

山东近海牙鲆同工酶的生化遗传分析*

尤 锋 王可玲 相建海 徐 成 吴谖琦

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 1996年5月,1997年1月、12月和1998年4月在山东青岛和荣成近海采集了131尾活牙鲆共710个生化样品,采用水平淀粉胶和垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法,对牙鲆的25种同工酶进行了分析。结果检测出了LDH, MDH, MEP, IDHP, G3PDH, AK, CK, ACP, PGM, SDH, ADH, CAT, SOD, GDH和GPI等15种同工酶在牙鲆眼睛、肌肉、心脏、肝脏、胸鳍和肾脏等6种组织或器官中的表达情况。对牙鲆15种同工酶进行了生化遗传分析,获得了基本酶谱。15种同工酶共记录出29个基因座位,其中9个基因座位 *Ldh-A*, *Ldh-C*, *Idhp-1*, *Acp-1*, *Pgm*, *Sdh*, *Adh*, *Cat*和 *Gdh* 为多态,其多态座位比例为31.03%。

关键词 牙鲆 同工酶 生化遗传分析

学科分类号 Q178.53

牙鲆是中国沿海的重要经济鱼类,近年来过度的捕捞已使其资源量严重衰减;其增殖业的迅猛发展,都对牙鲆自然群体的遗传本底、种质资源和遗传多样性产生了不可低估的影响。同工酶作为基因的生化表型,是遗传多样性和种质资源等研究的有效工具之一,多年来国内外有关研究较多。对于牙鲆,过去仅限于形态学、繁殖习性以及生态学等方面的研究,其生化遗传学的研究报道很少且不系统(王可玲等,1996;田焯和男等,1986,1987;Kim *et al*,1988)。本文报告山东近海牙鲆同工酶的生化遗传分析结果,以期为牙鲆群体生化遗传结构研究及其种质资源的合理开发利用、遗传育种等提供理论依据。

1 材料与方 法

牙鲆 [*Paralichthys olivaceus* (T. et S.)]活鱼于1996年5月,1997年1月、12月和1998年4月取自山东青岛近海和荣成养鱼场,共131尾,体长为7.5—43.0cm。每尾鱼经形态学测量后,取眼睛、肌肉、心脏、肝脏、胸鳍和肾脏等6种组织或器官,直接进行分析或经编号后放入样本袋,立即置于液氮中保存至分析。同工酶电泳采用淀粉凝胶(SG)和聚丙烯酰胺凝胶(PAG)两种支持物,样品制备、淀粉胶电泳、组化染色以及结果处理等参见王可玲等(1996),聚丙烯酰胺凝胶电泳方法参照莽克强等(1975)。同工酶的缩写、基因座位和等位基因的命名基本采用Shaklee(1989)所推荐的标准。使用的电极缓冲系统为:TC, Tris-柠檬酸, pH = 6.9; TC1, pH = 8.0; EBT, EDTA-硼酸-Tris, pH = 9.0; TG, Tris-甘氨酸, pH = 8.3。

* 国家攀登计划B资助项目,PD B-6-5-2号。尤锋,女,出生于1963年4月,硕士,副研究员, Fax: 0086-0532-2870882

收稿日期:1998-03-26,收修改稿日期:1998-08-18

2 结果

2.1 4种缓冲系统对25种同工酶筛选结果

通过对25种同工酶在4种缓冲系统中的筛选,选出3种缓冲系统中的15种同工酶用于牙鲆同工酶的生化遗传分析,见表1。其它分析过的10种同工酶分别为:甘油醛-磷酸脱氢酶(GAPDH)、碱性磷酸酶(ALP)、己糖激酶(HK)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)、磷酸葡萄糖酸脱氢酶(PGDH)、甘露糖磷酸异构酶(MPI)、酯酶(EST)、过氧化物酶(POD)、淀粉酶(AMY)和谷氨酰胺转氨酶(GOT),由于它们在上述缓冲系统和电泳支持物中,图谱不够清晰,因此本文只研究前述15种同工酶。

表1 用于分析的牙鲆同工酶的名称、编号、缓冲系统和电泳支持物

Tab.1 The name, serial number, buffer system and electrophoretic gel for analyzed isozymes of *Paralichthys olivaceus* (T. et S.)

酶的名称	编号	缓冲系统	电泳支持物
乳酸脱氢酶(LDH)	1.1.1.27	TC	SG
苹果酸脱氢酶(MDH)	1.1.1.37	TC	SG
苹果酸酶(MEP)	1.1.1.40	TC	SG
异柠檬酸脱氢酶(IDHP)	1.1.1.42	TC	SG
甘油-3-磷酸脱氢酶(G3PDH)	1.1.1.8	TC	SG
腺苷激酶(AK)	2.7.4.3	TC	SG
肌酸激酶(CK)	2.7.3.2	TC	SG
酸性磷酸酶(ACP)	3.1.3.2	TC	SG
磷酸葡萄糖变位酶(PGM)	5.4.2.2	TC	SG
山梨醇脱氢酶(SDH)	1.1.1.14	EBT	SG
醇脱氢酶(ADH)	1.1.1.1	EBT	SG
过氧化氢酶(CAT)	1.11.1.6	EBT	SG
超氧化物歧化酶(SOD)	1.15.1.1	TG	PAG
葡萄糖脱氢酶(GDH)	1.1.1.47	EBT	SG
葡萄糖磷酸异构酶(GPI)	5.3.1.9	EBT	SG

2.2 牙鲆同工酶的表达和生化遗传分析

2.2.1 15种同工酶的29个基因座位在6种组织中的表达及其活性的强弱见表2。

2.2.2 牙鲆同工酶的生化遗传分析

LDH 四聚体酶,由三个基因座位 *Ldh-A*、*Ldh-B* 和 *Ldh-C* 编码, B、C 基因座位在所分析的6种组织中仅在眼睛中表达; A 基因座位为多态,有100和167两种等位基因,但只见到100/100和100/167两种表型; C 基因座位也是多态,有98和100两种等位基因(图1:1)。

MDH 二聚体酶,共四个基因座位编码,有s-MDH和m-MDH两种类型。m-MDH靠近阴极,由两个基因座位 *m-Mdh-1* 和 *m-Mdh-2* 编码,互相之间不杂合; s-MDH靠近阳极,也由两个基因座位 *s-Mdh-1* 和 *s-Mdh-2* 编码,互相之间也不杂合。均为单态(图1:2)。

MEP 四聚体酶,只记录了两个基因座位, *Mep-1* 单态, *Mep-2* 活性强但易失活,也为单态。图谱中尚有一些很弱的区带,暂未记录(图1:3)。

表2 牙鲆15种同工酶在6种组织中的表达和活性

Tab.2 Expression and activity of 15 analyzed isozymes in 6 kinds of tissues of *Paralichthys olivaceus* (T. et S.)

酶的名称	基因座位	组 织					
		眼睛	肌肉	心脏	肝脏	胸鳍	肾脏
乳酸脱氢酶 (LDH)	<i>Ldh-A</i>	+++	++++	+++	+	++	+++
	<i>Ldh-B</i>	+++	-	-	-	-	-
	<i>Ldh-C</i>	++	-	-	-	-	-
苹果酸脱氢酶 (MDH)	<i>m-Mdh-1</i>	+++	+	+++	+++	+	+++
	<i>m-Mdh-2</i>	++	++	+++	-	+	++
	<i>s-Mdh-1</i>	+	+	-	-	-	-
	<i>s-Mdh-2</i>	-	-	+++	-	-	-
苹果酸酶 (MEP)	<i>Mep-1</i>	-	++	-	-	-	++
	<i>Mep-2</i>	+	-	+++	+	-	-
异柠檬酸脱氢酶 (IDHP)	<i>Idhp-1</i>	+	-	-	+++	+	+++
	<i>Idhp-2</i>	-	++	+++	-	-	-
甘油-3-磷酸脱氢酶 (G3PDH)	<i>G3pdh</i>	-	+++	-	-	-	-
腺苷激酶(AK)	<i>Ak-1</i>	++	++++	+++	+	+	+++
	<i>Ak-2</i>	+	-	+	+++	+	++
肌酸激酶(CK)	<i>Ck</i>	-	-	+++	-	-	++
酸性磷酸酶 (ACP)	<i>Acp-1</i>	+	-	+	+++	+++	+++
	<i>Acp-2</i>	-	-	-	++	-	-
磷酸葡萄糖变位酶 (PGM)	<i>Pgm</i>	+	+++	++	+++	+	++
山梨醇脱氢酶(SDH)	<i>Sdh</i>	-	-	-	+++	++	-
醇脱氢酶(ADH)	<i>Adh</i>	-	-	-	+++	++	-
过氧化氢酶(CAT)	<i>Cat</i>	-	-	-	+++	++	-
超氧化物歧化酶(SOD)	<i>Sod-1</i>	/	/	/	++++	/	/
	<i>Sod-2</i>	/	/	/	++	/	/
	<i>Sod-3</i>	/	/	/	+++	/	/
葡萄糖脱氢酶(GDH)	<i>Gdh</i>	-	-	-	++	-	-
葡萄糖磷酸异构酶 (GPI)	<i>Gpi-1</i>	-	+++	-	-	-	-
	<i>Gpi-2</i>	++	+	+++	+	-	++
	<i>Gpi-3</i>	+++	+	+++	+++	+++	+++
	<i>Gpi-4</i>	+++	+	++	+++	+	+++

注: ++++ 表示活性很强; +++ 为活性强; ++ 为活性较强; + 为活性较弱; - 为无活性; / 表示未进行实验

IDHP 二聚体酶,由两个基因座位 *Idhp-1*和 *Idhp-2*编码,虽迁移率相近,但有很强的组织特异性,且其表达也明显不同, *Idhp-1*为多态,有 78 和 100 两个等位基因,三种基因型 100 / 100、100 / 78 和 78 / 78 均可见到;而 *Idhp-2*为单态(图 1:4)。

G3PDH 二聚体酶,由一个基因座位编码,单态,只在肌肉中表达(图 1:5)。

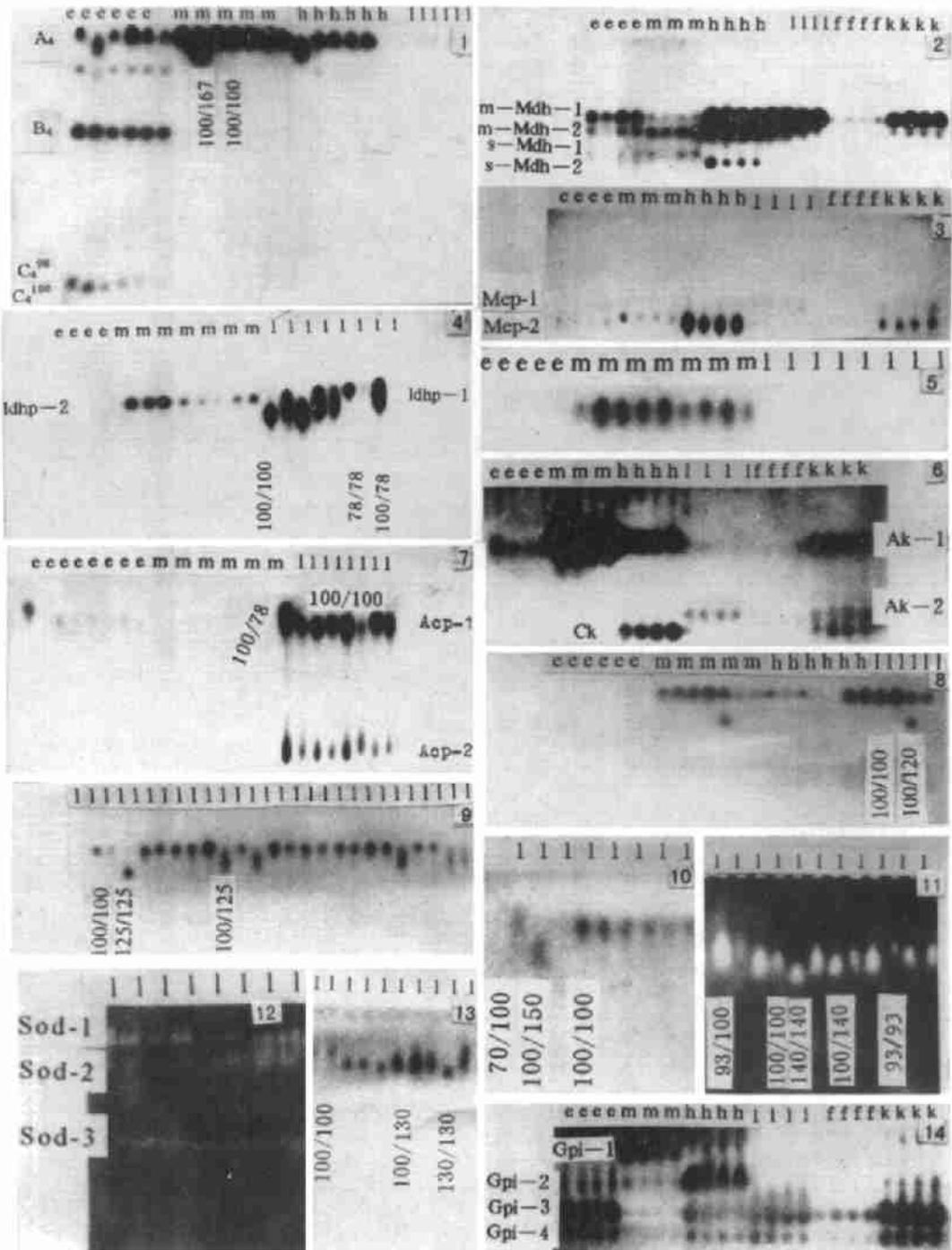


图1 山东近海牙鲆同工酶的电泳图谱

Fig.1 Electrophoretic patterns of isozymes on *Paralichthys olivaceus* (T. et S.) in the coastal waters of Shandong

1. LDH; 2. MDH; 3. MEP; 4. IDHP; 5. G3PDH; 6. AK, CK; 7. ACP; 8. PGM; 9. SDH; 10. ADH;

11. CAT; 12. SOD; 13. GDH; 14. GPI. e: 眼睛; m: 肌肉; h: 心脏; l: 肝脏; f: 胸鳍; k: 肾脏

AK 单体酶,由两个基因座位 *Ak-1* 和 *Ak-2* 编码,均为单态,*Ak-1* 在肌肉中为强显性;*Ak-2* 在肌肉中不表达,在眼睛、肝脏中活性较弱且易失活(图 1:6)

CK 二聚体酶,由一个基因座位编码,单态;在大多数新鲜组织中都有,但在心脏中活性最强。CK 图谱中往往同时出现 AK 图谱,只有与 AK 图谱相对照方能确定 CK 的区带(图 1:6)。

ACP 单体酶或二聚体酶,由两个基因座位 *Acp-1* 和 *Acp-2* 编码,*Acp-1* 为多态,有 100 和 78 两个等位基因,其基因型有 100 / 100、100 / 78 和 78 / 78 三种,但分析中只观察到前两种;*Acp-2* 只在肝脏中表达,单态(图 1:7)。

PGM 单体酶,由一个基因座位编码,多态,有 100 和 200 两个等位基因,只观察到 100 / 100 和 100 / 200 两种表型。在肌肉中活性最强,在眼睛和胸鳍中活性较弱,且容易失活(图 1:8)。

SDH 二聚体酶,由一个基因座位编码,多态,有 100 和 125 两种等位基因,三种表型 100 / 100、100 / 125 和 125 / 125 都能见到(图 1:9)。

ADH 二聚体酶,由一个基因座位编码;其区带在 EBT 系统中向阳极迁移,为多态,该座位有 70、100 和 150 三个等位基因,表型应为 6 种:70 / 70、70 / 100、100 / 100、100 / 150、70 / 150 和 150 / 150,观察到 100 / 100、70 / 100 和 100 / 150 三种,另三种表型未检测到(图 1:10)。

CAT 二聚体酶,由一个基因座位编码,多态,观察到 93、100 和 140 三个等位基因的 5 种表型:93 / 93、93 / 100、100 / 100、100 / 140 和 140 / 140,但基因型 93 / 140 未见到(图 1:11)。

SOD 二聚体酶,由三个基因座位编码,均为单态,只在肝脏中表达(图 1:12)。

GDH 二聚体酶,由一个基因座位编码;多态,有 100 和 130 两个等位基因,三种表型 100 / 100、100 / 130 和 130 / 130 均可见到(图 1:13)。

GPI 二聚体酶,由四个基因座位编码,均为单态;有一定的组织特异性。*Gpi-2* 在肝脏中有时活性不强,而易失活(图 1:14)。

综上所述,共记录了 15 种同工酶的 29 个基因座位,其中 *Ldh-A*、*Ldh-C*、*Idhp-1*、*Acp-1*、*Pgm*、*Sdh*、*Adh*、*Cat* 和 *Gdh* 9 个基因座位是多态,青岛近海牙鲆群体的多态座位比例则为 $p = 9 / 29 = 31.03\%$ 。

3 讨论与结论

3.1 牙鲆 LDH 的表达

牙鲆 LDH 的图谱,在肌肉和心脏中只有一条区带,且在肌肉中为超显性,可视为 A_1 ;在眼睛中则有稳定清晰的四条区带,第一条区带基本与肌肉和心脏中的区带在一条线上,应为 A_4 ;第三条区带清晰明显,作者认为可能是基因座位 B;在 A_4 与 B_4 之间出现的一条清晰的区带是两者的杂合带;第四条带就是 C_4 。而 B_4 与 C_4 之间有时尚有一些活性很弱的带,可能是次级修饰等原因造成的。不同的鱼类 LDH 的表达差异较大,如朱兰菲(1982)分析的 14 种鲤科鱼类,其肌肉和心脏中一般有 4—5 条区带;在鲢、鳙和草鱼的心脏、肌肉、肝脏、肾脏中 A、B 都表达(吴力钊等,1987)。但是,Lush(1977)曾分析过欧洲 12 种鲆鲽类(不包括牙鲆)的 LDH,发现其中有 10 种鱼在肌肉、心脏中只有一条区带即只有

A, 在眼睛中则既有基因座位 A、B、C 的存在也有 A 和 B 杂合带以及一些次级修饰带的存在, 与本文的结果相同。

3.2 酶蛋白的活性与样品的保存

酶的活性和结构与样品的新鲜程度密切相关, 活鱼样品在液氮中保存, 许多酶的活性都很强, 置于 -40 — -20°C 时, 酶的活性明显降低甚至没有活性; 同时亦发现未在液氮中保存的样品, 酶蛋白的结构会产生变化, 本来的一条区带可能出现两条以上的区带。如 SDH, 在新鲜样品中其酶的活性很强, 但随着保存时间的延长, 活性逐渐降低, 最终变得无活性; 其它易失活的酶还有 MEP 和 ADH 等。容易变化的酶有 LDH, 在眼睛中随着保存时间加长, 在 B_4 和 C_4 之间会出现一些很弱的区带, 其原因可能是酶蛋白降解所致。在同一种酶中不同基因座位活性的稳定性与样品的新鲜程度的关系也不同, 如在 LDH 中, *Ldh-A* 的活性极易保持, 而 *Ldh-B* 和 *Ldh-C* 则容易失活, 特别是 *Ldh-B*。另外, 匀浆后的样品不易保持其酶的活性, 在 G3PDH 中有一个在肝脏和肾脏中表达的基因座位只存在于新匀浆的样品中, 在 -20°C 保存两天后即失去活性。因此, 在进行同工酶分析的时候应尽量选用鲜活样品, 并将其保存在液氮中, 匀浆后的样品应尽快分析。

3.3 有效遗传标记的筛选

田畑和男等 (1986, 1987) 筛选出 IDHP 用于牙鲆的雌核发育和多倍体中的鉴定, 本文在分析中也发现 IDHP 在肝脏中是多态的, 可以作为牙鲆遗传育种中的有效标记。所分析的同工酶中, 还有一些含有多态基因座位, 其中等位基因数较多的 CAT 和 GDH 以及 *Ldh-C* 等经过筛选不仅可以作为遗传育种中的遗传标记, 有些也可以作为群体间的识别或物种进化中的有效标记。当然, 作为遗传育种中的遗传标记, 首先需要解决活体取样的关键技术。作者在实验中发现, 取自活鱼的鳍可检出某些酶的活性, 有的也可获得较好的图谱, 因而用鳍作为活体取样材料进行遗传标记很有前景。

参 考 文 献

- 王可玲, 尤 锋, 徐 成等, 1996. 5 种海水鱼同工酶组织表达的特性及其电泳的初步分析. 海洋与湖沼, 27(6): 626—631
- 朱兰菲, 1982. 几种鲤科鱼类及杂种的弱酸脱氢酶同工酶的比较. 水生生物学集刊, 7(4): 539—545
- 吴力钊, 王祖熊, 1987. 草鱼同工酶发育遗传学研究 I. 不同组织器官中的同工酶分析. 遗传学报, 14(4): 278—286
- 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, 43—47
- 田畑和男, 五利江重昭, 谷口顺彦, 1986. アインサイムマーカ-遺傳子によるヒウメ雌性發生 2 倍體および 3 倍體誘導の確認. 水産育種, 11: 35—41
- 田畑和男, 五利江重昭, 1987. ヒウメ親魚のアインサイム遺傳子型の生體検査法ど IDH 遺傳子座-動原體間の組換率について. 水産育種, 12: 51—56
- Kim D S, Cheong, S C, Park S R *et al*, 1988. Cytogenetic and biochemical studies on the flatfish, *Paralichthys olivaceus*. Bull Natl Fish Dev Agency (Korea), 42: 135—142
- Lush I E, Cowey C B, Knox D, 1977. The lactate dehydrogenase isozymes of twelve species of flatfish (*Heterosomata*). J Exp Zool, 171: 105—118
- Shaklee J B, 1989. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish: proposed guidelines. Trans Amer Fish Soc, 118: 218—227

BIOCHEMICAL GENETIC ANALYSIS OF ISOZYMES ON THE LEFT-EYED FLOUNDER, *PARALICHTHYS OLIVACEUS* (T. ET S.) IN THE COASTAL WATERS OF SHANDONG

YOU Feng, WANG Ke-ling, XIANG Jian-hai, XU Cheng, WU Su-qi

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

Abstract 131 live left-eyed flounders, *Paralichthys olivaceus* (T. et S.), were collected from the coastal waters of Qingdao and a fishing farm in Rongcheng City, Shandong Province from May in 1996 to April in 1998. In total, 710 biochemical samples from 6 tissues and organs (eye, muscle, heart, liver, pectoral fin and kidney) were fetched and stored immediately in liquid nitrogen (-196°C). The supernatant of samples to be used for the experiments were extracted by homogenizing and centrifuging. 15 isozymes (LDH, MDH, MEP, IDHP, G3PDH, AK, CK, ACP, PGM, SDH, ADH, CAT, SOD, GDH, GPI) in 3 buffer systems (TC, pH = 6.9; EBT, pH = 8.9; TG, pH = 8.3) were tested by horizontal starch gel and vertical polyacrylamide gel electrophoresis, and their expression in 6 tissues and organs-tissues specify was also tested. The biochemical genetics were analyzed in terms of their locus number, structure, alleles, etc., on the basis of which the basic electrophoretic patterns of these 15 isozymes were gained. The electrophoretic patterns of the rest isozymes were not recorded. Altogether 29 gene loci were recorded, among which 9 gene loci including *Ldh-A* (alleles, 100, 167), *Ldh-C* (alleles, 98, 100), *Idhp-1* (alleles, 78, 100), *Acp-1* (alleles, 78, 100), *Pgm* (alleles, 100, 200), *Sdh* (alleles, 100, 125), *Adh* (alleles, 70, 100, 150), *Cat* (alleles, 93, 100, 140) and *Gdh* (alleles, 100, 130) are polymorph, and the mean proportion of polymorph loci was 31.03%. In the meantime, the expression of *Ldh-A* and *Ldh-B* during the biochemical genetic analysis of LDH on *Paralichthys olivaceus* (T. et S.), the interrelationships between the activities of isozymes protein and stored condition of samples, and testing of effective genetic markers were also discussed.

Key words *Paralichthys olivaceus* (T. et S.) Isozyme Biochemical genetic analysis

Subject classification number Q178.53