

• 基础研究论著 •

腺苷同型半胱氨酸水解酶的表达纯化及活性测定方法建立*

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

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

摘要:目的 获得高纯度的重组 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶(SAHH), 并建立其活性测定方法。方法 运用基因工程技术, 在大肠杆菌系统中原核表达重组 SAHH, 经过镍亲和和层析和 Sephadex G15 两步纯化, 得到目的蛋白对其进行理化性质鉴定, 并通过优化活性测定条件, 确定 SAHH 活性测定方法。结果 终产物 SAHH 纯度为 95%, 相对分子质量为 49 000, 比活性为 1 615 U/mg。在 37 °C、pH7.5 的 HEPES 缓冲液中反应 20 min 为酶活性测定最佳条件, 抑制剂可有效抑制酶活性。结论 通过基因重组技术可获得高纯度的 SAHH, 产物理化性质良好, 活性测定方法成功建立, 为循环酶法测定同型半胱氨酸工艺稳定放大提供可循环依据, 并且为 SAHH 抑制剂科学研究提供一种可靠的方法。

关键词:腺苷同型半胱氨酸水解酶; 亲和层析; 生物活性; DTNB 显色

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)12-1500-03

Expression and purification of adenosyl homocysteine hydrolase and establishment of its activity determination method*

Xu Xiuli^{1,2}, Zhou Jianping¹, Liu Pei^{1,2}, Hao Qingqin^{1,2}, Wen Xinyu¹, Wang Ling¹, Tian Yaping^{1△}

(1. Department of Biochemistry, General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China;

2. Nankai University School of Medicine, Tianjing 300071, China)

Abstract: **Objective** To obtain high purified recombinant S-adenosyl homocysteine hydrolase(SAHH) and establish its activity determination method. **Methods** Genetic engineering technology was adopted to express recombinant SAHH in E. coli prokaryotic expression system. The target protein was obtained via two-step purification including nickel affinity chromatography and Sephadex G15, and its physical and chemical properties were identified. SAHH activity determination method was established through optimizing the condition of activity measurement. **Results** The purity of endproducts SAHH was 95% with relative molecular mass of 49 000 and the specific activity of 1 615 U/mg. The condition of 37 °C, pH7.5 HEPES buffer and 20 minutes' reaction was optimum for SAHH activity determination. SAHH inhibitor effectively inhibited its activity. **Conclusion** High purified SAHH can be obtained through recombinant genetic technology with good physical and chemical properties. Successful establishment of its activity determination provide a basis for stable amplification of circulating homocysteine enzymatic measurement technology and a reliable method for scientific research on SAHH inhibitors.

Key words: adenosyl homocysteine hydrolase; affinity chromatography; biological activity; DTNB colourtest

腺苷同型半胱氨酸水解酶(SAHH)是广泛存在于生物体内的一种“管家酶”, SAHH 可以催化腺苷同型半胱氨酸(AdoHcy)通过水解生成腺苷(Ado)和同型半胱氨酸(Hcy)^[1]。AdoHcy 是 S-腺苷甲硫氨酸(AdoMet)转甲基作用的唯一产物, 而代谢 AdoHcy 的唯一途径即为 SAHH 催化途径, 当 SAHH 受到抑制时, 会抑制 AdoHcy 的水解, 进而抑制 AdoMet 的转甲基作用, 因此, SAHH 对生物体内 AdoMet 转甲基作用及 AdoHcy 参与的反应起着重要的调节作用^[2]。

目前, SAHH 的抑制剂在药物设计领域引起广泛关注, 抑制 SAHH 活性即可抑制相应的转甲基作用, 因此, 其抑制剂表现出抗病毒、抗寄生虫等多种特性^[3]。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, 可以通过检测同型半胱氨酸的生成量来推测酶活^[4]。SAHH 抑制剂有效性的体现通过测定 SAHH 酶活可以进行评价, 因此, 一种简便标准化的 SAHH 酶活测定方法的提出对其研究可以起到很大的推动作用。

此外, 同型半胱氨酸测定已广泛应用于评价心血管疾病风险, 目前该项目多采用免疫化学分析方法, 价格昂贵。循环酶法^[5]分析可有效降低成本, 提供检测效率, 该酶的制备与纯化

将推进循环酶法的发展与应用, 基因工程方法制备生化酶类, 可有效降低成本, 如果该酶纯化制备工艺稳定投入生产, 将降低同型半胱氨酸试剂盒生产成本, 促进生化诊断试剂国产化步伐。

1 材料与方法

1.1 材料 pET30a(+)质粒、大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)均为本实验室保存; pET30a-SAHH 质粒由本实验室构建并保存。

1.2 仪器与试剂 纯化仪为 GE 公司 AKTA prime; 酶标仪为 Thermo 公司产品; 层析柱及填料购自 GE 公司; 酵母粉、蛋白胨均购自 Oxoid 公司; 硫酸卡那霉素、异丙基硫代 β 半乳糖苷(IPTG)、磷酸盐、氯化钠均为国产, 购自国药集团北京试剂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 SAHH 菌种表达及鉴定 由 NCBI 上检索出 SAHH 基因序列 NC_000006^[6], 将其编码区克隆至 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, 表达产物进行 SDS-PAGE 电泳检测表达量。

1.3.2 SAHH 纯化^[7] 表达菌体用超声破碎仪破菌后离心

* 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:许秀丽,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.

取上清,过滤后用镍亲和层析柱进行亲和层析,上样缓冲液为 20 mmol/L PB,500 mmol/L 氯化钠,pH7.4,洗脱缓冲液为 20 mmol/L PB,500 mmol/L 氯化钠,500 mmol/L 咪唑,pH7.4,从 0%~100%线性洗脱。收集各个峰进行电泳检测,检测后包含有目的蛋白的峰,再用 Sephadex G15 进行脱盐加甘油保存。SDS-PAGE 蛋白电泳对相对分子质量进行估测;采用高效液相色谱发对纯度进行鉴定;N 端测序分析确定蛋白序列一致性;采用 BCA 法测定蛋白浓度。

1.3.3 SAHH 酶活测定^[8] (1)酶活测定最佳反应条件确定:按照反应体系缓冲液、显色底物 DTNB、AdoHcy、酶、水,分别加入各种试剂反应一段时间后,读取 412 nm 处吸光值。实验时分别设置不同梯度的条件对显色底物浓度、反应时间、反应 pH、反应缓冲液、反应温度进行优化,选择最优的反应条件。(2)酶活测定:稀释不同浓度的同型半胱氨酸作为标准曲线按照上述最优反应体系条件进行反应,确定反应生成的同型半胱氨酸的量,从而计算出酶活。

2 结果

2.1 SAHH 菌种表达 SAHH 菌种由北京天一辉远生物公司进行测序,结果见图 1,测序结果显示插入的目的片段与基因片段序列一致,克隆成功。SAHH 菌种活化后,在 OD 值为 0.6~0.8 时,用 IPTG 诱导表达,分别取诱导前和诱导后的菌体进行破碎并 SDS-PAGE 蛋白电泳检测(图 2),结果表明,经过诱导后 SAHH 有大量表达,表达量在 15% 左右,可以进行纯化。

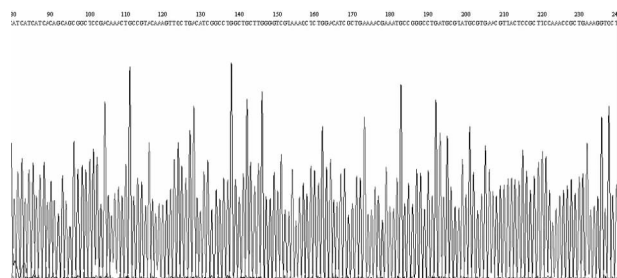


图 1 目的基因测序结果

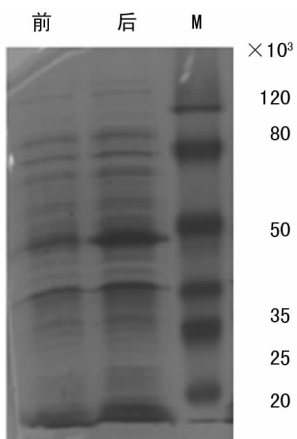


图 2 SAHH 诱导表达前后 SDS-PAGE 检测结果

2.2 SAHH 纯化 SAHH 主要取可溶性上清进行纯化,首先进行镍亲和和层析纯化,再进行脱盐纯化,纯化层析图如图 3 所示,与之对应的 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 4 所示,结果表明,经过两步纯化可得到纯度较高的 SAHH 酶。SAHH 相对分子质量为 49 000,纯度为 95%,N 端测序结果与理论序列一致。

2.3 SAHH 生物活性测定

2.3.1 酶活测定最佳条件确定 反应缓冲体系确定:选择 PB、Tris-HCl、HEPES 三种不同的缓冲液体系,作为反应环境进行酶活测定,吸光值分别为 0.15、0.18、0.13,吸光值越大代表反应生成的 Hcy 越多,因此反应缓冲体系选择 HEPES 缓冲液。显色底物浓度确定:分别加入不同量的 DTNB 显色底物,观察显色 OD 值,得出最佳 DTNB 加入浓度为 100 μmol/L。酶活反应时间的确定:不同时间测得的反应 OD 值不同,随着反应时间增加,显色反应增加,反应在 30 min 后基本达到平台期,所以选择反应时间应控制在 10~30 min。反应 pH 对酶活影响:由于文献报道该酶活催化最佳 pH 为中性附近,故选择中性 pH 附近的 pH6.5~8.5 作为最佳反应 pH,发现在 pH 7.5 时反应最佳。反应温度的影响:选择不同的温度进行酶活测试,发现在 37 °C 时,反应最佳。

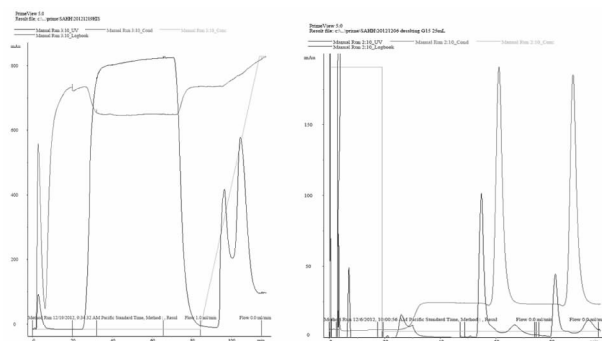


图 3 SAHH 两步层析图

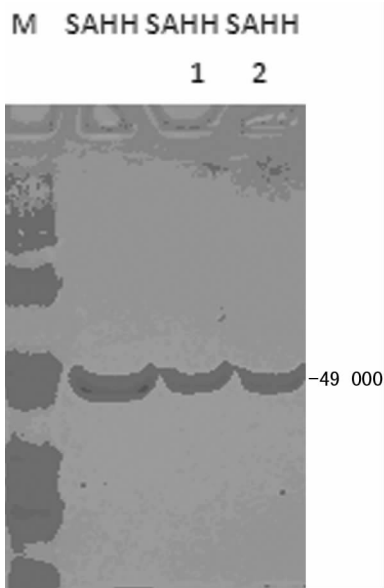


图 4 SAHH 纯化峰 SDS-PAGE 检测图

2.3.2 酶活性单位的确定 采用 200 μL 反应体系:HEPES 缓冲液 50 mmol/L,DTNB 250 μmol/L,AdoHcy 500 μmol/L,酶 20 μg,水补足至 200 μL,置于 37 °C 反应 20 min,测定 412 nm 的吸光值。同时将上述反应体系中的 AdoHcy 替换成 Hcy 作为标准曲线以观察生成的 Hcy 的量,计算 SAHH 活性,定义酶的比活为 20 min 内生成 1 μmol/L 产物所需要的酶量为 1 单位。得到 SAHH 酶活测定标准曲线为 $Y = 0.006X + 0.050$ ($r^2 = 0.986$),由此计算出酶活性为 1 615 U/mg。

2.3.3 抑制剂对酶活性影响 Neplanocin A(NPA)及其类似物可强烈抑制 SAHH 的活性,故选择该化合物作为 SAHH 抑制剂的代表,验证本活性测定方法的有效性。反应体系中加入 0.04 μg/mL NPA 检测出酶比活为 700 U/mg,活性有明显下

降,证明该方法可以有效地检测酶活。

3 讨 论

腺苷同型半胱氨酸水解酶是一种广泛存在于各种生物中的调节酶类,主要作为 S-腺苷蛋氨酸转甲基作用的抑制剂发挥调节作用。近年来,SAHH 抑制剂作为病毒抑制靶点方面的研究得到了大力的推广和支持。SAHH 抑制剂作为一种新兴的药物设计靶点,各种与之匹配的科研方法还不十分齐备,尤其以 SAHH 酶活测定方法的建立最为重要、快速、准确的测定其活性能为药物筛选提供有力的支持^[9]。

ELLMAN 试剂是在蛋白领域常用的一种显色试剂,显色迅速稳定,本文设计的方法就是基于 ELLMAN 试剂 DTNB 的显色原理,同生成物 Hcy 发生特异显色反应,从而通过显色深浅推断出生成物的多少进而计算酶活。DTNB 显色迅速,加入后即可发生反应,DTNB 的显色不会受到太大环境因素的影响,另外,选择 412 nm 属于可见光区,对实验条件要求不高,普通实验室即可具备此条件^[10]。

酶生物活性的多少由多种因素的影响,反应环境的温度、pH、缓冲环境等都会影响到酶活的测定,因此,选择一个最佳的酶反应环境也至关重要。分别改变不同影响因素做出酶活曲线,从而判断出各个影响因素的最佳反应条件。最佳反应条件的确定可以保证反应的可重复性和准确性,也为后续科研工作提供可借鉴的数据。

综上所述,腺苷同型半胱氨酸水解酶活性测定方法^[11]可以以为抗病毒药物筛选靶点提供有效的依据和可靠的科研数据,可以推进 SAHH 抑制剂在抗病毒药物领域的发展^[12]。

参考文献

[1] 陈昕,王琳. S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶及其抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志,1998,27(1):66-73.
 [2] 阮桂芝. 同型半胱氨酸在临床诊治中的价值[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(10):1151-1152.
 [3] 纪宇,李振涛,朱奇,等. S-腺苷高半胱氨酸水解酶及其抑制剂的

研究近况[J]. 药学进展,2005,29(11):481-486.

[4] Lozada-Ramirez JD, Martínez-Martínez 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.
 [5] Porcelli M, Fusco S, Inizio T, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant S-adenosylhomocysteine hydrolase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*[J]. Protein Expr Purif, 2000, 18(1):27-35.
 [6] 张金伟,曾润颖. 南极嗜冷假单胞菌 7197 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶(SAHH)基因的克隆与序列分析[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(4):5-7.
 [7] Nakanishi M, Iwata A, Yatome C, et al. Purification and properties of recombinant *Plasmodium falciparum* S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase[J]. J Biochem, 2001, 129(1):101-105.
 [8] Yuan CS, Ault-Riché DB, Borchardt RT. Chemical modification and site-directed mutagenesis of cysteine residues in human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase[J]. J Biol Chem, 1996, 271(45):28009-28016.
 [9] 何雪梅. S-腺苷同型半胱氨酸水解酶的提纯及应用[D]. 长沙:中南大学,2010.
 [10] 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.
 [11] Nakanishi M. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase as an attractive target for antimicrobial drugs[J]. Yakugaku Zasshi, 2007, 127(6):977-982.
 [12] 付云峰,吴庆莉,杨以阜,等. 以 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶为潜在靶点的新药研究进展[J]. 中国药理与毒理学杂志, 2006, 20(6):510-514.

(收稿日期:2013-03-15)

(上接第 1499 页)

变,其各型毒株 HA 变化也有所不同,在配制疫苗时,为保证疫苗质量,非常有必要确定好半成品 HA 含量的控制范围,对保存的各型别的半成品,在使用时进行 HA 含量的复测,以确保半成品的 HA 含量在控制范围之内。笔者根据稳定性试验结果,将企业内控标准规定在疫苗配制时 HA 含量控制在 33~36 μg/mL,在 2011 年制备的 20110701 等批疫苗,HA 含量分别为:成人剂量型, H1N1 33.04 μg/mL(16.56/0.5 mL); H3N2 35.54 μg/mL(17.77 μg/0.5 mL); B 34.66 μg/mL(17.33 μg/0.5 mL)。该疫苗含有较高的 HA,可提供适宜的抗原量。卵清蛋白和细菌内毒素含量偏低,避免了不良反应的发生,在鼠的安全性和免疫性的研究与国外疫苗效果基本一致, H1N1、H3N2、B 的保护率达到了 94%、97% 和 70%;各型抗体的 GMT 增加值均在 4 倍以上^[11],为进一步的临床研究提供了依据。

参考文献

[1] WHO. New influenza A/(H1N1) virus; global epidemiological situation[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84(25):249-257.
 [2] 张延龄,张晖. 疫苗学(修订本)[M]. 北京:科学出版社,2006:1171-1185.
 [3] 曾祥兴,李康生. 流感百年:20 世纪流感大流行的回顾与启示[J].

医学与社会,2010,23(11):4-6.

[4] Smith NM, Bresee JS, Shay DK, et al. Prevention and control of influenza: recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices(ACIP)[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1999, 48(RR-4):1-42.
 [5] Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine[J]. Vaccine, 2003, 21(16):1776-1779.
 [6] Wood JM, Dunleavy U, Newman RW, et al. The influence of the host cell on standardization of influenza vaccine potency[J]. Dev Biol Stand, 1999, 98(1):183-188.
 [7] 郭元吉,程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 4 版. 北京:中国三峡出版社,1997:16-32.
 [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
 [9] 邵铭,刘书珍,邱平,等. 2011 年流感疫苗批签发情况总结与质量分析[J]. 中国生物制品学杂志,2012,25(9):1242-1244.
 [10] WHO. Requirements for influenza vaccine, inactivated[J]. TRS, 1991, 8(14):38-52.
 [11] 戴宗祥,高菁霞,廖国阳,等. 季节性流行性感病毒裂解疫苗在小鼠中的安全性及免疫原性研究[J]. 中国疫苗和免疫, 2012, 18(6):530-533.

(收稿日期:2013-01-09)