

# 旗江珧不同组织中酯酶和过氧化物歧化酶同工酶的表达\*

## STUDY ON ELECTROPHORETOGRAMS OF ISOZYMES FROM DIFFERENT TISSUES OF *Atrina vexillum* Born

王梅芳 余祥勇

(湛江海洋大学水产学院 524025)

关键词 旗江珧(*Atrina vexillum* Born),同工酶,组织特异性

旗江珧(*Atrina vexillum* Born)是一种经济价值极高的海珍品,个体壳长可达50 cm,而其肥满的后闭壳肌约占体长的四分之一,是最有发展潜力的贝类养殖新品种之一。国内外有关旗江珧的研究报道极少<sup>[1,2]</sup>,目前尚无其生化特性及同工酶表达相关研究的报道。本文研究了旗江珧的消化盲囊、肾、鳃、后闭壳肌和外套膜5种组织的酯酶(EST)和过氧化物歧化酶(SOD)两种同工酶,并对其酶谱表型及表达位点进行了分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料采集及样品制备

实验贝为采自广东湛江覃斗海区的天然贝,贝龄1~2龄,体重156~192 g。从海区采捕后转入室内暂养。活体剖开后,取消化盲囊、肾、鳃、后闭壳肌和外套膜等5种组织各0.5 g,加蒸馏水1.5 ml,冰浴匀浆,4℃,10 000 r/min离心10 min,取上清液置-20℃保存备用。

#### 1.2 电泳、染色

采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度10%,隔离胶浓度5%,缓冲系统为TVB(Tris、EDTA二钠盐、硼酸)缓冲液,pH 8.4;消化盲囊、肾、鳃、后闭壳肌和外套膜组织的点样量分别为10、20、30、60和60 μl;同工酶的电泳分离在4℃左右稳压(150 V)条件下进行9~10 h。EST和SOD的显色方法参考文献[4],电泳酶谱分析参考文献[3]。

### 2 实验结果

#### 2.1 酯酶(EST 3.1.1.1)

不同组织的EST酶谱见图1A。

旗江珧的酯酶酶谱非常复杂,各组织间EST酶谱表型差异显著,没有任何两种组织具有完全相同的表达谱式。共检测出19条酶带,可分为6个区带:EST I(包括EST1~3),EST II(EST4),EST III(包括EST5~8),EST IV(包括EST9~11),EST V(包括EST12~17),EST VI(包括EST18~19)。

2.1.1 消化盲囊 由EST I,EST II,EST III,EST V 4个区带组成,其中EST II是该组织独有的,对应一条酶带EST4,而该组织缺乏EST VI区带。EST I有EST1,3两条酶带。EST III只具一条活性极强的酶带EST7;EST V包括EST12,13,14,17 4条酶带;EST酶带在该组织中几乎无个体差异。

2.1.2 外套膜 后闭壳肌和鳃组织 均由EST I,EST III,EST V,EST VI 4个区带组成,其中,EST I区带与消化盲囊相似,均由EST1,3两条酶带组成;EST III区带具有1~2条酶带,个体间多态现象非常明显;EST V区带在不同个体不同组织中所显酶带位置及带数均有差异;EST VI区带除在后闭壳肌组织中由2条酶带(EST18,19)组成外,外套膜、鳃和肾组织中均为一条带(EST19)。

2.1.3 肾组织 除具有与外套膜、后闭壳肌和鳃相同的EST I,EST III,EST V,EST VI区带外,独具EST IV区带,由1~3条带(EST9,10,11)组成,个体间存在差异。肾的EST I区带不同于其他组织,是由EST1,2酶带组成。

\* 中国科学院水生生物研究所国家重点实验室基金资助项目。

致谢:本院水产养殖系96级杨荣权同学参加部分实验。

收稿日期:1999-11-01;修回日期:2000-01-11

上述不同组织的酶活性有明显差异,考虑到消化盲囊、肾、鳃、后闭壳肌和外套膜组织的点样量的比例为 1: 2: 3: 6: 6, 从所显酶带的深浅便可知: 消化盲囊组织中 EST 酶的活性最高, 肾、鳃次之, 而后闭壳肌、外套膜最低。

## 2.2 过氧化物歧化酶(SOD 1.15.1.1)

不同组织的 SOD 电泳图谱见图 1B。

旗江珧 SOD 可分为两组酶带: 靠阳极的一组有 3 条清晰的酶带, 在各组织中均以迁移较慢的酶带表达较强; 而位于该带之上、迁移速度居中的酶带表达较弱; 迁移最快的带活性最弱, 且个别个体未显现出该

带。另外个别泳道(如  $d_4, a_1, k_4$ ) 该组谱带的迁移位置与其他泳道有所不同。

靠阴极的一组也有 3 条带, 各组织间酶谱表现出明显的差异, 消化盲囊中为一条迁移最慢的强活性带; 外套膜、后闭壳肌、鳃组织中是一迁移略快的强活性带; 而肾组织中为 2 条酶带, 除具有与外套膜、后闭壳肌、鳃组织相同迁移率的强活性带外, 还具有在这组酶带中迁移最快、活性极强的酶带。

SOD 酶活性在不同组织中也有明显差异: 消化盲囊、肾组织中活性最高, 而外套膜、后闭壳肌、鳃组织次之。

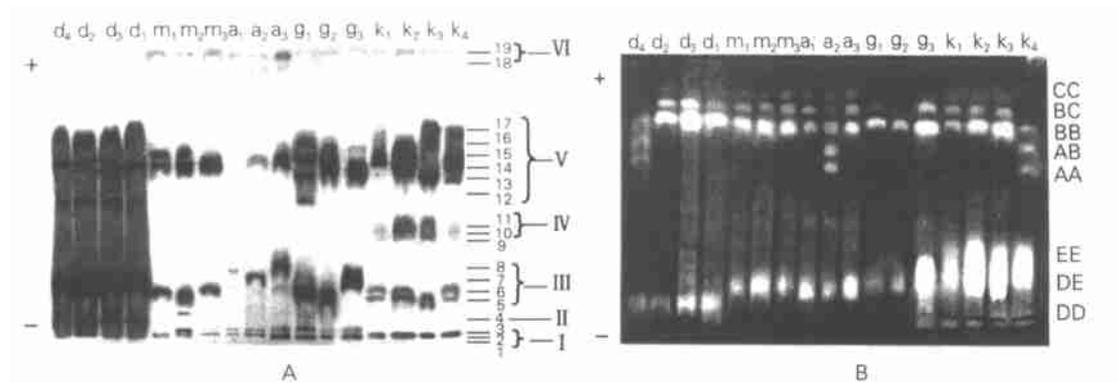


图 1 旗江珧不同组织 EST(A) 和 SOD(B) 同工酶电泳图谱

d — 消化盲囊 m — 外套膜 a — 后闭壳肌 g — 鳃 k — 肾

## 3 分析与讨论

### 3.1 EST 的表达

旗江珧 EST 同工酶在不同组织中的酶谱表型都存在一定差异。所分成的 6 组区带, 应分别对应不同的座位。从酶谱表型判断, 6 个座位编码的酶应为单体, *Est* I 座位对应 3 条酶带, 由 3 个等位基因编码, 在肾组织中表达为 *EST*1, *EST*2 同工酶, 而在其他 4 种组织中则为 *EST*1, *EST*3 同工酶; *Est* II (即 *EST*4) 仅在消化盲囊中存在, 由单个基因控制; *Est* III, *Est* V 在不同组织中酶谱表型有差异, 前者包括迁移率不同的 4 条带, 各组织中一般有 1~2 条, 可能由 4 个以上的复等位基因参与表达, 后者各组织中酶带数 1~4 条, 共有 8 条迁移率不同的带, 由多个基因参与编

码; *Est* IV 座位编码酶带共 3 条, 仅在肾组织中表达且个体间有差异, 由 3 个等位基因控制; *Est* VI 座位在肾、鳃、外套膜、肌肉组织 4 种组织中均为 1 条相同的酶带, 肌肉组织中还有另 1 条带, 可能是由一对等位基因控制, 在消化盲囊中不表达或酶带未显现。喻子牛<sup>[5]</sup>报道魁蚶的 EST 有 6 个座位, 其中 4 个为单态位点, 2 个为多态位点, 本文报道的旗江珧的研究结果与之相近, 在旗江珧中 *Est* III, *Est* V 两个座位编码的酶显示出多态性, 其余 4 个为单态位点。

### 3.2 SOD 的表达

根据 SOD 酶谱表型推测, 旗江珧的 SOD 同工酶由两个座位控制, 靠阳极一端的 SOD 酶是单座位二聚体酶, 类似于脊椎动物的上清液型 SOD (*s*-SOD), 分析在旗江珧群体中该座位包括 3 个复等位基因, 可分



别表示为 *Sod*a, *Sod*b 和 *Sod*c。由 b, c 等位基因参与编码形成了 BB, BC 和 CC 二聚体酶, 酶谱表现为 3 条带, 其中以 BB 的活性最强, 在各组织中均有表达; 由 a, b 等位基因参与编码形成了 AA, AB 和 BB 二聚体酶, 酶谱也表现为 3 条带。靠阴极一端的 SOD 酶也是单座位二聚体酶, 由 *Sod*d, *Sod*e 一对等位基因控制, 其产物 DD 只在消化盲囊中存在, EE 只分布于肾组织中, 而杂聚体 DE 除消化盲囊中未检测出来外, 在其他 4 种组织(肾、鳃、后闭壳肌和外套膜)中均有分布, 由此可以看出这对等位基因编码的同工酶在组织中的分布有明显差异。

一般认为 SOD 有两个座位控制, 分二聚体的 *s*-SOD(上清液型)和四聚体的 *m*-SOD(线粒体型)两类, 在相同的电泳条件下, *s*-SOD 因是可溶性的, 从而在上清液中酶含量较高而易于检测出来, 且迁移较快; 而 *m*-SOD 常因难溶于上清液中使上清液中酶含量较低而难检测出<sup>[3]</sup>。

在双壳类魁蚶的报道<sup>[5]</sup>中, 认为其 SOD 有 3 个座位, 而本文的结果旗江珧 SOD 为 2 个座位, 这种差异的存在, 是旗江珧的 SOD 座位缺少一个, 还是由于 *m*-SOD 同工酶在上清液中的酶含量太低而未检测出, 尚需进一步的研究。

### 3.3 关于组织特异性

研究表明, 旗江珧同工酶酶谱类型及活性, 有明显的组织特异性: EST, SOD 两种酶在消化盲囊中的活性明显高于其他组织, 肾、鳃两组织次之, 而后闭壳肌和外套膜组织活性最低。

分化的组织和细胞具有特定的结构和代谢特征, 而同工酶在不同组织中存在着一系列差异, 不同基因的表达产生了组织特异性的酶谱; 作为基因产物的同工酶, 性质方面的任何差异, 都可能在决定酶的功能中是重要的, 而酶的功能是与所在组织和细胞的功能相联系的。EST 是催化酯类化合物水解并进入中间代谢的重要酶类, 其作用除维持细胞正常的能量代谢外, 还能水解大量非生理正常存在的酯类化合物, 被

认为可能与机体的解毒作用密切相关。肾脏和消化盲囊是机体最重要的解毒器官, 在旗江珧中, EST IV 区带和 EST4 酶带分别仅存于肾组织和消化盲囊中, 因而这些酶可能与解毒的代谢活动有关。消化盲囊是旗江珧营养消化、吸收的重要场所, 大量的酯类化合物首先在这里进行水解, 以维持细胞正常的能量代谢, 该水解反应需要 EST 催化; 同时, 消化盲囊也是较易受到外界病原体侵害或不利因素影响的组织, SOD 是生物体防御氧化损伤的重要酶类, 当生物体受到外界病原体感染后, 体内自由基浓度将升高, 而 SOD 能清除体内过多的自由基 ( $O_2^-$ ), 以免除其对自身细胞的毒害。这恰与消化盲囊中 EST, SOD 同工酶活性明显高于其他组织相适应, 而 *Sod*d 编码的同工酶 DD 在肾组织中活性特别强, 可能也与该组织的某些特殊的代谢途径相关。另外, 在 SOD 的染色中, 肾组织的阴极端还能显示出一深蓝色带, 后闭壳肌和外套膜组织的阳极端出现深紫红色强带, 虽这些酶带并非 SOD 的特异性酶带, 但它们的存在也能反映出组织间生理特性和物质构成上的差异。这表明了生物体在长期的进化过程中, 组织分化的过程伴随着出现了一些适应于其功能的代谢特征, 导致了组织生理生化特征和同工酶表达上的特异性。

### 参考文献

- 1 王祯瑞. 中国动物志: 软体动物门, 双壳纲, 贻贝目. 北京: 科学出版社, 1997. 214 ~ 237
- 2 余祥勇等. 海洋科学, 1999, 4: 62 ~ 65
- 3 黄原. 分子系统学——原理、方法及应用, 北京: 农业出版社, 1998. 236 ~ 287
- 4 Harris, H., Hopkinson, D. . Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. New York: Oxford Publishing Co. Inc., 1976. 2 - 2 ~ 2 - 7
- 5 Yu Ziniu, Yang Rui, Kong Xiaoyu. 中国水产科学, 1998, 5(3): 7 ~ 12

(本文编辑: 李本川, 刘珊珊)