

养殖常用消毒药物对凡纳滨对虾 NAGase 活力的影响

谢晓兰^{1,2}, 黄乾生³, 魏晓倩³, 杜娟³, 王焱³, 柯才焕¹, 陈清西³

(1. 厦门大学海洋与环境科学学院海洋系, 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;

3. 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:研究几种消毒药物对来源于凡纳滨对虾壳膜与内脏的 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase, EC 3. 2. 1. 52)活力的影响。结果表明, 次氯酸钠和三氯异氰尿酸对 2 种来源的 NAGase 活性均有较强的不可逆抑制作用; 双链季铵盐对壳膜 NAGase 活性起强的激活作用, 而对内脏 NAGase 有轻微的抑制作用; 戊二醛对壳膜 NAGase 没有明显作用, 对内脏 NAGase 具有轻微的激活作用。

关键词: 凡纳滨对虾; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 消毒药物; 酶活力

中图分类号: S948 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2009)04-0108-05

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase, EC 3. 2. 1. 52)是几丁质酶系的成员之一, 它能协同内切、外切几丁质酶将几丁质分解成 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖(NAG)(杨承勇和周世宁, 1999), 对虾 NAGase 主要分布在其壳膜与内脏组织, 不仅与对虾的周期性蜕皮及虾幼体的孵化密切相关(Funke B & Spindler K D, 1989; 朴顺金等, 2006), 还具有促进对虾食物消化吸收、抗菌防卫等重要生理功能(黄乾生等, 2006; 杜娟等, 2008)。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 俗称南美白对虾或太平洋白对虾, 是目前世界上 3 大养殖对虾中单产最高的虾种, 味道鲜美营养高, 深受广大消费者喜爱。然而近年来爆发的大规模对虾流行病引发了养殖者对各种药物的滥用, 使对虾养殖业遭受重大的经济损失(李光友, 1995)。为了有效预防疾病, 养殖者必须选择合适的消毒药物并正确使用。目前普遍使用的水体消毒药物主要包括氯制剂(如次氯酸钠、三氯异氰尿酸)、醛制剂(如戊二醛)、双链季铵盐制剂(如二癸基二甲基氯化铵)等 3 大类(黄志斌和胡红, 2004)。研究了这几种常用养殖消毒药物对凡纳滨对虾 NAGase 活力的影响, 有利于了解药物对 NAGase 的调控作用, 为我国水产药物的监管提供一定的科学依

据, 同时对对虾养殖过程中的疾病防治及 NAGase 活力调控具有重要的指导作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

凡纳滨对虾壳膜与内脏 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶参考李光友(1995)的方法分离纯化得到, 为电泳单一纯酶制剂。对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(pNP-NAG)购置于上海医药工业研究院生化室, 次氯酸钠、三氯异氰尿酸、戊二醛与双链季铵盐制剂为湖南五指峰生化有限公司产品, 其余试剂均为国产分析纯。使用的蒸馏水为玻璃重蒸水。

1.2 方法

1.2.1 酶蛋白浓度的测定 酶浓度测定采用 Folin-酚法(李建武等, 1994)。

1.2.2 酶活力的测定 酶活力的测定参考 Xie X L 等(2004)的文献: 以 pNP-NAG 为底物, 在 2 mL 测活体系中, 包含 0.1 mol/L pH 5.2 NaAc-HAc 缓冲液和 0.25 mmol/L 的底物, 置 37 °C 恒温水浴, 加入适量酶液, 准确反应 10 min, 加入 2 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 终止反应。在 Beckman UV-650 型分光光度计上测定波长为 405 nm 的吸光度($A_{405\text{ nm}}$), 光径为 1 cm, 以对-硝基苯酚(pNP)为产物对照, 测得该条件下产物的消光系数为 $8.8 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。酶活力单位定义为在上述条件下, 每 1 min 水解底物产生 1 mol/L 产物的酶量。

1.2.3 消毒药物对酶活力的影响测定 采用前述酶活力测定方法, 在测活体系中, 加入不同浓度的药物溶液, 测定酶活力, 以不加效应物在相同测活体系

收稿日期: 2008-10-10

基金项目: 中国博士后科学基金项目(20070410806)、福建省科技重点项目(2006N0067)和福建省高等学校分子生物与药物化学重点实验室项目资助。

通讯作者: 陈清西。E-mail: chenqx@xmu.edu.cn

作者简介: 谢晓兰, 女, 1974 年生, 福建惠安人, 副教授, 博士后, 主要从事生物化学研究。

测定的酶活力为对照, 计算相对酶活, 分析它们对酶活力的影响。

1.2.4 消毒药物对酶活力的抑制机理测定 采用前述酶活力测定方法, 固定底物浓度为 0.25 mmol/L, 在含不同浓度药物的测活体系中, 研究酶量与酶活力的关系, 分析药物对酶的抑制机理。

2 结果

2.1 氯制剂类消毒药物对酶活力的影响

以对虾水产养殖中常用的氯制剂类消毒药物次氯酸钠 (NaClO) 和三氯异氰尿酸 (TCCA) 为效应物, 在测活体系中分别加入不同浓度的效应物, 探讨其对凡纳滨对虾壳膜与内脏来源的 NAGase 催化水解 pNP-NAG 的活力影响, 结果见图 1 ~ 图 2。由图 1 可见, NaClO 对壳膜 NAGase 的活力影响表现为先增强后抑制: 低浓度的 NaClO 对壳膜 NAGase 具有轻微激活作用, 0.75 mmol/L NaClO 使酶活提高约 10 %; 但随着浓度上升, 壳膜 NAGase 活力迅速下降, 导致酶活下降一半的浓度即 IC₅₀ 为 2.6 mmol/L。而 NaClO 对内脏 NAGase 仅具有强的抑制作用, 其 IC₅₀ 为 0.4 mmol/L。由图 2 可见, TCCA 对 2 种来源的 NAGase 表现出相似的抑制作用, 壳膜与内脏 NAGase 的 IC₅₀ 分别为 2.1 mol/L 和 1.8 mol/L。

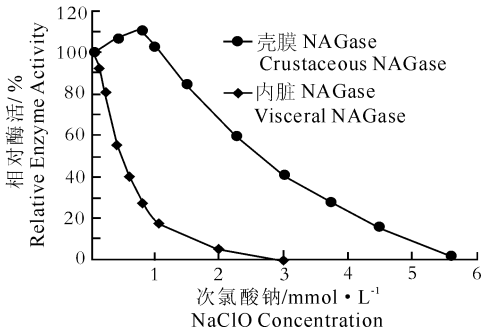


图 1 NaClO 对凡纳滨对虾壳膜 NAGase 与内脏 NAGase 的活力影响

Fig.1 Effect of NaClO on the activity of the crustacean NAGase and the visceral NAGase from prawn (*Litopenaeus vannamei*)

2.2 季铵盐类消毒药物对酶活力的影响

选用目前水产养殖中广泛使用的另一类消毒药物 - 双链季铵盐 (二癸基二甲基氯化铵, DDAC) 为效应物, 研究了该药物对凡纳滨对虾壳膜与内脏 NAGase 的影响, 见图 3。双链季铵盐在养殖生产使用的正常浓度范围内, 对壳膜 NAGase 活力表现为激活作用, 当浓度达到 22 μmol/L 时, 该酶活力提高约 95 %, 达到最高点, 但激活能力随着双链季铵盐

浓度的增加而有所下降。在相同的浓度范围内, 双链季铵盐对内脏 NAGase 活力则有一定程度的抑制作用, 当浓度达到 99.5 μmol/L 时使该酶活力下降了 21 %。

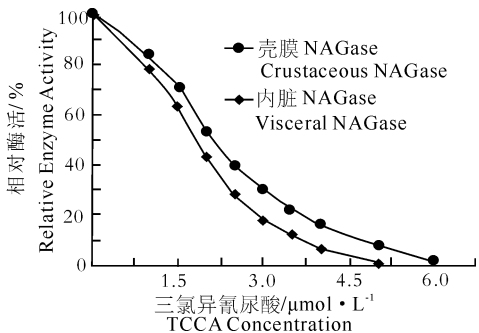


图 2 TCCA 对凡纳滨对虾壳膜 NAGase 与内脏 NAGase 的活力影响

Fig.2 Effect of TCCA on the activity of the crustacean NAGase and the visceral NAGase from prawn (*Litopenaeus vannamei*)

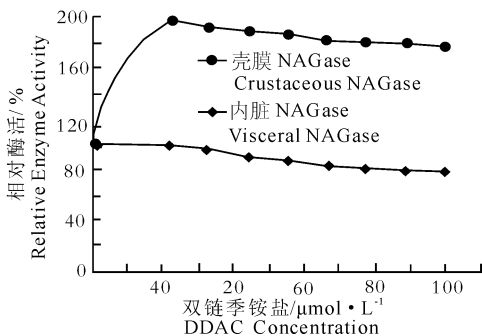


图 3 DDAC 对凡纳滨对虾壳膜 NAGase 与内脏 NAGase 的活力影响

Fig.3 Effect of DDAC on the activity of the crustacean NAGase and the visceral NAGase from prawn (*Litopenaeus vannamei*)

2.3 醛制剂类消毒药物对酶活力的影响

选用水产养殖中广泛使用的醛类消毒药戊二醛为效应物, 研究了该药物对凡纳滨对虾壳膜与内脏 NAGase 活力的影响, 结果见图 4。戊二醛在养殖生产使用的正常浓度范围内, 对壳膜 NAGase 活力几乎无影响; 对内脏 NAGase 有轻微的激活作用, 当戊二醛浓度为 20 μmol/L 时, 酶活力约提高了 15 %。

2.4 氯制剂类消毒药物对酶的抑制机理

2 种氯制剂类消毒药物次氯酸钠 (NaClO) 和三氯异氰尿酸 (TCCA) 对凡纳滨对虾壳膜 NAGase 与内脏 NAGase 均具有较强抑制作用, 进一步研究这 2 种消毒剂对 2 种来源的酶活力的影响是否可逆。分别在含不同浓度氯制剂的测活体系中, 固定底物浓度为 0.25 mmol/L, 改变壳膜 NAGase 的加入量, 测

定不同浓度氯制剂对凡纳滨对虾壳膜 NAGase 活力的影响。以酶的剩余活力对加入酶量作图,得到一组平行的直线(图 5)。由图 5 可见随着氯制剂浓度的增大,直线平行从原点向右移动,但斜率保持不变,说明氯制剂对壳膜 NAGase 的抑制是不可逆过程。这类消毒药物是通过降低有效的酶量导致酶活力的下降,而不是通过抑制酶活力而导致催化效率的降低。相同方法研究 2 种氯制剂类消毒药物对凡纳滨对虾内脏 NAGase 的抑制机理,得到相似结果,表明氯制剂对内脏 NAGase 的抑制也是不可逆过程。

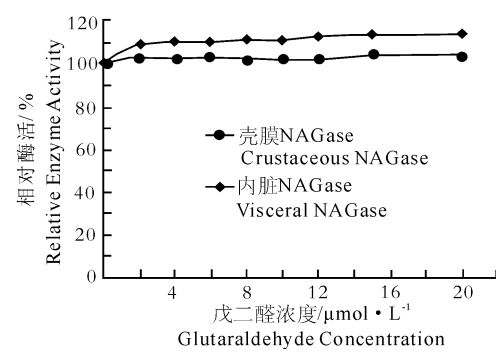


图 4 戊二醛对凡纳滨对虾壳膜 NAGase 与内脏 NAGase 的活力影响

Fig. 4 Effect of Glutaraldehyde on the activity of the crustacean NAGase and the visceral NAGase from prawn (*Litopenaeus vannamei*)

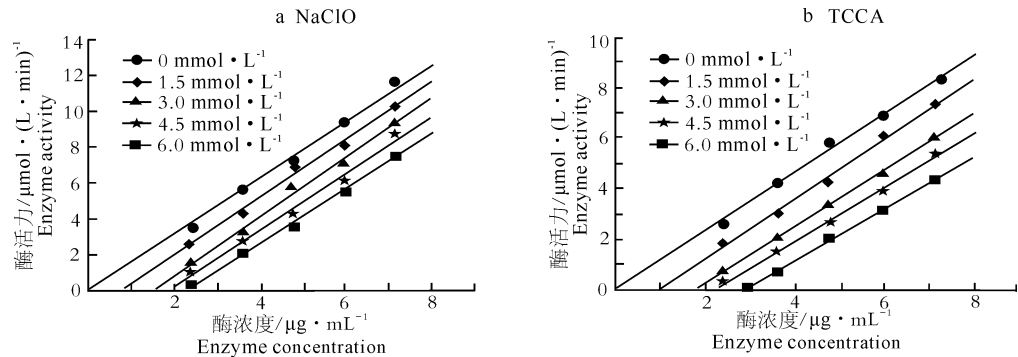


图 5 不同 NaClO 与 TCCA 浓度下壳膜 NAGase 活力和酶量的关系

Fig. 5 Effects of the crustacean NAGase concentration on its activity for the hydrolysis of pNP-NAG at different concentrations of NaClO and TCCA

3 讨论

在对虾水产养殖过程中普遍使用各种水体消毒药物以及抗菌药物。氯制剂、醛制剂、双链季铵盐制剂是目前普遍使用的 3 类水体消毒药物,其消毒机理各不相同,氯制剂主要利用其对病原菌蛋白的氯化与氧化作用达到杀菌作用;醛制剂主要利用其与病原菌蛋白质氨基结合使其烷基化而呈现杀菌作用;而双链季铵盐制剂是一种表面活性剂,主要利用其疏水与亲水基团的作用,使病原菌的膜通透性发生改变并破坏菌体的酶系统而起到杀菌目的(黄志斌和胡红,2004)。本实验在已报道过的金属离子、有机溶剂、饲料添加剂等对对虾 NAGase 活力影响(林建城等, 2005a; 林建城等, 2005b; 谢晓兰等, 2006)的基础上,进一步研究了 3 类养殖常用消毒药物对凡纳滨对虾 NAGase 活性的影响,研究结果对凡纳滨对虾生长过程的疾病诊控和药物筛选具有重要意义。

凡纳滨对虾壳膜 NAGase 与蜕皮生长密切相

关,而内脏 NAGase 与食物消化吸收有关(朴顺金等,2006;黄乾生等,2006)。本研究结果表明 3 类水体消毒剂对凡纳滨对虾壳膜与内脏 NAGase 的影响趋势不完全一致,进一步印证不同来源酶的结构与生物功能上的差别。氯制剂消毒药物对壳膜与内脏 NAGase 均产生不可逆抑制,这可能与氯制剂的强氧化作用破坏了酶的巯基有关,而巯基是酶活性的必需基团(Lin J C et al, 2005),因此,巯基的破坏导致酶的不可逆失活。内脏 NAGase 的 IC₅₀ 小于壳膜 NAGase 的 IC₅₀,暗示其对内脏酶具有更大的毒性。使用这一类消毒剂对对虾的蜕皮生长与摄食都会产生一定的负面影响。戊二醛作为消毒药物,它同时也能修饰对虾体内酶的氨基,但此次研究结果显示,在养殖生产使用的正常浓度范围内,戊二醛对对虾壳膜 NAGase 没有明显影响,而对内脏 NAGase 也只有轻微的激活作用,研究结果与甲醛需在高浓度下才会对对虾 NAGase 产生抑制作用的结果相一致(Xie X Let al, 2006),表明戊二醛的使用不会影响与 NAGase 相关的对虾生理过程。而双链季铵盐在

养殖使用的低浓度范围内,对壳膜 NAGase 表现为激活作用,对内脏 NAGase 有轻微地抑制作用,这可能是因为蛋白酶在水介质中,通过氢键、静电力和疏水键等作用使酶分子表面形成一个极性水化层从而维持其稳定的三维构象,而双链季铵盐是一种表面活性剂,高浓度的双链季铵盐会破坏蛋白酶的次级键与水化层,从而改变酶活性中心的微环境构象,引起酶活力的下降;但由于酶活性中心的柔韧性,低浓度的双链季铵盐对酶活性影响不大,有时反而有利于酶构象松散,导致酶活性中心的暴露,利于酶与底物结合并发挥催化作用。结果表明双链季铵盐的使用对凡纳滨对虾的蜕皮生长起促进作用,对凡纳滨对虾的摄食将产生轻微影响。

以上实验研究表明各类药物的使用要根据凡纳滨对虾的生长状况,尽量避免不合理的用药,以达到保护和治疗的目的。本研究结果有利于指导凡纳滨对虾的大面积养殖,防止滥用药物造成的经济损失。

参考文献:

杜娟,谢晓兰,石艳,等. 2008. 患红体病的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 基本性质的改变[J]. 应用与环境生物学报, 14(2): 207~210.

黄乾生,谢晓兰,石艳,等. 2006. 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, 45(6): 847~850.

黄志斌,胡红. 2004. 水产药物应用表解[M]. 南京:江苏科学技术出版社.

李光友. 1995. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学, (4): 1~1.

李建武,陈丽蓉,陈雅惠,等. 1994. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社.

林建城,王悦,谢晓兰,等. 2005a. 金属离子对凡纳滨对虾 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响[J]. 台湾海峡, 24(1): 78~82.

林建城,谢晓兰,陈清西. 2005b. 有机溶剂对南美白对虾 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, 44(5): 696~696.

朴顺金,谢晓兰,黄乾生,等. 2006. 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, 25(3): 348~352.

谢晓兰,王悦,陈清西. 2006. 氨基酸对凡纳滨对虾 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响[J]. 海洋科学, 30(3): 46~50.

杨承勇,周世宁. 1999. 几丁质酶的研究及运用前景[J]. 仲恺农业技术学院学报, 12(1): 64~69.

Funke B, Spindler K D. 1989. Characterization of chitinase from the brine shrimp *Artemia* [J]. Comp Biochem Physiol, 94B(4): 691~695.

Lin J C, Xie X L, Gong M, et al. 2005. Effects of mercuric ion on the conformation and activity of *Penaeus vannamei* β -N-acetyl-D-glucosaminidase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 36: 327~330.

Xie X L, Chen Q X, Lin J C, et al. 2004. Purification and some properties of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. Marine Biology, 37(5): 314~317.

Xie X L, Shi Y, Huang Q S, et al. 2006. Inactivation Kinetics of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from Prawn (*Penaeus vannamei*) by Formaldehyde [J]. Marine Science Bulletin, 8(1): 34~45.

(责任编辑 杨春艳)

The Effects of Some Aquacultural Disinfectors on the Activity of NAGase from Prawn (*Litopenaeus vannamei*)

XIE Xiao-lan^{1,2}, HUANG Qian-sheng³, WEI Xiao-qian³,
DU Juan³, WANG Ye³, KE Cai-huan¹, CHEN Qing-xi³

(1. Department of Oceanography, School of Oceanography and environmental Sciences,
Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. School of Chemistry and Life Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362011, China;

3. Key Lab of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The effects of some aquacultural disinfectors on the hydrolysis of pNP-NAG catalyzed by N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase, EC 3.2.1.52) from crustacean membrane and viscera of *Litopenaeus vannamei* were studied. Sodium hypochlorite (NaClO) and symclosene (TCCA) strongly and irreversibly inhibit the activity of these two different enzymes. Didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC) could sharply enhance the crustacean NAGase activity and slightly inhibit the viscera NAGase activity. Glutaraldehyde had no obvious effect on the crustacean NAGase activity, but lightly inhibited the viscera NAGase activity.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; N-acetyl- β -D-glucosaminidase; Aquacultural disinfectors; Enzyme activity