

云南高背鲫鱼不同组织同工酶分析

余 敏^① 杨正荣^② 曾 琳^{①**} 王黎青^② 范 伟^② 赖建华^① 谭德勇^{①*}

(^①云南大学生命科学学院 生物化学与分子生物学实验室 昆明 650091 ;^②云南省水产技术推广站 昆明 650034)

摘要 :采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 ,分析了滇池中云南高背鲫鱼(*Carassius auratus*)的脑、眼睛、肝脏、心脏、肌肉 5 种组织中的酯酶(EST)、超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH) 3 种同工酶的表达模式 ,并对各种酶的同工酶谱表型进行了分析。结果表明 ,云南高背鲫鱼的同工酶系统具有明显的组织特异性 ,且同工酶的种类与活性变化与其功能相适应。

关键词 :云南高背鲫鱼 ;同工酶 ;组织特异性

中图分类号 :Q955 **文献标识码 :**A **文章编号 :**0250-3263(2006)06-97-07

The Isozymes in Different Tissues of *Carassius auratus* from Yunnan Province

YU Min^① YANG Zheng-Rong^② ZENG Lin^① WANG Li-Qing^②
FAN Wei^② LAI Jian-Hua^① TAN De-Yong^①

(^①The Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology , School of Life Science , Yunnan University , Kunming 650091 ;

^②Station for Fishery Technology Application of Yunnan Province , Kunming 650034 , China)

Abstract :The EST ,SOD and LDH isozymes in five tissues(brain , eye , liver , heart and muscle) of *Carassius auratus* from Dianchi Waters were analyzed by using polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that the electrophoretograms of EST ,SOD and LDH isozymes had different patterns in different tissues. The isozymes and their activity changes are consistent with physiological functions.

Key words :*Carassius auratus* ;Isozymes ;Tissue specificity

鲫鱼(*Carassius auratus*)属硬骨鱼纲、鲤形目、鲤科、鲫属。云南高背鲫鱼又叫滇池高背鲫鱼 ,是滇池及其附属水体中鲫鱼的一种特有品种。体形及体色与普通鲫鱼相似 ,但身体比普通鲫鱼显著地高且宽 ,生长速度较普通鲫鱼快一倍 ,适应能力强 ,加之行雌核发育 ,能大量补充群体资源 ,保证了资源的稳定性 ,因而在滇池的经济鱼类中占重要地位^[1~3]。20 世纪 80 年代以来 ,已有研究者利用同工酶技术对云南高背鲫鱼在发育遗传学、种群遗传学、个体多态性方面进行了研究。其中蒋晓华等对云南滇池高背鲫鱼胚胎发育过程中酯酶(EST)和乳酸脱氢酶(LDH)的同工酶进行了分析 ,研究发现在胚胎的不同发育时期 ,LDH 和 EST 均持续表达 ,

从心搏期到肝形成期 ,LDH 新酶带逐渐增加 ,从血液循环期起到肝形成期 ,EST 酶也有新带增加。表明随着组织器官的结构和功能的分化 ,胚胎细胞核中相应基因开始表达 ,使得新酶带增多^[1,2]。黄生民等报道了云南高背鲫鱼(*Carassius auratus*)和方正银鲫(*C. a. gibelio*)酯酶、乳酸脱氢酶的比较 ,分析表明方正鲫鱼与

基金项目 农业部云南高背鲫原种场建设项目(农计函[2001]17 号) ,云南省农业厅、发改委项目(云农计联字[2001]33 号) ;

* 通讯作者 , E-mail :dytan@ynu.edu.cn ;

** 曾琳 现为中国科学院昆明动物研究所硕士研究生。

第一作者介绍 余敏 ,女 ,讲师 ,硕士 ;研究方向 :生物化学与分子生物学 ;E-mail :yumin-11@sina.com。

收稿日期 2006-03-20 ,修回日期 2006-07-09

滇池高背鲫鱼同一组织的 LDH 同工酶有明显差异,两种鱼的肝脏、脑、卵的 EST 同工酶也有明显差异,揭示方正鲫鱼与滇池高背鲫鱼至少在生化水平上已有明显分化。可能起源于不同地区,由不同祖先独立演化而成^[4]。云南高背鲫鱼作为重要的淡水经济鱼类,对其生理、生化特征的进一步研究,对其品种的鉴定、新品种的培育、养殖技术的发展等生产技术的建立有重要意义,但至今对其研究报道甚少。本研究采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对云南高背鲫鱼不同组织部位(脑、眼睛、心脏、肝脏、肌肉)的酯酶(EST)、超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH)的同工酶进行了比较分析,初步确定这3种酶在云南高背鲫鱼不同组织中的表达特征,旨在了解高背鲫鱼的生物化学遗传特征以及与其生理功能的关系,为云南高背鲫鱼的种质资源保护提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料 取滇池水体中正常发育的云南高背鲫鱼 10 尾,由云南省水产技术推广站提供。

体重为 150~200 g 均经过形态学鉴定。

1.2 样本制备 活体解剖取出脑、眼球、心脏、肝脏及肌肉。以 0.3% NAD(辅酶 II)液为提取液,冰上研磨样本,0℃,10 000 r/min 离心 20 min,取上清。肝以 1:4(w/v)加入 0.3% NAD 液,10 000 r/min 离心 10 min,去除上层油膜后,10 000 r/min 离心 10 min,至上层溶液澄清为止。其他以 1:3 比例加入 0.3% NAD 液,10 000 r/min 离心 10 min 取上清液。整个过程均在 -4℃ 下完成。酶提取液以 5:1(v/v)加入溴酚兰,混匀后备用。每个泳道孔上样 10 μl(约 10 μg)。

1.3 电泳 采用聚丙烯酰胺非变性不连续电泳,浓缩胶浓度为 5%,pH 6.8,酯酶和超氧化物歧化酶分离胶浓度为 12%,乳酸脱氢酶分离胶浓度为 10%,pH 8.9,电极缓冲系统为 Tris-Gly(pH 8.3),相关试剂配方参见《分子克隆》^[5]。

1.4 同工酶染色 电泳结束后,剥胶,将胶转入 37℃ 预热的染色液中于 37℃ 恒温箱中恒温染色,染色至所有酶带清晰显示为止。染色液配方见表 1。

表 1 同工酶染色液配方

Table 1 The recipe of dyestuff for isozyme staining

同工酶	染色缓冲液	NAD(mg)	NBT(ml)	PMS(mg)	其他药品
EST	0.1 mol/L 磷酸缓冲液 150 ml				α-醋酸萘酯 20 mg, β-醋酸萘酯 20 mg, 坚牢蓝 100 mg, 丙酮 1 ml
SOD	0.5 mol/L Tris-HCl, pH 9.5, 118 ml		31.5	31.5	
LDH	1.5 mol/L Tris-HCl, pH 9.5, 15 ml	30	30	10.5	1 mol/L 乳酸钠 10 ml, 蒸馏水 95 ml

Tris-HCl(1.5 mol/L Tris): Tris 181.71 g + 蒸馏水 900 ml; 用 HCl 调节 pH 至 9.5 稀释至 1 000 ml。乳酸钠(1 mol/L) 乳酸 203.76 ml + 蒸馏水 700 ml; 用 50% NaOH 调节 pH 至 7.0 稀释至 1 000 ml。磷酸缓冲液(0.1 mol/L): NaH₂PO₄·2H₂O 51.6 g + Na₂HPO₄ 14.2 g 稀释至 1 000 ml。1 g/ml 氯化硝基四氮唑蓝(NBT): 100 g NBT 溶于 100 ml 蒸馏水。

1.5 脱色 LDH 和 SOD 酶染色后的电泳胶条放入 2.5% 冰醋酸中进行脱色,酯酶 EST 染色后的胶条置于 5% 冰醋酸脱色。

1.6 图谱分析 染色后利用 Gel-Doc1000 凝胶分析系统进行拍照、分析。

2 结果

2.1 酯酶的表达 云南高背鲫鱼的 EST 同工酶表达如图 1 和表 2 所示,EST 同工酶谱的分

带如图 1 所示,以图谱中主带的位置为标准,以 C 图为例,将分子量最小的一条带定义为 EST-7,分子量最大的一条带定义为 EST-1,在不同组织的 EST 同工酶谱中有 3 条主带:EST-3、EST-5 和 EST-7,其中 EST-5 的位置正好位于 EST-3 和 EST-7 的中间。在 A 图中 EST-3 和 EST-5 中间有 1 条清晰的条带,定义为 EST-4。在 C 和 E 图中 EST-5 后有 1 条带,定义为 EST-6。EST 在云南高背鲫鱼中共有 7 条带,在 5 种

组织和器官中的活性都比较高。但呈现出明显的组织特异性 ,在脑中有 EST-3、4、5、7 四条带 ,在眼睛、心脏中有 3 条带 ,且带型基本一致 ,在肝脏中呈现 6 条带 ,且有 3 条特异性谱带 EST-

1、EST-2 和 EST-6。EST-3、EST-5 和 EST-7 在脑、眼睛、肝脏、心脏、肌肉中均有表达 ,且 EST-3 的表达最强。EST-1、EST-2 仅在肝脏中有弱表达。EST-4 只在脑中有表达 ,且活性较弱。

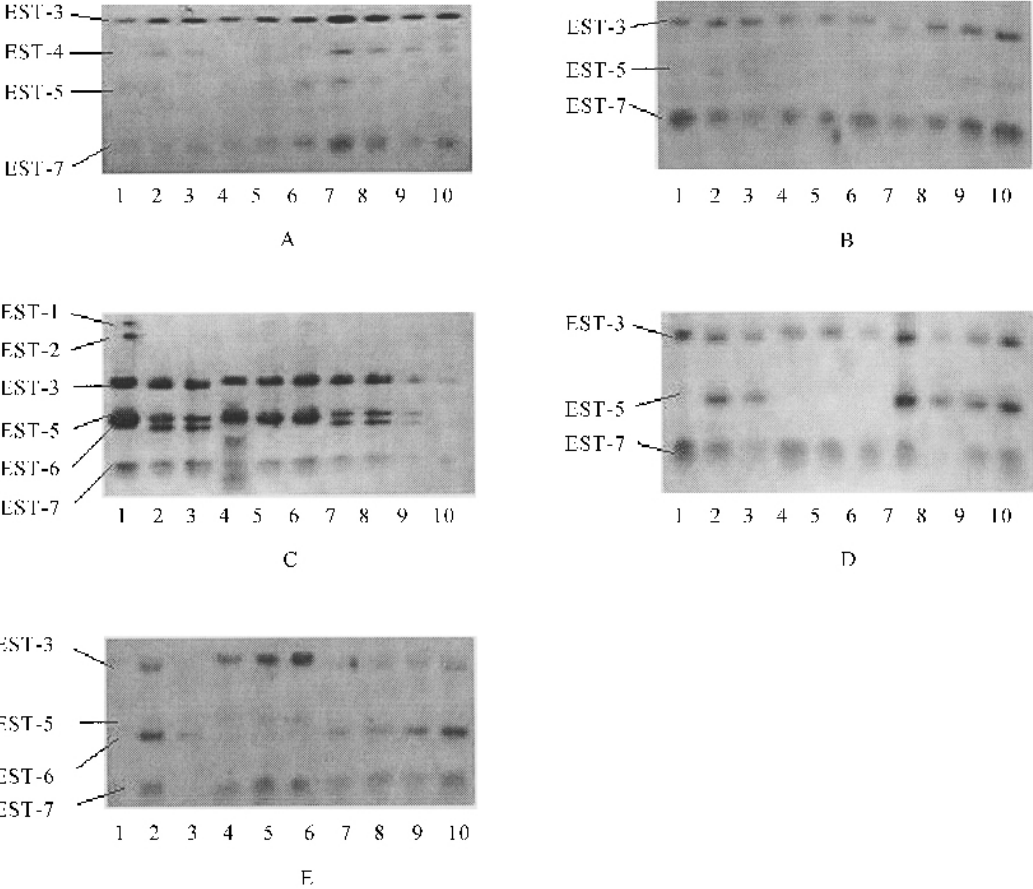


图 1 EST 同工酶电泳图谱

Fig.1 Electrophoretogram of EST isozymes

A , B , C , D , E 分别表示脑、眼睛、肝脏、心脏、肌肉的 EST 酶谱 ;1 ~ 10 泳道分别表示不同个体的酶谱。

A , B , C , D , E show electrophoretograms of EST isozymes expressed in brain , eye , liver , heart and muscle , respectively.

1 - 10 show the zymograms of different individuals.

2.2 超氧化物歧化酶的表达 云南高背鲫鱼 SOD 同工酶谱表达见图 2 ,带型的划分以谱带的位置和迁移率为标准 ,根据其分子量的大小共分为 8 条带。云南高背鲫鱼的 SOD 同工酶分析结果表明 ,SOD 同工酶在肝脏中种类最多且活性最强 ,共呈现 8 条带 ,其中 SOD-3、SOD-4、SOD-5 活性最强。SOD-1、4、7、8 在所测定的

组织中均有表达 ,SOD-4 在 5 种组织中活性均较强 ,SOD-1、SOD-7、SOD-8 在所有组织中表达均较弱。SOD-2 在眼睛中没有表达 ,SOD-3 在心脏中没有表达 ,而在其他组织中均有表达。SOD-5 和 SOD-6 仅在眼睛和肝脏中表达(图 2 和表 2)。

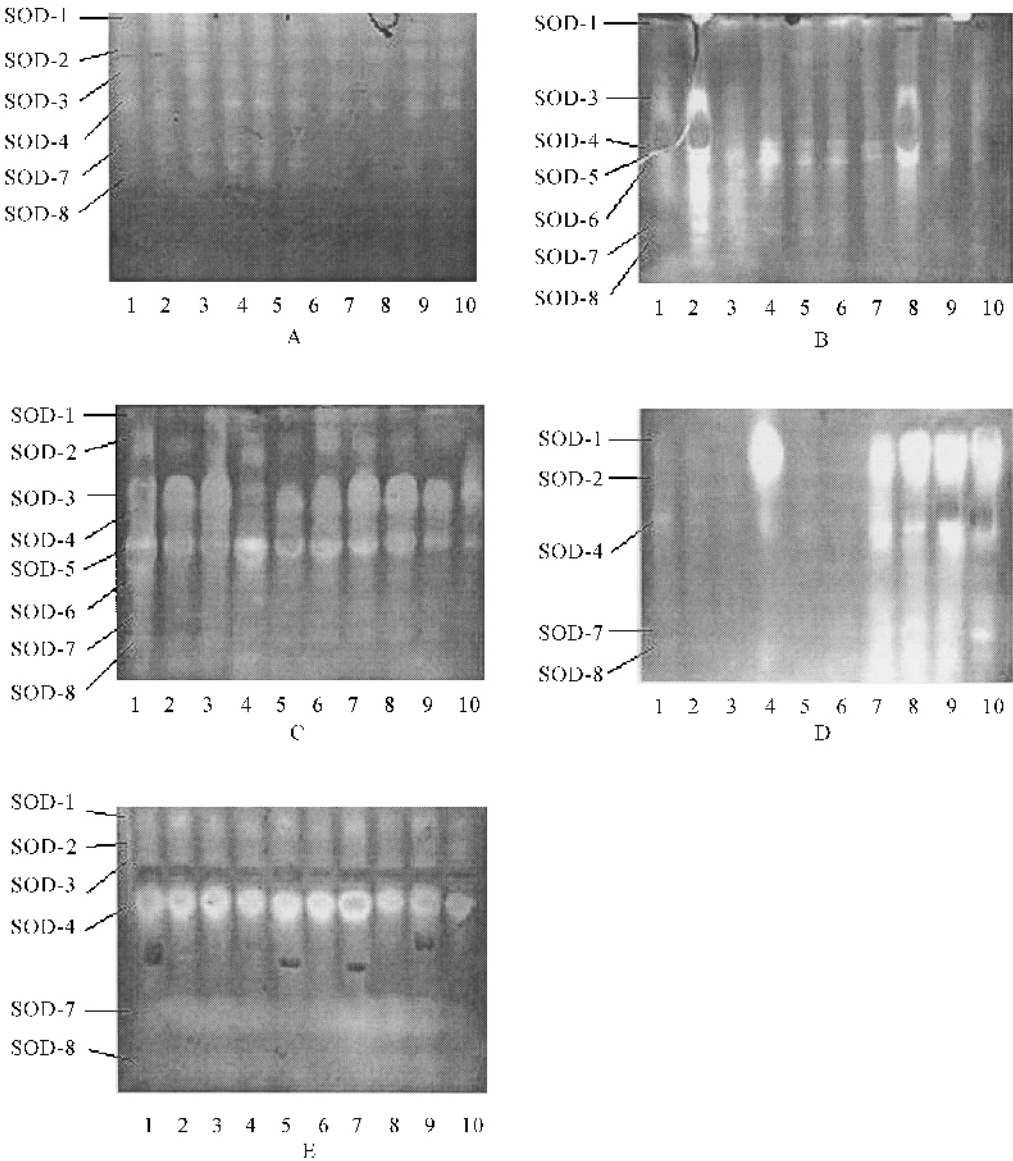


图 2 SOD 同工酶电泳图谱

Fig.2 Electrophoretogram of SOD isozymes

A, B, C, D, E 分别表示脑、眼睛、肝脏、心脏、肌肉的 SOD 酶谱 ;1 ~ 10 泳道分别表示不同个体的酶谱。

A, B, C, D, E show electrophoretograms of SOD isozymes expressed in brain, eye, liver, heart and muscle, respectively ;

1 - 10 show the zymograms of different individuals.

2.3 乳酸脱氢酶的表达 云南高背鲫鱼 LDH 同工酶谱表达见图 3,带型的划分原则同图 2,酶活性变化见表 2。从 LDH 同工酶检测结果显示,LDH 同工酶在肌肉中种类最多(共检测到 6

条带)且活性最强。LDH-4、LDH-5 和 LDH-6 在所测定的组织中均有表达,且活性最强;LDH-1 和 LDH-2 除脑组织中没有外,在其余组织中均能检测到,且活性较弱。

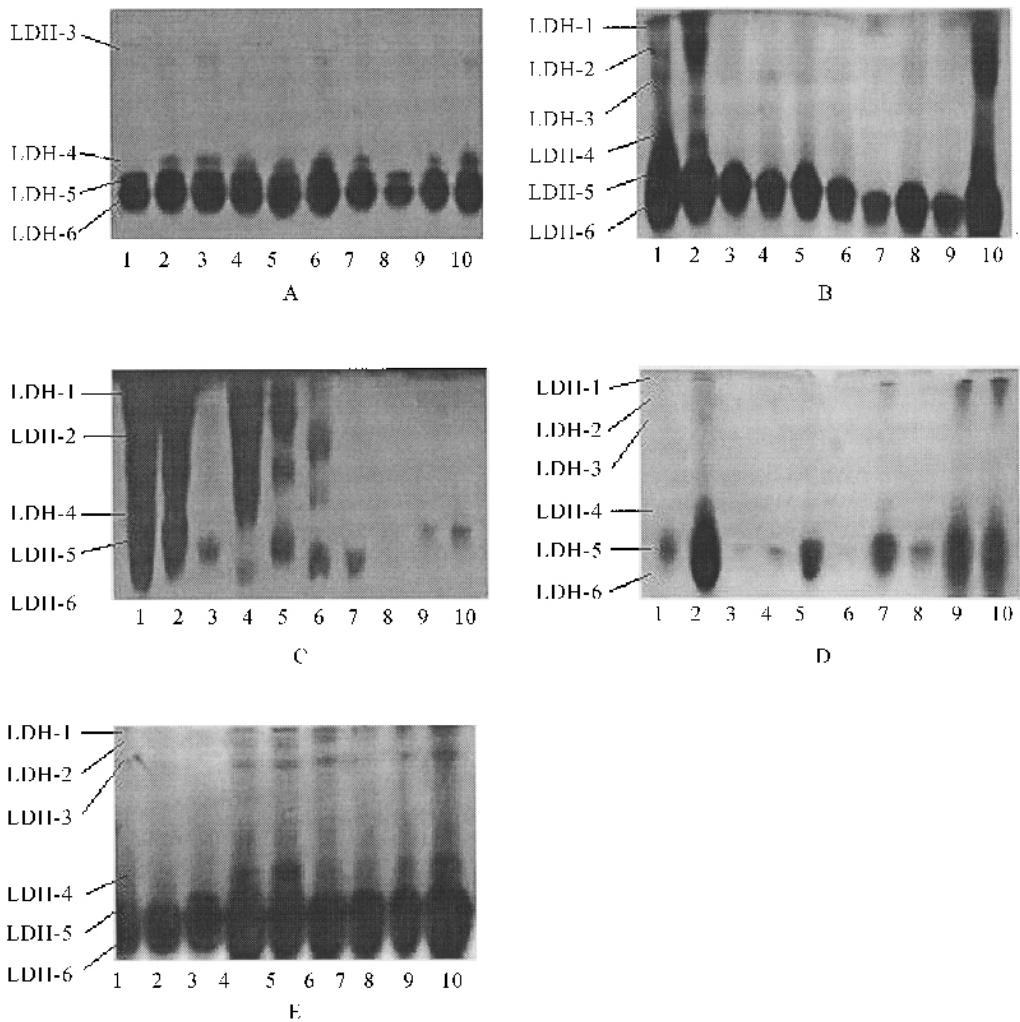


图 3 LDH 同工酶电泳图谱

Fig.3 Electrophoretogram of LDH isozymes

A , B , C , D , E 分别表示脑、眼睛、肝脏、心脏、肌肉的 LDH 酶谱 ,1 ~ 10 泳道分别表示不同个体的酶谱。

A , B , C , D , E show electrophoretograms of LDH isozymes expressed in brain , eye , liver , heart and muscle , respectively
1 - 10 show the zymograms of different individuals.

3 讨 论

同工酶是指能催化同一种化学反应 ,而其酶蛋白本身的分子结构组成有所不同的一组酶。作为一种生化指标 ,已广泛应用于鱼类的物种及杂种的鉴定、物种倍性鉴定、物种间亲缘关系比较及系统分类、基因连锁分析与基因作图、基因的重复与演化、胚胎发育过程中的基因表达与调控、病理研究与诊断等方面的研

究^[6~11]。本研究从同工酶的角度对云南高背鲫鱼的生化特征进行了研究 ,为进一步确定高背鲫鱼在种质鉴定中的同工酶指标奠定基础。

吴榔虎等人对高背银鲫、大口胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 及胭脂鲫 F_1 代不同组织的同工酶的表型分析显示 ,取自汉阳沌月亮湖渔场的高背银鲫酯酶同工酶在肝脏中呈现 8 条带 ,性腺和肌肉中有 6 条带 ,心脏中表现 7 条带 ,乳酸脱氢酶同工酶在肝脏中有 6 条带 ,性腺

表 2 云南高背鲫鱼 3 种同工酶在不同组织中的表达与活性

Table 2 The expression and activity of three isozymes in different tissues of *Carassius auratus*

酶 Isozyme	同工酶带 Isozyme bands	组织与器官 Tussie and organs				
		脑 Brain	眼球 Eye	肝脏 Liver	心脏 Heart	肌肉 Muscle
酯酶 EST	EST-1	-	-	+	-	-
	EST-2	-	-	+	-	-
	EST-3	++++	+++	++++	+++	+++
	EST-4	+	-	-	-	-
	EST-5	+	+	+++	++	+
	EST-6	-	-	+++	-	++
	EST-7	++	+++	++	+++	+++
超氧化物歧化酶 SOD	SOD-1	++	++	++	++	++
	SOD-2	++	-	++	++	+
	SOD-3	++	+	++++	-	+
	SOD-4	++	++	++++	++	++++
	SOD-5	-	++	+++	-	-
	SOD-6	-	+	+	-	-
	SOD-7	+	++	+	+	++
	SOD-8	+	+	+	+	+
乳酸脱氢酶 LDH	LDH-1	-	+	++	+	++
	LDH-2	-	+	++	+	+
	LDH-3	+	+	-	+	++
	LDH-4	++	+	+	++	++
	LDH-5	+++	+++	++	+++	+++
	LDH-6	++++	++++	++	++	++++

++++ 表示活性最强;+++ 表示活性强;++ 表示活性较强;+ 表示活性较弱;- 表示无活性。

++++ means the highest isozyme activity; +++ means high isozyme activity; ++ means relatively higher isozyme activity; + means relatively lower isozyme activity; - means the activity of isozyme has not been detected.

和肌肉中有 5 条带,心脏中呈现 9 条带^[7]。黄生民等人对云南高背鲫鱼和方正银鲫酯酶、乳酸脱氢酶的比较研究结果显示,云南高背鲫鱼的酯酶同工酶谱有 3 种表型,在血清、眼球晶体中为一种表型,在脑和肌肉中为另一种表型,在心脏、肾脏、脾脏、肝脏和卵中为第三种表型,云南高背鲫鱼的酯酶同工酶谱最多呈现 8 条带,最少呈现 3 条带^[41];乳酸脱氢酶同工酶也存在明显的组织特异性。本研究结果显示,3 种同工酶在云南高背鲫鱼的各种组织中均有表达,但在不同组织中的同工酶种类和表达强度有差异。尽管组织间有差异,但在不同组织中有共

同的谱带。酯酶中的 EST-3、5 和 7 在各种组织中均有表达,EST-1、EST-2、EST-4 和 EST-6 显示不同的组织差异,其中 EST-1、EST-2 仅在肝脏中有表达。超氧化物歧化酶中 SOD-1、4、7 和 8 是各种组织中共同的谱带,而其他谱带显示出组织的差异。LDH-4 在各种组织中均有表达,且活性最强,其他谱带在不同组织中表达不同。本研究观察到的同工酶谱的组织差异性与前人的研究结果是一致的。

鱼类不同组织同工酶存在不同程度的组织特异性,这与特定组织的重要代谢途径有关。对云南高背鲫鱼的 3 种同工酶分析结果显示,酯酶和超氧化物歧化酶均在肝脏中分布最多,且活性最强,脑中次之。肝脏是机体新陈代谢的重要器官,它在糖类、酯类、蛋白质、维生素、激素、金属等物质的代谢中起着重要作用,同时机体内的多种代谢废物、毒素通过生物转化作用在肝脏内被降解^[12]。SOD 是一种重要的防御酶,能清除生物体内的有害超氧自由基,维持机体正常的生理功能^[13],在肝脏中的高表达可能与其在肝脏中各种生物分子旺盛代谢产生的氧自由基的清除有关。EST 酶在肝脏中的高表达与其肝脏的酯类代谢活跃^[12]是一致的。乳酸脱氢酶是糖代谢途径的关键酶之一,催化乳酸和丙酮酸的相互转化,从而完成葡萄糖的无氧呼吸和乳酸的糖异生作用^[13]。在肌肉收缩过程中,糖原在有氧条件下,部分乳酸氧化成二氧化碳和水获取能量,但大部分乳酸又转化为糖原储存起来。乳酸脱氢酶在肌肉运动过程中起了重要的作用。本研究中乳酸脱氢酶在肌肉组织中活性最强,种类最多,这也是与其肌肉中乳酸代谢的需要是一致的。

黄生民曾对云南高背鲫鱼的 11 个成体分别进行过肝脏、肾、脾、肌肉和卵巢中 EST 同工酶表达情况的电泳分析发现,除卵巢外,其余 4 种组织均表现出明显的个体差异^[41]。本研究结果也表明,在分离效果较好的 EST 同工酶谱中,除脑和肝脏外,其余组织都表现酶谱的多样性。如心脏和肌肉中 EST 酶的 EST-5 在有的个体中有表达,有的个体中就没有表达,眼球中的

SOD-3 和 LDH-4 也存在个体间的差异。

同工酶谱广泛应用于分类、进化和品种鉴定^[6~11]。作为分类、进化和品种鉴定就需要种类间的标记稳定。同工酶谱的组织 and 个体间存在的差异提示,利用同工酶谱进行上述研究时,需要确定特定的组织和特定的同工酶谱带作为标准。同时也需要进行一定数量的个体分析,以排除个体差异造成的假象。

致谢 研究过程中,尚海、黎一苇、朱明、赵文秀、黄超等在取材、拍照及电泳技术方面给予了帮助,在此表示谢意。

参 考 文 献

- [1] 蒋晓华等. 云南滇池鲫鱼乳酸脱氢酶(LDH)同工酶发育遗传学分析. 西南农业学报, 1996, 9(4): 53~57.
- [2] 蒋晓华, 谷甦, 曾瑞光. 云南滇池鲫鱼胚胎发育过程中酯酶(EST)同工酶分析. 西南农业学报, 1997, 10(2): 100~103.
- [3] 吴伦祥. 云南省第四大湖泊——程海移植云南高背鲫鱼增养殖技术试验研究. 水产学杂志, 1995, 8(2): 59.
- [4] 黄生民, 秦长庚, 潘淑英等. 云南高背鲫鱼和方正银鲫酯酶、乳酸脱氢酶的比较研究. 动物学研究, 1988, 9(1): 69~76.
- [5] J. 萨姆布鲁克. 分子克隆. 北京: 科学出版社(第二版), 1992, 880~885.
- [6] 王宏伟, 王安利, 王维娜等. 鱼类同工酶研究进展. 动物学报, 2001, 47(专刊): 101~105.
- [7] 吴榔虎, 袁均林, 张伟. 高背银鲫、大口胭脂鱼及胭脂鲫(F₁)不同组织的同工酶的表型分析. 生物学杂志, 2003, 20(2): 19~22.
- [8] 戈志强, 朱江, 展龙平. 大银鱼 *Protosalanx hyalocranius* (Abbott)不同组织 LDH 同工酶、EST 同工酶的初步研究. 苏州大学学报(自然科学版), 2003, 19(3): 98.
- [9] 姜建国, 熊全沐, 姚汝华. 青鱼不同组织中的同工酶的表达模式. 水生生物学报, 1997, 21(4): 353~357.
- [10] 洪满贤, 林凌涛. 网纹石斑鱼乳酸脱氢酶同工酶的研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35(6): 952~954.
- [11] 李明云, 黄福勇. 香鱼肌肉与免疫器官 6 种同工酶的表达. 动物学杂志, 2004, 40(2): 18~22.
- [12] 王素芳, 赵树林, 蒋琳兰等. 微生物超氧化物歧化酶的研究进展. 药物生物技术, 2002, 15(3): 57.
- [13] 郑集, 陈钧辉编著. 普通生物化学(第三版). 北京: 高等教育出版社, 2001, 563~564.