

番麻蛋白酶活性中心基团的初步研究

徐凤彩 项金荣 汪炬 李明启
(光合作用研究室)

摘要 在不引起酶变性的条件下,用半胱氨酸(Cys)专一性化学修饰试剂碘乙酸、对氯汞苯甲酸(p CMB)、5, 5'-二硫双硝基苯甲酸(DTNB)对酶分子进行化学修饰后,酶活性显著下降。发现酶的失活程度与修饰剂浓度间存在着化学计量关系;同时底物(酪蛋白)对酶活性有明显的保护作用。说明被修饰的部位(Cys残基)是酶的活性中心基团。Cys对酶有明显的激活作用;同时, p CMB、DTNB、碘乙酸对酶活性有明显的抑制作用;被 p CMB抑制或 O_2 氧化而失活的酶溶液,又可用Cys重新激活,而恢复其活力,进一步证明其活性中心存在着Cys残基。以上事实均与典型的植物巯基蛋白酶——木瓜蛋白酶一致,说明番麻蛋白酶是一种巯基蛋白酶,其活性中心存在着Cys。

关键词 巯基蛋白酶; 半胱氨酸; 活性中心

蛋白酶种类繁多,为此1979年国际生化协会命名委员会公布,按它们的催化机理分为4大类:丝氨酸蛋白酶类、巯基蛋白酶类、羧基(酸性)蛋白酶类及金属蛋白酶类^[1]。在植物中已知木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶为巯基蛋白酶^[1]。龙舌兰麻蛋白酶的研究始于1964年Tipton的工作^[10],他报告在剑麻(*Agave sisalana*)叶片中含有几个蛋白酶组分,其中一个组分中含有 Fe^{2+} 辅基^[11]。1976年Du Toit^[7]从金边龙舌兰(*Agave americana variegata*)叶片中分离得到一种碱性丝氨酸蛋白酶。孙崇荣等从“东一号”剑麻(*A. hybrid No. 11648*)叶片中分离出一种巯基蛋白酶^[1,2]。这些情况表明,同为龙舌兰科(Agavaceae)、龙舌兰属(*Agave*)的不同种植物中的蛋白酶的性质相差甚远,为此,我们对番麻蛋白酶的活性中心作了初步研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

番麻*, 采自校园内生长良好的成熟叶片。

木瓜蛋白酶,我室制备,活力为60万 Tyr μ g/g 单位(粗酶)。

酪蛋白(进口分装)、考马斯亮蓝 G-250(进口分装)、对氯汞苯甲酸(p CMB,进口分装)、5, 5'-二硫-双硝基苯甲酸(DTNB,上海生化所)、半胱氨酸(Cys)及碘乙酸(均为上海生化制药厂产品)等所用试剂均为生化试剂或分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 番麻蛋白酶粗酶制剂制备 取成熟番麻叶片洗净切碎,加入30%(V/V)冷乙醇匀浆,四层纱布过滤,离心(3 500 rad/min, 20 min, 常温),于上清液中加-15℃冷乙醇至70%

1991-02-07 收稿

* 经我校植物教研室徐祥浩、吴万春教授鉴定。

浓度, 置冰箱过夜, 次日置布氏斗上快速抽干并用 -20°C 冷丙酮脱水干燥, 得白色粉末, 即为粗酶制剂。

1.2.2 番麻蛋白酶的纯化 Sephadex G-50 层析柱 ($3.0\text{ cm}\times 24\text{ cm}$) 先用 0.05 mol/L pH6.5 磷酸缓冲液平衡。称取粗酶 1 g 加入 pH7.8 上述缓冲液研磨提取并定容至 10 ml , 离心 ($15\ 000\text{ g}$, 30 min , 4°C), 取上清液 (酶活力 $1\ 948\text{ U/ml}$, 蛋白质含量为 5.215 mg/ml) 4 ml 上柱。用上述缓冲液洗脱, 蠕动泵恒流 (1.25 ml/min), 自动部分收集器收集, 洗脱至洗脱液中不呈酶活性。共收集 48 支管, 240 ml 。其蛋白质含量为 0.0435 mg/ml , 酶活力为 369.25 U/ml , 酶被纯化了 50.29 倍。

将上述洗脱液低温真空浓缩到 21 ml , 离心 ($15\ 000\text{ g}$, 30 min , 4°C), 取上清液 (蛋白质含量为 0.245 mg/ml , 酶活力为 511 U/ml) 3 ml , 上 Sephadex G-75 层析柱 ($1.5\text{ cm}\times 15\text{ cm}$), 层析柱处理同上, 并同样洗脱至洗脱液不呈酶活性, 共收集 40 ml , 其蛋白质浓度为 0.028 mg/ml , 酶活力为 353.8 U/ml , 酶被纯化了 74.85 倍。

1.2.3 结晶 将上述洗脱液低温真空浓缩到 10 ml , 蛋白质浓度为 0.91 mg/ml 左右, 加入 Cys, 使其终浓度为 5 mol/L , 置冰箱, 5 天后离心 ($20\ 000\text{ g}$, 40 min , 4°C) 收集结晶, 并用 5 ml pH7.8, 0.05 mol/L 磷酸缓冲液溶解, 蛋白质浓度为 0.088 mg/ml , 酶活力为 $1\ 560\text{ U/ml}$, 酶被纯化 105 倍。此酶液立即用于分析测定。

1.2.4 酶活力测定 依 Kunitz^[3] 的方法, 以酪蛋白为底物。0.1 ml 酶液, 加入 0.9 ml 激活剂 (pH7.8 0.05 mol/L 磷酸缓冲液内含 0.02 mol/L Cys 及 0.001 mol/L EDTA, 现配现用, 下同), 37°C , 保温恒定后, 加入同样预热的 1% 酪蛋白溶液 (W/V, 上述缓冲液配制) 1 ml , 37°C , 准确反应 10 min , 加入 3 ml 三氯乙酸 (TCA) 溶液 (内含 0.11 mol/L TCA, 0.22 mol/L NaAc, 0.33 mol/L HAC) 终止反应。对照先加 TCA, 后加底物, 其余同测定管。离心 ($5\ 000\text{ rad/min}$) 或过滤, 上清液于 275 nm 波长下测定 OD 值。

在上述条件下, 每增加 0.01 个光吸收单位为 1 个酶活性单位 (U)。

1.2.5 蛋白质含量测定 按 Bradford^[4] 方法。

2 实验结果

2.1 Cys 的激活作用

用 0.1 ml 酶液加入 0.9 ml 激活剂, 分别激活 0, 5, 10, 15, 20 min 后, 测定酶活力。以同样处理不加激活剂 (代之以缓冲液) 的酶活力作为对照, 结果如图 1。从图 1 可见, Cys 对番麻蛋白酶具有强烈的激活作用, 在相同的 Cys 浓度下, 随着激活时间的延长, 激活作用越强烈, 激活 25 min 后, 其酶活力为此时未被激活的酶活力的 1.8 倍。

2.2 pCMB 的可逆抑制作用

实验分为 2 个处理。处理 1: 0.1 ml 酶液分别加入 0.5 ml 不同浓度的 ($0\times$, $2\times$, $4\times$, $6\times$, $8\times$, $10\times$, $12\times 10^{-6}\text{ mol/L}$) 的 pCMB 溶液 (以 0.05 mol/L pH7.8 磷酸缓冲液配制) 和 0.4 ml 缓冲液 (同上), 37°C , 抑制 20 min 后, 测定酶活力; 处理 2: 0.1 ml 酶液加入 0.5 ml

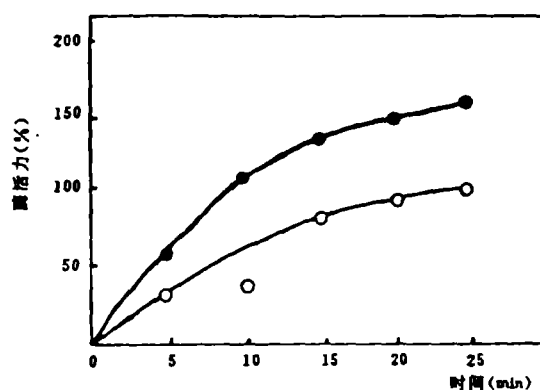


图1 Cys 对番麻蛋白酶的激活作用
(酶活力为 $1\ 560\text{ U/ml}$, 酶蛋白为 0.088 mg/ml)

●—● Cys 激活 (20 mol/L),
○—○ 未经 Cys 激活。

不同浓度(同上)的 p CMB 浓液, 37°C , 抑制 20 min 后, 再加入 0.4 ml 激活剂, 同样测定酶活性. 同时以不加 p CMB 的酶活力为 100%, 对木瓜蛋白酶以同样处理作比较, 结果如图 2. 从图 2 可见, 番麻蛋白酶活力受 p CMB 的强烈抑制, 随着 p CMB 浓度的增加, 酶活性下降越大, 抑制作用也就越强烈. 说明酶的失活程度与抑制剂浓度间存在明显的化学计量关系. 但是 p CMB 的这种抑制作用可被 Cys 逆转, 即重新激活. 而且这些情况与木瓜蛋白酶极相似, 当 p CMB 浓度为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, 番麻蛋白酶的相对活力为 21%, 木瓜蛋白酶的相对活力为 16%; 此时若加入 0.008 mol/L Cys 再激活 10 min, 番麻蛋白酶的活力可以恢复到 93%, 木瓜蛋白酶活力可以恢复到 96%. 这些结果表明番麻蛋白酶与木瓜蛋白酶具有相似的活性中心基团.

2.3 碘乙酸和 DTNB 的抑制作用

2.3.1 碘乙酸的抑制作用 取 0.1 ml 酶液与 0.5 ml 不同浓度 (0, 2, 4, 6, 8, $10 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 碘乙酸(上述缓冲液配制)充分混合, 37°C 抑制 20 min 后, 测定酶活力, 以不加碘乙酸的酶活力为 100%. 对木瓜蛋白酶作同样处理, 与之对照.

2.3.2 DTNB 的抑制作用 取 0.1 ml 酶液与 0.5 ml 不同浓度 (0, 1, 2, 3, 4, $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 的 DTNB(上述缓冲液配制)充分混合, 37°C , 抑制 20 min 后, 测定酶活力. 以不加 DTNB 的酶活力为 100%, 对木瓜蛋白酶作同样处理, 与之比较.

上述各处理结果如图 3. 从图 3 中可见, 当碘乙酸浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时, 番麻蛋白酶的相对活力为 38%, 木瓜蛋白酶的相对活力为 20.5%, 说明它们的活力均受碘乙酸的强烈抑制. 当 DTNB 浓度为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, 番麻蛋白酶的相对活力为 20%, 木瓜蛋白酶的相对活力为 28%, 同样说明, 二者的活力均受 DTNB 的强烈抑制. 这些结果表明二者具有相似的活性中心基团. 不同的是, 当碘乙酸浓度在 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 以下时, 木瓜蛋白酶的活力下降很快; 在此之后, 酶活力下降变得缓慢.

2.4 DTNB 的抑制与底物(酪蛋白)的保护作用

实验分 2 个处理. 处理 1: 取 1 ml 酶液先加入 0.5 ml 15 mmol/L DTNB, 充分混合后, 再

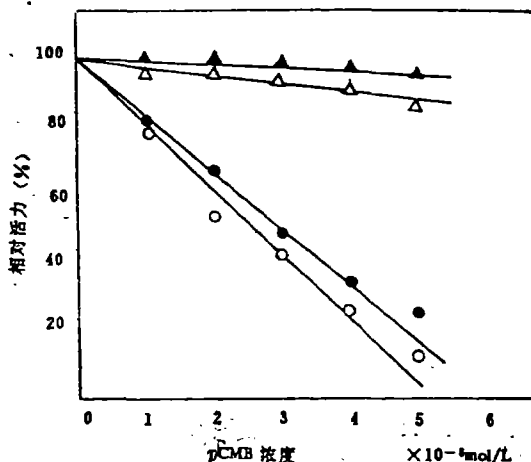


图 2 p CMB 对番麻蛋白酶的可逆抑制作用(酶活力为 1 560 U/ml, 酶蛋白含量为 0.088 mg/ml). Δ — Δ 重激活; \circ — \circ 抑制作用. 木瓜蛋白酶(活力为 1 560 U/ml, 蛋白含量为 0.38 mg/ml) \blacktriangle — \blacktriangle 重激活; \bullet — \bullet 抑制作用

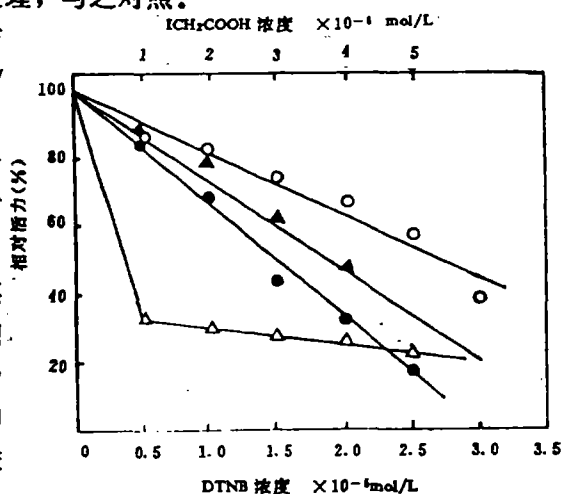


图 3 碘乙酸、DTNB 对番麻蛋白酶的抑制作用, (番麻蛋白酶的活力 1 560 U/ml, 酶蛋白含量为 0.088 mg/ml). \circ — \circ 碘乙酸抑制作用; \bullet — \bullet DTNB 的抑制作用; 木瓜蛋白酶(活力为 1 560 U/ml, 蛋白含量为 0.38 mg/ml) \blacktriangle — \blacktriangle DTNB 抑制, \triangle — \triangle 碘乙酸抑制

加0.5 ml 0.1%酪蛋白溶液,每隔5 min 取样测定酶活性;处理2: 1 ml 酶液先加入0.5 ml 0.1%酪蛋白溶液充分混合后,再加入0.5 ml 15 m mol/L DTNB 溶液,每隔5 min 取样测定酶活力,结果(如图4)表明,当 DTNB 抑制20 min 时,有底物保护的酶的相对活力为68%,而没有底物保护的酶的相对活力只有32%。这一结果证明,底物(酪蛋白)对酶的活性中心有明显的保护作用,同时也说明 Cys 位于酶的活性中心。

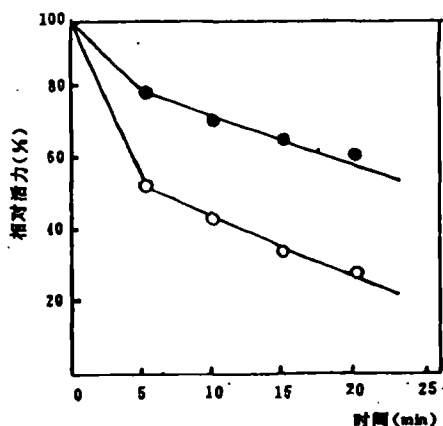


图4 DTNB 抑制及底物(酪蛋白)对酶活性中心的保护作用(酶活力为1 560 U/ml, 蛋白含量为0.088 mg/ml, DTNB 浓度为 2×10^{-4} mol/L). ●——●先加酪蛋白; ○——○后加酪蛋白

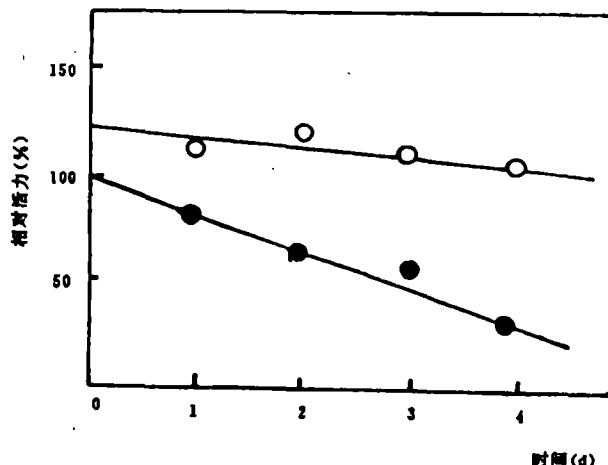


图5 番麻蛋白酶的活力衰变(蛋白含量为0.088 mg/ml)

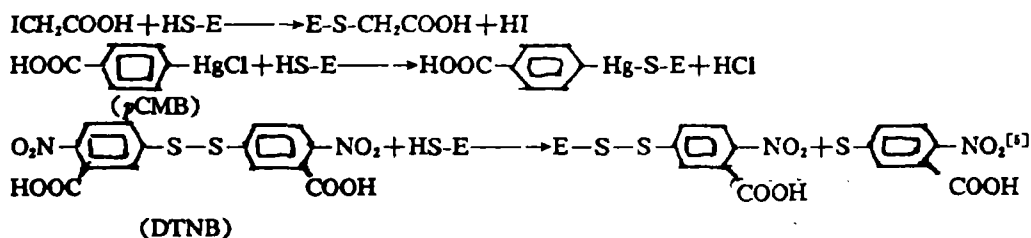
○——○ Cys 激活 (20 m mol/L, 10 min)
●——● 未经 Cys 激活

2.5 番麻蛋白酶的衰变

将一定量的酶溶液置室温下(约28℃)数天,每天取样测定酶活力;其一,0.1 ml 酶液加入0.9 ml 激活剂;其二,0.1 ml 酶液加入上述缓冲液0.9 ml,测定酶活力。结果(如图5)表明,随酶溶液在室温下放置时间的延长,酶活力下降越多,第3天酶活力下降了50%,第4天的酶活力只有原活力的33%。但不管时间长短,一经 Cys 重新激活,酶活力又可以恢复,如第4天的酶活力可以恢复到80%。这是由于酶被空气中的 O_2 氧化,使不稳定的-SH 基,转变稳定的二硫桥,-S-S-结构,致使酶活力下降。但是这种转变是可逆的,可被 Cys 等还原剂逆转,由-S-S-结构,再转变为-SH 基。证明 Cys 位于酶分子的活性中心。

3 讨论

3.1 碘乙酸、pCMB、DTNB 是 Cys 专一性化学修饰试剂,在不引起酶变性的条件下,能专一性地修饰酶分子中的 Cys:



经修饰后,引起酶活性下降,说明 Cys 存在于酶的活性中心。进一步证明被修饰的基团是否

存在于酶分子活性中心, 一般有两条标准: 一是酶的失活程度与修饰剂浓度之间是否存在化学计量关系; 二是酶分子的活性中心是否受到底物/竞争性抑制剂的保护^[3]。我们的结果也说明了上述事实, 从图2, 3, 4中可以看出酶的失活程度与修饰剂浓度存在着明显的化学计量关系; 图4证明底物(酪蛋白)对酶分子活性中心有明显的保护作用。由于酶的活性中心被底物占领后, 修饰剂就不能再与活性中心结合, 从而不能起修饰作用了。

3.2 一般巯基蛋白酶易被氧化而失去活性, 因此一些氧化剂如 O_2 、重金属离子如 Hg^{2+} 、 Cu^+ 、 Ag^{2+} 等, 易使酶失去活性。 O_2 易使 $-SH$ 基氧化形成稳定的 $-S-S-$ 结构而失去活性; 金属离子能与 $-SH$ 形成硫醇衍生物, 从而抑制酶的活性。但是, 这些氧化剂对酶的抑制都可被某些还原剂如 Cys 逆转, 而使酶恢复活性。我们实验也证明了这一点。

3.3 植物蛋白酶以巯基蛋白酶最为普遍^[4], 目前商品植物蛋白酶如木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶等大都为巯基蛋白酶, 孙崇荣等报告“东一号”剑麻为巯基蛋白酶^[1,2], 本实验报告番麻蛋白酶活性中心基因与木瓜蛋白酶活性中心有相似的性质, 认为也是巯基蛋白酶, 其活性中心存在 Cys 残基。巯基存在于酶的活性中心对酶的催化作用有着重要意义, 如进行亲核催化, 与底物/辅因子结合等。证明 Cys 存在于活性中心, 对研究番麻蛋白酶的作用机理及其酶制剂的生产与应用, 都具有较大的意义。但其活性中心是否还存在其它氨基酸残基, 有待进一步证明。

参 考 文 献

- 1 孙崇荣, 柴常星, 方深高. 剑麻蛋白酶——一种新发现的巯基蛋白酶. 科学通报, 1980, 25 (3): 138~140
- 2 孙崇荣, 柴常星, 方深高. 剑麻蛋白酶的亲和层析分离及酶活性基因研究. 复旦大学学报(自然科学版), 1981, 20 (4): 377~381
- 3 陈石根, 周润琦编著. 酶学, 长沙: 湖南科技出版社, 1987, 392
- 4 阎隆飞, 李明启主编. 基础生物化学, 北京: 农业出版社, 1982, 297~298
- 5 B. H. 奥列霍维奇编著. 袁积厚, 赵邦悌合译. 现代生物化学方法, 北京: 人民教育出版社, 1980, 209
- 6 Bradford M, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Anal. Biochem. 1976, 72, 248~254
- 7 Du Tiot, P J. Isolation and partial characterization of proteinase from *Agave americana variegata*, Biochem. Biophys. Acta. 1966, 110 (2): 414~422
- 8 Kunitz M, Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol. 1974, 30: 291
- 9 Ryan C A, Walker-Simmons, M. Plant proteinase. In: the Biochemistry of plants, 1981, vol. 6, pp. 321~350
- 10 Tipton K F, Agavain; A new plant proteinase. Biochem. Biophys. Acta. 1964, 92 (2): 334~340
- 11 Tipton K F, Agavain; A metallo proteinase. Biochem. Biophys. Acta. 1966, 110 (2): 414~422

PRIMARY STUDIES ON THE FUNCTIONAL GROUP AT THE ACTIVE
SITE OF A PROTEINASE FROM LEAVES OF *Agave americana*

Xu Fengcai Xiang Jinrong Wang Ju Li Mingqi
(Photosynthesis Research Laboratory)

Abstract A proteinase that hydrolyzed casein was isolated from leaves of *Agave americana* and the functional group at its active site was determined by chemical modification methods. It was found that the activity of the proteinase was activated by cysteine and inhibited by sulfhydryl reagents, such as iodoacetic acid (DTNB). These inhibitions were protected by its substrate casein, indicating that the group modified by these reagents was at the active site of the enzyme. The activity of the inhibited enzyme by pCMB was reactivated by cysteine. The activity of the enzyme solution kept at room temperature decreased gradually to about 33% at the fourth day and could be reactivated to 80% of its original activity by cysteine. All the above results came to the conclusion that the proteinase from leaves of *Agave americana* was a sulfhydryl proteinase.

Key words Sulfhydryl proteinase; Cysteine; Active sites