

红平红球菌 LSSE8-1 脱硫代谢 及其相关脱硫基因的比较

缙仲轩 罗明芳 李 信 邢建民 刘会洲*

(中国科学院过程工程研究所分离科学与工程实验室, 生化工程国家重点实验室, 北京 100080.)

*联系人: E-mail: hzliu@home.ipe.ac.cn)

摘要 红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*) LSSE8-1 是从我国贵州赤水气田中筛选分离的一株专一性脱硫菌. 该菌能选择性地氧化二苯并噻吩(DBT)生成 2-羟基联苯(HBP). 利用 DBTO₂(dibenzothiophene 5,5-dioxide)作底物既生成 HBP 又生成 DBT, 表明从 DBT 到 DBTO₂ 这一步反应在细胞水平是可逆的. 同时以 DBT 为对照, 0.01~0.4 mmol/L DBTO₂ 均对细胞的生长表现出毒害作用, 这就解释了脱硫反应中 DBTO₂ 不积累的问题. 在溶菌酶处理的基础上, 用碱液裂解法提取 LSSE8-1 质粒作模板, 选择 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 脱硫基因的保守区设计引物, 用 PCR 的方法扩增分别得到 1.3, 1.0 和 1.2 kb 三段脱硫基因片段. 选用 pGEM-T easy 载体, *E. coli* DH5 α 为受体菌, 克隆这三段基因后, 测序结果表明这三段脱硫基因高度保守. 与 IGTS8 的相关脱硫基因相比较, *dszA* 和 *dszB* 的同源性都是 100%, *dszC* 的同源性是 99%.

关键词 二苯并噻吩 四硫途径 中间产物 基因序列 脱硫 红平红球菌

由于石油燃料的广泛应用, 每年都有大量的有毒性的 SO₂ 气体排放到空气中, 这就导致了空气的污染和酸雨. 现在人们已普遍认识到这一问题的严重性, 而解决问题的最好方法是进行石油产品的脱硫. 目前常用的脱硫方法是加氢脱硫法, 但是该方法只能脱除一些结构简单的硫化物, 石油产品中存在的大量的有机硫化物不能被有效脱除. 这类硫化物的代表就是二苯并噻吩(DBT), 而该化合物也成为生物脱硫研究中杂环硫化物的模型. 生物脱硫手段在处理 DBT 及其衍生物方面表现出令人满意的效果, 因此该技术很可能与加氢脱硫结合起来生产超低硫成品油. 1988 年美国气体研究所(IGT)发现了选择性进攻 C-S 键“四硫途径”脱硫菌, 这是生物脱硫研究中的一个大的突破. 因为这种方法能最大限度地保存石油的燃烧值. 1993 年通过构建基因文库, Sylvia 等人^[1]发现脱硫基因集中在一段 4.0 kb 的 DNA 片段上, 1995 年 Christopher 等人^[2]测定了 IGTS8 的整个脱硫操纵子序列, 命名其中的 3 个基因片段分别为 *dszA*, *dszB* 和 *dszC*. 随后, 对 IGTS8 脱硫基因的启动子及其调控区有了比较清楚的认识^[3]. 在以后的研究中, 通过基因重组和 DNA shuffling 方法强化脱硫效果, 进行脱硫基因的高效改良均取得进展^[4,5]. 2001 年美国 EBC 公司日处理量为 5000 桶的柴油生物脱硫厂中

试成功, 证明了生物脱硫方法的可行性.

我国的生物脱硫研究起步相对较晚, 其研究工作还在起步阶段, 但在脱硫微生物的菌种筛选和野生型菌株的脱硫研究方面也取得了明显进展^[6~8]. 红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*) LSSE8-1 是从我国赤水气田中新分离的一株专一性脱硫菌. 与国外的 IGTS8 相同的是它能选择性地脱除 DBT 中的硫, 而使其以 HBP 的形式留在石油中, 最大限度地保存了石油的燃烧值. 而与 IGTS8 不同的是用 LSSE8-1 脱硫时没有中间产物 DBTO₂ 的积累. 为此, 本文用 DBTO₂ 做底物研究了 DBTO₂ 对细胞生长的影响, 同时克隆了该菌脱硫基因并与 IGTS8 的序列进行了比较.

1 材料与方 法

(i) 菌种与质粒. 红平红球菌 LSSE8-1 系从中国贵州省赤水气田中分离得到, 现保存于中国普通微生物菌种保藏中心, 保藏号 CGMCC No. 0643. pGEM-T easy 质粒载体购于美国 Promega 公司.

(ii) 试剂. 限制性内切酶 *EcoR* I, IPTG, X-Gal, 和 Taq DNA 聚合酶等, 均购于华美生物公司. DNA 片段回收纯化试剂盒购于北京鼎国生物技术公司. 连接酶购于美国 Promega 公司. 引物由上海生工生

物工程技术服务公司合成;二苯并噻吩(DBT), DBTO₂纯度为99%。以上试剂均从Sigma公司购进;二羟基联苯(2-HBP)从日本的TCI公司购进。实验中的正己烷和甲醇为光谱纯,其余试剂均为分析纯。

(iii) 红平红球菌 LSSE8-1 脱硫代谢产物的研究。用 BSM 培养基培养菌体,成分是每升培养基中含有 2.44 g KH₂PO₄, 14.03g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.3589 g MgCl₂ · 6H₂O, 0.001 g CaCl₂ · 2H₂O, 0.001 g FeCl₃ · 6H₂O, 0.004 g MnCl₂ · 4H₂O, 8 g 甘油, 2.00 g NH₄Cl, 用 0.1 mmol/L DBT 做硫源。30℃, 250 r/min 培养 3~5 d 后,取 2 mL 培养基,用 1 mol/L HCl 酸化至 pH 2.0,然后用正己烷在振荡器上萃取 2 min。用 HPLC (Agilent 1100, DAD 检测器) 研究代谢产物。分离柱是 Zorbax SB-C18 (4.6 mm × 25 cm); 流动相由 90% 甲醇和 10% 水构成,流速是 1 mL/min。

(iv) 不同浓度 DBTO₂ 对细胞生长的影响。BSM 培养基同上,用不同浓度的 DBTO₂ 取代 DBT 作硫源来研究 DBTO₂ 对细胞生长的影响。接种量为 4%, 30℃ 200 r/min 培养。每次取 1 mL 样品来测定底物及产物的浓度,取 1~3 mL 来测定培养液的光密度变化。光密度的测定用 Lambda Bio40 紫外可见分光光度计测定,波长选 600 nm; 其代谢产物用 HPLC 测定,方法同上。

(v) LSSE8-1 菌质粒的提取。红平红球菌 LSSE8-1 的质粒,用 Claude 所推荐的方法进行^[9]。具体方法如下:在 10 mL 的 LB 培养液中培养菌体使光密度(A₆₀₀)至 1,离心,收集菌体。用溶液 I (Tris-HCl [pH 8.0]-10 mmol/L EDTA, 内含 10 mg/mL 的溶菌酶)重悬沉淀,然后在 37℃保温半小时以上。将以上的重悬液分装,每个离心管装 100 μL。每管中加入新鲜配制的 200 μL 0.2 mol/L NaOH-4% SDS 溶液,冰浴 10 min。然后加入 150 μL 5 mmol/L pH 5 的乙酸钾溶液,再冰浴 10 min。12000 r/min 离心 5 min,将 400 μL 的上清液移至两个干净的小离心管中。加 400 μL Tris-饱和酚抽提,再用氯仿抽提,将水相移至干净的 1.5 mL 离心管中。加入等体积的异丙醇,室温下放置约 30 min。用 80% 的乙醇洗涤 DNA 后,真空干燥。然后用 25 μL Tris-EDTA 缓冲液(pH 7.5)重悬 DNA。

(vi) PCR 扩增脱硫基因片段。按照 IGTS8 的脱硫基因来设计引物。*dszA* 基因片段的上游引物是 5'-

ATGACTCAACAACGACAA,下游引物是 5'-TCA-TGAAGGTTGTCCTTGC。*dszB* 的上游引物是 5'-AT-GACAAGC CGCGTCGAC,下游引物是 5'-CTATCG-GTGGCGATTGAG, *dszC* 的上游引物是 5'-ATGACA-CTGTACCTGAA,下游引物是 5'-TCAGGAGGTG AAGCCGGG。PCR 反应在 TECHNE PCR 仪上进行。反应体系为 10 μL 10 × 反应缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl [pH 8.3], 10 mmol/L KCl), 6 μL 25 mmol/L MgCl₂, 1 μL 上游引物, 1 μL 下游引物, 1 μL Taq DNA 聚合酶, 1 μL 10mmol/L dNTP 溶液, 1 μL 质粒溶液作模板, 79 μL 重蒸水,反应体系的总体积是 100 μL。反应程序设定 94℃预变性 8 min, 然后进行 30 个循环的反应。循环中先 94℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min。30 个循环结束后再 72℃补充延伸 10 min。用不加入质粒的体系进行阴性对照。反应结束后取 10 μL PCR 产物在 0.8%(质量/体积)琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

(vii) 基因片段的克隆。上述的 PCR 产物全部进行电泳纯化,然后用 DNA 回收纯化试剂盒进行回收。回收的 DNA 取 1 μL,稀释至 10 μL 进行电泳分析,估算出其中的 DNA 浓度。连接反应体系: 5 μL 2 × 缓冲液, 1 μL pGEM-T easy 载体, 2 μL DNA, 1 μL T4 DNA 连接酶 补加 1 μL ddH₂O。4℃连接过夜。取 3 μL 连接产物用热击法进行转化反应。*E. coli* DH5α 的感受态细胞由 CaCl₂ 法得到。通过蓝/白筛选和 *EcoR* I 酶切检验挑选出阳性克隆。

(viii) 测序。用 SDS——碱液裂解法提取克隆基因的质粒,用 SP6 和 T7 引物进行 PCR 反应测序。测序仪器是 ABI PRISM 377-96,测序试剂是 BigDye terminator V2.0。第一次测序完成后,根据测序结果再设计引物进行下一个反应的测序,直至测通为止。

2 结果与讨论

2.1 红平红球菌 LSSE8-1 脱硫代谢产物的研究

用 DBT 为模型化合物脱硫代谢的产物分析结果如图 1 所示。经过 5 d 之后, DBT 全部消失,而生成一种新的产物 HBP。其特征是中间没有任何中间产物的积累。催化 DBT 脱硫反应的有三步反应,酶 *DszC* 催化 DBT 形成 DBTO₂, *DszA* 和 *DszB* 则进一步催化使其生成 HBP。因为没有发现中间产物的积累,以前的研究认为是由于酶 *DszC* 的活性低于 *DszA* 和 *DszB*

的缘故, 这样酶 DszC 的活性就成了制约脱硫速度的一个瓶颈, 是限制性步骤. 这一推断尽管圆满地解释了 DBTO₂ 的不积累问题, 但缺乏进一步的证据. 为了研究清楚这一问题, 本文进一步用不同浓度的 DBTO₂ 为底物进行了细胞生长与脱硫代谢的研究.

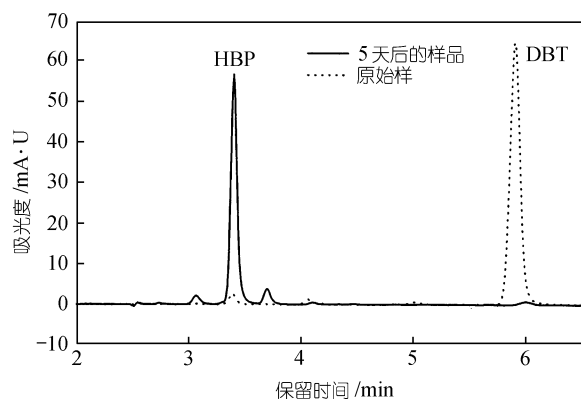


图1 LSSE8-1 对 DBT 的脱硫代谢产物 HPLC 分析结果

2.2 DBTO₂ 对细胞生长的影响

不同浓度的 DBTO₂ 对细胞生长的影响如图 2 所示. 在 0.5 mmol/L 的 DBT 对照中细胞生成最好, 经过约 24 h 的适应期之后, 就开始快速生长, 其光密度达到甚至超过 13. 而在 DBTO₂ 培养基中, 随着 DBTO₂ 浓度的增加其生长趋势渐缓. 当 DBTO₂ 的浓度达到 0.2 mmol/L 时, 细胞生长就受到明显的抑制, 其光密度在生长 120 h 之后还不到 1. 在 0.01 和 0.1 mmol/L 之间的 DBTO₂ 培养基也受到不同程度的抑制, 生长最好的是 0.05 mmol/L DBTO₂, 其次是 0.1 mmol/L DBTO₂, 生长最差的是 0.01 mmol/L 的 DBTO₂. 这里的数据说明 DBTO₂ 对细胞生长的作用是双重的, 一方面它抑制细胞的生长, 另一方面它又是培养基中细胞生长的惟一硫源, 这样过低的 DBTO₂ 浓度同样对细胞生长不利. 为了进一步地研究其产物生成情况, 本文用 HPLC 对其产物进行了分析, 其 5 d 后的代谢产物分析结果如图 3 所示. 图 3 显示, 在 0.01 和 0.05 mmol/L 浓度下, DBTO₂ 已完全降解, 在 0.1 mmol/L DBTO₂ 的浓度下, 培养基中只有少量的 DBTO₂ 残留, 而在 0.4 mmol/L 的浓度下, DBTO₂ 的残留量很高, A₆₀₀ 也显示这时菌体几乎没有生长. 在不同浓度 DBTO₂ 的培养基中, 代谢产物中均有 HBP 的产生. 以积分面积记, 在 0.01 mmol/L DBTO₂ 的条件下 HBP 峰面积是 12.2, 0.05 mmol/L

DBTO₂ 的条件下 HBP 生成量是 46, 在 0.1 mmol/L DBTO₂ 的条件下 HBP 的生成量是 60, 而在 0.4 mmol/L DBTO₂ 的条件下, HBP 的生成量是 23.9. 这与“四硫途径”的产物相吻合, 数据反应出 HBP 的生成量既与 DBTO₂ 的浓度有关, 又与细胞活性有关. 一般地讲是 DBTO₂ 的浓度越大则 HBP 的生成量越大, 但是过高的 DBTO₂ 显然对细胞的生长有毒害作用, 所以在 0.4 mmol/L 的高浓度下 HBP 的生成量反而低. 除此之外还有一个产物是 DBT. 在 0.01 mmol/L 的 DBTO₂ 中, DBT 的量用峰面积表示是 4, 0.05 mmol/L 时是 21.9, 0.1 mmol/L 是 18.1, 0.4 mmol/L 时是 13. 其规律也是与 DBTO₂ 的浓度和细胞活性有关. DBT 是“四硫途径”的一个上游产物, 它的出现说明 DBTO₂ 以某种方式被还原成了 DBT, 即从 DBT 到 DBTO₂ 的反应在细胞水平上是完全可逆的. 这一现象与 John 等人的研究结果相似. John^[10]以 IGTS8 为研究对象, 用 DBT 亚砷作底物, 可得到大量的 DBT, 以 DBTO₂ 为底物可得到少量的 DBTO, 但没有 DBT 的生成. John 由此推断 DBT, DBT 亚砷和 DBTO₂ 之间的反应是可逆的. 但他的实验结果与本实验也有不一致之处. John 用 DBTO₂ 做 IGTS8 的底物并不能得到 DBT, 而我们补给 LSSE8-1 不同量的 DBTO₂ 却都能得到 DBT, 这可能是 IGTS8 与 LSSE8-1 菌的一个差别. 催化 DBT 氧化生成 DBT 亚砷和 DBTO₂ 的酶是一种单加氧酶, 该酶催化的反应很少有逆反应出现. 所以, 该逆反应的发生是单加氧酶催化的结果还是细胞内其他酶作用的结果, 尚需要进一步的研究. 但是根据这一发现则可以从另一方面来解释 LSSE8-1 脱硫中中间产物不积累的问题. 因为 DBTO₂ 对细胞的毒性远远地高于 DBT, 而 DBT 氧化生成 DBTO₂ 这一步反

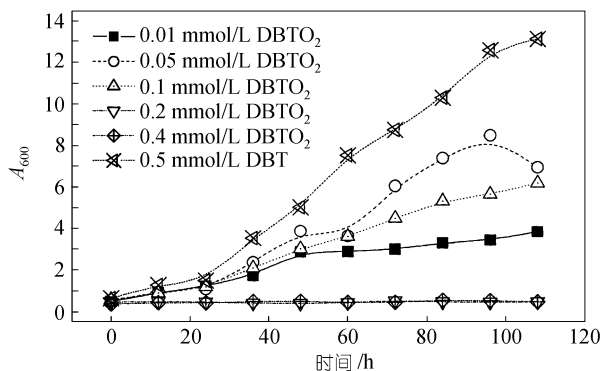


图2 不同浓度 DBTO₂ 对细胞生长的影响

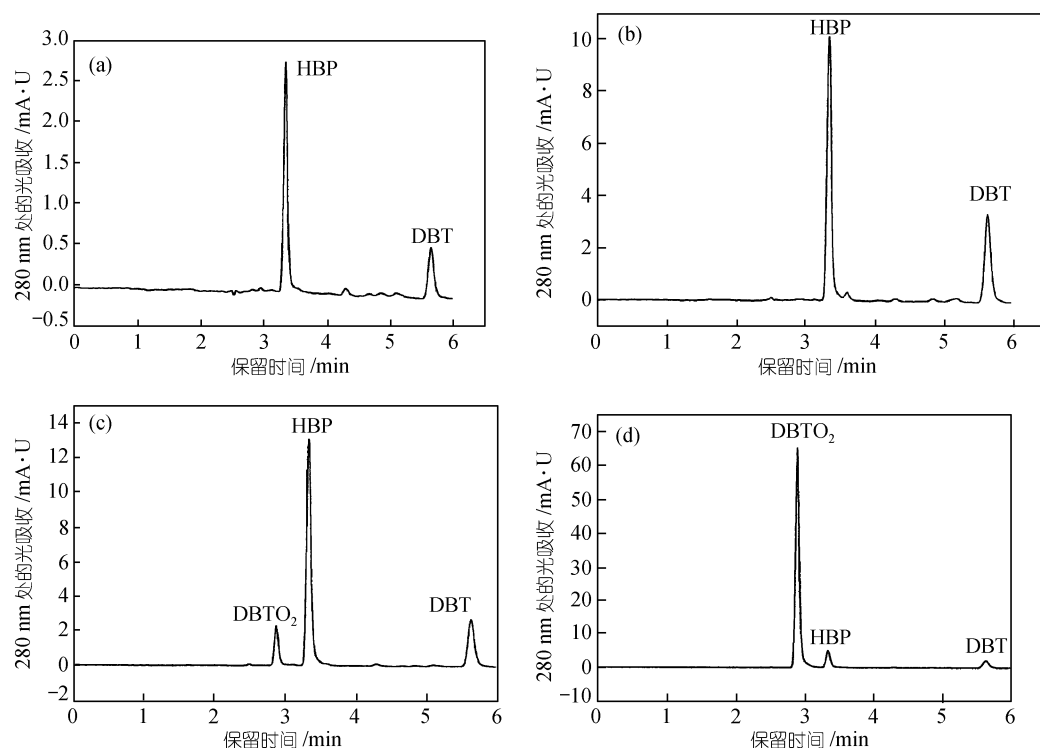


图3 不同浓度的 DBTO₂ 代谢产物的 HPLC 分析
(a) 0.01 mmol/L DBTO₂, (b) 0.05 mmol/L DBTO₂, (c) 0.1 mmol/L DBTO₂, (d) 0.4 mmol/L DBTO₂

应又是完全可逆的, 因此一旦 DBTO₂ 发生积累, 细胞会主动地将其转化为 DBT 或 HBP. 根据这一结果, 将 LSSE8-1 的脱硫途径进一步地修正, 如图 4 所示. 图 4 中, 由于不能断定其逆反应的进行方式, 我们在逆反应箭头旁标出问号. 为了进一步在基因水平研究 LSSE8-1 的脱硫代谢, 本文提取了 LSSE8-1 的质粒并用 PCR 方法进行了脱硫基因片段的分离与扩增.

2.3 PCR 法扩增 *dsz* 基因片段

PCR 扩增 *dsz* 基因片的结果如图 5 所示. 结果显示通过 PCR 扩增得到了 3 个不同的基因片段, *dszA*, *dszB* 和 *dszC*. 通过与 DNA 标准比较推测它们分别为 1.3, 1.0 和 1.2 kb, 由于标准 DNA 的上样量是 10 μ L, 以此推测 PCR 产物的浓度大约是 7 ng/ μ L. PCR 的顺利扩增说明脱硫基因的保守性可能较高. 基因克隆是保存和研究基因片段的重要手段, 为了进一步地研究该基因的性质, 我们将扩增的基因进行了克隆.

2.4 脱硫基因片段的克隆

通过蓝/白筛选得到阳性克隆, 培养菌体并提取

质粒, 用 *EcoR* I 进行酶切鉴定. 在 pGEM-Teasy 载体的两端均有 *EcoR* I 酶切位点, 因而如果脱硫基因被正确地克隆, 且该基因片段内没有 *EcoR* I 切点, 则通过 *EcoR* I 的单酶切就应得到质粒载体和脱硫基因两个片段. 酶切检验结果如图 6 所示, 表明三段脱硫基因分别被成功克隆, 且这三段基因片段内没有 *EcoR* I 切点. 已公布的 IGTS8 的脱硫基因片段内也没有 *EcoR* I 切点, 实验结果与文献一致. 该基因的成功克隆为以后用基因工程手段改造脱硫基因奠定了基础, 也为下一步的脱硫基因测序提供了方便.

2.5 脱硫基因的测序

三段脱硫基因 *dszA*, *dszB* 和 *dszC* 的测序结果分别如图 7, 图 8 和图 9 所示. *dszA* 的长度是 1362 bp, 其由起始密码 ATG 始, 以终止密码 TGA 止, 其编码的酶由 453 个氨基酸组成, 分子量 49561. *dszB* 是 1098 bp, 编码的蛋白质由 365 个氨基酸构成, 分子量 38983. *dszC* 是 1254 bp, 编码一个分子量为 44880 的由 417 个氨基酸构成的蛋白. 这三段基因与已公布的

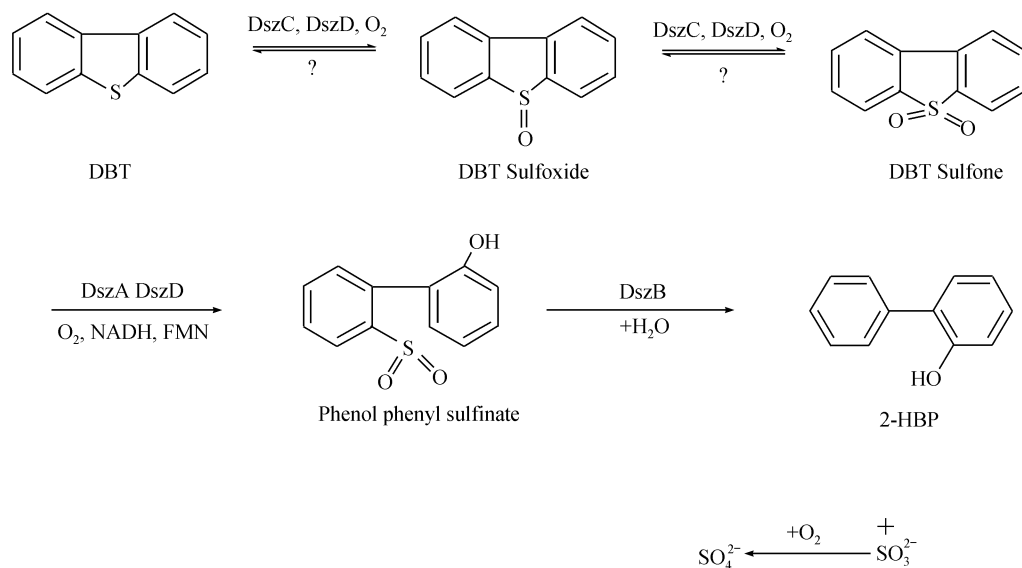


图 4 LSSE8-1 的脱硫途径

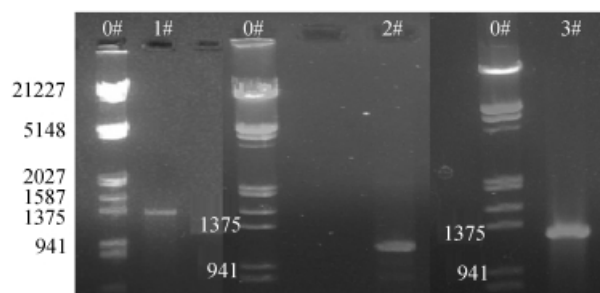


图 5 PCR 扩增脱硫基因的结果

0#, 标准 DNA; 1#, 扩增的 *dszA* 片段; 2#, 扩增的 *dszB* 片段; 3#, 扩增的 *dszC* 片段

IGTS8 的脱硫基因比较, 结果表明 *dszA*, *dszB* 与 IGTS8 的相关脱硫基因的同源性 100%, *dszC* 与之的同源性是 99%。其中 *dszC* 与 IGTS8 的 C 基因相比较, 有 9 bp 不同。它们分别是第 158 处的 A 代替了原来的 G, 第 167~168 处是 GC 而不是原来的 CG, 第 530 处以 C 代替了原来的 T, 534 处的 A 代替了原来的 G, 656 处的 G 代替了原来的 A, 751 和 752 处的 GC 代替了原来的 CG, 945 处的 T 代替了原来的 C, 1117 处的 T 代替了原来的 C。这样的变化在蛋白水平的体现是其一级结构中有 6 处氨基酸发生了变化。具体地讲, 第 53 个氨基酸是组氨酸而不是精氨酸, 第 56 个氨基酸是甘氨酸而不是丙氨酸, 第 177 个氨基酸是丙氨酸

而不是缬氨酸, 第 219 个氨基酸是甘氨酸而不是天冬氨酸, 第 251 个氨基酸是丙氨酸而不是精氨酸, 第 373 个氨基酸是酪氨酸, 而不是组氨酸。这样的变化并没有影响细胞的脱硫活性, 这也说明以上的几种氨基酸不是构成 C 酶活性中心的氨基酸, 也不会对其底物的选择性构成影响。该文的基因序列已提交 GenBank 数据库, 在 DDBJ/EMBL/GenBank 中的核酸序列数据库登录号分别为 AY294402, AY294403 和 AY294404。

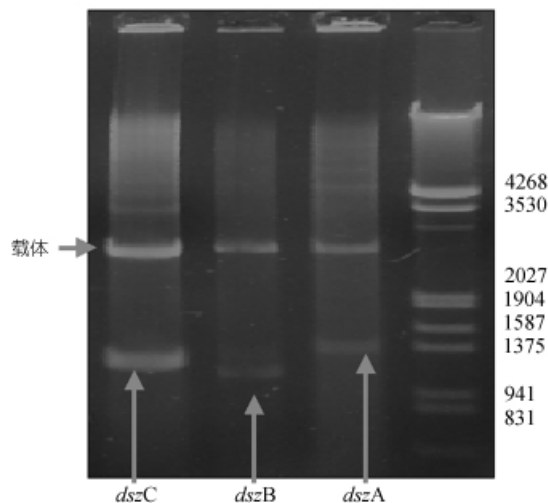


图 6 脱硫基因克隆的酶切检验结果

```

1   ATGACTCAAC AACGACAAAT GCATCTGGCC GGTTCCTTCT CGGCCGGCAA TGTGACTCAT
61  GCACATGGGG CGTGGCGGCA CACGGACGCG TCGAATGACT TTCTGTCGGG GAAGTACTAC
121 CAACACATCG CCCGTACTCT GGAGCGCGGC AAGTTCGATC TGTGTTTCT GCCTGACGGG
181 TTGGCCGTCG AGGACAGCTA CGGGGACAACT CTGGACACCG GTGTGCGCCT GGGCGGGCAG
241 GGTGCAGTCG CCTGGAGGCC GGCCAGTGTG GTCGCAACCA TGGCCGCGGT GACCGAGCAC
301 CTGGGTCTTG GGGCAACCAT TTCGGCGACC TACTATCCCC CGTATCACGT TGCTCGGGTG
361 TTCGCGACGC TCGATCAGTT GTCAGGGGGT CGGGTGTCTT GGAACGTCGT CACCTCGCTC
421 AACGACGCTG AAGCGCGCAA CTTCGGCATT AATCAGCATC TGGAACACGA CGCCCGCTAT
481 GACCGCGCCG ATGAGTTCTT GGAAGCGGTC AAGAACTCTT GGAACAGCTG GGACGAGGAC
541 GCCCTCGTGC TGGACAAGGC GGCCGGCGTG TTCGCCGATC CCGCGAAGGT GCACTACGTC
601 GATCACACG GGGAGTGGCT GAATGTGCGC GGACCTCTGC AGGTACCGCG TTCACCTCAG
661 GGTGAGCCGG TGATCCTGCA GGCCGGCCTG TCGCCCCGGG GTCGGCGCTT CGCCGGGAAG
721 TGGGCCGAGG CCGTCTTCAG TCTTGACACC AACCTCGAGG TGATGCAGGC CACCTACCAG
781 GGCATCAAAG CCGAGGTCGA CGCTGCGGGG CGCGATCCCG ATCAGACGAA AATCTTCACC
841 GCCGTGATGC CGGTACTCGG CGAAAGCCAG GCGGTGGCAC AGGAACGACT GGAATATCTC
901 AACAGTCTGG TCCATCCGGA AGTGGGACTG TCGACGCTAT CCAGTCACAC CGGCATCAAC
961 CTGGCGGCGT ACCCTCTCGA CACTCCGATC AAGGACATCC TGCGGGATCT GCAGGATCGG
1021 AATGTCCCGA CGCAACTGCA CATGTTGCGC GCCGCAACGC ACAGCGAAGA GCTCACGCTG
1081 GCGGAAATGG GTCGCGGCTA TGGAACCAAC GTGGGGTTCG TTCCTCAGTG GGCCGGTACC
1141 GGGGAGCAGA TCGCTGACGA GCTGATCCGC CACTTCGAGG GCGGCGCCGC GGATGGTTTC
1201 ATCATCTCTC CGGCCTTCCT GCCGGGCTCC TACGACGAGT TCGTCGACCA GGTGGTTCGG
1261 GTTCTGCAGG ATCGCGGCTA CTTCCGCACC GAGTACCAGG GCAACACTCT GCGCGACCAC
1321 TTGGGTCTGC GCGTACCACA ACTGCAAGGA CAACCTTCAT GA

```

图7 脱硫基因A的测序结果

```

1   ATGACAAGCC GCGTCGACCC CGCAAACCCC GGTTCAGAAC TCGATTCCGC CATCCGCGAC
61  ACACTGACCT ACAGCAACTG CCCGGTACCC AACGCTCTGC TCACGGCATC GGAATCGGGC
121 TTCCTCGACG CCGCCGGCAT CGAACTCGAC GTCCTCAGCG GCCAGCAGG CACGGTTCAT
181 TTCACCTACG ACCAGCCTGC CTACACCCGT TTTGGGGGTG AGATCCCGCC ACTGCTCAGC
241 GAGGGGTGCG GGGCACCTGG GCGCACGCGT CTACTCGGCA TCACCCGCTT CTTGGGGCGC
301 CAGGGCTTCT TTGTCCGCGA CGACAGCCCG ATCAGAGCGG CCGCCGACCT TGCCGGACGT
361 CGAATCGGCG TCTCGGCCTC GGCAATTCGC ATCCTGCGCG GCCAGCTGGG CGACTACCTC
421 GAGTTGGATC CCTGGCGGCA AACGCTGGTA GCGCTGGGCT CGTGGGAGGC GCGCGCCTTG
481 TTGCACACCC TTGAGCACGG TGAAGTGGT GTGGACGACG TCGAGCTGGT GCCGATCAGC
541 AGTCTGTGTG TCGATGTTCC CGCTGAGCAG CTCGAAGAAT CCGCGACCGT CAAGGGTGCG
601 GACCTCTTTC CCGATGTCGC CCGCGGTCAG GCCGCGGTGT TGGCCAGCGG AGACGTTGAC
661 GCCCTGTACA GTTGGCTGCC CTGGGCCGGG GAGTTGCAAG CCACCGGGGC CCGCCAGTGT
721 GTGGATCTCG GCCTCGATGA GCGCAATGCC TACGCCAGTG TGTGGACGGT CAGCAGCGGG
781 CTGGTTCGCC AGCGACCTGG CTTGTTCAA CGACTGGTCG ACGCGGCCGT CGACGCCGGG
841 CTGTGGGCAC GCGATCATTC CGACGCGGTG ACCAGCCTGC ACGCCGCGAA CCTGGGCGTA
901 TCGACCGGAG CAGTAGGCCA GGGCTTCGGC GCCGACTTCC AGCAGCGTCT GGTTCACGCG
961 CTGGATCACG ACGCCCTCGC CCTCCTGGAG CGCACACAGC AATTCCTGCT CACCAACAAC
1021 TTGCTGCAGG AACCCGTCGC CCTCGATCAG TGGGCGGCTC CGGAATTCTT GAACAACAGC
1081 CTCAATCGCC ACCGATAG

```

图8 脱硫基因B的测序结果

```

1   ATGACACTGT CACCTGAAAA GCAGCACGTT CGACCACGCG ACGCCGCCGA CAACGATCCC
61  GTCGCGGTTG CCCGTGGGCT AGCCGAAAAG TGGCGAGCCA CCGCCGTCGA GCGTGATCGC
121 GCCGGGGGTT CGGCAACAGC CGAGCGCGAA GACCTGCACG CGAGCGGCTC GCTGTGCTC
181 CTCGTCCCGC GCGAATACGG CGGCTGGGGC GCAGACTGGC CCACCGCCAT CGAGGTCGTC
241 CGCGAAATCG CGGCAGCCGA TGGATCTTTG GGACACCTGT TCGGATACCA CCTCACCAAC
301 GCCCCGATGA TCGAACTGAT CGGCTCGCAG GAACAAGAAG AACACCTGTA CACCCAGATC
361 GCGCAGAACA ACTGGTGGAC CGGAAATGCC TCCAGCGAGA ACAACAGCCA CGTGCTGGAC
421 TGGAAGGTCA GCGCCACCCC GACCGAAGAC GCGGCTACG TGCTCAATGG CACGAAGCAC
481 TTCTGCAGCG GCGCCAAGGG GTCGGACCTG CTGTTCTGTG TCGGCGTCGC CCAAGATGAT
541 TCTCCGCAGC AGGTGCGAT CATTGCTGCC GCTATCCCGA CATCGCGGGC TGGCGTTACG
601 CCCAACGACG ACTGGGCCGC CATCGGCATG CGGCAGACCG ACAGCGGTTC CACGGGCTTC
661 CACAACGTCA AGGTGCGAGC TGACGAAGTG CTGGCGCGCG CCAACGCCTT CGTTCTCGCC
721 TTCATACAAT CCGAGCGCGG CAGCCTCTTC GCGCCCATAG CGCAATTGAT CTTGCCAAC
781 GTCTATCTGG GGATCGCGCA CGGCGCACTC GATGCCGCCA GGGAGTACAC CCGTACCCAG
841 GCGAGGCCCT GGACACCGGC CGGTATTCAA CAGGCAACCG AGGATCCCTA CACCATCCGC
901 TCCTACGGTG AGTTCACCAT CGCATTGCAG GGAGCTGACG CCGCTGCCCG TGAAGCGGCC
961 CACCTGCTGC AGACGGTGTG GGACAAGGGC GACGCGCTCA CCCCCGAGGA CCGCGCGGAA
1021 CTGATGGTGA AGGTCTCGGG AGTCAAAGCG TTGGCCACCA ACGCCGCCCT CAACATCAGC
1081 AGCGGCGTCT TCGAGGTGAT CGGCGCGCGC GGAACATATC CCAGGTACGG TTTCGACCGC
1141 TTCTGGCGCA ACGTGCAC CCACTCCCTG CACGACCCGG TGTCTACAA GATCGCCGAC
1201 GTCGGCAAGC ACACCTTGAA CGGTCAATAC CCGATTCCCG GCTTCACCTC CTGA

```

图 9 脱硫基因 C 的测序结果

3 结论

红平红球菌 LSSE8-1 能选择性地氧化 DBT 中的 C—S 键, 最终生成 HBP. 但同时能催化中间产物 DBTO₂ 反应生成 DBT 和 HBP. 说明 LSSE8-1 所催化的 DBT 到 DBTO₂ 这一步反应在细胞水平是完全可逆的. DBTO₂ 对细胞生成有明显的毒害作用, 因而脱硫时一般没有 DBTO₂ 的积累. 脱硫基因片段 *dszA* 的长度是 1362 bp, *dszB* 是 1098 bp, *dszC* 是 1254 bp. 与 IGTS8 的脱硫基因相比较, *dszA* 和 *dszB* 的同源性是 100%, 而 *dszC* 的同源性是 99%, 说明脱硫基因是高度保守的.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: G2000048004)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2002AA302211)、国家自然科学基金(批准号: 20206032)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Sylvia A D, Edwin S O, Kenvin D Y. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Applied and environmental microbiology*, 1993, 9(59): 2837~2843
- 2 Christopher S P, Brian R K, John R. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Applied*

- and *Environmental Microbiology*, 1995, 2(61): 468~475
- 3 Mamie Z L, Charles H S, Daniel J M, et al. Genetic analysis of the *dsz* promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Journal of Bacteriology*, 1996, 11(178): 6409~6418
- 4 Maria E G, Abel F, Victor D L, et al. Designing recombinant *pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *Journal of Bacteriology*, 1997, 11(179): 7156~7160
- 5 Wayne M C, William E L, Michael J C, et al. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nature Biotechnology*, 2001, 4(19): 354~359
- 6 Jiang Chengying, Liu H, Xie Y, et al. Isolation of soil bacteria species for degrading dibenzothiophene. *Chinese J Chem Eng*, 2002, 4(10): 420~426
- 7 缙仲轩, 刘会洲, 罗明芳, 等. 专一性脱硫菌的分离与鉴定. *中国科学, B 辑*, 2002, 32(5): 397~405
- 8 Luo Mingfang, Xing J, Gou Z, et al. Microbial desulfurization of dibenzothiophene and 4,6-dimethylthiobenzothiophene in dodecane and straight-run diesel oil. *Korean J Chem Eng*, 2003, 20(4): 702~704
- 9 Claude D, Diane L, Helene B, et al. Conservation of plasmid-encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several *Rhodococcus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 7(63): 2915~2919
- 10 John R G, Edwin S O, Daniel C S. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 107: 31~36

(2003-05-19 收稿, 2003-10-17 收修改稿)