

一种新的有机磷降解酶的分离纯化及酶学性质研究

伍宁丰^① 邓敏捷^① 史秀云^② 梁果义^① 姚斌^{①*} 范云六^①

(中国农业科学院^①生物技术研究所; ^②饲料研究所, 北京 100081. *联系人, E-mail: yaobin@mail.caas.net.cn)

摘要 从农药厂被污染的土壤中分离到一株降解有机磷农药的高效菌株 C2-1, 经鉴定表明为假产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*). 对其产生的有机磷降解酶 OPHC2 进行了分离和纯化, 并对其酶学性质进行了研究. 其降解甲基对硫磷的最适温度为 65℃, 最适 pH 为 9, 并且此酶具有很好的热稳定性和 pH 稳定性, 对大多数金属离子和化学试剂不敏感. OPHC2 氨基酸序列及其编码基因的核苷酸序列分析表明, OPHC2 与目前发表的有机磷降解酶没有同源性.

关键词 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 有机磷 有机磷降解酶 纯化 酶学性质

有机磷农药是农药中的主要类别, 占世界农药总量的 80%, 是农业生产必不可少的. 但有机磷农药具有抑制人体乙酰胆碱酯酶的功能, 对人存在着程度不同的毒性. 随着人们生活质量的提高和环保意识的加强, 有机磷农药的残留毒性问题越来越受到人们的关注.

有机磷通常含有 3 个磷酸酯键, 所以常被称为磷酸三酯. 一般有机磷被分为 2 种类型, 一是磷通过双键与氧结合(P = O), 如甲胺磷、氧化乐果、敌敌畏等; 另一种是磷通过双键与硫结合(P = S), 如对硫磷、甲基对硫磷、辛硫磷、水胺硫磷和毒死蜱(乐斯本)等^[1]. 一般来说, 如果有机磷中的一个磷酸酯键被水解将大大降低其毒性, 如对硫磷将使其毒性降低 100 倍^[2,3]. 因此, 破坏有机磷的磷酸酯键是降低有机磷农药毒性行之有效的方法.

有机磷降解酶(organophosphorus hydrolase, EC 3.1.8.1)可降解有机磷农药分子, 破坏有机磷的磷酸酯键而使其脱毒. 由于各种有机磷农药都有类似的结构, 只是取代基不同, 所以一种有机磷降解酶往往可降解多种有机磷农药. 有机磷降解酶目前已被公认为是消除农药残留的最有潜力的新方法^[4].

微生物是有机磷降解酶的重要来源. 自 1973 年 Sethunathan 和 Yoshida^[5]从接触过有机磷农药的土壤中分离出第 1 株有二嗪农和对硫磷降解活性的黄杆菌以来, 人们不断发现一些土壤微生物(细菌、真菌)能够降解有机磷农药, 这主要是由于它能够产生有机磷降解酶, 同时降解后的产物可作为微生物生长的碳、氮、磷源, 为其生长提供营养^[6~8].

近年来, 对有机磷降解酶的分子生物学研究也

不断深入, 几种来源于不同微生物的有机磷降解酶被分离纯化, 并且对它们的酶学性质进行了研究. 人们还将有机磷降解酶基因克隆到大肠杆菌中, 并使其高效表达^[9,10]. 同时, 人们还对基因进行分子改造, 使其改变底物特异性, 从而能对多种有机磷农药具有高效的降解效率^[11,12].

本文旨在分离降解有机磷农药的高效菌株, 并对其产生的有机磷降解酶进行纯化和酶学性质研究.

1 材料与方法

(i) 培养基. Burk 无机盐培养基^[13]含 0.2 g/L K_2HPO_4 , 0.8 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g/L $CaSO_4 \cdot H_2O$, 0.003 g/L $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.005 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 和 0.5 g/L 酵母粉, pH 7.2. 121℃灭菌 20 min, 固体培养基加入 1.5% 琼脂. LB 完全培养基含 10 g/L NaCl, 10 g/L 蛋白胨和 5 g/L 酵母粉.

(ii) 菌株的分离和筛选. 取自农药厂的农药长期污染的土壤土样 0.5 g 于 100 mL 液体 Burk 培养基中 32℃振荡培养过夜. 菌液用无菌水梯度稀释后分别涂布于加有 0.2 mg/mL 敌敌畏和 0.2mg/mL 甲基对硫磷的 Burk 无机盐培养基上, 置于 32℃培养箱中培养, 挑取单菌落, 经平板划线纯化. 将分离到的每个单菌落菌株接种于分别含有有机磷农药甲基对硫磷(0.05%)、对硫磷(0.05%)、甲胺磷(0.05%)、氧化乐果(0.05%)、辛硫磷(0.05%)的 Burk 5 种无机盐平板上, 32℃温箱培养, 进行消解试验, 培养两天后观察是否有消解圈以及消解圈的大小.

(iii) 有机磷降解酶(OPHC2)粗酶液的提取. 用 1 L LB 完全培养基大量培养菌体细胞, 8000 × g 离心

10 min, 弃上清, 并将菌体重悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 含有 0.1 mmol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF)中, 用超声波破碎仪(Branson 公司, 美国)破碎细胞(10 s/次, 间隔 15 s, 共破碎 10 次), 15000 × g 离心 30 min, 留上清, 用饱和度为 20%~90%的硫酸铵沉淀蛋白, 将沉淀重新悬浮于 20 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中, 并在 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中透析过夜, 得到 OPHC2 粗酶液。

(iv) OPHC2 的分离和纯化. 通过聚丙烯酰胺(PAGE)非变性胶电泳将粗酶液中的蛋白各组分分离开, 取边上的一条电泳道的胶染色, 以此作为对照切下对应的未染色蛋白带, 在电洗脱仪(Phamasia 公司)上将各蛋白分别洗脱下来, 经酶活性测定确定目的蛋白。

(v) 酶的活性测定方法. 参照文献[14], 并进行了改进. 取 100 μ L 酶液加入含有 5 μ L 10 mg/mL 甲基对硫磷和 900 μ L 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)的体系中, 37℃保温 10 min, 加入 1 mL 10%三氯乙酸终止反应, 再加入 1 mL 10% Na_2CO_3 溶液显色, 410 nm 测定光吸收值, 计算水解产物对硝基酚的含量和酶的活性. 一个酶的活性单位(U)定义为: 在 37℃, 每分钟释放出 1 μ mol 对硝基酚所需酶量为 1 个酶活性单位。

(vi) 酶学性质的测定. 以纯化的有机磷降解酶 OPHC2 为材料, 在不同温度和不同的 pH 下进行酶促反应, 测定了其最适温度和最适 pH; 在 60℃和 70℃下分别处理酶液, 测酶活性, 以确定其热稳定性; 将酶液在不同 pH 的缓冲液中于 37℃保温 30 min 后, 测酶活性以确定其 pH 稳定性; 在酶促反应体系中分别加入不同金属离子及化学试剂, 各种化合物的终浓度为 1 mmol/L, 测酶活性, 以研究不同金属离子及化学试剂对酶反应的影响。

(vii) 降解甲基对硫磷的动力学分析. 用不同浓度的甲基对硫磷为底物, 在 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)的体系中 37℃下测酶反应速度, 按双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)求取 K_m 和 V_m 。

(viii) OPHC2 氨基酸测序. 将纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 通过电转仪(Phamasia 公司)将胶上的蛋白转至 PVDF 膜(Millipore 公司)上, 委托北京奥科生物技术公司对 OPHC2 进行蛋白 N 端测序. 同时, 将含有纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳胶交给军事医学科学院国家生物医学分析中心进行酶解后的内肽测序。

2 结果

2.1 有机磷降解菌的筛选

从农药厂的 4 个不同地方采集被农药污染的土样, 利用富集培养的方法, 从 4 个土样中筛选出了 63 株具有有机磷农药降解活性的菌株, 除 5 株是真菌外, 其余 58 株是细菌。

从 58 株细菌中选出 1 株性质优良的有广谱有机磷农药降解活性的细菌, 命名为 C2-1. 其在 5 种农药无机盐平板上培养 48 h 后均有明显的消解圈, 并能看出菌有所生长(图 1)。

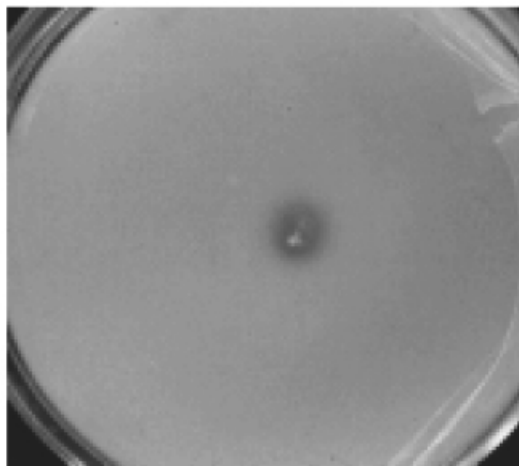


图 1 C2-1 菌在含有 0.05%(V/V)甲基对硫磷的 Burk 无机盐平板上形成的消解圈

2.2 菌种的鉴定及其生理生化特性

该菌株是革兰氏阴性菌, 菌体呈短杆状, 大小为 0.8 μm × 1.5~3.0 μm , 一般有 1~3 根极生鞭毛, 无芽孢, 氧化酶试验为阳性, 严格好氧. 此菌能够在加有有机磷农药的无机盐培养基上生长, 消解农药为其生长提供碳源. 经中国科学院微生物研究所国家菌种保藏检测中心鉴定, C2-1 菌为假产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)。

2.3 有机磷降解酶 OPHC2 在细胞上的定位

取 1 mL 过夜培养的菌液, 离心, 得上清和菌体, 保留上清, 将菌体重悬于 1 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中, 其中 500 μ L 保留作为菌体液, 另 500 μ L 进行超声波破壁、离心, 上清即为破壁菌液. 分别取 100 μ L 测定上清、菌体液和破壁菌液的酶活性, 其酶的活性分别为 0, 0.208 和 0.198 U/mL. 这一

结果说明菌体破壁前后酶的活性改变不大,而上清中几乎检测不到酶活性.因此可以初步确定酶蛋白在细胞膜上.这个结果与前人报道的来源于黄杆菌(*Flavobacterium* sp ATCC 27551)和假单胞菌(*Pseudomonas diminuta*)的 OPH 是一样的^[15,16],均为膜结合蛋白.

2.4 酶蛋白 OPHC2 的纯化

OPHC2 的粗提液经 PAGE 电泳(制备电泳)后,有 3 条较明显的蛋白带.切取蛋白带,并在电洗脱仪上洗脱蛋白.经酶活性测定,位于中间条带的蛋白是所需要的目的蛋白.将含有目的蛋白的洗脱液透析,浓缩,进行 SDS-PAGE 电泳,得到 1 条单一的蛋白条带,并初步确定 OPHC2 的分子量约为 35 kD(图 2).

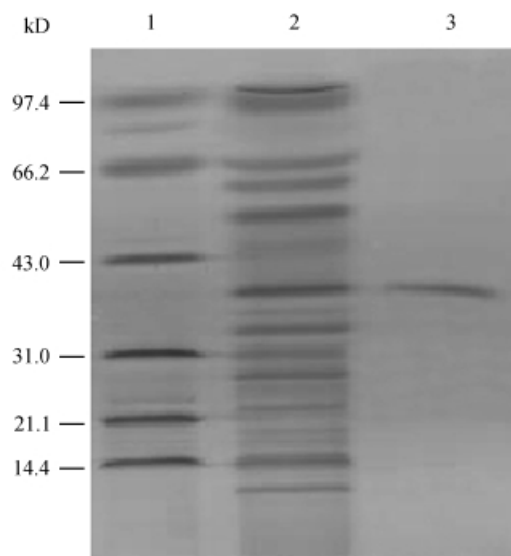


图 2 OPHC2 纯化过程的 SDS-PAGE 电泳图
1 示标准分子量; 2 示粗酶液; 3 示纯化的酶蛋白

2.5 酶学性质的研究

(i) OPHC2 酶反应最适温度及热稳定性. 不同温度下 OPHC2 酶活性测定结果表明,其降解甲基对硫磷的最适反应温度为 65℃. 温度在低于 65℃时,随着温度升高酶的活性逐步上升,但在 20℃时相对酶活性仍有 25.87%. 高于 65℃时酶活力迅速下降,到 80℃只有最大活力的 7.7%(图 3).

图 4 所示为 OPHC2 的热稳定性曲线,60℃时此酶很稳定,保温 30 min 后,其相对酶活有 85.6%; 70℃下保温 30 min,其酶活有所下降,但相对酶活仍

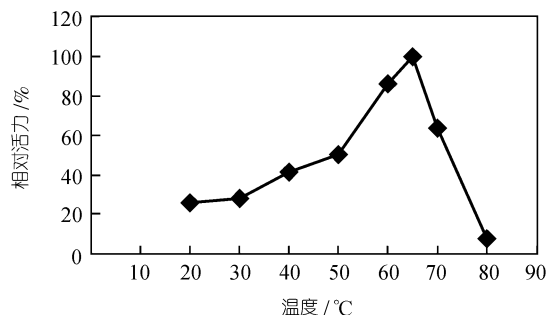


图 3 温度对 OPHC2 酶反应的影响

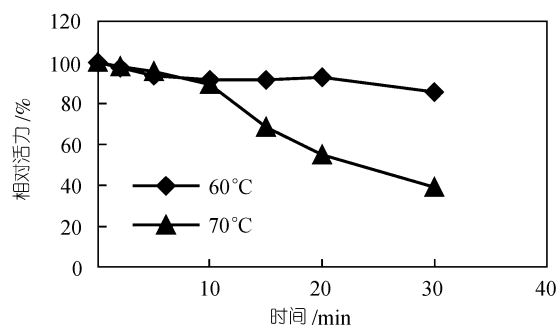


图 4 OPHC2 酶的温度稳定性

有近 40%,说明此酶有很好的耐热性.

(ii) OPHC2 酶反应的最适 pH 及 pH 稳定性. 不同 pH 下 OPHC2 酶活性测定结果表明,其最适反应 pH 为 9,但 pH 在 6~11 的范围内酶的相对活力均在 60%以上,说明其有很宽的 pH 酶解范围(图 5).

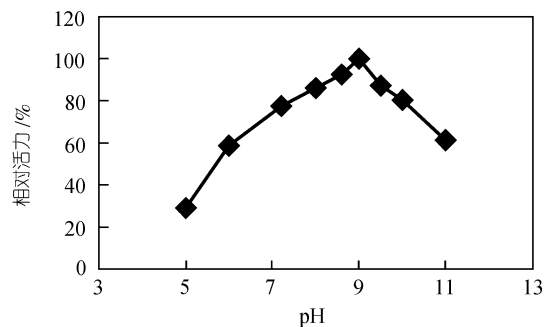


图 5 pH 对 OPHC2 酶反应的影响

图 6 所示为 OPHC2 酶的 pH 稳定性曲线. 从图中可以看出,在不同 pH 下保温 30 min 后酶的相对活力差别不大,即使在 pH 5 时其相对酶活性也达到 72.53%,且在碱性条件下更加稳定.

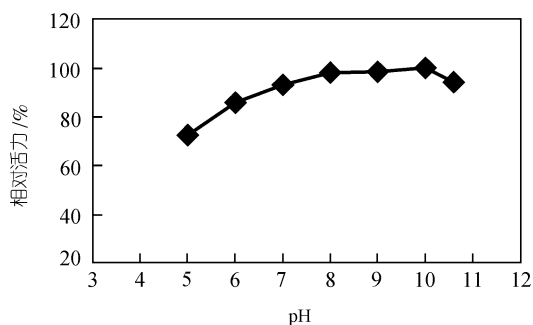


图 6 OPHC2 酶的 pH 稳定性

(iii) 不同金属离子及化学试剂对 OPHC2 酶反应的影响. 表 1 所示为不同金属离子及化学试剂对 OPHC2 酶反应的影响. 其中 SDS 影响最大, 为 OPHC2 酶的强烈变性剂. Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 及 Pb^{2+} 对 OPHC2 酶的活性有轻微的影响, 其他的金属离子及化学试剂对其影响不大或有的有促进作用.

2.6 降解甲基对硫磷的动力学分析

有机磷降解酶 OPHC2 降解不同浓度的甲基对硫磷, 以反应速度的倒数($1/v$)对底物浓度的倒数($1/[S]$)作图(图 7), 计算出 37℃ 时 OPHC2 对甲基对硫磷的米氏常数(K_m)为 64.6 $\mu\text{mol/L}$, 其最大反应速度($V_{\max}$)为 5.0 $\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}^{-1}$.

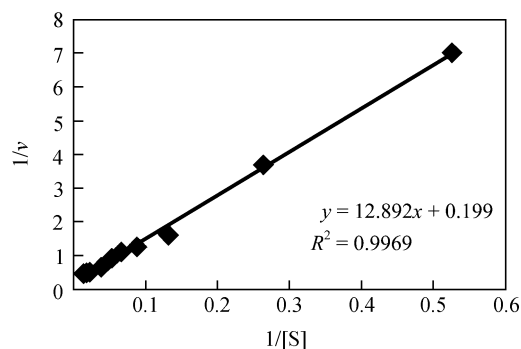


图 7 有机磷降解酶 OPHC2 降解甲基对硫磷的动力学曲线

2.7 OPHC2 氨基酸测序结果

北京奥科生物技术公司测试分析得出的 N 端肽

段氨基酸序列为 AAPAQKKTQVPGYYR. 军事医学科学院国家生物医学分析中心对 OPHC2 蛋白进行了酶解, 测了 4 个内肽段的 N 端氨基酸序列, 分别为: APEGMQGMFK, GIDDKDLQSLLAR, ILAEAATDK 和 MAQQAVAPYAK. 部分氨基酸序列分析表明, OPHC2 与目前发表的有机磷降解酶没有同源性.

3 讨论

有机磷降解酶 OPHC2 来源于假单胞菌, 与同样来源于假单胞菌(*Pseudomonas diminuta*)的 OPH 在酶学性质上相比较存在着差异^[2]. OPHC2 的最适反应温度为 65℃, 而 OPH 为 37℃; OPHC2 的最适 pH 为 8~10, 而 OPH 为 7.5~9.5. 但在不同金属离子及化学试剂对酶的影响上两者基本相同, 均影响不大. 比较二者对底物甲基对硫磷和对硫磷的降解效率发现, OPHC2 降解甲基对硫磷的效率要远远高于对硫磷, 而 OPH 正好相反, 对对硫磷的降解效率要远远高于甲基对硫磷.

有机磷降解酶 OPHC2 有很好的热稳定性, 这有利于其适应酶制剂生产的各种过程, 如喷雾干燥等. 同时此酶还具有很好的 pH 反应范围以及 pH 稳定性, 且各种金属离子对酶活性基本没有影响, 这些优良的酶学性质均有利于其适应应用过程中的各种环境.

到目前为止共有 7 个有机磷降解酶基因被克隆, 它们分别来源于黄杆菌(*Flavobacterium* sp ATCC 27551)^[17]、假单胞菌(*Pseudomonas diminuta*)^[6,18]、单胞菌(*Alteromonas* sp)^[19]、节杆菌(*Arthrobacter* sp)^[20]、邻单胞杆菌(*Plesiomonas* sp)^[21]、土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)^[5]及紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum* ATCC 12472)^[22]. 其中来源于假单胞菌的有机磷降解酶的编码基因有 2 个, 一个与黄杆菌是完全一样的^[6,17], 而另一个与来源于邻单胞杆菌的有机磷降解酶的编码基因有 99.6% 的同源性^[18,21]. 我们根据 OPHC2 N 端及内肽段的氨基酸序列, 设计合成了简并性引物, 通过 PCR 及反向 PCR, 克隆出其完整的编码基因 *ophc2*(975 bp), 并将其核苷酸序列与已发表的有机磷降解酶基因的编码序列进行了比较. 结果表明, 它们的同源性很低, 最高的只

表 1 不同金属离子及化学试剂对 OPHC2 酶解反应的影响

离子	对照	Ca^{2+}	Cr^{3+}	K^{+}	Mg^{2+}	Li^{+}	Cu^{2+}	Mn^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Pb^{2+}	EDTA	SDS
相对酶活力/%	100	110	101.8	111.3	110	100.8	98.7	83	109	87.7	99	88	109	0

有46%,说明OPHC2是一种新的有机磷农药降解酶。*ophc2*已在GenBank中登录,登录号为AJ605330(有关基因克隆的结果将另发表)。

对具有优良酶学性质的有机磷降解酶OPHC2的研究的目的是为了其进一步的应用。我们将对其编码基因进行分子改造使其适合于在真核表达系统毕赤酵母中高效表达,为有机磷农药降解酶的大规模廉价生产开辟一条新的途径。

致谢 本工作作为国家高技术研究发展计划资助项目(批准号:2001AA214121)。

参 考 文 献

- 1 Horne I, Sutherland T, Harcourt R, et al. Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(7): 3371~3376
- 2 Serdar M C, Gibson T D. Enzymatic hydrolysis of organophosphates: Cloning and expression of a parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta*. *Bio/Technol*, 1985, 3: 567~571
- 3 Serdar M C. Hydrolysis of cholinesterase inhibitors using parathion hydrolase. US Patent. 1996, 5 589 386
- 4 虞云龙, 樊德方, 陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与发展策略, 环境科学进展, 1996, 4(3): 28~36
- 5 Sethunathan N, Yoshida T. A *Flavobacterium* that degrades diazinon and parathion. *Can J Microbiol*, 1973, 19: 873~875
- 6 Chaudhry R G, Ali N A, Wheeler B W. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp that possesses DNA homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 288~293
- 7 Zboinska E, Lejczak B, Kafarski P. Organophosphonate utilization by the wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(9): 2993~2999
- 8 李淑彬, 周仁超, 刘玉焕, 等. 曲霉 M-2 降解有机磷农药(甲胺磷)的研究. 微生物学通报, 1999, 26(1): 27~30
- 9 DiSioudi B, Miller C, Lai K, et al. Rational design of organophosphorus hydrolase for altered substrate specificities. *Chem Biol Interact*, 1999, 14: 211~223
- 10 DiSioudi B, Grimsley J, Lai K, et al. Modification of near active site residues organophosphorus hydrolase reduces metal stoichiometry and alters substrate specificity. *Biochemistry*, 1999, 38(10): 2866~2872
- 11 Wu C F, Valdes J J, Rao G, et al. Enhancement of organophosphorus hydrolase yield in *Escherichia coli* using multiple gene fusion. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 75(1): 100~103
- 12 Cho C M, Mulchandani A, Chen W. Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(4): 2026~2030
- 13 Munnecke M D, Hsieh P D. Microbial decontamination of parathion and *p*-nitrophenol in aqueous media. *Applied Microbiol*, 1974, 28(2): 212~217
- 14 Mulbry W W, Karns J. Purification and characterization of three parathion hydrolases from gram-negative bacterial strains. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 289~293
- 15 Brown K A. Phosphotriesterases of *Flavobacterium* sp. *Soil Biol Biochem*, 1980, 12: 105~112
- 16 Dumas D P, Caldwell S R, wild J R, et al. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J Biol Chem*, 1989, 264: 19659~19665
- 17 Mulbry W W, Karns J S. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: Relationship between the gene and the protein. *Bacteriol*, 1989, 171 (12): 6740~6746
- 18 Liu H, Wang S J, Zhang X E, et al. *Pseudomonas* sp WBC-3 plasmid pZWL0 methyl parathion hydrolase (*mpd*), hypothetical protein, and transposase(*tnpA*) genes, complete cds. GenBank, 2003, AY251554
- 19 Cheng T C, Harvey S P. Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(5): 1636~1641
- 20 Ohshiro K. Molecular cloning and nucleotide sequencing of organophosphorus insecticide hydrolase gene from *Arthrobacter* sp strain B-5. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87: 531~534
- 21 Cui Z, Li S, Shen B. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and Cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10): 4922~4925
- 22 Vasconcelos A T R, Almeida D F, Almeida F C, et al. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (20): 11660~11665

(2003-09-05 收稿, 2003-11-18 收修改稿)