

脱卤酶化学修饰的研究

江 宁

刘吉泉 左右田健次

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(日本京都大学化学研究所 日本京都)

摘 要 脱卤酶是催化 α -卤酸转化为 α -羧基酸的酶。本文用各种化学修饰剂对脱卤酶 YL、109 和 H-2 进行化学修饰。实验结果表明作用于丝氨酸、赖氨酸、色氨酸残基的试剂对酶活无明显影响,而作用于组氨酸、精氨酸和带羧基氨基酸残基的试剂使酶活降低。底物对化学修饰剂有保护作用。组氨酸、精氨酸和带羧基氨基酸(谷氨酸或天冬氨酸)残基为脱卤酶活力所必需。

关键词 脱卤酶, 化学修饰

脱卤酶是催化 α -卤酸转化为 α -羧基酸的酶^[1,2],有 2-卤酸脱卤酶(EC 3.8.1.2)和卤乙酸脱卤酶(EC 3.8.1.3)两类,该酶在环境保护和 D-乳酸生产方面有一定应用前景^[3]。目前已发表的几个脱卤酶的氨基酸序列表明两类脱卤酶有很大的同源性^[4,5]。有关脱卤酶的活性中心则尚未见报道。本文用化学修饰的方法初步研究了三个脱卤酶(2-卤酶脱卤酶 YL、109 和卤乙酸脱卤酶 H-2)的活性中心;并对其反应机理作了推测。

1 材料和方法

1.1 材料

2-卤酸脱卤酶 YL、109 来自日本京都大学化学研究所分子微生物学实验室,卤乙酸脱卤酶 H-2 来自日本大阪府立大学农业化学系,以上 3 个酶都来源于假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)按文献[6]的方法得到电泳纯的酶。所用化学试剂购自 Takara 公司和 Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 酶反应与酶活的测定:在 1.5ml 离心管中加入 50 μ l 酶液(\sim 0.04mg 蛋白质/ml)和 40 μ l 底物缓冲液(10 μ l 250mol/L 氯乙酸或 2-氯丙酸,10 μ l 250mol/L NaOH,10 μ l 1mol/L Tris-H₂SO₄, pH9.5, 10 μ l 水),震荡混匀后于 30 $^{\circ}$ C 水浴中反应 10min,加 10 μ l 1.5mol/L H₂SO₄ 中止反应,用测 Cl⁻来测定酶活^[7]。

1.2.2 酶的化学修饰:在 1.5ml 离心管中加 10 μ l 酶液(\sim 0.8mg 蛋白质/ml)与 10 μ l 各种化学修饰剂,参见表 1。按表 1 的条件进行化学修饰后,加 180 μ l 水稀释,吸取 50 μ l 按 1.2.1 方法进行酶反应和测酶活,与未修饰的酶活比较计算相对活力。

1.2.3 底物保护:在 1.5ml 离心管中加入 2 μ l YL 酶液(\sim 8mg 蛋白质/ml),3 μ l 1mol/L Tris-H₂SO₄ (pH9.5)和 20 μ l 50mmol/L 2-氯丙酸,30 $^{\circ}$ C 反应 5min 后,加入 65 μ l 1mol/L 表 1 所示的缓冲液和 10 μ l 化学修饰剂,30 $^{\circ}$ C 反应。DEPC:25mmol/L 终浓度反应 30min;

PGO: 10mmol/L 终浓度反应 120min; CCMT: 50mmol/L 终浓度反应 120min。修饰反应后, 加 400 μ l 水稀释, 取出 50 μ l, 用氯乙酸作底物按 1.2.1 方法进行酶反应, 然后用 HPLC 直接分析底物氯乙酸与产物羟基乙酸含量, 用转化率表示酶活。

$$\text{转化率} = \frac{\text{产物量}}{\text{产物量} + \text{底物量}} \times 100\%$$

表 1 化学修饰剂及反应条件

Table 1 Reagents and reaction conditions of chemical modification

Reagent *	Concentration /mmol · L ⁻¹	Buffer/ 50mmol · L ⁻¹	pH	Temperature /°C	Time /min	Ref.
PMSF	1~2	KPB	7.5	30	60~120	(8)
PLP	0.5~4	KPB	7.5	30	10~30	(9)
NBS	0.005~0.05	KPB	6.0	30	15~60	(10)
DEPC	5~25	KPB	7.5	30	10~60	(11)
PGO	1~10	KPB	8.0	30	15~60	(12)
CCMT	50~100	MES	6.0	30	30~120	(13)
Woodward's Reagent K	5~10	MES	6.0	30	10~60	(13)

* : PMSF. Phenylmethylsulfonyl fluoride, PLP. Pyridoxal phosphate,

NBS. N-bromosuccinimide, DEPC. Diethyl pyrocarbonate, PGO. Phenylglyoxal,

CCMT. 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide metho-p-toluenesulfonate

2 结果与讨论

2.1 各种化学修饰剂对脱卤酶活性的影响

脱卤酶经各种化学修饰剂作用后, 酶活性的变化如表 2 所示。

表 2 各种化学修饰剂对脱卤酶活性的影响

Table 2 Effect of various reagents on the activity of dehalogenase

Specificity	Reagent	Concentration /mmol · L ⁻¹	Time/min	Relative		109
				H-2	Activity/% YL	
Ser	PMSF	2	120	>90	>90	>90
Lys	PLP	4	30	>90	>90	>90
Trp	NBS	0.05	60	>90	>90	>90
His	DEPC	25	30	53.9	8.5	9.2
Arg	PGO	10	60	18.7	15.2	25.3
Glu/Asp	CCMT	50	120	15.0	4.6	14.1
Glu/Asp	Woodward's Reagent K	5	60	9.1	15.9	0

从表 2 的结果可以看出, PMSF、PLP 和 NBS 对脱卤酶的活性无明显影响。DEPC、PGO、CCMT 和 Woodward's Reagent K 都使脱卤酶活性降低。不同浓度的 DEPC、PGO、CCMT 和 Woodward's Reagent K 与脱卤酶作用不同时间, 酶活的变化如图 1~4 所示。结果表明脱卤酶的活性随着这些修饰剂浓度的增加和作用时间的延长而降低。酶的活性中心可能由组氨酸、精氨酸和带羧基的氨基酸(谷氨酸或天冬氨酸)残基组成。

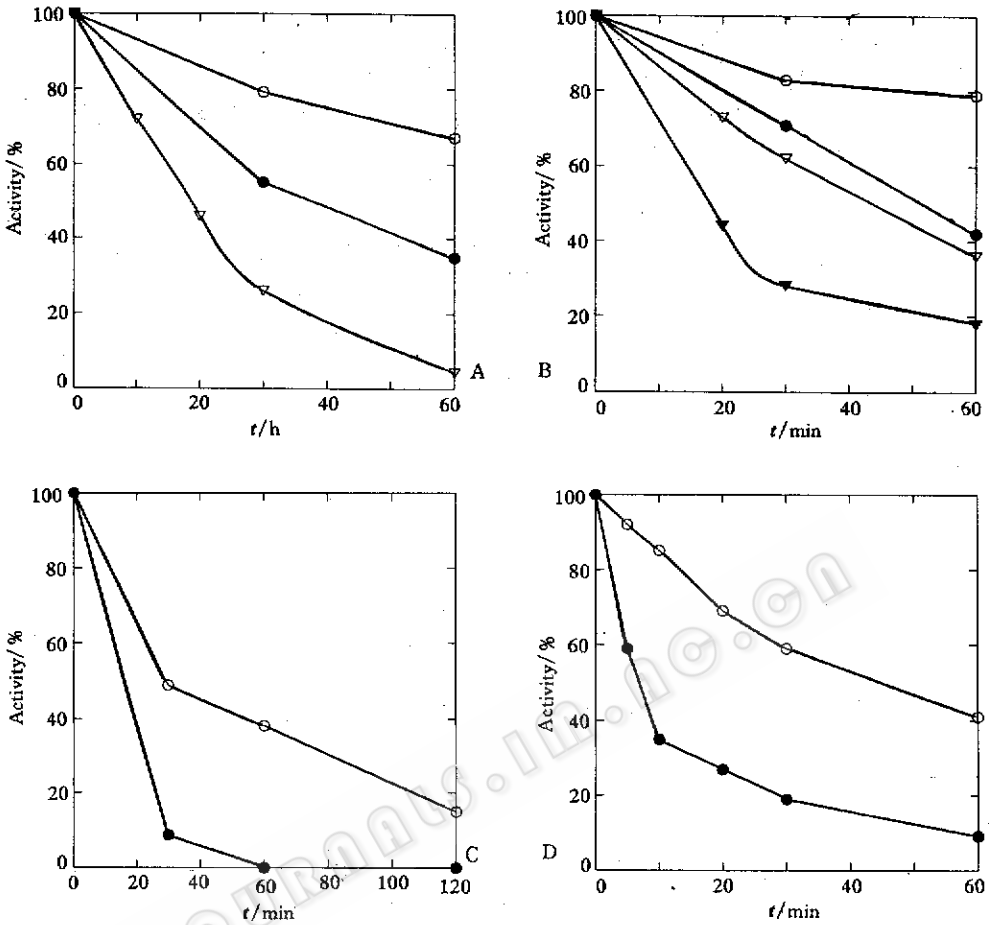


图 1 DEPC 反应 (A)、PGO 反应 (B)、CCMT 反应 (C)、Woodward's reagent K 反应 (D) 对脱卤酶活性的影响

Fig. 1 Changes in activity of dehalogenase on reaction with DEPC (A)、PGO (B)、CCMT (C) and Woodward's reagent K (D)

A. ○ 10mmol/L, ● 25mmol/L, △ 50mmol/L, B. ○ 1mmol/L, ● 2mmol/L
 C. ○ 50mmol/L, ● 100mmol/L, D. ○ 1mmol/L, ● 50mmol/L

2.2 底物保护对化学修饰的影响

用 2-氯丙酸作底物保护后, 化学修饰剂 DEPC、PGO 和 CCMT 对脱卤酶 YL 活性的影响如表 3 所示。

表 3 底物保护对化学修饰的影响

Table 3 Effect of substitute protection on chemical modification

Specificity	His			Arg			Glu/Asp		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Products/ $\times 10^3$	678	115	371	906	130	413	732	4.89	374
Substitute/ $\times 10^3$	8.8	732	350	0	682	240	0	687	380
Yield/%	98.7	13.6	51.5	100	16.0	63.2	100	7.07	49.6
Relative activity/%	100	13.8	52.1	100	16.0	63.2	100	7.07	49.6

a. Control, b. Chemical modification, c. Substitute protection before chemical modification

上述结果表明底物对组氨酸、精氨酸和带羟基的氨基酸残基的化学修饰都起到保护作用。由此初步推断脱卤酶的活性中心有这三种氨基酸残基存在。

2.3 脱卤酶反应机理的推测

根据我们的实验结果,对脱卤酶的反应机理进行了推测。在酶反应的最适 pH (9.5) 时,精氨酸残基带正电,谷氨酸(或天冬氨酸)和组氨酸残基带负电。当底物 α -卤酸分子接近酶的活性中心时,活性中心带正电的精氨酸残基吸引底物分子的羟基,酶分子带负电的羧基进攻底物分子电正性的 C2 原子,形成酯键并使卤素脱落。活性中心的组氨酸提供电子,使溶液中的水分子活化,促使酯水解形成产物 α -羟基酸。如果底物是三个碳原子以上的卤酸,则产物构型将发生反转。

Ploeg 等曾对脱卤酶催化引起构型反转的反应提出了两种可能的机理,一种是活化水分子的亲核进攻,另一种是酶羧基进攻后的酯水解^[14]。我们对脱卤酶活性中心的初步研究结果支持了后一种机理。

用化学修饰来研究酶的活性中心,是一种简便有效的方法。但由于试剂的专一性等问题,这方法也有一定的局限性。关于脱卤酶活性中心各氨基酸残基的准确定位,将有待通过原位突变等方法作进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Goldman P. *J Biol Chem*, 1965, **240**: 3434~3438.
- [2] Little M, William P A. *Eur J Biochem*, 1971, **21**: 99~109.
- [3] Hasan A, Motosugi K, Esaki N *et al.* *J Ferment Bioengin*, 1991, **72**: 481~482.
- [4] Janssen D B, Pries F, Ploeg J *et al.* *J Bacteriol*, 1989, **171**: 6791~6799.
- [5] Kawasaki H, Tsuda K, Matsushita I *et al.* *J Gen Microbiol*, 1992, **138**: 1371~1323.
- [6] Kawasaki H, Tone N, Tonomura K. *Agri Biol Chem*, 1981, **45**: 35~42.
- [7] Bergmann J G, Sanik J. *Anal Chem*, 1957, **29**: 241~243.
- [8] Milewski S, O'Donnell R W, Gooday G W. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**: 2545~2550.
- [9] Phillips N, Gross N H, Wood H G. *Biochemistry*, 1983, **22**: 2518~2523.
- [10] Mannervik B, Marmstall E, Ekwall K *et al.* *Eur J Biochem*, 1975, **53**: 327~333.
- [11] Daron H H, Aull J L. *Biochemistry*, 1982, **13**: 205~210.
- [12] Manohar R, Appaji R N. *Biochem J*, 1984, **224**: 703~707.
- [13] Bond M D, Steinbrink D R, Van Wart H E. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, **102**: 243~249.
- [14] Ploeg J, Hall G V, Janssen D B *et al.* *J Bacteriol*, 1991, **173**: 7925~7933.

Chemical Modification of Dehalogenase

Jiang Ning

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Liu Jiquan Kenji Soda

(*Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan*)

Abstract Dehalogenase is an enzyme which catalyzes α -haloacid to α -hydroxyl acid. Chemical modification reactions of dehalogenase YL, 109 and H-2 were carried out by various reagents. The experimental results showed that the activity was not significantly altered by seryl lysyl and trpyl reagent but decreased by hisyl, arginyl and carboxyl reagent. Substitute could protect the active centre to chemical modification. It was indicated that hisyl, arginyl and carboxyl (glu or asp) residue would be essential for the activity of dehalogenase.

Key words Dehalogenase, chemical modification