

# 三疣梭子蟹不同组织同工酶的分析

余红卫<sup>①</sup> 朱冬发<sup>①</sup> 韩宝芹<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; <sup>②</sup> 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

**摘要:** 采用垂直板状聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 分析了三疣梭子蟹(*Portunus triuberbuculatus*) 雌性成体心脏、鳃、肌肉、眼睛、肝胰腺和卵巢 6 种组织中的 10 种同工酶(ADH、MDH、ME、LDH、 $\alpha$ -AMY、GDH、SOD、SDH、EST 和 GOT) 的分化表达模式, 并对各种酶的同工酶位点表达及酶谱表型进行了分析。结果显示, 三疣梭子蟹的同工酶系统具有明显的组织特异性。

**关键词:** 三疣梭子蟹, 同工酶, 组织特异性

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2005)01-84-04

## The Isozymes in Different Tissues of *Portunus triuberbuculatus*

YU Hong-Wei<sup>①</sup> ZHU Dong-Fa<sup>①</sup> HAN Bao-Qin<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211;

<sup>②</sup> College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Using the technology of vertical polyacrylamide gel electrophoresis, ten isozymes (ADH, MDH, ME, LDH,  $\alpha$ -AMY, GDH, SOD, SDH, EST and GOT) from six different tissues of adult female *Portunus triuberbuculatus* were studied. The loci and phenotypes of the isozymes were also analyzed. The results showed that all isozymes were tissue specific.

**Key words:** *Portunus triuberbuculatus*, isozyme, tissue specificity

三疣梭子蟹(*Portunus triuberbuculatus*) 是一种重要的海洋经济动物, 隶属甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)梭子蟹科(Portunidae), 分布于中国、朝鲜、日本等海域<sup>[1,2]</sup>。由于三疣梭子蟹具有独特的经济价值, 因此自 20 世纪 50 年代起国内学者就在三疣梭子蟹的生长发育和组织学等方面做了许多工作<sup>[3-6]</sup>, 但是有关三疣梭子蟹种群的生化遗传学和种质资源的研究尚未见报道。因此, 本文在这方面做了一些初步的研究, 对三疣梭子蟹同工酶的组织特异性进行了分析, 以期在三疣梭子蟹的人工繁殖和资源保护提供基础材料, 现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料来源及样品制备** 实验所用三疣梭子蟹于 2004 年 2~4 月分 5 次购自宁波大世界水产市场, 共计 35 只, 头胸甲平均长为 7.42 cm, 宽为 16.37 cm, 平均体重 212.85 g, 均为雌性, 健康。梭子蟹活体带回实验室, 立即在冰块上解剖, 取心脏、鳃、眼睛(包括眼柄)肌

肉、肝胰腺和卵巢 6 种组织, 放入标记的 eppendorf 管中, -40℃ 保存备用。分析时以 1:3(g/ml) 的比例(肌肉为 1:5)加入 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)(其中含 0.6% 巯基乙醇), 电动玻璃匀浆器冰浴匀浆, 4℃ 15 000 r/min 离心 20 min(肝胰腺和卵巢离心 2 次), 取上清液, 按 1:1 体积比例加入 40% 的甘油, 置 -40℃ 保存以供分析。

**1.2 方法** 采用垂直板高不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 分离胶浓度为 7.5%, pH 8.9, 浓缩胶浓度为 4%, pH 6.8, 电极缓冲系统为 Tris-Gly(pH 8.3), 200 V 恒压 4℃ 电泳 3~4 h。染色方法参照季维智<sup>[7]</sup>、吴鹤龄<sup>[8]</sup>、

基金项目 浙江省高校青年教师资助计划项目;

第一作者介绍 余红卫, 男, 研究方向: 生化和发育遗传学, E-mail: yuhongwei@nbu.edu.cn 现为中国海洋大学在职研究生。

收稿日期: 2004-08-09, 修回日期: 2004-10-29

Shaw<sup>[9]</sup> 酶谱分析和命名参见熊全沐<sup>[10,11]</sup>,染色后立即用 AlphaImager™ 2200 凝胶成像系统拍照。

## 2 结 果

实验共测定了苹果酸脱氢酶(MDH)、苹果酸酶(ME)、乙醇脱氢酶(ADH)、乳酸脱氢酶(LDH)、山梨醇脱氢酶(SDH)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、谷草转氨酶(GOT)、 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -AMY)、酯酶(EST)和超氧化物歧化酶(SOD) 10 种同工酶,记录 23 个基因座位。

**2.1 苹果酸脱氢酶(MDH) (E.C.1.1.1.37)** 三疣梭子蟹的 MDH 为二聚体酶,而且存在线粒体型(m-Mdh)和上清液型(s-Mdh)两种类型。s-Mdh 只在鳃中表达,表现为 aa、ab 和 bb 三条酶带,且存在个体差异。m-Mdh 在肌肉、心脏、眼睛、鳃和卵巢中均表现为 ab 和 bb 二条酶带,而在肝胰腺中只表现为 ab 一条带,而且个体间有差异(图版 I:1)。

**2.2 苹果酸酶(ME) (E.C.1.1.1.40)** 从电泳结果分析,三疣梭子蟹的 ME 同工酶可能为四聚体,由 Me-1、Me-2 和 Me-3 3 个基因座位编码,其中 Me-1 在肝胰腺中不表达,Me-3 表达的组织特异性明显(图版 I:2)。

**2.3 乙醇脱氢酶(ADH) (E.C.1.1.1.1)** 为二聚体酶,由 2 个基因座位编码。Adh-1 只在心脏、肌肉和肝胰腺中表达,表现为 aa 一条带。Adh-2 也表现为 aa 一条带,在分析的 6 种组织中均表达,但肝胰腺和卵巢中的活性较强(图版 I:3)。

**2.4 谷草转氨酶(GOT) (E.C.2.6.1.1)** 可能为二聚体酶,由 2 个基因座位编码。在心脏和肌肉中,Got-1 和 Got-2 都表达,各自表现为 aa 一条酶带。在鳃、眼睛和肝胰腺中只有 Got-2aa 一条酶带表达。卵巢中的 GOT 酶活性非常弱,不易检测到(图版 I:4)。

**2.5 乳酸脱氢酶(LDH) (E.C.1.1.1.27)** 实验结果显示三疣梭子蟹 LDH 同工酶由 2 个基因座位编码,亚基之间不形成杂聚体。在所测的 6 种组织中,心脏和肌肉中检测到 2 条酶带,分别为 Ldh a<sub>1</sub> 和 Ldh b<sub>1</sub>,Ldh b<sub>1</sub> 活性非常强而 Ldh a<sub>1</sub> 的活性则很弱。鳃、眼和卵巢中只有 Ldh b<sub>1</sub> 一条酶带。卵巢中的 LDH 活性较弱。肝胰腺中没有 LDH 酶活性(图版 I:5)。

**2.6 酯酶(EST) (E.C.3.1.1.1)** 电泳分析推测三疣梭子蟹的 EST 同工酶为单体酶,组织特异性明显。所测 6 种组织中,肝胰腺和卵巢组织中的酯酶活性较强且酶带数较多。肝胰腺组织中有 Est-1a、Est-3a、Est-3b 和 Est-4a 四条酶带,Est-1a 活性较弱。卵巢中有 Est-2a、Est-3a 和 Est-4a 三条酶带,Est-2a 活性弱。肌肉和眼睛中都有 Est-3b 和 Est-4a 二条酶带。心脏组织中的酯酶只有 Est-

3b 一条酶带。鳃中的 EST 由 2 个基因座位编码,表现为 Est-3a 和 Est-4a 二条酶带(图版 I:6)。

**2.7 山梨醇脱氢酶(SDH) (E.C.1.1.1.14)** 可能为单聚体酶,由 1 个基因座位编码,在所分析的 6 种组织中都只有 Sdh-a 一条酶带,肝胰腺中 SDH 的活性最强(图版 I:7)。

**2.8 谷氨酸脱氢酶(GDH) (E.C.1.4.1.2)** 三疣梭子蟹的 GDH 同工酶可能为单体酶,由 1 个基因座位编码。在分析的组织中只在肌肉和心脏中表达,且心脏组织中的 GDH 活性很弱(图版 I:8)。

**2.9 超氧化物歧化酶(SOD) (E.C.1.15.1.1)** 为二聚体酶,由 3 个基因座位编码,可分为线粒体型和上清型两种形式。m-Sod 只在眼睛中表达,表现为 m-Sod aa 一条酶带,且活性较弱。s-Sod 在 6 种组织中均有表达,但在肝胰腺中只表现为 s-Sod 1aa 一条酶带,而在其他组织中则有 s-Sod 1aa 和 s-Sod 2aa 两条带。心脏和卵巢中的 SOD 酶活性较强(图版 I:9)。

**2.10  $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -AMY) (E.C.3.1.1.1)** 6 种组织中仅在肝胰腺和卵巢中表达。根据结果分析  $\alpha$ -AMY 为二聚体酶,由 3 个基因座位编码。肝胰腺组织中的  $\alpha$ -AMY 由 3 个基因座位编码,其中 Amy-1 和 Amy-2 各有 aa、ab 和 bb 三条酶带,Amy-2 活性强。Amy-3 只表现为 aa 一条酶带。卵巢中的  $\alpha$ -AMY 只表现为 Amy-2ab 一条酶带(图版 I:10)。

## 3 讨 论

**3.1 三疣梭子蟹同工酶表达的组织特异性** 结果显示,三疣梭子蟹具有比较完善的同工酶系统,并且同工酶系统有着广泛的组织分布。在所分析的 6 种组织中,心脏、肌肉含有除  $\alpha$ -淀粉酶外的其余 9 种同工酶,肝胰腺中含有除乳酸脱氢酶外的其余 9 种酶,鳃、眼睛和卵巢中也具有完善的同工酶系统。同时,三疣梭子蟹同工酶的分布和活性强弱具有明显的组织特异性。例如  $\alpha$ -淀粉酶只在肝胰腺和卵巢中表达,谷氨酸脱氢酶只在心脏和肌肉中表达,s-MDH 只在鳃中表达,m-SOD 只在眼睛中表达。SDH 虽然在 6 种组织中的表达相同,但酶活性有差异,肝胰腺中的 SDH 活性较强。同工酶的组织特异性不仅反映了不同组织不同的生理功能,而且表明基因在表达时具有空间性。

**3.2 乳酸脱氢酶在三疣梭子蟹及其他蟹类组织中的表达差异** 乳酸脱氢酶是糖代谢途径的关键酶之一,能催化乳酸和丙酮酸相互转化,从而完成葡萄糖的无氧酵解过程。一般认为在脊椎动物中,LDH 同工酶为四聚体,由 A、B 两个亚基随机组合成 5 种 LDH 同工酶。

但 LDH 在无脊椎动物组织中的表达则有较大的差异。张洁等<sup>[12]</sup>研究发现,中华绒螯蟹的 LDH 同工酶 A、B 亚基之间不形成杂聚体,各组织中主要含有电泳迁移率慢的 LDH 酶带,而迁移率快的 LDH 含量低、活性弱。王桂忠等<sup>[13]</sup>也指出,在锯缘青蟹的肌肉和肝胰腺中主要含电泳迁移率慢的 LDH 同工酶。本文的研究结果显示,在三疣梭子蟹的肌肉、眼睛、鳃和心脏中也主要含有电泳迁移率慢的 Ldh b<sub>4</sub> 同工酶,迁移率快的 Ldh a<sub>4</sub> 同工酶只在心脏和肌肉中表达,且活性很弱。在三疣梭子蟹肝胰腺中没有检测到 LDH 活性,此结果与王丹等<sup>[14]</sup>的研究结果一致,而张洁和王桂忠等则分别在中华绒螯蟹和锯缘青蟹的肝胰腺中检测到了电泳迁移率慢的 Ldh b<sub>4</sub> 同工酶活性。崔晋龙<sup>[15]</sup>的研究结果显示,在中华绒螯蟹和长江华溪蟹的肝胰腺中都检测到 4 种不同的 LDH 同工酶。造成以上差异的原因除了物种不同的因素外,实验条件和操作的差异也是造成研究结果不同的重要因素。

### 3.3 三疣梭子蟹卵巢组织中的同工酶表达及生理意义

在同工酶的研究中,学者们一般以肌肉、鳃、心脏、肝脏和眼睛等组织作为研究对象,对生殖腺同工酶系统的研究鲜有报道。Jeyalectumie 等<sup>[16]</sup>曾对野外蟹(*Paratelphusa hydrodromous*)生殖组织 LDH 同工酶的活性和生化组成进行了研究。潘伟槐等<sup>[17]</sup>对日本沼虾生殖腺中的 LDH、EST 和 SOD 同工酶做过分析。本实验对三疣梭子蟹卵巢组织的同工酶分化表达模式作了较为详细地研究。结果显示,三疣梭子蟹卵巢组织具有比较完善地同工酶系统。在所研究的 10 种同工酶中,除了 GDH 外,其他 9 种同工酶在卵巢组织中都有表达,其中 ADH、MDH、SOD、ME 和 EST 同工酶的活性较强。MDH 是三羧酸循环中重要的脱氢酶之一,能把苹果酸转化为草酰乙酸;EST 是催化酯类化合物水解的酶系,在酯类代谢和生物膜的结构方面有着重要作用,SOD 酶是一种重要的防御酶,能清除生物体内的有害超氧自由基,维持有机体正常的生理功能。潘伟槐等的研究结果显示,日本沼虾繁殖期生殖腺的 SOD 酶活性明显增加,其中雌性生殖腺更加明显。本文的研究结果也显示,SOD 在三疣梭子蟹卵巢中的活性很强。卵巢是重要的生殖组织,是生殖细胞发生和发育的场所,完善的同工酶系统是和卵巢的重要生理功能相适应的,预示着卵巢中有着旺盛

的代谢活动。此研究结果可为进一步研究三疣梭子蟹胚胎和幼体发育过程中同工酶表达的变化提供依据。

## 参 考 文 献

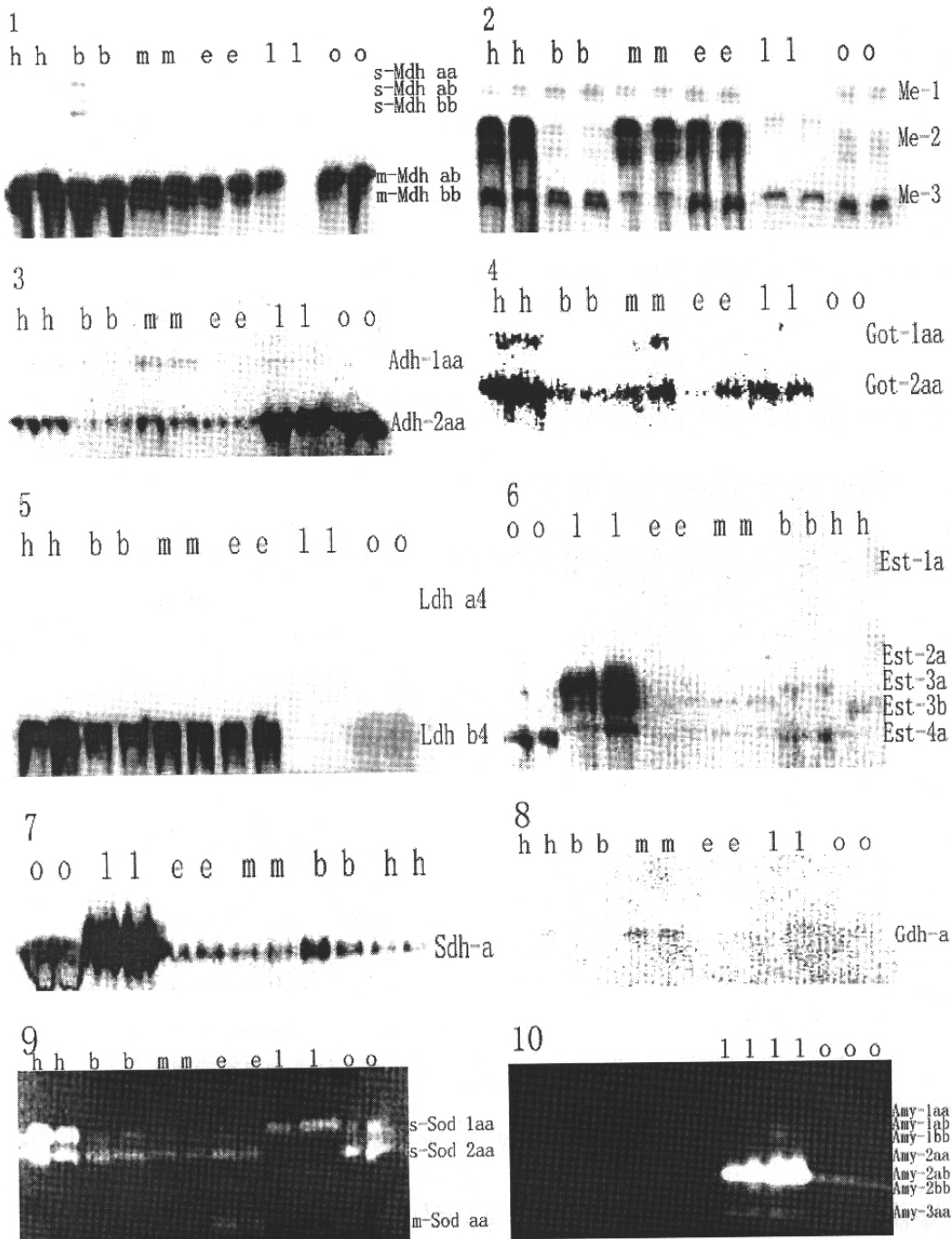
- [1] 戴爱云等. 三疣梭子蟹渔业生物学的初步调查. 动物学杂志, 1977 (2) 30 ~ 33.
- [2] 戴爱云等. 中国海洋蟹类. 北京: 海洋出版社, 1986.
- [3] 孙颖民等. 三疣梭子蟹生长的初步研究. 生态学报, 1984 (1) 57 ~ 64.
- [4] 孙颖民等. 三疣梭子蟹幼体发育. 水产学报, 1984 (3): 219 ~ 226.
- [5] 李太武等. 三疣梭子蟹精子的发生及超微结构的研究. 动物学报, 1995 (1) 41 ~ 47.
- [6] 李太武. 三疣梭子蟹肝脏的结构研究. 海洋与湖沼, 1996 (5) 471 ~ 477.
- [7] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999, 71 ~ 93.
- [8] 吴鹤龄等. 遗传学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1983, 272 ~ 275.
- [9] Shaw R, Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes a compilation of recipes. *Biochem Genet*, 1970 (4) 297 ~ 320.
- [10] 熊全沫. 鱼类同工酶谱分析. 遗传, 1992 (2) 41 ~ 44.
- [11] 熊全沫. 鱼类同工酶谱分析. 遗传, 1992 (3) 47 ~ 48.
- [12] 张洁, 陈立桥, 周忠良等. 中华绒螯蟹同工酶发育遗传学研究. 华东师范大学学报(自然科学版), 1996 (动物学专辑) 38 ~ 42.
- [13] 王桂忠, 李少菁. 锯缘青蟹个体发育过程中同工酶谱的比较研究. 海洋学报, 1991 (3) 412 ~ 416.
- [14] 王丹, 于伟君. 辽河长江两水系中华绒螯蟹酯酶和乳酸脱氢酶的同工酶比较研究. 辽宁大学学报, 1995 (4) 79 ~ 81.
- [15] 崔晋龙. 两种蟹的三种 LDH 同工酶的分析比较. 华北工学院学报, 2002 (5) 361 ~ 364.
- [16] C. Jeyalectumie, T. Subramoniam. Biochemical composition of seminal secretions with special reference to LDH activity in the reproductive tissues of the Field Crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Experimental Biology*, 1987 (46) 231 ~ 236.
- [17] 潘伟槐, 祝尧荣, 黄文光等. 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)成体组织三种同工酶的研究. 绍兴文理学院学报, 2001 (4) 43 ~ 46.

余红卫等 :三疣梭子蟹不同组织同工酶的分析

图版 I

YU Hong-Wei *et al.* :The Isozymes in Different Tissues of *Portunus triuberbuculatus*

Plate I



三疣梭子蟹同工酶的电泳图谱( 图片上方为正极 ,下方为负极 )

h 心脏 ; b 鳃 ; m 肌肉 ; e 眼睛 ; l 肝脏 ; o 卵巢