

邻苯二酚-1,2-双加氧酶的催化性质

李丽 李钦

(中国科学院微生物研究所,北京)

关键词 邻苯二酚-1,2-双加氧酶,邻苯二酚,假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)

邻苯二酚-1,2-双加氧酶能催化邻苯二酚的两个羟基之间裂解,生成顺,顺-己二烯二酸,加水很容易转化为尼龙-6,6的原料己二酸。此外,它有极易起化学反应的共轭双键和羧基,可成为新功能树脂的原料。1955年发现邻苯二酚-1,2-双加氧酶^[1],此后进行了大量研究工作,但是直到近几年由于合成顺,顺-己二烯二酸的需要,才引起人们的高度重视^[2-6]。我们对胞外酶产生菌的发酵条件及其所产的邻苯二酚-1,2-双加氧酶性质进行了研究,为工业规模的生产应用作了准备。

材料和方法

1. 材料 菌株和发酵条件见前报道^[6]。将所得发酵液离心,取其上清液作为酶样品,置于4℃冰箱中保存。

2. 方法 邻苯二酚-1,2-双加氧酶的活力测定方法根据 Ornston^[7]方法加以改进,记录在260nm UV-120-02型紫外分光光度计上的吸收值,以测定产物的生成。

3. 仪器及试剂 UV-120-02型紫外分光光度计是日本 Shimadzu 公司产品。邻苯二酚为北京化工厂产品。其它所用试剂均为分析纯。

结果与讨论

1. 酶的最适反应 pH

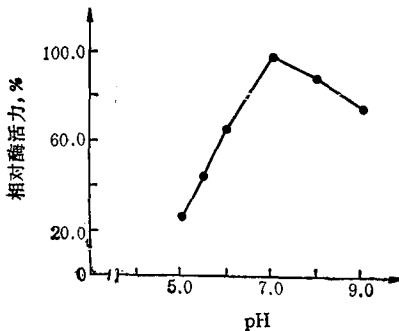


图1 酶的最适反应 pH 曲线

邻苯二酚为底物,30℃,在不同 pH 条件下测定酶的活力。pH 5.0—7.0 为磷酸氢二钠与磷酸二氢钾缓冲液;pH 8.0—9.0 为三羟甲基氨基甲烷(Tris)与盐酸缓冲液。酶的最适反应 pH 为 7.0(图 1)。

2. 酶的最适反应温度

以邻苯二酚为底物, pH 7, 在不同温度的条件下测定酶活力。酶的最适温度为 30℃(图 2)。

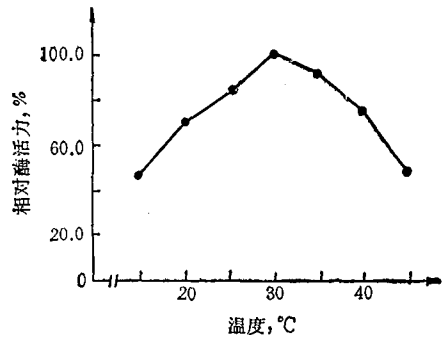


图2 酶的最适反应温度曲线

3. 酶的热稳定性

在不同温度下保温 4 小时,邻苯二酚为底物, pH 7, 测定温度 30℃, 测得剩余酶活力。在 4℃—30℃ 范围内,基本上能够保持原有酶活力(图 3)。

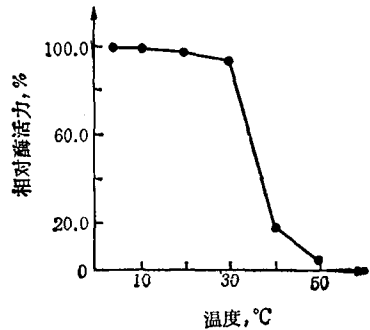


图3 酶的热稳定性曲线

4. pH 的稳定性

在不同 pH 缓冲液中,30℃ 温箱中存放 4 小时,每

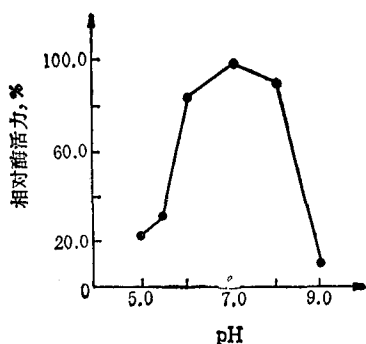


图4 pH稳定性曲线

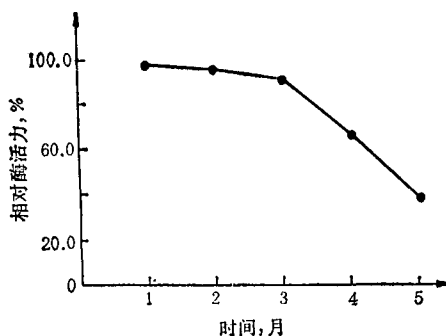


图5 酶液稳定性曲线

苯二酚为底物, 30°C, 测定酶的剩余活力。酶在 pH 6.0—8.0 范围内稳定(图4)。pH5.0—7.0 为磷酸氢二钠与磷酸二氢钾缓冲液; pH8.0—9.0 为三羟甲基氨基甲烷(Tris)与盐酸缓冲液。

5. 酶液的稳定性

酶液置于 4°C 冰箱中保藏, 存放三个月, 邻苯二酚为底物, pH7, 30°C, 进行活力测定, 酶活力可保存 90%(图5)。

6. 米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max}

在 30°C 下测定不同邻苯二酚初始浓度下的降解邻苯二酚的反应速度, 再根据双倒数作图法^[7]作图, 如图6。从图6计算出邻苯二酚-1,2-双加氧酶的 $K_m = 1.94 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $V_{max} = 2.44 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \cdot \text{h}$ 。

7. 酶的抑制剂

样品经透析, 在不同的金属离子、底物类似物、巯基剂存在下, 以邻苯二酚为底物, 测定酶活力。其中硝酸银和硫酸铜对酶反应有明显的抑制作用(表1)。

8. 金属离子对酶反应的影响

样品经透析, 在不同金属离子存在下, 邻苯二酚为底物, 测定酶活力。氯化物浓度均为 1mmol/L。其中二价钡离子对该酶有明显激活作用(表2)。

本文所报道的实验结果基本上与国外文献^[2]一致, 仅是酶的作用最适温度稍有偏差, 可能是由于所用菌种不同。文献上所用的是 *Acinetobacter calcoaceti-*

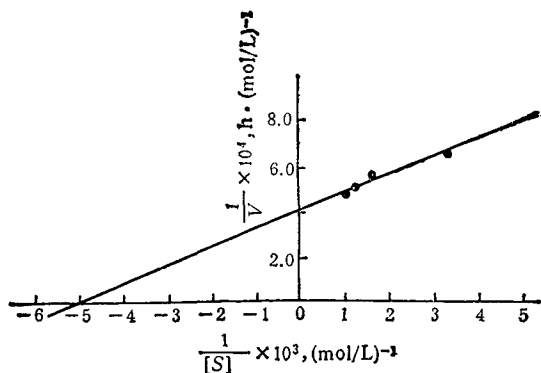


图6 邻苯二酚-1,2-双加氧酶反应速度的倒数与初始浓度的倒数关系图

表1 抑制剂的研究

抑制剂	浓度 (mmol/L)	存活率(%)
苯甲酸钠	1.0	100
硝酸银	0.1	0
硫酸铜	0.1	33
硫酸亚铁	0.1	100
碘乙酰胺	0.1	74
DTT	0.1	98
巯基乙醇	0.1	73
EDTA	1.0	98

表2 金属离子对酶活的影响

金属离子	相对酶活力(%)
无	100.00
Ca ²⁺	111.89
Mg ²⁺	124.34
Fe ³⁺	95.93
Ba ²⁺	161.98
K ⁺	41.50
Na ⁺	104.54
NH ₄ ⁺	57.19

cus 菌株, 并且酶样品是经过提纯的胞内酶, 本文所用的产胞外酶的 *Pseudomonas sp.* 84037 菌株, 直接用发酵液做酶性质的研究。我们得到的邻苯二酚-1,2-双加氧酶在常温下催化效果最佳, 稳定性好, 并且是胞外酶, 这样为实际应用及工业化大生产提供了很大便利, 有关该酶的进一步提纯及性质的研究正在进行中。

(下转第160页)

常规法提取 DNA 损失多,且由于染色体 DNA 粘稠,操作较困难。此外,需用大量 TE 透析,除去 DNA 中影响酶切的有机溶剂,所以耗时较长。微量法克服上述缺点,使提取过程简单快速(表 1)。

表 1 两种制备真核细胞 DNA 方法的比较

	细胞数	DNA 回收率 (%)	需时 (天)	操作
常规法	$5 \times 10^6 - 5 \times 10^8$	57.87 ± 16.9 ($n=14$)	3-7	复杂
微量法	$5 \times 10^4 - 5 \times 10^6$	88.46 ± 14.2 ($n=9$)	1-2	简单

3. 微量法制备的 DNA 用于 T β 基因构型检测的效果观察

T β 基因是编码 T 细胞抗原受体 β 链的单拷贝基因,在 T 细胞分化过程中,可由胚系构型转变为重排构型。在非 T 细胞中,该基因通常为胚系构型。本研究检测了 B 细胞株 Bri-8 细胞中的 T β 基因构型,结果显示在 BamHI、EcoRI、Hind III 消化时出现的杂交

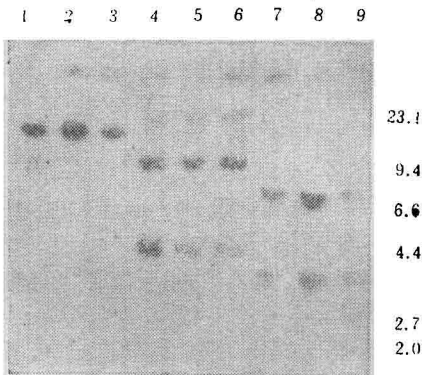


图 1 三种酶切条件下 Bri-8 细胞 DNA 与 T β 探针的杂交图

1-3 为 Bam HI 消化,4-6 为 EcoRI 消化,7-9 为 Hind III 消化,最右栏为 λ -Hind III,单位 kb。

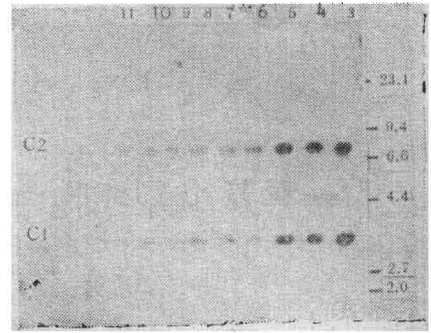


图 2 不同 Bri-8 细胞数提取的 DNA 在 Hind III 消化时与 T β 探针的杂交图

3-5 为 5×10^6 细胞,6-8 为 1×10^6 细胞,9-11 为 5×10^4 细胞,最右栏为 λ -Hind III,单位 kb。

片段大小与 Furly 等人报告的胚系基因大小相似^[1],图 1 表明 Bri-8 细胞的 T β 基因为胚型。本实验检测该基因的最少细胞数为 5×10^4 (图 2)。

本方法的主要特点是(1)用蛋白酶 K 消化细胞蛋白。(2)利用低熔点琼脂糖胶固着细胞 DNA,使去污剂等小分子物质扩散到 TE 中而被除去。(3)低熔点琼脂糖不影响限制性内切酶的作用,故本方法制备的 DNA 可用于 Southern 杂交中。鉴于本方法简单易行,DNA 回收率高,因此不仅对临床应用,而且对实验室检测少量细胞中的基因也有实用价值。

参 考 文 献

- 1 Wadlmann T A *et al. Gene*, 1987; 53: 121
- 2 James M *et al. Blood*, 1987; 69: 356
- 3 Ford A M *et al. EMBO J*, 1983; 2: 997
- 4 Feinberg A P *et al. Anal Biochem*, 1983; 132: 6
- 5 Furley A J *et al. Cell*, 1986; 46: 75

[本文于 1989 年 1 月 19 日收到]

(上接第 158 页)

参 考 文 献

- 1 Hayaishi O *et al. J Am Chem Soc*, 1955; 77: 5450
- 2 Ramesh N *et al. Journal of Bacteriology*, 1976; 127 (1): 536
- 3 孟广震. 生物工程学报, 1985; 1(2): 1
- 4 李钦. 生物工程进展, 1986; 2: 30

- 5 李钦等. 生物化学与生物物理进展; 1987;(5): 44
- 6 李钦等. 微生物学报, 1989; 1: 39
- 7 Ornston L N, Stanier R Y. *J Biochem*, 1966; 241: 3776
- 8 沈同等. 生物化学. 上海: 高等教育出版社, 1986: 232-238

[本文于 1989 年 1 月 20 日收到]