

# 患“抖抖病”中华绒螯蟹可溶性蛋白质 和同工酶分析\*

薛俊增

(杭州师范学院生物学系 杭州 310036)

**摘要:** 采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对正常的和患“抖抖病”的中华绒螯蟹几种组织中的可溶性蛋白质及乳酸脱氢酶、酯酶和过氧化物酶等同工酶进行了比较分析。结果表明,病蟹与健康蟹的蛋白质和三种同工酶分离图谱存在明显差异。

**关键词:** 中华绒螯蟹;抖抖病;可溶性蛋白质;同工酶

**中图分类号:** Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)02-17-05

## Analysis of the Soluble Proteins and Isozymes of the Chinese Mittenhanded Crabs with Shiver Disease

XUE Jun-Zeng

(Department of Biology, Hangzhou Teachers' College Hangzhou 310036)

**Abstract:** The soluble proteins, dehydrogenase (LDH), esterase (EST) and peroxidase (POD) isozymes, in the tissues of healthy mitten crabs *Eriocheir sinensis* and of individuals with shiver disease were studied by polyacrylamide gel electrophoresis. The result shows that the patterns of the soluble proteins, LDH, EST and POD isozymes, are different in these two groups.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; Shiver disease; Soluble protein; Isozymes

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)“抖抖病”(或称“颤抖病”)是近年危害养蟹业发展的主要病害,常引起河蟹大量死亡。关于“抖抖病”流行情况、病原体分析及防治的报道较多<sup>[1~10]</sup>,但至今未见有通过同工酶基因表达谱变化以分析“抖抖病”病原体对中华绒螯蟹代谢影响的报道。作者利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对病蟹的可溶性蛋白质(PROTEIN)及酯酶(EST)、乳酸脱氢酶(LDH)、过氧化物酶(POD)等同工酶进行了分析,初步探讨了“抖抖病”的发病机理,为“抖抖病”的防治提供理论依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料采集与样品制备 实验用健康蟹与

病蟹取自萧山市八工段河蟹养殖场,规格为每只体重 50 g 左右,活体剖取心脏、肝脏、肌肉、鳃、血淋巴等各 0.5 g,加入 1 ml 冷却样品提取液(Tris-Gly 缓冲液, pH 8.3),少量石英砂,冰浴研磨匀浆,经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入少量甘油及 0.1% 溴酚兰指示剂,置冰箱中备用。

**1.2 凝胶电泳** 采用 DYY-II 型垂直平板电泳槽,SCR-4 型恒流稳压电泳仪,参照文献[11]进行聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳。分离胶浓度为

\* 杭州市科技计划项目(No.99121B07);

作者简介 薛俊增,男,35岁,副教授,博士;研究方向:甲壳动物发育生物学。

收稿日期:2000-12-30,修回日期:2001-09-10

7%, 浓缩胶浓度为 3%, 电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸, 用时稀释 10 倍。蛋白质、EST、LDH 点样量为每孔 30  $\mu$ l, POD 点样量为每孔 50  $\mu$ l, 电泳采用稳流方式, 样品在浓缩胶中时电流为 20 mA, 进入分离胶后电流以调整为 30 mA, 电泳 4~5 h 结束。

**1.3 显色与记录** EST 染色按文献[12], LDH 染色和 POD 染色按文献[13], 放于 7% 醋酸中保存, 蛋白质染色按 Sambrook<sup>[14]</sup> 的方法, 经甲醇-醋酸脱色后于 15% 甘油中保存, 对着色后的凝胶片拍照记录, 并绘制模式图。

## 2 结果与讨论

**2.1 可溶性蛋白质** 病蟹与健康蟹的肝脏、心脏、鳃、肌肉和血淋巴等的可溶性蛋白质的电泳图谱(图 1)均有差异。

**肌肉:**健康蟹为 18 条谱带, 病蟹为 19 条谱带, 病蟹相对健康蟹新增加 1 条谱带, 比移值 ( $R_f$ ) 为 0.8, 此外, 病蟹  $R_f$  值为 0.51、0.57、0.74 的三条谱带比健康蟹相应位置上的三条谱带颜色淡一些。

**肝脏:**健康蟹具 11 条谱带, 病蟹具 9 条谱

带, 病蟹相对健康蟹缺少 2 条谱带,  $R_f$  值分别为 0.51、0.69。

**鳃:**病蟹相对健康蟹新增一条比移值为 0.11 的谱带。

**心脏:**健康蟹显示 12 条谱带, 病蟹显示 14 条谱带, 病蟹新增 2 条谱带,  $R_f$  值分别为 0.18、0.56。

**血淋巴:**健康蟹为 8 条谱带, 病蟹为 7 条谱带, 病蟹较健康蟹少一条  $R_f$  值为 0.01 的谱带。

蛋白质是生命的物质基础, 是构成细胞组织的重要成分之一, 它有构成新生组织, 修补组织及制造氧化还原所必需的酶和激素等生命基础物质的作用<sup>[8]</sup>。在对蟹的肝脏、肌肉等组织的可溶性蛋白质分离研究发现, 病蟹的肝脏、血淋巴均有正常谱带消失, 这可能是由于致病菌的侵入, 干扰了机体内蛋白质的生物合成, 从而导致生理活动必需蛋白质的缺失或减少, 同时, 致病菌的存在破坏了鳃、肌肉、心脏、血淋巴等的蛋白质代谢, 导致一些病理性蛋白质的产生, 在图谱中表现为一些蛋白质谱带的增多, 其中心脏谱带增加最多。这些病理性蛋白质的特性和生理作用还有待进一步研究。

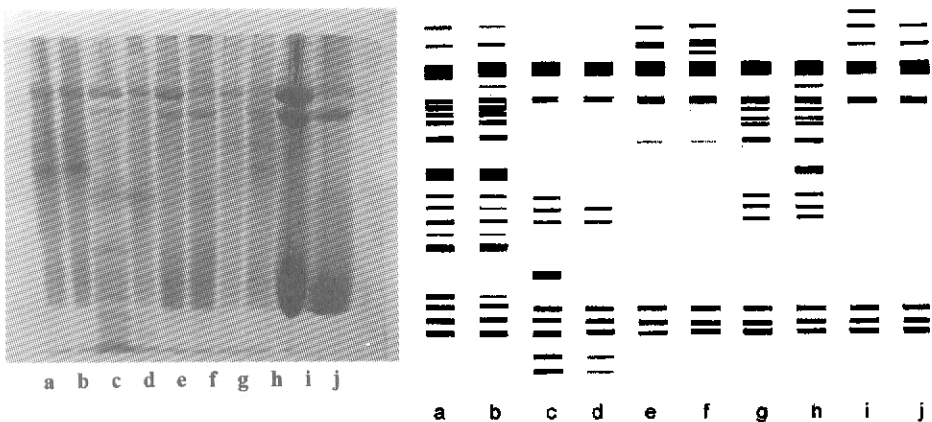


图 1 可溶性蛋白质电泳图谱

a, b: 肌肉 (muscle); c, d: 肝脏 (hepatopancreas); e, f: 鳃 (gill); g, h: 心脏 (heart); i, j: 血淋巴 (blood);  
a, c, e, g, i: 健康蟹 (normal crab); b, d, f, h, j: 病蟹 (crab with shiver disease)

**2.2 乳酸脱氢酶同工酶** 病蟹和健康蟹肝脏、鳃、心脏、肌肉、血淋巴等 5 种组织乳酸脱氢酶同工酶的电泳图谱(图 2)也存在明显差异。

**肌肉:**健康蟹有 2 条谱带, 病蟹为 1 条, 病

蟹与健康蟹相比缺少一条  $R_f$  为 0.02 的谱带。

**肝脏:**健康蟹有 3 条谱带, 病蟹有 2 条谱带, 病蟹缺少一条  $R_f$  值为 0.50 的谱带。

**鳃:**健康蟹表现 2 条谱带, 病蟹表现 1 条谱

带,病蟹较健康蟹少 1 条谱带 ( $R_f = 0.02$ )。而病蟹仅有的一条谱带也比健康蟹相应位置上的谱带窄一些,淡一些。

血淋巴:健康蟹显示 2 条谱带,病蟹显示 1 条谱带,健康蟹的 2 条谱带,比移值分别为 0.1、0.26,且谱带较宽,病蟹谱带比移值为 0.19,谱带较窄。

心脏:健康蟹为 2 条谱带,病蟹为 1 条谱带,病蟹的这条谱带虽与健康蟹第 2 条谱带位置相同, $R_f$  值均为 0.26,但谱带较宽,颜色较深。

乳酸脱氢酶主要是催化乳酸和丙酸的相互转化,伴随辅酶 NAD 的氧化还原,是糖代谢中必需的酶。正常情况下,蟹的肌肉、鳃、心脏活动较多,这几种组织糖的无氧代谢旺盛,因而 LDH 酶含量较多,酶活性较大。肝脏中 LDH 酶

较少,且不同于其它几种组织中的 LDH 酶,这可能与蟹类的肝脏主要是进行脂类代谢有关。在发病条件下,肌肉、肝脏、鳃中糖类的无氧代谢受阻,不能产生充足的能量供应。而心脏中,病蟹 LDH 酶活性比健康蟹 LDH 酶活性明显增强,病蟹心脏无氧代谢旺盛,这可能是病蟹心跳加快,心脏耗能增大的一种代偿性反应。血淋巴中,病蟹正常谱带消失,原因一方面可能是由于血淋巴是运输氧和营养物质的组织,它所含的 LDH 部分来源于肌肉、肝脏等器官,患病时,这些组织产生的酶活性减弱,从而造成血淋巴中 LDH 相应谱带消失;另一方面可能是由于血淋巴本身产生病变而导致正常酶的消失,并出现一种病理性 LDH 酶,因而图谱中显示一条特异谱带。

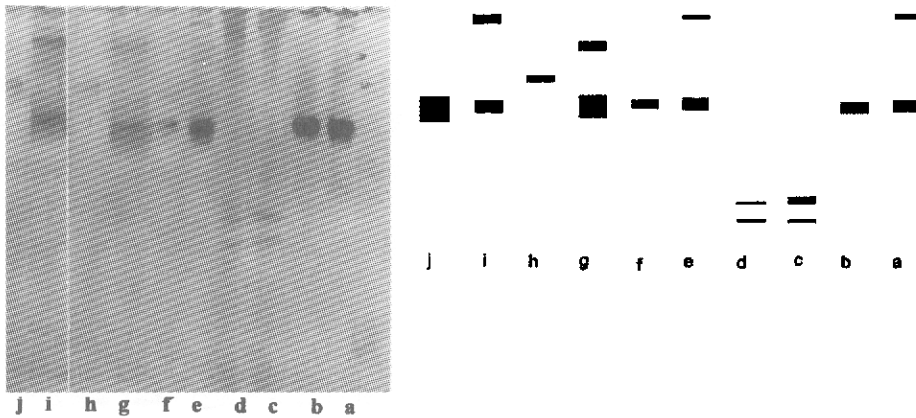


图 2 乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱

a, b: 肌肉 (muscle); c, d: 肝脏 (hepatopancreas); e, f: 鳃 (gill); g, h: 血淋巴 (blood); i, j: 心脏 (heart)  
a, c, e, g, i: 健康蟹 (normal crab); b, d, f, h, j: 病蟹 (crab with shiver disease)

**2.3 过氧化物酶同工酶** 病蟹与健康蟹肝脏、鳃、肌肉、血淋巴等 4 种组织的过氧化物酶同工酶电泳图谱(图 3)不同。

肌肉:健康蟹无明显谱带,病蟹出现一条颜色较深的谱带,比移值为 0.18。

肝脏:健康蟹为 6 条谱带,病蟹仅为 1 条谱带,而且,病蟹这条谱带 ( $R_f = 0.24$ ) 颜色较淡。

鳃:健康蟹与病蟹均只有一条谱带,比移值为 0.18,在颜色上,病蟹较深。

血淋巴:健康蟹与病蟹各有 5 条谱带, $R_f$  值相同,依次分别为 0.18、0.35、0.85、0.88、0.92,与健康蟹的谱带相比较,病蟹的第 1 条谱带相对较深,第 2、3、4、5 四条谱带相对较浅。

健康蟹的肝脏、血淋巴、POD 谱带较多,病蟹组织的过氧化物酶谱带减少,活性减弱,尤其以肝脏最为显著。由此表明“抖抖病”病原体很可能通过极大地削弱肝脏功能,使蟹体发生广泛病变。

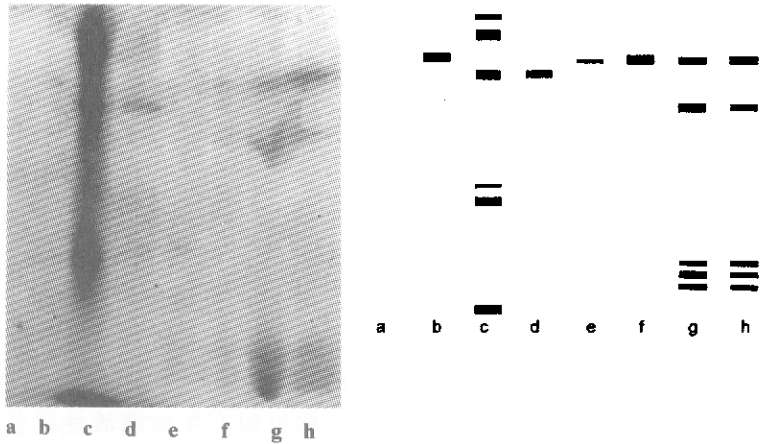


图3 过氧化物酶同工酶电泳图谱

a, b: 肌肉(muscle); c, d: 肝脏(hepatopancreas); e, f: 鳃(gill); g, h: 血淋巴(blood)  
a, c, e, g: 健康蟹(normal crab); b, d, f, h: 病蟹(crab with shiver disease)

2.4 酯酶同工酶 病蟹与健康蟹的肝脏、鳃、肌肉、血淋巴等4种组织酯酶电泳图谱(图4)亦各异。

血淋巴: 健康蟹表现12条谱带, 病蟹表现为8条谱带, 病蟹比健康蟹少4条较淡的谱带,  $R_f$ 值分别为0.69、0.76、0.86、0.89。

鳃: 健康蟹显示11条谱带, 病蟹显示13条谱带, 病蟹新增2条谱带,  $R_f$ 为0.23和0.51的两条谱带较健康蟹相同位置上的谱带宽一些、

浓一些。但另外两条谱带( $R_f$ 为0.89和0.91)却相应变淡。

肝脏: 健康蟹与病蟹虽均为9条谱带, 但二者谱带之间的位置存在差异, 颜色浓淡也不一, 主要表现为病蟹出现较浓一些的EST谱带。

肌肉: 健康蟹与病蟹均为8条谱带, 其中病蟹的第3条谱带( $R_f = 0.53$ )与健康蟹相比, 窄一些、淡一些。

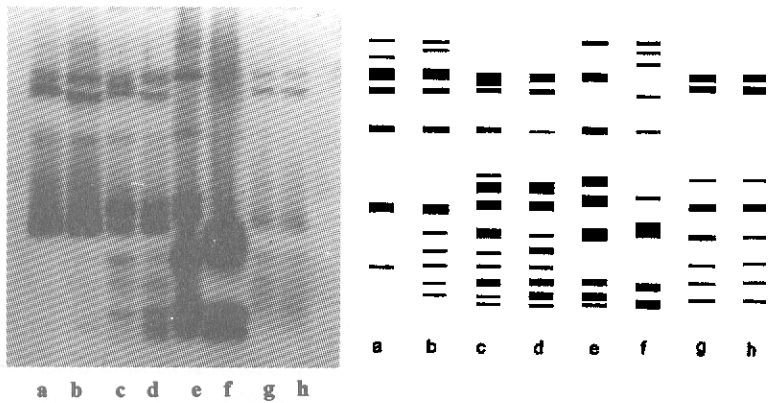


图4 酯酶同工酶电泳图谱

a, b: 血淋巴(blood); c, d: 鳃(gill); e, f: 肝脏(hepatopancreas); g, h: 肌肉(muscle)  
a, c, e, g: 病蟹(crab with shiver disease); b, d, f, h: 健康蟹(normal crab)

酯酶是催化酯类化合物水解的酶系, 它们能水解大量生理存在的酯类化合物包括一些药物, 因此认为有去毒作用。蟹的酯酶图谱较为

复杂, 各组织谱带颇多。病理时均出现或多或少的变化, 但比较而言, 肝脏在患病时EST谱带变化量大, 谱带加宽, 比移值改变, 酶活性加

强。肝脏是蟹类动物代谢的主要器官,因发病时,病蟹摄食减少或不摄食,故一方面病理性的饥饿诱发蟹肝脏酯酶活性增强,开始大量分解肝脏中储存的酯类以维护生命,另一方面肝脏酯酶的增加也可能是机体对病原侵袭的适应性免疫反应。

### 参 考 文 献

- [1] 陈辉,薛仁宇,贡成良. 中华绒螯蟹一种球状病毒颗粒的电镜观察. 中国水产科学, 1999, 6(3):114~115.
- [2] 何介华,贺路,曾令兵等. 中华绒螯蟹颤抖病病原的初步研究. 淡水渔业, 1999, 29(3):110~114.
- [3] 黄琪琰,朱选才. 河蟹颤抖病的防治. 中国水产, 2000 (1): 34~36.
- [4] 黄琪琰. 河蟹颤抖病的研究现状(上). 科学养鱼, 2000 (10):13~14.
- [5] 黄琪琰. 河蟹颤抖病的研究现状(下). 科学养鱼, 2000 (11):13.
- [6] 陆宏达,范丽萍,薛美. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学. 水产学报, 1999, 23(1):11~18.
- [7] 潘连德. 养殖河蟹“抖抖病”的病原检验与病理学初步研究. 水产科技情报, 1998, 25(6):273~277.
- [8] 沈锦玉,尹文林,钱冬等. 中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病原的研究. 中国水产科学, 2000, 7(3):89~92.
- [9] 魏泽能. 河蟹颤抖病的流行病学调查. 淡水渔业, 1999, 29(11):16~17.
- [10] 杨先乐,蔡完其. 中华绒螯蟹“抖抖病”流行情况初步调查. 水产科技情报, 1998, 25(6): 278~279.
- [11] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 武汉:武汉大学出版社, 1994. 298~299.
- [12] 张志良,吴光耀. 植物生物化学技术和方法. 北京:农业出版社, 1986. 92~95.
- [13] 李健吾,尚能彪,余瑞元等. 生物化学实验原理和方法. 北京:北京大学出版社, 1994. 335~358.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T(金冬雁,黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 北京:科学出版社, 1995. 885.