

三角帆蚌十六种同工酶系统的表型 及其在瘟病病蚌中的病理变化

邵健忠 项黎新 华志华 毛树坚

(杭州大学生物研究所, 310028)

提 要 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对我国三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea)11种组织中16种同工酶系统的酶谱表型、组织分布、活性含量和迁移特征进行了分析,并就不同酶谱特征与基因表达状况作了讨论。证实酯酶和 α -磷酸甘油脱氢酶的表型和活性含量在病蚌体内有明显的紊乱现象,表明三角帆蚌瘟病的病理机制与消化系统脂类代谢异常有密切关系。消化系统两种酶谱的特异性变化,可作为瘟病早期诊断的生化辅助指标。

关键词 三角帆蚌,同工酶系统,蚌病病理,蚌病诊断

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea)是我国培育淡水珍珠的优良品种,以往对它的研究主要见诸生态、养殖和组织形态学等,生理生化和分子生物学的工作较少[石安静,1985;石安静等,1987;刘小明,1991],同工酶系统的研究则尚未见报道。70年代末,随着生产上传染性“三角帆蚌瘟病”的大规模流行,国内开始有关病原学研究[倪达书等,1982];1986年确认三角帆蚌瘟病是一种病毒性蚌病[张治国等,1986];1987年对病原病毒进行了分离和鉴别,认为是撒砂样病毒科(Arenaviridae)病毒,暂名为三角帆蚌瘟病病毒(*Hyriopsis cumingii* Plague Virus, HcPV)[张治国等,1987]。为了深入探讨三角帆蚌瘟病的病理机制及开展临床诊断和防治,同时也为贝类学基础研究积累资料,本文报道瘟病前后三角帆蚌成体组织中16种同工酶系统的表型及病理变化。

一、材料和方法

1. 实验蚌 二龄三角帆蚌200余只,蚌体长10—12厘米,取自浙江省德清珍珠研究所蚌养殖基地,实验前置25°C水族箱人工饲养3—4周,确证健康无病后使用。

2. 病毒来源 HcPV取自浙江省德清疫点自然发病的瘟病病蚌组织,采用蔗糖密度梯度离心分离提纯[张治国等,1987],Reed-Muench法测定其对蚌体的半数致死剂量LD₅₀, -70°C保存备用。

3. 病蚌制备 取分离提纯的HcPV,以100LD₅₀(5.0LogLD₅₀/0.1ml)的量从斧足注射感染实验蚌,水温25°C,15天后发病死亡。实验将整个发病期分为早、中、后三个时期,每5天为一期,分别取材备用。

4. 同工酶样品的提取 分别取健康蚌及各期病蚌的外套膜、鳃、生殖腺、肝、胃、肠、

闭壳肌、斧足、心脏、触唇和围心腔液 11 种组织,加 0.05M Tris-0.38MGly, pH8.3 缓冲液匀浆,48,000g 离心,收集上清层同工酶液, -70°C 保存。

5. 电泳方法 采用高 pH 不连续系统聚丙烯酰胺凝胶平板电泳,参照 Blackshear 等方法进行 [Blackshear, P. J., 1984]。电泳前按 Bradford 法测定各样品的蛋白浓度 [Bradford, M. M., 1976], 以 200 微克/孔的量加样电泳。酶带的染色按 Siciliano 等方法进行 [希西来诺等, 1980; 胡能书等, 1985]。电泳图谱以区带数目、染色强度和相对迁移率为指标进行描绘。岛津 CS-930 薄层色谱仪扫描, 根据扫描峰面积值, 比较酶带组份的相对活性含量。

6. 酶的命名 对目前尚不清楚其分子遗传基础的同工酶带的命名, 均按国际生化命名委员会的规则进行 [苏学良等, 1991]。

二、结 果

(一) 健康蚌组织中同工酶系统的分析

1. 乙醇脱氢酶 (ADH, E. C. 1.1.1.1) 三角帆蚌 ADH 的活性很低, 11 种组织的电泳结果, 仅在闭壳肌中显示两条染色很浅的酶带 ADH-1 和 ADH-2, 其它组织均未检测到 ADH 的活性 (图 1, A)。

2. α -磷酸甘油脱氢酶 (α -GPDH, E. C. 1.1.1.8) 未感染病毒的健康蚌中 α -GPDH 的活性很低, 只能在外套膜、生殖腺、肝、胃、肠和闭壳肌中检测到微弱的酶带, 各组织的酶带数均为两条, α -GPDH-1 和 α -GPDH-2, α -GPDH-1 的活性略高 (图 1, B)。

3. 乳酸脱氢酶 (LDH, E. C. 1.1.1.27) 三角帆蚌 LDH 的活性也很低, 在外套膜、生殖腺、闭壳肌和斧足中各显示 1 条微弱的酶带, 与草鱼的 LDH-A₄ 酶带相对应 (图 1, C)。

4. 苹果酸脱氢酶 (MDH, E. C. 1.1.1.37) 三角帆蚌 MDH 的活性较高, 11 种组织均有分布, 包括趋于阴性一侧的线粒体型 m-MDH 和趋于阳极一侧的细胞质型 s-MDH 两组; m-MDH 的酶带数均为 1 条; s-MDH 的酶带数在外套膜、鳃、生殖腺、闭壳肌中为 1 条, 在肝、胃、肠、斧足、心脏、触唇和围心腔液中为 3 条; s-MDH 酶带中以 s-MDH-1 的活性最高 (图 1, D)。

5. 苹果酸酶 (ME, E. C. 1.1.1.40) 三角帆蚌中 ME 的活性很高, 但酶谱单一, 11 种组织的电泳结果均呈现 1 条宽阔的酶带, 染色强度相近, 含量基本一致 (图 1, E)。

6. 异柠檬酸脱氢酶 (IDH, E. C. 1.1.1.42) 细胞内的 IDH 有以辅酶 I 和辅酶 II 为受氢体的两种不同类型, 本文所分析的是以辅酶 II 为受氢体的类型, 其活性较低, 仅在鳃、生殖腺、肝和胃组织中检测到显色很淡的细胞质型 s-IDH 和线粒体型 m-IDH 酶带各 1 条; s-IDH 的泳动较快, 活性略高于 m-IDH (图 1, F)。

7. 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6PGD, E. C. 1.1.1.44) 三角帆蚌中 6PGD 的分布较广, 11 种组织均显示出 6PGD-1 和 6PGD-2 两条酶带, 但活性有所差异, 两者在外套膜、生殖腺、肝、胃、肠和闭壳肌中活性高, 含量相近; 在心脏、围心腔液中活性较高, 但含量不等, 以 6PGD-1 为主; 在鳃、斧足、触唇中含量相近, 但活性均较低 (图 2, A)。

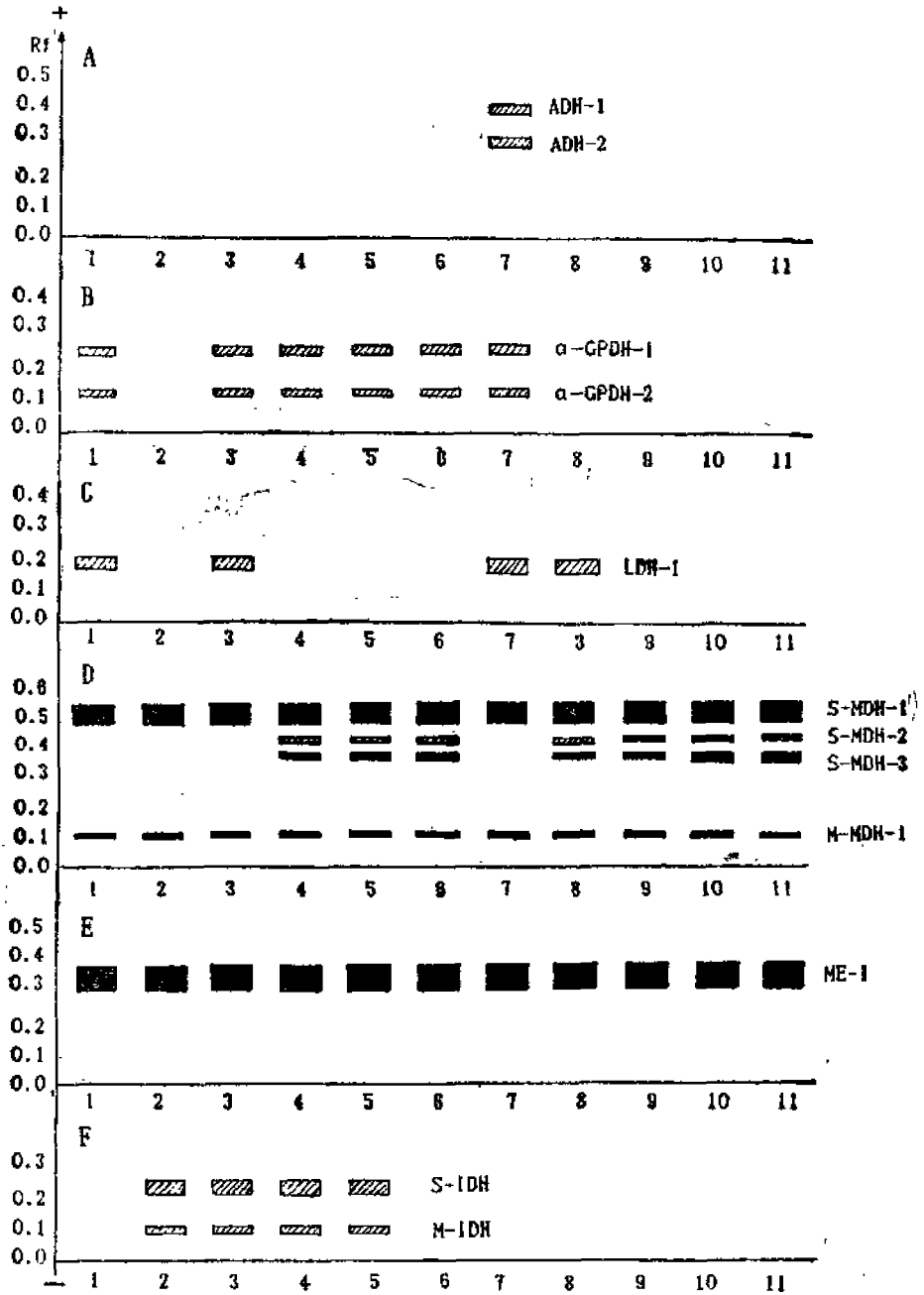


图1 A-F,依次为 ADH, α -GPDH, LDH, MDH, ME 和 IDH 同工酶的电泳谱图解

Fig. 1 Diagrams of ADH, α -GPDH, LDH, MDH, ME and IDH electrophoretograms in order of A-F

1.外套膜; 2.鳃; 3.生殖腺; 4.肝; 5.胃; 6.肠; 7.闭壳肌; 8.斧足; 9.心脏; 10.触唇; 11.围心腔液

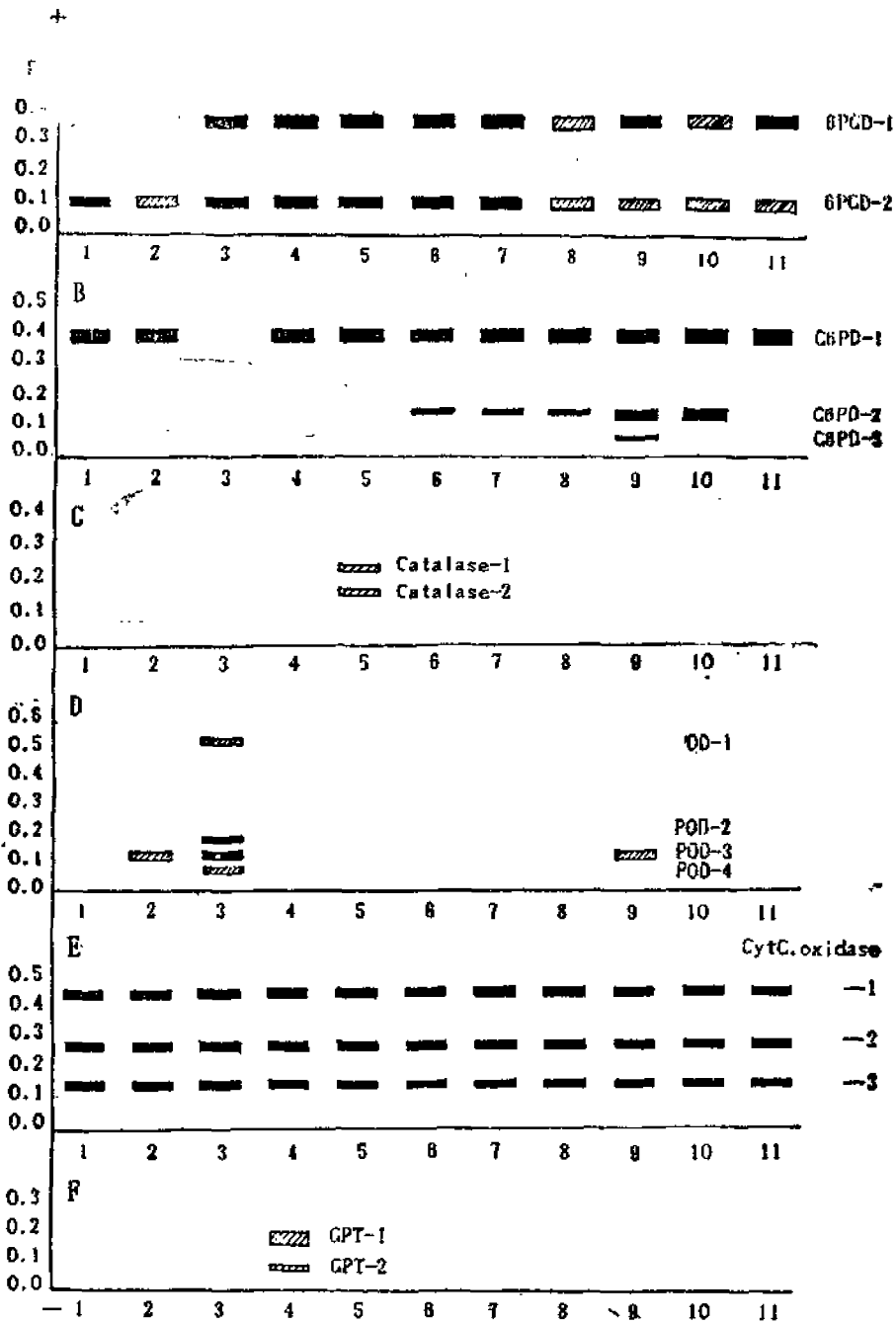


图 2 A-F, 依次为 6PGD, G6PD, Catalase, POD, CytC. Oxidase 和 GPT 同工酶的电泳谱图解

Fig. 2 Diagrams of 6PGD, G6PD, Catalase, POD, CytC. Oxidase and GPT electrophoretograms in order of A-F

注: 图例同图 1。

8. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PD, E. C. 1.1.1.49) 三角帆蚌的 G6PD 活性较高, 除生殖腺外, 其余 10 种组织均有分布。心脏的酶带最为典型, 有 G6PD-1、-2、-3 酶带共 3 条; 其次是肠、闭壳肌、斧足和触唇, 有 G6PD-1、-2 酶带 2 条; 外套膜、鳃、肝、胃和围心腔液仅含 G6PD-1 酶带 1 条; 3 种酶带中以 G6PD-1 的活性较高(图 2, B)。

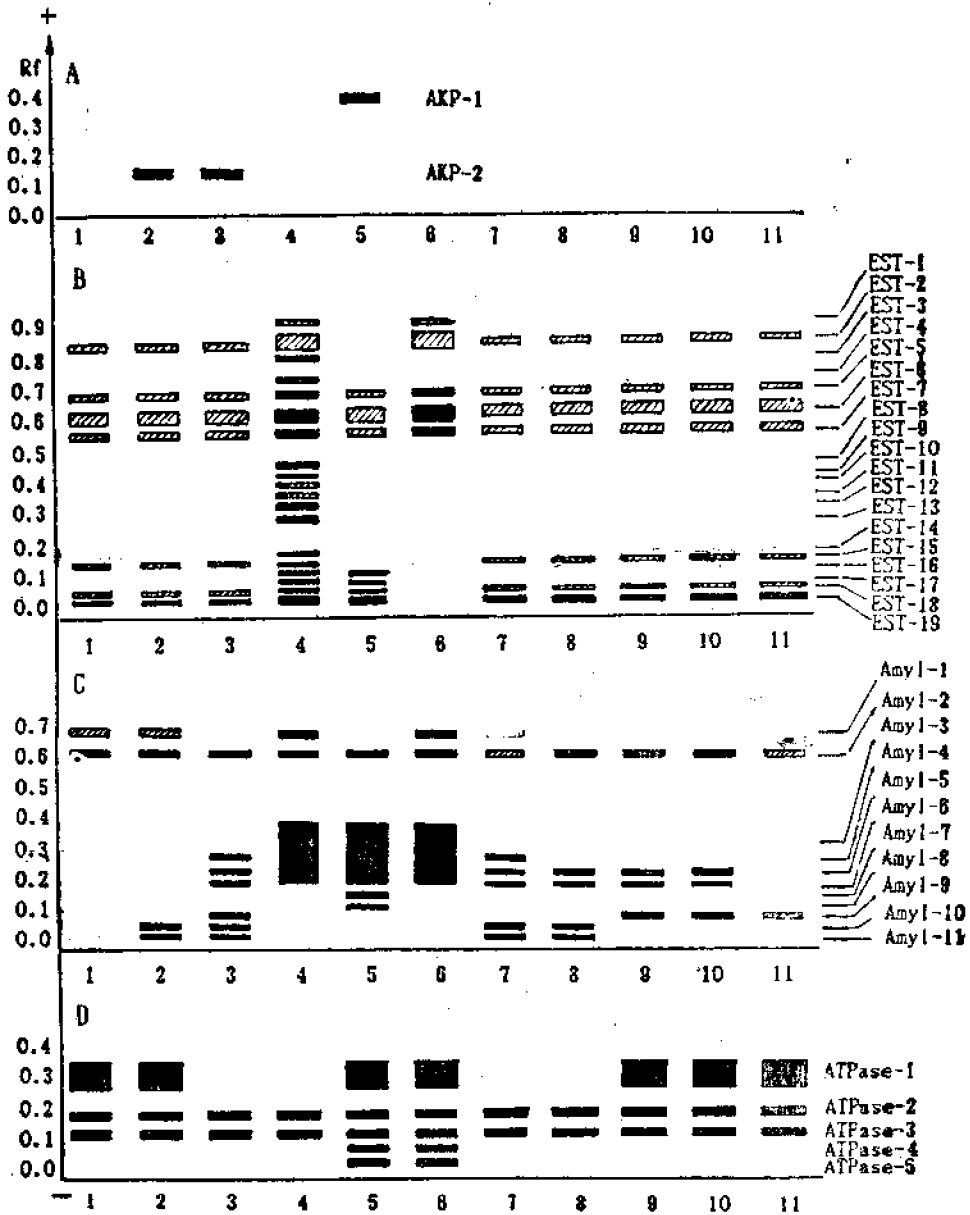


图 3 A-D, 依次为 AKP, EST, Amylase 和 ATPase 同工酶的电泳谱图解
 Fig. 3 Diagrams of AKP, EST, Amylase and ATPase electrophoretograms in order of A-D

注: 图例同图 1。

较低(图 3,B)。

15. 淀粉酶(Amylase, E. C. 3.2.1.1) 淀粉酶有 α 、 β 、 Q 和 R_4 种, 三角帆蚌中能检测到 α 、 β 和 R_3 种; 以 α 淀粉酶的活性最高, 分布于肝、胃和肠3种组织, 电泳后均呈现1条宽阔的无色透明酶带 Amyl-3; R 淀粉酶活性较低但酶带丰富, 11种组织中均有分布, 酶带呈特异性的浅蓝色, 包括 Amyl1-2、Amyl4-6、Amyl9-11共8条; 此外, 胃组织中还观察到红色的 β 淀粉酶酶带2条, 它们是 Amyl7-8(图 3,C)。

16. 腺苷-5'-三磷酸酶(ATPase, E. C. 3.6.1.8) 三角帆蚌 ATPase 的活性很高, 但11种组织的酶谱表型有所差异; 肠和胃组织的酶谱丰富, 有 ATPase1-5酶带共5条; 外套膜、鳃、心脏、触唇和围心腔液次之, 有 ATPase1-3酶带3条; 生殖腺、肝、闭壳肌、斧足则均含2条, 分别是 ATPase-2和 ATPase-3(图 3,D)。

三角帆蚌11种组织中同工酶的特异性分布列于表1。

(二) 病蚌组织中同工酶系统的病理变化

1. 酯酶同工酶 11种健康与病蚌组织中16种同工酶系统的比较分析结果表明, 感染 HcPV 后发生明显表型变化的同工酶有两种, 酯酶和 α -磷酸甘油脱氢酶, 两者的病变均集中在消化系统的肝、胃和肠3种组织中。酯酶同工酶的变化表现在酶带丢失和活性改变两方面。在肝组织的19条酶带中, EST5-19酶带发生较大变化, 其中 EST14-16和 EST19酶带丢失, EST5-7和 EST12-13酶带活性降低。胃组织的7条酶带中, EST16和 EST19酶带丢失, EST5-7酶带活性进一步降低。肠组织的酶带数目没有改变, 但 EST5-7酶带的活力大大下降。3种组织 EST 酶谱的变化均出现在 HcPV 感染的早期, 并保持到发病的中、后期(图 4)。

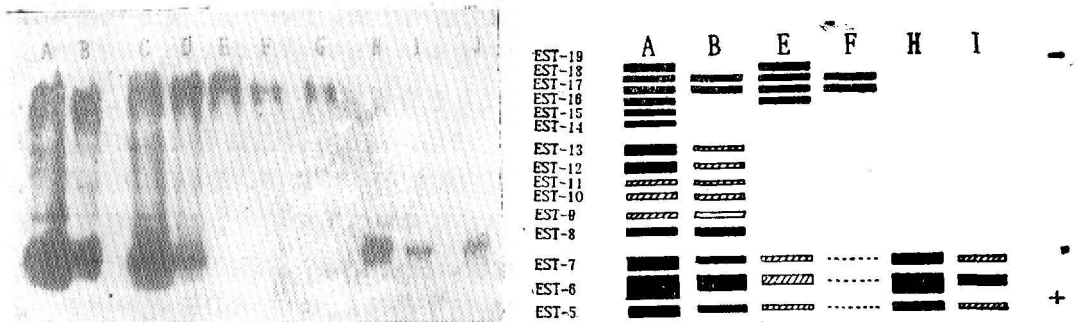


图 4 病蚌组织中 EST 同工酶的病变图谱

Fig. 4 Pathological zymograms of EST in diseased mussels

A-D: 肝; A、C. 健康蚌; B. 感染早期; D. 感染后期。

E-G: 胃; E. 健康蚌; F. 感染早期; G. 感染后期。

H-J: 肠; H. 健康蚌; I. 感染早期; J. 感染后期。

2. α -磷酸甘油脱氢酶 α -磷酸甘油脱氢酶的变化主要发生在胃组织, 在正常状态下, 酶带的染色浅, 活性低, 而在 HcPV 感染后, 酶带的着色却大大加深, 活性增加10倍以上, 这种变化也出现在病毒感染的早期, 并随病程发展而更为明显(图 5)。

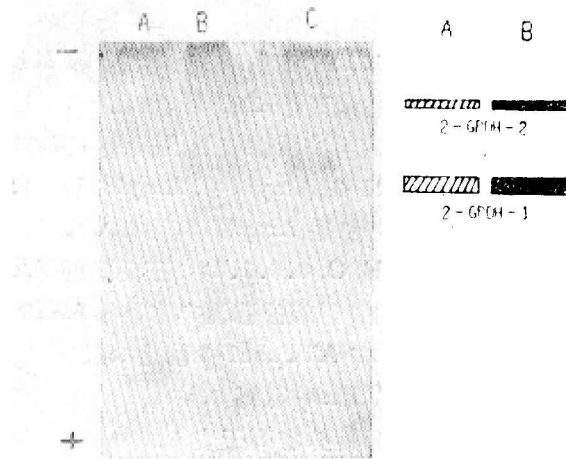


图5 病蚌组织中 α -GPDH同工酶的病变图谱

Fig. 5 Pathological zymograms of α -GPDH in diseased mussels

A-C: 胃; A. 健康蚌; B. 感染早期; C. 感染后期。

三、讨 论

1. 目前对贝类组织中酶的分析仅见牡蛎、贻贝和扇贝等消化系统的肝脏、胰脏和晶杆体中一些简单的消化酶的报道[蔡英亚等,1979];本文的分析结果则表明,三角帆蚌中的酶类已远不限于消化系统的几种简单的类型,在蚌体的11种组织中已存在相当丰富和完整的酶系统,它们不仅以同工酶的形式参与代谢和调节,而且在表型、分布和活性上均表现出高度的组织特异性。16种同工酶所催化的性质已涉及糖代谢中的无氧酵解、三羧酸循环、磷酸己糖旁路、糖的异生作用以及脂类的分解与合成,生物氧化和能量代谢等方面,表明三角帆蚌已具备以上与高等动物相类似的基本代谢途径及调节方式。

2. 同工酶表型及其基因座位的研究目前主要见于脊椎动物的GDH、MDH、G6PD、6PGD、IDH、ADH、AKP和EST等[陈惠黎,1981]。与这些同工酶系统相比较,三角帆蚌的G6PD、6PGD、IDH、ADH和AKP表现出相似的酶谱表型,如G6PD、6PGD、IDH和ADH呈现二聚体同工酶的特征,AKP呈现两种单体酶的特性,表明这些同工酶系统在三角帆蚌中存在与脊椎动物相似的遗传性状,分别由两个不同的基因座位编码合成[陈惠黎,1981;李扬文等,1991;吴力钊等,1988;傅予昌等,1988]。LDH则种类单一,11种组织的电泳结果仅出现Ldh-A基因编码的厌氧性 A_4 同工酶,未检测到B基因产物,该结果提示三角帆蚌中只存在一个Ldh-A基因,尚未出现B基因,这与目前报道的到鱼类才进化出B基因的结果是相一致的[朱蓝菲等,1983;Markert, C. L.等,1975]。MDH的种类及酶谱表型分别与脊椎动物的s-MDH A_2 、 A_B 、 B_2 和m-MDH C_2 相对应,提示三角帆蚌的MDH也是二聚体同工酶,分别由s-mdh A、B和m-mdh C基因编码合成,但电泳中未发现m-mdh D基因产物,这是由于贝类尚未进化出D基因还是其处于不活跃的“关闭”状态,值得进一步研究[杨兴棋等,1984]。EST在脊椎动物中有明显的多态性,难以与三角帆蚌的结果相比较[熊全沫等,1985];软体动物中曾有螺类EST的报

道,其酶谱表型与三角帆蚌十分相似。已证实螺类 EST 是由羧基酯酶等 4 种组分组成的,有 7 个位点至少 14 个独立的等位基因参与遗传[许学积等,1982]。这些结果,可作为三角帆蚌 EST 进一步研究的很好借鉴。

3. EST 和 α -GPDH 是脂类化合物水解和进入中间代谢的重要酶系,其作用除维持细胞内正常的能量代谢外,还与机体的解毒功能有密切的关系[俞远京等,1991]。病蚌组织中两种酶系的紊乱,将直接影响其脂类代谢的正常进行,从而使机体的能量代谢失衡、解毒功能下降。这些异常的“生化症状”很可能就是导致三角帆蚌瘟病的分子病理学机制之一。病变过程集中在消化系统的肝、胃、肠组织,进一步说明了瘟病的性质是一种消化系统的疾病,这与临床上病蚌所出现的肝溃烂、晶杆体消失、停止摄食等症状是相吻合的。

4. 同工酶是生物机体中可以反映机体内各种变化的天然标记,作为病理诊断指标具有特异性强、灵敏度高等优点,因而得到广泛应用[邱文平等,1990]。三角帆蚌的分析结果表明,瘟病病蚌中同工酶系统的变化集中于消化系统的 EST 和 α -GPDH,表现出很高的组织特异性和酶的特异性。两种酶谱表型的变化规律稳定,重复性好,均出现在发病的早期,灵敏度高,因此可作为三角帆蚌瘟病早期诊断和预防的一个很好的生化辅助指标,应用于生产。

作者中的华志华现在中国水稻研究所生理系。

参 考 文 献

- [1] 石安静,1985. 三角帆蚌珍珠囊形成的研究. 水产学报,9(3):247—253.
- [2] ——等,1987. 三角帆蚌外套膜细胞的超微结构. 水产学报,11(3):236—240.
- [3] 刘小明,1991. 河蚌结缔组织细胞发生及发育观察. 水产学报,15(2):124—129.
- [4] 朱蓝菲等,1983. 20 种螺科鱼类同工酶的表型分析及有关进化问题的探讨. 水产学报,7(2):145—152.
- [5] 许学积等,1982. 各地钉螺 α -磷酸甘油脱氢酶和酯酶同工酶变异的研究. 动物学杂志,26(3):26—28.
- [6] 张治国等,1986. 三角帆蚌瘟病的研究, I. 一种新的病毒病. 微生物学报,26(4):308—312.
- [7] ——,1987. 三角帆蚌瘟病的研究, II. 三角帆蚌瘟病的病原——一种嵌砂样病毒. 微生物学报,27(2):116—120.
- [8] 希西来诺, M. J. 等,1980. 凝胶上酶的分离和显现. 植物生理学通讯,4:59—70.
- [9] 苏学良等,1991. 英汉酶学名词词汇,54—535. 天津科学技术出版社.
- [10] 陈惠黎,1981. 同工酶分子生物学. 国外医学分子生物学分册,3(4):158—167.
- [11] 李扬文等,1991. 不同产地大熊猫红细胞同工酶的比较研究. 动物学报,37(3):281—286.
- [12] 吴力钊等,1988. 草鱼同工酶基因座位多态性的初步研究. 水生生物学报,12(2):117—124.
- [13] 邱文平等,1990. 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,6(2):196—198.
- [14] 杨兴棋等,1984. 几种罗非鱼乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶同工酶的电泳研究. 遗传学报,11(2):132—140.
- [15] 胡能书等,1985. 同工酶技术及其应用,70—132. 湖南科学技术出版社(长沙).
- [16] 俞远京等,1991. 中国本免不同组织器官酯酶同工酶的比较研究. 动物学杂志,26(3):26—28.
- [17] 倪达书等,1982. 三角帆蚌疾病的初步研究. 淡水渔业,(5):41—42.
- [18] 傅子昌等,1988. 团头鲂的胚胎及成体组织中八种同工酶系统的研究. 水生生物学报,12(3):219—229.
- [19] 蔡英亚等,1979. 贝类学概论,117—121. 上海科学技术出版社.
- [20] 熊全洋等,1985. 中国胭脂鱼同工酶的研究. 动物学报,31(1):20—27.
- [21] Blackshear, P. J., 1984. Systems for Polyacrylamid Gel Electrophoresis. In: *Methods in Enzymology*, vol. 104 (Jakoby, W. B. ed.), 237—255, Academic Press, New York.
- [22] Bradford, M. M., 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quanti-

ties of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

[23] Markert, C. L. *et al.*, 1975. Evolution of a gene. *Science*, 189(4197): 102-114.

SIXTEEN ISOZYMIC PHENOTYPES OF *HYRIOPSIS CUMINGII* LEA AND THEIR PATHOLOGICAL CHANGES IN PLAGUE DISEASED MUSSELS

Shao Jianzhong, Xiang Lixin, Hua Zihua and Mao Shujian

(*Biological Institute of Hangzhou University, 310028*)

ABSTRACT Sixteen isozymes, extracted from eleven tissues of healthy *Hyriopsis cumingii* Lea mussels and plague-diseased mussels respectively, were analysed with vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis. The isozymes referred above were alcohol dehydrogenase (ADH), α -phosphoglycerol dehydrogenase (α -GPDH), lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme (ME), isocitrate dehydrogenase (IDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), catalase, peroxidase (POD), cytochrome oxidase, glutamatepyruvate transaminase (GPT), alkaline phosphatase (AKP), esterase (EST), amylase and adenosine triphosphatease (ATPase). The isozymic phenotypes, tissue distributions, relative activities and mobile characteristics of the sixteen isozymes were determined, and the possible relationships between the isozyme pattern and gene expression were discussed. In comparison with the healthy mussels, the zymograms and activities of EST and α -GPDH in diseased mussels were evidently disordered. It provided the biochemical evidence that the mechanism of plague pathogenesis was closely related to the lipid metabolic block in digestive system of the diseased mussels. The pathological changes of the two isozymes in digestive system were considered to be an auxiliary biochemical diagnosis marker in the early stage of *Hyriopsis cumingii* Plague.

KEYWORDS *Hyriopsis cumingii* Lea, isozymic system, mussel plague pathogenesis, mussel plague diagnosis