

颗粒状甲烷单加氧酶异源表达方法

韩冰^{1*}, 苏涛^{2*}, 杨程¹, 江皓¹, 吴昊¹, 张翀¹, 李信², 邢新会¹

1 清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084

2 中国农业科学院研究生院, 北京 100081

摘要: 由于甲烷氧化菌只能利用甲烷作为唯一的碳源和能源, 存在生长缓慢、细胞密度低、培养困难等问题, 限制了其工业应用。解决该问题的有效途径之一是在容易实现高密度培养的异源宿主菌中表达甲烷单加氧酶(Methane monooxygenase, MMO)。本实验室前期首次在一种红球菌中成功地表达了来自于甲烷氧化菌(*Methylosinus trichosporium*)OB3b 的 pMMO(颗粒状甲烷单加氧酶), 但比酶活较原始菌低很多。本实验在该结果的基础上, 通过选用不同的启动子和宿主细胞探索表达 pMMO 的可能性, 结果得到了具有氧化甲烷活性的重组菌, 但是产物检测到乙醇的生成, 且该重组菌的 pMMO 活性不稳定, 暗示 pMMO 的催化特性可能发生了变化。另外, 很多重组菌检测到 pMMO 蛋白的表达, 但没有催化活性, 说明 pMMO 在宿主细胞中的正确组装是其功能表达的关键。

关键词: 甲烷氧化菌, 颗粒状甲烷单加氧酶, 异源表达, 生物催化

Heterologous expression of particulate methane monooxygenase in different host cells

Bing Han^{1*}, Tao Su^{2*}, Cheng Yang¹, Hao Jiang¹, Hao Wu¹, Chong Zhang¹, Xin Li², and Xinhui Xing¹

1 Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Methanotrophs use methane as the sole carbon and energy source, which cause slow growth, low cell density and hinder its industrial applications. One promising solution is to heterologously express methane monooxygenase (MMO) in other host cells that can be easily cultivated at high cell density. We systematically exploited the possibility of functional expression of pMMO by choosing different promoters and different host cells. The results showed that the recombinants could oxidize methane to methanol. In particular, ethanol could also be detected in the oxidized products, but the enzyme activity was instable, implying that some changes of pMMO expressed in the host cells might have occurred. In addition, SDS-PAGE analysis showed that many recombinants could express the subunits of pMMO, but the enzyme activity could not be detected. In conclusion, correct fold of pMMO in the host cells is important for its functional expression.

Keywords: methanotroph, particulate methane monooxygenase (pMMO), heterologous expression, biocatalysis

Received: February 22, 2009; **Accepted:** May 27, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z203), National Natural Science Foundation of China (No. 20676071).

Corresponding author: Xinhui Xing. Tel/Fax: +86-10-62794771; E-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA02Z203), 国家自然科学基金项目(No. 20676071)资助。

甲烷是一种重要的一碳化合物,如果能够利用甲烷来生产化工产品,不仅可以缓解石油资源日益减少的危机,同时也可以减少其对大气造成的温室效应。但是,由于甲烷结构非常稳定,虽然经过长期的工艺改进和催化剂改良,目前工业上从甲烷生产甲醇仍需要 255 °C 的高温和 5~15 MPa 的高压这样苛刻的条件^[1]。然而在自然界中却存在着—类特殊微生物——甲烷氧化菌^[2],它们含有一种特殊的酶——甲烷单加氧酶^[3](Methane monooxygenase, MMO)——可以在常温常压下实现甲烷转化为甲醇,也可以使丙烯一步转化为环氧丙烷^[4],并且除水以外没有其他副产物的产生,同时还可以氧化诸如三氯乙烯等环境难降解的卤代烃,应用于环境污染修复^[5-6]。因此,甲烷氧化菌及 MMO 被认为是多功能生物催化剂,其工业应用前景广阔。

尽管甲烷氧化菌拥有诸多优点,但由于其只能以甲烷为唯一碳源和能源进行代谢,存在生长缓慢、细胞密度低、培养困难等问题,限制了甲烷氧化菌及 MMO 的工业应用。解决该问题的有效途径之一是在易实现高密度培养的异源宿主菌中高效表达 MMO。MMO 分为 2 种,一种是存在于细胞质中的可溶性的甲烷单加氧酶 (Soluble methane monooxygenase, sMMO),另一种是存在于细胞膜上的颗粒状甲烷单加氧酶 (Particulate methane monooxygenase, pMMO)。sMMO 和 pMMO 虽然都能氧化甲烷,但和 sMMO 相比, pMMO 表达不受环境中 Cu 离子的抑制^[7],广泛存在于各种甲烷氧化菌中,而且更重要的是 pMMO 存在于细胞膜上,从底物和产物的传质及生物催化过程控制角度来讲, pMMO 的异源表达将更具研究价值。但由于 pMMO 结构极其复杂^[8],而且是膜蛋白,其异源表达技术除了本研究小组的研究外,至今国内外还没有成功的例子。本研究小组前期将来自于甲烷氧化菌 (*Methylosinus trichosporium*) OB3b 的编码 pMMO 的 *pmoCAB* 基因连接在红平红球菌的脱硫基因启动子的下游,构建出含 pMMO 基因簇的穿梭质粒,将该重组质粒转入红平红球菌中,首次成功获得了有活

性的 pMMO 的重组菌株^[9]。尽管该重组菌可以检测到氧化甲烷的活性,但是其活性比原始甲烷氧化菌低得多,推测这可能是由于调控 pMMO 基因表达的是相对较弱的脱硫酶 *dsz* 启动子,而且表达用的宿主又是革兰氏阳性的放线菌属,所以导致 pMMO 无法像在原始菌细胞中那样正确折叠和组装,影响了酶的活性。

本研究在本实验室已有工作的基础上,分别选用基因工程常用的 *lac* 启动子、严格调控转录的烷烃单加氧酶 *PalkB* 强启动子和推测的 σ^{70} pMMO 内源启动子,分别选用大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 和恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 等革兰氏阴性菌作为宿主菌,较系统地探索了 pMMO 表达的可能性,为进一步研究其高效表达技术提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 培养基和试剂

LB 培养基的配制参照文献[10], E-2 培养基的配制参照文献[11], NMS 培养基的配制参照文献[9]。基因工程菌株根据相应的抗性在培养过程中添加适量浓度的抗生素,其中氨苄青霉素使用浓度为 100 ng/mL; 卡那霉素使用浓度为 25~50 ng/mL。

1.2 菌株和质粒

本研究所涉及的菌株和质粒见表 1。

1.3 DNA 提取、DNA 产物纯化及内切酶

质粒提取按照天根 DP302 DNA 提取试剂盒说明; DNA 凝胶纯化参照 Omega Agarose Gel Extraction Kit D2510-01 使用说明指南; 实验所需限制性内切酶,连接酶及 T-A 克隆载体购于 TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.。

1.4 PCR 引物及反应条件

所用引物见表 2。

1.5 质粒转化方法

本实验所采用的质粒转化方法参照文献[11]所述。

表 1 实验菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids | Genotype and relevant characteristics | Source and reference |
|-------------------------------------|---|---|
| Strains | | |
| <i>E. coli</i> DH5 α | F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 (<i>lacZYA</i> ⁻ <i>argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r ⁻ _k ,m ⁻ _k) <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi</i> ⁻ 1 <i>gyrA96 relA1 phoA</i> | TaKaRa Biotech Co.,Ltd. |
| <i>P. putida</i> mt-2 | Wild type | Laboratory collection |
| <i>P. aeruginosa</i> 01 | Wild type | Laboratory collection |
| <i>P. stutzeri</i> A1501 | Wild type | Donated by Prof. LinMing of Chinese Academy of Agriculture Sciences, China |
| <i>E. coli</i> DH5 α pCompmo | Carrying pCompmo | This study |
| <i>P. putida</i> mt-2 pCompmo | Carrying pCompmo | This study |
| <i>P. aeruginosa</i> 01 pCompmo | Carrying pCompmo | This study |
| <i>P. stutzeri</i> A1501 pCompmo | Carrying pCompmo | This study |
| <i>E. coli</i> DH5 α pCHP | Carrying pCHP | This study |
| <i>P. putida</i> mt-2 pCHP | Carrying pCHP | This study |
| <i>P. aeruginosa</i> 01 pCHP | Carrying pCHP | This study |
| <i>P. stutzeri</i> A1501 pCHP | Carrying pCHP | This study |
| <i>M. trichosporium</i> OB3b | Wild type | Donated by Prof. Ichiro Okura of Tokyo Institute of Technology, Japan |
| Plasmids | | |
| pMD18T-simple | T-A cloning vector | TaKaRa Biotech Co., Ltd. |
| pUC18 | Expression vector with <i>Lac</i> , <i>Amp</i> ^r | TaKaRa Biotech Co., Ltd |
| pCom10 | Expression vector with <i>PalkB</i> , <i>Km</i> ^r | Donated by Prof. Witholt of Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Switzerland |
| pCompmo | <i>Km</i> ^r , pCom10 derivative carrying <i>pmoCAB</i> gene cluster | This study |
| pCHP | <i>Km</i> ^r , pCom10 derivative carrying <i>pmoCAB</i> gene cluster and putative σ^{70} promoter | This study |

表 2 实验所用引物

Table 2 Primer sequences used in this study

| Primer name | Sequence (5'-3') | T _m | Restriction enzyme |
|-------------|-------------------------------|----------------|--------------------|
| P20F | GCCGGCACAGAAGTTCACGTATTTATT | 55 °C | |
| P4481R | GATTGGCGATGTCTGAAGGTGAAGAT | 55 °C | |
| P500F | ATGAATTCAACAACAGAGACAACAG | 55 °C | <i>EcoR</i> I |
| P3871R | AAAGCTTCCAAACGCCGCAATTCTATC | 55 °C | <i>Hind</i> III |
| P501F | CATATGAATTCAACAACAGAGACAACAG | 54 °C | <i>Nde</i> I |
| P3870R | AAGCTTCCAAACGCCGCAATTCTATC | 54 °C | <i>Hind</i> III |
| P34F | AGTAGAATTCATTGAGAAGTGAGCAGCCT | 60 °C | <i>EcoR</i> I |
| P4474R | ATACAAAGCTTTGAAGATAATGCTGCCGA | 60 °C | <i>Hind</i> III |

1.6 基因工程菌的 pMMO 转录分析

利用荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 来分析重组菌中 *pmo* 基因的转录情况。所采用的探针是根据甲烷氧化菌功能基因 *pmoA* 保守区域设计的含有 FAM 荧光标记的 DNA 序列 (5'-FAM-CACCAGAGCGGACGGGAACACC-3')。具体操作步骤参照文献[9]。

1.7 基因工程菌的翻译分析

重组基因工程菌的 pMMO 翻译活性采用 SDS-PAGE 蛋白电泳的方法进行分析, 具体操作步骤参照文献[10]。

1.8 基因工程菌的催化活性分析

重组基因工程菌的 pMMO 的催化活性分析参照文献[9]。

2 结果与讨论

2.1 利用 pUC18 载体及 *lac* 启动子表达 *pmoCAB* 基因簇的研究

lac 启动子是基因工程研究中常用的调控外源基因表达的启动子。本研究将 *pmoCAB* 基因簇插入 pUC18 质粒的多克隆位点中, 利用引物 P500F/P3871R 通过 PCR 扩增了编码 *M. trichosporium* OB3b 的 *pmoCAB* 功能基因, 纯化后的 PCR 产物和质粒 pUC18 经限制性内切酶消化后进行连接反应, 反应产物通过 CaCl_2 化学转化的方法导入宿主细菌 *E. coli* DH5 α 中。利用 pUC18 载体的 Amp^r 抗性对转化子进行筛选。然而, 通过多次酶切-连接-转化实验, 均未能在抗性平板上获得转化子。以上结果说明普通的基因工程表达载体及其启动子不能实现 *pmoCAB* 基因簇在大肠杆菌中表达, 这和国外文献报道的结果相一致^[12], 推测主要原因可能是因为 *lac* 启动子不是严谨诱导型的启动子, 存在漏表达的情况, 而 pMMO 的表达产物对大肠杆菌有毒害作用所致^[13]。

2.2 利用 pCom10 载体及 *PalkB* 启动子表达 *pmoCAB* 的研究

2.2.1 *pCompmo* 质粒构建

pMMO 基因异源表达的一个突出问题是该段基因很难在大肠杆菌中完成克隆, Bettina Gilbert 指出在大肠杆菌中克隆完整的 *pmoCAB* 基因簇几乎是不可能的^[12]。2.1 的结果和 Bettina Gilbert 的结论相一致。为了探索 pMMO 异源表达的方法, 本实验通过“Trial and Error”的方式, 选用了调控严谨的 pCom10 质粒来对 pMMO 基因进行研究。该质粒的构建过程如图 1 所示, 利用引物 P501F/P3870R 扩增了编码 *M. trichosporium* OB3b 的 *pmoCAB* 功能基因, 纯化后的 PCR 产物和质粒经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 消化后连接, 连接产物通过 CaCl_2 化学转化的方法导入宿主细菌 *E. coli* DH5 α 中。

选取转化子做进一步酶切分析, 电泳结果显示 pCom10 与 *pmoCAB* 基因簇连接成功(图 2)。与 2.1 结果不同, 利用 pCom10 实现了 *pmoCAB* 表达载体在大肠杆菌中的克隆。推测这和启动子 *PalkB* 结构

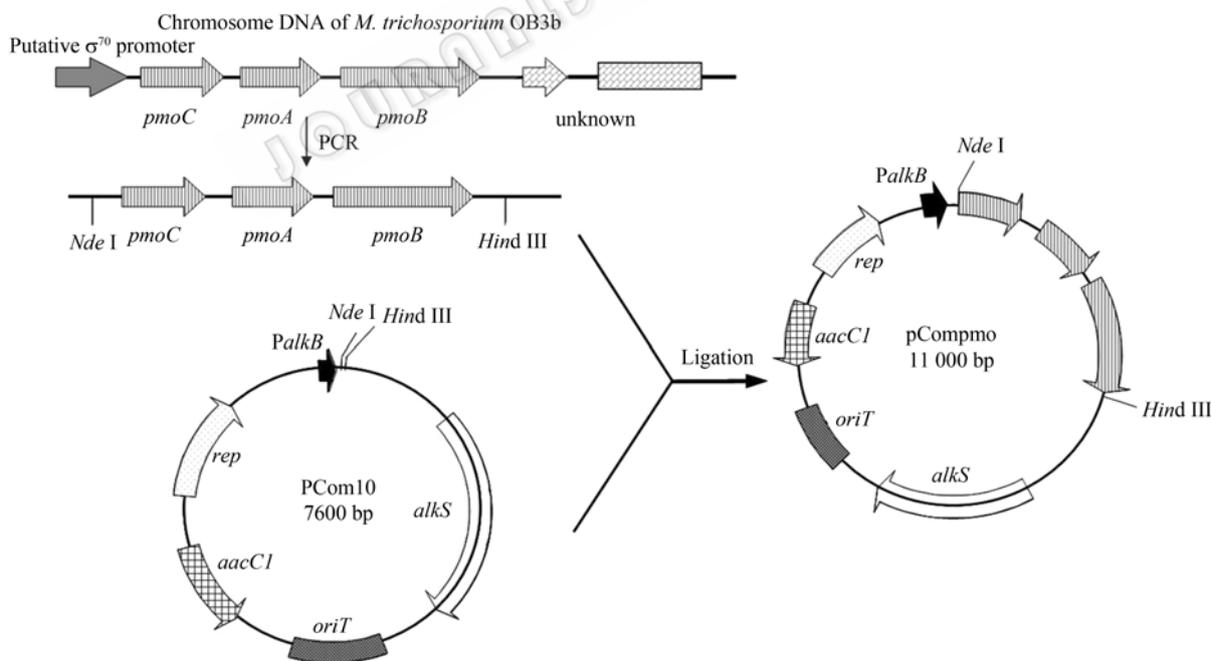


图 1 pCompmo 质粒构建图

Fig. 1 Construction of pCompmo.

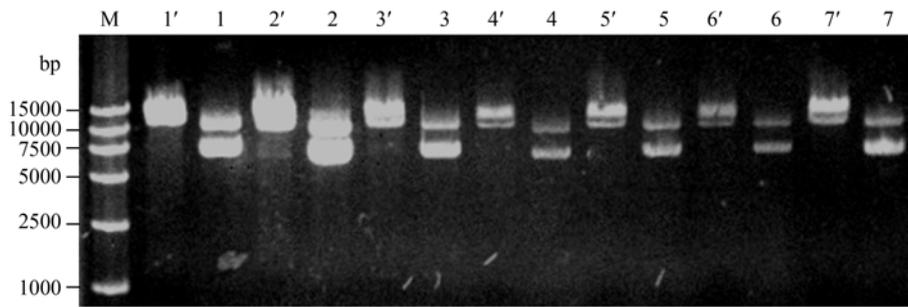


图 2 pCompmo 重组子酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pCompmo by enzyme digestion. M: DNA maker; Lane 1-7: the plasmid extracted from the transformants; Lane 1'-7': identification of pCompmo by enzyme digestion analysis.

和功能的特殊性有关。相对于 pUC18 载体, pCom10 载体调控插入基因表达受到蛋白 AlkS 的控制, 而 AlkS 又必须有其他诱导剂的调控才能表达, 这种调控机制非常严谨, 不会发生漏表达的情况。

2.2.2 质粒 pCompmo 转化产气肠杆菌、假单胞菌

为了探索 pMMO 基因的异源表达体系, 本研究选择了 2 种富含氧化还原酶的革兰氏阴性细菌进行了实验探讨。产气肠杆菌是生物制氢中广泛采用的微生物^[14-15], 其中氢酶与 pMMO 相似, 也为膜结合蛋白, 且基因、蛋白结构也非常复杂; 而恶臭假单胞菌^[16-17]中含有多种氧化还原酶, 如细胞色素 P450、二甲苯单加氧酶、烷烃单加氧酶等这些跨膜同 pMMO 也比较类似。本研究利用电转化的方法成功地将上述构建好的质粒 pCompmo 转入产气肠杆菌和恶臭假单胞菌 mt-2 中。分别提取转入 pCompmo 的产气肠杆和恶臭假单胞的质粒, 酶切验证转化成功(结果未显示)。

2.2.3 基因工程菌的转录、翻译、酶活性分析

利用 FISH 的方法, 用带有荧光标记的功能基因 *pmoA* 探针与重组菌的 mRNA 进行杂交, 并与 DAPI 染色后的照片进行对照, 结果如图 3 所示。通过将 *pmoA* 探针杂交照片与总细菌 DAPI 染色照片对比可以发现, 两者一致, 说明 *pmoA* 探针与重组菌 *pmoA* 的 mRNA 已杂交。*pmoA* 在基因工程重组菌中被成功转录。这也表明烷烃单加氧酶启动子 *PalkB* 可以调控 *pmoCAB* 基因转录。这些结果与本实验室缙仲轩等在红平红球菌中表达时的结果类似^[9]。

对重组菌 *E. aerogenes* pCompmo 的蛋白电泳中发现, 重组菌与 *E. aerogenes* 野生型菌株相比, 在

36~53 kD 处、24~36 kD 和 24 kD 处均有明显条带, 分子量大小约为 45 kD、27 kD 和 24 kD。而 pMMO 的 3 个亚基大小分别为 23 kD(PmoC)、27 kD(PmoA) 和 45 kD(PmoB), 如图 4 所示。SDS-PAGE 电泳说明转录 *pmoCAB* 基因的 mRNA 可以在基因工程宿主 *E. aerogenes* 中进行翻译。

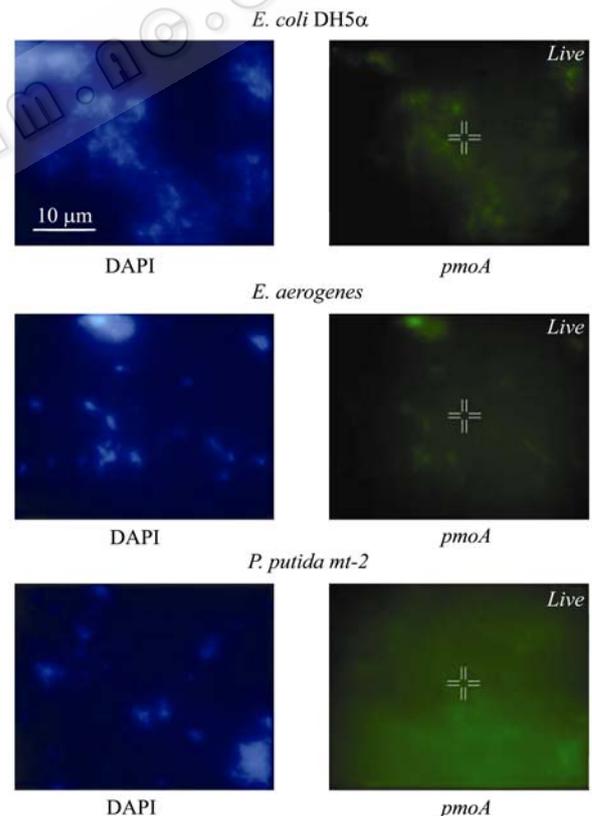


图 3 含有 pCompmo 的基因工程重组菌转录分析

Fig. 3 Images of transcription analysis by FISH with a probe of *pmoA*. Left: DAPI staining cells. Right: FISH images. Top: Recombinant *E. coli* DH5α. Middle: Recombinant *E. aerogenes*. Bottom: Recombinant *P. putida*.

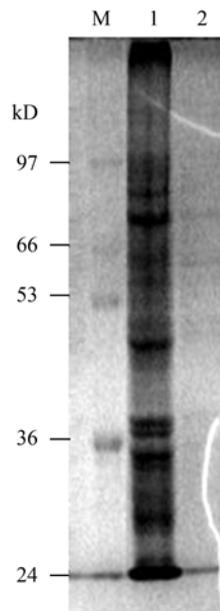


图 4 含有 pCompmo 的基因工程重组菌整细胞的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein produced by *E. aerogenes* pCompmo. M: standard protein marker; 1: *E. aerogenes* pCompmo; 2: wild *E. aerogenes*.

由于 pCom10 质粒表达蛋白和所选用碳源的种类关系很大^[10], 本研究通过改变 NMS 培养基的碳源成份, 对 3 株重组菌氧化甲烷的活性进行了检测,

结果如表 3 所示。在 NMS 培养基中, 在以葡萄糖, 乳糖以及葡萄糖加酵母的培养基为碳源培养时, *E. aerogenes* pCompmo 重组菌具有甲烷氧化的活性, 而且非常有趣的是其氧化产物中还发现有乙醇的产生。但大肠杆菌和假单胞菌都没有检测到甲烷氧化的活性。另外, 在后续检测丙烯氧化活性时, 3 种重组菌均没有氧化丙烯的活性, 这与缙仲轩等在红平红球菌中表达时的结果类似^[9]。

FISH 转录分析及 SDS-PAGE 分析的结果表明, 外源 *pmoCAB* 基因在启动子 *PalkB* 的调控下, 在宿主菌 *E. coli* DH5 α 、*P. putida* mt-2、*E. aerogenes* 中可以完成转录、翻译过程。但在 *E. coli* DH5 α 和 *P. putida* mt-2 却不能得到氧化甲烷的酶活性, 尽管在 *E. aerogenes* 中检测到了氧化甲烷的活性, 而且有趣地发现甲烷氧化产物中有乙醇产生, 但却没有氧化丙烯的活性, 这说明 pMMO 的氧化特性可能发生了改变, 其原因可能是 pMMO 在异源宿主中很难像在自身宿主中那样得到正确折叠和组装。由于膜蛋白结构的复杂性, 其表达和组装过程往往受到多种基因的调控和多种蛋白的参与。而 pMMO 又是一种有着非常复杂结构的膜蛋白, 其为 3 个均有跨膜区域

表 3 NMS 培养基不同碳源情况下重组菌氧化甲烷活性

Table 3 Recombinant pMMO activity in oxidizing methane by cultivation with different carbon source

| Medium | Carbon source | Strains | pMMO activity |
|--------|--|-------------------------------------|---------------|
| 1×NMS | 1% Glucose (g/L) | <i>E. coli</i> DH5 α pCompmo | N |
| | | <i>E. aerogenes</i> pCompmo | N |
| | | <i>P. putida</i> mt-2 pCompmo | N |
| 1×NMS | 1% Glucose (g/L)+30 mL CH ₄ | <i>E. coli</i> DH5 α pCompmo | N |
| | | <i>E. aerogenes</i> pCompmo | Y |
| 1×NMS | 30 mL CH ₄ | <i>E. coli</i> DH5 α pCompmo | N |
| | | <i>E. aerogenes</i> pCompmo | N |
| 1×NMS | 1% HCOONa (g/L) | <i>E. coli</i> DH5 α pCompmo | N |
| | | <i>E. aerogenes</i> pCompmo | N |
| 1×NMS | 1% Sucrose (g/L) | <i>E. coli</i> DH5 α pCompmo | N |
| | | <i>E. aerogenes</i> pCompmo | N |
| 1×NMS | 1% Lactose (g/L) | <i>E. coli</i> DH5 α pCompmo | N |
| | | <i>E. aerogenes</i> pCompmo | Y |
| 1×NMS | 0.05% n-Octane (g/L) | <i>E. coli</i> DH5 α pCompmo | N |
| | | <i>E. aerogenes</i> pCompmo | N |
| | | <i>E. coli</i> DH5 α pCompmo | N |
| 2×NMS | 2% Glucose +0.5% Yeast (g/L) | <i>E. aerogenes</i> pCompmo | Y |
| | | <i>P. putida</i> mt-2 pCompmo | N |

Note: the pMMO activity of oxidizing methane was measured by the concentration of methanol in the culture after predetermined cultivation time with methane, and the concentration of methanol in the culture was detected by gas chromatograph. "Y" presents that methanol could be detected, and "N" means that methanol could not be detected.

亚基 PmoC、PmoB 和 PmoA 组成 $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ 三聚体的桶装结构^[8,18], 该蛋白活性表达很可能和某些调控小蛋白有关, 2004 年发表在 Science 上的一篇文章报道指出在甲烷氧化菌中存在一种被称为 methanobactin 的小蛋白对 pMMO 的正确折叠具有重要的作用^[19]。2007 年发表在 PNAS 上的一篇文章进一步确认了以上观点, 并指出该小蛋白还具有富集 Cu 离子、帮助合成 pMMO 的作用^[20]。所以对于后续 pMMO 的异源表达研究来说, 应该考虑 methanobactin 的影响。

2.3 利用推测的 pMMO 内源启动子调控 *pmoCAB* 基因的外源表达研究

1999 年 Bettina Gilbert 等^[12]利用同源比对的方法推测 *M. trichosporium* OB3b pMMO 基因簇 5' 上游 800 bp 左右是其可能的启动子区, 并推测出 pMMO 基因簇是由类似于大肠杆菌 σ^{70} 启动子调控转录的。自此以后再没有该启动子的相关报道, 本研究在前期积累的基础上, 进一步尝试了使用该推测的内源启动子区异源表达 pMMO 基因。

2.3.1 含内源启动子 pMMO 基因簇的 T-A 克隆研究

利用引物 P20F/P4481R 扩增了编码 *M. trichosporium* OB3b 的 pMMO 基因, 目的片段包括内源启动子 σ^{70} 和完整的 *pmoCAB* 基因, 全长 4.4 kb。为了进一步确认 PCR 产物, 通过序列分析, 对其进行了限制性内切酶消化验证, 酶切图谱显示该序列为 *pmoCAB* 基因(结果未显示)。利用 T-A 克隆载体 pMD18T-simple 对纯化后的 PCR 产物进行克隆。对克隆产物进行蓝白斑筛选, 仅能得到少数白斑, 通过提取质粒酶切验证不正确, 通过把插入片段测序然后通过 NCBI 的 GenBank 数据库进行核酸序列比对和氨基酸序列比对, 均未得到与其具有相似性的序列。该结果说明, 利用 T-A 克隆载体不能在大肠杆菌中实现推测启动子和 pMMO 基因簇的克隆, 该结果和上述利用 pUC18 克隆 *pmoCAB* 基因簇的结果很相似。

2.3.2 选用 pCom 载体研究内源启动子调控的 pMMO 基因簇

由于无法采用 T-A 克隆方法在大肠杆菌中克隆带有内源启动子的 pMMO 基因簇。本研究继续利用

pCom10 质粒来克隆构建新的表达载体 pCHP 质粒。在降低抗生素 K_m 浓度(25 ng/mL)的前提下, 经过多次化学转化实验, 得到了转化入大肠杆菌 *E. coli* TOP10 的阳性转化子, 提取质粒, 通过 *EcoR* I 单酶切, *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切实验均证实了该质粒即为目的质粒 pCHP(电泳图未显示)。为了进一步得到所克隆的 *pmoCAB* 基因簇的详细信息, 利用通用引物 M13 对插入片段测序, 并与 GenBank 中所报道的序列进行比较。结果所克隆序列与 *M. trichosporium* OB3b 的基因簇(GenBank Accession No. AF186586)一致, 在大肠杆菌 *E. coli* TOP10 克隆的片段包括了推测的 σ^{70} 启动子和完整的功能基因 *pmoCAB*。

虽然 pCHP 在大肠杆菌中构建成功, 但是 SDS-PAGE 分析结果显示不能表达 pMMO(蛋白电泳图未显示)。因此, 本试验通过电转化的方法将质粒 pCHP 转入产气肠杆菌、恶臭假单胞菌 mt-2 和施氏假单胞菌 A1501 中, 探讨了在 E-2 培养基中, 葡萄糖和甘油分别作为碳源情况下, 各宿主重组菌诱导表达 pMMO 的情况, 如图 5 中的 SDS-PAGE 结果显示, 同对照相比, 重组产气肠杆菌和假单胞菌只是在 24 kD 处明显多一条带, 而这条带大小与 PmoC 相同, PmoA 和 PmoB 则无法从图上辨认出, 这只能

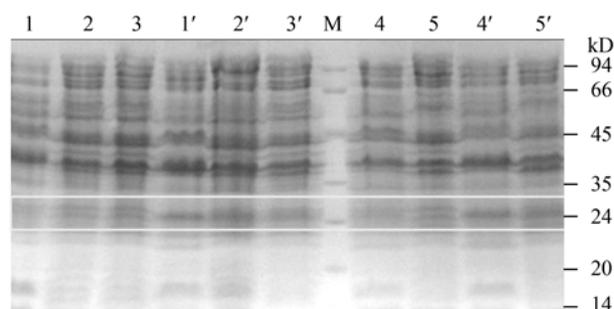


图 5 重组菌蛋白电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of proteins extracted from the recombinants. M: standard protein marker; Lane 1-3: wild-type *E. aerogenes*, wild type *P. stutzeri* A1501 and wild-type *P. putida* mt-2 in glycerine medium as the negative controls; Lane 1'-3': recombinant *E. aerogenes* pCHP, recombinant *P. stutzeri* A1501 pCHP and recombinant *P. putida* mt-2 pCHP in glycerine medium; Lane 4-5: wild-type *E. aerogenes* and wild-type *P. stutzeri* A1501 in glucose medium as the negative controls; Lane 4'-5': recombinant *E. aerogenes* pCHP and recombinant *P. stutzeri* A1501 pCHP in glucose medium.

说明 pMMO 的相对较小的亚基 PmoC 可能在 3 株重组菌中都得到转译。但是在后续的酶活分析中, 尽管考虑了具体包括碳源(乳糖、葡萄糖、甘油和柠檬酸)、 Cu^{2+} 浓度、C7-C12 正链烷烃诱导等方面的影响, 以上菌株均未得到催化甲烷生成甲醇的活性。结合 SDS-PAGE 结果说明可能该启动子只是使 PmoC 得到了表达, 而 PmoC 正是该启动子下游紧接的第一个蛋白序列, 由于这个 σ^{70} 启动子是推测的, 到目前也没有得到确认, 有可能该启动子只能启动表达 PmoC 蛋白亚基, 而另 2 个蛋白的表达需要其他启动子调控, 就像 sMMO 的表达一样^[21]; 需要 σ^{70} 和 σ^{54} 2 个启动子共同作用。

3 结论

在大肠杆菌中不能利用 pUC18 等常用基因工程表达质粒进行 *pmoCAB* 表达, 推测这主要是由于这些载体不能实现对插入基因的严谨调控, 造成了 pMMO 的漏表达, 从而对大肠杆菌产生毒害作用^[12], 导致 DNA 连接后不能得到转化子。

利用 pCom10 质粒中的烷烃单加氧酶启动子 *PalkB* 及其相关基因调控 *pmoCAB*, 构建了 pCompmo 质粒。FISH 转录分析及 SDS-PAGE 分析的结果表明外源 *pmoCAB* 基因在启动子 *PalkB* 的调控下, 在宿主菌 *E. coli* DH5 α 、*P. putida* mt-2、*E. aerogenes* 中可以完成转录、翻译等过程。但在 *E. coli* DH5 α 和 *P. putida* mt-2 中不能得到氧化甲烷的酶活性, 而在 *E. aerogenes* 中检测到了甲烷氧化的活性, 而且产物中检测到了乙醇的产生, 这说明 pMMO 的催化活性可能发生了改变, 其在异源宿主中很难像在自身宿主中那样得到正确折叠和组装。pMMO 的正确组装可能需要进一步考虑 methanobactin 小肽的协助作用。

利用 pCom10 作为表达载体, 构建了含有推测的内源 pMMO 启动子的 pCHP 质粒, 并转入 *E. coli* Top10。SDS-PAGE 结果显示, 在含 pCHP 的重组菌 *E. aerogenes* pCHP、*P. putida* mt-2 pCHP 和 *P. stutzeri* A1501 pCHP 中均确认到 pMMO 的一个亚基 PmoC 的表达。pMMO 原始的启动子的特性及高效功能表达条件还需要进一步研究。

REFERENCES

- [1] Liu YJ, Liu J. Summarization of the methanol synthesis gas production processes by natural gas. *Chem Ind Times*, 2007, **21**(5): 64–67.
刘一静, 刘瑾. 天然气制甲醇合成气工艺及进展. 化工时刊, 2007, **21**(5): 64–67.
- [2] Whittenbury R, Phillips KC, Wilkinso JF. Enrichment isolation and some properties of methane utilizing bacteria. *J Gen Microbiol*, 1970, **61**(2): 205–218.
- [3] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev*, 1996, **60**(2): 439–471.
- [4] Dalton H. The Leeuwenhoek Lecture 2000-The natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria. *Phil Trans R Soc B*, 2005, **360**(1458): 1207–1222.
- [5] Deokjin J, Thomas KW. Trichloroethylene and chloroform degradation by a recombinant pseudomonad expressing soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(7): 2473–2482.
- [6] Deokjin J, Craig SK, Richard SH, et al. Optimization of trichloroethylene degradation using soluble methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b expressed in recombinant bacteria. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **51**(3): 349–359.
- [7] Murrell JC, McDonald IR, Gilbert B. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends Microbiol*, 2000, **8**(5): 221–225.
- [8] Lieberman RL, Rosenzweig AC. Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature*, 2005, **434**(7030): 177–182.
- [9] Gou ZX, Xing XH, Luo MF, et al. Functional expression of particulate methane monooxygenase in recombinant *Rhodococcus erythropolis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **263**(2): 136–141.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 880–887.
- [11] Smits THM, Seeger MA, Witholt B, et al. New alkane-responsive expression vectors for *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Plasmid*, 2001, **46**(1): 16–24.
- [12] Gilbert B, McDonald IR, Finch R, et al. Molecular analysis of the *pmo* (particulate methane monooxygenase) operons from two type II methanotrophs. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(3): 966–975.
- [13] Sergei S, Andria MC, Tonya LP, et al. Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* bath. *Microbiology*, 1999, **145**: 1235–1244.
- [14] Ren YL, Xing XH, Zhang C. A simplified method for assay of hydrogenase activities of H-2 evolution and uptake in *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**(14): 1029–1033.
- [15] Zhang C, Xing XH, Lou K. Rapid detection of a

- gfp-marked *Enterobacter aerogenes* under anaerobic conditions by aerobic fluorescence recovery. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **249**(2): 211–218.
- [16] Gu JS, Wang YX, Jiao Q. Biocatalyst preparation from *Pseudomonas putida* SM-6 for conversion of DL-lactate to pyruvate. *Biochem Eng J*, 2005, **22**(2): 89–96.
- [17] Yildirim S, Franko TT, Wohlgemuth R, *et al.* Recombinant chlorobenzene dioxygenase from *Pseudomonas* sp P51: a biocatalyst for regioselective oxidation of aromatic nitriles. *Adv Synth Catal*, 2005, **347**(7-8): 1060–1072.
- [18] Kitmitto A, Myronova N, Basu P, *et al.* Characterization and structural analysis of an active particulate methane monooxygenase trimer from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochemistry*, 2005, **44**(33): 10954–10965.
- [19] Hyung JK, David WD, Alan AD, *et al.* Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria. *Science*, 2004, **305**: 1612–1615.
- [20] Knapp CW, Fowle DA, Kulczycki E, *et al.* Methane monooxygenase gene expression mediated by methanobactin in the presence of mineral copper sources. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(29): 12040–12045.
- [21] Graham PS, Julie S, Ian RM, *et al.* rpoN, mmoR and mmoG, genes involved in regulating the expression of soluble methane monooxygenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology*, 2003, **149**: 1771–1784.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。