

感染桃拉综合症病毒的凡纳滨对虾体内 4 种同工酶酶谱的变化

孙静秋, 许燕, 李晓英

(上海师范大学 生命与环境科学学院 上海 200234)

摘要: 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法, 对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 成体的复眼、肝脏、心脏、鳃和肌肉等 5 种组织中的酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、酯酶 (EST) 和过氧化物酶 (POD) 4 种同工酶进行研究, 并将健康虾与感染桃拉综合症病毒 (TSV) 病虾的同工酶酶谱进行比较。结果表明, 这 4 种同工酶在凡纳滨对虾体内的不同组织均有分布, 但在酶活性和条带数量上存在不同程度的组织特异性, 其中 4 种同工酶均在肝脏组织中表达最强, ACP 和 POD 在肌肉中、EST 在复眼中表达最弱, AKP 在复眼中不表达。感染 TSV 后, 病虾的 ACP 和 AKP 均出现酶带数量减少和酶活性降低, 如病虾的 ACP 酶谱在肝脏、心脏和鳃中缺失的酶带数分别为 2、1 和 1 条, 酶活性也呈现下降; AKP 酶谱在肝脏、心脏和肌肉中缺失的酶带数分别为 3、4 和 3 条, 且酶活性均明显降低; 而病虾的 EST 和 POD 表达的酶带数和酶活性却均有明显增加, 尤其是在肝脏和心脏中, EST 分别新增 3 条和 5 条酶带, POD 各新增 1 条酶带。总之这 4 种同工酶的表型在健康虾和病虾之间存在着明显的差异, 尤其是在肝脏中的变化最为明显, 说明肝脏中这 4 种同工酶的特异性变化可以作为研究凡纳滨对虾桃拉综合症的生理生化指标。[中国水产科学, 2008, 15(1): 122-128]

关键词: 凡纳滨对虾; 桃拉综合症病毒; 同工酶; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 组织特异性

中图分类号: Q959.223

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0122-07

同工酶是生物机体内生理生化的天然标记, 同工酶分析用于生物体病毒病害的检测与诊断已有不少报道^[1]。如吴惠仙等^[2]研究了日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 黑鳃病几种同工酶的变化, 认为其酯酶 (Esterase)、过氧化物酶 (Peroxidase)、乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase)、苹果酸脱氢酶 (Malate dehydrogenase) 的特异性变化主要表现在不同组织特异酶带的缺失及增加。王金星等^[3]发现中国对虾 (*Panaeus chinensis*) 患白斑病后, 肝脏和肌肉组织的 EST 和超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase) 的表型与健康虾之间存在着较明显的差异。黄灿华等^[4]也发现患白斑病的中国对虾病虾体内同工酶表型的变化规律稳定、重复性好, 认为同工酶表型变化可作为对虾病害检测与诊断的生理生化指标。

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 属十足目 (Decapoda) 对虾科 (Penaeidae), 是中国主要的水产养殖虾类, 具有很高的经济价值^[5]。近几年由于高密度养殖、近亲繁殖和过剩投饵等原因, 导致养殖对

象种质严重下降以及养殖池的饲养环境急剧恶化, 由细菌和病毒引起的传染病逐渐增多^[6]。桃拉综合症病毒 (Taura Syndrome Virus, TSV) 是 1992 年夏季在乌拉圭 Taura River 附近的凡纳滨对虾体内发现, 是近年来主要危害凡纳滨对虾养殖业发展的传染性病毒病^[7-8]。关于 TSV 的流行情况、病原体分析及防治已有若干报道, 但至今未见有通过同工酶变化分析 TSV 病原体对凡纳滨对虾代谢影响的报道, 本研究采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对健康虾和感染 TSV 病虾的肝脏、心脏、鳃、肌肉和复眼等组织的 ACP、AKP、EST 和 POD 这 4 种同工酶进行比较分析, 初步探讨了病虾体内同工酶的变化规律, 旨在为 TSV 的防治与诊断提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2005 年 7、8 月虾病流行期间, 从上海市奉贤区水产技术推广站获取典型感染 TSV 病虾和健康虾成体, 体长为 8~9 cm。

收稿日期: 2007-03-20; 修订日期: 2007-05-09.

基金项目: 上海市教委高校科技发展基金项目 (No.05DZ30).

作者简介: 孙静秋 (1980-), 女, 硕士研究生, 主要从事甲壳动物学生理生化研究. E-mail: 1000131891@shnu.edu.cn

通讯作者: 许燕. E-mail: xuyan6@shnu.edu.cn

1.2 主要试剂

1- 萘基磷酸钠、坚牢蓝 RR 盐、联苯胺、乙醇、乙酸、乙酸钠、 α - 乙酸萘酯、 β - 乙酸萘酯等试剂均购于国药集团化学试剂有限公司; 碱性磷酸酶显色液 (BioDev) 购于北京博大泰克生物基因技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 活体解剖凡纳滨对虾健康虾和病虾各 10 只, 分别取其复眼、肝脏、心脏、鳃和肌肉 5 种组织, 用吸水纸吸去各组织液后, 迅速称重, 并按 1:3 (W/V) 的比例加入预冷的提取液 (0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液), 于冰浴中匀浆。匀浆液经 12 000 r/min, 4 °C 条件下离心 30 min。取上清液按 1:1 (V/V) 的比例加入电泳上样缓冲液 (浓缩胶缓冲液 2 mL, 87% 甘油 1 mL 及少量溴酚兰)^[9] 混匀后, 置于 -20 °C 条件下备用。重复取样 2 次。

1.3.2 电泳 采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳, 7% 分离胶 pH 8.9 (其中 EST 选用 10% 分离胶) 和 3% 浓缩胶 pH 6.7^[10], 电极缓冲液为 0.05 mol/L Tris-0.38 mol/L Gly (pH 8.3)。点样量 30 μ L/ 孔, 开始时使用稳压 80 V, 当溴酚兰指示剂完全进入分离胶时, 电压增至 100 V, 当溴酚兰指示剂电泳至凝胶底端时, 停止电泳。电泳过程约 4~5 h。电泳环境温度为 4 °C。

1.3.3 染色与固定 ACP、POD 染色与固定方法参照胡能书等^[11] 的方法进行; AKP 染色与固定方法参照碱性磷酸酶染色试剂盒的说明进行; EST 染色与固定方法参考文献 [12] 的方法进行。

1.3.4 酶谱记录 显色固定后的凝胶主要采用两种方法进行酶谱记录: 先利用天能凝胶成像系统进行拍照, 然后再按照凝胶上酶带迁移的距离和染色深浅, 结合照片, 绘出酶谱示意图。本研究酶带的编号参照国际生物化学命名规则而定, 把向阳极泳动最快的同工酶编号为 1, 如 ACP-1, 并从阳极到阴极依次编号。

2 结果与分析

2.1 酸性磷酸酶 (ACP, EC 3.1.3.2)

从图 1 可看出凡纳滨对虾不同组织中表达的 ACP 酶带数不同, 其中复眼中只表达 ACP-1 这 1 条酶带, 肌肉只表达 2 条酶带 (ACP-1、2), 心脏和鳃各表达 3 条酶带 (ACP-1、2、4, ACP-1、3、4), 肝脏中酶带数最多, 有 4 条; 不同组织表达的 ACP 酶带深浅也有明显差异, 肝脏中 ACP-3 是染色最深、带最宽的酶带, 其次是鳃中的 ACP-1, 肌肉中的 ACP-1 染色最浅。以上结果表明凡纳滨对虾 ACP 同工酶存在明显的组织特异性, ACP 同工酶在肝脏中表达最强, 肌肉和复眼中最弱。

染病后, 凡纳滨对虾 ACP 酶谱发生了一定变化, 除复眼和肌肉中的 ACP 酶谱基本不变外, 其余 3 种组织的酶带数和染色程度均有减少, 其中以肝脏中的变化最明显, 缺失了 2 条酶带 (ACP-3、4), 心脏和鳃中均缺失了 ACP-4 酶带, 而肌肉中的 ACP-2、鳃中的 ACP-3、肝脏和心脏中的 ACP-1 酶带染色均减弱。即感染 TSV 后凡纳滨对虾 ACP 同工酶在酶带数量及酶活性上明显减弱。

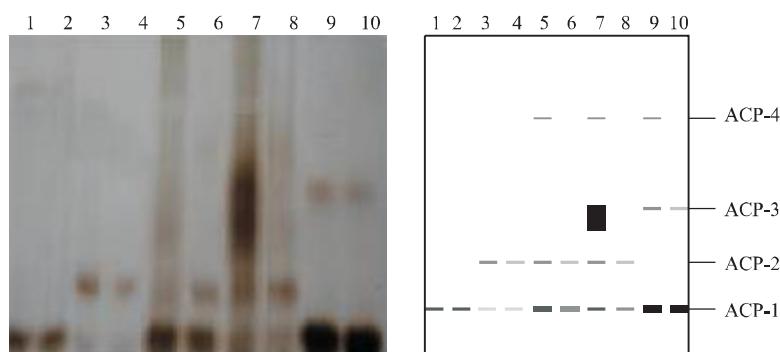


图 1 凡纳滨对虾不同组织中的 ACP 同工酶电泳图谱及酶谱示意图

注: 1,3,5,7,9: 健康虾; 2,4,6,8,10: 病虾; 1,2: 复眼; 3,4: 肌肉; 5,6: 心脏; 7,8: 肝脏; 9,10: 鳃。

Fig.1 Electrophoretograms and patterns of ACP isozymes in different tissues of *Litopenaeus vannamei*

Note: 1,3,5,7,9: healthy shrimp; 2,4,6,8,10: diseased shrimp; 1,2: compound eye; 3,4: muscle; 5,6: heart; 7,8: liver; 9,10: gill.

2.2 碱性磷酸酶(AKP, EC 3.1.3.1)

图2显示,从凡纳滨对虾中共检测出8条AKP同工酶酶带,各种组织中显示的酶带数存在差异:复眼中没有显示酶带,鳃中为2条酶带,肌肉中为4条酶带,心脏中为5条酶带,肝脏中最多为6条酶带;其中AKP-2、AKP-5和AKP-1、6分别只在肌肉、心脏和肝脏中存在。各组织之间除AKP同工酶酶带数量存在明显差异外,各组织表达的酶带染色深浅也明显不同,AKP-3、4、8在肝脏中染色较深,尤其是AKP-8染色最深。结果表明凡纳滨对虾各组织之间AKP表达差异显著,在肝脏中的表达最强,复眼中不表达。

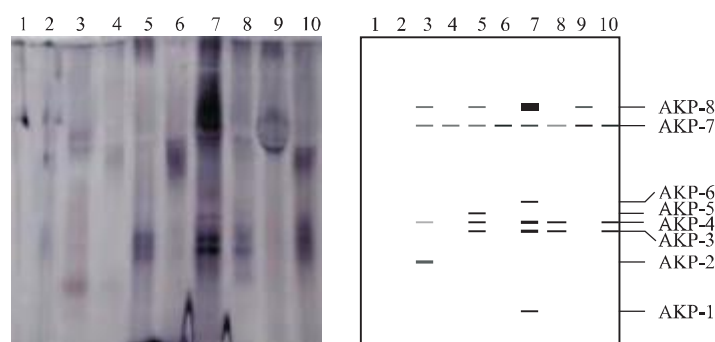


图2 凡纳滨对虾不同组织AKP同工酶电泳图谱及酶谱示意图

注:1,3,5,7,9:健康虾;2,4,6,8,10:病虾;1,2:复眼;3,4:肌肉;5,6:心脏;7,8:肝脏;9,10:鳃。

Fig.2 Electrophoretograms and patterns of AKP isozymes in different tissues of *Litopenaeus vannamei*

Note: 1,3,5,7,9: healthy shrimp; 2,4,6,8,10: diseased shrimp; 1,2: compound eye; 3,4: muscle; 5,6: heart; 7,8: liver; 9,10: gill.

2.3 酯酶(EST, EC 3.1.1.1)

图3显示凡纳滨对虾EST同工酶电泳图谱比较复杂,共检测出20条清晰的酶带,5种组织中均有多条酶带出现,但酶带的表达形式各不相同,其中EST-18是5种组织共有的酶带,且此酶带在肝脏和心脏中染色最深。肝脏中EST表达的酶带最多,为14条,其余分别为复眼7条、肌肉7条、心脏8条、鳃9条。其中肝脏中的EST-3、8和肌肉中的EST-10酶带染色较深;心脏和肌肉分别缺少了其他4种组织均有表达的EST-15和EST-3;复眼和鳃缺少其他3种组织均有表达的EST-19、20两条带,复眼和肌肉则缺少EST-8、9;EST-6、14、16只存在于肝脏中,EST-1只存在于肝脏和心脏中。可见EST在凡纳滨对虾各组织中分布广泛而差异明显,在肝脏中表达最强,复眼中最弱。

比较健康虾与感病虾的各组织中EST酶谱,除复眼和肌肉中的酶谱基本没有变化外,其他各

感染TSV后,病虾肌肉中AKP缺失了3条酶带(AKP-2、4、8);心脏中缺失了4条酶带(AKP-3、4、5、8);肝脏和鳃中AKP的酶谱变化较复杂,肝脏缺失酶带3条酶带(AKP-1、6、8),其中AKP-8是健康虾体内酶活力最高的酶带,且AKP-3、4、7的染色变浅;鳃中新增了2条酶带(AKP-3、4),同时丢失了AKP-8;复眼中无变化。结果表明,与健康个体相比较病毒感染的凡纳滨对虾除鳃中AKP酶带表达略有增加外,病虾肝脏、心脏和肌肉中AKP酶带表达均明显下降,表现为AKP酶数量和活性均降低。

组织的EST酶带数和染色均有增减。心脏中新增了EST-4、5、6、10、11 5条酶带,而缺失了EST-1;肝脏中新增了3条酶带(EST-10、13、17),其中尤以EST-10酶带最宽、最深,另外EST-1、2、3、4、6、9 6条酶带也变宽或变深;鳃中新增了EST-10酶带,而缺失了EST-2酶带,且EST-8酶带颜色变深。以上结果表明凡纳滨对虾病虾的心脏、肝脏和鳃等组织中EST同工酶酶谱变化明显,尤其是心脏和肝脏中的变化具有一定的规律性,表现为病虾体表达的酶带数量和染色程度均有明显增加,酶谱变化具有组织器官的特异性。

2.4 过氧化物酶(POD, EC 1.11.1.7)

图4显示凡纳滨对虾健康体POD同工酶的电泳图谱,从图中可看出凡纳滨对虾各组织中的POD同工酶共表达了5条酶带,肝脏中的POD酶带数最多,为4条(POD-1、2、3、7),但缺少其余4种组织共有的POD-6;其次是心脏,3条酶带(POD-1、

6、7); 复眼和鳃中酶谱相同,均表达 2 条 (POD-6、7); 肌肉中最少,只有 POD-6 酶带,而不表达其他 4 种组织均有的 POD-7; POD-2、3 两条酶带只在肝脏中表达, POD-1 酶带只在心脏和肝脏中表达。比较 POD 酶带数及染色程度可看出凡纳滨对虾 POD 表达具有明显的组织特异性,肝脏中表达最强,肌肉中表达最弱。

除复眼外,凡纳滨对虾病虾其他组织中 POD

同工酶的酶谱也都发生了明显变化。病虾肌肉中新增了健康虾中没有的 POD-4 和 POD-5 酶带,心脏中新增了 POD-3,肝脏中也出现了其余 4 种组织共有的 POD-6,且心脏和鳃中 POD-6 酶带染色明显加深。结果显示凡纳滨对虾病体内心脏、肝脏、肌肉和鳃中的 POD 表达的酶带数和染色程度均有增加,即染病后 POD 酶活力明显增加。

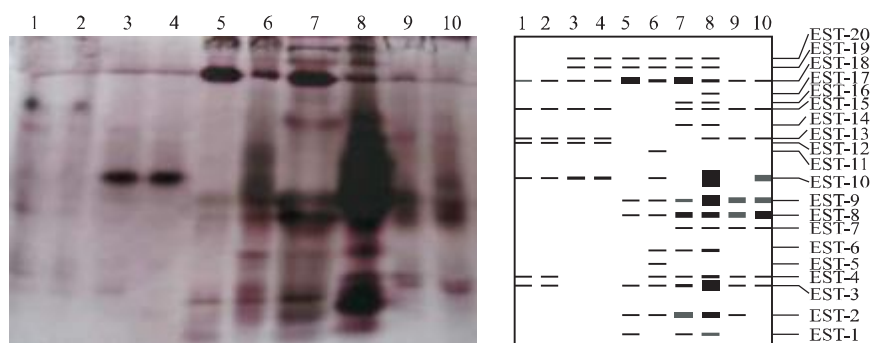


图3 凡纳滨对虾不同组织 EST 同工酶电泳图谱及酶谱示意图

注: 1, 3, 5, 7, 9: 健康虾; 2, 4, 6, 8, 10: 病虾; 1, 2: 复眼; 3, 4: 肌肉; 5, 6: 心脏; 7, 8: 肝脏; 9, 10: 鳃。

Fig.3 Electrophoretograms and patterns of EST isozymes in different tissues of *Litopenaeus vannamei*

Note: 1, 3, 5, 7, 9: healthy shrimp; 2, 4, 6, 8, 10: diseased shrimp; 1, 2: compound eye; 3, 4: muscle; 5, 6: heart; 7, 8: liver; 9, 10: gill.

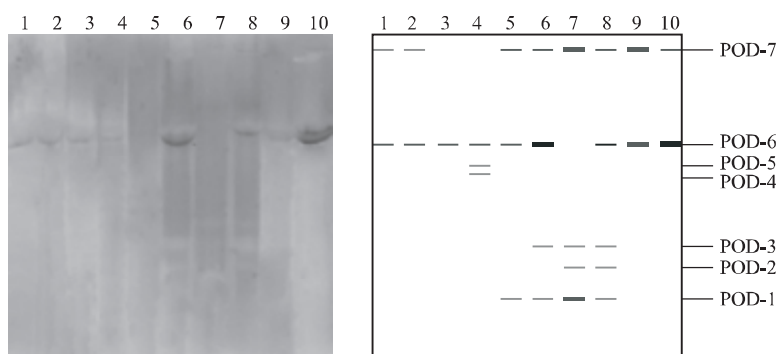


图4 凡纳滨对虾不同组织 POD 同工酶电泳图谱及酶谱示意图

注: 1, 3, 5, 7, 9: 健康虾; 2, 4, 6, 8, 10: 病虾; 1, 2: 复眼; 3, 4: 肌肉; 5, 6: 心脏; 7, 8: 肝脏; 9, 10: 鳃。

Fig.4 Electrophoretograms and patterns of POD isozymes in different tissues of *Litopenaeus vannamei*

Note: 1, 3, 5, 7, 9: healthy shrimp; 2, 4, 6, 8, 10: diseased shrimp; 1, 2: compound eye; 3, 4: muscle; 5, 6: heart; 7, 8: liver; 9, 10: gill.

3 讨论

3.1 同工酶表达的组织特异性

同工酶是由生物体细胞内基因组编码、催化某类生化反应、而本身的分子结构有所不同的一组酶,具有明显的种属特异性和组织特异性^[4,13]。本研究中凡纳滨对虾的 4 种同工酶具有广泛的组织

分布,在所分析的 5 种组织中,除 AKP 在复眼中不表达,其余组织均有这 4 种同工酶,但其表型分布和活性强弱又具有明显的组织特异性。不同组织四种同工酶酶谱均存在明显差异,这种组织特异性是与不同组织的生理功能分化相对应的^[14]。甲壳动物的肝脏对食物的消化、代谢与吸收起着很重要

的作用,因此同工酶活力很强;复眼、肌肉等组织功能相对单一,同工酶表现的活力较弱。这在本研究中也得到了证实,即凡纳滨对虾4种同工酶组织特异性明显,肝脏中ACP、AKP、EST和POD等同工酶活力最强,其次是心脏,肌肉或复眼中酶活性最弱。

3.2 TSV感染后同工酶酶谱变化规律

最近几年,在对甲壳动物的研究中,已把POD、ACP和AKP等看作具有免疫功能的酶,可共同作为检测甲壳动物免疫功能的指示酶^[15-16]。这些同工酶作为生物体内的天然标记,可以直接反映生物体受内外环境因素改变所导致的生理生化状态的变化。当病原体感染动物后,导致寄主组织发生特殊的代谢变化,在潜伏期和发展期都可导致同工酶表达的紊乱及酶带的缺失,并且有可能迅速诱导产生许多新的同工酶,由于对同工酶谱变化的检测具有快速准确、特异性强及灵敏度高等特点,已经被广泛应用于动物疾病早期鉴定的研究中^[1,17],很多学者认为同工酶的含量、组成及所具有的器官特异性可作为水产动物病理诊断的辅助指标^[2-4,18]。

ACP和AKP均为磷酸单酯酶,广泛存在于各种动物体内。它们不仅能催化磷酸单酯水解,还直接参与磷酸基团的转移,是动物体内重要的解毒体系,并且在动物机体的骨化过程中及在磷化物和其他一些营养物质的消化、吸收和转运过程中起着重要作用;同时ACP和AKP作为动物溶酶体酶的重要组成部分,在免疫反应中发挥作用;因此ACP和AKP对于虾的生长、生存有重要的意义^[19-21]。本研究对凡纳滨对虾健康个体与患病个体的ACP、AKP同工酶图谱进行了比较,结果显示,感染TSV后病虾体内的相关ACP、AKP同工酶带丢失,酶活性下降。说明病虾的磷酸酶活力较健康虾弱,导致虾体免疫功能下降,更容易受到病原体的侵染,并直接影响或干扰了虾体正常的物质代谢,引起虾体生理代谢功能紊乱,营养与能量供给受阻,表现出生长发育迟缓,最终导致虾体的大量死亡。

EST是酯类水解的重要酶系,也是最复杂最具有多态性的酶系^[22]。到目前为止,已发现的酯酶有20种之多^[23],其作用除了维持细胞内正常的能量代谢外,还能水解大量非正常生理存在的酯类化合物,被认为可能与机体的解毒作用有密切关系。本实验结果同样证明,在凡纳滨对虾各组织中EST有20种之多,其中在肝脏中的EST表达最强,而感染

TSV后病虾肝脏中EST变化也最明显,表现为酶带数和染色程度均增加,即病虾肝脏中EST酶活性显著增强。与黄灿华等^[4]报道的感染病毒的中国对虾病虾体内EST表型变化基本一致。这是因为肝脏是甲壳动物贮存、加工和分解酯类化合物的重要器官^[3],染病后,病虾摄食减少或者不摄食,这种病理性的饥饿诱发肝脏EST的活力增强,开始大量分解肝脏中储存的酯类以维护生命;另一方面,作为机体代谢和解毒主要器官的肝脏中EST酶活性增加也可能是机体对病原侵袭的适应性免疫反应。

POD是一类含铁的金属酶类,存在于细胞的过氧化物体内,其主要功能是降解有机物质在代谢等过程中所形成的酚、胺等过氧化物并减轻其毒性,防止活性氧自由基启动膜脂过氧化或膜脂脱酯作用,从而保护细胞生物膜不被破坏^[24]。刘晓云等^[25]在对中国对虾组织细胞中的过氧化物酶体的研究中表明过氧化物酶体与对虾清除进入机体有害异物的免疫反应具有密切的关系,病理情况下,对虾血细胞可释放POD;但POD在对虾免疫防御反应中的地位,具体作用仍不清楚。许多研究表明,病菌侵染植物组织后刺激植株内部产生一些特殊的代谢变化,导致其POD活性及同工酶谱相应改变;不同品种酶的活性及同工酶谱变化有一定的规律,而同一品种不同发病程度的株系酶活性及同工酶变化规律并不统一,这可能是寄主与病原互作机制的差异造成的,同时在一定程度上反映了不同品种抗性机理的差异^[26]。在本实验中,凡纳滨对虾TSV病体内心脏、肝脏、肌肉和鳃中的POD同工酶表达发生了变化,表现为染病后POD酶活性明显增加,尤其是肝脏中明显表达出原缺少的POD-6酶带。这可能是虾体内的免疫系统受到TSV病毒侵染后,产生的一系列免疫反应所引起的变化,尤其是肝脏的病变使得与代谢相关的酶类活性发生变化,引起代谢紊乱,从而导致细胞生物膜平衡遭破坏。

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^[2-4]。本实验结果表明,TSV侵染促使凡纳滨对虾体内发生了特殊的代谢变化,导致其同工酶带的增加或减弱,但各组织中不同同工酶的变化是有差异的,而这种差异与各组织和酶的功能直接有关。肝脏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^[27]。所以在感染 TSV 后肝脏中这 4 种同工酶酶谱变化最明显, 反映了肝脏的代谢功能特征。因此, 凡纳滨对虾的肝脏是进行同工酶酶谱分析较为合适的取样组织, 可考虑将肝脏中这 4 种同工酶酶谱的分析结合起来作为今后研究 TSV 病害早期诊断与防治的一种辅助生理生化指标。

致谢 上海市水产研究所史建华高级工程师和奉贤区水产技术推广站黄伟工程师为本研究提供实验材料, 谨致谢忱。

参考文献:

- [1] 李政, 王国良, 金珊. 同工酶技术在水产动物生理及疾病研究中的应用 [J]. 水利渔业, 2005, 25(4): 88-89.
- [2] 吴惠仙, 薛俊增. 日本沼虾黑鳃病几种同工酶的变化与病理分析 [J]. 海洋湖沼通报, 2002(1): 32-37.
- [3] 王金星, 赵小凡. 对虾组织蛋白质和同工酶表型及其在病虾中的变化 [J]. 海洋科学, 1995(3): 46-51.
- [4] 黄灿华, 陈棣华. 中国对虾病虾体内同工酶表型变化的初步研究 [J]. 中国水产科学, 1999, 6(1): 45-49.
- [5] 王吉桥. 南美白对虾健康养殖技术 [J]. 水产科学, 2002, 21(5): 43-46.
- [6] 陈宪春. 世界性虾病蔓延及我国虾病防治进展 [J]. 中国饲料, 1995(11): 10-11.
- [7] 杨先乐. 南美白对虾的病害及其控制 [J]. 渔业现代化, 2002(3): 6-9.
- [8] 湛嘉, 杨先乐, 赵秀灵. 南美白对虾桃拉综合症诊断与防治 [J]. 内陆水产, 2004, 29(12): 22-24.
- [9] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 73.
- [10] 庞秋香, 张士瑾, 王长法, 等. 雌雄文昌鱼同工酶的表型差异 [J]. 动物学报, 2004, 50(1): 62-67.
- [11] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 73-130.
- [12] 袁艺. 侧耳(平菇)的酯酶、多酚氧化酶及过氧化物酶同工酶的电泳分析 [J]. 安徽农业大学学报, 1997, 24(1): 88-92.
- [13] 张海琪, 何中央, 徐晓林, 等. 罗氏沼虾肌肉 8 种同工酶的研究 [J]. 海洋湖沼通报, 2004, (1): 32-36.
- [14] 王春琳, 母昌考, 丁爱侠, 等. 口虾蛄同工酶的组织特异性及生化遗传分析 [J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(3): 258-263.
- [15] 刘岩, 江晓路. 聚甘露糖醛酸对中国对虾免疫相关酶活性和溶菌溶血活性的影响 [J]. 水产学报, 2000, 24(6): 549-553.
- [16] 何南海. 对虾免疫功能指标的建立及其应用 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43(3): 385-388.
- [17] 王宏伟. 同工酶在水产动物研究中的应用 [J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2003, 23(4): 445-449.
- [18] 母昌考, 王春琳. 甲壳类同工酶研究进展 [J]. 水产科学, 2003, 22(4): 42-44.
- [19] Yokota Y, Nakano E, et al. Comparative studies on particulate acid phosphatases in sea urchin eggs [J]. Comp Biochem Biophysiol, 1982, 71(4): 563-567.
- [20] 陈素丽, 陈清西, 杨佩真. 长毛对虾磷酸酯酶的研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2000, 39(3): 135-140.
- [21] 张辉, 张海莲. 碱性磷酸酶在水产动物中的作用 [J]. 河北渔业, 2003, (5): 12-13.
- [22] 贾长恩, 李叔庚, 王士平, 等. 组织化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 294-310.
- [23] 孙虎山, 王宜艳, 王慧丽. 栉孔扇贝血淋巴中酯酶活性及其性质 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 39-44.
- [24] 贾守菊, 应雪萍, 陈艳乐, 等. 中华绒螯蟹不同发育阶段腹肢粘液腺同工酶的比较 [J]. 海洋湖沼通报, 2004, (4): 52-60.
- [25] 刘晓云, 张志峰, 包振民, 等. 中国对虾组织细胞中的过氧化物酶体 [J]. 海洋科学, 2003, 27(11): 43-46.
- [26] 张淑红, 高宝嘉, 温秀军. 枣疯病过氧化物酶及苯丙氨酸解氨酶的研究 [J]. 植物保护, 2004, 30(5): 59-62.
- [27] 蔡完其, 陆宏达. 患暴发性病毒病的中国对虾肝脏病理变化 [J]. 上海水产大学学报, 1994, 3(1): 27-33.

Changes of four isozymes in different tissues of *Litopenaeus vannamei* with Taura Syndrome Virus

SUN Jing-qiu, XU Yan, LI Xiao-ying

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Four isozymes including phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), esterase (EST) and peroxidase (POD) in eye, heart, liver, gill and muscle of *Litopenaeus vannamei* were analysed and compared between the health shrimp and the diseased shrimp infected by Taura Syndrome Virus (TSV) through vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results showed that the four isozymes were all expressed in five kind of tissues of *L.vannamei*, but the band numbers and activities of the four isozymes were tissue specific to some extent. The activities of the four isozymes were all the highest in liver of *L.vannamei*, while those of POD and ACP were the lowest in muscle; EST activity was the lowest in eye, and no AKP activity was expressed in eye. There were evident differences between diseased shrimp and healthy shrimp in zymograms and activities of ACP, AKP, EST and POD in tissues. The ACP and AKP activities decreased after infection with TSV. ACP decreased by 2, 1 and 1 band in liver, gill and heart, respectively and some bands got weaker; AKP decreased by 3, 4 and 3 bands in liver, heart and muscle respectively. But higher activities and more complex zymograms of EST and POD were detected in diseased shrimps than those in the healthy shrimps especially in liver and heart. EST presented 3 new bands and 5 new bands, and POD presented 1 new band in liver and heart of the disease shrimp respectively, furthermore some bands got deeper and thicker. Due to the electrophoretogram of four isozymes changed most obviously in liver of diseased shrimps with TSV, the isozymes in shrimp liver can be used as biochemical marker for diagnosis of Taura Syndrome in *L.vannamei*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 122–128]

Key words: *Litopenaeus vannamei*; TSV; isozyme; polyacryl amide gel electrophoresis; tissue specificity

Corresponding author: XU Yan. E-mail: xuyan@shnu.edu.cn