

几种鲤科鱼类及杂种的乳酸脱氢酶同工酶的比较*

朱 蓝 菲

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,分析了14种鲤科鱼类和4个杂交种的肌肉、心脏、晶状体、脑和肾脏的乳酸脱氢酶(LDH)同工酶。根据LDH酶谱的异同可将雅罗鱼亚科的5种鱼分成两组:草鱼、鲢和鳙;青鱼和赤眼鳟。鳊亚科中青梢红鲌的LDH谱形与长春鳊、团头鲂和红鳍鲌相似,而与鲮条有明显的区别。鲢亚科中的鲢与鳊的谱形相似。密鲮亚科中的细鳞斜颌鲷与黄尾密鲮的谱形也非常相似。将谱形相似的鱼类进行杂交,如细鳞斜颌鲷♀×黄尾密鲮♂、鲢♀×鲢♂,不仅杂种的成活率高而且可繁殖后代。谱形相差很大的鱼类进行杂交,如草鱼♀×团头鲂♂及草鱼♀×鲢♂,杂种的成活率都很低。这些结果和酶谱所显示的关系是一致的。

多年来不少作者曾采用不同的方法对鲤科鱼类的亲缘关系进行了研究,其中包括用形态比较、染色体组型、细胞中DNA的含量、杂交实验和免疫学方法等。随着电泳技术的不断改进,同工酶作为基因的表达产物,可反映出不同生物的不同基因位点的结构,所以同工酶分析用于鱼类种群遗传和进化方面的研究日益增多。Markert等^[5]研究了13个科中的30种鱼的LDH同工酶,发现不同的鱼类具有不同的酶谱,在两个基因的控制下,形成了由1条、2条、3条或5条区带所组成的不同谱形。Lush等^[4]用LDH酶谱讨论了鲈亚目中3个科的12种鱼的亲缘关系。以鲤科鱼类为材料的生化遗传方面的研究还不多。随着分类学的发展和遗传育种工作的需要,除了形态解剖方面的资料,还需积累一定的生化资料。为此我们对14种鲤科鱼类的LDH同工酶进行了比较,结合杂交试验的结果,探讨了它们的亲缘关系。

材 料 和 方 法

实验鱼取自本所养殖试验场和武汉东湖。将活鱼解剖,取出脑、心脏、肌肉、肾脏和晶状体等,用滤纸吸除血迹后将组织块剪碎,放入组织匀浆器中。按组织块的重量加10—20倍的蒸馏水,反复进行匀浆。匀浆液在冰水浴中放置1小时后离心20分钟(10,000g),取上清液在-10℃左右的条件下保存备用。

* 本项工作是在白国栋同志的指导下进行的;总结工作时王祖熊同志提了宝贵的意见;何楚华同志为本文拍摄了部分照片;黄尾密鲮和细鳞斜颌鲷及其杂交子代的实验鱼是由本室的引种驯化组提供的。作者特此一并致谢。1980年10月20日收到。

聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Davis^[2] 介绍的方法进行。丙烯酰胺和双丙烯酰胺都经过纯化。凝胶在 25℃ 恒温聚合, 胶的浓度为 5.6%。电泳时电压保持在 360 伏, 每支电泳管的电流不超过 2 毫安, 通电约一个半小时。电泳在冰箱中进行, 以便防止凝胶温度过高。

LDH 同工酶的显色是用硝基四氮唑蓝法。我们参考了 Gabriel (1971)^[3] 和 Schrauwen (1966)^[6] 的方法, 并进行了一些修改, 具体作法如下: 取乳酸钠(70—80%) 1.4 毫升、氯化硝基四氮唑蓝 40 毫克、0.25 M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (pH 7.5) 15 毫升和 0.1 M 氯化钠 5 毫升, 用蒸馏水稀释到 100 毫升配制成溶液 I; 取 10 毫克吩嗪二甲酯硫酸盐溶解于 10 毫升蒸馏水中成为溶液 II。显色前取溶液 I 10 毫升、溶液 II 0.2 毫升和辅酶 I 5 毫克配成混合液。电泳后将凝胶取出, 放入蒸馏水中漂洗后立即浸入混合染液中进行显色。最后, 将凝胶保存在 2.5% 的醋酸溶液中。

结 果

脊椎动物的 LDH 同工酶一般是由两个基因编码的亚基 A 和 B 构成。亚基 A 和 B 通过异聚和同聚形成 5 种同工酶 (A₄、A₃B、A₂B₂、AB₃ 和 B₄ 5 条区带)。鱼类的 LDH 同工酶最少有 3 个基因编码, 其中 A、B 基因所编码的酶出现在鱼类的多种组织中, 第三个基因所编码的酶在鲤形目中只存在于肝脏中^[7,9]。由于鱼类 A、B 亚基之间亲和力的大小不同, 因而出现了不同数目的同工酶^[9]。在没有出现种内变异的情况下, 同一种鱼的不同组织中, 由于基因的表达方式不同, 因而在各组织中显现出不同的酶活性, 致使某些组织中的酶谱反映很不完全 (图版 I:1—2)。为了获得每种鱼类的完整图谱, 同时进行几种组织中的酶谱分析是很必要的。

1. 同亚科不同属的 LDH 同工酶

雅罗鱼亚科 (Leuciscinae): 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 的 LDH 同工酶谱是由 5 条区带所组成, 区带的间隔很宽 (图版 I:1)。谱形与草鱼相似的还有鳊 (*Elopichthys bambusa*) 和鲮 (*Ochetobius elongatus*), 这 3 种鱼中相应的同工酶区带的迁移率相同, 而活性强弱有别。青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 的 LDH 酶谱也是由 5 条区带组成, 但区带的间隔比草鱼窄 (图版 I:2)。与青鱼的谱形相似的还有赤眼鲮 (*Squaliobarbus curriculus*)。将这 5 种鱼晶状体中的 LDH 同工酶谱进行比较, 可以看出, 由于构成酶蛋白的 A 亚基有区别, 因而形成了两类不同的谱形; 但也有共同的地方, 即朝向阳极的 B₄ 区带都有相同的迁移率 (图版 I:3)。

鲮亚科 (Abramidinae): 青梢红鲮 (*Erythroculter dabryi*) 的 LDH 同工酶谱也是由 5 条区带组成, 但较之青鱼, 其排列更紧密 (图版 I:4)。团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)、长春鲂 (*Parabramis pekinensis*) 和红鳍鲂 (*Culter erythropterus*) 的酶谱同青梢红鲮相似。鲮条 (*Hemiculter leucisculus*) 的酶谱仅由 3 条区带组成 (图版 I:5)。将这 5 种鱼类晶状体中的酶谱加以比较, 可以看出, 朝向阳极的 B₄ 区带具有相同的迁移率 (图版 I:6)。鲮条晶状体的同工酶谱中, 靠近阴极的一条宽带里还包含了一些很细的带, 可能是在这种电泳条件下分离的还不完全所致。

密鲴亚科 (Xenocyprinae): 细鳞斜颌鲴 (*Plagiognathops microlepis*) 和黄尾密鲴 (*Xenocypris davidi*) 的 LDH 同工酶谱都是由 3 条区带组成 (图版 II: 7—10A, B)。

鲢亚科 (Hypophthalmichthyinae): 鳙 (*Aristichthys nobilis*) 同鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 的酶谱相似 (图版 II: 11—14 A, B), 在晶状体中可看出是由靠得很近的 3 条区带组成 (图版 II: 12)。鳙的肾脏中靠近阴极有一条浅色的带, 而鲢是没有的。对于这条带的基因控制还不清楚。

各亚科的鱼类, 有的属间谱形相似, 有的属间在谱形上有明显的差异。

2. 属间杂交组合的 LDH 同工酶

(1) 细鳞斜颌鲴(♀)与黄尾密鲴(♂)的杂交

细鳞斜颌鲴和黄尾密鲴虽是不同属的鱼, 其 LDH 同工酶谱形却非常相似; 以细鳞斜颌鲴(♀)与黄尾密鲴杂交, 其杂种的心脏、脑、晶状体和肾脏中的 LDH 同工酶谱形也和双亲一样 (图版 II: 7—10)。

(2) 鳙(♀)与鲢(♂)的杂交

这一组杂交实验也是 LDH 同工酶谱形相似的属间杂交。杂种的心脏、晶状体和脑中的酶谱也和双亲一样; 肾脏的谱形像母本, 在靠近阴极处有一浅色带 (图版 II: 11—14)。

结果表明: LDH 同工酶谱形相似的鱼类进行杂交时, 由于杂种体内来自双亲的 A、B 亚基相同, 在体内组合时不可能产生新的杂交分子; 从而更进一步的说明这些亲本的 LDH 基因的相似性。

3. 亚科间杂交组合的 LDH 同工酶

草鱼(♀)与团头鲂(♂)和草鱼(♀)与鳙(♂)两个杂交组合的亲本酶谱差别很大 (图版 II: 15, 16), 即 A 和 B 亚基都不同。杂交后受 4 个不同的基因控制, 产生 4 种不同的亚基, 理论上可产生 35 个同工酶, 而实际上从杂种的图谱中可看到多数是杂聚体 (因迁移率很近而连成一片, 难以具体计数)。这许多杂聚体的出现, 更说明这两个亲本的 LDH 基因的差异。

讨 论

本文提及的鲤科 4 个亚科中一些属的鱼类, 其 LDH 酶谱的异同有一定的规律性。在种类较少的鲢亚科中, LDH 谱形是很相似的; 种类较多的雅罗鱼亚科和鲴亚科的一些属的鱼类, LDH 酶谱有明显的区别。根据 LDH 谱形的异同将一些不同属的鱼分成不同的组。我们认为这一事实可能与进化有关, 因为生物体在长期的进化过程中, 基因不断地发生突变, 这种突变可反映在蛋白质分子的结构上, 最终反映在生物体的整体水平上。由于基因的突变, 导致构成酶的亚基中氨基酸的替换, 使酶的结构发生变化, 这种变化可用电泳法测出。酶谱中区带的相对迁移率的差异, 以及由于两种亚基之间亲和力的大小不同, 决定了同工酶的数目, 并形成各种不同的谱形。实验所观察到的同一亚科中, 有些属的鱼类谱形相似, 说明亚基中氨基酸的组成相似, 进而推测其亲缘可能较近。

从我国大量的远缘杂交工作中可看出,由于亲本选择不当,成功的例子不多。其中杂种成活率高,雌性和雄性都可发育成熟,并能繁殖后代的仅有3组属间杂交:鲢亚科的鳙和鲢^[1], 鳊亚科的长春鳊和团头鲂²⁾以及密鲴亚科的细鳞斜颌鲴和黄尾密鲴³⁾。从同工酶分析,这3个组合的亲本都是同一亚科里 LDH 谱形相似的鱼类,表明它们的亲缘是较近的。我们这一初步结果与 Vesell 等^[8]和 Wilson 等^[10]在研究其它的脊椎动物时所提出的结论是一致的。

同一亚科里 LDH 谱形有明显区别的鱼类,如雅罗鱼亚科中以草鱼和青鱼为代表的两个组,虽然谱形有区别,但它们之间还是有一定的关系,毕竟在编码 LDH 同工酶的两个基因中有1个是相似的。这似乎反映出鱼类进化的一些过程。

谱形差异很大的鱼类,相比之下亲缘关系远一些。在实验中所观察的两个亚科间的杂交组合:草鱼和鳙的杂交及草鱼和团头鲂的杂交,亲本间谱形差异很大。杂交实验的结果表明,草鱼(♀)×鳙(♂)这一组杂种,从夏花到2龄鱼的成活率都低(本所育种组内部材料)。草鱼(♀)×团头鲂(♂)这一组杂种成活率也很低,至3冬龄时经解剖观察性腺发育极差³⁾。另一方面,杂种酶谱中许多杂聚体的出现,可能表明杂种的代谢受到某些不利因素的影响;是亲缘太远的结果。

参 考 文 献

- [1] 长江水产研究所, 1975. 鳙♀×(鳙♀×鲢♂)回交育种试验报告. 遗传学报, 2 (2): 144—151.
- [2] Davis, B., 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404—427.
- [3] Gabriel, O., 1971. Locating enzymes on gels. *Methods in Enzymology* Vol. XXII. Academic Press, New York and Londo 578—604.
- [4] Lush, I. E. et al., 1969. The lactate dehydrogenase isozymes of twelve species of flatfish (Heterosomata). *J. Exp. Zool.*, 171: 105—118.
- [5] Markert, C. L. et al., 1965. Lactate dehydrogenase isozyme patterns of fish. *J. Exp. Zool.*, 159: 319—332.
- [6] Schrauwen, J. 1966. *J. Chromatog.* 23(1): 177—180. Cited from: "Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel", edited by Maurer, H. R., Walter de Gruyter, Berlin. New York 1971, p. 149.
- [7] Shaklee, J. B. et al., 1973. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: The molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes. *J. Exp. Zool.*, 185(2): 217—240.
- [8] Vesell, E. S. et al., 1962. Variations in the lactic dehydrogenase of vertebrate erythrocytes. *J. Gen. Physiol.*, 45(3): 553—565.
- [9] Whitt, G. S. et al., 1973. Developmental and biochemical genetics of lactate dehydrogenase isozymes in fish. In *Genetics and Mutagenesis of fish* (J. H. Schröder), Springer-Verlag, Berlin. p. 243—276.
- [10] Wilson, A. C. et al., 1964. Evolution of lactic dehydrogenase. *Federation Proceedings American*, 23(6): 1258—1266.

1) 武汉市水产科学研究所育种组: 长春鳊♀×团头鲂♂杂交子一代和团头鲂的生长对比试验. 淡水渔业专业学术讨论会论文资料汇编(1978)。

2) 戴庆年等: 黄尾密鲴与细鳞斜颌鲴的杂交优势与性状遗传分析. 淡水渔业专业学术讨论会论文资料汇编(1978)。

3) 湖北省水生生物研究所鱼类养殖小组: 两种杂交鱼类的试验. 科学试验报告(1971)。

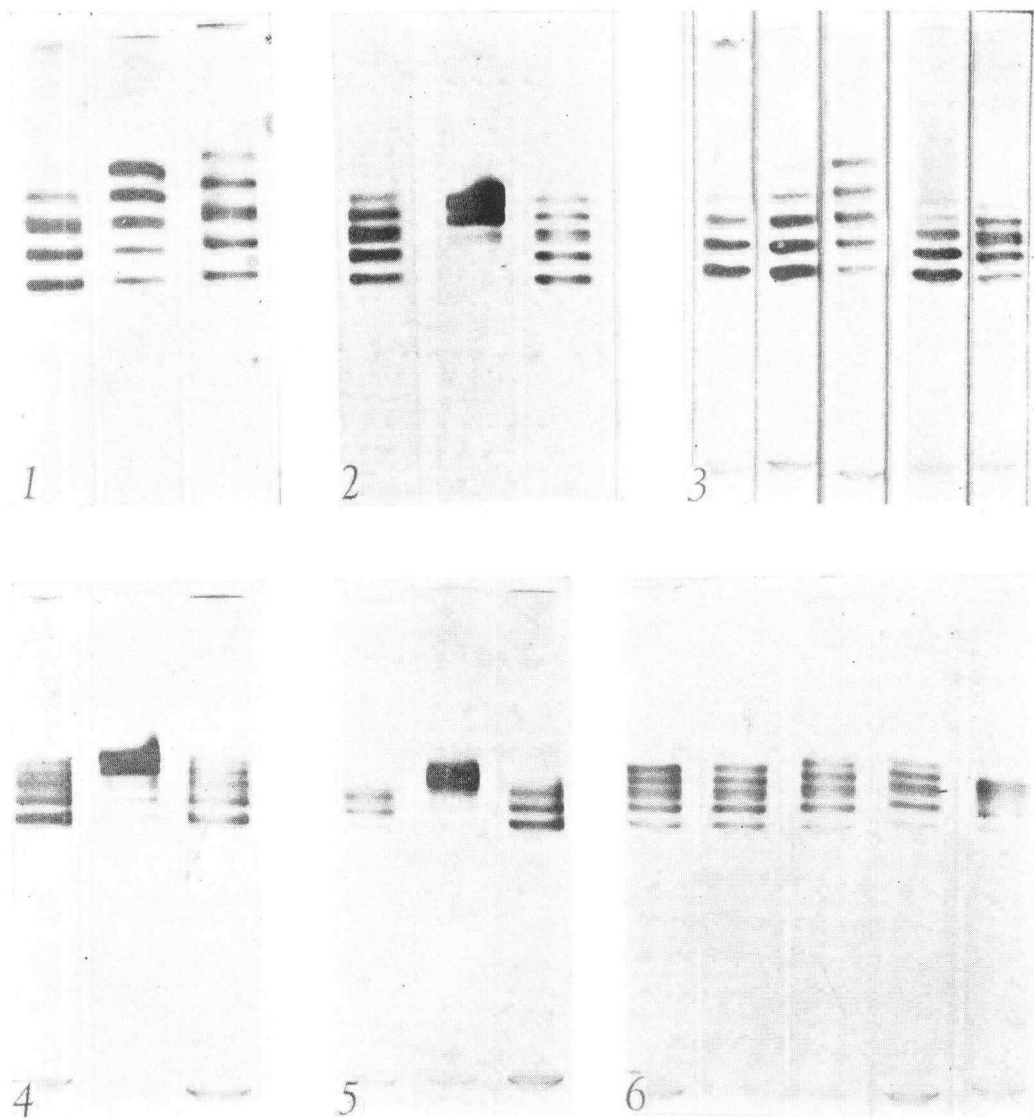


图 1 草鱼的心脏、肌肉和脑中的 LDH 同工酶谱。

图 2 青鱼的心脏、肌肉和脑中的 LDH 同工酶谱。

图 3 雅罗鱼亚科中 5 个属的代表：草鱼、鲢、鳙、青鱼和赤眼鳟的晶状体中的 LDH 同工酶谱。

图 4 青梢红鲃的心脏、肌肉和脑中的 LDH 同工酶谱。

图 5 鲮条的心脏、肌肉和脑中的 LDH 同工酶谱。

图 6 鲮亚科中 5 个属的代表：团头鲂、长春鳊、青梢红鲃、红鳍鲃和鲮条的晶状体中的 LDH 同工酶谱。

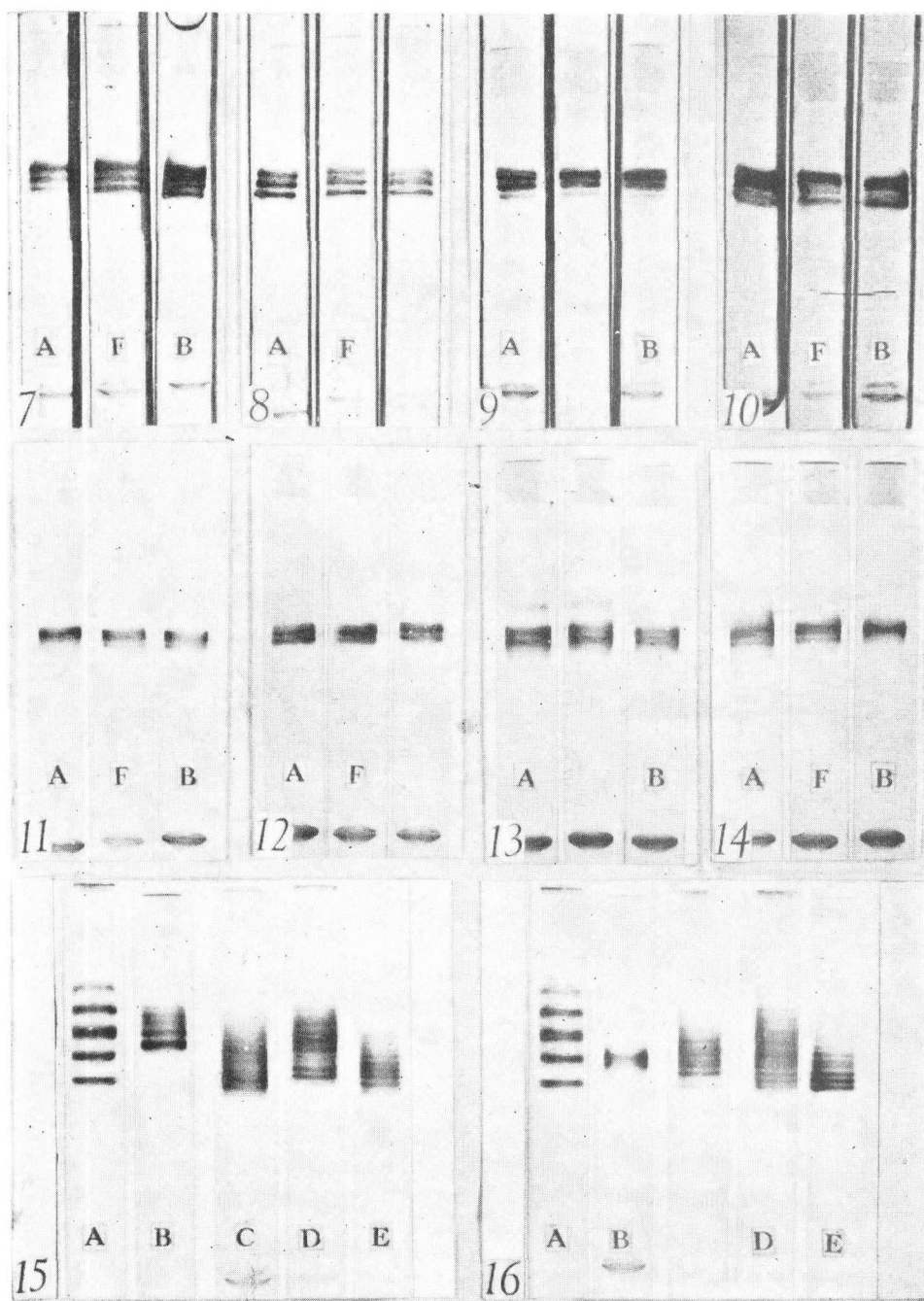


图 7—10 细鳞斜颌鲷(♀)与黄尾密鲷(♂)杂交组合的 LDH 同工酶谱:

图 7 心脏; 图 8 脑; 图 9 晶状体; 图 10 肾脏 (A. 细鳞斜颌鲷; F. 杂种; B. 黄尾密鲷)。

图 11—14 鲮(♀)与鲢(♂)杂交组合的 LDH 同工酶谱: 图 11 心脏; 图 12 晶状体; 图 13 肾脏; 图 14 脑 (A. 鲮; F. 杂种; B. 鲢)。

图 15 草鱼(♀)与团头鲂(♂)杂交组合的 LDH 同工酶谱。A、B. 双亲的脑; C、D、E. 分别是杂种的心脏、脑、晶状体。

图 16 草鱼(♀)与鲮(♂)杂交组合的 LDH 同工酶谱。A、B. 双亲的脑; C、D、E. 分别是杂种的心脏、脑、晶状体。

COMPARATIVE STUDIES ON LACTATE DEHYDROGENASE ISOZYMES IN SOME CYPRINID FISHES AND THEIR HYBRIDS

Zhu Lanfei

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

Abstract

This paper presents a survey of lactate dehydrogenase isozyme patterns of 14 species and 4 hybrids of Cyprinidae. Various tissues were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, including muscle, heart, lens, brain and kidney. The results of the experiments are summarized as follows:

The LDH patterns of fishes of the same subfamily may be remarkably different. Based on the difference of LDH isozyme patterns, we can divide 5 species of Leuciscinae into 2 groups: (1) *Ctenopharyngodon idellus*, *Elopichthys bambusa*, and *Ochotobius elongatus*, (2) *Mylopharyngodon piceus* and *Squaliobarbus curriculus*. In Abramidinae, the LDH isozyme pattern of *Erythroculter dabryi* is similar to that of *Parabramis pekinensis*, *Megalobrama amblycephala* and *Culter erythropterus*; but is strikingly different from that of *Hemiculter leucisculus*. In hypophthalmichthyinae, the LDH isozyme pattern of *Aristichthys nobilis* is similar to that of *Hypophthalmichthys molitrix*. In Xenocyprinae, the LDH isozyme pattern of *Plagiognathops microlepis* and that of *Xenocypris davidi* appear quite similar, too. Based on the LDH isozyme patterns, the phylogenetic relationship of the 14 species of Cyprinidae can be demonstrated to some extent.