

毛花猕猴桃蛋白酶的提纯和性质*

梁楚泗 李树瑜** 杨政蓓

(福建省亚热带植物研究所, 厦门 361009)

摘要 用硫酸铵盐析, 磷酸盐除果胶和两次 DEAE 纤维素柱层析等方法, 从毛花猕猴桃 (*Actinidia eriantha* Benth.) 无细胞提取液中提纯蛋白酶, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现一条带, 纯酶的活力为 325 U/mg, 比活力提高 89 倍, 总收率约为 37%。用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量为 23 kD, 用等电聚焦电泳测定等电点为 4.8。酶的最适 pH 为 3.8, 最适温度为 43℃ 左右。纯酶制剂对其底物牛血红蛋白的 K_m 值为 5.56×10^{-3} mmol。酶的紫外吸收光谱最大值为 278 nm。二巯基苏糖醇、巯基乙醇、L-半胱氨酸盐酸盐等还原剂对该酶有明显的激活作用, 而碘乙酸、对氯汞苯甲酸对其有抑制作用, 这表明该酶属于巯基酶类。

关键词 毛花猕猴桃; 蛋白酶; 性质

Purification and some properties of protease from *Actinidia eriantha* Benth. Liang Chusi, Li Shuyu, Yang Zhenpei (Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361009), *J. Plant Resour. & Environ.* 1999, 8(3): 1~6

Protease of *Actinidia eriantha* Benth. was purified to electrophoretic homogeneity by a combination of ammonium sulfate precipitation, removal of pectin by phosphate, two times chromatography on DEAE cellulose. The specific activity of purified enzyme was 325 U/mg protein, which represented as 89-fold purification with a 37% yield. The molecular weight was estimated to be about 23 kD by the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the isoelectric point was found to be 4.8 by isoelectric focusing. The optimum pH for the enzyme was 3.8, optimum temperature was 43°C, and its K_m value for bovine hemoglobin was 5.56×10^{-3} mmol. The maximum absorption of UV-spectra of the enzyme was at 278 nm. Some reductants such as DTT, ME, L-cysteine stimulated the enzyme activity, while I-AA, PCMB inhibited activity. It suggested that the enzyme is a thiol protease.

Key words *Actinidia eriantha* Benth.; protease; properties

毛花猕猴桃 (*Actinidia eriantha* Benth.) 是我国特有的野生资源, 果实小, 绒毛多, 生于荒野山岭, 未开发利用。虽然国内外对中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 蛋白酶进行过深入的理论研究和开发应用^[1-10], 但对毛花猕猴桃蛋白酶的提纯和性质的研究至今未见报道。作者分离纯化毛花猕猴桃蛋白酶, 并对其基本性质进行了研究, 为该酶今后进一步应用于食品、医药等方面提供了有价值的理论基础。

* 福建省自然科学基金资助项目。承蒙上海交通大学生命科学与技术学院张惟杰教授审阅, 在此一并致谢。本文曾选入全国第三次工业生化学术会议论文摘要汇编。

** 浙江大学生物科学与技术系毕业生。

梁楚泗, 男, 1937年7月出生, 学士, 副研究员, 主要从事酶制剂的提纯、性质及应用研究。

收稿日期: 1999-05-31

1 材料与amp;方法

1.1 材料

毛花猕猴桃果实采自厦门福建省亚热带植物研究所内的栽培植株。

1.2 试剂

连四硫酸钾($K_2S_4O_6$)为西德 E. Merck 公司出品;二巯基苏糖醇(DTT)和对氯汞苯甲酸(PCMB)为 England Koch-light Laboratories LTD 出品;乙二胺四乙酸二钠(Na_2 -EDTA)为国营上海试剂厂产品;巯基乙醇(ME)为上海试剂四厂产品;L-半胱氨酸盐酸盐为北京化工厂产品;碘乙酸(I-AA)由天津市化学试剂三厂出品;牛血红蛋白、溶菌酶、牛血清清蛋白、鸡卵清蛋白、两性电解质(Ampholin)均为上海生物化学研究所出品;DEAE 纤维素(DE-22)为 Whatman 公司产品。上述试剂均为分析纯,标准蛋白质均为层析纯。

1.3 方法

1.3.1 酶的纯化

1.3.1.1 无细胞提取液的制备 取成熟的毛花猕猴桃鲜果,每 3 g 鲜果加 2 mL 0.1 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液(内含 1 mol/L Na_2 -EDTA、10 mmol/L $K_2S_4O_6$),高速匀浆 1 min 破碎细胞。破碎后的提取液在冰浴中搅拌 1 h,于 8 500 r/min 离心 15 min,上清液即为无细胞提取液。

1.3.1.2 硫酸铵沉淀 向上清液中加入硫酸铵至 80% 饱和度,8 000 r/min 离心 15 min。沉淀用 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液悬浮,对双蒸馏水透析除盐。

1.3.1.3 磷酸盐除果胶 在透析后的酶液中加入固体氯化钙,结晶磷酸氢二钾使终浓度分别为 40 mmol/L 和 100 mmol/L,8 000 r/min 离心 15 min,弃去沉淀。

1.3.1.4 第一次 DEAE 纤维素柱层析 去除果胶后的酶液,加到经平衡的 DE-22 柱上(柱规格为 1.5cm \times 20cm),用 0~0.8 mol/L KCl 溶液进行线性梯度洗脱,收集活力峰,对双蒸馏水透析除盐。

1.3.1.5 第二次 DEAE 纤维素柱层析 将第一次 DEAE 纤维素柱层析后的酶活力部分,再加到经平衡的 DE-22 柱上(柱规格为 1.5cm \times 20cm),用 0~0.8 mol/L KCl 溶液进行线性梯度洗脱,收集部分活力峰得到纯化的酶制剂。

1.3.2 酶活性测定 取 0.2 mL 酶液,加入 0.3 mL 0.1 mol/L pH 4.0 醋酸缓冲液和 0.5 mL 激活剂(15 mmol/L DTT),在 40 $^\circ$ C 水浴中激活 10 min,然后加入 1% 牛血红蛋白 1 mL,于 40 $^\circ$ C 恒温水浴中反应 10 min,加 5% 三氯乙酸 5 mL 中止反应,于 4 000 r/min 离心 20 min 除去沉淀,取清液在 275 nm 测定吸光度。空白为 0.2 mL 酶液先加 5 mL 三氯乙酸,其余同上,测定吸光度。以每 mL 酶液在上述条件下水解牛血红蛋白,每 min 释放 1 μ g 酪氨酸所需的酶量为 1 个酶活力单位,用 U 表示。

1.3.3 蛋白质浓度测定 按 Schacterle 改进的 Folin 试剂法^[11]。

1.3.4 酶的纯度鉴定 采用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳^[12]。

1.3.5 酶的分子量测定 基本上按照 Weber 的方法^[13]。

1.3.6 等电聚焦电泳 按 Vesterberg 方法^[14]。

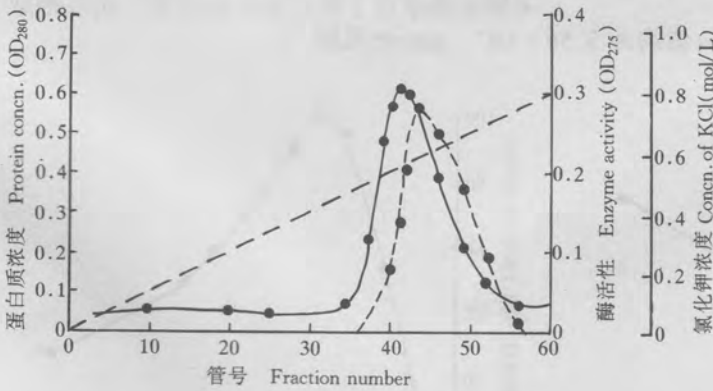
2 结果与讨论

2.1 酶的提纯

纯化各步结果见表 1, 第二次 DE-22 柱层析图谱见图 1。此酶纯化后纯度提高约 89 倍, 活力总收率约为 37%。纯化后的酶在聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现一条染色带(见图 2)。

表 1 毛花猕猴桃蛋白酶的纯化结果
Tab 1 Purification of protease from *Actinidia eriantha*

步骤 Steps	体积 Volume (mL)	活力 Activity (U/mL)	总活力 Total activity (U)	蛋白质 Protein (mg/mL)	总蛋白质 Total protein (mg)	比活 Specific activity (U/mg)	收率 Recovery (%)	提纯倍数 Purification multiple
抽提 Extract	335	26.9	9 012	7.34	2 459	3.66	100	1
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation	163	52.5	8 558	3.40	554.2	15.44	95.1	4.2
除果胶 Removal of pectin	125	67.9	8 488	2.45	306.3	27.71	94.2	7.6
第一次 DEAE 纤维素柱层析 First column chromatography on DEAE cellulose	72	113.8	8 194	0.45	32.4	252.90	90.9	69.1
第二次 DEAE 纤维素柱层析 secondary column chromatography on DEAE cellulose	33	100.7	3 323	0.31	10.2	325.0	36.9	88.8



●—● 蛋白质浓度 Protein concentration; ●—● 酶活力 Enzyme activity;
----- KCl 浓度 KCl concentration

图 1 毛花猕猴桃蛋白酶第二次 DE-22 柱层析图谱

Fig 1 Secondary column chromatography of protease from *Actinidia eriantha* on DE-22 cellulose

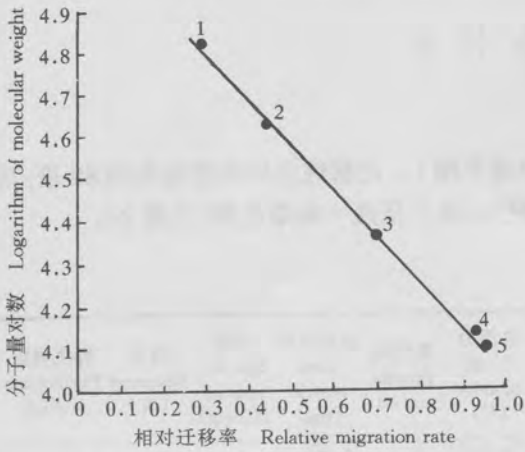


图 2 毛花猕猴桃蛋白酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig 2 Polyacrylamide gel electrophoretogram of purified protease from *Actinidia eriantha*

2.2 分子量测定

按 Weber 的方法, 采用标准 SDS-磷酸盐连续系统, 以牛血清清蛋白、鸡卵清蛋白、溶菌酶和细胞色素 C 为标准蛋白质, 测定酶的分子量。根据该酶的相对迁移率, 从图 3 查出其分子量是 23 kD。



标准蛋白质和毛花猕猴桃蛋白酶分子量：1. 牛血清清蛋白 67 000；2. 鸡卵清蛋白 43 000；3. 毛花猕猴桃蛋白酶 23 000；4. 溶菌酶 13 930；5. 细胞色素 C 12 500

The molecular weights of standard proteins and protease from *Actinidia eriantha* Benth.: 1. Bovine serum albumin 67 000; 2. Ovalbumin 43 000; 3. Protease from *Actinidia eriantha* 23 000; 4. Lysozyme 13 930; 5. Cytochrome C 12 500.

图3 毛花猕猴桃蛋白酶的分子量

Fig 3 Molecular weight determination of protease from *Actinidia eriantha* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

作图法,求得酶对牛血红蛋白的 K_m 值约为 5.56×10^{-3} mmol(见图7)。

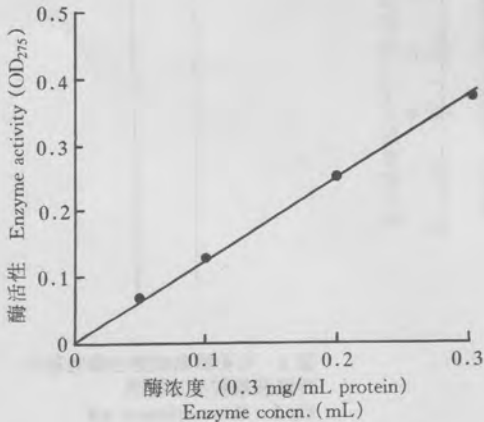


图4 毛花猕猴桃蛋白酶浓度对反应速度的影响
Fig 4 Effect of the concentration of protease from *Actinidia eriantha* on reaction rate

2.3 酶浓度对反应速度的影响

在 pH 4.0, 40℃ 时,以 1% 牛血红蛋白为底物,在 15~90 μg/mL 酶浓度范围内,酶反应速度依酶浓度的一级反应而变化,结果见图 4。

2.4 pH 对酶活力的影响

以 1% 牛血红蛋白为底物,在 40℃ 下测定不同 pH 值 (3.0, 3.3, 3.6, 3.8, 4.0, 4.2, 4.6, 4.8, 5.8) 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲液中酶活力,结果见图 5。可以看出,酶作用的最适 pH 值偏酸,即 pH 3.8 左右。

2.5 温度对酶活力的影响

以 1% 牛血红蛋白为底物,在 pH 4.0 条件下,于不同温度下测定酶活力。从图 6 可以看出 43℃ 时酶活力最高,当温度增至 45℃ 以上时,酶活力明显下降。

2.6 底物浓度对酶反应速度的影响—— K_m 值的测定

以牛血红蛋白为底物,其余条件同上,在不同底物浓度下测定酶反应速度。用双倒数

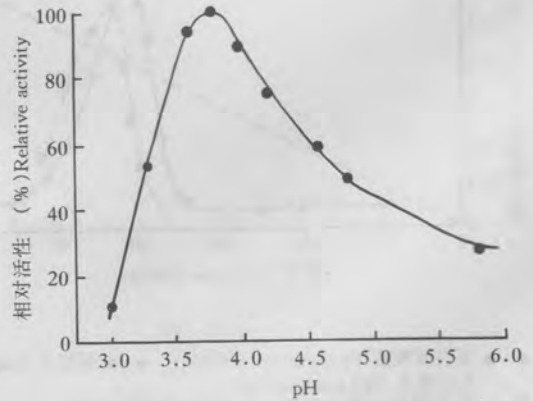


图5 pH 对毛花猕猴桃蛋白酶活力的影响
Fig 5 Effect of pH on activity of protease from *Actinidia eriantha*

2.7 酶等电点的测定

取比活为 325 U/mg 的纯酶样品进行等电聚焦电泳,结果(见图 8)表明,该酶的等电点约

为4.8,属于酸性蛋白酶。

2.8 酶的吸收光谱

取0.3 mg/mL的纯酶制剂,在200~700 nm范围内测定其光吸收,得到吸收光谱图(见图9),该酶的最大光吸收在278 nm处。

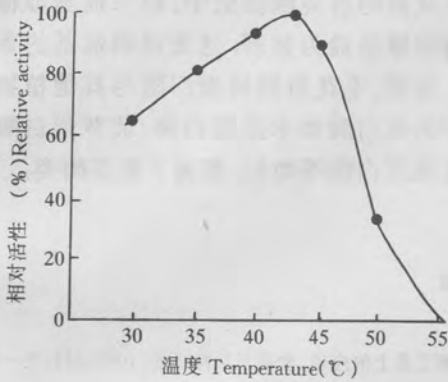


图6 温度对毛花猕猴桃蛋白酶活力的影响
Fig 6 Effect of temperature on the activity of protease from *Actinidia eriantha*

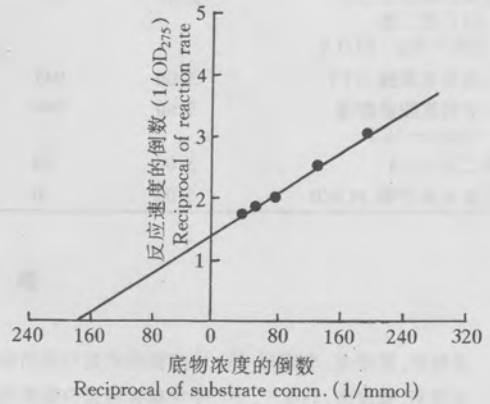


图7 底物浓度对毛花猕猴桃蛋白酶反应速度的影响
Fig 7 Effect of substrate concentration on the reaction rate of protease from *Actinidia eriantha*

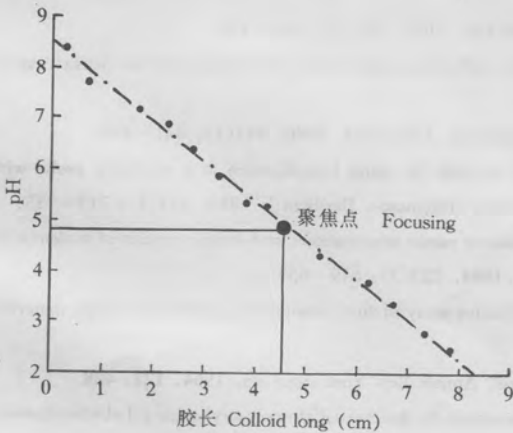


图8 毛花猕猴桃蛋白酶的等电点测定
Fig 8 Isoelectric point determination of protease from *Actinidia eriantha* by isoelectric focusing

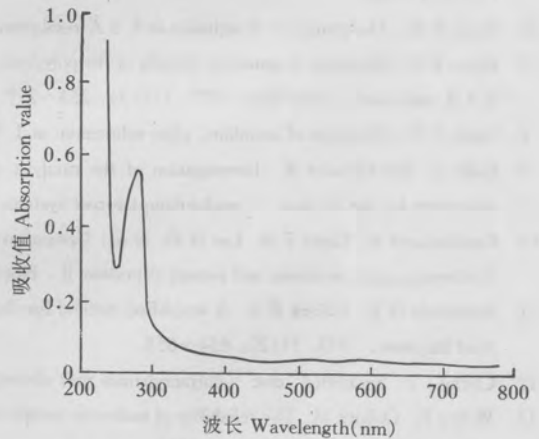


图9 毛花猕猴桃蛋白酶的吸收光谱
Fig 9 Absorption spectrum of protease from *Actinidia eriantha*

2.9 激活剂和抑制剂对酶活力的影响

其他反应同前,以不加各种试剂为对照,得出表2所示的结果。从表2可知,几种还原剂,如巯基乙醇(ME)、二巯基苏糖醇(DTT)、L-半胱氨酸盐酸盐对该酶均有明显的激活作用,在同一酶量和浓度时,他们的激活效应以DTT为最强,约为对照的9.5倍。

表2 一些化学试剂对毛花猕猴桃蛋白酶活力的影响
 Tab 2 Effect of some chemical reagents on the activity of protease from *Actinidia eriantha*

试剂 Reagent	终浓度 End concn. (mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)
对照 Control	-	100
巯基乙醇加乙二胺 四乙酸二钠 ME + Na ₂ - EDTA	5.00	500
二巯基苏糖醇 DTT	5.00	947
L-半胱氨酸盐酸盐 Cysteine HCl	5.00	844
碘乙酸 I-AA	5.00	14
对氯汞苯甲酸 PCMB	5.00	0

此外, 巯基酶的抑制剂, 如碘乙酸 (I-AA) 及对氯汞苯甲酸 (PCMB) 对此酶有强烈的抑制作用, 当 PCMB 的浓度为 5.00 mmol/L 时, 酶被完全抑制。

上述实验证实, 巯基是该酶的活性基团, 在本试验的各类激活剂中, 以二巯基苏糖醇对酶的激活最为显著, 这更说明巯基的重要性。显然, 毛花猕猴桃蛋白酶与其他植物果实中的蛋白酶如木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和无花果蛋白酶等类似, 都属于巯基酶类。

参 考 文 献

- 1 梁楚泗, 黄维南, 李璞君, 等. 中华猕猴桃蛋白酶的研制及其在啤酒工业上的应用, 食品与发酵工业, 1989, (1): 76~83.
- 2 梁楚泗, 黄维南, 刘福平, 等. 中华猕猴桃蛋白酶的性质及其副产品的研制. 食品与发酵工业, 1989, (3): 52~57.
- 3 梁楚泗, 刘明文. 中华猕猴桃蛋白酶的性质及抗炎作用的研究. 医药工业, 1985, 16(10): 24~29.
- 4 蔡红玉, 颜思旭, 梁楚泗, 等. 在变性剂作用下中华猕猴桃蛋白酶构象与催化活力变化的研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1986, 25(2): 216~225.
- 5 Baker E N. Preliminary crystallographic data for actinidin, a thiol protease from *Actinidia chinensis*. J Mol Biol, 1973, 74 (3): 411~412.
- 6 Baker E N. The structure of actinidin at 5.5 Å resolution. J Mol Biol, 1976, 101(2): 185~196.
- 7 Baker E N. Structure of actinidin: Details of the polypeptide chain conformation and active site from an electron density map at 2.8 Å resolution. J Mol Biol, 1977, 115(3): 263~277.
- 8 Baker E N. Structure of actinidin, after refinement at 1.7 Å resolution. J Mol Biol, 1980, 141(4): 441~484.
- 9 Salih E, Brocklehurst K. Investigation of the catalytic site of actinidin by using benzofuroxan as a reactivity probe with selectivity for the thiolate — imidazolium ion-pair systems of cysteine proteinases. Biochem J, 1983, 213(3): 713~718.
- 10 Brocklehurst K, Carey P R, Lee H H, et al. Comparative resonance raman spectroscopic and kinetic studies of acylenzymes involving papain, actinidin and papaya peptidase II. Biochem J, 1984, 223(3): 649~657.
- 11 Schacterle G R, Pollack R L. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. Anal Biochem, 1973, 51(2): 654~655.
- 12 Clarke J T. Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. Annals New York Acad Sci, 1964, 121: 428.
- 13 Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem, 1969, 244: 4406~4412.
- 14 Gabriel O. Methods in enzymology Vol. XXII, New York and London: Academic Press, 1971. 565~578.

(责任编辑: 惠 红)