

研究简报

中国大鲵不同组织同工酶的比较研究

彭亮跃 肖亚梅 骆剑 罗凯坤 黄小西 刘筠

(湖南师范大学生命科学学院,蛋白质化学与鱼类发育生物学教育部重点实验室,长沙 410081)

STUDIES ON THE ISOZYMES OF DIFFERENT TISSUES IN CHINESE GIANT SALAMANDER

PENG Liang Yue, XIAO Ya Mei, LUO Jian, LUO Kai Kun, HUANG Xiao Xi and LIU Yun

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Fish Developmental Biology of National Education Ministry, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081)

关键词:大鲵;同工酶;聚丙烯酰胺凝胶电泳;组织特异性

Key words: *Andrias davidianus*; Isozyme; PAGE; Tissue-specific

中图分类号:Q959 文献标识码:A 文章编号:1000-3207(2007)06-0915-05

中国大鲵 Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*) 是 1869 年被 David^[1] 在中国西部发现的,俗称娃娃鱼、狗鱼、蹄鱼,隶属两栖纲、有尾目、隐鳃鲵科、大鲵属,是世界上最大的珍稀有尾两栖类动物,被列为国家二级保护动物。曾广泛分布于我国中南部各省,是由水生脊椎动物向陆生脊椎动物过渡的类群,具有独特的科研和经济价值^[2,3],从 20 世纪 70 年代起,很多学者^[4-6]对大鲵的性腺发育、人工繁殖、胚胎发育及大鲵的资源状况和生态等方面做了一些研究,而有关中国大鲵同工酶方面的研究很少,同工酶的研究不仅有助于探讨个体发育过程中个体基因的表达与调控,同时还能揭示生物种群的进化和亲缘关系,是一种生化表现型的遗传标志。目前对鱼类和哺乳类动物的同工酶研究比较广泛,但两栖类是脊椎动物进化过程的一个重大转折点,因此其同工酶的研究是很有必要的。本文对中国大鲵 6 种组织 3 种同工酶进行了研究,旨在了解中国大鲵遗传物质的特征,为中国大鲵的种质标准和种质鉴定提供有价值的参数,并为其特殊的演化地位提供生化表型的遗传标志,同时也为合理开发利用中国大鲵资源,建立和保护人工种质资源及基因库提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用中国大鲵为 3 条雌性成体,个体重为

15—17 kg,于 2005 年 7 月取自本研究室养殖基地。

1.2 方法

样品制备 将中国大鲵处死后,迅速分别摘取背部肌肉(M)、心脏(H)、肝脏(L)、肾脏(K)、性腺(S)、胰脏(P),放入冰浴的培养皿中,用预冷的生理盐水(0.8% NaCl)洗净各组织上的血污、结缔组织及脂肪后,用小剪刀剪碎,取组织约 0.5 g,置冰浴玻璃匀浆器中按 1:4(质量:体积)加入 4% 磷酸缓冲液(pH 7.4, 0.1 mol/L)冰浴中匀浆,再放置冰浴中 2 h 后,高速冷冻离心机(4℃, 14000 r/min)离心 20 min,肝脏须再重复离心 1 次,取上清液分装,按 1:1 比例加入 40% 的蔗糖甘油,分装于 0.5 mL EP 管中,置于 -80℃ 冰箱中保存供同工酶电泳分析用。点样前 30 min,将样品从 -80℃ 冰箱中取出,放入 4℃ 冰箱中,点样时再取出。各组织的加样量如表 1。

垂直板聚丙烯酰胺电泳(PAGE) 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂配制及梯度胶的制备方法参考胡能书^[7]、朱蓝菲^[8]的方法。不同同工酶的凝胶浓度、凝胶缓冲液、电极缓冲液及电泳时间(表 2)。3 种同工酶显色方法参照朱蓝菲的方法进行^[8]。电泳结果通过 GDS8000PC 凝胶成像分析仪进行记录,并绘制模式图。

收稿日期:2006-03-01;修订日期:2007-01-27

基金项目:国家自然科学基金项目(30450006);湖南省教育厅资助项目(06B055)资助

作者简介:彭亮跃(1978—),男,湖南平江县人;在读硕士;研究方向为发育生物学。E-mail: pjlly@163.com

通讯作者:刘筠,教授,中国工程院院士;E-mail: liuyun@hunnu.edu.cn;肖亚梅,副教授,博士;E-mail: wanmath@163.com

表1 不同类型同工酶系统各组织的加样量

Tab. 1 Specimen Volume of different isozymes of different tissues (μL)

酶名称 Isozymes	肌肉 Muscle	心脏 Heart	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	性腺 Gonad	胰脏 Pancreas
LDH	30	30	30	30	30	30
EST	50	40	30	40	40	50
SOD	50	40	30	40	40	50

表2 不同类型同工酶凝胶浓度、缓冲液及电泳时间的选择

Tab. 2 Selection of gel concentration buffer solution and Electrophoretic time

Isozyme	Gel concentration	Gel buffer system	Electrode buffer system	Electrophoretic time
LDH	4 %—15 %	TC H ₂ O = 1:3	TC H ₂ O = 1:5	20h
EST	4 %—30 %	TVB	TVB H ₂ O = 1:1	20—24h
SOD	4 %—30 %	TVB	TVB H ₂ O = 1:1	18h

2 结果

同工酶的缩写、基因座位和等位基因的命名采用吴力钊等^[9]推荐的方法,以同工酶缩写名称的大写代表酶蛋白,小写代表编码的基因。当一种酶有多个基因座位时,按从阳极向阴极方向依次以1、2、3...等命名。但对遗传结构清楚的酶如LDH等则以A、B、C等命名。

2.1 乳酸脱氢酶(LDH)

中国大鲵6种组织中心脏(H)、卵巢(S)、肾脏(K)表达出LDH₁(B4)和LDH₅(A4)两条酶带,而肌肉(M)、肝脏(L)、胰脏(P)只表达出A4一条酶带。同一组织中A4的含量远高于B4。在不同组织的酶带中肌肉的A4酶带表达最强,肝脏次之,心脏中两条带都表达较强,表达最弱的是胰脏(图1)。

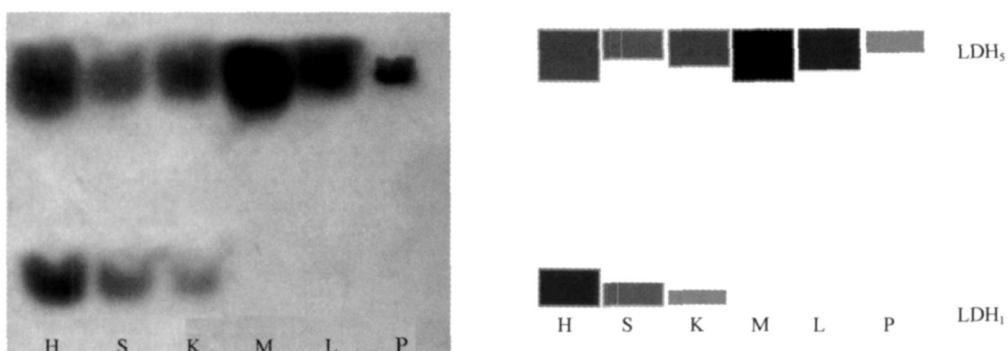


图1 中国大鲵不同组织器官中LDH同工酶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of LDH isozymes expressed in various tissues of *Andrias davidianus*

H—心脏(Heart) S—性腺(Gonad) K—肾脏(Kidney) M—肌肉(Muscle) L—肝脏(Liver) P—胰脏(Pancreas)(以下各图与此相同)

2.2 酯酶(EST)

中国大鲵各组织EST酶谱都由6条酶带组成(图2),明显分成2个区段,但这6条酶带在大鲵不同组织中表达强度有很大的不同,且以肝脏组织中表达最强,肾脏和性腺中次之,胰脏和心脏中较弱,肌肉中表达最弱。在同一组织中酯酶的表达强度也有很大的不同,肝脏中EST₂、EST₃和EST₅表达最强,EST₁和EST₄表达最弱;肾脏和性腺中EST₅表达最强,EST₁、EST₂和EST₃较强,EST₄最弱;心脏中各酶带表达基本相同,其中EST₆相对弱些;胰脏和肌肉各酶带表达也基本相同,但EST₅相对强些。EST₄在各组织中都为弱带,EST₅在各组织中活性相对都比较强。

2.3 超氧化物歧化酶(SOD)

中国大鲵SOD酶谱较复杂,可明显分为两个区段:区段1和

区段2。区段1由两条酶带SOD₇和SOD₈组成,在区段1中,不同组织酶带表达强度不同,肝脏的酶带表达最强,心脏和肾脏次之,肌肉的酶带表达最弱;同一组织各酶带表达也有差异,心脏和肌肉中SOD₇表达强于SOD₈,其他组织中两条酶带表达强度相同。区段2由1—5条酶带组成,在区段2中各酶带在数量和表达强度上都存在明显的组织特异性,6种组织中酶带的数目最多的是卵巢有5条带,SOD₁是卵巢中特有的带,但缺SOD₂酶带;最少的是心脏和肌肉都只有1条带,缺其他酶带;肾脏和胰脏有4条带,缺SOD₁和SOD₂酶带;肝脏有3条带,缺SOD₁、SOD₂和SOD₃酶带。在酶带表达的强度方面:肾脏、卵巢和肝脏中SOD₆表达最强;6种组织中SOD₅酶带除了肌肉中表达稍弱外,其他的表达都比较强;SOD₁、SOD₂、SOD₃和SOD₄在6种组织中除非没表达,表达的都比较弱(图3)。

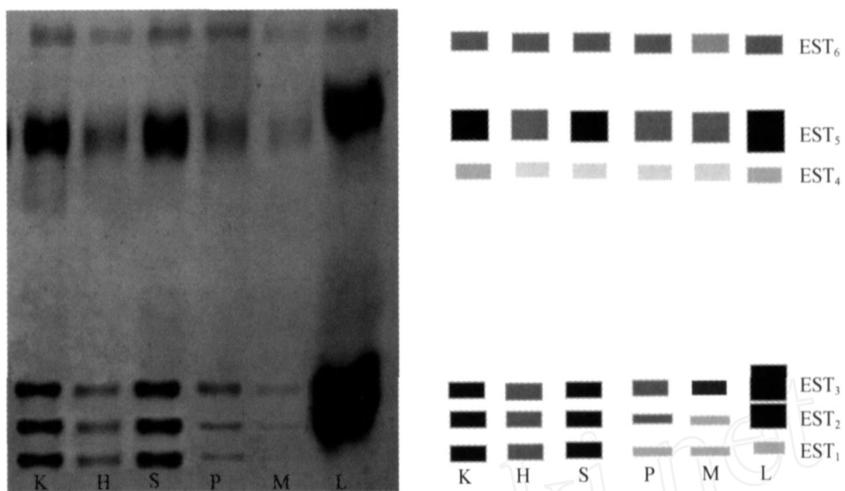


图2 中国大鲵不同组织器官中EST同工酶电泳图谱

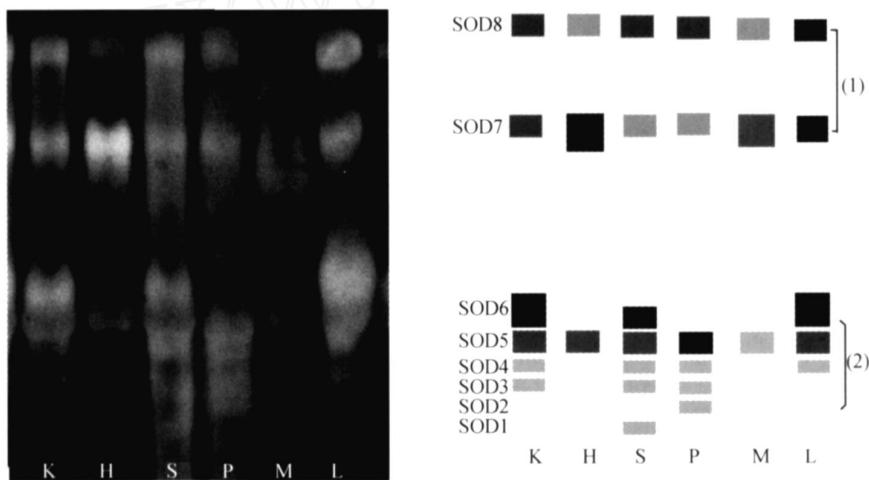
Fig. 2 Electrophoretogram of EST isozymes expressed in various tissues of *Andrias davidianus*

图3 中国大鲵不同组织器官中SOD同工酶电泳图谱

Fig. 3 Electrophoretogram of SOD isozymes expressed in various tissues of *Andrias davidianus*

2.4 三种同工酶的表达强度及其酶带数目的组织特异性

中国大鲵6种组织中的3种同工酶酶带数目和表达强

度都存在一定的组织特异性,3种同工酶在各组织中的酶带

数目和表达强度如表3。

表3 中国大鲵3种同工酶在6种组织中的表达和活性

Tab. 3 Expression and activity of 3 analyzed isozymes in 6 kinds of tissues of *Andrias davidianus*

酶名称 Isozymes	组织(Tissues)					
	肌肉 Muscle	心脏 Heart	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	性腺 Gnad	胰脏 Pancreas
LDH	LDH1(B4)	+++	+++	++	++	++
	LDH5(A4)	—	++	—	+—	—
EST	EST1	+—	+	+—	+	+—
	EST2	+—	+	+	+	+—
	EST3	+—	+	++	+	+—
	EST4	+—	+—	+—	+—	+—
	EST5	+	++	+++	+++	+
	EST6	+—	+—	+	+—	+—

续表

酶名称 Isozymes	组织(Tissues)					
	肌 肉 Muscle	心 脏 Heart	肝 脏 Liver	肾 脏 Kidney	性 腺 Gonad	胰 脏 Pancreas
SOD	SOD1	—	—	—	+ —	—
	SOD2	—	—	—	—	+ —
	SOD3	—	—	+ —	+ —	+ —
	SOD4	—	—	+	+	+
	SOD5	++	++	++	++	++
	SOD6	—	—	+++	+++	—
	SOD7	++	+++	+++	++	++
	SOD8	+	+	++	++	++

注 : + + + 表示染色较深的酶带 ; + + 表示染色深的酶带 ; + 表示染色浅的酶带 ; + — 表示染色很浅的酶带 ; — 表示无酶带

Note : The signs + + + stand for darker stained isozyme bands ; + + for dark-stained bands ; + for light-stained bands ; + — for light-stained bands ; — for absence of isozyme bands

3 讨 论

乳酸脱氢酶 LDH (E. C. 1. 1. 1. 27) 属于氧化还原酶类 , 为四聚体酶 , 在糖代谢过程中催化乳酸和丙酮酸的相互转化。鱼类、鸟类、和哺乳类动物等动物的乳酸脱氢酶多由 A 和 B 两种亚基构成 , 呈 5 种 (A4、A3B、A2B2、AB3、B4) 不同分子形式的四聚体 , 为 LDH-A、LDH-B 两个基因所编码。几乎在所有的脊椎动物中 , A4 在骨骼肌中占优势 , 其功能是在厌氧条件下将丙酮酸还原为乳酸。而 B4 在含氧组织 , 如心和脑中占优势 , 其功能是将乳酸脱氢形成丙酮酸 , 丙酮酸氧化放出能量供组织利用^[10]。可见 , A4 是与糖酵解有关的酶 , B4 是与糖有氧氧化有关的酶。因此 , A4 和 B4 含量的变化直接反映能量代谢的方式和水平的变化。从图 1 中可以看出 , 在中国大鲵的组织中 A4 的含量比 B4 明显高出很多 , 并且肌肉中 A4 的含量特别高 , 还有 3 种组织中没有 B4 , 这些结果表明 , 中国大鲵组织中糖酵解比较旺盛 ; 心脏中 A4 和 B4 的含量都比较高 , 与心脏活动消耗能量高有氧代谢旺盛有关 ; 性腺中 A4 和 B4 含量也相对较高 , 应与中国大鲵性腺合成代谢比较旺盛有关。6—7 月是中国大鲵的繁殖季节^[11] , 本实验所用材料取自 7 月底 , 正是中国大鲵的繁殖盛期 , 性腺的合成代谢应该比较旺盛 , 这与本实验结果也是相符的。糖酵解作用不仅是动物的某些组织在低温缺氧环境中的重要供能方式 , 也是动物整体在低温环境中的重要供能途径^[12]。中国大鲵长年生活在温度较低的水中并且不喜活动 , 而其糖酵解作用也比较旺盛 , 这是否与中国大鲵对环境的适应有关还须进一步实验来证明。

酯酶 EST (E. C. 3. 1. 1. 1) 同工酶是一个遗传基础和亚基组成较复杂的同工酶类。它属于复等位基因决定的同工酶 , 按照 Nei 的推论^[13,14] 可能含有 10 个以上的基因座。从功能上讲它是一种催化羧酸酯类的酯键水解或合成的酶类 , 多数同工酶对底物的特异性要求不太强 , 酶分子的多样性则较普遍 , 以醋酸- - 萘酯为底物的羧基酯酶类一般为单链或二聚多

肽链。实验结果显示 , 在中国大鲵各组织中 EST 在肝脏、肾脏和性腺中占优势 , 活性高。这说明在这些组织中 EST 是高表达的 , 由于酯酶是单链或异二聚体蛋白体 , 在代谢中可能有转酯作用 , 水解大量非生理存在的酯类化合物^[7] , 肝脏除了作为消化腺参与食物的消化外 , 是体内最大的毒物清除器官。肾脏在生物膜的结构和渗透功能方面 , 必须有大量酯酶参与 , 因此 , 活跃的脂类代谢使 EST 在这些组织中呈现高表达。同时 , 性腺中 EST 也呈现高表达 , 这也表明在性腺中脂类代谢也很旺盛 , 与本实验所取材的中国大鲵处在繁殖期 , 性腺脂类代谢旺盛是相符的 ; 也可能与实验所用到的中国大鲵在取材之前注射了类固醇类催产激素有关。具体原因还须进一步实验来证明。与之相比较心脏、肌肉、胰脏中 EST 的表达较弱 , 也恰与 EST 功能相适应。中国大鲵的各组织之中 EST 酶带在数量上没有存在组织特异性 , 只是酶带在各组织中表达强度不同 (图 2)。

超氧化物歧化酶 SOD (E. C. 1. 15. 1. 1) 是一种催化超氧化物阴离子自由基发生歧化反应 , 生成氧和过氧化氢的酶 , 广泛存在于动植物细胞中。SOD 在维持生物体内超氧阴离子自由基产生与消除的动态平衡中起着重要的作用 , 可以防御氧毒性 , 它是研究生物抗逆境与清除自由基有关反应机理的特殊工具酶。实验结果表明 , 在中国大鲵各组织中 SOD 存在明显组织差异 (图 3)。肝脏和肾脏中 SOD 酶活性明显高于其他组织 , 肝脏和肾脏是机体非常重要的免疫器官 , 应该在大鲵的防御系统中发挥着很重要的作用 , 而 SOD 在这两种器官中的高表达也是与其生理机能相对应的。心脏中 SOD 酶活性也比较高 , 表明心肌抗逆境能力比较强。潘伟槐等的研究结果表明 , 日本沼虾繁殖期生殖腺中 SOD 酶活性明显增强 , 其中雌性生殖腺更加明显^[15]。本文的研究结果也显示 , SOD 在中国大鲵卵巢中的活性很强 , 这是和卵巢的重要生理功能相适应的 , 预示着卵巢中有着旺盛的代谢活动。

参 考 文 献 :

- Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinesis*, 1986, 22(6): 69—80 [邱幼祥, 扬安峰. 中国大鲵的骨学研究. 北京大学学报(自然科学版), 1986, 22(6): 69—80]
- [2] Zhang KJ, Wang XM, et al. Advances in conservation biology of Chinese giant salamander [J]. *Biodiversity Science*, 2002, 10(3): 291—297 [章克家, 王小明, 等. 大鲵保护生物学及其研究进展. 生物多样性, 2002, 10(3): 291—297]
- [3] Li F. The survey of studies on the reproductive biology of *Andrias davidianus* [J]. *Journal of Aquaculture*, 1998, 4: 21—26 [李峰. 大鲵的繁殖生物学研究概况. 水产养殖, 1998, 4: 21—26]
- [4] Zhang YH, Liu QH, et al. Microstructure and ultrastructure of developing oocytes of Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, 45(1): 15—22 [张育辉, 刘全宏, 等. 中国大鲵卵母细胞发育的显微和超微结构. 动物学报, 1999, 45(1): 15—22]
- [5] Liu JY, Tan YA, Lu XS, Fan QJ. Research on technology of Chinese giant salamander F2 artificial incubation [J]. *Journal of Economic Animal*, 2005, 9(3): 152—155, 159 [刘鉴毅, 谭永安, 卢兴孙, 范其杰. 中国大鲵子二代规模化人工孵化技术的研究. 经济动物学报, 2005, 9(3): 152—155, 159]
- [6] Feng XR, Liu SN, Wen ZZ. Microscopical on the early embryonic development of *Andrias davidianus* [J]. *Journal of Xinyang Teachers College (Natural Science Edition)*, 1997, 10(1): 60—63 [冯小荣, 刘树楠, 文祯中. 大鲵胚胎发育的显微观察. 信阳师范学院学报(自然科学版), 1997, 10(1): 60—63]
- [7] Hu NS, Wan XG. Technology and application of isozymes [M]. Changsha: Hunan Techlogy Press, 1985 [胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用. 长沙:湖南科学出版社, 1985]
- [8] Zhu LF. Gradient gel electrophoresis on polyacrylamide of isozymes and proteins of fishes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(2): 183—185 [朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法. 水生生物学报, 1992, 16(2): 183—185]
- [9] Wu LZ, Wang ZX. Studies on the genetic polymorphism of isozymes in Grass carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1988, 12(2): 116—124 [吴力钊, 王祖熊. 草鱼同工酶基因座位多态性的初步研究. 水生生物学报, 1988, 12(2): 116—124]
- [10] Whitt GS, Shaklee JB, Markert CL. Isozymes [A]. In: Markert CL (Eds.), *Genetics and evolution* () [M]. New York: Academic Press, 1975, 381—400
- [11] Li JM. A probe into the spawning season of *Andrias davidianus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(2): 211—213 [李骏珉. 大鲵繁殖盛期的初步探索. 水生生物学报, 2003, 27(2): 211—213]
- [12] Li DY. Seasonal changes of lactate dehydrogenase isozymes and blood glucose concentration in *Nyctalus noctula* and *Rana nigromaculata* [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 1994, 46(3): 267—272 [李大筠. 山蝠和黑斑蛙乳酸脱氢酶同工酶及血糖浓度的季节变化. 生理学报, 1994, 46(3): 267—272]
- [13] José A, Alarcón M, Alvarez C. Genetic identification of sparid species by isozyme markers: application to interspecific hybrids [J]. *Aquaculture*, 1999, 173(124): 95—103
- [14] Allibone RM, Crowl TA, Holmes JM, et al. Isozyme analysis of *Galaxias* species (Teleostei: Galaxiidae) from the Taieri River, south island, New Zealand: a species complex revealed [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1996, 57: 107—127
- [15] Pan WH, Zhu RR, Huang WG, et al. Study of three isozymes in the adults of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Shaoxing College of Arts and Sciences*, 2001, 21(4): 43—46 [潘伟槐, 祝尧荣, 黄文光, 等. 日本沼虾成体组织三种同工酶的研究. 绍兴文理学院学报, 2001, 21(4): 43—46]