

牙鲆不同组织中抗蛋白酶物质活性研究 *

STUDY ON THE ANTIPROTEASE ACTIVITIES IN DIFFERENT TISSUES OF *Paralichthys olivaceus*

王宏田 张培军

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071)

关键词 牙鲆, 抗蛋白酶, 活性

病原菌在侵袭宿主时, 往往要分泌一些胞外酶, 这些酶在感染过程中能够协助病原菌抗吞噬或进行扩散^[1]。Ingdis 等 1993 年认为, 一些海洋中生活的细菌在侵袭鱼体时, 同样能够分泌多种蛋白酶。实验表明, 这些侵袭性酶的活性能够被鱼体内一些抗蛋白酶活性物质所抑制。通过检测这些物质对于胰蛋白酶的抑制作用, 可以定量地测定这些抗蛋白酶物质的活性^[2]。本实验以 1 龄牙鲆为实验对象, 检测了牙鲆体表黏液、腮、血清中抗蛋白酶物质的分布和活性。

1 材料和方法

1.1 牙鲆的饲养

实验用牙鲆由中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室提供。实验前将 5 条 1 龄鱼在 2 m³ 的水体中饲养, 通气 换水。鱼平均体重 460±30 g。

1.2 血清的获取

用无菌注射器从牙鲆的尾动脉中抽取血液, 于 4℃ 冰箱中放置 24 h, 血细胞凝集并与血清分离, 收集上层血清, 于 4℃, 以 10 000 r/min 的速率离心 20 min, 取上清液, 于 -30℃ 保存待测。

1.3 体表黏液中抗蛋白酶物质粗提液的制备

用蒸馏水冲洗鱼体, 然后用干净的载玻片将体表黏液轻轻刮下, 防止体表损伤, 然后与生理盐水一起匀浆 (1 L/g, V/W), 匀浆液于 4℃, 以 10 000 r/min 的速率离心 20 min, 取上清液于 -30℃ 保存待测。

1.4 其他组织中抗蛋白酶物质粗提液的制备

解剖鱼体, 取出相应的鱼体组织, 与生理盐水混合匀浆 (2 L/g, V/W), 匀浆液于 4℃, 以 10 000 r/min 的速率离心 20 min, 取上清液于 -30℃ 保存待测。

1.5 抗蛋白酶物质活力的测定

抗蛋白酶活力通过抑制蛋白酶水解酪蛋白的能力来表示^[3], 具体操作如下: 将酪蛋白溶解于 pH 7.5,

浓度为 0.025 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS) 中制成 2% 的蛋白溶液, 将 0.8 ml 蛋白溶液与 0.1 ml PBS 混合, 于 37℃ 保温 10 min, 加入 0.1 ml 胰蛋白酶溶液, 于 37℃ 保温 30 min, 加热使酶失活, 然后加入 2 ml 考马斯亮蓝溶液, 30 min 后于 595 nm 测定吸光值。对照样品中, 将 0.8 ml 酪蛋白溶液与 0.1 ml PBS, 0.1 ml 胰蛋白酶溶液混合后, 不经保温, 直接加热使酶失活, 然后加入 2 ml 考马斯亮蓝溶液, 测定吸光值, 记录吸光值差值 ΔA 。测定酶粗提液中抗蛋白酶物质的活性时, 将 0.8 ml 酪蛋白溶液与 0.1 ml 酶粗提液, 0.1 ml 胰蛋白酶溶液混合, 用上述方法测定吸光值的差值 ΔA 。以每毫克酶粗提液蛋白每分钟使胰蛋白酶活力降低的数值, 表示抗蛋白酶活性物质的活力 (单位: unit/(min·mg))。进行吸光度测量时, 以磷酸缓冲液作空白对照。

1.6 粗提液中蛋白质含量的测定

考马斯亮蓝染色法 (据徐宜为 1979 报道)。

2 结果与讨论

实验结果表明, 牙鲆的腮、体表黏液、血清中抗蛋白酶物质的活性分别为 2.56 ± 0.79 , 6.81 ± 1.95 , $5.18 \pm 1.35 (\times 10^{-2} \text{ unit}/(\text{min} \cdot \text{mg}))$ 。

从上述实验结果可知, 在牙鲆的体表黏液、腮、血清中

(下转 68 页)

* 本课题由国家 973 计划项目“海水病原菌致病因子的研究” G1999003 资助。中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4378 号; 实验海洋生物学研究开放实验室研究报告第 272 号。

第一作者: 王宏田, 出生于 1970 年, 博士, 助理研究员。目前主要参与国家 973 计划课题“鱼类特异性免疫系统的研究”。E-mail: htw@yahoo.com

收稿日期: 2001-04-02; 修回日期: 2001-07-18

(上接 15 页)

清中分布有抑制胰蛋白酶活性的物质,不同的组织中这些物质的活性不完全相同。

不同的病原菌在侵袭宿主时,能够产生不同的胞外酶,发挥不同的生理功能,如溶血性链球菌产生的透明质酸酶能够分解结缔组织中的透明质酸,链激酶可以激活溶纤蛋白酶原使之成为纤维蛋白酶,使纤维蛋白凝块溶解;产气杆菌产生的胶原酶,能够分解结缔组织中的胶原组织。宿主体内分泌的抗蛋白酶活性物质能够中和病原菌所分泌的侵袭性酶,从而能够有效地避免或减轻一些疾病的发生。据 Ellis 1987 年报道,鱼体中分泌的抗蛋白酶活性物质包括 α - 巨球蛋白和非 α - 巨球蛋白物质,其中后者占虹鳟血清中抗蛋白酶活性物质的 91 %。本实验测定了抗蛋白酶物质对蛋白酶活性的抑制作用,可以了解不同组织中全部抗蛋白酶活性物质的活力,对于不同形式的抗蛋白酶物质的组成比例,需要其他实验进一步研究。

针对病原菌所分泌的不同的侵袭酶,鱼体所分泌的抗蛋白酶活性物质发挥着不同的作用。Sall 等 1993 年研究表明,大西洋鲑(Atlantic salmon)血清中的抗凝血酶能够抑制病原菌所分泌的凝血酶。大西洋鲑血清中另一种抗蛋白酶物质 α_2 - 抗纤溶酶能够减轻疗疮病的发生。Magnadottir 和 Gudmundsdottir 1992 年研究表明,被病原菌感染过的鱼体,鱼血清中蛋白质含量

增高,抗蛋白酶活性物质的增多可能是造成这一现象的原因之一。用不同的病原菌感染牙鲆,观察牙鲆血清中抗蛋白酶物质的变化,有助于理解牙鲆的抗感染机理。抗蛋白酶物质在牙鲆体表黏液、鳃、血清中的广泛分布,表明牙鲆具有较完善的免疫系统以抵抗环境中病原体的侵袭。Marsdan 1996 年在实验中发现,牙鲆的血清、体表黏液、鳃中能够检测出较高的溶菌酶活性,牙鲆体表组织中非特异性免疫因子的存在,有利于增强牙鲆对环境的适应性。以往的研究着重于海水鱼血清中抗蛋白酶物质的变化,今后的研究工作有必要进一步研究其他组织如鳃中抗蛋白酶物质对于牙鲆抗病能力的作用。

参考文献

- 1 张晓莉,李 鹰,韩美君.医学免疫学和微生物学.北京:军事医学科学出版社,1998.105~106
- 2 王宏田,张培军.重组酵母菌对牙鲆非特异性免疫能力的影响,海洋与湖沼,2000,31(6):631~635
- 3 王宏田,张培军.假雄牙鲆不同组织中溶菌酶比活性的研究,海洋科学,2000,24(10):7~8

辅助参考文献

Marsdan, M. J., L. C. Freeman, D. Cox, C. J. Secombes. Nonspecific immune responses in families of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exhibiting differential resistance for furunculosis, *Aquaculture*, 1996,146:1~16

(本文编辑:刘珊珊)