

β -1,3-葡聚糖合成酶的提取及在 抗真菌抗生素筛选中的应用*

郑德友 张玖春 宋幼新 宋大康

(中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

真菌病,尤其是有致命危险的深部感染真菌病随着易感染患者的增加而越来越多^[1]。一些条件致病菌,在机体免疫能力下降时,也成为重要的病原,但是,治疗真菌病至今没有理想的药物。真菌细胞壁结构和组成的特点,为筛选抗真菌药物提供了理想的靶位。真菌细胞壁主要由多糖构成,约占干重的80%,蛋白约占3%~20%,还有少量的脂、色素和无机盐^[2]。多糖是骨架,主要包括几丁质、葡聚糖和甘露聚糖,其含量和比例因菌不同而异。临床上的重要条件致病菌白色念珠菌(*C. albicans*)的细胞壁主要由葡聚糖和甘露聚糖构成,兼有少量几丁质,葡聚糖又以 β -1,3-葡聚糖为主^[2,3],这为以葡聚糖合成酶作为筛选真菌细胞壁合成抑制剂的靶酶提供了理论依据。

目前对 β -1,3-葡聚糖合成酶已经有过不少的研究,但工作尚不够深入。不同研究组对不同来源该酶进行的研究,在酶稳定性,影响酶活的各种因素方面得出了不同的结论^[2]。现在较一致的看法是: β -1,3-葡聚糖合成酶不是由一条多肽链构成,而是不同亚基的复合物^[4],以UDP-葡萄糖为底物,合成 β -1,3-葡聚糖和少量的 β -1,6-葡聚糖。 β -1,3-葡聚糖是酸碱不溶的多聚物,随着 β -1,6-葡聚糖的增加,酸溶性成分也增加^[5,6]。

在文献报道的基础上,我们建立了粗酶的提取方法和活性测定系统,并将其用于抗真菌抗生素的筛选。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

白色念珠菌(*C. albicans*) AS 2.538 由本所菌种保藏室提供。

1.2 试剂

1.2.1 缓冲液 A: 包括1mmol/L EDTA, 1mmol/L 巯基乙醇, 2mol/L 蔗糖, 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5。

1.2.2 展开剂: 95%乙醇: 1mol/L 冰醋酸(7:3, V/V)

1.2.3 闪烁液: 200ml 甲苯溶有1g PPO(2,5-二苯基噁唑)及0.05g POPOP(1,4-[5-苯基噁唑基-2]苯)。

1.3 酶的提取

将*C. albicans*接种至YPG培养基中,32℃培养16~18h,离心收集菌体,1mmol/L EDTA洗涤两次,然后将菌体与0.5mm玻璃珠按1:1混合,悬浮于缓冲液A,冰盐浴冷却条件下在Bead-Beater上匀浆5min,倒出上清液,1000g离心5min去掉未破碎的细胞碎片。将上清液于4℃,100 000g离心1h,所得沉淀为粗酶制品,用于以后的酶活性测定试验。

1.4 酶活性测定方法

反应体系总体积250 μ l,含有5mmol/L [¹⁴C]-UDP-葡萄糖,0.8% BSA, 1mmol/L ATP, 50 μ l β -1,3-葡聚糖合成酶粗酶液, pH8.0 Tris-HCl 缓冲液。反应系统于28℃保温30min,最后加入20 μ l 冰醋酸终止反应。

* 本项工作得到“八五”攻关及国家自然科学基金资助。

本文于1995年5月16日收到。

1.5 纸层析及测定

反应终止后,点样于新华 3 号滤纸,下行层析,过夜。滤纸干后,剪下原点,其上为葡聚糖,在装有闪烁液的闪烁瓶中,于 Beckman LS 5801 液体闪烁计数器上测定放射性。

1.6 酶活性的影响因素

1.6.1 ATP 对酶活性的影响:加入不同浓度的 ATP,测定酶活力。

1.6.2 底物对酶活性的影响:加入不同浓度的 UDPG,测定酶活力。

1.6.3 二价金属离子对酶活性的影响:加入 1mmol/L Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} ,分别测定酶活力。

1.7 酶抑制剂的筛选

经过抑菌活性、膨破效应和诱导原生质球形成测定表现为阳性的发酵液样品,取 $50\mu\text{l}$ 加入反应系统,测定其对酶活力的影响。

2 结果和讨论

2.1 ATP 与酶活力的关系

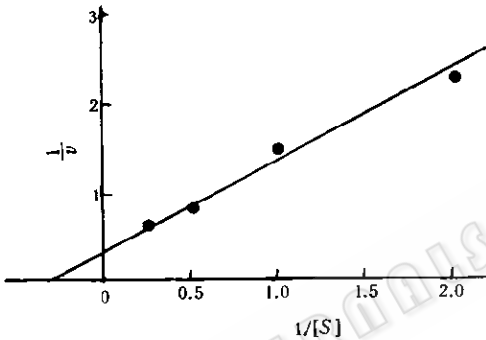


图 1 UDPG 与酶活力关系

UDPG 浓度单位: mmol/L ;

v 的单位: $\text{nmol glucose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 50\mu\text{l}^{-1}$;

$K_m = 3.3\text{mmol/L}$.

ATP 对来源于 *Saccharomyces cerevisiae* 的葡聚糖合成酶有一定的激活作用^[7],而在我们的实验中,ATP 对酶活无显著的影响,浓度高时有抑制作用。这与来源于 *Aphanomyces astaci*、*Neurospora crassa* 及 *Aureobasidium pullulans* 的结果一致^[8-10]。

2.2 底物浓度与酶活力关系

在上述反应条件下,每分钟转化 1nmol 葡萄糖的酶量作为 1 个酶活单位。用不同底物浓度进行实验,结果表明,所得粗酶的动力学方程符合 Michaelin-Menton 公式, K_m 值约为 3.3mmol/L (图 1)。

2.3 二价离子对酶活力的影响

不同来源的葡聚糖合成酶对二价离子的反应不一致。但是二价离子对来源于 *C. albicans* 的酶的作用尚没有研究报道。

表 1 一次筛选实验结果

| 样品号 | 菌号 | 抑制率 / (%) | 样品号 | 菌号 | 抑制率 / (%) |
|-----|------|-----------|-----|------|-----------|
| 1 | 616 | 7.6 | 11 | 3858 | 44.1 |
| 2 | 656 | 77.2 | 12 | 4068 | 13.4 |
| 3 | 682 | 74.0 | 13 | 4285 | 47.3 |
| 4 | 726 | 87.7 | 14 | 4397 | 53.4 |
| 5 | 860 | 30.0 | 15 | 7536 | 80.9 |
| 6 | 894 | 16.9 | 16 | 700 | 56.3 |
| 7 | 3396 | 34.9 | 17 | 718 | 46.3 |
| 8 | 3578 | 65.3 | 18 | 778 | 38.4 |
| 9 | 3589 | 58.8 | 19 | 2930 | 20.2 |
| 10 | 3742 | 53.0 | 20 | 3579 | 49.1 |

我们在实验中,取 1mmol/L 二价金属离子,加入反应系统中。结果表明 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶有激活

作用,分别提高 10.7%及 15.3%; Mn^{2+} 能较大幅度提高酶活,达到原来的 2.6 倍。 Cu^{2+} 抑制酶活性 16.7%, Zn^{2+} 强烈抑制酶活。 Fe^{2+} 对酶活无影响。

2.4 酶抑制剂筛选结果

我们对细胞学模型中筛选出的阳性样品进行了抑制酶活性的测定实验,表 1 是其中一次的测定结果。

从结果看出,实验中筛选得到的菌株,其产物对 β -1,3-葡聚糖合成几乎都有抑制作用,但不同样品的抑制率不同。这说明我们所建立的筛选方法是可行的。但从总的筛选结果来看,最后得到产物对酶抑制率大于 80%的菌株并不多。

虽然 β -1,3-葡聚糖合成酶是一个尚待深入研究的课题,许多结果有待进一步解释,但它在真菌尤其是酵母细胞壁合成和细胞生长中的重要地位显然是毋庸置疑的。把它作为一个靶酶,筛选其抑制剂,是获得抗真菌抗生素的理想途径之一。现已发现的抑制剂有 *Aculeacin*, *Papulacandin*^[2], *Echinocandin*^[11], *Cilofungi* 等^[12,13],但还没有开发成功的产品。另外,由于不同来源的该酶表现的性质不尽相同,所以我们认为选择临床上重要病原菌 *C. albicans* 来制备这个酶作为筛选用的靶酶,其针对性较强,因而是较为合适的选择。

参 考 文 献

- [1] 山口英世. 国外医学(微生物学分册), 1991, 14(2): 69~75.
- [2] Jose R H. *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis and Assembly*. Boca Raton / London: CRC Press, 1991.
- [3] Chattaway F W, Mary R H, Barlow A J E. *J Gen Microbial*, 1968, 51(3): 367~376.
- [4] Awald P, Zugel M, Monks C *et al.* *Exp Mycol*, 1993, 17(2): 130~141.
- [5] Manners D J, Masson A J, Patterson J C *et al.* *Biochem J*, 1973, 135(1): 19~30.
- [6] Manners D J, Masson A J, Patterson J C *et al.* *Biochem J*, 1973, 135(1): 31~36.
- [7] Shematek E M, Braatz J A, Cabib E. *J Biol Chem*, 1980, 255(3): 888~902.
- [8] Cerenius L, Soderhall K. *Physiol Plant*, 1984, 60(3): 247~252.
- [9] Quigley D R, Selitrennikoff C P. *Exp Mycol*, 1984, 8(3): 202~214.
- [10] Finkelmam M A J, Vardanis A. *Can J Microbiol*, 1987, 33(1): 123~127.
- [11] Sawistowska-Schroder E T, Kerridge D, Perry H. *FEBS*, 1984, 173(1): 134~138.
- [12] Tang J, T R Parr JR. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 35(1): 99~103.
- [13] Mika A, Tsutomu A, Tomokazu U *et al.* *J Antibiotics*, 1993, 46(7): 952~960.

PREPARATION OF β -1,3-GLUCAN SYNTHASE AND ITS APPLICATION TO THE SCREENING OF ANTIFUNGAL ANTIBIOTICS

Zheng Deyou Zhang Jiuchun Song Youxin Song Dakang

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract β -1,3-glucan synthase was obtained as a particulate fraction from cell-free extracts prepared after mechanical breakage cells of *Candida albicans*. Some properties of the glucan synthase were investigated. Using it as a target for screening for novel antifungal compounds, we obtained strains whose products showed differential enzyme inhibition.

Key words *Candida albicans*, β -1,3-Glucan Synthase, Inhibitor