

正常与感染粘孢子虫鲫鱼主要组织 可溶性蛋白质电泳比较

徐欣 彭永康*

(天津师范大学生物学系 天津 300074)

摘要: 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对正常和感染粘孢子虫的鲫鱼动脉球、肝脏、鳃、脑、肠、肌肉、眼、鳍 8 种组织可溶性蛋白质进行分析比较。结果表明:病鱼的动脉球、肝脏、鳃、脑、肠 5 种组织的蛋白质电泳谱带与正常鱼相比有较大变化,动脉球缺失 1 条谱带同时又诱导出 1 条新谱带;肝脏有 9 条谱带缺失;鳃有 2 条谱带缺失的同时诱导出 3 条新谱带;脑中新增 3 条谱带;肠中有 5 条谱带缺失同时产生 3 条新谱带。这些变化可作为辅助疾病诊断的生化指标,为从生化水平上揭示该病的致病机理及开展有效的早期防治研究奠定基础。

关键词: 鲫鱼;粘孢子虫;蛋白质;SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: R38 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)06-19-05

Soluble Proteins in Major Tissues of Normal and Myxosporean-infected Crucian Carp

XU Xin PENG Yong-Kang

(Department of Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China)

Abstract: Eight kinds of tissue soluble proteins of normal and Myxosporean-infected *C. auratus* var. *penzesis* were analyzed by SDS-polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that the electrophoretic protein bands of artery-ball, liver, gill, brain and intestine of diseased Crucian Carp were different from those of normal ones, with one band disappearing and one new band present in artery-ball; nine bands disappearing in the liver; two bands disappearing and two new bands present in the gill; three new bands present in the brain; five bands disappearing and three new bands present in the intestine. The results indicate that the protein metabolism changes greatly after infection by Myxosporean. The protein changes may be considered as a biochemical diagnosis index and the basis for the study of the pathogenic mechanism as well as for the early prevention of the disease.

Key words: *C. auratus* var. *penzesis*; Myxosporean; Soluble protein; SDS-PAGE

粘孢子虫 (Myxosporean) 属于粘体门 (Protozoa)、孢子虫纲 (Sporozoa), 是一类内部结构复杂, 专营寄生生活的微小生物, 呈世界性分布。它们是水生冷血动物特别是鱼类的专有寄生虫, 在我国淡水鱼中寄生的粘孢子虫就有 600 余种。由于其交替进行无性和有性生殖,

致使在合适的条件下数量激增^[1], 可在鱼的体

* 通讯作者, E-mail: Peng-YK@eyou.com;

第一作者介绍 徐欣, 女, 35 岁, 硕士研究生, 营口水产研究所工程师; 主要从事水产病害及药物研究。

收稿日期: 2002-12-31, 修回日期: 2003-09-10

表或内脏形成许多大小不一的孢囊,严重时可导致鱼类的大量死亡或鱼体畸形而失去应有的商业价值。

目前对该病的研究主要集中在粘孢子虫的生活史上,但迄今为止还没有一个为广大学者所普遍接受的生活史模式,粘孢子虫生活史中的许多环节尚未弄清^[2]。从19世纪 Gulge 首次发现粘孢子虫到现在,粘孢子虫还不能在实验室条件下进行人工感染而获得成功,也未见人工体外培养获得成功的报道,对弄清病原粘孢子虫,粘孢子虫病病理、诊断、防治及药物筛选造成极大不利^[1]。

粘孢子虫几乎能感染所有的养殖鱼类,只是程度有所差别。徐海圣等报道鲫鱼可感染31种粘孢子虫,认为鲫鱼作为一种古老的鱼类,在漫长的进化过程中,粘孢子虫与其经常接触,逐步建立了稳定平衡的寄生虫-寄主关系,并对感染此病的异育银鲫进行了研究,发现其各组织器官均可寄生粘孢子虫^[3]。

由于粘孢子虫成熟孢子具一层很厚的几丁质壳片,有很强的抗药性,目前还无有效药物可杀死鱼体内的成熟孢子^[4],所以对该病的预防成为关键,及时、准确地诊断至关重要。目前对该病的诊断方法有四种:病状、形态学、免疫学及分子生物学诊断,但还没有哪一项是完全适用的^[5]。作者采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法对感染此病的鲫鱼组织蛋白质进行了研究,并与正常鱼进行比较,希望通过比较分析正常组织细胞与异常组织细胞整体蛋白质的表达差异,进而对差异表达的蛋白质进行鉴定、定量、表征,寻找与粘孢子虫病有关的标志物,为深入研究提供新的手段和依据。

1 材料与方 法

1.1 实验用鱼 病鱼于2000年9月取自天津水产研究所鱼病门诊部,正常鱼购于农贸市场,均为彭泽鲫(*Carassius auratus* var. *penzesis*),重250 g左右。病鱼主要症状为:鳍、鳃、脑、皮肤及某些内脏器官出现大小不等的乳白色孢囊,鱼体消瘦。

1.2 蛋白质样品制备 分别摘取正常鱼和病鱼的动脉球、肝、脑、鳃、肌肉、眼、肠、鳍8种组织,置于4℃去离子水中洗净,滤干水分,称重后放入匀浆器中,按V:W=5:1的比例加入样品提取液(磷酸缓冲液,pH 7.0)匀浆,将匀浆液移入离心管中,10 000 r/min离心15 min,取上清液,加入等量蛋白质变性液,100℃沸腾3~5 min,置于-20℃冰箱冷冻保存待用。

1.3 标准蛋白 标准蛋白为中分子量,购于Bio-Rad公司,包括兔肌肉磷酸化酶b(rabbit muscle phosphorylase b),97 ku;牛血清白蛋白(bovine serum albumin),66 ku;卵清白蛋白(ovalbumin),43 ku;碳酸酐酶(carbonic anhydrase),31 ku;黄豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor),21 ku;溶菌酶(lysozyme)14 ku。

1.4 电泳及染色 采用圆盘柱状电泳,分离胶浓度为12.5%,浓缩胶浓度为5%,电极缓冲液为Tris-Gly(pH 8.3),样品加样量每管约为80 μl,标准蛋白加样量为4 μl,电压90 V,使用Bio-Rad稳压、稳流多功能电泳仪,电泳时间5 h左右。电泳结束后将胶条取出,0.05%考马斯亮蓝染色过夜,7%冰醋酸脱色至背景清晰为止。

1.5 照相及扫描 对实验结果进行拍照,并用岛津CS-930薄层层析扫描仪记录实验结果。

2 结果和讨论

本实验重复进行了8次,每次结果重复性好、蛋白质谱带恒定。实验结果表明病鱼在动脉球、肝、鳃、脑、肠5种组织的蛋白质电泳谱带与正常鱼相比有较大变化,眼、鳍和肌肉3种组织的蛋白质谱带变化微小,具体分析如下。

2.1 动脉球 从扫描图(图1)上看正常鱼和病鱼都有23条谱带,二者谱带数量无差别,但正常鱼29 ku的谱带在病鱼中缺失,病鱼则在48 ku处产生一条新的谱带,14 ku与21 ku之间及97 ku附近几个谱带的着色性深浅不同,扫描峰值也有较大差异。病鱼动脉球中蛋白质变化可能是鱼在被粘孢子虫感染后,该虫的营养体随血液循环到达心脏并大量繁殖,破坏心脏结构及功能,使心脏包括动脉球的蛋白质组成

或合成代谢发生变化。

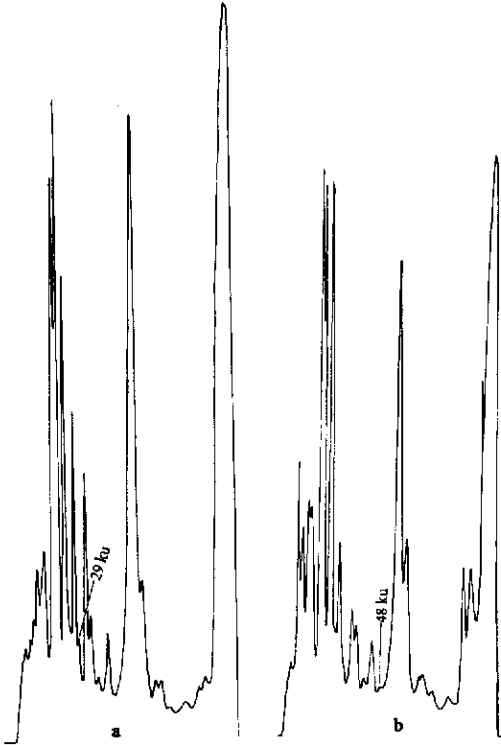


图1 鲫鱼动脉球蛋白凝胶扫描曲线

a. 正常鲫鱼; b. 病鲫鱼

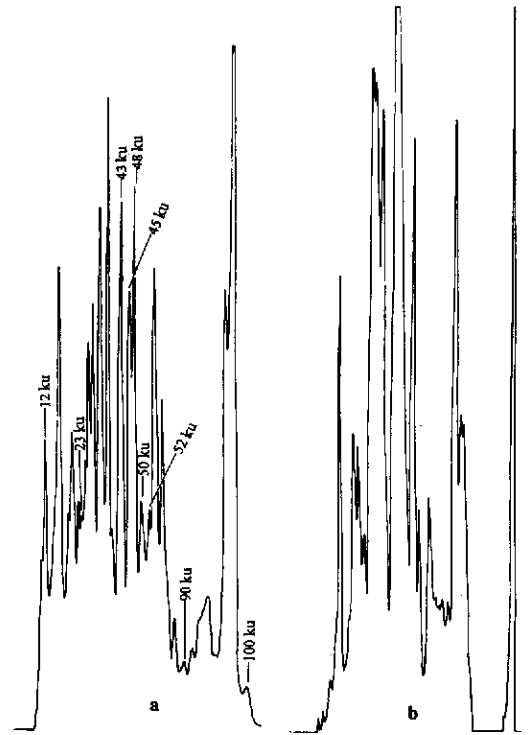


图2 鲫鱼肝脏蛋白质凝胶扫描曲线

a. 正常鲫鱼; b. 病鲫鱼

2.2 肝脏 从扫描图(图2)上看正常鱼有27条谱带,病鱼有18条谱带,鲫鱼感染粘孢子虫后肝脏中共有9条蛋白质谱带缺失,14 ku附近有2条,分子量分别为12、23 ku,在43 ku与66 ku间病鱼缺失了5条谱带,其分子量分别为43、45、48、50、52 ku,在97 ku处又有2条谱带缺失,其分子量约为90、100 ku,并且其它相应谱带的着色性比正常鱼弱很多,表明粘孢子虫对鲫鱼肝脏破坏严重。肝脏是鱼体内最大的腺体,是其重要的存储器官,内含较多的合成酶类和一些储存蛋白质^[6],当其遭受粘孢子虫感染后,蛋白质及酶的合成受到抑制,组成蛋白质遭到较大破坏,最终导致肝功能减弱直至衰竭。

2.3 鳃 从扫描图(图3)上看正常鱼有22条谱带,病鱼有23条谱带,病鱼比正常鱼多一条谱带,正常鱼12、23 ku两条谱带在病鱼中缺失,而病鱼在70、75、80 ku处又诱导导出3条新谱带。鳃作为鱼体抵御外界病原体侵袭的第一道屏

障,在感染粘孢子虫后,鳃的组织结构及正常生理机能发生一系列病理变化,蛋白质谱带的增加可能就是由于其蛋白质代谢紊乱,从而产生一些病理性蛋白质所致。

2.4 脑 从扫描图(图4)上看正常鱼有21条谱带,病鱼有24条谱带,病鱼分别在26、70、100 ku处诱导导出3条新谱带,并且14~21 ku之间几条带的峰值及着色性明显低于正常值。很多研究表明粘孢子虫对鱼的中枢神经系统破坏性较强,Frascas等对感染粘孢子虫的养殖大西洋鲑研究发现,粘孢子虫能引发脑炎,并在神经组织中观察到粘孢子虫的多核发育期^[7];鲢碘泡虫引起的鲢疯狂病,由于寄生虫破坏神经系统,造成鱼体机能紊乱,失去正常活动及摄食能力^[8]。本实验结果从生化水平上表明脑受粘孢子虫侵袭后,其蛋白质组成及代谢发生改变,产生了一些病理性蛋白质,但这些蛋白质的性质及作用还有待进一步研究。

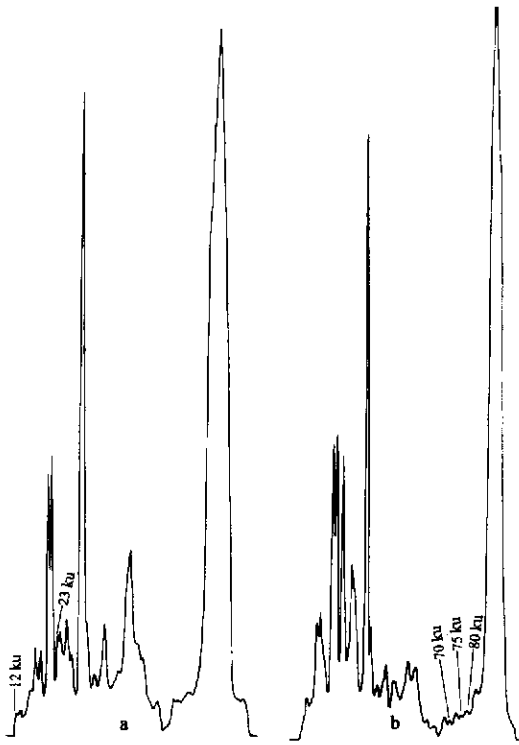


图3 鲫鱼鳃蛋白质凝胶扫描曲线

a. 正常鲫鱼; b. 病鲫鱼

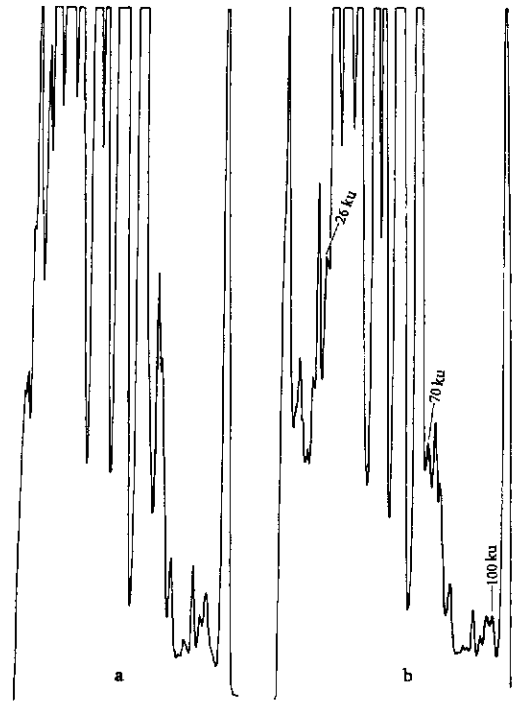


图4 鲫鱼脑蛋白质凝胶扫描曲线

a. 正常鲫鱼; b. 病鲫鱼

2.5 肠 从扫描图(图5)上看正常鱼有26条谱带,病鱼有24条谱带,正常鱼14、15、16、48、66 ku共5条谱带在病鱼中缺失,病鱼在97、100、102 ku处出现3条新谱带。组织病理研究表明粘孢子虫对寄主鱼肠部的破坏比较严重,刘小鹏等发现肠道的虫体损坏肠的粘膜下层,造成粘膜下层组织的胶原纤维及肌层的平滑肌纤维发生玻璃样病变^[1];Branson等对由粘孢子虫感染引起的养殖大菱鲆的肠病研究也发现肠壁发炎、溃烂,肠管脂质外溢,严重影响鱼正常的消化机能^[9],蛋白质作为细胞体现正常生理机能的物质基础,发生较大改变可能与以上变化有关。

以上结果表明,鲫鱼在感染粘孢子虫后,主要组织可溶性蛋白质电泳谱带发生较大变化,

出现三种变化趋势:①谱带增加,如脑中产生3条新谱带;②谱带缺失,如肝脏有9条谱带缺失;③既有增加又有缺失,如动脉球各减少和产生1条谱带,鳃缺失2条又产生3条新谱带,肠缺失5条又产生3条新谱带(表1)。制备样品时发现这几种组织的组织块上均有乳白色孢囊寄生,孢囊内含有大量孢子,其中鳃、肝脏和肠壁的孢囊数量尤为众多,脑、动脉球中的孢囊数量较少;从组织蛋白质电泳的结果看,感染的孢囊数量与蛋白质变化成正相关,但孢囊的大小则无明显影响。此外,健康鲫鱼各组织器官的蛋白质电泳谱带表现出明显的组织特异性,不同组织器官的电泳图谱不仅谱带数量有较大变化,并且带型也各不相同,说明各组织器官的蛋白质种类差异很大,这可能与各组织器官的结构、功能各异有关。

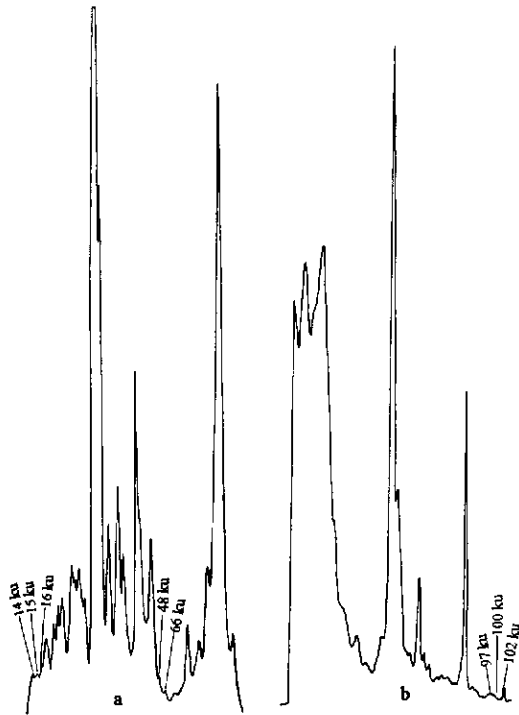


图5 鲫鱼肠蛋白质凝胶扫描曲线

a. 正常鲫鱼; b. 病鲫鱼

表1 感染粘孢子虫鲫鱼与正常鲫鱼蛋白质电泳谱带变化表

组织	谱带总数		病鱼谱带变化	
	病鱼	正常鱼	增加	缺失
动脉球	23	23	48	29
肝脏	18	27		12, 23, 43, 45, 48, 50, 54, 90, 100
鳃	23	22	70, 75, 80	12, 23
脑	24	21	26, 70, 100	
肠	24	26	97, 100, 102	14, 15, 16, 48, 66

由于至今尚未筛选出一种可杀灭粘孢子虫孢子的药物,所以对此病的早期诊断非常重要。

但目前主要运用镜检法检查鱼体是否感染粘孢子虫,当病鱼感染轻微或虫体还处在早期发育阶段,特别是鱼体体表不显现症状时,此法很难检测出粘孢子虫^[10]。作者试图从鱼体本身找出受该虫侵害后在蛋白质表达上的差异,以寻求更好的诊断方法。蛋白质谱带的变化在一定程度上反映了基因在表达水平上的变化,进一步研究产生变化的蛋白质有可能从生化及分子水平探讨该虫的致病机理,有助于找到更有效的防治方法。

参 考 文 献

- [1] 刘晓鹏,马志宏. 鲤鱼粘孢子虫病组织病理研究. 北京水产,1995(2):5~6.
- [2] 李义. 鱼类粘孢子虫病的研究进展. 水产科技情报,1995,22(2):64~68.
- [3] 徐海圣,王淑霞,吴惠仙. 鲫鱼寄生粘孢子虫的研究. 江西水产科技,1996,68(4):5~6.
- [4] 王桂堂. 我国淡水鱼类粘孢子虫病的流行与控制. 鱼类病害研究,2001,23(2):43~45.
- [5] 鲁义善. 鱼类寄生粘孢子虫病的诊断. 鱼类病害研究,2001,23(2):39~42.
- [6] 吴惠仙,薛俊增,赵艳. 日本沼虾黑鳃病的可溶性蛋白质分析. 水产科学,2001,20(5):11~12.
- [7] Frascas, Linfert D R, Tsongalis G J. アイルランドの养殖タイヨウサクの脳炎に关与する粘液胞子虫の分子生物学の特性. 鱼病研究,1999,34(3):171.
- [8] 横山 博. コイの筋肉シケイボルス症. 养殖,1996,33(11):31.
- [9] Branson E, Riaza A, Alvarez-Pellitero P. Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. J Fish Dis, 1999, 22(5): 395~399.
- [10] 汪建国,吴英松,鲁义善. 粘孢子虫免疫学研究进展. 鱼类病害研究,2001,23(3~4):19~23.