

# 有机溶剂对棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的影响

黄小红<sup>1</sup>, 陈清西<sup>2</sup>, 王 君<sup>2</sup>, 关 雄<sup>1\*</sup>

(1. 福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建 福州 350002; 2 厦门大学生命科学学院教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 以棉铃虫为材料, 经  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  分级沉淀、Sephadex G-200 分子筛凝胶过滤柱层析和 DEAE-32 离子交换柱层析分离纯化, 获得棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶酶制剂. 研究几种有机溶剂对棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (EC3. 2. 1. 14) 的活力与构象的影响. 结果表明: 甲醇、乙醇和乙二醇对酶有先扬后抑的作用, 正丙醇和丙三醇对酶有失活作用. 低含量的丙酮 (体积分数为 12.5%) 对酶有可逆失活作用, 随着丙酮含量的提高, 其酶促反应的动力学参数也随之改变,  $V_{\text{max}}$  值降低,  $K_{\text{m app}}$  值不变. 在 278 nm 波长激发下, 天然酶内源荧光在 339 nm 处有特征的荧光发射, 其强度随着丙酮含量的上升而减弱, 荧光发射峰也逐渐蓝移. 这表明丙酮改变了酶的构象.

**关键词:** 棉铃虫; *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶; 有机溶剂; 酶活力与构象

**中图分类号:** Q356.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1006-7817 (2005) 01-0078-04

## Effects of organic solvents on activity of *N*-Acetyl-D-glucosaminidase from *Helicoverpa armigera*

HUANG Xiao-hong<sup>1</sup>, CHEN Qing-xi<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, GUAN Xiong<sup>1</sup>

(1. Key Lab of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2 Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract:** A *N*-Acetyl-D-glucosaminidase (EC3. 2. 1. 30) was isolated from the pupae of *Helicoverpa armigera* (Hubner) and partially purified by ammonium sulfate fractionation, chromatography on Sephadex G-200 and DEAE-32. Effects of different organic solvents on the activity and conformation of *N*-Acetyl-D-glucosaminidase was investigated. The results indicated that the methanol, alcohol and glycerol activated the enzyme at low concentrations, but they inactivated it at high concentrations. The enzyme activity declined along with the increase of glycol, propanol and acetone concentrations. The values of  $V_{\text{max}}$  decreased gradually along with the increase of acetone concentration, however, the value of  $K_{\text{m app}}$  kept unchanged. At the same time, the conformational changes of the enzyme in acetone solutions of different concentrations were measured by fluorescence absorption spectra. The fluorescence emission intensity of the enzyme gradually weakened with the increasing of acetone concentrations, accompanied by the peak being gradually blue-shifted. The result showed that acetone could affect the conformation of the enzyme.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; *N*-Acetyl-D-glucosaminidase; organic solvent; activity and conformation of enzyme

*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (EC3. 2. 1. 14) 是一类能与内切几丁质酶和外切几丁质酶协同作用, 特异地催化水解几丁质 -1, 4 糖苷键而生成 *N*-乙酰-D-氨基葡萄糖 (NAG) 的水解酶, 它直接参与几丁质的分解代谢过程, 在生物体内物质代谢中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>. 昆虫的外骨骼和中肠围食膜均含有几丁质. 几丁质不仅是昆虫的主要结构组分, 也是昆虫防止机械损伤和生物危害的屏障. 降解几丁质是一种防治昆虫的重要方法. *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶由于具有水解几丁质、破坏围食膜的作用而被作为防治害虫的潜在靶标. 可以将此酶导入昆虫体内, 破坏其正常的组织结构, 协助细菌或病毒侵入目标虫体, 达到抑杀害虫的目的; 也可以通过调控几丁质酶活性来影响昆虫的生长发育<sup>[1, 2]</sup>.

收稿日期: 2004 - 07 - 20      修回日期: 2004 - 12 - 15

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2002AA245011) 和福建省科技厅资助项目 (2002N004).

作者简介: 黄小红 (1966 - ), 女, 副教授, 硕士. 研究方向: 酶学.

\* 通讯作者. Email: gx@fjau.edu.cn

本文以棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hubner)为材料,分离提取其 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶.研究有机溶剂对 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶酶活力的影响,不仅可以为研究酶在有机溶剂中的催化反应提供新的信息,为寻找酶特效的激活剂与抑制剂提供依据;而且还能新型生物杀虫剂的开发利用提供理论指导,为生产上控制棉铃虫提供有效手段.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

棉铃虫由福建省浦城绿安生物农药有限公司提供,饲养至蛹后用于酶的分离纯化.对硝基苯-*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖苷(pNp-*D*-GlcNAc)购于上海医药工业研究院生化室;其余试剂均为国产分析纯;使用的蒸馏水为重蒸水. DU-650分光光度计为 Beckman公司产品;日立 F-4010型荧光分光光度计是 Hitachi产品.

### 1.2 棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶的制备

1.2.1 酶的分离纯化 以棉铃虫蛹作为分离 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶的材料.用硫酸铵分级分离,收集 30% - 70%饱和度的沉淀蛋白,透析后得到棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶粗酶制剂.进一步通过 Sephadex G-200 分子筛凝胶过滤柱层析纯化,采用 pH为 6.8的  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(内含  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)洗脱,柱规格为  $2.6 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ ,流速为  $8 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ ,自动分步收集,每管 2.0 mL.测定酶活力和蛋白含量,合并酶活性峰,比活力为  $1609.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Sephadex G-200的洗脱酶液通过 DEAE-32离子交换柱层析纯化,采用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.8,内含  $0 - 1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl溶液)洗脱.柱规格为  $2.0 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ ,流速为  $12 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ ,分步收集,每管 3.0 mL.合并酶活性峰,测定酶活力和蛋白含量.比活力为  $2678.79 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .酶经以上步骤纯化,纯度提高 10.36倍.此酶作为酶活力分析原料.

1.2.2 蛋白含量的测定 采用 Folin 酚试剂法<sup>[3]</sup>测定蛋白含量,以牛血清蛋白为对照.

1.2.3 棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的测定 酶活力的测定参照文献[4]的方法(略有改进).以 pNp-*D*-GlcNAc为底物,在 2 mL的测活体系中(含终浓度为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH为 5.63的磷酸缓冲液及  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的底物),于 37℃恒温水浴中加入 20  $\mu\text{L}$ 酶液,反应 10 min,加入 2 mL  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH终止反应.用 Beckman DU-650分光光度计测定  $D(405 \text{ nm})$ 值.消光系数为  $8.8 \times 10^3 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$ .酶活力单位(U)定义:在上述条件下,每升溶液中每分钟释放 1  $\mu\text{mol}$  NAG的量为 1个酶活力单位.比活力定义为每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位数.

1.2.4 有机溶剂对棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶的影响 选择甲醇、乙醇、正丙醇、乙二醇、丙三醇、丙酮等有机溶剂为效应物,在 2 mL的测活体系中(含终浓度为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH为 5.63磷酸缓冲液及  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的底物),加入不同浓度的效应物,测定酶的相对活力,分析研究效应物对酶活力的影响.

1.2.5 丙酮对酶失活作用机理的判断 在不同浓度丙酮( $0 - 2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的测活体系中,固定底物浓度为  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,改变加入的酶量( $0 - 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),测定酶促反应的初速度.

1.2.6 丙酮对酶失活作用的类型 在测活体系中,固定酶的浓度,改变底物浓度(分别为  $0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响,以 Lineweaver-Burk双倒数作图,求其最大反应速度及其表观米氏常数.

1.2.7 酶经丙酮微扰后的荧光发射光谱的变化 棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶经不同浓度丙酮微扰后测定荧光发射光谱.激发光的波长为 278 nm,扫描荧光光谱的范围在 300 - 400 nm.

## 2 结果与分析

### 2.1 几种伯醇对棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的影响

甲醇、乙醇和正丙醇对棉铃虫 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶的影响的测定结果见图 1.甲醇和乙醇对此酶的效应表现为先扬后抑作用,随着甲醇和乙醇含量的提高,酶的活力迅速下降.导致酶活力丧失一半的甲醇、乙醇的体积分数分别为 27%、25%.正丙醇对 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶的作用表现为失活效应,其失活作用比甲醇和乙醇强,当正丙醇的体积分数达 13%时,酶活力丧失一半.

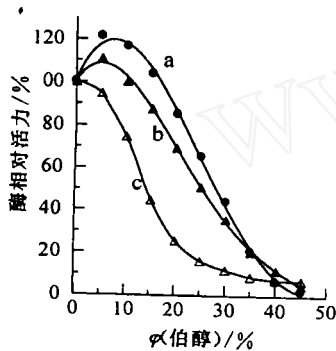
### 2.2 多元醇对棉铃虫 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的影响

不同浓度的乙二醇、丙三醇对棉铃虫 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的影响见图 2 乙二醇和丙三醇对酶的效应有所不同,乙二醇对酶的效应是先扬后抑,其体积分数低于 5% 时,对酶有轻度的激活作用;当其体积分数高于 5% 时,酶活力开始降低;当其体积分数提高到 45% 时,酶活力仅剩下 33.75%。而不同含量的丙三醇均可使酶活力下降,当其体积分数为 45% 时,酶的剩余活力为 27.21%。丙三醇对酶的失活作用略比乙二醇强。

### 2.3 丙酮对棉铃虫 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的影响

2.3.1 丙酮含量对棉铃虫 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的影响 丙酮对棉铃虫 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的影响试验表明丙酮对酶有失活作用。丙酮的体积分数为 45% 时,酶活力降低了 97.6% (图 3)。

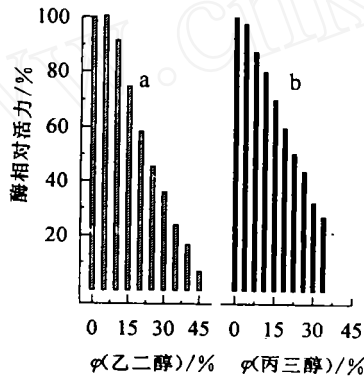
2.3.2 丙酮对酶失活作用机理的判断 丙酮使棉铃虫 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶失活的作用机理如图 4 所示。以酶活力和酶含量为坐标轴作图,得到一组通过原点的直线,随着丙酮含量的提高,直线的斜率减小。这说明丙酮对酶的失活作用属于可逆过程,丙酮是通过影响酶活力而导致催化效率降低,而不是通过降低有效酶含量来降低酶活力。



a. 甲醇; b. 乙醇; c. 正丙醇。

图 1 伯醇对棉铃虫 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的影响

Fig 1 Effects of methanol, alcohol and propanol on the activity of N-Acetyl-D-glucosaminidase



a. 乙二醇; b. 丙三醇。

图 2 多元醇对棉铃虫 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的影响

Fig 2 Effects of glycol and glycerol on the activity of N-acetyl-D-glucosaminidase

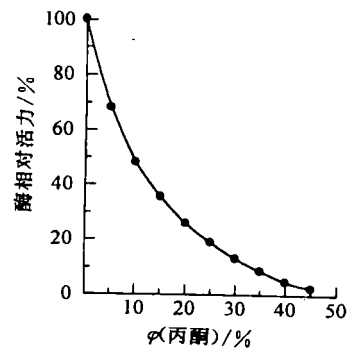


图 3 丙酮对棉铃虫 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力的影响

Fig 3 Effects of acetone on the activity of N-acetyl-D-glucosaminidase

2.3.3 丙酮对酶失活作用的类型 结果表明 (图 5):随着丙酮浓度的提高,表观米氏常数 ( $K_{m,app}$ ) 不变,而最大反应速度 ( $V_{max}$ ) 则随着丙酮浓度的提高而降低,可见在反应体系中加入丙酮不会影响酶与底物之间的亲和力,只是降低酶促反应的最大反应速度。这一现象表明失活作用是非竞争性机制。

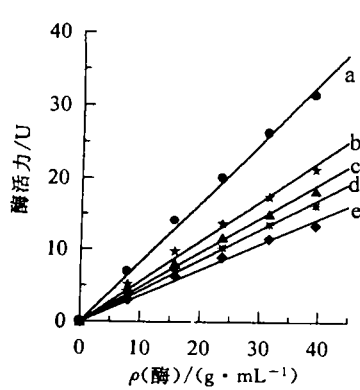
2.3.4 酶经丙酮微扰后的荧光发射光谱的变化 棉铃虫 N-乙酰-D-氨基葡萄糖苷酶经不同浓度的丙酮微扰后的荧光发射光谱变化情况如图 6 所示。天然酶内源荧光在 339 nm 处有特征的荧光发射峰,其强度随着丙酮浓度的上升而减弱。荧光发射峰逐渐蓝移至 334 nm 处。

## 3 讨论

研究伯醇对棉铃虫 N-乙酰-D-氨基葡萄糖苷酶的影响时发现甲醇和乙醇对酶有低含量的激活作用,甲醇和乙醇的体积分数为 5% 时酶活力达到最大。当甲醇和乙醇的体积分数分别高于 15% 和 10% 时,酶活力开始下降。酶在低含量的甲醇与乙醇溶液中有被激活的现象,说明酶在这 2 种介电常数较小的介质中进行催化反应时,酶活性中心的柔性构象会发生改变,而且改变的构象比天然的构象更适合于底物的结合和催化,所以酶活力增强。可见酶的天然构象并不一定是酶发挥生物学功能的最佳构象。正丙醇对酶没有低含量的激活作用,其失活作用比甲醇和乙醇都强,乙醇的失活作用比甲醇强。这是因为伯醇碳链的长度对酶有影响,酶活力会随着碳链的延长而下降。

低含量的乙二醇对 N-乙酰-D-氨基葡萄糖苷酶有轻度的激活作用,高含量的乙二醇对酶有失活作用。而乙二醇对长毛对虾酸性磷酸酶并没有低含量的激活作用,只有失活作用<sup>[5]</sup>。丙三醇能降低棉铃虫 N-乙

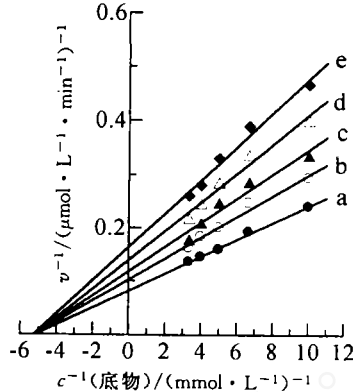
酰 - *D*-氨基葡萄糖苷酶的活性,但对豇豆根瘤腺苷酸琥珀酸裂解酶则有激活作用<sup>[6]</sup>。这说明同一种有机溶剂对不同酶所起的作用是不同的。棉铃虫 *N*-乙酰 - *D*-氨基葡萄糖苷酶活力之所以受丙三醇和高含量的乙二醇的影响,是因为它们能介入酶分子内部,导致维持蛋白质分子构象的次级键(尤其是氢键)和疏水作用力发生变化,酶分子的高级结构被破坏,从而影响了酶的催化活性。



a - e 丙酮浓度分别为 0、0.8、1.2、1.6 和 2.0 mol · L<sup>-1</sup>。

图 4 丙酮对 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶失活机理的判断

Fig 4 Determination of the inactivation mechanism of acetone on *N*-acetyl-*D*-glucosaminidase



a - e 丙酮浓度分别为 0、0.4、0.8、1.2 和 1.6 mol · L<sup>-1</sup>。

图 5 丙酮对酶失活效应的 Lineweaver-Burk 关系图

Fig 5 The Lineweaver-Burk plot of *N*-acetyl-*D*-glucosaminidase inactivation in acetone solution

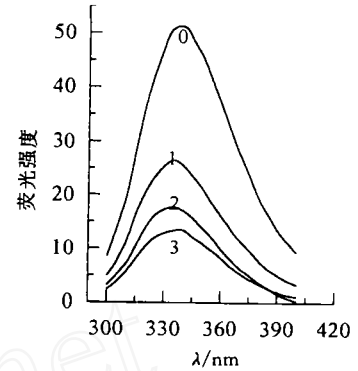


图 6 酶在丙酮溶液中的荧光发射光谱(曲线 0 - 3 的丙酮浓度分别为

0、40、60、80 mmol · L<sup>-1</sup>

Fig 6 Fluorescence emission spectra of *N*-acetyl-*D*-glucosaminidase denaturation in acetone solutions

丙酮对酶有失活作用,同时会影响酶的内源荧光发射。在蛋白质分子中,能发射荧光的氨基酸有色氨酸、酪氨酸以及苯丙氨酸,其中色氨酸的荧光强度最大,酪氨酸次之,苯丙氨酸最小。我们以 278 nm 作为激发波长,苯丙氨酸在这种条件下一般不被激发,由于酪氨酸的荧光发射峰在 303 nm,而色氨酸在 348 nm<sup>[7]</sup>,所以酶的内源荧光主要来自酪氨酸和色氨酸。丙酮与酶分子相互作用后,发生荧光强度降低的现象,即荧光淬灭。荧光淬灭的研究可以揭示发色基团在蛋白质中的位置<sup>[8,9]</sup>。荧光强度随着丙酮含量的提高而降低,同时酶的荧光发射峰也出现了兰移。伴随酶构象的改变,酶活力也随之降低。

总之,酶的构象是靠酶分子中的次级键来维持的,当反应体系中含有有机溶剂时,体系的氢键和疏水性发生改变,这会影响酶分子的构象,进而改变酶的活性。不同有机溶剂对酶的构象有不同的影响<sup>[10]</sup>。即使是同一种有机溶剂在不同含量范围所起的作用也有差异。长期以来,人们一直认为酶分子只能在水溶液中发挥其生物学功能,水溶液是这些大分子存在及其相互作用的天然介质。本试验证实酶也可以在有机溶剂中发挥作用,而且在不同有机溶剂中会表现出不同的催化活性。

#### 参考文献:

- [1] 欧阳石文,刘江良,冯兰香,等. 昆虫几丁质酶的研究与应用[J]. 山地农业生物学报, 2001, 20(2): 147 - 153.
- [2] 吴青军,张文吉,张友军. 昆虫几丁质酶及其在植物保护中的应用[J]. 昆虫知识, 2000, 37(5): 314 - 317.
- [3] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265 - 269.
- [4] L N J C, CHEN Q X, SHI Y, et al. The chemical modification of the essential groups of *N*-acetyl-*D*-glucosaminidase from *Turbo comutus* Solander[J]. *IUBMB Life*, 2003, 55(9): 547 - 552.
- [5] 陈清西,周兴旺,扬佩真,等. 乙二醇对长毛对虾酸性磷酸酶活力与构象的影响[J]. 台湾海峡, 1999, 18(4): 398 - 402.
- [6] 周跃钢. 甘油对豇豆根瘤腺苷酸琥珀酸裂解酶活性的影响[J]. 西南农业大学学报, 1997, 19(3): 252 - 254.
- [7] 扬家祥,张玉慧,许兴友,等. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J]. 淮海工学院学报, 1999, 18(4): 28 - 31.
- [8] 王守业,徐小龙,刘清亮,等. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J]. 化学进展, 2001, 13(4): 257 - 260.
- [9] 陈清西,颜思旭,力政军,等. 果菠萝蛋白酶在有机溶剂中的变性失活动力学研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1993, 32(1): 88 - 92.
- [10] 彭立风. 有机溶剂对酶催化活性和选择性的影响[J]. 化学进展, 2000, 12(3): 296 - 304.

(责任编辑:叶济蓉)