

克氏原螯虾不同发育阶段卵巢中 EST 同工酶比较

崔雪^{1,2}, 张引¹, 黄孝相¹, 徐东生¹, 吕邦玉²

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北武汉 430074; 2. 孝感学院生命科学技术学院, 湖北孝感 432100)

摘要 [目的] 研究克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 卵巢成熟过程 EST 的变化。[方法] 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法, 分析了卵黄形成期和成熟期卵巢中酯酶同工酶(EST) 的表达情况。[结果] 所研究的两个阶段卵巢中 EST 同工酶的表达可分为、和共3个区。其中区和区卵黄形成期 EST 表达较强, 酶带明显比成熟期浓, 尤其是区, 卵黄形成期 EST 同工酶的表达最强。相反, 在区, 成熟期 EST 酶带明显比卵黄形成区浓。[结论] 在克氏原螯虾卵子成熟过程中, EST 基因的表达存在时间差异性。

关键词 克氏原螯虾; EST 同工酶; 卵巢; 卵黄形成期; 成熟期

中图分类号 S966.12 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)31-13666-02

Comparison of EST Isozyme in the Ovary of *Procambarus clarkii* in Different Developmental Stages

CUI Xue et al. (College of Fishery, Huzhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract [Objective] The purpose was to study the changes of EST in the ovary of *Procambarus clarkii* in the mature period. [Method] By using the method of polyacrylamide gel electrophoresis, the expression of esterase (EST) isozyme in the ovary in vitellogenesis stage and mature stage was analyzed. [Result] The expression of esterase isozyme in the ovary in two stages could be divided into 3 regions (, and). In the vitellogenesis period, EST in region and expressed more strongly and the isozyme bands were obviously dense than that in mature stage. Especially, the expression of EST isozymes in region in the vitellogenesis period was strongest. On the contrary, EST isozyme bands in region in the mature stage were obviously dense than that in the vitellogenesis region. [Conclusion] The expression of EST gene had temporal difference in the mature stage of *P. clarkii* ovary.

Key words *Procambarus clarkii*; EST isozyme; Ovary; Vitellogenesis stage; Mature stage

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 隶属节肢动物门, 甲壳纲, 软甲亚纲, 十足目, 螯虾科。克氏原螯虾俗称龙虾、海虾等, 是重要的淡水经济虾类, 因其味道鲜美, 营养丰富, 而受到国内外市场青睐。同时, 克氏原螯虾也是我国近几年出口创汇的水产品之一^[1]。同工酶是生物体细胞内基因组编码的催化体内某一类生化反应, 而本身分子结构组成有所不同的一组酶。同工酶是生物体代谢的调节者, 与特殊的生理功能和细胞分化相联系。有关克氏原螯虾养殖和生物学的研究已有报道^[2-4], 但有关克氏原螯虾同工酶的研究较少, 母昌考等发现克氏原螯虾 EST 存在组织特异性^[5]。笔者通过对克氏原螯虾卵子成熟过程两个不同阶段酯酶同工酶(EST) 的表达情况进行了比较分析, 以期对克氏原螯虾卵子成熟过程的基因表达研究提供参考。

1 材料与方

1.1 材料 试验所用材料购自湖北孝感一宫菜市场。卵巢分期参照李胜等^[6]的方法进行。试验分析的克氏原螯虾卵巢分别为卵黄发生期和成熟期两个阶段。

1.2 方法

1.2.1 样品制备。对克氏原螯虾进行活体取样, 取卵巢, 分类后按 1:3 (W/V) 加入匀浆缓冲液直接进行匀浆, 匀浆后在高速冷冻离心机中 14 000 r/min 离心 30 min, 取上清加入等体积上样缓冲液, 混匀后供电泳分析用。

同工酶电泳采用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE) 垂直平板电泳。使用的电极缓冲液为 Tris-甘氨酸(TG, pH 8.3), 分离胶浓度为 7.0%, 浓缩胶浓度为 2.5%, 凝胶的制备参照周宗汉等^[7]的方法进行。

1.2.2 电泳。电泳过程采用 DYY-8B 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂生产); 用 50 μ l 微量进样器每孔加样 40 μ l。在浓缩胶中电泳时, 使用电压为 100 V, 至指示剂完全进入分离

胶后, 升高电压至 150 V, 总电泳时间为 4 h。整个电泳过程在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内进行。

1.2.3 染色、脱色和固定。凝胶的染色参照李思发^[8]的方法, 并有所修改。电泳结束后按照染色液配方, 将染色剂分别溶解, 电泳结束后, 取出凝胶, 用重蒸水冲洗干净, 置于培养皿中。然后将各染色液均匀混合, 倒入培养皿中, 37 $^{\circ}$ C 条件下置暗处显色至条带清晰。染色结束后, 用 7% 醋酸溶液进行脱色至底色透明, 最后用已配好的固定液固定保存。

1.2.4 结果记录。采用 2 种方法进行酶谱记录: 按照酶带迁移的距离和染色深度, 在记录本上画出酶谱草图; 利用复日 FR-980 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司生产) 进行观察, 拍照。

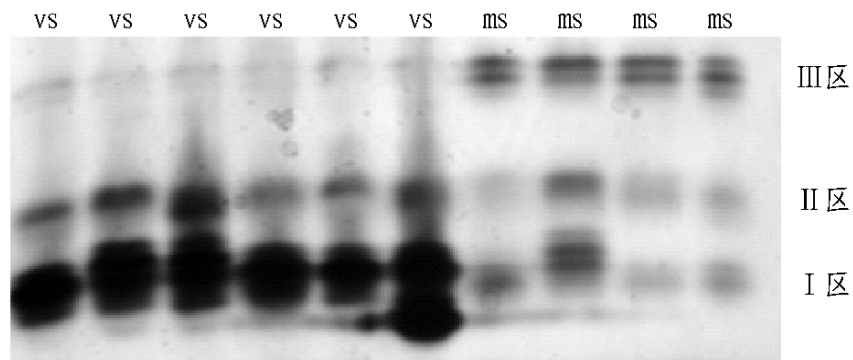
2 结果与分析

在进行组织处理时发现, 卵黄形成期的卵巢匀浆后有大量的脂肪浮于匀浆液的上层, 经离心后, 离心管最上层为脂肪, 中间为电泳所需上清液, 下层为沉淀。而成熟期的卵巢匀浆后离心分为上清液和下层沉淀, 很少能看到脂肪层的存在, 表明卵黄形成期卵巢脂肪含量高于成熟期。EST 同工酶电泳结果(图 1) 显示, 所研究的两个阶段卵巢中 EST 同工酶的表达可分为、和共 3 个区。其中区和区卵黄形成期 EST 表达较强, 酶带明显比成熟期浓, 尤其是区, 卵黄形成期 EST 同工酶的表达最强; 相反, 区成熟期 EST 酶带明显比卵黄形成期浓。

3 讨论

3.1 卵巢脂肪含量的变化及意义 卵子含大量供早期胚胎发育所需的营养物质卵黄, 在动物个体发育中起着不可替代的重要作用。该试验过程中发现, 克氏原螯虾卵黄形成期卵巢呈淡黄色, 成熟期呈紫黑色, 与谢松等^[9]的报道一致。

虾蟹类卵巢的成熟过程是一个随着卵黄的形成而大量积累和贮存营养物质和能量的过程^[11]。十足类甲壳动物卵巢快速发育是卵黄物质大量积累时期, 其中积累的主要物质之一是脂类^[10], 这些脂类将是胚胎发育重要的能源物质, 且



注:vs 为卵黄形成期,ms 为成熟期。

Note vs stands for vitellogenesis stage; ms stands for mature stage.

图1 克氏原螯虾卵黄形成期和成熟期卵巢EST图谱

Fig.1 EST mapping of *Procambarus clarkii* ovary in the vitellogenesis stage and mature stage

脂类积累的数量和质量对胚胎发育有很大的影响^[12]。李荷迪等指出,脂类在红螯螯虾胚胎发育中的作用仅次于蛋白质^[13]。在中华绒螯蟹受精卵内的卵黄储存着供给胚胎发育所需的各种营养物质,卵黄主要由3种主要物质组成,在胚胎不断发育过程中,逐渐分解为胚胎各期发育必需的物质和能量,其中蛋白质的相对含量最大,脂类次之,碳水化合物最小^[14]。该研究发现卵黄形成期脂肪含量高于成熟期,可能在克氏原螯虾卵子成熟过程中也可能存在脂肪和蛋白质及碳水化合物之间相互转化的过程。

3.2 EST同工酶表达的差异 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物^[15]。该试验中,卵黄形成期脂肪含量高于成熟期,而在Ⅱ区和Ⅲ区,卵黄形成期EST的表达明显强于成熟期,因此这可能与卵子成熟过程中大量脂肪的消耗有关,由此可认为,Ⅱ区和Ⅲ区的EST可能主要是参与催化脂肪降解。而在Ⅰ区,卵黄形成期的EST表达明显低于成熟期,说明Ⅱ区和Ⅲ区EST可能参与了卵子的成熟过程,而Ⅰ区可以作为卵子成熟的标志。

脂类是主要的高能物质,又是构成生物膜的重要成分。田华梅等发现中华绒螯蟹从受精卵到卵内第一无节幼体期间脂类变化不很显著,认为在此阶段脂类可能主要不是作为能量物质而只用于构建生物膜,因此相对量变化不大^[13]。

(上接第13661页)

之,刀蛭最弱;在Fenton体系中竹蛭 IC_{50} 为3.60 ng/ml,缢蛭 IC_{50} 为4.00 ng/ml,刀蛭 IC_{50} 为4.57 ng/ml,三者清除自由基的能力大小依次为竹蛭、缢蛭、刀蛭;对于二苯代苦味酰自由基,竹蛭的清除能力最明显,其 IC_{50} 为0.93 ng/ml,而缢蛭、刀蛭依次为1.93、2.93 ng/ml。因此,对于这3种自由基,竹蛭的清除效果最好,可开发利用价值较大,经试验证明其在清除羟自由基方面与Vc(IC_{50} 为3.25 ng/ml)相当;缢蛭次之,说明这2种蛭的抗氧化能力均值得进一步研究。该研究结果可为将竹蛭、缢蛭开发为新的抗氧化药物先导化合物或新的功能食品奠定一定的基础。而这些蛭类的抗氧化有效成分,还需要进一步研究。

参考文献

[1] 刘立明,刘丽虹,宋功武,等.分光光度法测定Fenton反应产生的羟自

该研究中,成熟期克氏原螯虾卵巢中脂肪含量明显低于卵黄形成期,且Ⅱ区和Ⅲ区EST同工酶的活性明显低于卵黄形成期,因此,可以认为克氏原螯虾卵巢发育过程不是以脂肪作为主要的能量来源,而是以蛋白质或碳水化合物为主要能量来源,这与中华绒螯蟹有相似之处。

同时,两个时期卵巢中EST同工酶表达的差异表明,EST同工酶在卵子成熟过程中具有时间特异性。该研究有助于了解克氏原螯虾胚胎发育过程中基因表达的特点,为克氏原螯虾胚胎发育的进一步研究提供参考。

参考文献

- [1] 王顺昌.克氏螯虾的生物学和生态养殖模式[J].淡水渔业,2003,33(4):59-61.
- [2] 宋长太.克氏螯虾及其人工养殖技术[J].淡水渔业,2001,31(1):28-29.
- [3] 赵维信,李胜.克氏原螯虾大颚器对卵巢发育的影响[J].水产学报,1999,23(3):229-233.
- [4] 张世萍,金辉,俸艳萍,等.河蟹、克氏原螯虾、黄鳝摄食生态的研究[J].水生生物学报,2003,27(5):496-501.
- [5] 母昌考,崔雪,戴余军,等.克氏原螯虾EST同工酶的组织特异性研究[J].水利渔业,2008,28(1):47-48.
- [6] 李胜,赵维信.克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化[J].上海水产大学学报,1999,8(1):12-18.
- [7] 周宗汉,林金榜,朱婉华.介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法[J].淡水渔业,1983(2):35-40.
- [8] 李思发.中国淡水主要养殖鱼类种质资源研究[M].上海:上海科学技术出版社,1998:189-193.
- [9] 谢松,安建宏,梁晓辉,等.克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)卵黄蛋白的部分生化性质[J].河北大学学报:自然科学版,2006,26(2):199-202.
- [10] WOUTERS R, LAVENS P, NETOJ, et al. Penidshri mp broodstock nutrition: An updated review on research and development[J]. Aquacult, 2001, 202: 1-21.
- [11] MOURENIE G, MEDINA A, GONZALEZ S, et al. Changes in lipid class and fatty acids contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* during maturation[J]. Mar Bo, 1994, 121: 187-197.
- [12] HERRING P J. Observations on the embryonic development of some deep-living decapod crustaceans with particular reference to species of *Acarthephyra* [J]. Mar Bo, 1974, 25: 25-33.
- [13] 李荷迪,周忠良,罗文,等.红螯螯虾胚胎发育过程中脂类及脂肪酸组成的分析[J].甲壳动物学会.甲壳动物论文集第四辑.北京:科学出版社,2003:376-381.
- [14] 田华梅,赵云龙,李晶晶,等.中华绒螯蟹胚胎发育过程中主要生化成分的变化[J].动物学杂志,2002,37(5):18-21.
- [15] 王梅芳,余祥勇,杨荣权,等.二色裂江珧EST和SOD同工酶组织特异性研究[J].湛江海洋大学学报,2000,20(1):5-8.

由基[J].湖北大学学报,2002(4):326-328.

- [2] 韩鹤友,何治柯,曾云鹤.羟自由基的分析研究进展[J].分析科学学报,2001(17):45-47.
- [3] 范晓岚,杨军,糜漫天,等.2-胡萝卜素抗氧化作用与疾病预防[J].中国公共卫生,2003(4):479-480.
- [4] 张金鼎.海洋药物与效方[M].北京:中医古籍出版社,1998.
- [5] 肖湘,方明英,张尔贤,等.缢蛭、织锦巴非蛤、二色裂江珧清除氧自由基作用研究[J].中国海洋药物,2002(3):5-7.
- [6] CHOC W, KIMS C, HWANG S S, et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison[J]. Part Science, 2002, 163: 1161-1168.
- [7] 程丽华,黄君礼,倪福祥.Fenton试剂生成·OH的动力学研究[J].环境污染治理技术与设备,2003,4(5):12-14.
- [8] LEANDERSON P, FARESJO A O, TAGESSON C. Green tea polyphenols inhibit oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells[J]. Free Radic Biol Med, 1997, 23: 235-242.
- [9] HALLIWELL B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence[J]. Lancet, 1994, 344: 721-724.
- [10] 汪秋宽,刘红丹,徐坚,等.牡蛎酶解液的抗氧化活性[J].中国水产科学,2007,14(2):295-299.