

## 利用毛细管电泳检测适冷蛋白酶自溶的动态过程\*

孙彩云 陈秀兰 张玉忠 高培基\*\*

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

关键词 毛细管电泳, 适冷蛋白酶, 自溶

蛋白酶由于具有催化蛋白质水解的能力,因此在蛋白酶溶液中,蛋白酶分子可以相互催化,造成蛋白酶降解,酶活降低,这种现象称为蛋白酶自溶(autolysis)。许多蛋白酶都具有自溶的特点。蛋白酶的自溶对蛋白酶的研究和保存带来很多困难。因此,弄清蛋白酶自溶的特点和机制非常重要,这是探讨防止蛋白酶降解方法的基础。Kumura等<sup>[4]</sup>对荧光假单胞菌产生的蛋白酶的自溶现象进行了研究,他们发现该蛋白酶在50℃下,保温2min就丧失90%的活性。利用HPLC分离自溶片段进行N端测序表明,该酶的自溶酶切位点是不确定的,但靠近酶切位点的氨基酸常常是侧链较短的氨基酸,如甘氨酸和丙氨酸<sup>[4]</sup>。Abraham和Breuil<sup>[5]</sup>发现,升温可以使Ophiostoma piceae产生的蛋白酶很快自溶。改变pH或用EDTA部分剥夺酶的金属离子都可以使酶的构象更容易自溶,而甘油、钙离子和硫酸铵则可以提高酶的热稳定性<sup>[2]</sup>。这些研究为弄清蛋白酶自溶的特点和机制奠定了基础。

目前,研究蛋白酶自溶的方法主要是利用SDS-PAGE电泳<sup>[4-8]</sup>。SDS-PAGE电泳需要经过制胶、蛋白样品变性、上样、电泳、染色和脱色等步骤,进行一次SDS-PAGE电泳约需3~5h<sup>[1]</sup>,费时较长,这对研究蛋白酶自溶的动态过程和机制很不方便。毛细管电泳具有分离效率高、速度快、样品用量少等特点,无需制胶,一次电泳只需10min左右<sup>[2]</sup>,这为研究蛋白酶自溶的动态过程和机制带来方便。适冷蛋白酶由于结构比较松散,而且在低温下具有高的催化活性,因而其自溶的特点更为明显,是研究蛋白酶自溶的动态过程和机制的良好材料。作者从深海淤泥中分离到一株适冷菌Pseudomonas sp. SM 9913<sup>[3]</sup>,其所产蛋白酶MCP-01是一种比较典型的适冷蛋白酶(未发表结果)。本文利用毛细管电泳研究了深海所产的适冷蛋白酶的自溶动态过程。

## 1 材料和方法

## 1.1 适冷蛋白酶 MCP-01 的纯化与制备

P. sp. SM 9913 在产酶培养基<sup>[8]</sup>中,500 ml三角瓶,装50 ml培养液,200 r/min,12℃下培养60 h,10 000 r/min离心15 min,上清液加入硫酸铵至55%,8 000 r/min离心10 min。沉淀溶于50 mmol/L的磷酸(pH 7.0)缓冲液中,11 000 r/min离心20 min,取上清液。透析浓缩后上Sephadex G 100柱,用毛细管电泳检测酶的纯度,回收纯酶部分。所有的操作均在4~7℃以下进行。蛋白酶酶活测定方法同文献<sup>[1]</sup>。

## 1.2 毛细管电泳方法

毛细管电泳仪为Beckman公司生产的P/ACE™ system MDQ型。毛细管管长50 cm,内径50 μm,分离压力15 kV,进样时间5 s,进样压力0.5 Pa,电泳温度15℃。电泳缓冲液为50 mmol/L硼砂缓冲液,pH 9.0。

## 2 结果

## 2.1 利用毛细管电泳检测适冷蛋白酶 MCP-01 在磷酸缓冲液中的自溶动态过程

将制备的纯适冷蛋白酶 MCP-01 分装于0.5 ml的eppendorf管中,每管50 μl,分别在30,40,50℃保温不同的时间。保温时间到后,将酶液上毛细管电泳检测。图1为利用毛细管电泳检测蛋白酶 MCP-01 在

\* 国家863计划海洋生物技术主题、国家自然科学基金、教育部霍英东基金及教育部重点科技计划资助。

\*\* 通讯联系人。

第一作者:孙彩云,出生于1961年,工程师,目前从事海洋适冷酶的适冷机制研究。E-mail: suncaiyun@life.sdu.edu.cn

收稿日期:2002-09-12,修回日期:2002-09-14

50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中在 20 ℃ 下的自溶动态过程。图中自上而下分别为蛋白酶 MCP-01 在 20 ℃ 下保温 0, 20, 40, 80, 120 min 和 5 h 后的自溶状态。从图 1 中可以看出, 蛋白酶 MCP-01 在 20 ℃ 下发生自溶, 随着保温时间的延长, 自溶加剧, 酶蛋白峰越来越小, 而新产生的蛋白峰却越来越大, 表明随着蛋白酶的自溶降解, 降解产生的蛋白片段越来越多。图 2 自上而下分别为蛋白酶 MCP-01 在 30 ℃ 下保温 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 后的自溶状态。蛋白酶 MCP-01 在 30 ℃ 下自溶速度明显加快, 保温 1 h 后, 酶蛋白峰已经很小, 基本消失。图 3 自上而下分别为蛋白酶 MCP-01 在 40 ℃ 下保温 0, 10, 20, 30 min 后的自溶状态。蛋白酶 MCP-01 在 40 ℃ 下自溶速度进一步加快, 保温 10 min, 酶蛋白峰已基本消失, 产生很多降解的片段。

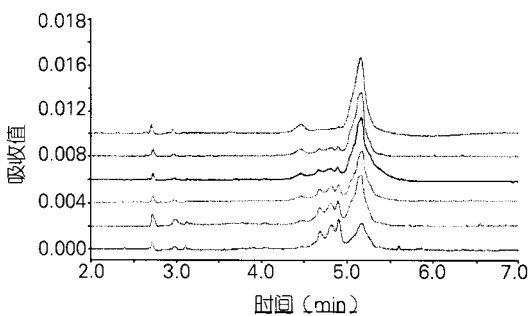


图 1 利用毛细管电泳检测的蛋白酶 MCP-01 在 20 ℃ 下的自溶动态过程  
Fig. 1 Autolysis process of protease MCP-01 incubated at 20 ℃ for different time with capillary electrophoresis

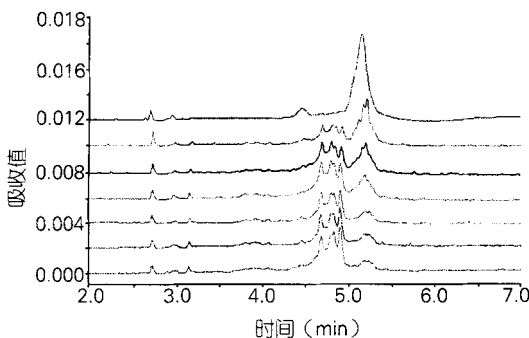


图 2 利用毛细管电泳检测的蛋白酶 MCP-01 在 30 ℃ 下的自溶动态过程  
Fig. 2 Autolysis process of protease MCP-01 incubated at 30 ℃ for different time with capillary electrophoresis

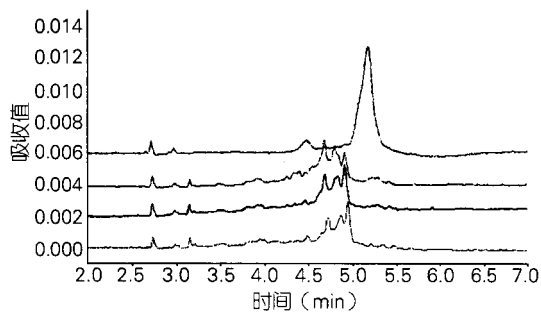


图 3 利用毛细管电泳检测的蛋白酶 MCP-01 在 40 ℃ 下的自溶动态过程  
Fig. 3 Autolysis process of protease MCP-01 incubated at 40 ℃ for different time with capillary electrophoresis

## 2.2 在磷酸缓冲液中蛋白酶 MCP-01 在不同温度下保温不同时间后的残留酶活性

测定蛋白酶 MCP-01 在磷酸缓冲液中在 20, 30, 40 ℃ 保温不同时间后的残留酶活。结果表明, 蛋白酶 MCP-01 酶活丧失较慢, 在 20 ℃ 保温 3 h 后, 酶活基本没有丧失。在 30 ℃ 和 40 ℃ 保温 60 min 后, 酶活分别丧失 14.9% 和 50.8% (表 1)。从图 3 可以看出, 蛋白酶 MCP-01 在 40 ℃ 下保温 30 min 后, 酶蛋白已经完全自溶, 但从表 1 可看出, 蛋白酶 MCP-01 在 40 ℃ 下保温 30 min 后, 仍有 81.3% 的残留酶活。这表明, 蛋白酶 MCP-01 自溶后产生的某些大蛋白片段仍具有蛋白酶酶活。

表 1 蛋白酶 MCP-01 在磷酸缓冲液中在 20, 30, 40 ℃ 保温不同时间后的残留酶活

Tab.1 The residual activity of MCP-01 incubated for different time at 20, 30, 40 ℃

保温温度 ( ℃ )	保温时间 ( min )	残留酶活 ( % )
20	60	100
20	180	98.7
30	30	96.1
30	60	85.1
40	30	81.3
40	60	49.2

## 3 讨论

毛细管电泳具有分离效率高, 速度快和样品用量少的特点, 近十几年, 被广泛应用于分析化学、生物化学、分子生物学、药物化学、食品化学、环境化学、医学和法医学等领域, 主要用于无机及有机化合物、氨基酸、肽、

蛋白质、核酸和对映体的分离分析<sup>[5]</sup>。

由于毛细管电泳的速度比普通的聚丙烯酰胺凝胶电泳快得多,因此毛细管电泳比普通电泳更适合用于研究生物大分子的动态变化过程。以前研究蛋白酶的自溶都是采用 SDS-PAGE 电泳<sup>[1-4]</sup>。本文利用毛细管电泳研究了适冷蛋白酶的自溶动态过程。结果表明,利用毛细管电泳研究蛋白酶的自溶动态过程,无需制胶、染色和脱色,电泳一次只需 8~10 min,非常简便迅速,而且,可以随时观察蛋白酶自溶的程度和状态,这是 SDS-PAGE 电泳无法做到的。尽管 SDS-PAGE 电泳速度慢,无法随时观察蛋白酶自溶的程度,但可以用来进行自溶片段的转膜回收,用于 N 端测序<sup>[3-5]</sup>。因此,用毛细管电泳和 SDS-PAGE 电泳研究蛋白酶的自溶各有优点,二者结合起来用于研究蛋白酶的自溶动态过程和机制,将会更迅速有效。

本文利用毛细管电泳研究适冷蛋白酶 MCP-01 自溶动态过程的结果表明,适冷蛋白酶 MCP-01 在 20、30、40 °C 下均发生自溶,随着温度的升高,自溶速度加快,随着自溶的加剧,降解产生的片段增多。酶活测定结果表明,适冷蛋白酶 MCP-01 降解产生的片段仍具有部分酶活,这说明 MCP-01 自溶后产生的某些大片段的底物结合域和催化域的结构可能没有被破坏,因而仍具有催化活性。

#### 参考文献

- 1 何忠效、张树政。电泳。北京:科学出版社,1999。55
- 2 邓延倬、何金兰。高效毛细管电泳。北京:科学出版社,1996。87
- 3 陈秀兰、张玉忠、高培基等。深海适冷菌 SM913 产生的适冷蛋白酶,海洋科学,2001,25(1):4~8
- 4 Kumura H., Murata S. *et al.*. Autolysis of the proteinase from *Pseudomonas fluorescens*, *J. Dairy Sci.*, 1999, 82(10):2 078~2 083
- 5 Abraham L.D., Breuil C.. Factors affecting autolysis of a subtilisin-like serine proteinase secreted by *Ophiostoma piceae* and identification of the cleavage site, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995, 1 245(1):76~84
- 6 Bajorath J., Saenger W. *et al.*. Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album* Limber, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1988, 954(2):176~182
- 7 Van den B. B., Eijsink V. G. *et al.*. Rendering one autolysis site in *Bacillus subtilis* neutral protease resistant to cleavage reveals a new fissio, *Biotechnol., Appl. Biochem.*, 1998, Pt :125~132
- 8 Varallyay E., Pal G. *et al.*. Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 243(1):56~60

## MONITORING DYNAMIC PROCESS OF PROTEASE AUTOLYSIS WITH CAPILLARY ELECTROPHORESIS

SUN Caiyun CHEN Xiulan ZHANG Yuzhong GAO Peiji  
(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, 250100)

Received: Sep., 12, 2002

Key Words: Capillary electrophoresis, Cold-adapted protease, Autolysis

#### Abstract

Capillary electrophoresis was used to study the autolysis dynamic process of a cold-adapted protease MCP-01, which was produced by a deep-sea cold-adapted bacterium *Pseudomonas sp.* SM913. The results showed that cold-adapted protease MCP-01 autolyzed at 20 °C, 30 °C and 40 °C. Its autolysis speed became higher and higher with temperature rising. More and more peptide pieces were produced after autolyzing autolysis. Some big peptide pieces produced by protease autolysis still had catalytic activity. Therefore, studying the autolysis dynamic process of a protease with capillary electrophoresis was faster and more convenient than with SDS PAGE electrophoresis.

(本文编辑:刘珊珊)