

天冬酰胺合成酶 B 抑制剂高效液相色谱筛选方法的建立与应用

张 继¹, 于 丹¹, 向文胜¹, 范志金², 王相晶^{1*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 南开大学元素有机化学研究所, 天津 300071)

摘要: 建立了一种快速、高效测定天冬酰胺合成酶 B (AS-B) 酶活性的反相高效液相色谱法 (RP-HPLC)。酶反应体系中的氨基酸经 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 柱前衍生, 通过 RP-HPLC 测定酶反应体系前后底物及产物的变化来分析酶的活性。采用的色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 6.2)-乙腈 (体积比为 15:85) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长 365 nm, 于 6 min 内实现了各组分的基线分离。通过该方法测定反应动力学参数进行 AS-B 的抑制定量分析。将已知 AS-B 抑制剂 L-谷氨酸-γ-甲酯用于酶反应体系, 测得的抑制剂的抑制常数与文献值相接近, 证明该方法可用于 AS-B 抑制剂的筛选。

关键词: 高效液相色谱法; 天冬酰胺合成酶 B; 抑制剂; 筛选

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)04-0472-04 栏目类别: 研究论文

Development and application of screening method for asparagine synthetase B inhibitors by high performance liquid chromatography

ZHANG Ji¹, YU Dan¹, XIANG Wensheng¹, FAN Zhijin², WANG Xiangjing^{1*}

(1. Department of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Research Institute of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: A screening method for asparagine synthetase B (AS-B) inhibitors by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) has been established. The contents of asparagines produced in the reaction system can be analyzed by HPLC after the derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB) and used to calculate the total activity of AS-B. The sample was separated on an Agilent C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at the temperature of 30 °C with the elution of 50 mmol/L sodium acetate buffer (pH 6.2)-acetonitrile (15:85, v/v) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 365 nm. The enzyme reaction system consisted of 100 mmol/L Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)-HCl buffer (pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L adenosine triphosphate (ATP), 10 mmol/L L-aspartate, 10 mmol/L L-glutamine and 2 μg recombinant soybean AS-B (1 mL of the total volume), then mixed for 1 min and incubated for 15 min at 37 °C. After quenching with ethanol and centrifugation, the supernatant was derivatized by DNFB and then separated by HPLC. The amino acids in the reaction system were baseline separated within 6 min. The quantitative analysis of AS-B inhibition was performed by determining its dynamic parameters. The inhibitor L-glutamic acid γ-methyl ester was used in the enzyme reaction system to test this method and its inhibition constant obtained was close to the literature value. The established method is fast, accurate, sensitive and suitable for high throughput screening AS-B inhibitors.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); asparagine synthetase; inhibitor; screening

* 通讯联系人: 王相晶, 教授, 主要研究方向为药物生物化学. Tel: (0451) 55190413, E-mail: wangxiangjing2008@yahoo.com.cn.
基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30440046) 和南开大学元素有机化学国家重点实验室十六期、十七期开放基金项目。
收稿日期: 2008-11-24

天冬酰胺合成酶 B(asparagine synthetase B, AS-B)(EC 6. 3. 5. 4)是广泛存在于原核和真核生物体内的一类氨基转移酶,以氨或谷氨酰胺以及天冬氨酸为底物催化天冬酰胺的生物合成。它是2000年新发现的除草剂作用靶标酶,单萜烯化合物1,4-桉树脑及其衍生物环庚草醚可以抑制AS-B的活性^[1],从而影响植物蛋白的合成,导致植物的死亡。研究也表明急性淋巴细胞性白血病(ALL)细胞对治疗剂天冬酰胺酶(ASNase)抗性的产生与AS-B的表达相关^[2],体外实验显示AS-B的抑制剂 adenylylated sulfoximine 可以抑制ASNase抗性的MOLT-4细胞的生长^[3],这为AS-B抑制剂可以作为临床上ALL的治疗剂提供了直接的证据。2006年加拿大的Ren等^[4]揭示了AS-B与结核病的病原菌*M. tuberculosis*对多种抗生素的先天抵抗力有关,这将为设计治疗非典型分支杆菌感染的药物提供新的策略。目前关于AS-B的特异性抑制剂还处于研发阶段,因此抑制剂高效筛选方法的建立将会极大提高化合物的筛选效率。

国内尚无有关AS-B活性测定的报道,国外的分析方法包括¹⁴C标记法或通过测量酶反应中生成的焦磷酸来测定AS-B酶活性及其抑制剂抑制率^[5-7],但这两种方法对设备条件的要求较高或成本较高。另外,通过测定酶反应体系中氨基酸量的变化也可作为研究AS-B酶活性的方法之一^[3,8,9]。氨基酸的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法和氨基酸分析仪测定法^[10-12],但毛细管电泳和氨基酸分析仪需要专门的仪器设备,考虑到一机多用,大多数的研究者采用HPLC方法^[11,13]。2,4-二硝基氟苯(DNFB)是氨基酸柱前衍生常用的衍生试剂之一,在避光、60℃条件下,能与一、二级氨基酸反应生成一种稳定的衍生物,该衍生物在365nm波长处有较强的紫外吸收。本文在借鉴前人研究的基础上^[3,9],以DNFB为衍生试剂将酶反应体系中的氨基酸衍生化后,通过C₁₈反相色谱柱在6min内实现了谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)衍生物(DNP-氨基酸)的很好分离,分析时间大为缩短,并利用反应体系中氨基酸量的变化计算有关反应动力学参数来研究酶的活性。将该体系用于AS-B抑制剂的筛选,结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括四元泵(G1311A)、在线真空脱气机(G1379A)、紫外检测

器(G1315B)、柱温箱(G1316A)、手动进样器(G1228B)和Agilent色谱工作站(美国Agilent公司);KQ-2200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DSY-2-4水浴锅(余姚市长江温度仪表厂);Milli-Q纯水系统(美国Millipore公司)。

大豆AS-B由本实验室通过基因工程菌表达纯化获得;DNFB、Glu、Asp、Gln、Asn和三磷酸腺苷(ATP)购自Sigma公司;抑制剂L-谷氨酸- γ -甲酯购自梯希爱(上海)化成有限公司;碳酸氢钠和醋酸钠为国产分析纯;乙腈为色谱纯(迪马公司);水为去离子水。

1.2 色谱条件

色谱柱为Agilent C₁₈柱(150mm×4.6mm,5 μ m),流动相为乙腈-50mmol/L醋酸钠缓冲液(pH 6.2)(体积比为15:85),流速为1mL/min,检测波长为365nm,柱温为30℃,进样量为10 μ L。

1.3 标准溶液的配制

天冬酰胺标准溶液:准确称取L-Asn固体粉末25mg,加入适量的100mmol/L Tris(三羟甲基氨基甲烷)-HCl缓冲溶液(pH 8.0)使其溶解,并稀释至25mL,配成1g/L标准储备溶液。适当稀释标准储备溶液,配制质量浓度分别为800,600,400,100,50 μ g/L的标准溶液。

氨基酸混合液:分别准确称取L-Glu、L-Asp、L-Gln和L-Asn固体粉末各25mg,加入适量的100mmol/L Tris-HCl缓冲溶液(pH 8.0)使其溶解,并稀释至25mL,配成每种氨基酸的质量浓度均为1g/L的标准溶液。

1.4 酶反应和衍生化反应

酶反应和衍生化反应主要参考文献[9,14]的方法进行。酶反应体系的组成:100mmol/L Tris-HCl缓冲溶液(pH 8.0)、100mmol/L NaCl、5mmol/L ATP、10mmol/L MgCl₂、10mmol/L L-Asp、10mmol/L L-Gln和2 μ g大豆AS-B,总体积为1mL,充分混匀后于37℃水浴锅中反应15min,随后加入500 μ L乙醇并置于沸水浴中5min终止反应,然后于13000r/min速率下离心15min,收集上清液备用。同时以不加酶的反应体系做空白实验。

取上述溶液100 μ L,加入200 μ L 500mmol/L碳酸钠溶液(pH 9.0)、20 μ L二甲基亚砜(DMSO)和6 μ L 20% DNFB的乙醇溶液,混匀后置于60℃水浴中避光反应1h,待冷却后取出100 μ L,用10mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.0)稀释至1mL,经滤膜过滤,滤液供HPLC分析。

1.5 抑制剂抑制常数的测定

反应体系的组成: 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L ATP, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L L-Asp, 10 mmol/L L-Gln, 2 μg 大豆 AS-B 及各种浓度的抑制剂 L-谷氨酸-γ-甲酯, 总体积为 1 mL, 充分混匀后于 37 °C 水浴锅中反应 15 min, 随后加入 500 μL 乙醇并置于沸水浴中 5 min 终止反应, 然后于 13 000 r/min 速率下离心 15 min, 收集上清液备用。同时以不加抑制剂的反应体系做对照实验, 以不加 AS-B 的体系做空白实验, 样品经 HPLC 分析后, 通过双倒数图计算出 AS-B 的表观米氏常数, 最终求出 AS-B 抑制剂的抑制常数。

2 结果与讨论

2.1 L-天冬酰胺的线性范围

将配制的一系列天冬酰胺标准液衍生化, 然后按照上述色谱条件进样分析, 每个样品测定 5 次, 测定峰面积, 并取平均值。以衍生化产物 DNP-Asn 的峰面积为纵坐标 Y 、其质量浓度为横坐标 X (μg/L) 绘制标准曲线, 得线性回归方程为 $Y = 2.2646X - 102.6$, $r = 0.9994$, 表明天冬酰胺的质量浓度为 100 ~ 800 μg/L 时, 其峰面积与浓度之间呈良好的线性关系。

2.2 高效液相色谱分离条件的优化

采用的流动相体系为乙腈-醋酸盐 (pH 6.2), 但乙腈浓度达到 20% (体积分数) 可导致 DNP-Asp 和 DNP-Glu 的峰重叠, 而乙腈浓度低于 10% 时 DNP-Asn 和 DNP-OH 的峰重叠。通过不同浓度的试验最终确定流动相中乙腈的浓度为 15%, 此时 4 种氨基酸的分离度较好且出峰时间短 (见图 1)。

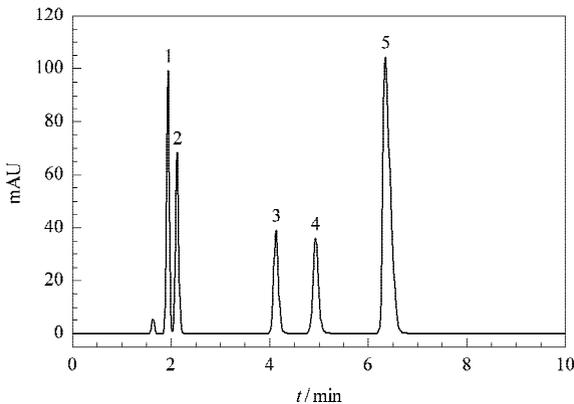


图 1 L-Asp, L-Glu, L-Asn 和 L-Gln 混合标准衍生物的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of the derivatives of L-Asp, L-Glu, L-Asn and L-Gln standards

1. L-Asp; 2. L-Glu; 3. L-Asn; 4. L-Gln; 5. DNP-OH.

2.3 酶反应产物的分离

将酶活反应液及对照反应液按 1.4 节的方法处理, 衍生后进样测定, 每个样品测定 3 次, 色谱图见图 2。由图 2 可以看出, 酶促反应中的生成物天冬酰胺与其他组分分离完全, 不影响天冬酰胺的测定。

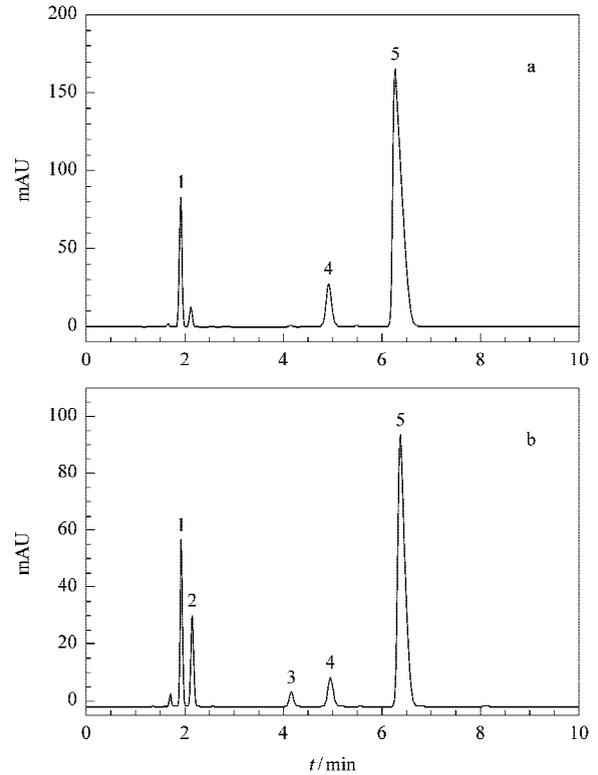


图 2 (a) 对照反应液及 (b) 酶促反应液衍生物的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of the derivatives of (a) blank comparison and (b) the enzymatic reaction mixture

1. L-Asp; 2. L-Glu; 3. L-Asn; 4. L-Gln; 5. DNP-OH.

2.4 加标回收率及精密度

取 4 份相同的酶促反应液样品各 0.9 mL, 其中 1 份为本底, 其余 3 份分别加入低、中、高 3 种浓度的 L-天冬酰胺标准溶液 100 μL, 按前述方法进行衍生。取 10 μL 衍生物进样测定, 各进样 5 次, 结果见表 1。由表 1 可见方法的回收率和精密度较好。

表 1 酶促反应液样品中 L-天冬酰胺的加标回收率和精密度 ($n = 5$)

Table 1 Recovery and RSD of L-asparagine in an enzymatic reaction mixture ($n = 5$)

Added/(μg/L)	Found/(μg/L)	Recovery/%	RSD/%
150.0	149.5	99.7	1.13
500.0	497.6	99.5	1.05
700.0	700.6	100.1	1.20

2.5 AS-B 抑制剂抑制常数的测定

对 AS-B 抑制剂 L-谷氨酸-γ-甲酯的抑制效果进行了实验, 计算抑制剂的抑制常数。固定酶和其他底物的浓度, 改变底物谷氨酰胺的浓度, 测定不同浓

度抑制剂对酶活力的影响,由 Lineweaver-Burk 双倒数作图得到一组纵轴截距不变的直线,说明这组抑制剂浓度不影响最大反应速度 V_{\max} ,只影响米氏常数 K_m ,其抑制机理表现为竞争性类型。以不同浓度抑制剂下测定的表观米氏常数 $K_{m(\text{app})}$ 对抑制剂的浓度 C (mmol/L) 做标准曲线,得到的线性方程为 $K_{m(\text{app})} = -0.252C + 1.42$, $r = 0.995$,其横轴截距 5.63 mmol/L 即为抑制剂的抑制常数。

文献曾报道抑制剂 L-谷氨酸- γ -甲酯对来源于 *Vibrio cholerae* 及大肠杆菌的 AS-B 的抑制常数分别为 8.9 mmol/L 和 6.6 mmol/L^[15,16]。本实验的测定值与文献值较为接近,表明该体系可以用于 AS-B 抑制剂的高通量筛选。

3 结论

本实验采用反相高效液相色谱柱前衍生法实现了 AS-B 酶反应体系中各氨基酸组分的分离,通过反应前后天冬酰胺量的变化可用于分析酶的活性。该方法灵敏度高,分析时间较短,可用于 AS-B 特异性抑制剂的高通量筛选,在实际工作中具有很高的应用价值。

参考文献:

[1] Romagni J G , Duke S O , Dayan F E. *Plant Physiol* , 2000 , 123(2) : 725
 [2] Su N , Pan Y X , Zhou M , et al. *Pediatr Blood Cancer* , 2008 ,

50(2) : 274

- [3] Gutierrez J A , Pan Y X , Koriniak L , et al. *Chem Biol* , 2006 , 13(12) : 1 339
 [4] Ren H P , Liu J. *Antimicrob Agents Chemother* , 2006 , 50(1) : 250
 [5] Luehr C A , Schuster S M. *J Biochem Biophys Methods* , 1980 , 3(3) : 151
 [6] Romagni J G , Dayan F E. *J Agric Food Chem* , 2000 , 48(5) : 1 692
 [7] Ciustea M , Gutierrez J A , Abbatiello S E , et al. *Arch Biochem Biophys* , 2005 , 440(1) : 18
 [8] Unnithan S , Moraga D A , Schuster S M. *Anal Biochem* , 1984 , 136(1) : 195
 [9] Li K K , Beeson W T , Ghiviriga I , et al. *Biochemistry* , 2007 , 46(16) : 4 840
 [10] Yan D R , Zhang J A , Cui C L , et al. *Modern Scientific Instruments* (阎大任, 张静安, 崔成来, 等. 现代科学仪器) , 2005(1) : 46
 [11] Li M , Yang Z X , Xie B , et al. *Chinese Journal of Chromatography* (李梅, 杨朝霞, 解彬, 等. 色谱) , 2007 , 25(6) : 939
 [12] Zhao S L , Shen J S. *Chemical Journal of Chinese Universities* (赵书林, 沈江珊. 高等学校化学学报) , 2005 , 26(9) : 1 613
 [13] Tcherkas Y V , Kartsova L A , Krasnova I N. *J Chromatogr A* , 2001 , 913(1/2) : 303
 [14] Wan S H , Yang H , Geng X M. *Chinese Journal of Chromatography* (万绍晖, 杨浩, 耿秀梅. 色谱) , 2005 , 23(4) : 408
 [15] Fresquet V , Thoden J B , Holden H M , et al. *Bioorg Chem* , 2004 , 32(2) : 63
 [16] Boehlein S K , Stewart J D , Walworth E S , et al. *Biochemistry* , 1998 , 37(38) : 13 230