

文章编号: 1000- 0615(2001)06- 0495- 05

## 雌核发育草鱼近交 $F_1$ 代的生化遗传特性

肖亚梅, 刘 筠, 罗 琛

(湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081)

**摘要:** 运用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对雌核发育草鱼近交  $F_1$  代、同龄正常两性生殖草鱼、鲤的乳酸脱氢酶(LDH)、酯酶(EST)、超氧化物歧化酶(SOD)以及血红蛋白、血清蛋白进行了分析。结果表明, 雌核发育草鱼近交  $F_1$  代 EST、SOD 同工酶以及血红蛋白电泳图谱与正常两性生殖草鱼电泳图谱存在有一定差异; 雌核发育草鱼近交  $F_1$  代的生化性状中未直接体现鲤遗传物质的影响。

**关键词:** 雌核发育; 草鱼; 同工酶; 血红蛋白; 聚丙烯酰胺凝胶电泳血清蛋白

中图分类号: Q959. 46<sup>+</sup> 8 文献标识码: A

## The genetic biochemical properties of the inbreeding $F_1$ -generation gynogenetic grass carp

XIAO Ya-mei, LIU Yun, LUO Chen

(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract:** By using the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), this paper studies isozymes (LDH, EST, SOD), haemoglobin and serum proteins of the inbreeding  $F_1$ -generation gynogenetic grass carps, bisexual reproduction grass carps in the same ages and carps, respectively. The results of experiments show that there exist some differences in their electropherograms between the inbreeding  $F_1$ -generation gynogenetic grass carps and bisexual reproduction grass carps; The biochemical characteristics of the inbreeding  $F_1$ -generation gynogenetic grass carps do not directly reflect the influence by the genetic materials of the carps.

**Key words:** gynogenesis; grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*); isozyme; haemoglobin; serum protein; polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

鱼类的繁殖大多是通过两性生殖来实现, 在自然界中也存在少数特殊有性生殖的鱼类, 如美帆银鲫、广东“缩骨鲫”等都是天然雌核发育鱼类<sup>[1-4]</sup>。随着对鱼类天然雌核发育逐渐深入的认识, 人工雌核发育技术日益成熟, 通过遗传上失活的精子诱导作用, 激活卵子并通过染色体加倍技术发育为二倍体鱼。自六十年代以来, 国内外学者相继成功地获得了人工雌核发育鲫、鲤、草鱼、斑马鱼、鲑、尼罗罗非鱼等<sup>[4-9]</sup>。鱼类人工雌核发育技术在鱼类性别控制、提高选择效率、快速建立纯系等生产应用上的前景, 已经引起人们关注<sup>[1,8]</sup>。罗琛<sup>[9]</sup>用紫外线照射过的鲤精液与草鱼成熟卵子受精后, 通过冷休克方法抑

收稿日期: 2000-12-18

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助(39830300); 教育部高校骨干教师基金资助(20065-12)

第一作者: 肖亚梅(1968-), 女, 湖南宜章县人, 博士。主要从事鱼类生殖生理的研究。Tel: 0731-8872552, E-mail: wanzhong@hunnu.edu.cn

通讯作者: 罗琛(1958-), 男, 湖南湘乡人, 研究员。主要从事发育生物学研究。Tel: 0731-8882199

制第二极体排出使卵核染色体恢复二倍性,成功地获得了雌核发育草鱼,同时,在这一雌核发育草鱼群体中,存在有雄性个体,并能正常发育、成熟<sup>[1]</sup>。罗琛用已达性成熟的雌、雄性雌核发育草鱼为亲本进行人工繁殖,获得了雌核发育草鱼近交后代(F<sub>1</sub>)。繁殖结果表明:雌、雄性雌核发育草鱼为亲本,受精率非常低;孵化过程中,许多胚胎因发育异常而致死,孵化率也很低;养殖结果同时也表明,雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代表现出比正常两性生殖草鱼强的抗病能力。本文运用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代及同龄正常两性生殖草鱼、鲤的部分同工酶、血红蛋白、血清蛋白等进行了分析,以了解雌核发育近交后代(F<sub>1</sub>)的生化遗传特性,并有利于进一步阐明雌核发育鱼类的遗传规律。

## 1 材料与方 法

采用的雌核发育近交 F<sub>1</sub> 代是以人工诱导雌核发育产生的雄雌性草鱼为父母本、人工繁殖的 6 月龄鱼。13 尾雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代及 12 尾同龄正常两性生殖草鱼均取自湖南省湘阴县东湖渔场,鲤购自湖南师范大学农贸市场。

分别剪取尾鳍约 0.5g,各加入 1.0~ 1.5mL 的 0.1M 磷酸缓冲液(pH 7.2)。玻璃匀浆器冰浴匀浆,高速冷冻离心机 4℃、15000r·min<sup>-1</sup>,离心 20min。分装上清液,按照 1:1 的比例加入 40%的蔗糖,-20℃保存,作为分析同工酶的材料。

用注射器从尾静脉抽血约 1.0~ 1.5mL,斜置于 4℃冰箱中过夜。吸取淡黄色的上清液,4℃、10000r·min<sup>-1</sup>,离心 10min。吸取上清液,按照 1:1 的比例加入 40%的蔗糖,-20℃保存,用以分析血清蛋白。

用注射器从尾静脉抽血约 0.5mL,加入到含 1%NaCl 的试管中,经离心洗涤、低渗破膜等处理后,获得红细胞裂解液,按照 1:1 的比例加入 40%的蔗糖,-20℃保存,以分析血红蛋白。

乳酸脱氢酶(LDH)、酯酶(EST)、超氧化物歧化酶(SOD)以及血红蛋白、血清蛋白的电泳及显色方法参见参考文献<sup>[10,11]</sup>。

实验结果用 GDS 8000 PC 凝胶成像分析系统进行照相,并绘模式图。

## 2 结 果

### 2.1 乳酸脱氢酶(LDH)

正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代 LDH 酶谱结构基本一致,电泳分离出 5 条酶带:LDH1 → LDH5,这 5 条酶带在正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代各个体中表达均较为一致。鲤也分离出 5 条酶带,鲤 LDH 同工酶谱与正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代不同(图 1,2)。

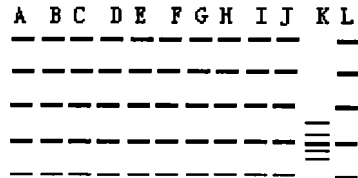


图 1 正常两性生殖草鱼 LDH 同工酶谱

Fig.1 Electropherogram of LDH isozymes in bisexual reproduction grass carp (A~ L: 正常两性生殖草鱼)

图 2 雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代、

正常两性生殖草鱼、鲤 LDH 同工酶谱  
Fig.2 Electropherogram of LDH isozymes in the inbreeding F<sub>1</sub>-generation gynogenetic grass carps, bisexual reproduction grass carp and carp (A~ J: 雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub>; K: 鲤; L: 正常两性生殖草鱼)

### 2.2 酯酶(EST)

正常两性生殖草鱼共分离出 6 条 EST 酶带(EST1~ EST6): EST2 为酶活性最强的带, EST2、EST3、EST5、EST6 在被检测的各正常两性生殖草鱼中均稳定存在; 12 尾正常两性生殖草鱼中 EST1 仅在其中 2 尾鱼中分离到; EST4 为较强带, 在 12 尾正常两性生殖草鱼中 EST4 有强弱差别( 12 尾中有 5 尾的 EST4 呈强带)( 图 3)。雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代的 EST 分离出 5 条酶带(EST1~ EST5), 均无正常两性生殖草鱼的 EST1; EST1~ EST5 与普通草鱼 EST2~ EST6 的电泳图谱基本相同, 雌核发育草鱼 F<sub>1</sub> 代的 EST3 也有强弱( 10/ 3)( 13 尾中有 10 尾的 EST3 呈强带) 不同。鲤的 EST 同工酶谱由 10 条酶带构成, EST4 为最强带(图 4)。

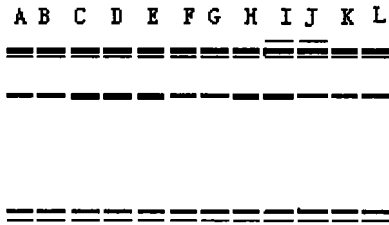


图 3 正常两性生殖草鱼 EST 同工酶谱  
Fig. 3 Electropherogram of EST isozymes in bisexual reproduction grass carp (A~ L: 正常两性生殖草鱼)

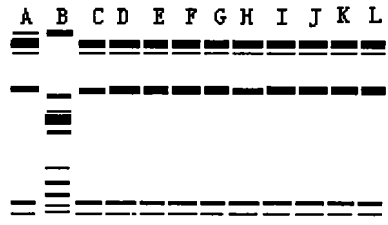


图 4 雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代、正常两性生殖草鱼、鲤 EST 同工酶谱  
Fig. 4 Electropherogram of EST isozymes in the inbreeding F<sub>1</sub>-generation gynogenetic grass carps, bisexual reproduction grass carp and carp (A: 正常两性生殖草鱼 B: 鲤 C~ L: 雌核发育草鱼 F<sub>1</sub>)

### 2.3 超氧化物歧化酶(SOD)

正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代、鲤的 SOD 同工酶谱酶带多而密集, 根据电泳迁移率的不同, 明显可以分为两个区段: 区段 1、区段 2。正常两性生殖草鱼区段 1 包含 8 条酶带, 带 5 在酶活性强弱上具有多态性; 区段 2 有 5 条酶带, 带 1 酶活性也有不同( 12 尾鱼中, 带 1 为强带的仅 1 尾)( 图 5)。雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代区段 1 由 9 条酶带组成, 雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代中的带 2~ 5 与正常两性生殖草鱼带 1~ 4 相同, 带 1 为 12 尾正常两性生殖草鱼没有检测到, 但在雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代中较稳定存在的一条弱带, 带 6、9 在酶活性强弱上具有多态性; 区段 2 包括 6 条酶带, 带 1 酶活性强弱在不同个体中不一致( 13 尾鱼中, 带 1 为强带的有 7 尾), 带 5 为一弱带, 在正常两性生殖草鱼中未观察到。鲤区段 1 包含 8 条酶带, 区段 2 有 3 条酶带(图 6)。

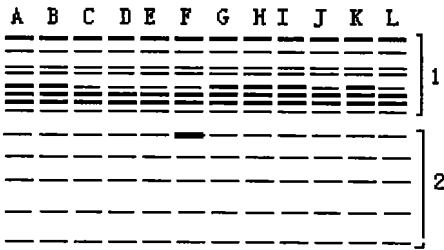


图 5 正常两性生殖草鱼 SOD 同工酶谱  
Fig. 5 Electropherogram of SOD isozymes in bisexual reproduction grass carp ordinary (A~ L: 正常两性生殖草鱼)



图 6 雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub>、正常两性生殖草鱼、鲤 SOD 同工酶谱  
Fig. 6 Electropherogram of SOD isozymes in the inbreeding F<sub>1</sub>-generation gynogenetic grass carps, bisexual reproduction grass carp and carp (A: 正常两性生殖草鱼 B: 鲤 C~ L: 雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代)

### 2.4 血红蛋白

正常两性生殖草鱼血红蛋白电泳分离出 14 条不同带,带 6、7、8 为强带,带 12 在一些个体中没有表达。雌核发育草鱼近交  $F_1$  代血红蛋白则分离出 13 条带,它们与正常两性生殖草鱼带 1~ 11、13、14 基本一致,13 尾鱼中均未检测到正常两性生殖草鱼带 12。鲤血红蛋白有 7 条带,其电泳图谱与两种草鱼均不一致(图 7, 8)。

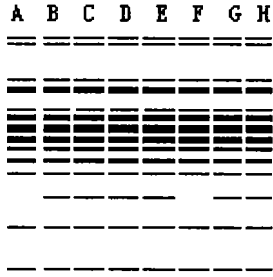


图 7 正常两性生殖草鱼血红蛋白电泳图谱

Fig. 7 Electropherogram of haemoglobin in bisexual reproduction grass carp (A~ H: 正常两性生殖草鱼)

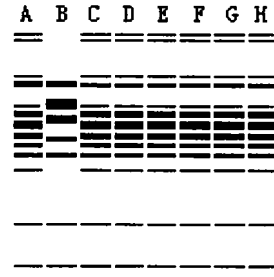


图 8 雌核发育草鱼近交  $F_1$ 、正常两性生殖草鱼、鲤血红蛋白电泳图谱

Fig. 8 Electropherogram of haemoglobin in the inbreeding  $F_1$ -generation gynogenetic grass carps, bisexual reproduction grass carp and carp (A: 正常两性生殖草鱼; B: 鲤; C~ H: 雌核发育草鱼  $F_1$ )

### 2.5 血清蛋白

正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交  $F_1$  代的血清蛋白电泳图谱较复杂,可划分为四大区段:正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交  $F_1$  代区段 1 均分离出约 13 条带,由于这一区段带多而密集,难以准确进行比较;区段 2 由 3 条强带和一条稍慢的弱带组成,这一区段在正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交  $F_1$  代中表达都很稳定;区段 3 都是由 8 条清晰的宽带组成,带 1 为强带,带 3、4 在正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交  $F_1$  代中都有个体差异;正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交  $F_1$  代的区段 4 皆为弱带,均可分离出 6 条相同带。鲤只有区段 1、2、3,无区段 4:区段 1 由 11 条带构成;区段 2 也有 4 条带(3 强 1 弱),弱带为快带;区段 3 由 5 条带组成,均为弱带(图 9, 10)。

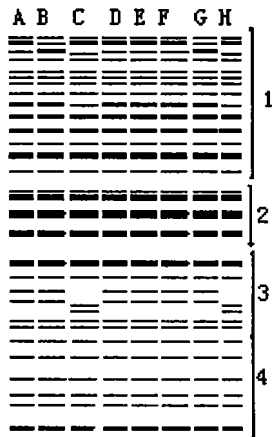


图 9 正常两性生殖草鱼血清蛋白电泳图谱

Fig. 9 Electropherogram of serum protein in bisexual reproduction grass carp (A~ H: 正常两性生殖草鱼)

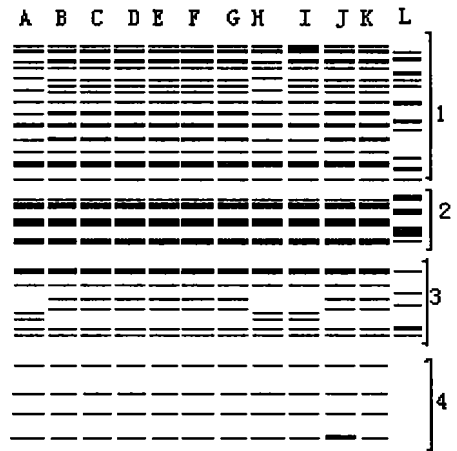


图 10 雌核发育草鱼近交  $F_1$ 、正常两性生殖草鱼、鲤血清蛋白电泳图谱

Fig. 10 Electropherogram of serum protein in the inbreeding  $F_1$ -generation gynogenetic grass carps, bisexual reproduction grass carp and carp (A~ J: 雌核发育草鱼近交  $F_1$ ; K: 正常两性生殖草鱼; L: 鲤)

### 3 分析与讨论

乳酸脱氢酶(LDH)是研究得最早、较为清晰的四聚体同工酶。在鱼类,现已报道有三个基因(A、B、C)控制LDH表达<sup>[11,12]</sup>。本研究中,正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代、鲤鱼的尾鳍中均只检测到A、B基因编码的五种LDH类型。LDH是糖类代谢必需的酶,在雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代中表达非常稳定,与所检测的12尾正常两性生殖草鱼基本相同。

酯酶(EST)为催化酯类化合物水解的酶系,实验中,EST显色是以萘乙酸酯为底物,显示的是羧基酯酶类。雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代电泳共分离出五条酶带,除带3稍有强弱变化外,各酶带分布都较稳定。与正常两性生殖草鱼相比,雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代无正常两性生殖草鱼EST1的多态性变化,控制EST3(正常两性生殖草鱼EST4)的基因在雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代中表达强度大于正常两性生殖草鱼。

超氧化物歧化酶(SOD)广泛存在于细胞中,脊椎动物中,有CuZn-SOD、Mn-SOD两种不同结构<sup>[13]</sup>,根据其电泳迁移率的不同,划分为s-SOD(上清液型)、m-SOD(线粒体型)两种类型<sup>[14]</sup>。雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代同工酶谱上的区段1相当于s-SOD(上清液型),区段2相当于m-SOD(线粒体型)。与正常两性生殖草鱼相比,雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代SOD多表达了一条弱慢带和一条弱快带,同时,控制区段2带1的基因表达也强于普通草鱼。

雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代中,血红蛋白电泳图谱很稳定,未观察到个体间差异。控制正常两性生殖草鱼血红蛋白带12的基因在雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代中未见表达。正常两性生殖草鱼、雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代的血清蛋白电泳图谱未见有明显差异。

雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代与正常两性生殖草鱼在EST、SOD同工酶图谱以及血红蛋白的电泳图谱上存在有差异,如雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代具有一些在所检测正常两性生殖草鱼中尚未见表达的特异酶带(SOD区段1中的带1、区段2中的带5),雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代在EST3、SOD区段2的带1基因表达强度明显强于正常两性生殖草鱼。作为基因表达的产物,同工酶谱以及血红蛋白的电泳图谱的差异在某种程度上反映了雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代在遗传基础上与正常两性生殖草鱼存在有一定的差异。雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代出现的较稳定的特异性酶带(如SOD区段1的带1)及酶活性的增强(反映出同工酶类型等位基因频率的变化)可作为遗传标记,为雌核发育草鱼近交 F<sub>1</sub> 代遗传分析及选育种所利用。雌核发育草鱼 F<sub>1</sub> 代与正常两性生殖草鱼生化遗传性状上存在的差异是否与鲤鱼相关?本实验中,雌核发育草鱼 F<sub>1</sub> 代同工酶谱以及血红蛋白电泳图谱中未直接发现鲤鱼遗传物质的影响。雌核发育草鱼 F<sub>1</sub> 代与正常两性生殖草鱼生化遗传性状上存在的差异发生的机理及可遗传性还有待进一步深入研究。

本研究得到了张轩杰教授、周工建研究员、杨辉、姚占洲、李建中等同志的支持与帮助,谨此表示谢意。

#### 参考文献:

- [1] 刘 筠. 养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社. 1993, 135- 137.
- [2] 葛 伟, 蒋一硅. 鱼类的天然雌核发育[J]. 水生生物学报, 1989, 13(3): 274- 286.
- [3] 俞豪祥, 张海明, 林连英. 广东雌核发育鲫鱼的生物学及养殖试验的初步研究[J]. 水生生物学报, 1987, 11(3) 287- 288.
- [4] 蒋一硅, 俞豪祥, 陈本德, 等. 鲫鱼的人工和天然雌核发育[J]. 水生生物学集刊, 1982, 7(4): 471- 477.
- [5] George Streisinger, Charline W, Naney D, et al. Production of clones of homozygous diploid Zebra fish (*Brachydanio rerio*)[J]. Nature, 1981, 291: 293- 296.
- [6] Johnstone R, Stet R J M. The production of gynogenetic Atlantic salmon, *Salmo salar* L. [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 819- 826.
- [7] Myers J M, Perman D J, Basavaraju Y, et al. Induction of diploid andro-genetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 205- 210.
- [8] 吴清江, 陈荣德, 叶玉珍, 等. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究[J]. 遗传学报, 1981, 8(1): 50- 55.
- [9] 罗 琛, 刘 筠. 人工诱导草鱼和鲫鱼雌核发育的研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1991, 14(2): 154- 159.
- [10] 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.
- [11] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社. 1985.
- [12] 吴力钊, 王祖熊. 鳙鱼同工酶发育遗传学研究[J]. 水生生物学报, 1992, 16(1): 8- 17.
- [13] 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化[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(5): 408- 413.
- [14] 杨书婷, 桂建芳. 两个雌核发育白鲢群体同工酶分析及遗传标记的确定[J]. 水生生物学报, 1999, 23(3): 264- 267.