

大弹涂鱼不同组织器官的同工酶研究

金春华, 钟爱华, 张海琪, 黄福勇, 李星云

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:采用垂直聚丙烯酰胺平板电泳技术,对大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)的眼睛、心脏、肝脏、肌肉、脾脏和鳃等6种组织器官中的13种同工酶进行研究,并分析了其酶谱表型。结果表明,四唑氧化酶(TO)和酸性磷酸酶(ACP)没有检测到酶带;三梨醇脱氢酶(SDH)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)仅在肝脏中表达;超氧化物歧化酶(SOD)在所有组织中均存在,部分组织中存在差异;乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、苹果酸酶(MEP)、酯酶(EST)、醇脱氢酶(ADH)、D-葡萄糖脱氢酶(GcDH)、甲酸脱氢酶(FDH)、谷氨酸脱氢酶(GDH)则具有明显的组织特异性。

关键词:大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)、同工酶、电泳、组织特异性

中图分类号: S965.232; Q342 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)03-0035-06

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)俗称花跳、星跳、花弹涂鱼等,隶属于鲈形目, 虎鱼亚目、弹涂鱼科,大弹涂鱼属,系沿岸暖水广温广盐性两栖鱼类。大弹涂鱼具有食物链短,鱼病少,易于养活,耐长途运输等特点,是一种有前途的滩涂养殖鱼类。大弹涂鱼的肉质鲜美,营养丰富,具有滋补功效,深受国内外群众的喜爱。目前,有关大弹涂鱼的研究报道不多,主要集中在形态特征、养殖繁育技术等方面^[1-3],尚未见到生化特性及同工酶表达方面的研究报道。本研究对大弹涂鱼6种组织中的13种同工酶进行了检测分析,旨在为大弹涂鱼的研究积累资料,同时为进一步研究大弹涂鱼遗传特异性、种质鉴别、生物进化等提供一定的理论依据,希望为大弹涂鱼的人工选种和定向育种提供生化遗传学指标。

1 材料与方法

1.1 材料采集及样品制备

实验用鱼采自浙江宁海海区的天然大弹涂鱼,共40尾,鱼龄1~2龄,全长11~15 cm,体质量22.1~28.3 g,活鱼运回实验室后,立即解剖,每尾取眼、心脏、肝脏、肌肉、脾脏、鳃等6种组织器官。实验时取上述6种组织器官称重后,按每克组织加2毫升0.1 mol/L的Tris-HCl(pH 7.0)酶提取液,用玻璃匀浆器在冰浴中匀浆。匀浆液置于4℃冰箱中抽取0.5 h,然后在4℃条件下15 000 r/min离心20 min,取上

液立即实验或置于-71℃冰箱保存备用。

1.2 电泳、染色

采用高pH不连续聚丙烯酰胺垂直平板电泳,电泳的方法参照文献[4],略作修改。浓缩胶浓度为3.125%,pH 6.7;分离胶的浓度为7%,pH 8.9;电极缓冲液为TQ(Tris-Glycine),pH 8.3。组织化学染色方法参照文献[5~6]。

1.3 结果记录

同工酶缩写、编号、座位等的命名采用Shaklee等^[7]推荐的方法,以同工酶缩写名称的大写代表酶蛋白,小写代表编码基因。

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;利用复日生物凝胶成像系统观察,扫描成像并储存于电脑中。

2 结果

本实验共检测了乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢

收稿日期:2002-03-14;修回日期:2003-12-10

基金项目:浙江省自然科学基金(399428)

作者简介:金春华(1964-),男,浙江东阳人,讲师,主要从事苗种繁育研究,E-mail: jchnbu@mail.nbptt.zj.cn

酶(MDH)、苹果酸酶(MEP)、醇脱氢酶(ADH)、山梨醇脱氢酶(SDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、葡萄糖脱氢酶(GcDH)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、四唑氧化酶(TO)、甲酸脱氢酶(FDH)、酯酶(EST)、酸性磷酸酶(ACP)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)共13种同工酶,其中TO、ACP未显示任何有活性的区带,山梨醇脱氢酶(SDH)仅在肝脏检测到两条微弱酶带,所以没有做详细的分析。其它10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)

鱼类的LDH为四聚体酶,大多由A、B、C3个位点控制,C位点存在于特定组织器官如肝脏、眼睛中,也有没有检测到C位点的鱼类。大弹涂鱼的LDH同工酶由3个位点控制,A、B两个位点在眼睛、肌肉、心脏、脾脏、鳃、肝脏中表达,C位点仅在眼睛中表达;和大多数鱼类一样,A位点在肌肉中超显性表达,B位点在心脏中超显性表达。A₄、B₄和C₄如图中所标注,其余各带为杂合带,共观察到7条带,其中两条弱带(图1:1-2)。

2.2 超氧化物歧化酶(SOD E.C.1.15.1.1)

超氧化物歧化酶为二聚体酶,由一个基因座位编码,在大弹涂鱼各组织或器官中均表达,心脏、肝脏和眼睛中活性较强(图1:3-4)。

2.3 苹果酸脱氢酶(MDH E.C.1.1.1.37)

苹果酸脱氢酶为二聚体酶,分上清液型(s-MDH)和线体型(m-MDH)^[8]。大弹涂鱼不同组织中的MDH分别有2~4条带,各组织中均有s-MDH,由一个基因座位编码;m-Mdh-1存在于所有组织中;肌肉、心脏、肝脏、鳃、眼中有m-Mdh-1、m-Mdh-2、m-Mdh-3,脾脏中只有m-Mdh-1和m-Mdh-2,大弹涂鱼的m-MDH可能是由三个基因座位编码(图1:5-6)。

2.4 苹果酸酶(MEP E.C.1.1.1.40)

苹果酸酶为四聚体,有上清液型和线粒体型。在大弹涂鱼的MEP共检测到3条带。眼、肝脏、肌肉、心脏、鳃中存在Mep-1、Mep-2、Mep-3,脾脏中仅存在Mep-2、Mep-1,可能由3个位点编码(图1:7-8)。

2.5 酯酶(EST E.C.3.1.1.1)

酯酶为单体或二聚体,共观察到12条酶带,具有显著的组织特异性。酯酶在大弹涂鱼的肝脏、脾脏和鳃耙中活性最高,其中Est-1、Est-10和Est-12仅在肌肉中表达,Est-2、Est-3和Est-5仅在脾脏

和鳃耙中表达,Est-4仅在眼睛中检测到。Est-6仅在肝脏和脾脏中检测到。Est-7在除眼睛之外的组织或器官中都可以检测到,全部12条酶带中,只有Est-8在6种组织或器官中都可以检测到。Est-9仅在鳃耙中检测到了酶活性,且活性较弱(图1:9-10)。

2.6 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH E.C.1.1.1.49)

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶为二聚体。在大弹涂鱼的肝脏可以观察到3条带,应该由3个基因编码(图1:11-12)。

2.7 醇脱氢酶(ADH E.C.1.1.1.1)

醇脱氢酶为二聚体酶,由3个基因编码,仅在大弹涂鱼鳃耙、肝脏和眼睛中表达。在肝脏中活性最强,在鳃耙和眼睛中活性较弱(图2:1-2)。

2.8 D-葡萄糖脱氢酶(GCDH E.C.1.1.1.118)

D-葡萄糖脱氢酶为二聚体酶,由6个基因座位编码,在各个组织或器官中均表达,在肝脏和心脏中活性最强。GcDH-1只在脾脏和心脏中表达,GcDH-5仅在肝脏和眼睛中表达,GcDH-6仅在肝脏中表达(图2:3-4)。

2.9 甲酸脱氢酶(FDH E.C.1.2.1.2)

甲酸脱氢酶为二聚体,由3个基因座位编码,除Fdh-2在肝脏表现较强活性外,其它组织或器官中活性均较弱(图2:5-6)。

2.10 谷氨酸脱氢酶(GDH E.C.1.4.1.2)

谷氨酸脱氢酶为四聚体酶,由3个基因座位编码,在肝脏中活性最强,在脾脏和心脏中没有检测到酶活性,其它组织或器官中表达均较弱(图2:7-8)。

3 讨论

3.1 大弹涂鱼乳酸脱氢酶同工酶的表达

大弹涂鱼的Ldh-A、B在肌肉、心脏、脾脏、鳃、眼睛中表达,在鳃、脾、心脏、肌肉中能观察到3条清晰明显的谱带,靠近阳极一端推测为A₄,中间一条为二者杂合带,靠近阳极一端应该是B₄。在眼睛中观察到了7条带,且最靠近阳极一端的谱带和其它谱带分隔明显,推测为C₄。C位点不仅能形成C₄,还能和A、B形成杂聚体^[8]。眼睛中共观察到了7条酶带,推测有C和A、B形成的杂合体。

3.2 关于大弹涂鱼同工酶的组织特异性

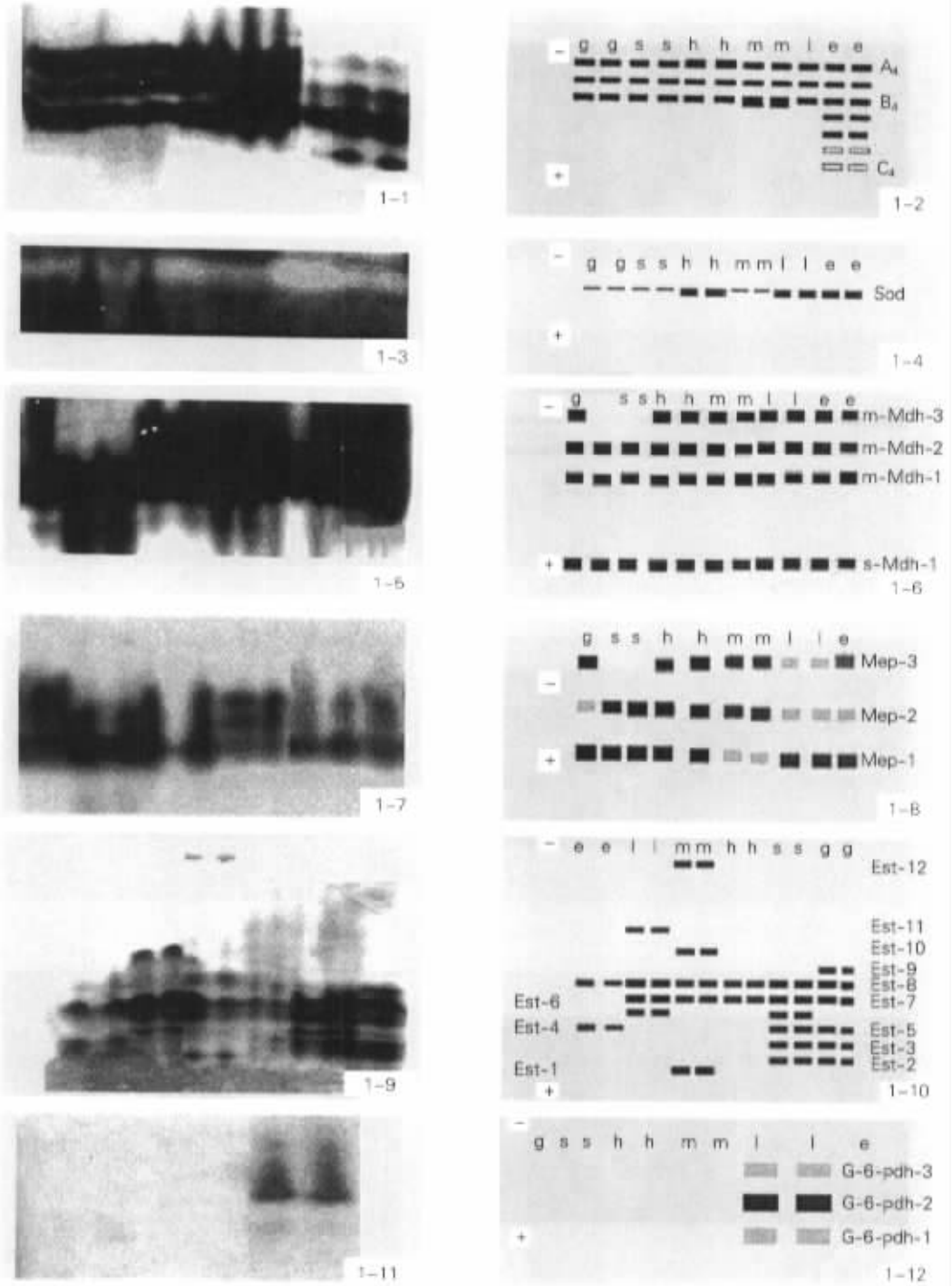


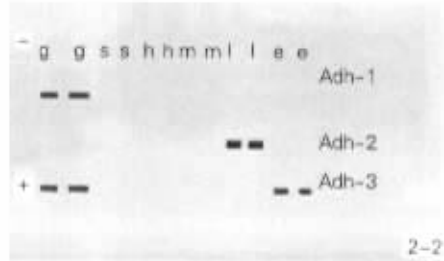
图1 大弹涂鱼不同组织中同工酶电泳图谱

Fig.1 Electrophoretic patterns of isozymes in various organs of *Boleophthalmus pectinirostris*

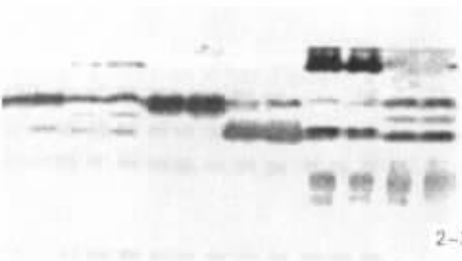
1-2. LDH(未标注的均为杂合带); 3-4. SOD; 5-6. MDH; 7-8. MEP; 9-10. EST; 11-12. G-6-PDH; g: 鳃耙; s: 脾脏; h: 心脏; m: 肌肉; l: 肝脏; e: 眼睛



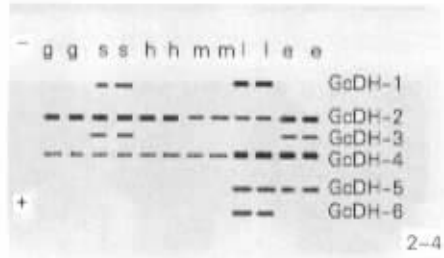
2-1



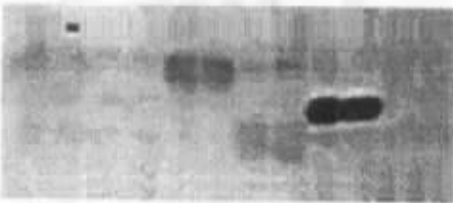
2-2



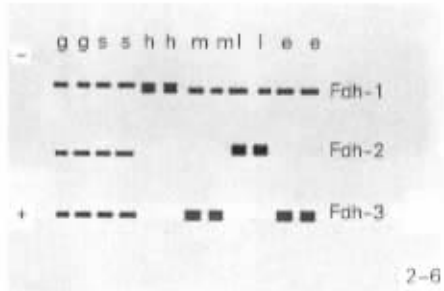
2-3



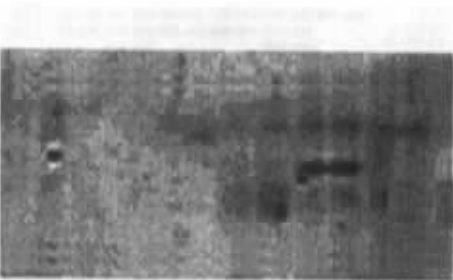
2-4



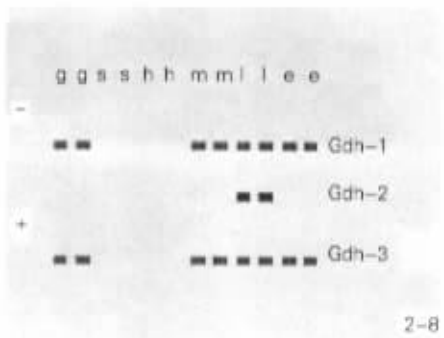
2-5



2-6



2-7



2-8

图 2 大弹涂鱼不同组织中同工酶电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretic patterns of isozymes in various organs of *B. pectinirostris*
1-2. ADH; 3-4. GcDH; 5-6. Fdh; 7-8. Gdh; g: 鳃耙 s: 脾脏; h: 心脏; m: 肌肉; e: 眼睛; l: 肝脏

研究表明大弹涂鱼的 6 种组织中, 存在丰富的酶系统, 它们不仅以同工酶的形式参与代谢和调节, 而且在表型、分布和活性上均表现出高度的组织特异性(图 1、图 2)。这些差异也是和所在组织和器官的功能密切相关的。

乳酸脱氢酶是参与糖酵解的酶, 可使细胞在氧气不足时仍能进行正常的生理活动。LDH - A₄ 在肌肉中超显形表达, LDH - B₄ 在心脏中超显形表达, 这与各自的生理功能相关, LDH - A₄ 主要催化乳酸氧化形成丙酮酸进入三羧酸循环, 与心脏中的有氧代谢活跃相一致, 而 LDH - B₄ 主要催化丙酮酸转化为乳酸, 与肌肉组织糖酵解反应活跃相一致。

酯酶是催化酯类化合物水解并进入中间代谢的重要水解酶系, 其遗传基础和亚基组成尚无定论, 一般为单链或二聚体^[5]。大弹涂鱼的 EST 酶谱中, EST - 8、EST - 7 具有广泛的组织分布(图 1: 9 - 10), 在细胞内执行最基本的生理功能。酯酶除了维持细胞正常的能量代谢外, 还能水解大量非生理存在的酯类化合物, 认为可能与机体的解毒作用密切相关, EST - 11 只在肝脏中出现且活性较强, 因而有可能参与解毒功能, 而肝脏是机体的重要解毒器官。

大弹涂鱼的 MEP、MDH 和 SOD 组织间存在差异; 如 SOD 在肝脏中的活性较高(图 1: 3 - 4); m - MDH 同工酶的作用主要是使苹果酸脱氢, 与糖原生产过程有联系, m - MDH 在肌肉、心脏、肝脏、鳃中染色较深(图 1: 5 - 6), 这与肌肉所需要的大量能量在柠檬酸循环过程中, 把苹果酸转为草酰乙酸有关, 而糖原能通过酵解和有氧分解迅速释放大量能量。

醇脱氢酶、甲酸脱氢酶、葡萄糖脱氢酶、山梨醇脱氢酶、葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶都在肝脏中表达, 且活性较高。同工酶的这种组织专一性表达与组织器官分化和酶带的特殊功能有关, 是一类较为特化的酶类; 肝脏作为主要的内脏器官之一, 具有消化、分泌以及解毒等多种功能, 因而与之相适应, 同工酶也较丰富、复杂。

3.3 酶蛋白的活性与样品的保存

酶的活性与样品的新鲜程度密切相关, 活鱼样

品在 - 71 °C 的超低温冰箱中保存, 许多酶的活性都很强, 而置于 - 30 ~ - 20 °C 的冰箱中时, 酶的活力明显降低, 而且不同组织中酶的活力也不同, 肝脏中酶活力降低较小, 其他组织中酶的活力降低较大, 甚至没有活力。易失活的酶有 MDH、ADH、MEP。随着保存时间的延长, 一些酶容易降解, 鲜活样品立即实验时, MDH 能观察到清晰的 s - MDH 谱带, 保存时间延长后 s - MDH 不容易检测。另外, 匀浆后的样品应立即实验。匀浆后立即点样电泳, MEP 在肌肉中表达的 3 条谱带很快就显色; 而置于 - 71 °C 的超低温冰箱中, 第二天融化后电泳, MEP 在肌肉中表达的谱带显色较慢, 有时要过夜才能观察到较弱的酶带, 并且能观察到降解的“帽状”酶带^[9]。因此, 在进行同工酶分析时, 应尽量选用鲜活样品, 并将其保存在低温环境中, 匀浆后的样品应尽快分析, 不能多次融化后使用。

参考文献:

- [1] 方家仲. 大弹涂鱼食性分析[J]. 海洋科学, 1996, 4: 26 - 28.
- [2] 谢湘筠, 张其永. 大弹涂鱼雌性性腺发育研究[J]. 台湾海峡, 1990, 9(3): 217 - 221.
- [3] 蔡泽平. 深圳湾大弹涂鱼种群结构与生殖特征[J]. 生态学报, 1996, 16(1): 77 - 82.
- [4] 周宗汉, 林金榜, 朱婉华. 介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法[J]. 淡水渔业, 1983, 2: 35 - 40.
- [5] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 湖南科技出版社, 1985: 86 - 126.
- [6] 李思发. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究[J]. 上海科技出版社, 1990: 83 - 101.
- [7] Shaklee J B. Genetic nomenclature for protein - coding in fish: proposed guidelines[J]. *Trans Amer Fish Soc*, 1989, 118: 218 - 227.
- [8] Kirpichnikov V.S. Genetic Bases of Fish Selection. Chapter 5: The biochemical genetics of fish[M]. Berlin: Soinger - Verlag, 1980: 143 - 200.
- [9] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 140 - 144.

Tissue – specificity of the isozymes in various parts of *Boleophthalmus pectinirostris*

JIN Chun – hua, ZHONG Ai – hua, ZHANG Hai – qi, HUANG Fu – yong LI Ming – yun
(Ocean and Fishery Department, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Mar., 14, 2003

Key words: *Boleophthalmus pectinirostris*; isozymes; electrophoresis; tissue – specificity

Abstract :Thirteen isozymes in six tissues or organs: eyes ,gill ,spleen ,liver ,muscle ,and heart of *Boleophthalmus pectinirostris* were studied by using the vertical polyacrylamide gel electrophoresis, the phenotypes and the expressions of the isozymes were analyzed. The results showed that ACP and TO were not detected in all organs, SDH and G – 6 – PDH isozymes expressed only in the liver. The SOD isozyme existed in all these tissues, the activity of the SOD in liver was higher than other tissues. The LDH 、MDH、MEP、EST ADH、GcDH、FDH and GDH isozymes were dearly tissue – specific. Namely, the LDH – A₄ isozyme was active in muscle, LDH – B₄ active in heart, but LDH – C₄ was observed only in eye, concerned with apparent tissues – specificity.

(本文编辑 张培新)