

螳状独缩虫自然种群同工酶的研究

王爱芹^{1,2} 余育和¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对采自武汉沙湖螳状独缩虫自然种群的酯酶 (EST)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和酸性磷酸酶 (ACP) 四种同工酶系进行了研究。实验表明: EST 同工酶系由六个基因座位 (Est-1—Est-6) 控制, 其中 Est-1、Est-2、Est-3 和 Est-5 为杂合基因座位, 而 Est-4 和 Est-6 为纯合基因座位。螳状独缩虫物种中 EST 同工酶四级结构既有单体也有二聚体; MDH 同工酶系由五个基因座位 (Mdh-1—Mdh-5) 控制, 其中 Mdh-2 和 Mdh-3 为杂合基因座位, 而 Mdh-1、Mdh-4 和 Mdh-5 为纯合基因座位。螳状独缩虫苹果酸脱氢酶存在明显的上清液型 (s-MDH) 和线粒体型 (m-MDH) 酶带; LDH 同工酶系较其他原生动物发达, 由 5 条明显酶带组成。与高等动物研究结果比较分析认为, 螳状独缩虫乳酸脱氢酶同工酶系可能为一个杂合基因座位 AB 控制; ACP 同工酶系简单, 为一个纯合基因座位编码。取得的结果为揭示螳状独缩虫酶学特征及其自然种群的遗传特征等问题提供了基础资料。

关键词: 螳状独缩虫; 同工酶; 武汉沙湖; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: Q959.117 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)02-0120-05

螳状独缩虫 (*Carchesium polypinum* Linne, 1785) 隶属于纤毛门 (Ciliophora Doffein)、寡膜纲 (Oligohymenophorea de Puytorac et al.)、缘毛目 (Peritrichida Stein)、独缩虫属 (*Carchesium* Ehrenberg), 是一种世界性分布的原生动物^[1]。20 世纪 40 年代以来, 众多学者相继运用各种技术方法对螳状独缩虫形态结构, 包括整体、亚细胞及分子水平, 进行了广泛而深入的研究。Karl^[2] 率先对螳状独缩虫进行了详尽的整体描述。嗣后的形态学研究由细胞整体形态向亚细胞与分子水平深入。1964 年, Lom^[3] 利用蛋白银染色技术揭示出该物种的表膜下纤维结构, 不少学者继 Lom 后对这种在纤毛虫物种鉴定及种间关系分析中极为重要的指征——表膜下纤维结构, 进行了深入的研究^[4-7]。近几年来, 由于分子生物学技术的飞速发展, 对螳状独缩虫的结构蛋白^[8] 与 DNA 的一级结构也有研究报道^[9, 10]。

本文在实验室前期工作基础上^[11], 对采自武汉沙湖的螳状独缩虫种群的酯酶 (EST)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、乳酸脱氢酶 (LDH) 及酸性磷酸酶 (ACP) 等四种同工酶进行分析研究, 以期获得至今仍缺乏

的螳状独缩虫同工酶特征的资料, 为进一步探讨野生螳状独缩虫遗传多样性、物种鉴定和环境监测等问题提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 物种采集与保存 螳状独缩虫是一种群体性原生动物, 在高富营养化水体中可形成很纯的群体集合。2004 年 2—3 月, 作者自湖北省武汉沙湖采集了 3 个样点的螳状独缩虫自然种群, 即 P_A、P_B 及 P_C。样本经清水冲洗后于解剖镜下收集, 加适量 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液和 1% Triton X-100 后, 置于 -20℃ 冰箱储存备用。

1.2 粗酶制备 样本经 3 次冷冻、融解及匀浆顺序操作后, 离心 (20,000r/min × 60min, 4℃) 收集上清液作为粗酶提取物。利用 eppendorf biophotometer 测量粗酶制备蛋白含量, 并利用 Tris-HCl 缓冲液调整以方便后续点样操作。

1.3 电泳 上样量为 25μL, 每个样品设两个平行样; 电泳于 4℃ 条件下进行, 电泳时间依酶而异; 染色方法参照胡能书^[12] 和王中仁^[13], 稍微改良; 采用

收稿日期: 2004-11-01; 修订日期: 2004-11-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (302701408); 中国科学院创新基金资助项目 (220207); 中国科学院分类特别支持费 (201408) 资助

作者简介: 王爱芹 (1979—), 女, 山东省文登市人; 硕士; 研究方向: 螳状独缩虫比较生物学

通讯作者: 余育和, E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

UVP 凝胶成像系统拍照记录, Lab Work 软件进行光密度扫描分析。实验所分析酶类及相关系统见表 1。

1. 4 同工酶及其基因位点命名 采用所研究酶的英文通用缩写代表该酶系统, 自负极至正极顺序编号表示基因座位。

表 1 四种同工酶缩写名和采用的电泳系统
Tab. 1 Four kinds of isozymes and the electrophoresis systems used in the analysis

同工酶名称 The name of isozymes	电泳缓冲系统 Buffer system	分离胶(%) Separation gel	浓缩胶(%) Concentration gel	电压(V) Voltage
酯酶 EST(E. C. 3. 1. 1. -)	pH 8. 6EBT	7	4	200
苹果酸脱氢酶 MDH(E. C. 1. 1. 1. 37)	pH 8. 0TC	6	4	150
乳酸脱氢酶 LDH(E. C. 1. 1. 1. 27)	pH 8. 3TC	6	3	150
酸性磷酸酶 ACP(E. C. 3. 1. 3. 2)	pH 8. 0TC	5	3	200

注: 缓冲系统中 T 为三羟甲基氨基甲烷(Tris); C 为柠檬酸盐(Citrate); E 为乙二胺四乙酸(EDTA); B 为硼酸盐(Borate)。

2 结果与讨论

2. 1 酯酶同工酶

蝗状独缩虫酯酶同工酶(EST) 酶谱由 13 条(图 2) 褐、紫色酶带构成(图 1)。褐色酶带 7 条分深浅两种,

前者数目为 5, 后者为 2, 5 条深褐色酶带中, 除 1 条紧邻阳极外, 其他则都分布在阴极端区域。2 条浅褐色酶带分布于紧靠上述 4 条深褐色酶带的阴极侧; 6 条紫色酶带分布于阳极侧区域, 分浅淡两种, 各为 3 条酶带。所有酶带中, 大多数酶带均很稳定, 仅淡紫色酶带除外。

酯酶为催化酯类化合物水解的复杂酶系, 分布于细胞质内, 四级结构为单体或二聚体。据此初步从酶谱分析, 蝗状独缩虫酯酶同工酶共由 Est 1—Est 6 六个基因座位控制, 均为单态座位。Est 1、Est 2、Est 3 和 Est 5 为杂合基因座位, 其中 Est 1 和 Est 3 编码的 3 种同工酶条带浓度比为 1: 2: 1, 表明这 3 条带为二聚体酶同工酶, 第 4、5 和 6 条带的浓度比为 2: 1: 1, 它们之间的距离也比较近, 由此判断这 3 种同工酶为基因座位 Est 2 的 3 种等位基因编码的单体酶; 第 11 和 12 条带浓度比为 1: 1, 暗示 Est 5 基因座位具有两种等位基因, 也编码单体酶; Est 4 和 Est 6 为纯合基因座位, 所编码的同工酶四级结构尚难判定。

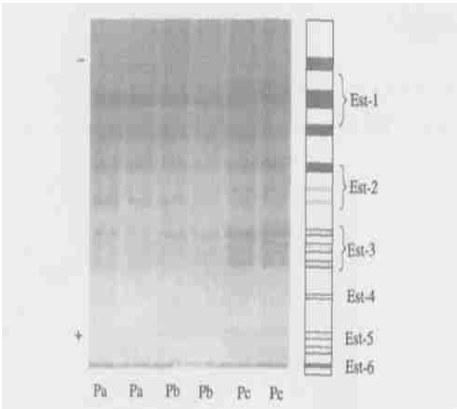


图 1 3 个蝗状独缩虫种群酯酶同工酶带型和基因型

Fig 1 Electrophoretic banding patterns and genotypes of EST of three *C. polypinum* populations

深褐色带 浅褐色带 浅紫色带 淡紫色带

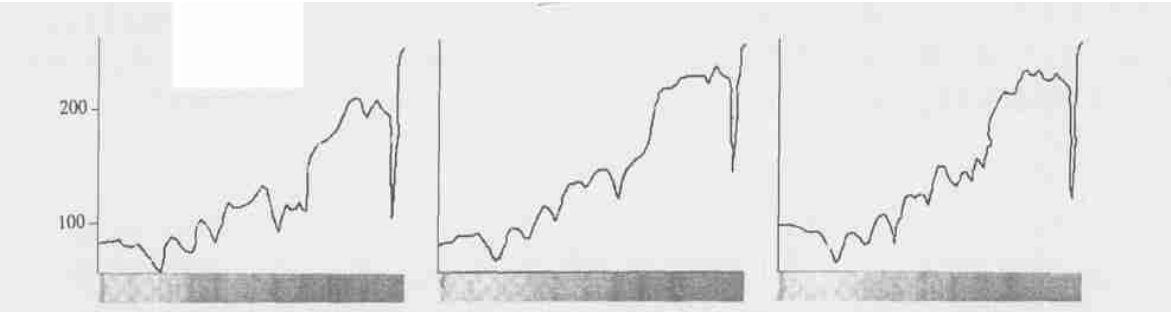


图 2 3 个蝗状独缩虫种群酯酶同工酶扫描曲线(上) 和电泳图谱(下)

Fig 2 The Scanning curve (above) and the electropherogram (below) of EST isozyme of three *C. polypinum* populations

2.2 苹果酸脱氢酶同工酶

苹果酸脱氢酶同工酶(MDH) 酶谱由 9 条酶带构成(图 3, 图 4)。根据苹果酸脱氢酶为二聚体酶及相关知识分析: 螭状独缩虫 9 条酶带由五个单态座位控制。靠近阴极的 4 条酶带为线粒体型(*mt*-MDH) 同工酶, 为纯合基因座位 *Mdh-1* 和杂合基因座位 *Mdh-2* 编码。近阳极侧区域的 5 条酶带为上清液型(*s*-MDH) 同工酶, 且自阴极起条带 5、6 及 7 由一个杂合基因座位 (*Mdh-3*) 控制, 而另外两条距离较远、浓度差异较大的酶带, 应为两个纯合基因座位 (*Mdh-4* 和 *Mdh-5*) 控制。螭状独缩虫苹果酸脱氢酶存在明显的上清液型和线粒体型酶带, 这与同属于纤毛虫属的上海四膜虫^[14] 相同而与草履虫相异^[15]。

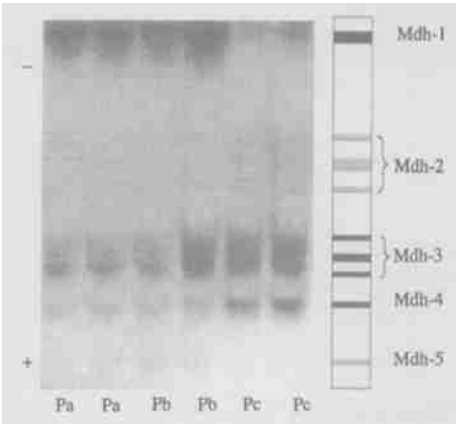


图 3 3 个螭状独缩虫种群苹果酸脱氢酶同工酶带型和基因型
Fig. 3 Electrophoretic banding patterns and genotypes of MDH of three *C. polyinum* populations



图 4 3 个螭状独缩虫种群苹果酸脱氢酶同工酶扫描曲线(上)和电泳图谱(下)
Fig. 4 The Scanning map (above) and the electropherogram (below) of MDH isozyme of three *C. polyinum* populations

2.3 乳酸脱氢酶同工酶

在高等生物中关于乳酸脱氢酶(LDH) 研究比较多, 而在原生动动物中却很少有图文兼供的研究报道: 草履虫 (*Panamicium*) 中没有检测到乳酸脱氢酶活性^[15], 梨形四膜虫 (*Tetrahymena pyriformis*) 中也仅发现一条酶带^[16]。本文发现, 螭状独缩虫乳酸脱氢酶同工酶酶谱由 5 条酶带组成(图 5, 图 6)。鱼类、鸟类和哺乳动物等动物的乳酸脱氢酶多由 A 和 B 两个基因控制, 具有 LDH₁、LDH₂、LDH₃、LDH₄ 和 LDH₅ 五种基因型^[12], 嗣后研究又发现了乳酸脱氢酶具有另外两种亚基, 它们的控制基因分别是 C、D 基因。分析比较认为, 螭状独缩虫乳酸脱氢酶同工酶似为一个杂合单态基因座位 AB 控制。

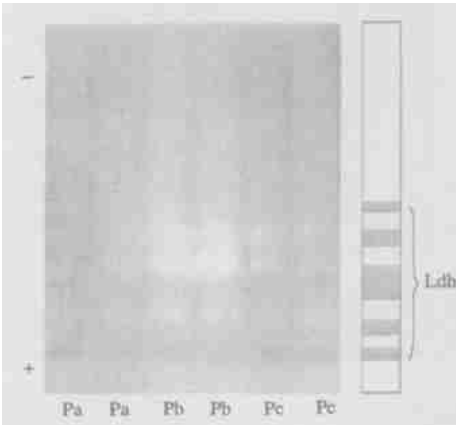


图 5 3 个螭状独缩虫种群乳酸脱氢酶同工酶带型和基因型
Fig. 5 Electrophoretic banding patterns and genotypes of LDH of three *C. polyinum* populations



图 6 3 个螭状独缩虫种群乳酸脱氢酶同工酶扫描曲线(上)和电泳图谱(下)
Fig. 6 The Scanning curve (above) and the electropherogram (below) of LDH isozyme of three *C. polyinum* populations

2.4 酸性磷酸酶同工酶

酸性磷酸酶同工酶(ACP) 为水解酶, 主要分布在溶酶体内, 在体内起消化食物、代谢废物和异物的作用, 一般认为它们是二聚体酶。从电泳图谱

(图 7) 和扫描图(图 8) 都可以看出, 螳状独缩虫中酸性磷酸酶同工酶酶带较少, 仅有一条酶带, 为一个纯合基因座位编码控制。

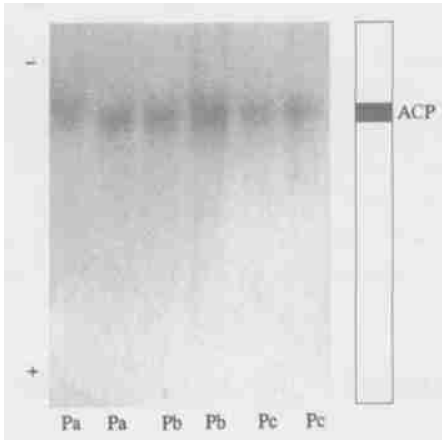


图 7 3 个螳状独缩虫种群酸性磷酸酶同工酶带型和基因型
Fig. 7 Electrophoretic banding patterns and genotypes of ACP of three *C. polypinum* populations

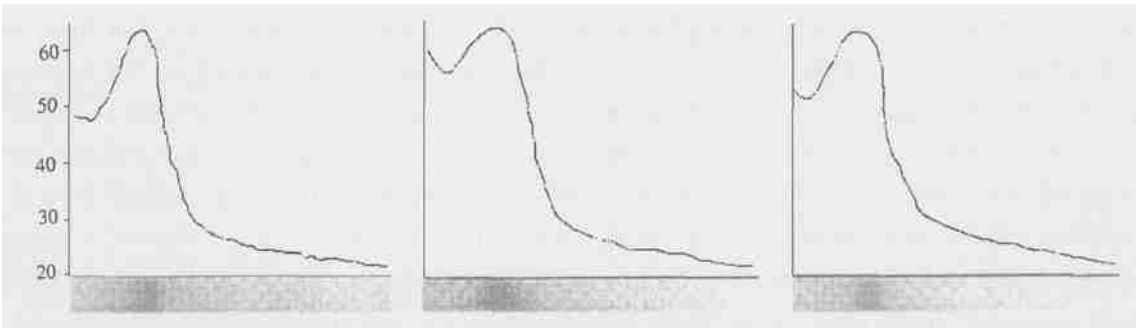


图 8 3 个螳状独缩虫种群酸性磷酸酶同工酶扫描曲线(上)和电泳图谱(下)

Fig. 8 The Scanning map (above) and the electropherogram (below) of ACP isozyme of three *C. polypinum* populations

参考文献:

[1] Shen Y F, Protozoology[M] Beijing: Science Press. 1999, 471—472
[沈韞芬. 原生动物学. 北京: 科学出版社, 1999, 471—472]

[2] Karl A. Die Tierwelt Deutschlands Untiere Oder Protozoa (Friedrich Dahl)[J]. Verlag von Gustav Fisher, Jena, 1932, 738

[3] Lom J. The morphology and morphogenesis of the buccal ciliary organelles in some peritrichous ciliates [J]. Arch. Protistenk. Bd, 1964, 107: 131—162

[4] Zagon I S, Small E B. *Carchesium polypinum*: somatic and buccal structure analysis after protargol staining[J]. Trans. Amer. Microsc. Soc., 1970, 89(3): 443—449

[5] Esteban G, Fernandez-Galiano D. Morphology and morphogenesis in *Carchesium polypinum* (Ciliophora: Peritrichida) [J]. Trans. Amer. Microsc. Soc., 1989, 108(4): 345—353

[6] Shi X L, Yu Y H, Shen Y F. Infraciliature and morphogenesis of *Carchesium polypinum* (Ciliophora: Peritrichida) [J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(1): 13—18 [施心路, 余育和, 沈韞芬. 螳状独缩虫表膜下纤毛系及形态发生. 动物学报, 2001, 47(1): 13—18]

[7] Hu G Q, Gao C M. The buccal filamentous reticulums in *Carchesium polypinum* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(4): 362—365 [胡国群, 高崇明. 螳状独缩虫口区微纤维结构的研究. 水生生物学报, 2003, 27(4): 362—365]

[8] Hu G Q, Gao C M. The evidence for the existence of intermediate-like filaments in *Carchesium polypinum* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 2003, 39(2): 178—181 [胡国群, 高崇明. 螳状独缩虫类中间纤维的初步研究. 北京大学学报(自然科学版), 2003, 39(2): 178—181]

[9] Miao W, Yu Y H, Shen Y F, et al. Intraspecific phypogeography of *Carchesium polypinum* (Peritrichia, Ciliophora) from China, inferred from 18S ITS+5. 8S ribosomal DNA [J]. Science in China Series G-Life Science, 2003, 47(1): 11—17 [缪炜, 余育和, 沈韞芬, 等. 螳状独缩虫种内分子系统地理学的研究. 中国科学(C 辑), 2003, 47(1): 11—17]

[10] Zhang X Y, Sun C, Yan T T., et al. RAPD analysis of genetic diversity of *Carchesium polypinum* [J]. Chinese Biodiversity, 2000, 8(3): 257—261 [张锡元, 孙 , 晏婷婷, 等. 螳状独缩虫遗传多

- 样性的 RAPD 分析. 生物多样性, 2000, 8(3): 257—261]
- [11] Yu Y H, Shen Y F, Liu J K. Study of Esterase isozymes in wild *Carchesium polypinum* by micro-isoelectric focusing[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, 17(3): 267—271[余育和, 沈钰芬, 刘建康. 野生纤毛虫同工酶微量等电聚焦分析探索. 水生生物学报, 1993, 17(3): 267—271]
- [12] Hu N S, Wan X G. Technology and application of isozyme[M]. Changsha: Science Press of Hunan Province. 1985[胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985]
- [13] Wang Z R. Plant allozyme analysis[M]. Beijing: Science Press. 1996 [王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996]
- [14] Hou L S, Xu X, Peng S G., et al. Comparative investigation on isoenzymes in different growth of *Tetrahymena shanghaiensis* S1[J]. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*, 1994, 4: 85—89[侯连生, 许新, 彭水根, 等. 不同生长期上海四膜虫 (*Tetrahymena shanghaiensis* S1) 的同工酶的比较研究. 华东师范大学学报(自然科学版), 1994, 4: 85—89]
- [15] Zhang X M, Tian Q, Gu F K. A study on the isoenzymes of *Paramecium bursaria* cultured in light and dark[J]. *Journal of East Normal University (Natural Science)*, 2001, 2: 78—83[张许枚, 田沁, 顾福康. 光培养和暗培养绿草履虫中同工酶的比较研究. 华东师范大学学报(自然科学版), 2001, 2: 78—83]
- [16] Simon E M, Meyer E B, Preparata R M. New wild *Tetrahymena* from Southeast Asia, China, and North America, including *T. asiatica*, *T. nanneyi*, and *T. sibana* n. spp. [J]. *Protozoa*, 1985, 32(1): 183—189

STUDIES ON ISOZYMES OF WILD *CARCHESIUM POLYPINUM*

WANG Ai-Qin^{1,2} and YU Yue-He¹

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: *Carchesium polypinum*, a cosmopolitan protozoa, belongs to *Carchesium* Ehrenberg, Peritrichida Stein, Oligohymenophorea de Puytorac *et al.*, Ciliophora Doflein. From the 1940s, many wide and deep reserches of its morphology and structure have been done at organism, subcellular and molecular levels. Karl described detailed characteristics of the whole organism first in 1932. After that, Lom studied the accurate fiber structure under pellicle, which is the most important criterion of speices identification and analysis of relationship between populations of ciliate. Along with the development of the molecular techniques, there are some reports about the protein and DNA structure of it, but the knowledge of isozyme—the important technique studies about species identification, relationship of intraspecific and interspecific and population genetic structure of this protozoa is very poor. In this paper, polyacrylamide gel electrophoresis was used to study four isozymes—Esterase (EST), Malate dehydrogenase (MDH), Lactate dehydrogenase (LDH) and Acid phosphatase (ACP), of three *Carchesium polypinum* populations from the Sand Lake of Wuhan, Hubei province. The results show that EST can be divided into 7 brown bands and 6 purple bands and are controlled by six loci (Est-1—Est-6), out of which Est-1, Est-2, Est-3 and Est-5 are heterozygotes and Est-4 and Est-6 are homozygotes. The analysis of its electrophoretic banding patterns indicates that its quaternary structure involves 2 patterns: monomer and dimer. The bands of MDH are coded by five loci (Mdh-1—Mdh-5), in which Mdh-1, Mdh-4 and Mdh-5 are heterozygotes and Mdh-2 and Mdh-3 are homozygotes. These bands can be distinctly divided into two typical kinds—s-MDH bands and n-MDH bands. The LDH expressed in *Carchesium polypinum* is more than it dose in other protozoans. Five bands are coded by one heteozygotic locus—AB, compared with the conditions in higher animal. ACP has only one band and is controlled by a homozygote locus. This work can not only accumulates the information of isozymic characters of wild *Carchesium polypinum*, but also provide a powerful lever for the studies on the population genetics and ecology.

Key words: *Carchesium polypinum*; Isozyme; Sand lake; Polyacrylamide gel electrophoresis