微 生 物 学 报 34 (4):293—300,1994
Acta Microbiologica Sinica

短小芽孢杆菌碱性蛋白酶BP的纯化和性质

邱秀宝
(中国科学院微生物研究所 北京 100080)
高 东 王颖达
(山东大学微生物系 济南 250100)

摘 要 短小芽孢杆菌产生的碱性蛋白酶BP经CM—Sephadex-C-50和Sephadex-G75两个柱层析，得到了聚丙烯酰胺凝胶电泳纯的酶组分，比活力从1307μ/mg提高到5538μ/mg。活力回收为21%，酶水解酪蛋白的最适反应温度为50℃，最适pH为9.5，Mn^{2+}、Ca^{2+}对酶有激活作用，Hg2+、Ag^{+}对酶有抑制作用。酶的热稳定性不高，但在Ca^{2+}保护下，热稳定性明显提高。酶的最适作用底物为酪蛋白，对血红蛋白、蛇毒蛋白、牛血清蛋白、卵蛋白、核糖核酸酶也有水解作用。对酪蛋白的Km为0.62%，V_{max}为50μg/min。DFP可完全抑制酶活性，PMSF和NBS也严重抑制酶活力，PCMB、*o*-PTH和EDTA几乎不抑制酶活力。纯酶的分子量为25000Dal。该酶蛋白含有17种氨基酸，其中甘氨酸(Gly)和丙氨酸(Ala)为主要氨基酸。

关键词 短小芽孢杆菌，蛋白酶，提纯和性质

早在1954年，Hagihara[1]纯化了枯草芽孢杆菌蛋白酶(Subtilisin)，1970年Keay[2]等研究了短小芽孢杆菌(*Bacillus Pumilus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus Subtilis*)等碱性蛋白酶，并通过离子交换等方法将它们分离纯化。70年代由河南皮革研究所、天津酶制剂厂研制了短小芽孢杆菌209碱性蛋白酶，用于皮革脱毛。1980年经邱秀宝等[3]对工业用209碱性蛋白酶进行了部分纯化，并对酶的性质和应用进行了研究。本文在BP(*Bacillus Pumilus*)试剂酶部分纯化的基础上进一步提纯，达到电泳纯，并对其性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

样品蛋白酶BP(江苏无锡酶制剂厂生产)，CM-Sephadex-C-50(瑞典pharmacia公司)，Sephudex-G-75、对氯汞苯甲酸(PCMB)、邻二氮菲(*o*-PTH)、碘乙酸(IAA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、酪蛋白(Casein)等均为进口产品，分子量标准蛋白为科中公司产品。

1.2 方法

1.2.1 蛋白酶活力测定[3,5]

1.2.2 蛋白测定：Lowry法[6]

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳[7]

1.2.4 SDS-PAGE[8]：采用10%SDS的聚丙烯酰胺垂直板电泳。标准蛋白为：

本文于1992年12月30日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Phosphorylase b(94000)、Albumin(67000)、TMV 外壳蛋白(17500)。

1.2.5 CM-Sephadex-C-50 柱层析：使用 2.6×50cm 层析柱，将处理好的凝胶装柱后，用 pH8.6 0.02mol/L Gly-NaOH 缓冲液平衡，上样后用 0.02mol/L pH8.6 苷氨酸-NaoH 缓冲液及不同浓度缓冲液的梯度洗脱，分步收集器速度为 0.67 ml/min，分别测收集各管的蛋白和活力，将有酶活部分合并，冷冻干燥。

1.2.6 Sephadex-G-75 柱层析：将 CM—Sephadex-C-50 得到的活性峰合并，经冻干浓缩，取一定量干粉溶解后，用水透析进行 Sephadex-G-75 柱层析(1×180cm)，用 0.02mol/L Gly-NaOH 缓冲液进行洗脱，收集蛋白酶活力峰，冷冻干燥。

1.2.7 米氏常数(Km)和最大反应速度(V_{max})测定[9]：以酪蛋白为底物，用 0.05mol/L pH9.5 的硼砂-NaOH 缓冲液配成不同浓度，与酶液 40℃反应 10 分钟，用 Folin 法测活力。根据 Lineweaver-Burk 法计算 Km 及 V_{max}。

1.2.8 氨基酸组成的测定：在有蛋白酶样品的试管中加入 5.7mol/L 恒沸 HC1 抽真空封口，110℃水解 24 小时，抽干 HC1 后加样品缓冲液上机分析。.

2 结果

2.1 酶的纯化

2.1.1 CM-Sephadex-C-50 柱层析：称取 0.1g 蛋白酶 BP，加水溶解上柱，结果见图 1，活性峰为峰 I。

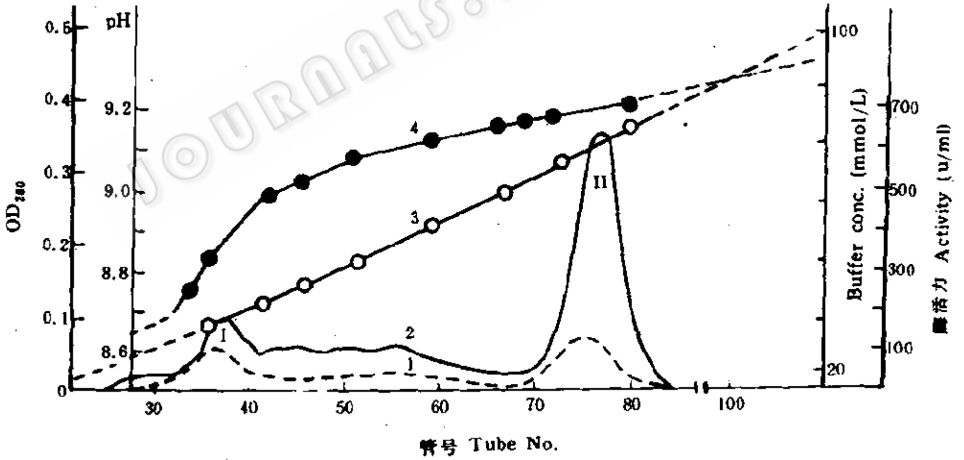

图 1 CM-Sephadex-C-50 柱层析

Fig. 1 Elution Pattern of the protease B P from CM-Sephadex-C-50 column

1. 蛋白 Protein (OD_{280})； 2. 活力 Activity； 3. 离子浓度 Ion conc； 4. pH.

2.1.2 Sephadex-G-75 柱层析：将上柱收集的峰 I 为样品上柱，用 LKB 紫外检测仪检测峰形，结果见图 2。两柱层析结果见表 1。从表 1 结果看，经二次层析纯化酶的比活由 1307 提高到 5538u/mg，纯度提高 4.26 倍。酶纯度用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，结果见图 3。经二次层析后得到的主峰样品达到了电泳纯。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

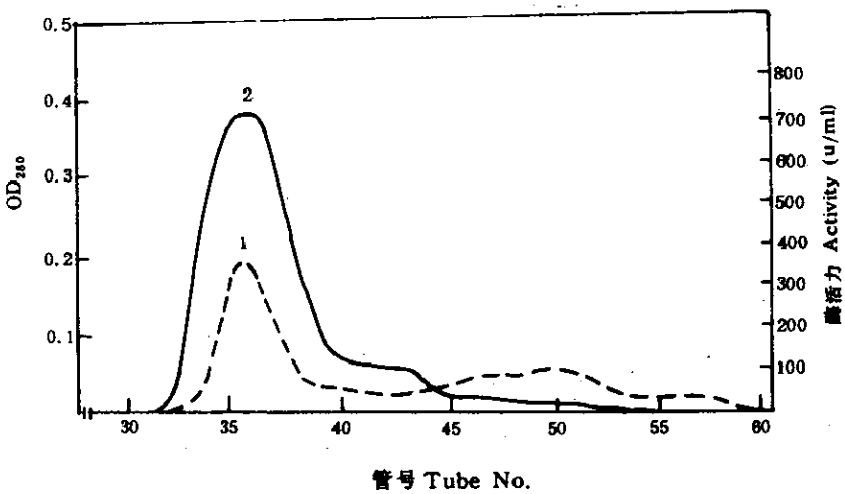

图 2　Sephadex-G-75 柱层析

Fig. 2　Elution pattern of fraction Ⅰ from sephadex-G-75

1. 蛋白 protein (OD_{280}); 2. 酶活力 Activity.

表 1　纯化结果

Table 1　Purification of the protease BP

步骤 Step	活力 Activity (U)	活力 Activity 收率(%) Recovery	蛋白 Protein (mg)	蛋白 Protein 收率(%) Recovery	比活 Specific activity (U/mg)	提纯倍数 Purification fold
蛋白酶 BP Enzyme sample	97152	100	74.3	100	1307	1
CM-Sephadex-C-50	32755	33.7	8.231	11.1	3979	3.04
Sephadex-G-75	19980.6	21	3.07	4.14	5538	4.26

2.2　分子量测定(SDS-PAGE)

纯酶的分子量是通过 SDS-PAGE 垂直板电泳测定的,由标准蛋白的相对迁移率和分子量的对数作图(图 4),查得纯酶的分子量为 25000。

2.3　动力学常数的测定

将 1ml 酶液与 1ml pH 9.5 不同浓度的酪蛋白在 40℃反应 10 分钟,用 Folin 法测活力,以浓度的倒数为横坐标,以反应速度的倒数为纵坐标作图,由图计算酶的 Km 为 0.62%,V_{max}为 50μg/min。

2.4　酶的性质

2.4.1 酶作用最适温度:在 pH9.0 的条件下,1ml 酶与 1ml 1%酪蛋白相混合,在不同温度下分别反应 10 分钟,用 Folin 法测活力,见图 6。纯酶的最适反应温度为 50℃,在 40—55℃之间均具有较高酶活力。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

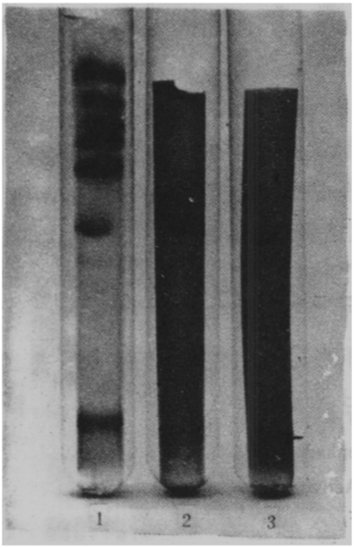

图 3　聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 3　Polyacrylamide gel electrophoretic pattern

1. 蛋白酶 BP protease;

2. CM-Sephadex-C-50(fraction Ⅱ);

3. Sephadex-G-75(fraction Ⅰ).

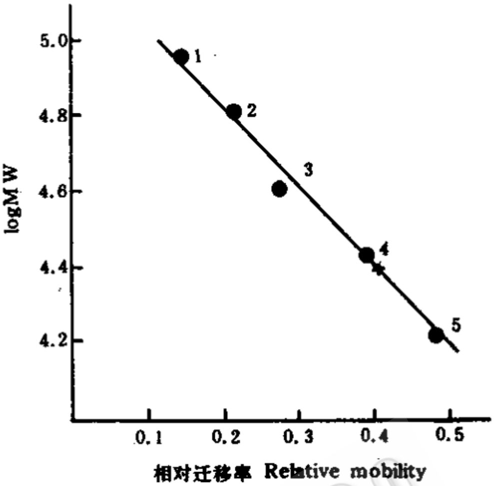

图 4　SDS-PAGE 测纯酶分子量

Fig. 4　Determination of Molecular weight by SDS-PAGE

标准蛋白 Standard proteins:

1. 磷酸化酶 b Phosphorylase b(94000);

2. 白蛋白 Albumin(67000);

3. 肌动蛋白 Actin(43000);

4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase(30000);

5. TMV Coat protein(17500);　* 纯酶 Purified enzyme.

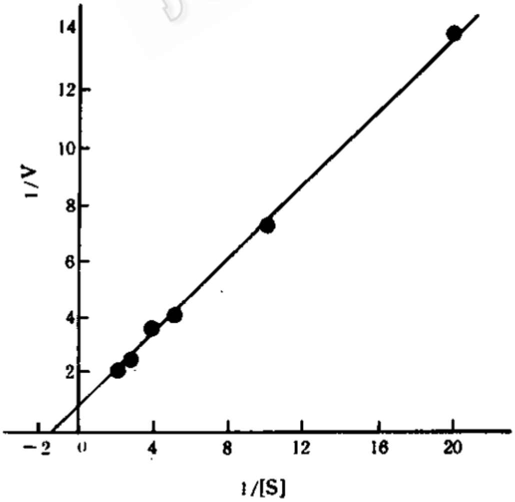

图 5　双倒数法测蛋白酶的 Km 值和 V_{max} 值

Fig. 5　Km and V_{max} Value by the method of Lineweaver-Burk

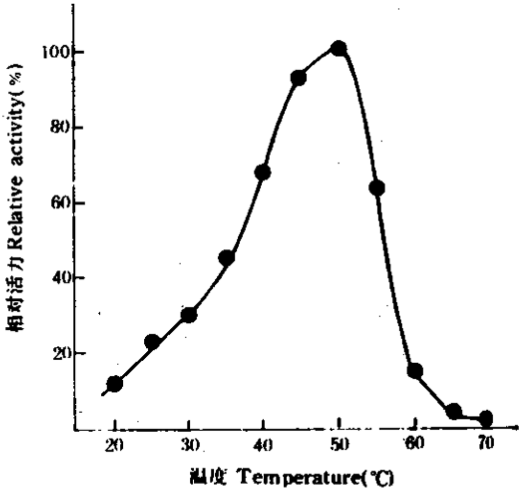

图 6　酶作用的最适温度

Fig. 6　The optimal reaction temperature of purified enzyme

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

2.4.2 酶作用最适 pH：以酪蛋白为底物，用 0.1mol/L 不同 pH 缓冲液配制成 1%浓度，按 Folin 法测活力，结果见图 7。酶作用的最适 pH 为 9—10，在 8—11 的范围均具较高活力。

2.4.3 酶的热稳定性：纯酶经不同温度处理后，再在 40℃下测定其残存活力，结果见图 8。酶的热稳定性不高，60℃下 10 分钟活力全部损失，在 Ca^{2+}保护下热稳定性显著提高，50℃处理 60 分钟活力保持 80%以上。

2.4.4 pH 对酶稳定性的影响：用不同 pH 配制的酶液在 40℃处理 60 分钟，再用 pH9.2 缓冲液将其稀释一定浓度，并使 pH 值均达到同一测定 pH 值，常规 Folin 法测剩余酶活力。在 40℃条件下酶的稳定性很好。在 pH5.5—12.0 之间均保持 80%以上活力。其中以 pH10 最稳定。

2.4.5 金属离子对酶活力的影响：将酶液与各种离子混合置 40℃10 分钟，用 Folin 法测剩余活力，以不加金属离子试验为对照，结果见表 2。结果表明，Ca^{2+}对酶稍有激活作用，而 Hg^{2+}、Ag^{+}离子对酶有抑制作用。

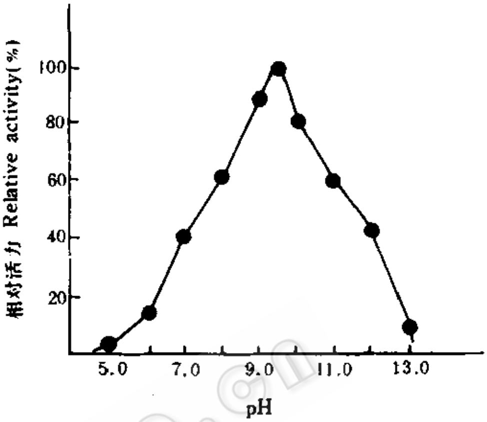

图 7　酶作用最适 pH

Fig. 7　The optimal reaction pH of enzyme

缓冲系统：pH5 醋酸缓冲液 Acetate buffer；
pH6—8 磷酸缓冲液 Phosphate buffer；
pH9—13 硼砂-NaOH 缓冲液 Borax-NaOH buffer.

表 2　金属离子对酶活力的影响

Table 2　Effect of metal salt on enzyme activity

金属离子 Metal salt (1×10^{-3}mol/L)	剩余活力 Residual activity (OD_{680})	相对活力 Relative activity (%)
对照　Control	0.4	100
$MnCl_2$	0.451	112
$Ca(Ac)_2$	0.43	107
NaCl	0.402	100.5
KCl	0.38	95
$Pb(Ac)_2$	0.382	95.5
$MgSO_4$	0.392	98
$ZnCl_2$	0.33	92.5
$FeSO_4$	0.349	86.7
$CuSO_4$	0.32	80
HgCl	0.159	39.7
$AgNO_3$	0.042	10.5

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

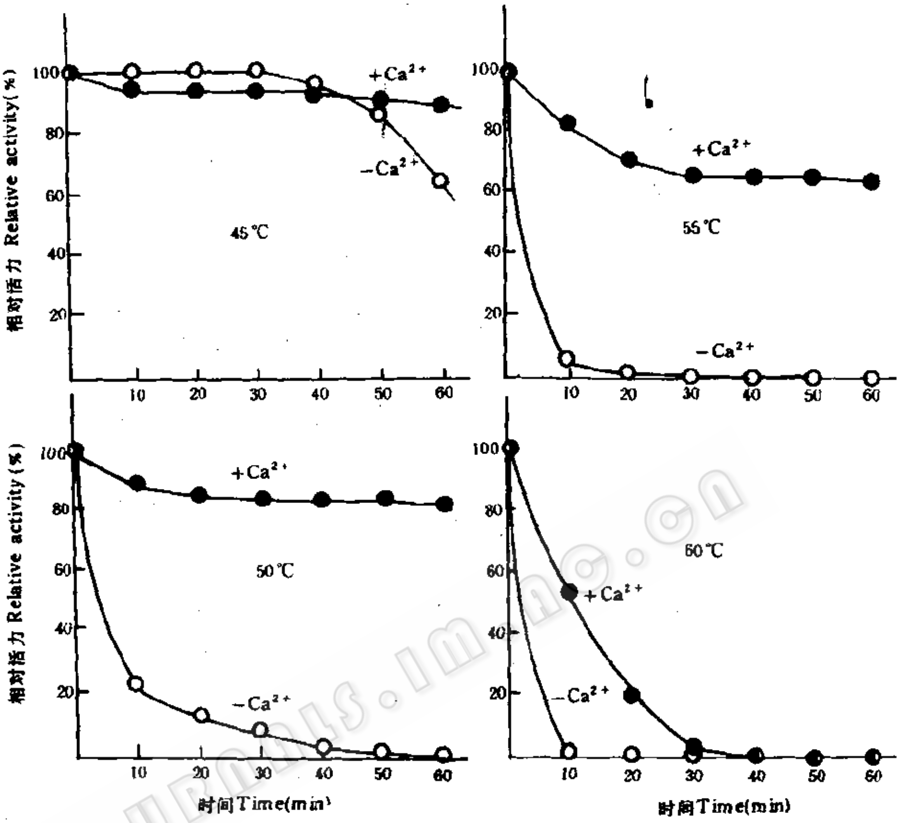

图 8　酶的热稳定性

Fig. 8　Effect of temperature on enzyme stability

2.4.6　各种化学修饰剂对酶活力的影响：将化学修饰剂与酶液混合，使修饰剂终浓度为 1×10^{-3}mol/L，在 40℃保温 10 分钟，用 Folin 法测活力(以酪蛋白为底物)，结果见表 3。

实验表明 DFP 几乎全部抑制酶活力，而 PCMB 和 EDTA 几乎不抑制酶活性。

2.4.7　酶对各种天然蛋白的水解作用：以 10 种不同的天然蛋白为底物，用 pH9.5 的 0.05mol/L 硼砂-NaOH 缓冲液配制成 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[5]测活力，结果见表 4。

实验表明该酶对酪蛋白水解作用最强，但不水解丙种球蛋白、硫酸鱼精蛋白和溶菌酶等。

2.5　酶蛋白氨基酸组成分析

分析结果表明有 17 种氨基酸组成(天冬、苏、丝、谷、甘、丙、胱、缬、甲、硫、亮、异亮、酪、苯丙、赖、组、精、脯)，其中以非极性 R 氨基酸为主，占总氨基数的 41.1%，氨基酸含量以甘氨酸和丙氨酸为最高。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表 3　各种修饰剂对酶活力的影响

Table 3　Effect of various chemical reagents on the enzyme activity

修饰剂 Chemical reagents (1×10^{-3}mol/L)	剩余活力 Residual activity (O D_{680})	相对活力 Relatine activity (%)
对照　Control	0.6	100
PCMB	0.55	91.7
IAA	0.27	45
o-PTH	0.465	77.5
PMSF	0.23	38.0
2-hydroxy-5-nitrobenzyl Bromide	0.52	86.7
EDTA	0.55	91.6
NBSF	0.225	37.5
DFP	0.015	2.5

表 4　酶对各种天然蛋白的水解作用

Table 4　Hydrolytic activity of the enzyme for natural proteins

天然蛋白 Natural proteins	吸光度 A_{570}
酪蛋白　Casein	0.104
血红蛋白　Haemoglobin	0.058
蛇毒蛋白　Snake venom protein	0.065
牛血清蛋白　Bovine serum albumin	0.061
卵蛋白　Egg albumin	0.013
血纤维蛋白　Fibrin	0.091
核糖核酸酶　Ribonuclease	0.041
丙种球蛋白　γ-globuline	0
硫酸鱼精蛋白　Protamine sulfate	0
溶菌酶　Lysozyme	0

3　结论

蛋白酶 BP 经二次层析后获得电泳纯，纯度提高 4.26 倍，酶性质的研究结果表明纯酶的主要性质与未纯化酶完全相同，说明主要活性组分是同一个蛋白，而且性质很稳定。

由于 DFP 强烈的抑制酶活性，而 EDTA 没有抑制作用，因此它是属丝氨酸蛋白酶。由于 NBS、PMSF 也强烈抑制纯酶活性，表明酪氨酸残基为酶活性的必需基团。

氨基酶分析结果因甘氨酸量太高，与丙氨酸峰相重、含量不好计算，这一结果有待进一步分析。

参　考　文　献

[1]　Hagihara B. Annual Reports of Scientific. Works of the Faculty of Science of Osaka University, 1954, **2**: 35.

[2]　Leonard Keay *et al*. *Biotechnol. Bioeng*, 1970, **12** (2): 213—249.

[3]　邱秀宝，程秀兰. 微生物学报，1984，**24** (1)：66—73.

[4]　Spies J R. *Method in Enzymology*, 1975, **3**: 467.

[5]　Spies J R. *Methods in Enzymology* 1975, **3**: 468.

[6]　Lowry O H *et al*. *J Biol Chem*, 1951, **193** (1): 265—275.

[7]　Maurer H R. Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Walter de Gruyter(ed) Berlin, 1971. 42—53.

[8]　孙晋武. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，见：张树政主编. 工业酶制剂(上册). 北京：科学出版社，1984. 321.

[9]　王庆诚. 酶动力学. 见：张树政主编. 工业酶制剂(上册). 北京：科学出版社，1984. 28.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

STUDIES ON PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF PROTEASE BP FROM *BACILLUS PUMILUS*

Qiu Xiubao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing* 100080)

Gao Dong Wang Yingda

(*Department of Microbiology, Shandong University, Jinan* 250100)

Abstract Protease BP from *B. pumilus* was purified to homogenety judged by polyacrylamide gel electrophoresis. The purification procedure included ion-encharge chromatography on CM-Sephadex-C-50 and Sephadex-G-75 chromatography. The enzyme was purified 4.26-fold with a yield of 21%. The molecular weight of the enzyme was determined by SDS-PAGE to be about 25000 Dal. The enzyme was the most active at 55℃ and pH 9.5. The enzyme activity was stimulated by Mn^{2+} and Ca^{2+}, but was inhibited by Ag^{+} and Hg^{2+}. The enzyme was unstable at 50℃—60℃. However, in the present of Ca^{2+}, the stability increased so that more than 80% of the original activity was maintained on heating at 50℃ for 60 min and 60% at 55℃ for 60 min. The optimum substrate for the enzyme was casein. The enzyme could effect on haemoglobin, snake venom protein, bovine serum albumin etc., but its effect on lysozyme, protamine sulfate and r-globuline was poor. The Km value for casein was 0.62% and V_{max} was 50 μg/min. The enzyme activity was inhibited completely by DEP and was inhibited by PMSF and NBSF too. PCMB, *o*-PTH and EDTA showed little inhibitory effect on the enzyme. The protease includes 17 amino acids, among which, Gly and Ala are dominant amino acids.

Key words Bacillus pumilus, Protease, Purification and property

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn