

菜青虫 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 活性必需基团的研究

石 艳, 刘炜风, 陈清西*

(厦门大学生命科学院, 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)

摘要: 从菜青虫表皮分离纯化 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase), 获得电泳单一纯的酶制剂, 通过化学修饰法研究该酶的活性必需基团. 分别以碳化二亚胺(EDC)、N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)、对-氯汞苯甲酸(pCMB)、二硫苏糖醇(DTT)、溴代乙酸(BrAc)和乙酰丙酮在特定条件下对该酶进行特异的化学修饰, 结果表明酸性氨基酸的侧链羧基、半胱氨酸巯基、色氨酸的吲哚基、组氨酸的咪唑基、二硫键被修饰后, 酶活性均显著下降, 因此这些氨基酸残基是酶活性的必需基团, 而精氨酸残基及赖氨酸 ϵ -氨基被修饰后对酶活力没有影响, 不是酶的必需基团.

关键词: 菜青虫; N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶; 活性必需基团; 化学修饰

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)06-0851-04

菜粉蝶(*Pieris brassicae*)又名菜白蝶, 昆虫纲鳞翅目粉蝶科, 其幼虫称为菜青虫, 是菜粉蝶危害蔬菜的主要形态. 菜青虫主要侵食十字花科植物的叶, 严重影响蔬菜品质. 多年来应用化学农药进行防治, 但化学农药的长期使用使害虫产生抗药性, 并在蔬菜中产生残毒, 且造成环境污染. 几丁质是由 N-乙酰葡萄糖胺通过 β -1,4 键连结起来的线性多糖, 是许多生物的结构性组分. 几丁质不仅是昆虫的重要结构组分, 而且也是昆虫防止机械损伤和生物危害的屏障. 昆虫在蜕皮期间, 必须降解几丁质, 才能蜕去旧表皮, 分泌新表皮, 进行正常的生长发育. 昆虫中催化水解几丁质的是几丁质水解酶, 主要包括几丁质酶和 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase, EC3.2.1.52). 两者协同作用将几丁质水解至单糖 N-乙酰氨基葡萄糖^[1,2]. 由于几丁质及其水解酶在昆虫中的重要性, 因此通过转几丁质水解酶基因植物^[2]或其抑制剂^[3]都将起到破坏昆虫的生长发育, 达到杀灭害虫的目的.

我们已对菜青虫表皮的 NAGase 进行了分离纯化、理化性质的研究^①. 在此基础上, 进一步通过化学修饰法探讨该酶活性部位的功能基团, 为了解菜青虫的生理生化特性提供理论基础, 同时为筛选以该酶为靶标的抑制剂开发新型生物农药奠定理论基础.

1 材料与方法

N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶从菜青虫表皮分离纯化得到. 通过解剖获得五龄菜青虫表皮, 用含 0.1 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L PBS(磷酸盐缓冲液, pH = 6.8)抽提, 硫酸铵分级分离以及 Sephadex G-200、羟基磷灰石柱层析分离纯化获得 PAGE 和 SDS-PAGE 为单一蛋白带的酶制剂, 纯酶的比活力为 8 715 U/mg; 对硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷(pNP-NAG)为上海医药工业研究院生化室产品; N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)、碳化二亚胺(EDC)、二硫苏糖醇(DTT)为 Sigma 产品; 对-氯汞苯甲酸(pCMB)为 Karl Roth 产品; 溴代乙酸(BrAc)、乙酰丙酮等为上海试剂一厂产品; 其它试剂均为国产 AR 纯, 所有溶液均以 Millipore 纯水系统制备的超纯水配制.

酶活力测定方法参考文献[4], 以 pNP-NAG 为底物, 在 2.0 mL 的反应体系中, 含 pH = 6.2 的 0.15 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)和 0.25 mmol/L pNP-NAG, 加入 10 μ L 酶液, 在 37 $^{\circ}$ C 下准确反应 10 min, 加入 2.0 mL 0.5 mol/L 的 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(OD_{405nm}), 消光系数按 8.80×10^3 L/(mol $\cdot$ cm)计算.

收稿日期: 2006-03-24

基金项目: 福建省自然科学基金(2006J0078), 厦门大学科技创新工程基金(XDKJCX20043001)资助

作者简介: 石艳(1971-), 女, 讲师, 在职博士生.

* 通讯作者: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

① Shi Y, Jiang Z, Han P, et al. Purification and some Properties of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from the cabbage butterfly(*Pieris brassicae*). Biochimie, (in press).

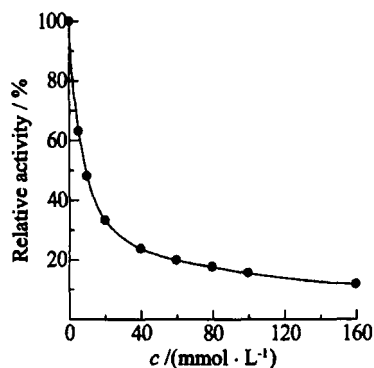


图1 EDC对酶的修饰作用

Fig.1 Modification of NAGase by EDC

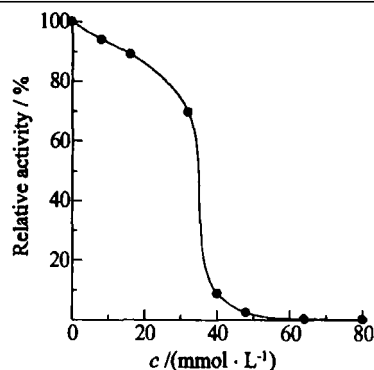


图2 pCMB对酶的修饰作用

Fig.2 Modification of NAGase by pCMB

各种化学修饰采用的条件详见结果部分. 修饰一定时间后, 取 10 μL 处理的酶液在正常反应体系下测定酶的剩余活力.

2 实验结果

2.1 碳化二亚胺对酶的化学修饰

水溶性的碳化二亚胺(EDC)是目前最常用的羧基修饰剂, 在偏酸性条件下专一地修饰羧基. 梁放等^[5]用 EDC 修饰人纤维蛋白酶原研究羧基对酶活力的影响. 本文采用在室温下, TEMED-HCl 缓冲体系(pH 4.5)中, NAGase 经不同浓度 EDC 修饰 1 h 后, 在正常体系中测定酶的剩余活力(图 1), 结果表明随着 EDC 浓度的增大, 酶活力逐渐丧失, 说明羧基是酶活性所必需的基团.

2.2 巯基的化学修饰

对氯汞苯甲酸(pCMB)是常用于蛋白质分子中巯基修饰的试剂, 在酸性条件下可以专一的修饰巯基^[6]. 取不同浓度的 pCMB 与酶在 0.05 mol/L pH 5.8 NaAc-HAc 缓冲液中, 37℃保温 30 min 进行修饰作用后, 在正常体系中测定酶的剩余活力, 结果(图 2)表明: 该酶随着 pCMB 浓度增大, 酶活力迅速下降, 当 pCMB 浓度达到 3.0 mmol/L 时, 酶活力完全丧失, 说

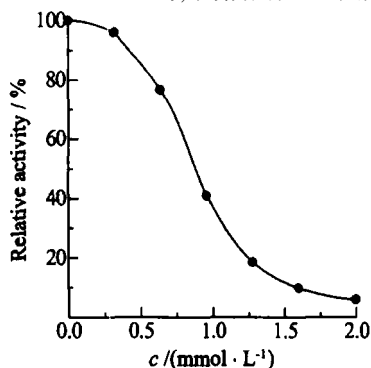


图3 溴代乙酸对酶的修饰作用

Fig.3 Modification of NAGase by BrAc

明巯基也是酶活性的必需基团.

2.3 溴代乙酸对酶的化学修饰

溴代乙酸(BrAc)在偏酸性条件下主要作用于组氨酸的咪唑基, 采用 BrAc 来修饰该酶, 探讨组氨酸咪唑基与酶活力的关系. BrAc 在 pH 5.8 NaAc-HAc 缓冲液中, 37℃下与酶作用 30 min 后, 在正常体系中测定酶的剩余活力, 酶活力随着 BrAc 浓度的增大迅速下降(图 3). 可见咪唑基也与酶活性密切相关, 是该酶活性所必需基团之一.

2.4 色氨酸残基的化学修饰

N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)在酸性条件下能较专一地修饰蛋白质的色氨酸残基^[7]. 采用 NBS 在 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液 pH 5.4 下对 NAGase 进行化学修饰, 酶活力变化见图 4, 随着 NBS 浓度增大, 酶活力逐渐下降至完全丧失, 表明色氨酸的吲哚基被修饰会引起酶活力的丧失, 色氨酸残基是酶活性的必需基团.

2.5 二硫键的化学修饰

DTT 是蛋白质分子中二硫键的专一性修饰剂之一^[6], 取不同浓度的 DTT 在 0.01 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液中, 37℃修饰处理 NAGase 30 min, 在正常的测活体系中检测酶的剩余活力, 结果表明酶活力随着 DTT 浓度的增大而下降(图 5), 当 DTT 浓

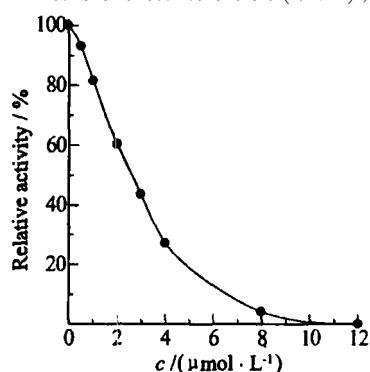


图4 NBS对酶的修饰作用

Fig.4 Modification of NAGase by NBS

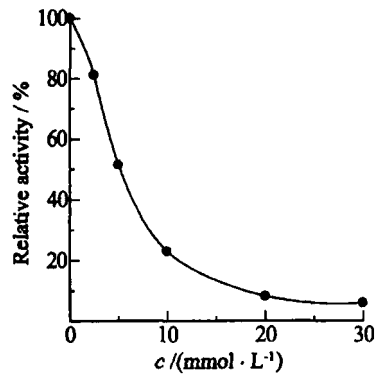


图5 DTT 对酶的修饰作用

Fig.5 Modification of NAGase by DTT

度达到 20 mmol/L 时,酶活力几乎丧失.说明酶分子中二硫键与酶活力相关,二硫键的断裂会使酶活力丧失.

2.6 氨基及精氨酸残基的化学修饰

醋酸酐在半饱和的醋酸钠(pH 8.0)下能特异地修饰氨基,乙酰丙酮在 pH9.0 条件下能特异地与蛋白质中的精氨酸残基起反应,选择这两种修饰剂对酶进行化学修饰,在一定的修饰剂浓度范围内(小于 100 mmol/L),酶活力变化不大,说明侧链氨基及精氨酸残基与酶的活性无关,不是酶的活性必需基团.

3 讨论

通过修饰剂对菜青虫表皮 NAGase 的化学修饰研究,结果表明:酸性氨基酸的侧链羧基、半胱氨酸巯基、色氨酸的吲哚基、组氨酸的咪唑基、二硫键被修饰后,酶活性均显著下降,因此这些氨基酸残基是酶活性的必需基团.而精氨酸残基及赖氨酸 ε-氨基被修饰后对酶活力没有影响,不是酶的必需基团. Amutha 等^[8]报道来源于耐热菌 *Bacillus* sp. NCIM 5120 的 NAGase 色氨酸、组氨酸、酸性氨基酸是该酶的活性功能基团,其中色氨酸与底物 pNP-NAG 的结合有关,而组氨酸、酸性氨基酸与酶的催化功能有关,但巯基及赖氨酸不是活性功能基团. Lin 等^[9]报道蛱蝶(*Turbo cornutus*) NAGase 色氨酸的吲哚基、组氨酸的咪唑基、酸性氨基酸的侧链羧基、赖氨酸的 ε-氨基是它的活性功能基团,而巯基与酶活性无关. 来自甲壳纲的南美白对虾(*Penaeus vannamei*)^[10]的 NAGase 化学修饰研究表明半胱氨酸的巯基、色氨酸的吲哚基、组氨酸的咪唑基、酸性氨基酸的侧链羧基、赖氨酸的 ε-氨基是酶活性所必需的,而锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[11] NAGase 的二硫键及侧链氨基与酶活力无关. 关于昆虫 NAGase 功能基团的研究还未见报道,但是通过比较烟草天蛾(*Manduca sexta*)与其他物种来源的 NA-

Gase 的氨基酸保守序列推测酸性氨基酸与酶的催化或结合底物密切相关^[1]. 可见酸性氨基酸是不同来源 NAGase 共同的保守功能基团,色氨酸的吲哚基、组氨酸的咪唑基也是大多数 NAGase 所共有的功能基团,但是巯基、精氨酸残基、赖氨酸 ε-氨基以及二硫键与该酶活性的相关性与其来源有关. 这些不同来源的 NAGase 功能基团的保守性是该酶能正常行使催化功能的保证,而某些功能基团的改变则可能是在进化过程中各物种为了适应各自的生活环境而出现的基因变异而导致的.

参考文献:

- [1] Zen K C, Choi H K, Krishnamachary N, et al. Cloning, expression, and hormonal regulation of an insect (N-acetylglucosaminidase) gene [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1996, 26(5): 435–444.
- [2] Kramer K J, Muthukrishnan S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1997, 27(11): 887–900.
- [3] Cohen E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action [J]. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1993, 22(1–2): 245–261.
- [4] Koga D, Nakashima M, Matsukura T, et al. Purifications and some properties of NAGase from alimentary canal of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1986, 50(9): 2357–2368.
- [5] 梁放, 吴一卉, 曹海石, 等. 人纤维蛋白溶酶原的化学修饰 [J]. *高等学校化学学报*, 2001, 22(4): 577–580.
- [6] 夏初临, 陈惠黎. 谷胱甘肽 S-转移酶活性中心的研究 [J]. *生物化学杂志*, 1991, 7(3): 327–332.
- [7] Chen Q X, Zhang W, Zheng W Z, et al. Kinetics of inhibition of Alkaline Phosphatase from Green Crab (*Scylla serrata*) by N-bromosuccinimide [J]. *J. Protein Chem.*, 1996, 15(4): 345–350.
- [8] Amutha B, Khire J M, Khan M I. Active site characterization of the exo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase from thermotolerant *Bacillus* sp. NCIM 5120: involvement of tryptophan, histidine and carboxylate residues in catalytic activity [J]. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, 1427(1): 121–132.
- [9] Lin J C, Chen Q X, Shi Y, et al. The chemical modification of the essential groups of β-N-acetyl-β-D-glucosaminidase from *Turbo cornutus solander* [J]. *IUBMB Life*, 2003, 55(9): 547–552.
- [10] 谢晓兰. 南美白对虾 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2005.
- [11] 张继平. 锯缘青蟹 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的性质及活力调控的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2006.

Studies on the Essential Groups of the β -N-acetyl-D-glucosaminidase from the Cabbage Butterfly(*Pieris brassicae*)

SHI Yan, LIU Weifeng, CHEN Qingxi*

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

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

Abstract: A β -N-acetyl-D-glucosaminidase (NAGase) was purified from the integument of the larva of cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). The purified enzyme was determined to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The characters of functional groups of the enzyme active site have been studied using chemical modification method. The enzyme was modified respectively by several chemical modification reagents, such as carbodiimide (EDC), pCMB (p-chloromercuribenzoate), N-bromosuccinimide (NBS), bromoacetic acid (BrAc), DTT (dithiothreitol), acetic anhydride and acetyl acetone at certain condition, and the residue activity was assayed in normal reaction media. The results showed that the enzyme activity was decreased when the carboxyl group, sulfhydryl group, indolyl group, imidazolyl group and disulfide bond were modified, respectively, which means that these groups were essential for the enzyme catalytic activity. The results also showed that the residues of lysine, arginine were irrespective with the enzyme activity.

Key words: cabbage butterfly (*Pieris brassicae*); β -N-acetyl-D-glucosaminidase; essential groups; chemistry modification