

doi: 10.7541/2016.80

正常和蛙病毒感染后大鲵血清和黏液蛋白图谱比较分析

袁江迪^{1,2} 陈中元¹ 张奇亚¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了更好地了解大鲵在感染蛙病毒过程中的生理生化及抗病毒反应, 通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 辅以密度分析, 对大鲵正常血清和感染血清、正常黏液和感染黏液的蛋白图谱分别进行测试比较。结果显示: 在正常血清(CS)、包括自然感染血清(NS)和人工感染血清(AS)在内的感染血清中, 蛋白带集中在60—80 kD, 其含量超过血清蛋白总量的42%; 正常血清在14—57 kD 之间有16条蛋白带: 57、53、50、43、40、38、36、31、27、26、25、22、16、15.5、15 和14 kD, 其中正常与感染血清(包括NS和AS)比较, 有10条共有蛋白带: 57、43、40、31、27、26、25、15.5、15 和14 kD和4条差异蛋白带: 53、33、22 和16 kD。正常黏液(CM)和感染黏液(NM或AM)共有11条蛋白带: 116、100、75、57、53、45、27、18、17、16和15 kD, 但感染黏液多出7条蛋白带: 90、52、43、32、26、20 和13 kD。还有些蛋白带含量出现变化, 如45 kD条带在CM中占总蛋白量的19.3%, 而在AM中仅占总蛋白的3.8%。研究证实蛙病毒感染能导致大鲵黏液和血清蛋白图谱发生变化, 也为深入探寻两栖类抗病毒相关的蛋白生物标记提供了有价值的信息。

关键词: 大鲵; 血清; 黏液; 蛙病毒感染; 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳; 密度分析; 蛋白图谱

中图分类号: S941.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2016)03-0594-07

大鲵(Chinese giant salamander *Andrias davidianus*) 属于有尾目隐鳃鲵科, 是我国特有、也是世界现存最大的两栖动物^[1]。这种两栖动物具有寿命长、自我修复能力强、能产生特殊体表黏液等特点, 具有相当高的经济和科研价值。在人工繁养技术建立后, 大鲵养殖已初具规模^[2]。学者们围绕大鲵资源保护、营养成分、遗传变异、分子生物学等相继开展了多方面研究^[3-7]。蛙病毒Ranavirus是一类能感染包括大鲵在内的14个科70多种两栖动物、上百种鱼等的水生动物病毒病原^[8]。但近些年人们注意到蛙病毒感染会使野生大鲵等两栖类种群下降^[9, 10], 使养殖大鲵产量锐减^[11, 12]。本实验室已从患系统性出血病的大鲵组织中, 分离鉴定了蛙病毒(*Andrias davidianus* ranavirus, ADRV)^[13]。但限于大鲵生理、生化及免疫学基础薄弱, 对蛙病毒引起大鲵流行病的机理及其防控研究难以深入。

血清和黏液具有为动物提供基本生活物质(包括激素、生长因子、蛋白等)、保护机体免受损害

与侵染等重要的生理生化及免疫保护作用^[14-16]。血清或其他体液蛋白的电泳已作为一种技术, 运用于机体生理生化指标的评估或某些疾病的诊断^[17-19]。先前还经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 测定了不同水生脊椎动物的血清黏液的相关报道, 显示出它们具有特定的蛋白组分和图谱^[20]。为此, 本文拟利用SDS-PAGE 测试, 辅以光密度分析, 对受病毒攻击前后的大鲵黏液与血清蛋白组分进行比较分析, 试图为筛选抗病毒应答或免疫相关组分提供信息。

1 材料与方法

1.1 实验动物

正常大鲵, 体重约120 g, 体长约30 cm, 由某大鲵养殖场提供的养殖子代大鲵, 符合国家相关法律法规。大鲵运回实验室后, 用曝气的自来水暂养一周, 水温保持在15—20℃, 无任何病症。随机取正常大鲵2尾, 以0.7 mL/尾的体积, 腹腔注射滴度为

收稿日期: 2015-03-23; 修订日期: 2015-08-14

基金项目: 国家自然科学基金(31430091); 四川省科技支撑计划(13ZC2065省院科技合作课题)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31430091); the Science and Technology Support Project of Sichuan Province (BZC2065)]

作者简介: 袁江迪(1989—), 男, 湖北荆州人; 硕士研究生; 主要从事水生病毒及分子生物学学研究。E-mail: yuanjiangdi@ihb.ac.cn

通信作者: 张奇亚; E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

$10^{6.5}$ TCID₅₀/mL的大鲵蛙病毒悬液,注射12d后作为人工感染大鲵采样。自然感染大鲵是从自然发病的大鲵群体中采集,体重约2000 g,体长约70 cm,并已鉴定是因大鲵蛙病毒感染所致^[13]。分别按下述方法采集制备大鲵血清和黏液样品。

1.2 血清样品的采集和制备

通过心脏取血方式采集大鲵血液,室温静置0.5h,4℃过夜析出血清。以3000 r/min,离心20min,将上清转移至新的EP管中,分装,-20℃保存。采用与此同样的方法和过程,分别制备大鲵正常血清Control serum (CS)、自然感染血清Natural infected serum (NS)和人工感染血清Artificial infected serum (AS),分装后置于冰箱保存、备用。

1.3 黏液样品的采集和制备

先用蒸馏水将大鲵冲洗3次,使其体表干净,用灭菌塑料薄片轻触大鲵体表并刮取黏液,置于离心管中,加入4倍体积的PBS,轻轻摇动与黏液混匀,4℃,9700 r/min离心30min,收集上清,-80℃过夜,冻干。在冻干黏液样中,再加入冻干之前1/10体积的PBS重溶,4℃,9700 r/min离心30min,重新收集上清分装,保存于-20℃,备用。采用相同的方法和过程,分别制备大鲵正常黏液(Control mucus, CM)、自然感染黏液(Natural infected mucus, NM)和人工感染黏液(Artificial infected mucus, AM),分装后置于冰箱保存、备用。

1.4 SDS-PAGE电泳

先绘制牛血清白蛋白浓度标准曲线,参照本实验室已报道的方法^[20]。分别解冻、稀释上述待测样品,并参考所绘制的标准曲线和蛋白浓度,选择适当稀释倍数尽量使蛋白总量相近,便于比较。电泳所加样品的最终含量及体积分别为:血清蛋白含量为1.3—1.6 mg/mL,上样量为10 mL/孔;黏液蛋白含量为2—3 mg/mL,上样量也为10 mL/孔。

将样品与上样液等体积混匀后,95℃煮沸5min,置冰上冷却,加样。再经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。同时,比较了不同分离胶浓度(10%、12%、13%、13.5%、14%和15%)电泳效果。确定能获得较完整清晰图谱的胶浓度为13.5%,并以此作为分离胶,浓缩胶浓度为5%。先用90 V电压电泳,待样品电泳至浓缩胶与分离胶的交界处,再调至120 V电压电泳,至溴酚蓝指示剂接近胶的底部时,停止电泳,用考马斯亮蓝染色过夜,然后脱色,扫描成像,记录数据。

1.5 图像分析

用Syngene GeneTools Analysis Software-Version 3.02图像分析软件,对血清和黏液蛋白图谱

逐一进行条带组成、分子量及蛋白含量数据分析。参照标准分子量,可获得各条带相对分子量、峰值高度(Height)和条带光密度值(Raw volume)等系列数据。各蛋白组分占总蛋白量的百分比与光密度值、总蛋白量成比例关系。因此可根据各条带光密度值及总蛋白光密度值(同一泳道中各蛋白条带光密度值之和Σ)来计算各条带的蛋白含量百分比[http://www.doc88.com/p-6971136802575.html]。计算公式为:百分比(Ratio, %)=各条带光密度值(Raw volume)/泳道所有条带光密度值之和。

2 结果

2.1 正常血清与感染血清蛋白图谱的异同

正常血清(CS)和感染病(NS和AS)血清蛋白在60—80 kD都有浓密的蛋白条带,超过血清蛋白总量的42%。正常血清还在14—57 kD有16条蛋白带:57、53、50、43、40、38、36、31、27、26、25、22、16、15.5、15和14 kD,其中可分辨出10条与感染血清共有蛋白带:57、43、40、31、27、26、25、15.5、15和14 kD。但正常与感染血清(包括NS和AS)之间的差异蛋白带有4条:53、33、22和16 kD,另外,还与自然感病血清(NS)之间有50和36 kD这2条差异带(图1)。

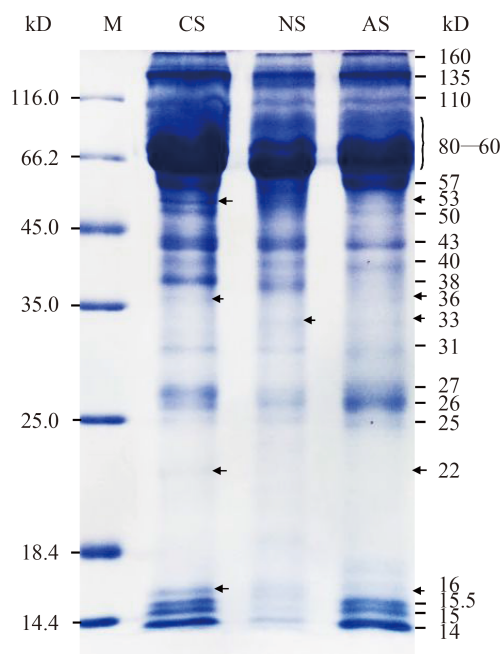


图1 经SDS-PAGE的正常与感染大鲵血清蛋白图谱

Fig. 1 Serum protein profiles of control and infected Chinese giant salamander on SDS-PAGE

M. Marker; CS. Control serum; NS. Natural infected serum; AS. Artificial infected serum. The arrows indicate different protein bands

2.2 正常与感染黏液蛋白图谱的异同

正常黏液(CM)和感染黏液(NM或AM)共同都有11条蛋白带: 116、100、75、57、53、45、27、18、17、16和15 kD, 而感染黏液多出7条蛋白带: 90、52、43、32、26、20和13 kD (图2)。经光密度扫描数据和曲线分析, 显示感染黏液中还有些蛋白带, 如45和16 kD与正常黏液相比含量发生了变化, 如45 kD条带占正常黏液(CM)总蛋白量的19.3%, 而在感染黏液中分别降至9.5% (NM)和3.8% (AM)。16 kD条带占正常黏液(CM)总蛋白量的6.0%, 而在感染黏液中升至12.6% (NM)和16.4% (AM) (图3)。从整体来看, 正常黏液蛋白带总数要低于感病黏液(表1)。

2.3 正常血清与黏液蛋白图谱的比较

正常血清图谱中蛋白带主要分布在40—135 kD, 超过总蛋白量的70%, 尤其集中在60—80 kD, 占总蛋白量45.2%。而在正常黏液图谱中, 蛋白条带分布均匀, 与正常血清蛋白带浓密的60—80 kD对应区域却没有蛋白带(图1、图2、表1)。因此, 无论是从相同区域蛋白带的分布, 或是

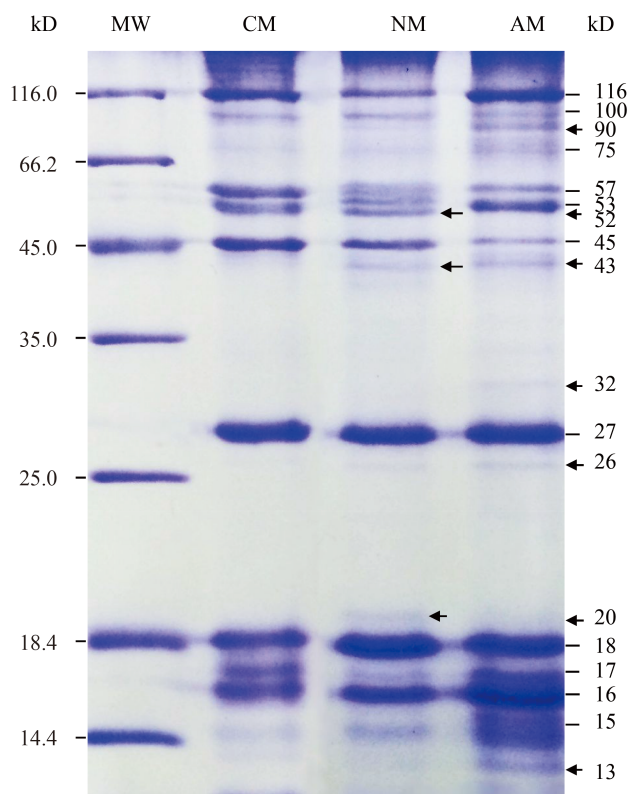


图2 经SDS-PAGE的正常与感染大鲵黏液蛋白图谱

Fig. 2 Mucus protein profiles of control and infected Chinese giant salamander on SDS-PAGE

M. Marker; CM. Control mucus; NM. Natural infected mucus; AM. Artificial infected mucus. The arrows indicate different protein bands

主要蛋白含量来看, 正常血清和黏液之间都存在显著差异。

3 讨论

血清蛋白电泳(Serum protein electrophoresis,

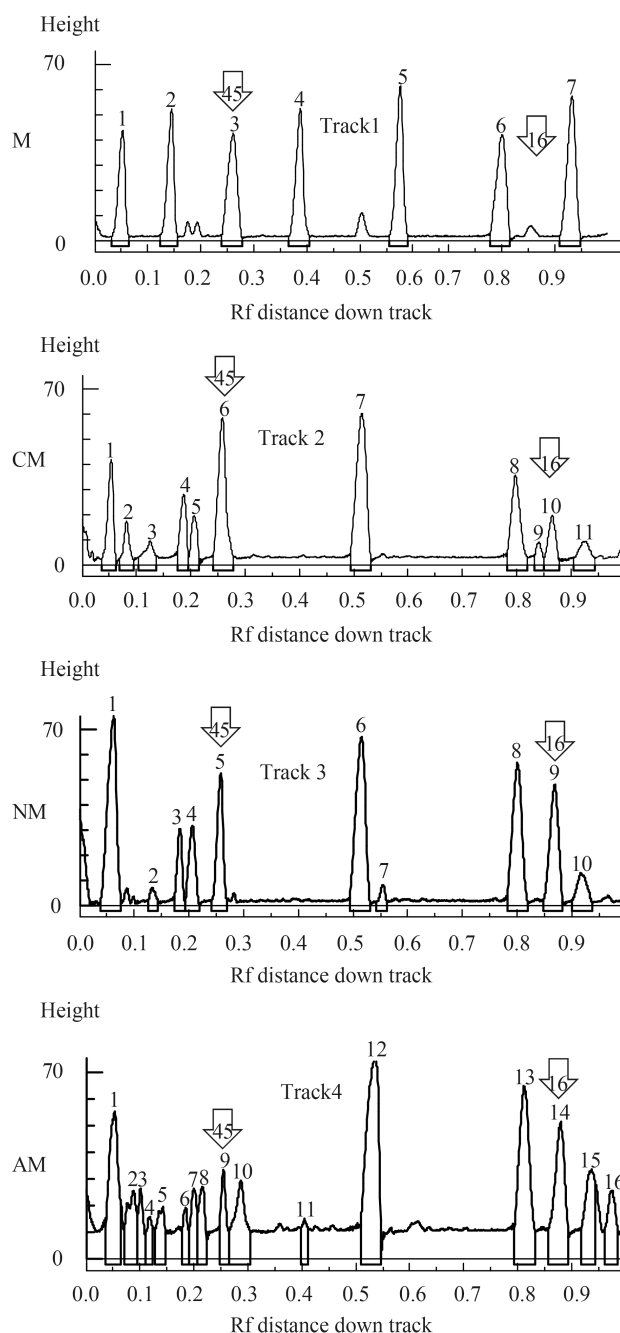


图3 正常与感染大鲵黏液蛋白的光密度曲线图

Fig. 3 Densitometric curves of mucus protein from control and infected Chinese giant salamander

M. Marker; CM. Control mucus; NM. Natural infected mucus; AM. Artificial infected mucus. X-axis represents distance down track; Y-axis represents profile height. The arrows indicate the two bands (45 and 16 kD), they have same distance migration, but different peak height

表 1 大鲵血清和黏液蛋白图谱各条带峰值(Height)及含量百分比(Ratio)

Tab. 1 The peak values (Height) and percentage contents (Ratio) of serum and skin mucus protein from normal (control) and infected Chinese giant salamander on SDS-PAGE

条带序号No.	标准分子量 Molecular weight marker (kD)	条带分子 量Bands (kD)	密度分析Density analysis											
			血清对照 Control serum (CS)		自然感染血清 Natural infected serum(NS)		人工感染血清 Artificial infected serum(AS)		黏液对照 Control mucus(CM)		自然感染黏液 Natural infected mucus(NM)		人工感染黏液 Artificial infected mucus(AM)	
			峰值 Height	比值 Ratio (%)	峰值 Height	比值 Ratio (%)	峰值 Height	比值 Ratio (%)	峰值 Height	比值 Ratio (%)	峰值 Height	比值 Ratio (%)	峰值 Height	比值 Ratio (%)
1		160	55	2.5	37	3.5	45	2.1						
2		135	74	7.1	51	11.5	66	7.8						
3	116.0	116							42	9.7	30	5.7	54	9.8
4		110	23	2.6	14	2.3	19	1.5						
5		100							18	4.1	21	4.4	12	1.7
6		90											14	1.9
7	66.2	80—60	49	45.2	65	45.5	66	42.3						
8		75							10	3.8	11	2.7	15	4.2
9		57	30	10.3	11	3.7	33	11.7	29	7.1	14	1.9	24	3.1
10		53	13	1.3					20	4.9	17	2.4	42	7.9
11		52									17	2.3		
12		50	12	1.4			18	1.4						
13	45.0	45							58	19.3	43	9.5	26	3.8
14		43	34	4.0	24	8.0	31	5.4			13	2.6	20	4.7
15		40	14	1.4	9	2.2	19	2.7						
16		38	28	3.6	13	4.0								
		36	8	0.8			12	0.8						
17	35.0	35												
18		33			5	1.5	12	0.8						
19		32											9	1.4
20		31	15	1.1	11	2.5	14	1.0						
21		27	35	3.1	8	1.9	19	1.6	60	25.1	66	21.5	68	17.7
22		26	33	2.2	18	5.1	40	4.6			7	1.6	11	1.9
23	25.0	25	9	1.0	7	1.9	15	1.6						
24		22	8	0.8										
25		20									5	1.7		
26	18.4	18							36	13.1	72	25.2	57	15.1
27		17							9	2.2	9	1.8	15	3.3
28		16	15	1.8					20	6.0	49	12.6	62	16.4
29		15.5	34	2.4	6	1.5	50	3.4						
30		15	34	2.9	5	1.3	54	4.2	10	4.7	13	4.1	10	5.6
31	14.4	14	96	4.5	22	3.6	90	7.1						
32		13											9	1.5

SPE)是一种可用于了解血清蛋白质组分、对不同生理及病理条件下血清蛋白成分变化进行定量的有效方法,被运用于不同指标的测试分析^[21, 22]。大鲵黏液为高度黏稠的乳白色凝胶样物质,与常见的鱼类黏液具有透明易溶于水的性状不同,大鲵黏液很难溶于水、生理盐或磷酸盐缓冲液(PBS)等。因

此,在用于电泳的大鲵黏液样品采集和制备过程中,需经冻干、溶解和离心处理,才能使黏液样品较充分溶解,以获得质量较好的电泳图谱。大鲵血清中部分蛋白带集中,不同组分的含量差异大,选配适当胶浓度是获得较高分辨率、组分完整、清晰的电泳图谱的关键条件之一。因此,在制备和稀释黏

液样及选择适宜电泳胶浓度条件时都经过反复试验和比较。

大鲵正常血清与正常黏液图谱有显著差异,且病毒感染后,它们的组分变化也明显不同。当与不同水生脊椎动物的血清与黏液蛋白图谱比较,大鲵黏液的蛋白图谱与无鳞的黄鳢(*Monopterus albus*)更接近些,而与草鱼(*Ctenopharungodon idellus*)、鲫(*Carassius auratus*)和江豚(*Neophocaena phocaenoides*)差异较大^[20]。大鲵血清蛋白图谱更接近水生哺乳动物江豚,而与草鱼、鲫、鳊(*Siniperca chuatsi*)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)、狗鱼(*Esox reicherti*)等差异大些。这似乎与我们先前在对从ADRV诱导的大鲵胸腺cDNA文库中,筛选鉴定免疫相关基因的结果有某种程度相吻合,部分大鲵抗体基因结构更接近进化地位较高级的动物,而不是相同或进化地位较低级的动物^[23]。正常与感染血清或黏液都出现了不同的差异蛋白带,这证实蛙病毒感染的确能导致大鲵血清和黏液蛋白组分发生变化,如蛙病毒感染能使黏液蛋白组分增加;虽然感染血清蛋白带总数变化不大,但与正常血清相比至少有5条差异带。这提示大鲵血清与黏液的来源、抗病毒作用不同,因此大鲵血清和黏液对蛙病毒感染的应答存方式也有异。另外我们还注意到:自然感染和人工感染的大鲵黏液蛋白组分之间也存在一些差异条带,这可能与自然感染大鲵的年龄和体重差别较大、生存时间长短不一、或不同个体的生理和免疫状况也不同有关。

本研究结果显示,大鲵血清条带在60—80 kD有很强的蛋白带,预示这部分在血清中含量很高的蛋白是具有重要生理功能的成分。参照人类白蛋白分子量约为69 kD,占血清蛋白总量的50%—60%,具有结合和运输、维持血液胶体渗透压、清除自由基、抑制血小板聚集和抗凝血等作用^[24, 25]及其他血清蛋白及分子量,推测这一组分可能是大鲵血清白蛋白^[26]。

迄今关于有尾两栖类黏液中与病毒侵染应答相关蛋白的研究仅见有少量报道^[27],而大鲵皮肤蛋白组的研究最近才开始^[28]。为何会产生上述现象?哪些蛋白组分的变化是与蛙病毒感染的免疫应答有关呢?还有待运用更精准的方法对其进行筛选与鉴定。随着这些问题的解答,无疑将为寻找两栖类血清和皮肤黏液中抗病毒相关蛋白提供新思路。

参考文献:

- [1] Browne R K, Li H, Wang Z H, *et al.* The giant salamanders (Cryptobranchidae): Part A. palaeontology, phylogeny, genetics, and morphology [J]. *Amphibian and Reptile Conservation*, 2012, **5**(4): 17—29
- [2] Fang Y L, Zhang Y, Xiao H B, *et al.* Genetic diversity analysis of wild Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) and their artificially propagated progenies [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **32**(5): 783—786 [方耀林, 张燕, 肖汉兵, 等. 野生大鲵及其人工繁殖后代的遗传多样性分析. 水生生物学报, 2006, **32**(5): 783—786]
- [3] Zhang K J, Wang X M, Wu W, *et al.* Advances in conservation biology of Chinese giant salamander [J]. *Biodiversity Science*, 2002, **10**(3): 291—297 [章克家, 王小明, 吴巍, 等. 大鲵保护生物学及其研究进展. 生物多样性, 2002, **10**(3): 291—297]
- [4] Liu S, Liu H L, Zhou Y H. Analysis of the nutritional composition of *Andrias davidianus* [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2010, **32**(2): 198—200 [刘绍, 刘卉琳, 周月华. 中国大鲵营养成分的分析. 营养学报, 2010, **32**(2): 198—200]
- [5] Tao F Y, Wang X M, Zheng H X, *et al.* Analysis of complete cytochrome *B* sequences and genetic relationship among Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*) from different areas [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(5): 625—628 [陶峰勇, 王小明, 郑合勋, 等. 中国大鲵五地理种群Cyt *b*基因全序列及其遗传关系分析. 水生生物学报, 2006, **30**(5): 625—628]
- [6] Yang L P, Meng Z N, Liu X C, *et al.* AFLP analysis of five natural populations of *Andrias davidianus* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2011, **50**(2): 99—104 [杨丽萍, 蒙子宁, 刘晓春, 等. 中国大鲵5个野生种群AFLP分析. 中山大学学报, 2011, **50**(2): 99—104]
- [7] Wang L X, Zheng X, Ai M, *et al.* Construction of cDNA library of *Andrias davidianus* skin tissue with analyzing the cDNA sequence and expression of *Arpc51* gene [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, **27**(3): 273—281 [王立新, 郑尧, 艾闽, 等. 大鲵皮肤cDNA文库构建及Arpc51基因cDNA序列和组织表达分析. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, **27**(3): 273—281]
- [8] Chinchar V G, Hyatt A, Miyazaki T, *et al.* Family *Iridoviridae*: poor viral relations no longer [J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2009, **328**: 123—170
- [9] Chinchar V G, Waltzek T B. Ranaviruses: not just for frogs [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, **10**(1): e1003850
- [10] Geng Y, Wang K Y, Zhou Z Y, *et al.* First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*) [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2011, **145**: 95—102
- [11] Geng Y, Wang K Y, Li C W, *et al.* PCR detection and electron microscopic observation of bred Chinese giant

- salamander infected with ranavirus associated with mass mortality [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2010, **40**(8): 817—821 [耿毅, 汪开毓, 李成伟, 等. 蛙病毒感染致养殖大鲵大规模死亡的电镜观察及PCR检测. 中国兽医科学, 2010, **40**(8): 817—821]
- [12] Zhang Q Y, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2015, **58**: 156—169 [张奇亚, 桂建芳. 水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用. 中国科学: 生命科学, 2014, **44**: 1236—1252]
- [13] Chen Z Y, Gui J F, Gao X C, *et al.* Genome architecture changes and major gene variations of *Andrias davidianus* ranavirus (ADRV) [J]. *Veterinary Research*, 2013, **44**: 101
- [14] Kallert D M, Borrelli J, Haas W. Biostatic activity of piscine serum and mucus on myxozoan fish infective stages [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, **33**(4): 969—976
- [15] Sciani J M, Angeli C B, Antoniazzi M M, *et al.* Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in South American toads: a preliminary biochemical delineation [J]. *The Scientific World Journal*, 2013, **2013**: 937407
- [16] Guardiola F A, Cuesta A, Arizcun M, *et al.* Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, **36**(2): 545—551
- [17] Munshi N C. Investigative tools for diagnosis and management [J]. *Hematology, the ASH Education Program*, 2008, 298—305
- [18] Katzmann J A, Stankowski-Drengler T J, Kyle R A, *et al.* Specificity of serum and urine protein electrophoresis for the diagnosis of monoclonal gammopathies [J]. *Clinical Chemistry*, 2010, **56**(12): 1899—1900
- [19] Camus M S, Krimer P M, Leroy B E, *et al.* Evaluation of the positive predictive value of serum protein electrophoresis Beta- gamma bridging for hepatic disease in three domestic animal species [J]. *Veterinary Pathology Online*, 2010, **47**: 1064—1070
- [20] Ou T, Lei X Y, Zhang Q Y. Analysis of protein profiles in serum and mucus from different aquatic vertebrates [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(1): 18—23 [欧铜, 雷晓颖, 张奇亚. 不同水生脊椎动物的血清与黏液蛋白图谱分析. 水生生物学报, 2012, **36**(1): 18—23]
- [21] Qureshi S, Memon S A, Ghanghro A B, *et al.* Electrophoretic analysis of serum proteins in workers exposed to organic acid anhydrides (OAAs) [J]. *International Journal of Multidisciplinary Sciences and Engineering*, 2013, **4**(5): 65—68
- [22] Bird J, Behrens J, Westin J, *et al.* UK Myeloma Forum (UKMF) and Nordic Myeloma Study Group (NMSG): guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) [J]. *British Journal of Haematology*, 2009, **147**(1): 22—42
- [23] Zhu R, Chen Z Y, Wang J, *et al.* Thymus cDNA library survey uncovers novel features of immune molecules in Chinese giant salamander *Andrias davidianus* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, **46**(2): 311—322
- [24] Nicholson J, Wolmaris M, Park G. The role of albumin in critical illness [J]. *British Journal of Anaesthesia*, 2000, **85**(4): 599—610
- [25] Tojo A, Kinugasa S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption [J]. *International Journal of Nephrology*, 2012, **2012**: 481520
- [26] Fazio F, Marafioti S, Torre A, *et al.* Haematological and serum protein profiles of *Mugil cephalus*: effect of two different habitats [J]. *Ichthyological Research*, 2013, **60**(1): 36—42
- [27] Schaerlinger B, Frippiat J P. IgX antibodies in the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, **32**(8): 908—915
- [28] Geng X, Wei H, Shang H, *et al.* Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) [J]. *Journal of Proteomics*, 2015, **119**(2): 196—208

COMPARATIVE ANALYSIS OF SERUM AND SKIN MUCUS PROTEIN PROFILES BETWEEN RANAVIRUS-INFECTED AND NORMAL CHINESE GIANT SALAMANDER *ANDRIAS DAVIDIANUS*

YUAN Jiang-Di^{1,2}, CHEN Zhong-Yuan¹ and ZHANG Qi-Ya¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The Chinese giant salam *Andrias davidianus* is endemic to China and is the largest remaining amphibian in the world, which has considerable economic and scientific significance. However, epidemic of ranavirus disease have been responsible for the wild population continued to decline a sharp drop in giant salamander production. For better understanding of the physiological and biochemical reactions, and antiviral responses of Chinese giant salamander, the protein profiles of serum and mucus from control and infected giant salamanders were analyzed and compared by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the densitometric analysis. The results show that protein bands from control serum (CS) and infected serum (including natural infected serum, NS and artificial infected serum, AS) were enriched at 60—80 kD, the contents were more than 42% of total protein. Besides, sixteen protein bands were present among 14—57 kD in CS: 57, 53, 50, 43, 40, 38, 36, 31, 27, 26, 25, 22, 16, 15.5, 15 and 14 kD. Four protein bands 53, 33, 22 and 16 kD were different between CS and NS, AS. Control mucus (CM) and infected mucus (including natural infection mucus, NM and artificial infected mucus, AM) have eleven common protein bands 116, 100, 75, 57, 53, 45, 27, 18, 17, 16 and 15 kD. But infected giant salamander mucus NM and AM have seven other protein bands 90, 52, 43, 32, 26, 20 and 13 kD. Furthermore, the protein contents of some bands have changed, for example, the 45 kD band in CM makes up 19.3% of total protein. However, it only makes up 3.8% in AM. This study has demonstrated that ranavirus infection can lead to protein components change in Chinese giant salamander's mucus and serum, which provided valuable information for explore antiviral associated protein biomarkers in amphibians.

Key words: Chinese giant salamander *Andrias davidianus*; Serum; Mucus; Ranavirus infection; SDS-PAGE; Densitometric analysis; Protein profiles