

日本对虾体内活性物质的研究进展*

PROGRESS OF THE STUDIES ON BIOACTIVE SUBSTANCE IN *Penaeus japonicus*

徐 军 刘逸尘 王维娜 王安利 张亦陈

(河北大学生命科学院 保定 071002)

日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 是日本最重要的对虾养殖品种。我国福建、广东等沿海近年也已开始养殖。这种虾具有生长速度快、养殖周期短、饲料容易解决、病害少、耐低氧、耐干露、营养价值与中国对虾相似等诸多优点,日益受到国内外人们的青睐。为此,本文主要对近 6 年来国外有关日本对虾体内激素和酶等主要活性物质作一综合介绍,以供从事该领域研究的工作者参考。

1 激素

1.1 蜕皮抑制激素(MH)

甲壳动物蜕皮抑制激素(MH)是从 X 器官窦腺复合体中释放出来的,它能抑制 Y 器官蜕皮类固醇的合成。Yang 等 1996 年从日本对虾的窦腺提取物中分离出来的属于 CHHS 科的 6 个主要肽(PEFSGP F VI)中发现 PEFSGP I V 能抑制蜕皮类固醇的合成,即

蜕皮抑制激素,它由 77 个氨基酸残基组成,有自由的氨基末端和羧基末端。日本对虾的蜕皮抑制激素与河蟹的蜕皮抑制激素序列相似性程度很高,并已经分离出了日本对虾蜕皮抑制激素的 cDNA,在一个正链 cDNA 克隆(814 碱基对)中,有一个具有 315 个碱基对的开放阅读框,理论上的翻译蛋白包括一个信号肽(28 个残基)和 PEFSGP I V(77 个残基)。Ohira 等 1997 年以在蜕皮抑制激素肽序列的基础上设计的两个变性寡聚核苷酸为引物,用 RT-PCR 扩增出一个 cDNA 片段,以此片段为探针可与眼柄 RNA 中的一个

* 河北省重点科技成果推广计划项目 98-TI 7 号。

第一作者:徐军,出生于 1977 年,硕士研究生, E-mail: xurjunl@263net

收稿日期:2001-03-07;修回日期:2001-06-28

0.95kb 的转录本特异性杂交,这个转录本仅存在于眼柄 RNA 中,在肝胰腺、腹部肌肉、脑、胸神经节和腹神经节 RNA 中没有。在蜕皮周期中,眼柄中 PEJSGP-IV mRNA 的水平不会发生显著的变化。以日本对虾蜕皮抑制激素的氨基酸序列为基础设计的变性引物与刀额新对虾眼柄 cDNA 进行 RT-PCR,克隆出编码蜕皮抑制激素同源蛋白质的部分 cDNA,用这部分 cDNA 为探针去筛选眼柄 cDNA 文库,分离出了几个与部分 cDNA 序列相同的 cDNA 克隆,最大的 cDNA 有 957 个碱基对并带有一个具有 315 个碱基对的开放阅读框。刀额新对虾的神经肽包括 77 个氨基酸残基并在其前有一个信号肽 (28 个氨基酸残基),与日本对虾的蜕皮抑制激素及其他甲壳动物的蜕皮抑制激素 (MH) 有很高的同源性,所以刀额新对虾的神经肽命名为 MEMH。RNA 印迹分析和 RT-PCR 扩增结果表明 MEMH 在蜕皮前期、中期和后期的眼柄和大脑中表达,在新生幼体的神经组织中也能检测到 MEMH 的 RNA 信息;然而,在肌肉、游泳足和肝胰腺中未能发现 MEMH。染色体组的 DNA 印迹分析和 PCR 扩增结果表明 MH 基因的单个拷贝存在于染色体组中^[1]。

1.2 甲壳动物高血糖激素 (CHHS)

从 X 器官腺复合体中释放出来的甲壳动物高血糖激素 (CHHS) 是甲壳动物激素中又一个突出家族,具有调节血淋巴中葡萄糖水平的功能,并参与蜕皮和繁殖。从日本对虾腺体萃取物中分离出的 6 个 CHHS 家族肽链,其中的 5 个 (PEJSGP-I, II, III, V, VI) 表现出高血糖行为,被认为是日本对虾的高血糖激素。Yang 等 1997 年测定了 5 种多肽的氨基酸序列,结果表明它们都包括 72 个氨基酸残基,有一个自由氨基末端和一个酰氨基 C 末端,彼此之间都表现出一定程序的序列相似性,但与蜕皮抑制激素 (MH, PEJSGP-IV) 的序列相似性差。已经分离出了编码 CHHS 的 cDNA, cDNA 克隆有 774 个碱基对,并带有一个开放阅读框 (345 个碱基对)。理论上的翻译蛋白包括一个信号肽 (24 个残基),一个 CHH 前体相关肽 (CPRP:17 个残基) 和 PEJSGP-III (72 个残基)。据 Ohira 等 1997 年报道:日本对虾的 CPRP 与其他甲壳动物的 CPRP 是同源,只是比他们显著地短些;在 RNA 印迹分析中, cDNA 能特异地与眼柄 RNA 中的一单链 mRNA (大约 0.8kb) 杂交,在肝胰腺或腹部肌肉中没有发现这种 mRNA。Lacombe 等^[2]绘制出了 32 个 CHH 序列,并应用多重序列校准、图形搜索和氨基酸守恒分析独立于它们的生物学功能地去描述它们的分子特征。分析清楚地表明:蛋白质聚集成两组 (CHH 和 VH)。氨基酸守恒分析再把 VH 组分为与生殖有关的 RIH 和与蜕皮有关的 MH 序列。最近研究表明日

本对虾甲壳动物高血糖激素能抑制体外培养的雌性短沟对虾卵黄移植片段中 mRNA 和蛋白质的合成。抑制水平直接与注射物中肽的浓度相关,说明了 CHHS 家族多肽可能影响甲壳动物卵黄的生理代谢^[3]。用免疫组织化学法定位日本对虾眼柄处的甲壳动物蜕皮抑制激素 MH 和高血糖激素 (CHH, PEJSGP-III),发现两者的神经分泌细胞定位于髓末端神经节 X-器官的相同束中^[4]。

1.3 其他

Wang 等^[5]通过两步逆相-HPLC 从日本对虾的肾上腺水状提取物中分离出了 3 种促细胞色素神经肽激素,并测定了它们的氨基酸序列。其中一种表现为色素集中活性,其氨基酸序列与已知的红色素集中激素 (RPCH) 相同,命名为 PEJRPCH;其他两种为色素分散激素 (PDH),命名为 PEJPDH-I 和 PEJPDH-II;它们都由 18 个氨基酸残基组成有一个自由的氨基端和一个酰胺 C 末端。两种 PDHS 在 11, 14, 16 位上的氨基酸残基不同,由于 16 位上氨基酸残基不同导致两种 PDH 折叠力显著不同。4 种色素细胞对 PEJRPCH 和两种 PDHS 的敏感性顺序是:红色素细胞 > 黄色素细胞 > 黑色素细胞 > 白细胞 (无色素细胞)。

Cardoso 等 1997 年通过串联质谱和序列产物扫描鉴定了日本对虾性腺中的睾丸酮、甾烷醇酮、17 α 羟基黄体酮和黄体酮等脊椎动物类固醇激素。在生物学样品中这些物质的鉴定经常通过气相色谱质谱和通过衍生物的液相色谱纯化,而在这些物质分析中,前种方法的应用,大大地简化了样品的预处理,提供了一种在混合物中扫描这些物质的非常简单的方法。Chuang 等 1994 年对日本对虾肌肉中胰岛素受体特性的研究,发现虾肌肉中胰岛素受体的 β -亚单位以多种亚基 Mr79 000, 77 000 和 75 000 的形式存在,只有 Mr79 000 是在加上胰岛素后自动磷酸化的,自动磷酸化发生在酪氨酸残基上,有冲洗能力的三硝基甲苯 X100 和 Mg²⁺ 对虾肌肉的胰岛素受体的自动磷酸化反应起到显著的促进作用。Okadaic 酸可激活胰岛素刺激胰岛素受体酶的活性,但如果没有胰岛素也不能激活。比较虾胰岛素受体与胰岛素结合后,来自虾肌肉中多种 β -亚单位激酶活性调节有待进一步研究。

2 酶

2.1 几丁质酶

几丁质酶对对虾的生长和蜕皮至关重要,昆虫、植物、酵母、细菌中的几丁质酶的氨基酸序列已经测出,但在甲壳动物中却没有。Watanabe 等 1996 年通过对肝胰腺中的 cDNA 进行 PCR 扩增,分离出了一个编码几丁质酶的 cDNA 克隆。这个克隆包括一个编码含

572 个氨基酸蛋白质的开放阅读框, 此蛋白质命名为 Pjchi-I。1997 年他们用 RT-PCR 在表皮组织中又分离出一个编码几丁质酶的 cDNA 克隆, 这个克隆包括一个编码 527 个氨基酸蛋白质的开放阅读框, 此蛋白质命名为 Pjchi-II。蜕皮之前, 在尾扇和剑的混合物中可检测出 Pjchi-II mRNA 的重要聚合物, 而在蜕皮中复制水平较低, 研究表明 Pjchi-II 在蜕皮中起作用。且 Pjchi-I 仅在肝胰腺中表达, 而 Pjchi-II 仅在尾扇或剑中表达。1998 年^[6]又从日本对虾肝胰腺中纯化出了几丁质酶家族的另一个新成员即 Pjchi-III, 它和 Pjchi-I, II 一样与其他非甲壳类动物有相当程度的序列相似性。

2.2 消化酶

据吴垠 1997 年日本对虾肝胰腺、胃、肠蛋白酶的最适温度分别为 40, 40, 55 °C, 临界失活温度分别为 58, 52, 69 °C; 脂肪酶最适温度分别为 35, 40, 40 °C, 临界失活温度分别为 51, 52, 53 °C; 淀粉酶的最适温度分别为 30, 30, 25 °C, 临界失活温度分别为 40, 45, 45 °C。

日本对虾肝胰腺中的胰蛋白酶最适温度为 45 °C, 它影响日本对虾的细胞自溶。Kim 等 1996 年纯化了此酶并对其特性进行了实验研究, 从日本对虾的肝胰腺中纯化出两种胰蛋白酶 (A 和 B), 两种酶都有一个分子量为 32kDa 的多肽链, 它们的近似分子量分别是 27.2 和 22.8kDa, 有相似的氨基酸组成, 并富含 Gly, Val, Ala, Asp 和 Glu, 但很少含 Met 和必需氨基酸。两种酶的活性可完全被 SBII, PMSF, TLCK 抑制, 但不受 TPCK 和抑肽素影响。

2.3 β -N 乙酰氨基己糖苷酶 (EC3, 2, 1, 52)

Koga 等 1996 年对日本对虾肝胰腺中 β -N 乙酰氨基己糖苷酶的纯化和特性进行了研究, 结果表明用硫酸铵分级沉淀法和色谱法, 可从日本对虾的肝胰腺中纯化出此酶; 用 SDS-PAGE 和凝胶过滤分别测得近似分子量为 64 000 和 110 000, 最适 pH 值和温度是 5.0 ~ 5.5 和 50 °C; 酶在 pH4 ~ 11 及低于 55 °C 时稳定。10 mmol/L HgCl₂ 可抑制其 39% 的酶活性, 此酶是外切型水解酶, 对短链 N-乙酰氨基聚糖水解能力强。

2.4 酚氧化酶

酚氧化酶是日本对虾免疫系统中的关键酶之一。据赵娇 1997 年报道该酶的最适 pH 值为 6.5, 在 pH 值 5.0 ~ 8.0 范围内有较高的稳定性, 最稳定的 pH 值为 7.0; 其最适温度为 40 °C, 在 40 °C 以下表现出较高的热稳定性, 而在 50 °C 以上迅速失活; 该酶对不同的酚类物质表现出不同的底物专一性。

2.5 转移酶

Wu 等 1996 年对日本对虾眼柄 G 末端 CVLS 序

列-特异性蛋白法尼基转移酶的纯化和特性进行了研究, 结果表明在变性条件下, 通过免疫印迹和 PAGE 纯化的此酶含有分子量为 49 000 和 48 000 两个亚基。有活性的酶相对分子量是 100 000, 但纯化的酶被还原为杂二聚体, 此酶最适 pH 值为 6.0, 被 Mn²⁺ 激活但被 Ca²⁺ 抑制。Lin 等^[7]对日本对虾眼柄 C-末端 CFFLE 序列-特异单体蛋白-牛儿基-牛儿酯转移酶 I 进行研究, 表明此酶主要包括 CFFLE 序列和果蝇特异 Ras1 G 末端, 带有 CAIL 序列, 但不是法尼基转移酶的特异序列 CVLS; 有活性的牛儿基-牛儿酯转移酶 I 相对分子量为 67 000 ± 1 000, 而纯化的酶为一个单体; 酶在 100 mmol/L Tris 缓冲液中最适 pH 值为 8.0, 微量的 Zn²⁺ 和 Mg²⁺ 能抑制酶活性。

2.6 同工酶

据李太武 1997 年报道: 日本对虾体内的乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、醇脱氢酶的活性和含量都高于中国对虾。由于上述几种同工酶的含量高、活性强, 使日本对虾在缺氧情况下仍具有很强的生命力, 能够存活很长时间。

2.7 其他

Kuo 等 1994 年在日本对虾的血淋巴中鉴定出有 LOX (12-脂肪氧和酶) 活性, 这是在海洋甲壳动物中 LOX 活性的首次发现。Koike 等 1996 年对日本对虾肝胰腺中 DNA 拓扑异构酶的研究表明, 此酶有两个分子量为 70 000 和 67 000 的主要蛋白带, 以及分子量为 64 000 和 56 000 次带; 酪氨酸激酶 P43 Vab1 的磷酸化或磷酸酪蛋白酯酶的去磷酸化都可导致酶活性下降。DNA 拓扑异构酶 I 是以磷酸化形式从日本对虾肝胰腺内提取出来的, 在活体外, 这种磷酸化对酶活性的表达是必需的; ZnCl₂, CuCl₂ 和 Pb(NH₃)₂ 在 mmol 浓度时就可抑制 DNA 拓扑异构酶 I 活性, 但此酶很少受 CaCl₂ 抑制。Lin 等 1994 年研究表明虾脱氧核糖核酸酶在 SDS 存在时, 加热仍有活性, 而无 SDS 时加热无活性。据 Chen 等 1997 年报道日本对虾在氨氮浓度高的水环境中, 其鳃、肝胰腺和中肠中的精氨酸酶特异活性与氨氮浓度成正相关, 而肌肉中的精氨酸酶活性与环境中的氨-氮浓度成反相关。

3 结语

无论是以前还是现在对日本对虾的激素和酶的研究都非常多, 本文是对近 6a (1994 ~ 1999 年) 关于这方面研究的一个综述。从中可以看出, 关于一些与生长有关的激素和酶的纯化和特性已研究的较为彻底并已经深入到基因水平, 但这些研究的大部分还处于实验室阶段, 通过转基因和发酵等手段大规模生产这

些活性物质并应用于养殖实践,以促进日本对虾的生长繁殖的工作做的还很少。另外就是近6a来与日本对虾免疫有关的一些激素和酶的研究还不是太透彻,其作用机制和基因水平等深入的研究还很少。因为日本对虾等无脊椎动物没有象高等动物那样完善的免疫防御系统(包括特异性和非特异性免疫系统),它们抵御外来疾病的能力是较弱的。作者认为在现在的基础上把与免疫有关的激素和酶等各方面研究搞清楚,并在日本对虾生长发育的各个阶段把与生长有关的和与免疫有关的各种激素和酶等活性物质之间的动态关系弄明白,无论是对于水产养殖还是对于日本对虾种群的繁衍保护都将是非常有意义的事情。

主要参考文献

- 1 Gu Pei Li, Chan Siu Mng. Cloning of a cDNA encoding a putative molting-inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp *Metapenaeus ensis*, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, **7**(3): 214 ~ 220
- 2 Lacombe C., Greve P. Overview on the subgrouping of the Crustacean hyperglycemic hormone family, *Neuropeptides*, 1999, **33**(1): 71 ~ 80
- 3 Khayat M., Yang W.J. Hyperglycemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in vitro incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*, *Genes and Comparative Endocrinology*, 1998, **110**(3): 307 ~ 318
- 4 Shih Tung Wei, Suzukit Yuzuru. Immunohistochemical identification on hyperglycemic hormone and molting-inhibiting hormone-producing cells in the eyestalk of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, *Zoological Science Tokyo*, 1998, **15**(3): 389 ~ 397
- 5 Wang W.J., Aida K. Characterization of chromatophorotropic neuropeptides from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1999, **114**(3): 415 ~ 424
- 6 Watanabe Toshiki, Kono Michiko. Purification and molecular cloning of a chitinase expressed in the hepatopancreas of the penaeid prawn *Penaeus japonicus*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, **1382**(2): 181 ~ 185
- 7 Lin Ruei-Shiuan, Chuang Ni-Ni. Carboxy terminal CFII sequence specific monomeric protein geranylgeranyltransferase I from the eyes of the shrimp *Penaeus japonicus*, *Journal of Experimental Zoology*, 1998, **281**(6): 565 ~ 573

辅助参考文献

- 吴垠,孙建明,周遵春. 温度对中国对虾、日本对虾主要消化酶活性的影响,大连水产学院学报,1997, **12**(2): 15 ~ 24
- 赵娇,戚晓玉. 日本对虾的酚氧化酶特性研究,上海水产大学学报,1997, **6**(3): 157 ~ 165
- 李太武,苏秀榕. 中国对虾和日本对虾6种同工酶的比较研究,海洋学报,1997, **19**(2): 85 ~ 88
- Yang W.J., Aida K. Amino acid sequence of a peptide with molting-inhibiting activity from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*, *Peptides (Tarryton)*, 1996, **17**(2): 197 ~ 202

- Ohira Tsuyoshi, Watanabe Toshiki. Molecular cloning of a molting-inhibiting hormone cDNA from the Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*, *Zoological Science Tokyo*, 1997, **14**(5): 785 ~ 789
- Ohira T., Watanabe T. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a crustacean hyperglycemic hormone from the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1997, **6**(1): 59 ~ 63
- Yang W.J., Aida K. Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, *Peptides (Tarryton)*, 1997, **18**(4): 479 ~ 485
- Cardoso A. M., Barros C. M. F. Identification of vertebrate type steroid hormones in the shrimp *Penaeus japonicus* by tandem mass spectrometry and sequential product ion scanning, *J. Mass Spectrom.*, 1997, **8**(4): 365 ~ 370
- Chuang N. N., Wang P. C. Characterization of insulin receptor from the muscle of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda), *Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 1994, **108**(3): 289 ~ 297
- Watanabe T., Kono M. Isolation of a cDNA encoding a putative chitinase precursor in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, **5**(4): 299 ~ 303
- Watanabe T., Kono M. Isolation of a cDNA encoding a chitinase family protein from cuticular tissues of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*, *Zoological Science (Tokyo)*, 1997, **14**(1): 65 ~ 68
- Kim H. R., Kim D. S. Purification and characterization of trypsin affecting on the autolysis of shrimp, *Penaeus japonicus*, *Journal of the Korean Fisheries Society*, 1996, **29**(6): 797 ~ 804
- Koga D., Hoshika H. Purification and characterization of beta-N-acetylhexosaminidase from the liver of a prawn, *Penaeus japonicus*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996, **60**(2): 194 ~ 199
- Wu C. S., Chuang N. N. Carboxy-terminal CVLS-sequence-specific protein farnesyltransferase from the eyes of the shrimp *Penaeus japonicus*: Purification and characterization, *Journal of Experimental Zoology*, 1996, **275**(5): 346 ~ 35
- Kuo J. M., Pan B. S. Identification of 12-Lipoxygenase in the haemolymph of tiger shrimp (*Penaeus japonicus* Bate), *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**(8): 1620 ~ 1623
- Koike A., Inada H. Local geographic distribution on catch of Misurami setnet in the Buzen fishing ground, *Journal of the Tokyo University of Fisheries*, 1996, **82**(2): 173 ~ 190
- Lin J. L., Wang W. Y. Thermal inactivation of shrimp deoxyribonuclease with and without sodium dodecyl sulfate, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, **1209**(2): 209 ~ 214
- Chen Jiann-Chu., Chen Jiann-Mn. Arginase specific activity and nitrogenous excretion of *Penaeus japonicus*, exposed to elevated ambient ammonia, *Marine Ecology Progress Series*, 1997, **153**(1 ~ 3): 197 ~ 202 (本文编辑:刘珊珊)