

文章编号: 1000-0615(2000)05-0417-05

# 马氏珠母贝不同组织同工酶的比较

李广丽, 叶富良

(湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

**摘要:** 采用聚丙烯酰胺凝胶水平平板电泳技术, 研究了马氏珠母贝的 8 种组织 7 种同工酶的酶谱表型, 结果表明: 所测组织中未检出  $\alpha$ - 磷酸甘油脱氢酶( $\alpha$ -GPDH)和醇脱氢酶(ADH), 乳酸脱氢酶(LDH)只在肝脏有一条微弱谱带, 苹果酸脱氢酶(MDH)、苹果酸酶(ME)和超氧化物歧化酶(SOD)部分组织间有显著差异, 而酯酶(EST)则具有明显的组织特异性。

**关键词:** 马氏珠母贝; 同工酶; 电泳; 组织特异性

中图分类号: S917 文献标识码: A

## The comparison of isozymes in different tissues of *Pinctada martensii*

LI Guang-li, YE Fu-liang

(Fisheries College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, 524025, China)

**Abstract:** Seven isozymes in eight different tissues of *Pinctada martensii* were analysed by level slab polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that there were not  $\alpha$ -GPDH and ADH isozymes in the any of eight tissues. The expression of LDH isozymes had one faint band only found in liver. The isozymic phenotypes of ME, MDH and SOD had evident difference among certain tissues, but the EST isozymes exhibited an apparent tissue-specificity.

**Key words:** *Pinctada martensii*; isozyme; electrophoresis; tissue specificity

马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)又称合浦珠母贝, 分布于日本及我国南海, 是一种具有较高经济价值的珍珠贝类, 目前对它的研究主要集中在组织学、养殖技术及苗种培育等方面<sup>[1-3]</sup>, 在生化遗传方面研究较少。李刚等对合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交进行了同工酶谱的比较研究<sup>[4]</sup>, 但未涉及不同组织的表型差异。本研究对马氏珠母贝 8 种组织中的 7 种同工酶进行检测分析, 旨在为贝类学研究积累资料, 同时为进一步研究珍珠贝遗传特异性、种质鉴别、生物进化等问题提供一定的理论参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 样本采集与保存

马氏珠母贝采自湛江市海康流沙大队珍珠场, 壳长范围在 4.5~6.0 cm, 活贝运回实验室后进行解剖, 取心脏、外套膜、闭壳肌、卵巢、精巢、肾脏、足、鳃、肝脏这 8 种组织, 将上述组织置于低温冰箱

收稿日期: 1998-10-30

资助项目: 广东省高教厅 1996 年重点科研项目

作者简介: 李广丽(1967-), 女, 内蒙古人, 硕士, 讲师, 主要从事水生动物生理生态学研究。E-mail: zhuch@zjou.edu.cn

保存待用。

## 1.2 样品制备

用电子天平分别称取这 8 种组织 0.2g 左右,以 1:5(体重:体积, g: mL) 加入 0.3% $\alpha$ NAD 液,在冰浴下于匀浆器中进行匀浆,并把匀浆后的样品倒入塑料离心管中,在冷冻离心机中以  $17\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $4\ ^\circ\text{C}$ ) 离心 20min(肝脏离心 2 次),取上清液各分为 2 份,分装于干净的塑料离心管中,一份放入  $4\ ^\circ\text{C}$  冰箱保存(样品使用不超过 2d),另一份则置于低温冰箱保存以备核查。

## 1.3 电泳方法

采用北京市六一仪器厂生产的稳压稳流型电泳仪及 5%(EST 为 7.5%) 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。实验所测酶类及有关系统见表 1。恒温循环仪降温至  $5\ ^\circ\text{C}$  后,在 50mA 电流下,预电泳 30min,每个点样孔点样 8 $\mu\text{L}$ ,前电泳 10min(25mA),在 275V 的恒压下进行正式电泳,电泳时间依不同酶而不同(50~100min),染色参照文献[5]的方法,稍加改进,以显带清楚为宜,取出后放入冰醋酸中脱色至谱带清晰为止,转入固定液中,固定保存以待拍照。

## 1.4 同工酶的命名

以各种酶谱的相对迁移率  $R_f$  由小到大依次命名,即向阳极运动的酶谱带开始依次命名为 1, 2, 3, ……  
 $R_f = l/L$  其中,  $l$  从点样孔至各谱带中点的距离,  $L$  从点样孔至指示剂终点的距离。

表 1 七种酶的缓冲系统

Tab. 1 The buffer system of seven kinds of isozymes

酶名称	苹果酸脱氢酶	$\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶	乳酸脱氢酶	醇脱氢酶	酯酶	苹果酸酶	超氧化物歧化酶
简称	MDH	$\alpha$ -GPDH	LDH	ADH	EST	ME	SOD
编号	E. C. 1.1.1.37	E. C. 1.1.1.8	E. C. 1.1.1.27	E. C. 1.1.1.1	E. C. 3.11.1.1	E. C. 1.1.1.40	E. C. 1.15.1.1
缓冲系统	TC	TC	TC	EBT	EBT	EBT	EBT

注:缓冲系统中 T 为三羟甲基氨基甲烷;E 为乙二胺四乙酸;B 为硼酸;C 为柠檬酸。

## 2 结果

本实验共检测 7 种同工酶,其中  $\alpha$ -GPDH、ADH 未显示任何有活性的区带,LDH 只在肝脏有一条微弱的谱带,而 ME、EST、SOD、MDH 则显示出清晰稳定的图谱。

### 2.1 苹果酸酶(ME, E. C. 1.1.1.40)

马氏珠母贝的 ME 分布较广,各组织均有 2 条谱带,既  $\text{Me}-1$  和  $\text{Me}-2$ ,但不同组织,二谱带相对活性明显不同(图 1)。

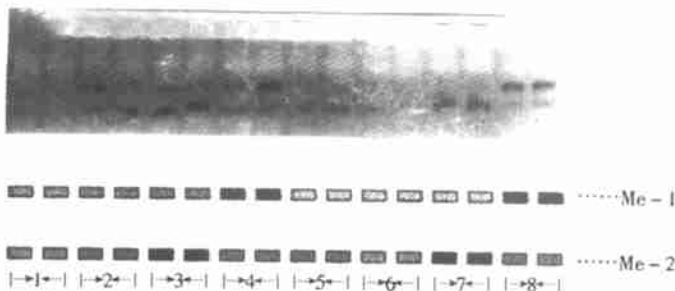


图 1 马氏珠母贝组织中苹果酸酶同工酶的图谱

Fig. 1 The ME isozymes patterns in various organs of *P. Martensii*

1. 鳃; 2. 足; 3. 肾脏; 4. 性腺(♀、♂); 5. 闭壳肌; 6. 外套膜; 7. 肝脏; 8. 心脏

### 2.2 酯酶(EST, E. C. 3. 1. 1. 1)

马氏珠母贝的EST较复杂(图2), 谱带共表现13条带, 明显地分为3个区, 各组织表现为3~7条谱带, 以肝脏、肾脏的染色最深, 即活性最高, 其中鳃有Est-1, Est-2, Est-4, Est-6, Est-8, Est-9, Est-12这7条谱带; 足有Est-3, Est-5, Est-7, Est-8, Est-9, Est-12这6条谱带; 肾脏有Est-3, Est-6, Est-8, Est-9, Est-13这5条谱带; 性腺(♀、♂)有Est-3, Est-6, Est-8, Est-9, Est-12这5条谱带; 闭壳肌有Est-3, Est-7, Est-12这3条谱带; 外套膜有Est-3, Est-6, Est-8, Est-10, Est-12这5条谱带; 肝脏有Est-2, Est-3, Est-6, Est-8, Est-10, Est-11, Est-13这7条谱带; 心脏有Est-3, Est-6, Est-8, Est-9, Est-12这5条谱带。

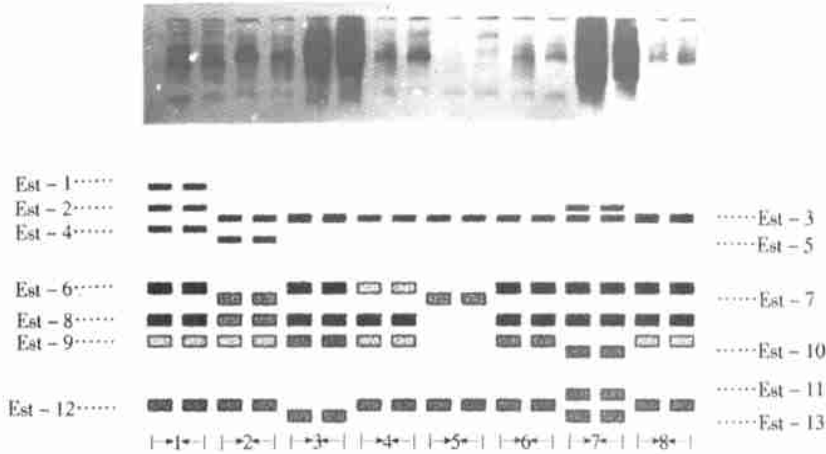


图2 马氏珠母贝组织中酯酶同工酶的图谱

Fig. 2 The EST isozymes pattern in various organs of *P. martensii*

### 2.3 超氧化物歧化酶(SOD, E. C. 1. 15. 1. 1)

SOD酶谱较简单(图3), 只是闭壳肌与其它7种组织的酶谱不同, 闭壳肌有Sod-1、Sod-3这两条谱带, 而其它组织则为Sod-1、Sod-2, 各组织均有Sod-1谱带。

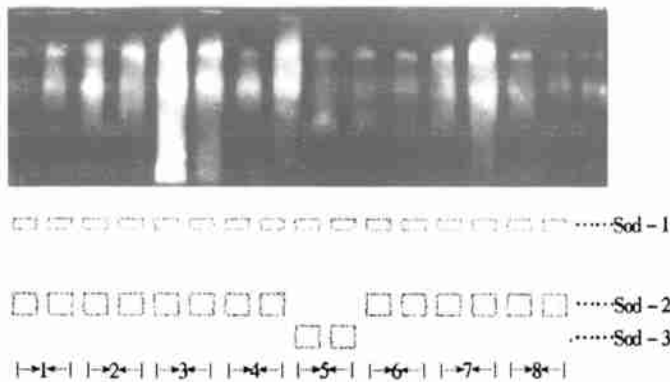


图3 马氏珠母贝组织中超氧化物歧化酶同工酶的图谱

Fig. 3 The SOD isozymes pattern in various organs of *P. martensii*

### 2.4 苹果酸脱氢酶(MDH, E. C. 1. 1. 1. 37)

马氏珠母贝各组织中MDH分别有2~4条谱带(图4), 各组织均有Mdh-1和Mdh-2这两条谱带, 而足、闭壳肌、外套膜、肝脏、精巢则还有Mdh-3、Mdh-4这两条谱带, 且精巢谱形不同(卵巢没有Mdh-4谱带), 在马氏珠母贝MDH的雌雄差异中, 不仅表现在谱带数量上, 而且表现在其活性上。

雌性谱带明显深于雄性。

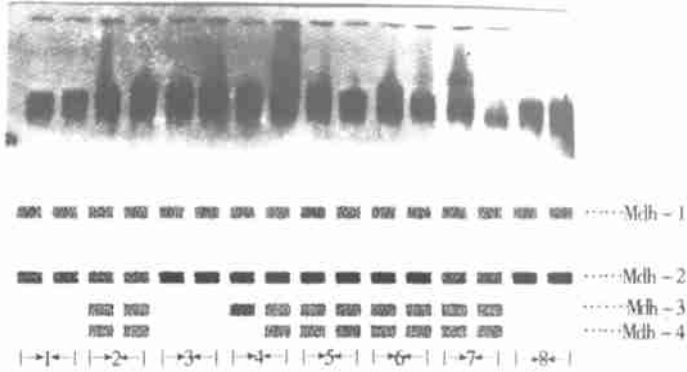


图4 马氏珠母贝组织中苹果酸脱氢酶同工酶的图谱

Fig. 4 The SOD isozymes pattern in various organs of *P. martensii*

### 3 讨论

在马氏珠母贝的8种组织中,已存在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(图1-4)。邵健忠等<sup>[6]</sup>研究了三角帆蚌16种同工酶,发现在健康蚌中LDH,ADH, $\alpha$ -GPDH活性很低,仅在个别组织中检测出染色很浅的微弱谱带。但本实验对马氏珠母贝8种组织进行检测,ADH, $\alpha$ -GPDH未检测出任何谱带,这与李刚等<sup>[4]</sup>对大珠母贝的研究结果相似,而LDH,仅在肝脏检测出一微弱谱带,其他7种组织为空白,这三种酶在珍珠贝中不存在抑或是极易失活而没检测出来,尚有待研究者的进一步探讨。

马氏珠母贝的EST较复杂,这是由于EST的底物范围很广,能将任何一种羧酸酯水解为相应的醇和酸,8种组织表现为13条谱带,各组织间的谱带没有任何两种组织具有完全相同的表达模式,以肝脏、肾脏的活性最强(图2)。由于EST是催化酯类化合物水解的酶系,它们能水解大量非生理存在的酯类化合物,包括一些药物,因此认为可能有去毒作用,其中Est-6,Est-8几乎各组织都有,Est-13只存在于肝脏和肾脏,因而这些酶都可能参与解毒功能,而肝、肾是机体最重要的解毒器官。其他组织EST同工酶的活性与酶带数目则可能与控制该组织EST的基因开启是否完全有关。各组织间EST不但在染色强度,而且在谱带数目方面有明显差异。已证实螺类EST是由羧基酯酶等4种组成,有7个位点至少14个独立的等位基因参与遗传<sup>[7]</sup>,而有关螺类的报道,其EST酶谱表型与马氏珠母贝十分相似,因此这些结果可作为马氏珠母贝EST进一步研究的很好借鉴。

马氏珠母贝的ME、SOD和MDH个别组织间有明显差异,如SOD,闭壳肌的谱带明显不同于其它组织(图3),而谱带相同的组织,各组分的相对含量具有显著差异(图1)。MDH是细胞中三羧酸循环中重要的脱氢酶之一,三羧酸循环对于任何一机体都起着重要的作用,由图4可见,MDH在闭壳肌、足和心脏的染色最深,这是与肌肉所需的大量能量在柠檬酸循环过程中,把苹果酸转为草酰乙酸有关,而心脏含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。MDH在体内催化L-苹果酸脱氢为草酰乙酸,草酰乙酸可生成天冬氨酸族的许多氨基酸,而这些氨基酸将参与珍珠质的形成<sup>[8]</sup>,这恰与本实验所检得外套膜的MDH的含量和活性都极高相吻合,表现为酶的活性与其生理功能相关。MDH各组织显现2~4条谱带,与和田<sup>[9]</sup>在马氏珠母贝中所测每个体有2~7条谱带相似。MDH的种类及酶谱表型分别与脊椎动物的s-MdhA<sub>2</sub>,AB,B<sub>2</sub>和m-MdhC<sub>2</sub>相对应,提示马氏珠母贝的MDH也是二聚体同工酶,分别由s-MdhA、B和m-MdhC基因编码合成,但电泳中未发现m-MdhD基因产物,这是由于贝类尚未进化出D基因还是其处于不活跃的“关闭”状态,值得进一步研究。

通过对30只马氏珠母贝8种组织的同工酶分析,发现不同个体的同一组织中ME、EST、SOD、

MDH 酶谱基本一致, 为进一步研究不同品系珍珠贝的遗传关系提供了有用的分析指标。

### 参考文献:

- [1] 沈亦平, 张锡元. 合浦珠母贝卵子发育超微结构研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1993, 5: 101- 108.
- [2] 何秀英, 徐权芳, 叶铭德. 合浦珠母贝深水浮筏式养殖试验[J]. 水产科技情报, 1995, 22(4): 178- 180.
- [3] 吕仕洪, 莫秀珍. 马氏珠母贝激光育苗的研究[J]. 水产科技情报, 1991, 18(1): 7- 8.
- [4] 李 刚, 姜卫国, 魏贻尧. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究 ④ 同工酶谱的比较研究[J]. 水产学报, 1983, 2(4): 321- 327.
- [5] Philip D P. Evolution of pattern of differential gene expression: a comparison of the temporal and spatial patterns of isozyme locus expression in two closely related fish species(Northern largemouth bass, *Micropterus salmoides*, and smallmouth bass, *micropterus dolomieu*) [J]. J Exp Zool, 1979, 210: 473- 488.
- [6] 邵健忠, 项黎新, 华志新, 等. 三角帆蚌十六种同工酶系统的类型及其在瘟病蚌中的病理变化[J]. 水产学报, 1993, 17(3): 199- 208.
- [7] 许学积, 郭源华. 各地钉螺  $\alpha$ - 磷酸甘油脱氢酶的酯酶同工酶变异的研究[J]. 动物学杂志, 1982, 2: 1- 4.
- [8] 石安静, 吴中文. 三种淡水育珠河蚌外套膜酶的组织化学研究[J]. 水产科学, 1985, 4(2): 1- 6.
- [9] 和田克 $\phi$ . 鹿儿岛岛上甌岛海鼠池产  $\ddot{A}$  K D \$ F [R]. 国立真珠研究所报告, 1975, 19: 2183- 2185.

## 中英海洋细菌多样性学术会议(第一轮通知)

为了促进中国与英国科学家在海洋细菌学领域的交流与合作, 在英国环境、运输及地区事务部 (Department of Environment, Transportation and the Regions, DETR) 的英国达尔文项目 (Darwin Initiative Project) 的资助下, 青岛海洋大学海洋生物系、英国赫里奥特- 瓦特大学生物系及联合国教科文组织中国海洋生物工程中心决定于 2001 年 7 月在青岛联合举办“中英海洋细菌多样性学术会议”。

1. 会议主题: A. 海水细菌多样性; B. 海洋沉积物细菌多样性; C. 海水养殖动物病原细菌多样性; D. 水产品检验细菌多样性; E. 海洋天然产物细菌多样性; F. 海水养殖环境细菌多样性; G. 海洋细菌多样性研究技术

2. 会议语言、论文摘要、论文全文: 英文

3. 会议注册费: 免收

4. 论文摘要: 请于 2000 年 12 月 20 日前将论文的详细摘要(A4 纸 1 页) 寄到组委会。(格式: 题目用四号字, 作者及内容为五号字, 字体均为 Time New Roman 型)

5. 论文全文: 请于 2001 年 5 月 15 日前将论文全文(A4 纸) 及软盘(WORD 97 或 WORD 2000 格式) 寄到组委会。已发表过的论文, 请注明发表的期刊及卷期页码。格式同上。

6. 组委会: 通讯地址: 山东省青岛海洋大学海洋生物系 青岛市鱼山路 5 号 邮政编码: 266003

联系人: 李 筠 徐怀恕

电 话: (0532) 2032266 传真: (0532) 2876418

电子信箱: Hsxu@mail. ouqd. edu. cu