

环境微生物中芳环加氧酶的获取策略*

苟敏^{1,2} 唐溪¹ 孔春雷¹ 沈娥¹ 曲媛媛^{1**} 周集体¹

(¹大连理工大学环境学院, 工业生态与环境工程教育部重点实验室 大连 116024)

(²四川大学建筑与环境学院 成都 610065)

摘要 芳环加氧酶可催化芳香环的羟基化反应, 广泛应用于生物修复及化工合成行业. 本文在综述芳环加氧酶的分类和应用的基础上, 详细探讨基于纯培养技术与宏基因组技术的芳环加氧酶开发策略, 并首次对这些策略进行比较和评估. 利用传统的纯培养技术已经获得大量的芳环加氧酶, 然而这些加氧酶种类单一, 重复率高, 且新颖性不足. 新兴的宏基因组技术赋予了开发未培养微生物资源的新思路, 但利用其获取芳环加氧酶的研究刚刚起步, 存在着筛选效率低、异源表达困难等难题. 本文从基因信息量、筛选通量与效率、时间与成本以及目的基因下游表达可行性等方面对这两种方法进行综合评价, 并提出宏基因组技术筛选不同类型芳环加氧酶的适用方法. 纯培养技术与宏基因组技术的有机结合, 与蓬勃发展的各种组学技术一起, 将有助于推动芳环加氧酶的理论研究及生物催化产业的快速发展. 图3 表2 参47

关键词 芳环加氧酶获取策略; 纯培养技术; 宏基因组技术; 评价; 环境微生物

CLC Q939.97 : TQ925

Discovery Strategies for Aromatic Oxygenases from Environmental Microbes*

GOU Min^{1,2}, TANG Xi¹, KONG Chunlei¹, SHEN E¹, QU Yuanyuan^{1**} & ZHOU Jiti¹

(¹Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering of Ministry of Education, School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China)

(²College of Architecture and Environment, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract Aromatic oxygenases, which can catalyze the hydroxylation of aromatic ring, have been widely used in bioremediation and chemical synthesis. In this paper, the classification and application area of aromatic oxygenases are summarized. Moreover, their discovery strategies based on pure culture technology and metagenomic technology are discussed in detail and first evaluated. Abundant of aromatic oxygenases have been obtained using pure culture technology, but these enzymes exhibit with single type, high repetition rate and low novelty. Emerging metagenomic technology provides new ideas for discovering microbial resource from uncultured microbes. However, it is still in the initial stage of exploiting aromatic oxygenases by metagenomic methods, and many problems such as low screening efficiency and hard to express heterologously have not been resolved. This review evaluates the two strategies by analyzing the content of genetic information, screening throughout and efficiency, the time consume, cost, and expression feasibility of aromatic oxygenase. And the metagenomic methods suitable for screening different types of aromatic oxygenases are proposed. In the future, pure culture and metagenomic technology combined with other omics technologies, will contribute to promoting the theoretical study of aromatic oxygenases and rapid development of biocatalysis industry. Fig 3, Tab 2, Ref 47

Keywords discovery strategy for aromatic oxygenase; pure culture technology; metagenomic technology; evaluation; environmental microbe

CLC Q939.97 : TQ925

芳香化合物是一类重要的工业原材料, 稳定的化学结构及低水溶性使其成为难降解的有机污染物之一^[1]. 研究表

明, 芳香化合物的好氧生物降解包含两个重要过程: 芳环的羟基化反应与断裂反应, 它们均由微生物体内的芳环加氧酶催化完成^[2]. 因此, 芳环加氧酶是芳烃好氧降解途径中的关键酶系, 关系到这类化合物的可降解性及降解程度^[3]. 对芳环加氧酶的研究始于1955年, Hayaishi与Mason等几乎同时证明加氧酶能将一个或两个氧原子(氧气或过氧化物中的氧)

收稿日期: 2011-10-26 接受日期: 2011-12-08

*国家自然科学基金项目 (Nos. 51078054, 21176040, 20923006) 资助
Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 51078054, 21176040, 20923006)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: qyy007@126.com)

直接加到苯环上形成羟基化合物^[4-5]。这种芳香族羟基化合物是精细化工及医学制药行业的重要中间体,因此,芳环加氧酶一直是环境保护及化工生产领域的研究热点。目前,研究者们已经利用纯培养技术从微生物体内获得了各类芳环加氧酶,并对其进行了分子生物学改造。随着后基因组时代的到来,宏基因组技术的出现更为这类酶资源的开发提供了新颖的思路。本文综述了环境微生物中芳环加氧酶的分类、应用范围及开发策略,并首次对这些开发策略进行了综合评价。

1 芳环加氧酶的分类

芳环加氧酶具有不同的分类方式,根据加氧形式,可分为单加氧酶(Monooxygenase)和双加氧酶(Dioxygenase)两类。单加氧酶可在苯环上添加一个氧原子,同时另一个氧原子被还原成水。根据参与酶反应的辅基,芳环单加氧酶包含以下4类:二铁羟化酶(Di-iron hydroxylases),如苯酚羟化酶;黄素单加氧酶(Flavin monooxygenases),如2-羟基联苯-3-单加氧酶;蝶呤依赖型单加氧酶(Pterin-dependent monooxygenases),如苯丙氨酸羟化酶;以及细胞色素P450酶(Cytochrome P450 enzymes)^[6-7]。双加氧酶可在苯环上插入2个氧原子生成顺式二氢二醇化合物(*cis*-Dihydrodiols),其可分为依赖血红素的双加氧酶及Rieske型非血红素双加氧酶两类,后者的典型代表为萘双加氧酶^[8]。

按催化功能划分,芳环加氧酶又可分为芳环羟化加氧酶(Ring-hydroxylating oxygenase)和芳环断裂加氧酶(Ring-cleaving oxygenase)两类,它们分别完成芳香化合物的羟基化及开环断裂过程(图1)。芳环羟基化是其好氧降解的第一步反应,决定了微生物降解芳香化合物的能力。芳环羟化加氧酶由至少2~3个蛋白组成了还原酶(Reductase)、含[2Fe-2S]簇的铁氧还蛋白(Ferredoxin)及末端氧化酶(Oxygenase)3个组分,这3个组分一起形成一个典型的电子传递短链,实现芳环的羟基化^[9]。芳环断裂加氧酶参与羟基化芳香化合物的开环断裂,使其进入下游的小分子代谢途径,决定了微生物降解芳香化合物的程度。断裂加氧酶按其氧化开环位点的不同,可分为邻位开环和间位开环两种形式,对应的酶被分别称为外二醇双加氧酶及内二醇双加氧酶。外二醇双加氧酶使C2-C3或C1-C6键断裂,如邻苯二酚2,3-双加氧酶;内二醇双加氧酶断裂C1-C2键,如邻苯二酚1,2-双加氧酶。

2 芳环加氧酶的应用

2.1 芳环加氧酶在生物修复领域的应用

芳环加氧酶能够催化多种有机反应,为扩大其生物修复的底物范围及提高催化效率,各种基因工程手段如定点突变、基因重组、DNA shuffling及区域互换等被用于芳环加氧酶的改造^[10]。Siani等在分离自南极海水的嗜冷菌中,转入编

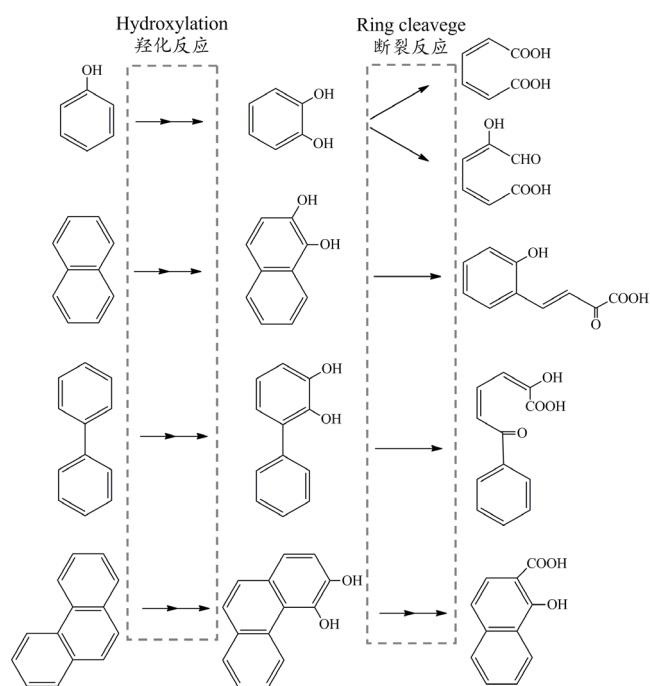


图1 芳香化合物好氧降解途径中的羟基化及开环断裂过程
Fig. 1 Hydroxylation and ring cleavage of aromatic compounds in aerobic metabolic pathway

码甲苯/邻二甲苯单加氧酶的外源基因,重组菌株在低温环境(4℃)可成功降解苯酚与邻甲酚^[11]。两个联苯降解模式菌株*Burkholderia cepacia* LB400与*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707被广泛研究。研究表明,菌株KF707对多氯联苯仅具有2,3-双加氧酶活性,而LB400则具有2,3或者3,4-双加氧酶活性。Suenaga等以这两个菌株的联苯双加氧酶大亚基(*bphA1*)为母体,采用DNA shuffling方法构建了多个嵌合*bphA1*基因,并获得同时具有2,3及3,4-双加氧酶活性的杂交菌株KF707-D34^[12]。在近期的研究中,他们利用两步同源重组,将菌株KF707的*bphA1*基因替换成上述的嵌合基因,多数杂交菌株表现出更高的多氯联苯降解活性及更广的底物范围^[13]。

2.2 芳环加氧酶在绿色化学合成领域的应用

生物催化具有高选择性、高反应速率及反应条件温和等优点,被认为是一种更绿色的合成途径。利用芳环羟化加氧酶定向选择性催化生成芳烃顺式二醇类物质的研究被大量开展。这些物质多是化工及医药行业的重要中间体,具有极大的市场应用价值^[14]。以靛蓝为例,靛蓝是一种广泛应用于印染、医药及食品工业的色素。截至2002年,全世界靛蓝生产量为2.2万吨/年,且需求量逐年上涨。研究证实:大多数芳烃降解菌均具有转化吲哚合成靛蓝的能力,该过程由其体内的芳环单加氧酶(如甲苯-4-单加氧酶与黄素蛋白单加氧酶)或双加氧酶(如萘双加氧酶与四氢化萘双加氧酶)催化完成,其反应途径如图2所示^[15-18]。吲哚同系物的微生物转化

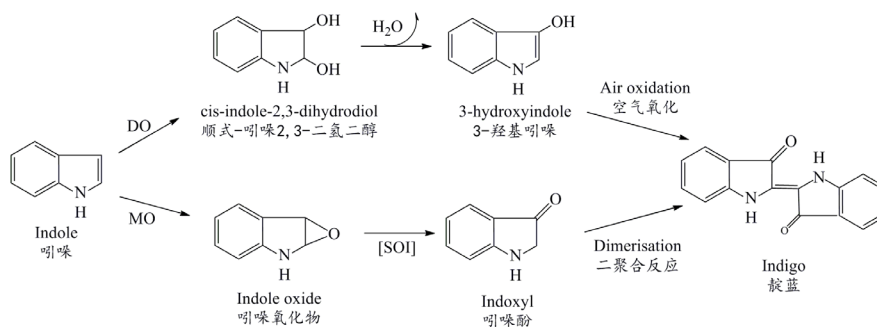


图2 微生物利用吲哚合成靛蓝的单加氧酶及双加氧酶途径

Fig. 2 Indigo production from indole by monooxygenase and dioxygenase from microbes

DO: 萘双加氧酶; MO: 苯乙烯单加氧酶; SOI: 苯乙烯氧化物异构酶

DO: naphthalene dioxygenase; MO: styrene monooxygenase; SOI: styrene oxide isomerase

也引起了研究人员的兴趣。Kim等利用来自*Pseudomonas* sp. KL28的多组分苯酚羟化酶催化20多种吲哚衍生物,合成了不同的靛蓝类色素,同时发现不同的底物可合成相同或不同的色素^[19]。2008年, Han等将*Methylophaga aminisulfivorans* MPT中的*fmo*基因克隆到大肠杆菌中,获得了能够以色氨酸为原料合成靛蓝的菌株,靛蓝最高产量可达920 mg/L^[20]。

此外,利用芳环加氧酶合成环氧化合物也有报道。环氧化合物是合成许多光学活性药物、农药及一些精细化学品的

重要前体物。近期,中国科学院成都生物研究所首次利用苯乙烯单加氧酶催化非共轭烯烃环氧化反应,合成的甘油类化合物可用于直接构建双手性中心及光学纯度优异的环境氧化合物^[21]。

2.3 芳环加氧酶在生物技术领域的应用

邻苯二酚是芳香化合物好氧降解过程的重要中间产物,其开环反应通常由邻苯二酚双加氧酶催化完成。邻苯二酚2,3-双加氧酶(C23O)的开环产物常常呈黄色,因此C23O

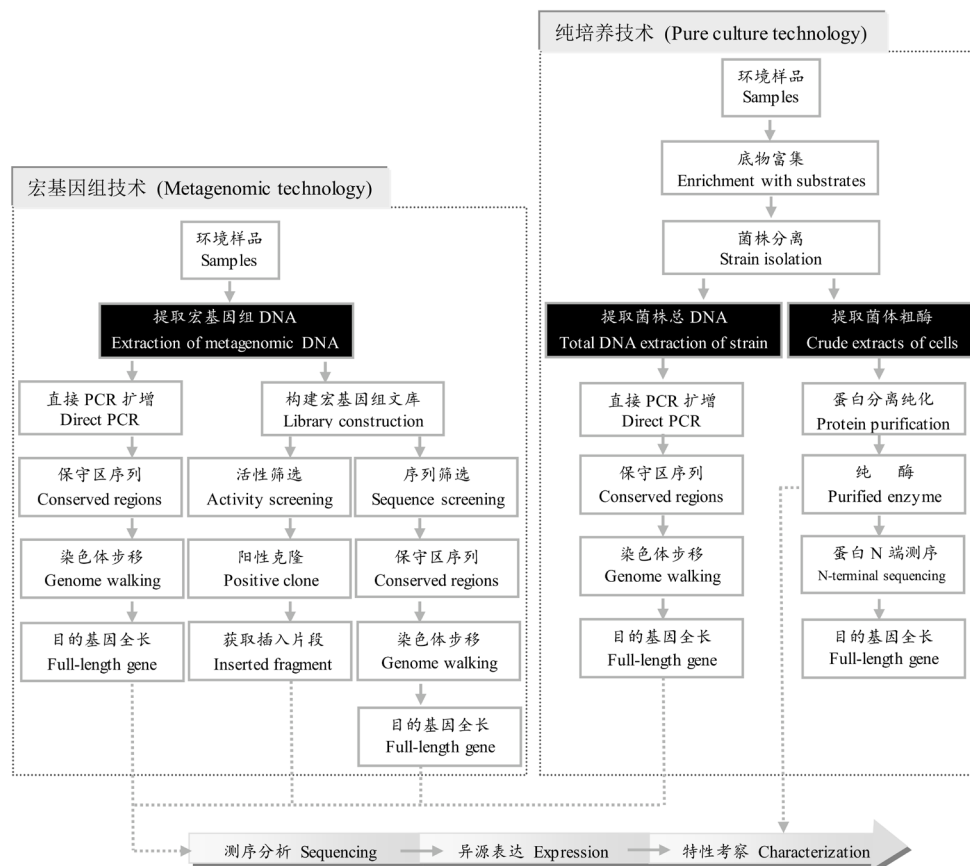


图3 芳环加氧酶不同筛选策略的操作流程图

Fig. 3 Different strategies for screening aromatic oxygenase

的编码基因在微生物学及生物工程中,常作为显色标记基因用于目标物的筛选与检测^[22]。山东大学吕鹏从洋葱伯克霍尔德氏菌L68中纯化到C23O,并成功构建邻苯二酚双加氧酶传感器,用于水体中痕量邻苯二酚的检测,检测限为0.05 mmol/L^[23]。

3 芳环加氧酶的获取策略

3.1 利用纯培养技术获取芳环加氧酶

微生物是芳环加氧酶的主要来源,因此分离微生物是获取芳环加氧酶的首要步骤。一直以来,研究者多利用纯培养技术(Pure culture technology)预先从环境样品中分离出能够利用芳香化合物的微生物菌种,再从其体内提取相关的芳环加氧酶。通常,从纯培养菌株中获取芳环加氧酶的策略有两种,如图3所示。一种为“基因—蛋白”途径,即首先设计引物,对菌落总DNA进行PCR扩增,获得芳环加氧酶基因的保守区序列,随后利用各种染色体步移技术(如TAIL-PCR,接头PCR,反向PCR等)克隆其基因全长,最后将该基因在大肠杆菌等宿主中进行异源表达,并从宿主中纯化出重组酶用作进一步研究^[24-25]。另一种为“蛋白—基因”途径,即利用各种蛋白分离纯化技术,直接从菌体粗酶中提取芳环加氧酶纯酶,随后测定纯酶N端序列,并根据该序列设计引物直接PCR或构建cDNA文库即可得到该酶的完整基因信息^[26-27]。相比之下,“基因—蛋白”策略直接快速,获得的芳环加氧酶基因经异源表达后,目的蛋白含量较大,纯化更加容易,尤其对含有标签的蛋白往往一次即可成功获得纯酶。对于直接分

离纯化菌体中的芳环加氧酶,由于野生菌所表达的蛋白成分复杂,往往需要多种色谱法联用才能保证加氧酶的完全纯化,工作量大且耗时较长,多适用于难以直接PCR扩增的真核微生物。

3.2 利用宏基因组技术获取芳环加氧酶

利用纯培养技术获得的各类芳环加氧酶信息,加深了研究者们对其生理生化特性、结构及反应机制的理解,并对其成功改造^[10]。然而研究者已经公认:由于难以模拟和重现微生物原始的生存条件,培养的困难导致人类所掌握的微生物多样性不到总数的1%,是巨大微生物资源的冰山一角^[28]。这种局限使得从微生物中筛选到的芳环加氧酶种类单一,重复率高,且新颖性不足,严重阻碍人们对其的认识及利用。如何更加充分、更深层次地发掘自然界蕴藏的微生物酶资源成为制备高效率、高活性微生物酶制剂的当务之急。新兴的宏基因组技术(Metagenomic technology)为芳环加氧酶的开发提供了崭新的思路。该技术避开传统的微生物分离培养过程,直接研究环境样品的宏基因组DNA(Metagenomic DNA,即总DNA),以获取未培养微生物的多样性信息及开发新型的微生物资源(如生物催化剂和活性物质),是环境微生物学的一个新的发展方向及研究热点^[29]。目前,国内外利用宏基因组技术开发的微生物资源主要集中在工业水解酶(如脂/酯酶、淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶)与抗生素两类,对新型芳环加氧酶的关注较少^[29-31]。

根据宏基因组技术的基本原理,环境样品宏基因组

表1 利用宏基因组技术获得的芳环加氧酶

Table 1 Aromatic oxygenases screened by metagenomic technology

环境样品 Sample	筛选目标物 Screening target	筛选对象 Screening resource	筛选方法 Screening method	筛选效率* Screening efficiency*	最高相似性** Highest similarity**	文献 Reference
土壤 Soil	苯乙烯单加氧酶 Styrene monooxygenase	质粒文库 Plasmid library	活性筛选 Activity screening	2/65000	< 50%	[32]
活性污泥 Activated sludge	外二醇双加氧酶 Extradiol dioxygenases	Fosmid文库 Fosmid library	活性筛选 Activity screening	91/96000	42%	[33]
土壤 Soil	外二醇双加氧酶 Extradiol dioxygenases	Fosmid文库 Fosmid library	活性筛选 Activity screening	235/87000	55%	[34]
土壤 Soil	P450单加氧酶 P450 monooxygenase	Fosmid文库 Fosmid library	序列筛选 Sequence screening	1/200000	70.6%	[35]
土壤 Soil	2,4-二氯酚羟化酶 2,4-dichlorophenol hydroxylase	质粒文库 Plasmid library	活性筛选 Activity screening	1个阳性克隆 One positive clone	< 48%	[36]
土壤 Soil	4-羟基苯丙酮酸双加氧酶 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Cosmid文库 Cosmid library	活性筛选 Activity screening	1/30000	< 58%	[37]
牛瘤胃 Bovine rumen	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	噬菌体表达文库 Phage expression library	活性筛选 Activity screening	1个阳性克隆 One positive clone	42%	[38]
土壤 Soil	漆酶 Laccase	质粒文库 Plasmid library	活性筛选 Activity screening	1/8000	42%	[39]
活性污泥 Activated sludge	4-硝基甲苯氧化酶 4-nitrotoluene-oxidizing enzyme	Fosmid文库 Fosmid library	活性筛选 Activity screening	6/40000	60%	[40]
活性污泥 Activated sludge	2,3-二羟基联苯1,2-双加氧酶 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase	宏基因组DNA Metagenomic DNA	直接PCR扩增 Direct PCR	——	99%	[41]

*筛选效率: 阳性克隆数与总克隆数的比值; **氨基酸序列最高同相似性

*Screening efficiency: the ratio of positive clones to total clones in the metagenomic library; ** Highest similarity of amino acid sequence

DNA是该技术的核心。提取宏基因组DNA后,获取芳环加氧酶的方式主要有2种,其操作流程如图3所示。一种方法是设计芳环加氧酶基因引物,对宏基因组DNA直接PCR扩增,其后续操作与纯培养方法的“基因—蛋白”途径相同。另一种方法是首先构建宏基因组文库,再从文库中筛选芳环加氧酶。这里的文库,是将宏基因组DNA经酶切后连接到合适的载体上,再转化到大肠杆菌等宿主中,所有宿主细胞的集合被称为宏基因组文库。文库的筛选方法包括活性筛选(Activity screening)与序列筛选(Sequence screening)。序列筛选以序列相似性为基础,根据已知功能基因的保守区序列设计探针/引物,对文库克隆进行杂交/PCR扩增,以获得阳性克隆。活性筛选也叫功能筛选,其原理为:文库中的阳性克隆可以表达目的性状,利用其在选择培养基上的表型特征(如显色、水解圈、抗性),或者利用生物化学手段分析其表达产物的物理特性(如荧光、结构)进行目标克隆的筛选。靛蓝产生法是最常用的芳环羟化加氧酶活性筛选方法,具有简单快捷的优点,它的原理为:大肠杆菌自身携带的色氨酸酶可将LB培养基中的色氨酸转化为吲哚,一旦大肠杆菌中插入的外源加氧酶基因实现表达,吲哚可在加氧酶的作用下生成靛蓝而使菌落呈蓝色,该法已成功用于文库中苯乙烯单加氧酶的鉴定^[32]。外二醇双加氧酶的活性筛选多以邻苯二酚为底物,该酶可催化邻苯二酚生成黄色的产物^[33-34]。对活性筛选获得的克隆子,直接测序插入的DNA片段,即可获得芳环加氧酶基因序列。迄今为止,从不同环境样品基因组中获得的芳环加氧酶信息如表1所示。

4 芳环加氧酶获取策略的评价

4.1 宏基因组技术与纯培养技术的综合评价

由于宏基因组技术的研究尚属新兴领域,其对芳环加氧酶的开发应用甚少。本节结合所获得的芳环加氧酶信息,对纯培养与宏基因组技术获取生物资源的过程进行初步的综合评价,从而为其它相关研究提供参考。

1) **基因信息量比较:**与宏基因组技术相比,纯培养技术一次只能针对某个特定微生物的基因组进行资源开发。而环境样品的宏基因组同时覆盖了几百Mb甚至Gb级的DNA容量,理论上包含几十到几百个原核基因组(按原核微生物基因组平均大小为5 Mb来计算),其中不乏纯培养技术难以培养的微生物^[32-41]。由此,宏基因组技术扩大了微生物资源的开发利用空间,更有机会筛选到新颖的芳环加氧酶基因。

2) **筛选通量及筛选效率比较:**虽然宏基因组技术避免了纯培养技术的菌株分离培养过程(图3),但其后续的文库筛选工作更加繁琐。尤其是序列筛选,由于需要对文库全部克隆进行芳环加氧酶基因的扩增或杂交,加上反复验证排除假阳性的过程,比纯培养技术具有更大的工作量。这对库容

高达百万个克隆的文库而言,无疑是一项巨大的工程。同时,筛选效率普遍低下也是宏基因组技术的主要瓶颈之一,阳性克隆率多在1/10 000左右^[42]。表1中外二醇双加氧酶的筛选效率相对较高,可能是由于它们分别分离自污水处理厂的活性污泥以及受燃料污染的土壤,这些环境样品中芳环加氧酶基因的丰度更高^[33-34]。而某些水体环境(如海洋沉积物)的微生物数量要远远低于陆地环境(如土壤),因此筛选工作量会更大。

有研究指出,对环境样品进行富集可以增加目标基因的丰度,从而提高文库的筛选效率。溴代脱氧尿苷富集、稳定同位素探针及底物诱导富集等方法已被用于增加文库中活性克隆的比例^[30]。此外,各种高通量筛选方法已被建立,如:微阵列、数字影像、SIGEX法,表面展示等,它们使得文库筛选更加快速、灵敏和准确^[31,43]。同时,随着测序技术的成熟及测序成本的降低,直接测序环境样品宏基因组已被广大研究者接受,必然会大大提高后期筛选的自动化水平及筛选效率。因此相对于难以实现自动化的纯培养技术,宏基因组技术将显现出更大的优势。

3) **时间与成本比较:**纯培养技术的时间与成本分别耗费在菌株的分离筛选及加氧酶的获取两个过程,远远低于宏基因组技术的花费。从资源的重复利用角度来讲,所构建的宏基因组文库可反复用于各种功能基因的筛选。相比之下,纯培养技术则需要重复地驯化筛选不同的菌株,以获得不同的功能基因。因此,尽管初期的文库构建工作投入成本较大,但若进行大批量开发,利用宏基因组技术获取微生物资源的单位成本并不高于纯培养方法。

4) **目的基因下游表达可行性比较:**有研究证明,由于外源基因的毒性、密码子偏好性以及使用不同的表达系统等问题,仅有40%的宏基因组基因能够在大肠杆菌中表达^[29]。例如,目前从宏基因组中共获得14个含淀粉酶的阳性克隆,但仅有4个被成功地表达及定性^[27]。因此,宏基因组来源的目的基因难以利用现有表达系统进行表达,从而阻碍了新型功能基因的实际应用,这也是宏基因组技术目前面临的最大瓶颈。

4.2 3种宏基因组筛选策略的综合评价

目前,宏基因组学技术中上游的文库构建策略已相对成熟,下游的筛选工作是整个宏基因组技术的主要限制性步骤。本节将对基于宏基因组技术的3种筛选策略:宏基因组直接PCR扩增,文库序列筛选及文库活性筛选进行比较。

1) **宏基因组直接PCR扩增:**图3显示,利用宏基因组直接PCR扩增比构建文库后筛选芳环加氧酶基因省时省力。但由于宏基因组DNA的复杂性,可能同时包含多个菌株的同一种类型的目的基因,使得采用染色体步移获得基因序列全长比从纯培养扩增更加困难,扩增后的序列分析也相对复杂,往

往不适于多组分芳环羟化酶的筛选,而且直接PCR获得基因的新颖性往往不足.但利用直接PCR技术可以快速地收集具有不同性质(如底物专一性、pH稳定性)的相似酶,从而构建具有实际工业应用价值的酶库^[45].

2) **文库序列筛选:** 基于PCR的序列筛选虽然直接快速,但其仅能获得目的基因的部分序列,且需要依靠染色体步移法继续获得基因全长;同时,PCR反应容易引起基因的突变,尤其催化中心关键位点的突变易降低或丧失酶活.尽管序列筛选到的序列含有目的基因的保守区,但它可能并不编码相应的目的蛋白,这也是序列筛选目前的最大瓶颈.

3) **文库活性筛选:** 研究者已公认:与序列筛选相比,活性筛选能获得更新颖的酶,但该方法要求功能基因必须在外源宿主中成功表达.多组分芳环羟化酶的异源表达比较困难,大多难以利用活性筛选获取.因此,与纯培养技术由于培养困难易丢失大量微生物信息一样,文库的活性筛选也会由于目的基因的低表达水平导致功能基因的遗漏.为了使活性筛选更加灵敏,Zhang等将土壤宏基因组DNA展示在T7噬菌体表面,成功筛选到聚酮化合物合成酶基因^[46].Li等构建了一种特殊的载体,该载体含有紫外光诱导型启动子,其下游插入了一段自溶基因,当宿主细胞经紫外灯照射时,会诱导自溶

基因表达使得宿主细胞自动裂解,释放出胞内酶,避免了细胞的破碎过程,从而可对文库快速地进行活性筛选^[47].

根据以上分析,对芳环加氧酶不同筛选策略的优缺点进行归纳总结,如表2所示.采用宏基因组技术获取芳环加氧酶时,对多组分芳环羟化酶而言,由于其异源表达比较困难,而利用宏基因组直接PCR获得的基因信息往往不够准确,因此文库序列筛选是较好的筛选策略;对于单组分芳环加氧酶,文库活性筛选及宏基因组直接PCR扩增策略均适用,但活性筛选可以获得更新颖的酶.不同的筛选策略具有各自的优缺点,实际操作中,需要根据筛选对象、实验条件及技术基础选择合适的筛选策略.

5 结 语

环境微生物中的芳环加氧酶在生物修复及化工合成领域具有极大的应用潜力.传统的纯培养技术及新兴的宏基因组技术是芳环加氧酶的主要获取方式.10多年的研究成果证明:与纯培养技术相比,宏基因组技术提高了人们对自然界微生物及其体内功能基因多样性的理解,同时赋予了开发未培养微生物资源的新视觉.但对新型微生物或功能基因的遗传性质、代谢特征、及功能的认识与表征又离不开纯培养技

表2 芳环加氧酶不同筛选策略的比较

Table 2 Comparison of different methods for discovery of aromatic oxygenases

筛选策略 Screening strategy	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
纯培养技术 Pure culture technology	▪ 获取目的基因较容易 Easy to obtain target gene ▪ 目的基因容易异源表达 Easy to express heterologously for target gene	▪ 获得的芳环加氧酶种类单一, 筛选重复率高 Aromatic oxygenases obtained with single type and high repetition rate ▪ 难获得未培养微生物中的功能基因 Hard to obtain the functional genes in uncultured microbes
纯培养与宏基因组技术 Pure culture and metagenomic technology	▪ 基因信息量大 Larger content of genetic information ▪ 获得的基因新颖性高 More opportunity to obtain novel gene ▪ 可获得未培养微生物的信息 Easy to exploit uncultured microbes ▪ 文库可重复利用 Library could be screened repeatedly	▪ 工作量大, 耗时, 成本高 Heavy work load, long time and high cost ▪ 筛选效率低下 Low screening efficiency ▪ 目的基因异源表达困难 Hard to express heterologously for target gene
宏基因组直接PCR Direct PCR from metagenome	▪ 筛选快速直接 Direct and quick screening	▪ 扩增全长困难, 不适于多组分加氧酶的筛选 Hard to PCR whole gene, and not suitable for screening multi-component oxygenases ▪ 获得的基因新颖性不足 Less opportunity to obtain novel gene
宏基因组筛选策略 Metagenomic methods	文库活性筛选 Activity screening from library	▪ 筛选快速 Quick screening ▪ 获得的基因新颖性高 More opportunity to obtain novel gene ▪ 不适于筛选低表达或不表达的酶 Not suitable for screening the enzymes with low or no expression
	文库序列筛选 Sequence screening from library	▪ 不受酶表达的限制, 灵敏 Sensitiveness and no limitation of enzyme expression ▪ 可获得具有相似特性的酶 Could obtain enzymes with similar characters ▪ 不能获得完整的基因片段 Could not obtain the complete gene ▪ 获得的基因新颖性不足 Less opportunity to obtain novel gene

术的参与。未来,传统的纯培养技术与宏基因组技术将有机结合,与蓬勃发展的各种组学技术一起,共同促进微生物学研究的前进。本文章虽然首次对纯培养及宏基因组技术的不同筛选策略进行了综合评价,但由于没有可供参考的文献,同时宏基因组技术目前尚不成熟,因此评价结果的合理性及适用范围有待于进一步验证。

References

- Samanta SK, Singh OV, Jain RK. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trend Biotechnol*, 2002, **20** (6): 243~248
- Sun Y (孙艳), Qian SJ (钱世钧). Advance on the studies of biodegradation of aromatic compounds. *Process Biotechnol*, 2001, **21** (1): 42~45
- Zhang J (章俭), Xia CG (夏春谷). Studies of structure and function of aromatic hydrocarbon dioxygenases. *Prog Chem*, 2004, **16** (1): 116~122
- Hayaishi O, Katagiri M, Rothberg S. Mechanism of the pyrocatechase reaction. *J Am Chem Soc*, 1955, **77** (20): 5450~5451
- Mason HS, Fowlks WL, Peterson E. Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J Am Chem Soc*, 1955, **77** (10): 2914~2915
- Burton SG. Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol*, 2003, **21** (12): 543~549
- Zhang Q (张强), Qu YY (曲媛媛), Zhou JT (周集体), Gou M (苟敏), Pi WQ (皮文清). Advances in hydroxylation of aromatic compounds with oxygenase. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2009, **15** (4): 540~545
- Qu YY (曲媛媛), Zhou JT (周集体), Wang J (王竞). Research advances of bacterial Rieske non-heme iron dioxygenase. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (2): 260~263
- Ashikawa Y, Fujimoto Z, Noguchi H, Habe H, Omori T, Yamane H, Nojiri H. Electron transfer complex formation between oxygenase and ferredoxin components in Rieske nonheme iron oxygenase system. *Structure*, 2006, **14** (12): 1779~1789
- Furukawa K. Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11** (3): 244~249
- Siani L, Papa R, Donato DA, Sannia G. Recombinant expression of toluene *o*-xylene monooxygenase (ToMO) from *Pseudomonas stutzeri* OX1 in the marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *J Biotechnol*, 2006, **126** (3): 334~341
- Suenaga H, Nishi A, Watanabe T, Sakai M, Furukawa K. Engineering a hybrid pseudomonad to acquire 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87** (4): 430~435
- Suenaga H, Nonaka K, Fujihara H, Goto M, Furukawa K. Hybrid pseudomonads engineered by two-step homologous recombination acquire novel degradation abilities toward aromatics and polychlorinated biphenyls. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **88**: 915~923
- Gibson DT, Parales RE. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11** (3): 236~243
- Pathak H, Madamwar D. Biosynthesis of indigo dye by newly isolated naphthalene-degrading strain *Pseudomonas* sp. HOB1 and its application in dyeing cotton fabric. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, **160** (6): 1616~1626
- Moreno-Ruiz E, Hernaez MJ, Martinez-Perez O, Santero E. Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolita* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *J Bacteriol*, 2003, **185** (6): 2026~2030
- McClay K, Boss C, Keresztes I, Steffan RJ. Mutations of toluene-4-monooxygenase that alter regiospecificity of indole oxidation and lead to production of novel indigoid pigments. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (9): 5476~5483
- Choi HS, Kim JK, Cho EH, Kim YC, Kim JL, Kim SW. A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga* sp. strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **306**: 930~936
- Kim JY, Kim JK, Lee SO, Kim CK, Lee K. Multicomponent phenol hydroxylase-catalysed formation of hydroxyindoles and dyestuffs from indole and its derivatives. *Lett Appl Microbiol*, 2005, **41** (2): 163~168
- Han GH, Shin HJ, Kim SW. Optimization of bio-indigo production by recombinant *E. coli* harboring *fmo* gene. *Enzyme Microb Technol*, 2008, **42** (7): 617~623
- Lin H, Qiao J, Liu Y, Wu ZL. Styrene monooxygenase from *Pseudomonas* sp. LQ26 catalyzes the asymmetric epoxidation of both conjugated and unconjugated alkenes. *J Mol Catal B Enzym*, 2010, **67** (3~4): 236~241
- Liang QF (梁泉峰), Chen M (陈明), Xu YQ (徐玉泉), Zhang W (张维), Ping SZ (平淑珍), Lu W (陆伟), Song XL (宋先龙), Wang WW (王薇薇), Geng LZ (耿立召), Masahiro Takeo, Lin M (林敏). 转座元件介导的苯胺代谢基因簇的筛选和鉴定. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2005, **50** (16): 1720~1724
- Lü P (吕鹏), Shi JG (史建国), Feng D (冯东), Zhuang Z (庄重), Wang JC (王建传), Ling JY (凌建亚), Zhang CK (张长铠). Studies on the catechol dioxygenase sensor. *Chin Environ Sci* (中国环境科学), 2005, **25** (4): 491~493
- Liu L, Schmid RD, Urlacher VB. Cloning, expression, and characterization of a self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44319. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006,

- 72 (5): 876~882
- 25 Zhou HW (周宏伟), Zhou MJ (周美娟). Cloning and functional study of a novel aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase gene. *J South Med Univ*, 2007, **27** (5): 717~719
 - 26 Divari S, Valetti F, Caposio P, Pessione E, Cavaletto M, Griva E, Gribaudo G, Gilardi G, Giunta C. The oxygenase component of phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Eur J Biochem*, 2003, **270** (10): 2244~2253
 - 27 Iwagami SG, Yang K, Davies J. Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp. strain 2065. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (4): 1499~1508
 - 28 Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol*, 2004, **7** (5): 492~498
 - 29 Schmeisser C, Steele H, Streit WR. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75** (5): 955~962
 - 30 Schloss PD, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14** (3): 303~310
 - 31 Lorenz P, Liebeton K, Niehaus F, Eck J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13** (6): 572~577
 - 32 van Hellemond EW, Janssen DB, Fraaije MW. Discovery of a novel styrene monooxygenase originating from the metagenome. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73** (18): 5832~5839
 - 33 Suenaga H, Ohnuki T, Miyazaki K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environ Microbiol*, 2007, **9** (9): 2289~2297
 - 34 Brennerova MV, Josefiova J, Brenner V, Pieper DH, Junca H. Metagenomics reveals diversity and abundance of *meta*-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environ Microbiol*, 2009, **11** (9): 2216~2227
 - 35 Kim BS, Kim SY, Park J, Park W, Hwang KY, Yoon YJ, Oh WK, Kim BY, Ahn JS. Sequence-based screening for self-sufficient P450 monooxygenase from a metagenome library. *J Appl Microbiol*, 2007, **102** (5): 1392~1400
 - 36 Lu Y, Yu Y, Zhou R, Sun W, Dai CY, Wan P, Zhang LY, Hao DY, Ren HJ. Cloning and characterisation of a novel 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a metagenomic library derived from polychlorinated biphenyl-contaminated soil. *Biotechnol Lett*, 2011, **33** (6): 1159~1167
 - 37 Lee CM, Yeo YS, Lee JH, Kim SJ, Kim JB, Han NS, Koo BS, Yoon SH. Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **370** (2): 322~326
 - 38 Belouqui A, Pita M, Polaina J, Martínez-Arias A, Golyshina OV, Zumárraga M, Yakimov MM, García-Arellano H, Alcalde M, Fernández VM, Elborough K, Andreu JM, Ballesteros A, Plou FJ, Timmis KN, Ferrer M, Golyshin PN. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *J Biol Chem*, 2006, **281** (32): 22933~22942
 - 39 Ye M, Li G, Liang WQ, Liu YH. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **87** (3): 1023~1031
 - 40 Kimura N, Sakai K, Nakamura K. Isolation and characterization of a 4-nitrotoluene-oxidizing enzyme from activated sludge by a metagenomic approach. *Microbes Environ*, 2010, **25** (2): 133~139
 - 41 Gou M, Qu YY, Xu BW, Zhou JT, Li XL, Zhou H. Isolation, characterization and docking studies of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from an activated sludge metagenome. *Biotechnol Lett*, doi 10.1007/s10529-011-0738-x
 - 42 Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol*, 2004, **6** (9): 981~989
 - 43 Uchiyama T, Watanabe K. Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries. *Nat Protoc*, 2008, **7** (3): 1202~1212
 - 44 Gabor EM, Alkema WB, Janssen DB. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ Microbiol*, 2004a, **6** (9): 879~886
 - 45 Kotik M. Novel genes retrieved from environmental DNA by polymerase chain reaction: current genome-walking techniques for future metagenome applications. *J Biotechnol*, 2009, **144** (2): 75~82
 - 46 Zhang KY, He J, Yang M, Yen M, Prof JY. Identifying natural product biosynthetic genes from a soil metagenome by using T7 phage selection. *Chembiochem*, 2009, **10** (16): 2599~2606
 - 47 Li S, Xu LH, Hua H, Ren C, Lin ZL. A set of UV-inducible autolytic vectors for high throughput screening. *J Biotechnol*, 2007, **127** (4): 647~652