

Zn²⁺ 对棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力与性质的影响*

黄小红¹ 陈清西¹ 王君¹ 谢雪清^{*} 关雄^{**}

(福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建农林大学动物科学学院 福州 350002)

(¹厦门大学生命科学学院教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室 福建厦门 361005)

摘要 以棉铃虫蛹为材料, 经分离纯化获得棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶制剂; 研究了 Zn²⁺ 对棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.14) 活力与性质的影响. 结果表明, Zn²⁺ 对酶活力有抑制作用, 酶活力丧失一半的 Zn²⁺ 浓度 (IC₅₀) 为 1.3 mmol/L. 进一步研究 Zn²⁺ 的抑制作用动力学, 发现 Zn²⁺ 对该酶的抑制作用是一种可逆过程, 抑制机理表现为竞争型, 抑制常数 K_i 为 1.158 mmol/L. Zn²⁺ 不会影响酶的酸碱稳定性, 但有 Zn²⁺ 存在时, 在 30~40 范围内, 酶是稳定的, 温度高于 50 °C 后, 随着 Zn²⁺ 浓度的增加, 酶的温度稳定性也相对增加. 图 5 参 10

关键词 棉铃虫; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; Zn²⁺; 活力; 性质

CLC S482.91

EFFECT OF Zn²⁺ ON ACTIVITY AND PROPERTIES OF β-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDASE FROM *HELICOVERPA ARMIGERA* PUPAE*

HUANG Xiaohong CHEN Qingxi¹, WANG Jun¹, XIE Xueqing & GUAN Xiong^{**}

(Key Lab of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education; College of Animal Sciences

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

(¹Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract A β-N-Acetyl-D-glucosaminidase (EC3.2.1.52) was purified from the pupae of *Helicoverpa armigera*. The effect of Zn²⁺ on β-N-Acetyl-D-glucosaminidase (NAGase, EC3.2.1.52) from *H. armigera* was studied. The result showed that Zn²⁺ inhibited the enzyme. The inhibitory kinetics of Zn²⁺ on the enzyme showed that Zn²⁺ was a reversible competitive inhibitor of the enzyme, and the inhibition constant (K_i) was determined to be 1.158 mmol/L. Zn²⁺ couldn't affect pH stability of the enzyme. However, in the presence of Zn²⁺, the enzyme was stable between 30 and 40 °C, and when the temperature was above 50 °C, the thermostability of enzyme increased with the increasing of the concentration of Zn²⁺. Fig 5 Ref 10

Keywords *Helicoverpa armigera*; β-N-Acetyl-D-glucosaminidase; Zn²⁺; activity; property

CLC S482.91

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase, EC3.2.1.52) 是几丁质水解酶系统的组成成分之一, 它与几丁质内切酶和几丁质外切酶协同作用将几丁质降解为 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖. 几丁质广泛存在于昆虫的中肠围食膜和表皮中, 是昆虫防止机械损伤和生物危害的屏障^[1]. N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶因为具有水解几丁质破坏围食膜和表皮的作用, 因此被认为与昆虫的蜕皮和变态有关^[2]. 可以将此酶导入昆虫的体内以破坏其正常的组织结构, 协助细菌或病毒侵入目标虫体内; 也可以通过调控酶的活性来影响昆虫的生长发育^[1,3]. 由于高等动植物

不含有几丁质, 以其为靶标开发新农药是生态控制棉铃虫的新策略.

棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 属鳞翅目夜蛾科, 是我国的主要棉花害虫, 目前以化学防治为主, 但农药的大量使用污染环境, 破坏生态平衡, 造成了棉铃虫的抗性. 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符合当今可持续发展的战略. 本文研究了 Zn²⁺ 对 NAGase 活力和性质的影响, 希望能为新型生物杀虫剂的开发利用提供理论指导.

1 材料与方法

1.1 材料

棉铃虫为福建省浦城绿安生物农药有限公司提供, 饲养至蛹后用于酶的分离纯化. 对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷 (pNp-β-D-GlcNAc) 购于上海医药工业研究院生化室; 其余试剂均为国产分析纯, 使用的蒸馏水为重蒸水. DU-650 分光光度计

收稿日期: 2005-06-23 接受日期: 2005-09-06

* 国家高技术研究发展计划项目 (2002AA245011) 和福建省自然科学基金 (Z0516010) Supported by the State High-Tech Research and Development Program of China ("863" Program) and Fujian Provincial Key Sci-Tech Project

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: guanxfaf@126.com)

为 Beckman 公司生产.

1.2 方法

1.2.1 棉铃虫 NAGase 的制备 参照文献 [4] 的方法进行酶的分离纯化, 获得比活力为 2 678.79 mg / mL, 纯化 10.36 倍的棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶.

1.2.2 棉铃虫 NAGase 活力的测定 酶活力的测定参照 Lin 等 [5] 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 (含终浓度为 0.1 mol L⁻¹ pH 5.63 磷酸缓冲液, 0.2 mmol L⁻¹ 的底物), 于 37 °C 恒温水浴中加入 20 μL 酶液, 准确反应 10 min 加入 2 mL 0.5 mol L⁻¹ NaOH 终止反应. 在 Beckman DU-650 分光光度计测定波长为 405 nm 的光密度值 (D_{405 nm}). 消光系数为 8.8 × 10³ (L mol⁻¹ cm⁻¹). 酶活力单位 (U) 定义: 在上述条件下, 每升溶液中每分钟释放 1 μmol NAG 的量为一个酶活力单位. 比活力定义为每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位数.

1.2.3 Zn²⁺ 浓度对棉铃虫 NAGase 的影响 选择 ZnSO₄ 为效应物, 在 2 mL 的测活体系中 (含终浓度为 0.1 mol L⁻¹ pH 5.63 磷酸缓冲液, 0.2 mmol L⁻¹ 的底物), 加入不同浓度的效应物 (0 ~ 10 mmol L⁻¹), 测定酶的相对活力, 分析研究效应物对酶活力的影响.

1.2.4 Zn²⁺ 对棉铃虫 NAGase 抑制作用机理的判断 在含不同浓度 Zn²⁺ (0 ~ 4 mmol L⁻¹) 的测活体系中, 固定底物浓度为 0.2 mmol L⁻¹, 改变加入的酶量 (0 ~ 5 μg mL⁻¹), 测定酶促反应的初速度.

1.2.5 Zn²⁺ 对棉铃虫 NAGase 抑制作用类型 在测活体系中, 固定酶的浓度, 改变底物浓度 (分别为 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mmol L⁻¹), 测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 求其最大的反应速度及其表观米氏常数.

1.2.6 Zn²⁺ 对棉铃虫 NAGase pH 稳定性的影响 将等量的酶液与不同 pH 值的缓冲液等量混合, 再加入不同浓度的 Zn²⁺ (0, 0.5, 1.0 和 1.5 mmol L⁻¹), 室温下放置 30 min 后, 取出酶液在 pH 5.63 的测活体系中检测酶的剩余活力, 以酶活力对处理的 pH 作图, 分析酶的酸碱稳定性.

1.2.7 Zn²⁺ 对棉铃虫 NAGase 的温度稳定性的影响 取酶液 20 μL, 加入 0.2 mol L⁻¹ pH 5.63 醋酸缓冲液 30 μL 和不同浓度的 Zn²⁺ (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5 mmol L⁻¹), 在不同的温度下保温 30 min 后, 取出测定剩余酶活力. 以酶活力对处理的温度作图, 分析酶的热稳定性.

2 结果与分析

2.1 Zn²⁺ 对棉铃虫 NAGase 活力的影响

研究了 Zn²⁺ 对酶活力的影响, 结果 (图 1) 表明, Zn²⁺ 对酶活力有抑制作用, 随着 Zn²⁺ 浓度的增高, 抑制强度逐渐增大. 酶活力丧失一半的 Zn²⁺ 浓度 (IC₅₀) 为 1.3 mmol L⁻¹, 10 mmol L⁻¹ Zn²⁺ 可使酶活力被抑制 81.9%.

2.2 Zn²⁺ 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 Zn²⁺, 固定底物浓度为 0.2 mmol L⁻¹, 改变加入的酶浓度, 测定酶活力. 结果 (图 2) 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 Zn²⁺ 对酶的抑制作用属于可逆过程, Zn²⁺ 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.

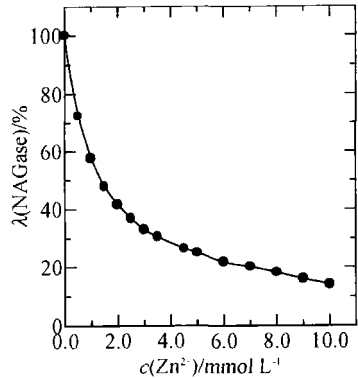


图 1 Zn²⁺ 对 NAGase 活力的影响
Fig 1 Effect of Zn²⁺ on NAGase from *H. armigera*

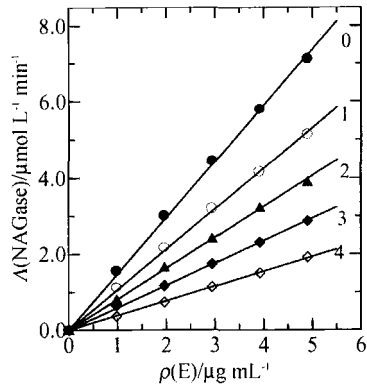


图 2 不同 Zn²⁺ 浓度下 NAGase 活力和酶量的关系
Fig 2 Effect of NAGase concentration on its activity with different concentrations of Zn²⁺

line 0~4 分别代表 Zn²⁺ 的浓度为 0, 0.5, 1.0, 2.0 和 4.0 mmol/L. The lines 0~4 represent Zn²⁺ concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mmol/L, respectively.

2.3 Zn²⁺ 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 3 的实验结果表明, Zn²⁺ 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 Zn²⁺ 浓度的增大而增大, 其抑制机理表现为竞争型抑制作用. 以 K_m 对 Zn²⁺ 浓度作图 (图 3 内插图), 求得抑制常数 K_i 为 1.158 mmol L⁻¹.

2.4 Zn²⁺ 对棉铃虫 NAGase 的 pH 稳定性的影响

将等量的酶液与不同 pH 值的缓冲液等量混合, 再加入不同浓度的 Zn²⁺ (0, 0.5, 1.0 和 1.5 mmol L⁻¹), 室温下放置 30 min 后, 取出酶液在 pH 5.63 的测活体系中检测酶的剩余活力, 以酶活力对处理的 pH 作图, 分析酶的酸碱稳定性. 结果 (图 4) 表明, 该酶在 pH 4~8 区域较稳定, 而在 pH 小于 4 和 pH 大于 8 不稳定. Zn²⁺ 对酶的 pH 稳定性的影响不明显.

2.5 Zn²⁺ 对棉铃虫 NAGase 的温度稳定性的影响

取酶液 20 μL 加入 0.2 mol L⁻¹ pH 5.63 醋酸缓冲液 30 μL 和不同浓度的 Zn²⁺ (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5 mmol L⁻¹), 在不同的温度下保温 30 min 后, 测定剩余酶活力. 以酶活力对处理的温度作图, 分析酶的热稳定性. 结果 (图 5) 表明, Zn²⁺ 存在时, 在 30~40 °C 范围内, 酶是稳定的, 温度高于 50 °C 后, 随着 Zn²⁺ 浓度的增加, 酶的热稳定性相对增加.

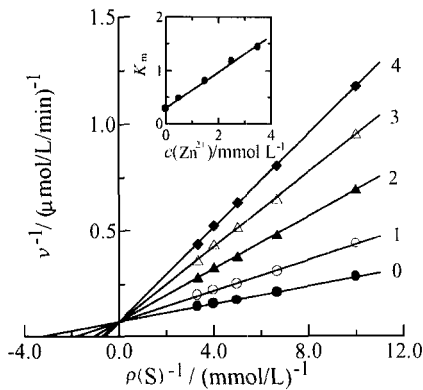


图3 Zn^{2+} 对 NAGase 活力的抑制类型

Fig 3 Lineweaver-Burk plots for NAGase inhibited by Zn^{2+} . Lines 0~4 the Zn^{2+} concentration respectively of 0, 0.5, 1.5, 2.5 and 3.5 mmol/L. The lines 0~4 represent Zn^{2+} concentrations of 0, 0.5, 1.5, 2.5 and 3.5 mmol/L, respectively.

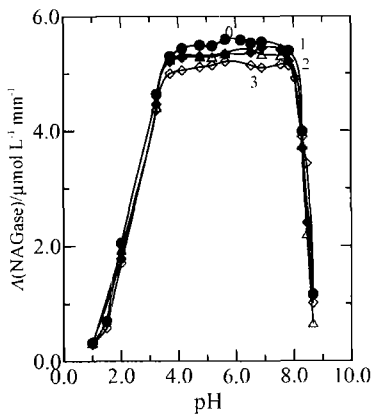


图4 不同 Zn^{2+} 浓度对 NAGase 的 pH 稳定性的影响

Fig 4 Effect of Zn^{2+} concentration on enzyme pH stability. Lines 0~3 the Zn^{2+} concentration respectively of 0, 0.5, 1.0 and 1.5 mmol/L. 0~3 represent Zn^{2+} concentrations of 0, 0.5, 1.0 and 1.5 mmol/L, respectively.

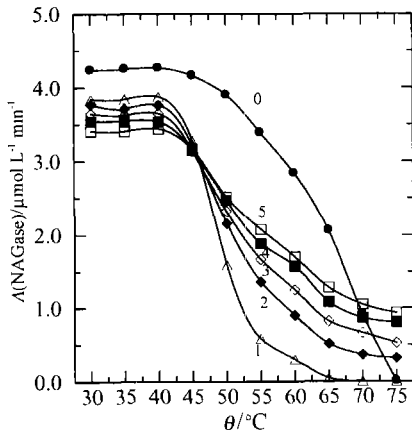


图5 不同 Zn^{2+} 浓度对 NAGase 的温度稳定性的影响

Fig 5 Effect of Zn^{2+} concentration on enzyme temperature stability. Lines 0~5 the Zn^{2+} concentration respectively of 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 mmol/L. 0~5 represent Zn^{2+} concentrations of 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.5 mmol/L, respectively.

3 讨论

酶与金属离子之间的关系有 3 种情况: 有的金属离子与酶蛋白紧密结合, 作为酶的组成部分, 不能用透析的方法除去, 在酶的分离纯化过程中也不与酶分离; 有的金属离子与酶结合不

紧密, 纯化过程中, 与酶分离, 纯化的酶中往往不含这类的金属离子, 但加入这类的金属离子之后酶活力大大地提高, 这一类称为金属离子激活剂; 还有的金属离子可抑制酶的活性, 称为酶的金属离子抑制剂^[6]。

Zn^{2+} 对棉铃虫 NAGase 的效应试验表明, Zn^{2+} 对酶有抑制作用。 Zn^{2+} 是棉铃虫 NAGase 的金属离子抑制剂, 但 Moudni^[7] 研究发现, Zn^{2+} 对原动物锥虫 NAGase 没有影响, Zn^{2+} 对苏云金芽孢杆菌^[8]、淡紫拟青霉^[9] 和产气肠杆菌^[10] 几丁质酶有激活作用, 这可能就是不同生物来源的几丁质酶系其酶学性质不同的缘故。

进一步对 Zn^{2+} 的抑制动力学进行研究, 发现 Zn^{2+} 对该酶的抑制作用是一种可逆过程, 抑制机理表现为竞争型, 即 Zn^{2+} 对酶催化反应的影响只引起酶促反应的米氏常数 (K_m) 下降, 表明 Zn^{2+} 与酶的结合会影响底物与酶的结合作用; 同样, 底物与酶的结合也会影响 Zn^{2+} 与酶的结合, Zn^{2+} 和底物是相互竞争地与酶结合, 这种抑制的程度取决于底物与抑制剂的相对浓度并可以通过增加底物浓度而解除。

试验也表明了 Zn^{2+} 的存在不会影响酶的酸碱稳定性, 但会影响酶的热稳定性, 当反应体系中存在 Zn^{2+} 时, 温度的稳定性降低, 从 50 °C 降到了 45 °C。但是当温度高于 45 °C 后, 随着 Zn^{2+} 浓度的增加, 出现了酶活力逐渐升高的现象, 说明 Zn^{2+} 可以缓解高温的热失活作用, 这一结果可作为生产上选用 Zn^{2+} 作为杀虫剂增效剂时浓度选择参照。

由于 Zn^{2+} 造成环境问题较少, 有望作为杀虫的增效剂, 但 Zn^{2+} 会影响酶的温度稳定性, 使用时应注意选择 Zn^{2+} 的浓度范围。

References

- Ouyang SW (欧阳石文), Liu JL (刘江良), Feng LX (冯兰香), Zhao KJ (赵开军). Research on insect chitinases and their application. *J Mount Agric & Biol* (山地农业生物学报), 2001, 20 (2): 147~153
- Kraner KJ, Muthukrishnan S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem Mol Biol*, 1997, 27 (11): 887~900
- Wu QJ (吴青军), Zhang WJ (张文吉), Zhang YJ (张友军). Insect chitinase and its potential use in plant protection. *J Entomol Knowl* (昆虫知识), 2000, 37 (5): 314~317
- Huang XH (黄小红), Chen QX (陈清西), Wang J (王君), Guan X (关雄). Isolation, purification and partial characterization of the β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from the pupae of *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol Sin* (昆虫学报), 2005 (4): 498~502
- Lin JC, Chen QX, Shi Y, Li SW, Zhao H. The chemical modification of the essential groups of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from *Turbo cornutus* Solander. *J JUBMB Life*, 2003, 55 (9): 547~552
- Zhao XP (赵欣平), Shu C (舒畅), Yang F (扬芳), Li KW (刘克武), Yu D (喻东). Effects of metal ions and urea on alkaline phosphatase from *Eriacus pela* (Chavannes). *Acta Entomol Sin* (昆虫学报), 2002, 45 (3): 318~322
- Moudni BE, Rodier MH, Jacquem in JL. Purification and characterization of N-acetylglucosaminidase from *Trypanosoma cruzi*. *Exper Parasitol*, 1996, 83: 167~173
- Huang XH (黄小红), Xu L (许雷), Chen QX (陈清西), Wang J (王君), Sha L (沙莉), Guan X (关雄). The effects of metal ions on the chitinase from *Bacillus thuringiensis*. *J Agri Biochemol* (农业生物技术学报), 2005, 13 (2): 264~265
- Xiao YN (肖炎农), Wang ZM (王祖明), Wang DB (王道本), Hu XH (胡小辉). Purification of extracellular chitinase produced by *Paecilomyces lilacinus* and its activity influencing factors. *Acta Phytopathol* (植物病理学报), 1998, 28 (3): 275~280
- Tang YX (唐亚雄), Zhao J (赵建), Ding SH (丁诗华), Liu SG (刘世贵), Yang ZR (扬志荣). Purification and properties of chitinase from *Enterobacter aerogenes*. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2001, 41 (1): 82~86