养殖常用抗菌药物对凡纳滨对虾外壳膜 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响

杜 娟[1], 安 刚[1], 谢晓兰[2], 黄乾生[1], 王 烨[1], 陈清西[1*]
(1. 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;
2. 泉州师范学院化学与生命科学学院, 福建 泉州 362011)

摘要: 研究几种抗菌药物对凡纳滨对虾壳膜 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, 诺氟沙星和磺胺甲噁唑对该酶活力有不同程度的抑制作用, 盐酸环丙沙星对此酶有激活作用, 而青霉素钾、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、磺胺嘧啶等对酶活力基本上没有影响; 磺胺甲噁唑的抑制作用最为显著, 导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度(IC_{50})为 0.094 mg/mL. 抑制作用动力学研究结果表明, 磺胺甲噁唑对酶的抑制作用为混合型可逆抑制, 其抑制常数 K_I 为 5.98 mg/mL, 对酶-底物络合物的抑制常数 K_{IS} 为 13.08 mg/mL. 该研究对凡纳滨对虾的人工养殖具有一定的参考价值.

关键词: 凡纳滨对虾; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 抗菌类药物; 酶活力; 抑制机理
中图分类号: Q 356.1 文献标识码: A 文章编号: 0438-0479(2008)06-0883-04

N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶(NAGase, EC 3.2.1.52)是几丁质酶水解系统的一个组成成分, 它能协同内切几丁质酶、外切几丁质酶将多聚壳聚糖分解成 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖(NAG), 具有促进食物消化吸收、疾病防卫、生长发育的重要生理功能[1]. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 俗称南美白对虾或太平洋白对虾, 是目前世界上三大养殖对虾中单产量最高的虾种, 味道鲜美营养高, 是国内外市场的畅销品种, 深受广大消费者喜爱. 然而近年来大规模爆发的对虾流行性疾病, 使我国乃至世界的对虾产业受到各种对虾疾病的困扰, 并遭受了重大的经济损失, 对虾养殖业严重受阻[2]. 为了有效地控制和治疗疾病, 养殖者必须选择合适的水产药物并正确地使用[3]. 目前, 越来越多的医用、兽用药物应用到水产养殖中, 但使用抗生素类、磺胺类、喹诺酮类等养殖常用药物对药物治疗水生动物的细菌性疾病时, 大多是借鉴兽医对哺乳动物的研究成果, 因此, 造成该类药物在水产业疾病防治用药的盲目性[4]. 研究与对虾生长发育密切相关的生理生化因子 NAGase 的调控对疾病的防范, 树立科学用药的观念, 对对虾养殖业的可持续发展具有重要的意义[5]. 本文分析了几种养殖常用抗菌药物对凡纳滨对虾 NAGase 活力的影响, 有利于了解药物对 NAGase 的调控作用, 这为我国水产药物的监管提供一定的科学依据并对对虾养殖过程中的疾病防患及 NAGase 的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

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶从凡纳滨对虾壳膜参考文献[6]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)购于上海医药工业研究院生化室, 庆大霉素为天津药业集团产品, 青霉素钾、链霉素、卡那霉素、磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑为河北远征药业有限公司产品, 氟哌酸(诺氟沙星)、盐酸环丙沙星为抗生素片剂, 实验前去除片剂的外膜取内部成分进行试验, 其他生化试剂均为国药集团化学试剂有限公司生产, 使用的蒸馏水均为玻璃重蒸水.

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.

1.2.2 酶活力的测定

酶活力的测定参考文献[6]: 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℃ 恒温水浴, 加入 10 μL 酶液, 准确反应 10 min, 加入 2

收稿日期: 2008-01-10
基金项目: 福建省科技重点项目(2006N0067), 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放课题(2007108)资助
* 通讯作者: chencx@xmu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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($OD_{405\,nm}$), 光径为 1 cm, 以 pNP 为产物对照, 测得该条件下产物的消光系数为 8.8×10^3 L/(mol·cm). 酶活力单位定义为在上述条件下, 每分钟水解底物产生 1 μmol/L 产物的酶量.

1.2.3 抗菌药物对酶活力作用的测定

采用 1.2.2 酶活力测定方法, 在测活体系中, 加入不同浓度的药物溶液, 测定出酶的相对活力, 分析它们对酶活力的影响. 以不加效应物在相同测活体系测定活力为对照. 一种药物均设计 3 组平行实验.

1.2.4 抗菌药物对酶活力的抑制动力学测定

采用 1.2.2 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, 分析它们对酶的抑制机理. 抑制类型的判断是根据改变底物浓度 c_S, 在含不同浓度药物的测活体系中, 测定酶活力 v_0, 通过 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 以 $1/v_0$ 对 $1/c_S$ 作图, 比较酶催化反应的动力学参数, 包括表观米氏常数(K_m)和最大反应速度(v_m)的变化.

2 结 果

2.1 抗菌药物对酶活力的影响

表 1 几种抗菌药物对凡纳滨对虾 NAGase 活力的影响

Tab. 1 Antibacterial medicines on the activity of NAGase from prawn

名称	浓度/(mg·mL^{-1})	相对酶活力/%
对照		100.0
青霉素钾	0.005	100.05±1.50
	0.01	101.36±1.55
卡那霉素	0.005	99.24±1.80
	0.01	101.66±1.50
庆大霉素	0.005	102.02±2.50
	0.025	107.27±1.60
链霉素	0.2	100.75±2.30
	1.0	96.06±1.80
磺胺嘧啶	0.1	109.82±1.80
	0.4	105.80±1.50
盐酸环丙沙星	0.1	123.16±1.60
	1.0	172.32±1.65
诺氟沙星	0.1	79.67±2.00
	1.0	56.55±1.80
磺胺甲噁唑	0.1	44.74±2.30
	1.0	13.37±1.55

参照水产药物的用法用量[7], 在离体条件下, 以抗生素类药物: 青霉素钾、链霉素、庆大霉素、卡那霉素, 磺胺类药物磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑和喹诺酮类药物氟哌酸、盐酸环丙沙星为效应物, 研究它们对凡纳滨对虾 NAGase 活力的影响. 结果(表 1)表明, 各药物对 NAGase 活力存在不同的影响结果. 青霉素钾、卡那霉素对酶活力几乎无影响, 庆大霉素和磺胺嘧啶对酶有轻微激活作用, 链霉素有轻微抑制作用; 而盐酸环丙沙星、诺氟沙星和磺胺甲噁唑则对酶活影响较大. 针对表 1 的结果, 我们继续对盐酸环丙沙星、诺氟沙星和磺胺甲噁唑等 3 种药物进行具体的酶活效应研究.

2.2 抗菌药物对酶活力影响的浓度效应

以盐酸环丙沙星、诺氟沙星和磺胺甲噁唑为效应物, 在 0.0~1.0 mg/mL 浓度范围内研究它们对酶活力的影响. 结果(图 1)表明盐酸环丙沙星有激活作用, 随着效应物浓度的增大, 酶活力逐渐提高, 当浓度达 1.0 mg/mL 时, 酶的相对活力提高了 72%. 诺氟沙星和磺胺甲噁唑对酶活力均有不同程度的抑制作用(图 1), 随着效应物浓度的增大, 酶活力逐渐下降, 呈现浓度效应. 磺胺甲噁唑对该酶的抑制能力明显比诺氟沙星的抑制能力强. 1.0 mg/mL 的磺胺甲噁唑可使酶活力下降 86.6%, 导致酶活力下降 50% 的抑制剂浓度(IC_{50})为 0.094 mg/mL. 而诺氟沙星对该酶抑制作用较低, 当浓度达 1.0 mg/mL 时, 酶的剩余活力为 56.5%, 在此条件下, 尚不能测定出其 IC_{50} 值.

2.3 磺胺甲噁唑对酶抑制作用机理的判断

分别在含不同浓度磺胺甲恶唑的测活体系中, 固定底物浓度为 0.25 mmol/L, 改变酶的加入量, 测定不同浓度磺胺甲噁唑对对虾壳膜 NAGase 催化 pNP-NAG 的水解活力影响. 以效应物作用后的剩余酶活力

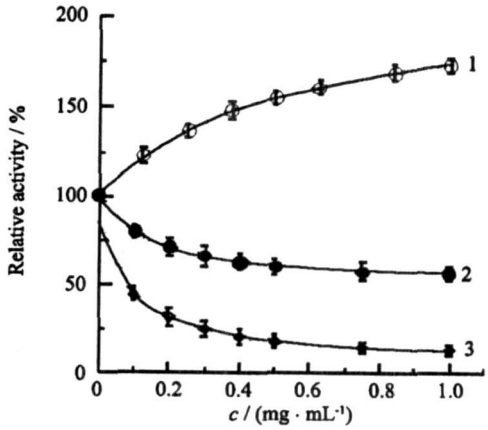

图 1 抗菌药物对凡纳滨对虾壳膜 NAGase 活力的影响

1. 盐酸环丙沙星; 2. 诺氟沙星; 3. 磺胺甲噁唑

Fig. 1 Effect of antibacterial medicines on the activity of NAGase

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

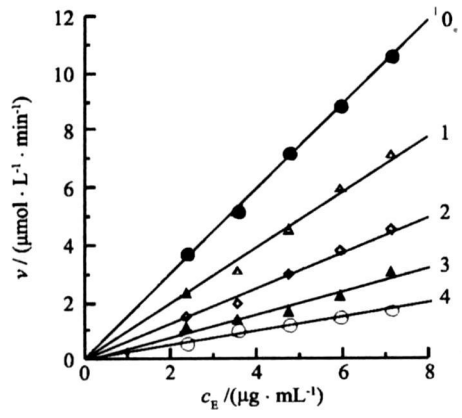

图 2　磺胺甲噁唑对凡纳滨对虾壳膜 NAGase 抑制作用直线 0~ 4 抑制剂浓度分别为 0、0. 05、0. 1、0. 2、0. 4 mg/ mL

Fig. 2　Inhibitory mechanism of Acetylsulfamethoxazole on the NAGase of prawn (*Litopenaeus vannamei*)

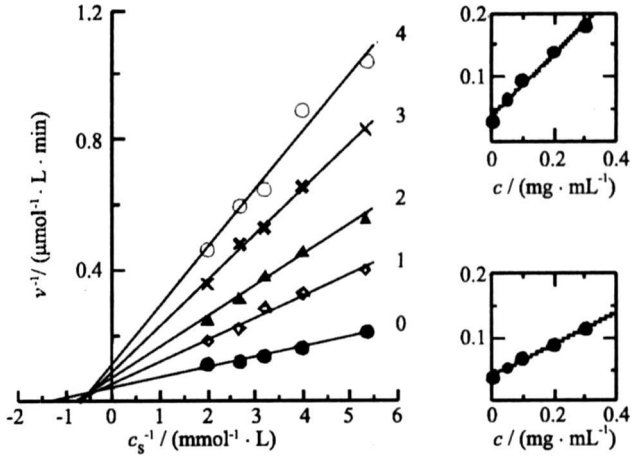

图 3　磺胺甲噁唑对凡纳滨对虾壳膜 NAGase 抑制类型直线 0~ 4 抑制剂浓度分别为 0、0. 05、0. 1、0. 2、0. 4 mg/ mL

Fig. 3　Inhibitory types of Acetylsulfamethoxazole on the NAGase of prawn (*Litopenaeus vannamei*)

对加入酶量作图, 得到一组通过原点的直线(图 2) , 随着效应物浓度的增大, 直线的斜率降低. 此结果说明磺胺甲噁唑对酶的抑制作用属于可逆过程, 增加药物浓度导致酶活力的下降是由于酶活力受到抑制, 催化效率降低, 而不是通过减少有效的酶量引起酶活力的下降.

2. 4　磺胺甲噁唑对酶的抑制作用类型及抑制常数的测定

在测活体系中, 固定加入的酶量, 改变底物浓度, 测定不同浓度磺胺甲噁唑对酶活力的影响, 以 Lineweaver- Burk 双倒数作图, 判断磺胺甲噁唑的抑制类型, 实验结果见图 3. 由图可见, Lineweaver- Burk 双倒数作图得到一组相交于第二象限的直线, 说明磺胺甲噁唑对酶的抑制作用属混合型. 磺胺甲噁唑不仅影响酶的米氏常数(K_m 值) , 同时也改变最大反应速度 V_m 值. 也就是它既影响酶的催化反应又影响酶与底物的亲和力. 以双倒数图的各直线斜率及纵轴截距分别对磺胺甲噁唑浓度作图, 均为一直线, 测定其对游离酶的抑制常数 K_I 与对酶- 底物络合物的抑制常数 K_{IS} 分别为 5. 98、13. 08 mg/ mL.

3　讨　论

NAGase 主要分布在凡纳滨对虾的内脏及虾壳下的表皮, 能催化几丁质的降解和合成, 在对虾生长发育过程中对旧壳的蜕换及新壳的形成起着重要作用[8]. 我们在已报道过的金属离子、有机溶剂、产物及产物类似物对凡纳滨对虾 NAGase 活力影响[9- 12] 的基础上, 进一步研究了抗生素类、喹诺酮类和磺胺类等养殖常用药物对 NAGase 催化水解动力学的影响, 对 NAGase 在对虾壳膜的催化机理及功能研究、对虾生长过程的疾病诊控和药物筛选具有重要意义.

实验结果显示, 抗生素类药物青霉素钾、卡那霉素对酶活力几乎无影响, 链霉素对酶有轻微的抑制作用, 浓度为 1 mg/ mL 时, 酶相对活力为 96. 06%; 庆大霉素对 NAGase 表现为轻微激活, 浓度为 0. 025 mg/ mL 时, 酶相对活力为 107. 27%. 凡纳滨对虾 NAGase 的底物 pNP- NAG 属于一类糖类化合物, 卡那霉素、庆大霉素也都属于一类糖甙类化合物, 但这类抗生素对该酶都不产生抑制作用, 说明凡纳滨对虾壳膜 NAGase 对该类化合物不具有分解作用.

磺胺类药物中, 磺胺嘧啶与磺胺甲噁唑对酶具有不同的效果, 前者对酶没有影响, 而后者产生较强的抑制, 这可能是因为后者的结构中引入了极性很强的甲氧基, 破坏了酶分子中维系构象的次级键, 从而导致了酶活力的下降. 其中, 磺胺甲噁唑对酶呈现可逆的混合型抑制, 说明其与游离酶、酶- 底物络合物均能结合产生抑制酶活作用, 这种结合不仅影响酶的催化反应还影响酶与底物的亲和力, 测得其对游离酶的抑制常数 K_I 与对酶- 底物络合物的抑制常数 K_{IS} 分别为 5. 98、13. 08 mg/ mL, 说明底物的存在对酶活有保护作用. 由于 NAGase 与凡纳滨对虾的周期性蜕皮有密切的关系[13] , 因此, 这类药物在生产中使用, 会导致 NAGase 的活力受到抑制, 凡纳滨对虾蜕皮受阻.

经过实验研究得出各类药物的使用要根据对虾的生长状况, 尽量避免不合适的用药. 对于抗生素类药物的使用, 可选择对虾壳膜 NAGase 影响不明显的药物

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

投放,以达到保护和治理的目的.该研究有利于指导对虾的大面积养殖和治理,防止滥用药物造成的经济损失.

参考文献:

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

[2] 李光友.中国对虾疾病与免疫机制[J].海洋科学,1995,4:1.

[3] 徐琴英,钱勇,朱选才.如何正确选择和使用水产药物[J].水产科技情报,2007,34(1):38.

[4] 杨雨辉,佟恒敏,卢彤岩.几种氟喹诺酮类药物对嗜水气单胞菌体外药效学研究[J].东北农业大学学报,2003,34(4):368-371.

[5] 王瑞旋,陈毕生.喹诺酮类药物在水产养殖中的应用研究概况[J].南方水产,2007,3(3):73-78.

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

[7] 黄志斌,胡红.水产药物应用表解[M].南京:江苏科学技术出版社,2004:7.

[8] 韩宝芹,余长缨,刘万顺,等.几丁质酶研究现状及展望[J].中国海洋药物,2001(5):41-43.

[9] Xie X L, Chen Q X. Inactivation kinetics of β-N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn(*Penaeus vannamei*) in the Dioxane Solution [J]. Biochemistry(Moscow), 2004, 69(12):1365-1371.

[10] 谢晓兰,王勤,陈清西.产物类似物对南美白对虾 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,2004,43(Sup.):24-27.

[11] 王悦,谢晓兰,王勤,等.乙醇对南美白对虾 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力与构象的影响[J].厦门大学学报:自然科学版,2004,43(Sup.):28-31.

[12] 林建城,王悦,谢晓兰.金属离子对南美白对虾 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.

[13] 颜雅雯,张继平,王勤,等.抗菌类药物对锯缘青蟹 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响[J].台湾海峡,2007,26(2):231-235.

Antibacterial Medicines on the Activity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase from Prawn (*Litopenaeus vannamei*)

DU Juan[1], AN Gang[1], XIE Xiao-lan[2], HUANG Qian-sheng[1]
WANG Ye[1], CHEN Qing-xi[1*]

(1. Key Lab. of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. School of Chemistry and Life Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362011, China)

Abstract: The effects of some antibacterial medicines on the hydrolysis of pNP-NAG catalyzed by N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase, EC 3.2.1.52) from prawn (*Litopenaeus vannamei*) were studied. The results indicated that norfloxacin and acetylsulfamethoxazole could inhibit the enzyme activity in different extent, while penicilin, streptomycin, gentamicin, kanamycin and sulfadiazine had hardly any effects on the enzyme activity. The inhibitory effect of acetylsulfamethoxazole was the most potent. The value of IC_{50}, the inhibitor concentrations leading to 50% enzyme activity lost, was estimated to be 0.094 mg/mL. The inhibitory kinetics of acetylsulfamethoxazole on the enzyme was further studied. The results showed that acetylsulfamethoxazole was reversible inhibitor of mixed-type, and the inhibition constants K_I and K_{IS} were determined to be 5.98 mg/mL and 13.08 mg/mL, respectively.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; N-acetyl-β-D-glucosaminidase; antibacterial medicines; enzyme activity effects; inhibitory mechanism

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net