

# 金属离子对棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响

王君<sup>1</sup>, 黄小红<sup>2</sup>, 陈清西<sup>1\*</sup>

(1. 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;

2. 福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建 福州 350002;)

**摘要:** 研究了金属离子对棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (EC3. 2. 1. 52) 活力的影响. 结果表明: Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 和 Li<sup>+</sup> 等金属离子对酶活力没有任何影响; 在指定范围内, Mg<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 对酶活力影响不显著; Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 和 Al<sup>3+</sup> 对该酶有不同程度的抑制作用. 进一步研究 Cu<sup>2+</sup> 和 Al<sup>3+</sup> 的抑制作用动力学, 结果表明: Cu<sup>2+</sup> 对该酶的抑制作用是一种可逆过程, 抑制机理表现为混合型, 抑制常数  $K_I$  为 0.23 mmol/L,  $K_{IS}$  为 1.49 mmol/L. Al<sup>3+</sup> 对该酶的抑制作用是一种可逆过程, 抑制机理表现为竞争性类型, 抑制常数  $K_I$  为 6.42 mmol/L.

**关键词:** N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 棉铃虫; 金属离子; 抑制动力学

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)06-0843-04

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase, EC3. 2. 1. 52) 是几丁质水解系统的一个组成成份, 它协同内切几丁质酶和外切几丁质酶将几丁质彻底降解为单糖. 几丁质是由 N-乙酰葡萄糖胺通过 β-1, 4 糖苷键连接起来的线性多糖, 它不仅是昆虫的重要结构组分, 也是昆虫防止机械损伤和生物危害的屏障<sup>[1]</sup>. 昆虫的蜕皮等生长发育过程依靠自身的几丁质酶进行调解, 因此通过破坏昆虫的几丁质, 或抑制几丁质酶的活性, 都可以影响昆虫的生长发育<sup>[2]</sup>. 此外, 由于高等动植物不含有几丁质, 以其为靶标的杀虫剂相对安全, 而几丁质水解酶又能够增加其它杀虫剂的毒力或促进对其它杀虫剂的吸收, 在害虫综合治理中具有广阔前景<sup>[3]</sup>.

棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 属鳞翅目夜蛾科, 是世界性的主要棉花害虫之一. 化学防治仍是目前防治这类害虫的最普遍和有效的一种方法, 但长期依赖于化学农药, 导致了其抗药性的产生. 目前, 棉铃虫对杀虫剂的抗药性问题已成为一个世界性难题, 也是棉铃虫暴发成灾的重要原因之一. 开发以 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶等几丁质酶系为靶标的新型生物农药势在必行. 本文研究了金属离子对 NAGase 活力的影响, 为探讨新型农药的开发提供理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 从棉铃虫蛹分离纯化得到, 棉铃虫蛹为福建省浦城绿安生物农药有限公司提供. 对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷 (pNP-β-D-GlcNAc) 为上海医药工业研究院生化室产品; 各种金属离子的无机盐为国产分析纯试剂, 所有溶液均以玻璃重蒸水配制.

### 1.2 方法

#### (1) 酶的分离纯化

以棉铃虫的蛹作为分离纯化酶的材料, 按 1□5 (质量浓度) 加入 0.01 mol/L pH 6.8 磷酸缓冲液 (含 0.2 mol/L NaCl) 4℃抽提 1 h, 离心获取的上清液, 经 30%~70% 硫酸铵分级分离, 透析后得到粗酶制剂. 进一步通过 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析 (2.5 cm × 60.0 cm) 纯化, 采用上述缓冲液洗脱, 活力峰合并后通过 DEAE-32 离子交换柱层析 (2.5 cm × 30.0 cm), 采用 0.01 mol/L, pH 6.8 磷酸缓冲液, 含 0~1.2 mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 收集活力峰部分. 酶的纯度鉴定采用聚丙烯酰胺凝胶电泳.

#### (2) 酶活力的测定方法

酶活力的测定参照文献[4]的方法并略有改进. 以 pNP-β-D-GlcNAc 为底物, 在 2 mL 的测活体系中, 包含终浓度为 0.1 mol/L pH 5.63 磷酸缓冲液, 0.2 mmol/L 的底物, 于 37℃ 恒温水浴中加入适量酶液, 准

收稿日期: 2004-10-22

基金项目: 福建省科技攻关课题 (2004N002), 福建省自然科学基金 (B0410003) 资助

作者简介: 王君 (1982-), 女, 硕士研究生.

\* 通讯作者: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

确反应 10 min, 加入 2 mL 0.5 mol/L NaOH 终止反应. 在 722 型分光光度计上测定波长为 405 nm 的光密度值( $OD_{405nm}$ ). 以硝基酚(pNP)为产物对照, 测定在该条件下产物的摩尔消光系数为  $8.8 \times 10^3 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ . 金属离子对酶的作用机理判断是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 比较酶催化反应的动力学参数, 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.

## 2 实验结果

### 2.1 酶的分离纯化结果

以棉铃虫蛹为提取酶的材料, 通过抽提、硫酸铵分级分离、Sephadex G-200 凝胶柱层析和 DEAE-32 离子交换柱层析纯化, 获得 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶制剂, 酶的比活力为 2 678.79 U/mg. 所得酶制剂经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一条带(图略). 说明该 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶制剂已达电泳纯.

### 2.2 一价金属离子对棉铃虫 NAGase 活力的影响

选用 NaCl、NaNO<sub>3</sub>、KCl 和 Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为效应物, 检测了 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 和 Li<sup>+</sup> 对该酶活力的效应, 结果表明, 当测活体系中效应物浓度在 0~10.0 mmol/L 范围时, 酶活力维持恒定, 说明 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 和 Li<sup>+</sup> 等金属离子对该酶活力没有任何影响. 实验还表明, Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 无机酸根离子对酶活力也没有影响(表 1).

### 2.3 二价金属离子对棉铃虫 NAGase 活力的影响

选用 MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub> 和 CuSO<sub>4</sub> 为效应物, 在指定浓度下测定了二价金属离子对酶活力的影响, 结果表明: Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 当测活体系中效应物浓度在

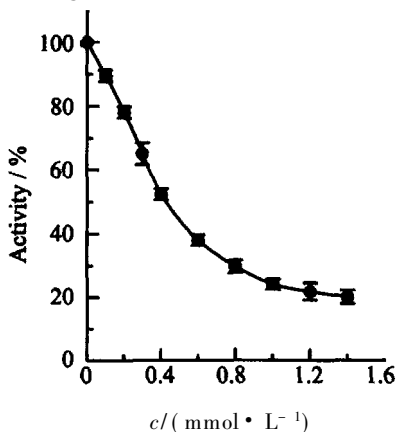


图 1 铜离子对 NAGase 活力的影响

Fig. 1 Effects of CuSO<sub>4</sub> on NAGase from *Helicoverpa armigera*

0~2.0 mmol/L 范围时, 酶活力维持恒定. Zn<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对该酶有较强的抑制作用. Zn<sup>2+</sup> 在 2.0 mmol/L 时, 可使酶活力下降 66%; Cu<sup>2+</sup> 在 2.0 mmol/L 时, 可使酶活力下降 80%(表 1).

表 1 金属离子对 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响  
Tab. 1 Effects of metal ions on the activity of NAGase from *Helicoverpa armigera*

一价金属离子	酶活力/% <sup>a</sup>	二价金属离子	酶活力/% <sup>b</sup>
对照	100.0 ± 1.5	MgCl <sub>2</sub>	100.5 ± 1.2
NaCl	99.5 ± 1.8	CaCl <sub>2</sub>	99.8 ± 2.5
NaNO <sub>3</sub>	98.5 ± 2.5	ZnSO <sub>4</sub>	34.2 ± 1.5
KCl	97.5 ± 3.5	CuSO <sub>4</sub>	20.1 ± 1.8
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99.0 ± 2.5		

注: 金属离子终浓度: a. 10 mmol/L; b. 2 mmol/L.

### 2.4 Cu<sup>2+</sup> 对棉铃虫 NAGase 抑制效应及抑制常数的测定

由于 CuSO<sub>4</sub> 对该酶活力影响较为显著, 进一步研究其浓度效应, 在 0~1.6 mmol/L 的范围内对酶活力的抑制作用的浓度关系见图 1, 随着 CuSO<sub>4</sub> 的浓度的增大, 酶活力迅速下降, 导致酶活力下降 50% 的 CuSO<sub>4</sub> 浓度为 0.41 mmol/L. 当 CuSO<sub>4</sub> 浓度大于 1.0 mmol/L 时, 酶活力的下降较为缓慢.

为阐明 CuSO<sub>4</sub> 对酶的抑制作用机理, 进一步研究 CuSO<sub>4</sub> 对酶的抑制作用类型. 在测活体系中, 固定酶的浓度, 改变底物浓度, 测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 判断抑制剂的抑制类型. 实验结果(图 2)表明: Cu<sup>2+</sup> 既影响酶的米

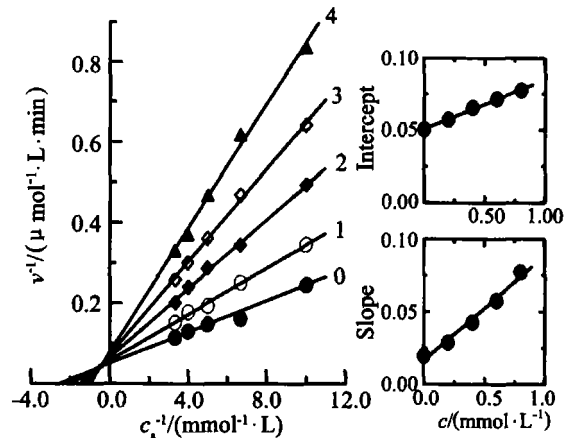


图 2 铜离子对 NAGase 活力的抑制作用

直线 0~4 的铜离子浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L

Fig. 2 Lineweaver-Burk plots for NAGase inhibited by CuSO<sub>4</sub>

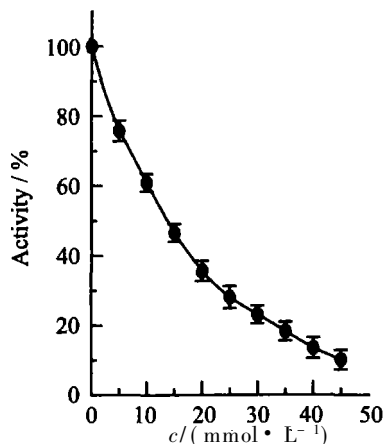


图 3 铝离子对 NAGase 活力的影响

Fig. 3 Effects of AlCl<sub>3</sub> on NAGase from *Helicoverpa armigera*

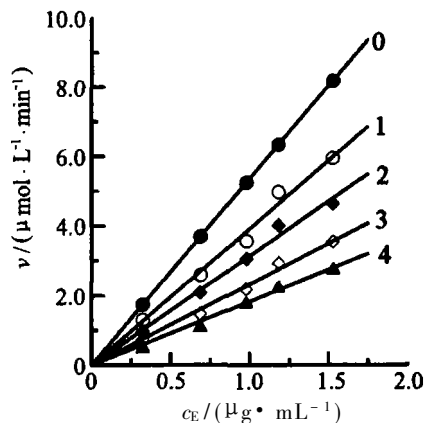


图 4 在不同 AlCl<sub>3</sub> 浓度下酶活力和酶量的关系

直线 0~ 4 分别代表铝离子的浓度为 0、5、10、15 和 20 mmol/L

Fig. 4 The effect of concertration of NAGase on the enzyme activity in presence of different concentrations of AlCl<sub>3</sub>

氏常数 ( $K_m$  值), 又影响最大反应速度  $V_m$  值. 随着  $Cu^{2+}$  浓度的增大,  $K_m$  值增大, 而  $V_m$  值减小, 其抑制机理表现为混合型抑制作用. 分别以直线的斜率和纵轴截距对  $Cu^{2+}$  浓度作图, 为直线(图 2 内插图), 分别可以求得抑制常数与游离酶的抑制常数 ( $K_I$ ) 和酶-底物络合物的抑制常数 ( $K_{IS}$ ), 其值分别为 0.23 mmol/L 和 1.49 mmol/L.

### 2.5 Al<sup>3+</sup> 对棉铃虫 NAGase 活力的影响

研究 AlCl<sub>3</sub> 对酶活力的影响, 图 3 为 AlCl<sub>3</sub> 对该酶的抑制作用浓度曲线, 随着 AlCl<sub>3</sub> 浓度的增高, 抑制强度逐渐增大. 表明 AlCl<sub>3</sub> 对酶活力有抑制作用, 测定导致酶活力下降 50% 的 AlCl<sub>3</sub> 浓度为 12.2 mmol/L. 35 mmol/L AlCl<sub>3</sub> 可使酶活力被抑制 80%.

### 2.6 Al<sup>3+</sup> 对棉铃虫 NAGase 的抑制表现为可逆效应

在测活体系中, 加入不同浓度的 AlCl<sub>3</sub>, 固定底物浓度为 0.2 mmol/L, 改变加入的酶浓度, 测定酶活力. 结果(图 4)表明, 酶活力对酶浓度作图为一组通过原点的直线, 随着效应物浓度的增高, 直线的斜率降低. 说明 AlCl<sub>3</sub> 对酶的抑制作用属于可逆过程, AlCl<sub>3</sub> 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.

### 2.7 Al<sup>3+</sup> 对棉铃虫 NAGase 抑制机理及抑制常数的测定

在测活体系中, 固定酶的浓度, 改变底物浓度, 测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 判断抑制剂的抑制类型. 图 5 的实验结果表明: Al<sup>3+</sup> 不影响最大反应速度  $V_m$  值, 而酶的米氏常数  $K_m$  值则随着 Al<sup>3+</sup> 浓度的增大而增大, 其抑

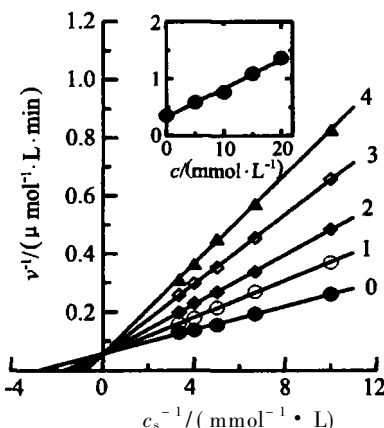


图 5 铝离子对 NAGase 活力的抑制类型

直线 0~ 4 的铝离子浓度分别为 0、5、10、15 和 20 mmol/L

Fig. 5 Lineweaver-burk polts for NAGase inhibited by AlCl<sub>3</sub>

制机理表现为竞争型抑制作用. 以  $K_m$  对 Al<sup>3+</sup> 浓度作图(图 5 内插图), 求得抑制常数  $K_I$  为 6.42 mmol/L.

## 3 讨论

各种金属离子对棉铃虫 NAGase 的效应实验表明, 一价金属离子对其活力没有影响. 由于 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 等离子在细胞内外是常见的, 在长期进化过程中, 细胞逐渐适应了这些离子浓度的变化, 形成了严密的调控机制. 碱金属中的 Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 和 Ba<sup>2+</sup> 是许多酶的激活剂, 对锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 碱性磷酸酶均表现为激活作用<sup>[5]</sup>. Mg<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 对南美白对虾 NAGase 有微弱的激活作用, 而 Ba<sup>2+</sup> 对酶有一定的抑制作用. 但

Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 和 Ba<sup>2+</sup> 均对锥虫(*Trypanosoma cruzi*) 的 NAGase 没有任何影响<sup>[6]</sup>. 本文的研究有类似的结果, Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 和 Ba<sup>2+</sup> 均对棉铃虫 NAGase 影响不显著. 金属离子 Zn<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对酶有不同程度的抑制. 但 Koga 等研究表明 Cu<sup>2+</sup> 对蚕消化道中 NAGase 具有激活作用<sup>[7]</sup>, 而我们的研究结果 Cu<sup>2+</sup> 对棉铃虫 NAGase 有抑制作用, 其抑制作用机理表现为混合型可逆作用. El Moudni 等研究 Zn<sup>2+</sup> 对锥虫 NAGase 没有影响<sup>[6]</sup>. 正三价金属离子对酶影响的研究报道相对较少, 本实验用 AlCl<sub>3</sub> 为效应物, 研究了 Al<sup>3+</sup> 对棉铃虫 NAGase 活力的影响, 表明 Al<sup>3+</sup> 对酶活力有抑制作用. Al<sup>3+</sup> 对该酶是一种竞争性的可逆抑制剂. 可见, 不同的金属离子对酶的影响不同, 同一种金属离子对不同种属的酶的影响也不同.

### 参考文献:

- [1] 欧阳石文, 刘江良, 冯兰香, 等. 昆虫几丁质酶的研究与应用[J]. 山地农业生物学报, 2001, 20(2): 147-153.  
[2] 肖业臣, 罗晓斌, 冯佩富, 等. 昆虫几丁质酶的研究进展

- [J]. 生物技术, 2003, 13(1): 38-39.  
[3] 吴青军, 张文吉, 张友军. 昆虫几丁质酶及其在植物保护中的应用[J]. 昆虫知识, 2000, 37(5): 314-317.  
[4] Lin J C, Chen Q X, Shi Y, et al. The chemical modification of the essential groups of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Turbo cornutus* Solander [J]. *Iubmb Life*, 2003, 55(9): 547-552.  
[5] 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.  
[6] El Moudni B, Rodier M H, Jacquemin J L. Purification and characterization of N-acetylglucosaminidase from *trypanosoma cruzi* [J]. *Experimental Parasitology*, 1996, 83: 167-173.  
[7] Koga D, Nakashima M, Matsukura T, et al. Purifications and some properties of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from alimentary canal of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1986, 50(9): 2357-2368.

## Effects of Metal Ions on the Activity of $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from the Pupae of *Helicoverpa armigera*

WANG Jun<sup>1</sup>, HUANG Xiao-hong<sup>2</sup>, CHEN Qing-xi<sup>\*</sup>

(1. Key Lab. of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Key Lab. of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The effects of metal ions on  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase (NAGase, EC3.2.1.52) from *Helicoverpa armigera* have been studied. The results show that Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> ions have no effect on the enzyme activity. Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions have few effects on the enzyme activity, while Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup> inhibit the enzyme. The inhibitory kinetics of Cu<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup> on the enzyme was further studied. The results showed that Cu<sup>2+</sup> was a reversible inhibitor of the enzyme and the inhibition was determined to be of mixed type. The inhibition constants of free enzyme ( $K_I$ ) and enzyme-substrate complex ( $K_{IS}$ ) are determined to be 0.23 mmol/L and 1.49 mmol/L, respectively. Al<sup>3+</sup> is a reversible competitive inhibitor of the enzyme, and the inhibition constants ( $K_I$ ) was determined to be 6.42 mmol/L.

**Key words:**  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase; *Helicoverpa armigera*; metal ions; inhibitory kinetics