

固氮鱼腥藻的蛋白水解酶及其部分性质的研究

杨林 冯渤 王业勤

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

应用溶菌酶处理, 超声破碎细胞, 通过差异离心和解离剂处理, 将细胞的不同部分分开。以水解 α -酪蛋白反应检测蛋白水解酶活性, 结果表明, 在细胞的可溶部分、内细胞质膜、外膜及胞浆周围区均存在蛋白水解酶活性。异形胞可溶部分的蛋白酶活性比营养细胞可溶的蛋白酶活高4—5倍。在固氮条件下, 营养细胞可溶性蛋白酶反应最适温度为50—55℃, 65℃时, 酶活迅速下降。有 Ca^{2+} 5mmol/l 时, 蛋白酶在60℃稳定, 无 Ca^{2+} 存在下, 酶液在60℃预处理10分钟, 酶活性丧失80%以上。酶反应的最适pH为8—10。而且氮饥饿之后, 培养基的pH值对细胞蛋白酶活水平有明显影响, 氮饥饿24小时内, 蛋白酶活迅速增加, 但在碱性条件下, 酶活水平比在中性条件下要高得多。邻菲罗啉对蛋白酶活性有严重的抑制, EDTA 仅有轻微抑制, 而 PMSF 对细胞蛋白酶活的抑制作用, 与细胞氮饥饿时间有关。

关键词 鱼腥藻, 蛋白水解酶, 钙离子, 抑制作用

蛋白水解酶在细胞分化、蛋白质降解、前体蛋白质加工等细胞过程中具有重要作用^[1]。鱼腥藻在氮饥饿时, 蛋白质的合成速度降低50~70%, 而蛋白质的降解增加6~7.5倍^[9]。至今已报道的蓝藻细胞在氮饥饿时, 与蛋白降解有关的蛋白水解酶中, 有与膜结合的降解藻蓝蛋白的蛋白水解酶、降解蓝藻颗粒体多肽蛋白酶、以及存在于细胞可溶部分, 降解许多细胞蛋白的蛋白酶^[4, 12]。然而, 蓝藻蛋白酶尚未分离纯化, 并鉴定其特性。

鱼腥藻营养细胞分化为异形胞过程中, 细胞蛋白酶活性随时间而升降, 表现有限的水解控制。而且异形胞的可溶蛋白和膜蛋白图谱与营养细胞的确有很大差别。在异形胞中, 大量蛋白被降解, 并合成了一些新的蛋白质^[2], 这明显涉及蛋白水解酶的调节作用。

本文简要报道蛋白水解酶活性在鱼腥藻细胞内的分布, 并研究了蛋白酶活性与一些环境条件的关系, 以及细胞可溶性蛋白酶的一些特性。

材 料 与 方 法

(一) 藻种及培养

鱼腥藻 7120 及其氧敏感突变种的培养方法前已报道^[1]。用 Allen 和 Arnon 培养基,

每升含 0.5 克 KNO_3 。氮饥饿培养时,藻细胞经离心洗涤悬浮于不含 KNO_3 的上述培养基中,按不同时间取样测蛋白酶活性。

(二) 营养细胞提取液的制备

离心收集藻细胞,用 25mmol/l, pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤,并悬浮于上述缓冲液中,在冰浴中超声 5 分钟,离心 (5,000r/min) 10 分钟除去异形胞及细胞残渣,上悬液即为细胞提取液。

(三) 细胞可溶性蛋白酶及与膜结合的蛋白酶的制备

氮饥饿 48 小时的藻细胞经离心洗涤后,按前述方法^[2],加溶菌酶 (1.5mg/ml) 35℃ 处理 90 分钟,低速离心收集藻细胞后,上清液中含溶菌酶处理释放的蛋白酶。藻细胞经渗透冲击,短时超声,破碎营养细胞。经差异离心获得异形胞,异形胞再经超声破碎。营养细胞及异形胞粗提液经低速离心除去未破碎细胞,再离心,80,000~140,000r/min 30 分钟,上清液含可溶性蛋白酶,沉淀含与膜结合的蛋白酶。膜部分经洗涤后用 2%triton-x100 提取 2 次,离心 105,000r/min 30 分钟,上清液为内细胞质膜,其沉淀为细胞壁外膜¹⁾。

(四) 蛋白酶活性的测定

以 α -酪蛋白作为底物。在 280nm 波长处,光谱检测^[11]。 α -酪蛋白的制备按 Ashby 的方法^[3]。酶反应总体积为 1ml,内含 α -酪蛋白 5mg/ml, CaCl_2 5 mmol/l, α -巯基乙醇 3 mmol/l,酶液 250~500 μ l,缓冲液用 Tris-HCl 或 KH_2PO_4 -NaOH 50mmol/l,温度、pH 值、反应时间均见图表说明。反应结束后,加 1ml 10% 冷的三氯醋酸终止反应。空白对照含所有成份,但加酶液前,先加三氯醋酸。经滤纸过滤后,取过滤液,280nm 测定吸收值。在 30 分钟水解中,相当于 1 μ mol 酪氨酸等价物的酶量作为一个酶活单位。以单位/mg 蛋白表示。

(五) 蛋白浓度的测定

酶蛋白浓度的测定用修改的 Lowry 法^[8]。此方法对测定膜蛋白尤为稳定迅速。

结 果

(一) 蛋白酶水解反应的时间曲线

α -酪蛋白已广泛应用于作为测定蛋白酶水解活性的底物。其方法简单易于操作。为此,检查了本方法对测定蓝藻细胞蛋白酶活的适用性,以粗提取液作为酶液,温度 30℃,pH7.5,测定酶反应时间与产物浓度的关系。酶反应产物在 30 分钟内呈线性增加,60 分钟后,酶反应速度下降,120 分钟后,反应产物几乎不随时间增加而增加,呈典型的酶反应速度曲线(图 1)。因此,在以下的酶反应中,均反应 30 分钟。这个方法对检测蓝藻蛋白

1) 王业勤等,鱼腥藻 7120 细胞外膜结构的完整性与固氮防氧保护(待发表)。

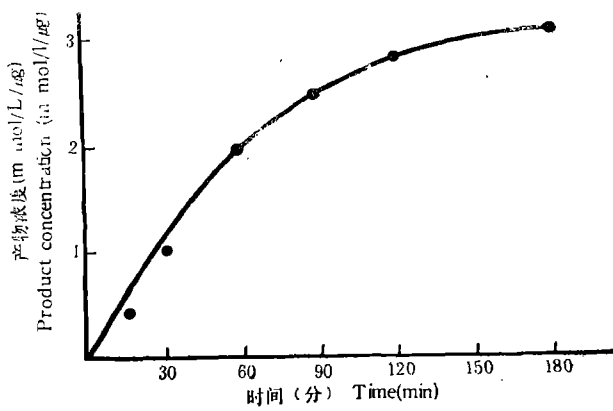


图1 蛋白水解酶反应的时间曲线

Fig. 1 Proteolytic reaction curve of *Anabaena* cell extract (Reaction conditions: Tris-HCl buffer, pH 7.5, 30°C)

酶活是适用的。用 α -酪蛋白作为底物优于牛血清白蛋白,但只有严格控制操作条件,结果的重现性才高。

(二) 蛋白水解酶在细胞中的分布

将鱼腥藻 7120 氮饥饿 48 小时的营养细胞的粗提取液,经 80,000r/min 离心,分为可溶部分和膜部分,可溶部分经 60% 饱和度硫酸铵沉淀部分纯化。膜部分经洗涤后,用 2% Triton 处理,将内细胞质膜(包括细胞质膜和类囊膜)和外膜分开,内细胞质膜经丙酮沉淀除去大部分干扰测定的色素,然后分别测定它们的蛋白酶活性(表 1)。在细胞可溶性部分、内细胞质膜部分和外膜部分均存在蛋白酶活性。此外,我们在用溶菌酶(1.5mg/ml 细胞)处理藻丝制备球型体时,离心收集细胞后,淡棕色的上清处理液经电泳检测,有 7~8 种多肽释放,其中也存在蛋白酶活性,它们可能是存在于细胞壁与细胞质膜之间的胞浆周围区的蛋白酶。因为细胞并未经渗透冲击,处理液中没有藻蓝蛋白释放。而且淡棕色处理液在 -40°C 存放期间有棕色物聚集沉淀出来,而此棕色物可能是溶菌酶消化的肽糖

表 1 蛋白水解酶在细胞不同部分中的分布

Tab. 1 Proteolytic activities in various fractions of vegetative cell

细胞的不同部分 Fractions of vegetative cell	酶活单位 Activity unit
可溶性部分 Soluble fraction	1.826
外膜部分 Outer membrane fraction	1.192
内细胞质膜部分 Intracytoplasmic membrane fraction	0.521
胞浆周围区部分 Periplasmic space fraction	1.025

Reaction conditions: Tris-HCl buffer, pH 7.5, 40°C, 30 min

层。溶菌酶处理释放的蛋白酶活要求中性 pH。

(三) 异形胞与营养细胞可溶蛋白酶活性的比较

分离的异形胞经超声破碎后，与破碎的营养细胞分别经 140,000r/min 离心 30 分钟，获得的上清液称为可溶性部分，分别测定它们的蛋白酶活性。异形胞中可溶性蛋白酶活性比营养细胞可溶性蛋白酶活性高 4~5 倍 (表 2)，与我们前文报道的异形胞可溶蛋白电泳图谱的结果一致^[2]。

表 2 营养细胞和异形胞可溶性蛋白酶活性的比较

Tab. 2 Comparison of soluble protease activities in vegetative cell and heterocyst

材 料 Source	营养细胞 Vegetative cell	异形胞 Heterocyst
酶活单位 Activity unit	1.10	5.19

Reaction conditions: KH_2PO_4 -NaOH buffer, pH8.0, 35°C, 30 min

(四) 酶反应的最适温度

我们测定了营养细胞可溶性蛋白酶水解酪蛋白的活性与反应温度的关系。在 25~55°C 范围内，酶活随反应温度的提高而增加，55°C 时的酶活最高，比 25°C 时的酶活高 80%，当温度达 60°C 时酶活开始下降，65°C 时酶活急剧下降，仅残剩 55°C 时酶活的 30%

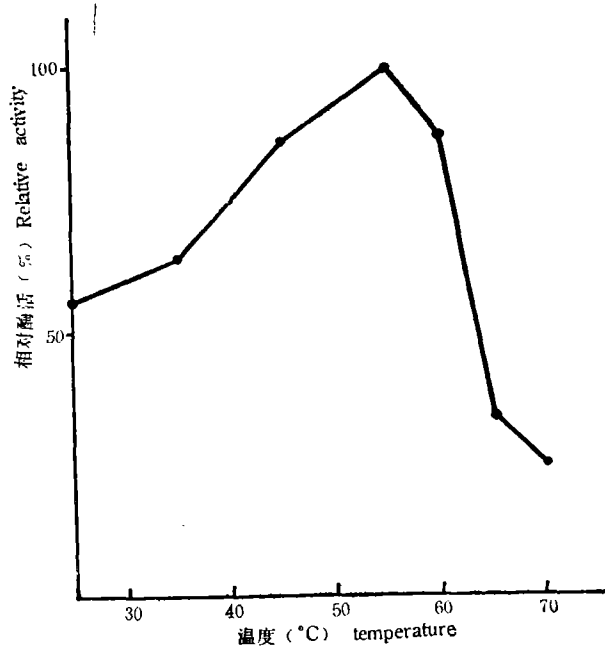


图 2 可溶性蛋白酶反应的温度曲线

Fig. 2 Effect of temperature on activity of soluble protease Reaction conditions: Tris-HCl buffer, pH 7.5, 30 min

左右,然而即使温度达 $70\sim 80^{\circ}\text{C}$,尚剩余一定的酶活(图 2)。可见可溶性蛋白酶要求较高的反应温度,最适反应温度为 55°C 。

(五) Ca^{2+} 对可溶性蛋白酶稳定性的作用

当酶反应温度为 30°C 时,反应体系中加入 Ca^{2+} 与否对酶活没有明显影响,然而当反应温度提高至 50°C 时,反应混合物中 Ca^{2+} 的浓度与酶活性有依赖关系,当 Ca^{2+} 浓度为 0.05 m mol/l 时,酶活与不加 Ca^{2+} 的酶活类似。可能在反应混合物中污染了微量 Ca^{2+} ,但随着 Ca^{2+} 浓度的增加至 0.5 m mol/l 时,酶活比不加 Ca^{2+} 的酶活高 25%,当 Ca^{2+} 浓度为 5 m mol/l 时,酶活比对照酶活高 60% 左右,酶活的增加与 Ca^{2+} 浓度相关(表 3)。显然 Ca^{2+} 离子对可溶性蛋白酶的活化和稳定有重要作用,为进一步验证这一现象,将酶提取液经 60% 饱和硫酸铵沉淀部分纯化后,悬浮于 Tris-HCl 的缓冲液中($\text{pH}7.5$),取一定量酶液在 60°C 预处理 10 分钟,热预处理时加或不加 5 m mol/l Ca^{2+} ,随后与未加热预处理的对照酶液一道,加入反应混合物在 30°C 进行酶反应,结果表明,经 60°C 预处理 10 分钟并加有 5 m mol/l Ca^{2+} 的酶液,与未经 60°C 热预处理的对照酶液一样,酶活没有损失,而不加 Ca^{2+} ,仅仅 60°C 处理酶液 10 分钟,酶活丧失达 80% 以上(图 3)。

(六) pH 值与酶活性的关系

以 Tris-HCl 缓冲液调节酶反应系统的 pH 值,分别测定了在 $\text{pH}6.4, 7.1, 8.1, 8.6, 9.0, 9.4, 10.7$ 时(均在 30°C 反应)酶反应的活性(图 4)。可溶性蛋白酶在碱性区有较宽的 pH 适应范围, $\text{pH}8\sim 10$ 范围内均表现高活性,而在偏酸性条件下,酶活明显下降。根据 pH 活性曲线,一般将蛋白酶分类为:酸性、中性和碱性蛋白酶。因此,鱼腥藻 7120 营养细胞可溶性蛋白酶是碱性蛋白酶。

(七) pH 值对细胞蛋白酶形成的影响

先将藻细胞培养于 $\text{pH}7.3$ 的含 NO_3^- 培养基中,然后通过过滤,洗涤,除去结合态氮,分别悬浮于 $\text{pH}7$ 和 $\text{pH}10$ (用 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 调节)的无结合态氮培养基中,照光培养,不同时间取样,超声破碎细胞, $5,000\text{r/min}$ 离心 10 分钟,取粗提取液测细胞总蛋白酶活性,酶反应 pH 为 $7.5, 30^{\circ}\text{C}$ 。当氮饥饿后,在 24 小时内,两种 pH 处理的细胞中的蛋白酶活性均迅速增加。但在 $\text{pH}10$ 培养的细胞中蛋白酶活性比在 $\text{pH}7$ 培养的细胞蛋白酶活性的增加要高,其中,氮饥饿 24 小时的高 84% (表 4),即在碱性条件下,细胞中蛋白酶的产生比中性条件下多。鱼腥藻 7120 的生长要求偏碱性,在偏酸性条件下生长极为

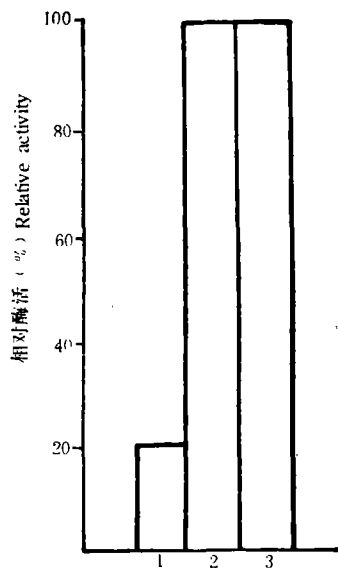


图 3 60°C 热预处理时, Ca^{2+} 对蛋白酶的保护作用

Fig. 3 Protection of Ca^{2+} on the stability of protease at 60°C pretreatment
1# 无 Ca^{2+} ; 2# 有 Ca^{2+} ; 3# 未预处理
1# Without Ca^{2+} ; 2# With Ca^{2+} ; 3# No pretreatment
(Reaction conditions: Tris-HCl buffer, $\text{pH}7.5, 30^{\circ}\text{C}, 30\text{ min}$)

表3 在高温下,不同浓度的 Ca^{2+} 对细胞可溶性蛋白酶活的影响
Tab. 3 Effect of Ca^{2+} concentration on soluble protease activity at 50°C

Ca^{2+} 浓度 (m mol/l) Ca^{2+} concentration	酶活单位 Activity unit
0	2.80
0.05	2.80
0.5	3.44
5	4.41

Reaction conditions: Tris-HCl buffer, pH 7.5, 50°C , 30 min

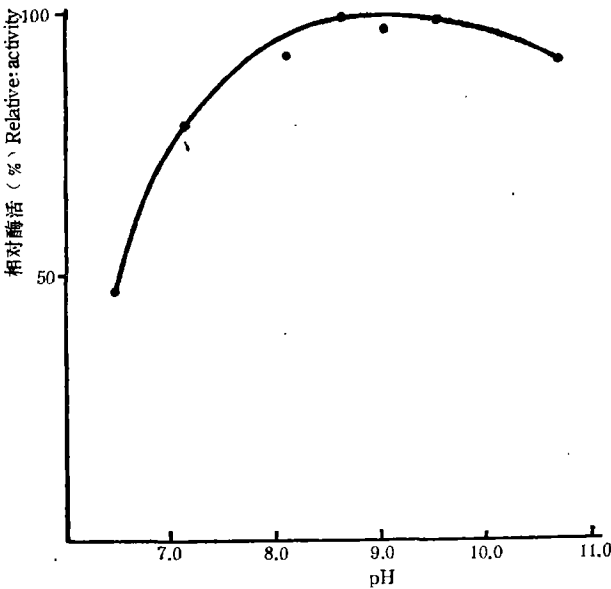


图4 可溶性蛋白酶反应的 pH 曲线

Fig. 4 Effect of pH on soluble protease activity Reaction conditions: Tris-HCl buffer, 30°C , 30 min

表4 培养基的 pH 对鱼腥藻 7120 细胞总蛋白酶的产生的影响
Tab. 4 Effect of pH of culture medium on production of protease of *Anabaena* 7120 cells

培养基 pH pH of medium	蛋白酶活单位 Activity unit		
	0 小时 (h)	12 小时 (h)	24 小时 (h)
7	3.20	4.47	5.15
10	3.20	6.94	9.45

Reaction conditions: Tris-HCl buffer, pH7.5, 50°C , 30 min

缓慢。因此,鱼腥藻 7120 蛋白酶的形成为类似于嗜碱杆菌的碱性蛋白酶的形过程^[6]。

(八) 抑制剂对蛋白酶活性的影响

我们检查了甲苯磺酰氟 (PMSF, 1m mol/l), 邻菲啰啉 (phenanthroline, 1m mol/l),

表 5 不同抑制剂对细胞氮饥饿不同时间的蛋白酶的抑制作用

Tab. 5 Inhibition of various inhibitors on proteolytic activity of cells under different durations of nitrogen starvation

藻材料 Source	培养时间(小时) Culture time (h)	对照酶活(单位) Activity of control (units)	甲苯磺酰氟 PMSF (1m mol/l)		邻菲罗啉 o-phenanthrolin (1m mol/l)	
			酶活单位 Activity units	抑制率 Inhibition (%)	酶活单位 Activity units	抑制率 Inhibition (%)
7120	0	4.11	3.78	8.1	0.67	83.8
	24	5.07	3.90	23.1	0.39	92.1
	48	3.09	3.36	-8.8	0.36	88.3
1	0	2.70	2.70	0	0.19	93.1
	24	9.65	4.00	58.5	0.23	97.6
	48	4.20	4.20	0	0.4	90.5

Reaction conditions: Tris-HCl buffer, pH 7.5,30 min

乙二胺四乙酸 (EDTA, 1m mol/l) 对蛋白酶活性的抑制作用。邻菲罗啉对营养细胞粗提取液蛋白酶活有强烈抑制作用,不管细胞是加 NO₃⁻ 培养还是缺结合态氮培养,其抑制程度在 90% 左右。而 PMSF 对蛋白酶活的抑制作用则与细胞培养的条件有关。从表 5 中可看到 PMSF 对 NO₃⁻ 培养的细胞粗提取蛋白酶活性没有明显的抑制作用(氮饥饿为零时)。氮饥饿 24 小时,细胞蛋白酶活增加,这时细胞蛋白酶活被 PMSF 抑制的程度明显增加。而氮饥饿 48 小时以后,细胞蛋白酶活下降,活性没有被 PMSF 抑制。也就是说,氮饥饿过程中细胞蛋白酶活性有与细胞分化相关的升降现象,即在氮饥饿后细胞分化时诱导产生了对 PMSF 敏感的蛋白酶^[1]。以上结果在鱼腥藻 7120 野生种和它的氧敏感突变种中是共同的。氧敏感突变种在氮饥饿 24 小时诱导产生的蛋白酶活更高。但在氮饥饿 60 小时后,其可溶性蛋白酶活经 50% 饱和度硫酸铵沉淀部分提纯后, PMSF 对酶活没有抑制作用,而邻菲罗啉呈现强烈抑制,但 EDTA 仅有轻微抑制(表 6)。邻菲罗啉和 EDTA 均为金属蛋白酶抑制剂,而 PMSF 为丝氨酸蛋白酶抑制剂。

表 6 抑制剂对氮饥饿 60 小时的突变种细胞可溶性蛋白酶的抑制

Tab. 6 Inhibition of various inhibitors on soluble protease activity of mutant cell after nitrogen starvation for 60 hours

处 理 Treatment	抑制率 Inhibition (%)
无抑制剂 No inhibitor	—
甲苯磺酰氟 PMSF (1m mol/l)	0
邻菲罗啉 O-phenanthrolin (1m mol/l)	96.3
乙二胺四乙酸 EDTA (1m mol/l)	14

Reaction condition: Tris-HCl buffer, pH 7.5, 30℃, 30 min

讨 论

Wood 和 Haselkorn 简要报道了鱼腥藻营养细胞粗提取液中存在需 Ca^{2+} 的可溶性蛋白酶和与膜结合的蛋白酶^[12]。后者特异性地水解藻蓝蛋白,用非离子型洗涤剂可将它从膜上释放出来^[4,12]。我们的结果表明,与膜结合的蛋白水解酶活性不仅存在于被 Triton-X100 释放的内细胞质膜部分,也存在于细胞壁的外膜和胞浆周围区。后者似乎与特异性水解藻蓝蛋白的活性无关,而可能与细胞壁的周转有关。因此与膜结合的蛋白酶并非一种。

可溶性蛋白酶并非酶反应必需 Ca^{2+} , 而 Ca^{2+} 对酶在高温时的热稳定性是必需的。这种需 Ca^{2+} 的蛋白酶也存在于大肠杆菌和嗜碱杆菌中^[6,10]。根据酶反应的最适温度 ($50\sim 55^\circ\text{C}$)、 Ca^{2+} 对酶的热稳定性作用、酶反应要求较宽的碱性 pH 值以及在碱性 pH 条件培养时蛋白水解酶活性大大增加等特性看来,鱼腥藻 7120 的可溶性需 Ca^{2+} 碱性蛋白酶类似于嗜碱杆菌中需 Ca^{2+} 的碱性蛋白酶。从抑制剂的作用结果看,可能既有丝氨酸蛋白酶,又有金属蛋白酶,据报道可溶性蛋白酶被二异丙基氟磷酸 (DPF) 所抑制^[12]。在我们的实验中,虽然丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 对它也有一定的抑制作用,但金属蛋白酶抑制剂中,邻菲啰啉几乎完全抑制它的活性,而 EDTA 则没有抑制。已有类似报道指出,一株海洋假单孢菌的结晶蛋白酶既被 DPF 抑制,又被 EDTA 抑制,而不被邻菲啰啉抑制^[7]。

氮饥饿 24 小时,异形胞分化过程中,细胞总蛋白酶活性增加,但 48 小时以后,酶活性下降。在酶活增加时,被 PMSF 抑制的程度增加,野生种和突变种的酶活消长有共同趋势,即在异形胞分化时,诱导产生对 PMSF 敏感的蛋白酶,以加速细胞蛋白的周转,特别是在异形胞中。

参 考 文 献

- [1] 王业勤、何家苑、戴玲芬、黎尚豪, 1981. 鱼腥藻 (*Anabaena*) 对氧敏感的固氮突变种. 植物学报, **23**(4): 288—296.
- [2] 王业勤、杨林、冯渤, 1987. 异形胞分化的调节及细胞蛋白的变化. 水生生物学报, **11**(1) 41—50.
- [3] Ashby, C. D. and D. A. Walsh, 1974. Purification and characterization of an inhibitor protein of cyclic AMP-dependent protein kinases. *Method in enzymology*, **38**: 351.
- [4] Foulds, I. J. and N. G. Carr, 1977. A proteolytic enzyme degrading phycocyanin in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *FEMS Microbiol. lett.*, **2**: 117—121.
- [5] Holzer, H. and P. C. Heinrich, 1980. Control of proteolysis. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 63—91.
- [6] Horikoshi, K. and T. Akiba, 1982. Alkalophilic microorganisms. pp. 93—101, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- [7] Kato, N., Nagasawa, F., Adachi, S., Tani, Y. and K. Ogata, 1972. Purification and properties of proteases from a marine psychrophilic bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, **36**: 1185—1192.
- [8] Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. and N. E. Tolbert, 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein sample. *Analytical Biochemistry*, **87**: 206—210.
- [9] Ownby, J. D., Shannahan, M. and E. Hood, 1979. Protein synthesis and degradation in *Anabaena* during nitrogen starvation. *J. Gen. Microbiol.*, **110**: 255—261.
- [10] Walsh, K. A. and P. E. Wilcox, 1970. Serine proteases. *Methods in enzymology*, **19**: 31—41.

- [11] Waxman, L. and E. G. Krebs, 1978. Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *J. B. C.*, **253**(17): 5888—5891.
- [12] Wood, N. B. and R. Haselkorn, 1980. Control of phycobiliprotein proteolysis and heterocyst differentiation in *Anabaena*. *J. Bacteriol.*, **141**: 1375—1385.

PROTEASES AND SOME OF THEIR CHARACTERISTICS IN NITROGEN FIXATION *ANABAENA* 7120

Yang Lin, Feng Bo and Wang Yeqin

(*Institute of hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

Abstract

Subcellular fractions of the blue-green alga were prepared through the treatment with lysozyme and sonication, followed by differential centrifugation and detergent solubilization. The proteolytic activities of the subcellular fractions were determined at 280 nm based on the reaction of α -casein. The results show that there are proteolytic activities in the soluble fraction, outer membrane, intracytoplasmic membrane, and periplasmic space. The activity of the soluble protease of heterocyst was 4—5 times higher than that of the vegetative cell.

The properties of the soluble protease of vegetative cell grown in combined nitrogen-free medium were also investigated. The enzyme has an optimum reactive temperature around 50—55°C, and its activity decreased rapidly at 65°C. With the presence of calcium ion, the enzyme is stable at 60°C. Preincubation of the soluble protease at 60°C for 10 min. without calcium ion resulted in a loss of more than 80% of the original activity. The activity of the enzyme was also found to be optimal at pH 8 to 10. Moreover the levels of the proteolytic activities of the vegetative cells were markedly affected by the pH of the culture medium upon nitrogen starvation. Alkaline condition greatly enhanced the activities.

Activities of proteases were found to be inhibited completely by 1 m mol/l α -phenanthroline but slightly by 1 m mol/l EDTA. Inhibition caused by PMSF was also observed but it varied with the duration of nitrogen starvation of the cells that produced the enzyme.

Key words *Anabaena*, protease, inhibition, calcium ion