

白色念珠菌分泌型天冬氨酸蛋白酶的纯化与性质

王丹敏¹ 刘丽英¹ 叶路¹ 高磊²

(武警医学院微生物教研室 天津 300071)¹ (南开大学生命科学院 天津 300071)²

摘要: 利用硫酸铵分级沉淀和 DEAE-Sephacel 离子交换层析从白色念珠菌 WD27 培养液中提纯得到一种蛋白酶, 纯化倍数为 25.4, 收率为 5.2%。其活性可被抑胃肽特异抑制, 初步鉴定该酶为天冬氨酸蛋白酶。该酶在酸性范围内有水解蛋白活性, 最适作用 pH 为 4.0, 最适温度为 37℃。酶在 pH5.0~6.0、45℃以下较稳定, 该酶具有较广的底物作用范围, 对牛血红蛋白最敏感。酶作用于牛血红蛋白的米氏常数 K_m 为 0.814mmol/L。

关键词: 白色念珠菌, 纯化, 性质

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0027-04

收稿日期: 2001-01-28, 修回日期: 2001-03-25

PURIFICATION AND PROPERTIES OF SECRETORY ASPARTIC PROTEINASE FROM *CANDIDA ALBICANS*

WANG Dan-Min¹ LIU Li-Yin¹ YE Lu¹ GAO Lei²

(*Department of Microbiology, CPAPF, Tianjin 300162*)¹

(*College of Life Science, University of Nan Kai, Tianjin 300071*)²

Abstract: An extracellular proteinase from *Candida albicans* WD27 was purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation and DEAE-Sephacel ion-exchange chromatography with 25.4 fold and 5.2% yield. This enzyme appeared to be aspartic proteinase since the enzyme activity could be inhibited by pepstatin which was specific inhibitor of this class of proteinase. The enzyme had an acidic proteolytic activity profile with the optimum pH of 4.0. The optimum temperature of the enzyme activity was 37 °C. The proteinase had a broad substrate specificity with the highest susceptibility to bovine hemoglobin. The K_m for bovine hemoglobin was determined to be 0.814mmol/L.

Key words: Secretory aspartic proteinase, Purification, Property

天冬氨酸蛋白酶属于羧基蛋白酶 (EC3.4.23.6), 其活性一般在酸性范围, 且可被抑胃肽 (pepstatin) 特异抑制。近十年来有关白念菌分泌型天冬氨酸蛋白酶 (SAP) 的研究日益受到重视。大量间接研究表明, SAP 在浅部和深部念珠菌病形成过程中起着非同小可的作用^[1-3], 为白念菌重要的毒力因子, 但 SAP 确切的致病机理目前尚不清楚。阐明该酶性质将在一定程度上有助于了解该酶在白念菌致病过程中的具体作用, 目前国内对该酶性质的研究尚未见报道。我们从白念菌高毒株培养液中分离纯化了天冬氨酸蛋白酶, 并对其性质作了一些研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

白色念珠菌 WD27, 为本实验室保藏菌种。

1.2 试剂

DEAE-Sephacel 为 Pharmacia 公司产品, 酵母碳基 (YCB) 为 Difco 实验室产品, 牛血清白蛋白 (BSA)、角蛋白、变性胶原蛋白、组蛋白、抑胃肽、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、二异丙基磷酸氟 (DFP) 均为 Sigma 公司产品, 其它试剂为国产分析纯试剂。

1.3 粗酶液制备

将经活化的菌株接种于 BSA-酵母碳基培养基 (BSA 0.3%, YCB1.6%, pH6.0), 于摇床 (180r/min) 37 °C 培养 48h 后, 取发酵液 5,000r/min 离心 15min, 取上清液用于酶的提纯。

1.4 酶的纯化

向粗酶液加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度为 30%, 放置 6h 后除去沉淀; 取上清液继续加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 60% 的饱和度, 离心收集沉淀, 溶于 pH6.4, 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液中, 用同一缓冲液透析过夜。将酶液加入预先平衡过的 DEAE-Sephacel 层析柱, 先用相同缓冲液洗脱 200mL, 再用含有 0~1mol/L NaCl 的同样缓冲液进行梯度洗脱, 收集酶活力最高的 39~44 号管洗脱液, 经对水透析后冻干于 4 °C 下保存酶粉。

1.5 蛋白质含量测定

采用 Lowry 法^[4]。

1.6 蛋白酶活性测定

参见文献 [5]。

2 结果

2.1 天冬氨酸蛋白酶的纯化

白念菌 WD27 菌株经 BSA-YCB 培养基发酵培养,可诱导产生胞外蛋白酶,用前述方法经 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀和离子交换层析(图 1)得到 3.2mg 纯化的蛋白酶,纯化倍数为 25.4 倍,得率为 5.2%。各步提纯结果见表 1。

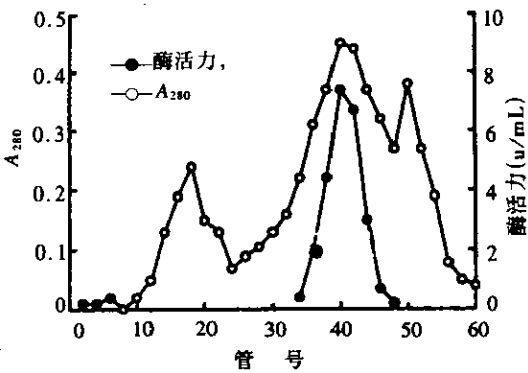


图 1 蛋白酶 DEAE-Sepharcel 层析图

表 1 白色念珠菌 WD27 天冬氨酸蛋白酶的纯化

步骤	总活力 (U)	总蛋白 (mg)	比活 (U/mg)	得率 (%)	纯化倍数
粗酶液	2140	1562	1.37	100	1
60% 硫酸铵沉淀	1305	256.9	5.08	61	3.7
DEAE-Sepharcel 层析	111.3	3.2	34.8	5.2	25.4

2.2 pH 对酶活力及稳定性的影响

结果表明酶在 pH3.0~5.0 下具有较高的蛋白水解活力,其最适反应 pH 为 4.0 (图 2)。不同 pH 的酶液于 30℃ 保温 2h 后,测定酶活力。结果表明该酶在 pH5.0~6.0 下最稳定,碱性下很容易失活。

2.3 温度对酶活力及稳定性的影响

于不同温度下测定酶活性,结果表明酶反应最适温度为 37℃。将酶液在不同温度下保温 30min,冷却后测残余活力。酶在 45℃ 以下时具有良好的热稳定性,60℃ 加热 30min 后酶活仅剩余 18.5%。

2.4 抑制剂对酶活力的影响

为鉴定分离到的蛋白酶的类别,在不同蛋白酶抑制因子存在下测定酶活性,结果见表 2。在所用试剂中,碘乙酸可使酶中巯基烷化,二异丙基磷酸氟 (DFP) 为丝氨酸蛋白酶特异抑制剂,苯甲基磺酰氟 (PMSF) 可特异抑制丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶活性,抑胃肽为天冬氨酸蛋白酶的 特异抑制剂。从实验结果可推知纯化产物属天冬氨酸蛋白酶类,且酶活性中心还含有巯基。

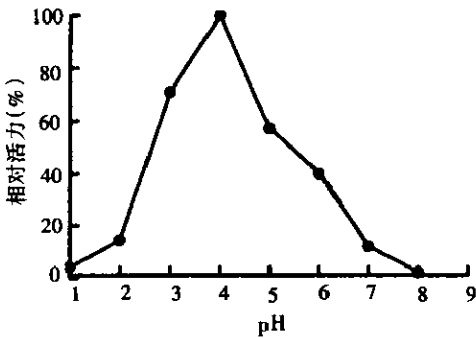


图 2 酶的最适反应 pH

2.5 酶的底物特异性

结果可知 (表 3),此酶与其它酸性蛋白酶一样有较广的底物作用范围,对多种机体组织蛋白有水解活力,牛血红蛋白为其最适底物,对白蛋白催化水解作用较弱。

表 2 抑制因子对酶活力的影响

试剂	浓度 (mmol/L)	相对活力 (%)
对照	—	100
EDTA	2.0	89
PMSF	2.0	91
DFP	2.0	82
巯基乙醇	2.0	126
碘乙酸	0.5	17
抑胃肽	0.01	53
抑胃肽	0.03	0

表 3 酶对不同底物的水解活力

底物	相对活力 (%)
牛血红蛋白	100
人血红蛋白	80
牛血清白蛋白	16
卵清白蛋白	12
酪蛋白	24
变性胶原蛋白	58
人皮肤角蛋白	61
毛发角蛋白	0
组蛋白	32

2.6 酶的动力学参数测定

以牛血红蛋白为底物, 配制 1 ~ 20mg/mL 范围内的一系列浓度, 按标准方法测酶活力, 用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 求得该酶的 K_m 为 0.814mmol/L, V_{max} 为 0.65umol·min⁻¹·mg⁻¹。

3 讨论

我们从白念菌 WD27 培养液中提纯得到的蛋白水解酶活性可被抑胃肽特异抑制, 因而初步鉴定该酶为天冬氨酸蛋白酶类, 虽然机体组织通常保持中性, 但白念菌由于生长时分解组织中碳源使其周围 pH 降低至弱酸性, 从而有利于 SAP 在局部发挥酶活性^[6]。白念菌很可能通过 SAP 降解角质层使其可侵入完整的皮肤, 且能以表皮角蛋白为生长所需的氮源从而可在皮肤中定居、增殖引起相应病变; 同时 SAP 对内皮下基质蛋白的消化作用有助于白念菌通过血道向深层扩散, 继而可能导致播散性念珠菌病发生。

参 考 文 献

- [1] Kwon-chung K J, Lehman D, Good C, *et al.* Infect Immun, 1985, 49: 571 ~ 575.
- [2] Louie A, Dixon D M, EL-maghrabi, E A, *et al.* J Med Vet Mycol, 1994, 32: 59 ~ 64.
- [3] Kretschmar M, Hube B, Bertsch T, *et al.* Infect Immun, 1996, 7: 6637 ~ 6642.
- [4] Lowry O H, Rosebrough H J, Farr A L, *et al.* J Biol Chem, 1951, 193: 265 ~ 275.
- [5] 王丹敏, 韩景田, 董小青, 等. 中国微生态学杂志, 2000, 12 (4): 215 ~ 216.
- [6] Banerjee A, Ganesan K, Datta A. Indian J of Biochem Biophys, 1991, 28: 444 ~ 448.