

研究简报

大瓶螺四种同工酶的电泳分析

THE ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF 4 ISOENZYMES OF *AMPULLARIA GIGAS*

李清漪 刘 堰

(西南师范大学生物系,重庆 630715)

Li Qingyi and Liu Yan

(Department of Biology, Southwest-China Teachers University, Chongqing 630715)

关键词 大瓶螺,同工酶,差异,电泳分析

KEYWORDS *Ampullaria gigas*, isoenzyme, difference, electrophoretic analysis

大瓶螺(*Ampullaria gigas*)又名福寿螺,是一种大型淡水食用贝类。关于该螺的同工酶研究,目前尚未见报道。本文以该螺不同组织,如肝脏、肌肉和蛋白腺等,以及不同生长发育期的大瓶螺的肝脏为材料,对其SOD、LDH、ALP和EST同工酶进行了电泳分析,并对大瓶螺SOD同工酶类别进行了鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大瓶螺由本校生物系贝类教研室提供。丙烯酰胺(Acr)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)和甘氨酸为Bio-Rad公司产品,N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Bis)为Fluka进口分装,实验用其它试剂均为国产分析纯。高速冷冻离心机系日本KR-180FA型,电泳仪系美国Bio-Rad1000型。

1.2 方 法

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳[张龙翔等,1982],分离胶浓度为5.7%,浓缩胶浓度为2.5%。

电极缓冲液为pH8.3Tris-甘氨酸液,而ALP则采用pH8.9硼酸-硼砂缓冲液。

SOD酶活性染色按Beauchamp等方法进行[Beauchamp等,1971];LDH和EST按周宗汉等[1983]方法

进行;ALP 采用萘酚磷酸铵盐、固兰 B 盐染色。

实验材料的制备是根据大瓶螺的生长、个体重量以及性腺的发育情况可分为幼螺期(个重2.5-3.5克、性腺尚未发育),中螺期(个重16.5-17.5克、性腺发育,但未大量繁殖)和成螺期(个重30克左右,大量繁殖期)三组,每组每次(n=3) 分别随机取四个个体,解剖后取其肝脏制备电泳样品,其制备方法按李清漪等[1985] 所介绍的进行。

另外,同一发育阶段的大瓶螺不同器官的各种同工酶的比较分析取材于中螺期的个体,制备方法同前。

2 结果与讨论

根据大瓶螺肝脏的电泳图谱可见,三个生长时期螺的肝脏 SOD 同工酶分别呈现3-4条谱带;LDH 同工酶呈现4-5条谱带;ALP 同工酶呈现1-2条谱带;EST 同工酶呈现6-8条谱带。根据三个时期谱带的数量和迁移率观察,SOD 和 ALP 同工酶谱型各有两种,而 LDH 和 EST 同工酶则各有三种酶谱类型(图1、2、3、4的 a、b、c)。

由上述实验结果分析,大瓶螺肝脏组织的四种同工酶在不同的生长发育期,都分别表现出不同数量的谱带差异,此种差异反映了在细胞生长分化时各种同工酶相应基因的活化作用的动力学过程,因为每一种同工酶中的各条谱带都是不同基因的产物。另一方面各种同工酶虽都具有2-3种酶谱类型,但在各种同工酶中所表现的情况不同,大瓶螺肝脏 SOD 以中成螺期谱带最多(四条谱带);LDH 以中螺期谱带最多(五条谱带);ALP 在幼中螺期的谱带为两条,而成螺期则有一条;EST 同工酶以中螺期呈现的谱带最多(八条谱带)。各种同工酶谱带的差异进一步表明,不同生长期内同工酶谱是具有时间特异性的,此问题与前人所报道关于同工酶在生物体内存在的一般规律相复合[张恭勳译,1983]。

取大瓶螺中螺期的肝脏,蛋白腺和肌肉(腹足肌),分别进行了上述四种同工酶的电泳分析,结果是 SOD 同工酶在三种组织器官内分别呈现出1-4条谱带,按其组织特异性区分共有三种谱型;LDH 1-5条谱带,谱型有三种;ALP 同工酶有1-2条谱带,谱型有三种;EST 同工酶有1-8条谱带,谱型三种(图1、2、3、4的 b、d、e)。

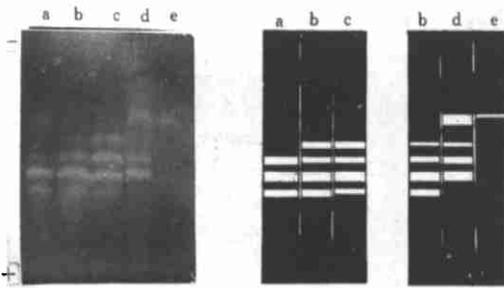


图1 大瓶螺 SOD 同工酶的 PAGE 图谱
Fig. 1 PAGE pattern of SOD isoenzyme from *Ampullaria gigas*

a, b and c. Respectively represents young, middle-aged and adult liver of *Ampullaria gigas*
d. Albumn gland e. Muscle
a、b、c 分别为幼螺、中螺、成螺的肝脏,d、蛋白腺、e、肌肉

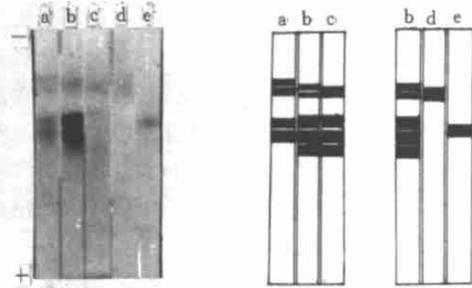


图2 大瓶螺 LDH 同工酶的 PAGE 图谱
Fig. 2 PAGE pattern of LDH isoenzyme from *Ampullaria gigas*

a, b and c. Respectively represents young, middle-aged and adult liver of *Ampullaria gigas*
d. Albumn gland e. Muscle
a、b、c 分别为幼螺、中螺、成螺的肝脏,d、蛋白腺、e、肌肉

四种同工酶酶活性染色结果,由谱带染色的深浅、谱带的宽窄和谱带的数量表明;不同组织的各种同工酶的活性与含量都有所不同,一般情况是肝脏的酶活性较强,而蛋白腺和肌肉次之。但 SOD 同工酶不仅在肝脏较强,在蛋白腺中酶活性亦较强,它们各有四条谱带,而肌肉则只有一条微弱活性的谱带(图1的 b、d、c)。

LDH、ALP 和 EST 同工酶在蛋白腺和肌肉组织内呈现的谱带都较少,且活性很微弱,尤以肌肉更是如此。这种不同部位、不同组织器官内各种同工酶自身谱带所表现出的差异说明了同工酶具有其组织特异性。

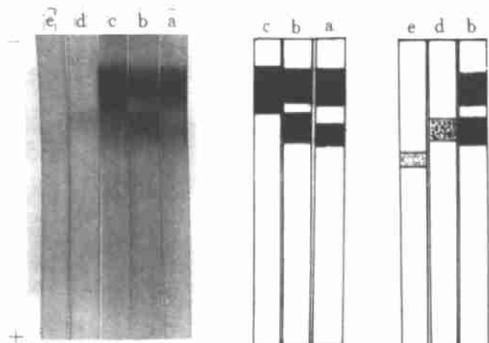


图3 大瓶螺 ALP 同工酶的 PAGE 图谱
Fig. 3 PAGE pattern of ALP isoenzyme from *Ampullaria gigas*

a, b and c. Respectively represents young, middle-aged and adult liver of *Ampullaria gigas*
d. Albumn gland e. Muscle

a、b、c 分别为幼螺、中螺、成螺的肝脏, d、蛋白腺, e、肌肉

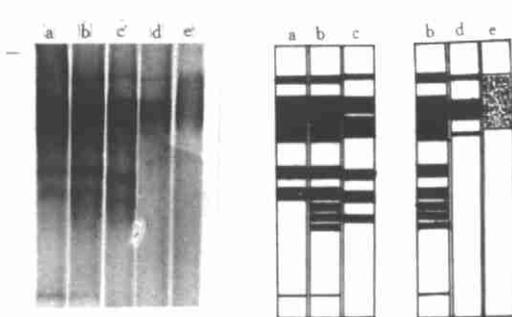


图4 大瓶螺 EST 同工酶的 PAGE 图谱
Fig. 4 PAGE pattern of EST isoenzyme from *Ampullaria gigas*

a, b and c. Respectively represents young, middle-aged and adult liver of *Ampullaria gigas*
d. Albumn gland e. Muscle

a、b、c 分别为幼螺、中螺、成螺的肝脏, d、蛋白腺, e、肌肉

为确定 SOD 同工酶所属类别, 作者采用了一定浓度的氰化钾和氯仿-乙醇混合液分别进行活性染色的抑制试验。结果表明用氰化钾(终浓度达 1mmol/L)处理后, SOD 的透明谱带全部不显(图5的 b); 用氯仿-乙醇(2:3V/V)混合液处理后, 其处理和未处理的透明谱带完全相同(图5的 a)。据报道(施秉仪, 1984; 李益新, 1985; Fridovich, 1975), SOD 分为 Cu、Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD 三种类型, 前者主要存在于真核生物的细胞质中, 对氰化钾极为敏感, 但不受氯仿-乙醇混合液的影响。而 Mn-SOD 主要存在于原核生物和真核生物的线粒体中, Fe-SOD 主要存在于原核生物和少数植物中, 与 Cu、Zn-SOD 相反, 对氯仿-乙醇混合液敏感, 而不受氰化钾的影响。由实验结果分析, 大瓶螺肝脏、蛋白腺和肌肉组织内的 SOD 对氰化钾敏感, 而氯仿-乙醇混合液对该酶没有影响, 说明它是属 Cu、Zn-SOD 类。

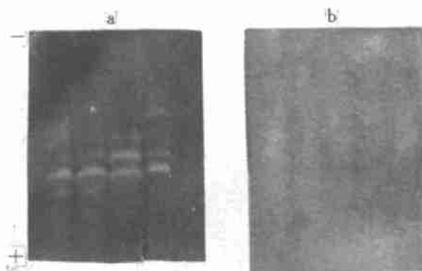


图5 氯仿-乙醇混合液和氰化钾对大瓶螺 SOD 活性染色的影响
FIG. 5 The influence of chloroform-ethanol and KCN on *Ampullaria gigas* SOD activity stain

a. The mixture of chloroform-ethanol
b. KCN

a、氯仿-乙醇混合液; b、氰化钾

参 考 文 献

- [1] 李清漪等, 1985. 贝类肌肉组织蛋白的电泳分析. 西南师范学院学报(自然科学版), (1): 59-63.
- [2] 李益新, 1985. 超氧化物歧化酶的结构与功能. 生物化学与生物物理进展, (3): 15-21.
- [3] 周宗仪等, 1983. 介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法. 淡水渔业, (2): 35-42.
- [4] 张龙翔等, 1982. 生化实验技术与方法, 94-111. 人民教育出版社(京).
- [5] 张恭勤译, 1983. 分子生物学与遗传学中的同工酶. 生物科学动态, (1): 59-63.
- [6] 施秉仪, 1984. 超氧化物歧化酶的生物学意义. 生物科学动态, (1): 21-26.
- [7] Beauchamp, C. O. et al., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and on assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276-287.
- [8] Fridovich I., 1975. Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.*, 44: 147-155