

相关变化, 在重组脂为每毫克蛋白含 0.3~0.6 mg 磷脂时, 细胞色素迅速还原, 此重组浓度正是活力恢复最大的浓度. 当浓度达每毫克蛋白含 0.8 mg 磷脂时细胞色素的氧化不再增加, 重组活力也达到最大. 浓度继续增加活力反而下降. 从图 4 看出每毫克蛋白中所含磷脂量高于 0.8 mg 时, 仍有 6.5% 的细胞色素  $c_1$  和 33.7% 的细胞色素 b 未恢复到氧化态, 这些不可逆恢复的部分有可能是蛋白变性的表现.

结果表明, 磷脂在维持泛醌细胞色素 c 还原酶活力和构象方面有着重要作用. 虽然经亲和层析法制备的酶丢失了大部分脂和醌, 失去了酶活力, 但是这些失去的酶活力可以通过脂和醌的重组得到恢复. 虽然脂的丢失使蛋白构象发生改变, 但是大部分构象可通过脂重组得到恢复.

### 参 考 文 献

- 1 Hatefi Y. *Ann Rev Biochem*, 1985; **54**: 1015
- 2 Mitchell P. *J Theor Biol*, 1976; **62**: 327
- 3 Gu L Q, Liu C H, Xu J X *et al.* *Tetrahedron*, 1990; **46** (9): 3199
- 4 King T E. In: Trumpower B L ed. *Function of quinone in energy conserving system*. New York: Academic Press, 1982: 3
- 5 Yu C A, Yu L. *J Bioener and Biomem*, 1993; **23** (3): 259
- 6 Kevin L, Paul W, Hans W *et al.* *J Mil Biol*, 1981; **149**: 259
- 7 Yue W H, Zou Y P, Yu C A. *Biochemistry*, 1991; **30**:

- 2303
- 8 Yu C A, Yu L. *J Biol Chem*, 1982; **257**: 2016
- 9 King T E. *J Biol Chem*, 1961; **236**: 2342
- 10 李 路, 郑连兴, 徐建兴等. *生物化学杂志*, 1992; **8** (2): 207
- 11 Yu C A, Yu L, Tsou E K. *J Biol Chem*, 1974; **249**: 4905
- 12 程昆蓉, 程伯基, 林克椿. *科学通报*, 1992; **37** (3): 263
- 13 程昆蓉, 程伯基, 林克椿. *生物化学杂志*, 1992; **8** (3): 307

**Effect of Lipid on the Property of QH<sub>2</sub>-Cytochrome c Reductase.** Zhang Yixin, Shang Heyong, Xu Jianxing (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

**Abstract** A lipid-depleted QH<sub>2</sub>-cytochrome c reductase has been prepared by a column of calcium phosphate. The activity of this enzyme is lower and the cytochromes contained in this enzyme is partially (about 53% of cytochrome b and 83% of cytochrome  $c_1$ ) reduced. The reconstitution of the lipid-depleted QH<sub>2</sub>-cytochrome c reductase with lipids can not only recover the activity but also induce the reduced cytochromes retain to its oxidized state. This result indicates that a special interaction between the lipid and protein is important for keeping the enzyme in its native conformation.

**Key words** QH<sub>2</sub>-cytochrome c reductase, lipid reconstitution, protein conformation

## 间羟苯甲酸 4-羟化酶纯化及部分性质研究

陈 瑞

(首都医科大学生物化学教研室, 北京 100054)

細川桂一

(日本川崎医科大学生物化学教研室, 仓敷市 701-01)

**摘要** 经超声破碎、硫酸铵分级沉淀、凝胶过滤、磷酸钙胶层析和离子交换层析等步骤, 从 *Comamonas testosteroni* 菌株中获得了 SDS-PAGE 单一条带, 相对分子质量为  $62 \times 10^3$  的间羟苯甲酸 4-

羟化酶. 比活提高 21 倍, 产率为 30%. 此酶为 FAD 加单氧酶, 催化间羟苯甲酸转变为 3, 4-二羟苯甲酸.

**关键词** 间羟苯甲酸 4-羟化酶, 纯化, 性质, 丛毛单孢菌

假单孢菌 (*Pseudomonas*, *Ps.*) 和丛毛单孢菌 (*Comamonas*, *Co.*) 是土壤和水中发现的最常见的两类需氧菌属. 细菌体内含有芳香族黄素蛋白羟化酶类. 它们能催化各种苯甲酸衍生物分解成微生物能利用的物质, 从而去除苯甲酸衍生物引起的环境污染<sup>[1]</sup>. 苯甲酸等芳香族化合物在进入共同的代谢途径之前, 它们各自的代谢途径是特异和复杂的. 催化这些特异反应的酶常可用各自的芳香族底物来诱导合成<sup>[2]</sup>. 比较研究各种对羟苯甲酸羟化酶的结构与功能, 能揭开这两类需氧菌属体内催化特异反应酶的起源与进化的奥秘, 并为更好地利用它们清除石油、化工等领域引起的环境污染, 提供理论依据. 国外文献报道, 从 *Ps. putida*<sup>[3]</sup> 或 *Ps. cepacia*<sup>[2]</sup> 或微球菌病 (*Micrococcus*)<sup>[4]</sup> 中均可提取出间羟苯甲酸 6-羟化酶 (MOB6-HOase). 从 *Aspergillus niger*<sup>[5]</sup> 中可提取出间羟苯甲酸 4-羟化酶 (MOB4-HOase). 我们从 *Co. testosteroni* 菌株 KH122-3S 中提取、纯化了 MOB4-HOase, 并对其性质作了初步研究.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

*Comamonas testosteroni* 菌株 KH122-3S 大量培养的菌糊是由日本林原生物化学研究所提供的. DNase I、 $\beta$ -NADPH、NADH、FAD、FMN、核黄素、DL-DTT、EDTA 二钠盐、牛血清白蛋白、甲叉丙烯酰胺、丙烯酰胺、过硫酸铵和 TEMED 均购自 Sigma 公司, 试剂均为分析纯. SDS-PAGE 低相对分子质量 (14 400~97 400) 标准购自 Bio-RAD. 间羟苯甲酸 (MOB) 和磷酸钙胶由细川桂一教授提供. Sephadex G200 (Pharmacia 公司)、DEAE-Cellulose (DE<sub>52</sub>) (Whatman 公司). 除 2L 与 4L 容积的层析柱为自制的以外, 其他各

种尺寸的层析柱均购自 LKB 或 Bio-RAD. 蠕动泵为 LKB2132, 超声波粉碎机为 Branson sonifier 250, 分光光度计为 Beckman DU-600 和岛津紫外可见分光光度计 UV-160A, Beckman 高速冷冻离心机, Pharmacia Multiphor II 多用电泳系统.

### 1.2 方 法

**1.2.1 酶活性测定:** 参照 Hosokawa 等<sup>[6]</sup> 的方法, 在 23℃ 用岛津紫外可见分光光度计 UV-160A 测定 340 nm 处光吸收值的变化, 来测定 MOB4-HOase 的活性. 一个单位的酶量定义为: 在 23℃ 每分钟氧化 1  $\mu$ mol NADPH.

**1.2.2 蛋白质浓度的测定:** 用 Folin-Ciocalteu 法<sup>[6]</sup>, 以牛血清白蛋白为标准.

**1.2.3 从所培养细菌中提取和纯化 MOB4-HOase:** 酶提取、纯化所有过程均在 (4 $\pm$ 2)℃ 进行. 12 000  $\times$  g、(4 $\pm$ 1)℃ 离心 30 min. 缓冲液 A 为 pH 7.5, 0.03 mol/L 磷酸钾缓冲液 (KPi), 内含 1 mmol/L MOB、0.1 mmol/L EDTA 和 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT). 缓冲液 B 为 pH 7.5, 0.02 mol/L KPi, 内含 1 mmol/L MOB、0.1 mmol/L EDTA 和 0.5 mmol/L DTT.

a. 细胞溶解: 360 g 湿的菌糊悬浮在 720 ml 缓冲液 A 中, 使其终浓度为 0.02 mol/L. 用超声波粉碎机 Branson sonifier 250 超声处理悬浮液. 将超声波处理过的悬浮液离心, 上清液收集使用. 沉淀再重复提取一次, 此为粗酶提取液, 测其 pH 为 7.1. 将醋酸镁加到粗酶提取液中, 使其终浓度为 0.02 mol/L. 再加入 DNase I, 使其终浓度为 5 mg/L. 4℃ 温和搅拌作用 30 min, 测其 pH 为 6.88, 离心后取上清液. 测定蛋白质浓度后, 用缓冲液 B 稀释上清液, 使其蛋白质终浓度约为 15 g/L. 取出 2 ml 测酶活性和蛋白质浓度, 其余 -80℃ 冰箱保存待用.

b. 硫酸铵分级沉淀: 将固体硫酸铵加入保存待用的粗酶提取液中, 至 30% 饱和度. 加硫酸铵过程中要边温和搅拌边监测 pH, 用 10% 氨水调节 pH 在 6.5~7.5 范围内. 30 min 后离心, 0%~30% 饱和度硫酸铵沉淀溶解在少量缓冲液 B 中, 用同样的缓冲液透析过夜, 换液 3 次. 上清液测量体积后加固体硫酸铵至 50% 饱和度. 同样边搅拌, 边调节 pH. 30 min 后离心, 30%~50% 饱和度硫酸铵的沉淀处理同上. 上清液继续加固体硫酸铵至 70% 饱和度. 50%~70% 饱和度硫酸铵的沉淀处理同上. 透析结束后, 分别离心去除不溶性的物质, 再各取出 2 ml 测定酶活性和蛋白质浓度, 其余 -80℃ 冰箱保存待用.

c. 分子筛层析: 30%~50% 饱和度硫酸铵的样品上到 Sephadex G200 柱 (7 cm × 103 cm) 上. 柱预先用缓冲液 B 平衡, 用同样的缓冲液洗脱, 流速为 32 ml/h, 活性高与低两部分, 分别收集合并, 用 30%~70% 饱和度硫酸铵浓缩, 沉淀用缓冲液 B 溶解、透析后保存. 取出 2 ml 测其酶活性、蛋白质浓度和  $A_{450}$ . FAD 在 450 nm 处有吸收高峰.

d. 磷酸钙胶层析: Sephadex G200 酶活性峰样品在缓冲液 C (含有 0.1 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L MOB、0.5 mmol/L DTT 的 pH 6.8, 1 mmol/L KPi) 中透析, 换液一次, 然后将样品上到磷酸钙胶柱 (3.5 cm × 61 cm) 上. 柱预先用缓冲液 C 平衡. 磷酸钙胶柱是由 Whatman chromedia CF11 纤维素粉与磷酸钙胶以 30:1 的重量比混合装填而成的. 用缓冲液 C 洗脱, 流速为 33 ml/h, 收集, 浓缩、透析、保存. 取出 2 ml 测其酶活性, 蛋白质浓度和  $A_{450}$ .

e. DEAE 纤维素 (DE<sub>52</sub>) 层析, 上一步的活性部分上 DE<sub>52</sub> 层析柱 (1.4 cm × 18 cm) 上. 柱预先用缓冲液 A 平衡, 用相同的缓冲液 250 ml 冲洗掉杂蛋白, 流速 30 ml/h, 然后用缓冲液 A, 加 0~0.15 mol/L 的 NaCl 进行线性梯度洗脱, 酶的活性部分在约 0.048 mol/L NaCl 时以单一峰被洗脱出来. 硫酸铵浓缩,

用缓冲液 B 溶解沉淀, 透析后保存. 取出 2 ml 测酶活性、蛋白质浓度和  $A_{450}$ .

1.2.4 测定  $A_{450}$ : 参照 Hosokawa 等<sup>[6]</sup>的方法, 以确定 FAD 的相对含量.

1.2.5 亚基分子质量的测定: 参照 Laemmli 等<sup>[7]</sup>的方法, 稍加修改. 分离胶 (12.5%), 浓缩胶 (5%) 制胶后, 每孔上样 15  $\mu$ l (含酶蛋白 3  $\mu$ g), 以 Bio-RAD 低相对分子质量标准 (14 400~97 400) 为标准.

1.2.6 酶蛋白恢复活性需要 FAD: 参照 Hesp 等<sup>[8]</sup>的方法, 稍加改进. 用 pH 3.0 25% 饱和度的酸性硫酸铵处理黄色的酶 30 min, 然后加 pH 3.0, 100% 饱和度的硫酸铵至终浓度为 70% 饱和度. 离心后的无色沉淀溶解在小量 pH 7.5 含  $10^{-4}$  mol/L EDTA、 $10^{-3}$  mol/L DTT、 $10^{-3}$  mol/L MOB 的 0.05 mol/L KPi 中, 用 pH 7.8, 1 mol Tris-HCl 缓冲液调节 pH 至 7.2. 将其分为 4 份. 1 为酶蛋白, 不加任何试剂; 2、3 和 4 分别加 FAD, FMN 和核黄素, 使其终浓度均为  $5 \times 10^{-4}$  mol/L. 4 份分别在缓冲液 B 中透析过夜, 换液 3 次. 离心去除任何不溶性物质. 然后分加与不加外源性 FAD、FMN 和核黄素至  $3.3 \times 10^{-6}$  mol/L 等 10 种情况, 分别测定它们的活性.

## 2 结 果

### 2.1 MOB4-HOase 的纯化

硫酸铵分级沉淀 30%~50% 饱和度的酶活性部分上 Sephadex G200 柱. 层析洗脱曲线

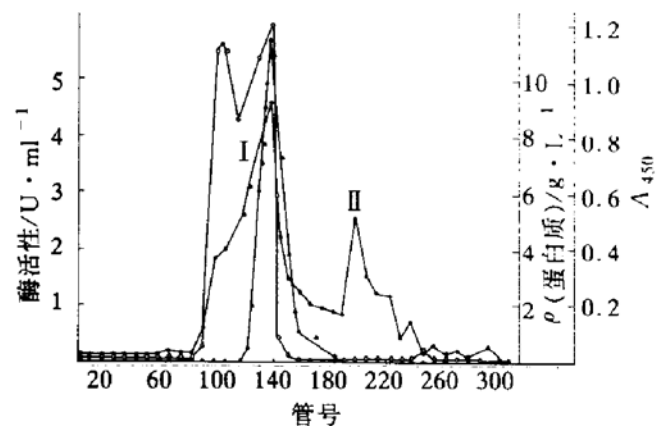


图 1 用葡聚糖凝胶柱层析纯化间羟苯甲酸 4-羟化酶

●—●:  $\rho$ (蛋白质); ▲—▲: 酶活性; ○—○:  $A_{450}$ .

(图 1) 中的峰 I 为酶活性峰.

合并活性管, 用 30% ~ 70% 饱和度硫酸铵浓缩的酶液经透析后上磷酸钙柱. 在层析的洗脱曲线 (图 2) 中, 酶活性峰、蛋白质峰与  $A_{450}$  峰重合.

合并活性管, 用 30% ~ 70% 饱和度硫酸铵浓缩的酶液透析后上  $DE_{52}$  柱. 层析的洗脱曲线 (图 3) 中的峰 III 为酶活性峰. 梯度洗脱时, 在约 0.048 mol/L NaCl 时, 它被洗脱出来. 酶活性峰、蛋白质峰与  $A_{450}$  峰重合.

通过上述纯化过程, MOB4-HOase 比活最高达 15.7 U/mg, 纯化 20.7 倍, 产率为 30%, 结果总结于表 1.

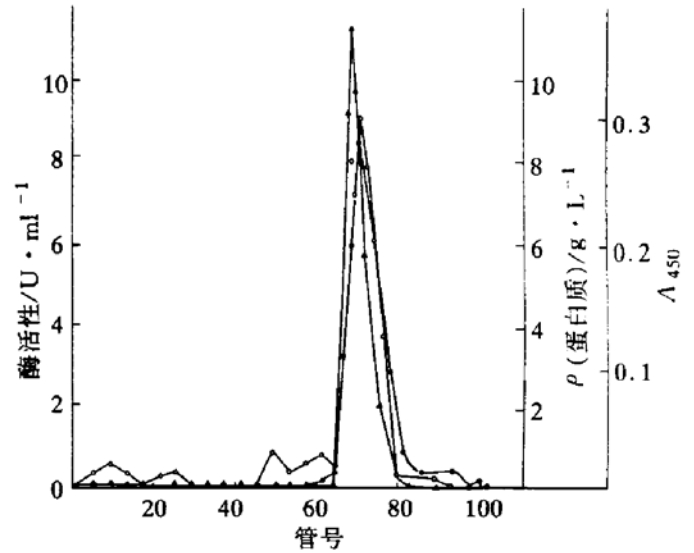


图 2 用磷酸钙柱层析纯化间羟苯甲酸 4-羟化酶  
●—●:  $\rho$ (蛋白质); ▲—▲: 酶活性; ○—○:  $A_{450}$ .

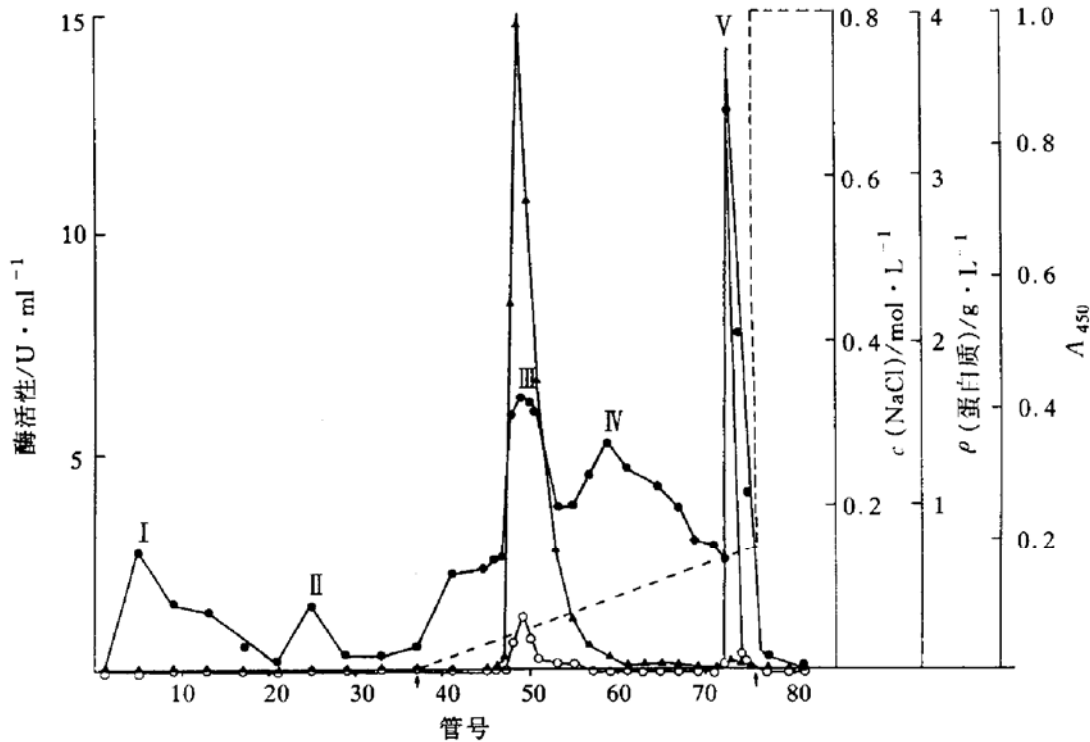


图 3 用  $DE_{52}$  柱层析纯化间羟苯甲酸 4-羟化酶

●—●:  $\rho$ (蛋白质); ▲—▲: 酶活性; ○—○:  $A_{450}$ .

表 1 间羟苯甲酸 4-羟化酶的纯化

纯化步骤	总体积 /ml	总蛋白质 /mg	总活性 /U <sup>1)</sup>	比活/U · mg <sup>-1</sup>	纯化倍数	产率 /%
超声提取	1892	27869	5492.5	0.197	1.00	100.0
硫酸铵						
组分 I, 0~0.3 饱和度	226	5465	623.3	0.114		
组分 II, 0.3~0.5 饱和度	224	7737	4812.4	0.622	3.2	87.6
组分 III, 0.5~0.7 饱和度	217	6241	107.0	0.017		
葡聚糖 G-200	197.3	3479	3766.8	1.08	5.5	68.6
磷酸钙凝胶柱层析	56.6	1279.8	2341.7	1.83 (0.7~2.89)	9.3	42.6
$DE_{52}$ 柱层析	42.4	408.1	1666.1	4.08 (1.69~15.7)	20.7	30.3

<sup>1)</sup>酶的活性单位定义为每分钟氧化 1  $\mu$ mol NADPH 为一个酶活性单位.

## 2.2 酶纯化各步骤样品的 SDS-PAGE

从图 4 我们可以看出, 经多步纯化, 酶纯度逐渐变高, 条带逐渐减少, 最后得到一均一的条带. SDS-PAGE 测定 MOB4-HOase 的相对分子质量为  $62 \times 10^3$ .

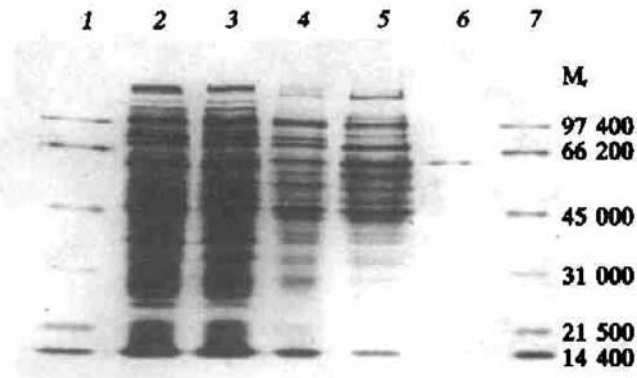


图 4 酶纯化各步骤样品的 SDS-PAGE

1 和 7: 相对分子质量标准; 2: 超声波提取液; 3: 30%—50% 饱和度硫酸铵组分; 4: 葡聚糖柱层析组分; 5: 磷酸钙柱层析组分; 6: DEAE-纤维素柱层析 (DE<sub>52</sub>) 组分; M<sub>r</sub>: 磷酸化酶 b 97 400、牛血清白蛋白 66 200、卵清蛋白 45 000、碳酸酐酶 31 000、大豆胰蛋白酶抑制剂 21 500 和溶菌酶 14 400.

## 2.3 酶蛋白恢复酶活性需要 FAD

从表 2 我们看出, 当酶蛋白单独存在时, 无酶的活性, 只有当酶蛋白与 FAD 结合成全

酶时, 才能恢复酶的活性, 而 FMN、核黄素均不能使酶蛋白恢复活性, 说明 MOB4-HOase 是 FAD 酶. 这与文献 [2~4] 报道的 MOB6-HOase 为 FAD 酶极为相似.

表 2 酶蛋白恢复酶活性需要 FAD

	被加入的黄素衍生物		比活性 U·mg <sup>-1</sup>
	透析前	在酶测定中	
1	—	—	0.0
2	—	FAD	5.2
3	—	FMN	0.0
4	—	核黄素	0.0
5	FAD	—	3.6
6	FAD	FAD	4.0
7	FMN	—	0.0
8	FMN	FMN	0.0
9	核黄素	—	0.0
10	核黄素	核黄素	0.0

## 3 讨 论

根据文献 [1, 5] 报道, MOB4-HOase 为 FAD 加单氧酶, 催化间羟苯甲酸转变为 3, 4-二羟苯甲酸. 反应式如下:



我们用所纯化的 MOB4-HOase 做了此酶催化 MOB 转变成 PC 的反应化学定量和反应进行时 MOB 转变成 PC 的动态变化的可见吸收光谱实验, 证明我们所纯化的酶能催化上述反应. 并证明从 *Co. testosteroni* 株 KH122-3S 提取的酶只能专一地利用 NADPH, 而不是

NADH. 有关这些及其他一些动力学实验结果, 我们将另文报道.

根据文献 [1] 报道, 从 *Co. 菌属* 提取的 MOB4-HOase 的产物 PC, 将在一系列酶催化下, 继续降解为丙酮酸. 今后应探讨大量培养能生成此酶的 *Co. testosteroni* 菌株用于石油化

工业芳香族化合物环保的可能性. 进一步做此酶的氨基酸序列分析, 对分别来自 *Co.* 与 *Ps.* 两菌属的 MOB4-HOase 与 MOB6-HOase 组成、结构、性质做比较, 这对揭示 *Co.* 和 *Ps.* 菌株的起源、进化的奥秘有重要的意义.

**致谢** 对日本林原生物化学研究所为我们大量培养细菌表示感谢. 我们的课题得到日本川崎医科大学资助和两备圣园纪念财团助成金, 在此一并感谢.

### 参 考 文 献

- 1 Hosokawa K, Sato K, Nigo Y *et al.* Protein structure and genetic engineering, Proceeding 23rd seminar on science and technology. Tokyo: Tokyo press, 1994: 69~90
- 2 Wang L-H, Hamzah R Y, Yu Y *et al.* Biochemistry, 1987; **26**: 1099
- 3 Oishi N, Hosokawa K. Seikagaku, 1988; **60**: 655
- 4 Rajasekharan S, Rajasekharan R, Vaidyanathan C S. Arch Biochem Biophys, 1990; **278**: 21
- 5 Premkumar R, Subba Rao P V, Sreeleela N S *et al.* Can J Biochem, 1969; **47**: 825
- 6 Hosokawa K, Stanier R Y, J Biol Chem, 1966; **241**: 2453
- 7 Laemmli U K. Nature (London), 1970; **227**: 680
- 8 Hesp B, Calvin M, Hosokawa K. J Biol Chem, 1969; **244**:

5644

**Purification and Partial Characterization of meta-Hydroxybenzoate Hydroxylase.** Chen Rui (Department of Biochemistry, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China); Keiichi Hosokawa (Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School, Kurashiki 701-01, Japan).

**Abstract** The m-hydroxybenzoate hydroxylase (MOB4-HOase) with 62 000 relative molecular mass from *Comamonas testosteroni* was purified to homogeneity upon SDS-PAGE by using sonic crushing, ammonium sulfate fractionation, molecular sieve chromatography, calcium phosphate gel chromatography and ion exchange chromatography. MOB4-HOase has been purified about 21 fold in specific activity with about 30% yield. This enzyme is a FAD-monoxygenase to catalyze m-hydroxybenzoate to protocatechuic acid.

**Key words** meta-hydroxybenzoate4-hydroxylase, purification, characterization, *Comamonas testosteroni*

## 67 ku 胃蛋白酶原的分离纯化及性质研究\*

肖志坚 杨希震 蒋孟军 黄旭荃

(江苏省原子医学研究所, 核医学国家重点实验室, 无锡 214063)

**摘要** 用 DEAE-52 阴离子交换层析, 高压液相凝胶过滤层析两步法, 从人胃粘膜中分离纯化到分子质量为 67 ku 的胃蛋白酶原. 此蛋白具有较强的抗碱性, 水解活性在 pH 10.8 处理后仍无明显变化, 其水解活性的最适 pH 为 1.8, 比活性为 5.96 U/mg.

**关键词** 胃蛋白酶原, DEAE-52 层析, 高压液相层析

国外许多研究表明, 人胃粘膜能分泌多种胃蛋白酶原 (pepsinogens)<sup>[1,2]</sup>. Samloff<sup>[1]</sup> 根据它们不同的电泳迁移率分别命名为 Pg1~Pg7, 其中 Pg2~Pg5 定为 PG I, Pg6~Pg7 定为

PG II, 两者分子质量接近, 均为 40 ku 左右<sup>[3]</sup>. 而分子质量较大的 Pg1 由于在粘膜中

\*江苏省科委基础研究课题资助.

收稿日期: 1995-09-27, 修回日期: 1995-12-14