

- 6 Nussbaum R L, Lesko J G, Lewis R A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987; **84**: 6521
- 7 Welcher A A, Torres A R, Ward D C. Nucleic Acid Res, 1986; **14**: 10027
- 8 Straus D, Ausubel F M. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87**: 1889
- 9 Wieland L, Bolger G, Asouline G *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **97**: 2720
- 10 Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Science, 1993; **259**: 946
- 11 Zhu S G, Wu M. Nucleic Acid Res, 1994; **22**: 2428
- 12 Wieland L, Bohm M, Bogatz S. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 9705
- 13 Lisitsyn N, Segre J A, Kusumi K *et al.* Nature Genet, 1994; **6**: 57
- 14 Collins F. Nature Genet, 1992; **1**: 3
- 15 Feng L, Wang X Q, Wu M *et al.* Science in China (Series B), 1992; **35**: 445
- 16 Lamers W H. Nucleic Acid Res, 1994; **22**: 878

The Method and Applications of Genomic Sub-

traction. Hou Ping, Wu Min (*National Laboratory of Molecular Oncology and Department of Cell Biology, Cancer Institute, CAMS-PUMC, Beijing 100021, China*).

Abstract Genomic subtraction is an efficient and economical method for isolating sequences present in one genomic DNA population (tester) but absent in another (driver). It proved widely applicable to detecting genomic abnormalities in cancer, probes for polymorphic loci and acquisition of new sequences in infectious diseases of viral organism. The foundation and development of genomic subtraction, experimental strategy, applications, problems in present and promise in future are described.

Key words subtractive hybridization, deleted gene, PCR, nuclease S1

甲烷单加氧酶的催化性能和活性中心结构*

沈润南 李树本

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

摘要 甲烷单加氧酶是甲烷利用细菌代谢甲烷过程中的重要酶系, 它能够催化烷烃羟基化和烯烃环氧化反应, 还能催化降解氯代烃类, 可用于环境中氯代烃类化合物污染的治理, 是具有广泛应用前景的生物催化剂。甲烷单加氧酶是含有 μ -氧桥双核铁催化活性中心的蛋白, 它的研究对分子氧的活化、化学催化剂的设计具有重要意义。文章介绍了甲烷单加氧酶催化性能和机理的最新研究进展。

关键词 甲烷单加氧酶, 甲烷利用细菌, 催化性能, 催化活性中心

甲烷单加氧酶 (EC 1.14.13.25 简称 MMO) 是甲烷利用细菌 (methanotrophic bacteria) 代谢过程中的重要酶系, 在细菌细胞内 MMO 直接利用分子氧作为底物催化甲烷氧化成甲醇, 这一反应在化学催化中很难实现。对 MMO 催化活性中心和机理深入研究, 为化学催化剂的设计提供一个理论模型, 以指导甲烷催化氧化制备甲醇催化剂的研制。具有重要的理论意义和应用价值。

MMO 作为一个具有应用前景的工业生物催化剂能够催化烷烃的羟基化反应和烯烃的环氧化反应 (反应式见图 1)。据统计, 欧、美、日各石油化学大公司就 MMO 催化烷烃羟基化、烯烃环氧化反应等申请专利 50 多项。MMO 催化烯烃环氧化反应具有立体选择性。而纯的

* 国家自然科学基金资助项目和中国科学院“八五”应用技术重大项目。

收稿日期: 1994-09-15, 修回日期: 1995-06-15

光学活性的环氧化合物作为药物合成中间体具有较大的市场潜力, 世界上一些大的制药公司和化学公司正在进行这方面的研究和工业开发. 然而, 由于生物催化过程生产强度低、生物催化剂稳定性差、需要消耗辅酶, 无法与现有的化学法生产竞争, 所以至今尚未见工业化报道. 但 MMO 终究会因其固有的催化反应多样性和宽的底物专一性而成为一种理想的工业生物催化剂. 解决以上问题的途径是: a. 探索新的催化反应, 生产附加值高、批量小、化学法不能合成或者很难合成的化合物; b. 通过细胞或酶的固定化提高酶的稳定性; c. 通过有机相反应的研究提高酶催化过程中产物的积累; d. 采用基因工程菌提高 MMO 催化活性.

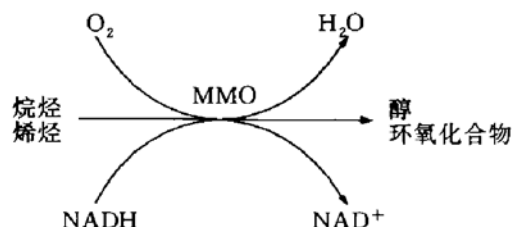


图 1 MMO 催化烷烃羟基化和烯烃环氧化反应

此外, 甲烷利用细菌生物降解氯代烃类可用于环境治理.

MMO 的研究可以帮助科学家了解: a. 分子氧的活化理论; b. 烷烃和烯烃特别是甲烷的活化理论; c. 目前已发现多种功能各异的 μ -氧桥双核铁簇蛋白, MMO 作为其中之一与其他蛋白质的关系. MMO 双核铁簇模拟化学已成为无机化学的重要研究领域.

1 甲烷利用细菌的分类和 MMO 的表现形态

可根据所利用碳源和能源不同将甲烷利用细菌分成专性甲烷利用细菌 (obligate methanotrophs), 兼性甲烷利用细菌 (facultative methanotrophs) 和拟甲烷利用细菌 (autotrophic methanotrophs). 专性甲烷利用细菌以甲烷作为唯一的碳源和能源; 兼性甲烷利用细菌除甲烷外还能利用其他多碳化合物生长; 而拟甲烷氧化细菌则先将甲烷等生长物质氧化成 CO_2 , 然后再利用 CO_2 生长. 目前所研究的 MMO 大部分来源于专性甲烷利用细菌. 甲烷利用细菌可按碳吸收途径不同分成: Type I 单磷酸核酮糖途径 (RuMP pathway); Type II 丝氨酸途径 (serine pathway); Type X 兼有 RuMP 途径和 Serine 途径. 表 1 是用于 MMO 研究的菌种分类.

表 1 研究 MMO 所用甲烷利用细菌的分类

菌 株	类 别	研究者	参考文献
专性甲烷利用细菌			
甲基单胞菌 <i>Methylomonas</i> sp. GYJ3	type I	李树本等, 中国科学院兰州化学物理研究所	[1]
甲基弯菌 <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	type I	Lipscomb <i>et al.</i> , Minnesota 大学	[2]
<i>sporum</i> 5		Lidstrom <i>et al.</i> , 加州理工学院	[3]
		Dalton <i>et al.</i> , Warwick 大学	[4]
甲基胞囊菌 <i>Methylocystis</i> sp. M	type II	Nakajima <i>et al.</i> , 日本国立环境研究院 Tsukuba 大学	[5]
甲基球菌 <i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	typ X	Dalton <i>et al.</i> , Warwick 大学	[6]
<i>capsulatus</i> M.		Akentieva <i>et al.</i> , 俄罗斯科学院化学物理所	[7]
兼性甲烷利用菌			
甲基杆菌 <i>Methylobacterium</i> CRL-26	type II	Patel, Exxon 公司	[8]

MMO 以两种不同的形式存在, 即膜键合形式的 MMO, 又称颗粒性的 MMO (pMMO); 细胞浆形式的 MMO, 又称可溶性 MMO (sMMO). 两种 MMO 催化性能基本相同. 纯酶水平的研究以 sMMO 为主. 对来源于 *Methylococcus capsulatus* M. 和 *Methylococcus capsulatus* 的 pMMO 也进行了较为详细的研究^[3,7], 关于 pMMO 羟基化酶的催化活性中心结构存在两种观点: Akentieva 等^[1]认为 pMMO 催化反应机理和催化活性中心与 sMMO 相同; 而 Chan 等^[3]认为 pMMO 的催化活性中心是一个三铜金属簇. 甲烷利用细菌生长过程中产生哪种形式 MMO 主要取决于培养过程中 Cu^{2+} 的浓度, 当 Cu^{2+} 量足够大时细胞主要产生 pMMO, 反之则产生 sMMO. 最近, Park 等^[9]通过控制培养条件获得 sMMO 和 pMMO 的方法, 可用于实验室制备 MMO.

2 MMO 的催化功能

2.1 MMO 催化烷烃羟基化反应和烯烃环氧化的功能

MMO 催化烷烃羟基化反应和烯烃环氧化反应的能力已引起很大的兴趣. 根据专利和已发表文章的统计结果表明, BP、Shell、Exxon、ICI、Pfizer、Dow、Idemitsu Kosan、Amoco 和 Glaxo 等一些大石油化学公司都参与了 MMO 催化功能的研究^[10]. 从统计结果中还可以看出 MMO 主要用于醇类和环氧化合物的制备. 1977 年 Dalton 小组^[11]研究了来源于 *M. capsulatus* Bath 的 sMMO 催化底物的能力, 研究结果表明 sMMO 是一个非专一性酶, 它能够催化 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ 烷烃类、卤代、硝基取代烷烃类、烯烃和二烯烃类、芳香烃类和醚类等化合物氧化生成相应的醇和环氧化合物. 随后筛选出许多甲烷利用细菌, 发现它们的悬浮细胞能够催化烷烃和烯烃羟基化和环氧化反应, 且具有较宽的底物选择性. 醇类和环氧化合物是重要的化工原料和合成中间体. 但是, 生产这种大宗化学品的 MMO 催化过程, 尚未见工业化报道. 针对这一过程所进行的细胞固定化、生物反应

器设计和反应条件优化等研究则一直在进行. 近几年随着医学的发展, 合成药物的光学纯度要求越来越高, 以尽可能减少药物的副作用, 提高药物的治疗效果. 和其他生物催化过程一样, MMO 催化烷烃基化反应和烯烃环氧化反应具有很高的立体选择性. MMO 和来源于烷烃、烯烃利用细菌的单加氧酶 (alkane or alkene monooxygenase, AMO), 已成为催化烯烃环氧化, 制备具有光学活性环氧化合物的重要生物催化剂, 由此获得的产物光学选择性接近 100%. 目前有关这方面的研究已取得一些有实用意义的结果. 如利用这类生物催化剂催化芳香烃基烯烃基醚环氧化反应可制备出 S-芳香烃基环氧丙烷基醚——合成 β -肾上腺素受体拮抗剂的中间体, Shell 公司和 Gist Brocades 公司已宣布将联合研究开发这一过程. 利用含 MMO 和 AMO 的休止细胞催化相应的烯烃环氧化反应制备 S(-)-4-溴-1, 2-环氧丁烷和 R(+)-4-羟基-1, 2-环氧丁烷, 后两者是合成抗菌素, 抗真菌药物和抗焦虑药物的中间体. 据报道, 日本矿业公司 (Nippon Mining Co.) 已实现商业规模的 MMO 和 AMO 催化烯烃环氧化反应制备纯光学活性环氧化合物工业过程, ICI 生物产品部也正在研究开发类似的一个工业过程. 但是, MMO 催化烯烃环氧化反应的工业化仍有一定困难, 即环氧化合物和 MMO 结合使 MMO 中毒、活性降低和失活. 近年发展的有机相酶催化反应体系是解决的途径之一. 在反应体系中环氧化合物分配于有机相中, 可避免和酶的接触, 减少酶的失活.

2.2 MMO 用于环境中氯代烃类的降解

由于氯代脂肪烃类化合物作为工业溶剂和聚合物单体广泛应用, 给环境带来严重污染. 环境调查表明在美国这类化合物对地下水污染较为严重, 直接威胁人类健康. 因此, 研究氯代脂肪烃的生物降解, 对治理环境污染具有很重要的现实意义. 研究表明含有甲烷利用细菌的混合培养物在有氧条件下能够生物降解氯代烃类污染物. 继之筛选出许多不同种类的能够生物降解氯代烃的甲烷利用细菌, 如 *M. tri-*

trichosporium OB3b, *Methylobacterium* sp. MM1 和 *Methylobacterium* sp. 86-1^[12], 用甲烷利用细菌生物催化降解氯代烃污染物具有以下优点: a. 甲烷利用细菌能够以很高的速率生物降解氯代烃类化合物, 在降解过程中不产生对人体有害的中间物, 而在无氧条件下, 用其他细菌生物降解氯代烃类会产生氯乙烯, 该化合物具有很强的致癌作用; b. 甲烷利用细菌生物降解氯代烃类具有很宽的底物选择性, 几乎能降解所有正在使用的氯代烃类. 在 Bell 编辑的《催化展望》一书中已将该过程列为环境催化研究的重要课题之一.

在氯代烃的生物降解过程中 MMO 催化氯代烷烃类羟基化、氯代烯烃类环氧化转化为相应醇和环氧化合物, 然后再由其他代谢酶系作用, 最终使之矿物化. 目前甲烷利用细菌作为工业化生物降解催化剂的主要问题是如何解决氯代烃类和降解产物氯代环氧化合物使 MMO 中毒问题. 加州理工大学 Lidstrom 等^[10]认为该项技术在今后几年里将实现工业化.

3 MMO 催化作用机理和活性中心结构

3.1 MMO 的理化性质和催化作用机理

MMO 是一个三组分复合酶体系, 到目前为止已从 7 种甲烷利用细菌中分离纯化出 MMO (见表 1), 其中对来源于 *M. trichosporium* OB3b 和 *M. capsulatus* Bath sMMO 进行了较系统的研究, MMO 的三个复合酶组分分别是羟基化酶、调节蛋白 B (regulatory protein B) 和还原酶. 羟基化酶是分子量为 120~245ku, 含 2 个或 4 个 Fe 的金属蛋白; 调节蛋白 B 是分子量为 14~17ku, 不含辅基和金属的蛋白; 还原酶是分子量为 40~45ku, 含 1 个 Fe_2S_2 和 FAD 辅基的蛋白. 1984 年 Dalton 小组^[6]证实 MMO 催化甲烷羟基化反应机理: 羟基化酶和烷烃或烯烃、分子氧结合, 并使之活化; 还原酶接受 NADH 的电子, 并将电子传递至羟基化酶; 调节蛋白 B 则在还原酶和羟基化酶之间的电子传递过程中起开关作用. 后经证实其他不同来源的 sMMO 也具有相同或相似

的催化机理 (图 2).

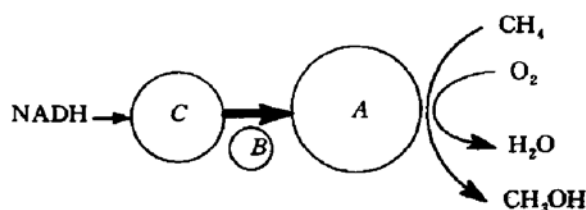


图 2 MMO 催化甲烷羟基化反应机理示意图

A: 羟基化酶; B: 调节蛋白 B; C: 还原酶.

3.2 羟基化酶活性中心结构

阐明具有羟基化和环氧化反应催化活性的羟基化酶活性中心结构是研究 MMO 催化作用机理的关键所在. 羟基化酶的催化活性与所含铁有关. 进一步研究羟基化酶的波谱性质, 发现部分还原态的羟基化酶 ($\text{Fe}^{\text{II}} \cdot \text{Fe}^{\text{II}}$) 的 ESR 光谱信号 ($g_{\text{w}}=1.88$) 与蚯蚓血红蛋白的信号相似, 后者经证实含有 μ -氧桥双核铁金属簇中心. Lipscomb 研究小组^[13]深入发现当部分还原态的羟基化酶 ($\text{Fe}^{\text{II}} \cdot \text{Fe}^{\text{II}}$) 进一步还原成全还原态的羟基化酶 ($\text{Fe}^{\text{I}} \cdot \text{Fe}^{\text{I}}$) 后 $g_{\text{w}}=1.87$ 信号消失, 而 $g=15$ 处出现一个新的 ESR 信号, 这一信号为双核二价铁的整数自旋共振信号, 并由 μ -氧桥双核铁模型化合物的 ESR 光谱研究证实. Prince 等^[8]和 Fox 等^[2]研究了羟基化酶的 Mossbauer 谱特征, 结果表明氧化态羟基化酶在 4.2K 下具有 $\Delta E=1.77 \text{ mm/s}$ 和 $\delta=0.5 \text{ mm/s}$ 单一四极分裂双重峰. 场相关研究结果表明铁原子中心是抗磁性的, 说明该中心含有偶数个 Fe^{II} 离子, 而全还原态羟基化酶 ($\text{Fe}^{\text{I}} \cdot \text{Fe}^{\text{I}}$) 的 Mossbauer 光谱具有 2 个四极分裂双重峰, 这是 Fe^{I} 的特征参数 ($\Delta E=3.14 \sim 2.4 \text{ mm/s}$ 和 $\delta=1.3 \text{ mm/s}$).

1991 年由 Dalton 研究小组和美国 MIT 的 Lippard 和斯坦福大学的 Hodgson 研究小组^[14]合作对 MMO 羟基化酶催化活性中心进行了结构表征. 新的结果主要来源于 EXAFS 数据. 这些结果是: a. 羟基化酶的双核铁可能是 1 个羟基氧桥或者烷基氧桥的双核铁簇; b. Fe-Fe 之间可能存在 1 个或 2 个羧基双螯合

桥; c. Fe-Fe 之间的距离是 0.341 nm; d. 每个 Fe 周围有 6 个氧 (或者氮) 配位, Fe-O (或者 N) 之间的距离是 0.205 nm.

1993 年, Rosenzweig 等^[15]对 *Methylococcus capsulatus* Bath 菌中的 sMMO 的羟基化酶结晶进行了 X 光衍射分析, 分辨率为 0.22 nm, 结果表明羟基化酶为 6 nm × 10 nm × 12 nm 大小的相对扁平分子, 双铁原子分别由一个外部的羟基和羧基桥联, 并和 4 个谷氨酸残基、2 个组氨酸和 1 个水分子相联 (图 3). 双铁中心位于一个疏水活性中心腔内, 该腔可键合甲烷等底物分子. 在 α , β 亚基之间存在一个扩张的通道, 在通道内有许多 α -单环, 它们可能用于和还原酶、调节蛋白连接. 作为 μ -氧桥双核铁簇蛋白的一种, MMO 羟基化酶已引起了重视.

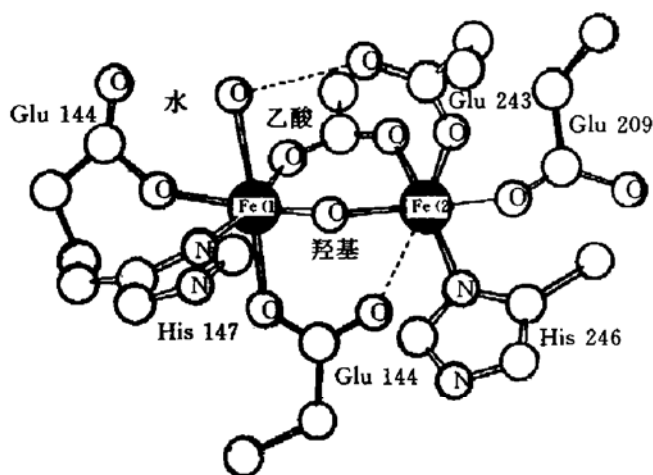


图 3 MMO 羟基化酶双铁簇中心结构

3.3 MMO 羟基化酶催化反应的机理

Dalton 等^[16]提出了羟基化酶催化甲烷羟基化反应的机理 (图 4). MMO 羟基化酶的双核铁簇中心处在三价铁 ($\text{Fe}^{\text{III}} \cdot \text{Fe}^{\text{III}}$) 状态 (结构 1), 甲烷键合于羟基化酶双铁簇中心附近的疏水口袋中 (结构 2). 其中一个 Fe^{III} 接受电子还原成 Fe^{II} 即 ($\text{Fe}^{\text{II}} \cdot \text{Fe}^{\text{III}}$) 形式 (结构 3). 另一个 Fe^{III} 再接受一个电子形成 ($\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}$) 物种 (结构 5). 分子氧与结构 5 作用, 双核铁簇被氧化成三价铁 ($\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{III}}$), 形成一个反应性过氧化物物种 (结构 6). 也可能存在另一条途径至结构 6,

即结构 3 和分子氧作用先形成一个超氧化合物 (结构 4), 超氧物种接受一个电子形成结构 6, 过氧化物物种可能通过两种途径和甲烷作用. 一种途径均裂产生羟基自由基, 由羟基自由基和 CH_4 作用形成 CH_3OH (结构 6 至结构 7); 另一种途径是过氧化物物种异裂形成铁氧烯物种 (结构 8), 它可直接获得甲烷分子上的氢形成一个甲基自由基, 甲基自由基与羟基作用形成 CH_3OH , 实验中已经观察到底物自由基的形成, 表明反应可能是一个自由基反应. 应用自由基底物探针反应证实 MMO 催化反应过程存在自由基中间体, 但同时也可能存在一个正碳离子中间体. 由 Lee 等^[17]在反应过程中观察到 Fe^{IV} 物种, 即形成结构 7 和结构 9 的证据, Fox 等^[18]系统研究了羟基化酶在反应过程中的光谱性质, 结果表明 2 个 Fe 离子在反应过程中不是等同的, 和 Dalton 的假设一致. 目前, Dalton 所提出的羟基化酶作用机理已被广泛地接受, 并为 MMO 的化学模拟提供了重要的理论依据.

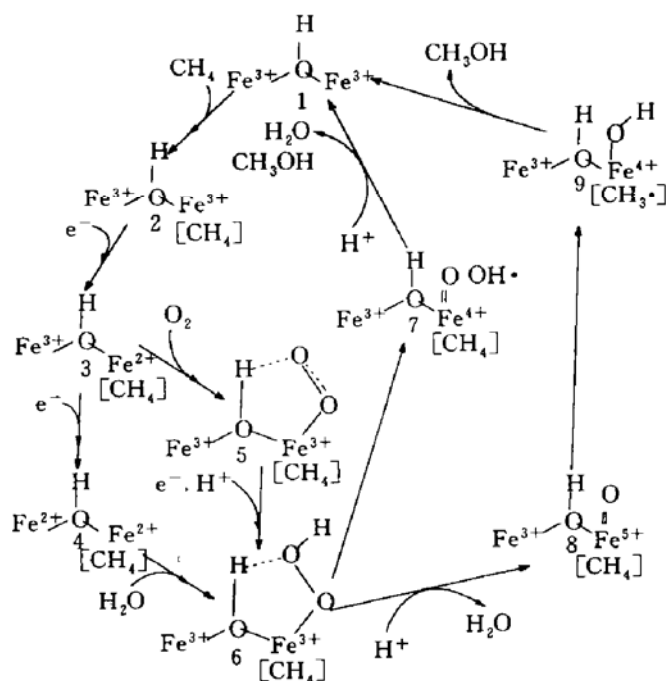


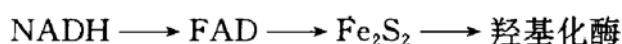
图 4 羟基化酶催化机理示意图

3.4 MMO 电子传递体系

羟基化酶的 μ -氧桥双铁簇是催化反应的活性中心, 完成一个循环后本身被氧化为三价

态铁, 需接受电子成为二价铁活性态, NADH 作为电子给体. 但是, 羟基化酶不能直接接收 NADH 的电子, 它们之间的电子传递过程见图 2. 还原酶含有一个 Fe_2S_2 中心和 FAD 中心, UV 最大吸收分别位于 340 nm, 420 nm, 480 nm 处^[19]. FAD 中心是一个电中性半醌. Fe_2S_2 中心似乎与菠菜铁氧化还原蛋白的活性中心极为相似, 还原酶具有 4 种不同氧化还原形式: 0 电子态 (氧化态); 1 电子态 (半醌态); 2 电子态 (半醌态和 Fe_2S_2 还原态); 3 电子态 (双氢醌态和 Fe_2S_2 还原态). 在反应条件下, 还原酶存在 1 电子态与 2 电子态之间的平衡, 并作为 NADH 的电子受体将电子转移至羟基化酶. 还原酶 Fe_2S_2 中心和 FAD 中心的氧化还原电位分别为: $\text{FAD}/\text{FAD}^{1e}$, $E_m = -150 \text{ mV}$; $\text{Fe}_2\text{S}_2/\text{Fe}_2\text{S}_2^{1e}$, $E_m = -220 \text{ mV}$; $\text{FAD}^{1e}/\text{FAD}^{2e}$, $E_m = -260 \text{ mV}$.

有氧停流 (stopped-flow) 法研究表明还原酶能够被 NADH 还原, 该过程不是 MMO 催化反应中的限速步骤. 研究还认为 FAD, Fe_2S_2 和 NADH 与 MMO 的催化反应活性具有相关性. MMO 电子传递链为:



MMO 分子间的电子转移与 MMO 3 个组分有关. 调节蛋白作为开关酶, 作用于羟基化酶与还原酶之间的电子传递. 分子间的电子传递不是 MMO 催化反应的限速步骤.

近期研究^[20]表明还原酶可改变 MMO 催化反应的立体选择性、羟基化酶活性中心的 EPR 信号. 目前有关 MMO 三个组分之间相互作用的分子水平的研究尚报导不多.

中国科学院兰州化学物理研究所自 1988 年开展甲烷利用细菌中 MMO 催化研究, 已筛选出一株具有较高活性的菌株, 并进行了酶纯化、反应的研究^[1].

参 考 文 献

- Liu A M, Li S B. *Biochem Internatl*, 1990; **22**: 959
- Fox B G, Surerus K K, Munck E *et al.* *J Biol Chem*, 1988; **263**: 10553
- Chan S I, Hiep-Hoa T N, Lidstrom M *et al.* In: Murrell J C ed. *Microbial growth on C₁ compounds*. Intercept Ltd, 1993: 93
- Pilkington S J, Dalton H. *FEMS Microbiol Letts*, 1991; **78**: 103
- Nakajima T, Uchiyama H, Yagi O *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1992; **56**: 736
- Woodland M P, Dalton H. *J Biol Chem*, 1984; **259**: 17698
- Akentieva N P, Gvodev S. *Biokhimiya*, 1990; **53**: 91
- Prince R C, Geoge G N, Savas J C *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1988; **952**: 220
- Park S, Shah N N, Taylor R T *et al.* *Biotech Bioeng*, 1992; **40**: 151
- Lidstrom M E, Stirling D I. *Annu Rev Microbiol*, 1990; **44**: 27
- Colby J, Stirling D I, Dalton H. *Biochem J*, 1977; **165**: 395
- Fox B G, Borneman J G, Wackett L P *et al.* *Biochemistry*, 1990; **29**: 6419
- Handrich M P, Munck E, Fox B G *et al.* *J Am Chem Soc*, 1990; **112**: 5861
- DeWitt J G, Bentsen J G, Rosenzweig A C *et al.* *J Am Chem Soc*, 1991; **113**: 9219
- Rosenzweig A C, Frederick C A, Lippard S J *et al.* *Nature*, 1993; **366**: 537
- Dalton H, Smith D D S, Pilkington S J. *FEMS Microbiol Revs*, 1990; **87**: 210
- Lee S K, Fox B G, Froland W A *et al.* *J Am Chem Soc*, 1993; **115**: 6450
- Fox B G, Hendrich M P, Surerus K K *et al.* *J Am Chem Soc*, 1993; **115**: 3688
- Lund J, Dalton H. *Eur J Biochem*, 1985; **147**: 291
- Froland W A, Andersson K K, Lipscomb J *et al.* *J Biol Chem*, 1992; **267**: 17588

Methane Monooxygenase: Catalytical Performance and Mechanism. Shen Runnan, Li Shuben (*State key laboratory of Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Lanzhou 730000, China*).
Abstract Methane monooxygenase (MMO), an important enzyme in metabolism of methane in methanotrophs, catalyzes the hydroxylation of alkanes and the epoxidation of alkenes. In addition, MMO can biodegrade

haloalkanes and haloalkenes. Being one of the proteins containing binuclear iron centers, MMO can activate oxygen for insertion into a C-H bond. The elucidation of structures of active centers of MMO is significant for methane utilization and design of chemical catalysts.

This article will concentrate on progress on above researches.

Key words methane monooxygenase, methanotroph, catalytical performance, binuclear iron center

毛细管无胶筛分电泳*

郭 栩 薛 俊 张 岩 林炳承**

(中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116012)

摘要 围绕着毛细管无胶筛分电泳的介质和机理, 概括介绍了近年来这种技术在各个方面的发展, 及其在 DNA 片段的分离、PCR 扩增产物的检测和蛋白质分子量的测定等方面的应用前景。

关键词 无胶筛分电泳, 线性聚合物, DNA 片段, PCR 扩增产物, 蛋白质

高效毛细管电泳 (HPCE) 作为一种极其重要的分离分析方法, 已引起生命科学各领域以及相关学科的极大重视, 并在生化分析, 临床医学和环境食品等领域得以广泛的应用。特别是近几年来, HPCE 的发展显示了其在多肽、蛋白质 (包括酶、抗体)、核酸的分离分析以及 DNA 测序方面的巨大潜力。

由于核酸片段、SDS-蛋白质的质量和电荷比值近似相等, 对它们的分离一般均使用毛细管筛分电泳。毛细管筛分电泳, 包括毛细管凝胶电泳 (CGE) 和毛细管无胶筛分电泳 (NGS) 两类, 均以样品分子大小为分离基础。

在毛细管筛分电泳中, 凝胶电泳发展较早。在 1983 年, Hjerten^[1]就首次将传统凝胶电泳技术中的聚丙烯酰胺凝胶装入内径为 150 μm 的玻璃毛细管中, 以消除毛细管内壁对蛋白质的吸附, 并利用这些方法对多种蛋白质进行分离^[1,2]。取得了很好的分离效果。

1987 年, Cohen 和 Karger^[3]使用了内径 100 μm 以下的弹性石英毛细管, 用同管内壁交联的方法制备凝胶柱, 分离了蛋白质、DNA 片段和寡聚核苷酸。1990 年, Lux 和 Xin 等^[4]

提出了用线性聚丙烯酰胺对柱内表面预处理和用 γ 射线引发聚合的方法, 在分离 DNA 片段和寡聚核苷酸时取得了极高的效率。以后, 我们实验室也在 CGE 柱的制备和应用工作方面做了很多尝试^[5]。

由于凝胶毛细管柱制备困难, 寿命短, 进样端易堵, 许多人开始探索使用低交联或无交联的聚丙烯酰胺柱。Cohen 等人用 9%~12% 浓度的线性聚丙烯酰胺分离 DNA 片段, 效果较为理想。1989 年, Zhu^[6]提出在 CE 缓冲液中加入纤维素衍生物, 他以甲基纤维素为筛分介质对 DNA 片段做了很好的分离, 在蛋白质的分离和分子量的测定方面也取得了初步的结果 (图 1)。现在, 一般将这种在电解质溶液中加入水溶性高分子聚合物的溶液体系, 称为无胶筛分电泳 (non-gel sieving, NGS) 体系。

NGS 体系同时具有抗电渗流和筛分的作用, 它柱效较高, 且易于制备。目前已被逐步应用于低聚核苷酸、DNA 限制性片段、聚合酶

* 国家自然科学基金资助项目。

** 通讯联系人。

收稿日期: 1994-09-15, 修回日期: 1995-01-16