

# 嗜热脂肪芽孢杆菌 HY-69 耐热金属蛋白酶 基因表达产物的纯化及性质研究\*

孙 超 金 城 杨寿钧\*\* 张树政

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 利用 CM-纤维素离子交换层析法,从宿主细胞枯草芽孢杆菌-MI113 中纯化了嗜热脂肪芽孢杆菌 HY-69 的耐热金属蛋白酶基因的表达产物,达电泳纯。该酶的最适反应温度为 70℃,有着较好的热稳定性和极高的盐酸胍抗性。70℃ 的半寿期为 45min。在 3mol/L 的盐酸胍中变性 20min,仍残余近 40% 的酶活。利用凝胶过滤和 SDS-PAGE,测定其分子量均为  $27\ 000 \pm 1\ 000$ 。通过 CD 光谱得知,该酶含有 66% 的  $\alpha$ -螺旋,28% 的  $\beta$ -转角,6% 的无规则卷曲,无  $\beta$ -折叠。利用 CD 光谱和荧光光谱研究了该酶在盐酸胍变性过程中的构象变化,推测其主要是通过增加包装效率,减少无规则卷曲来提高酶的稳定性。

**关键词** 耐热金属蛋白酶 纯化 酶的稳定性

分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(1999)01-0017-22

蛋白酶已被广泛应用于洗涤剂、皮革、食品等工业生产领域,是目前世界上产销量最大的一种商品酶<sup>[1]</sup>。酶的不稳定性是制约酶制剂工业进一步发展的一个重要因素。耐热酶因其对高温、酸碱、有机溶剂、蛋白变性剂等的良好抗性而倍受青睐。

嗜热脂肪芽孢杆菌 HY-69 耐热金属蛋白酶具有良好的热稳定性<sup>[2]</sup>,该酶的基因已在蛋白酶缺陷型的常温菌—枯草芽孢杆菌-MI113 中克隆并表达<sup>[3]</sup>。为了进一步研究耐热蛋白酶的性质,我们纯化了该克隆基因的表达产物,对其在盐酸胍变性过程中的 CD 光谱和荧光光谱进行了研究,初步探讨了该酶的耐热机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种与发酵

参见文献[3]。

### 1.2 酶的纯化

CM-纤维素经酸碱处理后,悬浮于 0.02mol/L NaAc-HAc, pH5.8 的缓冲液中,装柱(3.0×35cm),用同样的缓冲液平衡过夜,上样液在缓冲液中透析过夜。上样后,用 2 倍柱床体积的上述缓冲液冲洗,然后用 800mL 含 0~0.3mol/L NaCl 的上述缓冲液进行线性梯度洗脱。分部收集流出液,测定 280nm 吸收和酶活,合并酶活峰。

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39370166)。

\*\* 联系作者。

收稿日期:1998-02-26,修回日期:1998-09-28。

### 1.3 酶活测定

参见文献 [2]。

### 1.4 蛋白测定

用 Folin—酚法测定<sup>[4]</sup>,以牛血清白蛋白作标准。

### 1.5 分子量测定

参照文献 [5],分别利用凝胶过滤和 SDS-PAGE 进行测定。

### 1.6 光谱的测定

冻干酶粉溶于 0.05mol/L Tris-HCl, pH7.5 缓冲液中,酶的终浓度为 0.8mg/mL。利用 Jasco720-Spectrophotometer 进行 CD 的光谱测定,以同样的缓冲液作为空白对照。扫描范围 190~250nm,灵敏度 20mdeg,带宽 1.0nm。

### 1.7 荧光光谱的测定

冻干酶粉溶于 0.05mol/L Tris-HCl, pH7.5 缓冲液中,酶的终浓度为 0.02mg/mL。利用日立 Fluorescence Spectrophotometer850 测定在不同变性条件下的荧光光谱,以同样的缓冲液作空白对照。激发光波长 280nm。发射光波长 290~400nm。

### 1.8 氨基酸组成分析

0.7mg 的脱盐纯酶于 110℃ 在 5.7mol/L 的盐酸中水解 24h,用 Beckman121MB 氨基酸自动分析仪测定酶的氨基酸组成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 克隆基因表达产物的分离与纯化

取 500mL 发酵液在 4℃,8000r/min 离心 20min,取上清液,用分子量下限为 10kD 的中空超滤纤维柱浓缩至 200mL,CM-纤维素柱层析,收集酶活峰,透析除盐,冻干备用。以下该酶简称为 R<sub>3</sub> 酶。CM 纤维素层析结果见图 1。

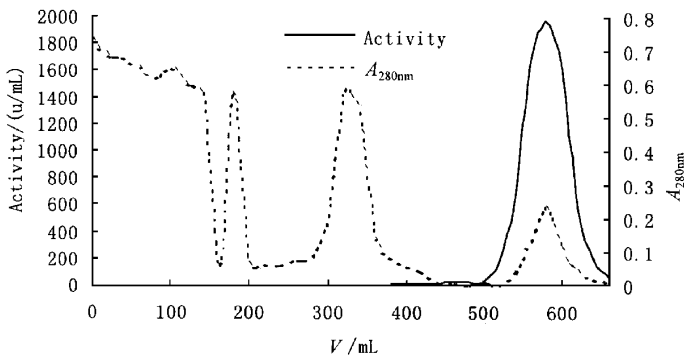


图 1 CM-纤维素柱层析

Fig.1 CM-cellulose chromatography

经 CM-纤维素层析纯化,该酶的酶活回收率可达 41.4%,纯化倍数为 26.9。结果见表 1。在 PAGE 和 SDS-PAGE 上该酶显示单一条带。结果见图 2、图 3。

表 1 酶的分离纯化

Table 1 Purification of the protease

Step	Total volume /mL	Total activity /u	Total protein /mg	Specific activity (u/mg)	Recovery of activity /%	Purification fold
Supernatant	5 000	849 000	1 575	540	100	1.0
Ultrafiltration	380	458 460	177	2 592	54.0	4.8
CM-cellulose chromatography	50	189 802	10.8	17 574	41.4	26.6

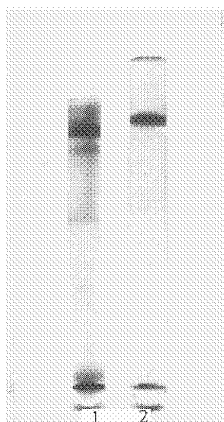


图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.2 PAGE pattern of the protease

1. Concentrated supernatant
2. After CM-cellulose chromatography

## 2.2 分子量测定

利用 Sephadex G-100 凝胶过滤和 SDS-PAGE 测定酶的分子量,结果分别为 26kD 和 28kD。该酶是单亚基蛋白。

## 2.3 最适反应温度与热稳定性

在不同温度下,按标准测活方法测定酶活力,酶的最适反应温度为 70℃。

酶在不同温度下保温 30min,冰浴 10min,70℃ 按标准方法测活。以未经保温的酶活力作对照。从图 4 可知该酶具有较好的热稳定性,在 50℃ 保温 3h,酶活力无明显变化,60℃ 保温 3h 仍残余 80% 的酶活。在 70℃ 的半寿期为 45min。

## 2.4 酶的氨基酸组成分析

氨基酸组成分析的结果见表 2,该酶含氨基酸残基共计 242 个(不包括 Trp 和 Cys),推测其分子量为 26 620,与 Sephadex G-100 凝胶过滤和 SDS-PAGE 测定结果相近。该蛋白中多含 Ala、Glu、Asp、Gly 等倾向于形成螺旋和  $\beta$  转角的氨基酸残基,这与下面 CD 光

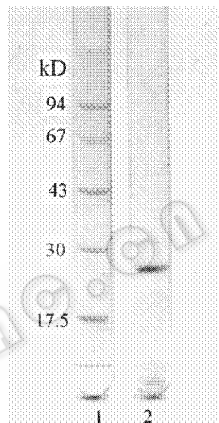


图 3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.3 SDS-PAGE pattern of the protease

1. Protein marker
2. After CM-cellulose chromatography

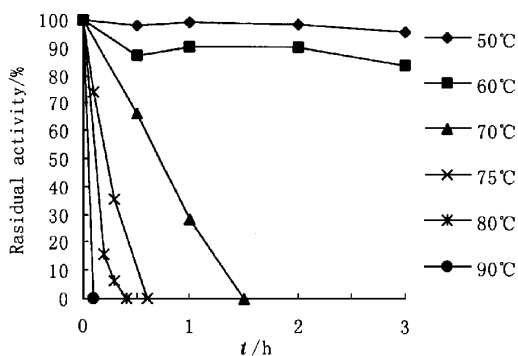


图 4 酶的热稳定性

Fig.4 Thermostability of the protease

谱所测的二级结构结果相符。

表2 氨基酸组成分析

Table 2 Amino acid composition of the protease

Amino acid	Mol. percent /%	Amino acid residues/mol	Amino acid	Mol. percent /%	Amino acid residues/mol
Asx	13.011	30	Ala	11.739	30
Thr	6.516	16	Val	7.708	18
Ser	10.168	24	Met	0.176	1
Glu	11.985	24	Ile	4.220	11
Pro	2.067	9	Leu	3.975	11
Phe	0.914	3	Arg	1.748	6
His	1.895	5	Tyr	3.865	12
Lys	5.801	11	Trp	ND	—
Gly	13.044	31	Cys	ND	—

ND not determined

### 2.5 酶在盐酸胍变性过程中的稳定性研究

**2.5.1 盐酸胍对酶活力的影响：**将酶在 37℃ 分别保温于 1mol/L 和 3mol/L 的盐酸胍溶液中，每隔 10min 取出一定量的酶液置于冰浴中，按标准方法测定酶活力，结果见图 5。该酶显示出很强的盐酸胍耐受性，在 3mol/L 的盐酸胍溶液中变性 20min，仍残余近 40% 的酶活，1mol/L 的盐酸胍基本对酶活力没有影响。

酶在盐酸胍变性后，用缓冲液稀释 50 倍终

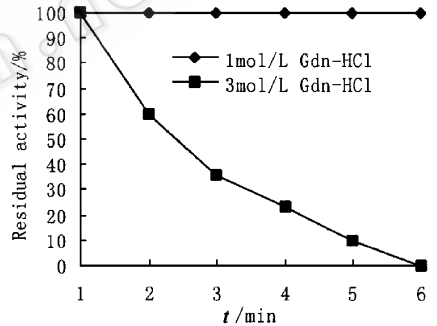


图5 盐酸胍变性时间对酶活力的影响

Fig.5 Effect of denaturation time on the enzyme activity

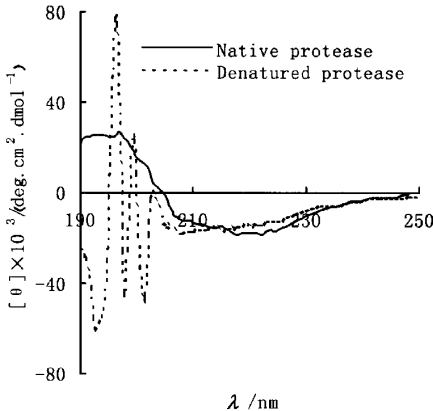


图6 蛋白酶变性前后的 CD 光谱

Fig.6 CD spectra of native and denatured protease

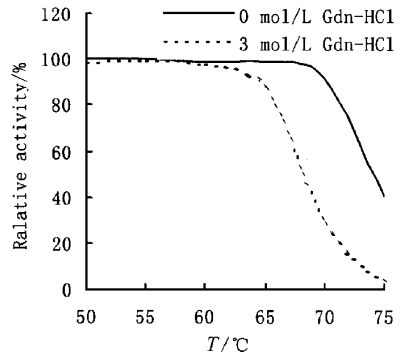


图7 盐酸胍对酶热稳定性的影响

Fig.7 Effect of Gdn-HCl on thermostability of the protease

止反应,放置过夜,并未发现明显的复性现象。曾有报道<sup>[6]</sup>,某些耐热金属蛋白酶在热变性中因自溶而引起不可逆变性,但是因为盐酸胍变性是在常温下进行,此时该酶活性很低,自溶不是其不可逆变性的主要原因,其真正原因有待进一步研究。

**2.5.2 变性过程中酶的 CD-光谱研究:** 盐酸胍变性前后的 CD 光谱见图 6,酶在 3mol/L 盐酸胍中 37℃ 保温 20min 后  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角消失,代之以  $\beta$ -折叠,变性 20min 后立即稀释 50 倍以终止反应,然后分别取变性与未变性的酶在不同温度下保温 20min,按标准方法测定酶活,比较其热稳定性,变性前后的残余酶活计算分别以变性前后未保温的酶活力作标准。从图 7 结果表明变性后酶的稳定性下降,说明  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角被  $\beta$ -折叠取代后,分子的包装效率下降,结构疏松,导致了热稳定性的下降。从变性前的

CD 光谱计算出该酶的二级结构组成,如表 3 所示,与 Thermolysin 和 Subtilisin 的二级结构相比,该酶含有更多的  $\alpha$ -螺旋,而无  $\beta$ -折叠,作为二级结构,前者比后者的折叠程度更高。又因该酶仅含有 6% 的无规则卷曲,所以整个分子有着更高的包装率——即表面积与体积比更小,刚性更强,酶的稳定性也就更高。

**2.5.3 变性过程中酶的荧光光谱研究:** 酶在不同浓度的盐酸胍溶液 37℃ 变性 30min,测定荧光光谱。结果见图 8。该酶处于天然状态时,280nm 激发的荧光光谱只表现出 330nm 处的荧光发射峰,该峰是 Trp 在蛋白内部的典型发射峰,而未发现 Tyr 在蛋白中的 330nm 处发射峰。该酶的氨基酸组成分析表明其蛋白中含有 12 个 Tyr,这说明了在蛋白的三级结构中,存在着从 Tyr 到 Trp 的有效能量转移<sup>[8-9]</sup>,因此,它们在蛋白的空间结构中相距较近,芳香环之间有可能形成疏水内核,起到稳定蛋白高级结构的作用。

Cowgill 等人认为蛋白处于无规则卷曲时,肽链自由羰基对 Trp 有荧光淬灭作用<sup>[10]</sup>。而处于高级结构中的羰基因参与了氢键的形成而失去了荧光淬灭作用。所以随着高级结构逐渐被破坏,自由羰基增加,会引起荧光强度的下降。图 8 所示结果与此相符,在盐酸胍变性浓度为 0~2mol/L,只显示出荧光强度的下降而无激发峰的明显红移。而随着盐酸胍浓度的增加,高级结构完全被破坏,Trp 暴露在水溶液中,荧光强度因溶剂对 Trp 的荧光淬灭作用而继续下降,发射峰也红移至 350nm 左右。此后随着盐酸胍浓度的增加,溶液极性增加,淬灭作用相应增加,荧光强度也有所下降。

表 3 几种蛋白酶的二级结构比较

Table 3 Comparison of second structure of several proteases

Enzyme	$\alpha$ -helix	$\beta$ -sheet	Radom	$\beta$ -turn
R <sub>3</sub> protease	0.66	0	0.06	0.28
Thermolysin <sup>[7]</sup>	0.29	0.30	0.41	ND
Subtilisin <sup>[7]</sup>	0.44	0.14	0.42	ND

ND not determined

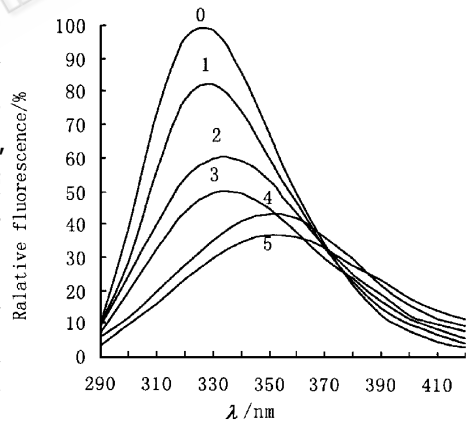


图 8 不同盐酸胍变性浓度下的荧光光谱

Fig. 8 Fluorescence spectra at various concentration of Gdn-HCl. Curve 0 shows fluorescence spectra of the native protease (curve 1~5 show fluorescence of the protease denatured by 1~5 mol/L Gdn-HCl, respectively).

## 参 考 文 献

- [ 1 ] B. L. Zamost ,H. K. Nielsen ,R. L. Stanes. *J. Indust. Microbiol.* ,1991 **8** :71~82.
- [ 2 ] 金 城 杨寿钧 张树政 ,*生物化学与生物物理学报* ,1994 **26** :357~363.
- [ 3 ] Ynag Shoujun Jin Cheng Zhang Shuzheng. *Am. N. Y. Acad. Sci.* ,1996 **782** :219~225.
- [ 4 ] O. H. Lowry N. J. Rosebrough A. L. Farr *et al.* *J. Biol. Chem.* ,1951 **193** :265~275.
- [ 5 ] 李建武 肖能庚 余瑞元等. *生物化学实验原理和方法* 北京 北京大学出版社 ,1994 pp. 207~223.
- [ 6 ] F. W. Dahlquist J. W. Long W. L. Bgbee. *Biochemistry* ,1976 **15** :1103~1111.
- [ 7 ] C. Grandi C. Vita D. Dalzoppo *et al.* *Int. J. Pept. Prot. Res.* ,1980 **16** :327~338.
- [ 8 ] L. Brand B. Witholt. *Methods in Enzymol.* ,1967 **11** :776~856.
- [ 9 ] J. Eisinger. *Biochemistry* ,1969 **8** :3902~3908.
- [ 10 ] R. W. Cowgill. *Biochim. Biophys. Acta* ,1969 **168** :431~438.

## Purification and Properties of Product of the Thermostable Protease Gene from *Bacillus stearothermophilus* HY-69\*

Sun Chao Jin Cheng Yang Shoujun Zhang Shuzheng

( Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 )

**Abstract** The thermostable metal protease gene from *Bacillus stearothermophilus* HY-69 had been cloned and expressed in *Bacillus subtilis* MI113. Its product was purified from host bacteria by CM-cellulose chromatography. The product showed homogeneity in PAGE. Its molecular weight is  $27\ 000 \pm 1\ 000$  ,measured by SDS-PAGE and sephadex G-100 gel filtration ,respectively. The protease is made up of 66% of  $\alpha$ -helix ,28% of  $\beta$ -turn ,6% of random and no  $\beta$ -sheet by calculations from CD data. The protease shows rather resistance to heat. Its optimum temperature is 70°C . It also shows high resistance to Gdn-HCl. Denatured in 3 mol/L Gdn-HCl for 20 minutes the enzyme remains about 40% of original activity. In order to explore the thermostable mechanisms of the enzyme ,its conformational variety in the course of denaturation by Gdn-HCl was investigated by CD spectra and fluorescence spectra. It is concluded that the enzyme increases its stability by increasing packing efficiency and decreasing amount of the random.

**Key words** Thermostable mental protease ,purification ,thermostability

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund( No. 39370166 ).