

红曲霉葡萄糖淀粉酶的肽图谱

李 钦 王永祥 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

我们实验室曾经对红曲霉的葡萄糖淀粉酶进行了提纯、结晶及性质的研究^[1-3], 并将该酶的两个主要分子形 E_3 和 E_4 进行了比较^[4], 它们的性质非常相似, 仅等电点相差 0.1pH 单位。为了进一步查明它们之间的差别, 进行了肽图谱的比较, 分别用胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶酶解之后, 进行滤纸高压电泳和层析双向肽图谱分析。 E_3 和 E_4 的肽图谱大多数斑点是一致的, 少数斑点不

同。下面简要报道此结果。

所用酶制剂为无锡酶制剂厂生产的红曲糖化酶, 菌种为锈色红曲霉 *Monascus rubiginosus* Sato AS3.3491, 活力为 20,000u/ml。结晶胰蛋白酶为 BDH 产品, 结晶胰凝乳蛋白酶为上海东风生化试剂厂产品, TPCK* 为 E. Merck 厂产品。

胰蛋白酶先用 TPCK 处理^[5], 以抑制其中可能有的胰凝乳蛋白酶活力, 葡萄糖淀粉酶经垂



图1 用胰蛋白酶水解的 E_3 (A) 和 E_4 (B) 的肽图谱

Fig. 1 Peptide map of trypsin digested glucoamylase E_3 (A) and E_4 (B).

I. 电泳缓冲液 pH1.9, 甲酸:冰乙酸:水=3:2:15 (V/V), 40V/cm, 40min. II. 层析溶剂为异戊醇:吡啶:水=35:35:30 (V/V), 25°C, 上行法展开 20h. I. Electrophoresis; pH 1.9, formic acid: glacial acetic acid: H_2O = 3:2:15(V/V), 40V/cm, 40min. II. Chromatography; isoamyl alcohol: pyridine: H_2O = 35:35:30(V/V), 25°C, 20h.

本文于 1983 年 6 月 4 日收到。

* TPCK = L-(1-Tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl Ketone.

直板型凝胶制备电泳得到纯化的 E_3 和 E_4 样品^[1], 含蛋白质 2—5mg/ml。先将酶样品用 0.1N NH_4OH 调 pH 到 9.0, 在沸水浴中加热 2min, 加入胰蛋白酶相当样品量的 $\frac{1}{50}$, 在 37℃ 水浴中保温 24h, 然后在沸水浴中加热 5min 停止反应。离心, 取上清液作肽图谱, 滤纸为新华 3 号, 高压电泳用 Shandon 高压电泳仪进行。上行层析后用 1% 茚三酮的丙酮溶液显色, 所得图谱见图 1。 E_3 有 19 个斑点, E_4 有 20 个斑点, 其中有 16 个是重合的, E_3 中有 3 个, E_4 中有 4 个斑点不

重合(即有小黑点的斑点)。

胰凝乳蛋白酶水解是在 pH7.8, 0.02M 的磷酸缓冲液中进行的, 其它条件同前。为了得到较清晰的图谱, 预先将酶水解液对蒸馏水透析 24h, 除去盐类和小分子物质, 这样在完全相同的条件下将 E_3 和 E_4 进行比较是可以的, 所得图谱见图 2, 因为经过透析斑点较少, E_3 中有一个斑点, E_4 中有两个斑点不重合(即有小黑点的斑点)。

红曲葡萄糖淀粉酶 E_3 和 E_4 的氨基酸分析表明其组成非常接近^[4]。肽图谱也大部分相同, 但仍存在一定的差异。

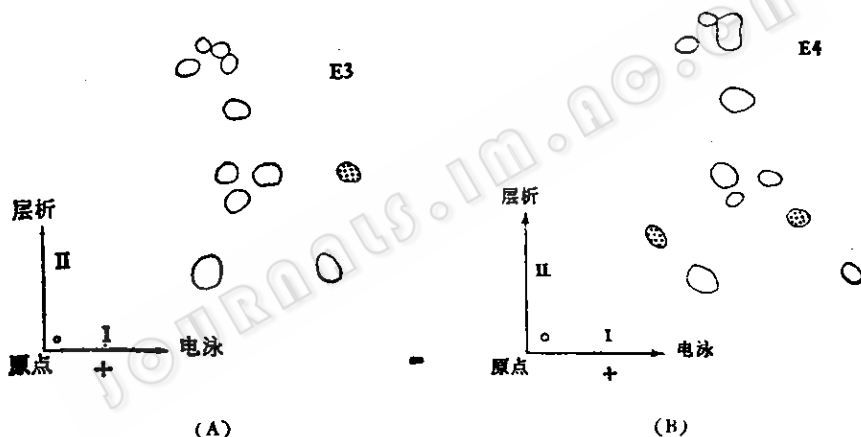


图 2 用胰凝乳蛋白酶水解的 E_3 (A) 和 E_4 (B) 的肽图谱

Fig. 2 Peptide map of Chymotrypsin digested glucoamylase E_3 (A) and E_4 (B).

1. 电泳缓冲液 pH1.9, 甲酸:冰乙酸:水=3:2:15 (V/V), 40V/cm, 40 分钟。II. 层析溶剂为异戊醇:吡啶:水=35:35:30 (V/V), 25℃, 上行法展开 20 小时。I Electrophoresis; pH1.9, formic acid: glacial acetic acid: H_2O = 3:2:15 (V/V), 40V/cm, 40 min. II. Chromatography: isomyl alcohol: pyridine: H_2O = 35:35:30(V/V), 25℃, 20hrs.

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 微生物学报, 16: 200—205, 1976。
- [2] 同上作者: 生物化学与生物物理进展, 1976 年

第 4 期, 第 36—39 页。

- [3] 同上作者: 微生物学报, 17: 101—107, 1977。
- [4] 同上作者: 微生物学报, 20: 263—270, 1980。
- [5] Carpenter, F. H. in "Methods in Enzymology", Vol. XI, Ed by C. H. W. Hirs, Academic Press, 1967, p237.