

棉铃虫 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质

黄小红¹ 陈清西² 尤民生¹ 王君² 关雄^{1*}

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

2. 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 *Helicoverpa armigera* 蛹为材料, 通过硫酸铵沉淀分级分离、Sephadex G-200 分子筛柱层析和 DEAE-32 离子交换柱层析纯化, 获得聚丙烯酰胺凝胶电泳纯的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶制剂。纯酶的比活力为 2 678.79 U/mg。以对硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷(pNP- β -D-GlcNAc)为底物, 研究酶催化底物水解的反应动力学。结果表明:酶的最适 pH 为 5.63, 最适温度为 55℃。该酶在 pH 4~8 区域较稳定, 而在 pH>8 时能迅速失去活力;在 50℃以下处理 30 min, 酶活力仍保持稳定, 高于 50℃, 酶很快失去活力。酶促反应动力学符合米氏双曲线方程, 测得米氏常数 K_m 为 0.16 mmol/L, 最大反应速度 V_m 为 10.73 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。酶催化 pNP- β -D-GlcNAc 反应的活化能为 66.24 kJ/mol。

关键词:棉铃虫;N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶;分离纯化;动力学;稳定性

中图分类号:Q965 文献标识码:A 文章编号:0454-6296(2005)04-0498-05

Isolation, purification and partial characterization of the β -N-acetyl-D-glucosaminidase from the pupae of *Helicoverpa armigera*

HUANG Xiao-Hong¹, CHEN Qing-Xi², YOU Min-Sheng¹, WANG Jun², GUAN Xiong^{1*} (1. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: β -N-acetyl-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.52) was purified from the pupae of *Helicoverpa armigera* by ammonium sulfate fractionation and chromatography on Sephadex G-200 and DEAE-cellulose. The purified enzyme preparation was homogeneous as judged by polyacrylamide gel electrophoresis. It was found that the specific activity of the enzyme was 2 678.79 U/mg. The optimal pH value was 5.63 and the optimal temperature 55℃. The enzyme was stable in the pH ranges of 4 to 8 under 37℃. The enzyme follows typical Michaelis-Menten kinetics for the hydrolysis of pNP- β -D-GlcNAc and the K_m and V_m values were 0.16 mmol/L and 10.73 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively. The activation energy of the enzyme for the hydrolysis of pNP- β -D-GlcNAc was 66.24 kJ/mol.

Key words: *Helicoverpa armigera*; β -N-acetyl-D-glucosaminidase; isolation and purification; kinetics; stability

几丁质酶系有内切几丁质酶、外切几丁质酶和 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (β -N-acetyl-D-glucosaminidase, NAG, EC 3.2.1.52) 3 种不同的组分, 广泛存在于微生物、甲壳动物和某些植物中 (Koga *et al.*, 1987; Spindler and Buchholz, 1988; Joshi *et al.*, 1989; Kono *et al.*, 1990; Broadway *et al.*, 1995), 在自然界的碳循环中具有重要的作用。NAG

能特异催化水解几丁质的 β -1,4-糖苷键生成 N-乙酰-D-氨基葡萄糖, 直接参与几丁质的分解代谢过程, 在生物体内的物质代谢中发挥着重要作用 (欧阳石文等, 2001)。昆虫的体壁和中肠围食膜均含有几丁质, 几丁质是昆虫的主要结构组分, 也是昆虫防止机械损伤和生物危害的屏障。NAG 因为能水解几丁质有破坏围食膜的作用, 因而被作为防治害虫的

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2002AA245011); 福建省重大项目(2002N004)

作者简介: 黄小红, 女, 1966 年 12 月生, 福建建瓯人, 副教授, 博士, 研究方向为酶学, E-mail: xhhuang@vip.sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: guanxfafu@126.com

收稿日期 Received: 2004-10-09; 接受日期 Accepted: 2005-02-03

潜在的一种手段。可以将此酶导入昆虫的体内来破坏其正常的组织结构,使细菌或病毒更宜侵入虫体,达到抑杀害虫的目的;也可以通过调控此酶的活性来影响昆虫的生长发育(吴青君等,2000;欧阳石文等,2001)。降解几丁质是一种防治昆虫很有前景的策略。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属鳞翅目夜蛾科,是我国乃至整个东半球的主要棉花害虫之一。20 世纪 90 年代以来,棉铃虫在我国连年大发生,并对常用杀虫剂特别是一些菊酯类杀虫剂产生抗药性,其猖獗危害制约了我国棉花持续、稳定的发展。我们以棉铃虫为材料,分离提取其 NAG,研究其酶学性质,这不仅可以为进一步研究该酶的结构与功能、比较不同来源生物的酶学差异提供有益的数据,而且可以为新型生物杀虫剂的开发利用提供新的线索,以期控制棉铃虫提供有利的手段。

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,Sephadex G-200 为 Pharmacia 产品;DEAE-cellulose-32 为 Whatman 产品;牛血清蛋白为标准蛋白,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酶的分离纯化:以棉铃虫蛹作为分离 NAG 的材料。采用硫酸铵分级分离,收集 30%~70% 饱和度的沉淀蛋白,透析后得到粗酶制剂。进一步通过 Sephadex G-200 分子筛凝胶过滤柱层析纯化,采用 0.01 mol/L pH 6.8 磷酸缓冲液(内含 0.2 mol/L NaCl)洗脱,柱规格为 2.6 cm \times 60 cm,流速为 8 mL/h,自动分部收集,2.0 mL/管。活力峰再通过 DEAE-32 离子交换柱层析纯化,以 NaCl 浓度梯度(0~1.2 mol/L)的 0.01 mol/L pH 6.8 磷酸缓冲液洗脱。柱规格为 2.0 cm \times 30 cm,流速为 12 mL/h,分部收集,3.0 mL/管。合并酶活性峰,作酶活力分析。

1.2.2 NAG 活力测定:酶活力的测定参照 Lin 等(2003)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 pH 5.63 磷酸缓冲液,0.2 mmol/L 的底物),于 37 $^{\circ}$ C 恒

温水浴中加入 20 μ L 酶液,准确反应 10 min,加入 2 mL 0.5 mol/L NaOH 终止反应。在 Backman DU-650 分光光度计测定波长为 405 nm 的光密度值(OD_{405 nm})。以硝基酚(pNP)为产物对照,摩尔消光系数为 $8.8 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。酶活力单位(U)定义:在上述条件下,每升溶液中每分钟催化水解产生 1 μ mol pNP 所需的酶量。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 蛋白浓度测定:采用 Folin-酚试剂法(Lowry *et al.*, 1951)测定蛋白浓度,以牛血清蛋白为对照。

1.2.4 纯度鉴定:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定酶的纯度。

1.2.5 酶催化底物 pNP- β -D-GlcNAc 水解反应的活化能测定:在测活体系中,改变底物浓度,测定酶促反应的初速度,按 Lineweaver-Burk 双倒数作图,求出酶促反应的最大速度(V_m)。在不同温度下,测定酶促反应的 V_m ,根据 Arrhenius 公式,以最大反应速度之对数($\lg V_m$)对 $1/T$ 作图,得直线关系,从直线的斜率求出酶催化 pNP- β -D-GlcNAc 反应的活化能。

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

棉铃虫 NAG 的纯化图谱见图 1。Sephadex G-200 分子筛柱层析纯化的活力峰在管号 80~110 之间。DEAE-32 离子交换柱层析纯化的活力峰在管号 28~32 之间。经各步分离纯化(表 1),最终得到比活力为 2 678.79 U/mg 的酶制剂。所得到的酶制剂经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一蛋白质成分(图 2)。说明该酶制剂已达电泳纯。

2.2 pH 对酶活力的影响

在 37 $^{\circ}$ C 的测活体系中,测定不同 pH 下的酶促反应的初速度,研究 pH 对酶催化底物 pNP- β -D-GlcNAc 水解反应的初速度的影响。结果(图 3)表明酶活力与 pH 值呈钟罩形关系,其最适 pH 为 5.63。

2.3 酶的酸碱稳定性的研究

将等量的酶液与不同 pH 值的缓冲液等量混合,室温下放置 30 min 后,取出 20 μ L 处理的酶液在 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 3)表明该酶在 pH 4~8 区域较稳定,而在 pH 小于 4 和 pH 大于 8 时不稳定。

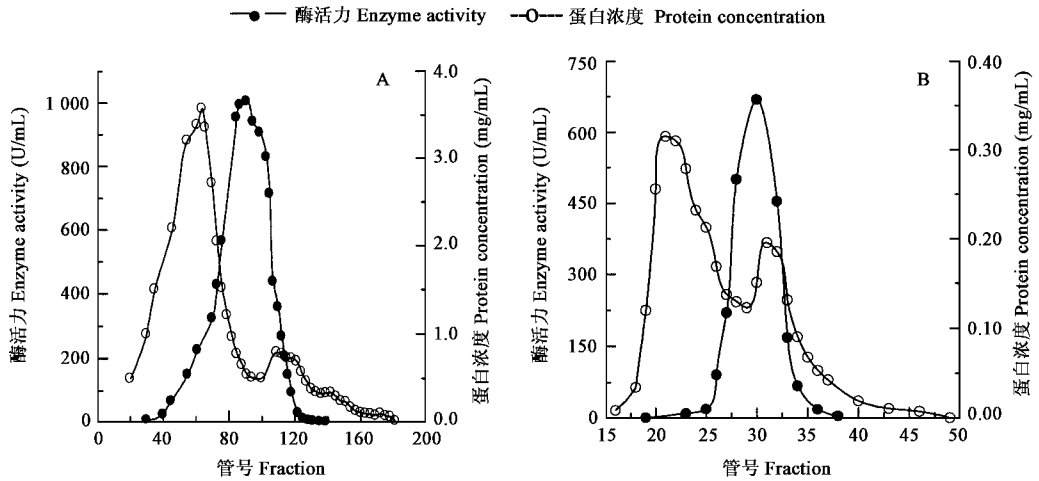


图 1 棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的 Sephadex G-200 (A) 和 DEAE-32 (B) 柱层析图谱
 Fig. 1 Purification chromatography of the β-N-acetyl-D-glucosaminidase on Sephadex G-200 (A) and on DEAE-cellulose (B)

表 1 棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化

Table 1 Purification of the β-N-acetyl-D-glucosaminidase from *Helicoverpa armigera*

纯化步骤 Purification	总体积 (mL) Total volume	总蛋白 (mg) Total protein	总活力 (U) Total activity	比活力 (U/mg) Specific activity	回收率 (%) Recovery	纯化倍数 Purification factor
匀浆上清液 Crude preparation	50	645	166 761.36	258.54	100	1.0
30% ~ 70% 硫酸铵沉淀 30% - 70% (NH ₄) ₂ SO ₄	15	340.5	103 507.5	303.99	62.1	1.18
Sephadex G-200	60	39.6	63 750	1 609.8	61.6	6.23
DEAE-cellulose	28	4.62	12 376	2 678.79	19.4	10.36

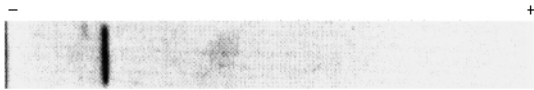


图 2 棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of the purified β-N-acetyl-D-glucosaminidase

2.4 温度对酶活性的影响

在 pH 5.63 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液的测活体系中, 加入 20 μL 酶液 (酶浓度 0.5 mg/mL) 测定不同温度下的酶催化反应的初速度, 研究温度对酶活力的影响。结果 (图 4) 表明, 酶的作用有个最适温度区域, 其最适温度为 55℃。

2.5 酶的热稳定性研究

天然酶在不同温度下 (25 ~ 75℃) 热处理 30 min

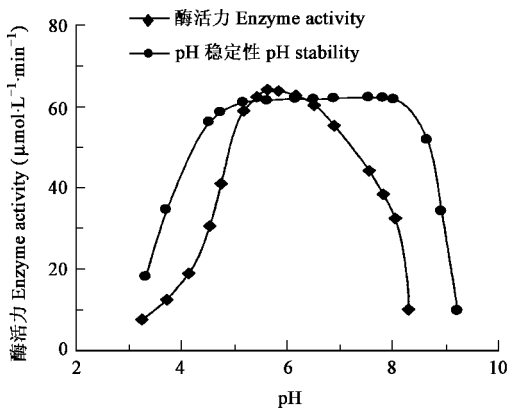


图 3 pH 对棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响及该酶的 pH 稳定性

Fig. 3 The effect of pH on the activity and pH stability of β-N-acetyl-D-glucosaminidase

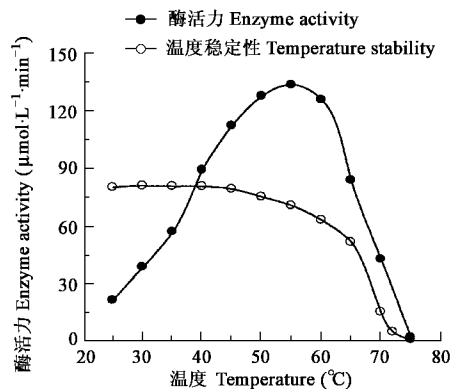


图 4 温度对棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响及该酶的温度稳定性

Fig. 4 The effect of temperature on the activity and temperature stability of β-N-acetyl-D-glucosaminidase

后,迅速冷却到室温,然后取出 20 μL 处理的酶液在最适的测活体系(pH 5.63, 37℃)中检测酶的剩余酶活力,结果(图 4)表明:酶在 45℃ 以下热变性 30 min,酶活力基本保持不变,说明酶在 50℃ 以内有较好的热稳定性。

2.6 酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的动力学参数测定

在 2 mL pH 5.63 的测活体系中,改变底物浓度,37℃ 下测定酶促反应的初速度,以酶促反应初速度对底物浓度作图,呈典型双曲线关系。说明酶催化底物水解反应遵循 Michaelis-Menten 方程式(见图 5 内插图)。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,求得该酶水解 pNP-β-D-GlcNAc 的 K_m 和 V_m 值分别为 0.16 mmol/L 和 $10.73 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (图 5)。

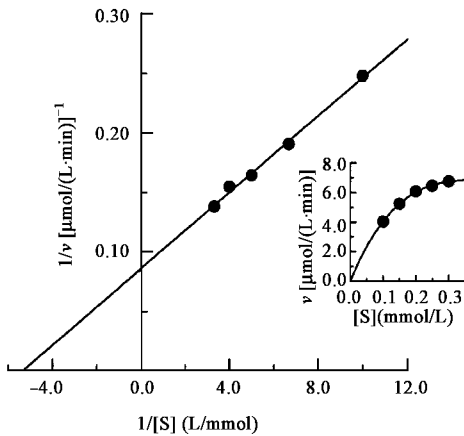


图 5 棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 5 The Lineweaver-Burk plot of β-N-acetyl-D-glucosaminidase for the hydrolysis of pNP-β-D-GlcNAc

内插图为反应的初速度对底物浓度的双曲线关系

The inset shows the relationship between the initial rate and the substrate concentration.

2.7 酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的活化能测定

在不同温度下测定酶催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的 V_m 值。根据 Arrhenius 公式,以最大反应速度之对数($\lg V_m$)对 $1/T$ 作图,得一直线(图 6),测定酶催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的活化能为 66.24 kJ/mol。

3 讨论

棉铃虫的蛹是全变态昆虫在后胚发育过程中,由幼虫转变为成虫时,必须经过的一个特有的静息虫态。蛹的生命活动虽然是相对静止的,但其体内

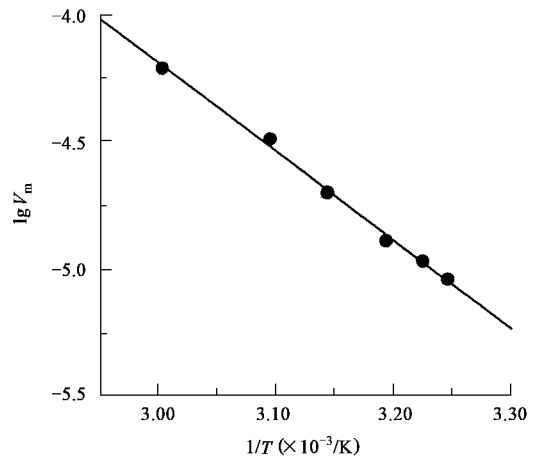


图 6 酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的活化能测定

Fig. 6 Determination of the activation energy of β-N-acetyl-D-glucosaminidase for the hydrolysis of pNP-β-D-GlcNAc

则进行着剧烈的旧组织解离和新组织发生的新陈代谢作用,将幼虫器官改造为成虫器官。我们根据它的这一特性选择蛹作为分离纯化 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的材料。蛹经过硫酸铵的分级沉淀、Sephadex G-200 分子筛柱层析和 DEAE-32 离子交换柱层析纯化 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力提高了 10.36 倍。分离纯化后的酶经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一组分,说明分离纯化的方法是有效可行的。在分离纯化的过程中,酶活力损失 80.6%。Koga 等(1986)用硫酸铵的分级沉淀、羟基磷灰石吸附层析、DEAE Bio-Gel 柱层析和 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱层析分离纯化家蚕 *Bombyx mori* 消化管的 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力提高了 64.77 倍,但酶活力损失 96.23%。与 Koga 的方法相比,我们采用的纯化方法比较简便,酶活力损失相对少,但与其他纯化方法相比,酶活力的损失还是较多。酶的分离纯化是对其展开全面研究的基础,因而获得回收率高的纯酶是开展研究的关键步骤,这方面还有待于进一步的探讨。

棉铃虫 NAG 的最适 pH 为 5.63,其酸碱稳定性范围较宽,在 pH 4 ~ 8 区域较稳定。这与蚕消化道来源的酶性质一致(Koga *et al.*, 1986),而不同于苏云金芽孢杆菌几丁质酶,后者的 pH 稳定区域较窄(黄小红等,2004)。Ohtakara 等(1979)从弧菌属 *Vibrio* sp. 的培养液中得到一种碱性几丁质酶在 pH 9 ~ 11 范围内稳定。说明不同生物来源的几丁质酶有较大差异,原因可能是不同生物所产生的酶具有不同的催化特性,因而具有不同的分子结构特点,由

此产生性质的差异。

酶的最适温度为 55℃ 并在 50℃ 内具有较好的稳定性,说明棉铃虫蛹对温度的适应性强。棉铃虫以蛹的虫态躲过不良环境或季节,如越冬。即蛹的抗逆力强,我们的实验结果是符合它的这种生物学特性的。

酶促反应动力学符合米氏双曲线方程,棉铃虫 NAG 的米氏常数 K_m 为 0.16 mmol/L,较家蚕(Koga *et al.*, 1986)消化管 NAG 的 K_m 值(0.787 mmol/L)和南美白对虾 *Penaeus vannamei* 的 K_m (0.254 mmol/L)小(Xie *et al.*, 2004),说明棉铃虫 NAG 对底物 pNP- β -D-GlcNAc 的亲合力大于家蚕和南美白对虾 NAG 的亲合力,酶的催化能力也强。

以上对棉铃虫 NAG 的研究不仅有助于阐明酶的作用机理,亦可作为筛选新型杀虫剂的靶标以及进一步为开发利用该酶提供依据。

参 考 文 献 (References)

Broadway RM, Williams DL, Kain WC, Harman GE, Lorito M, Labeda DP, 1995. Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20(5):271-276.

Huang XH, Chen QX, Wang J, Sha L, Huang ZP, Guan X, 2004. Isolation, purification and properties of the chitinase from *Bacillus thuringiensis*. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 10(6):771-773. [黄小红, 陈清西, 王君, 沙莉, 黄志鹏, 关雄, 2004. 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)几丁质酶的分离纯化及酶学性质. 应用与环境生物学报, 10(6):771-773]

Joshi S, Kozlowski M, Richens S, Comberbach DM, 1989. Chitinase and chitinase production during fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.*, 11(5):289-296.

Koga D, Shimazaki C, Yamamoto K, Inoue K, Kimura S, Ide A, 1987. β -N-acetyl-D-glucosaminidases from integument of the silkworm, *Bombyx*

mori: comparative biochemistry with the pupal alimentary canal enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, 51(6):1679-1681.

Koga D, Nakashima M, Matsukura T, Kimura S, Ide A, 1986. Purifications and properties of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from alimentary canal of the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.*, 50(9):2357-2368.

Kono M, Matsui T, Shimizu C, Koga D, 1990. Purifications and some properties of chitinase from the liver of a prawn, *Penaeus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.*, 54(8):2145-2147.

Lin JC, Chen QX, Shi Y, Li SW, Zhao H, 2003. The chemical modification of the essential groups of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Turbo cornutus* Solander. *J. IUBMB Life*, 55(9):547-552.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.

Otakara A, Mitsutomi M, Uchida Y, 1979. Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. *J. Ferment. Technol.*, 57(3):169-177.

Ouyang SW, Liu JL, Feng LX, Zhao KJ, 2001. Research on insect chitinases and their application. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 20(2):147-153. [欧阳石文, 刘江良, 冯兰香, 赵开军, 2001. 昆虫几丁质酶的研究与应用. 山地农业生物学报, 20(2):147-153]

Spindler KD, Buchholz F, 1988. Partial characterization of chitin degrading enzymes from two euphausiids, *Euphausia superba* and *Meganyctiphanes norvegica*. *Polar Biol.*, 9:115-122.

Wu QJ, Zhang WJ, Zhang YJ, 2000. Insect chitinase and its potential use in plant protection. *Entomological Knowledge*, 37(5):314-317. [吴青君, 张文吉, 张友军, 2000. 昆虫几丁质酶及其在植物保护中的应用. 昆虫知识, 37(5):314-317]

Xie XL, Chen QX, Lin JC, Wang Y, 2004. Purification and some properties of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). *Marine Biology*, 146(1):143-148.

(责任编辑:黄玲巧)