

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 9/80

C12N 1/20

C12P 19/00

//(C12N9/80, C12R

1: 38)

# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95115100.2

[45]授权公告日 2002年9月4日

[11]授权公告号 CN 1090236C

[22]申请日 1995.7.21

[21]申请号 95115100.2

[30]优先权

[32]1994.7.21 [33]JP [31]6-190133

[73]专利权人 宝酒造株式会社

地址 日本京都

[72]发明人 伊东信 栗田丰久 喜多克洋

[56]参考文献

DE3829005A 1989. 3. 16 C12N1/20

EP0373038A 1990. 6. 13 A61K0/00

JP6078782A 1994. 3. 22 C12P19/26

WO8911295A 1989. 11. 30 A01N43/00

审查员 王朋飞

[74]专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 糖脂神经酰胺脱酰酶

[57]摘要

本发明提供一种比常规糖脂神经酰胺脱酰酶具有更广泛的底物特异性的酶,其特征在于:作用于神经鞘糖脂分子中的神经酰胺,并将其水解为神经鞘氨醇碱和脂肪酸,由此形成了溶血鞘脂和脂肪酸;具有作用于中性糖脂类和酸性糖脂类的底物特异性;具有 pH 5 至 7 的最适 pH 值范围;具有 40℃ 左右的最适温度;具有在 pH 4 至 9 的 pH 值范围内 5℃ 下处理 16 小时仍然稳定的 pH 值稳定性;以及具有 60℃ 处理 30 分钟仍然稳定的热稳定性。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

# 权 利 要 求 书

---

1、一种糖脂神经酰胺脱酰酶，具有下列理化特性：

(1) 作用于神经鞘脂分子中的神经酰胺上并将其水解为神经鞘氨醇碱和脂肪酸，从而形成溶血糖脂和脂肪酸；

(2) 作用于中性和酸性糖脂；

(3) 具有pH 5至7的最适pH值范围；

(4) 具有40°C左右的最适温度；

(5) 在4至9的pH范围内5°C下处理16小时仍然稳定；以及

(6) 在60°C下处理30分钟仍然稳定。

2、根据权利要求1的糖脂神经酰胺脱酰酶，它来源于假单胞菌TK-4 (FERM BP-5096)。

3、一种生产溶血神经鞘脂的方法，包括用权利要求1的糖脂神经酰胺脱酰酶处理一种神经鞘脂以及从该反应混合物中回收溶血神经鞘脂。

4、一种生产糖脂神经酰胺脱酰酶的方法，它包括在培养基中培养一种属于假单胞菌属、并能够生产权利要求1的糖脂神经酰胺脱酰酶的微生物以及从培养基中回收这种酶。

5、根据权利要求4的生产糖脂神经酰胺脱酰酶的方法中，其中该微生物是假单胞菌TK-4 (FERM BP-5096)。

6、一种生产溶血神经鞘脂衍生物的方法，包括用权利要求1的糖脂神经酰胺脱酰酶处理神经鞘脂、从该反应混合物中回收溶血神经鞘脂以及使该溶血神经鞘脂发生一种取代反应。

7、根据权利要求6的生产溶血神经鞘脂衍生物的方法，其中该取代反应是一个酰化反应。

8、根据权利要求6生产溶血神经鞘脂衍生物的方法，其中该取代反应是用荧光标记溶血神经鞘脂中的神经鞘氨醇部分的一个氨基来进行的。

# 说明书

## 糖脂神经酰胺脱酰酶

本发明涉及一种新的具有广泛底物特异性的糖脂神经酰胺脱酰酶。本发明还涉及一种用上述糖脂神经酰胺脱酰酶生产一种溶血神经鞘脂(lysosphingolipid)的酶生产方法。

人们已知由诺卡氏菌属(*Nocardia*)的一种微生物可生产一种酶(JP-A-64-60379, 相应于美国专利4997760和5143841; 这里所用的“JP-A”是指一种“没有审查却公布的日本专利申请”), 这种酶能够作用于糖脂分子中的神经酰胺上并将神经酰胺部分水解成为神经鞘氨醇碱和脂肪酸, 从而形成溶血糖脂(lysoglycolipid)和脂肪酸。

这种被命名为神经酰胺脱酰酶[*Journal of Biochemistry*, 103, 1-4(1988)]的酶作用于神经节苷脂类, 如GD1a, GM1 GM2和GM3, 即称之为酸性糖脂上, 但不作用于半乳糖脑苷脂(Gal Cer)或葡萄糖脑苷脂(Glc Cer)上。它几乎不作用于中性糖脂, 如Lac Cer, Gb3 Cer或asialo-GM1(无唾液酸-GM1)。另有一种酶, 被称为神经酰胺酶, 它能够水解神经酰胺的神经鞘氨醇碱和脂肪酸之间的键(EC 3.5.1.23) [*Journal of Biological Chemistry*, 241, 3731-3737 (1966); *Biochemistry*, 8, 1692-1698(1969); *Biochemica et Biophysica Acta*, 176, 339-347 (1969); 和*Science*, 178, 1100-1102(1972)]但不能水解糖脂内神经酰胺部分中神经鞘氨醇碱和脂肪酸之间的键。

也就是说，没有一种已知酶能够水解中性糖脂分子中神经酰胺部分的神经鞘氨醇碱和脂肪酸之间的键。

一般来说，天然产生的糖脂如神经鞘糖脂，即使它们具有相同的碳水化合物链，它们也因其脂肪酸部分的不同而具有许多不同的分子类型。例如，来自马肾的福斯曼氏(Forssman)糖脂(Gb5 Cer)，根据其脂肪酸部分的不同至少包括十种不同的分子类型。最近，已经发现双层中糖脂的存在形式或抗原性受其脂肪酸分子类型的极大影响。所以，考虑到糖脂的生理功能，人们已经关注脂肪酸的结构。而且人们已进一步发现与神经鞘脂(包括糖脂和神经鞘磷脂)的降解和合成有关的酶的底物特异性取决于脂肪酸的分子类型。

为阐明上述主题，一直需要开发一种能把含有不同脂肪酸分子种类的天产生的神经鞘脂简单而又容易地转化成具有单一脂肪酸类型的糖脂的技术。还一直希望通过一种荧光物取代神经鞘脂中的脂肪酸来制备一种荧光标记的神经鞘脂，因为这种用荧光物标记的神经鞘脂不仅是一种对阐明神经鞘脂类的细胞内代谢或输送途径起重要作用的试剂，而且也是合成或降解神经鞘脂的酶的一种高度敏感性底物。

生产溶血神经鞘脂的已知方法包括在一种醇溶剂中胼解和碱性水解。当用这些方法处理含氨基糖的神经鞘脂时，碳水化合物链中的酰胺键会被降解成为双-N-乙酰基溶血糖脂。对含有一个唾液酸的糖脂(神经节苷脂)来说，是把唾液酸部分脱酰。因而，必需先用一个保护基团把脱酰后产物的脂质部分保护起来，并在去掉保护后进行再酰化。这一系列的化学操作需要大量劳力和工艺技术。另外，按照常规的化学方法制备一种具有溶血形式的多个唾液酸的

多唾液酚神经节苷脂如GQ1b是非常困难的。当用已知方法处理神经鞘磷脂时，可能释放出磷酸胆碱基团，这种基团能够降低最终产物的产率。

已知已有一种生产溶血神经鞘脂的生物学方法(JP-A-78782)。按照这种方法，形成了许多并不是所需的溶血神经鞘脂的副产物，而且应当除去这些副产物。这样，因为需要额外的清除步骤并且产率不令人满意，这种方法是不利于工业化生产的。

本发明的一个目的是提供一种比通常已知的糖脂神经酰胺脱酰酶具有更广泛的底物特异性的酶，特别是，能很好地作用于中性糖脂的糖脂神经酰胺脱酰酶。本发明的另一个目的提供一种以工业化规模，用上述糖脂神经酰胺脱酰酶生产溶血神经鞘脂的酶生产方法，它可用于糖脂工程领域中。

本发明涉及一种具有下列物理化学特性的糖脂神经酰胺脱酰酶：

(1) 作用于神经鞘糖脂分子中的神经酰胺上，并将其水解为神经鞘氨醇碱和脂肪酸，由此形成溶血神经糖脂和脂肪酸；

(2) 作用于中性和酸性糖脂上；

(3) 具有pH 5至7的最适pH值范围；

(4) 具有约40°C的最适温度；

(5) 在pH 4至9的范围内，当5°C下处理16小时后保持稳定；

并且

(6) 在60°C下30分钟内是稳定的。

本发明还涉及一种溶血神经鞘脂的生产方法，该方法包括用上述糖脂神经酰胺脱酰酶处理神经鞘脂并从反应混合物中回收溶血神经鞘脂。

为得到与糖脂相关的酶，本发明人收集了不同的试样（土壤，海水，淡水等）并对这些试样进行筛选。在筛选过程中，他们惊奇地发现了一种到目前为止尚属未知的新的糖脂神经酰胺脱酰酶活性，它可把中性和酸性糖脂水解为神经鞘氨醇碱和脂肪酸，从而形成溶血糖脂和脂肪酸。经过广泛的研究，本发明人已经确定了产生本发明的酶的微生物，并且进一步纯化了该酶，并阐明了其理化特性。而且，本发明人用上述酶处理神经鞘脂高效率地生产溶血神经鞘脂，已经获得了成功。从而完成了本发明。

图1显示了由本发明所获得的糖脂神经酰胺脱酰酶的最适pH值。在图1中，●表示醋酸盐缓冲液，△表示磷酸盐缓冲液，○表示甘氨酸缓冲液。

图2显示了由本发明所获得的糖脂神经酰胺脱酰酶的最适温度。

图3显示了由本发明所获得的糖脂神经酰胺脱酰酶的pH稳定性。在图3中，○表示醋酸盐缓冲液，●表示磷酸盐缓冲液，△表示tris(三羟甲基氨基甲烷)-盐酸盐缓冲液，□表示甘氨酸缓冲液。

图4显示了本发明获得的糖脂神经酰胺脱酰酶的热稳定性。

图5是使用本发明获得的糖脂神经酰胺脱酰酶消化无唾液酸-GM1(asialo-GM1)所获得的溶血无唾液酸-GM1(lysoasialo-GM1)的FAB-MS图谱。

图6是使用由本发明所获得的糖脂神经酰胺脱酰酶消化神经鞘磷脂所获得的溶血神经鞘磷脂的FAB-MS图谱。

下文将更详细地描述本发明。

对生产本发明的糖脂神经酰胺脱酰酶的方法不做特别限定。也就是说，它可以用例如能够生产本发明的糖脂神经酰胺脱酰酶的微

生物或细胞来完成。例如，可使用假单胞杆菌属TK-4 (*Pseudomonas* SP. TK-4)。该菌株已被本发明人首次从土壤中分离出来，它具有下列真菌学的特性。

- (1) 生长温度范围：最高到41°C。
- (2) 格兰氏染色：阴性。
- (3) 形态学：杆状菌。
- (4) 活动性：阳性。
- (5) 在有氧条件下生长：阳性。
- (6) 在缺氧条件下生长：阴性。
- (7) 过氧化氢酶：阳性。
- (8) 氧化酶：阳性。
- (9) O-F试验：F。
- (10) O/129敏感性试验：不敏感。
- (11) 色原的纯化：+/-。
- (12) 在铵离子和葡萄糖合成培养基中生长：阳性。
- (13) 用氨基酸作碳源：精氨酸、天冬酰胺、组氨酸、谷氨酸、丝氨酸和丙氨酸。
- (14) 在含7.5% NaCl营养肉汤中生长：阴性。
- (15) 丁二醇脱氢酶活性：阳性。
- (16) 甘油中产气：阳性。
- (17) 葡萄糖中产气：阳性。
- (18) 由2.5% 蛋白胨水溶液放出硫化氢：阳性。
- (19) 糖代谢：半乳糖、蔗糖、阿拉伯糖。
- (20) GC含量：69.4% 左右。

(21)单鞭毛: 是。

基于这些结果, 该菌株已被确认为属于假单胞菌 (*Pseudomonas*) 属的一种。

已把它命名为假单胞菌TK-4 (*Pseudomonas* SP. TK-4), 并按照布达佩斯条约寄存于通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究院 [1-3 Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibaragi 305; 日本] 自1994年6月24日起以保藏号FERM BP-5096进行了保藏。

例如, 在一种营养培养基中培养上述菌株, 培养完成后从培养基中分离就能获得本发明的酶。只要该菌株能利用并能产生本发明的酶的任何营养源, 都可加到培养基中。例如, 甘油, 葡萄糖, 蔗糖, 糖蜜等可用作碳源, 同时, 酵母提取物, 蛋白胨, 谷物浸泡液, 肉提取物, 脱脂大豆, 硫酸铵, 硝酸铵等可用作氮源。而且也可以加入无机物和金属盐(例如, 钠盐、钾盐、磷酸盐、镁盐、锌盐)。为了提高本发明酶的生产率也可以向培养基中加入0.01-0.5%的糖脂, 如无唾液酸-GM1。向培养基中加入二甲基环糊精, 使其浓度达到0.1%也是优选的。当培养能生产本发明酶的菌株时, 酶产率随着培养条件的不同而差异极大。一般优选菌株的种菌浓度在2-5%的范围, 培养温度在20-35°C范围并且培养基的pH值范围为5-8。在有氧条件下培养菌株1至7天就能生产本发明的酶。不用说, 该培养条件是以能获得本发明酶的最大生产率的方式来设定的, 它取决于所选菌株, 培养基的组份等。

本发明酶是由上述菌株进行细胞外生产而得。所以, 可以通过使培养基进行固体/液体分离, 然后用本领域的常规纯化方法来纯

化所得到的上清液，就可纯化这种酶。例如，可用盐析，有机溶剂沉淀，离子交换柱层析，羟基磷灰石柱层析，凝胶过滤柱层析或冷冻干燥来进行纯化。酶纯度可用例如聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳来测定。

本发明所获得的糖脂神经酰胺脱酰酶具有下列酶学和理化特性。

### (1) 酶活性的测定

糖脂神经酰胺脱酰酶的酶活性是由下列方法测定的。把10  $\mu$ l 的酶溶液加到10  $\mu$ l 的底物溶液中[50 mM醋酸盐缓冲溶液(pH 6.0)，内含2 mM的asialo-GM1和0.6% (重量/体积)的Triton X-100(聚乙二醇烷基芳基醚)]。在37°C反应30分钟后，将混合物加热到100°C，保持3分钟，以停止酶反应。然后用一台离心浓缩机浓缩反应混合物至干燥。再将所得到的浓缩物溶于10  $\mu$ l 50% 甲醇中并加到TLC(薄层层析)板上(硅胶60; 由Merck公司生产)。用氯仿/甲醇/0.02%CaCl<sub>2</sub>水溶液(5:4:1体积)展开后，再用地衣酚-硫酸方法对糖脂进行显色。使用这种展开剂，已脱除脂肪酸的糖脂显示的R<sub>f</sub>值略低于天然糖脂的R<sub>f</sub>值。可用一台TLC色谱扫描器(Shimadzu CS-9000, 由Shimadzu Corporation生产)在540 nm波长处测定出这个斑点。

一个活力单位(1U)定义为37°C下由无唾液酸-GM1中每分钟释放1  $\mu$ mol的溶血无唾液酸-GM1的酶用量。

### (2) 功能

它作用于糖脂分子中的神经酰胺上并将神经酰胺部分水解为神经鞘氨醇碱和脂肪酸，这样就形成了溶血糖脂和脂肪酸。

### (3) 底物特异性

按照方法(1)中测定酶活性的方法，测定酶的底物特异性。结

果，我们发现该酶不仅作用于神经节苷脂系列中的酸性糖脂，而且作用于神经节苷脂—、红细胞糖苷脂—(globo-)、乳糖苷脂—(lacto-)系列的神经鞘糖脂以及由一个单糖和与其连接的神经酰胺组成的脑苷脂，从而形成溶血糖脂和脂肪酸，如下列表1所示。在表1中，GM1和无唾液酸-GM1都从牛脑中制得[Methods in Enzymology, 83, 139-191(1982)]，而其它底物是由Iatron生产的市售产品。

表 1

底 物	消化率(%)
GM1	56.8
GM2	69.0
GM3	50.0
GD1b	43.4
GD3	51.2
Gb4	26.8
无唾液酸 - GM1	72.5
LacCer (乳糖脑苷脂)	11.2
GalCer (半乳糖脑苷脂)	14.4
GlcCer (葡萄糖脑苷脂)	7.3

#### (4) 最适pH值

如图1所示，本发明酶在约pH 5至7具有较高活性。在活性测定中，在pH 3.0-6.5, pH 6.5-9.0和pH 10分别使用了50 mM醋酸盐

缓冲液, 50 mM磷酸盐缓冲液和50 mM甘氨酸缓冲液。图1显示了本发明酶的最适pH值, 其中纵坐标表示相对活性(%)而横坐标表示pH值。在图1中, ●表示醋酸盐缓冲液, △表示磷酸盐缓冲液, ○表示甘氨酸缓冲液。

#### (5) 最适温度

如图2所示, 本发明的酶在40°C左右具有最大活性。也就是说, 图2显示了本发明的酶的最适温度, 其中纵坐标表示相对活性(%)而横坐标表示温度(°C)。

#### (6) pH稳定性

在5°C每个确定的pH值下把本发明酶存放16小时。再把pH值调至6.0后, 测定酶活性, 以检查酶对pH值的稳定性。在pH 3.5-6.0、pH 6.0-8.0、pH 8.0-9.0和pH 9.0到9.5下分别用50 mM醋酸盐缓冲液、50 mM磷酸盐缓冲液、50 mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)-盐酸缓冲液以及50 mM甘氨酸缓冲液作缓冲液。

如图3所示, 本发明酶在pH 4-9范围内保持稳定。也就是说, 图3显示了本发明酶的pH稳定性, 其中纵坐标表示残留活性(%)而横坐标表示pH值。图3中, ○代表醋酸盐缓冲液, ●代表磷酸盐缓冲液, △代表Tris-盐酸缓冲液、□代表甘氨酸缓冲液。

#### (7) 热稳定性

如图4所示, 对本发明酶热稳定性的检测表明, 在60°C下处理30分钟后它仍保持90%的活性。也就是说, 图4显示了本发明酶的热稳定性, 其中纵坐标表示残留活性(%)而横坐标表示温度(°C)。

#### (8) 分子量

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检查结果表明本发明酶

的分子量约为52,000。

#### (9) 酶反应产物的结构鉴定

通过本发明酶消化无唾液酸-GM1, 反相高压液相色谱(HPLC)纯化该消化产物, 然后用快速原子轰击质谱(FAB-MS)分析纯化了了的产物来进行鉴定由该酶所得到的消化产物。具体说, 把200 $\mu$ l酶溶液和10 $\mu$ l甲苯加到1 ml含有3 mg/ml无唾液酸 - GM1(c 18:0, d 18:1, 分子量为1,254)和0.6% Triton X-100的50 mM醋酸盐缓冲液(pH 6.0)中, 并在37 $^{\circ}$ C将混合物反应3天。反应完成后, 把5倍量的氯仿/甲醇(2:1, 体积)加到反应混合物中。分层后, 回收上层并蒸干。将所得到的残余物溶于500 $\mu$ l的氯仿/甲醇/水(3:48:47, 体积)从而得到用于反相柱层析的试样。这里使用ODS-80T柱(柱大小: 4.6 $\times$ 75 mm, 由Tosoh Corporation生产)。流速设在1 ml/分钟并按每份1.5 ml收集馏分。向柱上加样后, 用10 ml甲醇/水(6:4, 体积)流过该柱。然后, 进行分级洗脱直到甲醇浓度达到100%后60分钟。最后, 用5 ml氯仿/甲醇/水(60:30:4.5, 体积)过柱。收集含有溶血无唾液酸 - GM1的馏分, 由此得到纯化的制备液, 然后进行FAB-MS分析(基质: 三乙醇胺)。

图5显示了结果。也就是说, 图5显示了用本发明酶消化无唾液酸 - GM1所得到的产物的FAB-MS数据。图5中, 纵坐标表示相对强度而横坐标表示质荷比(M/Z)。图5中央是放大图[600 - 1200(M/Z)]。用作底物的无唾液酸 - GM1(Gal - GalNAc - Gal - Glc - Cer, 其中Cer代表神经酰胺; 分子量为1254)的信号位置[(M-H)]是1253, 而形成消化产物的溶血无唾液酸 - GM1(Gal - GalNAc - Gal - Glc - Sph, 其中Sph代表神经鞘氨醇碱, 分子量为988)的信号位置是987。

如图5所示，所得到的与溶血无唾液酸 - GM1的分子量988相应的信号987是最强的。图5还显示了信号825，它表明Gal已从溶血无唾液酸 - GM1的碳水化合物链部分的非还原末端中脱离。另一个信号622表明N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)已进一步从中脱离。基于这些数据，可以推论，本发明酶的反应产物是一种在其碳水化合物链部分中含有无唾液酸 - GM1的碳水化合物链部分的溶血糖脂。

除了如上所述的FAB-MS分析结果，还证实了下列事实。

(I) 用本发明酶消化得到的产物在水合茚三酮反应中呈阳性。

(II) 无唾液酸 - GM1的碳水化合物链部分是由内糖神经酰胺酶(endoglycoceramidase) (EC. 3. 2. 1. 123) 处理该产物而形成的，这种内糖神经酰胺酶能够水解碳水化合物链和神经酰胺之间或者碳水化合物链和神经鞘氨醇之间的糖苷键。

(III) 该碳水化合物链部分在水合茚三酮反应中呈阴性，这表明GalNAc中的乙酰基没有脱去。

基于这些结果，已经可以阐明本发明酶作用于糖脂分子中的神经酰胺上并把神经酰胺部分水解成鞘氨醇碱和脂肪酸，这样催化了生成溶血糖脂和脂肪酸的反应。

在用本发明酶生产溶血神经鞘脂中，只要能用本发明酶进行消化，任何神经鞘脂都可用作底物。这种神经鞘脂包括诸如脑硫脂或神经节苷脂等酸性糖脂类，例如GQ1, GT1, GD1, GD3, GM1或GM3；中性糖脂类，如红细胞糖苷脂，无唾液酸 - GM1或脑苷脂；以及神经鞘磷脂类(sphingophospholipids)，如神经鞘磷脂。

将这些底物悬浮于缓冲液中，并用本发明酶进行酶反应可获得

各种溶血神经鞘脂。这种酶反应能够在下述条件下进行，例如，每200  $\mu$ l 反应混合物用约40 mU的酶，反应混合物中的底物浓度为1至20 mg/ml，温度为37至40°C，pH值为5.0至6.0。优选使用醋酸盐缓冲液并将其浓度调整至25 mM。此外，最好在反应混合物中加入如Triton X-100的表面活性剂并使其最终浓度为0.8%。只要有溶血神经鞘脂从底物中产生出来，反应时间就不特别加以限制。反应一般在大约30分钟至3天内完成。反应完成后，用ODS反相柱层析可将反应产物从未反应的神经鞘脂中分离出来。用氯仿/甲醇/水(5:4:1 体积)作洗脱剂进行洗脱。洗脱物可用HPTLC分析方法进行监控。HPTLC可用氯仿/甲醇/10%醋酸(5:4:1, 体积)作为展开溶剂按常规方法进行。显色可用地衣酚-硫酸方法进行，来测定糖脂和溶血糖脂，用考马斯亮蓝方法显色来测定神经鞘磷脂和溶血神经鞘磷脂。若仅对溶血神经鞘脂的测定，可用水合茚三酮方法。

如上所述，用本发明的酶能够生产出溶血神经鞘脂。

通过取代反应把一个适当的取代基引入所获得的溶血神经鞘脂可生产出溶血神经鞘脂衍生物。

例如，在二环己基碳二亚胺存在下把脂肪酸和N-羟基琥珀酸酐亚胺酯化，将所得到的产物与溶血神经鞘脂反应来向其中引入脂肪酸，可获得酰化的衍生物。换一种方法是，可以合成脂肪酸氯化物，并与溶血神经鞘脂反应来向其中引入脂肪酸。

用荧光标记用本发明酶所得到的溶血神经鞘脂中的神经鞘氨醇上的氨基，可合成出荧光标记的神经鞘脂衍生物(荧光标记的新神经鞘脂)。荧光物的例子有丹磺酰氯，4-氟-7-硝基苯并咪唑，NBD-F和10-萘癸酸。

如上所述，本发明提供了一种具有非常广泛的底物特异性的糖脂神经酰胺脱酰酶以及用该糖脂神经酰胺脱酰酶生产溶血神经鞘脂的方法。使用本发明的酶使得从各种不同的神经鞘脂制备溶血神经鞘脂成为可能。由此获得的溶血神经鞘脂可以利用溶血神经鞘脂中的游离氨基酸，用常规方法使其进一步转化为神经鞘脂衍生物，例如，向其中再导入一种标记过的脂肪酸，用一种荧光物直接标记或者直接连接到一种无碳水化合物链的蛋白质（如，白蛋白）上。这些衍生物可用作一种底物来测定与碳水化合物相关的酶，可作为亲和层析纯化方法中的一种配合体，可作为抗神经鞘脂抗体的一种抗原或者用于揭示神经鞘脂功能的研究中。而且，用本发明酶所得到的溶血神经鞘脂可以作为底物或反应物应用于细胞技术领域，如阐明神经鞘脂的细胞内代谢和转运途径或者神经鞘脂在细胞中的功能。

为了更进一步详细说明本发明，将给出下列实施例。不过，这些实施例的目的是用来说明本发明的一些具体实施方案，而不是构成对本发明范围的限定。

#### 实施例1

在液体培养基中接种2%的假单孢菌TK-4 (BP-5096)，这种液体培养基含有0.5%蛋白胨，0.1%酵母提取液，0.2% NaCl和0.1%无唾液酸-GM1，并在30°C下培养48小时。培养完成后，在6,000 rpm下离心培养基60分钟。这样就除去了细胞，获得了培养上清液。随后的步骤都在5°C下操作。向培养上清液中加入硫酸铵至80%饱和度。然后把它放置过夜并在6,000 rpm下离心60分钟，收集沉淀并将其溶于少量的含0.2% Lubrol (润滑剂) 的20 mM醋酸盐缓冲液

(pH 6.0)中。然后,用相同的缓冲液透析过夜。透析完成后,把酶液用一Toyopearl HW-55F柱(柱大小:40×300 mm;由Tosoh Corporation生产)进行凝胶过滤层析。用含0.2% Lubrol和0.2 M NaCl的20 mM醋酸盐缓冲液(pH 6.0)作洗脱剂,以1 ml/分钟的流速进行洗脱,收集馏分每份5 ml。收集活性馏分并进行DEAM柱层析(柱大小:2.3×150 mm,由J.T.Bake生产),DEAM柱已用含有0.2% Lubrol的20 mM醋酸盐缓冲液(pH 6.0)进行了平衡。用相同的缓冲液以2 ml/分钟的流速进行洗脱,收集未被吸附的馏分。将所得到的馏分再上CM-5PW柱(柱大小:5×50 mm,由Tosoh Corporation生产),上样速度为0.5 ml/分钟,收集馏分每份1.5 ml。采用0至1 M NaCl的线性梯度洗脱进行展开,收集活性馏分,该馏分再用一TSK-G300SW柱(由Tosoh Corporation生产)进行凝胶过滤层析。用含0.2% Lubrol和0.2 M NaCl的20 mM醋酸盐缓冲液(pH 6.0),以1.5 ml/分钟的流速进行洗脱收集馏分,每份1.5 ml。收集活性馏分,并上已用含0.2% Lubrol的2 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.0)平衡过的羟基磷灰石柱(柱大小:1.4×70 mm)进行柱层析,并进行从起始缓冲液至400 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.0)的线性梯度洗脱。收集活性馏分,得到纯化的酶。已证实这种纯化酶能够水解无唾液酸-GM1,形成溶血无唾液酸-GM1和脂肪酸。

## 实施例2

### (1)溶血无唾液酸-GM1的生产

把无唾液酸-GM1用作神经鞘脂。它是按照Methods in Enzymology, 83, 139-191(1982)中所述方法从牛脑中制得。把实施例1中所得到的纯化酶(40 mU)加入200  $\mu$ l含2.5 mg/ml无唾液酸-GM1

和0.8% Triton X-100的25 mM醋酸盐缓冲液(pH 6.0)中, 并把所得到的混合物在37°C保温3天来进行反应。反应完成后, 加入该反应混合物5倍体积的氯仿/甲醇(2:1, 体积)进行分配。回收上层并将其蒸干。将所得到的残余物溶于500  $\mu$ l 氯仿/甲醇/水(3:48:47, 体积), 再进行ODS反相柱层析, 由此分离该反应产物和未反应的神经营鞘脂(无唾液酸-GM1)。这里使用的是ODS-80T柱(4.6  $\times$  75 mm, Tosoh Corporation)。流速设在1 ml/分钟并按每份1.5 ml收集馏分。用氯仿/甲醇/水(5:4:1, 体积)进行洗脱。用HPTLC分析监控洗脱物。HPTLC是用氯仿/甲醇/10%醋酸(5:4:1, 按体积计)作展开剂进行的, 并用地衣酚-硫酸显色法。对溶血神经鞘脂的专门检测, 使用了水合茚三酮法。

收集含溶血无唾液酸-GM1的馏分作为纯化了的产物并进行FAB-MS分析(基质: 三乙醇胺)。结果如图5所示。纵坐标和横坐标分别表示相对强度和质荷比(M/Z)。观察到与溶血无唾液酸-GM1的分子量988相对应的信号987是最强的信号。图5还显示了表明Gal已从溶血无唾液酸-GM1的碳水化合物链的非还原末端脱离的信号825, 和表明N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)已进一步从这里脱离的信号622。

纯化的产物在水合茚三酮反应中呈阳性。当用内糖神经酰胺酶(endoglycoCeramidase)处理纯化产物时, 形成了无唾液酸-GM1的碳水化合物链部分。所得到的碳水化合物链部分在水合茚三酮反应中呈阴性。

从这些结果中, 我们发现这种纯化了的反应产物就是溶血无唾液酸-GM1。

## (2) 溶血神经鞘磷脂的生产

除了用硅胶60柱（使用ODS-80T柱的相同条件）代替ODS-80T柱并用考马斯亮蓝法代替地衣酚方法进行显色外，用神经鞘磷脂（Matreya生产）作为神经鞘脂重复实施例2(1)中的相同步骤。

反应产物的FAB-MS分析结果如图6中所示。纵坐标和横坐标分别代表相对强度和质荷比(M/Z)。图6是在400至550(M/Z)范围内的放大图。

如图6所示，最强的信号是与溶血神经鞘磷脂的分子量466相对应的信号467[(M+H)]。

### 实施例3

#### 溶血神经鞘脂衍生物的合成

##### (1) 把单链脂肪酸导入溶血神经鞘脂

使溶血神经鞘脂与合成的脂肪酸氯化物反应(再酰化)把脂肪酸导入溶血神经鞘脂中。Lyso-GM1(溶血-GM1)是以实施例2(1)中所述的相同方法制得，并用作溶血神经鞘脂。作为脂肪酸，可使用C2:0, C14:0, C16:0, C18:0, C22:0和C24:0的分子类型。把相当于Lyso-GM1两至三倍摩尔当量的脂肪酸放入一个茄形小烧瓶中并向其中加入5至10 ml的亚硫酸氯。在烧瓶上连接一个冷凝器，在回流下水浴把烧瓶加热到80°C左右。在这种情况下，回流冷凝器装有一只顶端塞有氯化钙的玻璃管以隔断外面的空气。反应完成后，在一个通风装置中有氮气流的条件下去除亚硫酸氯并把烧瓶放在有氢氧化钾的干燥器中1至2小时。确认没有亚硫酸氯味后，把二乙醚加入烧瓶以溶解烧瓶中所含的反应产物。然后，再向其中加入1 μmol溶于1 ml 0.3 M碳酸氢钠溶液的溶血-GM1，接着搅拌2至3小时。用TLC监控反应。反应完成后，用超纯水透析反应混合物，得到再酰化的

GM1。按照这种方法，不管脂肪酸的碳链长度如何，任何脂肪酸都能以90%左右的产率导入溶血 - GM1中。

## (2) 荧光标记的新神经鞘脂的合成

荧光标记的神经鞘脂衍生物（荧光标记的新神经鞘脂）可通过荧光标记溶血神经鞘脂的神经鞘氨醇上的氨基来合成，溶血 - GM1可由实施例2(1)中所述的相同方法制得并用作溶血神经鞘脂。

为了用丹磺酰氯标记，把溶血 - GM1 ( $1 \mu\text{mol}$ )溶于1 ml 0.2 M碳酸氢钠溶液中并且再向其中加入一个当量体积的0.25%丹磺酰氯的丙酮溶液。把所得到的混合物放在 $37^\circ\text{C}$ 、黑暗处1小时并用超纯水透析。

另一方面，用下列方法进行NBD - F的标记。把溶血 - GM1 ( $0.5 \text{ nmol}$ )溶于 $500 \mu\text{l}$  0.1 M硼酸盐缓冲液 (pH 8.0)中，再向其中加入 $500 \mu\text{l}$  20 mM NBD - F/乙醇溶液，把所得到的混合物在 $60^\circ\text{C}$ 水浴中保温1分钟。随后立即用冰冷却反应混合物并在 $4^\circ\text{C}$ 下用超纯水透析2小时。

在以上这两种情况下，反应均必须在黑暗处进行。

由此合成的荧光标记的新神经鞘脂用TLC来检测，用氯仿/甲醇/10%醋酸 (5:4:1, 按体积计)作展开剂。丹磺酰化的GM1 (丹磺酰 - II3 - NeuAc  $\alpha$  - Gg4 - 神经鞘氨醇)的产率几乎为100%，而NBD - GM1 (NBD - II3 NeuAc  $\alpha$  - Gg4 - 神经鞘氨醇)的产率则是70 - 80%。

当详细描述了本发明并用其特殊实施例作参考后，对本领域的熟练技术人员来说不脱离本发明主题和范围所作的各种变化和进步都将是显而易见的。

说明书附图

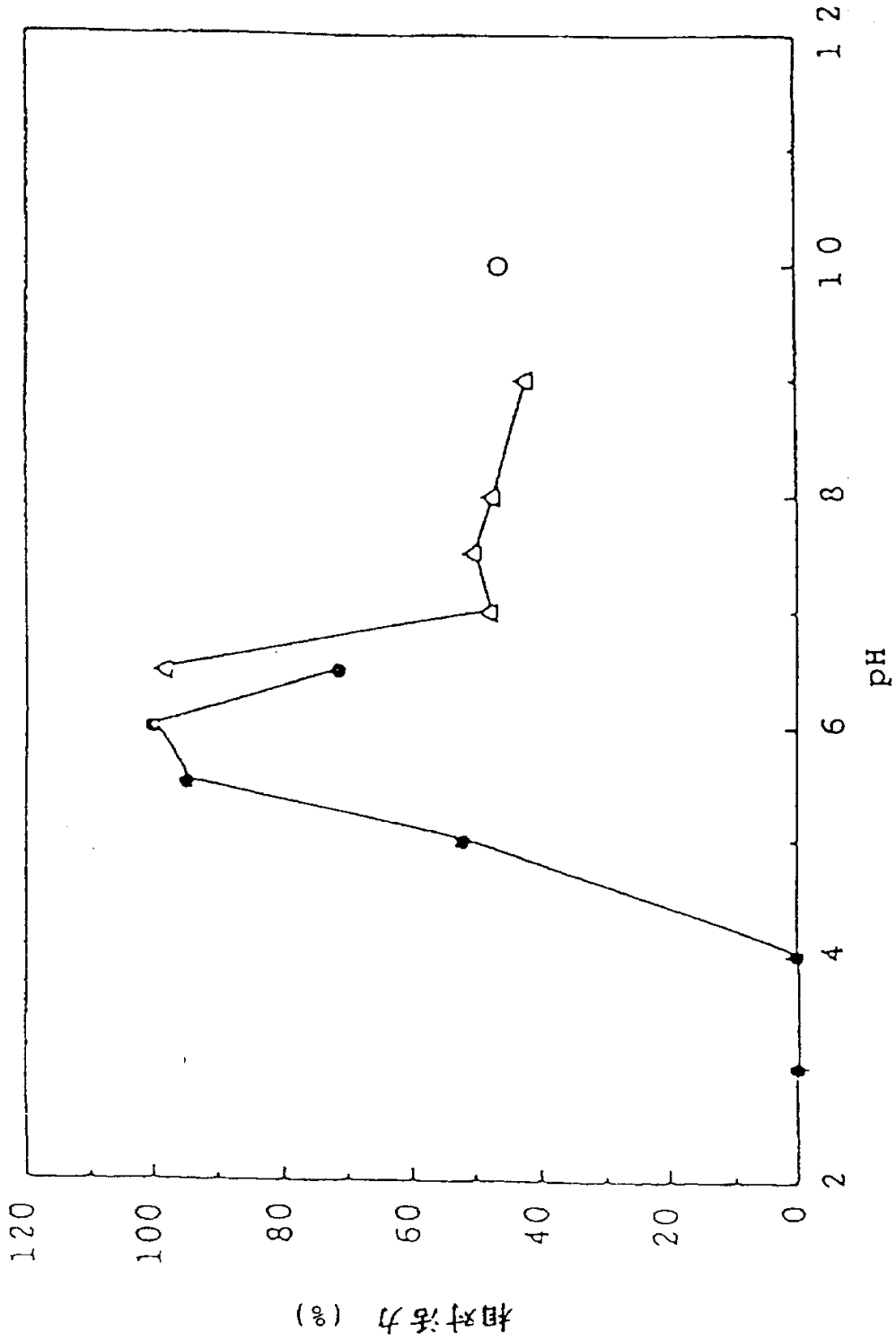


图 1

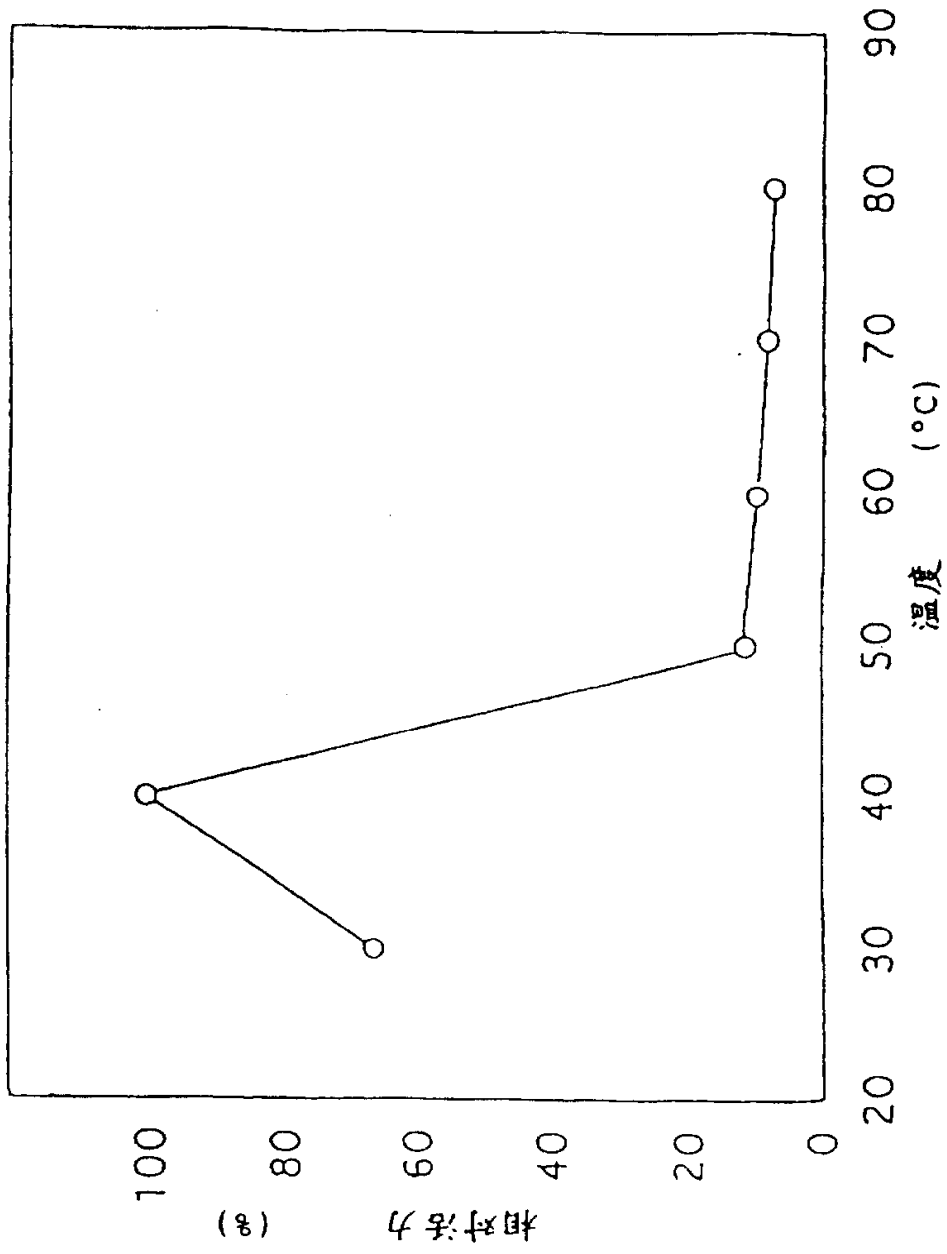


图 2

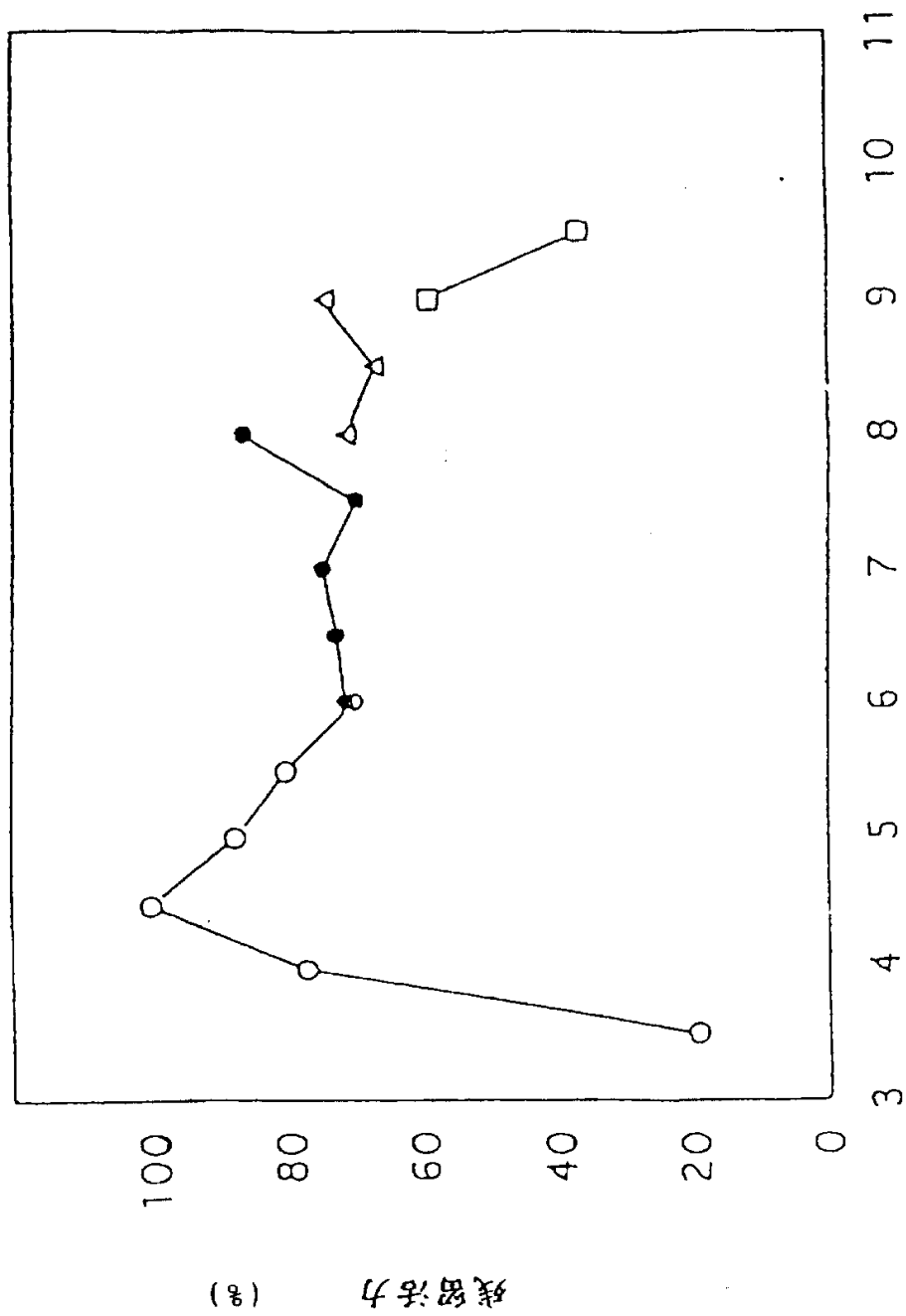


图 3

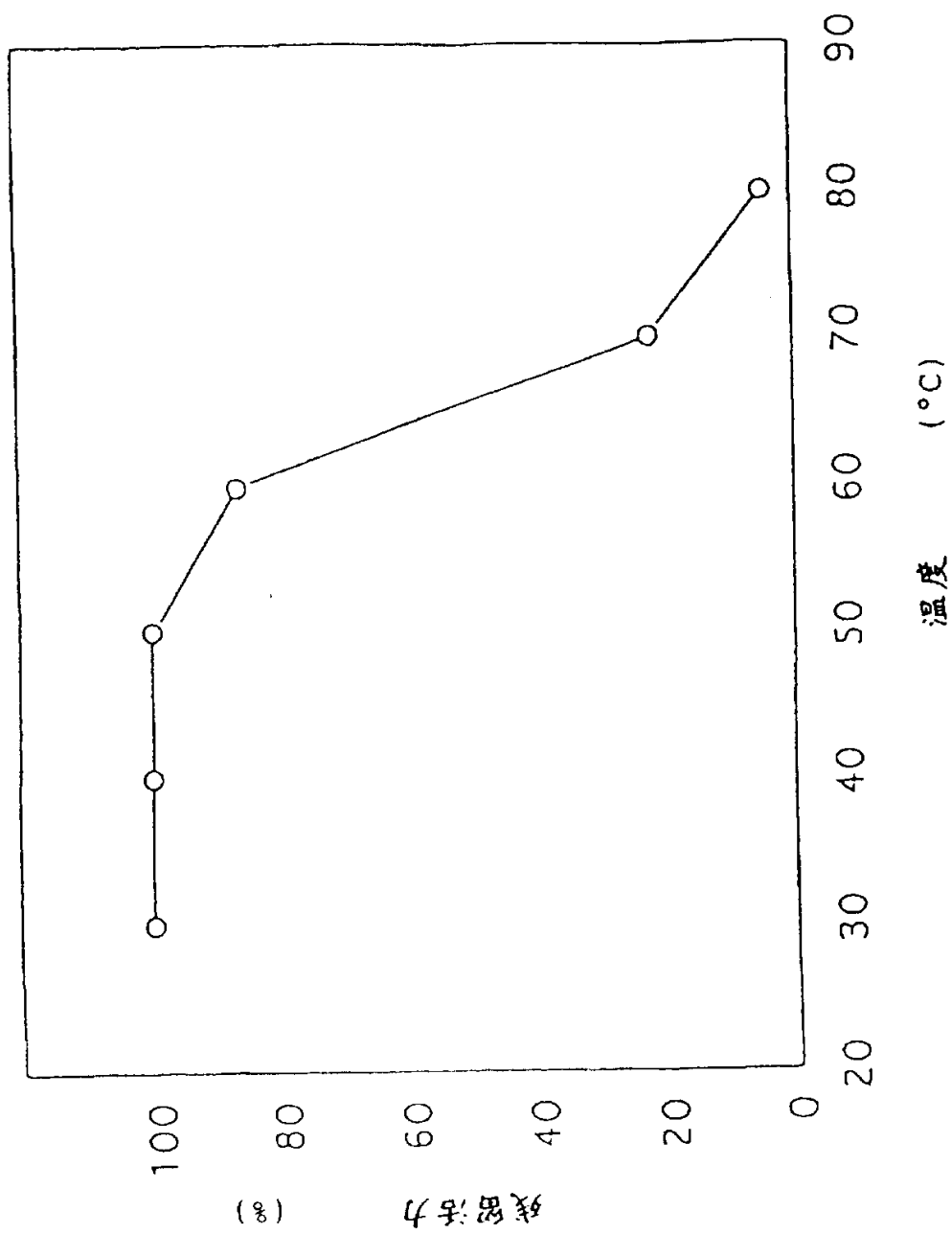


图 4

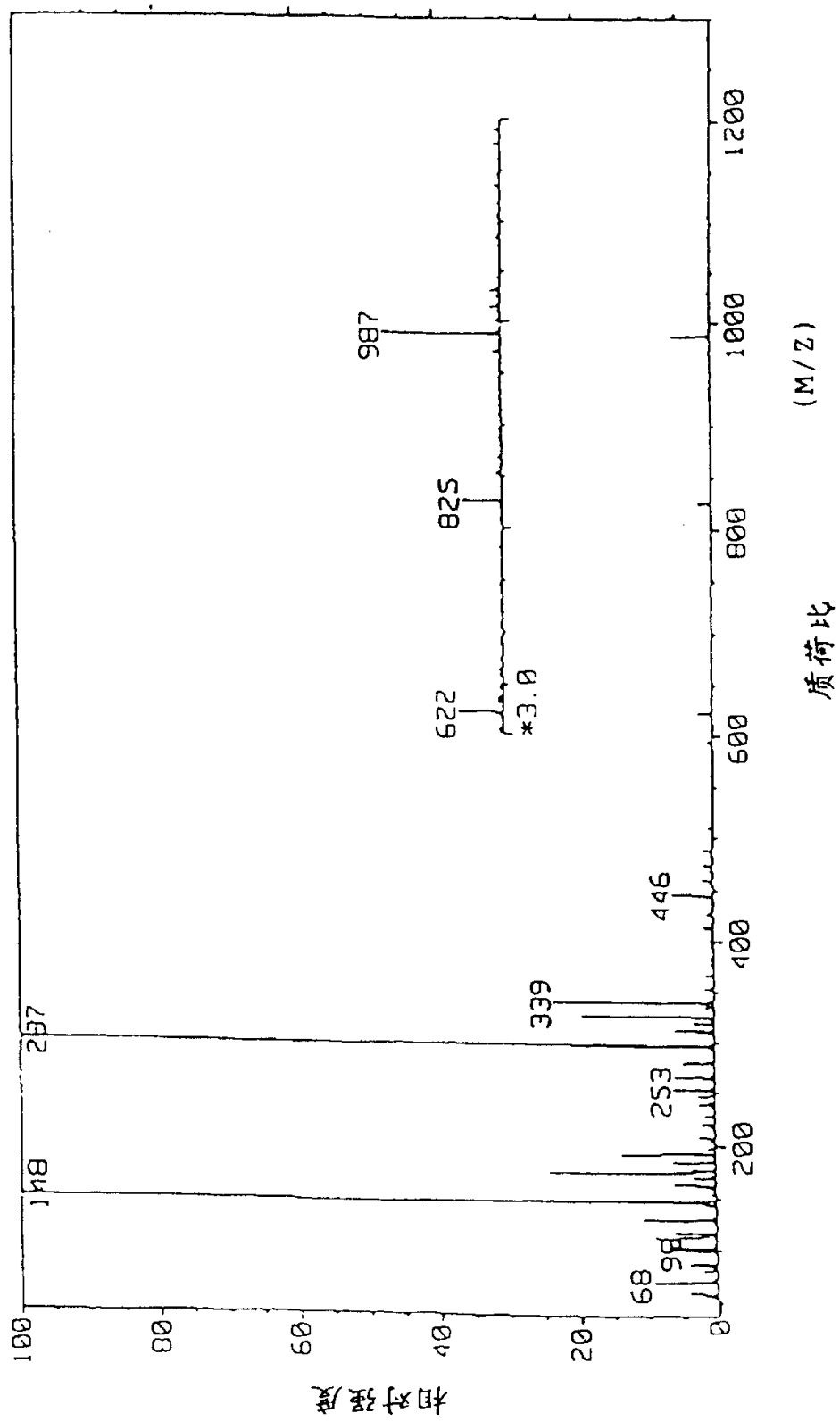


图 5

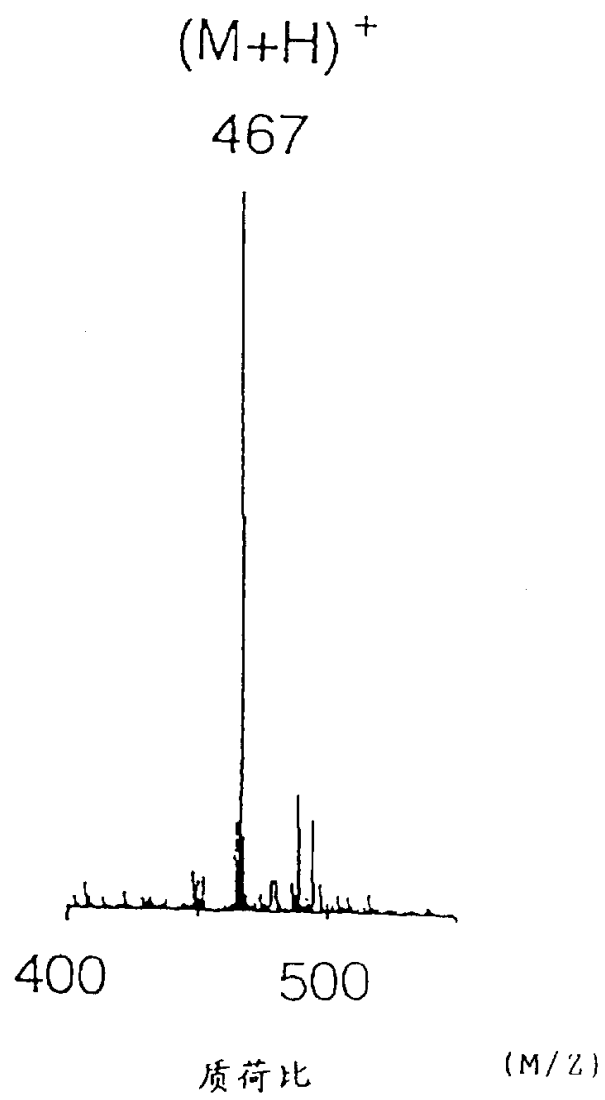


图 6