蓖麻蚕核型多角体碱性蛋白酶的分离与性质

林栖凤 卢文筠

（武汉大学病毒研究所，武汉）

提 要

本文证明在蓖麻蚕核多角体中也存在着碱性蛋白酶，该酶在Na_2CO_3碱性溶液中能使多角体蛋白质降解，最适pH为11--12，最适温度约为40℃，在60℃以上严重失活，重金属Hg^{+2}，Cu^{+2}离子对酶活性有较强的抑制作用，而Na^+，Mg^{+2}离子影响不大。本文采用ConA-Sepharose亲和层析一步分离了蓖麻蚕核多角体碱性蛋白酶，简化了分离过程。

Yamafuji，K.等[1]于1959年最早报道在家蚕核多角体病毒包涵体中存在着某种在弱碱性介质中使多角体蛋白降解的酶——碱性蛋白酶。其后，许多实验室相继证实在多种昆虫杆状病毒包涵体中也存在这种蛋白酶[2-7]。对该酶的研究是病毒基础研究的一部分，对病毒多角体蛋白和病毒粒子结构多肽的研究更有直接意义。

蓖麻蚕核多角体病毒(Attacus ricini nuclear polyhedrosis virus，简称ArNPV)属杆状病毒科A亚组，是一个有包涵体的环状双链DNA病毒。本文报道在ArNPV感染蓖麻蚕形成的多角体中也存在着碱性蛋白酶，并对该酶的分离方法和若干性质进行了研究。

材料与方法

一．核多角体的纯化 蓖麻蚕核多角体病毒由广西蚕业研究所惠赠。收集感染发病的5龄蚕体，按已经发表的方法[8]洗净多角体，悬于1%SDS中，在室温下搅拌20分钟，4000r/m离心20分钟，用蒸馏水洗涤多角体沉淀2—3次，除去SDS。纯净的多角体置0℃保存备用。

二．多角体蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 约10mg纯净的多角体悬于1ml 0.1mol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$，pH10.8溶液(以下简称碱液)中，在30℃保温不同时间，于3、5、10、20、40、60分钟，各取出0.2ml，立即用TK缓冲液（0.025mol/L Tris-0.025mol/L KCl，pH7.5）中和至pH8左右，终止反应。在台式离心机上5000r/m离心5分钟，除去未溶解的多角体，将含有多角体蛋白和病毒粒子的上清液15000r/m离心15分钟，使病毒粒子沉淀除去，上清液供电泳使用。为了进行比较，将预先在70℃热处理30分钟的多角体同样进行碱溶和电泳。采用Laemmli的SDS-PAGE系统[9]，凝胶

本文于1986年6月28日收到

浓度为10%。样品缓冲液含0.0625mol/L Tris-HCl（pH6.5），2%SDS，5%β-巯基乙醇，10%甘油，0.001%溴酚蓝。样品于沸水浴处理3分钟，置室温下冷却后，立即电泳，电泳后用0.1%考马斯亮蓝R250染色，常规方法脱色。

三.酶活性的测定

1.以多角体蛋白为底物 参考川濑茂实的方法[6]。在两支试管中，各加入多角体10mg，加少许蒸馏水制成悬液，分别进行70℃，30分钟加热和不加热处理，然后各加入4ml碱液，于37℃保温不同时间（0、7.5、15、30、60、120、180分钟），取反应液0.5ml，加入3.5ml10%三氯醋酸（TCA），0℃静置1小时，3000r/m离心20分钟，取上清液，以试剂为空白对照，测定280nm消光值，用溶液中酸可溶性多肽的生成量表示蛋白酶的活性。

2.以酪蛋白为底物 取多角体20mg，加入10ml碱液，37℃保温7.5分钟，取1/2作为酶液，另1/2于70℃加热30分钟。上述溶液各取0.5ml，分别加入1ml 1%酪蛋白溶液（酪蛋白溶于0.05mol/LNa_2CO_3-0.04mol/L NaCl），37℃保温不同时间，然后加1.5ml 20%TCA终止反应。0℃静置1小时，3000r/m离心20分钟，取上清液测定280nm的消光值。

四.蓖麻蚕核多角体碱性蛋白酶的分离 昆虫病毒碱性蛋白酶大多是具有糖键的一类蛋白质[8]，因此，本研究试图利用伴刀豆球蛋白A（ConA）特异性吸附糖蛋白的能力，将ConA与经过溴化氰活化的琼脂糖（Sepharose 4B）偶联制成ConA-Sepharose亲和吸附剂，分离ArNPV碱性蛋白酶。

1．ConA-Sepharose亲和吸附剂的制备 参考赵永芳的方法[10]，在30ml ConA溶液（内含ConA 300mg，pH7.5）中，加入经溴化氰活化的Sepharose 4B约40ml，置冰箱，搅拌20小时，加入pH9的乙醇胺溶液1ml，反应15分钟，然后依次用0.07mol/L Na_2CO_3-0.5 mol/L NaCl，0.1mol/L $Na_2B_4O_7$-0.5 mol/L NaCl（pH8.5），以及0.5mol/L NaCl溶液洗涤。置冰箱中备用。

2．粗酶液的制备 为了简化分离过程，首先将纯净的多角体约5mg悬浮于1ml 0.1mol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$（pH10.8）碱性溶液中，低温（0—2℃）放置不同时间，取样进行SDS-PAGE分析，确认使分子量较高的蛋白质几乎完全降解所需的时间（大约两昼夜），然后按此条件处理约20—30mg多角体，3000r/m离心20分钟，除去未溶解的多角体，上清液即为粗酶液，0℃保存备用。

3．ConA-Sepharose亲和层析 上述粗酶液用平衡液(0.5mol/L NaCl-0.05mol/L Tris-HCl，pH7.5）在4℃透析4小时，再加入平衡液稀释至10ml左右。加在已平衡好的ConA-Sepharose层析柱上(柱体积0.8×7cm)，先用30ml平衡液洗涤，再用含0.4mol/L α-甲基吡喃-D-甘露糖苷的0.5mol/L NaCl-0.05mol/L Tris-HCl，pH7.5溶液洗脱。流速1ml/4分钟，每管收集2.5ml，用瑞典LKB-2070部分收集器收集和检测。洗脱结束后，测定各组分的280nm消光值，绘制洗脱曲线，并用1%酪蛋白为底物测定各收集组分的酶活力。

五.pH对酶活的影响 用0.1mol/L甘氨酸和1mol/L NaOH配制pH8.0到12.5的一系列含0.2%酪蛋白的溶液，各加入酶液0.5ml(相当于2mg/ml多角体)，40℃反应1

小时，然后按三。所述方法处理，并测定280nm消光值，绘制 pH 与蛋白酶相对活性的关系曲线，峰值所示即为蛋白酶作用的最适pH。

六．温度对酶活性的影响 以pH11.2的0.2%酪蛋白为底物，加入 0.5ml 酶液，在20℃到70℃区间各温度反应15分钟，然后按三。所述方法处理，并测定280nm消光值，绘制温度与蛋白酶相对活性的关系曲线。

七．金属离子的影响 在 pH11.2 的 0.2% 酪蛋白底物溶液中，分别加入 NaCl，$MgCl_2$，$CuSO_4$，$HgCl_2$溶液，调整各金属离子浓度为10^{-6}mol/L到10^{-1}mol/L，加入0.5ml酶液，40℃反应1小时，然后加入等体积 20%TCA 终止反应，在室温下放置 30 分钟，3000r/m 离心 20 分钟，取上清液测定 280nm 的消光值。将未加入任何金属离子的溶液作对照，规定其剩余相对酶活为 100%，比较上述几种金属离子对蛋白酶活性的影响。

结果与讨论

一．核多角体的碱溶解行为

多角体在pH10.8的 Na_2CO_3 溶液中，于30℃反应 5 分钟后，即发生一定程度的降解，随着碱溶时间的增加，降解现象愈来愈明显。若 NPV多角体先经70℃加热30分钟，再进行碱溶解(30℃，30分钟)，则多角体蛋白基本不被降解（图1），表明多角体中某些蛋白酶已灭活。NPV多角体的碱溶现象即使在低温下也能观察到（图2），48 小时后多角体蛋白的主要组分几乎完全降解。以上与文献[2-7]的报导十分相似。

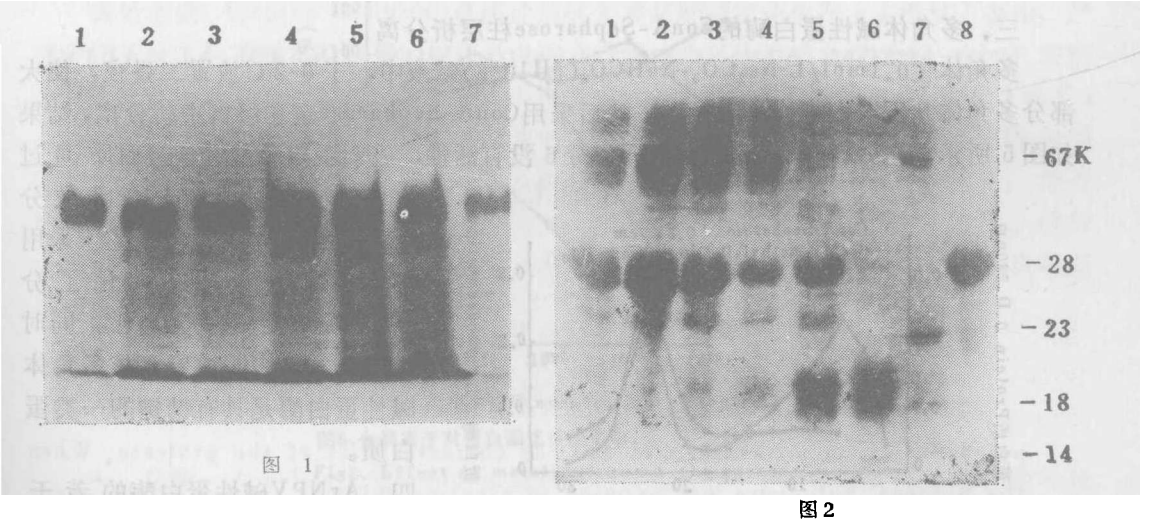

图2

图1.碱解不同时间的蓖麻蚕NPV多角体SDS-PAGE图。(1—6)。在0.1mol/LNa_2CO_3-$NaHCo_3$(pH10.8)溶液中，30°C保温3，5，10，20，40，60分钟；（7）多角体碱解前70°C加热30分钟。

Fig·1. SDS-PAGE of alkali solubilized ArNPV polyhedra at various times.purified ployhedra was incubated in 0.1mol/L Na_2CO_3·$NaHCO_3$(PH10.8)for various times at 30°C, 3, 5, 10, 20, 40, 60 minutes(1—6), polyhedra heated at 70°c for 30 minutes before incubation in carbonate (7).

图2.多角体在0～2°C碱解的SDS-PAGE图.（1—6）0.5，1，1.5，2，24，48小时；（7）标准蛋白；（8）多角体蛋白.

Fig.2.SDS-PAGE of alkali solubilized ArNPV poiyhedra.at 0°to 2°C, 0.5, 1, 1.5, 2, 24, 48hrs (1—6); standard molecular weight proteis (7); pelhedra (8).

二。酶活性的测定

多角体碱性蛋白酶的活性可通过测定多角体基质蛋白的减少，或降解产物的增加来表示。本文是通过测定多角体碱溶不同时间与溶液中酸可溶性蛋白生成量的关系来研究的。图 3 表示，酸溶性蛋白生成量在15分钟内急剧增加，说明多角体中的蛋白酶能迅速分解多角体基质蛋白。当用酪蛋白作底物时，二者的关系在 120 分钟内基本上呈直线（图 4 ）。若将多角体先经70℃加热30分钟，则酸溶性蛋白的量没有变化，表明加热使酶失活，多角体不被降解。

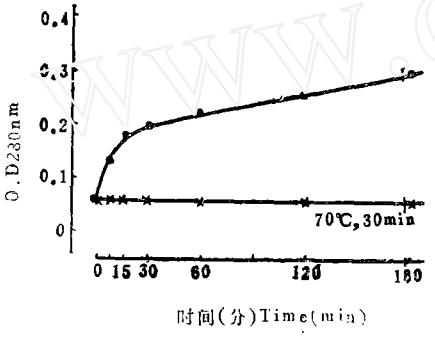

图3 .ArNPV多角体的水解时间关系曲线
—·—多角体不加热
—×—70°C加热30分钟
Fig3. Time course of hydrolysis of ArNPV Polyhedra.
—·—Untreated NPV polyhedra.
—×—Heat treated at 70°C for 30 min.

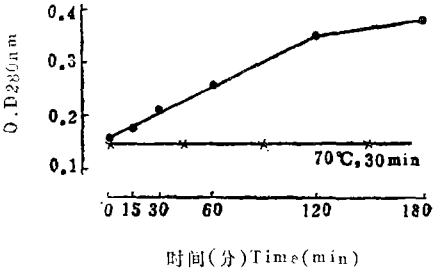

图4 .酪蛋白为底物的水解时间关系曲线
—·—酶液不加热
—×—70°C加热30分钟
Fig4. Time course of hydrolysis of casein as substrate.
—·—Untreated enzyme solution.
—×—Heat treated at 70°C for 30 min.

三。多角体碱性蛋白酶的ConA-Sepharose柱层析分离

多角体在0.1mol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$(pH10.8)碱液中，于 0-2℃放置二昼夜，使大部分多角体基质蛋白降解（图 2 ），然后采用ConA-Sepharose亲和层析进行分离，结果如图 5 所示，组分21-23有酶活性，而组分 6 没有活性，表明蛋白酶与其他蛋白质通过ConA-Sepharose 柱层析已被分离。该法与其他研究者[6,12]采用的二次柱层析相比，简化了分离过程，效果仍尚为满意。同时这一事实还表明蓖麻蚕核多角体碱性蛋白酶是具有糖键的一类蛋白质。

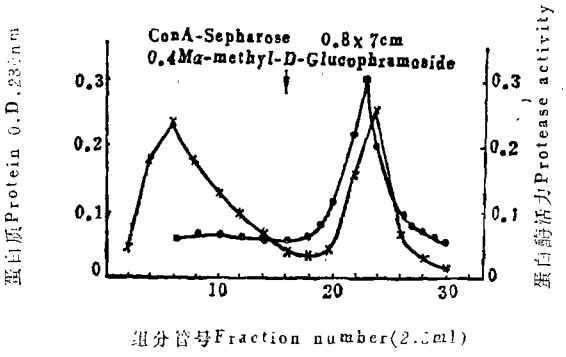

图5.ConA-Sepharose亲和层析与酶活力测定
柱体积：0.8×7Cm；流速：1ml/4分；2.5ml/管；—×—蛋白
—·—酶活力；；↓开始洗脱
Fig5.ConA-Sepharose affinity chromatography and enzyme activity column(0.8×7cm); 1ml/4min; 2.5ml/fraction; —×—protein; —·—protease activity; ↓start elute.

四。ArNPV碱性蛋白酶的若干性质。

pH对酶活性的影响如图 6所示，pH9.5以下几乎没有活性，从 pH10—11.5，酶活性急剧上升，在11.5达到最大值，即使在pH12.5，其活性仍有约38%。

该酶的最适作用温度约为

40℃。从25℃到35℃酶活性增加约3倍，在50℃以上酶活性急剧下降，在60℃以上处理15分钟，活性完全丧失（图7）。因此，当制备多角体蛋白时，为了消除蛋白酶的干扰，一般先将多角体在70℃加热30分钟，使可能存在的蛋白酶失活。

几种金属离子对酶活性的影响如图8所示，二价重金属Hg^{+2}，Cu^{+2}离子对酶有较强的抑制作用，但Na^{+}，Mg^{+2}离子的存在则几乎没有影响，可能金属离子与碱性蛋白酶的结合存在着某些特异性。

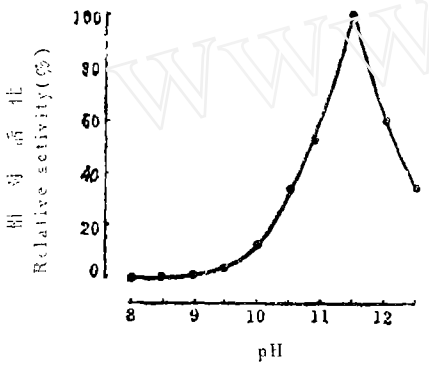

图6. pH 对蛋白酶活性的影响

Fig6. Effect of pH on the protease activity.

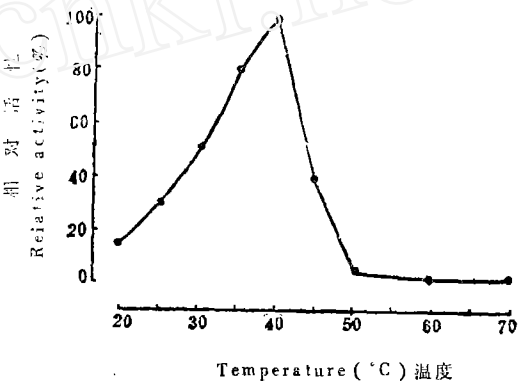

图7. 温度对蛋白酶活性的影响

Fig7. Effect of temperature on the protease activity.

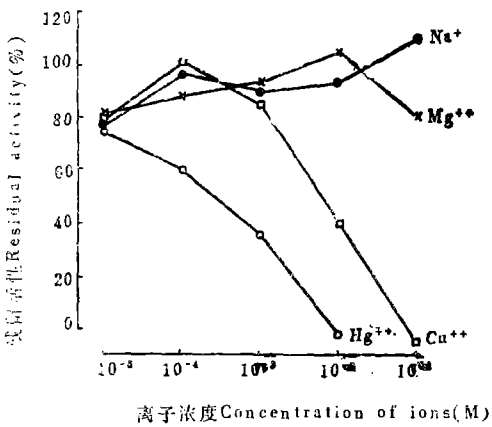

图8. 金属离子对蛋白酶活性的影响.

Fig8. Effect of metallic ions on the protease activity.

许多研究者[3-7,11-14]报道，在昆虫杆状病毒的多角体中存在着某种碱性蛋白酶，最适pH一般在10.5—11.5，最适温度一般为40—50℃。本文报道ArNPV多角体碱性蛋白酶的最适pH为11.5，最适温度为40℃，与他们的结果十分相似。

关于昆虫病毒包涵体中碱性蛋白酶的由来，曾引起许多研究者的兴趣。Zummer[14]，Kawase[15]在通过细胞培养获得的多角体中没有发现碱性蛋白酶，因而否认它是多角体的组成部分。然而Payne[16]等指出，碱性蛋白酶包含在多角体蛋白内，位于病毒粒子膜上，该酶对病毒粒子的释放可能起很大作用。

参 考 文 献

[1] Yamafuji, K.et al., 1959, *Enzymologia* 22: 1—12, 157—160
[2] Kozlov, E.A.et al., 1975, *J.Invertebr. Pathol.*, 25: 97—101
[3] Eppstein, D.A.1977, *Biochem.J.*, 167: 321—332
[4] Wood, H.A.1980, *Virology* 103: 392—399
[5] Langridge, W.H.R., et al., 1981, *Virology* 114:595—600
[6] 川瀬茂实等，1984，家蚕におけるウイルス病発病の要因分析，31-50
[7] 新田实等，日蚕杂，1982,51(5)：430-434
[8] 严家骐等，1982，病毒学集刊(1)：153-161
[9] Laemmli, L. K., 1970, *Nature* 227(5259)：680-685
[10] 赵永芳等，1984，生物化学与生物物理进展，1：67-71
[11] Tweeten, K. A., et al., 1978, *J. Virol.*, 26：702-711
[12] McCarthy, W. J., 1976, *J. Invertebr. Pathol.*, 28：57-65
[13] Pnyne, C. C. et al., 1978 *J, . Virology* 26：84-92
[14] Zummer, M. et al., 1979, *J. Invertebr.pathol.*, 33：383-384
[15] Kawase, S. et al., 1985, *Appl. Ent. Zool.*, 20(4)：498-499

ISOLATION AND SOME PROPERTIES OF AN ALKALINE PROTEASE IN NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF ATTACUS RICINI

Lin Qi-feng Lu wen-jun

(*Department of Virology, Wuhan University, Wuhan*)

The paper confirmed the presence of alkaline protease in the nuclear polyhedra of the Attacus ricini and the characteristics of the protease. When the nuclear polyhedra was exposed to alkaline solution, a proteolytic enzyme in the polyhedra degraded the major structural proteins of polyhedra into proteins with the lower molecular weight. The proteolytic activity showed an optimum temperature of 40℃ and an optimum pH of 11 to 12. The activity was inhibited by metallic ions such as Hg^{2+} and Cu^{2+}. The enzyme was purified by affinity chromatography with ConA-Sepharose.