



研究报告

流感嗜血杆菌 ATCC49247 来源的 IgA 酶理化性质及其对低糖基化 IgA1 的分解作用

朱梦莲^{1,2} 王丽² 李健春² 樊均明^{*2,3}

1 西南医科大学附属中医医院肾病内科 四川 泸州 646000

2 西南医科大学附属中医医院 中西医结合研究中心 四川 泸州 646000

3 成都医学院 四川 成都 610000

摘要:【背景】近年来,能够特异性切割人 IgA1 分子的 IgA 蛋白酶(IgA 酶)被认为是治疗 IgA 肾病(IgAN)的潜在药物,但各种物理化学因素均可能影响其生物学活性。【目的】研究流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) ATCC49247 IgA 酶的理化性质,确定 IgA 酶最适的作用条件后观察 IgA 酶对低糖基化 IgA1 的作用。【方法】从细菌培养液中分离纯化 IgA 酶,SDS-PAGE 电泳后银染法分别检测多种理化条件下 IgA 酶的水解活性及其对低糖基化 IgA1 的消化作用。【结果】*H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶可耐受的反应温度较广,最适温度为 50 °C;在高于 60 °C 的环境中,IgA 酶便不可逆地丧失了稳定性;IgA 酶在 pH 6.0–9.0 的环境下能够保持完整催化活性;1 mmol/L 的 PMSF 和高于 10 mmol/L 的 SDS 能够强烈地抑制 IgA 酶的活性,DTT 和 EDTA 对 IgA 酶活性无明显影响;所有浓度的 Al³⁺、Fe³⁺和高浓度的 Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺对 IgA 酶均表现出强烈的抑制作用,同时 Co²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Ni²⁺和 Mg²⁺都对 IgA 酶活性没有明显影响。选择了最适宜的 IgA 酶作用条件,发现 IgA 酶能够有效降解低糖基化 IgA1 底物。【结论】确定 IgA 酶最适宜的作用条件能保持良好的酶活性,更好地发挥了 IgA 酶对低糖基化 IgA1 的降解作用,为 IgA 酶的临床研究和药用价值的进一步开发提供一定的依据。

关键词: IgA 酶, *Haemophilus influenzae* ATCC49247, 理化性质, IgAN

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81641025); The First Batch of Science and Technology Projects in Sichuan Province at 2016 (2016JY0194); Sichuan Provincial Education Department Project (17TD0046)

***Corresponding author:** E-mail: junmingfan@163.com

Received: 04-07-2018; **Accepted:** 06-12-2018; **Published online:** 25-12-2018

基金项目: 国家自然科学基金(81641025); 四川省 2016 年第一批科技计划项目(2016JY0194); 四川省教育厅项目(17TD0046)

***通信作者:** E-mail: junmingfan@163.com

收稿日期: 2018-07-04; **接受日期:** 2018-12-06; **网络首发日期:** 2018-12-25

Physicochemical properties of IgA protease from *Haemophilus influenzae* ATCC49247 and its decomposition of IgA1 with low glycosylation

ZHU Meng-Lian^{1,2} WANG Li² LI Jian-Chun² FAN Jun-Ming^{*2,3}

1 Department of Nephrology, The Affiliated Traditional Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China

2 Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine, The Affiliated Traditional Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China

3 Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610000, China

Abstract: **[Background]** Recently, IgA proteases that specifically cleave human IgA1 molecules have been considered as potential drugs for the treatment of IgA nephropathy (IgAN), but its biological activity may be affected by various physical and chemical factors. **[Objective]** To explore the physicochemical properties of *Haemophilus influenzae* ATCC49247 IgA protease for determining the optimal conditions and then to observe its decomposition of low glycosylated IgA1. **[Methods]** IgA protease was isolated and purified from the bacterial culture solution and the hydrolysis activity of IgA protease and its decomposition of low glycosylated IgA1 were detected by SDS-PAGE electrophoresis under various physicochemical conditions. **[Results]** *H. influenzae* ATCC49247 IgA protease tolerated a wide range of temperatures and the optimum temperature is 50 °C. IgA protease irreversibly lost stability above 60 °C. IgA protease maintained full catalytic activity between pH 6.0 and 9.0. PMSF of 1 mmol/L and SDS of above 10 mmol/L strongly inhibited the activity of IgA protease, whereas DTT and EDTA had no significant effect on its activity. IgA protease was obviously inhibited by all concentrations of Al³⁺, Fe³⁺ and high concentration of Cu²⁺, Zn²⁺ and Fe²⁺, whereas Co²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺ and Mg²⁺ had no significant effect on its activity. By selecting the most suitable conditions for IgA protease, we found that most of the low-glycosylated IgA1 substrate could be degraded by IgA protease. **[Conclusion]** IgA protease can maintain good enzyme activity under the optimal conditions, when exerting the degradation of low glycosylated IgA1 and the result lays the foundation for the clinical research and the further development of the medicinal value for IgA protease.

Keywords: IgA protease, *Haemophilus influenzae* ATCC49247, Physicochemical character, IgAN

IgA 肾病(IgAN)是常见的原发性肾小球肾炎疾病,也是终末期肾脏疾病的主要病因,目前尚无有效治疗手段。其确切发病机制至今未明,但现已广泛认为机体异常糖基化(低糖基化) IgA1 及其免疫复合物的形成和沉积是 IgAN 疾病发生的共同特点和中心环节,因此以清除低糖基化 IgA1 及其免疫复合物为治疗靶点的药物设计和研发具有广阔前景。IgA 蛋白酶(IgA 酶)是由许多致病细菌分泌的一组内切肽酶,可以特异性切割人 IgA1 分子的铰链区,具有对 IgA1 底物的高度专一性^[1],它在不同物种和菌株之间也显示出活性多样性^[2-3],通常其活性可以通过对 IgA1 底物的消化作用来评估。IgA 酶对

IgA1 分子特异性切割的这种独特优势被创造性地用于 IgAN 治疗研究,如 Lamm 等早在 2008 年报道了流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)来源的 IgA 酶在体内能有效地清除 Passive IgAN 小鼠模型中沉积于肾小球的 IgA1 免疫复合物^[2],但这是针对正常的 IgA1 分子,并不能完全模拟 IgAN 病理条件下 IgA1 的异常糖基化状态,因此我们的团队前期做了一些创新性探索,研究了不同病原菌来源的 IgA 酶对低糖基化 IgA1 的作用^[4-5],并通过筛选了多种细菌菌株后最终鉴定出了流感嗜血杆菌 ATCC49247 来源的 IgA 酶具有最高的活性^[6-7],但 IgA 酶的生物学活性容易受作用底物的特性、温度、

pH 值和抑制剂等物理化学因素的影响。

考虑到理化因素对 IgA 酶活性的影响不利于其药用价值的进一步开发,因此本研究首次从 6 个方面对高活性的 *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶进行了系统性理化性质研究分析,在确定了 IgA 酶最适宜的作用条件后选择了最优作用条件观察了 IgA 酶对低糖基化 IgA1 的降解作用,这将更好地保持 IgA 酶的活性从而发挥其对 IgAN 的治疗作用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 流感嗜血杆菌和 IgA 酶

流感嗜血杆菌 ATCC49247 购自上海川翔生物科技有限公司, IgA 酶来源于流感嗜血杆菌 ATCC49247。

1.1.2 主要试剂和仪器

血琼脂基础, OXOID 公司; 脱纤维兔血, 自制; 快速银染试剂盒(P0017S), 上海碧云天生物技术有限公司; 人骨髓瘤患者 IgA1, Fitzgerald 公司; 苯甲基磺酰氟(PMSF), 南京凯基生物有限公司; 唾液酸酶(NA)、 β -半乳糖苷酶(GA)、生物素标记的 HAA 凝集素、HRP-avidin 二抗、二硫苏糖醇(DTT)、十二烷基磺酸钠(SDS)和 EDTA, Sigma 公司。CO₂ 培养箱, Thermo 公司; 化学发光成像系统、梯度 PCR 仪、小型 Trans-Blot®转印槽, Bio-Rad 公司。

1.1.3 培养基

称取 3.9 g 血琼脂基础, 100 mL 双蒸水溶解后经 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 待冷却至 50 °C 左右于无菌条件下加入脱纤维兔血 5 mL, 摇匀后立即倾注灭菌平板或制成斜面, 待凝固后 4 °C 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 流感嗜血杆菌的培养和 IgA 酶的提取与纯化

流感嗜血杆菌常规培养后从细菌培养液中分离纯化 IgA 酶, IgA 酶的提取与纯化参照我们前期的实验^[6], 纯化后采用 ELISA 法检测 IgA 酶的活性, 利用抗人 IgA1 Kappa 抗体捕捉人 IgA1, 与提取的 IgA 酶 37 °C 作用 2 h, 若样品中具有 IgA 酶活性, 则会消化去除 IgA1 Fc 段, 从而导致酶标抗体不能

与之结合, OD 值出现下降。

1.2.2 IgA 酶最适作用温度的研究

IgA 酶与 IgA1 于 30–80 °C 作用 2 h, SDS-PAGE 电泳后银染分析酶的最适作用温度。

1.2.3 IgA 酶热稳定性的研究

IgA 酶于 30–80 °C 处理 30 min 后, 与 IgA1 37 °C 孵育 2 h, SDS-PAGE 电泳后银染分析温度对酶活性的影响。

1.2.4 IgA 酶最适作用 pH 值的研究

IgA 酶于 37 °C 与 pH 3.0–10.0 等体积的缓冲液作用 1 h 后, 与底物 IgA1 作用 2 h, SDS-PAGE 电泳后银染分析酶的最适作用 pH 值。

1.2.5 常用化学试剂对 IgA 酶活力的影响

蛋白酶抑制剂 PMSF、还原剂 DTT、金属离子螯合剂 EDTA 和离子型去污剂 SDS 是生化反应体系中常用的 4 种试剂。本研究中 IgA 酶于 37 °C 分别与这 4 种试剂作用 1 h 后, 与底物 IgA1 作用 2 h, SDS-PAGE 电泳后银染分析化学试剂对酶活力的影响。

1.2.6 金属离子对 IgA 酶活力的影响

IgA 酶与等体积的不同浓度(5、10、30、50 mmol/L)的金属离子(Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Al³⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、Fe²⁺) 37 °C 作用 1 h 后, 再加入 IgA1 作用 2 h, SDS-PAGE 电泳后银染分析金属离子对酶活性的影响。

1.2.7 IgA 酶对低糖基化 IgA1 的作用

IgA1 分别与唾液酸酶(NA)、 β -半乳糖苷酶(GA)、唾液酸酶+ β -半乳糖苷酶于 37 °C 去糖基化处理 6 h 后, 与 IgA 酶于 37 °C 作用 2 h, SDS-PAGE 电泳后银染分析 IgA 酶对低糖基化的 IgA1 分解作用, IgA1 的低糖基化程度通过 ELISA 和 Western blot 法检测 HAA 进行验证。

1.3 数据统计与分析

所得统计数据采用平均值 \pm 标准差表示, 用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 多组间的比较采用方差分析, 多组间的两两比较采用 SNK 或 Dunnett 法, $P < 0.001$, 差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 ELISA 法检测 IgA 酶的活性

为了验证 *H. influenzae* ATCC49247 分泌的 IgA 酶相对活性, 采用双抗体夹心 ELISA 法定量检测 IgA 酶的相对活性。在 IgA 酶消化 IgA1 底物前, 先将 IgA1 通过免疫吸附的方式用抗人 IgA kappa 抗体捕获固定在塑料基质上, 酶消化作用可以切割掉被捕获的 IgA1 的 Fc 片段, 只留下被捕获的 Fab 片段, 然后再用 HRP 酶标记的抗人 IgA1 Fc 片段特异抗体进行定量检测, 如果 IgA 酶的活性相对较高, 则消化后残留的完整 IgA1 分子较少, ELISA 检测信号值低, 反之, 则信号值高。按照上述基本原理将 IgA 酶用以消化免疫吸附固定化的 IgA1 底物, 然后采用 ELISA 显色方式进行酶相对活性分析, 结果如图 1 所示, *H. influenzae* ATCC49247 来源的 IgA 酶显示出良好的酶活性。

2.2 IgA 酶理化性质的分析

2.2.1 IgA 酶最适反应温度的研究

将 5 ng IgA 酶分别与 0.5 g IgA1 在 30–80 °C 的温度范围内孵育 2 h, 然后对酶消化产物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分析 IgA1 的降解状况。如

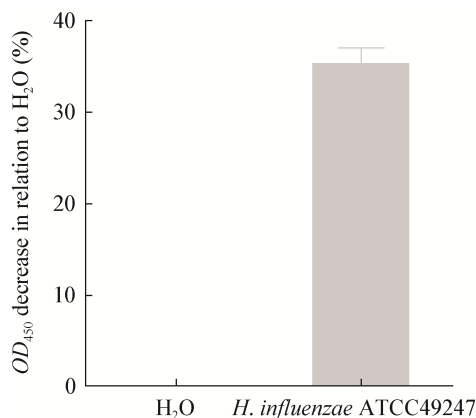


图 1 *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶的活性

Figure 1 Catalytic activities of IgA proteases from *H. influenzae* ATCC49247

注: 数据代表 3 个独立的重复, 每个柱代表与阴性对照(H₂O)相比 OD 值降低百分比的平均值±SEM.

Note: Data represent 3 independent replicates and each bar represents mean ± SEM for the percentage of reduction of OD value compared with the negative control (H₂O).

图 2A 所示, *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶可耐受的反应温度较广, 在 30–50 °C 范围内表现出强的酶活性, 甚至在 80 °C 时仍有明显的催化活性。

2.2.2 IgA 酶热稳定性的研究

预先将 5 ng IgA 酶在不同的温度(30–80 °C)下孵育 30 min, 然后再与 0.5 g IgA1 37 °C 共同孵育 2 h。如图 2Ab 结果显示, *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶在高于 60 °C 的环境中, 就不可逆地丧失了稳定性/活性, 其与 IgA 酶热变性有关。

2.2.3 pH 对 IgA 酶活性的影响

将 5 ng IgA 酶在不同 pH 值的反应缓冲液中 37 °C 预处理 1 h, 然后再加入 0.5 g IgA1 消化 2 h。如图 2Ac 结果显示, IgA 酶在碱性环境下(包括 pH 10.0)可以保持完整的催化活性, 而在 pH≤5.0 时只表现出具有部分活性, 可能与 IgA 酶在酸性环境下丧失了热稳定性有关。结果表明, *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶属于嗜碱性蛋白酶。

2.2.4 常规生化试剂对 IgA 酶活性的影响

将 5 ng IgA 酶在含有不同浓度的 PMSF/DTT/EDTA/SDS 反应溶液中 37 °C 预处理 1 h 后, 再加入 0.5 g IgA1 底物进行 2 h 的消化反应, 消化产物进行电泳染色分析。如图 2Ad 结果所示, 1 mmol/L 的 PMSF 便可以强烈地抑制 IgA 酶的活性, DTT 对 IgA 酶活性则无明显影响。图 2Ae 结果显示 IgA 酶不受 EDTA 的影响, 而高于 10 mmol/L 的 SDS 能够完全抑制 IgA 酶的活性。

2.2.5 金属离子对 IgA 酶活性的影响

5 ng IgA 酶在含不同浓度的 Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Al³⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、Fe²⁺反应缓冲液中 37 °C 预处理 1 h, 再加入 0.5 g IgA 酶消化 2 h, SDS-PAGE 电泳后银染分析 IgA1 的降解情况。如图 2B 所示, 金属离子 Al³⁺和 Fe³⁺对 IgA 酶均表现出强烈的抑制作用, 同时 Co²⁺、Mn²⁺和 Mg²⁺都对 IgA 酶活性没有影响, 各浓度 Ca²⁺对 IgA 酶活性无明显抑制作用, 且 IgA 酶在较广浓度范围的 Ni²⁺下仍可以维持一定的活性。另外, IgA 酶可以耐受低浓度的 Fe²⁺和 Cu²⁺, 但低浓度 Zn²⁺可以部分抑制 IgA 酶活性, 且高浓度 Cu²⁺可以抑制其活性。

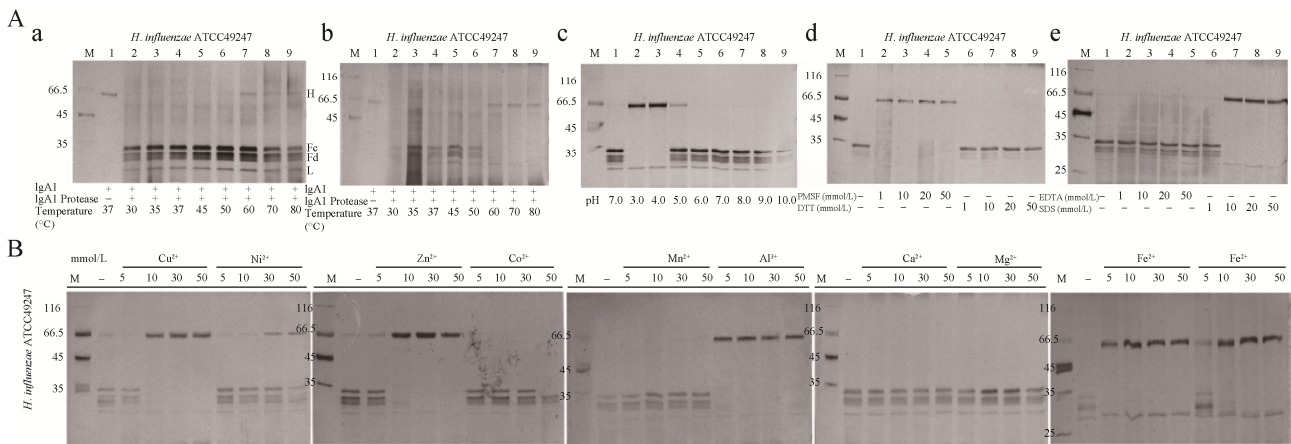


图2 流感嗜血杆菌 IgA 酶理化性质测定

Figure 2 Determination of physicochemical properties of *H. influenzae* ATCC49247 IgA protease

注：图 Aa-e 分别是温度、热稳定性、pH 值、生化试剂对 IgA 酶活性影响的银染结果；图 B 是 10 种常见金属离子对 IgA 酶活性影响的银染结果；M：蛋白标志物；H 和 L 表示完整的 H(α) 和 L 多肽链，Fc 和 Fd 表示 IgA 蛋白酶在 IgA 铰链处切割后的 H 链片段。
Note: Figure Aa-e are the results of silver staining of temperature, thermal stability, pH, and biochemical reagents on IgA enzyme activity; Figure B is the result of silver staining of 10 common metal ions on IgA enzyme activity; M: Protein marker; H and L indicate intact H(α) and L polypeptide chains, and Fc and Fd indicate the H chain fragments after IgA protease cleavage at the IgA hinge.

2.3 IgA 酶对人工低糖基化处理 IgA1 的分解作用

在系统分析 IgA 酶的理化性质后，选择最适宜的温度，偏碱性的缓冲体系，排除了一些影响其活性的金属离子因素，观察了适宜作用条件下 IgA 酶对低糖基化 IgA1 作用。首先，对人多发性骨髓瘤来源 IgA1 进行唾液酸酶(NA)和半乳糖苷酶(GA)处理，制备低糖基化 IgA1，再与 IgA 酶于 37 °C 作用 2 h，并采用可以特异结合 IgA1 去糖基化后暴露的 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)末端的蜗牛凝集素(HAA)检测 IgA1 的糖基化状态，将 HAA 与 ELISA 方法相结合，可以定量分析 IgA1 的糖基化状态。如图 3A 所示，正常 IgA1 经过唾液酸酶(NA)或半乳糖苷酶(GA)处理之后，HAA 对 IgA1 的结合能力变强，而 IgA1 在经过唾液酸酶和半乳糖苷酶(NA/GA)同时处理之后，凝集素对 IgA1 的结合力进一步增强，说明唾液酸酶和半乳糖苷酶的处理可以明显降低 IgA1 的糖基化状态($P < 0.001$)。通过 Western blot 方法确认这种去糖基化酶处理后 IgA1 的糖基化状态(图 3B)。去糖基化处理后 IgA1 的变性凝胶电泳蛋白条带分布无明显变化(图 3C 和 3Da)，将不同方式

低糖基化处理的 IgA1 经过 IgA 酶消化后，电泳结果说明，去唾液酸化处理并不会影响 IgA 酶对底物 IgA1 的消化作用，但去半乳糖苷酶处理(单独处理或与唾液酸酶合并处理)可以部分抑制 IgA 酶的降解作用(图 3Db)，但大部分低糖基化 IgA1 底物仍可以被 IgA 酶充分降解。以上实验数据显示，虽然 IgA1 的低糖基化状态可以部分抑制 IgA 酶的分解作用，但 IgA 酶仍可以降解大部分低糖基化 IgA1 底物。

3 讨论与结论

目前临床上对 IgAN 无特异性治疗方法，因此开发针对其发病环节的靶向治疗很有价值，而异常糖基化 IgA1 及其免疫复合物的发生被公认是 IgAN 致病过程中的关键环节。IgA 酶作为病原菌重要的一种毒力因子，能够特异性降解人 IgA1 分子，我们前期的实验证明不同 IgA 酶对低糖基化的 IgA1 及其免疫复合物有良好的降解作用，并筛选出 *H. influenzae* ATCC49247 来源 IgA 酶具有最高的酶活性，但其生物活性容易受各种物理和化学因素影响。以往的研究多集中于 IgA 酶在遗传多样性、

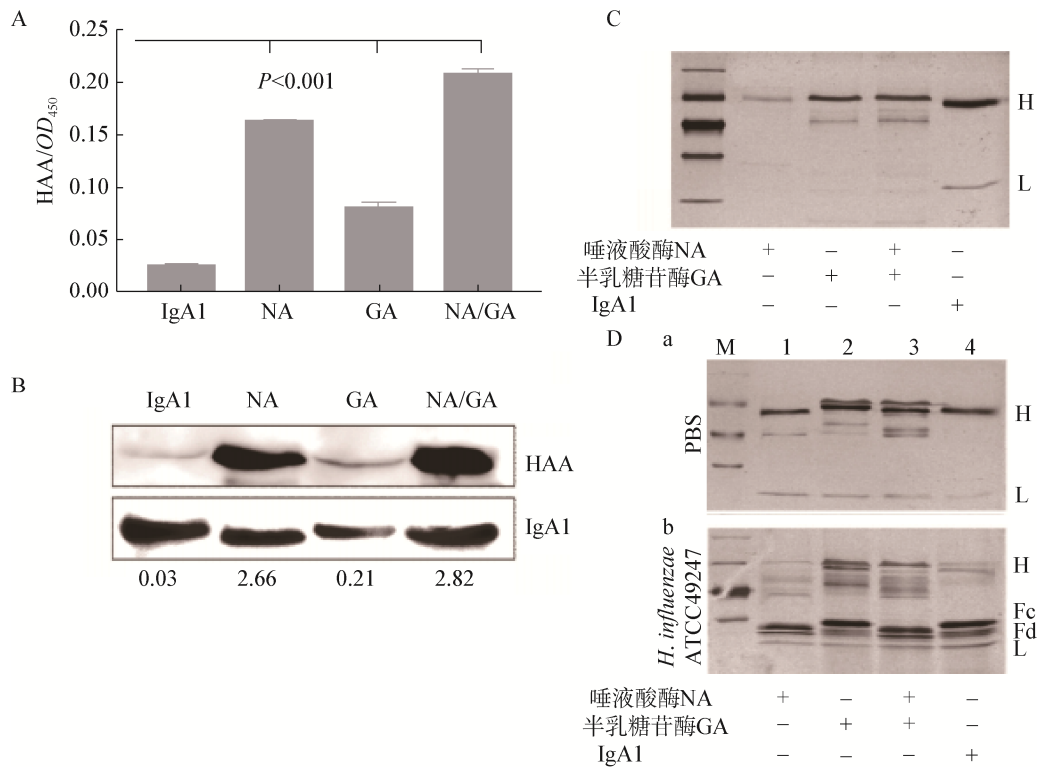


图 3 IgA 酶对人工低糖基化处理的 IgA1 分解作用

Figure 3 The effect of IgA protease on IgA1 with low glycosylation

注: A: 正常 IgA1 经过唾液酸酶(NA)和半乳糖苷酶(GA) 37 °C 处理 6 h 后, 采用 HAA/ELISA 方法检测糖基化状态, 每个处理重复 3 次, 结果表示为 Mean OD₄₅₀±SD; B: Western blot 检测 IgA1 的低糖基化状态(重链), HAA 用来特异识别低糖基化 IgA1, IgA 特异抗体用以识别总 IgA1; C: SDS-PAGE 变性凝胶电泳分析 IgA1 人工去糖基化处理体系中同等量的 IgA1、唾液酸酶、半乳糖苷酶的电泳图谱; D: M: 蛋白标志物; IgA1 经过不同的去糖基化酶(唾液酸酶和半乳糖苷酶单独处理, 或以上两种酶同时处理) 37 °C 处理 6 h 后, 与提取的 *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶于 37 °C 作用 2 h, SDS-PAGE 凝胶电泳分析. NA: 唾液酸酶处理的 IgA1; GA: 半乳糖苷酶处理的 IgA1; NA/GA: 唾液酸酶和半乳糖苷酶同时处理的 IgA1.

Note: A: Normal IgA1 was treated with neuraminidase and galactosidase for 6 h at 37 °C, and then the glycosylation status was detected by HAA/ELISA. Each treatment was repeated three times and the results were expressed as mean OD₄₅₀±SD; B: Western blot was used to detect the hypoglycosylation status (heavy chain) of IgA1. HAA was used to specifically recognize hypoglycosylated IgA1, and IgA-specific antibodies were used to identify total IgA1; C: SDS-PAGE denaturing gel electrophoresis analysis of IgA1 artificial deglycosylation system for the amount of IgA1, neuraminidase, galactosidase electropherogram; D: M: Protein marker; IgA1 was treated with different deglycosylases (neuraminidase and galactosidase alone or simultaneously) and treated at 37 °C for 6 h and treated with *H. influenzae* ATCC49247 IgA Protease at 37 °C for 2 h, and then analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis. desIgA1: neuraminidase-treated IgA1, deGallIgA1: galactosidase-treated IgA1, des/deGallIgA1: IgA1 treated simultaneously with neuraminidase and galactosidase.

血清型多样性和酶活性与病原菌致病性的关系等方面的探讨, 对于 IgA 酶自身的理化特性研究只有零星报道。因此, 本实验展开了对 *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶系统性理化性质的研究, 观察最适宜的作用条件下 IgA 酶对低糖基化 IgA1 的作用。

在 IgA 酶理化性质的研究中, 我们选择了 6 个方面进行探讨。热动力学是酶学反应的一个重要特征, 热稳定性研究结果显示 *H. influenzae*

ATCC49247 IgA 酶可耐受的反应温度较广, 最适温度可达 50 °C, 在 80 °C 时仍具有较强的催化作用, 这种高温下仍可以进行部分催化反应的酶学特点可能是催化反应在温度上升至可以使酶活性完全丧失的特定温度过程中, 酶催化反应已经高效地发生, 造成酶反应本身可以耐受较高温度的假象。在热稳定性方面, 我们发现 IgA 酶在高于 60 °C 的环境中就丧失了稳定性。我们还发现 IgA 酶表现出亲

碱性环境的特征,甚至可以耐受 pH 值为 10.0 的碱性环境,并且没有观察到明显的酶活性抑制,这与人体弱碱性体液环境较一致。此外,几乎所有的丝氨酸蛋白酶类和金属蛋白酶类 IgA 酶的提取分离和活性测试实验都是在偏碱性或中性的缓冲体系中进行^[8-10]。在常见生化试剂对 IgA 酶影响的实验中,我们进一步证实了 *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶的丝氨酸蛋白酶属性^[11]。本研究中 IgA 酶活性不受 EDTA 和 DTT 影响,但可以被 PMSF 强烈抑制,而高于 10 mmol/L 的 SDS 可以完全抑制 IgA 酶的活性,这与其丝氨酸蛋白酶属性的报道相一致。另外,在本研究中,我们首次研究了常见金属离子对丝氨酸蛋白酶类 *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶活性的影响。我们的研究结果显示,所有浓度的 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 和高浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对 IgA 酶均表现出强烈的抑制作用,同时 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mg^{2+} 都对 IgA 酶活性没有明显影响。以上理化性质部分的实验提示: *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶拥有丝氨酸蛋白酶属性,其提取分离过程适合在偏碱性(pH 5.0–9.0)环境中进行,最适宜的作用温度为 35–50 °C,其活性受 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 金属离子的影响。

IgA 酶的天然底物 IgA1 蛋白分子在铰链区的丝氨酸/苏氨酸残基存在着广泛的糖基化,但在特定的疾病条件下,如 IgAN、IgA1 铰链区的糖基化位点通常糖基化不完全,或处于低糖基化状态(半乳糖苷修饰缺失),这种低糖基化状态的 IgA1 是 IgAN 进展中重要的因素。在本研究中,为了更好地发挥 IgA 酶的活性从而提高其对低糖基化 IgA1 的降解效应,首先对其理化性质进行 6 个方面的分析,之后对 IgA 酶的作用处理选择了 50 °C 的温度,在偏碱性的缓冲体系中,避免使用影响 IgA 酶活性的生化试剂和金属离子,研究了 IgA 酶对低糖基化 IgA1 的作用。在将不同方式低糖基化处理的 IgA1 经过 *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶消化后,结果显示,虽然半乳糖苷酶处理能降低了 IgA1 对 IgA 酶的敏感性,但去唾液酸化处理并不会影响 IgA 酶对底物

IgA1 的消化作用,表明 IgA 酶仍然能够维持良好的生物活性,能有效降解大部分的低糖基化的 IgA1 底物。

虽然本研究对丝氨酸蛋白酶类 *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶理化性质进行了系统性研究,但由于实验技术上的限制,一些理化性质只能得出一个总体效应。总之,我们的研究结果初步揭示了 *H. influenzae* ATCC49247 IgA 酶较为详细的理化性质图谱,为 IgA 酶的作用条件提供了理论基础,有利于 IgA 生物蛋白酶药用价值的开发。

REFERENCES

- [1] Mistry D, Stockley RA. IgA1 protease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2006, 38(8): 1244-1248
- [2] Lamm ME, Emancipator SN, Robinson JK, et al. Microbial IgA protease removes IgA immune complexes from mouse glomeruli *in vivo*: potential therapy for IgA nephropathy[J]. The American Journal of Pathology, 2008, 172(1): 31-36
- [3] Lomholt H, Poulsen K, Kilian M. Comparative characterization of the IgA gene encoding IgA1 protease in *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*[J]. Molecular Microbiology, 1995, 15(3): 495-506
- [4] Wang L, Wang HL, Shen HC, et al. Decomposition of low glycosylated IgA1 and its immune complexes by bacterial-derived IgA protease[A]//The 11th National Congress of Basic Theory of Integrated Medicine[C]. Yinchuan: Chinese Association of Integrative Medicine, 2015: 2 (in Chinese)
王丽, 王洪连, 沈宏春, 等. 细菌源性 IgA 蛋白酶对低糖基化 IgA1 及其免疫复合物的分解作用[A]//第十一届全国中西医结合基础理论学术研讨会论文集[C]. 银川: 中国中西医结合学会, 2015: 2
- [5] Li XY. IgA protease degradate the deposited IgA immune complex in IgAN *in vitro* and *vivo*[D]. Luzhou: Master's Thesis of Sichuan Medical University, 2015 (in Chinese)
李雪英. IgA 蛋白酶清除 IgA 肾病免疫复合物的体内外研究[D]. 泸州: 四川医科大学硕士学位论文, 2015
- [6] Wang L, Li XY, Shen HC, et al. Bacterial IgA protease-mediated degradation of agIgA1 and aIgA1 immune complexes as a potential therapy for IgA nephropathy[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 30964
- [7] Wang HL, Zhong X, Li JC, et al. Cloning and expression of *H. influenzae* 49247 IgA protease in *E. coli*[J]. Molecular Biotechnology, 2018, 60(2): 134-140
- [8] Walker SG, Carnu OI, Tüter G, et al. The immunoglobulin A1 proteinase from *Streptococcus pneumoniae* is inhibited by tetracycline compounds[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2006, 48(2): 218-222
- [9] Simpson DA, Hausinger RP, Mulks MH. Purification, characterization, and comparison of the immunoglobulin A1 proteases of *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170(4): 1866-1873
- [10] Bachovchin WW, Plaut AG, Flentke GR, et al. Inhibition of IgA1 proteinases from *Neisseria gonorrhoeae* and *Hemophilus influenzae* by peptide prolyl boronic acids[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(7): 3738-3743
- [11] Wyatt RJ, Julian BA. IgA nephropathy[J]. New England Journal of Medicine, 2013, 368(25): 2402-2414