

香鱼肌肉与免疫器官 6 种同工酶的表达

李明云 黄福勇

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

摘要:采用聚丙烯酰胺电泳方法,对香鱼(*Plecoglossus altivelis*)肌肉和肝脏、脾脏及肾脏 3 种免疫器官的 6 种与防御机能相关的同工酶的表达进行研究,共分析了 SOD、POD、ACP、ALP、CAT、EST 等 6 种同工酶的表达模式。结果表明,香鱼已经具有了完善的机体防御系统,肝脏和肾脏在香鱼的防御系统中发挥着十分重要的作用。本研究能为筛选具有较强抗病力和适应性的香鱼良种提供有价值的理论参考。

关键词:香鱼;肌肉;免疫器官;同工酶

中图分类号 S965.112;Q26 文献标识码:A 文章编号 0250-3263(2005)02-18-05

The Expression of Six Isozymes in Muscle and Immune Organs of Ayu (*Plecoglossus altivelis*)

LI Ming-Yun HUANG Fu-Yong

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: From the June to the Aug., 2003, 18 Ayu (*Plecoglossus altivelis*) samples were collected from the culturing ponds in Fuxi town, Ninghai Country, Zhejiang Province. Polyarylamide gel electrophoresis was used to detect the expression of six isozymes (SOD, POD, CAT, ACP, ALP, EST) correlating with immune function in muscle and three immune organs: liver, spleen, and kidney. The results showed that Ayu has complete defense system, and in the system, the liver and kidney act important roles. And the study can provide valuable ideas in the seed breeding of Ayu, especially in the cultivation of the seed with great capabilities in anti-disease and adaptability.

Key words: Ayu (*Plecoglossus altivelis*); Muscle; Immune organs; Isozymes

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)隶属鲑形目、香鱼科、香鱼属,为我国小型名贵经济鱼类。近年来,由于各地捕捞强度增大、水利设施建设以及环境污染日益严重等原因,各地香鱼资源量均急剧减少。现在,全国各地均广泛开展了香鱼的人工养殖,总产量及单位面积产量均大幅度增加。关于香鱼的地理分布、生态习性、繁殖生物学及人工繁殖技术,已经有较多报道^[1~7]。

当生物体处于逆境条件或受到病害侵袭时,体内的某些同工酶会发生显著的变化,所以这些酶同时又可以被用作生物体抗病力或抗逆性能的重要衡量指标。在这些酶中 SOD、POD、ALP 和 ACP 就是其中最重要的几种指示酶类;

CAT 可以催化 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2 ,也可催化 H_2O_2 氧化某些供氢体,连同 SOD、POD,都和动物清除自由基的能力密切相关,对动物机体的抗辐射损伤、防机体衰老和抗肿瘤等方面有极为重要的作用^[8];EST 是催化酯类化合物水解的酶系,能水解多种酯类化合物,包括某些药物,因此被认为具有解毒作用。上述 6 种酶都与鱼体的防御性机能密切相关。从现有文献来看,目前对鱼类防御性机能的研究主要集中在

基金项目 科技部国家科技成果重点推广项目计划(No. 2003EC000194);

第一作者介绍 李明云,男,教授,主要从事鱼类遗传育种研究。

收稿日期 2004-07-12,修回日期 2005-01-26

细胞、体液等免疫因子的成分、生理功能方面,研究鱼体内与防御机能相关的酶时,常常采用测定酶活性的方法。而在分子水平上,运用诸如同工酶等分子生物学方法对鱼体的防御机能进行定性研究的报道较少^[9]。本文采用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳方法,对香鱼肌肉和免疫器官内上述 6 种与鱼体防御机能密切相关的酶的表达以及活性进行了研究,以了解香鱼在抗病、抗逆、抗应激机制方面的规律,为香鱼的资源保护、良种筛选提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用香鱼于 2003 年 5~9 月采自浙江省宁海县凫溪镇,共 18 尾,体长为 12.6~15.5 cm,体重为 30~45 g。

1.2 样品制备 对香鱼进行活体取样,取肌肉、肝脏、脾脏、肾脏 4 种器官或组织,进行直接分析或置超低温冰箱(-71℃)保存至分析。上

述操作均在无菌条件下进行。

1.3 电泳、染色 同工酶电泳采用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸, TG pH=8.3。样品的制备及结果处理参照相建海的方法^[10],凝胶制备及电泳参照周宗汉等的方法^[11],凝胶染色参照相建海、胡能书和李思发的方法^[10,12,13],并略加改进。

1.4 结果记录与酶谱分析 凝胶用 7% 醋酸溶液脱色固定后进行酶谱分析,利用 FR 复目紫外/可见光分析生物凝胶成像系统观察、拍照,再对凝胶测量后按酶带迁移率手工记录。酶谱分析参照王中仁的方法^[14]。

2 结果

2.1 超氧化物歧化酶的表达 香鱼的 SOD 同工酶表达如图 1:1 和表 1 所示,SOD-1 仅在肝脏中表达,SOD-3 在肝脏、脾脏和肾脏中都表达,SOD-2 在肌肉、肾脏和肝脏中表达。SOD 酶

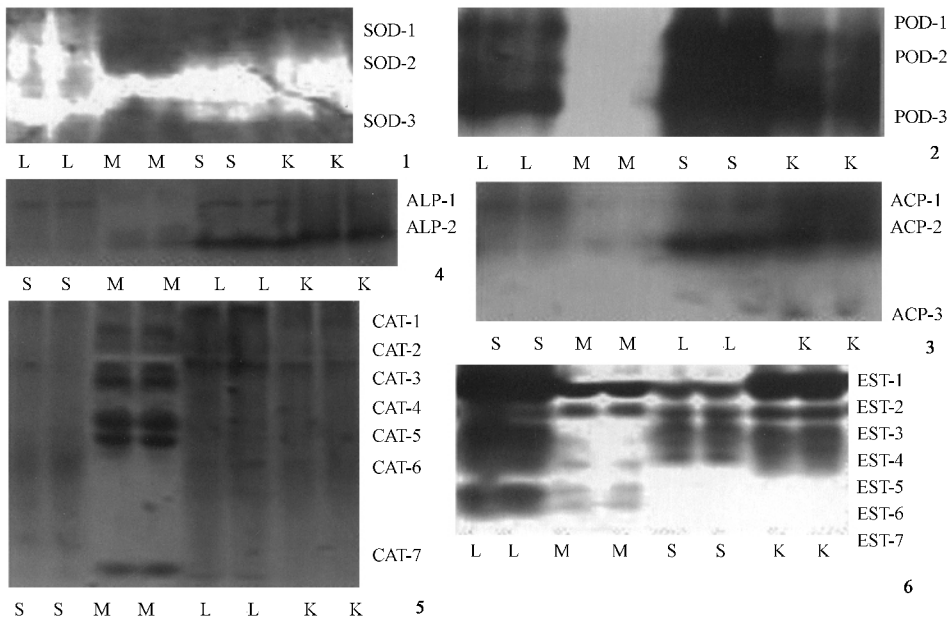


图 1 香鱼肌肉和免疫器官 6 种同工酶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of 6 isozymes in muscle and immuneorgans of Ayu

1. SOD; 2. POD; 3. ACP; 4. ALP; 5. CAT; 6. EST. L 肝脏; M 肌肉; S 脾脏; K 肾脏

图 1~6 中,各图谱电泳方向一致,均为上端阴极,下端阳极

L: Liver; M: muscle; S: spleen; K: kidney. In Fig. 1~6 the upside of the electrophoresis patterns is cathode and the underside of which is anticathode and the direction of all the electrophoresis patterns is same

在 4 种组织或器官中活性都比较高,但各免疫器官要明显高于肌肉,这也是与其生理机能相对应的。肝脏、肾脏和脾脏中,肝脏的 SOD 酶活性又要高于肾脏和脾脏。

2.2 过氧化物酶的表达 香鱼的 POD 同工酶表达如图 1 2 和表 1 所示,POD-1、POD-2 和 POD-3 均能在肝脏、脾脏和肾脏中检测到,且活性较强。POD 在脾脏中活性最强,在肌肉中没有检测到 POD 表达,说明肌肉中不含 POD 或活性极弱。

2.3 酸性磷酸酶的表达 香鱼的 ACP 同工酶表达如图 1 3 和表 1 所示,ACP 在肌肉和免疫器官内都可以检测到,ACP-1 和 ACP-2 在脾脏、肝脏和肾脏中都可以检测到,肌肉中只能检测到 ACP-2,且活性较弱,ACP-3 只能在肾脏中检测到。肝脏和肾脏中,ACP 活性较强,脾脏中活性较弱,肌肉中活性最弱。

2.4 碱性磷酸酶的表达 香鱼的 ALP 同工酶表达如图 1 4 和表 1 所示,肌肉和免疫器官内都可以检测到 ALP,在肝脏中 ALP 活性最强,这

与其功能相适应。在肌肉中只有 ALP-2 表达,脾脏中只有 ALP-1 表达,且两者中 ALP 活性都较弱。肝脏和肾脏中同时有 ALP-1 和 ALP-2 表达,但 ALP-1 活性较强而 ALP-2 活性较弱。

2.5 过氧化氢酶的表达 如图 1 5 和表 1 所示,在香鱼的免疫器官中,CAT 的表达较弱,脾脏中表达最弱,仅 CAT-6 检测到微弱活性,肝脏和肾脏中,仅有 CAT-1 和 CAT-3 表达,活性也较弱。但肌肉中 CAT 活性较强,除 CAT-1 和 CAT-6 没有检测到活性外,CAT-2、CAT-3、CAT-4、CAT-5 和 CAT-7 均检测到较强活性。

2.6 酯酶的表达 如图 1 6 和表 1 所示,在香鱼的肌肉和免疫器官中,酯酶具有复杂的酶谱,EST-1、EST-2、EST-3 和 EST-4 在 3 免疫器官中均有表达,除此之外,肝脏中还有 EST-6 和 EST-7 的表达,脾脏中还有 EST-5 的表达。肝脏、脾脏和肾脏 3 种免疫器官中,EST 活性均较强。肌肉中,有 EST-1、EST-2、EST-5、EST-6 和 EST-7 表达,但除了 EST-1 和 EST-2 活性较强外,其它活性均较弱。

表 1 香鱼 6 种同工酶在肌肉和免疫器官中的表达与活性

Table 1 The expression and activity of six isozymes in muscle and immuneorgans of Ayu

| 酶的名称 The name isozyme | 基因座位 The loci of gene | 组织与器官 Tissue and organs | | | |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------|-----------|-----------|
| | | 肌肉 Muscle | 肝脏 Liver | 脾脏 Spleen | 肾脏 Kidney |
| 超氧化物歧化酶 SOD | SOD-1 | - | +++ | - | - |
| | SOD-2 | ++++ | - | ++++ | ++++ |
| | SOD-3 | - | +++ | +++ | +++ |
| 过氧化物酶 POD | POD-1 | - | ++ | ++++ | ++ |
| | POD-2 | - | ++ | ++++ | ++ |
| | POD-3 | - | +++ | ++++ | +++ |
| 酸性磷酸酶 ACP | ACP-1 | - | + | + | ++++ |
| | ACP-2 | + | ++++ | + | ++++ |
| | ACP-3 | - | - | + | + |
| 碱性磷酸酶 ALP | ALP-1 | - | + | + | + |
| | ALP-2 | + | ++ | - | ++ |
| | CAT-1 | - | + | - | + |
| 过氧化氢酶 CAT | CAT-2 | + | - | - | - |
| | CAT-3 | ++ | + | - | + |
| | CAT-4 | ++++ | - | - | - |
| | CAT-5 | ++++ | - | - | - |
| | CAT-6 | - | - | + | - |
| | CAT-7 | ++ | - | - | - |
| | 酯酶 EST | EST-1 | ++++ | +++ | +++ |
| EST-2 | | +++ | ++ | ++ | +++ |
| EST-3 | | - | ++++ | ++ | ++ |
| EST-4 | | - | +++ | ++++ | - |
| EST-5 | | + | - | ++ | - |
| EST-6 | | + | +++ | - | - |
| EST-7 | | + | + | - | - |

++++ 表示活性最强;+++ 为活性强;++ 为活性较强;+ 为活性较弱;- 为无活性

++++ means the highest isozyme activity;+++ means high isozyme activity;++ means relatively higher isozyme activity;+ means relatively low isozyme activity;- means the activity of isozyme has not been detected.

3 讨论

3.1 香鱼肌肉与免疫器官机体防御的机能

有资料表明,香鱼对水质要求较高,野生香鱼只能生长在水质清澈、河底多石砾的通海溪流中,对各种毒物也较其他鱼类敏感^[15]。超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶在机体的清除自由基系统中,发挥着重要的作用^[16];酯酶能水解大量非生理存在的酯类化合物,包括某些药物,因此认为具有解毒作用。对一些动植物来说,在环境毒物存在的情况下,EST的表达会有显著的变化^[17,18]。另外,ACP和ALP在香鱼的防御系统,尤其是抗病机能中起着重要的作用^[19,20]。ACP是一组在酸性条件下可水解各种磷酸酯的酶,还可催化磷酸基团的转移,对底物特异性较低;ALP直接参与磷酸基团的转移和钙磷代谢,在脊椎动物的骨化中起重要作用。在人类疾病诊断中,ACP和ALP已经得到广泛应用。结果表明,POD在3种免疫器官中均有表达,其他5种酶在肌肉和3种免疫器官中均有表达,表明香鱼已经具有了完善的机体防御系统,这是与香鱼对水体环境条件要求较高的特点相适应的。从香鱼肝脏和肾脏中6种同工酶的表达看来,SOD、POD、ACP、ALP和EST均有表达,且酶活性较强,表明肝脏和肾脏在香鱼的防御系统中发挥着十分重要的作用;脾脏的ACP、ALP和CAT同工酶都是仅有微弱表达,但POD和SOD活性极强,表明这两种酶是脾脏防御机能的重要组成部分;在肌肉中,检测到CAT、SOD和EST活性较强,说明这3种酶在肌肉防御机能中发挥作用。

3.2 香鱼肌肉和免疫器官同工酶表达在遗传育种中的应用

实验所用材料均采自浙江省宁海县凫溪镇,该镇为我国香鱼的著名产地,研究表明,凫溪香鱼同工酶多态座位比例为21.8%,平均杂合度为0.0459,群体的遗传多样性处于比较高的水平(另文发表)。此外,我国辽宁碧流河、日本琵琶湖都是著名的香鱼产地。凫溪镇香鱼养殖大多采用凫溪溪流中的野生成鱼做亲鱼,或者用野生香鱼的F1、F2代做亲鱼,

这是该群体遗传多样性较高的重要原因。但由于近年来凫溪上游多次采用人工繁殖的鱼苗进行大规模放流,现在已经无法找到野生亲鱼。当前要培育优良香鱼苗种,除了要做好本地优良种质保护之外,还要采用遗传育种、主要是杂交育种的方法。对优良香鱼苗种进行培育、筛选的一个重要指标就是各个群体的抗病力和环境适应能力。由图1和表1可以看出,香鱼肌肉及免疫器官内,和防御机能密切相关的6种同工酶均有清晰的酶谱。通过研究香鱼肌肉和免疫器官内上述6种同工酶的方法,可以为筛选具有较强抗病力和适应性的香鱼良种提供有价值的理论参考。

参 考 文 献

- [1] 李明月,丁天喜,竺俊全等.我国香鱼的研究现状及养殖前景.宁波大学学报(理工版),1999,12(4):85~90.
- [2] 李明月,徐善良,王丹丽等.中国凫溪香鱼与日本琵琶湖香鱼的种间差异.浙江水产学院学报,1995,14(2):57~61.
- [3] 李明月,徐善良,吴洪喜.香鱼生长特性及体型变化的研究.浙江水产学院学报,1992,11(1):16~21.
- [4] 李明月,章红勇,徐茵.凫溪香鱼的食性及其相关器官发育的研究.浙江水产学院学报,1982,1(1):73~88.
- [5] 曹克驹,李明月.凫溪香鱼繁殖生物学的研究.水产学报,1982,6(2):107~118.
- [6] 李明月,何常金.香鱼工厂化规模养殖试验.淡水渔业,2003,33(4):30~32.
- [7] 李明月,竺俊全,赵志东等.香鱼苗种繁育及养成技术.淡水渔业,2000,30(7):3~5.
- [8] 刘志鸿,牟海洋,王清印.软体动物免疫相关酶研究进展.海洋水产研究,2003,24(3):86~90.
- [9] 罗曼,蒋立刻,刘颖等.野生与养殖长吻鮠血液及不同器官同工酶的比较.应用与环境生物学报,2000,6(5):447~451.
- [10] 相建海.海洋动物细胞和种群生化遗传学.济南:山东科学技术出版社,1999,70~80.
- [11] 周宗汉,林金榜,朱婉华.介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法.淡水渔业,1983,(2):35~40.
- [12] 胡能书,万贤国.同工酶技术及其应用.长沙:湖南科学技术出版社,1985,86~126.
- [13] 李思发.中国淡水主要养殖鱼类种质资源研究.上海:科学技术出版社,1998,189~193.
- [14] 王中仁.植物等位酶分析.北京:科学技术出版社,1996,

- 140 ~ 163.
- [15] 李明云, 史久品, 王雷等. 香鱼对几种常用鱼药的急性中毒试验. 浙江水产学院学报, 1996, **15**(2): 145 ~ 148.
- [16] 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989, 111 ~ 133.
- [17] 王兰, 杨秀清, 王茜等. 镉在河蟹五种组织器官的积累及对酯酶同工酶的影响. 动物学报, 2001, **47**(增刊): 96 ~ 100.
- [18] Li Shaonan, Fan Defang. Freshwater fish and their responses to inhibition by triphenol phosphate and malaoxon. *Journal of Pesticide Science*, 1999, **1**(1): 57 ~ 61.
- [19] 陈玉银, 黎军英. 家蚕中肠酸性磷酸酶细胞化学的研究. 蚕业科学, 1999, **25**(3): 154 ~ 157.
- [20] 张洪渊, 刘克武, 石安静等. 背角无齿蚌碱性磷酸酶的分离、纯化及其动力学研究. 水生生物学学报, 1996, **20**(1): 57 ~ 62.