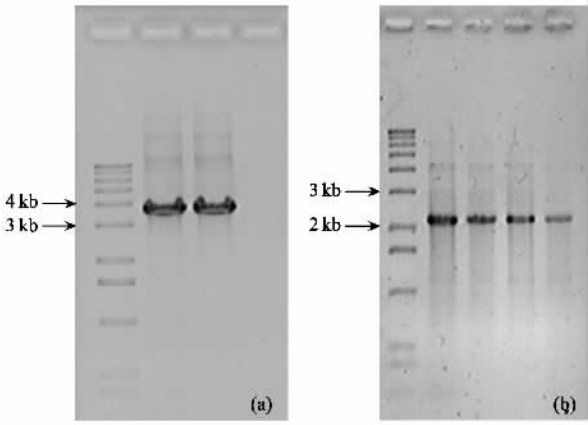
1,2,4-三氯苯^[6],而*Burkholderia* sp. PS14在含1,2,4,5-四氯苯的培养基中活化后,对1,2,3,4-四氯苯的降解速率最高^[12].量子生物学的研究认为,物质的电荷特性、三维空间构型以及疏水特性是影响生物降解性能的3大主要结构因素^[13],而在好氧降解条件下不同结构氯苯类化合物的电荷特性和空间构型的影响恰好相反,又由于氯苯类化合物的生物降解性与菌株培养驯化物质有关^[1],因此不同菌株在底物利用的特性方面存在差异.

2.2 J5-1 的氯苯双加氧酶和脱氢酶基因的克隆与序列比对分析

鉴于上述降解底物的实验研究,发现J5-1与已报道的菌株有较大差异,因此本研究进一步克隆其降解途径的前2个降解酶基因——氯苯双加氧酶和脱氢酶基因,从分子水平上分析该菌株的降解特性.

得到全长为5612bp的DNA序列,并提交GenBank进行核苷酸序列比对.结果表明,该序列与氯苯双加氧酶和脱氢酶基因序列具有高度的同源性,达到83%~99%.通过与其中同源性最高的PS12和P512株菌的相应基因序列^[14,15]进行比对,并结合开放读码框(ORF)分析,表明该序列包含了3个完整的基因序列,分别为2-羟基-6-氧-2,4-庚二烯酸甲酯水解酶、氯苯双加氧酶和脱氢酶基因序列,登录号为EF635855.由于J5-1的降解底物为1,2,4-三氯苯,故分别将这3个酶命名为TcbG、TcbA和TcbB,相应基因为*tcbG*、*tcbA*和*tcbB*,其中TcbA包括4个亚基,其

基因分别命名为 *tcbAa* (编码末端加氧酶 α 亚基), *tcbAb* (编码末端加氧酶 β 亚基), *tcbAc* (编码铁氧化还原蛋白)和 *tcbAd* (编码 NADH 还原酶), 其基因簇的组成如图 3 所示.



(a) 引物 P1, P2, 扩增 J5-1 的 *tcbG* 基因和 *tcbA* 的部分基因;
(b) 引物 B1, B2, 扩增 J5-1 的 *tcbA* 的部分基因和 *tcbB* 基因,
采用温度梯度为 54.4、56.5、58.7 和 60.8℃

图 2 J5-1 降解基因 PCR 电泳分析

Fig.2 PCR electrophoresis maps of degradation genes from J5-1

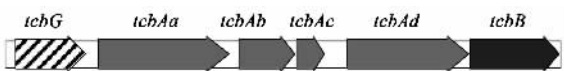


图 3 *tcbGAB* 基因簇图谱

Fig.3 Organization of *tcbGAB* gene cluster

分别将 *tcbG*、*tcbA* 和 *tcbB* 在 Genbank 上进行氨基酸序列同源性比对,发现本研究得到的 J5-1 功能基因氨基酸序列与 *Burkholderia* sp. PS12 的序列同源性最高,其次为 *Pseudomonas* sp. P51,而这 2 株菌均可降解 1,2,4-三氯苯;同时,所得序列中影响其功能的保守区序列^[5](如[2Fe-2S]结合位点保守区、双加氧酶 α 亚基保守位点、还原酶与 FAD 及 NAD 上的 ADP 部分的结合位点等)也与 *Burkholderia* sp. PS12

完全吻合,因此可以基本断定所得序列包含氯苯双加氧酶和脱氢酶基因序列.

2.3 氯苯双加氧酶 α 亚基的结构与进化分析

Witzig 等^[16]指出,芳香化合物的好氧降解通常从非血红素铁双加氧酶对底物的双羟基化开始,而其中的末端氧化酶 α 亚基含有决定其底物特异性的底物结合位点. Bagn  ris 等^[17]比较了苯双加氧酶 α 亚基和甲苯双加氧酶 α 亚基的氨基酸序列,发现其中的 4 个氨基酸残基(301 异亮氨酸、305 苏氨酸、307 异亮氨酸和 309 亮氨酸,以 *Pseudomonas putida* ML2 的苯双加氧酶 α 亚基氨基酸序列为准)是底物进入活性中心的通道,当这 4 个氨基酸残基分别为 301 缬氨酸、305 丝氨酸、307 亮氨酸和 309 缬氨酸时,所表达的酶即能降解甲苯和乙苯. Witzig 等^[16]也发现,位于底物进入活性中心通道上的氨基酸残基越小,空间阻碍越小,就越有利于较大的底物进入,从而增大了降解底物的范围.

通过 J5-1 的氯苯双加氧酶 α 亚基(TcbAa)与 *Burkholderia* sp. PS12 的氯苯双加氧酶 α 亚基(TecA1)的氨基酸序列比较,发现两者虽然只相差了 9 个氨基酸残基,但在 307~310 位置有连续 4 个氨基酸残基的差异,在 TcbAa 上分别为异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)、异亮氨酸(I)和谷胺酰胺(Q),而在 TecA1 上则分别为亮氨酸(L)、苏氨酸(T)、缬氨酸(V)和谷氨酸(E),如图 4 所示. 利用 SWISS-MODEL 程序^[18]在线预测 TcbAa 的三级结构,发现这 4 个氨基酸残基均位于底物进入活性中心的通道上. 而从氨基酸结构分析前者较后者的空间阻碍更大,因此不利于较大的底物进入,这也解释了 PS12 可以降解 1,2,4,5-四氯苯,而 J5-1 不能降解的原因.

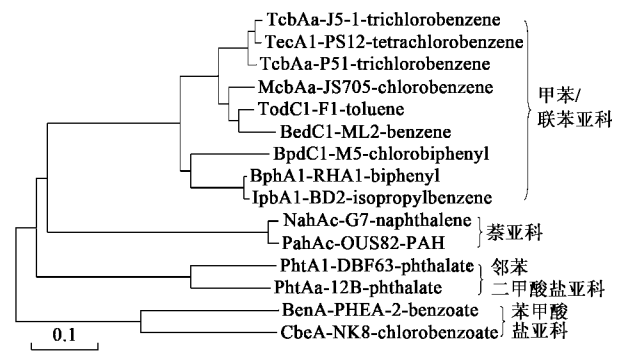
鉴于芳香化合物双加氧酶 α 亚基与底物特异性的关系,本研究考察了 TcbAa 在芳香化合物双加氧

TcbAa	181	FYMDHMLDRTEAGTEAIPGVQKNVIFCNWKLAAEQFCWDAYHAGITTAHLSGILAGLPDGV	240
TecA1	181	FYMDHMLDRTEAGTEAIPGVQKNVIFCNWKLAAEQFCWDAYHAGITTAHLSGILAGLPDGV	240
TcbAa	241	ELADLAPPTVGKQYRAPWGGHGIGFFIIGEPDLLITIMGPKITSYWTEGPASEKAAQRLGS	300
TecA1	241	ELADLAPPTVGKQYRAPWGGHGIGFFIIGEPDLLITIMGPKITSYWTEGPASEKAAQRLGS	300
TcbAa	301	VERGSKIMIQHMTVFPTCSFLIGANTVRTWHPRGPNVEVWFAFTVVDADAPDDIKEEFRR	360
TecA1	301	VERGSKIMIQHMTVFPTCSFLIGANTVRTWHPRGPNVEVWFAFTVVDADAPDDIKEEFRR	360
TcbAa	361	QTLRTFSAGGVFEQDDGENWVEIQHVLRGHKARSRPFNAEMSMGQTIIDDDVPVYGRISNV	420
TecA1	361	QTLRTFSAGGVFEQDDGENWVEIQHVLRGHKARSRPFNAEMSMGQTIIDDDVPVYGRISNV	420

图 4 TcbAa 和 TecA1 部分氨基酸序列比对结果

Fig.4 Alignment result of the partial amino acid sequences between TcbAa and TecA1

酶 α 亚基进化系统中的位置. 根据文献报道, 芳香化合物双加氧酶 α 亚基可分为 4 个亚科, 分别是甲苯/联苯亚科、萘亚科、苯甲酸盐亚科和邻苯二甲酸盐亚科^[16]. 用 MEGA 软件对分属上述 4 个亚科的具有不同降解功能的双加氧酶的 α 亚基序列进行比对, 并构建系统发育树, 如图 5 所示. 从中可见, TcbAa 属于甲苯/联苯亚科, 且与多取代氯苯双加氧酶 α 亚基的同源性最高, 其次是苯/甲苯双加氧酶 α 亚基, 而与联苯双加氧酶 α 亚基的同源性最低. 这也进一步证明双加氧酶 α 亚基序列能够决定降解底物的特异性.



分枝名称的写法为表达产物名-菌株名-降解底物, 所有数据均来自 GenBank. 系统进化树的构建采用 MEGA 软件的 neighbor-joining 方法

图 5 芳香化合物双加氧酶 α 亚基系统进化树
Fig.5 Phylogenetic tree of aromatic ring dioxygenase α subunits

3 结论

- (1) *Pseudomonas* sp. J5-1 对不同氯苯类底物的降解能力大小顺序为: 1,2,4-三氯苯 > 1,3-二氯苯 > 1,2-二氯苯 > 氯苯, 它与已报道的 1,2,4-三氯苯菌株在底物利用的特性方面存在差异.
- (2) 采用分段 PCR 技术克隆得到 J5-1 的包含 2-羟基-6-氧-2,4-庚二烯酸甲酯水解酶、氯苯双加氧酶和脱氢酶基因的序列, 序列长度为 5 612 bp. 分别将编码 3 个酶的基因命名为 *tcbG*、*tcbA* 和 *tcbB*. 其氨基酸序列与 *Burkholderia* sp. PS12 的序列同源性最高, 其次为 *Pseudomonas* sp. P51.
- (3) J5-1 的氯苯双加氧酶 α 亚基 (TcbAa) 与 PS12 的氯苯双加氧酶 α 亚基 (TecA1) 的氨基酸序列比对发现, 在 307 ~ 310 位置有连续 4 个氨基酸残基的差异 (I307L、M308T、I309V、Q310E), 造成前者底物进入活性中心的空间阻碍较后者大, 致使这 2 株菌对 1,2,4,5-四氯苯降解的偏好性有所差别.
- (4) TcbAa 在芳香化合物双加氧酶 α 亚基进化

系统中属于甲苯/联苯亚科, 且与多取代氯苯双加氧酶 α 亚基的同源性最大, 其次是苯/甲苯双加氧酶 α 亚基.

参考文献:

[1] 瞿福平, 张晓健, 吕昕, 等. 氯代芳香化合物的生物降解性研究进展[J]. 环境科学, 1997, 18(2): 74-78.

[2] 王磊, 周琪, 张伯生, 等. 1,3-二氯苯降解细菌 *Bacillus cereus* PF-11 的遗传选育及其降解特性研究[J]. 环境科学学报, 2002, 22(2): 231-235.

[3] 罗如新, 沈标, 李顺鹏. 一氯苯的微生物厌气降解及其降解性质粒的研究[J]. 南京农业大学学报, 1997, 15(8): 15-18.

[4] 王芳, Dörfler U, Schmid M, 等. 1,2,4-三氯苯矿化菌的鉴定与功能分析[J]. 环境科学, 2007, 28(5): 1082-1087.

[5] Adebuseye S A, Picardal F W, Ilori M O, et al. Aerobic degradation of di- and trichlorobenzenes by two bacteria isolated from polluted tropical soils[J]. Chemosphere, 2007, 66: 1939-1946.

[6] van der Meer J R, van Neerven A R W, de Vries E J, et al. Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1, 2-dichloro-, 1, 4-dichloro-, and 1, 2, 4-trichlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51 [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(1): 6-15.

[7] Beil S, Happe B, Timmis K N, et al. Genetic and biochemical characterization of the broad spectrum chlorobenzene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain PS12-dechlorination of 1, 2, 4, 5-tetrachlorobenzene[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 247(1): 190-199.

[8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. (第三版). 北京: 科学出版社, 2002. 1595.

[9] 宋蕾, 王慧, 施汉昌, 等. 1,2,4-三氯苯降解菌的分离及其降解质粒的研究[J]. 中国环境科学, 2005, 25(4): 385-388.

[10] 奥伯斯 F. 精编分子生物学实验指南[M]. (第三版). 北京: 科学出版社, 1998. 39.

[11] 张新宇, 高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧[J]. 生物信息学, 2004, 2(4): 15-18, 46.

[12] Sander P, Wittich R M, Fortnagel P, et al. Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(5): 1430-1440.

[13] 瞿福平, 张晓健, 何苗, 等. 氯代芳香化合物生物降解性能与其化学结构的相关性[J]. 环境科学, 1998, 19(6): 26-28.

[14] van der Meer J R, Roelofsen W, Schraa G, et al. Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1, 2, 4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 in nonsterile soil columns[J]. FEMS Microbiology Letters, 1987, 45(6): 333-341.

[15] Werlen C, Kohler H P E, van der Meer J R. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(8): 4009-4016.

[16] Witzig R, Junca H, Hecht H J, et al. Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and gene similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3504-3514.

[17] Bagn ris C, Cammack R, Mason J R. Subtle difference between benzene and toluene dioxygenases of *Pseudomonas putida* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1570-1580.

[18] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling[J]. Electrophoresis, 1997, 18: 2714-2723.