

中华绒螯蟹不同组织 LDH 同工酶凝胶电泳分析

王琦, 穆淑梅, 曹刚, 刘桂荣, 马丹丹, 康现江

(河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 采用高 pH 不连续系统聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳, 特异性组织化学染色对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的血清、肌肉、鳃、心脏、肝胰腺、精巢和精子等组织的乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶酶谱进行了研究。同时, 利用 2 种底物 (乳酸钠和 α -羟基 酸钠) 进行了特异性反应, 并对其精子特异性乳酸脱氢酶进行了研究。结果表明: 以乳酸钠为底物时, 中华绒螯蟹的肌肉、鳃、血清和心脏有 2 条谱带, 而精巢和精子有 3 条谱带, 但在肝胰腺中未发现谱带; 以 α -羟基 酸钠为底物时, 只在血清、精巢和精子发现有 1 条谱带。从而说明, 中华绒螯蟹乳酸脱氢酶同工酶存在组织特异性; 精子存在特异性乳酸脱氢酶。

关键词: 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*); 乳酸脱氢酶 (LDH); 同工酶; 聚丙烯酰胺凝胶电泳
中图分类号: Q55; Q959 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)04-0092-05

乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, 简称 LDH, EC 1.1.1.27) 是糖酵解途径中的一种重要的酶, 能可逆地催化乳酸和丙酮酸的相互转变, 广泛地分布于动物的各个组织, 以及植物和微生物之中^[1]。1959 年, Markert 等^[2] 用电泳法将牛心肌 LDH 结晶分离出 5 条区带, 均具有 LDH 催化活性, 首先提出了同工酶的概念。在鸟类和哺乳动物中, 它是由 A-亚基和 B-亚基所组成的四聚体, 由于分子中的 A-亚基和 B-亚基的相对含量不同形成 5 种同工酶 (LDH_{F5})。在骨骼肌中, 以 A-亚基为主; 而在心肌中, 则 B-亚基占优势^[3]。而且 LDH 在不同种动物, 不同组织, 不同的发育阶段或不同周期, 甚至个体在不同环境因素作用下均有其特异性谱带^[4]。

1963 年, Blanco 和 Zinkham^[5] 在人的成熟精子中首次发现了不同于 LDH_{F5} 的新型同工酶, 称为 LDH_X。它是 LDH 中与 LDH_{F5} 不同的另一种特殊类型的同工酶^[6]。同年, Goldberg^[7] 也在分析人精液的 LDH 电泳酶谱时发现, 除出现与体细胞相同的 5 条 LDH 同工酶区带外, 在 LDH₃ 和 LDH₄ 之间还存在额外的一条 LDH 同工酶区带。后来, 在许多哺乳动物和鸟类精子中均观察到 LDH_X 的存在, 并得知它们是由 G-亚基所形成的同质四聚体, 故又称 LDH C₄。目前, 普遍认为 LDH C₄ 仅存在于哺乳动物、鸟类和硬骨鱼中^[8,9]。Baldwin 等^[10] 从尾索动物海鞘 (*Pyura stolonifera*) 中分离了 LDH。此海鞘 LDH 为同质四聚体。陈明等^[3] 在对无脊椎动物中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765)) 成熟精

子的 LDH 研究时, 首次发现对虾成熟精子中存在 LDH C₄。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹 (以下简称河蟹), 主要产于中国, 是中国重要的经济蟹类。有关其 LDH 同工酶的研究国内已有一些相关报道: 乔新美等^[11] 比较了长江、瓯江河蟹的心脏、肝胰腺、卵巢和肌肉 4 种组织的 LDH 同工酶, 许加武等^[12] 对长江口河蟹与其他几种同科蟹的肝胰腺与步足肌肉的 LDH 同工酶进行了比较研究, 王丹等^[13] 对辽河、长江两水系河蟹 LDH 同工酶进行了比较研究, 都从生化方面表明了 LDH 同工酶存在明显的物种特异性和组织特异性, 程家骅等^[14] 对苏北南部沿海河蟹等 4 种常见蟹的眼、肝胰腺、肌肉和卵组织 LDH 同工酶进行了比较; 薛俊增^[15] 对患“抖抖病”的河蟹和健康河蟹的 5 种组织 LDH 同工酶进行了比较分析, 并表明病蟹与健康蟹的 LDH 同工酶分离图谱存在明显差异; 贾守菊等^[16] 对河蟹不同发育阶段腹肢粘液腺的 LDH 同工酶进行研究; 雷焕宗等^[17] 比较河蟹不同生理时期肌肉组织中 LDH 同工酶, 表明了河蟹

收稿日期: 2005-08-27; 修回日期: 2005-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371115); 河北省自然科学基金资助项目 (303118)

作者简介: 王琦 (1980), 男, 山西长治人, 硕士研究生, 主要研究方向: 生殖生物学, E-mail: wangqiwq@126.com; 康现江, 通讯作者, 电话: 0312-5079362, E-mail: XJKang@mail.hbu.edu.cn

附肢肌肉在不同生理阶段 LDH 同工酶的表达上具有一定特异性;王群等^[18]对河蟹生殖系统各组织 LDH 活性进行了测定,但未见河蟹精子 LDH 同工酶的相关报道。

作者采用高 pH 不连续系统聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳方法和两种不同的特异性底物,对河蟹的肌肉、心脏、鳃、肝胰腺、血清、精巢和精子等组织进行了 LDH 同工酶的酶谱分析,并对河蟹精子 LDH 同工酶进行了研究,为研究发育过程中基因的调控,对于了解精子的发生发育规律是比较有意义的,以及为进一步研究精子的发生和代谢过程中生理生化等的变化提供了资料。

1 材料和方法

1.1 样品采集

河蟹购自河北白洋淀,雄性未成熟和成熟河蟹各 15 只,每次实验各取 3 只,重复 5 次。活体解剖分别取其血清、鳃、心脏、腿部肌肉、肝胰腺、精巢和储精囊等组织,得到的储精囊进一步分离得到精子。以上材料放入低温冰箱中保存待用。

1.2 材料制备

各实验材料与 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 混合的比例为: 1: 2 (质量 (g)/体积 (mL)), 冰浴超声波匀浆,匀浆液在 0 °C, 12 000 r/min, 离心 30 min, 取上清液存入低温冰箱备用。

1.3 蛋白质质量浓度的测定

取上清液采用考马斯亮蓝染色法 (Bradford 法^[19]) 测定。

1.4 电泳方法

采用 DYCZ 24D 型双垂直平板电泳槽, DYY-6C 型恒流稳压电泳仪, 参照文献^[20]进行聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳。分离胶质量分数为 7.5%, 浓缩胶质量分数为 4%, 电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸。电泳采用稳压方式, 预电泳 15 min (150 V) 后, 样品在浓缩胶中电泳 15 min (150 V), 进入分离胶电压调到 300 V, 电泳 1 h 结束。

1.5 染色方法

以乳酸钠和 α -羟基丁酸钠两种底物, 参照文献^[21]进行 LDH 活性染色。待酶带显色 (呈蓝紫色) 后取出, 放于 7% 醋酸中保存。

1.6 结果记录

对显色后的凝胶片进行扫描, 并绘制模式图。

2 结果与讨论

2.1 以乳酸钠为底物河蟹不同组织 LDH 同工酶特征

将各样品的上样质量浓度调整到 2 g/L。上样品为成熟蟹肌肉、心脏、鳃、肝胰腺和血清 (图 1), 未成熟蟹精巢、成熟蟹精巢和精子 (图 2), 均以乳酸钠为底物。

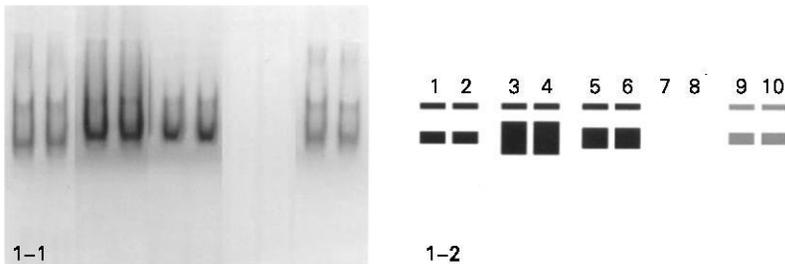


图 1 河蟹 5 种组织中 LDH 同工酶电泳图谱 (乳酸钠为底物)

Fig. 1 The electrophoretograms of LDH isozymes in five tissues of *E. sinensis* (Sodium lactate as substrate)

1-1. 电泳图 (图 2~ 4 同); 1-2. 模式图 (图 2~ 4 同); 1, 2: 肌肉; 3, 4: 心脏; 5, 6: 鳃; 7, 8: 肝胰腺; 9, 10: 血清 (图 3 图解同)

1-1. electrophoresis figure (the same as Fig. 2~ 4); 1-2. mode figure (the same as Fig. 2~ 4); 1, 2: muscle; 3, 4: heart; 5, 6: gill; 7, 8: hepatopancreas; 9, 10: serum (the same as Fig. 3)

由图 1 可以看出, 肌肉、心脏、鳃和血清均有 2 条谱带, 并且它们的相对迁移率也是一致的。但是它们的谱带颜色深浅是有差异的。这种谱带颜色深浅与其同工酶的活性是成正比的。而这种活性的差异, 决

定于其组织生理功能上的差别。蟹的肌肉、心脏和鳃的活动较频繁, 相应的这几种组织糖的代谢旺盛, 因而 LDH 酶质量浓度较大, 酶活性较大。而在血清中, LDH 酶活性较小。这主要是由于血淋巴是运输

氧和营养物质的组织,它所含的 LDH 酶部分来源于肌肉、心脏等器官组织,而在实验中所取的是血清,加之 LDH 是一种胞内酶,从而显示了血清较低的酶活性。这一电泳结果与薛俊增等^[15]的结果相同。然而对于肝胰腺来说,通过反复地进行实验都未发现 LDH 酶谱带。肝胰腺中 LDH 同工酶是否因活性极弱^[19],不易观察到;该酶在肝胰腺中更易失活^[14];还是与河蟹肝胰腺主要是进行脂类代谢有关^[15],有待进一步研究。

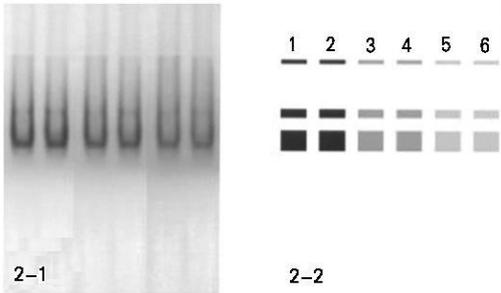


图2 河蟹精巢和精子 LDH 同工酶电泳图谱(乳酸钠为底物)

Fig.2 The electrophoretograms of LDH isozymes in testis and sperm of *E. sinensis* (Sodium lactate as substrate)

1,2: 未成熟蟹精巢; 3,4: 成熟蟹精巢; 5,6: 精子
1,2: immature testis; 3,4: mature testis; 5,6: sperm

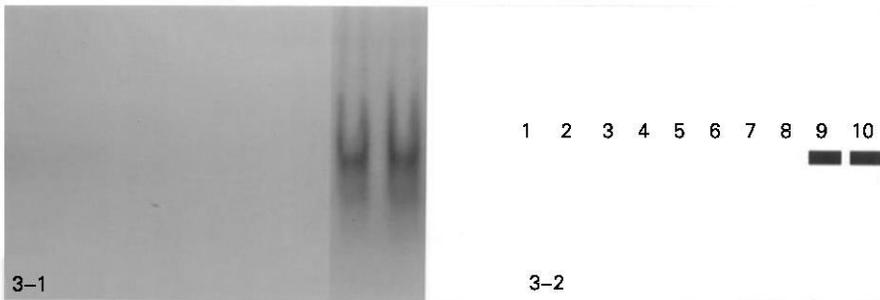


图3 中华绒螯蟹5种组织中LDH 同工酶电泳图谱(α -羟基丁酸钠为底物)

Fig.3 The electrophoretograms of LDH isozymes in five tissues of *E. sinensis* (α -Hydroxybutyric acid sodium salt as substrate)

由图4可以看出,精子、成熟蟹精巢和未成熟蟹精巢中都存在1条谱带,且三者具有相同的相对迁移率。但从谱带颜色深浅变化来看,刚好与图2相反。利用 α -羟基丁酸钠来检测LDH的活性,用以鉴定在河蟹精子中是否存在LDH C。结果表明,在河蟹的精子发生过程中,均存在LDH C,并且随着精子的成

由图2可以看出,未成熟蟹精巢、成熟蟹精巢和精子中都有3条谱带,并且显示了一致的相对迁移率。而其酶谱带的颜色是从未成熟蟹精巢过渡到成熟蟹精巢再到成熟精子逐渐减弱的,LDH酶活性也是逐渐减弱的。结果表明,在精巢和成熟精子中存在3种LDH同工酶,这一报道与陈明等^[3]的结果一致。再则,在河蟹的精子发生过程中,此LDH同工酶是普遍存在的,只是在各个发育时期其酶的含量和活性是发生变化的,表现为随着精子的成熟,此酶是逐渐减少的。

2.2 以 α -羟基丁酸钠为底物河蟹不同组织LDH同工酶特征

处理方法同2.1,将底物由乳酸钠改为 α -羟基丁酸钠后,其电泳图谱也发生了很大的变化(图3,4)。

由图3可以看出,肌肉、心脏、鳃和肝胰腺未发现LDH同工酶谱带,仅在血清中存在1条谱带。以 α -羟基丁酸钠为反应底物,能够高水平地显示某种组织中是否存在LDH C,也就是说, α -羟基丁酸钠可以作为LDH C的特异性底物^[8,9]。因此,在河蟹的肌肉、心脏、鳃和肝胰腺未发现LDH C的谱带,这与陈明等^[3]电泳结果一致,进一步说明了LDH C有更明显的组织特异性。而在血清中却存在LDH C,仍然是由于血淋巴在将氧和营养物质运输到河蟹雄性生殖系统的过程中,从其组织中携带出来的,进而表现出了一定的酶活性^[15]。

熟,LDH C的质量浓度和酶活性也是逐渐增强的,这与前面的实验结果——LDH的质量浓度和酶活性逐渐减弱,表现为消长关系,从而说明,在河蟹精子发生的过程中,LDH C逐渐替代LDH而发挥作用。进而推测,在河蟹精子成熟的过程中,发生着LDH不同类型的转变,这种转变更有利于河蟹精子的成熟,并在其精子的成熟过程中起着至关重要的作用。

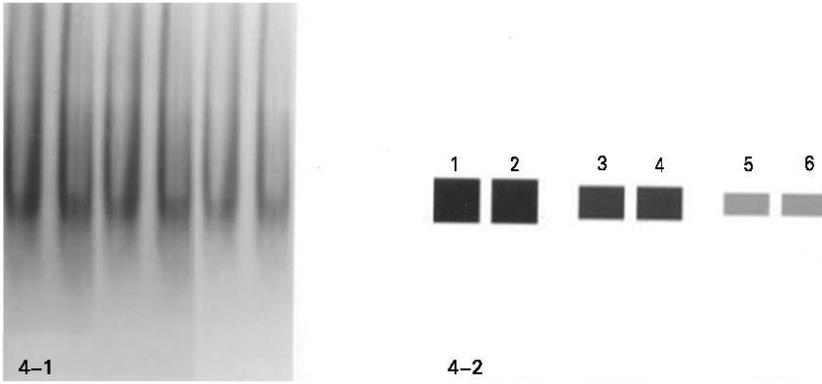


图4 中华绒螯蟹精巢和精子LDH同工酶电泳图谱(α 羟基丁酸钠为底物)

Fig.4 The electrophoretograms of LDH isozymes in testis and sperm of *E. sinensis*(α Hydroxybutyric acid sodium salt as substrate)

1, 2: 精子; 3, 4: 成熟蟹精巢; 5, 6: 未成熟蟹精巢
1, 2: sperm; 3, 4: mature testis; 5, 6: immature testis

本实验通过两种特异性底物——乳酸钠和 α 羟基丁酸钠, 分别对河蟹肌肉、鳃、心脏、肝胰腺、血清、精巢和精子进行了特异性反应, 显示了LDH同工酶的组织特异性, 首次发现了河蟹成熟精子中存在LDH C, 这对今后进一步了解河蟹的精子发生与成熟, 探讨蛋白质分子进化和动物亲缘关系提供了基础资料。有关它的功能以及在生殖细胞中出现的时期, 有待进一步研究。

参考文献:

[1] 方丁, 房世荣. 同工酶在医学上的应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 66-94.
[2] Markert C L, Moller F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1959, 45: 753-763.
[3] 陈明, 周念辉, 李爱媛, 等. 东方对虾精子中的乳酸脱氢酶C[J]. *科学通报*, 1994, 39(24): 2 272-2 274.
[4] 曾科文, 郑成洋, 潘雪峰. 水貂组织乳酸脱氢酶同工酶电泳分析[J]. *东北林业大学学报*, 1987, 15(6): 28-32.
[5] Blanco A, Zinkham W H. Lactate dehydrogenases in human testes[J]. *Science*, 1963, 139: 601-602.
[6] 李明. 精子乳酸脱氢酶同工酶的研究进展[J]. *临床检验杂志*, 2001, 19(6): 375-378.
[7] Goldberg E. Lactic and malic dehydrogenase in human spermatozoa[J]. *Science*, 1963, 139: 602.
[8] Zinkham W H, Blanco A, Kupchik L. Lactate dehydrogenase in testis: dissociation and recombination of subunits[J]. *Science*, 1963, 142: 1 303-1 304.
[9] Markert C L. Lactate dehydrogenase: biochemistry and function of lactate dehydrogenase[J]. *Cell Biochem Funct*, 1984, 2(3): 13-14.
[10] Baldwin K, Mortimer A P. Do ascidians possess the

ancestral subunit type of vertebrate lactate dehydrogenase[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1988, 246(2): 109-114.
[11] 乔新美, 曹维孝, 邹世平. 长江、瓯江中华绒螯蟹几种同工酶的分析比较[J]. *淡水渔业*, 1994, 24(5): 10-13.
[12] 许加武, 李思发. 长江口中华绒螯蟹与其它几种同科蟹的同工酶比较[J]. *水产科技情报*, 1996, 23(4): 159-162.
[13] 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[J]. *辽宁大学学报(自然科学版)*, 1995, 22(4): 79-81.
[14] 程家骅, 王云龙, 许加武, 等. 苏北南部沿海几种蟹类蛋白和同工酶的比较研究[J]. *中国水产科学*, 1998, 5(1): 10-17.
[15] 薛俊增. 患“抖抖病”中华绒螯蟹可溶性蛋白质和同工酶分析[J]. *动物学杂志*, 2002, 37(2): 17-21.
[16] 贾守菊, 应雪萍, 陈艳乐, 等. 中华绒螯蟹不同发育阶段腹腔粘液腺同工酶的比较[J]. *海洋湖沼通报*, 2004, 4: 52-60.
[17] 雷焕宗, 贾守菊, 应雪萍, 等. 中华绒螯蟹不同生理时期肌肉组织中同工酶的分析比较[J]. *河南科学*, 2004, 22(4): 480-483.
[18] 王群, 赵云龙, 陈立乔. 中华绒螯蟹雄性生殖系统生化组成及精子代谢[J]. *水产学报*, 2002, 26(5): 411-416.
[19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
[20] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 111-123.
[21] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 180-188.

Gel electrophoresis of lactate dehydrogenase(LDH) isozymes in different tissues of *Eriocheir sinensis*

WANG Qi, MU Shu-mei, CAO gang, LIU Gui-rong, MA Darr-dan, KANG Xiarr-jiang
(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Received: Aug., 27, 2005

Key words: *Eriocheir sinensis*; lactate dehydrogenase(LDH); isozymes; polyacrylamide gel electrophoresis

Abstract: The electrophoretograms of lactate dehydrogenase isozymes were studied in several tissues of *Eriocheir sinensis* by the high pH discontinuous system of polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) and the specific histochemical staining. At the same time, the two specific substrates (sodium lactate and α -Hydroxybutyric acid sodium salt) were managed in a specific reaction, and sperm specific LDH was researched by the specific dyeing. When sodium lactate served as the substrate in the muscle, gill, serum and heart, it was observed that the electrophoretograms of LDH were consisted of 2 bands, in the testis and sperm, there were 3 bands, in the hepatopancreas, however, there was no band. When α -Hydroxybutyric acid sodinm salt served as the substrate in serum, testis and sperm, it was observed that the electrophoretograms of LDH were consisted of one band. The results indicated that LDH isozymes had tissue specificity, the sperm of *E. sinensis* had sperm specific LDH.

(本文编辑: 刘珊珊)