

# 鲈鱼群体生化遗传学研究

## I. 同工酶的生化遗传分析\*

徐成 王可玲 尤锋 吴谖琦 张培军

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 于 1994 年 9 月—1995 年 12 月,在青岛近海采集 37 尾鲈鱼的生化样品,采用淀粉胶和聚丙烯酰胺凝胶 2 种电泳方法,分析了 LDH、MDH、MEP、IDHP、PGM、G3PDH、AK、CK、ADH、SDH、G6PDH、GDH、PGDH、CAT、MPI、EST、SOD 等同工酶在鲈鱼眼睛、肌肉、心脏、肝脏、肾脏、鳃、胸鳍等 7 种组织或器官中的表达情况,并对同工酶表型进行了生化遗传分析,以期为其种质资源保护和开发,以及遗传育种等方面的研究提供基础资料。结果表明,17 种同工酶由 31 个基因座位编码,其中 Mep-1、Pgm-1、Sdh、Gdh、Pgdh、Mpi、Est-1、Est-4 等 8 个基因座位为多态。多态座位比例为 25.8%。

**关键词** 鲈鱼,同工酶,生化遗传分析

**中图分类号** Q178.53

鲈鱼属于鲈形目鲈科,是一种优良的增养殖鱼类,目前国内外关于其生化遗传学的研究未见报道。生化遗传分析是通过分析同工酶的表型而获知其基因型,其中应用价值较高的是遗传多态性座位的研究。遗传多态性(genetic polymorphism)是指某基因座位在同一相互交配群体内存在两种以上基因型的现象。多态座位在个体间的差异是其自身携带的遗传标记,应用于多倍体倍性确定、雌核发育鉴定等方面有其独到的优点(Sugama *et al.*, 1992)。本文报道鲈鱼基本的生化遗传结构,以期为其种质资源保护和开发,以及遗传育种等方面的研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与处理

实验所用的鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)于 1994 年 9 月—1995 年 12 月取自青岛近海,为活鱼或当天捕获的鲜鱼,共 37 尾,全长(266.0±36.7)mm。每尾鱼取眼睛、肌肉、心脏、肝脏、肾脏、鳃、胸鳍等 7 种器官或组织,分别编号后置于小塑料袋中,迅速投入液氮保存至分析。供分析的样品加 1—2 倍量(V/W)的 Tris-HCl 缓冲液(0.01mol/L, pH=7.0)匀浆后离心(4℃, 1.7 万 r/m, 15min),上清液用于电泳。

### 1.2 电泳方法

同工酶电泳采用淀粉胶(SG)和聚丙烯酰胺凝胶(PAG)两种支持物。淀粉胶电泳参

\* 国家攀登计划 B 资助项目,PD B6-5-2 号。徐成,男,出生于 1968 年 9 月,博士生,助理研究员, E-mail: chxu@163.net

收稿日期: 1999-03-19, 收修改稿日期: 2000-05-28

照王可玲等(1994),采用 Tris-柠檬酸(TC,pH=6.9)和 EDTA-硼酸-Tris(EBT,pH=8.9)两种缓冲系统;聚丙烯酰胺凝胶电泳参照莽克强等(1975),采用高 pH 不连续系统,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸(TG,pH=8.3)。凝胶的组化染色方法参照 Harris 等(1976)和 Shaklee 等<sup>1)</sup>,略加修改。笔者曾在 4 种缓冲系统中筛选过 26 种同工酶,从中选出 17 种用于常规分析。酶的名称及电泳情况见表 1。

表 1 鲈鱼 17 种同工酶及其电泳情况

Tab.1 The names and electrophoretic methods of 17 analyzed isozymes in *Lateolabrax japonicus*

名称	缩写	编号	电泳支持物	缓冲系统
乳酸脱氢酶	LDH	1.1.1.27	SG	TC
苹果酸脱氢酶	MDH	1.1.1.37	SG	TC
苹果酸酶	MEP	1.1.1.40	SG	TC
异柠檬酸脱氢酶	IDHP	1.1.1.42	SG	TC
葡萄糖磷酸变位酶	PGM	5.5.2.2	SG	TC
甘油-3-磷酸脱氢酶	G3PDH	1.1.1.8	SG	TC
腺苷激酶	AK	2.7.4.3	SG	TC
肌酸激酶	CK	2.7.3.2	SG	TC
醇脱氢酶	ADH	1.1.1.1	SG	EBT
山梨醇脱氢酶	SDH	1.1.1.14	SG	EBT
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	G6PDH	1.1.1.49	SG	EBT
葡萄糖脱氢酶	GDH	1.1.1.47	SG	EBT
磷酸葡萄糖酸脱氢酶	PGDH	1.1.1.44	SG	EBT
过氧化氢酶	CAT	1.11.1.6	SG	EBT
甘露糖-6-磷酸异构酶	MPI	5.3.1.8	SG	EBT
酯酶	EST	3.1.1.-	PAG	TG
超氧化物歧化酶	SOD	1.15.1.1	PAG	TG

### 1.3 电泳结果记录

同工酶的缩写、基因座位和等位基因的命名基本采用 Shaklee 等(1990)推荐的方法,以同工酶缩写名称的大写代表酶蛋白,小写代表编码基因。

## 2 结果

### 2.1 同工酶的表达

**2.1.1 LDH(图 1:1)** 为四聚体酶,由 Ldh-A、Ldh-B、Ldh-C 三个基因座位编码,均为单态。此酶的组织特异性较强,Ldh-A 在肌肉中活性最强,为超显性;Ldh-A、Ldh-B 在眼、心、肝、肾、鳃、鳍中均表达,只有 A<sub>4</sub>、B<sub>4</sub> 两条带,无杂合;Ldh-C 只在眼睛中表达,且是在视网膜中表达,晶体中不表达(图 1:2)。

**2.1.2 MDH(图 1:3)** 为二聚体酶,一般有 s(细胞质型)-MDH 与 m(线粒体型)-MDH 两种类型。鲈鱼只见到 s-MDH,由 s-Mdh-A 和 s-Mdh-B 两个基因座位编

1) Shaklee J B, Keenan C P, 1986. A practical laboratory guide to the techniques and Methodology of electrophoresis and its application to fish fillet identification. Aust CSIRO Mar Lab, Report, 177

码,均为单态,座位间可杂合,表型为 3 条带。

**2.1.3 MEP(图 1:4)** 为四聚体酶,由 2 个基因座位编码。Mep-1 为多态,有 100 及 110 两个等位基因,可组合成 100/100、100/110、110/110 三种基因型,图谱中可见到相应的 3 种表型。Mep-1 在不同组织中表达相同,肌肉、肝脏活性较强。Mep-2 只在肝脏中表达,单态。

**2.1.4 IDHP(图 1:5)** 为二聚体酶,有 s-IDHP 与 m-IDHP 两种类型,各由 1 个座位编码,均为单态。座位间不杂合,表型可见 2 条带。此酶表达组织特异性强。眼、肝、肾、鳍中 s-IDHP 活性较强;肌肉、心脏中 m-IDHP 活性较强。这与各组织的代谢特征一致。

**2.1.5 PGM(图 1:6)** 单体酶,由 2 个基因座位编码。Pgm-1 为多态,有 75、100、120 三个等位基因。75 等位基因频率较低,未观察到其纯合子。表型只见 4 种:100/100、75/100、100/120、120/120。Pgm-1 各组织表达基本相同,肌肉、肝脏活性较强。Pgm-2 只在肝中表达,单态。

**2.1.6 G3PDH(图 1:7)** 二聚体酶,由 2 个基因座位编码,均为单态。G3pdh-1 只在肌肉中表达;G3pdh-2 只在肝中表达。其它组织未检出活性。

**2.1.7 AK(图 1:8)** 为单体酶,由 2 个基因座位编码,均为单态。Ak-1 在眼睛、肌肉、心脏中表达,肌肉活性较强;Ak-2 在肝脏、肾脏、鳃、鳍中表达,肝脏活性较强。2 座位间不杂合。

**2.1.8 CK(图 1:8)** 由于染色方法的原因,染 CK 时会同时出现 AK 图谱。只有 AK、CK 同时分析,相比较才能确定 CK 图谱。CK 为二聚体酶,由一个座位编码,只在肌肉中表达,单态。

**2.1.9 ADH(图 1:9)** 此酶在 EBT 系统中向负极迁移,为二聚体酶,只在肝中检出活性,由 1 个基因座位编码,单态。

**2.1.10 SDH(图 2:1)** 二聚体酶,由 1 个基因座位编码,多态,有 64、100、136 三个等位基因。表型只见 3 种:100/100、64/100、100/136,由于基因频率低,未观察到 64 及 136 的纯合子。SDH 只在肝、肾中检出活性,肝脏的活性较强。

**2.1.11 G6PDH(图 2:2)** 二聚体酶,由 G6pdh-1、G6pdh-2 两个座位编码,均为单态。座位间不杂合,可见到 2 条带。G6PDH 在肝中活性较强,2 个座位均表达;鳃表达情况似肝,活性较弱;眼睛、肌肉、肾脏中只有 G6pdh-1 表达,活性弱;心脏、鳍中未检出活性。

**2.1.12 GDH(图 2:3)** 二聚体酶,由 1 个基因座位编码。多态,有 85、100 两个等位基因,组合成 3 种基因型 85/85、85/100、100/100,与之相应的表型均可见到。GDH 只在肝中有活性。

**2.1.13 PGDH(图 2:4)** 二聚体酶,1 个基因座位编码,肝中活性最强;眼、心脏、肾、鳃次之,肌肉、鳍未检出活性。Pgdh 为多态,有 95、100 两个等位基因,组合成 3 种基因型 95/95、95/100、100/100,相应表型均可见到。

**2.1.14 CAT(图 2:5)** 二聚体酶,由 2 个基因座位编码,均为单态。心脏中只有 Cat-1 表达,肾脏中只有 Cat-2,活性均较弱。肝脏中 2 个座位都表达,活性强。其它组织未检出活性。

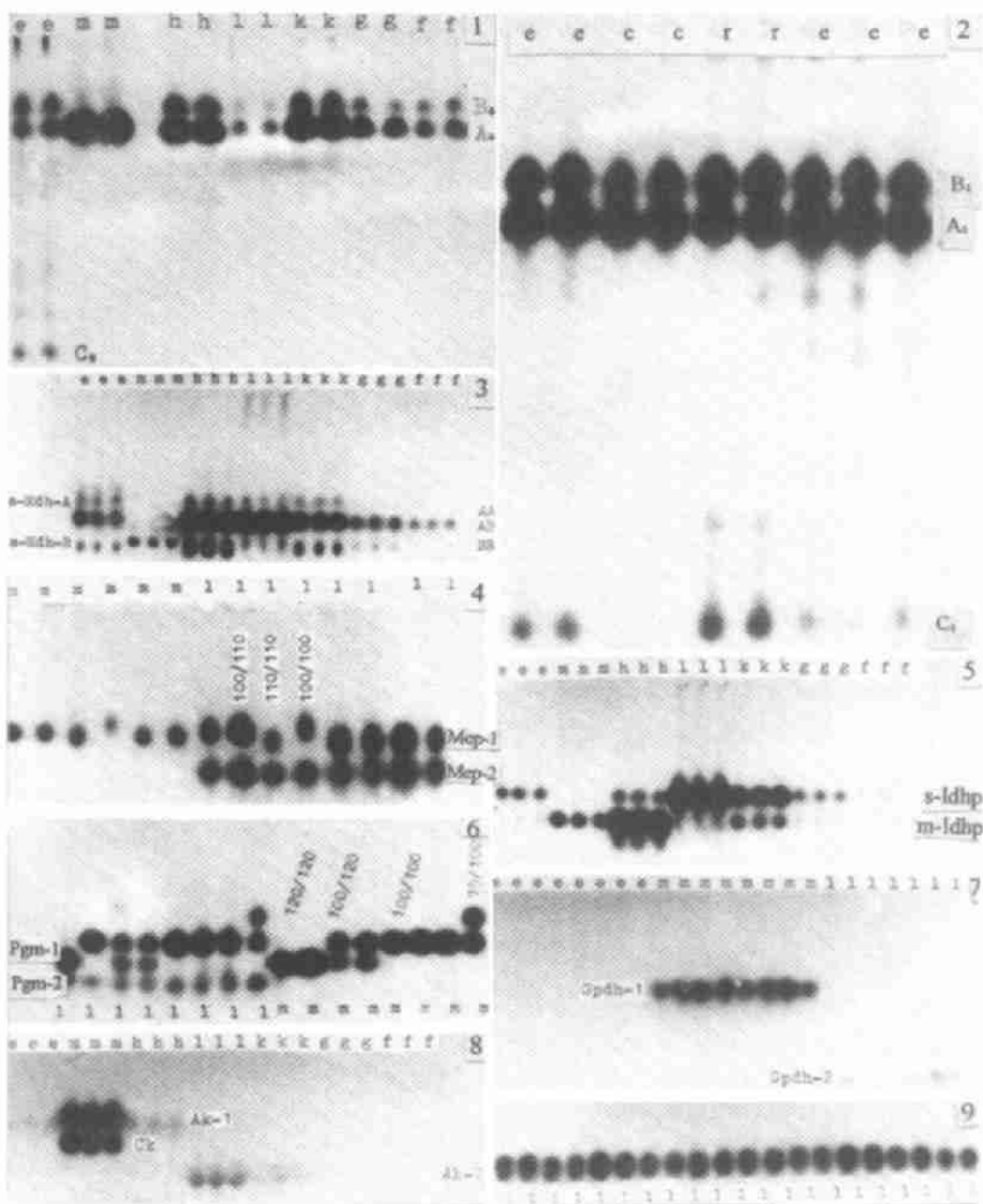


图1 鲈鱼同工酶电泳图谱(I)

Fig. 1 Isozyme electrophoregrams (I) of *Lateolabrax japonicus*

1. LDH; 2. LDH; 3. MDH; 4. MEP; 5. IDHP; 6. PGM; 7. G3PDH; 8. AK+CK; 9. ADH.

e: 眼睛 (eye); m: 肌肉 (muscle); h: 心脏 (heart); l: 肝脏 (liver); k: 肾脏 (kidney);

g: 鳃 (gill); f: 鳍 (fin); c: 眼晶体 (eye crystal); r: 视网膜 (retina)。图2同

2.1.15 MPI(图2:6) 单体酶,由一个基因座位编码,肝脏活性最强。Mpi为多态,有90,100,110三个等位基因,形成90/90、90/100、90/110、100/100、100/110、110/110六种基

因型。MPI 是单体酶,其杂合子应为 2 条带,90/110 分离较为明显,90/100 和 100/110 因迁移率较接近,分离不很清楚。

**2.1.16 EST** 是催化酯类水解的酶系,鲈鱼只检测了肝中 EST 活性,可记录出 4 个基因座位。EST-1 为单体酶,多态,有 100、110 两个等位基因,可见到 3 种表型(图 2:7)。EST-2 和 EST-3 为单态,各由 1 个基因座位编码,座位间不杂合。EST-4 是单体酶,有 100、105 两个等位基因,表型似 EST-1(图 2:8)。

**2.1.17 SOD(图 2:9)** 二聚体酶。只检测了肝中 SOD 活性,有 s-SOD 及 m-SOD 两种类型,各由 1 个基因座位编码,均为单态。座位间不杂合,表型只有 2 条带。

## 2.2 多态座位比例

前面分析的 17 种同工酶记录出 31 个基因座位,其中 Me-1、Pgm-1、Sdh、Gdh、Pgdh、Mpi、Est-1、Est-4 等 8 个基因座位为多态,多态座位比例(mean proportion of polymorphic loci,  $P$ )为: $P = 8/31 \times 100\% = 25.8\%$ 。

## 3 讨论

### 3.1 不同电泳方法所得图谱的生化遗传分析

生化遗传分析应回答的问题有:被分析的同工酶是几聚体?由几个基因座位编码?单态或多态?有几个等位基因?等等。不同的电泳方法,由于其电泳支持物的种类、浓度、缓冲系统、电泳条件(电压、电流、时间等)不同,可产生不同的电泳图谱,可能会得到不同的生化遗传分析结果。

当今分析同工酶主要为淀粉胶电泳(SGE)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)两种方法。两种方法相比,PAGE 分辨率较高,但不能像 SGE 那样切成片,只能一块胶分析一种酶,这样可比性差,效率也低。目前国际上积累的同工酶资料,绝大部分为采用 SGE 得到的结果,采用 SGE 也便于互相比较和借鉴。但对活性较弱或组成复杂的同工酶(如 EST 等),则 PAGE 更适用于其分析。使用何种电泳方法,标准只有一个,即尽可能地揭示同工酶的表达,清晰地反映同工酶的遗传变异,使生化遗传分析能全面、正确地记录出编码同工酶的基因座位数、酶的多态性、等位基因数等。

Numachi(1970)报道,鲈鱼骨骼肌中 LDH 为 3 条带,MDH 为 2 条带。该文献是 1970 年以前的资料,是作者对多种鱼类同工酶进行的比较生化方面的研究。其实验采用 PAGE,结果与本文 SGE 的结果不尽一致。分析该文献中 LDH 图谱,中间一条带超显性,应为  $A_4$ ;近阴极处一条弱带可能为  $B_4$ ,另一阳极区弱带则可能为次级修饰带,或其它原因产生的假性同工酶。其 MDH 与本文结果差别较大,主要原因可能是样品的采集与保藏等的差异。另外,PAGE 分辨率高而其图谱反比 SGE 区带少,说明其电泳条件不尽适合鲈鱼的 MDH。

### 3.2 LDH 基因表达

**3.2.1 Ldh-C 表达** 鱼类 Ldh-C 多在特定器官中表达。低等硬骨鱼,如鲤科鱼类多在肝中表达,高等鱼类多在眼中表达,而眼中表达有的是在晶体中,有的是在神经系统中(Shaklee *et al.*, 1976)。本文作者将鲈鱼眼睛的晶体与视网膜分开离心、电泳,结果见图 1:2。可见,鲈鱼 Ldh-C 是在神经系统中表达。

**3.2.2 Ldh-A、Ldh-B 表达** Ldh-A、Ldh-B 在各组织中基本均有表达, $A_4$  在白肌中为

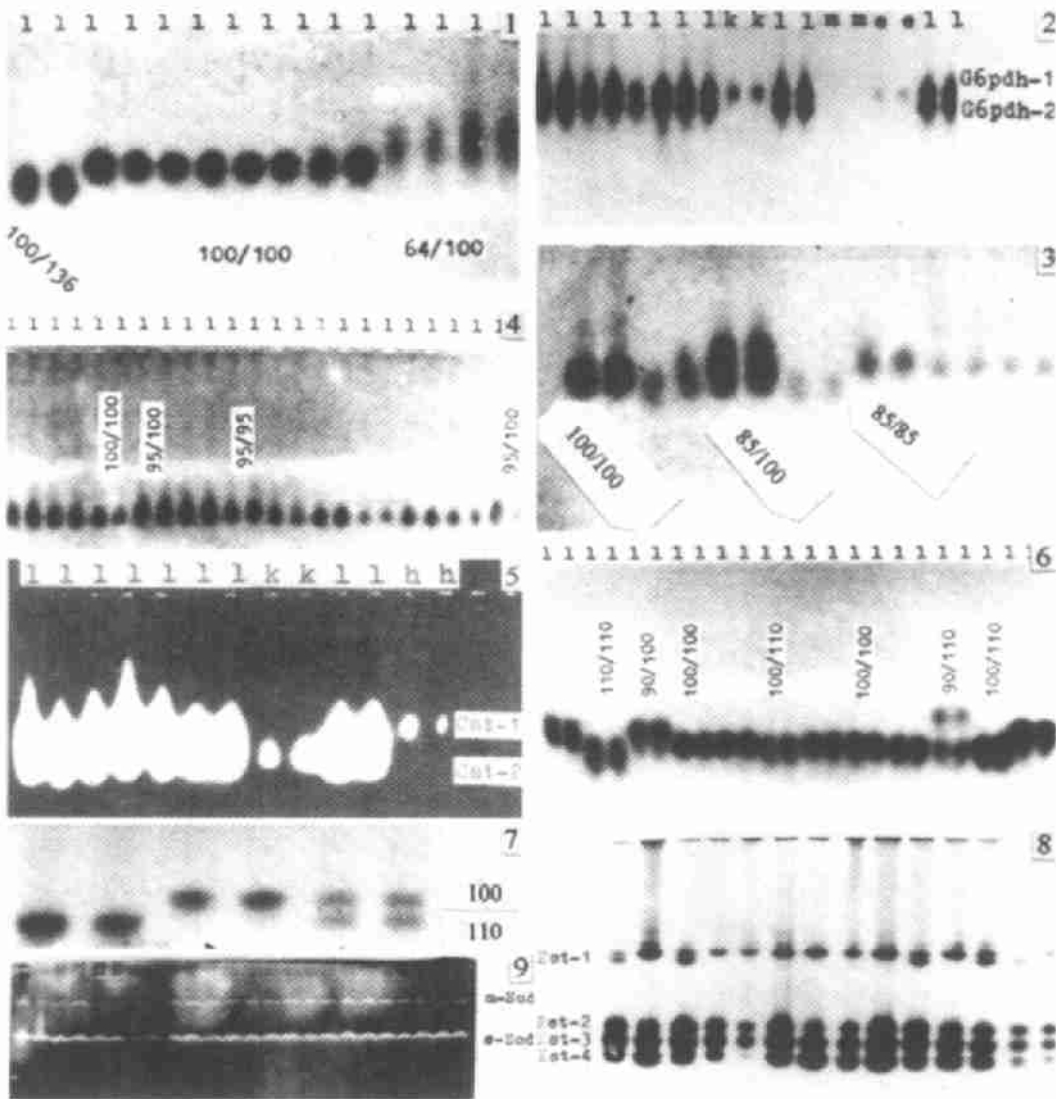


图 2 鲈鱼同工酶电泳图谱(II)

Fig.2 Isozyme electrophoregrams (II) of *Lateolabrax japonicus*

1. SDH; 2. G6PDH; 3. GDH; 4. PGDH; 5. CAT; 6. MPI; 7. EST; 8. EST; 9. SOD

超显性,一般以此区分 Ldh-A 和 Ldh-B 座位。但两者杂合情况在不同种类间差别很大,2—5 条带均有,若某座位多态更加复杂。Mok 等(1988)报道 12 种鱼类 LDH,50% 以上 Ldh-A、Ldh-B 座位不杂合;A<sub>1</sub> 酶带迁移率大于 B<sub>1</sub> 或相反,各占 50%。从本文结果看,鲈鱼 LDH 表达符合鱼类 LDH 表达的一般规律。

### 3.3 多态基因座位研究意义及应用前景

多态座位比例是种群遗传多样性的一个重要指标。脊椎动物一般在 15%—30% (Kirpichnikov, 1981);淡水鱼类为 11.8%—33.3% (李思发等,1990);海水鱼类中,带鱼为 12.5%—41% (王可玲等,1994),尖吻鲈为 34.8% (Shaklee *et al.*, 1985)。鲈鱼多态座位

比例为 25.8%, 在鱼类中居中等水平。

已有报道, 鱼类特定的基因型与其生长性状相关, 如虹鳟、鲤鱼的生长、肥满度等与运铁蛋白表型有关(Reintz, 1978); Pgm-1 杂合型虹鳟生长较快(Allendorf *et al*, 1983); 雌核发育的异育银鲫体重与血清蛋白和 EST 的不同基因型明显相关(朱兰菲等, 1987)。这样, 通过对同工酶多态性基因座位的分析, 如能确定某些特定基因型与优良生产性状的连锁关系, 在生产上就可用同工酶技术筛选出具有优良性状的亲本交配组合, 从而定向地建立稳定的人工优良繁殖品系。

根据种群间生化遗传差异的分析, 在鱼类遗传育种时, 可有意识地选择遗传差异大的群体进行杂交, 其子代可在生长性能、抗病能力等方面表现出较大的杂交优势。此外, 同工酶多态座位作为一种稳定而灵敏的遗传标记, 在增殖放流结果监测、种群鉴别、渔业管理等方面, 有着良好的应用前景。

### 参 考 文 献

- 王可玲, 张培军, 刘兰英等, 1994. 中国近海带鱼种群生化遗传结构及其鉴别的研究. 海洋学报, 16(1): 93—104
- 朱兰菲, 蒋一珪, 1987. 银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用. 水生生物学报, 11: 105—111
- 李思发, 吴力钊, 王 强等, 1990. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究. 上海: 上海科学技术出版社, 51—101
- 莽克强, 徐乃正, 方荣祥, 1975. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 26—47
- Allendorf F W, Thorgard G H, 1983. Tetraploid and the evolution of Salmonid Fishes. In: Truner B J ed. Evolutionary Genetics of Fishes. New York, London: Plenum Press, 1—53
- Harris H, Hopkinson D A, 1976. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. Amsterdam, Oxford: North Holland Publishing Com, Chapter 4
- Kirpichnikov V S, 1981. Genetic Bases of Fish Selection. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 143—200
- Mok H, Tsui S, Lee S, 1988. Implication of Tissue Expression of Lactate Dehydrogenase-C Gene in Phylogenetic Study of Enteleost. Jap J Icht, 35(1): 31—39
- Numachi K, 1970. Lactate and malate dehydrogenase isozyme patterns in fish and marine mammals. Bull Jap Soc Sci Fish, 36(10): 1067—1077
- Reintz G L, 1978. Differential performance of four strains of rainbow trout reared under standardized conditions. Prog Fish Cult, 40(1): 21—23
- Shaklee J B, Kepes K L, Whitt G S, 1976. Specialized Lactate Dehydrogenase Isozymes: The Molecular and Genetic Basis for the Unique Eye and Liver LDHs of Teleost Fishes. J Exp Zool, 185: 217—240
- Shaklee J B, Salini J P, 1985. Genetic Variation and Population Subdivision in Australian Barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). Aust J Mar Fish Res, 36: 203—218
- Shaklee J B, Allendorf F W, Morizot D C *et al*, 1990. Genetic Nomenclature for Protein-Coding Loci in Fish. Trans Amer Fish Soci, 119: 2—15
- Sugama K, Taniguchi N, Seki S, 1992. Survival, growth and gonad development of triploid red sea bream, *Pagrus major* (Temroinck et Schlegel): Use of allozyme markers for ploidy and family identification. Aqua Fish Manag, 23: 149—159

## BIOCHEMICAL GENETICS OF *LATEOLABRAX* *JAPONICUS* POPULATION

### I. BIOCHEMICAL GENETIC ANALYSIS OF ISOZYMES

XU Cheng, WANG Ke-Ling, YOU Feng, WU Su-Qi, ZHANG Pei-Jun

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

**Abstract** During Sep. 1994 – Dec. 1995, 37 sea bass (*Lateolabrax japonicus*) samples were collected from coastal water of Qingdao, Shandong Province. Starch gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis were used to detect expression of isozymes in seven organs or tissues: eye, muscle, heart, liver, kidney, gill and pectoral fin. LDH, MDH, MEP, IDHP, PGM, G3PDH, AK, CK were analyzed in Tris-citric acid buffer system (TC, pH=6.9); ADH, SDH, G6PDH, GDH, PGDH, CAT and MPI were analyzed in EDTA-boric acid-Tris buffer system (EBT, pH=8.9); SOD and EST in Tris-gly buffer system (TG, pH=8.3). Biochemical genetic analysis showed 17 isozymes were coded by 31 gene loci, 8 of which were found polymorphic. Of the polymorphic loci, Mep-1, Gdh, Pgdh, Est-1 and Est-4 each had two alleles and three phenotypes; Pgm-1, Sdh and Mpi each had three alleles, all six phenotypes of Mpi were observed, but only four of Pgm-1 and three of Sdh were observed, low frequency phenotypes were absent. Mean proportion of polymorphic loci was 25.8%.

**Key words** *Lateolabrax japonicus*, Isozyme, Biochemical genetic analysis