

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 21620141152462 UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

新鞘氨醇杆菌 US6-1 *tonB2* 基因缺失株  
的构建与功能研究

Construction and functional analysis of *tonB2* gene deletion  
mutant in *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1

赵卫军

指导教师姓名: 田蕴教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2017年06月

论文答辩时间: 2017年05月

学位授予日期: 2017年07月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2017年05月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要 .....	1
Abstract .....	3
第一章 前言 .....	5
1 多环芳烃简介 .....	5
1.1 多环芳烃的来源和分布 .....	5
1.2 多环芳烃的危害 .....	7
1.3 多环芳烃的生物降解 .....	8
2 TonB 转运系统概述 .....	10
2.1 TonB 系统的结构与功能 .....	10
2.2 TonB 蛋白作用机制模型 .....	13
2.3 TBDTs 的物质转运与调控 .....	16
2.4 TBDTs 在细菌中的分布 .....	18
3 新鞘氨醇杆菌 US6-1 研究进展 .....	19
3.1 新鞘氨醇杆菌 US6-1 简介 .....	19
3.2 鞘氨醇属细菌基因敲除研究 .....	21
4 本文的研究内容和意义 .....	23
第二章 材料与amp;方法 .....	26
1 材料 .....	26
1.1 实验菌株、质粒 .....	26
1.2 培养基 .....	26
1.3 药品试剂 .....	27
1.4 主要仪器 .....	27
1.5 主要分析软件 .....	28
2 基本方法 .....	28
2.1 <i>tonB</i> 基因的表达量分析 .....	28
2.2 <i>tonB</i> 基因缺失株的构建 .....	31
2.3 <i>tonB</i> 基因缺失株生物学特性研究 .....	37

<b>第三章 结果与分析</b> .....	<b>40</b>
<b>1 新鞘氨醇杆菌 US6-1 <i>tonB</i> 基因序列分析</b> .....	<b>40</b>
<b>2 新鞘氨醇杆菌 US6-1 <i>tonB</i> 基因表达量分析</b> .....	<b>44</b>
2.1 qPCR 基因选择与引物设计 .....	44
2.2 <i>tonB</i> 基因相对表达量分析 .....	44
<b>3 新鞘氨醇杆菌 US6-1 <i>tonB</i> 基因缺失菌株构建</b> .....	<b>46</b>
3.1 <i>tonB</i> 基因上下游同源序列的克隆与连接 .....	46
3.2 敲除载体的构建.....	46
3.3 三亲杂交及单交换子筛选.....	47
3.4 双交换子及基因缺失菌株的筛选验证.....	49
<b>4 缺失株 US6-1 <math>\Delta tonB2</math> 生物学特性研究</b> .....	<b>49</b>
4.1 缺失株 US6-1 $\Delta tonB2$ 生长曲线的测定 .....	49
4.2 缺失株 US6-1 $\Delta tonB2$ 对 Phe 的降解 .....	50
4.3 缺失株 US6-1 $\Delta tonB2$ 对 BaP 的降解 .....	52
4.2 缺失株 US6-1 $\Delta tonB2$ 生物膜形成能力测定 .....	52
<b>第四章 讨论</b> .....	<b>56</b>
<b>1 新鞘氨醇杆菌 US6-1 基因组、转录组分析</b> .....	<b>56</b>
<b>2 新鞘氨醇杆菌 US6-1 基因敲除研究</b> .....	<b>59</b>
<b>3 缺失株 US6-1 <math>\Delta tonB2</math> 的生物学特性</b> .....	<b>61</b>
<b>第五章 结论与展望</b> .....	<b>63</b>
<b>1 结论</b> .....	<b>63</b>
<b>2 展望</b> .....	<b>64</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>65</b>
<b>附录</b> .....	<b>82</b>
<b>致谢</b> .....	<b>84</b>

---

## Contents

<b>Abstract (in Chinese)</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract (in English)</b> .....	<b>3</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>5</b>
<b>1 A brief introduction of PAHs</b> .....	<b>5</b>
1.1 Sources and distribution of PAHs .....	5
1.2 The harmfulness of PAHs .....	7
1.3 Bioremediation of PAHs .....	9
<b>2 Summarize of TonB-dependent transport system</b> .....	<b>10</b>
2.1 Structure and function of TonB system.....	13
2.2 Models for TonB activity .....	16
2.3 TonB-dependent transport and regulation.....	18
2.4 Distribution of TBDTs in bacteria .....	19
<b>3 Advances in <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1</b> .....	<b>19</b>
3.1 Brief introduction of US6-1 .....	21
3.2 Gene knockout research on <i>Sphingomonads</i> .....	23
<b>4 Objectives and signifiace of this study</b> .....	<b>26</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods</b> .....	<b>26</b>
<b>1 Materials</b> .....	<b>26</b>
1.1 Strains and plasmids .....	26
1.2 Media .....	27
1.3 Reagents .....	27
1.4 Equipments .....	28
1.5 Main software .....	28
<b>2 Methods</b> .....	<b>28</b>
2.1 Analysis of <i>tonB</i> gene expression .....	31
2.2 Construction of <i>tonB</i> deletion mutant .....	37

2.3 Biological characters of <i>tonB</i> deletion mutant.....	40
<b>Chapter 3 Results and analysis.....</b>	<b>40</b>
<b>1 US6-1 <i>tonB</i> gene sequence analysis .....</b>	<b>44</b>
<b>2 US6-1 <i>tonB</i> gene expression analysis.....</b>	<b>44</b>
2.1 Primer design for qPCR.....	44
2.2 Relative expression of <i>tonB</i> gene.....	46
<b>3 Inactivation of <i>tonB</i> gene in US6-1.....</b>	<b>46</b>
3.1 Amplification of <i>tonB</i> flanking sequences.....	46
3.2 Construction of the knockout vector.....	47
3.3 Triparental mating and selection of first recombination event .....	49
3.4 The selection of second recombination event.....	49
<b>4 Biological characters analysis of the mutant US6-1<math>\Delta</math><i>tonB2</i>.....</b>	<b>49</b>
4.1 Growth curve of US6-1 $\Delta$ <i>tonB2</i> .....	50
4.2 Biodegradation of Phe by US6-1 $\Delta$ <i>tonB2</i> .....	52
4.3 Biodegradation of BaP by US6-1 $\Delta$ <i>tonB2</i> .....	52
4.4 Biofilm formation by US6-1 $\Delta$ <i>tonB2</i> .....	56
<b>Chapter 4 Discussion.....</b>	<b>56</b>
<b>1 Genome and transcriptome analysis .....</b>	<b>58</b>
<b>2 Analysis of US6-1 gene knockout strategy .....</b>	<b>61</b>
<b>3 Biological characters of <i>tonB</i> deletion mutant .....</b>	<b>63</b>
<b>Chapter 5 Conclusion and Perspective .....</b>	<b>63</b>
<b>1 Conclusions.....</b>	<b>63</b>
<b>2 Perspectives .....</b>	<b>64</b>
<b>References.....</b>	<b>65</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>82</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>84</b>

## 摘要

*Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 是一株筛选自 Ulsan 海湾沉积物的革兰氏阴性菌，能高效降解 2 环至 5 环的 PAHs。链特异转录组测序发现，苯并芘 (BaP) 压力下共有 13 个 TonB 系统相关基因表达水平显著上调，为揭示 TonB 系统在菌株 US6-1 应对 BaP 压力中的作用，我们以 TonB 系统中的关键基因 *tonB* 为研究对象，在基因组序列分析和实时荧光定量 PCR 分析的基础上通过自杀性质粒同源重组的方法构建了新鞘氨醇杆菌 US6-1 *tonB* 基因缺失菌株，并对 *tonB* 基因缺失株的生物学特性展开了研究，主要研究结果如下：

(1) 基因组序列的分析结果表明菌株 US6-1 有 4 个 *tonB* 基因，我们分别将其称为 *tonB1*、*tonB2*、*tonB3* 和 *tonB4*。*tonB3* (JI59\_RS10120) 处于 *tonB3* (JI59\_RS10120) /*exbD1* (JI59\_RS10130) / *exbD2* (JI59\_RS10135) /*motA* (JI59\_RS10125) 基因簇中；*tonB1* (JI59\_RS03025)，*tonB2* (JI59\_RS06215) 和 *tonB4* (JI59\_RS15490) 以单顺反子的形式存在，其侧翼没有发现 *exbB/exbD* 或其同源基因，这 3 个 *tonB* 基因可能是通过直接与相应的 TonB 依赖性受体相互作用而发挥相应的生物学功能。

(2) 氨基酸序列分析表明 *tonB3* 与 *tonB1*、*tonB2*、*tonB4* 基因编码氨基酸之间的同源性分别为 18.58%、23.04%、23.96%，两个 *exbD* 基因编码氨基酸之间的同源性为 24%；值得注意的是菌株 US6-1 基因组中有 43 个 TonB 依赖性受体蛋白编码基因，它们之间的氨基酸同源性为 10%~60.47%。

(3) 多重序列比对分析显示 4 个 TonB 蛋白的 C 末端结构域都具有“YP”基序，除 TonB4 外其他 3 个 TonB 蛋白都具有“SSG”基序；对 TonB 蛋白的 C 末端序列进行三维结构预测发现 TonB1、TonB2、TonB3 和 TonB4 的 C 末端结构域均由 2 个  $\alpha$  螺旋和 3 个  $\beta$  折叠片构成。

(4) 在以 BaP 为唯一碳源和不添加任何碳源的条件下，通过实时荧光定量 PCR 跟踪 BaP 胁迫和饥饿压力下 *tonB* 基因的表达差异。结果显示：饥饿处理 4d 后，基因 *tonB1*、*tonB3*、*tonB4* 的表达水平显著上调且明显高于 BaP 处理 4d 后该基因的表达水平；BaP 处理 2d、6d 后，基因 *tonB2* 表达水平显著上调且明显



高于饥饿处理组中该基因的表达水平。我们推测基因 *tonB2* 与菌株 US6-1 响应 BaP 压力有关，而基因 *tonB1*、*tonB3*、*tonB4* 可能参与了菌株 US6-1 的饥饿应答过程。

(5) 本研究通过自杀性质粒同源重组的方法构建了菌株 US6-1 *tonB2* 基因的缺失菌株 US6-1 $\Delta$ *tonB2*，并对缺失株的生物学特性进行了初步研究。结果表明，*tonB2* 基因的缺失对菌株 US6-1 $\Delta$ *tonB2* 的生长并没有影响，与 US6-1 相比缺失株 US6-1 $\Delta$ *tonB2* 对菲 (Phe) 和 BaP 的降解能力显著下降，由此可知基因 *tonB2* 在菌株 US6-1 降解多环芳烃的过程中扮演重要角色。此外，缺失株 US6-1 $\Delta$ *tonB2* 的生物膜形成能力显著增强。

**关键词：**新鞘氨醇杆菌；TonB 蛋白；实时定量 PCR；基因敲除

---

## Abstract

*Novosphingobium pentaromativorans* US6-1, a marine bacterium isolated from muddy sediment of Ulsan Bay, Republic of Korea, is a gram-negative bacterium, which can effectively degrade polycyclic aromatic hydrocarbons that have two to five benzene rings. Strand-specific RNA sequencing show that 13 TonB system-related genes significantly upregulated under BaP stress. In order to reveal the response of TonB system to BaP stress in strain US6-1, the key gene *tonB* in TonB system was studied. Based on the genomic sequence analysis and real-time quantitative PCR analysis, *tonB* gene deletion mutant of US6-1 was constructed by homologous recombination of suicide plasmids, and the biological characters of *tonB* gene-deleted strain was studied. The main results are as follows:

(1) Genome analysis revealed the locations of 4 hypothetical *tonB* genes in the *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 genome. We termed them *tonB1*, *tonB2*, *tonB3* and *tonB4* respectively. The *tonB3* (JI59\_RS10120) gene is organized into operon with *exbD1* (JI59\_RS10130) / *exbD2* (JI59\_RS10135) / *motA* (JI59\_RS10125) genes. *tonB1* (JI59\_RS03025), *tonB2* (JI59\_RS06215) and *tonB4* (JI59\_RS15490) exist in the form of monocistronic copy, with no flanking *exbB/exbD* or its homologous genes were detected. These three *tonB* genes may interact directly with corresponding TonB-dependent receptors to accomplish a certain biological function.

(2) The amino acid sequence analysis shows that the homology of the 4 TonB amino acids is 13.28 % to 23.96 %, and the multiple sequence alignment shows that 4 TonB proteins all contain a motif called “YP”, and that they all contain a motif called “SSG” except TonB4. We can find by tertiary structure prediction that carboxyl terminal domains of TonB1, TonB2, TonB3 and TonB4 all contain 2  $\alpha$ -helixes and 3  $\beta$ -pleated sheets.

(3) The result of quantitative PCR shows that the gene expression level of *tonB1*, *tonB3* and *tonB4* increase significantly after 4-day starvation, and the level is higher than that after 4-day in BaP treatment. The expression level of *tonB2* increases greatly

after 2-day or 6-day under BaP treatment, and it is notably higher than that under starvation. Thus, we predict that *tonB2* is related to the response of US6-1 to the pressure of BaP, while *tonB1*, *tonB3* and *tonB4* may be involved in the response to starvation.

(5) In this study, *tonB2* gene was deleted by homologous recombination of suicide plasmids, to generate the mutant US6-1 $\Delta$ *tonB2*, and then the biological characters of US6-1 $\Delta$ *tonB2* were studied. The results show that inactivation of *tonB2* had no significant effects on the growth of US6-1 $\Delta$ *tonB2*; Biodegradation rate of Phe and BaP by US6-1 $\Delta$ *tonB2* were significantly impaired, suggesting that *tonB2* plays an important role in PAHs degradation. On the other hand, *tonB2* deletion in US6-1 remarkably enhanced biofilm formation.

**Keywords:** *Novosphingobium*; TonB protein; qPCR; gene knockout

## 第一章 前言

### 1 多环芳烃简介

#### 1.1 多环芳烃的来源和分布

多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是煤、石油、木材等有机物不完全燃烧时产生的碳氢化合物,通常由两个或两个以上的苯环通过线性排列、弯接、簇聚等方式(如图 1.1)构成<sup>[1, 2]</sup>。多环芳烃种类繁多,其中有相当部分具有致癌性,如苯并芘、苯并葱等<sup>[3]</sup>。常温下多环芳烃为无色、白色或者淡黄色的固体有机物,它们具有高熔点、高沸点、低蒸气压、低水溶性的特点,随着分子质量的增加其蒸气压、抗氧化还原能力增加,水溶性降低<sup>[4, 5]</sup>。此外,多环芳烃还表现出了光敏感性、热稳定性、导电性等特征<sup>[6]</sup>。多环芳烃拥有非常典型的紫外吸收光谱,每一种多环芳烃都有其特征性的紫外吸收光谱,这对于多环芳烃的检测、鉴定非常重要。

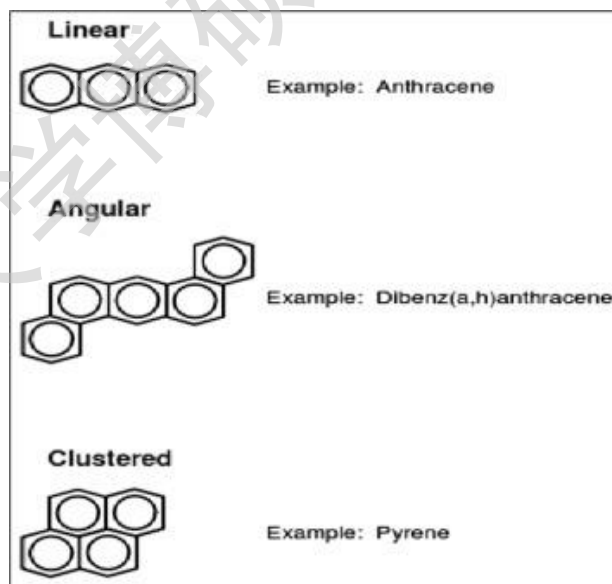


图 1.1 多环芳烃分子苯环排列方式<sup>[1, 2]</sup>

Figure 1.1 Molecular arrangement of the polycyclic aromatic hydrocarbons<sup>[1, 2]</sup>

资料来源: Baklanov, A., , A. Integrated systems for forecasting urban meteorology, air pollution and population exposure. 2007 Douben, P.E., PAHs: an ecotoxicological perspective. 2003

虽然多环芳烃种类繁多，但人们所关注的多环芳烃的种类是非常有限的，通常是 14-20 种多环芳烃<sup>[7]</sup>。多环芳烃的苯环之间拥有两个或两个以上的共用碳原子，共用碳原子数目小于等于 6 个的多环芳烃被认为是小分子多环芳烃，共用碳原子数目大于 6 个的多环芳烃被认为是大分子多环芳烃，大部分研究主要集中在小分子多环芳烃上，国际癌症研究机构认为最小的多环芳烃是菲和葱，它们的苯环之间都有 3 个共用的碳原子<sup>[3]</sup>。

多环芳烃的来源可分为 3 种类型：高温热解、造岩作用和生物活动，其中生物活动是多环芳烃的主要来源。当有机物在低氧或者无氧的条件下暴露于高温环境中，就会因有机物不完全燃烧而产生多环芳烃。有目的的高温裂解作用包括煤干馏成焦炭和煤焦油，石油残渣热裂解成更轻的碳氢化合物等过程。此外，还存在无意的高温裂解作用，如机车燃料的不完全燃烧，森林大火或壁炉中木材的不完全燃烧，供暖系统中石油燃料的不完全燃烧。高温热解作用在 350℃ 到 1200℃ 都有发生。多环芳烃也可以在较低的温度下产生，如石油中的多环芳烃是在 100℃-150℃ 的温度下经过上百万年的时间形成的<sup>[7]</sup>。

在原油成熟或者类似的过程中产生的多环芳烃被称为因造岩作用而产生的多环芳烃，此类多环芳烃主要是原油或原油制品在运输、储存、使用的过程中产生的，包括淡水或海水溢油、储油罐渗漏、天然气以及机车用油的挥发。众所周知，多环芳烃会在有机物的不完全燃烧中产生，其实在石油制品中也有多环芳烃存在。此外，多环芳烃也可在生物代谢的过程中产生，某些植物或细菌在生长或降解营养物质的过程中也会产生多环芳烃。多环芳烃的来源也可分为天然来源和人类活动产生两种。天然来源的多环芳烃包括森林大火、火山喷发、细菌或藻类合成、石油渗漏等；人类活动产生多环芳烃主要是焚化炉或工业生产中有有机物的不完全燃烧，其次是汽车尾气、火炉燃烧、飞机尾气、香烟烟雾和烧烤，其他的来源还有石油制品渗漏、下水污泥、杂酚油废料。自然环境或人类活动中有机物的不完全燃烧是多环芳烃的主要来源<sup>[8-10]</sup>。

大气是多环芳烃扩散的主要媒介，大气中的多环芳烃主要来自于有机物的不完全燃烧，城市大气中的多环芳烃的浓度比农村的高。大气中的多环芳烃以气相和固相两种形式存在，以固相形式存在的多环芳烃吸附于大气中的颗粒物上<sup>[11-13]</sup>。疏水性的多环芳烃具有较低的蒸气压，这使得它们比具有更高蒸气压的物质（如

苯)更容易与空气中的颗粒物结合<sup>[14]</sup>。不同多环芳烃蒸气压的不同导致了不同多环芳烃在气相和固相中分配比例的不同<sup>[15]</sup>。

大气中的多环芳烃通过湿沉降和干沉降过程不断沉积在地球表面。沉降在地表的多环芳烃有些来自于汽车尾气排放,另外一些则由大气从很远的地方携带而来。多环芳烃也可继续吸附到已结合多环芳烃的土壤颗粒上。一旦多环芳烃沉积到地球表面它们就可以移动。由于地表的大多数多环芳烃都与土壤颗粒结合<sup>[9, 16]</sup>,因此影响多环芳烃运动的主要因素是土壤颗粒大小和土壤颗粒上孔径的大小<sup>[17]</sup>。如果吸附多环芳烃的土壤颗粒不能运动,那么被吸附的多环芳烃的运动就会受到限制。多环芳烃与土壤颗粒的结合效果取决于多环芳烃和土壤颗粒两者的性质。

多环芳烃会通过与其在大气中多环芳烃的沉降相似的机制逐渐沉降到沉积环境中。与大气中颗粒物结合的多环芳烃通过干沉降和湿沉降过程沉降到湖泊、溪流和海洋的表面,这些多环芳烃随着水流不断分散最终汇入沉积物中。位于市区沉积物中的多环芳烃受大气中多环芳烃的影响,它们还会汇集来自雨水、下水道污水和路面径流的多环芳烃。多环芳烃汇入沉积物后就不能再运动,这是因为多环芳烃的非极性性质抑制了它们在水中的溶解。当然多环芳烃并非完全不能溶于水,尤其是那些小分子量的多环芳烃,因此总会有少量的多环芳烃溶于水中并被生物利用<sup>[18]</sup>。

## 1.2 多环芳烃的危害

多环芳烃对水生生物的毒性受代谢和光氧化作用的影响,通常在紫外光下它们拥有更强的毒性。多环芳烃对水生生物和鸟类表现出中度到高度毒性。土壤中的多环芳烃对陆生无脊椎动物并没有表现出毒害作用,除非土壤已被严重污染。多环芳烃会对生物体的繁殖、发育和免疫产生不利影响。哺乳动物摄入多环芳烃的方式多种多样,包括呼吸、接触和摄食<sup>[18-20]</sup>。植物可以通过根系吸收多环芳烃并转运至其他部位,吸收速率受多环芳烃浓度、水溶性、物理化学状态以及土壤特性的影响,多环芳烃引起的植物毒害作用是非常少见的。某些植物能够抵抗多环芳烃的危害,而另一些植物则可合成多环芳烃作为生长激素<sup>[20]</sup>。多环芳烃可在环境中持久存在并通过生物链富集。陆生无脊椎动物中也发现了多环芳烃的生物富集现象,不过多环芳烃的降解足以防止生物放大<sup>[21]</sup>。

不同多环芳烃对人体的危害并不相同,国际癌症研究机构将多环芳烃分为确定人类致癌物、可疑人类致癌物和可能人类致癌物,它们分属 1、2A 和 2B 族<sup>[3]</sup>。苯并芘属于确定人类致癌物,萘、屈、苯并蒽、苯并荧蒽属于可能人类致癌物。多环芳烃对人类的危害与接触多环芳烃的途径、接触时间、多环芳烃的浓度和毒性有关,此外还与接触者的健康状况和年龄有关<sup>[22]</sup>。职业性接触高浓度多环芳烃会导致眼睛发炎、恶心、呕吐、腹泻和精神混乱<sup>[23]</sup>,然而现在并不清楚是哪一种多环芳烃引起了这些症状,或者这些症状是由通常与多环芳烃共存的其他化合物引起的。长期接触多环芳烃会导致人体免疫功能下降、白内障、肝肾损伤、呼吸问题、哮喘类症状和肺功能异常,频繁地皮肤接触多环芳烃可能引起红斑和皮肤炎症,如果大量吸入或者摄入萘则会引起红细胞破裂<sup>[24-26]</sup>。

虽然多环芳烃本身也有毒性,但其危害主要是由多环芳烃的活性代谢物(如环氧化物和二氢二醇衍生物)与细胞蛋白和 DNA 结合造成的<sup>[27]</sup>。生物化学破坏和细胞损伤最终导致突变、发育畸形、肿瘤和癌症。对长期接触多环芳烃的职业工作者进行研究发现,长期接触多环芳烃增加了他们罹患皮肤癌、肺癌、膀胱癌和肠胃癌的风险<sup>[28]</sup>。苯并芘是第一个发现的化学致癌物,它也是导致动物癌症的最常见的多环芳烃<sup>[29]</sup>。

实验证明多环芳烃能够抑制啮齿动物的免疫反应,但多环芳烃引起免疫抑制的具体机制目前还不清楚。多环芳烃引起的免疫抑制可能会使机体罹患癌症或感染其他疾病。免疫作用的增强会使免疫细胞分泌更多的细胞因子从而引发炎症,在特定情况下炎症会引发肿瘤、过敏反应和自身免疫反应<sup>[29]</sup>。多环芳烃本身并不具有基因毒性,只有多环芳烃被代谢为二醇环氧化物时才能与 DNA 作用从而引起基因损伤,基因毒性在癌症的引发中扮演重要角色<sup>[30, 31]</sup>。多环芳烃代谢物能够引起碱基对的替换、读码框跳跃、基因缺失、S-期阻滞、DNA 链断裂和多种多样的染色体异常<sup>[32, 33]</sup>。人类在孕期接触多环芳烃会导致婴儿体重下降、早产和心脏畸形<sup>[34]</sup>。产前接触大量的多环芳烃婴儿会出现智力低下(3岁)、行为问题(6岁和8岁)和小儿哮喘<sup>[35]</sup>。

### 1.3 多环芳烃的生物降解

环境中多环芳烃的降解有生物降解、光氧化、化学氧化、土壤吸附、浸出、生物富集等途径<sup>[36-38]</sup>。每一种多环芳烃特有的结构、物理、化学和生理学特征使

得各种处理方法对它们的作用效果也不尽相同。研究的最多的是好氧或厌氧微生物对多环芳烃的降解。细菌要降解多环芳烃首先得摄取多环芳烃，多环芳烃在溶解状态或者气态才可被细菌利用<sup>[39-41]</sup>，吸附于土壤颗粒的多环芳烃并不能被细菌利用，因为降解多环芳烃的酶与多环芳烃是分开的<sup>[7, 42, 43]</sup>。影响多环芳烃生物利用度的因素多种多样，比如多环芳烃在土壤中的时间长短会影响它们从土壤中解吸附的速率<sup>[44]</sup>。

多环芳烃水溶性的大小是影响多环芳烃生物利用度的重要因素，而多环芳烃水溶性又与多环芳烃分子量大小密切相关<sup>[45, 46]</sup>。弯接排列的多环芳烃在热力学上最稳定，但其湾区则最容易受到降解酶的攻击，这使得弯接排列的多环芳烃比线性或簇接排列的多环芳烃更容易降解。另一方面，如果多环芳烃降解菌生存的环境中存在比多环芳烃容易利用的碳源时，多环芳烃的降解速率就会下降。当降解酶的活性位点特异性不强时就会出现竞争性抑制，这些非特异性的酶能够与多种化学物质结合，如果存在比多环芳烃容易利用的碳源降解菌就会利用这些碳源<sup>[47]</sup>。生物修复尤其是微生物修复是多环芳烃降解的主要途径，自然环境中存在着多种多样的微生物降解菌，能够降解低分子量多环芳烃的微生物数量比较多，而能降解高分子量的多环芳烃的微生物数量较少<sup>[48, 49]</sup>。现已发现多种细菌能够降解 BaP 在内的高分子量多环芳烃，如 *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1、*Novosphingobium pentaromativorans* US6-1<sup>[122]</sup>等。

目前，人们对 PAHs 的微生物降解机制更多的是关注代谢途径的解析，而对于微生物是如何与 PAHs 分子相互作用，微生物是通过何种方式介导 PAHs 进入细胞内以及微生物如何响应 PAHs 污染的降解机制研究较少。本课题组前期展开了新鞘氨醇菌 US6-1 降解不同 PAHs 的表达蛋白质组研究，获得了降解功能基因、关键酶（系）、代谢通路等重要信息。其中 TonB 依赖性转运蛋白在 PAHs 作用下表达量明显增加，且存在 PAHs 底物的特异性，这种 PAHs 诱导下高丰度表达的差异蛋白是否与菌株 US6-1 适应、降解 PAHs 有关？目前关于新鞘氨醇杆菌 US6-1 TonB 蛋白的研究还是空白，相关研究将有助于揭示 *N. pentaromativorans* US6-1 对多环芳烃的响应机制。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库