

(简 报)

水合氧化钛固定化蛋白水解酶在

蛋白质肽图分析上的应用

唐梓进 张 晔

(南京师范大学生物系, 南京)

自1977年 Cleveland 等^[1]用数种蛋白水解酶水解两种蛋白,再用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行肽段比较以来,蛋白质肽图分析方法在蛋白质结构与功能的研究以及不同蛋白质之间的关系和它们的结构功能的比较方面已成为一种重要的工具^[2,3]。Elder等^[4]又进一步对此方法进行改进直接用放射性碘标记蛋白质,然后进行酶解,电泳,放射自显影。此法灵敏度高,但要求一定的设备条件,操作复杂。

本文用钛氧化物载体固定蛋白水解酶应用于蛋白质肽图分析,方法简单,试剂便宜,残活力高,样品蛋白不用放射性标记,也没有酶本身的污染。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 胰蛋白酶:来自新疆伊犁地区肉联生化制药厂。固定化前,为除去混杂的其他蛋白水解酶的活性按文献〔5〕的方法进行预处理。

2. 胰蛋白水解酶:为扬州肉联生化制药厂产品,以胰蛋白酶为主并含有糜蛋白酶,弹性蛋白酶。

3. 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) AS1,398 中性蛋白酶:为无锡酶制剂厂产品,按下法进行初步纯化,200g粗酶粉溶于含0.4%CaCl₂的0.5 mol/L pH 6.5醋酸缓冲液中,4℃搅拌40min,用25%饱和度的硫酸铵沉淀除去杂蛋白,上清液用65%饱和度的硫酸铵沉淀出蛋白酶,沉淀在4℃对0.02mol/L pH8.0磷酸钠缓冲液透析,然后冻干备用。

4. 木瓜蛋白酶:为Emerk产品。

(二) 方法

1. 木瓜蛋白酶固定化:20ml 50%(V/V)四氯化钛盐酸溶液用3 mol/L氨水调pH到6.0,搅拌下加入每毫升含150mg木瓜蛋白酶溶液120ml,在4℃不断搅拌2h;然后在4℃8950×g离心10min。沉淀用0.9% NaCl洗涤离心,如此反复直洗到上清液无蛋白质反应为止(用考马氏蓝^[6]法检测)。洗净的湿固定化酶中加入20ml甘油保存备用。

2. 胰蛋白酶固定化:10ml 50%(V/V)四氯化钛盐酸溶液,用3 mol/L氨水调到pH6.0,搅拌下加入相当于含6g胰蛋白酶的40ml预处理过的溶液。以后步骤与木瓜蛋白酶固定化方法相同。

3. 枯草杆菌 AS 1,398 中性蛋白酶及胰酶的固定化同木瓜蛋白酶。

4. 牛血清白蛋白(BSA)用固定化胰蛋白酶的水解处理:在微型塑料离心管中加入0.2ml 0.1% BSA的0.02mol/L pH8.0磷酸钠缓冲液和0.2ml固定化胰蛋白酶,40℃摇动,反应3h,离心,上清液用Saul^[7]等的方法浓缩。我们用Sephadex G10代替G-25以防止分子量小的肽的损失。浓缩后的样品即可电泳。

5. 固定化胰蛋白水解酶水解BSA的方法:同胰蛋白酶。

6. 固定化枯草杆菌 AS 1,398 中性蛋白酶水解BSA的方法:同胰蛋白酶只是以0.4% BSA的0.02mol/L pH 7.5磷酸钠缓冲液代替上述0.1% BSA 0.02 mol/L pH8.0磷酸钠缓冲液。水解时间变更为1h。

7. 固定化木瓜蛋白酶水解BSA的方法基本

本文于1988年6月27日收到。

同胰蛋白酶,只是以0.2%BSA的0.02mol/L pH 6.0磷酸钠缓冲液内含0.02mol/L 巯基乙醇及0.004mol/L EDTA代替0.1% BSA 0.02mol/L pH8.0磷酸缓冲液,水解时间变更为2h,空白以相应的缓冲液代替BSA。

8. SDS电泳:按Anderson等^[8]的方法改成凝胶浓度为8—20%的梯度电泳。

结 果 与 讨 论

从图版 I - A, B, C 电泳结果显示各种蛋白酶由于对牛血清白蛋白肽键的切割特异性不同,因此形成分子量不同的肽片段图谱。与空白对照比较,显示没有酶蛋白自载体上脱落或自我水解的情况以及由此而造成的干扰。图谱清晰,效果很

好。这与文献〔9〕报道的蛋白酶经固定化后,不再自身水解的结果一致。而直接用酶水解的肽图分析方法,虽然简便,但用酶量很难控制,往往会造成酶蛋白本身或酶蛋白自身水解产生的肽片段的干扰。用¹²⁵I 标记底物蛋白^[4],然后用酶水解进行肽图分析,固然效果很好。但操作繁复,工作条件要求较高,试剂也较贵。

本方法设备条件简单,试剂便宜,操作方便,固定化酶与底物容易分离。固定化酶可反复洗涤,反复使用3—4次,4次以上效果较差。当加入甘油后可在-20℃较长时间保存,供随时取出使用。

参 考 文 献

- 〔1〕Cleveland, D. W., et al.; *J. Biol. Chem.*, 252:1102—1106, 1977.
- 〔2〕James, G. T.; in *Methods of Biochemical Analysis* (Glick, D., ed) J. Wiley, New York, Vol. 26, p165, 1980.
- 〔3〕Hames, B.D. and Rick Wood D. 著, 刘敏秀、程桂芳译:蛋白质的凝胶电泳实践方法, pp.151—157, 科学出版社, 1986.
- 〔4〕Elder, J.H. et al.; *J. Biol. Chem.*, 252:8510—8515, 1977.
- 〔5〕华家桢等编译:实用蛋白质化学技术, 上海科学技术出版社, p. 162, 1982.
- 〔6〕Read, S.M. et al.; *Anal. Biochem.*, 116:53—64, 1981.
- 〔7〕Saul, A. et al.; *Anal. Biochem.*, 138:451—453, 1984.
- 〔8〕Anderson, B.L., et al.; *Anal. Biochem.*, 132:366—375, 1983.
- 〔9〕Mihalyi, E.: *Application of proteolytic enzymes to protein structure studies*, 2nd edn, Vol.1, CRC press Inc. Florida. p.127, 1978.

AN APPLICATION OF HYDROUS TITANIUM OXIDE IMMOBILIZED PROTEOLYTIC ENZYMES TO PEPTIDE MAPPING

Tang Zijin Zhang Xi

(Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing)

Hydrous titanium oxides immobilized trypsin, papain, *B. Subtilis* AS1,398 neutral protease were applied to the peptide mapping with good resolution on the PAGE gel. After protein digestion enzyme was removed easily by simply centrifugation, no disturbances were found on the gel by proteolytic enzymes. The procedure is simple without specific requisites and it is also cheap.

Key words

Hydrous titanium oxide; immobilized protease

图 版 说 明

Explanation of plate

- A. 牛血清白蛋白经胰蛋白酶水解后SDS-PAGE肽图
SDS-PAGE of immobilized proteolytic enzyme digests of bovin serum albumin (BSA)
1. Standard molecular weight markers: Phosphorylas E, BSA, Actin, Carbonic Anhydrase, TMV protein, Cytochrome C
 2. Immobilized trypsin digests
 3. Immobilized pancreatin digests
 4. BSA
 5. Immobilized proteolytic enzyme without substrate (control)
- B. 牛血清白蛋白经枯草杆菌AS1.398中性蛋白酶水解后SDS-PAGE肽图
SDS-PAGE of Immobilized proteolytic enzyme digests of BSA
1. Standard markers
 2. Immobilized *B. Subtilis* AS1.398 neutral Protease digests
 3. BSA
- C. 牛血清白蛋白经胰蛋白酶及木瓜蛋白酶水解后SDS-PAGE肽图
SDS-PAGE of Immobilized proteolytic enzyme digests of BSA
1. Standard markers
 2. BSA
 3. Immobilized pancreatin digests
 4. Immobilized papain digests

唐梓进等：水合氧化钛固定蛋白水解酶在蛋白质肽图分析上的应用
Tang Zijin et al.: An application of hydrous titanium oxide immobilized
proteolytic enzymes to peptide mapping

图版 I
Plate I

