

鱼类低温适应机制的研究

(I) 驯化温度对草鱼和鲢鱼几种同工酶活性及酶谱的影响

曹永长* 王祖熊

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

摘要 采用分光光度法测量了 25℃ 和 10℃ 驯养的草鱼、鲢鱼、二代混精鲢鱼及对照组混精鲢鱼的肌肉和肝脏组织中乳酸脱氢酶 (LDH)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 和异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 活性的变化; 采用电泳法对 LDH、酯酶 (EST) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的同工酶谱进行了比较研究。实验结果表明, 草鱼肝脏组织在低温下发生了代谢途径的转换和重组, 而鲢鱼的肌肉组织和肝脏组织都只采取了增加酶浓度的方式。鲢鱼代谢转换机制的不完善, 可能是鲢鱼不耐低温的重要原因之一。三组鲢鱼肝脏组织的酯酶 (EST) 同工酶谱在不同适应温度下的变化表明, 鲢鱼肝脏组织的酯代谢在低温下发生了变化。最后, 作者对混精授精法提高鲢鱼耐寒能力的作用进行了评价。

关键词 草鱼; 鲢鱼; 酶活性; 同工酶; 温度; 混精授精; 驯化

鲢鱼 (*Cirrhinus molitorella*) 是我国珠江流域南部的重要养殖鱼类, 这种鱼对低温的适应能力甚差, 不能忍受 7℃ 以下的低温。冯祖强等研究了鲢鱼冷休克前后脑乙酰胆碱酯酶活力和三种不同同工酶类的动态变化, 并根据鲢鱼在冷休克期间脑乙酰胆碱酯酶活力显著降低和肝组织 LDH 和 EST 同工酶类出现酶活性变化的情况, 讨论了导致鲢鱼耐寒能力差的某些生化因素^[1]。王祖熊等采用混精授精的方法培育鲢鱼鱼种, 获得了能耐 6℃ 低温的混精鲢鱼, 证明混精授精法可以改善鲢鱼的耐寒能力^[2]。本文用草鱼、鲢鱼及混精授精法培育的鲢鱼后代作材料, 比较研究了温度适应对这几组试验鱼的几种不同组织的酶活性和同工酶谱的影响程度。

1 材料和方法

材料: 草鱼 (*Ctenopharygodon idellus*) 为长江野生草鱼, 每尾重约 50 g。鲢鱼是从广州地区购回的当年鱼, 每尾重 10 g 左右。改良鲢鱼: 采用王祖熊等的方法^[2], 以第一代混精鲢鱼作亲本, 用人工授精的方法获得第二代草鱼混精鲢鱼 (简称二代混精鲢鱼), 同时, 由第一代混精鲢鱼自交而得到对照组混精鲢鱼。将以上每种鱼分成两组, 分别在 10℃ 和 25℃ 的室内鱼池中进行驯养, 持续时间至少 4 周。

酶样品的制备采用本实验室的常用方法^[3]进行。用牛血清白蛋白作标准, 采用 Folin-酚法进行蛋白质含量测定^[4]。酶活力测定采用饱和底物法于 15℃ 进行, 酶单位定义为: 在 15℃ 和一定 pH 条件下每分钟催化生成 1 μmol 辅酶 [NAD (P)⁺/NAD (P)]

* 现在华南农业大学畜牧系工作。

1990-04-10 收稿

H] 的酶量为一个酶单位。测定不同的酶所用的反应系统中所含成分如下:

LDH: 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4), 0.76 mmol/L 丙酮酸钠, 0.2 mmol/L NADH。

IDH: 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), 1.0 mmol/L 异柠檬酸钠, 0.15 mmol/L NADP⁺, 1.0 mmol/L MgCl₂。

G6PDH: 67 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5), 0.2 mmol/L NADP⁺, 100 mmol/L 6-磷酸葡萄糖, 10 mmol/L MgCl₂。

同工酶电泳: LDH 同工酶采用垂直板淀粉凝胶电泳法^[5]进行分析, 肌肉组织 LDH 所用电泳缓冲系统为 Tris-柠檬酸系统 (pH7.0), 肝脏 LDH 采用 EBT 系统 (pH8.6)。酯酶同工酶和 SOD 同工酶采用板状不连续的聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行分析, 所用电泳缓冲系统为 Tris-Gly 系统, 点样量为每孔 0.25 mg 酶蛋白, 电压降为 12 V/cm, 4℃ 下电泳 5 h, LDH 和 EST 同工酶的组织化学染色均参考 Shaw & Prasad (1970) 的方法^[13]进行, SOD 同工酶活性染色参考 Beauchamp 等的方法^[6]。

2 结果

2.1 酶活性变化

25℃ 和 10℃ 下驯养的 4 组试验鱼的肝脏和肌肉组织的酶活性如表 1 所示。从表列数据可以看出, 温度的改变使 4 种鱼的肌肉和肝组织的酶浓度发生变化, 但变化情况在不同的鱼中, 以及同一种鱼的不同组织中是不同的。在草鱼肝组织中, 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶浓度在低温适应的鱼中分别下降了 73.3% 和 70.6%, 而同时, 乳酸脱氢酶浓度上升了 83.7%。肌肉组织中, 10℃ 下驯养的鱼的各种酶浓度比 25℃ 驯养的鱼的酶浓度都增加了。另外 3 组鱼 (即鲢鱼, 二代混精鲢鱼和对照组混精鲢鱼) 在不同驯养温度下的酶浓度变化趋势是一致的, 在两种组织中, 所测 3 种酶的浓度都是在低温驯养的鱼中比在高温驯养的鱼中稍高。

表 1 不同温度下驯养的鱼类肝脏和肌肉组织酶活性

酶	组织	草 鱼		鲢 鱼		二代混精鲢鱼		对照组混精鲢鱼	
		25℃	10℃	25℃	10℃	25℃	10℃	25℃	10℃
		LDH	0.840	1.543	0.766	1.470	0.688	1.090	1.231
	肌肉	0.938	1.560	2.950	3.817	2.262	3.581	3.122	4.061
G6PDH	肝脏	0.0162	0.00432	0.0442	0.0779	0.0335	0.0467	0.0505	0.0634
IDH	肝脏	0.0119	0.00356	0.00957	0.0121	0.00772	0.0112	0.01011	0.01514
	肌肉	0.00465	0.0122	0.01316	0.0206	0.0056	0.0273	0.0155	0.0313

2.2 同工酶谱的变化

本实验检测了 LDH, EST 和 SOD 等 3 种同工酶类在不同温度驯养的鱼组织中酶

谱的变化,主要结果如下。

LDH:草鱼和鲮鱼的 LDH 同工酶谱如图 1 所示。3 种鲮鱼的 LDH 同工酶图谱是一致的,但和草鱼的不同。4 种鱼的肌肉和肝脏组织中都未发现 LDH 同工酶谱在不同温度下有什么变化。

EST:3 组鲮鱼肝脏中 EST 的同工酶谱不同,在鲮鱼中出现的 EST-1,在两组混精鲮鱼中不出现,而 EST-3 只出现在这两组混精鲮鱼中(图 2)。这一差别到底是混精授精造成的,还是由于地理上的差异造成的呢(鲮鱼来自广州地区,混精鲮鱼来自广东兴宁)?有待于进一步的研究。

在不同的驯养温度下,3 组鲮鱼的 EST 同工酶谱发生了变化。在 10℃ 下驯养的鱼,没有发现 EST-2 酶带;在 25℃ 下驯养的鱼中,EST-6 酶带消失,而出现了 EST-2 酶带。这一变化,在 3 组鲮鱼中是一致的(图 2)。

SOD:3 组鲮鱼肌肉中的 SOD 同工酶谱是相同的,但和草鱼的却不同(图 3)。鲮鱼肌肉组织的 SOD 同工酶未发现多态现象。不同温度下驯养的鱼类肌肉组织 SOD 同工酶谱没有变化。

3 讨论

3.1 酶浓度变化在鱼类温度适应过程中的作用

关于酶活性变化与低温驯化之间的关系,Hazel 和 Prosser 作了较为详细的评述^[8]。实验证明,在温度适应过程中,许多酶的浓度都发生了变化,这些变化有普遍的规律性:1)参与同一代谢途径的酶浓度发生平行的变化;2)代表各种不同代谢途径的酶的相对活性发生不同的变化,亦即存在代谢途径的转换,在新的环境温度下,鱼类机体调节不同代谢途径的酶浓度,使之有利于总代谢。我们所测的 3 种酶,分别代表 3 个不同的代谢途径。草鱼肝脏组织酶浓度的变化,表明低温下草鱼肝脏组织的代谢途径发生了某种程度的变化。G6PDH 是催化 6-磷酸葡萄糖生成 6-磷酸葡萄糖酸,从而改变葡萄糖降解途径的一个分支酶,低温驯化的草

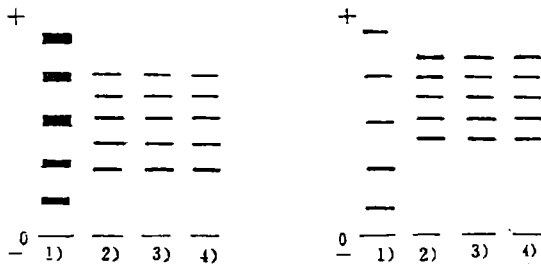


图 1 鱼类肌肉组织(左)和肝组织(右) LDH 同工酶电泳谱。1)草鱼,2)鲮鱼,3)二代混精鲮鱼,4)对照组混精鲮鱼。

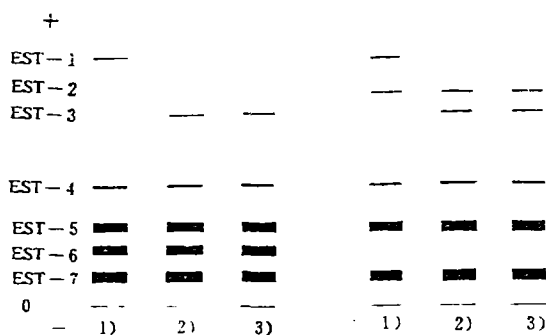


图 2 鲮鱼肝组织 EST 同工酶电泳图谱。1)鲮鱼;2)二代混精鲮鱼;3)对照组混精鲮鱼。左):10℃ 下驯养的鱼类;右):25℃ 下驯养的鱼类。

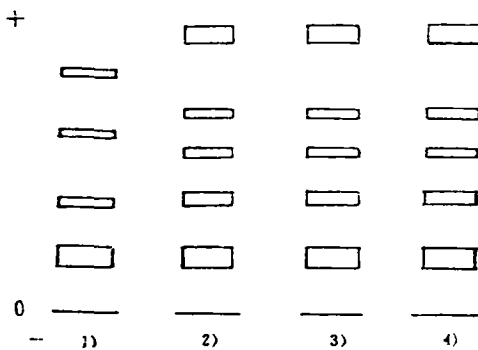


图 3 鱼类肌肉组织 SOD 同工酶电泳图谱 1)草鱼;2)鲮鱼;3)二代混精鲮鱼;4)对照组混精鲮鱼。

鱼肝脏中这种酶浓度的明显降低,说明在低温下草鱼的肝脏组织中,葡萄糖的有效利用受到了抑制。Shaklee等在青翻车鱼肝脏组织中也发现了这一现象^[12]。IDH活性在低温驯化的草鱼肝组织中明显低于高温驯化的鱼,而参与糖酵解途径的LDH活性的变化正好相反,这说明三羧酸循环和糖酵解途径在不同温度下驯化的草鱼肝组织中的作用是不同的。低温适应使糖酵解作用相对增强,而使三羧酸循环活性相对减弱。

草鱼肌肉组织的酶浓度变化与肝组织酶浓度的变化则不一样。所测的3种酶,除G6PDH由于浓度太低未能检测以外,LDH和IDH的浓度在低温驯化的草鱼肌肉组织中都增加。考虑到机体所处的环境温度对酶活性的影响,这种酶浓度的增加很可能是机体为了维持正常的代谢水平而采取的一种补偿机制。也就是说,在草鱼肌肉组织中,低温适应并没有导致代谢途径的转换,而只是靠增加酶浓度来维持正常的代谢水平。

草鱼不同组织的酶浓度的不同变化方式表明,温度适应对草鱼代谢途径的影响是组织特异性的。Evans等在虹鳟(*Salmo gairdneri*)中^[7],Shaklee等在*Lepomis cyanellus*中^[12]都观察到,温度适应导致的酶浓度变化的方向和程度与所测的组织有关。在低温适应的*Lepomis cyanellus*中,参与糖酵解的5种酶(GPI,ALD,GAPDH,PK,LDH)的浓度在脑组织中都增加,而在肌肉组织中都降低;而另外3种与有氧代谢有关的蛋白质(SDH,CYTC,CYTOX)在肌肉组织中都增加,说明低温导致了神经组织无氧代谢的加强,而使肌肉组织无氧代谢减弱,有氧代谢加强。广温性鱼类都具有这种低温适应能力,它们在低温环境下,通过调节不同代谢途径的酶浓度,使代谢途径发生转换,以利于机体的总代谢。

适应不同温度的鲢鱼肝脏和肌肉组织的酶浓度变化是一致的,即低温导致了两种组织中各种酶浓度的增加。这和草鱼肌肉组织中出现的情况是相同的。我们认为,这种酶浓度的增加是机体为维持正常的代谢水平而采取的一种补偿机制,这是一种最简单的也是主要的低温补偿机制,在一定的温度范围内,这种补偿机制是有效的。然而,对于变温性的鱼类来说,如果超出了它生活范围内所能忍受的温度,那么,单是增加酶的浓度,就不可能成为最佳的低温适应方式;其次,细胞膜的结构和细胞的容量也决定了这种机制的局限性,即酶能附着的膜和其它细胞结构也是有限的。由于鲢鱼长期生长在温暖地区,环境温度的变化相对较小,这种简单的补偿机制有可能使鲢鱼完成对较小温度变化的适应。但一旦遭遇到更低温的环境(如7℃以下的低温)时,这种补偿机制就失去了作用。冯祖强等研究了鲢鱼冷休克前后几种同工酶类的动态变化,发现在冷休克期间,鲢鱼肝脏LDH活性升高,而MDH和EST活性降低,说明冷休克期间的有氧代谢途径和无氧代谢途径的比例发生了变化。我们注意到,这种变化和我们在草鱼肝脏中观察到的酶浓度变化情况相似。这说明,代谢途径的转换和重组是一种比单纯增加酶浓度更有效的适应机制,而鲢鱼作为一种狭温性鱼类,还没有完善地建立起这种更能适应低温环境的补偿机制。如果说代谢途径的重组和转换是鱼类适应低温环境的一种重要的补偿机制的话,那么,鲢鱼不能忍受低温环境这一事实也就不难理解了。

3.2 同工酶谱变化在鱼类低温适应过程中的作用

关于同工酶谱在温度适应过程中的变化,早期的实验结果由于过分重视了同工酶多态性的作用而被夸大了。随着人们对同工酶遗传基础的深入了解,现在人们认为同工酶的变化可能只是多倍体的鱼类(如硬头鲮、金鱼)中所特有的一种低温适应机制^[14]。

我们检测了3组鲢鱼组织的LDH、EST和SOD同工酶,除肝脏EST同工酶外,LDH和SOD同工酶在两种适应温度下酶谱都没有发生变化。本实验中,检测到EST有6条酶带,这和前人的结果^[5]不同,可能是由于所用的电泳方法不同所致。尽管3组鲢鱼肝脏的酯酶同工酶谱不尽相同,但温度驯化对它们的影响是一致的,即EST-6的出现与低温适应相联系,而EST-2的出现与高温适应有关。酯酶是一个很复杂的水解酶家族,它们的亚基组成和遗传基础迄今尚未了解清楚。我们认为,EST-2和EST-6可能是鲢鱼在不同温度下所出现的同一种酶的不同分子形式,EST-2适合于温暖环境,而EST-6适合于低温环境。这一结果表明,鲢鱼体内脂肪代谢在温度适应过程中是发生了变化的。而这种变化的意义和生理作用究竟有多大,现有的资料还无法说明。

3.3 混精授精法对提高鲢鱼耐寒能力的作用

混精授精法培育的鲢鱼鱼种在形体特征上和鲢鱼相同。本实验中,两组混精鲢鱼(二代混精鲢鱼和对照组混精鲢鱼)的同工酶谱及其变化,以及酶浓度的变化情况都和鲢鱼相同。早期的研究证明,混精授精法能够提高鲢鱼的耐寒能力^[2],但是,混精授精法培育的鲢鱼还没有一条能忍受5℃左右的低温。那么,混精授精法对于提高鲢鱼的耐寒能力的作用到底有多大呢?我们注意到,在相同的饲养条件下,鲢鱼膜脂中不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸的比值(U/S)低于草鱼,鲢鱼的U/S亦低于混精鲢鱼,而一代混精鲢鱼的U/S又低于二代混精鲢鱼(关于这方面的实验结果将另文发表)。因此,我们认为,混精授精法对于提高鲢鱼的耐寒能力有一定的作用,但从糖代谢途径对低温的适应情况、同工酶谱的变化以及膜脂组成情况来看,效果是不理想的,也就是说,混精授精法对提高鲢鱼耐寒能力的作用相当有限。杂交的方法^[1]和混精授精法对提高鲢鱼的耐寒能力都曾起到过一定的作用,但都没有从根本上解决问题。现在,转基因鱼模型的建立^[4]为我们提供了一条可行的途径。如果能从耐寒的鱼类中分离出和提高鱼类耐寒能力有关的基因,然后将这些外源基因导入鲢鱼受精卵中,就有可能在较短的时间内获得鲢鱼耐寒新品种。

参 考 文 献

- 1 王祖熊等. 鲢鱼遗传改良的研究. 1. 杂交育种和遗传性状分析. 水生生物学集刊, 1984, 8(2): 195~206
- 2 王祖熊等. 鲢鱼混精授精的育种试验. 水产学报, 1985, 9(2): 203~206
- 3 冯祖强等. 鲢鱼冷休克及其死亡的某些生化因素. 水生生物学集刊, 1984, 8(3): 289~297
- 4 朱作言等. 转基因鱼模型的建立. 中国科学(B辑), 1989(2): 147~155
- 5 吴力钊等. 草鱼同工酶发育遗传学研究. 1. 不同组织器官的同工酶分析. 遗传学报, 1987, 14(4): 278~286
- 6 Beauchamp C O and Fridovich L. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem, 1971, 44: 275~287
- 7 Evans R M, et al. The effect of temperature and photoperiod on the respiratory metabolism of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Can J Zool, 1962, 40: 107~118
- 8 Hazel J R and Prosser C L. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. Physiol Rev, 1974, 54: 620~677

- 9 Lowry O H, et al. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265~273
- 10 Owen J M, et al. Studies on the nutrition of marine flatfish; the effect of dietary fatty acids on the tissue fatty acids of plaice (*Pleuronectes platessa*). *Marine Biol*, 1972, 13: 160~165
- 11 Roots B I. Phospholipids of goldfish (*Carassius auratus L.*) brain; the influence of environmental temperature. *Comp Biochem Physiol*, 1968, 25: 457~466
- 12 Shaklee J B, et al. Molecular aspects of temperature acclimation in fish; contributions of changes in enzyme activities and isozyme patterns to metabolic reorganization in the green sunfish. *J Exp Zool*, 1977, 201: 1~20
- 13 Shaw C R & Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes—A compilation of recipes. *Biochem Genet*, 1970, 4: 297~320
- 14 Somero G N. The roles of isozymes in adaptation to varying temperatures. *Isozymes II Physiological function* (Edited by C. L. Markert). New York: Academic Press, 1975, 221~234

**STUDY ON THE MECHANISM OF LOW TEMPERATURE ADAPTATION IN FISH
I. EFFECTS OF ACCLIMATION TEMPERATURE ON ISOZYME ACTIVITIES
AND ISOZYME PATTERNS IN TISSUES OF GRASS CARP AND MUD CARP**

Cao Yongchang Wang Zuxiong

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract Spectrophotometric techniques were used to monitor the changes of isozyme activities in liver and muscle tissues of the grass carp, mud carp, second successive generation mud carp derived from eggs fertilized with mixed—milt, and linebred progeny of mud carp originally derived from eggs fertilized with mixed—milt as control after thermal acclimation. The results showed that some metabolic reorganizations occurred in the liver tissue of the grass carp during cold acclimation, and that increasing enzyme concentration was the major or only response in the tissues of the mud carp. The authors consider that the mechanism of metabolic reorganizations is not perfect in the tissues of mud carps, which is the major reason why they can not tolerate temperature lower than 6—7°C. The changes in the isozyme patterns of esterase (EST) in liver tissue of the three tested mud carp sets indicated that some changes must have occurred in the lipid metabolism of their liver tissues during thermal acclimation. The effect of the Mixed—milt Fertilization Method on improving the capacity for low temperature tolerance in mud carp was discussed at the end of the paper.

Key Words Grass carp; Mud carp; Enzyme activity; Isozyme pattern; Temperature; Acclimation; Mixed—milt fertilization method