

青鱼胚胎发育中乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的研究

张 轩 杰

(湖南省生物研究所)

摘要 本文报道了 LDH 同工酶基因在青鱼胚胎发育过程中表达的时序。研究表明, LDH-B 基因在整过发育过程中都处于活动状态;胚胎发育早期的 LDH 同工酶谱与成熟卵的酶谱相同; LDH-A₂B₂、-A₃B 和 -A₄ 三种同工酶在胚胎发育至出膜前期后才出现。

基因功能的分化调节是细胞分化的基础,同工酶是胚胎发育和细胞分化过程中分析分化基因功能的理想基因产物。通过对胚胎发育过程中同工酶的分析研究,对于了解同工酶基因激活的时序与个体形态发生及生理机能的建立之间的关系等问题有十分重要的意义。

鱼类是研究胚胎发育的良好材料。本世纪 60 年代以来,已有一些学者对河鲢、斑马鱼以及白鲢等鱼类胚胎发育过程中的同工酶进行过研究。青鱼是我国主要的淡水养殖对象,对于青鱼胚胎发育过程中基因表达与 LDH 同工酶活性之间的对应关系尚未见正式报道。作者于 1986 年 6 月至 1987 年 6 月进行了这方面的初步研究。

材 料 与 方 法

本实验繁殖所用青鱼亲鱼取自湖南省平江县鱼类良种繁殖场。捕捉性成熟亲鱼催产、人工授精,受精卵置孵化缸中流水孵化。孵化水温为 22—24℃。取成熟卵样品和 10 组不同胚胎发育时期的样品(见表 1)。各样品置液氮中保存备用。实验时从液氮中取出样品,室温解冻。用预冷 0.7% 生理盐水洗卵,加入二倍体积的磷酸缓冲液 (pH7.4, 0.1mol/L), 用玻璃匀浆器在冰水中反复匀浆。然后置 4℃ 的冰冻离心机中离心 45 分钟,转速为 16000rpm, 取上清液保存于冰箱中备用, 24 小时内完成酶样电

表 1 青鱼胚胎样品的分期、特征和时序

试样编号	试样分期	样品的形态特征	受精后时间(时、分)
1	未受精成熟卵	卵球形、卵质均匀分布	受精前
2	1 细胞期	原生质在动物极集中,形成隆起的胚盘	30 分钟
3	卵裂期	分裂球为 64 个,排列比较整齐	2 小时
4	囊胚中期	隆起的胚层开始降低,细胞界限不清	3 小时 20 分钟
5	原肠中期	胚盘下包 2/3, 胚盾出现	8 小时 20 分钟
6	胚孔封闭期	胚孔关闭,神经板中线下凹	12 小时 30 分钟
7	眼基出现期	在前脑两侧,出现一对肾形的眼原基	13 小时 35 分钟
8	耳囊期	耳囊出现在后脑两侧,呈小泡状,体节 15—17 对	16 小时 30 分钟
9	出膜前期	尾略向背方举起,胚胎在卵膜内转动,泄殖孔出现	27 小时 10 分钟
10	眼球色素出现期	眼球复面内出现一对黑色斑点。	36 小时 30 分钟
11	循环期	心脏弯曲,血流清晰可见,血液淡红色	50 小时 10 分钟

泳。实验取样共重复 4 次。

LDH 同工酶分析采用聚丙烯酰胺凝胶电

泳,分离胶浓度为 5.6%,电泳时电流强度为每管 2.5mA。

电泳缓冲系统和染色方法均按 Shaw^[2] (1970) 所介绍的方法, 得到的 LDH 同工酶谱用 CS-910 双波长扫描仪扫描记录。

实验结果

青鱼胚胎发育过程中 LDH 同工酶酶谱从

成熟卵至循环期胚胎有明显变化(图 1、2)。

(一) 胚胎发育早期(第 1—6 期) 成熟卵的 LDH 同工酶酶谱只有两条酶带(LDH-B₁ 和 -AB₁), 且两条酶带的染色活性差异很大。这一酶谱一直保持到卵裂期(图 1—2, 1—3)。胚胎发育至囊胚中期时, 酶活性开始降低, 至胚孔封闭期, 几乎只剩下 LDH-B₁ 一条酶带, LDH-

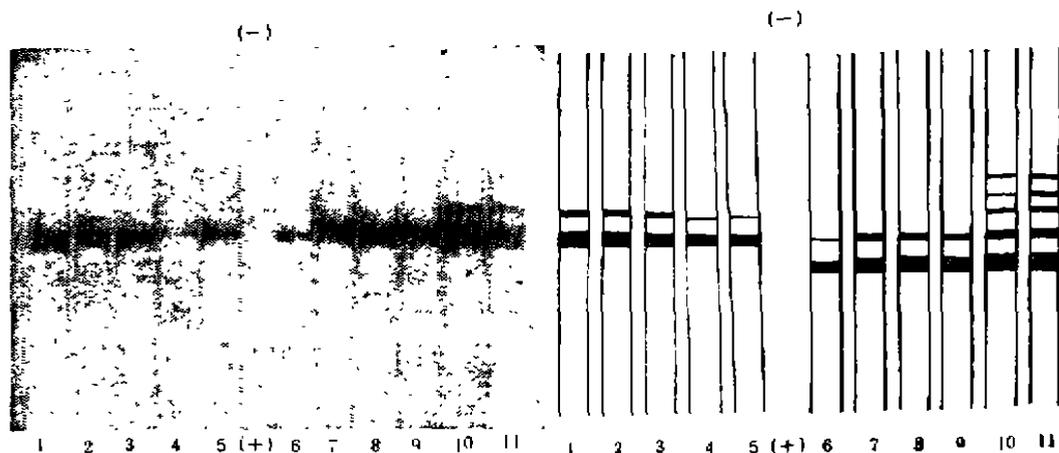


图 1 青鱼不同胚胎发育时期 LDH 同工酶电泳图谱

1. 成熟卵 2. 1 细胞时期 3. 卵裂期 4. 囊胚中期 5. 原肠中期 6. 胚孔封闭期 8. 耳囊期 9. 出膜前期
10. 眼色素出现期 11. 循环期

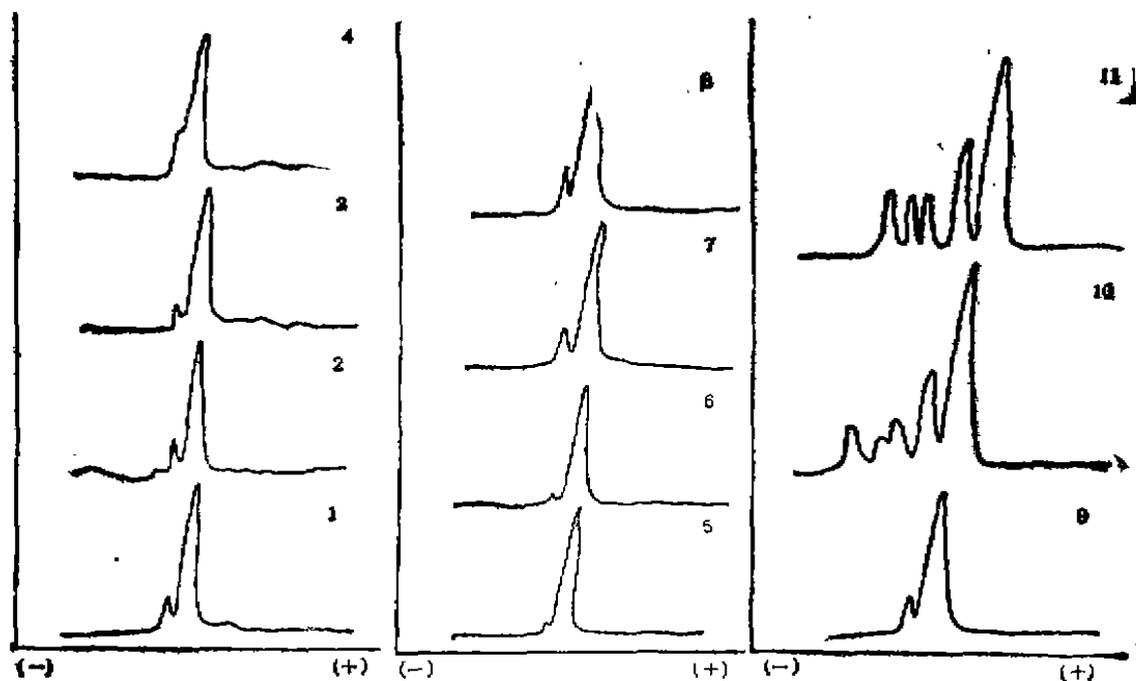


图 2 青鱼不同胚胎发育时期 LDH 同工酶扫描图谱

AB₂ 活性非常低(图 1,4—6)。

(二) 胚胎发育晚期(第 7—9 期) 胚胎发育进入眼基出现期后,酶活性又开始增加,LDH-AB₂ 重新出现,但发育至出膜前期,仍只有 LDH-B₄ 和 -AB₂ 两条酶带存在(图 1—2,7—9)。

(三) 胚后期(第 10—11 期) 胚胎发育至眼球色素出现期(第 10 期),LDH-B₄ 和 -AB₂ 同工酶活性明显增大,LDH-A₂B₂、LDH-A₃B 和 -A₄ 三种同工酶亦开始出现,但活性较弱(图 1—2,10)。胚胎发育至循环期(第 11 期),LDH 同工酶 5 条酶带清晰可见。按 5 种同工酶活性大小排列,以 LDH-B₄ 活性最强、LDH-AB₂ 次之,LDH-A₂B₂、-A₃B 和 -A₄ 三种酶活性基本相同(图 1—2,11)。

分析和讨论

(一) 本文所报道的青鱼胚胎发育过程中 LDH 同工酶的研究结果与王祖熊等^[1]在白鲢中的研究结果基本相同。

已知哺乳类动物 LDH 同工酶是由两个独立的基因控制,合成的亚单位组合成 5 种不同的四聚体。大多数硬骨鱼类的 LDH 同工酶也是由两个基因控制的。青鱼胚胎发育至循环期,明显地出现 5 条 LDH 同工酶带,证明其亦是由两个基因作用的结果。另外,一些学者在鱼类 LDH 同工酶的研究中,发现有 LDH-C₄ 基因控制的一条向阴极移动的酶带(LDH-C₄)存在,本文在青鱼的胚胎中没有发现这一酶带。朱兰非^[2]、陈淑群等^[3]研究过包括肝脏在内的青鱼成体组织的 LDH 同工酶,也未检测到 LDH-C₄ 同工酶的活性,因此,青鱼的遗传组成中很可能没有 LDH-C 基因的存在,或是该基因处于失活状态。

(二) 青鱼胚胎发育的前期(第 9 期以前)只存在 LDH-B₄ 和 LDH-AB₂ 两条带,且 LDH-B₄ 的活性高于 LDH-AB₂ 的活性,说明这一时期的 LDH 同工酶主要是以 LDH-B 基因控制的 B₄ 四聚体形式存在。并伴有少量的

AB₂ 四聚体。值得指出的是,在青鱼胚胎发育过程中,LDH-B 基因都处于活化状态,LDH-B₄ 同工酶担负着所谓“管家酶”的职责,是各期胚胎代谢库的成员。为什么在胚胎发育的早期,胚胎中都只出现母本的 LDH 同工酶谱呢?原因可能有二^[4]: (1) LDH-B 基因在成熟卵中就被活化,并在发育过程中一直处于激活状态。精子入卵后,父本基因受到卵质中存在的抑制因子抑制而无法表达。已有研究表明,在胚胎发育中,亲本基因的表达是不同步的,母本基因常被优先激活而表达;(2) 受精卵和早期胚胎发育中存在的 LDH 同工酶是由早已存在于成熟卵中的 mRNA 翻译或特定的 LDH 前体加工的产物。这一推论也符合关于合子基因一般不在原肠期前表达的观点。胚胎发育至第 4—6 期,LDH 同工酶活性有所降低。王祖熊在白鲢的研究中亦发现类似现象^[1]。可能是 LDH 同工酶在胚胎发育早期发生降解所致。亦可能是 LDH 同工酶的作用在这一发育时期不重要,导致合成 LDH 同工酶的 mRNA 的转录作用降低。因为 LDH 的生理机能是催化丙酮酸和乳酸相互转换。在特定的发育阶段或特异的组织内,某类同工酶可占优势。蛋白质的量不仅反映了蛋白质合成的机能,也表示了蛋白质降解的机能。特异 LDH 同工酶的存在表示了这些同工酶的合成和降解之间的平衡^[4]。第 7 期后酶活性的升高是合子自身基因表达的结果。胚胎发育至眼球色素出现后,除 LDH-B₄ 和 LDH-AB₂ 活性显著上升外,还出现了较多 A 肽组成的 LDH-A₂B₂、-A₃B 和 -A₄ 三种同工酶,并且这三种酶是同时出现的,可以认为这是胚胎自身 LDH-A 基因活化表达的结果。胚胎发育到第 10 期以后,心脏、肝脏等重要组织器官的分化作用都随着形态发生运动而逐步完成,导致了这些分化组织和器官中专一性细胞生理功能的建立和完善。总之,胚胎发育过程中,基因时序的活化和表达控制了酶在特定组织器官中的产生和专一性细胞代谢活动的形成。

参 考 文 献

- [1] 王祖熊等 1985 白鲢不同群体中乳酸脱氢酶和酯酶同工酶个体发生多态性的研究 水生生物学报 9(3): 285—292。
- [2] 朱蓝菲 1982 几种鲤科鱼类及杂种的乳酸脱氢酶同工酶的比较 水生生物学集刊 7(4): 539—545。
- [3] 陈淑群等 1987 青鱼(♀)和三角鲂(♂)不同亚科之间的杂交研究 湖南师范大学学报(自然版) 9(3): 75—81。
- [4] 徐信 发育生物学 华东师范大学出版社 1986 117—118。
- [5] Shaw, C. K. et al, 1970 Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochem. Genes.* 4: 297—320.