

## 烟草头孢霉汞还原酶特性的研究\*

王保军 李文忠 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

经检测, 抗汞真菌烟草头孢霉(*Cephalosporium tabacinum*) F2菌株中具有汞还原酶活性。该酶是一种胞内酶, 需 NADH 作为电子供体, 催化  $\text{Hg}^{2+}$  还原成为元素汞( $\text{Hg}^0$ )。该酶促反应还需巯基化合物, 反应最适温度为 30℃, 最适 pH 范围为 7.0—8.0。在 25—30℃ 保温 40 分钟或在 pH 7.0 保温 2 小时, 酶活力均是稳定的。金属离子  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  在浓度为 0.2—1.0 mmol/L 的范围内, 对酶活力有不同程度的抑制作用, 一定浓度的乙酸苯汞和铁氰化钾对酶活力也有部分抑制作用。

**关键词** 烟草头孢霉 F2; 汞还原酶

汞是一种重要的重金属, 汞化合物在工业、农业、医药中常用作催化剂、消毒剂和杀菌剂等。由于汞制剂的使用、采矿、含汞煤炭及石油的燃烧, 全世界每年约有  $2-7 \times 10^4$  吨汞排放到环境中, 此类有毒化合物对环境造成的污染已经引起人们的极大关注<sup>[1]</sup>。本世纪 60 年代起, 科学家对汞在自然界的循环进行了大量的研究。现已证明, 在自然界汞的迁移转化过程中, 微生物起着重要的作用, 某些微生物能够加剧汞的毒性, 而另外一些抗汞微生物对汞则具有解毒作用。因此, 研究微生物对汞的抗性及其解毒机理, 不仅能够为生物治汞净化环境提供重要的科学依据及可行的手段, 而且也能够丰富微生物生理学、生态学、生物化学及遗传学理论。目前, 国外对细菌的抗汞特性研究较多。研究者指出, 细菌对汞的抗性主要是由于抗性菌体内存在着汞解毒酶, 汞还原酶就是其中一种重要的解毒酶。该酶催化  $\text{Hg}^{2+}$  还原成为元素汞( $\text{Hg}^0$ ), 从生长环境中挥发出去, 从而解除汞对菌体的毒害。有关细菌中汞还原酶的报道较多<sup>[2-4]</sup>。但在真菌中此种酶报道极少。最近, 日本的手塚敏幸描述了抗有机汞真菌——青霉菌(*Penicillium* sp.) MR-2 菌中汞还原酶的特性<sup>[5]</sup>。国内对抗汞微生物研究尚少<sup>[6]</sup>, 真菌中汞还原酶的研究未见报道。我们曾对分离的抗氯化汞的真菌烟草头孢霉(*Cephalosporium tabacinum*) F2 菌株的抗汞特性及解毒作用进行了研究, 并对该菌的汞解毒机理进行了初探<sup>[7-9]</sup>。本文报道该菌中汞还原酶活性的检测及酶的某些特性。

## 材 料 和 方 法

## (一) 菌种

烟草头孢霉(*Cephalosporium tabacinum*) F2 为本组分离。

## (二) 培养基

蔗糖 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 土豆汁 1000ml, pH 7.0。

本文于 1991 年 9 月 13 日收到。

\* 国家自然科学基金资助项目。

### (三) 菌体培养及完整细胞悬浮液的制备

按前文进行菌体培养<sup>[9]</sup>, 16 小时后, 4℃ 离心 (K70D, 5000 × g) 30 分钟, 收集菌体, 用 0.067 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤并离心, 按 20 mg (干重)/ml 的浓度悬浮于同样的缓冲液中。

### (四) 无细胞提取液的制备

将细胞悬浮液在冰浴中 19 K Hz 200 W 超声波破碎 2' × 6 (Labsonic, 2000, B. Braun, USA)。18000 × g 离心 20 分钟, 取上清液, 用上述缓冲液配成蛋白量为 6 mg/ml 的粗酶液。

### (五) 完整细胞悬液中 <sup>203</sup>Hg 挥发的检测

在总体积为 10 ml 的反应液中含有 0.067 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 20 mg (干重) 细胞, 2 mmol/L 的 β-巯基乙醇及 5 μmol/L 的放射性 <sup>203</sup>HgCl<sub>2</sub>。反应液在 30℃ 振荡反应, 不同时间取样 0.1 ml, 加到 10 ml 闪烁液 (Toluene, Triton X100, 2:1) 中, 测定反应液中剩余的放射性 (Beckman LS5801 型液闪仪, USA)。按上述时间, 同时取样并过滤, 测定滤膜上细胞带有的放射性。由反应液中放射性的减少估算 <sup>203</sup>Hg 的挥发。

### (六) 在有粗酶液存在下 <sup>203</sup>Hg 挥发的检测

在总体积为 10 ml 的反应液中含有 0.067 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 粗酶液 (蛋白量 6 mg), 0.2 mmol/L 的 NADH, 2 mmol/L 的 β-巯基乙醇及 10 μmol/L 的 <sup>203</sup>HgCl<sub>2</sub>, 按上述完整细胞挥发 <sup>203</sup>Hg 的程序反应, 测定反应液中剩余的放射性, 并由反应混合液中放射性的减少量估算 <sup>203</sup>Hg 的挥发。

### (七) 汞还原酶活性的检测

在反应体系中, 当底物 Hg<sup>2+</sup> 与 NADH 共存时, 汞还原酶催化 Hg<sup>2+</sup> 还原而将 NADH 氧化成 NAD<sup>+</sup>, 使其在 340 nm 处吸光度 A 下降。在一定时间内, 用 A<sub>340</sub> 的下降速度表示汞还原酶的活力。反应混合液包括: 磷酸盐缓冲液 (0.067 mol/L, pH 7.0), 0.1 mmol/L 的 HgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L 的 NADH 或 NADPH, 2 mmol/L 的 β-巯基乙醇。反应液在 30℃ 预保温 5 分钟后, 加入 0.5 ml 的粗酶液 (蛋白量 3 mg), 反应液总体积为 3 ml, 随即在 340 nm (Beckman Du-7 型紫外分光光度计, USA) 对反应时间过程扫描。在上述条件下, 规定每分钟 A<sub>340</sub> 降低 0.01 单位所需的酶量为一个汞还原酶活力单位。

### (八) 蛋白质测定

用 Bradford 法测定<sup>[10]</sup>。

### (九) 汞的测定

用双硫腙比色法测定。

### (十) 试剂

HgCl<sub>2</sub> 为优级纯, 放射性 <sup>203</sup>HgCl<sub>2</sub> (比放射性 205 mCi/mmol) 为 England Radiochemical Centre Amersham 产品, NADH 和 NADPH 均为 Sigma 产品。

## 结果和讨论

### (一) 烟草头孢霉 F2 菌株中汞还原酶活性的检测

1. 完整细胞对汞的去除: 图 1 表明, 在适宜的条件下 (反应液 pH 7.0, 30℃, 振荡),

经汞适应培养的细胞与  $\text{HgCl}_2$  反应 40 分钟, 其除汞率达 82% (初加汞浓度为 30mg/L), 比未经汞适应培养的细胞除汞率(70%)要高。由此看来, 经在含汞条件下的适应性培养有利于提高细胞对汞的去除能力。

2. 完整细胞对放射性  $^{203}\text{HgCl}_2$  的去除: 图 2 结果表明, 完整细胞与  $^{203}\text{HgCl}_2$  反应后, 混合液中放射性汞量明显降低, 80 分钟后, 放射性汞量仅剩余 26%, 同时细胞上积累的汞量也很少, 只有总量的 18%。由此推测, F2 菌完整细胞对汞的去除作用是使汞挥发。有关文献[11]认为, 挥发汞的形态是元素汞 ( $\text{Hg}^0$ )。这有可能是由于胞内汞还原酶

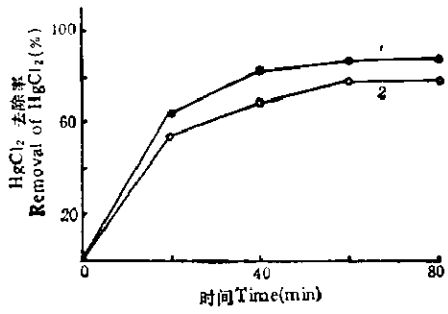


图 1 完整细胞对  $\text{HgCl}_2$  的去除  
1. 有汞条件下培养得到的细胞;  
2. 无汞条件下培养得到的细胞

Fig. 1 Removal of  $\text{HgCl}_2$  by intact cells of *Cephalosporium tabacinum* F2

- 1. Cells from the cultivation with mercury;
- 2. Cells from the cultivation without mercury

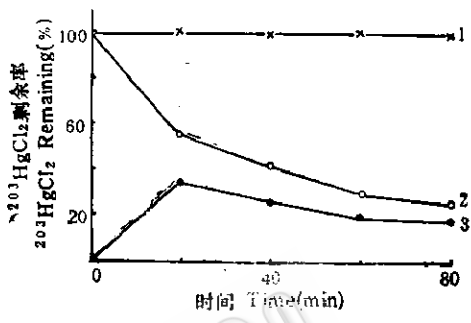


图 2 完整细胞对  $^{203}\text{HgCl}_2$  的去除  
1. 对照(未加细胞); 2. 反应混合液中的放射性汞量; 3. 细胞上的放射性汞量

Fig. 2 Removal of  $^{203}\text{HgCl}_2$  by intact cells of *Cephalosporium tabacinum* F2

- 1. Control(no cells); 2. Radioactive mercury in the reaction mixture; 3. Radioactive mercury on the cells

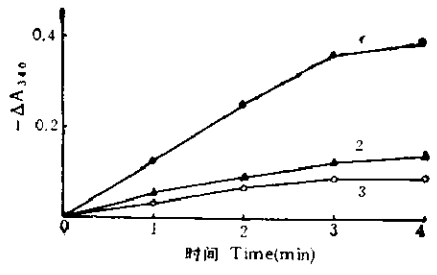


图 3 需 NADH 的汞还原酶的检出

- 1. 加 NADH; 2. 加 NADPH; 3. 无汞对照

Fig. 3 Detection of NADH-linked mercuric reductase

- 1. Added NADH; 2. Added NADPH;
- 3. Control (no mercury)

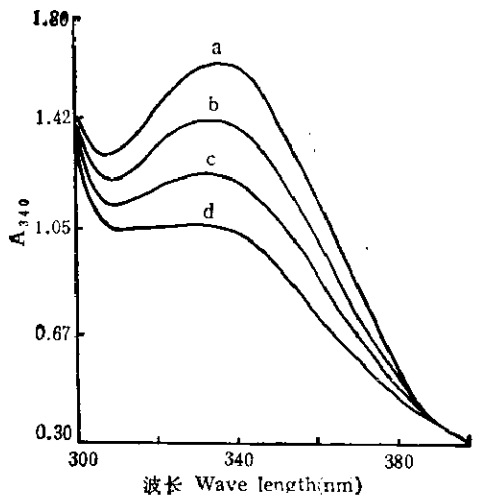


图 4  $\text{Hg}^{2+}$  酶促还原反应中 NADH 吸光度的改变  
a: 0 时; b: 2 分钟; c: 4 分钟; d: 6 分钟

Fig. 4 The changes of NADH absorbancy at 340nm in the presence of  $\text{Hg}^{2+}$

- a. 0 min; b. 2min; c. 4min; d. 6min

的作用,催化  $^{203}\text{HgCl}_2$  还原成为元素汞 ( $^{203}\text{Hg}^0$ ), 后者经挥发从液相中消失。在未加细胞的对照液中,放射性汞量基本不变,从而排除了非生物因素对汞的作用。

3. 无细胞提取液中汞还原酶活性的检测: 在电子供体 NADH 存在下,  $\text{Hg}^{2+}$  被酶促还原的同时, NADH 被氧化,使  $A_{340}$  值迅速降低,以 NADPH 代替 NADH 作电子供体时,  $A_{340}$  值下降很少。在无底物  $\text{Hg}^{2+}$  存在的对照反应液中, NADH 也有极少量被氧化(图 3)。对于此种现象, Komura 等<sup>[12]</sup>认为,这有可能是由于在粗酶液中存在微量 NADH 氧化酶的作用所致。酶促反应与对照样品在  $A_{340}$  值下降之差表明粗酶液中有需 NADH 的汞还原酶存在。

对汞离子酶促还原反应中的  $A_{340}$  进行等时间间隔扫描(图 4), 在 NADH 特征吸收波长 340nm 处的吸光度 A 依次下降,下降幅度递减,表明在  $\text{Hg}^{2+}$  存在下的酶促反应中, NADH 被氧化。

4. 粗酶液对  $^{203}\text{Hg}$  的挥发作用: 在有 NADH 和  $\beta$ -巯基乙醇存在下,粗酶液与放射性的  $^{203}\text{HgCl}_2$  反应。结果(图 5)表明,在有 NADH 存在的反应混合液中,放射性汞量迅速下降,15 分钟后,汞量剩余 20%,而在未加粗酶液或未加 NADH 的对照液中,放射性汞量基本不变。此结果进一步证明,该反应是需 NADH 的酶促反应。

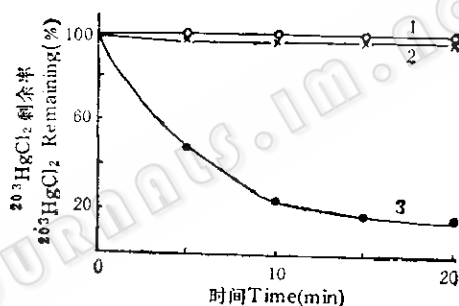


图 5 粗酶液对  $^{203}\text{Hg}$  的挥发作用

1. 未加粗酶液的对照; 2. 未加 NADH 的对照; 3. 加有 NADH 和粗酶液的反应混合液

Fig. 5 Volatilization of  $^{203}\text{Hg}$  from  $^{203}\text{HgCl}_2$  by the crude extract

1. Control (no crude extract); 2. Control (no NADH);

3. Reaction mixture added NADH and crude extract

## (二) 汞还原酶的特性

1. 底物特异性: 在含粗酶液、NADH、 $\beta$ -巯基乙醇及磷酸盐缓冲液的反应液中, 分别加入  $\text{HgCl}_2$ 、乙酸汞和乙酸苯汞(终浓度均为 0.1 mmol/L), 在 pH 7.0, 30℃ 反应。结果表明, 离子汞如  $\text{HgCl}_2$  和乙酸汞在有 NADH 存在下可被酶催化还原, 而乙酸苯汞则不能作为酶反应底物。

2. 酶反应的最适 pH: 以  $\text{HgCl}_2$  为底物, 测定不同 pH 条件下反应的酶活力。该酶反应的最适 pH 范围为 7.0—8.0 (图 6-A)。

3. 酶反应的最适温度: 测定不同温度时反应的酶活力, 结果(图 6-B)表明, 该酶反应的最适温度为 30℃。

4. 酶的 pH 稳定性: 粗酶液与一定体积不同 pH 的磷酸盐缓冲液 (0.067 mol/L) 混

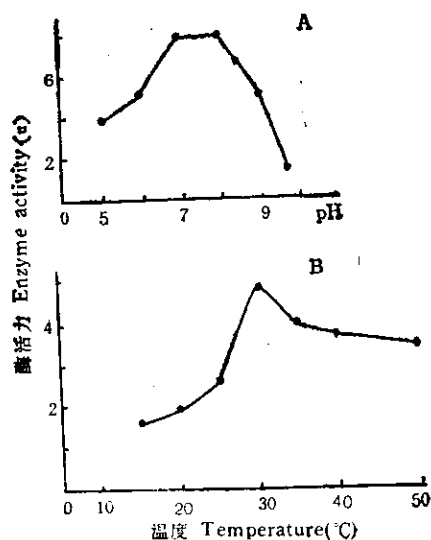


图6 pH(A) 和温度(B)对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of pH(A) and temperature (B) on enzyme activity

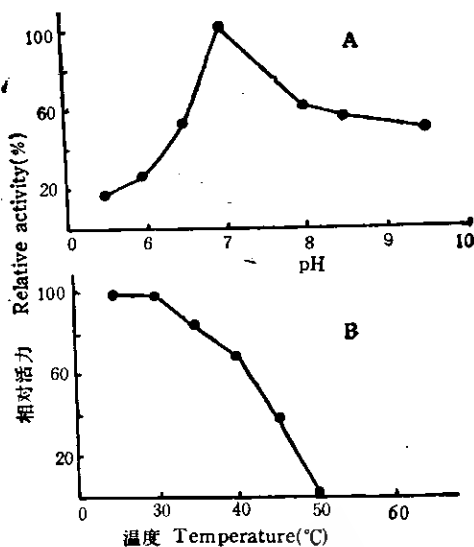


图7 pH(A) 和温度(B)对酶稳定性的影响

Fig. 7 Effect of pH(A) and temperature (B) on enzyme stability

合后, 30°C 保温 2 小时, 后将溶液 pH 调回到 7.0, 在标准条件下测定酶活力。该酶在 pH7.0 保温 2 小时是稳定的(图 7-A)。

5. 酶的热稳定性: 粗酶液在 0.067 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中放置不同温度保温 40 分钟, 然后在标准条件下测定酶活力。该酶在 30°C 以下存放稳定。在 45°C 保温 40 分钟后, 酶活力残存 40% (图 7-B)。

6. -SH 基化合物对酶活力的影响: 有关文献<sup>[1-4]</sup>指出, 在酶促  $\text{Hg}^{2+}$  还原反应中需要加入 -SH 基化合物, Izaki 等<sup>[13]</sup>认为, -SH 化合物在反应中的作用为: 一是与  $\text{Hg}^{2+}$  反应形成硫醇盐复合物, 是酶反应的真正底物; 二是对酶分子中的活性功能基团起保护作用。为此, 首先试验了各种 -SH 基化合物(终浓度均为 2 mmol/L) 对 F2 菌汞还原酶活力的影响。结果(表 1)证明, 所试 -SH 基均是有效的, 尤以  $\beta$ -巯基乙醇最为适宜, 其最适浓度为  $10^{-3}$  mol/L。

表 1 各种 -SH 基化合物对酶活力的影响

Table 1 Effect of various thiol compounds on enzyme activity

-SH 基化合物 Thiol compound	相对活力 Relative activity (%)
$\beta$ -巯基乙醇 $\beta$ -mercaptoethanol	100
L-半胱氨酸 L-cysteine	91.64
硫代乙醇酸 Thioglycolic acid	84.8
二硫苏糖醇 Dithiothreitol	74
未加 None	62.8

7. 金属离子对酶活力的影响: 如表 2 所示, 在浓度为 0.1 mmol/L (除  $\text{Ag}^+$  外)时,

所试的大多数金属离子对酶活力无明显影响。在高浓度时 (0.2—1.0 mmol/L),  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  对酶活力均有不同程度的抑制作用。

表 2 各种金属离子对酶活力的影响

Table 2 Effect of various metal ions on enzyme activity

金属化合物 Metal compound	浓 度 Conc. (mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)
未加 None		100
$\text{CaCl}_2$	0.1	100
	1.0	100
$\text{MgCl}_2$	0.1	100
	1.0	100
$\text{ZnCl}_2$	0.1	100
	1.0	83
$\text{MnCl}_2$	0.1	100
	1.0	58
$\text{CoCl}_2$	0.1	93
	1.0	45
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	0.1	100
	1.0	94
$\text{AgNO}_3$	0.1	58
	0.2	43
$\text{CuSO}_4$	0.1	97
	0.4	55
$\text{NiSO}_4$	0.1	93
	1.0	70

8. 抑制剂对酶活力的影响: 表 3 指出,  $\text{As}_2\text{O}_3$  和碘代乙酸对酶活力未显示抑制作用, 但乙酸苯汞在浓度为 1.0 mmol/L 时, 抑制率可达 65.6%, 铁氰化钾对酶活力也有一定的抑制作用。

表 3 抑制剂对酶活力的影响

Table 3 Effect of inhibitors on enzyme activity

抑 制 剂 Inhibitor	浓 度 Conc. (mmol/L)	抑 制 率 Inhibition (%)
未加 None		0
$\text{As}_2\text{O}_3$	0.1	0
	1.0	0
碘代乙酸 Iodoacetic acid	0.1	0
	1.0	0
乙酸苯汞 Phenyl mercuric acetate	0.1	6
	1.0	65.6
铁氰化钾 Potassium ferricyanide	0.1	5
	1.0	27

本文描述了抗汞真菌烟草头孢霉 (*Cephalosporium tabacinum*) F2 菌中汞还原酶的检测及酶的某些特性, 其酶的特性 (例如底物特异性、对-SH 基化合物的需要、对某些金属离子的敏感性、酶的热稳定性等) 与已报道的细菌和青霉菌 (*Penicillium* sp.) MR-2 菌株中的汞还原酶特性基本相似, 不同点在于, 烟草头孢霉 F2 菌中的汞还原酶在酶促  $\text{Hg}^{2+}$  还原反应中以 NADH 作为电子供体, 而细菌和青霉菌 MR-2 菌株的汞还

原酶多以 NADPH 作为电子供体。本研究进一步证明,作为一种汞解毒酶,它们不仅广泛分布于细菌等原核生物细胞内,而且在某些抗汞的真核微生物中也存在着。在自然界汞的循环和转化过程中,具有此种汞还原酶的抗汞微生物起着重要的解毒作用。

### 参 考 文 献

- [1] Robinson, J. B. et al.: *Microbiological Reviews*, 48: 95—124, 1984.
- [2] Schottel, J. L.: *J. Biol. Chem.*, 253: 4341—4349, 1978.
- [3] Weiss, A. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 132: 197—208, 1977.
- [4] Shigeru, N. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 49: 1513—1515, 1985.
- [5] 手塚敏幸: *Bioindustry*, 7: 18—24, 1990.
- [6] 杨惠芳等: *生态学报*, 6(2): 120—127, 1986.
- [7] 王保军等: *微生物学通报*, 15(1): 77—79, 1988.
- [8] 王保军等: *环境科学学报*, 8(1): 72—78, 1988.
- [9] 王保军等: *环境科学学报*, 12(3): 275—281, 1992.
- [10] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72: 248—254, 1976.
- [11] Summers, A. O. et al.: *J. Bacteriol.*, 112: 1228—1236, 1972.
- [12] Komura, I. et al.: *J. Biochem.*, 70: 895—901, 1971.
- [13] Izaki, K.: *Can. J. Microbiol.*, 27: 192—197, 1981.

## PROPERTIES OF MERCURIC REDUCTASE OF *CEPHALOSPORIUM TABACINUM*

Wang Baojun Li Wenzhong Yang Huifang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

The mercuric reductase was detected in the *Cephalosporium tabacinum* F2. The enzyme, which was an intracellular enzyme, catalyzed the reduction of mercuric ions to elemental mercury, which required NADH as electron donor and added thiol compound. The optimum temperature and pH of the enzymatic reaction were 30°C and 7.0—8.0, respectively. The enzyme activity was stable in the range of 25—30°C for 40 min and stable at pH 7.0 for 2 h. Metal ions, such as  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Gu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  showed different degree inhibitory effect on the enzyme activity, other compounds, such as phenylmercuric acetate and potassium ferricyanide, also partially inhibited the enzyme activity.

**Key words** *Cephalosporium tabacinum* F2; Mercuric reductase