

甲基营养菌 WB-1 甲胺磷降解酶的产生、部分纯化及性质*

钞亚鹏¹ 赵永芳² 刘斌斌¹ 王银善^{1**}

(¹中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071) (²武汉大学生命科学院 武汉 430072)

摘 要: 甲基营养菌 WB-1 菌株在以甲胺磷作碳氮源的无机盐培养基上生长时,产生甲胺磷降解酶情况较好,培养 20 h 为细胞收获的适宜时期。所得细胞经过超声波破碎、吐温-20 抽提、热处理(60℃, 9min), DEAE-纤维素 32 和 CM-纤维素 32 柱层析等步骤,得到的酶制品比活力为 18.0U/mg, 收率 78.8%, 纯化倍数 22.8。纯化的酶制品经连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,呈现一条主带,酶活力染色则呈现一条与之对应的活性谱带;该酶催化反应的适宜 pH 为 9.0, 底物专一性不强, Hg²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺ 对酶有强烈的抑制作用。部分纯化酶制品在 -20℃ (0.1mol/L 的磷酸盐溶液中) 存放 5d, 酶活力丧失约 60%。

关键词: 甲基营养酶, 甲胺磷降解酶, 纯化

中图分类号: Q554 文献标识码: B 文章编号: 1001-6209(2000)05-0523-27

近年来,由于甲胺磷农药的大量生产和使用,其废水和残留物造成的环境污染越来越严重,直接威胁到人类健康^[1]。有关污染处理的研究特别是生物法处理逐渐增多,但大多数停留在直接用活体微生物处理废水的应用水平上,而用微生物离体酶催化甲胺磷转化及有关机理在国内外却尚未见报道。本实验室在长期研究微生物降解甲胺磷的基础上,以一株甲基营养菌 WB-1 为材料,从含甲胺磷的无机盐培养基中制备出非水溶性甲胺磷降解酶粗样品,并建立了该酶的氧化还原测定方法^[2]。本文就 WB-1 非水溶性甲胺磷降解酶的产生、纯化及性质等方面作进一步分析。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

甲基营养菌 WB-1 系本实验室分离,经鉴定为气单胞菌属(*Aeromonas* sp. WB-1);吐温-20(广州化学试剂厂);DEAE-纤维素 32(DEAE-cellulose32) CM-纤维素 32(CM-cellulose32)(Pharmacia 公司);2,6-二氯酚靛酚(DCPIP);N-甲基吩嗪硫酸甲酯(PMS)(Merck 公司);氮蓝四唑(NBT, 上海前进试剂厂);标准甲胺磷(沙隆达农药集团公司提供);Beckman 高速冷冻离心机(Beckman 公司);752-C 型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);XZ-85-1 型核酸蛋白检测仪(华阳生物仪器厂);JY-92-II 型超声波破碎仪(宁波开发区新芝公司);DYY-II 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

* 国家自然科学基金资助项目(39670010);863 计划资助项目(SZ-03-01-03)

作者简介:钞亚鹏(1974-),男,山西省临县人,1998 年于中国科学院武汉病毒研究所获理学硕士学位,现为中国科学院微生物研究所研究实习员,主要从事酶学和糖类的基础和开发应用方面的研究

**通讯作者

收稿日期:1999-03-09,修回日期:1999-08-18 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.2 方法

1.2.1 菌体培养:将 WB-1 菌株在含甲胺磷的无机盐培养基上活化两次,然后以 5% 接种量进行液体振荡培养(30℃,18h)。

1.2.2 甲胺磷降解酶制备和酶活性测定 参阅文献 [2] 进行。

1.2.3 连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)参阅文献 [3] 进行。电泳毕,胶板用蒸馏水充分冲洗后,分别进行如下处理(1)蛋白染色:用 0.2% 的考马斯亮蓝 G-250 染色 3h,7% 乙酸脱色过夜;(2)活性染色:根据文献 [4] 加以修改,在 20mL 总体积的磷酸钾缓冲液(pH7.4 浓度 0.1mol/L)中,含有 10mg/mL 甲胺磷,0.64mg/mL NBT,28mg/mL PMS,另添加微量 NH_4Cl 、KCN、EDTA,于黑暗处 30℃ 反应 20min,蒸馏水充分冲洗终止反应。

1.2.4 蛋白含量的测定 参阅文献 [5] 进行。

2 结果

2.1 WB-1 菌株在不同培养基上的产酶特性

在以甲胺磷分别作唯一碳氮源、唯一碳源(补加硫酸铵作氮源)或唯一氮源(补加葡萄糖作碳源)的三种无机盐培养基中培养 WB-1 菌株,所得的细胞制成粗酶样测定其活力,发现其在前两种基质中生长时,甲胺磷降解酶的活性都较高,分别为 4.8 和 4.2 U/mL,而以甲胺磷作唯一氮源培养得到的样品中无酶活力。可见甲胺磷作碳源对甲胺磷降解酶的产生起决定性的作用,即细菌只有在利用甲胺磷的甲氨基过程中才产生该酶。而当培养基中添加可直接利用碳源葡萄糖后,由于葡萄糖效应,甲胺磷降解酶的产生完全被抑制。

2.2 WB-1 菌株生长与产酶的关系

用甲胺磷作碳氮源振荡培养 WB-1 菌株,测定不同时期的生物量和对应的酶活力(图 1)。由图可见,甲胺磷降解酶和生物量在菌体生长的前期基本同步,稳定期后则出现明显的差异。收获用于制备甲胺磷降解酶粗品所需的细胞时,以培养 20h 左右为宜。

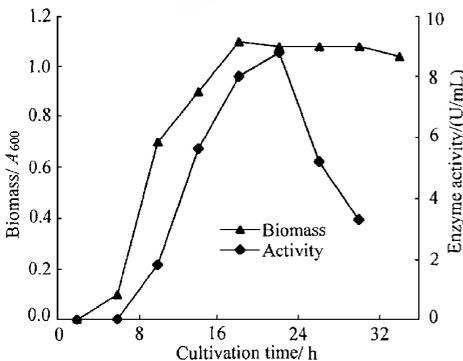


图 1 WB-1 菌株生长与产酶关系

Fig. 1 The course of growth and the enzyme production of WB-1 strain

2.3 酶的部分纯化

2.3.1 热处理:实验结果表明,当置粗酶液于 60℃ 水浴振荡 9min 时,酶活力不但未降低,而且还有小幅度的升高,进一步延长保温时间,则酶活力逐渐下降;而在 70℃ 水浴保温时,酶活力随时间不断下降。说明 WB-1 菌株的甲胺磷降解酶对 60℃ 短时处理较稳定,并且除去了大量的杂蛋白。因此采用该步作为酶纯化第一步。

2.3.2 DEAE-纤维素 32 柱层析:将热处理后的酶样品加入预先用含 0.2% 吐温-20 的 20mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.0)平衡的 DEAE-纤维素 32 阴离子柱,先后用同样缓冲液和添加 0.2mol/L NaCl 的缓冲液洗脱,柱型:2 × 15cm;流速:

26.4mL/h;上样量:7mL;每 8min 收集一管(3.52mL/管)结果如图 2 所示。合并含酶活力的部分,透析除盐(透析液为含 0.1% 吐温-20 的相同缓冲液)浓缩。

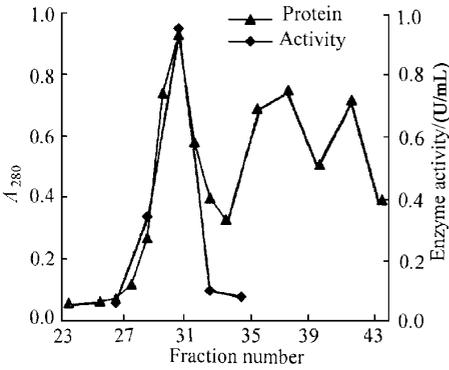


图2 DEAE-纤维素 32 柱层析图谱

Fig. 2 Chromatography of the enzyme on DEAE-cellulose32

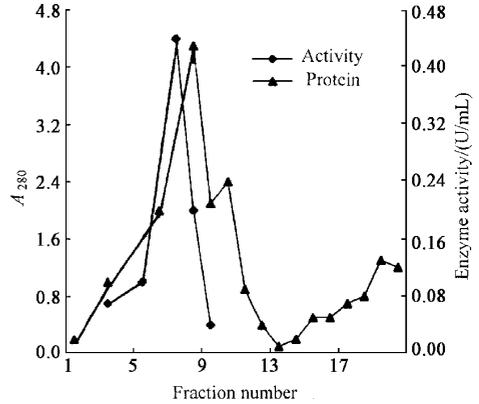


图3 CM-纤维素 32 柱层析图谱

Fig. 3 Chromatography of the enzyme on CM-cellulose32

2.3.3 CM-纤维素 32 柱层析: 将上述浓缩液加至经含 0.1% 吐温-20 的磷酸钾缓冲液 (pH7.0 20mmol/L) 平衡的 CM-纤维素 32 阳离子柱。柱型: $2 \times 8.9\text{cm}$ 流速: 14.6mL/h ; 上样量 2.0mL, 每 8min 收集一管 (1.9mL/管)。在用同样溶液洗涤过程中收集得到酶活力组分 (图 3)。合并该部分收集液, 对不含吐温-20 同种缓冲液透析, 浓缩备用。

2.3.4 纯化结果分析 经过上述诸步骤得到的结果列于表 1。比活力由最初的 0.8U/mg 提高到 18.0U/mg , 纯化倍数达 22.8, 收率为 78.8%。

表 1 甲胺磷降解酶的纯化结果

Table 1 Purification of the enzyme

	Total volume /mL	Total protein /mg	Total activity /U	Specific activity /(U/mg)	Purification fold	Recovery /%
Cell extracts	14.7	352.8	278.3	0.8	1	100.0
Heat treatment	11.8	75.5	325.7	4.3	5.5	117.2
DEAE-cellulose32 chromatography	9.2	22.9	198.5	8.6	11.0	71.3
CM-cellulose32 chromatography	5.2	12.2	219.4	18.0	22.8	78.8

2.4 酶蛋白的电泳鉴定

用部分纯化的酶样品按材料方法所述进行电泳分析 (图 4)。活性染色出现了一条深紫色谱带, 而蛋白染色胶条中有一条较浓的蛋白谱带与之对应, 另外还有几条无活性带。该电泳结果也直观地证明了甲胺磷降解酶的存在, 验证了前文建立的酶测活系统^[2]的专一性和可靠性。

2.5 甲胺磷降解酶的某些性质

2.5.1 催化反应的适宜 pH: 酶催化的适宜 pH 为 9.0 左右。若 pH 大于或小于 9.0, 酶活力均有不同程度的降低。pH 小于 6.0 或大于 11.0 时, 测定体系不再适用。

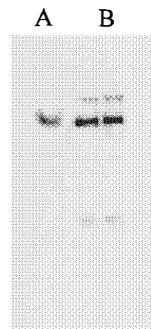


图4 甲胺磷降解酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 4 PAGE pattern of the enzyme

A: Activity staining; B: Protein staining.

2.5.2 底物专一性 :用表 2 所列各化合物(终浓度均为 0.2%)作底物进行反应,以甲胺磷作对照。结果表明,该酶的专一性较差,特别是对乙醇和正丁醇的催化活力大于 100%。

2.5.3 金属离子的影响 :试验所用 9 种金属离子,当其终浓度均为 1mmol/L 时, Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 对甲胺磷降解酶有严重的抑制作用, Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的作用也较明显, Co^{2+} 和 Zn^{2+} 则对酶活力基本无影响(表 3)。

表 2 甲胺磷降解酶的底物专一性

Table 2 Substrate specificity of the enzyme

Substrates	Relative activity/%
Methamidophos	100.0
Methanol	59.6
Formeldehyde	11.5
Formic acid	5.9
Methamine	34.6
Ethanol	115.4
n-Butanol	126.2
iso-Propyl alcohol	34.6

表 3 金属离子对酶活性的影响

Table 3 Effects of some metal ions on the enzyme activity

Ion	Relative activity/%	Ion	Relative activity/%
Fe^{3+}	46.3	Ca^{2+}	73.2
Fe^{2+}	62.6	Zn^{2+}	95.1
Cu^{2+}	0.0	Mn^{2+}	0.0
Hg^{2+}	4.8	Mg^{2+}	20.9
Co^{2+}	102.4	Control	100.0

2.5.4 酶的稳定性 :将纯化后的酶液置于 $-20^{\circ}C$ 5d 后酶活力丧失 60%,同时伴随着一些白色沉淀的产生。推测该酶在极性溶剂中稳定性极差,易于通过疏水作用力产生一些无活性的多聚体,这也从侧面证明了甲胺磷降解酶的疏水特性。

3 讨论

甲胺磷降解酶粗样品经过热处理总活力和收率都有不同程度的上升,这可能与该酶的膜结合特性有关^[6]。WB-1 细胞经过超声波破碎和温和去污剂吐温-20 的抽提后,大部分酶分子游离出来,但仍有少部分与膜碎片结合,影响其活力的发挥。适当的高温下保持一定时间,则有利于膜脂解离,使结合的酶分子进一步释放出来,导致了酶活力的异常升高。CM-纤维素 32 柱层析也有类似情况,除了上述原因外,还可能是在层析过程中除去了某些酶的抑制因子所致。

对样品进行柱层析分离过程中,吐温-20 的作用值得考究,例如阴离子层析时,如果平衡液和洗脱液中均不含任何去污剂,酶活性组分出现在穿流峰中,且活性丧失严重,但在系统中含有终浓度为 0.2% 的吐温-20 时,洗脱图谱(见图 2)发生了质的变化,酶活性组分转移到盐溶液的洗脱峰中,总活力也维持高水平。这表明:吐温-20 对稳定酶的活力有重要作用,吐温-20 可明显影响酶的带电性质。另外,吐温-20 作为一种表面活性剂,浓度过高会影响到层析系统本身的正常功能,故随后的阳离子层析系统中适当降低了吐温-20 (0.1%) 的浓度。

关于蛋白染色呈现多谱带的原因,可能与下列两方面有关(1)甲胺磷降解酶与细胞质膜紧密结合,并且处于电子链的核心位置,与功能相关的别的组分以不同方式结合,而用于膜蛋白解离的去污剂吐温-20 的作用是随机的,所以抽提后的样品中酶蛋白以多种形态存在,导致了粗酶样品的不均一性,给以后的提纯增大了难度。特别是酶蛋白从膜中解离时可能与邻近或结合蛋白一起被解离,而随后的纯化过程中由于吐温-20 存在,必然

会持续地起到解离作用, 导致边纯化边解离。(2) 某些可溶性蛋白与酶组分有类似带电性质, 用本文的纯化方法不易除去。

参 考 文 献

- [1] 曹志方, 王银善. 环境科学进展, 1996, 6(6): 33~35.
 [2] 钞亚鹏, 赵永芳, 王银善, 等. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(1): 145~147.
 [3] 赵永芳编著. 生物化学技术原理及其应用. 武汉: 武汉大学出版社(第二版), 1994. 275~304.
 [4] 刘建平, 王银善, 曹志方, 等. 武汉大学学报, 1997, 43(2): 243~247.
 [5] Lowry O H, Resebrough N J, Far A L, et al. *J Biochem*, 1951, 173: 265~275.
 [6] Findly J B C. Protein purification applications. Oxford: Oxford Press, 1990. 59~82.

PRODUCTION, PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF METHAMIDOPHOS-DEGRADING ENZYME FROM METHYLOTROPH WB-1*

Chao Yapeng¹ Zhao Yongfang² Liu Binbin¹ Wang Yinshan^{1**}

(¹ Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

(² Biochemistry Department of Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: After cultivation for 20h in the inorganic salt medium with methamidophos as sole carbon and nitrogen source, Methylophos WB-1 could produce methamidophos-degrading enzyme in larger amounts. The enzyme was partially purified by sonication disruption, Tween-20 extraction, heat treatment (9min at 60°C), DEAE-cellulose 32 and CM-cellulose32 chromatography with 22.8 times purification and 78.8% recovery. Activity staining showed single violate band corresponding to that of protein staining. Optimum pH of the enzyme was 9.0; poor substrate specificity was showed. It was strongly inhibited by Hg²⁺, Mn²⁺ and Cu²⁺, but not by Co²⁺ and Zn²⁺; it also exhibited poor stability.

Key words: Methylophos bacterium, Methamidophos-degrading enzyme, Purification

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39670010)

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要, 使科研成果尽快得到交流, 本刊自 2001 年 41 卷第 1 期开始继续扩版, 双月刊, 每册 128 面。全部道林纸印刷, 内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期缩短, 内容丰富翔实, 能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部