

文章编号:1000 - 0615(2004)05 - 0579 - 06

研究简报·

## 鳊溪香鱼群体同工酶的生化遗传分析

黄福勇, 李凌云

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

关键词:香鱼;同工酶;生化遗传分析;遗传多样性

中图分类号:S917

文献标识码:A

### Biochemical genetic analysis of isozymes in *Plecoglossus altivelis* population in Fuxi

HUANG Fu-yong, LI Ming-yun

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** 30 ayu (*Plecoglossus altivelis*) samples were collected from the cultural net in Fuxi Town, Ninghai County, Zhejiang Province. Polyarylamide gel electrophoresis was used to detect the expression of isozymes in 8 organs or tissues: eye, liver, kidney, muscle, spleen, heart, gill and pectoral fin. ADH, CAT, POD, ACP, ALP, EST, LDH, MDH, ME, GcDH, SCD, GDH, SDH, SOD, ATP were analyzed and the biochemical genetic results showed that 15 isozymes were coded by 55 gene loci, 12 of which (ADH-1, ADH-4, CAT-2, POD-3, ALP-2, EST-3, EST-4, LDH-5, ME-4, GcDH-4, GDH, SDH-2) were found polymorphic. The population of ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Fuxi town showed the higher genetic diversity when compared with other freshwater fishes, with 21.8% of the proportion of polymorphic loci and 0.0459 of the average heterozygosity per loci. And we think the expression of CAT, POD and SOD of ayu (*Plecoglossus altivelis*) can be used to evaluate the influence to body-protecting system of the fish when environmental factors were changed. The expression of isozymes in pectoral fin can be used as genetic marker in breeding of ayu (*Plecoglossus altivelis*).

**Key words:** *Plecoglossus altivelis*; isozyme; biochemical genetic analysis; genetic diversity

香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 隶属鲑形目, 香鱼科, 香鱼属, 为我国小型名贵经济鱼类, 广泛分布在北起鸭绿江南至广西北仑河等涉海溪流江河中, 也可生活在大型陆封水库中<sup>[1]</sup>, 为一年生洄游鱼类。近年来, 由于各地捕捞强度增大、水利设施建设以及环境污染日益严重等原因, 各地香鱼资源量均急剧减少。关于香鱼的地理分布、生态习性、繁殖生物学及人工繁殖技术, 已经有较多报道<sup>[2-8]</sup>, 但

生化遗传方面的研究尚未见有报道。同工酶作为一种重要的生化指标, 在鱼类种质资源利用、遗传育种方面有较多应用。作者应用聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳方法, 对香鱼的 8 种组织或器官进行了 18 种同工酶研究, 选取其中 15 种较清晰的酶谱进行同工酶位点分析, 以期对香鱼种质资源保护与开发以及遗传育种提供基础资料。

收稿日期: 2003-11-24

资助项目: 科技部国家科技成果重点推广项目计划 (2003EC000194)

作者简介: 黄福勇 (1977 - ), 男, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事水产动物生理生化遗传学研究

通讯作者: 李凌云 (1942 - ), 男, 浙江舟山人, 教授, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: limingyun@nbip.net.cn

## 1 材料与方法

香鱼于2003年5~9月采自浙江省宁海县凫溪镇,共30尾,体长为12.6~15.5cm,体重为30~45g。对香鱼进行活体取样,取眼球、肝脏、肌肉、脾脏、肾脏、心脏、胸鳍和鳃耙等8种器官或组织,直接进行分析或置超低温冰箱(-71)保存至分析。同工酶电泳采用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,电极缓冲液为Tris-甘氨酸,TG,pH=8.3。样品的制备及结果处理参照文献[9],凝胶的制备及电泳方法参照文献[10],凝胶染色参照文献[9,11,12],电泳酶谱分析参照文献[13]。

数据处理采用文献[16]的方法,统计多态座位比例(mean proportion of polymorphic loci-P)和每个座位的平均杂合度(average heterozygosity per locus-H),其计算式如下:

(1)  $P = \text{多态位点数} / \text{总座位数}$ ;

(2)  $H = (1 - \sum x_i^2) / n$

以上 $x_i$ 为 $x$ 种群的第 $i$ 个等位基因的频率, $n$ 为所测位点的总数。

## 2 结果与分析

### 2.1 TG缓冲体系对同工酶的筛选结果

本实验在TG缓冲体系下检测了18种同工酶,共筛选出具有清晰图谱的下列15种同工酶进行生化遗传分析:醇脱氢酶(ADH,E.C. 1.1.1.1)、过氧化氢酶(CAT,E.C. 1.11.1.6)、过氧化物酶(POD,E.C. 1.11.1.7)、酸性磷酸酶(ACP,E.C. 3.1.3.2)、碱性磷酸酶(ALP,E.C. 3.1.3.1)、酯酶(EST,E.C. 3.1.1.1)、乳酸脱氢酶(LDH,E.C. 1.1.1.27)、苹果酸脱氢酶(MDH,E.C. 1.1.1.37)、苹果酸酶(ME,E.C. 1.1.1.40)、D-葡萄糖脱氢酶(GCDH,E.C. 1.1.1.118)、琥珀酸脱氢酶(SCD,E.C. 1.3.99.1)、谷氨酸脱氢酶(GDH,E.C. 1.4.1.2)、山梨醇脱氢酶(SDH,E.C. 1.1.1.14)、超氧化物歧化酶(SOD,E.C. 1.15.1.1)、三磷酸腺苷酶(ATP,E.C. 2.7.4.3)。

对另外3种酶的分析结果如下,辛醇脱氢酶(ODH)和半乳糖脱氢酶(GAD)只显示微弱不清晰的酶带,-磷酸甘油脱氢酶(-GDPH)主要在肝脏和肾脏表达,但酶带模糊无法准确判读。

### 2.2 鳃溪香鱼同工酶表达及生化遗传分析酶

ADH 二聚体酶,共有5个基因座位编码,具有明显的组织特异性,在眼睛和肝脏中活性最强。对肝脏进行群体分析发现,ADH1、ADH4为多态,ADH1有60和100两个等位基因,检测到60/100和100/100两种表型;ADH4有91和100两个等位基因,检测到91/100和100/100两种表型。ADH1、ADH2、ADH3、ADH5均为单态(图1-1,2)。

CAT 四聚体酶,由7个基因座位编码,具有显著的组织特异性,在肌肉中活性强且具有复杂的酶谱。对肌肉

进行群体分析发现,仅有CAT-2为多态,观察到91、100两个等位基因的两种表型:91/100和100/100,其它座位均为单态(图1-3,4)。

POD 单体或二聚体酶,由3个基因座位编码,在肌肉和胸鳍中没有检测到活性,在其它各组织中活性均较强。POD-3为多态,有91和100两个等位基因,只检测到91/100和100/100两种表型。其余座位均为单态(图1-5,6)。

ACP 单体或二聚体酶,由3个基因座位编码,在肌肉中活性最低,ACP-3仅在肾脏中表达,且活性较低。具有明显的组织特异性。各基因座位均为单态(图1-7,8)。

ALP 单体或二聚体酶,由两个基因座位编码,在眼睛、脾脏、肝脏、心脏和胸鳍中的表达均和ACP相似,但肌肉中活性较强而鳃耙中活性较低。具明显组织特异性。ALP-2为多态,有86和100两个等位基因,只检测到86/100和100/100两种表型。ALP-1为单态(图1-9,10)。

EST 为二聚体酶,共记录了7个基因座位,在各组织中均具有较强活性,具有显著的组织特异性。以肝脏和肾脏中活性最强,对其进行群体分析表明,EST-3和EST-4均为多态,EST-3具有90和100两个等位基因的两种表型:90/100和100/100,EST-4具有100和110两个等位基因,仅检测到两种表型,100/100和100/110(图1-11,12)。

LDH 四聚体酶,由5个基因座位编码,A、B、C基因分别对应图中LDH1、LDH2、LDH5基因座位,A、B基因在8种器官或组织中表达,但在各部分活性差异较大;C基因同时在眼睛和肝脏中表达,但活性较弱。C基因座位为多态,具有89和100两个等位基因,检测到两种表型,89/100和100/100(图1-13,14)。

MDH 二聚体酶,由4个基因座位编码,有s(细胞质型)-MDH和m(线粒体型)-MDH两种类型。两种类型分别有两种基因座位编码,互相之间不杂合,且均为单态(图1-15,16)。

ME 四聚体酶,由4个基因座位编码,在肝脏和肾脏中活性最强,鳃耙中没有检测到活性,肌肉、脾脏、胸鳍中活性较低,具有明显组织特异性。ME-4为多态,具有83和100两个等位基因,仅检测到83/100和100/100两种表型。其余座位均为单态(图1-17,18)。

GcDH 二聚体酶,由4个基因座位编码,在脾脏中活性较弱,其余组织或器官中活性较强,组织特异性不明显。GcDH-4为多态,有93和100两个等位基因,仅检测到93/100和100/100两种表型。其余座位均为单态(图2-19,20)。

SCD 单体酶,由3个基因座位编码,在肝脏和肾脏中活性较强,其余组织或器官中活性较弱,SCD-3仅为一条微弱的酶带。有明显组织特异性。各个基因座位均为单态(图2-21,22)。

GDH 四聚体酶,由1个基因座位编码,仅在肝脏和

肾脏中表达,多态,由 64 和 100 两个等位基因,检出 64/100 和 100/100 两种表型(图 2-23,24)。

SDH 二聚体酶,由两个基因座位编码,在肝脏中活性较强而肾脏中活性较弱,其它组织或器官中未检测到活性。SDH-2 为多态,观察到 86、100 和 109 3 个等位基因的 4 种表型:86/86、100/100、109/100 和 109/109(图 2-25,26)。

SOD 二聚体酶,由 3 个基因座位编码,在眼睛和胸鳍中活性较弱,其它组织或器官中活性均较强,肝脏中活性最强。各个基因座位均为单态(图 2-27,28)。

ATP 单体酶,由两个基因座位编码,在胸鳍中活性最强,肌肉中没有检测到活性。各个基因座位均为单态(图 2-29,30)。

鳊溪香鱼群体多态位点基因频率统计见表 1。鳊溪香鱼群体的多态座位比例为 21.8%,平均杂合度为 0.0459。

### 3 讨论

#### 3.1 香鱼的同工酶表达

同其它鱼类相比,香鱼具备了较为复杂的同工酶系统。研究了 15 种同工酶,共检出 54 个基因座位,平均每种酶检出 3.6 个基因座位。马波和石连玉<sup>[14]</sup>采用淀粉凝胶电泳(SGE)方法对和香鱼同为鲑科鱼类的山女鲮进行研究,做了 6 种同工酶共检出 13 个基因座位,平均每种同工酶检出 2.2 个基因座位。本实验采用的 PAGE 电泳方法,较 SGE 方法分辨率更高,更加有利于检出一些活性较弱或组成更复杂的同工酶(如本实验中的 EST、CAT 等,二者共记录了 14 个基因座位,占所记录基因座位总数的 25.9%)。

香鱼的 EST 酶谱较复杂,在肝脏和肾脏中活性最强,这是由于 EST 是催化酯类化合物水解的酶系,能水解大

量非生理存在的酯类化合物,包括某些药物,因此认为具有解毒作用,而肝、肾是最重要的解毒器官。香鱼的 CAT、POD、SOD 均与清除鱼体内自由基有关,POD 能利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化供氢体,CAT 可以催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解为 H<sub>2</sub>O 与 O<sub>2</sub>,也可催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化某些供氢体,SOD 也是生物体防御氧化损伤的重要酶类,它能催化 O<sup>-2</sup> 发生歧化反应,生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub><sup>[15]</sup>,上述 3 种酶常作为机体保护系统加以研究,香鱼的肌肉组织中 CAT 活性最强,POD 没有检测到活性,但 SOD 活性稍低,这说明肌肉组织中清除自由基的机能主要是由 CAT 联合 SOD 完成的,推测 CAT 在其中发挥主要作用。另外,CAT、POD 均具有复杂清晰的酶谱,且具有多态位点,SOD 活性高,具有一定的组织特异性,可以考虑将 3 种同工酶结合起来评价生理生化、环境因子对香鱼机体保护系统的影响。

香鱼的 LDH-1 存在于除脾脏之外的各个组织与器官,且在各个组织与器官中活性较强,推测为基因座位 A<sub>4</sub>,第 2 条带清晰明显,且在肝脏中为超显性,作者推测为基因座位 B<sub>4</sub>。第 5 条带同时在眼睛和肝脏中表达,活性较低,与靠近阴极的 4 条带分隔明显,推测为 C<sub>4</sub>。第 3 条和第 4 条区带与第 2 条区带大致分布于同一区域,位于 B<sub>4</sub> 和 C<sub>4</sub> 之间,作者认为是两者的杂合带。

#### 3.2 香鱼有效遗传标记筛选

本试验所分析的同工酶中,共含有 12 个多态基因座位,其中 ADH、EST 等,不仅酶谱清晰,还包含有多个多态基因座位,经筛选后可以作为遗传育种的有效标记,也可以作为群体间识别以及物种进化的有效标记。为了能够直接应用于遗传育种并解决活体取样问题,本试验对胸鳍进行了分析,发现在多种酶中均可检测出活性,在 ADH、CAT、EST、LDH、GcDH 等 5 种同工酶中,还可以得到较清晰的图谱,因此作者认为可以采用胸鳍作为活体取样材料应用于香鱼遗传育种的遗传标记。

表 1 鳊溪香鱼群体多态位点等位基因频率

Tab.1 Allele frequencies at 12 polymorphic loci in population of *Plecoglossus altivelis* in Fuxi

基因位点 locus	等位基因 allele	基因频率 allele frequency	基因位点 locus	等位基因 allele	基因频率 allele frequency
ADH-1	100	0.83	EST-4	100	0.87
	60	0.17		110	0.13
ADH-4	100	0.87	LDH-5	100	0.92
	91	0.13		89	0.08
CAT-2	100	0.80	ME-4	100	0.93
	71	0.20		64	0.07
POD-3	100	0.90	GcDH-4	100	0.88
	91	0.10		93	0.12
ALP-2	100	0.98	GDH	100	0.87
	86	0.02		64	0.13
EST-3	100	0.85	SDH-2	100	0.84
	90	0.15		86	0.03
				109	0.13

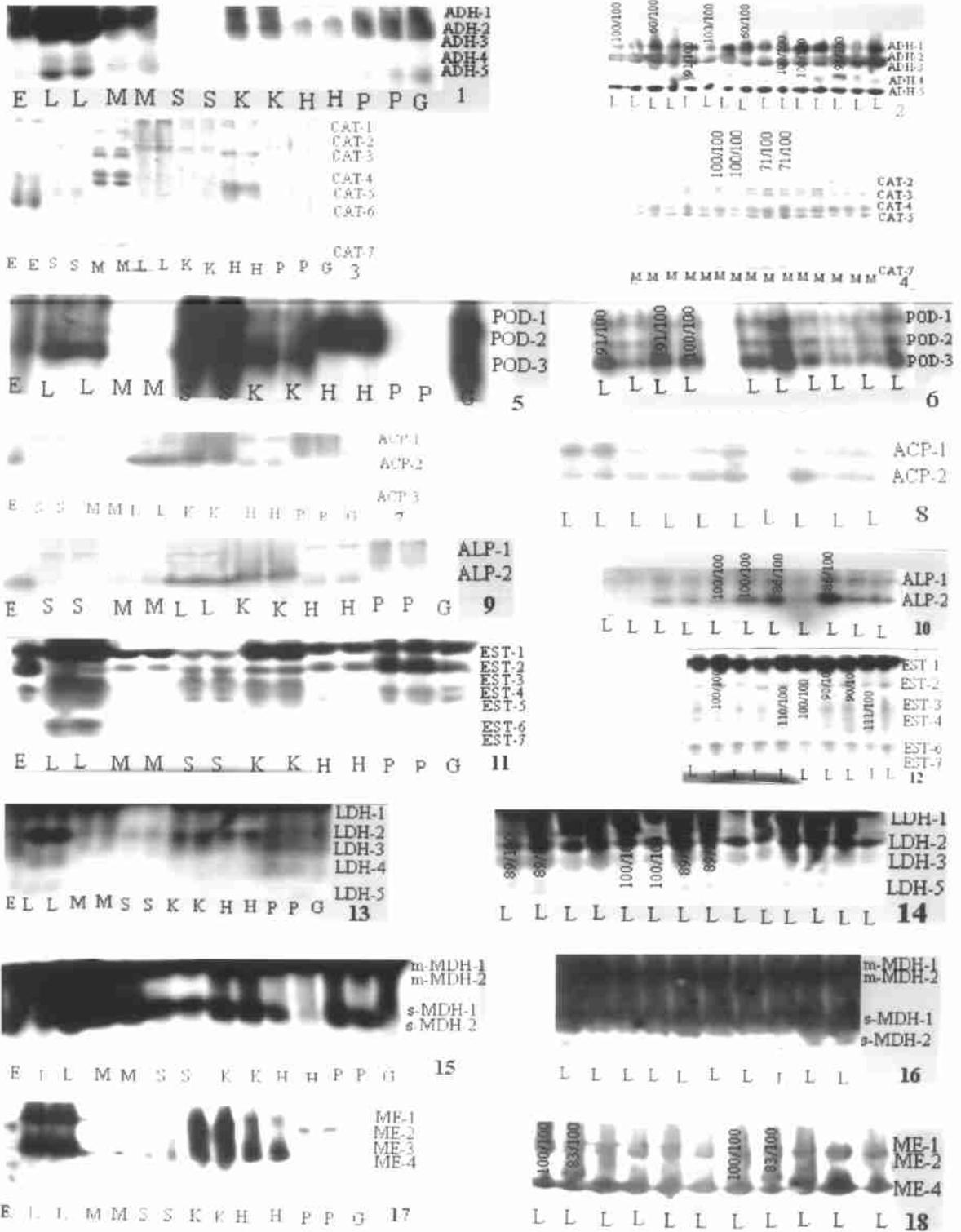


图1 鳧溪香鱼群体同工酶电泳图谱( )

Fig.1 Electrophoretic patterns of isozymes in *Plecoglossus altivelis* population in Fuxi

1~2. ADH; 3~4. CAT; 5~6. POD; 7~8. ACP; 9~10. ALP; 11~12. EST; 13~14. LDH; 15~16. MDH; 17~18. ME;

E:眼睛; L:肝脏; M:肌肉; S:脾脏; K:肾脏; H:心脏; P:胸鳍; G:鳃耙(图1和图2中,各图谱电泳方向一致,均为上端阴极,下端阳极)

E:eye; L:liver; M:muscle; S:spleen; K:kidney; H:heart; P:pectoral fin; G:gill(In fig. 1-1 and fig. 1-2, the upside of the electrophoresis patterns is cathode and the underside of which is anticathode, and the direction of all the electrophoresis patterns is same)

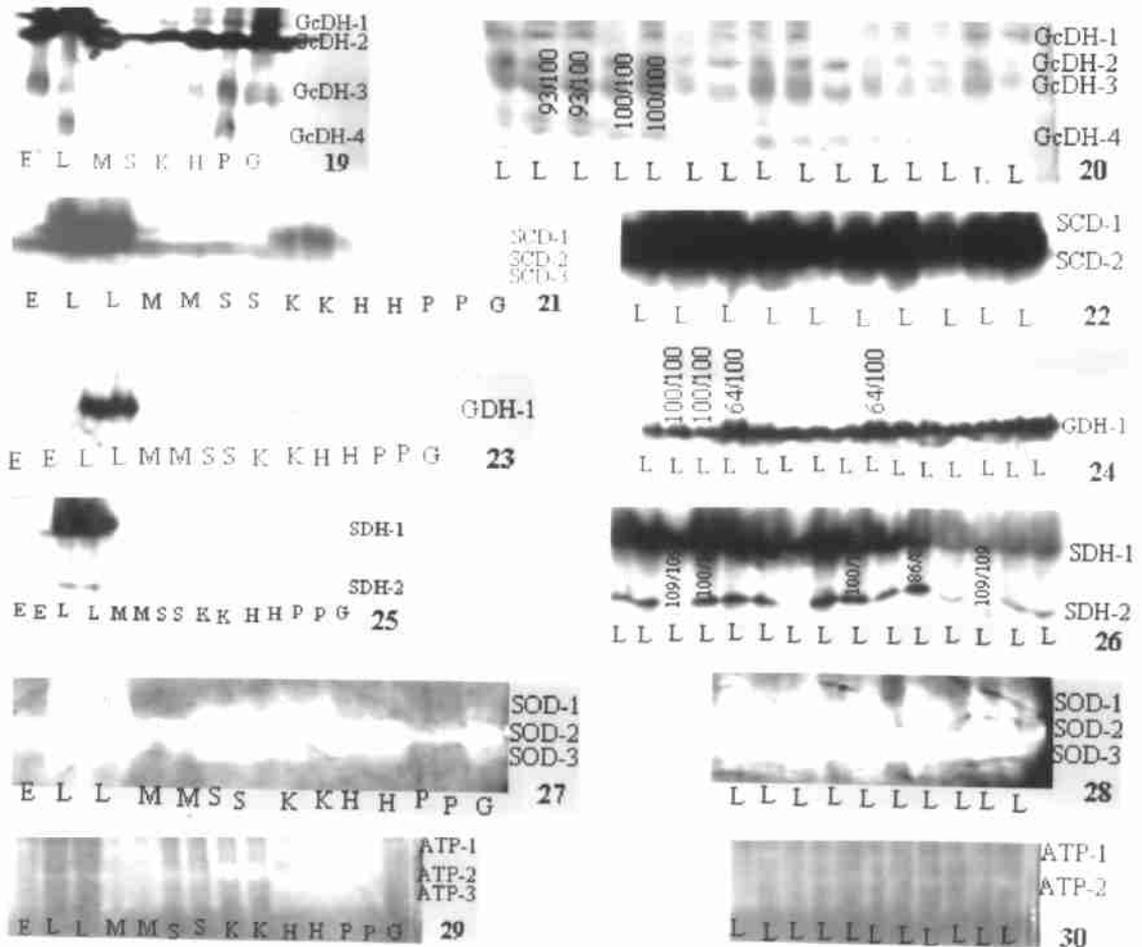


图2 鳊溪香鱼群体同工酶电泳图谱( )

Fig.2 Electrophoretic patterns of isozymes in *Plecoglossus altivelis* population in Fuxi

19. GcDH; 20. GcDH; 21~22. SCD; 23~24. GDH; 25~26. SDH; 27~28. SOD; 29~30. ATP

E:眼睛; L:肝脏; M:肌肉; S:脾脏; K:肾脏; H:肾脏; P:胸鳍; G:鳃耙

E:eye; L:liver; M:muscle; S:spleen; K:kidney; P:pectoral fin; G:gill

### 3.3 鳊溪香鱼群体的遗传多样性

多态基因座位是种群遗传多样性的一个重要指标,淡水鱼类一般在 11.8%~33.3%<sup>[16]</sup>。李思发<sup>[17]</sup>在 1996 年发表的资料中,长江中、下游鲢、鳙、草鱼、青鱼的多态座位比例分别为 5.9%、17.7%、6.7%和 5.9%,1987 年资料表明,鲢、鳙、草鱼的多态座位比例分别为 14.8%、17.4%、16.7%。由此可见鳊溪香鱼群体的多态座位比例为 21.8%,高于 1996 年和 1987 年的水平,在淡水鱼类中属于较高水平。平均杂合度与测定样本的大小关系不太大,比多态座位比例能更直接、有效地度量群体遗传变异地情况。鳊溪香鱼群体的平均杂合度为 0.0459,高于李思发<sup>[17]</sup>资料中 1996 年长江中、下游鲢、草鱼、青鱼的平均杂合度,上述 3 种淡水鱼类分别为 0.0180、0.0237 和 0.0010,低于鳙的平均杂合度 0.0674。

综上所述,鳊溪香鱼具有较为丰富的遗传多样性,这

与开展人工养殖时间较短、所采集养殖鱼类大多为野生亲鱼的子二代或子三代情况相符。同时也提示,必须做好香鱼的资源保护,要做好野生香鱼栖息溪流的保护,在人工繁殖选择亲鱼时,也要尽可能避免近亲交配,避免因为小群体亲鱼繁育产生的瓶颈效应导致遗传多样性降低,从而造成养殖香鱼的种质衰退。

### 参考文献:

- [1] Li M Y, Ding T X, Zhu J Q, *et al.* Present status of the research and perspective on stocking and culture of ayu (*Plecoglossus altivelis*) in China[J]. J Ningbo Univ (NSEE), 1999,12(4):85-90. [李明云,丁天喜,竺俊全,等.我国香鱼的研究现状及增养殖前景[J].宁波大学学报(理工版),1999,12(4):85-90.]
- [2] Li M Y, Xu S L, Wang D L, *et al.* The varietal difference of ayu between those living in Fuxi stream of China and in lake

- Biwa of Japan[J]. J Zhejiang Coll Fish, 1995,14(2):57-61. [李明云,徐善良,王丹丽,等.中国鳃溪香鱼与日本琵琶湖香鱼的种间差异[J].浙江水产学院学报,1995,14(2):57-61.]
- [3] Li M Y, Xu S L, Wu H X. Growth features and pattern of body form change of *Plecoglossus altivelis* T. et s. [J]. J Zhejiang Coll Fish, 1992,11(1):16-21. [李明云,徐善良,吴洪喜.香鱼生长特性及体型变化的研究[J].浙江水产学院学报,1992,11(1):16-21.]
- [4] Li M Y, Zhang H Y, Xu Y. Studies on the feeding habits and development of the correlative organs of the ayu *Plecoglossus altivelis* in Fuxi stream, Zhejiang [J]. J Zhejiang Coll Fish, 1982,1(1):73-88. [李明云,章红勇,徐茵.鳃溪香鱼的食性及其相关器官发育的研究[J].浙江水产学院学报,1982,1(1):73-88.]
- [5] Cao K J, Li M Y. Studies on the reproductive biology of the ayu in Fuxi stream, Zhejiang [J]. J Fish China, 1982,6(2):107-118. [曹克驹,李明云.鳃溪香鱼繁殖生物学的研究[J].水产学报,1982,6(2):107-118.]
- [6] Li M Y, He C J. Examples for captivity and fish disease control in *Anabaralius grahami* [J]. Freshwater Fisheries, 2003,33(4):30-32. [李明云,何常金.香鱼工厂化规模养殖试验[J].淡水渔业,2003,33(4):30-32.]
- [7] Li M Y, Zhu J Q, Zhao Z D, et al. Seed production and culture technique of *Plecoglossus altivelis* [J]. Freshwater Fisheries, 2000,30(7):3-5. [李明云,竺俊全,赵志东,等.香鱼苗种繁育及养成技术[J].淡水渔业,2000,30(7):3-5.]
- [8] Li M Y, Shi J P, Wang L, et al. An experiment on drug poisoning of ayu *Plecogloss altivelis* with several medicines in common use [J]. J Zhejiang Coll Fish, 1996,15(2):145-148. [李明云,史久品,王雷,等.香鱼对几种常用鱼药的急性中毒试验[J].浙江水产学院学报,1996,15(2):145-148.]
- [9] Xiang J H. Cell and population biochemical genetics of marine animals [M]. Jinan: Science and Technology Press of Shandong, 1999.70-80. [相建海.海洋动物细胞和种群生化遗传学[M].济南:山东科学技术出版社,1999.70-80.]
- [10] Zhou Z H, Lin J B, Zhu W H. Introduction of electrophoresis method of proteins and isozyme in fish's tissues [J]. Freshwater Fisheries, 1983,(2):3540. [周宗汉,林金榜,朱婉华.介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法[J].淡水渔业,1983,(2):35-40.]
- [11] Hu N S, Wan X G. Isozyme technique and its applications [M]. Changsha: Science and Technology Press of Hunan, 1985.86-126. [胡能书,万贤国.同工酶技术及其应用[M].湖南科学技术出版社,1985.86-126.]
- [12] Li S F. Genetical characterization of major freshwater culture fishes in China [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technical Publishers, 1998.189-193. [李思发.中国淡水主要养殖鱼类种质资源研究[M].上海:科学技术出版社,1998.189-193.]
- [13] Wang Z R. Plant allozyme analysis [M]. Beijing: Science Press, 1996.140-163. [王中仁.植物等位酶分析[M].北京:科学出版社,1996.140-163.]
- [14] Ma B, Shi L Y. Biochemical genetic structure of *Oncorhynchus masou* [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2002,15(2):57-60. [马波,石连玉.山女鲢同工酶的研究[J].水产学杂志,2002,15(2):57-60.]
- [15] Fang Y Z, Li W J. Free radicals enzyme applications in biology and medicine [M]. Beijing: Science Press, 1989.111-133. [方允中,李文杰.自由基与酶[M].北京:科学出版社,1989.111-133.]
- [16] Li S F, Wu L Z, Wang Q, et al. Comprehensive genetic study on Chinese carps [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technical Publishers, 1990.51-101. [李思发,吴力钊,王强,等.长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼种质资源研究[M].上海:上海科学技术出版社,1990.51-101.]
- [17] Li S F. A study on biodiversity and its conservation of major fishes in the Yangze River [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technical Publishers, 2001.19-20. [李思发.长江重要鱼类生物多样性和保护研究[M].上海:上海科学技术出版社,2001.19-20.]