

文章编号: 1674-5566(2012)04-0481-08

刀鲚不同组织的乳酸脱氢酶同工酶及 DNA 含量研究

徐钢春¹, 董晶晶², 聂志娟¹, 徐 跑¹, 顾若波¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081; 2. 南京农业大学 渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘 要: 采用同工酶技术和流式细胞术研究了刀鲚肝脏、眼睛、肾脏、肌肉、鳃和血清 6 个组织的乳酸脱氢酶(LDH)及尾鳍、鳃、肌肉、性腺和肝脏 5 个组织的细胞核 DNA 含量,旨在为刀鲚遗传背景和种质标准的建立提供技术参数。结果显示:(1)刀鲚不同组织的 LDH 同工酶呈现一定的组织特异性,眼睛是 LDH 表达较为典型的组织;除肌肉和血清没有 LDH₂ 条带外,其余组织均出现了 5 条同工酶酶带,并且相对迁移率一致,各组织中均未见 LDH-c 基因的表达。(2)刀鲚鳃、肌肉和肝脏 3 个组织的细胞核 DNA 含量不存在显著差异 ($P>0.05$),但都显著低于尾鳍、卵巢细胞 DNA 含量 ($P<0.05$);测定的鳃、肌肉和肝脏组织细胞核的 DNA 含量与单倍体的精子细胞的比值依次为 2.16、2.19 和 2.22,即刀鲚为二倍体鱼类。此外,肝脏细胞容易从组织上脱落,较易制成单细胞悬液,是用流式细胞仪进行倍性分析的适宜试材;如果要保持生物体健康存活状态,则剪取小部分尾鳍进行倍性分析为宜。

研究亮点: 首次报道了刀鲚的乳酸脱氢酶同工酶酶带相对迁移率、组织分布、活性扫描及细胞核 DNA 含量。研究发现,刀鲚眼睛是 LDH 表达较为典型的组织;刀鲚是二倍体鱼类,肝脏细胞是进行倍性分析的适宜试材,这为刀鲚遗传背景和种质标准的建立提供了科学依据。

关键词: 刀鲚; 乳酸脱氢酶; DNA 含量

中图分类号: S 917

文献标志码: A

刀鲚 (*Coilia nasus* Temminck et schlegel, 1846), 隶属鲱形目 (Clupeiformes) 鲱科 (Engraulidae) 鲱属 (*Coilia*), 又名长颌鲚, 俗称刀鱼、毛刀鱼、毛花鱼^[1]。在我国主要分布于黄渤海和东海一带,沿岸各通海江河如长江、钱塘江、黄河、淮河和辽河等均有分布,为我国长江中重要的洄游性鱼类,其以脂肪丰满,肉质细嫩鲜美而著称,是享有“长江三鲜”美誉之一的名贵鱼类,具有较高的经济价值和学术研究价值。

近年来,由于过度捕捞,水域受到污染和水文条件的改变等原因,导致刀鲚产量持续下降^[2-7]。有关刀鲚的形态特征、遗传多样性及鱼肉营养成分分析等种质方面的研究国内已有报道^[8-13]。程起群和李思发^[8]测量了代表种群形

态特征的传统可量性状和框架参数,采用主成分分析和逐步判别法对刀鲚与湖鲚进行了形态综合分析;刘文斌^[9]运用肌浆蛋白、同工酶显带的生化技术及骨骼等内部解剖性状探讨了包括长江刀鲚在内的鲱属 4 种鱼在不同环境中的系统发育及亲缘关系;马春艳等^[10]用 RAPD 技术对我国刀鲚资源进行遗传多样性分析,以刀鲚 DNA 为模板,对 RAPD 反应体系中的模板浓度、镁离子浓度、引物浓度和 dNTPs 浓度条件进行了优化实验,摸索了一个适合于刀鲚 RAPD 分析的反应体系;葛家春等^[11]利用 AFLP 技术对南京潜洲江段的野生刀鲚进行了遗传多样性分析,结果显示目前长江刀鲚野生群体的遗传多样性比较丰富;程起群等^[12]还以线粒体细胞色素 b (Cytb) 基因

收稿日期: 2011-11-16 修回日期: 2012-02-16

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2011JBFA17); 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B05); 公益性行业科研专项(201203065); 江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2011411)

作者简介: 徐钢春(1979—),男,助理研究员,研究方向为鱼类种质及繁育生理生态。E-mail: xugc@ffrc.cn

通讯作者: 顾若波, E-mail: gurb@ffrc.cn

片段序列为分子标记,分析了刀鲚和湖鲚的遗传多态性及遗传关系;徐钢春等^[13]采用常规方法对刀鲚两种不同生态类群“江刀”和“海刀”的鱼肉营养组成及品质进行了分析。然而,如同工酶、染色体组型、DNA 含量等种质指标尚未见报道。

鱼类同工酶研究始于 1960 年, KAPLAN 等^[14]首先分析了鲈科鱼类的 LDH 同工酶;如今,同工酶作为一种重要的生化指标,已广泛应用于鱼类的种质研究、细胞分化与个体发育、组织特异性、倍性分析及遗传等各个方面^[15]。乳酸脱氢酶(LDH)是一种结合蛋白,其辅酶是辅酶 I (NAD),在生物体内,它可以催化乳酸脱氢成为丙酮酸,而完成葡萄糖的无氧酵解过程。而脱氧核糖核酸(DNA)是绝大多数生物的遗传物质,一个细胞核中所含的 DNA 总量(称为 2C 或 2 倍体的 DNA 总量)对于某物种是一定的,DNA 含量可以反映基因组的大小,并作为细胞倍性的一个指

标,对于分类和系统演化的探讨、物种进化研究等具有参考意义,也是种质资源的主要指标之一^[16-18]。目前,尚未见对刀鲚同工酶及 DNA 含量种质的研究报道。本文采用垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳技术对刀鲚几种组织中的 LDH 同工酶酶谱进行了分析,并测定了多组织的细胞核 DNA 含量,旨在为刀鲚的遗传背景研究和种质标准制定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 刀鲚 LDH 同工酶

1.1.1 实验材料

实验用刀鲚于 2010 年 2 至 4 月取自中国水产科学院长江三鲜养殖示范基地池塘,健康无伤,幼鱼 7 月龄、成鱼 1 龄,具体生物学数据见表 1。

表 1 同工酶实验刀鲚生物学数据

Tab. 1 The biology characteristic of *Coilia nasus* under artificial farming conditions

发育阶段	性别	样本数/尾	体长/cm	全长/cm	体高/cm	体厚/cm	体重/g
幼鱼	♂	3	15.3	16.5	2.31	0.51	12.9
	♀	3	17.5	18.4	2.71	0.63	18.8
成鱼	♂	3	21.5	23.6	3.47	1.31	52.1
	♀	3	22.3	24.0	3.51	1.34	62.3

1.1.2 样品制备

用肝素抗凝剂湿润的注射器活体尾静脉抽血离心后取血清备用。解剖试验鱼,迅速取眼、肝脏、鳃、肌肉各组织器官适量,用预冷的 0.75% 生理盐水充分洗涤后,放入离心管中冻存备用。实验前,取少许组织称重,按 1:10(组织重:缓冲液)的比例加入 4 ℃ pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液,匀浆器冰浴充分匀浆后,冷冻离心机 4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min,取上清酶液与等量 20% 蔗糖溶液混匀,适量溴酚蓝作指示剂,4 ℃ 保存,每批酶液重复电泳试验 3~4 次。

1.1.3 电泳、染色及固定

采用垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳法,凝胶制备参照张庆朝等^[19],采用北京市六一仪器厂电泳仪及垂直板电泳槽,分离胶 7% (pH 8.8),浓缩胶 3.5% (pH 6.8),加样 10 μL 浓缩胶 100 V,分离胶 220 V 下电泳约 4 h。染色方法及染液配制参照胡能书和万贤国^[20]及朱蓝

菲^[21],略作调整,配制如下:NAD 12 mg、PMS 2 mg、NBT 15 mg、乳酸钠 20 mL、1 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)缓冲液 40 mL、蒸馏水 240 mL,避光浸染,观察染色情况及时取出于 7% 乙醇中固定。

1.1.4 拍照扫描

染色后的凝胶取条带清晰的采用 Tanon Gis system 2019 凝胶成像分析系统拍照扫描。

1.1.5 相对迁移率计算

计算公式如下:

$$R_f = I/L \quad (1)$$

式中: R_f 为相对迁移率; I 为点样孔至各谱带的距离; L 为点样孔至指示剂的距离。

1.2 刀鲚细胞核 DNA 含量

1.2.1 材料

所用刀鲚分别于 2009 年 6 月 8 日取自中国水产科学院长江三鲜养殖示范基地池塘,为纳苗蓄养繁殖 2 龄鱼,具体生物学数据见表 2;公鸡购于无锡市唐城菜市场。

表 2 人工养殖刀鲚生物学数据

Tab.2 The biology characteristic of *Coilia nasus* under artificial farming conditions

编号	性别	体长/cm	全长/cm	体高/cm	体厚/cm	体重/g
样品 1	♀	27.50	29.90	4.38	1.94	83.00
样品 2	♀	23.90	25.30	4.54	1.61	55.10
样品 3	♀	20.00	21.90	3.34	1.35	32.10
样品 4	♂	24.00	25.10	4.25	1.66	55.70
样品 5	♂	21.20	23.10	3.50	1.45	38.90

1.2.2 鸡血红细胞的制备

用肝素抗凝剂润湿的注射器从健康公鸡 (*Callus domesticus*) 翅膀血管中抽血 1 mL, 立即加入 0.5 mL 现配的卡诺氏固定液 [V(甲醇):V(冰醋酸) = 3:1] 制成细胞悬浊液, 固定于 eppendorf 管中, 4 °C 保存待测, 24 h 内测完。

1.2.3 组织细胞的制备

活体解剖分别取约 0.1 g 新鲜组织用眼科剪刀剪碎, 用 5 mL 磷酸缓冲液 (PBS) 制备细胞悬液, 以 1 000 r/min 离心去细胞碎片, 洗涤 2 ~ 3 次; 用 300 目筛绢过滤, 去除大组织块获得细胞悬液。

1.2.4 细胞核 DNA 含量的测定

将上述细胞悬液离心去上清, 加 200 μ L 组织裂解液 (DNA-prep A), 10 min 后加 1 mL DNA-prep B 液 (DAPI, 二脒基二苯基吡啶), 避光静置 10 min, EPICS-XL 型 (美国) 流式细胞仪测定 DNA 相对含量, 液体流速度保持在每秒 150 ~ 200 个细胞, 每个样品重复 3 次。所用试剂均为 Beckman Coulter 公司生产。比较刀鲚肌肉、肝脏等组织细胞与鸡血 2 n 峰的相对位置, 计算 DNA 含量, 鸡红细胞 DNA 绝对含量以国际上通用的 2.50 pg/2c 为标准。

1.2.5 数据处理

测量所得的图像和数据由计算机进行处理, 测定值采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, One-Way ANOVA 进行方差分析, Duncan 多重比较检验各组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 刀鲚 LDH 同工酶酶带相对迁移率及组织分布

电泳出的酶谱条带以迁移率最大的编号为 1, 由阴极到阳极共 5 条酶带, 条带从阴极到阳极

出现的顺序分别为 LDH₅、LDH₄、LDH₃、LDH₂ 和 LDH₁。结果显示 (图 1), 在 4 种组织 (肝脏、眼睛、肾脏、鳃) 中均出现了 5 条同工酶带, 而血清和肌肉中无 LDH₂ 条带只表现了 4 条同工酶带, 鳃和肌肉的主带偏向负极, 眼睛和肾脏的主带偏向正极, 肝脏和血清的主带分布于 L3 区偏向负极, 血清的主带在 L5 区也有显现, 呈现出同工酶表达的组织特异性; 但是在刀鲚幼鱼和成鱼阶段同工酶表达稳定且无性别间的明显差异。同时, 相对迁移率结果表明 (表 3), 6 种组织迁移率基本相似, 无明显差异。

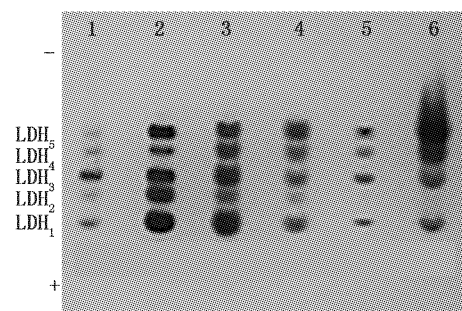


图 1 刀鲚各组织器官 LDH 同工酶酶谱
Fig.1 Gel electrophoresis of LDH in various organs of *Coilia nasus*

1. 肝脏; 2. 眼睛; 3. 肾脏; 4. 鳃; 5. 血清; 6. 肌肉。

表 3 刀鲚 LDH 同工酶各酶带的相对迁移率
Tab.3 R_f of LDH isoenzymes in different issues of *Coilia nasus*

酶带	肝脏	眼睛	肾脏	鳃	血清	肌肉
LDH ₁	0.442 8	0.440 6	0.441 7	0.443 8	0.441 7	0.442 7
LDH ₂	0.408 9	0.410 0	0.412 2	0.411 1	-	-
LDH ₃	0.387 1	0.388 2	0.389 2	0.390 4	0.388 1	0.390 3
LDH ₄	0.357 6	0.356 5	0.357 6	0.359 7	0.356 4	0.358 6
LDH ₅	0.332 4	0.334 6	0.332 4	0.333 5	0.334 6	0.331 3

注: “-”表示无条带。

2.2 刀鲚 LDH 同工酶的活性扫描

刀鲚眼睛乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶电泳图谱和酶带扫描图见图 2, 不同组织中各酶带相对

活性强度平均值见表 4。结果显示,肝脏中 LDH₃ 的活性强度明显高于其他 4 条酶带,鳃中 LDH₂ 的活性强度最小。眼睛中各酶带除 LDH₄ 的活性

强度稍弱外,其余酶带活性则相当,是 LDH 表达较为典型的组织。

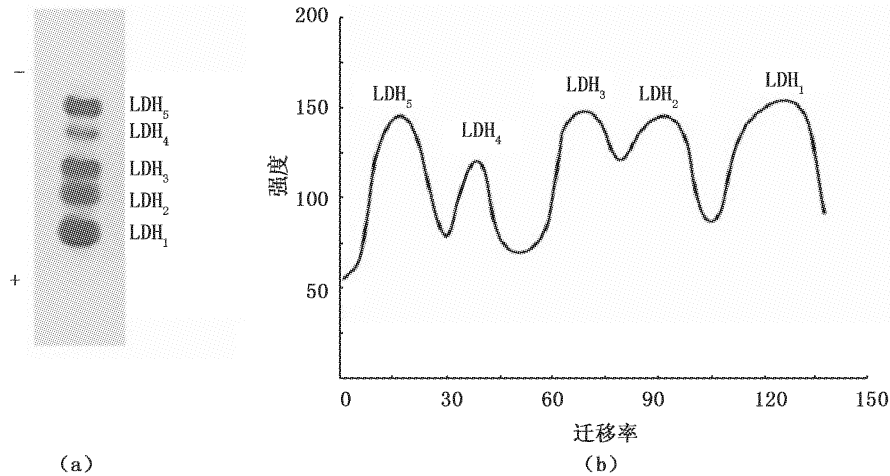


图 2 刀鲚眼睛 LDH 同工酶谱图 (a) 及其酶带扫描图 (b)

Fig. 2 Gel electrophoresis of LDH in the eye of *Coilia nasus* (a) and its scanning curve (b)

表 4 刀鲚不同组织中各酶带相对活性强度平均值

Tab. 4 Relatively active strength of LDH isoenzymes in different issues of *Coilia nasus*

组织	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
肝脏	18.83%	11.43%	47.19%	13.97%	8.57%
眼睛	30.83%	22.15%	20.22%	6.68%	20.11%
鳃	19.16%	8.56%	19.39%	21.10%	31.79%
血清	17.88%	-	29.09%	25.80%	27.23%
肌肉	30.94%	-	22.60%	20.38%	26.08%

注:“-”表示无条带。

2.3 刀鲚细胞核 DNA 含量测定

刀鲚肝脏 DNA 相对值为:平均值 = 279.3; 范围 (%) = 78.5; 变异系数 (%) = 4.03, 与鸡血细胞 2n 峰的相对位置见图 3, 鸡血细胞 DNA 相对值为:平均值 = 197.6; 范围 (%) = 82.8; 变异系数 (%) = 6.79, 其他不同组织的 DNA 含量测定结果见表 5。

以鸡血细胞 DNA 含量值为 2.50 pg/2c 计算^[22-25], 刀鲚肝脏细胞 DNA 含量与鸡血细胞的比值为 1.41, 其绝对含量为 3.534 pg/2c; 因此, 各组织的细胞 DNA 平均值绝对含量分别为:尾鳍 3.769 pg/2c, 鳃 3.410 pg/2c, 肌肉 3.454 pg/2c, 卵巢 3.913 pg/2c、精巢 1.578 pg/2c, 肝脏为 3.497 pg/2c。

在实验所用的 5 个组织中, 鳃、肌肉和肝脏

的细胞核 DNA 含量不存在显著差异 ($P > 0.05$), 但都显著低于尾鳍和卵巢细胞核 DNA 含量 ($P < 0.05$)。

2.4 刀鲚倍性分析

结果显示, 雄鱼和雌鱼性腺细胞核 DNA 含量中存在显著差异 ($P < 0.01$), 卵巢 DNA 含量为精巢的 2.48 倍。由于 6 月为刀鲚的繁殖季节, 精巢处于成熟期经历减数分裂, 形成了单倍体的精子细胞; 而此时的卵巢尚处于卵母细胞的大生长期未进行减数分裂成单倍体卵子, 实验取样的是卵巢组织细胞。本实验测定的鳃、肌肉和肝脏组织细胞核的 DNA 含量与单倍体的精子细胞的比值分别为 2.16、2.19 和 2.22, 可以确定刀鲚为二倍体鱼类。

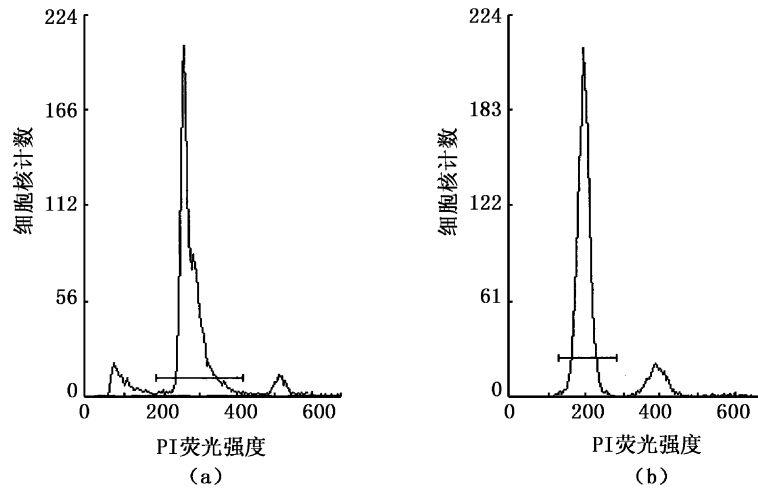


图3 刀鲚肝脏细胞 DNA 直方图 (a) 和对照鸡血红细胞标准 DNA 直方图 (b)
Fig. 3 DNA histogram of liver of *Coilia nasus* (a) and erythrocytes of chicken (b)

表5 刀鲚各组织的 DNA 相对值

Tab. 5 DNA contents of several tissues in *Coilia nasus*

组织	项目	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	平均值
尾鳍	平均值	301.6	300.1	292.8	296.5	298.3	297.9
	范围/%	55.0	57.0	52.4	48.7	58.0	54.2
	变异系数/%	9.25	7.25	7.34	7.24	6.84	7.58
鳃	平均值	270.7	270.5	270.1	268.9	267.4	269.5
	范围/%	56.0	58.3	45.5	64.8	67.9	58.5
	变异系数/%	5.12	4.12	5.65	5.63	8.93	5.89
肌肉	平均值	267.7	271.0	273.0	275.4	277.8	273.0
	范围/%	49.2	51.5	48.5	54.7	45.9	50.0
	变异系数/%	5.13	4.03	3.21	3.74	4.68	4.16
性腺	平均值	312.1	310.4	305.4	129.1	120.3	-
	范围/%	43.8	45.8	53.2	43.6	33.1	-
	变异系数/%	2.85	3.48	3.75	5.08	6.08	-
肝脏	平均值	271.0	275.8	279.3	276.5	279.2	276.4
	范围/%	73.9	70.0	78.5	69.8	69.7	72.4
	变异系数/%	7.27	6.02	4.03	6.01	6.14	5.89

注:“-”表示无法计算平均值。

3 讨论

3.1 刀鲚不同组织 LDH 同工酶的分析

乳酸脱氢酶是研究最早也是比较深入的一种同工酶。众多研究表明^[26-29], 鱼类 LDH 同工酶是由多基因决定的, 其 LDH 同工酶的分布存在明显的组织特异性。LDH 同工酶一般由 A、B、C 3 个基因位点控制, LDH-A、LDH-B 基因表达形成四聚体, 有 A₄ (LDH₅)、A₃B (LDH₄)、A₂B₂ (LDH₃)、AB₃ (LDH₂)、B₄ (LDH₁) 5 种组合方式, 表现为 5 条酶带, LDH-C 基因仅在特异的组织器官中表达^[30], 如硬骨鱼类的肝脏中, 或有些鱼类

的眼睛中^[29]。在某些鱼类中, 出现复等位基因决定的 LDH 同工酶的数目可多到几十种^[31]。本实验中, LDH-A、LDH-B 基因在各组织中均有表达, 而本实验结果条带中未见 LDH-C 基因的表达, 刀鲚的遗传组成中很可能没有 LDH-C 基因的存在, 或是该基因处于失活状态抑或受检测手段和方法的限制未能检出。

乳酸脱氢酶是参与糖酵解的关键性酶, 可使细胞在氧气不足的情况下仍能进行正常的生理活动。LDH 的 5 种同工酶中, LDH-B₄ (LDH₁) 基因表达的酶则主要催化乳酸脱氢酶转变成丙酮酸, 在心脏等好氧性器官组织中含量的高; 而 LDH-

A₄ 基因表达的酶(LDH₅)则主要催化丙酮酸还原成乳酸,一般在厌氧器官组织中含量高。由表 2 可以看出,在肌肉这一厌氧器官组织中 LDH₅ 强烈表达,这是对肌肉这类嫌气性组织的一种适应,也与其喜欢生活在开阔水域或流水环境相适应;而在肝脏这一乏氧器官中,LDH₅ 的酶活性是最小的,反而 LDH₃ 的酶活性是最大的,LDH₃ 在肝脏中强烈表达,这与淡水黑鲟^[32]的 LDH 同工酶表达相同,这可能与刀鲚耐低氧能力差的生理功能有着密切的关系。

在多数二倍体鱼类中,LDH 同工酶表现为 A、B 基因编码的 A、B 亚基构成的 5 条谱带^[33-34];由此可以推断刀鲚为二倍体鱼类。此外,本次实验的刀鲚不同组织乳酸脱氢酶中,眼睛中 5 条带强烈表达且稳定,血清中无 LDH₂ 条带,这两种组织可作为刀鲚种质鉴定的标志酶取样部位。

3.2 刀鲚 5 种组织 DNA 含量的比较分析

采用流式细胞术检测水生生物 DNA 含量以确定基因组大小及倍性分析是目前国内外进行物种鉴定和遗传变异研究的通用方法^[35-36]。通过与繁殖期间单倍体的精子细胞核 DNA 的比较,本研究中的 5 个组织细胞核 DNA 研究结果均表明刀鲚为二倍体鱼类,与同工酶研究结果相一致。其中,肝脏与鳃、肌肉的细胞核 DNA 含量比较一致且细胞容易从组织上脱落,较易制成单细胞悬液;因此,肝脏是利用流式细胞仪进行刀鲚倍性鉴定的最适宜试材;但以尾鳍作为珍稀或濒危鱼类非损伤性检测的材料,一般不至于造成实验鱼的死亡,因为鱼类的鳍由支鳍骨、鳍条和鳍膜组成,剪断鳍条和鳍膜对鱼的生存危害较小且刀鲚尾鳍鳍条和鳍膜有再生能力^[37],则剪取小部分尾鳍进行倍性分析亦可。

本研究结果表明,刀鲚鳃、肌肉和肝脏的细胞核 DNA 含量无显著差异,与吴洪喜等^[38]对泥蚶肌肉和鳃的 DNA 含量的测定和张晓军等^[39]对刀额新对虾细胞肌肉、鳃、卵巢细胞的 DNA 含量测定结果相似。但是,刀鲚尾鳍、卵巢细胞核 DNA 含量与其他组织存在差异,造成这种差异的原因可能与刀鲚尾鳍的细胞结构以及所具备的不同生理功能相关,在细胞分化过程中,不同组织细胞核 DNA 分子存在重排、扩增及逸失现象^[40-41],这方面的研究有待进一步地深入。

同一种生物体细胞的 DNA 含量是恒定的,具有种的特征,在亲缘关系相近的类群中可以作为探讨其演化地位和亲缘关系的依据^[33]。目前,叶玉珍等^[25]对 3 个鲫品系的研究表明,染色体数目多的鲫 DNA 含量高,染色体数目少的鲫 DNA 含量低,鲫 DNA 含量的高低可能与它的进化程度不同有密切关系;吴洪喜等^[38]测定的泥蚶与毛蚶和魁蚶的 DNA 含量相差不大,表明它们之间有非常接近的亲缘关系,但泥蚶比毛蚶和魁蚶具有稍多的 DNA 含量,因此认为泥蚶在进化程度上要比毛蚶和魁蚶高级。本试验的结果表明刀鲚的肝脏细胞核 DNA 含量低于似刺鳊(3.905 pg/2c)^[42]、异育银鲫(4.8 pg/2c)^[25]、史氏鲟(11.59 pg/2c)^[32];高于黄鳍(3.25 pg/2c)^[42]。可以类推,人工养殖刀鲚细胞核 DNA 含量的测定对刀鲚、湖鲚及凤鲚等分类和系统演化的探讨是具有应用前景的,若再结合现代生物技术将对以形态学为基础的分类系统起到很好的互相印证作用,这方面的工作有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] WHITEHEAD P J P. FAO species catalogue. Vol. 7. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei) [M]. Rome: United Nations Development Programme, 1985: 470-471.
- [2] 长江刀鲚资源调查协作组. 长江刀鱼资源及其利用[J]. 淡水渔业, 1976(8): 23-28.
- [3] 袁传忠, 秦安舫. 我国近海鲚鱼生态习性及其产量变动状况[J]. 海洋科学, 1984(5): 35-37.
- [4] 袁传忠. 长江中下游刀鲚资源和种群组成变动状况及其原因[J]. 动物学杂志, 1988, 23(3): 12-15.
- [5] 黄晋彪, 张雪生. 长江口刀鲚资源试析[J]. 水产科技情报, 1989(6): 173-175.
- [6] 黄仁术. 刀鱼的生物学特性及资源现状与保护对策[J]. 水利渔业, 2005, 25(2): 33-37.
- [7] 张敏莹, 徐东坡, 刘凯, 等. 长江下游刀鲚生物学及最大持续产量研究[J]. 长江流域资源与环境, 2005, 14(6): 694-698.
- [8] 程起群, 李思发. 刀鲚和湖鲚种群的形态判别[J]. 海洋科学, 2004, 28(11): 39-43.
- [9] 刘文斌. 中国鲚属 4 种鱼的生化和形态比较及其系统发育的研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(5): 559-564.
- [10] 马春艳, 刘敏, 马凌波, 等. 长江口刀鲚遗传多样性的随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(5): 19-24.
- [11] 葛家春, 曹延, 陈婵娟, 等. 利用扩增片段长度多态性技术分析长江刀鲚的遗传多样性[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 2008, 44(3): 332-338.
- [12] 程起群, 温俊娥, 王云龙. 刀鲚与湖鲚线粒体细胞色素 b

- 基因片段多态性及遗传关系[J]. 湖泊科学,2006,18(4):425-430.
- [13] 徐钢春,顾若波,张呈祥,等. 刀鲚两种生态类群—“江刀”和“海刀”鱼肉营养组成的比较及品质的评价[J]. 海洋渔业,2009,31(4):401-409.
- [14] KAPLAN N O, CIOTII M M, HAMOLSKY M, et al. Molecular heterogeneity and evolution of enzymes[J]. Science, 1960, 131:392-397.
- [15] 王宏伟,王安利,王维娜,等. 鱼类同工酶研究进展[J]. 动物学报,2001,47(专刊):101-105.
- [16] 方旅平,张馥厚,曹文清,等. 刀额新对虾和日本囊对虾细胞核 DNA 含量的测定和比较[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2007,46(1):146-148.
- [17] 朱新平,陈永乐,张菁,等. 黄喉拟水龟细胞核 DNA 含量的分析[J]. 动物学研究,2004,25(2):177-180.
- [18] 高静,黄晓红,曾华嵩,等. 中国 6 种经济鱼类的基因组大小测定[J]. 中国水产科学,2010,17(4):689-694.
- [19] 张庆朝,王慧,秦孜娟,等. 鱼类乳酸脱氢酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳技术研究[J]. 生物技术,1994,4(5):38-40.
- [20] 胡能书,万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1985:41.
- [21] 朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白质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.
- [22] BACHMANN K, HARRINGTON B A, CRAIG J P. Genome size in birds[J]. Chromosoma, 1972, 37:405-416.
- [23] TIERSCH T R, CHANDLER R W, WACHTEL S S, et al. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content[J]. Cytometry, 1989, 10:706-710.
- [24] VINOGRADOV A E. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship[J]. Cytometry, 1998, 31:100-109.
- [25] 叶玉珍,周建峰,王忠卫,等. 三个鲫品系 DNA 含量的比较研究[J]. 水生生物学报,2004,28(1):13-16.
- [26] 刘文斌,陈合格,张轩杰. 黄颡鱼不同组织中同工酶的表达模式[J]. 激光生物学报,2003,12(4):274-278.
- [27] 王金星,周才武. 中国鲤科鱼类的乳酸脱氢酶和酯酶同工酶的比较研究[J]. 海洋与湖沼,1987,18(1):64-69.
- [28] 朱翠兰,余为一,杨启超,等. 分布池塘泥鳅 LDH 同工酶电泳图谱特征的研究[J]. 安徽农业大学学报,1997,24(1):68-72.
- [29] 尹绍武,黄海,廖经球,等. 点带石斑鱼与褐点石斑鱼 4 种同工酶的比较研究[J]. 水产科学,2007,26(9):500-503.
- [30] 曾呈奎,相建海. 海洋生物技术[M]. 济南:山东科学技术出版社,1998:284-285.
- [31] 杨成,王国杰,王振吉. 高白鲑乳酸脱氢酶同工酶研究[J]. 青海农牧业,2008(3):34-35.
- [32] 李娟,王成武,安丽,等. 淡水黑鲟 5 种同工酶的组织特异性研究[J]. 中国农学通报,2011,27(7):380-384.
- [33] 朱蓝菲,桂建芳. 四类不同倍性鲫鱼在胚胎发育间同工酶基因表达的比较分析[J]. 实验生物学报,1998,31(4):369-375.
- [34] 崔森. 彭泽鲫雌核发育的异精效应及三种鲫鱼品系同工酶分析[D]. 广东:华南师范大学,2003:35-42.
- [35] 耿波,孙效文. 流式细胞术在水生生物 DNA 含量和倍性分析中的应用[J]. 水产学杂志,2008,21(2):21-24.
- [36] 薛淑群,尹洪滨. 匙吻鲟的细胞遗传学分析[J]. 水生生物学报,2009,33(6):1078-1082.
- [37] 张春光,叶恩琦. 刀鲚与凤鲚尾鳍再生现象的观察[J]. 动物学杂志,1995,30(3):52-53.
- [38] 吴洪喜,柴雪良,吴建波,等. 乐清湾泥蚶血细胞周期和 DNA 含量[J]. 海洋科学,2002,26(3):47-49.
- [39] 张晓军,周岭华,相建海. 刀额新对虾染色体核型及细胞核 DNA 含量[J]. 海洋与湖沼,2002,33(3):225-231.
- [40] 李贇,郑晓东,王昭萍,等. 牡蛎不同组织细胞核 DNA 含量比较[J]. 青岛海洋大学学报,1999,29(37):453-456.
- [41] 丁君,常亚青,邢荣莲,等. 九孔鲍不同器官 DNA 相对含量与细胞周期的分析[J]. 大连水产学院学报,2003,18(3):200-203.
- [42] 顾若波,徐钢春,闻海波,等. 太湖似刺鳊染色体组型分析及细胞核 DNA 含量[J]. 水产学报,2009,33(1):556-562.
- [43] 尹绍武. 黄鳍的红细胞观察及其 DNA 含量[J]. 海南大学学报:自然科学版,2004,22(2):152-155.

Studies on lactate dehydrogenase isozymes and DNA content in different tissues of *Coilia nasus*

XU Gang-chun¹, DONG Jing-jing², NIE Zhi-juan¹, XU Pao¹, GU Ruo-bo¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, Jiangsu, China; 2. College of Fisheries, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, Jiangsu, China)

Abstract: The aim of this study was to provide technical parameters for the foundation of genetic background and resources in *Coilia nasus*. In the present study, lactate dehydrogenase isozymes (LDH) in liver, eye, kidney, muscle, gill and serum, and DNA content in tail fin, gill, muscle, gonad and liver were studied by isozyme and flow cytometry techniques. The results indicated that: (1) The LDH in different tissues had a tissue specialty. All the tissues exhibited five isozyme bands and same relative migration rate, except for LDH-c expression. No LDH₂ bands were found in muscle and serum. (2) No significant differences were observed in DNA content in gill, muscle and liver ($P > 0.05$), but DNA content in those tissues was significantly lower than that in the tail fin and ovary cells ($P < 0.05$). The ratio of DNA content in gill, muscle and liver and haploid spermatide were 2.16, 2.19 and 2.22, respectively. Moreover, the hepatocytes which were easily isolated from tissue and made into single cell suspension were good materials for ploidy analysis by flow cytometry.

Key words: *Coilia nasus*; lactate dehydrogenase isoenzymes; DNA content