

DOI: 10.12264/JFSC2021-0163

## 刀鲚染色体核型及不同组织中的 LDH 同工酶

蒋俊<sup>1,2</sup>, 宋超<sup>1,2,3</sup>, 周丽青<sup>4</sup>, 胡丽娟<sup>1,2</sup>, 谢志伟<sup>1,2</sup>, 刘若晖<sup>1,2</sup>, 庄平<sup>1,2,3</sup>, 张涛<sup>1,2,3</sup>

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部东海与长江口渔业资源环境科学观测实验站, 上海 200090;
2. 上海长江口渔业资源增殖与生态修复工程技术研究中心, 上海 200090;
3. 中国水产科学研究院长江口渔业生态重点实验室, 上海 200090;
4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

**摘要:** 为筛选出刀鲚种质生化遗传标记, 并从细胞遗传与生化遗传层面丰富刀鲚(*Coilia nasus*)的种质资源研究内容, 本研究以刀鲚鳃丝细胞为材料, 进行短期离体培养制备染色体标本, 并采用 PAGE 电泳法对刀鲚的心脏、肝脏、肾脏、眼、肌肉、鳃 6 种组织进行乳酸脱氢酶(LDH)检测, 比较不同组织及不同群体间 LDH 同工酶的差异。结果表明, 刀鲚雌雄染色体数量不存在差异, 染色体数目均为  $2n=48$ , 全部属于端部着丝粒染色体(t), 核型为  $2n=48t$ , 臂数(NF)=48, 其性染色体类型为 ZW/ZZ 型, 与以往研究中刀鲚与短颌鲚(*Coilia brachygnathus*)染色体核型为 ZO/ZZ 型不同; 刀鲚雌性染色体中期分裂相中存在一团“点状物质”, 对其进行众数分析后发现, 该“点状物质”分布概率在 90.8%以上(120 个中期分裂相), 确认其为鲚属鱼类雌性异形性染色体。6 种组织中共检测到 6 条 LDH 同工酶酶带, 其中肝脏组织有 6 条酶带, 活性最低, 其余组织均有 5 条酶带, 活性各不相同; 不同群体间刀鲚 LDH 活性存在差异, 并存在个体差异性; LDH 在刀鲚体内分布较广泛, 具有明显的组织特异性, 其中眼 LDH 酶带表达丰富并且活性稳定, 可作为鉴定刀鲚种质的特征生化遗传标记。

**关键词:** 刀鲚; 染色体; 核型; 异形性染色体; 乳酸脱氢酶(LDH); 组织特异性

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0234-11

刀鲚(*Coilia nasus*)又名长颌鲚, 俗称刀鱼、毛鲚、野毛鲚等, 在我国东海和黄渤海, 以及长江、钱塘江、淮河及其他通海河流均有分布<sup>[1]</sup>。刀鲚是长江口主要经济鱼类, 因其产量高、具有易捕捞性质, 是长江口重要的经济捕捞对象, 具有较高的经济价值。刀鲚与凤鲚(*Coilia mystus*)、前颌间银鱼(*Hemisalanx prognathus*)、白虾(*Exopalaemon* spp.)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)一并曾有长江口“五大渔汛”之称, 但近年来, 由于过度捕捞、水域污染和栖息生境的改变等因素, 刀鲚已基本不能形成渔汛, 其资源岌岌可危<sup>[1]</sup>。因此, 刀鲚种质资源研究对于刀鲚遗传育种和分类研究

方面具有重要参考意义, 同时也是对其种质资源进行保护和利用的必要前提。

近年来, 有关刀鲚的研究主要集中在其生物学<sup>[2-3]</sup>、繁养殖<sup>[4-5]</sup>、应激性<sup>[6-7]</sup>、洄游机理<sup>[8]</sup>等方面。通过核型分析所得的结论在鱼类遗传育种方面是重要的参考资料<sup>[9-10]</sup>。现有研究表明, 鲚属鱼类中刀鲚<sup>[11]</sup>、短颌鲚(*Coilia brachygnathus*)<sup>[12]</sup>和凤鲚<sup>[13]</sup>的雌雄染色体数量存在差异, 雌性染色体数目为  $2n=47$ , 核型公式为  $2n=47t$ , 雄性染色体数目为  $2n=48$ , 核型公式为  $2n(\♂)=48t$ ; 雌性染色体臂数 NF=47, 雄性 NF=48; 都存在性染色体, 其性染色体类型为 ZO/ZZ 型。已有研究在短颌鲚与

收稿日期: 2021-04-30; 修订日期: 2021-06-02.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900802); 上海市科技兴农项目(2019-02-08-00-07-F01129; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2020TD13).

作者简介: 蒋俊(1995-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为水产动物种质资源. E-mail: jiangunn@163.com

通信作者: 张涛, 研究员, 主要从事鱼类生态学与繁育生物学研究. E-mail: zhangtaoyfi@163.com

凤鲚染色体中发现了一个明显的“点状物质”<sup>[12-13]</sup>, 但这个“点状分裂相”是杂质还是染色体, 尚未对其进行进一步的分析和确认, 故本研究针对这一发现进行深入的研究与分析, 以探究鲚属鱼类的染色体核型分类。

同工酶作为一种生化遗传参数, 在鱼类物种鉴定、亲缘关系研究和群体遗传结构分析等方面已得到广泛应用<sup>[14]</sup>。刀鲚生化遗传特性已有研究报道<sup>[15-17]</sup>。周宗汉等<sup>[15]</sup>研究表明, 刀鲚在肝脏、生殖腺、肌肉中乳酸脱氢酶(LDH)酶谱都由 I 型(3 条区带)和亚型(4 条区带)两种谱型组成; 刘文斌<sup>[16]</sup>对长江刀鲚和太湖刀鲚两个不同生态型的 LDH 进行比较, 发现两个地区刀鲚肌肉、脑、心脏和肝脏 4 个组织表现的酶带数量与迁移率都相同, 仅表现出酶带活性的差异; 徐钢春等<sup>[17]</sup>进一步探讨刀鲚不同组织的 LDH 表型差异, 发现眼是刀鲚 LDH 表达较为典型的组织, 肌肉和血清不存在 LDH-AB<sub>3</sub> 酶带, 其余组织均表现为 5 条酶带, 各组织均未发现由 LDH-C 基因控制表达的酶带。对比分析发现, 刘文斌<sup>[16]</sup>与徐钢春等<sup>[17]</sup>的研究存在不同点, 其中刘文斌<sup>[16]</sup>研究发现肌肉组织为 5 条酶带, 而徐钢春等<sup>[17]</sup>发现肌肉仅表现为 4 条酶带, 针对以上结论差异性, 本研究期望通过对刀鲚肌肉、肝脏等 LDH 进行再次分析, 得到刀鲚群体的 LDH 表达稳定遗传性与差异性, 在此基础上筛选出较为稳定的 LDH 生化遗传标记, 以丰富刀鲚群体的种质资源研究。

本研究从细胞水平、生化水平两个层面对刀鲚的种质特征进行分析评估, 以期获得刀鲚的核型特征和 LDH 酶谱特征, 从而了解其种质特征, 制定出相关种质检验标准, 为种质鉴别提供理论依据, 同时丰富刀鲚的种质资源研究数据, 为合理地保护刀鲚种质资源以及其系统进化研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

染色体研究供试刀鲚于 2020 年 6 月采自崇明内河, 为 1~2 龄性成熟个体, 用于染色体核型分析的 15 尾(10♀, 5♂)刀鲚, 体重分别为(68.69±

1.62) g (♂)和(64.54±0.41) g (♀), 体长分别为(24.05±1.92) cm (♀)和(22.26±1.78) cm (♂)。样品采集后放入泡沫箱中暂养 20 min, 待鱼体稳定后进行实验, 暂养水温控制在 24 °C。

LDH 研究供试刀鲚于 2020 年 9 月和 11 月分别采自江苏省扬中市、上海市崇明内河、江苏省连云港市灌河和浙江省嵊泗县 4 地, 扬中市刀鲚为养殖刀鲚(长江野生刀鲚群体人工繁育后 F1), 其余三地为野生刀鲚, 共 36 尾, 体重(23.52±13.76) g, 体长(18.9±3.95) cm。现场解剖试验鱼, 迅速获取心脏、肝脏、肾脏、眼、肌肉、鳃等组织, 用 PBS 充分洗涤, 沥干水分后, 装入冻存管, 液氮速冻, 分组移入干冰中, 后转入-80 °C 冰箱冻存待用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 染色体标本的制作** 采用蒋俊等<sup>[13]</sup>鱼类鳃丝细胞短期离体培养方法制备刀鲚染色体标本。实验采样现场取刀鲚鳃丝, 放入 0.04%秋水仙素溶液(50%过滤当地海水+50%去离子水)中; 35 min 后将样品置入 0.05 mol/L KCl 低渗溶液中, 上下颠倒数次后静置 50 min; 收集样品, 置入预冷的 Carney's 固定液( $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{冰醋酸}} = 3 : 1$ )中, 冰浴固定, 每 15 min 更换固定液, 共换液 3 次。将固定后的样品放入已预冷的解离液( $V_{\text{冰醋酸}} : V_{\text{蒸馏水}} = 1 : 1$ )中, 将鳃丝剪碎, 用预冷的一次性吸管吹散鳃丝上的细胞, 用手指轻弹管壁或将离心管上下颠倒数次, 形成样品的细胞悬浮液, 最后放入 4 °C 冰箱预冷。热滴片制片, 采用 10%吉姆萨染液染色 30 min, 蒸馏水冲洗 5~10 s, 自然干燥后镜检。

**1.2.2 核型计数及分析** OLYMPUS BX51 显微镜下对刀鲚染色体中期分裂相进行拍照, 每尾鱼平均选取 12 个, 共获得 180 个分布良好且清晰的分裂相, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件对染色体进行计数。雌雄各选 15 个具有代表性(分布效果良好、数目清晰完整、长度适中、着丝点清楚)的中期分裂相进行染色体配对和长度测量, 根据 Levan 等<sup>[18]</sup>的标准对染色体进行配对、分类、组型排列, 计算染色体相对长度(实测单条长度×2/全部染色体长度总和×100%)。采用 *t* 检验方法, 利用 SPSS 24 软件对雌雄刀鲚间及相邻的染色体相对长度进行

差异显著性检验( $P < 0.05$ )认为差异显著。

**1.2.3 组织酶液的制备** 实验前,准确称取适量组织,按 1:10 (g:mL)的比例加入 4 °C 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0),在冰浴条件下研磨充分,放入离心管,冷冻离心机 4 °C 12000 r/min 条件下离心 30 min,取上清酶液与等量蔗糖溶液混合后,加入适量 1%的溴酚蓝溶液作指示剂,4 °C 短时间保存。

**1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳** 采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳(PAGE)方法对各组织进行电泳,参考张庆朝等<sup>[19]</sup>和葛彦龙等<sup>[20]</sup>的方法,分离胶浓度为 6% (pH 8.8),浓缩胶浓度为 4.0% (pH 6.8),电极缓冲液为 Tris-Gly (pH 7.0),冰浴条件下(4 °C 左右),180 V 恒压电泳 40 min。

**1.2.5 LDH 同工酶染色方法及命名** LDH 同工酶染色方法参照朱蓝菲<sup>[21]</sup>、刘磊等<sup>[22]</sup>的方法略作修改,具体方法为:乳酸钠(1 mg/mL):氧化型辅酶 I 溶液( $\text{NAD}^+$ , 5 mg/mL):NaCl (0.1 mol/L):甲硫吩嗪(PMS, 1 mg/mL):氯化硝基四氮唑蓝(NBT, 1 mg/mL):磷酸盐缓冲液(PBS, 0.5 mol/L, pH 7.5)=2.5:4.0:2.5:1.0:10.0:5.0,按比例进行配制,现配现用;电泳结束后,取出凝胶板,完全浸入染色液中,恒温(37 °C)染色 15 min,待显带清晰后,蒸馏水冲洗,相机拍照保存。LDH 的命名及缩写参考 Shaklee 等<sup>[23]</sup>的方法。

**1.2.6 LDH 研究统计分析** 根据 LDH 酶带的分布与相对迁移率,从电泳阴极到阳极依次由 LDH-C<sub>4</sub>、LDH-A<sub>4</sub>、LDH-A<sub>3</sub>B、LDH-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>、LDH-AB<sub>3</sub>、LDH-B<sub>4</sub>命名,并对酶带数量进行分析,观察各组织酶带数量是否存在差异;采用 Image J 对电泳图谱进行灰度识别,绘制电泳图谱模式图,分析刀鲚 LDH 酶带的活性表达。

## 2 结果与分析

### 2.1 刀鲚二倍体染色体数目

在显微镜下,对 15 尾刀鲚(♂5, ♀10)的 180 个中期分裂相(2n, ♂60, ♀120)进行计数、统计(表 1)。结果表明,刀鲚染色体数目为 48 条,雄性占所测 60 个雄性中期分裂相的百分比为 86.0%,雌性占所测 120 个雌性中期分裂相的百分比为 75.8%,综上可以判定刀鲚的染色体数目为 2n=48。

表 1 刀鲚分裂中期染色体数目统计结果

Tab. 1 The metaphase chromosome number of *Coilia nasus*

项目 item	染色体数(2n) number of chromosomes (2n)						
	性别 sex	<6	46	47	48	49	合计 total
中期分裂相数目 number of metaphases	雄性 male	3	2	2	52	1	60
	雌性 female	23	3	2	91	1	120
所占百分比/% percentage	雄性 male	5	3.3	3.3	86	1.7	100
	雌性 female	15.3	2.7	5.3	75.8	0.7	100

### 2.2 刀鲚的染色体核型

通过对刀鲚雌鱼和雄鱼各 15 个良好的中期分裂相进行显微拍照统计分析,得出刀鲚雌鱼和雄鱼染色体的相对长度和臂比(表 2)。按照 Leven 等<sup>[18]</sup>的标准分析,刀鲚的染色体组型均为 t 型(染色体全部属于端部着丝粒染色体),核型公式为:2n=48t, NF=48。雄性刀鲚染色体相对长度最短为 2.98±0.24,最长为 5.67±0.34;雌性刀鲚染色体相对长度最短为 2.32±0.30,最长为 5.67±0.22。*t* 检验结果显示,雌雄刀鲚第 12~16 和 24 对染色体的相对长度差异显著( $P < 0.05$ ),其中第 13、24 对染色体相对长度雌雄差异极显著( $P < 0.01$ )。

根据表 1 数据,按照染色体相对长度由大到小排列,得到刀鲚的染色体中期分裂相核型图(图 1, 图 2),结果发现,刀鲚的雌雄染色体均可配对成为 24 对同源染色体,其染色体数为 48 条,但在雌鱼中发现第 24 对染色体中有一“点”状的染色体(图 1 箭头所示)与其他染色体形态存在明显差异。为验证该“点状物质”是否存在于刀鲚雌性个体中,本研究对 15 尾刀鲚雌鱼共 120 个染色体中期分裂相进行了众数统计分析(表 3),结果发现在刀鲚雌鱼的 120 个中期分裂相中,具有该“点状物质”的分裂相所占百分比为 90.80%,证明该“点状物质”为刀鲚雌鱼的染色体,可称其为刀鲚的异形性染色体。综上认为,在刀鲚中存在异形性染色体,其性染色体类型为 ZW/ZZ 型。

### 2.3 刀鲚不同组织 LDH 同工酶分析结果

PAGE 电泳图谱及其模式图分析结果显示,刀鲚 LDH 酶带共有 6 条(图 3),由 LAD-A、LDH-B

表 2 刀鲚染色体相对长度和臂比值  
Tab. 2 The relative length and arm ratio of *Coilia nasus* chromosomes

n=15;  $\bar{x} \pm SE$

序号 no.	雄性 male			雌性 female			雌雄差异性 difference between male and female
	相对长度/% relative length	臂比 arm ratio	类型 type	相对长度/% relative length	臂比 arm ratio	类型 type	
1	5.67±0.34	∞	t	5.67±0.22	∞	t	--
2	5.14±0.26	∞	t	5.17±0.20	∞	t	-
3	4.94±0.17	∞	t	4.97±0.17	∞	t	-
4	4.81±0.15	∞	t	4.80±0.09	∞	t	-
5	4.69±0.13	∞	t	4.69±0.10	∞	t	-
6	4.59±0.10	∞	t	4.61±0.10	∞	t	-
7	4.50±0.07	∞	t	4.52±0.10	∞	t	-
8	4.42±0.07	∞	t	4.45±0.10	∞	t	-
9	4.34±0.07	∞	t	4.38±0.10	∞	t	-
10	4.28±0.07	∞	t	4.32±0.11	∞	t	-
11	4.23±0.07	∞	t	4.27±0.09	∞	t	-
12	4.16±0.07	∞	t	4.23±0.09	∞	t	*
13	4.10±0.07	∞	t	4.17±0.08	∞	t	**
14	4.04±0.08	∞	t	4.11±0.09	∞	t	*
15	3.98±0.07	∞	t	4.05±0.07	∞	t	*
16	3.92±0.09	∞	t	3.97±0.05	∞	t	*
17	3.85±0.10	∞	t	3.90±0.07	∞	t	-
18	3.79±0.11	∞	t	3.83±0.07	∞	t	-
19	3.71±0.12	∞	t	3.73±0.10	∞	t	-
20	3.65±0.13	∞	t	3.64±0.15	∞	t	-
21	3.55±0.15	∞	t	3.55±0.23	∞	t	-
22	3.41±0.10	∞	t	3.44±0.30	∞	t	-
23	3.26±0.16	∞	t	3.27±0.31	∞	t	-
24	2.98±0.24	∞	t	2.32±0.30	∞	t	**

注: ∞表示臂比大于 7.0, -表示差异不显著(P>0.05), \*表示差异显著(P<0.05), \*\*表示差异极显著(P<0.01).

Note: ∞ indicates that the arm ratio is greater than 7.0; - indicates that the difference is not significant (P>0.05); \* indicates that the difference is significant (P<0.05); \*\* indicates that the difference is extremely significant (P<0.01).

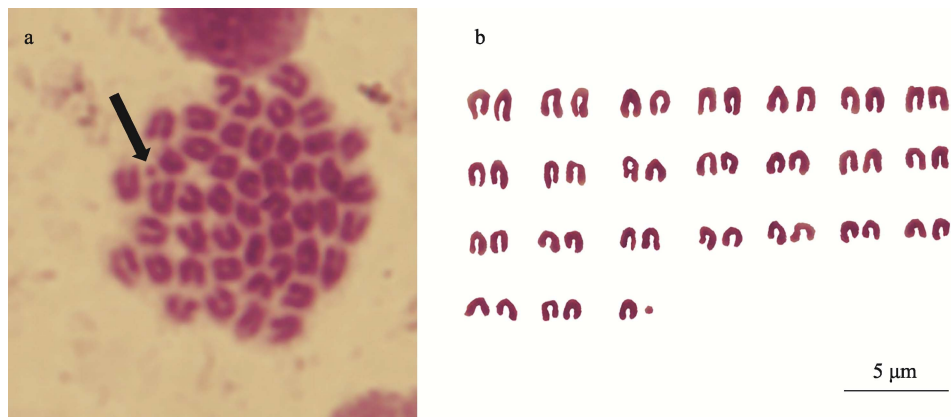


图 1 雌性刀鲚染色体中期分裂相(a)与核型图(b)  
箭头表示异形性染色体.

Fig. 1 The metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of the female *Coilia nasus*  
Arrow shows heteromorphic sex chromosome.

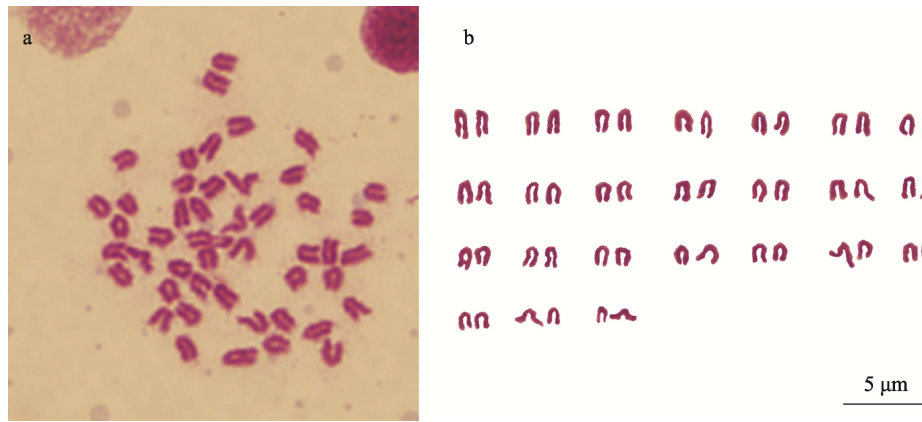


图 2 雄性刀鲚染色体中期分裂相(a)与核型图(b)

Fig. 2 The metaphase chromosomes (a) and karyotype (b) of the male *Coilia nasus*

表 3 刀鲚存在异形性染色体中期分裂相数目  
Tab. 3 Number of metaphases with heteromorphic sex chromosomes in *Coilia nasus*

项目 item	中期分裂相 metaphase		
	无 no	有 have	合计 total
存在异形性染色体数目 number of heteromorphic sex chromosomes	11	109	120
所占百分比/% percentage	9.2	90.8	100

位点自由组合而成的 LDH-A<sub>4</sub>、LDH-A<sub>3</sub>B、LDH-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>、LDH-AB<sub>3</sub>、LDH-B<sub>4</sub> 5 种典型 LDH 酶带, 在 6 种组织中均有表达, 各组织的活性强度不同(图 3); 由 LDH-C 位点组合而成的第 6 条酶带 LDH-C<sub>4</sub> 仅在刀鲚肝脏酶谱中有表达。根据刀鲚各组织 LDH 电泳酶谱染色深浅和模式图分析发现(图 3), 刀鲚不同组织的 LDH 活性具有组织特异性, 在心脏中, LDH-A<sub>4</sub>、LDH-A<sub>3</sub>B、LDH-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>、LDH-AB<sub>3</sub>、LDH-B<sub>4</sub> 5 条酶带由正极到负极, 活性逐渐减弱, LDH-B<sub>4</sub> 活性表达占优势;

肝脏相对其他组织酶带活性最小, 活性强度分布不均, 其 LDH-A<sub>3</sub>B 表达占优势; 肾脏中 LDH-B<sub>4</sub> 活性表达占优势, 其余 4 条酶带活性强度分布均匀; 眼、肌肉、鳃中, LDH-B<sub>4</sub> 活性表达均占优势, 眼中 LDH-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 活性表达较弱, 肌肉和鳃中 LDH-AB<sub>3</sub> 活性表达相对较弱。

### 2.4 不同群体刀鲚 LDH 比较分析结果

#### 2.4.1 眼 LDH 比较分析

对 4 个不同群体刀鲚眼 LDH 电泳酶谱和模式图进行比较分析(图 4), 结果显示, 扬中群体、崇明群体、灌河群体中不同个体眼的酶谱条带都呈现出 5 条带, 扬中群体中 3 号个体, 嵊泗群体中 11 号个体的酶带表达的相对位置与其他个体所在位置存在差异性; 在 4 个群体中, 除 3 号、11 号个体以外, 其余个体的 LDH-B<sub>4</sub> 活性表达占优势, 而 3 号、11 号个体的 LDH-A<sub>4</sub> 表达占优势, 表现出刀鲚个体酶带活性差异性; 4 个群体中, 眼的 LDH 同工酶个体平均活性从强到弱依次为扬中群体、崇明内河群体、灌河群体和嵊泗群体。

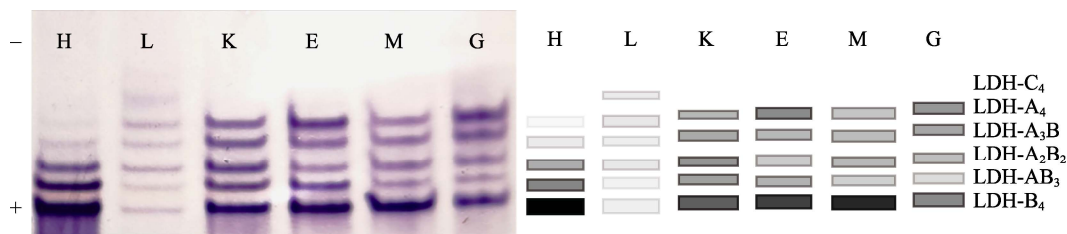


图 3 刀鲚 LDH 同工酶 PAGE 电泳酶谱及模式图

H: 心脏; L: 肝脏; K: 肾脏; E: 眼; M: 肌肉; G: 鳃.

Fig. 3 PAGE electrophoresis zymogram and pattern map of *Coilia nasus* LDH isozyme  
H: heart; L: liver; K: kidney; E: eye; M: muscle; G: gill.



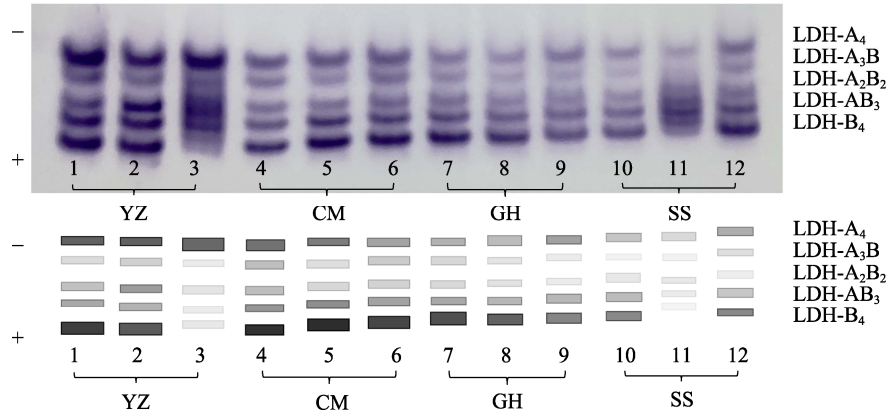


图 4 4 个不同群体刀鲚眼 LDH 同工酶 PAGE 电泳酶谱及模式图

YZ: 扬中; CM: 崇明; GH: 灌河; SS: 嵊泗.

Fig. 4 LDH isoenzyme PAGE electrophoresis zymogram and pattern map of eye in *Coilia nasus* from four populations  
YZ: Yangzhong population; CM: Chongming population; GH: Guanhe population; SS : Shengsi population.

**2.4.2 肌肉 LDH 比较分析** 对 4 个不同群体刀鲚肌肉 LDH 电泳酶谱和模式图进行比较分析(图 5), 结果显示, 扬中群体、崇明群体、灌河群体中不同个体肌肉组织的酶带均呈现为 5 条带, 而在嵊泗群体中, 10 号个体仅表达出 3 条酶带, 无 LDH-A<sub>3</sub>B、LDH-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 和 LDH-B<sub>4</sub> 条带, 不同刀鲚个体间酶带数量呈现差异性。在扬中群体中, LDH-A<sub>4</sub> 活性表达占优势; 崇明内河群体和灌河群体中, LDH-B<sub>4</sub> 表达占优势; 嵊泗群体中, 9 号、10 号个体中 LDH-A<sub>4</sub> 活性表达占优势, 而 11 号、12 号个体 LDH-B<sub>4</sub> 表达占优势; 表现出明显的个体酶带活性表达差异性; 4 个群体中, 肌肉组织的 LDH 同工酶个体平均活性从强到弱依次为扬中群体、嵊泗群体、崇明内河群体和灌河群体。

**2.4.3 肝脏 LDH 比较分析** 对 4 个群体肝脏组织 LDH 电泳酶谱和模式图进行比较分析(图 6), 结果显示, 4 个群体刀鲚均呈现出 6 条酶带, 但在嵊泗群体中, 10 号个体仅表达出 3 条酶带, 无 LDH-A<sub>3</sub>B、LDH-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 和 LDH-B<sub>4</sub> 条带, 不同刀鲚个体间酶带数量呈现差异性。在扬中群体、崇明内河群体和灌河群体中, LDH-C<sub>4</sub> 活性表达占优势; 嵊泗群体中, 9 号个体和 12 号个体 LDH-A<sub>4</sub> 活性表达占优势, 11 号个体 LDH-C<sub>4</sub> 活性表达占优势, 个体酶带活性表现出明显差异性; 4 个群体中, 肝脏组织的 LDH 同工酶个体平均活性从强到弱依次为嵊泗群体、灌河群体、扬中群体、崇明内河群体。

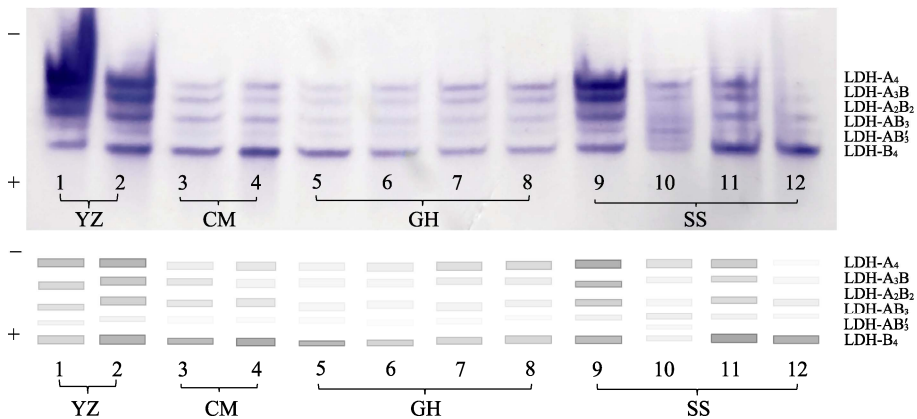


图 5 4 个不同群体刀鲚肌肉 LDH 同工酶 PAGE 电泳酶谱及模式图

YZ: 扬中; CM: 崇明; GH: 灌河; SS: 嵊泗.

Fig. 5 LDH isoenzyme PAGE electrophoresis zymogram and pattern map of muscle in *Coilia nasus* from four populations  
YZ: Yangzhong population ; CM: Chongming population; GH: Guanhe population; SS: Shengsi population.

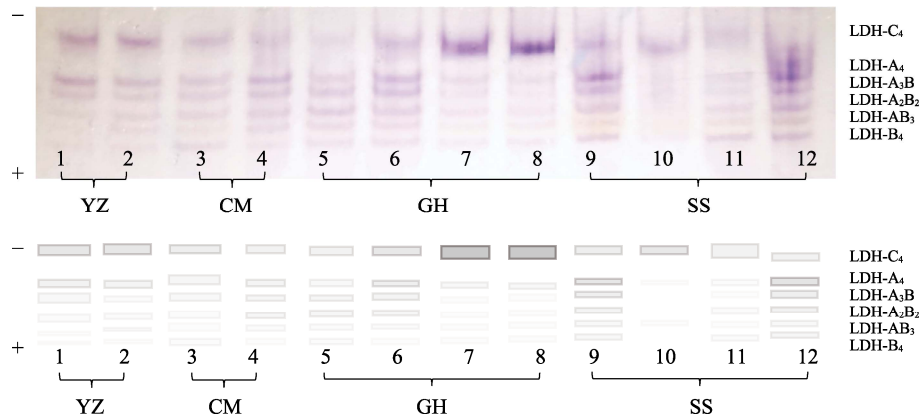


图 6 4 个不同群体刀鲚肝脏 LDH 同工酶 PAGE 电泳酶谱及模式图

YZ: 扬中; CM: 崇明; GH: 灌河; SS: 嵯泗。

Fig. 6 LDH isoenzyme PAGE electrophoresis zymogram and pattern map of liver in *Coilia nasus* from four populations  
YZ: Yangzhong population; CM: Chongming population; GH: Guanhe population; SS: Shengsi population.

### 3 讨论

#### 3.1 刀鲚染色体核型

本研究发现刀鲚雌鱼中存在异形性染色体,这与许世杰等<sup>[11]</sup>和洪云汉等<sup>[12]</sup>所报道的结果有明显差异。在短颌鲚染色体核型报道<sup>[12]</sup>中指出,短颌鲚雌鱼的染色体数目为  $2n=47$ ,雌雄染色体数目不同,其原因是雌性染色体缺失导致;经染色体配对发现雌鱼有一较小的染色体不能进行配对,但在雄鱼中是可进行配对的,故洪云汉等<sup>[12]</sup>提出短颌鲚的性染色体类型为 ZO/ZZ 型;但本研究通过对刀鲚染色体核型分析发现,在绝大多数(90.8%)刀鲚雌鱼的核型计数、配对过程中有一与其他染色体明显不同的“点状物质”(图 1),笔者对凤鲚染色体核型结果再次进行分析时,也同样发现凤鲚雌鱼中存这样一个“点”<sup>[13]</sup>,并且在短颌鲚雌鱼中期分裂相中,也同样存在这一个“点”,综上在几种不同鲚属鱼类雌性染色体中期分裂相中都发现该“点”的存在,而在刀鲚核型分析的报道结果中却未发现该“点”的存在<sup>[11]</sup>,推测可能在染色体标本制作时该点被误认为是杂质,也可能是在核型分析时由于其他染色体对其遮挡,未能发现该“点状物质”的存在。

为确认该“点”是否存在于刀鲚雌性个体中,本研究对 15 尾刀鲚共 120 个染色体中期分裂相进行了众数统计分析(表 3),发现存在该“点”的中期

分裂相占所测 120 个中期分裂相的百分比为 90.80%,并且在凤鲚核型分析结果中,凤鲚雌鱼中存在该“点”的中期分裂相占所测 120 个中期分裂相的百分比为 84.20%<sup>[11]</sup>。综上,初步判定该“点”不是染色体标本制作时产生的杂质,而是鲚属鱼类雌鱼的异形性染色体。刀鲚的染色体数目均为  $2n=48$ ,雌雄刀鲚之间不存在染色体数目上的差异(表 1),但刀鲚雌鱼中存在与其他染色体不同的异形性染色体,其在雌鱼染色体核型配对的方式与雄鱼不同,故刀鲚的性染色体类型为 ZW/ZZ 型,以雌性异配型的 W 染色体决定其后代性别,该类型的性染色体在鱼类的研究中已有相关报道<sup>[24]</sup>。

通过  $t$  检验发现,刀鲚异形性染色体的相对长度与同型性染色体具有极显著差异,使雌鱼中 W 型性染色体与其他染色体明显区分,并可通过肉眼观察出来。半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[24]</sup>雌雄染色体对比结果中也发现 ZW/ZZ 型的性染色体类型,但不同的是半滑舌鲷性染色体的相对长度较刀鲚更大,这一现象可能与鲚属鱼类与半滑舌鲷所处生境不同有关。

#### 3.2 刀鲚同工酶表达的组织特异性

本研究中,刀鲚的 6 种主要组织均能检测到 LDH 表达,表明在刀鲚体内 LDH 分布广泛。LDH 在刀鲚各组织中具有组织特异性,在肝脏中检测到 6 条酶带表达,而其他组织中均检测到 5 条酶

带, 各不同组织之间的酶带活性分布存在不同; 肝脏酶带活性明显比其他几种组织酶带活性低(图 1)。

硬骨鱼类中 LDH 同工酶一般为四聚体酶, 由 LAD-A、LDH-B 和 LDH-C 3 个基因位点控制, 其中 LDH-C 具有组织差异性, 表达编码所需的蛋白质电荷与 LAD-A、LDH-B 不同<sup>[25-26]</sup>。LDH-C 基因位点首先在鱼类的眼中发现, 有“眼带”之称<sup>[27]</sup>。在已有报道中, 发现 LDH-C 在鱼类的眼、肝脏中都有所表达, 肝脏中出现的 LDH-C 基因编码的酶带称其为“肝带”<sup>[28]</sup>, “肝带”电泳时一般偏向阴极端<sup>[29]</sup>。本研究发现刀鲚肝脏组织都存在偏向阴极的“肝带”, 这一现象与细鳞斜颌鲴(*Xenocypris microlepis*)<sup>[30]</sup>、蒙古红鲌(*Erythroculter mongolicus*)<sup>[31]</sup>的结果相似。肝脏在动物机体中是重要的代谢功能器官, 具有重要生理作用, 如解毒、糖原储存、蛋白合成的促进作用、分泌胆汁促消化等<sup>[32]</sup>, 刀鲚肝脏组织发现“肝带”的表达, 这可能与其肝脏所需要执行的重要生理功能相适应。

### 3.3 LDH 在刀鲚不同群体的表达

刀鲚 LDH 研究虽已有相关报道, 但本研究较以往研究, 存在如下差异: (1) 已报道的刀鲚 LDH 研究中, 均未发现刀鲚肝脏中有 LDH-C<sub>4</sub> 酶带的表达; (2) 本研究中发现刀鲚的肌肉组织中存在 5 条酶带, LDH-AB<sub>3</sub> 酶带有所表达, 与刘文斌<sup>[16]</sup>对刀鲚肌肉 LDH 的研究结果相同。笔者推测以上两点差异的原因如下: (1) 鱼体本身不同组织中酶带的编码基因并非同步表达, 从而造成有些酶带表达不明显, 使其酶带数量的表达存在差异性; (2) 即使控制酶带的编码基因同步表达, 但活性表现程度不同, 或由于不同组织的生理功能不同, 酶带受不同影响因子的调控, 而造成各组织间 LDH 同工酶的含量或活性的不同, 最后形成酶带强弱的差异性<sup>[33]</sup>; (3) 检测差异: 样品的获取、制备和保存方式不同, 实验方法、实验条件存在不同, 如凝胶板分离胶的浓度不同, 缓冲液 pH 不同, 电泳时电压的不同, 电泳时间差异等, 都可造成 LDH 酶谱表达的差异性。

本研究对刀鲚不同群体间不同组织 LDH 的

表达做了对比分析, 发现刀鲚样品的来源不同可导致其酶带表达具有差异性。本研究对扬中养殖刀鲚、灌河、崇明内河和嵊泗野生刀鲚的眼、肝脏、肌肉组织的 LDH 进行了对比分析, 结果发现, 不同群体中, 多数刀鲚个体的眼、肌肉组织均存在 5 条酶带, 肝脏组织多为 6 条酶带, 即说明在刀鲚眼、肌肉组织普遍存在 5 条酶带, 而肝脏中存在“肝带”——LDH-C<sub>4</sub> 酶带。此外, 刀鲚的 LDH 酶带表达具有明显个体差异性, 本研究发现嵊泗群体 10 号或 11 号个体在不同组织中存在酶带的异常表达, 在眼中(图 4) 11 号个体酶带分布异常, 在肌肉组织中(图 5), 10 号个体表现出 6 条酶带, 在肝脏中(图 6), 10 号个体仅表现出 3 条酶带, 推测可能与其生存的地理环境的多变性相关, 这与张芹等<sup>[34]</sup>实验结果相似, 由于水质环境等因素造成不同水域团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) 同种组织 LDH 酶带数目存在差异, 但具体原因有待进一步探究。

### 3.4 刀鲚生化遗传标记的选择

在生化遗传标记的选择中, 刀鲚的肝脏组织中虽然具有其他组织未检测到的 LDH-C<sub>4</sub>, 但其活性低, 表达不稳定, 故不能作为刀鲚种质鉴定的生化遗传标记, 在其余 5 个组织中发现, LDH 在刀鲚眼中表达相对稳定且强烈, 并易获取, 建议采用眼 LDH 作为刀鲚的生化遗传标记。

## 4 结论

刀鲚的染色体数目为  $2n=48$ ; 其雌雄染色体核型公式均为  $2n=48t, NF=48$ , 雌性存在异形性染色体, 性染色体类型为 ZW/ZZ 型。首次发现了刀鲚的雌性异形性染色体, 并对笔者以往的风鲚染色体核型结果予以纠正。

对刀鲚 6 种组织进行 LDH 检测, 刀鲚 LDH 特征: 酶带共有 6 条, LDH-C<sub>4</sub> 酶带仅在肝脏中表达, 除 LDH-C<sub>4</sub> 外的其他 5 种 LDH 酶带在各组织中均有表达; 刀鲚体内 LDH 的分布较为广泛, 具有明显组织特异性; 刀鲚眼 LDH 酶带的表达丰富, 并且活性稳定, 可作为刀鲚生化遗传标记鉴定刀鲚生化种质特征。



## 参考文献:

- [1] Zhuang P, Zhang T, Li S F, et al. Fishes of the Yangtze Estuary (second edition)[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2018: 125-126. [庄平, 张涛, 李圣法, 等. 长江口鱼类(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 125-126.]
- [2] Zhang S S, Luo J, Chen B J, et al. A study on morphological differences of *Coilia nasus* from different populations[J]. Freshwater Fisheries, 2020, 50(3): 26-33. [张赛赛, 罗珺, 陈博锦, 等. 不同群体刀鲚形态差异研究[J]. 淡水渔业, 2020, 50(3): 26-33.]
- [3] Hu Y B. A preliminary study on the age structure and growth characteristics of *Coilia mystus* and *Coilia nasus* in the Yangtze River Estuary[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [胡永斌. 长江口凤鲚和刀鲚年龄结构与生长特征的初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [4] Shi Y H, Zhang G Y, Zhang H M, et al. Complete artificial propagation and embryonic development of *Coilia nasus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(1): 36-43. [施永海, 张根玉, 张海明, 等. 刀鲚的全人工繁殖及胚胎发育[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(1): 36-43.]
- [5] Liu Y S, Shi Y H, Deng P P, et al. Growth of one-year *Coilia nasus* and pond water quality under high density cultivation[J]. Southwest China Journal of Agriculture Science, 2020, 33(7): 1593-1600. [刘永士, 施永海, 邓平平, 等. 高密度培育条件下刀鲚一龄鱼种生长与池塘水环境[J]. 西南农业学报, 2020, 33(7): 1593-1600.]
- [6] Du F K, Xu G C, Nie Z J, et al. Transcriptome analysis gene expression in the liver of *Coilia nasus* during the stress response[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 558.
- [7] Gao J W, Du F K, Gu R B, et al. Effect of transport stress on physiological-biochemical indices and expression of HPI genes and roles of glycyrrhizin on transport response in *Coilia nasus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(6): 817-825. [高金伟, 杜富宽, 顾若波, 等. 运输应激对刀鲚生理生化指标和 HPI 轴基因表达影响及甘草甜素的作用[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(6): 817-825.]
- [8] Zhu G L, Wang L J, Tang W Q, et al. De novo transcriptomes of olfactory epithelium reveal the genes and pathways for spawning migration in Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*)[J]. Plos One, 2014, 9(8): e103832.
- [9] Arai R. Fish Karyotypes(ed)[M]. Tokyo: Springer, 2011: 10-35.
- [10] Zhong S P, Chen C, Wang J, et al. Chromosome karyotype of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(1): 150-155. [钟声平, 陈超, 王军, 等. 七带石斑鱼染色体核型研究[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 150-155.]
- [11] Xu S J, Li Y Y, Fu G B, et al. Chromosome karyotype analysis of *Coilia nasus*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(7): 155-157. [许世杰, 李园园, 付官宝, 等. 刀鲚染色体核型分析[J]. 广东农业科学, 2014, 41(7): 155-157.]
- [12] Hong Y H, Zhou T. Karyotype of *C. brachygnathus* and its ZZ-ZO sex chromosome[J]. Hereditas, 1984, 6(4): 12-14. [洪云汉, 周瞰. 短颌鲚的核型及其 ZZ-ZO 性染色体[J]. 遗传, 1984, 6(4): 12-14.]
- [13] Jiang J, Zhuang P, Song C, et al. The karyotype of *Coilia mystus*[J]. Marine Fisheries, 2020, 42(1): 45-52. [蒋俊, 庄平, 宋超, 等. 凤鲚染色体核型研究[J]. 海洋渔业, 2020, 42(1): 45-52.]
- [14] Ardestani G, Rogelio D R, Reyes R, et al. Genetic diversity of two Philippine native freshwater goby species (Perciformes: Gobiidae): implications for conservation[J]. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 2014, 24(5): 592-600.
- [15] Zhou Z H, Lin J B, Wang F S, et al. Study on lactate dehydrogenase isoenzyme and sarcoplasmic protein electrophoresis of *Coilia*[J]. Journal of Nanjing University: Natural Science, 1986, 22(3): 440-445. [周宗汉, 林金榜, 王峰松, 等. 鲚属 *Coilia* 鱼类乳酸脱氢酶同工酶及肌浆蛋白电泳的研究[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 1986, 22(3): 440-445.]
- [16] Liu W B. Biochemical and morphological comparison and interspecific of four species of the genus *Coilia* in China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1995, 26(5): 558-565. [刘文斌. 中国鲚属 4 种鱼的生化和形态比较及其系统发育的研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(5): 558-565.]
- [17] Xu G C, Dong J J, Nie Z J, et al. Studies on lactate dehydrogenase isozymes and DNA content in different tissues of *Coilia nasus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(4): 481-488. [徐钢春, 董晶晶, 聂志娟, 等. 刀鲚不同组织的乳酸脱氢酶同工酶及 DNA 含量研究[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 481-488.]
- [18] Levan A, Fredga K A S. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52: 201-220.
- [19] Zhang Q C, Wang H, Qin Z J, et al. Study on polyacrylamide gel electrophoresis of lactate dehydrogenase isozyme in fish[J]. Biotechnology, 1994, 4(5): 38-40. [张庆朝, 王慧, 秦孜娟, 等. 鱼类乳酸脱氢酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳技术研究[J]. 生物技术, 1994, 4(5): 38-40.]
- [20] Ge Y L, Yin H B, Shi L Y, et al. Improved fish isozyme electrophoresis[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2010, 23(2): 51-52. [葛彦龙, 尹洪滨, 石连玉, 等. 鱼类同工酶电泳方法的改进[J]. 水产学杂志, 2010, 23(2): 51-52.]
- [21] Zhu L F. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of

- isozymes and proteins in fish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(2): 183-185. [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.]
- [22] Liu L, Zhang C J, Peng S M, et al. Differential expression of 4 kinds of isozyme in different tissues of *Pampus argenteus*[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(1): 68-75. [刘磊, 张晨捷, 彭士明, 等. 银鲈不同组织中 4 种同工酶的表达差异[J]. *海洋渔业*, 2017, 39(1): 68-75.]
- [23] Shaklee J B, Kepes K L, Whitt G S. Specialized lactate dehydrogenase isozyme: the molecular and genetic basic for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes[J]. *The Journal of Experimental Zoology*, 1973, 185(2): 217-240.
- [24] Zhou L Q, Yang A G, Liu X Z, et al. The karyotype of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fisheries of China*. 2005, 29(3): 417-419. [周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鳎染色体核型分析[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 417-419.]
- [25] Wang J X, Zhou C W. Lactate dehydrogenase isoenzymes in fish[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1989(1): 51-57. [王金星, 周才武. 鱼类的乳酸脱氢酶同工酶[J]. *海洋湖沼通报*, 1989(1): 51-57.]
- [26] Hu S Y, Peng Y, Zhao H T, et al. Study on isoenzymes of *Schizothorax kozlovi*[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2015, 54(18): 4540-4543. [胡思玉, 彭垠, 赵海涛, 等. 四川裂腹鱼同工酶研究[J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(18): 4540-4543.]
- [27] Zhang Q C, Wang H, Qin Z J, et al. Study on isozymes of red scale fish in Taishan Mountain[J]. *Zoological Research*, 1994, 15(2): 62-67. [张庆朝, 王慧, 秦孜娟, 等. 泰山赤鳞鱼同工酶的研究[J]. *动物学研究*, 1994, 15(2): 62-67.]
- [28] Jiang X H, Zan R G, Gu S. Analysis on the developmental genetics of lactate dehydrogenase isozymes in Dianchi high-back gurnard carp(*Carassius auratus*)[J]. *Southwest China Journal of Agriculture Science*, 1996, 9(4): 53-57. [蒋晓华, 管瑞光, 谷甦. 云南滇池高背鲫鱼乳酸脱氢酶(LDH)同工酶发育遗传学分析[J]. *西南农业学报*, 1996, 9(4): 53-57.]
- [29] Ferris S D, Whitt G S. Loss of duplicate gene expression after polyploidisation[J]. *Nature*, 1977, 265(5591): 258-260.
- [30] Zhang T, Gan J H, Zhou J G, et al. Electrophoretic analysis for two kinds of isozymes expressed in 5 tissues of *Xenocypris microlepis*[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2019, 9(1): 10-17. [张涛, 甘金华, 周剑光, 等. 细鳞斜颌鲂 5 种组织 2 种同工酶的电泳分析[J]. *中国渔业质量与标准*, 2019, 9(1): 10-17.]
- [31] Qin G X, Qi Z X, Tang G P, et al. Morphological characteristics and electrophoretic analysis of two kinds of isozymes in *Erythroculter mongolicus*[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(1): 194-200. [秦改晓, 齐子鑫, 唐国盘, 等. 蒙古红鲌形态特征及其两种同工酶的电泳分析[J]. *南方农业学报*, 2019, 50(1): 194-200.]
- [32] Zhang H J. Study on liver morphogenesis of *Glyptosternum maculatum* and biological adaptation[D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2011. [张惠娟. 黑斑原鲃肝脏的发生及相关生物学适应性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.]
- [33] Yi J H, Zeng Z Y, Hao G Q. Electrophoretic study on lactate dehydrogenase and esterase isozyme of tilapia and silver carp[J]. *Freshwater Fisheries*, 1982(6): 22-25. [易健华, 曾治义, 郝广勤. 罗非鱼与鲢乳酸脱氢酶及酯酶同工酶的电泳研究[J]. *淡水渔业*, 1982(6): 22-25.]
- [34] Zhang Q, Kong L J, Qu C Y, et al. Tissue specificity analysis of two isozymes in *Megalobrama amblycephala* from Yi River[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2020, 10(5): 37-43. [张芹, 孔令军, 屈长义, 等. 伊河团头鲂 2 种同工酶组织特异性分析[J]. *中国渔业质量与标准*, 2020, 10(5): 37-43.]

## Chromosome karyotype and LDH isoenzyme in different tissues of *Coilia nasus*

JIANG Jun<sup>1,2</sup>, SONG Chao<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Liqing<sup>4</sup>, HU Lijuan<sup>1,2</sup>, XIE Zhiwei<sup>1,2</sup>, LIU Ruohui<sup>1,2</sup>, ZHUANG Ping<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Tao<sup>1,2,3</sup>

1. Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment of the East China Sea and Yangtze Estuary, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. Shanghai Engineering Research Center of Fisheries Resources Enhancement and Ecological Restoration of the Yangtze Estuary, Shanghai 200090, China;
3. Key Laboratory of Fisheries Ecology of the Yangtze Estuary, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
4. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

**Abstract:** This study aimed to further understanding *Coilia nasus* germplasm resources, regarding aspects of cellular inheritance and biochemical inheritance, chromosome number, and karyotype structure of *C. nasus*, and to lay a theoretical foundation for screening the biochemical genetic markers of *C. nasus* germplasm. Short-term *in vitro* culture of gill filament cells was used to prepare chromosome specimens. Polyacrylamide gel electrophoresis was used to detect the expression of lactate dehydrogenase (LDH) in the heart, liver, kidney, eye, muscle, gill of *C. nasus*. The results showed that there was no difference in the number of chromosomes between males and females. The number of chromosomes was  $2n=48$ , all of which belonged to terminal centromeric chromosomes (t), and the karyotype was  $2n=48t$ . The number of arms (NF) was 48, and the sex chromosome type was ZW/ZZ. Unlike previous studies in which the karyotypes of *C. nasus* and *C. brachygnathus* were ZO/ZZ type, we found a “point” in the metaphase mitotic phase of the female chromosomes of *C. nasus*. Using mode analysis, we found that the probability of distribution of this “point” was more than 90.8% (120 metaphase mitotic phases), which was confirmed to be the female heteromorphic sex chromosome of *Coilia* species. A total of six LDH isoenzyme bands were detected in six tissues of *C. nasus* (heart, liver; kidney; eye, muscle; gill.), among which six bands were found in the liver tissue, with the lowest activity, and five bands were found in other tissues, with different activities. The expression of the LDH isoenzyme of *C. nasus* was tissue-specific. There were differences in LDH activity of *C. nasus* among different populations, in addition to individual differences. LDH is widely distributed in *C. nasus* and has obvious tissue specificity. The LDH enzyme band corresponding to expression in the eyes was highly expressed and presented stable activity, owing to which it can be used as a biochemical genetic marker for the identification of germplasm characteristics of *C. nasus*.

**Key words:** *Coilia nasus*; chromosome; karyotype; heteromorphic sex chromosome; lactate dehydrogenase (LDH); tissue specificity

**Corresponding author:** ZHANG Tao. E-mail: zhangtaoyfi@163.com