

假雄牙鲆消化器官中碱性磷酸酶 比活性的研究*

王宏田 徐永立 张培军

(中国科学院海洋研究所)

碱性磷酸酶 (alkaline phosphatases) 是一种内源性酶, 几乎存在于所有动物的细胞膜 (plasma membrane) 中, 它在许多代谢活动中, 如动物的生长、蛋白质的合成、营养成分的转运、类固醇的生成等方面都发挥着重要的作用 (Ram *et al.*, 1985)。因此, 对于碱性磷酸酶的研究, 有利于了解鱼类的消化生理, 并有助于更深刻地理解鱼类体内营养成分的吸收和转运机制。假雄牙鲆是在雌性牙鲆的一定生长发育阶段, 用人工诱导的方法使之性转化所获得的。对于假雄牙鲆的生理、生化特性的研究, 至今还未见正式报道。本实验以一年龄假雄牙鲆为研究对象, 研究了不同消化器官中碱性磷酸酶的比活性, 并初步探讨了在不同发育时期碱性磷酸酶比活性的变化, 从而能够更深刻地理解假雄牙鲆体内营养成分消化与吸收的过程和机制, 并有助于牙鲆的人工培育。

一、材料与方法

1. 假雄牙鲆的饲养

假雄牙鲆由中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室诱导转化而得, 在中科院海洋研究所水族楼里饲养。12 条实验用牙鲆置于 $2\text{ m} \times 1.5\text{ m} \times 1.5\text{ m}$ 的饲养池中饲养, 通气、换水。实验组 I 中 5 条牙鲆于 7 月份宰杀, 体重 $350 \pm 20\text{ g}$; 其余 7 条继续饲养至 8 月, 然后任选其中的 5 条进行实验, 5 条鱼平均体重为 $460 \pm 30\text{ g}$ 。饲养过程中用捕捞的海水鱼饲喂, 每日上、下午各投喂一次。养殖海水的温度 7 月为 19°C 左右, 8 月为 25°C 左右。

2. 碱性磷酸酶的提取和测定 (陈定福, 1994; 北京大学生物系生物化学教研室, 1987)

(1) 碱性磷酸酶的提取 将待测牙鲆鱼器官剪碎, 加入 3 倍体积的 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 为 7.5, 内含 0.1 mol/L NaCl), 于冰水浴中进行匀浆。匀浆液中加

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3846 号。
国家 863 课题“全雌牙鲆遗传育种研究”资助项目, 863-819-01-03 号。
收稿日期: 1999 年 11 月 11 日。

入 20% (v/v) 冷正丁醇抽提, 离心 (4℃, 8000r/min), 取上清液进行测定, 或者将上清液于 -30℃ 保存待测。

(2) 碱性磷酸酶比活性的检测 取 0.4 mL 浓度为 0.01 mol/L 的 5'-AMP 溶液, 0.1 mL 浓度为 1.0 mol/L 的 MgCl_2 溶液, 0.3 mL 浓度为 0.25 mol/L, pH 为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液于试管中混合, 温度为 38℃, 预热 10 min, 加入酶粗提液立即混匀, 在 38℃ 下保温 30 min, 加入 50% 三氯乙酸 (CCl_3COOH) 水溶液 0.2 mL 以终止反应。然后向溶液中加入定磷试剂, 摇匀, 于 50℃ 下保温 25 min, 然后取出用自来水冷却, 660 nm 测定吸光度。对照反应中先加入三氯乙酸 (CCl_3COOH) 溶液, 再加入酶液, 其余操作同上。每一组反应作 3 份平行样, 1 mg 酶粗提液蛋白每分钟使反应吸光度增加的数值即为碱性磷酸酶的比活性 [单位: $\text{unit}/(\text{min}\cdot\text{mg})$]。

3. 酶粗提液中蛋白质含量的测定

以牛血清蛋白做标准蛋白, 采用 Coomassie 亮蓝法测定 (徐宜为, 1979)。

二、结果与讨论

本实验将牙鲆分为实验 I 组和 II 组两组进行, 两组牙鲆不同消化器官中碱性磷酸酶比活性的测定结果见表 1。

表 1 实验 I 组和 II 组假雄牙鲆不同消化器官中碱性磷酸酶的比活性/ $\text{unit}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$

	前肠	中肠	后肠	肝脏	胃
实验 I 组碱性磷酸酶比活性	0.097 ± 0.015	0.089 ± 0.017	0.068 ± 0.011	0.072 ± 0.015	0.037 ± 0.016
实验 II 组碱性磷酸酶比活性	0.135 ± 0.026	0.128 ± 0.019	0.095 ± 0.012	0.101 ± 0.017	0.064 ± 0.011

从表 1 中可以看出, 不同器官中碱性磷酸酶的比活性的大小次序为: 前肠 > 中肠 > 后肠, 肝脏 > 胃, 说明碱性磷酸酶在牙鲆肠中的活性按照由前向后的顺序递减。牙鲆前肠碱性磷酸酶的比活性较其他消化器官的比活性都高, 说明前肠在营养物质的吸收和转运方面发挥着主要作用。前肠与中肠的碱性磷酸酶的比活性没有显著差异 ($p > 0.05$)。

随着牙鲆的生长, 其肠部位和肝脏中的碱性磷酸酶的比活性也逐渐增强, 并且变化显著 ($p < 0.05$)。这种变化可能是由于环境因素和牙鲆自身生理变化共同作用的结果。

环境因素 (如盐度和温度等的改变) 能够直接影响水生动物体内碱性磷酸酶的比活性 (Chambers, *et al.*, 1975); 饵料中某些微量元素 (如锌等) 对鱼类体内碱性磷酸酶的活性也有很大的影响 (魏万权等, 1999; Maage, *et al.*, 1993; Lan, *et al.*, 1995)。本实验在饲喂牙鲆的过程中, 所用的饵料主要为海水鱼, 其中的营养组成基本保持不变, 因此, 饵料不是导致酶活性发生变化的主要原因。饲养牙鲆所用海水的温度由 19℃ 上升至 25℃ 左右, 前后变化较大, 因而水温可能是影响牙鲆体内碱性磷酸酶活性变化的重要外界因素。胃中碱性磷酸酶活性的变化不显著 ($p > 0.05$), 可能是因为胃的消化功能与肠、肝的功能不同。一般有胃的鱼类胃中环境为酸性, 主要消化酸性蛋白; 而肠中的环境通常为碱性, 主要对碱性蛋白进行消化, 我们在另一项实验中发现, 这一规律对于牙鲆同样适用。牙鲆胃中碱性磷酸酶的活性较弱, 而且在牙鲆的不同生长发育

阶段酶活性变化并不显著,说明牙鲆胃中的碱性磷酸酶在牙鲆体内营养成分的消化与吸收过程中可能并不起重要作用。

由于碱性磷酸酶在鱼类对营养物质的吸收与利用中发挥着重要的作用,因此,鱼类对营养需求的改变可以直接影响其体内碱性磷酸酶的活性。实验过程中,随着个体的生长发育和环境温度的升高,牙鲆需要更多的营养物质来维持它的自身组成物质的代谢需求,并满足其运动和其他生理活动所消耗的能量,因此,牙鲆体内碱性磷酸酶的活性增强,或许正是其自身组成物质的代谢需求。

由于实验材料的缺乏,本实验只研究了人工诱导的假雄牙鲆体内不同消化器官中碱性磷酸酶的比活性,所得出的结论是否适用于天然养殖的牙鲆,以及人工诱导的假雄牙鲆与自然状态下生长的雄性牙鲆的不同消化器官内的碱性磷酸酶的活性有无差异,还需要进一步研究探讨。

参 考 文 献

- 北京大学生物系生物化学教研室, 1987, 生物化学实验指导, 高等教育出版社, 203—205。
陈定福, 1994, 南方鲇碱性磷酸酶的分离纯化及部分性质的研究, 生物化学杂志, 10 (4): 420—425。
徐宜为, 1979, 实验免疫学技术, 科学出版社, 199。
魏万权、李爱杰、李德尚, 1999, 饲料中添加锌对牙鲆生长和生化指标的影响, 青岛海洋大学学报, 1: 60—65。
Chambers, J. E., *et al.*, 1975, Variation in enzyme activities of the American oyster (*Crassostrea virginica*) relative to size and season, *Comp. Biochem Physiol.*, 51B: 145—150。
Lan, W. G., M. K. Wong, K. K. Chee, *et al.*, 1995, Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of the analytical procedures part 3. Five-level design and its application in polarographic reaction system for selenium determination, *Analyst*, 120: 1669—1675。
Maage A., K. Julshamn, 1993, Assessment of Zinc status in juvenile Atlantic salmon (*salmo salar*) by measurement of whole body and tissue levels of zinc, *Aquaculture*, 117: 179—191。
Ram, R. N., A. G. Satyanesan, 1985, Mercuric chloride, cythion and ammonium sulfate induced changes in the brain, liver and ovarian alkaline phosphatase content in the fish *Channa punctatus*, *Envir. Ecol.*, 3: 263—268。

THE SPECIFIC ACTIVITIES OF ALKALINE PHOSPHATASE IN DIFFERENT DIGESTIVE TISSUES OF PSEUDOMALE BASTARD HALIBUT *PARALICHTHYS OLIVACEUS**

Wang Hongtian, Xu Yongli, Zhang Peijun
(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT

The specific activities of alkaline phosphatase in different digestive tissues in one-year-old pseudomale *Paralichthys olivaceus* were studied, and the enzyme activities in different stages were

* Contribution No. 3846 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.

compared. The mean weights of the fish in Group I was $350 \pm 20\text{g}$. The specific activities of alkaline phosphatase in foregut, midgut, hindgut, liver, and stomach were 0.097 ± 0.015 , 0.089 ± 0.017 , 0.068 ± 0.011 , 0.072 ± 0.015 , 0.037 ± 0.016 (unit/ (min · mg)). The mean weights of the fish in group II was $460 \pm 30\text{g}$. The specific activities of alkaline phosphatase in the foregut, midgut, hindgut, liver, stomach were 0.135 ± 0.026 , 0.128 ± 0.019 , 0.095 ± 0.012 , 0.101 ± 0.017 , 0.064 ± 0.011 (unit/ (min · mg)). From the results it can be concluded that the specific activities of alkaline phosphatase in different digestive tissues of pseudomale *Paralichthys olivaceus* are different. The specific activities of the alkaline phosphatase in the foregut and midgut are higher than those in other tissues, while the enzyme specific activity in the stomach is the lowest. Additionally, the enzyme activities in the liver and different parts of the gut of the fish in Group II are higher than those in Group I, while no significant difference was observed in the stomach.