

# 两种海蜇毒素的分子标记研究\*

苏秀榕 杨 春 黄晓春 李太武

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

(宁波市效实中学 宁波 315200)

**提要** 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术研究了 8 种同工酶在海蜇的刺胞和中胶层的表达特异性,利用 RAPD 技术对海蜇刺胞组织的 DNA 标记进行研究。结果表明,作为生物体防御清除自由基的 SOD,在刺胞和中胶层均有表达。而与酯类化合物代谢相关的 EST、维持细胞正常的能量代谢的 ATPase,能在海蜇和口冠海蜇的刺胞中表达,而不能在中胶层中表达,所以,EST 和 ATPase 可作为刺胞毒素的分子标记。碳水化合物代谢中重要的酶类 MDH 和 ADH、清除细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 POD、催化磷酸单酯水解的重要酶类(与磷脂的转移、消化、吸收等活动密切相关的)ACP,在体外碱性环境下能水解有机磷脂键而产生一个有机基团和无机磷酸根的 ALP,这 5 种酶仅在毒性较强的口冠海蜇刺胞中表达,MDH 和 ACP 活性很高,在毒性相对较弱的海蜇刺胞中不表达。所以,这 5 种酶可作为海蜇毒性强弱的标记。以两种海蜇刺胞 DNA 为模板,S11、S32、S38、S95 等 4 个随机引物的 RAPD 谱图差异明显,亦可作为毒素强弱的间接分子标记。

**关键词** 海蜇刺胞毒素,同工酶,RAPD,刺胞

**中图分类号** Q346

海蜇是隶属于腔肠动物门(Coelentera)、钵水母纲(Scyphozoa)、根口水母目(Rhizostomaeae)的无缘膜动物(张芳等,2005)。海蜇在民间多称为水母,在中国沿海产有 4 种(郭文场等,2000):口冠水母科的口冠海蜇(*Stompholus meleagris* L. Agassiz)、根口水母科的海蜇(*Rhopilema esculentum* Kishinouye)、面蜇(*Rhopilema asamushi* Mesogloea)和黄斑海蜇(*Rhopilema hispidum* Vanhoefen),生活在沿海水深 20—40m 的浅海区,集中分布于 10—20m 的水域。海蜇俗称红海蜇或海蛇,毒性相对较弱;口冠海蜇又名沙海蜇或白蜇,属口冠水母科(Stomolophidae),毒性相对较强。由于二者触手或肩板上分布有大量的刺细胞(Cnidoblast),故而又称为刺胞动物(Cnidaria)。刺细胞中含有大量的刺胞毒液,成分复杂,主要为蛋白质、多肽(Anderson et al 2004);还有酶类(Radwan et al 2005; 于中华等,2005),如碱性磷

酸酶(Nevalainen et al 2004),分子量大小不等。刺胞毒素能引起过敏性皮炎、溶血和对心脏产生毒性(Mustafa et al 1995),因此人们从 20 世纪初期就开始研究这种动物毒素,近几年来主要集中在研究刺胞毒素的分离提取(Carrette et al 2004)、功能基因的克隆(Stienwald et al 2004)、毒素的单克隆抗体检测(Samoilovich et al 2004)等,而对于毒素标记的研究未见报道。目前仅见用碱性磷酸酶和酸性磷酸酶在蛇毒的毒性标记的报道,而未见在其他的毒素方面标记研究。作者选择了海蜇和口冠海蜇这两种毒性不同的水母,结合毒性的动物实验,利用同工酶和 RAPD 技术研究与毒性分泌相关组织的分子标记,为进一步研究毒素的生理生化特性提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

海蜇(*Rhopilema esculentum*)和口冠海蜇(*Sto-*

\* 浙江省自然科学基金资助项目, Y304358 号;宁波市科技局重点资助项目, 00120041 号。苏秀榕, 教授, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

*mopholus meleagris*)各 20个个体,采自渤海湾,取出刺胞和中胶层后迅速放入液氮中带回实验室,储于 -70℃ 冰箱保存备用。同工酶染色药品和随机引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司;PCR 反应试剂 (Taqase, dNTP, Buffer 和  $Mg^{2+}$ )、蛋白酶 K 购于大连 TAKARA 公司;其他药品均为分析纯,购于宁波市奥博公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 同工酶样品制备** 准确称量海蜇和口冠海蜇触手及中胶层,其中,用蒸馏水漂洗后,以 1:2 (W/W) 加入预冷的 PBS 缓冲液 (pH 7.2),冰浴条件下匀浆,12000 r/min, 4℃ 离心 30 min 取上清。同时分别取 0.1 ml 注射到健康的昆明系小

鼠体内,取 0.1 ml PBS 作为对照,并进行观察。另一部分加入适量溴酚兰后分装,样品放入 -70℃ 超低温冰箱中保存用作同工酶。同时,直接取海蜇和口冠海蜇触手提取 DNA 做 RAPD 分析。

**1.2.2 电泳** 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),电极缓冲液系统见表 1 的方法(胡能书等, 1985),略作改动。染色完毕后用 7.5% 冰醋酸溶液固定,复日生物电泳图像系统进行分析。

**1.2.3 同工酶的命名** 同工酶的命名以各酶带的相对迁移率从阴极向阳极运动的酶带开始依次命名为 a b.....。

表 1 8种同工酶及其缓冲系统

Tab 1 Eight types of isozyme and their buffer systems

同工酶	结构	缓冲系统
酯酶 (Esterase, EST)	单体	Tris-Gly
苹果酸脱氢酶 (Malate dehydrogenase MDH)	二聚体	Tris-Gly
醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase ADH)	二聚体	Tris-Gly
酸性磷酸酶 (Acid phosphatase ACP)	二聚体	Tris-Gly
超氧化物歧化酶 (Superoxide desmutase SOD)	二聚体	Tris-Gly
过氧化物酶 (Peroxidase POD)	单体或二聚体	Tris-Gly
碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase ALP)	单体	EBT
腺苷三磷酸酶 (Adenosine triphosphatase ATPase)	四聚体	EBT

**1.2.4 用海蜇和口冠海蜇的刺胞提取基因组 DNA** 其提取、检测及定量方法参照李太武等 (2003)。

**1.2.5 实验所用的随机引物**为上海生工生物工程技术服务有限公司合成,从 100 条中筛选出扩增结果稳定的 20 条进行实验。引物序列如下:

表 2 随机引物及其碱基序列

Tab 2 Sequences of random primers

引物	序列	引物	序列
S10	CTGCTGGGAC	S90	AGGGCCGTCT
S11	GTAGACCCGT	S95	ACTGGGACTC
S24	AATCGGGCTG	S96	AGCGTCTCC
S32	CAATCGCCGT	S144	GTGACATGCC
S35	TTCCGAA CCC	S148	TCACCA CGGT
S38	AGGTGACCGT	S152	TTATCGCCCC
S39	CAAA CGT CGG	S198	CTGG CGAACT
S47	TTGGCA CGGG	S199	GAGTCAGCAG
S65	GATGACCGCC	S212	ACGGATCCTG
S71	AAAGCTGCGG	S135	CCAGTACTCC

**1.2.6 RAPD 反应条件** 25 μl 反应体系中含有 2.5 μl 10 × buffer, 0.2 μmol/L dNTPs, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 25 ng DNA, 66 ng Primer 及 1U Taqase。阳性对照以等体积的 dH<sub>2</sub>O 替代基因组 DNA,其他组成与上述反应体系相同。经过 94℃ 变性 5 min 后,进行 40 个循环。每一个循环包括 94℃ 1 min, 37℃ 1 min, 72℃ 2 min 最后在 72℃ 延伸 10 min 扩增产物用 1.3% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,复日生物电泳图像系统进行分析,拍照。

## 2 结果

注射口冠海蜇刺胞的小鼠 10 min 后开始抖动、抽搐,最后死亡。注射海蜇刺胞、中胶层和口冠海蜇的中胶层的以及 PBS 缓冲液小鼠无异样。

### 2.1 超氧化物歧化酶 (SOD)

该酶在海蜇和口冠海蜇的刺胞和中胶层中均有表达,且活性较高。口冠海蜇中胶层只有 1 条 e 带,而海蜇的中胶层有 d e 两条带,d 带活性强,海蜇刺胞中只有 d e 两条谱带表达,其中 d

带表达最强。在口冠海蜇刺胞中表达了 4 条 (a, b, c, e) 谱带, 而且 4 条谱带表达均较强 (图 1)。

## 2.2 苹果酸脱氢酶 (MDH)

此酶在海蜇、口冠海蜇中胶层和海蜇刺胞都不表达, 而在口冠海蜇刺胞中表达为 a, b, c, d 四条酶带, 且活性很强 (图 1)。

## 2.3 酯酶 (EST)

EST 在海蜇和口冠海蜇的中胶层均不表达, 在海蜇的刺胞中有 2 条谱带 (a, c), 而口冠海蜇刺胞中 EST 谱带为 3 条: a, b, d 多于海蜇刺胞, 且 b, d 两条带分离得很清晰 (图 1)。

## 2.4 酸性磷酸酶 (ACP)

此酶仅在口冠海蜇刺胞中表达, 表达酶谱为 a, b 两条带, 其活性较高 (图 1)。

## 2.5 过氧化物酶 (POD)

如图 1 所示, 该酶表达极其简单, 仅在口冠海蜇刺胞中表达 1 条谱带, 而在其他样品中均不表达。

## 2.6 碱性磷酸酶 (ALP)

该酶仅在口冠海蜇刺胞中表达较弱的 1 条谱带, 但迁移率很低, 说明分子量较大 (图 1)。

## 2.7 醇脱氢酶 (ADH)

该酶与 POD、ALP 相似, 仅在口冠海蜇刺胞

中表达为 1 条谱带, 且活性较弱 (图 1)。

## 2.8 腺苷三磷酸酶 (ATPase)

如图 1 所示, ATP 酶仅在两种海蜇的刺胞中表达, 为 1 条谱带 a

## 2.9 海蜇和口冠海蜇刺胞组织的 RAPD 分析

从图 2 可见, 海蜇和口冠海蜇刺胞组织的 RAPD 扩增结果差异明显, 可以作为毒性强弱和种间分类的分子标记。

## 3 讨论

**3.1** 刺胞是刺胞动物特有的防御组织。刺丝囊位于刺细胞内, 内有盘曲的管状刺丝。当刺细胞受到物理、化学、生物等因素的刺激, 如环境中酸碱度、温度、湿度、渗透压改变等, 盘曲的刺丝可迅速弹射出来, 刺胞内的毒液经管状的刺丝释放出来。

**3.2** SOD 是生物体防御氧化损伤的重要酶类, 当生物体受到外界病原体侵染后, 体内自由基浓度将升高, 而 SOD 能清除体内过多的自由基 (Yu *et al.* 2005), 以免除其对自身细胞的毒害。在海蜇和口冠海蜇的刺胞和中胶层中 SOD 均有表达, 因此, 该酶不能作为毒性的标记。

**3.3** EST 是催化酯类化合物水解并进入中间代谢的重要酶类, 其作用除维持细胞正常的能量代谢外, 还能水解大量非生理正常存在的酯类化合

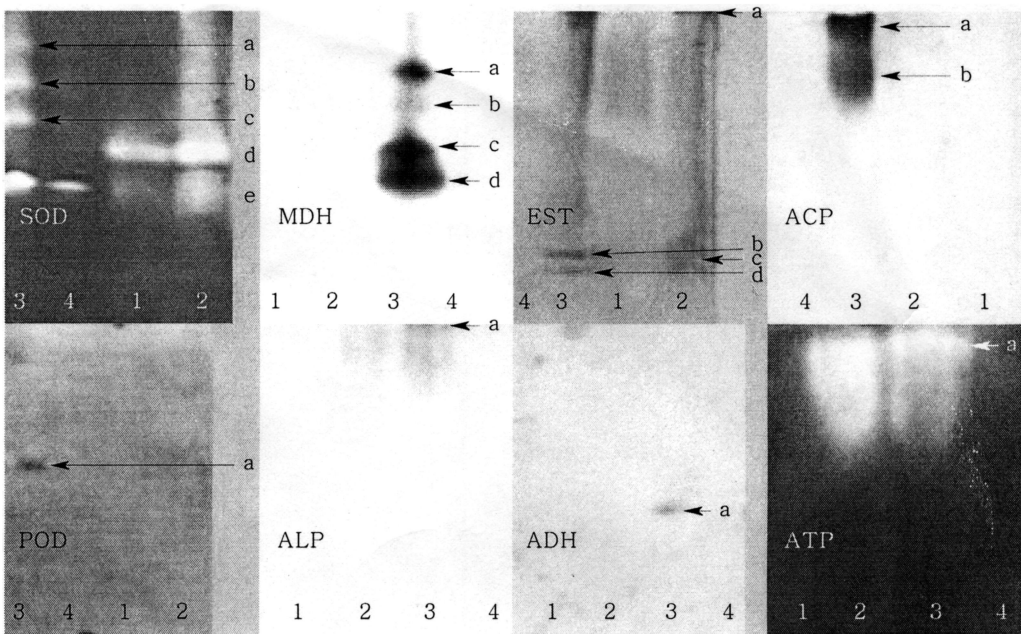


图 1 海蜇和口冠海蜇 8 种同工酶的谱图

Fig 1 The zymograms of eight types of isozyme of *R. esculentum* and *S. m. leagris*

1: 海蜇中胶层; 2: 海蜇刺胞, 3: 口冠海蜇刺胞, 4: 口冠海蜇中胶层

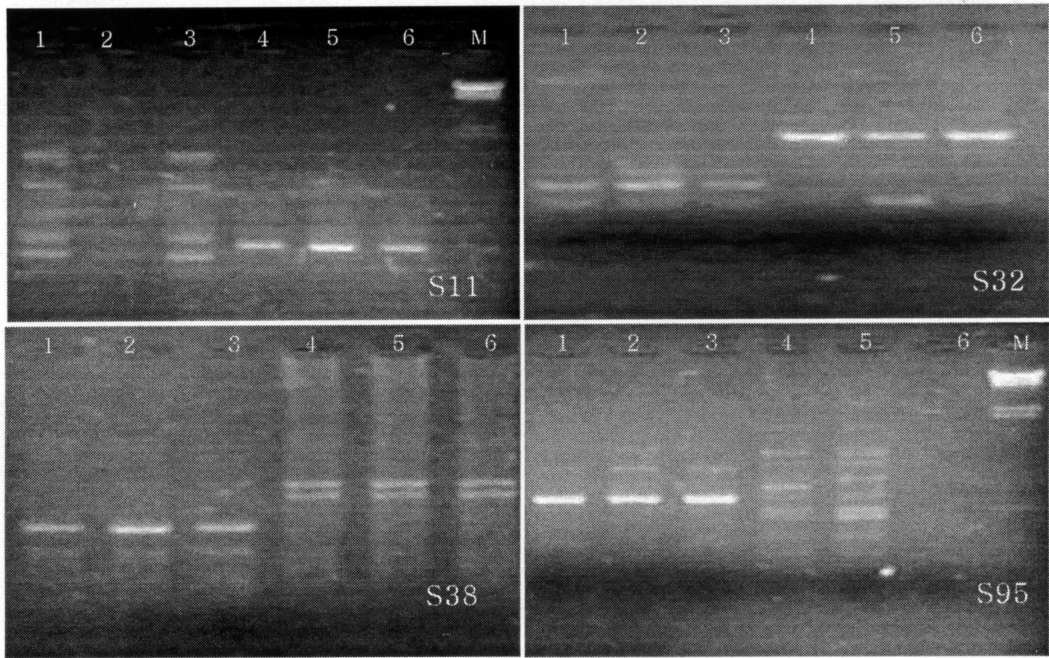


图 2 海蜇和口冠海蜇的 S11、S32、S38、S95 引物 RAPD 扩增图谱

Fig 2 The RAPD profiles of *R. esculentum* and *S. meleagris* with random primers S11, S32, S38 and S95

1—3 海蜇刺胞; 4—6 口冠海蜇刺胞

物,被认为可能与机体的解毒作用密切相关。ATPase的主要功能是水解 ATP 高能磷酸键,释放出大量能量供机体的需要,因此它是肌体能量代谢的实际参与者。EST 和 ATPase 均在海蜇和口冠海蜇的刺胞中表达,而不在中胶层中表达。因此,这两种酶与海蜇刺胞毒素存在有关,而不能标记毒性的强弱。

**3.4 MDH 是细胞中三羧酸循环 (TCA cycle) 中重要的脱氢酶之一,该酶的活性将影响糖有氧氧化的正常进行。POD 是一类清除细胞内  $H_2O_2$  的同工酶。ACP 是一种催化磷酸单酯水解的重要酶类,与磷酸物质的转移、消化、吸收等活动密切相关,同时该酶又是溶酶体的标志酶,因此在分解外源性有毒物质和损伤的细胞器及在细胞的防御机能中起着重要作用。ALP 是一组在体外碱性环境下能水解有机磷脂键而产生一个有机基团和无机磷酸根的同工酶。这 4 种酶仅在口冠海蜇刺胞中表达且 MDH 和 ACP 活性很高,可作为刺胞毒素毒性的标记。**

**3.5 从随机引物 S11、S32、S38、S95 的 RAPD 结果可以看出,两种样品均在 500—2000bp 处产生特异的扩增带,这些谱带扩增稳定可作为鉴定毒性强弱的分子标记。经过反复实验,作者未能从**

中胶层上皮组织中提取出 DNA,而在刺胞中提取 DNA 相对容易一些。作者正在继续进行研究,希望能找到刺胞组织中的特异性扩的 DNA 片段,该片段将与毒素密切相关,也可能就是毒素的基因。综上所述,同工酶和 RAPD 技术都可作为研究刺胞毒素的毒性标记方法。

## 参 考 文 献

- 于华华,刘希光,邢荣娥等,2005.水母毒素蛋白凝聚现象的初步研究.海洋与湖沼,36(5):413—417
- 李太武,李成华,宋林生等,2003.5个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析.生物多样性,1(2):118—124
- 胡能书,万贤国,1985.同工酶技术及其应用.长沙:湖南科学技术出版社,70—85
- 张芳,孙松,杨波等,2005.胶州湾水母类生态研究 I 种类组成与群落特征.海洋与湖沼,36(6):507—517
- 郭文场,张凯,2000.海蜇.水产养殖,2:13—16
- Anderson P A, Thompson L F, Money Penny C G, 2004. Evidence for a common pattern of peptideergic innervation of Cnidocytes Biol Bull 207: 141—146
- Carrette T, Seymour J 2004. A rapid and repeatable method for venom extraction from cubozoan nematocysts Toxicon 44(2): 135—139

- Mustafa M R, White E, Hongo K *et al*. 1995. The mechanism underlying the cardiotoxic effect of the toxin from the jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicol Appl Pharmacol* 133(2): 196—206
- Nevakainen T J, Peuruvaara H J, Quinn R J *et al*. 2004. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 139: 731—735
- Radwan F Y, Roman L G, Baksi K S *et al*. 2005. Toxicity and mAChRs binding activity of *Cassiopea xamachana venom* from Puerto Rican coasts. *Toxicon*, 45: 107—112
- Samoilovich M P, Begas O C, Kniazev N A. 2004. Molecular antibody detection of *Coelenterata* and *Echinodermata* antigens. *Zh Evol Biokhim Fiziol*, 40 (3): 284—286
- Stiewahl M N, Yanze R, Bamert P *et al*. 2004. The *Sine oculis/Six* class family of homeobox genes in jellyfish with and without eyes: development and eye regeneration. *Developmental Biology*, 274: 70—81
- Yu H H, Xuguang L R, Liu X S *et al*. 2005. Radical scavenging activity of protein from tentacles of jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15: 2659—2664

## THE MOLECULAR MARKERS OF THE TOXIN FROM TWO JELLYFISH SPECIES

SU Xi-Rong, YANG Chun, HUANG Xiao-Chun, LITa-Wu

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

(High School of Xiaoshi, Ningbo 315200)

**Abstract** This paper presents the molecular markers of toxin in cnidoblast of two jellyfish species *Stomopholus meleagris* and *Rhopilema esculentum*. To study physiological, biochemical and pharmacological characteristics of the cnidoblast animal, eight types of jellyfish isozyme were studied with vertical polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that superoxide desmutase (SOD), a defensive enzyme against superoxide anion radical, was expressed in both cnidoblast and mesoglea. Esterase (EST) that related to ester metabolism and adenosine triphosphatase (ATPase) that involved in energy cycle of normal cell can only be detected in cnidoblast and not in mesoglea, suggesting that both of the enzymes may be used as molecular marker for the existence of toxin. The other five types of enzymes, including malate dehydrogenase (MDH), alcohol dehydrogenase (ADH), peroxidase (POD), acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (ALP), were found only in cnidoblast of *Stomopholus meleagris*, but *Rhopilema esculentum*. Of them, MDH and ACP showed very high activity. MDH and ADH are two of important enzymes in the metabolism of carbohydrate; POD is an important enzyme to remove  $H_2O_2$  in cell; ACP catalyzes the hydrolysis of phosphomonoester and therefore is closely related to transfer, digestion and absorption of phospholipid. These results indicate that these five types of enzymes may be used to indicate the potency of toxin because the toxin in *S. meleagris* is more toxic than that in *R. esculentum*. RAPD was done using DNA from two types of jellyfish as a template, and a significant difference exists between the profiles of theirs.

**Key words** Jellyfish cnidoblast toxin, Isozyme, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Cnidoblast