

细菌过氧化氢酶的分离、结晶及性质

刘昌玲 王国庆

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

提 要

过氧化氢酶又称触酶 (Catalase EC 1.11.1.6), 它广泛存在动植物和微生物的细胞内, 是一种很有用的工具酶。细菌触酶目前国内外均无产品。本文就细菌酶的分离、结晶和鉴定及性质进行了研究。

关键词 过氧化氢酶, 酶结晶, 微球菌

自 79 年以来我们发现了触酶能催化某些有机磷毒剂的水解^[1], 而细菌酶优于牛肝酶。为此建立并改进了微球菌 (*micrococcus lysodeikticus*) 的培养方法, 解决了酶源。交替用有机溶剂和盐析法, 分离提纯酶, 得到了较理想的电泳纯、高活力的结晶酶, 分子量为 235000, 稳定性好, 比活力显著超出国内外其它来源产品 5—47 倍。

材 料 和 方 法

一、材料

硫酸铵、无水乙醇、氯仿、丙酮等均为国产化学纯试剂。菌种微球菌 (本院五所细菌室提供)。紫外可见分光光度计为日本岛津 UV-250 型。

二、方法

1. 触酶活力测定 用经我们改进的光电比色法^[2]。取 0.02mol/L 的 H_2O_2 的磷酸盐缓冲液 (0.05mol/L, pH6.8) 1ml, 磷酸盐缓冲液 0.9ml 置 25℃ 孵温 3min, 加入稀释酶溶液 0.1ml 准确反应 1min, 加入 0.5mol/L H_2SO_4 1ml 终止反应。然后加 1ml 1% 钼酸铵, 1ml 6% 的柠檬酸。在 360nm 波长读数。计算活力。

2. 蛋白含量测定 用紫外 280nm 处测吸收值或用 Folin 酚定量法^[3], 以人血清白蛋白做标准曲线。

结 果 与 讨 论

一、酶的分离和结晶

细菌酶的分离参考 Herbet. D 的方法^[4], 但纯化结晶的方法是经过我们摸索, 建立了细菌触酶在蒸馏水中纯化结晶法, 得到了活力很高

参 考 文 献

- 1 Bernic MB. *J Clin Invest*, 1973; 52: 823
- 2 Husain SS *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1983; 220: 31
- 3 Sumi H *et al.* *Acta Haematol Jpn*, 1982; 45: 119—128
- 4 Wun TC *et al.* *J Biol Chem*, 1982; 257: 3276
- 5 Stump DC *et al.* *J Biol Chem*, 1986; 261: 1274
- 6 Winkler ME *et al.* *Biochemistry*, 1986; 25: 4041
- 7 Ichinose A *et al.* *J Biol Chem*, 1986; 261: 3486
- 8 史伟. 国外医学生理病理科学与临床分册, 1989; 89: 12

- 9 Collen D *et al.* *J Biol Chem*, 1986; 261: 1259
- 10 Pharmacia Fine Chemicals Affinity chromatography principles & methods. p15—18
- 11 史伟等. 尿激酶前体与 tPA 或 UK 协同纤溶作用的研究 (待发表)
- 12 Laemmli U K. *Nature (Lond)*, 1970; 227: 680
- 13 施秉钧. 见: 上海第二医学院, 上海市免疫学研究所编, 免疫学技术 (研究生教材), 1984; 118—121
- 14 Bradford MM. *Analytic Biochem*, 1976; 72: 248
- 15 Wun TC *et al.* *J Biol Chem*, 1982; 257: 7262
- 16 Corti A *et al.* *Thromb Haemost*, 1986; 56: 219
- 17 Van de Werf F *et al.* *Ann Intern Med*, 1986; 104: 345

[本文于 1989 年 9 月 12 日收到]

表1 分离、结晶流程

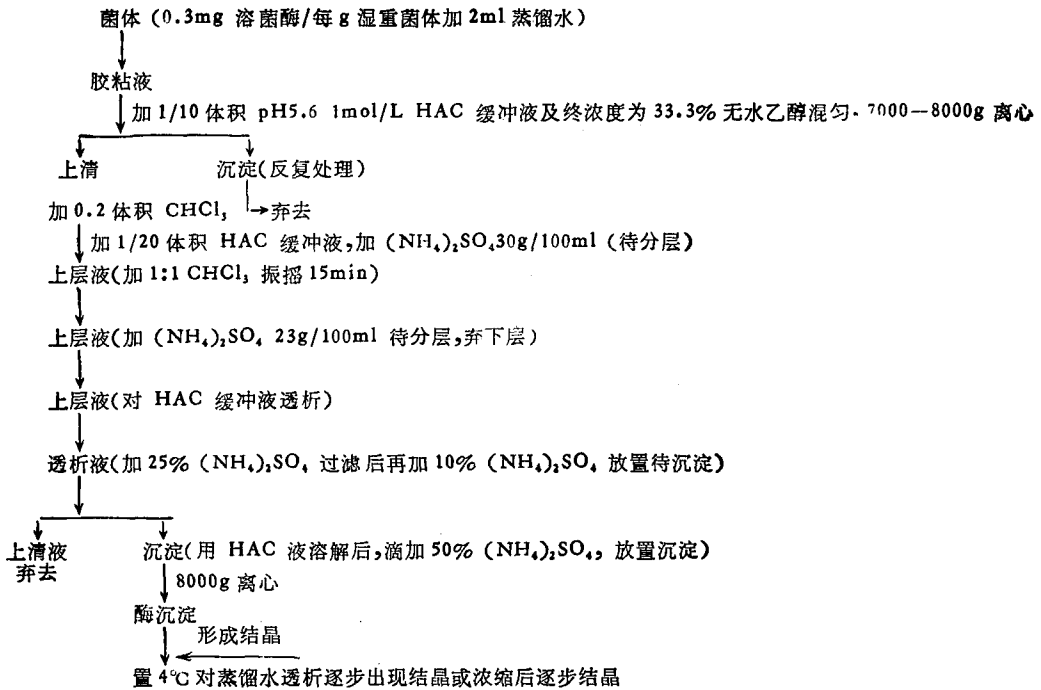


表2 细菌触酶提纯的结果

步 骤	总体积 (ml)	蛋白含量 (mg/ml)	活力单位 H_2O_2 mmol/min			提纯倍数	活力回收率
			总活力	mmol/ml	mmol/mg		
细菌悬液	1379	11.1	8886	6.7	0.6	1	100
乙醇划分上清	1200	7.4	8579	7.1	0.9	1.6	96.5
第二次氯仿划分	1100	4.5	8853	8.0	1.8	3.0	99.6
第一次盐析上清	1000	2.1	8645	8.6	4.1	6.7	97.3
第二次盐析上清	900	0.95	5997	6.6	7.0	11.6	67.5
最后沉淀酶	20	15.6	5898	294.9	18.9	31.1	64.4
结晶液 I	0.3	100.0	6194	2065.0	206.5	344.0	69.7
结晶液 II	0.2						46.5

的纯酶结晶, 整个分离纯化流程(表 1), 需在冰库 (4°—8℃) 里完成, 特别是加乙醇、氯仿时一定要使温度保持在 -5℃ 以下缓慢加入。

提取的结果(表 2)表明, 提纯倍数为 344 倍, 活力回收率在 46—70%。

二、酶的鉴定

1. 酶的吸收光谱 酶的蛋白吸收率为 280 nm, 其辅基吸收峰为 406nm, (图 1)。

2. 细菌触酶的结晶 我们分离的触酶, 在蒸馏水中反复纯化, 得到酶结晶悬液。光镜检查(图 2)。

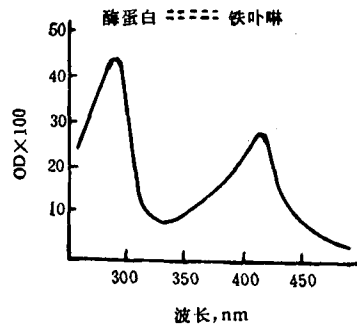


图1 触酶的吸收光谱

3. 酶的电泳分析 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果(图 3)证明为单一电泳纯。

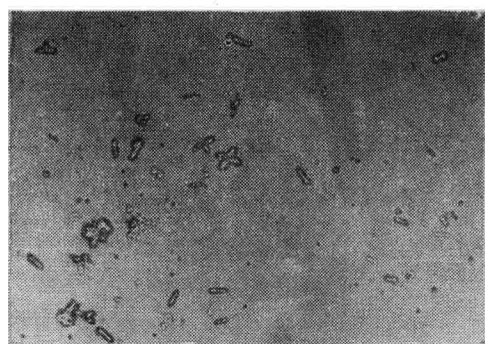


图2 细菌触酶的结晶



图3 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. 标准蛋白(11种) 2. 细菌触酶(本实验室提纯的)

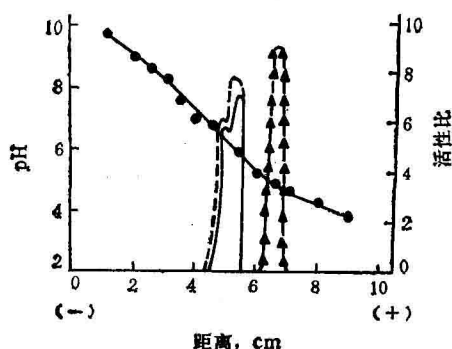


图4 触酶等电点和活性图谱

—○— 细菌酶活力(自提) —○— 牛肝酶活力(自提)
----- 牛肝酶活力(Sigma) -●- pH 梯度

等电点的测定^[5],用几种已知等电点(pI)的蛋白为对照与触酶样品在同样条件下,同时进

行聚焦电泳。并分别取空白凝胶块与蛋白带凝胶块同步,在同样条件下测定酶活力,以空白区为零,活力最高为10,结果(图4)表明细菌触酶的pI是4.5—4.9,并与活性区是重叠的。同时说明酶是很纯的。

4. 酶的分子量测定 用 SDS 聚丙烯酰胺垂直平板电泳法^[6],同时测定5个,已知标准分子量的蛋白与触酶的分子量。以各个被测标准样品的 R_f 值和其分子量在半对数纸上作图,同时计算得出回归方程是 $\lg MW = -0.964(R_f) + 4.951$ 测定触酶的 R_f 值为0.188,测算出分子量为58700,已知触酶有4个相等的亚基,所以酶的分子量是234800道尔顿。

用分析超离心机(日立282型)测出细菌触酶的沉降系数为 S_{20W} 11.4S,扩散系数为 D_{20W} 4.46×10^{-7} ,分子量为234000道尔顿。这与电泳测定结果一致。

三、酶的性质

1. pH对酶活力的影响 取不同pH的磷酸缓冲液,分别与同样浓度的 H_2O_2 和酶反应。以各组非酶对照计算,结果表明(表3)pH5—11对酶活性影响不大。

2. 温度对稀释的酶活性的影响 将酶稀释10000倍($2\mu g$ 蛋白/ml),分别放置在37℃和0—4℃,不同时间测定酶活力。在37℃的酶溶液,8小时内酶活力无明显下降,24小时活力下降58%,5天酶活力基本丧失。在0—4℃放置30天,酶活力仍无明显下降(图5)。

表3 pH对酶活性的影响

pH	3.5	4.0	5.0	6.0	7.0	7.5	8.5	9.0	10.0	11.0	12.0
活力(O.D)	0.142	0.237	0.465	0.497	0.507	0.485	0.478	0.474	0.447	0.425	0.307

3. 酶稳定性观察 取一份酶(85mg蛋白/ml)溶液,放置-7—-10℃,不同时间测定酶活性。溶液酶在200天内冻融8次,测定酶活性,没有下降,表明酶活力很稳定(图6)。

四、酶源的选定

为了找到一种较理想的酶源,即酶的来源

容易,含量丰富,催化效能高,制取方法较简易,稳定性好,又可大量生产等。我们把所能找到的国内外不同来源的触酶,进行比较,结果(表4)表明,微球菌的触酶比活性最高,比国内外产品高5—47倍,显著优于国内外商品水平,因此我们认为把它作为触酶的酶源是较理想的。此

碱性磷酸酶在壳聚糖上的固定化作用

陈 盛 吴海生

(福建师范大学高分子研究所生化研究室,福州 350007)

提 要

本文报道以蟹、虾废壳为原料提取壳聚糖,用戊二醛作交联剂,将碱性磷酸酶固定于壳聚糖上。同时探讨了一定量湿壳聚糖载体与交联剂浓度,给酶量及产率等关系的最适固定化酶条件,并对固定化酶的热稳定性、操作稳定性、米氏常数、最适 pH、最适温度等理化性质进行了探讨。

关键词 壳聚糖,戊二醛,碱性磷酸酶,固定化

引 言

从已有文献报道表明,用于酶及细胞固定化载体不少,但从实用性方面考虑,探索研制高

效、廉价的载体乃是酶工程应用基础研究亟需解决的一个重要课题。近年来,壳聚糖作为固定化酶载体引起了不少学者重视。壳聚糖是从蟹、虾、鲎等甲壳动物废弃的外壳中提取的一种

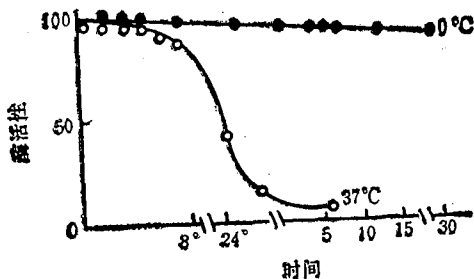


图5 温度对稀酶液的影响

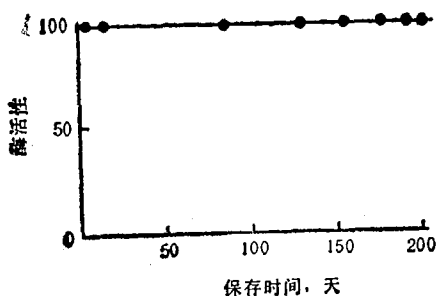


图6 酶的稳定性

表4 不同来源的酶活力比较

酶 源	牌 号	比 活 力 mmol/(min · mg)
微 球 菌	本实验室	26.719
细 菌	B. Merck	1.399
真 菌	B. Merck	2.633
牛 肝	Sigma(C-10)	5.516
牛 肝	Sigma(C-40)	1.399
牛 肝	上海东风厂	0.574

项研究国内未见有人报道。

参 考 文 献

- 1 刘昌玲等.中国药理学报,1985;6: 207
- 2 Munoz M V. *Trabajos del Departamento de Botany y Fisiologia Vegetal*. Facultad de ciencias, Universidad de Madrid, 1970; 2: 29—38
- 3 潘家秀等.蛋白质化学研究技术.北京;科学出版社,1961; 28—31
- 4 Herbert D. *Methods in Enzymology*, New York and London; Academic press, 1955; 2:784—874
- 5 刘昌玲.军事医学科学院院刊,1983;1: 89
- 6 Jacob G S. *Biochemistry*, 1979; 18: 2967

[本文于1989年9月19日收到]