

# 一种纯化细菌有机磷水解酶的简便方法

赵永芳<sup>1</sup>、王银善<sup>2</sup>、庞学军<sup>2</sup>、叶明<sup>3</sup>、周济兰<sup>3</sup>、朱勤<sup>1</sup>

1. 武汉大学生物系, 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 3. 湖北省肿瘤研究所。

## 摘 要

Cibacron blue T<sub>3</sub>GA 与溴化氰活化的 Sepharose 4B 偶联后, 产生一种能有效地分离有机磷水解酶的吸附剂。用 0.15mol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液从黄杆菌 p3-2 细胞抽提出的粗酶液通过柱层析分离, 即可得到纯化 8 倍、酶活性回收率为 269.4% 的纯酶制品。该酶制品用凝胶电泳测是均一的。

关键词: 纯化 有机磷水解酶 亲和层析

## 前 言

黄杆菌 (*Flavobacterium* sp) p3-2<sup>[1]</sup> 是从有机磷农药污染的土壤中分离出来。它所含的有机磷水解酶能切断对硫磷 (PAR) 以及很多结构类似农药的 P-O-C 键<sup>[1,2]</sup>。这些农药经酶处理后丧失了抑制胆碱酯酶的作用<sup>[3]</sup>。因此认为, 有机磷水解酶是对硫磷等有机磷农药在解毒过程中的关键酶。

为了应用有机磷水解酶治理上述农药造成的环境污染, 提纯酶的步骤则需简化。本文采用了一种纯化有机磷水解酶的简便方法, 即把用镁离子从黄杆菌 p3-2 细胞提取出的粗酶液, 通过 Cibacron blue T<sub>3</sub>GA-Sepharose 4B 层析柱分离, 一步就能得到纯的有机磷水解酶。其纯化倍数 8 倍, 回收率为 269.4%。

## 材 料 与 方 法

### 一、细菌的培养及冻干菌粉的制备

黄杆菌 P<sub>3-2</sub> 的培养按以前报道<sup>[1]</sup> 的方法进行。不同之处是将培养液中所用的有机磷碳源改为 1% 的丙三醇, 另加少许 Triton X-100。3000ml 培养液分装在 15 个 500ml 的三角瓶中, 灭菌后接入 4% 的种子液。30℃ 摇动培养 15 小时左右, 4000×g 离心 20 分钟, 收集菌体 (湿重约 15g)。菌体用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 洗涤二次, 4℃, 6000×g 离心 20 分钟, 收集的菌体用冻干机处理, 干燥后呈疏松的棕红色干粉。置冰箱 (4℃) 保存三个月, 活力无明显丧失。

## 二、粗酶液的制备:

参照 K. J. Cheng 等人的方法<sup>(4)</sup>进行。称取冻干菌粉 300mg, 加入 7ml 含 0.15mol/L MgCl<sub>2</sub> 的 25mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.0)抽提。离心(12000r/min) 5 分钟后收集上清液(呈带微黄的乳白色)即为粗酶液;

## 三、Cibacron blue T<sub>3</sub>GA-Sepharose 4B 吸附剂的制备:

参照文献[5]和[6]进行。经蒸馏水洗涤、用真空泵抽干的 Sepharose 4B (40g), 先与等量的 2mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液混匀, 尔后加入溴化氰在室温下搅拌反应 7 分钟。随即按顺序用冰水和 0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液抽滤洗涤, 待抽干后移入搅拌的 80ml 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液——0.5mol/L NaCl 溶液(内含 700mg Cibacron blue T<sub>3</sub>GA 染料), pH9.0。在 4℃ 反应 16 小时后, 加入 100ml 1mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH9.0)再反应 0.5 小时。除去过剩的活化基团。分别用醋酸缓冲液、尿素溶液和蒸馏水洗涤至滤液为无色, 即得到了 Cibacron blue T<sub>3</sub>GA-Sepharose 4B 吸附剂。其结构式见 Fig.1 所示。

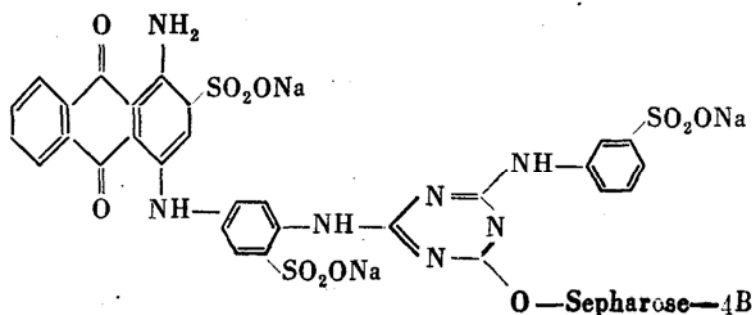


Fig.1 The Structures of Cibacron blue T<sub>3</sub>GA-Sepharose4B affinity matrix<sup>(6)</sup>

## 四、层析程序:

除注明外, 本试验的所有操作均在室温(25℃±1)下进行。将酶粗抽提液(5ml)加到已用 25mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.0)平衡的 Cibacron blue-Sepharose 4B 层析柱(2×11 cm), 流速为 8ml/h, 分部收集 2ml 管。然后用 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.0)洗涤, 接着改用 pH8.0 的上述缓冲液洗脱;

## 五、蛋白质的测定:

用 751 分光光度计测 A<sub>280nm</sub> 消光值表示。以牛血清白蛋白作标准;

## 六、酶活力的测定:

参考 Serdar 等<sup>(7)</sup>人的方法略加修改。取 0.1ml 酶液加到 5ml 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液(内含 10mg 对硫磷/升), pH8.5, 置 30℃ 水浴反应 30 分钟, 然后沸水中灭活 2 分钟, 产生的对一硝基酚用 A<sub>410nm</sub> 测消光值。规定每分钟消光值增加 0.01 所需的酶量为一个酶单位。

## 七、聚丙烯酰胺凝胶电泳:

参照文献[8]进行。聚丙烯酰胺板胶浓度 7.5%, 系碱性不连续系统。电极溶液为 Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.3), 电流强度 30mA, 电泳时间以指示剂移动到底为止;

八、试剂: Cibacron blue T<sub>3</sub>GA, Sepharose 4B 和溴化氰系进口的药品, 其余为国产的。

## 结 果

试验所用的粗酶液是用镁离子溶液抽提出来的。曾采用了三种方式即磁力搅拌式、匀浆式和间歇手摇式进行抽提, 结果见 Table 1。从表中蛋白质含量看, 磁力搅拌式抽出的蛋白质最多(13.86mg/ml), 间歇手摇式最少(8.57mg/ml)、匀浆式居中; 而从酶的总活力单位看, 间歇手摇式最高(220.5)、磁力搅拌式最低(50)、匀浆式仍居中。从回收率和纯化倍数两方面权衡, 间歇手摇式优点较多, 故本试验的粗酶液系用它抽提的。抽提时间以 1 小时为宜。若延长时, 虽然每毫升蛋白含量多, 但总酶活力则降低了(原因见下面)。

Table 1 Comparison of differ models for extractive PAR hydrolase

Extractive models	Total Volume (ml)	Amount of protein (mg/ml)	Total activity (u)
Magnetic Stir	7	13.86	50
Homogenate	7	12.6	130
Hand Shake	7	8.57	220.5

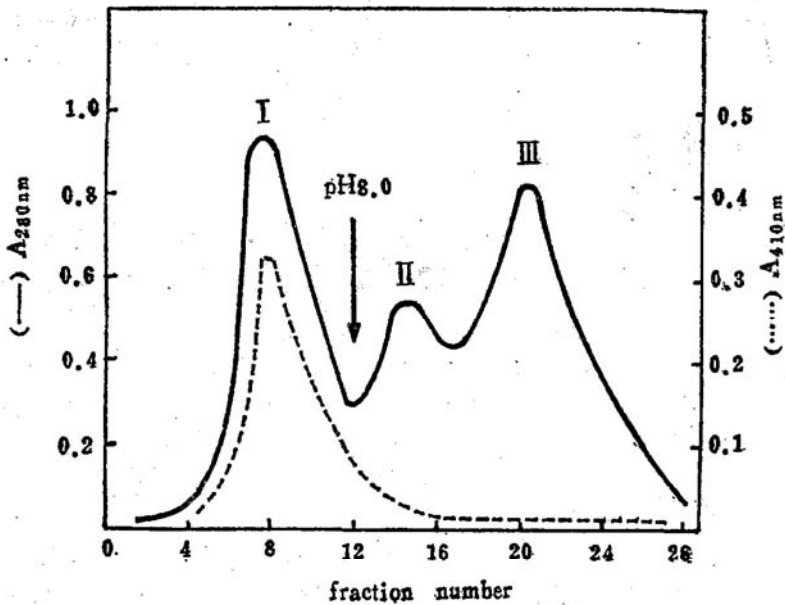


Fig.2 Separation profile of PAR hydrolase from Cibacron blue T<sub>3</sub>GA-Sepharose Elution procedure See text,

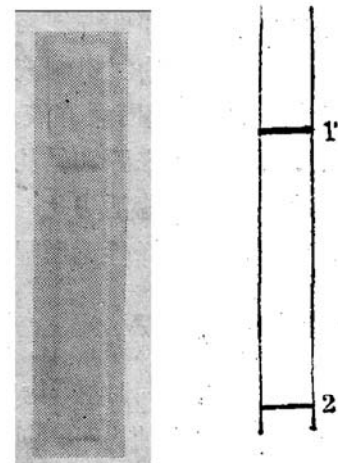


Fig.3 Gel electrophoretic pattern  
1. Purified Sample, 2. Bromophenyl blue.

粗酶液经 Cibacron blue-Sephrose 柱层析后, 可得到三个层析峰。用 50m mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.0)洗涤出现第 I 峰。该峰具有酶活力, 其大小与蛋白质含量基本一致。当改用 pH8.0 的上述缓冲液洗脱时出现第 II 峰和第 III 峰。这两个峰均无酶活力(见 Fig.2)。粗酶液经过柱层析一步分离后, 纯度提高 8 倍, 酶活力回收率为 269.4%。(见 Table2)。这是因粗酶液含有抑制物之故(见下面)。

将第 I 峰尖的有机磷水解酶浓缩液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 得到单一的电泳区带(见 Fig.3)这表明纯化后的有机磷水解酶是均一的。

为了证实上述纯化结果中酶活力回收率高于100%是因粗酶液含抑制物引起的。我们将分离得到纯酶液(即取0.15ml 峰 I 溶液)分别与杂蛋白液(即取 0.2ml 峰 II 和峰 III 混合液)和 50m mol/L Tris-HCl 缓冲液(即取 0.2ml 作对照)进行混合, 然后按酶测定方法比较酶活力, 结果前者比后者低24%; 另外, 从不同方式抽提有机磷酶效果的比较(Table 1)看出, 蛋白含量越高, 酶活力反而降低。这些事实初步表明, 黄杆菌 P<sub>3-2</sub> 细胞中存在着有机磷水解酶的抑制物, 而这种物质是极易被 Mg<sup>++</sup> 抽提出来的。但是通过 Cibacron blue-Sephrose 吸附剂分离后又极易去除。因此纯化后的回收率可高于100%。

Table 2 The purification of PAR hydrolase by cibacron blue T<sub>3</sub>GA-Sephrose 4B Column Chromatography

Steps	Total protein (mg)	Total activity (u)	Specific activity (u/mg)	Purification (-fold)	Recovery of enzyme activity (%)
Extraction	54	220.5	4.08	1	100
Active eluate	18.13	594.0	32.8	8.04	269.4

## 讨 论

一、黄杆菌 P<sub>3-2</sub> 冻干细胞的有机磷水解酶抽提液经过 Cibacron blue-Sephrose 柱层析一步分离法, 即可得到均一的酶液。这表明, 该菌体所含的有机磷水解酶是可以采用本文描述的方法纯化的。粗酶液中的杂蛋白与配体 Cibacron blue T<sub>3</sub>GA 是靠疏水键结合的, 所以用增高 pH 的相同缓冲液就可把配体所束缚的杂蛋白洗下来。这与文献报道<sup>[3]</sup>不一致。其原因可能与酶的来源和结构不同有关。由于这种纯化方法是在温和的蛋白质未变性的条件下完成的, 所以总酶活力比一般的纯化方法高。另外, 此层析柱可以重复使用(>20次), 且对蛋白的束缚量和选择性无明显降低。这更增强了大规模使用有机磷水解酶治理有关污染物的可能性;

二、试验数据证明。黄杆菌 P<sub>3-2</sub> 细胞内存在着有机磷水解酶的抑制物。而且它是易和有机磷水解酶同时被 Mg<sup>++</sup> 离子抽提出来的。如果抽提方式越剧烈, 粗酶液总活力就越低(因为在这条件下抽提时, 抑制物的增加高于酶的增加), 故纯化后回收率会很高(有时达900%)。因此, 推测黄杆菌 P<sub>3-2</sub> 的有机磷水解酶及其抑制物, 可能共居于胞外质<sup>(3,4)</sup>上。有关抑制物的性质, 正在研究中;

三、黄杆菌 P<sub>3-2</sub> 细胞经冰冻干燥后得到的菌粉性能较稳定。4℃ 存放 3 个月酶活力没有明显变化, 这对采用固化细胞或固化酶处理相应的点源污染是有意义的。

## 参 考 文 献

- [1] 王银善、庞学军。(1985),《环境科学学报》,5(3),315—321。
- [2] 王银善等。(1985),《环境科学学报》,5(4),468—473。
- [3] Pai.S.B.(1983),*Biochem. Biophys. Res. Commun.*,110(2),412—416。
- [4] Cheng.K.J. et al.(1970),*J. Bacteriol.*,104,748—753。
- [5] George.J. et al.(1978),*Nucl. Acids. Res.*,5,2223—
- [6] 赵永芳、祝兵,(1984),《生物化学与生物物理进展》,3,67—71。
- [7] Serdar. C. M. et al.(1982),*Appl. Environ. Microbiol.*,44,246—
- [8] 赵永芳编,(1982),《生物化学技术》,p199,武汉大学印刷厂印刷。
- [9] Pharmacia,(1984),*Affinity chromatography principles and methods*,

## A SIMPLE METHOD FOR PURIFICATION OF A BACTERIAL ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE

Zhao, Yong-fang<sup>1</sup>    Wang, Yin-shan<sup>2</sup>    Pang, Xue-jun<sup>2</sup>    Ye, Ming<sup>3</sup>  
Zhou, Ji-lan<sup>3</sup>    Zhu, Qin<sup>1</sup>

(1. *Department of Biology, Wuhan University.*)

(2. *Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica.*)

(3. *Hubei Institute of Tumour.*)

### ABSTRACT

The dye cibacron blue T<sub>3</sub>GA was coupled to cyanogen bromide activated sepharose 4B and the resulting affinity matrix was shown to be highly efficient for the purification of hydrolase of organophosphorus pesticides. A crude enzyme preparation from the bacterium flavobacterium SP P3-2 was extracted with 0.15mol/L MgCl<sub>2</sub> at pH7.0. The crude enzyme was purified 8 fold by using this chromatography procedure, and a recovery of 269.4 per cent of the enzyme activity was obtained. The purified enzymes were shown to be homogeneous on poly acrylamide gel electrophoresis.

**Key words:** Purification    Organophosphorus hydrolase,    Affinity  
chromatography