

甲烷氧化菌 *Methylomonas* sp. GYJ3 中甲烷单加氧酶 基因与 16S rDNA 序列分析

华绍烽¹ 李树本^{1*} 谭海东² 赵家政¹

(¹ 中国科学院兰州化学物理研究所 羧基合成与选择氧化国家重点实验室 兰州 730000)

(² 中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘 要: 甲烷氧化细菌中的关键酶系甲烷单加氧酶是一个含双核铁的多组份氧化酶, 常温、常压下能够催化甲烷转化为甲醇。对甲烷氧化细菌 *Methylomonas* sp. GYJ3 中溶解性甲烷单加氧酶基因和 16S rDNA 进行了测序与分析。利用已知相关基因数据库信息, 设计了 PCR 引物和测序引物, 获得了满意的测序结果。全长的溶解性甲烷单加氧酶基因为 5690bp, 部分 16S rDNA 的序列长度为 1280bp。与已发表的甲烷氧化细菌中甲烷单加氧酶进行了比较, 结果表明 MMOX 组份中氨基酸序列的同源性为 78% 到 99%, 基因序列的同源性为 71% 到 97%, 6 个组份中 *orfY* 片段的同源性相对较低。MMOX 氨基酸序列的多序列联配表明, MMOX 序列具有高度保守性, 特别是在双核铁中心区域。16S rDNA 进化分析显示 *Methylomonas* sp. GYJ3 与 γ 蛋白细菌是相关联的, 基于 MMOX 氨基酸序列的进化分析证明, 与 *Methylomonas* sp. GYJ3 最近似的菌株是 I 型甲烷氧化细菌 *Methylomonas* sp. KSW III。综合分析表明, 菌株 GYJ3 属于 I 型甲烷氧化细菌 *Methylomonas* sp. 属。这个结果为 I 型甲烷氧化细菌也能表达溶解性甲烷单加氧酶提供了新的证据。羟基化酶的理论等电点是 6.28, 理论分子量为 248874.41Da。

关键词: 甲烷单加氧酶; 甲烷氧化细菌; 序列分析; 16S rDNA 进化分析

中图分类号: Q78 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2007)01-0150-06

甲烷是对全球变暖有重要影响的温室气体之一, 也是重要的自然能源——天然气的主要成分。常温、常压下, 甲烷氧化细菌 (Methanotrophs) 中甲烷单加氧酶 (Methane monoxygenase, 简称 MMO) 能够催化甲烷转化为甲醇, 进一步被细胞内的脱氢酶脱氢氧化生成 CO₂ 和 H₂O。甲烷氧化细菌以甲烷为唯一碳源和能源, 对减少自然界中温室气体——甲烷的释放量和碳循环有着重要意义。

基于生物化学性质和形态分类学方法, 甲烷氧化细菌分 I、X 型 (单磷酸核酮糖代谢甲醛的途径) 和 II 型 (丝氨酸代谢甲醛的途径) 3 个类型, 其中主要酶系是甲烷单加氧酶, 它们均能表达与膜结合的颗粒性甲烷单加氧酶 (Particular MMO, 简称 pMMO), 然而, 当微生物生长环境中 Cu²⁺ 缺乏时, 一些菌株能够表达溶解性甲烷单加氧酶 (Soluble MMO, 简称 sMMO)^[1]。据目前研究成果来看, sMMO 主要分布在 II 型甲烷氧化细菌中, 只有极少数 I 型甲烷氧化细菌中也存在有 sMMO。sMMO 具有相似的组成 (除了 *Methylobacterium* sp. CRL-26): 一个拥有 3 个亚基的羟基化酶 (MMOH), 酶的活性中心位于其 α 亚基, 一个还原酶 (MMOR), 一个调节蛋白 (MMOB)。另外, Merckx 等^[2] 对第四个组份 *orfY* 可能的功能进行了探索。与 pMMO 相比较, sMMO 具有较宽的底物专一性, 有望成为发展新的生物除污和生物转化过程的基础。

近几年, 有关 sMMO 分子生物学的研究日趋活跃, 取得

了一些重要成果, 如 sMMO 中第四个组份 *orfY* 的克隆表达和可能的功能研究, Northern blot 和 PCR 引物延伸法分析证明: 细胞内 sMMO 或 pMMO 的不同表达发生在 DNA 到 mRNA 的转录过程中, 在低 Cu²⁺ 或无 Cu²⁺ 时, sMMO 的 mRNA 能够被转录^[3], 以 *Methylosinus trichosporium* OB3b 和 *Methylococcus capsulatus* Bath 菌中 sMMO 为背景各组份的克隆和活性表达^[4,5], 参照 sMMO 基因信息设计的探针已用于自然界中含 sMMO 的甲烷氧化细菌的筛选^[6]。到目前为止, 国外仅有 6 个甲烷氧化细菌中的 sMMO 基因组被鉴定和测序^[7-10], 其中只有 2 个 sMMO 基因组序列来自 I 型甲烷氧化细菌。

宁治中等^[11] 从玉门油田土样中筛选了一株甲烷氧化细菌 *Methylomonas* sp. GYJ3, 它的生物化学和形态分类学研究表明, 该菌株是甲基单胞菌, 属于 I 型甲烷氧化细菌。沈润南等^[12] 纯化、表征了其中的 sMMO, 但有关它的分子生物学研究尚属空白。本文报道了 *Methylomonas* sp. GYJ3 的培养状态和 sMMO 基因序列信息, 并与已报道的甲烷氧化细菌的相关基因进行了比较分析, 获得了基于 16S rDNA 和推测的 MMOX 氨基酸序列的生物进化分析结果, 对研究 I 型甲烷氧化细菌中 sMMO 的基因特征具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 甲烷氧化菌 (*Methylomonas* sp.) GYJ3 由本实验

基金项目: 国家自然科学基金 (20573124); 山东大学微生物技术国家重点实验室开放课题

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-931-4968129; E-mail: lsb@lzb.ac.cn

作者简介: 华绍烽 (1963 -) 男, 天津人, 副研究员, 主要从事酶催化及生物化学研究。E-mail: shfhua@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-03-20; 接收日期: 2006-04-29; 修回日期: 2006-08-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

室筛选。

1.1.2 试剂和仪器: Ampli Taq Gold DNA 聚合酶及 Ampli Taq Gold 缓冲液 (ABI), Blood & Tissue Genomic DNA Extraction Miniprep System (VIOGENE), UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒 (上海生工), ABI Prism BigDye Terminator v3.1 sequencing Kit (ABI) 3948 型 DNA/RNA 合成仪 (ABI), 9700 型 PCR 扩增仪 (PE Applied Biosystems), ABI 377 型自动 DNA 测序仪 (PE Applied Biosystems), 3700 型 DNA 分析系统 (PE Applied Biosystems), GeneAmp PCR System 9700 型测序仪 (PE Applied Biosystems)。

1.2 细胞培养

细胞培养基的组成如下 (g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.74; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.26; NH_4Cl 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02; KNO_3 1.0; NaCl 0.4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0004; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00034; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00024。先用 250mL 三角瓶在摇床上培养 (200r/min, 32°C), 然后使用 7L 发酵罐放大培养 (32°C ± 2°C, 300r/min), 碳源为甲烷。当培养液的密度 OD_{500} 达到 1.2 ~ 1.5 时离心收集细胞 (12min × 9000g, 4°C), 添加 10% 甘油后在 -80°C 条件下保存备用。

1.3 染色体 DNA 的分离

取 15mL 指数生长期的细胞液离心收集细胞, 使用 Blood & Tissue Genomic DNA Extraction Miniprep System 提取染色体总 DNA, 操作按照说明书进行。

1.4 16S rDNA 和 sMMO 基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 数据库的序列信息 (accession No. X55394, AF153282, Y18947, AF153281) 设计 16S rDNA 和 sMMO 基因组的扩增引物, 扩增 16S rDNA 的两对引物为: 5'-CTAGCGTTG TTCGGAATC-3'/5'-ATTGTAGCACGTTGTGTAGC-3'; 5'-GCTTAACA CATGCAAGTCGA-3'/5'-TGACCCTACCGTGGTCTGT-3'。

采用“步游”法对 sMMO 基因组 DNA 进行扩增、测序, 根据已报道的序列信息设计了 3 对引物: 5'-ATTCGTCACACC CATCAATG-3'/5'-CGCGTCCCTCATACTGCT-3'; 5'-TATGAGGGA CGGAATTGT-3'/5'-GACCAGCTTGGCGATGAA-3'; 5'-CCGACA TCTGATCGGTCG-3'/5'-GAACCGGCGGCTTGTAG-3'。然后根据已完成的序列设计了 7 对引物, PCR 扩增在 GeneAmp PCR system 9700 PCR 扩增仪上进行, 使用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 扩增产物, 对扩增产物进行直接测序。PCR 扩增反应条件: 95°C 5min, 95°C 25s, 58°C 20s, 72°C 2min, 35 个循环, 72°C 10min。16S rDNA 的扩增反应条件与上述条件相似, PCR 扩增产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳后溴化一啶染色鉴定。

1.5 16S rDNA 和 sMMO 基因的测序

sMMO 基因的测序在上海鼎安生物技术有限公司进行, 测序引物与 PCR 扩增引物相同。应用 GeneAmp PCR System 9700 型测序仪测定 16S rDNA 的序列, 测序在上海基康生物技术有限公司进行。使用 Sequencher (version 3.0; Gene Codes Corp. Inc.) 软件对测序结果进行拼接、编辑。

Methylomonas sp. GYJ3 的 16S rDNA 基因序列和 sMMO 基

因组序列已在 GenBank 核酸序列数据库中登记公开, 登记号 (Accession) 为 DQ149125 和 DQ149127。

1.6 生物进化分析

基于 16S rDNA 和 MMOX 氨基酸序列, 在 GenBank 数据库中进行同源序列的搜索, 选择高同一性的甲烷氧化菌株构建进化树。用 ClustalW (version 1.83) 软件进行序列联配, 使用 PHYLIP (version 3.6.3) 软件构建进化树, 计算方法采用距离算法 (neighbor-joining)^[13], 进化分支的重复数 (replicates) 为 100。

1.7 序列联配分析

通过使用 EBI (European Bioinformatics Institute) 网站的 Align 程序, 进行 *Methylomonas* sp. GYJ3 与其它菌株的 sMMO 的基因或氨基酸序列同一性联配分析, 联配比较的相关菌株为 *Methylomonas trichosporium* OB3b, *Methylomonas* sp. KSP III, *Methylomonas* sp. WI14, *Methylomonas* sp. KSW III, *Methylococcus capsulatus* Bath。使用序列编辑器 (BioEdit, Version. 7.0.4.1) 进行 MMOX 氨基酸多序列的联对比对, 比对的相关序列为 *Methylomonas trichosporium* OB3b, *Methylococcus* sp. M, *Methylococcus capsulatus* Bath, *Methylomonas* sp. KSW III^[13]。

1.8 甲烷单加氧酶的理论等电点、分子量的计算

根据氨基酸序列, 可以预测出蛋白质的许多物理性质, 包括等电点、分子量等。利用 ExPASy 服务器中 Compute pI/MW 工具计算溶解性甲烷单加氧酶中各组份的理论等电点、分子量。

2 结果

2.1 PCR 扩增和 DNA 测序

以 *Methylomonas* sp. GYJ3 的染色体 DNA 为 PCR 扩增的模板, 对 *Methylomonas* sp. GYJ3 中 sMMO 基因组和 16S rDNA 进行扩增, PCR 反应后, 获得了期望的目的片段。对已测定的序列进行拼接、分析, 最终获得了 5690bp 的 sMMO 全基因序列, 6 个可阅读片段 *mmoX*、*mmoY*、*mmoB*、*mmoZ*、*orfY* 和 *mmoC* 的长度分别是 1581bp, 1188bp, 417bp, 510bp, 324bp 和 1035bp, 与同源序列相比较, 基因序列结构相似, 证实了在 I 型甲烷氧化细菌 *Methylomonas* sp. GYJ3 中存在有溶解性甲烷单加氧酶基因。

2.2 序列的比较分析

sMMO 的 DNA 和氨基酸序列与来自其它 5 个甲烷氧化细菌的相应序列比较结果见图 1, 针对 MMOX, MMOB 和 MMOC 3 个组份的序列比较结果显示, *Methylomonas* sp. GYJ3 与 *Methylomonas trichosporium* OB3b, *Methylococcus* sp. WI14 有较高的序列相似性, 在 MMOX 组份中氨基酸序列的同一性是 99% 到 78%, 基因序列的同一性是 97% 到 71%, 在 MMOB 组份中氨基酸序列的同一性是 100% 到 66%, 基因序列的同一性是 99% 到 63%, 在 MMOC 组份中氨基酸序列的同一性是 92% 到 47%, 基因序列的同一性是 99% 到 57%。MMOY 和 MMOZ 组份的全序列比较显示了类似的结果。只有 *orfY* 组份的同一性较低, 它的功能是不清楚的。

推测的 MMOX 氨基酸序列 (氨基酸) 的多序列联配比较

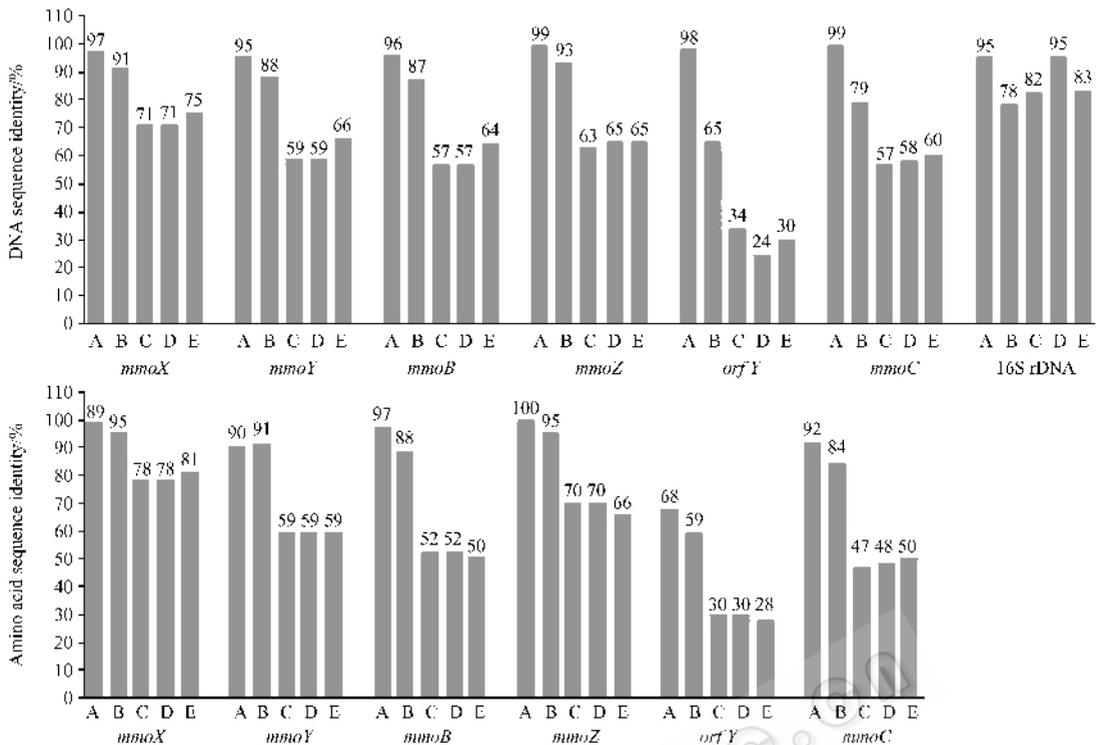


图 1 6 个甲烷氧化菌中 sMMO 各组份的基因序列和氨基酸序列的同一性比较

Fig.1 Identity comparison for DNA sequences and deduced amino acid sequence of sMMO multicomponent were from five known methanotrophs with *Methylomonas* sp. GYJ3. The sequence identities of sMMO were obtained by using the Cluster W program. The sequence of variety organisms were from the GenBank database: A: *Methylosinus trichosporium* OB3b; B: *Methylocystis* sp. WI14; C: *Methylomonas* sp. KSP III; D: *Methylomonas* sp. KSW III; E: *Methylococcus capsulatus* Bath.

说明:在比较的 5 个菌株中包含了高保守的氨基酸残基,特别是在双核铁中心区域,我们发现在菌株 GYJ3 与 *Methylosinus trichosporium* OB3b 的联配比较中,在肽链的 C 端仅有 3 个氨基酸(K406, E410, S433)的差异,根据 Rosenzweig^[14]和 Elango^[15]的报道, *Methylococcus capsulatus* Bath 和 *Methylosinus trichosporium* OB3b 中 MMOH 的 X 晶体衍射分析,这 3 个氨基酸残基都位于接近 γ 亚基的蛋白质表面,在疏水的活性中心区域,它们都是非配位的氨基酸残基,远离底物结合域,属于非关键性的氨基酸;与 *Methylocystis* sp. M 相比较,在肽链的 N 端保守性较高, C 端保守性较低,而与菌株 *Methylococcus capsulatus* Bath 和 *Methylomonas* sp. KSW III 相比较,差异性相对较大,差异性较大的氨基酸残基主要集中在肽链的两端,氨基酸残基 143~147 和 242~246 是双核铁活性中心两个铁原子的配位域,在甲烷氧化菌中这两个区域是完全保守的,含有固定的天门冬氨酸、谷氨酸、组氨酸。

2.3 生物系统进化分析

基于 16S rDNA (1280bp) 基因序列构建的生物进化树分析结果表明了菌株 GYJ3 与其它甲烷氧化菌的特殊关系,16S rDNA 的进化分析形成了两个簇,一个是含有 18 个菌株的 γ 蛋白菌亚群,另一个是含有 14 个菌株的 α 蛋白菌亚群(图 2),而我们的菌株 GYJ3 位于两个亚群之间,但显示了明显的不同进化距离,它更接近于 γ 蛋白菌亚群,没有表明其最近似的物种。为了进一步确证 GYJ3 在甲烷氧化菌中的进化关

系,以 MMOX 氨基酸序列构建了进化关系树,分析结果表明菌株 GYJ3 最相关的物种是 *Methylomonas* sp. KSW III /KSP III (图 3)。树的分支重复数为 100。

2.4 甲烷单加氧酶的理论等电点、分子量计算

根据 ExPASy 软件包的程序计算了溶解性甲烷单加氧酶各组份的理论等电点和分子量(表 1)。根据同源序列可知甲烷单加氧酶是一个同型二聚体,其中羟基化酶是一个关键组份,由 α , β , γ 3 个亚基组成,构成了 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 构型,因此羟基化酶的理论分子量应为 248.9kDa,等电点为 6.28,是一个中性蛋白酶,组份 B 的理论分子量为 14.9kDa,等电点为 4.85;还原酶的理论分子量为 37.1kDa,等电点为 4.69。沈润南^[12]的实验数据为 MMOH 的分子量为 240kDa, α , β , γ 3 个亚基的

表 1 *Methylomonas* sp. GYJ3 中 sMMO 各组份的理论分子量和理论等电点

Table 1 The computation of the theoretical pI and MW for sMMO components by using ExPASy software package

Components of sMMO	Isoelectric point	Molecular weight (Da)
MMOX	5.97	59998.54
MMOY	6.22	45082.35
MMOZ	8.94	19401.34
MMOH	6.28	248874.41
MMOB	4.58	14882.95
orfY	5.00	12152.47
MMOC	4.69	37075.26

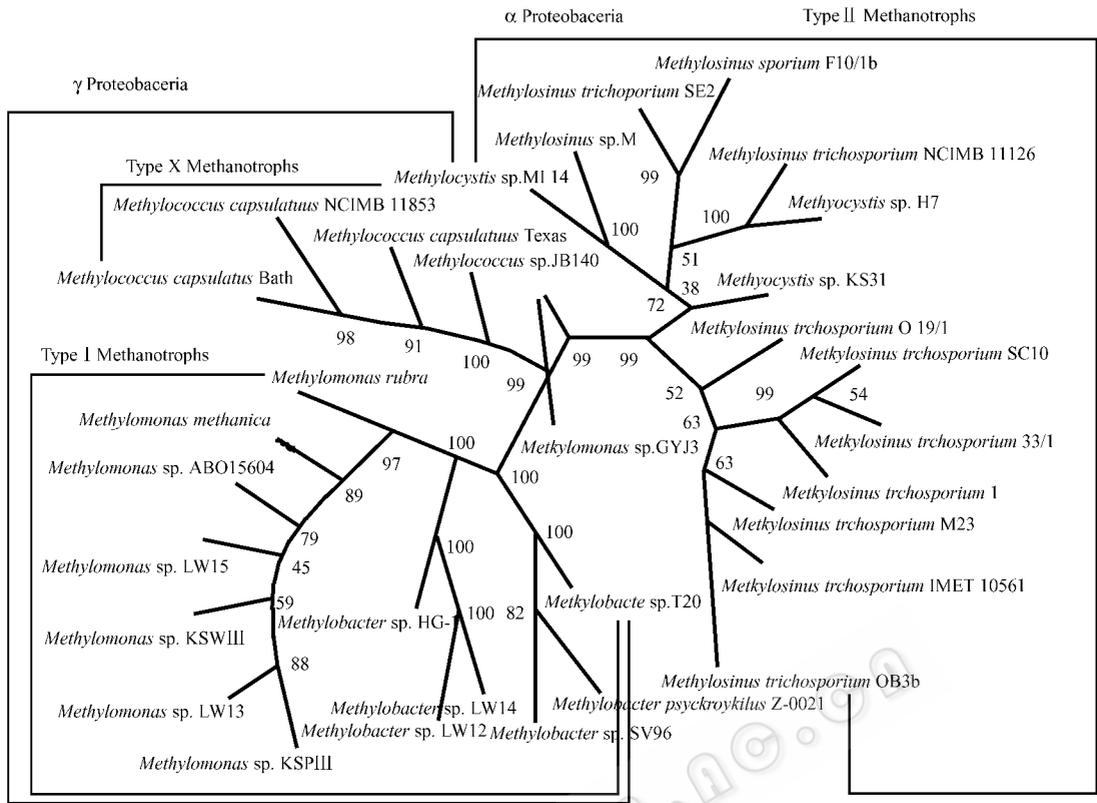


图 2 基于 16S rDNA 的 *Methylomonas* sp. GYJ3 遗传进化树

Fig.2 Phylogenetic analysis of the 16S rDNA from *Methylomonas* sp. GYJ3. The tree constructed by the programs DNADIST, NEIGHBOR, CONSENSE, SEQBOOT, and DRAWGRAM from the PHYLIP package (version 3.61 from J. Felsenstein, University of Washington). Bootstrap values from 100 replicates are also shown.

分子量分别为 56kDa, 43kDa, 27kDa, MMOC 为 42kDa, MMOB 为 14kDa, 与理论计算值相比较, γ 亚基的分子量差别较大, 其次是还原酶, 其它组份的差异均在 7% 以内, 这种差异性与蛋白质分子的空间构型有关, 说明 γ 亚基和还原酶的空间结构与标准蛋白相差较大。

3 讨论

甲烷在地球上的储藏量极为丰富, 是保障人类生存和发展的重要能源之一, 同时它也是一种温室气体。目前, 还没有一种化学催化剂能在常温下直接将甲烷转化成甲醇, 而甲烷氧化细菌中的甲烷单加氧酶是唯一可在常温下活化分子氧, 将甲烷氧化成甲醇的生物酶, 因此对甲烷氧化菌及其中的甲烷单加氧酶的研究成为当代酶催化化学研究的热点之一。

在已报道的甲烷氧化菌中, 已经显示 sMMO 主要存在于 II 型甲烷氧化细菌中, 仅有几个 I 型甲烷氧化细菌中拥有 sMMO, 如 *Methylomonas methanica* 68-1, *Methylomonas* sp. KSW III/KSP III 和菌株 GYJ3, 然而, 除了 *Methylomonas* sp. KSW III/KSP III 外, 其它菌株的 sMMO 研究鉴定工作都是在生物化学和形态学基础上进行的, 而没有基因信息的报道。很明显, 有关 I 型甲烷氧化细菌中 sMMO 的基因序列信息是缺乏的, 所以菌株 GYJ3 的基因序列数据对研究含 sMMO 的 I 型甲烷氧化细菌有重要的科学意义。

我们对 *Methylomonas* sp. GYJ3 中的 sMMO 进行基因测序和序列比对分析, 总的来看, 在已测序的 6 个菌株中, MMOX 组分是高度保守的, 它在 sMMO 中也是一个关键的组分, 由 526 个氨基酸组成了肽链, 它的蛋白质功能是 sMMO 的催化活性中心, 利用已发表的该组分基因序列信息设计的探针已被用于探测、鉴定甲烷氧化细菌中的 sMMO。其它组分或亚基的序列保守性相对于 MMOX 亚基的保守性较低, 然而, orfY 组分的保守性最低, 由于它的功能未知, 这个组分被很少研究, Merckx 等的研究表明 orfY 组分可能会潜在的抑制 sMMO 的活性, 他们推测 orfY 是 Cu、Fe、CH₄、O₂ 等小分子的传感蛋白, 与 MMOH 相结合, 这是迄今为止仅有的一篇有关 orfY 功能研究的报道。

生物系统发育学研究的是生物物种进化关系, 通过推断或评估物种间进化关系, 从而可以推断出许多潜在的生物功能及其性质。基于 16S rDNA 和 MMOX 氨基酸序列对菌株 GYJ3 进行的进化关系评估以及从以上两种分析结果可以看出, 基于 16S rDNA 的进化树分析与 MMOX 蛋白的进化树分析是相关联的, 前者从进化距离上说明菌株 GYJ3 更属于 γ 蛋白菌亚群, 而后者表明了菌株 GYJ3 与 *Methylomonas* sp. KSW III/KSP III 最近似。最近几年有关甲烷氧化菌的进化关系分析研究中, 有许多报道显示 MMOX 亚基是非常重要的组分, 在研究甲烷氧化菌进化关系中, 基于氨基酸序列的分析起了很重要的作用。这些方法弥补了传统形态学方法对进

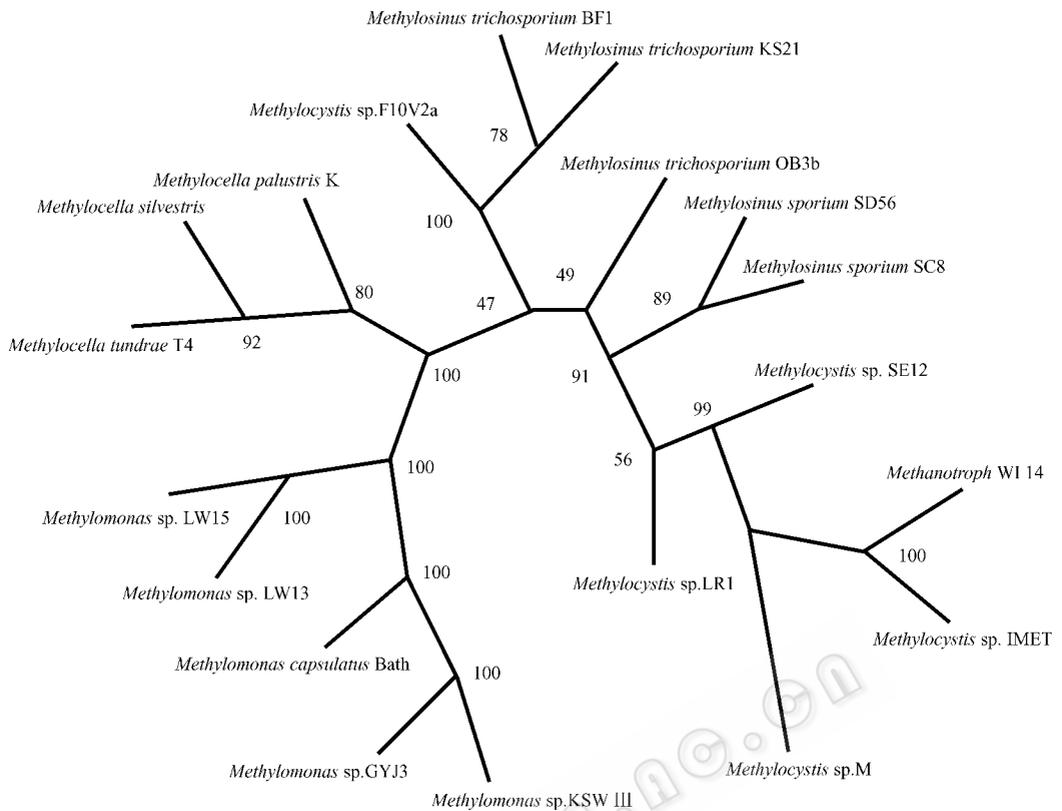


图 3 基于 MMOX 氨基酸序列的 *Methylomonas sp. GYJ3* 遗传进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of an alignment of 516 derived amino acids of mmoX genes, using the programs PROTDIST, NEIGHBOR, CONSENSE, SEQBOOT and DRAWGRAM from the PHYLIP (version 3.61) package. Bootstrap values from 100 replicates are also shown.

化关系鉴定的疑惑和不足。我们的研究结果与宁治中等^[11]在 1990 年报道的 GYJ3 菌株生物化学和形态学的研究结果基本一致。

然而, 菌株 GYJ3 的进化分析结果与序列比较结果是不同的, 在甲烷氧化菌中这是一个奇特的现象。这可能是由于有关 I 型甲烷氧化菌分离物的基因序列缺乏或 I 型甲烷氧化菌基因序列数据库的缺乏所致, 以致难以获得完全准确的信息。因此, 需要更多的来自于纯培养的 I 型甲烷氧化菌基因序列信息来充实数据库。另一方面, 在这个领域内, 序列比较仅仅是以相似性或类似性为标准的, 它不能或只是有限的反映了生物物种的生物进化关系, 更准确的分类学方法要依据生物化学、形态学和生物进化方法的综合。从 Bowmar^[16]的观点来看, 在物种层次上有关甲烷氧化菌的更准确的分类标准是细胞内脂肪酸的鉴定和形态学特征, 它能有效的用于不同甲烷氧化菌的分类学鉴定。因此, 在菌株 GYJ3 的进化分析结果和宁治中等以前报道的形态学研究结果的基础上, 可以认定菌株 GYJ3 是 *Methylomonas* 属的一个成员。我们的研究结果进一步证实了 I 型甲烷氧化菌能够表达 sMMO。

菌株 GYJ3 的 sMMO 基因组序列是第三个被测定的 I 型甲烷氧化菌中甲烷单加氧酶的基因组序列, 迄今, 可利用的 I 型甲烷氧化菌中 sMMO 的基因信息非常少, 我们工作的目标之一是在基因数据库中增加更多的有关信息, 因为按照传

统的概念, 在自然界中 sMMO 主要存在于 II 型甲烷氧化菌中, 而我们的试验结果将有利于评估含 sMMO 的 I 型甲烷氧化菌在自然界中的重要性, 同时有助于对菌株 GYJ3 中 sMMO 活性中心结构和功能的预测。

参 考 文 献

- [1] Lipscomb JD. Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Ann Rev Microbiol*, 1994, **48**: 371 - 399
- [2] Merx M, Lippard SJ. Why OrfY? Characterization of MMOD, a long overlooked component of the soluble methane monooxygenases from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Biol Chem*, 2002, **277** (8): 5858 - 5865.
- [3] Nielsen AK, Gerdes K, Murrell JC. Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Mol Microbiol*, 1997, **25** (2): 399 - 409.
- [4] West CA, Salmond GPC, Dalton H, et al. Functional expression in *Escherichia coli* of protein B and protein C from soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Gen Microbiol*, 1992, **138** (7): 1301 - 1307.
- [5] Lloyd JS, Finch R, Dalton H, et al. Homologous expression of soluble methane monooxygenase genes in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology*, 1999, **145** (2): 461 - 470.
- [6] Miguez CB, Bourque D, Sealy JA, et al. Detection and isolation of methanotrophic bacteria possessing soluble methane monooxygenase.

- (sMMO) genes using the polymerase chain reaction (PCR). *Microbial Ecol*, 1997, **33**(1): 21 - 31.
- [7] Stafford GP, Scanlan J, McDonald IR, *et al.* rpoN, mmoR and mmoG, genes involved in regulating the expression of soluble methane monoxygenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology*, 2003, **149**(7): 1771 - 1784.
- [8] McDonald IR, Uchiyama H, Kambe S, *et al.* The soluble methane monoxygenase gene cluster of the trichloroethylene-degrading methanotroph *Methylocystis* sp. strain M. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(5): 1898 - 1904.
- [9] Coufal DE, Blazyk JL, Whittington DA, *et al.* Sequencing and analysis of the *Methylococcus capsulatus* (Bath) soluble methane monoxygenase genes. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(8): 2174 - 2185.
- [10] Groees S, Laramée L, Wendlandt KD, *et al.* Purification and characterization of the soluble methane monoxygenase of the type II methanotrophic bacterium *Methylocystis* sp. strain W114. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(9): 3929 - 3935.
- [11] 宁治中, 缪德坝, 易淑云, 等. 甲烷氧化细菌的筛选和性质. *微生物学通报*, 1990, **17**(3): 283 - 286.
- [12] Shen RN, Yu CL, Ma QQ, *et al.* Direct evidence for a soluble methane monoxygenase from type I methanotrophic bacteria: purification and properties of a soluble methane monoxygenase from *Methylomonas* sp. GYJ3. *Arch Biochem Biophys*, 1997, **345**(2): 223 - 229.
- [13] Misener S, Krawetz SA. 生物信息学方法指南. 欧阳红生, 阮承迈, 李慎涛, 等译. 第一版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [14] Elango N, Radhakrishnan R, Froland WA, *et al.* Crystal structure of the hydroxylase component of methane monoxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Protein Sci*, 1997, **6**(3): 556 - 568.
- [15] Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ, *et al.* Crystal structure of a bacterial non-haem iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature*, 1993, **366**(6455): 537 - 543.
- [16] Bowman JP, Sly LI, Stackebrandt E. The phylogenetic position of the family Methylococcaceae. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, **45**(1): 182 - 185.

Sequence analysis of 16S rDNA and genes of soluble methane monoxygenase from *Methylomonas* sp. GYJ3

HUA Shao-feng¹, LI Shu-ben^{1*}, TAN Hai-dong², ZHAO Jia-zheng¹

(¹ State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

(² Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Soluble methane monoxygenase (MMO) from methanotrophs is a member of binuclear iron-containing multicomponent oxygenases, which can catalyze bioconversion of methane to methanol at ambient temperature and regulate methane recycle in nature. The research focused mainly on the sequence analysis of 16S rDNA and sMMO genes from *Methylomonas* sp. GYJ3. With the aid of the information from GenBank, the PCR primers and the sequence primers were designed, obtained a 5690bp of sMMO fragment and a 1280bp of 16S rDNA. Sequence comparison for MMOX with counterpart of other five strains showed that from 78% to 99% identity in protein level and from 71% to 97% identity in gene level, in the separate comparison of six components, only orfY component had a lower identical. The multiple alignment of MMOX amino acid sequence with other four strains showed that there is a high conservation, especially in two Fe binding regions. 16S rDNA phylogenetic analysis demonstrated that *Methylomonas* sp. GYJ3 is relative with γ proteobacteria. Phylogenetic analysis of MMOX amino acid sequence showed that *Methylomonas* sp. GYJ3 is closer to *Methylomonas* sp. KSW III of type I methanotrophs. It was concluded that *Methylomonas* sp. GYJ3 is belong to the genus of type I methanotroph *Methylomonas*, and the result was a direct evidence for the sMMO can be expressed in type I methanotrophs. The theoretical pI of hydroxylase was 6.28 and the theoretical MW of hydroxylase was 248874.41Da.

Keywords: Methane monoxygenase; Methanotroph; Sequence analysis; 16S rDNA; Phylogenetic analysis