

金属离子对锯缘青蟹 NAGase活力的影响

杨学敏^{1,2}, 谢进金^{1,3}, 张继平^{1,4}, 林建成¹, 陈清西¹

(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 泉州师范学院生物系, 福建 泉州 362000;

4 广东佛山科学技术学院生命科学学院, 广东 佛山 528231)

摘要: 本文研究了几种金属离子对锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 活力的影响。其结果表明: Li^+ 、 Na^+ 和 K^+ 对酶活力没有明显影响, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对该酶均有激活作用, 激活程度依次为 $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ 。 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 对该酶具有一定的抑制作用, $2.0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ 的 Hg^{2+} 可以使酶活力完全丧失。 Co^{2+} 对酶的效应是先激活后抑制, Mn^{2+} 对酶仅有轻微的激活作用。 Cd^{2+} 和 Fe^{3+} 对锯缘青蟹 NAGase 的抑制作用都呈竞争性-反竞争性混合型效应, Cd^{2+} 的抑制常数 K_I 和 K_{IS} 分别为 23.9 和 $5.0 \text{ mmol}/\text{dm}^3$, Fe^{3+} 的抑制常数 K_I 和 K_{IS} 分别为 395.5 和 $135.6 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ 。 $K_I > K_{IS}$, 说明酶-底物络合物 (ES) 与抑制剂的亲和力比游离酶 (E) 与抑制剂的亲和力大。

关键词: 海洋生物; N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶; 锯缘青蟹; 酶活力; 金属离子; 抑制机理

中图分类号: Q556.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2006)03-0343-05

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 (水体中的金属离子、有机化合物含量严重超标) 都将引起锯缘青蟹个体的生理生化变化, 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。这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^[1]。甲壳动物的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, 研究金属离子对该酶活力的影响对锯缘青蟹的养殖具有重要意义。我们在分离纯化锯缘青蟹 NAGase 并研究酶的部分性质的基础上^[2], 为了探讨 NAGase 活力受养殖环境污染影响的机理, 我们系统地研究金属离子对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响。这对于探讨养殖环境与锯缘青蟹生长发育过程的相关性具有重要的科学和实践意义。

收稿日期: 2005-07-08

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

锯缘青蟹 NAGase 酶制剂按前文方法^[2] 制备, 获得的 PAGE 和 SDS-PAGE 为单一蛋白带的酶制剂, 纯酶的比活力为 7 990U/mg 对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷 (pNP-NAG) 为上海医药工业公司产品; 各种金属的无机盐及其余试剂均为国产分析纯试剂, 所有溶液均以玻璃重蒸水配制.

1.2 方法

酶活力测定方法参考文献 [3] 并略为修改. 以 pNP-NAG 为底物, 在 2.0cm³ 测活体系中含 0.05 mol/dm³ NaAc-HAc 缓冲液 (pH = 5.8), 0.25mmol/dm³ pNP-NAG. 在 37℃ 恒温下, 加入 10mm³ 酶液, 准确反应 10min 后, 加入 2.0cm³ 0.5mol/dm³ 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. 在该缓冲体系中, 产物 (pNP) 的摩尔消光系数测定结果为 1.77 × 10³ dm³ / (mol · cm). 金属离子对酶活力的影响实验是在上述测活体系中, 加入不同浓度的金属无机盐, 以不加金属离子为对照, 测定酶的相对活力. 抑制作用类型测定是通过 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_m) 和最大反应速度 (v_m) 的变化来分析^[4].

2 结果

2.1 碱金属离子对酶活力的影响

选用 LiSO₄、NaNO₃、NaCl、Na₂SO₄、Na₂SO₃、KNO₃ 等无机盐为效应物, 检测它们对酶活力的影响. 结果表明, 当效应物浓度在 0.1~50.0mmol/dm³ 范围内, 测得酶活力保持不变. 这说明 Li⁺、Na⁺ 和 K⁺ 等碱金属离子及 SO₄²⁻、SO₃²⁻、Cl⁻ 和 NO₃⁻ 等酸根离子对 NAGase 催化水解反应的活力没有明显影响.

2.2 碱土金属离子对酶活力的影响

分别以 MgCl₂、Ca(NO₃)₂ 和 BaCl₂ 为效应物, 在 0~1.0mmol/dm³ 浓度下测定了这 3 种正二价碱土金属离子对酶活力的影响. 其结果 (图 1a) 表明: 这 3 种碱土金属离子对该酶都有激活作用, 激活程度依次为 Ca²⁺ > Ba²⁺ > Mg²⁺; 当其浓度达到 1.0mmol/dm³ 时, 分别使该酶活力提高 29.5%、27.0% 和 22.1%.

2.3 过渡金属离子对酶活力的影响

分别以 CoCl₂ 和 MnCl₂ 为效应物, 研究过渡金属离子 Co²⁺ 和 Mn²⁺ 对酶活力的影响. 结果 (图 1b) 表明, Co²⁺ 对酶的效应是先激活后抑制, 当 Co²⁺ 浓度达到 1.0mmol/dm³ 时, 激活作用达最大, 可使酶活力提高 22.3%; 随着 Co²⁺ 浓度增高, 酶

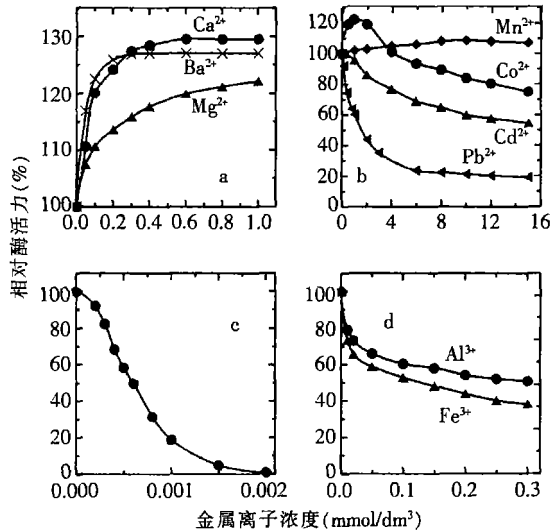


图 1 金属离子对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响
Fig.1 Effects of metal ions on the activity of NAGase from *Scylla serrata*

活力逐渐下降, 15mmol/dm^3 的 Co^{2+} 可使酶活力下降 25%。 Mn^{2+} 对酶有轻微的激活作用, 当其浓度达到 15mmol/dm^3 时, 仅使酶活力提高 8%。

2.4 正三价金属离子对酶活力的影响

以 AlCl_3 、 FeCl_3 为效应物, 在 $0\sim 300\mu\text{mol/dm}^3$ 浓度范围内检测正三价金属离子 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 对酶活力的影响。结果(图 1d)表明: Al^{3+} 、 Fe^{3+} 对该酶活力均有一定的抑制作用, 在较低浓度下, 对酶的抑制强度较大, 酶活力随着抑制剂浓度的增高而下降较显著; 当抑制剂浓度较高时, 这种下降的趋势变得较缓慢。当效应物浓度达到 $300\mu\text{mol/dm}^3$ 时, Al^{3+} 和 Fe^{3+} 分别使该酶活力下降 49.3% 和 61.9%。

2.5 重金属离子对酶活力的影响

选择 CdCl_2 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 和 HgCl_2 为效应物, 研究重金属离子 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 对锯缘青蟹 NAGase 的影响。结果(图 1c)表明, Hg^{2+} 对该酶有强烈的抑制作用, $1.5\mu\text{mol/dm}^3$ Hg^{2+} 几乎可以使酶活力完全丧失。图 1b 显示: Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对该酶有不同程度的抑制作用, 当其浓度达到 15mmol/dm^3 时, 分别可以使酶活力下降 44.5%; 而 Pb^{2+} 在低浓度条件下, 对酶的抑制强度较大, 浓度为 8mmol/dm^3 时, 可使酶活力下降 77%, 当 Pb^{2+} 浓度继续增高时, 下降的趋势则变得平缓。

2.6 Cd^{2+} 对酶的抑制作用类型和抑制常数的测定

以 CdCl_2 为效应物, 研究 Cd^{2+} 对该酶促反应动力学参数的影响。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 图 2 结果表明: Lineweaver-Burk 双倒数为一组相交于第三象限的直线, 横轴截距和纵轴截距都因 Cd^{2+} 浓度的变化而变化。这表明米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (v_m) 都随着 Cd^{2+} 浓度的增高而变化, K_m 值和 v_m 值都下降, 其抑制机理表现为竞争性-反竞争性混合型效应, Cd^{2+} 对酶-底物络合物 (ES) 的抑制强度比对游离酶 (E) 的抑制强度高。二次作图, 分别以得到的直线斜率和纵轴截距对 Cd^{2+} 浓度作图(图 2b、c), 求出 Cd^{2+} 对游离酶 (E) 的抑制常数 (K_I) 和对酶-底物络合物 (ES) 的抑制常数 (K_{IS}) 分别为 23.9 、 5.0mmol/dm^3 。 $K_I > K_{IS}$, 表明酶与抑制剂结合后能增加对底物的表观亲和力。

2.7 Fe^{3+} 对酶抑制作用类型和抑制常数的测定

FeCl_3 对该酶的抑制作用动力学研究表明, 其抑制作用与 Cd^{2+} 的抑制作用相似, 也表现为竞争性-反竞争性混合型。采用相同的方法测得其抑制常数 K_I 和 K_{IS} 分别为 395.5 、 $135.6\mu\text{mol/dm}^3$ 。

3 讨论

Li^+ 、 Na^+ 和 K^+ 等正一价碱金属离子在生物细胞内外是常见的, 细胞对这些离子的浓度变

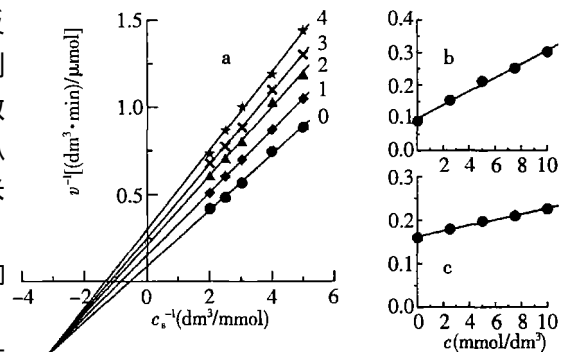


图 2 Cd^{2+} 对锯缘青蟹 NAGase 抑制作用的 Lineweaver-Burk 关系图

Fig.2 Lineweaver-Burk plot about the inhibition of Cd^{2+} on NAGase from *Scylla serrata*

直线 0~4 Cd^{2+} 浓度分别为: 0, 2.5, 5.0, 7.5 和 10mmol/dm^3

化有着严密的调控机制,通过长期的进化,许多酶的结构与功能已能适应这些离子的变化^[5]. 我们的实验结果显示了它们对锯缘青蟹 NAGase 的活力没有影响. 而正二价碱土金属离子中的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 是许多酶的激活因子,对锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 碱性磷酸酶均表现为激活作用^[6]. 本文的研究结果与此一致, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对锯缘青蟹 NAGase 也有激活作用,其激活程度依次为 $Ca^{2+} > Ba^{2+} > Mg^{2+}$. 正三价金属离子 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 对该酶具有一定的抑制作用. 过渡金属离子 Co^{2+} 对该酶的效应是先激活后抑制,在较低浓度条件下,对该酶有激活作用. 但随着其浓度的进一步增高,酶活力则逐渐下降,出现不同程度的抑制作用. 而 Mn^{2+} 对酶仅有轻微的激活作用,浓度达 15mmol/dm^3 时,仅使酶活力提高 8%. 重金属离子对酶一般都有抑制作用,它们常常使酶失活,尤其是 Hg^{2+} 对酶具有很强的抑制作用. Hg^{2+} 对来自蚕消化道、真菌及原生动物锥虫 (*Trypanosoma cruzi*) 的 NAGase 都具有很强的抑制作用^[7]. 本实验得到类似的结果,当 Hg^{2+} 浓度为 $1.5\mu\text{mol/dm}^3$ 时可使锯缘青蟹 NAGase 活力下降 95.2%; 当其浓度达到 $2.0\mu\text{mol/dm}^3$ 时酶活力几乎完全丧失. Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对该酶也有不同程度的抑制作用. 说明酶对不同的金属离子的敏感性差异较大. 研究 Cd^{2+} 和 Fe^{3+} 对锯缘青蟹 NAGase 的抑制作用,均表现为混合型机理. 这说明它们既能与游离酶结合,也能与酶-底物络合物结合. Cd^{2+} 的抑制常数 K_I 和 K_{IS} 分别为 23.9、 5.0mmol/dm^3 , K_I 约为 K_{IS} 的 5 倍. Fe^{3+} 的抑制常数 K_I 和 K_{IS} 分别为 395.5、 $135.6\mu\text{mol/dm}^3$, K_I 约为 K_{IS} 的 3 倍. 这说明酶-底物络合物 (ES) 与抑制剂的亲和力比游离酶 (E) 与抑制剂的亲和力大. 这与 Chen 等 (2003) 研究不同化合物对酪氨酸酶的影响有相似的结果^[8].

参考文献:

- [1] Funke B, Spindler K D. Characterization of chitinase from the brine shrimp *Artemia* [J]. *Comp Biochem Physiol* 1989, **94B** (4): 691~695.
- [2] Zhang J P, Chen Q X, Wang Q, *et al*. Purification and some properties of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*) [J]. *Biochem (Moscow)*, 2006 **71** (Sup 1): 55~59.
- [3] Xie X L, Chen Q X, Lin J C, *et al*. Purification and some properties of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. *Mar Biol* 2004, **146**: 143~148.
- [4] Chen Q X, Zhang Z, Huang H, *et al*. Unfolding and inactivation of *Ampullarium Crossean* β -glucosidase during denaturation by guanidine hydrochloride [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2003, **35**: 1227~1233.
- [5] 林建城, 王悦, 谢晓兰, 等. 金属离子对凡纳对虾 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响 [J]. *台湾海峡*, 2005 **24** (1): 78~82.
- [6] Chen Q X, Zheng W Z, Lin J Y, *et al*. Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2000, **32** (8): 879~885.
- [7] Moudni B E, Rodier M H, Jacquem in J L. Purification and characterization of N-Acetylglucosaminidase from *Trypanosoma cruzi* [J]. *Experimental Parasitology* 1996, **83**: 167~173.
- [8] Chen Q, Chen Q X, Qiu L, *et al*. Inhibitory effect of 4-cyanobenzaldehyde and 4-cyanobenzoic acid on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase [J]. *Journal of Protein Chemistry* 2003, **22** (7): 607~612.

Effects of metal ions on the activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from green crab (*Scylla serrata*)

YANG Xue-min^{1,2}, XIE Jin-jin^{1,3}, ZHANG Ji-ping^{1,4}, LN Jian-cheng¹, CHEN Qing-xi¹

(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. Department of Biology, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China; 4. School of Life Sciences, Foshan Science and Technology College, Foshan 528231, China)

Abstract The effects of some metal ions on the activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) from green crab (*Scylla serrata*) have been studied and the results show that Li^+ , Na^+ and K^+ have no effect on the enzyme activity; Mg^{2+} , Ca^{2+} and Ba^{2+} activate the enzyme with an order of $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ in intensity, while Al^{3+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+} inhibit the enzyme activity. $2.0 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ of Hg^{2+} decreases the enzyme activity completely. Co^{2+} activates the enzyme at concentration lower than $4.0 \text{mmol}/\text{dm}^3$ but inhibits it at higher concentration. Mn^{2+} has a little active effects on the enzyme. Inhibitory kinetics of Cd^{2+} and Fe^{3+} on the enzyme has been studied. It shows that the inhibition type of Cd^{2+} and Fe^{3+} on the enzyme is of mixed-type. The combination constants of Cd^{2+} and Fe^{3+} with free enzyme (K_I) and enzyme-substrate complex (K_S) were determined respectively. The values of K_I and K_S are obtained as 23.9 and $5.0 \text{mmol}/\text{dm}^3$ for Cd^{2+} and 395.5 and $135.6 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ for Fe^{3+} , respectively. K_I is larger than K_S , which elucidates that Cd^{2+} and Fe^{3+} inhibit enzyme-substrate complex much more potently than free enzyme.

Key words marine organism; N-acetyl- β -D-glucosaminidase; *Scylla serrata*; enzyme activity; metal ions; inhibition kinetics

(责任编辑: 郭水伙)