

研究报告

可降解 TCE 的甲烷氧化菌 16S rDNA 与 *pmoCAB* 基因簇序列分析

张云茹¹, 陈华清¹, 高艳辉², 邢志林², 赵天涛²

1 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054

2 重庆理工大学化学化工学院, 重庆 400054

张云茹, 陈华清, 高艳辉, 等. 可降解 TCE 的甲烷氧化菌 16S rDNA 与 *pmoCAB* 基因簇序列分析. 生物工程学报, 2014, 30(12): 1900–1911.

Zhang YR, Chen HQ, Gao YH, et al. Sequence analysis of 16S rDNA and *pmoCAB* gene cluster of trichloroethylene-degrading methanotroph. Chin J Biotech, 2014, 30(12): 1900–1911.

摘要: 甲烷氧化菌可高效催化甲烷和多种氯代烃降解, 开展甲烷单加氧酶的基因簇序列分析研究有助于深入了解催化机理, 并提升其在污染物生物降解领域中的应用价值。以甲烷为唯一碳源富集分离甲烷氧化菌, 取 5 种氯代烃作为共代谢基质考察其降解情况, 利用 MEGE5.05 软件构建基于 16S rDNA 的系统发育树对所选菌株进行初步鉴定, 用半巢式 PCR 法分段扩增菌株的颗粒性甲烷单加氧酶 (pMMO) 基因簇并进行 T-A 克隆测序, 通过 ExPASy 计算 pMMO 三个亚基的理论分子量。筛选到了一株甲基孢囊菌 *Methylocystis* sp. JTC3, 在三氯乙烯 (TCE) 初始浓度为 15.64 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, 反应 5 d 后降解率可达 93.79%。经扩增、测序、拼接得到了 3 227 bp 的 *pmoCAB* 基因簇序列, 包括 771 bp 的 *pmoC* 基因、759 bp 的 *pmoA* 基因、1 260 bp 的 *pmoB* 基因和 2 个非编码中间序列, 所对应 γ 、 β 、 α 亚基理论分子量分别为 29.1 kDa、28.6 kDa 和 45.6 kDa。通过 Blast 比对发现 *Methylocystis* sp. JTC3 的 *pmoCAB* 基因簇序列与 *Methylocystis* sp. strain M 的 *pmoCAB* 一致性较高, 其中 *pmoA* 的序列相对保守。JTC3 菌株可高效降解 TCE, 对 *pmoCAB* 基因簇序列的详细分析可为 pMMO 活性中心特征、氯代烃类底物选择性等方面的深入研究提供信息数据基础。

关键词: 甲烷氧化菌, 三氯乙烯, *pmoCAB* 基因簇, 16S rDNA, 系统发育树

Received: May 20, 2014; **Accepted:** August 14, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 51378522), Fundamental and Advanced Research Projects of Chongqing (No. cstc2013jcyjA20009).

Corresponding author: Tiantao Zhao. Tel/Fax: +86-23-62563221; E-mail: tiantaozhao@gmail.com

国家自然科学基金 (No. 51378522), 重庆市基础与前沿研究项目 (No. cstc2013jcyjA20009) 资助。

Sequence analysis of 16S rDNA and *pmoCAB* gene cluster of trichloroethylene-degrading methanotroph

Yunru Zhang¹, Huaqing Chen¹, Yanhui Gao², Zhilin Xing², and Tiantao Zhao²

¹ School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China

² School of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China

Abstract: Methanotrophs could degrade methane and various chlorinated hydrocarbons. The analysis on methane monooxygenase gene cluster sequence would help to understand its catalytic mechanism and enhance the application in pollutants biodegradation. The methanotrophs was enriched and isolated with methane as the sole carbon source in the nitrate mineral salt medium. Then, five chlorinated hydrocarbons were selected as cometabolic substrates to study the biodegradation. The phylogenetic tree of 16S rDNA using MEGA5.05 software was constructed to identify the methanotroph strain. The *pmoCAB* gene cluster encoding particulate methane monooxygenase (pMMO) was amplified by semi-nested PCR in segments. ExPASy was performed to analyze theoretical molecular weight of the three pMMO subunits. As a result, a strain of methanotroph was isolated. The phylogenetic analysis indicated that the strain belongs to a species of *Methylocystis*, and it was named as *Methylocystis* sp. JTC3. The degradation rate of trichloroethylene (TCE) reached 93.79% when its initial concentration was 15.64 $\mu\text{mol/L}$ after 5 days. We obtained the *pmoCAB* gene cluster of 3 227 bp including *pmoC* gene of 771 bp, *pmoA* gene of 759 bp, *pmoB* gene of 1 260 bp and two noncoding sequences in the middle by semi-nested PCR, T-A cloning and sequencing. The theoretical molecular weight of their corresponding gamma, beta and alpha subunit were 29.1 kDa, 28.6 kDa and 45.6 kDa respectively analyzed using ExPASy tool. The *pmoCAB* gene cluster of JTC3 was highly identical with that of *Methylocystis* sp. strain M analyzed by Blast, and *pmoA* sequences is more conservative than *pmoC* and *pmoB*. Finally, *Methylocystis* sp. JTC3 could degrade TCE efficiently. And the detailed analysis of *pmoCAB* from *Methylocystis* sp. JTC3 laid a solid foundation to further study its active sites features and its selectivity to chlorinated hydrocarbon.

Keywords: methanotroph, trichloroethylene, *pmoCAB* gene cluster, 16S rDNA, phylogenetic tree

氯代烃类化合物具有很强的致癌作用，由于在工业上的广泛使用，氯代烃类化合物造成了严重的环境污染，三氯乙烯 (Trichloroethylene, 简称 TCE) 是这类化合物中的典型污染物^[1-2]。甲烷氧化菌不仅能够利用甲烷作为碳源和能源生长^[3-4]，而且这些微生物还可以氧化包括 TCE 在内的多种氯代烃，甲烷单加氧酶 (Methane monooxygenase, MMO) 在降解过程起着关键作用，在工业污染治理领域现出了潜在的价值^[5-6]。甲烷氧化菌能够产生两种类型的 MMO：溶解甲烷单加氧酶 (Solution methane monooxygenase, sMMO) 和颗粒甲烷单

加氧酶 (Particulate methane monooxygenase, pMMO)^[7-8]，由于两种酶在底物范围、底物亲和性和对抑制剂敏感程度等方面的差异性，导致不同菌株催化降解氯代烃范围和效率的不同。sMMO 和 pMMO 在微生物体内具有相似功能，但两者的基因序列、晶体结构和底物选择性等都存在显著差异^[9-11]。近年来研究人员对基于发孢甲基弯菌 *Methylosinus trichosporium* OB3b、荚膜甲基球菌 *Methylococcus capsulatus* Bath 两株甲烷氧化菌的 sMMO 有较深入研究^[12-13]，sMMO 由羟基化酶 (MMOH)、还原酶 (MMOR)、调节蛋白 (MMOB) 以及未知功能的

orfY 四部分组成。国内外对 pMMO 的研究主要集中在晶体结构、底物对基因表达影响、基因工程菌构建等^[14-16]。pMMO 由 α 、 β 和 γ 亚基以 1 : 1 : 1 的比例组成, 以 $(\alpha\beta\gamma)_3$ 三聚体形式存在; 编码 pMMO 的基因簇 *pmmo* 由 3 个功能基因组成, 按 *pmoCAB* 排列, 分别编码 γ 亚基、 β 亚基、 α 亚基。Basu 等^[17]从 *Methylococcus capsulatus* Bath 中分离纯化得到 pMMO 的 α (47 kDa)、 β (27 kDa)、 γ (23 kDa) 亚基和一个 63 kDa 的蛋白质推测为还原酶 (pMMOR), 并明确指出该 3 个亚基组成的蛋白为羟甲基化酶 (pMMOH), 对于 pMMO 酶系类似于 sMMO 的 MMOR、MMOB 功能的蛋白目前还没有成功分离纯化。当前所有对 pMMO 的晶体结构及活性位点分析都是基于 $(\alpha\beta\gamma)_3$ 三聚体^[18], 对各亚基在催化甲烷氧化及氯代烃降解过程中的作用认识非常有限^[12]。

多数甲烷氧化菌仅以甲烷为唯一碳源和能源, 这对纯菌株的获取、传代和保藏有诸多不便, 且 pMMO 以颗粒形式结合在细胞质膜上, 因此从纯菌株的细胞膜双层脂疏水环境中对 pMMO 分离纯化和生化表征存在困难^[13,19]。分子生物学的快速发展使基因测序和分析成为研究蛋白质结构和功能的重要方法^[20], 结合计算化学方法和谱学表征信息, 可以预测蛋白质的某些生化参数、修饰蛋白质的某些功能, 提供阐明蛋白质结构和功能的重要信息, 这些都以 GenBank 中有大量的基因信息为前提。但 GenBank 数据库中 *pmoCAB* 基因信息并不完善, 目前只有 9 株 7 个属的甲烷氧化菌全基因组 (包含 *pmoCAB*) 序列信息, 5 株甲烷氧化菌的 *pmoCAB* 序列在 GenBank 中单独注册, 这阻碍了对 MMO 结构和催化功能的深入研究, 一定

程度上限制了甲烷氧化菌在温室气体减排和污染物降解领域的应用。目前国内还没有关于 *pmoCAB* 序列扩增的报道。

据此, 本研究分离得到一株可降解 TCE 的甲烷氧化菌 JTC3, 研究了其对 TCE 的耐受性和共代谢降解能力; 考察了 16S rDNA 的系统发育分析; 分析了代谢过程中关键酶 *pmoCAB* 基因结构。该研究对甲烷氧化菌关键酶结构的深入研究及其在污染物降解领域的应用提供了有价值的基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

NMS 液体培养基参考文献[21]配制。文中涉及的扩增引物见表 1, 由上海百力格生物技术有限公司合成。矿化垃圾取自上海老港生活垃圾填埋场, 填埋时间 18 a, 含水分 13.2%, 总氮 0.47%, 有机质 9.96%, pH 值 7.73。研究用 LA *Taq* 酶、DL 2 000 bp DNA marker 和 500 bp DNA ladder (Dye plus) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。主要设备有: Eppendorf 5332 型 PCR 仪、BIORAD 凝胶成像仪、SC-6 000A 气相色谱仪 (配 ECD 检测器)。

1.2 方法

1.2.1 甲烷氧化菌的分离纯化

选取 4 mm 筛下和 2 mm 筛上矿化垃圾颗粒 100 g, 置于 500 mL 血清瓶后具塞密封, 用 100 mL 甲烷置换瓶中空气, 30 °C 密闭驯化 2 周实现甲烷氧化菌的富集复壮。对富含甲烷氧化菌的矿化垃圾进行 10 倍系列稀释, 以甲烷为碳源用 NMS 固体平板分离纯化, 连续纯化 4-5 代得到单菌落。

表 1 引物及其核苷酸序列

Table 1 Primers and their nucleotide sequences

Primers	Nucleotide sequences (5'-3')
F27 ^[22]	AGAGTTTGATCATGGCTCAG
R1429 ^[22]	TACGGTTACCTTGTTACGACTT
A189gc ^[23]	GGNGACTGGGACTTCTGG
Mb661 ^[23]	CCGGMGCAACGTCYTTACC
PU 5'	ATGAGCTCVACGACTRRCACRGC HGC
PU 3'-1	GGAAGACGGAAGTTGACCCAC
PU 3'-2	AGTTGACGTAGCGGTTGATCCAC
PU 3'-3	ATCATAGCAGACGGGAACACGAG
PD 5'-1	CTCGTGTCCCGTCTGCTATGAT
PD 5'-2	TCACGGCGGTTGTCGGTTCGCT
PD 5'-3	AATACATCCGCATGGTCGAGC
PD 3'	AGTWTCGCTTAGGGCATGTC

1.2.2 基因组提取、DNA 产物纯化及 T-A 克隆

基因组提取参照 TIANGEN DP302 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明;PCR 产物纯化参照 TIANGEN DP209 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒;T-A 克隆参照宝生物 pMDTM19-T Vector Cloning Kit 试剂盒说明。

1.2.3 JTC3 菌株降解氯代烃试验

取甲烷氧化菌 JTC3 种子液 1 mL 注入分装了 20 mL NMS 培养基的 100 mL 血清瓶中,用 20 mL 甲烷置换瓶中等量空气置于 30 °C、170 r/min 恒温摇床富集培养 2-3 d 作为生物介质。以洁净空气置换血清瓶中气体,再用 20 mL 甲烷置换瓶中空气,配制不同的氯代烃饱和溶液并取 1 mL 至菌液中使其达到特定的初始浓度。定时顶空取样,利用气相色谱仪检测氯代烃的浓度变化,由亨利定律可换算得到氯代烃的液相浓度^[24],比较菌株 JTC3 对不同氯代烃的共代谢降解情况。

以同样方法富集菌液,将配制好一定浓度梯度的 TCE 饱和溶液加入系列处理后的血清瓶

中,每组设置 3 个平行样,同时设置无菌对照组。此时血清瓶中含有甲烷和不同浓度 TCE (0-70 μmol/L)。每隔一定时间气相色谱检测瓶中甲烷浓度变化,直至甲烷消耗完;同时检测 TCE 的浓度变化,观察 TCE 对甲烷氧化的影响及不同浓度 TCE 的降解情况。

1.2.4 气相色谱检测条件

氯代烃检测,色谱柱:GDX-104 2 m;氮气为载气,载气流速:35 mL/min;尾吹风速:10 mL/min;进样器(汽化室)温度:120 °C;柱箱温度(柱温):90 °C;检测器温度:200 °C;进样量:0.1 mL;基流补偿 0.00 nA。

生物气检测(甲烷、氧气和二氧化碳):TCD 检测器;色谱柱:TCX-01 1 m;氮气为载气,载气流速:40 mL/min;进样器(汽化室)温度:120 °C;柱箱温度(柱温):90 °C;检测器温度:120 °C。

1.2.5 JTC3 菌株的 16S rDNA 序列分析及分类鉴定

以甲烷氧化菌株 JTC3 的基因组 DNA 为模板,用引物 F27/R1429 扩增其 16S rDNA 并测序,选择具有代表性的 16S rDNA 序列相对完整的甲烷氧化菌,用 MEGA 5.05 软件中的邻近法(NJ)构建系统发育树,结合 NCBI (National center for biotechnology information)的 Blast (Basic local alignment search tool) 分析对菌株 JTC3 进行分类鉴定。PCR 反应条件:94 °C 5 min;94 °C 35 s,55 °C 30 s,72 °C 35 s,30 个循环;72 °C 5 min。

1.2.6 JTC3 菌株的 *pmoCAB* 基因簇的分段扩增和序列分析

以 JTC3 菌的基因组为模板,通过简并引物 A189gc/Mb661 扩增其 *pmoA* 基因片段并测序,

PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 59 °C 45 s, 68 °C 40 s, 35 个循环; 68 °C 5 min。

根据 GenBank 中 *pmoCAB* 基因簇同源序列信息和已测得的 JTC3 的部分 *pmoA* 基因序列, 用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计出 6 对嵌套引物 (图 1, 表 1), 采用三轮半巢式 PCR

分别扩增 *pmoB* 和 *pmoC* 基因片段并进行 T-A 克隆测序, 与已知的 *pmoA* 基因序列拼接成 *pmoCAB* 基因簇, 用菌落 PCR 法^[25]鉴定阳性克隆子。每轮半巢式 PCR 的模板及引物见表 2, 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 35 s, 55 °C 30 s, 72 °C 35 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

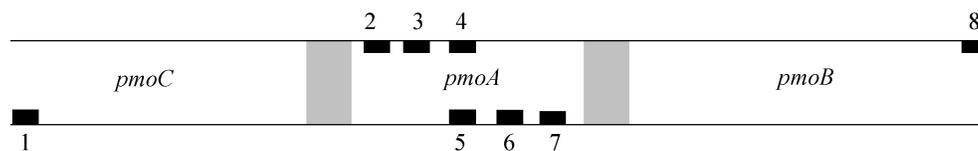


图 1 *pmoCAB* 基因簇构成及引物设计位置示意图

Fig. 1 Constituent map of *pmoCAB* gene clusters and location of primer designed where the black and gray regions are primer sites and noncoding regions respectively. The digital sites of 1 to 8 are PU 5', PU 3'-1, PU 3'-2, PU 3'-3, PD 5'-1, PD 5'-2, PD 5'-3, PD 3' respectively.

表 2 *pmoC* 和 *pmoB* 基因片段三轮半巢式 PCR 所用引物及模板

Table 2 Primers and templates used in semi-nested PCR

Semi-nested PCR		<i>pmoC</i> -terminal fragment	<i>pmoB</i> -terminal fragment
The first round	Template	Genome DNA	
	Primer	PU 5'/PU 3'-3	PD 5'-1/PD 3'
The second round	Template	PCR product of first round diluted 20 times	
	Primer	PU 5'/PU 3'-2	PD 5'-2/PD 3'
The third round	Template	PCR product of second round diluted 20 times	
	Primer	PU 5'/PU 3'-1	PD 5'-3/PD 3'

用 Blast 分析 JTC3 菌的 *pmoCAB* 基因簇序列及各组分的核苷酸序列, 并用 DNAMAN 6.0.3.99 软件翻译成相应的氨基酸序列, 比较同源性相近甲烷氧化菌 MMO 间的组成差异。

根据 *pmoCAB* 各组分对应的氨基酸序列, 利用 ExPASy 服务器中 Compute pI/Mw 工具计算 pMMO 中各组分的理论等电点和分子量。

2 结果与分析

2.1 甲烷氧化菌的分离纯化

分离得到一株甲烷氧化菌菌株, 命名为

JTC3, 在甲烷为唯一碳源的 NMS 平板能快速生长。该菌株菌落特征: 透明圆形, 菌落直径 1–1.5 mm, 表面光滑微隆起, 湿润, 与培养基结合不紧密易挑取, 周围平整。光学显微镜革兰氏染色呈阴性, 球菌, 菌体直径约为 0.5 μm, 无鞭毛, 无芽胞。

2.2 甲烷氧化菌 JTC3 降解氯代烃

利用甲烷氧化菌 JTC3 对 1,2-二氯乙烷、1,2-二氯丙烷、TCE 等 5 种氯代烃进行降解研究, 5 d 后氯代烃的降解效果如图 2 所示。由图 2A

可见,除 TCE 外,其他 4 种氯代烃基本无变化,这与 Oldenhuis 等^[26]得出的 TCE 为易降解化合物并且甲烷氧化菌与不同氯代烃亲和性不同的结论相一致, TCE 5 d 的降解量为 $0.29 \mu\text{mol/L}$; 图 2B 为 5 d 后的 TCE 浓度变化, 5 d 对照组浓度基本无变化, 实验组由初始(15.64 ± 0.27) $\mu\text{mol/L}$ 降为(0.97 ± 0.041) $\mu\text{mol/L}$, 平均降解率为 93.79%, 其降解速率随浓度的减小逐渐降低, 而对对照组浓度 5 d 后基本无变化。研究发现当 TCE 浓度在 $0.20\text{--}250.38 \mu\text{mol/L}$ 范围内, 最大氧化速率 V_{max} 变化达 120 倍^[27], 说明氯代烃初始浓度对甲烷氧化菌的降解活性影响显著。 *Methylocystis* sp. M 在 TCE 初始浓度为 $7.6 \mu\text{mol/L}$ (原文为 1 ppm) 时, 6 d 后才开始降解 TCE, 第 7 天时 TCE 降解率约为 91%^[28]。与甲基孢囊菌 *Methylocystis* sp. M 比较, JTC3 菌株能耐受高浓度的 TCE, 且降解 TCE 效率更好。

Oldenhuis 等^[26]详细研究了 TCE 对细胞毒性作用, 发现细胞的失活程度与 TCE 的降解量成正比。Choi 等^[29]研究了 TCE 对混合菌群甲烷氧化及 *pmoA* 基因表达的影响, 发现随着 TCE 浓度的增加, *pmoA* 的基因拷贝数逐渐减小。在考察 TCE 胁迫条件下 JTC3 菌株的甲烷氧化能力时, 发现了不同的实验结果。如图 3 所示, 当 TCE 浓度较低时 ($12.55\text{--}20.76 \mu\text{mol/L}$) JTC3 菌株的甲烷氧化能力不但没有被抑制, 反而有所促进。但当 TCE 浓度超过 $60.76 \mu\text{mol/L}$ 时甲烷氧化速率较低, 在 20 h 以后甲烷基本不再被氧化, 可以推测 TCE 影响甲烷单加氧酶的活性进而影响甲烷的氧化。为了进一步探究甲烷氧化菌 JTC3 的代谢特性, 还需对其进行初步分类鉴定以及 *pMMO* 基因簇的序列分析。

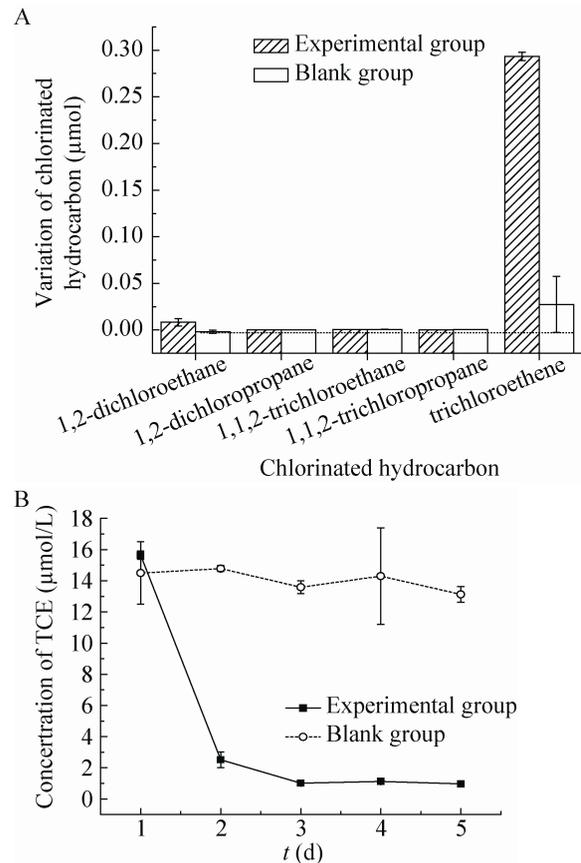


图2 甲烷氧化菌 JTC3 降解 5 种氯代烃效果及 TCE 浓度变化

Fig. 2 Degradation of chlorinated hydrocarbons (A) by *Methylocystis* sp. JTC3 and variation of TCE concentration over time (B).

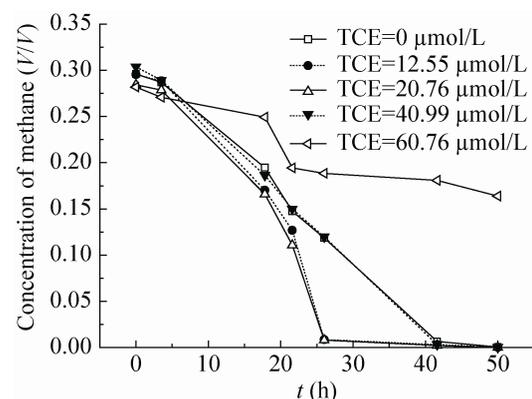


图3 不同 TCE 浓度对甲烷氧化的影响

Fig. 3 Effect of TCE concentration on methane oxidation.

2.3 甲烷氧化菌 JTC3 菌株的 16S rDNA 序列分析及其分类鉴定

通过 PCR 扩增得到 1 500 bp 左右的特异性 16S rDNA 条带 (图 4), 测序为 1 487 bp; 构建了基于 16S rDNA 的系统发育树 (图 5), 菌株有三大分支, 一是包括 5 株甲基孢囊菌和 4 株甲基弯菌的 α 变形菌纲分支; 中间是包括 6 个菌株的 γ 变形菌纲分支; 最下面一支是外群生丝微菌属的一个菌株。一般当一个分支上置信度大于 95% 时, 该分支内的两个菌株为同一种, 菌株 JTC3 属于 α 变形菌纲分支, 与 *Methylocystis* sp. M 以 99% 的置信度聚为一支。

经 NCBI 网站的 Blast 分析, JTC3 菌株的 16S rDNA 序列中, 有 92% 的碱基与甲基孢囊菌属的 EB-1、IMET 10484、WI 14M 等菌株一致性达到 99%, 95% 的 16S rDNA 序列与

Methylocystis sp. M 一致性达 98%。综上系统发育树分析和 Blast 比对结果及其代谢特征, 甲烷氧化菌 JTC3 为 α 变形菌纲/根瘤菌目/甲基孢囊菌属一个种, 命名为 *Methylocystis* sp. JTC3。

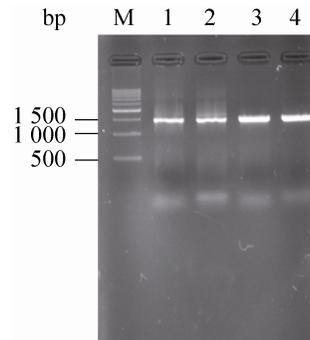


图 4 甲烷氧化菌 JTC3 的 16S rDNA

Fig. 4 PCR products electrophoresis of 16S rDNA from *Methylocystis* sp. JTC3. 1-4: 16S rDNA of *Methylocystis* sp. JTC3.

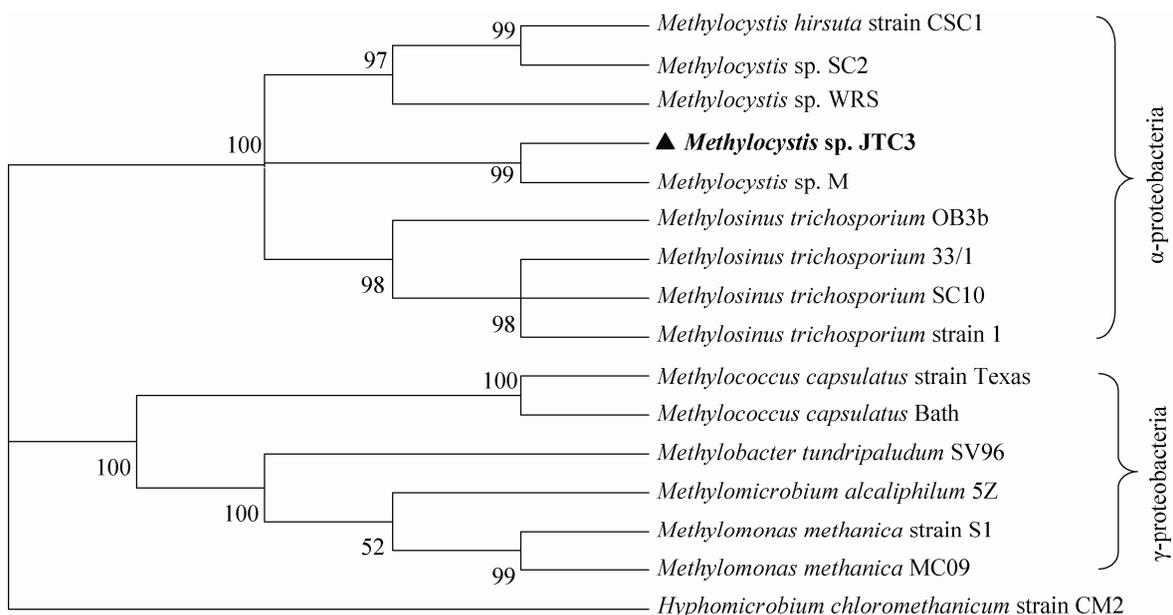


图 5 基于 16S rDNA 的 *Methylocystis* sp. JTC3 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic analysis of the 16S rDNA from *Methylocystis* sp. JTC3.

2.4 JTC3 菌株的 *pmoCAB* 基因簇分段扩增及序列分析

菌株 JTC3 的 *pmoCAB* 基因簇中部 *pmoA* 基因片段的 PCR 产物电泳结果见图 6A, 在 500 bp 附近有一条特异性的 DNA 条带, 经纯化测序为 489 bp, 与 GenBank 中甲烷氧化菌的 *pmoA* (AM849782.1) 序列一致性达到 99%, 表明该特异性片段为 *pmoA* 的基因片段。

在此基础上用三轮半巢式 PCR 扩增菌株 JTC3 的 *pmoC* 端和 *pmoB* 端基因片段, 结果见图 6B。根据 GenBank 中 *pmoCAB* 同源基因序列信息可以预测 JTC3 的 *pmoCAB* 基因簇、*pmoC* 片段及 *pmoB* 片段的序列长度范围, 用以分析 PCR 结果。图 6B 显示 *pmoC* 端片段在 1 000 bp–1 500 bp 处有单一 DNA 条带 (预测值约 1 340 bp), *pmoB* 端片段在 1 500 bp 附近有单一 DNA 条带 (预测值约 1 570 bp), 均与预测的序列长度相符, 且无非特异性条带, 表明经过三轮半巢式 PCR 成功扩增出 *pmoC* 端和 *pmoB* 端片段基因。

2.5 *pmoCAB* 基因簇序列分析

将测序所得的 *pmoC* 片段和 *pomB* 片段基因序列与已测得的 *pmoA* 序列拼接, 得到 *pmoCAB* 基因簇全序列, 在 GenBank 数据库中登记, 登记号为 *pmoCAB* KJ499432、*pmoA* KF742674、*pmoB* KF742675、*pmoC* KF742673。分析得知 *pmoCAB* 基因簇共 3 226 bp, 其中第 1–771 bp 间片段为 *pmoC* 基因, 第 1 087–1 845 bp 间 759 bp 片段为 *pmoA* 基因, 第 1 967–3 226 bp 间 1 260 bp 片段为 *pmoB* 基因, 其余为非编码中间序列。

Blast 分析菌株 JTC3 的各甲烷单加氧酶组分基因及氨基酸序列结果如图 7, 菌株 JTC3 与 *Methylocystis* sp. M 有较高的序列一致性, *pmoC*、*pmoA* 和 *pmoB* 3 个基因序列的一致性均达到 99%, 对应的氨基酸序列一致性分别为 99%、100%和 100%。菌株 JTC3 的 pMMO 与菌株 M 的 pMMO 序列高度一致, 这与系统发育树的分析结果一致。JTC3 的 16S rDNA 与菌株 M 遗传距离最近, 进一步证明了菌株 JTC3 是甲基孢囊菌属的菌株, 但菌株 JTC3 降解 TCE 效果明显优于菌株 M。

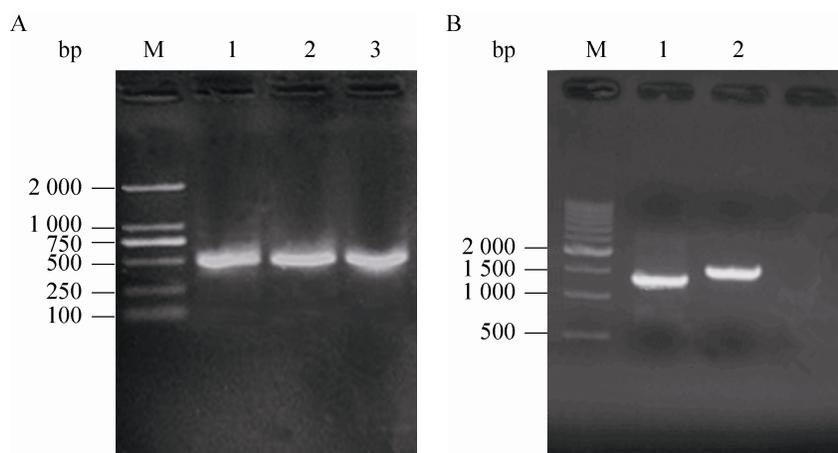


图 6 *Methylocystis* sp. JTC3 的 *pmoCAB* 基因簇分段扩增电泳图

Fig. 6 Segmentation amplification of *pmoCAB* cluster from *Methylocystis* sp. JTC3. (A) *pmoA* gene segment. 1–3: *pmoA* gene segment. (B) The third time of semi-nested PCR. 1: *pomC* segment; 2: *pomB* segment.

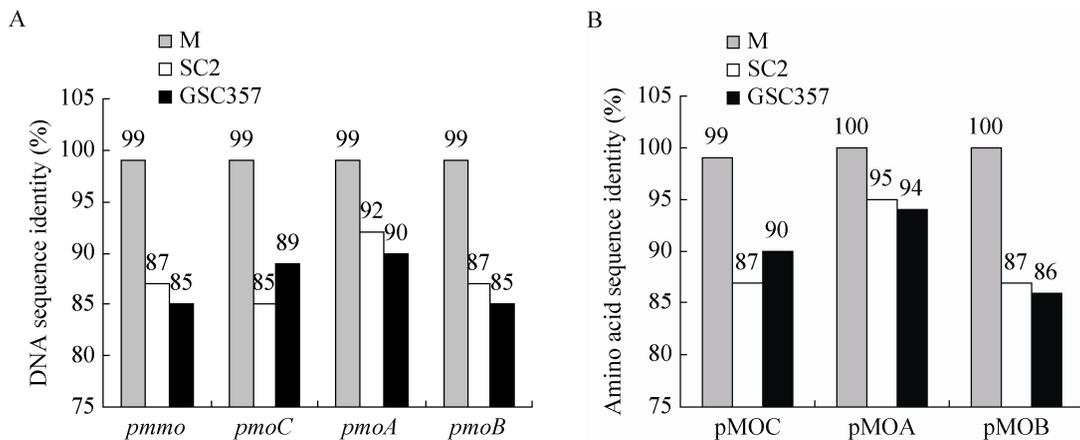


图7 JTC3菌株与3株甲烷氧化菌的pMMO序列一致性比较

Fig. 7 Comparison of sequences of pMMO genes from *Methylocystis* sp. JTC3 with several known methanotrophs.

与 *Methylocystis* sp. SC2 和 *Methylocystis* sp. GSC357 相比, 菌株 JTC3 的 pMMO 核苷酸序列和对应的氨基酸序列一致性达到 85% 以上。4 株菌的 3 个基因比较, *pmoA* 序列在不同菌株间比较保守, 对应的氨基酸序列一致性达到 94% 以上, 核苷酸序列一致性达到 90% 以上。

pmoCAB 序列的种系发生与其 16S rDNA 高度一致^[30], 在 *pmoCAB* 的 3 个功能基因中 *pmoA* 基因序列比较保守, 近年来常被作为标记基因研究不同环境中甲烷氧化菌的种群分布及数量变化^[31-32], 在 GenBank 数据库中报道也较多, 但独立注册的 *pmoA* 基因大部分都在 450–520 bp 之间, 没有完整的 *pmoA* 阅读框, 本研究获得了从起始密码子 ATG 至终止密码子 TAA 之间 759 bp 的完整 *pmoA* 基因开放阅读框。

根据 ExPASy 的软件包工具计算得到 *Methylocystis* sp. JTC3 中 pMMO 的 α 、 β 和 γ 亚基的理论等电点分别为 6.56、6.96 和 5.05, 理论分子量分别为 45.6 kDa、28.6 kDa、29.1 kDa。Semrau 等报道, *pmoCAB* 编码的 pMMO 的 α 、 β 和 γ 3 个亚基分子量分别约为 46 kDa、28 kDa、

29 kDa^[33], 不同属的甲烷氧化菌 pMMO 的 α 、 β 和 γ 亚基分子量有差别, *Methylococcus capsulatus* Bath 中 pMMO 的 3 个对应亚基的分子量分别为 47 kDa、27 kDa 和 23 kDa^[17], 而 *Methylosinus trichosporium* OB3b 中 pMMO 的 3 个对应亚基的分子量分别为 41 kDa、26 kDa 和 25 kDa^[13], 甲基孢囊菌属菌株 pMMO 的 3 个亚基分子量目前没有确切的报道。根据氨基酸序列预测的 pMMO 理论分子量与实际接近。对于分离纯化难度较大的蛋白质, 用分子生物学手段获得其基因, 并用软件分析获得部分生化参数是一个全新的思路。

3 结论与展望

Methylocystis sp. JTC3 能够高效降解 TCE, 且低浓度 TCE 能够促进其氧化甲烷, 用 16S rDNA 对其鉴定为甲基孢囊菌属的一个菌株, 其 *pmoCAB* 基因簇共 3 226 bp, 且基因序列与 *Methylocystis* sp. M 的 *pmoCAB* 序列一致性较高, 与同属的 SC2、GSC357 序列一致性相对低。

Methylocystis sp. JTC3 与 *Methylocystis* sp.

M 的 pMMO 各组分中, 只有 *pmoC* 对应的 γ 亚基与 *Methylocystis* sp. M 有 2 个氨基酸残基 (D/S 5, T/A131) 不一致。*Methylocystis* sp. TJC3 的第 5 位的天冬氨酸残基含有 1 个游离羧基属于酸性氨基酸残基, 第 131 位的苏氨酸残基含有一个游离羟基, 与之对应的 *Methylocystis* sp. M 第 5 位丝氨酸残基则含有极性羟基, 第 131 位为丙氨酸残基没有游离的官能团, 这 2 个氨基酸残基差别都涉及到与酶的活性中心有密切关系官能团—羟基, 2 个氨基酸的差异性对其与底物结合能力是否有影响有待进一步研究。

不同甲烷氧化菌间甲烷单加氧酶基因序列的差异决定了基础代谢和生理功能的差异, 同源性接近的菌株代谢模式本应相似, 但 JTC3 降解 TCE 效果明显优于菌株 M, 且菌株 M 对 TCE 的降解过程是 sMMO 起主导作用^[34], 含有 sMMO 的甲烷氧化菌均表现出较强的 TCE 降解能力, 只含有 pMMO 的甲烷氧化菌对 TCE 的降解能力强弱有别^[35], JTC3 菌株通过共代谢作用降解 TCE, 且在降解过程中培养基中铜离子的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 该条件有利于提高 pMMO 的活性, 不利于 sMMO 的表达, 暗示在 TCE 降解过程中 pMMO 起主导作用, JTC3 菌株共代谢 TCE 与 pMMO 的深层次关系有待进一步研究。确切的 pMMO 氨基酸序列和高级结构是了解不同菌株间代谢异同的前提, 也为酶的定点改造提供了依据。*pmoCAB* 基因簇测序为各亚基的底物结合位点、酶促反应活性中心特征、JTC3 菌株对氯代烃类底物的选择性及降解能力等的深入研究打下了基础。

REFERENCES

- [1] Choi SA, Lee EH, Cho KS. Effect of trichloroethylene and tetrachloroethylene on methane oxidation and community structure of methanotrophic consortium J Environ Sci Health, 2013, 48(13): 1723–1731.
- [2] Wei CH, Zhang XX, Ren Y, et al. Pollution control of persistent organic pollutants, in water system: adsorption/enrichment, biodegradation and process analysis. Environ Chem, 2011, 30(1): 300–309 (in Chinese).
韦朝海, 张小璇, 任源, 等. 持久性有机污染物的水污染控制: 吸附富集. 生物降解与过程分析. 环境化学, 2011, 30(1): 300–309.
- [3] Semrau JD, DiSpirito AA, Yoon S. Methanotrophs and copper. FEMS Microbiol Lett, 2010, 34(4): 496–531.
- [4] Wei SZ. Methanotrophs and their applications in environment treatment: a review. Chin J Appl Ecol, 2012, 23(8): 2309–2318 (in Chinese).
魏素珍. 甲烷氧化菌及其在环境治理中的应用. 中国应用生态学报, 2012, 23(8): 2309–2318.
- [5] Semrau JD. Bioremediation via methanotrophy: over view of recent findings and suggestions for future research. Front Microbiol, 2011, 2(209): 1–7.
- [6] Han B, Su T, Li X, et al. Research progresses of methanotrophs and methane monooxygenase. Chin J Biotech, 2008, 24(9): 1511–1519 (in Chinese).
韩冰, 苏涛, 李信, 等. 甲烷氧化菌及甲烷单加氧酶的研究进展. 生物工程学报, 2008, 24(9): 1511–1519.
- [7] Cao YB, Yin B, Niu YB, et al. Research progresses of methanotrophs. Environ sci, 2012, 6: 24–26 (in Chinese).
曹亚彬, 殷博, 牛彦波, 等. 甲烷氧化菌的研究进展. 环境科学, 2012, 6: 24–26.
- [8] Semrau JD, DiSpirito AA, Vuilleumier S. Facultative methanotrophy: false leads, true results, and suggestions for future research. FEMS Microbiol Lett, 2011, 323(1): 1–12.
- [9] Jagadevan S, Semrau JD. Priority pollutant degradation by the facultative methanotroph, *Methylocystis* strain SB2. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(11): 5089–5096.

- [10] Speitel Jr GE, Thompson RC, Weissman D. Biodegradation kinetics of *Methylosinus trichosporium* OB3b at low concentrations of chloroform in the presence and absence of enzyme competition by methane. *Water Res*, 1993, 27(1): 15–24.
- [11] Van Hylckama VJ, De Koning W, Janssen DB. Transformation kinetics of chlorinated ethenes by *Methylosinus trichosporium* OB3b and detection of unstable epoxides by on-line gas chromatography. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 62(9): 3304–3312.
- [12] Culpepper MA, Rosenzweig AC. Architecture and active site of particulate methane monooxygenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2012, 47(6): 483–492.
- [13] Lieberman RL, Rosenzweig AC. Biological methane oxidation: regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2004, 39(3): 147–164.
- [14] Culpepper MA, Cutsail III GE, Hoffman BM, et al. Evidence for oxygen binding at the active site of particulate methane monooxygenase. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(18): 7640–7643.
- [15] Han B, Su T, Yang C, et al. Heterologous expression of particulate methane monooxygenase in different host cells. *Chin J Biotech*, 2009, 25(8): 1151–1159 (in Chinese).
韩冰, 苏涛, 杨程, 等. 颗粒状甲烷单加氧酶异源表达方法. *生物工程学报*, 2009, 25(8): 1151–1159.
- [16] Yoon S, Im J, Bandow N, et al. Constitutive expression of pMMO by *Methylocystis* strain SB2 when grown on multi-carbon substrates: implications for biodegradation of chlorinated ethenes. *Environ Microbiol Rep*, 2011, 3(2): 182–188.
- [17] Basu P, Katterle B, Andersson K, et al. The membrane-associated form of methane mono-oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a copper/iron protein. *Biochem J*, 2003, 369(2): 417–427.
- [18] Smith SM, Rawat S, Telser J, et al. Crystal structure and characterization of particulate methane monooxygenase from *Methylocystis* species strain M. *Biochemistry*, 2011, 50(47): 10231–10240.
- [19] Horz HP, Yimga MT, Liesack W. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(9): 4177–4185.
- [20] Zhao T, Li H, Cheng C. 16S rRNA two level structure analysis in the classification and identification of microorganisms. *Food Ferm Indus*, 2011, 37(12): 105–108 (in Chinese).
赵婷, 李辉, 程池. 16S rRNA 二级结构分析在微生物分类鉴定中的应用. *食品与发酵工业*, 2011, 37(12): 105–108.
- [21] Zhao TT, Zhang LJ, Zhang YR, et al. Characterization of *Methylocystis* strain JTA1 isolated from aged refuse and its tolerance to chloroform. *J Environ Sci*, 2013, 25(4): 770–775.
- [22] Luo MF, Wu H, Wang L, et al. Growth characteristics of a methane-utilizing mixed consortia MY9. *Chin J Proc Eng*, 2009, 9(1): 113–117 (in Chinese).
罗明芳, 吴昊, 王磊, 等. 甲烷氧化混合菌群 MY9 的生长特性. *过程工程学报*, 2009, 9(1): 113–117.
- [23] Kolb S, Knief C, Stubner S. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(5): 2423–2429.
- [24] Robbins GA, Wang S, Stuart JD. Using the static headspace method to determine Henry's law constants. *Analy Chem*, 1993, 65(21): 3113–3118.
- [25] Chen SX, Wang XW, Fang YL. Rapid characterization of recombination clone by PCR screening of individual bacterial colonies. *Microbiol China*, 2006, 33(3): 52–56 (in Chinese).
陈书霞, 王晓武, 房玉林. 单菌落 PCR 法直接

- 快速鉴定重组克隆. 微生物学通报, 2006, 33(3): 52–56.
- [26] Oldenhuis R, Oedzes JY, Van der Waarde JJ, et al. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 57(1): 7–14.
- [27] Xing ZH, Zhang LJ, Zhao TT. Recent research, analysis of kinetics and prospect on degradation of chlorinated hydrocarbons via obligate and facultative methanotrophs. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 531–544 (in Chinese).
邢志林, 张丽杰, 赵天涛. 专一营养与兼性甲烷氧化菌降解氯代烃的研究现状、动力学分析及展望. 生物工程学报, 2014, 30(4): 531–544.
- [28] Uchiyama H, Nakajima T, Yagi O, et al. Aerobic degradation of trichloroethylene by a new type II methane-utilizing bacterium, strain M. Agri biol chem, 1989, 53(11): 2903–2907.
- [29] Choi SA, Lee EH, Cho KS. Effect of trichloroethylene and tetrachloroethylene on methane oxidation and community structure of methanotrophic consortium. J Environ Sci Health, 2013, 48(13): 1723–1731.
- [30] Knief C, Vanitchung S, Harvey NW, et al. Diversity of methanotrophic bacteria in tropical upland soils under different land uses. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(7): 3826–3831.
- [31] Dam B, Dam S, Blom J, et al. Genome analysis coupled with physiological studies reveals a diverse nitrogen metabolism in *Methylocystis* sp. strain SC2. PLoS ONE, 2013, 8(10): e74767.
- [32] Iguchi H, Yurimoto H, Sakai Y. Soluble and particulate methane monooxygenase gene clusters of the type I methanotroph *Methylovulum miyakonense* HT12. FEMS Microbiol Lett, 2010, 312(1): 71–76.
- [33] Semrau JD, Chistoserdov A, Lebron J, et al. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. J Bacteriol, 1995, 177(11): 3071–3079.
- [34] Shigematsu T, Hanada S, Eguchi M, et al. Soluble methane monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading *Methylomonas* sp. strains and detection of methanotrophs during in situ bioremediation. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(12): 5198–5206.
- [35] Baker PW, Futamata H, Harayama S, et al. Molecular diversity of pMMO and sMMO in a TCE-contaminated aquifer during bioremediation. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 38(2/3): 161–167.

(本文责编 陈宏宇)