

5种海水鱼同工酶表达的组织特性 及其电泳的初步分析*

王可玲 尤 锋 徐 成 吴谔琦

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1994年7—12月, 在山东、福建沿海采集真鲷、黑鲷、牙鲆、鲈和小黄鱼等5种鱼63尾692个生化样品, 应用水平淀粉胶和垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳方法, 对5种鱼的肌肉、眼睛、肝脏、心脏、鳍、鳃、肾脏共7种组织的23种同工酶进行初步分析。结果为: 1. 选出酶活性强, 基因座位表达稳定、清晰的肌肉、眼睛、肝脏、心脏4种组织, 用于以上5种鱼的常规性生化遗传分析; 2. 筛选出适于电泳分析的缓冲液系统有TC1, EBT, TG等3种以及14种图谱清晰、分辨率高的同工酶(LDH, MDH, IDHP, MEP, ADH, SDH, G6PDH, CAT, GDH, PGM, PGDH, GPI, EST, Pm, SOD)和肌浆蛋白(Pm); 3. 对其中的LDH, IDHP, ADH, GDH和EST 5种同工酶进行生化遗传分析, 包括每种酶的亚基结构、编码座位以及多态座位等位基因数等。

关键词 同工酶 电泳 组织特性 海水鱼

80年代以后, 同工酶的研究成为群体生化遗传学的热门课题, 它已在种质资源(王可玲等, 1994; 李思发等, 1990; 吴力钊等, 1992)、遗传育种(Cross et al., 1983; Magee et al., 1982; Sugama et al., 1988, 1992)、系统演化(Billington et al., 1990)、遗传标记(熊全沫, 1992)、临床病理乃至环境保护等方面得到了广泛的应用, 并取得了许多可喜的成果。本文报告5种海水重要增殖鱼类的同工酶表达的组织特异性及其电泳的初步分析, 为反映这些鱼类遗传背景的同工酶电泳提供一些基本参数, 其中涉及到的同工酶电泳谱, 在国内外多数尚属首次报道(Numachi, 1970; Shaklee et al., 1985; Sugama et al., 1989)。

1 材料与方 法

1994年7—12月, 在山东和福建沿海收集真鲷(*Pagrus major*)、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、鲈(*Lateolabrax japonicus*)和小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*)等5种活鱼或死后冰藏1—2d的鲜鱼, 共63尾。每尾鱼分别采取肌肉、眼睛、肝脏、心脏、鳍、鳃和肾脏等7种组织, 在实验室内经匀浆, 4℃下以15000r/min离心15min, 上清液用于电泳。分别使用水平淀粉胶和垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)(莽克强等, 1975)两种方法、4种电泳缓冲液系统(TC1, TC2, EBT和

* 国家科委攀登计划B项目, PDB6-5-2。王可玲, 男, 出生于1935年10月, 研究员。

收稿日期: 1995年9月5日, 接受日期: 1996年8月13日。

TG: 前3种用于淀粉胶, TG用于PAGE)(王可玲等, 1994), 对这些样品进行电泳分析。同工酶组化染色主要采用Harris (1976)¹⁾方法并略加修改。淀粉胶制成1.2cm厚的胶, 电泳后切成6—7片, 可分染5—6种同工酶, 以提高工效和可比性。共分析692个同工酶样品。

同工酶缩写、编号、座位、等位基因命名, 采用Shaklee等(1989)推荐的方法。

2 结果与讨论

2.1 同工酶活性的表达及其组织特异性

对5种鱼各自7种组织的22种同工酶的活性筛选结果见表1。可见, 同工酶的活性在不同组织中差异很大, 但不同鱼类在同一组织中酶的活性则是类似的, 亦即同工酶表达的种类特异性小而组织的特异性大。LDH, MDH, IDHP和MEP等酶在肌肉、眼睛和心脏中表达较好, 而ADH, SDH, G6PDH, CAT, GDH, PGM, PGDH, POD和EST等酶在肝脏中表达较好。某些基因座位, 如LDH-C基因座位, 5种试验鱼都仅在眼睛中表达(见图版1:6), 其它组织皆无活性, 这与其它鱼类(鲤科除外)(李思发等, 1990; 吴力钊等, 1992)LDH同工酶的研究结果是一致的(王可玲等, 1994; Shaklee et al., 1985)。

比较7种取样组织同工酶的活性, 以肌肉、眼睛、肝脏和心脏4种组织的活性较强, 基因座位表达的也较全面。因此, 这5种鱼同工酶的分析采取4种组织即可。而鳍、鳃和肾脏3种组织活性较差, 除非有特殊需要(如活鱼取样可采鳍等), 则可不再分析。

2.2 22种同工酶及肌浆蛋白(Pm)的电泳分析结果

以4种电泳缓冲液系统、2种电泳支持物进行试验的结果, 见表2。可见, 除小黄鱼外前12种同工酶在TC1或EBT系统(皆为淀粉胶电泳)中均有较清晰的图谱; 包括小黄鱼在内, EST, Pm和SOD则在TG系统(PAGE)中图谱较好: 它们已可用于种群生化遗传研究的常规分析。表2中ALD, GOT, MPI, POD 4种酶图谱不甚清晰或无, 应进一步试验, 或采用其它缓冲液系统进行分析。表2最后的4种酶, 其图谱与活性皆不好。另外, 以上所筛选出的14种酶中, 小黄鱼的G6PDH, GDH, PGM, PGDH等酶在这4种缓冲液系统中皆无图谱, 亦应进一步筛选。

所筛选出的14种酶及Pm适用的组织、电泳缓冲液系统和电泳支持物列入表3。表明14种同工酶适用的组织是肌肉、眼睛、肝脏和心脏; 电泳缓冲液系统是TC1, EST和TG3种。

2.3 5种鱼的5种同工酶和肌浆蛋白电泳图谱的初步分析结果

应用于种群生化遗传分析的同工酶谱, 除酶带应清晰外, 更重要的是能把编码该酶的几个基因座位、存在几个等位基因、是几聚体的酶等等反映出来。5种鱼的5种同工酶和肌浆蛋白的电泳图谱见图版1。它们分别代表着3种电泳缓冲液系统和2种电泳支持物(见表3)的电泳结果。依据这些电泳图谱对它们进行生化遗传分析, 初步结果如下。

LDH(乳酸脱氢酶)为四聚体酶, 5种鱼分别由2—3个基因座位编码。C基因座位

1) Harris, H. & Hopkinson, D. A., 1976, Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics, Chapter 4.

表 1 5 种鱼 22 种同工酶及 Pm 在 7 种组织中的活性比较
 Tab.1 Activities comparison of 22 isozymes and myogen in 7 tissues of 5 marine fishes

组织	鱼种	同工酶											和											
		LDH	MDH	IDHP	MEP	ADH	SDH	G6PDH	CAT	GDH	PGM	PGDH	GPI	ALD	GOT	MPI	POD	EST	Pm	SOD	GAPDH	ACP	ALP	AMY
肌	真鯛	+++	++	+	++	++	-	-	-	++	++	+	++	++	+	+	-	+++	+++	-	-	-	-	-
	黑鯛	+++	+++	+++	+++	-	-	-	++	++	+	++	++	++	+	+	-	+++	+++	-	-	-	-	-
	鮎	+++	++	+++	++	-	-	-	++	++	+	++	++	++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
	牙鲆	+++	++	+++	++	-	-	+	++	++	+	++	++	++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
肉	小黄鱼	+++	++	+	++	-	-	-	++	++	+	++	++	+	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
	真鯛	+++	+++	+++	++	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	黑鯛	+++	+++	+++	++	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	鮎	+++	++	+++	++	-	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
眼	牙鲆	+++	+	+++	-	-	-	-	++	++	+	++	++	+	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
	小黄鱼	+++	++	+++	+	-	-	-	++	++	+	++	++	+	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
	真鯛	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	黑鯛	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
肝	真鯛	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	黑鯛	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	鮎	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	牙鲆	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
脏	小黄鱼	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	真鯛	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	黑鯛	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	鮎	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
心	真鯛	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	黑鯛	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	鮎	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	牙鲆	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
鳍	小黄鱼	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
	真鯛	+	++	++	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-
	黑鯛	+	++	++	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-
	鮎	++	++	++	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-
鳃	真鯛	++	++	++	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-
	黑鯛	++	++	++	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-
	鮎	++	++	++	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-
	牙鲆	+++	+++	+++	+	+++	-	-	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
肾	小黄鱼	++	++	+++	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-
	真鯛	++	++	+++	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-
	黑鯛	++	++	+++	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-
	鮎	+++	+++	+++	+	+++	-	-	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-

活性图谱清晰; ++ 活性较强图谱较清晰; + 有活性图谱不清晰; - 无图谱。(表 2 同)

表2 5种鱼同工酶及 Pm电泳图谱在4种电泳缓冲液系统中筛选的初步结果

Tab.2 Primary tested results of electrophoretic patterns and myogen of isozymes of 5 marine fishes in 4 buffer systems

鱼种	缓冲系统	同工酶及 Pm																							
		LDH	MDH	IDHP	MEP	ADH	SDH	G6PDH	CAT	GDH	PGM	PGDH	GPI	ALD	GOT	MPI	POD	EST	Pm	SOD	GAPDH	ACP	ALP	AMY	
真鲷	TC1	+++	+++	+++	++				+	+	+	+	++	+	++	++	+								
	TC2	+++	+++	+++	+++								++	++	++	++	++	++							
	EBT			++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
	TG														++	++	++	+++	+++	+++	+++				
黑鲷	TC1	+++	+++	+++	++				+	+	+	+	++	+	++	++									
	TC2	+++	+++	+++	+++								++	++	++	++	++								
	EBT			++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
	TG														++	++	++	+++	+++	+++	+++				
鲈	TC1	+++	+++	+++	++										+	+									
	TC2	+++	+++	+++	+++								++	++	++	++	++								
	EBT			+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
	TG														+	+	+	+++	+++	+++	+++				
牙鲆	TC1	+++	++	+++	++										+	+									
	TC2	+++	+++	+++	+++								++	++	++	++	++								
	EBT			+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
	TG														++	++	++	+++	+++	+++	+++				
小黄鱼	TC1	+++	++	+++	++										+	+									
	TC2	+++	+++	+++	+++										+	+									
	EBT			+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
	TG														++	++	++	+++	+++	+++	+++				

TC: Tris-Citrate buffer, TCl: pH=6.9; TC2: pH=8.0; TG: Tris-Gly buffer, pH=8.3; EBT: EDTA-Borate-Tris buffer, pH=8.9.

表3 5种鱼14种同工酶电泳方法筛选结果

Tab.3 Tested results of electrophoretic methods of 14 isozymes and myogen of 5 marine fishes

同工酶组织	LDH	M,E,H	TC1	SG	MEP	M,H	TC1	SG	ADH	L	EBT	SG	SDH	L	EBT	SG	G6PDH	L	EBT	SG	CAT	L	EBT	SG	GDH	L	EBT	SG	PGM	L	EBT	SG	PGDH	L	EBT	SG	GPI	L	EBT	SG	EST	L	TG	PAG	Pm	M	TG	PAG	SOD

M: 肌肉; E: 眼睛; L: 肝脏; H: 心脏; T: Tris C, Citrate; E: EDTA; B, Borate; SG: 淀粉胶。

仅在眼睛中表达; A, B 两基因座位在心脏中活性高(图版 I:6)。

IDHP(异柠檬酸钠脱氢酶)系二聚体酶, 由 1—2 个基因座位编码, 存在细胞质和线粒体型两种同工酶, 组织特异性强, 心脏活性高(图版 I:2)。

ADH(醇脱氢酶)系二聚体酶, 由 1 个基因座位编码, 多态性强, 肝脏的活性强, 在小黄鱼观察到 3 个等位基因, 纯合子为 1 条带、杂合子为 3 条带(图版 I:4)。

GDH(葡萄糖脱氢酶)系二聚体酶, 由 1 个基因座位编码, 单态, 肝脏中的活性高, 在小黄鱼未检测出活性(图版 I:3)。

EST(酯酶)为一酶系, 存在 5 大类, 系单或二聚体酶。分析的 5 种鱼均至少有 5 个基因座位编码, 肝脏活性高, 种和种群的特异性强(图版 I:5)。

Pm 为肌浆蛋白, 系一群小分子的蛋白质, 每一区带代表着几种蛋白。其种和种群的特异性强, 是一个综合的生化指标(图版 I:1)。

3 结语

通过对在山东、福建沿海采集的真鲷、黑鲷、牙鲆、鲈和小黄鱼等 5 种鱼 692 个的生化样品进行水平淀粉胶和垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分析了 5 种鱼的 7 种组织的 23 种同工酶, 初步结果归纳如下。

3.1 从中选出肌肉、眼睛、肝脏、心脏 4 种组织的 14 种活性强, 图谱清晰、稳定的同工酶(LDH, MDH, IDHP, MEP, ADH, SDH, G6PDH, CAT, GDH, PGM, PGDH, GPI, EST, Pm 和 SOD) 和 Pm 可用于这些鱼类的生化遗传学研究。

3.2 筛选出 TC1, EBT 和 TG 等适于这 5 种鱼的 14 种同工酶和 Pm 电泳分析的 3 种缓冲液系统。

3.3 对上述 14 种同工酶中 5 种同工酶(LDH, IDHP, ADH, GDH, EST) 进行初步的生化遗传分析, 包括这些酶的亚基结构、编码座位以及多态座位等位基因数等, 建立了进一步研究这几类鱼类生化遗传结构的基础。

参 考 文 献

- 王可玲等, 1994, 海洋学报, 16(1): 93—104.
- 李思发等, 1990, 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究, 上海科学技术出版社(上海), 183—198.
- 吴力钊、王祖熊, 1992, 遗传学报, 19(3): 221—227.
- 莽克强等, 1975, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社(北京), 43—47.
- 熊全沫, 1992, 遗传, 14(2): 41—44.
- Billington, N. et al., 1990, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 1093—1102.
- Cross, T. F. and King, J., 1983, *Aquaculture*, 33: 33—40.
- Magee, S. M. and Philipp, D. P., 1982, *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 111: 593—602.
- Numachi, Ken-ichi, 1970, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 36(10): 1067—1077.
- Shaklee, James, B. et al., 1985, *Aust. J. Mar. Fish. Res.*, 36: 203—218.
- Shaklee, James, B. et al., 1989, *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 118: 218—227.
- Sugama, K. et al., 1988, *Rep. Usa Mar. Biol. Inst., Kochi Univ.*, 10: 75—81.
- Sugama, K. et al., 1989, *Bull. Mar. Sci. and Fish., Kochi Univ.*, 11: 79—87.
- Sugama, K. et al., 1992, *Aquat. and Fish. Manage.*, 23: 149—159.

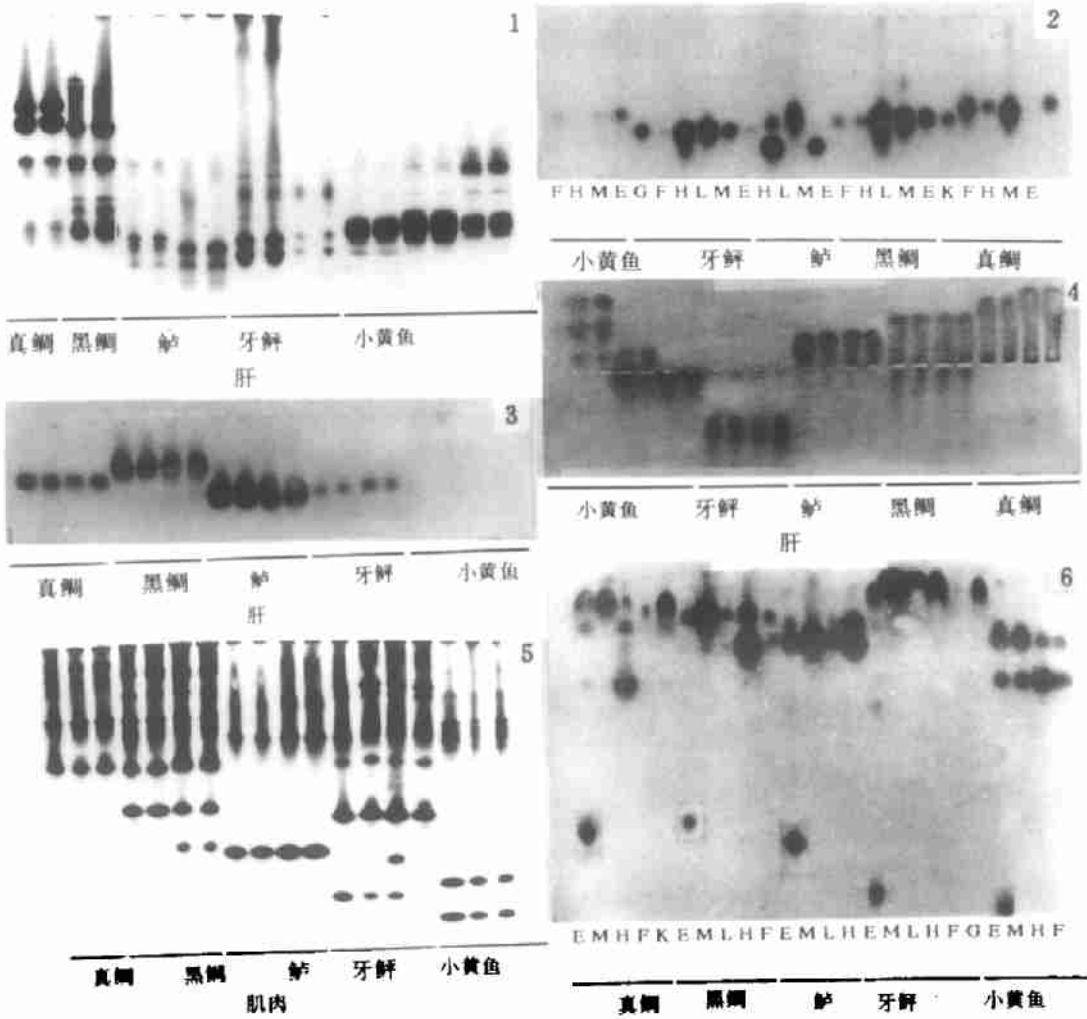
THE SPECIFIC EXPRESSION OF ISOZYMES IN DIFFERENT TISSUES AND PRELIMINARY BIOCHEMICAL GENETIC ANALYSIS BASED ON THE ELECTROPHORESIS OF FIVE MARINE FISHES

Wang Keling, You Feng, Xu Cheng, Wu Suqi

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

Abstract Sixty-three fishes belonging to 5 different species (*Pagrusomus major*, *Sparus macrocephalus*, *Paralichthys olivaceus*, *Lateolabrax japonicus*, *Pseudosciaena polyactis*) were collected from the coastal waters of Shandong and Fujian provinces from July to December in 1994. Biochemical samples were extracted by homogenizing from seven tissues (muscle, eye, liver, heart, gill, fin and kidney) of each species separately. Horizontal starch gel and vertical polyacrylamide gel electrophoresis were used in examining 692 samples. Four kinds of buffer systems, TC1, TC2 and EBT for starch gel and TG for polyacrylamide gel electrophoresis, were tested. Altogether 22 isozymes and a protein were examined through different kinds of tissue or different kinds of buffer systems. Only EST, Pm, and SOD were electrophoresed by polyacrylamide gel, the others by starch gel. The results showed the isozymes expression was highly tissue specific. Among the buffer systems tested, TC1, EBT and TG, seemed very useful for the future application due to their good resolution of isozymes and a protein, which exhibited stable expression and high level of activity in four kinds of tissue (muscle, eye, liver and heart) during the electrophoresis (Tab. 1). Furthermore, two buffer systems supporting the starch gel electrophoresis gave good resolution of 12 isozymes: TC1 to LDH, MDH, IDHP and MEP; EBT to ADH, SDH, G6PDH, CAT, GDH, PGM, PGDH, and GPI. Another buffer system, TG was a superior to EST, Pm and SOD for polyacrylamide gel electrophoresis (Tab.2, Tab.3). Finally, based on the zymograms, five isozymes, e.g. LDH, IDHP, ADH, GDH and EST (Plate I), were analyzed genetically on their subunit structure, coding gene loci and numbers as well as their specific expression in these five marine fishes.

Key words Isozyme Electrophoresis Tissue specificity Marine fishes



图版 I 5种海水鱼5种同工酶和肌浆蛋白的电泳图谱

Plate I Electrophoretic patterns of isozyms and myogen of *Pagrusomas major*, *Sparus macrocephalus*, *Lateolabrax japonicus*, *Paralichthys olivaceus* and *Pseudosciaena polyactis*.

1. 肌浆蛋白; 2. 异柠檬酸脱氢酶; 3. 葡萄糖脱氢酶; 4. 乙醇脱氢酶; 5. 醛酶; 6. 乳酸脱氢酶.
E. 眼睛; M. 肌肉; H. 心脏; L. 肝脏; K. 肾脏; F. 鳃; G. 鳍.