

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190307002

林建城, 罗新明, 林娟娟. Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的影响[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(5): 236-243

Lin J C, Luo X M, Lin J J. Effects of Hg^{2+} and Pb^{2+} on N-acetyl- β -D-glucosaminidase of *Tachypleus tridentatus* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(5): 236-243 (in Chinese)

Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的影响

林建城^{1,2,*}, 罗新明^{1,2}, 林娟娟^{1,2}

1. 莆田学院环境与生物工程学院, 莆田 351100

2. 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室(莆田学院), 莆田 351100

收稿日期: 2019-03-07

录用日期: 2019-06-27

摘要: 节肢动物蜕皮与 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(EC3.2.1.52, NAGase)密切相关。为了探究 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 这 2 种重金属离子对节肢动物 NAGase 的影响, 以中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)为材料, 从其内脏分离提取了 NAGase。利用酶促反应动力学方法, 研究 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 的影响; 通过对酶荧光发射光谱的测定, 研究 NAGase 酶蛋白经 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 作用后的空间构象变化。结果表明, Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 均有较强的抑制作用, Hg^{2+} 对 NAGase 的抑制作用强于 Pb^{2+} , Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对 NAGase 的抑制作用均表现为可逆过程, 其中 Hg^{2+} 对 NAGase 的抑制属于竞争性抑制作用, 抑制常数 K_i 为 $22.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Hg^{2+} 只与游离酶结合, 不与酶-底物络合物结合; 而 Pb^{2+} 对 NAGase 的抑制是属于竞争性-非竞争性混合型抑制作用, 抑制常数 K_i 和 K_{is} 分别为 $19.13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $75.23 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Pb^{2+} 与游离酶的亲和力相比与酶-底物络合物的亲和力更强。NAGase 经 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 作用后荧光发射强度均降低, 但荧光发射峰值并没有发生位移, 说明 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制作用均为酶蛋白空间构象的变化所致。这证明了 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 活力具调控作用。

关键词: Hg^{2+} ; Pb^{2+} ; 中国鲎; N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶; 抑制作用; 构象变化

文章编号: 1673-5897(2019)5-236-08

中图分类号: Q556.2

文献标识码: A

Effects of Hg^{2+} and Pb^{2+} on N-acetyl- β -D-glucosaminidase of *Tachypleus tridentatus*

Lin Jiancheng^{1,2,*}, Luo Xinming^{1,2}, Lin Juanjuan^{1,2}

1. College of Environmental and Biological Engineering, Putian University, Putian 351100, China

2. Fujian Provincial Key Laboratory of Ecology-toxicological Effects & Control for Emerging Contaminants, Putian University, Putian 351100, China

Received 7 March 2019

accepted 27 June 2019

Abstract: The molting of arthropods is closely related to N-acetyl- β -D-glucosaminidase (EC3.2.1.52, NAGase). In order to investigate the effects of Hg^{2+} and Pb^{2+} heavy metal ions on NAGase from arthropods, the NAGase were extracted from the viscera of *Tachypleus tridentatus*. The effects of Hg^{2+} and Pb^{2+} on NAGase were studied by

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2018J01467); 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室开放课题(PY16009); 莆田学院科研课题(2018005)

作者简介: 林建城(1966—), 男, 硕士, 教授, 研究方向为海洋生物酶学, E-mail: ptljc660402@sina.com

using the kinetics method of enzymatic reaction. Besides, the conformational changes of NAGase caused by Hg^{2+} and Pb^{2+} treatment were evaluated by the enzyme fluorescence emission spectrometry, respectively. The results showed that both Hg^{2+} and Pb^{2+} had strong inhibitory effects on the NAGase. The inhibitory effect of Hg^{2+} on NAGase was stronger than that of Pb^{2+} . The inhibitory effects of Hg^{2+} and Pb^{2+} on NAGase were both reversible. The inhibitory effect of Hg^{2+} on NAGase was the competitive type and its inhibition constant K_i was $22.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Hg^{2+} only combined with the free enzymes (E) and did not combine with the enzyme-substrate complex (ES). However, the inhibitory effect of Pb^{2+} on NAGase was the competitive and non-competitive mixed type. The inhibition constants K_i and K_{is} were $19.13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $75.23 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The affinity of Pb^{2+} for free enzyme was stronger than the enzyme-substrate complex. The fluorescence emission intensity of the NAGase treated by Hg^{2+} and Pb^{2+} were both decreased, but their fluorescence emission peak of NAGase did not shift. The results indicated that the inhibitory effects of both Hg^{2+} and Pb^{2+} on NAGase were caused by the conformational changes, which suggested that Hg^{2+} and Pb^{2+} had regulatory effects on the activities of NAGase from *Tachypleus tridentatus*.

Keywords: Hg^{2+} ; Pb^{2+} ; *Tachypleus tridentatus*; NAGase; inhibition; conformational change

根据几丁质酶作用机理不同,现认为至少包含有内切几丁质酶、外切几丁质酶和具外切酶性质的N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(EC3.2.1.52, NAGase)等3种组分^[1]。近年来,NAGase在节肢动物中的生理作用被广泛关注。Koga等^[2]从家蚕(*Bombyx mori*)的表皮层中获得NAGase,研究发现,蚕表皮NAGase与其周期性的蜕皮生理以及与生活周期中蛹的形成密切相关;随后,Buchholz^[3]研究了南极磷虾(*Euphausia superba*)的蜕皮生理与NAGase活力变化的相关性,发现在南极磷虾蜕皮前短时间内NAGase大量合成,酶活力迅速提高,用于降解虾几丁质表皮;而Zou和Fingerman^[4]的研究表明,招潮蟹(*Uca pugilator*)表皮和肝胰腺中NAGase的合成受类固醇蜕皮激素调控,NAGase活力变化与其周期性蜕皮之间存在密切相关。同样,朴顺金等^[5]研究了不同养殖期凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)外壳膜NAGase的性质,发现在虾幼体和生殖期时,由于蜕壳频繁,虾外壳膜NAGase比活力会迅速升高,从而进一步阐述了NAGase在节肢动物周期性蜕皮中的生理功能。

中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)属于节肢动物门肢口纲剑尾目,已成为了濒危物种,是国家二级保护动物,人类过度捕杀是导致其数量剧减的主要原因,另一个原因是工业生产产生的一些重金属由于过量排放严重破坏了海水系统,鲎赖以生存的海域环境受到严重污染,扰乱了鲎的正常生理活动与物质代谢。梁君荣等^[6]的研究表明,Zn、Pb、Cu和Cd等重金属对中国鲎的胚胎发育有不同的影响,当这些重

金属离子的浓度超过渔业水域水质标准浓度8倍时, Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对鲎的胚胎发育无明显影响,但 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 会使鲎胚胎发育中卵径变小,发育速度下降,对鲎胚胎发育的毒性从大到小为 $\text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} \approx \text{Cd}^{2+}$ 。此后,研究发现,金属离子对节肢动物特别是甲壳动物几丁质酶的生理生化有重要影响。张伟妮等^[7]的研究表明, Ag^+ 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Hg^{2+} 等4种重金属离子对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) NAGase酶活力均有不同程度的可逆抑制作用,其中 Ag^+ 和 Pb^{2+} 对酶还有先激活后抑制的作用;还有研究发现, Zn^{2+} 对锯缘青蟹内脏(*Scylla serrata*)^[8] NAGase会产生可逆抑制作用, Zn^{2+} 的存在会降低酶的温度稳定性;而 Hg^{2+} 对凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)^[9]内脏NAGase又有较强的不可逆的抑制作用。这说明环境中的金属离子对节肢动物中与蜕皮生理相关的几丁质酶产生重要影响。在中国鲎的胚胎发育到性成熟期间,至少需经19次蜕皮,鲎的蜕皮生理直接关系到鲎的正常生长与发育。 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 是环境中重金属离子污染物的重要组成份,直接影响到水生动物的生理代谢并引起慢性毒性效应^[10-11],但它们对中国鲎几丁质酶的影响,目前还未有深入研究。笔者课题组之前已对中国鲎内脏NAGase进行了分离纯化^[12],现继续探讨 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 这2种重金属离子对中国鲎NAGase的影响,研究中国鲎NAGase酶活力、构象变化和效应物之间的相关性,这对揭示海洋污染物与鲎蜕皮生理之间的相关性具有重要作

用,并为能更好地保护蜆资源和合理开发利用蜆资源提供一些科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

参照文献[12]所述方法分离纯化中国蜆内脏 NAGase,分别通过抽提、30%和80%的饱和硫酸铵分级分离、Sephadex G-200 凝胶层析以及 DEAE-32 离子交换层析分离,纯化后获得聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)单一纯的酶制剂,比活力为 $505.21 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,酶制剂在 4°C 下经过双蒸馏水透析后,用于 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对 NAGase 影响的研究。

NAGase 催化的底物对硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷(pNP- β -D-GlcNAc),分析纯,由上海医药工业研究院生化室合成;Sephadex G-200 是 Pharmacia 产品;纤维素 DEAE-32 是 Whatman 产品;硝基酚(pNP)、 HgCl_2 和 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 等试剂均为分析纯,均为上海国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 中国蜆 NAGase 活力测定

按文献[12]中 NAGase 活力的检测方法测定中国蜆 NAGase 活力。在 2 mL 的酶活力测定体系中,包含 1 mL $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAC-NaAC 缓冲液(pH 5.4),0.2 mL $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的底物 pNP- β -D-GlcNAc,0.78 mL 的双蒸馏水,20 μL 酶液。在 37°C 下反应 10 min,以 2 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 终止反应,测定 $A_{405 \text{ nm}}$,以先加 2 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH、后加 20 μL 酶液为空白对照。以产物硝基酚(pNP)为标准物,制定标准曲线。1 个酶活力单位(U)定义为:在上述条件下,每分钟催化水解产生 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pNP 所需的酶量规定为 1 U,酶催化活力大小以酶促反应速度(v)大小表示。

1.2.2 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国蜆 NAGase 活力的影响

在 NAGase 活力的测定体系中,在 $0 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内加入不同浓度的 HgCl_2 ,测定加入 HgCl_2 后 NAGase 的剩余酶活力;以同样的方法,在 $0 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内加入不同浓度的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$,测定加入 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 后 NAGase 的剩余酶活力。以未添加金属离子的对照组酶活力为 100%,其他各试验组以相对酶活力(%)表示。

1.2.3 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国蜆 NAGase 的抑制作用机理

在 2 mL NAGase 活力的测定体系中,底物

pNP- β -D-GlcNAc 浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,改变 NAGase 浓度(1.7、3.4、5.1、6.8 和 $8.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),分别测定在 0、10、20、30 和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 种不同浓度 HgCl_2 作用下 NAGase 的催化活力;同样测定在 0、15、20、25 和 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 种不同浓度 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 作用下 NAGase 的催化活力,并设立各自对照组,以酶浓度对酶活力作图,分别判断 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国蜆 NAGase 的抑制作用机理。

1.2.4 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国蜆 NAGase 的抑制作用类型

在 NAGase 活力的测定体系中,改变 pNP- β -D-GlcNAc 底物浓度(0.15、0.20、0.25、0.33 和 $0.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),分别测定在 0、10、20、30 和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 种不同浓度 HgCl_2 作用下 NAGase 的催化活力;同样分别测定在 0、15、20、25 和 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 种不同浓度 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 作用下的 NAGase 催化活力。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,确定中国蜆 NAGase 的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_m 以及在 HgCl_2 和 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 作用下的表观米氏常数 K_{mapp} 和最大反应速度 V_{mapp} ,分别判断 HgCl_2 和 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 对 NAGase 抑制作用的类型,并求解各自抑制常数 K_i 。

1.2.5 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国蜆 NAGase 荧光发射光谱的影响

Hg^{2+} 对中国蜆 NAGase 荧光发射光谱影响的测定,采用的 NAGase 浓度为 $5.72 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, HgCl_2 浓度分别为 0、10、20、30 和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;而 Pb^{2+} 对 NAGase 荧光发射光谱影响的测定,采用的 NAGase 浓度为 $8.59 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 浓度分别为 0、50、75、100、200、400 和 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,酶在 2 mL $37.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAC-NaAC 缓冲液(pH 5.4)中分别与不同浓度的 HgCl_2 和 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 混合,静置 30 min(37°C),后用美国 Cary Eclipse 荧光分光光度计扫描,在内源荧光激发光谱波长为 232.2 nm 的条件下,测定 NAGase 的内源荧光发射光谱。

2 结果 (Results)

2.1 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国蜆 NAGase 活力的影响

由图 1 可知, Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国蜆 NAGase 活性均有不同程度的抑制作用,抑制作用均呈浓度效应, Hg^{2+} 比 Pb^{2+} 对 NAGase 的抑制作用强,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg^{2+} 可抑制酶活力 97.0%,而 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Pb^{2+} 可使酶活力下降 53.6%。这说明 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 这 2 种重金属离子对中国蜆 NAGase 均有明显抑制作用, Hg^{2+} 对 NAGase 的抑制作用强于 Pb^{2+} 。

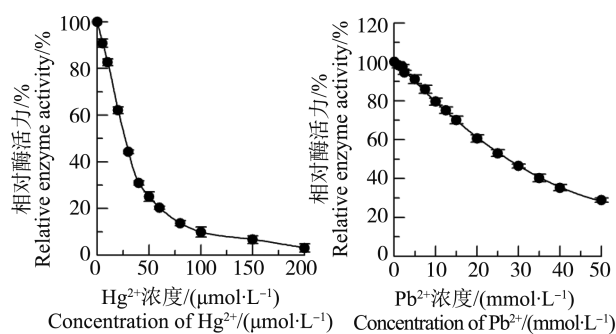


图1 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 活力的影响

Fig. 1 Effects of Hg^{2+} and Pb^{2+} on the activity of NAGase from *Tachypleus tridentatus*

2.2 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制作用机理

在 5 个不同酶浓度下,研究了 Hg^{2+} 对中国鲎 NAGase 的影响效应,结果如图 2 所示,以 NAGase 催化反应速度(v)对酶浓度作图,得到一组通过原点的直线,随 Hg^{2+} 浓度逐渐升高,各直线斜率不断降低,说明 Hg^{2+} 对 NAGase 的抑制作用是属于可逆抑制作用。同样,研究了 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 的影响效应,以加入 Pb^{2+} 后 NAGase 催化反应速度(v)对酶浓度作图(图 3),也得到一组通过原点的直线,随 Pb^{2+} 浓度升高,各直线的斜率也在降低,说明 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制作用也是一个可逆过程,属于可逆抑制作用。结果表明, Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 都是通过抑制 NAGase 活力而降低酶的催化效率,不是通过降低反应体系中的有效酶量而使酶活力降低的^[13]。

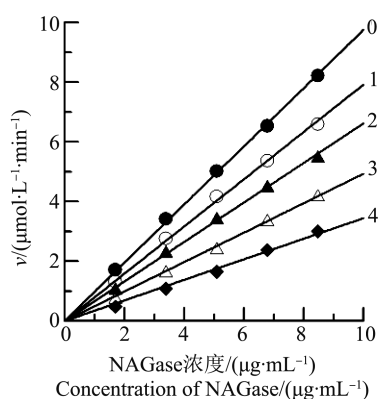


图2 Hg^{2+} 对中国鲎 NAGase 抑制机理的判断

注: v 为酶促反应速度;直线 0~4, Hg^{2+} 浓度分别为 0、10、20、30 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 2 Determination of the inhibitory mechanism of Hg^{2+} on NAGase from *Tachypleus tridentatus*

Note: v is the rate of reaction; Concentrations of Hg^{2+}

for curves 0~4 were 0, 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

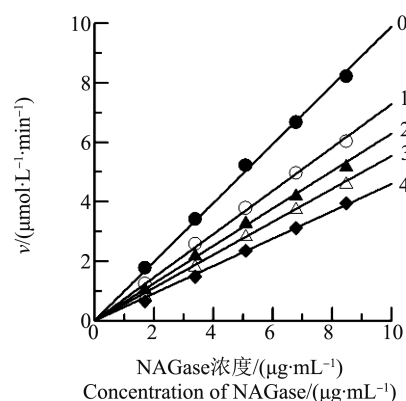


图3 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 抑制机理的判断

注:直线 0~4, Pb^{2+} 浓度分别为 0、15、20、25 和 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 3 Determination of the inhibitory mechanism of Pb^{2+} on NAGase from *Tachypleus tridentatus*

Note: Concentrations of Pb^{2+} for curves 0~4 were

0, 15, 20, 25 and 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

2.3 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制作用类型

通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图判断 Hg^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制类型,结果(图 4a)表明,随着 Hg^{2+} 浓度增大,相应的 5 条直线的斜率也逐渐增大,这 5 条直线交于 y 轴上的一点, Hg^{2+} 对酶的抑制并不改变酶促反应的最大反应速度(V_m), K_{mapp} 值随着 Hg^{2+} 浓度的增大而增大,说明 Hg^{2+} 对 NAGase 的抑制是属于竞争性抑制作用。 Hg^{2+} 与底物之间竞争地与 NAGase 活性中心结合,从而影响了 NAGase 与底物的亲和力, Hg^{2+} 只与游离酶(E)结合,而不与酶-底物络合物(ES)结合。以图 4a 各直线斜率对相应的 Hg^{2+} 浓度作图(图 4b),得到一条直线,直线方程为 $y=1.323\times 10^{-3}x+0.030$,从直线方程可以求得 Hg^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制常数 K_i 为 22.68 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

同样,研究了 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制类型, Lineweaver-Burk 双倒数作图(图 5a),结果显示, 5 条直线在第二象限相交于一点,各直线在横轴的截距和在纵轴的截距都随 Pb^{2+} 浓度的变化而变化,随着 Pb^{2+} 浓度的增大, NAGase 相应的 K_{mapp} 值增大,而相应的 V_{mapp} 值下降。以图 5a 各直线斜率对 Pb^{2+} 浓度进行二次作图(图 5b),得到一直线,直线方程为 $y=1.516\times 10^{-3}x+0.029$, 求出 Pb^{2+} 对酶的抑制常数 (K_i) 为 19.13 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 即竞争性抑制常数;再以图 5a 各直线在纵轴的截距对 Pb^{2+} 浓度作图(图 5c),得到一直线,直线方程为 $y=0.997\times 10^{-3}x+0.075$, 求出 Pb^{2+} 对 ES 的抑制常数(K_{is}) 为 75.23 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 即非

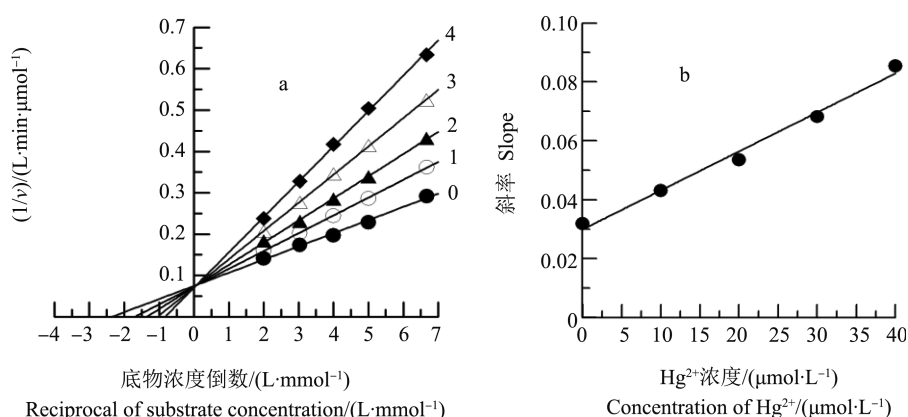


图4 Hg^{2+} 对中国鲎肠道NAGase抑制作用的Lineweaver-Burk关系图

注:直线0~4, Hg^{2+} 浓度分别为0、10、20、30和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots for inhibitory effect of Hg^{2+} on the activity of NAGase from *Tachyplesus tridentatus*

Note: Concentrations of Hg^{2+} for curves 0~4 were 0, 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

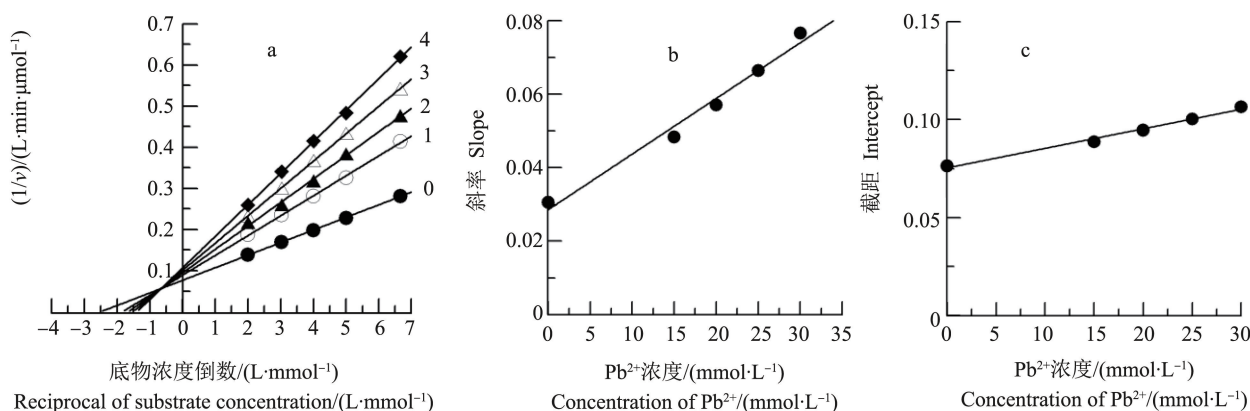


图5 Pb^{2+} 对中国鲎肠道NAGase抑制作用的Lineweaver-Burk关系图

注:直线0~4, Pb^{2+} 浓度分别为0、15、20、25和30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for inhibitory effect of Pb^{2+} on the activity of NAGase from *Tachyplesus tridentatus*

Note: Concentrations of Pb^{2+} for curves 0~4 were 0, 15, 20, 25 and 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

竞争性抑制常数 K_{IS} 为 $75.23 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_{\text{I}} < K_{\text{IS}}$, 由此判断 Pb^{2+} 对 NAGase 的抑制是属于竞争性-非竞争性混合型抑制作用; K_{IS} 约为 K_{I} 的 4 倍, 说明 Pb^{2+} 与游离酶(E)的亲和力比 Pb^{2+} 与酶-底物络合物(ES)的亲和力强^[13]。

2.4 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 内源荧光发射光谱的影响

目前, 研究蛋白质溶液构象的主要方法包括紫外吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱和核磁共振等^[13]。本研究是通过测定酶的荧光光谱变化来判断酶蛋白的空间构象的变化。由图 6 可知, 天然酶 NAGase 的荧光发射峰在 332 nm 处, 加入效应物 Hg^{2+} 后, 酶

蛋白的荧光强度发生了变化, 随着 Hg^{2+} 浓度增大, 酶的荧光强度逐渐下降, 但酶的荧光发射峰没有位移, 荧光发射峰的波长基本不变。酶的荧光强度发生变化表明了相应的酶蛋白的空间构象发生了变化, 说明 Hg^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制作用是通过改变酶的空间构象所致。

进一步研究了 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 内源荧光发射光谱的影响, 由图 7 可知, 因为试验采用的酶浓度与 Hg^{2+} 试验组不同, 获得的荧光发射强度也有差异。结果表明, 随着效应物 Pb^{2+} 浓度增大, NAGase 的荧光强度逐渐下降, 当 Pb^{2+} 浓度为 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时酶的荧光消失, 但酶的荧光发射峰始终没有产生

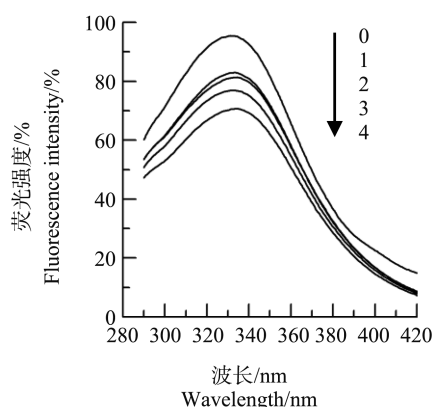


图6 中国鲎 NAGase 在 HgCl_2 中的内源荧光发射光谱

注: 曲线 0~4, Hg^{2+} 浓度分别为 0、10、20、30 和 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 6 Fluorescence emission spectra of NAGase from *Tachypleus tridentatus* in HgCl_2 solution

Note: Concentrations of Hg^{2+} were 0, 10, 20, 30 and $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for curves 0~4, respectively.

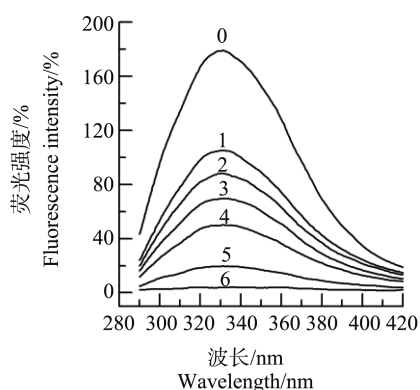


图7 中国鲎 NAGase 在 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 中的内源荧光发射光谱

注: 曲线 0~6, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 浓度分别为 0、50、75、100、200、400 和 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 7 Fluorescence emission spectra of NAGase from *Tachypleus tridentatus* in $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ solution

Note: Concentrations of Pb^{2+} were 0, 50, 75, 100, 200, 400 and $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for curves 0~6, respectively.

位移。这说明 Pb^{2+} 与中国鲎 NAGase 分子的结合致使酶蛋白空间构象产生变化, 酶活力下降, 酶荧光发射强度随之改变。

3 讨论 (Discussion)

笔者在文献[12]中已经证实了 NaCl 、 NaNO_3 、 KCl 和 Li_2SO_4 对中国鲎 NAGase 酶活力没有影响, 证明 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 对 NAGase 没有影响。因此,

HgCl_2 和 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 对中国鲎 NAGase 活力的抑制, 实质上是 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对酶产生的抑制作用。

重金属离子对酶经常呈现抑制现象, 但不同重金属离子对 NAGase 的抑制机理和抑制类型不同。杨学敏等^[4]的研究表明: Fe^{3+} 和 Cd^{2+} 对锯缘青蟹内脏 NAGase 的抑制均呈竞争性-反竞争性混合 II 型效应。而 Zn^{2+} 对锯缘青蟹 NAGase 则呈现可逆的混合型抑制作用, 结果显示, Zn^{2+} 与游离酶(E)的亲和力比 Zn^{2+} 与酶-底物络合物(ES)的亲和力强, 在 Zn^{2+} 作用下 NAGase 的荧光发射强度降低, 说明 Zn^{2+} 是通过改变酶蛋白空间构象变化致使酶活力下降^[8]; 但 ZnSO_4 对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[15]精巢 NAGase 表现为竞争性的抑制作用。王君等^[16]的研究表明, Cu^{2+} 对棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 蛹 NAGase 的抑制作用是一种可逆的混合型抑制; 而 CuSO_4 对尼罗罗非鱼精巢 NAGase 的抑制则为非竞争性抑制作用^[15], 同时, 在 CuSO_4 作用下酶的荧光发射峰值呈降低现象。此外, Ag^+ 对克氏原螯虾内脏 NAGase 的抑制作用又表现为反竞争性抑制^[7]; 而镉离子对尼罗罗非鱼精巢 NAGase 的抑制为竞争性抑制作用^[17]。

Hg^{2+} 对酶往往有较强的抑制作用, 其对不同性质的酶或对不同来源的酶作用机理同样存在差异。蔡西玲等^[18]研究了 Hg^{2+} 对木瓜蛋白酶的抑制机理, 结果表明, 当 $C_{\text{Hg}^{2+}} \leq 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对酶表现为非竞争性不可逆激活作用, 但当 $C_{\text{Hg}^{2+}} \geq 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对酶的抑制作用呈现以竞争性抑制为主, Hg^{2+} 可与酪蛋白竞争性地与木瓜蛋白酶的活性中心结合, 导致对酶的抑制, 同时 Hg^{2+} 结合后木瓜蛋白酶的荧光猝灭, 荧光发射峰发生红移, 表明 Hg^{2+} 与酶蛋白之间存在相互作用, 发生了能量转移, Hg^{2+} 可能导致木瓜蛋白酶分子的微环境疏水性有所降低, 从而引起酶活力的下降。而耿芳宋等^[19]的研究表明, Hg^{2+} 是人胎盘耐热性碱性磷酸酶的混合性抑制剂, 并使酶的构象发生改变, 当 $C_{\text{HgCl}_2} > 1.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 荧光强度不断下降, 但峰位不变。此外, Hg^{2+} 对锯缘青蟹内脏 NAGase 的抑制表现为可逆的竞争性抑制作用^[20], 但对尼罗罗非鱼精巢 NAGase 又表现为不可逆抑制作用^[21]。已有研究还发现, Hg^{2+} 对凡纳对虾内脏 NAGase 的不可逆抑制作用, 可能是 Hg^{2+} 与酶蛋白的巯基结合而引起酶的空间结构变化, 导致酶失活, 而且底物还具有保护 Hg^{2+} 所引起的酶失活作用^[9]。本研究结果表明, Hg^{2+} 对中国鲎 NAGase 抑制作用表

现为可逆的竞争性抑制,在 Hg^{2+} 作用下 NAGase 荧光强度降低,但酶的内源荧光发射峰没有位移,说明 Hg^{2+} 对 NAGase 催化活力的抑制是酶的空间构象发生变化所致, Hg^{2+} 可能也是与中国鲎 NAGase 酶蛋白的巯基产生螯合作用而引起空间构象的变化。

Pb^{2+} 对酶的抑制机理目前研究的还不多。有研究表明, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 是人胎盘耐热性碱性磷酸酶的反竞争性抑制剂,在不同浓度 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 的作用下,碱性磷酸酶的荧光强度和发射峰位均发生了变化,当 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 浓度为 $10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,酶活力丧失,荧光猝灭^[19];而 Pb^{2+} 对克氏原螯虾内脏 NAGase 的抑制又表现为非竞争性抑制^[7]。从本研究结果可知, Pb^{2+} 对中国鲎内脏 NAGase 的抑制是一个可逆的过程,属于竞争性-非竞争性混合型抑制作用,比较了抑制常数 K_{is} 和 K_i 值大小,发现 Pb^{2+} 在游离酶和络合物之间,更易于与游离酶结合而引起对酶的抑制作用。 Pb^{2+} 可使得中国鲎 NAGase 的内源荧光发射强度改变,但没有产生峰值移位现象,当 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 浓度是 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, NAGase 的内源荧光猝灭(图 7),而这时酶活力才刚开始下降(图 1),这种现象说明了 Pb^{2+} 使酶蛋白空间构象发生变化要快于造成的酶活力的变化,维系酶空间构象稳定的必需基团对 Pb^{2+} 相当敏感,这与张伟妮等^[15]研究的 CuSO_4 对尼罗罗非鱼精巢 NAGase 活力和构象的影响结果相似;但 Zhang 等^[8]在 Zn^{2+} 对锯缘青蟹 NAGase 抑制动力学的研究中,发现 Zn^{2+} 作用后 NAGase 活力的变化快于酶空间构象的变化。同时,进一步推测 Pb^{2+} 可能是与 NAGase 的必需基团巯基形成螯合物,或可能是与酶活性中心的羧基结合,从而导致酶蛋白空间构象变化^[19]。

综上所述: Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制作用均表现为可逆过程,其中 Hg^{2+} 对 NAGase 的抑制属于竞争性抑制作用, Hg^{2+} 只与游离酶结合,不与酶-底物络合物结合;而 Pb^{2+} 对 NAGase 的抑制是属于竞争性-非竞争性混合型抑制作用,相比于酶-底物络合物, Pb^{2+} 对游离酶的亲和力更强。 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 对中国鲎 NAGase 的抑制作用都是酶蛋白空间构象的变化所致。而 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 与 NAGase 酶蛋白功能基团之间的互作机制有待进一步探讨。

致谢:感谢莆田学院环境与生物工程学院林授锴博士和汪秀妹博士在英文摘要写作上给予的帮助。

通讯作者简介:林建城(1966—),男,硕士,教授,研究方向为海洋生物酶学。

参考文献 (References):

- [1] Broadway R M, Williams D L, Kain W C, et al. Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 1995, 20(5): 271-276
- [2] Koga D, Shimazaki C, Yamamoto K, et al. β -N-acetyl-D-glucosaminidase from integument of the silkworm, *Bombyx mori*. Comparative biochemistry with the pupal alimentary canal enzyme [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(6): 1679-1681
- [3] Buchholz F. Moulting cycle and seasonal activities of chitinolytic enzymes in the integument and digestive tract of the Antarctic krill, *Euphausia superba* [J]. Polar Biology, 1989, 9(5): 311-317
- [4] Zou E, Fingerman M. Chitinase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle [J]. Marine Biology, 1999, 13(1): 97-101
- [5] 朴顺金, 谢晓兰, 黄乾生, 等. 不同养殖期的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 基本性质比较[J]. 台湾海峡, 2006, 25(3): 348-352
Piao S J, Xie X L, Huang Q S, et al. Comparison of the basic properties of NAGase from the crustacean membrane of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different stages [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2006, 25(3): 348-352 (in Chinese)
- [6] 梁君荣, 王军, 苏永全, 等. 四种重金属离子对中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 胚胎发育的影响[J]. 生态学报, 2001, 21(6): 1009-1012
Liang J R, Wang J, Su Y Q, et al. Effects of metals on embryo development of *Tachypleus tridentatus* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2001, 21(6): 1009-1012 (in Chinese)
- [7] 张伟妮, 陈欣颖, 黄小红, 等. 4 种重金属离子对克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) NAGase 活力的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(6): 943-947
Zhang W N, Chen X Y, Huang X H, et al. Effects of four heavy metal ions on NAGase of *Procambarus clarkii* [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2012, 18(6): 943-947 (in Chinese)
- [8] Zhang J P, Hu Y H, Wang Q, et al. Inhibitory kinetics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from green crab (*Scylla serrata*) by zinc ion [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(15): 8763-8767
- [9] Lin J C, Chen Q X, Xie X L, et al. Irreversible kinetics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus van-*

- name) inactivated by mercuric ion [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006, 339: 30-36
- [10] 刘祥, 王敏, 陈求稳, 等. 典型重金属胁迫对日本沼虾的氧化损伤及交互作用[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(6): 116-126
- Liu X, Wang M, Chen Q W, et al. Oxidative damage and interaction induced by typical heavy metals in waters on the *Macrobrachium nipponense* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(6): 116-126 (in Chinese)
- [11] 姜会民. 氯化汞对鲤幼鱼鳃组织抗氧化系统和组织损伤研究[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(5): 997-1002
- Jiang H C. Effect of mercury chloride on antioxidant system and injury in gill of carps [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(5): 997-1002 (in Chinese)
- [12] 林建城, 许恒棋, 罗新明. 中国鲎内脏 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2017, 47(9): 62-69
- Lin J C, Xu H Q, Luo X M. Study on purification and enzymatic characteristics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from the viscera of horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science, 2017, 47(9): 62-69 (in Chinese)
- [13] 陈清西. 酶学及其研究技术(第二版)[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2015: 102-249
- Chen Q X. Enzymology and Research Technology (2nd Edition) [M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2015: 102-249 (in Chinese)
- [14] 杨学敏, 谢进金, 张继平, 等. 金属离子对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响[J]. 台湾海峡, 2006, 25(3): 343-347
- Yang X M, Xie J J, Zhang J P, et al. Effects of metal ions on the activity of N-acetyl- β -D-glucosamine from green crab (*Scylla serrata*) [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2006, 25(3): 343-347 (in Chinese)
- [15] 张伟妮, 谢璐娜, 黄小红. CuSO_4 和 ZnSO_4 对尼罗罗非鱼 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(6): 1093-1099
- Zhang W N, Xie L N, Huang X H. Effects of CuSO_4 and ZnSO_4 on N-acetyl- β -D-glucosamine from *Oreochromis niloticus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(6): 1093-1099 (in Chinese)
- [16] 王君, 黄小红, 陈清西. 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[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005, 44(6): 843-846
- Wang J, Huang X H, Chen Q X. Effects of metal ions on the activity of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from the pupae of *Helicoverpa armigera* [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2005, 44(6): 843-846 (in Chinese)
- [17] 林心宇, 张颖, 张伟妮, 等. 镉离子对尼罗罗非鱼精巢 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的失活动力学[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(3): 609-614
- Lin X Y, Zhang Y, Zhang W N, et al. Inhibitory kinetics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by cadmium [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2018, 24(3): 609-614 (in Chinese)
- [18] 蔡西玲, 曾虹燕, 蔡联辉, 等. Hg^{2+} 对木瓜蛋白酶的修饰作用及其动力学[J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2013, 44(10): 3391-3997
- Cai X L, Zeng H Y, Cai L H, et al. Modification effect of Hg^{2+} on papain and its kinetics [J]. Journal of Central South University: Science and Technology, 2013, 44(10): 3391-3997 (in Chinese)
- [19] 耿芳宋, 王秀丽, 刘洪明, 等. 汞和铅对人胎盘碱性磷酸酶活力与构象的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(8): 736-738
- Geng F S, Wang X L, Liu H M, et al. The effect of mercury and lead on catalytic activity and conformation of human placental alkaline phosphatase [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 1999, 15(8): 736-738 (in Chinese)
- [20] Xie J J, Chen Q X, Zhang J P, et al. Inhibitory kinetics of mercuric ion on the activity of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from green crab (*Scylla serrata*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2006, 39(4): 159-164
- [21] Zhang W N, Chen Q X, Lin X Y, et al. Irreversible inhibitory kinetics of mercuric ion on N-acetyl- β -D-glucosaminidase from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 154: 163-167 ◆