

草鱼病理学研究

Ⅲ. 草鱼出血病苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶相对活性的变化

曾伯平

陈昌福 纪国良

(中山大学生物学系, 广州 510275) (华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘 要 采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳方法, 研究了正常草鱼和患出血病草鱼的肾脏、肝脏、脾脏、心脏、鳃、肌肉以及血清中的苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶。结果表明, 患病草鱼和正常草鱼各组织器官及血清中的MDH同工酶酶谱均为6条带, 患病鱼的酶谱明显地不同于正常鱼的酶谱; MDH同工酶的活性具有组织和器官的特异性, 同一组织及器官, 患病草鱼MDH同工酶的总活性较正常草鱼偏高, 其中鳃、肝脏、脾脏以及血清中的MDH同工酶总活性具有显著性差异($p < 0.05$); 同种组织及器官, 患病草鱼的MDH同工酶的相应组分, 活性序列产生了较大的差异; MDH同工酶可以作为草鱼患出血病的一个生理、病理指标。

关键词 草鱼, 出血病, 同工酶

分类号 Q592.1

60年代初期, 开始了鱼类同工酶的遗传学研究。业已证明, 硬骨鱼类的同工酶系统具有明显的组织特异性和种族特异性。鱼类在脊椎动物中是较低等的一类动物, 但鱼类也同高等脊椎动物一样, 其MDH同工酶的活性可因外界条件的改变而产生相应的变化, 当机体新陈代谢紊乱, 出现疾病症状时, MDH同工酶的活性也会发生变化, 产生病态的同工酶谱。

目前, 同工酶方法逐渐被用来研究鱼类病理及帮助诊断鱼病^[2,3], 作者在对草鱼烂鳃病研究的基础上, 进一步探索了草鱼出血病某些组织和器官中的MDH同工酶的相对活性变化。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

材料鱼来自华中农业大学水产站和武汉市东西湖水产研究所, 体重10~20g。试验前, 于室内暂养一周; 采用经微孔滤膜过滤的病毒组织浆液人工注射感染正常草鱼的方

收稿日期: 1993-04-14

法,适宜条件下,饲养 5 ~ 7d,草鱼就出现典型的出血病症状.

1.2 样品处理

分别取正常草鱼和患病草鱼的肾脏、肝脏、脾脏、鳃、肌肉、心脏,用滤纸分别吸干水份及血污,以 1 : 2.5(W/V) 的比例加入 0.01 mol/L, pH = 7.4PBS 组织提取液,用玻璃匀浆器在冰浴中匀浆,匀浆液置 4℃ 冰箱中抽提 1 ~ 2h,再以 10000r/min 控温室内离心 15min,取上清液置冰箱中保存备用.

采用剪断腹侧动脉的方法取血,离心后血清置冰箱中保存备用.

1.3 电泳及染色

采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳方法,分离胶浓度 $T = 7\%$, pH = 8.9,浓缩胶度 $T = 2.5\%$, pH = 6.7,每管点样 10 μ l,制成样品胶,高度约 1cm,用溴酚蓝作指示剂,电泳时先低压 50V 电泳 1h,然后升到 100V,恒压 4 ~ 5h,电泳在 4℃ 冰箱中进行,电极缓冲液采用 pH = 8.3 的 Tris - 甘氨酸缓冲液.

染色参照胡能书等编的同工酶技术及其应用中的 MDH 同工酶染色方法,37℃ 条件下染色 2h,然后蒸馏水漂洗数次,用 7% 的醋酸溶液固定,存放于低温下备用.

1.4 薄层扫描

使用日本产 CS - 910 型双波长薄层扫描仪,波长 580nm,透射,灵敏度 $\times 1$,狭缝 10 \times 0.5mm,扫描速度 10mm/min,走纸速度 40mm/min.

2 结 果

通过对 16 尾正常草鱼和 20 尾具典型出血病病症草鱼的重复研究,得到如下结果.

2.1 MDH 同工酶电泳酶谱

正常草鱼和患病草鱼 6 种组织器官及血清中的 MDH 同工酶电泳酶谱均为 6 条带,但各种组织器官及血清中的 MDH 同工酶相对含量有所不同,正常草鱼的酶带具有一定的规律性,且明显地分为线粒体型和细胞浆型 2 组酶带;与正常草鱼相比,具典型出血病症状的草鱼其酶带着色有深有浅,酶带之间也常有着色现象,酶谱显得有些紊乱,浅带须借助扫描仪才能判断(图 1).

正常草鱼及患病草鱼六种组织器官及血清的 MDH 同工酶

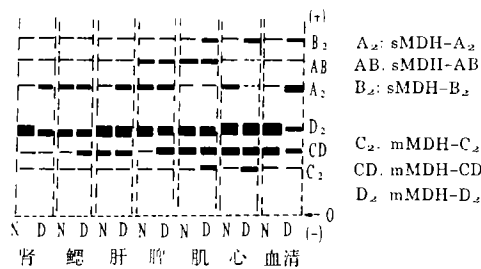


图 1 正常和患病草鱼不同组织器官及血清中 MDH 同工酶酶谱

Fig. 1 Electrophoretogram of MDH isozymes expressed in various tissues, organs and serum of the healthy and diseased grass carp

N: 正常草鱼酶带

D: 患出血病草鱼酶带

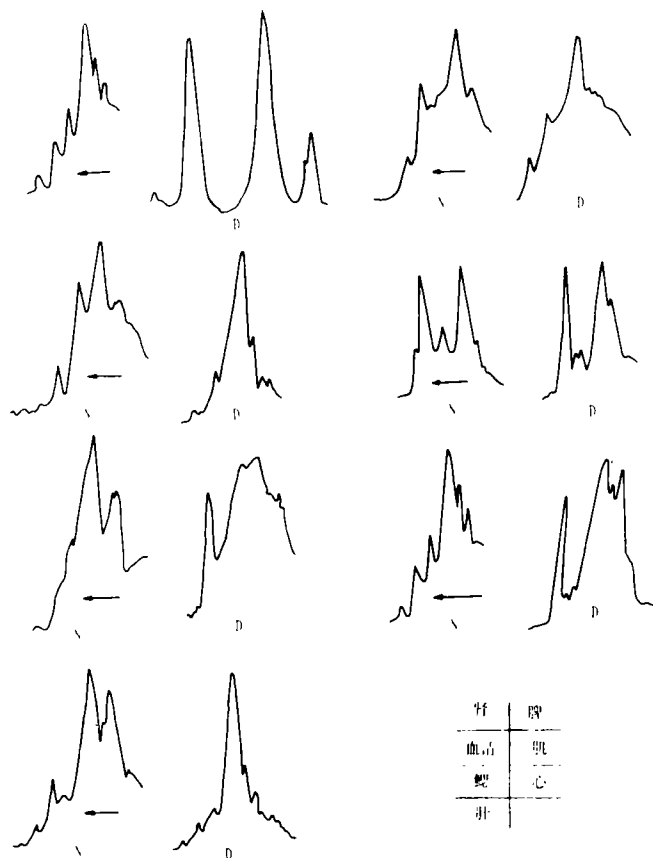


图 2 正常和患病草鱼 MDH 同工酶扫描图谱

Fig. 2 The MDH isozyme scanning figure of the healthy and diseased grass carp

N: 正常草鱼 D: 患病草鱼 ←: 扫描方向, 从原点开始

扫描结果见图 2.

2.2 MDH 同工酶的总活性及其相对活性

患出血病草鱼各组织器官及血清中的 MDH 同工酶总活性较正常草鱼同种组织器官及血清中的 MDH 同工酶总活性有所升高, 结果见表 1.

由表 1 可以看出患病鱼与正常鱼相比, 鳃、肝、脾及血清中的 MDH 同工酶总活性具有显著性差异 ($p < 0.05$), 肾脏、肌肉中的 MDH 同工酶总活性没有显著性差异 ($p > 0.05$).

正常草鱼和患出血病草鱼 MDH 同工酶各组分的活性序列见表 2.

从表 2 看出, 正常草鱼鳃、肝、脾的 MDH 同工酶活性序列大致相同, 患出血病后, 肝脏、脾脏的活性序列变化仍然一致, 表明肝、脾中的 MDH 同工酶活性变化是同步的.

无论正常或患病草鱼, 其中 mMDH - D₂ 的活性高于其他组分, 而 sMDH - B₂ 的活性低于其他组分, 可见, mMDH - D₂ 和 sMDH - B₂ 2 个组分在 MDH 活性序列中的位置是相对稳定的.

表 1 正常与患病草鱼 MDH 同工酶相对活性

Tab. 1 The relative activity of MDH isozyme in the healthy and diseased grass carp

组织器官	mMDH - C ₂	mMDH - CD	mMDH - D ₂	sMDH - A ₂	sMDH - AB	sMDH - B ₂	总活性	
肾	正常	5.64 ± 3.63	20.79 ± 9.28	55.24 ± 14.43	11.24 ± 8.33	17.05 ± 10.47	5.44 ± 3.63	115.20
	患病	15.45 ± 6.80	12.90 ± 4.05	52.12 ± 9.46	27.56 ± 9.28	10.14 ± 4.44	6.02 ± 1.81	124.09
鳃	正常	8.13 ± 4.80	6.55 ± 3.14	52.30 ± 16.64	19.00 ± 9.10	23.19 ± 15.23	5.44 ± 3.14	112.71
	患病	18.44 ± 7.71	37.35 ± 8.33	35.43 ± 11.24	17.05 ± 4.44	15.00 ± 6.55	11.83 ± 5.74	135.10
肝	正常	12.66 ± 8.53	12.11 ± 8.13	60.47 ± 13.44	13.18 ± 4.05	14.43 ± 7.71	6.80 ± 5.72	121.59
	患病	16.22 ± 6.80	29.00 ± 7.71	35.06 ± 5.44	22.22 ± 7.92	22.95 ± 6.02	14.54 ± 6.80	140.00
脾	正常	6.29 ± 3.63	9.98 ± 5.74	44.48 ± 16.32	25.10 ± 10.78	28.73 ± 16.00	9.98 ± 4.05	123.46
	患病	15.56 ± 4.05	30.66 ± 6.80	35.06 ± 11.83	15.79 ± 7.04	23.26 ± 10.31	14.65 ± 3.63	135.98
肌	正常	15.54 ± 7.27	18.34 ± 6.29	33.21 ± 13.05	23.89 ± 10.63	30.20 ± 9.10	13.94 ± 3.65	133.22
	患病	20.53 ± 7.49	24.35 ± 9.98	34.02 ± 10.94	17.36 ± 7.71	18.15 ± 7.92	27.28 ± 12.39	142.90
心	正常	6.55 ± 5.74	23.19 ± 7.72	49.54 ± 18.15	19.82 ± 10.31	16.74 ± 9.28	6.55 ± 4.80	122.41
	患病	29.60 ± 10.31	18.63 ± 4.80	44.54 ± 8.13	1.22 ± 0.88	2.47 ± 0.88	23.53 ± 2.56	120.09
血清	正常	14.65 ± 9.28	17.66 ± 9.98	46.03 ± 7.92	29.00 ± 15.79	13.81 ± 9.48	5.13 ± 2.56	126.30
	患病	14.77 ± 6.80	20.62 ± 7.71	21.39 ± 7.71	46.38 ± 9.10	18.35 ± 5.44	13.94 ± 7.49	135.45

表 2 正常与患病草鱼各组织器官及血清中 MDH 同工酶活性序列

Tab. 2 The MDH isozyme activity order of various tissues, organs and serum of the healthy and diseased grass carp

组织器官	状 态	MDH 同工酶活性排列
肾	正常	D ₂ > CD > AB > A ₂ > C ₂ > B ₂
	患病	D ₂ > A ₂ > C ₂ > CD > AB > B ₂
鳃	正常	D ₂ > AB > A ₂ > C ₂ > CD > B ₂
	患病	D > D ₂ > C ₂ > A ₂ > AB > B ₂
肝	正常	D ₂ > AB > A ₂ > C ₂ > CD > B ₂
	患病	D ₂ > CD > AB > A ₂ > C ₂ > B ₂
脾	正常	D ₂ > AB > A ₂ > CD > B ₂ > C ₂
	患病	D ₂ > CD > AB > A ₂ > C ₂ > B ₂
肌	正常	D ₂ > AB > A ₂ > CD > C ₂ > B ₂
	患病	D ₂ > B ₂ > CD > C ₂ > AB > A ₂
心	正常	D ₂ > CD > A ₂ > AB > C ₂ > B ₂
	患病	D ₂ > C ₂ > B ₂ > CD > AB > A ₂
血清	正常	D ₂ > A ₂ > CD > C ₂ > AB > B ₂
	患病	A ₂ > D ₂ > CD > AB > C ₂ > B ₂

C₂:mMDH - C₂;A₂:sMDH - A₂;CD:mMDH - CD;AB;sMDH - AB;D₂:mMDH - D₂;B₂:sMDH - B₂

3 讨 论

3.1 酶带与酶活性

草鱼 MDH 同工酶的酶带数,王令玲、李庆国^[4]报道长江草鱼为 3 条;Philipp^[5,6]认为

硬骨鱼类的 m-MDH 同工酶由 1 个基因座位编码,因而只有 4 条酶带;吴力钊、王祖熊^[7,8]研究表明草鱼胚胎时期的 MDH 同工酶带只有 5 条,其中 mMDH-D₂ 不能表达,但随着草鱼的生长发育,酶带由 5 条增加至 6 条;Gorman^[9]、杨兴棋等^[10]报道草鱼的 MDH 同工酶酶带为 6 条.作者对草鱼出血病 MDH 同工酶的研究结果与草鱼烂鳃病的结果相同,无论草鱼患病或正常,其 MDH 同工酶酶带均为 6 条,同工酶组分只有相对活性的变化而无数量上的增减,草鱼患出血病后,其 MDH 同工酶相对活性比正常草鱼偏高,同时,酶谱出现一定程度的紊乱,酶带之间常有着色现象,给扫描及其结果分析带来一定的影响.

3.2 出血病病原危害草鱼的组织及器官

对照正常草鱼,患出血病草鱼同种组织与器官中的 MDH 同工酶相对活性偏高,其中患病草鱼的鳃、肝、脾及血清中的 MDH 同工酶总活性与正常草鱼相比,具有显著性差异($p < 0.05$),其余组织器官中的 MDH 同工酶总活性没有显著性差异($p > 0.05$).由此可以推断,草鱼出血病病原危害草鱼的靶器官是鳃、肝脏和脾脏,结果与朱心玲等^[11]对草鱼出血病病毒所致肝功能代谢失调的研究结果相符,与华中农大水产系鱼病组^[12]对草鱼出血病理研究结果也相符.但作者认为,草鱼患出血病后,各种组织器官都有一定程度的损害,只是损害的程度不同,而鳃、肝脏、脾脏等器官的严重受损可能是出血病病原致死草鱼的直接原因.

通过对草鱼出血病与草鱼烂鳃病的 MDH 同工酶相对活性变化的研究可以发现,出血病毒与烂鳃病菌对鱼类的鳃这个重要器官都产生了严重的危害,由此说明,草鱼的鳃对草鱼呼肠孤病毒(*Grass carp reovirus*)及烂鳃病菌(*Myxococcus piscicola*)都很敏感.这 2 种病原危害草鱼的组织与器官出现一定的差异,其原因可能与病毒及细菌危害草鱼的作用机理有关.

参 考 文 献

- 1 Markert C L et al. Proc Natl Acad Sci, 1959, 45: 753
- 2 康惠, 黄向荣. 湖南水产, 1987(6): 14 ~ 17
- 3 Yayoi Ikeda et al. Bull Jap Soc Sei Fisheries, 1985, 51(1): 13 ~ 20
- 4 王令玲, 李庆国. 淡水渔业, 1987(3): 7 ~ 10
- 5 Philipp D P et al. J Exp Zool, 1979, 2100: 473 ~ 488
- 6 Philipp D P et al. Trans Am Fish Soc, 1982, 111: 593 ~ 602
- 7 吴力钊, 王祖熊. 遗传学报, 1987, 14(4): 278 ~ 286
- 8 吴力钊, 王祖熊. 遗传学报, 1987, 14(5): 387 ~ 394
- 9 Gorman G C et al. Copeia, 1977(4): 694 ~ 697
- 10 杨兴棋等. 遗传学报, 1984, 11(2): 132 ~ 140
- 11 朱心玲, 谢巧雄. 鱼类病害研究, 1990, 12(1): 1 ~ 4
- 12 华中农大水产系鱼病组. 鱼病简讯, 1986(3): 26 ~ 31, 42
- 13 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985

Studies on the Pathology of the Grass Carp

Ⅲ. The Change of the relative activity of Malate Dehydrogenase(MDH) Isozyme in some Tissues and Organs of the Hemorrhagic Grass Carp

Zeng Boping Chen Changfu Ji Guoliang*

Abstract By using polyacrylamide gel electrophoresis, the changes in the relative activity of malate dehydrogenase (MDH) isozymes in the gill, liver, blood serum, heart, spleen, muscle and kidney of hemorrhagic grass carp were studied. It was shown all these tissues and organs and blood serum possess six kind of ribbons and the electrophoretogram of MDH isozymes in the healthy and diseased fish was different. The MDH isozymes activity apparently exhibited a tissue-specific expression. The total activity of the MDH isozyme of the diseased fish was considerably higher than that of the healthy in various tissues and organs, the activity of the isozymes in the gill, liver, spleen and blood serum showed a conspicuous differently ($p < 0.05$), and the activity order of the MDH isozymes showed more differently in the same tissue and organ. Based on the above results, it is considered that MDH isozyme electrophoretogram of the tissues and organs can be used as a physiological as well as pathological index of the hemorrhagic disease of grass carp.

Keywords grass carp, hemorrhagic disease, isozyme

* Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275