

## 中国对虾病虾体内同工酶表型变化的初步研究

黄灿华 陈棣华

(中国科学院武汉病毒研究所, 430071)

**摘要** 应用对流免疫电泳及核酸探针检测技术筛选感染病毒的中国对虾(*Penaeus chinensis*)病虾,采用不连续的聚丙烯酰胺凝胶电泳研究病虾体内同工酶的表型变化。用分光光度计对电泳带扫描分析表明,病虾体内4种同工酶—酯酶(EST)、苹果酸脱氢酶(MDH)、谷草转氨酶(GOT)、超氧化物歧化酶(SOD)的表型与健康虾比较存在显著差异。其中,MDH、EST、GOT的变化分别反映病虾体内糖类、脂类、氨基酸等3大物质代谢明显紊乱,SOD活性下降,显示病虾免疫防御机能明显衰退。对虾体内同工酶表型变化规律稳定,重复性好,可作为对虾病害检测与诊断的生理生化指标。

**关键词** 中国对虾,暴发性流行病,同工酶表型变化,病害诊断

1993年以来对虾暴发性流行病严重制约着养虾业的发展,对虾病害主要是由病毒引起的,迄今世界各国至少发现了15种以上的对虾病毒<sup>[1]</sup>,我国人工养殖的对虾品种如中国对虾体内出现较多的是1种无包涵体杆状病毒和几种球状病毒。有关病毒病原的分离与鉴定,病毒在宿主体内的形态发生及宿主组织细胞病理学变化已有若干报道<sup>[2~4]</sup>。为了进一步探讨病毒在宿主体内的致病机制及宿主体内相关的生理代谢指标的变化,我们通过对流免疫电泳及病毒核酸探针杂交检测等方法筛选出感染病毒发病的中国对虾,比较研究了健康虾与病虾的同工酶表型差异。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 病 虾 河北乐亭及浙江舟山、宁波等地暴发性流行病典型发病的中国对虾成虾。

1.1.2 健康虾 河北乐亭养殖示范区生命活力强的中国对虾。

#### 1.2 方 法

##### 1.2.1 中国对虾病虾体内球状病毒与杆状病毒的

**检测** 采用球状病毒的抗血清作抗体,常规对流免疫电泳检查病虾体内球状病毒。采用杆状病毒核酸探针,检测病虾体内无包涵体杆状病毒。

1.2.2 同工酶样品的制备 取病虾肝胰腺、胃、中肠、肌肉等组织,按照1:2(W/V)加缓冲液(0.05 mol/L Tris-0.38 mol/L Gly pH8.3,0.001 mol/L B-巯基乙醇,0.001 mol/L EDTA)研磨,匀浆,30 000 g 冰浴离心30 min,收集上清液于-20℃低温保存。

1.2.3 电泳及染色 采用高pH不连续聚丙烯酰胺垂直平板电泳,酯酶电泳及染色<sup>[5,6]</sup>,苹果酸脱氢酶<sup>[7]</sup>,超氧化物歧化酶,谷草转氨酶<sup>[8,9]</sup>等方法进行。为了便于结果分析,实验前测试各样品的蛋白浓度,用微量进样器控制每孔加样量200 μg。电泳图谱以区带数目,染色强度,相对迁移率(Rf)进行描绘<sup>[10]</sup>。电泳凝胶经岛津UV-300分光光度仪薄层扫描,扫描波长EST(430 nm),MDH(570 nm),GOT(400 nm),SOD(480 nm),扫描速度75 mm/min;记录扫描曲线。

### 2 结 果

#### 2.1 病虾样品的检测

病虾样品经与无包涵体杆状病毒核酸探针杂

收稿日期:1997-10-20

交,结果呈阳性反应。电镜负染色,超薄切片均可看到大量杆状病毒。其中大丰、宁波样品经对流免疫电泳检测发现还存在球状病毒的混合感染。

### 2.2 对虾同工酶的分析

对虾同工酶的表型、分布和活性呈现高度的组织特异性。图1(a~d)显示了健康虾与病虾肝胰腺与肌肉组织中4种同工酶表型的差异。健康虾肝胰腺组织中酯酶同工酶可检出7条酶带,而在病虾中只能检出4条酶带,其中EST-(3~5)丢失,EST-6只能检出很微弱的酶带。EST在病虾肌肉组织中表现为活性下降,EST-3,4,EST-6,7,EST-9酶带的着色强度明显减弱[图1(a)]。苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶在健康虾肝胰腺与肌肉组织中均表现出较强的活性,特别是MDH-4,MDH-6。与病虾肝胰腺组织相比,健康虾没有新的酶带MDH-

2,病虾肝胰腺组织的MDH-3,4,MDH-6,7活性较健康虾下降显著。与健康虾肌肉组织相比,病虾MDH-2丢失,MDH-4,MDH-6,7酶活性下降亦十分明显[图1(b)]。健康虾肝胰腺组织谷草转氨酶GOT可检出4条同工酶酶带,而在病虾中GOT-4丢失,GOT-5活性下降明显;与健康虾相比,病虾肌肉组织中GOT-2着色强度要深,然而未能检出GOT-3酶带,此外,在快带区病虾明显出现新酶带GOT-8,9[图1(c)]。超氧化物歧化酶SOD在健康与病虾肌肉组织中均能检出SOD-3,SOD-6两条酶带,酶带的着色强度亦无明显差异;虽然健康虾与病虾肝胰腺组织中均可检出6条酶带,但病虾肝胰腺组织中SOD-3,4迁移率与健康虾不同,同时SOD-6活性下降显著[图1(d)]。

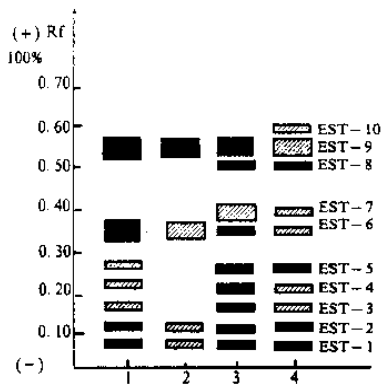


图 1(a) 健康虾与病虾酯酶(EST)同工酶图谱

Fig. 1 (a) EST electrophoretograms of healthy and diseased shrimp. 1, 3 健康虾肝、肌肉 hepatopancreas, muscles of healthy shrimp. 2, 4 病虾肝、肌肉 hepatopancreas, muscles of diseased shrimp.

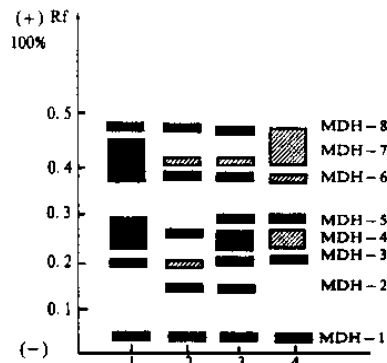


图 1(b) 健康虾与病虾苹果酸脱氢酶同工酶图谱

Fig. 1 (b) MDH electrophoretograms of healthy and diseased shrimp. 1, 3 健康虾肝、肌肉 hepatopancreas, muscles of healthy shrimp. 2, 4 病虾肝、肌肉 hepatopancreas, muscles of diseased shrimp.

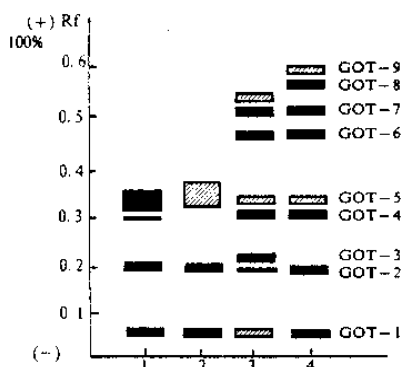


图 1(c) 健康虾与病虾谷草转氨酶(GOT)同工酶图谱

Fig. 1 (c) GOT electrophoretograms of healthy and diseased shrimp. 1, 3 健康虾肝、肌肉 hepatopancreas, muscles of healthy shrimp. 2, 4 病虾肝、肌肉 hepatopancreas, muscles of diseased shrimp.

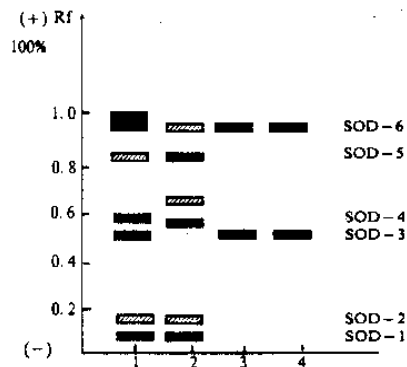


图 1(d) 健康虾与病虾超氧化物歧化酶(SOD)同工酶图谱

Fig. 1 (d) SOD electrophoretograms of healthy and diseased shrimp. 1, 3 健康虾肝、肌肉 hepatopancreas, muscles of healthy shrimp. 2, 4 病虾肝、肌肉 hepatopancreas, muscles of diseased shrimp.

### 2.3 健康虾与病虾部分组织的同工酶凝胶扫描

扫描曲线(图2)依电泳方向大致可分为慢、中、快3个带区,酶活力的强弱与峰值及峰面积呈正相关。病毒感染对虾发病之后,同工酶表型改变主要呈现如下几种情形:①酶带丢失,病虾肝胰腺组织EST中区酶带(EST-3~7)大多丢失,或不能测出酶活性[图2(a)]。②出现新酶带,病虾肝胰腺组织MDH同工酶在慢区与中区出现新酶带MDH-2[图2(b)];病虾肌肉组织在快带区出现新酶带GOT-8,9[图2(c)]。③部分同工酶带迁移率改变,病虾肝

胰腺组织SOD中区同工酶带SOD-3、SOD-4迁移位置与健康虾明显不同[图2(d)]。病虾与健康虾同工酶除存在表型差异外,酶活力变化从图2也可进行直观比较:总体上看,病虾的同工酶活力较健康虾低,差异最显著的如EST中带区(EST-3~7)、SOD快带区(SOD-6)。尽管病虾MDH、GOT同工酶在某些带区出现新酶带,但不难看出一些主要的同工酶如MDH-4,6以及GOT慢带区(GOT-3)酶活力较健康虾明显下降。

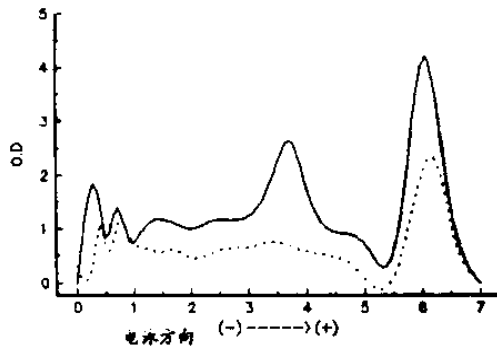


图2(a) 比较健康虾与病虾肝胰腺组织酯酶(EST)同工酶凝胶扫描曲线(—健康;·····患病)

Fig.2(a) Comparison of gel scanning curve of shrimp's EST isoenzyme

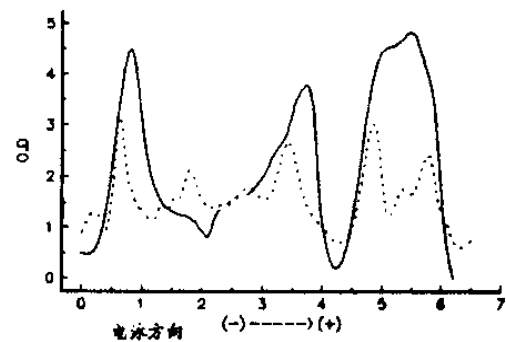


图2(b) 比较健康虾肝胰腺组织苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶凝胶扫描曲线(—健康;·····患病)

Fig.2(b) Comparison of gel scanning curve of shrimp's MDH isoenzyme

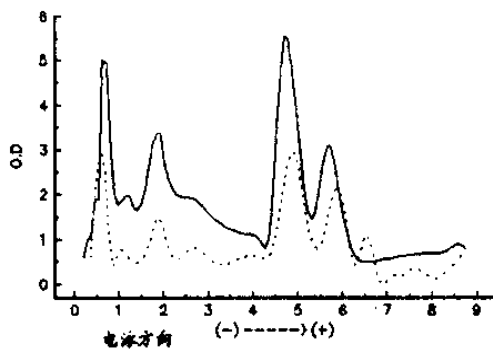


图2(c) 比较健康虾与病虾肌肉组织谷草转氨酶(GOT)同工酶凝胶扫描曲线(—健康;·····患病)

Fig.2(c) Comparison of gel scanning curve of shrimp's GOT isoenzyme

### 2.4 酶谱图象

对虾从病毒感染至典型发病死亡不同时期显示

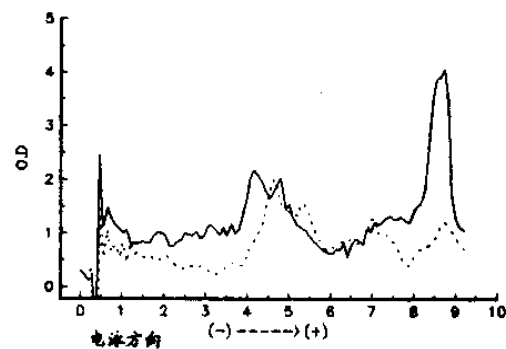
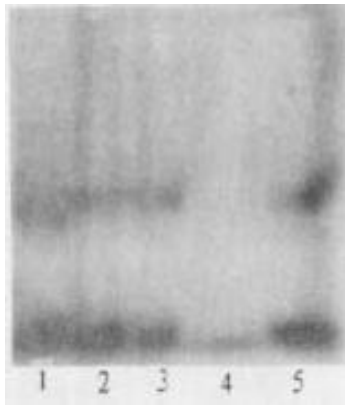


图2(d) 比较健康虾与病虾肝胰腺组织超氧,化物歧化酶(SOD)同工酶凝胶扫描曲线(—健康;·····患病)

Fig.2(d) Comparison of gel scanning curve of shrimp's SOD isoenzyme

的酶谱图象,多数同工酶谱呈量变到质变的过程。以对虾肝胰腺组织中酯酶同工酶谱为例,病变早期

EST-3~5 在不同地区的病虾体内仍可不同程度地检出,然而在病变后期或典型发病的对虾肝胰腺组织中 EST-3~5 检出率极低,EST-9 染色强度也显著减弱(图3)。



1.健康虾 Healthy shrimp; 2.大丰虾样,感染病毒 Shrimp from Dafeng, infected with viruses; 3.乐亭虾样,感染病毒 Shrimp from Laoting, infected with viruses; 4.感染晚期或典型病虾 Advanced stage of infected typical diseased shrimp; 5.人工感染早期病虾 Artificially infected shrimp at early stage

图3 对虾感染病毒不同时期肝胰腺组织中酯酶同工酶谱表型

Fig.3 Hepatopancreatic EST isoenzyme pattern of shrimps infected with viruses at different stages

### 3 讨论

(1)酯酶 EST、苹果酸脱氢酶 MDH、谷草转氨酶 GOT 分别与 3 大营养物质—酯类、糖类、蛋白质(氨基酸)的生理代谢密切相关,而 3 者在机体内的代谢相互转化,密切关联。其中 EST 是体内参与脂类化合物水解并进入中间代谢的重要酶系,其作用除维持细胞正常的能量代谢外,还与机体的解毒功能密切相关<sup>[10]</sup>;MDH 催化 L-苹果酸脱氢生成草酰乙酸,是三羧酸循环中最后 1 次氧化还原反应;GOT 是动物线粒体中重要的氨基转移酶,催化天冬氨酸与谷氨酸之间的转化并进入中间代谢<sup>[11]</sup>。病虾中 EST、MDH、GOT 相关的同工酶带丢失,酶活性下降,直接影响或干扰了虾体正常的生理代谢。对虾生理代谢功能紊乱,营养与能量供给受阻,表现出生长发育滞缓,并有可能导致组织细胞的大量死亡。SOD 广泛存在于真核生物体内,是生物体防御氧化损伤的重要酶类<sup>[12]</sup>。生物体受到外界病原体侵染

后,SOD 能清除体内产生的自由基( $O_2^-$ ),免除对细胞的毒害。病虾体内 SOD 活性下降,反映出机体防御机能衰退,对虾从感染病毒至发病晚期所出现的多种病原混合感染正是抗体防御机能丧失的表征。

(2)对虾肝胰腺是对虾消化道中营养消化、吸收的主要场所,同时也是多种对虾病毒敏感的靶器官。病毒侵染后期,腺体呈现白浊、糜烂、肝小管破裂等典型病理症状<sup>[4]</sup>。本研究重点比较了健康虾与病虾肝胰腺组织中几种同工酶表型变化,从生理生化方面证实,对虾从病毒感染至发病死亡,正是机体正常生理代谢机能逐步丧失的结果。

(3)同工酶是由生物体细胞内基因组编码,催化体内某类生化反应,而本身的分子结构组成有所不同的一组酶。病毒侵染宿主细胞后,病毒核酸进入宿主细胞核,操纵宿主细胞基因组的转录与翻译。其初级与次级转录产物既是病毒增殖的必要条件,也抑制或激活了宿主细胞的部分功能,其中包括宿主细胞的各种代谢酶类及其活力<sup>[13]</sup>。这样,借助细胞某种蛋白酶的变化,可反映出病毒的早期感染情况。事实上,同工酶作为生物机体中反映生理代谢变化的标记指标,用于生物体病毒病害的检测与诊断已有许多成功的报道<sup>[8,14]</sup>,但将之做为对虾病害早期检测、诊断的生理生化指标尚待深入研究。

致谢:本课题组高玮、石正丽同志参加部分工作,本所分析测试室刘时婉老师协助凝胶扫描工作,特此致谢。

### 参 考 文 献

- 高玮,张立人.对虾病毒病害的研究进展.中国病毒学,1997,12(1):8~13
- 陈棣华,张建红,石正丽,等.中国对虾一种球状病毒的分离提纯与检测.中国病毒学,1994,9(2):170~174
- 黄捷,于佳,宋晓玲,等.对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精微结构、核酸多肽及血清学研究.海洋水产研究,1995,16(1):11~23
- 黄灿华,石正丽,张立人.两种病毒侵染中国对虾后宿主细胞病理学变化与免疫标记.中国病毒学,1997,12(2):171~177
- 胡能书,万国贤.同工酶技术及其应用.湖南科学技术出版社,1985
- Blackshear P J. Systems for Polyacrylamid Gel Electrophoresis. In: Jakoby W Bed. Methods in Enzymology, vol. 104, New York: Academic Press. 1984. 237~255
- 杨兴祺.几种罗非鱼乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶同工酶电泳的研究.遗传学报,1984,11(2):132~140
- 张爱群,沈文梅.乙醇对超氧化物歧化酶活性邻联(二)茴香胺染

- 色法的影响. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(2): 161~162
- 9 邱文平, 周咏芝, 丁达明. 柑桔裂皮病类病毒感染的柑桔树中同工酶的变化. 病毒学报, 1990, 6(2): 196~198
- 10 邵健忠, 项黎新, 华志华, 等. 三角帆蚌十六种同工酶系统的表型及其在患病病蚌中的病理变化. 水产学报, 1993(3): 199~207
- 11 赵维信, 魏华, 贾江, 等. 镉对罗氏沼虾组织转氨酶活性及组织结构的影响. 水产学报, 1995, 19(1): 21~27
- 12 Weisiger R A, Fridorich I: Superoxider Dismutase. J Biol Chem, 1973, 3582 ~ 3592
- 13 Erlandson M A, Gordon J, Carstens E B. Size and map locations of early transcription products on the Autographa California nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, 1985, 142(1): 12~33
- 14 徐旭士, 张超英, 谢天恩. BsNPV 感染油桐尺及 Bs484 细胞的脂酶分析. 中国病毒学, 1994, 9(1): 37~42

## A study of isoenzyme phenotypic change in diseased shrimp *Penaeus chinensis*

Huang Canhua Chen Dihua  
(Wuhan Institute of Virology, CAS, 430071)

**Abstract** CIE technique and nucleic acid probe test were used to select diseased shrimps (*Penaeus chinensis*) which had been infected with viruses, and polyacrylamid gel electrophoresis method was used to study the isoenzyme phenotypic change in diseased shrimps. The bands in the gel were scanned and analyzed through spectrophotometer. There are 4 kinds of isoenzyme (MDH, EST, GOT and SOD) in diseased shrimps. Their patterns are quite different from those in healthy shrimps that phenotypic changes of MDH, EST, GOT reflect the disordered metabolism of carbohydrate, lipid, and protein in diseased shrimps respectively. The weakened activity of SOD indicates that the immunizing function is apparently beginning to fail. Due to the steadiness and good replication of their phenotypic changes, the shrimp isoenzyme can be used as biochemical indices for test and diagnosis.

**Key words** *Penaeus chinensis*, explosive epidemic disease, isoenzyme phenotypic change, disease diagnosis