

大竹蛏同工酶组织特异性与多态性初步研究

张志伟, 姚国兴, 陈爱华

(江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007)

摘要:用不连续垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳对大竹蛏(*Solen grandis* Dunker)外套膜、鳃、性腺、消化腺、斧足5种组织6种同工酶(LDH、ADH、EST、MDH、ACP、SOD)进行组织特异性分析,并对吕四渔场海域大竹蛏自然种群生化遗传多样性进行了初步研究。结果表明:大竹蛏同工酶的活性及酶谱特征具有明显的组织特异性,6种酶在消化腺中的活性最强,LDH、EST、MDH和SOD酶谱具有明显的组织特异性;6种酶在消化腺和斧足中共检测到12个基因位点,其中*Ldh-1*、*Ldh-2*、*Adh-1*、*Est-1*、*Mdh-1*、*Mdh-2*、*Mdh-3*、*Sod-2*等8个基因位点为多态,多态位点比例为66.67%,平均每个位点的等位基因数 N_s 为2.5,有效等位基因数(N_e)为1.9,预期杂合度(H_e)为0.3737,实际杂合度(H_o)为0.3333,香农信息指数(I)为0.6242。

关键词:大竹蛏(*Solen grandis* Dunker);同工酶;组织特异性;生化遗传

中图分类号:S917.4

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2009)03-0041-03

大竹蛏(*Solen grandis*)隶属软体动物门(Mollusca),瓣鳃纲(Lamellibranchia),帘蛤目(Veneroida),竹蛏科(Solenidae),广泛分布于我国沿海,生活在潮间带至20 m深的浅海,是重要的海产经济贝类。然而近年来,由于海域污染和过度捕捞等原因使大竹蛏资源量逐年下降,保护和恢复大竹蛏资源是当前亟待解决的问题。国内对大竹蛏研究主要集中在人工育苗^[1]、染色体核型^[2]及营养成分分析^[3]上,但有关大竹蛏种质资源与遗传多样性方面的研究仅见陈丽梅等^[4]扩增了大竹蛏、长竹蛏(*Solen strictus*)、小刀蛏(*Cultellus attenuatus*)的线粒体16S rRNA基因序列和COI序列。本研究采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,对大竹蛏5种组织的6种同工酶进行了组织特异性分析,并对吕四渔场海域自然种群生化遗传多样性进行了初步研究,以期为大竹蛏的种质状况评价和相关研究提供理论依据,同时也为研究、保护和合理利用大竹蛏种质资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品于2006年4月18日采自江苏吕四渔场自然种群,壳长为7~11 cm,体质量13~45 g,样品保持活体运回实验室立即解剖,取外套膜、鳃、性腺、消化腺、斧足5种组织,-80℃冰箱中保存备用。

1.2 酶液制备

准确称量0.4 g体组织,置预冷的研钵中,按质量体积比1:3加0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)和0.05%β-巯基乙醇冰浴研磨,装入1.5 mL eppendorf管中,标明编号,15 000 r/min高速冷冻离心30 min,取上清二次离心30 min;取部分上清液装入0.5 mL eppendorf管中4℃保存待用,余下部分装入1.5 mL

eppendorf管中保存于-80℃冰箱中备用。

1.3 电泳及染色

采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法。聚丙烯酰胺凝胶制备参照卢龙斗等^[5]方法进行,电泳及染色方法参照何忠效等^[6]的方法进行,浓缩胶质量分数为3.5%~4%,分离胶质量分数为7.5%~10%,电极缓冲液为pH 8.3的Tris-Gly缓冲液,使用DYCZ-24D型电泳槽,在4℃冰箱中电泳3~5 h,染色、拍照。

1.4 群体遗传参数计算

电泳酶谱谱带的命名方法及其酶谱分析参照王中仁^[7]的方法进行。若酶有一个以上位点编码时,各基因位点按编码酶从阴极到阳极的迁移顺序命名1、2、3...,同一基因位点的不同等位基因按照从阴极到阳极的顺序依次标记为a、b、c...,统计各位点不同个体的基因型,用POPgene 32进行数据处理。

多态位点比例 $P = \text{多态位点数} / \text{检测位点总数} \times 100\%$

有效等位基因数 $N_e = 1 / \sum p_i^2$,其中 p_i 为第 i 个等位基因的频率。

观测杂合度 $H_o = \text{观察到的杂合子数} / \text{观察个体总数}$

期望杂合度 $H_e = 1 - \sum p_i^2$

收稿日期:2008-07-12;修回日期:2008-09-26

基金项目:江苏省科技厅高技术研究发展项目(BG2006335);南通市农业创新科技计划项目(AL2006021)

作者简介:张志伟(1977-)男,山东临沂人,博士,主要从事水生生物遗传育种的研究,E-mail:zhzhwei2005@126.com;陈爱华,通信作者,E-mail:chenah540540@yahoo.com.cn

2 结果与分析

2.1 大竹蛎同工酶组织特异性

本研究共检测了大竹蛎 5 种组织 6 种酶的表达情况。结果表明,6 种酶在 5 种组织中的活性具有明显的组织特异性:LDH、ADH、EST 三种酶在消化腺中的活性最强,其次为鳃和斧足,外套膜和性腺中活性最弱;MDH 和 ACP 在消化腺中表达最强,在其余 4 种组织中活性强弱近似;SOD 在消化腺和斧足中的活性相接近,较其他 3 种组织更强。同时发现,LDH、EST、MDH、SOD 4 种酶在不同组织检测到的基因位点各不相同,酶谱具有明显的组织特异性(表 1)。大竹蛎 LDH 在鳃中仅检测到 *Ldh-2* 一个基因位点,在其他 4 种组织中均检测到 *Ldh-1*、*Ldh-2* 两个基因位点(图 1);EST 在外套膜中仅检测到 *Est-1* 一个基因位点,在其他 4 种组织中均检测到 *Est-1*、*Est-2* 两个基因位点;MDH 在斧足中检测到 *Mdh-1*、*Mdh-2*、*Mdh-3* 三个基因位点,在其他 4 种组织中均检测到 *Mdh-1*、*Mdh-2* 两个基因位点;SOD 在斧足中检测到 *Sod-1*、*Sod-2* 两个基因位点,在其他 4 种组织中均检测到 *Sod-1* 一个基因位点。

表 1 大竹蛎 6 种同工酶在 5 种组织的表达情况

Tab. 1 Expression of 6 kinds of enzymes in five tissues of *Solen grandis*

酶	组织				
	外套膜	鳃	性腺	消化腺	斧足
LDH*	+	++	+	+++**	++
ADH	+	++	+	+++**	++
EST*	+	++	+	+++	+++*
MDH*	++	++	++	+++	+++*
ACP	+	+	+	+++*	+
SOD*	+	+	+	++	+++*

注:+++ , ++ , + 分别表示酶的表达活性为强,中,弱;* 表示酶谱具有组织特异性,** 表示筛选出的组织

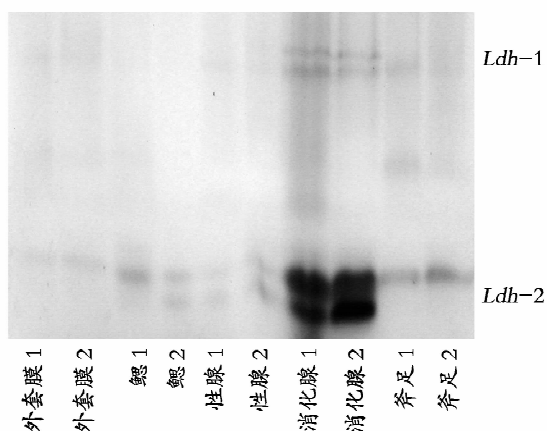


图 1 大竹蛎不同组织 LDH 酶的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of LDH expressed in five tissues of *Solen grandis*

2.2 大竹蛎吕四渔场自然种群同工酶多态性与遗传变异

以吕四渔场海域大竹蛎自然种群为研究对象,扩大样本量对不同组织不同酶进行电泳,图 2 为大竹蛎鳃组织 LDH 酶部分个体电泳图谱。选择稳定而清晰的酶谱对该种群生化遗传特征进行分析,6 种酶在消化腺和斧足中共检测到 12 个基因位点,各位点等位基因及频率见表 2,其中 *Ldh-1*、*Ldh-2*、*Adh-1*、*Est-1*、*Mdh-1*、*Mdh-2*、*Mdh-3*、*Sod-2* 8 个基因位点为多态,多态位点比例为 66.67%,根据各位点等位基因频率用 POPgene32 计算得出平均每个位点的等位基因数 N_a 为 2.5,有效等位基因数 (N_e) 为 1.9,预期杂合度 (H_e) 为 0.373 7,实际杂合度 (H_o) 为 0.333 3,香农信息指数 (I) 为 0.624 2。

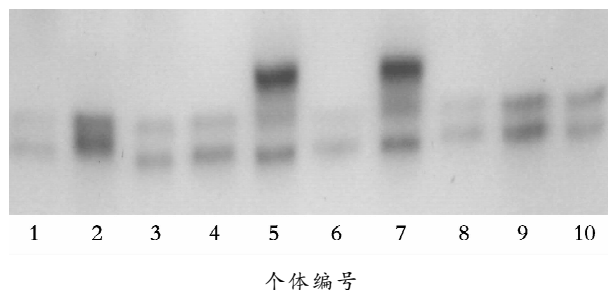


图 2 大竹蛎鳃 LDH 酶的电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis pattern of LDH expressed in the gill of *Solen grandis*

表 2 大竹蛎 12 个同工酶基因位点的等位基因频率

Tab. 2 Allelic frequency of 12 enzymes loci in *Solen grandis*

基因位点	等位基因	频率	基因位点	等位基因	频率	
<i>Ldh-1</i>	a	0.15	<i>Est-1</i>	a	0.85	
	b	0.35		b	0.15	
	c	0.15	<i>Est-2</i>	a	1.00	
	d	0.30		<i>Mdh-1</i>	a	0.40
	e	0.05			b	0.50
<i>Ldh-2</i>	a	0.10	c	0.10		
	b	0.40	<i>Mdh-2</i>	a	0.70	
	c	0.35		b	0.20	
	d	0.15		c	0.10	
<i>Adh-1</i>	a	0.15	<i>Mdh-3</i>	a	0.60	
	b	0.75		b	0.40	
	c	0.10		<i>Sod-1</i>	a	1.00
<i>Adh-2</i>	a	1.00	<i>Sod-2</i>		a	0.25
	b	0.20			b	0.20
<i>AcP</i>	a	1.00	c	0.55		

3 讨论

通过对大竹蛭 6 种同工酶 LDH、ADH、EST、MDH、ACP、SOD 的组织特异性研究发现,大竹蛭 5 种组织中已存在相当丰富的酶系统,而且在表型、分布和活性上均表现出高度的组织特异性。其他双壳贝类,如马氏珠母贝 (*Pinctadamartensii*)^[8]、泥蚶 (*Tegillarca granosa*)^[9] 同工酶等也均表现出较高的组织特异性。王冬群等^[10] 对竹蛭科的缢蛭 (*Sinonovacula constricta*)、细长竹蛭 (*Solen gracilis*) 和长竹蛭 5 种组织的同工酶进行了比较分析,结果发现 3 种蛭 5 种酶在消化腺中的活性最强,本研究结果与之相一致,有关西施舌 (*Coelomactra antiquata*)^[11] 的研究得到同样的结论。这可能与消化腺具有消化、分泌以及解毒等多种功能,代谢相对活跃相关;他们还同时发现 3 种蛭种内除 IDH 酶谱具有组织特异性外,其他 ADH、ME、MDH、SOD 只有活性的差异。本研究结果表明,大竹蛭 ADH 和 ACP 两种酶无组织特异性,LDH、EST、MDH、SOD 具有明显的组织特异性,可能是由于其种属特异所造成的。

除组织特异性研究外,贝类同工酶的报道另一方面则集中在遗传多样性分析上,本试验结果揭示大竹蛭的多态位点比例为 66.67%,远高于西施舌 (35.3%)^[11],合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) (38.46%~48.15%)^[12],接近太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) (47.1%~85.7%)^[13] 和毛蚶 (*Scapharca*) (55.56%~64.71%)^[14]。预期杂合度为 0.373 7,实际杂合度为 0.333 3,一方面两值均远远高于双壳贝类的平均水平(期望杂合度为 0.088~0.030)^[15],表明大竹蛭吕四渔场自然种群遗传多样性水平较高,香农信息指数为 0.624 2 也较高,验证了这一结论。另一方面两值相接近,表明该大竹蛭种群不存在杂合子不足或过剩的问题,自然种群没有受到选择、近交等人为干涉的影响,处于较优状态。在这种情况下,其种质资源的保护尤其应当加以重视,避免近交、选择育种等人为因素造成其遗传

多样性下降。

参考文献:

- [1] 侯和要,牟乃海,宋全山,等.大竹蛭人工繁育技术研究[J].齐鲁渔业,2004,21(6):32-35.
- [2] 孙振兴,郭胜超,邵雁群,等.三种海产帘蛤目贝类的核型研究[J].海洋学报,2004,26(1):88-94.
- [3] 戴聪杰.大竹蛭软体部分营养成分分析及其评价[J].集美大学学报(自然科学版),2002,7(4):304-308.
- [4] 陈丽梅,孔晓瑜,喻子牛,等.3种蛭类线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列比较及其系统学初步研究[J].海洋科学,2005,29(8):27-32.
- [5] 卢龙斗,常重杰.遗传学实验技术[M].中国科学技术大学出版社,1996.162-167.
- [6] 何忠效,张树政.电泳(第二版)[M].北京科学出版社,1999.
- [7] 王中仁.植物等位酶分析[M].科技出版社,1996.
- [8] 李广丽,叶富良.马氏珠母贝不同组织同工酶的比较[J].水产学报,2000,24(5):417-421.
- [9] 李太武,吕振明,林志华,等.泥蚶同工酶组织特异性研究[J].海洋学报,2004,26(4):125-132.
- [10] 王冬群,李太武,苏秀榕.三种蛭不同组织同工酶的比较分析[J].台湾海峡,2004,23(2):131-137.
- [11] 孔令锋,李琪.西施舌同工酶的组织特异性与多态性初步研究[J].中国水产科学,2008,15(1):178-182.
- [12] 杜晓东,李广丽,刘志刚,等.合浦珠母贝两个野生种群的生化遗传变异[J].中国水产科学,2002,9(2):100-105.
- [13] English L J, Maguire G B, Ward R B. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia [J]. *Aquaculture*, 2000, 187: 283-298.
- [14] 李旭光,阎斌伦,许广平,等.毛蚶三个地理群体生化遗传特征分析[J].海洋渔业,2007,29(3):207-213.
- [15] Laudien J, Flint N S, vander Bank F H, et al. Genetic and morphological variation in four populations of the surf clam *Donax serra* (Roding) from southern African sandy beaches[J]. *Biochem Sys Ecol*, 2003, 31: 751-772.

(下转第 96 页)