

来自 *Bacillus circulans* WZ-12 的二氯甲烷脱卤酶基因 *dcmR* 的克隆和表达

吴石金¹, 张华星², 胡志航¹, 陈建孟^{1*}

(1. 浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310032; 2. 浙江大学宁波理工学院, 宁波 315100)

摘要: 通过 PCR 方法从 *Bacillus circulans* WZ-12 中分离到二氯甲烷脱卤酶基因 *dcmR*, 构建具 T7 强启动子的 pET28b(+)-*dcmR* 质粒, 电击转化 *Escherichia coli* BL21(DE3), 构建了二氯甲烷生物降解基因工程菌 BL21[pET28b(+)-*dcmR*]. 重组菌经 IPTG 诱导后, 表达蛋白占总蛋白的 32%. 表达蛋白的酶活最高可达 25.78 U/mL, 酶的比活(以蛋白计)为 88.86 U/mg. 重组菌周质中酶活 2.92 U/mL, 胞内酶活 22.86 U/mL. 重组菌产生的酶的活力和比活较原降解菌株高 1~2 倍. 对工程菌的生长特性和降解特性的研究表明, 工程菌在 LB 培养基中的生长特性与原始菌株没有差别, 生长至对数期 $A_{600\text{nm}}$ 值都可达 2.4 左右. 重组菌株 *dcmR*-1 在 25 h 的降解率达 90% 以上, 降解效率比原降解菌株有明显提高. 该基因工程菌的构建对二氯甲烷生物降解机制研究以及复合污染环境的生物修复和工程应用具有实际意义.

关键词: 二氯甲烷; 脱卤酶基因 *dcmR*; 基因克隆与表达; 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)08-2479-06

Gene Cloning and Overexpression of Dichloromethane Dehalogenase from *Bacillus circulans* WZ-12

WU Shi-jin¹, ZHANG Hua-xing², HU Zhi-hang¹, CHEN Jian-meng¹

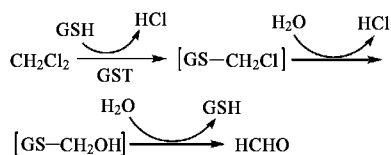
(1. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China; 2. Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100, China)

Abstract: The *dcmR* gene encoding dichloromethane dehalogenase was amplified by PCR from *Bacillus circulans* WZ-12 and cloned to expression vector pET28b(+), yielding recombinant plasmid pET28b(+)-*dcmR*. Then plasmid pET28b(+)-*dcmR* was introduced into *Escherichia coli* BL21(DE3). Expression was induced by IPTG, and the enzyme activity reached 25.78 U/mL, the specific enzyme activity reached 88.86 U/mg protein. The periplasmic and cytoplasmic enzyme activity reached 2.92 U/mL and 22.86 U/mL respectively. All results analysis demonstrated that the *E. coli* strain carrying the *dcmR* gene could produce dichloromethane dehalogenase efficiently. The growth characteristics of *dcmR*-1 was compared with the original strain, and the result showed that there was no difference, $A_{600\text{nm}}$ of *dcmR*-1 in LB medium could reach about 2.4 in logarithmic period, which was the same as that of the original strain. The recombinant strain *dcmR*-1 showed the higher degrading ability than *Bacillus circulans* WZ-12 and with more than 90% removal efficiency of 120 mmol/L CH_2Cl_2 in 25 h. All these results indicated that recombinant strain *dcmR*-1 was a promising strain in bioremediation of CH_2Cl_2 contaminated environment.

Key words: dichloromethane; *dcmR*; gene cloning and overexpression; biodegradation

二氯甲烷(CH_2Cl_2)是一类应用非常广泛的化学试剂, 主要在金属材料去油污、纺织、印染、油漆行业和制药工业等领域作溶剂使用. 当前, 二氯甲烷被认为是大气污染中毒性较大的卤代烃类物质, 严重危及人类健康. 有报道称环境中 CH_2Cl_2 超过 10 mg/L 浓度即可对人体生理过程造成不同程度的干扰^[1]. 城市废水中 CH_2Cl_2 浓度远远超过 24 $\mu\text{g/L}$ ^[2]. CH_2Cl_2 严重破坏臭氧层, 被美国 EPA 列为优先控制污染物. *Methylobacterium* 和 *Hyphomicrobium* 属的某些菌株能利用二氯甲烷作为唯一碳源生长, 这些细菌含有参与生物降解反应的关键酶——二氯甲烷脱卤素酶(EC 4.5.1.3), 此酶属于谷胱甘肽转移酶类(GST; EC 2.5.1.18), 是一种诱导酶, 能催化二氯甲烷转化生

成甲醛和无机氯. 反应途径如下:



卤代有机物大都为异生物合成物(Xenobiotics), 水溶性不高, 多不能被微生物酶系统识别, 甚至

收稿日期: 2008-10-05; 修订日期: 2008-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(20276070); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06A310); 浙江省环境工程重中之重学科开放基金项目(20080208)

作者简介: 吴石金(1971~), 男, 博士研究生, 副教授, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: wujian28@zjut.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: jchen@zjut.edu.cn

对微生物的代谢有抑制作用,传统的生物处理工艺难以奏效,从现场试验的结果确也证明,凡含二氯甲烷、三氯甲烷、氯代芳香烃(包括 PCBs)等卤代有机物的 VOCs 生物处理效果骤降.其关键问题是高效降解途径的缺乏和现有已知途径的缺陷^[3].近年来国外研究者针对这些问题,提出了应用分子生物学等手段进行降解途径的设计、组装,新代谢途径的创建,以扩展降解菌利用底物的范围、避免有毒中间产物的形成、提高底物通量及其生物可利用性、增加生物酶催化活性和稳定性等^[4].自从 1980 年 Stucki 等^[5]首次从工业废水中分离出能以二氯甲烷作为唯一碳源和能源的甲基杆菌(*Methylobacterium*),到 1994 年 Bader 等^[6]发现二氯甲烷高效降解菌株——*Methylophilus* sp. DM11 以来,迄今有报道已相继分离到包括生丝微菌(*Hyphomicrobium*)^[7]在内的 10 多株具备分解二氯甲烷能力的菌株,并对这些培养物的脱卤素酶进行了初步研究,根据这些酶的性质,把它们分成 2 组,一组是活力较低的 A 组,另一组是活力较高的 B 组^[8].脱卤素酶普遍存在于动物、植物和微生物体内,但微生物源的脱卤素酶因具备对多种有机卤化物同时有较高的脱卤活力,因此被认为是有机物脱卤最佳的和最具有开发潜力的生物催化剂之一.但现有微生物脱卤素酶因其纯度低,影响了对脱卤素酶催化机制的深入研究,另一方面也考虑到复杂条件下的工程应用,因此,利用二氯甲烷脱卤酶基因(*dcmR*)构建基因工程菌成为二氯甲烷生物降解机制和工程应用的一条良好途径.

Bacillus circulans WZ-12 是最近由本实验室分离得到的高效降解二氯甲烷的细菌^[9],在本实验室已成功构建了 *dcmR* 的原核表达质粒 pET28b(+)-*dcmR*.本研究报道从 *B. circulans* WZ-12 中克隆二氯甲烷脱卤酶基因 *dcmR*,将 *dcmR* 导入大肠杆菌,构建一种表达二氯甲烷脱卤酶的重组大肠杆菌,并试图对重组基因的诱导表达条件进行优化,以期为后续应用分子生物学手段构建超级降解菌和工程应用提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、酶和主要试剂

环状芽孢杆菌(*B. circulans*)WZ-12 为本实验室保存.载体 pET28b(+)和宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室惠赠.限制性内切酶、T4 连接酶、*Taq* 酶均购自 Sagon 公司, IPTG 和蛋白质标准物购自华美生物工程

公司.

1.2 PCR 扩增

根据 GenBank 上已发表的二氯甲烷脱卤酶基因 *dcmR* 进行 AlignX 同源性比对,选择一条序列为设计对象,利用 Primer Premier 软件进行设计.引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.引物序列为 P1 上游引物 F: 5'-GTTAAGCTTATGCTGAGC CCGAATCCAACGAACATAC-3' *Hind* III; P2 下游引物 R: 5'-ATATGTCGACTAAAGCGACTGCCGCGCCCTCCT TCTC-3' *Sal* I.

提取纯化菌液 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,反应条件为: 10 × PCR buffer 5 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 4 μL, dNTP 4 μL, 引物各 4 μL, 模板 DNA 2 μL, *Taq* 酶 1 μL, 无菌水调至总体积 50 μL.反应程序为: 94℃ 变性 2 min, 94℃ 变性 20 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 36 个循环; 72℃ 10 min.

1.3 DNA 重组、转化及筛选重组子

PCR 扩增产物经酚、酚/氯仿(1:1)、氯仿/异戊醇(24:1)抽提纯化后,用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切,经低熔点胶电泳分离,回收 700 ~ 1 000 bp 片断,再将回收片段与经相同双酶切的载体 pET28b(+)连接,从而将二氯甲烷脱卤酶基因定向克隆到载体 pET28b(+)中,并将含有插入片断的重组质粒命名为 pET28b(+)-*dcmR*,将重组质粒 pET28b(+)-*dcmR* 电激转化到 *E. coli* BL21(DE3)中,构建表达工程菌 BL21[pET-20(b)-*dcmR*].

1.4 阳性重组子的验证

提取阳性克隆的重组质粒 pET28b(+)-*dcmR*,用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳进行检测,并由上海生工生物工程技术有限公司进行测序验证.

1.5 重组子诱导表达条件优化

工程菌 BL21[pET28b(+)-*dcmR*]接种在 SOB 培养基,培养基和培养条件见文献^[10],通过不同诱导温度优化、不同养菌温度的优化和不同诱导剂浓度的优化等策略.最终确定诱导表达条件为在菌体光密度 A_{600nm} 为 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol/L, 30℃ 诱导 24 h.取 1 mL 诱导液离心收集菌体,将菌体用 100 μL × SDS 上样 Buffer 悬浮,煮沸裂解 5 min,所得裂解液取 20 μL 进行常规 SDS-PAGE 检测^[11].

1.6 脱卤素酶的活力测定

2 g 新鲜菌体悬浮于 0.05 mol/L Tris-HCl、pH 7.5 的缓冲液中,超声波破碎 2 次, 4℃, 15 000 r/min 离

心 2 次, 每次 15 min, 上清液即为粗酶液^[12]. 采用脱卤素酶-甲醛脱氢酶偶联反应 NADH 显色法^[13], 稍作改动, 反应缓冲液 0.05 mol/L Tris-HCl、pH 8.0, 反应总体积为 5 mL, 动态测定 $A_{330\text{nm}}$, 于 25℃ 每 min 产生 1 μg NADH 所需酶量定义为 1 个酶活单位(U).

2 结果与分析

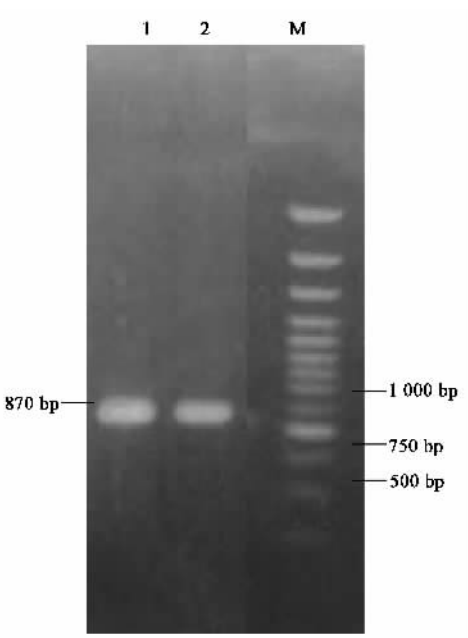
2.1 *dcmR* 的扩增

以 *B. circulans* WZ-12 全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 用 P1、P2 作为引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳分析结果表明, 扩增出 1 个大小约为 870 bp 的特异性的 DNA 条带(图 1), 与理论值为 861 bp 相符, 说明 PCR 方法成功扩增出菌液 WZ-12 的二氯甲烷脱卤酶基因 *dcmR*.

2.2 重组质粒 pET28b(+)-*dcmR* 的构建与验证

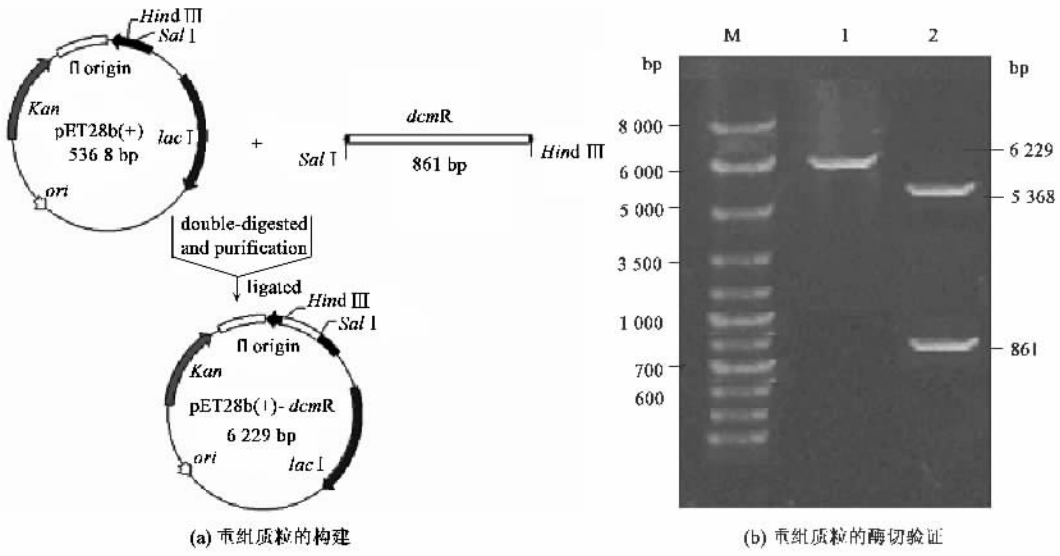
PCR 扩增产物纯化后, 经 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切, 回收后再与经相同双酶切的载体 pET28b(+)连接, 从而将二氯甲烷脱卤酶基因定向克隆到载体中. 含有二氯甲烷脱卤酶基因的重组质粒载体 pET28b(+)-*dcmR* 的构建见图2(a). 重组表达载体中含有氨苄青霉素抗性基因, 可以进行工程菌的抗性筛选. 重组质粒 pET28b(+)-*dcmR*, 用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切, 用琼脂糖凝胶电泳分析, 结果见图2(b). 图谱分析表明, 获得了大小约为 5 368 bp 和 861 bp 的 2 个带, 与理论值一致, 初步说明重组成功.

2.4 序列测定



M: 核酸分子量标准, 下同; 1、2: PCR 产物
图 1 *dcm* 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product by amplification of total *Bacillus circulans* WZ-12 genome DNA

重组质粒送上海生工生物工程技术有限公司测序, 测序结果表明, 克隆的基因片段全长 861 bp. 与 GenBank 报道的 *Methylobacterium* sp. DM4 的二氯甲烷脱卤酶基因序列相比, 在 152 bp 处由 A 替代 C; 在 233 bp 处由 G 替代 T; 在 258 bp 处由 C 替代 T. BLAST 比对结果显示, 克隆的基因片段与



1: pET28b(+)-*dcmR* *Hind* III 单酶切; 2: pET28b(+)-*dcmR* *Hind* III + *Sal* I 双酶切

图 2 重组质粒的构建与验证

Fig. 2 Recombinant plasmid construction and identification of the recombinant plasmid

Methylobacterium sp.DM4 的二氯甲烷脱卤酶基因序列同源性达 99% .由此推断二氯甲烷脱卤酶基因已成功克隆到 pET28b(+)载体中.

2.5 dcmR 的在工程菌中的表达

2.5.1 重组质粒的转化

用电激转化方法将重组质粒导入表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)中,在含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基上筛选转化子,筛选获得几十个阳性转化子,提取质粒后酶切鉴定,同时转化 pET-20(b)空载体,筛选阳性转化子作为对照菌株.

2.5.2 表达初检验

分别挑取 5 株含重组表达载体 pET28b(+)-*dcmR* 和 1 株含空载体 pET28b(+)的重组大肠杆菌 BL21(DE3)依照材料方法所述进行培养,诱导表达后,收集菌体,检测酶活.由酶活检测结果可知,5 株重组菌检测出的酶活均大于出发菌株,空载体对照组没有检测到酶活,结果见表 1.重组菌周质酶活非常低,说明周质分泌效率较差.培养基上清液中也基本无酶活,说明 *dcmR* 基因在该系统中不能外分泌表达,结果见表 2.

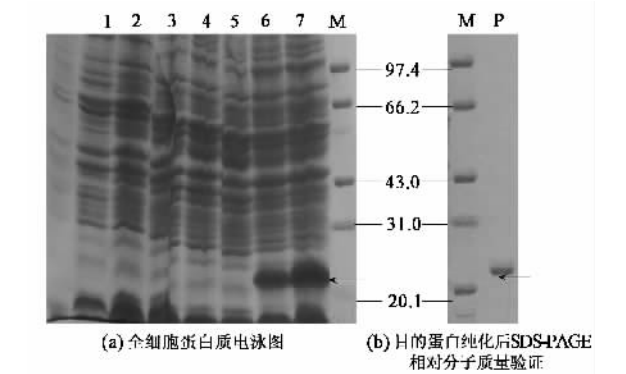
表 1 重组菌 BL21(DE3)的表达和酶活测定		
Table 1 Expression and enzyme activities of the recombinant strains		
菌株	酶活/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	
对照(空载体)	0	
<i>dcmR</i> -1	25.78	
<i>dcmR</i> -2	22.24	
重组菌株	17.18	
<i>dcmR</i> -3	17.18	
<i>dcmR</i> -4	20.58	
<i>dcmR</i> -5	17.27	
出发菌株	15.76	

表 2 重组菌 dcmR-1 和出发菌株的酶活比较					
Table 2 Comparison between enzyme activity of the recombinant strains dcmR-1 and that of original strain					
项目	总酶活 / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	比酶活 / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	胞内酶活 / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	周质酶活 / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	培养基 / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$
出发菌株	15.76	64.32	14.08	1.66	< 0.01
重组菌(<i>dcmR</i> -1)	25.78	88.86	22.86	2.92	< 0.01

2.5.3 电泳检测

为了进一步检验重组蛋白的存在,转化子培养液经过不同时间的诱导表达后,进行全细胞蛋白质的 SDS-PAGE,以转化 pET28b(+)空载体的 BL21(DE3)为对照,结果见图3(a),加入 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol/L,30℃诱导 24 h 重组蛋白表达条带最明显,其表达量可达总蛋白的 32%,说明 *dcmR* 基因在该系统中得到了高效表达.超量表达的蛋白条带经

割胶回收和纯化,再经 SDS-PAGE,获得单一条带,相对分子质量约为 22 ± 1 [图3(b)].相对分子质量与二氯甲烷脱卤酶的理论计算值 21 相符.



条带 1:受体菌空白对照 *E. coli* BL21(DE3); 条带 2:受体菌含空载体对照 *E. coli* BL21(DE3)[pET28b(+)]; 条带 3: IPTG 诱导前 *E. coli* BL21(DE3)[pET28b(+)-*dcmR*]; 条带 4: *E. coli* BL21(DE3) [pET28b(+)-*dcmR*]不诱导培养 8 h; 条带 5: *E. coli* BL21(DE3) [pET28b(+)-*dcmR*]不诱导培养 24 h; 条带 6: IPTG (0.6 mmol/L)诱导培养 24 h; 条带 7: IPTG (0.6 mmol/L)诱导培养 24 h; 条带 P: 目的蛋白

图 3 重组菌全细胞蛋白质 SDS-PAGE 图谱与目标蛋白分子量验证

Fig.3 SDS-PAGE of total protein of the recombinant cell and the target protein molecular weight verification

2.6 重组菌株和宿主菌 E. coli BL21(DE3)的生长特性比较

以 2% 的接种量将对数生长期的重组菌株 *dcmR*-1 和宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)种子液分别移入液体 LB 中,30℃,180 r/min 摇床振荡培养,每隔 4 h 取样测定菌体的生长量,从图 4 中可以看出,重组菌株 *dcmR*-1 和原宿主菌在 LB 培养基中生长生长曲线趋势相同,都成 S 型生长曲线,对数期 $A_{600\text{nm}}$ 值都可达到 2.3 ~ 2.4,由此可见,外源 *dcmR* 基因的导

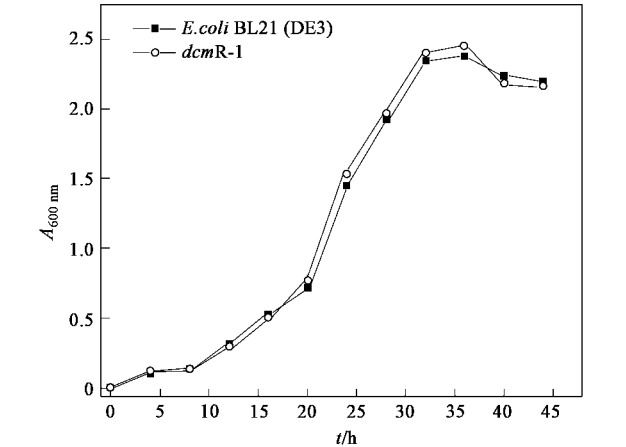


图 4 重组菌株 *dcmR*-1 和宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)生长特性比较

Fig.4 Growth curve of recombinant strain *dcmR*-1 and *E. coli* BL21(DE3) in LB medium

入只是增加了菌株的功能,对其生长没有影响.

2.7 重组菌株和 *B. circulans* WZ-12 对 CH₂Cl₂ 降解特性的比较

为了比较重组菌株和原始基因源菌株 *B. circulans* WZ-12 对 CH₂Cl₂ 生物降解特性,将 2 个菌株分别在 LB 培养基中培养至对数期,以 2% 的接种量分别接入 CH₂Cl₂ 含量为 120 mmol/L 的基础盐培养基中(250 mL/1 000 mL 三角烧瓶中,密闭),30℃,180 r/min 摇床振荡培养,每隔 6 h 取 1 次样,气相(Agilent 6890N/MS5975)检测方法检测 CH₂Cl₂ 的含量.设空白对照和阴性对照各 1 组,空白对照检测 CH₂Cl₂ 的非生物性丢失,以培养的宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)做阴性对照.从图 5 中可以看出,重组菌株 *dcmR*-1 在 25 h 的降解率达 90% 以上,而 *B. circulans* WZ-12 则需要 35 h 甚至更长时间,最高降解率在 80% ~ 85% 之间,这表明重组菌株的二氯甲烷脱卤酶基因导入了 T7 强启动子,提高了关键酶基因转录效率,最终提高了底物通量及其生物可利用性,对生物酶的催化活性和稳定性均有积极的作用.空白对照 CH₂Cl₂ 的浓度相对稳定,说明非生物性丢失并没有影响到本次实验结论.以培养的宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)做阴性对照,在菌体生长过程中可能存有少量利用或吸收,CH₂Cl₂ 的浓度稍有下降.

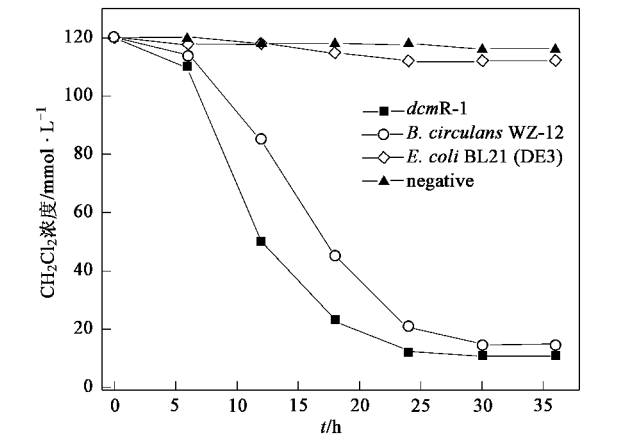


图 5 重组菌株 *dcmR*-1 和 *B. circulans* WZ-12 对 CH₂Cl₂ 降解特性的比较

Fig.5 Biodegradation of CH₂Cl₂ by recombinant strain *dcmR*-1 and *B. circulans* WZ-12

3 讨论

本研究从 *B. circulans* WZ-12 中克隆得到二氯甲烷脱卤素酶基因 *dcmR*,将该基因构建在 pET28b (+)表达载体上形成重组质粒 pET28b (+)-*dcmR*,

并将该重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3)中,电泳分析和酶活测定表明二氯甲烷脱卤素酶基因 *dcmR* 成功地在 BL21(DE3)中表达,重组菌酶活大于 *Hyphomicrobium* sp. DM2^[14] 和 *Methylobacterium* sp. DM11^[15].自从 1980 年 Stucki 等^[5]首次从工业废水中分离出能以二氯甲烷作为唯一碳源和能源的甲基杆菌(*Methylobacterium*),到 1994 年 Bader 等^[6]发现二氯甲烷高效降解菌株 *Methylophilus* sp. DM11,迄今有报道相继分离到包括生丝微菌(*Hyphomicrobium*)在内的 10 多株分解二氯甲烷的细菌,并对这些菌中的脱卤素酶进行了研究^[16,17].Scholtz 等^[16]在 1988 年首先克隆出二氯甲烷脱卤素酶基因 *dcmR* 全序列,后来不断有新 *dcmR* 基因在 GenBank 上登录.在本实验的前期工作中,为了筛选二氯甲烷高效降解菌株,采用气相色谱和 PCR 扩增相结合的方法,从自主驯化分离的近百株微生物培养物中,发现其中 1 株具有很高效的二氯甲烷降解能力并检测出理想的酶活性.通过传统的微生物鉴定方法结合 16S rDNA 分子鉴定,确定该分离物(WZ-12 菌株)为环状芽孢杆菌(*B. circulans*).环状芽孢杆菌具备二氯甲烷降解能力国内外尚没有报道.作为新性能菌种,其 16S rDNA 序列已登录在 GenBank 上(登录号:EF100968),该菌株也已在中国典型微生物菌种保藏中心保藏(CCTCC NO: M 207006).从 *B. circulans* WZ-12 克隆二氯甲烷脱卤素酶基因 *dcmR*,研究该基因的功能特点并构建相应的基因工程菌具有一定的理论和实践意义.pET 载体是利用大肠杆菌 T7 噬菌体的转录体系为元件构建的表达体系,是目前最有效的大肠杆菌表达载体之一.在重组质粒 pET28b (+)-*dcmR* 中,*dcmR* 基因的转录依靠 T7 强启动子.IPTG 是一种乳糖类似物,能够与 T7 RNA 聚合酶基因前的 lacUV5 的表达产物相结合,解除其对 T7 RNA 聚合酶表达的阻遏,促进 T7 RNA 聚合酶的表达,从而大量启动插在 T7 启动子后的外源基因的转录表达.实验通过 IPTG 诱导时期、诱导浓度和诱导时间的进一步研究,找出基因工程菌的最佳诱导表达条件.SDS-PAGE 结果表明,在 37℃ 培养条件下 *dcmR* 基因在大肠杆菌中可以很好地表达.但是这时,酶活和比酶活都不高;当在 30℃ 培养条件下,酶活和比酶活要高.这些研究结果与 Thomas 等^[18]用 *tac* 启动子在大肠杆菌中表达 *dcmR* 基因的结果一致.分析这种现象的原因主要有 2 点,一是 37℃ 条件下所表达的蛋白主要以包涵体形式存在,30℃ 条件下虽然也形成包涵体,但是可溶性蛋白含量要比

37℃条件下的高;二是二氯甲烷脱卤素酶酶活性的最适温度是在30℃,37℃时酶活性要明显下降.

我国对于微生物降解二氯甲烷的机制研究不多,从基因水平方面深入的报道更是空白.因此,发现新的微生物和新的基因资源,开展相关关键酶基因的克隆工作和构建基因工程菌,为后续应用分子生物学等手段进行高效生物降解途径的设计、组装,新陈代谢途径的创建具有积极的意义.

4 结论

(1)通过 PCR 方法分离到二氯甲烷脱卤酶基因 *dcmR*.通过构建具 T7 强启动子的 pET28b(+)-*dcmR* 质粒,电击转化(*Escherichia. coli*)BL21(DE3),构建了工程菌株 BL21[pET-20(b)-*dcmR*].在37℃培养条件下 *dcmR* 基因可在 BL21[pET-20(b)-*dcmR*]中进行高效表达.

(2)转化子经 IPTG 诱导后,表达蛋白占总蛋白的 32%.重组菌 *dcmR*-1 酶活达 25.78 U/mL,比酶活为 88.86 U/mg蛋白.重组菌周质中酶活 2.92 U/mL,胞内酶活 22.86 U/mL. *dcmR* 基因在该系统中不能外分泌表达.

(3)工程菌株提高了关键酶基因转录效率,最终提高了底物通量及其生物可利用性、增加生物酶的催化活性,降解效率比原降解菌株有明显提高,为后续应用分子生物学手段进行难生物降解有机污染物的高效生物降解途径的设计、组装和工程应用提供理论依据.

致谢:本研究得到中国农业大学农业生物技术国家重点实验室和浙江工业大学生物工程研究所柳志强等老师的指导和协助,在此一并致谢.

参考文献:

- [1] Doronina N V, Trotsenko Y A, Tourova T P, *et al.* *Methylophilus helvetica* sp. nov. and *Methylobacterium dichloromethanicum* sp. nov. - novel aerobic facultatively methylotrophic bacteria utilizing dichloromethane[J]. Syst Appl Microbiol, 2000, **23**: 210-218.
- [2] Doronina N V, Trotsenko Y A, Krausova V I, *et al.* *Paracoccus methylutens* sp. nov. - a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane[J]. Syst Appl Microbiol, 1998, **21**: 230-236.
- [3] Brunner W B, Staub D, Leisinger T. Bacterial degradation of dichloromethane[J]. Appl Microbiol, 1991, **40**: 950-958.
- [4] La Roche S D, Leisinger T. Sequence analysis and expression of the bacterial dichloromethane dehalogenase structure gene, a member of the glutathione S-transferase supergene family[J]. J Bacteriol, 1990, **172**: 164-171.
- [5] Stucki G, Galli R, Leisinger T. Dehalogenation of dichloromethane by cell extracts of *Hyphomicrobium* DM2[J]. Arch Microbiol, 1981, **130**: 366-371.
- [6] Bader R, Leisinger T. Isolation and characterization of the *Methylophilus* sp. strain DM11 gene encoding DCM dehalogenases/glutathione S-transferase[J]. J Bacteriol, 1994, **176**: 3466-3473.
- [7] Hartmans S, Tramper J, Wageningen. Dichloromethane removal from waste gases with a trickle-bed bioreactor[J]. Bioprocess Engineering, 1991, **6**: 83-92.
- [8] Janssen D B, Oppentocht J E, Poelarends G J. Microbial dehalogenation[J]. Current Opinion in Biotechnol, 2001, **12**: 254-258.
- [9] Wu S J, Zhang L L, Wang J D, *et al.* *Bacillus circulans* WZ-12—a newly discovered aerobic dichloromethane-degrading methylotrophic bacterium[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **76**(6): 1289-1296.
- [10] 陈卫,葛佳佳,张灏,等.半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的过量表达及 IPTG 诱导条件[J].无锡轻工业大学学报,2001, **21**(5): 492-495.
- [11] 董红军,伍丽娴,陈三凤.乙烯合成酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J].农业生物技术学报,2007, **15**(4): 698-701.
- [12] Scholtz R, Wackett L P, Egli C, *et al.* Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a fast-growing dichloromethane-utilizing bacterium [J]. Journal of Bacteriology, 1988, **170**(12): 5698-5704.
- [13] Kohler-Staub D, Thomas L. Dichloromethane dehalogenase of *Hyphomicrobium* sp. Strain DM2[J]. J Bacteriol, 1985, **162**: 676-681.
- [14] Gisi D, Willi L, Traber H, *et al.* Effects of bacterial host and dichloromethane dehalogenase on the competitiveness of methylotrophic bacteria growing with dichloromethane [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, **64**: 1194-1202.
- [15] Vuilleumier S, Thomas L. Protein engineering studies of dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase from *Methylophilus* sp. strain DM[J]. Eur J Biochem, 1996, **239**: 410-417.
- [16] Scholtz R, Wackett L P, Egli C, *et al.* Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a fast-growing dichloromethane-utilizing bacterium[J]. J Bacteriol, 1988, **170**: 5698-5704.
- [17] Salome D, Roche L A, Thomas L. Sequence analysis and expression of the bacterial dichloromethane dehalogenases structural gene, a member of the glutathione S-transferase family[J]. Journal of Bacteriology, 1990, **172**(1): 164-171.
- [18] Thomas L, Kohler-Staub D. Dichloromethane dehalogenase [J]. Methods Enzymol, 1990, **188**: 355-361.