

兴淮鲫(白鲫♀×散鳞镜鲤♂) 及其双亲同工酶的研究

张克俭 高 健

(上海水产大学, 200090)

张景龙 何玉明 王维善

(江苏省淮阴市水产科学研究所, 223001)

提 要 本文以兴淮鲫(白鲫♀×散鳞镜鲤♂)及其双亲为材料, 采用聚丙烯酰胺凝胶平板电泳法, 研究了3种鱼的晶体、脑、肌肉、心脏、肝脏及肾脏等6种组织器官的乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、酯酶(EST)和超氧化物歧化酶(SOD)等4种同工酶酶谱表达上的异同点及遗传倾向。结果表明, 兴淮鲫的LDH同工酶有偏父的表达倾向, 它的s-MDH和EST2种同工酶则表现出偏母表达的倾向, 在SOD同工酶的表达上, 与双亲相比, 既有相似处, 也有不同点。同时, 3种鱼的4种同工酶并显现出不同程度的组织特异性。此外, 在兴淮鲫的4种同工酶酶带中出现双亲没有的“新杂种酶带”及双亲的“互补酶带”, 且F₁代的有些酶带的活性比双亲相应酶带的活性有所增强。

关键词 兴淮鲫, 白鲫, 散鳞镜鲤, 同工酶, 组织特异性, 迁移率

杂交育种对改良养殖鱼类的品质等已取得显著成效, 如丰鲤、荷元鲤和建鲤等优良杂交种已获得较广泛推广。兴淮鲫是白鲫(♀)和散鳞镜鲤(♂)的杂种子一代(F₁), 经江苏淮阴地区多年的试养表明其具有明显的杂种优势, 如生长快、肉质优于双亲、抗病力强并易于起捕等。

为了探究和阐明兴淮鲫的杂交机理及生化遗传学的特征, 我们开展了杂交子一代及其双亲的同工酶、血清蛋白电泳、染色体组型、受精细胞学及性腺发育规律等多方面的研究。本文仅就兴淮鲫及其双亲的4种同工酶的研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 试验鱼

来自江苏省淮阴市水产科学研究所试验场。3种鱼各取10尾, 鱼龄为1~2龄, 体重150~250g, 体长20~25cm。

1.2 样品制备

活鱼断尾失血后分别称取晶体、脑、肌肉、心脏、肝脏及肾脏6种器官组织, 然后按1:3(晶体为1:6)加0.3%辅酶I溶液在冰浴中匀浆, 匀浆液用Beckman高速冷冻离心机离心, 时间为20min(4℃, 15000rpm), 肝脏经第1次离心后去除油膜并以同样条件进行第2次离心。取

出各器官组织的上清液于 4°C 下保存备用。24h 内使用。

1.3 制胶

为了提高不同的酶在电泳中的分离效果，采用了不同的制胶配方和缓冲系统 LDH 和 MDH 用 TC 系统(T 为三羟甲基氨基甲烷, O 为柠檬酸)，凝胶浓度为 4.4%。EST 和 SOD 则用 EBT 系统(E 为乙二胺四乙酸, B 为硼酸, T 同上)，凝胶浓度为 5.6%。

1.4 电泳及染色

电泳在 LKB 水平电泳仪上进行。胶板先进行 30min 预电泳，电流 50mA；然后加入 10μl 样品于点样槽内，再进行 10min 前电泳，25mA，随之进行正式电泳。电泳时间，TC 系统为 100min，电压 275V；EBT 系统为 50min，电压 300V。染色按北京大学生物系遗传教研室编 (1883) 的“遗传学实验方法及技术”的方法并稍加改进。

1.5 胶板的脱色与固定

染色后的胶板用冰醋酸脱色。LDH、MDH 和 SOD 用 2.5% 冰醋酸脱色，EST 用 5% 冰醋酸脱色。LDH、MDH 和 EST 脱色至胶板的无酶带部分呈透明状，且酶带清晰，SOD 的胶板染色后底板呈兰色，酶带无色。脱色后放入固定液中固定数小时即行拍照。

2 结果

2.1 乳酸脱氢酶(LDH)

从图 1 可以看出，白鲫的晶体、脑、肌肉、心脏和肾脏等 5 种器官组织均显现出 5 条酶带

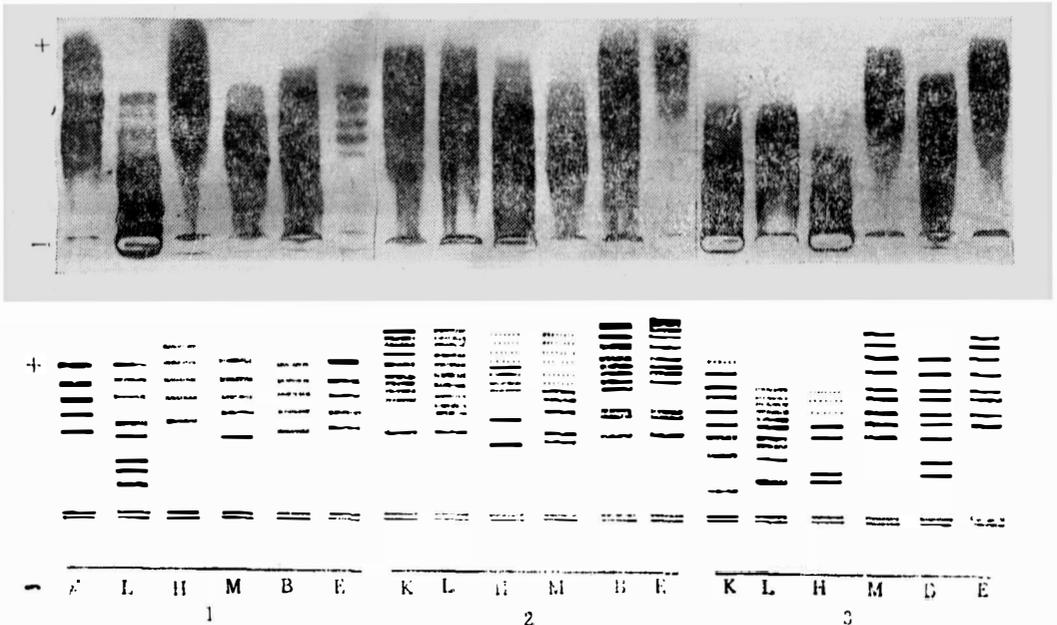


图1 兴淮鲫(F₁)及其双亲的 6 种器官组织的 LDH 同工酶谱型
 Fig.1 The LDH isozymic patterns of different organs of Xinghuai hybrid crucian carp (F₁) and its parents
 1.白鲫; 2. 散鳞镜鲤; 3. 兴淮鲫。
 K-肾脏, L-肝脏, H-心脏, M-肌肉, B-脑, E-晶体

但酶带的酶活性强弱和迁移率略有差异。肝脏除由 Ldh-A 及 Ldh-B 两个位点编码的 5 条酶带外, 在近阴极处还出现 Ldh-C 位点编码的 3 条酶带。散鳞镜鲤的 6 种器官组织电泳图谱中显现出的酶带数为 10~11 条。晶体、脑、肌肉和肝脏中各有 11 条酶带, 心脏则有 10 条酶带, 肾脏也为 10 条酶带。表明散鳞镜鲤的多种器官组织的 Ldh-C 位点均有表达, 并在由 Ldh-A 和 Ldh-B 位点编码表达的酶带间出现多条副带。兴淮鲫 6 种器官组织分别显现出 7~10 条酶带, 心脏 7 条、晶体 8 条, 肌肉和肾脏各为 9 条, 脑和肝脏各有 10 条。与父本一样, F₁ 代的心脏、肝脏和肾脏中的 Ldh-C 位点均编码表达而显现出酶带。同时, F₁ 代的肾脏中出现了双亲所没有的“新杂种酶带”。表明散鳞镜鲤和兴淮鲫的某些器官组织 LDH 同工酶有较强的组织特异性。

2.2 苹果酸脱氢酶(MDH)

兴淮鲫及其双亲的 6 种组织器官中均有 2 种不同的 MDH 同工酶, 即泳动较快的胞质型 s-MDH 与泳动较慢的线粒体型 m-MDH。彼此不杂合, 易区分。MDH 为二聚体, s-MDH 和 m-MDH 均由 2 个基因位点编码, 构成 3 种二聚体同工酶。s-MDH 的 2 个基因位点为 s-MDH-A 和 s-MDH-B; m-MDH 的 2 个基因位点是 m-MDH-C 和 m-MDH-D。

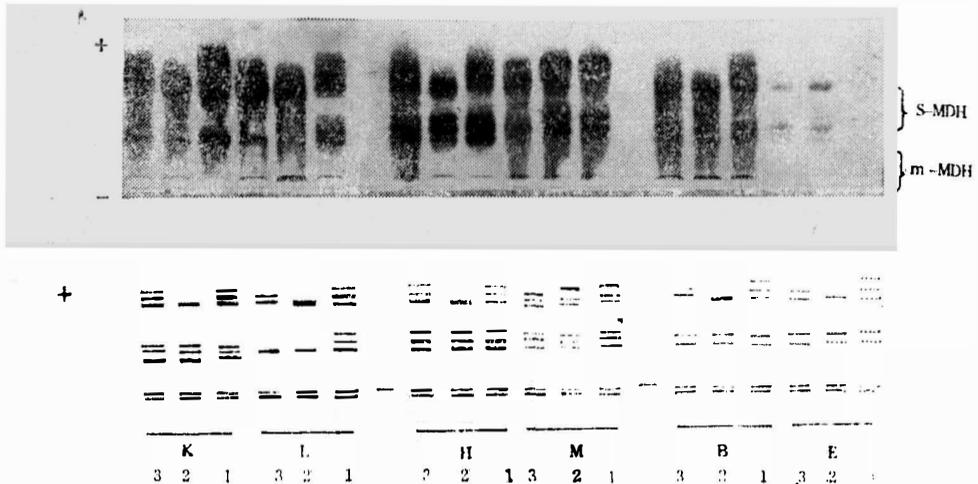


图2 兴淮鲫(F₁)及其双亲的 6 种器官组织的 MDH 同工酶谱型

Fig.2 The MDH isozymic patterns of different organs of Xinghuai hybrid crucian carp (F₁) and its parents

1. 白鲫; 2. 散鳞镜鲤; 3. 兴淮鲫。

K-肾脏, L-肝脏, H-心脏, M-肌肉, B-脑, E-晶体

从图 2 中可看出, 白鲫 6 种组织器官的 s-MDH 同工酶的电泳谱带较为相似, s-MDH(除肌肉外)均为 3 条酶带, 肌肉的 s-MDH 则为 2 条酶带。但晶体的 3 条酶带的酶活性都很弱。白鲫的晶体和脑各有 2 条 m-MDH 酶带。同样, 晶体的 2 条 m-MDH 酶带的活性也很弱。白鲫的肌肉、心脏、肝和肾各有 3 条 m-MDH 酶带。散鳞镜鲤的肌肉有 2 条 s-MDH 酶带, 其余 5 种组织器官均仅有 1 条 s-MDH 酶带; 它的肝脏有 1 条 m-MDH 酶带, 晶体和脑各有 2 条 m-MDH 酶带, 肌肉、心脏和肾则各有 3 条 m-MDH 酶带。兴淮鲫的 MDH 同工酶与母本白鲫较相似。从图 2 可知, 兴淮鲫的肝脏和晶体有 2 条 s-MDH 酶带, 其余各有 3 条 s-MDH 酶

带; F_1 代的晶体和脑各有 2 条 m-MDH 酶带, 肝脏仅为 1 条 m-MDH 酶带, 其余则各为 3 条 m-MDH 酶带。如上所述, 除肝脏外, 兴淮鲫及其双亲的 m-MDH 酶谱较为相似, 而 F_1 代的 s-MDH 酶谱近似母本, 与父本差异较大。

2.3 酯酶(EST)

兴淮鲫及其双亲的酯酶同工酶与其它淡水鱼类一样, 也是单体。兴淮鲫与双亲晶体的 EST 同工酶均显示出 4 条酶带。从图 3 可知, 2 条为 EST-2 和 EST-3 酶带, 另 2 条位于阴极区域内, 它们是 EST-6 和 EST-7 酶带, 3 种鱼的这 4 条酶带的迁移率相似, 但活性则有差异。白鲫的脑具有 3 条 EST 酶带, 分别为 EST-1, EST-2 和 EST-3。散鳞镜鲤的脑仅表达出 1 条 EST-3 酶带, F_1 代与父本相同, 也为 1 条 EST-3 酶带。 F_1 代与双亲的肌肉均为 1 条 EST-3 酶带。3 种鱼心脏的 EST 酶谱差异较大, 母本为 EST-1, EST-2 和 EST-3 等 3 条酶带, 父本是 EST-1 和 EST-3 2 条酶带, 而 F_1 中仅表达出 1 条 EST-3 酶带。母本和 F_1 代的肝脏有 EST-2、EST-3 和 EST-4 等 3 条酶带, 父本除具有上述 3 条酶带外, 还多 1 条 EST-5 酶带。3 种鱼的肾脏酶带数相同, 各有 EST-1、EST-2 和 EST-3 等 3 条酶带, 但 F_1 的 EST-1 酶带活性比双亲稍强。

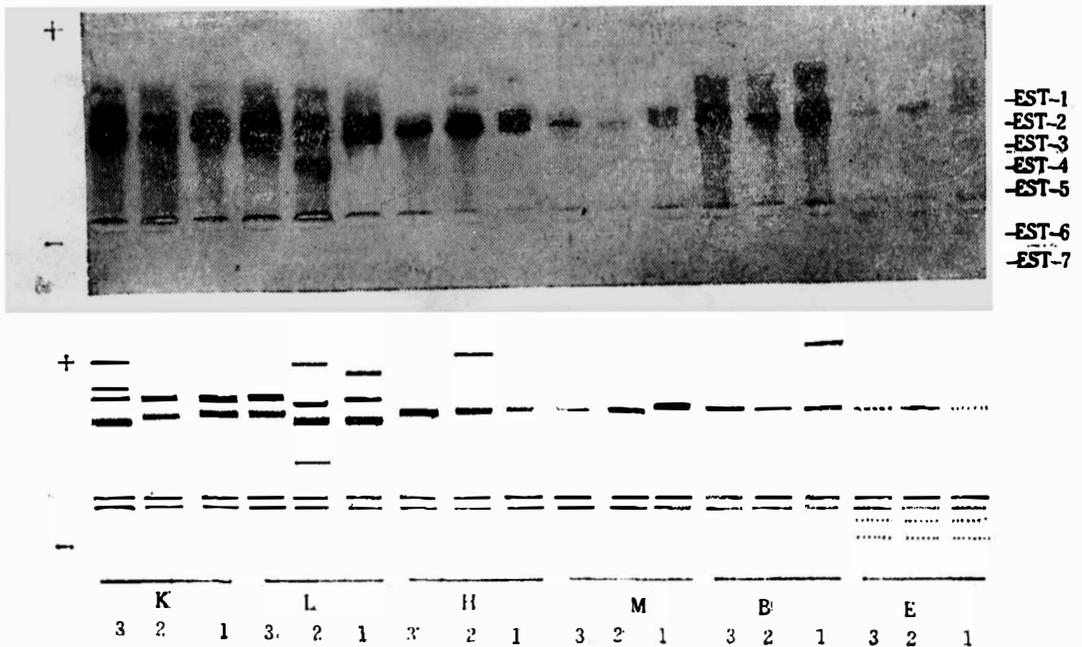


图 3 兴淮鲫(F_1)及其双亲的 6 种器官组织的 EST 同工酶谱型
 Fig. 3 The EST isozymic patterns of different organs of Xinghuai hybrid crucian carp (F_1) and its parents

1. 白鲫; 2. 散鳞镜鲤; 3. 兴淮鲫。
 K-肾脏, L-肝脏, H-心脏, M-肌肉, B-脑, E-晶体

2.4 超氧化物歧化酶(SOD)

图 4 表明, 白鲫的晶体具有 4 条 SOD 酶带, 散鳞镜鲤和兴淮鲫各有 3 条酶带, 但兴淮鲫相应酶带的活性比双亲的弱。3 种鱼在阴极区域内均有 1 条酶带, 同样, F_1 代这条酶带的活性

比双亲的弱。3种鱼脑的SOD酶带基本相同,但F₁代在阴极区域内出现了1条双亲皆没有的酶带。肌肉中,白鲫有4条SOD酶带,散鳞镜鲤及兴淮鲫各为3条。兴淮鲫及双亲心脏各有2条酶带。3种鱼肝脏中的SOD同工酶表现得较为特异,如白鲫有2条酶带,其中1条位于阴极区域内,镜鲤有1条活性很强的酶带,F₁除具有双亲相应的酶带外,还有1条双亲均不具有的新酶带。双亲肾脏的SOD同工酶谱型相似,各有2条酶带,而它们的F₁代却只表达出1条SOD酶带。可见,F₁代6种组织器官在SOD的表达上,与双亲有相似处,也有不同点。

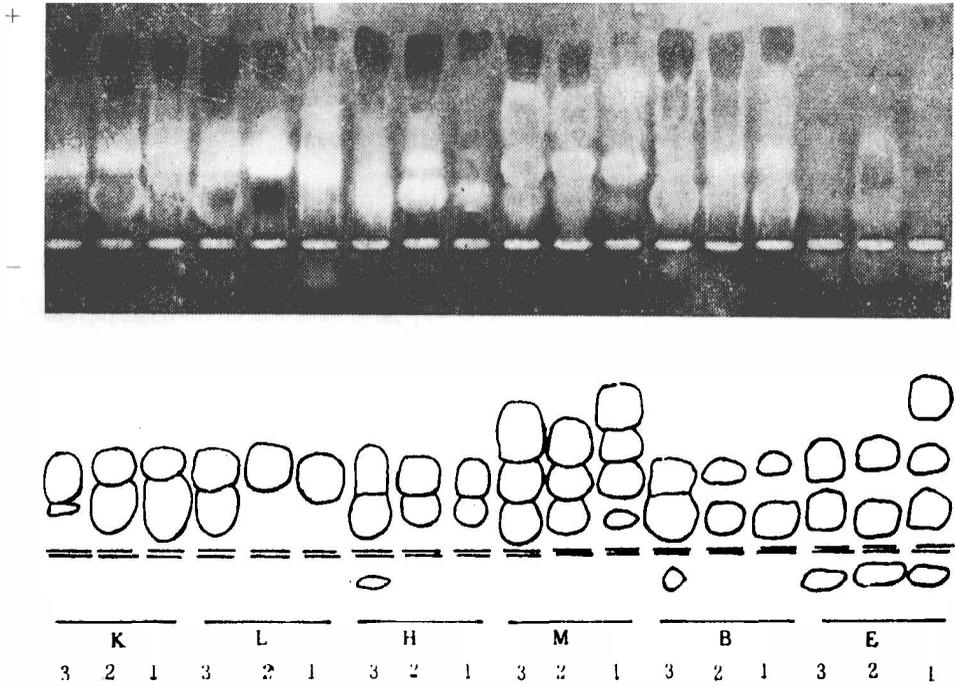


图4 兴淮鲫(F₁)及其双亲的6种器官组织的SOD同工酶谱型
 Fig.4 The SOD isozymic patterns of different organs of Xinghuai hybrid crucian carp(F₁)and its parents

1. 白鲫; 2. 散鳞镜鲤; 3. 兴淮鲫。
 K-肾脏, L-肝脏, H-心脏, M-肌肉, B-脑, E-晶体

3 讨 论

兴淮鲫及其双亲LDH等4种同工酶比较研究的结果表明,鱼类杂交一代(F₁)的各种同工酶的表达方式较复杂。就兴淮鲫而言,有偏母遗传和偏父遗传,以及双亲所没有的“新杂种酶带”或双亲的“互补酶带”的出现等4种方式。下面分别以兴淮鲫的LDH等4种同工酶的谱型作进一步论述。兴淮鲫6种组织器官的LDH同工酶酶带数在7~10条间,其父本为10~11条,母本除肝脏为8条外,其余均为5条。可见兴淮鲫在LDH同工酶的基因编码表达上有其独特的方式,但却是偏父遗传的,而与母本的差异较大。从图1的比较中可以看出,兴淮鲫的肾脏出现了1条双亲所没有的“新杂种酶带”,它是由C亚基编码的,位于近阴极的部位。此外,在母本肝脏中有2条由C亚基编码表达的活性很强的位于近阴极的酶带,在F₁代中并未被

编码表达出来。还有,在兴淮鲫的心脏和肾脏中分别出现2条酶活性很强的、双亲的“互补酶带”。在MDH同工酶的表达上却表现出较强的偏母遗传的倾向。从前面的结果可以看出,3种鱼(除肝外)的5种组织器官的m-MDH同工酶的谱型是相似的,由于双亲在m-MDH同工酶谱型上差异很小(仅在某些组织器官所表达出的酶活性强弱方面的较小差异),所以,它们的 F_1 代必然不会出现与双亲有较大差异的表达方式。然而,双亲6种组织器官的s-MDH同工酶的谱型差异较大,如白鲫的晶体、脑、肌肉、心、肝和肾分别具有3条、3条、2条、3条、3条及3条s-MDH酶带,散鳞镜鲤除肌肉有2条s-MDH酶带外,余均仅有1条酶带。在这种情况下对 F_1 代就会产生影响。结果表明, F_1 代中的晶体和肝脏分别具有2条酶带,其余分别为3条酶带。这虽然不完全与母本相同,却很相似于母本的s-MDH谱型,表现出偏母遗传的倾向。在EST同工酶的表达上,兴淮鲫也表现出偏母遗传的倾向。如兴淮鲫的肌肉、晶体、肝脏和肾脏等4种器官组织在酶的带数、活性强弱及迁移率诸方面都与母本相似。但兴淮鲫及其双亲心脏的EST酶谱差异明显,白鲫为3条,散鳞镜鲤为2条,它们的 F_1 代仅有1条。在SOD同工酶的表达上,兴淮鲫与其双亲相比,既有相似之处,也有不同点。如3种鱼的晶体、心脏和肾脏的SOD酶谱基本是相似的,而 F_1 代的脑所显示出的SOD酶谱与双亲都不相同,表明了 F_1 代自身的较特殊的表达方式。从图4中还可以看到兴淮鲫的脑和肝脏中还出现了双亲所不具有的“新杂种酶带,”该酶带位于阴极区域内。但必须指出的是,同工酶在杂种一代中的这些表达方式的出现是 F_1 代经过正常受精程序而发育成的后代。也就是说, F_1 必须具有双亲的两套遗传物质。如果杂交过程中,父本的精子仅起刺激作用而并没有与雌性原核融合的雌核发育而成的后代,则另当别论。

通过对兴淮鲫及其双亲同工酶的比较研究,也从一个侧面证实了兴淮鲫是经过正常受精程序发育而成的,它具有双亲的某些优良经济性状,所以兴淮鲫是利用杂交而获得的具有双亲优良经济性状的杂交组合。

本研究在施正峰副教授,宋承方副研究员的关心和指导下完成,文中照片由张敏拍摄,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 刘爱珠,胡庚东,1989.雌核发育草鱼与其亲本几种同工酶的比较.淡水渔业,(3):21—23.
- [2] 李万程,1988.岳鲤及其双亲(荷包红鲤♀湘江野鲤♂)LDH同工酶的研究.遗传学报,15(1):46—51.
- [3] 李生武等,1988.尼罗罗非鱼(♀)、奥利亚罗非鱼(♂)及其杂种(F_1)酯酶(EST)同工酶的研究.淡水渔业,(3):22—25.
- [4] 张轩杰等,1988.三元鲤及其双亲(资江鲤♂、芙蓉鲤♀)几个生化性状的比较研究.湖南师范大学学报(自然科学),11(3):238—243.
- [5] 鄂国民等,1990.三种胡子鲶及其杂种 F_1 的乳酸脱氢酶同工酶的比较研究.动物学研究,11(3):243—247.
- [6] 柯鸿文等,1993.淤泥湖团头鲂与梁子湖团头鲂杂交子一代的性状研究.水产科技情报,20(2):58—61.
- [7] Cashon, R. E. et al., 1981. Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* (L.). III. Inheritance of isocitrate dehydrogenase (Ldh-A and Ldh-B), glucose-6-phosphate dehydrogenase (6-Pgdh-A), and serum esterase (Est-S) polymorphism. *Biochem. Genet.*, 19(7/8):701—714.
- [8] Magee, S. M. and D. P. Philipp 1982. Biochemical genetic analyses of the grass carp ♀ × bighead carp ♂ F_1 hybrid and the parental species. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 111:593—602.

STUDY ON THE ISOZYMES OF XINGHUI HYBRID CRUCIAN CARP (*CARASSIUS AURATUS CUVIERI* ♀ × SCATTERED MIRROR CARP ♂) AND ITS PARENTS

Zhang Ke-jian and Gao Jian

(Shanghai Fisheries University, 200090)

Zhang Jing-long, He Yu-ming and Wang Wei-shan

(Huaiyin Fisheries Institute of Jiangsu Province, 223001)

ABSTRACT The polyacrylamide gel plate electrophoresis was used to study the differences and genetic tendency of lactate dehydrogenase(LDH), malate dehydrogenase (MDH), esterase (EST), and superoxide dismutase (SOD) of Xinghuai hybrid crucian carp and its parents. The tissues used in the experiment are eye (lens), brain, muscle, heart, liver, and kidney. The results showed that the LDH isozyme of Xinghuai hybrid crucian carp expressed more dominantly the characteristics of fatherly isozymes. The MDH and EST of Xinghuai hybrid crucian carp expressed more dominantly the characteristics of maternal isozymes. The SOD isozymic patterns of eye, heart and kidney of three fishes were similar, But the SOD isozymic patterns of liver, muscle and brain of Xinghuai hybrid crucian carp were different from its parents. All isozymes of the tested fishes expressed, in some degree, the tissue specificities. In addition, the isozymic patterns of Xinghuai hybrid crucian carp demonstrated a new hybrid enzyme band and a complementary enzyme band which were not found at the isozymic patterns of its parents. The isozymic patterns of Xinghuai hybrid crucian showed self-specificity. Nearly all studied isozymes of Xinghuai hybrid crucian carp owned higher active than that of its parents.

KEYWORDS Xinghuai hybrid crucian carp, *Carassius auratus cuvieri*, scattered mirror carp, isozyme, tissue specificity, mobility