

## 中华鳖同工酶研究

杨弘 夏德全 吴婷婷 简纪常 董在杰 曹莹 王涛

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

**摘要** 采用垂直淀粉胶电泳对中华鳖脑、眼、心、肌、肝、肾和卵巢七种组织中的六种同工酶系统(LDH、ADH、IDH、ME、G6PDH、EST)进行研究, 构建了中华鳖同工酶酶谱, 并利用草鱼 LDH-B<sub>4</sub> 抗体对中华鳖 LDH 酶谱进行了免疫化学分析, 确定了中华鳖 LDH 同工酶酶谱和亚基组成, 揭示了鱼类 LDH 与爬行类 LDH 在进化上的保守性。

**关键词** 中华鳖, 同工酶, 淀粉胶电泳, 免疫化学反应

中华鳖(*Amyda sinensis*)在我国大部分地区均有分布, 长江流域最广。近年来中华鳖养殖业发展速度较快, 是我国主要的特种水产养殖品种之一, 其经济价值极高。随着养殖规模的日益扩大, 导致其鳖种和稚鳖供不应求, 造成对野生鳖的大量捕杀, 使野生种群数量急剧下降。同时, 各地引入其它地方稚鳖和鳖种, 造成各地方种群严重混杂, 破坏了中华鳖种质资源。

同工酶作为遗传的生化指标, 现已广泛用于各物种的种群结构研究。本文采用同工酶电泳技术, 对中华鳖不同组织的不同同工酶系统进行研究, 确定其各组织同工酶酶谱, 并以此建立其种质鉴定的生化遗传标记, 为其种质利用和保护提供依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验用中华鳖捕自太湖, 平均个体重 150-200 克。活鳖运回实验室后, 割断颈动脉放血, 解剖, 取脑、眼、心、肌、肝、肾、卵巢七种组织, 立即 -20℃ 保存备用。

**1.2 样品制备** 取七种组织称重后, 加 4℃ 预冷的 pH7.0 的 0.1M 磷酸缓冲液(w/v=1/4)于冰浴中匀浆, 4℃、12 000rpm 离心 40 分钟, 肝样品重复离心一次, 取上清液立即电泳。

**1.3 LDH 同工酶的免疫化学反应** 按夏德全等方法<sup>[2]</sup>, 取脑组织样品与草鱼 LDH-B<sub>4</sub> 抗体以 1:1 或 1:2 比例混合, 37℃ 保温 5 分钟, 4℃、10 000rpm 离心 15 分钟, 取上清液电泳。

**1.4 电泳** 将美国 Sigma 公司和 Electro-starch 公司所产淀粉按 1:1 混合制胶, 胶浓度为 15%, 缓冲系统用 TC pH8.5(用于 LDH、IDH、ME), TC pH8.5(用于 ADH)和 EBT pH8.7(用于 G6PDH、EST), 电泳在 4℃ 冰箱中进行 16-18 小时。

**1.5 染色** ME 按 Siciliano 和 Shaw 方法<sup>[12]</sup>, 其余酶按 Shaw 和 Prasad 方法<sup>[10]</sup>。

收稿日期:1997-02-17。

## 2 结果

**2.1 乳酸脱氢酶(LDH, E.C.1.1.1.27)** 图 1 表明,中华鳖各组织 LDH 均为五带酶谱。为了查明其亚基组成,在脑样品 1 和 2 中分别以 1:1 和 1:2 比例加入草鱼 LDH-B<sub>4</sub> 抗体, B<sub>4</sub> 抗体与组织中含 B 亚基的 LDH 四聚体发生免疫化学反应(含 B 亚基的四聚体在图谱上消失),从图 1 中 1 和 2 揭示,图上只留下 A<sub>4</sub>、A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>(由于抗体量不大,故图上仍留下 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>,随抗体量的增加,其染色强度减弱,图上 2 比 1 染色浅),这表明中华鳖 LDH 同工酶在电泳图谱上依迁移率从慢至快依次为 A<sub>4</sub>、A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>、A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>、B<sub>4</sub>。眼、肌中 A<sub>4</sub> 丰富,心肌中 B<sub>4</sub> 丰富,未见在鱼类肝中通常含有的 C<sub>4</sub> 带。

**2.2 醇脱氢酶(ADH, E.C.1.1.1.1)** 鱼类肝中有一个 ADH 基因位点,产物为二聚体<sup>[8]</sup>。本研究揭示中华鳖肝中也有一条酶带(图 2),它是一个 Adh 位点的产物 A<sub>2</sub>。

**2.3 苹果酸酶(ME, E.C.1.1.1.40)** 鱼类的 ME 可分为细胞质型(s-ME)和线粒体型(m-ME)<sup>[5]</sup>,其中 m-ME 有一个基因位点编码,为四聚体产物 C<sub>4</sub>,在电泳图谱上迁移较慢;s-ME 在鱼类上也只有一个基因位点,产物为 A<sub>4</sub>,在电泳图谱上迁移较快。本研究揭示中华鳖 ME 与鱼类一样,也有 s-ME 和 m-ME,并与鱼类酶谱较相近,各由一个基因位点控制,除肾脏中 ME 酶活性较强外,其它组织中 ME 活性均非常弱(图 3)。

**2.4 异柠檬酸脱氢酶(IDH, E.C.1.1.1.42)** 鱼类 IDH 分为细胞质型(s-IDH)和线粒体型(m-IDH)<sup>[11]</sup>,m-IDH 有一个基因位点编码,在电泳图谱上表型为一条带,迁移慢;s-IDH 有二个基因位点编码,表型为三条带,迁移快。心脏中 IDH 一般 m-IDH 较显性,肝脏 s-IDH 较显性。研究表明,中华鳖的 IDH 酶谱类似于鱼类(图 4)。心、肌中 m-IDH 显性,肝、肾中 s-IDH 显性。

**2.5 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH, E.C.1.1.1.49)** 中华鳖 G-6-PDH 酶谱表明(图 5),不同组织中,脑、卵巢中酶活性较强,心、肌中酶活性极低,因 G-6-PDH 是体内葡萄糖代谢中已糖磷酸旁路的重要酶<sup>[1]</sup>,故推测中华鳖心脏、肌肉中缺乏此代谢旁路,但此旁路为需氧代谢途径,心脏作为富氧组织而 G-6-

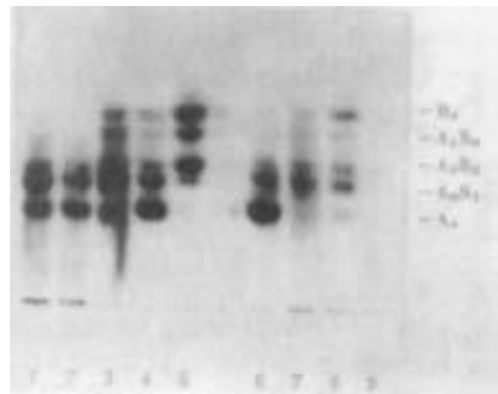


图 1 中华鳖不同组织 LDH 酶谱

Fig. 1 Electrophoretogram of LDH for seven tissues of *Amyda sinensis*

1. 脑 + LDH-B<sub>4</sub> 抗体(1:1) Brain + anti-B<sub>4</sub> of grass carp (1:1) 2. 脑 + LDH-B<sub>4</sub> 抗体(1:2) Brain + anti-B<sub>4</sub> of grass carp (1:2) 3. 脑 Brain 4. 眼 Eye 5. 心肌 Heart 6. 肌肉 Muscle 7. 肝 Liver 8. 肾 Kidney 9. 卵巢 Ovary

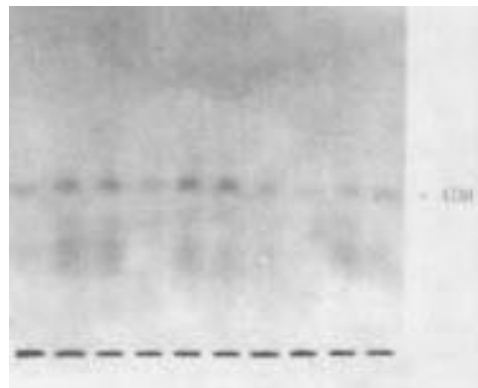


图 2 中华鳖肝中 ADH 酶谱

Fig. 2 Electrophoretogram of ADH isozymes in the liver of *Amyda sinensis*

PDH 活性很弱,可能与鳖类特殊的生理、生活习性有关。

**2.6 酯酶(EST, E.C.3.1.1.1)** 研究表明,中华鳖 EST 的表达具有明显的组织特异性,其电泳酶谱可分为两个区域(图 6),有多条酶带的迁移慢的区域,而迁移快的区域只有在肝组织中有酶带,从多个肝组织样品中 EST 酶谱可看出,此区域酶带具有多态现象(图 7),共出现了三种表型,即图 7 中 3 和 5 分别为两种纯合体,1、2 和 4 为它们的杂合体。

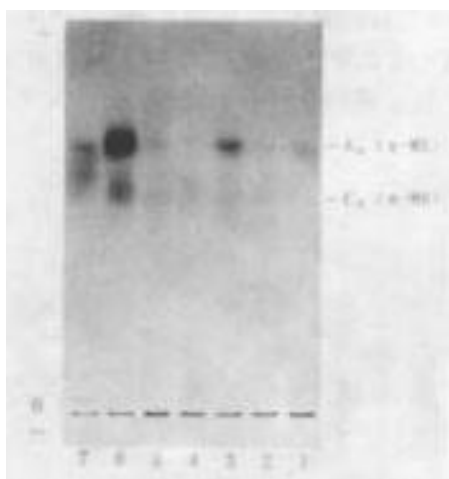


图 3 中华鳖七种组织中 ME 图谱

Fig. 3 Electrophoretogram of the ME isozymes in seven tissues of *Amyda sinensis*

1. 脑 Brain 2. 眼 Eye 3. 心肌 Heart 4. 肌肉 Muscle 5. 肝 Liver 6. 肾 Kidney 7. 卵巢 Ovary



图 4 中华鳖七种组织中 IDH 图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of the IDH isozymes in seven tissues of *Amyda sinensis*

1. 脑 Brain 2. 眼 Eye 3. 心肌 Heart 4. 肌肉 Muscle 5. 肝 Liver 6. 肾 Kidney 7. 卵巢 Ovary

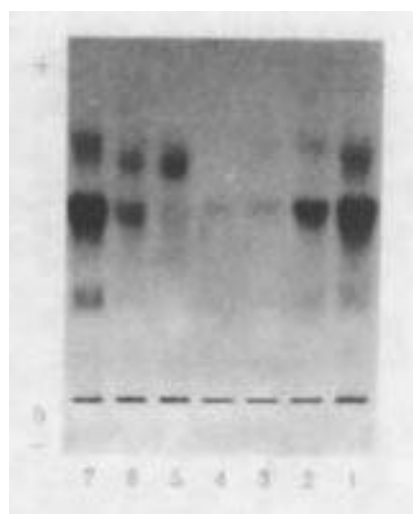


图 5 中华鳖七种组织中 G6PDH 图谱

Fig. 5 Electrophoretogram of the G6PDH isozymes in seven tissues of *Amyda sinensis*

1. 脑 Brain 2. 眼 Eye 3. 心肌 Heart 4. 肌肉 Muscle 5. 肝 Liver 6. 肾 Kidney 7. 卵巢 Ovary

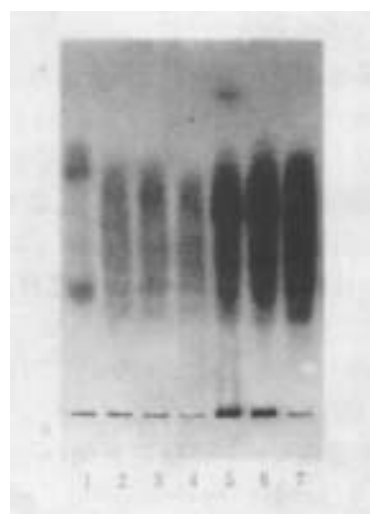


图 6 中华鳖七种组织中 EST 图谱

Fig. 6 Electrophoretogram of the EST isozymes in seven tissues of *Amyda sinensis*

1. 脑 Brain 2. 眼 Eye 3. 心肌 Heart 4. 肌肉 Muscle 5. 肝 Liver 6. 肾 Kidney 7. 卵巢 Ovary

### 3 讨论

3.1 LDH 在鱼类、鸟类、哺乳类中均有 A、B、C 三个基因编码,其中 A、B 两个位点的产物在多数组织中存在,而 C 位点表达具有组织特异性,在鸟类和哺乳类中主要在睾丸中表达<sup>[7,14]</sup>,与精子发育有关。鱼类 C 基因一般在眼或肝中表达<sup>[9]</sup>,爬行类中未发现 C 基因的存在。

3.2 应用免疫化学反应进行 LDH 同工酶酶谱分析比单纯应用电泳技术要准确得多,可以确定各酶带的亚基组成,此项技术在鱼类上已得到运用<sup>[13]</sup>。我们曾利用草鱼 LDH-A<sub>4</sub>、B<sub>4</sub>、C<sub>4</sub> 抗体对草鱼、鲢、团头鲂、板鲫、鳊、奥利亚罗非鱼等淡水鱼类不同组织的 LDH 酶谱进行了免疫分析<sup>[2,3,4]</sup>,表明草鱼 LDH 抗体无种的特异性,可与其它鱼类相应的 LDH 同工酶发生免疫化学反应。本研究利用草鱼 LDH-B<sub>4</sub> 抗体分析与鱼类亲缘关系较远的中华鳖 LDH 酶谱,结果表明它们之间仍能发生抗原抗体反应,并可确定其亚基组成,这揭示了 LDH 同工酶在生物进化历程中具有相当高的结构保守性。

3.3 LDH 同工酶除了在代谢活动中起重要作用外,有人还发现 LDH 具有结构蛋白作用,鸭晶状体 ε-晶体蛋白就是 LDH-B<sub>4</sub><sup>[6]</sup>。在中华鳖眼 LDH 酶谱上,LDH-A<sub>4</sub> 酶活力特别高,而其它酶活性要弱得多,这表明 LDH-A<sub>4</sub> 在眼中特别丰富,据此推测其眼晶体中 LDH-A<sub>4</sub> 可能也是作为结构蛋白存在,与鸭晶体中 LDH-B<sub>4</sub> 作用一样。

3.4 不同种类的同工酶在表达上具有一定的联系,中华鳖 LDH 和 G-6-PDH 在不同组织中的活性高低正反映了这种联系。LDH 是糖酵解中的关键酶,G-6-PDH 则是己糖磷酸旁路中的关键酶,而糖酵解是体内葡萄糖代谢的主要途径,己糖磷酸旁路则是重要的补途径。在中华鳖心肌中,LDH 活性很强(图 1),G-6-PDH 活性很弱(图 5),这可能与其生活习性有关,鳖类活动一般较缓慢,代谢率低,糖酵解途径提供的能量可能已足够心脏活动的需要。在中华鳖卵巢中,则情况正好相反,LDH 活性极弱,而 G-6-PDH 活性较强,卵巢是核酸合成反应旺盛的组织,己糖磷酸旁路的产物是 5-磷酸核糖,它既可作为核酸合成的原料,又可经过一些变化而进入糖酵解过程,故在卵巢中促进己糖磷酸旁路途径,抑制糖酵解途径是最有效的。在中华鳖脑组织中,LDH 与 G-6-PDH 活性均很强,这可能与脑是神经中枢,需要大量能量有关。在中华鳖肝中 EST 发现了多态现象,以此可作为品种选育的分了遗传标记。

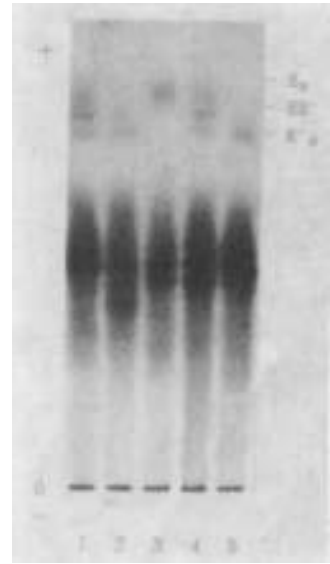


图 7 中华鳖肝 EST 多态性  
Fig. 7 Polymorphism of EST in liver of *Amyda sinensis*

### 参 考 文 献

- [1] 沈同等,1980.生物化学(下册).高等教育出版社(北京)。
- [2] 夏德全等,1990.鱼类乳酸脱氢酶同工酶 A<sub>4</sub> 性质的研究.核农学报,4(4):225-229。
- [3] 薛国雄等,1991.鱼类乳酸脱氢酶同工酶 B<sub>4</sub> 性质的研究.核农学报,5(1):31-36。
- [4] 吴婷婷等,1993.鳊鱼和奥利亚罗非鱼乳酸脱氢酶酶谱的比较.水产学报,17(4):325-329。
- [5] 王可玲等,1994.中国近海带鱼种群生化遗传结构及其鉴别的研究.海洋学报,16(1):93-104。

- [ 6 ] Aendris, W. et al., 1988. Duck lens  $\epsilon$ -crystalline and LDH-B<sub>4</sub> are identical: a single copy gene product with to distinct function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:7114 - 7118.
- [ 7 ] Blanco, A. and W. H. Zinkham 1963. Lactate dehydrogenase in human testes. Science, 139:601 - 602.
- [ 8 ] Magee, S. M. and D.P. Philipp, 1982. Trans. Am. Fish. Soc., 111: 593 - 602.
- [ 9 ] Shaklee, J. B. et al., 1973. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: the molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes. J. Exp. Zool., 185: 217 - 240.
- [ 10 ] Shaw, C.R. and R. Prasad, 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. Biochem. Genet., 4:297 - 320.
- [ 11 ] Siciliano, M. J. and D.A. Wright, 1973. Evidence for multiple unlinked genetic loci for isocitrate dehydrogenase in fish of the genus *Xiphophorus*. Copeia, (1): 158 - 161.
- [ 12 ] Siciliano, M. J. and C. R. Shaw, 1976. Separation and visualization of enzymes on gels, in Chromatographi C and Electrophoretic Techniques, Vol.2, Zone Electrophoresis, 4th ed., Smuth, I., Ed., Heinemann, London, pp185.
- [ 13 ] Whitt, G.S., 1970. Development genetic of the LDH isozymes of fish. J. Exp. Zool., 175:1 - 36.
- [ 14 ] Zinkham, W. H. et al., 1969. Linkage of lactate dehydrogenase B and C loci in pigeons. Science, 164:185 - 187.

## STUDIES ON THE ENZYMES OF *AMYDA SINENSIS*

Yang Hong Xia Dequan Wu Tingting Jian Jichang Dong Zaijie Cao Ying Wang Tao  
(Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Wuxi 214081)

**ABSTRACT** By use of vertical starch gel electrophoresis, the patterns of expression of six isozymes (LDH, IDH, ADH, ME, G6PDH and EST) were investigated in seven different tissues (brain, eye, heart, muscle, liver, kidney and ovary) of *Amyda sinensis*. The experession pattern of LDH was determined by immunochemical analysis with antibody of LDH -B<sub>4</sub> of grass carp. The results suggested that LDH of fishes and reptiles is conservative in evolution.

**KEY WORDS** *Amyda sinensis*, Isozyme, Starch gel electrophoresis, Immunochemical reaction