

两个雌核发育白鲢群体同工酶分析 及遗传标记的确定

杨书婷 桂建芳

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要 取源于武汉两个不同渔场两尾白鲢的卵子, 经紫外照射遗传物质失活的鲤鱼精子刺激雌核发育和热休克诱导第二极体保留的基因组操作技术, 获得了两个不同的人工雌核发育白鲢群体。采用聚丙烯酰胺垂直板电泳技术, 分析了这两个不同人工雌核发育白鲢群体(分别称为 Hy-G₁ 和 Hy-G₂)内不同个体的肝脏、肌肉组织以及红细胞中乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、酯酶(EST)、超氧化物歧化酶(SOD)等几种同工酶的表达谱式, 并与普通繁殖的同龄白鲢进行了比较。结果表明, 各个雌核发育白鲢群体内不同个体间的酶谱表现出很大程度的一致性, 具较高的纯合度, 而两个不同雌核发育群体 Hy-G₁ 和 Hy-G₂ 之间表现有明显差异。特别是肝脏和肌肉组织迁移率较快的酯酶谱带等以其稳定的差异, 建议作为区分这两个人工雌核发育白鲢群体的生化遗传标记。

关键词 同工酶, 人工雌核发育, 遗传标记, 白鲢

白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix* Curier et valenciennes)因其食浮游生物的特性, 在我国的淡水渔业中占有相当重要的位置。但近年来由于缺乏行之有效的选育工作, 在许多人工繁殖种群中出现了生长迟缓等经济性状严重退化现象。本实验在以前工作的基础上, 结合人工雌核发育技术对白鲢优良品系进行选育, 采用聚丙烯酰胺垂直板电泳技术, 对取自武汉市野芷湖和南湖渔场亲鱼卵进行雌核发育人工诱导技术处理所得二倍体白鲢内不同个体的肝脏、肌肉以及红细胞中的乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、酯酶(EST)、过氧化物脱氢酶(SOD)等几种同工酶的表达谱式进行了研究, 并与普通繁殖的同龄白鲢进行了比较, 由此分析了雌核发育白鲢同工酶基因表达的一些特点。其目的是试图在不同的雌核发育白鲢群体中找到较为明确的生化遗传标记, 为生产上进行合理的人工繁殖和良种选育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 人工雌核发育二倍体白鲢群体的获得 白鲢卵子分别取自武汉市南湖渔场和野芷湖渔场。采用常规的人工诱导雌核发育方法^[1,2], 即用经紫外线照射而遗传失活的红鲤精

子与白鲢卵子授精而激活其雌核发育。待授精 4min 后,采用热休克处理(39℃,1min)保留第二极体,促使卵子染色体组加倍而获得雌核发育二倍体白鲢。由源于南湖渔场的一尾白鲢卵子所获得的人工雌核发育群体被称为 Hy-G₁,由源于野芷湖渔场的一尾白鲢卵子所获得的雌核发育白鲢群体被称为 Hy-G₂。

1.2 样品制备及电泳、显色 按照朱蓝菲报道的方法进行^[3]。Hy-G₁群体共分析 10 尾鱼,Hy-G₂群体共分析 15 尾鱼,普通繁殖的白鲢(Hy-C)作为对照,共分析了 21 尾鱼。所用材料鱼均为当年获得的一龄鱼。

2 结果

2.1 酯酶(EST, E.C.3.1.1.1) 酯酶为单聚体酶,多数鱼类的酯酶存在多态性。本实验表明,在雌核发育群体和人工繁殖的普通白鲢肝脏组织中,酯酶谱式相当复杂,最多显示出 12 条谱带,根据其迁移率大致可划分为快、中、慢三部分(图版 I: 1)。在区段 I 存在有两条活性很强的酶带,应由单独基因座位控制,此酶带在检测的所有个体中均存在,可以认为是白鲢酯酶的基础酶带(管家酶);此外,在区段 I 还存在另外两条活性较弱且迁移率又很慢的酶带。在区段 I,Hy-G₁ 和 Hy-G₂ 以及普通白鲢群体之间无明显差异;区段 III 由 2 条明显的酶带和较其迁移率更快的 1 至 3 条较弱的酶带组成,普通白鲢群体既表现为杂合型,又见有快带纯合型和缺失型;Hy-G₁ 群体表现为快带纯合型和个别缺失型;Hy-G₂ 则全部表现为慢带纯合型。区段 II 的迁移率介于二者之间,所显示酶带在普通白鲢个体之间具有多态性,存在不同表型。Hy-G₁ 群体的酶谱接近普通白鲢群体,Hy-G₂ 群体则明显不同,酶活性极低。肌肉组织中的酯酶酶谱均比较简单(图版 I: 2)。在迁移率慢的区段,谱型基本一致,但在迁移率快的两条谱带表现出差异:Hy-G₁ 表现为快带纯合型,Hy-G₂ 为慢带纯合型,对照组普通白鲢则多数为杂合型,也有少数个体表现为慢带纯合型。在红细胞中,只检查了 Hy-G₂ 群体和普通白鲢群体,相对于肝脏区段 III 的酯酶酶带,21 尾对照组白鲢共观察到 6 种表型,而在 Hy-G₂ 群体 25 尾鱼中,除最大的 1 尾和最小的一尾表现不同外,其它 23 尾的酶谱都完全一致(图版 I: 3 只显示了部分结果)。

2.2 乳酸脱氢酶(LDH, E.C.1.1.1.27) 白鲢 LDH 同工酶为经典的四聚体酶,由三个基因座位控制,肌肉中只表达 LDH-A 和 LDH-B 两个座位,其中以 A₄ 和 A₃B₁ 的活性为最强,A₁B₃ 的活性最弱。LDH 同工酶在两个雌核发育白鲢群体和普通对照白鲢群体不同个体的肌肉组织中的表达无明显差异(图版 II: 3)。肝脏组织中 LDH-A、LDH-B 和 LDH-C 三个座位均得以表达,普通白鲢群体中 A₄ 的活性较强,但总体活性相差不明显;在雌核发育白鲢群体中,纯合态 B₄、A₄ 明显较 A、B 杂合态的活性强。LDH-C 座位在雌核发育群体中只表现 2 条酶带,且个体之间表型一致,但来自不同母本的两个雌核发育群体之间 2 条酶带的迁移率不同;而在普通对照组白鲢群体中所检查的 21 条鱼中,LDH-C 座位至少有 5 种表型(图版未显示)。

2.3 苹果酸脱氢酶(MDH, E.C.1.1.1.37) MDH 为二聚体,存在有相互不形成异聚体的可溶型(s-MDH)和线粒体型(m-MDH)两部分。普通白鲢群体肌肉和肝脏组织中,4 个基因座位都得以表达,但不同的 MDH 在两种组织中表达的程度各异,此与吴力钊等人^[4,5]的结果相近。肝脏组织中,s-MDH 活性很强,肌肉组织中 s-MDH 和 m-MDH 活性相近,在所

检测个体中,未发现基因座位的多态现象(图版 II: 1)。

2.4 超氧化物歧化酶(SOD, E.C.1.15.1.1) 在生物体内,SOD 主要以同工酶的形式存在。鱼类 SOD 同工酶的类型前人⁽⁸⁾曾做过一些研究,但尚无定论。有人依据 SOD 同工酶的迁移率而将其划分为 s-SOD 和 m-SOD 两种类型^(6,7)。本实验所得的 SOD 同工酶谱则相当复杂:普通对照组白鲢群体和雌核发育群体肌肉组织中的 SOD 同工酶谱基本相近,可明显分为两个区段,相应于 s-SOD 和 m-SOD 两部分。s-SOD 区段由 10 多条酶带组成,m-SOD 区段存在两条每一个体都表达的基础酶带。两个雌核发育群体各个群体内的不同个体和普通对照组白鲢相比,个体之间的一致性更强(图版 II: 2)。

肝脏组织中 SOD 酶谱基本分不出快带型和慢带型,酶带自阴极到阳极成近似均匀分布。接近中间区域为每个个体都表达的基础酶带。在基础酶带之上,个体之间存在着酶谱变异,最少 3 条,最多 6 条酶带,相同数目酶带的个体,其酶带的分布也有所不同。在普通对照组的 21 个个体中,共检出 4 种类型,存在明显的多态性。而雌核发育群体内不同个体间在基础酶带之上的酶谱有较强的一致性,共存在 5 条酶带。在基础酶带之下,二者之间存在明显差异,如雌核发育群体均表达的迁移率最快的酶在普通对照组白鲢中未表达,而在正常二倍体中均表达的迁移率最快的酶带在雌核发育群体中只有一个个体表达,其余个体的相应位置只有极细弱的带纹。总体比较起来,雌核发育个体的酶谱比普通对照组白鲢有较强的一致性(图版未显示)。

3 讨论

3.1 同工酶的组织特异性表达 许多学者曾对鱼类同工酶表达的组织特异性进行了研究^(6,9,10,13),本实验结果基本与前人的研究结果相近。所分析的四种同工酶在白鲢肝脏组织中的表达谱式较肌肉组织复杂,雌核发育群体与普通白鲢群体之间的差异也主要表现在肝脏组织中。此可能与组织行使的不同功能有关:肝脏作为主要的内脏器官之一,具有消化、分泌以及解毒等多种功能,因而与之相适应,其同工酶亦表现出复杂的多态性;比较而言,肌肉组织的功能则相对单一,因而其同工酶的表型比较一致,表明其分子进化相对保守。此外与现有的研究资料相比,本实验所检出的有关同工酶酶谱更为复杂。一般认为白鲢肝脏酯酶的多态座位有两个^(6,10),而本实验结果表明其多态位点不少于三个,肝脏 LDH-C 基因所表达的酶谱也较吴力钊等人^(4,5,12)的结果复杂,特别是 SOD 的酶谱,其酶带数目之多在现有资料中尚属少见,关于这些酶的类型以及基因座位的确定,有待于进一步研究。

3.2 雌核发育白鲢同工酶基因表达的基本特征 与普通对照组白鲢正常二倍体相比,本实验中雌核发育白鲢同工酶基因表达的最基本特征是其表型趋于一致,个体差异明显降低。肝脏酯酶、LDH-C 以及 SOD 等均有类似结果,表明经人工雌核发育技术处理之后,其遗传结构的纯合程度获得了提高。此外,雌核发育白鲢同工酶表型多态性的降低,并非是普通白鲢中相应谱带的简单减少。有些在普通白鲢表达的酶带未能在雌核发育白鲢中表达,如雌核发育群体中肝脏酯酶区段 II 的一些酶带;而有些在雌核发育白鲢中的某些酶带也不一定在普通白鲢中得以表达。如肝脏 SOD 区段 II 中迁移率最快的一些酶带等。此可能与基因剂量的差别表达有关:即普通白鲢由于融入了父本的遗传物质,因而表达了源于

父本的基因产物；雌核发育白鲢则由于母本遗传物质加倍，纯合度增加，因而使原来表达很弱或未能表达的基因得以表达，其产物足以被检测到。当然也不排除雌核发育白鲢在母本遗传物质加倍的过程中，由于核质相互作用而使一些特殊基因活化，表达基因产物。

3.3 两个雌核发育白鲢群体的生化遗传标记 余来宁等^[1]在白鲢的育种试验中曾观察到，用肝脏酯酶基因纯合型作亲本进行自交，后代也为纯合型；用杂合型作亲本，后代产生分离，出现多种类型。作者在本实验中用两种来源的亲本进行人工诱导雌核发育处理，所得两个群体在群体内个体之间谱型相当一致，而在群体之间则存在明显差异，表明亲鱼的基因型在很大程度上决定着雌核发育子代的分化情形。

研究同工酶基因表达的主要目的之一，即是要选择明显而稳定的特别是具多态性的等位基因，作为检测种群种质性状的生化遗传标记，有关这方面的工作已做了很多^(6,10,11)。从本实验也可基本确定，白鲢肝脏酯酶区段 III、肌肉酯酶区段 II 以及红细胞酯酶酶谱等以其表型的多态性和规律性，尤其是在两个雌核发育群体内个体间的相似性和两个不同雌核发育群体间的明显差异性，基本适合作为这两个白鲢雌核发育群体的生化遗传标记。

参 考 文 献

- [1] 桂建芳，梁绍昌，孙建民等，鱼类染色体组操作的研究 I、静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫。水生生物学报，1990，14(4): 336—344
- [2] 桂建芳，孙建民，梁绍昌等，鱼类染色体组操作的研究 II、静水压处理和静水压与冷休克结合处理诱导水晶彩鲫四倍体。水生生物学报，1990，15(4): 333—342
- [3] 朱蓝菲，鱼类同工酶和蛋白质聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法。水生生物学报，1992，16(2): 183—185
- [4] 吴力钊，王祖熊，白鲢个体发育过程中同工酶基因的表达与调控研究。水生生物学报，1997，21(3): 49—58
- [5] 吴力钊，王祖熊，长江中游鲢鱼天然种群的生化遗传结构及变异。水生生物学报，1997，21(2): 157—162
- [6] 陈淮杨，刘望夷。从超氧化物歧化酶的分布和结构看其分子进此。生物化学与生物物理进展，1996，23(5): 408—413
- [7] Beauchamp, C. D., et al., Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1971, 47: 276—287
- [8] 王强，沈俊宝，白鲢的同工酶研究。遗传，1991，3(3): 22—23
- [9] Nakano, E. and A. H. Whiteley, Differentiation of multiple molecular forms of four dehydrogenases in the teleost, *Oryzias Latipes*, studied by disc electrophoresis. *J. Exp. Zool.*, 1965, 159(2): 167—180
- [10] 余来宁，方耀林，宁宗德等，长江白鲢酯酶同工酶类型与生长相关性及其在原种保存中的应用。中国水产科学，1995，2(5): 8—14
- [11] 朱蓝菲，蒋一珪，银鲫种内的遗传标记及其在选种中的应用。水生生物学报，1987，11(2): 101—109
- [12] 夏德全，杨弘，吴婷婷等，天鹅洲通江型长江故道“四大家鱼”种群遗传结构研究。中国水产科学，1996，3(4): 11—18
- [13] 杨学明，李思发，长江鲢、草鱼原种—人工繁群体生长差异与生化遗传变化。中国水产科学，1996，3(4): 1—9

ISOZYME ANALYSIS AND PRELIMINARY CONFIRMATION OF THE GENETIC MARKERS IN TWO ARTIFICIAL GYNOGENETIC POPULATIONS OF SILVER CARP, *HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX*

Yang Shuting and Gui Jianfang

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract Two artificial gynogenetic populations were obtained from different broodstocks of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*, originated from two fishery farms in Wuhan. The eggs of each broodstock were inseminated with UV-irradiated sperm of red common carp (*Cyprinus carpio*) and heat shock was performed through 39°C for 1 min at 4 min after insemination for inducing diploid by inhibiting second polar body extrusion. Four isozyme zymograms, including esterase (EST), lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH) and superoxide dismutase (SOD), were analysed by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in liver, muscle and red blood cells from the two artificial population silver carps. In comparison with the popular hatchery silver carps, there were more similar isozyme zymograms among the individuals of artificial gynogenetic silver carp, and therefore, there existed higher homogeneity because of gynogenesis. Additionally, obvious difference between the gynogenetic populations and the hatchery populations was found from the isozyme zymograms. Some bands specific to the different gynogenetic populations were observed in EST isozyme zymograms in liver and muscle. Therefore, the specific bands would be suggested as the genetic markers of the two artificial gynogenetic populations of silver carp.

Key words Isozymes, Artificial gynogenesis, Genetic markers, Silver carp