

酶促反应的“诱导契合-锁钥”模式*

张子剑^{1, 2)} 潘荣¹⁾ 周园^{1, 2)} 赫荣乔^{1, 2)**}

⁽¹⁾中国科学院生物物理研究所, 脑与认知国家重点实验室, 北京 100101; ⁽²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 在酶学理论中, 阐释酶识别底物专一性的代表性学说有“锁钥”和“诱导契合”模型等. 作者此前研究了蚯蚓蛋白酶 (*Eisenia fetida* protease, *EfP*-) 的底物专一性, 提出了“诱导契合-锁钥”反应模式. 然而, 采用 *EfP*- 建立的模式是否具有普遍的酶学意义需要进一步论证. 以蚯蚓蛋白酶 (*Eisenia fetida* protease, *EfP*-)、枯草杆菌蛋白酶(subtilisin, Sub) 以及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)为材料, 分别研究了底物反应后酶与其他底物的相互作用. 结果显示, 经过凝血酶底物 chromozym TH(CTH)反应后, 蚯蚓蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶与尿激酶底物(chromozym U, CU)的反应活性显著降低($P < 0.05$), 表现出符合“诱导契合-锁钥”反应的模式. 蚯蚓蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶先与 CU 反应后, 却仍能与 CTH 反应, 但后续不能与 CU 发生反应, 仍然表现为“诱导契合-锁钥”模式. 另外, 丙酮酸反应后的 LDH, 对乳酸的反应活力显著降低($P < 0.05$), 而乳酸反应后的 LDH 对丙酮酸的活性却无显著变化. 这可能是丙酮酸诱导的 LDH 构象具有相对的刚性, 而乳酸诱导的酶构象具有相对柔性所致.

关键词 蚯蚓蛋白酶, 枯草杆菌蛋白酶, 乳酸脱氢酶, 锁钥模型, 诱导契合模型, 诱导契合-锁钥模型, 底物专一性

学科分类号 Q55

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00052

1894年, Fischer等^[1]针对酶的专一性提出了“锁钥”模型, 即酶与底物在相互作用之前其结构就具有了互补性. 1958年, Koshland^[2]提出了酶促反应的“诱导契合”学说, 认为酶与底物在空间距离上彼此接近时, 酶受底物分子的诱导, 其构象发生有利于底物结合的变化, 从而互补契合进行反应. Ma等^[3-5]近些年来提出了“构象选择-群体移动”学说, 即与底物结合之前, 酶具有不同的构象, 底物选择其中一种构象的酶相结合进行酶促反应.

2010年, 本实验室采用蚯蚓蛋白酶 (*Eisenia fetida* protease, *EfP*-), 研究了 *EfP*- 的底物专一性机制^[6]. 观察到, 酶与底物反应后, 对于同一底物, 酶促反应表现出“锁钥”模式, 而对于不同底物, 酶促反应表现出“锁钥”和“诱导契合-锁钥”模式. *EfP*- 与底物相互作用的这两种模式都可以归结为“诱导契合-锁钥”模式.

虽然我们提出并验证了“诱导契合-锁钥”模

型, 但是 *EfP*- 仅仅是自然界中许许多多酶中的一种^[7], 该模型是否具有普遍的酶学意义, 则需要通过其他类型的酶来进行验证. 根据本实验室的工作基础^[8-10], 采用蚯蚓蛋白酶 (*Eisenia fetida* protease, *EfP*-)、枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin, Sub)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 为对象, 探讨了反应完成后, 酶与其他底物的相互作用.

1 材料与方法

1.1 试剂

枯草杆菌蛋白酶(EC 3.4.21.62)^[11-12]、L-乳酸脱氢酶(EC 1.1.1.27)^[13]、L-乳酸钠、尿激酶生色底物 (Ben- β -Ala-Gly-Arg-4-nitroanilide hydrochloride)

* 国家自然科学基金资助项目(NSFC 30870544).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2011-01-29, 接受日期: 2011-04-11

Chromozym U (CU) 购于 Sigma 公司. 凝血酶生色底物 (Tosyl-Gly-Pro-Arg-4-nitroanilide acetate) Chromozym TH (CTH)、 NAD^+ 、 NADHNa_2 为 Roche Applied Science 产品, 丙酮酸钠由 Amerisco 生产. 其他试剂为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 蚯蚓蛋白酶 的制备. 蚯蚓蛋白酶 的分离纯化参考 Zhao 等^[14]建立的方法. 纯化的蛋白质在 10% SDS-PAGE 上为单一条带, 活力单位(U)定义为 25℃下每毫克酶每分钟催化 1 $\mu\text{mol/L}$ 生色底物转化为对硝基苯胺的酶量.

1.2.2 蚯蚓蛋白酶 的活性测定. 酶活力的测定参考 Pan 等采用的方法^[6, 15]. 将蚯蚓蛋白酶 (终浓度 40 $\mu\text{mol/L}$) 加入到 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 中, 再加入 Chromozym TH (终浓度 1 mmol/L, 25℃), 立刻在紫外可见分光光度计 (UV-2010 Hitachi, Japan) 上记录 405 nm 吸光度变化. 记录时间点: 0、1、2、4、8、16、32、64、128、256、512、600 min. 当反应完成时, 加入尿激酶生色底物, 同样条件下, 继续记录各时间点的吸光度. 待反应完成后, 继续加入第三个底物, 监测 405 nm 处吸光度. 不同底物的组合也按此条件进行测定, 包括: 先加 CTH, 后加 CTH; 先加 CU, 后加 CTH; 先加 CU, 后加 CU; 先加 CTH, 后加 CU, 再加 CTH; 先加 CU, 后加 CU, 再加 CU. 在反应初期的线性范围, 根据每分钟吸光度的变化, 计算酶的活性.

1.2.3 底物反应后枯草杆菌蛋白酶的活性测定. 由于枯草杆菌蛋白酶是一种常用的蛋白酶^[6], 因此作者选择该酶为材料进行底物专一性的研究. 酶活力测定参考 Kim 等建立的方法^[17]. 将枯草杆菌蛋白酶 (终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$) 溶解在 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 中, 加入 Chromozym TH (终浓度 1 mmol/L, 25℃). 反应完成后, 反应液经过 4 次超滤 (6 000 r/min, 4℃, 20 min), 除去剩余底物和产物, 得到 CTH 反应后的枯草杆菌蛋白酶 (Sub^{CTH}). 同样的方法得到 Sub^{CU} 以及经过 CTH 和 CU 顺次反应的 $\text{Sub}^{\text{CTH+CU}}$ 和 $\text{Sub}^{\text{CU+CTH}}$. 把与底物反应完成的枯草杆菌蛋白酶, 加入到含有 CTH 或者 CU (终浓度 1 mmol/L) 的比色皿中, 监测 1、2、4、8、16、32、64、128、256 min 吸光度 (405 nm), 并计算酶的活力.

1.2.4 LDH 酶活反应体系 pH 范围的确定. 乳酸脱氢酶既能催化乳酸生成丙酮酸 (正向反应, $\text{Lac} \rightarrow \text{Pyr}$), 也能催化丙酮酸产生乳酸 (逆向反应, $\text{Pyr} \rightarrow \text{Lac}$)^[18]. 为了确定同时催化正向反应和逆向反应的最适 pH 值, 配制不同酸碱度的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5), 分别测定不同 pH 下的正向反应活性和逆向反应活性. 正向反应体系为: 10 μl 2 mmol/L NADH, 10 μl 2 mmol/L 丙酮酸钠, 20 μl LDH, 160 μl Tris-HCl 缓冲液. 逆向反应体系为: 10 μl 2 mmol/L NAD^+ , 10 μl 2 mmol/L 乳酸钠, 20 μl LDH, 160 μl Tris-HCl 缓冲液.

1.2.5 乳酸脱氢酶的活性测定^[9]. 首先加入乳酸脱氢酶 (终浓度 0.6 $\mu\text{mol/L}$) 及 NADH (终浓度 0.1 mmol/L), 25℃保温 5 min, 然后加入丙酮酸钠 (终浓度 0.1 mmol/L), 立刻在紫外可见分光光度计上监测 340 nm 吸光度变化. 待反应完成后, 加入乳酸钠和 NAD^+ (终浓度均为 0.1 mmol/L), 继续监测 340 nm 吸光度变化. 反之, 在同样条件下, 乳酸脱氢酶、 NAD^+ 和乳酸钠反应完成后, 再加入丙酮酸钠和 NADH 进行酶活力的测定.

1.2.6 底物反应后乳酸脱氢酶活性测定. 乳酸脱氢酶 (终浓度 0.6 $\mu\text{mol/L}$) 与丙酮酸钠 (终浓度 0.1 mmol/L) 反应完成后, 超滤除去产物和剩余底物 (方法同枯草杆菌蛋白酶). 超滤后的乳酸脱氢酶加入乳酸钠和 NAD^+ , 在 340 nm 监测吸光度的变化. 同样的方法制备与乳酸钠反应后的 LDH, 然后测定其作用于丙酮酸钠的活性.

2 结果与分析

2.1 蚯蚓蛋白酶

蚯蚓蛋白酶 能分别与 CTH 和 CU 进行反应 ($E_fP^- + \text{CTH}$, $E_fP^- + \text{CU}$; 图 1a 和 1b). 事先在 E_fP^- 中加入 CTH, 待反应完成, 再加入 CU, 则 E_fP^- 表现出的尿激酶活性显著下降 ($P < 0.05$). 然而, 在 E_fP^- 中加入 CTH, 待反应完成, 再继续加入 CTH, 则该酶对 CTH 的反应速度无显著差异 (图 1c). 经过 CTH 诱导的 E_fP^- 几乎失去与 CU 反应的生物学功能 ($E_fP^- + \text{CTH} + \text{CU}$; 图 1a), 表现为“诱导契合-锁钥”反应模式. 相反, 如果先以 E_fP^- 与 CU 反应, 待反应完成, 再加入 CTH, 则反应可继续进行 ($E_fP^- + \text{CU} + \text{CTH}$, 图 1b). 在此基础上, 再加入 CU, E_fP^- 则不再具有与 CU

的反应活性($E_fP^- + CU + CTH + CU$, 图 1b), 也表现出“诱导契合 - 锁钥”反应模式. 另外, 在相同条件下, CU 反应后的 E_fP^- 仍能继续与 CU 反

应($E_fP^- + CU + CU$; 图 1b), 且活力无显著性差异, 表现为“诱导契合 - 锁钥”模式. 与之相同, $E_fP^- + CTH + CTH$ 的反应也符合此模式.

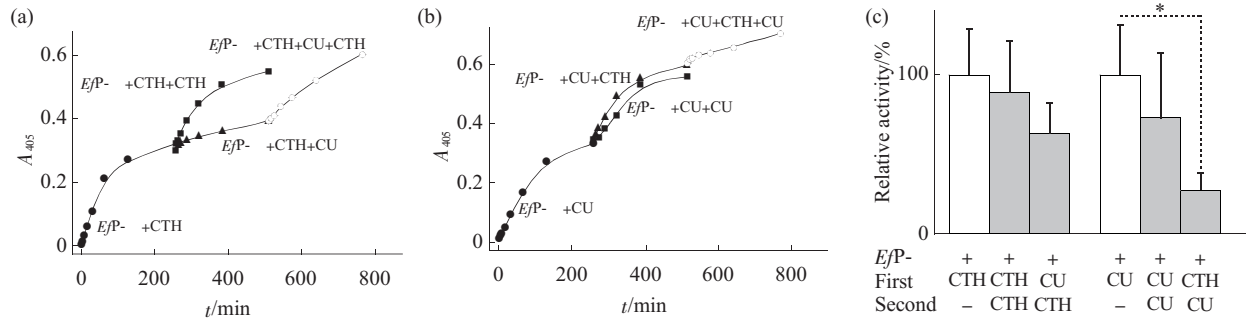


Fig. 1 The activity of E_fP^- on its different substrates

E_fP^- was first reacted with one substrate, and then with the second one, followed by measurement of A_{405} at 25°C. When it reached to the completion, the third substrate was added to the mixture with monitoring A_{405} . (a) CTH first, CU second and CTH third ($E_fP^- + CTH + CU + CTH$); CTH first, CU second ($E_fP^- + CTH + CU$); CTH first, CTH second ($E_fP^- + CTH + CTH$) as a control. (b) CU first, CTH second and CU third ($E_fP^- + CU + CTH + CU$); CU first CTH second ($E_fP^- + CU + CTH$); CU first, CU second ($E_fP^- + CU + CU$) as a control. (c) The relative activities of E_fP^- on the second substrates. The relative activity was defined as (the activity of substrate-induced E_fP^- / the activity of native E_fP^-) $\times 100\%$. * $P < 0.05$.

2.2 枯草杆菌蛋白酶

为了进一步确定酶促反应完成后, 形成的构象具有相对刚性, 即符合“诱导契合 - 锁钥”模式. 作者采用枯草杆菌蛋白酶进行验证. Sub 不仅能降解 CTH, 也能降解 $CU^{[20]}$. 为了排除剩余底物和产物的抑制作用, Sub 与 CTH 反应完成后, 通过超滤去除产物和剩余底物, 再分别测定其凝血酶 (CTH) 活性和尿激酶 (CU) 活性. 结果表明, CTH 诱导的 Sub, 其降解 CTH 的活力无显著变化, 但降解 CU 的活性却显著 ($P < 0.05$) 降低 (图 2a、2c 和 2g), 该结果与 E_fP^- 相似. 同样, 经 CU 诱导的 Sub 不但能够与 CU 反应, 而且还能与 CTH 继续反应, 其活性与对照之间无显著性差异 (图 2b、2d 和 2g). 说明 CU 诱导的 Sub 构象, 其稳定性较 CTH 诱导的构象相对较低. 经过 CU 和 CTH 依次诱导的枯草杆菌蛋白酶, 对 CU 的活性明显降低 (图 2e), 但是经过 CTH 和 CU 依次诱导后, 其凝血酶活性变化不明显 (图 2f).

2.3 乳酸脱氢酶

乳酸脱氢酶能催化丙酮酸与乳酸相互转化的正

逆反应, 作者采用乳酸 (Lac) 和丙酮酸 (Pyr) 分别与 LDH 进行反应, 进一步研究 LDH 与 Lac 反应完成后再与丙酮酸反应的活力变化; 反之亦然. 首先需要确定一个 pH 范围, 使得正逆反应的相对活力近似相等. 如图 3 所示, 当 $pH = 8.3$, 正向和逆向反应的相对活力在同一个交叉点上 (图 3a), 在此条件下, 乳酸脱氢酶与 NADH 温育 5 min, 然后加入丙酮酸钠, 待反应完成, 再加入乳酸和 NAD^+ , 记录 340 nm 吸光度变化 (图 3b 和 3d). 结果显示, 与丙酮酸钠反应后的 LDH 对于乳酸的反应速度显著变慢 ($P < 0.05$). 然而, 如果 LDH、 NAD^+ 与乳酸钠进行反应 (完成), 再加入丙酮酸和 NADH, 其反应速度无显著变化 (图 3c 和 3d).

为了排除剩余底物和产物抑制的可能性, 我们分别将与乳酸和丙酮酸反应后的 LDH 进行超滤, 除去剩余底物和产物, 再分别加入丙酮酸和乳酸进行反应. 结果显示 (图 4), 与丙酮酸反应后的 LDH 对乳酸的反应也显著变慢 ($P < 0.05$), 而和乳酸反应后的 LDH 与丙酮酸的反应速度却无显著性差异.

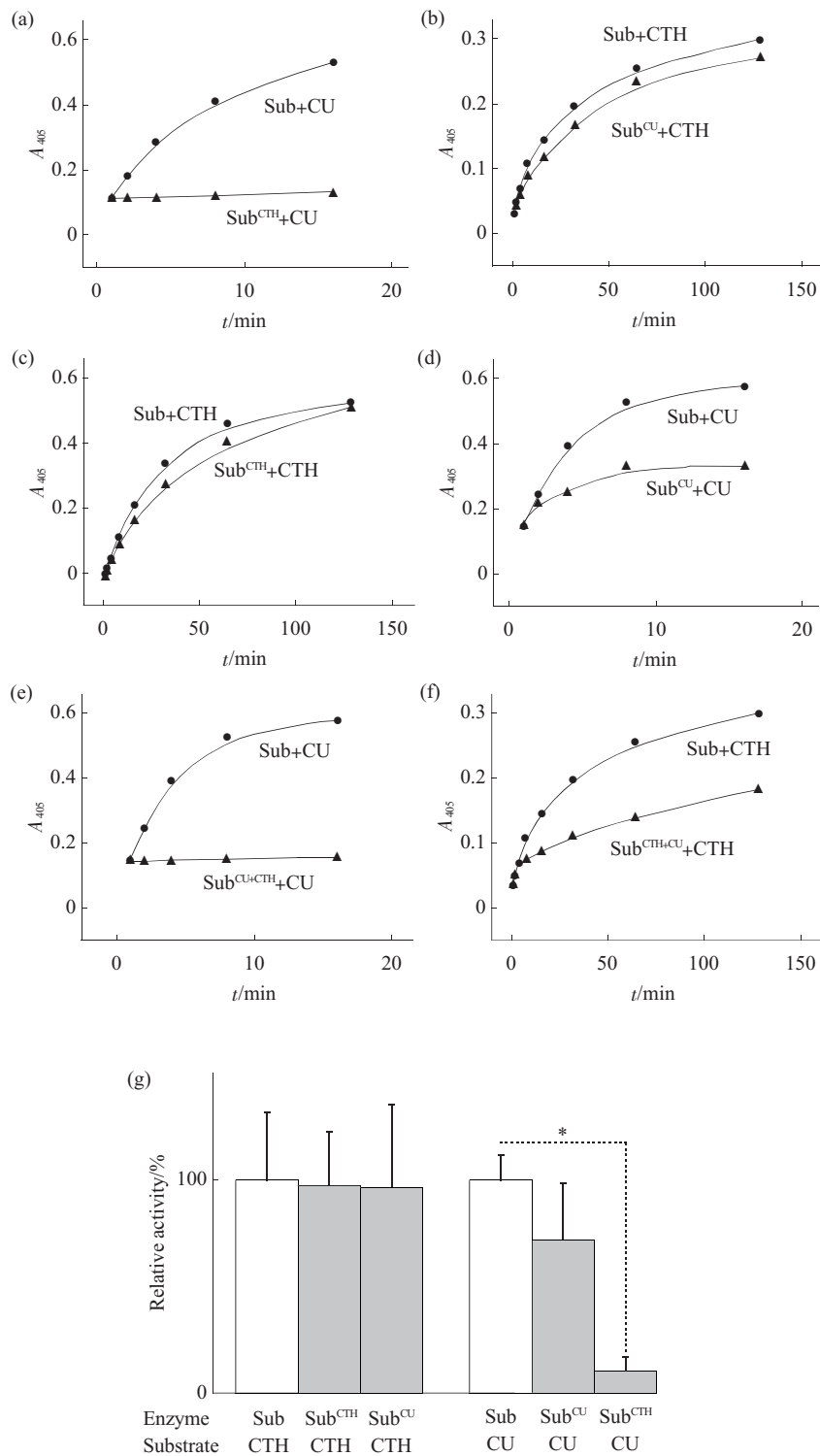


Fig. 2 Changes in the activities of subtilisin in the presence of its different substrates

The first substrate was added to subtilisin and allowed to approach the completion. Activity was measured by recording the A_{405} . Products and residual substrates were then removed from the incubated samples by four rounds of ultrafiltration (6 000 r/min, 4 °C, 20 min). The second substrate was then reacted with the induced enzyme, followed by measurements of A_{405} . (a) Activity of CTH-induced Sub (Sub^{CTH}) and native subtilisin with CU. (b) Activity of CU-induced Sub (Sub^{CU}) and native subtilisin with CTH. (c) Activity of Sub^{CTH} and native subtilisin with CTH. (d) Activity of Sub^{CU} and native subtilisin with CU. (e) Activity of Sub^{CU+CTH} and native subtilisin with CU. (f) Activity of Sub^{CTH+CU} and native subtilisin with CTH. (g) The relative activities of subtilisins in different forms. * $P < 0.05$. Sub^{CU+CTH} represented subtilisin treated with CU and CTH in turn, and Sub^{CTH+CU} was that treated with CTH and CU in turn.

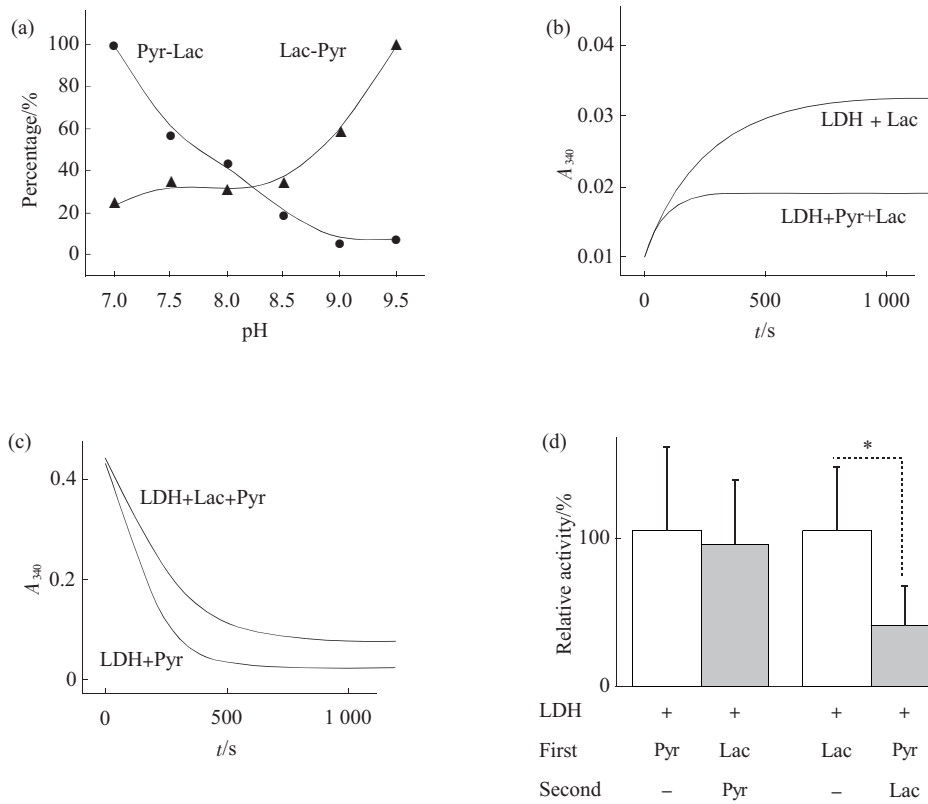


Fig. 3 The activities of lactate dehydrogenase on lactate then pyruvate and vice versa

(a) The activities of forward (Lac→Pyr) and reverse (Pyr→Lac) reactions at different pH values. (b) The activity of LDH on lactate after LDH first reacted with pyruvate approaching the completion. (c) The activity of LDH on pyruvate after incubated with lactate. (d) The relative activities of LDH on Lac then Pyr, and vice versa. Pyruvate is abbreviated in Pyr and lactate in Lac. * $P < 0.05$.

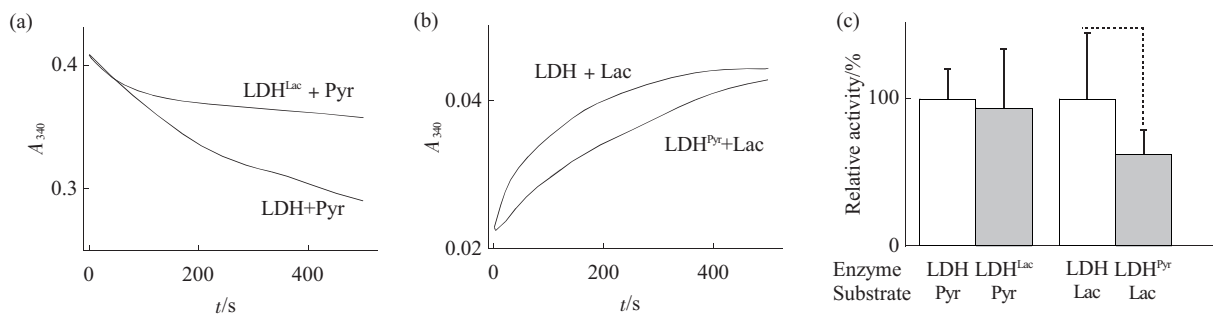


Fig. 4 The activities of lactate dehydrogenase after reacted with pyruvate or lactate

Assays of the forward and reverse activities of LDH were referred to Figure 3, and native LDH was used as control. (a) The reaction of LDH with lactate in the presence of NAD^+ was allowed to approach the completion. The reaction mixture was ultrafiltered to remove the products and residual substrates before assay of LDH on pyruvate. LDH^{Lac} represents lactate-incubated enzyme after ultrafiltered. (b) The activity of LDH^{Pyr} on lactate compared with that of native LDH. (c) Relative activities of LDH^{Lac} on pyruvate and LDH^{Pyr} on lactate, respectively. * $P < 0.05$.

3 讨 论

随着生命科学的发展, 酶学理论越来越多地应用到了各个领域, 如食品、发酵、制革、纺织、日用化学等. 越来越多的不同来源的酶被发现和分离纯化^[21], 具有新型功能的酶也被不断地发现^[22]. 此外, 多种酶及其复合物的晶体结构被解析^[23-24], 固定化技术^[25]和分子生物学等技术^[26]应用于酶活性的改造, 以期获得活性较高且稳定高产的酶. 另一方面, 酶学基本原理也用来解释生命代谢. 细胞通讯现象, 如衰老与端粒酶的关系^[27]、肿瘤与蛋白磷酸酶的关系^[28]、酶与细胞增殖的关系^[29]、参与免疫系统应答的酶分子^[30-31]以及表观遗传学的甲基化酶和脱甲基化酶^[32]等. 无论在酶的应用领域^[33]还是针对生命代谢的基础研究^[34], 都或多或少地涉及到了酶学中的基本问题, 即酶与底物相互作用的专一性问题.

生物化学教材在提及酶的底物专一性时, 常常采用 Koshland 提出的“诱导契合”学说来进行解释^[35-36], 并认为 Fisher 提出的“锁钥”学说存在一定的不合理性. 本文结果显示, 当酶与某一底物相互作用之后, 酶的构象发生改变, 而改变后的构象具有相对的稳定性, 即第一个底物与酶相互作用后, 第二个相同底物以及第 n 个、第 $n+1$ 个相同底物的酶促反应可能均为“锁钥”模式. 因此, 在这种情况下, “锁钥”模式具有其合理性.

被底物诱导的蛋白酶活性中心构象变得相对刚性, 这一现象首先是在蚯蚓蛋白酶与底物相互作用过程中观察到的^[6]. 蚯蚓蛋白酶和具有较高的同源性(约 97%), 都同时具有凝血酶和尿激酶活性^[37], 被 CTH 诱导后, 它们的活性中心构象发生与底物结构互补的变化, 变化后活性中心的构象不再适合 CU 结构, 从而难以结合 CU, 使得该酶的尿激酶活性明显下降($P < 0.05$). 另一方面, CU 诱导所形成的蛋白质构象稳定性相对较低, 仍有进一步变化的空间, 所以在 CTH 的作用下, 酶仍能够发生诱导契合. 因此, 与 CU 相互作用后, 蛋白酶能够继续与 CTH 反应, 且活力无显著变化. 与蚯蚓蛋白酶和类似, 枯草杆菌蛋白酶与 CTH 反应后, 也表现出对 CU 活性的显著下降($P < 0.05$), 表明 Sub 与底物的作用也符合“诱导契合-锁钥”模式.

凝血酶生色底物 CTH 与尿激酶生色底物 CU 在一级结构上有明显差别. 凝血酶生色底物 P₂ 位是 Pro, 而尿激酶底物 P₂ 位是 Gly, 从而决定了 CTH 的结构相对刚性, 而 CU 的结构相对柔性, 即自身具有一定形变能力. 我们推测, 蚯蚓或枯草蛋白酶的活性口袋被结构刚性较强的 CTH 诱导后, 其构象发生了较大变化, 不能被结构相对柔性的 CU 再诱导, 而遵循“锁钥”反应模式. 相反, 如果蛋白酶先经过 CU 诱导, 其构象变化相对较小, 则仍能被 CTH 诱导, 进一步发生诱导契合.

乳酸脱氢酶是糖酵解途径中的关键酶, 可以催化乳酸和丙酮酸的相互转化, 其催化反应本质是氢质子转移. 同时, 乳酸和丙酮酸在结构上十分接近. 因此, 采用 LDH 作为对象研究底物反应后的酶与其他底物的反应机制具有可行性. 结果显示, 无论去除剩余底物和产物与否, 丙酮酸反应后的 LDH 均表现出对乳酸反应速度的显著降低($P < 0.05$), 而乳酸反应的 LDH 对丙酮酸的反应活性无显著影响. 以上结果表明, LDH 在与丙酮酸反应后, 酶的构象会发生变化, 而这一变化有利于丙酮酸的反应, 而不利于乳酸的互补结合(图 4). 这是一个十分有趣的现象, 值得进一步探讨其分子机制.

在此, 酶与底物相互作用的“诱导契合-锁钥”模式可以描述成为(图 5): S₁ 和 S₂ 是酶 E 的两个底物, 底物 S₁ 诱导酶 E 形成与之互补构象 E'. 有趣的是, E' 能继续与 S₂ 作用形成 E'' 而进行酶促反应. 但是, 底物 S₂ 诱导酶 E 形成相对稳定的 E'', 不能被 S₁ 诱导而进行反应. 根据上述结果, 我们推测, 酶与底物反应后, 对同一种底物的反应遵循“锁钥”模式, 而与不同底物的反应可以是“锁钥”模式, 也可以是“诱导契合-锁钥”模式. 在此, 我们认为“诱导契合-锁钥”模式可能具有普适性, 其理由是: a. 枯草杆菌蛋白酶、蚯蚓蛋白酶^[6]和均表现出对同一底物, 如与 CU 反应后, 仍保留与 CU 反应速度的基本不变; b. 事先用 CTH 进行反应, 则反应后的蛋白酶几乎不再识别 CU; c. 用 CU 进行诱导, 再与 CTH 反应, 反应后的蛋白酶不再识别 CU; d. 如果采用丙酮酸进行反应, LDH 对乳酸的反应活性显著降低. 因此, 这些酶促反应均符合“诱导契合-锁钥”模式.

综上所述, 无论蚯蚓蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶还是氧化还原酶 LDH, 经过底物诱导后, 其构象的变化均会影响酶与其他底物的反应, 其酶促反应表现为“诱导契合-锁钥”模式。然而, 在自然界酶的种类繁多, 如氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂合酶类、异构酶类和连接酶类。我们的工作仅仅验证了其中的几种酶, 要阐释“诱导契合-锁钥”模式在酶促反应中的普遍性, 尚需做更多实验来加以证明。

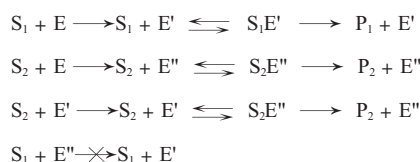


Fig. 5 The "Induced fit-lock and key" model for *E/P*- , *E/P*- and subtilisin on their different substrates

Enzymic reaction on the same substrate follows "induced fit-lock and key" procedure. The reacted enzyme on its substrates undergoes "lock and key" or "induced fit" followed by "lock and key" procedure. This demonstrates that "induced fit" and "lock and key" should be different stages in an enzymic reaction but not separative ones, where S_1 , S_2 , E' , E'' and E represent substrate 1, substrate 2, S_1 -induced, S_2 -induced and native enzyme, respectively.

参 考 文 献

- [1] Fischer E. Influence of configuration on the action of enzyme. Reports of The German Chemical Society, 1894, **27**(3): 2985-2993
- [2] Koshland D E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1958, **44**(2): 98-104
- [3] Ma B, Kumar S, Tsai C J, *et al.* Folding funnels and binding mechanisms. Protein Eng, 1999, **12**(9): 713-720
- [4] Frauenfelder H, Sligar S, Wolynes P. The energy landscapes and motions of proteins. Science, 1991, **254**(5038): 1598-1603
- [5] Tsai C J, Kumar S, Ma B, *et al.* Folding funnels, binding funnels, and protein function. Protein Sci, 1999, **8**(6): 1181-1190
- [6] Pan R, Zhang X J, Zhang Z J, *et al.* Substrate-induced changes in protease active site conformation impact on subsequent reactions with substrates. J Biol Chem, 2010, **285**(30): 22950-22956
- [7] Wu J X, Zhao X Y, Pan R, *et al.* Glycosylated trypsin-like proteases from earthworm *Eisenia fetida*. Int J Biol Macromol, 2007, **40**(5): 399-406
- [8] Zhao J, Xiao R, He J, *et al.* *In situ* localization and substrate specificity of earthworm protease- and protease- -1 from *Eisenia fetida*. Int J Biol Macromol, 2007, **40**(5): 67-75
- [9] Pan R, Zhou Y, He H J, *et al.* An enzyme from the earthworm *Eisenia fetida* is not only a protease but also a deoxyribonuclease. Biochem Biophys Res Commun, 2011, **407**(1): 113-117
- [10] Tian R, Li S J, Wang D L, *et al.* The acidic C-terminal domain stabilizes the chaperone function of protein disulfide isomerase. J Biol Chem, 2004, **279**(47): 48830-48835
- [11] Markland Jr F S, Smith E L. Subtilisins: Primary Structure, Chemical and Physical Properties // Paul D B. The Enzymes: 3. San Diego: Academic Press Inc, 1971: 561-608
- [12] Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. J Biol Chem, 1988, **263**(7): 3194-3201
- [13] Thibodeaux L K, Burnett K G, Burnett L E. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. J Exp Biol, 2009, **212**(21): 3428-3439
- [14] Zhao J, Li L, Wu C, *et al.* Hydrolysis of fibrinogen and plasminogen by immobilized earthworm fibrinolytic enzyme from *Eisenia fetida*. Int J Biol Macromol, 2003, **32**(3-5): 165-171
- [15] Zhou J, Fan R, Wu C, *et al.* Assay of Lumbrokinase with a Chromophoric Substrate. Prot and Pept Lett, 1997, **4**(6): 409-414
- [16] 毕汝昌, 储乃明. 枯草杆菌蛋白酶与蛋白质工程. 生物化学与生物物理进展, 1991, **16**(5): 329-335
Bi R C, Chu N M. Prog Biochem Biophys, 1991, **16**(5): 329-335
- [17] Kim S H, Choi N S. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from doen-Jang. Bios Biotechnol Biochem, 2000, **64**(8): 1722-1725
- [18] Adams M J, Buehner M, Chandrasekhar K, *et al.* Structure-function relationships in lactate dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, **70**(7): 1968-72
- [19] Vanderlinde R E. Measurement of total lactate dehydrogenase activity. Ann Clin Lab Sci, 1985, **15**(1): 13-31
- [20] Peng Y, Huang Q, Zhang R H, *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2003, **134**(1): 45-52
- [21] 李梅基, 李昭华, 胡建成, 等. 用壳聚糖亲和磁性微球纯化血浆凝血酶的研究. 生物化学与生物物理进展, 2010, **37**(4): 433-440
Li M J, Li Z H, Hu J C, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2010, **37**(4): 433-440
- [22] 王祎宁, 赵国柱, 赵悦茗, 等. 丝孢菌 *Monodictys asperspera* (Cooke & Massee) Ellis 漆酶的分离纯化及其酶学性质. 微生物学通报, 2009, **36**(11): 1710-1715
Wang Y N, Zhao G Z, Zhao Y M, *et al.* Microbiology, 2009, **36**(11): 1710-1715
- [23] Wang D C, Gu X C. A brief account on the study of the insulin crystal structure In retrospect: Forty years after the determination of insulin's crystal structure by Chinese scientists. Sci China Life Sci,

- 2010, **53**(1): 13-15
- [24] Wang C, Chen L, Wang L, *et al.* Crystal structure of the MH2 domain of *Drosophila* Mad. *Sci China Life Sci*, 2009, **52** (6): 539-544
- [25] 邹秉杰, 罗娟, 武海萍, 等. 生物素化 ATP 硫酸化酶的表达、固定化与应用. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(7): 923-928
Guo B J, Luo J, Wu H P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(7): 923-928
- [26] 王宇凡, 朱玥明, 魏东盛, 等. 利用定点突变分析海藻糖合酶的功能. *微生物学通报*, 2009, **36**(5): 658-665
Wang Y F, Zhu Y M, Wei D S, *et al.* *Micobiology*, 2009, **36**(5): 658-665
- [27] 钟天映, 陈媛媛, 毕利军. 端粒与端粒酶的研究——解读 2009 年诺贝尔生理学或医学奖. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(10): 1233-1238
Zhong T Y, Chen Y Y, Bi L J. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(10): 1233-1238
- [28] 李天祝, 向本琼. 蛋白磷酸酶 PP2A 的结构及其肿瘤抑制因子功能. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(2): 133-142
Li T Z, Xiang B Q. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(2): 133-142
- [29] 严丽梅, 吴建勇, 于潇华, 等. 内含子源性 microRNA 对内皮型一氧化氮合酶表达及血管内皮细胞增殖的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(7): 747-753
Yan L M, Wu J Y, Yu X H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(7): 747-753
- [30] Wang S D, Chen L P. Structural immunology of costimulatory and coinhibitory molecules. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(2): 183-189
- [31] Prochnow C, Bransteitter R, Chen X J S. APOBEC deaminases-mutases with defensive roles for immunity. *Sci China Life Sci*, 2009, **52**(10): 893-902
- [32] Lan F, Shi Y. Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Sci China Life Sci*, 2009, **52**(4): 311-322
- [33] 刘森林, 宗敏华. 来源于西梅的(R)-醇腈酶促立体选择性转氨合成(R)-酮醇腈. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(11): 1212-1216
Liu S L, Zong M H. *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37** (11): 1212-1216
- [34] 涂玲辉, 刘海鹏, 骆静. 钙调神经磷酸酶调节因子 RCANs 的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(1): 22-28
Tu L H, Liu H P, Luo J. *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37** (1): 22-28
- [35] Nelson D L, Cox M M. *Principles of Biochemistry*. 3rd ed. New York: W H Freeman, 2000: 253-255
- [36] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. *生物化学*. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 334-335
Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. *Biochemistry*. 3rd. Beijing: Higher Education Press, 2002: 334-335
- [37] Pan R, Zhang Z J, He R Q. Earthworm protease. *Appl Environ Soil Sci*, 2010:ID 294258(doi: 10.1155/2010/294258)

"Induced Fit-Lock and Key" Model in Enzymic Reactions*

ZHANG Zi-Jian^{1,2}, PAN Rong¹, ZHOU Yuan^{1,2}, HE Rong-Qiao^{1,2}**

¹The State Key Laboratory of Brain and Cognition, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract As described in enzymology, "induced fit" and "lock and key" models are used to explain the enzymic specificity of substrate. Previously, authors have studied the substrate specificity of *Eisenia fetida* protease (*EfP*), showing that the interaction between this protease and its substrates underwent an "induced fit" followed by "lock and key" model. It needs further investigating whether this model is suitable for other enzymes. Here, the reactions of substrate-induced *Eisenia fetida* protease (*EfP*), subtilisin (Sub) and lactate dehydrogenase (LDH) with their substrates were shown. *EfP* and Sub could not recognize chromozym U (CU) ($P < 0.05$) after incubated with chromozym TH (CTH) although the two proteases are natively able to react with both CTH and CU. The reaction followed an "induced fit-lock and key" pattern. In contrast, the two proteases were still able to react with CTH even though they have been incubated with CU. But neither earthworm protease nor subtilisin could recognize CU after CU and CTH treatment in turn, still suggesting that the reactions followed an "induced fit and then lock and key" procedure. Furthermore, the activity of LDH with lactate significantly decreased ($P < 0.05$) after the enzyme had been incubated with pyruvate. The activity on the conversion of pyruvate into lactate was not significantly affected by a prior incubation with lactate. This suggests that the pyruvate-induced complementary conformation of LDH is more stable than lactate-induced conformation.

Key words *Eisenia fetida* protease, subtilisin, lactate dehydrogenase, lock and key, induced fit, induced fit-lock and key model, substrate specificity

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00052

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (NSFC 30870544).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64889876, Fax: 86-10-64853625, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

Received: January 29, 2011 Accepted: April 11, 2011