

蛋白酶 B.P 与几种试剂蛋白酶的比较

邱秀宝 袁 影

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 蛋白酶 B. P 与国内外几种试剂蛋白酶比较, 证明其酶种单一, 只含有蛋白酶, 不含 DNA 酶和 RNA 酶, 与蛋白酶 K 和蛋白酶 E 相似。蛋白酶 B. P 除含有碱性蛋白酶外还含有较高的中性蛋白酶活性, 它可以广泛地水解多种天然蛋白, 应用于微生物细胞蛋白的水解, 提取 DNA 和 RNA, 还可水解叶肉细胞蛋白, 提取叶绿体 DNA, 是我国第一个碱性生化试剂蛋白酶。

关键词 试剂蛋白酶 B. P; 比较酶活力

作为生化试剂的蛋白酶品种很多, 规格各异, 来源也非常广泛, 如动物内脏、植物果实, 以及各类微生物。传统的产品有胰蛋白酶和 α -糜蛋白酶。目前, 越来越多的品种来之于微生物, 如蛋白酶 K, 蛋白酶 E, 蛋白酶 B. P。其中, 蛋白酶 B. P 是由短小芽孢杆菌产生的一种碱性蛋白酶, 它可以应用于各种天然蛋白的水解, 特别是对酵母、芽孢杆菌、大肠杆菌等微生物细胞蛋白有较强的水解作用。还可用于植物叶绿体 DNA 的提取。因此它可以代替蛋白酶 K、E 等

品种应用于遗传工程、分子生物学等方面的研究, 其某些特性作者已进行过详细的研究^[1]。本文介绍蛋白酶 B. P 与几种试剂蛋白酶的比较。

材 料 与 方 法

蛋白酶 B. P 由无锡酶制剂厂及中国科学院生物物理研究所生化厂供给, 蛋白酶 K 为西

DNA 测定和 B. P 酶的应用得到本所姜书勤同志的指导和帮助; 生物物理所郑振起同志协助试验, 在此一并致谢。

德 E. M. K 产品。蛋白酶 E 为美国 Sigma 公司产品。枯草杆菌中性蛋白酶为上海东风生化试剂厂产品。琼脂糖为上海东海鱼品加工厂产品。 λ -DNA 为中国科学院生物物理研究所生化厂产品。RNA 为英国产品。丙烯酰胺为美国 BDH 产品。甲叉双丙烯酰胺为广州化学试剂厂产品。

活力测定方法: Folin 试剂显色法^[1]

圆盘电泳: 中性胶系统^[2]。

DNAse 活力测定: 见文献[3]。

RNAse 活力测定: 反应系统: 0.2M、pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液 0.25ml, 0.02 M EDTA-Na 0.1ml, 蒸馏水 0.3ml, 酶液 0.1ml, RNA (12 μ g/ml) 0.25ml, 37 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟, 加 0.75% 偏钨双氧铀 0.25ml 终止反应, 300r/min 离心, 紫外 (260nm) 测 A 值。

结 果

(一) 五种试剂蛋白酶活力的比较

表 1 五种试剂蛋白酶活力的比较

品种	酸性蛋白酶 (pH2.5)	中性蛋白酶 (pH7.0)	碱性蛋白酶 (pH 9.2)
蛋白酶 B. P (无锡)	0	145 万 u/g	157.44 万 u/g
蛋白酶 B. P (生物物理所)	0	80 万 u/g	115.2 万 u/g
蛋白酶 K	1.23 万 u/g	72.5 万 u/g	151.68 万 u/g
蛋白酶 E	0	8.0 万 u/g	0
枯草杆菌蛋白酶	0	30 万 u/g	24.57 万 u/g

将各种酶加水溶解配制成 1mg/ml 溶液, 然后再分别用缓冲液稀释测定酸性、中性、碱性蛋白酶活力的含量。结果见表 1。

结果表明蛋白酶 B. P 含有中性和碱性两种蛋白酶成份, 以碱性酶为主。蛋白酶 K 含有酸性、中性和碱性三种, 其中碱性的为最强, 酸性的最弱, 蛋白酶 E 酶系较纯, 只有中性一种, 枯草杆菌蛋白酶以中性为主, 碱性为弱, 但不含酸性酶成份。

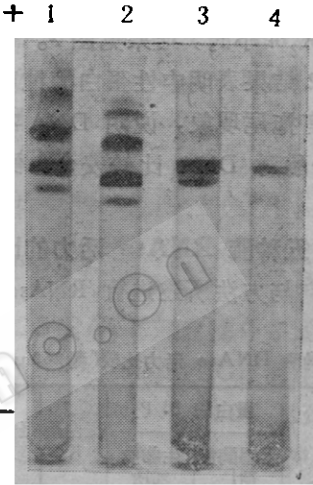


图 1 四种酶圆盘电泳比较

1.蛋白酶 B. P (微生物所, 无锡酶制剂厂) 2.蛋白酶 B. P (生物物理所) 3.蛋白酶K(E. M. K) 4.蛋白酶 E(Sigma)

(二) 四种酶圆盘电泳行为的比较

样品均对水透析过夜; 蛋白质浓度为 200 μ g, 7.5% 丙烯酰胺凝胶, 中性胶圆盘电泳^[2], 电

24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

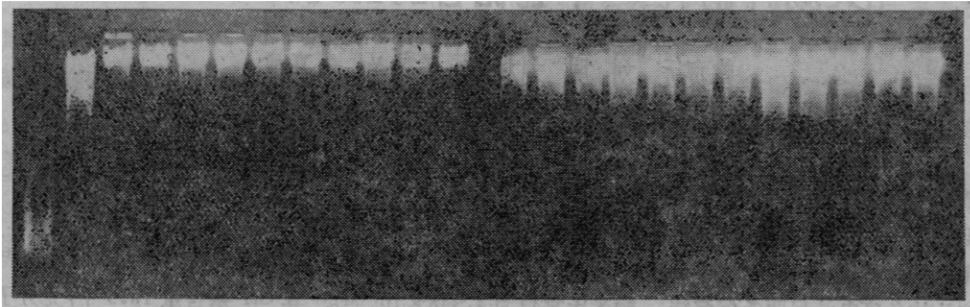


图 2 1% 琼脂糖凝胶电泳 DNAse 活力测定 1.对照 酶蛋白浓度 0mg/ml 2—5. B. P 酶 酶蛋白浓度分别为 0.01, 0.1, 1.0, 10.0mg/ml, 作者研制, 无锡酶制剂厂生产 6—9. B. P 酶 同上, 作者研制, 生物物理所生产 10—13. 蛋白酶 K, E. M. K 14—17. B. P 酶 同上, 作者研制, 批号 1 18—20. B. P 酶 同上, 作者研制, 批号 2 21—24 中性蛋白酶, 上海东风厂生产

流 1—2mA/支,电压 450V,电泳 3.5 小时,结果见图 1。

(三) 四种酶 DNAse 活力对比

将各种酶配成 10mg/ml 浓度溶液,然后稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三种浓度分别进行酶活力测定。取 4 μ l 上述酶液,加 4 μ l 2-DNA (760 μ g/ml),加 3 μ l 50 mM Tris 缓冲液和 21 μ l H_2O , 37 $^{\circ}C$ 反应 60 分钟,取出沸水浴处理 5 分钟。加溴酚蓝指示剂 1 滴 (5 μ l) 然后用 0.8% 琼脂糖平板电泳检测 2-DNA 分解状况,电泳 40V, 50mA, 4 小时,结果见图 2。

从图 2 结果表明中性蛋白酶纯度稍差,当浓度高时有拖尾现象,说明 DNA 有部分被破坏。B. P 酶对 DNA 比较安全,结果与蛋白酶 K 相似。

(四) 五种酶 RNAse 活力的比较

按材料与方法所述进行 RNAse 活力测定

结果见表 2。

结果表明,除枯草杆菌蛋白酶外,其他三种酶基本上不含 RNAse 蛋白酶 E 用量 10mg/ml 时显出微量活性。

(五) 蛋白酶 B. P 在叶绿体 DNA 提取中应用的结果

蛋白酶 B. P 不仅能应用于微生物细胞的 DNA 提取,而且还可以应用于植物叶绿体 DNA 的提取,它对叶肉细胞蛋白的分解作用很强,而且不破坏 DNA,这与试验 (三) 结果相符,蛋白酶 B. P 不存在 DNAse。

蛋白酶 B. P 是我国 1983 年研制成功的一种新型试剂蛋白酶,是我国第一个功能与蛋白酶 K 相当的碱性生化试剂蛋白酶,具有中性和碱性蛋白酶的复合酶制品,因此它在 pH 7—10 之间均具有较好的水解蛋白的能力,对多种天然蛋白均有较强的水解能力,用途广泛,对它的底物特异性有待进一步研究。

表 2 四种酶 RNAse 活力比较(测 260nm 紫外吸收)

酶种 mg/ml	蛋白酶 B. P		蛋白酶 K	蛋白酶 E	上海东风厂枯草杆菌蛋白酶
	无锡酶制剂厂	生物物理所			
1.0	0.027	0.002	—	0.078	1.025
1.0	—	0.003	0.034	—	0.798
0.1	0.005	—	—	—	0.375
0.01	—	—	—	—	0.26

参 考 文 献

- [1] 邱秀宝等: 微生物学报, 24(1): 66—73, 1984.
- [2] Maurer. H. R: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Walter de Gruyter (ed), Berlin, 1971.
- [3] 范云六, 姜书勤等: 微生物学报, 16(4) 277—281, 1976.