

嗜热链霉菌过氧化氢酶的纯化及性质研究*

周一** 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

嗜热链霉菌(*Thermostreptomyces* sp.) T485 的除去菌体的培养液,经硫酸铵盐析, Sephadex G-100、DEAE-Sephadex A-50 及羟基磷灰石等柱层析, 得到了凝胶电泳均一的过氧化氢酶, 纯化了 954 倍, 得率为 7%。用浓度梯度 PAGE 测定分子量为 152000, SDS-PAGE 测定亚基分子量为 57000, 凝胶薄层等电点聚焦测定等电点为 4.25。

过氧化氢酶的反应最适温度为 60°C, 最适 pH 为 7.0; 对 H₂O₂ 的 K_m 为 50 mmol · L⁻¹, V_{max} 值为 6.0 mmol · min⁻¹ · mg⁻¹。

NaN₃ 和 Hg²⁺ 对酶活力有强烈抑制作用, Ca²⁺ 对酶活力有激活作用。

测定了波长 200—500nm 的吸收光谱, 在 405nm 处有明显的吸收峰。根据受 NaN₃ 抑制和吸收光谱性质, 推测它为含血红素酶。此外还测定了过氧化氢酶的氨基酸组成。

关键词 过氧化氢酶; 嗜热放线菌; 嗜热链霉菌

过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6, H₂O₂:H₂O₂-Oxidoreductase) 分解过氧化氢为分子氧和水。虽然它存在于所有的好氧细胞中, 但仅在牛肝和一些微生物中浓度较高, 因此人们对牛肝^[1] 及某些细菌^[2-6]、真菌^[7-9] 的过氧化氢酶进行了深入的研究。近年来还报道了嗜热性细菌 *Thermocophilum album*^[10] 及 *Therms thermophilus* HB8^[11] 过氧化氢酶的纯化及性质, 对于放线菌及嗜热放线菌过氧化氢酶的研究未见过报道。作者在前文中曾报道了由嗜热放线菌中筛选到产过氧化氢酶的嗜热链霉菌 T 485^[12]。本文研究了该菌产生的过氧化氢酶的纯化及性质。

材料和方法

(一) 主要仪器及试剂

835-50 氨基酸自动分析仪、150—20 分光光度计及 557 可见与紫外分光光度计 (Hitachi), J2-21 高速离心机 (Beckman),

H₂O₂ (北京化工厂), Sephadex G-100、DEAE-Sephadex A-50、载体两性电解质、标准分子量及等电点的蛋白质 (Pharmacia), 羟基磷灰石 (中国科学院生物物理研究所)。

(二) 菌种及培养

嗜热链霉菌 T 485 的培养方法见作者前文^[12], 扩大培养用 2000 ml 三角瓶装 500 ml 培养基, 接入 50ml 种子液。

(三) 酶活力测定及酶活力单位定义

采用滴定方法^[12]。每分钟分解 1 μmol 的过氧化氢所需酶量定为 1 个酶活力单位。

(四) 蛋白质测定

采用 Lowry 方法^[13] 及在波长 280nm 测吸光度 (A)。

(五) 电泳方法

本文于 1988 年 7 月 20 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

** 现在地址: 中国科学院研究生院生物学部。
杨寿钧曾对本工作给予宝贵意见, 特此致谢。

纯度测定用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE),按 Davis 方法^[14],7% 凝胶,考马斯亮蓝 G-250 染色,分子量测定用浓度梯度 (4—30% 凝胶)^[15] 及 SDS 不连续 PAGE^[15,17]。等电点测定用凝胶薄层等电聚焦^[18]。

结 果

(一) 过氧化氢酶的分离纯化

1. 粗酶液制备:嗜热链霉菌 T485 的培养液用 $4424 \times g$ 离心 30min,除去菌体即得。

2. 硫酸铵沉淀及透析:将上步去菌体培养液放在冰浴中,加硫酸铵至饱和度 70%,4°C 过夜,用 $11325 \times g$ 离心 30min,沉淀用 pH7.1 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解,装入透析袋,对相同缓冲液透析。

3. Sephadex G-100 柱凝胶过滤:将透析后的样品上柱 ($2.7 \times 90\text{cm}$),用上述缓冲液洗脱,流速 20ml/h,用部分收集器收集洗脱液,将有酶活力的洗脱液合并。

4. DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析:将上步酶液上柱 ($2.6 \times 20\text{cm}$),先用含有 0.2mol/L NaCl 的上述缓冲液

洗脱,再用盐浓度梯度洗脱(缓冲液分别含有 0.2 和 0.8mol/L NaCl),流速 20ml/h,分部收集,合并有酶活力部分的洗脱液。

5. 羟基磷灰石吸附柱层析:将上步酶液用蒸馏水稀释后上柱 ($1.1 \times 17\text{cm}$),先用 pH7.0 的 2 mmol/L 磷酸缓冲液洗脱至 280nm 无吸光度为止,然后用离子浓度梯度洗脱(2 和 200mmol/L 磷酸缓冲液),流速 10ml/h,分部收集,合并有酶活力部分的洗脱液。

6. DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱再层析:将上步酶液上柱 ($1.6 \times 20\text{cm}$),洗脱条件同步骤 4。

7. 纯度鉴定及结果计算:将纯化的最后一步收集的酶液分别用 PAGE、浓度梯度 PAGE、SDS-PAGE 及凝胶薄层等电聚焦鉴定为均一的蛋白质带,这证明过氧化氢酶已被纯化。再将纯化过程中的每一步样品,分别测定酶活力、蛋白质含量及 PAGE (图 1),结果表明,过氧化氢酶的比活力由培养液中 1.3 u/mg 提高至 1240 u/mg,纯化了 954 倍,得率 7%(表 1)。以下试验均用纯化后样品进行。

(二) 一般性质

表 1 嗜热链霉菌 T485 过氧化氢酶的纯化

Table 1 Purification of catalase from *Thermostreptomyces* sp. T485

提纯步骤 Step	体积 Volume (ml)	蛋白 Protein (mg)	酶活力 Activity (u)	比活力 Sp Act (u/mg)	收率 Yield (%)	提纯倍数 Purification (Fold)
1. Culture supernatant	1330	6909.0	8645	1.3	100	1.0
2. 70% (NH ₄) ₂ SO ₄ P.Pt. and dialysis	40	853.0	4200	4.9	49	3.8
3. Sephadex G-100	100	63.0	2750	43.7	32	33.6
4. 1st DEAE-Sephadex A-50	144	8.5	2593	305.0	30	234.6
5. Hydroxyapatite	36	1.7	1080	635.0	13	488.5
6. 2nd DEAE-Sephadex A-50	18	0.52	640	1240.0	7	953.8

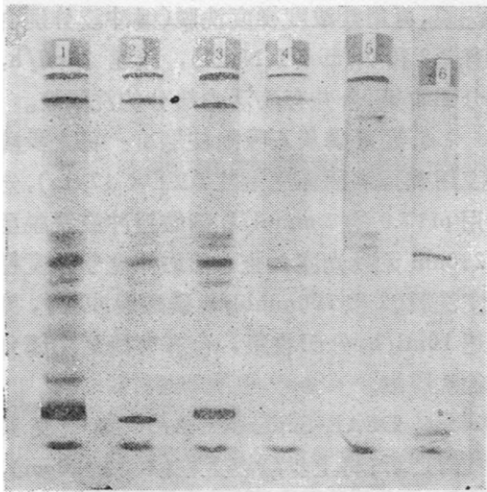


图 1 纯化过程中凝胶电泳图

Fig. 1 PAGE patterns of samples from different steps of purification

1-6 相应于表 1 中的步骤 1-6

1-6 correspond to steps 1-6 in table 1

1. 分子量测定: 用上述纯度鉴定时的浓度梯度 PAGE 及 SDS-PAGE 进行测定, 过氧化氢酶的分子量为 152000, 亚基分子量为 57000。不同蛋白质分子量 (对数坐标) 与 R_m 值作图 (图 2, 3), 浓度梯度

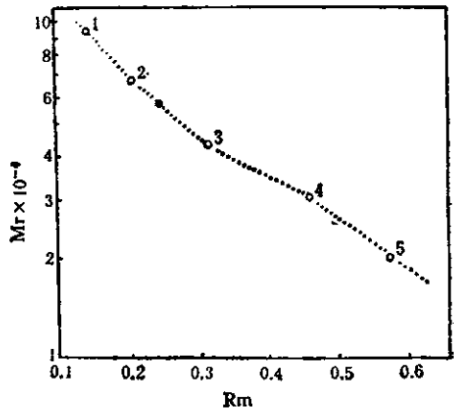


图 3 用 SDS 凝胶电泳测定分子量

Fig. 3 Determination of M_r by SDS-PAGE.

M_r calibration kit (KD):

- 1. Phosphorylase b 94; 2. Albumin 67;
- 3. Ovalbumin 43; 4. Carbonic anhydrase 30; 5. Trypsin inhibitor 20;
- T485 catalase

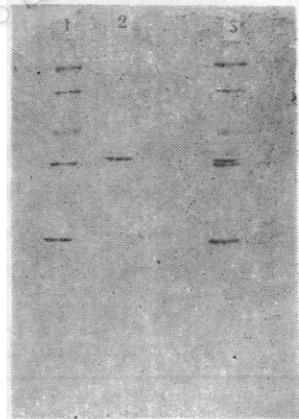


图 4 T485 过氧化氢酶和标准蛋白质的浓度梯度凝胶电泳图

Fig. 4 Concentration gradient PAGE pattern of T485 catalase and standard proteins

- 1. 标准蛋白质 Standard proteins; 2. T485 过氧化氢酶 T485 catalase; 3. 标准蛋白质 + T485 过氧化氢酶 Standard proteins + T485 catalase

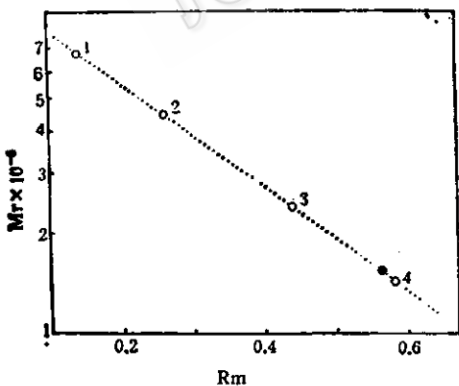


图 2 用浓度梯度凝胶电泳测定分子量

Fig. 2 Determination of relative molecular mass by concentration gradient PAGE

M_r calibration kit (KD):

- 1. Thyroglobulin 669; 2. Ferritin 440;
- 3. Catalase 232; 4. Lactate dehydrogenase 140; ● T485 catalase

PAGE 图见图 4。

2. 等电点测定: 用凝胶薄层等电聚焦方法进行, 6% 凝胶, pH3-10 的两性载体 (40%), 由蛋白质的等电点对阴极距离作

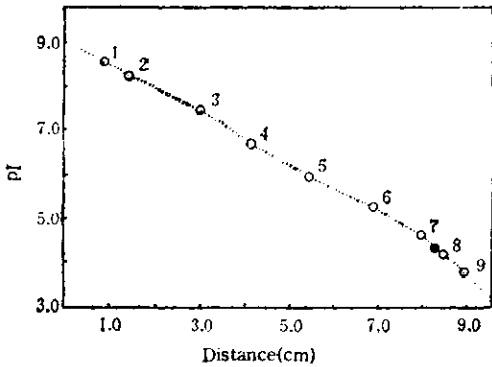


图 5 用凝胶薄层等电聚焦测定 pI 值

Fig. 5 Determination of pI value by PAG-IEF pI calibration kit:

- 1. Lentil lectin 8.45; 2. Lentil lectin 8.15;
- 3. Horse myoglobin 7.35; 4. Human carbonic 6.55; 5. Bovine carbonic anhydrase 5.85; 6. α -Lactoglobulin A 5.20; 7. Soybean trypsin inhibitor 4.55; 8. Glucose oxidase 4.15; 9. Methyl red (dye) 3.75; ● T485 catalase 4.25.

图 (图 5), 求出过氧化氢酶的等电点为 4.25。

3. 温度对酶活力的影响: 分别在不同温度下按常规方法测定酶活力。酶反应的最适温度为 60℃(图 6)。

4. pH 对酶活力的影响: 用 pH3.0—8.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液, pH8.0 及 9.0 的巴比妥钠-HCl 缓冲液, pH 9.0 和 10.0 的甘氨酸-NaOH 缓冲液分别配制底

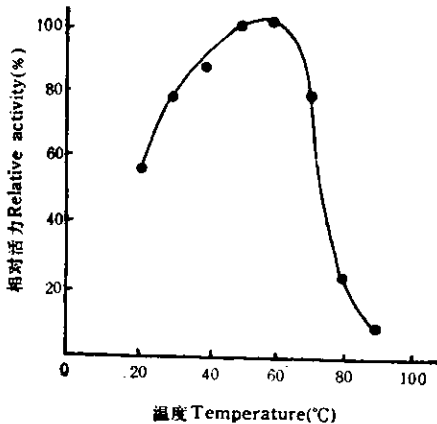


图 6 温度对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of temperature on activity

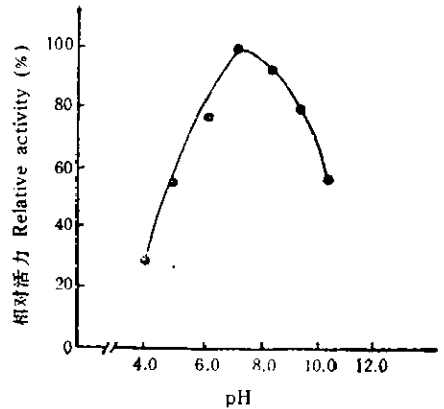


图 7 pH 对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of pH on activity

物, 按常规方法测定酶活力。酶反应最适 pH 为 7.0(图 7)。

5. 温度稳定性: 将酶液与 pH 5.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液混合, 在 50℃ 保温不同时间, 然后按常规方法测定酶活力, 以不保温的酶活力作为 100% 计算, 结果保温 11.0min 后, 酶活力为 50%。

6. 底物浓度对酶活力的影响: 以 100、30、20、10、7 及 5mmol/L 的 H_2O_2 做底物,

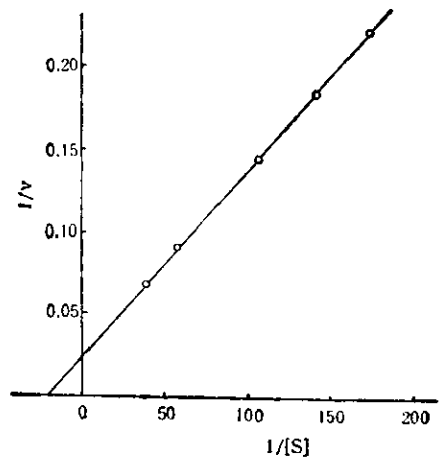


图 8 速度倒数对底物倒数作图

Fig. 8 Double-reciprocal plot of velocity (V) vs substrate concentration [S]

V: $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$; [S] $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

按常规方法测定酶活力,用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图(图 8),求得 K_m 值为 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, V_{\max} 为 $6.0\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

7. 金属离子和其他化合物对酶活力的影响: 将各种化合物配成溶液与酶液在 20°C 保温 30 min, 然后按常规方法测定酶活力,以不保温的酶活力作为 100%。 1mmol/L Hg^{2+} 使酶活力完全丧失, Ca^{2+} 及 Fe^{3+} 对酶活力有激活作用。 1mmol/L NaN_3 使酶活力剩余 65%, 10mmol/L 使酶活力完全丧失。 37.5mmol/L EDTA 强烈抑制酶活力,详细结果见表 2。

表 2 金属离子及其他化合物对酶活力影响

Table 2 Effect of some compounds and cations on activity

化合物 Compounds	浓度 Concn. (mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)
Hg^{2+}	0.1	23
	1.0	0
NaN_3	1.0	65
	10.0	0
EDTA	10.0	94
	37.5	12
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$	50.0	100
Ca^{2+}	1.0	143
Mn^{2+}	1.0	100
Zn^{2+}	1.0	100
Fe^{3+}	1.0	114

(三) 过氧化氢酶的氨基酸组成及吸收光谱

1. 氨基酸组成: 样品用 5.7mol/L HCl 在 110°C 分别水解 24、48 及 72 小时。分析半胱氨酸时, 样品需预先用过甲酸氧化后再水解^[19] 然后用氨基酸自动分析仪分析。计算一般氨基酸用 3 个水解时间的平均值; 丝氨酸和苏氨酸用外推法到 0; 半胱氨酸用过甲酸氧化。结果用每 100 个总的氨基酸残基数含有某种氨基酸残基数来表示(表 3)。从结果来看, 含量最高为苯丙氨

表 3 T485 过氧化氢酶的氨基酸组成

Table 3 Amino acid composition of catalase from *Thermotstreptomyces* sp. T 485

氨基酸 Amino acid	No. /100 residues
Asx	7.30
Thr	2.88
Ser	1.29
Glx	8.28
Pro	3.54
Gly	10.47
Ala	10.55
$1/2$ Cys	1.50
Val	7.64
Met	0.25
Ile	5.04
Leu	6.79
Tyr	undetected
Phe	20.83
His	1.94
Lys	4.01
Arg	4.36
Hyp	1.24

酸(20.83), 其次为丙氨酸(10.55), 最少为甲硫氨酸(0.25), 还有不常见的羟脯氨酸。

2. 吸收光谱: 测定浓度为 2×10^{-4} mmol/L 的过氧化氢酶在 200—500 nm 的吸收光谱表明, 除在 280nm 的蛋白质吸收峰外, 在波长 405 nm 处有明显的吸收峰(图 9), 这与含血红素的过氧化氢酶相似。

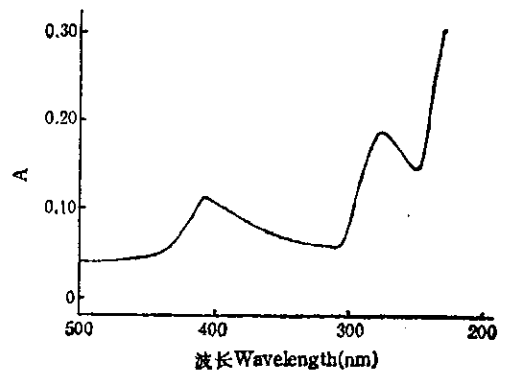


图 9 T485 过氧化氢酶的吸收光谱

Fig. 9 Absorption spectra of catalase from *Thermotstreptomyces* sp T485

讨 论

大部分过氧化氢酶,包括牛肝^[1]来源的及溶壁微球菌^[2]、球形红假单胞菌^[3]、大肠杆菌^[4]及微紫青霉(*Penicillium visale*)^[7,8]等的过氧化氢酶,分子量在 230000—320000 之间,它们具有 4 个亚基,每个亚基结合一个血红素基团,因而在波长 405 nm 处有一明显的吸收峰,酶活力被 N_2 及 CN^- 抑制。以后发现有一类来自于 *Pediococcus cerevisiae*^[5] 及胚芽乳杆菌^[6] 的过氧化氢酶,它们的某些性质与上述酶不同,酶活力对 N_2 和 CN^- 不敏感,分子中不含 Fe,而含有 Mn,因而也曾被称为“假过氧化氢酶”(Pseudocatalase)。近年来研究的 *Thermoleophilum album*^[10] 过氧化氢酶,

性质上介于上述两种酶之间,它具有 4 个亚基,分子量较小(141000),酶活力对于 N_2 和 CN^- 表现出轻微敏感,含有 Mn,在可见光区无吸收峰。另一 *Thermus thermophilus* HB8^[11] 过氧化氢酶具有 6 个亚基,分子中可能含有 Mn,但酶活力对 N_2 敏感,在可见光区有吸收峰,但不在 405nm,而在 440nm。本文纯化的嗜热链霉菌 T485 过氧化氢酶在某些性质上接近于前一类真正的过氧化氢酶。在波长 405nm 有吸收峰,酶活力受 N_2 强烈抑制,推测它应含有血红素基团。T485 过氧化氢酶和前面提到的两种嗜热性细菌过氧化氢酶比较差别就较多了。关于不同来源的过氧化氢酶的性质详见表 4。

在耐热性方面,T485 过氧化氢酶不及

表 4 不同来源的过氧化氢酶的性质比较

Table 4 Comparison of properties of catalase from various sources

来 源 Source	分子量 Mr (KD)	亚基数 No. of subunits	亚基分子量 Subunit Mr (KD)	含金属 Metal	K_m (mmol · L ⁻¹)	V_{max} (mmol min ⁻¹ · mg ⁻¹)	抑制作用 Inhibition NaN ₃	吸收光谱 Absorption spectra (nm)
Beef liver ^[1]	232	4	58	Fe			+	405,600
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ^[2]	232	4	57	Fe			+	495,506, 545,631
<i>Neurospora crassa</i> ^[9]	320	4	80	Fe			+	400,509,712
<i>Lactobacillus planterum</i> ^[4]	172	6	28.3	Mn	250		-	470
<i>Thermoleophilum album</i> ^[10]	141	4	34	Mn	15	11	-	None
<i>Thermus thermophilus</i> HB8 ^[11]	210	6	35	Mn?			+	440,460,500
<i>Thermotremptomyces</i> sp. T485	152	3?	57	Fe?	50	6	+	405

前面提到的两种嗜热性细菌过氧化氢酶。将 T485 过氧化氢酶在 50℃ 保温 110min, 酶活力仅有 50%, 而 *Thermoleophilum album* 过氧化氢酶在 60℃ 保温 24 小时, 酶活力还有 93%; 在不同温度下的酶活

力, T485 过氧化氢酶在 90℃ 时的酶活力仅有 60℃ 时的 10%, 而 *Thermus thermophilus* HB8 过氧化氢酶在 95℃ 时的酶活力为 60℃ 时的 85%。

过氧化氢酶均有 4 个或 6 个亚基, 嗜

热链霉菌 T485 过氧化氢酶用 SDS-PAGE 测定时,在凝胶上呈均一带,说明各个亚基分子量是相同的,另外根据浓度梯度 PAGE 测定分子量的结果,估算 T485 过氧化氢酶应为 3 个亚基,这是比较罕见的,需要作进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Schroeder, W. A. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**(1): 397—421, 1982.
- [2] Herbert, D. and J. Pinsent: *Biochem. J.* **43**: 193—203, 1948.
- [3] Clayton, R. K.: *Biochim et Biophys. Acta*, **36**: 40—47, 1959.
- [4] Claiborne, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**: 11664—11668, 1979.
- [5] Delwiche, E. A.: *J. Bacteriology*, **81**(3): 416—418, 1961.
- [6] Kono, Y. and I. Fridovich: *J. Bio. Chem.*, **258**(10): 6015—6019, 1983.
- [7] Vainshtein, B. K. et al.: *J. Mol. Biol.*, **188**: 49—61, 1986.
- [8] Melik-Adamyam, W. R. et al.: *J. Mol. Biol.*, **188**: 63—72, 1986.
- [9] Jacob, G. S. and W. H. Orme-Johnson: *Biochem.*, **18**(14): 2967—2975, 1979.
- [10] Allgood, G. S. and J. J. Perry: *J. Bact.*, **168**(2): 563—566, 1986.
- [11] Barryin, V. V. and A. I. Grebenko: *Doklady Akad. Nauk. USSR*, **236**(2): 461—464, 1986.
- [12] 周一等: *微生物学报*, **30**(3): 223—227, 1990.
- [13] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [14] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.
- [15] 张龙翔等: *生化实验方法和技术*, 高等教育出版社, p.119—124, 1985.
- [16] Lugtenberg, B. et al.: *FEBS Lett.*, **58**: 254, 1975.
- [17] Laemmli, V. K.: *Nature*, **227**: 680, 1970.
- [18] 张树政等主编: *酶制剂工业* (上册), 科学出版社: p.307—313, 1984.
- [19] 潘家秀等编著: *蛋白质化学研究技术*, 科学出版社: 北京, p.58, 1973.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CATALASE FROM *THERMOSTREPTOMYCES* SP.

Zhou Yi Yan Zizheng Shang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A catalase was purified to PAGE homogenous from the culture supernatant of a strain of *Thermotreptomyces* sp. by ammonium sulfate precipitation and successive column chromatography on Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50 and hydroxyapatite with 954-fold purification and 7% recovery. The M_r and subunit M_r estimated with concentration gradient PAGE and SDS-PAGE were 152000 and 57000 respectively. The isoelectric point was 4.25 determined with PAG-IEF.

The optimum pH of catalase was 7.0, optimum temperature was 60°C. The K_m value and V_{max} for H_2O_2 were $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $6.0\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

respectively. The enzyme was strongly inhibited by NaN_3 and Hg^{2+} , and activated by Ca^{2+} .

The absorption spectra of catalase showed a sharp peak at 405 nm, similar to that of the heme containing catalase. The amino acid composition of the catalase has been determined.

Key words

Catalase; Thermophilic actinomyces; *Thermotreptomyces* sp.

The project supported by National Natural Science Foundation of China.