

白腐真菌细胞色素 P450 的诱导及检测方法研究

宁大亮, 王慧*, 李冬

(清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要:以 CO 结合差光谱为基本检测法, 研究了白腐真菌黄孢原毛平革菌中细胞色素 P450 的诱导和适宜的分离检测方法。结果表明, 正己烷对该真菌 P450 有显著的诱导作用, P450 诱导量受正己烷浓度和诱导时间的影响, 每小时投加正己烷 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、诱导 6 h 可使该真菌微粒体 P450 比浓度高达 140~ 160 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 。在此基础上, 本研究优化了分离 P450 时破碎细胞的方法以及光谱法检测 P450 的条件。破碎细胞时, 采用高速分散结合玻璃研磨, 比采用玻璃研磨、超声破碎和珠磨等方法分离的微粒体 P450 含量高 1~ 5 倍, 是更为适宜的破碎方法。检测 CO 结合差光谱时, 通气和还原条件对 P450 检测值有显著影响, 较适宜的条件为: 样品池和对照池分别通入等量的 CO 和 N_2 , 通气流量为 3 mL/min (300 μL 样本), 通气时间 40 s; 通气后投加还原剂低亚硫酸钠, 投加浓度为 0.4 mol/L 。

关键词: 白腐真菌; 细胞色素 P450; 诱导; CO 结合差光谱; 细胞破碎

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)08-2485-06

Induction and Measurement of Cytochrome P450 in White Rot Fungi

NING Da-liang, WANG Hui, LI Dong

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The induction and measurement of cytochrome P450 in white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* were studied in this work. The spectrophotometric results demonstrated that *n*-hexane was able to induce the fungal P450 to high level, which facilitated isolation and measurement of microsomal P450. The highest concentration of microsomal P450 could reach 140~ 160 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ after 6 h induction by addition of 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ hexane each hour, and the concentration of hexane and incubation time had significant effect on the induction of P450s. After effective induction, the method for isolation and measurement of microsomal P450 with CO difference spectrum was studied and the optimized method was obtained as followed. High-speed disperser and glass homogenizer were used to disrupt cells, which obtained higher amount of microsomal P450 than those from cells disrupted by glass homogenizer, ultrasonicator and bead-beater respectively. To record CO difference spectrum, the sample was bubbled with CO for 40 s at a rate of 3 mL/min (300 μL sample), and the reference cuvette was bubbled with N_2 to the same extent. Then, the reducer sodium dithionite was added to a concentration 0.4 mol/L .

Key words: white rot fungus; cytochrome P450; induction; CO difference spectrum; cell disruption

白腐真菌是一类可降解木质素、营腐生生活的白色丝状真菌, 多数属于担子菌纲。白腐真菌的模式菌种黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 对多环芳烃、多氯联苯、二 英等许多有机污染物都有明显的降解功能^[1], 其降解酶系和作用机制是环境微生物领域的热点问题。细胞色素 P450 (简称 P450) 是一类含有高铁血红素 IX 的多功能氧化酶, 普遍存在于各类生物中, 参与代谢各种外源污染物、药物以及激素等物质^[2,3]。黄孢原毛平革菌拥有 150 多个功能未知的 P450 基因^[4], 是迄今所知的 P450 基因最丰富的真菌。基因水平的研究和 P450 抑制剂试验的结果表明, 该真菌的 P450 很可能参与降解多环芳烃、农药等许多有机污染物^[5~11], 具有突出的研究价值。但是, 目前对其降解功能的明确结论却很少, 直接分离该真菌 P450 酶液的研究仅鉴定了苯并(a) 芘羟化功能^[12]。限制着白腐真菌 P450 研究的重要原

因是真菌 P450 分离检测困难。

P450 含量检测既是环境毒理学分析的重要手段, 也是 P450 降解功能、酶学性质等蛋白质层次研究的基础^[3]。在动物 P450 的研究中, 最常用的检测方法是 CO 结合差光谱法, 检测时对还原剂浓度和通气量等条件不需要非常严格地限定也能有较稳定的结果。检测前的分离过程一般采用玻璃研磨等较温和的细胞破碎方法, 能够控制住 P450 的失活。但是对于白腐真菌, 由于细胞不易破碎, P450 相对含量较低而且分离到胞外后很容易失活^[12], 其 P450 含量分析难以采用通常的破碎方法和检测条件, 而各种破碎方法和不同检测条件对白腐真菌 P450 的

收稿日期: 2008-09-04; 修订日期: 2008-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400012); 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418506)

作者简介: 宁大亮 (1981~), 男, 博士研究生, 主要研究方向环境生物技术, E-mail: ndl03@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: wanghui@tsinghua.edu.cn

影响还缺乏系统的研究, 适宜的方法尚未见详细的报道, 这使分离检测成为白腐真菌 P450 研究的瓶颈问题。

本研究的目的是突破这一瓶颈, 在有效提高 P450 含量的基础上明确适合于白腐真菌 P450 的分离检测方法。因为正己烷对多种微生物的 P450 都有明显的诱导作用, 而且诱导产生的 P450 具有多样的功能, 被称作 P450 的多功能诱导剂^[1], 所以本研究采用正己烷诱导白腐真菌 P450, 并在优化的诱导条件下获得了较高 P450 含量的菌体; 在此基础上, 首次较系统地研究了不同分离方法和各个检测条件对白腐真菌 P450 检测结果的影响, 明确了白腐真菌 P450 适宜的分离检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

白腐真菌采用黄孢原毛平革菌 BKM-F-1767 (ATCC 24725) 菌株; 土豆葡萄糖固体培养基(每 L 培养基含 200~300 g 土豆的浸出液、20 g 葡萄糖、20 g 琼脂粉); 土豆葡萄糖液体培养基(PDB, 每 L 培养基含 200~300 g 土豆的浸出液、20 g 葡萄糖); 磷酸盐缓冲溶液 A (Na_2HPO_4 30.08 g/L, NaH_2PO_4 2.50 g/L, EDTA- Na_2 3.72 g/L; pH 7.5); 磷酸盐缓冲溶液 B (Na_2HPO_4 30.08 g/L, NaH_2PO_4 2.50 g/L, EDTA- Na_2 372.2 mg/L, DTT 1 mmol/L, PMSF 0.5 mmol/L, 甘油 20%; pH 7.5)。

超声波细胞粉碎机(宁波新芝, JY92-2D); 高速分散器(Fluko, FA25); 珠磨破碎仪(Thermo, FastPrep120); 高速冷冻离心机(日本日立, CR22G); 超速冷冻离心机(日本日立, CP100MX); 可见/紫外分光光度计(日本岛津, UV-2401PC)。

1.2 白腐真菌培养与 P450 诱导

冷藏的菌种接种到固体培养基置于 37℃ 恒温活化培养 6~8 d 使用。经过活化培养的孢子接种到液体培养基(孢子最终浓度约为 10^7 /L), 置于 37℃、130 r/min 培养。真菌培养 60 h 后, 按一定投量(若无特殊说明每次 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 每小时投加一次正己烷, 经过一定诱导时间(若无特殊说明采用 6 h) 后收集菌体, 提取微粒体酶液, 检测 P450 含量。

1.3 白腐真菌细胞破碎与微粒体分离

菌体用缓冲溶液 A 清洗 2 遍, 离心(5000 r/min, 15 min, 4℃) 2 次, 获得菌丝体细胞。采用除珠磨外其它方法破碎前, 将菌丝体细胞悬浮于缓冲溶液 B 中, 最终以湿重计算的菌体浓度为 0.5 g/mL, 随后

破碎。

超声破碎法: 在冰盐浴中用超声破碎仪破碎(每超声 4 s 暂停 20 s, 保持低温状态, 功率与时间如文中说明); 高速分散: 在冰浴中用高速分散器破碎 40 s (22000 r/min, 每次匀浆 20 s 暂停 30 s, 2 次); 玻璃研磨: 在冰浴中缓缓研磨, 上下反复 3 次; 珠磨: 采用 0.45 mm 粒径的锆珠(1 g 锆珠/1 g 菌体/1 mL 缓冲溶液 B), 破碎 1 min 或 2 min (每振荡 20 s, 冰浴冷却 20 s)。

破碎后得到的细胞匀浆经高速离心(15000 r/min, 15 min, 4℃, 2 次) 后, 上清液即细胞粗提酶液经超速离心(23800 r/min, 90 min, 4℃, 1 次), 沉淀物经缓冲溶液 B 清洗 2 次后重悬于缓冲溶液 B 中获得微粒体酶液, 蛋白浓度控制在 5~7 mg/mL, -80℃ 保存待测。

1.4 还原态 CO 结合差光谱检测 P450

参考文献[14, 15]的方法, 采用还原态 CO 结合差光谱检测 P450 及 P420(P450 部分失活形态)。采用 Bradford 法检测微粒体酶液蛋白含量, 用缓冲液 B 稀释使蛋白浓度在 1 mg/mL 左右。在样品池和对照池中适量加入 2 份待测微粒体酶液, 记录基线。向样品池和对照池中分别通入一氧化碳和氮气, 随后加入还原剂低亚硫酸钠, 扫描样品在 400~500 nm 处吸收光谱, 所得谱线扣除基线即为还原态 CO 结合差光谱。

P450 的浓度根据吸光系数 $\epsilon_{430-490}$ 为 91 L/(mmol·cm)^[2] 计算, P420 的浓度根据吸光系数 ϵ_{20-490} 为 110 L/(mmol·cm)^[14, 16] 计算, P450 和 P420 含量均用比浓度(酶液中的 P450 浓度与总蛋白浓度之比)表示。

1.5 微粒体的氧化还原差光谱

参考 Kitts 等^[17]的方法, 采用 Bradford 法检测微粒体酶液蛋白含量, 用缓冲液 B 稀释使蛋白浓度在 1 mg/mL 左右。在样品池和对照池中适量加入 2 份待测微粒体酶液, 记录基线。向样品池中加入 1 mg 低亚硫酸钠, 向对照池中加入 1 mg 过硫酸铵, 扫描样品在 400~750 nm 吸收光谱, 所得谱线扣除基线即为氧化还原差光谱。

2 结果与讨论

2.1 正己烷对白腐真菌 P450 的诱导及诱导条件的优化

若未经诱导, 黄孢原毛平革菌 P450 含量低于检测限, 经正己烷诱导后, 微粒体 P450-CO 结合差光谱

在 453 nm 有明显吸收峰(如图 1), 微粒体 P450 比浓度平均 148 pmol/mg (活性最高样本达到 168 pmol/mg), 说明正己烷对黄孢原毛平革菌微粒体 P450 有显著的诱导作用. 同时, CO 结合差光谱在 420 nm 出现明显的吸收峰, 这是由 P450 失活形态 P420 与 CO 结合引起的, 检测到的 P420 比浓度达 365 pmol/mg(活性最高样本达到 420 pmol/mg), 这说明有相当数量的 P450 在分离过程中或者在细胞内失去了活性, 转化为 P420, 这在其它真菌及细菌中也有发现^[13,16,18], 因此 P450 与 P420 比浓度之和对明确 P450 的表达量有一定参考价值.

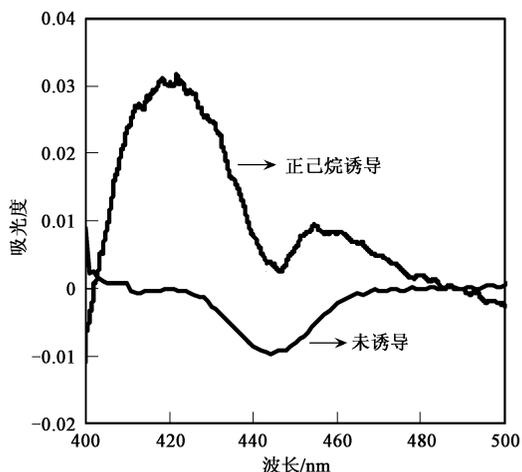


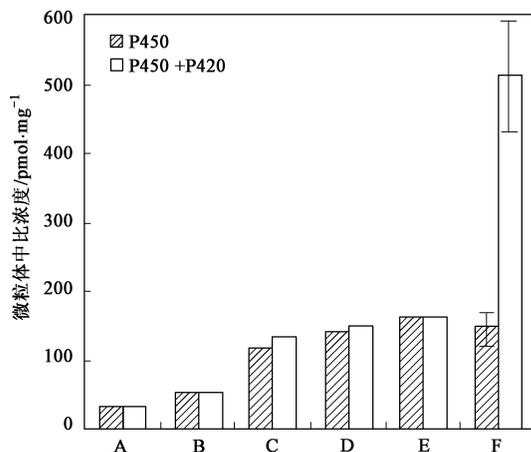
图 1 经正己烷诱导和未经诱导的黄孢原毛平革菌微粒体 CO 结合差光谱

Fig. 1 CO difference spectra of microsomes from *n*-hexane induced and non induced *Phanerochaete chrysosporium*

与文献报道的黄孢原毛平革菌(未经诱导)检测结果^[12]相比, 本研究中正己烷诱导后微粒体 P450 的含量是此前报道的 4~5 倍, P450 与 P420 的含量之和约为此前报道的 12~19 倍(如图 2), 说明正己烷对黄孢原毛平革菌 P450 也是很有效的诱导剂. 对黄孢原毛平革菌 P450 采用先诱导后分析的策略, 能够有效克服真菌 P450 含量较低造成的困难, 所获得的高 P450 含量菌体能够用作检测方法、降解功能等蛋白质层次的研究.

与其他经有机污染物诱导后的真菌微粒体 P450^[12,18-21]相比, 黄孢原毛平革菌微粒体 P450 经诱导后的比浓度较高, 若比较 P450 与 P420 比浓度之和, 黄孢原毛平革菌更为突出(如图 2). 这说明黄孢原毛平革菌 P450 较易受诱导, 该真菌适合作为研究 P450 的模式菌种.

正己烷的投加量和诱导时间均对黄孢原毛平革



A. 黄孢原毛平革菌, 未加诱导剂^[12]; B. 高山被孢霉, 投加正己烷^[18]; C. 镰刀霉, 投加加菲^[19]; D. 球孢枝孢菌, 投加甲苯^[20]; E. 黑曲霉, 投加苯甲酸^[21]; F. 黄孢原毛平革菌, 投加正己烷(本研究)

图 2 有机污染物诱导的真菌微粒体 P450 比浓度

Fig. 2 Specific concentrations of microsomal P450s in fungi induced by organic pollutants

菌 P450 的诱导活性有明显的影响(如表 1). 当正己烷投加浓度为 2 $\mu\text{L}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 、诱导时间为 6h 时, 微粒体 P450 比浓度较高; 正己烷投量过多或诱导时间过长会显著降低黄孢原毛平革菌微粒体中 P450 的含量; 但是正己烷投加浓度减小为 1 $\mu\text{L}/(\text{mL}\cdot\text{h})$, 或诱导时间增至 9 h, 黄孢原毛平革菌微粒体 P450 比浓度仍然较高. 以上结果显示, 诱导条件只有在一定范围内, P450 含量才能够显著增强, 若诱导条件选择不当, 诱导产生的 P450 可能过低, 因此诱导条件的优化对获取高 P450 含量的菌体是非常必要而有效果的; P450 活性与正己烷浓度之间并没有剂量效应关系, 反映了黄孢原毛平革菌 P450 调控机制的复杂性.

表 1 正己烷投加浓度和诱导时间对黄孢原毛平革菌 P450 含量的影响

Table 1 Effect of the amount of inducer (*n*-hexane) and incubation time in the presence of inducer on the specific concentration of microsomal P450 in *Phanerochaete chrysosporium*

正己烷投加浓度 $/\mu\text{L}\cdot(\text{mL}\cdot\text{h})^{-1}$	诱导时间 /h	微粒体中比浓度检测值/ $\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$	
		P450	P450+P420
1	6	89 ± 14	305 ± 35
2	6	128 ± 3	394 ± 9
4	6	16 ± 0	83 ± 0.5
2	9	110 ± 10	315 ± 43
2	12	17 ± 4	76 ± 7

利用上述最佳诱导条件下获得的高 P450 含量菌体, 分离检测条件的优化研究已经可以开展, 而对

白腐真菌 P450 诱导规律的揭示, 还有待于对各种的影响因素(包括诱导剂浓度、诱导时间、温度、pH、营养条件、溶解氧含量、生长阶段等)进一步开展更为细致的研究。

2.2 白腐真菌 P450 的分离方法及条件

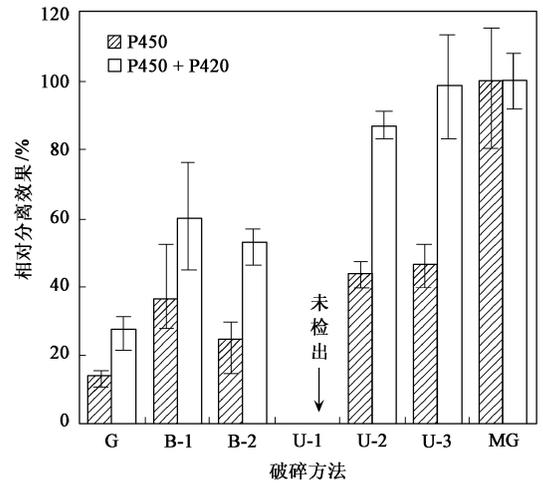
真菌 P450 的分离主要包括细胞破碎与差速离心, 在文献中, 差速离心的条件已经比较明确了, 但破碎细胞的方法各异, 对 P450 的分离效果未有过比较。在各类细胞破碎方法中, 玻璃研磨是动物^[14]、昆虫^[21]细胞 P450 分离最常用的方法之一, 超声破碎^[23]、高速分散结合玻璃研磨^[19]、珠磨破碎^[12]都曾成功运用于真菌 P450 的分离, 因此本研究比较了这 4 种破碎方法对白腐真菌 P450 的分离效果。其中超声破碎和珠磨破碎对不同的参数设置作了比较, 各种方法的其他参数选取均参考相关文献设置。采用微粒体 P450 比浓度及 P450 与 P420 的比浓度之和综合分析 P450 的分离效果; 采用单位菌体的粗提酶液蛋白浓度评价细胞破碎的效果。

结果如图 3, 采用高速分散结合玻璃研磨破碎细胞(MG 法), 对白腐真菌 P450 的分离效果最好, 对真菌细胞的破碎效果也较好, 在本研究考察的各类方法中最适于分离白腐真菌 P450。

对于超声破碎, 输出功率是关键参数, 若功率较低(250 W), 则破碎效果不好, 无法成功分离出活性 P450; 功率达到 480 W 时, 破碎和分离效果较好, 超声时间即使缩短 1/2, 对分离效果的影响也不大。操作条件优化后, 超声破碎对真菌细胞的破碎效果明显高于其它方法(可达 MG 法的 1.5 倍), 微粒体 P450 与 P420 比浓度之和也与高速分散结合玻璃研磨几乎相同, 但微粒体 P450 比浓度不足高速分散结合玻璃研磨的一半, 说明真菌 P450 在超声破碎过程中会大量失活, 其中不少转化为 P420。

玻璃研磨与高速分散结合后对真菌细胞的破碎效果是单采用高速分散的 2.3 倍, 并获得较好的 P450 分离效果; 但是, 单纯的玻璃研磨对真菌细胞的破碎效果与单采用高速分散相似, 对真菌 P450 的分离效果仅为 MG 法的 42%。

从以上现象来看, 与动物相比, 真菌细胞具有更坚固的细胞壁, 若采用通常的温和的破碎方法, 难以达到足够的细胞破碎效率; 与动物相比, 真菌中 P450 含量通常较低而且分离到细胞外后容易失活, 若采用较为剧烈的破碎方法, 虽然细胞破碎效果较好, 但往往造成 P450 大量失活, 而采用过于温和的破碎方法, 真菌 P450 又会因为浓度过低、操作时间



G. 玻璃研磨; B-1. 珠磨 1 min; B-2. 珠磨 2 min; U-1. 超声破碎, 250 W, 2 min; U-2. 超声破碎, 480 W, 1 min; U-3. 超声破碎, 480 W, 2 min; MG. 高速分散结合玻璃研磨; 各种方法与 MG 方法所获微粒体中比浓度的比值作为相对分离效果

图 3 不同破碎方法对黄孢原毛平革菌微粒体 P450 和 P420 分离效果的影响

Fig. 3 Effect of the methods for cell disruption on relative proportion of isolated P450 and P420 from *Phanerochaete chrysosporium*

偏长而失去活性。可见, 真菌细胞及其 P450 的特性使得破碎方法的选择和破碎条件的优化成为 P450 分离的关键问题。

2.3 白腐真菌 P450 的检测条件

在不同文献报道的 P450-CO 结合差光谱检测方法中, 通气条件、还原条件及检测操作流程不尽相同, 为明确适于白腐真菌 P450 的检测条件, 本研究较为系统地考察了还原剂浓度、样品池与对照池的还原剂投加差异、通气流量、通气时间、对照池通气、还原与通气的操作先后等条件对检测结果的影响。

2.3.1 还原条件

研究表明, 还原剂低亚硫酸钠的浓度是 P450 检测结果的主要影响因素之一。白腐真菌 P450 在不同还原剂浓度下检测结果如表 2。在本研究考察的浓度范围内, 低亚硫酸钠投加浓度较高(66.7 mg/mL)时, P450 特征峰最明显, 检测结果最稳定。若低亚硫酸钠投加量明显减小, 真菌 P450 和 P420 比浓度的检测值随之降低, 很可能是 P450 未被充分还原导致的。可见, 还原剂投加浓度应足够高, 但考虑到还原剂投加过大会使酶液中盐度过高, 引起蛋白质变性, 本研究建议还原剂投量控制在 66.7 mg/mL 即 0.4 mol/L。此外, 检测时样品池和对照池样本的还原剂投量差异如果超过 10%, CO 结合差光谱出现异常变化, P450、P420 检测值会显著偏低(如表 2)。

表 2 还原条件与检测操作流程对黄孢原毛平革菌 P450 检测结果的影响

Table 2 Effect of concentration of sodium dithionite, differing addition of sodium dithionite in the two cuvettes and sequence of bubbling and reduction on the specific concentration of *Phanerochaete chrysosporium* P450 determined by CO difference spectra

培养批次	还原剂浓度 /mg·mL ⁻¹	样品池对照池还原 剂浓度差异/%	检测操作流程	比浓度检测值/μmol·mg ⁻¹	
				P450	P450+ P420
1	5.0	< 2	先通气	38±29	132±71
1	16.7	< 2	先通气	75±12	320±35
1	66.7	< 2	先通气	156±11	556±32
1	66.7	> 10	先通气	未检出	106
2	66.7	< 2	先通气	98±7	387±15
2	66.7	< 2	先还原	55±1	250±4

本研究检测了未经诱导的黄孢原毛平革菌微粒体的氧化还原差光谱如图 4, 在 560 nm 和 530 nm 附近有波峰, 说明该真菌微粒体酶液中还含有其它 b 类细胞色素, 若还原剂浓度较低会被这些 b 类细胞色素消耗使 P450 无法充分还原. 而且 b 类细胞色素的还原态光谱在 420~430 nm 附近有较明显吸收峰, 若样品池、对照池还原剂浓度明显差异时这些细胞色素就会使差光谱中 420 nm 吸收值异常增大或减小.

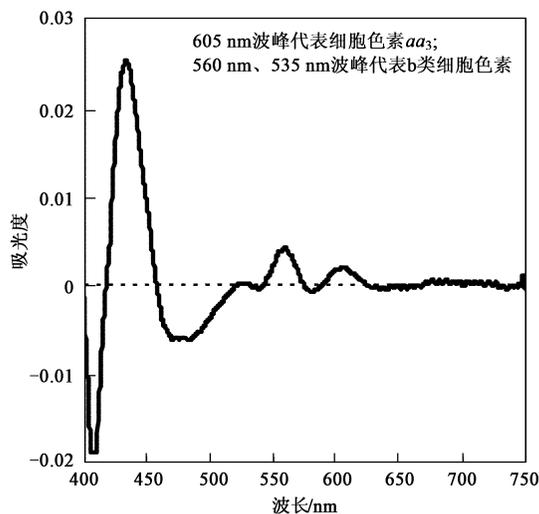


图 4 黄孢原毛平革菌微粒体氧化还原差光谱

Fig. 4 Reduced-minus-oxidized difference spectrum of microsomal fraction from non-induced cells of *Phanerochaete chrysosporium*

2.3.2 通气条件

对通气条件的研究结果显示, 样本单位体积通气流量在 2~10 mL/(min·mL) 范围内对检测结果影响不大, 流量为 10 mL/(min·mL) 的检测结果的精确度略高、更为稳定, 对于常用的 300 μL 微量比色皿可采用 3 mL/min 通气量; 在这一流量下, 通气时间 40 s 时 P450 检测值更高也更稳定, 更短时间 CO 传质效果不好, 更长时间则会造成 P450 的失活.

在哺乳动物肝细胞微粒体 P450 检测中, 对照池并不需要通入 N₂, 但是本研究结果显示, 若白腐真菌 P450 检测时对照池不通 N₂, 会引起 CO 差光谱的异常变化, 明显降低检测的精确度. 这是因为样品池通 CO 不仅会与还原态的血红素蛋白结合表现出特征光谱, 还会有一些“负面影响”, 例如大幅减小酶液中溶解的氧气浓度、通过气泡的扰动造成蛋白质的变性等, 真菌微粒体 P450 含量远远低于动物肝细胞的微粒体, 这些负面影响的干扰与检测结果在同一数量级, 只有在对照池中通入适量的 N₂, 才能够有效控制通气的负面影响, 使检测结果更接近真实值.

2.3.3 检测操作流程

已报道的 CO 结合差光谱检测操作流程有“先还原”^[24] 和“先通气”^[14] 2 种. 前者先在酶液中加入适量的还原剂再等量分装到样品池和对照池中扫描基线, 能够很方便地保证样品池和对照池酶液投加了等量还原剂, 而且 CO 的利用效率会更高, 所需的通气量会更少, 而后者则需要谨慎地控制还原剂投量和通气量. 但是, 本研究结果采用 2 种方法检测同一微粒体样本, 结果显示虽然“先还原”操作简便也更好控制, 但是 P450 和 P420 比浓度的检测值分别是“先通气”检测值的 56% 和 67% (如表 2), 说明先还原容易引起 P450 变性^[15], 使检测结果偏低.

另外, 在未经诱导的黄孢原毛平革菌微粒体氧化还原差光谱(如图 4) 中发现有 605nm 波峰, 说明存在少量细胞色素 aa₃, 该细胞色素的 CO 结合差光谱会在 444 nm 出现波谷^[25], 在未经诱导的真菌微粒体 CO 结合差光谱(如图 1) 中较为明显, 因此会使 P450 的特征峰发生红移(波长 > 450 nm), 并使检测结果略低于真实值. 经过诱导后微粒体中 P450 活性显著增大, 少量细胞色素 aa₃ 对 P450 含量的相互比较并不会造成太大干扰, 但若需要准确定量, 还是需要通过投加适量 KCN 消除细胞色素 aa₃ 的干扰.

3 结论

(1) 正己烷对黄孢原毛平革菌微粒体 P450 有显著的诱导作用; P450 的诱导量受正己烷的投加量和诱导时间的影响, 本研究条件下, 正己烷投加浓度为 2 $\mu\text{L}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 、诱导时间为 6 h 时, 微粒体 P450 比浓度最高, 达 140~160 pmo/mg 。

(2) 分离该真菌 P450 适宜采用高速分散结合玻璃研磨法破碎细胞。采用玻璃研磨、超声破碎和珠磨等其它方法会使细胞破碎率更低或更多 P450 失活。采用 CO 结合差光谱法检测该真菌 P450 时, 通气与还原条件对结果有显著影响, 必须谨慎控制才能获得可靠的检测结果; 而且该真菌微粒体酶液中会有少量细胞色素 *aa3*, 准确定量需要在通气前投加 KCN。

参考文献:

- [1] Bumpus J A, Tien M, Wright D, *et al.* Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus[J]. *Science*, 1985, **228** (4706): 1434-1436.
- [2] Sato R, Omura T. Cytochrome P-450[M]. Tokyo: Kodansha Ltd., 1978.
- [3] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [4] Martinez D, Larrondo L F, Putnam N, *et al.* Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, **22** (6): 695-700.
- [5] Doddapaneni H, Yadav J S. Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes *pe-1* (CYP63A1) and *pe-2* (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**(5): 559-565.
- [6] Doddapaneni H, Subramanian V, Yadav J. Physiological regulation, xenobiotic induction, and heterologous expression of p450 monooxygenase gene *pe-3* (CYP63A3), a new member of the CYP63 gene cluster in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Curr Microbiol*, 2005, **50**(6): 292-298.
- [7] Matsuzaki F, Shimizu M, Wariishi H. Proteomic and metabolomic analyses of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to exogenous benzoic acid[J]. *J Proteome Res*, 2008, **7**(6): 2342-2350.
- [8] Mougin C, Pericaud C, Malosse C, *et al.* Biotransformation of the insecticide lindane by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Pesticide Science*, 1996, **47**(1): 51-59.
- [9] Mougin C, Laugero C, Asther M, *et al.* Biotransformation of triazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Pesticide Science*, 1997, **49**(2): 169-177.
- [10] Teramoto H, Tanaka H, Wariishi H. Fungal cytochrome P450s catalyzing hydroxylation of substituted toluenes to form their hydroxymethyl derivatives[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **234**(2): 255-260.
- [11] Teramoto H, Tanaka H, Wariishi H. Degradation of 4-nitrophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **66**(3): 312-317.
- [12] Masaphy S, Levanon D, Henis Y, *et al.* Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **135**(1): 51-55.
- [13] Asperger O, Wirkner K, Schmidt M, *et al.* Detection of diverse cytochrome P450-dependent biooxygenation catalysts in microorganisms using a multipurpose inducer[J]. *Bioanalysis*, 1994, **10**: 233-246.
- [14] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes[J]. *J Biol Chem*, 1964, **239**(7): 2370-2378.
- [15] Schenkman J B, Jansson I. Spectral analyses of cytochrome P450[J]. *Meth Mol Biol*, 1998, **107**: 25-33.
- [16] Bhatnagar R K, Ahmad S, Kohli K K, *et al.* Induction of polysubstrate monooxygenase and aflatoxin production by phenolharboring in *Aspergillus parasiticus* nri1 3240[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, **104**(4): 1287-1292.
- [17] Kitts C L, Ludwig R A. *Azohizobium caulinodans* respire with at least 4 terminal oxidases[J]. *J Bacteriol*, 1994, **176**(3): 886-895.
- [18] Asperger O, Steinbrenner H, Lehmann A, *et al.* Induction and functional role of cytochromes P450 in the filamentous fungi *Mortierella alpina* ATCC 8979 and *Cunninghamella blakesleeana* DSM 1906 during hydroxylation of cycloalkylbenzoxazoles[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**(4): 516-522.
- [19] 许华夏, 李培军, 刘宛, 等. 真菌细胞色素 P450 与多环芳烃浓度及降解率的相互关系[J]. *农业环境科学学报*, 2004, **23**(5): 972-976.
- [20] Luyck D M A M, Prenafeta-Boldu F X, de Bont J A M. Toluene monooxygenase from the fungus *Cladosporium sphaerospermum*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **312**(2): 373-379.
- [21] Faber B W, van Gorcom R F M, Duine J A. Purification and characterization of benzoate-para-hydroxylase a cytochrome P450 (CYP53A1), from *Aspergillus niger*[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, **394**(2): 245-254.
- [22] 邱星辉, 刘薇, 冷欣夫. 棉铃虫 6 龄幼虫中肠与脂肪体微粒体 P450 酶系的比较[J]. *动物学报*, 2002, **48**(2): 208-212.
- [23] 宁大亮, 王慧, 庄芈, 等. 原位光谱法检测白腐真菌 P450 的诱导及其降解功能[J]. *高等学校化学学报*, 2007, **28**(8): 1469-1474.
- [24] Strauber H, Muller R H, Babel W. Evidence of cytochrome P450-catalyzed cleavage of the ether bond of phenoxybutyrate herbicides in *Rhizococcus erythropolis* K2-3[J]. *Biodegradation*, 2003, **14**(1): 41-50.
- [25] Kaminski P A, Kitts C L, Zimmerman Z, *et al.* *Azohizobium caulinodans* uses both cytochrome bd (quinol) and cytochrome *cbb3* (cytochrome c) terminal oxidases for symbiotic N_2 fixation[J]. *J Bacteriol*, 1996, **178**(20): 5989-5994.