

文章编号: 1004-7271(2001)02-0140-05

斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 的活性

房文红, 王 慧, 来琦芳, 李国保

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘 要:研究了培养介质的 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 浓度、 $\text{Na}^+:\text{K}^+$ 比、pH 值、培养温度以及培养时间和底物 $\text{ATP}-\text{Na}_2$ 量对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响。培养介质中 Na^+ 浓度为 50~100mM、 K^+ 浓度为 25~30mM、 Mg^{2+} 浓度为 8~20mM、 $\text{Na}^+:\text{K}^+$ 比在 10:1~2:1、pH 7.0~7.5 时, Na^+/K^+ -ATPase 活性较高, Na^+/K^+ -ATPase 活性随着培养温度升高而增大。 Na^+/K^+ -ATPase 反应时释放出的无机磷(P_i)累积量与培养时间呈直线性增加。底物 $\text{ATP}-\text{Na}_2$ 浓度达到 1.04mM 时, Na^+/K^+ -ATPase 活性达到最高, 随着 $\text{ATP}-\text{Na}_2$ 量的增多, Na^+/K^+ -ATPase 活性并未增大。

关键词:斑节对虾; 鳃 Na^+/K^+ -ATPase; 活性

中图分类号: S912 文献标识码: A

Activity of Na^+/K^+ -ATPase from the gill of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

FANG Wen-hong, WANG Hui, LAI Qi-fang, LI Guo-bao

(East China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Shanghai 200090, China)

Abstract: The sodium-potassium dependent adenosine triphosphatase (Na^+/K^+ -ATPase) is assumed to be a key enzyme in adaptive process in euryhaline aquatic organisms. This paper demonstrated activity of Na^+/K^+ -ATPase in branchial preparations from the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*), examined the ion and substrate requirements and effects of incubation temperature, pH and incubation time. Maximal enzyme activity was obtained at 50 to 100 mM Na^+ , 25 to 30mM K^+ , 8 to 20mM Mg^{2+} , $\text{Na}:\text{K}$ ratio of 2:1, and pH at 7.0 to 7.5. The activity of Na^+/K^+ -ATPase increased with the increasing of incubation temperature. The increasing of incubation time resulted in a close to linear release of phosphate from the substrates catalysed by Na^+/K^+ -ATPase. Maximal activity of Na^+/K^+ -ATPase was gained at 1.0mM $\text{ATP}-\text{Na}_2$, while activity of Na^+/K^+ -ATPase was not promoted with higher concentration of $\text{ATP}-\text{Na}_2$.

Key words: *Penaeus monodon*; gill Na^+/K^+ -ATPase; activity

Na^+/K^+ -ATPase 存在于一切动物细胞的细胞质膜上, 参与细胞膜两侧的 Na^+ 、 K^+ 离子的跨膜主动运输。ATPase 能被 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 所激活, 受乌本苷抑制。水生动物的鳃上皮细胞是离子调节的主要场所。Quimm 和 Lane^[1] 首次报道了甲壳动物鳃上皮细胞存在 Na^+/K^+ -ATPase, 从此开始了对甲壳动物 Na^+/K^+ -ATPase 活性的研究^[2-5]。一些渗透调变类蟹的后鳃表现出较高水平的 Na^+/K^+ -ATPase 活

收稿日期: 2000-09-12

第一作者: 房文红 (1968-), 男, 江苏兴化人, 助理研究员, 从事水产养殖与病害研究。上海水产大学 1991 届校友。E-mail: wenhongfang@sina.com

性^[6]。在蓝蟹(*Callinectes sapidus*)中,鳃上某些区域的 Na^+/K^+ -ATPase 较高,这些区域指定为离子运输^[4],并且广盐性甲壳动物适应于低盐度海水,其鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性高于高盐度中的 Na^+/K^+ -ATPase 活性^[4,7]。甲壳动物中有关 Na^+/K^+ -ATPase 活性的研究在虾蟹类中报道很多^[1,2,7-10],但对有关虾的 Na^+/K^+ -ATPase 活性报道较少。斑节对虾为广盐性海水动物,经淡化可在淡水中生存和生长。了解斑节对虾在淡化过程中 Na^+/K^+ -ATPase 活性变化,建立盐度驯化与 Na^+/K^+ -ATPase 活性变化关系模型,有助于探索水生动物的盐度驯化机制,对今后苗种培育中盐度驯化和在内陆盐碱地进行虾类移植具有指导意义。本试验旨在探讨不同培养条件如培养介质的离子组成、底物、培养时间和温度等对 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响,为今后进一步开展 Na^+/K^+ -ATPase 活性研究提供前期基础工作。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用斑节对虾购自上海市闵行区路农贸市场。对虾在实验室经 7~10d 暂养,盐度约为 10,海水采用自来水加海水盐,经 24h 以上充气处理,水温控制在 23~25℃。暂养期间每天投喂适量螺蛳肉,及时排污,每天换水 1/2。试验用斑节对虾体重 13~19g。

1.2 样品处理

用纱布擦干对虾体表,剪去鳃部头胸甲,用镊子取出头胸甲两侧的鳃片。样品取出后,置于 9 倍体积的冰冷匀浆液(匀浆液:0.25mol/L 蔗糖,6mmol/L EDTA- Na_2 , 咪唑 20mmol/L, 0.1% 脱氧胆酸钠, pH 6.8)。该组织在冰冷的毛玻璃组织匀浆器中匀浆,最大转速 2000r/min,匀浆 15min 左右。整个匀浆过程中,匀浆器置于冰水浴中。匀浆液在冷冻离心机中以 8000r/min 离心 20min,上层液保存于冰水浴中, Na^+/K^+ -ATPase 活性测试在样品处理后 8h 内进行。

1.3 Na^+/K^+ -ATPase 活性测定

Na^+/K^+ -ATPase 活性测定是通过测定反应底物 ATP- Na_2 水解后释放出来的无机磷 P_i 量的多少。该方法主要参考 Whealy 和 Henry^[8]的研究方法。简言之, Na^+/K^+ -ATPase 活性是通过测定 K^+ 存在时与 K^+ 不存在时(用乌本苷代替)ATP 释放出无机磷 P_i 量的差值来计算。

取 0.1mL 粗提取液样品在 2mL 培养介质中进行培养。实验组培养介质含有 100mM NaCl, 20mM KCl, 5mM MgCl_2 , 20mM 咪唑(pH 7.8); 对照组培养介质含有 130mM NaCl, 5mM MgCl_2 , 20mM 咪唑, 1mM 乌本苷(pH 7.8)。所有试管中加入 0.2mL 50mM ATP- Na_2 (用咪唑中和),反应即开始。在 25℃ 下培养 45min,加入 0.1mL 50% 三氯乙酸中止反应,在 5000r/min 下离心 10min,取 1mL 上清液测定 P_i 浓度。 P_i 浓度测定采用钼酸铵法^[11],显色温度为 25℃。 Na^+/K^+ -ATPase 粗匀浆液的蛋白质浓度采用 Folin-酚试剂法^[12]。 Na^+/K^+ -ATPase 活性单位为 nmol P_i /(mg Protein·min)。

1.4 数据处理

所有试验设置 3 个平行组,数据为 3 个数据的平均值 ± 标准差 (Means ± SE)。

2 结果

2.1 培养介质中 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 浓度对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

单独调整培养介质中 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 浓度,分别测定培养介质中 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 浓度对 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响(图 1、2 和 3)。 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 对鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响基本相似,低浓度时随离子浓度升高, Na^+/K^+ -ATPase 活性呈对数上升,当培养介质中 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 升高到一定浓度时,酶活性达到最高值,随着离子浓度的继续升高,酶的活性在较高值维持一段后略下降。 Na^+ 浓度为 50~100mM、 K^+ 浓度为 25~30mM、 Mg^{2+} 浓度为 8~20mM 时,斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性较高。

2.2 Na^+/K^+ 比对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Na^+/K^+ -ATPase 培养介质 Na^+ 、 K^+ 总离子强度不变, 恒定为 130mM , 调整 Na^+/K^+ 比例, 测定不同 Na^+ 、 K^+ 比例下鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性(图 4)。当 Na^+/K^+ 比例在 $10:1 \sim 1:2$ 之间, Na^+/K^+ -ATPase 活性均在 $30\text{nmol Pi}/(\text{mg protein}\cdot\text{min})$ 以上; Na^+/K^+ 比例在 $10:1 \sim 2:1$ 之间, Na^+/K^+ -ATPase 活性最高。

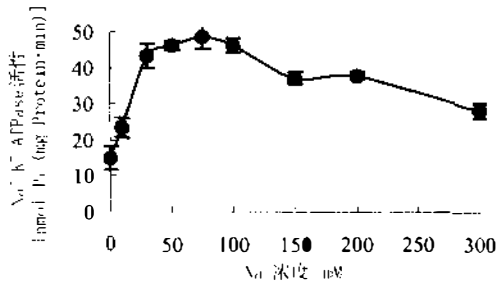


图 1 反应介质中 Na^+ 浓度对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Fig.1 Effect of Na^+ concentration on giant tiger shrimp gill Na^+/K^+ -ATPase activity

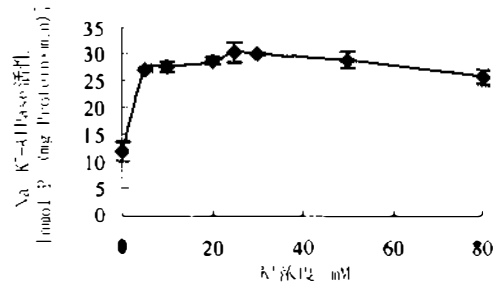


图 2 反应介质中 K^+ 浓度对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Fig.2 Effect of K^+ concentration on giant tiger shrimp gill Na^+/K^+ -ATPase activity

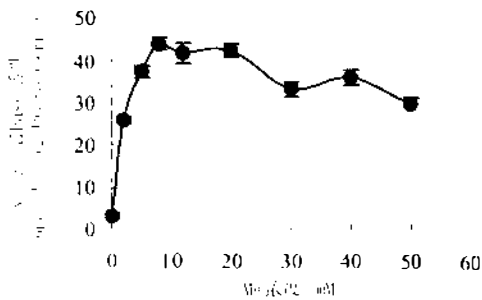


图 3 反应介质中 Mg^{2+} 浓度对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Fig.3 Effect of Mg^{2+} concentration on giant tiger shrimp gill Na^+/K^+ -ATPase activity

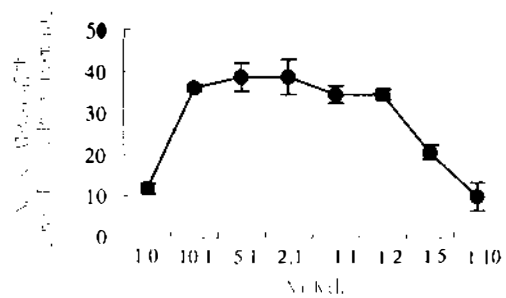


图 4 反应介质中 $\text{Na}:\text{K}$ 比对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Fig.4 Effect of $\text{Na}:\text{K}$ ratio on shrimp gill Na^+/K^+ -ATPase activity

2.3 培养介质的 pH 值对 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

培养介质的 pH 值对 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响见图 5。 Na^+/K^+ -ATPase 反应时最适 pH 值在 $7.0 \sim 7.5$ 之间, 低于或高于此 pH 值范围, Na^+/K^+ -ATPase 活性均有所下降。

2.4 底物 $\text{ATP}-\text{Na}_2$ 量对 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Na^+/K^+ -ATPase 反应底物 $\text{ATP}-\text{Na}_2$ 量的多少对 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响符合米氏方程(图 6)。当 $\text{ATP}-\text{Na}_2$ 低于 1.0mM 时, Na^+/K^+ -ATPase 活性随着 $\text{ATP}-\text{Na}_2$ 量增多呈指数增大; $\text{ATP}-\text{Na}_2$ 大于 1.0mM 时, Na^+/K^+ -ATPase 活性基本上稳定在同一水平。

2.5 温度对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

将斑节对虾 Na^+/K^+ -ATPase 粗提液分别在 5°C 、 15°C 、 25°C 和 35°C 条件下培养 45min , 其他条件相同, 测定四个温度下 Na^+/K^+ -ATPase 活性(图 6)。 Na^+/K^+ -ATPase 活性随着温度升高而增大, 15°C 和 35°C 时 Na^+/K^+ -ATPase 活性分别为 5°C 和 25°C 时酶活性的 2 倍左右; 25°C 时酶活性约为 15°C 时的 4 倍。

2.6 斑节对虾 Na^+/K^+ -ATPase 在不同反应时间下释放出的 P_i 累积量

在 Na^+/K^+ -ATPase 反应中加入底物 ATP- Na_2 后 5、10、20、30、40、50 和 60min, 测定 Na^+/K^+ -ATPase 反应释放出的 P_i 量。释放出的 P_i 累积量随时间的延续呈直线增加, 将时间(x)与各时间采样点的 P_i 累积量(y)进行线性回归, 回归方程为 $y = 0.0414x + 0.2996$, 相关系数 $R^2 = 0.9864$, 参见图 8。

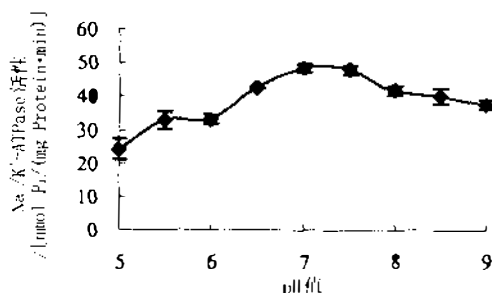


图 5 反应介质的 pH 值对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Fig.5 Effect of pH on shrimp gill Na^+/K^+ -ATPase activity

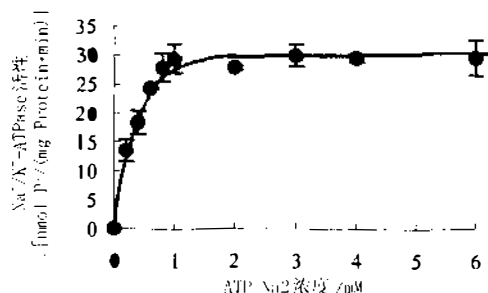


图 6 反应介质中 ATP- Na_2 浓度对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Fig.6 Effect of ATP- Na_2 concentration on giant tiger shrimp gill Na^+/K^+ -ATPase activity

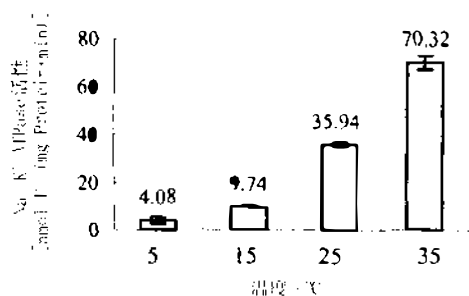


图 7 反应温度对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Fig.7 Effect of temperature on giant tiger shrimp gill Na^+/K^+ -ATPase activity

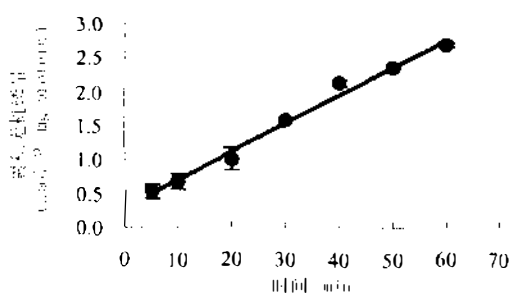


图 8 斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 释放出 P_i 累积量与培养时间的关系

Fig.8 Accumulation of inorganic phosphate from giant tiger shrimp gill Na^+/K^+ -ATPase at increasing incubation times

3 讨论

研究 Na^+/K^+ -ATPase 活性时, 在不同的研究中, 酶的活性是在不同提取成分和不同测定条件下进行测定, 因此很难将斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性和其他甲壳动物进行比较, 但可以比较它们的 Na^+/K^+ -ATPase 特性。斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 特性与其他甲壳动物基本相似, 然而也有不同之处。

本试验中底物 ATP 浓度达到 1.0mM, Na^+/K^+ -ATPase 活性即达到最高, 与其他作者的研究结果有所不同。美洲真蟹 (*Callinectes sapidus*)^[7]、淡水螯虾 (*Orconectes limosus*)^[9] 和海滨紫蟹 (*Hemigrapsus mudus*)^[10] 鳃 Na^+/K^+ -ATPase 在底物浓度大于 5mM 时, 其酶的活性达到最高; 而 Stern 等^[13] 在研究罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性, ATP 0.5mM 时即可得到最大酶活性。

Busacker 和 Chavin^[14] 报道 pH 值过高或过低均会抑制 ATPase 活性, 硬骨鱼类的最适 pH 值在 7.0-7.5 之间。Corotto 和 Holliday^[10] 研究海滨紫蟹鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性时 pH 值为 7.2, Kosiul 等^[9] 研究淡水螯虾鳃时 pH 值为 7.25, Stern 等^[13] 研究罗氏沼虾鳃时最佳 pH 值为 7.5; 而 Wheatly 和 Henry^[8] 研究广

盐性螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)时 pH 值设为 7.8,但未进行最适 pH 值筛选,尽管本试验在起初设定试验方案时参考 Wheatly 和 Henry^[8]的方法,将 pH 值初定为 7.8,而本试验得出,斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase pH 值最适范围为 7.0~7.5。

本试验中培养介质 Mg^{2+} 最适浓度为 8~20mM,高于本试验所设定的浓度(5mM),与 Corotto 和 Holliday^[10]研究海滨紫蟹(*Hemigrapsus nudus*)鳃时的 Mg^{2+} 浓度(10mM)相接近。而淡水螯虾^[9]和罗氏沼虾^[13]鳃 Na^+/K^+ -ATPase 的最适 Mg^{2+} 浓度分别为 2.3 和 2.5mM。

斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 对 Na^+ 、 K^+ 依赖性(Na^+ 浓度为 100~200mM、 K^+ 浓度为 20~30mM 时酶活性最高)与其他甲壳动物基本一致。然而,当每一离子浓度高于最大活性浓度时,或多或少见有抑制作用,这可能是与其它离子竞争激活位点^[15]。

在 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 浓度对斑节对虾鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性影响三组试验中,当 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 浓度为 0 时, Na^+/K^+ -ATPase 均表现出一定的活性(图 1、2、3 和 4),与 Corotto and Holliday^[10]在 K^+ 浓度时海滨紫蟹鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性时结果相似,而其他作者^[9,16]在相同的试验中其酶的活性很低。这是因种间差异所致,有待于进一步探讨。

本试验得到上海水产大学何培民博士的热情帮助,特此致谢。

参考文献:

- [1] Quinn D J, Lane C E. Ionic regulation and Na^+ , K^+ -stimulated ATPase activity in the land crab *Cardisoma guanhumi*[J]. Comp Biochem Physiol, 1966, 19:533-543.
- [2] Towle D W. Equivalence of gill Na^+/K^+ -ATPase from blue crab acclimated to high and low salin[J]. Am Zool, 1974, 14:1259.
- [3] Mantel L H, Olsen J. Studies on the $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -activated ATPase of crab gills[J]. Am Zool, 1976, 16:223.
- [4] Neufeld G J, Holliday C W, Pritchard J B. Salinity adaptation of gill Na^+ , K^+ -ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. J Exp Zool, 1980, 211:215-224.
- [5] Holliday C W. Salinity-induced changes in gill Na^+ , K^+ -ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*[J]. J Exp Zool, 1985, 233:199-208.
- [6] Towle D W. Membrane-bound ATPase in arthropod ion-transporting tissues[J]. Am Zool, 1984, 24:177-185.
- [7] Towle D W, Palmer G E, Harris J L. Role of gill $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -dependent ATPase in acclimation of blue crabs *Callinectes sapidus* to low salinity[J]. J Exp Zool, 1976, 196:315-321.
- [8] Wheatly M C, Henry R P. Branchial and antennal gland Na^+/K^+ -dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the curlyfin crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. J Exp Biol, 1987, 133:73-86.
- [9] Kosiol B, Biżulko T, Graszyski K. Purification and characterization of gill (Na^+ , K^+)-ATPase in the freshwater crayfish *Oreorecta limosus* Rafinesque[J]. Comp Biochem Physiol, 1988, 89B:171-177.
- [10] Corotto F S, Holliday C W. Branchial Na^+ , K^+ -ATPase and Osmoregulation in the Purple Shore Crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana)[J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 113A:361-368.
- [11] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论[M]. 北京:人民教育出版社, 1979. 18-19.
- [12] 张龙翔. 生化实验技术方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1984. 165-166.
- [13] Stern S, Bourd A, Cohen D. Characterization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase from the gills of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man)[J]. Comp Biochem Physiol, 1984, 79B:47-50.
- [14] Busacker G P, Charvin W. Characterization of $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase from the gill and the kidney of the goldfish (*Carassius auratus* L.)[J]. Comp Biochem Physiol, 1981, 69B:249-256.
- [15] Skou J C. Effects of ATP on the intermediary steps of the reaction of the ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-dependent enzyme system. II. Effect of a variation in the $\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}$ ratio [J]. Biochim Biophys Acta, 1974, 339:246-257.
- [16] Holliday C W. Branchial Na^+/K^+ -ATPase and osmoregulation in the isopod, *Idotea uenenski*[J]. J Exp Biol, 1988, 136:259-272.