

一株石油烃降解菌 TY22 烷烃羟化酶基因的克隆及功能研究

唐贇, 敬珊, 邹书珍, 冀黎骏, 杨雪, 余小丽 (西华师范大学生命科学学院, 四川南充 637009)

摘要 [目的] 对一株石油烃降解菌 TY22 的烷烃羟化酶基因 *alkB* 克隆测序, 并对其外源表达和功能进行研究。[方法] PCR 扩增获得 *alkB* 基因部分序列, 再根据该序列通过染色体步移技术, 最终获得完整 CDS 序列。将 *alkB* 基因与 pET21b(+) 载体构建重组质粒, 并转入 *E. coli* BL21(DE3) 进行表达。再将 *alkB* 基因克隆至 pCom8 载体中, 分别转入 *E. coli* GEC137(pGEC47 Δ B) 和 *Pseudomonas fluorescens* KOB2 Δ 1 进行基因功能的互补试验。[结果] 染色体步移获得了 1 236 bp 的烷烃羟化酶基因完整 CDS 序列 (GenBank Accession: KU867870)。诱导表达发现, 重组菌在 0.1 mmol/L IPTG、30 °C 条件下诱导培养 6 h 的表达效果最佳, 得到与预期相符的 46 kDa 蛋白。基因功能互补试验发现, 重组菌能在以 C₁₂~C₁₆ 为唯一碳源的培养基中生长。[结论] TY22 菌株的烷烃羟化酶基因完整 CDS 序列全长 1 236 bp, 能氧化 C₁₂~C₁₆ 的中长链烷烃, 并能在大肠杆菌中有效表达。

关键词 石油烃降解菌; 烷烃羟化酶; 表达; 功能

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)36-0131-04

Cloning and Functional Analysis of Alkane Hydroxylase Gene of a Petroleum Hydrocarbon Degrading Bacteria TY22

TANG Yun, JING Shan, ZOU Shu-zhen et al (College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637009)

Abstract [Objective] To clone and sequence the alkane hydroxylase gene *alkB* of a petroleum hydrocarbon degrading bacteria TY22, then to clone *alkB* into express vector for expressing and identifying its function. [Method] First, use PCR amplification to get partial sequence of 1236 bp *alkB* gene, then obtain the complete CDS sequence by chromosome walking techniques. Second, clone *alkB* gene into pET21b(+) vector, and transform the recombinant plasmid into *E. coli* BL21(DE3) for expressing. Third, clone *alkB* gene into pCom8 vector, and transform the recombinant plasmid into *E. coli* GEC137(pGEC47 Δ B) and *Pseudomonas fluorescens* KOB2 Δ 1 respectively for gene function complementation test. [Result] We got the complete CDS sequence of 1 236 bp alkane hydroxylase gene through chromosome walking techniques (GenBank Accession: KU867870). The expression strain had the most expression with 0.1 mmol/L IPTG, 30 °C culture for 6 hours, relative molecular mass 46 kDa was also in line with expectation. Gene function complementation test showed that the recombinant strains can grow in the medium with *n*-alkanes C₁₂~C₁₆ as sole carbon source. [Conclusion] Alkane hydroxylase gene *alkB* complete CDS sequence length of strain TY22 was 1 236 bp. It can oxidize *n*-alkanes with chain length C₁₂~C₁₆, and efficient expression in *E. coli* BL21(DE3).

Key words Petroleum hydrocarbon degrading bacteria; Alkane hydroxylase; Expression; Function

石油是目前全世界最为重要的能源物质,但在石油开发过程中经常会发生事故性泄露,在石油制品的生产和使用过程中,也往往会造成大量石油污染物进入土壤、河流和大气而产生严重的环境污染^[1-4]。据估计,全球每年有 1×10^9 t 石油污染物泄漏或排放至周围环境中,对生态环境造成了极大的破坏^[5-6]。随着污染情况日益加剧,高效且不产生二次污染的石油烃微生物修复技术现已成为该领域研究的热点。

烷烃具有高度的还原性,微生物对其进行降解时,通常是由烷烃羟化酶(AlkB, Alkane hydroxylase)启动整个反应。在烷烃羟化酶的催化下,将氧插入烷烃分子中使其变为醇或酮,然后逐步降解为不同类型的脂肪酸,最后通过不同途径将其分解为 CO₂ 和 H₂O^[7-9]。所以,烷烃羟化酶作为启动整个降解过程的关键酶,也成为了研究的焦点。

笔者以南充炼油厂周围被石油污染的土壤中筛选出的一株高效石油烃降解菌 TY22 为研究对象。经鉴定,该菌归属于拜氏不动杆菌(*Acinetobacter beijerinckii*),革兰氏染色呈阴性,其最适生长温度和 pH 分别为 30 °C、7.0,能以链长为 12~32 的正构烷烃为唯一碳源和能源生长^[10-11]。由于该菌是一株能降解中长链烷烃的不动杆菌新种,且其对正构烷烃的降解范围较宽,所以对其解烃基因的克隆和鉴定有着

重要的意义。该研究以期为后续石油烃污染修复工程提供优良的遗传资源,同时对其应用到石油烃污染的生物修复具有重要的实践意义。

1 材料与方法

1.1 菌株与载体 石油烃降解菌 TY22,由西华师范大学微生物学实验室保存;宿主菌 *E. coli* GEC137(pGEC47 Δ B)(抗四环素 Tet^r)和宿主菌 *Pseudomonas fluorescens* KOB2 Δ 1,由瑞士 Zürich 大学 van Beilen 教授赠送,西华师范大学微生物学实验室保存;*E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,购自北京 TIANGEN 有限公司;pCom8 质粒(抗庆大霉素 Gm^r),由瑞士 Zürich 大学 van Beilen 教授赠送,西华师范大学微生物学实验室保存;pET21b(+) express vector(抗氨苄青霉素 Amp^r),西华师范大学微生物学实验室保存;pMD19-T Vector(抗氨苄青霉素 Amp^r),购自大连 TaKaRa 有限公司。

1.2 主要试剂与酶 PrimeSTAR Max Premix(2 \times)、Quick-Cut *Nde* I、QuickCut *Xho* I、QuickCut *Sal* I、T₄ DNA Ligase 等购自大连 TaKaRa 有限公司;2 \times Taq PCR MasterMix、DNA Marker、双色预染蛋白质 Marker、细菌基因组 DNA 离心柱型提取试剂盒、通用型 DNA 离心柱型纯化回收试剂盒、质粒离心柱型小提试剂盒等购自北京 TIANGEN 有限公司。

1.3 引物 该研究所用引物见表 1,引物均合成于上海英潍捷基有限公司,PAGE 纯化。

1.4 烷烃羟化酶基因的克隆、测序 以 TY22 菌株基因组 DNA 为模板,利用引物 *alkB*wf/*alkB*wr 和 2 \times Taq PCR Master-

基金项目 四川省科技厅应用基础研究项目(2014JY0196);四川省南充市科技局重点项目(16YFZJ0040)。

作者简介 唐贇(1970—),男,四川南充人,副教授,博士,硕士生导师,从事资源细菌学研究。

收稿日期 2017-10-30

Mix 进行 PCR 扩增,反应条件为 95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,48 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 °C 后延伸 10 min。将获得的 PCR 产物纯化回收后,克隆到 pMD19-T Vector 中,并转入 *E. coli* DH5 α ,筛选阳性克隆后

测序。最后将 TY22 菌株送往上海生物工程有限公司,根据上一步获得的烷烃羟化酶基因 *alkB* 部分序列,利用染色体步移技术得到 *alkB* 基因的完整 CDS 序列。

表 1 该研究所用引物

Table 1 Primers of this study

序号 No.	引物名 Primers name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	来源 Source
1	<i>alkB</i> wf	AAYACNGCNCAYGARCTNGGVCAYAA	文献[12]
2	<i>alkB</i> wr	GCRTGRTGRTCHGARTGNCGYTG	文献[12]
3	上游引物 P1	GCGGGAATTCATATGATGAATGCCAGTAAATG	该研究
4	下游引物 P2	GGATACGGCTCGACTTAAGATTCAACAGCATCTTG	该研究
5	下游引物 P3	GAATGCCGCTCGAGTTAAGATTCAACAGCATCTTG	该研究

1.5 烷烃羟化酶基因序列及氨基酸序列分析 将 TY22 菌株的烷烃羟化酶基因 *alkB* 完整 CDS 序列在 NCBI 网站进行 Nucleotide BLAST 比对;将其对应蛋白质氨基酸序列在 NCBI 网站进行 Protein BLAST 比对;利用 EXPASY 网站 ProtParam 工具,在线分析氨基酸数目、蛋白质相对分子质量、理论等电点 pI 等;将氨基酸序列提交 NPS@ ;SOPMA secondary structure prediction 网站预测蛋白二级结构;利用 SWISS-MODEL 网站,将氨基酸序列提交后进行三维同源建模分析,在线预测蛋白的三级结构。

1.6 烷烃羟化酶基因在大肠杆菌中诱导表达

1.6.1 目的基因的 PCR 扩增。以 TY22 菌株基因组 DNA 为模板,利用上游引物 P1/下游引物 P3 和 PrimeSTAR Max Premix(2 \times)进行 PCR 扩增,获取带有 *Nde* I 和 *Xho* I 这 2 个酶切位点及其保护碱基的 *alkB* 基因的完整 CDS 序列。反应条件为 98 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 10 s,58 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 2 min,共 35 个循环;72 °C 后延伸 10 min。PCR 结束后将产物纯化回收。

1.6.2 构建 pET21b(+)-*alkB* 重组质粒。将上一步获得的 PCR 纯化回收产物和 pET21b(+)-express vector 分别进行 *Nde* I、*Xho* I 双酶切,各自回收酶切产物后利用 T₄ DNA Ligase 16 °C 连接过夜,最后转入 *E. coli* BL21(DE3)并筛选阳性重组菌。

1.6.3 重组菌诱导表达电泳。将过夜培养的重组菌按 1% 接种量接入含相应抗生素的 LB 培养基中,培养至 OD₆₀₀ \approx 0.6。然后按:①终浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L 的 IPTG;②25、30、37 °C 的培养温度;③2、4、6 h 的培养时间这 3 种条件分别诱导培养重组菌,然后用 8% 分离胶 SDS-PAGE 电泳检测表达结果,探究 IPTG 浓度、温度和时间对其诱导表达的影响。

1.7 烷烃羟化酶基因缺失与互补功能验证

1.7.1 目的基因的 PCR 扩增。以 TY22 菌株基因组 DNA 为模板,利用上游引物 P1/下游引物 P2 和 PrimeSTAR Max Premix(2 \times)进行 PCR 扩增,获取带有 *Nde* I 和 *Sal* I 这 2 个酶切位点及其保护碱基的 *alkB* 基因的完整 CDS 序列。反应条件为 98 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 10 s,60 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 2 min,共 35 个循环;72 °C 后延伸 10 min。PCR 结

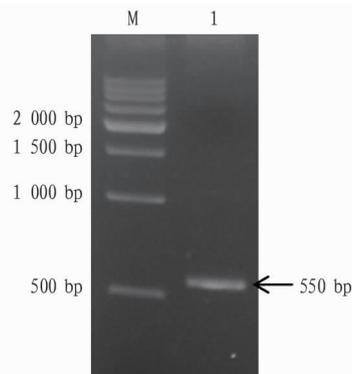
束后将产物纯化回收。

1.7.2 构建 pCom8-*alkB* 重组质粒。将上一步获得的 PCR 纯化回收产物和 pCom8 质粒分别进行 *Nde* I、*Sal* I 双酶切,各自回收酶切产物后利用 T₄ DNA Ligase 16 °C 连接过夜,最后转入 *E. coli* GEC137(pGEC47 Δ B)和 *Pseudomonas fluorescens* KOB2 Δ 1 中筛选阳性重组菌。

1.7.3 重组菌的功能互补试验。将过夜培养的 *E. coli* GEC137(pGEC47 Δ B)阳性重组菌,按 1% 接种量分别接入含有 1% C₈、C₁₀、C₁₂ 正构烷烃为唯一碳源的 E₂ 无机盐培养基中 37 °C、180 r/min 培养,观察其生长情况;将过夜培养的 *Pseudomonas fluorescens* KOB2 Δ 1 阳性重组菌,按 1% 接种量分别接入含有 1% C₁₂、C₁₄、C₁₆ 正构烷烃为唯一碳源的 E2 无机盐培养基中 37 °C、180 r/min 培养,观察其生长情况。

2 结果与分析

2.1 烷烃羟化酶基因的克隆及测序 根据参考文献可知,引物 *alkB*wf/*alkB*wr 的目的产物约为 550 bp。以 TY22 菌株基因组 DNA 为模板,PCR 扩增结果见图 1。由图 1 可知,目的片段大小与预期相符,对其回收后 TA 克隆测序。



注:M:500 bp DNA Ladder;1:PCR 扩增产物

Note:M:500 bp DNA Ladder,1:Product of PCR

图 1 *alkB*wf/*alkB*wr 引物 PCR 扩增Fig.1 PCR amplification of primer *alkB*wf/*alkB*wr

测序比对后发现该序列与 alkane hydroxylase(烷烃羟化酶 AlkB)基因序列存在很高的同源性,由此推测其为 TY22 菌株烷烃羟化酶基因 *alkB* 的部分序列。将菌株送至上海生物工程有限公司,根据此序列利用染色体步移技术得到全长

1 236 bp 的 *alkB* 基因完整 CDS 序列, GenBank 登录号为 KU867870, 其对应氨基酸序列登录号为 AMO65651。

2.2 烷烃羟化酶基因序列及氨基酸序列分析

2.2.1 BLAST 比对分析。将所得烷烃羟化酶基因 *alkB* 完整 CDS 序列在 NCBI 网站进行 Nucleotide BLAST 比对, 结果发现该序列与 *Acinetobacter beijerinckii* 的烷烃羟化酶基因序列存在很高的同源性, 其中与 *Acinetobacter* sp. M-1 (GenBank 登录号 AB049410.1) 的 *alkB* 基因的同源性达 88%。利用 NCBI-ORF Finder 预测 ORF 并将其对应氨基酸序列在 NCBI 网站进行 Protein BLAST 比对, 结果发现与多株 *Acinetobacter beijerinckii* 的烷烃羟化酶氨基酸序列存在极高的同源性, 最高可达 99%。由此可以推断, 所得序列即为 TY22 菌株的烷烃羟化酶基因 *alkB* 序列。

2.2.2 蛋白理化性质分析。利用 EXPASY 网站 ProtParam 工具, 在线分析氨基酸数目、蛋白质相对分子质量、理论等电点 pI 等, 结果如下: 氨基酸数目 411, 相对分子质量 46.7 kDa, 理论等电点 pI 9.22, Asp + Glu 41, Arg + Lys 50, 分子式 $C_{2137}H_{3297}N_{571}O_{588}S_{11}$, 不稳定指数 43.90, 脂溶性指数 86.67, 总平均亲水性 GRAVY -0.331。

2.2.3 蛋白二级结构、三级结构预测。将氨基酸序列提交 NPS@; SOPMA secondary structure prediction 网站预测蛋白二级结构, 结果发现该蛋白二级结构主要由 α 螺旋(h)、 β 转角(t)、无规则卷曲(c)和延伸链(e)4 种组成。其中 α 螺旋占 37.47%, 包含 154 个氨基酸; β 转角占 10.71%, 包含 44 个氨基酸; 无规则卷曲占 35.28%, 包含 145 个氨基酸; 延伸链占 16.55%, 包含 68 个氨基酸。利用 SWISS-MODEL 网站进行三维同源建模分析, 预测蛋白三级结构, 结果见图 2。

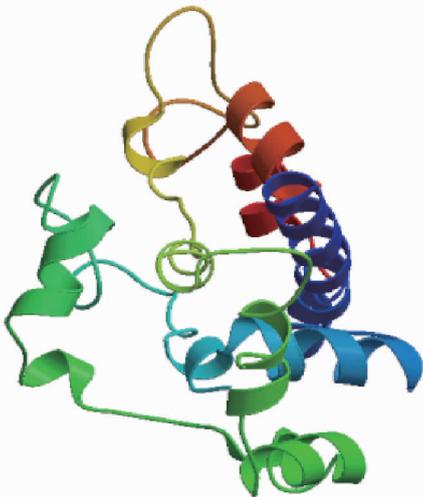


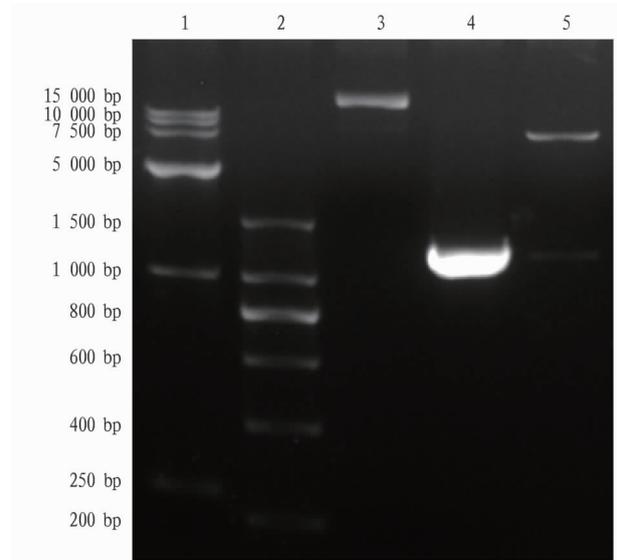
图2 蛋白三级结构预测

Fig.2 Prediction map of protein tertiary

由二、三级结构预测结果可知, 该蛋白有 5~6 个 α 螺旋, 推测其结构与 *P. putida* Gpo1 菌株的烷烃羟化酶 AlkB 结构类似, 几个 α 螺旋构成一个袋状结构域。当烷烃进入后, 其中 1 个 α 螺旋的疏水性侧链伸入袋中形成底物结合中心, 烷烃末端的甲基靠近“袋口”形成催化中心, 由此开始对烷烃的末端进行氧化。

2.3 烷烃羟化酶基因在大肠杆菌中诱导表达

2.3.1 PCR 扩增与构建重组质粒。以 TY22 菌株基因组 DNA 为模板, 利用引物 P1/P3 扩增得到一条大小相符的片段, 纯化回收后与 pET21b(+) 载体分别进行 *Nde* I、*Xho* I 双酶切, 并利用 T_4 DNA Ligase 16 $^{\circ}C$ 连接过夜, 最后转入 *E. coli* BL21(DE3) 筛选阳性重组菌, 结果见图 3。



注: 1. D15000 DNA Marker; 2. DNA Marker E; 3. 重组质粒 pET21b(+)-*alkB*; 4. P1/P3 引物 PCR 产物; 5. 双酶切的重组质粒 pET21b(+)-*alkB*

Note: 1. D15000 DNA Marker, 2. DNA Marker E, 3. Recombinant plasmid of pET21b(+)-*alkB*, 4. Product of PCR with primer of P1/P3, 5. Product of recombinant plasmid of pET21b(+)-*alkB* with dual-enzyme digestion

图3 重组质粒双酶切验证

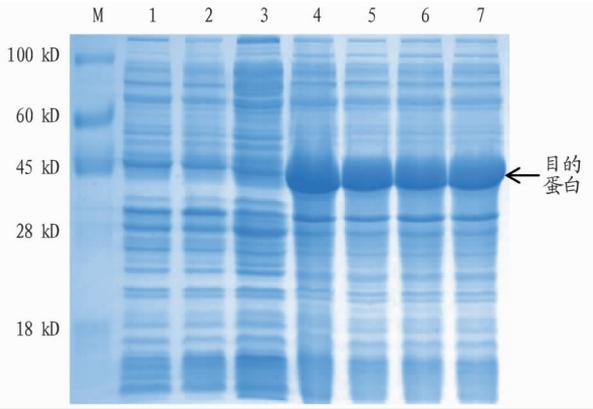
Fig.3 Identification of the recombinant plasmid by dual-enzyme digestion

2.3.2 重组菌诱导表达电泳。将重组菌在 LB 培养基中 37 $^{\circ}C$ 、180 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 分别加入 IPTG 至终浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L, 30 $^{\circ}C$ 、180 r/min 诱导 6 h, 然后用 8% 分离胶 SDS-PAGE 电泳检测, 结果见图 4。由图 4 可知, 重组菌在 0.1 mmol/L IPTG、30 $^{\circ}C$ 条件下诱导培养 6 h 的表达效果最佳, 所得的 46 kDa 蛋白与预期理论值相符。

2.4 烷烃羟化酶基因缺失与互补功能验证

2.4.1 PCR 扩增与构建重组质粒。以 TY22 菌株基因组 DNA 为模板, 利用引物 P1/P2 扩增得到 1 条大小相符的片段, 纯化回收后与 pCom8 载体分别进行 *Nde* I、*Sal* I 双酶切, 并利用 T_4 DNA Ligase 16 $^{\circ}C$ 连接过夜, 最后转入 *E. coli* GEC137(pGEC47 Δ B) 和 *Pseudomonas fluorescens* KOB2 Δ 1 中筛选阳性重组菌, 结果见图 5。

2.4.2 重组菌的功能互补试验。2001 年, 瑞士 van Beilen 教授等构建出了 *E. coli*-*Pseudomonas* 穿梭表达质粒 pCom8, 该质粒能在 *E. coli* 或 *Pseudomonas* 中复制和表达外源基因, 并可受烷烃及类似物的诱导, 能用于检测烷烃降解途径中重要的酶基因^[13]。

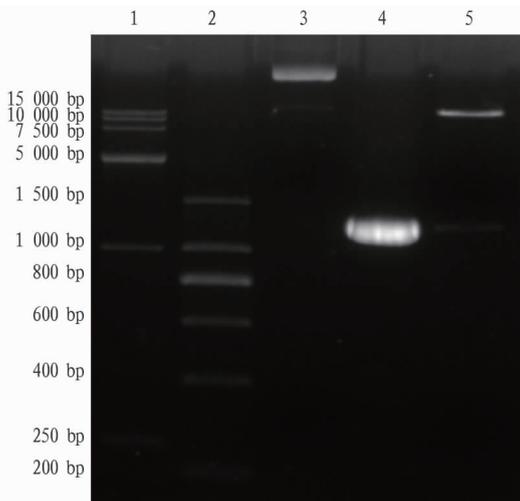


注: M. 蛋白质 Marker; 1. 非重组菌未诱导; 2. 非重组菌经诱导; 3. 重组菌未诱导; 4. 重组菌加入 0.1 mmol/L IPTG 诱导; 5. 重组菌加入 0.2 mmol/L IPTG 诱导; 6. 重组菌加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导; 7. 重组菌加入 1.0 mmol/L IPTG 诱导

Note: M. Protein Marker, 1. Non induced of *E. coli* BL21 with plasmid pET21b(+)-*alkB*, 2. Induced of *E. coli* BL21 with plasmid pET21b(+)-*alkB*, 3. Non induced of *E. coli* BL21 with plasmid pET21b(+)-*alkB*; 4. Induced with 0.1 mmol/L IPTG of *E. coli* BL21 with plasmid pET21b(+)-*alkB*, 5. Induced with 0.2 mmol/L IPTG of *E. coli* BL21 with plasmid pET21b(+)-*alkB*, 6. Induced with 0.5 mmol/L IPTG of *E. coli* BL21 with plasmid pET21b(+)-*alkB*, 7. Induced with 1.0 mmol/L IPTG of *E. coli* BL21 with plasmid pET21b(+)-*alkB*

图4 重组质粒在不同 IPTG 浓度表达的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of recombinant plasmid expressed at different IPTG concentration



注: 1. D15000 DNA Marker; 2. DNA Marker E; 3. 重组质粒 pCom8 - *alkB*; 4. P1P2 引物 PCR 产物; 5. 双酶切的重组质粒 pCom8 - *alkB*

Note: 1. D15000 DNA Marker, 2. DNA Marker E, 3. Recombinant plasmid of pCom8-*alkB*, 4. Product of PCR with primer of P1P2, 5. Product of recombinant plasmid of pCom8-*alkB* with dual-enzyme digestion

图5 重组质粒双酶切验证

Fig. 5 Identification of the recombinant plasmid by dual-enzyme digestion

E. coli GEc137 (pGEc47 Δ B) 菌株中含有 pGEc47 Δ B 质粒,其上带有 *P. putida* GPo1 菌株除烷烃羟化酶基因 *alkB* 以外的完整烷烃降解基因簇,因此该菌不能以 $C_6 \sim C_{12}$ 的正构烷烃作为唯一碳源生长。如果将合适的 *alkB* 基因构建到 pCom8 载体中组成重组质粒,并转入 *E. coli* GEc137 (pGEc47 Δ B) 中表达,便能使烷烃羟化酶基因的功能互补,从而其重组菌就可以 $C_6 \sim C_{12}$ 的正构烷烃作为唯一碳源生长。

P. fluorescens KOB2 Δ 1 是 *P. fluorescens* CHAO 的 *alkB1* 基因缺失菌株,因此它不能以 $C_{12} \sim C_{16}$ 的正构烷烃作为唯一碳源生长,如果将能氧化 $C_{12} \sim C_{16}$ 烷烃的烷烃羟化酶基因构建到 pCom8 载体中组成重组质粒,并转入 *P. fluorescens* KOB2 Δ 1 中表达,便能使 *alkB* 基因的功能互补,其重组菌就可以 $C_{12} \sim C_{16}$ 的正构烷烃作为唯一碳源生长。

将 TY22 菌株的烷烃羟化酶基因 *alkB* 构建到 pCom8 质粒中,得到重组质粒 pCom8 - *alkB*,将其分别转入上述 2 株 *alkB* 基因缺失宿主菌中,并置于含相应正构烷烃为唯一碳源的 E2 无机盐培养基中培养,观察其生长情况,结果见表 2。由表 2 可知, TY22 菌株的烷烃羟化酶能氧化 $C_{12} \sim C_{16}$ 的中长链烷烃。

表2 重组菌的互补生长情况

Table 2 Complement growth of recombinant strain

烷烃碳源 Carbon source	<i>E. coli</i> GEc137 (pGEc47 Δ B) 重组菌 Recombinant strain of <i>E. coli</i> GEc137 (pGEc47 Δ B)	<i>P. fluorescens</i> KOB2 Δ 1 重组菌 Recombinant strain of <i>P. fluorescens</i> KOB2 Δ 1
C_8	-	-
C_{10}	-	-
C_{12}	+	+
C_{14}	-	+
C_{16}	-	+

注: “+”表示生长;“-”表示未生长;“-”表示未进行此试验
Note: “+” growth; “-” no growth; “-” not experiment

3 结论

(1) 以 TY22 基因组 DNA 为模板,利用引物 *alkB*wf/*alkB*wr PCR 扩增得到 TY22 菌株的烷烃羟化酶基因的部分序列。再根据所得序列通过染色体步移技术,最终获得 TY22 菌株烷烃羟化酶基因 *alkB* 的完整 CDS 序列,该序列全长 1 236 bp, GenBank 登录号为 KU867870。经分析,该基因编码一段 411 aa 的蛋白质,其相对分子量为 46.7 kDa,等电点 9.22。预测其二级结构, α 螺旋占 37.47%, β 转角占 10.71%, 无规则卷曲占 35.28%, 延伸链占 16.55%。

(2) 选择 pET21b(+) 作为表达载体,将其与 TY22 菌株的烷烃羟化酶基因 *alkB* 构建得到 pET21b(+)-*alkB* 重组质粒,再将其转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行表达。结果发现,重组菌在 0.1 mmol/L IPTG, 30 $^{\circ}$ C 条件下诱导培养 6 h 的表达效果最佳,所得的 46 kDa 蛋白也与预期理论值相符。

(3) 将 TY22 菌株烷烃羟化酶基因 *alkB* 与 pCom8 质粒构建得到 pCom8 - *alkB* 重组质粒,再将重组质粒分别转入 *E. coli* GEc137 (pGEc47 Δ B) 和 *Pseudomonas fluorescens* KOB2 Δ 1 中进行基因的功能互补试验,结果发现, TY22 菌株

(下转第 153 页)

- [39] NISHIWAKI A, MIZUGUTI A, KUWABARA S, et al. Discovery of natural *Miscanthus* (Poaceae) triploid plants in sympatric populations of *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan [J]. *Amer J Bot*, 2011, 98(1): 154 – 159.
- [40] 范希峰, 侯新村, 朱毅, 等. 杂交狼尾草作为能源植物的产量和品质特性 [J]. *中国草地学报*, 2012, 34(1): 48 – 52.
- [41] 谭芙蓉, 吴波, 代立春, 等. 纤维素类草本能源植物的研究现状 [J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(1): 162 – 168.
- [42] 焦子伟, 张相锋, 尚天翠, 等. 国内外有机农业杂草控制技术进展 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 4(1): 1 – 7.
- [43] 朱笑坤, 鲁东飞, 柳明, 等. 杂草控制技术的发展和新型的转基因除草技术 [C] // 农药与环境安全国际会议论文集. 北京: 北京农药学会, 2005.
- [44] 强胜. 生物防治 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 144 – 156.
- [45] 邓欣, 万年峰, 朱亚芳, 等. 杂草生物防治现状与评估 [J]. *杂草科学*, 2006(1): 15 – 17.
- [46] 马晓渊. 加强杂草生物防治的研究和应用 [J]. *杂草科学*, 2007(3): 1 – 6.
- [47] 胡冀宁, 孙备, 李建东, 等. 植物竞争及在杂草科学中的应用 [J]. *作物杂志*, 2007(2): 12 – 15.
- [48] 徐正浩, 王一平, 余柳青, 等. 水稻移栽密度和早期水管理对无芒稗生态控制效果的影响 [J]. *生态学杂志*, 2004, 23(4): 41 – 43.
- [49] 王大力, 马瑞霞, 刘秀芬. 水稻化感抗草种质资源的初步研究 [J]. *中国农业科学*, 2000, 33(3): 94 – 96.
- [50] 薛立, 傅静丹. 影响植物竞争的因子 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2012, 32(2): 6 – 15.
- [51] 张玉娟, 唐士明, 邵新庆, 等. 植物化感作用在草地生态系统中的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(2): 958 – 961.
- [52] 王晓英. 刺柏叶水提液对高羊茅的化感作用及其 GC – MS [J]. *草地学报*, 2016, 24(2): 363 – 368.
- [53] 王建国, 李拥军, 郭佛杨, 等. 薇甘菊对农田常见杂草和水稻化感作用的研究 [J]. *河南农业科学*, 2013, 42(10): 88 – 90.
- [54] 郭怡卿, 陆永良. 水稻化感作用与杂草的生物防治 [J]. *中国生物防治学报*, 2015, 32(2): 157 – 165.
- [55] 李贵, 李永丰, 刘丽萍, 等. 化感作用在综合控制农田杂草中的应用前景 [C] // 中国第五届植物化感作用学术研讨会论文集. 天津: 中国植物保护学会, 2011.
- [56] 邵华, 彭少麟, 张驰, 等. 薇甘菊的化感作用研究 [J]. *生态学杂志*, 2003, 22(5): 62 – 65.
- [57] 王栋, 刘平平, 马春晖, 等. 蒙山莠菪化感作用对 4 种草坪草种子萌发的影响 [J]. *杂草科学*, 2011, 29(2): 19 – 22.
- [58] 高志梅, 李拥军, 谷文祥. 青蒿化感作用的初步研究 [J]. *华南农业大学学报*, 2007, 28(1): 122 – 124.
- [59] DILLDAY R H, LIN J, YAN W. Identification of allelopathy in the USDA – ARS rice germplasm collection [J]. *Australian J Exp Agric*, 1994, 34(7): 907 – 910.
- [60] 徐正浩, 余柳青. 不同株型水稻对无芒稗的生态控制研究 [J]. *中国水稻科学*, 2000, 14(3): 125 – 128.
- [61] 李贵, 吴竟仑, 王一专, 等. 不同水稻品种抑制杂草的差异性研究 [J]. *中国水稻科学*, 2008, 22(6): 669 – 672.
- [62] 徐正浩, 谢国雄, 周宇杰, 等. 不同株型和化感作用特性水稻对 3 种稻田主要杂草的干扰控制作用 [J]. *作物学报*, 2013, 39(7): 1293 – 1302.
- [63] 徐正浩, 陈再廖, 林云彪, 等. 浙江入侵生物及防治 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2011: 24 – 63.
- [64] 杨明进, 王琦, 李欣. 农田主要杂草识别与防除技术 [M]. 银川: 宁夏人民出版社, 2009: 50 – 61.
- [65] 李平, 孙小龙, 韩建国, 等. 能源植物新看点: 草类能源植物 [J]. *中国草地学报*, 2010, 32(5): 97 – 100.
- [66] 甘国福. 除草剂土壤残留污染对后茬作物的影响及控制对策 [C] // 中国植物保护学会 2005 年农作物药害预防及控制技术研讨会. 大连: 中国植物保护学会, 2005.
- [67] 孔垂华. 植物与其它有机体的化学作用: 潜在的有害生物控制途径 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(4): 712 – 720.
- [68] 彭学岗. 我国玉米田杂草化学防除现状及抗性防治策略 [J]. *湖北植保*, 2012(4): 62 – 64.
- [69] 王宏生. 利用化感物质防治杂草研究现状及应用前景 [C] // 中国第三届植物化感作用学术研讨会. 第八届全国杂草科学大会、联合国粮农组织—中国“水稻化感作用论坛”论文摘要集. 北京: 中国植物保护学会生物入侵分会, 2007: 33 – 36.
- [70] 程汉亭, 沈奕德, 黄乔乔, 等. 木薯对伴生杂草化感作用的初步研究 [J]. *杂草科学*, 2013, 31(2): 31 – 33, 38.
- [71] 刘迎, 王金信, 李浙江, 等. 植物化感作用在农田杂草防除中的应用 [J]. *杂草科学*, 2005(4): 6 – 9.

(上接第 134 页)

的烷烃羟化酶能氧化 $C_{12} \sim C_{16}$ 的中长链烷烃。

参考文献

- [1] 阙兴艳, 于君宝, 王雪宏, 等. 石油污染湿地土壤生物修复研究进展 [J]. *湿地科学*, 2012, 10(2): 250 – 256.
- [2] LIU C W, LIANG M S, CHEN Y C, et al. Biodegradation of n-alkanes at high concentration and correlation to the accumulation of H^+ ions in *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 [J]. *Biochemical engineering journal*, 2012, 63(8): 124 – 128.
- [3] 王小雨, 冯江, 王静. 莫莫格湿地油田开采区土壤石油烃污染及对土壤性质的影响 [J]. *环境科学*, 2009, 30(8): 2394 – 2401.
- [4] 朱杰, 阮志勇, 董卫卫, 等. 一株高效烷烃降解菌 *Acinetobacter* sp. LAM1007 的分离鉴定及降解特性 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(7): 1535 – 1546.
- [5] 李永霞, 郑西来, 马艳飞. 石油污染物在土壤中的环境行为研究进展 [J]. *安全与环境工程*, 2011, 18(4): 43 – 47.
- [6] WATANABE K, KODAMA Y, SYUTSUBO K, et al. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities [J]. *Applied & environmental microbiology*, 2000, 66(11): 4803 – 4809.
- [7] YONG N, CHI C Q, FANG H, et al. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments [J]. *Scientific reports*, 2014, 4(7500): 1 – 11.
- [8] JEON H J, KIM M N. Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation [J]. *International biodeterioration & biodegradation*, 2015, 103: 141 – 146.
- [9] 唐赞. 嗜热菌 NG80 – 2 的烷降解特性及其烷烃单加氧酶分子生物学研究 [D]. 天津: 南开大学, 2006.
- [10] 唐赞, 谭洪. 一株高效降解中长链烷烃菌株的分离鉴定及其降解特性研究 [J]. *生物过程*, 2013(3): 9 – 15.
- [11] 敬删, 唐赞. 一株降解中长链烷烃菌株 TWJ22 的解烷特性研究 [J]. *西华师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 38(2): 141 – 145.
- [12] WANG L P, WANG W P, LAI Q L, et al. Gene diversity of CYP153A and *alkB* alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean [J]. *Environmental microbiology*, 2010, 12(5): 1230 – 1242.
- [13] SMITS T H M, SEEGER M A, WITHOLT B, et al. New alkane-responsive expression vectors for *Escherichia coli* and *Pseudomonas* [J]. *Plasmid*, 2001, 46(1): 16 – 24.

科技论文写作规范——题名

以最恰当、最简明的词句反映论文、报告中的最重要的特定内容,题名应避免使用不常见的缩略语、首字母缩写词、字符、代号和公式等。一般字数不超过 20 字。英文与中文应相吻合。英文题名首字母大写,连词及冠词除外。