

两种泥鳅不同核质关系下 LDH 同工酶 基因表达的研究

赵振山¹ 吴清江² 熊传喜¹ 和法德¹ 高贵琴¹ 罗宇良¹

(1. 华中农业大学淡水增养殖生物学农业部重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 采用聚丙烯酰胺不连续系统凝胶电泳方法分析了泥鳅和大鳞副泥鳅不同杂交组合不同核质关系下胚胎发育阶段(0—145h)中乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的分化表达谱式, LDH同工酶的基因表达随细胞质、细胞核不同及胚胎发育各个时期具有不同的个体发育谱式。以泥鳅卵子为细胞质的I、II两组, 杂交组(II)LDH同工酶基因在受精后 3min 至原肠中期雄核基因参与表达与调控, 部分基因位点比本交组(I)启动与表达的时间要早, 两组的管家酶主要来自细胞质。以大鳞副泥鳅为细胞质的III、IV两组, 各酶均以细胞质调控为主, 其管家酶与泥鳅有很大不同。并具体分析和讨论了不同核质关系下 LDH同工酶基因的表达和调控的时空顺序。

关键词: 泥鳅; 大鳞副泥鳅; 不同核质关系; LDH同工酶; 基因表达

中图分类号: S966.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)02-0167-07

在鱼类单性发育的研究中, 人们常采用同种或异种精子或卵子进行雌核发育或雄核发育的诱导, 在雌核发育的人工诱导过程中, 精子可以来自种内、属内、属间、亚科间甚至科间的鱼类, 而且诱导率无显著差异。但在雄核发育过程中, 卵子雌核失活后, 不提供遗传物质, 但可为雄核的正常发育提供必要的细胞质环境, 这就存在着细胞核和细胞质能否配合、是否相融的问题, 细胞质不仅是起培养基或载体的作用, 还参与细胞有丝分裂过程中各种蛋白及遗传物质的代谢。事实上, 在亲缘关系较远的鱼类中, 其杂交也会出现一系列的问题。以泥鳅(♀)×大鳞副泥鳅(♂)为材料, 成功地诱导出 61.1% 的雄核发育大鳞副泥鳅^[1], 亲缘关系更远的鱼类是否可以诱导, 核质关系能否配合协同、细胞质和细胞核在早期发育过程中的作用等问题仍需要解决。本实验通过 4 尾鱼的 4 种组合得到了 4 种不同核质下发育的泥鳅、大鳞副泥鳅及其正反杂交种, 以探讨不同核质关系下乳酸脱氢酶(LDH)基因的表达和调控情况。

1 材料与方法

1.1 材料来源及样品制备 从武汉野芷湖区捕捞的泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)

收稿日期: 1999-12-18; 修订日期: 2000-04-25

基金项目: 国家自然科学基金(No. 39770592); 湖北省自然科学基金资助项目

作者简介: 赵振山(1963—), 男, 河南省辉县人; 副教授; 主要从事鱼类养殖和遗传育种研究

Cantor)和大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus* Sauvage)成鱼,选择性成熟的两种亲鱼雌雄各一,共4尾,HCG催产,剂量为雌鱼800—1000IU/尾,雄鱼减半,亲本及其交配组合见表1。

表1 泥鳅、大鳞副泥鳅亲本及其子代组合

Tab.1 Combinations of parents *M. anguillicaudatus* and *P. dabryanus* and their offspring

子代编号 Offspring	亲 本 Parents	备 注 Note
I	泥鳅♀×泥鳅♂	I、II细胞质相同,细胞核不同
II	泥鳅♀×大鳞副泥鳅♂	III、IV细胞质相同,细胞核不同
III	大鳞副泥鳅♀×大鳞副泥鳅♂	II、IV细胞核相同,细胞质不同
IV	大鳞副泥鳅♀×泥鳅♂	I、III细胞核、细胞质均不同

表2 4个组合早期发育时序及主要形态特征(水温24℃)

Tab.2 Time schedule and major morphological features of samples taken from the early development of the four combinations

样品组别及编号 Sample group and No.	发育时期 Developmental stage	受精后时间(时:分) Post-fertilization time (h:min)	主要形态特征 Major morphological characteristics
I II III IV			
0	未受精卵	0	注:0 ₁ 为泥鳅 0 ₂ 为大鳞副泥鳅
1	受精后3min	0:03	卵吸水,卵膜出现间隙
2	囊胚晚期	7:00	细胞极小,囊胚层低偏
3	原肠中期	8:30	胚层下包3/6—4/6
4	眼基出现期	13:30	胚体增厚,出现管长形的眼基
5	尾芽期	16:30	尾芽突出
6	孵出期	29:30	约1/2苗出膜
7	鳔雏形期	63:00	鳔雏形,外鳔丝伸长
8	鳔一室期	145:00	鳔充气一室,能够平游

经人工授精的卵盛入直径为15cm的培养皿中,每个培养皿约有3—5千粒受精卵,控温24℃孵化,每隔3h换水一次,并注意随时除去死卵,以不影响其他胚胎的正常发育。胚胎发育的形态变化在解剖镜下观察并记录,以便与已报道的泥鳅和大鳞副泥鳅正常发育阶段相对照^[2,3]。在卵受精3min至鱼苗平游期过程中共取样8批(表2),得到四组8批样品,每组每批约100粒卵或100尾鱼苗,同时取未受精卵作对照。将所得样品研磨,按1:10(W/V)的比例加入20%蔗糖溶液,在4℃下高速冷冻离心机13000r/min,离心30min,避开油层,取出上清液,置冰箱冷藏备用。

1.2 电泳及染色 采用聚丙烯酰胺不连续系统凝胶双面垂直板状(200×200×1.5mm³)电泳法,所用分离胶和浓缩胶的浓度均为5%,凝胶制备参见生化实验方法和技术^[4],电极缓冲液为pH8.3的Tris-甘氨酸缓冲系统。加样量为30—55μL/槽,电泳在4℃左右冰箱内进行,起始电流为10mA/板,待样品进入分离胶后,电流增至20mA/板,待指示剂出胶后

继续走 5h, 停止电泳。染色按 Shew 和 Prasad^[5] 方法, 染色后的凝胶板用 7% 的醋酸固定。

2 结果

I、II 组均以同一尾泥鳅为母本。其中 I 为泥鳅本交, II 为该泥鳅(♀)与另一尾大鳞副泥鳅(♂)杂交。其细胞质一致, 细胞核中基因组不同。I、II 两组的 LDH 同工酶电泳后酶带分布见图 1。

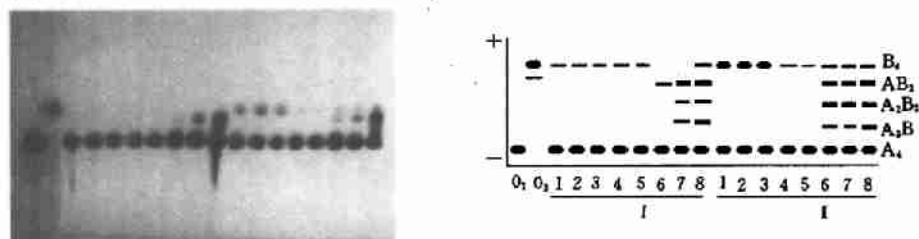


图 1 I 组和 II 组 F₁ 早期发育阶段 LDH 同工酶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of LDH isozymes expressed in the early development stage of group I and group II

由图 1 可见, 未受精卵(0₁)中只有 *Ldh-A* 基因表达, 呈现一条 A₄ 带, I 组中, 从受精后 3min 至尾芽出现期(1—5)有 A₄ 和 B₄ 两条酶带表达, 但 B₄ 酶带一直较弱, 出膜期和鳃雏形期 LDH-B₄ 带不表达, 而出膜期 AB₃ 带开始出现, 鳃雏形期还有 A₂B₂、A₃B 带出现, 加上原有的 AB₃ 和 A₄ 两条酶带共 4 条酶带, 鳃一室期时, B₄ 酶带重新出现, 使该期共形成 5 条酶带, 其中以 A₄ 带着色最深, 活性最强, AB₃ 带次之, B₄ 带最弱。II 组中 *Ldh-A* 和 *Ldh-B* 基因所决定的 A、B 亚基均参与表达, 其中 A₄ 同聚体酶带在各期中均较强表达。B₄ 酶带在受精后 3min 具有较强活性, 囊胚晚期和原肠中期也同样活性较强, 这种表达方式显然与父本的影响有关, 眼基出现期(4)和尾芽期(5)则呈现为弱带, 从孵出期开始, 由 LDH-A 和 LDH-B 亚基聚合而成的 A₄、A₃B、A₂B₂、AB₃、B₄ 5 条酶带均表达, 其中以 A₄ 最强, AB₃ 次之。A₄ 酶带是未受精卵和 I、II 两组受精后各期共有的酶带, 是以泥鳅为母本的受精卵和鱼苗发育过程中的管家酶(Housekeeping enzyme)。*Ldh-C* 基因在各期中均未被激活。

图 2 的 III、IV 组均以同一尾大鳞副泥鳅为母本, 细胞质相同, 其中 III 组为本交与 II 组为同一父本, IV 组为杂交, 与 I 组的雄性泥鳅为同一父本。III 组未受精卵(0₂)中, *Ldh-A*、*Ldh-B* 基因均具活性, 呈现 B₄ 和 AB₃ 两条酶带, 受精后 3min 至尾芽期(1—5)均以 B₄ 和 AB₃ 两条酶带具有表达活性, 孵出期(6)时, A₄ 被激活, 而且 AB₃ 活性增强, 鳃雏形期(7)和鳃一室期(8)与孵出期酶谱相同。IV 组中, 受精后 3min 和囊胚晚期除未受精卵中原有的 B₄、AB₃ 具活性外, A₄ 被微弱激活, 而原肠中期(3)至孵出期(6)时, 该酶活性消失, 鳃雏形期(7)和鳃一室期由 *Ldh-A* 和 *Ldh-B* 基因所编码的 A、B 亚基聚合而成的 5 条 LDH 同工酶带均具染色活性。以大鳞副泥鳅为母本的 III、IV 组, 管家酶均来自母本的细胞质, 为 B₄ 和 AB₃ 两条酶带, 其中以 B₄ 活性最强, 各发育阶段均未见 *Ldh-C* 基因所编码的酶带出现。

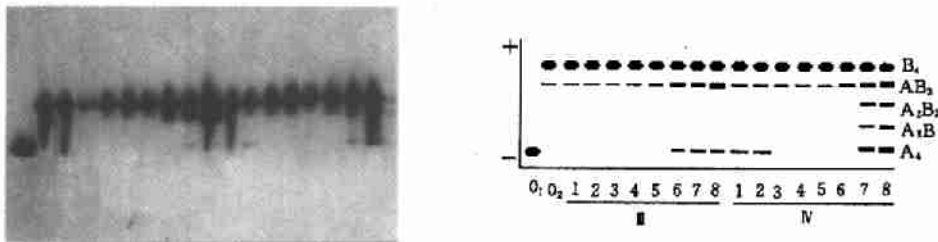


图2 III组和IV组F₁早期发育阶段LDH同工酶电泳图谱

Fig.2 Electrophoretogram of LDH isozymes expressed in the early development stage of group III and group IV

和大多数硬骨鱼类一样,泥鳅和大鳞副泥鳅的LDH同工酶也为四聚体。在鳃一室期之前由两个基因座位 *Ldh*-A、*Ldh*-B 所编码,并未见到 *Ldh*-C 基因编码的酶带出现。

3 讨论

3.1 细胞质相同细胞核不同时 LDH 同工酶基因表达与调控模式

3.1.1 泥鳅卵提供细胞质、核不同 I、II 两组均为同一尾泥鳅卵细胞质,细胞核不同,其遗传物质分别为 I 组染色体数为 $2n=100$, II 组为 $2n=74$ (泥鳅 $2n=100$,大鳞副泥鳅 $2n=48$ ^[6]),那么 I、II 两组鱼的细胞核中遗传物质有 1/2 不同,即雄核不同,这就导致了其同工酶基因表达和调控在时空和顺序上出现差异。

I、II 两组中的共同点是:*Ldh*-A、-B 基因在整个胚胎发育过程中均参与同工酶的代谢调控;*Ldh*-C 基因在鳃一室期之前未表达。LDH-A 亚基占优势,无论是未受精卵和胚胎及胚后发育中均以 A₄ 占绝对优势,为管家酶,这一酶带明显来自卵细胞,当属细胞质调控,这与鲢、鳙等鱼类早期胚胎发育过程中 B 亚基占优势正好相反^[7,8],而与两种黑鲈属鱼类:大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)和小口黑鲈(*M. delomieu*)早期胚胎发育过程中 LDH 同工酶的管家酶相似^[9]。其差异在于: I 组中 B₄ 酶带在孵出期(6)和鳃雏形期(7)活性消失,其他各期均具活性,但较弱;而 II 组中受精后各期的 B₄ 酶带均具活性,而且受精后 3min 至原肠中期(1—3),该酶带活性明显比 I 组同期要强得多,显然是异源精核同工酶基因作用的结果,这符合有关父母本基因在杂种胚胎中均表达的模式^[10]。尽管 I、II 两组细胞质相同,但 II 组中杂种胚胎发育的 *Ldh*-A、-B 基因所编码的 B₄ 酶带在孵出期和鳃雏形期(6—7)以及 A₂B₂、A₃B 酶带在孵出期比 I 组中提前表达,而且活性也比 I 组中要强。

3.1.2 大鳞副泥鳅卵提供细胞质、核不同 以大鳞副泥鳅卵子为细胞质的 III、IV 组,其 LDH 同工酶基因表达都以细胞质为主要调控,是父本基因受抑制的同工酶基因表达模式,此现象可能是因母本卵质中的调控因子不能识别父本基因的调控元件或是不能有效地与这些元件发生作用^[11]。

3.2 细胞核相同,细胞质不同时,同工酶基因表达与调控模式

II、IV 组中,其核均为泥鳅和大鳞副泥鳅组合, $2n=74$ ^[11],两组比较其 LDH 同工酶基因表达并未出现较多的相似性。

3.3 泥鳅和大鳞副泥鳅“管家酶”与环境特性的关系

以泥鳅卵质而形成的 I、II 两个组,其管家酶 LDH 为 A_4 ,以大鳞副泥鳅卵质而形成的 III、IV 组,其管家酶 LDH 为 B_4 ,两组鱼之所以出现如此较大的差别,可能主要是生理原因造成的,在众多的研究中发现, $Ldh - A$ 基因在主行厌氧代谢的肌肉组织中优势表达,而 $Ldh - B$ 基因在供氧充足的心肌中优势表达,这不仅使人联想到两种鱼的生活环境,泥鳅栖息于浅水湖塘、水田、沼泽中,其胚胎和成鱼的环境条件恶劣,氧气较少^[2],因此,以 $Ldh - A$ 基因表达 A_4 为管家酶似乎与组织中主行厌氧代谢占优势相一致,而大鳞副泥鳅生活在氧气较好的江河湖泊,其管家酶以 $Ldh - B$ 基因为主调控基因, B_4 为管家酶,也与其生活环境条件相一致。这种管家酶与生活环境和生理条件的相互协同,在其他鱼类中是否具有普遍现象,有待于进一步探讨。

3.4 两种鱼细胞核和细胞质的协同性

从两种泥鳅卵子为细胞质的 LDH 同工酶表达方式发现,LDH 同工酶基因在以泥鳅为细胞质时表达相对复杂,而且杂合体中的雄核基因均参与表达。而相反,以大鳞副泥鳅为细胞质时,雄核基因很难表达并呈现活性。这是否意味着与其中的基因组大小有关呢?是否在杂合体中小的基因组难以表达和识别大的基因组中的基因位点呢?

众所周知,泥鳅为天然四倍体(武汉地区),其染色体数 $2n = 100$ ^[6],染色体中的基因位点要多,而且重复基因较多。据桂建芳等^[12]研究鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎发育差异的细胞遗传学结果来看,鱼类远缘杂交的亲性和除与双亲间核型有关外,还与亲本种间基因组大小密切相关。天然多倍体物种由于基因的加倍与重复,因而其协调外来基因组参与发育的能力也较强。本研究中泥鳅为天然四倍体,其协调大鳞副泥鳅基因的能力也较强,说明来自雄核的大鳞副泥鳅基因均可与细胞质中相应的同工酶或雌核基因相适应,并协同表达,因此其 LDH 同工酶表现出杂合体雄核基因参与表达的酶谱。相反,天然二倍体大鳞副泥鳅为母本的杂交组合中,由于基因组较小的雌核和细胞质难以识别外来泥鳅雄核基因,使来自雄核的同工酶基因难以参与表达,因此呈现出与本交极为相似的酶谱。桂建芳等^[12]以鲢等基因组较小的物种为母本与鲤、鲫、白鲫进行杂交时,基因组较小的雌核和卵质难以协调外来的基因组较大的雄核进行正常卵裂。从同工酶基因表达与调控上看,二者具有相似之处。

许桂珍等^[13]在研究鳙团移核鱼 LDH、MDH 同工酶时指出,核、质间相互作用的模式,可能是早期发育细胞质起主要作用,细胞核发生一定影响,以后随着鱼的不断发育,细胞质的作用不断降低和减弱,核的作用不断提高和增强。后期发育和生长,细胞核起主导作用,决定着性状发育的方向,但细胞质仍有一定影响。在性状中,核与质相互作用、相互制约、相互影响,共同决定着性状的发育。

由上述分析可知,细胞质在鱼类早期胚胎发育同工酶基因表达与调控过程中发挥着重要作用。而且管家酶均来自母本的细胞质中,远缘杂交的胚胎发育过程中存在着核质关系相融性问题,亲缘关系越远,其核质的协同性越差^[14,15],基因组较大的母本雌核或细胞质协调外来基因的能力要强,而且亲缘较近鱼类,其核质协调能力要强于亲缘关系较远的物种间杂交。提示在鱼类雄核发育的诱导过程中,选择近缘种基因组较大的鱼提供卵子的细胞质,其诱导成功的几率可能要高一些,鱼类雄核发育的细胞质绝不是仅提供营

养或只起载体作用,而且参与胚胎发育过程中同工酶基因的表达与调控,参与蛋白质合成与代谢,参与糖、脂肪和能量以及胚胎发育过程中所有与物质代谢有关的活动。这就要求在鱼类雄核发育诱导过程中,不仅要选择合适的组合并采取最恰当的方法和手段灭活雌核和极体,而且要保持细胞质功能的完整,这可能是鱼类雄核发育成功的关键技术之一。

参考文献:

- [1] 赵振山,吴清江. 人工诱导大鳞副泥鳅雄核发育二倍体克隆鱼的产生[J]. 遗传学报, 1998,25(5):416—421
- [2] 梁秋棠,梁坚勇,陈朝,等. 大鳞副泥鳅的胚胎发育及鱼种培养[J]. 水生生物学报, 1988,12(1):27—41
- [3] 郑文彪,泥鳅胚胎和幼鱼发育的研究[J]. 水产学报, 1985,9(1):37—47
- [4] 张龙翔,张庭芳,李合媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1981,94—111
- [5] Shaw C R, Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes[J]. *Biochem. Genet.*, 1970, 4:291—320
- [6] 李康,李渝成,周瞰. 两种泥鳅染色体组型的比较研究[J]. 动物学研究. 1983,4(1):75—80
- [7] 吴力钊,王祖熊. 白鲢发育过程中同工酶基因的表达与调控研究[J]. 水生生物学报. 1997,21(1):49—58
- [8] 吴力钊,王祖熊. 鳊鱼同工酶发育遗传学研究[J]. 水生生物学报. 1992,16(1):8—17
- [9] Philipp D P. Evolution of pattern of differential gene expression: a comparison of the temporal and spatial patterns of isozyme locus expression in two closely related fish species (Northern largemouth bass, *Micropterus salmoides*, and smallmouth bass, *Micropterus dolomieu*)[J]. *J. Exp. Zool.*, 1979, 210:473—488
- [10] Pontier P J, Hart N H. Creatine kinase gene expression during the development of *Brachydanio* [J]. *J. Exp. Zool.*, 1979, 209:283—296
- [11] Whitt G S, et al. Allelic expression at enzyme loci in an intertribal hybrid sunfish[J]. *J. Hered.* 1973, 64:55—61
- [12] 桂建芳、梁绍昌、朱蓝菲,等. 鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎发育差异的细胞遗传学分析[J]. 动物学研究. 1993,14(2):171—177
- [13] 许桂珍. 鳊移核鱼 LDH、MDH 同工酶的研究[J]. 生物技术, 1995,5(4):30—33
- [14] 叶玉珍,吴清江,陈荣德. 草鱼和鲤杂交的细胞学研究—鱼类远缘杂交核质不同步现象[J]. 水生生物学报. 1989,13(3):234—239
- [15] 王祖熊,张锦霞,靳光琴. 鱼类杂交不亲和性的研究[J]. 水生生物学报, 1986,10(2):171—179

THE EXPRESSION OF LDH ISOZYMIC GENES IN MISGURNUS
ANGUILLICAUDATUS AND PARAMISGURNUS DABRYANUS
UNDER DIFFERENT RELATIONS BETWEEN
NUCLEUS AND CYTOPLASM

ZHAO Zhen-shan¹, WU Qing-jiang², XIONG Chuan-xi¹,
HE Fa-de², GAO Gui-qin¹ and LUO Yu-liang¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquaculture and Enhancement Biology, Ministry of Agriculture,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430072; 2. Institute of Hydrobiology, The Chinese
Academy of Sciences Wuhan 430072)

Abstract: The expression patterns and regulations of LDH isozymic system are investigated in the early developmental stages [from unfertilized eggs to the one chamber air bladder stage (0–145h)] in different combinations between nucleus and cytoplasm of *M. anguillicaudatus* and *P. dabryanus*. Isozymes are resolved by polyacrylamide gel electrophoresis and then detected by using specific histochemical staining. The expression patterns and regulations of LDH isozymic systems are different in the different combinations of nucleus and cytoplasm. Group I and II had the same cytoplasm of *M. anguillicaudatus*, and the male nucleus genes of LDH are expressed in hybridization group (II) from 3min of post-fertilization to mid gastrula stage. However their gene products in inbreeding group (I) are not expressed. Some of the isozymic genes in hybridization group are expressed earlier than in inbreeding group. The house keeping enzymes of group I and II are from cytoplasm. Group III and IV have the same cytoplasm of *P. dabryanus*, the LDH isozymic genes are expressed and regulated by cytoplasm, their house keeping enzymes are very different from those of *M. anguillicaudatus*. The temporal and spatial expressions and regulations of LDH genes in different combinations between nucleus and cytoplasm are discussed.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*; Different relations between nucleus and cytoplasm; LDH; Isozymic gene expression and regulation