

药用中性蛋白酶的研究

邱秀宝 任永娥 程秀兰 崔福绵
徐大雅 李万年 孙世章 李禄先

(中国科学院微生物研究所,北京)

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) AS 1.398 中性蛋白酶的粗酶 (5 万 u/g), 用自来水 (1:10) 抽提 12 小时, 在这抽提液中加入 20% (v/v) CaCl_2 溶液 (在 100ml 水中加 60g 无水 CaCl_2); 再加 25% 固体硫酸铵使酶沉淀, 过滤后得酶饼, 用 0.005M pH7.2 磷酸缓冲液溶解, 经 Sephadex G-25 柱脱盐, 冷冻干燥得片状粉末, 含酶活 60—100 万 u/g, 纯度提高 4 倍, 本制剂具有较强的抗炎消肿及溶解纤维蛋白的作用。

经初步纯化的酶制剂, 以酪蛋白为底物其作用最适 pH7.2—7.4; pH6.5—8.0 稳定。最适温度为 50—55℃, 在 37℃ 处理 120 分钟能保持 80% 以上活力, 60℃ 10 分钟酶全部失活; 本酶被 EDTA ($1/3 \times 10^{-3}M$)、重金属盐 (Hg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 等) 所抑制, 不被 PCMB ($1/3 \times 10^{-4}M$) 所抑制。

蛋白酶用于医药历史很久, 1981 年 G. J. Martin^[1] 提到 Marcan 就已经用菠萝蛋白酶作为抗水肿药物和抗炎剂, 1952 年 Innerfield 等^[2] 首先发现了胰蛋白酶对血栓周围的炎症有明显的抑制作用, 肯定了蛋白酶的消炎特征。

药用蛋白酶多半来源于动物内脏, 植物果实, 汁液等, 因此来源有限, 生产困难, 近年来逐渐被微生物来源所代替^[3-5], 为了适应我国临床的需要, 我们选择了枯草杆菌 AS 1.398 中性蛋白酶应用于临床, 因为中性蛋白酶最适反应 pH 接近于人体 pH 值, 在临床上应用比较合适, 另一方面枯草杆菌蛋白酶经美国食品及药物管理局批准是不须经过毒性鉴定的安全生产菌。经试验证明 AS 1.398 蛋白酶具有较强的消炎消肿及祛痰作用, 并对各种烧伤疤痕软化具有良好的疗效, 本文重点介绍酶的制备及其基本性质的研究。

材料与方 法

(一) 材料

粗酶粉是江苏省无锡酶制剂厂生产的工业用酶, 商品名 AS 1.398 (5 万 u/g), 性质研究用的酶粉为江苏省射阳制药厂精制冷冻干燥粉 (100 万 u/g)。

(二) 方法

1. 制备方法

粗酶抽提: 将 5 万 u/g 粗酶用自来水 1:10 在 4—8℃ 下浸泡 16 小时, pH6.8—7.0。

去渣分离: 在上述抽提液中加入氯化钙液 (100ml 水中溶解 60g CaCl_2), 加量为酶液体积的 20%, 然后加入 25% (w/v) 固体硫酸铵, 充分搅拌, 使其形成硫酸钙白色沉淀, 以吸附酶液中粘性物质及部分色素, 静置 30 分钟即可用布氏漏斗抽滤, 得到去渣滤液。

本文于 1980 年 6 月 23 日收到。

药理及临床试验工作由安徽省医学科学研究所进行, 特此致谢。

硫酸铵沉淀：于上述酶液中加入 30% 固体硫酸铵 (w/v)，使酶沉淀，用氨水调节 pH 至 6.5 左右，4—8℃ 下放置过夜，用布氏漏斗抽滤，得酶饼。

酶饼溶解：将上述酶饼用 0.005 M pH7.2 磷酸缓冲液溶解，用二层 80 目尼龙布过滤去不溶物质，得酶液。

Sephadex G-25 脱盐：上述酶液中含有大量硫酸铵，我们用上海长征制药厂生产的 Sephadex G-25 进行柱式脱盐，商品 G25 先经蒸馏水悬浮膨胀，然后装柱 (1.0×15cm)，先用 0.005 M pH7.2 磷酸缓冲液淋洗，使 pH 达 7.2，再用 0.02 M pH7.2 磷酸缓冲液平衡，上柱酶的粘度为 1.3 cSt 左右，上酶量为柱体积的 20%，然后用 0.02 M pH7.2 磷酸缓冲液洗脱，用奈氏试剂测流出液硫酸铵含量，用 10% 三氯乙酸测流出液蛋白，收集无盐酶液，体积为上柱酶的 1.6 倍。

冷冻干燥：脱盐酶液立即进行真空冷冻干

燥，-40℃ 下升华干燥 36 小时，得灰白色蓬松薄片状粉末待制口服片用。

2. 酶活力测定

用改良的 Folin 法^[6]，即 1 ml 酶液在 37℃ 下水解 2ml 0.5% 酪蛋白 10 分钟，以每分钟释放出 1μg 的酪氨酸为一个活力单位。

3. 蛋白测定：Folin 法^[7]。

4. 酶液粘度测定法：采用奥斯华德^[8]毛细管粘度计 0.8mm，常数 = 0.0276。

5. 硫酸铵测定：奈氏试剂法^[9]。

结 果

(一) 不同抽提剂的比较：为了配合生产需要，必须选择一种操作简便、成本低而又效率高的抽提剂，因此比较了五种不同抽提剂，结果见表 1。

由表 1 可见不论什么条件下，不同溶

表 1 不同溶剂对酶抽提效果的比较

Table 1 Effect of different solvents on enzyme extraction

处理条件 Condition	溶剂 Solvent	0.02M pH7.2 磷酸缓冲液 Phosphate buffer	0.01M ZnCl ₂	0.01M CaCl ₂	自来水 Tap water	蒸馏水 Distilled water
	活力 Activity (u)					
24℃ 0h		37370	30500	34500	38750	33762
4℃ 12h		39300	31300	34900	40830	35660
37℃ 2h		36750	30750	35500	41000	34500

剂对酶抽提效果均为自来水 > 磷酸缓冲液 > CaCl₂ > 蒸馏水 > ZnCl₂，为此我们选用自来水为抽提剂。

(二) 去渣方法的比较：去除粗酶中不溶物及粘性物质，是酶纯化的首要一步，多用高速离心的办法，或过滤，或加某些助滤剂 (如硅藻土) 等手段，但往往达不到理想的要求。我们采用 CaCl₂ 及 (NH₄)₂SO₄ 形成 CaSO₄ 的方法，既简便又有效，与一般方法比较，它不仅过滤速度快，酶液清亮，而且粘度小收率高，结果见表 2。

(三) Sephadex G-25 脱盐：脱盐柱的柱高与柱直径的比例必须选择合适，否

则影响脱盐效果，从柱直径:柱高为: 1:5, 1:10 及 1:15 的三种比例试验证明，以 1:15 为最好，1:5 最差，1:15 脱盐比较彻底，分离完全，稀释度小。并且酶液粘度对脱盐效果影响极大，粘度越小脱盐效果越好，样品越集中。纯化各段工序收率见表 3。

(四) 酶性质的研究

1. pH 对酶活力的影响^[10,11]

将冷冻干燥酶粉溶解在无离子水中 (1mg/ml) 取 1ml 酶液共 5 份，分别加 2ml 不同 pH 0.025M 缓冲液配制的 0.5% 酪蛋白，37℃ 下反应测活力 (见图 1)。

1.398 中性蛋白酶在 37℃ 条件下，对

表 2 不同去渣方法比较

Table 2 Comparison of different methods for removing dregs

方法 Methods	总活力单位($\times 10^3$) Total activity(u)	总蛋白 Total protein(mg)	活力回收* Activity recovery(%)	酶液粘度 Viscosity (cst)	过滤速度 Speed of filtration (l/h)
滤纸过滤 Filter paper filtration	5200	4700	71	1.551	0.125
硅藻土助滤 Filtration with diatomaceous earth	4320	4000	59	1.166	0.167
硫酸钙助滤 Filtration with CaSO_4	5564	6099	76	1.269	2

* 100g 粗酶在 37℃ 抽提后得到 7,300,000 u 活力作为 100%。

7,300,000 (u) of protease activity was obtained from 100g crude enzyme after extraction at 37℃, this figure was taken as 100%.

表 3 酶的纯化

Table 3 Purification of Enzyme

纯化步骤 Fraction	活力 Activity		蛋白 Protein		收率(%) [*] Recovery(%)		比活 Specific activity (u/mg protein)	纯化倍数 Purification fold
	u/ml	总活力(u) Total activity(u)	mg/ml	总蛋白 Total protein (mg)	活力 Activity	蛋白 Protein		
粗酶 100 g Crude enzyme	5600	5.6×10^6	17.2	17200	100	100	325.6	1
抽提液 Extract	5600	5.6×10^6	5.8	6000	100	35.0	960.0	2.95
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation	27000	4.3×10^6	11.2	1792	77.5	10.4	2400.0	7.30
脱盐 Desalination	11100	2.8×10^6	6.2	805.6	50.0	4.0	1790.0	5.50
冷冻干燥 Lyophilization	72 万/g	1.9×10^6	470mg/g	620	34.0	3.6	1540.0	4.70

* 粗酶用 1:2000 水抽提所得到的活力及蛋白为 100% 计算各段收率。

The recovery of activity and protein of each fraction was calculated on basis of crude enzyme extracted with water (1:2000).

酪蛋白的最适作用 pH 为 7.2—7.4。

2. pH 对酶稳定性的影响

用各种不同 pH 的 0.025M 缓冲液配好的酶液, 在 37℃ 水浴保温 1 小时, 取出后用 0.025M pH7.2 磷酸缓冲液稀释 20 倍, 使 pH 达到 7.2, 然后用常规 Folin 法测残

余酶活力, 结果见图 2, 图 2 表明 1.398 蛋白酶在 37℃ 下稳定, pH 范围较宽, 在 pH 6.5—8.0 之间, pH 低于 5 或高于 9 时酶迅速失活。

3. 温度对酶活力的影响

将冷冻干粉溶解在 0.02M pH7.2 磷酸

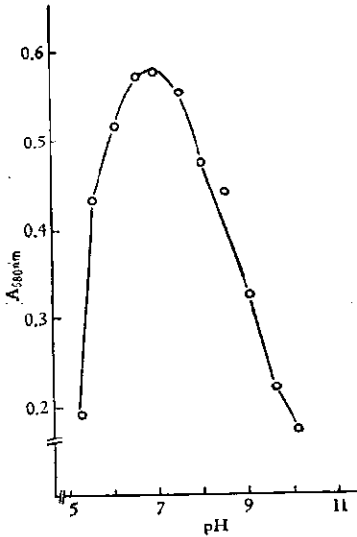


图 1 不同 pH 对酶活力的影响

Fig 1 Effect of pH on enzyme activity
 pH 4—4.5: Na₂HPO₄-Citric acid buffer
 pH 6—8: Phosphate buffer
 pH 8.5—10.5: Glycine-NaOH buffer

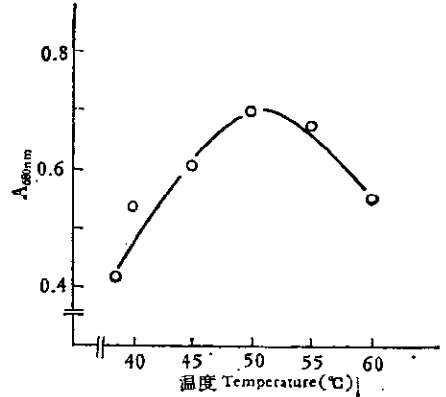


图 3 温度对酶反应的影响

Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity

酶反应速度,结果见图 3。

从图 3 结果表明: 1.398 蛋白酶对酪蛋白水解的最适温度为 50—55°C。

4. 温度对酶稳定性的影响: 将 1.398 酶液在 pH7.0 和 pH8.0 条件下, 放在四种不同温度下保温不同时间, 然后用常规法测定其剩余酶活力, 比较其对热的稳定性, 结果见图 4、5。

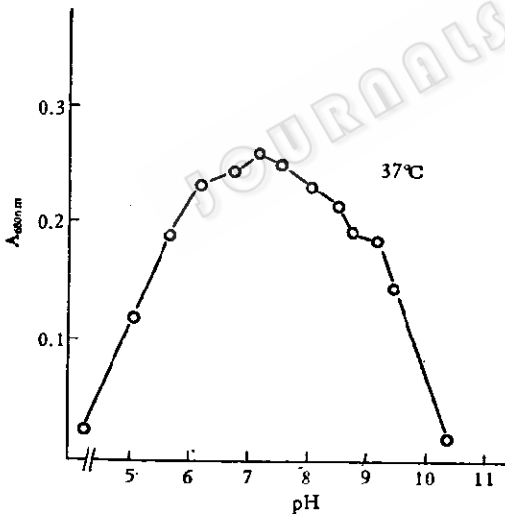
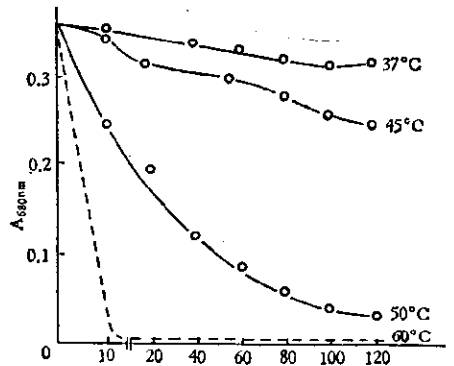


图 2 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH on enzyme stability
 Buffer as in fig 1.



保温时间 Incubation time (min)

图 4 在不同温度下酶的稳定性 (pH7.0)

Fig. 4 Effect of temperature on enzyme stability at pH7.0

缓冲液中 (mg/ml) 稀释 50 倍, 取 1ml 酶液 (共 5 份), 分别放在不同温度下加 2ml 0.5% 酪蛋白进行反应, 15 分钟后, 停止反应按常规测酶活力, 比较其在不同温度下

从图 4、5 结果表明: AS 1.398 中性蛋白酶在 37°C 下比较稳定, 处理 120 分钟酶活仍保存 80% 以上, 超过 45°C 稳定性下

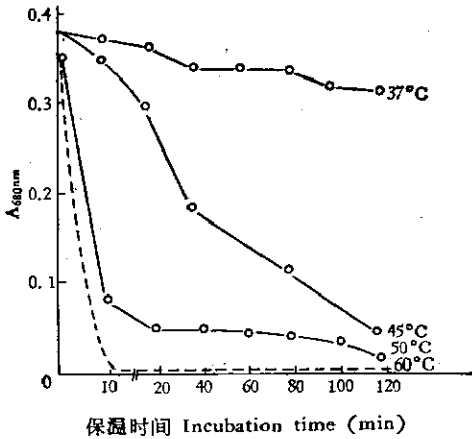


图5 在不同温度下酶的稳定性 (pH8.0)

Fig. 5 Effect of temperature on enzyme stability at pH8.0

降; 60°C, 10 分钟全部失活。

在 pH 8.0 条件下比 pH 7.0 不稳定, 只有在 37°C 时比较稳定, 超过 45°C 活力下降速度比在 pH 7.0 快。

5. 各种金属离子及抑制剂对酶活力的影响: 将冷冻干燥酶粉用无离子水溶解, 然后放入无离子水中透析 24 小时, 透析完了将酶液稀释成 1mg/ml, 再用无离子水稀释 20 倍, 取 0.5ml 分别加入 0.5ml ($2 \times 10^{-3}M$) 各种抑制剂及各种离子溶液, 37°C 处理 10 分钟, 加 2ml 0.5% pH 7.2 酪蛋白(最终离子浓度为 $1/3 \times 10^{-3}M$), 按常规法测活力。每个处理重复三个样品, 以不加各种试剂的为对照, 结果见表 4。

表 4 结果表明: AS 1.398 中性蛋白酶被 EDTA ($1/3 \times 10^{-3}M$) 所抑制, 但不被 PCMB ($1 \times 10^{-4}M$) 所抑制, 证明此酶活性中心不含有一SH 基, 而与金属离子有关, 它又受重金属盐(如 Hg^{+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 等)所抑制。从表 5 结果进一步说明 EDTA 对该酶抑制作用很强, 我们用未透析的二种样品(提纯冷冻干燥样品及粗酶)进行处理, 发现在 $10^{-5}M$ EDTA 中, 冷冻样品全部失活, 而粗酶只抑制 37%。在 $10^{-4}M$ 时,

表 4 各种金属离子及抑制剂对酶活力的影响

Table 4 Effect of various metal ions and inhibitors on enzyme Activity

试验号 No.	金属离子 Metal ion ($1/3 \times 10^{-3}M$)	相对活力 Relative activity
1	O	100 %
2	ZnCl ₂	91.1
3	Pb(CH ₃ COO) ₂	70.8
4	FeSO ₄	67.7
5	CuSO ₄	41.6
6	Al(SO ₄) ₃	7.8
7	HgCl ₂	0
8	EDTA	0
9	PCMB($1 \times 10^{-4}M$)	104.2

表 5 不同浓度 EDTA 对酶抑制作用比较

Table 5 Effect of different concentrations of EDTA on enzyme activity

EDTA	纯酶抑制率 Purified enzyme inhibition rate (%)	粗酶抑制率 Crude enzyme inhibition rate (%)
0	0	0
$1 \times 10^{-5}M$	100	99
$1/3 \times 10^{-3}M$	100	99.6
$1 \times 10^{-4}M$	100	99.3
$1 \times 10^{-3}M$	100	37.0
$1 \times 10^{-4}M$	41	6.0

两者几乎全部失活。可能是由于粗制品中总的金属离子的含量要比精制酶中含量高之故, 因此以同一浓度 EDTA 处理, 其抑制率不同, 一旦 EDTA 量达 $10^{-4}M$ 时, 对二者的抑制率达到一致。

(五) 抗炎活性试验: 用 AS 1.398 冷冻品, 按 40 mg/kg 大鼠小肠给药时显示明显的抗炎作用, 其抑制率达 37.6%, LD_{50} 为 45.06 mg/kg, 与菠萝蛋白酶接近, 对慢性气管炎化痰效果明显, 并对烧伤疤痕有明显的止痒减痛及软化作用。

参 考 文 献

- [1] G. J. Martin: *Exp. Surg.*, 20: 227, 1962.
[2] Innerfield et al.: *S. Clin Invest*, 31: 1049, 1952.

- [3] 山村雄一: 药局, 23 (10): 51—58, 1972。
 [4] 官田孝一: 武田研究所报, 31 (8): 10, 1972。
 [5] 伊藤万藏, 杉甫衛: 药学杂志, 88(12): 1576—1582, 1588—1595。
 [6] Matsubara, H. et al.: *The Journal of Biochemistry*, 45(4): 251, 1958。
 [7] Colowick and Kaplan: *Methods in Enzymology III*, Academic Press Inc. New York, 1957, p. 448。
 [8] N. H. 普季洛娃著: «胶体化学实验作业指南», 南开大学物理化学教研组译, 高等教育出版社, 1957年。
 [9] Hobart, H. Willard et al.: *Instrumental Methods of Analysis*, D. Van Nostrand Company Inc. Toronto, New York, London, 1955, p. 9。
 [10] Tadanobu Nakadal et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(12): 2695—2701, 1973。
 [11] Tadanobu Nakadal et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(12): 2703—2708, 1973。

STUDY ON NEUTRAL PROTEASE FOR MEDICAL PURPOSE

Qiu Xiubao Re Yonge

Cheng Xiulan Cui Fumian

Xu Daya Li Wannian

Sun Shizhang Li Luxian

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Neutral protease of *Bacillus subtilis* AS 1.398 was purified by the following procedures: The crude enzyme (5×10^4 u/g) was extracted with tap water (1:10) at 4°C for 12 h; to 100 ml of the extract, 20 ml CaCl₂ solution (60 g CaCl₂ in 100 ml distilled water) and 25 g ammonium sulfate were added, the precipitate was removed by filtration, to 100 ml filtrate, 30 g (NH₄)₂SO₄ was added, and the precipitate was collected by filtration and redissolved in 0.005 M phosphate buffer of pH 7.2, desalted with Sephadex G-25 and then lyophilized.

A five-fold purification was achieved: the final product, a greyish white powder has an activity of $6-10 \times 10^6$ u/g, some characters of the purified enzyme were as follows: optimal pH 7.2—7.4, stable in the range of pH 6.5—8.0; optimal temperature, 50—55°C; about 80% of its activity remained at 37°C for 2h; and loss completely at 60°C for 10 min. It is strongly inhibited by EDTA (10^{-4} M) and metal ions such as Hg⁺, Al³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and not inhibited by PCMB (10^{-4} M).