

氨基酸对凡纳滨对虾 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响

谢晓兰^{1,2}, 王悦¹, 陈清西¹

(1. 厦门大学 生命科学学院, 国家教育部 细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 泉州师范学院 化学系, 福建 泉州 362000)

摘要: 选用甘氨酸 (Gly)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile)、脯氨酸 (Pro)、苯丙氨酸 (Phe)、色氨酸 (Trp)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、半胱氨酸 (Cys)、谷氨酰胺 (Gln)、天冬酰胺 (Asn)、谷氨酸 (Glu)、天冬氨酸 (Asp)、组氨酸 (His)、赖氨酸 (Lys) 及精氨酸 (Arg) 等 18 种氨基酸为效应物, 研究它们对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶催化 pNP-NAG 水解反应的影响。结果表明, 非极性氨基酸及不带电荷的极性氨基酸对 NAGase 没有明显的抑制作用; 带正电荷的碱性氨基酸 L-His 及 Lys 有轻微的激活作用, 而 Arg 则先激活后抑制; 带负电荷的酸性氨基酸 Asp 及 Glu 有明显的抑制作用, 其 IC₅₀ 分别为 20, 28 mmol/L。研究 Asp, Glu 对酶催化 pNP-NAG 水解反应的抑制作用机理, 并测定其抑制常数。研究表明 Asp 及 Glu 的抑制作用均表现为可逆效应, 抑制类型均为竞争性抑制, 其抑制常数 K_i 值分别为 9.50 mmol/L 和 11.06 mmol/L。

关键词: 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*); N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 氨基酸; 抑制作用机理

中图分类号: Q 356.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)03-0046-05

几丁质酶系是由内切几丁质酶、外切几丁质酶和 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase, EC3.2.1.52) 等 3 种不同组分组成的^[1], 广泛存在于动物和微生物界。对虾 NAGase 不仅与对虾生长发育过程中的周期性蜕皮及虾幼体的孵化密切相关^[2], 还与食物消化吸收、抗菌防卫等有关。目前, 国外有关于美国龙虾、南极磷虾的 NAGase 的研究报导^[3-5], 但研究工作还局限于酶的分离纯化、基本性质及组织分布差别方面。而国内有关于罗氏沼虾、中国明对虾几丁质酶的研究^[6-8], 但未见甲壳动物 NAGase 的相关研究报导。南美白对虾, 学名凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 是目前世界上三大养殖对虾中单产量最高的虾种, 适应能力强, 经济价值高, 中国沿海养殖面积逐年增加, 但在对虾养殖过程中经常因食物调配不当、养殖环境污染而扰乱了对虾的正常生理活动与物质代谢, 使对虾的健康程度下降, 容易受到病原体的侵蚀而感染发病导致大量死亡, 造成巨大的经济损失。因此, 研究氨基酸对 NAGase 的活

力影响, 对于 NAGase 催化机理的了解、不同生长期的食物调配具有重要的指导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶从凡纳滨对虾内脏分离纯化得到^[9], 酶制剂为 PAGE 单一纯, 比活力为 1560 U/mg; 对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷 (pNp-β-D-GlcNAc) 购置于上海医药工业研究院生化室; 其余试剂均为国产分析纯; 使用的蒸馏水为玻璃重蒸水。

收稿日期: 2004-09-20; 修回日期: 2005-06-27

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目(2004J054); 福建省教育厅科技计划项目(JA04260)

作者简介: 谢晓兰(1974-), 女, 福建泉州人, 讲师, 在职博士研究生, 主要从事海洋生物酶学研究; 陈清西, 通讯作者, 教授, 博导, E-mail: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

1.2 方法

酶活力测定方法见参考文献 [10]，以 pNP-β-D-GlcNAc 为底物，在 2 mL 的测活体系中，包含 0.15 mol/L NaAc-HAc 缓冲液 (pH 5.2)，0.5 mmol/L 的底物，不同浓度的氨基酸，于 37 °C 恒温水浴中加入适量酶液，准确反应 10 min，加入 2 mL 0.5 mol/L NaOH 终止反应，在 752 型 Spectrum 紫外可见分光光度计上测定波长为 405 nm 的光密度值 (A_{405nm})，消光系数按 $1.73 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 计算^[11]。氨基酸对酶的抑制作用类型是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图，比较酶的动力学参数 (包括表观米氏常数和最大反应速度) 的变化来判断。

2 结果

2.1 几种氨基酸对凡纳滨对虾 NAGase 的活力影响

以甘氨酸 (Gly) 丙氨酸 (Ala) 缬氨酸 (Val)

亮氨酸 (Leu) 异亮氨酸 (Ile) 脯氨酸 (Pro) 苯丙氨酸 (Phe) 色氨酸 (Trp) 丝氨酸 (Ser) 苏氨酸 (Thr) 半胱氨酸 (Cys) 谷氨酰胺 (Gln) 天冬酰胺 (Asn) 谷氨酸 (Glu) 天冬氨酸 (Asp) 组氨酸 (His) 赖氨酸 (Lys) 及精氨酸 (Arg) 等 18 种氨基酸为效应物，研究它们对酶活力的影响。结果 (表 1) 表明，当效应物浓度为 5~15 mmol/L 时，非极性氨基酸 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro 及极性氨基酸 Ser, Thr, Cys, Gln, Asn 对凡纳滨对虾 NAGase 的催化活力没有明显的影响；芳香族氨基酸 Phe 也没有明显作用，但 Trp 有轻微的抑制作用，当浓度为 15 mmol/L 时，酶的剩余相对活力 91.7%；酸性氨基酸 Asp, Glu 对酶活力有较明显的抑制作用，它们对酶的抑制程度依次为 Asp > Glu；而碱性氨基酸对酶有轻微的激活作用，浓度为 15 mmol/L 时，它们对酶的激活程度依次为 His > Lys > Arg。

表 1 几种氨基酸对酶活力的影响

Tab. 1 Effects of some amino acids on the enzyme activity

名称	浓度(mmol/L)	相对活力(%)	名称	浓度(mmol/L)	相对活力(%)	名称	浓度(mmol/L)	相对活力(%)
对照	0	100.0	Phe	15	101.7	His	5	112.9
Gly	5	99.7	Trp	5	97.8		15	124.7
	15	99.1		10	94.6	Lys	5	106.2
Ala	5	101.3		15	91.9		10	112.7
	15	101.8	Ser	5	99.7		15	113.7
Val	5	100.6		15	100.1	Arg	5	109.5
	15	101.1	Thr	5	100.6		10	113.4
Leu	5	101.5		15	100.4		15	109.8
	15	99.3	Cys	5	103.7	Glu	5	95.4
Ile	5	103.5		15	100.4		10	87.4
	15	105.9	Gln	5	98.7		15	74.5
Pro	5	99.9		15	99.6	Asp	5	84.0
	15	100.4	Asn	5	99.3		10	70.7
Phe	5	101.4		15	97.3		15	58.1

2.2 酸性氨基酸对该酶活力影响的浓度效应

与其它氨基酸相比，酸性氨基酸 Glu 和 Asp 对 NAGase 有较明显的抑制作用，故进一步考察它们对凡纳滨对虾 NAGase 催化水解 pNp-β-D-GlcNAc 活力影响的浓度效应。酶的剩余活力与氨基酸的浓度依赖关系结果见图 1，随着 Asp 与 Glu 浓度的增大，酶活

力呈指数迅速下降，导致酶活力下降一半所需的效应物浓度 (IC_{50}) 分别为 20, 28 mmol/L。显然 Asp 的抑制能力比 Glu 强。

2.3 酸性氨基酸对凡纳滨对虾 NAGase 的抑制作用

分别在含不同浓度 Asp, Glu 的测活体系中，固

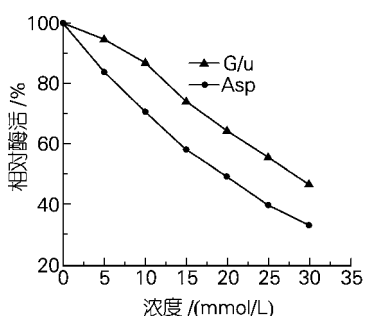


图1 Glu 和 Asp 对酶活力的影响

Fig.1 Effects of Glu and Asp on the enzyme activity

定底物浓度为 0.5 mmol/L, 改变酶的加入量, 测定不同浓度 Asp, Glu 对凡纳滨对虾 NAGase 催化 pNp-β-D-GlcNAc 的水解活力影响。以效应物作用后的剩余酶活力对加入酶量作图, 得到一组通过原点的直线 (图 2), 随着效应物浓度的增大, 直线的斜率降低。此结果说明酸性氨基酸对酶的抑制作用属于可逆过程, 增加氨基酸浓度导致酶活力的下降是由于酶活力受到抑制, 催化效率降低, 而不是通过减少有效的酶量引起酶活力的下降。

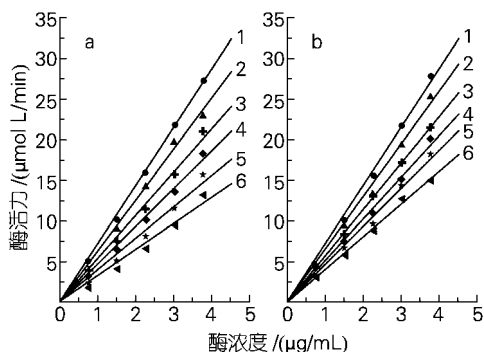


图2 不同 Asp 或 Glu 浓度下酶活力和酶量的关系

Fig.2 The effect of concentrations of amino acids on the enzyme activity

a.L-Asp ; b.L-Glu

1~6 的氨基酸浓度分别为 0,5,10,15,20 和 25 mmol/L

1~6 were 0,5,10,15,20 and 25 mmol/L, respectively

2.4 天冬氨酸对酶的抑制类型和抑制常数的测定

研究 Asp 对凡纳滨对虾 NAGase 的抑制作用类

型, 在测活体系中, 固定酶量, 改变底物浓度, 测定不同浓度 Asp 对酶活力的影响, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 可以判断 Asp 的抑制类型。实验结果见图 3, Lineweaver-Burk 双倒数作图得到相交在纵轴的一组直线, 横轴截距随着 Asp 浓度的增大而增大, 即米氏常数 (K_m) 随着 Asp 浓度增大而增大, 最大反应速度 (V_m) 则不受影响。说明其抑制机理表现为竞争性抑制, Asp 和底物(S)竞争游离酶(E)的结合部位, 但不能和结合酶(ES)结合。二次作图, 以不同 Asp 浓度下的表现米氏常数(K_m)对 Asp 浓度作图为直线, 从斜率可求出其抑制常数 $K_i = 9.50$ mmol/L。

2.5 谷氨酸对该酶也表现为竞争性抑制

以谷氨酸为效应物, 探讨其对凡纳滨对虾 NAGase 的抑制作用类型。以相同的方法, 在含不同浓度 Glu 的测活体系中, 改变底物浓度, 测定酶促反应的初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数作图 (图 4)。结果表明, Glu 也表现为竞争性抑制作用, 因为 $1/v$ 对 $1/c_s$ 的双倒数作图为一组相交在纵轴的直线, 横轴截距随着 Glu 浓度的增大而增大, 即米氏常数 (K_m) 随着 Glu 浓度增大而增大, 最大反应速度 (V_m) 则不受影响。以相同的方法测得 Glu 对凡纳滨对虾 NAGase 的抑制常数 K_i 为 12.06 mmol/L。

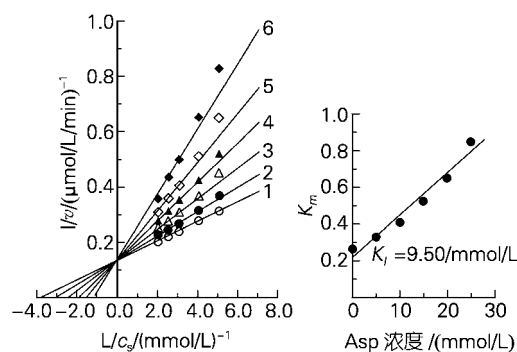


图3 Asp 对凡纳滨对虾 NAGase 的抑制作用

Fig.3 Lineweaver-Burk plots for inhibition of Asp on the NAGase from the prawn (*Litopenaeus vannamei*)

1~6 的抑制剂浓度分别为 0, 5, 10, 15, 20 和 25 mmol/L,

v 表示酶促反应初速度; C_s 表示底物浓度

1~6 were 0,5,10,15,20 and 25 mmol/L, respectively

v presents initial velocity of enzyme promotion reaction; C_s presents the concentration of the bottom matters

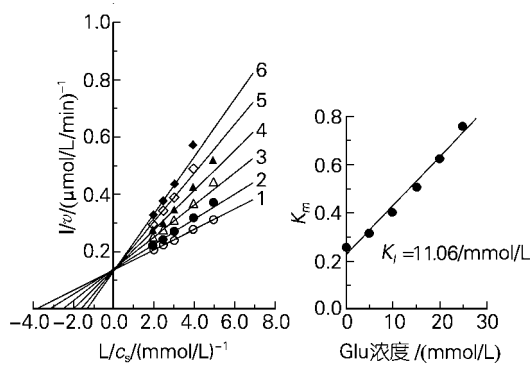


图4 Glu对凡纳滨对虾NAGase的抑制作用

Fig.4 Lineweaver-Burk plots for inhibition of Glu on the NAGase from the prawn (*Litopenaeus vannamei*)

1~6的抑制剂浓度分别为0, 5, 10, 15, 20和25 mmol/L

v_0 表示酶促反应初速度, C_0 表示底物浓度

1~6 were 0,5,10,15,20 and 25 mmol/L, respectively

v_0 presents initial velocity of enzyme promotion reaction; C_0 s presents the concentration of the bottom matters

3 讨论

NAGase 主要分布在凡纳滨对虾的内脏及虾壳下的表皮,能催化几丁质的降解和合成,在对虾生长发育过程中对旧壳的蜕换及新壳的形成起着重要作用。作者在研究金属离子、有机溶剂、产物及产物类似物对酶活力影响的基础上^[12-15],进一步研究氨基酸对NAGase 催化水解 pNp-β-D-GlcNAc 活力的影响,对NAGase 在对虾体内的催化机理及功能研究、虾蜕壳前后的食物调配具有重要意义。

大部分蛋白质都由L型氨基酸组成,且氨基酸对酶的抑制具有立体异构专一性,只有L-氨基酸才有明显的抑制作用^[16,17]。实验结果显示,所选的非极性氨基酸 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp 及极性氨基酸 Ser, Thr, Cys, Gln, Asn 中,除了 Trp 有轻微的抑制外,其它对凡纳滨对虾 NAGase 的催化活力皆没有明显的影响;碱性氨基酸 His、Lys 和 Arg 对酶有轻微的激活作用,当浓度为 15 mmol/L 时,酶相对活力依次为 124.7%、113.7%、109.8%;而酸性氨基酸 Asp 及 Glu 对酶则有较明显的抑制作用,当浓度为 15 mmol/L 时,酶相对活力依次为 58.1%、74.5%。导致这种结果可能与氨基酸的带电性有关,在测活体系的 pH 为 5.2 的条件下,非极性氨基酸及极性氨基酸均不带电或只带少量电荷;而碱性的-NH₂ 结合 H⁺

带正电荷,酸性氨基酸的-COOH 解离带负电荷。带正电荷的碱性氨基酸可与酶活性部位外围的负电荷结合,有利酶活性部位的暴露而便于底物结合;而带负电荷的酸性氨基酸可与酶活性部位带正电荷的必需基团可逆结合,阻碍了底物与酶活性中心的结合,从而抑制了酶活力。Trp 的轻微抑制则可能由于侧链基团与酶的结合,导致酶分子构象的变化而影响酶的催化作用。进一步研究酸性氨基酸的抑制机理,结果显示对酶的效应是竞争性抑制作用, Asp 与酶的结合能力比 Glu 强,这些结果与文献报道的锯缘青蟹 ALP 具有较大差异^[18]。

参考文献:

- [1] Broadway R M, Williams D L, Kaln W C, et al. Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, 20: 271 - 276.
- [2] Funke B, Spindler K D. Characterization of chitinase from the brine shrimp *Artemia* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1989, 94B(4): 691 - 695.
- [3] Lynn K R. Chitinases and chitobiasis from the American lobster (*Homarus americanus*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1990, 96B(4): 761 - 766.
- [4] Peters G, Saborowski R, Mentlein R, et al. Isoforms of an N-Acetyl-β-D-glucosaminidase from the Antarctic krill, *Euphausia superba*: purification and antibody production [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 120B: 743 - 751.
- [5] Peters G, Saborowski R, Buchholz F, et al. Two distinct forms of the chitin-degrading enzyme N-Acetyl-β-D-glucosaminidase in the Antarctic krill: specialists in digestion and moult [J]. *Marine Biology*, 1999, 134: 697 - 703.
- [6] 程明哲, 苏拔贤, 宋英良, 等. 虾头几丁质酶的研究[J]. 热带海洋, 1996, 15(2): 68 - 73.
- [7] 李友宾. 罗氏沼虾肝胰腺几丁质酶的亲和-消化纯化方法初探[J]. 湛江海洋大学学报, 2001, 21(2): 69 - 71.
- [8] 李友宾. 罗氏沼虾肝胰腺几丁质酶分离纯化及部分性质[J]. 西南民族学院学报(自然科学版), 2001, 27(3): 325 - 329.
- [9] 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]. *Marine Biology*, 2004, 146: 143 - 148.

- [10] Lin J C, Chen Q X, Shi Y, *et al.* The chemical modification of the essential groups of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from *Turbo cornutus* Solander [J]. *IUBMB Life*, 2003, **55**(9): 547 – 552.
- [11] Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z, *et al.* Kinetic of inhibition of alkaline phosphatase from green crab (*Scylla serrata*) by N-bromosuccinimide [J]. *J Protein Chem*, 1996, **15**(4): 345 – 350.
- [12] 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.
- [13] 谢晓兰, 王勤, 陈清西. 产物类似物对南美白对虾 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, **43**(Sup): 24 – 27.
- [14] 王悦, 谢晓兰, 王勤, 等. 乙醇对南美白对虾 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活力与构象的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, **43**(Sup): 28 – 31.
- [15] 林建城, 王悦, 谢晓兰, 等. 金属离子对南美白对虾 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.
- [16] Fishman W H. On the importance of being stereo specific [J]. *Clinica Chimica Acta*, 1989, **186**(2): 129-135.
- [17] Hoylaerts M F, Manes T, Millan J L. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase [J]. *Biochem*, 1992, **286**: 23 – 28.
- [18] 陈清西, 张喆, 庄总来, 等. 锯缘青蟹碱性磷酸酶分离纯化及部分性质研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, **29**(4): 362 – 367.

Inhibitory effects of amino acids on the β -N-Acetyl-D-Glucosaminidase from prawn (*Litopenaeus vannamei*)

XIE Xiao-lan^{1,2}, WANG Yue¹, CHEN Qing-xi¹

(1. The 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 Chemistry, Quanzhou Normal College, Quanzhou 362000, China)

Received : Sep., 20, 2004

Key words: *Litopenaeus vannamei*; β -N-Acetyl-D-glucosaminidase; amino acids; inhibitory kinetics

Abstract: The β -N-Acetyl-D-glucosaminidase (NAGase, EC.3.2.1.52) catalyzes the cleavage of N-acetylglucosamine polymers. It is a composition of the chitinases and cooperates with endo-chitinase and exo-chitinase to disintegrate chitin into N-acetylglucosamine. It is widely distributed in animal tissues and in microorganisms. The effects of some amino acids on the activity of NAGase from the viscera of prawn (*Litopenaeus vannamei*) were studied. The results showed hydrophobic amino acids and neutral hydrophilic amino acids had no effects on the enzyme activity apparently. The alkaline amino acids activated the enzyme activity lightly, and the order of activation was His > Lys > Arg. The acidic amino acids had inhibitory effects on the enzyme activity, and the inhibitory effects were reversible with remaining enzyme activity. The IC₅₀s of Asp and Glu (the inhibitor concentrations leading to 50% activity loss) were estimated to be 20 and 28 mmol/L, respectively. The inhibitory mechanisms were competitive types and their K_is were determined to be 9.50 and 11.06 mmol/L respectively.

(本文编辑:张培新)