

三疣梭子蟹肌肉乳化病的同工酶病理变化研究

陈寅儿, 王国良, 金 珊, 李 政

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(PAGE), 对患有肌肉乳化病的三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 3种组织中10种同工酶及肌浆蛋白的酶谱表型进行分析, 并就患病后酶谱变化特征及原因进行了讨论。证实在部分组织中, 除SOD酶外9种酶及肌浆蛋白的酶带均出现明显的紊乱现象, 表明病蟹的病理机制极可能与代谢异常有关, 其特异性变化可以作为疾病早期诊断及病理分析的生化辅助指标。

关键词: 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*); 肌肉乳化病; 同工酶

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)05-0036-04

肌肉乳化病是近年来三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)养殖业中新出现的一种流行病, 该病具有感染速度快、流行面广、死亡率高等特点, 危害十分严重^[1]。已有学者对该病的病原^[2]、流行情况及防治措施^[1]进行初步的研究, 但在同工酶病理变化方面, 还未见报道。作者研究了患乳化病后梭子蟹的10种同工酶及肌浆蛋白的病理变化, 旨在为深入探讨肌肉乳化病的病理机制及开展诊断防治工作积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用健康及患病梭子蟹于2003年10月取自浙江舟山, 平均体质量为0.08~0.12 kg。每只蟹经形态学测量鉴定后, 分别取肌肉、肝胰腺和心脏组织用双蒸水冲洗干净, 滤纸吸干水分。各称取0.4 g冰浴研磨。匀浆液抽提, 4℃下13 000 r/min离心30 min。移取上清液, 分装至0.5 mL大号离心管, 保存于-71℃超低温冰箱中, 病蟹与健康蟹的组织取样均取6只以上蟹混合使用。

1.2 电泳与染色方法

采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。经筛选确定以下条件: 分离胶凝胶度7.5%, 交联度为4.76%; 浓缩胶凝胶度3.125%, 交联度为20%。电极缓冲液为Tris-Gly系统。点样量25 μL, 加样时加等体积的溴酚蓝指示剂。采用北京六一厂稳流稳压电泳仪, 稳压电泳。电泳后染色, 染色的方法采用改良后的李思发的方法^[3]。电泳结果用上海福日MN生物凝胶成像系统扫描保存。所分析的组织分别取自在肌肉乳化病中损害最为严重的肌肉、肝胰

腺和心脏。

2 结果

2.1 同工酶的筛选

本实验运用聚丙烯酰胺凝胶电泳共筛选出具有清晰图谱的下列10种同工酶进行同工酶病理分析: 过氧化氢酶(CAT, E.C. 1.11.1.6)、酸性磷酸酶(ACP, E.C. 3.1.3.2)、碱性磷酸酶(AKP, E.C. 3.1.3.1)、酯酶(EST, E.C.3.1.1.1)、α-淀粉酶(a-AMY, E.C.3.1.1.1)、苹果酸脱氢酶(MDH, E.C. 1.1.1.37)、苹果酸酶(ME, E.C. 1.1.1.40)、谷氨酸脱氢酶(GDH, E.C.1.4.1.2)、超氧化物歧化酶(SOD, E.C. 1.15.1.1)、三磷酸腺苷酶(ATP, E.C.2.7.4.3)。

2.2 同工酶病理分析

ACP单体或者二聚体酶, 患病与健康梭子蟹的差异为: 病蟹肌肉和心脏组织中ACP-1酶带活性异常增高。而肝胰腺组织中ACP-2酶带活性相对增高(图1-1)。

AKP单体或者二聚体酶, 患病与健康梭子蟹的差异出现在肝胰腺和心脏两种组织中。病蟹肝胰腺中AKP-1活性增强, 且增加了AKP-2酶带表达, 心脏中AKP-2失活。肌肉组织中AKP酶的表达无显著差异, 均为1条酶带(图1-2)。

收稿日期: 2005-01-04; 修回日期: 2008-01-25

基金项目: 浙江省科技厅项目(2003C32032); 浙江省自然科学基金项目(302440)

作者简介: 陈寅儿(1979-), 女, 浙江宁波人, 实验师, 硕士, E-mail: chenyingner@nbu.edu.cn

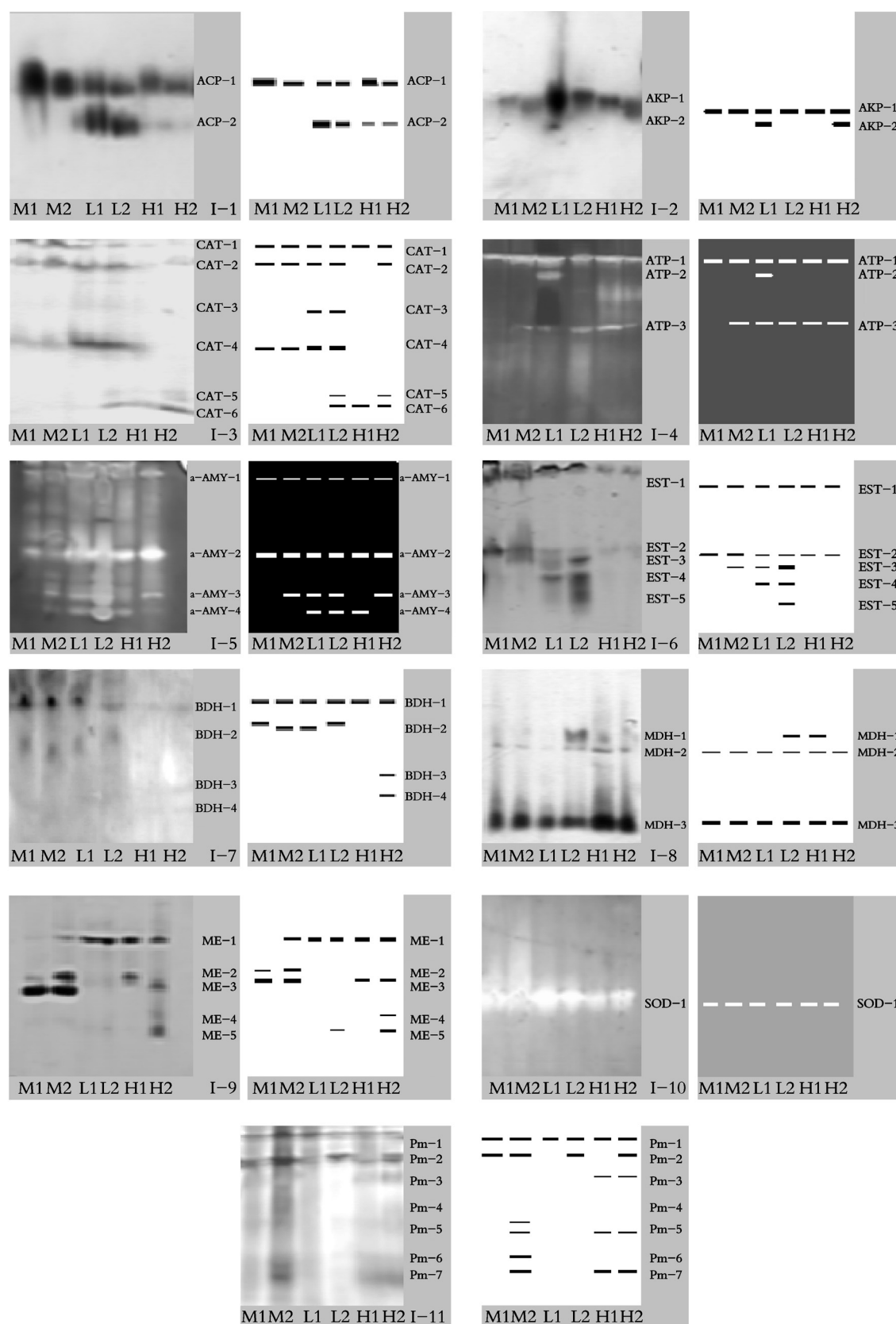


图1 健康梭子蟹与患病梭子蟹部分组织同工酶的图谱对比
Fig.1 Electrophoretograms of heathy and disease *Portunus trituberculatu*
M. 肌肉; L.肝脏; H.心脏; 1.患病蟹; 2.健康蟹
M.muscle; L.liver; H.heart; 1.diseased crabs; 2.healthy ones

CAT 四聚体酶,患病与健康梭子蟹的差异表现为肝胰腺及心脏组织部分酶带失活。患病后肝胰腺中 CAT-5、CAT-6 两条酶带失活;心脏中 CAT-2、CAT-5 两条酶带失活。肌肉组织中 CAT 酶的表达无显著差异,均为 3 条酶带(图 1-3)。

ATP 单体酶,患病与健康梭子蟹的差异出现在肌肉和肝胰腺两种组织中。病蟹肌肉中 ATP-3 酶带失活,肝胰腺中有特异性酶带 ATP-2 出现。心脏组织中 ATP 酶的表达无显著差异,均为 2 条酶带(图 1-4)。

a-AMY 患病与健康梭子蟹的差异出现在肌肉和心脏组织中。病蟹肌肉中 a-AMY-2 酶带活性增强,同时 a-AMY-3 酶带失活。心脏组织 a-AMY-3 缺少,同时增加了 a-AMY-4 酶带的表达,亦有可能是 a-AMY-3 酶带的迁移率改变而导致。肝胰腺中 a-AMY 酶的表达无显著差异,均为 4 条酶带(图 1-5)。

EST 二聚体酶,患病与健康梭子蟹的差异出现在肌肉和肝胰腺两种组织中。病蟹肌肉中 EST-3 失活,肝胰腺 EST-5 失活。心脏组织中 EST 酶的表达无显著差异,均为 2 条酶带(图 1-6)。

GDH 四聚体酶,健康梭子蟹与患病梭子蟹 GDH 酶的差异仅出现在心脏组织中。病蟹心脏中 GDH-3 和 GDH-4 酶带失活。肌肉和肝胰腺组织中 GDH 酶的表达无显著差异,均为 2 条酶带(图 1-7)。

MDH 二聚体酶,患病与健康梭子蟹的差异出现在肝胰腺和心脏两种组织中:肝胰腺 MDH-1 基本失活,心脏中 MDH-1 酶带活性却异常增大。肌肉组织中 MDH 酶的表达无显著差异,均为 2 条酶带(图 1-8)。

ME 四聚体酶,患病与健康梭子蟹的差异在 3 种组织中均有体现:病蟹肌肉中 ME-1 失活,肝胰腺中 ME-5 失活,而心脏中 ME-4 与 ME-5 均失活(图 1-9)。

SOD 二聚体酶,3 种组织中 SOD 酶基本表达正常,无显著病理差异,均为 1 条酶带(图 1-10)。

Pm 患病与健康梭子蟹的差异在 3 种组织中均有表达:病蟹肌肉中 Pm-4,Pm-5 ,Pm-6 ,Pm-7 失活,肝胰腺与心脏中 Pm-2 均失活(图 1-11)。

3 讨论

3.1 同工酶与肌浆蛋白作为乳化病病理指标的依据

同工酶技术作为一种生化指标,已被广泛运用于水产动植物疾病研究工作中,如病原分析、病害预测、环境改良、病理分析、抗病苗种选育等各个方面。在病理分析中,由于同工酶的表达差异,可以直观地反映与酶相关的代谢途径的变化,因而同工酶的这种特异性变化可以作为病理分析及诊断

的一个生化辅助手段^[4]。肌浆蛋白,系一群小分子的蛋白质,每一区带代表着几种蛋白,是一个综合的生化指标^[5]。有关水产动物肌浆蛋白的研究,已有不少报道,主要集中在种质资源^[5-9]方面,在病理分析中少见报道。本研究中肌浆蛋白在 3 种组织中均差异显著,而且表达重复性高,是一种病程相关蛋白。因而可以考虑将肌浆蛋白的表达变化作为一项病理指标进行分析。

在本研究所检测的 10 种酶中,除 SOD 以外其余酶带均出现正常酶带消失的现象,产生这种情况的原因一方面可能是由病变直接导致酶失活,另一方面也可能是由于致病菌侵染,使部分组织机能下降,代谢功能降低,从而间接导致酶的活性减弱以至于不能在酶谱中显现。此外在 AKP 酶、ATP 酶及 MDH 酶中,也有疑似为病理性酶带的特异条带出现,可能是由致病菌对蟹体基因表达过程的影响以及对同工酶的诱导作用而造成。因此利用凝胶电泳技术检测同工酶的表达变化不仅可以作为疾病诊断的分析指标,但可以考虑将其作为衡量病变程度的参考依据。

3.2 肌肉乳化病的致病机制

本实验中共选用的 10 种同工酶及肌浆蛋白中,除 SOD 酶以外,其余酶类及肌浆蛋白的表达均在一种或多种组织中发现有显著差异(表 1),由于这

表 1 梭子蟹患病前后同工酶及肌浆蛋白的分析比较

Tab.1 Analysis of isozymes & Pm in 3 tissues between healthy and disease Portunus trituberculatus

同工酶及肌浆蛋白	不同组织		
	肌肉	肝胰腺	心脏
ACP 酸性磷酸酶	+	-	+
AKP 碱性磷酸酶	-	+	+
ATP 三磷酸腺苷酶	+	+	-
a-AMY a-淀粉酶	+	-	+
CAT 过氧化氢酶	-	+	+
EST 酯酶	+	+	-
GDH 谷氨酸脱氢酶	-	-	+
ME 苹果酸酶	+	+	+
MDH 苹果酸脱氢酶	-	+	+
SOD 超氧化物歧化酶	-	-	-
Pm 肌浆蛋白	+	+	+

注: +表示差异显著; -表示差异不显著

些酶的变化分别涉及到糖类、脂类、及蛋白质类物质的代谢,及酚类物质的氧化等多种代谢和循环途径,因而很难简单地将其致病机制归纳为由于一种或几种酶的失调所导致,而更可能是由于致病菌的侵入及大量增殖,严重干扰了以肝胰腺为主的靶器

官的正常代谢机能,破坏主要酶类的正常代谢,从而导致各器官组织的物质代谢下降或紊乱、功能失调和形态改变,使机体所需营养物质的正常代谢受阻,不能产生充足的能量供应,最终导致死亡。

生物体内 SOD 酶的变化常被作为衡量机体是否受到损伤的一个指标^[10]。在本研究中 SOD 酶的表达未有显著变化,这可能与 SOD 酶在梭子蟹中表达的酶带过少有关。

参考文献:

- [1] 金珊,李政,陈寅儿,等. 梭子蟹养殖中出现的一种新疾病[J].水产养殖,2003,24(6):24.
- [2] 许文军,徐汉祥,金海卫,等. 梭子蟹“乳化病”病原的研究[J]. 浙江海洋学报 2003, 3:209-213.
- [3] 李思发. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究[M].上海:上海科技出版社.1998.189-193.
- [4] 相建海. 海洋动物细胞和种群生化遗传学[M].山东:山东科学技术出版社,1999.55-68.
- [5] 王可玲,张培军,尹青. 东方鱼屯属鱼类肌浆蛋白的种间差异及其聚类分析[J].海洋与湖沼,1984,15(5):493-499.
- [6] Yamaoka K, Nishiyama M, Taniguchi N. Genetic divergencein Lizardfishes of the Genus Saurida from southern Japan[J]. *Japanese Journal of Ichthyology*, 1989,36(2):208~219.
- [7] 刘静,尤锋,李春生. 中国鲷属鱼类同工酶谱分析[J].海洋科学,1999,23(5):31~35.
- [8] 王可玲,尹青.舟山近海带鱼与小带鱼肌浆蛋白、乳酸脱氢酶同工酶和肝脂酶的变化[A].中国鱼类学会.鱼类学论文集(第三辑)[C].北京:科学出版社,1983.41-44.
- [9] 张海琪,李明珠,钟爱华. 大黄鱼肌浆蛋白和肝酯酶同工酶的电泳分析[J].东海海洋 2002,21(4): 41-45.
- [10] 陶保华,胡超群,任春华. 斑节对虾弧菌病的病理学研究[J].热带海洋学报.2001,20(3):47-52.

Analysis of the myogen and isozymes of the *Portunus trituberculatus* with emusification disease

CHEN Yin-er, WANG Guo-liang, JIN Shan, LI Zheng

(Life Science and Technology Falcuty, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Jan.,4,2005

Key words: *Portunus trituberculatus*; emusification disease; isozymes

Abstract: The myogen (Pm),and 10 kinds of Isozymes in the 3 kinds of tissue of healthy *Portunus trituberculatus* and of individuais with emusification disease were studied by polyacrylamide gel electrophoresis. The result showed that the electrophoretogram changed greatly in the emusification disease *Portunus trituberculatus* . Compared with the isozyme patterns of some tissues from healthy crabs ,those of diseased ones are different .It is considered that isozymes electrophoretogram can be used as a physiological as well as pathological index in the emusification disease.

(本文编辑: 刘珊珊)