

# 膜状急纤虫(原生动物, 纤毛门)休眠期包囊与营养期细胞同工酶组成和活性比较

陈季武<sup>1</sup> 李艺松<sup>1</sup> 曾红<sup>1,2</sup> 顾福康<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; <sup>2</sup>福建师范大学生物工程学院, 福州 350007)

**摘要** 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳酶化学技术显示, 腹毛目纤毛虫膜状急纤虫(*Tachysoma pellionella*)休眠期包囊和营养细胞中乳酸脱氢酶、 $\alpha$ 磷酸甘油脱氢酶、醇脱氢酶、细胞色素氧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、过氧化物酶和过氧化氢酶等7种同工酶的酶谱组成有明显差异, 并且在休眠包囊中同工酶成分少、活性低, 部分同工酶酶谱表现出趋于简单的趋势。ATP酶、苹果酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶等3种同工酶在休眠包囊与营养细胞中有相同的酶谱, 但在休眠期包囊酶的活性低于营养期细胞。

**关键词** 膜状急纤虫; 营养细胞; 休眠包囊; 同工酶; 凝胶电泳酶化学技术

纤毛虫在饥饿、温度突然变化等条件下, 常常形成静止不动的休眠包囊。目前对纤毛虫休眠包囊的形态及其结构分化的研究已经积累了较多的资料<sup>[1-3]</sup>; 利用电镜酶细胞化学方法, 对纤毛虫休眠包囊中存在的物质代谢和能量利用的特征也已有所了解<sup>[4-6]</sup>。但是, 对纤毛虫休眠包囊的生理生化变化尚知之不多。本文利用聚丙烯酰胺凝胶电泳酶化学技术检测分析了腹毛目纤毛虫膜状急纤虫(*Tachysoma pellionella*)休眠包囊与营养细胞同工酶组成和活性差异, 试图从一个侧面探索休眠包囊与营养细胞代谢调控中酶系的变化, 为阐明休眠包囊的生命活动规律提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

急纤虫于1999年12月采集自华东师范大学小湖内, 经分离和建立纯系培养。

### 1.2 细胞培养和休眠包囊的诱导

将急纤虫接种至培养皿中, 置于25℃的恒温培养箱中, 以池塘过滤水中加入麦粒后形成的麦粒发酵液进行培养, 每4~6天更换一次培养液, 虫体可达到较高密度。当不再更换培养液并中断食物供给时, 几天后大部分细胞便形成包囊。

### 1.3 方法

低速离心浓缩收集休眠包囊和营养细胞(数量上休眠包囊约为营养细胞的2~3倍), 然后冰浴匀浆,

4℃高速离心匀浆液, 取上清液用于聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分别检测休眠包囊与营养细胞的10种同工酶(乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、 $\alpha$ 磷酸甘油脱氢酶、过氧化氢酶、细胞色素氧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、过氧化物酶、ATP酶、苹果酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶)。电泳条件为: 分离胶浓度为12%, 浓缩胶为5%, 缓冲液为pH 8.3 Tris-Gly系统。电泳时, 浓缩胶电压为80 V, 分离胶电压为150 V, 待溴酚蓝泳动至距离分离胶下端0.5 cm时停止电泳。电泳在4℃下进行, 以防止电泳过程中产生的热量导致同工酶失活。染色参照文献[7]、[8]、[9]报道的方法。染色后将凝胶用凝胶扫描系统进行拍照和分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 休眠包囊和营养细胞中结构与活性变化的7种同工酶酶谱分析

在乳酸脱氢酶图谱中, 营养细胞和休眠包囊分别含4条和2条酶带(图1-1), 表明休眠包囊乳酸脱氢酶种类不如营养细胞丰富。营养细胞的第2条酶带为强谱带; 休眠包囊的酶带均为弱谱带, 表明休眠包囊乳酸脱氢酶活性比营养细胞低。在醇脱氢酶

收稿日期: 2005-01-28 接受日期: 2005-05-17

国家自然科学基金资助项目(No.30270160)

\* 通讯作者。Tel: 021-62232715, Fax: 021-62233754, E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn

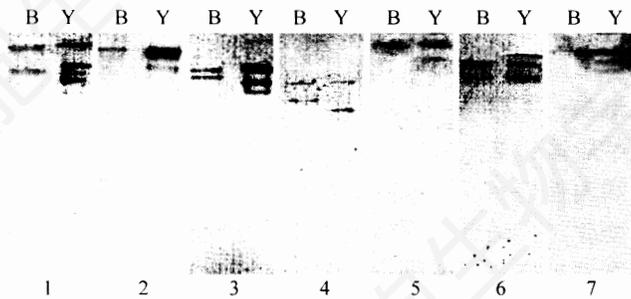


图1 急纤虫休眠包囊与营养细胞中7种结构与活性变化的同工酶电泳图谱

1: 乳酸脱氢酶; 2: 醇脱氢酶; 3:  $\alpha$  磷酸甘油脱氢酶; 4: 过氧化氢酶; 5: 细胞色素氧化酶; 6: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 7: 过氧化物酶。B: 休眠包囊; Y: 营养细胞。

电泳图谱中, 营养细胞和休眠包囊分别含3条和1条酶带(图1-2), 两者相比, 休眠包囊缺失了2条迁移快的酶带, 仅保留了与营养细胞相同的1条迁移慢的酶带。其中, 营养细胞的第1条酶带为强谱带, 第2条酶带为次强谱带, 休眠包囊仅含1条弱谱带, 表明休眠包囊的醇脱氢酶活性比营养细胞弱。在 $\alpha$ 磷酸甘油脱氢酶电泳图谱中, 营养细胞和休眠包囊分别含3条和2条酶带(图1-3), 且酶带的迁移位置明显不同, 表明此酶在休眠包囊中组成与营养细胞明显不同。其中, 营养细胞的第1条酶带为强谱带, 第2条酶带为次强谱带; 休眠包囊只含2条弱谱带, 显示休眠包囊 $\alpha$ 磷酸甘油脱氢酶活性比营养细胞低。在过氧化氢酶电泳图谱中, 休眠包囊和营养细胞都含2条酶带, 其中两者第1条酶带迁移率相同, 但前者的第2条酶带迁移慢于后者的第2条酶带(图1-4)。在细胞色素氧化酶电泳图谱中, 营养细胞有2条酶带; 休眠包囊却丧失了快泳动酶带, 仅含1条酶带, 其迁移位置和颜色深浅与营养细胞的慢泳动酶带相似(图1-5)。表明两者组成差异明显, 休眠包囊中细胞色素氧化酶种类少于营养细胞, 其酶活性也低于营养细胞, 提示休眠包囊电子传递系统不如营养细胞发达, 其氧化呼吸作用也不如营养细胞旺盛。在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶电泳图谱中, 营养细胞和休眠包囊分别含3条和2条酶带(图1-6), 表明两者组成差异明显。休眠包囊酶带也明显浅于营养细胞的酶带, 显示休眠包囊葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性比营养细胞弱。在过氧化物酶电泳图谱中, 仅营养细胞显现3条酶带, 且慢泳动酶带为次强谱带; 而休眠包囊没有看见酶带(图1-7), 表明休眠包囊中的过氧化物酶活性很微弱, 以致不能显出酶带。

在休眠包囊与营养细胞内, 上述7种同工酶电泳图谱在谱带数量、位置、宽度和颜色深浅方面都有明显差别, 相应于两者同工酶的活性和含量差异明显, 提示在急纤虫由营养细胞向包囊的分化过程中, 这7种同工酶的活性和组成发生了急剧变化。由于这些同工酶大多是细胞各代谢过程中起催化作用的重要酶或关键酶, 如乳酸脱氢酶是糖酵解过程中的重要酶; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是糖代谢中的关键酶; 细胞色素氧化酶是电子传递的同工酶, 是与许多生理代谢过程有关的氧化酶。这些酶类的变化, 也提示了细胞代谢过程的不少酶系可能发生改变, 酶系的变化又可能引起细胞代谢方式的改变, 继而会影响细胞相应的生理代谢和形态特征。所以这些酶系的变化也是与细胞生理变化和形态变化密切相关。

上述7种同工酶在休眠包囊内的含量和活性均低于营养细胞, 并在休眠包囊中显示出活性低、成分少的特征, 部分同工酶酶谱表现出趋于简单的趋势, 加之酶活性减弱, 结果很可能引起相关代谢过程的弱化, 进而弱化休眠包囊的一系列生理功能, 以适应细胞的休眠状态。因此, 这7种同工酶活性减弱和组成缺失, 是急纤虫由营养细胞转入休眠包囊的生化标志之一, 其中表达这7种同工酶的基因参与调控急纤虫由营养细胞转入休眠包囊的生理变化, 并在这一转变过程中起着重要的作用。

## 2.2 急纤虫休眠包囊与营养细胞中3种结构稳定的同工酶酶谱分析

在ATP酶电泳图谱中, 营养细胞和休眠包囊都显现2条酶带, 迁移位置也相同, 但营养细胞第2条酶带颜色比休眠包囊第2条酶带稍深(图2-1), 加之所检测的休眠包囊数约比营养细胞多2倍, 表明两者ATP酶组成相似, 但休眠包囊能量代谢比营养细胞弱。ATP直接测定也证实了这一点(另文报告)。在苹果酸脱氢酶电泳酶谱中, 休眠包囊和营养细胞都显现3条酶带, 迁移位置相似, 且第1条酶带均染色深, 色带宽(图2-2), 说明两者苹果酸脱氢酶组成和活性是相似的, 表达苹果酸脱氢酶的基因不仅没有随着急纤虫由营养体到包囊的变化而关闭, 而且两者相应的代谢活动都很活跃。在谷氨酸脱氢酶电泳酶谱中, 休眠包囊和营养细胞分别呈现两条迁移位置相同的酶带(图2-3), 表明两者谷氨酸脱氢酶组成相似, 但前者的第1条酶带颜色略浅于后者的第1条酶带, 加上所测休眠包囊数量约比营养细胞多1倍, 表明休眠包囊中谷氨酸脱氢酶活性

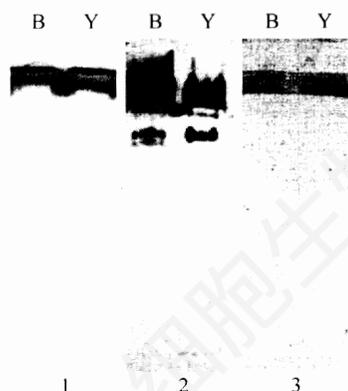


图2 急纤虫休眠包囊与营养细胞中3种结构稳定的同工酶电泳图谱

1: ATP酶; 2: 苹果脱氢酶; 3: 谷氨酸脱氢酶。B: 休眠包囊, Y: 营养细胞。

低于营养细胞。由于谷氨酸脱氢酶在氨基酸代谢中起重要作用, 所以这一结果提示, 休眠包囊中的氨基酸代谢不如营养细胞旺盛。根据结果认为, 这3种酶的活性在休眠包囊和营养细胞内虽有差别, 但酶组成保持不变, 不受营养细胞变成休眠包囊的影响。

这3种结构保持稳定的酶, 在代谢过程中起着重要的作用, 如苹果酸脱氢酶是三羧酸循环中的关键酶; ATP酶是能量代谢过程中的重要酶; 谷氨酸脱氢酶是氨基酸代谢中的重要酶, 其酶类的结构稳定性提示休眠包囊虽然结构形态上发生了一系列变化, 但仍像营养细胞那样, 进行物质消化和能量利用等代谢活动, 是一个能进行有效生命活动的生物体。

### 参考文献 (References)

- [1] 吴月华等。动物学杂志, 2004, 39: 91
- [2] Calvo P et al. *J Eukaryot Microbiol*, 2003, 50: 49
- [3] 顾福康等。动物学杂志, 1992, 27: 48.
- [4] 李恭楚等。齿脊肾形虫休眠包囊的细胞器及酶细胞化学的研究。见: 中国动物学会主编。中国动物科学研究, 北京: 中国林业出版社, 1999, 718
- [5] 陈灵等。动物学研究, 2000, 21: 199
- [6] 顾福康等。华东师范大学学报(自然科学版), 2002, (2): 87
- [7] 胡能书等编。同工酶技术及其应用, 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985, 70
- [8] 章静波主编。细胞生物学实用方法与技术, 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995, 124
- [9] 谢昕等。氨基酸和生物资源, 1998, 20: 19

## A Comparison of Components and Their Activities of Isozymes between Resting Cyst and Vegetative Cell of the Ciliate *Tachysoma pellionella* (Protozoa, Ciliophora)

Ji-Wu Chen<sup>1</sup>, Yi-Song Li<sup>1</sup>, Hong Zeng<sup>1,2</sup>, Fu-Kang Gu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

<sup>2</sup>School of Biology Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 310007, China)

**Abstract** Polyacrilamide gel electrophoresis enzyme-chemistry technique analysis revealed that the components of seven species of isozymes including lactic dehydrogenase,  $\alpha$ -phosphoglycerol dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, cytochrome oxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, peroxidase and catalase in the resting cyst of Ciliated protozoa *Tachysoma pellionella* is obvious different from those in the vegetative cell and that these isozymes in the resting cyst has lower activities and less components than those in the vegetative cell. There is trend of simplification of the electrophoretogram patterns for these isozymes in the resting cyst. The components of the other three species of isozymes in the resting cyst, ATPase, malic dehydrogenase and glutamic acid dehydrogenase, are the same as ones in the vegetative cell, but their activities are different and the former lower than the latter.

**Key words** *Tachysoma pellionella*; vegetative cell; resting cyst; isozyme; electrophoresis enzyme-chemistry technique

Received: January 28, 2005 Accepted: May 17, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270160)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-62232715, Fax: 86-21-62233754, E-mail: fkgu@bio.ecnu.edu.cn