

PAHs降解基因及降解酶研究进展*

曹晓星¹ 田蕴¹ 胡忠³ 郑天凌^{1,2,*}

(¹厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005 ²厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建厦门 361005;

³汕头大学理学院生物系, 广东汕头 515063)

摘要 由于环境中的多环芳烃 (PAHs) 具有高遗传毒性和“三致”性 (致癌、致畸和致突变), 其生物降解基因和降解功能酶研究备受关注。多环芳烃双加氧酶是近年来研究较多的多环芳烃降解的关键酶系之一, 主要由细菌产生, 可通过氧化反应使多环芳烃开环生成小分子的中间产物并最终氧化成 CO₂ 和水。目前, 有关这类酶的理化性质、结构特点、功能等的研究相继开展, 本文对 PAHs 降解基因、降解酶的研究现状与发展趋势进行综述。

关键词 多环芳烃; 生物降解; 双加氧酶

中图分类号 X17 文献标识码 A 文章编号 1000- 4890(2007) 06- 0917- 08

Research progress in PAHs degradation genes and enzymes CAO Xiaoxing¹, TIAN Yun¹, HU Zhong³, ZHENG Tianling^{1,2} (¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005 Fujian, China; ²State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005 Fujian, China; ³Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063 Guangdong, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(6): 917- 924

Abstract Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of organic pollutants that accumulated in the environment due to a variety of anthropogenic activities. More and more attention has been paid to PAHs because of their toxic, carcinogenic and mutagenic potential. The aromatic ring-cleaving enzymes produced by microbes play a definitive role in the metabolism of aromatic compounds. These enzymes can catalyze the addition of two atoms of molecular oxygen directly on to aromatic rings and their derivatives, with subsequent cleavage of aromatic rings. At present, the studies on the physical and chemical properties, molecular structure, and functions of these enzymes are carried on, and this paper reviewed the current status and trend on the research of the genes and enzymes involved in PAHs degradation.

Key words polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs); biodegradation; dioxygenase

1 引言

多环芳烃 (PAHs) 是一类有毒的环境污染物, 大量的人类活动使它们在环境中不断累积 (Juhász & Naidu, 2000)。目前, 由于其所具有的潜在毒性、致癌和致畸特性, 使它受到了越来越多人的关注与研究 (Witt, 2002)。

环境中多环芳烃的去除途径包括挥发、光氧化、化学氧化、生物积累、土壤吸附、浸滤作用及微生物降解等。由于芳香族化合物的苯环结构而不易被矿

化和利用, 目前为止环境中大部分芳香族化合物的降解是由微生物承担。张金丽等 (2002) 研究表明, 微生物降解在污染物的迁移转化乃至最终消减的过程中占有重要地位, 是沉积环境中多环芳烃去除的最主要途径。

自然环境中的藻类、真菌、细菌等微生物对多环芳烃均有一定程度的降解作用, 但其降解机制不同, 且降解作用与效果在不同的环境, 不同的生长发育阶段有所差别。微生物对多环芳烃等污染物质的生物降解是海洋环境污染研究中最活跃的领域之一。我国在 20 世纪 70~ 80 年代就曾开展了此类研究, 至 90 年代引起越来越多的重视, 并在研究的广度和深度上不断扩展 (郑天凌等, 2001; 谷体华等, 2005; 骆苑蓉等, 2005; 孙娟等, 2005; 黄栩等, 2006)。

* 国家自然科学基金项目 (40576054, 40476047) 和长江学者和创新团队发展计划资助项目 (40521003)。

** 通讯作者 E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn

收稿日期: 2006-05-31 接受日期: 2006-12-17

2 参与 PAHs 降解的主要细菌种属

2.1 假单胞菌属 (*Pseudomonas*)

作为一种对石油和苯环类化合物降解的主要菌属,假单胞菌属的相关降解途径已较为明朗。研究发现,降解分成两条途径,一条途径通向重要的中间产物,像儿茶酚或原儿茶酸;另一条途径是产生三羧酸循环的中间产物 (Mahajan *et al.*, 1994 Prabhu & Phale, 2003)。多环芳烃双加氧酶在第一条途径中是关键酶系,负责打开苯环结构。研究表明,多环芳烃双加氧酶由多聚体和许多亚基组成:包括一个还原酶亚基,一个铁氧还原蛋白亚基,一个大的 α 亚基和一个小的 β 亚基组成的铁硫蛋白 (Harayama *et al.*, 1992)。

多环芳烃的酶降解大多具有较强的区域性和选择性。Bagneris 等 (2005) 研究发现,假单胞菌的苯双加氧酶和甲苯双加氧酶有相同的反应特性,结构和基因构成,但它们酶作用的底物特异性不同,相对而言,甲苯双加氧酶具有更高的烷基苯催化活性。

2.2 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)

鞘氨醇单胞菌属的菌株是降解芳香族污染物的另一类主要菌株,常通过水杨酸和邻苯二酚途径代谢 PAHs 和其它芳香化合物。张小凡和小柳津广志 (2002) 在菲降解菌,鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp) PY3 的 DNA 片段与 pUC119 质粒连接后,对菲降解菌 *Sphingomonas* sp PY3 的 meta-开裂基因进行克隆和研究。通过酶切、连接及转化,得到 2 个质粒 pUp1 和 pUp2。经 DNA 测序及数据库检索发现, pUp1 含有 2 个 ORF。ORF 1 含有铁硫蛋白 (plant type [2Fe-2S]) 及水解酶的 Motif ORF 2 含有双加氧酶及铁硫蛋白 ([4Fe-4S]) 的 Motif 经与其它菌的芳香化合物水解酶及双加氧酶的比较证明, ORF 1 是编码菲水解酶的基因; ORF 2 是编码菲双加氧酶的基因。

周德平等 (2004) 利用 PCR 扩增分离得到了少动鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas aurinobilis*) ZX4 菌株的儿茶酚 2,3-双加氧酶基因 (C230-ZX4)。序列分析结果表明,该基因与已报道的来自菌株 *Sphingomonas yanokuyae* B1 和 *Sphingomonas* sp KMG425 的 *xyIE* 基因 (编码产物均为 C230) 具有较高的核苷酸序列同源性。

Meyer 等 (1999) 研究发现,类芽胞杆菌属 *Paenibacillus* sp 和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*

sp 这 2 个菌属菌株的邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (C23DO) 基因间有较高的同源性,他们根据不同菌属 C23DO 基因的不同特征设计了特异性强的引物,成功地在 2 个菌属的菌株中扩增出约 900 bp 的 C23DO 基因产物。

2.3 红球菌属 (*Rhodococcus*)

红球菌属也是最近报道较多的降解菌属。Genaro 等 (2001) 发现混浊红球菌 R7 菌株 (*R. opacus* R7) 具有降解萘和二甲苯的能力。芳烃降解过程中龙胆酸降解途径和邻苯二酚降解途径的相关酶系参与了萘和二甲苯的降解。沈锡辉等 (2004) 也分离得到既可降解苯酚又可降解萘等多种芳烃的红球菌 PNAN5 菌株 (*Rhodococcus* sp stain PNAN5) 并研究发现该菌株是通过邻苯二酚 1,2-双加氧酶催化的开环途径。

3 PAHs 降解基因

3.1 利用降解菌的种属同源性,通过各种杂交技术获得新的基因片段

随着对 PAHs 降解基因研究的深入和降解基因库的不断丰富,人们发现降解菌的种属相同或者相近时,得到的能够利用相同底物的降解基因具有比较高的同源性。而且,同一种属的菌株在利用不同的底物时,它的降解基因也可能出现很高的同源性。

Garcia-Vales 等 (1989) 用 *xyle* 和 *nahG* 基因探针与质粒 PLB113 酶切片段杂交,显示了 6.1 kb 片段与 2 个探针 DNA 均有同源性。

Rossello-Mora 等 (1994) 以 *nahA* (NO) 和 *nahH* (C230) 基因为探针,与 6 个萘降解菌株的质粒杂交,发现菌株 *P. stutzeri* 19SMN4 的质粒含有 *nahH* 基因,同时以芳香环降解基因探针 *nahA*、*nahG* 和 *nahH* 与 12 个 *P. stutzeri* 菌株的总 DNA 酶切片段杂交,不但定位了阳性酶切片段所携带的降解基因,而且发现所有菌株中降解基因均有同源性。

目前,已证实一些假单胞菌中与菲、蒽转化有关的 *nah*、*pah*、*ndo* 和 *dox* 操纵子与萘的降解基因有很高的同源性。Hamann 等 (1999) 利用 *P. putida* PaW 736 中编码萘双加氧酶的一段 ISPa 基因 *ndoB* 为探针,与多个不同多环芳烃降解菌总 DNA 杂交,以期找到同源序列。

Atsushi 等 (2000) 先用已报道的萘降解基因 *phdI* 为探针与分离出来的大片段基因组 DNA 和质粒进行 Southern 杂交,发现降解基因可能位于染色

体之上,之后根据降解基因的保守区域设计简并引物 PCR并获得了 302 bp的 DNA 片段,最后再根据该片段来设计探针,通过与降解基因文库中的大肠杆菌菌落杂交得到了带有目的基因的阳性克隆子。

3.2 相关降解基因的筛选与检测

现在,有人将多环芳烃双加氧酶的亚基的基因作为靶点通过 PCR 等分子手段来检测环境样品中降解 PAHs的菌种,检测和量化芳环分别的代谢途径 (Baldwin *et al*, 2003; Moser & Stahl, 2001)。也有人通过这些酶来做遗传筛选以检出具有 PAHs分解作用潜力的细菌 (Herrick *et al*, 1993; Fleming *et al*, 1998; Hamann *et al*, 1999; Meyer *et al*, 1999)。

3.3 通过应用宏基因组学技术筛选得到降解基因

海洋环境的特殊性与高度复杂性造就了极为丰富的微生物多样性,孙昌魁等 (2001)估计 99% 以上的微生物为不可培养微生物 (unculturable microorganism, 或称未能培养的微生物)。这就意味着对隐匿其中的重要功能基因(如高效降解 PAHs的基因)有着被发掘与应用的巨大潜力。

宏基因组 (metagenome)是指在某一时刻某一区域所有微生物基因组的总和。关于宏基因组的定义是由 Schmitt等 (1991)研究海洋微型浮游生物的群落结构时提出。目的是直接从环境样品中提取总 DNA,构建宏基因组文库,从中筛选所需要的目的基因。

直到 1998年第一次出现宏基因组学这一名词之后 (Handelman *et al*, 1998),该技术才开始应用于生物活性物质的筛选,迄今已有几丁质酶、淀粉酶、核酸酶、酯酶、脂肪酶、蛋白酶、氧化酶和抗菌药物等基因得到筛选与表达 (Rondon *et al*, 2000; Gillespie *et al*, 2002; Patrick *et al*, 2002)。

Yeates等 (2000)扩展了 PCR 反应的方法,使其可以用来获得环境样品中环羟基化双加氧酶 (ring-hydroxylating dioxygenases, RHDs) 的基因片段。但是,不论从重要序列的同源性比较或关键残基的接触反应都显示了同一结果,就是所有从克隆实验中推断得到的多肽均与目前报道的有所不同。另外,他们从所有的土壤样品的测试中,得到一种具有更加显著广泛性的新的序列分组,并由此推断目前已知 RHDs特点并不能很充分地展现自然界中所有 RHDs功能域的多样性。由此可知,自然界中未可培养微生物的功能基因对环境中污染物的降解所做的贡献也是不容忽视的。因此,将宏基因组学

的技术运用于海洋环境的有机污染的微生物修复、构建环保功能基因库均具有重大现实意义。

4 PAHs降解酶类的研究现状与趋势

4.1 微生物产生的加氧酶及其分类

近 10年来,多环芳烃的生物降解及其降解酶系的研究已成为环境、生物科学各个领域关注的热点,后者是在大量的研究基础上,尤其是方法、手段得到改进基础上得到长足进步。

微生物加氧酶主要有 2种,即单加氧酶和双加氧酶。丝状真菌一般产生单加氧酶,对多环芳烃降解的第一步是羟基化多环芳烃。而细菌产生双加氧酶,将苯环裂解,把 2个氧原子加到底物中形成双氧乙烷,之后进一步氧化成顺式双氢乙醇,双氢乙醇可继续氧化为儿茶酸、原儿茶酸和龙胆酸等中间代谢物,接着苯环断开,产生琥珀酸、延胡索酸、乙酸、丙酮酸和乙醛。降解中的产物被微生物用来合成自身的生物量,同时产生水和 CO₂ (张金丽等, 2002)。

目前已知的能催化芳香烃类化合物的双加氧酶大约有 40多种,国内外的相关研究已经深入到反应机理的研究,光学活性物质的获得,双加氧酶结构与功能的研究及其分子生物学改造,相关基因结构、起源与高表达等领域 (章俭等, 2004)。

芳香化合物降解过程中均需要双加氧酶,在酶的生物学系统分类中,一般将能催化氧化芳香烃类化合物的双加氧酶均归属于非血红素类铁氧化-还原蛋白。但是,按照酶的开环的方式又可分为以下 2类 (Senda *et al*, 1996; Hugo *et al*, 1998; 孙艳和钱世钧, 2001; 章俭等, 2004) (表 1)。

4.2 几类常见的细菌双加氧酶

通常在 PAHs的降解过程中,环的氧化都是一

表 1 细菌双加氧酶类型 (按开环方式)

Tab 1 Type of bacteria dioxygenases (pressed by ring opening fashion)

双加氧酶 (种类)	辅助因子	举例	组分
环羟基化双加氧酶	需要还原辅酶	甲苯双加氧酶 苯甲酸双加氧酶	包括还原酶、铁氧还原蛋白、末端氧化酶,是 $(\alpha\beta)_n$ 或 $(\alpha)_n$ 的低聚物
环断裂双加氧酶	不需要辅助因子	邻苯二酚 2,3-双加氧酶 邻苯二酚 1,2-双加氧酶	4个分子量为 32kDa的亚基,每个亚基有起催化作用的单个 Fe ²⁺ 的活性中心 有不同的 α, β 亚基, $[\alpha\beta Fe^{3+}]_n$ 另外一些为单一肽链 $[\alpha\alpha Fe^{3+}]_n$ 具有单个 Fe ³⁺ 的活性中心

个限速的步骤,而参加最初催化反应的双加氧酶是一个多组分的复杂酶系 (Okuta *et al*, 2003)。这个复杂的酶系,主要由黄素蛋白、铁-硫蛋白和铁氧还蛋白所组成 (Yeh *et al*, 1977; Crutcher *et al*, 1979)。

4.2.1 环断裂双加氧酶 在芳香环断裂双加氧酶中儿茶酚双加氧酶就具有典型的代表性。儿茶酚双加氧酶是一类非血红素铁蛋白,能直接促进 2 分子的氧原子同时加成在儿茶酚上,同时产生裂开了芳香环的派生物。环的打开可以发生在 2 个邻近的相关二醇的不同方位,同时这种开环位点的不同被用于把儿茶酚双加氧酶区分为 2 大类:外断裂和内断裂开环酶。内断裂双加氧酶,如儿茶酚 1,2-双加氧酶如果要具有酶的活性就必须在其活性位点包含有一个高旋的三价铁原子 (Sanakis *et al*, 2003)。外断裂邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (C230) 有 4 个分子量为 32 KDa 的亚基,每个亚基有个起催化作用的 Fe^{2+} ,催化产物 2-羟基粘康酸半醛是黄色的,因此这个酶的这个基因 *xyIE* 可作为分子生物学研究中的报告基因。酶反应机制是:邻苯二酚首先连接到酶上,然后再与 O_2 连接,形成三元结构,芳环断裂形成半醛 (Senda *et al*, 1996; Butler & Mason, 1997; 孙艳和钱世钧, 2001)。

4.2.2 环羟化双加氧酶 环羟化双加氧酶 (aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases, ARHD) 属于单环的非血红素铁加氧酶大家族 (Jiang *et al*, 1996; Butler & Mason, 1997), 此类加氧酶被认为由以下几种组分组成。

1) 羟化酶组分

羟化酶组分,是 $(\alpha\beta)_n$ 或 $(\alpha)_n$ 的低聚物。在 $(\alpha\beta)_n$ 型酶中 2 个非烷基类群, Rieske 型 $[Fe_2S_2]$ 中心和单核铁与 α 亚基有关。 α 亚基含有一个 Rieske $[2Fe-2S]$ 中心和单核铁 (Harayama *et al*, 1992) (结构如图 1), 后者位于酶的催化中心。 β 亚基影响末端氧化酶的最初构象。 α 和 β 亚基共同影响底物特异性 (孙艳和钱世钧, 2001)。

2) 电子传递组分

电子传递组分,与黄素蛋白和 Rieske 型 $[Fe_2S_2]$ 铁氧还蛋白 (NADH-铁氧还蛋白氧化还原酶) 结合而稳定。在安息香酸盐和甲苯甲酸盐 1,2-双加氧酶系统,一个单一的蛋白包含有还原酶和 Rieske 型铁氧还蛋白结构域从 NADH 向羟化酶组分传递电子 (Harayama *et al*, 1992)。在邻苯

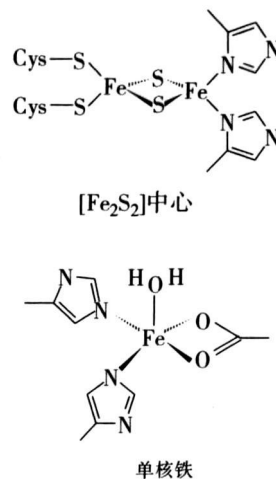


图 1 $[Fe_2S_2]$ 中心和单核铁
Fig 1 $[Fe_2S_2]$ center and single-center iron

二甲酸盐 4,5-双加氧酶系统,邻苯二甲酸盐双加氧酶还原酶 (PDR 是一种单一的蛋白包含有 FMN 结合还原酶和 plan1 型铁氧还蛋白结构域。)有相同的功能。因而在 ARHD 系统中的电子传递可以概括写成:

NADH 还原酶 FAD/FMN 铁氧化还原蛋白 $[Fe_2S_2]$ 羟化酶 α 亚基 $[Fe_2S_2]$, Fe (Butler & Mason, 1997; Jiang *et al*, 1996; Kauppi *et al*, 1998)

4.2.3 末端双加氧酶 早在 20 世纪 70 年代,苯二氢二酚顺式构型和 $^{18}O_2$ 实验的化学证据就揭示 2 个氧原子来源于分子氧,并表明发生了加双氧酶催化的反应。Axcell 和 Geary (1975) 曾对腐臭假单孢菌株中的苯加双氧酶进行了定性,并纯化出均一的酶蛋白。这种酶系极不稳定,它由一个具有近 60 KDa 分子量的黄素蛋白及 2 个具有约 21 KDa 和 186 KDa 分子量的非血红素铁蛋白所组成。较大的非血红素蛋白被认为是末端双加氧酶。Crutcher 和 Geary (1979) 进一步研究了末端加双氧酶的特征,发现它含有 2 个 $[Fe_2S_2]$ 集团,其分子量为 215 KDa。

Krivobok 等 (2003) 在萘降解菌 *Mycobacterium* sp. strain 6PY1 的研究中,克隆了被称为 Pdo1 和 Pdo2 的 2 种酶的末端羟化双加氧酶结构的编码基因,属于双加氧酶的一个亚科且是革兰氏阳性细菌所特有。当它在 *Escherichia coli* 中大量表达时, Pdo1 和 Pdo2 显示了对 PAH 底物不同的选择性,在酶促反应中萘和菲的双羟化作用中,后者会优先氧化菲。当来自于种类 KP7 的菲双加氧酶电子载体蛋白在重组体中被联合表达时, Pdo2 酶的活性在接触

反应中得到了显著的增强。纯化得到的 Pdo2 酶是一种棕色蛋白质,由 2 种类型的亚基组成其分子量约 52 KDa 和 20 KDa, 种类 6PY1 细胞抽提物的免疫印记分析显示 Pdo1 出现在生长于安息香酸盐、菲或芘和缺少醋酸盐培养物的细胞中。与 Pdo1 相比 Pdo2 只在 PAH 生长细胞中被检测到。

研究认为,末端氧化酶是一个铁硫蛋白(iron sulfur protein, ISP)是双加氧酶的催化组分。为了羟基化芳香族底物,需要 O_2 和 Fe^{2+} 。因此,除了底物结合位点,末端氧化酶还含有一个铁结合位点和 Rieske 型 $[2Fe_2S_2]$ 结构。末端氧化酶组分为一个大的寡聚蛋白,分子量为 150~200 KDa 主要由分子量分别是 50 和 20 KDa 的 2 种不同亚基 α 和 β 组成。它们以苯、甲苯和萘双加氧酶的 $\alpha_2\beta_2$ 或苯甲酸双加氧酶的 $\alpha_3\beta_3$ 型式结合(孙艳和钱世钧, 2001)。

4.3 降解酶研究中的相关技术

4.3.1 蛋白质组学技术及差异表达此领域的应用

蛋白质组学是指某一种细胞、组织或生物体的基因组所表达的全部蛋白质及其存在方式(Wasinger *et al.*, 1995; Wikins *et al.*, 1996)。80 年代末,生物质谱的发展,“软电离”技术的应用使得蛋白质组学迈入了一个新的发展纪元。也为在蛋白的氨基酸测序和肽序列标签的获得上提供了极大的便利,通过与数据库中各种蛋白信息的比较,可以提高蛋白质鉴定的效率。目前,很少有人将研究的目光投入到将蛋白质组学的相关技术应用到多环芳烃降解酶系的研究中来,研究的重点依然只侧重于找到相关的降解基因和降解酶类。并且,由于中间代谢产物的多样性和出现的瞬时性,不仅增加了研究过程中对仪器设备的要求、研究资金的投入、人力资源的消耗及对整个降解过程的深入探讨的困难。

但是,蛋白质组学在研究蛋白与蛋白之间的相互作用,相关降解酶类的鉴定工作等领域中所具有的一系列优势,可以更好地帮助找到所需的相关降解酶类,也可以为进一步分析降解过程中各种功能蛋白的表达和相互间的作用,甚至多环芳烃的降解机理以及整个降解过程的探讨提供有利的依据。因此,如何使得蛋白质组学的相关技术能够介入到多环芳烃降解酶类的相关研究中来也必将成为我们今后研究降解过程、探讨降解机理这些领域时的热点之一。

得到降解基因后从基因表达方面入手获得降解酶是目前国内外使用较频繁的手段,但是,在降解基因未知或需要更好地研究降解过程时,使用差异表

达的手段似乎能更直观且有效地获得具有降解活性的酶类。并且研究各底物中酶系的表达和降解过程中各类酶出现的差异状况,也为进一步了解和探讨降解机制提供了实际依据。

在凝胶电泳中,使用丙稀酰胺梯度胶比使用线性胶有更大的优点,它可以使低分子量蛋白质形成清晰的条带,并在一块胶内分离得到分子量范围更大的蛋白(汪家政和范明, 2002)。对此,笔者新近利用丙稀酰胺梯度凝胶电泳技术来寻找差异表达,获得了较满意的效果(图 2)。

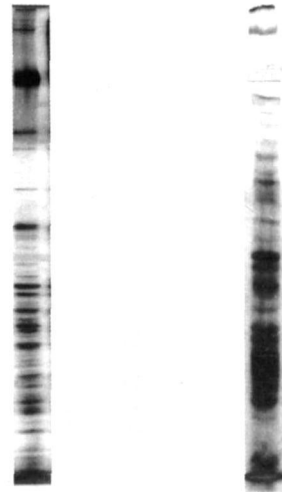


图 2 5%~15% 丙稀酰胺梯度胶与 10% 线性分离胶对分离降解菌 US6-1 菌体全蛋白时的效果比较

Fig 2 Comparison of effect on the 5%~15% acrylamide gradient gel and 10% linearity separate gel from the degrading-bacteria US6-1 complete protein

图 2 左边为分离降解菌 US6-1 菌体全蛋白时梯度为 5%~15% 的梯度胶效果,右边为降解菌 US6-1 菌体全蛋白在 10% 线性胶中的电泳效果,从图 2 可以看出,低分子量蛋白质在梯度胶中能够得到更好的分离。

很多实验室采用双向电泳的方法寻找差异表达的蛋白和酶。Khan 等(2001)用双向凝胶电泳法找到了降解菌 *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1 培养在含菲、硫芴和芘的环境中时大量表达的 6 种主要的酶,其中一种酶的 N 末端序列与报道的双加氧酶相似(图 3)。

另外,通过双向电泳技术 Wang 等(2000)和 Krivobok 等(2003)找到了 50.81 和 70 kDa 的差异蛋白,其中在 50 kDa 的蛋白被鉴定为具有双加氧酶活性。

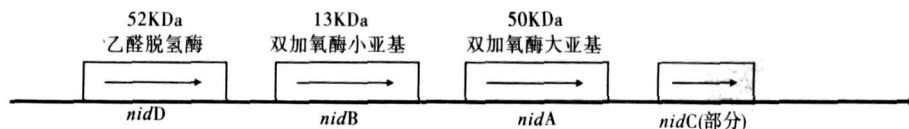


图 3 *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1 中的双加氧酶
Fig 3 Dioxygenase of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1

4.3.2 各种遗传工程、分子学手段的应用 1994 年由 Stammer (1994) 首次提出, 是指通过对目的基因酶切成随机片段, 然后进行 PCR 重聚, 由于同源重组而产生基因突变的方法。DNA 改组是 DNA 分子的体外重组, 是基因在分子水平上有性重组 (sexual recombination)。通过改变单个基因 (或基因家族 gene family) 原有核苷酸序列, 创造新基因, 并赋予表达产物以新功能 (胡光星等, 2002)。

Kumamaru 等 (1999) 改进 KF70-7 菌和 LB404 菌的 bphA1, 一些改进后的 BPDox 降解 PCBs 及联苯类化合物的能力增强, 甚至一些单环芳香族的化合物如苯、甲苯等亦能被降解, 并获得了一些能识别正、侧位 PCBs 替代物的改进的 BPDox (Buhmann & Chen 1999), 这些突变体显示了对四氯和五氯 PCBs 及商品化 PCBs 复合物的较强的降解能力 (Seeger et al., 1999)。

Furukawa 等 (2000) 通过 DNA 改组 (DNA shuffling) 等生物技术对降解途径中关键酶的底物适应范围进行改造, 进一步扩展了其降解谱, 提高了其降解能力。并且, 现在还有很多实验表明, 在双羟基化酶 α 亚基的活性中心附近, 用大的疏水氨基酸残基 (如: Phe) 取代小的疏水氨基酸残基 (如: Ala, Val, Leu) 等可以改变活性中心疏水口袋的大小和形状, 同时改变酶的作用底物范围 (Kukor & Oisen, 1996; 蔡在龙等, 1997)。

5 展望

人类在陆地上的开发已趋于饱和, 向海洋发展是今后不可避免的趋势。海洋污染尤其是海洋有机污染是当今世界沿海国家普遍关注的环境问题 (郑天凌等, 1994)。多环芳烃作为海洋环境污染之首, 对人类健康和生态环境具有很大的潜在危害 (陈双雅等, 2002)。因此, 针对目前海洋环境中多环芳烃污染治理的种种不足, 尽快的通过各种先进的技术、手段消除其可能造成的危害就显得尤为必要。

(1) 目前, 在多环芳烃的研究上, 还多偏向于陆地环境的多环芳烃降解, 对于海洋环境中的 PAHs

降解机理研究还相对不足。因而应加强对海洋环保功能微生物及其基因资源的研究与利用。

(2) 至今, 人们对于三环以下低环 PAHs 的降解途径、降解基因和降解酶类的研究相对较多, 也较为清晰, 但对于高环的 PAHs 降解研究还有待深入开展。

(3) 对于 PAHs 加氧酶的研究, 国际上对于其反应机理、光学活性物质的获得、双加氧酶结构与功能的分子生物学改造以及相关基因结构与起源等研究都已开始有所涉及。但目前国内的研究还只停留在菌株筛选、酶的分离纯化、酶的结构表征、相关基因的转导和高效表达等方面 (Garcia-Valdes et al., 1989)。真正涉及降解全过程中酶类被诱导表达的先后顺序以及各种功能蛋白的表达和相互间的作用则相对较少。

(4) 此外, 应注重相关学科的交叉与渗透和新技术、新方法的使用, 尤其是整合分子杂交技术、宏基因组学技术、蛋白质组学技术、DNA 改组、遗传工程等技术, 在多环芳烃研究领域更多、更有效的应用, 这无疑将加快该领域的研究进程。

参考文献

- 蔡在龙, 季朝能, 王学敏, 等. 1997. 编码耐热邻苯二酚 2,3-双加氧酶的 pheB 基因在大肠杆菌中的亚克隆与高表达. 第二军医大学学报, 18(2): 101-104
- 陈双雅, 郑天凌, 胡忠. 2002. 若干新技术研究海洋多环芳烃生物降解的进展. 台湾海峡, 21(4): 504-515
- 谷体华, 袁建军, 郑天凌, 等. 2005. 泉州湾表层沉积物对多环芳烃潜在降解活性的研究. 厦门大学学报 (自然科学版), 44(z1): 102-106
- 胡光星, 郭美锦, 储炬, 等. 2002. DNA 改组技术发展与应用. 中国生物工程杂志, 22(3): 9-12
- 黄栩, 骆苑蓉, 胡忠, 等. 2006. 持久性有机污染物 (POPs) 生物修复研究进展. 环境科学学报, 26(3): 353-361
- 骆苑蓉, 胡忠, 郑天凌, 等. 2005. 红树林沉积物中的微生物对苯并 [a] 芘的降解研究. 厦门大学学报 (自然科学版), 44(z1): 75-79
- 沈锡辉, 刘志培, 王保军, 等. 2004. 苯酚降解菌红球菌 PNaN5 菌株 (*Rhodococcus* sp. strain PNaN5) 的分离鉴定、降解特性及其开环双加氧酶性质研究. 环境科学学

- 报, 24(3): 482-486
- 孙娟, 郑文教, 陈文田. 2005 红树林湿地多环芳烃污染研究进展. 生态学杂志, 24(10): 1211-1214
- 孙艳, 钱世钧. 2001. 芳香族化合物生物降解的研究进展. 生物工程进展, 21(1): 42-46
- 孙昌魁, 冯静, 马桂荣, 等. 2001. 海洋微生物多样性的研究进展. 生命科学, 13(3): 97-100
- 汪家政, 范明. 2002 蛋白质技术手册 北京: 科学技术出版社: 101-103
- 张金丽, 郑天凌. 2002 多环芳烃污染环境的控制与生物修复研究进展. 福建环境, 19(2): 26-29
- 张小凡, 小柳津广志. 2002 鞘氨醇单胞菌 PY3菲降解基因的克隆及序列分析. 微生物学报, 42(6): 680-685
- 章俭, 夏春谷. 2004 芳香烃双加氧酶的结构与功能研究. 化学进展, 16(1): 116-122
- 郑天凌, 王海黎, 洪华生. 1994 微生物在碳的海洋生物地球化学循环中的作用. 生态学杂志, 13(4): 47-50
- 郑天凌, 庄铁城, 蔡立哲. 2001 微生物在海洋污染环境中的生物修复作用. 厦门大学学报, 40(2): 524-534
- 周德平, 闵航, 夏颖, 等. 2004 少动鞘氨醇单胞菌 ZX4儿茶酚2,3-双加氧酶基因的克隆与序列分析. 农业生物技术学报, 12(2): 192-196
- Axcell BC, Geary PJ. 1975. Purification and some properties of a soluble benzene-oxidizing system from a strain of *Pseudomonas*. *Biochemical Chemistry Society Perkins Transactions*, 1(3): 2506-2511.
- Bagneris C, Cammack R, Mason JR. 2005. Subtle difference between benzene and toluene dioxygenases of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3): 1570-1580
- Balkin BR, Nakatsu CH, Nies L, et al. 2003. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6): 3350-3358
- Buhmann F, Chen W. 1999. Tuning biphenyl dioxygenase for extended substrate specificity. *Biotechnology and Bioengineering*, 63: 544-551.
- Butler CS, Mason JR. 1997. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Advances in Microbial Physiology*, 38: 47-84
- Cutcher SE, Geary PJ. 1979. Properties of the iron-sulphur proteins of the benzene dioxygenase system from *Pseudomonas putida*. *Biochemical Journal*, 177: 393-400
- Fleming JJ, Yao WH, Saylor GS. 1998. Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: Application to pure culture and soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3698-3706
- Funakawa K. 2000. Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3): 244-249.
- García-Valles E, Cozar E, Lahcat J, et al. 1989. Molecular cloning of aromatic degradative genes from *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS Microbiology Letters*, 61: 301-306
- Gennaro PD, Rescalli E, Galli E. 2001. Characterization of *Rhodococcus opaus* R7, a strain able to degrade naphthalene and α -xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil. *Research in Microbiology*, 152(9): 641-651.
- Gillespie DE, Brady SF, Bettemann AD, et al. 2002. Isolation of antibiotics Turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 4301-4306
- Hamann C, Hegemann J, Hildebrandt A. 1999. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *FEMS Microbiology Letters*, 173: 255-263
- Handelman J, Rondon MR, Brady SF, et al. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes. A new frontier for natural products. *Chemistry Biology*, 5: 245-249.
- Harayana S, KokM, Neidle EL. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology*, 46: 565-601
- Henrick JB, Madsen EL, Batt CA, et al. 1993. Polymerase chain reaction amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 687-694
- Hugo N, Amengaud J, Gaillard J, et al. 1998. A novel [2Fe-2S] ferredoxin from *Pseudomonas putida* m2 promotes the reductive reactivation of catechol 2,3-dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 9622-9629.
- JiangHY, Parales RE, Lynch NA, et al. 1996. Site-directed mutagenesis of conserved amino acids in the α subunit of toluene dioxygenase. Potential mononuclear non-heme iron coordination sites. *Journal of Bacteriology*, 178: 3133-3139
- Juhász AL, Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45: 57-88
- Kauppi B, Kyoung L, Carredano E, et al. 1998. Structure of an aromatic ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure*, 6: 571-586
- Khan AA, Wang RF, Cao WW, et al. 2001. Molecular cloning nucleotide sequence and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8): 3577-3585
- Krivobok S, Kuony S, Meyer C, et al. 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: Evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 185(13): 3828-3841.
- Kukor JJ, Oisen RH. 1996. Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1728-1740
- Kumaranu T, Suenaga H, Mitsuoka M, et al. 1998. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolu-

- tion of biplanar dioxygenase. *Nature Biotechnology*, **16**: 663–666.
- Mahajan MC, Phale PS, Vaidyanathan CS. 1994. Evidence for the involvement of multiple pathways in the biodegradation of 1- and 2-methylnaphthalene by *Pseudomonas putida* CSV86. *Archives of Microbiology*, **161**(5): 425–433.
- Meyer S, Moser R, Neef A, et al. 1999. Differential detection of key enzymes of polyaromatic hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology*, **145**: 1731–1741.
- Moser R, Stahl U. 2001. Insights into the genetic diversity of initial dioxygenases from PAH-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 609–618.
- Okuta A, Ohnishi K, Yagane S, et al. 2003. Intersubunit interaction and catalytic activity of catechol 2, 3-dioxygenases. *Biochemical Journal*, **371**: 557–564.
- Patrick L, Klaus L, Frank N, et al. 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**: 572–577.
- Prabhu Y, Phale PS. 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**(4): 342–351.
- Rondon MR, August PR, Bettemann AD, et al. 2000. Cloning the metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 2541–2547.
- Rossello-Mora RA, Lalucat J, Garcia-Valdes E. 1994. Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 966–972.
- Atsushi S, Tokuro I, Shigeaki H. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7. *Journal of Bacteriology*, **182**(8): 2134–2141.
- Sanakis Y, Mamma D, Christakopoulos P, et al. 2003. Catechol 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* in organic media: An electron paramagnetic resonance study. *International Journal of Biological Macromolecules*, **33**: 101–106.
- Schmidt T, Debing E, Pace N. 1991. Analysis of a marine plankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology*, **173**: 4371–4378.
- Seeger M, Zielinski M, Timmis KN, et al. 1999. Regio-specificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the bph-encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 3614–3621.
- Senda T, Sugiyama K, Narita H, et al. 1996. Three-dimensional structures of free form and two substrate complexes of an extradiol ring-cleavage type dioxygenase, the BphC enzyme from *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *Molecular Biology*, **255**: 735–752.
- Stemmer WPC. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, **370**: 389–391.
- Wang RF, Wennerstrom D, Cao WW, et al. 2000. Cloning, expression, and characterization of the katG gene, encoding catalase-peroxidase, from the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 4300–4304.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. 1995. Progress with gene-product mapping of the mollusc *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, **16**(7): 1090–1094.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. 1996. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *BioTechnology & Genetic Engineering Reviews*, **13**: 19–30.
- Witt G. 2002. Occurrence and transport of polycyclic aromatic hydrocarbons in the water bodies of the Baltic Sea. *Marine Chemistry*, **79**: 49–66.
- Yeates C, Holmes AJ, Gillings MR. 2000. Novel forms of ring-hydroxylating dioxygenases are widespread in pristine and contaminated soils. *Environmental Microbiology*, **2**(6): 644–653.
- Yeh WK, Gibson DT, Liu TN. 1977. Toluene dioxygenase: An ultracomponent enzyme system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **78**: 401–410.

作者简介 曹晓星,女,1980年7月生,硕士研究生。主要从事环境微生物学研究。E-mail: xiaoxing@ust.hk
责任编辑 王伟
