

# 患出血病鲫鱼主要组织可溶性蛋白质变化的研究

徐 欣, 彭永康

(天津师范大学 生物系, 天津 300074)

**摘要:** 采用 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS—PAGE)对正常和患出血病的鲫鱼心、肝、肾、鳃、脑、肌肉、肠、眼 8 种组织中可溶性蛋白质进行比较分析。结果表明: 病鱼的心、肝、肾、鳃、脑、肌肉 6 种组织的蛋白质电泳谱带与正常鱼相比有较大变化, 心和肾各缺失 5 条谱带; 肝新诱导出 1 条谱带, 另有 1 条谱带缺失; 鳃中新诱导出 2 条谱带, 有 2 条谱带缺失; 脑中增加了 4 条新谱带, 1 条谱带缺失; 肌肉新增 5 条谱带。说明鱼在遭受病原菌侵袭后, 蛋白质的合成代谢受到较大影响。这些变化可作为辅助疾病诊断的生化指标。

**关键词:** 鲫鱼; 出血病; 可溶性蛋白质; SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: S943.117.41<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1000—7091(2003)04—0099—05

## Comparative Studies on the Soluble Protein Changes of Major Organs and Tissues in Normal and Hemorrhagic Diseased Crucian Carp

XU Xin, PENG Yong-kang

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

**Abstract:** Eight kinds of tissue soluble proteins of normal and Hemorrhagic diseased crucian carp were analysed by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that the protein electrophoretic bands of heart, liver, kidney, branch, brain and muscle of diseased crucian carp were different from those of normal ones, five bands disappeared in heart and kidney; one new band present and one band disappeared in liver; two new bands present and two bands disappeared in branch; five new bands present in muscle. It indicated that the protein metabolism of fish changed greatly after infected by pathogenic bacteria. The changes of protein can be considered as a biochemical diagnosis indexes and the basis for studying the pathogenic mechanism at the biochemistry level and early prevention.

**Key words:** Crucian carp ; Hemorrhagic disease ; Soluble protein ; SDS—PAGE

自上世纪 80 年代中期起, 我国发生了大规模的淡水养殖鱼类爆发性出血传染病, 此病具有以下 3 个主要特点: 流行面广, 感染鱼的种类多, 发病持续时间长。每年的 3~11 月都能发生, 5~9 月为发病高峰期, 鱼的死亡率较高, 给水产养殖业造成了巨大损失。鉴于该病的较强危害性, 广大水产工作者开展了多方面的研究工作, 并取得较大进展。在病原体研究方面, 黄琪琰等发现导致该病的主要病原菌为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*), 高温季节里

造成急性死鱼的主要是该菌<sup>[1]</sup>, 陆承平等报道该菌的主要毒性机制是产生溶血素, 肠毒素, 细胞毒素、胞外蛋白酶等<sup>[2]</sup>, Chakraborty 等不仅克隆了这些毒素的基因, 还对这些基因的分布、调控进行了研究<sup>[3~9]</sup>; 黄琪琰等做了该病流行病学的调查分析, 查明造成大范围流行与水质变化和养殖管理有关<sup>[1]</sup>; 米瑞美和丛宁等对该病引起的鱼体显微、亚显微组织病理和生理变化也做了研究, 发现病鱼组织器官广泛发生变性、坏死和解体, 肝、肾、胰功能均发生不

收稿日期: 2003—03—25

作者简介: 徐 欣(1968—), 女, 辽宁营口人, 在读硕士研究生, 工程师, 主要从事水产病害及防治药物研究。

同程度的障碍,细胞结构及主要细胞器都出现病理变化<sup>[7~9]</sup>。

对该病引起的鱼体生化方面变化的研究也已开展,如陈昌福对患病的翘嘴鲌血清蛋白质成分变化做了研究<sup>[10]</sup>,但对其他组织的蛋白质变化国内还未见报道。本试验中我们运用 SDS-PAGE 法对患出血病鲫鱼的 8 种主要组织可溶性蛋白质的变化做了初步研究,SDS-PAGE 作为生化分析中常用的方法在水产病害研究中的应用越来越多,蛋白质是基因表达的产物,它的变化在一定程度上反映了基因表达上的变化,通过分析蛋白质电泳谱带的差异,可以进一步从生化水平上揭示该病的致病机理并有望对此病进行有效的早期诊断和防治。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验用鱼

患出血病鲫鱼取自天津水产研究所鱼病门诊部;正常鱼购于农贸市场,在水族箱内饲养 5 d,每天投喂颗粒饵料,体质健康,病鱼及正常鱼均为异育银鲫,重 250 g 左右。病鱼主要症状为:鱼体鳃、鳃盖、头顶充血,身体两侧有血斑,解剖后发现肝、心肿大,颜色较淡,肾脏充血发炎并肿大。

### 1.2 蛋白质样品制备

分别摘取正常鱼和病鱼的心、肝、脑、鳃、肾、肌肉、肠、眼 8 种组织,置于 4℃ 去离子水中洗净,用滤纸吸干水分,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,匀浆液移入离心管中,10 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加入等体积蛋白质变性液,100℃ 沸腾 3~5 min,置于-20℃ 冰箱冷冻保存待用。

### 1.3 标准蛋白

标准蛋白为低分子量,购于 Bio-Rad 公司,包括:兔肌肉磷酸化酶 b(Rabbit muscle phosphorylase b) 97 kD;牛血清白蛋白(Bovine serum albumin)66 kD;卵清蛋白(Ovalbumin)43 kD;碳酸酐酶(Carbonic anhydrase)31 kD;黄豆胰蛋白酶抑制剂(Soybean trypsin inhibitor)21 kD;溶菌酶(Lysozyme)14 kD(图 1-A)。

### 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,样品加样量每管约为 85 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。

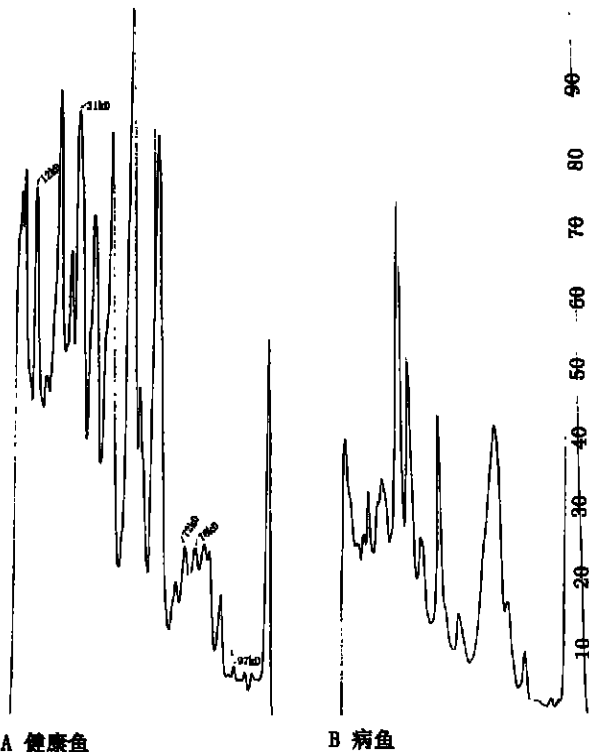


图 1 鲫鱼心脏蛋白凝胶扫描图

### 1.5 照相及扫描

对试验结果进行拍照,并用岛津 CS-930 薄层层析扫描仪记录试验结果。

## 2 结果与讨论

试验结果表明,病鱼在心、肝、肾、鳃、脑、肌肉等组织的蛋白质电泳谱带与正常鱼相比发生较大变化(肠的蛋白质谱带变化也很大,但由于谱带不甚清晰,所以没做进一步分析),本试验重复进行 8 次,每次结果都很稳定,蛋白质谱带恒定,下面是对电泳结果的具体分析。

### 2.1 心脏

从扫描图可以看到正常鱼有 22 条谱带,而病鱼则只显示 17 条谱带,比健康鱼少 5 条谱带(图 1-A),所缺少的 5 种蛋白质分子量分别为 97, 76, 72, 31, 12 kD,其他相对应谱带病鱼与正常鱼之间在着色性、谱带粗细与峰值上也存在明显差异(图 1-A, B)。造成病鱼心脏中蛋白质变化可能是在遭受病原菌侵袭后,其心脏由于受血液携带的病原菌的影响,蛋白质的合成代谢发生较大变化,主要表现为蛋白质的合成受到抑制。丛宁等对患该病鲫鱼的心脏进行电镜观察也发现心肌细胞里的内质网、高尔基复合体等极少,造成蛋白质合成受阻<sup>[7]</sup>,其观察结果

与本试验病鱼蛋白质电泳谱带的减少相吻合。

## 2.2 肝脏

从扫描图可以看到, 正常鱼和病鱼都有 29 条谱带, 在谱带的数量上没有差别, 但在谱型上有两个区域产生明显差异, 如在分子量约为 97 kD 处, 病鱼中明显有 1 条分子量约为 100 kD 的蛋白质被诱导产生(图 2—B 箭头所示); 而在 66 kD 附近处, 则有 1 条分子量约为 45 kD 的谱带消失(图 2—A), 另外, 正常鱼与病鱼相比较, 对应谱带的着色性、粗细及峰值也分别存在较大差异(图 2—A, B)。肝脏作为鱼体中最大的腺体, 担负着解毒、供热等重要功能, 当病原菌侵入后, 肝脏受其分泌的毒素影响, 发生了一些特殊代谢, 蛋白质特别是一些酶发生了变化, 黄琪琰等对患此病的异育银鲫研究也发现病鱼血清的谷草转氨酶、谷丙转氨酶显著高于正常鱼<sup>[12]</sup>, 这一结果与本试验研究结果也是一致的。

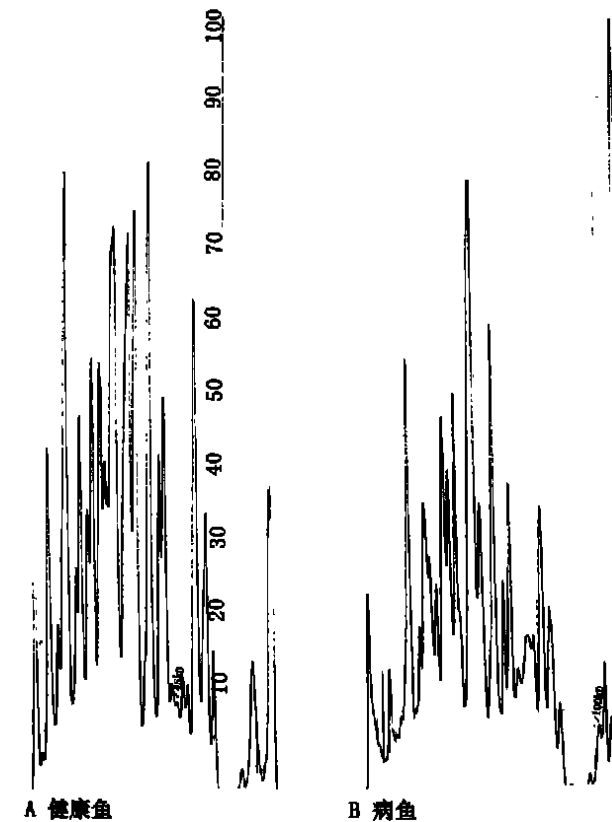


图 2 鲫鱼肝脏蛋白凝胶扫描图

## 2.3 肾脏

从扫描图可以看到正常鱼肾脏内可检测到 26 条谱带, 但鱼感病后, 蛋白质发生两方面的变化, 首先是个别蛋白质的消失, 如在 97 kD 附近, 有 3 条谱带消失, 其分子量约为 110, 100 和 95 kD(图 3—A 箭头所示), 在低分子量区, 则有 2 条谱带消失, 分子量约为 10 kD 和 12 kD(图 3—A 箭头所示)。第二方面

变化主要是病鱼中蛋白质含量明显下降, 表现为多条谱带扫描峰值与正常鱼相比明显下降(图 3—A, B)。据翟子玉等对患此病的异育银鲫的组织病理学研究发现, 病鱼的肾脏中有大量细菌并不断繁殖, 肾小管上皮细胞及尿管上皮细胞大量坏死, 肾脏的生理机能遭到严重破坏<sup>[11]</sup>, 估计是病原体侵袭机体后, 干扰了肾脏细胞的正常代谢, 阻断蛋白质的正常合成, 从而影响其生理机能。

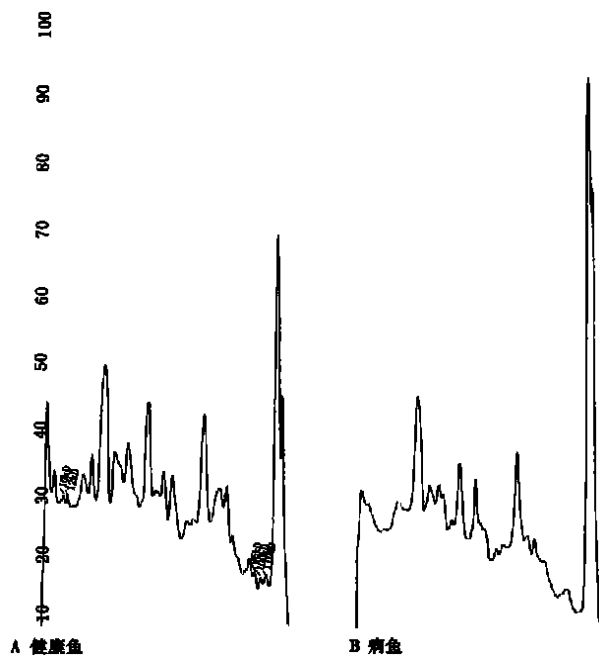


图 3 鲫鱼肾脏蛋白凝胶扫描图

## 2.4 鳃

从扫描图上可以看到正常鱼和病鱼都有 22 条谱带, 在谱带的数量上没有差别。正常鱼在 14, 18 kD 处比病鱼多 2 条带(图 4—A 箭头所示), 但病鱼则分别在 50 kD 和 110 kD 处诱导产生 2 条新的谱带(图 4—B 箭头所示), 同时在 66~97 kD 分子量范围内的 6 条谱带在蛋白质含量上比正常鱼要少得多, 从扫描图上看, 其峰值比正常鱼低。鱼在遭受病原菌侵袭后鳃受到的破坏较大, 鳃作为鱼体抵抗病原菌侵袭的第一道屏障, 在鱼体因受外界因素影响导致免疫力降低时更易遭受病原菌的破坏, 导致其正常生理机能的改变, 蛋白质作为细胞体现正常生理机能的物质基础, 发生相应变化可能与这一原因有关(图 4—A, B)。

## 2.5 脑

从扫描图可以看到正常鱼有 19 条谱带, 病鱼有 22 条谱带。病鱼比健康鱼多 4 条谱带。这 4 条谱带的分子量分别为 70, 50, 18 和 16 kD(箭头所示),

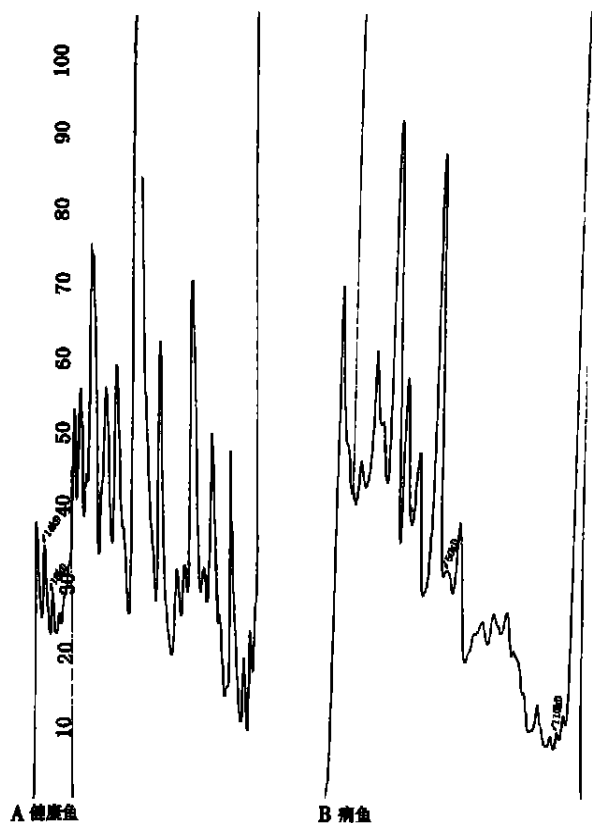


图4 鲫鱼腮蛋白凝胶扫描图

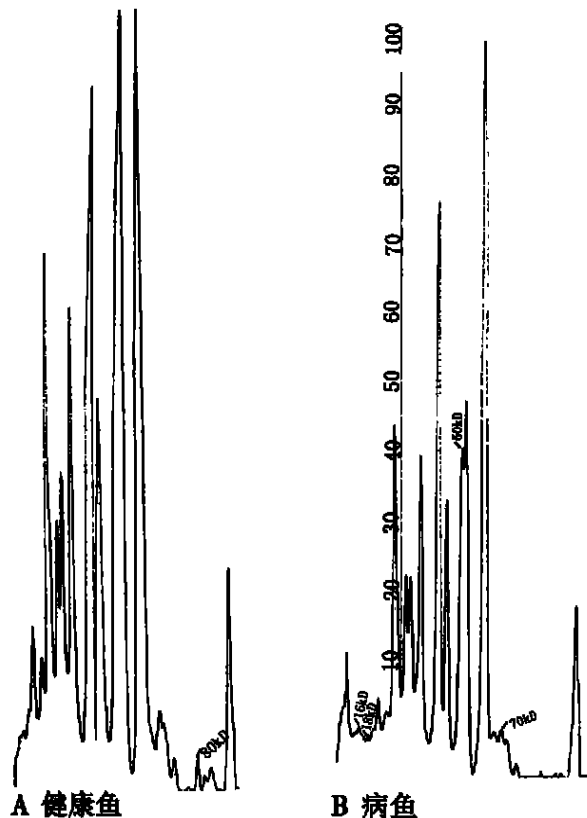


图5 鲫鱼脑蛋白凝胶扫描图

但约在 80 kD 处失去 1 条谱带(图 5—B 箭头所示), 另外, 与正常鱼相比, 病鱼多条蛋白质谱带着色浅, 扫描图中可看到峰值低, 表明病鱼中这些蛋白质含量相应减少(图 5—A, B)。说明病原菌侵袭鱼的脑部后, 影响脑细胞蛋白质的正常合成代谢, 并可能诱导一些病理蛋白质的产生, 改变其正常的生理机能。

## 2.6 肌肉

从扫描图可以看到正常鱼有 22 条谱带, 病鱼有 27 条谱带, 病鱼比正常鱼多 5 条谱带。这 5 条谱带的分子量分别约为 70, 60, 52, 40 和 31 kD, 另外个别谱带在着色性上也有差异(图 6)。说明肌肉细胞在鱼感病后蛋白质代谢发生变化, 病理观察也发现病鱼肌肉纤维束弯曲、断裂, 粘膜脱落坏死<sup>[1]</sup>。肌肉蛋白质的电泳图谱也和脑一样表现为谱带的增多, 可能也是由于受致病菌分泌的毒素影响, 导致一些病理蛋白质的产生, 此外, 肌肉的蛋白质电泳谱带在各组织中是最清晰的, 适合作为疾病诊断的辅助标记。

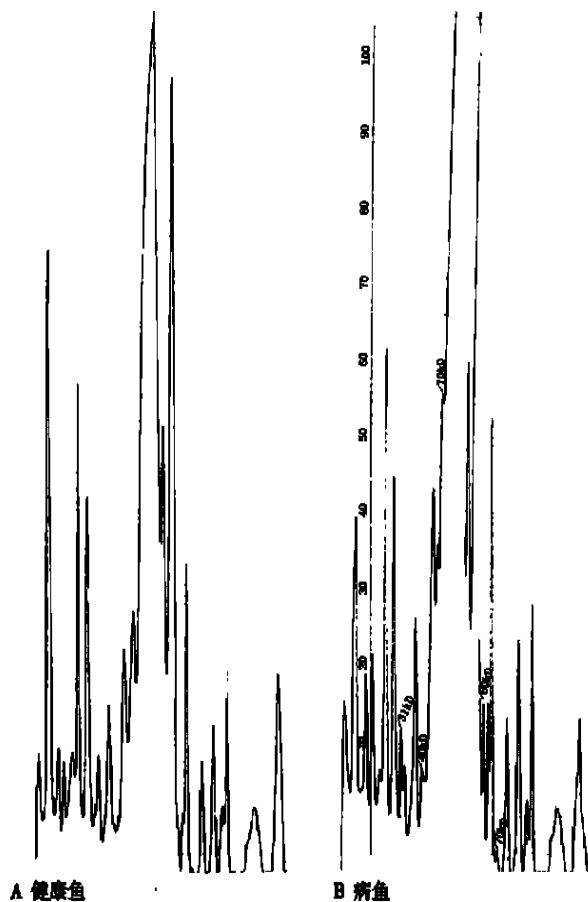


图6 鲫鱼肌肉蛋白凝胶扫描图

以上结果表明, 鲫鱼在感染出血病后主要器官和组织中可溶性蛋白质电泳谱带发生了较大变化,

出现三种变化趋势, ①谱带增加, 如肌肉中产生 5 条新谱带, 肝脏增加 1 条, 鳃增加 2 条, 脑增加 4 条; ②谱带缺失, 如心脏、肾脏各有 5 条谱带缺失, 肝、脑各有 1 条谱带缺失, 鳃缺失 2 条; ③既有增加又有缺失, 如肝脏、鳃、脑(表 1)。此外, 健康鲫鱼各组织的蛋白质电泳图谱表现出明显的组织特异性, 不同组织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结构、功能各异有关。

根据本试验结果, 可以初步认为患出血病鲫鱼的蛋白质电泳谱带发生较大变化是由于鱼体遭受致病菌的侵袭与破坏, 导致各组织器官的生理机能紊乱, 从而影响其蛋白质代谢所致。已积累的有关鱼

类细菌性出血病病原体的研究结果表明由嗜水气单胞菌引起的鱼类细菌性出血病主要是由于致病菌侵袭鱼的各组织器官, 其分泌的各种毒素引起溶血性贫血及各脏器组织的广泛性病变, 尤其是其分泌的胞外蛋白酶能分解宿主的蛋白质, 破坏补体(或免疫球蛋白), 从而降低鱼的免疫机能<sup>[13~16]</sup>, 这些研究虽然对鱼类细菌性败血症的致病菌及病鱼体内生理、病理变化作了有价值的探讨, 但对鱼体本身发生的变化, 在生化及分子水平上的研究还很少。本工作通过对正常及患细菌性败血症异育银鲫 8 种组织蛋白质变化的比较, 使我们从生化水平上得到一些指标, 这些指标为开展该病的早期诊断和防治提供了一些参考依据。

表 1 患出血病鲫鱼与健康鲫鱼蛋白质电泳谱带变化

组织		心脏	肝脏	肾脏	鳃	脑	肌肉
电泳谱带	病鱼	17 条	29 条	21 条	22 条	22 条	27 条
总数	正常鱼	22 条	29 条	26 条	22 条	19 条	22 条
病鱼谱带	谱带增加		45 kD		110 kD	70 kD	70 kD
变化情况					50 kD	50 kD	60 kD
						18 kD	52 kD
						16 kD	40 kD
							31 kD
	谱带缺失	97 kD	97 kD	110 kD	18 kD	80 kD	
		76 kD		100 kD	14 kD		
		72 kD		95 kD			
		31 kD		12 kD			
		12 kD		10 kD			

参考文献:

[ 1 ] 黄琪琰. 中国水产动物疾病学研究进展[ J ]. 水产学报, 1996, 20(2): 68—70.

[ 2 ] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[ J ]. 水产学报, 1992, 16(3): 282—287.

[ 3 ] 汤伏生. 气单胞菌基因研究[ J ]. 国外水产, 1995, (1): 6—11.

[ 4 ] Chakraborty T. Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin [ J ]. *Infect Immune*, 1984, 46: 435—441.

[ 5 ] Aoki T. Drug-resistant *Aeromonas hydrophila* in Thailand [ A ]. In: The 2nd Asian fisheries forum[ C ]. Cds, Hirano, Hanyu. Asian Fisheries Society Manila, 1990. 693—696.

[ 6 ] Noterdaeme L, Bigawa S, Willems K A. Biochemical and physiological characteristics and plasmid profiles of *Aeromonas hydrophila* strains, isolated from freshwater fish and from fresh water [ J ]. *J Fish Dis*, 1991, 14(3): 313—321.

[ 7 ] 丛 宁, 凌爱珍, 李 恕, 等. 鲫鱼出血病肝心组织超微病理变化的初步研究[ J ]. 水产科技情报, 1993, 20(2): 68—70.

[ 8 ] Low K W. Actin rearrangement accompanying *Aeromonas hydrophila* entry into cultured fish cells [ J ]. *J Fish Dis*, 1998, 21(1): 55—65.

[ 9 ] 米瑞英, 谢宝华, 陶炳春, 等. 白鲢出血性败血症病理组织学研究[ J ]. 动物学杂志, 1994, 29(1): 17—19.

[ 10 ] 陈昌福, 曾妍雄. 患细菌性败血症的翘嘴鳊血清中蛋白质成分的变化[ J ]. 华中农业大学学报, 2000, 19(5): 481—482.

[ 11 ] 翟子玉, 陈慧达, 俞豪祥, 等. 团头鲂、鲫鱼出血性败血症的研究[ J ]. 水产科技情报, 1993, 20(3): 105—108.

[ 12 ] 黄琪琰, 刘丽艳, 范丽萍. 异育银鲫溶血性腹水病的病理生理研究[ J ]. 水产学报, 1992, 16(4): 316—321.

[ 13 ] John M P, Stephenpk, Radomm S. Secreted enzymes of *Aeromonas* [ J ]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 15: 1—10.

[ 14 ] Chabot D J, Thune R L. Proteases of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterization and relation to virulence in Channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) [ J ]. *J Fish Dis*, 1991, 14(2): 171—183.

[ 15 ] 储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶对鲫鱼的致病性[ J ]. 南京农业大学学报, 2000, 23(2): 80—84.

[ 16 ] Ascencio F, Wadstrom T. Effect of *Aeromonas* protease on the binding of *Aeromonas hydrophila* strains to connective tissue proteins [ J ]. *Microbios*, 1991, 66: 27—37.