

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C12N 9/48

C12P 21/06 A23J 3/34



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97109542.6

[43]公开日 1997 年 12 月 3 日

[11] 公开号 CN 1166526A

[22]申请日 97.3.8

[30]优先权

[32]96.3.8 [33]JP[31]51848/96

[32]97.2.14 [33]JP[31]30458/97

[71]申请人 味之素株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 浅野皆夫 河合美佐子 三轮哲也
丹尾式希

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 37 页 附图页数 18 页

[54]发明名称 氨肽酶GX以及用它水解蛋白质的方法

[57]摘要

本发明的目的是提供有效分解在其序列中包含谷氨酸或天冬氨酸的低分子量肽的氨肽酶以及用所述氨肽酶水解肽或蛋白质的方法。

氨肽酶 GX 来自萌发的大豆子叶, 并且从含有谷氨酸或天冬氨酸的肽或蛋白质的 N 末端释放谷氨酸或天冬氨酸, 以及使用该氨肽酶水解肽或蛋白质的方法。

权 利 要 求 书

1、具有下述特性的氨肽酶:

- 1) 最适P H: 约5.5 至约9.5 ;
- 2) 最适温度: 约25 至约60 °C;
- 3) 温度稳定性: 置于50 °C下80 分钟后, 保持约80 %或更高活性, 或置于60 °C下40 分钟后保持约40 %或更高活性;
- 4) 分子量: 约400 至550 KD (凝胶过滤),
约380 至460 KD (常规PAGE), 和
约53 至60 KD, 约30 至32 KD, 以及
约25 至28 KD (还原和加热后的SDS -PAGE);
- 5) 底物特异性: 分解在N -末端含有谷氨酸或天冬氨酸的肽或蛋白质, 以便释放谷氨酸或天冬氨酸;
- 6) 抑制剂: 被Leuhistin、放线酰胺素、alphamenine A或1,10- 正菲咯啉抑制;和
- 7) 金属离子的作用: 被镁或铜抑制。

2、根据权利要求1 的氨肽酶, 其来源于萌发的大豆子叶。

3、一种水解肽或蛋白质的方法, 其包括使权利要求1 或2 的氨肽酶GX 与肽或蛋白质接触并反应。

4、一种水解肽或蛋白质的方法, 其包括使通过破碎含有权利要求1 或2 的氨肽酶GX 的萌发的大豆子叶而获得的细胞提取物与肽或蛋白质接触并反应。

5、根据权利要求3 或4 的方法, 其中来源于萌发的大豆子叶的半胱氨酸蛋白酶D3 或含它的粗酶溶液被结合起来使用。

6、根据权利要求5 的方法, 其中亮氨酸氨肽酶或含它的粗酶溶液进一步被结合起来使用。

说明书

氨肽酶G X 以及用它水解蛋白质的方法

本发明涉及一种新的氨肽酶以及用所述氨肽酶或含有所述氨肽酶的细胞提取物水解肽或蛋白质的方法。

氨肽酶是一种连续地从肽或蛋白质上释放N - 末端氨基酸的酶。

蛋白质，如大豆蛋白、小麦谷蛋白、酪蛋白等的分解，尤其是将大豆蛋白分解成氨基酸已通常使用用盐酸或硫酸的酸水解或来自微生物如曲霉的常规蛋白质酶来进行（日本专利L O P 公开号7 0 , 8 5 2 / 1 9 7 6 , 日本专利公开号3 2 , 3 4 4 / 1 9 8 0 , 日本专利公开号6 0 , 4 8 0 / 1 9 9 1 , 日本专利L O P 公开号2 3 9 , 9 6 6 / 1 9 8 7 , 日本专利L O P 公开号2392/1990和日本专利L O P 公开号1 1 2 , 4 6 1 / 1 9 9 1) 。

通过用酸水解大豆蛋白制备作为天然调味选择物的大豆蛋白水解产物需要在1 0 0 °C下反应1 至2 天，这样的高温和长时间的反应需要高的能量消耗。另一方面，蛋白质的酸水解容易，但存在问题，因为产生的氨基酸还将被分解（被破坏），由于中和作用将导致高盐含量。

这些问题的一个处理方法是在温和条件下通过常规蛋白酶分解蛋白质。然而，常规蛋白酶，一般的木瓜蛋白酶，枯草杆菌蛋白酶等为内肽酶，从而它们将蛋白质分解为肽，但难于将肽进一步分解为氨基酸。因此，具有强味觉的天冬氨酸和谷氨酸很难被释放，同时带来苦味，在此情况下，而使产生的水解产物不能被用作调味液体。

为了解决这个问题，混合使用肽链端解酶即一组将肽分解成氨基酸的酶，如氨肽酶、羧肽酶等被认为是有效的，例如，对于用曲霉分解大豆蛋白，通常为通过发酵制酱油，亮氨酸氨肽酶和酸性羧肽酶的重要性被认为是增加了游离氨基酸的含量 (Tadanobu Nakadai, Shouken, Vol.11, No.2(1985)) 。

在这篇文献中，而且还描述了在酱油中仍存在它们的序列中包含酸性氨基酸的二肽和三肽，并且这些肽很难用来自曲霉的肽酶分解。而且，这些二肽和三肽还包括大量的在N - 末端含有谷氨酸或天冬氨酸的肽。

本文采用的“难于分解的肽”指的是作为用于它们分解的催化剂的酶，即

肽酶，对于它们具有低的底物特异性。

这种不良的分解在其序列中含有酸性氨基酸的二肽和三肽的能力不仅对于发酵制造酱油中的来自曲霉的肽酶是一个问题，而且对于商业肽酶制剂，通常是来自曲霉的那些商业肽酶制剂也是一个问题。

因此在酱油等工业中，为了提高肽或蛋白质水解产物中的被释放的氨基酸的水平需要发现某些肽酶，该肽酶能有效分解在其序列中含有谷氨酸和天冬氨酸的低分子量的肽。

本发明人研究了大豆子叶作为解决上述问题的线索。由于当大豆萌发时，贮存在大豆中的蛋白质在极短时间内被完全分解成氨基酸的这一事实，本发明人期望已萌发的大豆含有某一种肽酶，该肽酶能容易地分解来自贮存蛋白质的甚至是几乎不可分解的肽。

尤其是，本发明人推测可能存在某种具有底物特异性和某些特性的肽酶，通过该肽酶可将包含具有例如连续的酸性氨基酸，如 -Glu-Glu-Glu-Glu-Glu- 的酸性氨基酸富集特色的作为主要贮存蛋白质的大豆球蛋白和 β - 伴大豆球蛋白完全分解成氨基酸。

作为在萌发的大豆中发现的蛋白水解酶，已报道下列种类：7 S 球蛋白蛋白酶 (K.A.Wilson等人，植物生理学82，71 (1986)，X.Qi 等人，植物生理学99，725 (1992))，11 S 球蛋白蛋白酶 (K.A.Wilson等人，植物生理学82，71 (1986)，K.A.Wilson等人，植物生理学88，355 (1988))，Bowman-Birk 类型的胰蛋白酶抑制剂蛋白酶 (M.A.Maddcn 等人，植物化学24，2811 (1985))，Ounitz 类型的胰蛋白酶抑制剂蛋白酶 (P.M.Hartl 等人，植物化学25，23 (1986)，K.A.Wilson 等人，植物生理学88，355 (1988))，丝氨酸蛋白酶 (M.Akhtaruzzaman 等人，生物科学生物技术生物化学56 (6) 878 (1992))，新的硫醇蛋白酶D3 (日本专利LOP 公开号264/1996，公开于1996，1，8，以及日本专利申请号353，931/1995))。

然而，这些酶为内肽酶，因此不适合于将含有酸性氨基酸的肽分解成氨基酸。

而且，已报道羧肽酶 (Sachio Kubota, Yakugaku

Zasshi 96(5), 639(1976))和氨肽酶(Shinji Watanabe 等人, Nippon Nogei Kagakkaishi 63(3), 617(1989))为肽链端解酶, 但这些不适合于将含酸性氨基酸的肽分解成氨基酸。

因此, 本发明的目的是提供一种氨肽酶, 该酶能有效地分解大豆水解产物等中存在的其序列中含有谷氨酸和天冬氨酸的低分子量的肽, 以及使用所述氨肽酶分解肽或蛋白质的方法。

作为他们急欲解决上述问题的研究的结果, 本发明人发现可用于分解含有酸性氨基酸的肽的酶存在于萌发的大豆子叶的提取物中, 从而完成了本发明。

本发明提供了氨肽酶GX, 该酶具有容易地将在N-末端具有酸性氨基酸, 例如L- α -谷氨酰谷氨酸(Glu-Glu)等的肽或蛋白质分解的能力。

本发明的氨肽酶具有下列特性:

- 1) 最适pH: 约5.5 - 约9.5;
- 2) 最适温度: 约25 - 约60 °C;
- 3) 温度稳定性: 置于50 °C下80分钟后保持约80%或更高活性, 或置于60 °C下40分钟后保持约40%或更高活性;
- 4) 分子量: 约400 - 550 KD (凝胶过滤), 约380 - 460 KD (常规PAGE), 和约53 - 60 KD, 约30 - 32 KD以及约25 - 28 KD (还原和加热后的SDS-PAGE)。
- 5) 底物特异性: 分解在N-末端含有谷氨酸或天冬氨酸的肽或蛋白质, 以便释放谷氨酸或天冬氨酸;
- 6) 抑制剂: 被Leuhistin, 放线酰胺素, alpha-menine A或1,10-正菲咯啉抑制; 和
- 7) 金属离子的作用: 被镁或铜抑制。

本发明氨肽酶的典型实例来源于萌发的大豆子叶。

此外, 本发明提供了一种水解肽或蛋白质的方法, 该方法包括使所述氨肽酶GX与肽或蛋白质接触并反应, 以及一种水解肽或蛋白质的方法, 该方法包括让通过使含有所述氨肽酶GX的萌发的大豆子叶破碎而得到的细胞提取物与肽或蛋白质接触并反应。

进一步, 本发明提供了一种水解肽或蛋白质的方法, 该方法包括让所述氨肽酶GX和蛋白酶D3的混合物(日本专利LOP公开号No.264/1996和

日本专利申请号3 5 3 , 9 3 1 /1 9 9 5) 与肽或蛋白质接触并反应。

更进一步, 本发明提供一种水解肽或蛋白质的方法, 该方法包括让氨肽酶 G X, 蛋白酶D 3 和亮氨酸氨肽酶的混合物与肽或蛋白质接触并反应。

所述蛋白酶D 3 为一种从萌发的大豆子叶的提取物中纯化的酶, 它的特性和纯化方法详细描述在日本专利L O P 公开号N o . 2 6 4 /1 9 9 6 中。重组蛋白酶D 3 也在大肠杆菌中制备 (日本专利申请号3 5 3 , 9 3 1 /1 9 9 5) , 它详述于实施例1 1 中。

采用的蛋白酶D 3 优选为高纯度制剂的形式, 但也可从萌发的大豆子叶制备而来的粗酶。

采用的亮氨酸氨肽酶可为可商业购得的酶 (例如购自s i g m a 的1503号), 但优选为一组从萌发大豆提取物获得的粗d a i z d u (大豆) 亮氨酸氨肽酶。作为d a i z d u (大豆) 亮氨酸氨肽酶 (D L A P) , 在萌发的大豆的提取物中存在两类氨肽酶, 即D L A P 1 和D L A P 2 。所述D L A P 1 和D L A P 2 在性质上与已报道的来自大豆的氨肽酶 (shinji Watanabe 等人, Nippon Noge i Kagakkaishi 63(3), 617 (1989)) 非常相似, 但没有它们相同的可靠的证据。DLAP1和DLAP2的制备将在实施例14中描述。

D L A P 1 为具有下列性质的氨肽酶:

- 1) 最适p H: 约5 .5 - 约9 .5 ;
- 2) 最适温度: 约2 5 - 约6 0 °C;
- 3) 温度稳定性: 在置于5 0 °C下6 0 分钟后保持约9 0 % 或更高的活性, 或置于6 0 °C下1 0 分钟后保持约2 5 % 或更高的活性。
- 4) 分子量: 约6 0 - 7 0 K D (常规P A G E , 活性染色);
- 5) 底物特异性: 在N - 末端分解含有亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸、蛋氨酸等的肽或蛋白质, 以便释放相应的氨基酸; 和
- 6) 抑制剂: 被抗氨肽霉素A 或放线酰胺素抑制。

D L A P 2 为具有下列特性的氨肽酶:

- 1) 最适p H: 约5 .0 - 约9 .0 ;
- 2) 最适温度: 约3 0 - 约7 0 °C;
- 3) 分子量: 约4 5 - 5 5 K D (常规P A G E , 活性染色);
- 5) 底物特异性: 在N - 末端分解含有苯丙氨酸等的肽或蛋白质, 以便释

放苯丙氨酸等；和

6) 抑制剂：被放线酰胺素或甲苯磺酰氟抑制。

下文将详细描述本发明。

优选使用作为用于制备本发明新的氨肽酶的物质的萌发的大豆的种类是不受限制的。即，种植地区和大豆的种类是不受限制的；即可为购得的大豆，或可为用作榨油原料的大豆都是不受限制的。对于它们的萌发方法和种植条件没有限制，无论在它们萌发之后是否存在芽和萌发时间是否足够长均可使用它们，但优选作为原料的萌发大豆是使播种的种子吸收水份后生长7天的那些萌发的大豆。

为了制备本发明的新的氨肽酶GX，大豆，优选上面描述的那些大豆被用作从其中提取酶的来源。优选地，将子叶从大豆中切下，并用作从其中提取酶的来源。对于本发明新的氨肽酶的工业应用来说，可以如此使用大豆的提取物，也可使用它的粗或纯制剂。

本发明的新的氨肽酶的纯化将在实施例3中详细描述。通过破碎萌发大豆的子叶获得的细胞提取物的制备也将下面的实施例中详细描述。

本发明新的氨肽酶GX将对在通常的蛋白质，例如酪蛋白、牛血清清蛋白、球蛋白、大豆蛋白或来自前述常规蛋白质的肽中，在N-末端具有谷氨酸或天冬氨酸的蛋白质或寡肽起作用，从而释放所述谷氨酸或天冬氨酸。而且，新的氨肽酶GX将对通常几乎不被用肽链端解酶（已知的氨肽酶，羧肽酶），分解的肽起作用，例如在N-末端具有酸性氨基酸的二肽，在N-末端具有酸性氨基酸的具生物活性的肽，以及 α -多谷氨酸，从而释放它们N-末端的酸性氨基酸（见下面的实施例7、8、9和10）。

本发明的新的氨肽酶GX的最适pH在约5.5-9.5的范围内，严格地为约pH7-约9（见图1）。因此，肽或蛋白质在这个pH范围内将被水解。

新的氨肽酶GX的最适温度在约25-60℃范围内，严格地为约35-55℃（见图2）。因此，在这个温度范围内，肽或蛋白质将被水解。

新的氨肽酶GX的温度稳定性甚至在50℃下保温80分钟后仍保持最初活性的约80%或更高，或在60℃下保温40分钟后仍保持最初活性的40%或更高。因此，肽或蛋白质的水解反应可望在50℃或更低时进行以较长时间地防止酶失活（见图3）。

测定了抑制剂对本发明新的氨肽酶的作用。结果表明该酶被氨肽酶抑制剂, 如 Leuhistine, 放线酰胺素等强烈地抑制, 被 alphamenine A, 1,10-正菲咯啉(即金属螯合物)、氯化镁、氯化铜等轻微地抑制(见表1)。从这个结果可以看出, 本发明新的氨肽酶GX 是一种在其活性表达中涉及金属的氨肽酶。

本发明新的氨肽酶估测的分子量在样品未被还原或加热时在SDS-PAGE 中测定的为约390-400KD (见图4)。另一方面, 当样品被还原和加热时, 在SDS-PAGE 中, 该酶被分别分离成分子量为约53-60KD, 约30-32KD, 和25-28KD 的亚单位(见图5)。

通过凝胶过滤柱对纯化的酶的分子量的分析表明, 活性峰存在于分子量为约400-550KD 中(见图6)。而且, 通过常规PAGE 测定的分子量在约380-460KD 范围内(见图7)。

为了获得具有高酸性氨基酸含量的(a) 氨基酸和肽的混合物或(b) 蛋白质水解产物, 在用各种蛋白酶处理之后, 可让本发明新的氨肽酶GX 本身, 或破碎萌发的大豆子叶获得的细胞提取物对肽或蛋白水解产物起作用。例如, 在37℃下, 在存在2mM 叠氮化钠时, 在50mM 磷酸钠缓冲液中(pH8.0) 用萌发的大豆的提取物来分解L- α -谷氨酰谷氨酸(Glu-Glu) 将导致从底物Glu-Glu 中大量释放谷氨酸。

为了获得具有高含量的从大豆蛋白质中释放的酸性氨基酸的氨基酸混合物, 不仅可使用本发明新的氨肽酶GX 本身, 而且可以使用通过破碎萌发的大豆子叶而获得的细胞提取物来分解肽混合物, 即用来自萌发大豆的酶类半胱氨酸蛋白酶D₃ 处理的蛋白质水解产物。

另一方面, 用来自萌发大豆的酶类半胱氨酸蛋白酶D₃ 处理的肽混合物可用亮氨酸氨肽酶与本发明氨肽酶GX 结合来水解以提供具有高产率氨基酸的水解产物。例如, 如果用半胱氨酸蛋白酶D₃ 处理的蛋白质水解产物在42℃下, 在用氢氧化钠调节至pH8.0 的溶液中, 用新的氨肽酶GX 与DLAP1 和DLAP2 (来自萌发大豆的亮氨酸氨肽酶) 的结合来进行水解, 其中每毫克底物的GX 量为0.4-4U, DLAP1 为10-130U, DLAP2 为10-65U, 那么该肽将被大量分解而释放各种氨基酸(见下面的实施例)。

下面将参照实施例来举例说明本发明。

实施例1: 肽酶活性的检测

采用的底物为二肽Glu - Glu，即由谷氨酸组成，测定通过酶的作用而释放的谷氨酸。用茚三酮或可购得的Yama s a谷氨酸分析仪器，使用常规氨基酸分析法定量测定谷氨酸。使用下面条件和方法，除非另有说明。

将0.05 ml 酶液，0.02 ml 50 mM L - α - 谷氨酰谷氨酸，0.02 ml 100 mM N - 2 - 羟乙基哌嗪 - N' - 2 - 乙磺酸(HEPES)缓冲液(PH7.2)和0.11 ml 水混合，并在37 °C下反应20分钟。通过加入0.05 ml 50 %乙酸水溶液使反应停止，定量测定在反应溶液中被释放的谷氨酸。每分钟致使2 μ m谷氨酸从L - α - 谷氨酰谷氨酸中释放的酶的活性被认为是1个单位。

实施例2：L - α - 谷氨酰谷氨酸 (Glu - Glu) 分解肽酶的研究

用上面的检测方法来研究萌发的大豆子叶的提取物中的分解活性。首先，萌发后7天的子叶的提取物被用于Glu - Glu分解活性的测定。

向4 g (8个子叶)萌发后7天的子叶中加入5倍过量体积(20 ml)的冰冷缓冲液(20 mM磷酸钾缓冲液PH7.0, 200 mM NaCl, 10 mM 2 - 巯基乙醇, 2 mM NaN₃)，并将子叶用匀浆器破碎，对其进行提取，并用网过滤。于4 °C将滤液在32,000 g下离心30分钟。用滤纸过滤上清液，得到粗提取物。在该粗提取物中，存在酶活性。

实施例3：L - α - 谷氨酸谷氨酸 (Glu - Glu) 分解肽酶的纯化

由于L - α - 谷氨酰谷氨酸 (Glu - Glu) 分解活性存在于来自萌发后7天的子叶的提取物中，具有这种活性的酶称为GX。用下面的方法进行GX的纯化。

1、提取

向600 g播种后7天的子叶中加入5倍过量体积(3000 ml)的冰冷的缓冲液(20 mM磷酸钠缓冲液, PH7.0, 200 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc SC (4 - (2 - 氨基乙基) - 苯磺酰氯HCl), 10 μ M E - 64, 10 mM 2 - 巯基乙醇, 2mM NaN₃)，将子叶用匀浆器破碎，对其进行提取，并用网过滤。于4 °C将滤液在32,000g下离心30分钟。将上清液用滤纸过滤(购自Advantech Toyo K.K.第514A号)。用薄膜浓缩装置浓缩作为滤液而获得的粗提取物(Minitan, 购自Millipore)。

2、硫酸铵的分馏

确定由此制备的粗提取物的PH (用NaOH调至PH7.0), 通过加入硫酸铵, 将该溶液制成含有硫酸铵40%的饱和溶液(763g/3150ml)。4℃下该溶液搅拌6小时, 并于4℃在32,000g下离心30分钟得到上清液。通过进一步加入硫酸铵将该溶液制成含有硫酸铵65%的饱和溶液(564g/3,400ml)。其于4℃下搅拌过夜(15小时), 接着于4℃在32,000g下离心30分钟以回收沉淀物。该沉淀物溶于120ml缓冲液(50mM磷酸钾缓冲液, pH7.0, 100mM NaCl, 2mMNa₃)中, 7℃下对缓冲液(2L×5, 16小时)重复透析。透析后, 于4℃将透析液在32,000g下离心20分钟, 接着通过0.2μm滤器(Nalgene滤器)过滤以用于后续步骤中的阴离子交换层析。

3、阴离子交换层析

将上面2中获得的样品在FPLC系统中(Pharmacia)通过HiLoad 26/10 Q琼脂糖HP进行分馏, 其方法如下。由于体积大, 将约190ml样品分成8个等分试样, 每个等分试样进行离子交换层析。已预先将柱用前面透析中使用的相同缓冲液平衡, 使用该样品之后, 将栓用5倍柱体积的缓冲液洗涤。洗涤之后, 被吸附的活性馏分用8倍柱体积具有100mM至250mM NaCl的增加的线性梯度的缓冲液洗脱。收集活性馏分(2000ml)并在超滤装置(Minitan, 由Millipore制造)中浓缩至90ml。通过加入11.88g硫酸铵将样品调至硫酸铵浓度为1M。于4℃在32,000g下将溶液离心10分钟, 以得到将用于后续步骤中的疏水层析的上清液。

4、疏水层析

将上面3中获得的样品在FPLC系统中通过HiLoad 26/10苯基琼脂糖HP进行分馏, 其方法如下。将样品分成2个等分试样, 每个等分试样上柱。已预先将柱用缓冲液(50mM磷酸钾缓冲液, pH7.0, 1M(NH₄)₂SO₄, 2mM Na₃)平衡, 在加入样品后, 该柱用5倍柱体积的缓冲液洗涤。接着, 用具有1M至0M硫酸铵的减小的线性梯度的缓冲液将被吸附的活性成分进行分馏。用超滤装置(Minitan (Millipore)和Centriprep 10 (Amicon))将180ml活性馏分浓缩至9.8ml。于4℃将冷凝物在32,000g下离心10分钟, 以得到用于后续步骤中的凝胶过滤的上清液。

5、凝胶过滤层析

将上面4 获得的样品在F P L C 系统中通过Hi l o a d 2 6 / 6 0 S u p e r d e x 2 0 0 p g 的凝胶过滤进行分馏, 其方法如下。将样品分成2 个等分试样, 每个等分试样进行层析。已预先将柱用缓冲液 (5 0 m M 磷酸钾缓冲液, P H 7 . 0 , 1 0 0 m M N a C l , 2 m M N a N ₃) 平衡, 将样品过柱进行分馏。浓缩活性馏分得到纯化的酶。当不被还原也没有热处理时, 在S D S - P A G E 中测得纯化的酶的分子量为3 9 0 - 4 0 0 K D (见图4)。当进行还原和热处理时, 在S D S - P A G E 中, 该酶被分别分离成分子量为约5 3 - 6 0 K D, 约3 0 - 3 2 K D 和约2 5 - 2 8 K D 的亚单位 (见图5)。当进一步通过凝胶过滤柱S u p e r o s e b (Pharmacia) 的凝胶过滤分析纯化的酶的分子量时, 在分子量为约400-550KD处出现活性峰 (见图6)。

测定通过一系列纯化步骤导致的比活的增加。用于分解G l u - G l u 的上面粗G X 酶溶液的比活为约7 . 6 m U / m g , 而纯化的酶G X 的比活为约6 6 U / m g 。这个结果表明在一系列的纯化步骤中, 氨基酸酶在比活方面被纯化高达约8 7 0 0 倍。

常规P A G E 中酶活性染色表明活性酶的分子量为约3 8 0 - 4 6 0 K D。本文将描述活性染色方法。

实施例4、常规P A G E 中的肽活性染色

将2 0 , 6 0 , 1 2 0 m U 酶配制在D a v i s 样品制备的缓冲液 (0 . 0 6 2 5 M T r i s - H c l 缓冲液, P H 6 . 8 , 1 5 % 甘油, 0 . 0 0 1 % 溴酚兰) 中, 5 ° C 下, 在商品凝胶 (M u l t i g e l 2 / 1 5 , D a i - I c h i K a g a k u Y a k u h i n K . K .) 中, 通过使用电泳缓冲液 (3 g T r i s , 1 4 . 4 g / l 甘氨酸) 将其进行电泳。将电泳后的凝胶与溶液A (8 0 0 μ l / M H E P E S , P H 7 . 0 , 3 0 0 μ l L - 氨基酸氧化酶 (1 m g / m l) , 1 2 . 5 U 过氧化物酶, 4 μ l 3 - 氨基 - 4 - 乙基吡唑 (20 m M) , 5 3 0 μ l 4 - 氨基安替比林, 5 8 4 0 μ l G l u - P h e (20 m M) 和溶液B (8 m l 2 % 琼脂糖水溶液 (5 5 ° C)) 混合, 3 7 ° C 下在恒温箱中保温2 小时。L - 氨基酸氧化酶和过氧化物酶从B o e h r i n g e r M a n n h e i m 购得, 3 - 氨基 - 4 - 乙基吡唑从D o j i n K a g a k u K . K . 购得, 所有其他的试剂从N a k a r a i T e s q u e K . K . 购得。结果表明被发现活性酶分子量为约3 8 0 - 4 6 0 K D (见图7)。

下面将描述由此获得的纯化GX的酶特性。

实施例5、氨肽酶GX的最适PH和最适温度的测定。

用下面的方法测定由于反应PH（最适PH）的变化而引起的酶活性的变化。

采用的酶反应缓冲液为乙酸钠缓冲液（PH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0），磷酸钠缓冲液（PH 6.0, 7.0），Tris-HCl缓冲液（PH 7.0, 7.8, 8.3, 8.8）和碳酸钠缓冲液（PH 9.0, 9.5, 10.0）。

在每一种PH下，将180 μ l 3.5 mU GX配制在50 mM缓冲液中，并在30 $^{\circ}$ C下预保温5分钟。将20 μ l底物Glu-Glu（对于反应为5 mM）加入到各样品中。搅拌并保温20分钟。加入20 μ l 1 M乙酸钠缓冲液（PH 4.0）以终止反应。

测得的结果示于图1中。从图1可以看出，本发明氨肽酶GX的最适PH在约5.5 - 9.5的范围内，严格地为约7 - 约9（见图1）。

由于反应温度（最适温度）而引起的酶活性变化的测定按如下方法进行：

将20 μ l底物Glu-Glu（对于反应为5 mM）加入到50 mM乙酸钠缓冲液（PH 6.0）中，在各种温度（25, 30, 37, 42, 50, 60, 70 $^{\circ}$ C）下，将180 μ l由此获得的反应溶液预保温5分钟。再向其中加入7 mU氨肽酶GX。将该样品搅拌并保温20分钟。加入20 μ l 1 M乙酸钠缓冲液（PH 4.0）以终止反应。

测定结果示于图2中。从图2中可以看出，本发明氨肽酶GX的最适温度在约25 - 60 $^{\circ}$ C范围内，严格地约35 - 55 $^{\circ}$ C（见图2）。

温度稳定性的测定按如下方法进行：

在预定温度（25, 30, 37, 42, 50, 60, 70 $^{\circ}$ C）下，将3.5 U/ml酶在缓冲液（PH 6.0）中保温预定时间（10, 20, 30, 40, 80分钟），接着测定在30 $^{\circ}$ C下它的剩余活性。

测定结果示于图3中，在50 $^{\circ}$ C甚至在保温80分钟后本发明的酶仍保持约80%或更高的活性，或在60 $^{\circ}$ C保温40分钟后还保持40%或更高的活性。因此，进行较长时间反应的反应温度优选为50 $^{\circ}$ C或更低。

实施例6、蛋白质抑制剂对GX的作用

测定了抑制剂和金属对本发明新的氨肽酶G X的作用。采用的抑制剂为放线酰胺素、抑氨肽霉素A、antipain、alphamenine A、diprotinA、Leuhistin、苯基甲磺酰氟(PMSF)、反-环氧琥珀酰-L-亮氨酸酰胺(4-胍基)-丁烷(E-64)、碘乙酰胺和1,10-正菲咯啉,采用的金属为氯化锌、氯化锰、氯化镁和氯化铜。1,10-正菲咯啉、氯化锌、氯化锰、氯化镁和氯化铜购自Nakarai Tesque K.K,并且所有其它的抑制剂购自Peptide Institute, Inc。

在各种抑制剂存在下,将酶于室温(25℃)下放置20分钟,用如实施例1的相同方法测定酶的剩余活性。

在各种抑制剂存在下的酶活性的测定结果示于表1中。本发明的氨肽酶G X被氨肽酶抑制剂,例如leuhistin和放线酰胺素强烈地抑制,被alphamenine A, 1,10-正菲咯啉(即金属螯合物)、氯化镁和氯化铜轻微地抑制。

从上面可以看出,本发明的氨肽酶G X是一种在其活性表达中涉及金属的氨肽酶。

表1

各种蛋白酶抑制剂对GX的作用

抑制剂	浓度	剩余活性 (相对值%)
—	—	100
放线酰胺素	100 μ M	12
抗氨肽霉素A	100 μ M	100
antipain	100 μ M	100
alphamenineA	100 μ M	63
diprotin A	100 μ M	100
E-64	10 μ M	100
leuhistin	100 μ M	0
PMSF	10 μ M	100
碘乙酰胺	50mM	100
正菲咯啉	10 μ M	47
氯化锌	2mM	76
氯化锰	2mM	88
氯化镁	2mM	32
氯化铜	2mM	56

实施例7、GX对二肽的底物特异性

为了测定GX的底物特异性，将分解每一种二肽的活性与分解Glu-Glu的活性进行比较。采用的二肽为Glu-Asp、Glu-Ser、Glu-Thr、Glu-Phe、Glu-Ala、Glu-Gly、Glu-lys、 γ -Glu-Glu、 γ -Glu-leu、Ser-Glu、Ala-Glu、Phe-Glu、lys-Glu、Pro-Glu、Asp-Asp、Asp-Phe、Asp-Glu、Asp-Ala、Asp-lys、Asp- ϵ -lys、Gln-Gly和Gln-Gln，并用如实施例1中使用Glu-Glu作为底物的相同方法让酶作用于每一种二肽，接着对反应溶液中的氨基酸进行氨基酸定量分析以比较分解活性。

GX对各种二肽的相对分解活性的结果示于表2中。

表2

G X 对各种二肽的相对分解活性

二肽	相对分解活性 (%)
Glu-Glu	100
Glu-Lys	175
Glu-Gly	80
Glu-Ala	108
Glu-Phe	32
Glu-Thr	102
Glu-Ser	128
Glu-Asp	63
γ -Glu-Glu	4
Pro-Glu	0
Lys-Glu	0
Phe-Glu	0
Ala-Glu	0
Ser-Glu	0
Asp- ϵ -Lys	11
Asp-Lys	172
Asp-Ala	110
Asp-Glu	30
Asp-Phe	79
Asp-Asp	14
Gln-Gln	0
Gln-Gly	0
γ -Glu-Leu	0

实施例8、GX对氨基酸对硝基酰苯胺衍生物的底物特异性及其与氨肽酶M的底物特异性的比较。

为了测定GX的底物特异性，将每种氨基酸对硝基酰苯胺衍生物的底物特异性与其对谷氨酸对硝基酰苯胺 (Glu-pNA) 的底物特异性进行比较。将0.05 ml 酶液，0.02 ml 2 mM的每种氨基酸对硝基酰苯胺，0.02 ml 100 mM的每种氨基酸对硝基酰苯胺，0.02 ml 100 mM HEPES 缓冲液 (pH 7.0) 和0.11 ml H₂O进行混合，并在37 °C下反应20分钟。加入0.05 ml 50 % 乙酸水溶液以终止反应。测定在反应溶液中释放的对硝基苯胺的量。为了比较，将每分钟内致使1 μmol 对硝基苯胺从每种氨基酸对硝基酰苯胺衍生物中释放的酶活性被认为是1个单位。将它的底物活性与可从Pierce 公司购得的氨肽酶M (ApaseM) 的底物活性进行比较。

氨基酸对硝基酰苯胺衍生物的分解活性的结果示于表3中。

表3

合成底物	GX U/mg	Apase M (U/mg)
Glu-pNA	65	2.8
Leu-pNA	0	1500
Phe-pNA	0	1100
Gly-pNA	0	100
Ala-pNA	0	2300
Pro-pNA	0	0.3

实施例9, GX对嗜铬粒蛋白A的分解

测定了GX对嗜铬粒蛋白A (Peptide Institute, Inc.) 即在N-末端含有谷氨酸的寡肽的分解。

在37℃下, 将0.02 ml缓冲液 (500 mM碳酸铵), 0.05 ml 5 mM嗜铬粒蛋白A, 0.08 ml H₂O和0.05 ml 6 mU酶反应。随着时间每次以0.02 ml 的量对反应溶液进行取样。用0.02 ml 50%的乙酸水溶液终止反应。用激光质谱 (Kompakt Maldi III, ShimadzuKratos 生产)分析反应溶液的分子量。

图8 显示反应1.5 小时后反应溶液的分布图。观察到1823.1, 1693.7, 1564.0, 1434.8, 1305.7和1176.1的分子量, 这些结果对应于嗜铬粒蛋白A 和它的片段的分子量。GX 具有氨肽酶活性, 由于这种活性使谷氨酸一个个地从嗜铬粒蛋白中释放出来。

实施例10、GX对 α -多谷氨酸的分解

测定了GX对 α -多谷氨酸 (分子量等于或大于8000) 的分解。

37℃下, 将0.05 ml 100 mM HEPES 缓冲液, 0.05 ml α -多谷氨酸 (50 mg/ml), 0.3 ml H₂O和0.1 ml 100 mU酶反应。随着时间每次以0.02 ml 的量对反应溶液进行取样。用0.02 ml 50%乙酸水溶液终止反应。测定反应溶液中的谷氨酸含量, 其结果示于图9 中。

在下文将描述来自萌发大豆子叶的蛋白酶D3 的制备方法, 该方法被结合使用于大豆蛋白的分解。

来自萌发的大豆子叶的蛋白酶D3 的检测方法, 它的活性单位的定义以及来自萌发的大豆子叶提取物的该酶的制备方法被详细描述在由本发明人申请的待审批的日本专利LOP 公开号264/1996 中。

来自萌发的大豆子叶的蛋白酶D3 是一种新的硫醇蛋白酶, 其在日本专利LOP 公开号264/1996 中被描述为酶1 或酶2, 其中任一种可用于分解大豆蛋白。

在与蛋白酶D3 相关的, 由本发明人于1995 年12 月28 日申请的日本专利申请号353, 931/1995 中描述了通过使用CDNA 和含有下文所述的CDNA 的大肠杆菌来制备重组蛋白酶D3 的方法, 描述了通过使用

大肠杆菌的重组蛋白酶D3。

对于由大肠杆菌产生的重组蛋白酶D3来说，在日本专利申请号3 5 3 9 3 1 /1 9 9 5 中描述了蛋白酶D3 - α 和D3 - β ，并且其中任一种可用于分解大豆蛋白。

实施例11、通过使用大肠杆菌来制备重组蛋白酶D3

从来自萌发大豆子叶的mRNA制备cDNA文库，一部分来自该文库的蛋白酶D3 - β cDNA以常规方法进行克隆并被整合至在大肠杆菌能起作用的表达载体中。培养用该表达载体转化的大肠杆菌以产生蛋白质内含体形式的基因产物。从微生物中取出该内含体，接着体外溶胞并解链，在移至酸侧的PH下，让其与底物接触。下文将详细描述该方法。

表达质粒的构建示于图10和11中。

如图10所示，全长D3 - β cDNA已整合至克隆 pMOSS- α 中，其用限制性酶spII裂解，接着用Klenow酶使其末端钝化，随后用EcoRI裂解以产生约870bp的片段。用Nhe I 裂解商业可购得的表达载体 pGEMEX-1 (Promega)，接着用Klenow酶使其末端钝化，用EcoRI裂解以产生大的片段。将上述的870kb的片段与这个大片段连接以产生质粒pGEMp β -N。

如图11所示，将pMOSS-a分别用EcoKI和PvuII裂解以产生190bp片段，接着将该片段插至M13mp19中的EcoRI和SmaI位点之间以构建M13 β -C。使用M13 β -C的单链DNA作为模板，寡核苷酸5' - CAAATGTCTGAGACAACTACT - 3' 作为突变引物，在体外突变系统 (Amersham公司) 中，在Sculptor中，通过定点突变将TGT(D3- β cDNA的开放阅读框中的第242位的半胱氨酸密码子) 突变为TGA (终止密码子) 以产生M13 β -C (C242opal)。接着用EcoRI和BamHI裂解以产生约190bp片段。

此后如图10所示，通过用EcoRI和BamHI裂解所述质粒pGEMp β -N而得到的大片段被连接至从上述M13 β -C(C242opal)获得的约190bp片段上，从而构建了表达载体pGEMp β 。即，整合至该pGEMp β 中以使其表达的序列示于序列表SEQ ID NO.1中，其中核苷酸1-9来自该载体。

接着将所述的pGEMp β 转化至大肠杆菌JM109 (DE3) (Promega) 中。37℃下，在摇晃于含有异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷

适宜介质的条件下培养所得的转化体，直至微生物中D3 基因产物以蛋白质内含体形式累积。

收集由此培养的微生物，将其超声破碎并离心以回收蛋白质内含体。洗涤该蛋白质内含体，并将其溶于50 mM Tris-HCl 缓冲液中，以产生约10mg/ml蛋白质溶液，其中该缓冲液PH为8，含有8 M尿素，10 mM二硫苏糖醇、50 mM NaCl 和5 mM乙二胺四乙酸 (EDTA)。该溶液称为被溶解的pD3-β。

向1份被溶解的pD3-β中缓慢加入100份含还原的谷胱甘肽和氧化的谷胱甘肽（即含1 mM还原的谷胱甘肽，0.1-0.5 mM氧化的谷胱甘肽和5 mM EDTA的50 mM磷酸钾 (PH10.5)），但不含任何蛋白质改性剂。

将混合物浓缩约50倍，并用50 mM含200 mM NaCl 的磷酸钾缓冲液 (PH10) 代替该溶剂。该溶液称为重新折叠的pD3-β。

用于C30分解的所得D3-β的比活为15 U/mg。该活性的测定详细描述在日本专利LOP公开号264/1996中。

将pGEMpβ转化至大肠杆菌JM109中，该转化体已于1995年7月3日保藏在National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, 日本(保藏号为: FERM BP-5793)。

下文将描述来自萌发大豆子叶的亮氨酸氨肽酶的活性检测方法，制备方法等，这些被结合用于分解大豆蛋白。

实施例12、亮氨酸氨肽酶活性的检测

采用的底物为亮氨酸对硝基酰苯胺，测定由于该酶的作用而释放的对硝基苯胺。使用下列条件和方法。除非另有说明。

将0.05 ml 酶液，0.02 ml 2 mM L-亮氨酸对硝基酰苯胺，0.02 ml 100 mM HEPES 缓冲液 (PH7.0) 和0.11 ml H₂O进行混合，并在37℃下，将其反应20分钟。加入0.05 ml 50%乙酸水溶液以终止反应。测定反应溶液中释放的对硝基苯胺的量。每分钟导致1 μmol 对硝基苯胺从作为底物的亮氨酸对硝基酰苯胺上释放的酶活性被认为是1个单位。

实施例1 3、亮氨酸氨肽酶的研究

上面的检测方法被用于萌发的大豆子叶的提取物中的分解活性的研究，首先测定了萌发后7天的子叶的亮氨酸对硝基酰苯胺的分解活性。

向4 g (8个子叶) 播种后7天的子叶中加入5倍过量体积(20 ml) 的冰冷缓冲液(20 mM磷酸钾缓冲液, pH 7.0, 200 mM NaCl, 10 mM α -巯基乙醇, 2 mM NaN_3)，并将子叶用匀浆器破碎，将其提取，并用网过滤。于4 °C在32,000 g下将滤液离心30分钟。用滤纸过滤上清液得到粗提取物。在此粗提取物中存在酶活性。

实施例1 4、Daizhu (大豆) 亮氨酸氨肽酶的纯化

由于亮氨酸对硝基酰苯胺(Leu-PNA) 分解活性存在于萌发后7天的子叶的提取物中，具有该活性的酶被称为daizhu亮氨酸氨肽酶(DLAP)，用下述方法进行DLAP馏分(DLAP1和DLAP2) 的纯化。

1、提取

向播种后7天的600 g子叶中加入5倍过量体积(3000 ml) 的冰冷缓冲液(20 mM磷酸钾缓冲液, pH 7.0, 200 mM NaCl, 0.1 mM pepabloc SC(4-(2-氨基乙基)-苯磺酰氟HCl), 10 μ M E-64, 10 mM 2-巯基乙醇, 2 mM NaN_3)，将子叶用匀浆器破碎，将其提取，并用网过滤。于4 °C在32,000 g下将滤液离心。用滤纸(No. 514A, 购自Advantec TOYO K. K.)过滤上清液。作为滤液获得的粗提物用薄膜浓缩装置(Minitan, 购自Millipore公司) 浓缩。

2、硫酸铵的分馏。

确定由此制得的粗提取物的pH (用NaOH调至pH 7.0)，通过加入硫酸铵将该溶液制成含有硫酸铵40%的饱和溶液(763 g / 3150 ml)。4 °C下，将该溶液搅拌6小时，于4 °C在32,000 g下离心30分钟得到上清液。通过进一步加入硫酸铵将上清液制成含有硫酸铵65%的饱和溶液(564 g / 3,400 ml)。4 °C下，将其搅拌过夜(15小时)，接着于4 °C在32,000 g下离心30分钟以回收沉淀物。将该沉淀物溶于120 ml 缓冲液(50 mM磷酸钾缓冲液, pH 7.0, 100 mM NaCl, 2 mM NaN_3) 中，7 °C下，对缓冲液(2 L $\times$ 5, 16小时) 反复透析。透析后，于4 °C在32,000 g下将透析液离心20分钟，接着用

0.2 μ m 滤器 (Nalgene滤器) 过滤以用于后续步骤中的阴离子交换层析。

3、阴离子交换层析

将上面2 中获得的样品在F P L C 系统 (Pharmacia) 中通过Hiload26/10Q 琼脂糖HP 进行分馏, 其方法如下。由于体积大, 将约1 9 0 ml 样品分成8 个等分试样, 每个等分试样进行这种离子交换层析。已预先将柱用前面透析中使用的相同缓冲液平衡, 上样后, 将柱用5 倍柱体积的缓冲液洗涤。将总共约2 0 0 0 ml 刚上样后的包括洗涤的洗脱馏分用超滤离心装置 (Minitan, Millipore生产) 浓缩至55ml。该馏分称为DLAP 1 馏分。通过加入7 . 2 6 g 硫酸铵将该样品调至硫酸铵浓度为1 M。于4 $^{\circ}$ C在3 2 , 0 0 0 g 下将溶液离心2 0 分钟以产生将被用于后续步骤中的疏水层析的上清液。洗涤之后, 将留在柱上的活性馏分用8 倍柱体积的具有1 0 0 m M - 300mM NaCl 线性梯度的缓冲液洗脱。此步骤中吸附于柱上的活性馏分被称为DLAP 2 馏分。DLAP 2 馏分用2 0 0 - 3 0 0 m M NaCl 的缓冲液洗脱, 将总共约4 1 0 ml 的洗脱液用超滤离心装置 (Minitan, Millipore) 浓缩至4 6 ml 。通过加入6 . 0 7 g 硫酸铵将样品调至硫酸铵的浓度为1 M。于4 $^{\circ}$ C在3 2 , 0 0 0 g 下将溶液离心2 0 分钟以用于后续步骤中的疏水层析。

4、疏水层析

在F P L C 系统中用Hiload 26/10苯基琼脂糖HP 将上面3 中获得的样品DLAP 1 和DLAP 2 进一步分馏, 其方法如下。将约6 0 ml 的DLAP 1 分成两个等分试样, 每个等分试样上柱, 已预先将柱用缓冲液 (5 0 m M磷酸钾缓冲液, P H 7 . 0 , 1 M (NH₄)₂SO₄ , 2 m M NaN₃) 平衡。上样后, 用5 倍柱体积的相同的缓冲液洗涤该柱, 接着通过用硫酸铵为1 M至 0 M减小的线性梯度的缓冲液洗脱该柱来分馏该活性成分。在此步骤中, 用0 . 4 至 0 M硫酸铵洗脱活性馏分。用Minitan和Centriprep 10 (Amicon) 将600ml的洗脱液浓缩至3.0ml。于4 $^{\circ}$ C在3 2 , 0 0 0 g 下将浓缩液离心1 0 分钟, 得到被用于后续步骤中的凝胶过滤的上清液。将约4 6 ml DLAP 2 上柱, 已预先将柱用缓冲液 (5 0 m M磷酸钾缓冲液, P H 7 . 0 , 1 M (NH₄)₂SO₄ , 2 m M NaN₃) 平衡。上样后, 该柱用5 倍柱体积的相同的缓冲液洗涤, 接着通过用硫酸铵为1 M至 0 M减小的线性梯度的缓冲液洗脱该柱来分馏该活性成分。在此步骤中, 用0 . 4 M至 0 M硫酸铵洗脱活性馏

分。用Minitan和Centriprep (Amicon)将100ml洗脱液浓缩至1.0ml。于4 °C在32,000g下将浓缩液离心10分钟,产生用于后续步骤中的凝胶过滤的上清液。

5、凝胶过滤层析

在F P L C 系统中,通过用Hiload 26/60琼脂糖200Pg进行凝胶过滤,将上面4得到的DLAP1进行分馏,其方法如下。将样品分成2个等分试样,每个等分试样进行层析。在样品分馏之前,已预先将柱用缓冲液(50mM 磷酸钾缓冲液, PH7.0, 100mM NaCl, 2mM NaN₃)平衡。浓缩得到的活性馏分,以产生DLAP 1 制剂。

在F P L C 中通过相同柱的凝胶过滤将上述4 中获得的DLAP 2 进行分馏。浓缩所得的活性馏分,以产生DLAP 2 制剂。

测定由于一系列纯化步骤导致的比活性的增加。上述亮氨酸氨肽酶的粗酶的比活性为约5 U /mg, 而纯化的酶DLAP 1 的比活性为约1 6 0 U/mg, 这表明在纯化步骤中对于比活性, DLAP 1 被纯化了约3 2 倍, 由于纯化的DLAP 2 的比活也为约1 6 0 U/mg, 对于比活, DLAP 2 也被纯化了3 2 倍。DLAP 1 被检测出对丙氨酸对硝基酰苯胺 (Ala -PNA) 比对Leu -PNA更为敏感; 即, 使用丙氨酸对硝基酰苯胺 (Ala -PNA) 来换算活性单位, 它的比活为2 7 0 U/mg。

在下文, 在使用丙氨酸对硝基酰苯胺的活性测定中将表示DLAP 1 的活性。通过使用苯丙氨酸对硝基酰苯胺 (Phe -PNA), DLAP2 被检测出比对 Leu-PNA更为敏感, 即, 使用Phe-PNA来换算活性单位, 它的比活为3200U/mg。

在下文, 在使用Phe -pNA的活性测定中将表示DLAP 2 的活性。

从常规PAGE中的酶的活性染色来看, 活性DLAP 1 酶的分子量被测定为约6 0 -7 0 KD (见图1 2)。从类似的染色来看, 活性DLAP 2 酶的分子量被测定为约4 5 -5 5 KD (见图1 3)。在下文将描述活性染色方法。

实施例1 5、常规PAGE中的DLAP 1 和DLAP 2 的活性染色

将2 0, 6 0 和1 2 0 mU酶配制在Davis 的样品制剂缓冲液 (0 . 0 6 2 5 M Tris -HCl 缓冲液, PH6 .8, 1 5 %甘油, 0 .0 0 1 %溴酚兰) 中, 并在5 °C下, 用商品凝胶(Multigel 2/15, Dai-Ichi Kagaku Yakuhin K.K.), 在电泳缓冲液 (3 g Tris, 1 4 .4 g / l 甘氨酸) 进

行电泳。为了检测DLAP 1，于37℃在恒温箱中将电泳后的凝胶在溶液A (50 mM磷酸钾缓冲液，pH 8.0，0.5 mg/ml 丙氨酸-β-萘酰胺) 中保温30分钟。用蒸馏水洗涤后，将该凝胶用溶液B (50 mM磷酸钾缓冲液，pH 8.0，1 mg/l 坚牢蓝盐B (四氯化邻联二茴香胺) 染色。坚牢蓝盐B由Sigma提供，所有其他试剂来自Nakarai Tesque K.K.。从该结果中，活性DLAP 1酶的分子量被测定为约60-70 KD (见图12)。

使用50 mM磷酸钾缓冲液 (pH 8.0) 和0.5 mg/ml 苯丙氨酸-β-萘酰胺作为溶液A类似地检测DLAP 2。从该结果中，活性DLAP 2酶的分子量被测定为约45-55 KD (见图13)。

下面将描述在此方法中获得的DLAP 1的特性。使用L-丙氨酸对硝基酰苯胺作为底物代替用于实施例12的方法中的L-亮氨酸，对硝基酰苯胺来测定DLAP 1的活性。

实施例16、DLAP 1的最适pH和最适温度的测定

用下面方法测定由于反应pH (最适pH) 而引起的酶活性的变化。

采用的酶反应缓冲液为柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0), MES缓冲液 (pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0), HEPES缓冲液 (pH 7.0, 7.5, 8.0), Tris-HCl缓冲液 (pH 8.0, 8.5, 9.0) 和碳酸钠缓冲液 (pH 9.0, 9.5, 10.0, 10.5)。

将180 μl 0.7 U DLAP 1配制于各种pH下的50 mM缓冲液中，并在30℃下预保温5分钟。将20 μl 底物L-丙氨酸，对硝基酰苯胺 (对于反应为0.4 mM) 加入至各样品中，接着搅拌并保温20分钟。加入50 μl 1M乙酸钠缓冲液 (pH 4.0) 以终止反应。

测定结果示于图14中。从该图可以看出，本发明的DLAP 1的最适pH在约5.5-9.5的范围内，严格地为约7-约9 (见图14)。

由于反应温度 (最适温度) 而引起的酶活性的变化测定如下：

将20 μl 底物L-丙氨酸对硝基酰苯胺 (对于反应为0.4 mM) 加入到50 mM MES缓冲液 (pH 6.0) 中，并在各种温度 (25, 30, 37, 42, 50, 60, 70℃) 下，将由此获得的180 μl 反应溶液预

保温5 分钟。再向其中加入0.7 U DLAP1。

搅拌该样品，并接着保温20 分钟。向其中加入50 μ l 1 M 乙酸钠缓冲液 (PH4.0) 以终止反应。

测定结果示于图15 中，从该图可以看出，本发明的DLAP1 的最适温度在约25 -60 $^{\circ}$ C范围内，严格地为约35 -55 $^{\circ}$ C (见图15)。

温度稳定性的测定进行如下：

在预定温度 (30, 42, 50, 60 $^{\circ}$ C) 下，将900 U/ml 酶在缓冲液 (PH6.5) 中保温预定时间 (10, 20, 40, 60 分钟)，接着在30 $^{\circ}$ C下测定其剩余活性。

测定结果示于图16 中。本发明的DLAP1 在50 $^{\circ}$ C下甚至在保温60 分钟后还保留约90 % 或更高的初始活性，或在60 $^{\circ}$ C下保温10 分钟后还保留约25 % 或更高的活性。因此，较长时间的反应的反应温度优选为50 $^{\circ}$ C或更低。

实施例17、蛋白酶抑制剂对DLAP1 的作用

测定了蛋白酶抑制剂对本发明的DLAP1 的作用。采用的抑制剂为放线酰胺素、抗氨肽霉素A、antipain, alphasubstancin A、diprotin A、Leuhistin、苯基甲磺酰氟(PMSF)、反-环氧琥珀酰-L-亮氨酸酰胺(4-脒基)-丁烷(E-64)、碘乙酰胺、1, 10 -正菲咯啉和N -乙基马来酰亚胺 (NEM)。1, 10 -正菲咯啉和N -乙基马来酰亚胺购自Nakarai Tesque K.K., 所有其他抑制剂购自Peptide Kenkyusho K.K.。

在各种抑制剂存在下，将酶于室温 (25 $^{\circ}$ C) 下放置20 分钟，用如实施例12 中的相同方法测定酶的剩余活性。

在各种抑制剂存在下的活性测定的结果示于表4 中。该酶被氨肽酶抑制剂，例如放线酰胺素或抗氨肽霉素A 强烈地抑制。

表4

各种蛋白酶抑制剂对DLAP 1 的作用

抑制剂	浓度	剩余活性 (相对低 %)
—	—	100
放线酰胺素	100 μ M	48
抗氨肽霉素A	100 μ M	30
antipain	100 μ M	100
alphamenineA	100 μ M	100
diprotin A	100 μ M	100
E-64	10 μ M	80
leuhistin	100 μ M	83
PMSF	10mM	100
NEM	100mM	95
碘乙酰胺	50mM	100
正菲咯啉	10 μ M	100

实施例18、DLAP 1 对氨基酸对硝基酰苯胺衍生物的底物特异性。

为了测定DLAP 1 的底物特异性，将每种氨基酸对硝基酰苯胺衍生物的底物特异性与丙氨酸对硝基酰苯胺 (Leu -pNA) 的底物特异性进行比较。

将0.025 ml 2 mM每种氨基酸对硝基酰苯胺，0.01 ml 50 mM HEPES 缓冲液 (PH8.0) 以及0.04ml H₂O混合，接着预保温5分钟，并在37℃下与0.025 ml 的酶液反应20分钟。加入0.025 ml 50%的乙酸水溶液以终止反应，测定反应溶液中释放的对硝基苯胺的量。每分钟致使1 μ mol 对硝基苯胺从每种氨基酸对硝基酰苯胺衍生物中释放的酶活性被认为为是1个单位。相对于丙氨酸对硝基酰苯胺的每种底物的分解活性示于表5中。

表5

二肽	相对分解活性
Ala-pNA	100
Gly-pNA	97
Leu-pNA	65
Ile-pNA	21
Val-pNA	23
Phe-pNA	53
Glu-pNA	15
Asp-pNA	10
Lys-pNA	93
Arg-pNA	78
His-pNA	12
Met-pNA	103
<Glu-pNA	9
Pro-pNA	18

下面将描述在实施例1 4 中用与DLAP 1 相同的方法获得的DLAP 2 的酶的特性。通过使用L - 苯丙氨酸对硝基酰苯胺代替实施例1 2 方法中的底物L - 亮氨酸对硝基酰苯胺来测定DLAP 2 的酶活性。

实施例1 9 、DLAP 2 的最适PH和最适温度的测定

用下面的方法测定由于反应PH (最适PH) 而引起的酶活性的变化。

采用的酶反应缓冲液为柠檬酸钠缓冲液 (PH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0), MES缓冲液 (PH5.5, 6.0, 6.5, 7.0), HEPES缓冲液 (PH7.0, 7.5, 8.0), Tris-Hol缓冲液 (PH8.0, 8.5, 9.0), 以及碳酸钠缓冲液 (PH9.0, 9.5, 10.0, 10.5)。

将180 μ l 0.7U DLAP2配制于各个PH下的50mM缓冲液中, 30°C下预保温5分钟。将20 μ l 底物L-苯丙氨酸对硝基酰苯胺 (对于反应为0.4 mM) 加入到各样品中。将其搅拌并接着保温20分钟。加入50 μ l 1 M乙酸钠缓冲液 (PH 4.0) 以终止反应。

测定结果示于图17中。从该图可以看出, 本发明的DLAP2的最适PH在约5.0-9.0的范围内, 严格地为约6-约9 (见图17)。

由于反应温度 (最适温度) 而引起的酶活性的变化测定如下:

将20 μ l 底物L-苯丙氨酸对硝基酰苯胺 (对于反应为0.4 mM) 加入到50 mM MES缓冲液 (PH 6.0) 中, 在各个温度 (25, 30, 37, 42, 50, 60, 70 °C) 下, 将由此获得的180 μ l 溶液预保温5分钟。向其中再加入0.7U DLAP2。搅拌样品, 并接着保温20分钟, 加入50 μ l 1 M乙酸钠缓冲液 (PH 4.0) 以终止反应。

测定结果示于图18中。从该图可以看出, 本发明DLAP2的最适温度在约30-70 °C的范围内, 严格地为约35-65 °C (见图18)。

实施例20、蛋白酶抑制剂对DLAP2的作用。

测定了抑制剂对本发明DLAP2的作用。采用的抑制剂为放线酰胺素、抗氨肽霉素A、antipain、Alphamenine A、diprotin A、leuhistin, 苯基甲磺酰氟 (PMSF)、反-环氧琥珀酰-L-亮氨酸酰胺 (4-胍基)-丁烷 (E-64)、1, 10-正菲咯啉、N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 和碘乙酰胺。1, 10-正菲咯啉和N-乙基马来酰亚胺购自Nakarai Tesque K.K., 所有其他抑制剂购自Peptide Kenkyusho K.K.。

在各种抑制剂存在下, 将酶于室温 (25 °C) 下放置20分钟, 用如实施例12中的相同方法测定酶的剩余活性。

在各种抑制剂存在下的活性测定的结果示于表6中。该酶被氨肽酶抑制剂放线酰胺素强烈地抑制, 被PMSF轻微地抑制。

表6

蛋白酶抑制剂对DLAP2的作用

抑制剂	浓度	剩余活性 (相对值%)
—	—	100
放线酰胺素	100 μ M	37
抗氨肽霉素A	100 μ M	86
antipain	100 μ M	100
alphamenineA	100 μ M	100
diprotin A	100 μ M	100
E-64	10 μ M	98
leuhistin	100 μ M	100
PMSF	10 μ M	67
NEM	100mM	89
碘乙酰胺	50mM	100
正菲咯啉	10 μ M	75

实施例2 1、DLPA 2 对氨基酸对硝基酰苯胺衍生物的底物特异性

为了测定DLAP 2 的底物特异性, 将每一种氨基酸对硝基酰苯胺衍生物的底物特异性与苯丙氨酸对硝基酰苯胺 (p h e -p N A) 的底物特异性进行比较。将0 .0 2 5 ml 2 m M各种氨基酸对硝基酰苯胺, 0 .0 1 ml 5 0 0 m M H E P E S 缓冲液 (P H 8 .0) 和0 .0 4 ml H₂ O混合, 在3 7 °C下将其与0 .0 2 5 ml 酶液反应2 0 分钟。加入0 .0 2 5 ml 5 0 % 乙酸水溶液以终止反应。测定反应溶液中释放的对硝基苯胺的量。每分钟致使1 μ m o l 对硝基苯胺从作为底物的各种氨基酸对硝基酰苯胺衍生物中释放的酶活性被认为是一个单位。相对于苯丙氨酸对硝基酰苯胺的各种底物的分解活性示于表7 中。

表7

合成底物	相对分解活性 (%)
Phe-pNA	100
Ala-pNA	3
Gly-pNA	2
Leu-pNA	5
Ile-pNA	0
Val-pNA	0
Glu-pNA	0
Asp-pNA	0
Lys-pNA	0
Arg-pNA	0
His-pNA	0
Met-pNA	3
<Glu-pNA	0
Pro-pNA	3

实施例2 2、氨肽酶GX、D3、DLAP1和DLAP2对大豆蛋白的分解

用使用上述方法从萌发大豆子叶中制备的上面表征的氨肽酶GX、D3、DLAP1和DLAP2来分解大豆蛋白的方法描述如下:

1、蛋白酶D3对大豆蛋白的初步分解

采用的大豆蛋白为大豆蛋白制剂, Ajipron SU (Ajinomoto CO .Inc)。于120 °C在高压灭菌器中将Ajipron SU 水溶液(2.5g/35ml Milli-Q 水)灭菌10分钟,接着用Hcl调至PH4.0。将底物溶液(2.5g/40ml)与来自实施例11中制备的重组大肠杆菌(FERM BP-5793)的再次折叠的pD3-β反应。为了进行该反应,将1 ml 再次折叠的p D 3 - β (25U/ml), 0.4ml 5M氯化钠水溶液以及0.5ml 20mM半胱氨酸水溶液与8ml的上述底物溶液混合,并在37 °C下反应0-72小时。分解的进程是通过如日本专利LOP 公开号264 /1996 中描述的用4 - 硝基 - 7 - 硝基苯并 - 2 - 噁 - 1 , 3 - 二唑 (NBD - F) 试剂定量测定以氨基和亚氨基形式的氮来监测 (K .Imai和Y. Watanabe, Anal. Chim. Acta., 130, 377-383(1983))。结果示于表8中。

表8

反应时间	NBD - F 值 (mM) .
0 小时	N .D .
2 4 小时	6 0
4 8 小时	8 9
7 2 小时	1 0 6

2、氨肽酶GX对大豆蛋白的二次分解

将上面1 中反应7 2 小时后获得的初级水解产物用实施例3 中制备的GX来分解。用氢氧化钠将上面1 中获得的初级水解产物调至约PH7。将200 μl 1U GX加入到200 μl 初级水解产物 (含有10 mg 底物) 中,并在42 °C下将由此获得的400 μl 溶液反应7 2 小时 (第1 组)。200 μl 的1 U GX被配成400 μl (不含底物),并在42 °C下保温7 2 小时 (对照组1), 并将上面1 中获得的200 μl 初级水解产物 (含10mg 底物) 被配成400 μl,并在42 °C下保温7 2 小时 (对照组2)。

反应7 2 小时后进行水解产物的氨基酸分析。结果示于表9 中。

如表9 中所示,在第1 组中释放的谷氨酸和天冬氨酸比其他氨基酸多得多。

表9

7 2 小时后各组中的氨基酸分析 (m M)

	组1	对照组1	对照组2
天冬氨酸	2.6	N.D.	0.3
天冬酰胺	1.5	N.D.	0.4
谷氨酸	5.4	N.D.	1.6
谷氨酰胺	0.8	N.D.	0.6
苏氨酸	0.8	N.D.	0.5
丝氨酸	2.7	N.D.	0.6
脯氨酸	0	N.D.	0
甘氨酸	1.7	N.D.	0.5
丙氨酸	2.4	N.D.	0.8
缬氨酸	0.9	N.D.	0.9
半胱氨酸	2.0	N.D.	2.0
甲硫氨酸	0.7	N.D.	0.7
异亮氨酸	1.4	N.D.	1.2
亮氨酸	1.7	N.D.	1.5
酪氨酸	0	N.D.	0
苯丙氨酸	0.6	N.D.	0.5
色氨酸	0	N.D.	0
赖氨酸	1.0	N.D.	0.8
组氨酸	0.4	N.D.	0.3
精氨酸	1.1	N.D.	0.9
氨基酸总量	27.1	N.D.	13.9

3、GX、DLAP 1 和DLAP 2 对大豆蛋白的二次分解。

上面1 中反应7 2 小时后获得的初级水解产物用氨肽酶GX 和实施例1 4 中制备的DLAP 1 和DLAP 2 来分解。用氢氧化钠将上面1 中获得的初级水解产物调至约PH7。350 μ l 的GX (1 U)，DLAP 1 (320 U)

和DLAP 2 (1 0 0 U) 的混合物加入到5 0 μ l 初级水解产物 (含有2 . 5 mg 底物) 中, 在4 2 $^{\circ}$ C下将由此获得的4 0 0 μ l 溶液反应0 - 7 2 小时 (第2 组)。3 5 0 μ l 的GX (1 U), DLAP 1 (3 2 0 U) 和DLAP 2 (1 0 0 U) 的混合物单独配成4 0 0 μ l, 在4 2 $^{\circ}$ C下保温0 - 7 2 小时 (对照组3)。由上面1 中获得的仅5 0 μ l 初级水解产物 (含2 . 5 mg 底物) 配成4 0 0 μ l, 并在4 2 $^{\circ}$ C下保温0 - 7 2 小时 (对照组4)。于1 1 0 $^{\circ}$ C在强真空中将第2 组中反应7 2 小时后的水解产物进一步用恒沸HCl (Wako Pure Chemical Industries) 水解2 4 小时。用与上面1 中相同的方法使用NBD - F 对分解的进程进行监测。结果示于表1 0 中。

表1 0

反应时间	NBD - F 值 (mM)		
	组2	对照组3	对照组4
0 小时	1 3	8	2 6
2 4 小时	3 5	9	2 5
4 8 小时	3 9	9	2 7
7 2 小时	3 8	9	2 5

反应7 2 小时后进行水解产物的氨基酸分析。第2 组酸性水解产物中的氨基酸含量以相对于第2 组的二次水解产物中的氨基酸的量来表示 (表1 1)。

表1 1

反应7 2 小时后各组的氨基酸分析 (m M)

	组2	组2 的酸水解产物	组3	组4
天冬氨酸	1.3	3.9	0.1	0.2
天冬酰胺	1.4	0	0	0.2
谷氨酸	2.5	6.2	0.2	0.8
谷氨酰胺	1.5	0	0	0.3
苏亮酸	1.3	1.4	0.2	0.3
丝氨酸	2.4	2.3	0.1	0.3
脯氨酸	1.8	2.1	0.2	0
甘氨酸	2.4	2.4	0.2	0.2
丙氨酸	2.3	1.9	0.3	0.4
缬氨酸	2.1	1.6	0.3	0.3
半胱氨酸	0.7	0.6	0	1.0
甲硫氨酸	0.6	0.4	0.4	0.4
异亮氨酸	1.7	1.4	0.3	0.6
亮氨酸	3.0	2.5	0.5	0.7
酪氨酸	0.9	0.9	0.1	0
苯丙氨酸	1.3	1.3	0.1	0.3
色氨酸	0	0	0	0
赖氨酸	2.1	1.9	0.2	0.4
组氨酸	0.7	0.7	0.1	0.2
精氨酸	2.1	2.0	0.1	0.4
氨基酸总量	32.1	33.5	3.4	7.0

如表1 1 中所示, 第2 组二次水解产物中氨基酸总计为3 2 .1 m M, 第2 组酸性水解产物中氨基酸总计为3 3 .5 m M。在第2 组中, 第2 组二次水解产物中的氨基酸的产率因而为酸性水解产物的9 5 .8 %。

在第2 组中, 除天冬氨酸和谷氨酸之外的其他氨基酸被大大地释放这一事实可能是除氨肽酶G X 作用之外, D L A P 1 和D L A P 2 作用的结果。

本发明新的氨肽酶GX被认为是一种在用来自含肽和蛋白质的原料的高含量的酸性氨基酸而高产量地产生分解水解产物中极为有用的酶。即，如实施例8中所示，本发明的酶能较多地释放用甚至具有宽的底物特异性的氨肽酶也很难释放的氨基酸。

本发明新的氨肽酶GX可与常规的蛋白质分解方法结合使用，这样可分解尤其是具有用常规方法仍不能释放N-末端酸性氨基酸的那些底物。更具体地说，使用本发明提供的氨肽酶GX，N-末端含有谷氨酸或天冬氨酸的肽或蛋白质可释放带有良好味觉的谷氨酸或天冬氨酸。由此获得的肽或蛋白酶水解产物可用于各种物品，例品食品、调味品、饲料等中。尤其是，如实施例22中所示，所有均来自萌发的大豆子叶的蛋白酶D3、DLAP1和DLAP2可被结合使用来分解大豆蛋白，这些酶的结合导致了以豆蛋白盐酸水解产物为基准的约95.8%的产率。

此外，业已知大豆蛋白中的主要成分，例如 β -Conglisinin、甘氨酸等含有酸性氨基酸富集的序列，例如-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-等(J.J.Doyle等人, J.Biol. Chem., 261, 9228(1986), J.D. Ng人, Plant Physiol., 101, 713(1993), N.C. Nielsen等人, Plant Cell 1 313 (1989))，用常规的蛋白酶和肽酶不能将这些序列分解。来自萌发大豆子叶的本发明氨肽酶GX作为有效地分解来自大豆蛋白的酸性肽的酶被认为具有最好的特异性和特性。因此可以相信，本发明的酶，即氨肽酶GX是用于增加酸性氨基酸的释放的最有效的氨肽酶。

虽然用于酸性氨基酸特异性的氨肽酶包括来自猪消化道膜(A. Benajiba等人, Eur. J.Biochem. 107, 381(1980))，和来自产乳酸细菌(F. A. Exterkate等人, Appln. Environ. Microbiol., 53, 577(1987))，例如EC. 3.4.11.7谷氨酰氨肽酶，但是本发明的氨肽酶GX不被这种常规氨肽酶的抑制剂(抗氨肽霉素A)所抑制。而且，本发明的氨肽酶被leuhistine和放线酰胺素抑制，但没有报道谷氨酰氨肽酶被所述抑制剂抑制。来自红酵母属(Rhodotolura)的酵母的氨肽酶(日本专利LOP公开号244, 381/1987)也为酸性氨基酸特异性的氨肽酶，但该酶不同于本发明的酶，因为它不被氯化镁或氯化锰抑制。还报道了来自大豆的另一种氨肽酶(Shinji Watanabe等人, Nippon Nogei Kagakkaishi 63(3), 617(1988))，但这个已有的酶在底物特异性上完全不同

于本发明的氨肽酶G X。而且，曾经报道的来自其他植物的氨肽酶没有包括任何一种酶与本发明的酶类似的酶，因此可以推出本发明的酶是首次发现的来源于植物的酸性氨基酸特异性的氨肽酶。因此，本发明新的氨肽酶G X从生物学观点来看也是不平常的。

序列表

信息: 1

长度: 1 0 5 6

类型: 核酸

链型: 双链

拓扑学: 线性

序列类型: c D N A 至 m R N A

起始来源

生物体: 甘氨酸最多

序列特征

表示特征的符号: C D S

位置: 1 , 1 0 5 6

确定特征的方法: P

序列特征

表示特征的符号: 插入序列

位置: 1 , 9

确定特征的方法: E

序列:

ATG GCT AGG TAC GAC AGC GCC CAC GCG GAC AAG GCC GCC ACG TTG CGC	48
Met Ala Arg Tyr Asp Ser Ala His Ala Asp Lys Ala Ala Thr Leu Arg	
5 10 15	
ACC GAG GAG GAG CTG ATG TCC ATG TAC GAG CAG TGG CTC GTG AAG CAC	96
Thr Glu Glu Glu Leu Met Ser Met Tyr Glu Gln Trp Leu Val Lys His	
20 25 30	
GGG AAG GTG TAC AAC GCG CTC GGC GAG AAG GAG AAG CGC TTC CAG ATC	144
Gly Lys Val Tyr Asn Ala Leu Gly Glu Lys Glu Lys Arg Phe Gln Ile	
35 40 45	
TTC AAG GAC AAC CTG CGA TTC ATC GAC GAC CAC AAC TCC GCG GAG GAC	192
Phe Lys Asp Asn Leu Arg Phe Ile Asp Asp His Asn Ser Ala Glu Asp	
50 55 60	
CGA ACC TAC AAG CTC GGA CTG AAC CGG TTC GCT GAT CTC ACC AAC GAG	240
Arg Thr Tyr Lys Leu Gly Leu Asn Arg Phe Ala Asp Leu Thr Asn Glu	
65 70 75 80	
GAA TAC AGG GCC AAG TAC TTG GGA ACC AAG ATC GAT CCC AAC CGG AGG	288
Glu Tyr Arg Ala Lys Tyr Leu Gly Thr Lys Ile Asp Pro Asn Arg Arg	
85 90 95	
CTC GGA AAG ACC CCG AGC AAC CGC TAC GCG CCA CGT GTC GGC GAC AAA	336
Leu Gly Lys Thr Pro Ser Asn Arg Tyr Ala Pro Arg Val Gly Asp Lys	
100 105 110	
TTG CCT GAT TCC GTT GAT TGG AGG AAG GAA GGT GCT GTT CCT CCT GTC	384
Leu Pro Asp Ser Val Asp Trp Arg Lys Glu Gly Ala Val Pro Pro Val	
115 120 125	
AAA GAC CAA GGA GGC TGT GGG AGC TGT TGG GCA TTC TCA GCA ATC GGT	432
Lys Asp Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Ala Ile Gly	
130 135 140	
GCA GTA GAA GGA ATA AAT AAG ATA GTA ACA GGC GAA CTG ATT TCG TTA	480
Ala Val Glu Gly Ile Asn Lys Ile Val Thr Gly Glu Leu Ile Ser Leu	

145	150	155	160	
TCA GAA CAA GAA TTG GTG GAT TGT GAT ACT GGA TAT AAC CAA GGA TGC	528			
Ser Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Gly Cys				
165	170	175		
AAT GGA GGA CTT ATG GAC TAT GCA TTT GAG TTC ATA ATC AAC AAT GGC	576			
Asn Gly Gly Leu Met Asp Tyr Ala Phe Glu Phe Ile Ile Asn Asn Gly				
180	185	190		
GGC ATT GAT TCT GAT GAG GAT TAC CCA TAC CGT GGT GTT GAT GGT AGA	624			
Gly Ile Asp Ser Asp Glu Asp Tyr Pro Tyr Arg Gly Val Asp Gly Arg				
195	200	205		
TGC GAC ACA TAT AGG AAA AAT GCT AAA GTC GTT TCT ATT GAT GAC TAC	672			
Cys Asp Thr Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Val Val Ser Ile Asp Asp Tyr				
210	215	220		
GAA GAT GTT CCT GCC TAT GAT GAG TTA GCC TTG AAA AAG GCC GTT GCA	720			
Glu Asp Val Pro Ala Tyr Asp Glu Leu Ala Leu Lys Lys Ala Val Ala				
225	230	235	240	
AAT CAG CCC GTG AGC GTT GCT ATT GAA GGA GGG GGC AGG GAA TTT CAA	768			
Asn Gln Pro Val Ser Val Ala Ile Glu Gly Gly Gly Arg Glu Phe Gln				
245	250	255		
TTA TAT GTA TCT GGT GTA TTC ACG GGG AGA TGT GGC ACA GCA CTA GAT	816			
Leu Tyr Val Ser Gly Val Phe Thr Gly Arg Cys Gly Thr Ala Leu Asp				
260	265	270		
CAT GGT GTC GTG GCT GTT GGG TAT GGA ACA GCT AAA GGT CAT GAT TAT	864			
His Gly Val Val Ala Val Gly Tyr Gly Thr Ala Lys Gly His Asp Tyr				
275	280	285		
TGG ATC GTA AGG AAT TCA TGG GGT TCT AGC TGG GGA GAG GAT GGC TAC	912			
Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Gly Ser Ser Trp Gly Glu Asp Gly Tyr				
290	295	300		
ATC AGA TTA GAA AGA AAT CTT GCT AAC AGC AGA TCA GGC AAG TGT GGA	960			

Ile	Arg	Leu	Glu	Arg	Asn	Leu	Ala	Asn	Ser	Arg	Ser	Gly	Lys	Cys	Gly	
305					310					315					320	
ATT	GCA	ATT	GAG	CCA	TCT	TAT	CCC	CTT	AAG	AAT	GGT	CCA	AAT	CCC	CCT	1008
Ile	Ala	Ile	Glu	Pro	Ser	Tyr	Pro	Leu	Lys	Asn	Gly	Pro	Asn	Pro	Pro	
					325					330					335	
AAT	CCT	GGA	CCA	TCA	CCC	CCT	TCA	CCT	GTG	AAG	CCG	CCA	AAT	GTC	TGA	1056
Asn	Pro	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Val	Lys	Pro	Pro	Asn	Val		
					340					345					350	

附图简要说明

图1 显示在不同P H值下的氨肽酶G X活性的P H分布图。

图2 显示在不同温度下的氨肽酶G X活性的分布图。

图3 显示在不同温度下的氨肽酶G X活性的稳定性的分布图。

图4 显示在用考马斯染色的纯化的氨肽酶G X的S D S -P A G E中的分布图，其中样品没有被加热和还原。

图5 显示在用考马斯染色的纯化的氨肽酶G X的S D S -P A G E中的分布图，其中样品被加热和还原。

图6 显示用琼脂糖6 凝胶过滤纯化的氨肽酶G X的分子量的分析。

图7 显示进行活性染色的纯化的氨肽酶G X在S D S -P A G E中的分布图，其中样品没有被加热和还原。

图8 显示其中嗜铬粒蛋白A被氨肽酶A分解的反应溶液的质谱图，嗜铬粒蛋白A的结构及其相应片段的质量。

图9 显示当 α -多谷氨酸被氨肽酶G X分解时谷氨酸的增加。

图1 0 显示表达质粒p G E M p β 的(部分)结构。

图1 1 显示表达质粒p G E M p β 的(部分)结构。

图1 2 显示进行活性染色的纯化的氨肽酶D L A P 1在S D S -P A G E中的分布图，其中样品没有被加热和还原。

图1 3 显示进行活性染色的纯化的氨肽酶D L A P 2在S D S -P A G E中的分布图，其中样品没有被加热和还原。

图1 4 显示在不同P H值下的氨肽酶D L A P 1活性的P H分布图。

图1 5 显示在不同温度下的氨肽酶D L A P 1活性的分布图。

图1 6 显示在不同温度下的氨肽酶D L A P 1活性的稳定性的分布图。

图1 7 显示在不同P H值下的氨肽酶D L A P 2活性的P H分布图。

图1 8 显示在不同温度下的氨肽酶D L A P 2活性的分布图。

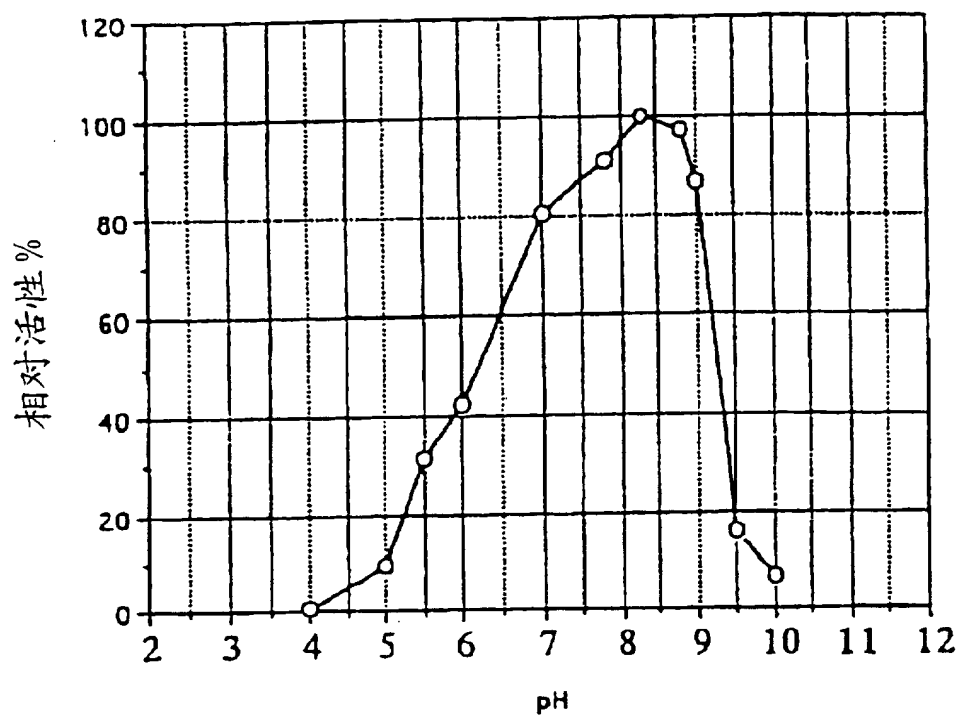


图 1

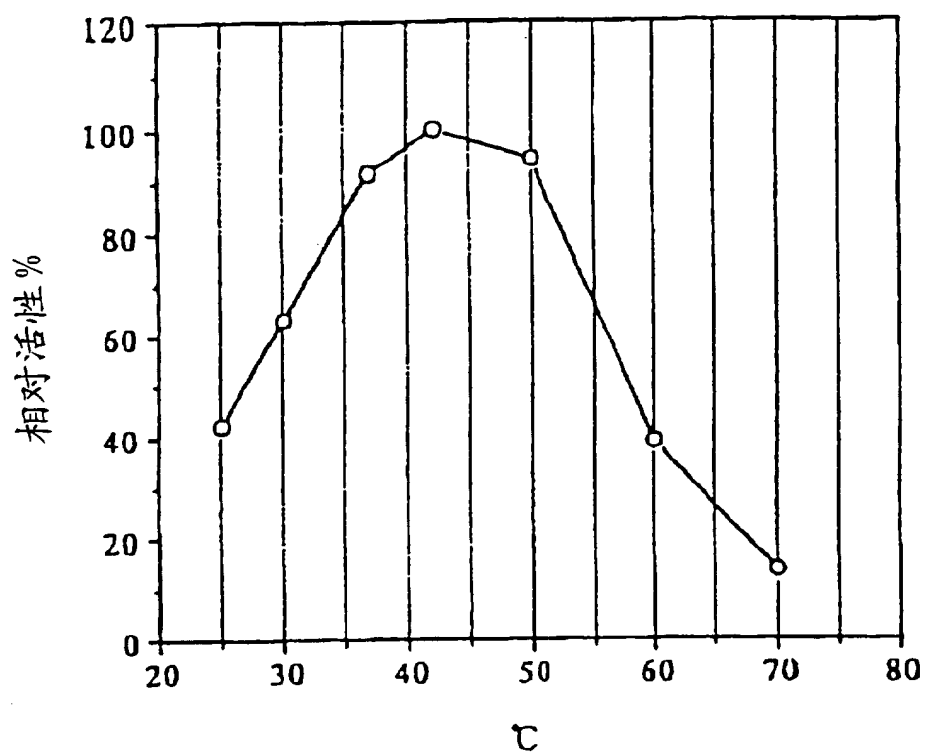


图 2

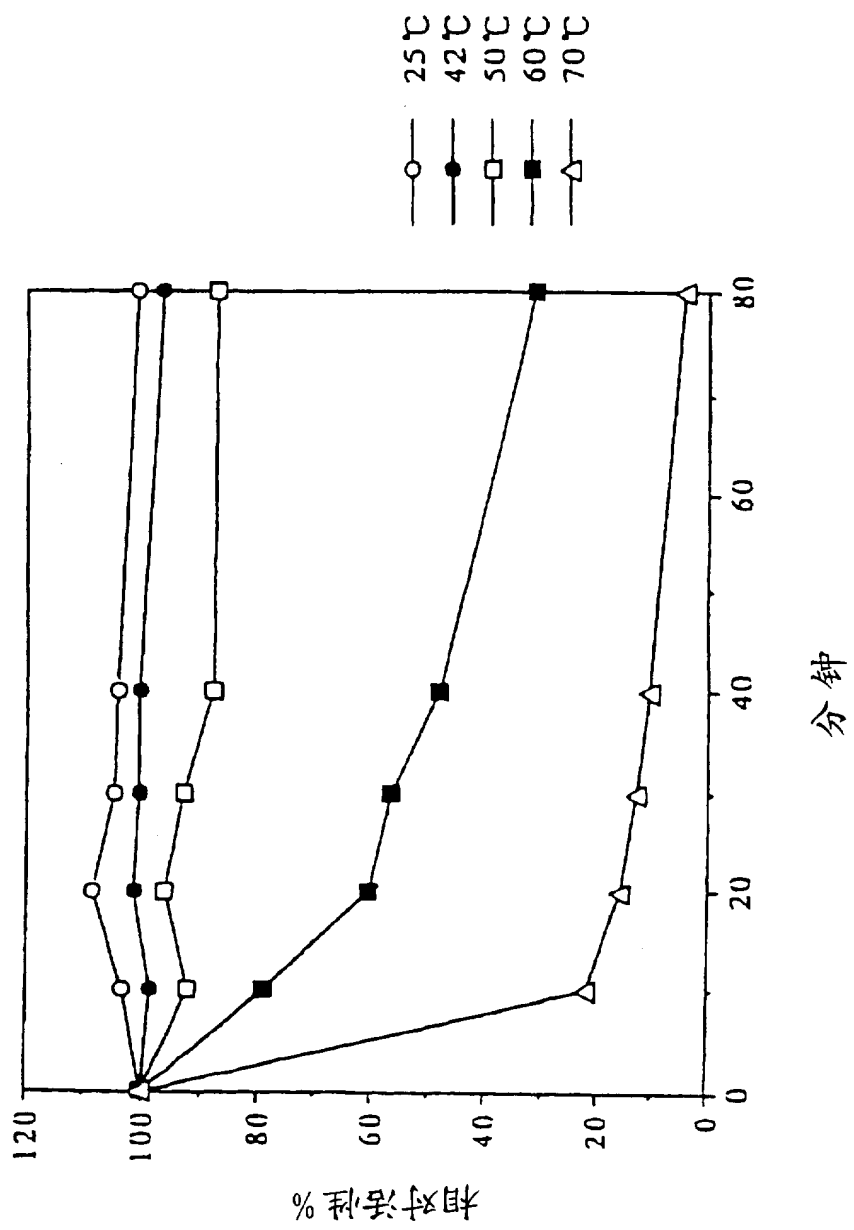
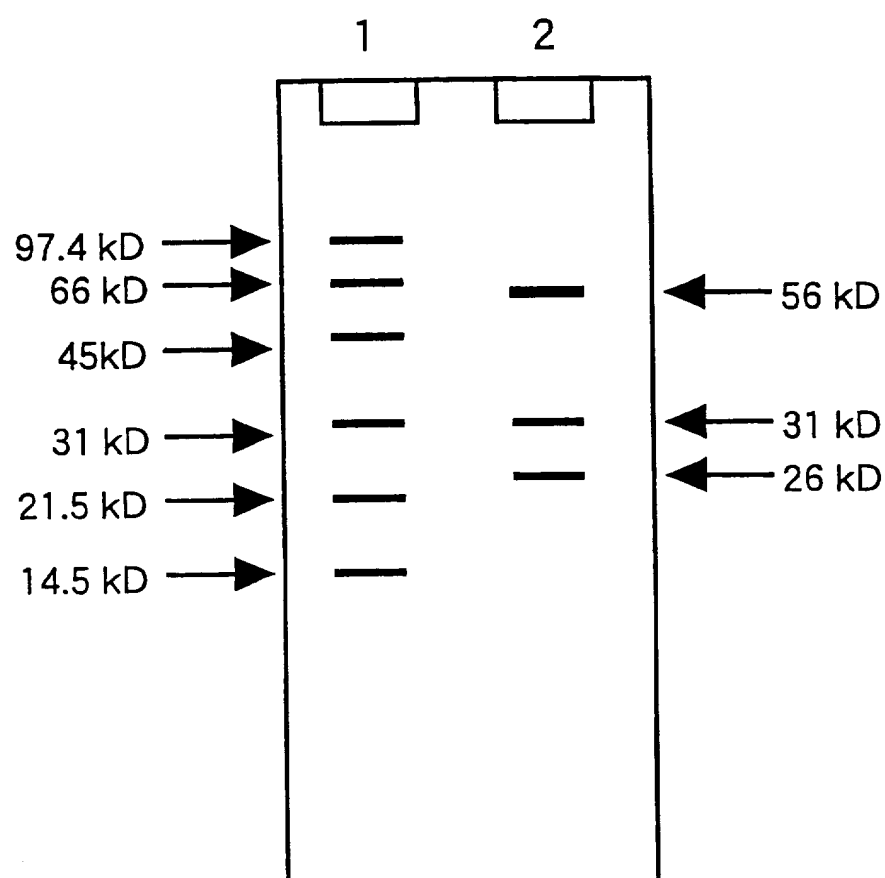
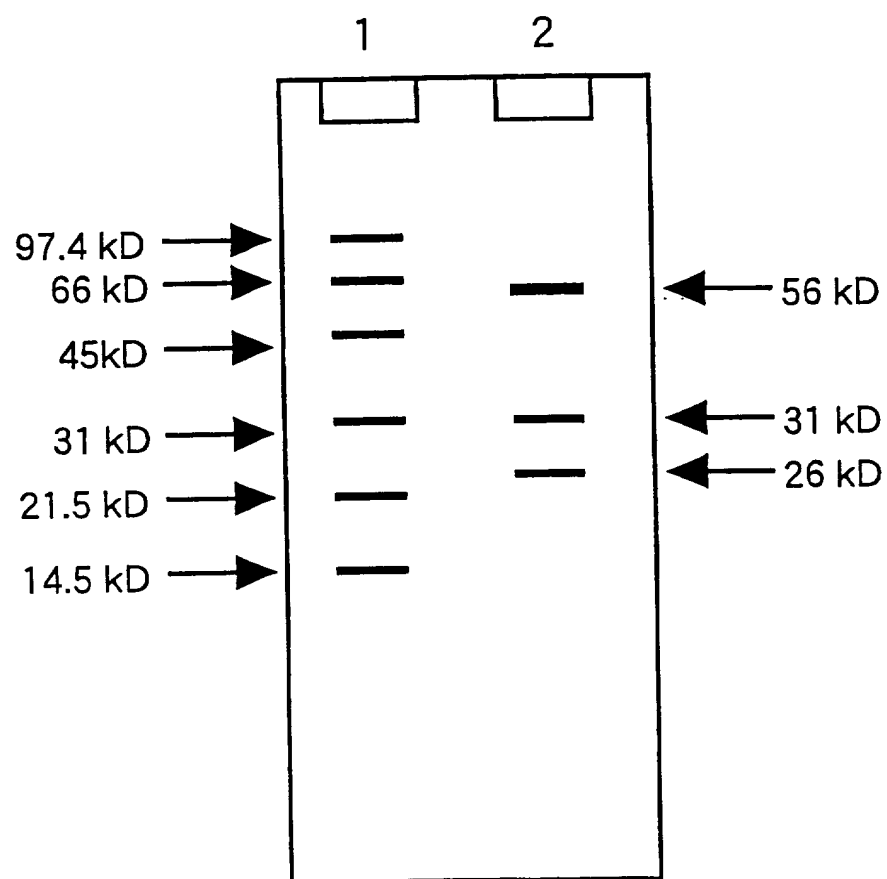


图 3



道 1: 分子量标记
道 2: 20 μg GX

图 4



道1: 分子量标记
道2: 20 μg GX

图 5

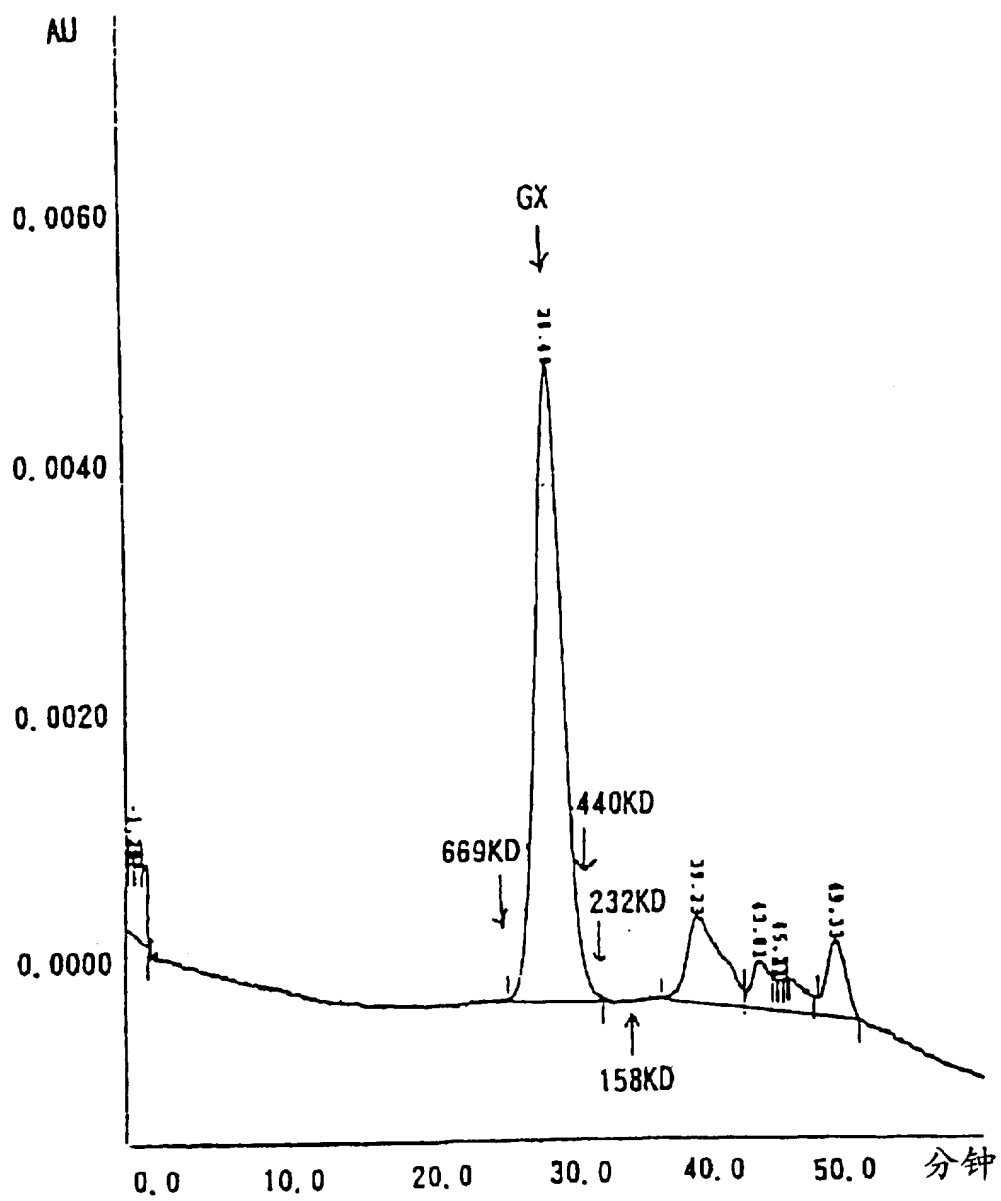


图 6

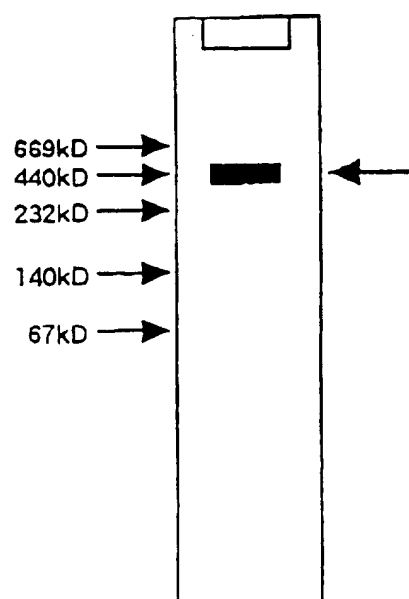


图 7

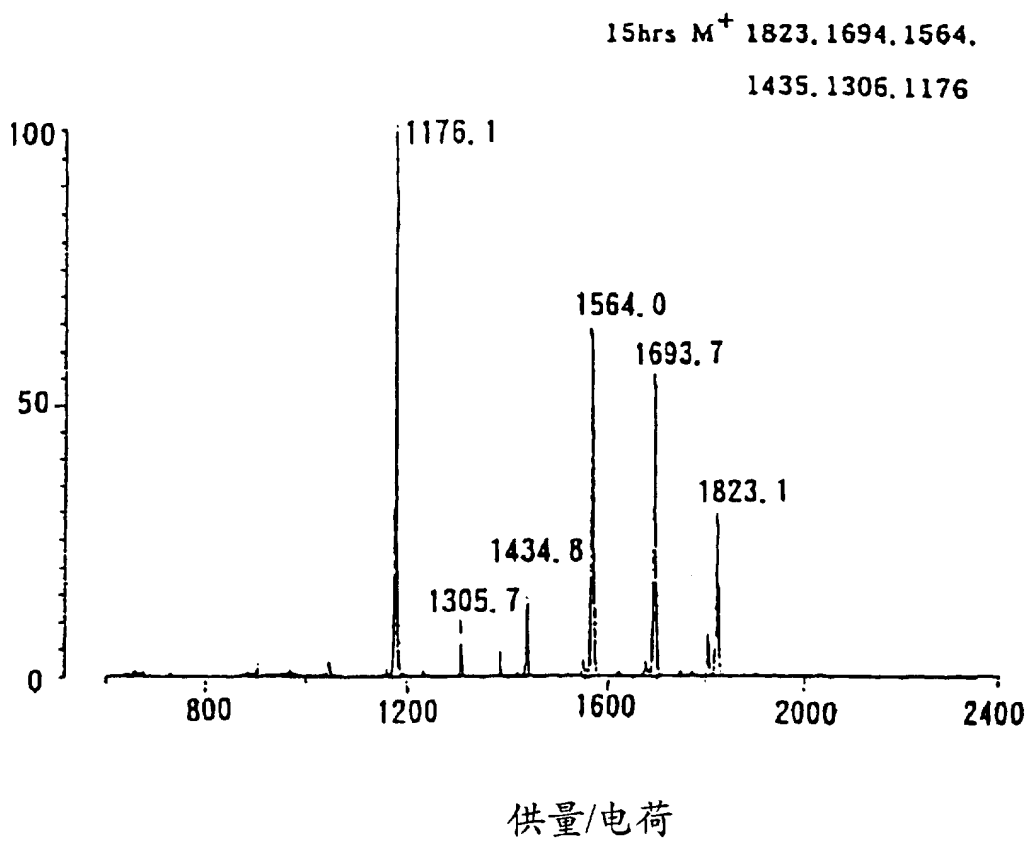
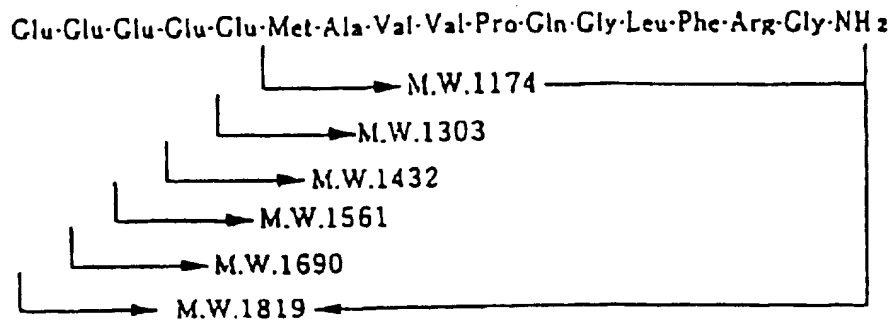


图 8

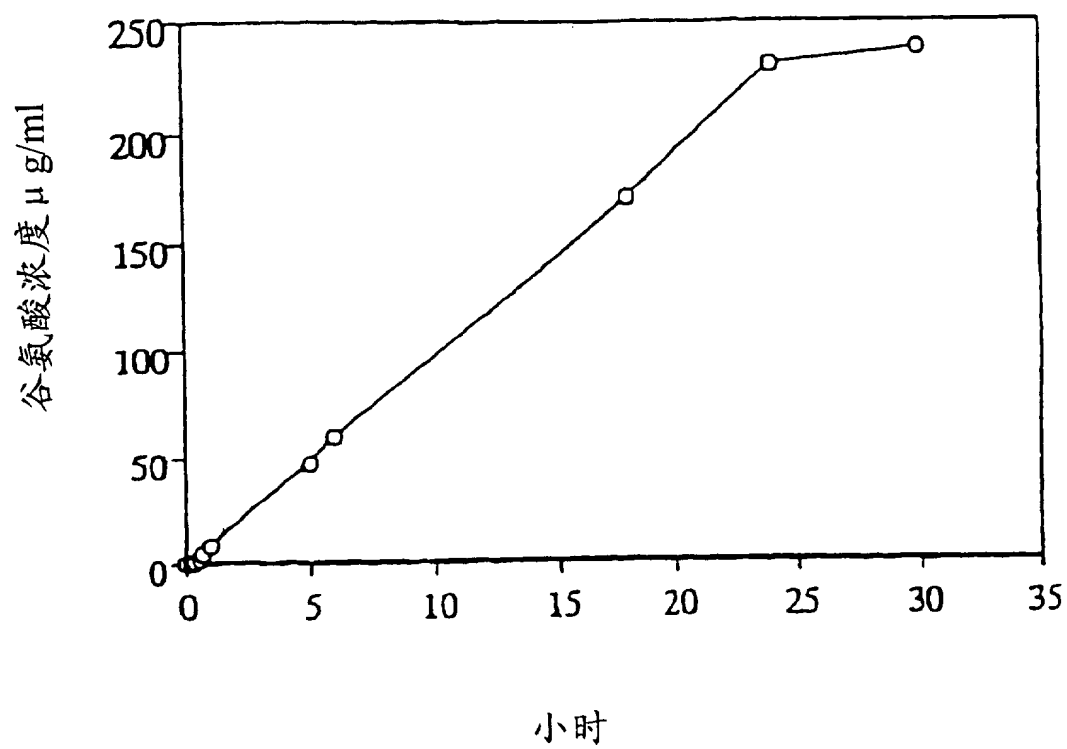


图 9

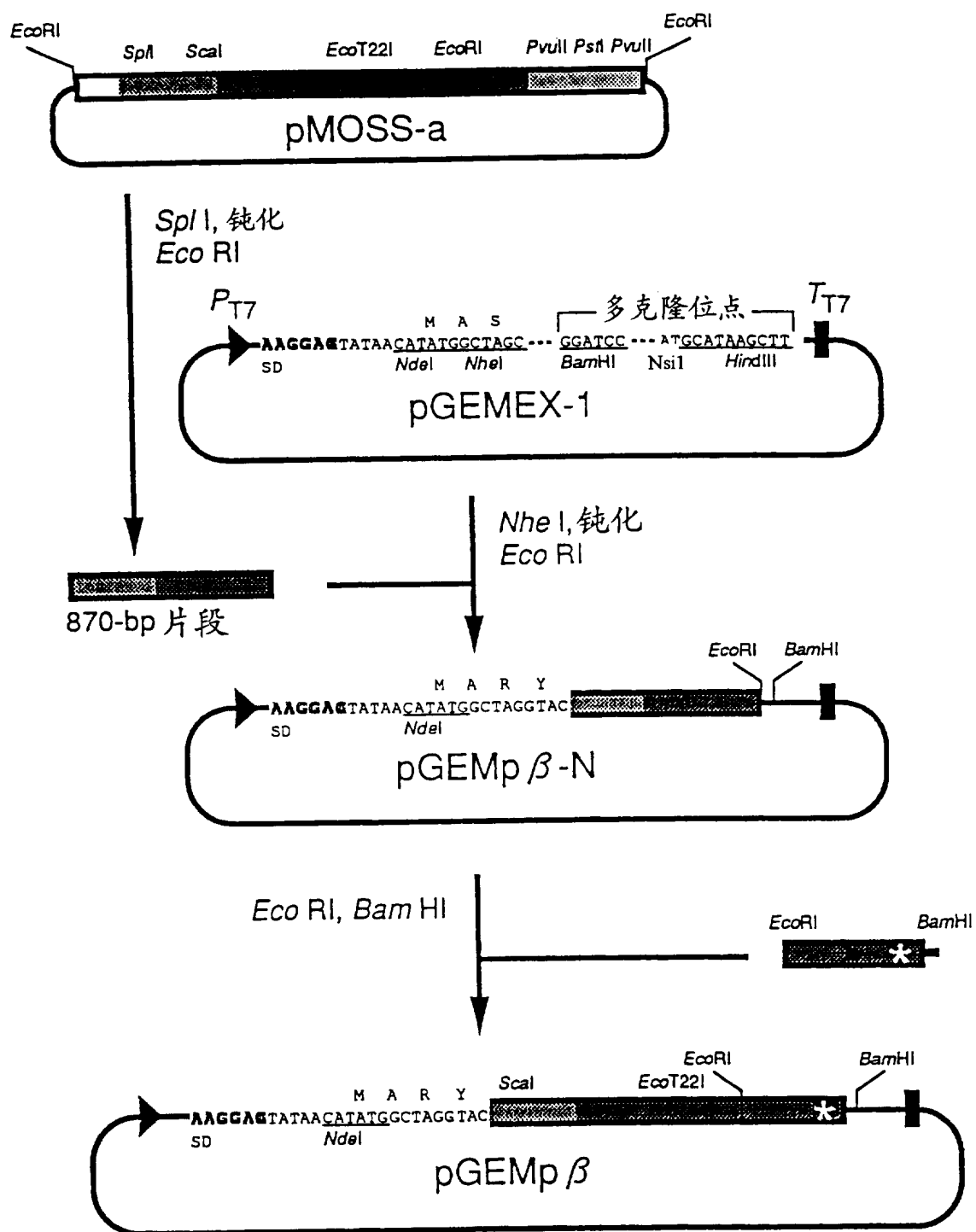


图 10

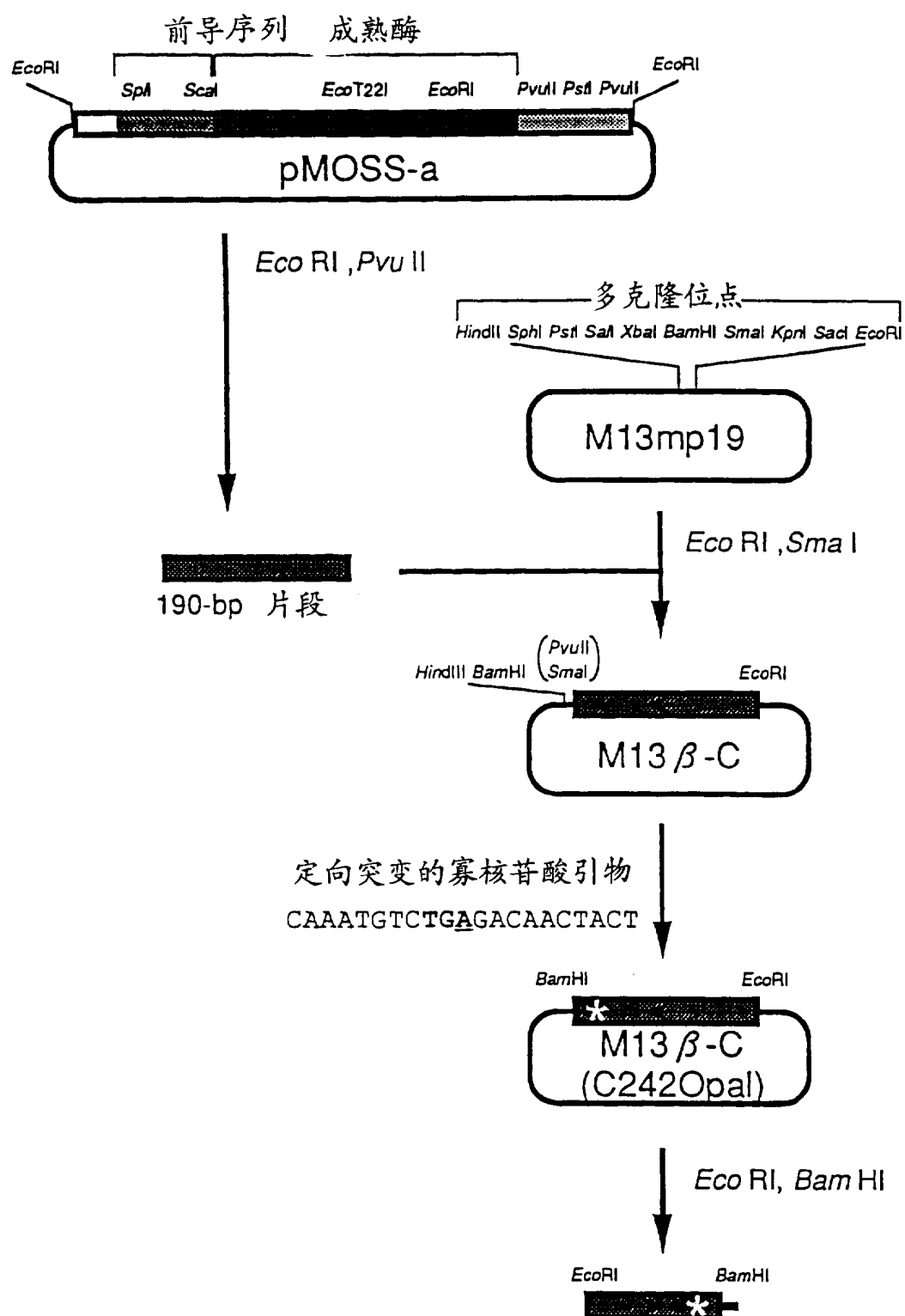
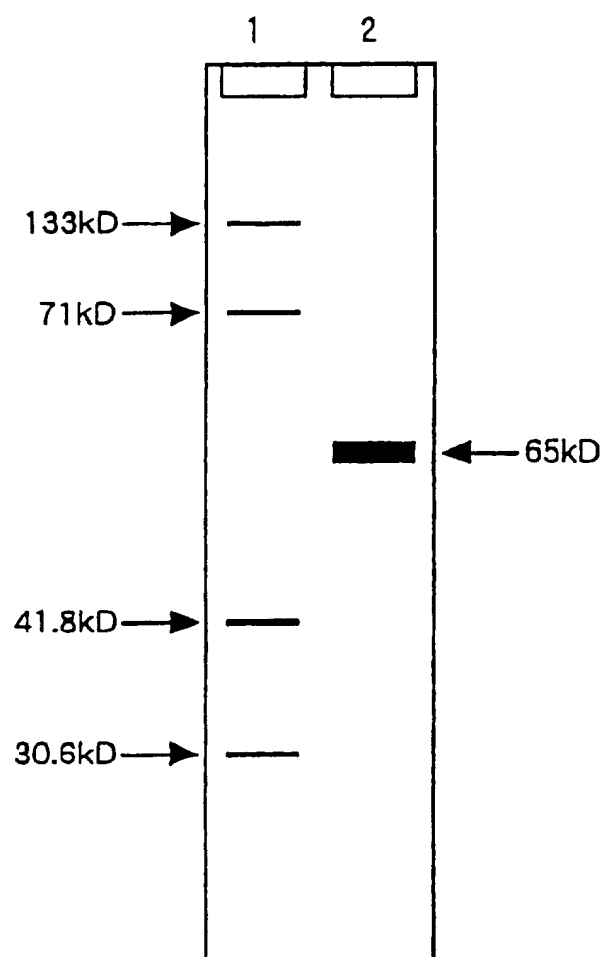
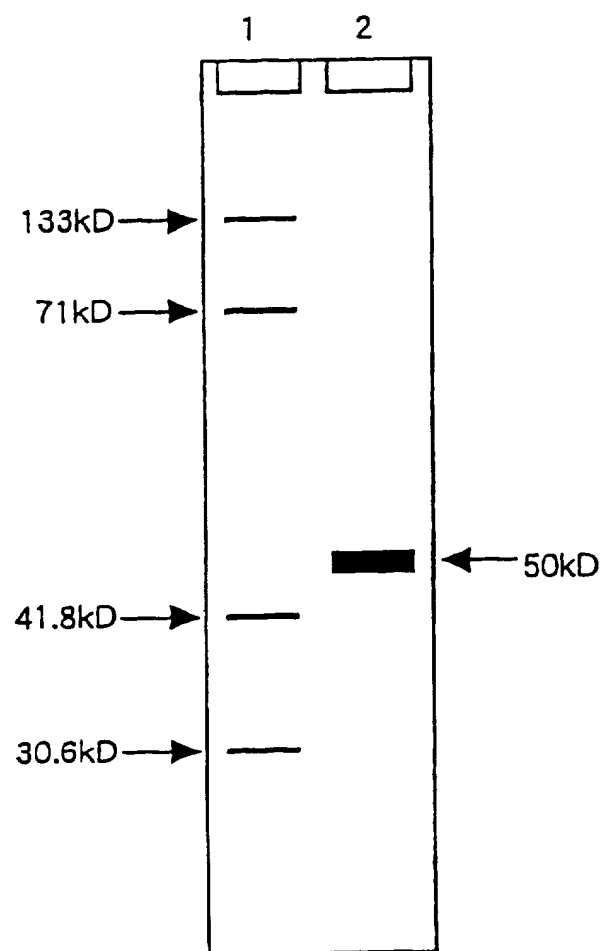


图 11



道 1 : 分子量标记
道 2 : DLAP1

图 12



道1:分子量标记
道2: DLAP 2

图 13

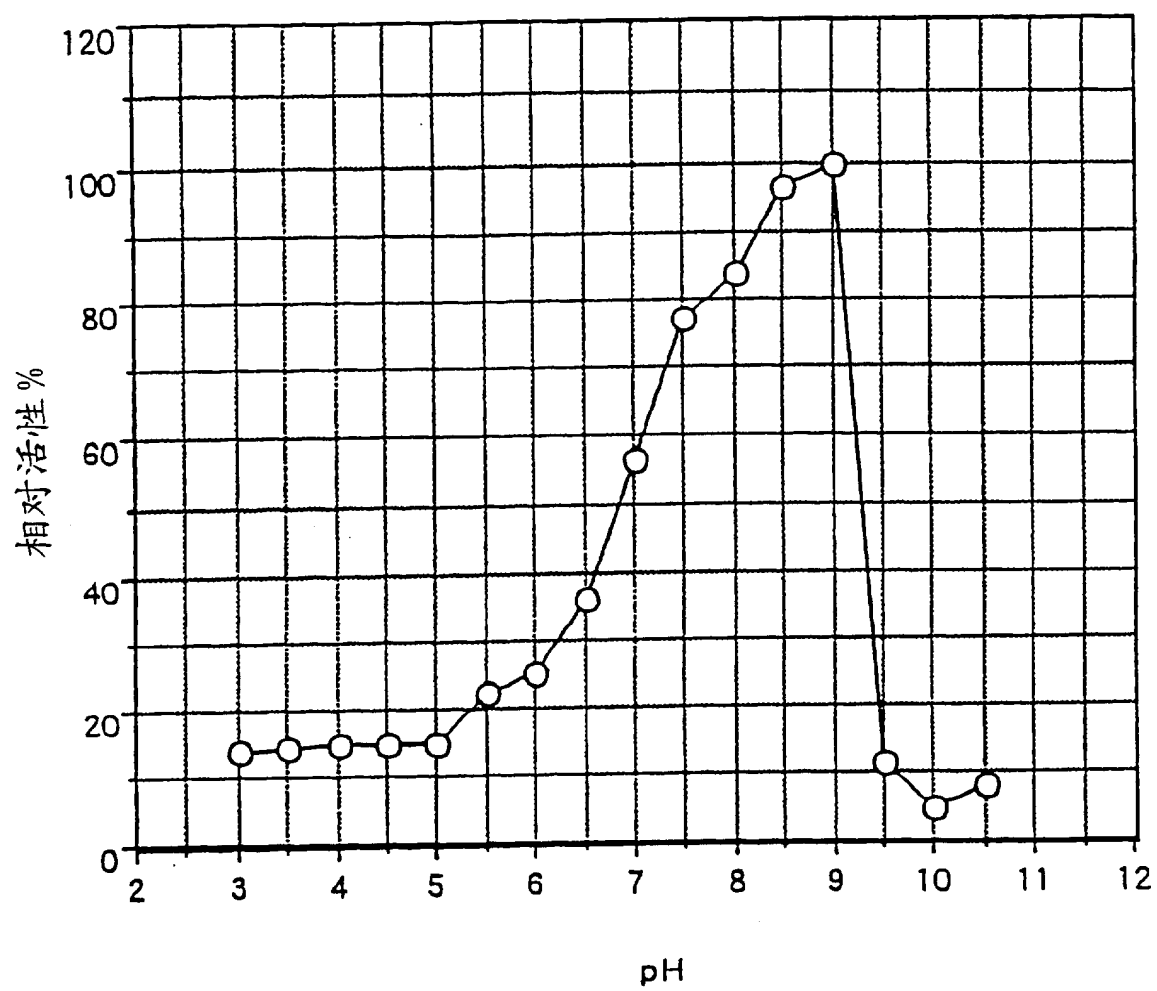


图 14

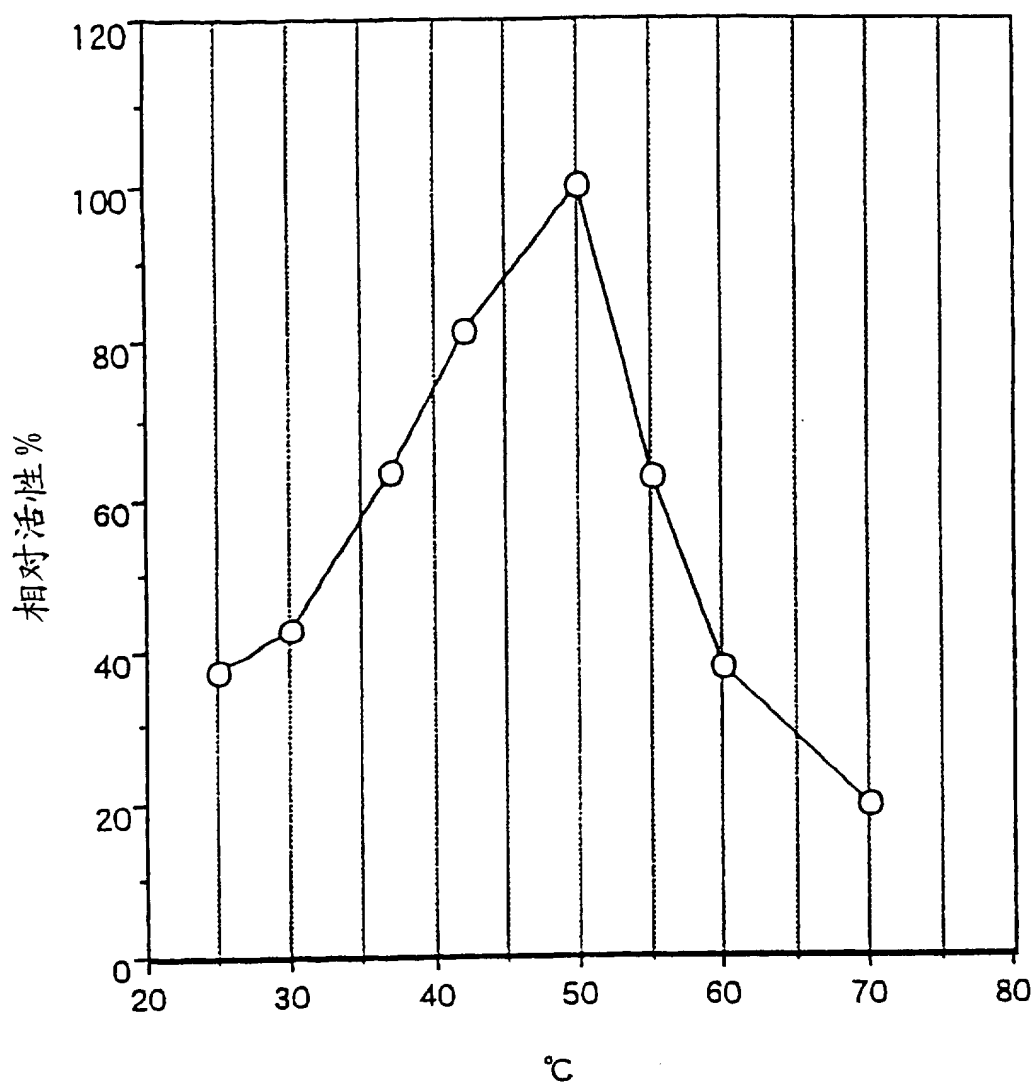


图 15

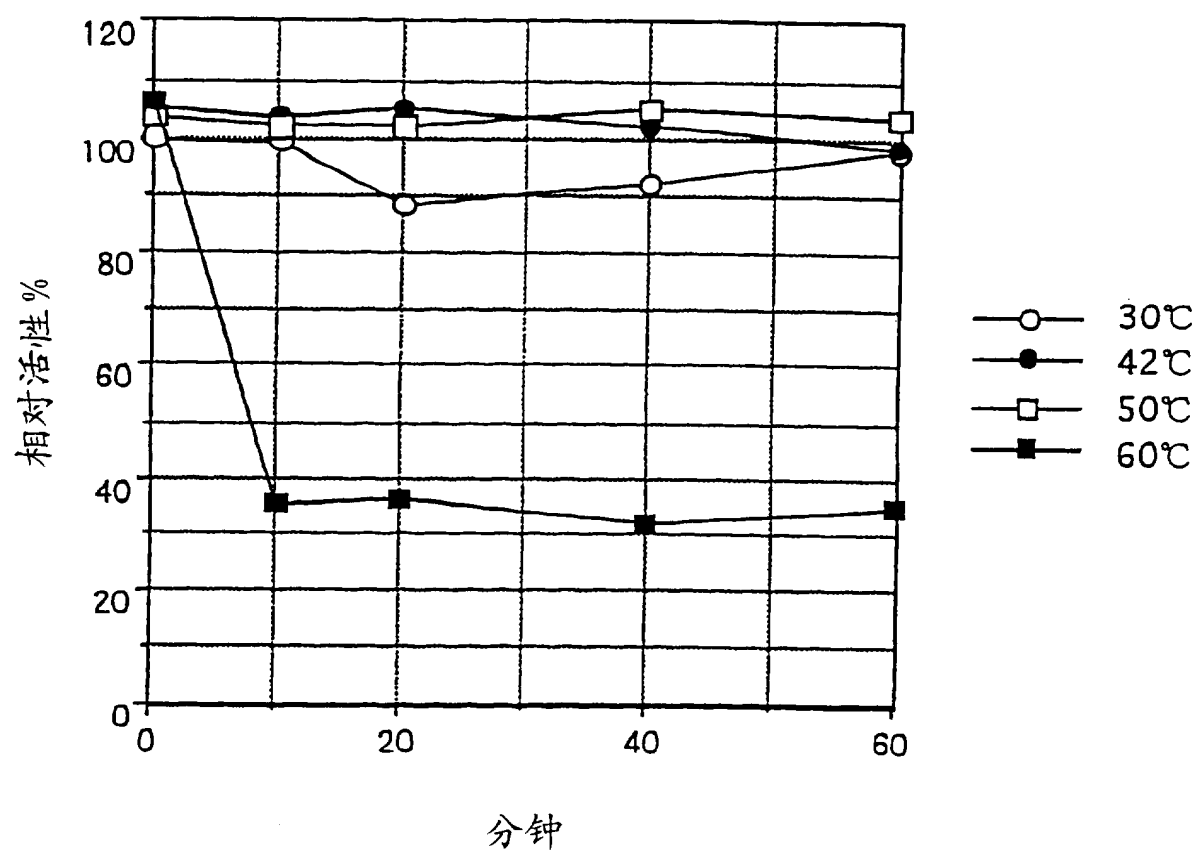


图 16

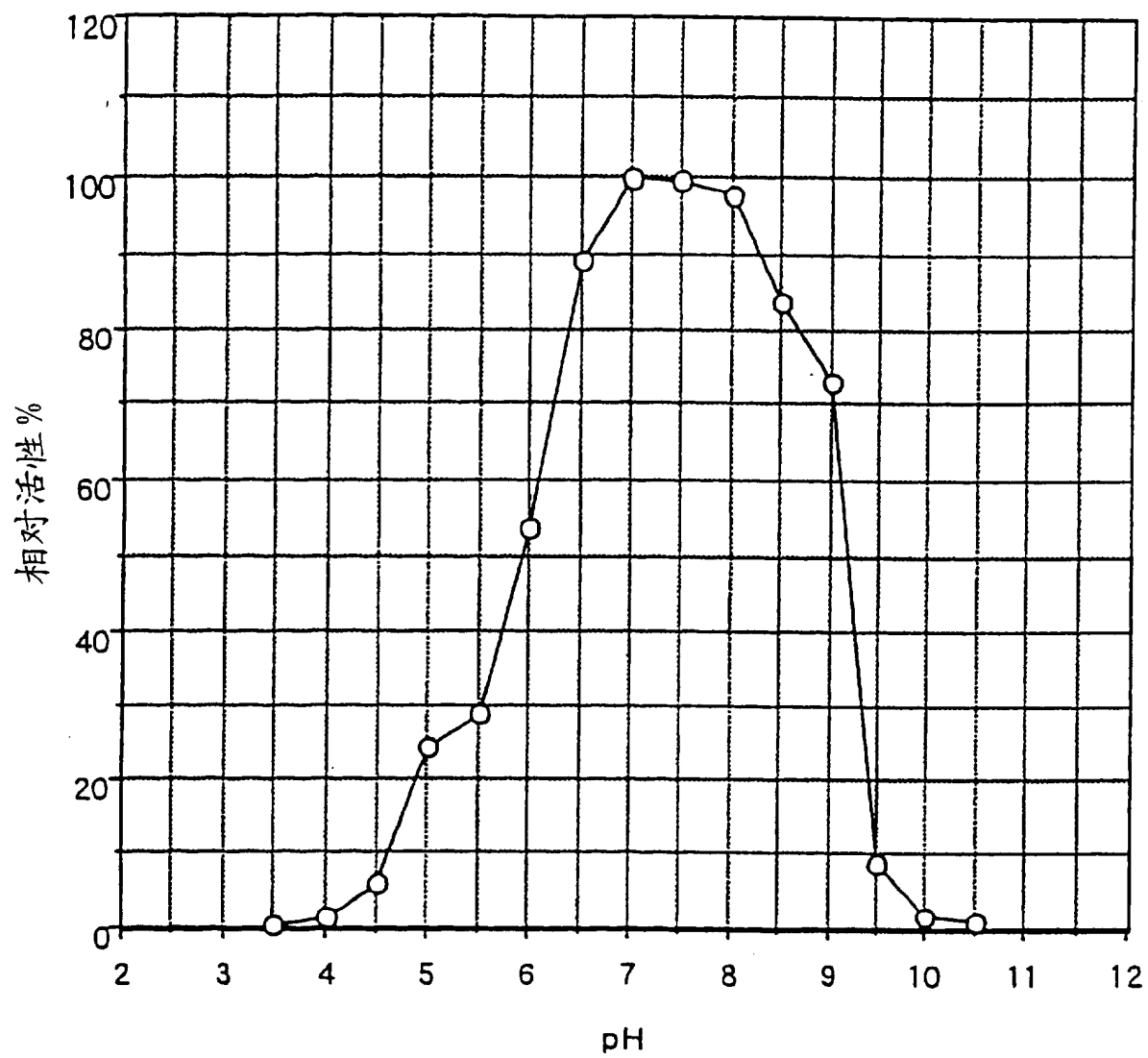


图 17

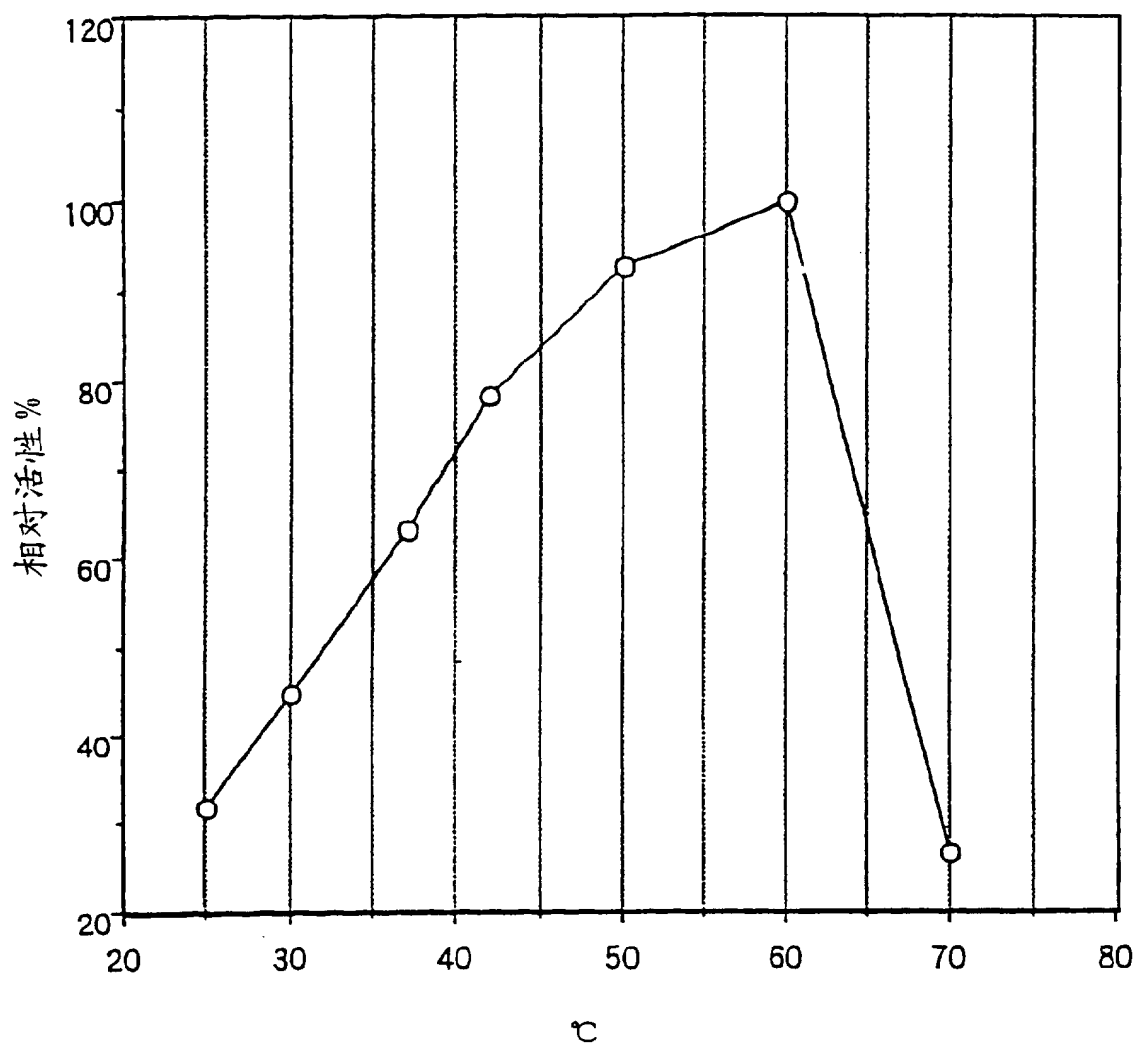


图 18