文章编号：1001-3555(2016)02-0177-05

大肠杆菌异源表达 pmoB 及催化甲烷氧化生成甲醇的研究

张铁男*，王　艳，姜　丹，辛嘉英，张　帅，董　静
（哈尔滨商业大学 食品工程学院 省高校食品科学与工程重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150076）

摘要： 颗粒甲烷单加氧酶(pMMO)是甲烷氧化菌中催化甲烷氧化生成甲醇的一种酶. *Methylococcus capsulatus* IMV 3021 的 pMMO 活性位点是 pmoB 亚基，该亚基是一种可溶性蛋白. 我们研究将 pmoB 亚基进行异源表达及生物催化活性的验证. 当培养基中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)浓度为 5 mmol/L 时，可以观察到异源表达 pmoB 亚基具有催化甲烷氧化成甲醇活性，生成甲醇浓度为 1.04 mmol/L. 研究 pMMO 活性对于开发能直接将甲烷转化成甲醇的新型、环保催化剂有非常重要意义.

关键词： 生物催化；颗粒甲烷单氧酶；*Methylococcus capsulatus* IMV 3021；甲烷；甲醇
中图分类号： Q 814.9　　**文献标志码：** A

甲烷是一种重要的一碳化合物，甲醇是生产大宗化学品的重要原料，但由于甲烷结构非常稳定，目前工业上从甲烷生产甲醇仍需要 255 ℃、5 ~ 15 MPa 这样需要高能耗投入的条件[1]. 甲烷单加氧酶(MMOs)可以实现在常温常压条件下甲烷转化为甲醇.

MMOs 具有催化甲烷氧化生成甲醇活性，是甲烷氧化菌甲烷氧化途径中的主要生物酶[2]. 甲烷氧化菌以甲烷为营养源代谢途径的关键酶—甲烷单加氧酶以两种形式存在：颗粒型甲烷单加氧酶(pMMO)结合在细胞内膜，可溶性单加氧酶(sMMO)则游离在细胞质中. 铜浓度较低时，一部分甲烷氧化菌表达可溶性酶(sMMO)，而铜浓度(>0.2 mg/L)较高时，MMOs 以酶-膜结合形式表达. pMMO 由 3 个亚基组成：pmoB (α，~47 kDa)，pmoA (β，~24 kDa)以及 pmoC (γ，~22 kDa)[3]，每一个亚基都具有跨膜结构域. 虽然 pMMO 分子量和各亚基组合情况尚未确定，Yu 和 Lieberman 提出 $\alpha\beta\gamma$ 单体分子量大约是 100-kDa[4]，$\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 聚合体分子量大约是 200-kDa[5]. 关于 pMMO 是否含有金属离子仍有争议，据报道纯化后的 pMMO 单体($\alpha\beta\gamma$)可能含有 2 ~ 15 个铜离子[3-7]和 0 ~ 2 个铁离子[5-8].

甲烷氧化菌 *Methylococcus capsulatus* (Bath)中的甲烷单加氧化酶能够催化甲烷氧化生成甲醇. 该过程需要有 NADH[7-8]或四甲基对苯醌[8, 10-12]提供电子，pMMO 中的铜离子在电子传递过程中也具有重要作用[12].

从 *Methylosinus trichosporium* OB3b[14-15]和 *Methylococcus capsulatus* Bath[5-8]菌中纯化获得 pMMO 结构一致，均含有 pmoB 基因. 在本研究中，异源表达 pmoB 的 DNA 模板来 *Methylococcus capsulatus* IMV 3021，其与 *Methylococcus capsulatus* Bath 是同一菌属和种类，利用此 DNA 模板，成功的将 pmoB 异源表达并验证重组体具有全细胞催化甲烷氧化生成甲醇的活性.

1 实验部分

1.1 菌株和质粒

E. coli DH5α (Invitrogen, New York, USA)是用于质粒扩增，(pET-28a+) (Novagen, Darmstadt, Ger)和 *E. coli* BL21(DE3)(GE Healthcare Life Science, Fairfield, USA)用于蛋白表达.

1.2 *Methylococcus capsulatus* IMV3021 培养条件

Methylococcus capsulatus IMV3021 是乌克兰微生物学和病毒学研究所(Kiev. Ukraine)馈赠. 取 100 mL *Methylococcus capsulatus* IMV3021 无机盐培养基 A 液和 1mL B 液定容至 1 000 mL 容量瓶中(A 液和 B 液组成见表 1)，为 *Methylococcus capsulatus*

收稿日期： 2016-02-10；**修回日期：** 2016-03-10.
基金项目： 黑龙江省教育厅面上项目(No. 12521138)资助(Heilongjiang Provincial Education Department Funded Project (No. 12521138)).
作者简介： 张铁男(1977-)，男，博士，讲师，研究方向：生物催化(Zhang Tie-nan(1977-), Man, Doctor, Lecturer, Research Area: Biocatalysis).
* 通讯联系人，E-mail：tienanzhang@hrbcu.edu.cn；Tel：+86-451-84844281.

IMV3021 无机盐培养液. 采用250 mL 三角摇瓶，装入100 mL 的 *Methylococcus capsulatus* IMV3021 无机盐培养液，菌体接种量为10%（v/v），采用抽真空法置换入新鲜的甲烷：空气（体积比 1∶1）的混合气，每24 h 换一次气. 28 ℃、180 rpm 空气浴摇床培养. 培养3～5 d.

表1 *Methylococcus capsulatus* IMV3021 无机盐培养基（终浓度）

A Solution /(g·L^{-1})		B Solution /(g·L^{-1})	
NH_4Cl	0.50	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.0003
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.30	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.00034
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.02	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.00024
KNO_3	1.0	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.004
NaCl	0.30	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.0003
EDTA	0.01	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.00034
$FeCl_3$	0.001		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.004		
K_2HPO_4	0.40		
$KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$	0.40		
Na_2HPO_4	0.74		

1.3 融合蛋白表达质粒结构

使用试剂盒((Promega Biotech Co, Ltd., Madison, USA)从 *Methylococcus capsulatus* IMV 3021 提取总 DNA 后，经 PCR(ABI, 9700, USA)获得 pmoB 基因目的片段. 引物序列为：P1：5′-ATGGCCATGGAACACGGTGAGAAATCGCAGGC-3′； P2：5′-CTA GCGGCCGC CATGAACGACGGGATCAGCG-3′. 引物 P1 划线处是 NcoI 的识别位点，引物 P2 划线处是 NotI 的识别位点，用于表达载体构建. 凝胶纯化后，PCR 产物被 NcoI 和 NotI(Novozymes, Copenhagen, DMK)酶切，然后与线性化的 pET-28a(+)连接(载体 pET-28a(+)自身携带 His_6 标签)，形成重组载体 pET/pmoB，pET/pmoB 转入大肠杆菌 DH5α. 在含氨苄青霉素(100 μg mL^{-1})的 LB 抗性琼脂板筛选阳性克隆，再由 DNA 测序进行鉴定.

1.4 His_6-pmoB 蛋白的表达

经测序鉴定序列正确的重组载体 pET/pmoB 转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中，接种于100 mL 的 LB 培养基(含有 100 μg mL^{-1} 氨苄青霉素)中，37 ℃培养，直至 OD_{600} 值达到1.0，培养温度调至28 ℃，添加终浓度为0.4 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 pmoB 表达. 细菌培养4 h，培养液4 ℃离心(10 000×g)5 min，准备进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析.

1.5 His_6-pmoB 蛋白质的纯化

将经过4 h 诱导培养的细菌重悬于结合缓冲液中(50 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl，10 mmol/L 咪唑，pH 8.0)，然后在0 ℃以250 W 功率对细菌进行超声裂解，在4 ℃下以10 000 × g 离心沉淀20 min，将可溶性蛋白结合到 Ni^{2+}-NTA 树脂上(Promega Biotech Co, Ltd, Madison, USA)，用4倍体积的结合缓冲液进行预平衡. 测定用来平衡的结合缓冲液吸光值后，确定该缓冲液中不含蛋白质，再用洗脱液洗脱融合蛋白(含有 His 标签)，洗脱液中分别含有浓度为20, 50, 80, 200, 300, 500 mmol/L 的咪唑，使用4倍体积的洗脱液以1 mL·min^{-1} 的速度进行洗脱. 洗脱产物由浓度为12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分析.

1.6 全细胞催化甲烷氧化生成甲醇分析

以甲烷为底物分析重组体中 pmoB 催化甲烷生成甲醇的活性. 离心(3 000×g)富集的重组体细胞用20 mmol/L 磷酸盐缓冲(pH 7.0)漂洗，再离心(3 000×g)获得的沉淀用新配制的缓冲液(50 μm $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、2 mmol/L Na_2EDTA 和5 mmol/L NADH(电子供体)，pH 7.0)重悬，重组体浓度是1～3 mg dwc mL^{-1}，将1 mL 重悬液置于10 mL 密闭容器中，先将密闭容器抽真空，再通入甲烷与空气混合气体(1∶4，V/V)，置于28 ℃恒温振荡器(150 rpm)培养，生成的甲醇采用气相色谱法测定.

将培养液在4 ℃下以10 000×g 速度离心5 min. 使用气相色谱仪(毛细管 GC 柱(25.0 m×0.25 mm；固定相，SE-54)和火焰离子化检测器(FID)分析上清液中的甲醇含量. 氮气作为载气，流速为75 mL·min-1. 柱温、检测器和进样口温度分别设置为200、180 和60 ℃. 采用外标法进行定量分析[16].

2 结果与讨论

2.1 His_6-pmoB 融合蛋白的表达与鉴定

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析重组体 pmoB 诱导表达情况. 与培养基中没添加 IPTG 对照组比较，在经过 IPTG 诱导4 h 的重组体 SDS-PAGE可明显观察到一个蛋白条带(见图1)，分子量大约是 44 kDa(pmoB 理论分子量是 44615Da). pmoB 是由386 个氨基酸残基组成，重组蛋白在序列中包含一个组氨酸标签(His-tag)，便于纯化和鉴定.

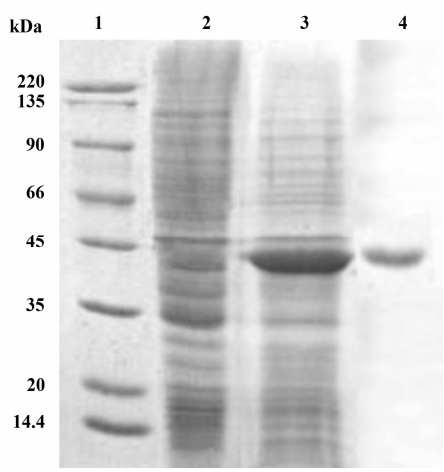

图 1 在 *E. coli* BL21(DE3)中表达的融合蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)图

Fig. 1 SDS-PAGE of fusion proteins expressed in *E. coli* BL21(DE3)

Lane 1: protein molecular mass standards; Lane 2: total protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET-28a(+) after induction with IPTG for 5 h; Lane 3: total protein of *E. coli* BL21(DE3) containing pET/pmoB after induced with IPTG for 5 h; Lane 4: purified His_6-pmoB from soluble protein washed at 80 mM imidazole on Ni-NTA His · Bind resin.

2.2 电子供体对 *Methylococcus capsulatus IMV* 3021 合成甲醇的影响

将 *Methylosinus capsulatus* IMV 3021 培养液离心获得的菌体沉淀用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)洗涤两遍，菌体沉淀分成 2 组. 第一组使用的新配置重悬缓冲液组分如下：50 μm $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 和 2 mmol/L Na_2EDTA，pH 值为 7.0；第二组使用的新配置重悬缓冲液组分如下：50 μm $CuSO_4 \cdot 5H_2O$，2 mmol/L Na_2EDTA 和 5 mmol/L NADH (电子供体)，pH 值为 7.0，同时取两组 1 mL 重悬液置于 10 mL 密闭容器中，先将密闭容器抽真空，再通入甲烷与空气混合气体(1∶4，V/V)，置于 28 ℃ 恒温振荡器(150 rpm)培养培养 4 h，将培养液在 10 000×g 离心(4 ℃)5 min，用气相色谱仪测定上清液中的甲醇浓度. 可以发现 NADH 对于 pMMO 催化甲烷氧化成甲醇活性是必要条件(见图 2)，第二组培养基上清液中甲醇的浓度是 2.49 mmol/L.

2.3 重组体全细胞催化甲烷氧化生成甲醇

将 *E. coli* BL21(DE3)和 *E. coli* BL21(DE3)重组体培养液离心获得的菌体沉淀用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)洗两遍，菌体沉淀用的新配置缓

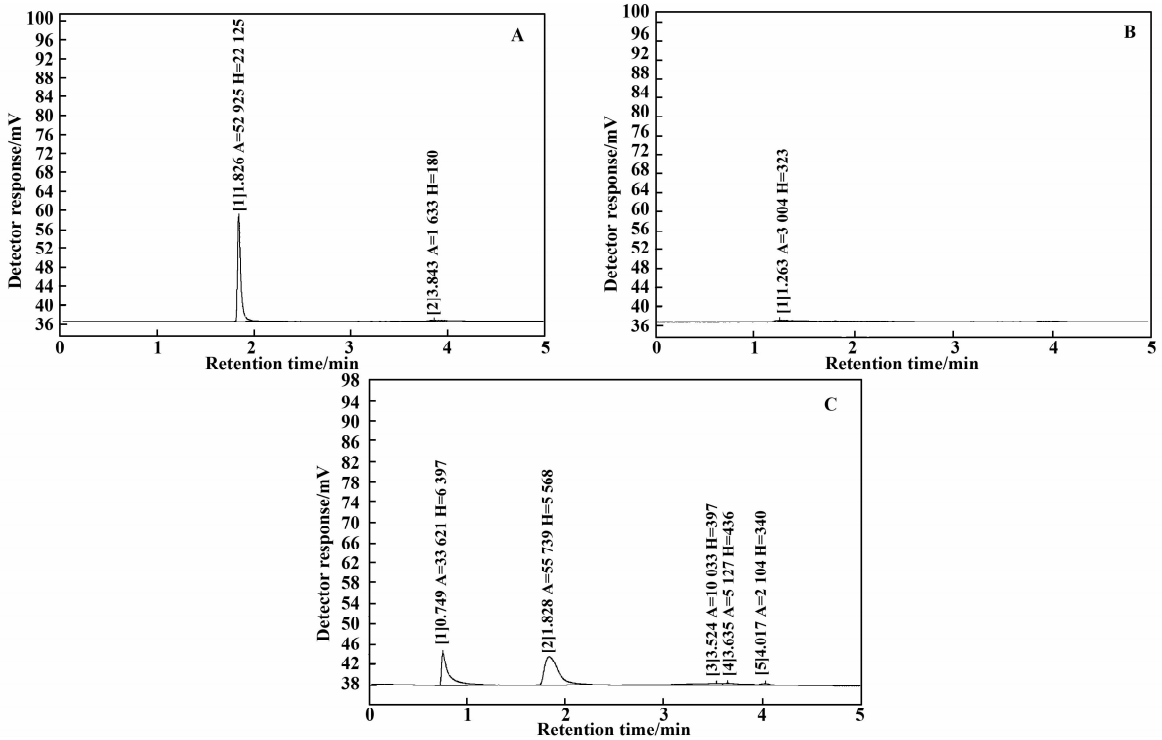

图 2 气相色谱仪检测甲醇色谱图

Fig. 2 The chromatograms for methanol by gas chromatograph

A: Representative gas chromatograph chromatogram of methanol (2.00 mmol/mL) standards. B: Representative chromatogram of samples in group a. C: Representative chromatogram of samples in group b. Retention times, in minutes, are shown. Detection was by FID.

冲液(50 μm $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2 mmol/L Na_2EDTA 和 5 mmol/L NADH (电子供体), pH 7.0)重悬. 将 *E. coli* BL21(DE3)和 *E. coli* BL21(DE3)重组体各 1 mL 重悬液置于 10 mL 密闭容器中, 先将密闭容器抽真空, 再通入甲烷与空气混合气体(1∶4, V/V),置于 28 ℃恒温振荡器(150 rpm)培养培养 4 h,将培养液在 10 000×g 离心 (4 ℃) 5 min, 用气相色谱仪测定上清液中的甲醇浓度. 如图 3 所示, 重组体全细胞催化甲烷氧化成甲醇, 甲醇浓度为 1.04 mmol/L. pmoB 亚基由两部分组成, 一部分是 N 端含有两个跨膜螺旋的铜还原蛋白结构域, 一部分是 C 端铜还原蛋白结构域. C 端铜还原蛋白位于细胞周质中, 是 pMMO 中唯一的可溶性结构域[17].

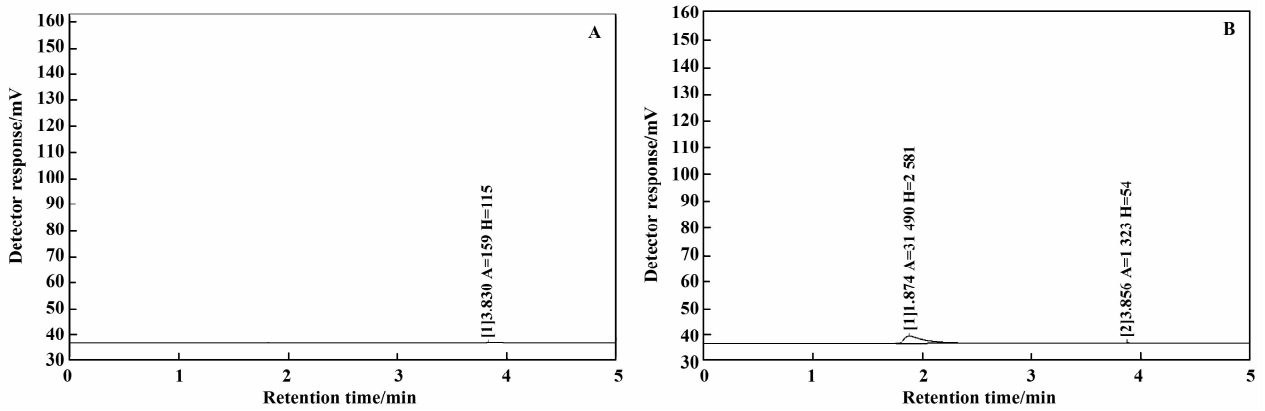

图 3 甲醇气相色谱仪检测图. A: *E. coli* BL21(DE3)上清液气相色谱图

Fig. 3 The chromatograms for methanol by gas chromatograph. A: Representative chromatogram of samples in supernatant of *E. coli* BL21(DE3). B: Representative chromatogram of samples in supernatant of recombinant. Retention times, in minutes, are shown. Detection was by FID.

3 结论

由于 pMMO 分子量大于 100 Da, 异源表达具有难度, 即使重组体构建成功, 酶活较原始菌也会低很多, 并且催化反应产生较多副产物[18]. 本研究成功表达了 pMMO 的活性中心 pmoB, 并通过全细胞催化实现了生物催化甲烷氧化生成甲醇, 虽然甲醇产量没有原菌高, 但无副产物, 并且通过基因克隆与表达技术证明 pmoB 确实是 pMMO 的活性中心, 与 Rosenzweig 通过蛋白晶体结构推测结论一致[16].

参考文献:

[1] a. Liu Yi-jing(刘一静), Liu Jin(刘 瑾). Summarization of the methanol synthesis gas production processes by na- tural gas(天然气制甲醇合成气工艺及进展)[J]. *Chem Ind Times*(化工时刊), 2007, **21**(5): 64-67.
b. Yang Guang(杨 光), Chen Yong(陈 勇), Li Chen-zhi(李臣芝), *et al.* Effect of preparation conditions on catalystic performance of Cu-MnOx for low-temperature methanol synthesis(制备条件对 Cu-MnOx 低温液相甲醇合成性能影响)[J]. *J Mol Catal*(*China*)(分子催化), 2015, **29**(2): 143-151.
c. Du Jun-chen(杜君臣), ChangShi-ying(常仕英), Huang Wei-qiang(黄卫强), *et al.* Progress of the Pd catalysts for methane oxidation under low temperature(甲烷低温氧化 Pd 催化剂的研究进展)[J]. *J Mol Catal*(*China*)(分子催化), 2015, **29**(5): 482-493.
d. Yu Xiao-peng(余晓鹏), Zhang Fu-bao(张付宝). Ni-Ru/MgAl catalysts derived from hydrotalcites for the dry reforming of methane(甲烷干重整反应用 Ni-Ru/MgAl 类水滑石催化剂的研究)[J]. *J Mol Catal*(*China*)(分子催化), 2015, **29**(5): 448-457.
[2] Wilshusen J H, Hettiaratchi J P, De Visscher A, *et al.* Methane oxidation and formation of EPS in compost: Effect of oxygen concentration, EnViron[J]. *Poll*, 2004, **129**(2): 305-314.
[3] Stolyar S, Costello A M, Peeples T L, *et al.* Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium Methylococcus capsulatus Bath[J]. *Micro*, 1999, **145**(5): 1235-1244.
[4] Yu S S, Chen K H, Tseng M Y, *et al.* Production of high-quality particulate methane monooxygenase in high yields from Methylococcus capsulatus (Bath) with a hollow-fiber membrane bioreactor[J]. *J Bact*, 2003, **185**

(20)：5915-5924.

[5] Lieberman R L, Shrestha D B, Doan P E, *et al.* Purified particulate methane monooxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath) is a dimer with both mononuclear copper and a copper-containing cluster[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(7): 3820-3825.

[6] Choi D W, Kunz R C, Boyd E S, *et al.* The membrane-associated methane monooxygenase pMMO and pMMO-NADH: quinone oxidoreductase complex from Methylococcus capsulatus Bath[J]. *J Bact*, 2003, **185**(19): 5755-5764.

[7] Nguyen H H1, Elliott S J, Yip J H, *et al.* The particulate methane monooxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme. Isolation and characterization[J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(14): 7957-7966.

[8] Basu P, Katterle B, Andersson K K, *et al.* The membrane-associated form of methane mono-oxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath) is a copper/iron protein [J]. *Biochem*, 2003, **369**(2): 417-427.

[9] Anthony C. The biochemistry of methylotrophs[M]. Academic Press, 1982.

[10] Bédard C, Knowles R. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH_4, $NH4^+$, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers[J]. *Micro Rev*, 1989, **53**(1):68-84.

[11] Shiemke A K, Cook S A, Miley T, *et al.* Detergent solubilization of membrane-bound methane monooxygenase requires plastoquinol analogs as electron donors. Arch. Biochem[J]. *Biophys*, 1995, **321**(2): 421-428.

[12] Zahn J A, DiSpirito A A. Membrane-associated methane monooxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath) [J]. *J Bact*, 1996, **178**(4): 1018-1029.

[13] Karlsen O A, Larsen O, Jensen H B. The copper responding surfaceome of Methylococccus capsulatus Bath [J]. *FEMS Micro Lett*, 2011, **323**(2): 97-104.

[14] Miyaji A. Particulate methane monooxygenase from Methylosinus trichosporium OB3b [J]. *Meth Enzy*, 2011, **495**: 211-225.

[15] Miyaji A, Kamachi T, Okura I. Improvement of the purification method for retaining the activity of the particulate methane monooxygenase from Methylosinus trichosporium OB3b[J]. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**(22): 1883-1887.

[16] Smith S M, Rawat S, Telser J, *et al.* Crystal structure and characterization of particulate methane monooxygenase from Methylocystis species strain M[J]. *Biochem*, 2011, **50**(47): 10231-10240.

[17] Balasubramanian R, Smith S M, Rawat S, *et al.* Oxidation of methane by a biological dicopper centre[J]. *Nature*, 2010, **465**(7294): 115-119.

[18] Han Bing(韩 冰), Su Tao(苏 涛), Yang Cheng(杨程), *et al.* Heterologous expression of particulate methane monooxygenase in different host cells(颗粒状甲烷单加氧酶异源表达方法)[J]. *Chin J Biotechnol*(生物工程学报), 2009, **25**(8): 1151-1159.

Heterologous Expression of pmoB in *Escherichia coli* and Catalytic Oxygenation of Methane to Methanol

ZHANG Tie-nan*, WANG Yan, JIANG Dan, XIN Jia-ying, ZHANG Shuai, DONG Jing

(*Key Laboratory of Food Science and Engineering*, *College of Food Engineering*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076, *China*)

Abstract: Particulate methane monooxygenase (pMMO) are enzymes that catalyze the oxidation of methane to methanol in the methanotrophs. To localize the active site within the pMMO structure, constructs were generated corresponding to the soluble cupredoxin domains of *Methylococcus capsulatus* IMV 3021 pmoB. In this chapter, we describe protocols to express and biocatalyst of the pmoB subunit. The NADH concentration in the growth medium was found to be 5 mmol/L. We show that pmoB subunit by heterologous expression catalyze the oxygenation of methane to methanol. The methanol concentration was 1.04 mmol/L. Understanding pMMO function has important implications for the development of new, environmentally friendly catalysts for the direct conversion of methane to methanol.

Key words: biocatalysis; particulate methane monooxygenase; *Methylococcus capsulatus* IMV 3021; methane; methanol