

研究简报

鳊鱼和奥利亚罗非鱼乳酸 脱氢酶酶谱的比较

THE COMPARISON OF LACTATE DEHYDRO- GENASE ZYMOGRAM OF MANDARIN FISH AND *TILAPIA AUREA*

吴婷婷*¹ 张燕生*² 薛国雄*² 夏德全*¹

Wu Tingting*¹, Zhang Yanshen*¹, Xue Guoxiong*² and Xia Dequan*¹

关键词 鳊鱼, 奥利亚罗非鱼, 乳酸脱氢酶, 酶谱

KEYWORDS mandarin fish, *Tilapia aurea*, lactate dehydrogenase, zymogram

哺乳类动物各种组织和器官的乳酸脱氢酶(LDH)同工酶较稳定, 酶带分布非常有规律, 同源组织的 LDH 同工酶酶谱通常相似和稳定。鱼类 LDH 同工酶复杂得多, 有三分之二品种中, 其 LDH 同工酶类似哺乳类动物的酶谱; 但在其余三分之一种类中, 两个亚基随机结合受到限制, 出现了不规则酶谱, 有的只有 2—3 条酶带, 有的超过 5 条酶带。即使具有 5 条酶带的鱼中, 其骨骼肌和心肌 LDH 在电泳酶谱上迁移快慢正好与哺乳类动物相反。此外鱼类 C 基因产物并不特定在某一组织或器官中, 一些鱼的 C 基因产物在肝脏中表达, 另一些鱼在眼睛中表达(也有人把眼睛中调控 LDH 的基因称 E 基因), 这些都表明鱼类的 LDH 同工酶的模式很不相似, 这对识别鱼类 LDH 酶谱带来一定困难。国外在五十年代末、六十年代初发展起来的传统酶分析法[Smithes, 1955, 1959; Markert 和 Moller, 1959] 尚不能满足我国在鱼类种间关系、系统分类、基因表达和调控、遗传结构分析等方面研究的需求。目前国外盛行着利用免疫化学技术来探索上述问题, 但国内尚未充分开展。本文目的在于利用免疫吸附技术分析这两种鱼的 LDH 同工酶酶谱和探讨这两种鱼 LDH 同工酶的同异及意义。

一、材料与方 法

2—3 龄鳊鱼和 1—2 龄奥利亚罗非鱼均取自淡水渔业研究中心试验场, 草鱼 LDH-A₁ 及 LDH-B₁ 的抗体 IgG 由我们自己制备[夏德全等, 1990; 薛国雄等, 1991]。淀粉是美国 Sigma 公司和美国 Elec-

收稿日期: 1992-09-26。

*¹ 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡, 214081(Freshwater Fisheries Research Centre, CAFS, Wuxi, 214081)。

*² 中国科学院发育生物学研究所, 北京, 100080 (Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing, 100080)。

tro-starch 公司产品。NAD、PMS、NBT 等药品均是美国 Sigma 公司产品。垂直淀粉胶电泳装置为美国 Buchler 公司产品。

取新鲜的鳊鱼和奥利亚罗非鱼的心脏、肝脏、脑、眼睛及白肌,称重后加4°C预冷的 pH 7.0 的 0.1M 磷酸钠缓冲液 (W/V = 1:5) 于冰浴中匀浆至细胞充分破碎。在 65°C 水浴中 1.5—2 分钟后迅速冰浴, 15,000 r.p.m., 4°C, 离心 30 分钟。吸出上清液, 移入 Eppendorf 管中, 放入 -40°C 冰箱中待用。

将 A₁ 和 B₁ 抗体 IgG 干粉用 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 以 4~6mg/ml 浓度配制 (随用随配) 取两种鱼的肝、眼、脑同工酶抽提液各 40μl, 加 20~25μl 抗体 (而肌肉和心脏抽提液则各取 25μl, 加抗体 40μl), 振荡混匀 1 分钟后于 37°C 水浴 3—5 分钟, 用台式离心机 10,000r.p.m. 4°C, 离心 5 分钟。取上清液 40μl 滴入已预冷好的淀粉胶 (4°C) 点样孔中, 另取不加抗体的组织抽提液样品作对照。制胶和电泳按薛国雄方法 [1978], 染色参照 shaw 和 Prasad 的方法 [1970]。

二、结 果

奥利亚罗非鱼 Ldh-A 和 Ldh-B 在脑、肌、心、肝、眼组织中均能表达, 它们的产物在电泳图上通常

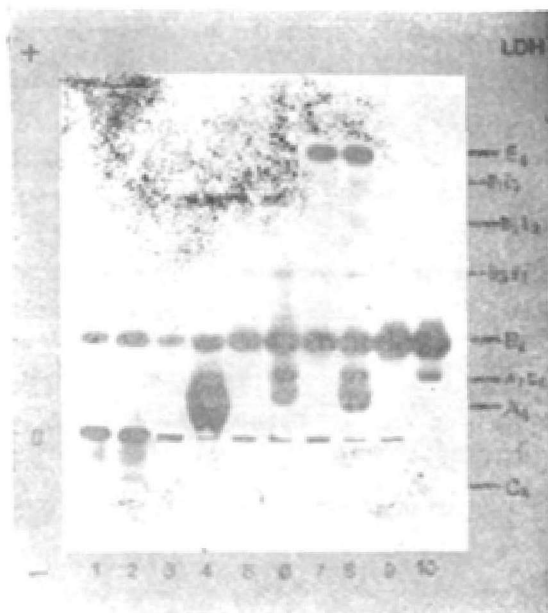


图 1 A₁ 抗体处理前后的奥利亚罗非鱼 LDH 酶谱比较

Fig. 1 Comparative analysis for zymogram of *Tilapia aurea* LDH before and after immunoreaction with anti-A₁ antibody

1. 免疫反应后肝 LDH 酶谱;
2. 肝脏 LDH 酶谱;
3. 免疫反应后肌肉 LDH 酶谱;
4. 肌肉 LDH 酶谱;
5. 免疫反应后脑 LDH 酶谱;
6. 脑 LDH 酶谱;
7. 免疫反应后眼 LDH 酶谱;
8. 眼 LDH 酶谱;
9. 免疫反应后心脏 LDH 酶谱;
10. 心脏 LDH 酶谱。

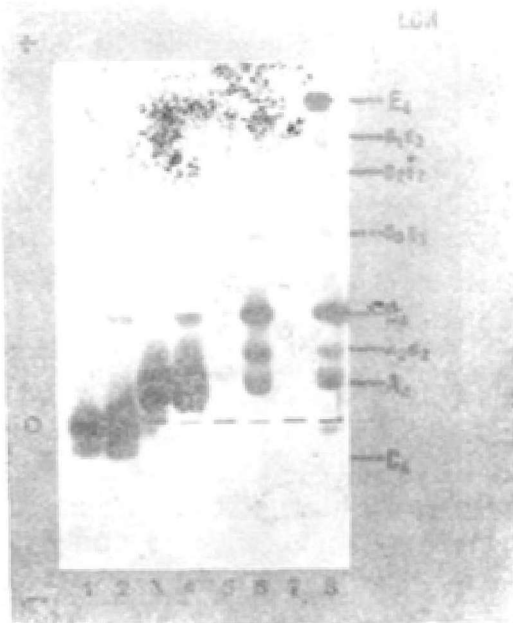


图 2 B₁ 抗体处理前后的奥利亚罗非鱼 LDH 酶谱比较

Fig. 2 Comparative analysis for zymogram of *T. aurea* LDH before and after immunoreaction with anti-B₁ antibody

- 1.—5. 同图 1。

呈现三条酶带。用 LDH-A₄ 抗体免疫吸附后,靠近点样孔处两条酶带消失(图 1)。这是因为 LDH-A₄ 抗体吸附了由 A 亚基组成的同源或异源四聚体 LDH 同工酶 A₄、A₂B₂ 之故。这就可确定奥利亚罗非鱼大多数组织所含三个 LDH 同工酶,依迁移率从快到慢分别为 B₄、A₂B₂、A₄。用 LDH-B₄ 抗体处理,在电泳图上仅在靠阴极端剩一条酶带,即 A₄ 带(图 2)。这是因为 B₄ 抗体吸附了 B₄ 和 A₂B₂ 之故,这结果同样证实了上述诊断。

用 LDH-A₄ 和 LDH-B₄ 抗体处理鳊鱼各组织中 LDH (图 3、图 4), 处理前后的酶谱上看到鳊鱼大多数组织中也含三个同工酶,依迁移率从快到慢次序,分别为 A₄、A₂B₂、B₄, 这表明鳊鱼 Ldh-A 和 Ldh-B 均在各组织中得到表达,它们的产物结合成三个同工酶,从图上所知,A₄ 和 B₄ 迁移率正好与奥利亚罗非鱼相反。

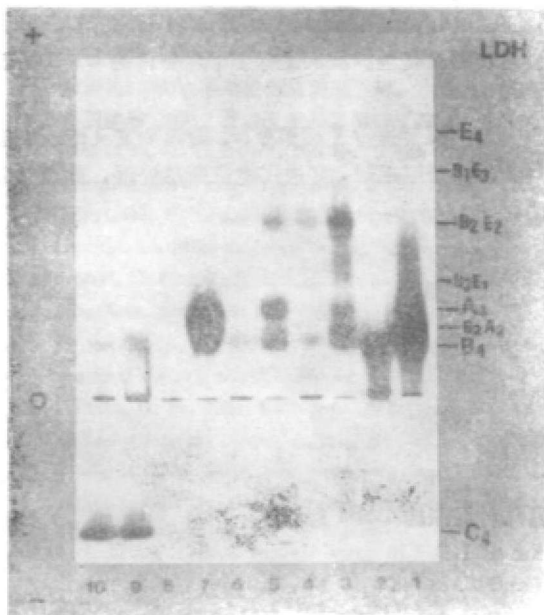


图 3 A₄ 抗体处理前后的鳊鱼 LDH 酶谱比较

Fig. 3 Comparative analysis for zymogram of mandarin fish LDH before and after immunoreaction with anti-A₄ antibody

1. 心脏 LDH 酶谱; 2. 免疫反应后心脏 LDH 酶谱;
3. 眼 LDH 酶谱; 4. 免疫反应后眼 LDH 酶谱;
5. 脑 LDH 酶谱; 6. 免疫反应后脑 LDH 酶谱;
7. 肌肉 LDH 酶谱; 8. 免疫反应后肌肉 LDH 酶谱;
9. 肝脏 LDH 酶谱; 10. 免疫反应后肝 LDH 酶谱。

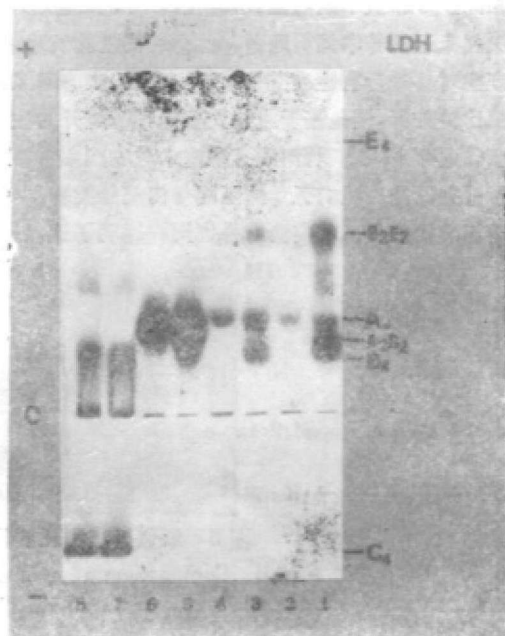


图 4 B₄ 抗体处理前后的鳊鱼 LDH 酶谱比较

Fig. 4 Comparative analysis for zymogram of mandarin fish LDH before and after immunoreaction with anti-B₄ antibody

1. 眼 LDH 酶谱; 2. 免疫反应后眼 LDH 酶谱;
3. 脑 LDH 酶谱; 4. 免疫反应后脑 LDH 酶谱;
5. 肌肉 LDH 酶谱; 6. 免疫反应后肌肉 LDH 酶谱;
7. 肝脏 LDH 酶谱; 8. 免疫反应后肝 LDH 酶谱。

从图 1—4 肝组织电泳图上看到:这两种鱼肝脏 LDH 经 A₄ 抗体或 B₄ 抗体处理后,酶谱没有发生变化,这表明:(1)在肝脏中,C 基因产物没有与 A 基因产物或 B 基因产物发生杂聚作用;(2)A₄ 抗体和 B₄ 抗体不与肝脏中 C 基因产物 LDH-C₄ 发生免疫化学反应。

从图 1—4 眼和脑组织电泳图上看到:这两种鱼的眼和脑中存在 E 基因,也即 Whitt [1981]称它 C 基因的产物 E₄ 及 E 的杂聚体。用 A₄ 抗体处理后(图 1、图 3),A 亚基聚合成的同源或异源四聚体 A₄、A₂B₂ 消失(图 1 中的 5、6 和 7、8,图 3 中的 3、4 和 5、6),其它酶带没有变化,这表明 A 亚基没有与 E 亚基合成异源四聚体,不然这些酶带就会消失。用抗体 B₄ 处理这两种鱼的脑和眼的 LDH,电泳图上仅

剩下 A_4 一条酶带(图 2 中的 7,8,图 4 中的 1,2), 这表明 B_4 抗体不但与 B_4 、 A_2B_2 发生免疫吸附反应, 而且也可以和 E 的同源四聚体以及 E 和 B 的杂合体发生免疫吸附反应。Whitt [1984] 提出在进化过程中 E 基因起源于 B 基因, 它们之间具有高度同源性和极强免疫交叉反应。我们的研究结果与 whitt 论断一致, 进一步证实了 E 基因起源于 B 基因, 它们之间有较近的亲缘关系。

三、讨 论

鳊鱼和奥利亚罗非鱼同属鲈形目(Perciforms), 分属鲈科(Serranidae)和鲷科(Cichlidae)。二者均为二倍体鱼, $2N=48$ 和 $2N=44$ [杨慧一, 1982; 陈敏容等, 1988], 亲缘关系较近, 但生活习性及食性极不相同。罗非鱼不耐低温, 不能在我国广大地区室外越冬饲养。而鳊鱼具有较强耐寒能力, 但至今仍未解决其人工饲养中饲料问题。此两种高档的食用鱼目前在我国大规模人工饲养尚有一些困难, 这使我们产生对其进行有性杂交设想、企图获得具有双亲优良性状的杂交鱼。我们进行了这两种鱼的 LDH 同工酶比较分析, 便是基于上述设想而预先展开的生化工作。

近年来, 我们利用同工酶技术对我国几种淡水鱼的杂交组合进行了酶谱分析、酶活测定及传统形态学分类比较。我们认为同工酶与传统分类基本规律相同, 酶谱越相似, 其进化地位则越接近, 此点与分类标准相吻合。本实验结果也同样说明了这点。

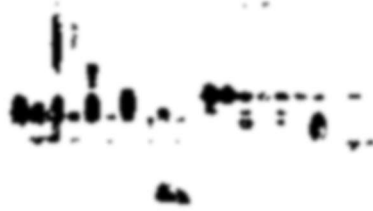


图 5 鳊鱼与奥利亚罗非鱼几种组织的 LDH 酶比较

Fig. 5 Comparison of zymogram of LDH in some tissues both Mandarin fish and *T. aurea*

1,2. 鳊鱼心脏; 3,4. 鳊鱼眼; 5,6. 鳊鱼脑; 7,8. 鳊鱼肌肉; 9,10. 鳊鱼肝脏; 11,12. 奥利亚罗非鱼心脏; 13,14. 奥利亚罗非鱼眼; 15,16. 奥利亚罗非鱼脑; 17,18. 奥利亚罗非鱼肌肉; 19, 20. 奥利亚罗非鱼肝脏。

表 1 鳊鱼、奥利亚罗非鱼 LDH 的组织特异性分布

Table 1 The tissues specific distribution of LDH isozyme in Mandarin fish and in *T. aurea*

同工酶	基因	鳊 鱼					奥利亚罗非鱼				
		心肌	白肌	眼	脑	肝	心肌	白肌	眼	脑	肝
LDH A_4	ldh A	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0
LDH A_1B_3		+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
LDH B_4	ldh B	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
LDH C_4	ldh C	0	0	0	0	+	0	0	0	0	++
LDH E_4	ldh E	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0
LDH E_1B_3		0	0	+	0	0	0	0	+	0	0
LDH E_2B_2		0	0	+	+	0	0	0	+	0	0
LDH E_3B_1		0	0	+	+	0	0	0	+	+	0

从图 5 和表 1 结果看出, 鳊鱼和奥利亚罗非鱼相同器官中的 LDH 基因表达基本一致, 而且总的 LDH 酶谱也很相似, 这表明鳊鱼和奥利亚罗非鱼有较近亲缘关系, 预测它们之间杂交可以得到具有双亲优良性状的杂交鱼。胡玫(1990)报导了用奥利亚罗非鱼为母本, 鳊鱼为父本进行杂交, 获得了形态和生化遗传性状类似母本的杂交鱼, 杂交鱼能育并能繁殖后代, 此结果与我们的预测相一致, 这表明同工酶研究能为预测杂交能否成功提供依据。

鳊鱼和奥利亚罗非鱼的脑和眼组织中均有 E_4 和 EB 杂聚体, 这表明鳊鱼和奥利亚罗非鱼的 LDH 不同于国内大多数淡水鱼, 而更接近于某些海水鱼的 LDH 特征[Markert 和 Holmes, 1969]。

参 考 文 献

- [1] 杨慧一, 1982. 鳊鱼染色体组型的研究. 遗传学报, 9(2): 143—146.
- [2] 陈敏容等, 1983. 三种罗非鱼染色体组型的比较研究. 遗传学报, 10(1): 56—62.
- [3] 夏德全等, 1990. 鱼类乳酸脱氢酶同工酶 A_4 性质的研究. 核农学报, 4(4): 225—229.
- [4] 薛国雄, 1987. 乳酸脱氢酶的同工酶. 生物科学动态, (3): 10—17.
- [5] 薛国雄等, 1991. 鱼类乳酸脱氢酶同工酶 B_4 性质的研究. 核农学报, 5(1): 31—36.
- [6] Markert, C. L. and F. Moller, 1969. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 45: 753—763.
- [7] Markert, C. L. and R. S. Holmes, 1969. Lactate dehydrogenase isozymes of flatfish, pleuroneotiforms: kinetic, molecular and immunochemical analysis. *J. Exp. Zool.*, 171: 85—104.
- [8] Shaw, C. R. and R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: A complication of recipes. *Biochem. Genet.*, 4: 297—320.
- [9] Smithes, O., 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61: 629—641.
- [10] Whitt, G. S., 1981. Developmental genetics of fishes: isozymic analysis of differential gene expression. *American Zoologist*, 21: 549—572.
- [11] —, 1984. Genetic, developmental and evolutionary aspects of the lactate dehydrogenase isozyme system. *Cell Biochemistry and Function*, 2: 134—139.