

文章编号:1001-5132 (2008) 01-0034-05

岱衢族大黄鱼不同组织的同工酶谱

管丹冬, 李明云*, 叶帅东

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 于 2006 年 11 月, 在象山港采集 30 尾网养岱衢族大黄鱼, 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳方法, 研究分析了岱衢族大黄鱼眼睛、肌肉、肝脏、肾脏、脾脏、心脏、胸鳍、鳃和脑 9 种组织中 16 种同工酶(LDH、ADH、MDH、ME、SOD、POD、EST、GAD、ALP、ATP、FDH、SCD、IDH、GDH、ACP、GcDH)的表达情况, 发现除 IDH、GDH、ACP、GcDH 4 种酶只显示微弱且不稳定的区带外, 其他酶类在各组织中都显示出清晰稳定的酶谱, 且这些酶在表型、分布和活性上均表现出高度的组织特异性, 与各组织的生理功能相一致。

关键词: 岱衢族大黄鱼; 同工酶; 组织特异性表达

中图分类号: Q954.62; S965.322 文献标识码: A

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*), 俗称黄鱼、黄花鱼等, 曾是我国重要的四大捕捞对象之一, 也是福建、浙江 2 省重要的经济鱼类^[1]。随着大黄鱼人工育苗和网箱养殖等技术的相继成熟, 其人工养殖得到迅猛发展, 取得了较高的经济和社会效益。

我国沿海大黄鱼可分为 3 个不同的地理种族, 即主产于岱衢洋的岱衢族; 主产于官井洋的闽-粤东族以及主产于雷州半岛的碣洲族。目前对于大黄鱼同工酶方面的研究局限于闽-粤东族, 未见其他地理种群的相关报道。全成干等^[2,3]检测厦门养殖大黄鱼即闽-粤东族同工酶的遗传多样性; 李明云等^[4]研究了象山港养殖闽-粤东族大黄鱼同工酶的组织分布和群体遗传多样性。

本研究采用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳法对岱衢族大黄鱼 9 种组织中的 16 种同工酶进行检测

分析, 旨在丰富大黄鱼不同地理种群的生化遗传资料, 同时为进一步研究大黄鱼的遗传特性、种质鉴别等问题提供一定的基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

岱衢族大黄鱼样本于 2006 年 11 月取自浙江省宁波市海湾水产苗种繁育中心海水养殖网箱, 为岱衢族大黄鱼野生亲本繁育的子二代群体, 随机取 30 尾, 平均体长为 31.5 cm, 平均体重为 384.7 g。在冰面上迅速活体解剖, 取眼睛、肌肉、肝脏、肾脏、脾脏、心脏、胸鳍、鳃和脑 9 种组织移入离心管, 标记后投入液氮生物容器中, 运回实验室置 -83 超低温冰箱保存至分析。

收稿日期: 2007-07-14.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 国家高技术研究发展计划 863 项目(2006AA10A405); 浙江省重大项目(2006C12005); 宁波市重大招标项目(2004C100040B2)。

第一作者: 管丹冬(1984-), 男, 浙江象山人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物生化遗传学。E-mail: guandandong@163.com

*通讯作者: 李明云(1942-), 男, 浙江舟山人, 教授, 主要研究方向: 水产动物遗传育种和分子毒理学。E-mail: limingyun@nbip.net

1.2 方法

1.2.1 样品制备

准确称取 9 种组织,以 1:3 的比例(W/V)加入 0.05% 巯基乙醇水溶液,冰浴条件下匀浆,4℃ 冷冻离心机中 15 000 r·min⁻¹离心 30 min (肝脏离心 2 次或更多次,直至提取的酶液纯清),取上清液,按 1:1 的比例加入 40% 甘油和 0.1% 溴酚蓝指示剂后分装,立即用于电泳分析或放入 -83℃ 超低温冰箱中保存备用。

1.2.2 电泳

采用不连续垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳法。分离胶浓度为 8.2%(pH 8.9),浓缩胶浓度为 3.6%(pH 6.7),电极缓冲液为 Tris-甘氨酸, TG, pH 8.3; 采用 DYY-2C 型稳压稳流电泳仪, DYCZ-24D 型垂直电泳槽; 电泳在 4℃ 冰箱中进行。TG 系统恒压 200 V, 电泳时间 2~3 h。实验所测酶类及缓冲系统见表 1, 同工酶的染色方法参考文献[5]。染色完毕后用 7.5% 冰醋酸溶液固定, 复日生物凝胶成像系统观察、拍照, 并对凝胶测量后按酶带迁移率手工记录。电泳酶谱分析参考文献[6]。

1.2.3 同工酶的命名

同工酶的命名以各酶带的相对迁移率(R_f)从小到大依次命名, 即从阴极向阳极运动的酶带开始依次命名为 1, 2, 3, …, $R_f = l/L$, l 为阴极端至各酶带中点的距离, L 为阴极端至指示剂终点的距离。

2 结果与分析

共检测了 16 种同工酶, 见表 1。其中异柠檬酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、酸性磷酸酶和 D-葡萄糖脱氢酶 4 种酶只在部分组织中显示微弱且不稳定的区带, 而其他酶类则在各组织中都显示出清晰稳定的酶谱。

2.1 乳酸脱氢酶(LDH, E.C.1.1.1.27)

鱼类的 LDH 由 A、B、C 3 个基因位点编码, C 位点仅在特异性组织中, 如肝、眼中存在^[7]。岱衢

表 1 岱衢族大黄鱼检测的酶类及其缓冲系统

酶名称	简称	编号	缓冲系统
乳酸脱氢酶	LDH	E.C.1.1.1.27	Tris-Gly
乙醇脱氢酶	ADH	E.C.1.1.1.1	Tris-Gly
苹果酸脱氢酶	MDH	E.C.1.1.1.37	Tris-Gly
苹果酸酶	ME	E.C.1.1.1.40	Tris-Gly
超氧化物歧化酶	SOD	E.C.1.15.1.1	Tris-Gly
过氧化物酶	POD	E.C.1.11.1.7	Tris-Gly
酯酶	EST	E.C.3.2.1.1	Tris-Gly
半乳糖脱氢酶	GAD	E.C.1.1.1.48	Tris-Gly
碱性磷酸酶	ALP	E.C.3.1.3.1	Tris-Gly
腺苷-5'-三磷酸酶	ATP	E.C.1.1.1.41	Tris-Gly
甲酸脱氢酶	FDH	E.C.1.2.1.2	Tris-Gly
琥珀酸脱氢酶	SCD	E.C.1.3.99.1	Tris-Gly
异柠檬酸脱氢酶	IDH	E.C.1.1.1.42	TC
谷氨酸脱氢酶	GDH	E.C.1.4.1.2	Tris-Gly
酸性磷酸酶	ACP	E.C.3.1.3.2	Tris-Gly
D-葡萄糖脱氢酶	GcDH	E.C.1.1.1.118	Tris-Gly

注: Tris-Gly 为 Tris-甘氨酸电极缓冲系统, pH 8.3; TC 为 Tris-柠檬酸电极缓冲系统, pH 7.0。

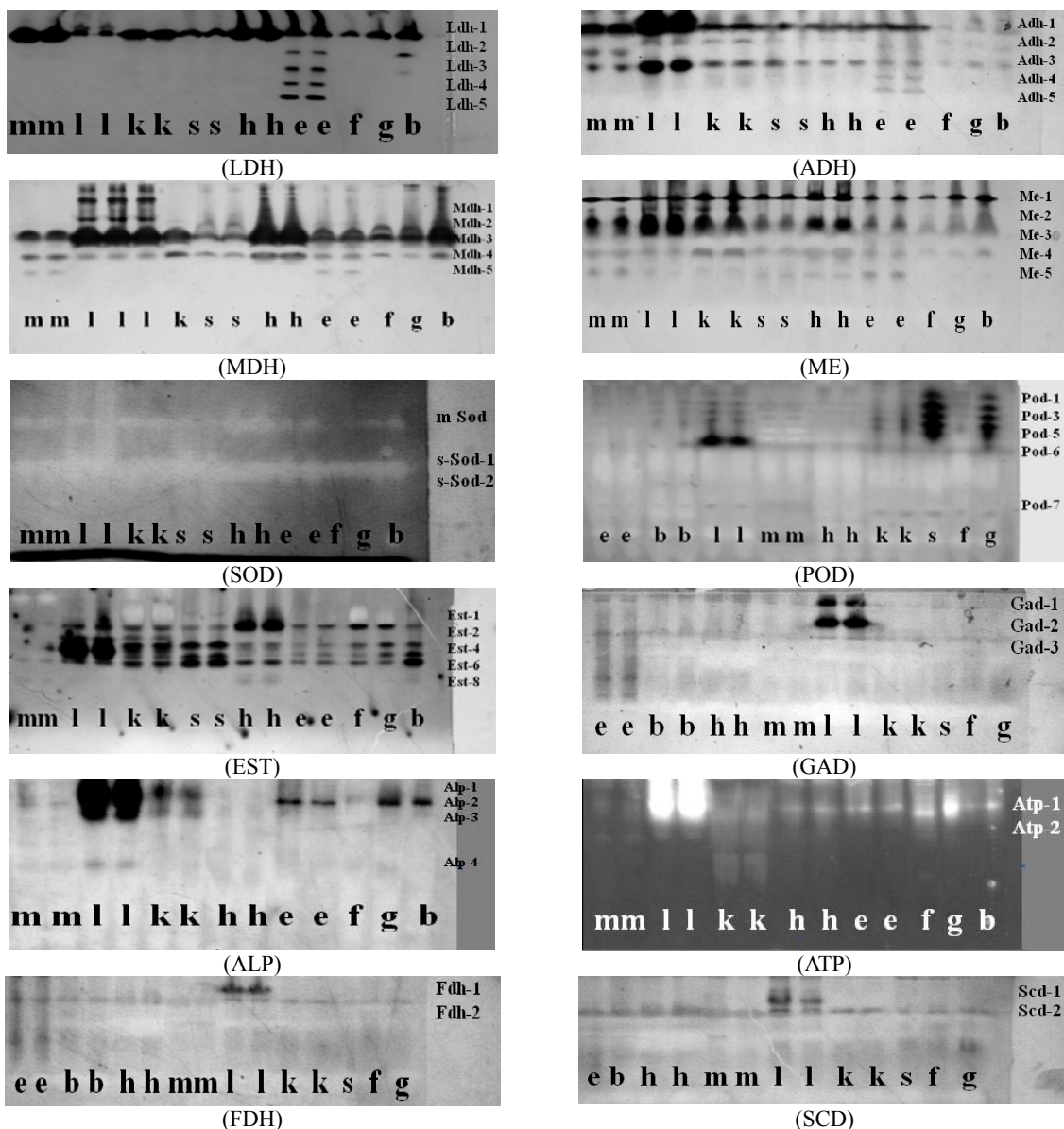
族大黄鱼的 LDH 存在明显的组织特异性, 除眼睛和脑组织外, 其他组织均只有 1 条酶带, 对应 A 位点; 眼睛 A、B 2 位点都存在, 其表达产物缔合成 5 种多肽聚合物, 对应 A₄、A₃B、A₂B₂、AB₃ 和 B₄ 5 条酶带; 脑表现为 3 条酶带, 未见 Ldh-4,5 表达。C 基因位点在本实验中未检测到。在酶活性上, 肌肉和心脏组织较强。

2.2 醇脱氢酶(ADH, E.C.1.1.1.1)

岱衢族大黄鱼的 ADH 存在 3~5 条酶带, Adh-1, 2, 3 在各组织中都存在, Adh-4, 5 仅在眼睛中表达。肝脏和肌肉中酶活性较强。

2.3 苹果酸脱氢酶(MDH, E.C.1.1.1.37)

硬骨鱼类的 MDH 由上清液型(s-MDH)和线粒体型(m-MDH) 2 种类型组成, 均是由 2 个基因位点编码的二聚体^[8], 岱衢族大黄鱼肝脏 MDH 2 种类型同工酶都表达, 分别表现为 2~3 条酶带。其余组织均表达 s-MDH, Mdh-5 仅在肌肉和眼睛中表达。在酶活性上, 肝脏、心脏、脑和肌肉组织较强。



m 为肌肉; l 为肝脏; k 为肾脏; s 为脾脏; h 为心脏; e 为眼睛; f 为鳍; g 为鳃; b 为脑

图 1 岱衢族大黄鱼不同组织的同工酶谱

2.4 苹果酸酶(ME, E.C.1.1.1.40)

岱衢族大黄鱼的ME存在 3~5 条酶带, 其中 Me-1,3,4 在各组织中都存在, 而Me-2 只存在于肌肉、肝脏和肾脏组织中, Me-5 在胸鳍、鳃和脑中都未见表达. 鱼类的ME为四聚体酶, 由 2 个基因位点编码^[7], 肌肉、肝脏和肾脏表现为典型的四聚体 5 条酶带.

2.5 超氧化物歧化酶(SOD, E.C.1.15.1.1)

岱衢族大黄鱼的 SOD 分为上清液型(s-SOD) 和线粒体型(m-SOD) 2 类, s-SOD 为二聚体, 由 2

个基因位点编码, 表达为 2 条靠得很近的酶带. 肝脏和脾脏中酶活性较强.

2.6 过氧化物酶(POD, 1.11.1.7)

岱衢族大黄鱼的 POD 表现出很强的组织特异性, 肌肉、眼睛和心脏组织均检测不到活性, 其他组织表达为 5~7 条酶带, 脾脏、肝脏和鳃活性最强, 染色很深.

2.7 酯酶(EST, E.C.3.2.1.1)

岱衢族大黄鱼的 EST 表型较复杂, 各组织有 4~7 条酶带, 其中 Est-2 仅存在于肝脏和肾脏中,

Est-7,8 仅在心脏和脑中微弱表达。眼睛、胸鳍、鳃和脑 4 种组织中未见 Est-4 酶带。从图 1 可见,肝脏酯酶活性很强,酶带之间靠得很近,相反,肌肉的 EST 表达活性很弱,几乎未见表达。

2.8 半乳糖脱氢酶(GAD, E.C.1.1.1.48)

岱衢族大黄鱼的 GAD 除肝脏表达为 3 条较强的酶带外,其他组织均只有 1 条酶带,活性较弱。

2.9 碱性磷酸酶(ALP, E.C.3.1.3.1)

岱衢族大黄鱼的 ALP 存在明显的组织特异性。肝脏表达活性最强,脾脏次之,心脏、胸鳍中未见活性区带,其他组织仅见 1 条酶带。

2.10 腺苷-5'-三磷酸酶(ATPase, E.C.1.1.1.41)

肌肉和肝脏组织表达为 2 条酶带,其他组织均只有 1 条酶带。在肝脏中, Atp-1 为超显性表达,活性很强。

2.11 甲酸脱氢酶(FDH, E.C.1.2.1.2)

岱衢族大黄鱼的 FDH 除肝脏表达为 2 条酶带外,其他组织均只存在 1 条酶带,且活性较弱。

2.12 琥珀酸脱氢酶(SCD, E.C.1.3.99.1)

岱衢族大黄鱼的 SCD 除肝脏表达为 2 条酶带外,其他各组织表达较一致,都为 1 条酶带,且迁移率相同,在表达活性上也没有显著差异。

3 讨论

从以上结果可以看出,在岱衢族大黄鱼的 9 种组织中具有相当丰富和完整的酶系统,它们不仅以同工酶的形式参与代谢和调节,而且在表型、分布和活性上均表现出高度的组织特异性。这些特异性使一种酶能在不同组织中担负不同的功能,协助各组织完成各自的代谢任务,使有机体成为既分工又统一的整体。

岱衢族大黄鱼的 EST 酶谱较复杂,在肝脏中活性最强,这是由于 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,包括某些药物,被认为与机体的解毒功能密切相关^[9,10]。肝脏是大黄鱼重要的消化器官,同时也是机体最重要的解毒器官,在岱衢族大黄鱼中,肝脏酯酶表达活性强与其消化、解毒的代谢活动旺盛有关。

SOD、POD 与机体的免疫机能密切相关,因而作为机体的保护酶系统而被广泛地研究^[11-13]。SOD 能清除体内过多的自由基,免除其对自身细胞的毒害^[14]。POD 利用 H₂O₂ 氧化供氢体,降解嘌呤、酚和胺等物质并减轻其毒性^[15]。在岱衢族大黄鱼肝脏和脾脏中,SOD 和 POD 两者活性都很强,提示在岱衢族大黄鱼体内清除自由基或减轻毒性的任务主要是由肝脏和脾脏等免疫器官来完成的。

LDH 参与糖酵解,在无氧条件下能将糖酵解产生的丙酮酸还原为乳酸,产能以维持机体的能量需要。ADH 也是参与糖酵解的重要酶类,可在缺氧条件下将三羧酸循环受阻产生的丙酮酸转化为乙醇,避免因丙酮酸的过量积累而使动物中毒死亡;同时在糖酵解过程中产生的能量也可以帮助生物体在缺氧的逆境条件下度过难关。MDH 和 ME 是三羧酸循环中 2 种重要的脱氢酶,两者的含量将直接影响糖有氧氧化反应的顺利进行。肌肉主要司职运动,需要大量分解糖类能量物质,因此,在岱衢族大黄鱼的肌肉中,与运动供能相关的 LDH、ADH、MDH、ME 的活性均较强;另外心脏含有大量的线粒体和良好的血液供应,因此它的代谢特别需要氧气和能量,表现在酶谱上相应的酶活性也较强。

ATP、ALP、SCD、GAD、FDH 5 种同工酶在肝脏中酶活性最强或酶谱最复杂,这与肝脏活跃的代谢功能是一致的。ACP、GcDH、GDH、IDH 4 种酶在岱衢族大黄鱼中的表达很弱或不稳定,这可能说明岱衢族大黄鱼体内这 4 种同工酶所控制的代谢活动的水平都较低或酶活性低而未能充分检出。

与以往研究的闽-粤东族大黄鱼酶谱相比较,除 ME 和 ADH 外,其他酶类的表达基本一致。ME 仅

在肌肉中观察到 1 条酶带,由 1 个位点编码^[2-4]. ADH仅在肝脏中检测到活性^[4],而在本研究中,岱衢族大黄鱼ME检测到 2 个位点 5 条酶带,ADH在 9 种组织中都有分布,这些差异的产生,究其原因,可能有 2 点:(1)实验方法的不尽相同,包括分离胶、浓缩胶浓度,电泳时间、染色方法等存在不同程度的差异.(2)样本不同,本研究中的岱衢族大黄鱼是从野生亲本选育而来的F₂代,在同工酶酶谱上存在与闽-粤东族大黄鱼相异的部分,也是可能的.

参考文献:

- [1] 陈卫忠. 东海区主要经济鱼类资源近况[J]. 海洋渔业, 1994, 16(4):163-167.
- [2] 全成干, 王军, 丁少雄, 等. 大黄鱼养殖群体遗传多样性的同工酶[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1999, 38(4):584-588.
- [3] 王军, 全成干, 苏永全, 等. 官井洋野生与养殖大黄鱼同工酶的研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(6):39-41.
- [4] 李星云, 张海琪, 竺俊全, 等. 象山港养殖大黄鱼同工酶的分析[J]. 海洋学报: 中文版, 2003, 25(增刊 2):231-236.
- [5] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985.
- [6] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [7] 姜建国, 熊全沫, 姚汝华. 青鱼不同组织中同工酶的表达模式[J]. 水生生物学报, 1997, 21(4):353-358.
- [8] 张庆朝, 王慧, 秦孜娟, 等. 泰山赤鳞鱼同工酶的研究[J]. 动物学研究, 1994, 5(2):62-67.
- [9] 李广丽, 朱春华. 罗氏沼虾个体发育早期的同工酶研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4):338-343.
- [10] 蔡完其. 罗氏沼虾莫格球拟酵母病的病理研究[J]. 水产学报, 1996, 20(1):13-17.
- [11] 黄福勇, 李星云. 鳊溪香鱼群体同工酶的生化遗传分析[J]. 水产学报, 2004, 28(5):579-584.
- [12] 王春琳, 母昌考, 丁爱侠, 等. 口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)同工酶的组织特异性及生化遗传分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(3):258-263.
- [13] 苏秀榕, 杨春, 黄晓春, 等. 两种海蜇毒素的分子标记研究[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(3):206-210.
- [14] Yu H H, Xiguang L R, Liu X S, et al. Radical scavenging activity of protein from tentacles of jellyfish *rhophilema esculentu*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005, 15:2 659-2 664.
- [15] 陈康. 动物细胞中过氧化物酶体的功能[J]. 生物学通报, 1995, 30(1):18-19.

Isozyme Patterns in Various Tissues of Dai-ju Stock *Pseudosciaena crocea*

GUAN Dan-dong, LI Ming-yun*, YE Shuai-dong

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In November, 2006, 30 Dai-ju Stock *Pseudosciaena crocea* samples were collected in Xiangshan bay, Zhejiang Province. Vertical polyacrylamide gel electrophoresis was used to investigate the expression of sixteen isozymes (LDH, ADH, MDH, ME, SOD, POD, EST, GAD, ALP, ATP, FDH, SCD, IDH, GDH, ACP, GcDH) in 9 tissues (eye, muscle, liver, kidney, spleen, heart, pectoral fin, gill and brain) of the samples. The result indicate that, except 4 isozymes showing weak and unsteady bands, the remaining isozymes reveal clear and steady bands in all the tissues of various kinds.

Key words: Dai-ju stock *Pseudosciaena crocea*; isozyme; tissue specific expression

CLC number: Q954.62; S965.322 **Document code:** A

(责任编辑 史小丽)