

效应物对牛肠激酶活性的影响

郑丽钦¹, 杨美花², 潘志针¹, 王秋红²,
孙黎², 陈清西^{1*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 厦门特宝生物工程股份有限公司, 福建 厦门 361022)

摘要: 肠激酶(EK, EC 3. 4. 21. 9)是一种在基因工程产品中广泛应用的工具酶. 以小分子荧光物质甘氨酸-天冬氨酰-天冬氨酰-天冬氨酰-天冬氨酰-赖氨酰-萘胺(Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-naphthylamide, GD₄K-naphthylamide)为底物, 采用荧光跟踪法研究了不同氨基酸、几种常用有机溶剂、EDTA、DTT 等对牛肠激酶(BEK)活力的影响. 结果表明: L-赖氨酸(L-Lys)、丙酮、EDTA、DTT 对该酶的活性有较强的抑制作用, $I_{C_{50}}$ 分别约为 25, 50, 50 和 120 mmol/L. 进一步研究了 L-Lys 与丙酮对 BEK 活力的抑制机理以及抑制类型, 结果表明: L-Lys 对该酶的抑制机理为可逆抑制, 其抑制类型为竞争型抑制类型, 其抑制常数 K_i 为 12.02 mmol/L. 丙酮对 BEK 的抑制类型表现为不可逆抑制.

关键词: L-赖氨酸; 牛肠激酶; 动力学; 抑制作用

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)05-0725-04

肠激酶(Enterokinase, EK, EC 3. 4. 21. 9)是存在于哺乳动物十二指肠内的一种异源二聚体丝氨酸蛋白酶^[1], 天然肠激酶由一条结构亚基(heavy chain, 重链)和一条催化亚基(light chain, 轻链)构成, 两者通过一个分子间二硫键结合, 催化亚基的分子量通常为 26.3 ku, 具有 3 个糖基化位点, 经糖基化修饰后分子量大约为 43 ku^[2]. 催化亚基可以特异性识别胰蛋白酶原中 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 序列并沿序列的羧基端切下. (Asp)₄ 残基强大的负电荷降低了这个位点胰蛋白酶原自切割的可能性, 而 EK 活性中心有一个特殊的阳离子位点^[3], (Asp)₄ 可以与其结合而行使上述特异性酶切功能^[1]. 目前 EK 作为工具酶已被广泛应用于基因工程产品的生产中. 本文在开发研制重组的 EK 基础上, 探讨几种效应物(氨基酸、有机溶剂等)对该重组的 EK 催化 GD₄K-naphthylamide 水解的酶活力的影响, 探讨其作用机理, 该研究对于其作为工具酶应用于基因工程产品的生产、应用方面具有重要的指导意义.

1 材料与方 法

1.1 材 料

牛肠激酶(BEK)由厦门特宝生物工程股份有限公司提供. Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-naphthylamide(简称 GD₄K-naphthylamide)为 Sigma 公司产品; L-天冬氨酸(L-Asp)、甘氨酸(L-Gly)、精氨酸(L-Arg)、赖氨酸(L-Lys)购自伯奥生物科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯; 实验用水为超纯水.

1.2 方 法

1.2.1 BEK 活力测定

参考文献[4-5]方法, 以 GD₄K-naphthylamide 为底物, 在 BEK 作用下, 底物水解会释放出具有荧光的 -萘胺, 激发光波长为 331 nm, 发射光波长为 420 nm, 采用 Max M 2e 荧光酶标仪和 Costar 荧光酶标板测定. 具体测定方法是: 在 200 μ L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲体系中, 以 0.10 mmol/L GD₄K-naphthylamide 为底物, 加入 20 μ L BEK 酶液, 在 25 $^{\circ}$ C 恒温下跟踪荧光值(F)随反应时间的增大, 从直线斜率计算酶活力. 活力单位定义为在上述测活条件下, 每秒引起的荧光强度增加 1 个单位的酶量.

1.2.2 BEK 催化底物 GD₄K-naphthylamide 的动力学参数测定

在 200 μ L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲体系中, 改变底物浓度, 固定酶的终浓度为 2 μ g/mL, 在 25 $^{\circ}$ C 恒温下跟踪荧光值(F)随反应时间的增大, 从直线斜率计算酶活力. 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 计算酶催

收稿日期: 2008-11-10

基金项目: 福建省重点科技项目(2007N0051), 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开发课题(2009103)资助

* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn

化反应的动力学参数,包括表观米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m).

1.2.3 效应物对 BEK 活力的影响

在固定底物浓度为 0.10 mmol/L 的测活体系中,分别加入不同浓度的效应物,在正常测活体系中测定酶活力.以未加入效应物为 100% 的酶活力,计算酶的剩余活力,考察效应物对该酶活力的影响,效应物的抑制强度以导致酶活力下降 50% 所需的抑制剂含量(IC_{50})表示.

1.2.4 效应物对 BEK 抑制机理的判断

在固定底物浓度为 0.10 mmol/L 的测活体系中,加入不同浓度的效应物,改变 BEK 的加入量,测定不同浓度效应物对 BEK 催化底物水解酶活力的影响,以酶活力对酶浓度的作图,判断效应物对 BEK 的抑制机理.

1.2.5 效应物对 BEK 抑制类型及抑制常数的测定

在测活体系中,固定 BEK 的浓度,改变底物浓度,测定不同浓度的效应物对 BEK 催化底物水解的酶活力的影响.以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,比较酶催化反应的动力学参数,包括表观米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)的变化来判断.

2 实验结果

2.1 BEK 催化合成底物 GD₄ K⁻-naphthylamide 的动力学特征

在 200 μ L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲体系中,以不同浓度的 GD₄ K⁻-naphthylamide 为底物,加入 20 μ L BEK 酶液,在 25 $^{\circ}$ C 恒温下跟踪荧光值(F)随反应时间的改变.以不同批次的 BEK 样品进行以酶反应的初速度对底物浓度作图为一组双曲线,说明酶促反应遵循米氏(Michaelis-Menten)动力学方程.以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,从直线的截距求得该酶催化底物 GD₄ K⁻-naphthylamide 水解的米氏常数 K_m 和最大速度 V_m 分别为 0.23 mmol/L 和 84.03 U/s.

2.2 氨基酸对 BEK 活力的影响

在 25 $^{\circ}$ C、pH 8.0 的测活体系中,固定底物浓度为 0.10 mmol/L,酶浓度为 2 μ g/mL,测定 L-Asp、L-Gly、L-Arg、L-Lys 4 种氨基酸对酶活力的影响.结果(图 1)显示:在小于 30 mmol/L 的范围内,L-Asp 对 BEK 基本没有抑制作用;L-Gly、L-Arg 对 BEK 有轻微的抑制作用,随着效应物浓度的增加,抑制作用增大,但未达到 50%;L-Lys 对该酶具有较强的抑制活性,其抑制也具有剂量依赖性,其 IC_{50} 为 25 mmol/L.

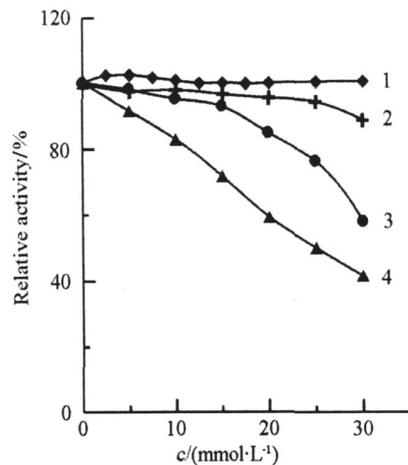


图 1 氨基酸对 BEK 活力的影响
直线 1~4 分别为 L-Asp, L-Gly, L-Arg, L-Lys

Fig. 1 The inhibitory effect of amino acids on the BEK activity

2.3 L-Lys 对 BEK 的抑制机理及抑制常数的测定

在测活体系中,固定底物 GD₄ K⁻-naphthylamide 浓度,加入不同浓度的 L-Lys 并改变加入酶蛋白的量,测定不同浓度 L-Lys 对该酶活力的影响.以酶活力对酶蛋白的浓度作图,得到一组通过原点的直线,如图 2 所示.随着加入的 L-Lys 的浓度增大,直线的斜率逐渐下降,说明 L-Lys 对该酶的抑制作用属于可逆过程,增加 L-Lys 含量导致酶活力的下降是由于酶活力受到抑制,催化效率降低,而不是通过导致有效酶量的减少而引起酶活力的下降.

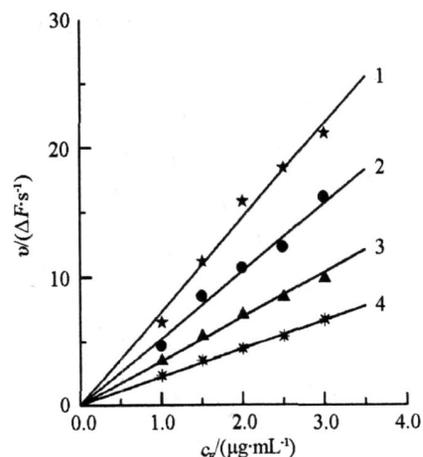


图 2 L-Lys 对 BEK 抑制机理的判断
直线 1~4 的 L-Lys 浓度分别为 0, 15, 25 和 40 mmol/L

Fig. 2 Inhibitory mechanism of L-Lysine on BEK

在测活体系中,固定酶的浓度,改变底物浓度,测定不同浓度的 *L*-Lys 对 BEK 活力的影响.图 3 为 *L*-Lys 对 BEK 抑制作用的 Lineweaver-Burk 图,得到一组相交于纵轴的直线,说明 *L*-Lys 对 BEK 的抑制只影响酶促反应的表观米氏常数 (K_m),不影响最大反应速度 (V_m) 值,其抑制机理表现为竞争性类型,以不同浓度 *L*-Lys 求得的表观米氏常数 (K_m) 对抑制剂浓度作图,见图 3 内插图,求得 *L*-Lys 对 BEK 的抑制常数 K_i 为 12.02 mmol/L.

2.4 有机溶剂对 BEK 活力的影响

在 25 °C、pH 8.0 的测活体系中,固定底物浓度为 0.10 mmol/L,酶的反应终浓度为 2 μg/mL,测定甲醇、正丙醇、乙腈、丙酮 4 种有机溶剂对酶活力的影响.结果见图 4,在小于 6 mol/L 的范围内,甲醇对 BEK 的酶活力没有影响,而正丙醇、乙腈对 BEK 具有一定

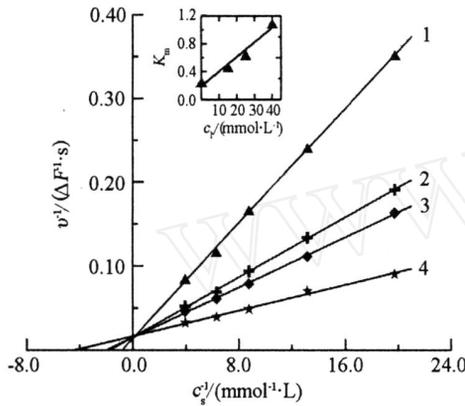


图 3 *L*-Lys 对 BEK 抑制作用的 Lineweaver-Burk 图
直线 1~4 表示的 *L*-Lys 浓度分别为 0, 15, 25 和 40 mmol/L

Fig. 3 Lineweaver-Burk polts for inhibition of *L*-Lysine on BEK activity

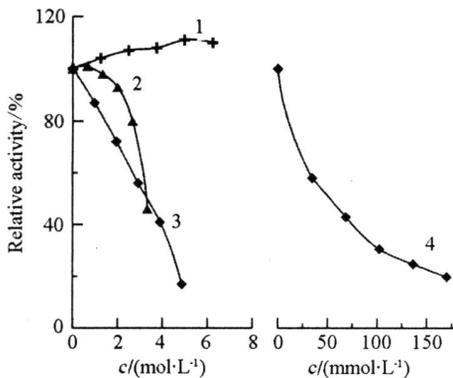


图 4 有机溶剂对 BEK 活力的影响
图中直线 1~4 分别为甲醇、正丙醇、乙腈、丙酮
Fig. 4 The inhibitory effect of methanol, propyl alcohol, acetonitrile and acetone on BEK activity

的抑制作用,其半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 2.8 和 3.0 mol/L,丙酮对 BEK 的活力的抑制作用最强,其半抑制浓度 (IC_{50}) 为 50 mmol/L.

在测活体系中,固定底物 GD₄ K-naphthylamide 浓度,改变加入的酶蛋白的量,测定不同含量丙酮对该酶催化底物的影响.图 5 表示酶在含不同浓度的丙酮的测活体系中,酶的活力与加入的酶量间的关系.以酶活力对酶的浓度作图得到一组平行的直线,说明丙酮对 BEK 的抑制属于不可逆过程,即丙酮通过减少有效酶量而非通过抑制酶的活力导致酶的活力下降.

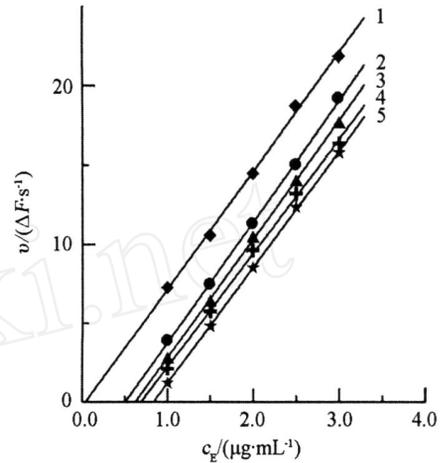


图 5 丙酮对 BEK 抑制机理的判断
直线 1~5 丙酮的浓度分别为 0, 17, 34, 51 和 68 mmol/L

Fig. 5 Inhibitory mechanism of acetone on BEK

2.5 EDTA 和 DTT 对 BEK 活力的影响

在 25 °C、pH 8.0 的测活体系中,固定底物浓度为 0.10 mmol/L,酶的反应终浓度为 2 μg/mL,改变 EDTA 与 DTT 的浓度,结果如图 6 所示.实验结果表明:EDTA 与 DTT 均对 BEK 具有抑制作用,其抑制具有剂量依赖性,其 IC_{50} 分别为 50 和 120 mmol/L.

3 讨论

易进华^[6]等发现 *L*-Lys 对丝氨酸蛋白酶的活性具有一定的抑制作用,本实验采用的 BEK 为丝氨酸蛋白酶,实验结果证实了 *L*-Lys 对该酶活性有明显的抑制,用反应稳态速度及底物浓度的双倒数作图,其结果符合米氏方程.分析 *L*-Lys 的抑制作用可能与该酶特异性识别 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 序列有关,结合表观米氏常数及抑制类型的判断实验,推断 *L*-Lys 同底物竞争与酶的结合.

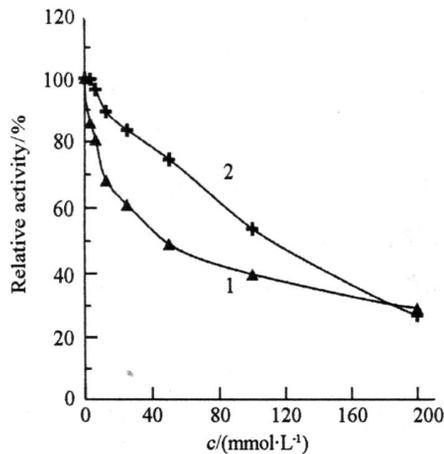


图6 EDTA、DTT对BEK活力的影响
曲线1和2分别表示EDTA与DTT

Fig. 6 The inhibitory effect of EDTA and DTT on the BEK activity

本文通过跟踪法研究了不同的效应物对BEK活力的影响。研究发现,在6 mol/L的浓度下,甲醇对BEK的活性没有影响,而正丙醇、乙腈与丙酮对BEK有着不同程度的抑制作用,其半抑制浓度(IC_{50})分别为2.8, 3.0 mol/L与50 mmol/L。另外EDTA与DTT对BEK的酶活力也具有较高的抑制作用,其半抑制浓度(IC_{50})分别为50和120 mmol/L。本文对L-Lys及丙酮的抑制机理进行了深入的探讨,从理论上阐明了效应物的抑制机理,为寻找其它对该酶有抑制活性的效应物提供理论依据。

此外,Lei等报道^[7],酶切反应可在较宽的变化范围内进行,温度可在4~45之间,pH值可在4.5~

9.5之间变化,而且在多种变性剂和去污剂存在下仍具有活性,对于活性测定的其它影响因素如温度、pH值等有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] LaVallie E R, Rehemtulla A, Racie L A, et al. Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (31): 23311 - 23317.
- [2] Voza L A, Wittwer L, Higgins D R, et al. Production of a recombinant bovine catalytic subunit in the methlotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Biotech*, 1996, 14: 77 - 81.
- [3] Lu D S, Zheng X L, Tan K, et al. Crystal structure of enteropeptidase light chain complexed with an analog of the trypsinogen activation peptide [J]. *J Mol Biol*, 1999, 292: 361 - 373.
- [4] Peng L S, Zhong X F, Ou J X, et al. High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris* [J]. *J Biotech*, 2004, 108: 185 - 192.
- [5] 孙自勇, 陈均勇, 陈新园, 等. 牛肠激酶轻链在毕赤酵母中的分泌表达纯化和活性鉴定 [J]. *南京大学学报: 自然科学版*, 2004, 40(1): 41 - 48.
- [6] 易进华, 王罗春, 张元兴, 等. 重组肠激酶酶切 Trx. rPA融合蛋白的研究 [J]. *中国医药工业杂志*, 2007, 38(6): 419 - 422.
- [7] Lei F, Sun Q M, Hua Z C. Expression of recombinant Chinese bovine enterokinase catalytic subunit in *P. pastoris* and its purification and characterization [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2004, 36(7): 513 - 517.

Inhibitory Effects of Different Effectors on Bovine Enterokinase

ZHEN G Li-qin¹, YANG Mei-hua², PAN Zhi-zhen¹, WANG Qiu-hong²,
SUN Li², CHEN Qing-xi^{1*}

(1. Key Lab. of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Amoytop Biotech. Co, Xiamen 361022, China)

Abstract: Enterokinase (BEK, EC 3.4.21.9) is an important enzyme widely used in gene engineering. In this study, the inhibitory effects of several amino acids, organic solvents, EDTA and DTT on the activity of bovine enterokinase (BEK) for the hydrolysis of Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-naphthylamide were investigated by monitoring the change of fluorescent. The results indicated that L-Lys, acetone, EDTA and DTT had strong inhibitory effect on the activity of BEK, with the concentrations of 25, 50, 50 and 120 mmol/L, respectively leading to 50% enzyme activity lost. The research result showed that the mechanism of L-Lys effect on BEK activity was reversible, belonging to competitive type inhibitory. The inhibition constant of L-Lys (K_i) was 12.02 mmol/L. The results also showed that the mechanism of acetone inhibiting effect on BEK was irreversible.

Key words: L-Lysine; bovine enterokinase; dynamics; inhibitory