

# 甲醛脱氢酶的纯化

## 摘要

甲醛是一种极具代表性的室内有机污染物，对人体危害极大。甲醛治理措施包括物理措施、化学措施及生物措施。生物措施因安全有效，不会带来再次污染，对长期迟缓释放的甲醛有良好的治理效果等好处，在甲醛治理中存在明显优势。细菌是净化甲醛的主要微生物，对长期迟缓释放的甲醛有良好的治理效果，并且生物手段具有高经济效益、无污染、操作简便等优点，但从霉菌中检测到 FADH 活性的报道较少。本课题选用经诱变处理后的甲醛抗性菌株-宛氏拟青霉菌，对其进行液体培养，从而得到菌体，依次通过超声波细胞破碎、硫酸铵沉淀、透析及柱层析，纯化得到活性高的 FADH。本实验的重点是通过 DEAE-Sephrose、Sephadex-G100、CM-Sephrose 三个柱层析条件的探索，提高酶活力，便于后期制成商品化产品投入市场，带来良好的经济和社会效益。结果表明：DEAE-Sephrose 层析上样量为 64 mL、洗脱流速为 1.5 mL/min，Sephadex-G100 凝胶过滤层析上样量为 5%CV、洗脱流速为 0.50 mL/min，CM-Sephrose 上样量为 3%CV、洗脱流速为 0.75 mL/min 时，对甲醛脱氢酶的分离纯化效果最佳。

**关键词：**宛氏拟青霉菌 甲醛脱氢酶 蛋白质纯化仪 层析柱条件优化 酶活力测定

# Purification of formaldehyde dehydrogenase

## Abstract

Formaldehyde is a representative indoor organic pollutant, which is harmful to human body. At present, three methods are used for Formaldehyde treatment. They are the physical method, the chemical method and the biological method, respectively. Because of its safety and efficiency, biological method can not produce secondary pollution, and has good control effect on formaldehyde released slowly for a long time, so it has obvious advantages in formaldehyde treatment. Bacteria are the main microorganisms for the purification of formaldehyde, which has good control effect on formaldehyde released slowly for a long time, and has the advantage of high economic benefit, no pollution and simple operation. However, there are few reports on the detection of FADH activity from mold. In this study, the formaldehyde-resistant strain *Penicillium Wan*, which was treated by mutagenesis, was cultured in liquid, and the bacteria were purified by ultrasonic cell fragmentation, ammonium sulfate precipitation, dialysis and column chromatography to obtain the highly active FADH. The key point of this experiment is to improve the enzyme activity by exploring the three column chromatography conditions of DEAE-sepharose Sephadex-G100 CM-sepharose, so as to make the commercial products into the market in the later stage, and bring about good economic and social benefits. The results showed that the amount of sample was 64 mL in the fraction DEAE-Sepharose chromatography, the flow rate of elution was 1.0 mL / min, the amount of sample in Sephadex-G100 gel filtration

chromatography was 5%CV, the elution rate was 0.50 mL / min CM-Sepharose was 3%CV, and the elution flow rate was 0.75 mL/min, the best separation and purification effect of formaldehyde dehydrogenase was obtained.

**Key words:** *Paecilomyces variotii*; formaldehyde dehydrogenase; Protein purifier; Chromatography purification condition optimization; Enzyme activity determination

# 目 录

1 引言 .....	1
1.1 甲醛简介 .....	1
1.1.1 甲醛的来源 .....	1
1.1.2 甲醛的危害 .....	1
1.1.3 甲醛的治理方法 .....	1
1.2 甲醛脱氢酶的作用机制 .....	2
1.3 甲醛脱氢酶的研究现状 .....	2
1.3.1 甲醛脱氢酶的结构 .....	2
1.3.2 甲醛脱氢酶的制备与纯化 .....	2
1.4 实验目的与内容 .....	3
2 材料与amp;方法 .....	4
2.1 实验材料 .....	4
2.1.1 菌种 .....	4
2.1.2 培养基 .....	4
2.2 主要试剂与溶液配制 .....	4
2.2.1 主要试剂 .....	4
2.2.2 溶液贮存 .....	5
2.3 主要仪器与设备 .....	5
2.4 实验方法 .....	5
2.4.1 F1-23 的活化 .....	5
2.4.2 F1-23 的液体培养 .....	6
2.4.3 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度 .....	6
2.4.4 FADH 的粗提取 .....	6
2.4.5 FADH 酶活的测定方法 .....	6
2.4.6 硫酸铵沉淀 .....	7
2.4.7 透析 .....	7
2.4.8 DEAE-Sephrose 层析条件的探索 .....	7
2.4.9 Sephadex-G100 凝胶过滤层析条件的探索 .....	8

2.4.10CM-Sephrose 层析条件的探索 .....	8
2.4.11SDS-PAGE 电泳 .....	9
<b>3 结果与分析 .....</b>	<b>10</b>
3.1 蛋白质标准曲线的绘制 .....	10
3.2DEAE-SephroseAKTA 层析图谱 .....	11
3.3Sephadex-G100 洗脱曲线 .....	13
3.4CM-Sephrose 洗脱曲线 .....	14
3.5SDS-PAGE 电泳 .....	15
3.6SFADH 的纯化效果 .....	15
<b>4 结论与展望 .....</b>	<b>17</b>
参考文献 .....	18
致谢 .....	19

# 1 引言

## 1.1 甲醛简介

### 1.1.1 甲醛的来源

甲醛是一种极具代表性的室内有机污染物，长期存在于室内空间，是室内空气污染中主要污染物之一。室内甲醛的主要来源有两个方面，包括室内污染和室外污染。室外的甲醛污染气体在特定情况下可以进入室内，导致室内空气中含有较高的甲醛含量。室内甲醛则主要来源于日用品和室内装修材料。其中，室内装修材料是目前室内甲醛污染的首要来源<sup>[1]</sup>。

### 1.1.2 甲醛的危害

甲醛是一种原生物质，可经由吸入及皮肤接触对人体健康造成危害，它对人体的毒害涉及多系统、多器官。它对人的呼吸系统、免疫系统、肝脏、皮肤、内分泌系统都会产生危害。严重的还会产生胚胎毒性，引起胚胎畸形。甲醛还具有致癌作用，早在 2004 年国际癌症权威机构已将甲醛定义为第一类致癌物。另外，大量科学家研究发现甲醛污染可能与白血病的发生有关，但尚无证据证明两者间的因果关系<sup>[2]</sup>。不同浓度的甲醛对人体形成的危害具体表现为：当空气中甲醛的浓度达  $0.06\text{mg}/\text{m}^3 \sim 0.07\text{mg}/\text{m}^3$  时，儿童会发生气喘；达到  $0.1\text{mg}/\text{m}^3$  时，就有异味和不适感；达到  $0.5\text{mg}/\text{m}^3$  时，会刺激眼睛，导致流泪；达到  $0.6\text{mg}/\text{m}^3$  时可引起咽喉不适；浓度更高时，可引起恶心、呕吐、咳嗽、胸闷，甚至肺气肿；甲醛至  $30\text{mg}/\text{m}^3$  时，会马上致死<sup>[3]</sup>。

### 1.1.3 甲醛的治理方法

目前处理甲醛有三种办法，即物理办法、化学办法和生物办法。物理办法效率较低，效果较差，不能从根本上解决甲醛污染。化学办法效率较高，不过成本也较高，并且可能产生二次污染，治理效果易受限制。生物办法安全有效，无二次污染，对长期迟缓释放的甲醛治理效果优良，而且生物技术高经济效益、无污染、操作简单，能弥补物理和化学方法净化甲醛的缺点和弊端，因而受到广泛科研工作者和社会各界的关注，对净化空气和保护人类健康具有至关重要的意义<sup>[4]</sup>。生物方法主要有植物净化法和微生物降解法两种方法。植物净化法仅用于室内甲醛气体浓度很低的情况下，植物净化虽然作用时间久，但效

果不够明显<sup>[5]</sup>。微生物因其独特的生物特性，在甲醛降解中具有广阔的前景。微生物类别多、代谢类型广且代谢效率高，可利用非碳碳键、低碳化合物等作为碳源兼能源，进而将有害物质转化为无毒或有益物质<sup>[6]</sup>。细菌是净化甲醛的主要微生物，对长期迟缓释放的甲醛有良好的治理效果，并且生物技术经济效益高、无污染、操作简略，但从霉菌中检测到 FADH 活性的报道较少<sup>[7]</sup>。

## 1.2 甲醛脱氢酶的作用机制

NAD<sup>+</sup>和依赖型 GSH 对甲醛解毒的主要过程分为以下 4 步：(1)在特异性甲酸运载体的作用下甲醛从胞外运至胞内，再与 GSH 自发缩合形成 S-羟甲基谷胱甘肽 (HMGS)；(2) HMGS 在 FAD 在的作用下氧化为 S-甲酰谷胱甘肽，同时伴随着 NAD<sup>+</sup>到 NADH 的转换；(3)S-甲酰谷胱甘肽在 S-甲酰谷胱甘肽水解酶(FGH)的作用重新产生 GSH 并形成一分子甲酸；(4)甲酸在甲酸脱氢酶的作用下转化为二氧化碳，同时伴随着分子 NADH 的产生<sup>[8]</sup>。

## 1.3 甲醛脱氢酶的研究现状

### 1.3.1 甲醛脱氢酶的结构

甲醛脱氢酶是中等锌链醇脱氢酶家族中的一员，存在于绝大多数原核以及一切的真核生物中，对于微生物的甲醛解毒具有重要作用。分析发现的亚基分子量大小都在 40KD 左右，凝胶过滤层析显示出存在有二聚体和四聚体两种情况。大部分通常需要和谷胱甘肽参与甲醛的氧化。恶臭假单胞菌中的甲醛脱氧酶（是目前发现的唯一一个不需要参与即可以氧化甲醛的酶）<sup>[9]</sup>。

### 1.3.2 甲醛脱氢酶的制备与纯化

细菌是净化甲醛的主要微生物，降解甲醛的真菌报道相对较少。甲醛脱氢酶在细菌<sup>[10]</sup>和酵母菌<sup>[11]</sup>中均有发现。目前，净化甲醛的细菌主要有恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌、产碱假单胞菌、甲基营养菌等。假单胞菌属和甲基营养菌是净化甲醛的主要细菌<sup>[12]</sup>。这些菌种都可以通过分离纯化得到相应的甲醛脱氢酶。但是来源不同的甲醛脱氢酶降解甲醛的效果也各不相同，因此尽量筛选不同的甲醛降解菌，并对其分离纯化，将得到的高纯度酶液用于实际的甲醛治理，通过比较不同菌种筛选的难易、保藏条件及纯化条件，提纯出的甲醛脱氢酶的酶学性质及固定化的难易和甲醛治理的效果，以便找到最适合的甲醛降解

菌。从目前的报道来看，来源于曲霉属的 FADH 研究较多<sup>[13]</sup>，但来源于其他属的霉菌鲜有报道，故本实验利用具有甲醛抗性的宛氏拟青霉菌作为提取甲醛脱氢酶的对象，并通过一系列的生化实验手段进行纯化，主要通过三步柱层析条件的优化，寻找最佳纯化条件，获得高纯度的甲醛脱氢酶液。由于目前对甲醛脱氢酶的研究尚不成熟，因此将甲醛脱氢酶投入市场并应用于实际生活仍需较长时间。

#### **1.4 实验目的与内容**

本课题选择宛青拟霉菌为试验菌株，通过液体培养及一系列的生化分离手段，将其产生的甲醛脱氢酶纯化分离。本实验主要通过柱层析条件的探索，并以酶活为指标，提高酶活力。主要从柱子的上样量及流速等方面来研究甲醛脱氢酶的最佳纯化条件。



## 2 材料与amp;方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 菌种

以拟青霉菌为出发菌株，通过紫外诱变，处理后得到的甲醛抗性突变株 F1-23 (*Paecilomyces variotii* F1-23)，该菌株由××××学院生物与食品工程学院实验室选育保存<sup>[14]</sup>。

#### 2.1.2 培养基

固体培养基：葡萄糖 20 g，琼脂 20 g，硝酸钠 2 g，三水合磷酸氢二钾 1 g，七水合硫酸镁 0.5 g，三水合硫酸亚铁 0.01 g，蒸馏水 1000 mL，pH6.7。

液体培养基：葡萄糖 20 g，牛肉膏 4 g，氯化钾 0.5 g，七水合硫酸镁 1 g，三水合硫酸亚铁 0.01 g，蒸馏水 1000 mL，pH7.5。

### 2.2 主要试剂与amp;溶液配制

#### 2.2.1 主要试剂

0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0)：2.4228 g Tris 溶于近 1000 mL 去离子水中，用 1 mol/L HCl 调 pH，调节 pH 计至 8.0，并定容至 1000 mL。

6.0 mmol/L 辅酶 I 溶液：取 0.3980 g 辅酶 I，溶于适量去离子水中，并定容至 100 mL。

60 mmol/L 谷胱甘肽溶液：0.18437 g 谷胱甘肽溶于 10 mL 去离子水中。

0.02 mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液 (含 1 mol/L NaCl)：各取 2.4228 g Tris 和 58.5 g NaCl 溶于一定的蒸馏水中，然后两者混合，加蒸馏水至近 1000 mL，用 1 mol/L HCl 调 pH，调节 pH 计至 8.0，并定容到 1000 mL。

2% NaHCO<sub>3</sub>：取 20 g NaHCO<sub>3</sub> 溶于适量蒸馏水中，并定容至 1000 mL。

1 mmol/L EDTA (pH8.0)：取 0.29224 g EDTA 溶于近 1000 mL 蒸馏水，用 KOH 调 pH，调节 pH 计至 8.0，并定容至 1000 mL。

染液：考马斯亮蓝 G250，称取 0.01 g 考马斯亮蓝 G250 溶于 5 mL 95% 乙醇，再加入 10 mL 浓磷酸，然后加蒸馏水定容凝胶贮备液：丙烯酰胺 29.2 g，亚甲基双丙烯酰胺 0.8 g，加重蒸水至 100 mL。

分离胶缓冲液：18.15 g Tris，加约 80 mL 重蒸水，用 1 mol/L HCl 调 pH 到 8.8，用重蒸

水稀释至最终体积为 100 mL。

浓缩胶缓冲液：6 g Tris，加 60 mL 重蒸水，用 1 mol/L HCl 调 pH 至 6.8，用重蒸水稀释至最终体积为 100 mL。

10% SDS：取 10 g SDS 溶于 100 mL 蒸馏水中。

0.1% 溴酚蓝：取 0.1 g 溴酚蓝溶于 3 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液中，于研钵中充分研磨，然后定容到 100 mL。

2 倍还原缓冲液：取 2.5 mL 浓缩胶，2.0 mL 甘油，4.0 mL 质量浓度 10% SDS，0.5 mL 质量浓度 0.1% 溴酚蓝，1.0 mL 巯基乙醇，混匀。

电极缓冲液：Tris 3 g，甘氨酸 14.4 g，SDS 1.0 g，加重蒸水至 1000 mL。

低相对分子质量标准蛋白质：开封后溶于 200  $\mu$ g 重蒸水，加 200  $\mu$ g 2 倍样品缓冲液，分装 20 小管。

质量浓度为 10% 的过硫酸铵：取 10 g 过硫酸铵溶于 100 mL 蒸馏水，此溶液应在临用时配制。

### 2.2.2 溶液贮存

凝胶贮备液、分离胶缓冲液、浓缩胶缓冲液和电极缓冲液需要贮存在 4  $^{\circ}$ C 冰箱中，且凝胶贮备液需要在一个月内使用。

分装好的低相对分子质量标准蛋白需保存在 -20  $^{\circ}$ C。

## 2.3 主要仪器与设备

立式压力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）、GH 隔水式培养箱（北京科伟永兴仪器有限公司）、全温度摇瓶柜（太仓市豪诚实验仪器制造有限公司）、台式 pH 计（Mettler Toledo）、超声波破碎仪（LNB）、超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）、紫外可见分光光度计、台式高速冷冻离心机（湖南凯达科学仪器有限公司）、WGL-230B 电热鼓风干燥箱（天津市泰斯特仪器有限公司）、电热恒温水浴锅（江苏金坛宏凯仪器厂）、微电脑电陶炉（佛山市顺德区爱卡生活电器有限公司）、电子天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）、微量注射器、抽滤装置、AKTA 蛋白质纯化仪、层析柱（上海厦美生物科技有限公司）、HL-2 恒流泵、HD-9705 紫外检测仪、BSZ-160F 电脑自动部分收集器（上海精科实业有限公司）、垂直平板电泳槽（北京六一仪器厂）、稳压电泳电源等。

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 F1-23 的活化

将保存在-4 °C冰箱中的 F1-23 菌种取出，待其恢复至室温后，斜面接种，于 28 °C 恒温培养箱中下培养 3 天。

### 2.4.2 F1-23 的液体培养

在 250 mL 的锥形瓶中装入 90 mL 的液体培养基，灭菌条件为 121 °C，15 min。在每瓶中加入 10 μL 的甲醛溶液，并接入 1-2 环的 F1-23，在 25 °C、180 rpm 的条件下培养一周左右<sup>[12]</sup>。

### 2.4.3 蛋白质标准曲线的测定

取 7 支干净的试管，按 0-6 进行编号，每支试管中加入 4 mL 考马斯亮蓝染液，取不同量的标准蛋白液和 0.9% 的 NaCl 溶液，使蛋白质浓度依次为 0、10、20、30、40、60、80 μg/mL。充分混匀后，室温静置 3 min，以 0 号管为空白，于波长 595nm 处，测得吸光度并记录数据，以吸光度为纵坐标，各标准液浓度为横坐标作图即得标准曲线<sup>[15]</sup>。

### 2.4.4 FADH 的粗提取

FADH 为胞内酶，实验对比发现超声波细胞破碎法效果更佳，故采取超声粉碎法作为细胞破碎的方案。粗酶液的制备：将过滤后的菌丝保留，称取其湿重。以菌丝湿重：石英砂：缓冲液按 1:1:2 的比例混合，先用研钵在冰浴上研磨一段时间至菌体明显被破碎，再置于冰浴中用超声波破碎仪进行破碎，破碎参数是功率 700 w，工作 5 s，间隙 7 s<sup>[16]</sup>。破碎结束后，用沾有乙醇的棉球轻轻擦拭超声波破碎仪的探头。设置低温冷冻离心机的转速为 10000 rpm，温度为 4 °C，离心 10 min。去除沉淀，保留上清液待用<sup>[14]</sup>。

### 2.4.5 FADH 酶活的测定方法

表 1 甲醛脱氢酶酶活测定的反应体系

Table 1 Reaction system for determination of formaldehyde dehydrogenase activity

单位: mL	样品	空白
Tris-HCl 缓冲液	2.00	2.10
辅酶 I	0.50	0.50
还原型谷胱甘肽	0.10	0.10
甲醛	0.10	0.10
酶液	0.10	0

酶活的定义：在 37 °C、pH8.0 的条件下，每分钟催化生成 1 μmol 的 NADH 为 1 个酶活单位，用 U/mg 菌丝表示。 $U/mL = (A_{340nm}/min) / (6.22 \times (mg \text{ 菌丝}/mL \text{ 酶液}))$ 。 $U/mg = U \times 1000 / (A_{595nm}/K)$ 。其中:6.22 为 1 mmol 的 NADH 在 340nm 处的吸光系数，K 为蛋白质标准曲线的系数。

#### 2.4.6 硫酸铵沉淀

盐析主要是利用不同蛋白质在不同的盐浓度下溶解度不同，不断改变盐浓度，使蛋白质先后析出。盐析一般选用氯化钠、硫酸铵、硫酸镁等中性盐。但因硫酸铵具有溶解度大、价格低廉及比较温和不易使蛋白质变性等优点，故本实验选用硫酸铵沉淀。经研究，硫酸铵溶液饱和度为 80% 时，FADH 粗提液中的目的酶几乎能够被全部沉淀。尽可能将硫酸铵研磨粉碎，待用。在上述收集的上清中加入已研磨好的硫酸铵粉末，少量多次缓慢加入，使其饱和度达到 30%，在 4 °C 的冰箱中放置 2 h，10000 rpm，4 °C 冷冻离心后，弃去沉淀，保留上清；在上清中继续加入硫酸铵粉末，使其饱和度达到 80%，按上述同样操作，4 °C 的冰箱中放置 1.5 h，10000 rpm，4 °C 冷冻离心后，弃去上清，保留沉淀，将沉淀复溶于 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中<sup>[14]</sup>。

#### 2.4.7 透析

透析袋的一端用透析夹夹紧，加入少量重蒸水后给予适当挤压透析袋，确定是否漏水。加入盐析后的复溶酶液（留出 1/3-1/2 的空间）。用透析夹夹住另一端，使透析袋完全浸没的透析液中，透析液为 0.02 mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液。透析液的更换的间隔时间约为 8 h。最后用 BaCl<sub>2</sub> 检查是否残留 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，若透析液中出现白色沉淀则继续透析，反之，若无白色沉淀则透析结束<sup>[17]</sup>。

#### 2.4.8 DEAE-Sepharose 层析条件的探索

AKTA 蛋白质纯化仪的操作方法：先将处理好的 DEAE-Sepharose 凝胶加入到蛋白柱中，确保装柱均匀，无气泡和分层。接着将装好的柱子连接到蛋白质纯化仪上，连接时，柱上端与蛋白质纯化仪的下端相连，柱下端与蛋白质纯化仪的上端相连。然后打开电脑和相应仪器的开关，打开桌面上的 UNICORN 图标，进入操作界面。将 A1、A2 管放入去离子水中，设置 B 为 50%，清洗一段时间后，再将它们放入起始缓冲液中，平衡一段时间至基线稳定。然后将 B 设置为 0%，A1 管道放入一定体积的粗酶液中进行进样。进样完成后，将 A1、A2 管道再次放入起始缓冲液中，将 B 设置为 50%，运行至样品峰被完全洗脱下来，

基线再次水平。再将 A2 管道放入 0.02 mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液（含有 1 mol/L NaCl），设置 B 为 10%，进行洗脱，如果未出现洗脱峰或出现洗脱峰后基线再次水平，则改变 B 为 20%进行洗脱，操作同上。最后设置 B 为 100%，将所有蛋白洗脱下来。洗脱结束后，用 2 mol/L NaCl 溶液、去离子水和 20%乙醇依次清洗整个系统，清洗至基线稳定、pH 基本不变即清洗完成。取下柱子，置于-4℃冰箱保存<sup>[18]</sup>。

洗脱流速对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响：分别设置流速为 1.0 mL/min、1.5 mL/min、2.0 mL/min，由 AKTA 层析图谱得出最佳流速。

样品上样量对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响：分别设置粗酶液的上样量为 8 mL、32 mL 和 64 mL，根据 AKTA 层析图谱，得出最佳上样量。

#### 2.4.9 Sephadex-G100 凝胶过滤层析条件的探索

Sephadex-G100 凝胶过滤层析：首先取 5 g Sephadex-G100 凝胶粉末，加入 50 mL 蒸馏水，置于沸水浴中处理 3h，然后真空抽滤，将液体抽干，再加入 50 mL 洗脱液处理 1h。将处理好的凝胶沿柱内壁加入到层析柱中，使其自然沉降。当其沉降结束后，用洗脱液平衡过夜。平衡结束后，将紫外检测仪旋转到 A280<sub>nm</sub> 处，灵敏度旋转到 100T%，调节光量旋钮，使采集信号为 100，接着将灵敏度旋转到 1A，调节 A 调零旋钮，使采集信号显示为 0。接着量取一定体积的酶液，用胶头滴管沿柱内壁缓慢地加入到层析柱中，再用少量缓冲液清洗柱内壁。然后设置流速，设置自动部分收集器的收集规格，设置完毕后，即可用洗脱液进行洗脱。洗脱完成后，先用大量的初始缓冲液进行清洗，再用 2-3 倍蒸馏水过柱。最后将凝胶溶于 20%的乙醇溶液，并置于-4℃的冰箱中保存<sup>[19]</sup>。

洗脱流速对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响：选用 0.25 mL/min、0.50 mL/min、0.75 mL/min、1.0 mL/min 的流速，分别得到相应的洗脱曲线，从而得到最佳的流速。

样品上样量对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响：选用 1%CV、2%CV、3%CV、4%CV、5%CV、6%CV 的上样量，并绘制洗脱曲线，根据洗脱曲线得出最佳上样量。

#### 2.4.10 CM-Sepharose 层析条件的探索

按照 Sephadex-G100 凝胶过滤层析的方法进行装柱、平衡和上样，洗脱按照 DEAE-Sepharose 离子交换层析的方法进行，但是更换离子强度的标志变为 A280<sub>nm</sub> 处的吸光度变为 0 或接近 0<sup>[20]</sup>。

洗脱流速对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响：选用 0.25 mL/min、0.5 mL/min、0.75 mL/min、1.0 mL/min 的流速，分别得到相应的洗脱曲线，从而得到最佳的流速。

样品上样量对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响：选用 1%CV、2%CV、3%CV、4%CV 的上样量，并绘制洗脱曲线，根据洗脱曲线得出最佳上样量。

#### 2.4.11 SDS-PAGE 电泳

采用 5% 的分离胶和 12% 的浓缩胶，通过制胶器制胶。上样时，酶液与 2x 蛋白上样缓冲液按 1:1 的比例混合后，置于沸水浴处理 3-5 min，然后取 20  $\mu\text{L}$  上样。电泳时先用 80 V 电压电泳至分离胶与浓缩胶的分界处，再改用 120 V 电压电泳至分离胶底部 1 cm 左右，停止电泳。取出胶体，放入大平皿中，加入适量染色液，置于振荡器上混合 1h，然后用脱色液洗脱至背景清晰。根据相对迁移率，判断酶分子的分子量<sup>[21]</sup>。

### 3 结果与分析

#### 3.1 蛋白质标准曲线的绘制

表 2 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度

Table 2 Determination of protein concentration by Coomassie brilliant Blue method

	0(空白)	1	2	3	4	5	6
标准蛋白液/mL	-	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
0.9%NaCl/mL	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.4	0.2
考马斯亮蓝染液/mL	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
蛋白质浓度 (μg/mL)	0	10	20	30	40	60	80
A595nm	0	0.024	0.127	0.206	0.305	0.450	0.573

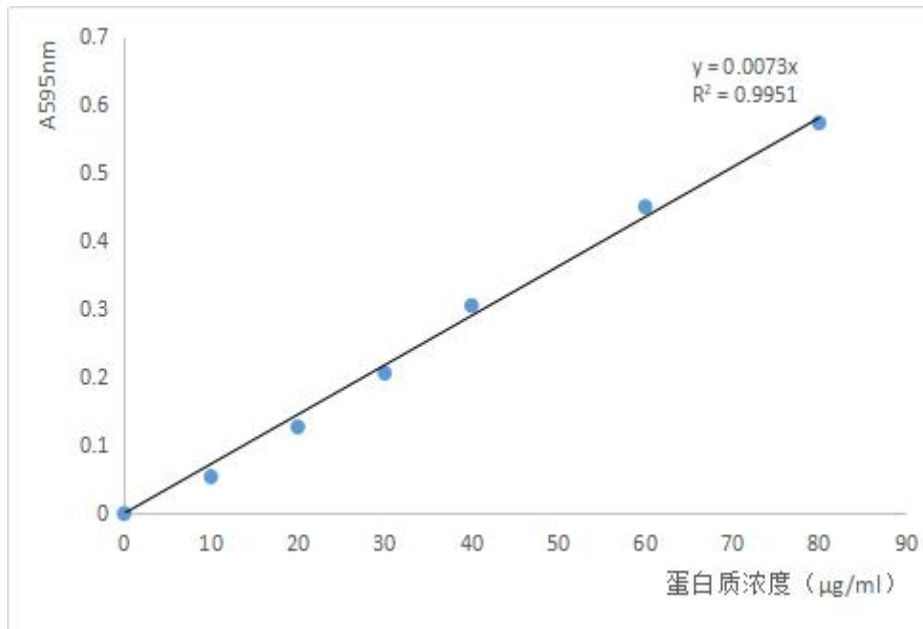


图 1 蛋白质的标准曲线

Fig.1 Standard protein curve

### 3.2 DEAE-sepharose AKTA 层析图谱

#### 1、洗脱流速对甲醛脱氢酶纯化效果的影响

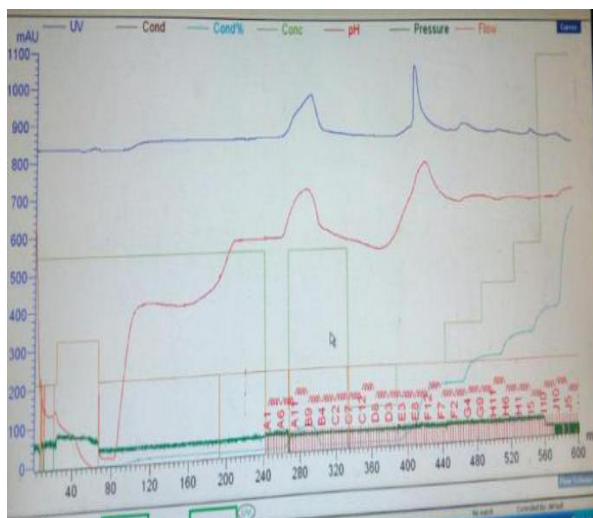


图 2 洗脱流速为 2.0 mL/min

Fig.2 Flow rate of elution was 2.0 mL/min

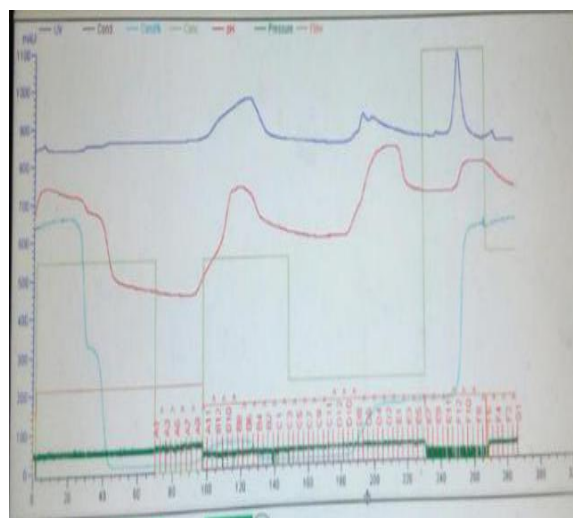


图 3 洗脱流速为 1.5 mL/min

Fig.3 Flow rate of elution was 1.5 mL/min

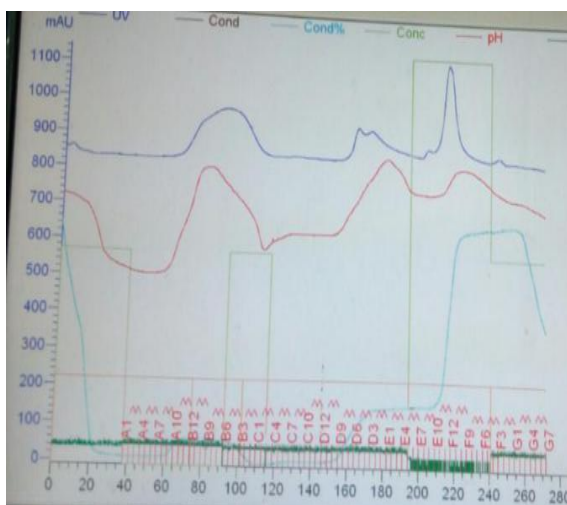


图 4 洗脱流速为 1.0 mL/min

Fig.4 Flow rate of elution was 1.0 mL/min

由图 2、3、4 可以发现：甲醛脱氢酶的粗酶液经过 DEAE-Sepharose 柱层析后出现了三个蛋白峰。当洗脱液含有的 NaCl 浓度为 0.2 mol/L 和 1.0 mol/L 时，出现了较为明显的蛋白峰，而其他浓度下均无明显蛋白峰出现。通过对蛋白峰的收集液进行甲醛脱氢酶的酶活测定，发现峰 1 即穿透峰有较高的酶活性，峰 2 为杂蛋白，峰 3 洗脱的是少量残留甲醛脱氢酶。当洗脱流速为 2.0 mL/min 时，只出现了两个明显的蛋白峰，可能是因为残留物质被提前洗脱了，分离效果较差。而以 1.5 mL/min 和 1.0 mL/min 洗脱时，展现出三个峰。且



就峰形而言，1.5 mL/min 的峰 1、峰 3 峰更尖锐，峰宽较窄，1.0 mL/min 的峰宽较大。所以流速为 1.5 mL/min 时对甲醛脱氢酶的分离效果更好。

2 上样量对甲醛脱氢酶纯化效果的影响

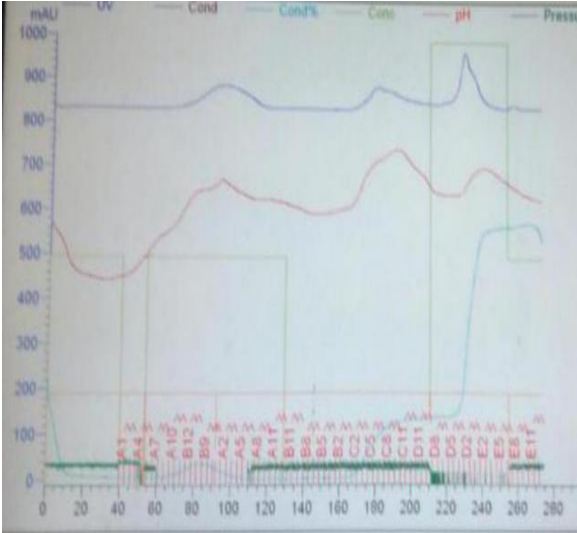


图 5 上样量为 8 mL

Fig.5 Sample loading was 8 mL

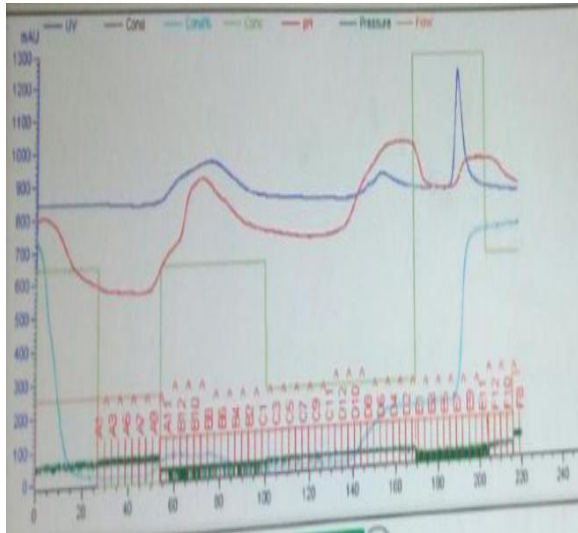


图 6 上样量为 32 mL

Fig.6 The sample size was 32 mL

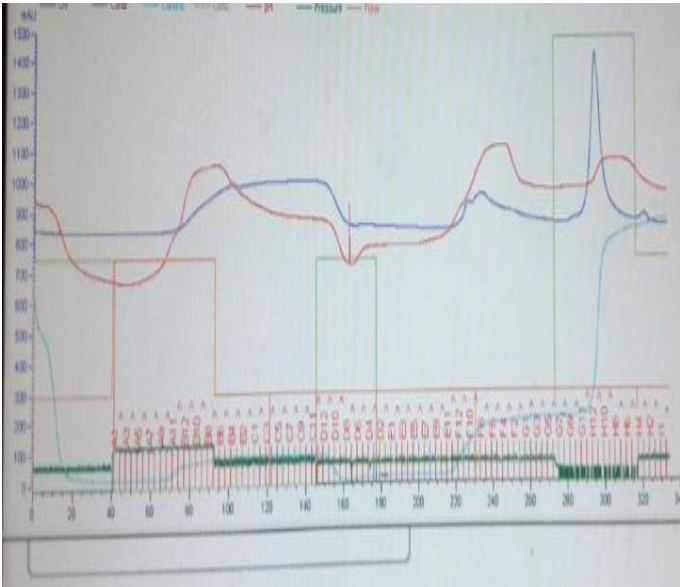


图 7 上样量为 64 mL

Fig.7 The sample size was 64 mL

由图 5、6、7 可知：上样量越大，峰 1 的峰宽就越大，峰 3 的峰高就越高。经过检测发现 64 mL 上样量时，酶活最高，分离效果最佳。但是因为上样量大，导致上样时间长，分离时间较长，影响效率，故可以先将粗酶液进行浓缩后再上样。

### 3.3 Sephadex-G100 洗脱曲线

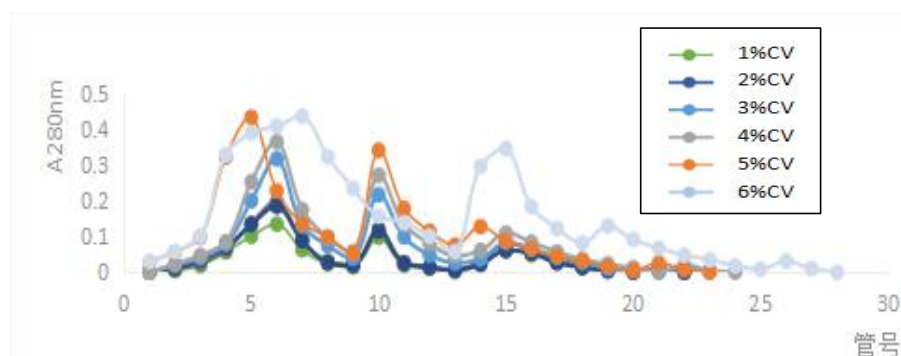


图 8 上样量对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响

Fig.8 Effect of sample concentration on purification of formaldehyde dehydrogenase

由图 8 可得：不同上样量时洗脱曲线的峰形不同。在 1%CV-5%CV 时，随着上样量的增多，峰 1、峰 2、峰 3 的峰高有比较明显的增加，尤其是峰 1、峰 2 增加更为明显。而当上样量增加到 6%CV 时，峰高与 5%CV 时差不多，基本没有增加，但是峰宽明显变大，故甲醛脱氢酶的上样量在 5%CV 时纯化效果最佳。通过酶活测定，发现峰 2 为降解酶存在峰。

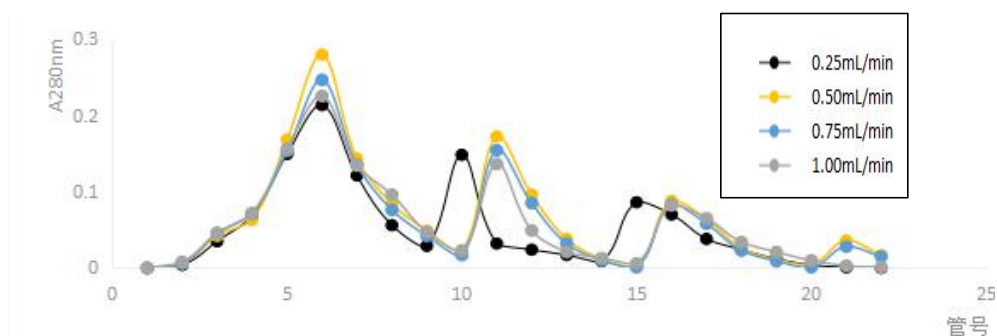


图 9 洗脱流速对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响

Fig.9 Effect of elution flow rate on the separation and purification of formaldehyde dehydrogenase

由图 9 可知：洗脱流速不同，洗脱曲线也存在明显不同。当洗脱流速为 0.25 mL/min、1.0 mL/min 时，有 3 个峰，而洗脱流速为 0.5 mL/min、0.75 mL/min 中时，有 4 个峰，故以 0.5 mL/min 和 0.75 mL/min 洗脱时，洗脱效果较好。而以 0.5 mL/min 洗脱时，峰高更高，故 0.5 mL/min 洗脱流速对甲醛脱氢酶的分离纯化最佳。通过测定酶活，峰 2 为降解酶的峰。

### 3.4CM-Sepharose 洗脱曲线

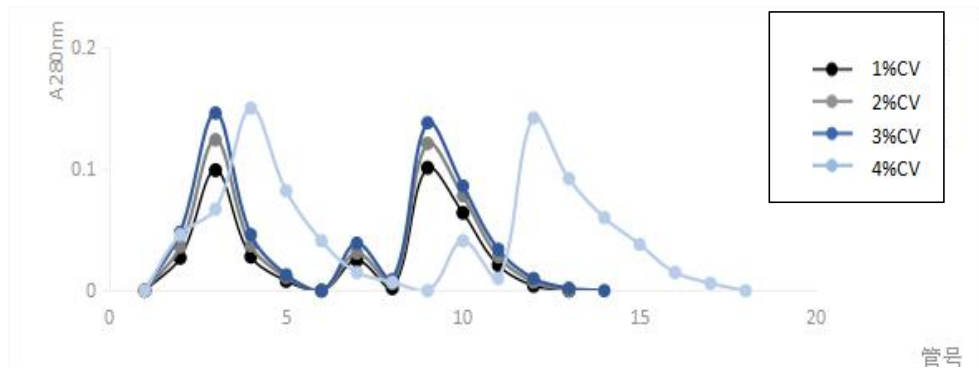


图 10 上样量对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响

Fig.10 Effect of sample concentration on purification of formaldehyde dehydrogenase

由图 10 可得：在 1%CV-3%CV 时，随着上样量的增多，峰 1、峰 2、峰 3 的峰高有比较明显的增加，尤其是峰 1、峰 2 增加更为明显。而当上样量增加到 4%CV 时，峰高与 3%CV 时差不多，基本没有增加，但是峰宽明显变大，故甲醛脱氢酶的上样量在 3%CV 时纯化效果最佳。通过酶活测定，发现峰 3 为甲醛降解酶的主峰。

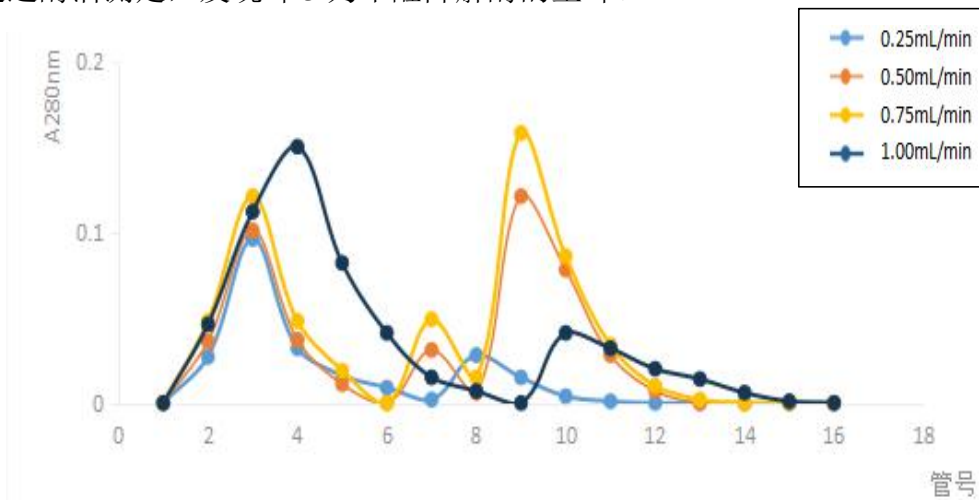


图 11 洗脱流速上样量对甲醛脱氢酶分离纯化效果的影响

Fig.11 Effect of flow rate of elution on the purification of formaldehyde dehydrogenase

当洗脱流速为 0.25 mL/min、1.0 mL/min 时，有 2 个峰，而洗脱流速为 0.5 mL/min、0.75 mL/min 中时，有 3 个峰，因此以 0.5 mL/min 和 0.75 mL/min 洗脱时，洗脱效果较好。而以 0.75 mL/min 洗脱时，峰高更高，故 0.75 mL/min 洗脱流速对甲醛脱氢酶的分离纯化最佳。通过测定甲醛脱氢酶的活性，发现其主要存在于峰 3。

### 3.5 SDS-PAGE 电泳

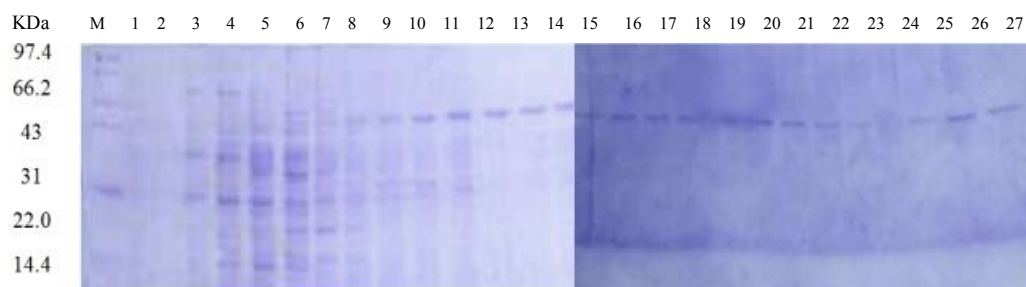


图 12 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.12 SDS-PAGE electrophoresis

M: 为低分子量的标准蛋白 maker, 泳道 3 为发酵液, 泳道 4 为 40%蔗糖浓缩的发酵液, 泳道 5 为经 PEG 浓缩的发酵液, 泳道 6 为破碎离心上清液, 泳道 7 为 30%硫酸铵盐析液, 泳道 8 为 80%硫酸铵盐析液, 泳道 9、10、11 为透析液, 泳道 12、13、14 为层析时高活性的酶液。泳道 15-21 为 DEAE-Sepharose 层析液, 泳道 22-24 为 Sepharose-G100 层析液, 泳道 25-27 为 CM-Sepharose 层析液体。

由图 12 可知, 甲醛脱氢酶经过一系列的纯化后, 纯度显著提高, 纯化效果良好。甲醛脱氢酶的亚基分子量约为 42KD。

### 3.6 FADH 的纯化效果

表 2 FADH 纯化各步骤酶活的变化

Table 2 Changes of enzyme activity in each step of FADH purification

步骤	蛋白质含量 (mg)	总酶活(U)	比酶活 (U/mg)	回收率(%)	纯化倍数
粉碎离心上清液	353.93	30868	87.21	100	1
30%盐析	50.04	12862	257.03	41.67	2.95
80%盐析	42.02	11254	267.82	36.46	3.07
透析	34.75	9968	286.85	32.29	3.29
DEAE-Sepharose 层析	21.4	6572	307.10	21.29	3.52
Sephadex-G100 层析	18.6	6018	323.55	19.50	3.71
CM-Sepharose 层析	17.2	5864	335.09	19.00	3.84

由表 2 可知, 在甲醛脱氢酶的制备过程中, 酶活会有比较大的损失。在制备过程中,

经超声波细胞破碎后的粗酶液，酶活较高，但杂蛋白含量也比较高，需要经过后续处理才能得到高纯度的甲醛脱氢酶。在后续处理中，盐析操作时损失的酶活较高，与未经纯化的粗酶液比，降低了 63.54%；经三步柱层析处理后比酶活有了一定的提高，较原来纯度提高了 3.84 倍，可用于后续的酶学性质研究。

## 4 结论与展望

随着生活水平和科学技术的发展，人们越来越关注自身的健康问题，对室内甲醛含量的关注也日益增加。室内甲醛对人类的健康威胁较大，而且很难避免。因此，甲醛降解方面的研究是一个热门课题，具有巨大的发展潜力，也会带来巨大的经济效益和社会效益。

实验的最终结果是通过一系列的生化分离得到了纯度较高的甲醛脱氢酶酶液。当 DEAE-Sephrose 层析上样量为 64 mL、洗脱流速为 1.5 mL/min，Sephadex-G100 凝胶过滤层析上样量为 5%CV、洗脱流速为 0.50 mL/min，CM-Sephrose 上样量为 3%CV、洗脱流速为 0.75 mL/min 时，对甲醛脱氢酶的分离纯化效果最佳。但是实验主要是通过对三步柱层析条件进行优化来纯化甲醛脱氢酶，操作相对复杂、耗时久而且纯化的花费较高，故在实际生产中有一定的局限性。因此，可以考虑直接采用三级色谱柱连用，或者利用亲和层析纯化。也可以先测出甲醛脱氢酶的等电点，直接采用两步柱层析纯化酶液。

甲醛脱氢酶的特异性和灵敏性很高，便于检测和治理甲醛。但是甲醛脱氢酶对环境要求高，温度、湿度、酸碱度都会影响它的活性；其次这类物质的稳定性差，易分解，所以无法保证长期的除甲醛效果；最后这类方法的安全性尚待验证，因为该类技术仍处在研究阶段。本实验尚未对甲醛脱氢酶进行固定，故还无法直接应用于家庭，也不能直接降解空气中的甲醛。甲醛脱氢酶的固定化方法的研究是至关重要的，如果该方面取得较大进展，对于家庭的甲醛治理将会十分有益。

## 参考文献

- [1] 罗洪镁. 室内甲醛污染来源、危害及防治技术研究进展[J]. 节能环保, 2016:288.
- [2] 孙兆东. 甲醛的危害及防治方法简述[J]. 科技风, 2014(14):194-200.
- [3] 杨华萍. 室内甲醛检测方法及防治措施研究进展[J]. 研究与开发, 2017, 43(10):124.
- [4] 白丽丽. 室内甲醛污染及防治措施的研究[J]. 资源节约与环保, 2015, (04):60-63.
- [5] 景荣荣. 7种室内耐阴观叶植物对甲醛污染的耐胁迫能力及净化能力研究[D]. 山东建筑大学, 2017:1-2.
- [6] 胡秀芳, 谢梦梦, 邵雪莲. 微生物对甲醛的净化效应与作用机制[J]. 生物资源, 2017, 39(04):257-258.
- [7] 姚璐晔, 李欣怡, 史琦琳, 等. 宛氏拟青霉菌甲醛脱氢酶的分离纯化及酶学性质[J]. 生物技术, 2016, 26(06):587-592.
- [8] 张婧. 甲醛分解途径关键酶的原核表达与纯化及应用研究[D]. 昆明理工大学, 2010:7-8.
- [9] 张婧, 年洪娟, 陈丽梅. 微生物甲醛脱氢酶研究进展[J]. 生物技术通报, 2010, 03:50-57.
- [10] Mitsui R, Omori M, Kitazawa H, et al. Formaldehyde-limited cultivation of a newly isolated methylotrophic bacterium, *Methylobacterium* sp. MFl: enzymatic analysis related to CI metabolism[J]. J Biosci Bioeng, 2005, 99(1):18-22.
- [11] Schuttre H, Flossdorf J, Sahn H, et al. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*[J]. Eur J of Biochem, 1976, 62(1):151-160.
- [12] 景爱霞, 毕波, 李彤, 等. 甲基营养菌 MP688 甲醛脱氢酶的表达、纯化及酶活性质[J]. 军事医学, 2017, 41(05):381-384.
- [13] 李萍, 王东阳, 许云. 自然环境中甲醛降解菌的分离筛选与鉴定[J]. 南方农业学报, 2014, 45(09):1589-1593.
- [14] 姚璐晔, 李想, 邢望, 等. 紫外诱变选育高效降解甲醛菌株及其降解特性[J]. 食品科学, 2015, 36(13):143-147.
- [15] 陈钧辉, 李俊. 生物化学实验[M]5版. 北京:科学出版社, 2014:63-64.
- [16] 黄赛花, 苏流坤, 张浩原, 等. 霉菌甲醛脱氢酶活性的分光光度法测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(08):985-986.
- [17] 闫潇. 一株甲醛降解菌的筛选与产酶特性研究[D]. 沈阳农业大学, 2017:3-8.
- [18] 武瑞霞, 翟一潭, 霍超, 等. 短小芽孢杆菌 E-1-1-1 中 AFM1 降解酶的分离纯化[J]. 中国食品学报, 2017, 17(10):130-131.
- [19] 赵春燕, 康素华, 荣向花, 等. 凝胶层析分离纯化乳酸菌菌体蛋白条件的优化[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(22):47-48.
- [20] 葛飞, 石贝杰, 唐尧, 等. 康氏木霉诱变菌株纤维素酶系的分离纯化与酶学特性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(12):150-153.
- [21] 张慧芳. 混菌发酵产纤维素酶的分离纯化及其酶学性质研究[D]. 山西农业大学, 2014:31-33.