

溜曲霉 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的化学修饰*

李梅 陶勇 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

用几种蛋白质侧链修饰试剂对 β -N-乙酰氨基己糖苷酶进行化学修饰, 在一定条件下, 当疏基、羟基、酪氨酸残基分别被 IAA 及 NEM、PMSF、NAI 修饰后, 酶活力不受影响, 说明这些基团与活力无关。当羧基、组氨酸及色氨酸残基分别被 EDC、DEP、NBS 修饰后, 酶活力大幅度下降, 说明这些基团或者参与了酶催化作用, 或者位于酶活性位区附近。

关键词 溜曲霉; β -N-乙酰氨基己糖苷酶; 化学修饰

β -N-乙酰氨基己糖苷酶 (β -N-Acetylhexosaminidase EC 3.2.1.52) 具有 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (β -N-Acetylglucosaminidase EC 3.2.1.30) 活力及 β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶 (β -N-Acetylgalactosaminidase EC 3.2.1.53) 活力。它可以作为一种工具酶, 用于糖链结构分析, 分解某些大分子缀合物, 还能水解神经节苷脂, 为治疗神经节苷脂沉积症有潜在的可能性, 因此人们对该酶的报道较多^[1-3], 但未见化学修饰方面的研究, 作者首次报道了溜曲霉 β -HexNAcase 的纯化^[4], 本文又对其化学修饰进行了一些研究, 今报道其结果。

材料和方法

(一) 材料

β -HexNAcase 凝胶电泳均一^[4]。

(二) 主要化学试剂及仪器

pNPGlcNAc、pNPGalNAc 及 DEP (Sigma), NEM 及 NAI (Merck), EDC (Bio-Rad), NBS 及 IAA (北京化工厂), 几丁二糖 (自制)^[5]。721 型分光光度计 (上海第二分析仪器厂)。

(三) 分析方法

1. 酶活力测定: 以 pNPGlcNAc

pNPGalNAc 及几丁二糖为底物, 测定方法分别见文献^[4, 5]。

2. 一般的化学修饰: 取 25 μ l 蛋白质侧链化学修饰剂, 加入 175 μ l 缓冲液, 50 μ l 酶液, 在 30 $^{\circ}$ C 作用 30 分钟, 然后加入 750 μ l pH5.0 的 0.2mol/L 的 HAc-NaAc 缓冲液稀释, 立即按常规方法测定酶活力。

结果和讨论

用 8 种蛋白质侧链修饰剂分别对溜曲

本文于 1990 年 11 月 6 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目及中国科学院资助项目。

本文采用缩写符号:

β -HexNAcase: β -N-乙酰氨基己糖苷酶

β -GlcNAcase: β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶

β -GalNAcase: β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶

pNPGlcNAc: 对硝基酚 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷

pNPGalNAc: 对硝基酚 β -N-乙酰氨基半乳糖苷

IAA: 碘乙酸

NEM: 乙基顺丁烯二酰亚胺 (N-Ethylmaleimide)

PMSF: 苯甲基磺酰氟 (Phenylmethanesulfonyl fluoride)

NAI: 乙基咪唑 (N-Acetylimidazole)

EDC: 碳化二亚胺 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide)

NBS: N-溴代琥珀酰亚胺 (N-Bromosuccinimide)

HAc-NaAc: 醋酸-醋酸钠

DEP: 焦磷酸二乙酯 (Diethylpyrocarbonate)

PBS: 磷酸缓冲液

霉 β -HexNAcase 分子的巯基、羟基、羧基、His、Tyr 及 Trp 进行修饰。所用修饰剂及其浓度,反应缓冲液 pH, 修饰后的相对酶活力见表 1。

表 1 化学修饰剂对酶活力的影响

Table 1 The effects of protein modification reagents on activity

试剂 Reagents	浓度 (mmol/L) Final conc.	pH	相对酶活力(%) Relative activity	
			β -GlcNAcase	β -GalNAcase
对照 Control	0.0		100.0	100.0
EDC	1.0	4.75	100.0	100.0
	50.0	4.75	65.4	58.1
NBS	0.005	4.8	3.2	3.6
	0.01	4.8	0.0	0.0
DEP	1.0	6.0	82.5	84.3
	10.0	6.0	31.1	30.5
Iodoacetamide	10.0	5.5	50.7	49.4
	10.0	7.5	10.0	2.8
IAA	10.0	6.0	96.2	100.0
	10.0	7.4	100.0	100.0
NEM	10.0	6.0	99.3	100.0
NAI	1.0	7.4	97.8	nd
	10.0	7.4	97.1	nd
PMSF	10.0	7.4	100.0	100.0

(一) 巯基、羟基的化学修饰

IAA、NEM、NAI 及 PMSF 分别对 β -HexNAcase 修饰后,酶活力不受影响(表 1),表明巯基、丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸均不是 β -HexNAcase 活力必需的。

(二) 羧基的化学修饰

用不同浓度的 EDC 对 β -HexNAcase 进行修饰,当 EDC 浓度为 50mmol/L 时, β -GlcNAcase 和 β -GalNAcase 酶活力分别为 65.4% 和 58.1% (表 1)。这是由于 β -HexNAcase 中酸性氨基酸含量高^[4],需要较大的 EDC 来修饰。同时,在反应时将加亲核试剂的与不加亲核试剂的进行对比,当 EDC 浓度一定时,加亲核试剂甘氨酸乙酯,相对 β -GlcNAcase 和 β -GalNAcase 活力分别由 78.1% 和 68.6% 下降至 65.4% 和 58.1% (表 2)。说明在有

亲核试剂存在时,排除了酶分子聚合^[6],EDC 修饰后酶活力下降,因此可以认为羧基与酶的催化功能有关。

表 2 EDC 对 β -HexNAcase 修饰作用Table 2 Effects of EDC modification on β -HexNAcase

亲核试剂 Nucleophilic reagents	浓度 (mmol/L) Conc.	相对活力(%) Relative activity	
		β -GlcNAcase	β -GalNAcase
	0.0	78.1	68.6
乙二胺 Ethylenediamine	200.0	71.8	58.1
甘氨酸乙酯 Glycine ethyl ester	200.0	65.4	58.1

(三) Trp 残基的化学修饰

不同浓度的 NBS 在 pH4.8 时与酶

(0.2u)反应。当 NBS 终浓度为 0.01mmol/L 时, β -HexNAcase 活力完全丧失。

将不同浓度的 pNPGlcNAc、几丁二糖和酶液分别在冰浴中预冷 5 分钟, 然后与 NBS 水溶液按常规方法反应, 并测定酶活力, 以不加底物及 NBS 的酶液作对照(相对酶活力 100%)。结果是随底物浓度的增加, 其酶活力相对减少不多(表 3), 当 pNPGlcNAc 浓度为 3.0mmol/L 时, 相对应的 β -HexNAcase 活力达 91.1%;

几丁二糖浓度为 0.3mmol/L 时, 相对酶活力达 96.0%。由此认为 Trp 残基与酶活力有关, 这是因为当底物和酶一旦接触, 立即形成中间复合物, 从而阻止了 NBS 对 Trp 残基的氧化, 表现出底物对酶的保护作用。而自然底物几丁二糖对酶的保护作用又比合成底物 pNPGlcNAc 要大(表 3), 虽然溜曲霉 β -HexNAcase 对两者的亲和力是接近的^[9]。

(四) His 残基的化学修饰

表 3 底物对 β -HexNAcase 被 NBS 修饰的保护作用

Table 3 Protection of β -HexNAcase activity from NBS modification by different concentration of substrate

NBS Final conc. (mmol/L)	pNPGlcNAc		几丁二糖 Chitobiose	
	浓度 Final conc. (mmol/L)	相对活力 Relative activity	浓度 Final conc. (mmol/L)	相对活力 Relative activity
0.00	0.00	100.0	0.0000	100.0
0.01	0.00	3.20	0.0300	0.0
	1.20	39.8	0.0187	19.2
	1.80	50.9	0.0375	42.7
	2.40	70.7	0.0750	80.5
	3.0	91.1	0.1500	87.6
			0.3000	96.0

DEP 是同 His 的咪唑基发生作用的

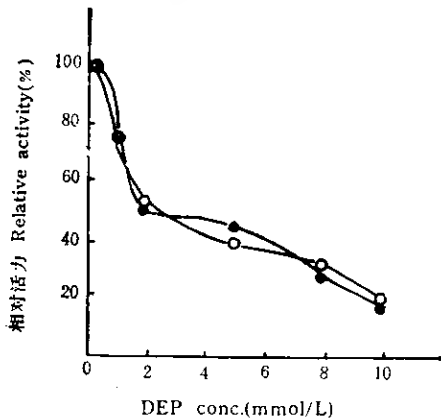


图 1 DEP 对 β -HexNAcase 活力影响

Fig. 1 Effect of DEP modification on β -HexNAcase activity

O-O: β -GlcNAcase; ●-●: β -GalNAcase

试剂,用无水乙醇配制成不同浓度^[7], 然后和酶液反应,其结果见图 1。随 DEP 浓度增加, β -HexNAcase 活力逐渐降低, 当 DEP 为 1mmol/L 时, 相对酶活力仅有 17%。用 pH7.0 的 0.75mol/L 羟胺处理被 10mmol/L DEP 作用过的酶^[8], 使分子上的组氨酸恢复原来状态, 相对酶活力也就从 31% 恢复至 79.3% (表 4)。由此结果说明酶分子中的组氨酸残基为酶活力必需基团, 而氨基与酶活力无关。

β -HexNAcase 在 pH5.5 和 7.5 条件下, 被碘代乙酰胺修饰后, 酶活力大幅度下降, 这表明 β -HexNAcase 活力与咪唑基和羧基有关。

根据上述初步结果可以认为溜曲霉

表4 脲腈逆转 DEP 对 β -HexNAcase 的修饰作用

Table 4 Modification of histidine by DEP and reversal by hydroxylamine

逆转时间 (min) Reversion time	相对活力(%) Relative activity	
	β -GlcNAcase	β -GalNAcase
0	31.0	30.0
10	67.6	66.2
30	74.7	72.5
120	79.3	78.4

β -HexNAcase 活力的必需基团为羧基、色氨酸与组氨酸残基，但究竟哪个基团或几个基团参与了酶的催化作用，或哪些基团参与了其结合作用以及其作用机制还需进

一步试验。

参 考 文 献

- [1] Bedi, G. S., et al.: *Archives of Biochem. and Biophys.*, 233(1): 237—250, 1984.
- [2] Frohwein, Y. Z. et al.: *Biochemistry*, 6(9): 2775—2782, 1967.
- [3] 严自正等: 微生物学报, 30(2): 122—128, 1990.
- [4] 陶 勇等: 微生物学报, 30(4): 259—266, 1990.
- [5] 李 梅等: 生物化学与生物物理学报, 23(4): 284—290, 1991.
- [6] Herz, J. M. et al.: *FEBS Lett.*, 131(1): 198, 1981.
- [7] Miles, E. W.: *Methods in Enzymology* (Hirs, C. H. W. and S. N. Timasheff ed.), 47: 431, Academic Press, New York and London, 1977.
- [8] Francoise, T. B. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 19: 270—275, 1971.

THE CHEMICAL MODIFICATION OF β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASE FROM *ASPERGILLUS TAMARII*

Li Mei Tao Yong Yan Zizheng Zhang Shuzheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

The effects of some protein modification reagents on the β -N-Acetylhexosaminidase activity have been studied. The enzyme was not affected by IAA and NEM, PM-SF, NAI modification thereof, suggesting that thiol group, hydroxyl group and tyrosine residues were non-essential to enzyme activity. But the enzyme activity was remarkably diminished after EDC, DEP, NBS modification. These results indicated that the

carboxyl groups, histidine and tryptophan residues seemed to be essential to catalytic activity or located at the active site of the β -N-Acetylhexosaminidase.

Key words

Aspergillus tamaris; β -N-Acetylhexosaminidase; Chemical modification