

郑小青, 梅依霞, 洪炆飞, 等. 姚江水系中华鳖不同组织 3 种同工酶的表达差异[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 244 - 247.
doi:10. 15889/j. issn. 1002 - 1302. 2015. 07. 084

姚江水系中华鳖不同组织 3 种同工酶的表达差异

郑小青, 梅依霞, 洪炆飞, 汪财生, 唐 伟, 钱国英, 李彩燕
(浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100)

摘要:采用聚丙烯酰胺垂直梯度凝胶电泳法,对姚江水系中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)的 6 种组织(心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、肺)中的乳酸脱氢酶(LDH)、酯酶(EST)、谷氨酸脱氢酶(GDH) 3 种同工酶进行了初步研究,并与日本品系中华鳖的同工酶谱图进行了对比。结果表明:2 个品系中华鳖的同工酶具有不同程度的组织特异性,LDH 组织差异极为明显;姚江水系中华鳖相同组织 LDH 整体表达量与日本中华鳖类似,EST - 1 表达量高于日本中华鳖,GDH 整体表达量低于日本中华鳖,肌肉中 GDH - 3 表达量高于日本中华鳖。本研究得到了姚江群体中华鳖的标志性酶谱,并明确了其与日本品系中华鳖酶谱的差异和特殊性。

关键词:中华鳖;同工酶;表达;组织特异性;乳酸脱氢酶;酯酶;谷氨酸脱氢酶
中图分类号: S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002 - 1302(2015)07 - 0244 - 03

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)又称水鱼、团鱼、元鱼、甲鱼等,是我国重要的特种经济动物和名特优水产养殖品种之一。近 10 余年来,在养殖业蓬勃发展的同时,人们对野生资源的不合理开发加剧,中华鳖的生存形势持续恶化,原种资源不断减少。过度的食用消费、栖息地的破坏、化学污染等因素导致我国中华鳖种质资源遭受严重破坏,种群面临大规模锐减、濒临灭绝的境地,尤其是一些特殊地域种群的原产地没有引起足够的重视。如主要分布在宁波姚江流域的姚江水系中华鳖原种已处于濒危状态,野生种质资源稀缺。该群体中华鳖抗病力强、适应性好、肉质鲜美、胶质浓郁,深受消费者喜爱。姚江水系中华鳖除了具有中华鳖的基本固有特征外,主要特征为腹部有 4 处明显花斑,与其他品系中华鳖差异非常明显。目前,关于中华鳖同工酶的研究大多集中于黄河群体、太湖群体和台湾群体^[1-3],而姚江水系中华鳖同工酶表达差异的研究尚未见报道。为了有效保护中华鳖的种质资源,保持地方种群优良的种质性状,应用聚丙烯酰胺垂直梯度凝胶电泳法对姚江水系中华鳖 6 种不同组织中的乳酸脱氢酶(LDH)、酯酶(EST)、谷氨酸脱氢酶(GDH) 3 种同工酶进行了研究,并与日本品系中华鳖进行比较,以期在蛋白质水平上建立其种质资源的遗传标记,为该地方品系中华鳖的种质鉴定、遗传分析及良种选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为三龄雄性中华鳖,其中姚江水系中华鳖取自

收稿日期:2014 - 08 - 12

基金项目:国家级大学生创新训练计划(编号:201310876001);浙江省宁波市科技创新团队项目(编号:2012B82016);浙江省宁波市科技局重点项目(编号:2013C11011)。

作者简介:郑小青(1993—),女,浙江杭州人,主要从事水产动物生物学研究。E - mail:guaner56@163. com。

通信作者:李彩燕,博士,副教授,主要从事水产动物营养生理与活性物质研究。E - mail:licy@zwu. edu. cn。

浙江省余姚市明凤淡水养殖场,日本品系中华鳖取自绍兴中亚工贸园有限公司。

1.2 样品制备

活鳖运回实验室后,迅速杀死取其心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺和腿部肌肉,称质量后加入 Tris - HCl 缓冲液(pH 值 7.5)进行匀浆,再离心 20 min,取其上清液与甘油按 1 : 2 混合后,直接电泳或于 - 80 ℃保存备用。

1.3 电泳

采用聚丙烯酰胺垂直梯度凝胶电泳法^[4-7],操作步骤参考区又君等报道的方法^[5]进行,电泳过程使用夹心式垂直板电泳槽(Mini - PROTEAN Tetra),取 10 μL 样品加样。分离胶浓度为 7.5% (pH 值 8.8),浓缩胶浓度为 4.5% (pH 值 6.8),电极缓冲系统为 Tris - Gly (pH 值 8.3),在 160 V 恒压、冰浴中电泳 2 h (除 EST 研究的电泳时间为 1.5 h 外)。

电泳后的凝胶染色参照何忠效等^[6]和郭尧军^[7]的操作方法,并加以修改(表 1)。在电泳结束前,提前配制好染色液,其中 EST 染色液需过滤后使用。电泳后的凝胶置于染色液中直至显色,LDH、EST 检测凝胶室温下约染色 20 min, GDH 检测凝胶置于 37 ℃染色约 4 h。经蒸馏水清洗染色后的显色凝胶置于光亮背景下拍照记录。

表 1 用于分析中华鳖同工酶的名称、编号、方法、缓冲系统和凝胶浓度

酶的名称	编号	缓冲系统	pH 值	浓缩胶 (%)	分离胶 (%)
酯酶(EST)	3.2.1.1	磷酸盐缓冲液(PBS)	6.4	4.5	7.5
乳酸脱氢酶(LDH)	1.1.1.27	Tris - HCl	8.0	4.5	7.5
谷氨酸脱氢酶(GDH)	1.4.1.4	Tris - HCl	8.4	4.5	7.5

2 结果与分析

应用于种群生化遗传分析的同工酶谱,除酶带应清晰外,更重要的是反映出编码该酶的几个基因座位、存在几个等位基因、是几聚体的酶等特征性信息^[8]。2 个不同品系中华鳖的 6 种组织中 3 种同工酶活性强弱结果见表 2。从表 2 中可

以看出,2 个品系中华鳖的心脏、肝脏、脾脏、肾脏中 LDH、EST 2 种同工酶均明显表达且含量较高,肺与肌肉中的 LDH、EST、GDH 同工酶有所表达但相比于其他组织的同工酶含量则较

少。其中姚江水系中华鳖的 6 种组织中属肝脏组织同同工酶的整体表达量最高,而日本品系中华鳖的 6 种组织中属肾脏组织同同工酶的整体表达量最高。

表 2 2 个品系中华鳖的 6 种组织中 3 种同工酶谱分析

酶名称	同工酶	姚江水系中华鳖						日本品系中华鳖					
		肌肉	心脏	肝脏	脾脏	肺	肾脏	肌肉	心脏	肝脏	脾脏	肺	肾脏
LDH	1	-	-	+	+++	-	+++	-	-	+	++	-	+++
	2	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++	++
	3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++
	4	++	++	+	+	++	+	++	++	+	+	++	+
	5	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	+
EST	C(6,7,8)	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
	1	++	++	++	+	++	+	+	++	+	+	++	+
	2	++	+++	++	+	++	+	++	+++	++	++	+++	+
	3	+	+++	++	+	+++	+	++	+++	++	++	+++	+
GHD	4	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	++	+
	1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+++
	2	+	++	-	-	-	-	++	+++	++	+	++	+
	3	++	+++	+	+	+	+	++	++	++	++	+++	-

注:“+++”表示活性强、图谱清晰,“++”表示活性较强、图谱较清晰,“+”表示有活性、图谱不清晰,“-”表示无图谱。

2.1 乳酸脱氢酶(LDH)

2 个品系中华鳖 6 种组织的 LDH 同工酶的电泳图谱如图 1 所示。姚江水系中华鳖 LDH 同工酶在心脏、肝脏、脾脏、肾脏中 LDH-5 含量最高,肌肉中 LDH-1 含量最高,肺中 LDH-1、LDH-5 的表达量均相对偏高,且在心脏、肝脏、肾脏、肌肉中有 LDH-C 基因(即 LDH-6、LDH-7、LDH-8)表达。日本品系中华鳖 LDH 同工酶在心脏、脾脏、肾脏中 LDH-5 含量最高,肌肉中 LDH-1 含量最高,肺中 LDH-1、LDH-5 含量均相对偏高,且在心脏、肝脏、肾脏和肌肉中有 LDH-C 基因表达。姚江水系中华鳖相同组织 LDH 整体表达量与日本品系中华鳖类似,仅 LDH-5 在姚江水系中华鳖肝脏中表达高于日本中华鳖。

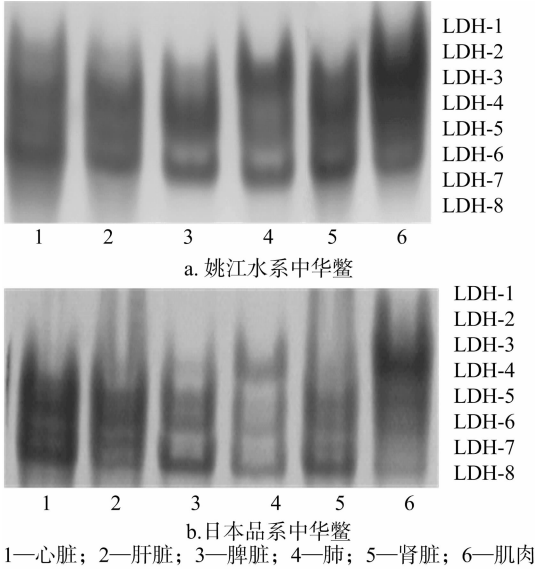


图1 2个品系中华鳖不同组织的LDH电泳图谱

2.2 酯酶(EST)

中华鳖不同组织 EST 同工酶的电泳图谱如图 2 所示。

由图 2 可见,姚江水系中华鳖 EST-1 表达量高于日本品系中华鳖,日本品系中华鳖 EST-4 表达量远高于姚江水系中华鳖,姚江水系中华鳖的肾脏组织中 EST-3 表达量大于日本品系中华鳖。姚江水系中华鳖所有组织的 EST-2、EST-3 表达量都较高,EST-4 表达量较低。姚江水系中华鳖的酯酶总活性依次为肝脏>肾脏>心脏>脾脏>肺>肌肉,尤其是 EST-2、EST-3 在肝脏、肾脏有显示清晰的酶带,在脾脏有微弱的酶带。日本品系中华鳖所有组织的 EST-2、EST-3 表达量都较高,EST-1、EST-4 表达量相当,其酯酶总活性依次为肝脏>肾脏>心脏>脾脏>肺>肌肉,尤其是 EST-2、EST-3 在肝脏、肾脏组织电泳有清晰的酶带。

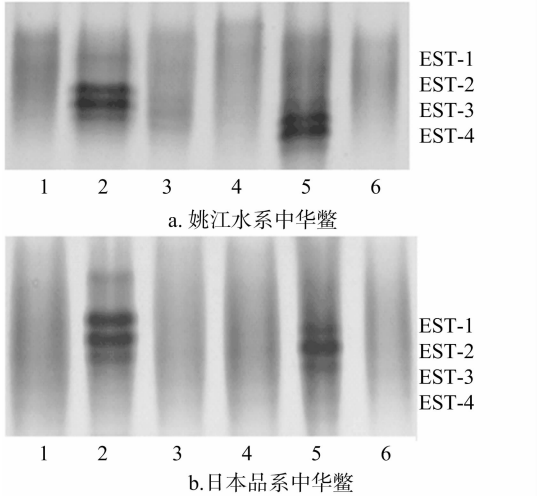


图2 中华鳖不同组织的EST电泳图谱

2.3 谷氨酸脱氢酶(GDH)

GDH 为二聚体酶,在不同品系中华鳖的不同组织的 GDH 酶谱中均呈现了 3 个活性区域(图 3)。姚江水系中华鳖的肝

脏、心脏、肾脏、肌肉组织中 GDH 表达量较高,其他组织表达量低,且在肌肉中有 GDH-1、GDH-3 的表达。日本品系中华鳖在肝脏、脾脏、肾脏、肌肉中 GDH 表达量均较高,其中肝脏中的 GDH 表达量最高;GDH-1 在肌肉中大量表达而在其他组织几乎不表达;肌肉中未检测到 GDH-2、GDH-3,而其他 5 种组织中都有所表达。日本鳖 GDH 表达量整体上高于姚江水系中华鳖,但肝脏和心脏组织中 2 个品系中华鳖的 GDH 表达量相近,肌肉组织中姚江水系中华鳖 GDH-3 的表达量高于日本中华鳖。

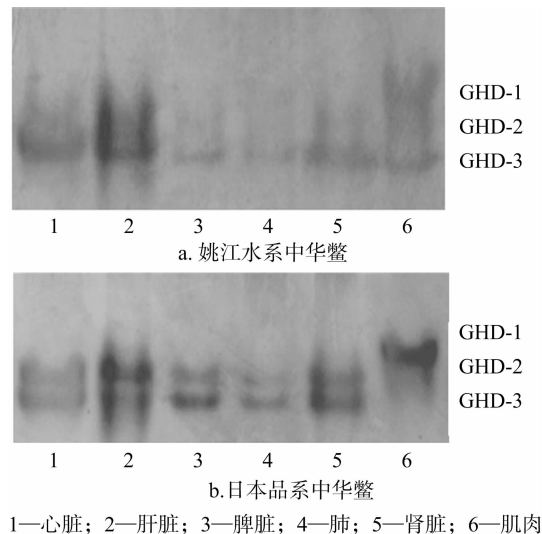


图3 中华鳖不同组织的GDH电泳图谱

3 结论与讨论

已有学者采用同工酶电泳分析了不同群体中华鳖的组织表达特异性^[1-3,9-11]。如杨弘等采用垂直淀粉胶电泳对中华鳖脑、眼、心脏、肌肉、肝脏、肾脏和卵巢 7 种组织中的 6 种同工酶系统 (LDH、ADH、IDH、ME、GAPDH、EST) 进行研究,构建了中华鳖同工酶酶谱,揭示了 LDH 在中华鳖进化上的保守性^[2]。姚雁鸿等运用垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对中华鳖和台湾鳖的肝脏、肾脏、眼、肌肉等几种组织中的 LDH、EST 同工酶进行比较研究,结果发现在中华鳖组织中有组织特异性、无多态性的 LDH 同工酶在台湾鳖的组织中却既有组织特异性又有多态性^[3]。

3.1 乳酸脱氢酶

乳酸脱氢酶(LDH)是糖代谢途径中一种重要的氧化还原酶,存在于机体所有组织细胞的胞质内,能催化丙酮酸与乳酸之间的相互转化,是研究最广泛的一种同工酶^[1-3,9-12]。已经证明 LDH 同工酶系统具有明显的种族及组织特异性^[9,12]。心肌是含氧量丰富的组织,细胞以有氧代谢为主,催化乳酸生产丙酮酸的 LDH-5 占优势。骨骼肌是相对缺氧的组织,催化丙酮酸还原生产乳酸的 LDH-1 占优势,使骨骼肌因激烈运动造成的相对缺氧条件下仍能得以酵解获得能量^[13]。

中华鳖作为水陆两栖的动物,能适应较大的含氧量波动,既能适应水环境,也能适应短时间的陆上生活,故其肺部 LDH-1、LDH-5 都有较多表达。肝脏、肾脏、脾脏中 LDH-5 占优势的原因与心肌中 LDH-5 占优势的原因类似,且不同

组织其他的酶带均有所差异,推测 LDH 可作为姚江水系中华鳖组织特异性鉴定的同工酶。

日本品系中华鳖和姚江品系中华鳖的心脏、肝脏、肾脏、肌肉组织都有 LDH-C 基因不同程度的表达,其表达量与相应组织在中华鳖体内的活动度有一定的线性关系,推测 LDH-C 基因的表达可增加产能。此外,在姚江水系中华鳖的肝脏中 LDH-5 占优势,而在日本品系中华鳖中却没有出现该现象,这可能与日本中华鳖个体的脂肪含量较高有关(数据另文发表)。以上 2 个推测还有待进一步研究验证。

3.2 酯酶

酯酶(EST)是催化酯类化合物水解进入中间代谢的重要水解酶,在细胞内执行最基本的生理功能^[10],其结构多为单体,由 1 个亚基组成^[4]。EST 还能水解大量正常存在的非生理性酯类化合物,可能与机体的解毒功能有关。本研究发现,姚江水系中华鳖 EST 整体表达量低于日本鳖,猜测原因可能与中华鳖的生存环境有关。

酯酶并非生理性修饰酶,故可以 EST 酶谱作为遗传指标^[14-15]。从酶谱整体的角度看,姚江水系中华鳖和日本品系中华鳖的 EST 酶谱均呈现组织特异性。酯酶 EST-4 在日本品系中华鳖中表达而在姚江水系中华鳖中基本不表达,而姚江水系中华鳖肾脏中的酯酶 EST-3 表达量高于日本品系,且姚江水系中华鳖肝脏和肾脏中 EST 条带数目多、活性强,具有种属特异性,均可作为姚江水系中华鳖的种属鉴定指标。

3.3 谷氨酸脱氢酶

谷氨酸脱氢酶(GDH)是动物体内参与谷氨酸新陈代谢的关键酶之一^[12-15],它以 NAD、NADP 或者同时利用两者作为辅酶,参与到谷氨酸的合成与分解中,但在大多数生物体内反应是向着合成谷氨酸的方向进行的^[16]。目前水产动物同工酶 GDH 的研究少见报道。本研究发现,GDH-3 在日本品系中华鳖肌肉中不表达,而在姚江水系中表达,表明 GDH-3 的表达可能会导致某种生化途径改变,从而影响生物的代谢途径。由于谷氨酸是重要的鲜味氨基酸,故猜测 GDH-3 的高表达可能是姚江水系中华鳖与日本中华鳖相比味道更为鲜美原因,但其相关性有待于进一步确认。GDH 是氨基酸代谢中的重要酶类,尤其在非必需氨基酸的合成和转化中起着重要作用^[17];因此 GDH-3 的表达是否直接影响氨基酸含量也有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵金良,蔡完其,李思发. 中华鳖同工酶的组织特异性研究[J]. 上海水产大学学报,1998,7(4):311-316.
- [2] 杨弘,夏德全,吴婷婷,等. 中华鳖同工酶研究[J]. 中国水产科学,1997,4(4):55-59.
- [3] 姚雁鸿,余来宁,方耀林,等. 中华鳖和台湾鳖的同工酶初步比较[J]. 淡水渔业,2002,32(6):44-45.
- [4] 朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法[J]. 水生生物学报,1992,16(2):183-185,197.
- [5] 区又君,齐旭东,李加儿. 波纹唇鱼不同组织 5 种同工酶表达的差异[J]. 南方水产,2009,5(2):51-55.
- [6] 何忠效,张树政. 电泳[M]. 北京:科学出版社,1990:287-298.
- [7] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999:70-80.

付辉云,章海鑫,赵春来,等. 军山湖黄尾密鲮的形态生物学研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):247-249.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.085

军山湖黄尾密鲮的形态生物学研究

付辉云,章海鑫,赵春来,傅义龙,陈文静,张燕萍

(江西省水产科学研究所,江西南昌 330039)

摘要:分析了鄱阳湖水系黄尾密鲮(*Xenocypris davidi* Bleeker)的外部形态特征和框架特征,为其形态种质标准和系统分类研究提供参考。结果表明,背鳍Ⅲ,7;臀鳍Ⅲ,9-11;腹鳍Ⅰ,8-9;胸鳍Ⅰ,15-16。平均全长是体长的1.25倍,体长分别是体高、头长、尾柄长和肠长的3.85倍、5.00倍、6.55倍和4.95倍,头长分别是吻长、眼径和眼间距的3.37倍、3.94倍和2.59倍;体高是体宽的2.99倍,尾柄长是尾柄高的1.45倍。肥满度系数 $K=1.51$,其体长与体质量之间的关系可以用幂函数表示,体长与肠长间呈线性关系。

关键词:黄尾密鲮;形态特征;框架特征;军山湖;良种选育;参考依据

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0247-03

黄尾密鲮(*Xenocypris davidi* Bleeker)俗称黄尾、黄片、黄姑子、黄瓜鱼等,隶属于鲤科(Cyprinidae)鲮亚科(*Xenocyprininae*)鲮属(*Xenocypris*),属底层鱼类,通常生活在江河、湖泊的中下层,尤其喜栖息于多水草、软泥底质的水域底层,是一种中小型淡水鱼类,在我国的长江、珠江、闽江及闽东南各溪流均有分布。由于其具有肉厚、质实、味道鲜美、营养价值高、易捕捞等特点,是水库、湖泊、池塘增殖养殖的理想鱼类。它已成为当前水产养殖品种结构调整中首选的优良品种之一。目前对黄尾密鲮的研究主要集中在一般生物学特性描述^[1-2]、食性^[3]、养殖^[4]、人工繁殖^[5-6]及苗种培育^[7]等方面。

鱼类传统形态特征和现代框架特征研究已有不少报道,如尼罗罗非鱼^[8]、鲃属鱼类^[9]、华鲃属鱼类^[10]、鲮属鱼类^[11]、沙塘鳢^[12]、细鳞斜颌鲴^[13]、鳊鱼^[14]等,这些结果多应用于形态种质标准和亲缘关系研究,也应用于系统发育探讨。黄尾

密鲮一般形态特征虽有报道,但都没有进行深入细致的研究。本研究所用黄尾密鲮样本取自江西省境内鄱阳湖水系的军山湖,对其外部形态特征和框架特征进行了详细研究分析,旨在为其形态种质标准、种质资源保护和合理利用、亲缘关系研究以及后续良种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用黄尾密鲮均取自江西省境内军山湖中的天然野生群体,选取体形匀称、活力好的健康个体92尾,体长185~282 mm,体质量87.0~336.2 g,取样期为2014年12月至2015年1月。

1.2 数据测量

1.2.1 传统形态的测定 传统形态学数据测定参照殷名称的方法^[15],包括可量形状和可数形状2类。可量性状包括体质量、全长、体长、体高、体宽、眼径、头长、肠长、尾柄长、尾柄高、眼距、吻长、空壳质量,共计13项指标;可数性状分别为背鳍、胸鳍、腹鳍、臀鳍、侧线鳞、下咽齿、鳃耙,共计7项指标。长度测量精确至1 mm,质量称量精确至0.1 g。

1.2.2 框架的测量 现代框架数据测定参照李思发的方法^[16]稍改动。框架测量示意图如图1所示,测量了框架点1-2、1-3、1-4、2-3、2-4、3-4、3-5、3-6、4-5、5-6、5-7、5-10、6-7、6-8、6-9、7-8、8-9、8-10、9-10间距

收稿日期:2015-02-03

基金项目::江西省科技计划(编号:20141BBF60036);国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201303056-6)。

作者简介:付辉云(1968—),男,江西进贤人,硕士,助理研究员,主要从事水产养殖及渔业资源调查等研究。Tel:(0791)88105231; E-mail:75156989@qq.com。

通信作者:张燕萍,博士,助理研究员,主要从事鱼类育种、渔业资源调查及渔业环境监测等研究。Tel:(0791)88105231; E-mail:zhangyanpingxie@163.com。

[8]王可玲,尤 锋,徐 成,等. 5种海水鱼同工酶表达的组织特性及其电泳的初步分析[J]. 海洋与湖沼,1996,27(6):626-631,682.

[9]李永通,向应海,杨业勤. 中国大鲵及鳖不同组织LDH同工酶的比较研究[J]. 动物学杂志,1992,27(1):28-31.

[10]王金星,赵小凡,廖正根. 休眠与非休眠期中华鳖乳酸脱氢酶同工酶的比较分析[J]. 海洋湖沼通报,1995(2):43-47.

[11]叶玉珍,王小虎,吴清江. 孵化温度对中华鳖4种同工酶和肌肉蛋白基因表达的影响[J]. 华中农业大学学报,2004,23(4):385-388.

[12]肖调义,陈清华,陈开健,等. 四种黄颡鱼乳酸脱氢酶同工酶电

泳的研究[J]. 上海水产大学学报,2004,13(1):72-74.

[13]艾晓杰,杨丽娥,程美蓉. 白香猪消化器官乳酸脱氢酶同工酶的比较研究[J]. 四川畜牧兽医,2005(8):23-24.

[14]王启瑞. 缘蜻科部分种类酯酶同工酶的分子系统学研究[D]. 西安:陕西师范大学,2001:10-16.

[15]朱新平,林礼堂,夏仕玲. 鲢鱼、麦瑞加拉鲮鱼及露斯塔野鲮酯酶同工酶的电泳研究[J]. 淡水渔业,1992(5):30-31.

[16]王亚平,姜宇海. 谷氨酸脱氢酶在黄疸鉴别诊断中的应用[J]. 南京军医大学学报,2003,25(4):294-295.

[17]曹志华,高贵琴,张巧玲. 鲤鱼肠道及肠内微生物谷氨酸脱氢酶同工酶及活性的初步研究[J]. 淡水渔业,2001,31(5):52-53.