

甲烷单加氧酶活性化合物的体外重构

华绍烽¹, 范云场¹, 张 磊¹, 孙汝生¹, 闫新华¹, 罗文莎¹, 王昆仑¹, 李树本²

(1. 河南理工大学 化学化工学院, 河南 焦作 454000;

2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 甲烷氧化菌中甲烷单加氧酶既能催化甲烷转化为甲醇, 也能降解小分子含氯有机物. 将甲烷单加氧酶组分进行基因重组表达, 利用表达的组分重构酶活性化合物, 测定了重构化合物的丙烯环氧化活性及对三氯乙烯和三氯甲烷的降解. 结果显示: 经过 30 ℃、220 r/min、20 min 降解, 约有 52% 的三氯乙烯被降解; 在 32 ℃、220 r/min、8 h 反应条件下, 约有 26% 的三氯甲烷被降解; 表明甲烷单加氧酶亚基组分表达正确, 能够在微生物体外重构活性化合物.

关键词: 甲烷单加氧酶; 表达; 重构; 活性化合物

中图分类号: O643.32

文献标志码: A

甲烷氧化菌 (*Methanotrophs*) 在 1906 年首次被发现, 20 世纪 70 年代, 对其进行了广泛的分离、鉴定、系统分类和功能研究^[1,3]. 甲烷氧化菌是甲基氧化菌 (*Methylotrophs*) 的一个分支, 是一类能以甲烷作为唯一碳源和能源进行同化或异化代谢的微生物, 甲烷氧化菌中的甲烷单加氧酶 (MMO) 在生理条件下选择性地 将甲烷氧化为甲醇, 再进一步氧化为甲醛, 一部分通过丝氨酸代谢途径或单磷酸核酮糖代谢途径同化为细胞生物量, 其余部分深度氧化为二氧化碳^[2]. 甲烷氧化菌对全球气候变化、整个生态碳循环过程有着非常重要的作用, 其生存于各种生态环境中 (湖泊, 稻田, 垃圾填埋场, 煤矿等), 对生物甲烷的消耗起着重要作用; 其细胞内的甲烷单加氧酶在这些氧化过程中起关键性作用, 该酶存在两种形式: 分泌在周质空间的可溶性甲烷单加氧酶 (sMMO) 和膜结合的颗粒状甲烷单加氧酶 (pMMO).

甲烷单加氧酶是一种结构复杂的多亚基组分酶, 在催化甲烷转化为甲醇的过程中需要电子供体输入, 促使甲烷单加氧酶亚基之间或亚基中的氨基酸侧链之间发生相对运动, 进而在温和条件下将具有高键能的甲烷 (C—H 键能 104 kcal/mol) 氧化成甲醇; 甲烷氧化细菌中的 sMMO 底物范围较宽, 不

仅能够氧化甲烷, 还可以氧化短链烷烃、烯烃及芳香族化合物^[3], 同时还能降解三氯甲烷、三氯乙烯等有毒卤代烃和多环芳烃^[4], 催化三氯乙烯生成三氯乙醛, 进而被甲烷氧化细菌氧化成酸性产物, 达到降解三氯乙烯, 消除环境污染的目的^[5]. 甲烷单加氧酶的优越催化性质使其受到了极大关注; 因此, 从工业利用和生态保护的角度考虑, 甲烷单加氧酶具有很重要的研究价值. 甲烷单加氧酶氧化甲烷生产甲醇还存在许多瓶颈问题, 如产酶的微生物菌株生长缓慢、细胞密度低、催化效率不高是限制甲烷氧化菌工业化应用的瓶颈问题. 因此, 寻求增加催化效率的策略、表达更多的甲烷单加氧酶或高密度培养甲烷氧化菌是实现其工业应用的必要前提. 分子生物学技术可对甲烷单加氧酶的生物催化研究提供有力的工具, 例如: 采用甲烷单加氧酶的基因组分, 构建高效表达的甲烷单加氧酶工程菌进行催化反应; 用正确表达的甲烷单加氧酶亚基组分进行体外重构酶活性化合物; 通过生物信息学分析, 定点突变关键基因, 筛选高酶活性菌株等方法.

第一个用分子生物学方法研究甲烷氧化菌的是英国 Murrell 小组的 Mc Donald 等^[6], 采用 16S rRNA 和 pMOA 基因构建了克隆文库. 此后于 1994

收稿日期: 2016-10-21; 修回日期: 2016-11-30.

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目 (142102210049); 河南省教育厅科学技术重点研究项目 (14B150026) (Science and Technology Research Foundation Projects of Henan Province (Grant 142102210049); Science and technology project of Henan Provincial Education Department (Grant 14B150026)).

作者简介: 华绍烽 (1963-), 男, 博士, E-mail: shfhua33@163.com (Hua Shao-feng (1963-), Male, Doctor, E-mail: shfhua33@163.com).

年, 美国加州大学的 Wood 小组^[7]将来源于 *Methylosinus trichosporium* OB3b 的 sMMO (5.5 kb) 基因簇进行克隆, 获得了一个降解 TCE 较好的转化子, 构建了稳定表达系统, 但由于催化活性远低于野生菌的活性, 这两个研究被认为是不成功的. 1999 年, Murrel 研究小组^[8-9]报道了以 *Methylosinus trichosporium* OB3b 为背景的 sMMO 分子克隆与同源表达、异源表达的研究结果, 利用只能表达 pMMO 的 *Methylobacterium album* BG8 和 *Methylocystis parvus* OBBP 两个甲烷氧化菌株为宿主细胞, 表达了 *Methylosinus trichosporium* OB3b 的 sMMO 基因, 表达活性比野生菌稍高. 2003 年日本京都大学理工研究所的 Fukuda 等^[10]报道了以 *Methylocystis* sp. M 为背景, 在 *E. coli* 中表达了甲烷单加氧酶羟基化酶 3 个亚基.

迄今为止, 还没有一个具有工业实用价值的高活性甲烷氧化菌或甲烷单加氧酶的研究报道, sMMO 的表达活性较低, 菌株生长缓慢, 培养条件苛刻, 还不能达到商用目的. 我们是在甲烷单加氧酶生物化学性质研究和其基因克隆表达研究的基础上, 进行细胞外酶亚基活性重构试验, 为获得一个具有工业应用价值的甲烷单加氧酶, 展开一些探索性研究.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

分别含 pCDFDuetTM-1-C-orfY、pRSFDuetTM-1-X-Z 和 pETDuetTM-1-Y-B 重组质粒的 *E. coli* 细胞已构建完成, 由本室保存 (pCDFDuetTM-1-C-orfY 含 sMMO 的还原酶基因和一个未知小分子蛋白基因, pRSFDuetTM-1-X-Z 含 sMMO 的 α 亚基基因和 γ 亚基基因, pETDuetTM-1-Y-B 含 sMMO 的 β 亚基基因和调节蛋白 B 基因); 青霉素、链霉素、卡拉霉素均购自 TaKaRa; 胰蛋白胨、酵母抽提物为 OXOID 产品; TCE、三氯甲烷等其它试剂均为分析纯; 蛋白质电泳 Marker (Fermentas), NADH (Sigma), 质粒抽提试剂盒 (OMEGA), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Thermo).

高速冷冻离心机 (Heraeus), 多功能电泳仪 (北京六一), 气相色谱 (HP6890), 紫外-可见分光光度计 (GE Ultaspec 7000), ÄKDA pure 层析系统 (GE), 水浴锅; 全自动生化培养箱, 恒温摇床, 无菌操作设备均为国产.

1.2 培养基及重构缓冲液

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母抽提物 5 g/L, NaCl 5 g/L, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2. 固体 LB 培养基: 在液体 LB 培养基中添加 1.5% 琼脂.

抗生素抗性: pCDFDuetTM-1-C-orfY 为链霉素抗性, pRSFDuetTM-1-X-Z 为卡拉霉素抗性, pETDuetTM-1-Y-B 为氨苄青霉素抗性.

重构缓冲液: 50 mmol/L Tris/HCl 缓冲液, pH 7.5, 含 1 mmol/L EDTA, 3 mmol/L 还原性谷胱甘肽, 0.3 mmol/L 氧化性谷胱甘肽, 20% 甘油, 10 mmol/L 二硫苏糖醇.

1.3 表达重组子的诱导表达及检测

分别抽提 pCDFDuetTM-1-C-orfY、pRSFDuetTM-1-X-Z 和 pETDuetTM-1-Y-B 3 个克隆子质粒, 转化至感受态 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 含有空载体的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株做对照. 挑取单菌落接种于 5 mL LB 培养基 (pCDFDuetTM-1-C-orfY 加入 25 μ g/mL 的硫酸链霉素, pRSFDuetTM-1-X-Z 加入 25 μ g/mL 卡那霉素, pETDuetTM-1-Y-B 加入 100 μ g/mL 的氨苄青霉素), 首先在 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600} 0.4 ~ 0.6, 再转接于 500 mL LB 培养基中摇瓶培养至 OD_{600} 0.8 ~ 1.0, 含 pCDFDuetTM-1-C-orfY, pRSFDuetTM-1-X-Z 质粒的培养基中加 0.1 mmol/L $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$; 32 $^{\circ}$ C 条件下, 分别在每个培养瓶中加入 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 30 min 后 12 000 r/min 离心收集菌体, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 菌体置 -40 $^{\circ}$ C 保存待用.

1.4 甲烷单加氧酶组分的部分纯化

取一定量菌体溶解于 pH 7.2 的 50 mmol/L Tris/HCl 缓冲液中, 经过冰浴超声破碎, 在 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 40 min 收集无细胞上清液, 对 50 mmol/L Tris/HCl 缓冲液透析后上 DEAE-sepharose Fast Flow 阴离子交换柱, 采用含 0 ~ 1.2 mol/L NaCl 的 Tris/HCl 缓冲液梯度洗脱, 收集纯化的各组备用.

1.5 甲烷单加氧酶活性化合物的重构

部分纯化的 sMMO 各组分 10 mL (3 μ mol α 亚基、0.15 μ mol β 亚基、0.15 μ mol γ 亚基, 1.2 μ mol 调节蛋白 B 和 0.15 μ mol 还原酶), 对 pH 7.2, 50 mmol/L Tris/HCl 缓冲液透析过夜, 然后在室温条件下, 重构缓冲液中进行 10 ~ 15 h 活性重构, 然后这个化合物在 4 $^{\circ}$ C 对 4 L 的 50 mmol/L Tris/HCl 缓

冲液透析待用。

1.6 甲烷单加氧酶的活性及蛋白质含量测定

sMMO 活性测定采用丙烯环氧化反应, 在 10 mL 重构液中加入 10 mmol/L NADH, 封口, 抽取 4 mL 顶空气置换 4 mL 丙烯, 在 30 °C 下, 220 r/min 反应 30 min, 采用气相色谱法(FID 检测器, 外标法定量)测定反应液中环氧丙烷。

活力单位定义: 每 min · mg sMMO 催化生成环氧丙烷的 μmol 数 ($\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$) 为 1 个活力单位。

细胞总蛋白测定: 细胞超声裂解, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Thermo)测定蛋白浓度, 操作按照说明书进行。

1.7 重构的甲烷单加氧酶活性化合物的降解

5 mL 重构液置于 20 mL 反应瓶中, 加入 10 mmol/L NADH 和 TCE 饱和的 Tris/HCl 缓冲液(约 900 mg TCE/L) 50 μL , 密封瓶口, 30 °C, 220 r/min, 反应 20 min 后加入 2 mL 正己烷终止反应, 震荡萃取全部 TCE 进行气相色谱分析 TCE 残余量。

三氯甲烷可以溶解在水中, 在反应液中, 以加入三氯甲烷和 NADH 组分作为反应开始, 经过 32 °C, 220 r/min, 8 h 反应后, 分析氯仿的残余量。

色谱条件: SE-54 毛细管柱, FID 检测器, 外标法测样品浓度; TCE 检测进样器, 柱温和检测器温度分别为 180、70 和 190 °C, 三氯甲烷的检测进样器, 柱温和检测器温度分别为 160、80 和 180 °C。

2 结果与讨论

2.1 表达蛋白的凝胶电泳分析

基因表达产物的 12% (w/v) SDS-PAGE 电泳: 将转化了 pCDFDuet™-1-C-orfY, pRSFDuet™-1-X-Z 和 pETDuet™-1-Y-B 的菌株 BL21 (DE3) 分别诱导表达之后, 取 1 mL 离心, 菌体中加入 250 μL 的上样缓冲液, 煮沸 3 min, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果显示, 构建的甲烷单加氧酶亚基组分均以溶解状态表达, MMOX/MMOY/MMOZ/MMOB/MMOC/orfY 分子量分别为 56、43、23、14、40 和 15 kDa, (如图 1), 与预期的亚基蛋白分子量一致, 证明甲烷单加氧酶 6 个基因组分已正确高效表达。保持适宜的培养条件, 可以防止中间产物自身折叠时发生聚集, 同时低温有利于蛋白产物的正确折叠, 但温度过低又会影响细胞的正常生长, 因此生长阶段温度为 37 °C, 诱导表达阶段温度为 32 °C 为宜。时间

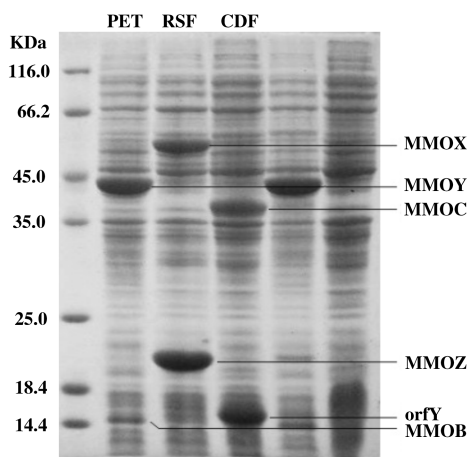


图 1 大肠杆菌中高效表达的溶解性甲烷单加氧酶各组分

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of each components for soluble methane monooxygenase expressed in *E. coli*

的选择, 以细菌处于对数生长期即 OD_{600} 0.6 ~ 1.0 时进行诱导表达为宜。培养条件的改变, 不仅影响外源基因的表达水平, 还会影响其表达方式, 一个好的表达控制条件可以使表达产物由无活性形式转变为活性状态。

2.2 溶解性甲烷单加氧酶重构

在 10 mL 反应瓶中, 将部分纯化的 sMMO 亚基组分以一定摩尔比: 3 μmol α 亚基、0.15 μmol β 亚基、0.15 μmol γ 亚基、1.2 μmol 调节蛋白和 0.15 μmol 还原酶加入到重构缓冲溶液中, 在一定条件下, 各亚基的构型趋于自然状态, 分子链之间的二硫键逐渐形成, NADH 作为电子供体提供了酶催化动力, 通过丙烯环氧化反应, 证明初步重构的化合物已经显示出大约 21 $\mu\text{mol units/mg}$ 活性(计算过程未显示), 尽管活性较低, 有待于各组分表达条件的完善和重构条件的优化, 实验结果说明该酶的重构是可行的。目前, 有关甲烷单加氧酶类似研究还未见报道, 国外 Murrell 研究组的 Lloyd 曾经报道过溶解性甲烷单加氧酶在 *Methylocystis parvus* OBBP 菌株中的表达的研究报道, 比活性只有 1 ~ 2.5 $\mu\text{mol units/mg}$ 。因此, 此研究为甲烷单加氧酶工业应用进行了探索。

2.3 重构的甲烷单加氧酶的降解

三氯乙烯(TCE)是工业清洁剂和溶剂, 有许多工业用途, 但废弃的 TCE 可以污染地下水源, 对人体有剧毒性和潜在的致癌作用, 采用甲烷氧化菌中甲烷单加氧酶对其降解有重要意义。在反应瓶中加入甲烷单加氧酶重构溶液, 以加入底物 TCE 和

NADH 为反应起始, 反应 40 min 后, 气相色谱测定三氯乙烯残存量. 从图 2 看, 大约有 52% 的三氯乙烯被降解, 说明重构的 sMMO 可以降解三氯乙烯, 已经显示了应有的降解活性. 对三氯甲烷的降解也是如此, 从图 3 可以看出, 大约有 26% 的三氯甲烷被降解, 说明重构的 sMMO 显示了活性, 可以降解三氯甲烷.

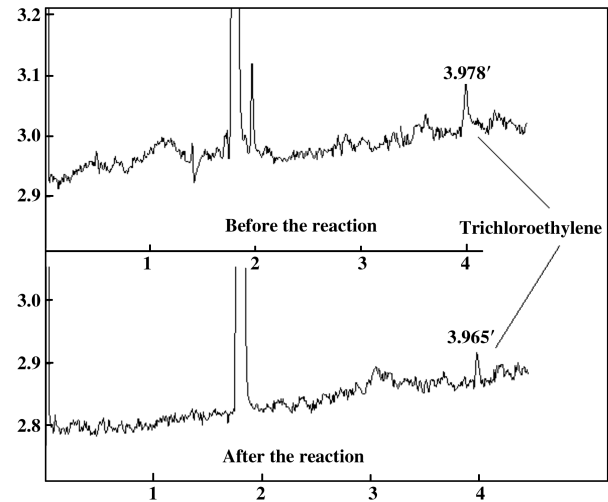


图 2 重构的甲烷单加氧酶对三氯乙烯的降解
Fig. 2 Trichloroethylene degradation by reconstitution of the active complex measured with a GC

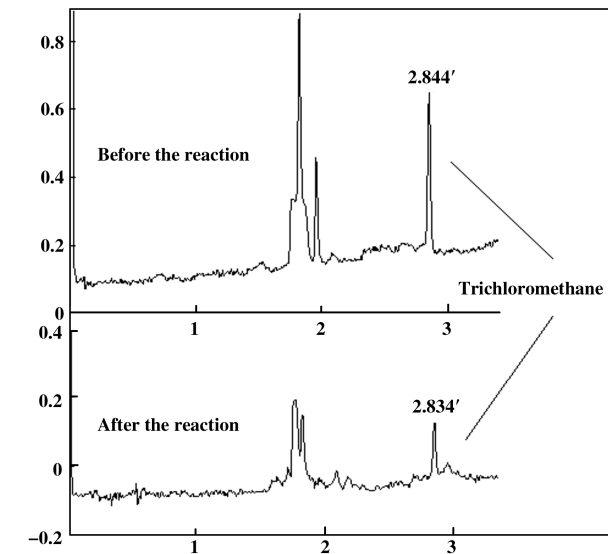


图 3 重构的甲烷单加氧酶对三氯甲烷的降解
Fig. 3 Trichloromethane degradation with reconstitution of the active complex measured with a GC

实验结果表明, 三氯乙烯和三氯甲烷均在一定程度上得到了降解, 说明甲烷单加氧酶各组分表达准确, 酶的重构的可行的. 目前, 还未见有关重构

的甲烷单加氧酶活性化合物降解含氯有机物的报道, 类似的微生物降解含氯有机物研究有, 沈润南等^[11]利用 0.54 g 干细胞/mL 的甲烷氧化菌降解三氯乙烯, 不同的底物浓度降解速率不同, 当 15 mg/L 三氯乙烯时降解速率最大, 在 100 min 的反应时间基本完全降解. Shukla 等^[5]报道了甲烷氧化细菌降解三氯乙烯达到 0.19 ppm/h. Jahng 等^[6]报道了采用不同载体进行基因重组的甲烷单加氧酶降解三氯乙烯, 5 mL ($A_{600}=2$) 休眠态细胞, 5 h 降解三氯乙烯达到了 6~8 $\mu\text{mol/L}$. 与这些研究工作相比较, 我们的研究工作更接近工业化.

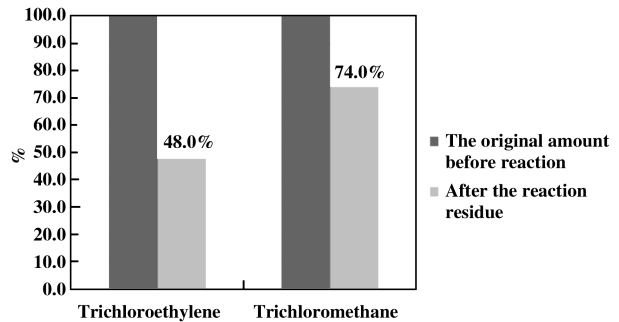


图 4 重构的甲烷单加氧酶活性化合物对三氯乙烯和三氯甲烷的降解比较
Fig. 4 Trichloroethylene and trichloromethane were degraded by the reconstituted sMMO complexes

3 结论

大肠杆菌表达系统是目前使用最为广泛、研究最多的表达系统, 该表达系统安全性好, 遗传背景和生理学特性清楚, 基因表达调控机制相对明确, 生长周期短, 大多数不同来源的基因均能在其中实现高效表达, 同时也是放大实验或商业应用比较理想的宿主细胞. 我们采用大肠杆菌系统表达甲烷单加氧酶有助于有效解决野生甲烷氧化菌培养密度低问题. 通过本研究说明甲烷单加氧酶在体外一定条件下, 可以实现活性化合物的重构, 显示出较好催化活性.

甲烷单加氧酶是一个复杂的酶系统, 每个亚基具有自己的一定构型, 且功能作用方面相互配合, 完成系统催化反应. 这方面工作的关键是首先要获得正确表达、折叠的亚基蛋白分子, 并在一定条件下完成天然构型的重排, 重构条件的优化和各亚基的分子摩尔比是二个重要因素, 将在今后的研究中进行进一步优化改进, 期望获得活性更高的重构甲烷单加氧酶活性化合物.

参考文献:

- [1] a. Zhu J, Wang Q, Yuan M. Microbiology and potential applications of aerobic methane oxidation coupled to denitrification (AME-D) process: A review [J]. *Wat Res*, 2016, **90**(1): 203–215.
b. Lin Kai (林凯), Xin Jia-ying (辛嘉英), Wang Yan (王艳), *et al.* Kinetics of D-glucose oxidation to D-gluconic acid with hydrogen peroxide over bio-reduced Au/ γ -Al₂O₃ catalysts (生物还原制备 Au/ γ -Al₂O₃ 催化葡萄糖氧化动力学研究) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(5): 427–435.
- [2] Kalyuzhnaya M G, Puri A W, Lidstrom M E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria [J]. *Meta Engineer*, 2015, **29**(1): 142–152.
- [3] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria [J]. *Microbiol Rev*, 1996, **60**(2): 439–471.
- [4] Colby J, Stirling D, Dalton H. The soluble methane monooxygenase of methylococcus capsulatus (Bath): Its ability to oxygenate *n*-alkanes, *n*-alkenes, ethers, and acyclic, aromatic and heterocyclic compounds [J]. *Biochem J*, 1977, **165**(2): 395–402.
- [5] Shukla A K, Vishwakarma P, Upadhyay S N, *et al.* Biodegradation of trichloroethylene (TCE) by methanotrophic community [J]. *Biore Technol*, 2009, **100**(9): 2469–2474.
- [6] Jahng D, Kim C S, Hanson R S, *et al.* Optimization of trichloroethylene degradation using soluble methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b expressed in recombinant bacteria [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **51**(3): 349–359.
- [7] Wood T K. Active expression of soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b in heterologous hosts [J]. *Microbiol*, 2002, **148**(11): 3328–3330.
- [8] Lloyd J S, Finch R, Dalton H, *et al.* Homologous expression of soluble methane monooxygenase genes in *Methylosinus trichosporium* OB3b [J]. *Microbiol*, 1999, **145**(2): 461–470.
- [9] Lloyd J S, Marco P, Dalton H, *et al.* Heterologous expression of soluble methane monooxygenase genes in methanotrophs containing only particulate methane monooxygenase [J]. *Arch Microbiol*, 1999, **171**(6): 364–370.
- [10] Fukuda M, Fujii Y, Utsugi M, *et al.* High-level expression of subunits of methane monooxygenase hydroxylase in *E. coli*. Annal report for Institute advanced energy [J]. *Kyoto Univer, Kyoto*, 2003, 134.
- [11] Shen Run-nan (沈润楠), Li Shu-ben (李树本). The biodegradation of trichloroethylene by a methanotrophic bacterium (甲烷利用细菌降解三氯乙烯的研究) [J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 1998, **38**(1): 63–69.

Reconstitution of an Active Methane Monooxygenase Complex from the Recombination Subunits in Vitro

HUA Shao-feng¹, FAN Yun-chang¹, ZHANG Lei¹, SUN Ru-sheng¹, YAN Xin-hua¹,
LUO Wen-sha¹, WANG Kun-lun¹, LI Shu-ben²

(1. School of Chemistry & Chemical Engineering, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000, China;
2. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Methanotrophs uses a soluble methane monooxygenase (sMMO) to catalyse the convertible of methane to methanol and to degrade micro-molecular organics containing chlorine. The present study describes the reconstituted sMMO complexes from individually expressed components of sMMO in *Escherichia coli*. functional activity of the recondituted sMMO complexes was measured by the propylene epoxidation reaction. The TCE and chloroform degradation results were obtained with the reconstituted enzyme complex. These results demonstrate that sMMO components express correctly in *Escherichia coli*, biologically active complexes can be prepared by the recombinant subunits of sMMO, the degradation rate of TCE is about 52% at 30 °C for 20 min at 220 r/min, for comparison, the extent of trichloromethane degradation in the recondituted sMMO complexes is 26% in 8h at 32 °C.

Key words: methane monooxygenase; expression; reconstitution; active complex