

# 锯缘青蟹 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶在甲醛溶液中的失活动力学研究

谢进金, 张继平, 王勤, 杨学敏, 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:** 研究甲醛对锯缘青蟹 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAGase EC 3.2.1.52)活力的影响, 结果表明: 随着甲醛浓度的增大, 酶活力呈指数下降, 导致酶活力下降 50% 的甲醛浓度(失活半衰期,  $IC_{50}$ ) 为 0.60 mol/L. 酶在低浓度甲醛溶液中的失活过程显示为可逆失活. 用底物反应动力学方法考察酶在甲醛溶液中的失活动力学, 测定游离酶(E)和酶-底物络合物(ES)在甲醛溶液中失活的微观速度常数, 并比较游离酶(E)和酶-底物络合物(ES)的正向反应的微观失活速度常数  $k_{+0} > k'_{+0}$ , 表明底物对酶被甲醛的失活作用有一定的保护作用. 正向的失活速度常数  $k_{+0}$  和  $k'_{+0}$  随着甲醛浓度的增大而增大, 而逆向的速度常数  $k_{-0}$  随着甲醛浓度的增大而减小, 表明随着甲醛浓度的增大, 酶变性越来越快, 而活力恢复越来越难.

**关键词:** 锯缘青蟹; N-乙酰氨基葡萄糖苷酶; 甲醛; 失活动力学

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)01-0098-04

锯缘青蟹(*Scylla serrata*)是我国沿海重要的海洋经济蟹之一. 由于病原体的侵蚀和养殖环境的污染, 如水体中的重离子、有机化合物、酸碱度的改变等都将引起青蟹体内生理生化的变化, 影响其正常的代谢, 导致青蟹的疾病日益严重<sup>[1]</sup>, 严重制约了青蟹养殖业的发展. N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.52, 简称 NAGase)与甲壳动物生长发育过程中的周期性蜕皮有密切相关<sup>[2]</sup>, 研究该酶对青蟹的养殖具有重要意义. 我们已对该酶的分离纯化、理化性质的研究作了报道. 在此基础上, 我们采用 Tsou<sup>[3]</sup>方法研究该酶在甲醛溶液中的失活动力学, 通过建立酶在甲醛溶液中的失活作用的动力学模型, 测定游离酶(E)和结合酶(ES)的微观失活速度常数, 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一定的科学指导意义.

## 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, 比活力为 7 990 U/mg; 对硝基苯酚- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷(pNP-NAG)购于上海医药工业研究院; 甲醛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: 以 pNP-NAG 为底物, 在 2.0 mL 的反应体系中, 含 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液 (pH 5.8), 0.4 mmol/L pNP-NAG, 10  $\mu$ L 酶液, 混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 10 min 后加入 2.0 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 终止反应, 于 Beckman UV-650 型分光光度计上测定波长为 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<sup>[4]</sup>.

(2) 甲醛对酶活力的影响: 在上述测活体系中加入不同浓度的甲醛, 测定酶的相对活力, 酶的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) 酶在甲醛溶液中的失活作用机理的判断: 参考文献[5]方法在含不同浓度甲醛的测活体系中, 改变加入的酶量, 测定酶活力与酶量的关系, 加以判断.

(4) 酶失活动力学: 采用 Chen 等<sup>[4]</sup>建立的酶在失活过程中的底物反应动力学方法来分析测定酶在甲醛溶液中失活动力学的微观速度常数.

## 2 结果

### 2.1 酶催化 pNP-NAG 水解的动力学参数

在 0.1 mol/L pH 5.8 的 NaAc-HAc 缓冲体系中, 于 37 $^{\circ}$ C 下, 改变底物 pNP-NAG 的浓度, 测定酶促反应的初速度. 用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 求得该酶催化 pNP-NAG 水解的米氏常数  $K_m$  为 0.426 mmol/L,  $V_m$  为 16.31 mmol/L/min (图 1).

收稿日期: 2005-02-24

基金项目: 国家自然科学基金(40576066)资助

作者简介: 谢进金(1965-), 男, 副教授, 访问学者. 现在泉州师范学院生物学系工作.

\* 通讯作者: chenx@jingxian.xmu.edu.cn

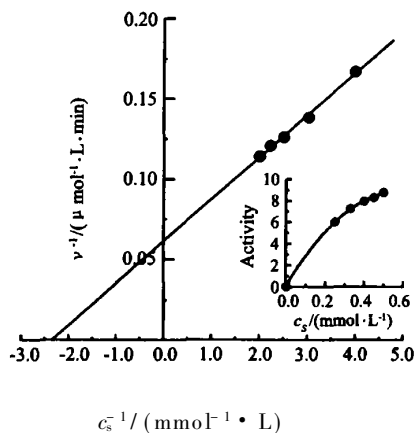


图 1 酶的动力学参数测定

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

## 2.2 甲醛对酶活力的影响

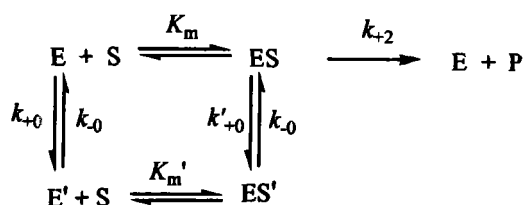
在含 0.4 mmol/L pNP-NAG 为底物的测活体系中加入不同浓度的甲醛, 检测酶的剩余活力, 分析甲醛对酶活力的影响, 结果如图 2, 表明随着甲醛浓度的增大, 酶活力呈指数下降, 测定导致酶活力下降 50% 的甲醛浓度 (失活半衰期  $IC_{50}$ ) 为 0.6 mol/L.

## 2.3 酶在甲醛溶液中的失活作用

在含 0.4 mmol/L pNP-NAG 和不同浓度甲醛的测活体系中, 改变酶量, 测定酶催化反应的活力. 图 3 表示酶的剩余活力与酶量的关系, 酶活力对酶量作图得到一组通过原点的直线, 随着甲醛浓度的增大, 直线的斜率降低. 说明低浓度甲醛对酶的失活作用是可逆过程, 甲醛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.

## 2.4 酶在不同浓度甲醛溶液中的失活动力学

监测酶在含不同浓度甲醛的测活体系中产物的形成量与反应时间的关系. 图 4 显示酶催化 0.4 mmol/L 底物 pNP-NAG 水解反应的动力学过程. 在不同浓度甲醛下, 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. 说明在不同浓度甲醛下, 酶还保留一定的剩余活力. 该直线的斜率随着甲醛浓度的增大而下降, 显示酶在甲醛溶液中的失活作用是一种可逆过程<sup>[5]</sup>. 其动力学模型为:



式中 E、ES 分别代表游离酶和酶-底物络合物, E' 和 ES' 代表这两种形式的失活酶. 由于测活的底物浓度

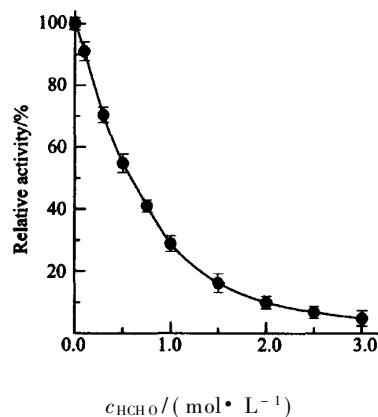


图 2 甲醛对酶的失活作用

Fig. 2 Inactivation of formaldehyde on the enzyme

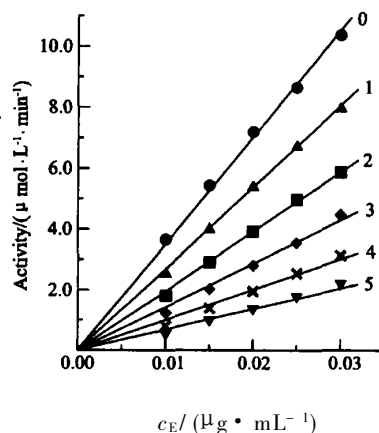


图 3 甲醛对酶失活作用机理的判断

直线 0~5 的甲醛浓度分别为: 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mol/L

Fig. 3 Determination of the inhibition mechanism of formaldehyde on the enzyme

和变性剂 (甲醛) 浓度均远大于酶浓度, 推导出酶在甲醛溶液中的产物形成的动力学方程可以表示为:

$$[P]_t = \frac{vk_{-0}}{A} \cdot t + \frac{v}{A^2}(A - k_{-0})(1 - e^{-At}) \quad (1)$$

$$A = \frac{k_{+0} \cdot K_m + k_{+0}[S]}{K_m + [S]} + k_{-0} \quad (2)$$

式中  $[P]_t$  为时间  $t$  的产物形成量,  $A$  为表观失活速度常数,  $v$  为酶在不含甲醛的测活体系中的反应初速度. 当反应时间足够大时, 产物的形成量与时间成直线关系, 其直线方程可以表示为:

$$[P]_{\text{cak}} = \frac{vk_{-0}}{A} \cdot t + \frac{v}{A^2}(A - k_{-0}) \quad (3)$$

根据方程式 (1) 和 (3), 可以得到:

$$[P]_{\text{cak}} - [P]_t = \frac{v}{A^2}(A - k_{-0}) \cdot e^{-At} \quad (4)$$

$$\ln([P]_{\text{cak}} - [P]_t) = -A \cdot t + \ln[v(A - k_{-0})/A^2] \quad (5)$$

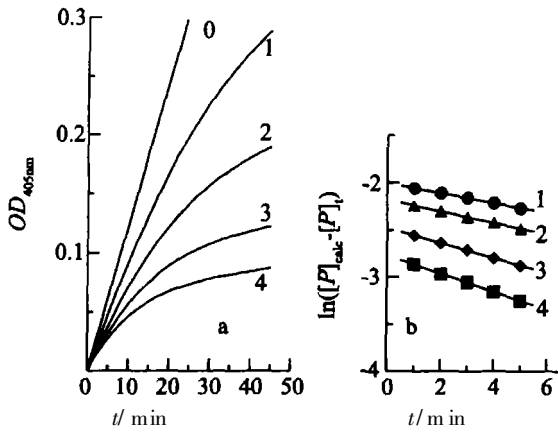


图 4 酶在不同浓度甲醛中的失活作用动力学  
 线 0~4 的甲醛浓度分别为: 0、0.2、0.4、0.6 和 0.8 mol/L. a. 动力学过程; b. 半对数作图  
 Fig. 4 Course of inactivation of enzyme in different concentrations of formaldehyde

以  $\ln([P]_{calc} - [P]_t)$  对时间( $t$ ) 作图为直线, 从直线斜率可以求表观速度常数( $A$ ). 在求得( $A$ ) 后, 以  $[P]_{calc}$  对反应时间( $t$ ) 作图(方程 3), 从直线的斜率可以求得微观逆反应速度常数  $k_{-0}$ .

结合方程(2) 和米氏方程, 可以得到:

$$\frac{A}{v} = \frac{K_m}{V_m}(k_{+0} + k_{-0}) \frac{1}{[S]} + \frac{k_{+0} + k_{-0}}{V_m} \quad (6)$$

由于  $K_m$ 、 $V_m$  和  $k_{-0}$  是已知的数, 根据方程(6), 以  $A/v$  对  $1/[S]$  作图为一组直线, 分别从直线的斜率和截距可以求得正向失活速度常数( $k_{+0}$  和  $k'_{+0}$ ).

### 2.5 甲醛对酶的失活微观速度常数测定

分别测定酶在含不同浓度甲醛的测活体系中催化不同浓度底物反应的组动力学. 图 5 为 0.4 mol/L 甲醛浓度下的测定结果. 以  $\ln([P]_{calc} - [P]_t)$  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  $A$ . 根据方程(3), 以  $[P]_{calc}$  对反应时间  $t$  作图为一组直线, 由于在每个底物浓度下的表观失活速度常数  $A$  和对应的初速度  $v$  为已测定的已知数, 因此可以

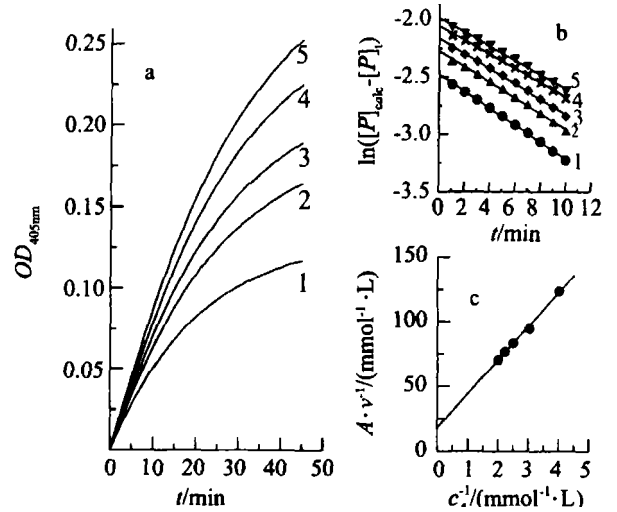


图 5 0.4 mol/L 甲醛对酶的失活速度常数测定  
 线 1~5 的底物浓度分别为: 0.25、0.33、0.40、0.45 和 0.50 mmol/L. a. 底物反应动力学过程; b. 半对数作图; c.  $A/v$  对  $1/[S]$  作图  
 Fig. 5 Determination of the rate constants of the enzyme inactivated by 0.4 mol/L formaldehyde

方便地求出酶在 0.4 mol/L 甲醛溶液中的失活逆反应的速度常数  $k_{-0}$  值, 在不同底物浓度下的酶被甲醛失活的逆反应速度常数基本相同, 其值为  $0.136 \pm 0.015 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ . 结果列于表 1. 根据方程式(6), 以  $A/v$  对  $1/[S]$  作图为一组直线(图 5c). 由于  $K_m$ 、 $V_m$  及  $k_{-0}$  为已知数, 因此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  $k_{+0}$  及结合酶的失活速度常数  $k'_{+0}$ , 酶在其它浓度的甲醛溶液中的微观失活速度常数用同样的方法也可以求得, 结果均列于表 1.

### 3 讨论

在青蟹中, NAGase 主要分布在其内脏及壳膜, 能催化几丁质的降解和合成, 在青蟹生长发育过程中旧壳的蜕换及新壳的形成起着重要作用. 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

表 1 青蟹 NAGase 在甲醛溶液中的失活速度常数

Tab. 1 The inactivation rate constants of green crab NAGase in formaldehyde solution

甲醛浓度 / (mol · L <sup>-1</sup> )	失活速度常数 / (10 <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )			相对活力 / %
	$k_{+0}$	$k_{-0}$	$k'_{+0}$	
0				100.0
0.2	1.086 ± 0.020	0.229 ± 0.010	0.209 ± 0.015	81.5 ± 1.5
0.4	1.535 ± 0.025	0.136 ± 0.015	0.349 ± 0.010	60.8 ± 1.0
0.6	1.613 ± 0.022	0.078 ± 0.005	0.633 ± 0.010	49.5 ± 0.9
0.8	2.249 ± 0.025	0.054 ± 0.008	0.901 ± 0.013	38.5 ± 0.6
1.0				28.8 ± 0.5

导意义. 本文报道该酶在甲醛溶液中的失活作用动力学, 比较游离酶和酶-底物络合物在甲醛溶液中的失活速度常数. 从表 1 可以看出, 在相同浓度的甲醛溶液中, 游离酶的正向微观失活速度常数 ( $k_{+0}$ ) 是酶底物络合物的失活速度常数 ( $k'_{+0}$ ) 的 3~5 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  $k_{+0}$  随着甲醛浓度的增大而增大, 说明其变性越来越快, 逆向反应的微观速度常数  $k_{-0}$  相反地随着甲醛浓度的增大而下降, 表明酶复活的过程越来越慢. 有关该酶构象与活力变化的关系还值得进一步深入的研究, 以阐明其结构与功能之间的关系及作用的机理. 从本文结果看, 青蟹 NAGase 在甲醛溶液中的失活作用机理与对虾 NAGase 在二氧六环溶液中的失活作用机理<sup>[6]</sup> 及福寿螺  $\beta$ -葡萄糖苷酶在盐酸胍溶液中的失活动力学<sup>[7]</sup> 具有相同的动力学模型, 该研究结果进一步补充 Tsou<sup>[3]</sup> 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也同样适合于研究可逆失活作用.

#### 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] Tsou C L. Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity [J]. *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.*, 1988, 61: 381-436.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Xie X L, Chen Q X. Inactivation kinetics of  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) in the dioxane solution [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, 69(12): 1365-1371.
- [7] Chen Q X, Zhang Z, Huang H, et al. Unfolding and inactivation of *Ampullarium crossean*  $\beta$ -glucosidase during denaturation by guanidinium hydrochloride [J]. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003, 35: 1227-1233.

## Inactivation Kinetics of NAGase from Green Crab (*Scylla serrata*) by Formaldehyde

XIE Jin-jin, ZHANG Ji-ping, WANG Qin, YANG Xue-min,

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 formaldehyde on N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase) from green crab (*Scylla serrata*) was investigated. The results showed that formaldehyde could inactivate the enzyme activity with  $IC_{50}$  of 0.6 mol/L. The inactivation of enzyme by formaldehyde is a reversible reaction with remaining enzyme activity. Inactivation kinetics of the enzyme in formaldehyde solutions was studied using the Tsou's method of the substrate reaction, and the microscopic rate constants of inactivation for the free enzyme and the enzyme-substrate complex were determined. Comparison of these rate constants was made, the result showed that  $k_{+0}$  was larger than  $k'_{+0}$ , indicating a marked protective effect of the substrate on the inactivation reaction of this enzyme with formaldehyde. Moreover, the value of forward inactivation rate constant of the enzyme ( $k_{+0}$  and  $k'_{+0}$ ) increased with increasing formaldehyde concentration while the value of reverse reaction ( $k_{-0}$ ) decreased. The results suggested the inactivation of enzyme in higher concentration of formaldehyde would be more difficultly reversible.

**Key words:** Green crab (*Scylla serrata*); N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase; formaldehyde; inactivation kinetics