

日本鬼鲉不同组织的 8 种同工酶谱

董徐辉, 李星云

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用垂直聚丙烯酰胺平板电泳技术, 对象山港野生日本鬼鲉(*Inimicus japonicus*)的 9 种组织器官的 8 种同工酶进行研究, 并分析了其酶谱表型。结果表明, 琥珀酸脱氢酶(Succinate dehydrogenase, 简称 SuDH)在所有组织中均存在, 组织间差异较小; 乳酸脱氢酶(Lactic dehydrogenase, 简称 LDH)、苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, 简称 MDH)、苹果酸酶(Malic enzyme, 简称 ME)、酯酶(Esterase, 简称 EST)、醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, 简称 ADH)、过氧化物酶(Peroxidase, 简称 POD)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, 简称 SOD)则具有明显的组织特异性, 且这些酶在表型、分布和活性上均表现出高度的组织特异性。

关键词: 日本鬼鲉(*Inimicus japonicus*); 同工酶; 组织特异性表达

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)10-0018-06

日本鬼鲉(*Inimicus japonicus*), 俗称老虎鱼, 海蝎子, 为暖温性底层鱼类。在中国产于南海、东海、黄海和渤海^[1]。其头长短于头宽, 头侧和下颌下方有许多发达的皮须, 鳃盖膜分离, 与峡部相连, 体无鳞, 背鳍有 16~17 鳍棘, 胸鳍下叶有两指状游离鳍条; 其体色呈红色或黄, 体长可达 200 mm, 初夏产卵。背鳍鳍棘基部后面各有发达的毒腺, 被刺伤后肿痛甚剧烈, 故俗名“海蝎子”。目前, 有关日本鬼鲉的研究不多, 2003 年 Nozaki 等^[2]对日本鬼鲉的生殖周期进行了研究; 2003 年 Takushima 等^[3]对日本鬼鲉人工催产和人工受精进行研究, 并取得成功; 2005 年刘振勇等^[4]通过人工育苗获得鬼鲉幼鱼 11.025 万尾。此外, 刘晓萍等^[5,6]对背鳍棘毒腺结构进行光镜和电镜观察。然而日本鬼鲉种质方面的研究未见有人报道。鬼鲉作为一种经济水产动物, 在国内已经开展了人工育苗和养殖研究。因此, 对其进行种质研究也是十分必要。

种质资源是育种的物质基础。要育成好的鱼类品种, 必须要有丰富的种质资源, 大量收集、了解、保存、利用种质资源是国内外科研工作者十分重视的工作之一。同工酶技术可以从生化遗传的角度, 了解某一物种的遗传结构及其多样性, 且稳定性较好, 技术也已经相当成熟。本研究对日本鬼鲉 9 种组织中的 8 种同工酶进行了检测分析, 旨在为日本鬼鲉的种质研究积累资料, 为进一步研究象山港野生日本鬼鲉的遗传特性、种质鉴别、生物进化等提供一定的理论依据^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料采集及样品制备

实验鱼共 8 尾采自浙江象山港, 均为野生雌性成鱼, 质量平均约为 0.45 kg ± 0.05 kg, 用丁香酚麻醉, 立即解剖, 取肝脏、脾脏、心脏、肾脏、脑、鳃、眼睛、肠和肌肉等 9 种组织。实验时取上述 9 种组织称质量后, 以 1:3 的比例(W/V)加入 0.05% 巯基乙醇水溶液, 再加适量石英砂, 冰浴条件下研磨匀浆, 4℃ 冷冻, 离心 15 000 r/min, 离心 30 min (肝脏离心 2 次或更多次, 直至提取的酶液纯清), 取上清液, 按 1:1 的比例加入 40% 甘油和 0.1% 溴酚蓝指示剂后分装, 立即用于电泳分析或放入 -70℃ 超低温冰箱中保存备用。

1.2 电泳、染色

采用不连续垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 分离胶浓度为 8.2% (pH 8.9), 浓缩胶浓度为 3.6% (pH 6.7), 电泳缓冲液为 TG (Tris-Gly), pH 8.3; 电泳的方法参照文献^[8], 略作修改。实验时采用 DYY-2C 型稳压稳流电泳仪和 DYCZ-24D 型垂直电泳槽, 电泳在 4℃ 冰箱中进行。TG 系统稳压 200V, 电泳时间 2~3 h。组

收稿日期: 2009-11-26; 修回日期: 2010-04-10

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划(IRT0734)项目

作者简介: 董徐辉(1985-), 男, 浙江人, 硕士研究生, 研究方向: 种质种苗创新, 电话: 13857476758 E-mail: dxh8597@126.com; 李星云, 通信作者, 电话: 0574-87609571, E-mail: limingyun@nbip.net

织化学染色方法参照文献[8,9]。染色后用 7.5%冰醋酸溶液固定,扫描仪扫描、拍照,手工记录酶带迁移率。

1.3 图谱记录

主要采用 2 种方法进行酶谱的记录,即:按酶带的迁移距离和染色深度,在记录本上记录;扫描成像并储存于电脑中。

同工酶缩写、编号、座位等的命名采用胡能书等^[8]推荐的方法,以各酶带的相对迁移率(R_f)从大到小依次命名,即从阳极向阴极运动的酶带开始依次命名为 1、2、3、..., $R_f=1/L$, 1 为阴极端至各酶带中点的距离, L 为阴极端至指示剂终点的距离。

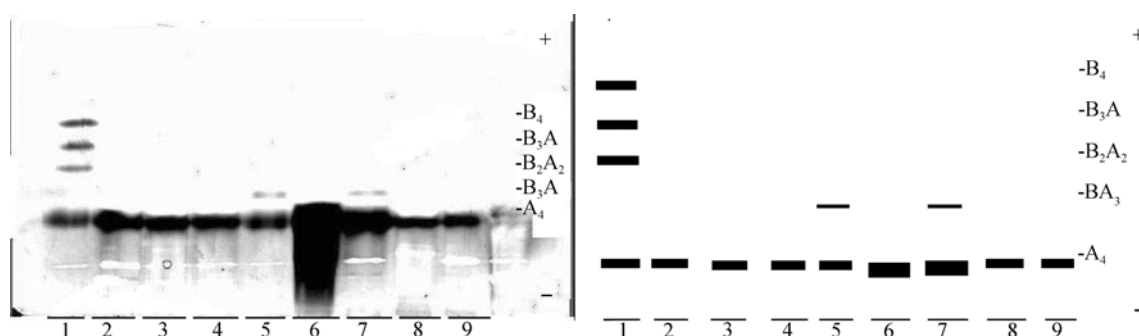


图 1 日本鬼鲉不同组织 LDH 图谱

Fig. 1 LDH patterns in various tissues of *Inimicus japonicus*

1. 眼; 2. 鳃; 3. 肾; 4. 心; 5. 脑; 6. 肌肉; 7. 脾脏; 8. 肝脏; 9. 肠, 数字上“-”为原点(图 2~图 8 同)
1. eye; 2. branchia; 3. kidney; 4. heart; 5. brain; 6. muscle; 7. spleen; 8. liver; 9. intestine, “-” as origin(the same as Fig.2~Fig.8)

2.2 苹果酸脱氢酶(MDH E.C.1.1.1.37)

硬骨鱼类的 MDH 有上清液型(s-MDH)和线粒体型(m-MDH)两种,均为两个基因位点编码的二聚体^[10]。日本鬼鲉不同组织中的 MDH 分别有 3~5 条带。MDH 1、MDH 2、MDH 3、MDH 4 是上清液型,MDH 5、MDH 6 是线粒体型。上清液型 MDH 2、MDH 3、MDH 4 在检测的 9 组织中都有分布,而 MDH 1 是肾、肌肉、肝特有的。线粒体型 MDH 5 在心和脑中有表达,线粒体型 MDH6 在鳃、肾、肌肉、肠中有表达(图 2)。

2.3 超氧化物歧化酶(SOD E.C.1.15.1.1)

超氧化物歧化酶二聚体的 s-SOD(上清液型)和四聚体的 m-SOD(线粒体型)两类,有两个基因位点编码^[11]。s-SOD 是可溶性的,在上清液中酶含量较高,易于检测出来。作者检测到 SOD1 是 m-SOD, SOD 2 和 SOD 3 是 s-SOD。超氧化物歧化酶在日本鬼鲉各组织或器官中有明显的差异表达,在脾脏,

2 结果

本实验共检测了 LDH、MDH、SOD、ME、ADH、POD、EST 和 SuCD 共 8 种同工酶。8 种同工酶均检测到有活性的酶带。

2.1 乳酸脱氢酶(LDH E.C.1.1.1.27)

LDH 除心、眼睛和脑组织外,其他组织均只有一条酶带 A_4 ; 眼睛有 4 条带,分别是 A_4 、 A_2B_2 、 AB_3 和 B_4 ,但是没有检测到 A_3B_1 的存在;心、脑表现为两条酶带,分别是 A_4 、 A_3B_1 。C 基因位点在本实验中未检测到。在酶活性上,肌肉和心脏组织较强,肌肉中最强(图 1)。

肠中均有 3 条带,眼中有微弱的一条带,脑中没有发现 SOD 表达,其余的各组织中均有两条带(图 3)。

2.4 苹果酸酶(ME E.C.1.1.1.40)

日本鬼鲉的 ME 检测到 2~5 条酶带。鱼类的 ME 可分为细胞质型(s-ME)和线粒体型(m-ME),其中 m-ME 由 1 个基因位点编码,为四聚体产物,在电泳图谱上迁移较慢; s-ME 也是四聚体产物^[12]。ME-5 是 m-ME,其余都是 s-ME。ME-2, ME-3, ME-4 存在于所有器官组织中,ME-1 存在心脏和脾脏中。ME-5 在鳃、肾、心和肌肉中检测到(图 4)。

2.5 醇脱氢酶(ADH E.C.1.1.1.1)

在以前的报道中,鱼类 ADH 被认为是由 1 个基因位点编码或由两个基因位点编码的二聚体酶^[13]。从日本鬼鲉的醇脱氢酶电泳图来看,醇脱氢酶应该是 3 个基因位点编码。在日本鬼鲉的肝脏中有非常特异的 ADH-2, ADH-3 两条带,和其他组织有明显的差异性。在日本鬼鲉的眼没有检测到醇脱氢酶的活性条带(图 5)。

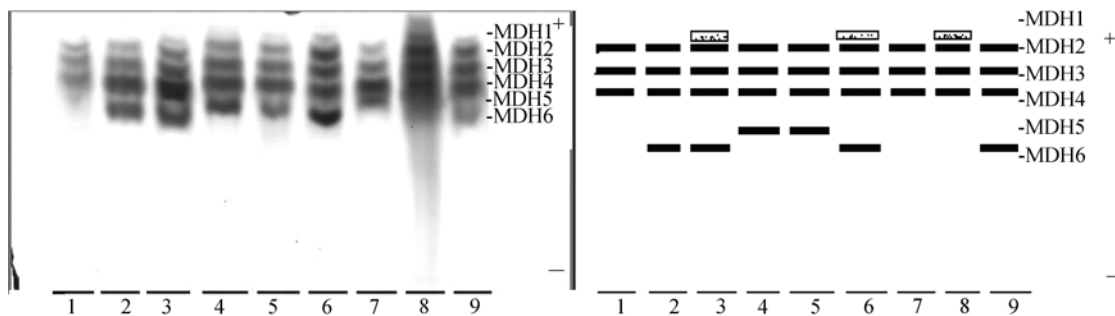


图 2 日本鬼鲉不同组织 MDH 图谱

Fig. 2 MDH patterns in various tissues of *Inimicus japonicus*

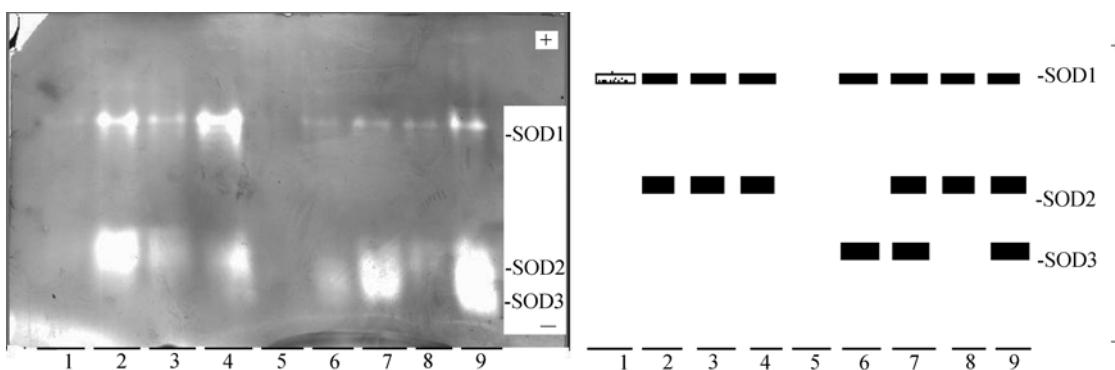


图 3 日本鬼鲉不同组织 SOD 图谱

Fig. 3 SOD patterns in various tissues of *Inimicus japonicus*

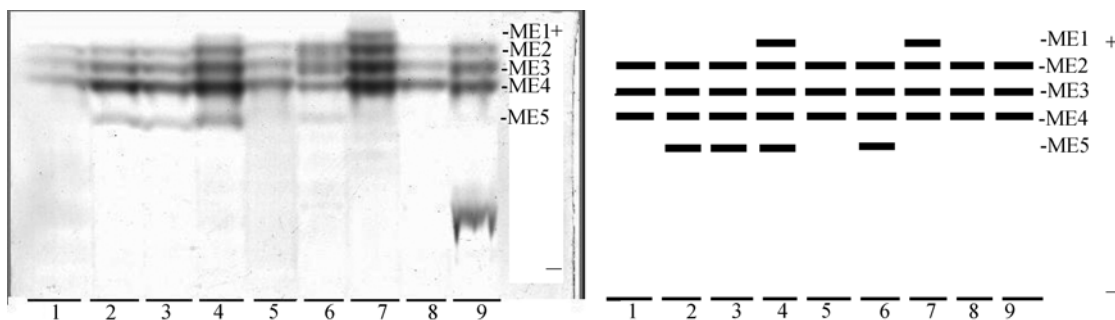


图 4 日本鬼鲉不同组织 ME 图谱

Fig. 4 ME patterns in various tissues of *Inimicus japonicus*

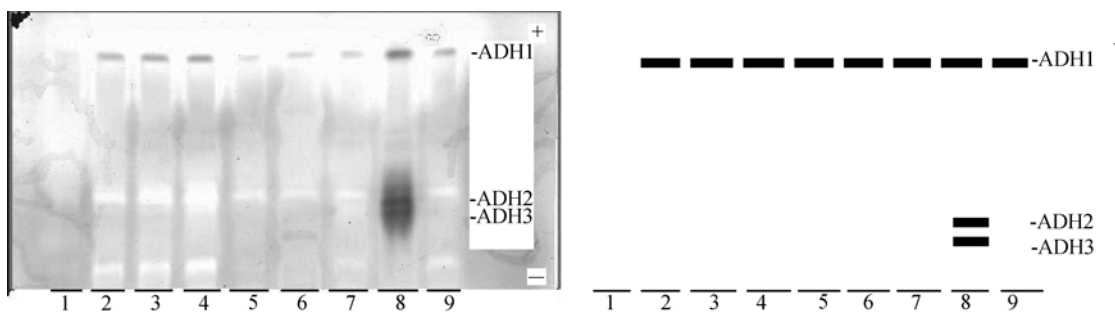


图 5 日本鬼鲉不同组织 ADH 图谱

Fig. 5 ADH patterns in various tissues of *Inimicus japonicus*

2.6 过氧化物酶(POD E.C.1.11.1.7)

从已有的研究结果来看,有的鱼类 POD 被认为是二聚体酶,有的则认为是单体酶^[14], POD 在日本鬼鲉中可能是二聚体。POD 表现出很强的组织特异性,

在 9 个组织中除肌肉外, 都有相应条带表达。在日本鬼鲉的眼、鳃、肾、心、脑中各检测到 1 个条带, 脾、肝、肠检测到 9 条酶带且表达活性比其他组织强(图 6)。

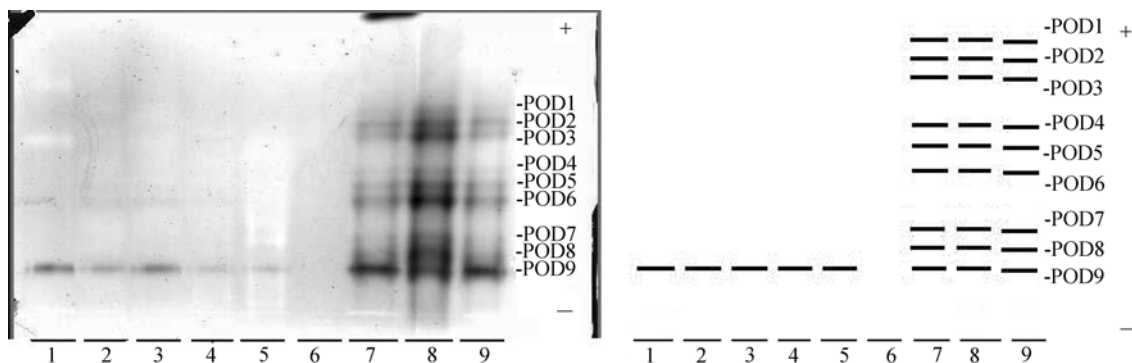


图 6 日本鬼鲉不同组织 POD 图谱

Fig. 6 POD patterns in various tissues of *Inimicus japonicus*

2.7 酯酶(EST E.C.3.1.1.1)

酯酶为单体或二聚体, 从以上的图谱来看日本鬼鲉的酯酶应该是二聚体。EST 的表型比较复杂, 从图上共可以观察到 2~7 条带。日本鬼鲉的肾、肠, 肝脏和眼中酯酶活性较高, 其他组织中也有不同数目和深度酶带的表达, 其中在脑中只有 EST-3 的表达

(图 7)。

2.8 琥珀酸脱氢酶(SuCD, E.C.1.3.99.1)

日本鬼鲉 SuCD 在各组织中表达较一致, 都为两酶带, 且迁移率相同, 在表达活性上也没有显著差异(图 8)。

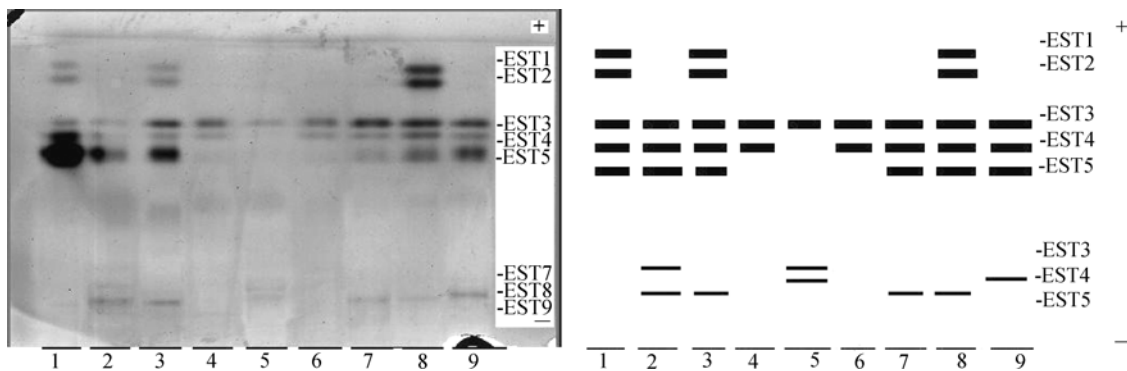


图 7 日本鬼鲉不同组织 EST 图谱

Fig. 7 EST patterns in various tissues of *Inimicus japonicus*

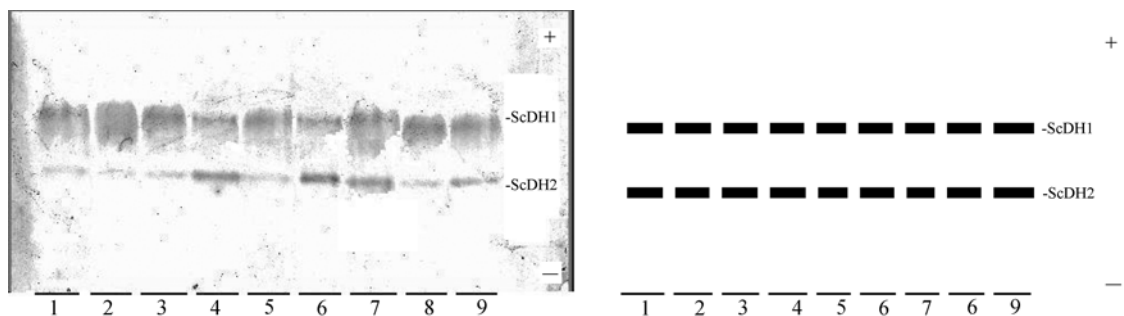


图 8 日本鬼鲉不同组织 SuCD 图谱

Fig. 8 SuCD patterns in various tissues of *Inimicus japonicus*

3 讨论

所检测的 8 种酶是复杂酶系统其中之一, 它们以各种同工酶的不同形式来参与机体的代谢和调节。因为某一形式的同工酶在机体中都有着不同的作用, 因此不同组织中有着不同形式的同工酶, 协助各组织完成各自的代谢任务。

LDH 与乳酸的产生和利用有关。当肌肉在剧烈运动时, 需要乳酸脱氢酶的参与下进行无氧运动从而使三羧酸循环受阻产生的丙酮酸转化为乳酸。此后在乳酸的利用也需要 LDH 的参与。肌肉中的无氧运动频率要远远高于其他组织, 所以在日本鬼鲉肌肉中 LDH 的活性很强。LDH 在鱼类肌肉大量表达的情况与姜建国等^[14]对青鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)的 LDH 图谱研究结果相一致。Shaklee 等^[15]在硬骨鱼类的 LDH-AB₃ 与 -A₂B₂ 之间也曾观察到 1 条酶带 LDH-C₄, 姜建国等^[14]在青鱼的 LDH 图谱中 LDH-B₄ 后面也有 LDH-C₄ 条带, 可是作者的实验中没有发现 LDH-C₄。LDH-C₄ 可能是在某些硬骨鱼类中才能存在, 因为黄福勇等^[16], 王军等^[17]分别在香鱼(*Plecoglossus altivelis*), 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)中也没有发现 LDH-C₄ 条带。ADH 也是参与糖酵解的重要酶类, ADH 在肝脏中活性大且同工酶形式较多, 这与管丹东^[18], 黄福勇^[16], 李明云^[19], 尤峰等^[20]的研究结果一致。ADH 的活性不稳定, 样品在 -70 °C 冰箱保存 1 个月后, 发现其活性明显下降, 图谱上条带会变得很弱, 甚至检测不到。金春华等^[21]对大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)的 ADH 研究中也发现其比较容易失活。所以, 在做 ADH 的研究中必须保持样品新鲜度。

Starzyk 等^[22], 姜建国^[14], 金春华等^[21]对其他鱼类的研究中上清液型 MDH 只有 3 条带, 他们分别是由两个基因编码的 MDH-A₂, MDH-AB, MDH-B₂。而日本鬼鲉上清液型 MDH 有 4 条, 这说明在日本鬼鲉上清液型 MDH 不只有两个基因座位编码, 而有 3 个基因座位编码。MDH-1 是 MDH-C₂, MDH-2, MDH-3, MDH-4 分别是 MDH-A₂, MDH-AB, MDH-B₂。基因座位 A 和 B 之间可以杂交, 座位 C 不可以和基因座位 A 和 B 杂交。MDH 和 ME 是生物氧化的重要酶类, 主要催化苹果酸与丙酮酸、草酰乙酸之间的相互转化。因此这些酶在各个组织中大量存在, 并且活性较强。在肌肉、肝脏等新陈代谢比较旺盛的组织中, 它们的活性就相对较强。

EST 是催化酯类化合物水解进入中间代谢的重要水解酶, 在细胞内执行最基本的生理功能。它们能水解大量非生理存在的酯类化合物, 包括一些药物, 因此认为可能有去毒作用。肝、肾是机体最重要的解毒器官, 所以在肝、肾中酯酶同工酶的形式较多, 而且活性较强, 这与黄福勇在鳧溪香鱼研究中报道的结果相一致^[16]。肠是消化脂肪等酯类的主要器官, 因此酯酶在肠中活性也较强。

SOD 是生物体防御氧化损伤的重要酶类, 能清除体内产生的自由基 O⁻。机体在正常代谢过程中产生自由基 O⁻, 且外界环境因素能增加细胞中自由基 O⁻ 的浓度, 若不能及时清除, 会引起生物膜的过氧化损伤, 甚至造成细胞器的损害以及 DNA 与蛋白质等的降解与失活。管丹东^[18], 黄福勇等^[16]在大黄鱼和香鱼的研究中, 发现 SOD 在脾脏和肝脏的活性较强。然而日本鬼鲉在肠和鳃中 SOD 的活性比较强, 这可能与日本鬼鲉自身的栖息方式有关。作为近海的一种底栖鱼类, 它的肠道、鳃几乎和近海的淤泥直接接触。从而使肠道和鳃最容易受到外界病原体和不利条件影响, 因此在肠和鳃中 SOD 的活性比较强。这与生活在淤泥中泥蚶(*Tegillarca granosa*)的消化腺中 SOD 的强活性相一致^[23]。POD 利用 H₂O₂ 氧化供氢体, 降解嘌呤、酚和胺等物质并减轻其毒性^[24]。脾是重要的免疫器官, 肝脏则是机体最重要的解毒器官, 因此 POD 在脾脏、肝脏和肠道中的种类比较多, 且活性也相对较高。管丹东等^[18]大黄鱼的 POD 酶谱分析中, 也发现在脾脏、肝脏中 POD 表达酶带较多且活性较强。

综合 8 个同工酶谱来看, 肝脏作是机体最为重要的器官之一, 各种同工酶在其中不但种类最多而且活性强。

参考文献:

- [1] 姜孝玉, 涂洪斌. 日本鬼鲉毒腺 cDNA 表达文库的构建和初步分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002; 29(3): 424-428.
- [2] Nozaki R, Takushima M, Mizuno K. Reproductive cycle of devil stinger, *Inimicus japonicas*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28: 217-218.
- [3] Takushima M, Nozaki R, Kadomura K. Induced ovulation using LHRHa and artificial fertilization in devil stinger, *Inimicus japonicas*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28: 521-522.
- [4] 刘振勇, 全汉锋. 鬼鲉人工育苗技术研究[J]. 上海水

- 产大学学报, 2005, 14(1): 30-35.
- [5] 刘晓萍, 于业军. 日本鬼鲉背鳍棘毒腺中 I、II 型毒腺细胞关系的探讨[J]. 动物学报, 2000, 46(2): 221-226.
- [6] 刘晓萍, 于业军. 中国沿海常见棘毒鱼类的毒性研究-日本鬼鲉背鳍棘中的毒腺结构[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 597-603.
- [7] 王宏伟, 王安利, 王维娜, 等. 鱼类同工酶研究进展[J]. 动物学报, 2001, 47 (专刊): 101-105.
- [8] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科技出版社, 1985: 86-126.
- [9] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 90-112.
- [10] 张庆朝, 王慧, 秦孜娟, 等. 泰山赤鳞鱼同工酶的研究[J]. 动物学研究, 1994, 5(2): 62-67.
- [11] 王梅芳, 余福勇. 旗江珧不同组织中酯酶和过氧化物歧化酶同工酶的表达[J]. 海洋科学, 2000, 24 (7): 14-16.
- [12] 王可玲, 张培军, 刘兰英, 等. 中国近海带鱼种群生化遗传结构及其鉴别的研究[J]. 海洋学报, 1994, 16 (1): 93-104.
- [13] 陈定福, 杨清发. 吻鲈和圆口吻鲈同工酶的电泳分析[J]. 西南师范大学学报, 1997, 22(2): 162-168.
- [14] 姜建国, 熊全沫, 姚汝华. 青鱼不同组织中同工酶的表达模式[J]. 水生生物学报, 1997, 21(4): 353-358.
- [15] Shaklee J B, Kepes K L, Whitt G S. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: the molecular and genetic basis for the unique eye and liver of teleost fishes[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1973, 185: 217-240.
- [16] 黄福勇, 李多云. 鳊溪香鱼群体同工酶的生化遗传分析[J]. 水产学报, 2004, 28(5): 579-584.
- [17] 王军, 全成干, 苏永全, 等. 官井洋野生与养殖大黄鱼同工酶的研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(6): 39-41.
- [18] 管丹冬, 李多云, 叶帅东, 等. 岱衢族大黄鱼不同组织的同工酶谱[J]. 宁波大学学报(理工版), 2008, 23(1): 35-38.
- [19] 李多云, 张海琪, 竺俊全. 象山港养殖大黄鱼同工酶的分析[J]. 海洋学报, 2003, 25(2): 231-236.
- [20] 尤峰, 王可玲, 相建海, 等. 山东近海牙鲆同工酶的生化遗传分析[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 128-133.
- [21] 金春华, 钟爱华, 张海琪, 等. 大弹涂鱼不同组织器官的同工酶研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 35-40.
- [22] Starzyk R H, Merritt R B. Malate dehydrogenase isozymes in the Longnose Dace, *Rhinichthys cataractae*[J]. *Biochemical Genetics*, 1980, 18:7-8.
- [23] 李太武, 吕振明, 林志华, 等. 泥蚶同工酶谱在不同组织的差异研究[J]. 海洋学报, 2004, 26(4): 125-132.
- [24] Kirpichnikov V S. Genetic Bases of Fish Selection [M]. Berlin: SpringerVerlag, 1981. 319-395.

Distribution of eight enzymes in various organs of *Inimicus japonicus*

DONG Xu-hui, LI Ming-yun

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Nov., 26, 2009

Key words: *Inimicus japonicus*; isozyme; tissue specific expression

Abstract: Eight isozymes in nine organs of *Inimicus japonicus* were studied by vertical polyacrylamide gel electrophoresis. Succinate dehydrogenase (SuDH) existed in all organs, showing little differences. Lactic dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme (ME), esterase (EST), alcohol dehydrogenase (ADH), peroxidase (POD), and superoxide dismutase (SOD) showed clearly tissue-specific distributions.

(本文编辑: 谭雪静)