

简 报

枯草杆菌碱性蛋白酶 E 的纯化和性质 *

王贤舜 路 阳 张治洲 邓 力** 李 冰** 施建平 王培之

(中国科技大学生物系, 合肥 230026)

关键词 蛋白酶 E, 层析分离, 等电点, 最适 pH, 热稳定性, 抗氧化性

目前国内外研究较多的是地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 碱性蛋白酶 Carlsberg 和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) 碱性蛋白酶 BPN' 的纯化。鉴于蛋白酶 E 和蛋白酶 BPN' 在结构上有 15% 的非同源性^[1], 故我们用修饰纯化蛋白酶 BPN' 的方法^[2]来纯化蛋白酶 E(subtilisin E)。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

工程菌 PW2006 (由本实验室王培之构建, 其质粒 pPZW102 中含有蛋白酶 E 基因 *aprE*) 发酵上清液(离心除去菌体和不溶物), 加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 到 0.65 饱和度, 沉淀上清液中蛋白酶 E 和杂蛋白。Suc-AAPF-pNa (琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺) 上海东风生化试剂厂产品。DEAE-Cellulose, CM-Sephacrose CL-6B 是 Pharmacia 公司产品。等电点、分子量标准样品和透析袋是 Sigma 公司产品。其它为国产试剂。

1.2 方法

1.2.1 碱性蛋白酶 E 的活力测定有四肽底物法和 Folin 酚法。

1.2.1.1 四肽底物 Suc-AAPF-pNa 测定法^[3]: 用含 0.01 mol/L CaCl_2 , pH 8.0 的 0.1 mol/L Tris 缓冲液配制 0.001 mol/L 四肽底物溶液。测活时, 取 2.5 ml 底物溶液加入 1—5 μl 酶液用岛津 UV-3000 双光束双波长紫外可见分光光度计测单位时间内 410 nm 处光吸收的变化。酶活单位是 $A_{410}/(\text{min} \cdot \mu\text{l})$ 。

1.2.1.2 Folin 酚法^[4]: 这是国内酶制剂厂广泛使用的测蛋白酶活力的方法。

1.2.2 蛋白质浓度的测定^[5]: 用考马斯亮蓝 G-250 定量测定蛋白质浓度。

1.2.3 等电点聚焦电泳法^[6]测蛋白酶 E 等电点。

1.2.4 蛋白酶分子量测定见文献[7]。

1.2.5 亚基分子量测定^[7]: 由于蛋白酶 E 存在自催化水解作用和对 SDS 抗性, 因此先加抑制剂

PMSF (氟化磺酰苯甲烷) 抑制酶活性后再进行 SDS 电泳。

2 结 果

2.1 蛋白酶 E 的提纯与鉴定

2.1.1 脱盐脱色素: 发酵上清液 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀物用 0.01 mol/L, pH 7.5 磷酸盐缓冲液溶解, 经过透析得无硫酸铵粗酶液, 将此酶液通过 DEAE-Cellulose 层析柱, 色素被吸附, 带正电荷的蛋白酶 E 随 pH 7.5 0.01 mol/L 磷酸缓冲液洗脱流出。

2.1.2 CM-Sephacrose CL-6B 柱层析纯化蛋白酶 E: 经脱盐脱色素的蛋白酶 E 粗酶液上 CM-Sephacrose CL-6B 柱后分二级洗脱。第一级用平衡缓冲液即 0.01 mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液洗脱, 一个层析柱体积缓冲液就可洗去大量杂蛋白; 第二级用 0—0.35 mol/L NaCl 直线梯度洗脱, 收集主峰酶蛋白, 酶活提高 4 倍, 结果见图 1。以上分离过程均在 4℃ 下进行。

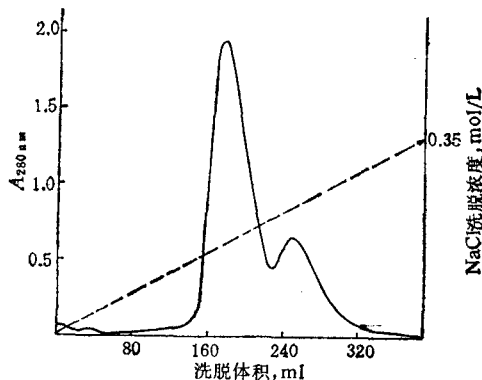


图 1 用 CM-Sephacrose CL-6B 柱 (1.5cm×30cm) 纯化蛋白酶 E

* 国家 863 计划枯草杆菌蛋白酶蛋白质工程课题研究经费支持。

** 中国科学院上海生物化学研究所。

收稿日期: 1991-06-14 修回日期: 1991-08-11

纯化的酶经等电点聚焦电泳和 SDS 凝胶电泳都是一条带,见图 2 和图 3。序列分析 N 端 10 个氨基酸是 Ala-Gln-Ser-Val-Pro-Tyr-Gly-Ile-Ser-Gln,与文献报道一致。由此认为纯化的酶是纯品。

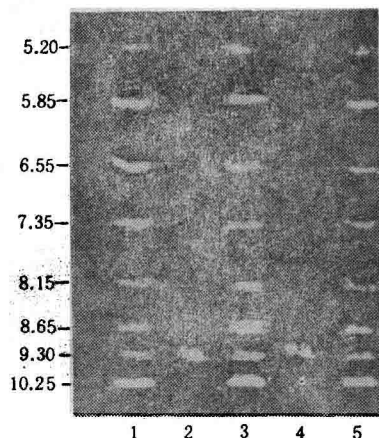


图 2 蛋白酶 E 等电点聚焦凝胶电泳
1, 3, 5 为 pI 标准蛋白, 2 为蛋白酶 E 的等电点约 9.3

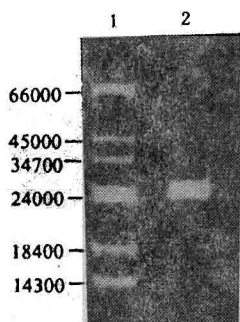


图 3 纯化的蛋白酶 E 的 SDS 凝胶电泳
1. 标准分子量蛋白
2. 蛋白酶 E 的分子量

2.2 性质

2.2.1 分子量与等电点: 用凝胶过滤法测得分子量和 SDS 凝胶电泳测得的分子量均为 27000 左右。说明蛋白酶 E 是单亚基分子(见图 3)。等电点聚焦电泳测得该酶等电点约为 9.3(见图 2)。

2.2.2 常数 K_m 和 K_{cat} : pH 8.6, 0.1 mol/L Tris 缓冲液, 25°C 蛋白酶 E 催化水解四肽底物动力学常数 K_m (mmol/L) 为 0.17, K_{cat} (s^{-1}) 为 5.1, K_{cat}/K_m 是 30。

2.2.3 pH 对酶活性的影响: 如图 4(1), (2) 所示, 蛋白酶 E 的最适 pH 是 10—11, $6 < pH < 11$ 时酶迅速失活。

2.2.4 温度对酶活性的影响: 从图 5 看出 65°C 下蛋白酶 E 的半衰期为 50min, 耐热性较强。

2.2.5 过氧化氢对酶活性的影响: 在 1 mol/L H_2O_2 溶液中酶迅速失活, 2min 残留酶活只有原酶活

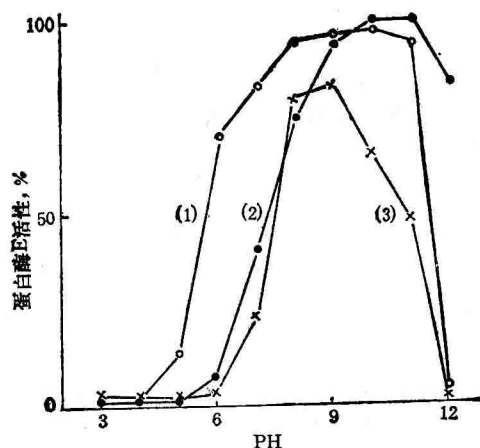


图 4 pH 对蛋白酶 E 稳定性的影响

- (1) ○—○: 测定不同 pH 条件下蛋白酶 E 的活性;
(2) ●—●: 不同 pH 下蛋白酶经 37°C 保温 1h, 然后在 pH10 条件下测酶活力;
(3) ×—×: 不同 pH 下蛋白酶经 37°C 保温 24h 然后在 pH10 条件下测酶活

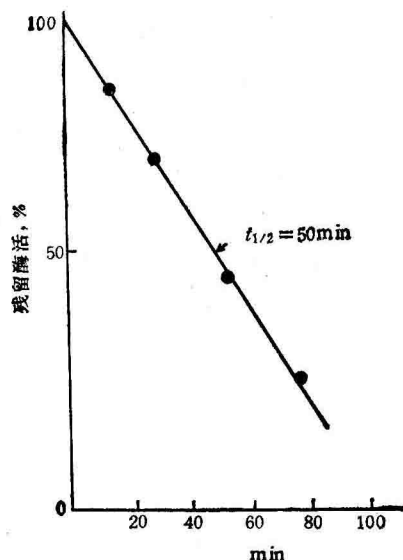


图 5 温度对蛋白酶 E 活性的影响
65°C 下测不同时间残留酶活百分数得半衰期为 50min 的 20%。

3 讨论

3.1 蛋白酶 E 自催化作用能力较强。 为了降低自催化作用, 在纯化过程中除了严格掌握在 4°C 下进行外, 我们采用 pH 在 7.2—7.5 条件下进行。在这 pH 条件下既可以避免酶的迅速变性失活, 又能使酶处于较低的催化活性, 因此能纯化出电泳纯蛋白酶 E。

3.2 碱性蛋白酶是工业用酶, 用途广泛, 目前主要用于洗涤剂工业。 蛋白酶 E 耐碱, 抗 SDS 并有较好

热稳定性等,适于作洗涤剂的填充料。由于洗涤剂的发展趋势是增白洗涤剂,它有氧化性。纯酶对氧化剂 H_2O_2 的抗氧化能力研究发现,在 $1\text{mol/L } H_2O_2$ 中迅速失活,因此必需对蛋白酶进行改造使之具有抗氧化能力才能用于增白洗涤剂。有关酶的改造和改造后酶的抗氧化能力,另有论文报道。

参 考 文 献

1 Stahl D A *et al.* *J Bacteriol.* 1984; 158:411

- 2 Estell D A *et al.* *J Biol Chem.* 1985; 260: 6518
- 3 Delmar E Cr *et al.* *Anal Biochem.* 1979; 99: 316
- 4 中山大学生物系编. 生化技术导论. 北京: 高等教育出版社, 1978; 52
- 5 Bradford M M. *Anal Biochem.* 1976; 72: 243
- 6 Haglund H. *Methods of Biochemistry Analysis.* 1971; 19:1
- 7 Weber K *et al.* *J Biol Chem.* 1969; 244: 4406

PHA 诱导的 c-myc 基因表达与人淋巴细胞增殖

姚家慧 陈鸿书

(第三军医大学分子生物学实验室, 重庆 630038)

关键词 c-myc, 细胞增殖, 植物血球凝集素, 蛋白激酶 C, Ca^{2+}

细胞癌基因(c-onc)与细胞增殖的调节是当前分子生物学研究的中心课题之一,早在1985年 Macara 就提出癌基因调节细胞增殖的模型,认为 c-myc 是在细胞增殖早期参与作用的“获能基因”^[1]。该模型为进一步研究癌基因与细胞增殖的关系提供了有意义的线索,唯其细节尚待进一步阐明和证实,至今 c-myc 与细胞增殖的关系仍是研究的热点。本文以正常人外周血淋巴细胞(PBL)为材料,在离体培养的条件下,通过核酸分子杂交及同位素掺入等技术,研究 c-myc 表达与细胞增殖的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料

含 1.8kb c-myc cDNA 与 pBR322 重组质粒的大肠杆菌菌株(HB101),上海肿瘤研究所提供;碱性磷酸酶标记的抗生物素蛋白(AAP),Sigma; Bio-11-dUTP,北京医科大学药厂;植物血球凝集素(PHA),广州市医药工业研究所;乙酸肉豆蔻酸佛波酯(PMA),Sigma; 乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA),华美生物工程公司;环己酰亚胺(CHM),Fluka; [甲基- 3H] 胸腺嘧啶核苷(TdR),中科院上海原子核研究所; [5- 3H] 尿苷(UR),中科院原子能研究所。

1.2 细胞培养

新鲜人 PBL 的制备按文献[2]方法进行。分离的 PBL 以 1×10^6 个/ml 密度悬浮于 RPMI 1640 培养基中,置 37°C 培养;培养基含 10% 小牛血清及浓度均

为 100U/ml 的青霉素和链霉素,以及各种组合的调节细胞增殖的试剂,包括 PHA, PMA, EGTA 及 CHM。

1.3 [3H]-UR 及 [3H]-TdR 掺入实验

3×10^6 细胞培养 36h 后加入 [3H]-UR, 终强度为 $1\mu\text{Ci/ml}$, 继续培养 18h 后终止。而对 [3H]-TdR 掺入,则在培养 56h 后加入 [3H]-TdR, 终强度为 $1\mu\text{Ci/ml}$, 继续培养 6h 后终止。把细胞收集在 49 型玻璃纤维滤纸上,依次用蒸馏水、5% 三氯醋酸、无水乙醇洗涤,烘干,测其放射性。

1.4 RNA 斑点杂交分析

1.4.1 生物素标记的 c-myc cDNA 探针的制备用强碱法提取 c-myc cDNA 重组质粒,用 Bio-11-dUTP 标记重组质粒,标记方法采用二步缺口翻译法^[3]。

1.4.2 RNA 的提取

细胞培养 6h 后终止,立即提取总 RNA,因为 PHA 和 PMA 培养 6h 时 PBL 中 c-myc mRNA 表达达到高峰^[4]。RNA 的提取按照文献[5]方法进行。

1.4.3 RNA 的斑点杂交

制得的 RNA 用甲醛变性后稀释到所需浓度,点加到 $6 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}: 0.15\text{mol/L NaCl}, 0.015\text{mol/L}$ 柠檬酸钠, pH7.0) 浸泡的硝酸纤维素滤膜(NC膜)上, 80°C 真空烘膜 2h。制好的膜放入预杂交液 50°C