

文章编号: 1004-7271(2006)01-0047-05

盐度突变对凡纳滨对虾组织 碳酸酐酶活性的影响

潘爱军^{1,2}, 来琦芳², 王慧², 周凯², 么宗利², 庄平²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090)

摘要 采用改进的 Δ pH法检测凡纳滨对虾组织碳酸酐酶活性, 监测了环境盐度从 5 突变到 25 后对虾鳃和触角腺组织碳酸酐酶活性及其血淋巴渗透浓度的动态变化。结果表明 (1) 鳃组织碳酸酐酶活性在盐度突变后 4 d 内没有显著变化, 活性水平在 $(21.68 \pm 1.25) \mu\text{mol CO}_2/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 第 5~11 天有显著性的增高现象, 在第 10 天活性最高, 为 $(43.03 \pm 2.82) \mu\text{mol CO}_2/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 第 12 天回落至起始水平 (2) 触角腺碳酸酐酶活性动态变化的模式与鳃相似, 起始增高时间比鳃晚 6 d (3) 触角腺碳酸酐酶活性显著增高起始的时间与鳃组织碳酸酐酶活性开始显著下降的时间有关联性 (4) 在低盐度时, 凡纳滨对虾属于强高渗调变生物。

关键词 对虾, 碳酸酐酶, 酶活性, 盐度变化, 鳃, 触角腺, 渗透调节

中图分类号 S 912 文献标识码: A

Effects of abrupt salinity changes on the carbonic anhydrase activity in the tissues of *Litopenaeus vannamei*

PAN Ai-jun^{1,2}, LAI Qi-fang², WANG Hui², ZHOU Kai², YAO Zong-li², ZHUANG Ping²

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Key and Open Laboratory of Marine and Estuary Fisheries, Ministry of Agriculture of China, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract The effects of abrupt salinity changes (salinity of 5–25) on the carbonic anhydrase (CA) activity in the pooled gills and antennal gland and hemolymph osmotic concentration of *Litopenaeus vannamei* were investigated in this paper, and the carbonic anhydrase activity was measured by the means of improved delta pH method. The results showed that (1) the CA activity of the pooled gills didn't change significantly in 4 days after abrupt salinity changes, with the activity level of $(21.68 \pm 1.25) \mu\text{mol CO}_2/(\text{mg} \cdot \text{min})$. CA activity increased from days 5–11 after abrupt salinity changes, and the peak activity of $(43.03 \pm 2.82) \mu\text{mol CO}_2/(\text{mg} \cdot \text{min})$ appeared on day 10, and the activity reduced to the same level as the beginning of experiment on and after day 12. (2) the CA activity changes in antennal gland were similar to those in the pooled gills; however, the time that the CA activity of antennal gland began to increase was 6 days later than that of pooled gills. (3) the beginning time of CA activity increase of antennal gland was related to the time of CA activity decrease of pooled gills. (4) *Litopenaeus vannamei*

收稿日期 2005-04-19

基金项目 农业部农业科技跨越计划项目(2002 跨-17)

作者简介 潘爱军(1977-),男,安徽宿松人,硕士研究生,专业方向为鱼类生态学。E-mail: panaj@163.com

通讯作者 庄平(1960-),男,研究员,博士生导师,主要从事水生生物生理生态学方面的研究。E-mail: pzhuang@online.sh.cn

was a strong hyper-osmoregulator when salinity was low.

Key words :shrimp ; carbonic anhydrase enzyme activity ; salinity change ; gill ; antennal gland osmoregulation

碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)是生物体内参与渗透压调节、离子调节、酸碱平衡等生理生化过程的核心酶之一^[1,2]。国外有关水生甲壳动物碳酸酐酶的研究对象主要是美洲蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[3-5]、普通滨蟹(*Carcinus maenas*)^[1,6,7]和淡水螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)^[8],研究内容包括CA的组织分布、鳃亚细胞CA分布和部分特性^[4,5],以及盐度突变后第3、第7鳃丝及触角腺CA活性的动态变化^[9-12]。检测CA活性的方法有 Δ pH法^[10]、比色法^[6]以及通过测定CA酯酶活性间接测定法^[10]等。国内在水生甲壳动物上尚未见与CA相关的研究报道。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有适应性广、生长迅速、便于养殖的优点^[12],且为盐碱水域移植驯化的优良品种之一。本研究监测了环境盐度从5突变到25,凡纳滨对虾鳃和触角腺组织CA活性及血淋巴渗透浓度的动态变化,探讨在盐度突变情况下凡纳滨对虾组织CA参与的生理调节,旨在为盐碱水域渔业开发、移植驯化的品种选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用凡纳滨对虾于2004年8月采集自东海水产研究所奉贤养殖虾池(盐度为5)。选择体格健壮的雄虾为试验用虾,试验虾的体长为(8.4±0.6)cm,体重为(7.0±0.8)g。

1.2 方法

1.2.1 暂养及管理

经挑选出来的试验用虾置于1 m³的养殖池中暂养,暂养水是由波美度为10的浓缩海水,用自来水稀释至盐度5,暂养3 d后,移入到用同样方法配置、盐度为25的海水中。日投喂颗粒饲料2次,分别于早晚6时各一次,日换水量为1/2。

1.2.2 样品制备

在采样前,对虾停喂48 h,每天定时取8~10 ind,并采集养殖池中水样。用纱布吸干对虾体表水分,测体长、体重,先使用1 mL注射器从对虾围心腔中抽取血淋巴液,用于渗透浓度测定,随后分别取鳃、触角腺组织装入离心管,液氮速冻,-80℃超低温冰箱中存放待测。

1.2.3 碳酸酐酶活性测定及蛋白质含量的测定

CA活性测定方法参考Henry的 Δ pH法^[10]并加以改进。将单尾虾的鳃和触角腺组织置于预冷的Tris缓冲液(mmol/L 225 甘露醇,75 蔗糖,10 TRIS,用15%磷酸调到pH为7.4)中,冰浴条件下匀浆后,取适量组织匀浆液,用预冷的Tris缓冲液稀释至8 mL组成反应缓冲体系,充分振荡混匀,插入pH电极开始监测反应缓冲体系pH值,待起始pH值稳定,加入240 μ L 0℃饱和CO₂水溶液,即刻计时,记录下降0.15pH所用的时间(t_{enz})。

一个酶活力单位(U)定义:在反应体系4℃,起始pH值为7.4,添加240 μ L 0℃饱和CO₂水溶液,pH值下降0.15所用的时间(t_{enz})为空白对照反应时间(t_0)的一半时所需的酶量。酶活力单位计算公式^[3]: $U = t_0/t_{enz} - 1$ 。反应体系中所含酶量为一个酶活力单位附近时确定酶活性^[13]。pH测量用METTLER TOLEDO公司的Inlab 423复合电极和Delta 320 pH计。

蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝G-250法以计算比活力,标准蛋白质用牛血清白蛋白(BSA),酶活性的单位用 μ mol CO₂/(mg·min)表示,换算方法参见文献[8]。

1.2.4 渗透浓度测定

取对虾血淋巴样品10 μ L,用Wescor公司的5520 Vapor渗透压仪测定渗透浓度,同时测定水样渗透浓度。

1.2.5 数据分析

采用统计软件 SPSS 11.0 对实验数据进行分析, 利用方差分析(One-Way ANOVA)检验 CA 活性及血淋巴渗透浓度变化的显著性, 如果方差分析差异显著, 则用 Tukey 进行多重比较, 所有检验的显著水平为 0.05。

2 结果

2.1 鳃组织 CA 活性变化情况

在盐度 5 突变到盐度 25 的过程中, 鳃组织 CA 活性在突变后即有一个上升随即下降的波动, 但 CA 活性在突变后 4 d 内变化不显著 ($P < 0.05$), 活性水平在 $(21.68 \pm 1.25) \mu\text{mol CO}_2/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。在第 5 d, CA 活性显著上升 ($P < 0.05$), 到第 10 d 上升到最高值 $(43.03 \pm 2.82) \mu\text{mol CO}_2/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 大约是突变时 CA 起始活性的 2 倍, 在突变后第 12 d 回落至突变起始时的酶活性水平 ($P > 0.05$) (图 1)。

2.2 触角腺组织 CA 活性变化情况

对虾触角腺组织 CA 活性在突变后的第 2 d, 有一个下降的波动, 活性水平为 $(4.63 \pm 0.93) \mu\text{mol CO}_2/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 大约是起始 CA 活性的一半。在突变后的第 11 d, 活性显著上升 ($P < 0.05$), 到 16 d CA 活性达到最高值, 为 $(19.53 \pm 0.99) \mu\text{mol CO}_2/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 大约是起始 CA 活性的 2 倍, 随后活性降低, 在第 18 d 又回到起始活性水平上 ($P > 0.05$) (图 2)。

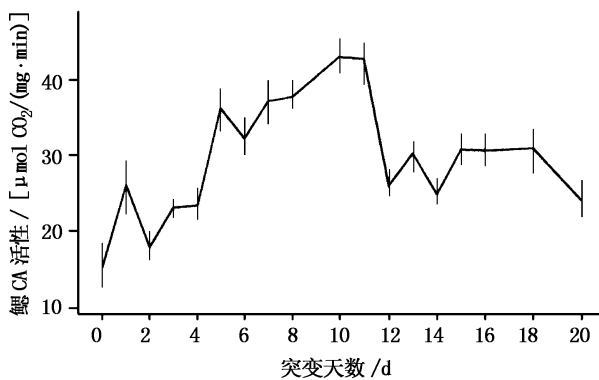


图 1 盐度 5 突变至盐度 25 时, 凡纳滨对虾鳃组织碳酸酐酶活性的动态变化

Fig.1 Time course of changes in carbonic anhydrase activity in the pooled gills of *Litopenaeus Vannamei* acclimated to salinity of 5 and transferred to 25. Mean \pm SEM (N = 6 - 9). T = $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$

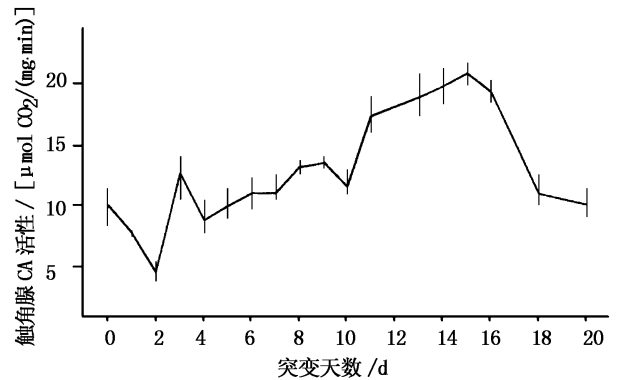


图 2 盐度 5 突变至盐度 25 时, 凡纳滨对虾触角腺碳酸酐酶活性的动态变化

Fig.2 Time course of changes in carbonic anhydrase activity in the antennal gland of *Litopenaeus Vannamei* acclimated to salinity of 5 and transferred to 25. Mean \pm SEM (N = 4 - 6). T = $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$

2.3 对虾血淋巴渗透浓度变化情况

在盐度 5 渗透浓度为 $(127.5 \pm 4.5) \text{mmol/kg}$ 的水环境中, 凡纳滨对虾血淋巴渗透浓度为 $(611.75 \pm 35.82) \text{mmol/kg}$ 。当盐度突变到 25 渗透浓度为 $(774.22 \pm 5.32) \text{mmol/kg}$ 的水环境中, 血淋巴渗透浓度呈现迅速上升趋势 ($P < 0.05$), 在盐度突变后 1 d 内, 对虾血淋巴的渗透浓度达到新的平衡 $(798.86 \pm 2.57) \text{mmol/kg}$ ($P > 0.05$) (图 3)。

3 讨论

3.1 鳃组织 CA 活性的动态变化

当水环境盐度突变后, CA 活性前 4 d 无显著变化, 从第 5 d 起 CA 有了显著的提高。依据 Henry 等

人的观点^[7],美洲蓝蟹、普通滨蟹鳃组织 CA 活性在环境盐度突变 4 d 后出现升高是合成了新酶。因此凡纳滨对虾鳃组织中 CA 活性增高亦可能是合成了新酶。在突变后 12 d 鳃 CA 活性降低且随后稳定,表明对虾可能适应突变后的水环境。

鳃组织 CA 活性在突变后的第 1 d 有一个上升波动,可能是盐度突变激活了鳃组织中的 CA,从而加强了鳃的 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 和 $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ 交换^[12],促进了鳃对 Na^+ 和 Cl^- 离子的吸收,由于 Na^+ 和 Cl^- 离子浓度占了渗透浓度的 90% 左右^[14],因此使血淋巴的渗透浓度迅速上升。

从图 1 可以看出,在盐度 5 时,凡纳滨对虾鳃组织 CA 活性为 $(15.30 \pm 3.42) \mu\text{mol CO}_2 / (\text{mg} \cdot \text{min})$,CA 活性水平不到美洲蓝蟹^[3]、普通滨蟹^[7]鳃的 15%,

凡纳滨对虾鳃组织 CA 活性偏低一方面与试验对象有关;另一方面可能与检测方法有关,通常 CA 活性的检测是采用 Henry 的 ΔpH ^[10]法,此法是采用磁力搅拌。贺华君等人发现磁场对 CA 活性大约有 17% 的增强作用^[15]。本试验采用微型振荡器机械搅拌取代磁力搅拌的方法,避免了磁场的增强作用。

3.2 触角腺组织 CA 活性的动态变化

对虾触角腺组织 CA 活性动态变化情况与鳃组织 CA 活性动态变化情况相比较,触角腺 CA 活性增高起始的时间比鳃晚 6 d,两组织 CA 活性起始增高的时间不一致性,表明在适应盐度突变过程中,两组织 CA 活性增高的起始信号不同。触角腺 CA 活性增高起始的时间与鳃组织 CA 活性开始下降的时间恰巧相同,可能触角腺 CA 活性增高的起始信号来源于鳃。在突变后的第 2 d,触角腺 CA 活性降低还可能与水生广盐性甲壳动物从低盐度突变到高盐度产生代谢性酸中毒^[16]有关。

3.3 凡纳滨对虾渗透浓度调节能力

虽然在盐度 5 和盐度 25 的水环境中凡纳滨对虾血淋巴渗透浓度不同,但与水环境的渗透浓度变化幅度相比,血淋巴渗透浓度的变化仅在一个小范围内,表明凡纳滨对虾属于渗透调变类(Osmoregulator)。在盐度 5 时,凡纳滨对虾血淋巴渗透浓度远高于环境渗透浓度,所以凡纳滨对虾在低盐度时属于高渗透调变生物。凡纳滨对虾在盐度 5 时血淋巴与环境渗透浓度差大约为 485 mmol/kg,远远大于小蓝蟹,与美洲蓝蟹^[2]、中国对虾^[17]相差不大(见表 1),根据 Mantel 和 Farmer^[18]提出的水生甲壳动物渗透浓度调节能力强弱可以依据其血淋巴渗透浓度与环境的渗透浓度差来确定,因此在盐度 5 的水环境中,凡纳滨对虾属于强高渗透调变生物,具有较强的渗透浓度调节能力,与美洲蓝蟹^[2]和中国对虾^[17]一样。

表 1 水生甲壳动物的血淋巴与其外环境渗透浓度的比较

Tab.1 The comparison of blood and medium osmotic concentration for the aquatic crustaceans

品种	环境盐度	血淋巴渗透浓度 (mmol/kg)	环境渗透浓度 (mmol/kg)	两渗透浓度差 (mmol/kg)	文献
美洲蓝蟹 <i>Callinectes sapidus</i>	5	624	165	459	[4]
中国对虾 <i>Penaeus chinensis</i>	4.5	587	114	473	[22]
淡水螯虾 <i>Pacifastacus leniusculus</i>	淡水	365	20	345	[10]
普通滨蟹 <i>Carcinus maenas</i>	8			350	[2]
小蓝蟹 <i>Callinectes similes</i>	5			250	[2]
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	5	612	127	485	本实验

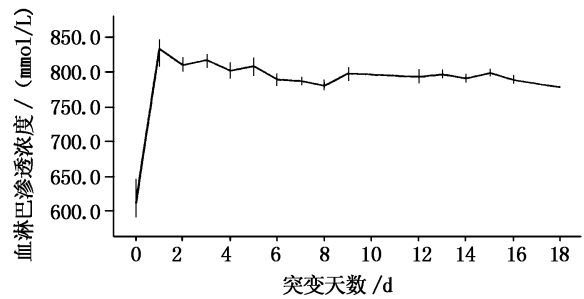


图 3 盐度 5 突变至盐度 25 时,凡纳滨对虾血淋巴渗透压的动态变化

Fig.3 Time course of changes in hemolymph osmotic concentration in *Litopenaeus Vannamei* acclimated to salinity of 5 and transferred to 25. Mean \pm SEM (N = 4 - 9). T = $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$

3.4 凡纳滨对虾体内碳酸酐酶对渗透调节的影响

凡纳滨对虾从盐度 5 突变到盐度 25 后的第 1 d 内,血淋巴渗透浓度迅速升高,随后稳定在一定的水平上,鳃 CA 活性仅有小幅度的变化。原因可能有:一、凡纳滨对虾在低盐度突变到高盐度的适应过程中, Na^+/K^+ -ATPase 起主导的作用,CA 起辅助作用^[1],因为鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性在低盐度中保持在较高水平^[19],在突变到等渗环境后,活性仍然较高;二、CA 是催化效率最高的酶之一^[2],鳃 CA 活性小幅上升足以使对虾血淋巴渗透浓度迅速上升;三、除了鳃和触角腺之外,还有其它组织如肠道^[20]参与了血淋巴渗透调节。四、盐度突变刺激鳃细胞膜通透性增大,环境渗透浓度高于血淋巴渗透浓度,使得环境中的离子顺离子浓度梯度差扩散进入体内。

凡纳滨对虾血淋巴渗透浓度在盐度突变 1 d 内已经达到新的平衡,而鳃和触角腺组织 CA 活性均在盐度突变 4 d 以后出现显著的增高现象,因此两组织 CA 可能还参与了其它的生理适应调节,这有待进一步研究。

碳酸酐酶检测技术得到了美国 Auburn 大学生物科学系 Raymond P. Henry 教授的热情指导,谨此致谢。

参考文献：

- [1] Henry R P, Stephen Gehrich, Dirk Wehrauch, et al. Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2003, 136: 243 – 258.
- [2] Henry P P. Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans[J]. J Exp Biol, 2001, 204: 991 – 1002.
- [3] Henry R P, Watts S A, Early carbonic anhydrase induction in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*, during low salinity acclimation is independent of ornithine decarboxylase activity[J]. J Exp Zool, 2001, 289: 350 – 358.
- [4] Henry R P. Subcellular distribution of carbonic anhydrase activity in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. J Exp Zool, 1988, 248: 19 – 24.
- [5] Henry R P, Cameron J N. The distribution and partial characterization of carbonic anhydrase in selected aquatic and terrestrial decapod crustaceans [J]. J Exp Zool, 1982, 221: 309 – 321.
- [6] Botcher K D, Becker W, Carbonic anhydrase in branchial tissues of osmoregulating shore crabs, *Carcinus maenas*[J]. J Exp Zool, 1990, 255: 251 – 261.
- [7] Henry R P, Garrelts E E, McCarty M M, et al., Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na^+/K^+ -ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure[J]. J Exp Zool, 2002, 292: 595 – 603.
- [8] Wheatly M G, Henry R P. Branchial and antennal gland Na^+/K^+ -dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. J Exp Biol, 1987, 133: 73 – 86.
- [9] Henry R P, Cameron J N. Acid-base balance in *Callinectes sapidus* during acclimation from high to low salinity[J]. J Exp Biol, 1982, 101: 255 – 264.
- [10] Henry R P. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: The electrometric delta pH method and the pH stat method. In The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics(ed. Dodgson S J, Tashian R E, Gros G, Carter N D)[M]. New York: Plenum, 1991. 119 – 125.
- [11] Elena Palacios, Araceli Bonilla, Dulce Luna, et al. Survival, Na^+/K^+ -ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp(*Litopenaeus vannamei*)postlarvae[J]. Aquaculture, 2004, 234: 497 – 511.
- [12] 王吉桥. 南美白对虾健康养殖技术——南美白对虾的生物学[J]. 水产科学, 2002, 21(4): 44 – 46.
- [13] Wolfgang Bruns, Rolf Dermietzel, Gerolf Gros. Carbonic anhydrase in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle[J]. J Physiol, 1986, 371: 351 – 364.
- [14] 王同明. 生物化学及检验技术[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1986. 181 – 188.
- [15] 贺华君, 朱元保, 范秋领, 等. 磁场对碳酸酐酶的影响[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 1999, 20(2): 1 – 5.
- [16] Whiteley N M, Scott J L, Breeze S J, et al. Effects of water salinity on acid-base balance in decapod crustaceans[J]. J Exp Biol, 2001, 204: 1003 – 1011.
- [17] 房文红, 王慧, 来琦芳, 等. 不同盐度对中国对虾血淋巴渗透浓度和离子浓度的影响[J]. 上海水产大学学报, 1995, 4(2): 122 – 127.
- [18] Mantel L, Farmer L. The Biology of Crustacea[M]. New York: Academic Press. New York, 1983. 53 – 161.
- [19] 顾全保, 王幽兰, 左嘉睿. 不同发育时期中华绒螯蟹血淋巴渗透压的分析[J]. 动物学报, 1990, 36(2): 165 – 170.
- [20] 姜永华, 颜素芬, 陈政强. 南美白对虾消化系统的组织学和组织化学研究[J]. 海洋科学, 2003, 27(4): 58 – 62.