

颗粒性甲烷单加氧酶的研究*

崔俊儒 辛嘉英 胡霄雪 刘婷婷 李树本 夏春谷**

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

摘 要 从甲基弯菌 (*Methylosinus trichosporium*) IMV3011(简称 M.3011)的膜中分离纯化出颗粒性甲烷单加氧酶(Particulate Methane monooxygenase,简称 pMMO)和 NADH 脱氢酶。Cu²⁺、不同外源电子给体、EDTA 等对 pMMO 活性的都有影响,测定了 pMMO 分子量,以及其活性中心金属离子含量。对于 M.3011 培养基中 Cu²⁺ 浓度对 pMMO 的生成和活性没有影响,但在分离纯化过程中对 pMMO 稳定性有明显影响。电镜结果显示,Cu²⁺ 浓度对 pMMO 的数量有较明显的影响。对于纯化的 pMMO,对苯二酚仍是有效的电子供体,而 NADH 却是无效的电子供体。纯化过程中采用对苯二酚作为 pMMO 活性分析时的电子供体,排除了共纯化 NADH 脱氢酶的必要,有利于对 pMMO 活性中心进行深入研究。

关键词: 甲基弯菌 IMV3011, pMMO, Cu²⁺, 电子供体, 对苯二酚

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)05-0594-06

甲烷单加氧酶(MMO)在细胞中有两种不同表现形式^[1,2]:可溶性甲烷单加氧酶(soluble methane monooxygenase,简称 sMMO)和颗粒性甲烷单加氧酶(particulate MMO,简称 pMMO)。其中 sMMO 存在细胞浆中,pMMO 则键合于细胞膜上。目前对 sMMO 的研究较多,而对 pMMO 催化性能和作用机理认识不足。迄今为止已对八种甲烷利用细菌的 MMO^[3-10]进行了分离纯化。除从 *Methylococcus capsulatus* M^[10]分离出一种 pMMO 外,其他所研究的都为 sMMO。pMMO 反应机理研究的最大势垒是其纯化过程,通常采用的方法是用去污剂增加蛋白的溶解度,使蛋白转化成可溶性的,但溶解的蛋白量较少且易失活,不利于纯化。仅有的从内质膜上分离纯化到活性 pMMO 的报道^[11]仍无法重复,近年来对 pMMO 的催化活性中心及其性质的研究主要在膜水平进行^[12-14]。本文利用在高铜培养条件(>5.0 μmol/L)和无铜培养条件下产生 pMMO 的甲基弯菌 M.3011,采用超声波破碎、高速冷冻离心、离子交换层析等技术从内质膜上分离纯化出了 pMMO。发现 Cu²⁺ 浓度在 M.3011 培养中对 pMMO 的生成和活性都没有明显影响,而在分离纯化过程中对其稳定性有明显影响。TEM 照片分析显示:Cu²⁺ 浓度直接决定了 pMMO 的数量。利用 HPLC 测定了 pMMO 的分子量,与其它文献所报道基本相符^[15]。Cu²⁺ 浓度、不同外源电子给体、EDTA 浓度等对 pMMO 活性的都有影响。对苯二酚可作为 pMMO 最直接的电子供体,这为进一步在酶水平对 pMMO 的催化活性中心及其性质的研究打下了基础。

* 国家自然科学基金重点项目(29933040),国家重点基础研究规划(G1999022406)

** 通讯作者: Tel: 0931-8276531 Fax: 0931-8277147 E-mail: lzpcen@ns.lzb.ac.cn

作者简介: 崔俊儒(1976—),男,河北人,中国科学院兰州化学物理所 OSSO 国家重点实验室实习研究员,主要从事生物酶催化反应及机理研究。

收稿日期: 2001-12-17,修回日期: 2002-04-15

1 材料和方法

1.1 菌种及培养

甲基弯菌 (*Methylosinus trichosporium*)IMV 3011 系由俄罗斯科学院催化研究所赠送的来自于俄罗斯微生物与病毒研究所 (Kiev, USSR) 的菌种。培养基成分如下: NH_4Cl 0.5g, K_2HPO_4 0.49g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.40g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, KNO_3 1.6g, NaCl 0.3g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0013 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0004 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00034 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00024 g, 定容至 1L, pH7.0。培养气体为甲烷-氧气 (1:1, V/V)。在 15L 全自动发酵罐 (LH1075, 英国 LH Fermentation Co. Ltd) 中, 32°C, 300r/min 培养 72 ~ 96h。

1.2 细胞破碎及分离

将发酵液 9 000r/min 离心 10min (CR21, 日本 Hitachi 公司) 收集菌体, 用一定体积的 20 mmol/L 磷酸缓冲溶液 (pH7.0) 重新悬浮后离心收集菌体, 重复 2 次后得到完整的细胞, 4°C 保存备用。

细胞按 10mL/g 的量加入含 10mmol/L 巯基乙醇的 25mmol/L 磷酸缓冲溶液 (pH7.0) 重新悬浮, 0°C ~ 4°C 下超声波 (JY92 - II, 宁波新芝公司) 破碎细胞 (600W, 6s × 95 次, 间隔 6s), 0°C ~ 4°C 下 20 000r/min 离心 60min 收集上清液, 4°C 保存备用。

1.3 pMMO 的分离纯化

将 1.2 得到的上清液上 DEAE-Sepharose (瑞典 Pharmacia Biotech 公司) 离子交换层析柱, 以含 10mmol/L 巯基乙醇的 25mmol/L 磷酸缓冲溶液 (pH7.0) 作为标准洗脱液, 流速为 1.0mL/min。洗脱下带正电荷的杂蛋白组分 I 后, 进行阶段梯度洗脱。收集各峰组分浓缩后 4°C 保存备用。

1.4 金属离子含量测定

采用原子吸收光谱仪 (WFX-10, Japan) 测定蛋白质中金属含量。

1.5 不同外源添加因子对 pMMO 活性的影响

取酶液 (细胞液) 1mL 置 10mL 反应瓶中, 密封后用注射器 1:1 置换 5.0mL 丙烯, 在 32°C、150r/min 摇床反应 6 min (细胞反应 30min), 气相色谱法 (GC7890 II, 上海天美公司) 测定环氧丙烷生成量。MMO 比活性以每毫克蛋白每分钟催化产生环氧丙烷的纳摩尔数表示 (nmol/min · mg)。

1.6 细胞的电镜分析

32°C, 150r/min 摇床培养 4d 后取细胞 (有铜/无铜培养) 悬浮液 1.5mL 置于 1.5mL 塑料离心管中, 6 000r/min 离心 4 min 后弃上清, 加入内含 3% 戊二醛的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 4°C 备用。双固定, 常规染色, 超薄切片, 透射电镜 (JEM-100cx, Japan) 观察。

1.7 分析方法

环氧化物的检测和定量分析在气相色谱仪上进行。每隔一定时间用注射器取出 0.5mL 9 000r/min 离心 4 min, 取上清。色谱条件为: SE-54 弹性石英毛细管柱 (25m × 0.25mm i. d.), 载气 N_2 , 检测器 FID, 分流进样。进样器、检测器温度分别控制在 180°C、200°C, 柱温 60°C, 进样体积 1 μL , 外标法定量。

采用 BIOSEP SEC-S3000 柱(Phenomenex)HPLC(HP1090,美国 hp 公司)测定 pMMO 的分子量(流动相 50mmol/L 磷酸缓冲溶液, pH6.8, 流速 0.3mL/min, 进样量 20 μ L)。标准蛋白分子量分别为 13.7、25、43、67kD(Pharmacia Biotech, USA)。

2 结果和讨论

2.1 pMMO 的分离纯化

采用的 IMV 3011 菌株由俄罗斯科学院催化研究所赠送,该所曾将其用于丙烯环氧化研究^[16]。我们发现该菌株在无铜条件下进行培养时,经超声波破碎后细胞碎片活性损失严重,而再经离心后上清基本测不到活性;菌株在有铜($\text{Cu}^{2+} > 5.0\mu\text{mol/L}$)条件下进行培养时,超声波破碎离心后上清可以测到大于 10% 活性。这说明在 pMMO 的分离纯化过程中, Cu^{2+} 具有十分关键的作用。图 1 所示,超声波解离下来的膜蛋白经 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换层析柱分离后,主要被分成了 4 个组分。组分 I 是不与柱填料吸附的带正电荷的杂蛋白,组分 IV 是与柱填料吸附较强的带负电荷的杂蛋白。分别向组分 II 和组分 III 中添加外源电子给体发现, Cu^{2+} 、对苯二酚存在下的组分 II 具有较高的 MMO 活性,而组分 III 具有利用 NADH 还原苯醌为对苯二酚的能力。因此断定组分 II 是 pMMO 组分,而组分 III 是催化电子由 NADH 向苯醌传递的 NADH 脱氢酶。

图 1 所示,超声波解离下来的膜蛋白经 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换层析柱分离后,主要被分成了 4 个组分。组分 I 是不与柱填料吸附的带正电荷的杂蛋白,组分 IV 是与柱填料吸附较强的带负电荷的杂蛋白。分别向组分 II 和组分 III 中添加外源电子给体发现, Cu^{2+} 、对苯二酚存在下的组分 II 具有较高的 MMO 活性,而组分 III 具有利用 NADH 还原苯醌为对苯二酚的能力。因此断定组分 II 是 pMMO 组分,而组分 III 是催化电子由 NADH 向苯醌传递的 NADH 脱氢酶。

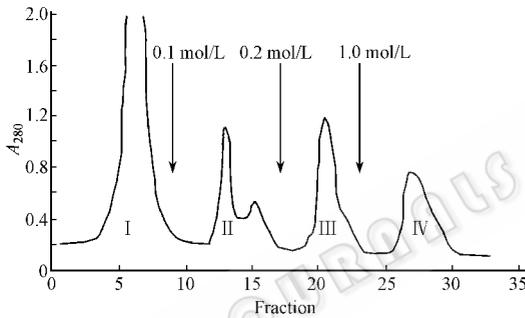


图 1 pMMO 的 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换层析

Fig.1 Chromatography of pMMO on a DEAE-Sepharose CL-6B column

2.2 pMMO 分子量的测定

采用 HPLC 体积排阻法对纯化到的 pMMO 组分进行分子量测定,发现在分子量为 ~90kD 处有一蛋白峰,经 SDS(十二烷基硫酸钠)变性处理后的 pMMO 组分进行 HPLC 体积排阻法测定分子量发现,分别在分子量为 ~27kD、~66kD 和 ~90kD 处有三个蛋白峰。初步断定 pMMO 的分子量为 93kD,由 27kD

和 66kD 两个亚基组成。培养基中铜的有无对 MMO 的分子量几乎没有影响(表 1)。

2.3 pMMO 的金属离子分析

pMMO 的活性中心包含 Cu 和 Fe ($2\text{Fe}\&15\text{Cu/mol}$)^[15],原子吸收光谱研究显示,组份 II 是一种 Cu 多 Fe 少的金属蛋白,组份 III 则是一种 Fe 多 Cu 少的金属蛋白。培养基中有无铜对 Cu/Fe 没有明显影响(表 2)。

2.4 EDTA 和 Cu^{2+} 对 pMMO 活性的影响

表 3 结果显示, Cu^{2+} 可明显增加以各种形式存在的 pMMO 的活性,而金属离子

表 1 pMMO 分子量的测定

Table 1 Molecular weight of pMMO by HPLC			
Sample	Molecule weight/kD		
With Cu	89.6	65.6	27.2
Without Cu	88.9	66.1	26.7

表 2 金属离子分析结果

Table 2 Result of metal ion analysis		
Sample	Cu($\mu\text{g/mL}$)	Fe($\mu\text{g/mL}$)
Peak II *	0.65	< 0.01
Peak III *	0.66	1.62
Peak II	3.62	0.53
Peak III	1.50	3.47

* Without Cu

整合剂 EDTA 可抑制 pMMO 的活性,其中对纯化的 pMMO 活性抑制最为明显。Cu²⁺ 对 pMMO 的激活作用可能与 Cu²⁺ 参与了 pMMO 活性中心调控或电子传递过程有关。因此有关 pMMO 的活性中心研究应在 Cu²⁺ 参与下进行。

2.5 不同外源添加因子对 pMMO 活性的影响

当有 pMMO 可利用的电子供体存在时, pMMO 催化的丙烯环氧化反应可连续进行,表现出较高的环氧化活性。细胞经超声波破碎、冷冻高速离心后上清液中分别加入不同的外源因子,结果如表 4 所示。

对苯二酚、甲酸钠、琥珀酸钠、NADH 在整细胞水平均能提高 M.3011 的环氧化活性,当细胞破碎离心后,只有对苯二酚能够提高 pMMO 活性,由此推断 pMMO 在催化烃单加氧化时可能直接以醌类物质作为电子供体,也可能是通过与 pMMO 紧密结合的醌/pMMO 还原酶从醌类物质中得到电子的。甲酸钠在整细胞时可以提高细胞活性,而当细胞破碎离心后却无法提高其活性,可能是因为丢失了存于胞浆中的甲醇脱氢酶。

表 4 不同外源添加因子对 pMMO 活性的影响

Table 4 Effect of different additional factor

Addition	pMMO specific activity (nmol/min · mg)	Relative activity / %
None	0.54	100
1.0mmol/L Quinol	0.87	160.8
1.0mmol/L Quinol + 0.2mmol/L Cu ²⁺	1.11	205.5
40mmol/L Formate	0.37	69.5
40mmol/L Formate + 0.2mmol/L Cu ²⁺	0.85	157.1
40mmol/L Succinate	0.53	98.1
40mmol/L Succinate + 0.2mmol/L Cu ²⁺	0.66	121.9
1.0mmol/L NADH	0.47	87.1
1.0mmol/L NADH + 0.2mmol/L Cu ²⁺	1.06	197.3

表 3 EDTA 和 Cu²⁺ 对 pMMO 活性的影响

Table 3 Effect of EDTA and Cu²⁺ on pMMO

Sample	Addition	Relative activity/ %
Whole cell	None	100
	0.2mmol/L Cu ²⁺	121
	0.2mmol/L EDTA	73
Membrane	None	100
	0.2mmol/L Cu ²⁺	126
	2.0mmol/L EDTA	61
Fraction II obtained from DEAE-Sepharose	None	100
	0.2mmol/L Cu ²⁺	136
	2.0mmol/L EDTA	18

的醌/pMMO 还原酶从醌类物质中得到电子的。

2.6 透射电镜 (TEM) 观察

将培养好细胞(有铜/无铜培养)悬浮液 1.5mL 置于 1.5mL 塑料离心管中,6000r/min 离心 4min 后弃上清,加入内含 3%戊二醛的 20mmol/L 磷酸盐缓冲液 4℃ 备用。双固定,常规染色,超薄切片,透射电镜 (JEM-100cx, Japan) 观察。图 2-A 所示为有铜条件下培养的细胞的 33 000 倍电镜图,从图中可以清楚的看到在细胞膜上有大量的蛋白(pMMO);图 2-B 所示为无铜培养的细胞的 50 000 倍电镜图,几乎看不到膜上有蛋白;在图 2-C(无铜培养 100 000 倍电镜图)中,细胞的膜上有少许蛋白附着。由此可以认为,培养基中 Cu²⁺ 浓度直

表 5 整细胞(有铜/无铜)环氧化活性比较

Table 5 Comparison of activity on whole cells from M.3011

Sample	pMMO specific activity(nmol/min · mg)
With copper	6.2
Without copper	6.4

接决定了 pMMO 的生成数量, 细胞在 Cu^{2+} 浓度极低的情况下通过膜富集到少量可以调控基因表达 pMMO 的 Cu^{2+} 而得以产生蛋白。经过超声波破碎后, 无铜培养的细胞由于 pMMO 量少而完全失活, 有铜培养的细胞中 pMMO 数量较多, 所以有活性保留。

至于两种情况下培养的细胞在整细胞水平上环氧化活性无差异(表 5)则有待于进一步的深入研究。

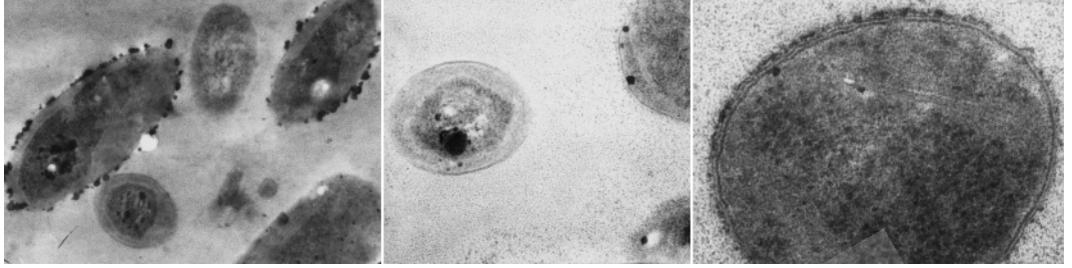


图 2 有铜/无铜培养的 M.3011 细胞透射电镜照片

Fig.2 TEM Microphotographs of M. 3011 cultured with copper/without copper

A. With copper $\times 33\ 000$; B. Without copper $\times 50\ 000$; C. Without copper $\times 100\ 000$.

参 考 文 献

- [1] Burrows K J, Cornish A. *J Gen Microbiol*, 1984, **130**(12) :3327 ~ 3333.
- [2] Stanley S H Prosp. *Biotechnol Lett*, 1983, **5** :487 ~ 492.
- [3] Pate R N, Savas J. *J Bacterial*, 1987, **169**(5) :2313 ~ 2317.
- [4] Woodland M, Dalton H. *J Biol Chem*, 1984, **259**(1) :53 ~ 60.
- [5] Fox B G, Lipscomb J. *Biochem Biophys Res Comm*, 1988, **154**(1) :165 ~ 170.
- [6] Fox B G, Froland W A, Dege J E, et al. *J Biol Chem*, 1989, **264**(17) :10023 ~ 10033.
- [7] Pilkington S J, Dalton H. *FEMS Microbiol lets*, 1991, **1**(1) :78 ~ 103.
- [8] Fox B G, Shanklin J, Somerville C, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(6) :2486 ~ 2490.
- [9] Nakajima T, Uchiyan H. et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, **56**(5) :736 ~ 741.
- [10] Akentiewa N P Gvidev. *Biochimiya*, 1990, **53**(1) :91 ~ 96.
- [11] Tonge G M, Harrison D E F, Higgins I J. *Biochem J*, 1977, **161**(2) :333 ~ 334.
- [12] Yuan H, Collins M L, Antholine W E. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1998, **72**(3 ~ 4) :179 ~ 185.
- [13] Takeguchi M, Miyakawa K, Okura I. *Journal of Molecular Catalysis A*, 1999, **137**(1 ~ 3) :161 ~ 168.
- [14] Takeguchi M, Okura I. *Journal of Molecular Catalysis A*, 1999, **145**(1 ~ 2) :45 ~ 50.
- [15] Colin M J, McDonald I, Jan R. et al. *Trends in Microbiology*, 2000, **8**(5) :221 ~ 225.
- [16] Kovalenko G A, Sokolovskii V D, *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, **39**(5) :522 ~ 528.

Study of Particulate Methane Monooxygenase From M.3011^{*}

Cui Junru Xin Jiaying Hu Xiaoxue Liu Tingting Li Shuben Xia Chungu^{**}

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

Abstract : Particulate Monooxygenase (pMMO) and NADH-dehydrogenase were purified from membranes of *Methylosinus trichosporium* IMV 3011 . Factors such as Cu^{2+} , different exogenous electron donors , ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) had effects on the activity of pMMO . Molecular weight of pMMO was determined by HPLC , and content of metal ion from the active center by atomic absorption spectrum analysis . The concentration of Cu^{2+} had no effect on the production and activity of pMMO in the bacterial culture , but influenced the stability greatly during the purification of pMMO . Transmission electron microscope (TEM) photos of M. 3011 with different copper concentration showed that the concentration of copper decided the quantity of pMMO . Quinol was an effective exogenous electron donor for the purified pMMO , whereas NADH was ineffective , which meant NADH-dehydrogenase was unnecessary to be co-purified . It facilitated further study on the catalytic core of pMMO .

Key words : Particulate monooxygenase , pMMO , Electron donor , Quinol , Cu^{2+}

^{*} This work was supported by a grant from the National Nature Science Foundation of Chinese (29933040) and the Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999022406)

^{**} Correspondence author

缅怀王大耜先生

中国科学院微生物研究所研究员、著名微生物学家王大耜先生，因病医治无效，于2002年8月13日不幸逝世，享年79岁。

王大耜先生曾任中国科学院微生物研究所副所长、中国微生物学会秘书长、副理事长、《微生物学报》第六届编辑委员会委员。王大耜先生一直从事工业微生物学和细菌分类学研究，对工作有强烈的事业心和高度的责任感，曾获全国科技大会奖和国家发明奖，1977年出版《细菌分类基础》专著。

王大耜先生在任《微生物学报》编委期间，审阅了大量稿件，他知识渊博，谦虚谨慎，为《微生物学报》的办刊工作做出了很大贡献。

王大耜先生的不幸逝世是我国微生物分类学界的损失，使我们失去了一位可敬可爱的师长。

王大耜先生千古！

《微生物学报》编辑部