

二氢叶酸还原酶结合底物的去除*

范映辛 吴嘉炜 周筠梅

(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 分析了应用氨甲蝶呤 (MTX-Agarose) 亲和层析法提纯的鸡肝二氢叶酸还原酶的组成和性质. 建立了用平面粒度胶等电聚焦法去除与酶紧密结合底物的方法. 讨论了结合底物对酶构象研究的影响, 并指出, 用未完全去除结合底物的酶研究酶在变性过程构象变化会得到错误的结论.

关键词 二氢叶酸还原酶, 提纯, 制备等电聚焦电泳

二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR, EC 1.5.1.3) 是核酸代谢中的关键酶之一^[1], 是癌症药物治疗中的主要靶酶, 近年来得到广泛的研究. DHFR 是一个不含二硫键的单体酶, 分子质量较小, 不同来源的酶分子质量在 1.5~2.5 ku 范围内. 许多不同来源酶的氨基酸序列及晶体结构都已确定. 脊椎动物二氢叶酸还原酶还有一个显著的特点, 即可被一定浓度的无机盐 (NaCl 和 KCl 等)、变性剂 (脲和盐酸胍等) 和某些巯基修饰试剂激活^[1~4], 且激活幅度较大, 便于研究, 可成为研究蛋白质结构和功能关系的独具特色的材料.

二氢叶酸还原酶在生物体中的含量很少, 提纯很困难. Kaufman 等^[5]根据二氢叶酸还原酶能与氨甲蝶呤 (MTX) 特异性紧密结合的性质, 利用 MTX-Agarose 亲和层析大大提高了二氢叶酸还原酶的纯化效率. 但是利用亲和层析提纯时要用底物二氢叶酸或叶酸洗脱, 所得的酶结合了底物. 二氢叶酸还原酶与底物的结合很紧密, 解离常数一般在 10^{-9} 量级, 用常规的透析法很难除去. Kaufman 等^[6]曾用密度梯度等电聚焦制备电泳方法去除鸡肝二氢叶酸还原酶结合的底物, 但该方法操作繁琐, 一次实验需近 100 h. 我们采用平板粒度胶等电聚焦制备电泳法较简捷地脱去了与酶结合的底物, 得到相同纯度的酶. 并进一步讨论了结合底物对酶构象研究的影响.

1 材料与方法

1.1 试剂

二氢叶酸 (含量不少于 90%)、NADPH (含量不少于 97%)、MTX-Agarose 均为 Sigma 公司产品; 两性电解质 (Ampholine)、IEF-Sephacrose 均为 Pharmacia 公司产品; 其他试剂为国产分析纯; 实验用水均为二次去离子水.

1.2 活力及构象测定

酶活力按 Mathews^[7]的方法在 20℃ 下用岛津 UV-250 分光光度计测定. 测活体系中含 50 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液 (pH = 7.5)、10 mmol/L β -巯基乙醇、0.1 mmol/L 二氢叶酸、0.1 mmol/L NADPH, 总体积为 1.2 ml.

1.3 二氢叶酸还原酶的提纯

用 MTX-Agarose 亲和层析提取鸡肝二氢叶酸还原酶的步骤按 Kaufman 等^[5]的方法进行. 从亲和层析柱上洗脱下来的活力组分经 Sephadex G-75 凝胶柱分离, 上等电聚焦制备电泳. 使用 Pharmacia 公司 2117 Multiphor II 电泳系统及其 501 制备附件. 每次上样 8~9 ml, 样品的蛋白质浓度约 3 g/L. 用 pH 范围在 6.0~8.0 和 8.0~9.5 的两种 Ampholine 的 1:1 混合物作为实际使用的两性电解质, 以 1 mol/L NaOH 为阴极电极液, 1 mol/L H_2SO_4 为阳极电极液. 电泳过程中恒定功率 10 W,

* 攀登计划项目.

收稿日期: 1995-12-04, 修回日期: 1996-03-08

温度为 4℃. 电泳开始时的电压在 360 V 左右, 随着电泳时间的延长电压逐渐升高, 约 24 h 后, 电压达到 1200 V, 停止电泳. 按标准方法 (LKB Co. Laboratory Manual of LKB 2117 Miltiphor II Electrophoresis System, 33-35) 用滤纸印迹, 固定, 用考马氏亮蓝 R 250 染色. 取相应的条带加少量去离子水, 测定相应蛋白质的等电点, 洗下蛋白质, 上 Sephadex G-75 凝胶过滤柱, 用 10 mmol/L、pH6.8 的磷酸钾缓冲溶液洗脱, 除去 Ampho-line.

1.4 光谱测定

吸收光谱的测定用岛津 UV-250 分光光度计; 荧光光谱的测定用 Perkin-Elmer MPF-66 型荧光光度仪, 激发、发射狭缝宽度均为 5 nm, 激发波长为 280 nm, 比色池光径为 1 cm.

1.5 FPLC 分析

用 Pharmacia 公司的 FPLC 系统及 ProRPC 5/10 反相柱, 用 0.1% 的三氟乙酸的水溶液和乙腈溶液梯度洗脱.

2 结果和讨论

2.1 亲和层析提纯后产物的分析

按 Kaufman^[5]的方法, 经亲和层析提纯后

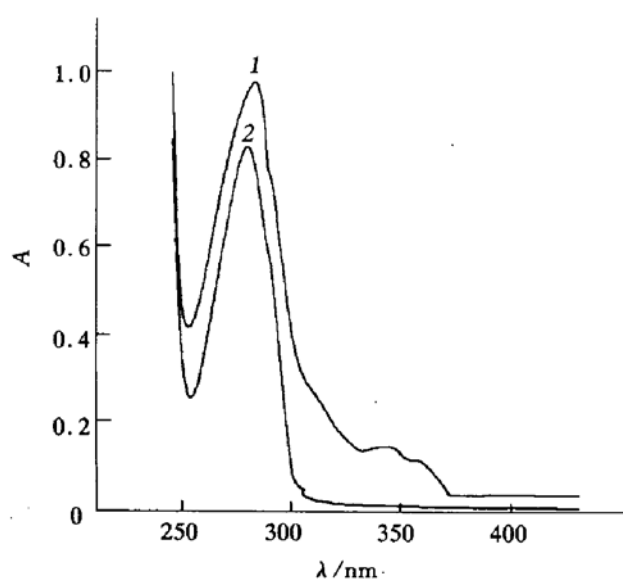


图1 脱底物前后二氢叶酸还原酶的吸收光谱
1: 脱底物前; 2: 脱底物后. 均在 pH=6.8, 0.05 mol/L 的磷酸钾缓冲溶液中测定.

的酶在 SDS-PAGE 上为一条带, 25℃ 时的比活为 8.9 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$. 其吸收光谱如图 1 曲线 1 所示, 除最大波长为 280 nm 处的蛋白质特征吸收外, 在 300~370 nm 范围有一宽吸收带. 用 FPLC 反相柱 ProRPC 5/10 分析, 可得三个峰 (图 2), 其中峰 3 为二氢叶

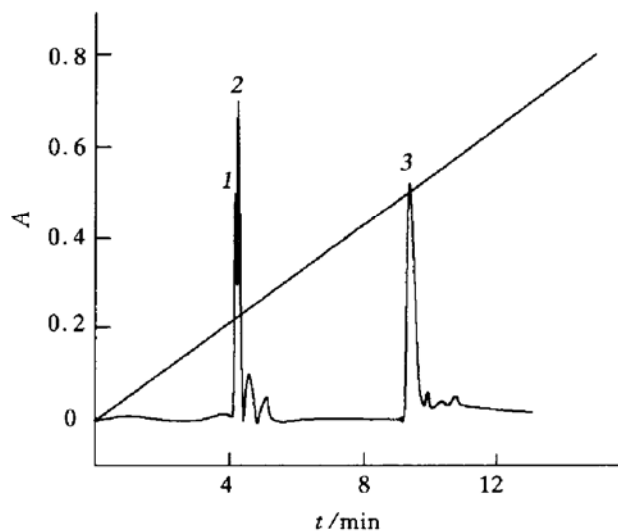


图2 亲和层析纯化二氢叶酸还原酶的反相色谱分析
流动相: A: 0.1% TFA 水溶液; B: 0.1% TFA 乙腈溶液 (洗脱梯度: 15 min 内 B 含量从 0% 线性升高到 80%), 280 nm 检测; 流速 0.5 ml/min.

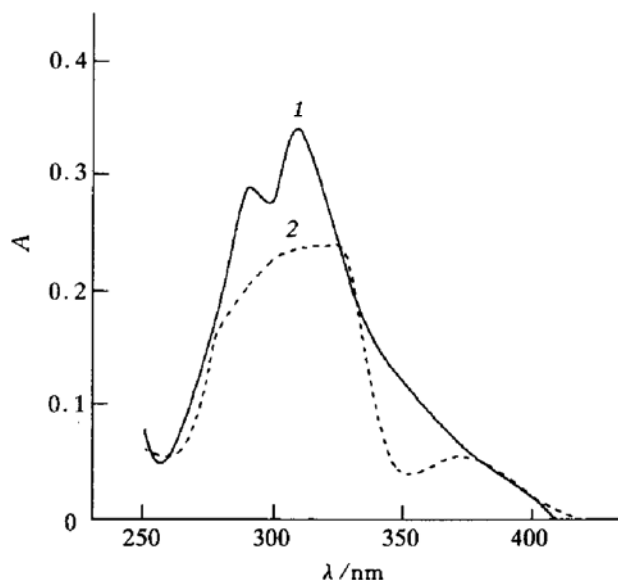


图3 图2中峰1和峰2的吸收光谱
1: 叶酸; 2: 二氢叶酸.

酸还原酶, 其吸收光谱与图 1 曲线 2 相同, 峰 1 和峰 2 的吸收光谱如图 3 所示, 与游离叶酸和二氢叶酸的吸收光谱^[8]相比可知, 峰 1

和峰2分别是叶酸和二氢叶酸。如在测活体系中加入 NADPH 和亲和层析提纯的酶, 则发生酶促反应, 先是一个快相, 然后是一个慢相, 分别是二氢叶酸和叶酸作为底物的反应。虽然亲和洗脱用二氢叶酸, 但二氢叶酸不稳定, 在空气中部分氧化为叶酸, 放置时间越长, 叶酸的相对含量越多。

2.2 结合底物二氢叶酸还原酶的等电聚焦

按 1.3 所述方法, 用平面粒度胶等电聚焦电泳除去二氢叶酸还原酶结合的底物。在电泳过程中, 电压不断升高, 可以看到有黄色物质, 即带负电荷的二氢叶酸或叶酸向阳极泳动, 电泳结束后吸附在阳极电极条上。滤纸印迹后经三氯乙酸固定、考马氏亮蓝 R250 染色、脱色后可得三条主要的条带(图4), 其

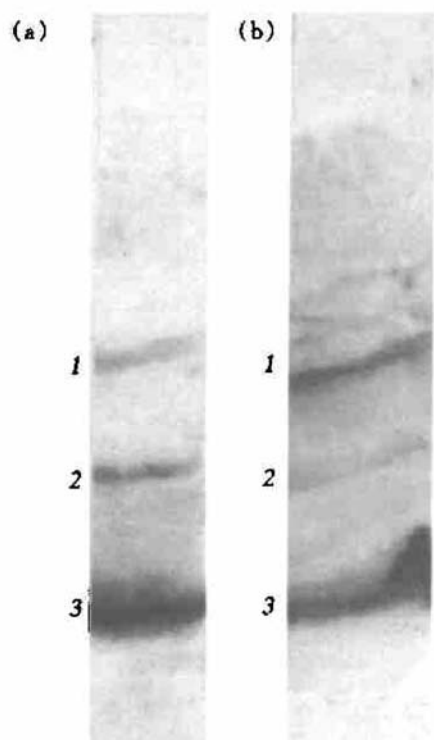


图4 MTX-agarose 纯化酶的等电聚焦电泳图

(a) 聚焦 20 h; (b) 聚焦 30 h.

中带2和3都有较强的二氢叶酸还原酶的活力, 对应的 pH 为 7.3 和 8.4, 脱去 Ampholine 后, 带3的吸收光谱中 300 nm 以上的吸收很小, 280 nm 和 260 nm 处的光吸收比值 A_{280}/A_{260} 约为 1.87, 为标准的蛋白质的光谱(图1

曲线2), 底物二氢叶酸或叶酸已脱去。带2的吸收光谱与电泳前(图1曲线1)相似, 为仍结合底物的二氢叶酸还原酶。带1在 pH 6.5 附近, 只有很低的二氢叶酸还原酶的活力, 其分子质量与带2带3相同, 可能是二氢叶酸还原酶的变体。25℃ 时带3的比活为 $12.6 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 与文献用密度梯度等电聚焦提纯的酶比活相近。以上结果表明该方法可较方便地脱去二氢叶酸还原酶结合的底物, 脱去底物后酶的等电点从 7.4 移至 8.4。图4a 和 b 分别是聚焦 20 h 和 30 h 的结果, 电泳时间越长, 结合底物的酶越少。但电泳时间过长, 条带向阴极漂移, 且易使条带变形。一般选择电泳时间为 25 h, 使终电压达 1200 V 即可。聚焦后酶活力的回收可达 60%~70%。从以上结果可以看出, 用平板粒度胶等电聚焦操作简单, 耗时少, 纯化效果与密度梯度聚焦基本一样。

决定聚焦效果的因素主要有两个: a. 胶的湿度。胶太干, 在聚焦过程可能出现裂缝; 胶太湿, 电压升高慢, 条带易扩散、漂移、变形。b. 选择 Ampholine 的 pH 范围要合适。从本文实验的结果看, 用 pH 为 6~8 和 8~9.5 的 Ampholine 1:1 混合可得到较好的分离效果。

2.3 结合底物对二氢叶酸还原酶构象测定的影响

蛋白质内源荧光和远紫外圆二色谱是研究蛋白质溶液构象最主要的监测指标。鸡肝二氢叶酸还原酶有三个色氨酸残基, 分别位于 24、57 和 113 位。其内源荧光在变性过程中发生显著的变化, 最大发射波长从 320 nm 红移至 355 nm (图5曲线1和2), 表明这些内埋色氨酸残基从疏水环境暴露到了水溶液中^[2,3]。但底物结合引起酶的内源荧光猝灭^[3], 在酶变性过程中结合底物逐渐解离, 而使其对酶内源荧光的猝灭减小, 荧光强度增大。从图5可以看出, 天然酶中加入等摩尔数的二氢叶酸, 形成 1:1 的酶与底物的复合物, 使荧光强度大大降低, 而在 6 mol/L 的盐酸胍变性溶液中,

加入底物对酶的内源荧光无明显的影响(图5曲线2和4). 一些作者^[9]用未脱底物的酶作变性实验, 发现变性后酶的内源荧光增强, 并认为二氢叶酸还原酶天然构象中24位色氨酸残基的荧光被其周围的残基猝灭, 把变性酶荧光增强解释为该色氨酸残基在酶变性后与猝灭残基远离引起的, 这种解释是错误的. 实际上, 引起荧光猝灭的并不是酶本身的结构残基, 而是结合底物造成的. 变性酶荧光增强则是由于酶变性后猝灭荧光的底物的解离. 去除底物就可以排除这种干扰, 研究酶的构象变化.

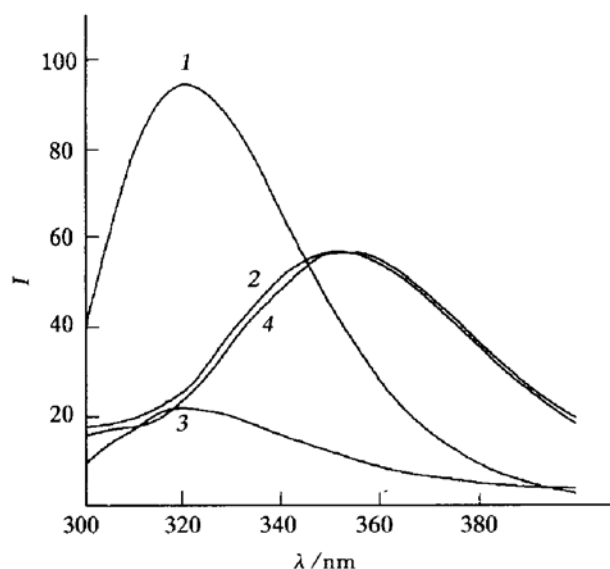


图5 二氢叶酸还原酶的荧光光谱

1: 脱底物酶; 2: 脱底物酶在6 mol/L 盐酸胍中变性; 3: 酶和底物1:1的复合物; 4: 酶和底物1:1的复合物在6 mol/L 盐酸胍中变性. 均在0.05 mol/L, pH = 7.5的磷酸钾盐缓冲溶液中测定, 酶浓度均为15 mg/L. 激发波长为280 nm.

圆二色谱是溶液中测定蛋白质二级结构最主要的方法. 结合底物由于远紫外区的吸光度太大而影响测量, 底物的结合也会影响二氢叶酸还原酶近紫外区圆二色谱的性质^[10].

由此可见, 脱掉二氢叶酸还原酶结合的底物对其结构和功能的研究具有重要的意义, 本文提供了一个简单的脱掉紧密结合底物的方法, 这一方法可能也适合脱去与其他酶紧密结合的底物.

参 考 文 献

- 1 Blakley R L. In: Blackly R L eds. Folate and pterins. New York: Wiley Interscience, 1984; 1: 191~253
- 2 范映辛, 谷国强, 居 鸣, 生物物理学报, 1995; 11 (2): 155
- 3 Fan Y X, Ju M, Zhou J M *et al.* Biochim Biophys Acta, 1995; 1252: 151
- 4 Barbehenn E K, Kaufman B T. Arch Biochem Biophys, 1982; 219: 236
- 5 Kaufman B T. Method in Enzymology, 1974; 34B (22): 272
- 6 Kaufman B T. Arch Biochem Biophys, 1977; 179: 420
- 7 Mathews C K. Methods in Enzymology, 1963; 6 (48): 364
- 8 Williams E A, Morrison J F. Biochim Biophys Acta, 1991; 1078: 47
- 9 Martin J, Langer T, Boteva R *et al.* Nature, 1991; 352: 36
- 10 D'Souza L, Freisheim J H. Biochemistry, 1972; 11 (20): 3770

Removal of the Bound-Substrates from Dihydrofolate Reductase by Flat-Bed Isoelectric Focusing Electrophoresis. Fan Yingxin, Wu Jiawei, Zhou Junmei (National Laboratory of Biomolecules, Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China)

Abstract Chicken liver dihydrofolate reductase purified by Agarose-methotrexate (MTX-Agarose) column has been analyzed. The bound-substrates, dihydrofolate or folate, were removed by flat-bed isoelectric focusing electrophoresis. The effect of the bound-substrates on studying the conformation of the enzyme was discussed, and the wrong conclusion in the literature obtained with the enzyme in the presence of bound-substrates was pointed out.

Key words dihydriofolate reductase, purification, preparative isoelectric focusing electrophoresis