

患红体病凡纳滨对虾肝胰腺 NAGase 基本性质的改变研究

谢晓兰¹ 龚丽芬¹ 魏晓倩² 黄乾生² 陈清西^{2*} (1. 泉州师范学院化学与生命科学学院 福建泉州 362000; 2. 厦门大学生命科学学院 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 [目的]为虾养殖过程中红体病的诊断和控制提供重要的理论依据。[方法]分别测定健康和患红体病的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的肝胰腺 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.52, NAGase)的比活力及其性质差异。[结果]2 种来源 NAGase 的比活力、基本酶学性质等均存在差异。对虾患红体病后,肝胰腺 NAGase 的比活力和最适温度下降,但催化反应动力学常数 K_m 、 V_m 值和活化能上升。[结论]该研究表明 NAGase 与对虾患病可能存在着密切关系。

关键词 凡纳滨对虾; NAGase; 红体病; 性质比较

中图分类号 Q356.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2011)21-12906-03

Changes of Basic Properties of NAGase from the Hepatopancreas of Prawn (*L. vannamei*) Suffered from Taura Disease

XIE Xiao-lan et al (School of Chemistry and Life Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362000)

Abstract [Objective] The research aimed to provide important theoretical basis for diagnosis and control of taura disease during breeding prawn. [Method] N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.52, NAGase) from the hepatopancreas of prawn in different sources from health and taura disease were separated and extracted. The changes of activity and basic properties of the enzyme were studied. [Result] The results showed that the specific activity, optimum temperature and dynamic constants including K_m , V_m , and E_a for the hydrolysis of pNP-NAG by the enzyme from different sources varied. The activity of NAGase and the value of the optimum pH were lower after the prawn suffered from taura disease. But the optimum temperature and the kinetics parameters such as the values of K_m , V_m and E_a , were higher after the prawn suffered from taura disease. [Conclusion] The study indicates that there are some intimate relationship between NAGase and if the prawn has taura disease.

Key words *L. vannamei*; N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase); Taura disease; Comparison of properties

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase, EC 3.2.1.52)是几丁质酶的成员之一,在甲壳动物的生长发育、食物消化吸收与疾病防御等方面具有重要功能^[1-2]。红体病是凡纳滨对虾养殖过程中常见的流行病,由桃拉(TAURA)综合症病毒引起,患病时虾身体发红,空胃,甲壳变软,镜检可发现色素细胞扩散,肝胰脏肿大、变白^[3]。目前,国内关于对虾红体病的病理、病因报道较多,但关于对虾红体病与具有疾病防御功能的 NAGase 的关系仍报道很少。为此,笔者比较健康与患病凡纳滨对虾肝胰腺 NAGase 的比活力和部分酶学性质的差异,这可为对虾养殖过程中的红体病的诊控提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 凡纳滨对虾由福建漳州海澄对虾养殖场提供(养殖条件:密度为 37.5 万~42.0 万尾/hm²,以粤海牌对虾饲料喂养,水温为 25~31℃,环境 pH 在 7.0~8.5,盐度为 20%~25%,溶解氧浓度为 5.2~5.8 mg/dm³,氨氮含量在 0.55 mg/dm³左右)。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产品,其余试剂均为国产分析纯;蒸馏水为玻璃重蒸水。

1.2 方法 酶浓度测定采用 Folin-酚法。酶活力、酶催化反应最适 pH、pH 稳定性、最适温度及热稳定性的测定参见文献[4]。酶催化 pNP-NAG 水解的动力学常数 K_m 和 V_m 采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图计算。活化能(E_a)测定根据 Arrhenius 公式,以酶促反应最大速度之对数($\lg V_m$)对 1/T 作图,得直线关系,从直线斜率求算。

2 结果与分析

2.1 健康虾与患红体病虾的肝胰腺 NAGase 比活力比较 以体长约 3.80 cm 的健康及患红体病的凡纳滨对虾为研究对象,以 pNP-NAG 为底物,在 37℃下 0.15 mol/L、pH 5.2 的 NaAc-HAc 缓冲体系中测定患病前后的肝胰腺 NAGase 活力,比较研究对虾患红体病前后的肝胰腺 NAGase 的比活力差异。由表 1 可知,凡纳滨对虾在患红体病后 NAGase 比活力明显下降。

表 1 凡纳滨对虾患病前后肝胰腺 NAGase 催化 pNP-NAG 的比活力及酶学性质

Table 1 Specific activity and enzymatic properties of hepatopancreas NAGase from healthy and Taura *L. vannamei* on the hydrolysis of pNP-NAG

NAGase 源	比活力	最适温度	最适 pH	K_m	V_m	E_a
NAGase sources	Specific activity//U/mg	The optimum temperature//℃	The optimum pH	mmol/L	μmol/(L·min)	kJ/mol
健康虾 Healthy <i>L. vannamei</i>	35.34 ± 4.50	40	5.5	0.26	25.08	47.89
红体病虾 Taura <i>L. vannamei</i>	20.02 ± 2.00	37	5.8	1.12	27.62	55.70

2.2 健康虾与患红体病虾的肝胰腺 NAGase 的基本性质比较

2.2.1 最适 pH 比较。以 pNP-NAG 为底物,在 37℃、不同 pH 缓冲液中(pH 4.0~5.8 的 0.2 mol/L NaAc-HAc 缓冲液, pH 5.8~7.0 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液),酶蛋白终浓度均为 0.25 mg/ml,测定酶促反应的初速度 v_0 ,分别探讨 pH 对不同来源酶的催化活力影响。由图 1 可知,肝胰腺 NAGase 在

基金项目 福建省科技重点项目(2006N0067);福建省泉州师范学院重点学科建设项目(MDSch-2009A)。

作者简介 谢晓兰(1974-),女,福建惠安人,副教授,博士,从事生物化学研究, E-mail: xxl_qztc@sohu.com。* 通讯作者,教授,博士,博士生导师,从事分子酶学机理及其应用研究, E-mail: chenqx@xmu.edu.cn。

收稿日期 2011-04-15

患红体病后 催化底物水解反应的最适 pH 由 5.5 上升至 5.8。

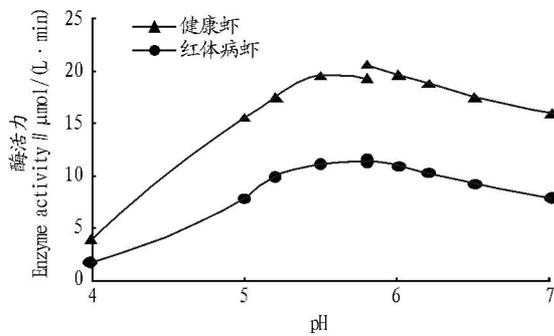


图1 pH对健康及患红体病的凡纳滨对虾的肝胰腺 NAGase 催化活力的影响

Fig.1 Effect of pH on the activity of the hepatopancreas NAGase from healthy and taura prawn (*L. vannamei*)

2.2.2 pH 稳定性比较。2 种不同来源的肝胰腺 NAGase 分别在 4 °C、不同 pH (pH 2.0 ~ 11.0) 缓冲液中放置 1 h 后, 取出 20 μl 在 37 °C、pH 5.2 的缓冲体系(酶终浓度为 0.25 mg/ml) 下检测酶的剩余活力。由图 2 可知 2 种来源的肝胰腺 NAGase 的 pH 稳定性差不多 均在 pH 6.0 ~ 7.0 较窄的范围内具有稳定性。

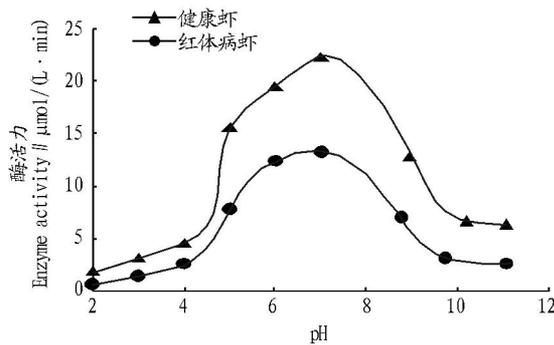


图2 健康虾及患红体病虾的肝胰腺 NAGase 的 pH 稳定性

Fig.2 pH stability of the hepatopancreas NAGase from healthy and taura prawn (*L. vannamei*)

2.2.3 最适温度比较。在 pH 5.2 的测活体系中 不同温度下 测定酶催化反应的初速度 v_0 , 考察温度对酶催化 pNP-NAG 水解反应的影响。由图 3 可知 患病对虾肝胰腺 NAGase 的酶促反应最适温度为 37 °C 而健康虾肝胰腺 NAGase 的最适温度为 40 °C 表明对虾患病后肝胰腺 NAGase 的最适温度有所下降。

2.2.4 热稳定性比较。2 种不同来源的肝胰腺 NAGase 在不同温度下保温 30 min 后 取出 20 μl 在 37 °C 的测活体系中分析剩余活力(酶终浓度为 0.25 mg/ml)。由图 4 可知 红体病对虾的肝胰腺 NAGase 在温度低于 37 °C 时 酶活力随着温度增大迅速下降 当温度大于 37 °C 时 酶活力保持稳定不再下降; 低于 37 °C 时 健康虾的肝胰腺 NAGase 酶活力也随着温度增大而迅速下降 在 37 ~ 45 °C 时出现一个缓慢下降的平台 接着酶活力再次随着温度增大而呈直线下降。这说明对虾肝胰腺 NAGase 在患病前后热稳定性发生了变化。

2.2.5 动力学参数比较。以 pNP-NAG 为底物 在 pH 5.2 的缓冲体系下 测定 2 种不同来源肝胰腺 NAGase 的酶促反应动力学参数。由图 5 可知 酶催化 pNP-NAG 水解反应遵循

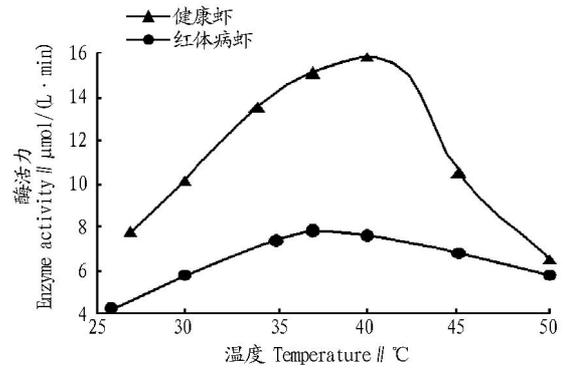


图3 温度对健康及患红体病的凡纳滨对虾的肝胰腺 NAGase 催化活力的影响

Fig.3 Effect of temperature on the activity of the hepatopancreas NAGase from healthy and taura prawn (*L. vannamei*)

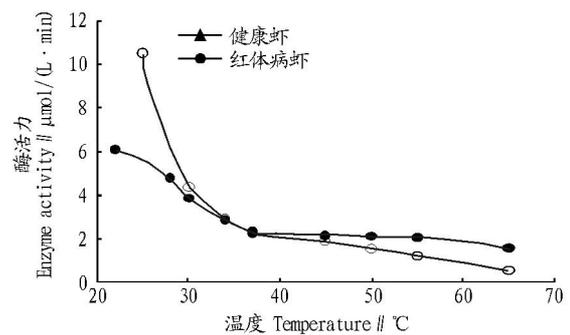


图4 健康虾及患红体病虾的肝胰腺 NAGase 的热稳定性

Fig.4 Thermal stability of the hepatopancreas NAGase from healthy and taura prawn (*L. vannamei*)

米氏双曲线方程式; 以患病虾的肝胰腺 NAGase 的 K_m 和 V_m 值均比健康虾的高, 说明患病后酶对底物亲和力变小 酶的催化能力也发生变化。

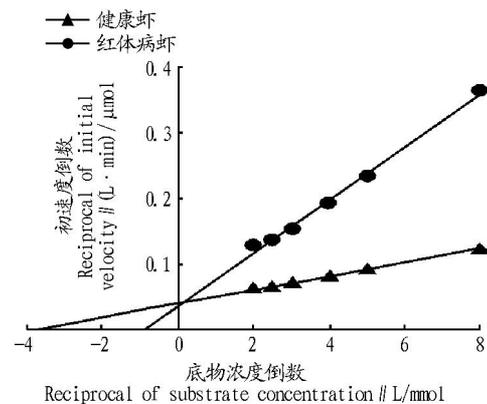


图5 健康与患红体病的凡纳滨对虾肝胰腺 NAGase 催化 pNP-NAG 水解反应的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.5 Lineweaver-Burk plots on the hydrolysis of pNP-NAG by the hepatopancreas NAGase from healthy and taura prawn (*L. vannamei*)

2.2.6 活化能比较。由表 1 可知 不同来源的 NAGase 活化能存在差异 患病后酶的活化能有所提高。

3 结论与讨论

凡纳滨对虾肝胰腺 NAGase 与食物消化吸收密切相关^[5]。红体病是对虾养殖过程最易感染的流行病之一 患病时对虾食欲不振 摄食量大减 消化道特别是胃不饱满, 体形

消瘦,甲壳变软,脱壳不久死亡。部分病虾甲壳与肌肉容易分离,肠道发红,并且肿胀^[3]。在哺乳动物内,NAGase含量及活力变化常作为疾病诊断的指标^[6],故研究对虾患红体病前后体内NAGase性质变化对疾病诊断具有一定的借鉴作用。笔者曾研究发现,对虾患红体病后壳膜NAGase比活力有轻微上升,这与患病症状甲壳易分离的症状相符;患病后壳膜NAGase的基本性质也发生明显变化^[7],暗示该酶可能与对虾患病具有相关性。

该研究结果显示,凡纳滨对虾在患红体病后肝胰腺NAGase比活力发生较大幅度下降,与患病症状食欲下降相一致;患红体病后肝胰腺NAGase催化底物pNP-NAG水解反应的最适pH从原来的5.5提升到5.8,且在pH6.0~7.0较窄的范围内具有稳定性;患病后肝胰腺NAGase催化底物pNP-NAG水解的最适温度为37℃,而健康虾的最适温度为40℃,说明患病后肝胰腺NAGase的基本酶学性质发生了变化;酶动力学研究表明,肝胰腺NAGase催化pNP-NAG水解反应的 K_m 、 V_m 及活化能 E_a 患病后均增大,说明患病后肝胰腺

NAGase对底物的亲和力变小,即与底物的结合能力减弱,酶的催化能力下降。这进一步暗示酶与对虾患病可能存在着密切关系,但到底是外界环境因子或病原体先导致酶特征变化,从而引发红体病产生;或是先引发红体病,再造成酶的特征变化,还有待于进一步研究。

参考文献

(上接第12898页)

- [1] AMOULD C, JEUNIAUX C. Les enzymes hydrolytiques du système digestif chez les crustacés pagurides [J]. Cah Biol, 1982, 23: 89-103.
- [2] FUNKE B, SPINDLER K D. Characterization of chitinase from the brine shrimp *Artemia* [J]. Comp Biochem Physiol, 1989, 94(4): 691-695.
- [3] 梁皆能, 何义进. 南美白对虾红体病的综合防治 [J]. 科学养鱼, 2002(10): 48.
- [4] 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.
- [5] 黄乾生, 谢晓兰, 石艳, 等. 不同生长期凡纳滨对虾肝胰腺NAGase的基本性质变化 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(6): 847-850.
- [6] 黄幼蓉, 苗德林. β -N-乙酰葡萄糖胺酶组织化学改良法在胃癌诊断中的应用 [J]. 重庆医科大学学报, 1994, 19(2): 146-147.
- [7] 杜娟, 谢晓兰, 石艳, 等. 患红体病的凡纳滨对虾壳膜NAGase基本性质的改变 [J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2): 207-210.
- [8] SCAPIGLIATI G, SCALIA D, MARRAS A, et al. Immunoglobulin levels in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) in relation to age, season, and water oxygenation [J]. Aquaculture, 1999, 174: 207-212.
- [9] 沈凡, 樊启学, 杨凯, 等. 不同溶氧条件下黄颡鱼免疫机能及抗病力的研究 [J]. 淡水渔业, 2010, 40(4): 44-49, 55.
- [10] BOLEZA K A, BURNETT L E, BURNETT K G. Hypercapnic hypoxia compromises bactericidal activity of fish anterior kidney cells against opportunistic environmental pathogens [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2001, 11: 593-610.
- [11] BUCHMANN K, SIGH J, NIELSEN C V, et al. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Veterinary Parasitology, 2001, 100: 105-116.
- [12] MÜNDERLE M, SURES B, TARASCHEWSKI H. Influence of *Anguillicola crassus* (Nematoda) and *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) on swimming activity of European eel *Anguilla anguilla* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 60: 133-139.
- [13] SIGH J, LINDENSTROM T, BUCHMANN K. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17: 75-86.
- [14] MARTINEZ-PORCHAS M, MARTINEZ-CORDOVA L R, RAMOS-ENRIQUEZ R. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress [J]. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 2009, 4(2): 158-178.
- [15] 杜浩, 危起伟, 甘芳, 等. 美洲鲈鱼应激后皮质醇激素和血液生化指标的变化 [J]. 动物学杂志, 2006, 41(3): 80-84.
- [16] 孙学亮, 邢克智, 陈成勋, 等. 急性温度胁迫对半滑舌鳎血液指标的影响 [J]. 水产科学, 2010, 29(7): 387-392.
- [17] DAVIS K B, GRFFINA B R, GRAY W L. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection [J]. Aquaculture, 2002, 214: 55-66.
- [18] 王文博, 汪建国, 李爱华, 等. 振荡胁迫对鲫血液皮质醇和溶菌酶水平的变化 [J]. 水生生物学报, 2004, 28(6): 682-684.
- [19] LIMA L C, RIBEIRO L P. Effects of temperature on performance characteristics and the cortisol stress response of surubim *Pseudoplatystoma* sp. [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2006, 37(1): 89-95.
- [20] 王文博, 李爱华, 汪建国, 等. 拥挤胁迫对草鱼非特异性免疫功能的影响 [J]. 水产学报, 2004, 28(2): 139-144.
- [21] WELEER T L, MCNULTY S T, KLESIUS P H. Effect of sublethal hypoxia on the immune response and susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to enteric septicemia [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2007, 38(1): 12-23.
- [22] ESPELED S, LOKKEN G B, STEIRO K, et al. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1996, 6: 95-110.
- [23] 洪磊, 张秀梅. 环境胁迫对鱼类生理机能的影响 [J]. 海洋科学进展, 2004, 22(1): 114-121.
- [24] PERSON-LE RUYET J, PICHAVANT K, VACHER C, et al. Effect of O_2 supersaturation on metabolism and growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. Aquaculture, 2002, 205: 373-383.
- [25] LIE O, EVENSEN O, SORENSEN A, et al. Study on lysozyme activity in some fish species [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1989, 6: 1-5.
- [26] 聂芬, 石小涛, 李大鹏, 等. 拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼血浆溶菌酶活性和补体水平的影响 [J]. 水生生物学报, 2007, 31(4): 581-584.
- [27] GONZALEZ S F, BUCHMANN K, NIELSEN M E. Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2007, 31: 576-586.
- [28] ORTUNO J, ESTEBAN M A, MESEGUER J. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, 84: 17-27.
- [29] 邓永强, 汪开毓, 黄小丽. 鱼类小瓜虫病的研究进展 [J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(2): 149-153.
- [30] SIGH J, LINDENSTROM T, BUCHMANN K. The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. Journal of Fish Diseases, 2004, 27: 409-417.