

野生纤毛虫同工酶微量等电聚焦分析探索

余育和 沈韫芬 刘建康

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

微量电泳是用来分离和表征提取于少量生物材料中的核酸和蛋白质的分析技术。作者以缘毛目螅状独缩虫(*Carchesium polypinum* Linne, 1758)为材料, 用微量等电聚焦(Micro-isoelectric focussing)探索了分析野生纤毛虫同工酶的可行性。实验结果表明:(1)样品量小至两个群体螅状独缩虫(约 200 个个体)即可进行酯酶同工酶微量等电聚焦分析;(2)自野外采集材料中立即分离制备的螅状独缩虫匀浆上清液的酯酶同工酶酶谱与实验室放置 10h 后分离制备的酶谱几乎一致。因此, 野生纤毛虫同工酶可用微量等电聚焦进行分析。

关键词 微量电泳, 微量等电聚焦, *Carchesium polypinum*, 酯酶同工酶

物种鉴定和其系统发育的探究是系统生物学的主要任务之一。纤毛虫这方面的研究远较其它生物类群落后, 这是由于纤毛虫中许多种是由形态上几乎或完全不能区分的亲缘种(Sibling species)构成的复合种^[1], 即它们具有高度的形态学保守性; 另一方面, 某些种的可塑性很大^[2]。近十年来, 随着各种生化技术的引入及由此带来的许多重大发现, 纤毛虫的系统发育也得到了广泛的研究, 许多类群的系统发育趋于或已经阐明^[3-7]。

在引入纤毛虫研究的生化技术中, 同工酶电泳分析技术的诊断价值高, 且可在短时间内对许多样本同时进行扫描研究, 是很受欢迎的一种, 应用非常广泛^[8-10]。然而, 这种技术目前仍局限于实验培养的种群, 野生纤毛虫的收集量很难甚至不可能满足目前采用的常规电泳, 其同工酶研究还是一块处女地。作者探索了微量聚丙烯酰胺凝胶电泳分析野生纤毛虫同工酶的可行性, 以期为种的鉴定和系统发育的研究引荐一种新的技术方法。

材料和方法

材料 蝛状独缩虫(*Carchesium polypinum* Linne, 1758)是一种群体性、最常见且具有世界性分布的缘毛目纤毛虫, 所以选用它作为本探索性试验的材料。从武汉东湖生态站船边直接刮取材料或挂片(一般 4d)。采回的材料分两份。一份用于立即分离螅状独缩虫, 一份留待 10h 后分离。加一定量 10mmol/L Tris-HCl, pH7.0 缓冲液和 1% Triton X-100 于一定获取量的材料中, 经冷冻、融解、研磨顺序操作三次后, 离心(26,000r/m60min)收

* 这项工作得到吾师北京大学陈阅增教授的热情帮助。谨此致谢。
1992 年 9 月 12 日收到。

集上清液作粗酶提取物备用。

方法 电泳仪为北京六一仪器厂产的DYY-Ⅲ4稳压稳流电泳仪,另配置一个微安表。电泳毛细玻璃管系用0.1ml吸液管(内径0.5mm)截长为10cm玻璃管替代。聚丙烯酰胺凝胶的制备用Gainer^[11]改良法,6μl TEMED,0.21ml两性电解质(LKB Ampholine pH3—10),0.38ml40%丙烯酰胺,0.38ml1%甲叉双丙烯酰胺,0.21ml0.7%过硫酸铵,0.67ml36%蔗糖,加蒸馏水至2ml。

电极液和样品覆盖液的配制按Quentin-Neuhoff^[12],正极电极液为硫酸溶液,pH2.95,负极电极液为氢氧化钠溶液,pH10.4。正负极电极液都含有12%蔗糖以减少电泳过程中的内渗作用。电泳在冰箱中进行,200V稳压电泳3h。酯酶的染色及固定参照Simon等^[13]。

结 果

(一) 微量聚丙烯酰胺凝胶电泳的灵敏性

将螅状独缩虫粗酶提取物,以匀浆体积折算为群体含量,按0.5、1、2、4个群体的递增方式加入胶柱A、B、C、D。图1示电泳结果。胶柱A有一明显的酶带,胶柱B在胶柱A的基础上增加一条带,该带位于前酶带的正极侧。胶柱C出现第3条带,它位于前两条酶带之间。胶柱D上的酶带数和胶柱C一样多,并未随上样量的几何递增而添加,说明胶柱C上样量,即2个群体,已达到满足反映螅状独缩虫的酯酶同工酶的上样量。

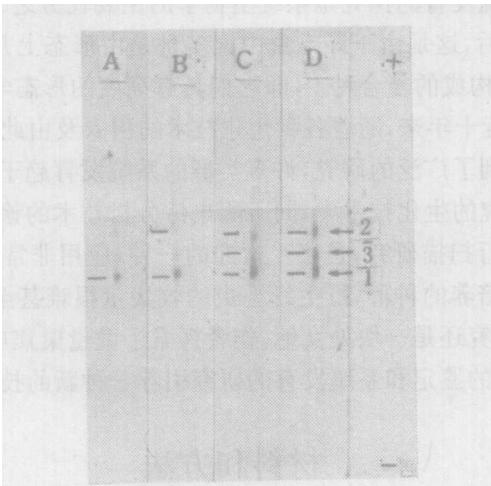


图1 不同数量的螅状独缩虫酯酶酶谱

Fig. 1 The esterase zymogram of *Carchesium polypinum* of various colony numbers.

A. 0.5个群体 0.5 colony; B. 1个群体 1 colony; C. 2个群体 2 colonies; D. 4个群体 4 colonies

注:1个群体大约有100个个体 1 colony consists of about 100 zooids.

(二) 前后分离螅状独缩虫的酶谱比较

从野外采集的材料中立即分离制备螅状独缩虫的粗酶提取物和实验室放置10h后分离制备的粗酶提取物的酯酶酶谱见图2,两种处理的提取物均展示三条酶带且分布相同,

它们的紫外扫描的图形也几乎一致。

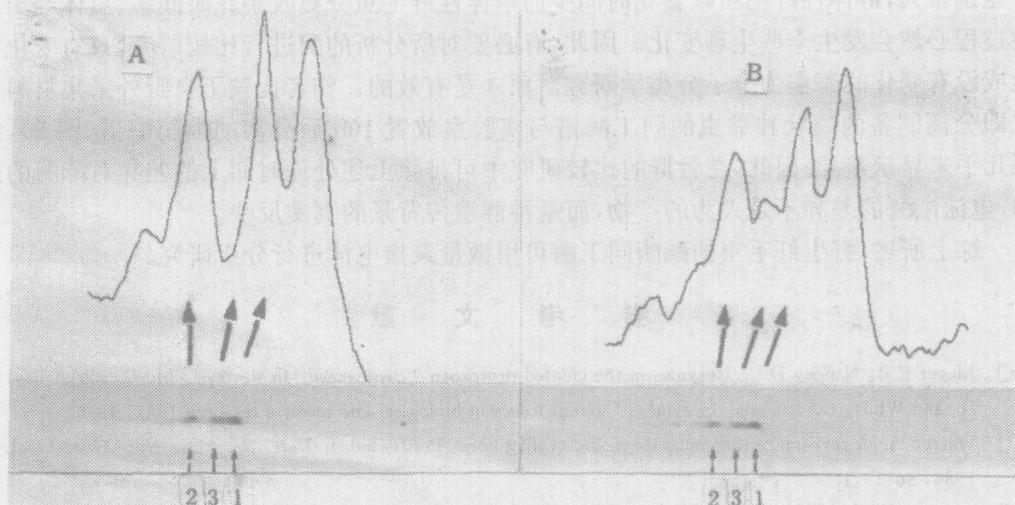


图 2 前后分离的螅状独缩虫酯酶谱

Fig. 2 *Carchesium polypinum*: Comparison of esterase zymogram obtained from two different samples

A. 从野外采集样本中立即分离制备 Sample prepared immediately after collection

B. 样本采集后置于实验室 10h 后分离制备 Sample prepared from specimens kept in the laboratory for 10h at 30°C

讨 论

同工酶电泳资料是分子分类学赖以建立的基础之一,原生动物纤毛虫实验种群的许多分类学问题的澄清或解决仰仗着同工酶电泳分析^[13,14],然而,这项技术迄今未在野生纤毛虫的研究中得到应用,实为遗憾。作者从几方面探讨了野生纤毛虫同工酶分析的可行性。

野生纤毛虫进行同工酶电泳分析首先遇到的困难是不容易获得足够材料的问题。目前分类学研究中采用的电泳方法为常规电泳,它需要较多的材料。作者在进行四膜虫种群同工酶研究时发现,就是那些酯酶活性高的四膜虫种群也需要数以千计的个体,而这个数量对于野生纤毛虫是很难甚至不可能达到的。因此,变更常规电泳方法显然十分迫切。作者以螅状独缩虫为材料,在经过改装的国产 DYY-Ⅲ 4 稳压流电泳仪上进行了酯酶同工酶微量聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,只需用两个群体(约 200 个个体)就可以展示出螅状独缩虫的酯酶同工酶酶谱(图 1c)。对于群体性纤毛虫,这个数量不难满足。对于单体纤毛虫来说,大多也是可以办到的。

另一个要考虑的问题是,野生纤毛虫在收集过程中,其酶是否经历变化。在做实验种群研究时,研究者可同时收获一种群内各个体或数种种群,其环境不存在很大差异,而野生纤毛虫研究中,不可能满足这一要求。野外工作时,有些材料采集点距工作点很近,可马上进行纤毛虫的分离收集;有些材料采集点距工作点很远,纤毛虫在经过人为影响的环境

中滞留时间较长。此外,就是在同一采样点的材料中,不同野生纤毛虫的分离收集所需时间差别很大,群体性纤毛虫收集花时间少而单体性纤毛虫分离收集花时间多。虫体经历上述过程必然会发生一些生理变化。因此,有必要对所分析的酶进行比较研究,只有变化不大或没有变化的酶作为分子分类学研究对象才是有效的。作者比较了自野外采集材料中立即分离制备的媳状独缩虫的同工酶谱与实验室放置10h后分离的酯酶酶谱(图2),结果几乎未显示差异。因此,在种群的比较研究中可排除上述处理时间上的差异对酯酶的影响,电泳酯酶的差异不是人为的产物,而是种群遗传背景的真实反映。

综上所述,野生纤毛虫的酯酶同工酶可用微量聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析研究。

参 考 文 献

- [1] Meyer E B, Nanney D L. Isozymes in the ciliated protozoan *Tetrahymena*. In Rattazzi, M. C., Scadarios, J. G. and Whitt, G. S., eds. *Isozymes: Current topics in biological and medical research* 1987, 13:61.
- [2] Warren A. A revision of the genus *Vorticella* (Ciliophora: Peritrichida). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (zool.)*, 1986, 50(1):1.
- [3] Brunk C F et al. Phylogenetic relationships among *Tetrahymena* species determined using the polymerase chain reaction. *J. Mol. Evol.* 1990, 30:290.
- [4] Enberg J et al. Comparison of primary and secondary 26sRNA structures in two *Tetrahymena* species: Evidence for a strong evolutionary and structural constraint in expansion segments. *J. Mol. Evol.* 1990, 30:514.
- [5] Nanney D L et al. Comparison of ribosomal and isozymic phylogenies of Tetrahymenine ciliates. *J. Protozool.* 1989, 36(1):1.
- [6] Schlegel M, Kramer M, Hahn K. Taxonomy and phylogenetic relationship of eight species of the genus *Euplotes* (Hypotrichida, Ciliophora) as revealed by enzyme electrophoreses. *Europ. J. Protistol.* 1988, 24:22.
- [7] Sogin M L, Elwood H J. Primary structure of *Paramecium tetraurelia* small-subunit rRNA coding region: phylogenetic relationships within the Ciliophora. *J. Mol. Evol.* 1986, 23:53.
- [8] 冯苏莲等. 四膜虫s1株——上海四膜虫,新种. 动物学报, 1988, 34(1):42.
- [9] Borden D et al. Electrophoretic analysis of evolutionary relationships in *Tetrahymena*. *Evolution*, 1977, 31:91.
- [10] Tait A. Enzyme variation between syngens in *Paramecium aurelia*. *Biochem. Genet.* 1970, 4:461.
- [11] Gainer H. Isoelectric focusing of proteins at the 10^{-10} to 10^{-9} g level. *Analytical Biochem.* 1973, 651:646.
- [12] Quentin C D, Neuhoff V. Micro-isoelectric focusing for the detection of LDH isoenzymes in different brain regions of rabbit. *Int. J. Neurosci.* 1972, 4:17.
- [13] Simon E M, Meyer E B, Preparata R M. New wild *Tetrahymena* from Southeast Asia, China and North America including *T. malaccensis*, *T. asiatica*, *T. nanneyi*, *T. caudata*, and *T. silvana* spp. *J. Protozool.* 1985, 22:182.
- [14] Nanney D L, McCoy J W. Characterization of the species of the *Tetrahymena pyriformis* complex. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 1976, 95:664.

STUDY OF ESTERASE ISOZYMES IN WILD *CARCHESIUM POLYPINUM* BY MICRO-ISOELECTRIC FOCUSING

Yu Yuhe, Shen Yunfen and Liu Jiankang

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

Micro-electrophoreses are analytical techniques available for separating and characterizing RNAs, DNAs and proteins extracted from small amounts of biological materials. Micro-isoelectric focussing, one kind of micro-electrophoreses, is used for the first time to analyse esterase isozyme of the wild ciliate *Carchesium polypinum* (Linne, 1758), the isozymes of which have not been investigated before. The results of the experiments demonstrate: 1, samples of two colonies of *Carchesium polypinum* (about 200 zooids) are sufficient for the microfocussing analysis of esterase isozyme; 2, *Carchesium polypinum* separated immediately from the sample collected from Lake Donghu has almost the same pattern of esterase isozyme as the sample which has been kept in the laboratory for 10 hrs at 30°C. Therefore, isozymes of wild ciliates can be analysed by microfocussing.

Key words Micro-electrophoreses, Micro isoelectric focussing,
Carchesium polypinum, Esterase isozyme