

文章编号: 1004 - 7271(2001)02 - 0118 - 05

## 广东鲂(♀) × 团头鲂(♂)杂交子一代 及其双亲同工酶的比较

叶星, 谢刚, 许淑英, 庞世勋, 祁宝伦, 潘德博

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

**摘要:**采用聚丙烯酰胺垂直平板电泳法对广东鲂、团头鲂及其杂交子一代肌肝眼3种组织的4种同工酶(EST、LDH、MDH、SOD)进行电泳,分析其酶谱组成和活性差异。结果显示父母本同种组织中大部分同工酶的表达酶谱较相似,尤其以眼组织的LDH、肝组织的MDH以及3种组织的SOD同工酶的表现最为相似,表明两种鱼的亲缘关系较近,是本远缘杂交成功的遗传物质基础。同时父母本的某些同工酶谱又存在有稳定的种间差异,如肝组织的LDH。杂交子一代同工酶表现有些具有来自双亲的区带总和,有些则单独表达父本或母本的基因,更有些出现父母本没有的表现。

**关键词:**广东鲂;团头鲂;杂交子一代;同工酶

**中图分类号:**S917;Q321 **文献标识码:**A

## Comparison on isozymes of F<sub>1</sub> hybrid *Megalobrama hoffmanni* (♀) × *Megalobrama amblycephala* (♂) and its parents

YE Xing, XIE Gang, XU Shu-ying, PANG Shi-xun, QI Bao-lun, PAN De-bo

(Pearl River Fisheries Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** By using vertical polyacrylamide gel electrophoresis, expressions of four isozymes (EST, LDH, MDH, SOD) from three different tissues of adult *Megalobrama hoffmanni*, *Megalobrama amblycephala* and their F<sub>1</sub> hybrid were studied. The results show that most of the isozymes in the same tissues of the parents fishes have the similar phenotypes such as LDH in eyes, MDH in livers and SOD in all the three tissues. It demonstrates that the two fishes have the closely relative relationship and that is the reason for the success of the hybridization. While some differences do exist between the two parents fishes, and phenotype of LDH in the livers is an example. The gene expression of F<sub>1</sub> hybrids is variable. Some isozymes have phenotypes from parents, some have expressed genes from father fish or mother fish alone. Some even have isozymes phenotypes that do not appear in parents.

**Key words:** *Megalobrama hoffmanni*; *Megalobrama amblycephala*; F<sub>1</sub> hybrid; isozymes

鱼类同工酶作为一种生化指标已被广泛用于鱼类亲缘关系的比较、系统分类、倍性与杂种的鉴定、发育遗传和基因连锁分析以及预测杂交的成功与否等<sup>[1-8]</sup>。鱼类的远缘杂交能形成正常胚胎并顺利达到鱼种阶段的为数不多,其原因包括双亲核型相近程度、基因组大小、核质相容性与核质分裂节奏以及

收稿日期:2001-02-14

资助项目:广东省重点科技攻关项目(962203608)。

第一作者:叶星(1962-),女,硕士,副研究员。E-mail: yexing@163.net

酶的基因座位或表达时空顺序的不同等<sup>[9-12]</sup>。本文对广东鲂(♀)×团头鲂(♂)杂交子一代及其双亲的乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、酯酶(EST)和超氧化物歧化酶(SOD)4种同工酶的表达谱式进行比较,分析双亲的亲缘关系以及杂交子一代酶的表达受双亲控制的程度。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验鱼及样品处理

实验鱼同时取自广东顺德陈村鱼场的同一口塘。广东鲂♀尾、团头鲂和杂交子一代各10尾,2冬龄,体重0.4-0.8kg。活体解剖,取肝、眼和肌组织,用蒸馏水冲洗后装入塑料样品袋,-70℃保存。制样时,取0.5g组织加1mL双蒸水,冰浴匀浆,4℃14 000r·min<sup>-1</sup>离心30min,取上清。每管400μL,加入等体积的40%的甘油,混匀,-70℃保存备用。

### 1.2 实验方法

采用聚丙烯酰胺垂直平板电泳法。EST、SOD的缓冲系统为TC,LDH、MDH则采用EBT。主要试剂的配制、电泳及染色参照朱蓝菲<sup>[13]</sup>、李思发等<sup>[14]</sup>方法,略作改动。电泳时取50μL已制备好的样品,加入等体积的加样缓冲液,混匀后上样。10~15℃,电压110V,电泳时间约3h,电泳结束取下凝胶,置于相应的染色液中,37℃避光作用至条带清晰,用英国UVP公司的GDS7500型凝胶图像分析系统拍照记录。

## 2 结果

### 2.1 酯酶(EST,E.C.3.1.1.1)

父母本及杂交子一代的肝、眼和肌组织的EST酶活性均以肝组织的最高。肝组织的EST在靠近阴极端有1条谱带,由EST-1座位控制。广东鲂多数个体此酶带的含量和活性高而团头鲂的则细弱;杂交子一代有些个体酶带含量和活性较强似母本,有的则象父本。所有检测个体在中间区域都有1条迁移率一致的活性谱带,由EST-2座位编码。此座位稳定表达可视为肝组织EST共有的基础酶带。杂交子一代有50%的个体在EST-1和EST-2谱带间还出现父母本所没有显示的带,杂交子一代个体间此位点存在多态性。由于鱼类的EST绝大部分是由一个亚基组成的单体酶<sup>[15]</sup>,因此可认为杂交子一代及双亲的肝EST均由不少于4个的基因座位编码(图1)。眼的EST酶谱较简单,多为2条谱带,酶活性较肝组织的低(图未显示)。酶活性母本高而父本低,杂交子一代的活性象父本,偏低。肌组织的EST最简单,广东鲂和杂交子一代有EST-3酶带,团头鲂则无此酶带(图未显示)。

### 2.2 乳酸脱氢酶(LDH,E.C.1.1.1.27)

广东鲂和团头鲂及杂交子一代的眼、肌组织的LDH均有由A、B两座位编码的亚基聚合成的A<sub>4</sub>、A<sub>3</sub>B、A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>、AB<sub>3</sub>、B<sub>4</sub>五种四聚体。2种组织酶谱非常相似,均表现为经典的“五带谱型”。眼的LDH的5条酶带间隔均匀、迁移率和活性相近(图2),肌组织的LDH的亚基活性则不同,以A<sub>4</sub>活性最高,A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>次之,A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>和B<sub>4</sub>最弱(图未显示)。

肝组织的LDH酶谱带则表现为6-7带型。广东鲂的肝LDH有6条酶带;团头鲂除了具有6条与广东鲂相似的酶带外,在靠阳极方向则多1条带(图3),故共有7条。这种种间的差异表达稳定。杂交子一代的酶谱带与广东鲂同。垂直式电泳未能显示C基因编码的谱带,本试验另采用水平式电泳显示双亲和杂交子一代的肝组织在偏阴极的方向有一酶带,由C亚基所编码,是其它鲤科鱼类所共有的<sup>[16]</sup>,说明肝组织的LDH均由A、B和C3个亚基编码。

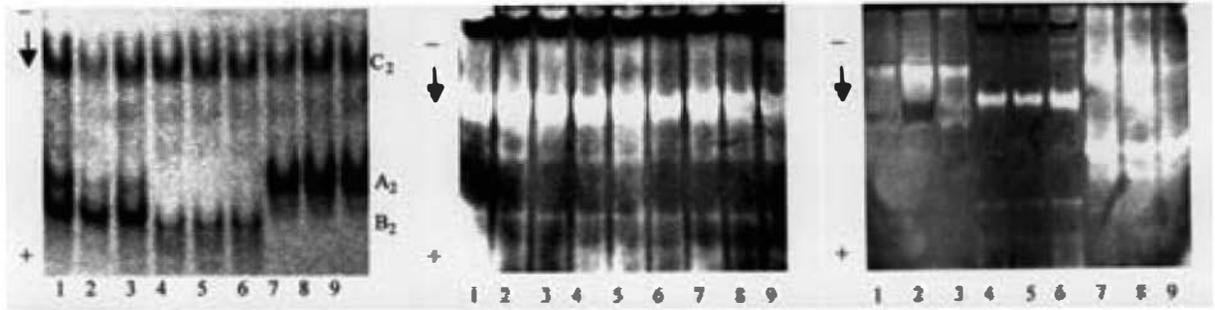


图1 肝组织酯酶电泳图谱  
Fig.1 Electropherogram of EST isozymes from the livers

图2 眼组织乳酸脱氢酶电泳图谱  
Fig.2 Electropherogram of LDH isozymes from the eyes

图3 肝组织乳酸脱氢酶电泳图谱  
Fig.3 Electropherogram of LDH isozymes from the livers

(1,2 杂交子一代;3-5 团头鲂;6-8 广东鲂)

### 2.3 苹果酸脱氢酶(MDH, E.C.1.1.1.37)

父母本和杂交子一代3种组织均有MDH表达,可分s-MDH(上清液型,又称可溶型MDH)和m-MDH(线粒体型MDH)2种类型<sup>[17]</sup>。所有检测个体3种组织中的m-MDH的谱带相似,为C基因编码的二聚体C<sub>2</sub>。s-MDH表型则有所不同,广东鲂肌组织的s-MDH为A基因编码的亚基A<sub>2</sub>,迁移率较慢,活性较高;团头鲂的s-MDH为B基因编码的亚基B<sub>2</sub>,迁移率较快但活性较低;杂交子一代的s-MDH既有A<sub>2</sub>也有B<sub>2</sub>,说明父母本的A或B基因在子代同时得到表达(图4)。肝组织的MDH酶谱极相似,多为5-6条酶带;眼组织的s-MDH有些差异,团头鲂有B<sub>2</sub>亚基,广东鲂和杂交子一代没有B<sub>2</sub>但有AB杂合体(图未显示)。

### 2.4 超氧化物歧化酶(SOD, E.C.1.15.1.1)

鱼类超氧化物歧化酶同工酶的研究报道较少,其类型尚无定论<sup>[5,18]</sup>,通常也依据迁移率的快慢划分为上清液型s-SOD和线粒体型m-SOD。广东鲂和团头鲂及杂交子一代同种组织的SOD的酶谱相近,不同组织则差异较大。其酶谱类型及基因座位有待进一步确定。3种组织的SOD活性以肝组织的最高(图5.6)。

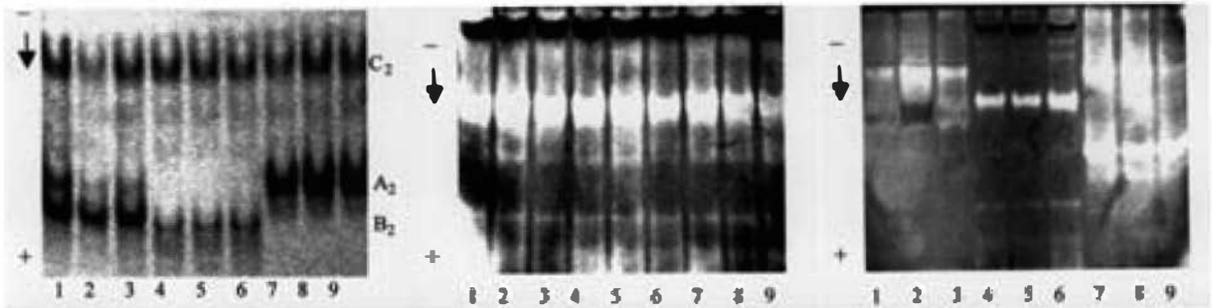


图4 肌苹果酸脱氢酶电泳图谱  
Fig.4 Electropherogram of MDH isozymes from the muscles

图5 肌超氧化物歧化酶电泳图谱  
Fig.5 Electropherogram of SOD isozymes from the muscles

图6 3种组织超氧化物歧化酶电泳图谱  
Fig.6 Electropherogram of SOD isozymes from three tissues

(图4.5 1-3 杂交子一代;4-6 团头鲂;7-9 广东鲂)

(图6 1-3 眼;4-6 肌;7-9 肝,其中1,4,7 为杂交子一代;2,5,8 团头鲂;3,6,9 广东鲂)

### 3 讨论

#### 3.1 父母本同工酶的表达特点

团头鲂和广东鲂同种组织的同工酶酶谱大多极为相似。如眼组织的 EST、眼和肌组织的 LDH、肝组织的 MDH、3 种组织的 SOD 等,因而从蛋白质水平反映了 2 种鲂的基因组的差异较小,亲缘关系较近,这也是本远缘杂交试验能取得成功的遗传物质基础;另一方面,有些酶的表达则存在种的特异性,如广东鲂肌组织的 EST 有酶带而团头鲂的没有;团头鲂肝组织的 LDH 酶在靠阳极端有一条广东鲂所没有的带,这一酶带清晰易辨、表达稳定,可作为区分此两种鱼的遗传标记之一。

与其它鱼类的同工酶相似,两者同工酶的表达也都存在组织特异性。如 EST、SOD 在不同组织中的活性不同;EST 在肝组织的酶谱复杂,而在肌组织则相当简单;LDH 的 C 谱带则只在肝组织表达等等。两者肝组织的 LDH 与“五带谱型”相比多了 1 或 2 条带,其基因控制还不清楚。有的学者认为这种同工酶谱带数目不同的原因是由 C 基因产物与 A 或 B 基因产物发生杂聚作用产生的络合物,有的认为是由更多的基因位点编码的产物<sup>[14,19,20]</sup>,还有学者认为是由于 A、B 亚基间亲和力的大小不同所致<sup>[21]</sup>。

#### 3.2 同工酶在杂交子一代的表达

远缘杂交子代基因的表达通常有父母本基因的不同步表达、非同步表达和单方亲本的基因表达 3 种方式。当种间同工酶的表现有明显差异时,其杂交子代的基因表达会出现:①具有来自双亲区带的总和;②出现了双亲中没有的新区带;③出现单方亲本基因的表达。当种间同工酶的迁移率相同而活性不同时,其杂交子代同工酶活性常介于两亲本之间<sup>[22]</sup>。广东鲂和团头鲂 4 种同工酶的酶谱差异不是太明显。杂交子一代的同工酶表型各有异同。大多符合上述规律,有些个体具有来自双亲的区带总和,如在同一杂交子一代个体中肌组织的 MDH 同工酶同时兼有父母本的某些酶带;有些个体则出现双亲中没有的新带,如肝组织的 EST,杂交子一代占半数的个体在 1 和 2 亚基间出现父母本所没有的带;有些则出现单方亲本基因的表达,如肝组织 LDH,杂交子一代出现了与母本相同的 6 条带。但眼组织的 EST,母本的酶活性高而父本低,杂交子一代活性象父本,偏低,便与上述的普遍规律有异。

#### 3.3 同工酶与机体代谢的关系

杂交子一代和双亲的生长性能比较显示团头鲂具有最快的生长速度,且生理耐受力最强(如较耐低氧、耐运输操作等);广东鲂生长最慢,生理耐受能力最差,但 EST、MDH 两种同工酶活性最高的却是广东鲂。一般而言,酶类的活力反映了基因的活力,这种同工酶酶谱或活性差异与鱼的生长代谢的关系如何尚待进行深入研究。弄清同工酶基因表型与鱼的经济性状间的关系,就有可能通过反交或杂交后代的选育等传统育种方法或基因工程育种方法获得具有优良性状的品种。

本文的撰写得到上海水产大学楼允东教授的悉心指导,谨致谢意。

#### 参考文献:

- [1] 朱蓝非. 几种鲤科鱼类及杂种的乳酸脱氢酶同工酶的比较[J]. 水生生物学集刊, 1982, 7(4): 539 - 543.
- [2] 李思发, 王 强, 陈水乐. 长江、珠江、黑龙江三水系的鲢、鳙、草鱼原种种群的生化遗传结构与变异[J]. 水产学报, 1986, 10(4): 351 - 372.
- [3] 张英培, 刘 红, 楼允东. 异育银鲫及其双亲同工酶的比较研究[J]. 遗传学报, 1990, 17(1): 34 - 37.
- [4] 吴力钊, 王祖熊. 白鲢个体发育过程中同工酶基因的表达与调控研究[J]. 水生生物学报, 1997, 21(1): 49 - 58.
- [5] 杨书婷, 桂建芳. 两个雌核发育的白鲢群体同工酶分析及遗传标记的确定[J]. 水生生物学报, 1999, 23(3): 64 - 268.
- [6] Jose A, Alarcón M, Carmen Alvarez. Genetic identification of spariid species by isozyme markers: application to interspecific hybrids[J]. Aquac, 1999, 173: 99 - 103.
- [7] Martnez G, McEwen Y, McAndrew H J. Electrophoretic analysis of protein variation in two Spanish populations of the European seabass, *Dicentrarchus labrax* L. (Pisces Moronidae)[J]. Aquac Fish Manage, 1991, 22: 443 - 455.

- [8] Reira J, Martínez C, Amorós A, et al. Interspecific genetic differentiation in western Mediterranean sparid fish[J]. *Aquac.* 1994, 125, 47 - 57.
- [9] 楼允东. 中国鱼类遗传育种研究的进展[J]. *水产学报*, 1989, 13(1): 93 - 100.
- [10] 王祖熊. 鱼类杂交不亲和性的研究[J]. *水生生物学报*, 1986, 10(2): 171 - 179.
- [11] 叶玉珍, 吴清江, 陈德荣, 等. 草鱼和鲤杂交的细胞学研究 - 鱼类远缘杂交核质不同步现象[J]. *水生生物学报*, 1989, 13(3): 234 - 239.
- [12] 桂建芳. 鱼类远缘杂交正反杂种胚胎发育差异的细胞遗传学分析[J]. *动物学研究*, 1993, 14(2): 171 - 177.
- [13] 朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法[J]. *水生生物学报*, 1992, 16(2): 183 - 185.
- [14] 李思发. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究. 上海: 上海科学技术出版社, 1998. 189 - 193.
- [15] 方一丁, 房世荣. 同工酶在医学上的应用. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 32.
- [16] Shaklee J B, Kepecs K L, Whitt G S. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: The molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes[J]. *J Exp Zool.* 1973, 185(2): 217 - 240.
- [17] 张朝庆, 王慧, 秦夜娟, 等. 泰山赤岭鱼同工酶的研究[J]. *动物学研究*, 1994, 15(2): 62 - 67.
- [18] 王强, 沈俊宝. 白鲢的同工酶研究[J]. *遗传*, 1991, 3(3): 22 - 23.
- [19] 吴婷婷, 张燕生, 薛国雄, 等. 鳊鱼和奥利亚罗非鱼乳酸脱氢酶谱的比较[J]. *水产学报*, 1993, 17(4): 325 - 329.
- [20] 李万程. 岳鲤及其双亲(荷包红鲤♀、湘江野鲤♂)LDH同工酶的研究[J]. *遗传学报*, 1988, 15(1): 46 - 51.
- [21] 朱蓝菲. 几种鲤科鱼类及杂交种的乳酸脱氢酶同工酶的比较[J]. *水生生物学集刊*, 1982, 7(4): 539 - 542.
- [22] 朱蓝菲, 桂建芳, 梁绍吕, 等. 鲢的远缘杂交子代和人工三倍体的同工酶表达[J]. *水生生物学报*, 1993, 17(4): 293 - 297.