

节杆菌 PJ3 基因组中发现 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因

杨美英 麻鹏达 李文明 刘晶莹 李 亮 朱筱娟* 王兴智*

(东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024; 吉林农业大学生命科学院, 长春 130118. * 联系人,
E-mail: zhuxj720@nenu.edu.cn; xingzhi@public.cc.jl.cn)

摘要 从污水中分离出一株以吡啉为惟一碳源和氮源生长的菌株 PJ3, 用 16S rDNA 鉴定为节杆菌 (*Arthrobacter* sp), 构建了 PJ3 菌株基因组文库并获得一株阳性克隆 JM109 (pUCW402). 通过 GenSCAN 软件和 BLAST 分析发现, 在插入 pUCW402 的外源片段(3360 bp)中存在一个由 933 bp 片段编码的 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因. 进化分析表明, 从 PJ3 来源的 2,3-二羟基联苯双加氧酶在进化树上形成一个独立的分支. Southern 杂交进一步证实, 编码该酶的基因定位于节杆菌 PJ3 的基因组 DNA 上. 为了鉴定该基因的生物学功能, 构建了 BL21 (pETW-8)重组菌株. 与菌株 JM109 (pUCW402)和 PJ3 相比, 2,3-二羟基联苯双加氧酶的表达水平在 BL21 (pETW-8)中最高. 酶活分析表明, 2,3-二羟基联苯双加氧酶不具有绝对专一性, 对 2,3-二羟基联苯的催化能力高于邻苯二酚. 因此推测 PJ3 菌株对芳香族化合物降解过程中, 2,3-二羟基联苯双加氧酶主要负责催化双环化合物的降解.

关键词 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因 节杆菌(*Arthrobacter* sp) 进化树 基因定位 酶活力

人工合成的芳香族化合物或其衍生物在许多情况下都有可能释放到环境中^[1], 而且由于它们具有热稳定与化学稳定性, 会长期积累形成环境污染物^[2]. 环境中的微生物可以通过突变获得利用这些化合物作为自己的碳源、氮源进行生存的能力. 细菌邻裂双加氧酶在降解这些化合物, 使它们重新进入碳循环的过程中起着关键的作用^[3]. 因此通过生物降解来解决芳香族化合物对环境污染这一问题成为最具吸引力的途径之一. 同时由于这一方法对化学处理环境污染物的有效替代也使得它具有很广阔的商业前景^[4].

多氯联苯(PCB)降解的主要途径是由联苯双加氧酶启动的, 2,3-二羟基联苯双加氧酶(23DHBD)催化第 3 步中两个氧原子插入到 2,3-二羟基联苯形成 2-羟基-6-氧-6-苯基己二烯酸的过程^[5]. 在各种能利用联苯的细菌, 如拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia* sp) B1^[6], 红球菌(*Rhodococcus globerulus*) P6^[7], 和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp) BN6^[8]中都发现存在 2,3-二羟基联苯双加氧酶.

吡啉是煤焦油产生过程中形成的一种难降解的杂环芳香族化合物, 具有毒性和致突变作用, 并且对土壤和地下水都有污染^[9]. 目前, 降解吡啉的细菌主

要有假单胞菌属(*Pseudomonas resinovorans*) CA10^[10], 鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp) GTIN11^[11]等. 而且已从这些菌株中克隆了吡啉降解基因簇, 它们具有一个很相似的代谢途径, 都是起始于吡啉含氮杂环的氧化裂解形成 2'-氨基联苯 2,3-二羟基这一过程^[11]. 然而人们发现, 某些吡啉降解菌株, 如鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp) CB3^[12]的吡啉降解基因簇中吡啉双加氧酶与联苯氧化酶有一定联系. 本研究报道了节杆菌 PJ3 能够以吡啉作为碳源和氮源进行生长, 并且首次从该菌株的基因组文库中分离到 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因.

1 材料与方法

() 细菌菌株与质粒. 细菌 PJ3 是从啤酒厂污水淤泥中分离到的一株土壤菌株. 大肠杆菌 JM109 和 BL21 (DE3)分别用作质粒转化和蛋白表达的宿主菌. 质粒 pUC19 和 pET-28a(+)分别用作克隆和表达载体.

() 吡啉降解菌株的富集培养. 实验样品取自于当地一家啤酒厂(43°10'N, 124°22'E)的污水淤泥. 为了筛选出吡啉利用菌株, 以吡啉作为惟一碳源和氮源的无碳、氮矿物培养基(CNFMM)进行细菌的富集培养. CNFMM组成见文献[13,14]. 污泥样品按

2007-01-31 收稿, 2007-03-19 接受

中国-瑞典国际合作项目(批准号: AM15B12)、长江学者和高校创新团队(批准号: IRT0519)、高等学校学科创新引智计划(批准号: B07017)、国家植物转基因中试与产业化基地(吉林)(批准号: JY03-B-17)和长春市科技局国际合作项目资助

10%的接入量接种于培养基中,于30℃摇床上振荡培养1周,再按10%的接入量转接到新的培养基中培养1周,如此重复4次以后,样品进行倍比稀释涂LB^[15]平板,过夜,有明亮、黄色的克隆长出。

() 菌株PJ3 16S rDNA的鉴定。按照标准方法^[16]提取菌株PJ3的总DNA,进行16S rDNA基因扩增。PCR反应引物分别对应于大肠杆菌(GenBank序列号为J01859) 16S rDNA基因的7~26和1491~1512 bp^[14,17]。PCR产物由上海生工公司测序。测序序列运用DDBJ/EMBL/GenBank DNA数据库进行BLAST同源性比较。

() 基因组文库构建和阳性克隆的筛选。用EcoR限制性内切酶对PJ3基因组DNA进行消化,回收3~8 kb的片段,与具有同样切口且用碱性磷酸酶去磷酸化后的pUC19载体进行连接,转化JM109。所有重组操作均按照参考文献^[16]进行。用50 mmol/L的邻苯二酚喷雾^[12,18],筛选能够变为黄色的克隆。运用碱裂解的方法^[16]从阳性克隆中分离质粒DNA,酶切分析插入外源片段的大小,并测序。

() 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因的分离和过表达载体构建。运用GenSCAN软件和BLAST对插入阳性克隆质粒pUCW402的片段进行分析。以pUCW402为模板PCR扩增到933 bp的片段,EcoR和HindⅢ消化后插入具有相同切点的pET-28a(+)载体中构建过表达载体pETW-8,转化BL21(DE3)获得BL21(pETW-8)克隆。扩增引物由上海生工合成,分别为5'-ccggaattcATGACTCACATCCGTGGACTTG-3'和5'-cccaagcttCGTCTGCGACTAGTTTGCCG-3',下划线部分分别为EcoR和HindⅢ酶切位点。

() Southern杂交分析。运用EcoR和BamHⅠ分别消化PJ3基因组DNA,用0.8%(质量体积比)琼脂糖凝胶电泳,并转印到尼龙膜上。其他操作按照Gene Images™ DNA标记和检测试剂盒(Amersham Biosciences)说明进行。以pUCW402为模板,PCR扩增到933 bp的片段为探针。

() 细胞粗提物的制备。JM109(pUCW402)和BL21(pETW-8)用含有50 μg/mL氨苄青霉素和卡那霉素的LB液体培养基进行培养,在600 nm测量细胞密度。当A值达到0.6时,增加异丙基-b-D-硫代半乳糖苷(IPTG)使其终浓度为1 mmol/L,继续培养3 h,离心收集菌体。PJ3菌株培养条件同上。以下的操作按照文献^[19,20]的方法进行,上清液进行蛋白浓度

和酶活力分析。

() SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳运用Bio-Rad生产的MiniPRITEANII装置进行。分离胶浓度为12%,考马斯亮蓝R-250染色。

() 2,3-二羟基联苯双加氧酶活性分析。邻苯二酚作为底物,对2,3-二羟基联苯双加氧酶在25℃,30℃,37℃,42℃,50℃,60℃和70℃条件下的最适温度和50 mmol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.6和4.5),50 mmol/L磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液(pH 5.29和6.24),50 mmol/L Tris-盐酸缓冲液(pH 7.1和8.4)和50 mmol/L碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(pH 9.4和10.5)范围内的最适pH进行优化。运用紫外分光光度法测量PJ3, JM109(pUCW402)和BL21(pETW-8)菌体内2,3-二羟基联苯双加氧酶催化2,3-二羟基联苯和邻苯二酚分别形成2-羟基-6-氧-6-苯基己二烯酸($\lambda_{\max}$, 434 nm; $\epsilon = 21700 \text{ cm}^{-1} \cdot (\text{mol/L})^{-1}$)^[2]和2-羟基粘康酸半醛($\lambda_{\max}$, 375 nm; $\epsilon = 33400 \text{ cm}^{-1} \cdot (\text{mol/L})^{-1}$)^[21]的酶活。以牛血清白蛋白作为对照,运用Bradford法^[22]测定总蛋白含量。将25℃每分钟形成1 μmol产物定义为一个单位的酶活。酶的比活力是指每毫克酶蛋白所含酶活力的单位数^[2,20]。

() GenBank登录的序列及序列号。PJ3菌株的16S rDNA基因核酸序列、2,3-二羟基联苯双加氧酶基因的核酸及蛋白序列已经提交GenBank/EMBL/DDBJ,序列号分别为DQ531668, DQ841119和ABH06543。

2 结果

2.1 PJ3菌株的分离与鉴定

从当地啤酒厂污水淤泥中分离出一株能以吡唑作为碳源和氮源生长的菌株PJ3。对该菌株的16S rDNA基因序列进行测序,并且在DDBJ/EMBL/GenBank进行比对发现,PJ3菌株的16S rDNA基因序列与节杆菌属(*Arthrobacter* sp) YL8 (DQ191322),节杆菌属(*Arthrobacter* sp) X4 (DQ202320),节杆菌属(*Arthrobacter* sp) YL3 (DQ223655)和节杆菌属(*Arthrobacter* sp) L4 (DQ201188)的16S rDNA基因序列的相似性达99%,因此菌株PJ3被鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp)。

2.2 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因的克隆

将部分EcoR消化的基因组DNA片段与具有相同酶切位点的pUC19载体连接,转化JM109构建

PJ3 的基因组文库. 筛选到具有氨苄青霉素抗性的克隆之后, 用 50 mmol/L 的邻苯二酚对转化克隆进行喷雾, 含有质粒 pUCW402 的阳性克隆由于表达双加氧酶的活性, 将邻苯二酚氧化成黄色的 2-羟基粘康酸半醛被筛选出来. 酶切和测序均证实插入 pUCW402 的外源片段为 3360 bp. 运用 GeneSCAN 软件分析看出, 该序列包括 3 个可读框(图 1). BLAST 同源比对表明, 在核酸数据库中并没有与这一序列同源的匹配结果. 然后用 Primer Premier 5.0 软件将核酸序列转变为氨基酸序列后再次进行 BLAST. 结果发现, 位于 529~839 区段的氨基酸序列与蛋白数据库中序列号为 BAD10913^[23] 的 2,3-二羟基联苯双加氧酶的同源性为 57%, 529 位氨基酸上游的区段没有任何匹配, 在

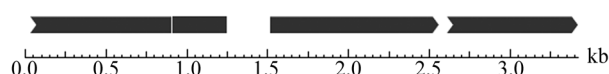


图 1 运用 GeneSCAN 软件对序列进行预测的结果
序列为 pUCW402 质粒中插入的 *EcoR* 酶切 PJ3 基因组 DNA 的片段.
1.5~2.5 kb 的可读框与编码 529~839 氨基酸残基的核酸序列一致

965~1095 区段的氨基酸与节杆菌属(*Arthrobacter* sp) FB24 (ZP_00410964) 锚蛋白的同源性为 65%. 而且由 930 bp 编码的 529~839 氨基酸残基所对应的核酸序列与图 1 中预测的 1.5~2.5 kb 可读框一致. 因此, 这一段核酸序列被初步确定为 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因序列.

2.3 PJ3 菌株 2,3-二羟基联苯双加氧酶的多态性分析

将来源于 PJ3 菌株的 2,3-二羟基联苯双加氧酶的蛋白序列与 DDBJ/EMBL/GenBank 蛋白数据库中的序列进行了比对, 并运用 TreeView 软件构建了无根进化树图(图 2). 在树图中, 来源于 PJ3 菌株的 2,3-二羟基联苯双加氧酶没有与已知的 2,3-二羟基联苯双加氧酶形成一簇而是形成一个独立的分支. 该酶的蛋白序列与序列号为 AAS55955 的嗜吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinivorans*)(未正式发表)菌株的 2,3-二羟基联苯双加氧酶、红球菌(*Rhodococcus* sp) RHA1 (YP705738) 型外裂酶的同源性最高, 为 60%. 与来源于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp) LB400 (AAK14787)、由

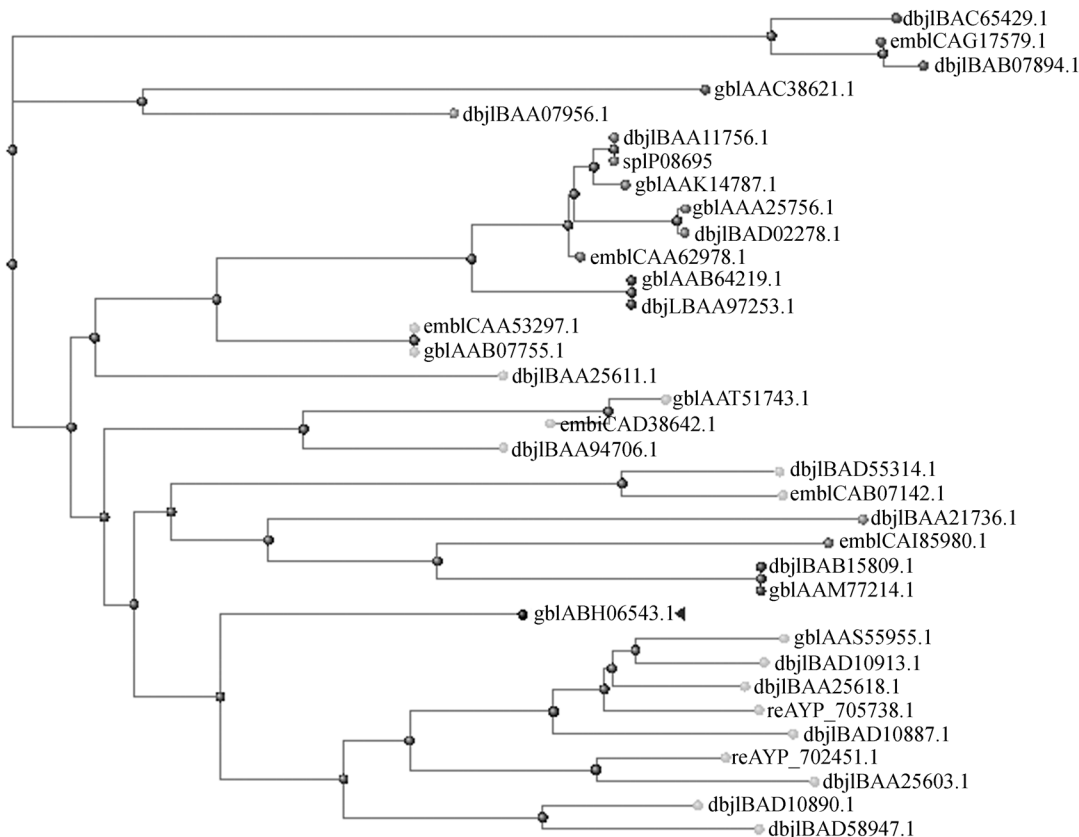


图 2 2,3-二羟基联苯双加氧酶与相关蛋白构建的进化树

运用 BLAST (ver.2.0.10) 在 DDBJ/EMBL/GenBank 蛋白数据库中进行序列比对, TreeView 软件构建无根多态树.

图中序列号为 ABH06543 的分支即是 PJ3 菌株的 2,3-二羟基联苯双加氧酶

*bphC*基因编码的2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶(外裂酶家族中第一个被确定了空间结构的酶)^[24]的同源性仅为35%.

2.4 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因的 Southern 杂交鉴定

为了鉴定2,3-二羟基联苯双加氧酶基因定位于PJ3的基因组DNA上,用*EcoR*消化的pUCW402质粒作为对照进行Southern杂交分析(图3).从图中可以明显看到,*EcoR*消化PJ3基因组DNA后的杂交信号出现在3.0 kb的位置,且与对照的杂交信号出现位置一致.*BamH*消化PJ3总DNA后杂交到的片段的大小约为2.0 kb,这与3360 bp片段的*BamH*酶切结果一致.上述两结果证实2,3-二羟基联苯双加氧酶基因位于节杆菌PJ3的基因组DNA.

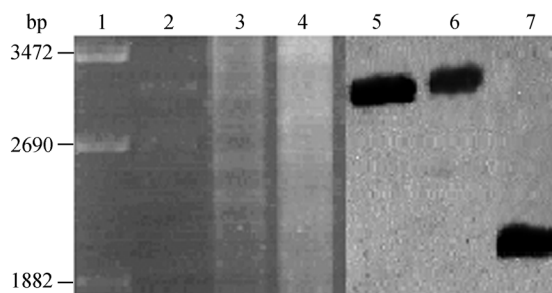


图3 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因在PJ3基因组DNA上的定位

1-4泳道为琼脂糖凝胶电泳图谱,5~7泳道为Southern杂交结果.1, λ EcoT14消化的DNA Marker;2和5, *EcoR*酶切pUCW402质粒;3和6, *EcoR*酶切基因组DNA;4和7, *BamH*酶切基因组DNA

2.5 不同菌株中2,3-二羟基联苯双加氧酶的表达情况及分子量估测

由933 bp(包括终止密码子TAG)编码的2,3-二羟基联苯双加氧酶基因是否具备生物学功能,这可通过构建过表达载体pETW-8,在重组菌株BL21(pETW-8)的表达情况及酶活分析进行鉴定.运用细胞总蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果见图4.与重组菌株JM109(pUCW402)和BL21(pETW-8)相比,PJ3菌株中2,3-二羟基联苯双加氧酶的表达水平是最低的;3个菌株中BL21(pETW-8)的表达水平最高.310个氨基酸的2,3-二羟基联苯双加氧酶的分子量约为36 kD,与文献[5,23]报道一致.图4中,BL21(pETW-8)表达的2,3-二羟基联苯双加氧酶稍大于其他两个菌株,是由于在BL21(pETW-8)中2,3-二羟基联

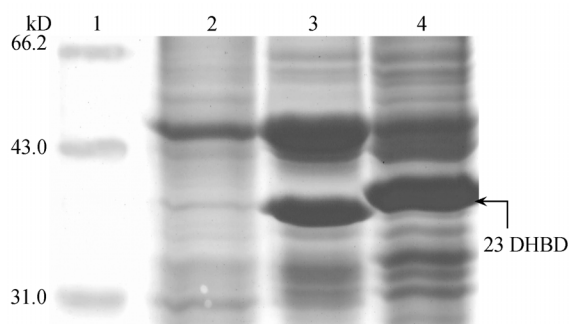


图4 3个菌株细胞粗提取物中2,3-二羟基联苯双加氧酶的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
1, 小分子量蛋白Marker;2, PJ3;3, JM109(pUCW402);4, BL21(pETW-8).考马斯亮蓝R-250染色

苯双加氧酶与6个组氨酸标签形成融合蛋白的原因.

2.6 粗提取物中2,3-二羟基联苯双加氧酶的最适温度和最适pH

以邻苯二酚为底物,测定了2,3-二羟基联苯双加氧酶在25~70及pH 3.6~10.4范围内的酶活(图5).从图5(a)中可以看出,随温度的升高, JM109(pUCW402)和BL21(pETW-8)中2,3-二羟基联苯双加氧酶的活性表现为先升后降的趋势,42℃时酶活最高.但在PJ3中2,3-二羟基联苯双加氧酶的活性表现为随温度的升高酶活逐渐下降的趋势.上述3个菌株中,2,3-二羟基联苯双加氧酶的活性都是随着pH的升高先升后降(图5(b)),在pH 6.24时酶活最高.因此将PJ3的最适温度和最适pH确定为25℃和6.24,而JM109(pUCW402)和BL21(pETW-8)的最适温度和最适pH则为42℃和6.24,这与瘤胃亚菌(*Prevotella ruminicola*) 23产生的蛋白酶的最适温度和最适pH比较相似^[25].

2.7 最适温度和最适pH条件下粗酶提取物酶活力分析

在最适温度和最适pH条件下,对2,3-二羟基联苯双加氧酶催化邻苯二酚和2,3-二羟基联苯分别生成黄色产物2-羟基粘康酸半醛和2-羟基-6-氧-6-苯基己二烯酸(图6)的酶活进行了测定.从表1中可以看出,3个菌株中酶的比活力明显不同, JM109(pUCW402)和BL21(pETW-8)高于PJ3. PJ3中2,3-二羟基联苯双加氧酶催化邻苯二酚和2,3-二羟基联苯转变成底物的能力仅为BL21(pETW-8)的34.6%和13.7%. JM109(pUCW402)中的酶活也要比PJ3中的酶活高一倍.就2,3-二羟基联苯双加氧酶相对于邻苯二酚和2,3-二羟

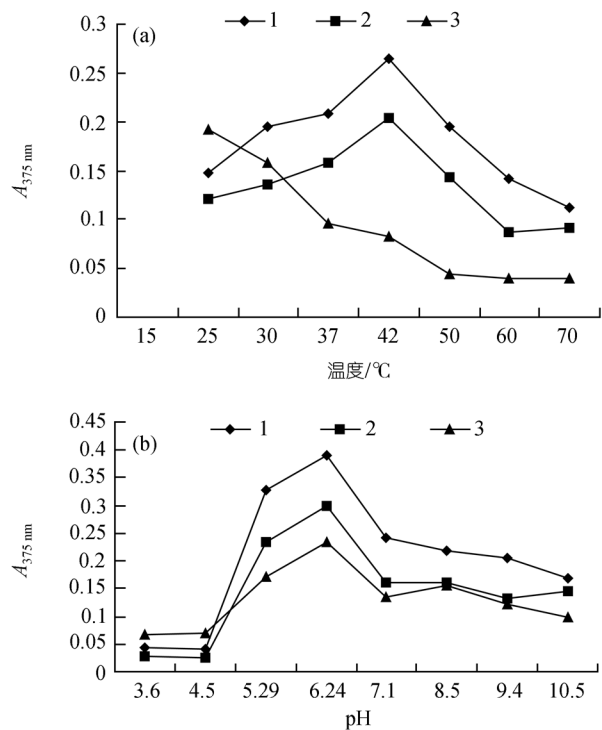


图 5 不同温度(a)和 pH(b)条件下测定的 2,3-二羟基联苯双加氧酶的活性
标准差为 3 次重复测定的统计结果。1, 菌株 BL21(pETW-8); 2, 菌株 JM109 (pUCW402); 3, 菌株 PJ3

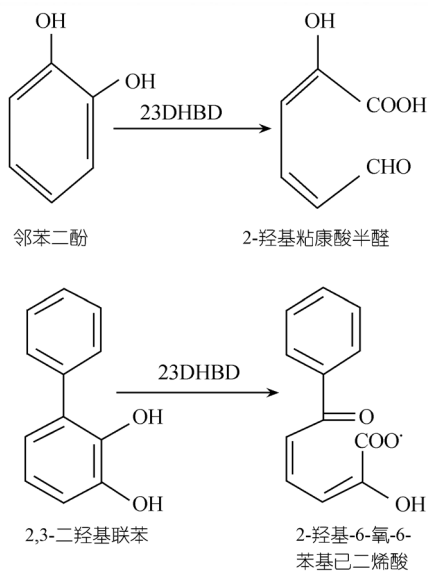


图 6 2,3-二羟基联苯双加氧酶催化反应

基联苯的底物特异性而言, 2,3-二羟基联苯作为底物时的酶活要明显高于邻苯二酚。在 PJ3, JM109

表 1 PJ3, JM109 (pUCW402)和 BL21 (pETW-8) 3 个菌株的细胞粗提物中 2,3-二羟基联苯双加氧酶活性比较

底物	细胞粗提物来源	总可溶性蛋白/mg	酶活力 /U	酶比活力 /U·mg ⁻¹
邻苯二酚	PJ3	0.797	0.0347	0.044
	JM109(pUCW402)	0.690	0.0649	0.094
	BL21(pETW-8)	0.720	0.0911	0.127
2,3-二羟基联苯	PJ3	0.797	0.157	0.197
	JM109(pUCW402)	0.690	0.251	0.364
	BL21(pETW-8)	0.720	1.036	1.439

(pUCW402)和 BL21 (pETW-8) 3 个菌株中 2,3-二羟基联苯双加氧酶催化 2,3-二羟基联苯的活性分别是催化邻苯二酚活性的 4.48, 3.87 和 11.3 倍。

3 讨论

人类活动将大量有毒的芳香族化合物释放到环境中, 由于它们具有热和化学稳定性成为难以降解的污染物。微生物, 尤其是细菌在矿化这些污染物进入生物地球化学循环和维持生物圈的发展中具有重要作用 [26]。人们对微生物尤其是细菌在降解芳香族化合物领域进行了广泛研究 [27]。其中有 77% 的节杆菌能够至少利用两种芳香族化合物, 有一些甚至可以利用 19 种芳香族化合物进行生长。因此, 节杆菌属是芳香族化合物矿化过程中比较重要的细菌种群之一 [1,28]。

本研究报道了从污水淤泥中分离出一株能以吡啉作为惟一碳源和氮源进行生长的菌株 PJ3, 16S rDNA 基因鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)。构建 PJ3 基因组文库, 筛选出一株阳性克隆 JM109 (pUCW402)。在插入 pUCW402 质粒的外源片段中存在一个由 933 bp 片段编码的 2,3-二羟基联苯双加氧酶基因。多态树分析发现, 这一 2,3-二羟基联苯双加氧酶与多态树中来源于嗜吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinivorans*, GenBank 序列号: AAS55955)的 2,3-二羟基联苯双加氧酶亲缘关系最近, 但同源性仅为 60%, 而且它没有与外裂酶家族中已知的 2,3-二羟基联苯双加氧酶形成一簇而是形成一个独立的分支。PJ3 菌株中 2,3-二羟基联苯双加氧酶在进化树中的分布, 可能是由于该菌株降解芳香族化合物过程不同于其他菌株; 也可能是由于在双加氧酶进化的过程中形成了一种特殊的酶或者是由自然界中其他细菌中基因水平转移等原因造成的。

重组菌株 JM109 (pUCW402)和 BL21 (pETW-8)表达的 2,3-二羟基联苯双加氧酶在催化底物邻苯二酚和 2,3-二羟基联苯时均表现出高的酶活, 但是在 BL21 (pETW-8)菌体内的表达水平要高于 JM109 (pUCW402),

而且酶的比活力在两个菌体内也明显不同。这可能是由以下3个原因造成的。首先是两个重组菌株所携带的载体中插入的外源片段长度不同, pUCW402 质粒的外源片段是 3360 bp, 而pETW-8 的外源片段只有 933 bp, 这可能导致翻译效率的不同。pET-28a(+)是一种基于T7 RNA聚合酶和T7启动子的高效表达载体。同时BL21是一种通用的蛋白表达菌株, 作为B型菌株, 它属于Ion蛋白酶和ompT外膜蛋白缺陷型菌株, 重组蛋白在其体内可能更稳定^[29]。

邻裂双加氧酶能分成两个家族, 负责单环芳香族化合物外裂的双加氧酶和负责双环芳香族化合物外裂的双加氧酶^[6]。本研究第一次报道了从节杆菌PJ3 体内分离到2,3-二羟基联苯双加氧酶这种外裂酶。而且该酶在催化双环化合物2,3-二羟基联苯邻裂时的酶活要高于催化单环化合物邻苯二酚时的酶活。同时在实验过程中, 从PJ3 菌株中还克隆到3,4-二羟基苯乙酸-2,3-双加氧酶基因。因此推测在PJ3 菌株降解芳香族化合物的过程中, 2,3-二羟基联苯双加氧酶主要负责双环化合物的裂解, 3,4-二羟基苯乙酸-2,3-双加氧酶负责单环化合物的降解, 而且在PJ3 菌株体内可能存在一个与已知芳香族化合物代谢途径有所不同的降解过程。关于PJ3 菌株降解芳香族化合物的详细机制还在进一步研究中。

参 考 文 献

- Paul H T, Ronald L C. Initial reactions of xanthone biodegradation by an *Arthrobacter* sp. *J Bacteriol*, 1986, 9: 818—827
- Moon J H, Kang E, Min K R. Characterization of the gene encoding catechol 2,3-dioxygenase from *Achromobacter xylosoxidans* KF701. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238: 430—435[DOI]
- Boldt Y R, Sakowsky M J, Ellis L B M. A manganese-dependent dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2 belongs to the major extradiol dioxygenase family. *J Bacteriol*, 1995, 177: 1225—1232
- Cherry J R. Directed evolution of microbial oxidative enzymes. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11: 250—254[DOI]
- Furukawa K, Arimura N. Purification and properties of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Pseudomonas aeruginosa* carrying the cloned *bphC* Gene. *J Bacteriol*, 1987, 169: 924—927
- Kim E, Zylstra G J. Molecular and biochemical characterization of two *meta*-Cleavage dioxygenases involved in biphenyl and *m*-Xylene degradation by *Beijerinckia* sp strain B1. *J Bacteriol*, 1995, 177: 3095—3103
- McKay D B, Prucha M, Reineke W. Substrate specificity and expression of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases from *Rhodococcus globorulus* strain P6. *J Bacteriol*, 2003, 185: 2944—2951[DOI]
- Riegert U, Heiss G, Kuhm R E. Catalytic properties of the 3-chlorocatechol-oxidizing 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Sphingomonas* sp strain BN6. *J Bacteriol*, 1999, 181: 4812—4817
- Inoue K, Widada J, Nakai S. Divergent structures of carbazole degradative *car* operons isolated from Gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68: 1467—1480[DOI]
- Nam J W, Nojiri H, Noguchi H. Purification and characterization of carbazole 1,9a-dioxygenase, a three-component dioxygenase system of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 5882—5890[DOI]
- Kilbane J J, Daram A J, Abbasian. Isolation and characterization of *Sphingomonas* sp GTIN11 capable of carbazole metabolism in petroleum. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297: 242—248[DOI]
- Shepherd J M, Gareth L J. Novel carbazole degradation genes of *Sphingomonas* CB3: Sequence analysis, transcription, and molecular ecology. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247: 129—135[DOI]
- Nojiri H, Hiroyo S, Kana M. Genetic characterization and evolutionary implications of a *car* gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp strain CA10. *J Bacteriol*, 2001, 183: 3663—3679[DOI]
- Habe H, Ashikawa Y, Yuko S. *Sphingomonas* sp strain KA1, carrying a carbazole dioxygenase gene homologue, degrades chlorinated dibenzo-p-dioxins in soil. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 211: 43—49[DOI]
- Grifoll M, Casellas M, Bayona J M. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: Identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 2910—2917
- Ausubel F M. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995
- Bakermans C, Madsen E. Diversity of 16S rDNA and naphthalene dioxygenase genes from coal-tar-waste-contaminated aquifer waters. *Microb Ecol*, 2002, 44: 95—106
- Okutal A, Ohnishi K, Yagame S. Intersubunit interaction and catalytic activity of catechol 2,3-dioxygenases. *J Biochem*, 2003, 371: 557—564[DOI]
- Moon J, Min K R, Kim C K. Characterization of the gene encoding catechol 2,3-dioxygenase of *Alcaligenes* sp KF711: Overexpression, enzyme purification, and nucleotide sequencing. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 332: 248—254[DOI]
- Kim D, Kim Y S, Kim S K. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp strain DK17. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 3270—3278[DOI]
- Iwata K, Nojiri H, Shimizu K. Expression, purification, and characterization of 2'-Aminobiphenyl-2,3-diol-1,2-dioxygenase from carbazole-degrader *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67: 300—307[DOI]
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254
- Katsuhiko T C, Masak M I, Toshiaki K. Multiplicity of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrading bacterium *Rhodococcus rhodochrous* K37. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68: 787—795[DOI]
- Emma R M, William W M. Induction of *bphA*, encoding biphenyl dioxygenase, in two polychlorinated biphenyl-degrading bacteria, psychrotolerant *Pseudomonas* strain Cam-1 and Mesophilic *Burkholderia* strain LB400. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2669—2676[DOI]
- Wang H T, Hsu J T. Optimal protease production condition for *Prevotella ruminicola* 23 and characterization of its extra cellular crude protease. *Anaerobe*, 2005, 11: 155—162[DOI]
- Diaz E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: A paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol*, 2004, 7: 173—180
- Gouri M D, Shimura M, Miyazawa D, et al. *bph* genes of the thermophilic PCB degrader, *Bacillus* sp JF8: Characterization of the divergent ring-hydroxylating dioxygenase and hydrolase genes upstream of the Mn-dependent BphC. *Microbiol*, 2005, 151: 4139—4151[DOI]
- Eyal S M, Baasov T, Uzi R. The trans-Anethole degradation pathway in an *Arthrobacter* sp. *J Biol Chem*, 2002, 277: 11866—11872[DOI]
- Jennifer G, John J D. *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, 1988, 3: 1245—1253