

锯缘青蟹 NAGase 在 DMSO 溶液中的失活动力学

张继平^{1,2}, 陈清西¹

(1 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 佛山科学技术学院生命科学学院, 广东 佛山 528231)

摘要: 以二甲亚砜 (DMSO) 为效应物, 研究其对锯缘青蟹 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 活力的影响。结果表明, 酶的剩余活力随着 DMSO 浓度增高而迅速下降, 当 DMSO 浓度达 4.0 mol/dm^3 时, 酶活力几乎完全丧失。该酶在低于 2 mol/dm^3 的 DMSO 溶液中的失活作用表现为可逆过程。导致酶活力丧失 50% 的 DMSO 浓度 (IC_{50}) 为 0.75 mol/dm^3 。应用酶失活过程的底物反应动力学方法测定了游离酶 (E) 和酶-底物络合物 (ES) 在不同浓度 DMSO 溶液中的微观失活速度常数 k_{+0} 和 k'_{+0} , k_{+0} 明显大于 k'_{+0} , 说明游离酶较酶-底物络合物对 DMSO 更为敏感, 底物对酶被 DMSO 失活有保护作用。随着 DMSO 浓度增加, 逆向微观复活速度常数 k_{-0} 不断下降, 这说明 NAGase 在高浓度 DMSO 中失活的可逆性减弱。

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; 二甲亚砜; 失活动力学

中图分类号: Q556.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2006)01-0019-06

锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 属于甲壳纲、十足目、短尾亚目、梭子蟹科。其个体大、生长快、适应性较强, 且营养丰富, 具有较高的商品价值, 是我国沿海重要的海洋经济蟹类之一。其养殖面积逐年增加, 养殖由粗放型向集约化养殖方向发展。但由于病原体的侵蚀扰乱、环境的污染 (水体中的重金属离子、有机化合物) 都将引起锯缘青蟹体内的生理生化变化, 影响其正常生理活动与物质代谢, 导致锯缘青蟹的健康程度下降, 疾病的发生日益增多^[1], 严重制约了我国养蟹业的发展。

N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.52, 简称 NAGase) 广泛存在于海洋甲壳动物中, 能将较长链的壳聚糖降解成短链或单糖。它直接参与甲壳动物生长发育中的周期性蜕皮^[2,3]。甲壳动物很多疾病都与其蜕皮生理状态发生的病理性改变有关。因此, 研究该酶对于锯缘青蟹的养殖具有重要意义。在分离纯化锯缘青蟹 NAGase 并研究酶的部分性质的基础上, 为了进一步研究水体难溶的有机污染物对该酶活力的影响, 我们有必要先探讨作为有机物良好媒介溶剂的二甲亚砜 (简称 DMSO) 对锯缘青蟹 NAGase 的影响, 并采用 Tsou (1998) 介绍的方法^[4] 研究该酶在 DMSO 溶液中的失活动力学。通过建立酶在该溶液中失活作用的动力学模型, 分析测定了游离酶 (E) 和结合酶 (ES) 的微观失活速度常数, 为进一步研究有机污染物对锯缘青蟹 NAGase 的影响提供了理论基础。

收稿日期: 2005-05-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40576066); 厦门大学科技创新工程基金资助项目 (XDKJX20043001)

作者简介: 张继平 (1972~), 男, 博士研究生。

通讯作者: 陈清西, 男, 教授 (博导); Tel/Fax 0592-2185487, E-mail chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

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

1 材料与方法

1.1 材料

对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷 (pNP-NAG) 为上海医药工业公司产品; 对硝基苯酚 (pNP)、二甲亚砜 (DMSO) 为 Sigma 公司产品. 锯缘青蟹 NAGase 酶制剂参考文献 [3] 方法制备, 获得 PAGE 和 SDS-PAGE 为单一蛋白带的酶制剂, 纯酶的比活力为 7990 U/mg 其他试剂为国产分析纯试剂, 所用试剂均用去离子水配制.

1.2 方法

1.2.1 酶促反应动力学参数 (K_m , v_m) 的测定 以 pNP-NAG 为底物, 在 2.0cm^3 0.05mol/dm^3 NaAc-HAc 缓冲体系 ($\text{pH} = 5.8$) 中, 改变底物浓度, 于 37°C 下加入 10mm^3 酶液, 在 Beckman DU-650 分光光度计上跟踪波长为 405nm 的吸光值随反应时间的变化直线, 从直线斜率计算酶促反应的初速度 v_m . 产物 (pNP) 的摩尔消光系数测定结果为 $1.77 \times 10^3\text{dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{cm})$.

1.2.2 DMSO 对酶活力的影响 在 2.0cm^3 的测活体系中 (其包含 0.2mmol/dm^3 底物和 0.05mol/dm^3 NaAc-HAc 缓冲液, $\text{pH} = 5.8$), 加入不同浓度的 DMSO, 在 37°C 恒温下, 加入 10mm^3 酶液, 准确反应 10min 后, 加入 2.0cm^3 0.5mol/dm^3 NaOH 终止反应. 在 Beckman DU-650 分光光度计上测定波长为 405nm 的吸光值, 以不加 DMSO 的为对照, 计算酶的相对活力. DMSO 对酶的失活程度以导致酶活力下降 50% 的失活剂浓度 (IC_{50}) 来衡量. 对该酶在 DMSO 溶液中失活作用机理的判断采用文献 [5] 的方法, 即在含不同浓度 DMSO 的测活体系中, 测定不同浓度的酶量与酶活力的关系图.

1.2.3 酶失活动力学分析 参考文献 [6, 7], 采用酶在失活过程中的底物反应动力学方法来分析测定该酶在 DMSO 溶液中的失活动力学.

2 实验结果

2.1 NAGase 水解 pNP-NAG 动力学参数的测定

在测活体系中, 改变底物浓度, 于 37°C 下加入 10mm^3 酶液, 在 Beckman DU-650 分光光度计上跟踪波长为 405nm 的吸光值随反应时间的增长直线, 从直线斜率计算出酶促反应的初速度 (v_0). 用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 可求得该酶催化 pNP-NAG 水解的米氏常数 (K_m) 值为 $0.394 \pm 0.012\text{mmol/dm}^3$, 最大反应速度 (v_m) 值为 $13.58 \pm 0.32\text{ }\mu\text{mol}/(\text{dm}^3 \cdot \text{min})$, 见图 1

2.2 DMSO 对酶活力的影响

以 DMSO 为效应物, 在测活体系中加入不同浓度 DMSO, 研究其对锯缘青蟹 NAGase

活力的影响, 结果见图 2 随着 DMSO 浓度增高, 酶活力迅速下降, 导致酶活力下降一半所需的

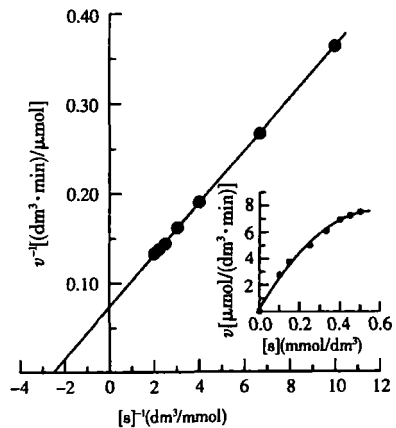


图 1 锯缘青蟹 NAGase 水解 pNP-NAG 的双倒数图

Fig.1 Lineweaver-Burk plot of NAGase for the hydrolysis of pNP-NAG

内插图为 v 对 $[S]$ 双曲线图, 酶终浓度为 $0.2\mu\text{g}/\text{cm}^3$

DM SO 浓度 (IC_{50}) 为 0.75 mol/dm^3 . 当 DM SO 浓度达到 4.0 mol/dm^3 时, 酶活力丧失 97%, 说明高浓度 DM SO 对锯缘青蟹 NAGase 有明显的失活作用.

2.3 酶在 DMSO 溶液中的失活作用表现为可逆过程

在测活体系中, 固定 pNP-NAG 浓度为 0.2 mol/dm^3 , 加入不同浓度的 DM SO, 改变加入的酶量, 测定酶催化反应的活力. 以剩余酶活力对加入酶的浓度作图 (图 3 直线 1~ 5 的 DM SO 浓度分别为: $0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 \text{ mol/dm}^3$, 底物浓度为 0.4 mmol/dm^3), 结果得到一组通过原点的直线, 随着 DM SO 浓度增高, 直线的斜率逐渐降低. 这说明酶在 DM SO 溶液中的失活作用是可逆的反应, 因为不可逆的作用将会导致有效酶量下降而产生一组平行线.

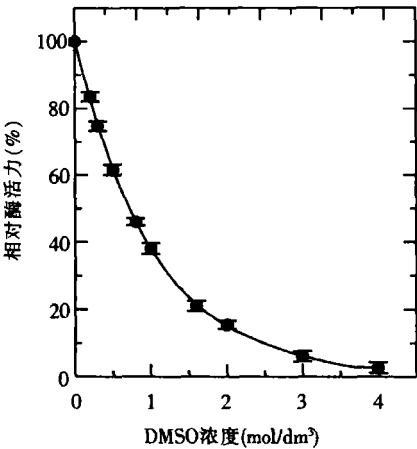


图 2 DMSO 对酶的失活作用

Fig.2 Inactivation of DMSO on the enzyme
底物(pNP-NAG)浓度为 0.25 mmol/dm^3

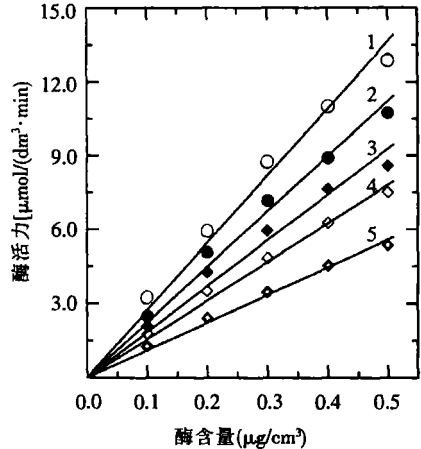


图 3 酶在 DMSO 溶液中的剩余活力与其浓度的关系

Fig.3 Relationship of activity with the concentration
of the enzyme in DMSO solution

2.4 酶在不同浓度 DMSO 溶液中的失活动力学过程

酶在含不同浓度 DM SO 的测活体系中, 监测产物的形成量与反应时间的关系. 图 4a 显示酶催化 0.4 mmol/dm^3 pNP-NAG 水解反应的动力学过程. 在各种 DM SO 浓度下, 产物形成的速率随着反应时间的延长而逐渐下降直到一条稳定斜率的直线. 这说明在各种 DM SO 浓度下, 酶还保留一定的剩余活力. 该直线的斜率随着 DM SO 浓度的增大而下降, 进一步显示该酶在低浓度 DM SO 溶液中的失活作用是一种可逆过程. 以 $\ln([p]_{\text{calc}} - [p]_t)$ 对时间 (t) 作图为直线 (图 4b), 从直线斜率可以求出表观失活速度常数. 图 4 中 OD 为光密度值, $[p]_t$ 为时刻产物形成量的实测值, $[p]_{\text{calc}}$ 为 t 时刻产物形成量的计算值.

2.5 酶在 DMSO 溶液中的失活微观速度常数的测定

在含不同浓度 DM SO 的测活体系中, 分别测定酶催化不同浓度底物反应的动力学. 图 5a 为酶在含 0.4 mol/dm^3 DM SO 测活体系中催化不同底物浓度水解的动力学曲线. 根据文献 [6-7] 方法, 以 $\ln([p]_{\text{calc}} - [p]_t)$ 对 t 作图为一组直线 (图 5b), 从直线的斜率可以求得表观失活速度常数 A . 以 $[p]_{\text{calc}}$ 对反应时间 t 作图为一组直线, 从直线的斜率求得失活逆反应的速度常数 k_{-o} 值, 结果列于表 1. 以 A/v 对 $1/[s]$ 作图为一组直线 (图 5c). 从直线的斜率和截距分别可以求得游离酶的正向微观失活速度常数 k_{+o} 及结合酶的失活速度常数, 其测定结果也列于

表 1. 酶在其他浓度的 DMSO 溶液中的微观失活速度常数也可以同样的方法求得, 结果均列于表 1.

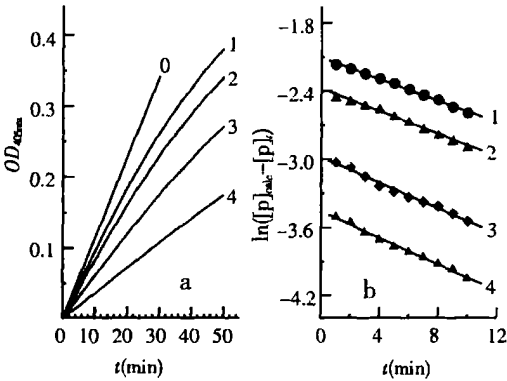


图 4 酶在 DMSO 溶液中的失活作用动力学

Fig.4 Kinetics of the enzyme inactivated by DMSO
线 0~4 的 DMSO 浓度分别为:0,0.2,0.4,0.8,1.6 mol/dm³

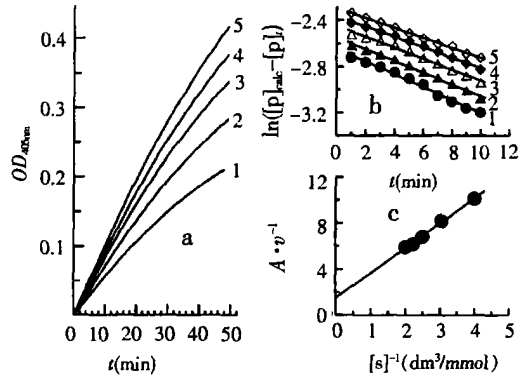


图 5 酶的微观失活速度常数的测定结果

Fig.5 Determination of the inactivation rate constants
线 1~5 的[s]⁻¹分别为:0.25,0.33,0.40,0.45,0.50 mmol/dm³

表 1 锯缘青蟹 NAGase 在 DMSO 溶液中的失活速度常数

Tab 1 Inactivation rate constants of green crab NAGase in DM SO solution

DM SO 浓度 (mol/dm ³)	失活速度常数 (10 ⁻³ min ⁻¹)			剩余酶活力 (%)
	k ₊₀	k ₋₀	k' ₊₀	
0	0	0	0	100.0
0.2	21.77	2.127	6.278	83.6 ± 0.2
0.4	66.88	2.012	7.830	68.1 ± 0.1
0.8	72.51	1.732	9.100	46.2 ± 0.3
1.6	77.60	0.907	21.63	21.1 ± 0.2

3 讨论

DM SO 作为一种公认的有机物与水的媒介溶剂, 在医药、农业、化妆品等研究与生产中得到了广泛的应用^[8]. 在酶学研究中, DM SO 本身作为一种有机物, 在低浓度时通常对酶的影响很小, 如蘑菇酪氨酸酶在 0.70mol/dm³ 的 DM SO 溶液中活力仍可以保持在 93% 以上^[7]. 本文的研究结果表明, 锯缘青蟹 NAGase 在 0.1 mol/dm³ DMSO 的溶液中, 剩余活力可保持在 92%; DM SO 浓度达到 0.2 mol/dm³ 时, 酶的剩余活力只保持在 83.5%; 随着 DMSO 浓度的进一步增高, 酶的剩余活力进一步下降. 这说明锯缘青蟹 NAGase 比蘑菇酪氨酸酶对 DM SO 更加敏感. 因此, 在研究有机物对锯缘青蟹 NAGase 的影响时, 如要采用 DMSO 作溶剂, 溶剂的浓度应控制在 0.1 mol/dm³ 以下比较适宜. Tsou (1998) 的不可逆动力学方法^[4] 已被拓展来研究酶的可逆抑制作用和失活作用. 例如, 在锯缘青蟹碱性磷酸酶^[9]、福寿螺 (*Ampullarium crossean*) N-乙酰氨基葡萄糖苷酶^[7] 等的盐酸胍失活动力学, 以及在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) NAGase 在二氧六环中的失活动力学研究^[10] 中, 均获得满意的实验结果. 在本文中, 我们建立了锯缘青蟹 NAGase 在 DM SO 溶液中的失活作用的动力学模型. 酶在 DM SO 溶液中的失活作用动力学显示游离酶的正向微观失活速度常数是酶-底物络合物的失活速度常数的 3~8 倍, 表明

游离酶比结合酶更容易失活。此外, 正向反应的微观失活速度常数随着 DMSO 浓度的增高而增大, 说明其变性越来越快; 逆向反应的微观速度常数相反地随着 DM SO 浓度的增高越来越小, 表明酶复活的能力越来越低。该研究结果表明 T_{sou}(1998)提出的底物反应过程中测定酶的不可逆失活作用动力学方法^[4], 也同样适合于研究其可逆失活作用。

参考文献:

- [1] 徐海圣, 舒妙安, 邵庆均, 等. 锯缘青蟹常见病害及其防治技术 [J]. 水产科学, 2000, **19**(5): 24~ 26
- [2] Funke B, Spindler K D. Characterization of chitinase from the brine shrimp *artemia* [J]. *Comp Biochem Physiol* 1989, **94B**(4): 691~ 695
- [3] Kono M, Matsui T, Shimizu C, *et al*. Purifications and some properties of chitinase from the liver of a prawn (*Penaeus japonicus*) [J]. *Agric Biol Chem*, 1990, **54**(8): 2145~ 2147
- [4] Tsou C L. Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity [J]. *Adv Enzymol Related Areas Mol Biol*, 1988, **61**: 381~ 436
- [5] Chen Q X, Song K K, Wang Q, *et al*. Inhibitory effects of mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes [J]. *J Enzy Inhb Med Chem*, 2003, **18**(6): 491~ 496
- [6] Chen Q X, Liu X D, Huang H. Inactivation kinetics of mushroom tyrosinase in the dimethylsulfoxide solution [J]. *Biochem (Moscow)*, 2003, **68**(6): 644~ 649
- [7] Chen Q X, Zhang Z, Huang H, *et al*. Unfolding and inactivation of an pullarium cossean β -glucosidase during denaturation by guanidine hydrochloride [J]. *Int J Bioche Cell Bio* 2003, **35**: 1227~ 1233
- [8] 陈秀仁, 张怀有, 田锡义. 二甲亚砷的性质及应用 [J]. 辽宁化工, 2000, **29**(1): 31~ 35
- [9] Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z, *et al*. Comparison of inactivation and unfolding of green crab alkaline phosphatase during denaturation by guanidinium chloride [J]. *J Protein Chem*, 1996, **15**(4): 359~ 365
- [10] Xie X L, Chen Q X. Inactivation kinetics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) in the dioxane solution [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, **69**(12): 1365~ 1371

Inactivation kinetics of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Scylla serrata* by dimethylsulfoxide

ZHANG Jiping^{1, 2}, CHEN Qingxi¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. School of Life Sciences, Foshan Science and Technology College, Foshan 528231, China)

Abstract The effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) from green crab (*Scylla serrata*) has been investigated. The results show that DMSO can inactivate the enzyme activity, and the inactivator's concentration leading to 50% of enzyme activity lost (IC_{50}) is estimated to be 0.75 mol/dm^3 . The inactivation of enzyme by DMSO is a reversible reaction with remaining enzyme activity. Inactivation kinetics of the enzyme in DMSO solutions is studied

using the Tsou's method of the substrate reaction, and the microscopic rate constants for the free enzyme and the enzyme-substrate complex are determined and compared. The results show that k_{+0} is much larger than k'_{+0} , indicating a marked protective effect of the substrate on the inactivation reaction of this enzyme by DM SO. Moreover, the value of forward inactivation rate constants of the enzyme (k_{+0} and k'_{+0}) increased with increasing DM SO concentration while the value of reverse reaction (k_{-0}) decreased. The results suggest that the inactivation of enzyme in higher concentration of DM SO would be much difficultly reversible.

Key words marine organism; N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase); experimental research; *Scylla serrata*; dimethylsulfoxide; inactivation kinetics

(责任编辑:郭水伙)