

红螯螯虾胚胎发育期主要消化酶和同工酶的活性变化

罗文^{①②③} 赵云龙^{①*} 姚俊杰^① 段晓伟^① 安传光^①

(^① 华东师范大学生命科学学院 上海 200062 ; ^② 绍兴文理学院生命科学学院 绍兴 312000 ;

^③ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 : 采用生物化学方法测定了红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 胚胎发育各期主要消化酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和脂肪酶)的比活力及主要同工酶(乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和酯酶)的活力。结果显示,5种消化酶各自表现出不同的变化模式,胃蛋白酶和胰蛋白酶的比活力早期均逐渐上升,到发育后期胃蛋白酶出现快速下降,而胰蛋白酶却仍保持较高水平,淀粉酶比活力呈“V”字型变化趋势,晚期活性较高,纤维素酶和脂肪酶的比活力则均较低。4种同工酶酶谱随胚胎的发育渐趋复杂,酶活性也随之增强。结果表明,消化酶和同工酶活力的高低均受其基因的调控,并随胚胎发育适时表达,为胚胎组织、器官和系统的形成以及未来仔虾的开口摄食提供物质保证。

关键词 : 红螯螯虾 ; 胚胎发育 ; 消化酶 ; 同工酶

中图分类号 : Q955 文献标识码 : A 文章编号 : 0250-3263(2006)01-12-07

Changes in Main Digestive Enzyme and Isozyme Activities during Embryonic Development of Redclaw Crayfish

LUO Wen^{①②③} ZHAO Yun-Long^① YAO Jun-Jie^① DUAN Xiao-Wei^① AN Chuan-Guang^①

(^① School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062 ;

^② School of Life Sciences, College of Shaoxing Arts and Sciences, Shaoxing 312000 ;

^③ Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract : The objectives of the present study were to investigate the changes in main digestive enzymes (pepsin , trypsin , amylase , cellulase , lipase) and isozymes (LDH , MDH , G6PD , EST) during embryonic development of Redclaw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*). The results showed that all five digestive enzymes had some activities and their activities changed differently. Pepsin and trypsin specific activities were gradually increased in earlier embryonic development stages , but pepsin activity decreased rapidly in later stages and trypsin activity still kept at a high level. Amylase specific activity changed as “ V ” pattern and reached high values in later stages . Cellulase and lipase specific activities all showed relatively low values . The four isozyme patterns were complicated and their activities enhanced correlating with the stages of embryonic development . The results suggest that digestive enzyme and isozyme activities are controlled by their genes and expressed in sequence during embryonic development , which provides construre and energy substances for the formation of tissues , organs and systems , and guaranty to the feeding of larvae .

Key words : *Cherax quadricarinatus* ; Embryonic development ; Digestive enzyme ; Isozyme

基金项目 国家自然科学基金(No.30270161) ;

* 通讯作者 ,E-mail : ylzha@bio.ecnu.edu.cn ;

第一作者介绍 罗文,男,博士后,讲师,从事甲壳动物发育生物学研究 ;E-mail luowenbosi@163.com.

收稿日期 2005-06-01,修回日期 2005-11-15

红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 俗称澳洲淡水龙虾, 是极具增殖潜力的淡水经济虾类之一。由于目前在其亲体培养和幼体培育的人工育苗环节中, 胚胎的死亡率较高、成活率低, 已成为制约红螯螯虾规模化育苗和养殖的瓶颈。

卵黄是红螯螯虾卵子为后续胚胎发育所积累的主要营养物质, 消化酶和同工酶对卵黄的水解利用为胚胎发育提供各种必需的结构和能量物质来源。近年来, 甲壳动物消化酶和同工酶的功能日益受到人们的关注, 但研究多集中在幼体和成体阶段^[1~7], 针对胚胎发育的研究较少^[8~12]。因此, 在基本掌握红螯螯虾胚胎形态发生和卵黄主要生化组成及变化规律的基础上^[13~17], 对其胚胎发育期主要消化酶和同工酶的活性变化进行了研究, 以期了解卵黄、酶活性变化与胚胎发育之间的关系, 为深入了解虾蟹胚胎发育的机理积累生物学基础资料。

1 材 料

亲虾于 2003 年 10 月取自浙江省淡水水产研究所养殖场。暂养 1 周后选取雌雄平均体长分别为 (10.21 ± 0.68) cm 和 (12.75 ± 0.87) cm、平均体重分别为 (72.41 ± 3.32) g 和 (80.73 ± 3.68) g、基本性成熟的成虾。按 2:1 的雌雄性比饲养在 $30 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ 的水族缸内促产, 水温控制在 28°C 左右。雌虾抱卵后随机抽取 5 只, 单独饲养, 定期取材。取样前先取少量虾卵, 在解剖镜和显微镜下确定其胚胎发育期, 胚胎发育根据其形态特征分为 6 期^[15], 即: I. 受精卵 (fertilized egg stage) \ II. 卵裂和囊胚期 (cleavage stage and blastula stage) \ III. 原肠期 (gastrula stage) \ IV. 无节幼体期 (egg nauplius stage) \ V. 复眼色素形成期 (embryo with eye pigments forming stage) \ VI. 准备孵化期 (prepare-hatching stage)。每期取 0.2 g 卵置 -70°C 冰箱保存备用。取自同一亲虾 6 个不同发育时期的样本为 1 组, 共设 5 组平行。

2 方 法

2.1 消化酶活力测定 胃蛋白酶、类胰蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶 5 种消化酶活力测定参见潘鲁青^[7]的方法进行, 可溶性蛋白质含量测定采用福林-酚法^[18]。胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力单位: 40°C 下, 每分钟水解干酪素生成 $1 \mu\text{g}$ 酪氨酸作为一个酶活力单位; 淀粉酶活力单位: 25°C 下, 每分钟催化淀粉生成 $1 \mu\text{g}$ 麦芽糖作为一个酶活力单位; 纤维素酶活力单位: 40°C 下, 每分钟催化纤维素生成 $1 \mu\text{g}$ 葡萄糖作为一个酶活力单位; 脂肪酶酶活力单位: 37°C 下, 每分钟催化橄榄油生成 $1 \mu\text{g}$ 脂肪酸作为一个酶活力单位。所有消化酶均最终以比活力即 U/mg prot. 表示。

2.2 同工酶测定

2.2.1 测定 乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和酯酶 4 种同工酶的测定方法参见卢建平^[11]的方法进行。

2.2.2 记录 本文参照胡能书^[19]的方法绘制酶谱示意图, 图中■示酶带色深, 为一级带 (酶活性强); ▨示酶带色浅, 为二级带; □示酶带色极浅, 为三级带 (酶活性极弱); ▨表示扩散带。同时每一级酶带又可根据酶带的宽度分为宽带和窄带二类。本文酶带的编号参照国际生物化学命名规则而定, 把向阳极泳动最快的同工酶编号为 1, 如 EST-1, 并从阳极到阴极依次编号。

2.3 统计分析 雌虾抱卵后采用随机抽取 5 只 (即 $n = 5$) 的方法以消除样品间的个体差异。消化酶的比活力数值采用 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ 来表示, 并用 SPSS 统计软件进行 One-Way ANOVA 方差分析和比较。

3 结 果

3.1 消化酶

3.1.1 可溶性蛋白的含量变化 图 1 所示, 红螯螯虾胚胎发育时期可溶性蛋白的含量呈先上升后下降的变化趋势, 第 III 期 (原肠期) 升至最高, 第 VI 期 (准备孵化期) 最低。

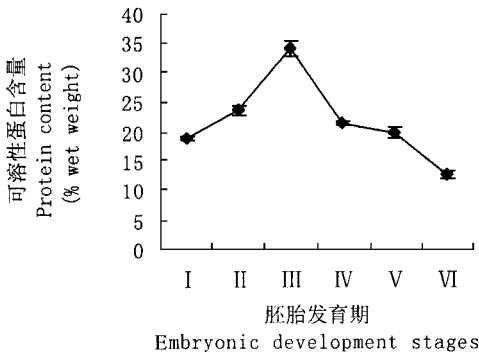


图1 红螯螯虾胚胎发育各期可溶性蛋白的含量
Fig.1 Soluble protein content at different embryonic development stages of *Cherax quadricarinatus*

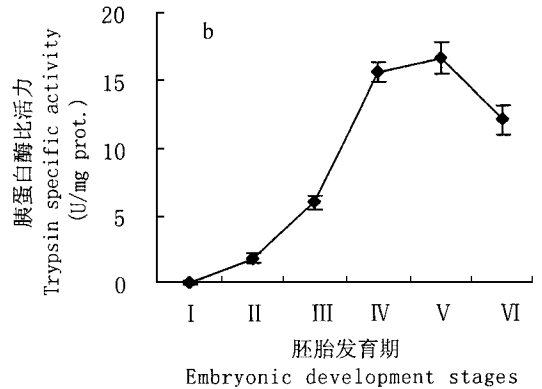
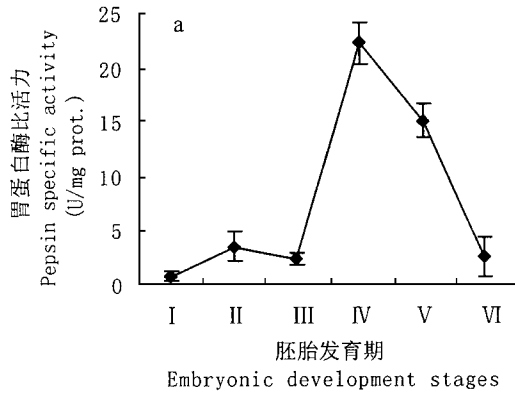


图2 红螯螯虾胚胎发育各期胃蛋白酶和胰蛋白酶的比活力

Fig.2 Pepsin and trypsin specific activity at different embryonic development stages of *Cherax quadricarinatus*

a. 胃蛋白酶的比活力 ; b. 胰蛋白酶的比活力。
a. Pepsin specific activity ; b. Trypsin specific activity.

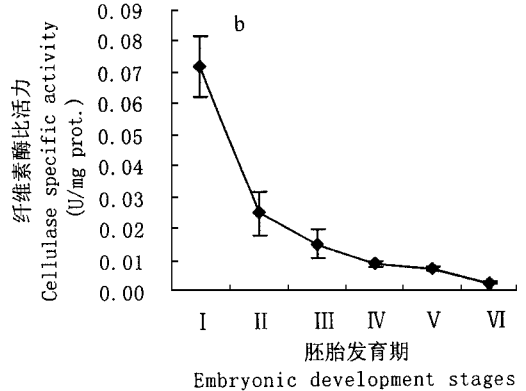
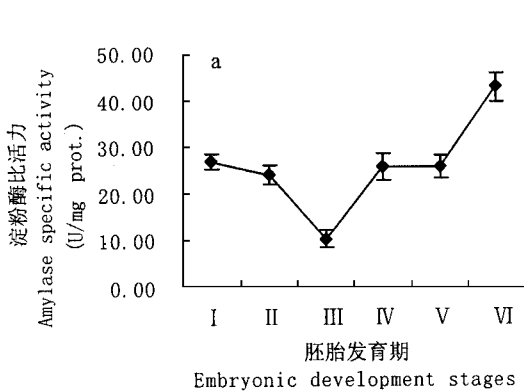


图3 红螯螯虾胚胎发育各期淀粉酶和纤维素酶比活力

Fig.3 Amylase and cellulase specific activity at different embryonic development stages of *Cherax quadricarinatus*

a. 淀粉酶的比活力 ; b. 纤维素酶的比活力。

a. Amylase specific activity ; b. Cellulase specific activity.

3.1.2 胃蛋白酶和胰蛋白酶的比活力 由图2可见,胃蛋白酶和胰蛋白酶的比活力表现出两种不同的变化模式。胃蛋白酶比活力前3期均很低,第Ⅳ期(无节幼体期)快速升至最高,而后逐渐降至与前3期相近的低水平。而胰蛋白酶的比活力从第Ⅰ期(受精卵)开始逐渐上升,至第Ⅴ期(复眼色素形成期)达到最高,第Ⅵ期仅有下降。

3.1.3 淀粉酶和纤维素酶 由图3可见,淀粉酶和纤维素酶的比活力亦表现出两种不同的变化模式。淀粉酶的比活力变化趋势如“V”字形,第Ⅲ期最低,Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ期活性相近,第Ⅵ期升至最高。纤维素酶的比活力很低,第Ⅰ期

最高也仅为(0.071 6 ± 0.009 7) U/mg prot. ,后随胚胎发育逐渐下降。

3.1.4 脂肪酶 图 4 所示 脂肪酶的比活力总体上不高 ,其中第 III 期最低为(0.064 2 ± 0.010 5)U/mg prot. ,第 V 期最高仅为(0.156 7 ± 0.015 9)U/mg prot. ,第 VI 期又略有下降。

3.2 同工酶

3.2.1 乳酸脱氢酶(LDH ,E. C. 1.1.1.27) 图 5 所示 红螯螯虾胚胎的 LDH 活性总体上随胚胎发育的深入而呈逐渐复杂和加强的趋势。前 3 期 LDH 同工酶无条带显示 ,直到第 IV 期才开始出现 1 条带 ,即 LDH-1 ,第 V 期也仅见 LDH-1 ,颜色有所加深 ;第 VI 期的酶谱有较大的变化 ,显示有 4 条酶带 ,酶活性明显加强 ,尤其以 LDH-1 的活性为最强。

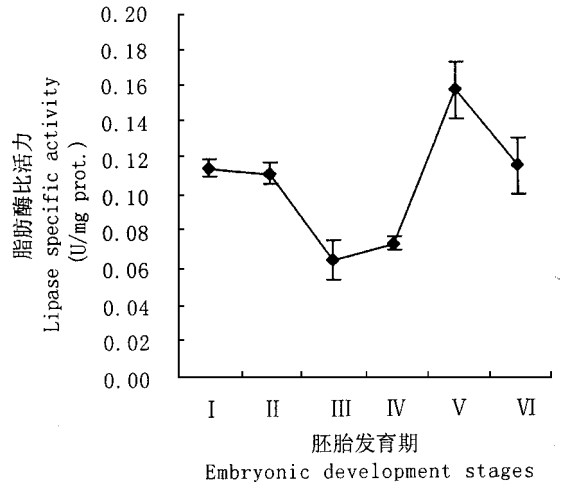


图 4 红螯螯虾胚胎发育各期脂肪酶比活力
Fig.4 Lipase specific activity at different embryonic development stages of *Cherax quadricarinatus*

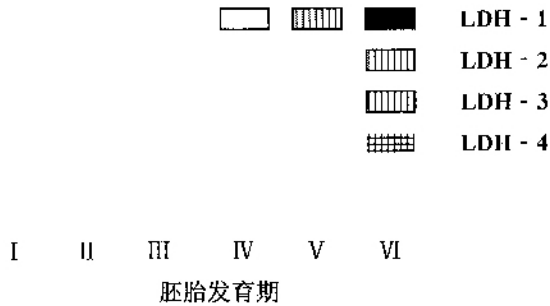
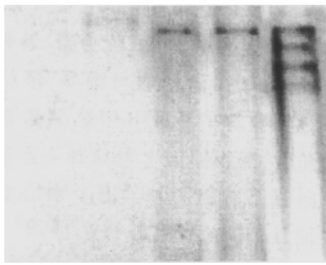


图 5 红螯螯虾胚胎不同发育时期 LDH 同工酶谱

Fig.5 Electrophoretograms of LDH isozymes during embryonic development stages of *Cherax quadricarinatus*

3.2.2 苹果酸脱氢酶(MDH ,E. C. 1.1.1.37) 图 6 显示红螯螯虾胚胎中 MDH 的酶谱总体呈逐渐加深和复杂的变化趋势。前 2 期无明显酶带显示 ,第 III、IV 期均出现 1 条酶带 ,为 MDH-2 ,第 IV 期的带比第 III 期略深。从第 V、VI 期开始酶谱出现 2 组条带 ,但以前面一组的条带为主 ,后一组基本上是扩散型的条带 ,颜色也较淡。第 V 期和第 VI 期的酶谱相比 ,第 V 期的酶带颜色略深。

3.2.3 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD ,E. C. 1.1.1.49) 图 7 显示 G6PD 同工酶在胚胎发育

的前 4 期均无条带 ,仅在第 V、VI 期各出现 2 条酶带 ,第 V 期为 G6PD-1 和 G6PD-3 条带 ,而第 VI 期则为 G6PD-1 和 G6PD-2 条带 ,其中 G6PD-1 的颜色基本相同。

3.2.4 酯酶(EST ,E. C. 3.11.1.1) 图 8 显示 EST 同工酶在胚胎发育第 II 期开始出现条带 ,为 EST-5 和 EST-6。从第 III 至第 V 期条带逐渐加深和增多 ,出现了 EST-4。第 VI 期的酶谱颜色最深 ,条带也最为复杂 ,共出现 8 条带 ,其中尤以 EST-2、EST-3 和 EST-5 颜色为深。

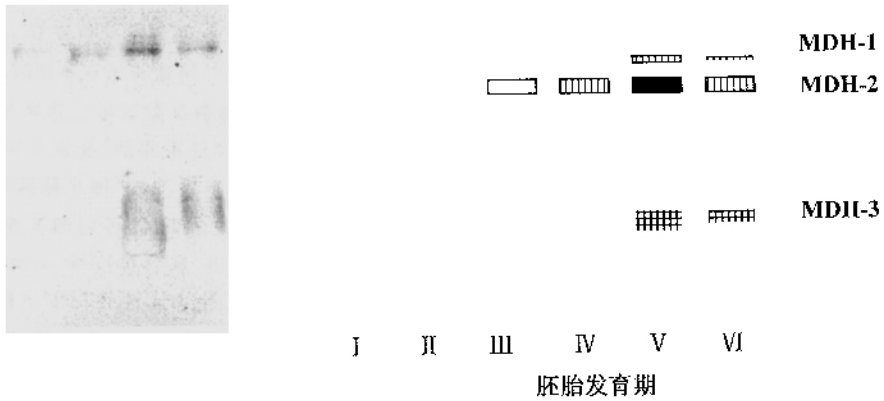


图 6 红螯螯虾胚胎不同发育时期 MDH 同工酶谱

Fig.6 Electrophoretograms of MDH isozymes during embryonic development stages of *Cherax quadricarinatus*

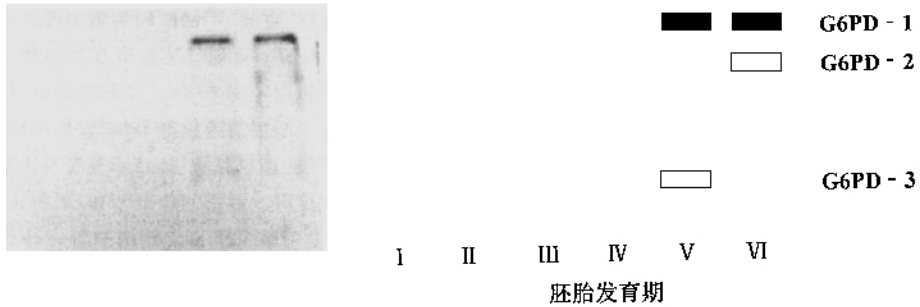


图 7 红螯螯虾胚胎不同发育时期 G6PD 同工酶谱

Fig.7 Electrophoretograms of G6PD isozymes during embryonic development stages of *Cherax quadricarinatus*

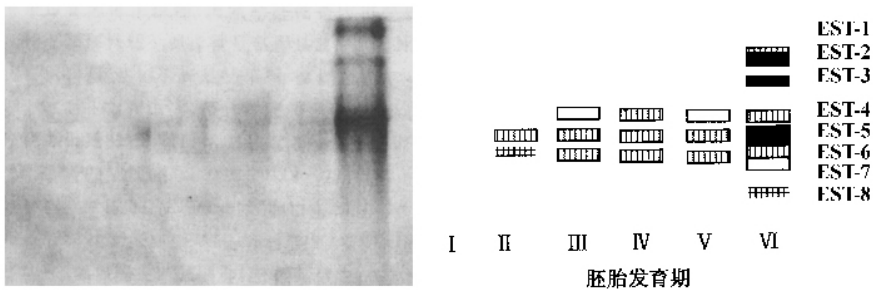


图 8 红螯螯虾胚胎不同发育时期 EST 同工酶谱

Fig.8 Electrophoretograms of EST isozymes during embryonic development stage of *Cherax quadricarinatus*

4 讨论

4.1 消化酶与胚胎发育间的关系 红螯螯虾以抱卵的方式进行胚胎孵化,通常认为抱卵孵化的蟹其胚胎发育仅依靠自身储存的丰富卵

黄作为营养物质^[9]。以前的研究发现^[15],红螯螯虾胚胎在原肠期以前,是以表面卵裂形成多细胞为主,消耗营养物质不多,因此,胃、胰两种蛋白酶的活性呈缓慢的上升,可溶性蛋白的含量也同时累积上升,为后续的胚胎发育作准备。

原肠期后随着细胞快速分化和组织、器官的雏现,尤其是肝胰腺及消化系统的逐渐形成,胃、胰两种蛋白酶的比活力同步达到最高值。然而胚胎发育到准备孵化期,两种消化酶却表现出不同的变化模式,胃蛋白酶的比活力快速下降至很低,而类胰蛋白酶的比活力仍保留较高水平。这可能与两种酶的功能不同有关,胃蛋白酶可将蛋白质水解成肽等短肽链,而类胰蛋白酶则可将多肽水解成氨基酸,对蛋白质的吸收利用更为直接和重要,从而表明红螯螯虾是以胰蛋白酶来为今后仔虾发育作消化蛋白的准备。这在其他一些虾蟹幼体或仔虾期研究中,胰蛋白酶比活力远高于胃蛋白酶的结果得到了验证^[7,20]。

糖类物质在红螯螯虾胚胎发育的早期主要用于各种蛋白和脂类复合物的构建,在胚胎发育的信号传导中起重要作用^[21]。随着甲壳和消化系统的逐步形成,淀粉酶的比活力快速上升,至准备孵化期达到最高。淀粉酶的比活力在胚胎发育末期快速上升的现象在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和锯缘青蟹(*Scylla serrata*)中都有报道^[9,12],说明淀粉酶对虾蟹仔虾的独立开口摄食非常重要。

5种消化酶在胚胎发育初期就具有一定的活性,表明母体在卵母细胞形成过程中已将相关的酶或卵源性 mRNA 转运并储存在卵黄中,它们对胚胎发育的启动以及早期卵黄物质的利用具有重要作用,进而为胚胎早期发育过程中细胞的快速增长及迁移提供保障^[22]。随着胚胎发育的进行,母型物质的逐渐消耗,需要合子型基因的适时表达并完全取而代之。因此,胚胎必然存在一个由母型调控向合子型调控转变的过程,并开始合成自身的 mRNA 和蛋白质。这个过渡期对胚胎发育非常关键,如果不能顺利完成,胚胎就不能进一步形成组织和器官。李少菁^[9]曾发现不能孵化的胚胎和幼体,其消化酶活性明显低于能正常孵出的胚胎和幼体。这可能是许多胚胎尽管卵黄丰富,却停留在发育早期而死亡的主要原因之一。因此在生产上,可尝试使用简单快捷的消化酶活力测定来宏观监

控虾蟹胚胎发育的顺利与否。原肠期后消化道和肝胰腺逐渐形成并开始分泌消化酶,至胚胎准备孵化期,几种主要的消化酶均升至较高水平,为仔虾孵化后开口摄食作好准备。Biesiot^[23]亦证实,美国龙虾(*Homarus americanus*)的胚胎在其幼体孵出之前已有酶合成和分泌细胞的存在。故在育苗生产过程中,针对准备孵化期消化酶的高低,配制适合仔虾开口摄食的饵料,对提高仔虾的存活率亦至关重要。

4.2 同工酶与胚胎发育间的关系 LDH、MDH 和 G6PD 同工酶主要功能都是参与细胞的能量代谢。红螯螯虾胚胎发育的早期主要以卵裂和细胞迁移为主,胚胎消耗的能量不多,故这3种同工酶活性均很低,酶谱不明显。从第Ⅲ期后,随着原肠的形成,胚胎开始分化出组织并形成多种器官原基,尤其是心跳的出现和心脏的逐渐形成^[13,14]。胚胎能量代谢开始进入高峰期,需要通过糖酵解、三羧酸循环,维持足够量还原型谷胱甘肽以保护细胞不被氧化或启用其他代谢路径(如磷酸戊糖旁路)来为胚胎发育提供能量和结构物质^[24]。

据报道^[16],脂类在红螯螯虾胚胎发育中的作用仅次于蛋白质。本研究中胚胎发育期的 EST 同工酶酶谱的出现早于其他4种同工酶,并随发育逐渐加强,至胚胎准备孵化期酶谱最为复杂,酶活性最强。有学者^[25-27]曾报道过许多甲壳动物脂肪酶的活性明显低于酯酶,甚至有的只有酯酶而无脂肪酶,本研究中脂肪酶的比活力明显偏低,与上述报道基本相符。原因可能在于脂肪酶的适宜底物为长链脂肪酸的甘油酯,且要求底物呈乳化状态,在高等动物中则往往需胆汁来辅助消化脂肪;而酯酶的主要功能是水解脂肪族酯和芳香族酯,且酶分子普遍具有多样性,对脂类的消化更广泛。由此可见,红螯螯虾脂类的消化、吸收和代谢主要是依靠酯酶而非脂肪酶来完成。

红螯螯虾同工酶在胚胎发育早期活性很低,说明它是以合子型调控为主。编码同工酶的基因在原肠期前后的激活对于胚胎的能量代谢非常关键。一些代谢所需的关键性同工酶基

因在这个时期被激活并表达,酶活力从此开始显著增强,这也与其循环系统的日益完善相适应。

参 考 文 献

- [1] Morgan R P ,Kramarsky N E ,Sulkin S D. Biochemical changes during larval development of the Xanthid Crab *Rhithropanopeus harrisi*. Isozyme changes during ontogeny. *Marine Biology* , 1978 **48** :223 ~ 226.
- [2] Thebault M T , Bernicard A. Variations in the lactate dehydrogenase activity during the development of the shrimp *Palaemon serratus* . *Comp Biochem Physiol* ,1978 **61B** :379 ~ 384.
- [3] Hirche H J , Anger K. Digestive enzyme activities during larval development of *Hyas araneus* . *Comp Biochem Physiol* ,1987 , **87B**(2) :297 ~ 302.
- [4] 王桂忠 ,李少菁. 锯缘青蟹个体发育过程中同工酶谱的比较研究. *海洋学报* ,1991 **13**(3) :412 ~ 416.
- [5] 李纯厚 ,钟振如 ,陈敏. 斑节对虾个体发育早期的同工酶变化. *水产学报* ,1994 **18**(1) :62 ~ 64.
- [6] 张志峰 ,马英杰 ,廖承义等. 中国对虾幼体发育阶段的同工酶研究. *海洋学报* ,1997 **19**(4) :63 ~ 71.
- [7] 潘鲁青 ,王克行. 中华绒螯蟹幼体消化酶活力与氨基酸组成的研究. *中国水产科学* ,1997 **14**(2) :13 ~ 20.
- [8] Ewing R D ,Clegg S S. Lactate dehydrogenase activity and anaerobic metabolism during embryonic development in *Artemia salina* . *Comp Biochem Physiol* ,1969 **31**(2) :297 ~ 307.
- [9] 李少菁 ,王桂忠 ,汤鸿等. 锯缘青蟹胚胎发育过程中几种水解酶活力的比较研究. *厦门大学学报(自然科学版)* ,1995 **34**(6) :970 ~ 973.
- [10] Gonzalez-Baro M R ,Heras H ,Pollero R J. Enzyme activities involved in lipid metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borellii* . *Journal of Experimental Zoology* , 2000 **286**(3) :231 ~ 237.
- [11] 卢建平 ,姜乃澄. 罗氏沼虾胚胎发育过程中同工酶的研究. *东海海洋* ,2000 **18**(3) :34 ~ 39.
- [12] 田华梅 ,王群 ,赵云龙等. 中华绒螯蟹胚胎发育过程中的消化酶活力及氨基酸组成. *中国水产科学* ,2003 **10**(5) :402 ~ 408.
- [13] 赵云龙 ,王群 ,堵南山. 罗氏沼虾细胞胚胎发育的研究 I . 胚胎外部结构形态发生. *动物学报* ,1998 **44**(3) :249 ~ 256.
- [14] 孟凡丽 ,赵云龙 ,陈立侨等. 红螯螯虾胚胎发育研究 I . 胚胎外部结构的形态发生. *动物学研究* ,2000 **21**(6) :468 ~ 472.
- [15] 孟凡丽 ,赵云龙 ,陈立侨等. 红螯螯虾胚胎发育研究 : II . 消化系统的发生. *动物学研究* ,2001 **22**(5) :383 ~ 387.
- [16] 李荷迪 ,周忠良 ,罗文等. 红螯螯虾胚胎发育过程中脂类及脂肪酸组成的分析. 见:甲壳动物学会编. *甲壳动物论文集(第四辑)*. 北京:科学出版社,2003 :376 ~ 381.
- [17] 罗文 ,周忠良 ,赵云龙等. 红螯螯虾胚胎发育过程中蛋白质含量及氨基酸组成的分析. *华东师范大学学报(自然科学版)* 2004 **1** :88 ~ 92.
- [18] 李建武 ,萧能赓 ,余瑞元等. *生物化学实验原理和方法*. 北京:北京大学出版社,1994 :168 ~ 170.
- [19] 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 ~ 130.
- [20] 刘玉梅 ,朱谨钊 ,吴厚余等. 中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究. *海洋与湖沼* ,1991 **22**(6) :571 ~ 575.
- [21] Babu D E. Observations on the embryonic development and energy source in the crab *Xantho bidentatus* . *Mar Biol* ,1987 , **95** :123 ~ 127.
- [22] Briggs R ,Cassens G. Accumulation in the oocyte nucleus of a gene product essential for embryonic development beyond gastrula. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 **55** :103 ~ 109.
- [23] Biesiot P M ,Capuzw J M. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards. *J Exp Mar Biol Ecol* , 1990 **136** :107 ~ 122.
- [24] 沈同 ,王镜岩主编. *生物化学*. 北京:高等教育出版社,1990 :103 ~ 108.
- [25] Berner D L ,Hammond E G. Phylogeny of lipase specificity. *Lipids* ,1970 **5** :558 ~ 562.
- [26] Lovett D L ,Felder D L. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus*(Crustacea ,Decapoda ,Penaeidea). *Biology Bulletin* , 1990 **178** :144 ~ 159.
- [27] 汤鸿 ,李少菁 ,王桂忠等. 锯缘青蟹幼体消化酶活力. *厦门大学学报(自然科学版)* ,1995 **34**(1) :88 ~ 93.