



УДК 577.154.26

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ И ДИСУЛЬФИДНЫХ ГРУПП
В β -1,3-ГЛЮКАНАЗЕ ИЗ МОРСКОГО МОЛЛЮСКА
SPISULA SACHALINENSIS

Елякова Л. А., Улькина Ж. И., Бережневская Л. И.,
Глебо Л. И.

Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного научного центра Академии наук СССР,
Владивосток

Показано, что β -1,3-глюканаза-ламинариназа IV (КФ 3.2.1.6 1,3- β -D-глюканглюканогидролаза) из морского моллюска *Spisula sachalinensis* не содержит свободных сульфгидрильных групп. После восстановительного расщепления тиогликолевой кислотой и NaBH_4 в среде 8 М мочевины определено 5 дисульфидных групп. Столько же групп получено после электролитического восстановления в нейтральной среде при катодном напряжении $-1,8$ В в отсутствие детергента; в среде 8 М мочевины определено 6 дисульфидных групп. Последовательное восстановление дисульфидных групп показало, что ферментативная активность β -1,3-глюканазы находится в зависимости от состояния ее дисульфидных связей и уменьшается по мере их разрыва.

Настоящее исследование проведено с целью определения количества сульфгидрильных и дисульфидных групп в β -1,3-глюканазе (КФ 3.2.1.6 1,3- β -D-глюканглюканогидролаза), выделенной из морского моллюска *Spisula sachalinensis* [1], и выяснения их влияния на каталитическую активность фермента.

Для определения свободных сульфгидрильных групп использовали метод спектрофотометрического титрования Бойера [2], реакцию с реагентом Элмана [3] и амперометрическое титрование [4], широко варьируя условия определения (см. «Экспериментальную часть»).

Показано, что ни одним из вышеуказанных методов не удалось определить свободных сульфгидрильных групп. Это согласуется с обнаруженным нами ранее фактом [1], что SH-специфичные групповые реагенты не влияют на активность β -1,3-глюканазы.

Определение общего числа дисульфидных связей проводили с предварительным восстановительным расщеплением несколькими методами: NaBH_4 [5], тиогликолевой кислотой [6] и электролитически [7, 8] с последующей регистрацией числа образованных SH-групп (табл. 1).

Как видно, тиогликолевая кислота и NaBH_4 в присутствии 8М мочевины расщепляют 5 дисульфидных связей, так же как и водород в момент выделения при электролизе без участия детергента при катодном напряжении $-1,8$ В. В последнем случае восстановление идет во времени: в 1-й ч разрываются сразу 4 связи. Разрыв 5-й связи идет медленно, и только через 3 ч связь рвется полностью. Шестая дисульфидная группа фермента была определена только в жестких условиях электролиза в среде 8 М мочевины.

Определение S—S-групп в β -1,3-глюканазе

Восстановитель	Условия восстановления	Метод определения SH-групп	SH-групп/моль белка
Борогидрид натрия	8 М мочевины, трис-буфер (рН 8,4)	Амперометрическое титрование Реагент Элмана	9,85; 9,95 9,72; 9,95 10,15; 9,81 9,89; 9,91
Тиогликолевая кислота	8 М мочевины, трис-буфер (рН 8,4), 37°, 4 ч	» »	9,73; 9,85 10,10; 9,83
Электролитическое восстановление	0,2 М фосфатный буфер (рН 7,0), —1,8 В 8 М мочевины, 0,2 М фосфатный буфер (рН 7,0), —1,8 В	» » » »	9,80; 9,78 10,23 12,00; 12,00 12,20

Таблица 2

Изменение активности β -1,3-глюканазы при последовательном восстановлении дисульфидных групп

Определяемое число SH-групп	Число восстановленных S—S-групп	Активность, %					
		1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	6 ч
2,05	1	100	100	100	100	100	100
4,10	2	100	100	70	21	0	0
5,60	3	100	100	69	15	0	0
7,80	4	80	23	7	0	0	0
9,78	5	0	0	0	0	0	0

Полученные данные согласуются с данными аминокислотного анализа [1], по которому определено 11 остатков цистеиновой кислоты, и позволяло считать, что β -1,3-глюканаза содержит 6 дисульфидных групп.

Для выяснения роли дисульфидных связей в поддержании нативной конформации и каталитической активности фермента нами был использован метод электролитического восстановления [7, 8], который позволяет осуществить расщепление связей в мягких условиях, а также варьировать скорость восстановления и останавливать реакцию на желаемой стадии.

Последовательное восстановление пяти дисульфидных групп β -1,3-глюканазы проводили, изменяя катодное напряжение от —1,0 до —1,8 В с одновременным определением ферментативной активности. Условия восстановления были такими же, как и при определении этим методом общего числа дисульфидных групп без применения детергента. Изменение активности наблюдали в течение 6 ч после восстановления соответствующего числа групп.

Предварительно была проверена стабильность фермента в условиях опыта. В течение всего опыта (6 ч) она оставалась неизменной.

Из данных табл. 2 видно, что не все дисульфидные связи в β -1,3-глюканазе одинаково важны для поддержания ее нативной структуры. Восстановление одной дисульфидной связи, которое происходит при —1,0 В за 1 ч, вообще не оказывает влияния на ферментативную активность. Можно предположить, что эта очень легко восстанавливаемая группа находится на поверхности фермента [9]. После восстановления трех связей (—1,2 В, 1 ч) первоначальная активность продолжает сохраняться еще в течение 2 ч. Следовательно, можно допустить, что в данном случае не происходит каких-либо значительных конформационных изменений и молекула сохраняет свою нативную структуру за счет водородных связей, сил Ван-дер-Ваальса и гидрофобных взаимодействий.

Однако через 2 ч активность такого фермента начинает падать и через 4 ч теряется полностью. Разрыв четырех связей ($-1,8 \text{ В}$, 1 ч) вызывает немедленное уменьшение активности, и через 2 ч фермент полностью инактивируется. Восстановление пяти связей ($-1,8 \text{ В}$, 4 ч) делает фермент неактивным.

Интересно отметить, что после снятия напряжения у фермента с восстановленными дисульфидными группами (от одной до пяти) мостики самопроизвольно замыкаются через 30 мин и потерянная активность восстанавливается полностью.

Экспериментальная часть

Гомогенная β -1,3-глюкозаза (M 22 000) была выделена из *Spisula salinensis* и очищена согласно описанной ранее методике [1]. Липофильно высушенные фракции с колонки SE-сефадекса обессоливали на колонке с сефадексом G-25 ($2,5 \times 60 \text{ см}$) в 0,02 н. уксусной кислоте и упаривали на роторном испарителе при температуре не выше 35° . Концентрацию белка определяли спектрофотометрически. Оптическая плотность при 280 нм 0,1%-ного раствора фермента составляла 1,0.

Спектрофотометрическое титрование по Бойеру [2] проводили в ацетатном буфере (рН 4,6) с добавлением 8 М мочевины или 1—3%-ного додецилсульфата натрия 10^{-3} М раствором *n*-хлормеркурибензоата, добавляя по 0,01 мл через 15 мин в течение 2—2,5 ч при $22-25^\circ$ к 3 мл 10^{-5} М раствора фермента. Для выявления вяло реагирующих групп измерение производили через 24 ч после добавления 0,1 мл 10^{-3} М *n*-хлормеркурибензоата.

При определении SH-групп реагентом Эллмана [5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)] [3] растворяли 2 мг белка в 10 мл 8 М мочевины. К аликвоте 2 мл добавляли 0,5 мл трис-фосфатного буфера, рН 8,0 (0,05 М трис, 0,05 М фосфат, 0,01 М ЭДТА) в 8 М мочевины и 0,5 мл 0,002 М реагента Эллмана в фосфатном буфере, рН 8,0. Через 15 мин измеряли оптическую плотность при 412 нм.

Амперометрическое титрование [4] осуществляли на установке обычного типа в атмосфере инертного газа с использованием стационарного платинового электрода и чувствительного гальванометра (0,01 мкА). 2 мг белка растворяли в 4 мл трис-буфера (рН 7,4) и титровали $2 \cdot 10^{-3}$ М AgNO_3 по 0,02 мл. Точку эквивалентности определяли графически.

Для восстановления дисульфидных групп NaBH_4 к 2 мл 8 М мочевины, содержащей 0,4 мг белка, добавляли 1 мл 1%-ного водного раствора NaBH_4 , 0,01 мл бутилового спирта для предотвращения вспенивания и выдерживали 30 мин при 40° в атмосфере инертного газа. Затем рН смеси доводили до 7,0 1 М HCl , приливали 2 мл трис-фосфатного буфера (рН 8,0), 0,3 мл ацетона для разрушения избытка NaBH_4 , 1 мл 0,002 М реагента Эллмана и доводили буфером до 10 мл. Измеряли оптическую плотность при 412 нм.

При восстановительном расщеплении дисульфидных связей тригликолевой кислотой реакцию проводили в 8 М мочевины при рН 8,1 и 37° в течение 4 ч. Раствор восстановленного белка подкисляли до рН 3,0 и обессоливали на колонке с сефадексом G-25 ($0,9 \times 15 \text{ см}$) в 0,02 н. уксусной кислоте. Из аликвоты раствора реагентом Эллмана определяли SH-группы.

В случае амперометрического определения SH-групп раствор после восстановления подкисляли 0,3 мл 1 М HNO_3 , добавляли 3 мл трис-буфера (рН 7,4), 0,5 мл ацетона и доводили буфером до 10 мл. На титрование брали аликвоту 4 мл.

Электролитическое восстановление проводили по несколько измененному методу Сесил и Вейтцман [7]. Алюминный сосуд (25 мл) содержал насыщенный раствор KCl , катодный (25 мл) — слой ртути толщиной 1 см,

в которую погружали платиновый электрод для осуществления контакта с ртутью, и исследуемый раствор, 2 мг в 5 мл фосфатного буфера (рН 7,0) или фосфатного буфера (рН 7,0) в 8 М мочеvine. Слой ртути и раствор фермента тщательно перемешивали механической стеклянной мешалкой в течение всего времени восстановления. Оба сосуда соединяли агаровым мостиком. Сопротивление в 200 Ом подключали через 6-вольтовый аккумулятор и катодный потенциал регулировали вручную в пределах -1 — $-1,8$ В. Его измеряли высокоомным вольтметром ВК7-9, включенным между катодом и каломельным электродом сравнения, погруженным в катодный сосуд. Чтобы предупредить повышение рН во время электролиза, над раствором белка пропускали ток CO_2 , очищенный от кислорода и H_2S .

Для определения SH-групп во время электролиза отбирали аликвоты по 0,3 мл непосредственно в измерительную кювету, которая содержала 2 мл трис-фосфатного буфера (рН 8,0) в 8 М мочеvine, предварительно продутого инертным газом для избежания возможного окисления SH-групп. Затем добавляли 0,25 мл 0,0005 М раствора реагента Элмана и измеряли оптическую плотность через 10—15 мин при 412 нм.

Активность фермента определяли по возрастанию количества восстанавливаемых сахаров методом Нельсона [10] из аликвот (0,01 мл), взятых одновременно с аликвотами для определения SH-групп.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sova V. V., Elyakova L. A. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 258, 219—227.
2. Boyer P. D. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 4331—4337.
3. Ellman G. L. (1959) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 82, 70—77.
4. Benesch R. E., Lardy H. A., Benesch R. (1955) *J. Biol. Chem.*, 216, 663—676.
5. Cavallini D., Graziani M. T., Durpe S. (1966) *Nature*, 212, 294—295.
6. Anfinsen C. B., Haber E. (1964) *J. Biol. Chem.*, 236, 1361—1363.
7. Cecil R., Weitzman D. J. (1964) *Biochem. J.*, 93, 1—11.
8. Markus G. (1964) *J. Biol. Chem.*, 153, 375—381.
9. Nagy J., Straub F. B. (1969) *Acta biochim. et biophys.*, Acad. sci. hung., 4, 15—19.
10. Nelson N. (1944) *J. Biol. Chem.*, 153, 375—381.

Поступила в редакцию
19.V.1975

DETERMINATION OF SULFHYDRYL AND DISULFIDE GROUPS IN β -1,3-GLUCANASE FROM THE SEA MOLLUSC *SPISULA* *SACHALINENSIS*

ELYAKOVA L. A., ULKINA J. I., BEREZHEVSKAYA L. I.,
GLEBKO L. I.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science
Centre, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

β -1,3-Glucanase, «laminarinase» IV (L IV) (E C 3.2.1.6 β -1,3-glucan glucanohydro-
lase), from the sea mollusc *Spisula sachalinensis* was shown to contain no free sulfhydryl
groups. Five disulfide groups were determined upon reductive splitting with thiogly-
colic acid and NaBH_4 in 8 M urea. The same result was obtained on electrolytic reduc-
tion in neutral medium at -1.8 V in the absence of a detergent, whereas six disulfide
groups were determined in 8 M urea. Sequential reduction of disulfide bridges showed the
enzymic activity of L IV to be dependent on the disulfide bonds, decreasing as they are
cleaved.