

文章编号:1000-0615(2008)05-690-07

## 凡纳滨对虾精氨酸激酶的分离纯化及性质研究

姚翠鸾<sup>1</sup>, 王志勇<sup>1</sup>, 张瑞英<sup>2</sup>, 韩学哲<sup>3</sup>, 张子剑<sup>2</sup>, 孔鹏<sup>2</sup>, 冀培丰<sup>1</sup>, 黄珊珊<sup>1</sup>

(1. 集美大学水产学院水产生物技术研究所,福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室,福建 厦门 361021;

2. 河北大学生命科学学院,河北 保定 071002;

3. 科学出版社,北京 100717)

**摘要:** 经过CM-纤维素批量层析、Sephadex G-100柱层析、DEAE-纤维素柱层析等步骤,从凡纳滨对虾肌肉组织分离得到精氨酸激酶,经SDS-PAGE检测达到电泳纯,分子量约为40 kDa。对该酶的性质进行分析结果表明,精氨酸激酶的最适作用温度为55℃,当温度高于65℃时,酶活力显著下降;pH 8时酶活力较高,低浓度的精氨酸对酶活力有促进作用,高浓度时表现抑制作用,而底物类似物精胺和氨基胍则对酶促反应表现出完全的抑制。NaCl, KCl对酶的活力具有促进作用,低浓度(10 mmol·L<sup>-1</sup>)MgCl<sub>2</sub>对酶活力表现出激活作用,而CuCl<sub>2</sub>与MnCl<sub>2</sub>则表现出完全抑制酶活力,CaCl<sub>2</sub>与ZnCl<sub>2</sub>在低浓度时对酶活力无明显影响,但是随着浓度升高,对酶具有抑制作用。

**关键词:** 凡纳滨对虾;精氨酸激酶;纯化;性质

**中图分类号:** S 917

**文献标识码:** A

精氨酸激酶(arginine kinase, ATP: 精氨酸 N-磷酸转移酶, EC 2. 7. 3. 3)是无脊椎动物体内调节能量代谢最重要的酶,在无脊椎动物体内能量产生较多时催化形成磷酸精氨酸贮存能量,在细胞活动爆发,需要能量的过程中则催化产生ATP<sup>[1]</sup>。最近的研究发现精氨酸激酶是甲壳动物受到免疫刺激和病毒感染后变化最为明显的蛋白质之一<sup>[2-4]</sup>,相关研究还表明它与甲壳动物适应环境中盐度、pH值、重金属离子等刺激密切相关<sup>[5-8]</sup>,其在甲壳动物中的生理作用也越来越受到重视。精氨酸激酶是无脊椎动物体内能量代谢的关键调控酶,它不仅在对虾的能量代谢过程中具有重要作用,而且在对虾体内的表达量也很高<sup>[9]</sup>。因此,对精氨酸激酶深入研究十分必要。目前,国内外学者已经分离得到了褐对虾(*Penaeus aztecus*),中国明对虾(*Fenneropenaeus*

*chinensis*)肌肉组织中的精氨酸激酶,并对其构象进行了研究<sup>[10-12]</sup>。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)作为我国乃至全世界目前养殖产量最大、养殖面积最广的经济对虾养殖种类之一,迄今尚未见关于其精氨酸激酶的分离纯化与性质的相关报道。本实验对凡纳滨对虾体内的精氨酸激酶进行分离纯化,并对其性质进行研究,以期为其的深入研究奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

凡纳滨对虾肌肉组织。

#### 1.2 试剂

CM-纤维素、DEAE-纤维素、葡聚糖凝胶 G-100 购自 Amersham 公司, L-精氨酸、氨基胍购自 Sigma 公司,蛋白质分子量标准购自上海生物工

收稿日期: 2007-12-03

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究发展规划(2006CB101804);国家自然科学基金(30671605);集美大学创新团队基金资助项目(2006A001)

作者简介: 姚翠鸾(1971-),女,福建安溪人,博士,副教授,从事分子生物学与生物化学的研究。E-mail: clyao@jum.edu.cn

通讯作者: 王志勇, Tel: 0592-6183816; E-mail: zywang@jmu.edu.cn

程有限公司,其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 精氨酸激酶的分纯化

**粗酶的制备** 取 10 g 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  贮存的新鲜凡纳滨对虾肌肉,高速组织捣碎机  $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  匀浆 5 min,加入 40 mL 预冷的缓冲液 A ( $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  巯基乙醇,  $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  叠氮化钠,  $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  苯甲基磺酰氟(PMSF), pH 8.0),搅拌均匀,把悬液放置于预冷的离心管中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\ 000\times\text{g}$  离心 20 min 后保存上清。

**CM-纤维素批量层析** 将粗酶液与采用缓冲液 B ( $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  巯基乙醇,  $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, pH 8.0) 预处理好的 CM-纤维素等体积混合,搅拌均匀,在冰浴条件下进行层析 20 min。  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\ 000\times\text{g}$  离心 20 min,收集具有酶活力的上清液。

**Sephadex G-100 凝胶过滤纯化** CM-批量层析的活性成分上预先用缓冲液 B 平衡好的 Sephadex G-100 层析柱,上样(1 mL)后采用相同缓冲液以  $0.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  的速度洗脱,每管收集 1.5 mL,紫外检测器 A280 检测,收集活力峰。具有酶活力的洗脱液采用 CM 纤维素进行批量层析,方法同上。

**DEAE-纤维素柱层析** SephadexG-100 凝胶过滤的具有酶活力收集液上预先用缓冲液 B 平衡好的 DEAE-纤维素层析柱,上样 2 mL 后用含  $0.1\sim 1.0\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 的缓冲液 A 梯度洗脱,分步收集,检测  $A_{280}$  吸光值和酶活力,收集具有酶活力的洗脱液。

### 1.4 蛋白浓度测定

总蛋白浓度的测定采用 Bradford 方法<sup>[13]</sup>,用牛血清白蛋白作为标准。

### 1.5 酶活力测定

酶活力的测定参考 Chen 等<sup>[14]</sup>的方法,稍作改进如下:取 1.45 mL 反应缓冲液,加入酶液  $50\ \mu\text{L}$ ,在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 1 min 后,加入 2.5% TCA  $1250\ \mu\text{L}$  终止反应,沸水浴 1 min,冰浴 1 min,室温平衡 5 min 使其恢复至室温,在反应液中加入 PDR 2  $250\ \mu\text{L}$ ,室温放置 3 min 后测定 700 nm 处的吸光度。然后由标准曲线计算酶的活性。空白以缓冲液代替酶液。

酶活的定义:在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应,每毫升酶液每分钟产生 1 mg 无机磷为一个酶活力单位(U)。

### 1.6 纯度鉴定及分子量测定

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),参考 Laemmli 方法<sup>[15]</sup>。

### 1.7 酶的热稳定性研究

将纯酶液与适量酶活力测定缓冲液混合,分别在 25, 35, 45, 55, 65, 75 和  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 60 min 后,立即置于冰浴中冷却,在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  用上述同样方法测定酶活力。

### 1.8 酶的 pH 稳定性测定

将纯酶液与适量 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的缓冲液混合,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  测定酶活力,用上述同样方法检测不同 pH 值对酶活力的影响。

### 1.9 底物类似物对酶活力的影响

分别在缓冲液中加入精氨酸、精胺及氨基胍至终浓度分别为  $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  及  $200\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。测定其对酶活力的影响。

### 1.10 金属离子对酶活力的影响

在反应缓冲液中加入氯化钠,氯化钾,氯化锌,硫酸铜,氯化锰,氯化钙,氯化镁,至终浓度分别为  $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  及  $200\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,测定酶活力。

## 2 结果

### 2.1 精氨酸激酶的分纯化

按照上述纯化步骤,经过 CM-纤维素批量层析、SephadexG-100 柱层析、DEAE-纤维素柱层析等步骤,从 10 g 凡纳滨对虾肌肉组织中分离得到 1.2 mg 精氨酸激酶。各步纯化结果见表 1。

表 1 从凡纳滨对虾肌肉组织中纯化精氨酸激酶的结果  
Tab. 1 Purification of arginine kinase from the muscle of shrimp *L. vannamei*

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 ( $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$ )	比活力 ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	纯化倍数 (倍数)
粗提液	175.0	95.2	0.54	1.00
CM-纤维素批量层析	70.0	43.0	0.61	1.13
SephadexG-100 柱层析	2.4	3.9	1.63	3.01
DEAE-纤维素柱层析	1.2	2.9	2.42	4.48

CM-纤维素批量层析 CM-纤维素批量层析可以有效地吸附粗酶液中部分蛋白质,离心后大部分精氨酸激酶保留在上清液中而得到部分纯化。

Sephadex-G100 柱层析 精氨酸激酶活力

部分从 Sephadex-G100 层析柱洗脱曲线见图 1, 通过分子筛分离, 去除了 2 个杂蛋白峰; 收集液经过 CM 批量层析, 去除了部分杂蛋白, 同时对样品也起到了富集与浓缩效应。

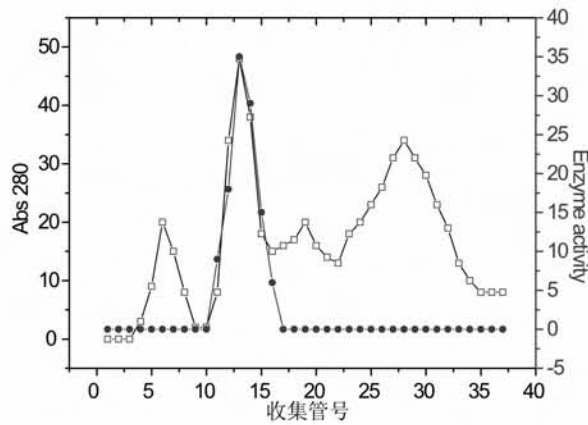


图 1 精氨酸激酶 SephadexG-100 分子筛柱层析洗脱曲线

—□— 洗脱液在 280 nm 下的吸收, —●— 酶活力

Fig. 1 SephadexG-100 chromatography elution profile of arginine kinase.

—□— Abs at 280nm, —●— Enzyme activity

DEAE-纤维素柱层析 洗脱图谱显示有 2 个主要的蛋白质峰被洗脱下来, 其中 18~22 号收集液具有精氨酸激酶活性, 见图 2。

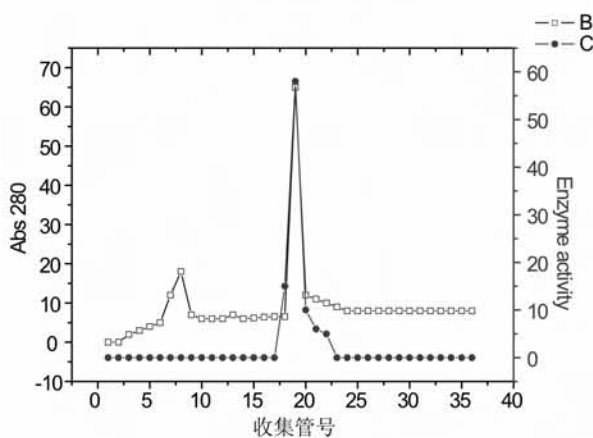


图 2 精氨酸激酶 DEAE-纤维素离子交换层析洗脱曲线

—□— 洗脱液在 280 nm 下的吸收, —●— 酶活力

Fig. 2 DEAE-cellulose chromatography elution profile of arginine kinase.

—□— Abs at 280nm, —●— Enzyme activity

## 2.2 酶的纯度鉴定及分子量测定

纯化后的目的蛋白在 SDS-PAGE 上呈现单一条带, 分子量约为 40 ku(图 3)。

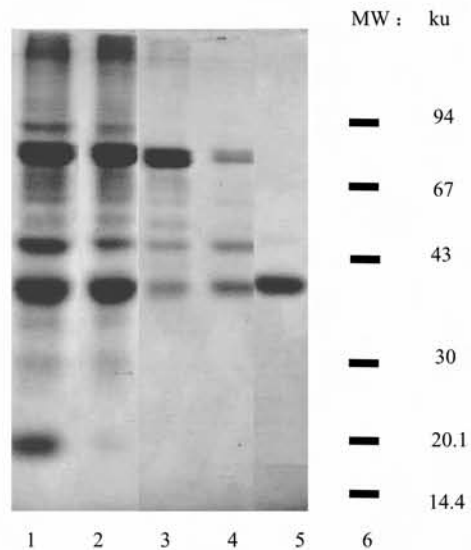


图 3 纯化后的精氨酸激酶聚丙烯酰胺

凝胶电泳分析, 凝胶浓度 10%

1. 粗酶液; 2. CM 纤维素批量层析后的酶液; 3. SephadexG100 柱层析后的酶液; 4. CM 纤维素批量层析后的酶液; 5. DEAE-纤维素柱层析后的酶液; 6. 低分子量蛋白质标准

Fig. 3 Purification and determination of molecular weight of arginine kinase with SDS-PAGE.

Electrophoresis was carried out using 10% polyacrylamide gel; lane

1. crude extracts; 2. enzyme solution after CM-cellulose treatment; 3. enzyme solution after SephadexG-100 chromatography; 4. enzyme solution after CM-cellulose treatment; 5. SDS-PAGE of DEAE-cellulose elution column of arginine kinase activity; 6. molecular mass makers (in kilodaltons); molecular standard

## 2.3 酶的热稳定性

纯酶经 25、35、45、55、65、75、85 °C 温度分别处理 60 min 后, 在 25 °C 下测定其残余活力, 结果表明, 精氨酸激酶在 25~55 °C 下酶活力稳定, 随着温度的升高酶活力也逐渐升高, 但是当温度高于 55 °C 后, 酶活力即呈现出下降趋势, 当温度超过 75 °C 后, 酶活力基本丧失(图 4)。

## 2.4 酶的 pH 稳定性测定

纯酶经 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的缓冲液处理后, 活性测定结果表明, 精氨酸激酶在 pH 值为 6~8 时比较稳定, 当 pH 低于 6.0 或高于 9.0 后, 酶活力明显降低(图 5)。

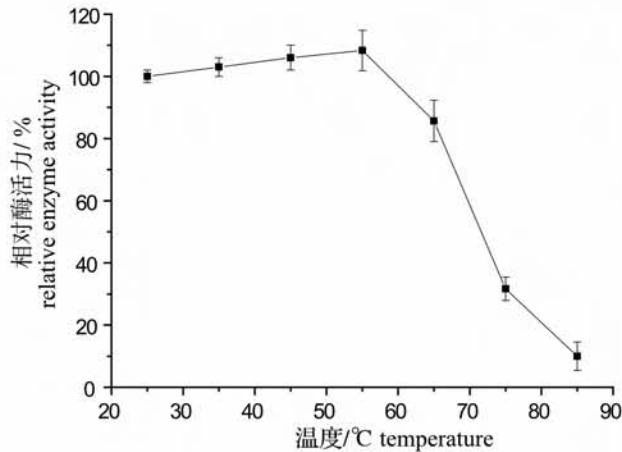


图4 温度对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of different temperature on the thermal stability of arginine kinase. (in 60 min)

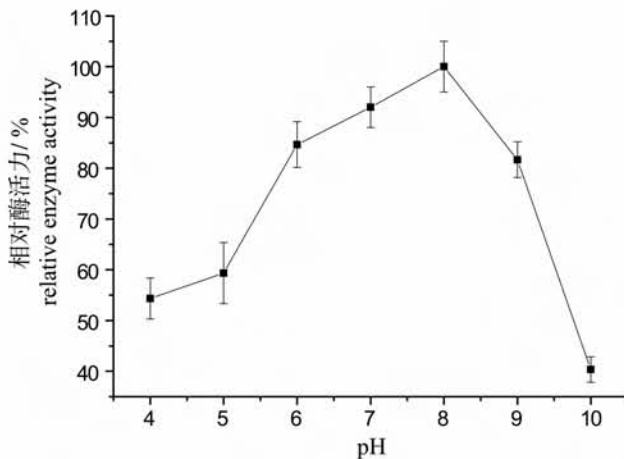


图5 pH对酶活力的影响

Fig. 5 The pH optima for arginine kinase activity

## 2.5 底物类似物对酶活力的影响

在反应缓冲液中加入不同浓度的精氨酸、精胺或氨基胍后,结果表明:添加少量的精氨酸会提

高酶的活力,但是当精氨酸浓度大于  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  后,酶活力明显下降;精胺在低浓度时就对酶活力具有强烈的抑制作用,氨基胍对酶活力具有抑制作用,但是这种抑制作用与氨基胍的浓度无明显相关性(图6)。

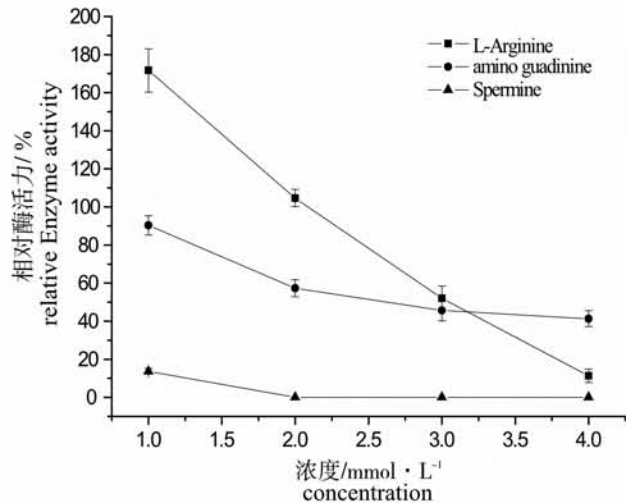


图6 底物类似物对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of substrate analogs on arginine kinase activity

## 2.6 金属离子对酶活力的影响

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  对酶的活力均有激活作用,但是这种激活作用随着离子浓度的升高表现出降低趋势。在反应缓冲液中分别加入  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , 至终浓度为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  及  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 测定酶活力。 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Mg}^{2+}$  对酶活力表现出激活作用,而  $\text{Cu}^{2+}$  与  $\text{Mn}^{2+}$  则表现出完全的抑制,  $\text{Ca}^{2+}$  与  $\text{Zn}^{2+}$  在低浓度时对酶活力无明显影响,但是随着浓度升高,对酶具有抑制作用。

表2 不同金属离子对精氨酸激酶活力的影响

Tab. 2 Effect of different metal ion on arginine kinase activity

离子浓度 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ion concentration	相对酶活力 relative enzyme activity						
	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$
10	$169 \pm 12$	$173 \pm 12$	$93 \pm 10$	$179 \pm 15$	$5 \pm 2$	$82 \pm 6$	$5 \pm 2$
50	$159 \pm 13$	$147 \pm 11$	$46 \pm 5$	$92 \pm 9$	0	$58 \pm 4$	0
100	$134 \pm 10$	$124 \pm 12$	$18 \pm 2$	$80 \pm 5$	0	$31 \pm 4$	0
200	$112 \pm 12$	$77 \pm 9$	$4 \pm 2$	$25 \pm 3$	0	$8 \pm 2$	0

### 3 讨论

精氨酸激酶在调节对虾能量代谢过程中具有重要作用,是对虾肌肉组织中表达量较高的一种激酶<sup>[1]</sup>,同时,它也是甲壳动物体内最重要的致敏源之一,因此,对它进行研究具有重要意义<sup>[16]</sup>。Yao等<sup>[2]</sup>曾克隆得到了中国明对虾的精氨酸激酶基因,经与其它对虾该酶序列比较发现其较为保守,根据核苷酸序列推测的分子量为40 ku;本实验采用离子交换结合分子筛凝胶层析的方法从10 g凡纳滨对虾的肌肉组织中分离得到1.2 mg精氨酸激酶,经过SDS-PAGE凝胶电泳检测,表现为分子量40 ku的单体,与上述实验结果相一致。这也提示天然状态的精氨酸激酶未存在能够引起分子量明显变化的翻译后修饰。

迄今为止,有关学者已从几种甲壳动物的肌肉组织中分离到了它们的精氨酸激酶,但是对分离到的精氨酸激酶主要集中在对其结构和构象变化的研究,对其性质的研究还尚未见到报道<sup>[9-11, 14]</sup>。本研究首次报道了凡纳滨对虾肌肉组织中的精氨酸激酶的性质,结果表明凡纳滨对虾中该酶对温度的耐受性较高,在pH 6.0~8.0时比较稳定,与从褐对虾中分离到的该酶的特性一致,提示不同虾类该酶对温度及pH的稳定性相似。

精氨酸作为机体代谢过程的重要产物和精氨酸激酶的底物,对精氨酸激酶活性是否有调节作用以及其结构类似物对精氨酸激酶的活性影响均尚见报道。本实验表明,精氨酸作为反应底物,在低浓度(10 mmol·L<sup>-1</sup>)时可以增加酶的活力,但高浓度时则对酶活产生抑制作用,提示该酶的活性受到底物浓度的反馈调节。精胺及氨基胍作为底物精氨酸的类似物,在低浓度时也表现出对酶活性明显的抑制,推测这种抑制可能是由于和底物的竞争引起的,提示精氨酸类似物可以抑制该酶的活力;精胺在结构上比氨基胍更接近精氨酸,其对精氨酸激酶的抑制也比氨基胍更加强烈,这种抑制作用的相对专一性说明该酶对底物的结合与催化作用可能是通过酶特定的结构域识别精氨酸的胍基实现的,这些结果为深入了解精氨酸激酶的催化机制提供了有价值的参考资料。

酶在催化反应过程中会受到许多因素的影响,其中,金属离子是影响酶催化反应动力学的重

要因素之一。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>是多种酶的激活剂,它们也表现出对精氨酸激酶的激活作用,但是这种激活作用随着离子浓度的升高表现出降低趋势。Mg<sup>2+</sup>是精氨酸激酶的酶促反应所必需的,10 mmol·L<sup>-1</sup>的Mg<sup>2+</sup>对酶活力表现出激活作用,提示在反应体系中加入低浓度的Mg<sup>2+</sup>是必需的,这与Li等<sup>[17]</sup>对蝗虫中精氨酸激酶的研究结果一致。而Cu<sup>2+</sup>与Mn<sup>2+</sup>则表现出完全的抑制。Ca<sup>2+</sup>与Zn<sup>2+</sup>是复杂水环境中的常见离子,在低浓度时对酶活力无明显影响,可能是对虾机体的复杂调控机制对外界环境的适应,但是随着浓度升高,对酶具有抑制作用。本研究为深入了解对虾体内精氨酸激酶活性的调控奠定了一定基础,但是金属离子对酶活性的影响较为复杂,不同酶对不同金属离子的敏感性差异较大,其详细机理还有待于进一步探讨。精氨酸激酶在对虾能量调控中具有的重要作用,并与对虾的免疫反应相关,对精氨酸激酶及其活性调控的深入了解,将对对虾的高健康养殖提供有用的参考。

#### 参考文献:

- [1] Ellington W R. Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other muscle phosphagens [J]. J Exp Biol, 1989, 143: 177-194.
- [2] Yao C L, Wu C G, Xiang J H, et al. Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 19(4): 317-329.
- [3] Astrofsky K M, Roux M M, Klimpel K R, et al. Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) [J]. Arch Virol, 2002, 147(9): 1799-1812.
- [4] Wang B, Li F, Dong B, et al. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray [J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(5): 491-500.
- [5] Kinsey S T, Lee B C. The effects of rapid salinity change on in vivo arginine kinase flux in the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. Comp Biochem Physiol B, 2003, 135(3): 521-531.
- [6] Abe H, Hirai S, Okada S. Metabolic responses and

- arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2007, 146 (1): 40–46.
- [7] Silvestre F, Dierick J F, Dumont V, *et al* . Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium [J]. *Aquatic Toxicol*, 2006, 76(1): 46–58.
- [8] Morris S, van Aardt W J, Ahern M D. The effect of lead on the metabolic and energetic status of the Yabby, *Cherax destructor* , during environmental hypoxia [J]. *Aquat Toxicol*, 2005, 75(1): 16–31.
- [9] France R M, Sellers D S, Grossman S H. Purification, characterization, and hydrodynamic properties of arginine kinase from gulf shrimp (*Penaeus aztecus* ) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 345(1): 73–78.
- [10] Yu Z, Gao D, Pan J, *et al* . Activity and structure changes of arginine kinase from shrimp *Fenneropenaeus chinensis* muscle in trifluoroethanol solutions [J]. *Tsinghua Science Technol*, 2003, 8 (4): 460–465.
- [11] Pan J C, Yu Z H, Hui E F, *et al* . Conformational change and inactivation of arginine kinase from shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in oxidized dithiothreitol solutions [J]. *Biochem Cell Biol*, 2004, 82(3): 361–367.
- [12] Tang H H, Yang Y M, Zhang S E. Effects of aspartic acid and potassium chloride on arginine kinase from shrimp [J]. *Int J Biol Macromol*, 2006, 40(1): 15–21.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248–254.
- [14] Chen B, Guo Q, Guo Z, *et al* . Improved activity assay method for arginine kinase based on a ternary heteropolyacid system [J]. *Tsinghua Science and Technology*, 2003, 8 (4): 422–427.
- [15] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the head of bacteriophage T<sub>4</sub> [J]. *Nature*, 1970, 227, 680–685.
- [16] 姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物精氨酸激酶的结构与功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24(3):203–208
- [17] Li M, Wang X Y, Bai J G. Purification and characterization of arginine kinase from locust [J]. *Pept Lett*, 2006, 13(4): 405–410.

## Purification and partial characterization of arginine kinase from muscle tissue of shrimp, *Litopenaeus vannamei*

YAO Cui-luan<sup>1</sup>, WANG Zhi-yong<sup>1</sup>, ZHANG Rui-ying<sup>2</sup>, HAN Xue-zhe<sup>3</sup>,  
ZHANG Zi-jian<sup>2</sup>, KONG Peng<sup>2</sup>, JI Pei-feng<sup>1</sup>, HUANG Shan-shan<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety of Fujian Province University, Institute of Fisheries Biotechnology, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China;

3. Science Press, Beijing 100717, China)

**Abstract:** The arginine kinase was purified from muscle tissue of the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. The crude extract was treated with CM-cellulose in a batch procedure. Fractionation of arginine kinase was performed by SephadexG-100 chromatography and followed by DEAE-cellulose 32 ion-exchange chromatography. The molecular weight was approximately 40 ku as judged by SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis. The enzyme remained stable at 25 – 55 °C within 60 min and inactivated at higher temperature (65 °C). The activity of purified shrimp arginine kinase was remained stable in the range of pH 6.0 – 8.0. Treated with 10 mmol · L<sup>-1</sup> arginine, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, the enzyme activity significantly increased. However, the enzyme activity was obviously inhibited by its substrate analogs such as spermine, amino guanidine, CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; arginine kinase; purification; characterization