

## 牛凝乳酶的结晶及其二硫键的化学修饰

黄葵 陈世芝\* 杨开宇

(中国科学院微生物研究所, 北京)

为了配合凝乳酶的蛋白质工程, 围绕酶的纯化, 结晶和二硫键的化学修饰进行了研究。实验结果表明采用FPLC Mono Q柱代替DEAE-纤维素柱层析可以提高同工酶A, B及其降解组分C的分离效果并缩短纯化时间。以10mg/ml的纯凝乳酶B为出发材料, 在4℃ 1.4—2.0 mol/L氯化钠条件下进行培养可以获得外形近似为正立方体晶体。化学修饰的结果证明, 凝乳酶的三对二硫键处于酶分子不同的空间部位。0.72mmol/L DTT在pH6.3条件下能还原处于分子表面的一对二硫键, 经溴化氰降解分肽测定为Cys<sup>250</sup>-Cys<sup>283</sup>, 还原后引起活力下降25%。在二硫键之间引入汞原子其活力与还原酶, 羧甲基化酶的活力大体相同, 说明Cys<sup>250</sup>-Cys<sup>283</sup>在维持凝乳酶具有活力的空间构象中起着一定的作用。

**关键词** 牛凝乳酶; 二硫键

在高效表达的基因工程菌中, 凝乳酶通过二硫键形成分子间交联的包含体, 为后工艺带来困难<sup>[1]</sup>。考虑到不同来源的凝乳酶含有不同数目的二硫键, 如牛凝乳酶含有三对二硫键, 米黑毛霉, 寄生内座壳菌的凝乳酶分别含有两对, 一对二硫键<sup>[2]</sup>。因此, 设想通过蛋白质工程将牛凝乳酶的二硫键减少, 以期提高复性率, 并了解二硫键与酶功能的关系。

迄今为止, 牛凝乳酶的空间结构尚未确定, 对其二硫键的特性了解甚少。为了进行分子设计, 开展了牛凝乳酶的结晶和二硫键化学修饰的研究。

### 材料与方 法

#### (一) 材料

牛凝乳酶酶制剂是Chr Hensen公司的产品; FPLC Mono Q是Pharmacia公司产品。其它材料见方法部分。

#### (二) 方法

##### 1. 凝乳酶的纯化

(1) 部分纯化: 按文献[3]的方法进

行。

(2) FPLC进一步纯化: 将部分纯化的凝乳酶(20mg/1ml)通过用0.1mol/L, pH5.8磷酸缓冲液平衡过的Mono Q阴离子交换柱(1×10cm)。用平衡缓冲液淋洗后, 进行磷酸钠缓冲液线性梯度洗脱, 起始盐浓度与pH为0.1mol/L和5.8, 最终盐浓度与pH为0.4mol/L和5.5, 流速为1 ml/min, 每管1 ml紫外监测仪监测A<sub>280nm</sub>的值。

2. 凝乳酶晶体的培养: 经FPLC纯化的B型凝乳酶, 对60%的聚乙二醇(分子量6000)透析, 将酶浓缩到10mg/ml。取此样品22μl注入微型晶体培养皿中, 在4℃对1.4mol/L氯化钠-0.1mol/L磷酸钠缓冲液透析。培养四周后, 将透析液换为1.8mol/L氯化钠-0.1mol/L磷酸钠缓冲液。继续培养二周后, 将氯化钠浓度提高到2.0mol/L。

3. SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按文献[4]方法进行。

本文于1989年9月19日收到。

\* 中国科学院生物物理研究所。

4. 晶体的染色: 按文献[5]的方法。

5. 酶活力测定

(1) 在酶的分离纯化过程中采用凝乳法<sup>[6]</sup>, 此方法较简便。

(2) 在研究化学修饰对酶活力影响时采用分光光度法<sup>[7]</sup>, 此方法较灵敏。

6. 蛋白质浓度测定: 按文献[8]方法进行。

7. 凝乳酶的还原

(1) 预处理: 将自制的 B 型凝乳酶晶体溶于 0.1mol/L, pH6.3 磷酸钠缓冲液中, 蛋白质浓度为 2mg/ml (0.06mol/L), 在室温下与 10mmol/L 碘乙酸 (北京化工二厂产品, 溶于 0.1mol/L, pH6.3 磷酸钠缓冲液中) 反应 1h, 总体积为 20 $\mu$ l。反应后通过装有 200 $\mu$ l Sephadex G-25 的短柱, 1500r/min 离心 2min, 去除未反应的碘乙酸, 收集滤液。

(2) 还原: 经预处理的凝乳酶在室温下与 0.72mmol/L DTT (Sigma 公司) 反应不同时间, 总体积 20 $\mu$ l, 反应完毕后, 按上述方法通过 Sephadex G-25 柱, 去除未反应的 DTT, 收集滤液。

8. 羧甲基化: 将还原后去除 DTT 的凝乳酶与 10mmol/L 碘乙酸反应 1h, 按前述方法除去未反应的碘乙酸, 收集滤液。

9. 汞化: 将还原后去除了 DTT 的凝乳酶与 10mmol/L 氯化汞 (北京化工厂) 反应 1h, 按前述方法除去未反应的氯化汞, 收集滤液。

10. DTNB 测定巯基<sup>[9]</sup>: 取 20 $\mu$ l 经过还原去除 DTT 的凝乳酶与等体积的 1mmol/L DTNB (Sigma 公司产品, 溶于 0.1mol/L pH7.0 磷酸钠缓冲液中) 反应 15min, 稀释 10 倍, 测定 412nm 处的光吸收值, 以未经还原的凝乳酶作为空白对照。

11. 溴化氰降解凝乳酶及 Sephadex

G-100 柱层析分肽<sup>[10,11]</sup>: 凝乳酶溶于 25% 的乙酸溶液中, 浓度为 10mg/ml, 加入等体积的溴化氰 (Sigma 公司) 在避光条件下, 室温降解 24h, 反应后冷冻干燥, 除去其中的溴化氰, 得到的干粉备用。

Sephadex G-100 凝胶柱 (2  $\times$  50cm) 用 25% 乙酸溶液平衡, 将溴化氰降解得到干粉溶于 25% 乙酸中, 上样 2ml, 25% 乙酸洗脱, 流速为 12ml/h, 每管 1ml, 紫外监测仪测  $A_{280nm}$  的值。

## 结果与讨论

### (一) 凝乳酶纯化方法的改进

早在 1960 年 Foltmann 就提出了凝乳酶的纯化方法<sup>[3]</sup>, 并一直沿用至今, 其最后一个步骤是 DEAE-纤维素柱层析。但此方法分离同工酶的效果不够理想。A、B 两个同工酶不能全部分开, 为了弥补这一缺陷, 我们在 Foltmann 工作的基础上对纯化方法进行了改进, 即部分纯化的方法不变, 但用 FPLC 代替 DEAE-纤维素柱层析, 取得了满意的结果。

经过部分纯化的凝乳酶通过 Mono Q 柱后, 被分为三个组分, 依出现的先后次序为 C, B, A (图 1)。图 2 是按 Foltmann 方法用 DEAE-纤维素柱分离凝乳酶的层析图谱, 通过比较可以看出, 后者分离效果不够好, A、B 两个峰有重叠, 而前者能将三个组分完全分开。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳表明, 经过 Mono Q 柱后, A、B 两组分为电泳均一, 而 C 组分不纯 (图 3)。

已知, 在 A、B、C 三个组分中, A 组分不稳定容易降解, C 组分是 A 组分的降解产物只有 B 组分比较稳定适合作为培养品体的材料, 而 A、C 组分混杂在 B 组分中会影响纯度, 因此应该将三者分开, FPLC 正

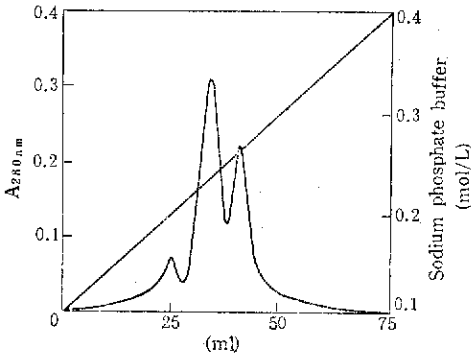


图 1 高速蛋白液相层析  
 Fig.1 FPLC (MonoQ column, 1 × 10cm)  
 磷酸钠缓冲液线性梯度洗脱  
 Linear gradient with sodium phosphate buffer  
 (0.1mol/L, pH5.8—0.4mol/L, pH5.5)

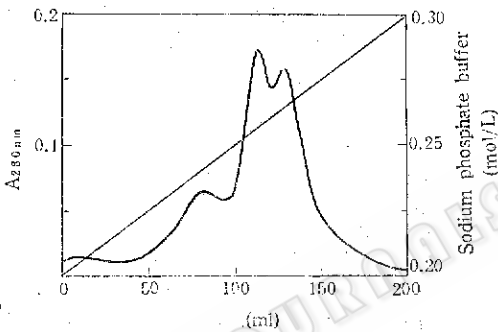


图 2 DEAE-纤维素柱层析  
 Fig.2 DEAE-cellulose chromatography (2 × 20cm)  
 磷酸钠缓冲液线性梯度洗脱  
 Linear gradient elution with sodium phosphate buffer  
 (0.2mol/L, pH5.8—0.3mol/L, pH5.6)

好满足了这一要求。

### (二) 凝乳酶的结晶

我们在获得纯酶的基础上，对培养晶体的条件进行了一系列的比较，其中包括蛋白质浓度 (8mg/ml, 10mg/ml, 11.5 mg/ml, 20mg/ml), 温度 (4℃, 25℃), 起始盐浓度 (氯化钠 1.4mol/L 和 2.0mol/L) 实验证明，培养凝乳酶晶体的最适宜条件是：蛋白质浓度为 10mg/ml，起始盐浓度为 1.4mol/L 氯化钠 - 0.1mol/L 磷酸钠，pH5.5，最适温度为 4℃，图 4，图 5 为在此培养条件下，不同培养时间所获得的结晶照片。用汞溴酚蓝染色，晶体呈蓝紫



图 3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳  
 Fig.3 SDS polyacrylamide gel electrophoresis  
 1. Fraction B 2. Fraction A 3. Fraction C

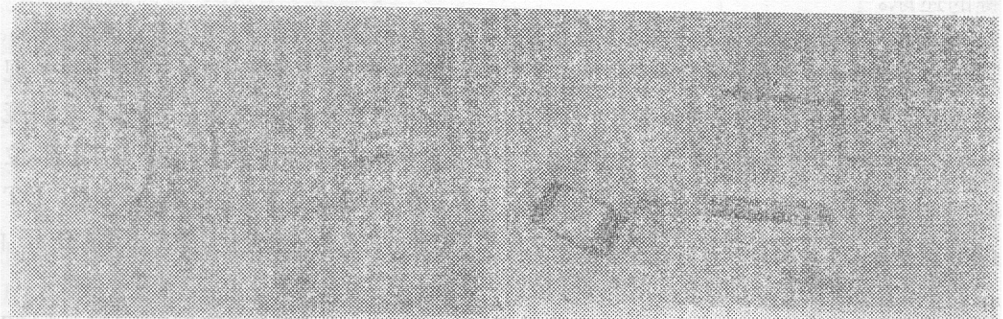


图 4 培养 5 周(A)和 10 周(B)的凝乳酶晶体  
 Fig.4 Crystal of chymosin grown for 5 weeks(A) and for 10 weeks(B) (×200)

色,说明为蛋白质晶体(图5)。无机盐晶体不被染色。

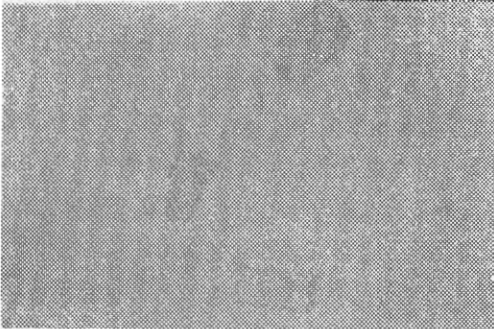


图5 汞溴酚蓝染色的凝乳酶晶体

Fig.5 Crystal of chymosin stained with mercury bromophenol blue ( $\times 200$ )

将所得到的晶体溶解,经测定具有很高的凝乳酶活力,证明是凝乳酶晶体。

### (三) 凝乳酶二硫键的还原

要通过蛋白质工程减少凝乳酶的二硫键,必须首先对三对二硫键在酶分子中所处的空间位置以及它们与酶活力的关系有所了解。实验的第一个目标是要选择适当条件使只有一对二硫键被还原。且反应条件应尽可能温和(如无变性剂,酶活力保持稳定的pH),使还原后所测定的酶活力能反映这对二硫键破坏后的情况,排除其他因素所引起的失活。根据Cheesman<sup>[12]</sup>和Bewley & Li<sup>[13]</sup>的报道,我们确定在pH6.3的条件下研究DTT对凝乳酶二硫键的还原。

1. DTT对二硫键还原过程动态变化的分析:为了测定还原后所产生的巯基,主要采用<sup>14</sup>C-碘乙酸标记的方法。由于还原前后的pH必须控制在6.3,此时碘乙酸除能与巯基反应外,还可能与组氨酸、赖氨酸等反应。为了消除这种干扰,在还原前按材料与方法所述的步骤,用非放射性的碘乙酸进行预处理,经过预处理的酶分别与0.72mmol/L DTT在pH6.3进行反应。实验表明,在1h内随着时间的延长,

巯基数目增加,1h后无明显变化(图6)。用DTNB测定得到同样结果(表1)。

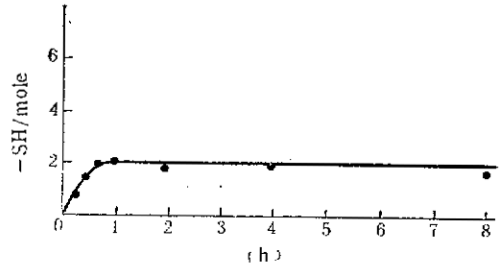


图6 凝乳酶与0.72mmol/L DTT的反应曲线

Fig.6 Time course of reduction of disulfide bonds of chymosin with 0.72mmol/L DTT

用<sup>14</sup>C-碘乙酸测定反应产生的巯基数

The liberated-SH groups were determined with <sup>14</sup>C-iodoacetic acid

表1 反应时间对凝乳酶二硫键还原的影响

Table 1 Effect of time on the reduction of disulfide bonds of chymosin

Time(h)	1	4
-SH/mole	1.92	1.94

0.06mmol/L chymosin was reduced with 0.72 mmol/L DTT for different times as indicated. The liberated-SH groups were determined with DTNB

2. 尿素存在的条件下DTT对凝乳酶二硫键的还原:为了探讨上述被还原的二硫键在酶分子中所处的空间位置,在8mol/L尿素存在的条件下用0.72mmol/L DTT对凝乳酶进行还原。由图7可见,超过1h被还原的二硫键仍在不断增加,达到4h后三对二硫键全部被还原。这一现象与无变性剂时的情况完全不同,说明凝乳酶的三对二硫键处于不同的空间部位,在无变性剂条件下被0.72mmol/L DTT还原的一对二硫键很可能处于酶分子的表面。

3. 被还原二硫键的定位:已知凝乳酶分子中有8个甲硫氨酸,经过溴化氰彻底降解后得到三个大片段和四个小片段

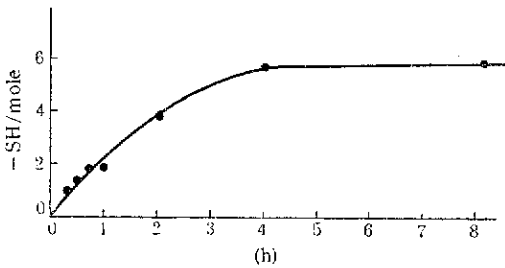


图 7 凝乳酶在8mol/L尿素存在条件下与0.72mmol/L DTT的反应曲线

Fig.7 Time course of reduction of disulfide bonds of chymosin with 0.72mmol/L DTT in the presence of 8 mol/L urea. The liberated-SH groups were determined with <sup>14</sup>C-iodoacetic acid.

(图8)<sup>[14]</sup>,其中最大的片段由250位和283位的一对二硫键连接起来,如果这对二硫键被还原,则此大片段将会消失而产生两个小片段。为了确定首先被 DTT 还原的二硫键的确切位置,应用了溴化氰降解分肽方法。

图 9A 为未经还原的凝乳酶经溴化氰降解分肽的结果,第一个峰应为由 Cys<sup>250</sup>-Cys<sup>283</sup> 所维系的最大片段;第二个峰应为 1—82肽段,第三个峰应为 83—125 肽段。

经过0.72mmol/L DTT还原 1h 并羧甲基化的凝乳酶其分肽图谱与天然酶的有显著差异(图9B)。第一个峰显著降低,而第二个峰显著加宽,这很可能是第一个大片段二硫键被还原后所释放出来的两个片段与第二个片段大小接近不易分开。据此可以推断还原的二硫键主要是 Cys<sup>250</sup>-Cys<sup>283</sup>组成的二硫键。

4. 二硫键还原后活力的测定: 经过预处理的凝乳酶与 0.72mmol/L DTT 反应1h后立即去除其中过量的 DTT 并测定其剩余活力。为了防止已还原的二硫键重新氧化,用碘乙酸将自由巯基羧甲基化,得到衍生物2CM-chymosin; 或用氯化汞

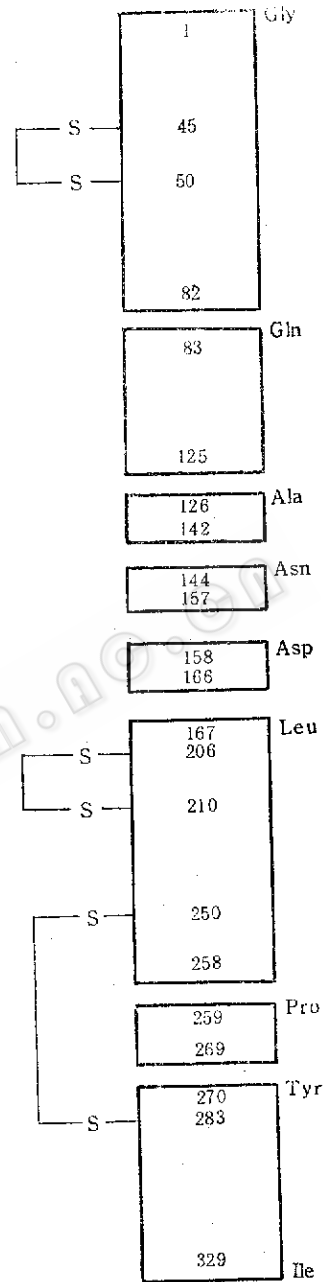


图 8 溴化氰降解凝乳酶的肽段<sup>[14]</sup>

Fig.8 Peptides degraded with cyanogen bromide 将两个巯基通过汞原子形成-S-Hg-S-桥,得到衍生物 Hg-Chymosin, 对这两种衍生物也进行了活力测定。表 2 表明,一对二硫键被还原及其两种衍生物均导致25%左右活力的下降。考虑到所有的样品都是经过碘乙酸预处理的。因此,有必要对预

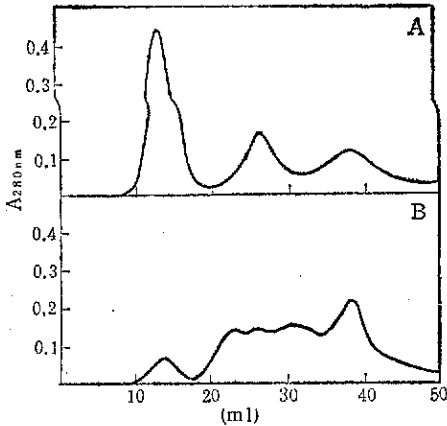


图 9 天然凝乳酶(A)和还原并羧甲基化凝乳酶(B)经溴化氢降解后的Sephadex-G100层析图

Fig.9 Sephadex G-100 chromatography of native chymosin peptides (A) and peptides of reduced and carboxymethylated chymosin (B) degraded with cyanogen bromide. Eluent: 25% acetic acid, flow rate: 12ml/h

处理的酶进行活力测定。结果表明,其活力保持不变,由此可见,活力下降主要是一对二硫键被还原引起的。 $-S-Hg-S-$ 桥的形成使原来的二硫键延长了  $3 \text{ \AA}$ , 但活

力比还原酶和羧甲基化酶活力并未明显提高,说明天然酶二硫键的长度对酶活性的维持是必要的。

氨基酸序列分析表明,不同来源凝乳酶的二硫键虽有三对、二对、一对的不同,但都含有  $Cys^{250}-Cys^{283}$  这对二硫键。这一事实与  $Cys^{250}-Cys^{283}$  被还原后引起活力下降的实验结果联系起来,说明这对保守二硫键在维持凝乳酶具有活力的空间构象中起着一定作用。

表 2 凝乳酶一对二硫键被修饰后的活力

Table 2 Remained activities of chymosin with one disulfide bond reduced or modified

Sample	activity(%)
Chymosin (native)	100
Chymosin (pre.)	100
2SH-chymosin	74.3
2CM-chymosin	71.8
Hg. chymosin	78.6

Chymosin (Pre.): 经过非放射性 IAA 预处理的凝乳酶  
Pretreated chymosin with iodo- $^{125}I$  acetic acid

## 参 考 文 献

- [1] Schoemaker, J. M. et al.: *The EMBO J.*, 4(3):775-780, 1985.
- [2] Foltmann, B.: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1, (P.F. Fox ed.) Elsevier Applied Science, pp. 33-61, 1987.
- [3] Foltmann, B.: *Methods in Enzymol.*, Vol. 19, (Permann and Lorand ed.) New York, Academic Press, pp. 421-436, 1970.
- [4] Laemmli, U. K.: *Nature (London)*, 227:680-685, 1987.
- [5] 卢光莹等: *生物物理学报*, 3(2):184-186, 1987.
- [6] Emtage, J. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:3671-3675, 1983.
- [7] Aoyagi, Takaaki et al.: *J. Antibiotics*, 24(10):687-694, 1971.
- [8] Bradford, M. M.: *Analyt. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- [9] Ellman, G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 82:70-77, 1959.
- [10] Gross, E. & Witkop, B.: *J. Biol. Chem.*, 237:1856-1860, 1962.
- [11] Steers, E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 240:2478-2484, 1965.
- [12] Cheesman, G.C.: *Nature (London)*, 206:1011-1012, 1965.
- [13] Bewley, T. A. & Li, C.H.: *Int. J. Protein Res.*, 1:117-124, 1969.
- [14] Foltmann, B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(6):2321-2324, 1977.

## Purification, Crystallization and Chemical Modification of Disulfide Bond of Calf Chymosin

Huang Kui Chen Shizhi Yang Kaiyu

(*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing*)

In order to carry out protein engineering of chymosin, purification, crystallization and chemical modification of calf chymosin were undertaken. The resolution of iso-enzymes A,B and the degraded product, fraction C was improved and the period of purification was shortened by using fast protein liquid chromatograph. Crystal of approximately cubic shape was obtained from 10mg/ml purified chymosin B at 4°C after successive dialysis against 1.4,1.8 and 2.0mol/L NaCl in 0.1mol/L sodium phosphate buffer. One disulfide bond located on the surface of chymosin molecule was reduced by 0.72mmol/L DTT at pH6.3. The reduced disulfide bond was identified as Cys<sup>250</sup>-Cys<sup>285</sup> by using the method of cyanogen bromide degradation and peptide separation.

The reduction of one disulfide bond resulted in the loss of about 25% activity. Carboxymethylated and mercurated derivatives exhibit the similar activity to that of the reduced enzyme suggesting that Cys<sup>250</sup>-Cys<sup>285</sup> plays some role in keeping the conformation with full activity.

### Key words

Calf chymosin; disulfide bond