

菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活性的研究

王文琪, 徐申波, 姜令绪, 杨 宁, 张玉娜

(莱阳农学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 通过不同的反应条件对菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 血淋巴溶菌酶活性的影响实验, 发现各反应条件与菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力密切相关: 随着血淋巴添加量的增加, 菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力逐渐升高, 添加量在 150~250 μL 之间时, 两者呈现直线关系; 溶菌酶活力随着温度和 pH 的升高呈峰值变化, 分别在反应温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 和 pH 为 6.4 时达到最大值, 但统计分析显示 pH 在 5.2~6.4 之间时, 溶菌酶活力差异不显著 ($P > 0.05$); 溶菌酶活力随着反应时间的延长逐渐升高, 当反应时间大于 100 min 后趋于稳定。这为探讨菲律宾蛤仔免疫力的不同变化提供基础性的数据。

关键词: 菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*); 溶菌酶活力; 温度; pH

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)08-0046-04

贝类的免疫系统属于非特异性免疫反应, 除了血细胞的作用外, 其血淋巴中存在多种生物活性因子, 如溶菌酶、抗菌肽、凝集素、调理素等, 具有抑菌杀菌作用^[1-4]。溶菌酶 (Lysozyme) 是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶, 又称胞壁质酶 (muramidase)^[5-6]。据李义^[7]报道溶菌酶是非特异性免疫系统的重要组成部分, 是一种碱性蛋白, 能够水解革兰氏阳性菌细胞壁中粘肽的乙酰氨基糖并使之裂解而释放出来, 形成一个水解酶体系, 破坏和消除侵入体内的异物。Cheng^[8]研究发现溶菌酶在贝类的炎症反应中起核心作用。刘世良^[4]等报道指出溶菌酶能够溶解病原体的细胞壁, 并且部分或者全部抑制病原菌的生长与繁殖。可见, 溶菌酶对于贝类的免疫防御具有重要的作用, 研究影响其活性的反应条件就显得格外重要。目前, 有关贝类血淋巴溶菌酶活力性质的研究尚未见报道。作者研究了菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力的性质, 探讨了不同反应条件对溶菌酶活力的影响, 为贝类溶菌酶活力测定方法的改进提供了必要的科学数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 于 2005 年 5 月购于城阳水产品批发市场, 其进出水管活动正常, 健康无病, 壳长为 4.07 cm \pm 0.33 cm, 壳宽为 2.84 cm \pm 0.16 cm 体质量为 11.34 g \pm 1.25 g。菲律宾蛤仔在盐度为 30, pH 为 7.6, 温度为

18 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的海水中暂养 3 d, 暂养期间不充气, 不投饵, 日换水 2 次, 每次换水量为 1/2。

1.2 实验方法

1.2.1 实验梯度设置

作者分别研究了血淋巴添加量、反应时间、反应温度和反应 pH 对菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力的影响。血淋巴添加量梯度设置为 50, 100, 150, 200, 250, 300 μL ; 反应时间依次为 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 min; 反应温度分别设置为 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 $^{\circ}\text{C}$, 温度梯度通过 CH·SY21 电热恒温水浴锅和冰块来调控; 反应 pH 分别是 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, 5.6, 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, 7.6, 8.0, pH 用 1 mol/L 的盐酸、0.1 mol/L 的磷酸钾盐和 LP-115 型 pH 计调控。

1.2.2 样品制备

每个实验分别取暂养 3 d 后的正常菲律宾蛤仔 100 只, 用滤纸擦干其贝壳上的海水, 然后用 1 mL 无菌一次性注射器 (5 号针头) 从菲律宾蛤仔后闭壳肌中取血, 分别至于 1.5 mL 的离心管中, 经 TGL-16 G

收稿日期: 2006-04-19; 修回日期: 2006-06-30

基金项目: 青岛市自然科学基金资助项目 (05-1JC-87); 莱阳农学院博士基金资助项目 (Y0222)

作者简介: 王文琪 (1969), 女, 山东莱阳人, 博士, 副教授, 研究方向: 水产养殖, 电话: 13730901370, wengwanning@lyac.edu.cn

台式离心机 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于 10 mL 的离心管中, 再在 IKA- MSI 振荡器上 1 600 r/min 振荡混匀后用于测定溶菌活力。

1.2.3 溶菌活力的测定

溶菌活力 (U_L) 的测定参照 Hultmark 等^[9] 改进的方法, 并做了适当的调整。

菌悬液的制备: 以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 冻干粉为底物, 用 0.1 mol/L, pH= 6.4 (反应 pH 实验除外) 磷酸钾盐缓冲液配成底物悬液, 使其 570 nm 波长处的吸光度值 (A 值) 约为 0.35。

溶菌活力测定: 取 3 mL 菌悬液于试管内, 冰浴 10 min, 然后加入 200 μ L (血淋巴添加量实验除外) 待测血清振荡混匀, 于 UV-2000 分光光度计 570 nm 波长处测定其吸光度值 (A_0), 然后将试管移入 37 $^{\circ}$ C (反应温度实验除外) 水浴中放置 30 min (反应时间实验除外), 取出后立即置于冰浴中 10 min, 以终止反应, 测其吸光度值 (A)。

溶菌活力计算: $U_L = (A_0 - A) / A$

1.2.4 血淋巴蛋白浓度的测定

蛋白浓度测定采用考马斯亮兰法^[10]。绘制标准曲线: 取 21 支试管, 分为 7 组, 每组三个平行, 用 1.0 g/L 的牛血清标准蛋白溶液给各试管分别加入: 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mL, 然后用无离子水补充到 0.1 mL, 最后各试管中分别加入 5.0 mL 考马斯亮兰 G-250 试剂, 混合 5 min 后在分光光度计上测定各样品在 595 nm 波长处的光吸收值 A_{595} 。用标准蛋白质量 (mg) 为横坐标, 用吸光度值 A_{595} 为纵坐标作图, 即得到一条标准曲线。根据标准曲线计算所测定的未知样品的蛋白含量。

1.2.5 数据处理与分析

所有实验数据均以 3 个平行数据的平均值表示; 实验数据采用单因素方差分析 (ANOVA)。

2 实验结果

2.1 血淋巴添加量对菲律宾蛤仔溶菌酶活力的影响

本实验应用考马斯亮兰法制作的蛋白质量标准曲线: $y = 4.7386x + 0.0009$, $R^2 = 0.9973$, 式中 y 和 x 分别表示吸光度值与蛋白质量 (图 1)。表 1 分析了血淋巴添加量与溶菌酶活力及相邻梯度间溶菌酶活力的关系, 由表 1 和图 2 可以看出, 随着血淋巴添加量的增加, 菲律宾蛤仔溶菌酶活力逐渐升高, 血淋巴添加量为 300 μ L 和 350 μ L 的处理组溶菌酶活力差异不显著 ($P > 0.05$); 而血淋巴添加量为 100 μ L 到 250 μ L 范围内, 随着血淋巴添加量增加, 溶菌酶活力成正比增加 (图 2); 通过计算相邻处理组间的溶菌酶活力的差值得出表 1 中第 3 列的数值, 而此溶菌酶活

力的差值对应的血淋巴量都是 50 μ L, 即相邻处理实验组间的血淋巴添加量的差值均为 50 μ L, 用 50 μ L 血淋巴量对相邻处理组间的溶菌酶活力的差值作图, 得出图 2 中的另一条曲线即相邻梯度间溶菌酶活力差曲线, 由相邻梯度间溶菌酶活力差曲线可以发现当血淋巴溶菌酶添加量为 100 μ L 到 250 μ L 范围内, 随着血淋巴添加量的增加, 溶菌酶活力的增加差值无显著差异 ($P > 0.05$)。

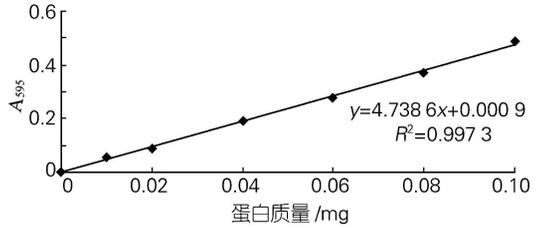


图 1 应用考马斯亮蓝法制作的蛋白质量标准曲线

Fig. 1 Standard figure of quality of protein by Coomassie brilliant blue method

表 1 菲律宾蛤仔血淋巴添加量与溶菌酶活力关系

Tab 1 Data of hemolymph of *Ruditapes philippinarum* and bacteriolytic activity

血淋巴量 (μ L)	相邻梯度间		蛋白质量 (mg)
	溶菌酶活力	溶菌酶活力差	
50	0.018 ^A	-	0.020
100	0.090 ^B	0.072 ^a	0.041
150	0.140 ^C	0.050 ^b	0.062
200	0.195 ^D	0.055 ^c	0.079
250	0.248 ^E	0.053 ^d	0.098
300	0.265 ^F	0.017 ^e	0.122
350	0.272 ^G	0.005 ^f	0.139

注: a= B- A; b= C- B; c= D- C; d= E- D; e= F- E; f= G- F

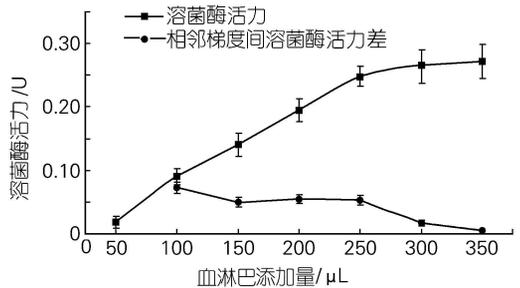


图 2 血淋巴添加量对菲律宾蛤仔溶菌酶活力的影响

Fig. 2 Relationship between the quantity of hemolymph of *Ruditapes philippinarum* and bacteriolytic activity

2.2 菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力稳定性的研究

图3表明,随着反应温度的增加,菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力呈现峰值变化,在0~30℃的范围内,溶菌活力缓慢升高,之后迅速增加,至50℃达到最高值($U_{L,max} = 0.897$),随后又迅速降低,60℃之后趋于缓慢,至80℃溶菌酶活力最低($U_{L,min} = 0.005$)。

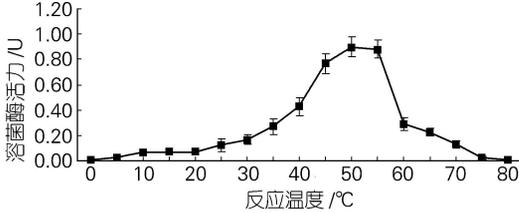


图3 反应温度对菲律宾蛤仔血淋巴溶菌活力的影响
Fig. 3 Relationship between reaction temperature and bacteriolytic activity of hemolymph of *Ruditapes philippinarum*

由图4可见,随着反应液pH的增加,菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力呈现峰值变化,在pH为6.4时溶菌酶活力达到最高值($U_{L,max} = 0.308$),但是pH在5.2~6.4之间的溶菌酶活力无显著差异($P > 0.05$),当pH为8时溶菌酶活力最低($U_{L,min} = 0.049$)。

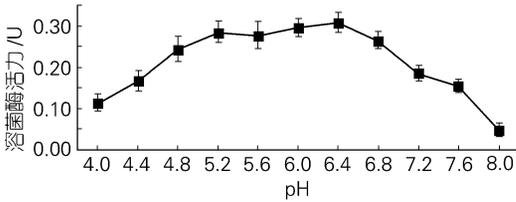


图4 pH对菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力的影响
Fig. 4 Relationship between pH and bacteriolytic activity of hemolymph of *Ruditapes philippinarum*

由图5可以看出,随着反应时间的延长,菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力逐渐升高,在10~100min之内两者呈正相关性,100min后趋于稳定,且100,110,120min时的溶菌酶活力差异不显著($P > 0.05$)。

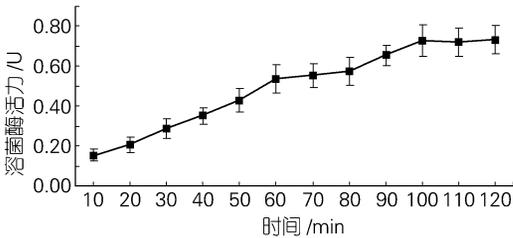


图5 反应时间对菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力的影响
Fig. 5 Relationship between duration and bacteriolytic activity of hemolymph of *Ruditapes philippinarum*

3 讨论

3.1 血淋巴添加量对菲律宾蛤仔溶菌酶活力的影响

血淋巴添加量是影响溶菌活力测定的一个重要条件。血淋巴添加量与血淋巴蛋白浓度以及溶菌酶的含量呈正相关性。溶菌酶是无脊椎动物非特异性免疫系统的重要组成部分,主要存在于血细胞中或由血细胞释放到血淋巴中。不同种类的血淋巴浓度不同,这就表明其中蛋白酶的含量不同,而酶的含量是影响酶测定方法灵敏度的一个关键因素。作者参照 Hultmark 等^[9]的方法,首先研究了血淋巴添加量对菲律宾蛤仔溶菌酶活力的影响。实验结果显示:随着血淋巴添加量的增加,菲律宾蛤仔溶菌活力逐渐升高,血淋巴添加量为50μL的处理组,溶菌酶活力非常低,数据的平行性与重复性差,血淋巴添加量为300μL和350μL的处理组溶菌酶活力差异不显著($P > 0.05$),且血淋巴添加量为100μL到250μL的相邻处理组间的溶菌酶活力差无显著差异($P > 0.05$),溶菌酶活力与血淋巴添加量呈直线关系。由此表明,血淋巴添加量与菲律宾蛤仔溶菌酶活力密切相关,添加量较少(50μL),则溶菌酶活力测定方法的灵敏度低,这可能与菲律宾蛤仔蛋白质质量浓度较低(0.4g/L),其相应的溶菌酶含量较少有关;添加量较多(300μL和350μL),则无法反映出血淋巴添加量与溶菌酶活力的相关性,作者认为这主要是受到底物浓度的影响;血淋巴添加量只有在适当的范围内才能既提高测定方法的灵敏度又表达出两者之间的直线关系。因此作者在测定其它反应条件对菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力影响时,将血淋巴添加量确定为200μL,以便提高测定方法的灵敏度。

3.2 菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力稳定性的研究

反应温度、反应pH和反应时间是影响菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力稳定性的重要因素。许多研究表明反应温度和pH对溶菌酶的稳定性具有显著影响^[11,12]。本实验中,随着反应温度的升高,菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力均呈现峰值变化,在0~30℃的范围内,溶菌酶活力缓慢升高,之后迅速增加,至50℃时达到最高值($U_{L,max} = 0.897$),随后又迅速降低,60℃之后趋于缓慢,至80℃溶菌酶活力最低($U_{L,min} = 0.005$)。随着反应液pH的增加,菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力呈现峰值变化,在pH为6.4时溶菌酶活力达到最高值($U_{L,max} = 0.308$),但是pH在5.2~6.4之间的溶菌酶活力无显著差异($P > 0.05$),

当 pH 为 8 时溶菌酶活力达到最低值,这说明溶菌酶对弱酸性环境的耐受性较强,而对碱性环境的耐受性较差。

反应时间与菲律宾蛤仔血淋巴溶菌酶活力密切相关,在 10~ 100 min 之内两者呈正相关性,100 min 后溶菌酶活力趋于稳定,且第 100, 110, 120 min 时的溶菌酶活力差异不显著($P > 0.05$)。由此表明,反应时间能够影响菲律宾蛤仔溶菌酶活力的稳定性,根据本实验结果,反应时间在 100 min 以上,溶菌酶活力能够保持较高的活力和较好的稳定性。

参考文献:

[1] Lapeyre J F, Chu F L E, Meyers J M. Hemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1995, 5: 179-190.
 [2] 陈竞春,石安静. 贝类免疫生物学研究概况[J]. 水生生物学报, 1996, 20(1): 74-78.
 [3] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates [J]. *Aquaculture*, 1999, 172: 125-145.

[4] 刘世良,麦康森. 贝类免疫系统和机理的研究进展 [J]. 海洋学报, 2003, 23(5): 95-105.
 [5] 朱奇,陈彦. 溶菌酶及其应用[J]. 生物学通报, 1998, 33(10): 9-10.
 [6] 吴晓英,林影,陈慧英. 溶菌酶的研究进展[J]. 工业微生物, 2002, 32(4): 55-58.
 [7] 李义. 甲壳动物免疫学的研究进展[J]. 水利渔业, 2003, 23(1): 4-6.
 [8] Cheng T C. The role of lysosomes in molluscan inflammation [J]. *Smer Zool*, 1983, 6(6): 403-412.
 [9] Hultmark D, Steiner H, Rasmussen T, et al. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J], *Eur J Biochem*, 1980, 106: 7-16.
 [10] 陈缘,周玫. 自由医学基础与病理生理[M]. 北京: 科技出版社, 1994. 67-69.
 [11] 程建军,张辉,刘滨城,等. 蛋壳溶菌酶的稳定性研究 [J]. 食品科学, 2004, 25(11): 187-188.
 [12] 韩冷,韩妙君,冯婷. 不同来源溶菌酶的性质比较 [J]. 氨基酸与生物资源, 2004, 26(3): 73-75.

Study on activity of lysozyme in hemolymph of *Ruditapes philippinarum*

WANG Wenqi, XU Shengbo, JIANG Lingxu, YANG Ning, ZHANG Yunan
 (Laiyang Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Received: Jan. , 19, 2006

Key words: *Ruditapes philippinarum*; bacteriolytic activity; temperature; pH

Abstract: This paper studied the effects of hemolymph volume, temperature, pH and time on the property of lysozyme in the hemolymph of *Ruditapes philippinarum*. The results indicated that there was a close relation between the four reaction conditions and bacteriolytic activity. As the volume is in of hemolymph increased, the bacteriolytic activity in the hemolymph increased gradually, while the volume and the bacteriolytic activity showed linearity when the volume is in between 150 μ L and 250 μ L. As the reaction temperature and pH increased, the graphs of bacteriolytic activity plotted against dates all showed curves. The graphs of bacteriolytic activity had well defined peaks when the temperature equaled 50 $^{\circ}$ C and the pH equaled 6.4. The data of bacteriolytic activity had no marked difference in the ranges from 5.2 to 6.4 pH. As the reaction time increased, bacteriolytic activity increased gradually between 10min and 100min., while bacteriolytic activity remained at a constant level between 100, 110 and 120 min and there was no distinct difference($P > 0.05$). That provided base data of different infections on immune activity of *R. philippinarum*.

(本文编辑:张培新)