

# 河南省小鲵科两种动物酯酶、过氧化物酶 同工酶的比较研究<sup>\*</sup>

陈晓虹 王林嵩 瞿文元

(河南师范大学生命科学学院 新乡 453002)

**摘要** 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,对商城肥鲵和豫南小鲵 7 种组织的酯酶(EST)、过氧化物酶(POD)同工酶谱系进行研究。结果表明:小鲵科动物 EST、POD 存在较大的组织特异性,但没发现性别差异;商城肥鲵与豫南小鲵同一组织对应的有些 EST、POD 酶带的迁移率不同,同一组织中有些酶带的表达也不同。因而,同工酶的表达与组织功能相一致,其特征性酶带可作为分类和进化的依据。

**关键词** 同工酶 酯酶 过氧化物酶 商城肥鲵 豫南小鲵

中图分类号:Q554<sup>+</sup>.6 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2000)05-19-05

## Comparative Study on Esterase and Peroxidase Isozymes in Various Tissues from two Salamanders (Hynobiidae) in Henan Province

CHEN Xiao-Hong WANG Lin-Song QU Wen-Yuan

(College of Life Sciences, Henan Normal University Xinxiang 453002, China)

**Abstract**: Comparative study on the isozyme of Esterase and Peroxidase patterns in skin, muscle, spleen, stomach, intestine, liver, lung of *Pachyhynobius shangchengensis* and *Hyno-*

<sup>\*</sup> 河南省自然科学基金(No. 99180014),河南省动物学重点学科基金资助项目;

第一作者介绍:陈晓虹,女,35岁,讲师,硕士,研究方向:动物学;

收稿日期:1999-12-27,修回日期:2000-04-03

*bius yunanicus* was carried out to probe into their distribution by PAGE. The results showed that their EST and POD were tissue-specific and no difference in sex. There are differences in some bands and their Rfs of EST and POD in the counterparts tissues between two salamanders. Therefore, the expressions of isozymes was accorded with the functions of tissues, and then specific isozymes can be used as the taxonomic and evolutionary basis for animals.

**Key words** : *Pachyhynobius shangchengensis* ; *Hynobius yunanicus* ; EST ; POD ; Isozyme

商城肥鲵 (*Pachyhynobius shangchengensis*) 属于有尾目、小鲵科、肥鲵属,是分布区极狭窄的有尾类,仅大别山商城、金寨、霍山、英山有分布<sup>[1,2]</sup>。豫南小鲵 (*Hynobius yunanicus*) 属于有尾目、小鲵科、小鲵属,为一新种,目前仅在河南省商城县采集到。本研究的目的,一是研究小鲵科动物酯酶、过氧化物酶谱系和组织分布,从而探讨其分布规律及特点;二是比较商城肥鲵与豫南小鲵同一组织酶谱的差异,以图从功能上及基因表达特点上,为动物分类及进化提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 商城肥鲵成体 7 条(5 雌、2 雄),豫南小鲵成体 4 条(2 雌、2 雄),均采自河南省商城县黄柏山林场海拔 400~1 000 m 的山涧溪流回水凶中。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品制备** 实验前处死动物,解剖后取皮肤、肌肉、脾、胃、小肠、肝、肺 7 种组织,经 4℃ 0.65% NaCl 溶液洗净吸干水分后称重,在研钵中按 1:3(皮肤、肌肉),1:5(胃、肠、肝),1:10(脾、肺)分别加入 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)冰浴匀浆,4℃ 离心,10 000 r/min,20 分钟,取上清液-20℃ 保存备用。

**1.2.2 电泳** 参照 Laemmli 方法<sup>[3]</sup>。采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶浓度 3%(pH 6.8),分离胶浓度 9%(pH 8.9),胶板厚度 1 mm,共 20 槽,EST 加样量为 40~70  $\mu$ l,POD 加样量为 60~90  $\mu$ l,电极缓冲液为 Tris-Gly(pH 8.3)。电泳起始电压 100 V,指示剂移到分离胶后调至 200 V,4℃,恒压电泳 6 小时。

**1.2.3 染色** 电泳完毕后,参照胡能书等<sup>[4]</sup>方法进行同工酶染色。主要成分为酯酶染液:50 mg  $\alpha$ -乙酸萘酯+50 mg  $\beta$ -乙酸萘酯+50 mg 固兰 RR+100 ml 0.1 mol/L 磷酸缓冲液;过氧化物酶染液:10 ml 1.5 mol/L NaAc+10 ml 1.5 mol/L HAc+10 ml 联苯胺+70 ml 蒸馏水。胶板放入充分混匀后,加过氧化氢数滴。

**1.2.4 测相对迁移率** 对胶板拍照、扫描。

## 2 结果

**2.1 EST 同工酶酶谱** 商城肥鲵和豫南小鲵 7 种组织各个个体的 EST 分布见图 1、3、表 1 所示。

商城肥鲵 EST 有 4 带型(皮肤、脾),5 带型(胃、肠、肺),6 带型(肝),8 带型(肌肉)。豫南小鲵 EST 有 4 带型(脾、胃、肠、肺),5 带型(皮肤、肝),7 带型(肌肉)。两种动物 7 种组织都有 EST7、EST8、EST10 三条酶带。表达的个体较多,活性较强的酶带有 EST8、EST7、EST3。

**2.2 POD 同工酶酶谱** 商城肥鲵和豫南小鲵 7 种组织各个个体的 POD 酶谱见图 2、4、表 2。

商城肥鲵 POD 有 4 带型(皮肤、胃),5 带型(肌肉),6 带型(肠),7 带型(脾),8 带型(肺),9 带型(肝)。7 种组织都有 POD1、POD4、POD9 三条酶带,除皮肤外,其余 6 种组织有 POD3。豫南小鲵的 POD 有 5 带型(肌肉),6 带型(脾、胃、肠),7 带型(皮肤、肝、肺),7 种组织都有 POD1、POD3、POD4、POD9 四条酶带,除肌肉外,其余 6 组织有 POD7。

两种同工酶带中未发现与性别有关同工酶带。

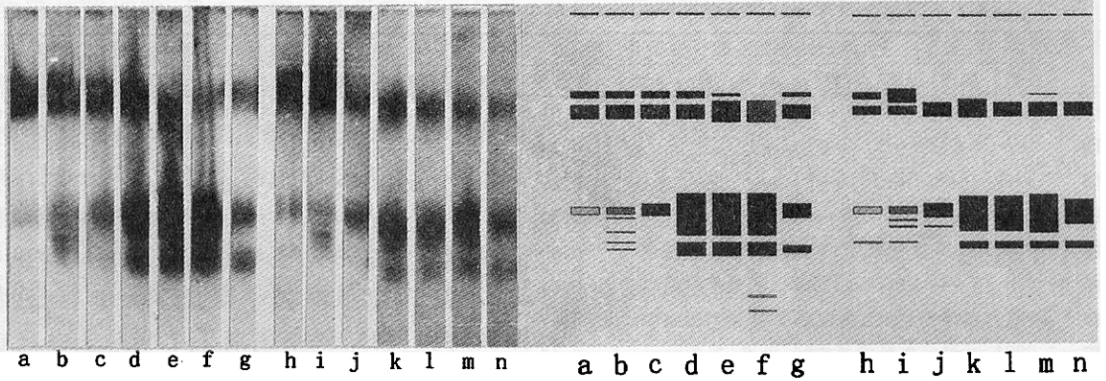


图1 商城肥鲢、豫南小鲃酯酶同工酶谱

商城肥鲢:a. 皮肤;b. 肌肉;c. 脾;d. 胃;e. 肠;f. 肝;g. 肺 豫南小鲃:h. 皮肤;i. 肌肉;j. 脾;k. 胃;l. 肠;m. 肝;n. 肺

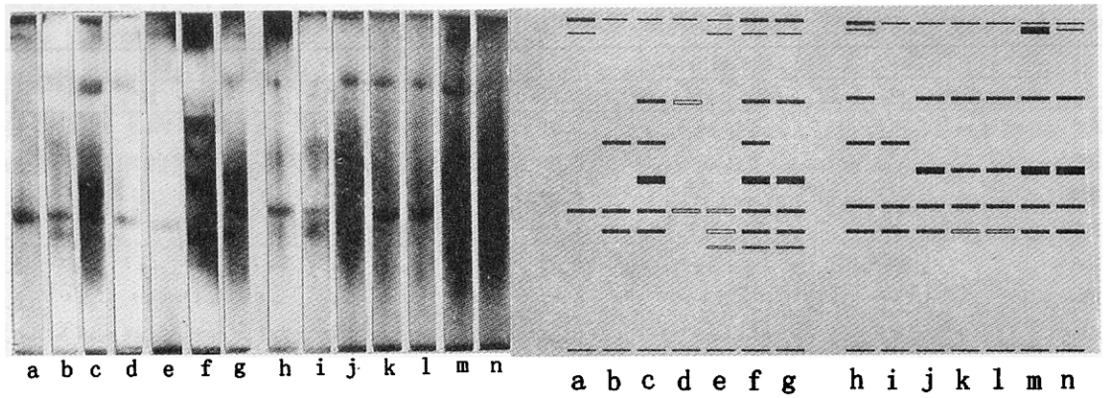


图2 商城肥鲢、豫南小鲃过氧化物酶同工酶谱

字母表示同图1注

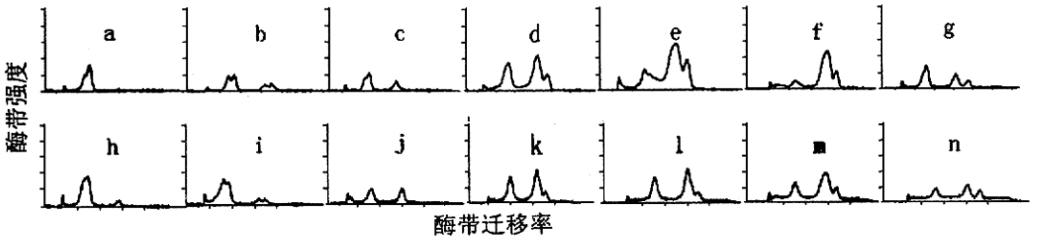


图3 商城肥鲢、豫南小鲃酯酶同工酶扫描图

字母表示同图1注

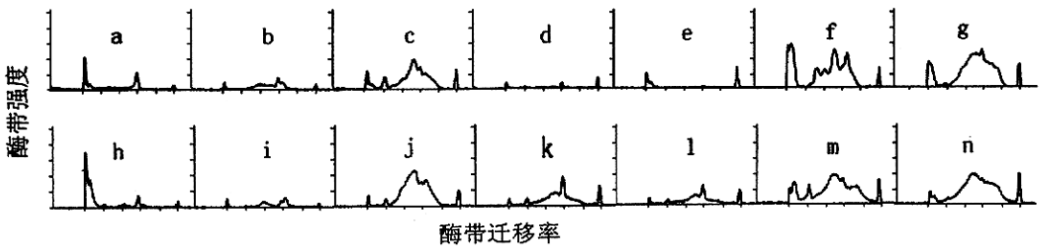


图4 商城肥鲢、豫南小鲃过氧化物酶同工酶扫描图

字母表示同图1注

表 1 商城肥鲵、豫南小鲵酯酶同工酶谱带

	商 城 肥 鲵							豫 南 小 鲵								
	皮肤 <sup>5</sup>	肌肉 <sup>7</sup>	脾 <sup>7</sup>	胃 <sup>7</sup>	肠 <sup>6</sup>	肝 <sup>7</sup>	肺 <sup>7</sup>	迁移率	皮肤 <sup>4</sup>	肌肉 <sup>4</sup>	脾 <sup>4</sup>	胃 <sup>4</sup>	肠 <sup>4</sup>	肝 <sup>4</sup>	肺 <sup>4</sup>	迁移率
EST10	+ <sup>3</sup>	+ <sup>5</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>6</sup>	+ <sup>1</sup>	0.01	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>1</sup>	0.02
EST9	+ <sup>3</sup>	+ <sup>7</sup>	+ <sup>6</sup>	++ <sup>7</sup>	+ <sup>3</sup>		+ <sup>6</sup>	0.24	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>				+ <sup>1</sup>		0.22
EST8	++ <sup>5</sup>	++ <sup>6</sup>	++ <sup>7</sup>	++ <sup>3</sup>	++ <sup>6</sup>	+ <sup>7</sup>	++ <sup>4</sup>	0.29	++ <sup>4</sup>	++ <sup>4</sup>	++ <sup>4</sup>	++ <sup>4</sup>	++ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	0.26
EST7	+ <sup>3</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>5</sup>	+++ <sup>5</sup>	+++ <sup>6</sup>	+++ <sup>7</sup>	+++ <sup>7</sup>	0.58	+ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	++ <sup>3</sup>	+++ <sup>4</sup>	+++ <sup>4</sup>	+++ <sup>4</sup>	+++ <sup>4</sup>	0.56
EST6		+ <sup>3</sup>						0.60		+ <sup>2</sup>						0.59
EST5		+ <sup>6</sup>						0.64		+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>					0.61
EST4		+ <sup>4</sup>						0.67								
EST3		+ <sup>3</sup>		++ <sup>6</sup>	++ <sup>6</sup>	++ <sup>7</sup>	++ <sup>7</sup>	0.69	+ <sup>2</sup>	+ <sup>3</sup>		++ <sup>3</sup>	++ <sup>4</sup>	++ <sup>3</sup>	++ <sup>3</sup>	0.68
EST2						+ <sup>7</sup>		0.83								
EST1						+ <sup>5</sup>		0.87								

表 2 商城肥鲵、豫南小鲵过氧化物酶同工酶谱带

	商 城 肥 鲵							豫 南 小 鲵								
	皮肤 <sup>6</sup>	肌肉 <sup>7</sup>	脾 <sup>7</sup>	胃 <sup>6</sup>	肠 <sup>7</sup>	肝 <sup>7</sup>	肺 <sup>7</sup>	迁移率	皮肤 <sup>4</sup>	肌肉 <sup>4</sup>	脾 <sup>4</sup>	胃 <sup>4</sup>	肠 <sup>4</sup>	肝 <sup>4</sup>	肺 <sup>4</sup>	迁移率
POD9	++ <sup>6</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>5</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>3</sup>	++ <sup>7</sup>	++ <sup>4</sup>	0.01	++ <sup>2</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>2</sup>	0.02
POD8	+ <sup>1</sup>				+ <sup>2</sup>	+ <sup>6</sup>	+ <sup>1</sup>	0.05	+ <sup>1</sup>					+ <sup>3</sup>	+ <sup>1</sup>	0.04
POD7			+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>		+ <sup>3</sup>	+ <sup>1</sup>	0.29	+ <sup>1</sup>		+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>1</sup>	0.28
POD6		+ <sup>1</sup>	+ <sup>3</sup>			+ <sup>3</sup>		0.37	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>						0.37
POD5			++ <sup>4</sup>			++ <sup>4</sup>	++ <sup>2</sup>	0.47			++ <sup>3</sup>	++ <sup>2</sup>	+ <sup>1</sup>	++ <sup>2</sup>	++ <sup>3</sup>	0.45
POD4	+ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>5</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>6</sup>	+ <sup>5</sup>	0.57	+ <sup>3</sup>	+ <sup>2</sup>	++ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>3</sup>	0.56
POD3		+ <sup>4</sup>	+ <sup>3</sup>		+ <sup>4</sup>	++ <sup>6</sup>	+ <sup>2</sup>	0.63	+ <sup>3</sup>	+ <sup>1</sup>	++ <sup>3</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>4</sup>	++ <sup>4</sup>	++ <sup>3</sup>	0.63
POD2					+ <sup>2</sup>	+ <sup>5</sup>	+ <sup>3</sup>	0.68								
POD1	+ <sup>6</sup>	+ <sup>7</sup>	+ <sup>7</sup>	+ <sup>6</sup>	+ <sup>6</sup>	+ <sup>7</sup>	+ <sup>7</sup>	0.98	+ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	++ <sup>4</sup>	++ <sup>4</sup>	0.98

表 1、2 中 酶带从上到下为从负极到正极。+++ 表示染色深的酶带；++ 表示染色较深的酶带；+ 表示染色浅的酶带，无符号表示无酶带。右上标数字表示表达该酶带的个体数。

### 3 讨 论

**3.1 EST 同工酶** 实验结果显示,在所研究的小鲵科动物中,EST 在肝、肠、胃中占优势,表现为多型性,活性高。说明在这些组织中 EST 的基因是高表达、多型性,由于酯酶是单链或异二聚体蛋白体,在代谢中可能有转酯作用,水解大量非生理存在的酯类化合物<sup>[4]</sup>,而胃肠是脊椎动物的消化器官,肝脏除了作为消化腺参与食物的消化吸收外,是体内最大的毒物清除器官。因此,活跃的脂类代谢使 EST 在这些组织中呈现高表达、多型性。与之相比,皮肤、肌肉、肺、脾中 EST 的表达较弱,也恰与 EST 功能相适应。

实验中发现,小鲵科动物的 EST 存在较大的组织特异性,有些酶带在所有组织中表达

(EST7、EST8、EST10),有些酶带仅在不同组织中表达。POD 酶带也存在同样现象。EST8、EST9 在同种内,有的个体同时表达,有的个体仅表达 EST8,有的则表达 EST9,这两条带可能由等位基因控制,Yamamoto 在对鲫鱼 EST 同工酶的研究中也发现,ESTA、ESTB、ESTC 酶带分别由等位基因 A 和 a、B 和 b、C 和 c 控制<sup>[5]</sup>。因此,这些共同表达的酶带有可能是其基础水平表达的酶带,而差异性表达酶带则是诱导表达所致,其特征性酶带可作为分类与进化的依据。哪些是特征性酶带,尚待进一步研究。同时未发现与性别有关的同工酶带,表明性激素可能与其表达无关。

**3.2 POD 同工酶** POD 存在于细胞的过氧化物体内,其主要功能是清除氨基酸分解代谢及糖醛酸合成代谢等过程中形成的过氧化物。动

物的甲状腺细胞、具有吞噬功能的白细胞等含有丰富的过氧化物酶,因此在血流丰富、白细胞及吞噬细胞含量较多的肝、肺、脾中 POD 同工酶的表达较强,而在皮肤、肌肉、胃、肠中表达较弱,进一步说明同工酶的表达和活性与组织功能相一致。

POD4、POD5、POD7、POD8 在商城肥鲵组织的迁移率大于豫南小鲵相对应的组织,仅 POD9 的迁移率小于豫南小鲵,表明商城肥鲵与豫南小鲵的同一型 POD 同工酶之间荷质比存在差异,在相同条件下,电泳迁移率与所分离物质的荷质比有关,说明两种动物的同工酶有可能在一级结构上存在差异。EST 同工酶在两种动物对应组织的迁移率也存在差异。不同种动物在同工酶酶带的带型表达没有差异时,其电泳迁移率的差异是否可做为分类的依据之一,尚待探讨。

致谢 河南师范大学徐存拴先生对本研究给予大力支持,牛红星、吕九全、河南省商城县黄柏山林场及陈中如等协助采集标本,在此一并致谢。

### 参 考 文 献

- [1] 叶昌媛,费梁,胡淑琴.中国珍稀及经济两栖动物.成都:四川科学技术出版社,1993.1~412.
- [2] 中国野生动物保护协会主编,费梁执行主编.中国两栖动物图鉴.郑州:河南科学技术出版社,1999.1~432.
- [3] Laemmli, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680~685.
- [4] 胡能书,万贤国.同工酶技术及其应用.长沙:湖南科学出版社,1985.
- [5] Yamamoto Shinya, Takeharu Takase, Minoru Ikeda *et al.* Linked loci with a null allele for liver ESTerase in crucian carp. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 1998, 48(3~4): 93~101.