

脱硫菌 *Rhodococcus* sp. LY822 专一性脱硫活性及相关基因的研究

白雪晶¹, 熊小超², 姜声华¹, 刘会洲², 李信¹

(1. 中国农业科学院研究生院生物化学与分子生物学实验室, 北京 100081;

2. 中国科学院过程工程研究所绿色过程与工程重点实验室, 北京 100080)

摘要:以专一性脱硫菌 *Rhodococcus* sp. LY822 质粒 DNA 为模板, 利用已知的脱硫基因序列设计引物, PCR 扩增得到了 3 个脱硫基因片段 *dszA*, *dszB* 和 *dszC*. 构建了相应的表达质粒 pETA, pETB 和 pETC, 在转化大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达, 得到了 *dszA*, *dszB* 和 *dszC* 基因的融合表达产物. SDS-PAGE 分析结果显示, 蛋白带分子量分别为 50, 40 和 45 kDa. 3 种重组菌 BL21(DE3)(pETA), BL21(DE3)(pETB) 和 BL21(DE3)(pETC) 的无细胞粗提液(2 mL) 的活性检测结果表明, DszC 酶的粗提液反应 30 min 能够将 0.02 mmol/L 二苯并噻吩完全转化为二苯并噻吩砒, DszA 酶的粗提液能够将 0.01 mmol/L 二苯并噻吩砒完全转化为羟基联苯亚磺酸盐, DszA 和 DszB 酶的粗提液联合作用能够将 0.01 mmol/L 二苯并噻吩砒完全转化为 2-羟基联苯, 证明 LY822 对二苯并噻吩的降解符合专一性脱硫的“4S 途径”.

关键词: 二苯并噻吩; 生物脱硫; 脱硫基因; 红球菌

中图分类号: TQ033

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2008)01-0125-05

1 前言

石油中的含硫化合物燃烧后产生的二氧化硫造成环境污染, 降低石油产品的含硫量是目前国内外研究的热点. 生物脱硫技术选择性高, 反应条件温和, 并且能够有效脱除 DBT(Dibenzothiophene, 二苯并噻吩)及其衍生物中的硫, 是目前石油产品加工传统加氢脱硫技术的补充. 1990 年, 美国学者 Kilbane 等^[1]从土壤中分离得到一株专一性脱硫菌 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, 它能以 DBT 为唯一硫源生长, 主要依靠 DszC, DszB 和 DszA 三种酶经 4 步脱硫反应(4S 途径)将 DBT 中的硫脱除. DszC 参加 2 步连续的单加氧反应, 将 DBT 转化为 DBTO (Dibenzothiophene Sulfoxide, 二苯并噻吩亚砒), 再转化为 DBTO₂(Dibenzothiophene Sulfone, 二苯并噻吩砒); DszA 参与将 DBTO₂ 转化为 HBPS [2-(2'-Hydroxyphenyl) Benzenesulfinate, 羟基联苯亚磺酸盐]的单加氧反应; DszB 催化 HBPS 生成终产物 2-HBP (2-Hydroxybiphenyl, 2-羟基联苯), 脱除的硫以亚硫酸盐的形式进入水相.

自 1993 年起, 国内外开展了脱硫基因克隆表达的研究^[2-4]. Denome 等^[5]首先克隆了“4S 途径”脱硫相关基因, 并命名脱硫基因为 *soxABC*; Piddington 等^[6]再次验证了脱硫基因序列并将其命名为 *dszABC*; Kazuaki 等^[7]将脱硫基因 *dszABC* 在大肠杆菌中高效表达; 马挺等^[8]研究了 *dszC* 在大肠杆菌中的克隆表达; 熊小超等^[9]将含有完整脱硫基因操纵子的重组质粒转入野生型红平

红球菌 LSSE8-1 中, 提高了野生型菌的脱硫活性. 脱硫基因异源表达的相关研究^[6,10]表明, 利用合适的大肠杆菌表达载体, *Dsz* 基因在大肠杆菌中可获得比在原始菌中更高的表达量, 且表达产物活性稳定, 并可以消除硫代谢过程中硫酸盐的反馈阻遏作用. 本实验室 2004 年从山东胜利油田的土壤样品中分离得到一株专一性脱硫菌 *Rhodococcus* sp. LY822^[11], 为进一步研究脱硫微生物的脱硫机制及构建高效的脱硫基因工程菌, 本工作以 *Rhodococcus* sp. LY822 为出发菌株, 分别克隆了 *dszA*, *dszB* 和 *dszC* 基因, 构建了相应的表达质粒 pETA, pETB 和 pETC, 在转化大肠杆菌 BL21(DE3) 中得到了高效表达, 并分别对重组菌的无细胞粗提液进行了酶活性检测.

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株与质粒

Rhodococcus sp. LY822 为本实验室从山东胜利油田土壤样品中分离获得^[11], 原核表达载体 pET-21a 与 pET-28a 购自 Novagen 公司.

2.1.2 培养基

BSM 培养基(g/L): KH₂PO₄ 2.44, Na₂HPO₄·12H₂O 14.03, MgCl₂·6H₂O 0.36, CaCl₂·2H₂O 0.001, FeCl₃·6H₂O 0.001, MnCl₂·4H₂O 0.004, 甘油 8, NH₄Cl 2, DBT 0.02.

LB 培养基(g/L): Tryptone 10, Yeast extract 5, NaCl 5, pH 7.0.

2.1.3 抗生素

氨基青霉素 100 mg/L, 卡那霉素 30 mg/L.

2.1.4 试剂

PCR (Polymerase Chain Reaction, 多聚酶链式反应) 引物由上海生工生物技术有限公司合成; dNTP 及 Taq 酶、PCR 产物回收试剂盒等购自北京鼎国生物公司; 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、X-Gal 及 IPTG 均购自 Takara 公司; DBT 和 DBTO₂ 均产自美国 Acros Organics 公司; 2-HBP 产自日本 TCI 公司. 实验中正己烷和甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯.

2.2 红球菌 LY822 质粒 DNA 的提取

将红球菌 LY822 单菌落接种于 BSM 液体培养基中, 质粒 DNA 的提取参照文献[12].

2.3 脱硫基因的克隆和序列测定

根据已报道的 IGTS8 的脱硫操纵子的序列 (GenBank Accession No.L37363)设计引物, 同时在引物的上下游分别引入了 *EcoRI* 和 *HindIII* 的酶切位点(见下面的下划线位置). *dszA* 基因的上游引物为 5'-CGCAGAATTCATGACTCAACAACGA-3', 其下游引物为 5'-GGGTTCGACGCGGCAAGCTTTGAAGG-3'; *dszB* 基因的上游引物为 5'-AGGACAGAATTCATGACAAGCCGCG-3', 其下游引物为 5'-CATGCGGATGAAGCTTTCGGTGGCG-3'; *dszC* 基因的上游引物为 5'-CGATAGGAACGAATTCATGACTG-3', 其下游引物为 5'-ATCAGCGCCTCAAAGCTTCAG-3'. PCR 反应体系包括 10xPCR 缓冲液 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ L, DNA 模板 0.1~2 ng, Taq 酶(2 U) 0.5 μ L, 加入 2%的二甲基亚砷, 用超纯水补至 50 μ L. 以 LY822 的大质粒作为 PCR 的模板, 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 次循环, 72 $^{\circ}$ C 补充延伸 10 min. PCR 产物纯化后用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII* 消化, 并用这 2 种酶消化质粒载体 pET-21a 和 pET-28a 分别回收酶切后的脱硫基因和载体片段. *dszA* 酶切后的 PCR 产物与同样酶切过的载体 pET-21a 连接, *dszB* 和 *dszC* 酶切后的 PCR 产物与酶切过的载体 pET-28a 连接, 构建重组表达质粒. 将上述 3 种连接产物分别转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取转化子培养, 鉴定出阳性克隆, 得到重组表达质粒 pETA, pETB 和 pETC, 重组菌菌液送上海生工生物公司测序.

2.4 脱硫基因的诱导表达

将重组表达质粒 pETA, pETB 和 pETC 分别转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 筛选转化子 BL21(DE3, pET-*dsz*), 转化子单菌落在含有抗生素的 LB 液体培养

基中过夜培养, 再以 1%的接种量接种于摇瓶中, 37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.6, 加入 IPTG (Isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside, 异丙基- β -d-硫代半乳糖苷)至终浓度 0.4 mmol/L, 20 $^{\circ}$ C 下 150 r/min 继续培养, 诱导表达 3~5 h 后取样, 用 SDS-PAGE 检测蛋白产物.

2.5 重组大肠杆菌无细胞粗提液脱硫代谢活性的测定

无细胞粗提液的制备: 所有操作均在 15 $^{\circ}$ C 以下进行. 10000 r/min 离心 15 min, 收集经诱导表达的大肠杆菌细胞, 用 0.85%的 NaCl 洗涤菌体 1 次. 将 10 g(干重)细胞悬浮于 20 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中, 超声波振荡破碎细胞(20 kHz), 12000 r/min 离心 30 min 去除破碎后的残余物. 上清液即为含有脱硫基因表达产物的无细胞提取液.

酶活性测定方法: 取 2 mL 含有脱硫酶的无细胞提取液, 加入 40 μ L 1 mmol/L DBT 或 20 μ L 1 mmol/L DBTO₂, 反应在 30 $^{\circ}$ C 进行, 30 min 后加入 50 μ L 1 mol/L 盐酸终止反应. 取 1 mL 反应液, 用等量的正己烷萃取, 4000 r/min 离心 10 min, 取正己烷层采用 Agilent 1100 系列高压液相色谱仪(Agilent Technologies Ltd., USA)分析其中的 DBT, DBTO₂ 和 2-HBP. 分析条件为二极管阵列检测器(检测波长设为 254 和 280 nm), ZORBAX SB-C18 色谱柱, 控制柱温为 35 $^{\circ}$ C; 流动相为甲醇/水(9/1, ϕ), 流速 1 mL/min. 自动进样器进样 5.0 μ L. DBT 和 2-HBP 均采用外标法定量.

3 结果与讨论

3.1 出发菌株 *Rhodococcus* sp. LY822 专一性脱硫检测

将 *Rhodococcus* sp. LY822 接种于 BSM 培养基(0.2 mmol/L DBT 为硫源)中, 取不同时期的培养物用于 HPLC 分析检测代谢产物. 该菌的脱硫代谢曲线(图1)显示, 0.2

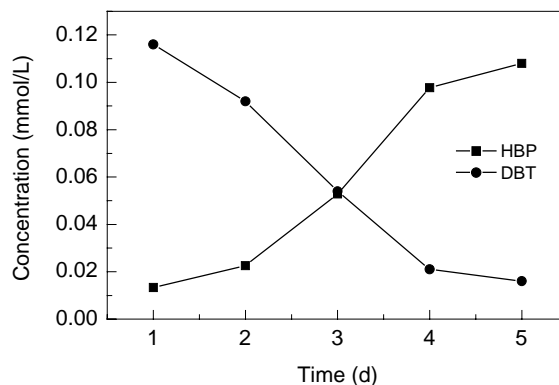


图1 红球菌 LY822 脱硫代谢曲线

Fig.1 Time curves of DBT desulfurization by growing cells of *Rhodococcus* sp. LY822

mmol/L 的 DBT 全部转化为 2-HBP, 没有发现中间产物的积累. 据报道^[4], *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 的“4S 途径”中主要依靠 DszA, DszB 和 DszC 催化脱硫反应, 代谢产物的积累情况与这 3 种酶的活性有关, 如果 DszA 和 DszB 的活性很高, 中间产物 DBTO₂ 一经生成即被氧化成 HBPS, 再很快被氧化为 2-HBP, 则培养基中检测不到中间产物. 因此, 上述实验结果提示该菌可能为具有断裂 DBT 的 C—S 键的“4S 途径”的专一性脱硫菌.

3.2 脱硫基因的克隆和序列分析

用 PCR 方法获得了红球菌 LY822 的 3 个脱硫基因片段 *dszA*, *dszB* 和 *dszC*, 构建了重组表达质粒 pETA, pETB 和 pETC. 经限制性内切酶酶切鉴定, 电泳结果表明 LY822 的 3 个脱硫结构基因的大小分别为 1.3, 1.0 和 1.2 kb, 与已报道的 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 的脱硫基因大小相符(图 2).

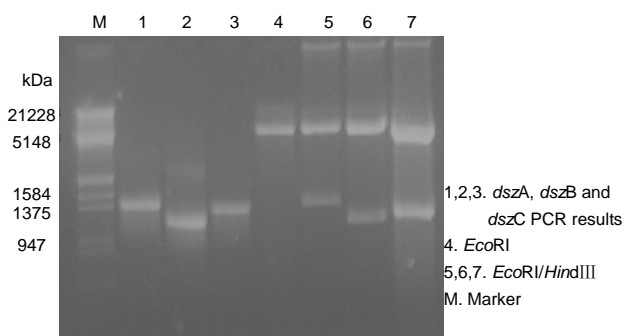


图 2 重组质粒 pETA, pETB 和 pETC 的酶切鉴定
Fig.2 Verification of recombinant plasmids pETA, pETB and pETC by digestion of restriction enzymes

测序结果显示, 红球菌 LY822 脱硫基因与 IGTS8 的相关基因的相似性很高, *dszA*, *dszB* 和 *dszC* 的相似性分别为 99.9%, 100%和 99.5%. 上述实验结果证实了红球菌的脱硫相关基因的高度保守性. 红球菌 LY822 脱硫相关基因 *dszA*, *dszB* 和 *dszC* 的序列信息已提交 Genbank 数据库, 在 DDBJ/EMBL/GenBank 中核酸序列数据库登录号分别为 EF570781, EF570782 和 EF570783.

3.3 脱硫基因的诱导表达

SDS-PAGE 图谱(图 3)显示, 经 IPTG 诱导表达, 在 55, 45 和 50 kDa 处有新增的蛋白带, 大小与已报道的 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 脱硫基因表达产物一致, 并且随着诱导时间的延长, 条带的亮度也明显增强, 初步推断为 *dszA*, *dszB* 和 *dszC* 基因在 pET-21a 和 pET-28a 上融合表达的产物.

3.4 重组大肠杆菌无细胞粗提液脱硫代谢活性的测定

利用重组大肠杆菌 BL21(DE3)(pETC)无细胞粗提

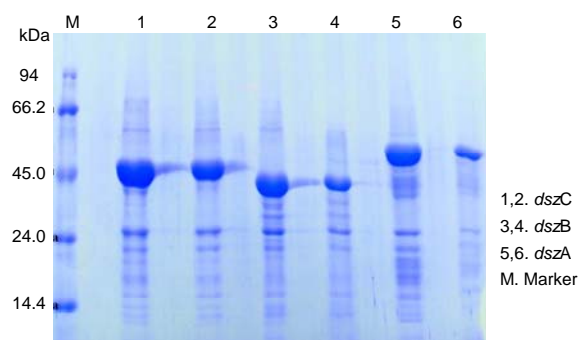


图 3 IPTG 诱导表达 *dszA*, *dszB* 和 *dszC* 基因的结果
Fig.3 Result of expression of *dszA*, *dszB* and *dszC* by induction of IPTG

液进行 DBT 脱硫反应 30 min, 底物与产物的 HPLC 分析结果如图 4(a)所示. 在红球菌中 DBT 选择性氧化生成 DBTO₂ 的反应由 DszC 酶催化, 也需要氧化还原酶 DszD 和辅酶因子 FMN 和 NADH 的参与^[14,15]. 其中 DszD 不是脱硫专一性的酶, 在大肠杆菌中也存在类似功能的酶, FMN 和 NADH 等也存在于大肠杆菌细胞中. 经过 30 min 的酶反应, 0.02 mmol/L DBT 完全转化为 DBTO₂, 证明 DszC 酶在重组大肠杆菌 BL21(DE3)(pETC)中得到表达并产生了稳定的活性.

DszA 酶催化 DBTO₂ 氧化生成羟基联苯亚磺酸盐, 同样需要 DszD 酶、FMN 和 NADH₂ 的参与. 重组 pETA 的大肠杆菌无细胞粗提液催化 DBTO₂ 反应的分析结果如图 4(b)所示. 经过 30 min 的反应, DszA 酶的粗提液已将 0.01 mmol/L DBTO₂ 完全转化, DBTO₂ 峰基本消失, 但是并没有其他产物峰出现, 这可能是由于生成的产物 HBPS 存在于水相中.

为了进一步研究 DszA 和 DszB 酶的催化特性, 将重组大肠杆菌 BL21(DE3)(pETA)与 BL21(DE3)(pETB)的无细胞粗提液混合用于 DBTO₂ 的脱硫反应, 结果如图 4(c)所示. 经过 2 种酶的联合作用, 0.01 mmol/L DBTO₂ 完全转化为 2-HBP, 证明 DBTO₂ 首先由 DszA 催化生成 HBPS, HBPS 再在 DszB 的作用下生成 2-HBP.

重组大肠杆菌 BL21(DE3)(pETA), BL21(DE3)(pETB)与 BL21(DE3)(pETC)的脱硫代谢过程的相关研究表明, *Rhodococcus* sp. LY822 的脱硫相关基因 *dszA*, *dszB* 和 *dszC* 在大肠杆菌 BL21(DE3)中得到表达, 且基因表达产物均具有稳定的生物活性; 3 种重组大肠杆菌脱硫反应的代谢产物与已报道的 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 的脱硫代谢中间产物一致, 进一步证明了出发菌株 *Rhodococcus* sp. LY822 对模型化合物 DBT 的降解符合专一性脱硫的“4S 途径”.

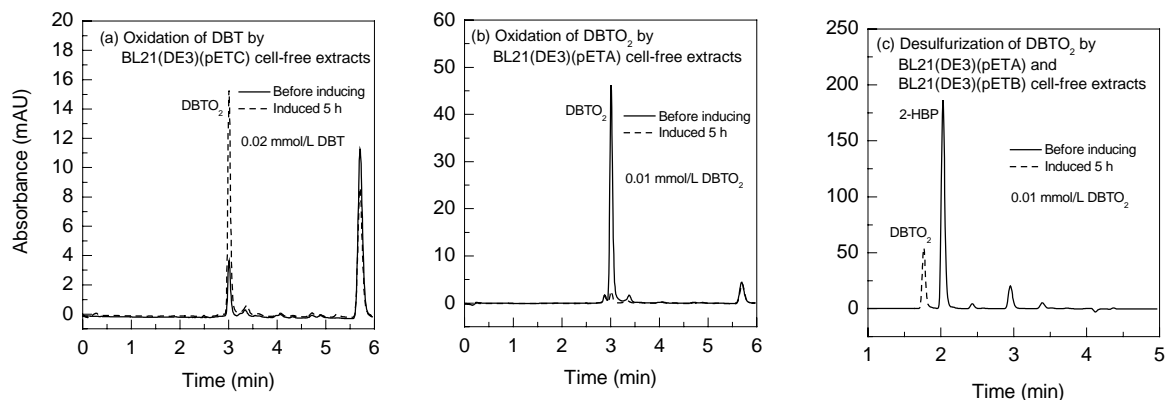


图 4 重组大肠杆菌无细胞粗提液脱硫活性的高效液相色谱分析
Fig.4 HPLC analysis results of desulfurization activity by recombinant *E. coli* strain cell-free extracts

4 结论

(1) *Rhodococcus* sp. LY822 能够将 0.2 mmol/L 的 DBT 完全转化为 2-HBP, 从而脱除 DBT 中的硫, 反应中没有中间产物 DBTO₂ 的积累。

(2) 克隆了专一性脱硫菌 *Rhodococcus* sp. LY822 的脱硫基因 *dszA*, *dszB* 和 *dszC*, 与 IGTS8 的相关基因的相似性分别为 99.9%, 100% 和 99.5%, 证实了红球菌的脱硫相关基因的高度保守性。

(3) 脱硫基因 *dszA*, *dszB* 和 *dszC* 在大肠杆菌中表达的重组蛋白分子量分别为 55, 45 和 50 kDa。

(4) 重组大肠杆菌 BL21(DE3)(pETA), BL21(DE3)(pETB) 与 BL21(DE3)(pETC) 的无细胞粗提液脱硫反应的代谢产物与已报道的“4S 途径”中的相应代谢产物一致, 证明红球菌 LY822 对模型化合物 DBT 的降解符合专一性脱硫的“4S 途径”。

参考文献:

- [1] Kilbane J J, Bielaga B A. Toward Sulfur-free Fuels [J]. *Chem. Tech.*, 1990, 12: 747-751.
- [2] Denome S A, Olson E S, Young K D. Identification and Cloning of Genes Involved in Specific Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8 [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59(9): 2837-2843.
- [3] Li F L, Xu P, Ma C Q, et al. Deep Desulfurization of Hydrodesulfurization-treated Diesel Oil by a Facultative Thermophilic Bacterium *Mycobacterium* sp. X7B [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, 223: 301-307.
- [4] 缙仲轩, 刘会州, 罗明芳, 等. 专一性脱硫菌的分离与鉴定 [J]. *中国科学(B 辑)*, 2002, 32(5): 398-405.
- [5] Denome S A, Oldfield C, Nash L J, et al. Characterization of the Desulfurization Genes from *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8 [J]. *J. Bacteriol.*, 1994, 176(21): 6707-6716.
- [6] Piddington C S, Kovavevich B R, Rambosk J, et al. Sequence and Molecular Characterization of a DNA Region Encoding the Dibenzothiophene Desulfurization Operon of *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8 [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61(2): 468-475.
- [7] Kazuaki H, Yoshitaka I, Morio K, et al. Improvement of Desulfurization Activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by Genetic Engineering [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, 65(2): 239-246.
- [8] 马挺, 王仁静, 李京浩. 二苯并噻吩单加氧酶基因(*dszC*)的克隆及其在大肠杆菌中的表达 [J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2005, 38(6): 1-6.
- [9] 熊小超, 缙仲轩, 李信, 等. 脱硫基因工程菌的构建及应用方法 [P]. 中国专利: 200510112988.1, 2005-10-18.
- [10] Gallardo M E. Designing Recombinant *Pseudomonas* Strains to Enhance Biodesulfurization [J]. *J. Bacteriol.*, 1997, 179(22): 7156-7160.
- [11] 姜声华. 专一性脱硫菌 LY822 的分离筛选及脱硫基因工程菌的构建 [D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2006. 12-18.
- [12] Claude D, Diane L, Helene B, et al. Conservation of Plasmid-encoded Dibenzothiophene Desulfurization Genes in Several *Rhodococci* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 7(63): 2915-2919.
- [13] Gray K A, Pogrebinsky O S, Mrachko G T, et al. Molecular Mechanisms of Biocatalytic Desulfurization of Fossil Fuels [J]. *Nat. Biotechnol.*, 1996, 14: 1705-1709.
- [14] Matsubara T, Ohshiro T, Nishina Y, et al. Purification, Characterization, and Overexpression of Flavin Reductase Involved in Dibenzothiophene Desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1 [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 1179-1184.

Study on Specific Desulfurization Activity and Related Genes of *Rhodococcus* sp. LY822

BAI Xue-jing¹, XIONG Xiao-chao², JIANG Sheng-hua¹, LIU Hui-zhou², LI Xin¹

(1. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Key Lab. Green Process Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Desulfurization related genes of a dibenzothiophene desulfurizing bacterium *Rhodococcus* sp. LY822 were separately amplified via polymerase chain reaction with specific primers based on the related sequences of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, and *dszA*, *dszB* and *dszC* were cloned. Three expression plasmids, pETA, pETB and pETC, were constructed and transformed into *E. coli* BL21 strain. After the isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside induction with them, *dszA*, *dszB* and *dszC* were expressed effectively in the recombinant *E. coli* BL21 strain. The SDS-PAGE results indicated that the molecular weights of desulfurization related genes expression products were about 50, 40 and 45 kDa. Desulfurization activity analysis showed that BL21(DE3)(pETC) cell-free extracts could convert 0.02 mmol/L DBT into DBTO₂. BL21(DE3)(pETA) cell-free extracts could convert 0.01 mmol/L DBTO₂ into HBPS. BL21(DE3)(pETA) and BL21(DE3)(pETB) cell-free extracts could convert 0.01 mmol/L DBTO₂ into 2-HBP. It could be concluded that *Rhodococcus* sp. LY822 could specially break the C—S bond of dibenzothiophene and convert dibenzothiophene into 2-hydrobenzophene by “4S” biodesulfurization pathway.

Key words: dibenzothiophene; biodesulfurization; *dszA*; *dszB*; *dszC*; *Rhodococcus*