

团头鲂乳酸脱氢酶与苹果酸脱氢酶 组织特异性的激光扫描分析

李思发 蔡完其

(上海水产大学水产养殖系, 200090)

提 要 用 LKB 水平电泳仪, 4.4%聚丙烯酰胺凝胶, 对 10-11 月龄团头鲂(全长 14-16cm)的 11 种组织——白肌、晶体、脑、脾、肾、性腺、心、肝、鳍、红血球及血清的乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶作电泳, 再用 LKB 激光光密度计对同工酶的迁移率及活性作定性定量分析。在不同组织中, 同工酶的迁移率和活性有明显的组织特异性。

关键词 团头鲂, 同工酶, 电泳, 激光扫描, 组织特异性, 迁移率, 活性

种内与种间的遗传变异是进化研究的主要课题之一, 也是遗传育种工作的基础研究。同工酶的电泳分析, 已证明是探讨遗传变异的一种有效手段, 可以用来揭示物种之间、种群之间、亲本与子代之间的遗传与进化关系。

团头鲂成为我国主要淡水养殖对象已 30 余年, 但对其遗传特性所知尚少。傅予昌与王祖熊(1988)曾对团头鲂 6 种组织 8 种同工酶作过定性描述。国内外对鱼类同工酶的研究也基本上为定性描述。本研究旨在对团头鲂 11 种组织中乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶进行定性定量分析, 以期作为选育和遗传保护的生化遗传指标。

1 材料和方法

1.1 采样

1988 年 3-4 月间从上海水产大学试验站采集全长 14-16 厘米团头鲂共 30 尾。起水后, 立即擦干, 切断尾动脉, 取血 2 份, 一份供红血球分析, 一份供血清分析, 然后剪取尾鳍上叶、摘取眼球、白肌、脑、肝、肾、性腺、心及脾, 野外保存于液氮中, 室内保存于 -25℃ 冰箱中。

本研究所取团头鲂的性腺均处于 I 期, 预备试验中电泳未见雌雄个体间有显著差别。又据易健华等(1982)报道, 性腺发育 III 和 IV 期的二种罗非鱼的肝、肾及肌的 LDH 无雌雄差别。所以, 本研究中电泳时不区分其性别, 均作性腺处理。

1.2 电泳

取 0.2-0.3 克组织或整个晶体加 3 倍体积的 0.3% 辅酶 I 溶液, 15000r. p. m. 5℃ 离心 20 分钟, 肝组织离心两次去除脂肪。上清液 4℃ 保存, 24 小时内使用。

电泳在 LKB 水平电泳仪上进行, 凝胶为 4.4% 聚丙烯酰胺。预电泳 30 分钟, 50mA; 前电泳 10 分钟, 25mA; 正式电泳约 2 小时, 275V。电泳温度 5℃。染色按 Phillip 等(1981)的方法稍加改进。谱带命名按 Allendorf and Utter (1979)。

以谱带离原点的距离为绝对迁移率, 绝对迁移率对迁移最大的谱带的迁移率之比为相对迁移率。相对活性为扫描曲线上某一谱带所占部位的面积对整个曲线面积之比。

1.3 统计分析

除红细胞与血清因实测电泳样本较其它组织少, 不便一起作均值多重分析外, 其它组织都使用方差分析和均值多重比较分析^[1,3]。

2 结果与讨论

2.1 乳酸脱氢酶(LDH)

团头鲂的 LDH 由三个基因座位(Ldh-A, Ldh-B 及 Ldh-C)编码, 为四聚体。Ldh-A 和 Ldh-B 两座位在所检查的 10 种组织中组合表达为 5 种基本的同工酶, 电泳显示为 5 条谱带-A₄、A₃B₁、A₂B₂、A₁B₃ 及 B₄; 而 Ldh-C 座位仅在肝脏中表达, 形成谱带 C₄, 与傅予昌、王祖熊的结果一致。还看到在 C₄ 与 A₄ 之间有一谱带 C₃B₁, 在 A₄ 与 A₃B₁ 之间有一谱带 C₂B₂。Kepes and whitt (1972), whitt (1975)指出, 鲤科鱼类的 C₄ 同 B₄ 有某种免疫化学关系。作者初步认为, C₃B₁ 与 C₂B₂ 可能是 Ldh-C 与 Ldh-B 的杂合体。在肾脏, A₂B₂ 与 A₁B₃ 之间有一副带, 来源不明, 暂叫 Ldh-X。在部分鱼的心、脑中, 在 A₄ 与 A₃B₁、A₃B₁ 与 A₂B₂ 之间也见有副带 Ldh-X。

红细胞的 5 种 Ldh 同工酶的活性相近, 都较弱; 而在血清中的 A₄ 与 A₃B₁ 的活性很强, 各谱带的活性呈从 A₄ 座位到 B₄ 递减的趋势。红细胞与血清的这种差别反应了 A 座位与 B 座位功能的不同, 因此, 红细胞主营好氧呼吸, 血清主营嫌氧呼吸。

表 1 团头鲂 9 种组织中 LDH 同工酶的相对迁移率(均值±标准差)和方差分析

Table 1 Relative mobility (mean ± SD) of 5 isozymes of LDH in 9 tissues of blunt snout bream and ANOVA among tissues

	谱 带				
	A ₄	A ₃ B ₁	A ₂ B ₂	A ₁ B ₃	B ₄
肌	30.7±1.8	47.3±1.5	63.6±1.8	80.4±2.3	100±0
晶体	34.1±0.6	51.1±0.6	66.4±0.7	82.6±0.5	100±0
脑	32.8±1.4	48.7±1.0	64.9±0.5	81.8±0.5	100±0
肝	33.0±1.7	46.5±2.5	64.2±2.0	82.9±3.6	100±0
肾	31.8±1.2	48.3±1.3	65.0±1.4	81.4±0.5	100±0
性腺	32.7±1.1	48.5±1.1	64.5±1.1	82.3±0.7	100±0
心	33.1±1.5	49.7±1.6	65.7±1.0	82.4±0.7	100±0
鳍	34.0±1.3	50.2±1.1	66.1±1.1	82.5±0.5	100±0
脾	31.9±1.0	49.0±1.2	65.1±1.2	82.3±0.8	100±0
F 值	5.15 **	9.75 **	4.88 **	1.69	

** 表示 >F_{0.01}, * 表示 >F_{0.05}, 下同

表 2 团头鲂 9 种组织中 LDH 同工酶相对迁移率的均值多重比较

Table 2 Multiple mean comparison of relative mobility of LDH in 9 tissues of blunt snout bream

A ₄	晶体	鳍	心	肝	脑	性腺	脾	肾	肌
晶体	.	—	—	—	—	—	*	**	**
鳍	—	.	—	—	—	—	*	*	**
心	—	—	.	—	—	—	—	—	**
肝	—	—	—	.	—	—	—	—	*
脑	—	—	—	—	.	—	—	—	*
性腺	—	—	—	—	—	.	—	—	—
脾	—	—	—	—	—	—	.	—	—
肾	—	—	—	—	—	—	—	.	—
肌	—	—	—	—	—	—	—	—	.

A ₃ B ₁	晶体	鳍	心	脾	脑	性腺	肾	肌	肝
晶体	.	—	—	—	*	**	**	**	**
鳍	—	.	—	—	—	—	—	**	**
心	—	—	.	—	—	—	—	*	**
脾	—	—	—	.	—	—	—	—	**
脑	—	—	—	—	.	—	—	—	*
性腺	—	—	—	—	—	.	—	—	—
肾	—	—	—	—	—	—	.	—	—
肌	—	—	—	—	—	—	—	.	—
肝	—	—	—	—	—	—	—	—	.

A ₂ B ₂	晶体	鳍	心	脾	肾	脑	性腺	肝	肌
晶体	.	—	—	—	—	—	*	**	*
鳍	—	.	—	—	—	—	—	*	**
心	—	—	.	—	—	—	—	—	*
脾	—	—	—	.	—	—	—	—	—
肾	—	—	—	—	.	—	—	—	—
脑	—	—	—	—	—	.	—	—	—
性腺	—	—	—	—	—	—	.	—	—
肝	—	—	—	—	—	—	—	.	—
肌	—	—	—	—	—	—	—	—	.

注: * 表示 >D_{0.05}, ** 表示 >D_{0.01}, 下同。

A_2B_2	晶体	鳍	脑	脾	肌	心	性腺	肾	肝
晶体	•	—	*	**	**	**	**	**	**
鳍	—	•	—	—	**	**	**	**	**
脑	—	—	•	—	—	*	**	**	**
脾	—	—	—	•	—	—	**	**	**
肌	—	—	—	—	•	—	—	*	**
心	—	—	—	—	—	•	—	—	**
性腺	—	—	—	—	—	—	•	—	**
肾	—	—	—	—	—	—	—	•	**
肝	—	—	—	—	—	—	—	—	•

A_1B_3	心	脑	性腺	鳍	晶体	肾	脾	肌	肝
心	•	—	*	**	**	**	**	**	**
脑	—	•	—	**	**	**	**	**	**
性腺	—	—	•	—	**	**	**	**	**
鳍	—	—	—	•	—	*	**	**	**
晶体	—	—	—	—	•	—	**	**	**
肾	—	—	—	—	—	•	*	**	**
脾	—	—	—	—	—	—	•	**	**
肌	—	—	—	—	—	—	—	•	—
肝	—	—	—	—	—	—	—	—	•

B_4	性腺	脑	心	肾	鳍	晶体	脾	肝	肌
性腺	•	—	—	—	**	**	**	**	**
脑	—	•	—	—	**	**	**	**	**
心	—	—	•	—	**	**	**	**	**
肾	—	—	—	•	**	**	**	**	**
鳍	—	—	—	—	•	**	**	**	**
晶体	—	—	—	—	—	•	—	**	**
脾	—	—	—	—	—	—	•	—	**
肝	—	—	—	—	—	—	—	•	—
肌	—	—	—	—	—	—	—	—	•

9 种组织 LDH 同工酶的迁移率差异分析如表 1 和表 2 所示, 相对活性的比较如表 3 和表 4 所示。同迁移率的差异相比, 组织间同工酶相对活性的差异较为显著。通常认为, 好氧组织如脑、性腺、心、红血球中 B_4 占优势, 而在嫌氧组织如肌、脾及血清中 A_4 占优势, 但团头鲂肾中 A_4 与 B_4 都比较强, 原因尚待阐明。

AB	鳍	晶体	脾	性腺	肝	心	肾	脑	肌
鳍	•	—	—	—	—	—	*	**	**
晶体	—	•	—	—	—	—	—	*	*
脾	—	—	•	—	—	—	—	—	*
性腺	—	—	—	•	—	—	—	—	—
肝	—	—	—	—	•	—	—	—	—
心	—	—	—	—	—	•	—	—	—
肾	—	—	—	—	—	—	•	—	—
脑	—	—	—	—	—	—	—	•	—
肌	—	—	—	—	—	—	—	—	•

BB	鳍	性腺	晶体	脾	肾	心	脑	肝	肌
鳍	•	—	—	—	—	*	**	**	**
性腺	—	•	—	—	—	*	*	*	**
晶体	—	—	•	—	—	—	*	*	**
脾	—	—	—	•	—	—	—	—	—
肾	—	—	—	—	•	—	—	—	—
心	—	—	—	—	—	•	—	—	—
脑	—	—	—	—	—	—	•	—	—
肝	—	—	—	—	—	—	—	•	—
肌	—	—	—	—	—	—	—	—	•

9 种组织的 MDH 的相对活性及比较列于表 7 与表 8。组织间有明显差异。

表 7 团头鲂 9 种组织 MDH 同工酶的相对活性(均值±标准差)及方差分析

Table 7 Relative activity (mean±SD) of MDH in 9 tissues of blunt snout bream and ANOVA among tissues

	m-Mdh				s-Mdh	
	AA	AB	BB	CC	CD	DD
肌	28.0±5.4	14.5±2.8	7.3±2.2	10.2±4.8	19.1±1.6	22.8±8.4
晶体	52.6±8.7	12.3±4.3	4.7±3.5	21.0±10.1	7.6±1.6	3.8±2.9
脑	21.5±3.8	15.5±0.9	12.0±1.3	27.5±6.9	13.5±5.8	/
肝	24.5±2.7	16.2±1.9	6.7±1.7	46.5±7.0	/	/
肾	21.2±2.2	10.2±1.5	2.5±1.5	35.7±2.2	20.6±1.5	10.4±1.4
性腺	26.3±5.1	12.8±3.4	3.0±1.5	27.9±4.3	20.0±4.1	9.0±3.6
心	27.4±4.4	21.9±1.9	13.2±1.3	16.8±1.5	11.7±1.5	6.3±0.9
鳍	22.6±3.0	17.4±2.1	8.1±3.6	33.3±1.8	16.8±2.6	2.5±2.2
脾	32.1±3.7	9.9±4.1	2.7±1.5	33.9±3.1	19.4±3.3	3.7±2.2
F 值	41.21 **	18.01 **	30.47 **	38.70 **	21.98 **	29.39 **

CC	肝	肾	脾	鳍	性腺	脑	晶体	心	肌
肝	.	**	**	**	**	**	**	**	**
肾	—	.	—	—	—	*	**	**	**
脾	—	—	.	—	—	—	**	**	**
鳍	—	—	—	.	—	—	**	**	**
性腺	—	—	—	—	.	—	—	**	**
脑	—	—	—	—	—	.	—	**	**
晶体	—	—	—	—	—	—	.	—	**
心	—	—	—	—	—	—	—	.	—
肌	—	—	—	—	—	—	—	—	.

CD	肾	性腺	脾	肌	鳍	脑	心	晶体
肾	.	—	—	—	—	**	**	**
性腺	—	.	—	—	—	**	**	**
脾	—	—	.	—	—	**	**	**
肌	—	—	—	.	—	**	**	**
鳍	—	—	—	—	.	—	*	**
脑	—	—	—	—	—	.	—	**
心	—	—	—	—	—	—	.	—
晶体	—	—	—	—	—	—	—	.

DD	肌	肾	性腺	心	晶体	脾	鳍
肌	.	**	**	**	**	**	**
肾	—	.	—	—	**	**	**
性腺	—	—	.	—	—	—	**
心	—	—	—	.	—	—	—
晶体	—	—	—	—	.	—	—
脾	—	—	—	—	—	.	—
鳍	—	—	—	—	—	—	.

总的说来,除了血清中只有 s-Mdh,红细胞中兼有 s-Mdh 与 m-Mdh 的有关机理已基本明了外,对于 m-Mdh 在心、晶体及肌肉中活性较强,而 AA 一般又较强于 BB; s-Mdh 在肝、肾、性腺及脑里较强,而 CC 一般又较强于 DD 的机理尚待阐明。

本文是加拿大国际发展研究中心组织和资助的亚洲鱼类遗传研究网的中国课题的成果之一。本校淡水渔业专业 1988 届同学包海岩参加部分工作。

参 考 文 献

- [1] 林德光, 1982. 生物统计的数学原理, 631. 辽宁人民出版社(沈阳).
- [2] 易健华等, 1982. 罗非鱼与鲢乳酸脱氢酶及脂酶同工酶的电泳研究. 淡水渔业, (6): 22-25.
- [3] 莫惠栋, 1984. 农业试验统计, 622. 上海科学技术出版社.
- [4] 傅予昌, 王祖熊, 1988. 团头鲂的胚胎及成体组织中八种同工酶系统的研究. 水生生物学报 12(3): 19-228.
- [5] Allendorf, F. W. and F. W. Utter, 1979. Population genetics. pp. 407-454. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brett (eds.) *Fish Physiology*. Academic press. New York.
- [6] Kepes, K. L. and G. S. Whitt, 1972. Specific lactate dehydrogenase gene function in the differentiated liver of cyprinid fish. *Genetics*. 71(suppl): 29.
- [7] Phillip, D. P. et al., 1981. *Biochemical genetic of largemouth bass (Micropterus salmoides)*. EA-2688, Research Project 1063-1 EPRI, Palo, Alto, CA, USA. 265p.
- [8] Whitt, G. S., 1975. A unique lactate dehydrogenase isozyme in the teleost retina. pp 45-470. In: *Vision in fishes*. Plenum Publ Co, New York.

DENSITOMETRIC SCANNING ANALYSIS ON TISSUE SPECIFIC ISOZYMES OF BLUNT SNOUT BREAM (*MEGALOBrama AMBLYCEPHALA*)*

Li Si-fa and Cai Wan-qi

(Department of Aquaculture, SFU, 200090)

ABSTRACT In LKB electrophoresis set with 4.4% polyacrylamide gel, the lactate dehydrogenase (LDH) and malate dehydrogenase (MDH) were examined from 11 tissues—white muscle, eye lens, brain, liver, kidney, gonad, heart, spleen, fin, red cell and serum of blunt snout bream. Qualitative and quantitative analysis on mobility and activity were conducted by a LKB Ultroskan laser densitometer. The activity and mobility of isozymes in different tissues showed a significant tissue specificity.

KEYWORDS blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*), isozyme, electrophoresis, laser scanning, tissue specificity, mobility, activity

* This paper is one of the reports of the Chinese program of the Asian Fish Genetic Network organized and supported by the International Development Research Center of Canada. Many thanks to Miss Bao Hai-yan for her laboratory work.