中国科学(B辑)
第25卷 第1期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1995年1月

氨基酰化酶分子中并不存在二硫键*

王洪睿 张彤 王泽峰 王希成 周海梦**

(清华大学生物科学与技术系，北京 100084;
中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室，北京 100101)

摘要 用NR/R双向对角线SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明氨基酰化酶分子中并不存在二硫键. MNP滴定氨基酰化酶的结果表明，酶分子中的10个半胱氨酸巯基有8个是可反应基团，另外2个内埋巯基在7mol/L盐酸胍溶液中被暴露出来，并可与MNP反应. DTNB测定的结果表明，酶分子中的10个半胱氨酸巯基有4个可反应巯基，6个DTNB所不能接触的巯基经7mol/L盐酸胍变性后，可以与DTNB作用. 两种巯基试剂测定的结果均表明氨基酰化酶分子中含总巯基数为10个. 这一数据与氨基酰化酶序列分析所得到的半胱氨酸残基数是一致的. 因此进一步证实了氨基酰化酶分子中确无二硫键的存在.

关键词 氨基酰化酶 二硫键 NR/R双向电泳 半胱氨酸巯基

酶分子中的二硫键的形成对于酶的结构、活性及稳定性的影响一直是人们所关心的问题. 氨基酰化酶分子中是否存在二硫键这个问题对于研究该酶的结构与功能是一个关键性的问题. Kördel等人早年曾报道，氨基酰化酶(N-Acylamino acid amido hydrolase, EC 3.5.1.14)是由两个相同的亚基组成的二聚体，分子量为85 500. 氨基酰化酶分子中有12个半胱氨酸残基，其中有4个是含有游离巯基的，另外8个形成了4对二硫键[1]. 这表明每个亚基中含有2个游离的半胱氨酸巯基和2对二硫键. Kördel等人的这一结果一直被广大研究者所接受并被广泛引用.

最近对氨基酰化酶的去折叠与再折叠进行深入的研究时，我们详细地研究了氨基酰化酶分子中的半胱氨酸巯基及巯基在催化中的作用，并试图考察二硫键的存在对酶去折叠与再折叠的影响. 因此我们分别用NR/R双向对角线SDS-PAGE电泳的方法和用MNP,DTNB等巯基试剂进行化学修饰的方法研究了酶分子中的半胱氨酸残基及二硫键的情况，发现酶分子中存在着10个半胱氨酸残基，全部为还原型的半胱氨酸巯基，分子中并无二硫键的存在。本文的结果显然不同于Kördel等人报道的结果.

1993-10-05收稿，1994-03-25收修改稿

* 缩写符号：NR/R——non-reduced/reduced; MNP——2-chloromercuri-4-nitrophenol; DTNB——5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); PAGE——polyacrylamide gel electrophoresis; SDS——soudium dodecyl sulfate

** 联系人

1 材料和方法

氨基酰化酶的制备用 Birnbaum 等人的方法[2]从新鲜猪肾中分离纯化得到丙酮分级后的酶制品，再按 Kördel 等人的方法[1]，经 Sephadex G-150 凝胶柱层析和 DEAE-Cellulose DE-52 离子交换柱进一步纯化．最后经 FPLC 层析后得到纯酶制品．经聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定均为一条带．经等速电泳鉴定为一个对称峰，FPLC 鉴定亦为一对称峰．

MNP 为 Aldrich 产品，DTNB 和盐酸胍均为 Sigma 公司产品，β-巯基乙醇为 Fluka 产品，脲晶体为 Baker 公司产品，N-氯乙酰-DL-丙氨酸为日本化成工业株式会社合成，对照所用的氨基酰化酶为 Sigma 公司产品，其它产品均为国产分析纯．

酶活力的测定除用 N-氯乙酰-DL-丙氨酸代替 N-氯乙酰-L-丙氨酸外，其余均按 Kördel 等人[1]的方法进行，在 238nm 处监测底物的水解速度，其摩尔消光系数为 185 (mol/L)$\cdot cm^{-1}$．酶浓度的测定采用紫外吸收法，测定其 280nm 处的光吸收值，并按消光系数 $E^{1\%}_{1cm}=13.5$[3] 进行计算得到．

NR/R 双向对角线 SDS-PAGE 参照 Wang 的方法[4]进行．第一向为 10% SDS-PAGE (16cm×16cm×1mm 板胶)，第一向样品处理液为 62.5mmol/L Tris-HCl, 10% 甘油，2% 的 SDS, pH6.8．第二向为 12% SDS-PAGE (16cm×16cm×1.5mm 板胶)，第二向样品处理液为在第一向处理液再加入 5% β-巯基乙醇．样品经第一向样品处理液处理 1h 后电泳．第一向电泳结束后，按加样孔切下胶条，置于第二向样品处理液中于室温下浸泡 90min，然后将胶条置于第二向胶上进行第二向电泳．第一向和第二向电泳均采用含有浓缩胶和分离胶的不连续电泳．

NR/R 单向 SDS-PAGE 在 Laemmli 方法[5]的基础上进行，即两份同一样品分别经还原(含 β-巯基乙醇)和非还原(不含 β-巯基乙醇)的样品处理液在室温下处理 1h，在同一块胶上进行 SDS-PAGE，并比较电泳结果．

MNP 和氨基酰化酶的反应很快，并在 395nm 处产生负差吸收，用 OD_{395nm} 可监测反应程度[6]．通常反应在几分钟内完成，因此可获得一定摩尔比的 MNP 修饰酶．MNP 修饰酶的差光谱测定：3ml 酶液于光径 1cm 的石英比色杯中，逐次加入适量 MNP，每次加入 MNP 后测 OD_{395nm} 至光吸收稳定，然后扫描光谱，可获得一系列不同摩尔比修饰的酶的差吸收光谱．加入 MNP 的总体积小于体系体积(3mL)的 2%．参比液除不含酶外，其余均同样品液．

可反应巯基和总巯基数的测定按 Ellman 方法[7]进行，测定 412nm 处光吸收的增加量，并按摩尔消光系数 13 600 $(mol/L)^{-1}\cdot cm^{-1}$ 进行计算．

紫外、可见光吸收的测定以及差光谱的测定均在 Kontron UVikon 860 型分光光度计上进行，测定温度为 25 ℃．电泳在 Bio-Red Model 3 000/300 电泳仪上进行．

2 结果

2.1 氨基酰化酶的 NR/R 双向和单向 SDS-PAGE

70 年代发展起来的 NR/R 双向对角线 SDS-PAGE[4]可以直观地分析出蛋白质分子内是否含有二硫键，以及二硫键存在于肽链间还是肽链内．图 1 为氨基酰化酶和某些标准蛋白质的 NR/R 双向 SDS-PAGE 图．从图 1 的结果可以看到无论是按本文方法纯化得到或从 Sigma

公司购买的氨基酰化酶都正好处于对角线上.

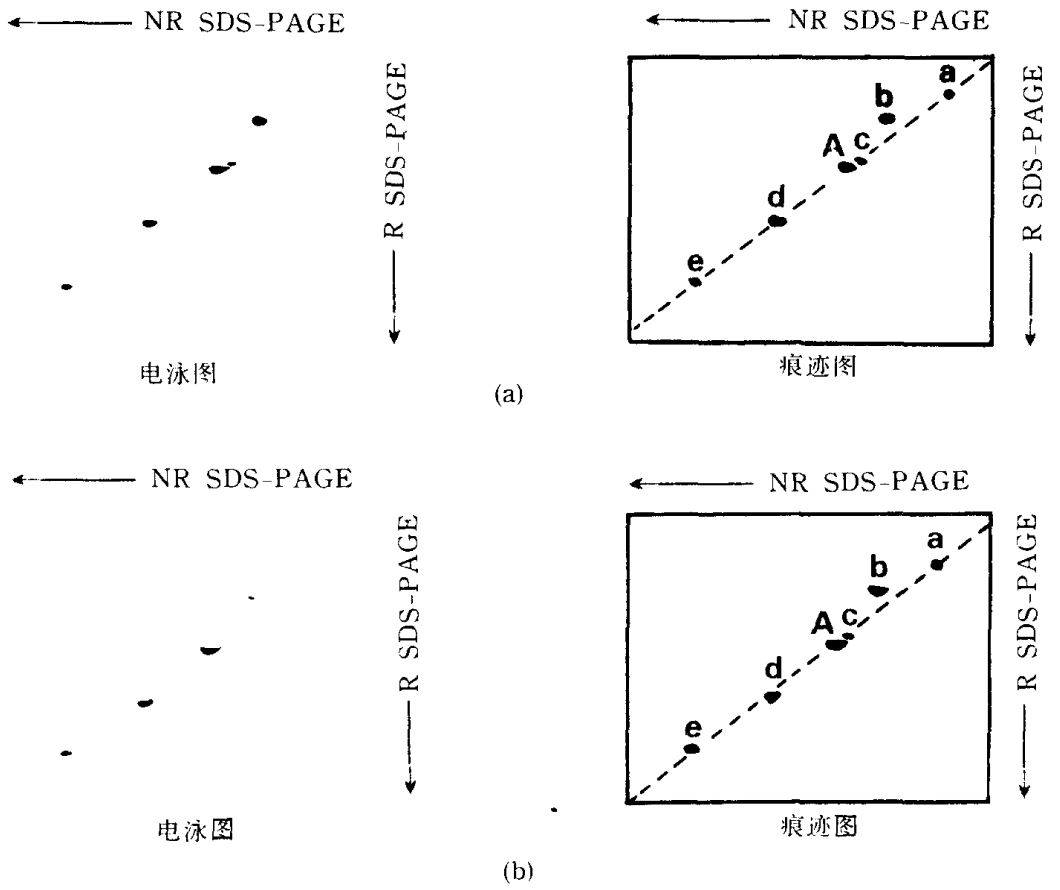

图 1 氨基酰化酶的 NR/R 双向 SDS-PAGE

电泳方向: 第一向 NR, 从右(负极)至左(正极), 第二向 R, 从上(负极)至下(正极); 样品: 分子量标准蛋白质: a为磷酸化酶, b为牛血清白蛋白, c为肌动蛋白, d为碳酸酐酶, e为TMV 外壳蛋白, A为氨基酰化酶; 虚线表示对角线位置; (a)为按本文方法纯化得到的酶, (b)为 Sigma 购买的酶

按照 NR/R 对角线 SDS-PAGE 判断: 既无链内又无链间二硫键的分子位于对角线上(两向电泳中分子迁移率相等), 存在链内二硫键的分子位于对角线上方(第二向泳动速度减慢), 而存在链间二硫键的分子由于被还原使肽链被拆开而变小, 泳动速度加快, 因此出现在对角线下方. 上述分子量标准蛋白质中只有牛血清白蛋白因含有链内二硫键而出现在对角线上方. 其它标准蛋白质不含二硫键, 均出现于对角线上. 氨基酰化酶正好出现于对角线上, 因此可以判明氨基酰化酶分子中不含二硫键.

图 2 为氨基酰化酶和分子内含有 4 对二硫键的核糖核酸酶 A 的 NR/R 单向 SDS-PAGE. 从图 2 的结果可以清楚地看到经 NR 和 R 处理的氨基酰化酶经 SDS-PAGE 后出现于同一迁移距离位置上(即 NR 与 R 的迁移率相等), 而核糖核酸酶 A 的 NR 的迁移距离明显大于 R 的迁移距离(即 NR 的迁移率大于 R). 图 2 的结果也表明氨基酰化酶分子中并无二硫键的存在.

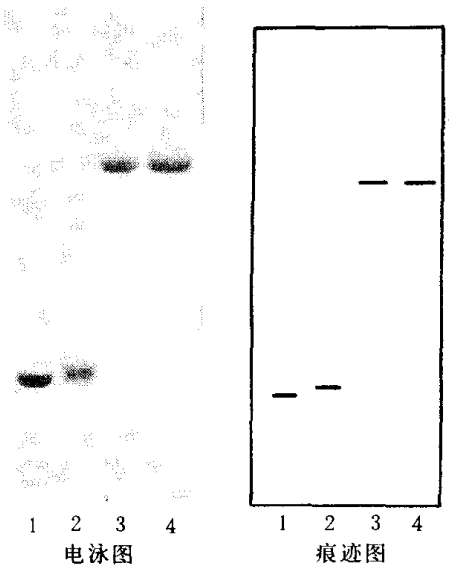

图2 氨基酰化酶和核糖核酸酶A的NR/R单向SDS-PAGE
1—核糖核酸酶A, NR; 2—核糖核酸酶A, R; 3—氨基酰化酶, NR; 4—氨基酰化酶, R; 电泳条件: 12.5%分离胶, 3.75%浓缩胶, 恒电流25mA, 泳动3h

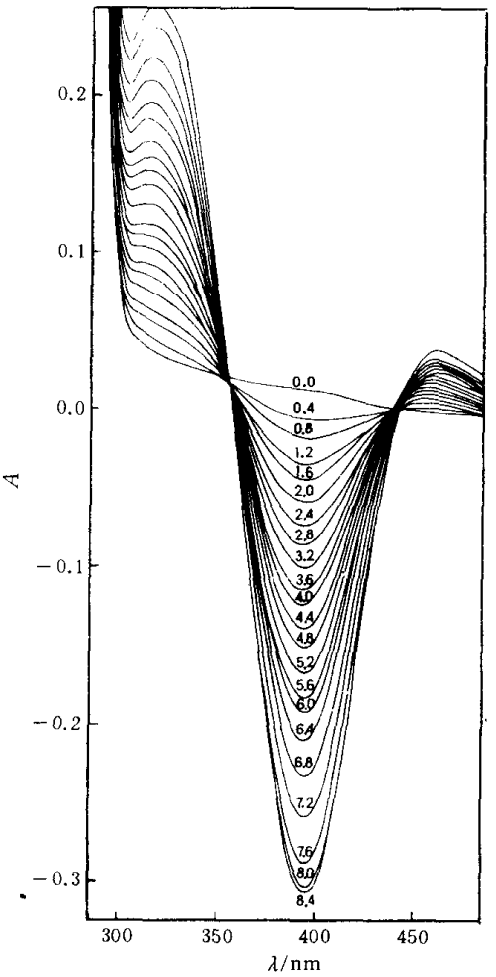

图3 用MNP滴定天然氨基酰化酶时的差吸收光谱
酶被溶解于0.1mol/L磷酸盐缓冲液中, pH7.2, 酶浓度为15.5μmol/L; 图中的数字表示MNP/酶的分子比

2.2 MNP滴定氨基酰化酶的差吸收光谱及对酶活力的抑制作用

图3为MNP滴定氨基酰化酶时的差吸收光谱, 从图3中可以看到, 随着MNP/酶的增大, 在395nm处的负差吸收峰增大, 直至MNP/酶 =8时负差吸收峰达到最大值. 继续增加MNP滴定量, 负差吸收峰不再进一步增大. 这一结果表明氨基酰化酶对MNP有8个可反应疏基.

从395nm的负差吸收变化可以得到不同的修饰程度, 并测定了对应的剩余活力. 图4为酶的剩余活力分数 a 对MNP修饰酶的修饰的残基数 m 作图. 从图4的结果可见, 这是属于邹承鲁作图法[8]中的第二种情况, 即试剂作用的同类基团X中必需基团和非必需基团速度远为不同. 从图中的数据我们可以求得, 对于每一个亚基而言, 反应最快的基团 $s=3$, 反应较慢的基团数 $p=2$(包括其中一个几乎不能反应的内埋较深的基团), 其中必需基团 $i=1$. 因此对于整个酶分子来讲必需基团数目是2.

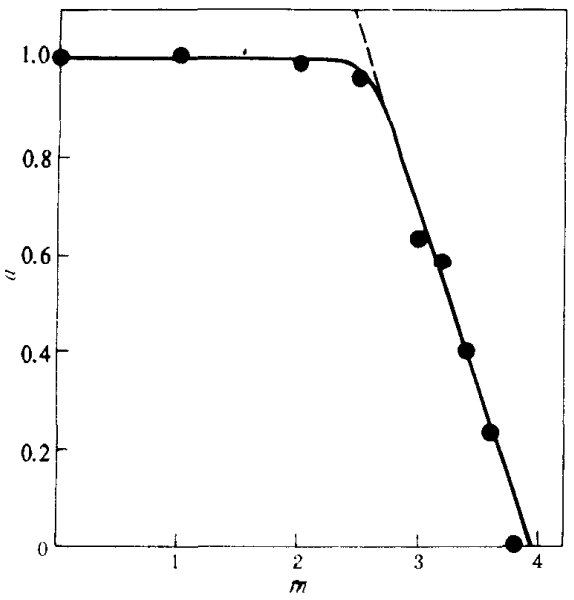

图4 氨基酰化酶剩余活力分数和被MNP修饰的基团数之间的关系

a——活力剩余分数，m——每个亚基上被修饰的基团数

3 讨论

最近在研究氨基酰化酶的去折叠与再折叠时发现氨基酰化酶在6mol/L脲溶液中和70 ℃以上条件下热变性时伸展是不完全的，具有部分的残余有序结构[10,11]. 因此探讨引起这些残余结构的因素对于研究该酶的折叠问题是很重要的. Kördel等人[1]早年的工作表明氨基酰化酶分子中有12个半胱氨酸巯基(氨基酸组成分析结果)，其中有4个是以还原的游离巯基状态存在，另外8个以氧化形式形成了4对二硫键. 本文的实验结果表明氨基酰化酶分子中所含总巯基数为10个. 这一结果与最近发表的猪肾氨基酰化酶的氨基酸序列[9]完全吻合. 因此可以认为氨基酰化酶的每一个亚基有5个半胱氨酸残基，而且都是以游离巯基的形式存在的，没有二硫键的存在. NR/R双向对角线SDS-PAGE和NR/R单向SDS-PAGE的结果均表明该酶分子内确无二硫键的存在. 本文的结果与Kördel等人的结果显然不同，我们认为首先Kördel等人的早期测定的氨基酰化酶结果(每个分子含12个半胱氨酸残基)与目前得到的序列[9]结果(10个半胱氨酸残基)不相吻合；其次，Kördel等人虽用多种巯基试剂研究了酶的半胱氨酸巯基的作用，但在确定半胱氨酸和胱氨酸数目时，他们主要只用了一种巯基试剂，即乙烯基吡啶(Vinylpyridine). 而我们用电泳和几种化学修饰的方法都表明酶分子中确无二硫键的存在，这个重要的结构信息，对于进一步研究该酶的结构与功能，特别是研究其折叠的机制具有重要的意义. 此外MNP对氨基酰化酶的抑制作用的研究结果表明酶分子的半胱氨酸巯基是酶活性的必需基团，而且每个酶分子中只有2个对酶的活性是必需的. 这一结果与我们过去报道的是完全一致的[12,13].

2.3 氨基酰化酶的总巯基数的测定

分别用Ellman试剂和MNP测定了氨基酰化酶的可反应巯基数和总巯基数，结果列于表1中. 从表1的结果可以清楚地看到到酶分子中NMP可接触到并发生反应的巯基数是8个，而DTNB可接触到并发生反应的巯基数是4个，这可能是由于DTNB分子较大，并且带有负电荷，因此某些内埋较浅的基团由于空间位阻作用或电荷效应而不能发生反应. 然而无论用那种方法测定它的总巯基数，结果都得到10个，这一结果与氨基酰化酶的氨基酸序列表明的结果[9]是一致的. 因此可以认为氨基酰化酶分子中的10个半胱氨酸残基都是处于还原状态，并无二硫键的存在.

表1 氨基酰化酶的可反应巯基数和总巯基数

试 剂	可反应巯基数	总巯基数
MNP	8.0	10.6[a)]
DTNB	4.0	10.4[a)]
		9.6[b)]

a) 在7mol/L盐酸胍溶液中变性1h后测定的结果

b) 在8mol/L脲溶液中变性1h后测定的结果

致谢　本文的研究工作是在邹承鲁教授的指导下进行的，在此表示衷心的感谢.

参　考　文　献

1 Kördel W, Schneider F. Chemical investigations on pig kidney. Biochim Biophys Acta, 1976, 445: 446～457

2 Birnbaum S M. Aminoacylase, amino acid acylase I and II from hog kidney. Methods in Enzymology, 1955, 2(12): 115～119

3 Kördel W, Schneider F. Chemical modification of two tryptophan residues abolishes the catalytic activity of aminoacylase. Hoppe-Seyter's Z Physiol Chem, 1976, 357(8): 1 109～1 115

4 Wang K, Richards F M. Approach to nearest neighbor analysis of membrane proteins. Application to the Human erythrocyte membrane of a method employing cleavable crosslinkages. J Biol Chem, 1974, 249: 8 005～8 018

5 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature, 1970, 227: 680～685

6 Quiocho F E, Thomoson J W. Substrate binding to an active creatine kinase with a thiol-bound mercurinitrophenol chromophoric probe. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 71: 2 858～2 862

7 Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys, 1959, 82: 70～77

8 Tsou C L. Quantitative relation between modification of functional groups of protein and biological activity. Sci Sin, 1962, 11: 1 535～1 558

9 Mitta M, Ohnogi H, Yamamoto A *et al*. The primary structure of porcine aminoacylase I deduced from cDNA sequence. J Biochem, 1992, 112: 737～742

10 王洪睿，王希成，张　彤等. 氨基酰化酶在脲溶液中变性时构象变化速度与失活速度的比较研究. 中国科学，B辑，1994, 24(7): 710～716

11 何　飚，严　明，张　彤等. 氨基酰化酶热变性时失活与构象变化的比较研究. 科学通报，1994, 39(7): 656～659

12 周海梦，王希成. 氨基酰化酶I的必需半胱氨酸巯基. 生物化学杂志，1991, 7(6): 702～706

13 Wang H R, Yin Y, Zhang Y X *et al*. Kinetics of inactivation of aminoacylase I during modification of its thiol groups by DPDS and PCMB. Science in China, Series B, 1993, 36(1): 52～59