学校编码：10384　　分类号＿＿＿＿密级＿＿＿＿
学号：20051302087　　UDC ＿＿＿＿

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

凡纳滨对虾N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力调控的研究

Research on the activity regulation of N-Acetyl-β-D-glucosaminidase from *Litopenaeus vannamei*

杜娟

指导教师姓名：　陈清西　　教授
专　业　名　称：生物化学与分子生物学
论文提交日期：2008 年 4 月 21 日
论文答辩时间：2008 年 5 月 29 日
学位授予日期：2008 年　　月　　日

答辩委员会主席：黄耀坚
评　　阅　　人：＿＿＿＿＿＿

2008 年 5 月 20 日

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2008 年 5 月 20 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（　），在　　年解密后适用本授权书。

2、不保密（√）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：　　日期：2008 年 5 月 20 日

导师签名：　　日期：2008 年 5 月 20 日

目　录

Contents

摘　要

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。N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-Acetyl-β-D-glucosaminidase，简称 NAGase，EC. 3.2.1.52)在对虾的蜕壳发育和营养代谢中发挥着重要作用。因此，研究凡纳滨对虾在患病过程的酶学变化，探讨环境污染物、饲料添加剂、水产养殖常用药物等对 NAGase 活力的影响与调控，以及对虾活体急毒性试验的开展，探究重金属离子对凡纳滨对虾 NAGase 活力的影响，将有利于对虾养殖业发展，为对虾养殖水环境污染监测提供更加充分、直观的科学依据，并填补国内外在这方面的研究空白。本文以凡纳滨对虾壳膜与内脏所提 NAGase 为对象，展开以下几方面的研究。

（1）跟踪考察分析健康和患红体病的凡纳滨对虾壳膜与内脏 NAGase 的活力和性质的差异。测得健康对虾壳膜 NAGase 的活力为 34.80 U/mg，内脏 NAGase 的活力为 35.34 U/mg；而患红体病对虾壳膜 NAGase 的活力为 38.32 U /mg，内脏 NAGase 的活力为 20.02 U/mg。结果表明：两种来源对虾的 NAGase 活力、基本酶学性质等均存在差异。对虾患红体病后，壳膜与内脏 NAGase 的催化反应动力学常数 K_m 和 V_m 值、活化能均较高，但其最适温度较低，pH 稳定性及热稳定性较差。同时，对虾患病前后，壳膜与内脏来源的 NAGase 对外界各影响因子（Hg^{2+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}、Cd^{2+}、Pb^{2+}、Al^{3+}等重金属离子污染物；乙醇、甲醛、苯酚、甲醇、二氧六环、DMF、DMSO 等有机污染；脲、NBS、SDS 等常用化学修饰剂及变性剂）的敏感性也发生了变化。

（2）养殖水体常用消毒药物中，次氯酸钠、三氯异氰尿酸、季氨盐对凡纳滨对虾壳膜与内脏来源的 NAGase 的活力有不同程度的影响。同时，次氯酸钠、三氯异氰尿酸对两种来源的酶的抑制为不可逆过程。青霉素钾、链霉素、庆大霉素、卡那霉素等对壳膜与内脏来源的 NAGas 活力基本上没有影响；养殖常用的内服、外用抗菌药物中，盐酸环丙沙星对两种来源的酶有激活作用，而诺氟沙星和磺胺甲噁唑对酶活力则有不同程度的抑制作用。磺胺甲噁唑对壳膜 NAGase 表现为混合型可逆抑制，对内脏来源的 NAGase 表现为非竞争性抑制；诺氟沙星对内脏来源的 NAGase 为混合型可逆抑制。考察几种养殖常用维生素对内脏 NAGase 活力的影响，其中 VB_{12}、烟酸、核黄素等对酶活力基本上没有影响；而

VB_1、VB_6、抗坏血酸等对该酶活力均有不同程度的抑制作用，进一步研究了 VB_6 的抑制作用动力学，其对酶的抑制作用为非竞争性可逆抑制。

（3）对凡纳滨对虾进行养殖试验，研究重金属离子对对虾 NAGase 活力影响，在不同时间取样并考察 Cu^{2+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Pb^{2+}、Hg^{2+}等重金属离子对凡纳滨对虾壳膜及内脏 NAGase 活力的影响。结果显示 5 种重金属离子低浓度组在短时间内对凡纳滨对虾壳膜与内脏的 NAGase 活力没有显著影响，48h 后随作用时间的延长，重金属离子使两种来源的 NAGase 活力均逐渐降低，表现为显著性抑制的剂量效应关系。

关键词：凡纳滨对虾；N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶；性质；活力调控；动力学

Abstract

The production per unit of *Litopenaeus vannamei* tops among three major prawns in the world. And it is known that N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase EC. 3.2.1.52) plays a pivotal role in molting and nutritious metabolism of prawns. Hence, our study of enzymatic changes of prawns when sick, the effects of environmental pollutants, forage addition and common drugs used for aquatic breeding on the activities of NAGase, along with the study of acute toxic assays on prawn living bodies and the effects of heavy metal ions on activity of NAGase of prawns will benefit the prawn breeding industry and provide a more sufficient and direct scientific basis for monitoring the pollution in aquatic environment for culturing the prawn. Meanwhile, our study fulfills the blank in this field both domestically and internationally. Our study focuses on the NAGase extracted from *Litopenaeus vannamei* and falls into three categories:

(1) Study of differences of activities and properties of NAGase in prawns between health ones and the ones with "red body disease (RBD)". Our results show that the activities of NAGase in shell membrane and viscera of healthy prawns are 34.80 U/mg and 35.34 U/mg, respectively; while the activities of NAGase in shell membrane and viscera of prawns with RBD are 38.32 U /mg and 20.02 U/mg, respectively. This illustrate that there are differences between healthy prawns and the ones with RBD in activity and basic enzymatic properties of NAGase. Although catalytic reaction kinetic constant K_m and V_m value and activity energy of NAGase from the shell membrane and viscera of prawns with RBD are higher, the optimal temperature of NAGase is lower; also pH and thermal stabilities of NAGase are worse. At the same time, the sensitivity of NAGase changes between healthy prawns and prawns with RBD to outside factors, including heavy metal ions like Hg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Al^{3+}; organic pollutants like ethanol, formaldehyde, phenol, methanol, dioxane, DMF and DMSO; common chemical dressing agent and denaturant like urea, NBS and SDS.

(2) Study of different effects of common antidote for aquatic bodies, such as sodium hypochlorite, symclosene and quaternary ammonium on the activity of NAGase from shell membrane and viscera of *Litopenaeus vannamei.* Meanwhile, the inhibitions of sodium hypochlorite and symclosene to these two different enzymes are irreversible. Moreover, our results show that benzylpenicillin sotassium, streptomycin, gentamicin and kanamycin have no effect on the activities of these two kinds of NAGase. Our results also show that among common antibiotics, ciprofloxacin activates these two kinds of NAGase while norfloxacin and sulfalene inhibit them. Sulfalene shows mixed reversible inhibition on NAGase from shell membrane while noncompetitive inhibition on NAGase from viscera; norfloxacin shows mixed reversible inhibition on NAGase from viscera. We also study the effects of several common vitamins on the activity of NAGase extracted from viscera. Our data illustrate that VB_{12}, niacin and lactoflavin have no significant effect on the enzyme activity while VB_1, VB_6 and ascorbic acid inhibit it in distinct degrees. Further kinetic study shows that the inhibition of VB_6 on the enzyme is noncompetitive.

(3) Study of culture conditions for *Litopenaeus vannamei,* and different effects of heavy metal ions on NAGase activities. We study how different metal ions such as Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+} affect the activity of NAGase extracted from shell membrane and viscera of *Litopenaeus vannamei.* Our results show that no significant change in the activity of NAGase extracted from shell membrane and viscera of *Litopenaeus vannamei* treated with these five metal ions in short time. Nevertheless, the activities of these two NAGase decrease after 48 hours treatment with metal ions, which indicates a significant dose-dependent inhibition.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; β-N-Acetyl-D-glucosaminidase; properties; activity control; kinetics

第一章 前言

1.1 凡纳滨对虾概况及养殖

凡纳滨对虾（*Litopenaeus vannamei*）又称南美白对虾、万氏对虾、白脚虾、白腿对虾，分类上隶属于节肢动物门（Arthropoda）、甲壳纲（Crustacea）、十足目（Decapoda）、游泳亚目（Natantia）、对虾科（Penaeidae）、对虾属（*Penaeus*）、*LitoPenaeus* 亚属[1]。原产于中、南美洲太平洋沿岸的温暖水域，以厄瓜多尔沿岸分布最为集中，与斑节对虾、中国对虾并列为世界对虾养殖的三大品种，是集约化高产养殖的优良品种[2]。具有壳薄、肉厚、生长快、群体增长均匀、抗逆性强、耐盐性广、营养要求低、食性广、出肉率高、肉味鲜美、离水存活时间长以及经济价值高等优点[3~6]。我国于 1988 年由张伟权教授引进，1994 年批量育苗成功[7]。现已在全国沿海养殖，由于其耐低盐度，许多内陆地区也试养成功，我国年产量已达 12 万吨[7,8]。

1.1.1 凡纳滨对虾简介

凡纳滨对虾外形与中国明对虾*Fenneropenaeus chinensis* 酷似，成体最长可达23cm，正常体色为青蓝色或浅青灰色，全身不具斑纹；额角稍向下弯，额角尖端的长度不超过第一触角柄的第二节，其齿式为59/ 24；头胸甲短，与腹部长度之比为1：3；体长而侧高，略呈梭形；额角侧沟短，止于胃上刺下方；头胸甲具肝刺和鳃角刺；第一触角具双鞭，内鞭较外鞭纤细，长度大致相等，约为第一触角柄长度的1/ 3；第1-3 对步足的上肢十分发达，第4-5 对步足无上肢，第5 对步足具锥形外肢；尾节具中央沟，但不具缘侧刺[1]。该虾广泛分布于太平洋沿岸水域秘鲁北部至墨西哥桑诺拉一带[9]。

凡纳滨对虾属杂食性种类，偏动物性食性。自然水体中，在幼虾期，主要以水生昆虫幼体、小型甲壳类、水生蠕虫、动物尸体、有机碎屑等为食；成虾期食物组成多样。对饲料的固化率要求较高，但对动物性饵料的需求并不十分严格，只要饵料成分组成中蛋白质的比率占25 %以上，即可正常生长[10~13]。繁殖期间，尤其是性腺发育中、后期，摄食量明显增大。凡纳滨对虾忍受的高、低温极限为41 ℃和4 ℃，生存的水温为6-39 ℃，在18-35 ℃水温范围内均可摄食和生长，而在24-33 ℃摄食和生长较好，且随温度的升高，凡纳滨对虾的摄食和生长增强。30-33 ℃是凡纳滨对虾生长和摄食的最适水温，在此温度下摄食和生长均可达到