

摘要

利用气相色谱方法从 2000 余株细菌中, 确定丁香假单胞菌大豆致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) ICMP2189 是一株能够产生乙烯的细菌, 其最高产率为 $0.6\mu\text{l/ml/OD}_{600}/\text{h}$ 。根据已发表的乙烯形成酶基因(ethylene-forming enzyme gene, *efe*)序列 D13182 设计引物, 从这株菌中扩增出了乙烯形成酶基因, 测序后经序列比对发现与已公布的丁香假单胞菌芝麻致病变种 (*P. syringae* pv. *sesami*) 中的 AF101060 和 AB025277、麻致病变种 (pv. *canabina*) 中的 AF101059 及大豆致病变种(pv. *glycinea*)中的 AF101057 四条乙烯形成酶基因序列相似性为 100%。将乙烯形成酶基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中利用 T7 强启动子进行了过量表达, 表达蛋白可达总蛋白的 45%, 并且表达的乙烯形成酶可以赋予大肠杆菌 BL21 (DE3) 生产乙烯的能力, 其最高乙烯产率为 $0.99\mu\text{l/ml/OD}_{600}/\text{h}$ 。在丁香假单胞菌大豆致病变种 ICMP2189 中利用细菌本身的三磷酸甘油醛脱氢酶启动子带动乙烯形成酶基因表达, 但是并不能增加宿主菌的乙烯产率, 这说明乙烯形成酶可能不是 α -酮戊二酸型产乙烯途径中的控制乙烯产率的关键因素。在谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 中利用 tac 启动子、乙烯形成酶的启动子及棒杆菌本身的三磷酸甘油醛脱氢酶启动子、谷氨酸脱氢酶启动子来带动乙烯形成酶基因表达, 结果发现乙烯形成酶基因并不能赋予宿主菌产生乙烯的能力, 说明谷氨酸棒杆菌可能不适合用于构建高产乙烯的工程菌株。

关键词: 丁香假单胞菌大豆致病变种, 乙烯形成酶基因(*efe*), 乙烯, 表达

Abstract

Pseudomonas syringae pv. *glycinea* ICMP2189 was identified as an ethylene-forming strain from more than 2000 bacteria, with the ethylene productivity of 0.6 μ l/ml/OD₆₀₀/h. According to the published *efe* gene D13182 encoding the ethylene-forming enzyme (EFE), a pair of primers were designed to amplify the *efe* gene from *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189. The resulted PCR product was sequenced and its sequence was completely identical to those from *P. syringae* pv. *sesami* (AF101060 and AB025277), *P. syringae* pv. *canabina* (AF101059), and *P. syringae* pv. *glycinea* (AF101057). The *Escherichia coli* BL21(DE3) which carried the *efe* gene under the control of T7 promoter could efficiently express the recombinant protein accounted for 45 percent of total cellular protein, and produced ethylene with a productivity of 0.99 μ l/ml/OD₆₀₀/h. *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189, which carries the extra *efe* gene under the control of the promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189, could not improve the ethylene productivity, suggesting that the EFE may not be the key factor for controlling ethylene productivity in KGA biosynthetic pathway of ethylene. In another strain *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, the *efe* which was controlled respectively under the promoters of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and glutamate dehydrogenase gene from *C. glutamicum* ATCC13032, *efe* from *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189, and *tac* promoter could not endow the host with ethylene-forming activity. The result indicates that *C. glutamicum* ATCC13032 may not be an appropriate host for expressing *efe* gene.

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, ethylene-forming enzyme gene(*efe*), ethylene, expression

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的科研成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：



时间：

2007年6月18日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解中国农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：



时间：

2007年6月18日

导师签名：



时间：

2007年6月18日

第一章 生物乙烯研究进展

乙烯是现代石油化学工业的基础原料。通过乙烯的聚合、氧化、卤化、烷基化、水合、羰基化、齐聚等反应,可以获得多种极其重要的化工原材料,其下游衍生物或制品对整个国民经济的发展起着重要作用(黄立道, 2005)。因此,世界各国都在极力促进乙烯工业的建设和发展。目前,我国乙烯消费量为 1500 万吨,国内乙烯产量仅为 600 万吨,其余 900 万吨完全依赖于进口,自给率仅为 43%。随着我国经济的持续快速发展,我国对乙烯的需求持续增加,预计到 2010 年乙烯需求当量将达 2000 万吨以上,60%以上需要进口(邹劲松, 2004; 房广信, 李立新, 2003)。由于乙烯是从石油中提炼和加工的,随着石油资源的日益枯竭,进行生物乙烯—替代石油产品的研究将具有重要的战略意义。

1 乙烯的理化性质及用途

乙烯的分子式为 C_2H_4 , 相对分子量为 28.05, 其凝固点、熔点及沸点分别为 $-181^{\circ}C$, $-169.5^{\circ}C$, $-103.7^{\circ}C$, 其密度与空气密度比值为 0.978, 比空气稍轻。常温常压下为无色气体, 稍有香甜味, 难溶于水(Certifiers and Use, 1999)。乙烯作为石油化学工业的基础原料, 通过不同的化学反应, 可以获得多种极其重要的化工原材料(黄立道, 2005)。另外, 乙烯还是一种重要的植物激素, 对于植物的生长发育具有调控作用, 主要包括解除休眠, 幼芽和根的生长及分化, 不定根的形成, 叶和果实的脱落, 一些植物的催花作用, 雌雄异体花的雌性诱导作用, 花器官的发育, 花和叶的老化, 果实的成熟等几个方面(Pratt and Goeschl, 1969; Osborne, 1978; Liberman, 1979; Sembdner *et al.*, 1980; Yang, and Hoffman, 1984; Beyer *et al.*, 1984)。

2 乙烯的生物合成途径

2.1 1-氨基环丙烷羧酸(ACC)途径

1-氨基环丙烷羧酸(ACC)途径主要存在于植物中, 几乎所有植物的器官如根, 茎, 叶, 花, 种子等都可以产生乙烯, 但是各器官的产量差别很大, 并且在不同的生长发育阶段也会有不同的产量表现(Matto and Suttle, 1991; Reid, 1995)。具体 ACC 途径见图 1.1(Gasper *et al.*, 1996)。其过程可简化为 $MET \rightarrow SAM \rightarrow ACC \rightarrow ETHYLENE$ 。第一步是甲硫氨酸(MET)经过甲硫氨酸腺苷转移酶催化作用, 将 ATP 上的腺苷转移到 MET 上, 形成 S-腺苷甲硫氨酸(SAM), 此步又称 MET 的活化(Burg, 1973; Murr and Yang, 1975; Yu and Yang, 1979)。第二步是形成的 SAM 在 ACC 合酶的作用下形成 ACC。有研究表明 ACC 合酶的 mRNA 水平与乙烯产量水平呈正相关, 是乙烯途径中的限速酶(Adams and Yang, 1979; Yang *et al.*, 1980)。第三步, 是由 ACC 产生乙烯(ETHYLENE), 此步由 ACC 氧化酶催化, 这种酶过去又称为乙烯形成酶

(EFE), 需 Fe^{2+} 参与, CO_2 激活 (Peiser *et al.*, 1984; Brunbuber *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 1992)。ACC 氧化酶不像 ACC 合酶那样受到严密的调控, 在植物中表达是呈组成型的 (Sembdner *et al.*, 1980)。

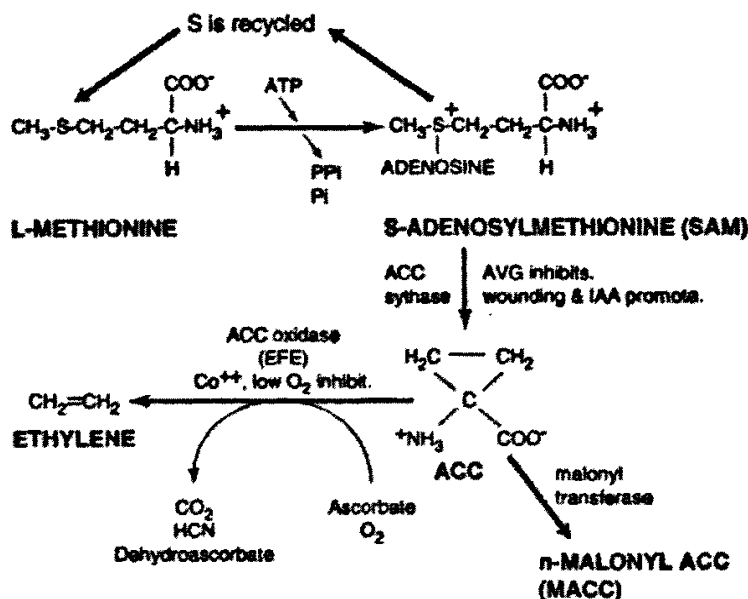


图 1.1 乙烯的 ACC 合成途径 (Sembdner *et al.*, 1980)

Fig. 1.1 ACC biosynthetic pathway of ethylene

2.2 2-酮-4-甲硫基丁酸 (KMBA) 途径

2-酮-4-甲硫基丁酸 (KMBA) 途径虽然也是 MET 依赖型, 但是其合成途径不同于植物的 ACC 途径, 并且现在发现这条途径只存在于微生物中。KMBA 途径的研究主要集中在 20 世纪的 70 - 90 年代, 主要研究的微生物有 *Escherichia coli*, *Cryptococcus albidus*, *Septoria musiva* (Primrose, 1976a, b, 1977; Billington *et al.*, 1979; Ince and Knowles, 1985, 1986; Fukuda *et al.*, 1989a, b, c)。一般认为微生物中 MET 依赖型的产乙烯途径都遵循相同的模式即 KMBA 途径, 其过程可简单表示为: MET → KMBA → ETHYLENE, MET 经过一个中间产物 KMBA 即可转化为乙烯。具体的 KMBA 途径见图 1.2 (Fukuda *et al.*, 1993):

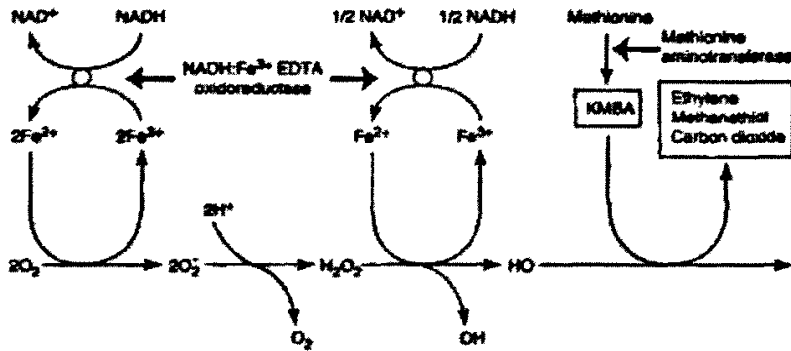


图 1.2 乙烯的 KMBA 合成途径(Fukuda *et al.*, 1993)

Fig. 1.2 KMBA biosynthetic pathway of ethylene

Primrose (1976a, b; 1977) 利用 *E. coli* 作为研究材料, 发现 KMBA 途径反应体系中必须存在 KMBA, Fe^{3+} -EDTA, NADH, O_2 , 这个发现后来在其它菌体中也得到了确认 (Ince and Knowles, 1985, 1986)。在上图中, 反应可分为两部分, 第一部分, 首先 2mol Fe^{3+} -EDTA 和 1mol NADH 在 NADH- Fe^{3+} 氧化还原酶的作用下, 生成 2mol 的 Fe^{2+} -EDTA 和 1mol 的 NAD^+ , 2mol Fe^{2+} -EDTA 经 2mol O_2 的还原, 产生一分子的超氧自由基 $[\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^-]$ 。 O_2^- 经过一步歧化反应, 形成过氧化氢 $[2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2]$ 。过氧化氢随后与 Fe^{2+} 经过 Fenton 反应产生氢氧根离子 $[\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-]$ 。第二部分, MET 在甲硫氨酸氨基转移酶的作用下, 生成 KMBA, 这步反应在生物体中是普遍存在的。KMBA 与第一部分生成的 OH^- 作用生成乙烯、甲硫醇和二氧化碳(Fukuda *et al.*, 1989c, 1993; Ogawa *et al.*, 1990;), 这步反应的酶系尚不清楚, 在大肠杆菌中, 研究者认为可能是过氧化物酶和/或葡萄糖脱氢酶参与, 而且观察到有核黄素存在时的光照刺激也可以使这步进行(Primrose, 1976a, 1977), 后来又有研究认为参与的酶可能是一种转氨酶, 而不是过氧化物酶/葡萄糖脱氢酶(Ogawa *et al.*, 1990)。在对 *Septoria musiva* 的研究中, 参与此步反应的酶也没有得到确认, 但是研究者却发现二甲基二硫化物和蚁酸伴随乙烯产生 (Brown-Skrobot *et al.*, 1985)。

2.3 α -酮戊二酸 (KGA) 途径

这条途径目前认识的较为充分, 认识这条途径的难点是乙烯直接前体的确定。这项研究主要是在 *Penicillium digitatum* 和 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 两种菌中进行的。在最初的研究中人们发现 ^{14}C 标记的葡萄糖、甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、精氨酸等都可以转化为乙烯, 并且猜想葡萄糖转化为乙烯需要经过糖酵解和三羧酸循环 (Wang *et al.*, 1962)。后来, 其他研究者利用 ^{14}C 标记的柠檬酸, 乙酸, 丙酮酸进一步确定了乙烯的形成需要三羧酸循环的参与(Gibson, 1964; Gibson and Young, 1966; Ketring *et al.*, 1968)。通过三羧酸循环中的多种相关物质作为底物如琥珀酸, 柠檬酸, 苹果酸等, 发现 α -酮戊二酸(KGA)是乙烯生产最高效的底物, 也因此认为 KGA 就是三羧酸循环与乙烯途径的节点(Chou and Yang, 1973)。Fukuda 等(1986;1988;1989a,b)利用体外系统成功的确定了乙烯合成途径的前体物质就是 KGA 及一些其它的必须成分, 之后他们提纯了乙烯形成酶, 对其酶学性质进行了研究。他们所提出的途径

见图 1.3(Fukuda *et al.*,1993)。

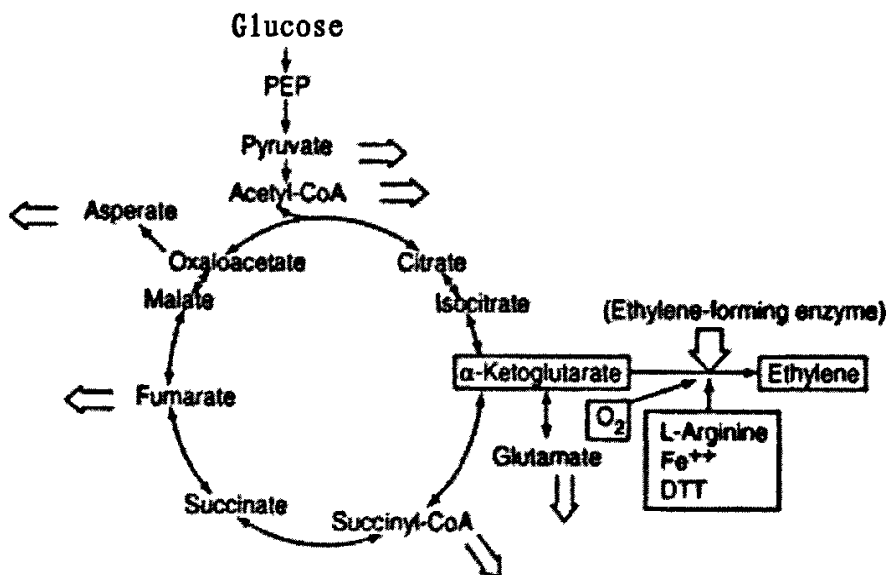


图 1.3 乙烯的 KGA 合成途径(Fukuda *et al.*,1993)

Fig. 1.3 KGA biosynthetic pathway of ethylene

图中显示 KGA 在 L-Arg, Fe²⁺, DTT 及氧气的参与下, 经过一步乙烯形成酶的催化反应, 就可以生成乙烯。在对 *Penicillium digitatum* 乙烯合成途径研究的基础上, 研究者又对 *P. syringae* 的乙烯合成途径进行了研究, 他们发现二者的乙烯形成途径实际上是一样的 (Goto *et al.*, 1985; Goto and Hyodo, 1987; Nagahama *et al.*, 1991a)。由于后者的乙烯产率是前者的几倍, 所以以后的 KGA 途径研究主要以 *P. syringae* 为研究对象, 对具体的乙烯合成机理进行了深入的研究。

2.4 其它途径

现在人们还发现一些低等植物也能够产生乙烯, 比如浮萍植物, 苔藓植物, 厥类, 问荆等 (Osborne, 1989; Thomas *et al.*, 1983)。但是现在已有的研究结果都表明这些植物合成乙烯的途径是不同于高等植物所普遍遵循的 ACC 途径, 但是关于低等植物中乙烯合成途径的研究比较少, 所以现在也不能确定是否遵循微生物中的 KMBA 途径或是 KGA 途径 (Tittle, 1987; Walters and Osborne, 1979; Osborne, 1982, 1991; Osborne *et al.*, 1996)。

另外, 还有报道称从下水道污泥中分离出一株细菌 *Dehalococcoids ethenogenes* 195, 对这种细菌的 16S rDNA 分析发现与已发现的菌种同源关系很远。它的独特能力是可以把下水道中的有害污染物四氯乙烯转化为乙烯。这种菌可能被用来做为有害污染物的降解菌用于环境修复 (Maymo-Gatell *et al.*, 1997; He *et al.*, 2003)。

在土壤表面的空气中会有一定浓度的乙烯气体存在，这对植物的生长发育有重要的生态学作用(Smith and Russell, 1969; Smith, 1976; Primrose, 1979; Arshad and Frankenberger, 1988,1990a,1992; Muromtsev *et al.*, 1993; Bibik *et al.*,1995;Ahmad and Arshad, 1998)。这些乙烯的来源已经被证明是来自土壤中的生物和非生物两个方面。但主要是来自生物作用 (Arshad and Frankenberger, 2002)。土壤中的细菌，真菌及藻类都可以产生乙烯，具体哪一类群起主要作用现在还有争议。有研究表明从土壤中分离的细菌产生乙烯是在厌氧条件下产生的(Smith and Cook,1974; Smith and Restall, 1971, Cook and Smith,1977)，但是也有其它研究表明从土壤中分离的细菌只能在有氧的条件下才能够产生乙烯 (Primrose, 1976; Pazout *et al.*, 1981)。通过向土壤中加入抗细菌物质或是抗真菌物质，人们确定细菌和真菌都可以是乙烯的生产者(Sutherland and Cook, 1980; Frankenberger and Phelan 1985; Arshad and Frankenberger, 1990a)。有些研究表明土壤可以转化 MET, KMBA 或是 ACC 为乙烯，但是具体的合成途径不清楚(Arshad and Frankenberger, 1990b; Arshad and Frankenberger, 1989; Frankenberger and Phelan, 1985)。此外土壤中存在的低等植物（绿藻类）如 *Regnellidium diphllum*, *Masilea quadrifolia* 等也是可以产生乙烯的 (Cherneys and Kende,1996; Osborne *et al.*,1996)。所以，土壤乙烯的产生很可能是微生物区系中各类群共同作用的结果，其合成途径应该包括现在已经认识的途径，其它未知的途径也应该存在。具体是哪类微生物是产乙烯的主体，这主要取决于土壤类型及外界环境 (Arshad and Frankenberger, 2002)。

3 产生乙烯的微生物

乙烯在自然界中一个最主要的作用就是做为一种植物激素调控着植物的生长发育(Davies, 1995)。人们之所以能够认识到某些微生物能够产生乙烯，主要是基于想要认识这些微生物是否通过乙烯的激素作用来对植物产生影响这个角度出发的。因此现在所有发现的能够产生乙烯的微生物都是与植物有关的。如产乙烯的 *Penicillium digitatum* 是从发了霉的柑橘上分离得到的 (Biale, 1940; Miller *et al.*, 1940)，*Pseudomonas phaseolicola* PK2 是葛藤的一种病原菌 (Goto *et al.*, 1985)，*Agrobacterium* 是一种植物的内源细菌 (Ezura *et al.*,2000; Kępczyński *et al.*,2003)。土壤中微生物对植物的生长发育起调控作用一重要个方面是其产生乙烯来介导的 (Ahmad and Arshad, 1998)。现在发现的可以产生乙烯的微生物见表 1.1 (Arshad and Frankenberger, 2002)。

表 1.1 产乙烯的微生物 (Arshad and Frankenberger, 2002)
Table 1.1 Ethylene-evolving microorganisms

Species	Reference
A. Bacateria	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Billington <i>et al.</i> (1979)
<i>Aeromonas spp.</i>	Billington <i>et al.</i> (1979)
<i>Agrobacterium rizhogenes</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)
<i>A. tumefaciens</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)

<i>Arthrobacter</i> spp.	Primrose(1976b)
<i>Azospirillum</i> spp.	Strzelezyk <i>et al.</i> (1994a)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a)
<i>B. subtilis</i>	Mansouri and Bunch(1989)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Mansouri and Bunch(1989)
<i>Citrobacter</i> spp.	Primrose(1976b)
<i>Clostridium butyricum</i>	Pazout <i>et al.</i> (1981)
<i>Corynebacterium</i> spp.	Billington <i>et al.</i> (1979)
<i>C. aquaticum</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1984, 1989a)
<i>C. paurometabolum</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a)
<i>Coryneform bacteria</i>	Billington <i>et al.</i> (1979)
<i>Enterbacter aerogenes</i>	Manasouri and Bunch(1989)
<i>E. cloacae</i>	Primrose(1979)
<i>Erwina amylovora</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)
<i>E. carotovora</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)
<i>E. herbicola</i>	Primrose(1976b)
<i>Esherichia coli</i>	Primrose(1976b); Swanson <i>et al.</i> (1979); Shipston and Bunch(1989); Mansouri and Bunch(1989)
<i>Klebsiella ozaenae</i>	Primrose(1976b)
<i>K. pneumoniae oxytoca</i>	Primrose(1976b)
<i>K. pneumoniae</i>	Primrose(1976b)
<i>Micrococcus luteus</i>	Mansouri and Bunch(1989)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Primrose(1976b)
<i>P. aeruginosa</i>	Mansouri and Bunch(1989)
<i>P. fluorescens</i> var. <i>reptillivoria</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)
<i>P. syringae</i>	Sato <i>et al.</i> (1997); Swanson <i>et al.</i> (1979)
<i>P. syringae</i> pv. <i>canabina</i>	Sato <i>et al.</i> (1997)
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	Sato <i>et al.</i> (1987)
<i>P. indigofera</i>	Primrose(1976b)
<i>P. marginata</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)
<i>P. syringae</i> pv. <i>morii</i>	Sato <i>et al.</i> (1987)
<i>P. syringae</i> pv. <i>sesami</i>	Sato <i>et al.</i> (1997)
<i>P. pisi</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979); Billington <i>et al.</i> (1979)
<i>P. polycolor</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)
<i>P. putida</i>	Pazout <i>et al.</i> (1981);Fukuda <i>et al.</i> (1989a); Sato <i>et al.</i> (1987)
<i>P. solanacearum</i>	Bonn <i>et al.</i> (1975);Swanson <i>et al.</i> (1979); Freebairn and Beddenhagen(1964); Sato <i>et al.</i> (1987)
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Goto <i>et al.</i> (1985);Goto and Hyodo(1987); Nagahama <i>et al.</i> (1991a,b)
<i>P. tabaci</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)

<i>Rhizobium trifolii</i>	Billington <i>et al.</i> (1979)
<i>Serratia liquefaciens</i>	Primrose(1976b)
<i>S. marcescens</i>	Mansouri and Bunch(1989)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mansouri and Bunch(1989)
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Nagahama <i>et al.</i> (1992)
<i>Xanthomonas campestris</i>	Mansouri and Bunch(1989)
<i>X. citri</i>	Goto <i>et al.</i> (1979)
<i>X. phaseoli</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)
<i>X. phaseoli</i> var. <i>sojense</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)
<i>X. vesicatoria</i>	Swanson <i>et al.</i> (1979)
B. ACTINOMYCETES	
<i>Streptomyces</i> spp.	Dasilva <i>et al.</i> (1974); Ilag and Curtis(1968)
C. FUNGI	
<i>Acrasis rosea</i>	Amagi and Maeda(1992)
<i>Agaricus bisporus</i>	Lochard and Kneebone(1962); Wood and Hammond(1977); Ward <i>et al.</i> (1978); Babiker and Pepper(1984)
<i>A. candidus</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Nickerson(1948)
<i>Votrytis spectabilis</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Cacarisporium parasiticum</i>	Hanke and Dollwet(1976)
<i>Canadida variouaari</i>	Arshad and Frankenberger(1989); Babiker and Pepper(1984)
<i>Cenococcum geophilum</i>	Graham and Linerman(1980)
<i>Cephalosporium gramineum</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Chalutz and DeVay(1969); Fukuda and Ogawa(1991)
<i>C. chlamaloides</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Colletotrichum musae</i>	Peacock and Muirhead(1974)
<i>Coriolus hirsutus</i>	Tanake <i>et al.</i> (1986)
<i>Coriolus versicolor</i>	Tanake <i>et al.</i> (1986)
<i>Cryptococcus albidus</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a)
<i>C. laurentii</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a); Fukuda(1984)
<i>C. lunata</i>	El-Sharouny(1984)
<i>C. damatium</i> var. <i>truncatum</i>	Tzeng and DeVay(1984)
<i>Cylindrocarpon</i> spp.	El-Sharouny(1984)
<i>Cylindrocladium floridanum</i>	Acelrood-McCarthy and Linderman(1981)
<i>C. scoparium</i>	Acelrood-McCarthy and Linderman(1981)
<i>Cytospora eucalypticola</i>	Wilkes <i>et al.</i> (1989)
<i>Daedalea dickinsii</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a)
<i>Dematium pulludans</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Dictyoxylum deiscoideum</i>	Bonner(1973); Amagai and Maeda (1992)

<i>D. mucoroides</i>	Amagai and Maeda(1992);Amagai(1984)
<i>D. purpureum</i>	Amagai and Maeda(1992)
<i>Endothia gyrosa</i>	Wilkes <i>et al.</i> (1989)
<i>Fistulina hepatica</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Flammulina velutipes</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Fomitopsis pimicola</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Fusarium spp.</i>	Babiker and Pepper(1984)
<i>F. avenaceum</i>	Swart and Kamerbeek(1976)
<i>F. campioceras</i>	Swart and Kamerbeek(1976)
<i>F. culmorum</i> var. <i>cereale</i>	Swart and Kamerbeek(1976)
<i>F. equiseti</i>	El-Sharouny(1984)
<i>F. merismoides</i> var. <i>crassum</i>	Swart and Kamerbeek(1976)
<i>F. moniliforme</i>	El-Sharouny(1984); Swart and Kamerbeek(1976)
<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i>	El-Sharouny(1984); Swart and Kamerbeek(1976)
<i>F. oxysporum</i> f. <i>narcissi</i>	Dimond and Waggoner(1953); Swart and Kamerbeek(1976)
<i>F. oxysporum</i> f. <i>tulipae</i>	Swart and Kamerbeek(1976,1977); Hottiger and Boller(1991)
<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. vasinfecium</i>	Tzeng and Devay(1984)
<i>F. poae</i>	Swart and Kamerbeek(1976,1977)
<i>F. redolens dianthi</i>	Swart and Kamerbeek(1976,1977)
<i>F. solani</i>	El-Sharouny(1984)
<i>F. solani minus</i>	Swart and Kamerbeek(1976,1977)
<i>F. sporotrichioides</i>	Swart and Kamerbeek(1976,1977)
<i>Gloeoptylum trabeum</i>	Chandhoke <i>et al.</i> (1992)
<i>Geophillum saeplarum</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Graphium sp.</i>	Hanke and Dollwet(1976)
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	Graham and Linderman(1980)
<i>Hirshiopirus abietinus</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Nickerson(1948)
<i>Humicola grisea</i>	El-Sharouny(1984)
<i>Hymenochaete tabacina</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Macrophomina phaseoli</i>	El-Sharouny(1984)
<i>Monilia geophila</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a)
<i>Mortierella spp.</i>	Babiker and Pepper(1984)
<i>Mucor spp.</i>	Dasilva <i>et al.</i> (1974)
<i>M. genevensis</i>	Hanke and Dollwet(1976)
<i>M. hiemalis</i>	Lynch(1972);Arshad and Frankenberger(1989); Babiker and Pepper(1984)
<i>M. silvaticus</i>	Linderberg <i>et al.</i> (1979)

<i>Mycelium radialis atrovirens</i>	Strzelezyk <i>et al.</i> (1989)
<i>Mycoplasma dimorpha</i>	Fukuda(1984)
<i>Mycotypha microspora</i>	Hanke and Dollwet(1976)
<i>Myrothecium roridum</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Nectria flammea</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a);Fukuda(1984)
<i>Neurospora crassa</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Psecilomyces elagans</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a)
<i>Penicillium spp.</i>	Babiker and Pepper(1984); Considine and Patching(1975)
<i>P. corytophilum</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>P. crustosum</i>	Considine <i>et al.</i> (1977); El-Sharouny(1984)
<i>P. digitatum</i>	Biale(1940);Fukuda <i>et al.</i> (1984);and others
<i>P. expansum</i>	Kapulnik <i>et al.</i> (1983)
<i>P. italicum</i>	Kapulnik <i>et al.</i> (1983)
<i>P. luteum</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>P. notatum</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>P. patulum</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>P. steckii</i>	El-Sharouny(1984)
<i>P. urticae</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a);Fukuda(1984)
<i>Psetilotium sp.</i>	Hanke and Dollwet(1976)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Phaeolus schweiniizii</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Phoma herbarum</i>	El-Sharouny(1984)
<i>Photiata adiposa</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Phycomyces balkeleeensis</i>	Russo <i>et al.</i> (1977)
<i>Phycoporus coccineus</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>P. nitens</i>	Fukuda and Ogawa(1991)
<i>Phymatotrichum omnivorum</i>	Hill and Lyda(1976)
<i>Picea abies</i>	Blaschke(1997)
<i>Polysphondylium pellidum</i>	Amagai and Maeda(1992)
<i>P. violaceum</i>	Amagai and Maeda(1992)
<i>Pythium butleri</i>	El-Sharouny(1984)
<i>P. ultimum</i>	El-Sharouny(1984)
<i>Rhizocionia solani</i>	El-Sharouny(1984)
<i>Rhizopus spp.</i>	Babiker and Pepper(1984)
<i>R. japonicus</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a)
<i>R. nigricans</i>	Babiker and Pepper(1984)
<i>R. stolonifer</i>	El-Sharouny(1984)
<i>Rhodotorula spp.</i>	Babiker and Pepper(1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Thomad and Spencer(1977)
<i>Schizopyllum commune</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	Fukuda <i>et al.</i> (1989a);Fukuda(1984)
<i>Sclerotium spp.</i>	El-Sharouny(1984)

<i>Sclerotinia laxa</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Ilag and Curtis(1968); Babiker and Pepper(1984)
<i>S. candia</i>	El-Sharouny(1984)
<i>Septoria musiva</i>	Brown-Skrobot <i>et al.</i> (1985)
<i>Sordaria spp.</i>	Hanke and Dollwet(1976)
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Fukuda(1984)
<i>Thamnidium spp.</i>	Hanke and Dollwet(1976)
<i>T. elegans</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Thiedavia alata</i>	Ilag and Curtis(1968)
<i>Trichoderma spp.</i>	Babiker and Pepper(1984)
<i>T. viride</i>	Strzelezyk <i>et al.</i> (1989)
<i>Tulasnella calospora</i>	Hanke and Dollwet(1976)
<i>Tyromyces palustris</i>	Tanaka <i>et al.</i> (1986)
<i>Ulocladium atrum</i>	El-Sharouny(1984)
<i>Verticillium spp.</i>	El-Sharouny(1984)
D. ALGAE	
<i>Acetabularia mediterranea</i>	Kevers <i>et al.</i> (1989)
<i>Chorella</i>	Kreslavskii (1988)
<i>Codium latum</i>	Watanabe and Kondo(1976)
<i>Padina arborescens</i>	Watanabe and Kondo(1976)
<i>Porphra tenera</i>	Watanabe and Kondo(1976)

在微生物中目前发现有条乙烯合成途径，一条是 MET 依赖型的，这点虽然与高等植物中的 ACC 途径相同（也是 MET 依赖型），但是这条途径产生乙烯的直接前体是 KMBA，而不是 ACC，是所谓的 KMBA 途径。另一条是 KGA 途径，它较为简单，它是把三羧酸循环中的 KGA 通过一个单体酶 EFE 作用就可以直接产生乙烯，这条途径目前发现只存在于丁香假单胞菌的几个变种和一些真菌中。而且这条途径产生乙烯的速率是 KMBA 途径的 500-1000 倍(Goto *et al.*, 1985)，是三条途径中最为高效的一条途径。而丁香假单胞菌的乙烯产率又是真菌产率的几倍 (10^{-7} nl/cell/hr)，因此可产生乙烯的丁香假单胞菌也就自然地成为了人们以开发生物乙烯为目的的主要研究对象。

4 乙烯形成酶的酶学性质及催化机理

4.1 乙烯形成酶的酶学性质研究

这里所讲的乙烯形成酶主要是指 KGA 途径的乙烯形成酶，这是三种途径中研究得较为透彻的一种酶，并且具有高效的乙烯产率。做为研究对象的乙烯形成酶主要来自真菌 *Penicillium digitum* IFO9372 和 *P. syringae* pv. *phesaolicola* PK2 两株菌。两种酶的酶性质比较见表 1.2 (Fukuda *et al.*, 1993)：

表 1.2 来自丁香假单胞菌和指状青霉的两种乙烯形成酶的性质比较 (Fukuda *et al.*, 1993)

Table 1.2 Comparison of some properties of ethylene-forming enzymes
from *Pseudomonas syringae* and *Penicillium digitatum*

Property	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Penicillium digitatum</i>
Molecular mass(KDa)		
Gel filtration	36	42
SDS-PAGE	42	42
pI	5.9	5.9
pH		
Optimum	7.0 - 7.5	7.0 - 7.5
Stability at 5°C	6.0 - 8.0	6.0 - 8.0
Temperature(°C)		
Optimum	20-25	25
Stability	<30	<30
Km Value(M)		
Fe(II)	5.9×10^{-5}	4.0×10^{-5}
L-Arginine	1.8×10^{-5}	6.0×10^{-5}
KGA	1.9×10^{-5}	3.8×10^{-5}
N-Terminal sequence	MTNLQTFELP-	LAPPAPSNLG-

从上表中我们可以看出两种酶的酶学性质大体上相同的，它们都具有相同的等电点 (pI=5.9)，相同的最适 pH 值 (7.0-7.5)，相似的酶活最适温度，都必须有 Fe^{2+} ，L-Arg，KGA 存在才能显示活性，但是亲和性有较大差异。蛋白测序显示二者的 N-段的氨基酸序列是不同的，目前 *P. syringae* 中的乙烯形成酶的基因已经得到克隆，但是 *Penicillium* 中的乙烯形成酶基因至今没有看到报道。

4.2 乙烯形成酶的催化机理研究

Fukuda 等 (1986) 从 *P. digitatum* 中纯化了乙烯形成酶，并且成功的建立了体外反应系统。他们也因此确定了乙烯的直接前体是 KGA。这个无细胞反应体系 KGA，L-Arg， Fe^{2+} ，DTT，其最适浓度分别为 1mM，0.5mM，0.75mM 和 1mM。标记试验表明 L-Arg 不能转化为乙烯 (Fukuda *et al.*, 1986)。在另外一个研究中，Fukuda 等 (1989b) 第一次从 *P. digitatum* 中纯化得到了电泳纯级的乙烯形成酶，证明了乙烯形成酶是一个单体酶，相对分子量为 42KDa。Goto 和 Hyodo (1987) 建立了一个 *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Kudzu strain) 的无细胞乙烯形成体系。乙烯的最有效产生条件为 0.5mM KGA，0.5mM FeSO_4 ，5mM DTT 和 10mM Histidine。最适的酶活温度为 25°C。Nagahama 等 (1991a) 通过 *Pss* pv. *phaseolicola* (Kudzu strain) 的细胞提取物也建立了一个体外乙烯形成系统。这个系统 (有氧条件下) 的组成为 0.25mM KGA，0.2mM FeSO_4 ，2mM DTT 10mM L-Histidine, 0.2mM L-Arg。这个系统除了 L-histidine 对它促进作用之外，其它成分都是与 *P. digitatum* 一样的。对于酶催化反应机理的研究，其主要研究方法是观察一些常见的酶抑制剂或是激活剂对酶活性的影响，然后根据结果预测其可能的机制，对与 EFE 的这类研究见表 1.3 (Arshad and Frankenberger, 2002)。

表 1.3 一些物质对来自于指状青霉 IFO9372 和

丁香假单胞菌大豆致病变种 PK2 的乙烯形成酶的影响 (Arshad and Frankenberger, 2002)

Table 1.3 Effect of various reagents on the ethylene-forming enzyme of *P. digitatum* IFO9372 and *P. syringae* pv. *phaseolicola* PK2

Reagent	Relative ethylene-forming activity(%)	
	<i>P. digitatum</i> *	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> **
Control	100	100
Respiratory inhibitors		
KCN*	22	nt
NaN ₃	62	90
Free radical reagents		
Superoxide dismutase	121	120
Mannitol	74	90
Sodium benzoate	92	100
n-Propylgallate	0	1
1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octane(DABCO)	17	nt
Hydroquinone	18	60
Uric acid	nt	90
Transition metals and SH reagents		
CoCl ₂	3	20
CuSO ₄ ·5H ₂ O	15	50
MnCl ₂ ·4H ₂ O	11	6
5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoate)(DTNB)	10	0.7
Chelating reagents		
EDTA(Na)	0	1
Tiron	0	0.8
Others		
Catalase	145	200
H ₂ O ₂	1	0.7
Ascorbate	128	130

All concentrations were 1mM, except for superoxide dismutase(150U ml⁻¹ reaction mixture), DABCO(10mM), hydroquinone(10mM), catalase(0.05mg ml⁻¹ reaction mixture) and H₂O₂(0.03%).

*Source: Fukuda *et al.* (1989b). **Source: Nagahama *et al.*(1991b).

从表中我们可以看出酶的活性被螯合剂 EDTA 和 Triton 强烈抑制, 这说明催化反应应该是有 Fe²⁺ 参与的。二价金属离子如 Co²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ 的抑制作用可能是由于它们与 Fe²⁺ 竞争靶位的原因。5,5'-二硫-2-硝基苯甲酸(DNTB)的抑制作用则说明了在酶的活性中心应该有巯基的参与。超氧化物歧化酶, 过氧化氢酶对酶活没有抑制作用, 说明超氧化物和过氧化氢不参与反

应。但是过氧化氢酶的激活作用这说明在反应时有过氧化氢的生成。甘露醇, 苯甲酸钠对反应几乎没有什么作用, 说明羟基自由基(OH·)可能不参与反应。这些结果表明 Fe^{2+} 很可能是与酶上的一个 SH 结合的。一些自由基清除剂(如没食子酸丙酯, 氢醌酯)的抑制作用可能就是因为像 EDTA 那样, 与 Fe^{2+} 离子形成了复合体。

在最适条件下, L-Arg, Fe^{2+} , KGA 的浓度是很低的, 所以这些物质必须通过某种方式与酶结合在一起才能有效的发挥作用。因此酶的活性位点被认为有两个配位原子 L1, L2 可以结合 Fe^{2+} 。在复合体中, 有 L-Arg 和 KGA 参与形成一个希夫碱结构的中间体, 这个中间体与 O_2 作用, 形成一个不稳定的过氧化物型的 Fe^{2+} 中间体, 随后, 其上的 KGA 分子被分解成 C_2H_4 和三分子的 CO_2 。

基于来自于 *P. digitatum* 和 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 的 EFE 的酶学特性研究, Nagahama 等(1991a)提出了一个假想的反应机制(Fig. 1.4)。在这个设想中, 结合在酶上的 Fe^{2+} 使反应的活性中心, 精氨酸, KGA, Histidine 随后都与 Fe^{2+} 结合形成一个中间体, 当有 O_2 参与进来, 结合在此时的 Fe^{5+} 上时, 这个中间体变得不稳定, KGA 分子就会被分解成为一个 C_2H_4 分子和三个 CO_2 分子。

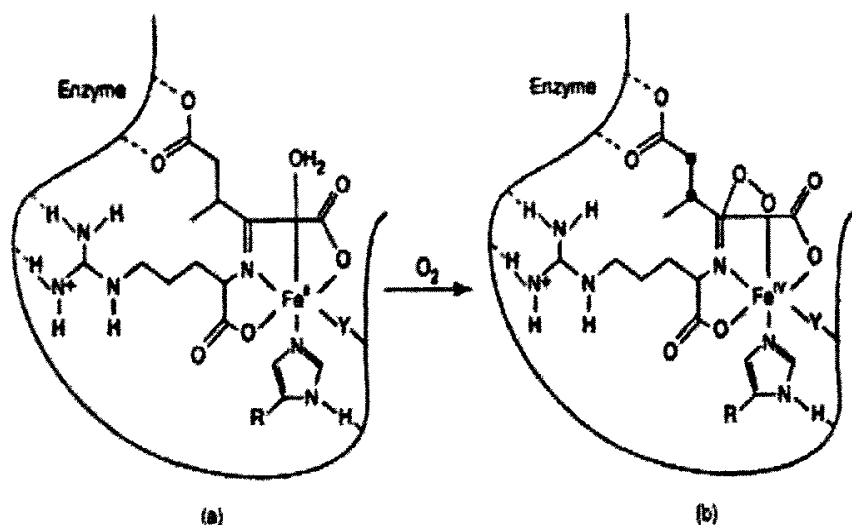


图 1.4 乙烯形成酶催化结构模式图(Nagahama et al., 1991a)

Fig. 1.4 Model of the proposed intermediate consisting of the EFE, 2-oxoglutarate, L-arginine, and the imidazole compound. (a) The intermediate before reaction with oxygen and (b) after reaction. The carbon atoms from 2-oxoglutarate that are converted to C_2H_4 are indicated(●).

Fukuda 等(1992a)对从 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 中提纯的 EFE 进行研究, 发现 EFE 可以同时催化两个反应, 即以 KGA 为底物形成乙烯和琥珀酸, 二者比例为 2:1 (图 1.5)。

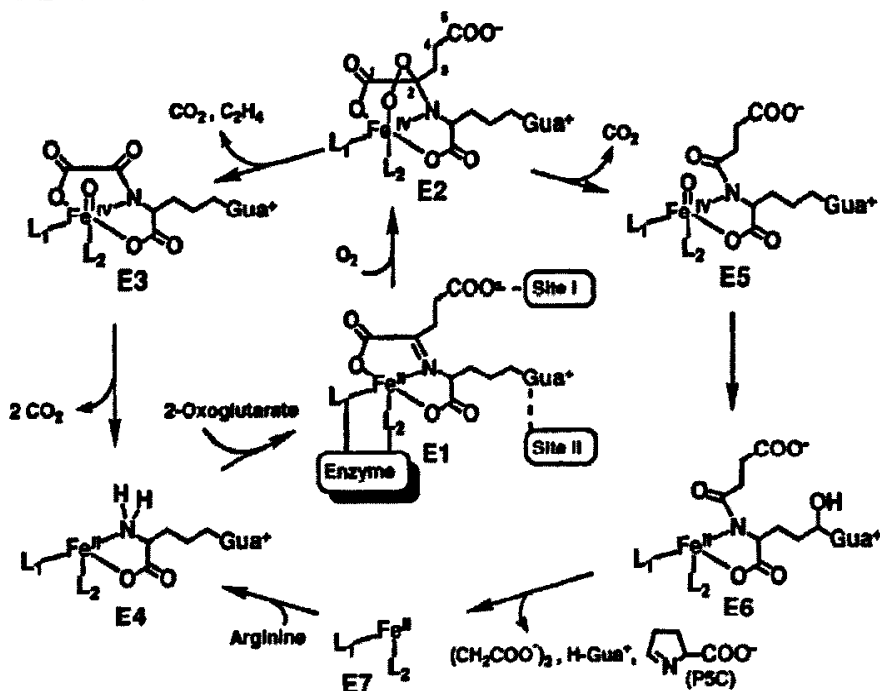


图 1.5 丁香假单胞菌菜豆致病变种 PK2 中乙烯形成酶催化酮戊二酸形成乙烯和琥珀酸的双循环机制 (Fukuda et al., 1992a)

Fig. 1.5 The dual-circuit mechanism proposed for the simultaneous formation of ethylene and succinate from 2-oxoglutarate by the enzyme isolated from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2.

L1 and L2, ligands on the enzyme; and Site I and II, binding sites on the enzyme. For simplicity, the coordinated water molecules are not included in the Figure. All the iron ions are assumed to hexacoordinated. Gua⁺; protonated guanidine group.

其主反应是 KGA 经过双加氧作用, 形成一分子的乙烯和三分子的二氧化碳 ($C_5H_5O_5 + O_2 \rightarrow C_2H_4 + 3CO_2 + H_2O$)。副反应为由 KGA 生成琥珀酸 ($C_5H_5O_5 + 1/2O_2 \rightarrow C_4H_4O_4 + CO_2$), 同时精氨酸被分解为胍和 P5C(L- Δ -pyrroline-5-carboxylate) ($C_6H_{14}N_4O_2 + 1/2O_2 \rightarrow CH_5N_3 + C_5H_7NO_2 + H_2O$)。总反应式如下:



由于 P5C 和胍的形成涉及到 L-Arg 上 Δ -C 原子的羟基化, 所以后两个反应表现出了 KGA 依赖型双加氧酶的特性 (Hyaishi et al., 1975)。鉴于以上的研究结果, Fukuda 提出了一个 EFE 催化反应的双通路模型, 在这个模型中, 酶结合 KGA 和 L-Arg 形成一个席夫碱结构的中间体, 从而进行接下来的两个反应。模型中酶被设想含有两个配体 L1, L2, 它们与 Fe^{2+} 结合形成活性中心, L1, L2 很可能是就是 His 残基 (Fukuda et al., 1992a)。 Fe^{2+} 可与 KGA 和 L-Arg 结合形成三元席夫碱结构, KGA 的末端羧基和 L-Arg 的胍基分别与酶上位点 I 和位点 II 作用 (E1)。然后 E1 与氧气作用, 形成一个过氧复合体 E2, 随后 E2 发生不可逆分解反应, 氧气原来的不

稳定双键断开,同时 KGA 分子 C2 和 C3, C4 和 C5 之间的键断裂,产生乙烯, CO₂ 和 E3。E3 复合体上由氧化性很强的 Fe⁵⁺和还原性很强的类草酰基的配体。因此, E3 会发生一个分子内的氧化还原反应,转变为 E4。从 E1→E2→E3→E4(→E1)这一系列的反应形成乙烯的一个主要循环。此外, E2 分子上 KGA 分子的另外一种分解方式是发生在 C1-C2 之间,这样 E2 转变为含有琥珀酰精氨酸的 E5,其上的 Fe⁵⁺很活跃,可以羟化精氨酸分子中的 α -C 原子形成 E6, E6 不稳定,随后会自发的分解为琥珀酸、胍、P5C 和 E7。E7 又可以结合 Arg 形成 E4。从 E1→E2→E5→E6→E7→E4 (→E1) 的过程形成琥珀酸的循环。产生乙烯的时候为什么会有琥珀酸形成途径呢,一个可能是通过 L-Arg 的分解作用抑制乙烯的合成的一种机制。由于 EFE 与 KGA 依赖型的双加氧酶具有相似的属性,所有 EFE 有可能是后者一个较原始的形式,只不过 EFE 的某些属性在很久以前就停止了进化。

5 乙烯形成酶基因的克隆

5.1 乙烯形成酶基因定位于细菌的内源质粒

Fukuda 等 (1992b) 从 *P. syringae* pv. *phesaolicola* PK2 中首次克隆了从微生物中的 EFE 编码基因,并且确定其位于一个名为 pPSP1 的内源质粒上。后来 Nagahama 又从 *P. syringae* pv. *phesaolicola* 的另外三株菌和 *P. syringae* pv. *glycinea* 的四株菌中发现 *efe* 基因存在于质粒上。在 Sato 等 (1997) 新发现的可以高效产乙烯的细菌 *P. syringae* pv. *cannabina* 和 *sesami* 中, *efe* 基因也是定位在内源质粒上的。Watanabe 等 (1998) 发现 *P. syringae* pv. *glycinea* MAFF301683 中含乙烯基因的质粒 pETH2 具有可接合的能力,可以赋予原来不产乙烯的菌株产乙烯的能力。在其它产乙烯的病原细菌中 *efe* 基因也被证明存在于质粒上,而非基因组上 (Nagahama, 1994)。

5.2 乙烯形成酶基因的克隆

Fukuda 等 (1992b) 从 *P. syringae* pv. *phesaolicola* PK2 中提取质粒 pPSP1 之后,利用 pUC19 建立了一个质粒文库,在随机选择的 40 个克隆中,利用前面测序 N-端氨基酸序列反推的核酸序列作为探针,来进行杂交,结果得到了两个阳性克隆。其中的一个克隆: *E. coli* JM109 (pEFE01), *efe* 基因在其本身的启动子控制下表达,其产乙烯的能力为 230nl/ml culture/hr (OD₆₀₀=2.0),其能力大约相当于 *P. syringae* pv. *phesaolicola* PK2 的 1/5-1/10。对核酸序列分析发现 *efe* 的读码框为 1050bp,编码 350 个氨基酸 (分子量为 39444Da)。E. coli JM109 (pEFE01) 表达的 EFE 蛋白具有与从 *P. syringae* pv. *phesaolicola* PK2 中提取的 EFE 相同的免疫原性。

5.3 乙烯形成酶基因序列分析及研究

Sato 等 (1997) 利用已有的 *efe* 序列设计引物,从 *P. syringae* (78 株, 43 个变种) 和其

它植物和昆虫来源的 79 株中又筛选到了一些可以产乙烯的细菌。但是从目前已经知道的产乙烯的细菌来看,利用 KGA 途径的细菌只存在于丁香假单胞菌的菜豆致病变种(葛藤宿主菌株),大豆致病变种,麻致病变种,芝麻致病变种这四个变种中,而且其核酸序列比较发现从这些变种中扩增出的编码区序列是高度保守的(编码区 1053bp 中只有 2 个碱基的差异)(Goto *et al.*,1985; Sato *et al.*,1987; Sato *et al.*,1997)。从 *P. syringae* pv. *phesaolicola* PK2 中克隆得到的乙烯基因 5'非编码区有明显的原核启动子结构,比如-35 区, -10 区及 SD 序列。在 3'端有一段反向重复序列,其功能不清楚,但是推测其应当起到转录终止的作用。

乙烯形成酶的氨基酸序列同源性比较发现, EFE 与植物的一些成熟相关蛋白, KGA 依赖型双加氧酶具有部分的序列相似性,但是序列全局比较的同源性很低,只有一些功能区域显示出了保守性。Matsuda 等(1991)认为在 KGA 依赖型的双加氧酶中有三个保守区域,它们可能是结合 KGA, Fe^{2+} (与两个 His 结合)的位点。EFE 也有这些保守位点。对 EFE 的疏水性分析,研究者发现植物中的成熟相关蛋白和 EFE 有很好的相似性。另外在 EFE 中独有的两个疏水区(93-114 位和 209-226 位)。对于 EFE 与 KGA 依赖型的双加氧酶的进化关系还有待研究。

表 1.4 野生型和突变型乙烯形成酶动力学参数比较 (Nagahama, 1998)

Table 1.4 Kinetic parameters of wild-type enzyme and mutated EFEs

Enzyme	2-Oxoglutarate			The first rate constant for heat inactivation k(min ⁻¹)
	Km(μM)	K _{cat} (min ⁻¹)	relative K _{cat} (%)	
Wild type	13	30	100	0.007
H116Q	15	0.72	2.4	0.122
H168Q	7	0.90	3.0	0.166
H169Q	11	2.8	9.3	0.080
H189Q	ND	ND	ND	ND
H233Q	ND	ND	ND	ND
H268Q	33	0.54	1.8	0.014
H284Q	7	0.60	2.0	0.100
H305Q	6	12	40	0.039
H309Q	10	1.0	3.3	0.069
H335Q	8	18	60	0.014

ND, Not determined.

在另外一项研究中(Nagahama, 1998),研究者对利用定点诱变技术,把 EFE 中的 10 个组氨酸分别用谷氨酰胺来替代以研究 His 在酶促反应中的作用(Table 1.4)。结果 H189 和 H233 位点突变的酶会完全丧失其活性,这支持了前面猜想的酶活中心需要两个组氨酸残基来结合 Fe^{2+} 的设想。不过有趣的是 EFE 的氨基酸序列比对分析认为这两个保守组氨酸应该是 H189 和 H268。实际上 H268 位点突变的酶活性虽然较低,但是仍然有形成乙烯的能力的。H116, H168, H169, H284, H309 五个位点突变不仅造成了酶活的下降,而且热稳定性受到了破坏。这可能是因为这五个氨基酸位于酶结构的内部,当它们突变时,会破坏原有分子内氢键的形成,使得酶的立体结构受到一定程度的破坏,使得酶活性中心不能有效形成和酶结构的热稳定性下降。

而 H268 和 H335 两个位点突变却对热稳定性没有影响,这说明这两个氨基酸可能位于酶的表面。

6 产乙烯工程菌株的构建

6.1 乙烯形成酶基因在大肠杆菌中表达

Fukuda 等(1992b)从 *P. syringae* pv. *phesaolicola* PK2 提取出含有 *efe* 基因的质粒,经过酶切之后连入 pUC19,其中一个重组质粒 pEFE01 连入了一个含有 *efe* 的 2.5Kb 片断,这个质粒可以赋予大肠杆菌产生乙烯的能力,其产率为 230nl/ml/hr ($OD_{610}=2$),约为丁香假单胞菌的 1/5-1/10,表达的乙烯形成酶蛋白占到总蛋白的 0.3%。这是 *efe* 基因第一次在大肠杆菌中表达。随后, Ishihara 等(1995)又用 *lac* 启动子和 *tac* 启动子在大肠杆菌中对乙烯形成酶基因进行了过量表达。他们经过比较发现乙烯形成酶基因本身的启动子在大肠杆菌表达的效率要远远低于 *lac* 启动子和 *tac* 启动子,它们在 25℃时表达乙烯形成酶活性约是前者的 25-30 倍。用 *lac* 启动子和 *tac* 启动子表达乙烯基因的大肠杆菌乙烯产率超过 10 μ l/mg/hr,是 *P. syringae* pv. *phesaolicola* PK2 的 10 倍。但是在 30℃和 37℃时都会明显的形成包涵体,且 37℃培养时基本检测不到有乙烯产生。

6.2 乙烯形成酶基因在假单胞菌中的表达

Ishihara 等(1996)将乙烯形成酶基因连接到了一个高拷贝广宿主的质粒 pML122 上,所得重组质粒命名为 pMEFE1,其上的乙烯形成酶基因是由新霉素磷酸转移酶启动子来控制表达的。将 pMEFE 分别导入到丁香假单胞菌菜豆致病变种 PK2 和恶臭假单胞菌 AC10 中,结果宿主菌都表现出了很强的产生乙烯的能力。其中恶臭假单胞菌具有最高的乙烯合成速率,可达 8 μ l/ml/ OD_{610} /hr,但是其维持时间很短,而且之后合成速率急剧下降。丁香假单胞菌的最高乙烯合成速率为 2 μ l/ml/ OD_{610} /hr,且能够在一段较长的时间内维持比较高的合成速率。

6.3 乙烯形成酶基因在光合细菌中的表达

Fukuda 等(1994)首次将乙烯形成酶基因引入到了光合细菌(菌株名为 PCC7942 R2-SPc),实现了将空气中二氧化碳转化为乙烯的设想。但是由于表达是利用乙烯形成酶本身的启动子,所以生产效率很低(50nl/ml/hr)。Ogawa 等(1997)则利用了乙烯基因本身的启动子,大肠杆菌的 *lacZ* 启动子和光合系统 II 中的 D1 蛋白启动子 *psbA1* 来在光合细菌 PCC 7942 中进行乙烯形成酶基因的表达,结果发现 *psbA1* 带动的表达乙烯产率最高。但是这个质粒会与染色体发生同源重组,所以乙烯的产率随着传代次数的增多而下降,表现出产量的不稳定性。Takahama 等(2003)把 *psbA1* 基因的编码框替换为乙烯形成酶基因,这个整合有乙烯形成酶基因的菌株乙烯生产速率为 451nl/ml/ OD_{730} /h。并且具有很好的稳定性。但是出现的一个问题在产生乙烯阶段菌体表现出较为严重的代谢压力,从而使得乙烯的产率逐渐下降。

7 本课题的研究意义及内容

关于利用生物乙烯来代替化工乙烯的设想早在 1984 就有人提出 (Fukuda et al., 1984), 但是由于在过去的 20 年里石油工业发展迅速, 化工经济成为国民经济的主要支柱。而且生物乙烯本身产量不高, 其开发应用需要很长的一段路要走, 在过去这种生物乙烯替代工业乙烯的设想没有得到重视。这种情况不仅是生物乙烯所经历过的问题, 如过去生物乙醇, 生物氢气等与石油来源的产品无论从技术, 成本, 研发投入上都是不可比拟的。现在人类面临的一个严重问题是石油资源的日益匮乏, 而石油化工行业是当今社会的基础行业, 其产品应用于社会的各个行业中, 没有石油工业的现代社会是不能想象的。所以现在各国都认识到了寻找开发石油替代产品的战略意义。

自然界中能够产生乙烯的生物很多, 但是绝大多数产生乙烯的能力很低, 只有丁香假单胞菌的几个变种能比较高效地产生乙烯, 是其他途径的 500-1000 倍以上。现有关于丁香假单胞菌生产乙烯的研究成果主要是由日本的科学家来完成的。在中国没有有相关的报道。在面临着寻找石油替代产品的需求形势之下, 我们经过调查研究, 选择了生物乙烯作为研究对象。

本课题的主要研究内容包括: 高产乙烯的微生物的筛选, 乙烯形成酶基因的克隆和表达, 乙烯工程菌株的构建三个方面, 目的是为将来利用微生物生产乙烯打下基础。

第二章 材料与方法

1 材料

1.1 菌株与质粒

表 2.1 菌株与质粒

Table 2.1 Bacterial Strains and Plasmids

菌株和质粒	相关表型及描述	来源
Strain and plasmid	Relevant genotype and description	Source
Strain		
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, λ, $\Delta(lac-proAB)$, [F', <i>traD36, proA⁺B⁺, lacI^fZ</i>ΔM15]</i>	Laboratory collection
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F, ϕ80d/lacZΔM15, $\Delta(lacZYA)$U169, <i>deoR, recA, endA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), phoA, supE44, λ, thi-1, gyrA96, re(A)</i></i>	Laboratory collection
<i>E. coli</i> BI21 (DE3)	<i>F, ompT, hsdSϕ(r_B⁻, m_B⁻), gal(λcl857, <i>ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm(DE3)</i></i>	Laboratory collection
<i>Conrynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	Wild type, Nx ^R	CICC
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> ICMP2189	Wild type, Amp ^R	Plant Protection Institute of CAAS
Plasmid		
pBlueScript SK(+)	3.0Kb, Amp ^R	Laboratory collection
pET28a	Expression vector, 5.3Kb, Km ^R	Laboratory collection
pET28a- <i>efe</i>	pET28a containing the gene for EFE	This work
pZ8-1	Shuttle expression vector, containing <i>tac</i> promoter, <i>mcs</i> , <i>E. coli</i> <i>ori</i> from pACYC177, <i>C. glutamicum</i> <i>ori</i> from pHM1519, Km ^R	Provided by Pf. Joern Kalinowski
pZ8-1- <i>efe</i>	pZ8-1 containing the gene for EFE	This work
pZ8-1- <i>efe</i> (RBS)	pZ8-1 containing the <i>efe</i> with a RBS of <i>C. glutamicum</i>	This work
pZPE	pZ8-1 containing the <i>efe</i> with its native promoter	This work
pJC1	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector, 6.2Kb, Km ^R	Provided by Dr. Lothar Eggeling
pJC1-Pgap'- <i>efe</i>	pJC1 containing the gene of <i>efe</i> with the promoter of <i>gdp</i> gene from <i>C. glutamicum</i>	This work
pJC1-Pgdh- <i>efe</i>	pJC1 containing the gene of <i>efe</i> with the promoter of	This work

	<i>gdh</i> gene from <i>C. glutamicum</i>	
pDSK519	<i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle vector, 8.1Kb	Provided by Pf. Zhang Liqun
pDSK-Pgap-efe	pDSK519 containing the gene of <i>efe</i> with the promoter of <i>gpd</i> gene from <i>P. syringae</i> ICMP2189	This work

1.2 培养基与抗生素

表 2.2 细菌培养基

Table 2.2 The media for bacteria

培养基	配方	用途
LB	Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 1%	培养 <i>E. coli</i> (37℃) 及 <i>C. glutamicum</i> (30℃), 产乙烯时加 2%葡萄糖
无盐 LB	Tryptone 0.8%, Yeast extract 0.75%	制备 <i>E. coli</i> 感受态细胞
KB	Tryptone 2%, K ₂ HPO ₄ 0.015%, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.015%, Glycerol 1%(V/V)	培养 <i>P. syringae</i> (30℃) 及制备感受态细胞, 产乙烯时加 2%葡萄糖
LBGGT	Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 1%, Glucose 0.5%, Glycine 2.5%, Tween80 0.5%	制备 <i>C. glutamicum</i> 感受态细胞

注：培养基 pH 值为 7-7.5，固体培养基中加入 1.3%琼脂，Glucose、Glycine、Tween80 单独灭菌（115℃，20min）。

表2.3 抗生素溶液的配置及使用浓度

Table 2.3 Antibiotic solution and their applications

名称	缩写	储液浓度	配制方法	使用浓度
氨苄青霉素	Amp	100mg/ml	水溶液，过滤除菌	100µg/ml for <i>E. coli</i> 20µg/ml (<i>P. syringae</i>)
卡那霉素	Km	100mg/ml	水溶液，过滤除菌	50µg/ml for <i>E. coli</i> 25µg/ml for <i>P. syringae</i> or <i>C. glutamicum</i>
蔡啶酮酸	Nx	20mg/ml	水溶液，过滤除菌	20µg/ml for <i>C. glutamicum</i>

1.3 引物

表 2.4 引物及其扩增片断

Table 2.4 Primers and the resulted fragments

引物	扩增片断名称	说明
redarmy1: GCGGAATTCATGACCAACCTACAGACTTTC redarmy2: ATTAAGCTTTTATGAGCCTGTCGCGCGG	efe	EFE 编码序列(1053bp),参考序列为 D13182.
efe(RBS)1: GTAGAATTCAAAGGAGGACA -ACCATGACCAACCTACAGACTTTC redarmy2: 同上	efe(RBS)	efe 基因前面加有 <i>C. glutamicum</i> 的 RBS 序列 (Ruckert et al.,2003) .
Pefe1: GATGAATTCGATGGGTTTGCCAGTCTTG redarmy2: 同上	efe(promoter)	efe 基因及其启动子序列，参考序列 D13182.
Pgap1: AGTGGATCCCGCCGAGAGCATTTT ATTGT Pgap2: CGCGAATTCAGAGTCATACAGCCGTCCTTC	Pgap	<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> 的三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 启动子序列 (Bormann et al., 1992),参考序列为 NC_004578,NC_007005,NC_005773.
Pgap'1: GTAGGATCCGGGATTACCATTGAAGCCAGT Pgap'2: TATCTGCAGACGTC CGATACGGCCAAA	Pgap'	<i>C. glutamicum</i> 的三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)启动子序列 (Eikmanns, 1992; Schwinde et al.,1993), 参考序列为 NC_006958.
Pgdh1: CGGGAATTCGACCTGCTCATCAACTGTCA Pgdh2: AAAGGATCCGTTGTTCTAGCTAGCCTCGG	Pgdh	<i>C. glutamicum</i> 谷氨酸脱氢酶 (GDH) 启动子序列 (Bormann et al., 1992), 参考序列为 NC_006958.

注：引物序列中下划线为引入的酶切位点；方框内序列为 *C. glutamicum* 的 RBS 序列；参考序列号为 Genbank 序列号。

2 方法

2.1 植物病叶中细菌的分离

从北京周边郊区，公园，农田等地采集各种植物的病叶，做为细菌的分离源。具体分离方法为：植物病叶用自来水洗去表面附属物，蒸馏水漂洗两次，无菌水漂洗两次，70%酒精表面消毒 20—50 秒，再用无菌水洗去残留酒精，用灭菌剪刀将叶子剪成小块，然后在研钵中加入 5-8ml 无菌水，将叶子磨碎，取上清进行 10 倍和 100 倍稀释，两个稀释度各取 200μL 涂至 KB 固体培养基平板中，48h 后将长出的菌落进行纯化保存。

2.2 PCR 反应体系及条件

20μL 体系中含 TaqDNA 聚合酶 1—1.5U，10×buffer 2μL，dNTP(10mM) 0.5μL,引物各

- (3) 按 1%接种量将菌液接入液体 LB 培养基, 37℃, 200rpm 培养 2-3hr 至 $OD_{600}=0.5-0.8$;
- (4) 菌液冰浴 10min, 4000rpm, 4℃离心 10min, 弃上清, 倒置离心管 1min, 流尽剩余液体;
- (5) 按每 100ml 菌液加入 10ml 冰预冷的 0.1M $CaCl_2$ 溶液重悬细胞, 冰浴 10min, 4000rpm, 4℃离心 10min;
- (6) 弃上清, 按每 50ml 的原始培养物加入 2ml 含 10%甘油的 0.1M $CaCl_2$ 溶液悬浮细胞, 分装入 1.5ml Eppendorf 管中, 每管 200 μ l, -70℃贮存。

2.4.2 大肠杆菌电击感受态细胞制备

- (1) 取一新鲜的 *E.coli* DH10B/ES1301mutS/JM109 菌落接种于 20 ml LB 培养基中, 37℃, 150rpm 过夜;
- (2) 次日晨 1%接种量接种于 1 L 无盐 LB 培养基中, 37℃, 200rpm, 摇 3~5hr 至 $OD_{600}=0.5-0.8$;
- (3) 将培养物冰浴 15~30min, 4000g、4℃离心 10min, 尽可能地去掉上清;
- (4) 加入 500ml 冰预冷灭菌 ddH₂O, 轻轻翻转使菌体悬浮, 离心, 再次用 100ml 冰预冷灭菌 ddH₂O 清洗菌体;
- (5) 用 100ml 冰预冷的 10%甘油洗菌体 1 次;
- (6) 将菌体用大约 1ml 预冷的 10%甘油悬浮, 细胞浓度应在 $10^{10}-3\times 10^{10}$ 个/ml;
- (7) 细胞悬液按 40 μ l 小份分装, 置于-70℃冰箱保存备用。

从第三步开始, 尽可能低温操作, 使细胞保持在 0℃。

2.4.3 谷氨酸棒杆菌电击感受态细胞制备

- (1) 取一新鲜的 *C. glutamicum* 菌落接种于 LB 培养基中, 30℃, 200rpm 培养 12h;
- (2) 次日晨接种于制备感受态细胞专用培养基 LBGGT 中, 调整初始 $OD_{600}=0.2$, 培养约 12h 至 $OD_{600}=1.2$;
- (3) 将培养物冰浴 15~30min, 4000g、4℃离心 10min, 尽可能地去掉上清;
- (4) 用冰预冷的灭菌 ddH₂O 洗涤菌体两次;
- (5) 用冰预冷的 10%甘油洗菌体 1 次;
- (6) 用适量 10%甘油悬浮菌体, 细胞悬液按 40 μ l 小份分装, 置于-70℃冰箱保存备用。

2.4.4 丁香假单胞菌感受态细胞制备

丁香假单胞菌感受态细胞制备使用的培养基为 KB 培养基，具体方法同 2.4.2(大肠杆菌电击感受态细胞制备)。

2.4.5 感受态细胞电转化方法

(1) 将电转化杯和白色滑块放在 0°C 预冷；

调节：Pulser apparatus 25 μ F Pulser controller 200 Ω

0.2cm 电激槽用 2.5kV 0.1cm 电激槽用 1.8kV

将 1-2 μ l DNA 与 40 μ l 感受态细胞在预冷的 1.5ml Eppendorf 管中混匀；

(2) 将混合物吸入预冷的电激杯内，尽量避免出现气泡，轻甩使溶液至底部，迅速将电激杯放入预冷的滑块内，并将其推入；同时按下两个 Pulse 键；

(3) 迅速取出电激槽，立即加入 960 μ l LB 培养基，混匀，移至 1.5ml 小管中，37°C、90rpm 摇动 0.5-1hr；

(4) 在适当的选择培养基上涂布培养，筛选转化子。

2.4.6 大肠杆菌热激法转化

(1) 将DNA（体积<10 μ l，DNA<50ng）加到200 μ l 感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴30min；

(2) 42°C热激90s 或45°C 60s，不要摇动离心管；

(3) 迅速置于冰上1-2min，加入800 μ l SOC 培养液，37°C复壮45min-1h；

(4) 取适量菌液涂于适当的选择培养基上，37°C培养，筛选转化子。

2.5 细菌质粒快速检测（Cracking）

(1) 用牙签从单菌落上（直径 1-1.5mm）挑取少量菌体与 0.5ml Eppendorf 管中，加入 10 μ L 灭菌水，在涡旋振荡器上剧烈振荡使菌体分散。

(2) 向分散的菌液中加入 10 μ l 2XCracking Buffer (0.02 M NaOH, 0.05% SDS 和 20% Sucrose)，在涡旋振荡器上剧烈振荡使菌体裂解。

(3) 放入 37°C 水浴锅中水浴 20-30min，然后 12000rpm 离心 10min。

(4) 取上清 5 μ l-10 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳。

此法可以进行外源片断是否成功连入载体的初步验证，在大量的克隆中筛取连接正确的克隆。

2.6 酶切反应及连接反应

ddH ₂ O	14.5μl
10×Buffer	2μl
目的 DNA	3μl
限制性内切酶	0.5μl
总体积	20μl

依次加入 Eppendorf 管后, 轻弹混匀, 瞬时离心后置于 37℃ 温浴 2h 左右, 然后进行其他操作或加入 10×上样 Buffer 后电泳检测。

10μl 反应体系中分别加入载体(约 100ng)和外源片段(摩尔比约为 1:3), 10×ligase buffer 1μl, T₄DNA ligase 1μl (约 1-5u), 混匀, 16℃ 温浴, 16hr, 转化。

2.7 琼脂糖凝胶中DNA片段的回收

2.7.1 冻融法

- (1) 琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下小心切下所需条带, 尽量减少多余凝胶, 将凝胶切成小块;
- (2) 将凝胶块移入1.5ml 离心管中, 加入等体积的Tris 饱和酚, 振荡混匀;
- (3) 放入液氮速冻或-70℃冰箱冷冻1hr, 迅速放入37℃水浴中使凝胶融化。重复步骤2-3 次;
- (4) 直到凝胶冻融成糜状;
- (5) 12,000rpm 离心10min, 取上清至新的1.5ml 离心管中;
- (6) 酚相加1/2 体积灭菌ddH₂O, 振荡混匀。12,000rpm 离心10min, 上清与步骤4 中上清合并;
- (7) 加等体积的酚: 氯仿 (1:1, v/v), 颠倒混匀, 12,000rpm 离心10min 抽提;
- (8) 加等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1, v/v) 颠倒混匀, 12,000rpm 离心5min 抽提2 次;
- (9) 上清加1/10 体积的3M NaAc (pH5.2)、2 倍体积的预冷无水乙醇, -20℃沉淀;
- (10) 12,000rpm 离心15min, 弃上清; DNA 沉淀用70%乙醇洗涤2 次, 真空干燥;
- (11) 将DNA 溶于适量体积的TE 中, 取1μl 电泳检测并定量, 其余-20℃保存。

2.7.2 快速纯化回收试剂盒法(赛百盛试剂盒使用说明)

- (1) 琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下小心切下所需条带, 凝胶尽量小, 将凝胶切成小块;
- (2) 加入等体积的溶胶剂, 65℃水浴加热10-15min, 期间取出颠倒混匀2-3 次, 直至凝胶完全融

化;

- (3) 加入0.4ml 纯化树脂(使用前振荡混匀)充分混匀3min, 将混合液装入离心纯化柱;
- (4) 12,000rpm 离心30s, 倒掉收集管中的废液;
- (5) 加入500 μ l 70%乙醇, 12,000rpm 离心30s, 倒掉收集管中的废液;
- (6) 重复上一步, 用70%乙醇再洗一次, 离心, 倒掉收集管中的废液;
- (7) 12,000rpm 离心2min, 去除70%乙醇;
- (8) 将纯化柱放在干净的1.5ml 离心管中, 开盖放置5-10min, 以保证乙醇挥发干净;
- (9) 加入20 μ l 灭菌的ddH₂O 或TE 缓冲液于纯化树脂上, 注意不能将水滴在管壁上;
- (10) 放置2min, 12,000rpm 离心30s。液体即是纯化的得DNA 产物, 取1 μ l 电泳检测并定量

2.8 菌种的保存

- (1) 固体平板上培养的菌落, 将平皿用石蜡膜封紧, 倒置, 4℃可保存1~2 个月。
- (2) 细菌的保存, 过夜培养的菌液, 加等量的30%无菌甘油, 振荡混匀, -70℃可保存一年。

2.9 大肠杆菌蛋白诱导表达及 SDS-PAGE 电泳

2.9.1 大肠杆菌的诱导表达

- (1) 挑取转有重组质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 细菌, 加入含有相应抗生素的 LB 液体培养基, 37℃过夜振荡培养;
- (2) 按照 1: 100 转接过夜培养菌液, 37℃振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5-0.6 左右, 随后取出部分菌液作为对照, 剩下部分加入终浓度为 0.8 M 的 IPTG 诱导表达;
- (3) 诱导2.5小时后, 将菌液7000rpm, 1min 收集菌体; 然后加入50-100 μ l 的2X 样品缓冲液, 悬浮菌体; 沸水裂解菌体, 处理10min; 冰上放至2-5min, 10000rpm, 1min, 收集上清, 上样20 μ l至12%分离胶的SDS-PAGE电泳检测表达结果。

2.9.2 SDS-PAGE电泳所需溶液

分离胶缓冲液[1.5M Tris(pH8.8)]: 称取Tris 18.17g, SDS 0.4g溶于水, 用3M HCl 调至pH8.8, 蒸馏水定容至100ml。

浓缩胶缓冲液[1M Tris(pH6.8)]: 称取Tris 6.0g, SDS 0.4g溶于水, 用3M HCl 调至pH6.8, 蒸馏水定容至100ml。

30%丙烯酰胺溶液(Acr-Bis): 将29g丙烯酰胺和1g N, N'-亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为60ml的水中。加热至37℃溶解之, 补加水至终体积为100ml, 溶液的pH值应不大于7.0, 置棕色瓶中保存于室温。

10%过硫酸铵(AP)溶液: 1g过硫酸铵溶解于终量为10ml的水溶液中, 可在4℃保存数周。

样品缓冲液: 称取Tris 1.21g, 甘油10ml, 巯基乙醇5ml, 溴酚蓝0.1g, SDS 2g, 溶于水后, 用HCl调至pH8.0, 用蒸馏水定容至100ml。

电泳缓冲液: 称取Tris 3.03g, 甘氨酸14.4g, SDS 1.0g, 溶于水后, 用HCl调至pH8.3, 用蒸馏水定容至1000ml。

10%SDS: 称取SDS 10g, 加蒸馏水定容至100ml。

染色液: 45% 甲醇, 10%乙酸, 0.1%考马斯亮蓝R-250, 溶解后过滤备用。

脱色液: 25% 甲醇, 10%乙酸。

表 2.5 12%分离胶配制

Table 2.5 The collocation of separation gel

12%分离胶总体积	10ml	11 ml	13 ml	15 ml
dH ₂ O	3.3 ml	3.63 ml	4.3 ml	4.9 ml
30%Acr-Bis	4.0 ml	4.4 ml	5.2 ml	6.0 ml
1.5M Tris(pH8.8)	2.5 ml	2.75 ml	3.25 ml	3.8 ml
10%SDS	0.1 ml	0.11 ml	0.13 ml	0.15 ml
10%AP	0.1 ml	0.11 ml	0.13 ml	0.15 ml
TEMED	0.004 ml	0.0044 ml	0.0052 ml	0.006 ml

表 2.6 5%浓缩胶配制

Table 2.6 The collocation of stacking gel

5%浓缩胶总体积	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml
dH ₂ O	2.7 ml	2.1 ml	1.4 ml	0.68 ml
30%Acr-Bis	0.67 ml	0.5 ml	0.33 ml	0.17 ml
1M Tris(pH6.8)	0.5 ml	0.38 ml	0.25 ml	0.13 ml
10%SDS	0.04 ml	0.03 ml	0.02 ml	0.01 ml
10%AP	0.04 ml	0.03 ml	0.02 ml	0.01 ml
TEMED	0.004 ml	0.003 ml	0.002 ml	0.001 ml

2.9.3 SDS-PAGE 电泳方法

将处理好的蛋白样品用微量注射器点到胶孔中, 进行浓缩胶电泳时电压调节至 60V 恒压电泳, 待溴酚蓝电泳至浓缩胶与分离胶界面时, 调节电压至 160V 恒压电泳, 待溴酚蓝电泳至底部时, 停止电泳。小心取下胶块, 放入染色液中, 在微波炉内中火加热 1min, 之后振荡充分染色 30min。然后用脱色液振荡脱色 2-3 次, 每次 2h。

2.10 生物乙烯的测定方法

2.10.1 乙烯测定方法

所用气相色谱仪为HP6890, 利用HP气相色谱化学工作站 (HP CHEMSTATION Ver. 5.01) 进行操作, 色谱柱为HP-PLOT/ Al_2O_3 , 规格: $15\text{m}\times 0.53\text{mm}\times 15\mu\text{m}$ (内膜厚度), 炉内温度 70°C , 载气 N_2 流速为 28.5ml/min , 裂解气 H_2 流速为 80ml/min , 空气流速为 400ml/min , 检测器温度为 180°C , 氢焰离子检测器 (FID) (后检测器)。

操作步骤:

- (1) 气相色谱仪的开机: 打开 N_2 , 空气, 氢气总阀及分阀, 调整分阀表指针在0.5处, 按下气相色谱仪开关, 打开工作站电脑, 待色谱仪启动完毕后, 连接工作站与气象色谱仪。
- (2) 启动程序: 选择已设定好的程序, 点击菜单栏Edit进入Parameters Edit界面, 选择Dectectors, 进入后选出Back Detector, 待温度上升至 180°C 时, 点击Ignite按钮, 自动点火, 不成功时可手动点火。待基线稳定时准备上样。
- (3) 进样: 用 $100\mu\text{l}$ 微量注射器吸取密封容器中顶端气体从前进样口迅速注入, 并马上按下色谱仪上Start键, 开始仪器记录。
- (4) 结果保存: 乙烯特征峰出现时间大约在 0.24min , 当时间超过 0.4min 时就可按色谱仪上的Stop键停止记录。选择Data Analysis界面, 保存峰图及峰值数据。
- (5) 关机: 关机为程序关机, 即选择Close程序, 当Close程序运行完毕时, 在界面上会出现绿色Ready信号, 这时可以关闭工作站, 然后依次关掉气相色谱仪, 氢气, 空气及氮气 (总阀和分阀都要关闭)。

2.10.2 1nmol 乙烯的标定

- (1) 准备120 ml 血清瓶两个, 标为1#、2# 瓶;
- (2) 将血清瓶灌满水, 并用插有针头的胶塞塞好, 防止气泡产生, 取下胶塞, 倒出100 ml 水 (用容量瓶量取), 换上新胶塞, 这样瓶中的空气体积即为100 ml;
- (3) 向1#瓶中注射 2.24 ml (标况下为 2.24 ml , 非标准状况下, 根据 $PV = nRT$ 来计算注入量) 乙烯, 再从1# 瓶中取出1 ml 气体注入2# 瓶中, 从2# 瓶中取出 $100\mu\text{l}$ 气体打入气相色谱仪, 所显示的峰高即为1 nmol 乙烯的量。

2.10.3 产乙烯菌株的筛选方法

将平板活化好的新鲜菌体用牙签挑取适量接入 2ml 液体培养基中, 所用试管规格为

15mm×100mm，然后用橡胶塞封住管口，30℃摇床横置 160rpm 振荡培养 24h 之后，抽取顶端气体进行气相色谱检测。

2.10.4 细菌乙烯产率测定方法

将活化好的种子液接入大瓶液体培养基中，调节菌体光密度 OD_{600} 为 0.1-0.2，然后以 2ml/管分装至若干小试管（15mm×100mm）中。统一在摇床中 25℃、160rpm 振荡通气培养，每隔 1h 取出三管做为三个重复，用橡胶塞密封住管口，同样在摇床中振荡通气培养，1h 后测定气体产量和菌体 OD_{600} 。气体产率单位为 $\mu\text{l/ml/h}$ 或 $\mu\text{l/ml}/OD_{600}/\text{h}$ 。

第三章 结果分析与讨论

1 丁香假单胞菌大豆致病变种 ICMP2189 能够产生乙烯

1.1 丁香假单胞菌大豆致病变种 ICMP2189 产生乙烯能力的确定

从各种植物的叶子和从其它研究机构收集到的细菌共计 2000 余株中,通过气相色谱检测(图 3.1),可以发现丁香假单胞菌大豆致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) ICMP2189 所产生的气体峰出现的位置与工业乙烯形成的峰具有相同的保留时间,而其它细菌产生的气体在相同的保留时间中无明显峰出现。这说明 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 是一株能够产生乙烯的细菌。

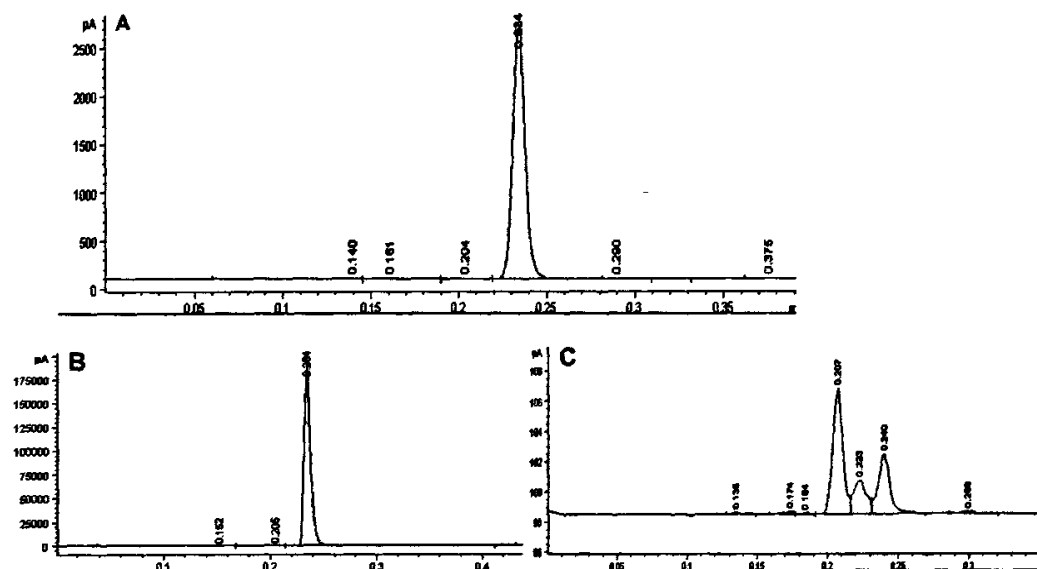


图 3.1 产乙烯微生物的筛选. A. *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP 2189 产生的气体气相色谱分析; B. 工业乙烯气相色谱分析(正对照); C. *E. coli* JM109 产生的气体气相色谱分析(负对照)

Fig. 3.1 Identification of ethylene-producing bacterium. A. Gas chromatograph of the gas produced by *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189; B. Gas chromatograph of industrial ethylene(CK⁺); C. Gas chromatograph of the gas produced by *E. coli* JM109(CK⁻)

1.2 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 产率分析

将 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 接种于含 2%葡萄糖的 KB 培养基中,培养方法见第二章 2.10.4。所得结果见图 3.2。从图中可以看出每毫升菌液每小时的产量随着菌体数量的上升而上升,在接种后第 15 小时出现最高产率 2.4 μ l/ml/h,但是单位菌体的最高乙烯产率(0.6 μ l/ml/OD₆₀₀/h)是出现在接种后第 7 小时,在第 15 小时,单位菌体的乙烯产率为 0.29 μ l/ml/OD₆₀₀/h,约为最高值的一半。这说明菌体处于不同的生长阶段,由于菌体本身的生

理状态或是培养条件的改变，单位菌体的乙烯产率是不同的。

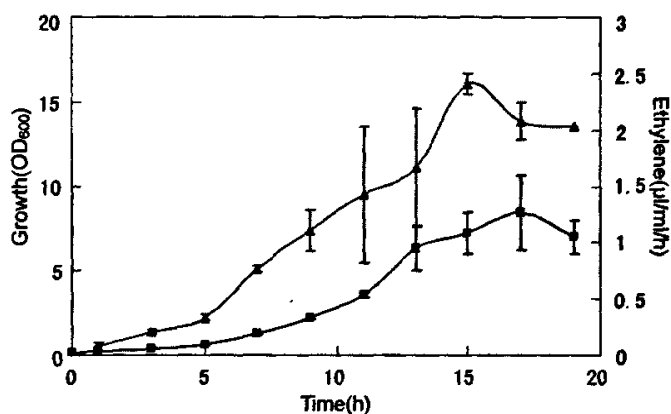


图 3.2 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 菌体生长(■)与生产乙烯(▲)的关系

Fig. 3.2 Growth kinetics(■) and ethylene production(▲) by *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189

2 乙烯形成酶基因的克隆及序列测定

以丁香假单胞菌大豆致病变种ICMP2189全基因组DNA为模板进行PCR扩增，获得约为1 kb的乙烯形成酶基因*efe* (图1)，与预期扩增片段长度1071bp相符。扩增片段经测序(GenBank Accession No.: EF175870) 比对发现与已发表的丁香假单胞菌芝麻致病变种中的AF101060和AB025277、麻致病变种中的AF101059及大豆致病变种中的AF101057四条*efe*基因序列完全一致，与丁香假单胞菌菜豆致病变种中的D13182和AF101058的*efe*基因有2个碱基的差别。

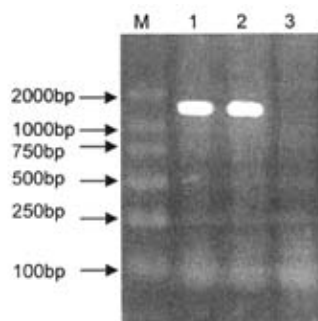


图 3.3 *efe*基因的PCR产物电泳图

Fig. 1. Electrophoresis of PCR product of *efe*

M, marker2000; 1 and 2, *efe* gene; 3, negative control.

3 乙烯形成酶基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达

3.1 表达载体 pET28a-*efe* 的构建及鉴定

扩增得到的 *efe* 基因利用引入的酶切位点 *EcoR* I 和 *Hind*III直接连接到大肠杆菌表达载体 pET28a 中，得到重组表达载体 pET28a-*efe*，经 *EcoR* I 和 *Hind*III双酶切所得小片段大小与

efe 基因的 PCR 产物相一致，说明表达载体构建正确。

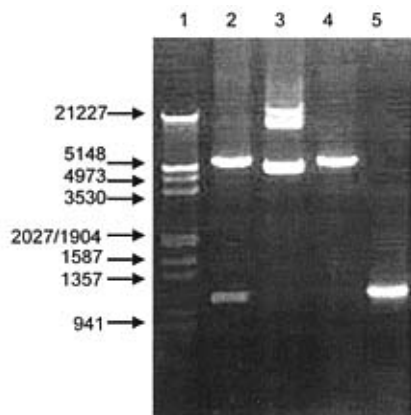


图 3.4 重组质粒 pET28a-*efe* 酶切鉴定及 PCR 鉴定

Fig. 3.4 Identification of pET28a-*efe* by double endonucleases enzyme digestion and PCR

1. Marker (ADNA/*Hind*III&*Eco*R I)
2. pET28a-*efe*/*Eco*R I &*Hind*III
3. pET28a-*efe*
4. pET28a/*Eco*R I
5. pET28a-*efe* 为模板扩增 *efe* 基因

3.2 *efe* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达

大肠杆菌 BL21(pET28a-*efe*)经过 4 个小时的诱导表达，超量表达的蛋白条带约为 45kDa，由于是融合表达，去掉来自载体 pET28a 上的约 4kDa 的融合氨基酸，剩余分子量与乙烯形成酶的理论计算值 3.9kDa 相符，其表达量可达总蛋白的 45%，说明 *efe* 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中得到了高效表达。

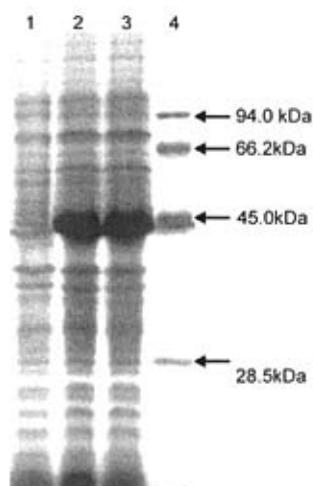


图 3.5 *efe* 基因表达图谱

Fig. 3.5 Expression of *efe* gene

- 1 *E. coli* BL21(pET28a)诱导表达
- 2,3 *E. coli* BL21(pET28a-*efe*)诱导表达
- 4 蛋白 Marker

3.3 乙烯生产菌株 *E. coli* BL21(DE3) (pET28a-*efe*) 的产乙烯情况

3.3.1 *E. coli* BL21 (pET28a-*efe*) 生产乙烯的能力的确定

E. coli BL21 (pET28a-*efe*) 在密闭试管中培养 24h 后，抽取顶端气体利用气相色谱检测乙

烯的产生(图 4)。从图谱中可以看到在 0.24min 处有明显的峰出现,这与标准乙烯所出现的位置一致,而经过同样处理的 *E.coli* BL21 (pET28a) 在此位置无明显峰出现。结果表明 *eFe* 基因可以赋予大肠杆菌产生乙烯的能力。

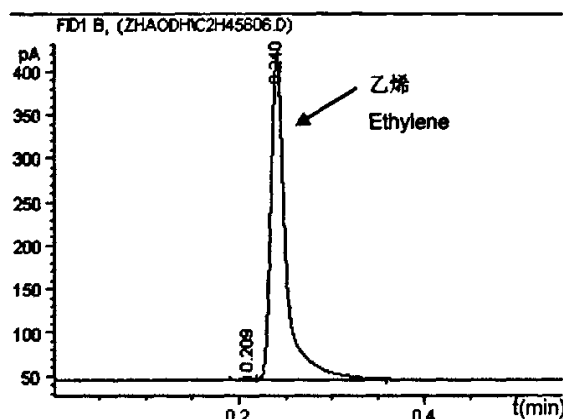


图 3.6 *E. coli* BL21(pET28a-*eFe*)经诱导表达后产生的气体气相色谱分析图谱

Fig. 3.6 Identification of ethylene produced by recombinant strain *E. coli* BL21 (pET28a-*eFe*)

3.3.2 *E. coli* BL21(pET28a-*eFe*)乙烯的产生与菌体生长时期的关系

测定 *E. coli* BL21(pET28a-*eFe*)乙烯产率的培养基为含 2%葡萄糖的 LB 培养基,测定方法见第二章 2.10.4,测定结果见图 3.7,从图中可以看出每毫升菌液的最高乙烯产率 3.57 μ l/ml/h 出现在接种后的第 7 个小时,属于菌体对数生长中期。单位菌体的最高乙烯产率为 0.99 μ l/ml/OD₈₀₀/h,出现在接种后的第 1 个小时,以后逐渐下降,在第 7 个小时单位菌体的乙烯产率为 0.76 μ l/ml/OD₈₀₀/h,在第 11 个小时后急剧下降,直至接近 0。这种现象的原因可能是随着菌体迅速的生长,前体(葡萄糖)物质的迅速转化,导致后期底物的枯竭,表现为乙烯产率急剧下降。

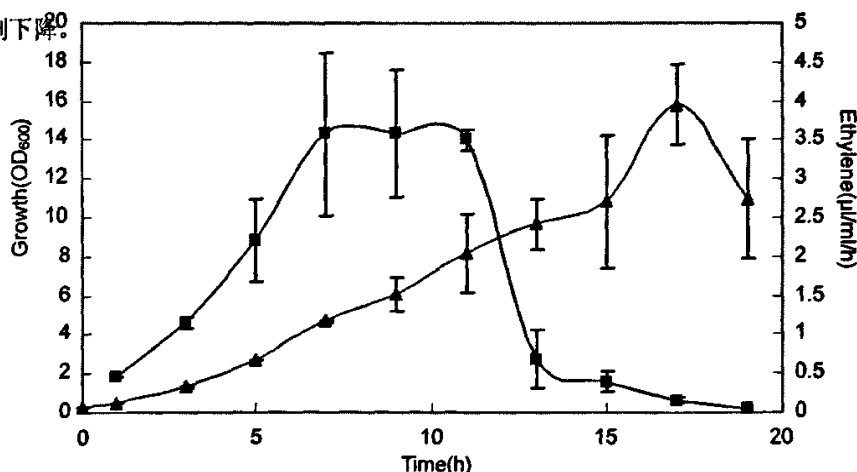


图 3.7 *E. coli* BL21 (pET28a-*eFe*) 菌体生长(▲)与生产乙烯(■)的关系

Fig. 3.7 Growth kinetics(▲) and ethylene production(■) by *E. coli* BL21(pET28a-*eFe*)

3.3.3 乙烯生产对 *E. coli* BL21 菌体生长的影响

将 *E. coli* BL21(pET28a-efe)与 *E. coli* BL21(pET28a)在 3.3.2 中相同条件下培养,测定二者菌体生长曲线进行比较(图 3.8),从结果中可以发现 *E. coli* BL21(pET28a-efe)的生长速度是明显高于 *E. coli* BL21(pET28a)的。其原因可能是 *E. coli* BL21(pET28a-efe)中菌体利用了 T7 强启动子进行了外源基因的过量表达,虽然这可能会对菌体造成一定程度的代谢压力,但是由于产生的乙烯形成酶可以转化葡萄糖为乙烯,因此可以消减培养基存在的葡萄糖对菌体生长的抑制,而 *E. coli* BL21(pET28a)中由于无乙烯形成酶的产生,从而表现出了明显的葡萄糖对菌体生长的抑制作用。

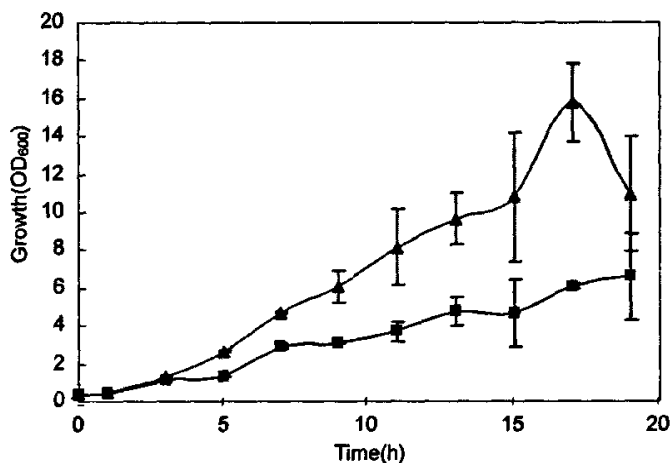


图 3.8 *E. coli* BL21(pET28a-efe) (▲)与 *E. coli* BL21(pET28a) (■)的生长比较

Fig. 3.8 Comparison of growth between *E. coli* BL21(pET28a-efe) (▲) and *E. coli* BL21(pET28a)(■)

3.3.4 *E. coli* BL21(pET28a-efe)和 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 乙烯产率的比较分析

将 *E. coli* BL21(pET28a-efe)和 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 在各自产乙烯培养基(见 1.2)中按照 2.10.4 的方法进行培养,可以发现二者乙烯的产率变化模式(图 3.9)有很大的不同, *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 由于本身生长较慢,葡萄糖做为乙烯的前体在较长的一段时间内是充足的,随着菌体的生长,转化乙烯的能力也在上升,所以乙烯产率($\mu\text{l/ml/h}$)一直保持一个上升状态,到后期逐渐趋于稳定。与此相反 *E. coli* BL21(pET28a-efe)由于生长迅速,而且 *efe* 基因在 T7 强启动子下过量表达,一开始就表现出了最强的乙烯产率($\mu\text{l/ml/OD}_{600}/\text{h}$)(见 3.3.2),在菌体的对数生长中期乙烯前体葡萄糖量就表现为严重不足,从而出现了乙烯产率急剧下降的现象,这说明 *E. coli* BL21(pET28a-efe)转化葡萄糖为乙烯的能力是要强于 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 的。

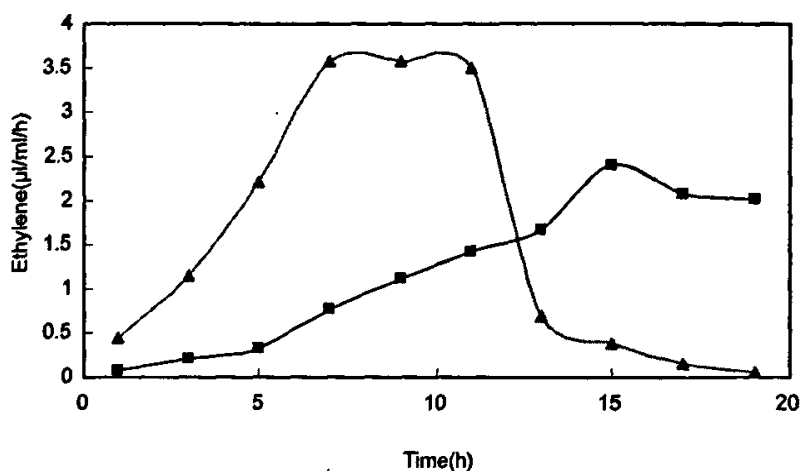


图 3.9 *E. coli* BL21(pET28a-efe)与 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 乙烯产率(μl/ml/h)变化的比较

Fig. 3.9 Comparison of the ethylene production(μl/ml/h) between *E. coli* BL21(pET28a-efe) and *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189

4 利用三磷酸甘油醛脱氢酶启动子在假单胞菌中表达乙烯形成酶基因

4.1 质粒 pDSK-Pgap-efe 的构建

三磷酸甘油醛脱氢酶是生物体内广泛存在的一种酶,在糖酵解中发挥着重要的作用,在体内呈组成型表达。本实验利用了三磷酸甘油醛脱氢酶的启动子序列(Pgap)来带动乙烯形成酶基因在 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 中表达。首先将含有 *EcoR* I 和 *Hind*III 酶切位点的 *efe* 基因连接到 pBluescript II SK(+)中(命名为 pBlue-*efe*),再利用载体上的 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点,将从 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 基因组中克隆得到的三磷酸甘油醛脱氢酶启动子片段 Pgap 连到 pBlue-*efe* 上,形成 pBlue-Pgap-*efe*,然后利用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 将 Pgap 和 *efe* 一起切下,连入可在丁香假单胞菌的复制的质粒 pDSK519 中,形成重组质粒 pDSK-Pgap-*efe* (图 3.10)。Pgap-*efe* 片段包括丁香假单胞菌三磷酸甘油醛脱氢酶启动子区 459bp 及其后的起始编码序列 9bp,后面由 *EcoR* I 酶切位点(GAATTC)连有完整的 *efe* 基因编码序列(1053bp)。重组质粒的 PCR 鉴定见图 3.11。

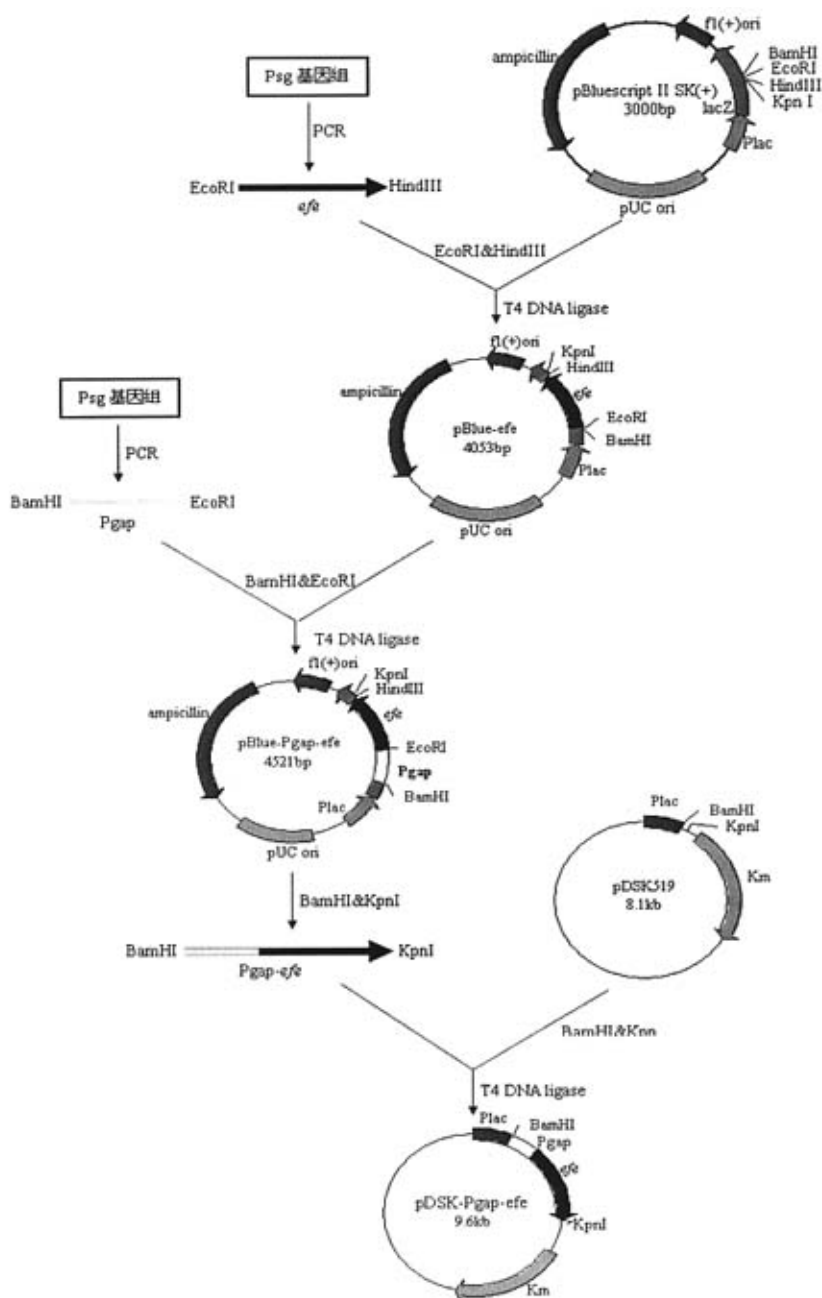


图 3.10 表达载体 pDSK-Pgap-efe 的构建

Fig. 3.10 Construction of expression vector pDSK-Pgap-efe

Psg: *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189

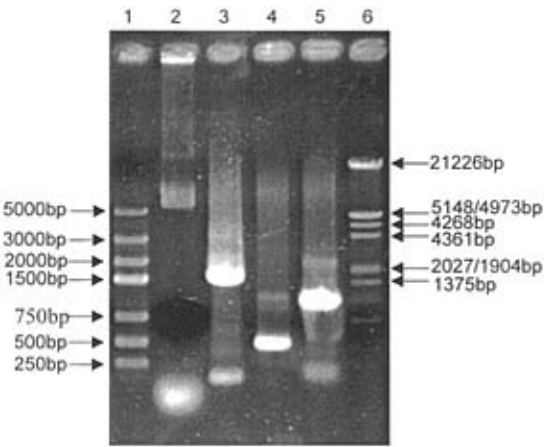


图 3.11 重组质粒 pDSK-Pgap-efe 的 PCR 验证

Fig. 3.11 Identification of recombinant plasmid

pDSK-Pgap-efe by PCR

- 1, Marker3
- 2, pDSK-Pgap-efe
- 3, Pgap-efe PCR product
- 4, Pgap-efe PCR product
- 5, efe PCR product
- 6, NEcoR I & HindIII

4.2 含重组质粒 pDSK-Pgap-efe 的丁香假单胞菌-*P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189(pDSK-Pgap-efe)的获得

用重组质粒 pDSK-Pgap-efe 电转化 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 后,涂于含 25μg/ml 卡那霉素的 KB 固体平板上进行筛选,挑取长出的菌落做 PCR 验证(图 3.12)。从电泳结果可看出转化后的 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 能够扩出 Pgap-efe 片段,证明了重组质粒的转入。

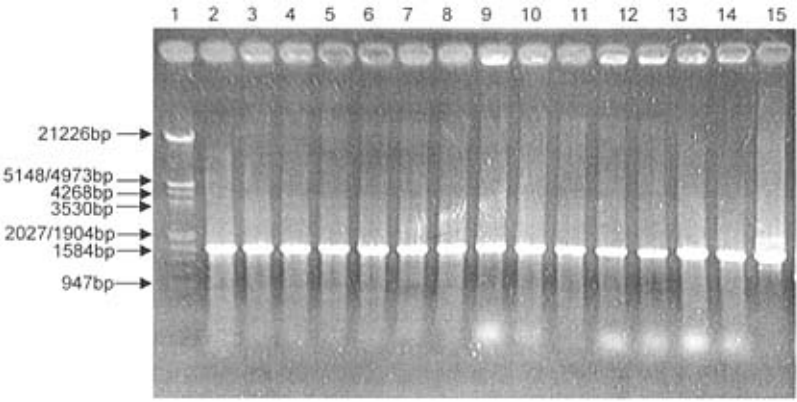


图 3.12 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 (pDSK-Pgap-efe) 的 PCR 鉴定

Fig. 3.12 Identification of *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 (pDSK-Pgap-efe) 的 PCR by PCR

- 1, NEcoR I & HindIII
- 2-14, Pgap-efe PCR product using *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 (pDSK-Pgap-efe) as template
- 15, Pgap-efe PCR product using pDSK-Pgap-efe as template

4.3 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 (pDSK-Pgap-efe) 与 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 的乙烯产率比较

培养方法及测定方法同 1.2, 二者的乙烯产率($\mu\text{l/ml/OD}_{600}/\text{h}$)比较见图 3.13, 从图中可以看出虽然 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 (pDSK-Pgap-efe) 中引入了多拷贝的乙烯基因, 并且由宿主本身组成型启动子带动表达, 但是与 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 相比, 并没有表现出更高的乙烯产率($\mu\text{l/ml/OD}_{600}/\text{h}$), 这说明在乙烯的合成途径中, 乙烯形成酶所催化的反应可能不是控制乙烯产率的关键步骤, 单纯增加乙烯形成酶的表达量并不能提高乙烯的产率。

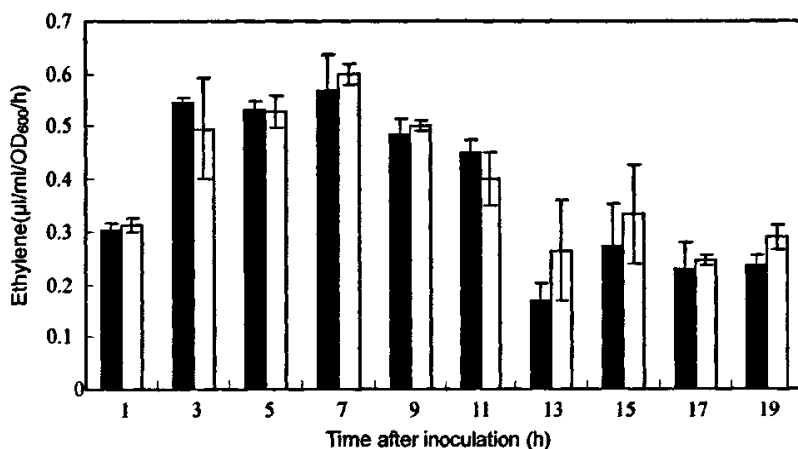


图 3.13 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189(pDSK-Pgap-efe)(■)与 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189(□)的乙烯产率($\mu\text{l/ml/OD}_{600}/\text{h}$)比较

Fig. 3.13 Comparison of ethylene production($\mu\text{l/ml/OD}_{600}/\text{h}$) between *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189(pDSK-Pgap-efe)(■) and *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189(□)

5 乙烯形成酶基因在谷氨酸棒杆菌中表达

谷氨酸棒杆菌是食用味精(谷氨酸钠)的主要生产菌株, 具有非常高效率的谷氨酸生产能力, 考虑到谷氨酸的直接前体是 α -酮戊二酸, 因此有理由认为谷氨酸棒杆菌产生 α -酮戊二酸的能力也应该是强势的。本课题中的乙烯形成的直接前体也是 α -酮戊二酸, 所以将乙烯形成酶在谷氨酸棒杆菌中进行表达, 利用体内的强势的谷氨酸途径, 来进行乙烯的生产, 是一个很好的尝试。本课题选择的供试菌株为谷氨酸棒杆菌的标准菌株 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032。

5.1 谷氨酸棒杆菌表达载体的构建

5.1.1 pZ8-1-*efe* 的构建

pZ8-1-*efe* 的构建是直接利用前面已经构建好的表达质粒 pET28a-*efe*，从中用 *EcoR* I 和 *Xho* I 切下 *efe* 片段，然后利用 *Xho* I 和 *Sal* I 的同尾特性将其连入经过 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切的 pZ8-1 中（图 3.14），由载体上的 *tac* 启动子带动基因的表达。重组质粒的鉴定见图 3.15。

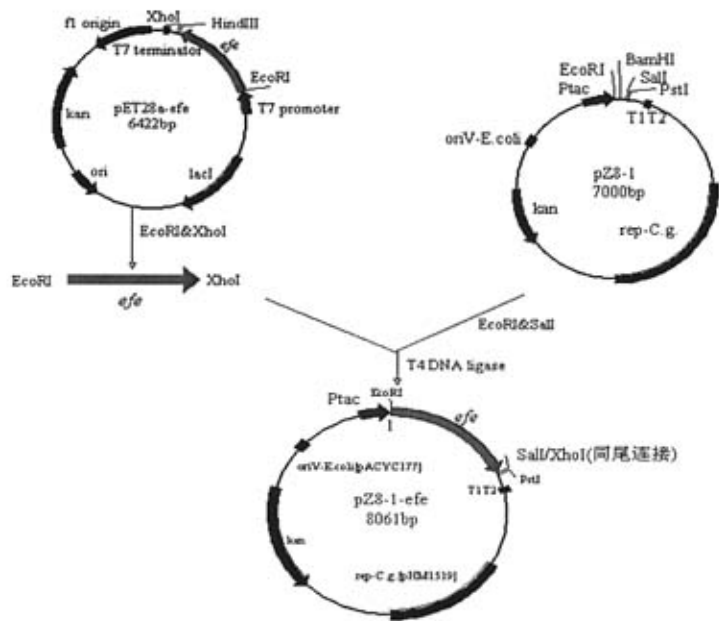


图 3.14 pZ8-1-*efe* 的构建

Fig. 3.14 Construction of pZ8-1-*efe*

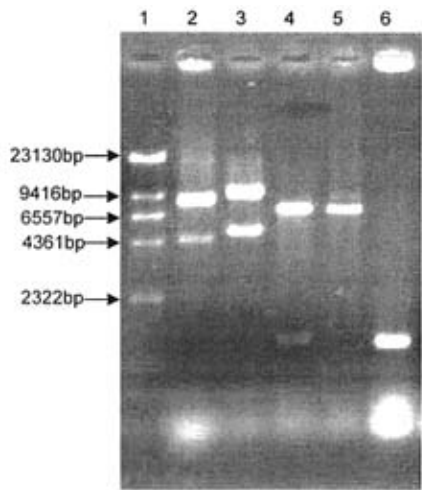


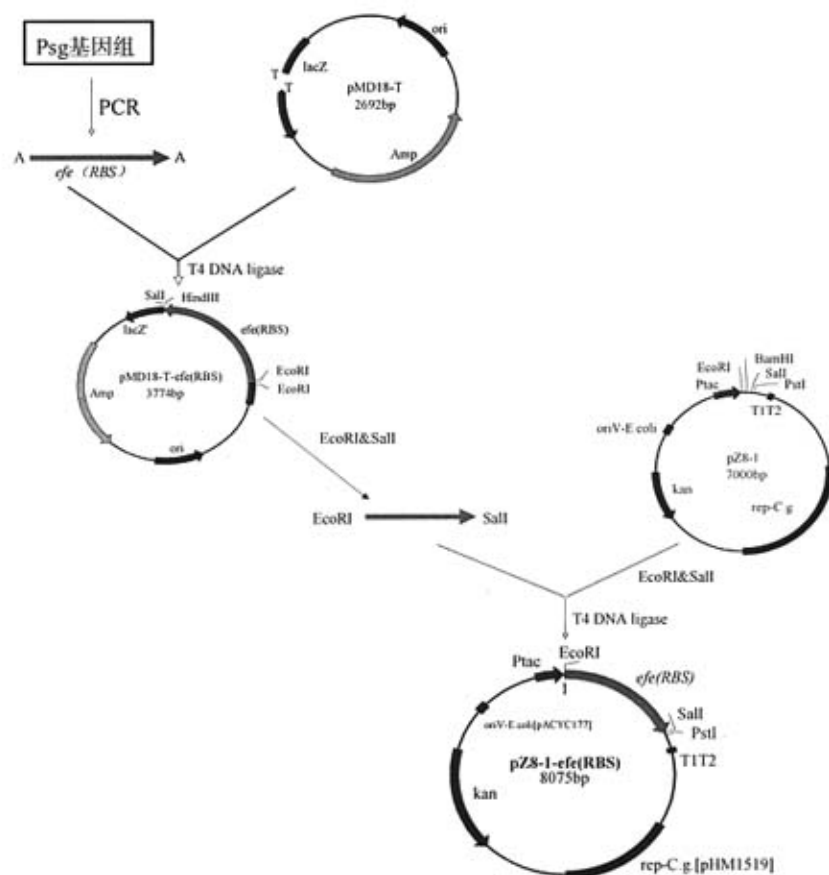
图 3.15 pZ8-1-*efe* 的鉴定

Fig. 3.15 Identification of pZ8-1-*efe*

- 1, *N*HindIII
- 2, pZ8-1
- 3, pZ8-1-*efe*
- 4, pZ8-1-*efe*/EcoRI & PstI
- 5, pZ8-1/EcoRI & PstI
- 6, *efe* PCR product using pZ8-1-*efe* as template

5.1.2 pZ8-*efe*(RBS)的构建

根据 Ruckert 等 (2003) 的方法, 在 *efe* 基因前段合适距离引入一段谷氨酸棒杆菌的 RBS 序列 (核糖体结合位点) (引物序列见第二章 1.3), 以提高翻译效率。将此片段连入 pZ8-1 中, 形成 pZ8-1-*efe* (RBS), 具体构建过程见图 3.16, 重组质粒鉴定见图 3.17。

图 3.16 pZ8-1-*efe*(RBS)的构建Fig. 3.16 Construction of pZ8-1-*efe*(RBS)

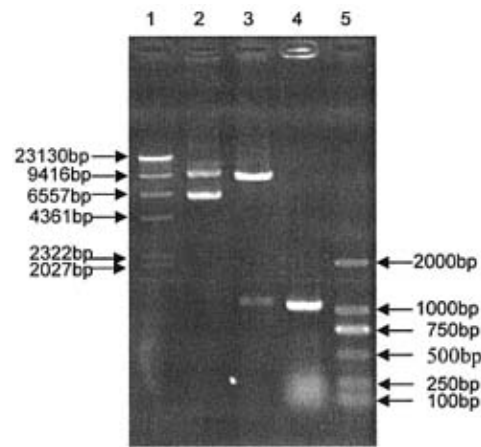


图 3.17 pZ8-1-*efe*(RBS)的鉴定
Fig. 3.17 Identification of pZ8-1-*efe*(RBS)
1, λ HindI
2, pZ8-1-*efe*(RBS)
3, pZ8-1-*efe*(RBS)/EcoR I &Sal I
4, *efe*(RBS) PCR product using
pZ8-1-*efe* as template
5, DL2000

5. 1. 3 pZPE 的构建

根据发表的 *efe* 基因序列 (D13182)，设计引物扩增含有乙烯形成酶基因启动子序列的 *efe* 基因片段 (1.5kb)，所引入的酶切位点与 *efe* (RBS) 片段相同，将此片段连入 pZ8-1 形成重组质粒 pZPE，在这个质粒中 *efe* 基因由自身的启动子控制表达。pZPE 具体的构建过程与 4.1.2 的 pZ8-1-*efe*(RBS)构建方法相似。重组质粒 pZPE 的酶切鉴定见图 3.18。

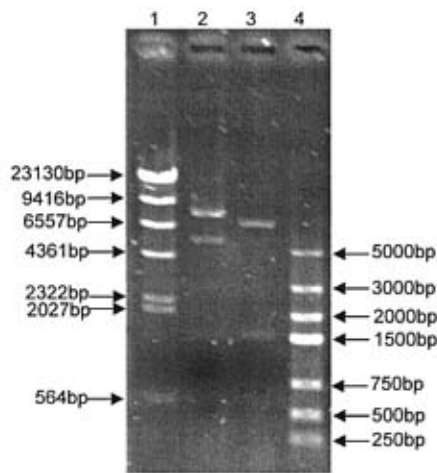


图 3.18 重组质粒 pZPE 的鉴定
Fig. 3.18 Identification of
recombinant plasmid pZPE
1, λ HindIII
2, pZPE
3, pZPE/EcoR I &Sal I
4, Marker3

5. 1. 4 pJC1-Pgap'-*efe* 的构建

三磷酸甘油醛脱氢酶是糖酵解途径的一种关键酶，呈组成型表达，因此我们尝试利用三磷酸甘油醛脱氢酶的启动子 (Pgap'，加 ' 是为了与 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 中三磷酸甘油醛脱氢酶的启动子 Pgap 相区别) 来带动乙烯形成酶基因在 *C. glutamicum* ATCC13032 中

表达。直接根据已公布的 *C. glutamicum* ATCC13032 全基因组序列设计引物（见第二章 1.3），扩增 *Pgap* 片段，构建成重组质粒 *pJC1-Pgap'-efe*，构建流程见图 3.19，鉴定见图 3.20。*Pgap'-efe* 片段组成为三磷酸甘油醛脱氢酶基因起始编码区 45bp 及其上游 456bp 通过 *Pst* I 酶切位点（CTGCAG）和 *Eco*R I 酶切位点（GAATTC）共 12bp 连接完整的 *efe* 基因编码序列（1053bp）。

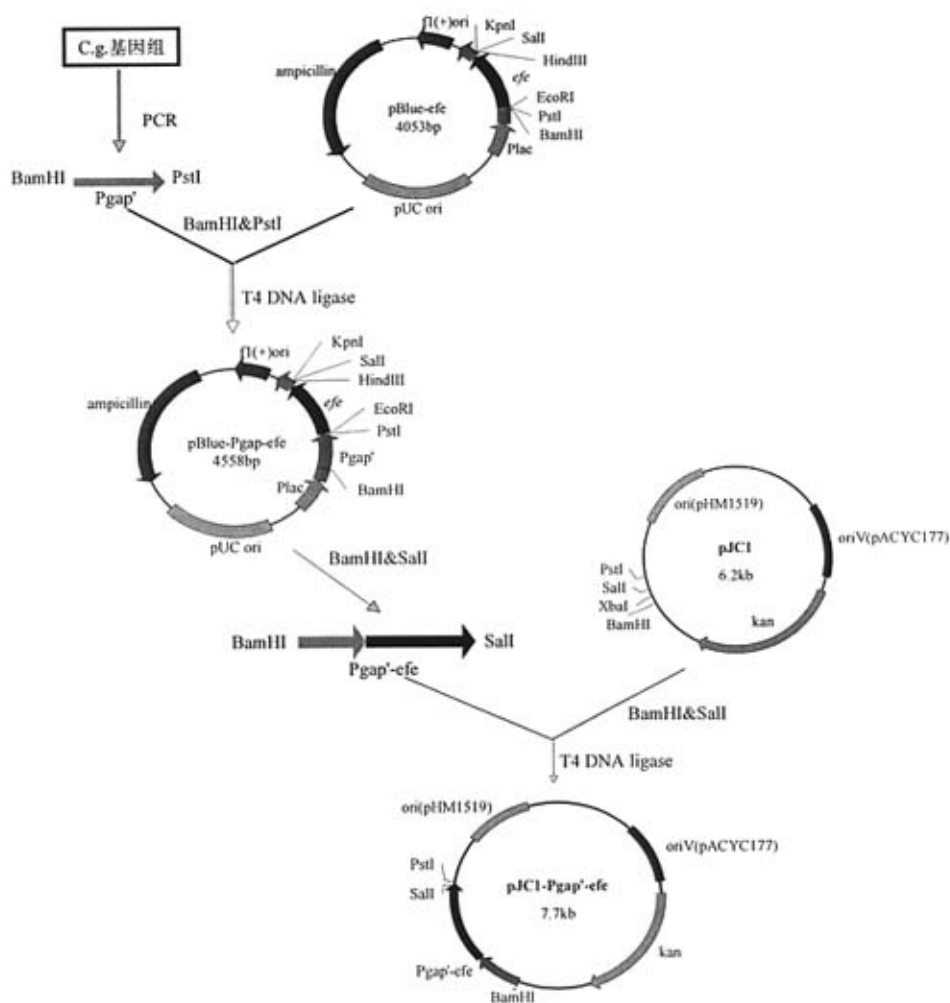
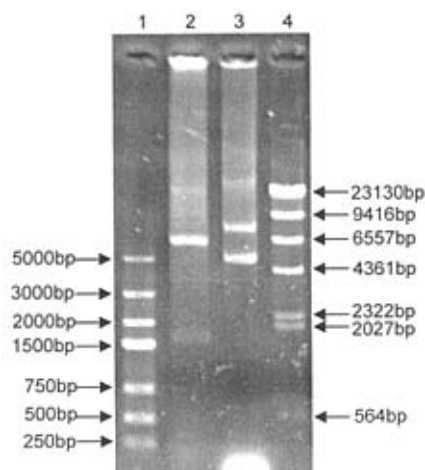


图 3.19 重组质粒 *pJC1-Pgap'-efe* 的构建

Fig. 3.19 Construction of recombinant plasmid *pJC1-Pgap'-efe*

C.g.: *C. glutamicum* ATCC13032



5.1.5 pJC1-Pgdh-efe 的构建

谷氨酸棒杆菌中能够大量产生谷氨酸是靠谷氨酸脱氢酶来催化的，因此我们也选用了谷氨酸脱氢酶的启动子 (Pgdh) 来带动 *efe* 的表达。pJC1-Pgdh-efe 的构建流程与 pJC1-Pgap'-efe 的过程大体相同，只是 Pgdh 片段的酶切位点为 *Bam*H I 和 *Eco*R I，其它均相同，重组质粒的鉴定见图 3.21。pJC1-Pgdh-efe 中 Pgdh-efe 的序列组成为谷氨酸脱氢酶的起始编码序列 21bp 及其上游序列 580bp 通过 *Eco*R I 酶切位点(GAATTC) 连接完整的 *efe* 基因编码序列 (1053bp)。

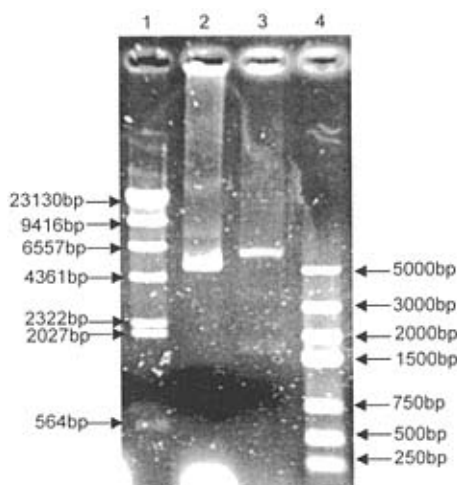


图 3.21 重组质粒 pJC1-Pgdh-efe 的鉴定

Fig. 3.21 Identification of recombinant plasmid pJC1-Pgdh-efe

- 1, λ /HindIII
- 2, pJC1-Pgdh-efe
- 3, pJC1-Pgdh-efe/*Bam*H I & *Sal* I
- 4, Marker3

5.2 含乙烯形成酶基因的谷氨酸棒杆菌产乙烯情况

将上述五种 *efe* 的表达质粒电转化导入 *C. glutamicum* ATCC13032(以下简称 Cg)中，得到

五个菌株 Cg (pZ8-1-*efe*)、Cg(pZ8-1-*efe*(RBS))、Cg(pZPE)、Cg(pJC1-Pgap'-*efe*)、Cg(pJC1-Pgdh-*efe*)。用含 2%葡萄糖的 LB 为培养基，按照第二章 2.10.3 的方法，进行上述五个菌株的培养，所产生的气体色谱检测见图 3.22。结果显示五个菌株相对于野生型的 *C. glutamicum* ATCC13032 均没有表现出乙烯的产生能力，也就是说导入 *efe* 基因并没有赋予 *C. glutamicum* ATCC13032 产生乙烯的能力。

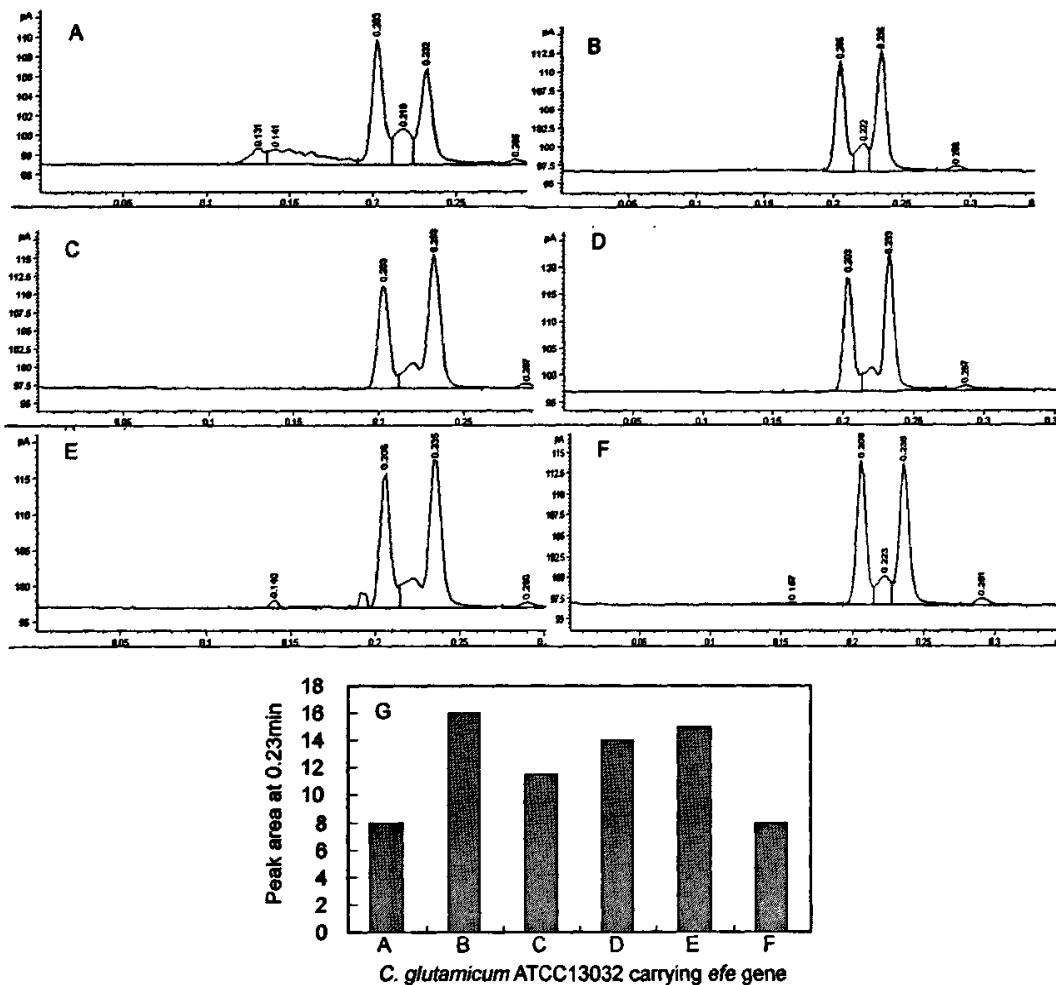


图 3.22 含乙烯形成酶基因的 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 产生的气体气相色谱分析

Fig. 3.20 Gas chromatograph of gas produced by *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 carrying *efe* gene

- A. *C. glutamicum* ATCC13032
- B. *C. glutamicum* ATCC13032(pZ8-1-*efe*)
- C. *C. glutamicum* ATCC13032(pZ8-1-*efe*(RBS))
- D. *C. glutamicum* ATCC13032(pZPE)
- E. *C. glutamicum* ATCC13032(pJC1-Pgap'-*efe*)
- F. *C. glutamicum* ATCC13032(pJC1-Pgdh-*efe*)
- G. Comparison of the peak area at 0.23min among A, B, C, D, E, and F.

6 讨论

6.1 产乙烯的 KGA 途径在自然界中的稀有性及 *efe* 基因的保守性

由于自然界的中乙烯的主要作用是调控植物的生长发育,并且在一些微生物侵染植物的过程中具有重要的助侵染作用,所以我们分离产乙烯的微生物主要从与植物相关的细菌入手。我们采集了多种植物的病叶,希望从中尽可能多的分离出植物内生菌及致病菌,还从其他实验室和菌种保藏中心收集了一些植物致病菌。利用气相色谱仪对每株菌所产生的气体进行分析,结果从 2000 余株细菌中我们发现只有 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 能够比较高效的产生乙烯。这个结果与已有的文献报道相似。Goto(1985)等人在农杆菌,棒杆菌,欧文氏菌,假单胞菌,黄假单胞菌共计 196 株细菌中发现只有来源于葛藤(Kudzu)的丁香假单胞菌菜豆致病变种具有高产乙烯的活性,Sato(1987)等人在多种丁香假单胞菌的不同变种中通过气相色谱筛选发现只有引起大豆黄萎病的大豆致病变种可以高产乙烯,后来 Sato(1997)等人又从丁香假单胞菌的 43 个变种 157 株菌中筛选得到了麻致病变种和芝麻致病变种可以高产乙烯,从现在的研究结果来看,可以高产乙烯的细菌只存在于丁香假单胞菌的菜豆致病变种(葛藤宿主菌株),大豆致病变种,麻致病变种,芝麻致病变种这四个变种中,本课题中的产乙烯细菌就属于其中的大豆致病变种。

根据已经发表的乙烯形成酶基因的序列设计引物从 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 中扩增 *efe*,测序后与已有的乙烯形成酶基因序列比对,可以发现这株菌的 *efe* 与已发表的丁香假单胞菌芝麻致病变种 AF101060 和 AB025277、麻致病变种 AF101059 及大豆致病变种 AF101057 中的 *efe* 基因序列完全一致,与丁香假单胞菌菜豆致病变种 D13182 和 AF101058 中的 *efe* 基因有 2 个碱基的差别。翻译后的氨基酸序列有 1 个氨基酸的差别。从这些结果我们可以看出 KGA 途径在自然界中的存在具有严格的菌株特异性,并且途径中的乙烯形成酶基因在序列上也是高度保守的。

6.2 大肠杆菌是构建高产乙烯工程菌株的优良宿主

克隆得到的 *efe* 基因在 T7 启动子的带动下可以在大肠杆菌中进行过量表达,由于大肠杆菌具有较快的生长速度,和较好的葡萄糖吸收能力,因此在合适的条件下能够比较高效转化葡萄糖为乙烯。具体表现为:第一,大肠杆菌的最高乙烯产率 3.57 $\mu\text{l/ml/h}$ 要高于假单胞菌的最高乙烯产率 2.4 $\mu\text{l/ml/h}$;第二,大肠杆菌在接种后在很短的时间内就可以达到其最高差率,而假单胞菌则需要一个较长的时间才能达到。大肠杆菌在达到最高产率后会急速下降,是批量培养中葡萄糖快速消耗的表现,所以在以后的实际生产中,进行补料发酵应该会维持这一产率;第三,大肠杆菌无论是实际发酵生产还是理论基础,都得到广泛了的研究,因此开发高产乙烯的大肠杆菌将获得很强的技术支持。

在 *efe* 基因表达的过程中,在 25℃、30℃、37℃ 均严重形成包涵体,对于乙烯产率的提高防止包涵体的形成是一个重要的工作。另外去除 α -酮戊二酸代谢支路和增强向 α -酮戊二酸的代谢流

的代谢工程改造将会对乙烯产率的提高具有重要意义。

6.3 乙烯形成酶基因可能不是KGA途径中控制乙烯产率的关键因素

利用丁香假单胞菌本身的三磷酸甘油醛脱氢酶基因的启动子,来加强乙烯形成酶基因在宿主中的表达,但是实际结果是工程菌株与野生型菌株并没有表现出更高的乙烯产率。在KGA途径中,乙烯的直接前体是 α -酮戊二酸,而 α -酮戊二酸又是三羧酸循环中的一个中间产物,并且还可以接受其它物质传递的氨基,转变为谷氨酸起到氨基载体的作用。由于 α -酮戊二酸的重要生理作用,所以其在细胞内自由存在并且可以转化为乙烯的量是受到严格调控的,所以单纯增加乙烯形成酶的量并没有表现为乙烯产率的上升。从这个角度讲,设法增强 α -酮戊二酸合成和减弱 α -酮戊二酸的其它利用支路或许能够增加乙烯的产率。

6.4 乙烯形成酶基因不能赋予谷氨酸棒杆菌产乙烯的能力

谷氨酸棒杆菌中谷氨酸生产途径与KGA途径仅最后一步是不同的,因此利用前者强势的谷氨酸生产途径来进行乙烯的生产应该是一个很好的设想。本课题中利用五种不同的表达模式使乙烯形成酶基因在棒杆菌中进行表达,这其中包括在棒杆菌中已经广泛使用的tac启动子、本身的组成型启动子及乙烯形成酶的启动子,但是构建出的工程菌株均没有表现出乙烯的生产能力。分析其原因可能是:第一,乙烯形成酶在棒杆菌表达后不能稳定存在,或是不能够正确折叠形成有活性的三级结构,致使其不能发挥其酶学作用;第二,即使乙烯形成酶能够形成具有酶活性的三级结构,但是由于胞内某些物质的抑制作用,或是乙烯形成酶发挥酶活性需要的某些因子而宿主不能够提供,致使其不能发挥其酶学作用。具体的原因需要进一步的实验确认。

第四章 结论

1. 确定 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 具有产生乙烯的能力, 在含 2% 的葡萄糖的 KB 培养基中, 25℃, 160rpm 振荡培养条件下, 最高乙烯产率为 2.4 μ l/ml/h (OD_{600} =7.22), 单位菌体的最高乙烯产率为 0.6 μ l/ml/ OD_{600} /h (此时 OD_{600} =1.283)。
2. 从 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 中能够扩增出乙烯形成酶基因 (*efe*), 测序后序列比对发现与丁香假单胞菌芝麻致病变种 AF101060 和 AB025277、麻致病变种 AF101059 及大豆致病变种 AF101057 中的 *efe* 基因序列完全一致, 与丁香假单胞菌菜豆致病变种 D13182 和 AF101058 中的 *efe* 基因有 2 个碱基的差别, 说明 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 中产乙烯的方式为 KGA 途径。
3. *efe* 在 T7 启动子带动下能够在 *E. coli* BL21 (DE3) 中过量表达, 并且能够赋予大肠杆菌产生乙烯的能力。在含 2% 的葡萄糖的 LB 培养基中, 25℃, 160rpm 振荡培养条件下, 最高乙烯产率为 3.57 μ l/ml/h (OD_{600} =6.07), 单位菌体的最高乙烯产率为 0.99 μ l/ml/ OD_{600} /h (此时 OD_{600} =0.455)。
4. 在 *P. syringae* pv. *glycinea* ICMP2189 利用细菌本身的三磷酸甘油醛脱氢酶启动子带动乙烯基因的表达, 并不能增加宿主菌的乙烯产率, 说明乙烯形成酶可能不是 KGA 途径中控制乙烯产率的关键因素。
5. 在 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 中利用 tac 启动子, 本身的三磷酸甘油醛脱氢酶启动子, 谷氨酸脱氢酶启动子及乙烯形成酶的启动子带动乙烯形成酶基因表达, 并不能赋予宿主菌产生乙烯的能力。

参考文献

1. Adams D O, and Yang S F, Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76:170-174.
2. Ahmad Z Zahir, Arshad M, Response of *Brassica carinata* and *Lens culinaris* to the ethylene precursors L-methionine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30(14): 2185-2188.
3. Amagai A and Maeda.Y. The ethylene action in the development of cellular slime molds : An analogy to higher plants. *Protoplasma*, 1992, 167: 159-168.
4. Amagai A. Induction by ethylene of macrocyst formation in. the cellular slime mould. *Dietyostelium mucoroides*. *J Gen Microbiol*, 1984, 130: 2961-2965.
5. Arshad M and Frankenberger W T Jr. Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil*, 1990a, 133, 1-8.
6. Arshad M, Frankenberger WT Jr. Response of *Zea mays* and *Lycopersicon esculentum* to the ethylene precursors, L-methionine and L-ethionine applied to soil. *Plant Soil*, 1990b, 122: 219-227.
7. Arshad M and W T Frankenberger Jr. Biosynthesis of ethylene by *Acremonium falciforme*. *Soil Biol.Biochem.*, 1989, 21: 633-638.
8. Arshad M, Frankenberger W T Jr. Influence of ethylene produced by soil microorganisms on etiolated pea seedlings. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 2728-2732.
9. Arshad Muhammad; Frankenberger W T. Microbial biosynthesis of ethylene and its influence on plant growth. *Advances in microbial ecology* 1992, 12: 69-111.
10. Arshad, M. and Frankenberger, W.T. Jr. Biosynthesis of ethylene by *Acremonium falciforme*. *Soil Biology and Biochemistry*, 1989, 21: 633-638.
11. Arshad M, and Frankenberger W T. *Ethylene: Agricultural Sources and Applications*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2002, pp. 140.
12. Axelrood-McCarthy P E, Linderman R G, Ethylene production by. cultures of *Cylindrocladium floridanum* and *C. scoparium*. *Phytopathl*, 1981, 71: 825-830.
13. Babiker H M and Pepper I L. Microbial production of ethylene on desert soils. *Soil Biol.Biochem.*, 1984, 16: 559-564.
14. Beyer E M, Morgan J P W, Yang S F. *Ethylene. Advanced Plant Physiology*. PITMAN Press, Bath, UK, 1984, p.111-126.
15. Biale J B. Effect of emanations from several species of fungi on respiration and color development of citrus fruits. *Science*, 1940, 91: 458-459.
16. Bibik N D, Letunova S V, Druchek E V, and Muromtsev G S. Effectiveness of a soil-acting ethylene producer in obtaining sanitized seed potatoes. *Russ. Agricul. Sci*. 1995, 9: 19-21.
17. Billington D C, Golding B T, and Promise S B. Biosynthesis from methionine. *Biochem. J.*, 1979, 182: 827-836.
18. Blöschke H Der Einfluß von Temperatur und Feuchtigkeit auf die Bildung von Äthylen

- in Fichtenstreu. Flora, 1977, 166: 203-209.
19. Bonner J T, Hormones in social amoebae, in: Hormonal Control of Growth and Differentiation, Vol.2, J. Lobue and A. S. Gordon, eds., Academic Press, New York, NY, 1973, 84-88.
20. Bormann E R, Eikmanns B J, Sahm H. Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. Molecular Microbiology, 1992, 6(3): 317-326.
21. Brown-Skrobot S K, Brown L R, and Filter T H Jr. Mechanism of ethylene and carbon monoxide production by *Septoria musiva*, Dev. Indust. Microbiol., 1985, 26: 567-573.
22. Brunbuber, N M, Mort J L, Chritoffersen, R E, and Reich N O. Steady-state mechanism of recombinant avocado ACC oxidase: Initial velocity and inhibitor studies, Biochem, 2000, 39: 10730-10738.
23. Burg S P. Ethylene in plant growth, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70: 591-597.
24. Certifiers S, Use H. Ethylene processing. TAP review, 1999, 25: 1-8.
25. Chalutz E, and DeVay J E. Production of ethylene in vitro and in vivo by *Ceratocystis fimbriata* in relation to disease development. Phytopathology, 1969, 59: 750-755.
26. Chandhoke V, Goodell B, Jellison J, Fekete F A. Oxidation of KTBA by iron-binding compounds produced by wood-decaying fungus *Gloeophyllum trabeum*. FEMS Microbiol Lett, 1992, 90: 236-266.
27. Chernys J, Kende H. Ethylene biosynthesis in *Regnillidium diphyllum* and *Marsilea quadrifolia*. Planta, 1996, 200: 113-118.
28. Chou T W, and Yang S F, The biogenesis of ethylene in *Penicillium digitatum*, Arch Biochem. Biophys., 1973, 157: 73-82.
29. Considine P J, Patching J W, Ethylene production by microorganisms grown on phenolic acids. Ann Appl Biol, 1975, 81: 115-119.
30. Cook R J, Smith A M. Influence of water potential on production of ethylene in soil. Can J Microbiol. 1977, 23(6): 811-817.
31. Da Silva E J, Henriksson E & Henriksson L E. Ethylene production by fungi. Plant Sci. Lett., 1974, 2: 63-66.
32. Davies P J. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In: P J Davies, ed. Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development, 1995, pp. 1-11.
33. Dimond A E and Waggoner P E. The cause of epinastic symptoms in Fusarium wilt of tomatoes. Phytopathol, 1953, 43: 663-669.
34. Dong J G, Fernandez-Maculet J C, and Yang S F. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane -1-carboxylate oxidase from apple fruit. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 9789-9793.
35. El-Sharoomy H M. Screening of ethylene-producing root-infecting fungi in Egyptian soil Mycopathologia, 1984, 85: 13-15.
36. Eikmanns J Bernhard. Identification Sequence Analysis and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate isomerase. Journal of Bacteriology, 1992, 174(19): 6076-6086.

37. Ezura H, Yuhashi K I, Yasuta T, Minamisawa K. Effect of ethylene on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to melon. *Plant Breeding*, 2000, 119(1): 75-79.
38. Frankenberger W T Jr, Phelan P J. Ethylene biosynthesis in soil: II. Kinetics and thermodynamics in the conversion of L-aminocyclo-. propane-L-carboxylic acid to ethylene. *Soil Sci Soc Am J*. 1985, 49: 1422-1426.
39. Fukuda H, Fujii T, Ogawa T. Preparation of a cell-free ethylene-forming system from *Penicillium digitatum*. *Agricultural and biological chemistry*. 1986, 50(4): 977-981.
40. Fukuda H, Fujii T, and Ogawa T. Production of ethylene by a growth-suppressed mutant of *Penicillium digitatum*, *Biotechnol. Bioengineer.*, 1988, 31: 620-623.
41. Fukuda H. Microbial production of gaseous hydrocarbons and tasks for its practical use(challenge to cope with unstable oil supply forecast in 21st century), *Chem. Economy. Engineer. Review*, 1984,16: 18-22.
42. Fukuda H, Ogawa T, Tazaki M, Nagahama K, Fujii T, Tanase S, and Morino Y Two reactions are simultaneously catalyzed by a single enzyme: The arginine-dependent simultaneous formation of two products, ethylene and succinate, from 2-oxoglutarate by an enzyme from *Pseudomonas syringae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992a, 188: 483-489.
43. Fukuda H, Ogawa T, Ishihara K, Fujii T, Nagahama K, Omata T, Inoue Y, Tanase S, Morino Y. Molecular cloning in *Escherichia coli*, expression, and nucleotide sequence of the gene for the ethylene-forming enzyme of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992b, 188(2): 826-832.
44. Fukuda H, T Fujii, and T Ogawa. Microbial production of C2-hydrocarbons, ethane, ethylene and acetylene. *Agric. Biol. Chem*, 1984, 48: 1363-1365.
45. Fukuda H, Takahashi M, Fujii T, and Ogawa T. Ethylene production from L-methionine by *Cryptococcus albidus*, *J. Ferment. Bioeng.*, 1989a, 67: 173-175.
46. Fukuda H, Kitajima H, Fujii T, Tazaki M, and Ogawa T. Purification and some properties of a novel ethylene-forming enzyme produced by *Penicillium digitatum*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1989b, 59: 1-6.
47. Fukuda H, Takahashi M, Fujii T, Tazaki M, and Ogawa T, , An NADH:Fe(III) EDTA oxidoreductase from *Cryptococcus albidus*: An enzyme involved in ethylene production in vivo? *FEMS Microbiol. Lett.*, 1989c, 60: 107-112.
48. Fukuda H. and Ogawa T. 1991. Microbial ethylene production. In: Matto A K and Suttle J.C. (eds), *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton, pp. 279-292.
49. Fukuda H. Heterologous expression of the gene for the ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Biotech. Lett.* , 1994, 16: 1-6.
50. Fukuda H, Ogawa T, and Tanase S. Ethylene production by microorganisms, *Adv. Microbiol. Physiol.*, 1993,35: 275-306.
51. Gasper T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid D M, and Thorpe T A. Plant hormones and plant growth regulation in plant tissue culture *In Vitro*. *Cell. Dev. Biol. Plant*, 1996, 32: 272-289.
52. Gibson M S, and Yong R E. Acetate and other carboxylic acids as precursors of ethylene, *Nature*, 1966,210: 529-530.

53. Gibson M S. Incorporation of pyruvate-C¹⁴ into ethylene by *Penicillium digitatum*, Sacc. Arch. Biochem. Biophys., 1964, 106: 312-316.
54. Goto M, and Hyodo H, Ethylene production by cell-free extract of the Kudzu strain of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, Plant Cell Physiol., 1987, 28: 405-414.
55. Goto M, Ishida Y, Takikawa Y, and Hyodo H. Ethylene production. by the Kudzu strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* causing halo. blight in *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi. Plant Cell Physiol. 1985. 26: 141-150.
56. Goto M, Ishida Y, Takikawa Y, et al. Ethylene production by the Kudzu Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* causing halo blight in *Pueria lobata* (Willd) Ohwi. Plant Cell Physiol, 1985, 26(1): 141-150.
57. Goto M, Yaguchi Y, and Hyodo H, Ethylene production. in citrus leaves infested with *Xanthomonas citri* and its relation. to defoliation. Physiol. Plant Pathol. 1980, 16: 343-350.
58. Graham J H and Linderman R G. Effects of ethylene on root growth, ectomycor-. rhizal formation, and *Fusarium* infection of Douglas-fir. Can. J. Bot., 1981, 59: 149-155.
59. Graham J H, Linderman R G. Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* sp. *pini*, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium*-infected Douglas-fir roots. Can. J. Microbiol., 1980, 26: 1340-1347.
60. Hanke M, and Dollwet H H A. The production of ethylene by certain soil fungi. Sci. Biol. J. 1976, 2:227-230.
61. He J, Ritalahti K M, Yang K L, Koenigsberg S S, Loffler F E. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. Nature, 2003, 424: 62-65.
62. Hill Thomas F Jr. and Lyda Stuart D. Gas exchanges by *Phymatotrichum omnivorum* in a closed, axenic system, Mycopathologia, 1976, 59: 143-147.
63. Hog L, and Cruits R W. Production of ethylene by fungi, Science, 1968, 159:1357-1358.
64. Hottiger T, and Boller T. Ethylene biosynthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp *tuplipae* proceeds from gulatmate/2-oxoglutamate and requires oxygen and ferrous ions, Arch. Microbiol, 1991, 157: 18-22.
65. Ince J E, and Knowles C J. Ethylene formation by cell-free extracts of *Echerichia coli*, Arch. Microbiol, 1986, 146: 151-158.
66. Ince J E, and Knowles C J. Ethylene formation by cultures of *Escherichia coli*, Arch. Microbiol. 1985, 141: 209-213.
67. Ishihara K, Matsuoka M, Inoue Y, et al. Overexpression and In Vitro Reconstitution of the Ethylene-Forming Enzyme from *Pseudomonas syringae*. Jomal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 79(3):205-211.
68. Ishihara K, Matsuoka M, Ogawa T, Fukuda H. Ethylene production using a broad-host-range. plasmid in *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas. putida*. J Ferment Bioeng, 1996, 82: 509-511.
69. Kapulnik, E, Matto, A K, Chalutz E, and Chet I, The relationship between the production of ethylene by certain fungi, their enzyme constitution, and their ability to accumulate intracellular phosphate. Z. Pflazemphysiol. 1983, 109: 347-354.
70. Kępczyński J, Bihun M, Kępczyńska E. Ethylene production by *Agrobacterium*

- rhizogenes* strains *in vitro* and *in vivo*. *Plant Growth Regul.*, 2003, 39:13-17.
71. Ketring D L, Yong R E, and Biale J B. Effects of monofluoroacetate on *Penicillium digitatum* metabolism and on ethylene biosynthesis, *Plant Cell Physiol.*, 1968, 9:617-631.
 72. Kevers C, Driessche T V, and Gaspar T. Relationship between ethylene and ethane production by whole *Acetabularia mediterranea* cells and by microsomal fractions. *Saussurea*, 1989, 19:121-123.
 73. Kreslavskii V D, Markarov A D, Brandt A B, Kiseleva M I, Mukhin E N, Ruziewa R Kh, Yakumin A F, and Rudendo T I. Effects of red light, phytohormones, and dichlorophenylurea derivatives on ethylene evolution by *Chlorella*. *Sov. Plant Physiol.* 1988, 35:889-896.
 74. Liberman M. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann Rev Plant Physiol*, 1979, 30: 533-591.
 75. Linderberg T, Granball U, and Berg B. Ethylene formation in some coniferous forest soils, *Sotl. Biol. Biochem.* 1979, 11: 637-643.
 76. Lynch J M. Identification of substrates and isolation of microorganisms responsible for ethylene production in soil. *Nature*, 1972, 240: 45-46.
 77. Mansouri S, and Bunch A. W. Bacterial ethylene synthesis from 2-oxo-4-thiobutyric acid and from methionine, *J. Gen. Microbiol.* 1989, 135: 2819-2827.
 78. Matsuda J, Okabe S, Hashimoto T and Yamada Y. Molecular cloning of hyoscyamine G beta-hydroxylase, a 2-oxoglutarate- dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266(15): 9460-9464.
 79. Matto A K, and Suttle J C, eds., *The plant hormone ethylene*. CRC Press, Boca Raton F L, 1991, p.337.
 80. Maymó-Gatell Xavier, Chien Yueh-tyng, Gossett James M., Zinder Stephen H. Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. *Science*, 1997, 276: 1568 -1571.
 81. Miller E V, Winston J R, Fisher D F. Production of epinasty by emanations from normal and decaying citrus fruits and from *Penicillium digitatum*. *Jour. Agric. Res.* 1940, 60: 269-277.
 82. Muromtsev G S, Letunova S V, Rentovich L N, Timpanova Z L, Gorbatenko IY, Shapoval, O A, Bibik N D, Stepanov G S, and Druchek Y V, Retprol-New Ethylene-Releasing Preparation of Soil Activity. *Russian Agri. Sci*, 1993. 109-115.
 83. Murr D P and Yang S F. Inhibition of *in vivo* conversion of methionine to ethylene by L-canaline and 2,4-dinitrophenol. *Plant Physiology*, 1975, 75:12-18.
 84. Nagahama K, Ogawa T, Fujii T, Tazaki M, Goto M, and Fukuda H. L-Arginine is essential for the formation *in vitro* of ethylene by an extract of *Pseudomonas syringae*, *J. Gen. Microbiol.*, 1991a, 137: 1641-1646.
 85. Nagahama K, Ogawa T, Fujii T, Tazaki M, Tanase S, Morino Y, Fukuda H. Purification and properties of an ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2. *J Gen Microbiol*, 1991b, 137(10): 2281-2286.
 86. Nagahama K, Yoshino K, Matsuoaka M, Sato M, Tanase S, Ogawa T and Fukuda H. Ethylene production by strains of the plant-pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* depends upon the presence of indigenous plasmids carrying homologous

- genes for the ethylene-forming enzyme microbiology, 1994, 140:2309-2313.
87. Nagahama K, Yoshino K, Matsuoka M, Tanase S, Ogawa T, Fukuda H. Site-Directed Mutagenesis of Histidine Residues in the Ethylene-Forming Enzyme from *Pseudomonas syringae*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 85(3): 255-258.
88. Nicherson W J. Ethylene as a metabolic product of the pathogens fungus, *Blastomyces dermatitidis*, Arch. Biochem., 1948, 17: 225-233.
89. Ogawa T, Takahashi M., Fujii T, Tazaki M, and Fukuda H. The role of NADH:Fe(III) EDTA oxidoreductase in ethylene formation from 2-keto-methylthiobutyrate. J. Ferment. Bioeng., 1990, 69: 287-291.
90. Ogawa Takahira, Sakai Miho, Matsuoka Masayoshi, Fukuda Hideo. Ethylene production by recombinant cyanobacteria, PLANT PHYSIOLOGY, 1997, 114 (3): 1576-1576, Suppl. S.
91. Osborne D J, Ethylene in leaf ontogeny and abscission, in: The Plant Hormone Ethylene, A. K Matto and J. C. Suttle, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, pp. 193-214.
92. Osborne D J, The ethylene regulation of cell growth in specific target tissues of plants, in: Plant Growth Substances, P. F. Wareing. ed., Academic Press, London, 1982, p.279.
93. Osborne D J, Walters J, Miborrow B V, Norville A, and Stange L M C. Evidence for a non ACC ethylene biosynthesis pathway in tower plants, Phytochem, 1996, 42:51-60.
94. Osborne D J. Ethylene in phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise. Volume I. Eds DS Letham, PB Goodwin and TJV Higgins. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978. pp.265-294.
95. Osborne D L. The control role of ethylene in plant growth and development, in: Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants, H. Clijsters et al., eds., Kluwe Academic Publishers, 1989, pp.1-11.
96. Pazout J, Wurst M, Vancura V. Effect of Aeration on Ethylene Production by Soil Bacteria and Soil Samples Cultivated in a Closed System. PLANT AND SOIL, 1981, 62: 431-437,
97. Peacock B C, and Muirhead I F. Ethylene production by *Colletotrichum musae*, Queensl. J. Agric. Anim. Sci., 1974, 31: 249-252.
98. Peiser G D, Wang T T, Hffinan N E, Yang S F, Liu H W, and Walsh C T. Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81:3059-3063.
99. Pratt H K, Goeschl J D. Physiological roles of ethylene in plants. Annual Review of Plant Physiology. 1969, 20: 541-584.
100. Primrose S B. Formation of ethylene by *Escherichia coli*, J. Gen. Microbiol. 1976a, 95: 159-165.
101. Primrose S B. Ethylene-forming bacteria from soil and water. J. Gen. Microbiol. 1976b, 97: 343-346.
102. Primrose S B. Evaluation of the role of methional, 2-keto-4-methylthiobutyric acid and peroxidase in ethylene formation by *Escherichia coli*, J. Gen. Microbiol. 1977, 98:519-528.

103. Primrose S B. Ethylene and agriculture: the role of the microbe. *J Appl Microbiol.*, 1979, 46:1-25.
104. Reid M S. Ethylene in plant growth, development and senescence, in: *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and molecular Biology*, P. J. Davies, ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995, pp.486-508.
105. Ruckert C, Puhler A, Kalinowski J. Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. *Journal of Bacteriology*, 2003, 104: 213-228.
106. Russo V E A., Halloran B, and Gallori E. Ethylene is involved in the autochemotropism of phycomyces, *Planta*, 1997, 134:61-67.
107. Sato M, Urushizaki S, Nishiyama K, et al., Efficient production of ethylene by *Pseudomonas syringae* which causes halo bright in Soybeans. *Agir Biol Chem*, 1987, 51(4):1177-1178.
108. Sato M, Watanabe K, Yazawa M, et al. Detection of new ethylene-producing bacteria, *Pseudomonas syringae* pv. *cannabina* and *sesami*, by PCR amplification of genes for the ethylene-forming enzyme. *Phytopathology*, 1997, 87:1192-1196.
109. Schwinde W Jorg, Thum-Schmitz Natalie, Eikmanns J Bernhard, Sahm Hermann. Transcriptional analysis of the gap-pgk-tpi-ppc gene cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(12): 3905-3908.
110. Sembdner G D, Gross H W, Liebisch G, Schneider. Biosynthesis and metabolism of plant hormones. In J Macmillan, ed, *Encyclopedia of Plant. Physiology*, New Series, Vol 9. Springer Verlag, Berlin, 1980, 281-444.
111. Smith A M and Cook R J. Implications of ethylene production by bacteria for biological balance of soil. *Nature*, 1974, 252: 703-705.
112. Smith K A, Restall S W F. The occurrence of ethylene in anaerobic soil. *European Journal of Soil Science*, 1971, 22(4): 430-443.
113. Smith K A, Russell R S. Occurrence of Ethylene, and its Significance, in *Anaerobic Soil Nature*, 1969, 222: 769 - 771.
114. Smith, A. M. Ethylene production by bacteria in reduced microsites in soil and some. implications to agriculture. *Soil Biol. Biochem.*, 1976, 8: 293-298.
115. Sutherland J B and Cook R J. Effects of chemical and heat treatments on ethylene. production in soil. *Soil Biol. Biochem.* 1980, 12: 357-362.
116. Suzelezyk E, Pokojaska A, Kampert M, Michalski L, and Kowalski S. Production of plant growth regulation by non-mycorrhizal fungi associated with the roots of forest trees, in: *Interrelationships between microoganasims and plants in soil*, Proc. Intl. Symp. Liblice. Czech. Y. Vancura and F. Kune(eds), Acad. Publ., Czech Acad. Sci. Prague, 1989, pp. 213-222.
117. Swanson B T, Wilkins H F, and Kennedy B W. Factors affecting ethylene production by some plant pathogenic bacteria, *Plant Soil*, 1979, 51: 19-26.
118. Swart A, and Kamerbeek G A, Different ethylene production *in vitro* by several species and formae speciales of *Fusarium*, *Neth. J. Plant Soil*, 1976, 51: 19-26.
119. Swart A, and Kamerbeek G A. Ethylene production and mycelium growth of the tulip strain of *Fusarium oxysporum* as influenced by the shaking of and oxygen supply to the culture medium, *Physiol. Plant*, 1977, 39: 38-44.

120. Takahama K, Matsuoka M, Nagahama K, Ogawa T. Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the *psbAI* locus. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(3): 302-305.
121. Tanaka H, Enoki A, and Fuse G. Correlation between ethylene production from α - or γ -methylthiobutyric acid and degradation of lignin dimeric model compounds by wood inhibiting fungi, *Mokuzai Gakkaishi*, 1986, 32: 125-135.
122. Thomas K C, and Spencer M. L-methionine as an ethylene precursor in *Saccharomyces cerevisiae*, *Can. J. Microbiol.* 1977, 23: 1669-1674.
123. Thomas R J, Harrison M A, Taylor J, and Kaufman P B, Endogenous auxin and ethylene in *Pellia*(Bryophyta), *Plant Physiol.*, 1983, 73:395-397.
124. Tittle F L. Auxin-stimulated ethylene production in fern gametophytes and sporophytes, *Phyiol. Plant*, 1987, 70:499-502.
125. Tzeng D D, and DeVay J E. Ethylene production and toxigenicity of methionine and its derivatives with riboflavin in cultures of *Verticillium*, *Fusarium*, and *Collectotrichum* species exposed to light, *Physiol. Plant*. 1984, 62: 545-552.
126. Walters J, and Osborne D J. Ethylene and auxin-induced cell growth in relation to auxin transport and metabolism and ethylene production in the semi-aquatic plant, *Regnellidium diphyllum*, *Planta*. 1979, 146:309-317.
127. Wang C H, Persyn A, and Krackov J. Role of Krebs cycle in the ethylene biosynthesis, 1962, 195: 1306-1308.
128. Ward T M, Wright M, Roberts J A, Self R, Osborne D.J. Analytical procedures for the assay and identification of ethylene. In: Isolation of plant growth substances. Society for experimental biology seminar series, Hillman, J.R., ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1978, 4: 135-151.
129. Watanabe K, Nagahama K, and Sato M. A conjugative plasmid carrying the *e*fe gene for the ethylene-forming enzyme of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Phytopathology*, 1998, 88: 1205-1209.
130. Watanabe T and Kondo. Ethylene evolution in marine algae and a proteinaceous inhibitor of ethylene biosynthesis from red alga. *Plant and Cell Physiology*, 1976, 17: 1159-1166.
131. Wilkes J, Dale G T, Old K M. Production of ethylene by *Endothia gyrosa* and *Cytospora eucalypticola* and its possible relationship to kino vein formation in *Eucalyptus maculata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1989, 34: 171-180.
132. Wood D A, Hammond J B W. Ethylene production by axenic fruiting cultures of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Micro. Biol*, 1977, 34(2): 228-229.
133. Yang S F, and Hoffman N E. Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 1984, 35: 155-189.
134. Yang S F, Yip W K, and Dong J G. Mechanism and regulation of ethylene biosynthesis. in: Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interaction. H. E. Flores et al., eds., *Amer. Soc. Plant Physiol.*, 1990, pp.34-35.
135. Yu Y B and Yang S F. Auxin-induced ethylene production its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion, *Plant Physiol*. 1979, 64: 1074-1077.
136. 房广信, 李立新. 中国乙烯工业现状与发展展望. *广州工业*, 2003, 23(4): 6-10.

137. 黄立道. 乙烯及乙烯工业现状. 中国氯碱, 2005, 5:1-5.
138. 邹劲松. 世界乙烯工业现状及发展趋势分析. 当代石油石化, 2004, 12(8): 19-27.

致 谢

转眼之间三年的硕士学习即将结束，回首过去，心中有太多的感慨。首先，要非常感谢我的导师陈三凤教授，本课题是在老师的悉心指导下完成的。从研究工作的立题、实验设计、实验中遇到诸多问题的解决、论文的写作等各个环节都倾注了老师大量的心血。在这三年时间里，老师严谨的治学态度、敏锐的思维、对工作全身心投入的敬业精神、谦虚正直的做人风格和对学生的学习及生活无微不至的关怀，使我受益终生。

感谢李季伦院士和陈文新院士，两位先生以他们渊博的知识，平易近人的态度，和无私的奉献精神，为我们树立的人生的典范和事业的楷模。另外，还要特别感谢本系的袁红莉教授在学习上给予的指导和帮助，感谢田杰生副教授在气相色谱仪的使用过程中给予的指导和帮助。感谢本系的杨苏声老师、王贺祥老师、李颖老师、李大伟老师、王宾老师、宋渊老师、何群老师、王磊老师、姜伟老师等在学习上给予的指导。

论文的完成离不开朝夕相处的同学们的关心和帮助。感谢本实验室的伍丽娟师姐、王建平师兄、李宏彬师兄、马玉超师姐、陶丽、许峰、洪媛媛、陈曦、李华敏、高明辉、朱朗以及已毕业的吕静师姐、涂然师姐、崔艳华师姐、葛世玫师姐、刘元师姐、赵洪新师兄、谢宝恩师兄、刘旭明师兄在学习上给予的帮助和生活上的关心。特别感谢伍丽娟师姐在三年学习期间在各种实验技术及理论方面的细心指导，感谢王建平师兄和许峰博士在论文写作中提出的宝贵意见。三年的学习生活，是你们营造了良好的实验室气氛，为实验室的各项工作顺利的开展创造了良好的条件。认识你们是我的幸运，你们是我一生的朋友。

感谢我的大学同学丁尧、候佩臣、夏文才、林东旭、李玉梅三年来在生活上给予的关心，感谢大学寝室的好哥们孙兆山、吴希文、杨德成、徐海峰、李林给予的关心和帮助。感谢我的研究生寝室同学梁翰文、刘建兵、吴作军陪我一起度过这难忘的三年生活，你们的经典语录我将熟记于心。

衷心感谢我的父母、姐姐、姐夫、弟弟在我学业和生活上一直默默地支持和鼓励，是因为你们我才得以走到今天，你们是我事业人生的支点和拼搏奋斗的动力。

谨以此文献给在我人生旅途中培养、指导我的导师！

献给支持帮助过我的老师、学友！

献给辛勤养育我二十五年的父母！我爱你们，我亲爱的爸爸妈妈！

在未来的人生道路上我将继续努力！

个人简介

董红军，男，1982年12月生，黑龙江人，汉族。

教育背景：

2000.9——2004.7 黑龙江八一农垦大学生物技术专业，本科学习；

2004.9——2007.7 中国农业大学微生物学专业，攻读硕士学位。

文章发表情况：

董红军，伍丽娟，陈三凤，乙烯合成酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达，农业生物技术学报（Accepted）。