

# 假单胞菌 DM11 菌株的二氯甲烷脱卤素酶研究

蔡宝立

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

L. P. Wackett

(明尼苏达大学微生物学研究所, 美国)

二氯甲烷( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )被广泛地用作清除剂、溶剂、萃取剂、冷冻剂和熏蒸剂, 是一种主要的环境污染物。1980年 Rittmann 等<sup>[1]</sup>首次从工业废水中分离出以二氯甲烷为唯一碳源和能源的细菌, 而后又相继分离到 10 多株分解二氯甲烷的细菌, 并对这些菌中的脱卤素酶进行了研究。根据这些酶的性质, 把它们分成二组, 一组是活力较低的 A 组二氯甲烷脱卤素酶, 另一组是活力较高的 B 组二氯甲烷脱卤素酶<sup>[2-9]</sup>。

假单胞菌 (*Pseudomonas*) DM11 菌株是最近分离出的高效分解二氯甲烷的细菌, 其脱卤素酶属于 B 组<sup>[1]</sup>。本文报道 DM11 菌株的培养条件、脱卤素酶的纯化方法、酶的底物特异性及酶反应的最适条件。

## 材料和方法

### (一) 试剂和仪器

NAD、甲型脱氢酶 (FDH) 和谷胱甘肽 (GSH) 为 Sigma 产品, 标准蛋白和蛋白质染料为 Bio-Rad 产品。标准蛋白的分子量是: 碳酸酐酶 29000; 卵清蛋白 45000; 牛清蛋白 66000; 磷酸化酶 97400。酶的纯化使用 Pharmacia 的快速蛋白液相色谱仪 (FPLC), 酶活力测定用 Beckman DU-70 分光光度计, 电泳槽为 Bio-Rad 产品。

### (二) 菌株和培养条件

假单胞菌 DM11 菌株由 Scholtz<sup>[8]</sup>惠赠。接种于液体培养基中 4℃ 贮藏。培养基及培养条件见文献 [8], 但每次加入  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的最终浓度改为 10mmol/L。为了制备用于酶纯化的细胞, 用 2 份 45ml DM11 菌株的前培养液分别接种到二个装有 1000ml 培养基的 6L 三角瓶中, 用橡皮塞盖紧瓶口, 30℃ 下振荡培养。于 24 小时和 42 小时分别用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.15, 并补加

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 使终浓度为 10mmol/L, 46 小时终止培养。4℃, 10000r/min 离心 30 分钟, 细胞沉淀用 50mmol/L Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 7.5) 洗一次, 贮存于 -20℃ 备用。

### (三) 生长曲线的测定

按前述方法, 用 45ml DM11 菌株的前培养液接种 1000ml 培养基, 并于开始后的 24、42、50、62 和 70 小时测定培养液的  $\text{OD}_{600}$  值, 同时调节 pH 和补加  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 。用  $\text{OD}_{600}$  值对培养时间作图。

### (四) 酶的分离和纯化<sup>[1]</sup>

2g 冰凉的湿细胞悬浮于 10ml 裂解缓冲液 (50mmol/L Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pH 7.5, 0.1 mmol/L EDTA- $\text{Na}_2$ , 20% 甘油, 用前加入 DTT, 使终浓度为 5mmol/L), 用细胞压榨机 6803-9070kg 挤压二次, 4℃, 18000r/min 离心二次, 每次 20 分钟, 上清液为粗酶液。将 8-10ml 粗酶液直接注入 FPLC 的 Mono QHR 16/10 柱, 进行酶的纯化。平衡缓冲液改为 50mmol/L Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 7.0), 10% 甘油。

### (五) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[10]</sup>

分离胶的浓度为 12%, 样品胶的浓度为 4%, 粗酶液的上样量为 20 $\mu\text{g}$ , 纯酶液的上样量为 3 $\mu\text{g}$ 。

### (六) 蛋白质浓度测定<sup>[11]</sup>

标准蛋白为碳酸酐酶。

### (七) 脱卤素酶的活力测定<sup>[9]</sup>

采用脱卤素酶-甲型脱氢酶偶联反应测定脱卤素酶的活力。反应缓冲液为 50mmol/L Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 8.2) 或 100mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.2)。反应总体积为 0.5ml, 动态测定  $\text{OD}_{600}$  后, 按照下面公式计算酶活力:

本文于 1990 年 3 月 6 日收到。

$$V = \frac{\Delta A_{340} \times 0.5}{0.0062 \times \text{min}} \quad (\text{nmol/min})$$

酶的比活力用  $\text{mkat/kg}$  蛋白质表示,每秒产生  $1\text{mol}$  产物(甲醛)定义为  $1\text{kat}$ 。

## 结果和讨论

### (一)DM11 菌株的生长曲线

DM11 菌株的生长曲线见图 1。从图 1 可知,培养 42 小时后,也就是调 2 次 pH 并补加  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  后,细菌处于对数生长期。50 小时后细胞增殖缓慢,进入平衡期。为了制备高活力的酶,应在 46 小时前后收获细胞。从  $1\text{L}$  培养液中一般可以得到  $1\text{g}$  湿菌体。

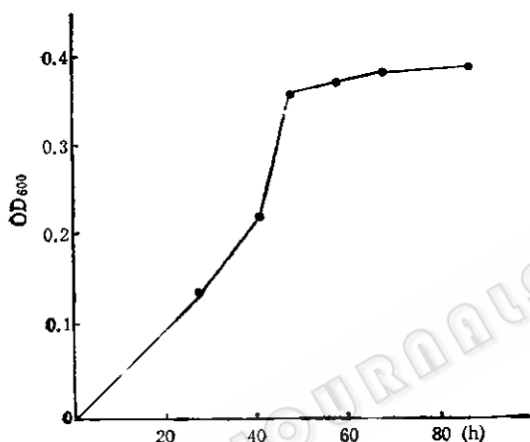


图 1 假单胞菌 DM11 菌株的生长曲线

### (二)脱卤素酶的分离和纯化

用 FPLC 和 Mono QHR 16/10 柱纯化 DM11 菌的脱卤素酶具有很好的重复性,脱卤素酶的峰,一般在 61 分钟出现。酶的回收率在 65% 左右,纯化系数为 11—12。纯化的酶经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示出一条均一的带(图 2)。纯酶在  $-80^\circ\text{C}$  下保存 10 个月,剩余酶活力在 90% 以上。

### (三)酶的最适反应条件

脱卤素酶-甲醛脱氢酶(FDH)偶联反应已成为测定脱卤素酶活力和研究脱卤素酶性质的主要手段。因此,研究这一偶联反应的最适条件具有重要意义。在偶联反应中,一般均使用过量的 NAD ( $0.5\text{mmol/L}$ ) 和 FDH ( $1.2\text{u/ml}$ ),所以反应缓冲液的种类和 pH、反应温度以及 GSH 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的浓度成为影响酶反应速率的重要因

素。在进行各种条件试验时,反应温度为  $30^\circ\text{C}$ (温度试验除外),反应缓冲液都使用  $100\text{mmol/L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{pH } 8.2$ ) (缓冲液试验除外), pH 都是  $8.2$ (pH 试验除外)。

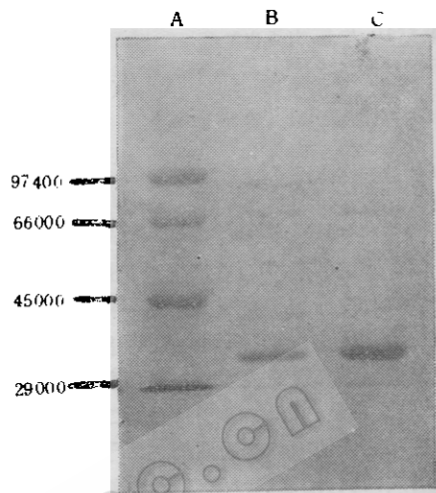
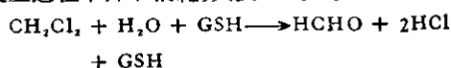


图 2 脱卤素酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

A. 标准蛋白质; B、C. 纯化的 DM11 菌株脱卤素酶

1. 反应缓冲液对酶活力的影响: 在相同条件下 ( $1\text{mmol/L}$  GSH,  $2\text{mmol/L}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 当反应缓冲液使用  $100\text{mmol/L}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{pH } 8.2$ ) 时, 其酶活力是使用  $50\text{mmol/L}$  Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{pH } 8.2$ ) 时的 2.7 倍。但来自假单胞菌 DM4 的脱卤素酶(A 组酶), 在上述两种缓冲液中的酶活力没有明显区别。

2. GSH 浓度对酶活力的影响: 二氯甲烷脱卤素酶的催化反应需要 GSH 的参与, 但 GSH 在反应过程中并不消耗, 其反应式为:



固定底物  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的浓度为  $2\text{mmol/L}$ , 当 GSH 浓度为  $0.75\text{--}1\text{mmol/L}$  时, 酶活力最高。GSH 浓度超过  $3\text{mmol/L}$  时, 酶活力迅速下降。许多实验室在进行二氯甲烷脱卤素酶反应时均使用  $5\text{mmol/L}$  GSH。因此所测得的酶活力可能不是最佳值。

3.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  浓度对酶活力的影响: 固定 GSH 的浓度为  $1\text{mmol/L}$ , 当  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的浓度为  $2\text{--}3\text{mmol/L}$  时, 酶活力最高。 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的浓度超过  $3\text{mmol/L}$  时, 酶活力缓慢下降。DM11 菌株的脱卤素酶虽然能脱  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  脱掉 2 个氯原子而转化

成甲醛, 但是  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的浓度过高可能对酶具有毒性, 所以酶活力下降。在进行 DM11 菌株的培养时,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  要分三次加入也是这个道理。

4. 最适 pH: 固定 GSH 的浓度为  $1\text{mmol/L}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的浓度为  $2\text{mmol/L}$ , 当反应体系的 pH 为  $8.0-8.5$  时, 脱卤素酶的活力最高。pH 值小于  $6.3$  和大于  $10.6$  时, 酶活力完全丧失 (图 3)。

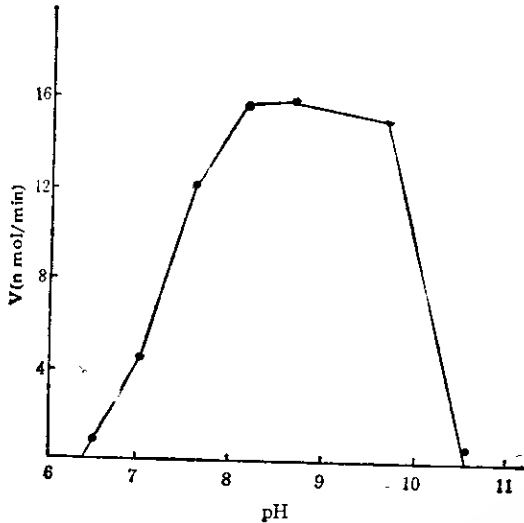


图 3 pH 对脱卤素酶活力的影响

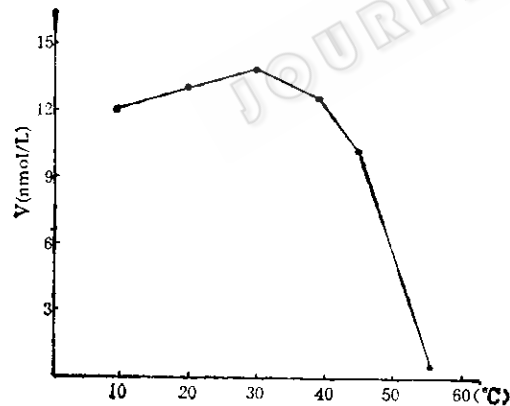


图 4 温度对脱卤素酶活力的影响

5. 最适温度: 酶反应溶液在加入  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  前, 在不同温度的水浴中保温 5 分钟, 然后加入

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 并在相应温度下测定酶活力。结果 (图 4) 表明, 当反应温度为  $30^\circ\text{C}$  时酶活力最高, 超过  $57^\circ\text{C}$  时酶活力完全丧失。

#### (四) 脱卤素酶对底物的专一性

试验了  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{I}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{ClBr}$  和  $\text{CH}_2\text{ClI}$  等 5 种化合物, 其结果表明, 它们都是 DM11 菌株脱卤素酶的底物, 其比活力见表 1。我们还检查了  $\text{CH}_3\text{Cl}$  和  $\text{CHCl}_3$ , 是否可作为 DM11 菌株脱卤素酶的底物, 结果是否定的。这说明该酶只能专一性地分解含 2 个卤原子的甲烷衍生物。

表 1 脱卤素酶在各种底物中的比活力

底物	底物浓度 (mmol/L)	酶的比活力 (mkat/kg 蛋白质)
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	2	77.8
$\text{CH}_2\text{Br}_2$	2	123.3
$\text{CH}_2\text{I}_2$	4	78.8
$\text{CH}_2\text{ClBr}$	0.2	56.1
$\text{CH}_2\text{ClI}$	0.2	60.3

#### 参 考 文 献

- [1] Rittmann, B. E. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 1225—1226, 1980.
- [2] Brunner, W. et al.: *ibid.*, **40**: 950—958, 1980.
- [3] Stucki, G. et al.: *Arch. Microbiol.*, **130**: 366—371, 1981.
- [4] Lapat-Polasko, L.T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 825—830, 1984.
- [5] Kohler-Staub, D. et al.: *J. Bacteriol.*, **162**: 676—681, 1985.
- [6] Galli, R. et al.: *Conservation and Recycling*, **8**: 91—100, 1985.
- [7] Kohler-Staub, D. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 2837—2843, 1986.
- [8] Scholtz, R. et al.: *J. Bacteriol.*, **170**: 5698—5704, 1988.
- [9] Galli, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **134**: 943—952, 1988.
- [10] Scholtz, R. et al.: *J. Bacteriol.*, **169**: 5016—5021, 1987.
- [11] Bradford, M.: *Anal. Biochem.*, **72**: 248—254, 1976.

## STUDIES ON DICHLOROMETHANE DEHALOGENASE OF *PSEUDOMONAS* SP. STRAIN DM11

Cai Baoli

(*Institute of Molecular Biology, Nanjing University, Tianjin*)

L. P. Wackett

(*Gray Freshwater Biological Institute, University of  
Minnesota, Navarre, U.S.A.*)

Dichloromethane dehalogenase was isolated and purified from *Pseudomonas* sp. strain DM11 by improved methods. The optimum reaction conditions for the enzyme are 100mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH8.2), 1mmol/L GSH, 2mmol/L  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and 30°C. The specific activities of the enzyme are 77.8, 123.3, 78.8, 56.1 and

60  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  protein for  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{I}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{ClBr}$  and  $\text{CH}_2\text{ClI}$  used as a substrate, respectively.

### Key words

*Pseudomonas* sp.; Dichloromethane dehalogenase