

## 甲烷氧化细菌 (*Methylosinus methanica*) 81Z 中与甲醇氧化有关基因的克隆\*

张玉英 赵树杰

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

R. S. Hanson

(Gray Freshwater Biological Institute, University of Minnesota, Navarre MN55392 U. S. A.)

以大肠杆菌 (*E. coli*) DH-1 菌株和考斯质粒 pLA 2917 为宿主-载体系统, 建立了甲烷氧化细菌 (*Methylosinus methanica*) 81Z 染色体基因文库。甲醇利用菌 (*Methylobacterium organophilum*) XX 的甲醇脱氢酶 (MDH) 结构基因片段 (2.5kb) 经  $\alpha$ - $^{32}$ P 标记后作为探针对该文库进行筛选, 得到两个杂交阳性重组质粒, 即 pG5 和 pH11, 其中 pG5 的插入片段为 25.4kb, 互补分析表明: pG5 的插入片段能使包括 MDH 和细胞色素 C (Cyt. c) 基因突变株在内的 5 株甲醇利用菌 (*Methylobacterium* sp.) AM1 的甲醇氧化阻滞突变株恢复在甲醇上的生长能力, 并且能使 3 株甲醇利用菌 XX 的甲醇氧化阻滞突变株恢复野生型生长。至少有 4 个与甲醇氧化有关的基因位于该片段上。Southern blot 杂交进一步证实: 该插入片段与探针同源的区域在其 4.8 kb Sal I 片段内。

**关键词** 甲烷氧化细菌; 甲醇氧化; 基因克隆

甲烷氧化细菌 81Z 是从沼气发生器中分离到的一株 II 型专性甲烷氧化细菌<sup>[1]</sup>。该菌纯培养物具有这类菌的基本特征: 以甲烷为生长的唯一碳源和能源, 严格好氧。它能够在沼气发生器这种厌氧环境中生存, 可能具有一套特殊的代谢调节系统。对它的  $C_1$  代谢有关基因及其调节机理的研究, 有助于从分子水平上阐明其生存机制, 也有利于进一步开发这类菌在生产领域的应用<sup>[2,3]</sup>。

由于专性甲烷氧化细菌诱变困难, 基因载体系统缺乏, 这类菌的  $C_1$  代谢有关基因的研究一直处于困难阶段。到目前为止, 国际上仅有少量报道<sup>[4,5]</sup>。Lidström, M. E. 等人<sup>[5]</sup>提出: 用兼性甲醇利用菌 AM1 的 *mox* 基因系统来分析专性甲烷氧化细菌的相应基因系统是一条可能的途径。甲

醇利用菌 AM1 和 XX 均属于 II 型甲醇利用菌, 在  $C_1$  代谢途径上与甲烷氧化菌 81Z 有相似之处, 它们的碳同化途径都是丝氨酸途径<sup>[6]</sup>。MDH 是它们  $C_1$  代谢中甲醇氧化反应所共有的一个关键酶。血清学研究表明<sup>[6]</sup>: 同具有丝氨酸途径的 II 型甲醇利用菌和 II 型甲烷氧化菌, 其 MDH 具有很强的相似性。目前, MDH 基因在甲醇利用菌 XX 和 AM1 中已研究得较深入。因此, 我们利用兼性甲醇利用菌 XX 和 AM1 的甲醇氧化阻滞突变株作互补分析, 结合重组 DNA 技术和分子杂交方

本文于 1989 年 3 月 13 日收到。

\* 本研究实验工作是在美国明尼苏达大学淡水生物所完成的。

Dr. Sara M. Machlin 和 Cathryn A. Bastien 在实验方面给予热情帮助, 特此致谢。

法, 筛选和克隆了专性甲烷氧化细菌 81Z 中与甲醇氧化有关的基因。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株和质粒

所用细菌菌株和质粒见表 1。

### (二) 培养基和培养条件

大肠杆菌用 LB 培养基, 37℃ 培养。甲烷氧化细菌培养见文献 [1]。甲醇利用菌突变株的培养参照文献 [7]。大肠杆菌用抗生素浓度为: 卡那霉素 25 μg/ml, 四环素 20 μg/ml, 氨苄青霉素 20 μg/ml。甲醇利用菌用抗生素浓度为: 四环素 10 μg/ml。

表 1 细菌菌株和质粒  
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	有关基因型或表型 Relevant genotype or phenotype	注 明 Note
<i>E. coli</i> DH-1	recA1 thi-1 hsdR17 (rk-mk <sup>+</sup> )	
<i>Methylosinus methanica</i> 81Z	Wild type	
<i>Methylobacterium</i> sp. strain AM1 mutants		Function encoded by <i>mox</i> gene
PG1	MeOH <sup>-</sup> <i>mox</i> A <sub>1</sub>	PQQ attachment
M15A	MeOH <sup>-</sup> <i>mox</i> A <sub>2</sub>	PQQ attachment
UV4; UV25	MeOH <sup>-</sup> <i>mox</i> B	Regulation
UV40; UV45; UV50	MeOH <sup>-</sup> <i>mox</i> C	Regulation
UV27; UV46	MeOH <sup>-</sup> <i>mox</i> D	Transport/Stability
AA31; AA32	MeOH <sup>-</sup> <i>mox</i> E	Regulation
UV26	MeOH <sup>-</sup> <i>mox</i> F	MDH structural gene
UV10; UV24	MeOH <sup>-</sup> <i>mox</i> G	Cyt.c structural gene
UV48	MeOH <sup>-</sup> <i>mox</i> H	Regulation
<i>Methylobacterium organophilum</i> XX mutants		
SM13; SM37	MeOH <sup>-</sup> V-A <sub>1</sub>	
SM10; SM23	MeOH <sup>-</sup> V-A <sub>2</sub> ( <i>mox</i> A <sub>2</sub> )	
SM29; RH41	MeOH <sup>-</sup> V-B <sub>1</sub> ( <i>mox</i> A <sub>1</sub> )	
SM35	MeOH <sup>-</sup> V-B <sub>2</sub>	
SM2	MeOH <sup>-</sup> V-B	
SM8; SM28; PT46	MeOH <sup>-</sup> V-C ( <i>mox</i> F)	
SM3; SM48	MeOH <sup>-</sup> VI-C	
PT34; PT47	MeOH <sup>-</sup> VI-D	
SM4; SM18	MeOH <sup>-</sup> VII-A	
SM16; RH33	MeOH <sup>-</sup> VII-B	
Plasmids		
pLA 2917	Km <sup>r</sup> /Tc <sup>r</sup>	Inc P-1 cosmid
pRK 2013	Km <sup>r</sup>	
pUS 325	Amp <sup>r</sup>	MDH structural gene clone

Note: "MeOH": methanol.

### (三) DNA 制备

质粒 DNA 的提取和纯化基本参照文

献[8]。甲烷氧化细菌 81Z 染色体 DNA 的提取参照文献[9]。27kb 左右酶切片段的

制备参照文献[10],用陷井法从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段,经过 DEAE-纤维素微型柱纯化后用乙醇沉淀,再经 70% 冷乙醇洗涤两次,最后溶解于 TE (pH7.9) 缓冲液<sup>[10]</sup>中。

#### (四) 甲烷氧化细菌 81Z 染色体基因文库的构建

取 19—28kb 范围的甲烷氧化细菌 81Z 染色体 DNA Sau 3A 酶解片段,连接于载体 pLA 2917 的 Bgl II 位点<sup>[4]</sup>,经体外包装后转染大肠杆菌 DH-1。图 1 文库按 F. Bagdusarian 等人<sup>[11]</sup>方法保存于 -70℃。

#### (五) 互补分析

三路接合 (three way mating)<sup>[8]</sup> 在 Panassay 平板上进行,来自甲烷氧化细菌 81Z 基因文库的重组质粒在 pRK 2013 存在下被接合进甲醇氧化阻滞突变株(共 34

株,见表 1),然后在下列三组选择平板:即 Maclellennan 培养基<sup>[8]</sup>加 (1) 0.5% 甲醇; (2) 0.5% 甲醇和 Tc 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; (3) 0.25% 甲胺和 Tc 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  上检测由重组质粒引起的突变株的甲醇生长能力的恢复。

#### (六) 杂交

杂交探针为克隆在质粒 pUS 325 SmaI 位点上的 MDH 结构基因片段。该片段来自甲醇利用菌 XX 染色体 DNA,大小为 2.5kb<sup>[7]</sup>。菌落杂交基本参照文献[10]。探针用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (400Ci/mmol) 缺口平移法标记,杂交在 42℃ 下进行约 18 小时,探针放射性强度为 3.66cpm/ml、杂交后洗涤依次在 2  $\times$  SSC/0.1% SDS、1  $\times$  SSC/0.1% SDS 和 0.2  $\times$  SSC/0.1% SDS 中进行。杂交滤膜在室温下干燥数分钟

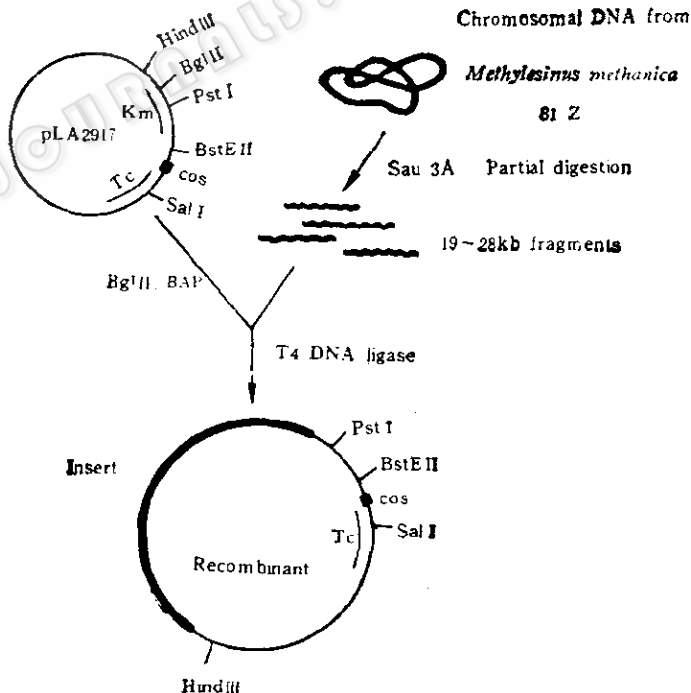


图 1 甲烷氧化细菌 81Z 染色体基因文库的构建

Fig. 1 Construction of *Methylosinus methanica* 81Z genomic library.

表 2 pG5 和 pH11 的互补类型\*

Table 2 The complementation pattern of pG5 and pH11

突变株 Mutants	突变基因 Mutant gene	pG5	pH11
<i>Methylobacterium</i> sp. strain AM1			
UV10	mox G	+	+
UV24	mox G	+	+
UV26	mox F	+	+
PG1	mox A <sub>1</sub>	+	-
UV21	mox A <sub>2</sub>	+	-
<i>Methylobacterium</i> <i>organophilum</i> XX			
SM29	V-B <sub>1</sub> (mox A <sub>1</sub> )	+	-
RH41	V-B <sub>1</sub> (mox A <sub>1</sub> )	+	-
SM35	V-B <sub>2</sub>	+	-

\* 注: “+”: 正效应; “-”: 负效应。其余既不能被 pG5 互补也不能被 pH11 互补的突变株未列入此表中。

Notes: “+”: positive effect; “-”: negative effect. The mutants which were not complemented by pG5 nor pH11 are not given in this table.

后, 于 -70℃ 下用柯达 X-mat AR 底片进行自显影。

Southern blot 杂交探针用 Biotinnylate-dUTP 缺口平移法标记, 所用标记和测定系统均购自美国 BRL 公司, 杂交及测定方法参照该公司 BluGNE system 使用说明。

## 结果和讨论

### (一) 甲烷氧化细菌 81Z 染色体基因文库的构建

共获得 2046 个 Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup> 转化子, 插入片段的长度范围为 15—28kb, 平均长度为 21.5kb。

### (二) 筛选含有与甲醇氧化有关基因的插入片段

最初用甲醇利用菌 XX 突变株 PT46 作受体, 通过互补分析对整个文库进行筛选, 结果未观察到正的互补效应。改用菌落杂交法筛选, 在 2000 个 Tc<sup>r</sup>Km<sup>r</sup> 转化子

中得到 7 个自显影阳性菌落。将这 7 个转化子与 34 株突变株(表 1) 进行互补分析, 发现其中有两个转化子都能使甲醇利用菌 AM1 突变株 UV26、UV10 和 UV24 恢复在甲醇上的生长能力。将这两个转化子命名为 pG5 和 pH11。除此之外, pG5 还能使另外 5 株突变株恢复在甲醇上的生长(表 2)。

根据互补效应可以看出: pG5 和 pH11 的插入片段是部分重叠的, MDH 和 Cyt. c 基因可能位于 pG5 和 pH11 插入片段的重叠区域。由于 mox A<sub>1</sub> 和 V-B<sub>1</sub> 属于同一基因<sup>[5,7]</sup>, 因而可以推测: 至少有 4 个与甲醇氧化有关的基因位于 pG5 的插入片段上。这 4 个基因分别是 mox A<sub>2</sub>, mox F, mox A<sub>1</sub>(V-B<sub>1</sub>) 和 mox G。V-B<sub>2</sub> 与 mox 基因系统的对应关系还不明确, 因此不能确定其是否与 mox G 或者 mox A<sub>2</sub> 等同。

### (三) pG5 插入片段上与 MDH 基

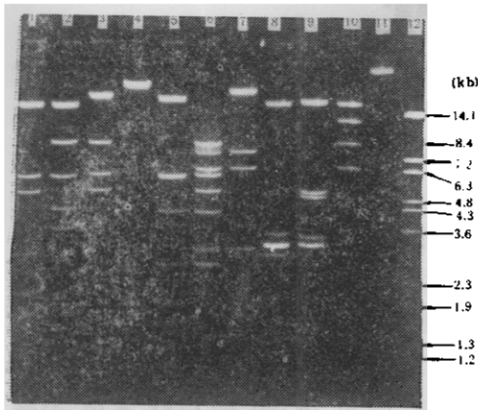


图2 pG5的酶切电泳图

Fig. 2 Pattern of restriction enzyme-digested pG5 on agarose gel

1. EcoR I + Pst I; 2. EcoR I; 3. Bam HI + Pst I; 4. Bam HI; 5. HindIII + Pst I; 6. Sph I + Pst I; 7. Sph I; 8. Sal I + HindIII; 9. Sal I; 10. Sma I; 11. Uncut pG5; 12. BstE II-digested  $\lambda$  DNA

### 因有关区域的鉴定和分析

在 pG5 中, 由于载体的 Bgl II 位点被破坏, Sau 3A 切点太多, 插入片段的长度根据限制性内切酶谱分析大约为 25.4kb (图2)。Southern blot 杂交结果显示(图3): 与甲醇利用菌 XX 的 MDH 结构基因同源的区域在该插入部分的 4.8 kb SalI 酶切片段内, 这个区域估计位于 12.2 kb

Sma I 酶切片段靠近中间的部分。当用 Pst I 对 pG5 进行酶切时, 这个区域被切为两个部分, 9.0kb 片段含有主要部分。

pG5 不能互补甲醇利用菌 XX MDH 结构基因 (V-C) 突变株的现象, 缺乏进一步的数据来解释。由于从 MDH 的合成到活性表达还需要其它基因的协同作用, 结构基因同这些基因之间的关系在甲醇利用菌 XX 和 AM1 中有何差异, 是否存在次级调节系统, 目前还不清楚。另一种可能性是 V-C 基因与 *mox F* 基因不是完全等同的, 其差异何在有待证实。

在甲醇利用菌 AM1 中, 与 MDH 合成和表达有关的 9 个 *mox* 基因位于 25kb 长的同一染色体区域内<sup>[9]</sup> (图4)。其中, *mox F* 和 *mox G* 基因在同一操纵子内, 是协同转录的。另一调节基因 *mox H* 在染色体的另一区域, 这两个区域间的距离还不清楚。而在甲醇利用菌 XX 中, 与 MDH 合成有关的 5 个基因 (V 组) 位于染色体上约 13kb 区域内, 其中, V-B<sub>1</sub>、V-C 和 V-A<sub>2</sub> 分别对应于 *mox A*<sub>1</sub>、*mox F* 和 *mox A*<sub>3</sub><sup>[7]</sup>。V-B<sub>2</sub> 和 V-A<sub>1</sub> 是否分别与 *mox G* 和 *mox B* 相对应, 目前尚无可靠根据, 从互补分析结果看, V-B<sub>2</sub> 可能与

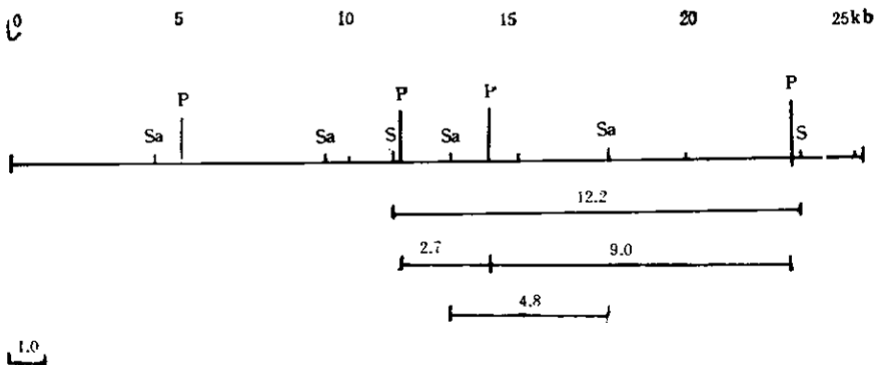
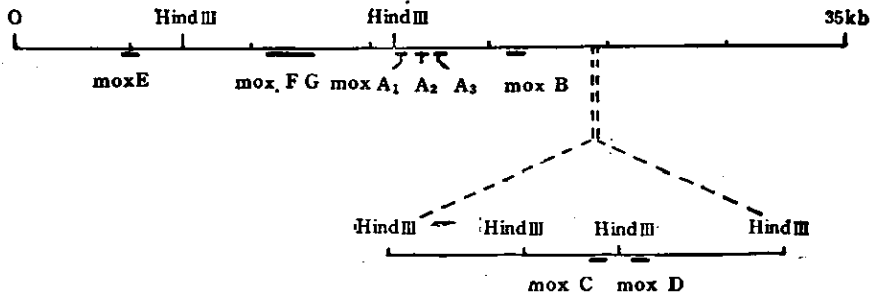


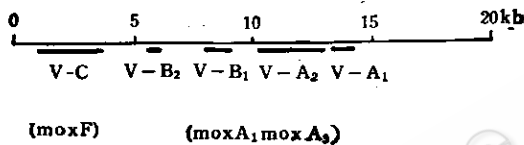
图3 pG5 插入片段上与探针同源的区域

Fig. 3 The homologous region of the probe on the insert of pG5

Note: "S": SmaI; "Sa": Sal I; "P": Pst I



*Methylobacterium* sp. strain AM1



*Methylobacterium organophilum* XX

图4 甲醇利用菌 AM1 和 XX 中 MDH 合成表达有关基因的定位

Fig. 4 Location of the genes involved in synthesis and express of MDH in *Methylobacterium* sp. strain AM1 and *Methylobacterium organophilum* XX

mox G 有关。甲醇利用菌 XX 的 Cyt. c 基因定位还不明确。其余与 MDH 表达有关的 VI 组和 VII 组基因分别位于另外两个染色体区域, 上述三个区域之间的距离可能为 40—50kb。由此看来, 甲醇利用菌 AM1 和 XX 的甲醇氧化有关基因在染色体上的分布和排列是有较大差异的。pG5 能够互补 mox A<sub>1</sub>、mox A<sub>2</sub>、mox F 和 mox G 基因, 不仅说明在甲烷氧化细菌 81Z 中存在与此功能相同的基因, 而且可能提示, 这些基因的分布更接近甲醇利用菌 AM1, 而不是 XX。

## 参 考 文 献

- [1] 赵树杰等: 中国沼气, 增刊 (第四届国际厌氧消化讨论会增报稿全文专集) p. 130—137, 1986。
- [2] Whittenbury, R. et al.: Society of Fermenta-

- tion Technology, Japan, Tokyo p. 1—9, 1975.
- [3] Higgins, I. J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89: 671—677, 1979.
- [4] Isabel, A. M. et al.: *Biotechnology*, 5: 490—493, 1987.
- [5] Lidström, M. E. et al.: *Microbial Growth on C<sub>1</sub>-compound*, (ed. H. W. Van Versevel et al.) Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, p. 246—254, 1987.
- [6] Anthony, C.: *The Biochemistry of Methylo-trophs* Academic Press Inc., London, p. 112—176, 1982.
- [7] Machlin, S. M. et al.: *J. Bacteriol.*, 170: 141—148, 1988.
- [8] Allen, L. N. et al.: *J. Bacteriol.*, 161: 955—962, 1985.
- [9] Shujie Zhao et al.: *App. Environ. Microbiol.*, 48: (4) 807—812, 1984.
- [10] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 175—268, 1982.
- [11] Bagdusarian, F. et al.: *Gene*, 24: 299—308, 1983.

## CLONING OF THE GENES ENCODING FOR METHANOL OXIDATION FROM METHANOTROPH *METHYLOSINUS METHANICA* 81Z

Zhang Yuying Zhao Shujie

(Chengdu Institute of Biology, Academia

Sinica, Chengdu)

R. S. Hanson

(Gray Freshwater Biological Institute, University of

Minnesota, Navarre, Minnesota 55392 U. S. A.)

*E. coli* DH-1 and cosmid pLA2917 was used as a host-vector system to construct genomic bank of *Methylosinus methanica* 81Z. Two recombinants, pG5 and pH11, were found containing inserts which give positive response when the bank was screened with a  $\alpha$ -<sup>32</sup>P labelled methanol dehydrogenase (MDH) structural gene probe from *Methylobacterium organophilum* XX. Complementation analysis shows that the insert of pG5, with size of 25.4 kb, can restore the growth on methanol of 5 MDH<sup>-</sup> mutants which include MDH and Cyt.c structural gene mutants of *Methylobacterium*

sp. strain AM1, as well as 3 MDH<sup>-</sup> mutants of *Methylobacterium organophilum* XX. At least 4 genes encoding for methanol oxidation were proposed locating on this insert. Southern blot provided the further evidence that there was a homologous region of the MDH structural gene probe within the 4.8 kb Sal I fragment of the insert.

### Key words

Methanotroph; Methanol oxidation; Gene clone