

红灯食烷菌 (*Alcanivorax hongdengensis*) 黄素结合单加氧酶 (AlmA) 的基因克隆及其烷烃诱导表达

王万鹏^{1,2}, 邵宗泽^{2*}

(¹ 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

(² 国家海洋局第三海洋研究所, 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005)

摘要:【目的】研究海洋烷烃降解菌新种模式菌株 *Alcanivorax hongdengensis* A-11-3 降解长链烷烃的分子机制。【方法】PCR 克隆编码黄素结合单加氧酶的基因序列, 利用生物信息学软件对序列进行分析, 运用 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 技术分析基因在不同烷烃诱导下的表达水平。【结果】从菌株 A-11-3 中克隆获得了两个黄素结合单加氧酶基因片段 (*almA1* 和 *almA2*)。它们编码的氨基酸序列与菌株 *Acinetobacter* sp. DSM 17874 的 AlmA 同源性分别为 58.6% 和 53.2%。实时荧光定量 PCR 分析表明, *almA1* 基因只在长链烷烃 ($C_{28} - C_{32}$) 的诱导下上调表达, 而 *almA2* 基因中能在更宽范围的长链烷烃 ($C_{24} - C_{34}$) 和支链烷烃诱导下上调表达。两者均在 $C_9 - C_{22}$ 的烷烃诱导下没有上调表达。【结论】黄素结合单加氧酶可能是 A-11-3 降解长链烷烃和支链烷烃的关键酶。

关键词: 食烷菌; 长链烷烃; 支链烷烃; 黄素结合单加氧酶 (AlmA); 生物降解

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-07-1051

烷烃羟化酶是烷烃降解过程的关键酶^[1]。近年来, 从微生物中发现了几种不同类型的烷烃羟化酶。报道比较多的是与恶臭假单胞菌 GPo1 菌株的烷烃单加氧酶 (AlkB) 和细胞色素 P450 类似的烷烃羟化酶。食烷菌 (*Alcanivorax*) 是海洋环境中最重要的烷烃降解菌。从伯库岛食烷菌 (*Alcanivorax borkumensis*) SK2 菌株中发现了两个类似 GPo1 菌株的烷烃单加氧酶基因^[2]。*almA* 编码的酶是第一个能降解链长超过 C_{30} 的烷烃氧化酶, 是最近从 *Acinetobacter* sp. DSM 17874 中发现的, 它编码一个黄素结合单加氧酶家族的蛋白^[3]。在多个属的细菌中也发现了与 *almA* 同源的基因序列^[4], 但这些基因还未有功能验证的报道, 例如, 菌株 *Acinetobacter* sp. RAG-1, *Acinetobacter* sp. M-1,

Acinetobacter baylyi ADP1, *Marinobacter aquaeolei* VT8, *Oceanobacter* sp. RED65, *Ralstonia* spp., *Mycobacterium* spp., *Photorhabdus* sp., *Psychrobacter* sp. 和 *Nocardia farcinica* IFM10152 等。

泄漏入海洋的石油足够在其表面形成一层厚达 20 个油分子的膜, 严重威胁到海洋生态环境的安全^[1]。石油中含量最高的成分各种链长的烷烃。目前, 海洋石油污染的治理方法主要有物理法、化学法、生物法等。其中利用微生物修复的生物法是所有方法中处理费用最低的; 它的应用范围也比其他的方法来的广泛; 而且, 生物修复只是一个自然过程的强化, 不会造成二次污染^[12]。环境监测是生物修复不可缺少的一个组成部分。监测技术的特异性、敏感性、方便性都影响着生物修复的恰当与有效与

基金项目: 国家自然科学基金 (30670051); 福建省科技厅项目

* 通信作者。Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

作者简介: 王万鹏 (1982 -), 男, 山东淄博人, 厦门大学博士研究生, 主要从事环境微生物与分子生物学研究。E-mail: wangwanpeng2008@126.com

收稿日期: 2009-12-28; **修回日期:** 2010-03-17

否。由于污染监测变得越来越重要,更精确的生物传感器正在代替传统的测量方法来确定修复的效率和环境的影响。基于分子水平上的技术应用越来越广泛,例如可以通过检测 *almA* 的种类和丰度来测定生物修复的能力和有效性。另外,对 *almA* 的促进或制约因素的了解,也有助于对污染的实地生物修复进行有效的指导。无论是对于生物催化还是生物修复,筛选新颖的 *almA*,以及对不同 *almA* 的催化特性进行研究都将成为当前的一个研究热点。

红灯食烷菌 (*Alcanivorax hongdengensis*) 菌株 A-11-3 分离自马六甲海峡表层海水,是一株石油降解新种^[5]。该菌对烷烃的降解范围较宽,能以 C₈ - C₃₆ 的烷烃为唯一碳源和能源生长。从菌株中已经克隆到了 *alkB* 基因片段 (426 bp) 和 P450 基因片段 (843 bp)^[6],但对其长链烷烃降解机制还不清楚。本研究首先检测了菌株 A-11-3 *almA* 基因存在与否,并进一步在 mRNA 水平上证明了其与长链烷烃降解的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 菌株 *A. hongdengensis* A-11-3 为本实验室分类鉴定,并保藏于中国海洋微生物保藏中心 (MCCC 1A1496⁺ CGMCC 1.7084^T = LMG 24624^T),

以 C₈ - C₃₆ 的烷烃为唯一碳源和能源生长^[6]。

1.1.2 培养基: ① 人工海水培养基 (MMC)^[7]。② M2 液体培养基^[8]。

1.1.3 主要试剂和仪器: 烷烃: 正己烷、正戊烷、正庚烷、正辛烷、壬烷、二十四烷和二十八烷购自中国医药 (集团) 上海化学试剂公司; 十六烷购自天津市化学试剂研究所; 十一烷、正十四烷购自 Sigma 公司; 十八烷、二十烷、三十二烷购自 Eastgate 公司; 十烷购自 New Jersey 公司; 二十二烷购自 Mayflower 公司; 三十六烷购自 KOCH2L-IGHT LABORATORIES 公司。零号柴油和原油: 均购自泉州泉港区炼油厂。PCR 相关试剂由 TaKaRa 提供; 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 恒温培养箱 (Memmert 和 SHP-250 上海精宏设备有限公司); JI-250 水平凝胶电泳仪 (大连捷迈科贸有限公司); 恒温培养摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司); PCR 仪 (Eppendorf); AlpHa Innotech 凝胶成像仪 (San Leandro, California); Ultrospec 2100 pro 紫外分光光度计 (Amersham pharmacia); AE240 电子分析天平 (Mettler DCode DGGE (Bio-Rad)); 实时定量 PCR 仪 (IQTM5 Real Time PCR Detection System, Bio-Rad)。

1.2 *almA* 片段的 PCR 扩增和测序

1.2.1 引物: 表 1 为本实验室设计的烷烃单加氧酶引物 (*almAf/almAr*)。

表 1 *almA* 基因的简并 PCR 引物与荧光实时定量 PCR 特异引物

Table 1 Degenerate primers for *almA* gene and specific primers used for Q-PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Target gene	Function ^a
<i>almAdf</i>	GGNGGNACNTGGGAYCTNTT	<i>almA</i>	degenerate primers(f)
<i>almAdr</i>	ATRTCNGCYTTNAGNGTCC	<i>almA</i>	degenerate primers(r)
A-11-3re <i>almA1f</i>	TAATGATGATGTCCGCCTCC	A-11-3 <i>almA1</i>	Q-PCR (f)
A-11-3re <i>almA1r</i>	CCGTCCAGCTATAACCC	A-11-3 <i>almA1</i>	Q-PCR(r)
A-11-3re <i>almA2f</i>	ATAGGTTAAATACGGTCTCTGCAG	A-11-3 <i>almA2</i>	Q-PCR (f)
A-11-3re <i>almA2r</i>	CAGCACTGGCCAGATAACTACG	A-11-3 <i>almA2</i>	Q-PCR (r)
A-11-3 re <i>GyrBf</i>	GCCGTCACGCTGGGAATATTGT	A-11-3 <i>gyrB</i>	Reference gene specific primers for Q-PCR (f)
A-11-3 re <i>GyrBr</i>	GCCGACGCGCGAGGAAGATG	A-11-3 <i>gyrB</i>	Reference gene specific primers for Q-PCR(r)

^a. f, forward primer; r, reverse primer.

1.2.2 *almA* 片段的 PCR 扩增: 以菌株 A-11-3 的基因组 DNA 为模板,用本实验室设计的烷烃单加氧酶引物 (*almAf/almAr*) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (总体积 50 μL): 10 × Buffer 5.0 μL, dNTP (0.2 mmol/μL) 4.0 μL, 引物 1 (10 pmol/μL) 6.0 μL, 引物 2 (10 pmol/μL) 6.0 μL, *Taq* 酶 (2 U/μL) 0.3 μL, DNA 模板 (50 ng - 1 μg) 1.0 μL, 去离子水 27.7 μL。PCR 扩增的条件: 95°C 5 min; 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个

循环; 72°C 5 min。

1.2.3 系列分析: PCR 产物纯化、连接 pMD19-T 后,转化入 *E. coli* DH5α 感受态细胞中,由上海生工完成测序。测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行分析,再通过软件 DNAMAN (version 5.1) 对扩增序列和 GenBank 中近缘种的序列进行比对,用 DNAMAN 的邻位加入法 (neighbor-joining) 以及最大似然法 (maximum-likelihood) 建系统发育树。

1.3 菌株的诱导培养

挑取菌株 A-11-3 的单菌落于 30 mL M2 培养基 (150 mL 三角瓶) 中活化 24 h; 按照 1% (v/v) 量将上述培养物转接到另外 30 mL 新鲜 M2 培养基中, 培养至对数期; 将 1 mL 对数期培养物 (2% 转接量) 用无菌水洗涤两次, 接种于 50 mL MMC 培养基中 (250 mL 三角瓶), 补加 0.1% FeSO₄ 溶液及微量元素溶液, 同时分别加入 0.1% C₉ - C₃₆ 和 Pristane (C₁₉H₄₀) 作为诱导物; 此外设置添加 1% (w/v) 醋酸钠 (NaAc) 为碳源的对照组; 将上述接种培养物, 置于 25 °C, 180 r/min 恒温摇床中诱导培养 72 h。

1.4 总 RNA 的抽提及纯化

分别收集烷烃诱导与未诱导的 A-11-3 菌体 (细胞总数 $\leq 5 \times 10^8$), 按照 RNeasy spin 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒 (Qiagen) 的说明书分离纯化细菌总 RNA。总 RNA 中含有的微量基因组 DNA 使用 RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 去除。

1.5 反转录

离心管中配制混合液: 细菌总模板 RNA 0.25 - 0.5 μ g, 随机引物 (50 μ mol/L) 1 μ L, dNTP Mixture (10 mmol/Leach) 1 μ L, 补充 RNase free dH₂O 至 10 μ L; 65 °C 温浴 5 min 后, 立刻放置冰上急冷 2 min 以上; 离心数秒钟使模板 RNA 引物等的混合液聚集于微管 (microtube) 底部; 在上述管中配制反转录反应液: 上述模板 RNA/引物等的混合液 10 μ L, 5 \times PrimeScrip Buffer 4 μ L, RNase 抑制剂 (40 U/ μ L) 0.5 μ L, PrimeScrip 逆转录酶 (200 U/ μ L) 100 - 200 U, 补充 RNase free dH₂O 至 20 μ L。反转录条件: 30 °C 10 min; 42 °C 60 min; 70 °C 保温 15 min 后冰上冷却。得到的 cDNA 溶液可直接用于 qPCR 定量实验。

1.6 荧光实时定量 PCR

具体操作依据 Bio-Rid 公司的 IQTM5 型荧光定量 PCR 仪说明书, 引物设计使用 Primer Premier 5.0 软件。对于用荧光染料 SYBR green I 进行相对定量研究时, 首先进行 PCR 扩增条件的优化。引物序列见表 1。经引物浓度、模板浓度的优化组合筛选实验后, 荧光定量 PCR 反应体系: IQTM SYBR Green Supermix 12.5 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, cDNA 溶液 2 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 程序: 95 °C 3 min, 95 °C 10 s, 58 °C 30 s (荧光采集, 共 40 个循环), 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 50 + 0.5 °C /cycle 共 80 个循环。所有

的 PCR 反应均做 3 个重复, 以验证每个样品扩增的重复性, 同时设置无反转录逆转录混合物为模板的阴性对照 (NC), 及不加 DNA 模板的无模板对照 (NTC)。

为了构建 *almA1* 和 *almA2* 基因 C_i 值标准曲线, 选取 C₂₈ 和 C₃₂ 诱导处理 72h 的 cDNA 材料, 分别按照 1 - 10⁴ 十倍稀释, PCR 程序同上。制作标准曲线时, 假定稀释 10⁴ 倍的样品中 RNA 起始模板数为 10, 其他梯度稀释的样品拷贝数也依次递增, 这样可以得到标准曲线的相关参数。2^{- Δ C_t} 和 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 详细的推导过程见文献 [9]。2^{- Δ C_t} 法、将诱导处理样品和未诱导处理样品进行比较。2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法引入看家基因 *gyrB*, 以该基因为参照对 *almA1* 和 *almA2* 进行相对定量。

1.7 基因序列

扩增到的 *almA1* 和 *almA2* 基因序列提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中。*almA1* 在 GenBank 登录号为 FJ263132, *almA2* 在 GenBank 登录号为 FJ263133。

2 结果

2.1 烷烃单加氧酶基因 *almA* 的 PCR 克隆和分析

采用简并引物 *almAf/almAr* (见表), 通过条件优化的 PCR 扩增反应, 获得了大小为 1130bp 的两个不同黄素结合单加氧酶基因 *almA* 片段。经 NCBI Blast 分析后, 其编码的多肽与同属的 *A. borkumensis* SK2^T 的黄素结合单加氧酶基因 (YP_692002) 有最高相似性, 为 81%, 与菌株 *Acinetobacter* sp. DSM 17874 黄素结合单加氧酶 *almA* 的同源性为 58.6%。*almA2* 编码的多肽与 SK2^T 假定的单加氧酶基因 (YP_691910) 有最高相似性, 为 86%, 与菌株 *Acinetobacter* sp. DSM 17874 黄素结合单加氧酶 *almA* 的同源性为 53.2%。*almA1* 与 *almA2* 编码的氨基酸序列同源性为 64.2%。

图 1 是 *almA* 编码的氨基酸序列的系统发育树。A-11-3 的两个 *almA* 基因片段与其他黄素结合单加氧酶编码的多肽中都含有 5 个保守结构域; 它们是 motif1 (GGTWLP [R/K] YPGIRSDSD)、motif2 (IGSGATA)、motif3 (TMLQR [S/T] P)、motif4 (ADI [L/V] [L/V] [S/T] ATGL) 和 motif5 (GY [L/T] N [A/I] [S/P] WTL)。这些保守的结构域中许多丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T) 和天冬氨酸 (D) 高度保守。说明所得到的两个基因确实是黄素结合单加氧酶基因片段。

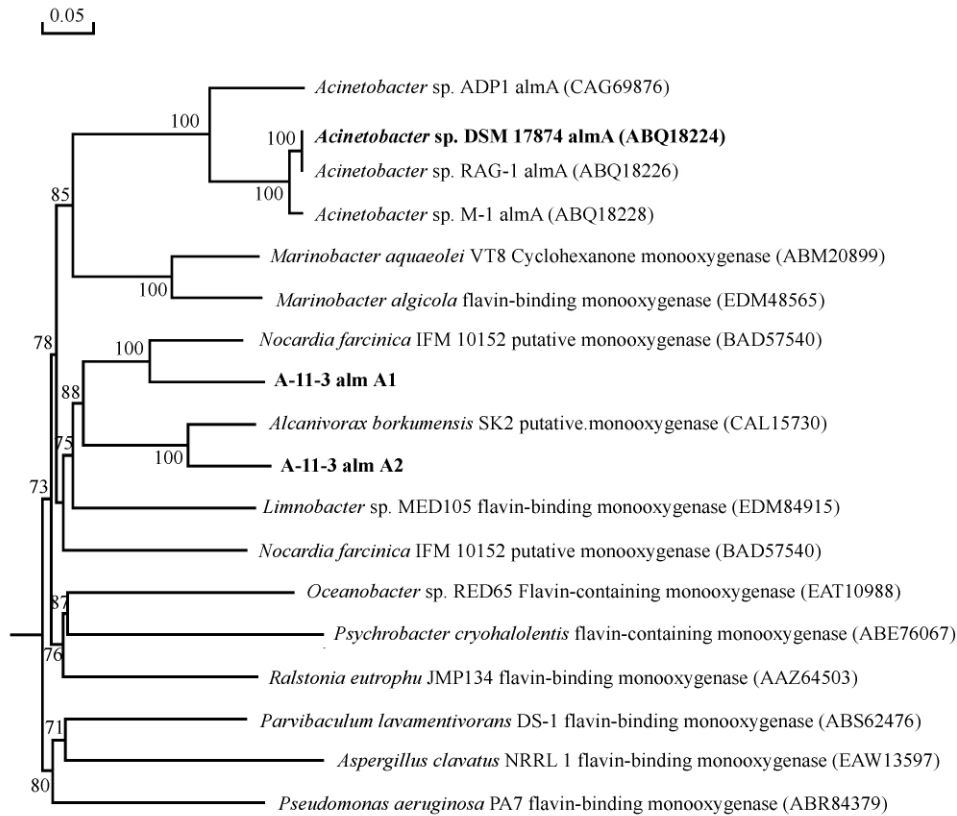


图 1 A-11-3 黄素结合单加氧酶部分片段氨基酸序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on partial amino acid sequences of flavin-binding monooxygenase (377 aa in total) from strain A-11-3 and closely related representatives. Bootstrap values (form 1000 replication) are shown at branch points; The scale bar corresponds to 0.05 substitution per amino position. The numbers in parenthesis men sequences accession number in GenBank.

2.2 定量 PCR 的特异性扩增分析与标准曲线的建立

为了提高定量 PCR 的可靠性和准确性,必须知道 PCR 产物特异性和 PCR 的动力学特征。通过熔解曲线分析,发现 *almA1* 基因在 86.5°C - 87°C, *almA2* 基因在 87 °C, *GyrB* 基因在 86°C 左右各有单一的峰,表明 *almA* 两个基因和 *GyrB* 基因均被特异扩增。在荧光定量 PCR 后,获得了循环数与荧光相对强度的 S 型动力学曲线。无论 *almA* 还是 *GyrB* 基因,其指数扩增期和平台期均十分明显,线性范围广,从 15 - 31 个循环都能检测出,表现为理想的扩增曲线,表明本实验的定量 PCR 实验数据适用于 *almA* 基因的相对定量分析。

分别选取两个碳源诱导处理样品进行梯度稀释,以基因 *almA1* 和 *almA2* 同时进行定量 PCR。系列稀释的 cDNA 模板浓度与 C_t 值的关系曲线(图 2)。在初始浓度未知的情况下,无论假定初始浓度为多少,其斜率和截距都是一定的(数据未显示)。对基因 *almA1* 进行定量 PCR, C_{28} 和 C_{32} 处理的标准

曲线的斜率分别为 -3.567 和 -3.277,两标准曲线的相关系数 R^2 分别为 0.996 和 0.997,反应效率都高于 99.8%。对基因 *almA2* 进行定量 PCR, C_{28} 和 C_{32} 处理的标准曲线的斜率分别为 -3.319 和 -3.268,两标准曲线的相关系数 R^2 分别为 0.997 和 0.988,反应效率都高于 99.9%,说明该体系可以用于荧光定量 PCR 体系。

2.3 *almA* 基因的诱导表达分析

在优化了 3 对引物(表 1)的定量实验条件后,按照材料和方法 1.4 中描述的培养条件对菌株 A-11-3 进行诱导实验。收集适量经 NaAc 培养及 C_9 - C_{36} , Pristane ($C_{19}H_{40}$) 诱导的菌体(细胞总数约为 5×10^8),利用 RNA 提取试剂盒(Tiagen)抽提并纯化细菌总 RNA,反转录成 cDNA,而后进行 RT-PCR 分析。由电泳检测可知,所抽提的 RNA 完整性相对较好。细菌总 RNA 经过 Dnase 1 消化 DNA 后电泳已无 DNA 污染, OD_{260}/OD_{280} 值在 1.9 - 2.1 范围内说明纯度较好基本达到要求。RT-PCR 结果(图 3)表明,内参基因 *gyrB* 的表达量在诱导和未诱导的情

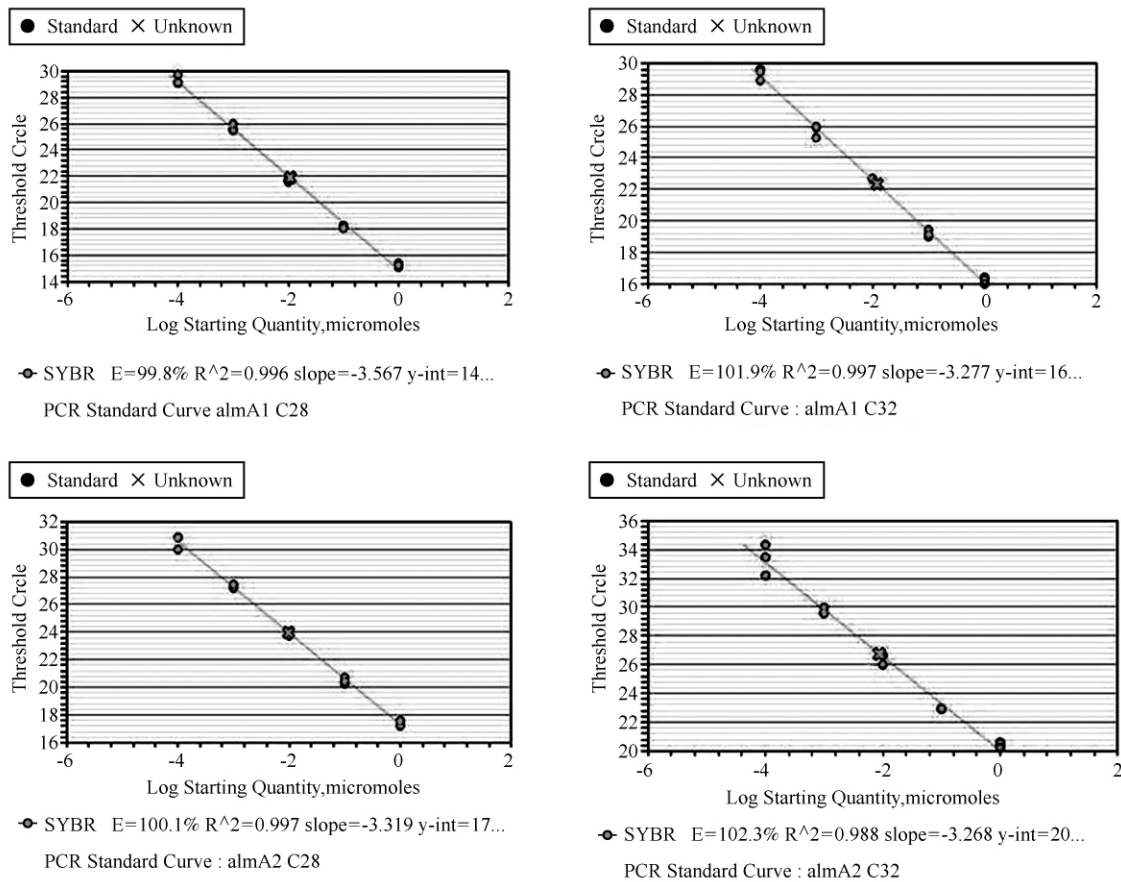


图2 实时荧光定量 PCR 系列稀释的 cDNA 模板浓度与 Ct 值的标准曲线

Fig. 2 Q-PCR Standard Curve between Ct and cDNA templates with gradient dilution.

况下基本一致。而 *almA1* 在 NaAc 培养时,有一定的本底表达但不明显,在 $C_9 - C_{22}$ 表达不明显;在 $C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{19}H_{40}$ 的诱导时,其 mRNA 产生量均有明显的增加,说明在这些烷烃诱导的情况下,这 *almA1* 酶基因均有上调表达。*almA2* 在 NaAc 培养情况下,没有明显的表达;而在 $C_{28}, C_{30}, C_{32}, C_{34}, C_{36}, C_{19}H_{40}$ 诱导时,其 mRNA 产生量均有明显的增加。为进一步定量该结果,我们又进行了下一步的实时荧光定量 PCR 分析。

荧光定量 PCR 分析结果表明(图 4), *almA1* 和 *almA2* 两个基因均在长链烷烃诱导下上调表达。*almA1* 在 C_{30} 和 C_{32} 诱导时有极其明显的差异表达,在 C_{28} 诱导时较为明显的差异表达,而在 C_{24}, C_{34}, C_{36} 和 Pristane ($C_{19}H_{40}$) 诱导时差异表达不明显。*almA2* 在 C_{30} 诱导时有极其明显的差异表达,在 $C_{24}, C_{28}, C_{32}, C_{34}$ 和 Pristane ($C_{19}H_{40}$) 诱导时明显的差异的表达,而在 C_{36} 诱导时差异表达不明显。

3 讨论

目前有关细菌长链烷烃降解的机制报道很少。Throne-holst 等人(2007)从 *Acinetobacter* sp. DSM 17874 获得了 *almA* 基因,并通过突变失活首次证明了 *almA* 基因能降解链长超过 C_{32} 的直链烷烃^[5]。此外,王磊等人(2007)从 *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 的功能大质粒中获得参与烷烃降解的另一类单加氧酶 *LadA*^[10],并通过纯酶活性证明其底物范围为 $C_{15} - C_{36}$ 。

本研究从烷烃降解菌 A-11-3 中 PCR 扩增获得了 2 个黄素结合单加氧酶基因片段, *almA1* 与 *almA2*。它们与已报道的有烷烃降解活性的 *AlmA* 有较低的同源性。系统进化分析表明, *almA1* 与 *Nocardia farcinica* IFM10152 (BAD57540) 单加氧酶位于一个分支上, *almA2* 与食烷菌 *A. borkumensis* SK2^T 的假定 *almA* 位于一个分支上,而与其他黄素结合单加氧酶距离较远。烷烃诱导表达分析结果表明,它们都能被长直链烷烃诱导表达。此外, *almA2*

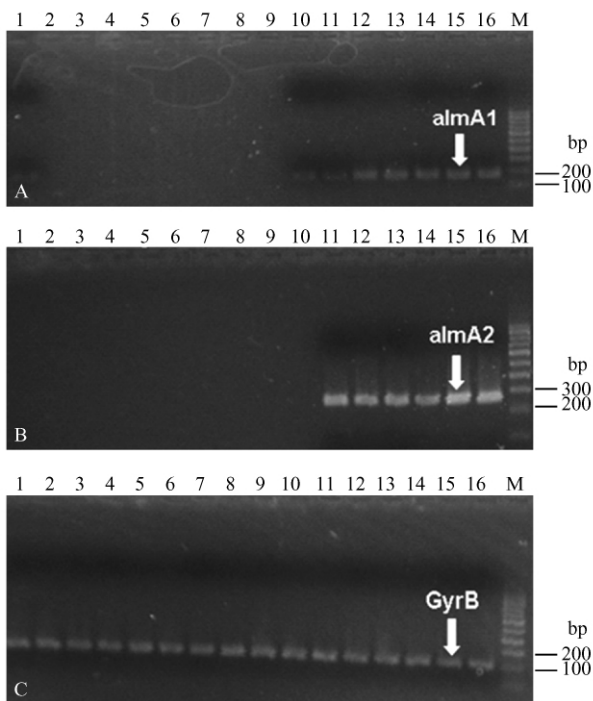


图3 RT-PCR 半定量检测菌株 A-11-3 的两个 *almA* 基因在不同碳源诱导下 mRNA 转录表达

Fig.3 Semi-quantitative RT-PCR analysis of mRNA expression of *almA1*, *almA2* in strain A-11-3. A. *almA1*; B. *almA2*; C. *gyrB*, as a reference gene. 1. NaAc; 2. C₉; 3. C₁₀; 4. C₁₂; 5. C₁₄; 6. C₁₆; 7. C₁₈; 8. C₂₀; 9. C₂₂; 10. C₂₄; 11. C₂₈; 12. C₃₀; 13. C₃₂; 14. C₃₄; 15. C₃₆; 16. pristane; M. Market.

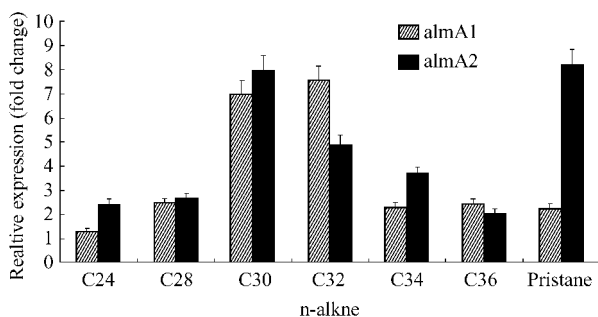


图4 不同烷烃诱导的 A-11-3 *almA1* 和 *almA2* 基因表达水平的荧光定量 PCR 分析

Fig.4 Real-time PCR analysis of the expression of *almA1* (Black Columns) and *almA2* (Stripes Columns) in different substrate as sole carbon and energy source. *gyrB* was used as the reference gene, and cells grown with sodium acetate were used as the control state. Substrates used are indicated. Relative expression levels were determined with real-time RT-PCR.

基因还能被支链烷烃(姥鲛烷, C₁₉H₄₀) 诱导表达。说明 A-11-3 菌株的 *almA* 基因可能负责长直链烷烃和支链烷烃的降解。对其确切功能,还有待通过酶学分析及基因敲除等手段进行验证。

已经报道, AlkB 和 P450(CYP153 家族)负责中

等链长烷烃(C₅ - C₂₀)的降解^[11]。在菌 A-11-3 中,我们也发现了这两套烷烃单加氧酶系统^[3],通过实时定量 PCR 确定了它们的底物范围为 C₈ - C₂₆,其中 P450 的底物发范围主要为 C₈ - C₁₄(未发表)。因此,菌株 A-11-3 目前共发现有 3 套烷烃单加氧酶系统,它们的底物范围互补,这种多基因的策略为其在海洋环境中有效地降解各种类型的烷烃提供了可能。

参考文献

- [1] Head IM, Jones DM, Relling W FM. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4 (3) : 173 - 183.
- [2] Schneiker S, Martins dos Santos VA, Bartels D. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon degrading marine bacterium *Acanivorax borkumensis* *Nature Biotechnology*, 2006, 24 (8) : 997 - 1004.
- [3] Throne-Holst M, Wentzel A, Ellingsen T, Kotlar H, Zotchev S. Identification of novel genes involved in long-chain nalkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. 2007, *Applied Environmental Microbiology*: 73:3327-3332.
- [4] Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK, Zotchev SB, Throne-Holst M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiogyl Biotechnology*, 2007, 76: 1209-1221.
- [5] Wu Yh, Lai Q, Zhou ZW, Qiao N, Liu C, Shao Z. *Acanivorax hongdengensis* sp. nov., a alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59:1474-1479.
- [6] 吴业辉,邵宗泽. 海洋烷烃降解菌 *Acanivorax* sp. A-11-3 的分离鉴定及其降解酶基因研究. 台湾海峡 (*Journal of Oceanography in Taiwan Strait*), 2008, 11 (4):27.
- [7] Liu C, Shao Z. *Acanivorax dieselolei* sp nov a novel alkane degrading bacterium isolated from sea water and deep sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 55: 1181-86.
- [8] Wang B, Lai Q, Cui Z, Tan T, Shao Z. A pyrene-degrading consortium from deep-sea sediment of the West Pacific and its key member *Cycloclasticus* sp. P1. *Environmental Microbiology*, 2008, 10: 1948-1963.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} Method. *Methods*, 2001, 25 (4) : 402-408.

- [10] Feng L, Wang W, Cheng J, Ren Y, Zhao G, Gao C, Tang Y, Liu X, Han W, Peng X, Liu R, Wang L. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, 2007, 104: 5602-5607.
- [11] van Belien JB, Funhoff EG. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 74: 13-21.
- [12] 何良菊, 魏德州, 张维庆. 土壤微生物处理石油污染的研究. *环境科学进展 (Chinese Journal of Environmental Engineering)*, 1999, 7(3): 110-116.

Identification of AlmA genes involved in long-chain alkane degradation by *Alcanivorax hongdengensis* A-11-3

Wanpeng Wang¹, Zongze Shao^{2*}

(¹ School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(² China Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to identify of genes involved in long-chain (LC) alkane degradation in *Alcanivorax hongdengensis* A-11-3. [Methods] PCR was applied to obtain Flavin-binding monooxygenase genes, then quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-RT-PCR) and RT-PCR were applied to analyze gene expression in response to different LC-alkanes and pristane. [Results] Two homologues, *almA1* and *almA2*, were obtained. They showed 58.6% and 53.2% similarities with *almA* of *Acinetobacter* sp. Strain DSM 17874, respectively, at amino acid level. Enhanced expression of *almA1* genes was observed when strain A-11-3 grew with long chain alkanes (C₂₈ to C₃₂), in sodium acetate medium. However, the induction expression was not observed in the case of C₉-C₂₂ alkanes. Similarly, *almA2* was induced by long chain alkanes (C₂₄ to C₃₄). In addition, it was also induced by the branched alkane pristane. [Conclusion] AlmA genes were mostly responsible for the degradation of long-chain alkanes and pristane in strain A-11-3.

Keywords: *Alcanivorax*; long-chain (LC) alkanes; pristane; flavin-binding monooxygenase gene (AlmA); biodegradation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670051)

* Corresponding author. Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

Received: 28 December 2009/ Revised: 17 March 2010