

## 胱硫醚 $\beta$ - 合酶活性的测定及应用

郑 斌 韩 梅 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 石家庄 050017)

**主题词** 胱硫醚  $\beta$ - 合酶; 酶活性; 比色测定法; 大鼠

**摘 要** 胱硫醚  $\beta$ - 合酶催化同型半胱氨酸与丝氨酸缩合成胱硫醚, 后者经茚三酮显色后在 465 nm 波长处有最大吸收峰, 而底物丝氨酸和同型半胱氨酸与茚三酮的反应产物在此波长吸收很低, 因此可用酶促反应后 465 nm 吸光度的增加值检测胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性的高低。依据这一原理, 本文建立了胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性比色测定方法。实验结果发现, 该方法具有精密度高、重复性好和简便易行等优点。对大鼠不同组织胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性进行测定的结果显示, 大鼠各种组织中均有胱硫醚  $\beta$ - 合酶分布, 但其活性存在一定差异。

### Cystathionine $\beta$ - synthase Activity Assay Method and its Application

ZHENG Bin, HAN Mei and WEN Jin- Kun

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**MeSH** Cystathionine  $\beta$ - synthase; Enzyme Activation; Absorptiometry, Photon/methods; Rat

**ABSTRACT** **Aim** To establish a method of cystathionine  $\beta$ - synthase activity assay and detect cystathionine  $\beta$ - synthase activity in various tissues of rat. **Methods** We first extracted cystathionine  $\beta$ - synthase from various tissues of rat. And then the final concentration of the assay components in 0.4 mL of incubation mixture were: 100 mmol/L Tris- HCl (pH 8.6), 0.25 mmol/L pyridoxal 5'- phosphate, enzyme protein (2.5~40 mg), 20 mmol/L serine, and 20 mmol/L L- homocysteine. After incubation for 60 min at 37 °C, the reaction was stopped by addition of 0.05 mL 50% trichloroacetic acid. Following 5 min incubation on ice, the precipitated protein was removed by centrifugation. To a 0.2 mL aliquot of a supernatant, 3.3 mL of ninhydrin reagent was added and the color was developed. The absorbance at 465 nm was read against a substrate and enzyme- free blank was subtracted. **Results** Colorimetry to detect the cystathionine  $\beta$ - synthase activity was established; and cystathionine  $\beta$ - synthase activity in various tissues of rat was different. **Conclusion** The method established can detect cystathionine  $\beta$ - synthase activity successfully. It had the merit of high precision and good repetition and was easy to operate.

胱硫醚  $\beta$ - 合酶(cystathionine  $\beta$ - synthase, CBS)是一种吡哆醛磷酸依赖性酶, 以 63 kDa 的同源四聚体形式存在<sup>[1]</sup>, 它催化同型半胱氨酸与丝氨酸缩合成胱硫醚。近年发现, 当胱硫醚  $\beta$ - 合酶基因突变造成胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性下降时, 可引起同型半胱氨酸堆积, 导致高同型半胱氨酸血症。现已证实, 后者是造成动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的一个独立的危险因素<sup>[2]</sup>。为了进一步研究胱硫醚  $\beta$ - 合酶的活性调节机制及其在 As 发生发展过程中的意义, 本文建立了一种简便的胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性测定方法, 并对大鼠不同组织中的胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性进行了检测。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

SD 大鼠, 体重 180~200 g, 河北省实验动物中心提供。L- 同型半胱氨酸、十六烷基三甲基溴化

胺、胱硫醚、吡哆醛磷酸为 Sigma 公司产品, 丝氨酸为上海康达氨基酸厂出品,  $\beta$ - 巯基乙醇购自华美生物工程公司, 其他试剂为国产分析纯。

#### 1.2 胱硫醚 $\beta$ - 合酶提取液的制备

参照 Skovby 等<sup>[3]</sup>方法, 将大鼠断头处死, 迅速取出肝脏, 生理盐水清洗后, 按 2.5 mL/g 组织加入提取液(1 mmol/L  $\beta$ - 巯基乙醇、30 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 6.0) 制备匀浆。再加入等体积的裂解液(1 mmol/L  $\beta$ - 巯基乙醇、0.1% 十六烷基三甲基溴化胺), 充分混匀, 4 °C, 12 000 r/min 离心 20 min。取上清液经 glass wool 过滤后, -20 °C 保存备用。蛋白测定用改良酚试剂法, 以牛血清白蛋白为标准物。

#### 1.3 酶活性的测定

参照 Kraus 等<sup>[4]</sup>方法略加改进。取反应缓冲液(100 mmol/L Tris- HCl, pH 8.6) 40  $\mu$ L, 加入 0.1 mmol/L 丝氨酸 80  $\mu$ L, 12.5 mmol/L 吡哆醛磷酸 8  $\mu$ L, 酶提取液适量, 相当于 2.5~40 mg 蛋白质, 37 °C 孵

育 5 min 后, 再加入 0.2 mol/L 的 L- 同型半胱氨酸 40  $\mu$ L, 用水定容到 400  $\mu$ L。于 37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后, 用 50% 三氯乙酸终止反应, 冰浴 5 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清 200  $\mu$ L, 加入 3.3 mL 茚三酮(0.5 g 茚三酮溶于 50 mL 冰醋酸后, 再加 1/3 体积的冰磷酸)。沸水浴 5 min, 冰浴 2 min 终止反应, 室温静置 20 min 后, 用分光光度计于 465 nm 波长测定吸光度值。同时设定底物对照和酶提取液对照。所用底物均需现用现配。酶活性计算公式: 胱硫醚 ( $\mu$ mol) =  $\{ (S - B) / A \} \times I$ ; 式中

S: 标本吸光度值减去酶提取液对照的吸光度值;

B: 底物对照的吸光度值;

A: 1  $\mu$ mol 胱硫醚的吸光度值。

I: 5.5

酶活性单位的定义为在 37  $^{\circ}$ C 1 h 催化 1  $\mu$ mol 胱硫醚生成所需的酶量为一个单位。

#### 1.4 显色稳定性测定

200  $\mu$ L 胱硫醚溶液(1  $\mu$ mol) 与 3.3 mL 茚三酮充分混合, 依次经沸水浴 5 min, 冰浴 2 min 后, 取出置于室温。分别在 5、10、15、20、25、30、40、50 和 60 min 后, 于 465 nm 处测吸光度值。

#### 1.5 反应产物吸收光谱的测定

1  $\mu$ mol 胱硫醚与酶促反应缓冲液(不含酶提取液和底物)混合, 加入 3.3 mL 茚三酮。经沸水浴 5 min, 冰浴 2 min 后, 室温静置 20 min, 之后测定不同波长下的吸光度值; 同时按酶活性的测定方法在相应波长测定酶促反应产物的吸光度值。以波长为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制曲线。

#### 1.6 批内和批间精确度测定

取酶提取液, 按上述方法重复测定 6 次, 每次 10 管, 计算变异系数。将提取液分装后每隔 3~5 d 测定胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性 1 次, 每次 10 管, 共测 4 次。计算各次平均值的变异系数。

#### 1.7 线性关系及灵敏度测定

取酶提取液 1 份, 精确测定胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性后, 作 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 和 1:64 的连续稀释, 并测定酶的活性。每个稀释度均设立底物与酶提取液对照, 将测定结果与理论值作相关性分析并测定酶活性的最小可检出限。

#### 1.8 回收实验

1.8.1 标准曲线的建立 用反应缓冲液配制胱硫醚含量为 15  $\mu$ mol 的贮存液, 作连续倍比稀释后, 使胱硫醚含量分别为 7.5、3.75、1.875、0.9375 和 0.46875  $\mu$ mol, 与 3.3 mL 茚三酮充分混合, 沸水浴 5

min, 冰浴 2 min, 取出于室温静置 20 min 后, 在 465 nm 处测定吸光度值。以吸光度为纵坐标, 胱硫醚的摩尔数为横坐标, 绘制标准曲线。

1.8.2 回收率的测定 按上述方法测定 12 份酶提取液的吸光度值后, 分别向反应体系中加入 24、44 和 64  $\mu$ L 0.1 mol/L 胱硫醚溶液, 使反应体系中胱硫醚的摩尔数增加到 2、6 和 8  $\mu$ mol, 显色后再次测定吸光度值, 与理论值比较, 计算回收率。

#### 1.9 大鼠不同组织中胱硫醚 $\beta$ - 合酶活性的测定

按上述从肝脏提取胱硫醚  $\beta$ - 合酶方法分别从大鼠心、肝、脾、肺、肾和腹主动脉提取并测定胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性。

## 2 结果

#### 2.1 胱硫醚 $\beta$ - 合酶显色稳定性

胱硫醚经茚三酮显色后静置于室温中, 在前 20 min 内, 吸光度以 0.005/min 的速度递减, 在 20~40 min 期间, 吸光度不发生明显的变化。之后, 每隔 10 min 吸光度降低 0.002。表明标本应在显色后 20 min 才能测定吸光度值, 且应在 20 min 内测定完毕。

#### 2.2 反应产物的吸收光谱

胱硫醚经茚三酮显色后在酸性环境中于 465 nm 处有最大吸收峰, 其不同波长下的吸光度如图 1 (Figure 1) 所示。为了检查酶促反应体系中所生成的胱硫醚与标准品的吸收光谱是否相同, 我们测定了酶促反应产物在不同波长下的吸光度值, 发现在 430~500 nm 之间两者的吸光度值具有相关性。证实在 465 nm 波长下所测得的吸光度值可表示反应体系中胱硫醚的生成量。

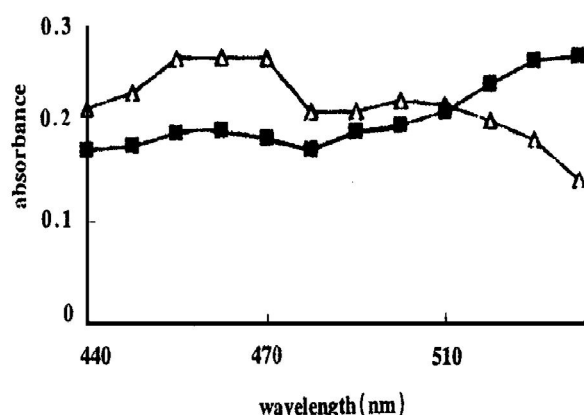


图 1. 胱硫醚和酶促反应产物的吸收光谱

Figure 1. Absorption spectrum of cystathionine and reaction product. ■- ■: reaction products;  $\triangle$ -  $\triangle$ : cystathionine

#### 2.3 批内和批间精确度

6 次胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性测定的变异系数在 3.6% ~ 4.86% 之间, 小于 5%; 4 批测定结果的平均值之间的变异系数为 4.6%, 亦小于 5%, 说明测定值的精确度符合要求。

#### 2.4 线性关系及灵敏度

酶提取液连续稀释 4 次, 各稀释度测定值的相关系数  $r = 0.95$ , 说明相关性良好。当反应体系中酶提取液的蛋白量低于 2.5 mg 时, 酶活性不能检出。

#### 2.5 回收率

向反应体系中加入 24、44 和 64  $\mu$ L 0.1 mol/L 的胱硫醚后, 其平均回收率分别为 101.77% (100.4% ~ 103.1%)、99.01% (98.57% ~ 100.15%) 和 101.39% (99.88% ~ 102.19%), 说明在所检测的浓度范围内, 回收良好。

#### 2.6 大鼠不同组织中胱硫醚 $\beta$ - 合酶的活性

大鼠心、肝、脾、肺、肾和腹主动脉组织中胱硫醚  $\beta$ - 合酶比活性均值分别为  $0.27 \pm 0.01$ 、 $0.64 \pm 0.01$ 、 $0.53 \pm 0.05$ 、 $0.30 \pm 0.01$ 、 $0.54 \pm 0.08$  和  $0.47 \pm 0.05$  ku/g, 其中, 肝组织中胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性最高, 与脾、肾、血管组织比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 肾、血管、脾组织中胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性居中, 三者比较无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 心肌和肺组织中活性最低, 二者之间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

已经证明, 胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性下降可导致同型半胱氨酸堆积, 后者通过损伤血管内皮、影响血凝机制、促进平滑肌细胞增殖等作用而成为引发动脉粥样硬化的一个独立的危险因素<sup>[4]</sup>。因此建立一种测定胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性的实验方法对研究胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性调节机制及其与高同型半胱氨酸血症之间的关系至关重要。胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性测定国外多采用放射性同位素标记法<sup>[1]</sup>, 此种方法不仅操

作繁琐, 而且增加了放射性污染。本文所应用的比色法是依据胱硫醚经茚三酮显色后在 465 nm 波长处有最大的吸收峰, 而丝氨酸、同型半胱氨酸与茚三酮的反应产物在此波长吸收很低, 因此, 可用酶促反应后 465 nm 吸光度的增加值(减去底物对照的吸光度值)检测胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性的高低。此方法具有稳定、精密度高、重复性好、简便易行等优点, 适于一般实验室应用。本实验应注意以下几点: (1) 固定底物浓度 20 mmol/L, 测定酶浓度对酶促反应速度的影响, 结果显示, 酶提取液用量以含有 20 mg 蛋白较为适宜; (2) 丝氨酸、同型半胱氨酸浓度对酶活性测定结果具有一定影响, 两者浓度为 20 mmol/L 时, 所测得的吸光度值大小适中; (3) 孵育时间以 60 min 最为适宜。时间过短, 酶促反应不充分。用本法测定了大鼠不同组织中胱硫醚  $\beta$ - 合酶的活性, 显示大鼠各种组织中均有胱硫醚  $\beta$ - 合酶存在。在所检测的组织中, 肝组织胱硫醚  $\beta$ - 合酶活性较高, 心肌和肺组织中略低, 脾、肾、血管组织居中。

#### 参考文献

- 1 Kery V, Poneleit L, Kraus JP. Tryptase cleavage of human cystathionine  $\beta$ - synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **355**: 222-232
- 2 Glueck CJ, Shaw P, Lang JE, et al. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol*, 1995, **75** (15): 132-136
- 3 Skovby F, Kraus JP, Rosenberg LE. Biosynthesis and proteolytic activation of cystathionine  $\beta$ - synthase in rat liver. *J Biol Chem*, 1984, **259**: 588-593
- 4 Kraus JP, Packman S, Fowler B, et al. Purification and properties of cystathionine  $\beta$ - synthase from human liver. *J Biol Chem*, 1978, **253**: 523-528

(此文 1999- 05- 30 收到, 1999- 11- 15 修回)

(此文编辑 胡必利)