

• 基础实验研究论著 •

S-同型半胱氨酸甲基转移酶活性检测和保存方法的建立*

刘培^{1,2}, 周建平³, 许秀丽^{1,2}, 郝庆钦^{1,2}, 温新宇¹, 王玲¹, 田亚平^{1△}

(1. 解放军总医院生化科, 北京 100853; 2. 南开大学医学院, 天津 300071;

3. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要:目的 建立一种简单的 S-同型半胱氨酸甲基转移酶(HMT)活性测定方法, 确定 HMT 的最佳使用条件, 并初步探索 HMT 的保存方法。方法 采用原核表达系统制备 HMT, 经镍亲和层析和 Sephadex G15 两步纯化。SDS-PAGE 对目的蛋白进行理化性质鉴定。基于 5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)可以特异性地与含有巯基的化合物快速发生化学反应的原理, 通过检测同型半胱氨酸的减少量来计算酶活性, 确定 HMT 最佳活性测定条件。比较添加和不添加甘油的两组 HMT 酶液置于不同温度下保存, 定期测定活力; 在 HMT 酶液中加入不同浓度的不同保护剂, 比较冷冻干燥后的活性保留率。结果 重组表达的酶纯度高达 95% 以上, 相对分子质量为 36 000, 具有良好的催化活性, 比活为 2 000 U/mg。在 37 ℃、pH7.4 的 HEPES 缓冲液中反应 25 min 为酶活性测定最佳条件。加入甘油能明显延长酶的保存时间并且酶液在 6 个月内的活力保留一半。冷冻保护剂甘露醇和海藻糖的添加对 HMT 酶冻干品的酶活保留率分别为 104.0% 和 100.0%。结论 通过基因工程技术获得 HMT, 建立了简单的 HMT 活性测定方法, 并确定了该酶的最佳保存方法, 为临床应用奠定了基础。

关键词: S-同型半胱氨酸甲基转移酶; 亲和层析法; 活性测定; 稳定性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)12-1526-03

Activity assay and preservation of S-homocysteine methyltransferase*

Liu Pei^{1,2}, Zhou Jianping³, Xu Xiuli^{1,2}, Hao Qingqin^{1,2}, Wen Xinyu¹, Wang Ling¹, Tian Yaping^{1△}

(1. Department of Biochemistry, 301 Hospital, Beijing 100853, China; 2. School of Medicine,

Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Institute of Pharmacology and Toxicology,

Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: **Objective** To construct a simple method for the measurement of activity of S-homocysteine methyltransferase (HMT), and explore the best processing condition for HMT and the preservation of HMT. **Methods** HMT was expressed in prokaryotic system by using genetic engineering technology, then was purified by using affinity and Sephadex G15 chromatography. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to identify the physicochemical and biological properties of target protein. Based on the principle of 5,5'-disulfide-double (2-nitro benzoic acid) (DTNB) could react with sulfhydryl compounds rapidly, the reduction of homocysteine was detect to evaluate the activity of enzyme, then the best processing conditions of HMT were determined. Activity of enzyme, preserved in preservation solution with or without glycerol and preserved under different temperatures, was detected. Activity remaining ratios were detected and compared between HMT preserved in preservation solution with different protective agents of different concentration and preserved by cryodesiccation. **Results** The purity of recombinant HMT was above 95%, with molecular weight of 36 000 and excellent catalytic activity, and the catalytic activity was 2 000 U/mg. The optimum condition for the detection of biological activity was using HEPES buffer of pH 7.4 at 37 ℃ and reaction for 25 min. Glycerol could significantly prolong the preserving time of HMT, and half activity of HMT could be remained for six months. The reservation rates of activity of HMT, preserved in preservation solution with mannitol and trehalose, were 104% and 100%, respectively. **Conclusion** HMT could be obtained through genetic engineering. A simple test method of HMT was established, and the best processing conditions and preserving methods of HMT were determined, which laid a foundation for clinical application.

Key words: S-homocysteine methyltransferase; affinity chromatography; activity assay; stability

生物大分子的甲基化修饰在信号传导、蛋白修复、生物合成、基因沉默、染色体表达调控^[1-4]和硒解毒^[5-6]等方面发挥着重要作用。S-同型半胱氨酸甲基转移酶(HMT)可以利用 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体将同型半胱氨酸(Hcy)转化为 S-腺苷同型半胱氨酸和甲硫氨酸^[7], 是现在临床上循环酶法测定 Hcy

的关键酶之一。研究表明, 该酶的异常水解与老年痴呆症、抑郁症、帕金森综合征、癌症等多种疾病有关, 因其特有的高灵敏度和特异性而被广泛地应用到临床心血管疾病和相关疾病的诊断中。目前, HMT 活性的检测多采用放射性底物法和纸层析法^[8-9]。放射性底物法通常采用¹⁴C 或³H 标记 AdoMet, 甲

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(2011AA02A111)。 作者简介: 刘培, 女, 主要从事诊断试剂原料开发研究。

△ 通讯作者, E-mail: tianyp@301hospital.com.cn。

基转移反应后,通过同位素扫描成像仪观察生成放射性标记产物的量,从而检测该酶的活性。该方法底物与产物后续色谱分离工作繁琐,费时费力,重复性差,难以达到准确定量;另外, ^{14}C 或 ^3H 标记 AdoMet 昂贵的价格以及放射性废物高成本的处理费用也是该方法难以克服的缺点^[10]。基于 5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)可以特异性地与含巯基的化合物快速发生化学反应的原理^[11],通过检测 Hcy 的减少量来推测酶活,本研究尝试建立了一种更简单、准确、稳定、安全、可靠的 HMT 活性检测方法,并初步探索了 HMT 酶的保存方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和试剂 本实验室保存的质粒 pET30a(+),大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3);由本实验室构建并保存的 pET30a-HMT 质粒。层析柱及纯化填料购自 GE 公司;酵母粉、蛋白胨购自 Oxoid 公司;硫酸卡那霉素、异丙基硫代 β 半乳糖苷 (IPTG)、甘露醇、海藻糖、甘油等购自国药集团北京试剂有限公司。无特殊说明均为分析纯。

1.1.2 主要仪器 纯化仪为 GE 公司 AKTA prime;酶标仪为 Thermo 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 HMT 表达及鉴定 将合成的 HMT 基因序列克隆至 Pet30a 载体,由克隆菌 DH5 α 克隆,进而转化至表达菌 BL21 (DE3)中扩大培养,IPTG 诱导表达,采用 SDS-PAGE 电泳方法检测表达产物产量。

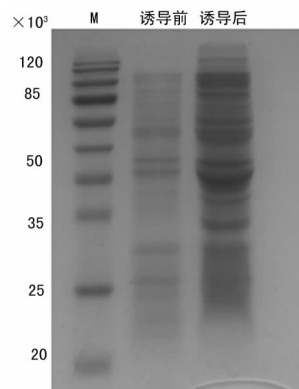
1.2.2 HMT 表达及纯化^[12] 用超声破碎仪破坏菌体后离心取上清,0.22 μm 膜过滤后,用镍亲和和层析柱纯化,上样缓冲液:PB 20 mmol/L,氯化钠 500 mmol/L,pH 7.4;洗脱缓冲液:PB 20 mmol/L,氯化钠 500 mmol/L,咪唑 500 mmol/L,pH 7.4,0%~100%线性洗脱。收集各个峰进行 SDS-PAGE 电泳检测,将含有目的蛋白的峰用 Sephadex G15 进行脱盐并加甘油保存。

1.2.3 HMT 酶活测定 (1)酶活测定最佳反应条件确定:按照反应体系的要求,分别加入各种试剂(缓冲液、Hcy、SAM、酶)反应一段时间后,加 DTNB 显色,412 nm 读取吸光值。实验分别设置不同梯度的条件,对反应时间、pH、缓冲液、温度进行优化,选择最优的反应条件。(2)酶活测定:稀释不同浓度的 Hcy 作为标准曲线按照上述最优反应体系条件进行反应,确定反应减少的 Hcy 的量,从而计算出酶活性。(3)酶保存方法的选择:分别添加不同的防腐剂、稳定剂、表面活性剂将同一批酶分别保存在 4、-20、-80 $^{\circ}\text{C}$,选取合适的时间在最优条件下测定酶的活性,以获得最优的酶保存条件。

2 结果

2.1 HMT 菌种表达 HMT 表达菌活化后,菌液吸光值达到 0.6~0.8 时,加异丙基硫代 β 半乳糖苷诱导表达,分别破碎诱导前和诱导后的菌体并经 SDS-PAGE 电泳检测,如图 1 所示,结果表明,经过诱导后 HMT 有大量表达,表达量在 15% 左右,可以进行纯化。

2.2 HMT 纯化 称适量菌体于上样缓冲液中混匀,超声破碎后离心取上清纯化。经镍亲和和层析纯化后,再脱盐,相对应的 SDS-PAGE 电泳结果如图 2 所示(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。结果显示,经两步纯化可得到纯度较高的 HMT 酶。HMT 相对分子质量为 40×10^3 ,纯度为 95%。



M:蛋白质标记物。

图 1 HMT 诱导表达 SDS-PAGE 检测结果

2.3 HMT 酶活测定

2.3.1 酶活测定最佳反应条件确定 分别选择 PB、Tris-HCl、HEPES 三种常用的试剂为不同缓冲液体系,作为反应环境,并对不同的 pH、温度、时间条件下进行酶活测定。结果见图 3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。在对缓冲液体系选择时,三种缓冲液吸光值分别为 0.10、0.09、0.06,吸光值越小,反应减少的 Hcy 量越多,由结果可以看出 HEPES 缓冲液为最佳反应缓冲体系。随着反应时间增加,显色反应减弱,在 25 min 后基本达到平台期,所以反应时间应控制在 10~25 min。选择 6.0~9.0 pH 范围内观察酶活变化,最后确定最佳 pH 为 7.4。酶反应最佳反应温度在 25~37 $^{\circ}\text{C}$,所以选择 0~45 $^{\circ}\text{C}$ 测定酶的最佳反应温度,最终确定酶的最佳反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.2 HMT 活力测定 所有缓冲液新鲜配制,总测定体系 0.2 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25 min,测定波长 412 nm。稀释不同浓度的 Hcy 作为标准曲线($Y=0.0058X+0.0482$, $r^2=0.9972$),按照上述反应体系条件进行反应,确定反应减少的 Hcy 的量,1 个酶活性单位定义为每 25 min 消耗 1 $\mu\text{mol/L}$ 反应物(Hcy)所需要的酶量,由此计算出比活为 2 000 U/mg。

2.3.3 HMT 酶液的稳定性 将新制备的酶分为加甘油和未添加甘油 2 组,分别置于 4、-20、-80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,每间隔 7 d 测定酶活力 1 次。以纯化后的 HMT 酶液的酶活力为 100%,分别计算酶活保留率(%)。测定不同温度下 2 组 HMT 酶液活力($n=3$),并计算酶活保留率,得到 HMT 在半年内的稳定性数据并作图。由图 3 可知,HMT 酶液常温保存时酶活性丧失最快,1 个月后酶活保留率小于 10%;-20 $^{\circ}\text{C}$ 和 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存时,-80 $^{\circ}\text{C}$ 下的酶活丧失略小于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的,半年后两者的酶活保留率都在 50% 以上,且两者酶活丧失都远小于常温保存。由此可以看出,低温保存有利于 HMT 酶液的稳定。另外,从图 3 还可以看出,加入 30% 甘油有利于 HMT 酶液的稳定,加入甘油的酶液酶活保留率都高于不加甘油组。-80 $^{\circ}\text{C}$ 下含 30% 甘油的 HMT 酶液最为稳定。

2.4 保护剂添加对冻干过程中的 HMT 活力稳定性的影响 分别将常见的具有保护作用的冻干保护剂山梨醇、海藻糖、甘露醇添加到 HMT 酶液中,进行冷冻干燥。以冷冻干燥前酶活力作为 100.0%,比较不同保护剂对酶液冷冻干燥过程中 HMT 稳定性的影响,见表 1。在 HMT 冻干过程中,4% 的甘露醇和 8% 的海藻糖对 HMT 酶液保护效果最好,酶活保留率

都达到 100.0%。其余不同添加量的海藻糖和甘露醇,酶活保留率虽然都在 100.0% 以下,但都高于对照组(未加保护剂)。这说明海藻糖、甘露醇对 HMT 冻干都有保护作用。山梨醇保护能力最差,低浓度山梨醇的 HMT 冻干品酶活保留率竟低于对照组,山梨醇浓度达到 8% 以后酶活保留率才提高到 90.6%。由数据还可看出,海藻糖、山梨醇对 HMT 冻干过程的保护作用具有浓度依赖性,酶活保留率随浓度的升高也在上升;而 8% 甘露醇时酶活保留率反而下降,因此其最适浓度为 4%。

表 1 不同保护剂对 HMT 冻于过程的影响		
保护剂	浓度(%)	酶活保留率(%)
山梨醇	2	56.8
	4	78.9
	8	90.6
海藻糖	2	95.6
	4	95.6
	8	100.0
甘露醇	2	96.6
	4	104.0
	8	89.9
未加保护剂	0	81.5

3 讨 论

HMT 在生物大分子的甲基化修饰方面发挥着重要作用。近些年随着 HMT 在临床上的应用越来越广泛,HMT 的制备和特性研究成为关键,尤其以建立简单快速的 HMT 酶活测定方法和保存条件最为重要。

ELLMAN 试剂显色迅速、稳定,在蛋白领域是一种常用的显色试剂。本文就是基于 ELLMAN 试剂 DTNB 的显色原理,同反应物 Hcy 发生特异显色反应,从而通过显色深浅推断出底物减少的多少进而计算酶活。DTNB 显色反应受环境因素影响小且迅速;另外,412 nm 属于可见光区,普通实验室即可具备此条件^[13]。

冷冻干燥中的脱水过程会损伤蛋白质,使得复水后的蛋白质很容易失去活性。因此,必须加入保护剂以减少酶活力的损失。保护剂对蛋白质起保护作用的优先作用假说^[14]被广为接受,其主要原理是保护剂优先被排斥在蛋白质区域外(优先排斥),蛋白质则优先与水作用(优先水合)。在这种情况下,蛋白质表面就比其外部溶液分布有较多的水分子,形成稳定蛋白质的水化膜,从而对蛋白质起保护作用。这可解释本研究中甘油对 HMT 酶液的保护作用。

目前,对于保护剂稳定生物分子的机制主要有“水替代”和“玻璃态”假说^[14]。“水替代”假说认为冷冻干燥过程中,保护剂的羟基能替代蛋白质表面失去的水的羟基,使蛋白质表面形成一层假定的水化膜,保护氢键的联结位置不直接暴露在周围环境中,从而稳定蛋白质的高级结构。另一种“玻璃态”假说认为当保护剂浓度足够大,且不会发生保护剂的结晶,在干燥过程中,保护剂、水混合物就会玻璃化。在这种状态下,具有黏性的保护剂形成一种玻璃体,包围在蛋白质分子的周围,阻止蛋白质的伸展和沉淀,从而维持蛋白质分子三维结构的稳定,起

到保护作用。本研究中 4% 甘露醇不仅可以保护冻干过程中的 HMT,而且对溶解后的 HMT 也具有活性保护作用。因此,甘露醇是 HMT 的一种理想的冻干保护剂。

综上所述,HMT 活性测定方法克服了采用放射性标记 AdoMet 分析甲基转移酶费时、无法定量、重复性差以及反应产物分离步骤繁琐等缺点,并探讨了 HMT 活性检测的最佳反应条件、影响因素以及酶液保存条件,为 HMT 的临床应用奠定了基础。

参考文献

[1] Bedford MT,Richard S. Arginine methylation:an emerging regulator of protein function[J]. Mol Cell,2005,18(3):263-272.

[2] Bedford MT,Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals;who,what,and why[J]. Mol Cell,2009,33(1):1-13.

[3] Cheng X,Blumenthal R. S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases: structures and functions [M]. Singapore: World Scientific,1999;5-8.

[4] Clarke SG,Tamanoi F. The enzymes;protein methyltransferases [M]. San Diego:Academic Press,2006;7-10.

[5] Ganther HE. Enzymic synthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in mouse liver extracts[J]. Biochemistry,1966,5(3):1089-1098.

[6] Spallholz JE. Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity[J]. Biomed Environ Sci,1997,10(2/3):260-270.

[7] Breksa AP,Garrow TA. Recombinant human liver betaine-homocysteine S-methyltransferase;identification of three cysteine residues critical for zinc binding [J]. Biochemistry,1999,38(42):13991-13998.

[8] Delgado-Reyes CV,Wallig MA,Garrow TA. Immunohistochemical detection of betaine-homocysteine S-methyltransferase in human,pig, and rat liver and kidney[J]. Arch Biochem Biophys,2001,393(1):184-186.

[9] Carmel R,Donald W. Homocysteine in health and disease[M]. New York:Cleveland Clinic Foundation,2001;63-78.

[10] Wijekoon EP,Hall B,Ratnam S,et al. Homocysteine metabolism in ZDF (type 2) diabetic rats[J]. Diabetes,2005,54(11):3245-3251.

[11] Lozada-Ramirez JD,Martinez-Martinez I,García-Carmona F,et al. Cloning,overexpression,purification,and characterization of S-adenosylhomocysteine hydrolase from Corynebacterium efficiens YS-314 [J]. Biotechnol Prog,2008,24(1):120-127.

[12] Neuhierl B,Thanhichler M,Lottspeich F,et al. A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation[J]. J Biol Chem,1999,274(9):5407-5414.

[13] Khare P,Gupta AK,Gajula PK,et al. Identification of novel s-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors through homology-model-based virtual screening,synthesis,and biological evaluation [J]. J Chem Inf Model,2012,52(3):777-791.

[14] 张玉华,凌沛学,籍保民,等. 糖类在生物活性物质冷冻干燥中的保护作用及其作用机制[J]. 中国生化药物杂志,2006,27(4):247-249.