

短小芽孢杆菌碱性蛋白酶的提纯和性质的研究

邱秀宝 程秀兰

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 209 产生的胞外碱性蛋白酶的粗酶制剂 ($5 \times 10^4 \text{u/g}$), 经硼砂-NaOH 缓冲液抽提, 硫酸铵沉淀, Sephadex G-25 脱盐, DEAE-纤维素柱层析, 冷冻干燥获得部分纯化的酶。纯酶的活力为 $199 \times 10^4 \text{u/g}$, 比活力提高 2.6 倍。此酶的最适 pH 8.5—9.0, 在 pH 6—10 之间稳定, 因此是属于微碱性蛋白酶^[1]。最适温度为 50℃, 在 50℃ 以下稳定, 在 60℃ 处理 10 分钟活力损失 95%。 0.003M Ca^{2+} 的存在对酶的热稳定性和 pH 稳定性均有显著提高。 Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^+ , Zn^{2+} 对酶有抑制作用; Mn^{2+} 有明显的激活作用; $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 的 PCMB, IAA, O-PTH, PMSF 对活力无影响; $1 \times 10^{-3} \text{M}$ EDTA 对酶有 30% 的抑制作用; 在 40℃ 用 NBS ($1 \times 10^{-4} \text{M}$)、DFP (2.5mM) 对酶进行 10 分钟处理, 酶活力完全损失。此酶能水解多种天然蛋白, 如酪蛋白、血红蛋白、蛇毒蛋白等, 不水解鱼精蛋白和溶菌酶。以酪蛋白为底物测得的 k_m 值为 $0.66 \times 10^{-4} \text{g/ml}$ 。在 pH 7.3 进行圆盘凝胶电泳, 虽然呈现九条带, 但均具有大小不等的蛋白酶活力。

关键词 短小芽孢杆菌; 蛋白酶; 性质

1970 年 Keay^[2] 等研究了 *Bacillus pumilus*、*Bacillus subtilis* 和 *Bacillus licheniformis* 碱性蛋白酶, 通过离子交换层析等方法将它们分离纯化, 并把这一群酶命名为芽孢杆菌肽酶 (Bacillopeptidase)。1972 年我国皮革研究所从晒生皮块的土壤中分离到一株高产碱性蛋白酶菌种 (209 号), 经鉴定属于短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*), 它具有较好的脱毛作用, 现已大规模应用于皮革脱毛。我们为了解决科研工作中急需用的试剂蛋白酶, 对 209 碱性蛋白酶进行纯化, 现将其纯化结果与性质的研究介绍如下。

材料与方 法

(一) 材 料

209 粗酶制剂是天津酶制剂厂生产的工业用酶, 活力为 $5 \times 10^4 \text{u/g}$ 。

(二) 试 剂

酪蛋白由德国 E. Merck 公司出品; 对氯汞苯

甲酸 (PCMB) 由 England Koch-light Laboratories LTD 出品; N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS)、醋酸汞 (PMA)、乙二胺四乙酸 (EDTA) 均为北京化工厂产品; 邻二氮菲 (O-PTH) 系 Fluka 公司产品; 碘乙酸 (IAA) 是英国 BDH 产品; 苯甲基磺酸氟 (PMSF) 系西德 E. Merck 公司产品; 牛血红蛋白系 GMBH & Co 产品; 丙种球蛋白为上海化学试剂厂产品; 血纤维蛋白是 BDH 产品; 尖吻蝮蛇毒由安徽省祁门县蛇伤医疗所供给; 卵蛋白由无锡恒丰绒织厂附属化工厂产品; γ -球蛋白由 Calbiochem 产品; 牛血清蛋白为中国科学院生物物理研究所产品; 溶菌酶为上海禽蛋厂产品; 硫酸鱼精蛋白为上海生化制药厂产品; DEAE 纤维素为上海有机所实验厂产品; Sephadex G-25 为瑞典 Pharmacia 产品。

(三) 方 法

1. 纯酶制备: 粗酶制剂用 0.05M pH 10 硼砂-

本文于 1982 年 3 月 16 日收到。

本研究进行中得到本所酶结构与功能组同志帮助; 安徽省祁门县蛇伤医疗研究所黄接荣同志提供蛇毒蛋白; 北京大学生物系茹炳根同志提供胰蛋白酶抑制剂特此致谢。

NaOH 缓冲液 (1:10) 抽提 $\xrightarrow{4^{\circ}\text{C} 12\text{h}}$ 抽滤去渣
 得清液 (A) $\xrightarrow[\text{达 45\% 饱和度}]{\text{加硫酸铵}}$ 放冰箱过夜 \rightarrow 抽滤去
 清液 \rightarrow 沉淀加蒸馏水溶解 $\xrightarrow[8000 \text{ rpm/分}]{\text{离心 15 分钟}}$ 得清亮酶
 液 (AM) \rightarrow Sephadex G-25 脱盐 \rightarrow DEAE 纤维素
 柱层析 \rightarrow 得无色酶液 \rightarrow 冷冻干燥 \rightarrow 得白色粉末状
 的酶。

2. 活力测定:

(1) Folin 试剂显色法^[3]: 取 1ml (40℃ 预
 热 4 分钟) 酶液加到 1ml (40℃ 预热 4 分钟) 1%
 酪蛋白溶液 (pH9.0) 中, 混匀后在 40℃ 反应 10
 分钟, 加 2ml 0.4 M 三氯乙酸终止反应 (以失活的
 酶为对照), 用滤纸过滤, 取 1ml 滤液加 5ml 0.4 M
 Na₂CO₃ 溶液, 加 1ml Folin 试剂 (原液稀释 3 倍),
 40℃ 显色 10 分钟; 在 72-型分光光度计 680nm 比
 色, 测吸光度。以每毫升酶液在上述条件下水解
 酪蛋白, 每分钟释放 1 微克 (μg) 酪氨酸所需的
 酶量为 1 个酶活力单位, 用 (u) 表示。

(2) Anson 法^[4]: 1ml 酶液与 1ml 0.5% pH
 9.0 蛋白溶液混合, 在 40℃ 反应 10 分钟; 加 2ml

10% TCA 终止反应 (以失活的酶为对照), 用滤
 纸过滤, 取 0.2ml 滤液加 0.3ml 茚三酮 (pH
 5.5)^[4], 在水浴中煮沸 15 分钟, 用 50% 异丙醇定
 容到 5ml, 用 72-型分光光度计在 570nm 比色, 测
 吸光度, 以 A_{570} 值代表相对酶活力。

3. 蛋白测定: 按 Lowry 法^[5]。

4. 凝胶电泳^[6]: 采用中性系统, 每管蛋白量
 0.2—0.3mg; 电流 3mA; 4℃ 2 小时然后将凝胶取
 出放在 12.5% 三氯乙酸中固定 30 分钟, 用考码
 斯亮蓝染色 1—2 小时, 用 7% 醋酸脱色。

结果与讨论

(一) 酶的提纯

见方法 1, 纯化各步结果见表 1, 此酶
 纯化后纯度提高 2.6 倍; 活力总回收达
 45%, 每克冷干粉活力达 $199 \times 10^4 \text{ u}$, 外观
 雪白膨松, 经测定不含 α -淀粉酶、脂肪酶
 和 DNA 酶。在 SDS 或 Triton X-100 存在
 下仍具有分解细胞蛋白的能力, 为分离和
 提取核酸提供了较好的工具酶。

表 1 209 蛋白酶提纯结果

Table 1 Purification of 209 proteinase

步 骤 Fraction	体 积 volume (ml)	活 力 Activity		蛋 白 Protein		比 活 Specific activity (u/mg)	纯 度 倍 数 Purification ×
		单 位 / ml (u/ml)	回 收 Recovery (%)	(mg/ml)	回 收 Recovery (%)		
抽提 (A) extraction	427	12096	100	12.3	100	1008.0	1
硫酸铵沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ recipita- tion (AM)	94	44940	81.8	20.4	36.5	2203.0	2.2
Sephadex G-25	166	22050	70.9	7.7	24.3	2863.6	2.8
DEAE-纤 维素 DEAE- Cellulose	462	5502	49.2	1.42	12.5	2874.6	3.84
冷冻干燥 Lyophiliza- tion	1.15 (g)	199×10^4 (u/g)	44.4	553.8 (mg/g)	12.1	3602.4	3.6

(二) 酶作用的最适 pH

以牛奶酪素为底物, 用 0.1M 各种不同

pH 缓冲液配制成 1% 浓度的溶液, 按
 Folin 法测活力, 从图 1 中可以看出最适作

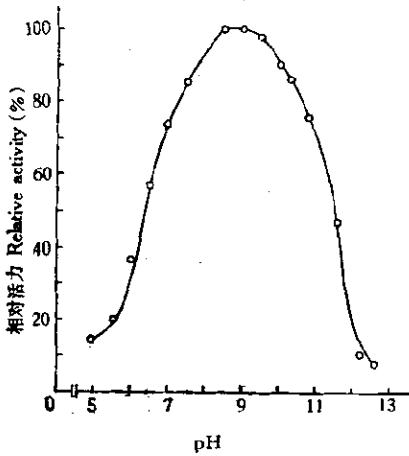


图1 pH 对酶活性的影响

Fig. 1 Effect of pH on enzyme activity

缓冲系统: pH4—5.5 醋酸缓冲液 (Acetate buffer)
 pH6—8.0 磷酸缓冲液 (Phosphate buffer)
 pH8.5—9.0 硼酸缓冲液 (Boric acid borax buffer)
 pH9.5—12.0 硼砂-NaOH (Borax-NaOH buffer)

用 pH 为 8.5—9.0, 最适范围为 8.0—9.5。

(三) pH 对酶稳定性的影响

将 0.1 M 不同 pH 缓冲液配制的酶液在 40℃ 放置 60 分钟, 50℃ 放置 30 分钟 (反应液中含有 0.003 M Ca^{2+}), 然后测剩余酶

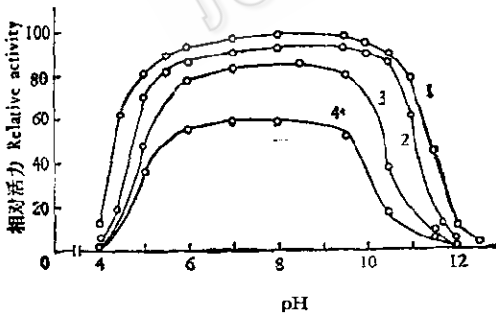


图2 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH on the stability of enzyme

1. 加钙 $+\text{Ca}^{2+}$, 40℃ for 60min
2. 不加钙 $-\text{Ca}^{2+}$, 40℃ for 60min
3. 加钙 $+\text{Ca}^{2+}$, 50℃ for 30min
4. 不加钙 $-\text{Ca}^{2+}$, 50℃ for 30min

使用的缓冲液同图 1

The same buffers as indicated in the legend of Fig. 1 were used.

活力, 结果见图 2, 此酶在 pH6—10 最稳定, 在 0.003 M Ca^{2+} 存在下酶稳定性加强。

(四) 酶作用最适温度

取 1ml 1% 酪蛋白液 (溶于 0.05M pH9.0 硼酸-NaOH 缓冲液) 在不同温度下预热 3 分钟, 加 1ml 酶液在不同温度的水浴中反应 10 分钟, 然后加 2ml 0.4 M TCA 终止反应, 用 Folin 法测活力。图 3 说明在 50℃ 时酶活力最高, 在 0.003 M Ca^{2+} 存在时酶稳定性提高。

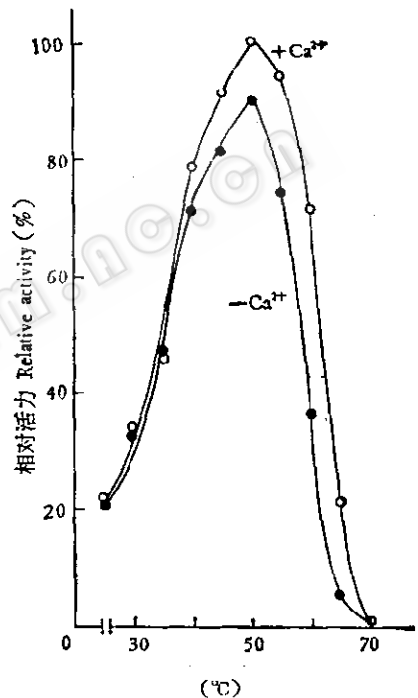


图3 温度对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity
1. $+\text{Ca}^{2+}$ 2. $-\text{Ca}^{2+}$

(五) 温度对酶稳定性的影响

将酶液分别在 50°, 55°, 60℃ 下保温不同时间, 然后测定剩余酶活力, 如图 4 所示, 在 60℃ 放置 10 分钟后几乎完全失活; 在 Ca^{2+} 保护下酶稳定性显著提高, 在 50℃, 60 分钟还能保持 80% 以上活力, 但在 60℃ 放置 30 分钟以上, Ca^{2+} 几乎没有显示保护作用, 这与用 *Bacillus. sp.* 所得的

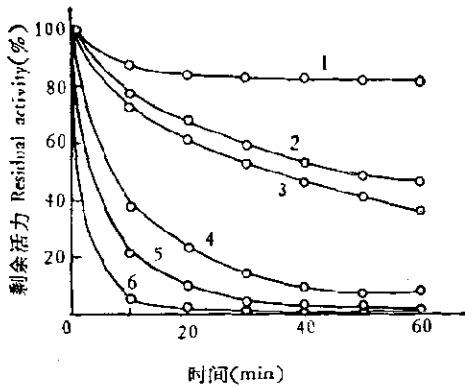


图 4 温度对酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on enzyme stability

1, 50°C + Ca²⁺ 2, 50°C - Ca²⁺ 3, 55°C + Ca²⁺
4, 55°C - Ca²⁺ 5, 60°C + Ca²⁺ 6, 60°C - Ca²⁺

结果相同^[7]。

(六) 金属离子对酶活力的影响

将酶液与金属离子混合（使反应液中金属离子的浓度为 $1 \times 10^{-3} M$ ），在 40°C 放置 10 分钟，以不加金属离子的试验为对照，用 Folin 法测剩余酶活力，实验表明 209 碱性蛋白酶受 Mn^{2+} 激活，严重地被 Ag^{+} 抑制， Fe^{2+} ， Cu^{2+} 等也能抑制此酶（表 2）。

表 2 金属离子对酶活力的影响

Table 2 Effect of various metal ions on enzyme activity

金属盐 Metal salt	剩余活力 (A_{540nm}) Residual activity	相对活力(%) Relative activity
对照 (Control)	0.300	100
$MnCl_2 \cdot 1 \times 10^{-3} M$	0.375	125
$Ca(Ac)_2$	0.318	106
NaCl	0.308	102
KCl	0.295	98.3
$Pb(Ac)_2$	0.275	91.6
$MgSO_4$	0.260	86.7
$HgCl$	0.232	77.3
$ZnCl_2$	0.217	72.3
$FeSO_4$	0.18	60.0
$CuSO_4$	0.178	59.3
$AgNO_3$	0.02	0.06

(七) 各种蛋白质侧链修饰剂对酶活力的影响

将酶液与各种修饰剂混合（使反应液中修饰剂浓度为 $1 \times 10^{-3} M$ pH8.5），在 40°C 保温 10 分钟，用 Folin 法测定剩余酶活力，结果如表 3 所示，PCMB、IAA、PMSF、O-PTH 均不抑制 209 蛋白酶，而 DFP、NBS 却严重地抑制酶活力，与亮曲霉碱性蛋白酶 (*Aspergillus candidus* alkaline proteinase) 相似^[9]。

表 3 各种化学修饰剂对酶活力的影响

Table 3 Effect of various chemical reagents on the enzyme activity

试 验 Test	相 对 活 力 Relative activity (%)
对照 Control	100
+PCMB $10^{-3} M$	100
+IAA $10^{-3} M$	98
+O-PTH $10^{-3} M$	97.8
+PMBF $10^{-3} M$	100
+PMA $10^{-3} M$	68.6
+EDTA $10^{-3} M$	66.6
+NBS $10^{-3} M$	0
+DFP 2.5mM	0

(八) 胰蛋白酶抑制剂对酶活力的影响

将酶液与抑制剂等体积相混（使反应

表 4 抑制剂对酶活力的影响

Table 4 Effect of different inhibitors on enzyme activity

抑 制 剂 Inhibitor	相 对 活 力 Relative activity (%)
对照 (control)	100
2-Nitro-4-Carboxyphenyl- NN'-diphenyl Carbamate	52.1
卵粘蛋白 Mucin	89.4
大豆胰蛋白酶抑制剂 Soyatrypsin inhibitor	96.6
牛胰胰蛋白酶抑制剂 Trypsin inhibitor from Oxlungs	77.7
苯甲脒 Benzyl amidine	97.9

液中抑制剂浓度为 0.05%, pH 9.2), 在 40℃ 保温 10 分钟, 用 Folin 法测定剩余酶活力。结果如表 4 所示。209 碱性蛋白酶几乎不被胰蛋白酶抑制剂抑制, α -糜蛋白酶的抑制剂对其有 50% 的抑制作用。

(九) SDS 对酶活力的影响

将不同量的酶液与 SDS 等体积相混 (使反应液中 SDS 浓度为 0.5%, pH 10) 在 40℃ 保温 10 分钟, 用 Folin 法测剩余酶活力。结果如表 5 所示, 抑制率与酶浓度有关, 酶浓度越高抑制率越小。有底物保护下酶稳定性提高。试验证明酶浓度达 200 u 时可以保留 42.5% 活力。因此在使用中只要适当控制酶浓度就能弥补 SDS 对它的抑制作用。

表 5 SDS 对酶活力的影响

Table 5 Effect of SDS on enzyme activity

酶 量 Enzyme (u)	相 对 活 力 Relative activity (%)	
	Test 1	Test 2
对照 Control	100	100
20	18.9	27.7
25	17.4	27.7
50	21.2	27.7
100	22.2	30.8
200		42.5

1. 酶与 SDS 在 40℃ 保温 10 分钟后加底物

Substrate was added after that the mixture of enzyme plus SDS was incubated at 40℃ for 10 min.

2. 酶, SDS 和底物在 40℃ 保温 10 分钟

The mixture of enzyme, SDS and substrate was incubated at 40℃ for 10 min.

(十) Triton X-100 对酶活力的影响

将酶液与不同浓度的 Triton X-100 混合, 在 40℃ 保温 10 或 90 分钟, 按 Folin 法测剩余酶活力。结果见图 5, Triton X-100 对酶有明显的抑制作用, 但是在底物存在的情况下比较稳定, 在 40℃ 处理 10 分钟几乎不失活, 40℃ 处理 90 分钟还保

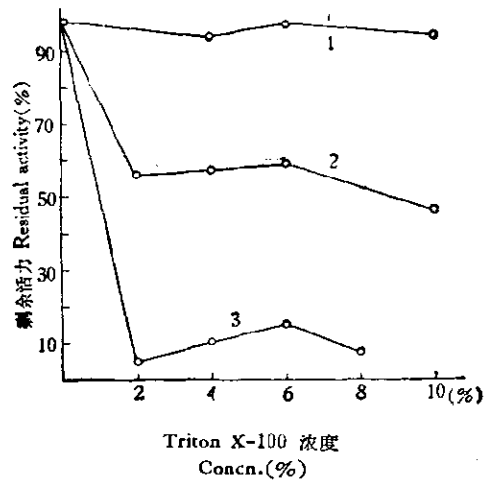


图 5 Triton X-100 对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of triton X-100 on enzyme activity

1. 有底物保护, 40℃ 保温 10 分钟。

Reaction mixture with substrate was incubated at 40℃ for 10 min.

2. 有底物保护, 40℃ 保温 90 分钟

Reaction mixture with substrate was incubated at 40℃ for 90 min.

3. 无底物保护, 37℃ 保温 90 分钟

Reaction mixture without substrate was incubated at 37℃ for 90 min.

持 40% 以上的活力。

(十一) 不同浓度 NBS 对酶活力的影响

将酶液与不同浓度的 NBS 混合 (pH

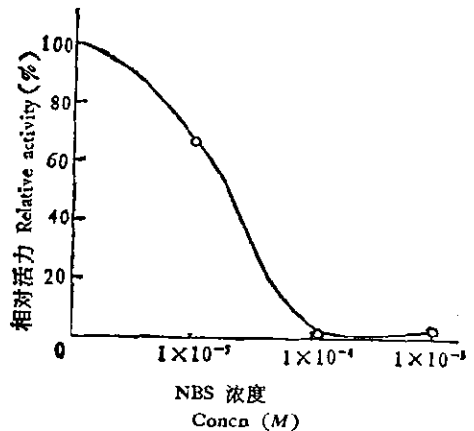


图 6 NBS 浓度对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of NBS concentration on enzyme activity

9.0) 以不加 NBS 为对照, 40℃ 保温 10 分钟, 用 Folin 法测定剩余酶活力。结果如图 6 所示, $1 \times 10^{-4} M$ NBS 能使酶全部失活, $1 \times 10^{-5} M$ 酶活损失 30%。

(十二) 酶对各种天然蛋白的水解作用

用 10 种天然蛋白为底物, 分别用 pH 9.5 0.05 M 硼砂-NaOH 缓冲液配制成浓度为 0.5% 的溶液。取 1ml 酶液与 1ml 底物混合, 在 40℃ 反应 10 分钟, 用 Anson 法测活力, 结果如表 6 所示, 209 蛋白酶对酪蛋白^[8], 血红蛋白、蛇毒蛋白等均有水解作用, 但对鱼精蛋白、溶菌酶无水解能力。

表 6 酶对各种天然蛋白的水解作用

Table 6 Hydrolytic activity of the enzyme for natural proteins

天然蛋白 Natural proteins	吸光度 (A_{560})
酪蛋白 Casein	0.600
血红蛋白 Haemoglobin	0.514
蛇毒蛋白 Snake venom protein	0.249
血纤维蛋白 Fibrin	0.197
丙种球蛋白* 丙-globuline*	0.173
卵蛋白 Egg albumine	0.148
γ -球蛋白** γ -globuline**	0.05
牛血清蛋白 Bovine serum albumin	0.03
溶菌酶 Lysozyme	0
硫酸鱼精蛋白 Protamine sulfate	0

* 人血 (Human blood)

** 兔子 (Rabbit blood)

(十三) K_m 值的测定

以酪蛋白为底物, 用 0.005 M pH9.5 硼砂-NaOH 缓冲液配制, 浓度为 0.05—0.5%, 取 1ml 酶液 (15u) 与 1ml 不同浓度的酪蛋白溶液混合, 40℃ 保温 10 分钟, 用

Folin 法测活力, 用双倒数法作图求得 K_m 值为 $0.66 \times 10^{-2} g/ml$ 。

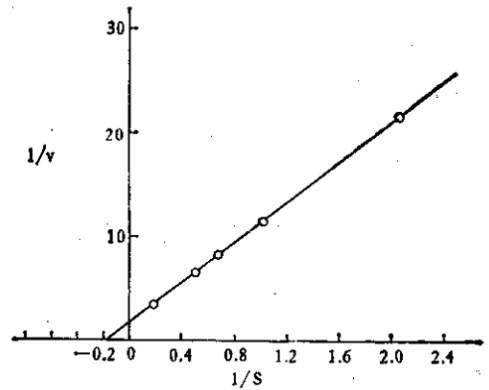


图 7 K_m 值的测定

Fig. 7 Measurement of K_m

(十四) 聚丙烯酰胺圆盘电泳^[6]

根据 Maurer 介绍方法在中性系统中进行电泳, 共做三根胶, 一根电泳完后染色, 一根从前沿开始切成 14 段 (每段 0.5 cm) 用 Folin 法测活力, 另一根胶同样切成 14 小段分别放在 1% 酪蛋白琼脂平板上 (pH9.2), 在 30℃ 保温过夜, 观察平板水解

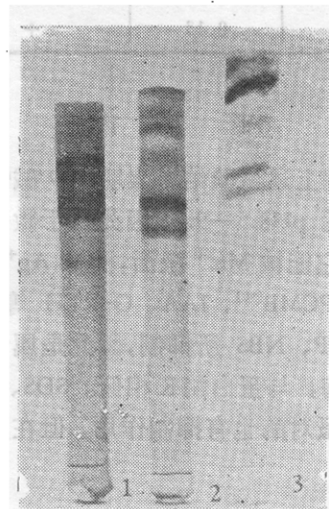


图 8 圆盘电泳

Fig. 8 Disc electrophoretic patterns

1. 209 碱性蛋白酶 (209 Alkline proteinase)
2. 蛋白酶 E (Proteinase E)
3. S. G 蛋白酶 (S. G proteinase)

透明圈大小,比较各段蛋白酶的活力。结果见表 7,用两种方法测得的结果一致,最高活力在距前沿 5—6 cm 处,也即是照片上色带最深的部位。凡有蛋白带的地方均具有蛋白酶活力。同时用蛋白酶 E (Proteinase E), S. G, 蛋白酶为对照,结果见图 8。

表 7 丙烯酰胺圆盘电泳活力测定结果

Table 7 Result of polyacrylamide gel electrophoresis

分 段 Section No.	福 林 法 Folin (A_{530})	酪蛋白平板法 Casein plate
1	0.235	±
2	0	—
3	0	—
4	0	—
5	0	—
6	0	—
7	0	—
8	0.08	±
9	0.1	±
10	1.05	++++
11	1.10	++++
12	0.75	+++
13	0.37	++
14	0.13	+

讨 论

根据上述试验结果表明 209 碱性蛋白酶的最适 pH8.5—9.0, 因此属于微碱性蛋白酶^[2], 它能被 Mn^{2+} 激活, 而被 Ag^+ 抑制; 它不被 PCMB^[10]、IAA、O-PTH 等抑制, 而被 DFP、NBS 所抑制, 因此是属于丝氨酸蛋白酶, 与蛋白酶 K 相似。SDS、Triton X-100 虽对酶也有抑制作用, 但在底物保

护下抑制作用将显著减弱, $0.003M Ca^{2+}$ 存在使酶的稳定性显著提高。该酶不分解胰蛋白酶专一性底物, 也不被大豆胰蛋白酶抑制剂所抑制, 因此认为与胰蛋白酶的特异性不同。由于在丙烯酰胺凝胶电泳中看到了九条区带, 并证明区带部位均具有蛋白酶活力, 为此有必要进一步纯化并搞清其功能。从试验结果表明 209 碱性蛋白酶不仅能水解酪蛋白, 血红蛋白, 而且能水解蛇毒蛋白, 这将为医药工业提供新的蛇伤药物。本制品经使用证明对细胞蛋白具有较强的水解能力, 而且不破坏 DNA, 提取的 DNA 仍具有转化活力, 因此具备了作为科研教学试验用工具酶的条件。其商品名各为 Proteinase BP。

参 考 文 献

- [1] 伊藤万藏 杉浦衛: 药学雑誌, 89 (12): 1583—1590, 1968.
- [2] Keay et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 12(2): 213—249, 1970.
- [3] Spies, J. R.: *Methods in enzymology*, III. Academic Press Inc., New York 1975, p 467.
- [4] Idem: *Methods in enzymology*, III Academic Press Inc. New York 1975, p468.
- [5] Lowry O. H. et al. *J. Biol. Chem.*, 193(1): 265—275, 1951.
- [6] Maurer, H. R.: *Disc Electrophoresis and Related Techniques of polyacrylamide Gel Electrophoresis*. Walter de Gruyter (ed.) Berlin 1971.
- [7] Tobe, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 39(9): 1749—1755, 1975.
- [8] Hayashi, K. and M. Terada: *Agr. Biol. Chem.*, 36(10): 1755, 1972.
- [9] Ohara, T. and S. Nasuno: *Agr. Biol. Chem.*, 36(10): 1979.
- [10] Ebeling, W. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 47 (1): 91—97, 1974.

A STUDY ON THE PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF ALKALINE PROTEINASE FROM *BACILLUS* *PUMILUS* STRAIN 209

Qiu Xiubao Cheng Xiulan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

An alkaline proteinase produced by *Bacillus pumilus* was partially purified through a process involving ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-25 filtration, chromatography on DEAE-cellulose and lyophilization, and a final product, a white powder was obtained. The specific activity of enzyme preparation after purification increased 2.6 times. The optimum pH and temperature for casein hydrolysis were 9.0 and 50°C, respectively. The enzyme was stable over the pH range from 6 to 10. Ca^{2+} enhanced

the heat stability of the enzyme.

The enzyme was completely inactivated after treatment with DFP (2.5 mM) or NBS ($1 \times 10^{-3} M$), but not with PCMB and O-PTH. The addition such as Cu^{2+} , Fe^{2+} and Hg^{+} ($1 \times 10^{-3} M$) inhibited the enzyme activity, while Mn^{2+} tends to stimulate activity. Casein, haemoglobin, snake venom protein and fibrin were susceptible to enzymatic hydrolysis.

Key words

Bacillus pumilus; Proteinase; Property