

应用硫酸苯酚法建立一种甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性检测方法的研究

林育姿, 官倩红, 张真庆, 韩峰, 于文功

(中国海洋大学 医药学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 建立了一种简便快捷的甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性的测定方法。研究发现相同分子质量的聚甘露糖醛酸和聚古罗糖醛酸与苯酚硫酸试剂反应后显色程度不同, 以此可以用来测定 β -D-甘露糖醛酸/ α -L-古罗糖醛酸(M/G) 值的变化, 从而计算甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶的活性。利用本方法测定了已知结构的褐藻胶片断的 M/G 比, 其结果与传统的 $^1\text{H-NMR}$ 测定值基本一致。

关键词: 硫酸苯酚法; 甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶; 酶活检测

中图分类号: R931.77, Q558.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)02-0048-04

褐藻胶是由 β -D-甘露糖醛酸(β -D mannuronic acid, 简称 M) 和 α -L-古罗糖醛酸(α -L-guluronic acid, 简称 G) 通过 1 \rightarrow 4 糖苷键连接而成的直链多糖。其中, M、G 互为差向异构体, 其差别仅在于 G-5 位羧基位置。褐藻胶中 M 与 G 的存在形式可能有 3 种: 聚甘露糖醛酸片段 (poly mannuronate, PM)、聚古罗糖醛酸片段 (poly-guluronate, PG) 和甘露糖醛酸-古罗糖醛酸混合嵌段 (MG block)^[1]。不同 M/G 比的褐藻胶具有不同的物理化学性质与生物活性^[2]: 富含 M 的褐藻胶具有免疫调节^[3]、抗肿瘤^[4]、抗艾滋病^[5] 等活性; 而富含 G 的褐藻胶具有诱导角质细胞生长^[6] 等作用。在生物体内褐藻胶合成过程中, 首先合成聚甘露糖醛酸段, 在甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶作用下部分甘露糖醛酸转变为古罗糖醛酸^[1,7]。由于甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶是一种重要的工具酶, 近年来已成为研究与开发的热点。通过基因工程技术改造褐藻胶生产菌株的生物合成途径, 或者直接利用酶, 就可获得不同结构的褐藻胶。目前检测甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性的方法主要是确定其作用前后褐藻胶的 M/G 比, 如 NMR^[1]、高效液相色谱法、气相色谱法^[8] 等。作者在检测甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶的活性时发现相同分子质量的聚甘露糖醛酸与聚古罗糖醛酸在苯酚硫酸法反应过程中显色程度不同, 吸收值存在较大差异。比较甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶作用前后褐藻胶在苯酚硫酸法中的吸光差异就可以确定该酶的活性。此方法可简便有效地检测甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

仪器: 酶标仪 (Tecan Rainbow); 试剂: 咪唑 (CP 重结晶), 苯酚 (中国医药集团上海化学试剂公司); 聚甘露糖醛酸、聚古罗糖醛酸、甘露糖醛酸-古罗糖醛酸混合嵌段 (分子量均为 10 000), 均为青岛华海制药厂产品; 重组甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶由作者所在的实验室自制; 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配置

0.1% 聚甘露糖醛酸、聚古罗糖醛酸、甘露糖醛酸-古罗糖醛酸混合嵌段溶液: 分别精确称取 25 mg 相应糖醛酸溶于 25 mL 水中; 硫酸硼砂溶液: 0.9 g 硼砂溶于 10 mL 水中, 小心加入 90 mL 预冷的浓硫酸, 有界面出现, 放置过夜; 咪唑试剂: 0.1 g 咪唑溶于 100 mL 95% 乙醇中; 80% 苯酚: 80 g 苯酚加 20 g 水使之溶解; 6% 苯酚: 临用前以 80% 苯酚配置。

1.2.2 硫酸咪唑法测定糖醛酸含量

分别取 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL 0.1% 聚甘露糖醛酸或聚古罗糖醛酸溶液, 按文献^[9] 的方法测定 530 nm 处的吸光值, 再制作标准曲线。每个浓度设 3 个平行样。

收稿日期: 2006-04-20; 修回日期: 2006-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371683)

作者简介: 林育姿 (1981-), 女, 河北河间人, 硕士, 研究方向: 海洋生物技术; 于文功, 通讯作者, E-mail: yuwg66@ouc.edu.cn

1.2.3 苯酚硫酸法测定甘露糖醛酸含量

分别取 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL 0.1% 聚甘露糖醛酸或聚古罗糖醛酸溶液, 1 mL 0.1% 甘露糖醛酸古罗糖醛酸混合嵌段溶液按文献[10]的方法测定 490 nm 处的吸光值, 聚甘露糖醛酸和聚古罗糖醛酸制作标准曲线。每个浓度设三个平行样。

1.2.4 ¹H-NMR 测定甘露糖醛酸古罗糖醛酸混合嵌段

甘露糖醛酸古罗糖醛酸混合嵌段样品 20 mg, 加入重水 0.5 mL 溶解, 冻干。反复 3 次后以丙酮为内标进行 ¹H-NMR 分析。

1.2.5 苯酚硫酸法对甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性的检测

选择聚甘露糖醛酸为底物, 酶活反应终质量浓度为 1g/L, 与来源于 *Pseudomonas* sp. QDA 的重组甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶反应 18 h 后, 100 °C 加热 10 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液, 按文献[10]的方法测定吸光值。酶活空白对照反应时间为 0, 其他步骤相同。

2 结果

2.1 硫酸卡唑法测定聚甘露糖醛酸与聚古罗糖醛酸含量

用硫酸卡唑法分别测定了不同质量浓度聚甘露糖醛酸、聚古罗糖醛酸在 530 nm 处的吸光值。其线性范围均为: 0.1~0.6 g/L, 聚甘露糖醛酸的标准曲线为 $Y = 2.7306X + 0.1315$ ($R^2 = 0.9999$), 聚古罗糖醛酸的标准曲线为 $Y = 2.9157X + 0.1029$ ($R^2 = 0.9996$, 图 1)。在相同质量浓度下, 聚甘露糖醛酸与聚古罗糖醛酸的吸光值基本一致, 两种糖醛酸化学含量相同。此法无法区分聚甘露糖醛酸与聚古罗糖醛酸。

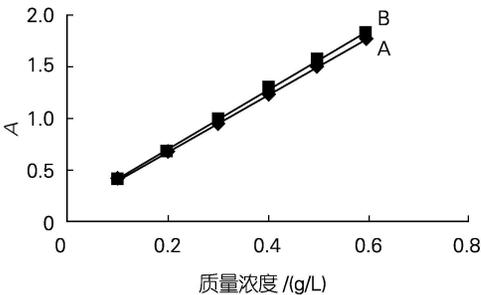


图 1 聚甘露糖醛酸、聚古罗糖醛酸的硫酸卡唑法标准曲线

Fig. 1 The standard curves of sulfate carbazole method

A: 聚甘露糖醛酸; B: 聚古罗糖醛酸
A: poly mannuronate; B: poly guluronate

2.2 苯酚硫酸法测定聚甘露糖醛酸与聚古罗糖醛酸含量

用苯酚硫酸法分别测定了不同质量浓度聚甘露糖醛酸、聚古罗糖醛酸在 490 nm 处的吸光值。当质量浓度在 0.2~1.0 g/L 范围内, 两种糖醛酸的吸光值呈线性关系但存在明显差异: 聚甘露糖醛酸测定的标准曲线为 $Y = 0.2075X + 0.1200$ ($R^2 = 0.9980$), 聚古罗糖醛酸测定的标准曲线为 $Y = 0.556X + 0.1211$ ($R^2 = 0.9995$, 图 2)。随质量浓度的升高, 两种糖醛酸的吸光差异增加。在 1 g/L 条件下, 两种糖醛酸的吸光值差异最大, 此时聚甘露糖醛酸的吸光值为 0.337 0, 聚古罗糖醛酸的吸光值为 0.670 0, 吸光差异值为 0.333 0。因此可根据反应前后吸光值变化测定甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性。也就是说在相同条件下测定酶活, 如果反应前后测定吸光值变化 0.333 0, 则甘露糖醛酸全部被异构酶作用转变为古罗糖醛酸, 即转化率为 100%。褐藻胶底物分子量为 10 000 时, 酶活公式可表示为 $E = (A_{后} - A_{前}) / 0.3330$ (E 为甘露糖醛酸转化率; $A_{前}$ 、 $A_{后}$ 分别为反应前后的吸光值)。

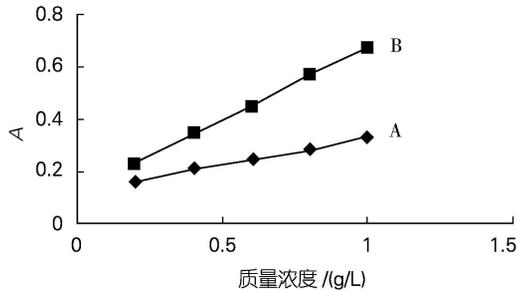


图 2 聚甘露糖醛酸、聚古罗糖醛酸的苯酚硫酸法标准曲线

Fig. 2 The standard curves of sulfate phenol method

A: 聚甘露糖醛酸; B: 聚古罗糖醛酸
A: poly mannuronate; B: poly guluronate

2.3 苯酚硫酸法测定甘露糖醛酸-古罗糖醛酸混合嵌段

以苯酚硫酸法测定甘露糖醛酸古罗糖醛酸混合嵌段样品吸光值为 0.419 5, 同分子量同浓度聚甘露糖醛酸样品吸光值为 0.337 0, 吸光值变化 0.082 5。按公式计算 $E = 0.2477$, 即该甘露糖醛酸古罗糖醛酸混合嵌段样品中古罗糖醛酸质量分数约 24.77%, 计算其 M/G 比约 3.04。

2.4 $^1\text{H-NMR}$ 测定甘露糖醛酸-古罗糖醛酸混合嵌段

$^1\text{H-NMR}$ 测定甘露糖醛酸-古罗糖醛酸混合嵌段样品, 4.6 位置为甘露糖醛酸 ^1H 吸收峰, 积分约 2.83; 4.9 位置为古罗糖醛酸 ^1H 吸收峰, 积分约为 1 (图 3)。该样品 M/G 比为 2.83, 与苯酚硫酸法测得的结果 3.04 基本一致。

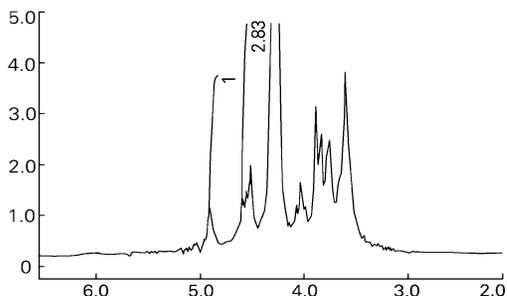


图 3 $^1\text{H-NMR}$ 测定甘露糖醛酸-古罗糖醛酸混合嵌段样品结果

Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ of MG block result

4.6 处吸收峰为甘露糖醛酸 ^1H 吸收峰; 4.9 处吸收峰为古罗糖醛酸 ^1H 吸收峰

Peak in 4.6 is M-1H; peak in 4.9 is G-1H

2.5 苯酚硫酸法检测甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性

聚甘露糖醛酸底物与甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶反应后, 以苯酚硫酸法测定样品吸光值即 $A_{后}$ 为 0.4469, 空白对照的吸光值即 $A_{前}$ 为 0.3370, 按公式计算 $E = 0.33$, 约有 33% 的甘露糖醛酸转变为古罗糖醛酸。

3 讨论

作者在检测甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性的实验中发现, 相同分子质量相同浓度的聚甘露糖醛酸与聚古罗糖醛酸在苯酚硫酸溶液中显色程度有很大不同, 吸光值存在显著差异。在线性范围内, 质量浓度为 1 g/L 条件下两种糖醛酸差异最大, 确定该浓度为酶促反应的底物终浓度。通过酶促反应前后样品的吸光值差异可计算出甘露糖醛酸的转化率, 以此确定甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶的活性。该方法的准确性与传统的 NMR 等方法基本一致, 但简便快捷。

苯酚硫酸法无确切反应方程式, 基本原理为糖在强酸中脱水而生成糠醛或其衍生物, 再与苯酚结合显色。聚甘露糖醛酸与聚古罗糖醛酸互为差向异构体, 在苯酚硫酸法中吸光值存在较大差异。这种差

异可能正是由于两种糖醛酸的构型不同, 因此在与苯酚硫酸试剂反应过程中形成了不同构型的中间体, 而它们与苯酚结合生色的程度不同所造成的。

不同分子质量的褐藻胶对于苯酚硫酸法的敏感性是不同的。虽然质量浓度相同, 但分子质量不同的褐藻胶具有不同的吸光值。这可能是由于分子质量大小不同在产生中间体时有不同影响。本实验中测得的数据 0.3330 是相对分子质量为 10 000 的聚甘露糖醛酸与聚古罗糖醛酸的吸光差异值。在应用苯酚硫酸法测定甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性时, 酶促反应前和反应后的样品分子质量一样, 所以能准确地计算出相应的甘露糖醛酸转化率。

在以往的文献报道中, 苯酚硫酸法仅作为糖的定量测定方法, 并无其他方面应用的报道。目前测定褐藻胶甘露糖醛酸 G-5 差向异构酶活性的方法一般采用化学法、NMR^[1]、高效液相色谱法、气相色谱法^[8]、古罗糖醛酸特异性裂解酶法^[11]等。其中, 化学法、高效液相色谱法、气相色谱法需要降解样品, 耗时长; NMR 需要将样品反复进行重水交换, 且比较昂贵; 古罗糖醛酸特异性裂解酶十分稀少且需要另外制备。与以上方法相比较, 苯酚硫酸法简便快捷, 特别是对于大规模的产酶菌株筛选、酶促反应的条件优化等实验是十分适用的。

参考文献:

- [1] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 刘斌, 王长云, 张洪荣, 等. 海藻多糖褐藻胶生物活性及其应用研究新进展[J]. 中国海洋药物, 2004, 23(6): 3641.
- [3] Flo T H, Ryan L, Latz E, *et al.* Involvement of toll-like receptor(TLR)2 and TLR4 in cell activation by mannanuronic acid polymers [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 35 489-38 495.
- [4] Fujihara M, Nagumo T. The effect of the contact of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity[J]. *Carbohydr Res*, 1992, 224: 343-347.
- [5] Geng Meiyu, Li Fuchuan, Xin Xianliang, *et al.* The potential molecular targets of marine sulfated polymannuroguluronate interfering HIV-1 entry[J]. *Antiviral Research*, 2003, 59: 127-135.
- [6] Kawada A, Hiura N, Shiraiwa M, *et al.* Stimulation of human keratinocyte growth by alginate oligosaccharides, a possible cofactor for epidermal growth factor in cell culture[J]. *FEBS Lett*, 1997, 408: 43-46.
- [7] Peter G. Bacterial alginate biosynthesis recent pro

- gress and future prospects [J]. *Microbiology*, 1998, 144: 1 133-1 143.
- [8] 郑瑞津, 吕志华, 于广利, 等. 褐藻胶 M/G 比值测定方法的比较[J]. 中国海洋药物, 2003, 96(6) : 35-37.
- [9] 林颖, 黄琳娟, 田庚元. 一种改良的糖醛酸含量测定方法[J]. 中草药, 1999, 30(11) : 817-819.
- [10] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 11-12.
- [11] Chaitanya E Dennis E O. Cloning of *Pseudomonas aeruginosa* algG, which controls alginate structure [J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(6) : 2 894-2 990.

A new method for enzymatic assay of C-5-mannuronan epimerase

LIN Yu-zi, GONG Qianhong, ZHANG Zhenqing, HAN Feng, YU Weirong
(School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Jan. , 20, 2006

Key words: sulfate phenol; C-5-mannuronan epimerase; enzymatic assay

Abstract: A simple and convenient method for the C-5-mannuronan epimeration assay was established in this study. The color intensity of poly-mannuronate was markedly different from that of poly-guluronate when they reacted with sulfate phenol. So the activity of C-5-mannuronan epimerase can be determined using the sulfate phenol method by comparing the absorption of the alginate substrate before and after the enzymatic reaction. The M/G ratio of alginate fragments with known structure was detected by Sulfate phenol method, and the result was almost the same as the value by $^1\text{H-NMR}$.

(本文编辑: 张培新)