

一株 II 型甲烷氧化菌中甲烷单加氧酶基因和 16S rDNA 的分析

华绍烽, 李树本*

(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)

摘要 【目的】利用分子生物学方法对一株甲烷氧化菌 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 中的 16S rDNA 和溶解性甲烷单加氧酶基因序列进行分析并探索其进化分类地位。【方法】利用基因数据库已有的基因序列信息, 设计 PCR 扩增引物和基因测序引物, 对溶解性甲烷单加氧酶基因和 16S rDNA 进行扩增和测序, 并进行溶解性甲烷单加氧酶的 6 个基因和氨基酸序列与同类菌株的相应序列进行联配分析。【结果】获得了全长为 5319 bp 甲烷单加氧酶基因序列和长度为 1290 bp 的 16S rDNA 序列。该菌株与 *Methylosinus trichosporium* OB3b 中相对应基因的同源性是 99.0% ~ 82.7%, MMOX 氨基酸序列的同源性为 99.4% ~ 81.8%, 相似性为 99.8% ~ 89.2%。基于以上分析表明 MMOX 组分有很高的序列保守性, 特别是在活性中心区域。【结论】菌株 IMV 3011 属于甲基弯菌属, 最近似的菌株是 *Methylosinus trichosporium* OB3b。

关键词: 甲烷氧化菌; 甲烷单加氧酶; 基因测序; 16S rDNA; 进化分析

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0294-08

甲烷氧化细菌能够利用甲烷为唯一碳源和能源, 在温和条件下实现甲烷氧化生成甲醇。甲烷氧化细菌主要分为 3 种类型, Type I、Type II 和 Type X 甲烷氧化细菌。目前, 已经有多个甲烷氧化细菌被研究^[1-2]。在甲烷氧化细菌中主要的酶系是甲烷单加氧酶 (Methane monooxygenase, MMO), 在细胞中, 依靠生长环境中可利用的 Cu 离子浓度不同, 甲烷单加氧酶有两种不同表达形式, Cu²⁺ 较高能够使颗粒性甲烷单加氧酶 (particular MMO, 简称 pMMO) 表达; Cu²⁺ 较低时 (小于 0.25 μmol/L), 在一些菌株中溶解性甲烷单加氧酶 (soluble MMO, 简称 sMMO) 被表达, 这种不同酶形式的表达发生在 DNA 到 mRNA 的转录过程中, 在细胞内, Cu²⁺ 能够抑制 sMMO 的活性^[3-4]。与 pMMO 相比较, 对 sMMO 的研究较为全面和深入, 因为 sMMO 具有宽的底物选择性, 特别是在生物除污和生物转化过程中具有潜力。十余年以

来, 研究最为详尽和深入的甲烷氧化细菌是 II 型菌 *Methylosinus trichosporium* OB3b 和 X 型菌 *Methylococcus capsulatus* Bath, 它们的 sMMO 系统具有相似的分子结构和组成, 包括 3 个功能性组分: 羟甲基化酶 (MMO Hydroxylase, 简称 MMOH), 酶的活性中心位于该酶的 α 亚基上; 能结合 NADH 的还原酶 (MMOR), 为催化反应提供两个必须的电子; 调节蛋白 (MMOB), 是一个对反应起调节作用的受动蛋白; 另外, Merkx 等报道了未知功能的第四个组分 (orfY 或 MMOD)^[5], 它的功能未知, 它们组成了一个催化反应体系, 催化着重要羟基化和环氧化反应。

近几年, 由于甲烷单加氧酶可以催化减少甲烷在空气中的释放, 降解地下水污染物三氯乙烯和其它含氯有害化学物质, 受到了广泛关注, 研究领域涉及酶的作用机理、生物化学性质和 ESR, Mössbauer, CD, MCD, EXAFS 和荧光光谱等谱学表征, 特别是

基金项目: 国家自然科学基金(20573124, 20873167)

* 通信作者。Tel: +86-10-64870204; Fax: +86-10-64870204; E-mail: lisb@lzb.ac.cn

作者简介: 华绍烽 (1963-) 男, 天津市人, 博士, 副研究员, 从事生物催化、微生物和分子生物学研究。E-mail: sfhua@lzb.ac.cn

收稿日期: 2008-10-20; 修回日期: 2008-11-21

在分子生物学的研究方面有着快速的发展^[6-7]。目前,已经有 6 个甲烷氧化细菌的 sMMO 基因簇被测序和鉴定^[8-14],DNA 序列和分子结构表现了一定的相似性,因此可以利用这些已知的序列来设计引物,从培养或环境中的样品中扩增相应的基因,诸如 *Methylococcus capsulatus* Bath 和 *Methylosinus trichosporium* OB3b 的基因序列已经被利用探测一些菌株中 sMMO 的存在^[15-18]。

在蛋白质结构与功能的研究中,基因测序和分析是研究蛋白质功能的重要方法,特别是结合了谱学表征的信息后,可以预测、修饰蛋白质的某些功能,可以阐明结构与功能作用的重要信息,也是构建具有某种特殊功能的基因工程菌基础。例如,通过基因测序和分析的方法发现了 sMMO 中的第四个组分(MMOD);证明了还原酶是铁氧化还原酶家族(FNR)的一个成员^[8,19]。

目前国内对该领域的研究报导甚少,我们对一个新的 II 型甲烷氧化菌 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 进行了研究,该菌株由俄罗斯微生物与病毒研究所的科学家友好赠送。辛嘉英等已报道了这个菌株的性质和 pMMO 的催化性质^[20-22],华绍烽等已报道了有关 sMMO 的纯化和表征^[23],这个甲烷氧化菌 IMV 3011 已经做为实验微生物用于生物除污和催化 CO₂ 转化为甲醇的研究^[24],而迄今有关它的分子生物学研究是一个空白点。在本研究中,我们设计了 PCR 引物和测序引物,进行了 PCR 扩增与测序,报导了该序列的分析比较结果,描述了菌株 IMV 3011 的分子结构特征和进化分析结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:菌株甲基弯菌 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:TaKaRa Agrose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒,MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit. 2.0,Ex Taq DNA 聚合酶,DNA Marker 均为 TaKaRa 产品,其它试剂均为 AR 或生物试剂,高速冷冻离心机(Hitachi),电泳仪(北京六一)。

1.2 细胞培养

Methylosinus trichosporium IMV 3011 被培养在基础液体培养基中,培养基的组成如下(g/L):K₂HPO₄ 0.49, KH₂PO₄ · 7H₂O 0.40, NH₄Cl 0.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.3, CaCl₂ · 2H₂O 0.02, KNO₃ 1.6, NaCl 0.3, FeSO₄ ·

7H₂O 0.004, MnSO₄ · H₂O 0.0004, ZnSO₄ · 7H₂O 0.00034, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.00024。首先细胞摇瓶培养(200 r/min, 33℃),碳源和能源为甲烷。然后在 6 L 发酵罐中放大培养,培养条件:33 ± 1℃, 300 r/min,甲烷为碳源。当培养液的密度 OD₅₉₀ 达到 1.2 ~ 1.5 时离心收集细胞(9000 × g, 12 min, 4℃),添加 10% 甘油后在 -80℃ 条件下保存备用。

1.3 染色体总 DNA 的提取

离心收集指数生长期的细胞,使用 MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit. 2.0(TaKaRa)试剂盒提取染色体总 DNA,操作按照试剂盒说明书进行。

1.4 PCR 扩增和测序

根据 GenBank 数据库中的同源序列信息(Accession Nos. Y18947, U81595, AF153281, X55394, U81594, AF153282),使用 Oligo 6.6 软件分别设计 sMMO 的 6 个组分(MMOX, MMOY, MMOB, MMOZ, orfY, MMOC)和 16S rDNA 的扩增引物见表 1 和测序引物见表 2,以染色体 DNA 为模板,引物对 MMOXF/MMOXR; MMOYF/MMOYR; MMOBF/MMOBR; MMOZF/MMOZR; MMODF/MMOZR; MMOCF/MMOCR; MMOSF/MMOSR 分别扩增 sMMO 的 *mmoX*, *mmoY*, *mmoB*, *mmoZ*, *orfY*, *mmoC* 编码基因 and 16S rDNA 基因,这些被扩增的片段分别代表甲烷单加氧酶羟甲基化酶的 α, β, γ 亚基、组分 B、还原酶、一个未知功能的组分 orfY 和 16S rDNA。PCR 扩增反应条件:50 μL 的反应体系,94℃,1 min;98℃,10 s;55℃,30 s;72℃,2 min;30 个循环;72℃,6 min。使用引物对 MMOSF/MMOSR 扩增 16S rDNA,反应条件:94℃,1 min;94℃,30 s;55℃,1 min;72℃,1.5 min;30 个循环;72℃,5 min。使用 TaKaRa Agrose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒纯化 PCR 扩增产物。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离后直接测序,采用 GCC 软件(version 3.0;Gene Codes Corp, Inc.)拼接和编辑序列,基因测序在宝生物有限公司完成。

1.5 进化树的构建

根据菌株 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 的 16S rDNA 和 MMOX 组分的氨基酸序列分别进行生物进化分析。首先用 Blast 工具在 GenBank 中搜索同源序列,基于 16S rDNA 序列搜索到同一性均在 98% 以上的 21 株菌株,基于 MMOX 氨基酸序列进行搜索后选择了 17 株菌株,用 Clustal W 软件进行序列联配,用 PHYLIP(version 3.6.3)软件包中

DNAPARS 和 PROTPARS 程序进行统计学计算,通过 各分支的重复数(replicate)为 100。最大节约法(maximum parsimony)进行进化树估算,

表 1 扩增溶解性甲烷单加氧酶和 16S rDNA 的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for amplification of sMMO and 16S rDNA

Primer	Target gene	Sequence(5'→3')	Be expressed protein
MMOXF	MMOX	ATGGCGATCAGTCTCGCWACSAARGC	α subunit of hydroxylase
MMOXR		TCAGAAATTCGGCAGCGGAT	
MMOYF	MMOY	ATGTCACAGCCTCAGAGCTC	β subunit of hydroxylase
MMOYR		TCARTTCTTGTAGCCGGCGA	
MMOZF	MMOZ	ATGSSAARAGAGAACCSATCCACGA	γ subunit of hydroxylase
MMOZR		TCAGCCCTGCAGATGCAGGA	
MMOBF	MMOB	ATGWYAGCGCDCATAACGCTTAYAACGCCGG	Compose B of MMO
MMOBR		TRATGTCGGTCAGGGCCGATCGAGGCCA	
MMOCF	MMOC	ATGTAYCAGATCGTCATYGAGA	Reducase of MMO
MMOCR		TCAGCCGCTGCCAGGAATT	
MMODF	OrfY	CGCCAAGACCAAATCAAGGC	Unknown function compose
MMODR		TCAGCCGCTGCCAGGAATT	
MMOSF	16S rDNA	TAACACATGCAAGTCAACG	
MMOSR		CGCTGACCCCTACCGTGGTTCG	

表 2 溶解性甲烷单加氧酶和 16S rDNA 的测序引物

Table 2 Sequencing primers for amplification of sMMO and 16S rDNA

Primer	Target gene	Sequence(5'→3')	Be expressed protein
MMOXF	MMOX	ATGGCGATCAGTCTCGCWACSAARGC	α subunit of hydroxylase
MMOXSEQF1		TCCTTCGCCGACGGCTTCATC	
MMOXSEQF2		CTATTGGCCGATCAGCATC	
MMOSEQR		GGCGTATCTCTGGCGATGA	
MMOYF	MMOY	ATGTCACAGCCTCAGAGCTC	β subunit of hydroxylase
MMOYSEQF		CCCTTCTTCACGGCGCAATC	
MMOYSEQR		GTGCTCTCATTTGCCCCAGGA	
MMOYR		TCARTTCTTGTAGCCGGCGA	
MMOZF	MMOZ	ATGSSAARAGAGAACCSATCCACGA	γ subunit of hydroxylase
MMOZSEQF		ATCAAGGCCGCCAAGACCAA	
MMOZSEQR		TCTTGGCCGGCCTTGATCTTG	
MMOZR		TCACGCCTGCAGATGCAGGA	
MMOBF	MMOB	ATGWYAGCGCDCATAACGCTTAYAACGCCGG	Compose B of MMO
MMOBR		TCARATGTCGGTCAGGGCCGATCGAGGCC	
MMOCF	MMOC	ATGTAYCAGATCGTCATYGAGA	Reducase of MMO
MMOCSEQF		TTCTTCGGCGTCACCAATCA	
MMOCSEQR		TGGAAGGAGATCGCGTCGAA	
MMOCR		TCAGCCGCTGCCAGGAATT	
MMODSEQF	orfY	ATCAAGGCCGCCAAGACCAA	Unknown function compose
MMODSEQR		TGGAAGGAGATCGCGTCGAA	

1.6 序列比对分析

通过 EB(European bioinformatics institute)网站的 Align 程序进行 sMMO 的 DNA 或氨基酸序列相似性、同一性的联配分析。使用序列编辑器(BioEdit , Version. 7.0.4.1)进行推测的 MMOX 氨基酸多序列的联配比对,比对的序列: *Methylosinus trichosporium* OB3b (accession No. CAA39068), *Methylocystis* sp. M (accession No. AAC45289), *Methylocystis* sp. WI14

(accession No. AAF01268), *Methylococcus capsulatus* Bath (accession No. YP113659), *Methylomonas* sp. KSWIII/KSPIII (accession No. BAA84757 , BAA84751)

1.7 基因序列登记号(Accession number)

Methylosinus trichosporium IMV 3011 的 16S rDNA 序列和 sMMO 基因簇序列已在 GenBank 数据库中登记公开,登记号为 DQ149126 和 DQ149124。

2 结果和讨论

2.1 PCR 扩增

使用表 1 中的引物扩增 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 中 sMMO 的 6 个组分和 16S rDNA, 但未能扩增出 *orfY* 基因片段, 测序结果表明: *mmoX* 的长度为 1581 bp, *mmoY* 为 1161 bp, *mmoB* 为 417 bp, *mmoZ* 为 509 bp, *mmoC* 为 1032 bp 和 1290 bp 的 16S rDNA。根据结构分析, *orfY* 组分位于 *mmoZ* 和 *mmoC* 之间, 因此, 采用 MMOZSEQF 和 MMOCR 引物扩增 *orfY* 片段, 使用 MMODSEQF/ MMODSEQR 测序引物对 PCR 产物进行测序, 经过对测序结果基因分析后获得了一个 321 bp 的目的基因 *orfY* 片段。经过对 6 个组分序列的拼接和编辑, 我们最终获得了一个完整的 sMMO 基因序列, 全长为 5319 bp, 为进一步克隆表达, 研究 sMMO 的分子结构奠定了基础。从这个结果可以知道 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 是一个能够表达 sMMO 的甲烷氧化细菌。

2.2 sMMO 基因的比对分析

基因 *mmoX* 为羟基化酶 α 亚基的基因编码, 包含了酶的活性中心, 是该酶的核心组分, 利用这个组分的基因序列可探测其它甲烷氧化细菌中 sMMO 的存在。推测的 MMOX 氨基酸序列与 *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylocystis* sp. M, *Methylocystis*

sp. WI14, *Methylococcus capsulatus* Bath, *Methylomonas* sp. KSWIII/KSPIII 菌株中相应序列进行联配表明 MMOX 组分的氨基酸序列具有高度的保守性, 特别是在双核铁中心区域, 见图 1, 143 ~ 147 和 242 ~ 246 位氨基酸残基分别是活性中心的两个铁原子的配位域, 在图 1 中用阴影表示, 可以推测在这些甲烷氧化菌中有相似的活性中心结构, MMOX 的高度保守性也可以说明在不同的甲烷单加氧酶中, 各组分之间的相互作用、酶与底物的相互结合和底物与产物的结合释放机理可能有着重要的相似性。

2.3 sMMO 基因的同性和相似性比较

Methylosinus trichosporium IMV 3011 的 sMMO 基因簇与 *Methylosinus trichosporium* OB3b (A), *Methylocystis* sp. M (B), *Methylocystis* sp. WI14 (C) 和 *Methylococcus capsulatus* Bath (D) 菌株中相应基因进行了比较, 结果见图 4, 6 个组分的基因及推测的氨基酸序列被联配分析, 表明菌株 IMV 3011 与 *Methylosinus trichosporium* OB3b 的同性和相似性最高, 相应基因的同性是 99.0% ~ 82.7%, 而其次是 *Methylocystis* sp. M 菌株。在选择比较的 4 株菌株中对 MMOX 组分的氨基酸序列进行联配比较表明同一性是 99.4% ~ 81.8%, 相似性是 99.8% ~ 89.2%。总的来看, 每个 sMMO 中 *orfY* 片段与来源于 *Methylococcus capsulatus* Bath 的基因簇比对结果具有较低的同性和相似性。*orfY* 片段的基本功能是不

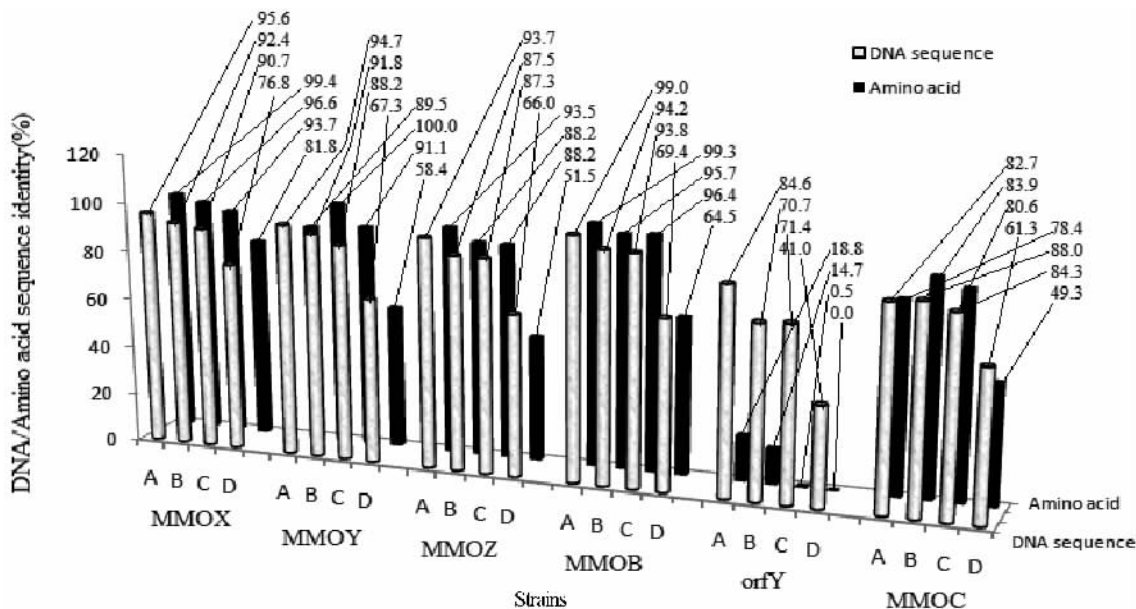


Fig. 2 4 个同源序列与菌株 IMV3011 的溶解性甲烷单加氧酶的基因序列和氨基酸序列比较

Fig.2 Comparison of DNA sequences and deduced amino acid sequence of sMMO genes from several known methanotrophs with *Methylosinus trichosporium* IMV 3011. DNA sequences identities, amino acid sequences identities and similarities of sMMO were obtained using the EBI maintains of analysis tool align program via the World Wide Web at the European Bioinformatics Insititute. The MMO genes and amino acid sequence of varity organisms are from the GenBank database : A : *Methylosinus trichosporium* OB3b , B : *Methylocystis* sp. M , C : *Methylocystis* sp. WI14 , D : *Methylococcus capsulatus* . Bath.

2011	1	MAISLATKAA	TDALKVNRAP	VGVEPQEVHK	WLOSFNWDFK	ENRRTKYP	TKY
OB3b	1	MAISLATKAA	TDALKVNRAP	VGVEPQEVHK	WLOSFNWDFK	ENRRTKYP	TKY
sp.M	1	MAISLATKAA	TDALKVNRAP	VGVEPQEVHK	WLOSFNWDFK	DNRTKYA	TKY
W114	1	MAISLATKAA	TDALKVNRAP	VGVEPQEVHK	WLOSFNWDFK	DNRTKYA	TKY
Bath	1	MALSLATKAA	TDALANRRAP	TSVNAQEVHR	WLOSFNWDFK	NNRTKYA	TKY
Kswp	1	MALSLATKAA	TDALANRRAP	VSMGAEQEVHR	WLOSFNWDFK	NNRTKYA	TKY
2011	51	HMANETKEQF	KVIAKEYARM	EAAKDERQFG	TLLDGLTRLG	AGNKVHPRWG	
OB3b	51	HMANETKEQF	KVIAKEYARM	EAAKDERQFG	TLLDGLTRLG	AGNKVHPRWG	
sp.M	51	HMANETKEQF	KVIAKEYARM	EAAKDERQFG	TLLDGLTRLG	AGNKVHPRWG	
W114	42	HMANETKEQF	KVIAKEYARM	EAAKDERQFG	TLLDGLTRLG	AGNKVHPRWG	
Bath	51	KMANETKEQF	KLIAKEYARM	EAVKDERQFG	SLQDVALTRLN	AGVVRVHPKSWN	
Kswp	51	KMANETKEQF	KLIAKEYARM	EISVDERQFG	SLQDVALTRVD	AGVVRVHPKSWN	
2011	101	ETMKVINSFL	EVGEYNAIAA	SAMLWD SATA	AEQKNGYLAQ	VLDEIRH	THQ
OB3b	101	ETMKVINSFL	EVGEYNAIAA	SAMLWD SATA	AEQKNGYLAQ	VLDEIRH	THQ
sp.M	101	ETMKVINSFL	EVGEYNAIAA	SAMLWD SATA	AEQKNGYLAQ	VLDEIRH	THQ
W114	92	ETMKVINSFL	EVGEYNAIAA	SAMLWD SATA	AEQKNGYLAQ	VLDEIRH	THQ
Bath	101	ETMKVINSFL	EVGEYNAIAA	TGMLWD SATA	AEQKNGYLAQ	VLDEIRH	THQ
Kswp	101	EISMKVINSFL	EVGEYNAIAA	TGMLWD SATA	PEQKNGYLGQ	VLDEIRH	THQ
2011	151	CAFINHYYSK	HYHDPAGHND	ARRTRAI GPL	WKGMRV FAD	GFI S GDA VEC	
OB3b	151	CAFINHYYSK	HYHDPAGHND	ARRTRAI GPL	WKGMRV FAD	GFI S GDA VEC	
sp.M	151	CAFINHYYSK	HYHDPAGHND	ARRTRAI GPL	WKGMRV FAD	GFI S GDA VEC	
W114	142	CAFINHYYSK	HYHDPAGHND	ARRTRAI GPL	WKGMRV FAD	GFI S GDA VEC	
Bath	151	CAFINHYYSK	NGQDPAGHND	ARRTRAI GPL	WKGMRV FAD	GFI S GDA VEC	
Kswp	151	CAFINHYYSK	QGDPAAGHND	ARRTRAI GPL	WKGMRV FAD	GFI S GDA VEC	
2011	201	SVNLQLVGEA	CFTNPLIVAV	TEWA SANGDE	IPTVFLSVE	TDEL RH MANG	
OB3b	201	SVNLQLVGEA	CFTNPLIVAV	TEWA SANGDE	IPTVFLSVE	TDEL RH MANG	
sp.M	201	SVNLQLVGEA	CFTNPLIVAV	TEWA SANGDE	IPTVFLSVE	TDEL RH MANG	
W114	192	SVNLQLVGEA	CFTNPLIVAV	TEWA SANGDE	IPTVFLSVE	TDEL RH MANG	
Bath	201	SINLQLVGEA	CFTNPLIVAV	TEWA SANGDE	IPTVFLSVE	TDEL RH MANG	
Kswp	201	SINLQLVGEA	CFTNPLIVAV	TEWA SANGDE	MTPTVFLSIE	TDEL RH MANG	
2011	251	YQTVVSIAND	PASAKFLNTD	LNNAFWTQOK	YFTPVLGVL	EVGSKFKVEP	
OB3b	251	YQTVVSIAND	PASAKFLNTD	LNNAFWTQOK	YFTPVLGVL	EVGSKFKVEP	
sp.M	251	YQTVVSIAND	PAAAKYLNTD	LNNAFWTQOK	YFTPVLGVL	EVGSKFKVEP	
W114	242	YQTVVSIAND	PAAAKYLNTD	LNNAFWTQOK	YFTPVLGVL	EVGSKFKVEP	
Bath	251	YQTVVSIAND	PAAAKYLNTD	LNNAFWTQOK	YFTPVLGVL	EVGSKFKVEP	
Kswp	251	YQTVVSIAND	PAAAKYLNTD	LNNAFWTQOK	YFTPVLGVL	EVGSKFKVEP	
2011	301	WVKTWNRWVY	EDWGGIWI GR	LQKYGYE SPA	SLRDAKRDAY	WAHHD LALAA	
OB3b	301	WVKTWNRWVY	EDWGGIWI GR	LQKYGYE SPA	SLRDAKRDAY	WAHHD LALAA	
sp.M	301	WVKTWNRWVY	EDWGGIWI GR	LQKYGYE SPR	SLRDAKRDAY	WAHHD LALAA	
W114	292	WVKTWNRWVY	EDWGGIWI GR	LQKYGYE SPR	SLRDAKRDAY	WAHHD LALAA	
Bath	301	WVKTWNRWVY	EDWGGIWI GR	LQKYGYE SPR	SLRDAKRDAY	WAHHD LALAA	
Kswp	301	WVKTWNRWVY	EDWGGIWI GR	LQKYGYE SPR	SLRDAKRDAY	WAHHD LALAA	
2011	351	YALWPLGFAR	LALPDEEDQA	WFEANYPGWA	DHVGKIFNEW	KKLGYEDPKS	
OB3b	351	YALWPLGFAR	LALPDEEDQA	WFEANYPGWA	DHVGKIFNEW	KKLGYEDPKS	
sp.M	351	YALWPLGFAR	LALPDEEDQE	WFEANYPGWA	DHVGKIYNEW	KKLGYEDPKS	
W114	342	YALWPLGFAR	LALPDEEDQE	WFEANYPGWA	DHVGKIYNEW	KKLGYEDPKS	
Bath	351	YALWPLGFAR	LALPDEEDEE	WFEANYPGWY	DHVGKIYEEW	RARGCEDPKS	
Kswp	351	YALWPLGFAR	LALPDEEDEE	WFEANYPGWY	DHVGKIYEEW	RARGCEDPKS	
2011	401	GFIPYKWLLE	NGHDVYIDRV	SQVFFIPSLA	KGSGSLRVHE	FNGKKHSLTD	
OB3b	401	GFIPYKWLLE	NGHDVYIDRV	SQVFFIPSLA	KGSGSLRVHE	FNGKKHSLTD	
sp.M	401	GFIPYAWLLE	NGHDVYIDRV	SQVFFIPSLA	KGSGSLRVHE	FNGKKHSLTD	
W114	392	GFIPYAWLLE	NGHDVYIDRV	SQVFFIPSLA	KGSGSLRVHE	FNGKKHSLTD	
Bath	401	GFIPYAWLLE	NGHDVYIDRV	SQVFFIPSLA	KGSGSLRVHE	FNGKKHSLTD	
Kswp	401	GFIPYAWLLE	NGHDVYIDRV	SQVFFIPSLA	KGSGSLRVHE	FNGKKHSLTD	
2011	451	DWGERQWLE	PERYECHNIF	EQVEGRELSE	VIAEGHGVR	DGKTLIAQPH	
OB3b	451	DWGERQWLE	PERYECHNIF	EQVEGRELSE	VIAEGHGVR	DGKTLIAQPH	
sp.M	451	DWGERMWLSE	PERYECHNIF	EQVEGRELSE	VIAEGHGVR	DGKTLIAQPH	
W114	442	DWGERMWLSE	PERYECHNIF	EQVEGRELSE	VIAEGHGVR	DGKTLIAQPH	
Bath	451	DWGERMWLSE	PERYECHNIF	EQVEGRELSE	VIAEGHGVR	DGKTLIAQPH	
Kswp	451	DWGERMWLSE	PERYECHNIF	EQVEGRELSE	VIAEGHGVR	DGKTLIAQPH	
2011	501	TRGD	NLWTL	EDIK RAGCVF	PDPLAKF		
OB3b	501	TRGD	NLWTL	EDIK RAGCVF	PDPLAKF		
sp.M	501	VRGD	NLWTL	EDIK RAGCVF	PDPLAKF		
W114	492	VRGD	NLWTL	EDIK RAGCVF	PDPLAKF		
Bath	501	VRGD	KLWTL	DDIKR LNCVF	KNPLV KALFN		
Kswp	501	TKKD	GKLWTL	DDIKR LNCVF	SDPLKAL		

1 甲烷单加氧酶 MMOX 组分的氨基酸序列联配

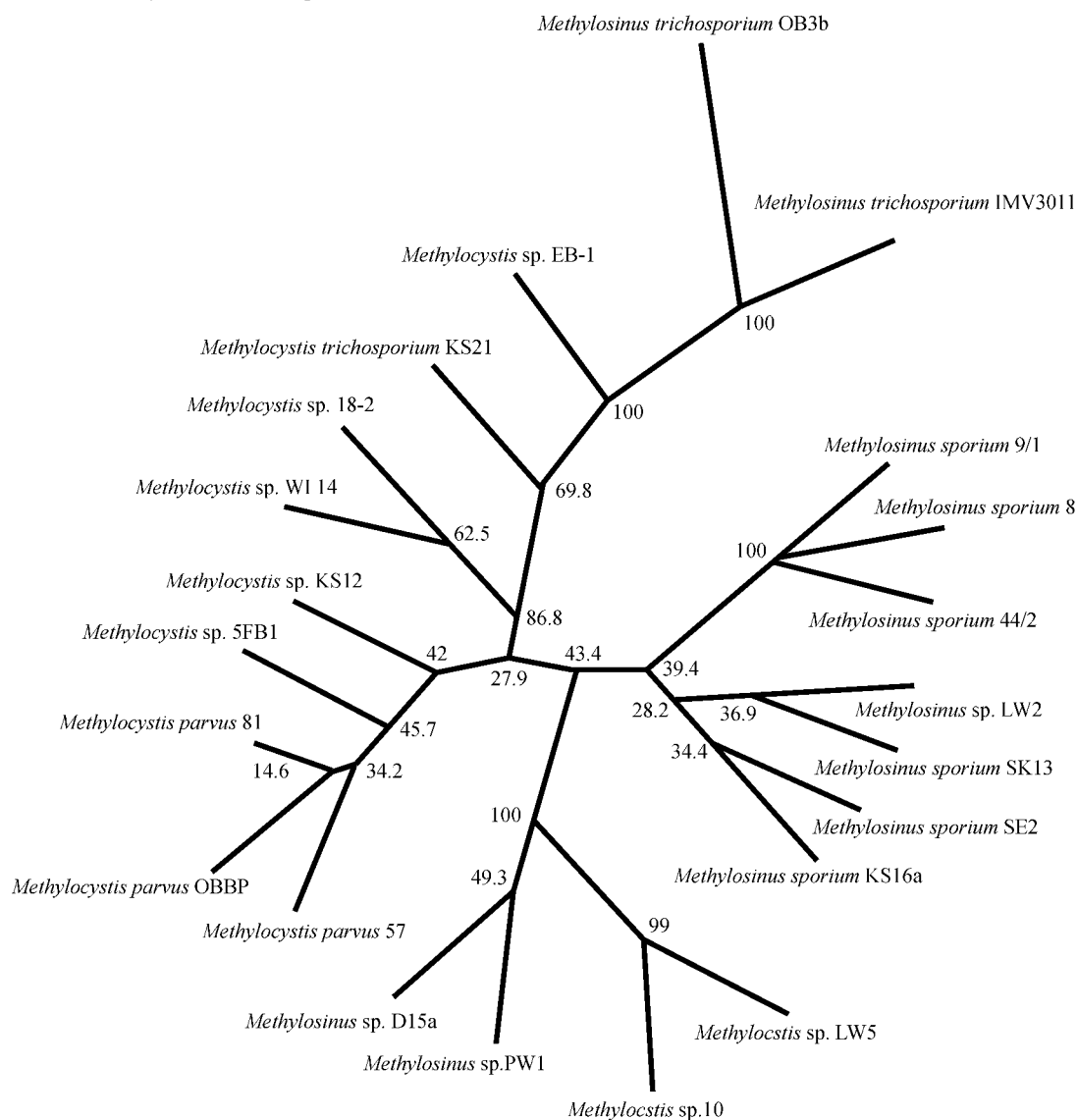
Fig. 1 Sequence alignments of deduced amino acids corresponding to the hydroxylase α subunits. Residues in boxes are universally conserved. The two Fe binding sites on MMOX are black boxed. The MMOX gene from *Methylosinus trichosporium* IMV 3011(3011), *Methylosinus trichosporium* OB3b(OB3b), *Methylocystis* sp. M(sp.M), *Methylocystis* sp. W114(W114), *Methylococcus capsulatus* Bath(Bath), *Methylomonas* sp. KSWIII/KSPIII(Kswp).

清楚的,因为在核酸序列数据库中没有与之同源性较高的序列相匹配。因此,和 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 最接近的菌株是 *Methylosinus trichosporium* OB3b。通过 16S rDNA 全序列比对方法比较, *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 与 *Methylosinus trichosporium* OB3b 的序列同一性最高为 89.9%;也说明了菌株 IMV 3011 与 *Methylosinus trichosporium* OB3b 的亲缘性最近,见图 2。

2.4 生物系统进化分析

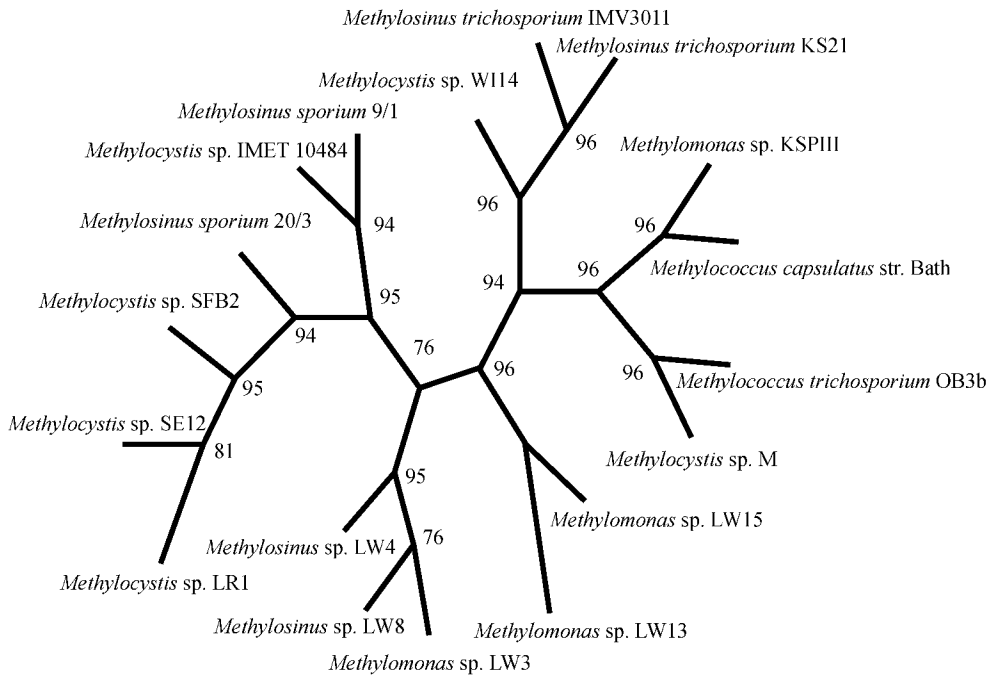
依据 16S rDNA 基因序列构建的生物进化树分析结果,表明了菌株 IMV 3011 的进化分枝位置,这个结果说明了 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 最近似的菌株是 *Methylosinus trichosporium* OB3b 见图

3。而根据 MMOX 氨基酸序列构建的进化树分析结果表明菌株 IMV 3011 进化相近的物种是 *Methylosinus trichosporium* KS21 见图 4,两种进化分析存在差异,后者是基于基因序列翻译的氨基酸序列构建的进化树,在翻译过程中,可能有一定的信息被掩盖,前者是以 16S rDNA 基因序列构建的进化分析,该基因片段在生物进化中具有高保守性,分析结果更真实、更准确。所以在这个研究中,基于 16S rDNA 的进化分析和其它联配比较的综合分析,表明菌株 IMV 3011 是 *Methylosinus trichosporium* 属的一个成员,最近似的菌株应是 *Methylosinus trichosporium* OB3b。



3 基于 16S rDNA 的 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of the 16S rDNA from *Methylosinus trichosporium* IMV 3011. The tree constructed by the programs SEQBOOT, DNAPARS, CONSENSE and DRAWGRAM from the PHYLIP package (version 3.6.3). Bootstrap values from 100 replicates are also shown.



4 基于 MMOX 组分的 *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of an alignment of 516 derived amino acids of MMOX genes, using the programs SEQBOOT, PROTPARS, CONSENSE and DRAWGRAM from the PHYLIP package (version 3.6.3). Bootstrap values from 100 replicates are also shown.

参考文献

- [1] Heyer J, Galchenko VF, Dunfield PF. Molecular phylogeny of type II methaneoxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiology*, 2002, 148: 2831 – 2846.
- [2] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 1996, 60: 439 – 471.
- [3] Dispirito AA, Gullledge J, Murrell JC, et al. Trichloroethylene oxidation by the membrane associated methane monooxygenase in type I, type II and type X methanotrophs. *Biodegradation*, 1992, 2: 151 – 164.
- [4] Nielsen AK, Gerdes K, Murrell JC. Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Molecular Microbiology*, 1997, 25: 399 – 409.
- [5] Merckx M, Lippard SJ. Why OrfY? Characterization of MMOD, a long overlooked component of the soluble methane monooxygenases from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 5858 – 5865.
- [6] 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: 537 – 543.
- [7] Elango N, Radhakrishnan R, Froland WA, et al. Crystal structure of the hydroxylase component of methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *protein science*, 1997, 6: 556 – 568.
- [8] Cardy DL, Laidler G, Salmond PC, et al. Molecular analysis of the methane monooxygenase (MMO) gene cluster of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Molecular Microbiology*, 1991, 5: 335 – 342.
- [9] Stafford GP, Scanlan J, McDonald IR, 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.
- [10] Ward N, Larsen Q, Sakwa J, et al. Genomic insights into methanotroph: The complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *PLoS Biology*, 2004, 2: e303.
- [11] Stolyar S, Franke M, Lidstrom ME. Expression of individual copies of *Methylococcus capsulatus* Bath particulate methane monooxygenase genes. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183: 1810 – 1812.
- [12] Stainthorpe AC, Lees V, Salmond GPC, et al. The methane monooxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Gene*, 1990, 91: 27 – 34.
- [13] McDonald IR, Uchiyama H, Kambe S, et al. The soluble methane monooxygenase gene cluster of the trichloroethylene-degrading methanotroph *Methylocystis* sp. strain M. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 1898 – 1904.
- [14] Murrell JC. Molecular genetics of methane oxidation. *Biodegradation*, 1994, 5: 145 – 149.
- [15] Auman AJ, Lidstrom ME. Analysis of sMMO-containing

- Type I methanotrophs in Lake Washington sediment. *Environmental Microbiology*, 2002, 4 : 517 – 524.
- [16] McDonald IR , Kenna EM , Murrell JC. Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* , 1995 , 61 : 116 – 121.
- [17] Miguez CB , Bourque D , Sealy JA , et al. Groleau1 detection and isolation of *Methanotrophic* bacteria possessing soluble methane monooxygenase (sMMO) genes using the polymerase chain reaction (PCR). *Microbial Ecology* , 1997 , 33 : 21 – 31.
- [18] Murrell JC , McDonald IR , Bourne DG. Molecular methods for the study of methanotroph ecology. *FEMS Microbiology Ecology* , 1998 , 27 : 103 – 114.
- [19] Andrews SC , Shipley D , Keen JN , et al. The haemoglobin-like protein (HMP) of *Escherichia coli* has ferrisiderophore reductase activity and its C-terminal domain shares homology with ferredoxin NADP⁺ reductases. *FEBS Letters* , 1992 , 302 : 247 – 252.
- [20] Xin JY , Cui JR , Hu XX , et al. Particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* is a copper-containing enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 2002 , 295 : 182 – 186.
- [21] Xin JY , Cui JR , Chen JB , et al. Continuous biocatalytic synthesis of epoxypropane using a biofilm reactor. *Process Biochemistry* , 2003 , 38 : 1739 – 1746.
- [22] Xin JY , Cui JR , Niu JZ , et al. Production of methanol from methane by methanotrophic bacteria. *Biocatalysis and Biotransformation* , 2004 , 22 : 225 – 229.
- [23] Hua Sf , Li Sb , Xin JY , et al. Purification , Identification and Biochemical Characterization of sMMO from *Methylosinus trichosporium* IMV 3011. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* , 2007 , 71 : 122 – 129.
- [24] Xin JY , Cui JR , Niu JZ , et al. Biosynthesis of methanol from CO₂ and CH₄ by methanotrophic bacteria. *Biotechnology* , 2004 , 3 : 67 – 71.

Molecular analysis of soluble methane monooxygenase and 16S rDNA from a type II methanotroph

Shaofeng Hua , Shuben Li *

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

Abstract :The soluble methane monooxygenase (sMMO) from *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 catalyzes the conversion of methane to methanol. [**Objective**] To identify the novel species *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 and to describe its evolution status. [**Methods**] With the aid of the information from GenBank , we designed several sets of primers for PCR amplification and sequencing , the 16S rDNA and complete of genes sequence for soluble methane monooxygenases were gene sequenced and analyzed with biology software. [**Results**] We obtained a 5319 bp of full-length DNA of soluble methane monooxygenases and a 1290 bp of 16S rDNA. Software analysis for six open reading frames and the deduced amino acid sequences of soluble methane monooxygenases has shown that 99.0% to 82.7% identity to the counterpart of *Methylosinus trichosporium* OB3b , 99.4% to 81.8% identity and 99.8% to 89.2% similarity to the predicted amino acid of *mmoX* genes in compared five strains. The multiple alignments of MMOX amino acid residues reveal that there is high conservation in MMOX , especially in two Fe binding regions. [**Conclusion**] These results indicated that strain IMV 3011 should be a true member of *Methylosinus trichosporium* , and it is closer to the species *Methylosinus trichosporium* OB3b.

Keywords : methanotroph ; soluble methane monooxygenases ; gene sequence ; 16S rDNA ; phylogenetic analysis

(本文责编 张晓丽)