

# “东一号”剑麻蛋白酶分离纯化及特性研究

徐凤彩 卢顺舵 廖毅 李明启

(光合作用研究室)

**摘要** 比较了用乙醇沉淀法和硫酸铵盐析法从“东一号”剑麻中提取蛋白酶的效果。用前者制得的粗酶经 Sephadex G-25 柱层析得两个蛋白峰, 其中峰 I 与酶活性重叠。峰 I 再经 SP-Sephadex C-50 离子交换柱层析, pH. 离子强度线性梯度洗脱得 4 个蛋白峰, 其中峰 4 与酶活性重叠。此酶液经聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳, 在每条胶柱上呈单一蛋白带; 置 4℃ 下 2 d 后出现六角形结晶。结晶酶液在 pH 5.5-10.0, 60℃ 范围内稳定性较好; 其最适 pH 为 7.5; 最适温度为 40℃;  $K_m$  (酪蛋白) 值为 0.114% (w/v) 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测得其分子量 66KD; 用 Sephadex G-100 柱层析测得的分子量为 69.9KD。用 Ellman's 试剂测得其游离巯基含量为 4.3 mol-SH/10<sup>5</sup>g 蛋白质。

**关键词** “东一号”剑麻: 巯基蛋白酶

“东一号”剑麻 (*Agave hybrid* No: 11648) 是龙舌兰科 (Agavaceae) 龙舌兰属 (*Agave*) 中的一个杂交种, 以为假菠萝麻 (*A. angustifolia*) 为母本, 蓝剑麻 (*A. amaniensis*) 为父本杂交, 再与蓝剑麻回交而成<sup>[1]</sup>, 是一种热带经济作物, 主要利用其叶纤维, 去纤维后的叶汁中含有丰富的蛋白质。孙崇荣等<sup>[1]</sup>用硫酸铵分部沉淀法从中提取一种蛋白酶, 并认为是一种巯基蛋白酶; 继而用亲和层析获得纯酶制剂, 并证明有两个组分<sup>[2]</sup>, 但其酶学性质尚需进一步研究。我们从“东一号”剑麻去纤维后的废弃汁中用乙醇分部沉淀法制得粗酶制剂, 经纯化获得结晶, 并研究其性质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

“东一号”剑麻, 采自校园内生长良好的成熟叶片。

酶蛋白 (进口分装): 考马斯亮蓝 G-250/R-250 (Sigma), Sephadex G-25, G-50, SP-Sephadex C-50 (Pharmacia), 低分子量标准蛋白 (上海中华公司) 等, 所用试剂均为生化或分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 粗酶制剂制备 两种方法: 其一, 320 g 材料加入 250 ml, 30% (V/V) 预冷 (-20℃) 乙醇压榨出汁, 4 层纱布过滤, 离心 (3500 rad/min, 15 min) 上清液加入冷乙醇至 50% (V/V), 置冰箱过夜, 离心 (同上) 收集沉淀, 用 -20℃ 丙酮脱水干燥, 即得白色粉末为粗酶。其二, 150g 材料加入 0.05 mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液 300ml 匀浆, 4 层纱布过滤, 离

1992-08-26 收稿

• 经我校植物教研室徐祥浩、吴万春教授鉴定。

心(同上),上清液加硫酸铵至30%饱和度,离心(同上)除去沉淀,上清液再加硫酸铵至50%饱和度,离心收集沉淀,低温真空干燥为粗酶。

1.2.2 酶的纯化 Sephadex G-25 层析柱(2.5 cm×30 cm)先用 0.05 mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液平衡,取方法1制备的粗酶1g溶于上述缓冲液并定容至10 ml,离心(9000 rad/min, 10 min, 室温),取清液5 ml(1.12 mg 蛋白/ml)上柱,用上述缓冲液洗脱至洗脱液在280 nm 波长下无光吸收(1.25 ml/min, 5 ml/管),收集呈酶活性的第8~14管共35 ml,透析(对重蒸水),低温真空浓缩至5 ml(1.24mg 蛋白/ml),再上柱。SP-Sephadex C-50 经预处理<sup>[4]</sup>装柱(2.5×30 cm),0.02 mol/L pH 7.4 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液平衡,用 pH4.0~8.0, 0.02~0.4 mol/L 上述缓冲液进行线性梯度洗脱(60ml/h, 5 ml/管),收集呈酶活性的第4峰(即56~72管)洗脱液共60 ml,对重蒸水透析过夜,再经低温真空浓缩至蛋白质浓度为1.1 mg/ml左右,置冰箱(4℃)2 d后出现结晶,7 d后结晶完全,离心(10500 g, 4℃, 30 min)收集结晶备用。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳 用2.5%浓缩胶,10%分离胶。结晶酶溶于0.05 mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液并定容至5 ml(1.2/mg 蛋白/ml),每管加样5 μl 在5 mA 下电泳100 min。脱胶后用0.25%考马斯亮蓝R-250(含20%TCA)染色,以7%乙酸退色2 d,观察蛋白带。

1.2.4 游离巯基含量测定 用 Ellman's 试剂法<sup>[10]</sup>。

1.2.5 分子量测定 两种方法:其一,SDS-PAGE 法<sup>[5]</sup>;其二,Sephadex G-100 柱层析(1.5 cm×60 cm)法,0.05 mol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液平衡,加样6 ml(1.21 mg 蛋白/ml),同一缓冲液洗脱(60 ml/h, 5 ml/管)。均用下列标准蛋白:磷酸化酶 B (MW 94KD);牛血清白蛋白 (MW 67KD);肌动球蛋白 (MW 43KD);碳酸酐酶 (MW 30KD);TMV 外壳蛋白 (MW 17.5KD)。

1.2.6 酶活性测定 用酪蛋白为底物。0.1 ml 酶液加入 0.9 ml 激活剂(0.05 mol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液内含 20m mol/L Cys. 1 m mol/LEDTA),加入预热的1%酪蛋白溶液(W/V, 0.05 mol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液配制)1 ml, 40℃反应10 min,加入3 ml 三氯乙酸(TCA)溶液(0.11 mol/L TCA, 0.22 mol/L NaAc, 0.33 mol/L HAc 配制)终止反应(对照先加TCA,后加底物),静置30 min,过滤,上清液于275 nm 波长下比色。在上述条件下每10 min 增加1个光吸收单位的酶量为1个酶活力单位(U)。

1.2.7 蛋白质含量测定 用 Bradford 法<sup>[8]</sup>,并以牛血清白蛋白为标准蛋白。

## 2 实验结果

2.1 酶制剂制备与纯化 两种方法制备的粗酶制剂(表1)表明,乙醇法提取的产率(g/

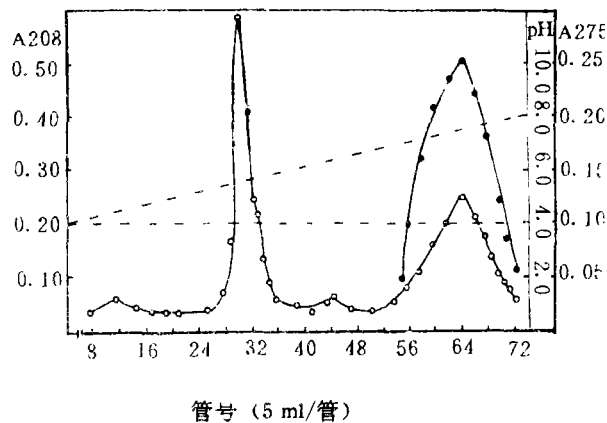


图1 SP-Sephadex C-50 离子交换柱层析 SP-Sephadex C-50 用 0.02 mol/L pH7.4 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液平衡,用 0.02 mol/L~0.4 mol/L、pH4~pH8.0 柠檬酸-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液 pH、离子强度线性梯度洗脱(60 ml/h)。o—o 蛋白质峰;●—● 酶活性峰;---pH 梯度。

g 鲜重) 较高, 但比活力稍低, 为白色粉末; 盐析法制备的粗酶比活力较高, 但产率稍低, 为淡绿色。

表1 粗酶制剂的制备方法

方 法	酶产率 (%)	酶的比活力 (U/mg 蛋白)
乙醇分部沉淀法	2.73	6.13
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 盐析法	2.33	7.21

乙醇法制备的粗酶经 Sephadex G-25 柱层析分离, 洗脱液出现两个蛋白峰, 其中第 1 峰为酶活性峰, 收集峰 1 洗脱液经 SP-Sephadex C-50 离子交换柱层析, pH、离子强度线性梯度洗脱, 得 4 个蛋白峰, 其中第 4 峰为酶蛋白峰 (图 1)。此峰洗脱液经聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳, 在每条胶柱上均只显示一条蛋白带 (图 2)。此酶液置冰箱内 (4℃) 2 d 后出现六角形结晶 (图 3)。

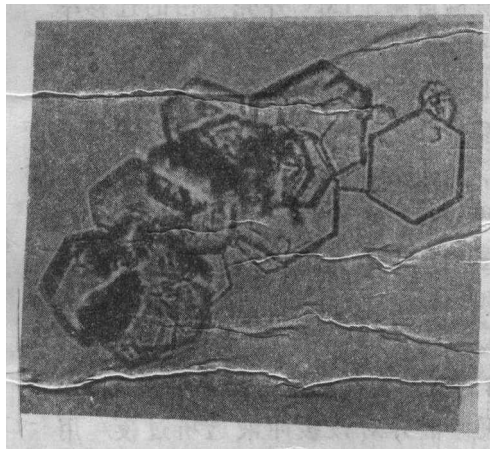
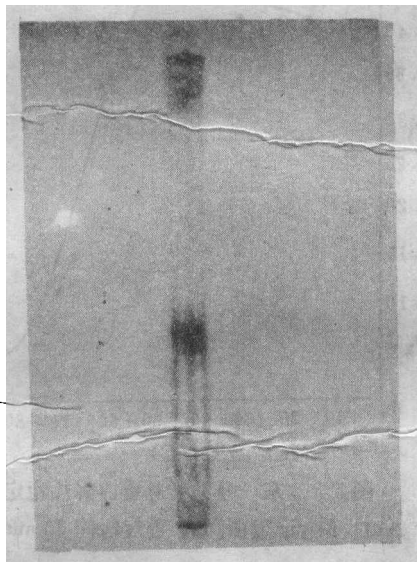


图2 “东一号”剑麻蛋白酶聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

图3 “东一号”剑麻蛋白酶结晶 (100X)

酶的纯化结果如表 2, 酶被纯化了 34 倍。

表2 酶的分离纯化结果

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总体积 (ml)	总活力 单位 (U)	比活力 (U/mg)	纯化 ×
1 抽 提	320	500	1186	3.70	1
2 离心上清液	250	400	1108	4.43	1.2
3 粗 酶	98.9	8.76 (g)	712.6	7.21	1.9
4 Sephadex G-25 层析	7.0	35	68.5	9.97	2.6
5 离子交换柱层析	0.4	60	25.5	63.8	17.2
6 结 晶	0.07	2	8.9	125.7	34.0

## 2.2 酶的酸碱稳定性及最适 pH 结晶酶液在 pH2.5~11.5、室温下放置 4 h 后调 pH 至

7.5 测定各自的酶活力结果表明, 该酶在 pH5.5~10.0 范围内活力稳定. 在上述不同 pH 条件下测定酶活力结果 (图 4) 表明其最适 pH 为 7.5.

2.3 酶的热稳定性及最适温度 结晶酶液在 16~90℃ 下保温 30 min 后, 流水冷却, 分别测定酶活性. 结果 (图 5) 表明该酶在 16~60℃ 内酶活力稳定. 在上述温度下直接测定酶活力结果表明其最适温度为 40℃.

2.4  $K_m$  值 以酪蛋白为底物, 测定酶在 0.0313, 0.035, 0.0417, 0.0625, 0.083, 0.125, 0.25, 1.0% (W/V) 不同底物浓度下的酶活力, 双倒数作图 (图 6) 求得  $K_m$  值为 0.114%.

2.5 酶的分子量测定 用 SDS-PAGE 电泳法<sup>[5]</sup>求得磷酸化酶 B、牛血清蛋白、肌动球蛋白、碳酸酐酶、TMV 外壳蛋白的迁移率 ( $R_m$ ) 分别为 0.540, 0.607, 0.680, 0.736, 0.810, 以  $LgM-R_m$  作图, 依据“东一号”剑麻蛋白酶的  $R_m$  (0.610), 求得其分子量为 66.0KD, 用 (Sephadex G-100) 柱层析法以洗脱体积 ( $V_e$ , ml) 对分子量的对数 ( $LgM$ ) 作图 (图 7), 依据“东一号”剑麻蛋白酶的洗脱体积 ( $V_e=144.4$  ml) 求得其分子量为 69.9KD.

2.6 游离巯基含量测定 结晶酶溶于 Tris-HCl 缓冲液并对该缓冲液透析过夜, 用 Ellman's 试剂<sup>[9]</sup>测定“东一号”剑麻蛋白酶游离巯基含量为  $4.3 \text{ mol-SH}/10^{-5} \text{ g}$  蛋白. 若依上述平均分子量 68KD 计, 每 mol 酶蛋白含有 2.9 mol 游离巯基.

### 3 讨论

龙舌兰属 (*Agave*) 中经研究含有蛋白酶的有 5 个种 (或杂交种). 其中 Tipton<sup>[10,12]</sup> 报告在剑麻 (*A. sisalana*) 中存在被称为“Agavain”的蛋白酶, Du Toit<sup>[6]</sup> 报告在金边龙舌兰 (*A. americana* var. *variegata*) 中存在的他认为是碱性丝氨酸蛋白酶; 孙崇荣等<sup>[1,2]</sup> 报告“东一号”剑麻中存在的巯基蛋白酶 (Agavain-SH), 以及我们实验室发现的番麻 (*Agave americana*)<sup>[6]</sup> 和假菠萝麻 (*Agave angustifolia*) (中

国植物生理学·中国植物生理学会第五届全国会议论文摘要汇编, 武汉, 1990, 10.27~

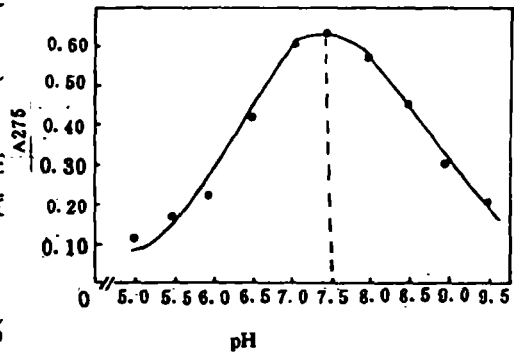


图4 “东一号”剑麻蛋白酶最适 pH (1.21mg 蛋白/ml)

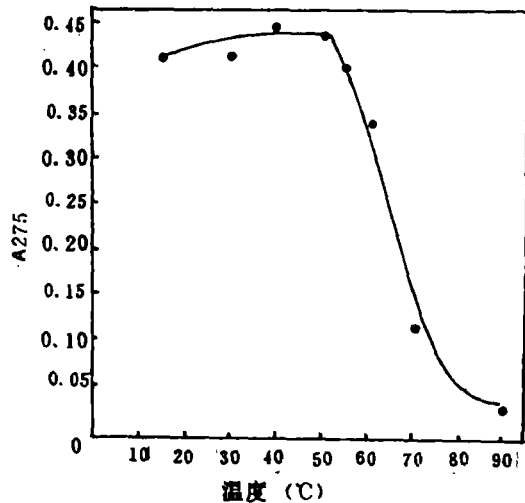


图5 “东一号”剑麻蛋白酶热稳定性 (1.21 mg 蛋白/ml. 处理时间 30 min)

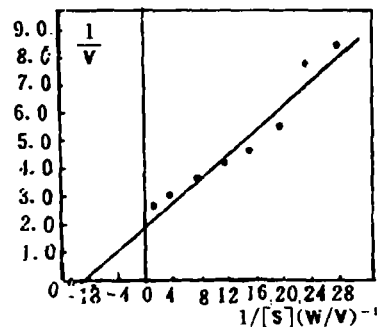


图6 “东一号”剑麻蛋白酶的双倒数作图 (底物: 酪蛋白; 酶蛋白浓度: 1.21 mg/ml)

11.02, 第 131 页) 叶片中的巯基蛋白酶。从这几种蛋白酶的特性 (表 3) 可以看出, 它们的分子量有较大差异, 最大的和最小的相差 1 倍; 但它们的最适 pH 较接近, 约在 pH7.0~8.5 之间。至于这几种酶蛋白的特征, Tipton<sup>[10,12]</sup> 最初报告 “Agavain” 不被 pCMB 抑制, 认为不是巯基蛋白酶, 但它被 EDTA 抑制, 因此认为是一种含 Fe 的金属蛋白酶; 也可被 DFPA 抑制, 又可能是一种丝氨酸蛋白酶。但 Boller<sup>[7]</sup> 重复 Tipton 的实验却未能证实他的结果, “Agavain” 对 EDTA 不敏感而受 PMSF 抑制。我们实验室则观察到剑麻蛋白酶受 pCMB 和 DTNB 抑制 (植物学报, 1992, 待发表)。因此 Tipton 认为 “Agavain” 是金属蛋白酶或丝氨酸蛋白酶是可疑的。Boller 认为 Tipton 所用的酶不纯, 混杂了真菌的酶。因此 “Agavain” 的性质尚待进一步证实。金边龙舌兰是番麻的一个变种, Du Toit<sup>[9]</sup> 只根据金边龙舌兰蛋白酶中测不出半胱氨酸, 便认为不是巯基蛋白酶, 但它却可被 pCMB 抑制, 因此也不能排除它亦是巯基蛋白酶, 以上看来已知几种龙舌兰属植物的蛋白酶可能均是巯基蛋白酶。

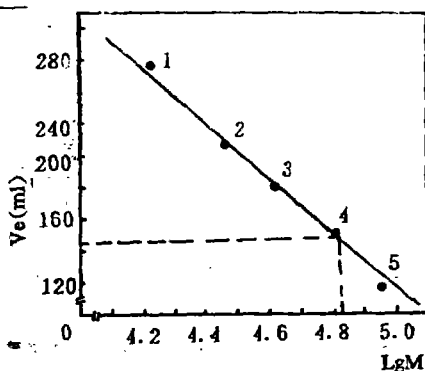


图 7 Sephadex G-100 测定

“东一号” 剑麻蛋白酶分子量

- 1 TMV 外壳蛋白
- 2 碳酸酐酶
- 3 肌动球蛋白
- 4 牛血清白蛋白
- 5 磷酸化酶 B

表 3 几种龙舌兰蛋白酶的特性比较

酶来源	酶定名	分子量 (KD)	最适 pH	最适温度 (°C)	酶活性中心特性	文献
剑 麻	Agavein	52.5	6~8.0	—	含铁 (?)	11, 12
金边龙舌兰	—	55~57	7.8~8.0	—	丝氨酸 (?)	7
“东一号” 剑麻	Agavain-SH	68.0	7.5	40	巯基	1, 2
番 麻	Aqavain-SH I	32.4~34.6	7.0~7.5	45	巯基	5
假菠萝麻	Agavain-SH II	—	8.5	45	巯基	见文

参 考 文 献

- 1 孙崇荣, 柴常星, 方深高, 孙雪英, 沈家柏, 叶启腾, 蔡华梯. 剑麻蛋白酶——一种新发现的巯基蛋白酶. 科学通报, 1980 (3): 138~140
- 2 孙崇荣, 柴常星, 方深高, 孙雪英, 沈家柏, 叶启腾, 蔡华梯. 剑麻蛋白酶的亲和层析及酶活性基团的研究. 复旦大学学报 (自然科学版), 1981, 20 (4): 377~381
- 3 李宗道编著. 龙舌兰麻. 麻类理论与技术, 上海: 上海科学技术出版社, 1980, 637~653
- 4 华家桢, 奚国良, 易庆成编译. 蛋白质的离子交换层析, 实用蛋白质化学技术, 上海科学技术出版社, 1982, 15~18
- 5 徐凤彩, 项金荣, 汪炬, 李明启. 番麻蛋白酶活性中心基团的初步研究. 华南农业大学学报, 1992, 13 (2): 61~65
- 6 郭尧君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展. 生物化学与生物物理进展 1991, 18 (1): 32~37
- 7 Boller Tin. Plant Proteolytic Enzyme. CRC Pleass. Boca Roca. Florida. 1986. Vol. 1. 68~69
- 8 Bradford M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976. 72: 248
- 9 Du Toit Pj. Isolation and partial characterization of proteinase from *Agave americana* variegata. Biophys Acta 1976. 429 (3): 911

- 10 Kor AA, Liu TY. On the mechanism of action of streptococcal proteinase. I. Active-site titration. *Biochemistry* 1973. 12: 320~328
- 11 Tipton K F. Agave: A new plant proteinase. *Biophys Acta*. 1976. 92 (2): 341~350
- 12 Tipton K F. Agavain: A metalloproteinase. *Biochem Biophys Acta*. 1966. 110 (2): 414~422

## PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A PROTEINASE FROM AGAVE HYBRID NO. 11648

Xu Fengcai Lu Shunduo Liao Yi Li Mingqi

(Department of Agricultural Biology)

**Abstract** A proteinase was extracted from the leaves of *Agave* hybrid No. 11648 by precipitation with ethanol. The crude enzyme was fractionated with Sephadex G~25 into two fractions (I and II). Only fraction I had hydrolytic activity on casein. The peak of fraction I coincides with the peak of proteinase activity. Fraction I protein was further fractionated with SP-Sephadex C~50 into four fractions (I', II', III', and IV'), and only fraction IV' had hydrolytic activity on casein. Enzyme crystals of hexagonal shape were formed after placing the enzyme solution in 4°C for two days, and a single band was found in the PAGE with the crystals. The optimum pH was 7.5, and the optimum temperature was 40°C. It was relatively stable at temperature below 60°C and at pH value ranging from 5.5 to 10.0. Its  $K_m$  value for casein was 0.114% (w/v). Its molecular weight determined by SDS~PAGE and chromatography on Sephadex G~100 with standard proteins were found to be 66KD and 69.9KD respectively. Its content of free sulfhydryl groups determined by Ellman's reagent was 4.3 mol~SH/10<sup>5</sup> g protein, approximately equal to 2.9 mol free sulfhydryl in 1 mol proteinase.

**Key words** *Agave* hybrid No. 11648; Sulfhydryl proteinase