

不同养殖期的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 基本性质比较

朴顺金¹, 谢晓兰², 黄乾生¹, 谢进金², 陈清西¹

(1. 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;

2. 福建泉州师范学院化学与生命科学学院, 福建 泉州 362000)

摘要: 以不同生长期的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的外壳为材料, 分离提取外壳膜 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (EC 3. 2. 1. 52 NAGase), 测定分析不同生长期的外壳膜 NAGase 的酶比活力及其性质的变化. 结果表明: 不同生长期的酶活力、最适温度、催化反应的动力学参数 (K_m 、 v_m)、活化能等均存在差异. 不同生长期酶的最适 pH 均为 5.5. 不同生长期的对虾外壳膜 NAGase 对 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Hg^{2+} 的敏感性也不同. Cu^{2+} 对养殖 8 周对虾外壳膜 NAGase 的激活作用最为显著, 可以使酶活力提高到 400%. Zn^{2+} 对不同生长期的酶活力均有抑制作用, 但对成体对虾酶抑制作用最为显著, 可以使酶活力下降 80%. Hg^{2+} 对各个生长期的酶活力影响效果也不一样, 当浓度为 0.1 mmol/dm^3 时, 仅对养殖 6 & 9 周的对虾的酶有激活作用, 当 Hg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/dm^3 时, 五个生长期的虾皮 NAGase 活力均受到不同程度抑制.

关键词: 海洋生物; 实验研究; 凡纳滨对虾; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 性质比较

中图分类号: Q 556. 1

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2006)03-0348-05

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (EC 3. 2. 1. 52 简称 NAGase) 是几丁质酶的一个组成成员, 广泛存在动、植物及微生物体中. 具有促进消化吸收、疾病防御、生长发育的重要功能^[1]. 20 世纪 80 年代初, A moull 等 (1982) 注意到甲壳动物的周期性蜕皮过程与几丁质酶具有生理相关性, 蜕皮前, 几丁质酶表达量明显增加, 以促进蜕皮, 而后表达量减少以抑制蜕皮^[2]. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是全世界三大养殖对虾中单位产量最高的虾种. 该品种以其独特的养殖生物学特点在我国沿海地区养殖面积逐年增加, 但在养殖中经常出现爆发性流行病, 造成了巨大的经济损失. 这些除了病原体的侵蚀扰乱了对虾的正常生理活动与物质代谢外, 环境的污染特别是水质中的金属离子、严重超标的有机化合物等都将引起对虾体内生理生化的变化, 导致对虾健康程度下降, 生长滞缓, 蜕壳困难, 患病率和死亡率升高等问题的出现. 本文比较不同生长期对虾外壳膜 NAGase 的酶活力和部分酶学性质的差异, 对于探讨养殖环境与对虾的生长发育过程的相关性提供直接的理论依据.

1 材料与方法

1. 1 材料

收稿日期: 2005-10-10

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 (JA 04260)

作者简介: 朴顺金 (1966~), 女, 硕士研究生.

通讯作者: 陈清西 (1959~), 男, 教授, 博导; E-mail: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

不同生长期的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 37.5~42 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 2.0~2.5 溶解氧浓度为 5.2~5.8mg/dm³;氨氮在 0.55mg/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;蒸馏水玻璃重蒸水。

1.2 方法

蛋白浓度测定常用 Folin-酚方法^[3];酶活力测定方法参考文献[4]。酶催化反应最适 pH、最适温度的测定,按文献[5]测定方法。以酶活力对相应 pH 值、T 作图,求出该反应条件下,酶催化反应最适 pH 值、最适温度。酶催化反应动力学参数测定,采用酶活力测定方法,改变底物 pNP-NAG 浓度,测定酶促反应初速度 v_0 ,以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,从直线的截距求得该酶催化 pNP-NAG 的米氏常数 K_m 和最大速度 v_m 。酶催化水解反应的活化能测定,测定不同温度下酶催化水解反应动力学参数,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,从直线斜率求出不同生长期的 NAGase 催化 pNP-NAG 水解反应的活化能 (E_a)。

金属离子对酶活力的影响研究方法同文献[6],在 37℃,pH 5.2 的测活体系中,加入不同浓度的金属离子,以测定金属离子对酶活力的影响。 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 的浓度范围分别设置为 0.25~2.0mmol/dm³、1.0~10mmol/dm³ 和 0.1~1.0mmol/dm³。

本实验采用数理统计方法对三组重复数据进行处理,误差处理采用标准方差。

2 结果与讨论

2.1 不同生长期的 NAGase 比活力的比较

研究凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 在不同生长期的活力变化,结果(图 1)表明,NAGase 在幼体时有较强的比活力,随着个体成长比活力有下降趋势,酶活力在养殖 9 周时降低到最低值,随后有所回升,在养殖 11~12 周后,酶的比活力出现大幅度的增值。可见,对虾外壳膜 NAGase 活力变化与对虾的生长发育有着密切关系。幼虾时,对虾外壳围食膜蜕壳频繁,故 NAGase 的比活力相对较高;随着个体成长,蜕壳次数逐渐减少并趋于稳定,虾皮 NAGase 的比活力也逐渐减小并趋于稳定;对虾长到生殖期时,蜕壳次数又增多,故虾皮 NAGase 又出现大幅度的增高。

2.2 不同生长期的 NAGase 的最适 pH 值比较

改变测活体系 pH 值,测定不同生长期的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 酶促反应的初速度,探讨 pH 值对酶催化活力的影响。结果如图 2a 所示,不同的生长期对虾外壳膜 NAGase 的最适 pH 值均为 5.5。显示在不同养殖期该酶对 pH 的敏感度没有存在差异。

2.3 不同生长期的 NAGase 的最适温度比较

在 pH 5.2 的测活体系中,不同温度下,测定酶促反应的初速度 v_0 ,以分析温度对酶活力的

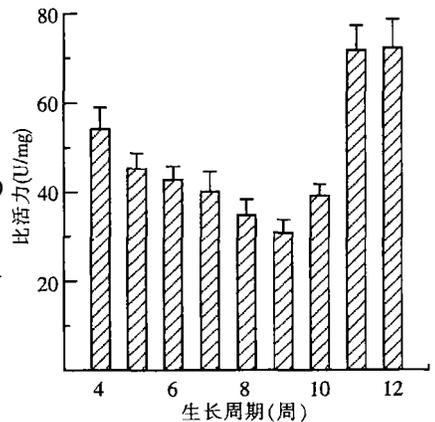


图 1 不同生长期凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 活力比较

Fig.1 Comparison of the specific activities of NAGase from the crustacean membrane of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different growth stages

影响。结果(图 2b)表明, 养殖 4、6、8 周时, 酶的最适温度为 35℃, 而养殖 9、12 周的酶的最适温度为 30℃。NAGase 最适温度较低, 这与虾壳与水体直接接触有关。不同生长期的最适温度差异可能也与外界温度变化有关。

2.4 不同生长期的 NAGase 催化 pNP-NAG 动力学参数和活化能的比较

在 pH 5.2 的缓冲体系下, 改变底物 pNP-NAG 的浓度, 测定酶促反应初速度 v_0 , 以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图求得不同生长期虾外壳膜 NAGase 催化 pNP-NAG 水解的动力学参数 (K_m 和 v_m 值), 结果总结于表 1。酶的 K_m 和 v_m 值存在差异, 说明不同生长期的 NAGase 对底物的结合能力与催化能力发生变化。以酶活力的最大速度之对数 ($\lg v_m$) 对 $1/T$ 作图, 得直线关系, 从直线斜率求出

不同生长期的 NAGase 催化 pNP-NAG 水解反应的活化能 (E_a), 测定结果列于表 1 供比较。不同生长期的 NAGase 催化 pNP-NAG 水解反应的活化能也存在较大的差异。

表 1 不同生长期的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 催化 pNP-NAG 的动力学参数

Tab 1 Kinetic parameters of NAGase from the crustacean membrane of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different growth stages for the hydrolysis of pNP-NAG

饲养时间(周)	最适温度(℃)	最适 pH 值	K_m (mmol/dm ³)	v_m (μmol/dm ³ ·min)	E_a (kJ/mol)
4	35	5.5	1.25	53.59	66.20
6	35	5.5	0.50	22.13	77.97
8	30	5.5	0.76	32.56	99.08
9	30	5.5	0.67	21.59	74.25
12	30	5.5	2.87	143.19	138.11

2.5 不同生长期的虾外壳膜 NAGase 对 Cu²⁺ 敏感性比较

选用 CuSO₄ 为效应物, 检测 Cu²⁺ 对该酶催化 pNP-NAG 水解的活力影响, 结果见图 3。当检测体系中 Cu²⁺ 浓度设置为 0.25~2.0 mmol/dm³, Cu²⁺ 对各个生长期的 NAGase 均起激活作用, 尤其在低浓度时更为显著, 且对不同生长期 NAGase 的激活强度存在明显的差异, 对养殖 8 周的酶可以使活力提高到 400%, 而仅使养殖 4 周的酶活力提高到 150%, 显示不同生长期的 NAGase 对外界 Cu²⁺ 浓度的耐受能力存在着一定的差距, 以养殖 8 周的对虾对重金属 Cu²⁺ 离子较为敏感, 而养殖 4 周的对虾受影响较低。

2.6 不同生长期的虾外壳膜 NAGase 对 Zn²⁺ 敏感性比较

选用 ZnSO₄ 为效应物, 在指定浓度范围内研究 Zn²⁺ 对不同生长期的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 活力影响, 图 4 显示 Zn²⁺ 对各个生长期的 NAGase 都起抑制作用, 但抑制程度不一样, 当 Zn²⁺ 浓度为 10 mmol/dm³ 时, 分别可以使养殖 4、6、8、9、12 周的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 的酶活力下降 73.2%、68.5%、57.5%、64.7% 和 83.2%。说明不同生长期的凡纳滨对虾外

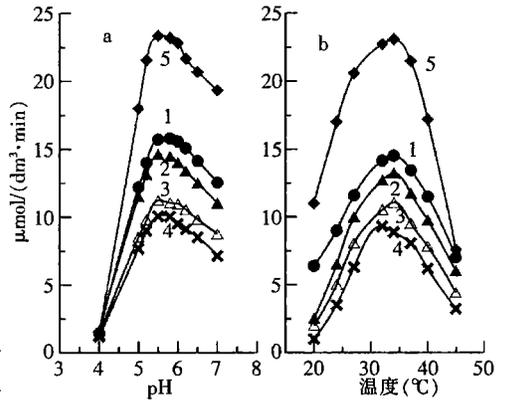


图 2 pH 值、温度对不同生长期凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 活力的影响

Fig.2 Effects of pH and temperature on the activity of NAGase from the crustacean membrane of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different growth stages
曲线 1~5 分别代表饲养 4、6、8、9、12 周

壳膜 NAGase 对外界 Zn^{2+} 的承受能力不一样,其中以养殖 12 周的对虾最为敏感,养殖 8 周最不敏感。

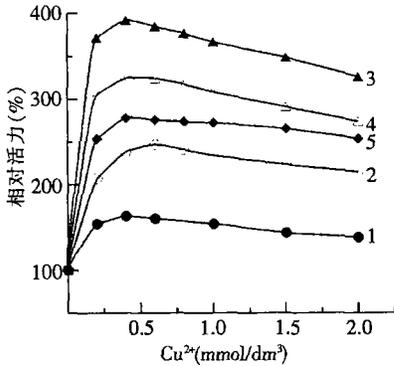


图3 Cu^{2+} 对不同生长期凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 活力的影响

Fig.3 Effects of Cu^{2+} on the activity of NAGase from the crustacean membrane of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different growth stages

曲线 1~5 分别代表养殖 4、6、8、9、12 周

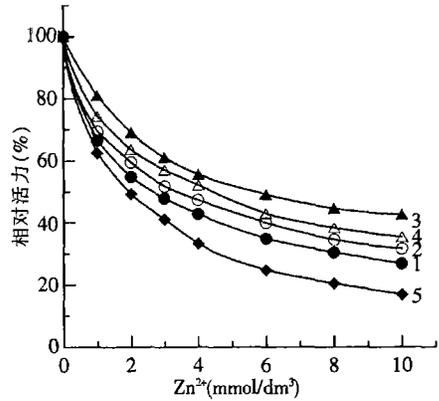


图4 Zn^{2+} 对不同生长期凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 活力的影响

Fig.4 Effects of Zn^{2+} on the activity of NAGase from the crustacean membrane of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different growth stages

曲线 1~5 分别代表养殖 4、6、8、9、12 周

2.7 不同生长期的虾皮 NAGase 对 Hg^{2+} 敏感性比较

选用 $HgCl_2$ 为效应物,研究 Hg^{2+} 对 NAGase 活力影响,结果表明, Hg^{2+} 对各个生长期的虾皮 NAGase 的活力影响效果不一样.当 Hg^{2+} 浓度为 0.1 mmol/dm^3 时,养殖 6、8、9 周的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 的酶活力依次提高了 18.4%、44.4%、3.2%,而对养殖 4、12 周的酶不但没有激活反而出现抑制,分别使酶活力下降 33.8% 和 25.4%.当 Hg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/dm^3 时,养殖 4、6、8、9、12 周 5 个生长期的 NAGase 的剩余酶活力分别为 12.1%、22.7%、34.5%、18.0%、14.6%. Hg^{2+} 对凡纳滨对虾由小到大的 5 个生长期的虾皮 NAGase 的抑制 IC_{50} 依次为 0.18 、 0.42 、 0.67 、 0.33 、 0.24 mmol/dm^3 .

3 结语

凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 与蜕壳生长发育密切相关.不同生长期对虾外壳膜 NAGase 的酶含量存在较大的差异.在幼虾时,酶活力较高是由于幼虾蜕壳较频繁缘故,随着对虾的生长,酶相对含量逐渐的降低,当虾体生长到成体时,酶活力又提高到恒定的高水平,与对虾的繁殖、代谢及抵抗病害的侵袭有关.不同生长期对虾外壳膜 NAGase 对重金属污染的敏感度也不同,养殖到 8、9 周的酶对 Cu^{2+} 的敏感性较为明显,酶活力提高最为显著,而幼虾、成体的酶受影响较小,酶活力提高较小;对 Zn^{2+} 和 Hg^{2+} 的敏感度具有相反的效果,而幼虾(养殖 4 周)、成体(养殖 12 周)的酶受影响较显著,酶活力被抑制较大,而养殖 6、8、9 周的酶受抑制较低.显示不同生长期的对虾外壳膜 NAGase 的性质存在较大的差异,该研究对于探讨养殖环境与对虾的生长发育过程的相关性提供直接的理论依据.

参考文献:

- [1] 杨承勇,周世宁. 几丁质酶的研究及运用前景[J]. 仲凯农业技术学院学报, 1999, 12(1): 64~69.
- [2] A mou l C, Jeun iaux C. Les enzym es hydrolytiques dusystem e digestif chez les crustaces pagurides[J]. Cah Bio] 1982, 23: 89~103
- [3] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al*. Protein measurement with the folin-phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265~272
- [4] 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
- [5] Xie X L, Chen Q X, Lin J C, *et al*. Purification and some properties of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Litopenaeus Vannam ei*) [J]. Marine Biology, 2004, 146: 143~148
- [6] 林建城,王悦,谢晓兰,等. 金属离子对凡纳对虾 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

Comparison of the basic properties of NAGase from the crustacean membrane of shrimp (*Litopenaeus vannam ei*) in different stages

PAO Shun-jin¹, XIE Xiao-lan², HUANG Qian-sheng¹, XIE Jin-jin², CHEN Qing-xi¹

(1. Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering School of Life Sciences Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. College of Chemistry and Life Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

Abstract N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (EC 3.2.1.52, NAGase) from the crustacean membrane of shrimp (*Litopenaeus vannam ei*) in different growth stages was separated and extracted. The variations of activity and basic properties of the enzyme were studied. 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 in different growth stages varied, but the optimum pH was all at 5.5. The effects of metal ions on the enzyme showed that the sensitivities to Cu^{2+} , Zn^{2+} and Hg^{2+} of the enzyme in different growth stages were different. Cu^{2+} activated enzyme in shrimps of 8 week-old was the most activity by increment of 400%. Zn^{2+} could inhibit the enzyme in all growth stages and the effect was the most in matured shrimp by increment of 80% of its activity. The effects of Hg^{2+} on the enzyme in different growth stages were distinct. When concentration of Hg^{2+} reached 0.1 mmol/dm^3 , it could only activate the enzyme of 6, 8 and 9 week-old shrimp. When concentration was at 1.0 mmol/dm^3 , it could inhibit the NAGase enzyme at all 5 stages of shrimp growth.

Key words marine biology; N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase); experimental research; *Litopenaeus vannam ei*; comparison of characters

(责任编辑:霍湘娟)