

在甲醇中生长的变异株 761AR^[3], 作为诱变原始菌株。

Methylobacterium organophilum XX 菌株: 为不能利用甲烷的兼性甲醇氧化细菌, 其细胞形态及色素与 761M 菌株相似^[4]。

Hyphomicrobium sp. 8502 菌株: 本实验室分离的能利用甲醇而不利用甲烷的生丝微细菌。

(二) 培养基及培养条件

各菌株所用培养基及培养条件见参考文献[2]。

(三) 诱变处理及突变体的筛选

761AR 菌株在液体培养基中以 3ml/L 的甲醇为碳源培养至对数生长期, 取菌液 10ml 置直径 90mm 的培养皿中, 黑暗中用 15W 的紫外灯距离 25cm 照射。不同处理时间 (0.5, 1.5, 3.0 分钟) 的菌液于黑暗中 34℃ 培养过夜, 然后适当稀释, 涂布于含 4 ml/L 甲醇的平板上。在空气中培养至粉红色菌落形成 (7 天), 用牙签取单菌落, 对应点种于含甲醇和不含甲醇的平板上, 分别在空气和甲烷气圈中培养。菌落形成后, 挑取甲醇中生长而甲烷中不生长的菌落, 重复对应点种, 直至肯定利用甲醇不利用甲烷的表型为止。在液体培养基中扩大培养, 并重复碳源对照实验。

(四) 甲烷单加氧酶活性的测定

1. 氧电极法: 细胞振荡培养至对数期, 17000×g 离心 10 分钟, 用 50mmol/L 磷酸盐-5mmol/L MgCl₂ (pH7.0) 洗涤二次, 再在 0.5—1.0mg 干重/ml 的密度悬浮于同一缓冲液中, 用 Rank 氧电极测定依赖于甲烷氧化的氧吸收^[5], 用氧吸收表示 MMO 的活性。

2. 气相色谱法: 取细胞悬液 1.0ml (约 3mg 干重) 于 6ml 小瓶中, 小瓶密闭后, 用注射器加入 1.0 ml 丙烯和氧气等体积的混

合气, 31℃ 水浴中往复振荡 (150r/min 振幅 4cm) 保温 60 分钟, 用 103 型气相色谱仪 (上海分析仪器厂制) 测定环氧丙烷的生成, 用转化丙烯生成环氧丙烷的能力指示 MMO 活性。测定条件: 不锈钢柱, 长 2 m, 内径 0.3cm, Porapak QS 50—80 目固定相, 柱温 155℃, 进口温度 180℃, 氮气作载气, 流速 15ml/min, FID 检测, 外标法。

(五) 突变体与野生型间同一性的鉴定

1. 染色体 DNA 的提取、酶切及 G+C mol% 的测定: DNA 的提取、酶切方法同参考文献[6], 酶切后用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳比较电泳谱带的异同。DNA 中 G+C mol% 的测定用熔点测定法, 见参考文献[7]。

2. 可溶性蛋白质电泳谱带的比较: 细胞在液体培养基中振荡培养至对数生长末期, 用 RPR-12 转头 8000r/min 离心 15 分钟, 用 50 mmol/L 磷酸盐-5 mmol/L MgCl₂ (pH7.0) 洗涤二次, 再悬浮于同一缓冲液中, 超声波处理破碎细胞, 破碎液用 RPR-20 转头 15000r/min 离心 20 分钟, 上清液用于 SDS-PAGE 电泳, 染色后比较电泳谱带。

3. 内膜结构的电子显微镜观察: 超薄切片制作和染色方法均同参考文献[8]。

结 果

(一) 761AR 菌株的诱变及突变体的筛选

诱变后的 761AR 菌液, 经稀释后涂布于甲醇平板。长出的菌落经多次甲醇-甲烷对照培养, 得到 9 株在甲醇中生长而不在甲烷中生长的纯培养物 (表 1)。将这些菌落在含甲醇的液体培养基中扩大, 再次涂布甲醇平板, 挑取单菌落, 再次对应点种

表 1 MMO 缺陷突变株在甲醇和甲烷中的生长

Table 1 The growth of MMO defective mutants and strain 761AR on methane and methanol

菌株 Strains	菌落数 (15d) Number of colonies	
	甲醇 Methanol	甲烷 Methane
761AR	50	50
761AR-32	63	0
761AR-37	62	0
761AR-47	48	0
761AR-48	33	0
761AR-53	50	0
761AR-54	99	0
761AR-55	68	0
761AR-63	50	0
761AR-73	49	0

于甲醇及甲烷平板。表 1 结果表明,所分离的菌株均丧失了甲烷利用能力。氧吸收测定结果也表明,以甲烷为底物时没有氧的消耗。选取 761AR-55 突变株做进一步研究。

(二) 761AR-55 突变株甲烷单加氧酶活性的缺陷

1. 氧电极法: 用 Rank 氧电极测定依赖于底物消耗的氧吸收。结果表明, 761AR-55 菌株已丧失甲烷氧化能力, 说明其 MMO 活性已经缺陷(表 2)。

2. 气相色谱法: 以丙烯为底物, 用野生型菌株 761M、诱变原始菌株 761AR 以及 MMO 缺陷菌株的完整细胞催化丙烯的氧化, 然后用气相色谱测定氧化产物环

表 2 761AR-55 突变株与 761AR 菌株氧吸收的比较

Table 2 The comparison of oxygen absorption of mutant 761AR-55 with strain 761AR

菌 株 Strains	基质 Substrates		
	甲烷 Methane	甲醇 Methanol	琥珀酸 Succinate
<i>Methylomonas</i> sp. 761AR	+	+	微弱 weak
<i>Methylomonas</i> sp. 761AR-55	-	+	微弱 weak
<i>Methylobacterium organophilum</i> XX	-	+	+

注: “+”表示有氧吸收; “-”表示没有氧吸收。

Note: “+”oxygen absorption was detected; “-”no oxygen absorption was detected.

表 3 761AR-55, 761AR, 761M 菌株氧化丙烯生成环氧丙烷能力的比较

Table 3 The ability of mutant 761AR-55, 761AR, and 761M to oxidize propene to epoxy propane

菌株 Strains	761M	761AR	761AR-55
生长碳源 Carbon source of growth	甲烷 methane	甲醇 methanol	甲醇 methanol
活性* Activity	6.16	8.39	0

* 用每毫克干重细胞在 1 分钟内产生的环氧丙烷的 nmol 数表示活性。

The activity was expressed as nmoles of epoxy propane produced by 1mg of dry cells in 1 minute.

氧丙烷的生成。表 3 结果表明, 761AR-55 菌株失去丙烯氧化能力, 而亲本菌株及诱变原始菌株均能氧化丙烯生成环氧丙烷。

(三) 761AR-55 突变株与亲本菌株同一性鉴定

1. 染色体 DNA 酶切图谱的比较: 染

色体 DNA 用限制性核酸内切酶完全水解后, 用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段。图 1 为 761AR-55 突变株、761M 野生型菌株以及甲醇氧化菌 *Methylobacterium organophilum* XX 菌株染色体 DNA 经 PstI 酶切后的电泳谱带。由图 1 可见, 761AR-55 菌株 DNA 酶切谱带与其亲本菌株之间无可见的差异, 而与 *Methylobacterium organophilum* XX 菌株差异明显。

2. DNA 碱基组成 G + C% 的比较: 用熔点测定法测定了 761AR-55 突变株及其亲本 761M 菌株以及另外两株甲醇氧化菌染色体 G + C mol% 含量。结果表明: 761AR-55 突变株 DNA G + C mol% 含量(52%)与亲本菌株 761M (51%)一致, 而与另两株甲醇氧化菌 *Methylobacterium*



图 1 761AR-55、761M 和 *Methylobacterium organophilum* XX 菌株染色体 DNA PstI 酶切谱带的比较

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis patterns of PstI-digested chromosomal DNA from 761AR-55, 761M and *Methylobacterium organophilum* XX

A. 761M DNA; B. 761AR-55 DNA; C. *M. organophilum* XX DNA.

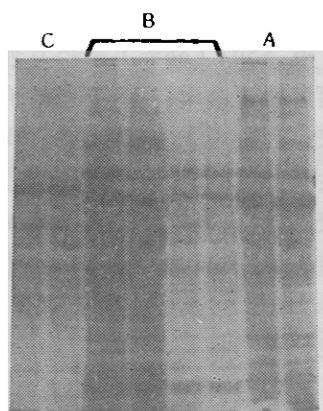


图 2 761AR-55、761M 和 *Hyphomicrobium* sp. 8502 菌株的可溶性蛋白质 SDS-PAGE 电泳谱带比较

Fig. 2 The SDS-PAGE patterns of soluble proteins of mutant 761AR-55, 761M and *Hyphomicrobium* sp. 8502.

A. 761M; B. 761AR-55; C. 8502.



图 3 761AR-55 突变株及 761M 野生菌株内膜结构的电子显微镜观察

Fig. 3 The ultrastructures of intracytoplasmic membranes of the mutant strain 761AR-55 and the wild type strain 761M.

A. 761AR-55; B. 761M.

organophilum XX (66%) 和 *Hyphomicrobium* sp. 8502 (66%) 相距甚远。

3. 可溶性蛋白质 SDS-PAGE 电泳谱带的比较: 用超声波破碎细胞经离心制备了可溶性蛋白质溶液, 用常规 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(分离胶浓度为 10%) 分离。图 2 的结果表明, 761AR-55 突变株与野生型菌株 761M 可溶性蛋白 10% SDS-PAGE 电泳谱带相同, 而与 *Hyphomicrobium* sp. 8502 菌株有明显区别。

4. 细胞内膜结构比较: I 型专性甲烷氧化细菌的一个重要特性就是具有独特的内膜结构, 是区别于 II 型菌和非甲烷氧化细菌的重要特性之一。本实验用透射电子显微镜对 761 AR-55 突变株及 761M 的内膜结构进行了观察。图 3 表明, 突变株与亲本菌株之间具有相同的内膜结构。

讨 论

甲烷氧化细菌突变体的获得非常困难, 对其它微生物行之有效的许多方法(包括紫外线照射及亚硝基胍、EMS 等化学诱变剂处理), 对于甲烷氧化细菌(特别是专性甲烷氧化细菌)的效果都不理想^[9,10]。其原因, Haber 等认为^[4], 可能是由于专性甲烷氧化细菌只能利用一碳化合物作为碳源和能源, 一碳代谢途径的变异可能是致死性的; Higgins 等推测这类细菌可能缺乏有错误倾向的 SOS DNA 修复机制, 对紫外线及其它某些诱变剂不敏感^[9]; 细胞对诱变剂的通透性也曾被作为对这类细菌化学诱变困难的解释。这些解释大都是推测, 并无多少直接的实验依据。

近几年, MMO 的诱变工作取得了一些进展。Nicolaidis^[11] 及 McPheat^[12] 等都成功地获得了专性甲烷氧化细菌 *Methylobacterium albus* 和 *Methylobacterium trichosporium* OB3b 的 MMO 缺陷突变株。

他们使用二氯甲烷作为 MMO 缺陷突变体的选择剂, 因为它被 MMO 不完全氧化而造成细胞内一氧化碳的积累, 是野生型细胞的致死因素。二氯甲烷可能也有诱变作用, 已经有人证明它可以引起移码突变。

作者用高剂量的紫外线照射(15W 灯管, 相距 25cm 照射 90 秒钟)来诱变专性甲烷氧化细菌 *Methylobacterium* sp. 761M 菌株, 得到甲烷单加氧酶缺陷变异株。这一结果表明, 简便的紫外线诱变方法应用于甲烷氧化细菌是可行的。本实验中, 按前述方法诱变, MMO 缺陷突变型的突变频率在 10^{-3} 左右, 与紫外线诱变法在其它细菌中的突变频率较为接近。作者从前的研究工作也指出, *Methylobacterium* sp. 761M 菌株对紫外线的诱变效应较其它专性甲烷氧化细菌敏感^[4], 本文的诱变结果可能与这一特性有关。同时, 761AR 菌株在没有甲烷的条件下也能利用甲醇生长的特性, 使用简单的牙签点种法筛选突变株也成为可能。

对 761AR-55 突变株的进一步研究表明, 其 MMO 缺陷的表型非常稳定, 在长达两年多的连续转种过程中都没有恢复甲烷氧化活性。此突变株虽然完全丧失了 MMO 活性, 但其它特性, 包括 DNA 内切酶图谱、碱基组成、可溶性蛋白电泳带及内膜结构等, 均与亲本菌株 761M 保持一致。生理特性也如此, 例如仍然具有完整的三羧酸循环, 某些有机物质对生长仍有促进作用等。这些都充分表明, 761AR-55 是由 761AR 菌株诱变而得的。作者认为 761 AR-55 菌株与其亲本 761M 菌株一样, 是对甲烷氧化细菌进行遗传分析的良好材料, 其 MMO 缺陷变异对于甲烷代谢的关键酶 MMO 的遗传学研究, 具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 赵树杰等: 微生物学报, 21(3): 271—277, 1981。
 [2] Shujie Zhao et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 1237—1242, 1984。
 [3] Shujie Zhao et al.: *Microbial Growth on C₁ Compounds*, ASM, Washington, D. C., pp. 262—268, 1984。
 [4] Haber, C. L. et al.: *Science*, 221: 1147—1153, 1983。
 [5] Patt, T. E. et al.: *J. Bacteriol.*, 120: 955—964, 1974。
 [6] Shujie Zhao et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*,

- 48: 807—812, 1984。
 [7] Gerhardt, P. et al.: *Manual of Methods for general Bacteriology*, ASM, Washington, D. C., pp. 457—458, 1981。
 [8] 郑中华等: 微生物学报 27(1): 1—5, 1987。
 [9] Higgins, I. J. et al.: *Microbiol. Rev.*, 45: 556—590, 1981。
 [10] Williams, E. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 4: 137—141, 1978。
 [11] Nicolaidis, A. A. et al.: *ibid.*, 41: 47—52, 1987。
 [12] McPheat, W. L. et al.: *Arch. Microbiol.*, 148: 40—43, 1987。

THE STUDY ON THE MUTANTS DEFECTIVE IN MMO ACTIVITY FROM A METHANOTROPH *METHYLOMONAS* SP. 761M

H. Kaize Zhao Shujie

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu)

The methanol-utilizing mutant 761AR of a Type I obligate methanotroph, *Methylomonas* sp. 761M, was mutagenized by using high dosage of ultraviolet irradiation. Nine mutant strains defective in MMO activity were screened out by testing their ability to grow on the plates with methanol or methane as carbon source. Further studies on one of these mutants, 761AR-55, revealed that this strain had entirely lost the MMO activity by measuring both the ability of methane oxidization and that of oxidizing propene to epoxy propane. In

spite of the MMO defection, other characteristics of this mutant including the PstI-digestion patterns and G+C% of chromosomal DNA, the SDS-PAGE patterns of soluble proteins, and the ultrastructure of intracytoplasmic membranes, remained identical to the wild type strain 761M.

Key words

Methanotroph; *Methylomonas*; MMO defective mutants