

# 产物及其类似物对锯缘青蟹 NAGase 酶活力的影响

杨学敏<sup>1,2</sup>, 张继平<sup>3</sup>, 谢进金<sup>4</sup>, 颜雅雯<sup>1</sup>, 陈清西<sup>1</sup>

(1 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室、厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005;

2 漳州职业技术学院食品与生物工程系, 福建 漳州 363000 3 广东佛山科学技术学院生命科学学院,

广东 佛山 528231; 4 泉州师范学院生物系, 福建 泉州 362000)

**摘要:** 以产物 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖 (NAG) 及其类似物-葡萄糖 (glu)、半乳糖 (gal)、果糖 (fru) 和蔗糖 (suc) 为效应物, 研究它们对锯缘青蟹 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 活力的影响及抑制作用机理。结果表明, 上述效应物对酶均表现为可逆的抑制作用。NAG 有较强的抑制作用, 其  $IC_{50}$  为  $0.011 \text{ mol/dm}^3$ 。但产物类似物对该酶的抑制作用均弱于 NAG。NAG 对该酶的抑制作用机理表现为反竞争性抑制, 抑制常数  $K_S$  为  $4.37 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ; glu gal suc 则表现为非竞争性抑制, 抑制常数  $K_I$  分别为  $0.125$   $0.394$   $0.474 \text{ mol/dm}^3$ ; 而 fru 则表现为竞争性抑制, 抑制常数  $K_I$  为  $0.455 \text{ mol/dm}^3$ 。

**关键词:** 海洋生物; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 实验研究; 锯缘青蟹; 产物及其类似物; 抑制机理

中图分类号: Q556.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2006)02-0229-05

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase, EC 3.2.1.52) 能协同内切几丁质酶和外切几丁质酶将自然界中数量巨大的天然多聚物-几丁质降解为 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖 (简称 NAG), 该酶的降解产物在生命科学、医学、化工、农业及环境科学等方面潜在的应用价值已受到越来越广泛的关注, 特别是发现几丁质酶在生物体自溶、形态发生和营养代谢中具有一系列的重要作用<sup>[1]</sup>。目前, 人们已注意到 NAGase 的生理过程与甲壳动物生长发育过程中的周期性蜕皮是密切相关的<sup>[2]</sup>。海洋中的甲壳动物——锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 是海水养殖的优良品种, 体内的 NAGase 是其赖以生存、生长的重要酶类之一, 主要分布在青蟹内脏及壳膜。前文, 作者报道了锯缘青蟹 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 的分离纯化、理化性质的研究<sup>[3]</sup>。在此基础上, 作者进一步探讨产物及其类似物对该酶抑制作用及其作用机理, 这对于阐明 NAGase 的催化作用机理、青蟹养殖不同生长时期的食物调配等方面具有重要的指导意义。

## 1 材料与方法

锯缘青蟹 NAGase 酶制剂按文献 [3] 方法制备, 获得 PAGE 和 SDS-PAGE 为单一蛋白带的

收稿日期: 2005-05-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40576066); 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放基金资助项目 (2005101)

作者简介: 杨学敏 (1973 ~ ), 女, 硕士研究生。

通讯作者: 陈清西, 男, 教授 (博导); E-mail: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

酶制剂, 纯酶的比活力为 7 990 U /mg 对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷 (pNP-NAG)为上海医药工业研究院生化室产品; Sephadex G-100 为 Pharmacia 产品; DEAE-32 为 Whatman 产品; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖 (NAG)、蔗糖 (suc)、D-葡萄糖 (glu)、D-果糖 (fru)、D-半乳糖 (gal)和其它试剂均为国产 AR 纯, 所有溶液均以玻璃重蒸水配制。

酶活力测定方法参考文献 [4], 以 pNP-NAG 为底物, 在 2.0 cm<sup>3</sup> 的反应体系中, 含 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaAc-HAc 缓冲液 (pH 5.8), 0.25 mmol/dm<sup>3</sup> pNP-NAG, 加入 10 mm<sup>3</sup> 酶液, 在 37°C 下准确反应 10 min 加入 2.0 cm<sup>3</sup> 0.5 mol/dm<sup>3</sup> 的 NaOH 终止反应, 在 752 型 Spectrum 紫外可见分光光度计上测定波长为 405nm 的光密度值 (OD<sub>405 nm</sub>), 消光系数按 1.73 × 10<sup>4</sup> dm<sup>3</sup> / (mol · cm) 计算<sup>[5]</sup>。产物类似物对酶的抑制机理判断是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 比较酶催化的动力学参数, 包括表观米氏常数 (K<sub>m</sub>) 和最大反应速度 (v<sub>m</sub>) 的变化来分析<sup>[6]</sup>。

## 2 实验结果

### 2.1 产物及其类似物对青蟹 NAGase 活力的影响

选择产物 NAG 及其类似物: glu gal fru 和 suc 为效应物, 分别探讨它们对锯缘青蟹 NAGase 酶活力的影响。结果表明, 上述的效应物对该酶有不同程度的抑制作用, 随着抑制剂浓度的增大, 酶活力逐渐下降。酶的剩余活力与抑制剂浓度的依赖关系见图 1。测得导致酶活力下降 50% 所需的抑制剂浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为 0.011、0.135、0.553、0.748 和 0.642 mol/dm<sup>3</sup>。抑制强度依次为: NAG > glu > gal > suc > fru

### 2.2 抑制作用机理的判断

在含不同浓度效应物的测活体系中, 固定底物浓度加入不同量的天然酶液, 检查酶的活力与加入酶量的关系。图 2 为锯缘青蟹 NAGase 在含不同浓度的 NAG 的测活体系中酶的活力与加入的酶量间的关系图 (曲线 0~4 分别代表 NAG 的浓度为: 0、5、10、15 和 20 mmol/dm<sup>3</sup>)。为一组通过原点的直线, 随着 NAG 浓度的增大, 直线的斜率降低, 说明抑制作用是属于可逆。其余的效应物 (glu gal fru 和 suc) 对锯缘青蟹 NAGase 也表现可逆的抑制作用。

### 2.3 NAG 对锯缘青蟹 NAGase 的抑制类型

在含不同浓度 NAG 的测活体系中, 固定酶的浓度, 改变底物 pNP-NAG 浓度, 测定酶促反应的初速度。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图 [直线 0~4 NAG 浓度分别为: 0、5、10、15 和

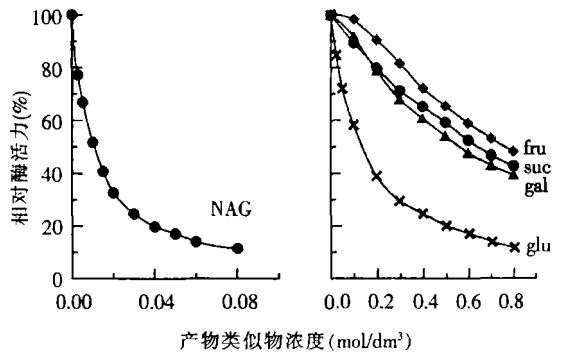


图 1 产物类似物对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响

Fig.1 Effect of product analogs on the activity of NAGase from *Scylla serrata*

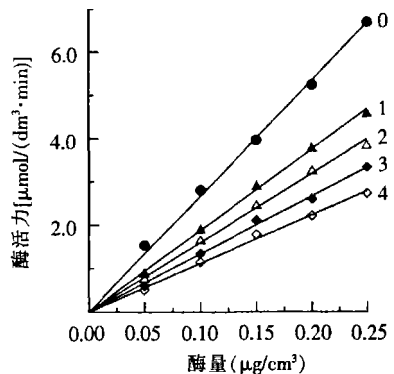


图 2 在不同 NAG 浓度下酶活力与酶量的关

Fig.2 Effect of concentrations of NAGase on its activity in presence of different concentrations of NAG

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www

20mmol/dm<sup>3</sup> (图 3)], 得到 1 组平行线。说明 NAG 对锯缘青蟹 NAGase 的抑制类型为反竞争性, 酶的表现米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速度 ( $v_m$ ) 均随着 NAG 浓度的增大而减小。NAG 只能与酶-底物络合物 (ES) 结合而不能与游离酶 (E) 结合。以不同浓度的 NAG 下测定的  $1/v_m$  对 NAG 浓度作图 (图 3 内插图), 求得 NAG 对酶-底物络合物的抑制常数 ( $K_B$ ) 为  $4.37 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>, 结果列入表 1, 以供比较。

表 1 产物及其类似物对青蟹 NAGase 的抑制效应

Tab 1 Inhibitory effects of product and its analogs on green crab NAGase

效应物	$IC_{50}$ (mol/dm <sup>3</sup> )	抑制作用	抑制类型	抑制常数 (mol/dm <sup>3</sup> )	
				$K_I$	$K_{IS}$
N-乙酰氨基葡萄糖	0.011	可逆抑制	反竞争性	-	$4.37 \times 10^{-3}$
葡萄糖	0.135	可逆抑制	非竞争性	0.125	0.125
D-半乳糖	0.553	可逆抑制	非竞争性	0.394	0.394
D-果糖	0.748	可逆抑制	竞争性	0.455	-
蔗糖	0.642	可逆抑制	非竞争性	0.474	0.474

## 2.4 glu ga 和 suc 对青蟹 NAGase 的抑制类型及抑制常数的测定

探讨 glu ga 和 suc 对锯缘青蟹 NAGase 抑制作用类型, Lineweaver-Burk 双倒数作图为一组横轴截距不变的直线, 说明它们不影响表现米氏常数 ( $K_m$ ), 只影响最大反应速度 ( $v_m$ ), 其抑制效应为非竞争性类型。图 4 为 glu 对该酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图 (直线 0~4 glu 浓度分别为: 0, 0.05, 0.1, 0.2 和 0.3 mol/dm<sup>3</sup>), 显示 glu 即可以与游离酶结合也能与酶-底物络合物结合, 其结合强度相同。抑制剂与酶的结合并不影响底物与酶的结合, 它们各自独立、互不相干, 抑制剂

不改变酶对底物的亲和力。以不同 glu 浓度下测定的酶促反应最大速度  $v_m$  之倒数对 glu 浓度作图 (图 4 内插图) 为一条直线, 从直线的斜率可以求得 glu 与游离酶及酶-底物络合物结合的抑制常数  $K_I$  与  $K_B$  ( $K_I = K_B$ )。相同的方法可以求得 ga 和 suc 的抑制常数, 结果总结于表 1。

## 2.5 fru 对锯缘青蟹 NAGase 的抑制类型

探讨 fru 对锯缘青蟹 NAGase 的抑制类型。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图得到一纵轴截距不变的直线 [直线 0~4 fru 浓度分别为: 0, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5 mol/dm<sup>3</sup> (图 5)], 说明 fru 不

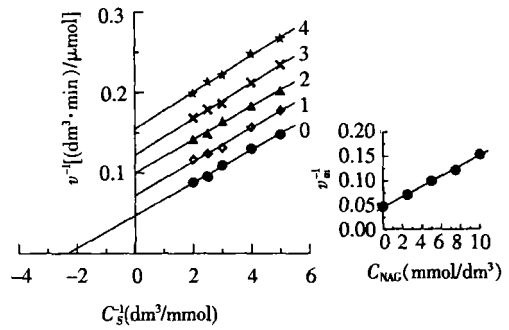


图 3 NAG 抑制锯缘青蟹 NAGase 的 Lineweaver-Burk 曲线  
Fig.3 Lineweaver-Burk plots for inhibition of NAG on the NAGase

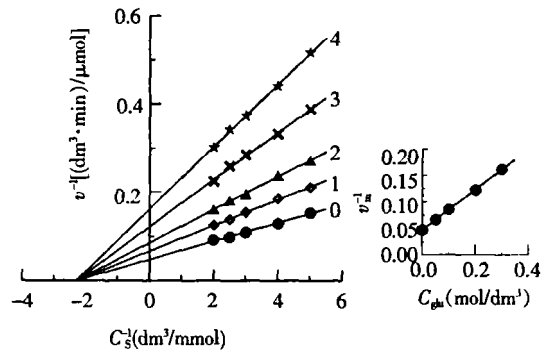


图 4 glu 抑制锯缘青蟹 NAGase 的 Lineweaver-Burk 曲线  
Fig.4 Lineweaver-Burk plots for inhibition of glucose on the NAGase activity

改变酶促反应的最大反应速度 ( $v_m$ ), 只影响米氏常数 ( $K_m$ ), 其抑制表现为竞争性类型.  $K_m$  值随着抑制剂浓度的增大而增大, 表现酶对底物的亲和力下降, 抑制剂的存在与底物竞争和酶的结合. 相反, 底物和酶的结合也阻止了抑制剂与酶的结合, 增加底物浓度可以排除抑制剂对酶的效应, 表现出酶反应的  $v_m$  不随着抑制剂浓度增大而变化. 以  $K_m$  对  $fru$  浓度作图 (图 5 内插图) 为一条直线, 求得  $fru$  与游离酶的结合的抑制常数 ( $K_i$ ). 测定结果一并列入表 1.

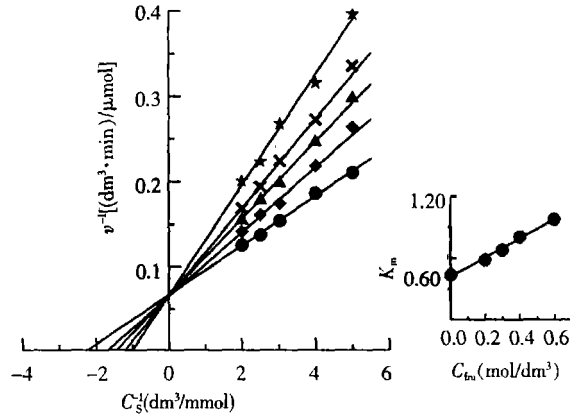


图 5 fru 对锯缘青蟹 NAGase 抑制作用的 Lineweaver-Burk 曲线  
Fig.5 Lineweaver-Burk plots for inhibition of fructose on the NAGase activity

### 3 讨论

本文研究产物 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖和它的类似物葡萄糖、半乳糖、果糖和蔗糖对青蟹 NAGase 的抑制效应. 结果表明 NAG 和 glu 对酶的抑制作用较为显著, 随着抑制剂浓度的增大, 酶活力呈指数的下降. NAG 的抑制强度是 glu 的 13 倍, 显示在葡萄糖的 2'-位的羟基被乙酰氨基取代其抑制作用加强, 说明锯缘青蟹 NAGase 对 2'-位的乙酰氨基有专一的识别作用. NAG 类似物对该酶的抑制强度较低, 当浓度达到  $0.80 mol/dm^3$  时, glu, gal, fru 和 suc 分别只使酶活力下降 88.2%、60.6%、48.8% 和 60.2%, 它们对酶的抑制作用类型研究表明, 除 fru 为竞争性外, glu, gal 和 suc 均为非竞争性的抑制作用机制. 上述的研究结果显示, 这些底物类似物对锯缘青蟹 NAGase 的效应类似于对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) NAGase 的效应<sup>[7]</sup>, 差异仅表现在抑制强度的不同, 显示不同来源的 NAGase 具有相似的催化作用机理.

葡萄糖、果糖和半乳糖的化学式都是  $C_6H_{12}O_6$ , 但结构式不同, 是同分异构物. 半乳糖是己醛糖, 是葡萄糖的非对映体, 其成环的方式与葡萄糖相同. 两者不同之处仅在于 C-4 上的构型正好相反, 故两者为 C-4 的差向异构体, 它们对酶的抑制作用均表现非竞争性. 果糖为己酮糖, 果糖成环的方式与葡萄糖不同, 它是由 C<sub>2</sub> 上的羰基 C<sub>5</sub> 上的羟基结合而成的, 它对酶的抑制作用与葡萄糖不同, 表现为竞争性. 而蔗糖是 α-D-葡萄糖和 β-D-果糖以 α-1, 2 糖苷键结合的二糖, 对酶的抑制作用表现为非竞争性, 与葡萄糖相同, 显示作用是由葡萄糖基团引起的, 但在 β-位上挂上果糖基团, 其抑制强度大大下降,  $IC_{50}$  增大约 4 倍. 因此, 各种产物类似物的抑制类型和抑制强度的差别可能是由效应物结构和组成的差异引起的.

根据本实验结果, 在锯缘青蟹养殖的不同时期应注意投料成份的配比, 特别是在锯缘青蟹蜕壳阶段要适当控制糖含量.

### 参考文献:

[1] Broadway R M, William s D L, Kah W C, et al Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 1995 20 271~ 276  
[2] Funke B and Spindler K D. Characterization of chitinase from the brine shrimp *artemia* [J]. Comp Biochem

Physiol, 1989 **94B**(4): 691~ 695

- [ 3 ] Zhang J P, Chen Q X, Wang Q, *et al*. Purification and some properties of  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*) [J]. *Biochem (Moscow)*, 2006 **71** (Sup 1): 55~ 59
- [ 4 ] Xie X L, Chen Q X, Lin J C, *et al*. Purification and some properties of  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. *Mar Biol* 2004, **146**: 143~ 148
- [ 5 ] Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z, *et al*. Kinetics of inhibition of alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*) by N-Bromosuccinimide [J]. *J Protein Chem*, 1996 **15**(4): 345~ 350
- [ 6 ] Chen Q X, Ke L N, Song K K, *et al*. Inhibitory effects of hexylresorcinol and dodecylresorcinol on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase [J]. *The Protein Journal* 2004 **23**(2): 135~ 141
- [ 7 ] 谢晓兰, 王勤, 陈清西. 产物类似物对南美白对虾 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, **43** (Sup): 24~ 27.

## Inhibitory effects of product and its analogs on N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase from green crab (*Scylla serrata*)

YANG Xuemin<sup>1,2</sup>, ZHANG Jiping<sup>3</sup>, XIE Jinjin<sup>4</sup>, YAN Ya-wen<sup>1</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering/ School of Life Sciences Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Food & Biotechnology, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China; 3. School of Life Sciences, Foshan Science and Technology College, Foshan 528231, China; 4. Department of Biology, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

**Abstract** In this paper, the inhibitory effect and mechanism of product and its analogs on the activity of NAGase from green crab (*Scylla serrata*) have been studied. The results show that NAG, glucose, galactose, fructose and sucrose can inhibit the enzyme activity for the hydrolysis of pNP-NAG and its inhibition is reversible reaction with remaining activity. Product (NAG) is most potent in the tested compounds. The inhibitor concentration leading to 50% of enzyme activity lost ( $IC_{50}$ ) was estimated to be  $0.011 \text{ mol/dm}^3$ . However, the inhibitory ability of product analogs was much weaker than that of NAG. The inhibitory type of NAG on the enzyme was found to be uncompetitive and the inhibitory constant ( $K_{IS}$ ) was determined to be  $4.37 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ . Glucose, galactose, sucrose were classified as noncompetitive inhibitors and their inhibitory constant were determined to be 0.125, 0.394 and 0.474  $\text{mol/dm}^3$ , respectively. Fructose was classified as competitive and the inhibitory constant was determined to be 0.455  $\text{mol/dm}^3$ .

**Key words** marine biology; N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase; experimental research; green crab (*Scylla serrata*); product and its analogs; inhibitory mechanism

(责任编辑: 林秀清)