

文章编号:1673-1689(2008)03-0104-05

露湿漆斑菌胆红素氧化酶的分离纯化及其性质

刘友勋, 马富英, 熊征, 颜克亮, 吴航军, 张晓昱*

(华中科技大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘 要: 露湿漆斑菌产生的胆红素氧化酶粗酶液通过硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-100 纯化, 得到纯化 152.54 倍胆红素氧化酶, 得率 19.14%; 用 PAGE 检测为单一条带, 活性电泳证实该单一蛋白质组分为胆红素氧化酶, SDS-PAGE 证明该酶的相对分子质量为 64 000。该酶最适反应温度为 55 ℃, 以胆红素为底物时最适 pH 值为 7.5, 而以 ABTS 为底物时最适 pH 值为 4, 该酶在 pH 3~8 之间都能够检测到酶活。以胆红素为底物, 胆红素氧化酶的 K_m 值和 V_{max} 分别为 552.06 $\mu\text{mol/L}$ 和 38.91 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$; 而以 ABTS 为底物, 胆红素氧化酶的 K_m 值和 V_{max} 分别为 631.84 $\mu\text{mol/L}$ 和 12.79 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

关键词: 露湿漆斑菌; 胆红素氧化酶; 纯化; 性质

中图分类号: Q 556

文献标识码: A

Purification and Characterization of Bilirubin Oxidase from *Myrothecim roridum*

LIU You-xun, MA Fu-ying, XIONG Zheng, YAN Ke-liang,
WU Hang-jun, ZHANG Xiao-yu*

(School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Bilirubin oxidase from *Myrothecim roridum* was purified to electrophoretic homogeneity by the steps of ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose Fast Flow and Sephadex G-100 column chromatography. Purification of about 152.54 fold was achieved with an overall yield of 19.14%. It was demonstrated to be bilirubin oxidase by native PAGE, and its molecular weight was estimated to be about 64 000 by SDS-PAGE. The optimum temperature of the enzyme activity was 55 ℃. The optimum pH for bilirubin and ABTS were 7.5 and 4, respectively. The K_m for bilirubin and ABTS was 552.06 $\mu\text{mol/L}$ and 631.84 $\mu\text{mol/L}$, respectively. In addition, The V_{max} for bilirubin and ABTS was 38.91 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ and 12.79 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, respectively.

Key words: *Myrothecim roridum*; bilirubin oxidase; purification; properties

胆红素(Bilirubin)是一类线形四吡咯衍生物, 是血红素在人体内的代谢产物之一。胆红素在人

体内生成过多或肝细胞对胆红素的摄取结合排泄过程发生障碍, 都可使血液中胆红素浓度增高而出

收稿日期: 2007-06-21.

作者简介: 刘友勋(1976-), 男, 湖北鄂州人, 生物化学与分子生物学博士研究生。

* 通讯作者: 张晓昱(1957-), 男, 湖北恩施人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物学与生物技术方面的研究. Email: zhangxiaoyu@mail.hust.edu.cn

现高胆红素血症^[1]。所以,测定血中胆红素水平对临床诊断肝胆疾病、溶血等有着重要的意义。胆红素氧化酶(Bilirubin oxidase, BOD)是一种含铜的多酚氧化酶,能催化胆红素氧化,氧气是其电子受体。反应过程为胆红素氧化酶催化胆红素生成胆绿素,后者进一步氧化最终生成性质还不清楚的无色化合物^[1-3]。自从1981年日本学者发现漆斑菌属能高产胆红素氧化酶后,临床医学中开始使用酶法来测定胆红素,该方法具有特异灵敏和操作简便等优点,适用于临床手工或自动化测定^[3]。由于胆红素氧化酶和漆酶具有类似的性质,近年来,胆红素氧化酶的应用逐渐拓宽,被用于生物电池的制造、纺织行业的布料脱色、环境废水的处理等方面的研究^[4-6],但是国内对于BOD的生化性质研究报道较少。

Murao等在研究BOD方面做了大量工作。他们通过深层培养,比较了*Myrothecium*属不同菌株的产酶能力,并分离得到一株疣孢漆斑菌(*Myrothecium verrucaria*),其产酶能力高达19 U/mL,而同属不同种的菌株还不到1 U/mL^[7]。张淑贤在筛选产BOD的微生物时,发现一株高产BOD的露湿漆斑菌(*Myrothecium roridum*),但其酶产量为1.3 U/mL^[8]。不同菌株的疣孢漆斑菌的BOD已被分离纯化,但所报道的回收率不一样,王菊君从疣孢漆斑菌纯化出BOD的得率为23%左右,而Murao纯化出BOD的得率为17%左右^[7-9]。

作者从土壤中筛选到一株高产BOD的露湿漆斑菌,其酶产量可达到5 U/mL左右。对该菌产生的BOD进行了分离纯化,对胆红素氧化酶性质进行初步研究,为该酶的应用打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

该菌从土壤中分离得到,经分子生物学鉴定和显微观察为露湿漆斑菌(GenBank中的编号为EF458487)。

1.2 主要生化试剂

2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻吡咯啉-6-磺酸)(ABTS),美国Sigma公司产品;DEAE-Sepharose Fast Flow和Sephadex-G100填料,美国GE Healthcare Bioscience产品。其它生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 培养基

PDB:200 g去皮土豆,20 g葡萄糖,1 000 mL蒸馏水。

1.4 酶活力的测定

ABTS法:在3 mL反应体系中,含有2.7 mL pH 4.5、0.2 mol/L的乙酸-乙酸钠缓冲液,0.1 mL酶液,0.2 mL 1 mmol/L的ABTS,按次序混合并摇匀,30 s后开始记录 A_{420} ,每隔15 s记录一个 A_{420} 值。一个酶活力单位(U):在上述条件下,每分钟催化1 μ mol ABTS氧化所需的酶量。

胆红素法:参照文献[3,7]。

1.5 蛋白质质量分数测定

按Lowry法^[10]测定,以牛血清白蛋白作标准。

1.6 电泳

SDS-PAGE见文献[10]。分离胶质量浓度为10 g/dL, SDS-PAGE用考马斯亮蓝R250,摇床染色2 h;PAGE活性染色按文献[11]略加修改,使用底物分别为ABTS和胆红素。

1.7 酶的分离与纯化

1.7.1 硫酸铵盐析、透析 菌种在28℃下、PDB培养基中摇瓶培养5 d后,经8层纱布过滤,6 000 r/min离心20 min,所得上清液冷冻过夜,解冻除去沉淀,上清液即为粗酶液。80%饱和度硫酸铵沉淀,4℃静置过夜。10 000 r/min离心20 min,弃去上清液,沉淀溶解于蒸馏水中,对其透析过夜。

1.7.2 DEAE-Sepharose Fast Flow柱层析 将上述所得酶液加到已用0.01 mol/L磷酸钠缓冲液(PBS 7.0)平衡过的DEAE-Sepharose Fast Flow柱(1.8 cm×20 cm),先用PBS洗柱,后改用含0~0.5 mol/L NaCl的PBS梯度洗脱,合并有酶活组分,将所得溶液冷冻干燥成粉。

1.7.3 Sephadex G-100柱层析 将上述所得活力组分的冻干粉溶解于3 mL蒸馏水中,所得酶液加到平衡好的层析柱(2.0 cm×80 cm)上,用上述缓冲液洗脱,收集活力较高的组分,并将其冻干,溶解在2 mL的蒸馏水中,-20℃下保存。

1.8 酶学性质

1.8.1 表观相对分子质量测定 SDS-PAGE法测定漆酶的相对分子质量,根据已知相对分子质量的标准蛋白质在SDS-PAGE中的相对迁移率 R_f ,作 $R_f-\lg M_r$ 图,求得其相对分子质量。

1.8.2 最适反应温度 先将加有底物的反应缓冲液在不同温度下保温15 min,然后在测试之前加入酶液,按酶活测试法测其活力。

1.8.3 酶的最适反应pH值 将胆红素分别溶于pH 3.0~8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中,用于测酶活力,或在pH 3.0~8.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中加入ABTS来测酶活。

1. 8.4 动力学常数测定 在不同底物(ABTS、胆红素)浓度的反应体系中,计算酶反应的初速度,作 Lineweaver-Burk 双倒数图。

2 结果与分析

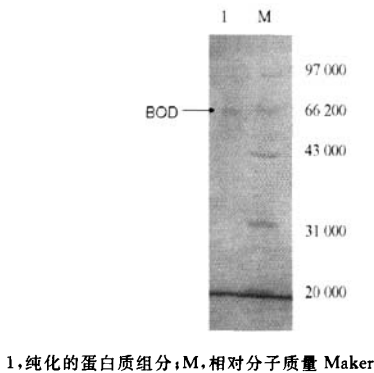
2. 1 胆红素氧化酶的分离与纯化

胆红素氧化酶的分离与纯化结果见表 1。粗酶液经 80 g/dL 硫酸铵盐析、DEAE-Sephrose F F 柱层析和 Sephadex G-100 柱层析后所得样品比活力为 106.77,纯化倍数为 152.54,活力回收率为 19.14 %。该酶样品经 SDS-PAGE 检测只显示一

条蛋白质带,见图 1。表明纯化后的蛋白质为单一组分,已达到电泳纯。酶样品经活性电泳后,将凝胶切成两块,一块以 ABTS 为底物,在 pH 4.5 醋酸缓冲液中进行活性染色,30 min 后显示出单一的绿色条带,见图 2 中泳道 1;另一块凝胶以胆红素为底物,在 pH 8.0 的 HCl-Tris 缓冲液中进行活性染色,胆红素溶液先将凝胶染成黄色,大约 2 h 后在黄色的背景下呈现出一条浅绿色的条带,见图 2 中泳道 2。这些结果表明纯化得到单一蛋白质组分为胆红素氧化酶。

表 1 胆红素氧化酶的纯化总表
Tab. 1 A summary of bilirubin oxidase purification

纯化步骤	酶总活力/U	总蛋白质质量/mg	酶比活力/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶	1 540.98	2 201.23	0.7	—	100
80% (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀	1 467.25	320.34	4.584	6.55	95.21
DEAE-Sephrose F. F	856.30	40.23	21.28	30.4	55.57
Sephadex G-100	280.82	2.63	106.77	152.54	19.14



1, 纯化的蛋白质组分; M, 相对分子质量 Maker
图 1 BOD 的 SDS-PAGE 图
Fig. 1 SDS-PAGE of BOD

2. 2 胆红素氧化酶的部分酶学性质

2. 2. 1 相对分子质量 由 SDS-PAGE 电泳图, 得到相对迁移率与胆红素氧化酶相对分子质量 (M_r) 的关系, 从图 1 可以看出, 胆红素氧化酶相对分子质量大约为 64 000 (从上往下的 5 条带相对分子质量 M_r 分别为 97 400、66 200、43 000、31 000、20 000)。

2. 2. 2 最适反应温度 以 ABTS 为底物在 pH 4.5 的缓冲液中测其不同温度下的酶活。从图 3 可以看出, 在 10~55 °C 之间, 随着温度的上升, 酶活也在提高, 55 °C 时达到最高, 超过 55 °C 时酶活开始下降, 到 70 °C 时 BOD 几乎完全失活。实验结果表明, 酶的最适反应温度为 55 °C 左右。

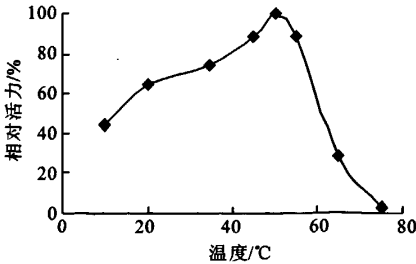
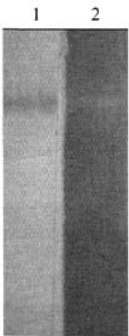


图 3 温度对 BOD 活性的影响
Fig. 3 Effect of temperature on the activity of BOD



1. 与 ABTS 活性反应; 2. 与胆红素活性反应
图 2 BOD 的活性 PAGE 图
Fig. 2 Native PAGE of BOD

2. 2. 3 最适反应 pH 值 如图 4 所示, 在 28 °C 下, 分别以胆红素和 ABTS 为底物测该酶在 pH 2

~8 下的酶活。在有氧的条件下, BOD 能将胆红素氧化成绿色的胆绿素或者进一步生成无色物质。以胆红素为底物时, 在 pH 2~4 之间, 基本上测不到酶活, 而在 pH 4~7.5 之间酶活逐渐上升, pH 值超过 7.5 之后, 酶活迅速下降, 所以 BOD 催化胆红素氧化的最适 pH 值在 7.5 左右。另外, BOD 也能将 ABTS 氧化成绿色 ABTS⁺。当以 ABTS 为底物时, 在 pH 2~4 之间, 其酶活逐渐上升, 而 pH 超过 4 时其酶活逐渐下降, 所以 BOD 催化 ABTS 值氧化的最适 pH 值在 4 左右。这些结果表明, 酶催化反应的最适 pH 值是相对而言, 催化不同的底物有不同的最适 pH 值。BOD 适合在偏酸性的条件下和 ABTS 反应, 而在中性偏碱性的条件下适合和胆红素反应。

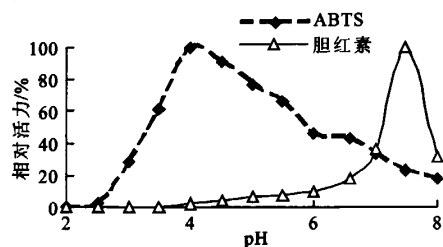


图 4 pH 值对 BOD 活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on the activity of BOD

2. 2. 4 酶的 K_m 值和 V_{max} 以 Lineweaver-Burk 作图(见图 5, 6)。以胆红素为底物, 在 pH 7.5 时, BOD 的 K_m 值和 V_{max} 分别为 $552.06 \mu\text{mol/L}$ 和 $38.91 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$; 而以 ABTS 为底物, 在 pH 4.0 时 BOD 的 K_m 值和 V_{max} 分别为 $631.84 \mu\text{mol/L}$ 和 $12.79 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。由此可见, BOD 与胆红素的亲和力比与 ABTS 的亲和力大, 与胆红素最大反应速率也比与 ABTS 最大反应速率大, 这一结果证明了胆红素是 BOD 的最适底物。

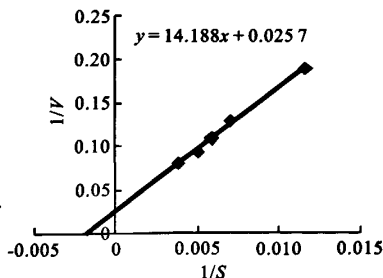


图 5 双倒数法测 BOD 的 K_m 胆红素

Fig. 5 Double reciprocal plot of K_m bilirubin

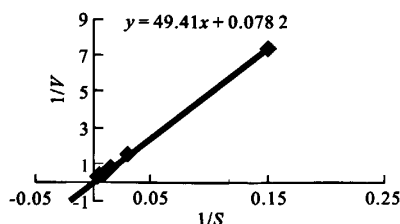


图 6 双倒数法测 BOD 的 K_m ABTS

Fig. 6 Double reciprocal plot of K_m ABTS

3 结 语

BOD 和漆酶都属于多铜离子氧化酶, 又称为多酚氧化酶, 二者之间有许多交叉底物, 例如 ABTS、丁香醛连氮、愈创木酚, 但二者之间的区别在于 BOD 能专一性地氧化胆红素, 而漆酶不能催化胆红素的氧化, 其最适底物为 ABTS。作者通过研究 BOD 的 K_m 证实了胆红素是 BOD 的最适底物。漆酶是一种用途非常广泛的酶, 但由于其酶活作用范围偏酸性, 对其应用受到了一定的限制^[12]。而 BOD 和漆酶属于同一家族, 有许多类似的性质, 其中性范围内有很好的催化活性, 因此受到广大科学工作者的关注, 使 BOD 从医学应用领域逐渐转移到其它领域, 例如生物电池等^[6]。露湿漆斑菌是一种高产 BOD 的真菌, 作者从该菌的土豆发酵液中分离纯化得到单一的蛋白质组分, 将该蛋白质进行活性电泳后, 用底物 ABTS 和胆红素的溶液浸泡凝胶, 活性染色结果表明, 纯化的蛋白质是 BOD, 而且未发现同工酶。王菊君从疣孢漆斑菌纯化出一种相对分子质量为 54 000 的胆红素氧化酶^[9], 而作者纯化的 BOD 相对分子质量为 64 000 比其要大, 这可能是由于两个菌种之间的差异造成。胆红素是 BOD 的专一底物, 其常用于 BOD 的酶活测定。但胆红素的溶液不稳定, 容易发生自氧化, 一般只能保存 3 d, 这给 BOD 的酶活测定带来不准确性^[1]。ABTS 虽然不是 BOD 的最适底物, 但其和 BOD 反应迅速, 生成绿色的 ABTS⁺在 420 nm 处有特定的吸收峰, 易于测定, 而且 ABTS 溶液比较稳定, 在 4 °C 下可以保存 1 个月。因此, 相比较而言, 用 ABTS 作为测定 BOD 酶活的底物是一个很好的选择。不论是以胆红素还是以 ABTS 为底物时, BOD 在 pH 3 之前未测到活性, 而在 pH 3~8 之间都能够测到酶活, 这表明 BOD 在比较宽的 pH 值范围下有催化活性, 这一结果也预示着 BOD 具有较大的工业应用价值, 其它相关的酶学性质还在进一步研究之中。

参考文献(References):

- [1] 赵晓瑜, 刘彬彬, 杨茂华, 等. 终止剂法测定胆红素氧化酶活性[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2006, 26(5): 520-523.
ZHAO Xiao-yu, LIU Bin-bin, YANG Mao-hua, et al. Improved method to measure bilirubin oxidase by using ascorbic acid as terminating agent[J]. *Journal of HeiBei University: Natural Science Edition*, 2006, 26(5): 520-523. (in Chinese)
- [2] 刘彬彬, 赵晓瑜, 杨茂华, 等. 露湿漆斑菌胆红素氧化酶的鉴定[J]. 邢台学院学报, 2006(2): 118-120.
LIU Bin-bin, ZHAO Xiao-yu, YANG Mao-hua, et al. Identification of bilirubin oxidase from *Myrothecium roridum*[J]. *Journal of XingTai University*, 2006(2): 118-120. (in Chinese)
- [3] 郭健, 陶沙, 莫培生, 等. 胆红素氧化酶产酶菌株的分离及最佳产酶条件的研究[J]. 微生物学报, 1991, 31(1): 156-159.
GUO Jian, TAO Sha, MO Pei-sheng, et al. Isolation of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* and the optimum conditions of enzyme production[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1991, 31(1): 156-159. (in Chinese)
- [4] 康峰, 伍艳辉, 李佟茗. 生物燃料电池研究进展[J]. 电源技术, 2004, 28(11): 723-727.
KANG Feng, WU Yan-hui, LI Tong-ming. Research progress in biofuel cell [J]. *Chinese Journal of Power Sources*, 2004, 28(11): 723-727. (in Chinese)
- [5] 黄茂福. 染整用酶制剂的研究与开发现状(I)[J]. 印染助剂, 2004(4): 1-4.
HUANG Mao-fu. The researching and development status quo of the enzymes for dyeing and printing(I)[J]. *Textile Auxiliaries*, 2004(4): 1-4. (in Chinese)
- [6] Sakasegawa S I, Ishikawa H, Imamura S, et al. Bilirubin oxidase activity of *Bacillus subtilis* CotA[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2006, 72(1): 972-975.
- [7] Murao S, Tanaka N. Isolation and identification of a microorganism producing bilirubin oxidase[J]. *Agric Biol Chem*, 1981, 45: 2031-2034.
- [8] 张淑贤, 苏凤岩, 王竹, 等. 产胆红素氧化酶菌种筛选[J]. 微生物学杂志, 1991(11): 16-19.
ZHANG Shu-xian, SU Feng-yan, WANG Zhu, et al. Screen of a microorganism producing bilirubin oxidase[J]. *Journal of Microbiology*, 1991(11): 16-19. (in Chinese)
- [9] 王菊君, 曹恩华, 赵英霞. 疣孢漆斑菌(*Myrothecium verrucaria*)J-1 胆红素氧化酶的纯化及性质初步研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1991(6): 662-665.
WANG Ju-jun, CAO En-hua, ZHAO Yin-xia. Purification and characteristics of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* J-1 [J]. *Chinese Biochemical Journal*, 1991(6): 662-665. (in Chinese)
- [10] 汪家政. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [11] 湛斌, 唐雪明, 沈微, 等. 粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆及在毕赤酵母中的初步表达[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 43-46.
CHEN Bin, TANG Xue-ming, SHEN Wei, et al. Cloning of a laccase gene from *Neurospora crassa* and its preliminary expression in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(4): 43-46.

(责任编辑: 李春丽)