

# 患红体病的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 基本性质的改变\*

杜娟 谢晓兰<sup>1</sup> 石艳 黄乾生 陈清西\*\*

(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)

(<sup>1</sup>泉州师范学院化学与生命科学学院 福建泉州 362000)

**摘要** 分别以健康和患红体病的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)外壳膜为材料,抽提其 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.52,简称 NAGase),测定分析两种来源对虾的外壳膜 NAGase 的活力和性质的差异.测得健康对虾 NAGase 的活力为 34.80 U mg<sup>-1</sup>,而患红体病对虾的活力为 38.32 U mg<sup>-1</sup>.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.表明对虾患红体病后,外壳膜 NAGase 的活力、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. 图 5 表 1 参 11

**关键词** 凡纳滨对虾; N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶; 酶学性质; 红体病

**CLC** Q959.223.630.6 : S945.4

## Variations in Basic Properties of NAGase from Crustacean Membrane of *Litopenaeus vannamei* Suffered from Red-body Disease\*

DU Juan, XIE Xiaolan<sup>1</sup>, SHI Yan, HUANG Qiansheng & CHEN Qingxi\*\*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,  
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

(<sup>1</sup>College of Chemistry and Life Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, Fujian, China)

**Abstract** N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (EC 3.2.1.52, NAGase) was extracted and purified from the crustacean membranes of both healthy and red-body disease suffering shrimps (*Litopenaeus vannamei*). The activity of the enzyme from the crustacean membrane of healthy shrimps was 34.80 U mg<sup>-1</sup>, and that from the ones of red-body-disease was 38.32 U mg<sup>-1</sup>. The variations in activities and basic properties of the enzymes between the two kinds of shrimps were investigated. The results showed that the variations existed in the specific activity, optimum temperature and dynamic constants including  $K_m$ ,  $V_m$ , and  $E_a$  for the hydrolysis of pNP-NAG by the enzymes from the two sources. The activity of NAGase and the kinetic parameters, such as the values of  $K_m$ ,  $V_m$  and  $E_a$  were higher after the shrimp suffered from red-body disease, but the optimum temperature was relatively low, and pH and thermal stabilities were not so good. Fig 5, Tab 1, Ref 11

**Keywords** *Litopenaeus vannamei*; N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase); enzymic character; red-body disease

**CLC** Q959.223.630.6 : S945.4

几丁质酶系是由内切几丁质酶、外切几丁质酶和 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase, EC 3.2.1.52)等 3 种组分组成,广泛存在于微生物、甲壳动物和植物中,在生物体的生长发育、食物消化吸收与疾病防御等方面具有重要功能<sup>[1~4]</sup>.近年来,人们注意到几丁质酶与对虾生长发育过程中的周期性蜕皮存在相关性,并在虾幼体的孵化中起重要作用<sup>[5,6]</sup>.凡纳滨对虾红体病由桃拉(TAURA)综合症病毒引起,是养殖过程中常见的流行病,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<sup>[7]</sup>.目前,国内关于对虾红体病的病理、病因报导不少,但对虾红体病与具有疾病防御功能的 NAGase 的关系仍未见报道.本文以凡纳滨对虾(*Litopenaeus*

*vannamei*)为材料,比较健康虾与患病虾外壳膜 NAGase 的比活力和部分酶学性质的差异,研究结果将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 2.5~2.8 万尾/亩;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%,溶氧量为 5.2~5.8 mg L<sup>-1</sup>;氨氮在 0.55 mg L<sup>-1</sup>左右);对-硝基苯-N-乙酰- $\beta$ -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,酶活力测定参考文献[8].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考文献[9].酶催化 pNP-NAG 水解的动力学常数  $K_m$  和  $V_m$  采

收稿日期:2007-10-17 接受日期:2008-03-05

\* 福建省科技重点项目(2006N0067)资助 Supported by the Key Project of the Science and Technology Foundation of Fujian, China (2006N0067)

\*\* 通讯作者 Corresponding author (E-mail: chenqx@xmu.edu.cn)

用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图测定. 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外壳膜 NAGase 活力比较

以体长约 3.80 cm 的健康的及患红体病的凡纳滨对虾为研究对象, 比较研究对虾患红体病前后的外壳膜 NAGase 的活力差异, 以 pNP-NAG 为底物, 在 37 °C 下, 0.15 mol L<sup>-1</sup> NaAc-HAc pH 5.2 的缓冲体系中测定患病前后的外壳膜 NAGase 活力. 测得健康凡纳滨对虾的活力为 34.80 U mg<sup>-1</sup>, 而患红体病的对虾活力为 38.32 U mg<sup>-1</sup>. 结果表明, 凡纳滨对虾在患红体病后 NAGase 活力有轻微的上升.

### 2.2 健康虾与患红体病虾的外壳膜 NAGase 基本性质比较

**2.2.1 最适 pH 比较** 以 pNP-NAG 为底物, 在 37 °C、不同 pH 缓冲液中 (pH 4.0~5.8 用 0.2 mol L<sup>-1</sup> NaAc-HAc 缓冲液, pH 5.8~7.0 用 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液), 酶蛋白终浓度均为 0.20 mg mL<sup>-1</sup>, 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, 结果 (图 1) 表明, 从整体来说, 患红体病对虾外壳膜 NAGase 酶活力都比正常虾来源的外壳膜 NAGase 酶活力高, 但 pH 对酶活力影响的趋势几乎相同, 酶的最适 pH 均为 5.5.

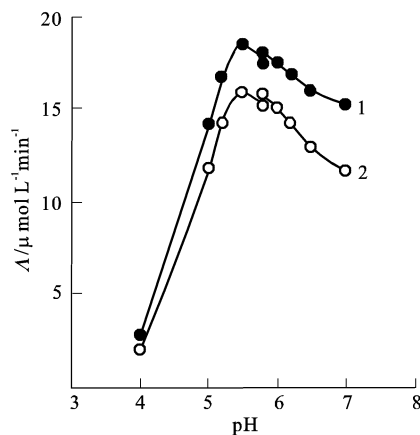


图 1 pH 对凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 活力的影响

Fig. 1 Effect of pH on the NAGase activity of *L. vannamei*

1: 染病虾; 2: 健康虾. 下同

1: Sicked *L. vannamei*; 2: Healthy *L. vannamei*. The same below

**2.2.2 pH 稳定性比较** 健康虾和红体病虾来源的外壳膜 NAGase 分别在 4 °C 下、不同 pH (2.0~11.0) 缓冲液中放置 1 h 后, 取出 20 μL 在正常的测活体系中 (37 °C、pH 5.2 的缓冲体系, 酶终浓度为 0.20 mg mL<sup>-1</sup>) 检测酶的剩余活力. 图 2 显示, 健康虾来源的外壳膜 NAGase 在 pH 5.0~9.0 范围内具有良好的稳定性, 而红体病来源的外壳膜 NAGase 仅在 pH 6.0~7.0 具有稳定性, 而当 pH 低于 5.0 或高于 8.0 时, 显示不稳定. 可见, 对虾患病后 NAGase 的 pH 稳定性明显下降.

**2.2.3 最适温度比较** 在 pH 5.2 的测活体系中, 研究温度对酶活力的影响. 在相同的测活体系中, 改变反应液的温度, 测

定不同温度下酶催化反应 10 min 的初速度 ( $v_0$ ), 考察温度对酶催化活力的影响. 结果 (图 3) 表明, 患病对虾外壳膜 NAGase 的酶促反应最适温度为 34 °C, 而健康虾外壳膜 NAGase 的最适温度为 37 °C, 说明对虾患红体病后其外壳膜 NAGase 的最适温度有所下降.

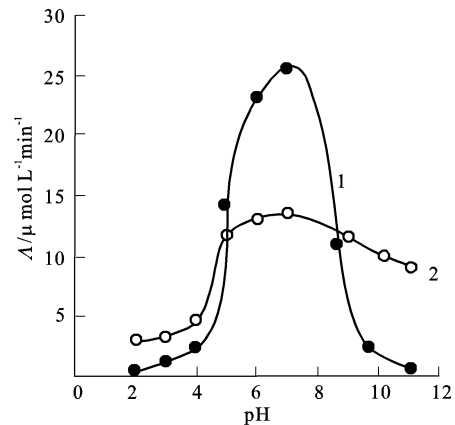


图 2 凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 的 pH 稳定性

Fig. 2 pH stability of *L. vannamei* NAGase

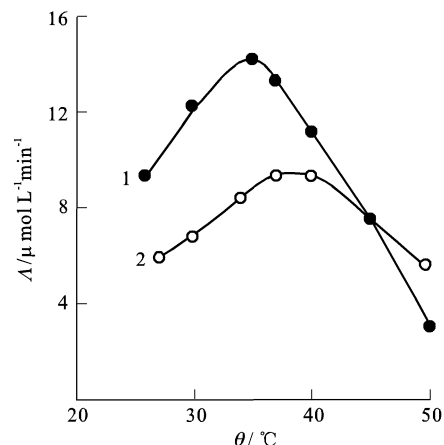


图 3 温度对凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the NAGase activity of *L. vannamei*

**2.2.4 热稳定性比较** 取定量的健康虾和红体病虾来源的外壳膜 NAGase 酶液, 在不同温度下保温处理 30 min, 然后取出 20 μL 热处理的酶在 37 °C 的测活体系中检测酶的剩余活力 (酶终浓度为 0.20 mg mL<sup>-1</sup>), 酶活力与处理的温度关系图见图 4. 结果表明, 对虾外壳膜 NAGase 在患病前后热稳定性发生了变化. 红体病来源的外壳膜 NAGase 对热处理较为敏感, 随着温度的下降, 酶活力丧失较为迅速, 当温度达到 45 °C 时, 病虾的酶活力下降了 90.7%, 相比之下, 健康虾的酶活力仅下降 74.3%. 当变性温度达 65 °C 时, 病虾的酶活力几乎完全丧失, 而健康虾的酶活力还保留 9.6%.

**2.2.5 酶促反应动力学参数的比较** 在 37 °C、pH 5.2 的测活体系中, 改变底物 pNP-NAG 的浓度, 分别检测健康虾和红体病虾来源的外壳膜 NAGase 的酶促反应动力学参数. 结果显示, 两种不同来源的酶催化 pNP-NAG 水解反应均遵循米氏双曲线方程式, 以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图 (图 5), 求得健康虾的外壳膜 NAGase 水解 pNP-NAG 的动力学常数  $K_m$  和  $V_m$

值分别为  $0.37 \text{ mmol L}^{-1}$  和  $16.92 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $V_m/K_m$  为  $0.0457 \text{ min}^{-1}$ . 患红体病后虾的外壳膜 NAGase 的  $K_m$ 、 $V_m$  均有明显的改变, 其中  $K_m$  增大到  $3.33 \text{ mmol L}^{-1}$ , 而  $V_m$  值增大到  $96.15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $V_m/K_m$  为  $0.0289 \text{ min}^{-1}$ . 说明患病后酶对底物亲和力 ( $V_m/K_m$ ) 变小, 下降了 36.76%.

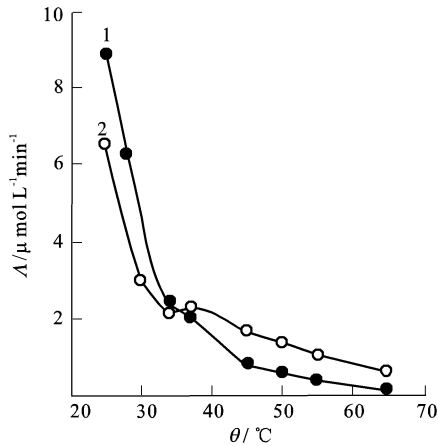


图 4 凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 的热稳定性  
Fig. 4 Thermal stability of *L. vannamei* NAGase

2.2.6 酶催化反应活化能比较 在不同温度下测定健康虾与患红体病虾的外壳膜 NAGase 催化 pNP-NAG 水解反应的  $V_m$  值. 以酶促反应的最大速度之对数 ( $\lg V_m$ ) 对  $1/T$  作图, 得直线

关系, 从直线斜率求得健康虾和红体病虾来源的外壳膜 NAGase 的酶催化 pNP-NAG 水解反应的活化能 ( $E_a$ ) 分别为  $52.58 \text{ KJ mol}^{-1}$  和  $79.26 \text{ KJ mol}^{-1}$ . 结果表明, 患红体病后虾的外壳膜 NAGase 的活化能明显提高, 显示酶的催化能力下降.

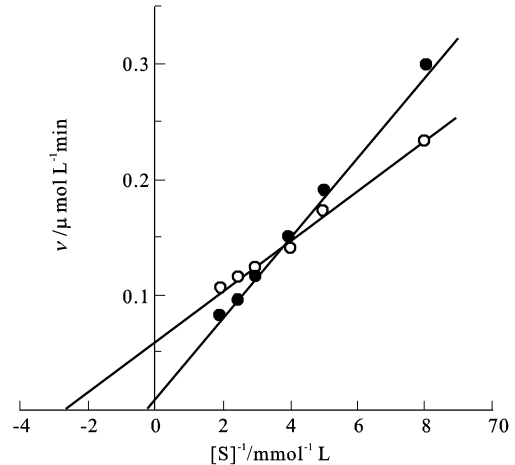


图 5 凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 催化 pNP-NAG 水解反应的双倒数图 (pH 5.2)  
Fig. 5 Lineweaver-Burk plots on the hydrolysis of pNP-NAG by *L. vannamei* NAGase at pH 5.2

上述的健康虾与患红体病虾的外壳膜 NAGase 催化 pNP-NAG 水解的酶学特性的参数变化总结于表 1, 以供比较.

表 1 凡纳滨对虾患病前后外壳膜 NAGase 催化 pNP-NAG 的酶学性质

Table 1 Properties of healthy and sicked *L. vannamei* NAGase on the hydrolysis of pNP-NAG

NAGase	$\theta_{\text{opt}}/^\circ\text{C}$	pH <sub>opt</sub>	$K_m$ /mmol L <sup>-1</sup>	$V_m$ /mmol (L min) <sup>-1</sup>	$V_m/K_m$ (min <sup>-1</sup> )	$E_a$ /KJ mol <sup>-1</sup>
健康虾 From the healthy	37	5.5	0.37	16.92	0.0457	52.58
红体病虾 From the sicked	35	5.5	3.33	96.15	0.0289	79.26

### 3 讨论

凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 与蜕壳生长发育密切相关<sup>[10]</sup>, 患红体病的对虾反应迟钝, 活动力减弱, 多数沉于水底不动或慢游于水面, 甲壳变软, 部分病虾甲壳与肌肉容易分离, 脱壳不久死亡<sup>[11]</sup>. 因此, 我们以凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 为研究对象, 分析了健康虾与患红体病虾的外壳膜 NAGase 动力学性质的差异, 以期对红体病的诊治提供重要的理论依据.

通过对对虾患病前后外壳膜 NAGase 的比活力和基本性质的研究与比较, 可以看出两种来源的外壳膜 NAGase 存在很大差异, 红体病来源的 NAGase 的比活力大于健康来源的, 这与患病症状甲壳易分离相一致, 暗示该酶可能与对虾患病具有相关性. 进一步分析比较两种来源酶的基本酶学性质, 结果显示二者最适 pH 均为 5.5, 但 pH 稳定性发生了变化, 患病前酶在 pH 5.0~9.0 有较好的稳定性, 而患病后仅在 pH 6.0~7.0 具有稳定性, 酶的 pH 稳定性变差, 对外界 pH 的变化更敏感. 对虾患病前后, 外壳膜 NAGase 的酶促反应最适温度从 37 °C 降至 34 °C, 且热稳定性下降. 这些结果说明对虾患病后对外界的适应能力下降. 酶动力学研究表明, 外壳膜 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, 患

病后外壳膜 NAGase 对底物的亲和力变小, 即跟底物的结合能力减弱; 暗示酶在患病前后动力学特征发生了变化, 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, 还有待进一步的研究.

### References

- Huang XH (黄小红), Chen QX (陈清西), W J (王君), Xie XQ (谢雪清), Guan X (关雄). Effect of  $\text{Zn}^{2+}$  on activity and properties of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Helicoverpa armigera* pupae. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (6): 711 ~ 713
- Huang XH (黄小红), Chen QX (陈清西), W J (王君), Sha L (沙莉), Huang ZP (黄志鹏), Guan X (关雄). Effect of different organic solvents on the chitinase from *Bacillus thuringensis*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (1): 71 ~ 73
- Xie XL, Chen QX. Inactivation kinetics of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) in the dioxane solution. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, **69** (12): 1365 ~ 1371
- Yang CY (杨承勇), Zhou SN (周世宁). Research and application prospect of chitinase. *J Zhongkai Agrotechnical College* (仲恺农业技术

- 学院学报), 1999, **12** (1): 64 ~ 69
- 5 Amould C, Jeuniaux C. Les enzymes hydrolytiques dusysteme digestif chez les crustaces pagurides. *J Cah Biol*, 1982, **23**: 89 ~ 103
  - 6 Huang QS (黄乾生), Xie XL (谢小兰), Shi Y (石艳), Piao SJ (朴顺金), Chen QX (陈清西). Comparison of the properties of NAGase from the hepatopancreas of prawn (*Lifopenaeus vannamei*) in different growth stages. *J Xiamen Univ Nat Sci* (厦门大学学报), 2006, **45** (6): 847 ~ 850
  - 7 Xu GJ (许广江). Reseach on the red-body-disease in *Penaeus vannamei*. *Chin Countryside Well-off Technol* (中国农村小康科技), 2003, **5**: 24
  - 8 Lin JC, Chen QX, Shi Y, Li SW, Zhao H. The chemical modification of the essential groups of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Turbo cornutus* Solander. *IUBMB Life*, 2003, **55** (9): 547 ~ 552
  - 9 Xie XL, Chen QX, Lin JC, Wang Y. Purification and some properties of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). *Mar Biol*, 2004, **146**: 143 ~ 148
  - 10 Piao SJ (朴顺金), Xie XL (谢晓兰), Huang QS (黄乾生), Xie JJ (谢进金), Chen QX (陈清西). Comparison of the basic properties of NAGase from the crustaceous membrane of prawn (*Penaeus vannamei*) in different growth stages. *J Oceangr Taiwan Strait* (台湾海峡), 2006, **26** (3): 348 ~ 352
  - 11 Liang JN (梁皆能), He YJ (何义进). Reseach on the red-body disease in *Penaeus vannamei*. *Sci Fish Farming* (科学养鱼), 2002, **10**: 48