

氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因的克隆及其定量表达

宋蕾¹, 王慧², 施汉昌²

(1. 内蒙古工业大学建筑工程学院, 呼和浩特 010051; 2. 清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 从 1,2,4-三氯苯降解菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) J5-2 的总 DNA 中, 利用 PCR 方法克隆到氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因, 命名为 *tcbC*(J5-2) (GenBank 登录号 EF111021). 分析 *tcbC*(J5-2) 基因的氨基酸序列后发现, 该基因不同于已见报道的 1,2,4-三氯苯降解菌 *Pseudomonas* sp. P51 中的氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因 *tcbC*(P51), 与其同源性仅为 95%. *tcbC*(J5-2) 基因在 48、52 和 73 这 3 个关键位置的氨基酸分别为 Leu(亮氨酸)、Ala(丙氨酸)和 Ile(异亮氨酸), 而 *tcbC*(P51) 基因分别为 Val(缬氨酸)、Ala(丙氨酸)和 Met(蛋氨酸). 利用实时荧光定量反转录-PCR(real-time reverse transcription-PCR)方法, 考察了菌株 J5-2 在分别以 1,2-二氯苯、1,3-二氯苯和 1,2,4-三氯苯为唯一碳源时 *tcbC*(J5-2) 基因的定量表达. 结果表明, 1,2,4-三氯苯对 *tcbC* 基因的诱导作用更强.

关键词: 铜绿假单胞菌; 氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶; 1,2,4-三氯苯; 实时荧光定量反转录-PCR

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)02-0606-04

Cloning and Quantitative Expression of Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase Gene

SONG Lei¹, WANG Hui², SHI Han-chang²

(1. College of Architecture and Civil Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Huhhot 010051, China; 2. State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The chlorocatechol 1,2-dioxygenase gene, designated as *tcbC*(J5-2) (GenBank Accession No. EF111021), was cloned from total DNA of *Pseudomonas aeruginosa* J5-2 which can degrade 1,2,4-trichlorobenzene. The deduced amino acid sequence analysis of *tcbC*(J5-2) shows that it is different from *tcbC*(P51) cloned from another 1,2,4-trichlorobenzene-degrader *Pseudomonas* sp. P51. *tcbC*(J5-2) is only 95% similar to *tcbC*(P51) at the amino acid level. Three critical amino acid residues in *tcbC*(J5-1) are Leu-48, Ala-52, and Ile-73. Otherwise, they are Val-48, Ala-52, and Met-73 in *tcbC*(P51). mRNA accumulation of *tcbC* in J5-2 was quantified by real-time reverse transcription-PCR, when J5-2 grew on 1,2-dichlorobenzene, 1,3-dichlorobenzene and 1,2,4-trichlorobenzene respectively. The results show that 1,2,4-trichlorobenzene is a better inducer than 1,2- and 1,3-dichlorobenzene.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; chlorocatechol 1,2-dioxygenase; 1,2,4-trichlorobenzene; real-time reverse transcription-PCR

1,2,4-三氯苯(1,2,4-trichlorobenzene, 1,2,4-TCB)是三氯苯的 3 种同分异构体中应用最为广泛的一种^[1]. 与一氯苯、二氯苯相比, 1,2,4-TCB 的生物降解性大大降低, 毒性显著^[2]. 到目前为止, 国外已经报道了几株 1,2,4-TCB 的降解菌^[3~8]. 国内报道的降解菌仅有 2 株^[9,10]. 这些研究主要集中在降解途径及降解菌的降解特性方面, 只有以 *Pseudomonas* sp. P51 为代表的极少数降解菌深入到了基因水平的研究^[11].

对于氯苯类化合物, 起关键作用的降解酶主要是氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶(CC12O). 不同来源的 CC12O 基因, 由于基因序列的不同导致在底物特性方面可能存在很大差异^[12~16]. 另外, CC12O 基因是诱导型基因, 通过考察基因在不同碳源条件下的定量表达可以找出诱导作用比较好的碳源, 对菌株的实际应用具有重要意义.

本研究中的降解菌 J5-2 与 *Pseudomonas* sp. P51 相比, 在降解特性上存在明显差异. 因此有必要对 J5-2 中的 CC12O 基因进行克隆及序列分析, 从基因水平对这种差异进行解释. 同时利用实时荧光定量反转录-PCR 方法寻找对 CC12O 基因诱导性比较强的碳源, 以利于菌株的实际应用.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、培养基和试剂

Pseudomonas aeruginosa J5-2(本实验室分离). *E. coli* DH5 α (本实验室保存), 质粒载体 pGEMT-easy(氨卞青霉素抗性, Ap^r)购自 Promega 公司. 丰富培养

收稿日期: 2008-01-09; 修订日期: 2008-04-14

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: 宋蕾(1978~), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境微生物学和分子生物学, E-mail: songlei2002@tsinghua.org.cn

基 Luria-Bertani (LB), 添加 100 mg/L Ap.

常用生化试剂购自天根生化科技(北京)有限公司. 引物合成由北京三博远志生物技术有限责任公司完成.

1.2 细菌总 DNA 提取

采用 CTAB 法^[17]提取菌株 J5-2 的总 DNA.

1.3 CC120 基因克隆

扩增部分 CC120 基因片段所用引物为: 上游 F2: 5'-at(c/t)ga(c/t)gt(g/c)tgga(c/t)tc(c/g)acgcc-3'; 下游 R2: 5'-cgc(c/g)a(c/t)(c/g)tga(c/t)(c/g)gc(a/c/g)gcctt-3'. 扩增全长 CC120 基因片段引物为: 上游 F5: 5'-cgcttccgagttggtgatg-3'; 下游 R5: 5'-ttgatgtctccgccgattc-3'. 由于目标片段 GC 含量较高, 因此特别选择含高 GC buffer 的 LA *Taq* 酶(宝生物工程(大连)有限公司). 25 μ L 反应体系: 2 $\times$ GC Buffer 12.5 μ L, dNTP 200 μ mol/L, primer 0.25 μ mol/L, LA *Taq* 0.7U, Template DNA 5 ng. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C, 温度梯度 *G* 为 (58 $\pm$ 8) $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min.

1.4 细菌 RNA 提取

在菌株 J5-2 的对数生长期收集菌体, 加 1 mL TRIzol(Invitrogen 公司)混匀后, 15 ~ 30 $^{\circ}$ C 放置 5 min; 4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 加 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min; 4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min 离心 15 min, 取约 600 μ L 水相转移到新离心管中; 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇, 混匀, 室温放置 20 ~ 30 min; 4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加 1 mL 75% 乙醇(用 DEPC 水配置), 4 $^{\circ}$ C, 5 000 r/min 离心 3 min, 倒出液体, 室温晾干; 最后用无 RNase 水充分溶解.

1.5 CC120 基因的定量表达

根据荧光定量 PCR 对基因片断的长度要求, 设计克隆 CC120 基因的特异性引物. 上游 F16: 5'-ctcgcacacccgctcgt-3'; 下游 R16: 5'-cggtcggtccttgttcg-3'. 选择 J5-2 的 16S rRNA 作为定量 PCR 过程的内参, 上游引物 16SF: 5'-ccacgcttgcacctc-3'; 下游引物 16SR: 5'-ggctcaaccygggaactg-3'. 将 CC120 基因的特异性片段克隆重组, 利用重组质粒绘制标准曲线. 试验中利用 Ex ScriptTM RT reagent kit 将 J5-2 的总 RNA 进行反转录. 反转录程序: 42 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 2 min. 得到 cDNA 后利用 SYBR Premix Ex *Taq*TM kit 进行荧光定量 PCR, 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 10 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 45 个循环. 反应体系: SYB(2 $\times$) 12.5 μ L, 上游引物 0.2 μ mol/L, 下游引物 0.2 μ mol/L, 模板 2.0

μ L, H₂O 9.5 μ L, 总体积 25 μ L. 试验中设置阴性对照, 同时每个样品设置 3 个平行.

1.6 序列测定与分析

DNA 序列测定由诺赛基因公司完成. 利用 NCBI 网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 程序进行序列比对.

2 结果与讨论

2.1 菌株 J5-2 中 CC120 全长基因的克隆

以菌株 J5-2 总 DNA 为模板, 选择 F2R2 为第一对引物扩增 CC120 部分片段, 得到图 1(a) 所示的目的片段, 经比对为 CC120 基因的部分片段. 获得部分片段后再以 F5R5 为第二对引物扩增 CC120 全长基因, 同样以 J5-2 的总 DNA 为模板, 结果如图 1(b) 所示. 将所得目的片段切胶回收, 与 pGEMT-easy 载体连接, 构建重组质粒进行测序.

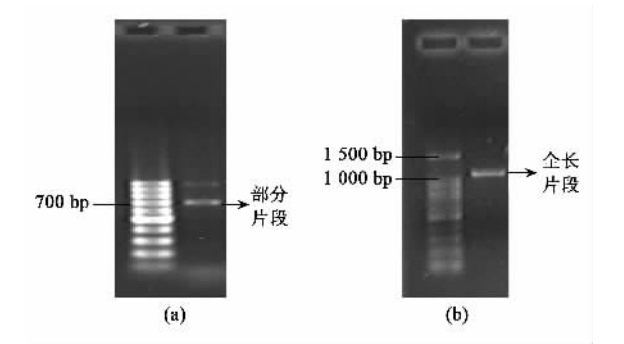


图 1 J5-2 中 CC120 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of CC120 gene in J5-2

2.2 CC120 基因序列分析

将该基因初步命名为 *tcbC* (J5-2), 登录号为 EF111021. 对 *tcbC* (J5-2) 的氨基酸序列及 GenBank 上其他 CC120 基因的氨基酸序列进行同源性比对, 结果发现: *tcbC* (J5-2) 与 *cbnA* (登录号 BAA74530) 的同源性最高, 为 98%; 而与另一株 1,2,4-三氯苯的降解菌 *Pseudomonas* sp. P51 中克隆到的 *tcbC* 基因 (登录号 AAD13625) 相比, 同源性仅为 95%. 为了进一步分析上述 3 个基因在氨基酸序列上的差异, 本研究对 *tcbC* (J5-2)、*cbnA* 和 *tcbC* (P51) 的氨基酸序列进行了具体分析, 结果如图 2 所示.

Liu 等^[18]的研究表明: 在 48、52 和 73 这 3 个位置的氨基酸对 CC120 基因的底物特性有很大影响. *cbnA* 的序列中, 这 3 个位置的氨基酸分别为: Leu-48、Val-52 和 Ile-73, 因此该基因对 3,5-二氯邻苯二酚 (3,5-DC) 有较高酶活; 而对 3,4-二氯邻苯二酚 (3,4-DC) 几乎不表现活性. *tcbC* (P51) 的氨基酸序列中

<i>cbnA</i>	1	50
<i>tcnC</i> (J5-2)	MNERUKVAS ALUDAIQKTL TEQRUTEEDW RAGUGYHMKL AEAKEMALLL	
<i>tcnC</i> (P51)	MNERUKVAS ALUDAIQKTL TEQRUTEEDW RAGUGYHMKL AEAKEMALLL	
	*	*
<i>cbnA</i>	51	100
<i>tcnC</i> (J5-2)	DUFFNHIUD LKAQATRGST PAIQCPYFLE GAPUUGALK TYEDDSHHPL	
<i>tcnC</i> (P51)	DUFFNHIUD LKAQATRGST PAIQCPYFLE GAPUUGALK TYEDDSHHPL	
	*	*
<i>cbnA</i>	101	150
<i>tcnC</i> (J5-2)	UIRGURTDD GAPAAGAUD UWHSTPDGKY SGFHDQIPTD LYRGKUADA	
<i>tcnC</i> (P51)	UIRGURTDD GAPAAGAUD UWHSTPDGKY SGFHDQIPTD MYRGKUADA	
	*	*
<i>cbnA</i>	151	200
<i>tcnC</i> (J5-2)	QCKYAUIRTH PAPYQIPNKG PTGULLEHMG SHTWRPAHUI FKURKDGFP	
<i>tcnC</i> (P51)	QCKYAUIRTH PAPYQIPNKG PTGULLEHMG SHTWRPAHUI FKURKDGFP	
	*	*
<i>cbnA</i>	201	250
<i>tcnC</i> (J5-2)	LTTQYVFEGG DWUDSDCKG UAPDLUMPAK TEGGAQUHAI DFUIERPREH	
<i>tcnC</i> (P51)	LTTQYVFEGG DWUDSDCKG UAPDLUMPAK TEGGAQUHAI DFUIERPREH	
	*	*
<i>cbnA</i>	251	
<i>tcnC</i> (J5-2)	A	
<i>tcnC</i> (P51)	U	

* 表示序列中影响基因特性的关键位置

图2 *tcnC*(J5-2)与*cbnA*、*tcnC*(P51)基因的氨基酸序列对比

Fig.2 Amino acid sequences blast among *tcnC*(J5-2),
cbnA and *tcnC*(P51)

这3个位置的氨基酸分别为 Val-48、Ala-52 和 Met-73,使得该基因对 3,4-DC 有较高酶活;而对3,5-DC 几乎不表现活性.在本研究获得的 *tcnC* (J5-2)基因的氨基酸序列中,这3个关键位置的氨基酸分别为 Leu-48、Ala-52 和 Ile-73.因为同时拥有 Leu-48 和 Ile-73,所以 *tcnC* (J5-2)对 3,5-DC 有较高酶活,这一特性与 *tcnC* (P51)不同;又因为拥有 Ala-52,所以 *tcnC* (J5-2)对 3,4-DC 也有活性,这一特性与 *cbnA* 不同.由此初步得出结论,由于氨基酸序列的差异, *tcnC* (J5-2)基因是不同于 *tcnC* (P51)和 *cbnA* 的 CC120 基因.也正是由于氨基酸序列的差异, P51 不能利用 1,3-二氯苯(1,3-DCB)^[11],而 J5-2 可以利用 1,3-DCB(数据未发表).

2.3 *tcnC* 在 J5-2 中的定量表达

考察 *tcnC* (J5-2)的定量表达时,菌株 J5-2 的生长条件如下: 1,2,4-TCB、1,2-DCB 和 1,3-DCB 分别为唯一碳源,100 mL 无机盐培养基^[9],底物的终浓度为 400 mg/L, 30℃、150 r/min 振荡培养 10 d.

试验中选择 J5-2 的 16S rRNA 作为内参.为了准确定量,首先考察不同反应之间的 PCR 效率是否一致.结果表明利用不同引物 16SF-16SR、F16-R16 所得到的直线斜率基本相同(反应效率基本相同): slope = - 3.44 ± 0.2,因此,试验中应用的标准曲线为:

$$C_T = - 3.44 \lg R + 42 \tag{1}$$

式中, C_T 为临界阈值, R 为 mRNA 当量.为了消除不

同生长条件对计算结果的影响,公式(1)进行了校正,得到如下方程^[19]:

$$R' = R^S \times \frac{R^S_{TCB16S}}{R^S_{16S}} \tag{2}$$

式中, R^S (S 表示样品)是根据公式(1)得到未知样品的 RNA; R^S_{16S} 代表相应的未知样品在相同生长条件下,作为内参的 16S rRNA; R^S_{TCB16S} 代表以 1,2,4-TCB 为碳源时的 16S rRNA.根据公式(2),最终可以得到 J5-2 中 *tcnC* 的 RNA 表达量.

如图 3 所示,菌株 J5-2 中的 *tcnC* 基因在以 1,2,4-TCB 为唯一碳源时 mRNA 的表达量相对较高.由此初步说明, 1,2,4-TCB 对 *tcnC* (J5-2)基因的诱导作用比 1,2-DCB 和 1,3-DCB 更强.其主要原因是 1,2,4-TCB 在好氧代谢过程中生成的中间产物之一是 2,3,5-三氯粘康酸,而这种物质是 *tcnC* 基因的诱导物^[20].

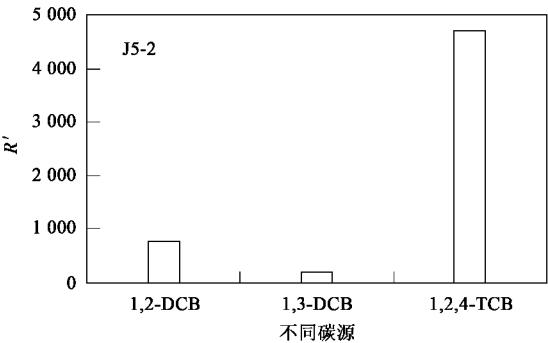


图3 不同碳源条件下 *tcnC*(J5-2)的 mRNA 定量表达

Fig.3 mRNA quantitative expression of *tcnC*(J5-2) in
different carbon sources

3 结论

(1) 以菌株 J5-2 总 DNA 为模板克隆得到 CC120 基因,初步命名为 *tcnC* (J5-2).

(2) 分析 *tcnC* (J5-2)基因的氨基酸序列,因为同时拥有 Leu-48 和 Ile-73,使得 *tcnC* (J5-2)对 3,5-DC 有较高酶活;Ala-52 使得 *tcnC* (J5-2)对 3,4-DC 也有活性.因此,由于氨基酸序列的差异, *tcnC* (J5-2)基因是不同于 *tcnC* (P51)和 *cbnA* 的 CC120 基因.

(3) J5-2 在以 1,2,4-TCB 为唯一碳源生长时, *tcnC* (J5-2)基因在 mRNA 水平上的表达量相对较高. 1,2,4-TCB 对 *tcnC* (J5-2)基因的诱导作用比 1,2-DCB 和 1,3-DCB 更强.

参考文献:

[1] 杜青平,贾晓珊.1,2,4-三氯苯对大蒜根尖分生细胞有丝分裂

- 的影响[J]. 环境科学学报, 2006, **26**(6): 962-967.
- [2] Schroll R, Brahushi F, Dörfle U, *et al.* Biomineralisation of 1, 2, 4-trichlorobenzene in soils by an adapted microbial population[J]. Environ Pollut, 2004, **127**(3): 395-401.
- [3] 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]. Appl Environ Microbiol, 1991, **57**(5): 1430-1440.
- [4] Adrian L, Szewzyk U, Wecke J, *et al.* Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes[J]. Nature, 2000, **408**: 580-583.
- [5] Van der Meer J R, Neerven A R W, Vries E J. Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1, 2, 4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 in nonsterile soil columns[J]. FEMS Microbiol Ecol, 1987, **45**: 333-341.
- [6] Wang F, Grundmann S, Schmid M, *et al.* Isolation and characterization of 1, 2, 4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil[J]. Chemosphere, 2007, **67**(5): 896-902.
- [7] Adebusey 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**(10): 1939-1946.
- [8] Rapp P, Timmis K N. Degradation of chlorobenzenes at nanomolar concentration by *Burkholderia* sp. strain PS14 in liquid cultures and in soil[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, **65**: 2547-2552.
- [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] 宋蕾, 姜健, 高静思, 等. 降解 1, 2, 4-三氯苯的硝基还原假单胞菌 J5-1 的分离鉴定和邻苯二酚 1, 2-双加氧酶基因的克隆[J]. 环境科学, 2007, **28**(8): 1878-1881.
- [11] Van der Meer J R, Neerven A R W, 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]. J Bacteriol, 1991, **173**(1): 6-15.
- [12] Jencova V, Strnad H, Chodora Z, *et al.* Chlorocatechol catabolic enzymes from *Achromobacter xylosoxidans* A8 [J]. Int Biodeter Biodegr, 2004, **54**(2-3): 175-181.
- [13] Müller T A, Byrde S M, Werlen C, *et al.* Genetic analysis of phenoxyalkanoic acid degradation in *Sphingomonas herbicidovorans* MH[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, **70**(10): 6066-6075.
- [14] Rapp P, Gabriel-Jürgens L H. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase[J]. Microbiology, 2003, **149**(10): 2879-2890.
- [15] Liu S, Ogawa N, Miyashita K. The chlorocatechol degradative genes, *tfdT-CDEF*, of *Burkholderia* sp. strain NK8 are involved in chlorobenzoate degradation and induced by chlorobenzoates and chlorocatechols[J]. Gene, 2001, **268**(1-2): 207-214.
- [16] Trefault N, De la Iglesia R, Molina A M. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways[J]. Environ Microbiol, 2004, **6**(7): 655-668.
- [17] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 著. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [18] Liu S, Ogawa N, Senda T, *et al.* Amino acids in positions 48, 52 and 73 differentiate the substrate specificities of the high homologous chlorocatechol 1, 2-dioxygenase CbnA and TcbC[J]. J Bacteriol, 2005, **187**(15): 5427-5436.
- [19] Corbella M E, Puyet A. Real-time reverse transcription-pcr analysis of expression of halobenzoate and salicylate catabolism-associated operons in two strains of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, **69**(4): 2269-2275.
- [20] Chugani S A, Parsek M R, Hershberger C D, *et al.* Activation of the catBCA promoter: probing the interaction of CatR and RNA polymerase through in vitro transcription[J]. J Bacteriol, 1997, **179**: 2221-2227.