

白鲢不同繁育群体中乳酸脱氢酶 (LDH) 和酯酶 (EST) 同工酶个体发生 多态性的研究*

王祖熊 刘 峰

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

本文叙述了白鲢两个繁殖群体的精子, 成熟卵, 10 个不同发育阶段的胚胎和胚后期样品中乳酸脱氢酶和酯酶同工酶电泳图谱多态性研究结果。作者把本文描述的同工酶个体发生的群体差异称作“个体发生多态性”; 这种多态性对白鲢的发育是非致死性的, 因此, 应属于一般的群体生化多态性。本文还提到了今后需进一步深入研究的有关问题及其在渔业应用方面的前景。

在动物个体发育过程中, 胚胎细胞逐渐特异化而形成复杂的多细胞个体。这种特异化不仅表现在个体形态和生理功能方面的一系列变化, 同时, 也表现出基因产物——蛋白质和酶等的一些规律性变化。已有研究表明, 个体发生的这些规律性变化是受发育遗传因子控制的^[3,9,13,19,21]。不同胚胎发育阶段所出现的特异性的同工酶, 反映了发育过程中特定组织细胞代谢活动的形成^[10,18]。因此, 通过对胚胎发育过程中同工酶的分析研究, 能使我们对同工酶基因活动与个体形态发生及其生理功能的建立之间的关系等问题得到进一步的了解。

鱼类是研究胚胎发育的理想材料。本世纪六十年代以来, 已有不少学者对鱼类胚胎发育过程中的同工酶进行了研究^[6,7,17,19,21]。但是, 对于同一种鱼的不同繁育群体之间是否存在同工酶个体发育方面的差异等问题, 尚未见正式报道。我们采用我国的主要养殖鱼类——白鲢为材料, 进行了这方面的初步研究工作。

材 料 与 方 法

取白鲢的两个繁殖群体作为分析材料, 分别用 A、B 表示。A 组繁殖亲本系我所养殖场 1984 年 5 月中旬在所本部催产, 人工授精卵于孵化桶中流水孵化; B 组亲本同期在本所关桥试验场催产孵化, 方法与 A 组相同。两处的孵化水温均在 21—24℃ 之间。各组亲

* 本文是鱼类繁育体系攻关研究课题的部分结果。

1984 年 12 月 24 日收到。

鱼发情之后,取精液及成熟卵样品;其余10个不同发育时期的胚胎以及胚后发育的样品分别于两处的孵化桶中逐次取得^[1](表1)。各组分别取3个平行样品作为对照。上述各样品均先用生理盐水洗净,随后加入二倍体积 pH 7.4 的磷酸缓冲液,用玻璃匀浆器在冰浴中匀浆。匀浆液于 4℃, 10,000 r/min., 冷冻离心 30 分钟。上清液置 -10℃ 冰箱中保存备用。雄鱼精液加入二倍体积 pH 7.4 的磷酸缓冲液, JC-2 型超声波振荡器于冰浴中破细胞 3 次,每次 3 分钟。破细胞液于 4℃, 10,000 r/min., 冷冻离心 30 分钟。取上清液于 -10℃ 冰箱中保存备用。

表 1 两组白鲢样品的编号、分期、特征和时序

Tab. 1 Number, morphological charater and time sequence of two groups (A and B) of silver carp samples

试样的组别和编号 ⁽¹⁾		试样的分期 ⁽²⁾	样品的形态特征 ⁽³⁾	距受精的时间 (时、分) ⁽⁴⁾
A	B			
1	1	未受精成熟卵	圆球形,卵质均匀分布	受精前
2	2	1 细胞期	原生质在动物极集中,出现胚盘	受精后 0.10
3	3	囊胚早期	分裂球小而多,细胞界限不明	2.30
4	4	囊胚中期	胚层比早期低,细胞界限不清	3.50
5	5	原肠中期	胚盘下包 2/3, 出现胚盾	8.50
6		眼基出现期	眼基及肌节出现	14.50
7	6	肌肉效应期	可见肌肉收缩	21.20
8	7	心脏出现期	卵黄囊上方出现心脏原基	24.10
9	8	出膜期	仔鱼初出膜,全身透明	32.10
10	9	眼色素期	眼色素出现, A 组见微循环	52.30
	10	循环期	心脏弯曲,血流清晰可见	56.15
	11	体色素出现	出现少量体色素	68.15
11		体色素期	身体各部出现较多色素	85.10

(1) Number and group of samples, (2) Developmental stages, (3) Morphological characteristics, (4) Time after fertilization (h min).

两种酶的同工酶分析均采用淀粉凝胶垂直电泳法。淀粉胶浓度为 14%。点样量每孔 15 微升。电泳缓冲系统及染色方法等均参考 Shaw and Prasad (1970) 的方法^[20]。电泳时电压梯度为 9 V/cm; 通电时间为 8—12 小时。电泳在 4℃ 条件下进行。

两种酶的电泳分析结果

(一) 乳酸脱氢酶 (LDH)

两组白鲢在个体发育过程中, LDH 同工酶变化的模式有明显差异 (图 1, 2):

1. 成熟卵的 LDH 同工酶谱不同, A 组有 4 条不同酶活性的同工酶带, 而 B 组只有 2 条活性带, 且活力相差较大。以各同工酶向阳极泳动的速率为序, A 组具有: LDH-1 LDH-2, LDH-3 和 LDH-4。而 B 组仅有 LDH-1 和 LDH-2。

2. 细胞分裂前的两组受精卵电泳谱都存在 2 条迁移率快的同工酶谱带, 但随后两组变化有所不同, A 组在 3, 4 期只剩下 LDH-1; 5 期后又出现并逐渐加强 LDH-2 的酶活

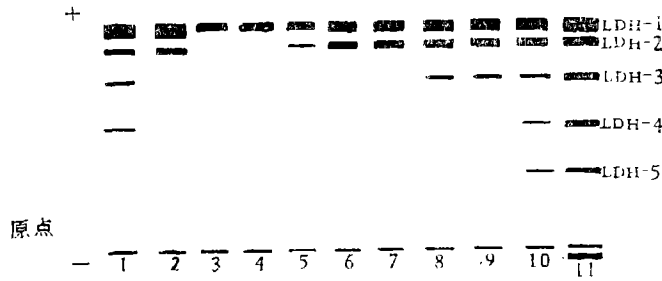


图 1 A组白鲢 LDH 同工酶个体发生电泳谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of LDH isozymic ontogenesis in group A of silver carp

图 1, 2, 4 和 5 中的 11 个发育期 (1—11) 同表 1。

The eleven developmental stages (1-11) in Figs. 1, 2, 4 and 5 are same as those shown in Tab. 1

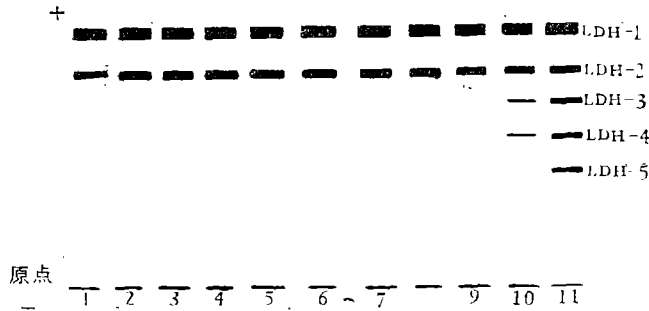


图 2 B组白鲢 LDH 同工酶个体发生电泳谱

Fig. 2 Electrophoretic patterns of LDH isozymic ontogenesis in group B of silver carp

性; 8 期后开始出现 LDH-3, 10 期出现 LDH-4; 在 11 期, 不但出现 LDH-5, 并且还出

+

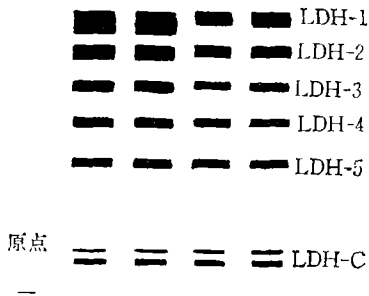


图 3 白鲢 B11 期、A11 期、A 和 B 组精液的 LDH 同工酶电泳谱(自左至右)

Fig. 3 LDH isozymic patterns in samples: B-11, A-11, A-sperm and B-sperm of silver carp (from left to right)

现 1 条趋向阴极的同工酶带 (LDH-C)。但 B 组发育至 9 期一直保持 LDH-1 和 LDH-2 条酶带; 到 10 期才开始出现活力甚微的 LDH-3 和 LDH-4 2 条酶带; 11 期出现 LDH-5, 此时, LDH-2、LDH-3 和 LDH-4 酶活力虽也有明显增加, 但未观察到 LDH-C 带的出现。

在点样量为 25 微升时 (图 3), B 11 期仔鱼样品的电泳谱中也出现 1 条极弱的阴极带, 与 A 11 期仔鱼相似。同时我们还可以看到两组白鲢精液试样的乳酸脱氢酶同工酶带都为 5 条, 但 A 组鱼的酶活力稍低, 尤其是 LDH-2、LDH-3 和 LDH-4。

(二) 酯酶 (EST) 同工酶

在两组白鲢的发育过程中,也发现酯酶同工酶变化模式不同(图4—7):

1. A组白鲢成熟卵中有 EST-2 和 EST-3 两种酯酶同工酶带,但受精后 EST-3 酶活性消失;发育至6期时又重新观察到 EST-3 的出现,同时也出现酶活力较弱的 EST-1 和 EST-4 两条同工酶带。值得注意的是,EST-1 同工酶的活力在9期(即出膜期)达到最高,随后又逐渐降低直至消失。只有 EST-2 在整个发育过程中始终存在,但在5期以后,其活力有了显著提高。

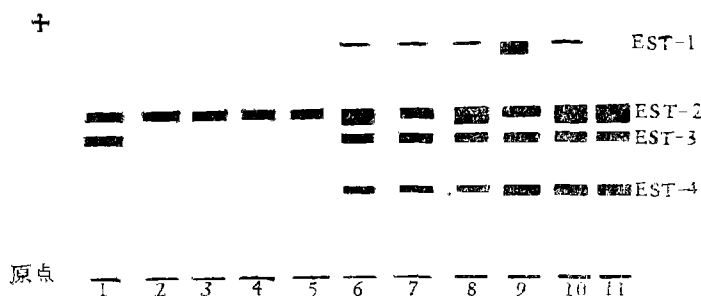


图4 A组白鲢 EST 同工酶个体发生电泳谱

Fig. 4 Electrophoretic patterns of EST isozymic ontogenesis in group A silver carp

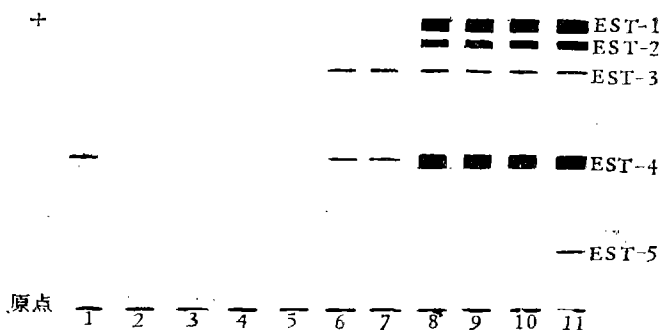


图5 B组白鲢 EST 同工酶个体发生电泳谱

Fig. 5 Electrophoretic patterns of EST isozymic ontogenesis in group B silver carp

2. B组白鲢的成熟卵电泳图谱中,只有活力很低的 EST-4 同工酶带;受精后此酶活性也消失。因此,2—5期中未检测出任何酯酶活性谱带;6,7二期也只有活力甚低的 EST-3 和 EST-4 两条酶带;8期以后,EST-1, EST-2, EST-3 和 EST-4 就一直存在,其中以 EST-1 和 EST-4 的活力较高;在11期,又出现迁移率低而活力也甚微的 EST-5

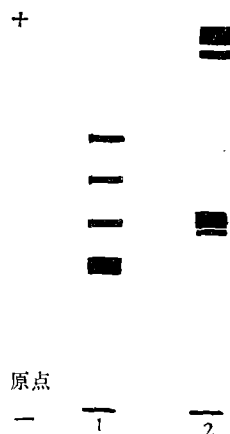


图 6 B组白鲢 10 期(1)和精液(2)的 EST 同工酶谱

Fig. 6 EST isozymic patterns in samples: B-10(1) and B-sperm (2) of silver carp

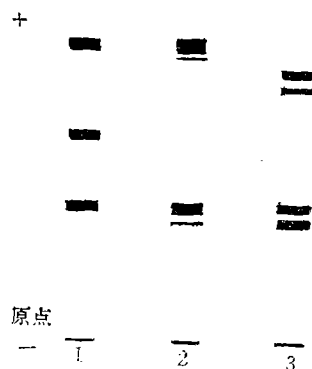


图 7 白鲢脱膜期和成体肝 EST 同工酶谱比较, A 组(1)、B 组(2)、肝(3)

Fig. 7 Comparison of EST isozymic patterns in the samples: Hatching stage of A-group fish (1) and B-group fish (2), adult liver(3) of silver carp

同工酶带。晚期白鲢胚胎中的酯酶同工酶迁移率与其雄鱼精液中的酯酶同工酶的迁移率是不同的(图 6)。

3. A 和 B 两组鱼出膜后的胚胎 EST 同工酶电泳谱与成体白鲢肝组织的 EST 同工酶谱也有差异(图 7)。

根据上述各项结果,可以肯定,白鲢的现有人工繁殖群体中存在着乳酸脱氢酶(LDH)和酯酶(EST)同工酶个体发生的多态性。

讨 论

(一) 有关 LDH 同工酶个体发生多态性

1. 白鲢 LDH 同工酶个体发生是 Ldh-A、Ldh-B 和 Ldh-C 3 个基因表达的结果,这与前人在其它硬骨鱼类中研究的结果相同^[4,6,7,9,16,17,19,21]。值得指出的是, Ldh-B 基因在白鲢整个发育过程中都处于活动状态,因此, LDH-1 同工酶担负着所谓“管家酶”的职责,是各期胚胎细胞代谢库的成员;并在两组鱼中都一样始终存在。另外,白鲢 Ldh-C 基因的产物是向阴极泳动的一条酶带,并都出现于 11 期;两组白鲢的 11 期仔鱼的外部特征分别是体色素开始出现或遍及全身,但在体内都已形成肝脏。由于 B 组 11 期的样品比 A 组早了近 17 小时(表 1),所以其肝的代谢功能也较低,反映在电泳图谱中 LDH-C 活力也较低。这项结果与前人在其它鱼类中研究 LDH-C4 同工酶的组织特异性表达的论断相符^[10,18,21]。前人对鱼类 Ldh 基因进化的研究表明, Ldh-C 基因是由 Ldh-B 基因演化来的,它的产物也不一定都向阴极泳动^[14]。此外,在高等脊椎动物精子中有人观察到 Ldh-X^[2,12],而白鲢则没有。

2. 白鲢精液破细胞样品中有 5 条 LDH 同工酶活性带,但为什么在受精后和胚胎发育早期(5 期以前)胚胎中却基本都只出现母本的 LDH 同工酶谱呢? 原因可能有三:(1)

精子入卵后,父本基因受到卵质中存在的抑制因子所抑制而无法表达。前人亦已证明在胚胎发育中亲本基因的表达是不同步的,并且母本基因总是优先被活化而表达^[8]。(2)因精卵和早期胚胎中的 LDH 同工酶是由早已存在于成熟卵中的 mRNA 翻译的产物或特定的 LDH 前体加工的产物。这一推论也是符合前人关于合子基因组一般不在原肠期以前表达的论证的^[17]。(3)受精时,由精子带入卵中的精液量是很少的,且随细胞分裂而不断稀释。因此,即使精液中也存在 5 种 LDH 同工酶或其信息体 (Informosome),也可能由于量少而不能通过电泳检出。

3. 关于 LDH 个体发生多态性产生的原因上文已经提到二组白鲢父本精液中的 LDH 同工酶谱没有差异,而在二组白鲢母本的成熟卵(即样品 1)中 LDH 同工酶谱却不相同。因此,在二组白鲢中产生 LDH 同工酶个体发生多态性的主要因素。可能是由于二组白鲢卵子成熟过程中,LDH 同工酶代谢速率上存在着差异。具体地说,B 组白鲢的成熟卵可能对 Ldh-A 基因的产物(A 肽)具有较高的降解速率,因此,在受精卵及其早期发育的胚胎样品(1—8 期)中,难以检出要求有较多 A 肽才能组成的 LDH-2、LDH-3 和 LDH-4 同工酶类。此外,由于母本基因优先活化表达等原因,使 B 组白鲢胚胎直到第 9 期仍和成熟卵的谱式相同。至于 10 期后又逐渐出现其它几种 LDH 同工酶的原因,可以考虑,从第 9 期起,心脏和肝脏等重要生命器官的组织分化作用都已随着形态发生刺激 (Morphogenetic stimulus) 而逐步完善,导致了这些特化器官中专一性细胞生理学功能的逐步建立和完善。

(二) 有关 EST 同工酶个体发生多态性

1. 关于 EST 同工酶的分类和发育重要性。

酯酶是一个复杂的“大家族”,它们的分类不仅要看它们的底物专一性程度和电泳迁移率,而且还应从它们对温度、抑制剂的敏感性、分子量的大小等方面进行考察。A 组鱼的 EST 同工酶个体发生过程中,EST-2 同工酶是经常存在的。有人认为,这类酶的作用是执行一般的代谢功能,如降解卵黄颗粒等,而和胚胎的特化作用无关^[17]。在 B 组鱼的受精卵以及 5 期以前的胚胎样品中都未检测到酯酶活性,所以我们认为,酯酶对早期胚胎发育可能不是必需的。而从在两组鱼的出膜期均有较多 EST 同工酶表达的情况看,它们似有可能和仔鱼的脱膜有关。从图 7 可以看出,上述两组白鲢出膜期酯酶与成体肝脏中酯酶电泳迁移率不同,进一步说明了在白鲢胚胎出膜期存在着酯酶的特异性作用。但它们是否属于鱼类孵化酶的成员,还待进一步实验证实。此外,也观察到两组 10 期仔鱼样品中酯酶与精液样品中酯酶不同(图 6),说明二者功能上也可能存在着差异,前者可能与该期细胞分化作用有关,而后者可能与精子入卵的功能有关。

2. 关于 EST 同工酶个体发生多态性产生的影响和原因

酯酶属于水解酶类,在酯代谢和生物膜的结构与功能方面发挥作用。因此,它们的个体发生多态性应与建立各种细胞生理学专一性的模式和相对速率有关。目前,我们知道,这种酶的个体发生多态性不会影响白鲢的胚胎与胚后发育;但是否会影响幼鱼生长和发育成熟的速率与程度等,均应是今后继续深入研究的课题。至于这种多态性产生的原因,应与上述 LDH 多态性的产生相似,主要由基因表达调控方面差异造成的,是与形态

发生和细胞功能分化过程的差异密切相关的。

最后,应当指出,这类同工酶个体发生多态性是一般的生化多态现象,对胚胎发育无害,很可能是特定的形态和生理学适应性的分子生物学基础。在这方面开展广泛深入的研究是必要的。这种研究结果可以作为有效地指导渔业开发利用的实用生化指标;将这类指标与鱼类的生产性能结合起来考察研究,也可成为选种育种的有效手段。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院实验生物研究所发生生理研究室, 1962。白鲢的胚胎发育。家鱼人工繁殖的研究。125—136页。科学出版社。
- [2] Blanco, A. and W. H. Zinkham, 1963. Lactate dehydrogenase in human testes. *Science*, 139: 601—602.
- [3] Claycomb, W. C. and C. A. Villee, 1971. Lactate dehydrogenase of *Xenopus laevis*: factors affecting their appearance during development. *Develop. Biol.*, 24: 413—427.
- [4] Frankel, J. S. and N. H. Hart, 1977. Lactate dehydrogenase ontogeny in the genus *Brachydanio* (Cyprinidae). *J. Heredity*, 68: 81—86.
- [5] Goldberg, E., 1963. Lactic and Malic dehydrogenases in human spermatozoa. *Science*, 139: 602—603.
- [6] Goldberg, E., Cucrier J. P. and J. C. Ward, 1969. Lactate dehydrogenase ontogeny, parental gene activation, and tetramer assembly in embryos of brook trout, lake trout, and their hybrids. *Biochem. Genet.*, 2: 335—350.
- [7] Hart, N. H. and M. Cook, 1977. Esterase isozyme patterns in developing embryos of *Brachydanio rerio* (Zebra danio), *Brachydanio abolineatus* (pearl danio), and their hybrids. *J. Exp. Zool.*, 199 (1): 109—127.
- [8] Hitzeroth, H., Klose, J., Ohno, S. and U. Wolf, 1968. Asynchronous activation of parental alleles at the tissue specific gene loci observed on hybrid trout during early development. *Biochem. Genet.*, 1: 287—300.
- [9] Holmes, R. S. and G. S. Whitt, 1970. Developmental genetics of the esterase isozymes of *Fundulus heteroclitus*. *Biochem. Genet.*, 4: 471—480.
- [10] Kepes, K. L. and G. S. Whitt, 1972. Specific lactate dehydrogenase gene function in the differentiated liver of cyprinid fish, *Genetics*, 71: S29 (Abstr.).
- [11] Lush, I. E., 1970. Lactate dehydrogenase isozymes and their genetic variation in coalfish (*Gadus viridis*) and cod (*Gadus morrhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 32: 23—32.
- [12] Mann, T., 1954. Biochemistry of semen. pp. 46—53, 154—159. Wiley, New York.
- [13] Markert, C. L. and H. Ursprung, 1962 The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. *Develop. Biol.*, 5: 363—381.
- [14] Markert, C. L., Shaklee, J. B. and G. S. Whitt, 1975. Evolution of a gene. *Science*, 189: 102—114.
- [15] Nakano, E. and A. H. Whitely, 1965. Differentiation of multiple molecular forms of four dehydrogenases in the teleost, *Oryzias latipes*, studied by disk electrophoresis. *J. Exp. Zool.*, 159(2): 167—180.
- [16] Numachi, K., 1972. Genetic control and subunit composition of lactate dehydrogenase in *Pseudorasbora parva*. *Japan. J. Genet.*, 47: 193—201.
- [17] Phillip, D. P. and G. S. Whitt, 1977. Patterns of gene expression during teleost embryogenesis: LDH isozyme ontogeny in the Medaka (*Oryzias latipes*). *Develop. Biol.*, 59: 183—197.
- [18] Shaklee, J. B., Kepes, K. L. and G. S. Whitt, 1973. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: The molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDH's of teleost fishes. *J. Exp. Zool.*, 185: 217—240.
- [19] Shaklee, J. B., Champion, M. J. and G. S. Whitt, 1974. Developmental genetics of teleosts: A biochemical analysis of the lake chubsucker ontogeny. *Develop. Biol.*, 38: 356—382.
- [20] Shaw, C. K. and R. Prasad, 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4: 297—320.
- [21] Whitt, G. S., 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.*, 175: 1—35.

STUDY ON THE ONTOGENETIC POLYMORPHISM OF
LACTATE DEHYDROGENASE AND ESTERASE
ISOZYMES IN DIFFERENT BREEDING
POPULATIONS OF SILVER CARP
(*HYPOPHthalmichthys*
MOLITRIX)

Wang Zuxiong and Liu Feng

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

The results of polymorphic study on the electrophoretic patterns of lactate dehydrogenase and esterase isozymes in the sperms, mature eggs, ten embryonic and postembryonic samples taken from two breeding populations of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) are given in this paper. On molecular biological basis of the polymorphism, we discuss the regulation of gene expression, the morphogenetic stimulus, and the mode and relative metabolic rate for establishing special cytophysiological functions. In short, the general developmental genetic rule of this fish are the same as other teleost fishes studied previously. We designate these population differences of isozymic ontogenesis as "ontogenetic polymorphism" which is not vital to the development of silver carp, so that it belongs to a kind of common biochemical polymorphism. In this essay, the related problems ought to be further studied and their prospects for fishery use are also mentioned.

Key words Isozymes, Ontogenetic polymorphism, Morphogenetic stimulus, Gene expression, Cytophysiological function, Silver carp