

金鱼不同组织器官及胚胎发育不同时期 蛋白水解酶的种类和活性变化

李效宇 夏 民 李 莉 卜艳珍 吉爱玲
姬生栋 徐存拴

(河南师范大学生物系, 河南新乡 453002)

摘要: 采用复性电泳方法研究了金鱼组织器官蛋白水解酶及个体发生过程中蛋白水解酶的种类和活性变化, 主要结果表明: (1) 金鱼各组织器官蛋白水解酶种类差异不大, 大多数组织器官都具有 113、69、20、16kD 四条带, 但不同组织器官常具有其特异性蛋白水解酶; 肠道蛋白水解酶种类最多、活性最强。 (2) 蛋白水解酶的活性受 pH 值影响和制约, 大多数组织器官蛋白水解酶活性最适 pH 值为 8.5。 (3) 在金鱼胚胎发育早期(从卵裂到心跳期)多数种类蛋白水解酶不表达, 从孵化期开始表达; 幼鱼蛋白水解酶种类相似于成鱼组织器官蛋白水解酶。 (4) 金鱼组织器官蛋白水解酶发生于胚胎发育后期(孵化期), 多数蛋白水解酶在胚后发育阶段(仔鱼、幼鱼)逐渐出现。

关键词: 金鱼, 组织器官, 个体发生, 蛋白水解酶, 复性单向电泳

中图分类号: Q556⁺.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2000)02-0128-09

在动物胚胎发育过程中, 随着细胞的分化, 导致其形态发生和生理功能特化, 进而形成具有各种组织器官的复杂新个体, 而这种个体发育的完成有赖于一些特异性蛋白质和酶的选择性合成和降解, 通过对胚胎发育过程中某些特异性蛋白质和酶的研究, 能使我们对细胞分化和基因表达、调控作用联系起来阐明生物发育的机理, 关于在鱼类胚胎发育过程中同工酶的表达及其对胚胎发育的作用已有一些报道^[1-3], 而在这一过程中蛋白水解酶的表达等研究则未见报道, 仅见到关于鱼类肝胰脏、肠道蛋白水解酶的零星报道^[4-6]。研究表明, 蛋白水解酶不仅在蛋白质水解过程中起决定作用, 而且与细胞分化、胚胎发育及生物体的抗逆反应密切相关^[7,8]。作者用复性电泳方法研究了金鱼不同组织器官蛋白水解酶的特点及胚胎发育过程中蛋白水解酶活性的动态变化, 探讨了蛋白水解酶在金鱼胚胎发育过程中的作用。

1 材料与方法

所用材料均为室内水族箱饲养的 2 龄鹤顶红金鱼。

收稿日期: 1997-10-02; 修订日期: 1999-08-30

基金项目: 中法先进研究计划项目(国科生字[1996]134号)及河南省教委自然科学基金资助项目(编号: 21159)

作者简介: 李效宇(1965—), 男, 河南省新蔡县人, 讲师, 现在攻读博士

1.1 金鱼组织器官取材方法和样品制备 取健康无病的2龄金鱼,用冷的磷酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH7.0)冲洗体表后置于冰浴上将鱼解剖,分别摘取眼、脑、肌肉、心脏、肝脏、肠道、卵巢、精巢8种新鲜组织,在4℃磷酸盐缓冲液中分别剪碎,冲洗去表面和内部的血液,肠道要剪开肠壁,清洗去内容物,并剔除肠壁脂肪。组织清洗干净后加入一定比例的4℃磷酸盐缓冲液,冰浴匀浆;在4℃下,20000g离心30min,分装上清液于Ependoff管,保存于-80℃冰箱中备用。

1.2 金鱼胚胎发育不同时期取材和样品制备方法 按李璞等^[9]的人工授精方法获得受精卵,置于室温中发育,水温20—22℃,pH7.0—7.5,每天早晚各换水一次并随时除去死卵(胚胎)。参照李璞对金鱼胚胎发育分期方法,分别取不同发育阶段的卵(胚胎)和幼鱼(表1),用4℃磷酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH7.0)清洗表面,卵或胚胎要除去卵膜,加入一定比例磷酸盐缓冲液后,冰浴匀浆,4℃下、20000g离心30min,分装上清液于Ependoff管中,保存于-80℃冰箱中备用。

1.3 其他 样品蛋白质浓度测定 参照Neuhoff方法^[10]采用复性单向电泳(G-PAGE)方法^[11]分析研究金鱼蛋白水解酶的种类和活性等特点,本方法在制备聚丙烯酰胺凝胶时,将

表1 金鱼胚胎发育时序和主要形态特征(水温20—22℃, pH7.0—7.5)

Tab.1 The major morphological features and developmental time
of goldfish embryogenesis

样品编号 No. of sample	发育时期 Developmental stage	受精后时间(h·min) Time after fertilization	主要形态特征 Major morphological characteristics
1	8细胞期 8-cell stage	1:50	胚盘分裂为8个细胞 Blastodisc cleavaged into 8 cells
2	高囊胚期 Early blastula	4:05	囊胚层较高,囊胚层上细胞数目增多, 而体积变小 Cell number on the high blastula largely increased and the cells became smaller
3	原肠胚早期 Early gastrula	8:00	胚盘下包并形成胚环、胚盾 Blastodisc began to epibole and embryonic ring and embryonic shield formed
4	晶状体形成期 Appearance of eye lens	29:50	眼晶体出现 Eye lens appeared
5	心跳期 Heart beating	33:20	心脏开始跳动 Heart beat
6	孵化期 Hatching	70:55	大部分胚胎破膜而出 The majority of embryos hatched
7	鳔形成期 Air bladder-forming	94:00	鳔出现但未充气 Air bladder appeared but not aerified
8	鳞片形成期 Scale-forming	514:00	体形分化、鳞片出现 Body shape differentiated and scales appeared

易为蛋白水解酶降解的明胶(用作蛋白水解酶底物)共聚于分离胶里,电泳结束后,将与蛋白水解酶结合的 SDS 用非离子去垢剂(如 Triton X-100)除去,凝胶板里的蛋白水解酶即可恢复活性,然后将凝胶板在保温液里孵育。在孵育期间,凝胶板所含的蛋白水解酶可将相应位置的明胶消化掉,胶板经固定后用 Coomassie Brilliant R250 染色,整个胶板被染成蓝色,但被蛋白水解酶消化掉明胶的区域不再为 Coomassie Brilliant R250 着色而成为无色透亮区域,该区域即为相应蛋白水解酶的电泳位移。区域的大小和透光度代表该酶活性的强弱,可用密度计定量测定。在电泳时,同时加入标准蛋白质,还可测知蛋白水解酶的相对分子量。另外,保温液的 pH 值和化学成分可影响蛋白水解酶的活性,通过调节保温液的 pH 值、温度、加入酶的活化因子或抑制因子等来研究蛋白水解酶的生化性质并鉴定其种类。

采用 10% 分离胶、3% 浓缩胶,样品在加样前加入 1/3 样品缓冲液(78% 甘油 10mL + 3.5mL 0.5mol、pH6.8 的 Tris-HCl + 10gSDS + 86.5mL 双蒸水),每种样品加 2 槽,每槽加样 100 μ g 蛋白质(唯肠道样品加样 10 μ g),电泳时电流不超过 10mA/板,4℃ 下电泳 15—17h。电泳后用洗涤液(3.03g Tris-base, 12mL Triton X-100、500mL 双蒸水、pH6.5)洗涤胶板 30min,用双蒸水洗 15min、胶板保温液(0.1mol Gly、5mmol CaCl₂, 分别调所需 pH)洗涤 5min 后,放入保温液中置 37℃ 温箱中保温 24h。胶板的固定、染色、脱色参照 Laemmli 方法^[12]进行。电泳时还同时加入标准蛋白质,按标准蛋白质的相对迁移率作标准曲线,从曲线上查知相应蛋白水解酶的相对分子量。

2 结果

2.1 金鱼不同组织器官蛋白水解酶的种类、活性及 pH 值的影响

金鱼不同组织器官蛋白水解酶的种类、活性及 pH 值的影响归纳如表 2。从表 2 及图 1 结果来看,眼组织蛋白水解酶种类较少,仅有 113kD、69kD、53kD 和 20kD 4 条酶带(图 1C—G, a), 20kD 蛋白水解酶仅在 pH5.5 可检出(图 1C, a), 是一种酸性蛋白水解酶,其它 3 条酶带在大部分 pH 值下可检出,在 pH3.5、pH4.5 未检出;其活性随 pH 增大而加强,pH8.5 时最强(图 1E, a), pH 再增大(9.5、10.5)时,其活性又明显下降(图 1F、G, a)。说明这三种蛋白水解酶可能是碱性蛋白水解酶。

脑组织蛋白水解酶种类最少,仅检出 113kD、69kD 两条酶带(图 1D、E、F、G, b), pH 对这两种蛋白水解酶的活性的影响和眼组织相似。

肌肉组织蛋白水解酶种类较多,共检出 147kD、113kD、69kD、52kD、43kD、20kD、16kD 7 条酶带(图 1C—G, c),其中 113、69、20、16kD 为其它组织器官共有,pH 对肌肉蛋白水解酶活性的影响类似于其它组织,但 20kD 和 43kD 两条带例外,20kD 蛋白水解酶在酸性(pH4.5、5.5)(图 1B、C, c)和碱性(pH8.5、9.5、10.5)(图 1E、F、G, c)时均表现较强活性,而在中性时活性反而较弱(图 1D, c)。而 43kD 蛋白水解酶仅在 pH10.5 时能检出(图 1G, c),显然是一种碱性蛋白水解酶。

心脏蛋白水解酶和肌肉组织很相似,但心脏 20kD 蛋白水解酶仅在 pH8.5 检出(图 1E, d),且活性很弱,这与肌肉组织有较大差异,而心脏组织的 16kD 蛋白水解酶却在 pH9.5 表现出最强活性(图 1F, d),其它 pH 时均较弱或不表达。

表2 金鱼组织器官蛋白水解酶的种类、活性及pH的影响*

Tab.2 The kinds, activities and pH-dependence of proteinases in the tissues of Goldfish

组织器官 Tissues	蛋白水解酶分子量 (KD) Molecular weight of proteinases																		
	250	174	147	133	113	86	72	69	53	52	43	40	35	31	27	25	20	18	16
pH3.5 心 Heart																			
肝 Liver																			
肠 Gut	2+					3+					4+ 4+								
卵巢 Ovary																			
精巢 Spermary																			
眼 Eye																			
脑 Brain																			
肌 Muscle																			
pH4.5 心 Heart																			3+
肝 Liver																			
肠 Gut	2+					4+			3+			4+ 4+							
卵巢 Ovary																			
精巢 Spermary																			
眼 Eye						+			+	+									+
脑 Brain																			
肌 Muscle						+			+	+									+
pH5.5 心 Heart						+			+	+									+
肝 Liver																			+
肠 Gut	4+	2+				4+			2+ 4+				4+ 4+						2+ 4+
卵巢 Ovary																			+
精巢 Spermary						+			+										+
眼 Eye						3+			+	+									
脑 Brain																			
肌 Muscle						4+			+										
pH7.0 心 Heart						4+			2+										3+
肝 Liver						4+			2+										
肠 Gut	4+	4+				4+			4+ 4+				4+ 4+						2+ 4+
卵巢 Ovary									3+										3+
精巢 Spermary						2+			+										+
眼 Eye						4+			2+	+									
脑 Brain						4+			+										
肌 Muscle						+			4+										+
pH8.5 心 Heart						+			4+										4+ +
肝 Liver						+			4+										+
肠 Gut	4+	4+				4+			4+ 4+				4+ 4+						4+ 4+
卵巢 Ovary									3+										3+
精巢 Spermary						2+			+										+
眼 Eye						4+			2+	+									
脑 Brain						4+			+										
肌 Muscle						+			4+										+
pH9.5 心 Heart						+			4+										4+ +
肝 Liver						+			4+										+
肠 Gut	4+	4+				4+			4+ 4+				4+ 4+						4+ 4+
卵巢 Ovary									3+										2+
精巢 Spermary						4+			3+										3+
眼 Eye						3+			+	+									
脑 Brain						2+			+										
肌 Muscle						+			4+										4+
pH10.5 心 Heart						+			2+										3+ +
肝 Liver						+			4+										+
肠 Gut	4+	2+				2+			4+ 4+				4+ 4+	3+		2+	2+	+	2+ 4+ 4+
卵巢 Ovary										+									2+
精巢 Spermary						+			2+										3+

* 蛋白水解酶活性表示方法:
Indication of activity of proteinases
+活性弱 2+活性较弱 3+活性强 4+活性很强
+weak 2+general 3+strong 4+stronger

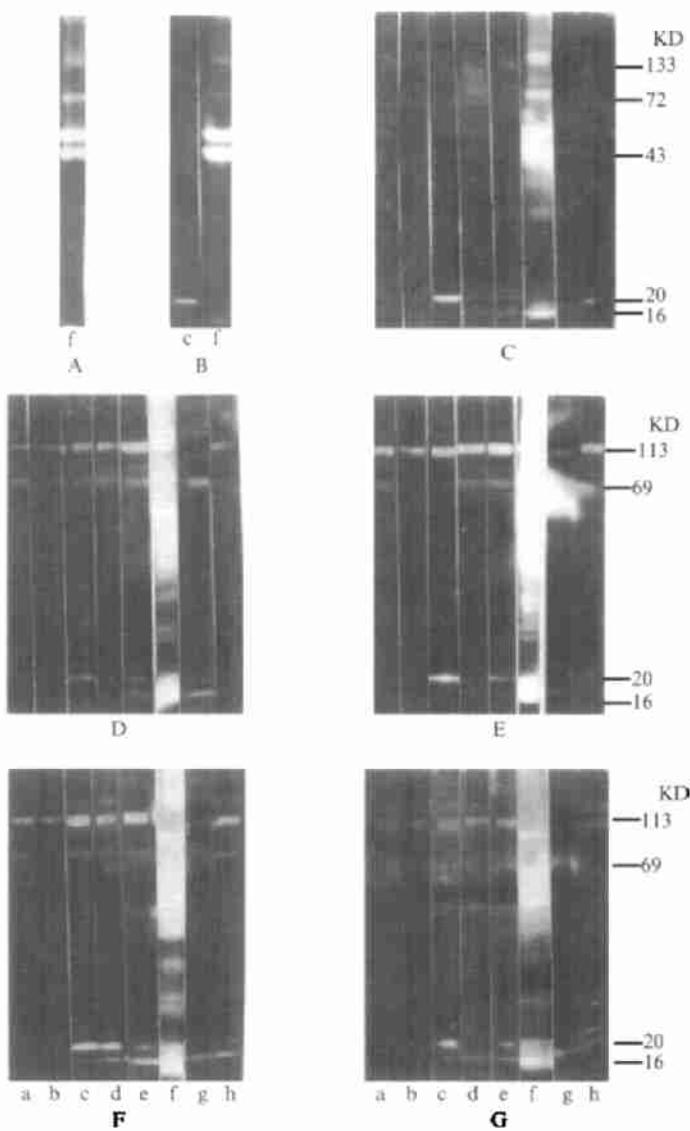


图1 A-G: 不同pH时金鱼组织器官蛋白水解酶谱
a. 眼, b. 脑, c. 肌, d. 心, e. 肝, f. 肠, g. 卵巢, h. 精巢

Fig.1 A-G. Electrophoretogram of proteinases in the tissues of goldfish at different pH levels
A. pH3.5, B. pH4.5, C. pH5.5, D. pH7.0, E. pH8.5, F. pH9.5, G. pH10.5; a. eyes, b. brain,
c. muscle, d. heart, e. liver, f. gut, g. ovary, h. sperm

肝脏蛋白水解酶共检出 113、81、69、43、20、16kD 6 条酶带(图 1C-G,e), 其中 113、69、20、16kD 四条和其它组织共有, 81kD 蛋白水解酶仅在 pH7.0 时检出(图 1D, e), 且其它组织均不具有, 是肝脏特有的中性蛋白水解酶。

肠道蛋白水解酶共检出 250、174、133、86、72、52、43、40、35、31、27、25、20、18、16kD 等 15 条带(图 1A-G,f), 活性最适 pH 为 8.5(图 1E,f), 和其它组织器官所不同的是肠道蛋白水解酶在大部分 pH 时都表现较强活性(尽管其加样量只有其它组织的十分之一)。

卵巢和精巢蛋白水解酶相似,仅检出 113、69、20、16kD 四条带(图 1C-G, g, h), 和其它组织相比,活性相对较弱。

实验结果表明, pH 值影响蛋白水解酶的活性,大部分蛋白水解酶在酸性条件下活性弱,中性比酸性时强, pH8.5 最强(图 1E), pH 过高(如 pH10.5)(图 1G),活性又迅速下降。个别种类蛋白酶表现出的例外情况已如前述。

2.2 金鱼胚胎发育过程中蛋白水解酶的种类及活性变化

从表 3 结果来看,金鱼胚胎发育早期,除原肠胚期检出 1 条活性很弱的 106kD 蛋白水解酶带(图 2, c),从卵裂直至心跳期均未检出蛋白水解酶活性(或活性极弱而难以用所述方法检测)。孵化期蛋白水解酶带骤然增加,共检出 229、188、174、147、113、20kD 6 条蛋白水解酶带(图 2, f),其中 229、188kD 两种活性很强的蛋白水解酶带为孵化期所特有。仔鱼期(未开食即鳔形成期)蛋白水解酶有所增加,共检出 174、147、133、113、69、53、43、20kD 等 8 条酶带(图 2, g),但活性较弱,且大部分为金鱼组织器官所共有的蛋白水解酶(113、69、20kD)及肠道

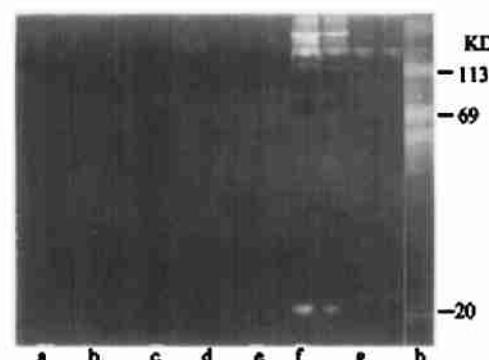


图2 金鱼胚胎发育不同时期蛋白水解酶谱

a. 8 细胞期, b. 高囊胚期, c. 原肠胚早期, d. 晶状体形成期, e. 心跳期, f. 孵化期, g. 鳔形成期, h. 鳞片形成期

Fig.2 Electrophoretogram of proteinases in the developing stage of goldfish

a. 8-cell stage, b. early blastula, c. early gastrula, d. appearance of eye lens, e. heart beating, f. hatching, g. air bladder forming, h. scale forming

表3 金鱼胚胎发育不同时期的蛋白水解酶种类和活性变化*(水温20—22℃, pH7.0—7.5)

Tab.3 The kinds and activities of proteinases in the embryogenesis of goldfish

胚胎发育时期 Embryogenic stage	蛋白水解酶分子量 (KD) Molecular weight of proteinases (KD)																		
	250	229	188	174	147	133	113	106	86	69	53	52	43	40	35	31	20	18	16
8细胞期 8-cell stage																			
高囊胚期 Early blastula																			
原肠胚早期 Early gastrula																			
晶状体形成期 Appearance of eye lens																			
心跳期 Heart beating																			
孵化期 Hatching	+ 4+	2+ 3+																3+	
鳔形成期 Air bladder forming		+ 2+	+	+														+	
鳞片形成期 Scale-forming	+ 3+																	+	3+

* 活性表示方法同表2 Indication method for activity of proteinase was the same as Table 2.

特有蛋白水解酶(174、133、43kD)。至幼鱼期(鳞片形成期)蛋白水解酶种类已基本接近成鱼组织器官蛋白水解酶,共检出 250、113、86、69、52、43、40、35、31、20、18、16kD 等 12 条酶带(图 2,h),金鱼成鱼各组织器官蛋白水解酶到幼鱼期大多都已表达。

3 讨论

3.1 金鱼组织器官的蛋白水解酶及其异同

从实验结果来看,金鱼 8 种组织器官中,除肠道组织外,其它组织蛋白水解酶种类很相似,大多都具有 113、69、20、16kD 4 条蛋白水解酶带,但每种组织常有其自身的特异性酶带,如肌肉组织特有的 20kD 酸性蛋白水解酶(图 1B,C,c),肝脏中 81kD 中性蛋白水解酶(图 1D,e),心脏、肌肉组织特有的 147、43kD 碱性蛋白水解酶,肠道特有的 250、174、133、86、72、52、35、31、18kD 蛋白水解酶,从蛋白水解酶的种类来看,以肠道最多,肝脏次之,肌肉、心脏、眼、脑、生殖腺依次减少。从蛋白水解酶的活性来看,也是以肠道最强,这是由肠道执行消化食物蛋白质的功能决定的,其次是肝脏、肌肉、心脏、眼、精巢,卵巢和脑组织最弱。

3.2 关于肌肉组织中的 20kD 蛋白水解酶

金鱼大部分组织器官中的 20kD 蛋白水解酶在偏弱碱性时($\text{pH}8.5$)活性最强,而肌肉组织中 20kD 蛋白水解酶不仅在弱碱性时活性强,而酸性时也表现出较强的活性(如 $\text{pH}4.5$ — 5.5 时)[图 1B,C,c]。因此推测肌肉中 20kD 蛋白水解酶是分子量相同的两种蛋白水解酶,即肌肉组织中具有 20kD 的酸性蛋白酶和碱性蛋白水解酶,碱性蛋白水解酶为其它组织共有,而酸性蛋白水解酶为肌肉组织所特有,这种蛋白酶可能与肌肉组织的自主性收缩运动生理功能密切相关,因为在肌肉收缩运动时常呈现酸性环境。关于这种蛋白水解酶的生化性质(如等电点、结构、性质等)和生理功能有待于进一步研究分析。

3.3 关于肝脏、肠道蛋白水解酶及其消化功能

肠道蛋白水解酶种类最多、活性最强,其中大部分是一些跟肠道中食物蛋白质的消化密切相关的组织蛋白水解酶,这些蛋白水解酶的最适 pH 偏弱碱性,与饱食时肠液 pH 相一致,这一结果也与倪寿文等^[6]对草鱼、鲤等肠道蛋白水解酶活性研究结果相吻合。

关于肠道蛋白水解酶的来源,不同研究者看法不一,Jany^[13]认为银鲫肠道主要分泌肠激活酶,以激活肝胰脏分泌的蛋白水解酶原,而 Sarbahi^[14]则报道鲫肝胰脏、肠、肠球(intestinal bulb)都分泌蛋白水解酶。从本结果来看,金鱼肠道蛋白水解酶可能大部分为肠道所分泌,但也不能排除肝脏分泌后被肠激酶激活的可能,这一问题有待于应用免疫酶组织化学方法研究。

3.4 pH 值对金鱼组织器官蛋白水解酶活性的影响

金鱼组织器官蛋白水解酶活性受 pH 值的影响和制约,大部分蛋白水解酶在低 pH 值时($\text{pH}3.5$ — 5.5)无活性或活性很弱(图 1A—C),随着 pH 升高($\text{pH}7.0$ — 8.5)(图 1D—E),蛋白水解酶活性明显加强,且以 $\text{pH}8.5$ 时最强, pH 值再升高($\text{pH}9.5$ — 10.5)(图 1F—G),活性又迅速下降,因此,金鱼组织器官蛋白水解酶最适 pH 值大多为 8.5,即大部分都是弱碱性蛋白水解酶。尽管 pH 值对蛋白水解酶的活性起着制约作用,但对组织器官蛋白水解酶的种类影响不大,除极个别情况外,同一组织器官蛋白水解酶在不同 pH 值时其种类基本相同,

仅活性不同而已。

3.5 金鱼蛋白水解酶的发生

金鱼组织器官蛋白水解酶在胚胎发育早期均不表达,这是由于早期胚胎发育阶段细胞同化作用占优势,大部分组织器官未发育健全,还不可能行使其生理功能,因此,体现组织器官特异性的蛋白水解酶未表达或发生,但原肠胚期检出的106kD蛋白水解酶是这一发育时期的特异性蛋白水解酶,它是母细胞mRNA的表达而非胚胎基因控制下的新酶分子的合成。考虑到原肠胚期主要进行胚层分化(细胞分化),因此这种蛋白水解酶可能跟细胞分化有一定关系。

金鱼组织器官蛋白水解酶的发生始于孵化期,该时期174、147、113和20kD蛋白水解酶表达,这些蛋白水解酶可能是由胚胎基因编码合成的,由于孵化期已有呼吸、循环等生命现象,并伴有很强的肌肉收缩运动,这些蛋白水解酶的发生可能与该时期生理活动相适应。到仔鱼期(未开食)蛋白水解酶发生进一步增加,此时仔鱼已不是胚胎而成为完全独立的新个体,各种生理机能都趋于完善和复杂化,相应蛋白水解酶种类增加,但由于仔鱼尚不能平游,也未开始摄食,蛋白水解酶活性很弱,且肠道中大部分蛋白水解酶不表达。到幼鱼期,蛋白水解酶种类已很接近成鱼,大部分蛋白水解酶都已发生或表达。由此可见,金鱼组织器官蛋白水解酶是在胚胎发育后期逐渐发生和表达的,大部分是胚胎或新个体基因编码的蛋白水解酶,其基因调控的分子机理有待进一步研究。

3.6 关于孵化期的蛋白水解酶

孵化期特有的两种活性很强的蛋白水解酶(229、188kD)(图2,f)可能是胚胎孵化腺细胞所分泌的孵化酶,它与胚胎破膜时卵膜蛋白的水解有关,关于这两种蛋白水解酶发生时期、活性表达、衰退和消失时期及其生化特性有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 吴力钊,王祖熊. 鳊鱼同工酶发育遗传学研究[J]. 水生生物学报, 1992, 16(1): 8—16
- [2] 吴力钊,王祖熊. 白鲢个体发育过程中同工酶基因表达与调控的研究[J]. 水生生物学报, 1997, 21(1): 49—58
- [3] 罗莉中,王春元. 金鱼(*Carassius auratus* L.)同工酶的发生遗传学研究. II. 金鱼胚胎发育不同时期乳酸脱氢酶同工酶分析[J]. 遗传学报, 1984, 11(6): 487—493
- [4] 黄耀洞,刘永坚. 草鱼肠道、肝胰脏蛋白酶活性的初步研究[J]. 水生生物学报, 1988, 12(4): 328—333
- [5] Bitterlich G. Digestive enzyme pattern of stomachless filter feeders, *Silver Carp*, *Hypophthalmichthys molitrix* Val. and *Bighead Carp*, *Aristichthys nobilis* Rich. [J]. J. Fish Biol 1985, 27: 103—112
- [6] 倪寿文,桂远明,刘焕亮. 草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗罗非鱼肝胰脏和肠道蛋白酶活性的初步探讨[J]. 动物学报, 1993, 39(2): 160—167
- [7] Vassalli J-D, Pepper Ms. Membrane proteases in focus [J]. Nature, 1994, 370: 14—15
- [8] Mohsenzadeh S, Xu C S, Franco Fracella, et al. Heat shock inhibits and activates different protein degradation path ways and proteases activities in *Neurospora crassa*. [J]. FEMS, 1994, 124: 215—224
- [9] 李璞等. 鲫鱼和金鱼胚胎发育的分期[J]. 动物学报, 1959, 11(2): 145—154
- [10] Neuhoff V, et al. A simple, Versatile, Sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences [J]. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979, 360: 1657—1670
- [11] Neuhaus-Steinmetz U, Xu C S, Franco Fracella, et al. Heat shock response and cytotoxicity in C₆ rat glioma Cells: structure-activity relationship of different alcohols [J]. Molecular pharmacology, 1994, 45: 36—

.41

- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ [J]. *Nature*, 1970, **227**:680—685
- [13] Jany K D. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bony fish, *carassius auratus gibio* (Bloch): Endopeptidases [J]. *Comp. Biochem. Physiol.* 1976, **53**:31—38
- [14] Sarbahi D S. Studies of the digestive tracts and the digestive enzymes of the goldfish, *Carassius auratus* L. and large mouth black bass, *Micropterus Salmooides* (*lacepech*) [J]. *Biol. Bull.*, 1951, **100**:244—257

THE PROTEINASES AND THEIR ACTIVITY IN THE TISSUES AND EMBRYOGENESIS OF GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS* L.)

LI Xiao-yu, XIA Min, LI Li, BO Yan-zhen, JI Ai-ling, JI Sheng-dong
and XU Cun-shuan

(Department of Biology, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453002)

Abstract: The properties of proteinases in the tissues of goldfish and the kinds of proteinases in the embryogenesis of goldfish were investigated with G-PAGE. The kinds of proteinases were similar, and most tissues of goldfish had four kinds of proteinases with molecular weights being 113 kD, 69 kD, 20 kD and 16 kD respectively. Many kinds of proteinases with strongest activities were observed in the gut. The activities of proteinases were affected by pH, and the optimum pH was 8.5. In the embryogenesis of goldfish, the proteinases began to express at hatching stage, but not in the early embryogenetic period. The proteinases started to express at hatching stage, but most of them expressed at the late developmental stage.

Key words: Goldfish (*carassius auratus* L.); Tissue; Ontogenesis; Proteinase;
G-PAGE