# 假雄牙鲆不同组织中溶菌酶比活性的研究*

# SPECIFIC ACTIVITIES OF LYSOZYME IN DIFFERENT TISSUES OF PSEUDOMALE FLOUNDER( *Paralichthys olivaceus* T.ET S.)

王宏田　　徐永立　　张培军

(中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

**关键词**　牙鲆( *Paralichthys olivaceus*) , 溶菌酶 , 比活性

溶菌酶( Lysozyme) 是鱼类非特异性免疫系统的重要组成部分。据 Ingram 1980 年报道,溶菌酶能够破坏细菌的胞壁结构 , 增强由补体介导的溶菌作用 , 同时对真菌、寄生物以及病毒也具有破坏作用,因此,溶菌酶对于鱼类抵抗各种病原体的侵袭具有重要意义 , 了解溶菌酶在鱼体内的分布,有助于更好地了解鱼类抵抗各种疾病的机制。以往的实验对溶菌酶在鱼体不同组织中的分布研究得较少,对于牙鲆体内不同组织中溶菌酶活力的比较则未见报道。本实验以 1 a 龄假雄牙鲆为实验材料 , 研究溶菌酶在不同组织中的分布 , 并初步比较其比活性的差别。

## 1　材料和方法

### 1.1　假雄牙鲆的饲养

假雄牙鲆由中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放室人工诱导。通过组织切片检查其性腺发育,确定实验用鱼为雄性。实验前将 5 条鱼在约 2 m×1.5 m×1.5 m 的水体中饲养,通气,换水。鱼平均体重 460±30 g。

### 1.2　血清的获取

用无菌注射器从牙鲆的尾动脉中抽取血液,于 4 ℃冰箱中放置 24 h,使血细胞凝结,并与血清分离。收集上层血清,于 - 30 ℃保存备用。

### 1.3　体表黏液中酶粗提液的制备

用蒸馏水冲洗鱼体 , 用干净的载玻片将体表黏液轻轻刮下 , 防止体表损伤 , 然后与生理盐水一起于冰水浴中匀浆 (1 ml/ mg, V/ W) , 匀浆液于 4 ℃条件下,以 10 000 r/ min 的速度离心 20 min,取上清液于 - 30 ℃保存备用。

### 1.4　其他组织中酶粗提液的制备

解剖鱼体,取出相应的鱼体组织,与生理盐水混合匀浆 ( 2 ml/ mg, V/ W) , 匀浆液于 4 ℃, 以 10 000 r/ min 的速度离心 20 min, 取上清液于 - 30 ℃保存备用。在提取牙鲆肠中的溶菌酶时,将肠分为三部分,肠后端膨大部分为后肠,肠前端非膨大部分平均分为两截,分别作为前肠和中肠。

### 1.5　溶菌酶比活力的测定

参考有关文献[1]并进行相应的修改 , 具体做法如下 : 将溶壁微球菌( *Micrococus lysodeiktious* , Sigma 产品) 用 0.01 mol/ L, pH 6.2 的磷酸缓冲液 ( PBS) 稀释至波长为 530 nm 时吸光度为 0.8 的菌悬液。将 1 ml 菌悬液与 0.1 ml 一定浓度的粗酶提液或血清混合 , 测定反应开始时于 470 nm 的吸光度 , 然后将混合液于 37 ℃保温 60 min,冰浴冷却使反应停止,于 470 nm 处测其吸光度 , 以每毫克酶粗提液蛋白每分钟使混合液吸光度降低的数值来表示溶菌酶的比活力 , 单位为 unit/ ( min · mg) 。

### 1.6　酶粗提液中蛋白质浓度的测定

以牛血清蛋白作标准蛋白 , 用 Coomassic 亮蓝染色法测定[2]。

---

*　国家 973 课题“鱼类病原菌致病因子的作用过程”资助 1999012003 号。
中国科学院海洋研究所研究报告第 4031 号;实验海洋生物学开放实验室研究报告第 259 号。
收稿日期 :2000-02-14;修回日期 :2000-05-12

## 2 结果与讨论

### 2.1 结果

溶菌酶在假雄牙鲆的体表黏液、血清、脾脏、肾脏中的比活性分别为 $(6.54\pm2.19)\times10^{-3}$，$(5.87\pm1.97)\times10^{-3}$，$(2.33\pm0.98)\times10^{-3}$，$(4.54\pm1.75)\times10^{-3}$ unit/(min·mg)。

溶菌酶在假雄牙鲆的肝脏、胆汁、胃以及前肠、中肠、后肠的比活性为：$(6.49\pm2.35)\times10^{-3}$，$(0.58\pm0.13)\times10^{-3}$，$(1.57\pm0.65)\times10^{-3}$，$(4.32\pm1.46)\times10^{-3}$，$(2.07\pm1.13)\times10^{-3}$，$(2.41\pm1.29)\times10^{-3}$ unit/(min·mg)。

溶菌酶在假雄牙鲆的鳃中的比活性为 $(3.96\pm1.47)\times10^{-3}$ unit/(min·mg)，肌肉中未发现溶菌酶的活性。

由上述结果可以看出，溶菌酶在牙鲆体内不同的组织中广泛分布着，但它们的比活性并不相同。在实验条件下，体表黏液、血清、肾、肝脏、前肠以及鳃中溶菌酶比活性较高；胃、中肠、后肠、脾脏中溶菌酶比活性较前述组织中的低；胆汁中溶菌酶的比活性较上述器官的都低；肌肉中没有检测出溶菌酶的活性。

### 2.2 讨论

Fange 等于 1976 年、Murray 和 Flether 于 1976 年在对淡水鱼和海水鱼的研究中发现，溶菌酶在鱼的黏液、血清和某些淋巴组织中广泛分布着。本实验中发现，不但在通常认定的免疫组织中可以检测出溶菌酶的活力，在肠、腮、肝、胃等组织中同样可以检测出溶菌酶的活力。因此，就非特异性免疫能力而言，鱼类具有相当完善的功能。

Hánsen 于 1974 年报道，鱼体中溶菌酶的产生与哺乳类动物相似，主要由嗜中性粒细胞和单核细胞产生，少量由巨噬细胞生成。吴维宁 1990 年、Pulsford 等 1994 年、Rombout 等 1989 年在对鱼类的研究中发现，血液、肝、脾、肾、肠黏膜等组织和器官中含有丰富的血细胞，因此，这些组织中的溶菌酶可能是由这些血细胞分泌的。血液在鱼体中各部位的循环流动能够使溶菌酶分布得更加广泛，使那些自身不能产生血细胞的组织同样可以含有溶菌酶。

Fletcher 等 1976 年、Lukyanenko 1965 年、Lukyanenko 1965 年研究报道，性别和季节、遗传[3]、温度[1]、食性等诸多因素都可以影响鱼体内溶菌酶的活性。生活环境的不同，也使得鱼体同一组织中溶菌酶的适宜反应条件不同。例如，Sankaran 和 Gurnani 于 1982 年研究发现，淡水鱼肝脏中溶菌酶的活性在 pH5.4 最高，海水鱼肝脏中溶菌酶的活性在 pH 为 6.2 和 9.2 时最高。同一种鱼，其不同组织中溶菌酶的适宜反应条件是否相同，以及体外实验对于不同组织中溶菌酶的活力进行比较时所得出的结论是否适合于鱼体内的自然生理过程，都需进一步实验研究。另外，由于实验材料的缺乏，本实验只是研究了人工诱导的假雄牙鲆体内的溶菌酶活性。将来把这一实验结果与自然条件下生长的牙鲆体内的溶菌酶活性进行比较，对于尝试通过遗传育种的方式来提高牙鲆的抗病能力可能会有借鉴作用。

鱼类所生活的环境较陆地动物的生活环境而言，流动性更大，成分变化更快，鱼类接触各种病原体的机率也增大。溶菌酶在鱼体中的广泛分布，及其对不同病原体的广泛破坏能力使得鱼体有能力抵御各种病原体的侵袭。基于本实验结果以及牙鲆的生理结构，作者对牙鲆体内溶菌酶的防御机制作下述设想：鳃、体表、肠黏膜、胃构成牙鲆的第一道防御屏障，阻止有害病原体进入鱼体中；血液构成第二道防御屏障，对通过消化道进入循环系统中的病原微生物进行灭活。肝、脾、肾等其他组织形成第三道防御屏障，对通过循环系统进入组织内的病原体进行杀灭。各种组织间的作用并非孤立的，它们相互联系，共同作用，以提高鱼体的抗病能力。

**参考文献**

1 陈昌福，罗宇良，蔡 冰等。中国水产科学，1996，3(3)：25~30
2 徐宜为，实验免疫学技术。北京：科学出版社，1979。199
3 Chiayvareesajja J., K.H. Roed, A.E.Eknath *et al*.. *Aquaculture*, 1999, 175:49~62

(本文编辑：刘珊珊)