

变性剂对重组牛肠激酶活性的影响

陈小兰¹, 杨美花^{1,2}, 李智聪¹, 郑丽钦^{1,2}, 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 Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- β -萘胺为底物, 采用荧光跟踪法研究了变性剂盐酸胍、硫脲、尿素对重组牛肠激酶(rEK)活力的影响及抑制动力学. 结果表明: 盐酸胍、硫脲、尿素均对该酶的活性有较强的抑制作用, 它们对该酶的半抑制浓度(IC_{50})分别为 0.025, 0.080 和 0.750 mol/L. 研究的 3 种变性剂对该酶的抑制均显示可逆抑制机理; 抑制类型也均为竞争性类型, 测定它们对酶的抑制常数 K_i 分别为 0.015, 0.060 和 0.553 mol/L.

关键词: 变性剂; 重组牛肠激酶; 动力学; 抑制作用

中图分类号: TQ 925.4

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)03-0603-04

肠激酶(enterokinase, EK, EC 3.4.21.9)是哺乳动物消化系统中基础的丝氨酸蛋白水解酶之一, 由一条结构亚基(重链)和一条催化亚基(轻链)构成, 两者通过一个分子间二硫键结合. 结构亚基负责将催化亚基固定在小肠刷状缘膜上并引导它向肠腔移动, 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, 将胰蛋白酶原活化成为胰蛋白酶, 从而启动各种酶原活化的级联^[1]. 对于 EK 酶切的高度特异性, Rumsh 等^[2]认为是由于酶中钙离子的丧失使得酶自切割, 从而具备了激活其他酶的高度特异性. Janska 等^[3]研究氨基末端残基发现了 EK 轻链的三维结构与类胰蛋白酶等的丝氨酸蛋白酶的结构同源性. Song 等^[4]则发现将轻链氨基末端的 Ile 突变为 Val 其酶活几乎不发生改变. 有研究^[5,6]发现 EK 的重链强烈影响 EK 对大分子底物的识别, 而对合成的融合蛋白或小分子底物的识别没有影响. 重组牛肠激酶(recombinant bovine enterokinase, rEK)的分子质量通常为 26.3 ku, 具有 3 个糖基化位点^[7], 其糖基化分子质量大约为 43 ku. Vozza 和 Lisa 等^[7,8]先后报道了用大肠杆菌(*Escherichia coli*)和甲醇酵母制备 rEK 的方法, 另外, Vozza 等^[7]发现, rEK 体外实验证明有全酶酶切特异性并且相对于天然 EK 表现出对基因工程融合蛋白底物的酶切活性增强, 因而现在

多采用基因工程的方法生产 rEK.

本文应用酶动力学方法, 探讨几种常用蛋白变性剂(盐酸胍、硫脲、尿素)对 rEK 催化 Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- β -萘胺(GD₄K- β -萘胺)水解反应的影响, 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

rEK 由厦门特宝生物工程股份有限公司提供; GD₄K- β -萘胺为 Sigma 产品; 盐酸胍、硫脲、尿素均为国产分析纯试剂; 实验用水为超纯水.

1.2 方法

1.2.1 rEK 活力的测定

参照文献[9-10]方法, 以 GD₄K- β -萘胺为底物, 在 rEK 作用下, 底物水解会释放出具有荧光的 β -萘胺, 激发光波长为 331 nm, 发射光波长为 420 nm, 采用 Max M^{2c} 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- β -萘胺为底物, 加入 20 μ L rEK 酶液, 在 25 $^{\circ}$ C 恒温下跟踪荧光值(ΔF)随反应时间的变化, 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 效应物对 rEK 活力的影响

在固定底物浓度为 0.10 mmol/L 的测活体系中,

收稿日期: 2010-05-17

基金项目: 国家基础科学人才培养基金项目(J1030626); 厦门市科技创新项目(3502Z20081143)

* 通信作者: chenqx@xmu.edu.cn

分别加入不同浓度的效应物,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%所需的抑制剂浓度(IC_{50})表示.

1.2.3 效应物对 rEK 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,改变 rEK 的加入量,测定不同浓度的效应物对 rEK 催化底物水解的酶活力的影响,以酶活力对酶量的浓度作图,判断效应物对 rEK 的抑制机理.

1.2.4 效应物对 rEK 抑制类型及抑制常数的测定

在固定 rEK 质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的测活体系中,改变底物的浓度,测定不同浓度的效应物对 rEK 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)的变化来判断变性剂对 rEK 的抑制类型.

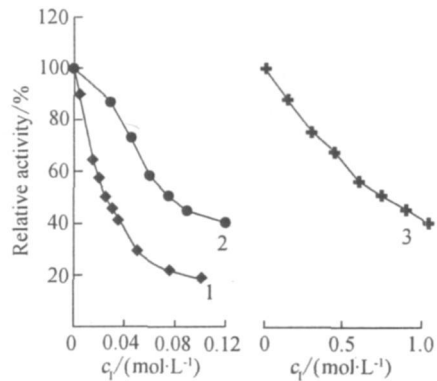
2 实验结果

2.1 盐酸胍、硫脲、尿素对 rEK 活力的影响

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 的测活体系中,固定底物浓度为 0.10 mmol/L 和 rEK 质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以不加效应物为对照,测定不同浓度的盐酸胍、硫脲、尿素对 rEK 活力的影响,结果如图 1 所示.实验结果表明,3 种蛋白变性剂均对酶活力有较强的抑制效应,其中尿素的抑制活性最弱,其 IC_{50} 为 0.750 mol/L;硫脲次之,其 IC_{50} 为 0.080 mol/L;盐酸胍的抑制活性最强,其 IC_{50} 为 0.025 mol/L,当盐酸胍浓度达到 0.050 mol/L 时,酶活力下降 75%.

2.2 盐酸胍、硫脲、尿素对 rEK 的抑制机理及抑制常数的测定

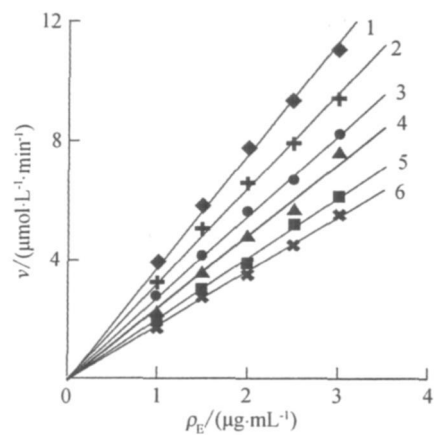
在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 测活体系中,固定底物 $\text{GD}_4\text{K}-\beta$ 萘胺浓度为 0.10 mmol/L,改变 rEK 的加入量,测定不同浓度盐酸胍对该酶活力的影响.以酶活力对酶蛋白的浓度作图,得到一组通过原点的直线,结果如图 2 所示.随着加入的盐酸胍浓度增大,直线的斜率逐渐下降,说明盐酸胍对该酶的抑制作用属于可逆过程,增加盐酸胍浓度导致酶活力的下降是通过抑制酶活力降低催化效率,而不是通过导致有效酶量的减少而引起酶活力的下降.硫脲、尿素对 rEK 的抑制机理与盐酸胍类似,也是随着加入硫脲、尿素浓度的增大,直线的斜率逐渐下降,也属于可逆过程.



曲线 1~3 分别表示盐酸胍、硫脲、尿素.

图 1 盐酸胍、硫脲、尿素对 rEK 活力的影响

Fig. 1 Inhibitory effects on activity of rEK of Guanidine Hydrochloride, thiourea and urea



直线 1~6 盐酸胍浓度分别为 0, 5, 10, 15, 20 和 25 mmol/L.

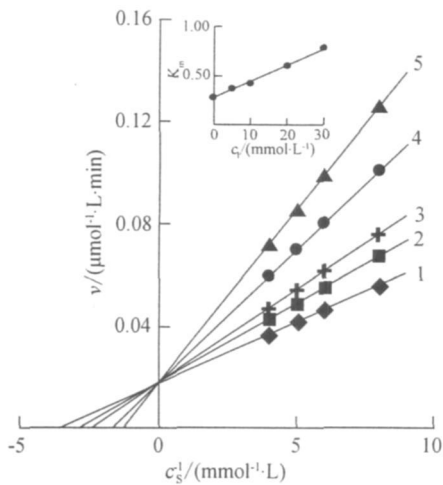
图 2 盐酸胍对 rEK 抑制机理的判断

Fig. 2 Inhibitory mechanism of Guanidine Hydrochloride on rEK

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 测活体系中,固定 rEK 质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,改变底物 $\text{GD}_4\text{K}-\beta$ 萘胺浓度,测定不同浓度盐酸胍对 rEK 活力的影响.根据盐酸胍对 rEK 抑制作用的 Lineweaver-Burk 图,得到一组相交于纵轴的直线,结果如图 3 所示,说明盐酸胍对 rEK 的抑制只影响酶促反应的 K_m ,不影响 V_m ,其抑制机理表现为竞争性类型,以不同浓度盐酸胍求得的 K_m 对抑制剂浓度二次作图(图 3 内插图),求得盐酸胍对 rEK 的抑制常数 K_I 为 0.015 mol/L.硫脲、尿素对该酶的抑制机理与盐酸胍类似,其抑制常数 K_I 分别为 0.060 和 0.553 mol/L.现将 3 种变性剂的抑制动力学参数列于表 1.

3 讨论

EK 的底物酶切位点序列具有高度的特异性,这



直线 1~5 的盐酸胍浓度分别为 0, 5, 10, 20, 30 mmol/L。

图3 盐酸胍对 rEK 活力抑制作用的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots for inhibition of Guanidine Hydrochloride on rEK activity

表 1 不同变性剂对 rEK 催化反应的动力学参数

Tab. 1 Kinetics parameters of rEK at different denaturant

变性剂	$IC_{50}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	抑制类型	$K_I/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
盐酸胍	0.025	竞争性	0.017
硫脲	0.080	竞争性	0.060
尿素	0.750	竞争性	0.553

种特点使得 EK 成为基因工程融合蛋白表达后修饰过程中一个极其有用的工具而被广泛应用^[11]。目前, 该酶主要是通过毕赤酵母重组表达生产, 不同的提纯工艺对酶的活力有很大的影响, 然而, 生产中各因素对酶活力的影响报道并不多。郑丽钦等^[12]的研究表明赖氨酸、异丙醇、乙腈、丙酮、EDTA 和 DTT 均对 rEK 有不同程度的抑制效应。

本文以荧光物质 GD4K- β 萘胺为底物, 采用荧光跟踪法研究了几种常用蛋白变性剂对 rEK 活力的影响。研究表明, 3 种变性剂盐酸胍、硫脲、尿素对 rEK 活力均有不同程度的抑制作用, 其半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.025, 0.080 和 0.750 mol/L。酶动力学研究表明, 3 种变性剂均为竞争性的可逆抑制剂, 并求得其抑制常数。本文深入探讨了 3 种变性剂的抑制作用机理, 从理论上阐明了效应物的抑制机理和类型, 为寻找其他的对该酶有抑制活性的效应物提供理论依据。在基因重组药物生产实践中, 盐酸胍、硫脲、

尿素均为常用的变性剂, 本研究结果表明, 变性剂的使用浓度对 rEK 活力有较大的影响, 对生产实践有一定的指导作用。

参考文献:

- [1] 查向东, 孔小卫, 周立志. 牛肠激酶次特异性识别序列分析[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(5): 708-709.
- [2] Mikhailova A G, Rumsh L D. Structural characteristics providing for high specificity of enteropeptidase [J]. Bioorg Khim, 1998, 24(4): 282-287.
- [3] Light A, Janska H. The amino terminal sequence of the catalytic subunit of bovine enterokinase [J]. Journal of Protein Chem, 1991, 10(5): 475-480.
- [4] Song H W, Choi S I, Seong B L. Engineered recombinant enteropeptidase catalytic subunit: effect of N-terminal modification[J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 400(1): 1-6.
- [5] Lu D, Yuan X, Zheng X, et al. Bovine proenteropeptidase is activated by trypsin, and the specificity of enteropeptidase depends on the heavy chain[J]. Bio Chem, 1997, 272(50): 31293-31300.
- [6] 顾玮彦, 袁磊, 徐志南, 等. 利用 his tag 纯化和复性基因工程产物肠激酶[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6): 18-22.
- [7] Voza L A, Wittwer L, Higgins D R, et al. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 77-81.
- [8] Collins Racie L A, McColgan J M, Grant K L, et al. Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA [J]. Nature Biotechnology, 1995, 13: 982-987.
- [9] 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]. Journal of Biotechnology, 2004, 108: 185-192.
- [10] 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.
- [11] 张向辉, 谭树华, 李泰明. 肠激酶特点及其基因工程的研究进展[J]. 药物生物技术, 2005, 12(5): 347-350.
- [12] 郑丽钦, 杨美花, 潘志针, 等. 效应物对牛肠激酶活性的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2009, 48(5): 725-728.

Effects of Different Denaturant on Recombinant Bovine Enterokinase

CHEN Xiaolan¹, YANG Meihua^{1,2}, LI Zhicong¹, ZHENG Liqin^{1,2},
SUN Li², CHEN Qingxi^{1*}

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

Abstract: Enterokinase(EK, EC 3. 4. 21. 9) is an important enzyme widely used in gene engineering. In this study, the inhibitory effects of several denaturant guanidine hydrochloride, thiourea and urea on the activity of rEK for the hydrolysis of Gly-Asp-Asp-Asp-Lys-β-naphthylamide were investigated by the monitoring the change of fluorescence. The results indicated that guanidine hydrochloride, thiourea and urea had strong inhibitory effect on the activity of rEK, with the concentrations of 0.025, 0.080 and 0.750 mol/L, respectively leading to 50% enzyme activity lost. Research showed that the mechanism of guanidine hydrochloride, thiourea and urea effecting on rEK activity were reversible, belonging to competitive type inhibitory. The inhibition constants of guanidine hydrochloride, thiourea and urea were respectively 0.015, 0.060 and 0.553 mol/L.

Key words: denaturant; recombinant bovine enterokinase; kinetics; inhibition

• 简 讯 •

2010 年度我校获国家、部、省、市级科技奖项目

序号	项目名称	获奖类别	获奖等级
1	戊型肝炎病毒优势构象性抗原决定簇的发现及其在诊断中的应用	国家科学技术奖	2等
2	细胞坏死分子机制的研究	高等学校科学研究优秀成果奖	1等
3	海洋微型生物碳泵	中国高等学校十大科技进展	
4	海洋桡足类滞育生物学研究	海洋创新成果奖	2等
5	眼表上皮疾病的基础与临床研究	福建省科学技术奖	1等
6	非线性退化抛物方程与 Navier-Stokes 方程的边界层问题	福建省科学技术奖	2等
7	煤炭分布式智能生产执行系统 MES 研制与应用	福建省科学技术奖	2等
8	多晶硅连续凝固铸锭产业化工艺与设备	福建省科学技术奖	3等
9	胃癌生长方式、临床病理特征的研究及应用	福建省科学技术奖	3等
10	Brugada 综合征心电图学及心脏超声影像学特征及相关性研究	福建省科学技术奖	3等
11	角结膜疾病的基础研究及临床应用	福建省科学技术奖	3等
12	医用全身扩散加权成像及其在肿瘤转移灶诊断中的应用	厦门市科技进步奖	1等
13	角结膜疾病的基础研究及临床应用	厦门市科技进步奖	2等
14	运用数理方法研究代谢综合征中医证型的分类及其特征	厦门市科技进步奖	2等
15	寰枢关节及椎动脉三维 CT 的影像解剖与临床应用	厦门市科技进步奖	2等
16	煤炭分布式智能生产执行系统 MES 研制与应用	厦门市科技进步奖	3等
17	异基因造血干细胞移植治疗血液病临床研究	厦门市科技进步奖	3等
18	乙型肝炎病毒前 S 区和前 X 区与肝细胞癌关系的研究	厦门市科技进步奖	3等
19	汽车工业用 MEMS 传感器的研发和产业化及微纳制造产业化平台的建设	厦门市科技进步奖	3等
20	BE 上皮内瘤变 腺癌序列和鳞癌微卫星改变及临床意义	厦门市科技进步奖	3等

厦门大学科技处