

# 用亲和层析法分离提纯红曲霉葡萄糖淀粉酶的不同分子型

王杨声 孙晋武 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

葡萄糖淀粉酶(产生菌为红曲霉 (*Monascus rubiginosus* Sato) AS3.3491) 是多型性酶, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈三条区带, 相应于 AS 3.2199 (原使用菌株) 所产生的  $E_3$ 、 $E_4$  和  $E_5$ <sup>[1]</sup>。由于这三个组分性质极为接近, 提纯十分困难。我们曾用 DEAE-纤维素柱层析和垂直板型聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法分离得到了凝胶电泳

均一的  $E_3$  和  $E_4$ <sup>[2,3,4]</sup>, 但始终没有得到凝胶电泳均一的  $E_5$ 。

我们现在利用 ConA-Sepharose 对红曲霉葡萄糖淀粉酶的粗酶(凝胶电泳有三条带) 进行亲和层析。实验结果证明该三个组分均被 ConA-Sepharose 吸附, 但由于含糖量不同, 形成了亲和力大小的差异, 当用  $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖

进行梯度洗脱时,亲和力不同的  $E_3$ 、 $E_4$  和  $E_5$  依次被洗脱下来。一次柱层析就可以得到凝胶电泳均一的  $E_3$ 、 $E_4$  和  $E_5$ , 它们的蛋白质回收率分别为 17.3%, 12.1% 和 12.6%, 总蛋白质回收率为 42%。酶活力的回收率分别为 17.6%, 13.4% 及 10.4%, 总酶活力的回收率为 41.4%。洗脱的次序是和酶分子的糖含量有关, 糖含量最少的酶, 最先被洗脱下来。

近年来, 在生化分离方法中, 亲和层析越来越取得广泛的应用。亲和层析不同于一般的层析技术, 它是利用分离物质的生物功能特异性以达到分离的目的。首先是选择合适的配基, 这种配基必需对于分离物质具有特异的亲和性。例如抗原和抗体之间, 酶和抑制剂之间都具有这种专一的作用。这样的配基共价结合在载体上后, 便能从混合物中选择性地吸附需要分离的物质, 然后利用实验条件的改变进行解吸以获得纯化的物质。亲和层析吸附效率高, 分离效果较为理想。

ConA-Sephrose 是伴刀豆球蛋白 A(ConA) 通过溴化氰活化的方法共价结合在 Sephrose 上的制剂。由于 Con A 可以和含有  $\alpha$ -D-甘露糖,  $\alpha$ -D-葡萄糖基团或相似构型的基团的分子相结合<sup>[9]</sup>, 因此 ConA-Sephrose 可以用来分离提纯糖蛋白, 糖肽和多糖等。

已知红曲霉菌葡萄糖淀粉酶  $E_3$  和  $E_4$  均为糖蛋白, 其糖的组成均为甘露糖, 半乳糖, 木糖和葡萄糖。但糖的含量不同,  $E_3$  为 7%,  $E_4$  为 9%<sup>[6]</sup>。我们用 ConA-Sephrose 柱将红曲霉菌葡萄糖淀粉酶进行亲和吸附, 用  $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖梯度洗脱, 得到了凝胶电泳均一的  $E_3$ 、 $E_4$  和  $E_5$ , 并计算了它们的回收率。本文报道此研究结果。

## 材料和方法

### 一、材料

酶制剂为无锡酶制剂厂生产的红曲霉菌糖化酶, 酶活力每克 20,000 单位, 生产菌种为红曲霉, 菌号为 AS 3.3491。

### 二、试剂及仪器

ConA-Sephrose 为瑞典 Pharmacia 产品,  $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖为英国 L. Light 产品。DGS-1 电泳光密度扫描仪为北京试验设备厂产品。

### 三、分析方法

酶活力与蛋白质的测定以及聚丙烯酰胺凝胶电泳方法均同前报<sup>[2]</sup>。但由于上柱液和洗脱液中含有钙、锰、镁等离子, 在测定蛋白质含量时, 这些离子有干扰作用, 因此样品需先对水透析然后再测定。

## 结果和讨论

### 一、上柱样品的准备

按前报的方法<sup>[2]</sup>, 酶制剂 300g 加蒸馏水 1500ml, 37℃ 抽提一小时, 过滤后得到浸出液 840ml, 分成四份。于每份浸出液中加入计算量的硫酸铵使其分别达 20% 至 60%, 65%, 70% 和 75% 饱和度, 比较各部分的比活和凝胶电泳图谱。根据结果选用比活最高, 凝胶电泳图谱最为清晰的 20—60% 饱和度的硫酸铵沉淀的酶, 用少量蒸馏水溶解, 通过 Sephadex G-25 柱 (3 × 25 cm) 脱盐<sup>[2]</sup>, 所得酶液作为上柱材料。

### 二、亲和层析柱的准备

取 10 ml ConA-Sephrose 悬浮液自然沉降装柱 (1.2 × 14 cm), 以起始缓冲液 (0.01M, pH 5.8 醋酸缓冲液, 内含氯化钠 0.15M, 氯化锰, 氯化钙和氯化镁各 1 mM) 洗涤, 直至流出液的 pH, 电导率与起始缓冲液相同。

### 三、ConA-Sephrose 亲和层析

取上述脱盐酶液 14 ml (约含 50mg 蛋白质) 上柱, 再用起始缓冲液平衡。然后用  $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖直线浓度梯度洗脱。下限为起始缓冲液 200 ml, 上限为含有 0.15M  $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖的起始缓冲液 200 ml。流速为每小时 15—20 ml。自洗脱开始时收集, 每管 5 ml。用紫外分光光度计测定每管 280 nm 的吸光度(或透光率)。每隔 5 管测定酶活力、pH 及电导率。选择分布在洗脱峰不同位置的管进行凝胶电泳, 并根据此结果合并洗脱液。洗脱结果见图 1。在洗脱过程中, pH 和电导率基本上没有变化。自从开始洗脱后, 结合在 ConA-Sephrose 上

表1 红曲霉菌葡萄糖淀粉酶在 ConA-Sephrose 柱上的亲和层析

样 品	凝胶电泳 (Rm)	体 积 (ml)	蛋白质 (mg/ml)	总蛋白质 (mg)	酶活力 (u/ml)	总酶活力 (u $\times 10^3$ )	比活力 (u/mg)	回 收 率 (%)	
								蛋白质	酶活力
上样液	0.58 0.53 0.50	14	3.3	46.2	3540	495	1106	100	100
E <sub>3</sub>	0.58	50	0.16	8	174	87	1087	17.3	17.6
E <sub>3</sub> + E <sub>4</sub>	0.58 0.53	58	0.14	8.12	158	91	1129	17.5	18.5
E <sub>4</sub>	0.52	40	0.14	5.6	166	66	1186	12.1	13.4
E <sub>4</sub> + E <sub>5</sub>	0.53 0.50	108	0.12	12.96	131	141	1088	28	28.5
E <sub>5</sub>	0.50	86	0.068	5.85	60	51	882	12.6	10.4

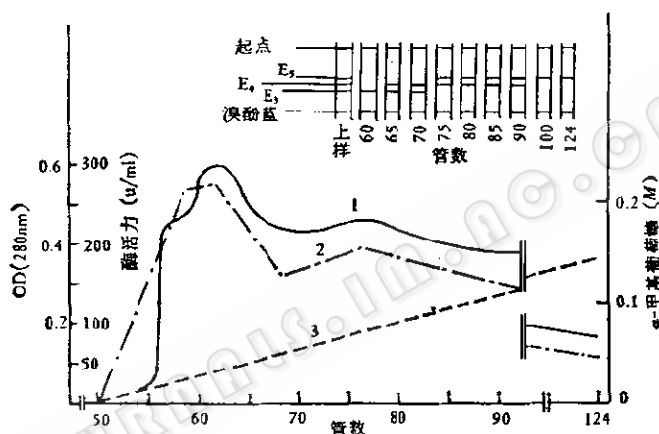


图1 红曲霉菌葡萄糖淀粉酶在 ConA-Sephrose 柱上亲和层析的洗脱图谱

1. 蛋白浓度, 2. 酶活力, 3.  $\alpha$ -甲基葡萄糖浓度层析柱:  $1.2 \times 14$  cm, 加样量: 50 mg 蛋白质上柱起始缓冲液: 0.01M pH5.8 醋酸缓冲液, 内含 NaCl 0.15M,  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$  和  $MgCl_2$  各 1mM。洗脱液: 下限为起始缓冲液 200 ml, 上限为含有 0.15M  $\alpha$ -甲基 D-葡萄糖的起始缓冲液 200 ml。洗脱速度: 15—20 ml/hr

的红曲霉菌葡萄糖淀粉酶很快被  $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖置换而不断被洗脱下来。洗脱过程共出现两个峰。结果表明洗脱的先后次序为  $E_3$ 、 $E_4$  和  $E_5$ 。第一峰的前半部(50—62 管)为  $E_3$ , 后半部为  $E_3$  和  $E_4$  的混合物。第二峰的前半部为  $E_4$  (71—77 管), 后半部开始出现  $E_5$ , 100 管以后全部为  $E_5$ 。

洗脱液不同部位的凝胶电泳的光密度扫描结果见图 2。

将凝胶电泳图谱相同的洗脱液部分合并, 对蒸馏水透析 24 小时, 测定各部分的蛋白质含

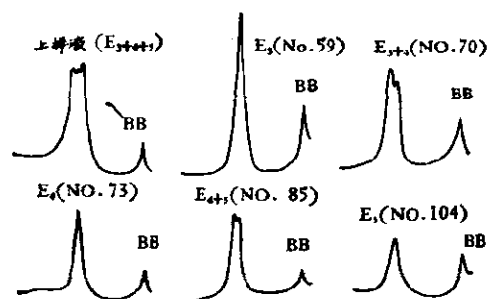


图2 红曲霉菌葡萄糖淀粉酶经 ConA-Sephrose 柱亲和层析的不同洗脱液的凝胶电泳扫描图谱 (BB 为溴酚蓝)。

量及酶活力, 计算不同分子型酶的回收率, 并进

行凝胶电泳,记录各部分的相对迁移率( $R_m$ ),结果见表1。 $E_3$ 、 $E_4$ 和 $E_5$ 的蛋白质回收率分别为17.3%,12.1%和12.6%,总回收率为42%。三者的酶活力回收率分别为17.6%,13.4%和10.4%,总回收率为41.4%。

由表1可以看出,由于 $E_3$ 、 $E_4$ 和 $E_5$ 是不同分子型酶,因此将它们分开后,比活并无显著变化。提纯后的 $E_3$ 、 $E_4$ 和 $E_5$ 其凝胶电泳相对迁移率和原酶液中相应的区带完全吻合。

洗脱时,我们曾试用过不同浓度梯度的 $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖,如0—0.05M,0—0.1M,0—0.15M和0—0.2M,其中以0—0.15M最为理想。另外还曾用葡萄糖代替 $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖进行梯度洗脱,虽得到了类似于图1的洗脱图谱,但分离效果不如 $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖,没有得到凝胶电泳均一的 $E_5$ 。

由于Con A本身是一种蛋白,因此考虑到它的pH稳定性,我们选用pH5.8的缓冲液作为上柱和洗脱条件。为了避免ConA变性,ConA-Sepharose 悬浮液贮存在3—8℃的冰箱中。据文献报道,悬浮液中若有过量的 $Mn^{2+}$ 和 $Ca^{2+}$ 存在,可以增进ConA的稳定性,保持其分子结合活性<sup>[7]</sup>。因此我们在上柱和洗脱过程中都保持了一定量的 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 等离子。

用ConA-Sepharose将糖蛋白与非糖蛋白进行分离的报道很多,取得了良好的分离效果。例如Murthy等<sup>[8]</sup>利用ConA-Sepharose从血清中选择性地吸附含糖的 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶( $\alpha_1$ -antitrypsin)而达到和Albumin分开的目的。Cheng-Shung Gong等<sup>[9]</sup>报道了利用ConA-Agarose将含糖的葡聚糖内切酶( $C_x$ 纤维素酶)和不含糖的纤维二糖酶分开,而这种分离是无法借助于

DEAE-纤维素层析达到的。此外,ConA-Sepharose还成功地用来分离脑和溶酶体的水解酶<sup>[10]</sup>,前列腺酸性磷酸酯酶<sup>[11]</sup>,人肝硷性磷酸酯酶<sup>[12]</sup>。但是对于同属糖蛋白,而只是糖含量不同的物质之间的分离,则报道很少。在我们的实验中, $E_3$ 、 $E_4$ 和 $E_5$ 都是糖蛋白,但由于含糖量不同,形成了亲和力大小的差异。 $E_3$ 比 $E_4$ 含糖量小<sup>[6]</sup>,因此吸附力也就小,容易洗脱下来。而 $E_5$ 最后洗脱下来,也许表明它的含糖量最高(尚未进行定量测定)。实验结果证明,ConA-Sepharose不仅可以用来很好地将糖蛋白和非糖蛋白分开,而且可以用来分离不同糖含量的蛋白质,但必须采用梯度洗脱法来代替阶段洗脱法。

## 参 考 文 献

- [1] 孙晋武等:微生物学报,23(1):44—49,1983。
- [2] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组:微生物学报,16(3):200—205,1976。
- [3] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组:微生物学报,17(2):101—107,1977。
- [4] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组:生物化学与生物物理进展,4:36—39,1976。
- [5] Gokdstein, I. J., Hollerman, C. K., Smith, E. E.: Biochemistry, 4: 876—883, 1965。
- [6] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组:微生物学报,20(3):263—270,1980。
- [7] Summer, J. B., Howell, S. F.: J. Biol. Chem., 115: 583—588, 1936。
- [8] Murthy, R. J. and Hercz, A.: FEBS Letters, 32: 243—246, 1973。
- [9] Cheng-shung Gong et al.: Biotechnology and Bioengineering, 21 (2): 167—171, 1979。
- [10] Brattain, M. G. et al.: Biochem. J., 163: 247—251, 1977。
- [11] Van Etten, R. L., Saini, M. S.: Biochim. Biophys. Acta, 484: 487—492, 1977。
- [12] Trepanier, J. M., et al.: Biochem. J., 155: 653—660, 1976。