

丙酮对锯缘青蟹 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力与构象的影响

杨学敏, 王勤, 谢进金, 张继平, 林建成, 陈清西*

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

摘要: 以丙酮为效应物, 研究其对锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 活力的影响, 结果表明: 该酶的剩余活力随着丙酮浓度增大而呈指数下降, 当丙酮浓度达 25%, 酶的剩余活力仅为 20%, 说明丙酮对青蟹 NAGase 有明显的失活作用. 导致酶活力丧失 50% 的丙酮浓度为 7.5%. 在较低丙酮浓度 (< 10%) 的失活是可逆的反应过程. 动力学研究表明, 该酶的失活过程属于混合型, 并进一步测定游离酶 (E) 和酶底物络合物 (ES) 与丙酮的结合常数 (K_1 和 K_{1S}), 分别为 4.06% 和 10.49%, $K_1 < K_{1S}$, 说明底物存在对酶被丙酮的失活作用有一定的保护作用. 应用荧光发射光谱研究青蟹 NAGase 经丙酮微扰后的分子构象变化情况, 结果表明: 丙酮对酶分子构象有显著的影响, 酶的内源荧光强度随丙酮浓度增大而降低, 说明酶分子中的生色基团 Trp 和 Tyr 残基的微环境发生了变化.

关键词: 锯缘青蟹; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 丙酮; 失活作用; 构象变化

中图分类号: Q356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)02-0261-03

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase, EC 3.2.1.52) 是几丁质酶的一个组成成员, 它能协同内切几丁质酶和外切几丁质酶将几丁质降解为 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖 (NAG), 在自然界的氮循环中起着极其重要的作用^[1]. 该酶广泛存在于动物、微生物和植物中, 在环境保护、医学、食品和基础生命科学研究中也具有广泛的应用价值. 近年来, 人们注意到几丁质酶与虾、蟹等甲壳动物的周期性蜕壳过程具有生理相关性^[2].

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. 近些年来, 环境污染日益严重, 一旦海洋环境受到有机溶剂、重金属离子等污染, 该酶的活力和构象必然受到影响, 从而影响到青蟹的生长与生存^[3]. 本文研究丙酮对锯缘青蟹 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力与构象的影响, 以期对海洋环境的监测与防患、人工养殖青蟹等方面提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

锯缘青蟹 NAGase 酶液为本实验室从青蟹内脏分离纯化得到, 锯缘青蟹内脏先用 0.01 mol/L Tris-

HCl 含 0.2 mol/L NaCl 缓冲液 (pH 7.5) 抽提, 硫酸铵分级分离、Sephadex G-100、DEAE-32 柱层析等生物实验技术分离纯化获得 PAGE 和 SDS-PAGE 为单一蛋白带的酶制剂, 纯酶的比活力为 7 990 U/mg; 对硝基苯酚-β-D-氨基葡萄糖苷 (pNP-NAG) 购于上海医药工业研究院; 丙酮为上海化学试剂有限公司分析纯产品; 使用的蒸馏水为玻璃重蒸水.

1.2 方法

(1) 酶活力测定: 参考文献[4]方法, 以 pNP-NAG 为底物, 在 2.0 mL, 含 0.2 mmol/L 底物的测活体系中 (pH 5.8), 加入 10 μL 酶液, 37 °C 下反应 10 min 后加入 2.0 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 终止反应, 752 型 Spectrum 分光光度计上测定波长 405 nm 的光密度值, 消光系数按 $1.73 \times 10^4 (\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1})$ 计算^[5].

(2) 丙酮对酶活力的影响: 在上述的测活体系中加入不同浓度丙酮, 测定酶的相对活力, 酶失活程度以导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 (IC_{50}) 为衡量.

(3) 酶在丙酮溶液中的失活作用机理的判断: 参考文献[6]方法在含不同浓度丙酮的测活体系中, 改变加入的酶量, 测定酶活力与酶量的关系, 加以判断.

(4) 酶失活作用类型测定: 酶在丙酮溶液中的失活作用通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 比较酶催化的动力学参数 K_m 和 V_m 的变化来判断.

(5) 酶分子构象变化的研究: 在 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液 (pH 5.8) 的 1 mL 体系中含定量的酶浓度, 加入不同浓度丙酮溶液, 于 37 °C 恒温水浴中

收稿日期: 2005-03-17

基金项目: 国家自然科学基金 (40576066) 资助

作者简介: 杨学敏 (1973-), 女, 硕士生. 现工作单位: 漳州职业技术学院.

* 通讯作者: chenx@jingxian.xmu.edu.cn

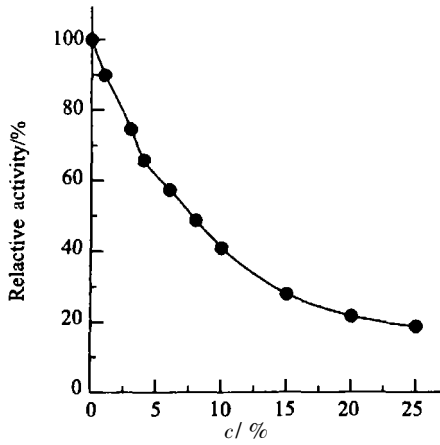


图1 丙酮对酶的失活作用

Fig. 1 Inactivation of acetone on the enzyme

保温 10 min. 以日立 F-4010 型荧光仪自动扫描记录酶的内源荧光发射光谱的变化, 测定波长范围为 300~400 nm, 激发波长为 279 nm.

2 结果

2.1 丙酮对酶活力的影响

在含 0.2 mmol/L pNP-NAG 为底物的测活体系中加入不同浓度的丙酮, 分析丙酮对锯缘青蟹 NA-Gase 活力的影响, 丙酮对酶活力影响的浓度效应结果见图 1. 可见, 随着丙酮浓度增大, 酶活力逐渐下降. 当丙酮浓度达到 25% 时, 酶活力下降 79.4%. 导致酶活力下降 50% 所需的丙酮浓度(IC_{50})为 7.5%.

2.2 丙酮对酶的失活作用表现为可逆过程

在测活体系中, 固定底物(pNP-NAG)浓度为 0.2 mmol/L, 加入不同浓度的丙酮, 改变加入酶的量, 测定酶催化反应的活力. 图 2 表示酶经丙酮作用后的剩

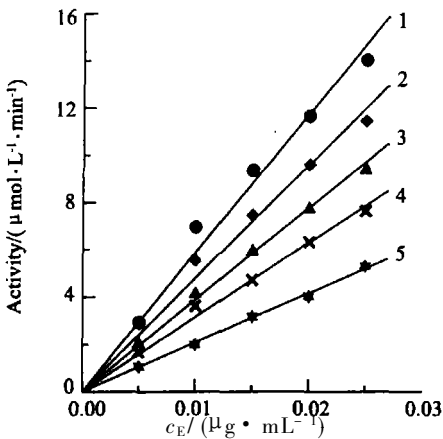


图2 丙酮对酶失活作用机理的判断. 曲线 1~ 5 的丙酮浓度分别为: 0、4%、6%、8% 和 10%

Fig. 2 Determination of the inactivation mechanism of acetone on the enzyme

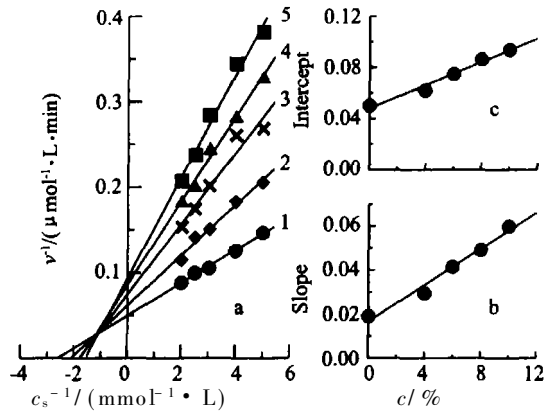


图3 丙酮对酶的失活作用类型测定. 直线 1~ 5 的丙酮浓度分别为 0、4%、6%、8% 和 10%

Fig. 3 Lineweaver-Burk polts for inactivation of acetone on NA Gase

余酶活力与加入的酶量间的关系, 酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线, 随着丙酮浓度的增大, 直线的斜率降低. 说明丙酮对酶的失活作用属于可逆过程, 丙酮是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低, 而不是通过降低有效的酶量导致活力的下降.

2.3 丙酮对酶抑制作用类型和抑制常数测定

研究丙酮对酶的失活作用类型, 在测活体系中, 固定酶的浓度, 改变底物浓度, 测定酶在含不同浓度丙酮的测活体系中的反应初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 结果(图 3)表明, 随着丙酮浓度的增加, 得到一族斜率和截距都随丙酮浓度增大而增大的直线, 各直线相交于第二象限(图 3), 说明丙酮对该酶的 K_m 值和 V_m 均产生影响, V_m 值随着丙酮浓度的增大而减小, 而 K_m 值随着丙酮的增大而增大. 说明丙酮对 NA-Gase 的失活作用表现为混合型类型, 丙酮既影响酶的催化反应又影响了酶与底物的亲和力. 分别以斜率和纵轴截距丙酮浓度作图, 求得抑制常数 K_I 和 K_{IS} 分别

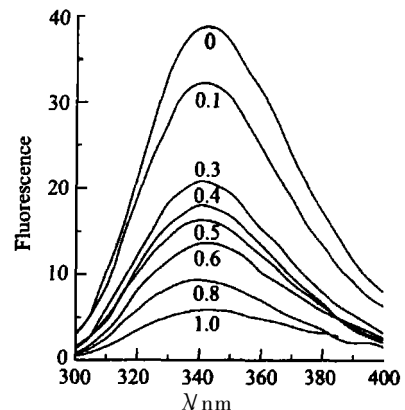


图4 酶在不同浓度(%)丙酮溶液中的荧光光谱

Fig. 4 Fluorescence emission spectra of the enzyme in different concentrations of acetone

为 4.06% 和 10.49%。 $K_1 < K_{1S}$, 说明底物存在对酶被丙酮的失活作用有一定的保护作用。

2.4 酶经丙酮作用后的荧光发射光谱的变化

测定锯缘青蟹 NAGase 在含不同浓度丙酮溶液中失活后的荧光发射光谱变化, 结果见图 4。天然酶内源荧光在 342.4 nm 处有特征的荧光发射峰, 其强度随着丙酮浓度上升而逐渐减弱, 直至完全淬灭, 但酶的荧光发射峰基本没有位移。

3 讨论

锯缘青蟹 NAGase 主要分布在内脏及壳膜, 直接参与几丁质的降解和合成, 与它的换壳直接相关。研究该酶活力的调控对人工养殖青蟹及对养殖环境监测具有科学指导意义。本文报道该酶在丙酮溶液中的酶活力和构象变化情况, 结果表明, 该酶在丙酮溶液中的失活作用是可逆过程, 7.5% 丙酮可以导致酶活力下降 50%。丙酮是极性溶剂, 主要通过减弱酶分子表面的水化层, 从而导致酶活力的下降; 也可能是由于丙酮介入到酶分子的内部, 改变了酶活性中心必需基团所处的微环境极性, 同时破坏了维持酶分子构象的疏水键, 引起肽链伸展, 导致酶空间构象发生变化, 从而降低了酶的催化活性^[7]。我们用 279 nm 波长激发得到 342.4 nm 荧光发射峰主要是由生色基团 Trp 和 Tyr 残基所贡献^[8], 丙酮微扰青蟹 NAGase 后, 荧光强度显著下降, 其原因可能是由于丙酮的介入, 改变了 Trp 和 Tyr 残基的微环境, 使内埋的残基暴露到极性环境中, 引起

了荧光的淬灭^[9]。

参考文献:

- [1] 蒋红彬, 张瀛, 蒋千里, 等. 几丁质酶的研究概况[J]. 山东科学, 2000, 13(4): 41-45.
- [2] Funke B, Spindler K D. Characterization of chitinase from the Brine Shrimp *Artemia*[J]. Comp. Biochem. Physiol., 1989, 94B(4): 691-695.
- [3] 郑文竹, 黄璜, 刘晓丹, 等. 乙醇对锯缘青蟹碱性磷酸酶活力与构象的影响[J]. 台湾海峡, 2000, 19(4): 489-493.
- [4] Xie X L, Chen Q X, Lin J C, et al. Purification and some properties of NAGase 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, Song K K, Wang Q, et al. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. J. Enzy. Inhib. Med. Chem., 2003, 18(6): 491-496.
- [7] 陈清西, 颜思旭. 果菠萝蛋白酶的分子构象与活力变化的研究[J]. 生物化学杂志, 1991, 7(3): 301-307.
- [8] 陈清西, 颜思旭. 果菠萝蛋白酶在有机溶剂微扰时的分子折叠与活力变化的研究[J]. 高等学校化学学报, 1993, 14(3): 424-427.
- [9] 陈清西, 陈素丽, 石艳, 等. 长毛对虾碱性磷酸酶性质[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1996, 35(2): 257-261.

Effect of Acetone on Activity and Conformation of NAGase from Green Crab (*Scylla serrata*)

YANG Xue-min, WANG Qin, XIE Jiu-jin,

ZHANG Ji-ping, LIN Jian-cheng, CHEN Qing-xi*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The effect of acetone on the activity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase) from green crab (*Scylla serrata*) was investigated. The results showed that the remaining activity rapidly declined with increasing the concentrations of acetone. The acetone of concentration at 7.5% could lead to 50% enzyme activity lost. The inactivation of acetone on the enzyme was reversible when the concentration was lower than 10%. The kinetics showed that the inactivation of the enzyme in acetone solution was mixed-typed. The combinatory constants of the free enzyme (K_1) and the enzyme-substrate complex (K_{1S}) were determined to be 4.06% and 10.49%, respectively. The value of K_{1S} is larger than that of K_1 , indicating a marked protective effect of the substrate on the inactivation of the enzyme. Conformational changes of the enzyme in different concentrations of acetone were measured by fluorescence spectra. The fluorescence emission peak intensity of the enzyme gradually decreased and the peak had slight red-shifted with increasing acetone concentration. The results suggested the microenvironment of tyrosine and tryptophan of enzyme has been affected.

Key words: Green crab (*Scylla serrata*); N-acetyl-β-D-glucosaminidase; acetone; inactivation; conformational changes