

假单胞菌 WBC-3 甲基对硫磷水解酶性质的初步研究

楚晓娜 张先恩* 陈亚丽 刘 虹 宋冬林

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘 要:从最近分离到的有机磷农药降解菌 *Pseudomonas* sp. WBC-3 中获得了甲基对硫磷水解酶(Methyl parathion hydrolase, MPH, EC 3.1.8.3)。该酶在 48h 的培养物中分布比例分别为:上清液 2.1%, 胞内 86.2% 和胞间质 11.7%, 说明 MPH 为胞内酶。经过 CM-sepharose Fast Flow 阳离子交换层析, 获得电泳纯的酶。SDS-PAGE 和凝胶过滤层析表明, 该酶为单体蛋白, 分子量约为 34kD。动力学分析显示该酶为非特异性有机磷降解酶, 但最适底物为甲基对硫磷。在 pH9~12 范围, 酶表现较高活力水平, 最高活力的反应温度为 40℃。根据各类金属离子和螯合剂对酶活的影响, 推测 MPH 为金属酶。

关键词:甲基对硫磷水解酶, 有机磷降解酶, 有机磷农药, 纯化和性质

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2003) 04-0453-07

有机磷农药在杀虫剂中占据重要的地位, 是世界上生产和使用最多的农药品种^[1], 是控制农作物害虫和病媒昆虫的重要手段。然而, 由于有机磷农药的毒性, 随着广泛使用, 也带来严重的副作用, 日益成为重要的化学环境污染物。其中结构相似的乙基对硫磷、甲基对硫磷、杀螟松等, 虽然属于禁用或慎用之列, 但由于其具有高毒效、经济的优势, 至今仍大量生产并应用, 造成生态失衡, 并直接影响到人们的身体健康。

微生物对有机磷农药的降解作用早已受到人们关注。20 世纪 70 年代初就已经证明黄杆菌 (*Flavobacterium* sp.) ATCC27551 有降解乙基对硫磷的生物活性^[2]。1989 年, Mulbry^[3] 和 Dumas^[4] 分别从 *Flavobacterium* sp. 和缺陷假单胞菌 (*Pseudomonas diminuta*) 中首次分离纯化出了有机磷水解酶 (Organophosphorus hydrolase, OPH), 并发现来源于这两株菌的有机磷降解基因 (*opd*, Organophosphate-degrading gene) 具有很高的同源性^[5]。近期也从其它一些微生物中发现了有机磷降解酶基因, 如书杆菌 (*Arthrobacter*) 含有降解有机磷农药 (Monocrotophos, MCP) 的基因^[6], 交替单胞菌 (*Alteromonas*) 可以降解有机磷神经毒剂^[7], 土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 含有与 *opd* 相似的基因^[8] 等。其中 *Flavobacterium* sp. 和 *P. diminuta* 中 *opd* 基因及其所编码的 OPH 是至今研究得最多的材料, 对其基因的改造、表达以及对酶的特性、蛋白质结构都有较深入的认识^[9~11]。

甲基对硫磷为乙基对硫磷的结构类似物, 有关微生物降解的研究不多见。1988 年一株降解甲基对硫磷的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 被筛选分离出来, 其全细胞基因通过与同位素标记的 *opd* 的探针进行的点杂交证明了其具有与 *opd* 的同源的基因^[12]。1994 年,

项目来源 国家“863 计划”九五环境微生物项目资助 (SZ-03-01-03)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-68512083 E-mail: zhangx@mail.most.gov.cn

作者简介 楚晓娜 (1976-), 女, 河南郑州人, 在读硕士, 主要从事环境微生物学的研究。E-mail: subinna2002@hotmail.com

收稿日期 2002-10-18, 修回日期: 2003-04-07

一株恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)被证明不仅能够利用甲基对硫磷作为唯一碳源生长,还能够利用其作为唯一的磷源^[13],其基因(*mpd*, Methyl parathion degrading gene)已经被克隆和测定序列^[14]。本研究组最近报道了一株新的有机磷农药降解菌^[15],也具有彻底降解甲基对硫磷的能力,经鉴定并命名为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) WBC-3。其甲基对硫磷水解酶(Methyl parathion hydrolase, MPH, EC 3.1.8.3)的基因已经被克隆,其基因序列与上述报道的基因同源性较低(结果另报道)。本文报道 MPH 的纯化及性质研究的初步结果。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

甲基对硫磷(Methyl parathion)(纯度 95%)由沙市农药厂提供。杀螟松(Fenitrothion)(纯度 99%)和乙基对硫磷(Ethyl parathion)(纯度 99%)由沈阳化工研究所提供。阳离子交换柱层析柱材料为 CM-sepharose Fast Flow (Sigma)。兰色葡聚糖、卵清白蛋白、牛血清白蛋白(BSA)和 RNase 均为 Sigma 产品。低分子量标准蛋白由华美生物公司提供。巴比妥缓冲液组成为每升含柠檬酸 6.008g、硼酸 1.769g、巴比妥 5.266g、 KH_2PO_4 3.893g,用 0.2mol/L NaOH 调节缓冲液的 pH 值至 7.0~12.0。实验中所用化学试剂为分析纯。所有溶液均采用 Milli-Q 超纯水(Millipore)配制,培养基用普通蒸馏水配制。

1.2 菌种和培养方法

Pseudomonas sp. WBC-3 为本实验室分离保存的菌株^[15]。从含氨苄青霉素的 LB 平板挑单菌落到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基,于 30℃ 恒温 200r/min 振荡培养。平板或斜面于 30℃ 培养。

1.3 MPH 的提取与纯化

1.3.1 细胞周间质蛋白提取 取培养至稳定期(48h)的 WBC-3 的 LB 培养液 50mL,以 4000r/min 离心 10min,将沉淀重悬于 10mL Tris-HCl (50mmol/L, pH9.0),采用 Osmotic shock 法^[16]提取细胞周质蛋白。提取缓冲液为 30mL Tris-HCl (pH8.0),含 20% 蔗糖和 1mmol/L EDTA。

1.3.2 胞内物提取 将沉淀重悬于 10mL Tris-HCl (50mmol/L, pH9.0),混匀后,超声波破碎细胞 超声 6s,停 9s,破碎细胞总时间 30min。8000r/min 离心 10min,收获上清即得胞内酶。

1.3.3 层析 提取的粗酶液经 CM-sepharose Fast Flow 纯化。层析柱用 0.5 mol/L NaOH 和 0.5 mol/L NaCl 彻底平衡后用蒸馏水洗涤,然后用磷酸钾缓冲液(10 mmol/L, pH 7.0)洗涤。用蠕动泵上样,速度为 1.0 mL/min。再用 0~0.7 mol/L NaCl 梯度缓冲液(磷酸钾缓冲液, 10 mmol/L, pH 7.0)洗脱。测定洗脱组分在 280 nm 和 405 nm 下的光吸收值,从中发现含 MPH 的洗脱组分。收集这些组分,再在超滤杯(Filtron,截留分子量为 10kD)中浓缩。除收集洗脱组分以外,所有的操作均在 4℃ 下完成。

1.3.4 SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%,固定染色液为考马斯亮蓝 R-250(含甲醇 40%,乙酸 7%),脱色液含甲醇 40%和乙酸 7%。蛋白质电泳仪为 Bio-Rad 公司产品。用 Bio Imaging Systems 电泳图象分析系统分析电泳结果。

蛋白质浓度测定采用 Bradford 法^[17],使用 BSA(浓度从 50μg/mL 到 500μg/mL)为蛋白浓度标准样品。

1.4 酶活测定

反应体系 :10 μ L 50mmol/L 甲基对硫磷母液 (溶于甲醇), 2 μ L 酶液, 以 Tris-HCl (50mmol/L, pH9.0)补至终体积 2mL,混匀,室温反应 5s 后测吸光值。产物对硝基苯酚消光系数为 17700 mol/(L $\cdot$ cm) (OD_{405})。

MPH 水解乙基对硫磷和杀螟松反应体系中乙基对硫磷或杀螟松的母液 (50 mmol/L) 为 5 μ L。 MPH 水解杀螟松的产物为 3-甲基对硝基苯酚,消光系数为 18700 mol/(L $\cdot$ cm) (OD_{385})。

酶活力单位定义为 :在室温下每分钟水解 1 μ mol 底物即产生 1 μ mol 对硝基苯酚或 3-甲基对硝基苯酚所需要的酶量。测定在 Perkin Elmer Lambda25 紫外/可见分光光度计上进行。测定甲基对硫磷、乙基对硫磷降解,波长选择 405nm ;测定杀螟松降解,波长选择为 385nm。测定在室温 (25 $^{\circ}$ C) 下进行。

1.5 MPH 分子量的确定

分子量的测定采用两种方法 :用 SDS-PAGE 来测定酶变性后单体的大小,用凝胶过滤层析来测定酶的天然分子量^[18]。

凝胶过滤层析柱的柱材料为 Sephadex G-100 (Sigma),平衡液和洗脱液为磷酸钾缓冲液 mol/L (40 mmol/L, pH 7.0),标准蛋白为牛血清白蛋白 (BSA, 10 mg/mL, Sigma), RNase (10 mg/mL, Sigma) 和卵清蛋白 (5 mg/mL, Sigma),标准蛋白分子量分别为 66.0kD、13.7kD 和 45.0kD。用 Blue-glucan (Sigma)测定柱子外部水体积。通过比较 MPH 和标准蛋白的洗脱体积来计算 MPH 天然分子量。

2 结果

2.1 MPH 在细胞内的定位

取 3 份等体积 (50mL) 培养至稳定期的 WBC-3 的培养液,按上述实验方法,分别获得清液、胞间质和胞内提取物,以甲基对硫磷为底物分别测定各部分的 MPH 酶活。结果表明在细胞生长至稳定期,86.2% 的 MPH 酶活在胞内,11.7% 在胞间质,只有 2.1% 分泌到胞外。这一结果为纯化酶的准备工作提供了依据,即主要通过超声波破碎细胞的方法直接获得粗酶。

2.2 酶的纯化效果

用超声波法获取的粗酶,经超滤浓缩后上柱纯化。纯化效率见表 1。纯化得到的酶的比活是粗酶的 49.1 倍,整个纯化过程的酶活力回收率为 31.3%。纯化后的酶经 SDS-PAGE验证为电泳纯 (见图 1)。与以前的报道相比,本纯化方法简单,而且高效。

表 1 *Pseudomonas* sp. WBC-3 中 MPH 的纯化

Table 1 Purification of MPH from *Pseudomonas* sp. WBC-3

MPH sample	Volume /mL	Protein concentration / (mg/mL)	Total protein /mg	Total activity /U	Specific activity / (U/mg)	Overall purification /folds	Overall yield /%
Crude enzyme	40.0	21.845	873.82	18795.9	21.5	1.0	100.0
Purified enzyme	0.5	11.154	5.58	5883.7	1055.0	49.1	31.3

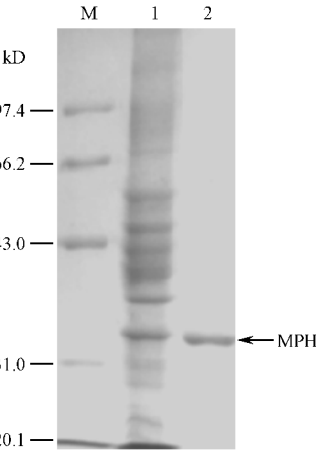


图 1 MPH 纯化过程的 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE of total proteins of the cellular extraction and purified MPH
M. Low molecular weight marker ; 1. Total cellular proteins (crude enzyme) ; 2. Purified MPH.

2.3 MPH 分子量的确定

MPH 分子量的测定采用两种方法 :SDS-PAGE 法和凝胶过滤层析法。如前所述,SDS-PAGE 的结果显示为一条带,与蛋白质标准相比较,以及凝胶扫描系统软件分析,目的蛋白的分子量大小约为 33.5kD。说明该 MPH 为单体蛋白,或同源多聚体蛋白。根据凝胶过滤层析法的洗脱体积计算,MPH 非变性蛋白的分子量约为 35kD。综合两种方法的结果,说明该 MPH 为一分子量约为 34kD 的单体蛋白质。

2.4 MPH 的动力学参数

分别以甲基对硫磷、乙基对硫磷和杀螟松为底物,利用双倒数作图法,求取 K_m , k_{cat} 和 V_m 值,结果见表 2。

表 2 MPH 的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of MPH

Substrate	$K_m/(mmol/L)$	$V_{max}/(mmol/(L \cdot min))$	k_{cat}/min^{-1}
Ethyl-parathion	35.8	9.6×10^{-6}	509.7
Methyl-parathion	0.0807	0.175	2.1×10^6
Fenitrothion	9.0	6.0×10^{-5}	4779.0

2.5 理化因素对 MPH 酶活的影响

本系列实验以甲基对硫磷为底物,反应体系见 1.4 节叙述。

2.5.1 pH 影响 :该酶的最适 pH 为 11.0。从 pH7.0 ~ 11.0,酶活一直呈线形增长,在 pH11.0 到达最高值。pH 从 9.0 ~ 12.0 的酶活一直较高,是 7.0 时的两倍多。

2.5.2 温度影响 :该酶的最适反应温度为 40℃ 左右,为室温时酶活力的 120%。在 15℃ ~ 30℃ 的环境中酶的活力没有很大的变化,而在 4℃ 的环境下酶活力只剩室温时的 80%,超过 40℃ 以后,酶活力急剧下降,到 50℃ 时只有室温时的 60%。

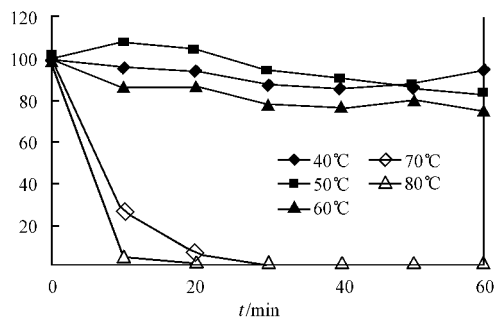


图 2 MPH 的热稳定性

Fig.2 Thermal stability of MPH

The MPH was incubated at different temperature 40℃, 50℃, 60℃, 70℃ and 80℃ for 1 h. The residual activities of MPH were measured using methyl parathion as the substrate. The activity at room temperature (25℃) was defined as 100% .

图 2 为 MPH 的热稳曲线。该酶在 40℃ ~ 60℃ 都比较稳定,60℃ 保温 1h 后还有近 80% 的酶活剩余,超过 60℃,酶容易失活。浓度为 0.867mg/mL 的纯酶,4℃ 保存 4 个月酶活力剩余 84%, - 20℃ 保存 4 个月酶活力剩余 95%。

2.5.3 金属离子及有机试剂对酶活的影响 :将 MPH 用 Tris-HCl (50mmol/L, pH9.0)透析,再于含金属离子或有机试剂浓度为 0.1mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中孵育 30min,测定酶活,确定金属离子或有机试剂对酶具有激活作用还是抑制作用。结果见表 3。

表 3 金属离子及有机试剂对酶活力的影响

Table 3 Effect of some compounds and metal ions on the activity of MPH*

Metal ions	Relative activity / %	Metal ions or compounds	Relative activity / %
MPH without dialyses		Cu ²⁺	93.7
Zn ²⁺	165.0	Al ³⁺	70.0
Cr ²⁺	80.0	Ag ²⁺	108.0
Cr ²⁺	115.8	Bi ³⁺	82.0
Fe ²⁺	133.3		
Ba ²⁺	95.8	Triton100	79.5
Mn ²⁺	118.3	Tween20	52.3
Hg ²⁺	35.2	Tween80	86.8
Li ⁺	117.3	DTT	12.8
Ni ²⁺	105.0	SDS	0.0
Mg ²⁺	97.5	EDTA	50.0

MPH* was dialyzed and incubated with metal ions or some organic compounds (0.1mmol/L) for 30 min, then the enzyme activity to methyl parathion was measured. The activity of dialyzed MPH without incubation was defined as 100% .

3 讨论

MPH 与 OPH 都能够降解对硫磷和甲基对硫磷,这两种底物是结构类似物,都含有苯环。可能两个酶的底物结合中心具有类似的结构 ;但是 MPH 和 OPH 对底物的催化速率不同。表 2 显示,MPH 对 3 种底物具有不同的 K_m 和 V_{max} 值,说明 MPH 对甲基对硫磷的底物亲和力以及最大反应速度要大于对杀螟松和乙基对硫磷的亲和力和最大反应速度 ;从 k_{cat} 可看出 MPH 对甲基对硫磷的水解效率也远远大于乙基对硫磷和杀螟松,而 OPH 对乙基对硫磷的亲和力要大于甲基对硫磷,对乙基对硫磷作用的活力高于甲基对硫磷^[4] 在酶的组成上,MPH 为单体,而 OPH 为同源二聚体^[11]。

MPH 的水解反应适于在碱性条件下进行。甲基对硫磷在碱性条件下不稳定,易分解,可能是水解反应在碱性条件下速度较快的原因之一。

从表 3 可以看出,酶在透析前的活力为透析后的 165%,而且加入螯和剂 EDTA 会使酶活降低至 50%。同时 Cr^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Li^{+} 、 Mn^{2+} 也对酶有或多或少的激活作用,因而推测该酶为金属酶。而相反的, Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Bi^{3+} 对酶有抑制作用。其中 Hg^{2+} 的抑制作用最为明显,使 MPH 酶活降至 35.2%。分析原因可能是该酶的活性中心含有巯基,因为重金属离子可以和巯基结合,对活性与巯基有关的酶产生特别显著的抑制作用,DTT 对酶的抑制作用也证明了这一点。SDS、Triton100、Tween80 和 Tween20 对酶活的抑制作用则是表面活性剂抑制酶活的普遍现象。

参 考 文 献

[1] 华小梅,单正军. 我国农药的生产使用状况及其污染环境因子分析. 环境科学进展, 1996, 4(2) 33 ~ 44.
[2] Sethunathan N, Yoshida T. A *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. *Can J Microbiol*. 1973. 19 373 ~
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

875.

- [3] Mulbry W W, Karns J S. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene : relationship between the gene and protein. *J Bacteriol*, 1989, **12** : 6740 ~ 6746.
- [4] Dumas D P, Caldwell S R, Wild J R, *et al.* Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J Biol Chem*, 1989, **264** : 19659 ~ 19665.
- [5] Harper L L, McDaniel C S, Charles E M, *et al.* Dissimilar plasmids isolated from *Pseudomonas diminuta* and a *Flavobacterium* sp. (ATCC27551) contain identical *opd* genes. *Appl Environ Microb*, 1988, **10** : 2586 ~ 2589.
- [6] Bhadbhade B J, Samaik S S, Kanekar P P. Biomineralization of an organophosphorus pesticide, Monocrotophos, by soil bacteria. *J Appl Microbiol*, 2002, **93**(2) : 224 ~ 234.
- [7] Hill C M, Li W S, Cheng T C, *et al.* Stereochemical specificity of organophosphorus acid anhydrolase toward p-nitrophenyl analogs of soman and sarin. *Bioorg Chem*, 2001, **29**(1) : 27 ~ 35.
- [8] Horne I, Sutherland T D, Harcourt R L, *et al.* Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(7) : 3371 ~ 3376.
- [9] Richins R D, Mulchandani A, Chen W. Expression, immobilization, and enzymatic characterization of cellulose-binding domain-organophosphorus fusion enzymes. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **69**(6) : 591 ~ 596.
- [10] Mulchandani A, Chen W, Mulchandani P, *et al.* Review : biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. *Biosens Bioelectron*, 2001, **16** : 225 ~ 230.
- [11] Benning M M, Shim H, Raushel F M, *et al.* High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry-US*, 2001, **40** : 2712 ~ 2722.
- [12] Chaudhry G R, Ali A N, Wheeler W B. Isolation of methyl parathion-degradation *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the *opd* gene from a *Flacobacterium* sp. *Appl Environ Microb*, 1988, **2** : 288 ~ 293.
- [13] Rani N L, Lalithakuari D. Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. *Can J Microbiol*, 1994, **40** : 1000 ~ 1006.
- [14] Cui Z L, Li S P, Fu G P. Isolation of a methyl parathion-degradating strain M6 and cloning of methyl parathion hydrolase gene. *Appl Environ Microb*, 2001, **67** : 4922 ~ 4925.
- [15] 陈亚丽, 张先恩, 刘虹, 等. 甲基对硫磷降解菌 *Pseudomonas* sp. WBC-3 的筛选及其降解性能的研究. *微生物学报*, 2002, **42**(4) : 490 ~ 497.
- [16] Chaidaroglou A, Brezinski D J, Middleton S A, *et al.* Function of arginine-166 in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry-US*, 1988, **27** : 8338 ~ 8343.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** : 248 ~ 254.
- [18] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 第二版. 武汉 : 武汉大学出版社, 1995. 140 ~ 143.

Study on the Properties of Methyl Parathion Hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3

Chu Xiaona Zhang Xianen* Chen Yali Liu Hong Song Donglin
(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: A methyl parathion degradation enzyme, or methyl parathion hydrolase (MPH, EC 3.1.8.1), locating in the soluble intracellular fraction of *Pseudomonas* sp. WBC-3, was purified 49.1-fold to homogeneity by one-step ion exchange chromatography. The physical and chemical properties of the purified MPH were studied. The purified MPH displayed relatively broad optimal

temperature around 40℃. The activity of MPH was affected by pH and the optimal pH was 11.0. Cd²⁺ and Fe²⁺ could enhance the catalytic efficiency of MPH while Hg²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ and Bi³⁺ showed inhibition effect. With methyl parathion as the optimal substrate, the *K_m* was 0.0807mmol/L and the *k_{cat}* was 2.1 × 10⁶ min⁻¹. In addition, the comparison of native and subunit molecular weights of MPH suggested that this enzyme was a monomer of approximate 34kD.

Key words :Methyl parathion hydrolase, Organophophorus pesticides, Organophosphate degrading enzyme, Purification, Properties

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development(SZ-03-01-03)
* Corresponding author. Tel/Fax 86-10-68512083 ;E-mail :zhangx@mail.most.gov.cn
Received date :10-18-2002

常见基金项目的英文译名

1. 国家自然科学基金
Chinese National Natural Science Foundation
2. 国家“ 863 计划”, 又名 国家高技术研究发展计划项目
Chinese National Programs for High Technology Research and Development
3. 国家“973 项目”, 又名 国家基础研究发展规划项目(有两种资助方式)
(1) 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目
Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(973 program)
(2) 国家重大基础研究发展规划(973 计划)项目
Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development
4. 国家科技公关项目
Chinese National Programs for Science and Technology Development
5. 国家“十五”重点科技攻关项目
The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China
6. 国家杰出青年科学基金
National Science Foundation for Distinguished Young Scholars
7. 国家杰出人才科学基金
Chinese National Science Foundation for Outstanding Scholarship
8. 农业部农业微生物重点实验室项目
Key Laboratory Project on Agromicrobiology of Chinese Agriculture Ministry
9. 科技部转基因植物研究与产业化专项
National R. & D. Project of Transgenic Crops of Ministry of Science and Technology of China
10. 中澳科技合作项目
Science and Technology Cooperation Project of China and Australia