

栉孔扇贝六种同工酶的生化遗传分析*

王志铮

(浙江海洋学院 舟山 316004)

李太武¹⁾

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

刘艳

(辽宁师范大学生命科学学院 大连 116029)

孙修勤

(国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

郭皓

(国家海洋局环境保护研究所 大连 116023)

李春茂

(大连市长海县水产研究所 长山岛 116500)

宋林生 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 利用聚丙烯酰胺垂直板电泳技术对中国栉孔扇贝和日本栉孔扇贝两个自然种群的6种同工酶(MDH、ADH、G-6-PDH、IDH、GDH、ME)进行了研究,得到了基本酶谱,对其进行了生化遗传分析。共记录了18个座位28个等位基因并对其差异进行了比较和讨论。两种群各自具有种群内的个体差异及特征谱带,可将其作为栉孔扇贝亚种间差异的一种分子标记,并为系统分类及贝类学基础研究提供一定的参考数据。

关键词 栉孔扇贝,同工酶,生化遗传分析

中图分类号 Q789

栉孔扇贝(*Chlamys farreri* Jones et Preston)属于软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、珍珠目(Pterioidea)、扇贝科(Pectinidae),是一种广泛分布于我国北方沿海的较大经济贝类。目前对它的研究主要集中在生理生态、养殖技术及种苗育成等方面(王昭萍等,1998),在生化遗传方面的研究较少且不系统。生化遗传分析是通过同工酶的表现而获知其基因型,其中应用价值较高的是遗传多态性座位的研究(徐成等,2001)。刘保忠等(1999)曾用淀粉胶电泳技术研究了山东地区栉孔扇贝野生种群同工酶的表达状况,对其他地区的种群分析尚未见报道。近年来,由于人工育苗技术的推广,亲本数量少、近亲繁育恶性循环等使得该品种的种质资源受到严重影响,遗传背景简单化,个体变小、早熟、抗逆性差。这种由于过度捕捞和增养殖发展所带来的不良影响在其他种类的自然群体中也有所表现(尤锋等,1999)。为改善这种不良状况,恢复其遗传多样性,本课题组引进日本栉孔扇贝并用其同中国栉孔扇贝进行杂交育种,从中筛选优良抗逆性品种。本文报道了杂交亲本(中国北方栉孔扇贝×引进种日本栉孔扇贝)的6种同工酶的生化遗传分

* 国家“973”资助项目“扇贝生物种群遗传结构及遗传多样性的应用”,G1999012008号。王志铮,男,出生于1970年12月,硕士研究生,助理研究员, E-mail: wzz-1225@163.com

1) 通讯作者。李太武,男,出生于1955年12月,博士后,教授, E-mail: litaiwu@163.net

收稿日期:2001-04-29,收修改稿日期:2001-12-14

析结果, 以期为栉孔扇贝群体遗传结构研究及种质资源的鉴定开发利用和杂交育种提供一定的理论依据, 同时为贝类学的研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 样品制备

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*) 中国种于 1999 年采自辽宁大连长海县獐子岛自然海区, 3 龄, 平均壳高为 6—8cm; 栉孔扇贝日本种于 1998 年引自日本北海道, 3 龄, 平均壳高 7—8cm, 空运回大连长海县, 暂养一年。排卵活动结束后, 活体带回实验室、解剖取闭壳肌、置于 -70℃ 冰箱保存备用。

取 0.8g 闭壳肌组织, 加入酶提取液(预冷重蒸水含 0.05% 巯基乙醇, pH= 6.5—7.0) 3ml, 冰浴下放于匀浆器中研磨, 匀浆液在 4℃ 条件下, 以 13000r/min 离心 30min, 取上清液分装, -20℃ 冰箱保存备用。

1.2 电泳

采用北京市六一仪器厂生产的稳压稳流型电泳仪进行不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳, 方法参照文献(胡能书等, 1985; 熊全沫, 1992a, b) 略做改动。浓缩胶($T=3.6\%$), pH= 6.7; 分离胶($T=8.2\%$), pH= 8.9; Tris-Gly 缓冲系统(0.050mol/L Tris-0.400mol/L Gly), pH= 8.3。实验所测酶类见表 1, 各样品的酶蛋白质含量相等。电泳先用 300V 电压, 当样品进入分离胶界面时改用 200V 电压, 电泳 4h 左右。凝胶厚度为 1.5mm, 电泳结束后进行各种酶的染色, 复日 SmartView2001 生物图像分析系统摄影分析。

1.3 命名

命名原则参照文献(Gosling, 1982)。以各种酶谱的相对迁移率($R_f = d/l$, d 为酶带迁移距离; l 为指示剂迁移距离) 由小到大依次命名。基因座位以它编码的同工酶的缩写字母表示。若该酶有一个以上座位编码时, 各座位按其编码酶从阴极到阳极的迁移顺序命名(1、2、3……), 若该座位有一个以上等位基因时, 各等位基因按英文字母顺序命名(a、b、c……)。

表 1 实验分析的同工酶类和电泳条件

Tab.1 Isozymes assayed, buffer used in the study

同工酶	结构	酶编号	缓冲系统
苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, MDH)	二聚体	EC1. 1. 1. 37	Tris-Gly
醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)	二聚体	EC1. 1. 1. 1	Tris-Gly
葡萄糖-6 磷酸脱氢酶 (Glucose-6 phosphate dehydrogenase, G-6-PDH)	二聚体	EC1. 1. 1. 49	Tris-Gly
异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate dehydrogenase, IDH)	二聚体	EC1. 1. 1. 41	Tris-Gly
谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, GDH)	二聚体	EC1. 4. 1. 2	Tris-Gly
苹果酸酶(Malic enzyme, ME)	四聚体	EC1. 1. 1. 40	Tris-Gly

2 结果

2.1 苹果酸脱氢酶 MDH

中国栉孔扇贝的 MDH 为二聚体酶(图 1a), 谱带共表现出 6 条带, 有三个座位编码, 个

体间存在差异,其中 *Mdh-2* 座位单态纯合在各个体中均有表达, *Mdh-1*、*Mdh-3* 两座位呈杂合态,均有 a、b 两个等位基因控制表达,杂合带可观察到。

日本栉孔扇贝的 MDH 为二聚体酶(图 1b),谱带明显分为两个区域,提示有两个座位编码。个体间存在差异。*Mdh-1* 座位单态纯合在各个体中均有表达为一条带, *Mdh-2* 座位呈杂合态,有 a、b 两个等位基因控制编码 1—3 条带,杂合带可见。

2.2 醇脱氢酶 ADH

中国栉孔扇贝的 ADH 为二聚体酶(图 1c),各个体均表现出 2 条带,无差异,说明有两个座位编码且两座位均单态纯合。

日本栉孔扇贝的 ADH 为二聚体酶(图 1d),共计 3 条带,由三个座位编码。三个座位在各个体中均纯合表达,但 *Adh-1* 座位在不同的个体中有的表达有的不表达。

2.3 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 G-6-PDH

中国栉孔扇贝的 G-6-PDH 为二聚体酶(图 1e),酶谱较复杂,个体间表达有差异,约有 3—5 条谱带,显著地分作三个区域,由三个座位编码。其中, *G-6-pdh-3* 座位单态纯合在各个体中均有表达, *G-6-pdh-1* 座位在该居群个体内表达微弱或不表达, *G-6-pdh-2* 座位有 3 个等位基因(a、b、c)编码 1—5 条谱带。

日本栉孔扇贝的 G-6-PDH 为二聚体酶(图 1f),酶谱计 2—4 条带,分布在不同的三个区域,提示有三个座位编码,个体间表达有差异。 *G-6-pdh-1*、*G-6-pdh-3* 两座位单态纯合在各个体中均有表达,并且 *G-6-pdh-1* 座位在该居群个体内表达极强烈, *G-6-pdh-2* 座位只在某些个体中表达为 1—2 条带。

2.4 异柠檬酸脱氢酶 IDH

中国栉孔扇贝的 IDH 为二聚体酶(图 1g),酶谱复杂,共检测出 8 条带,个体间表达有差异,可分为四个区域,说明有四个座位编码。其中, *Idh-3*、*Idh-4* 座位分别表现为一条纯合谱带,在各个体中均有表达。 *Idh-1* 座位有 1—3 条谱带由两个等位基因编码, *Idh-2* 座位有 3 个等位基因编码 1—3 条谱带。

日本栉孔扇贝的 IDH 为二聚体酶(图 1h),谱带共表现出 7 条带,有两个座位编码。 *Idh-1* 座位有两个等位基因编码 1—3 条带, *Idh-2* 座位有 3 个等位基因(a、b、c)编码 1—5 条谱带,杂合带可见。

2.5 谷氨酸脱氢酶 GDH

中国栉孔扇贝的 GDH 为二聚体酶,酶谱显示出两个区域 2—6 条带,个体间表达有差异。说明有两个座位编码,其中, *Gdh-1* 座位有 1—3 条谱带,由 b、c 两个等位基因编码, *Gdh-2* 座位有 3 个等位基因 a、b、c 编码 1—3 条谱带(图 1i)。

日本栉孔扇贝的 GDH 为二聚体酶,谱带表现出 2—5 条带,明显分作两个区域,由两个座位编码,个体间表达有差异。 *Gdh-1* 座位由两个等位基因 a、b 控制编码 1—3 条谱带, *Gdh-2* 座位有 2 个等位基因 a、b 编码 1—3 条谱带(图 1i)。

2.6 苹果酸酶 ME

中国栉孔扇贝的 ME 为四聚体酶,约有三个座位编码 3—7 条谱带,个体间表达有差异。 *Me-1* 座位有 1—5 条谱带,由 a、b 两个等位基因编码, *Me-2*、*Me-3* 两座位分别表现为一条纯合谱带并且各个体中均有表达(图 1j)。

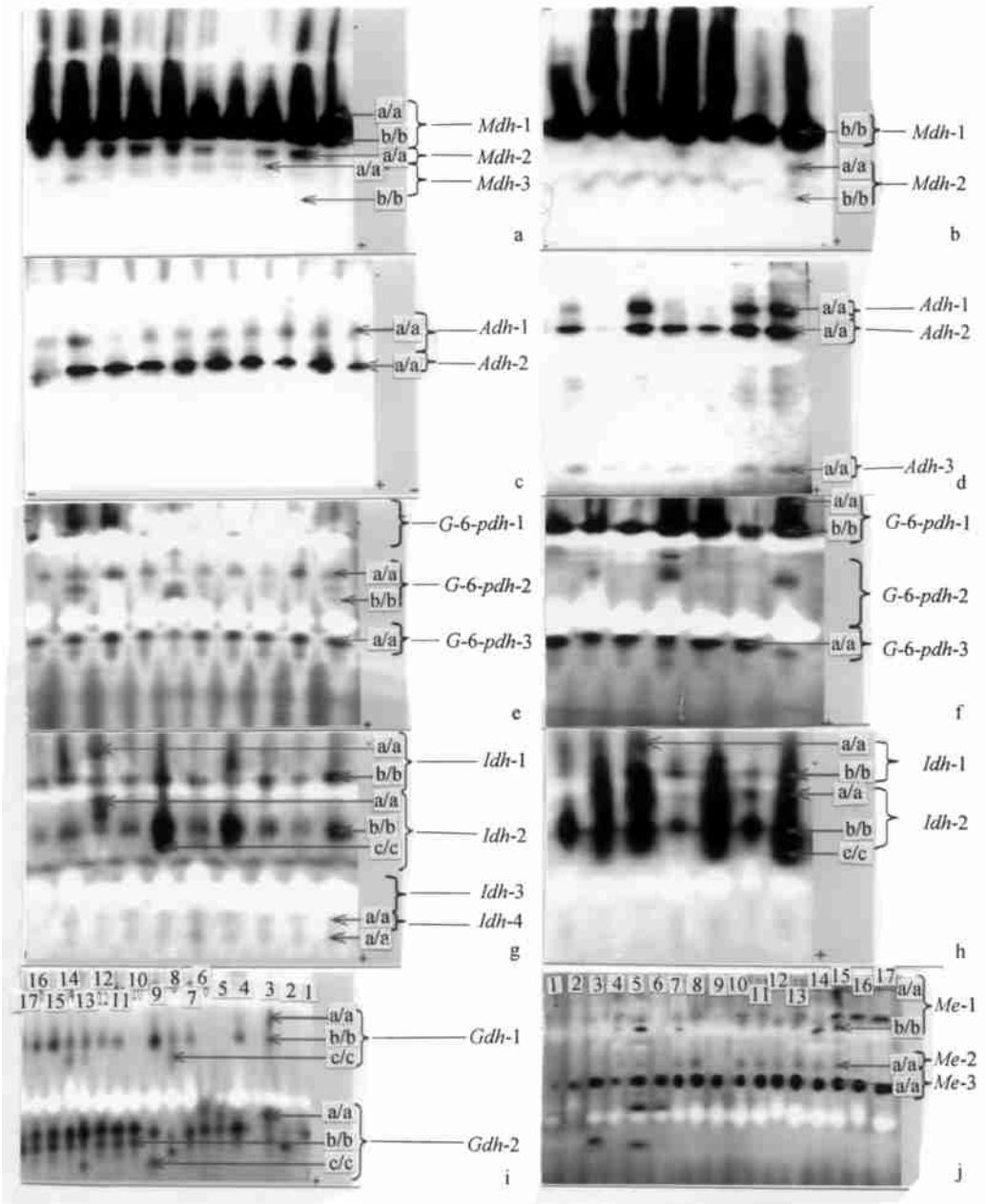


图 1 栉孔扇贝同工酶的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of isozymes on *Chlamys farreri*

a. 中国种群 MDH; b. 日本种群 MDH; c. 中国种群 ADH; d. 日本种群 ADH; e. 中国种群 G-6-PDH; f. 日本种群 G-6-PDH; g. 中国种群 IDH; h. 日本种群 IDH; i. GDH (1-7 为中国种群; 8-17 为日本种群); j. ME (1-7 为中国种群; 8-17 为日本种群)

日本栉孔扇贝的 ME 为四聚体酶, 约有两个座位编码 3-5 条谱带, 个体间表达有差

异。*Me-1* 座位由两个等位基因 *a*、*b* 控制编码 2—5 条谱带, *Me-2* 座位表现为一条纯合谱带。另外, 该酶谱还有两条谱带, R_f 值分别为 0.46 和 0.57, 但它们仅在个别个体中表达 (图 1j)。

3 讨论

3.1 种间同工酶表型比较

栉孔扇贝的闭壳肌中已存在较完整的酶系统, 它们以不同的酶形式和表型参与不同的代谢途径。李广丽等 (2000) 曾对马氏珠母贝不同组织的同工酶进行了研究, 发现 ADH 在各组织中均不表达, 李刚等 (1983) 对大珠母贝的研究结果也是如此, 但 Patric Durand 等 (1993) 在日本黑珍珠贝野生种群与养殖种群的遗传变异研究中发现: ADH 除在养殖种群 F_2 代中单态纯合外, 在其他各野生与养殖样品中均多态表达, 且活性很强。邵健忠等 (1993) 研究了三角帆蚌的 16 种同工酶的表达状况, 发现健康蚌中 ADH 活性很低, 仅在个别个体组织中检测到染色很浅的弱带。本实验在栉孔扇贝的闭壳肌中检测到了活性较强的 ADH 谱带, 这与他们的结果有不同。该酶在珍珠贝目中的存在和表达情况有待于进一步探讨。

本次实验所检测的 MDH 在两种样品中均有 2—6 条带, 这与其他珍珠贝类相似。MDH 是细胞三羧酸循环中一个重要的脱氢酶, 它对任何一个机体都起着极重要的作用, 由图 1a、b 可见, MDH 在闭壳肌中表达极强, 这与肌肉运动所需大量能量有关。栉孔扇贝的闭壳肌很发达, 在三羧酸循环中, MDH 催化苹果酸脱氢为草酰乙酸释放出能量供运动所需。日本栉孔扇贝 MDH 的种类及酶谱表型分别与马氏珠母贝的 s -*MdhA*₂、*AB*、*B*₂ 和 m -*MdhC*₂ 相对应, 提示日本栉孔扇贝 MDH 也是由 s -*MdhA*、*B* 和 m -*MdhC* 基因编码合成的, 但中国栉孔扇贝的 MDH 酶谱表型却与此不同, 其表达机制尚待进一步研究。

3.2 两个种群种内差异性比较分析

从获得的数据来看, 中国栉孔扇贝和日本栉孔扇贝在这 6 种同工酶中具有基本相似的基因座位并由其控制同工酶的表达, 但也具有一定的区别。表现为: (1) 等位基因水平的差异, 包括 A. 差别基因的存在, 如在谷氨酸脱氢酶中, *Gdh-1* 座位, 中国居群有 *b*、*c* 两个等位基因编码, 而日本居群中则有 *a*、*b* 两个等位基因控制编码; B. 等位基因数目的差异, 如在 *Gdh-2* 位点, 中国居群具有 3 个等位基因, 而日本居群中则有 2 个等位基因。(2) 基因座位水平的差异, 包括: A. 某座位某基因的表达强度存在差异, 如在葡萄糖-6 磷酸脱氢酶中, *G-6-pdh-1* 座位在中国居群内弱表达或不表达而在日本居群内则为强表达, 醇脱氢酶中也存在这种差异。B. 基因座位数目的差异, 如在醇脱氢酶中, 日本居群比中国居群多出了 *Adh-3* 座位; 在异柠檬酸脱氢酶中, 中国居群比日本居群多出了 *Idh-3*、*Idh-4* 两个座位。中国栉孔扇贝自然居群与日本栉孔扇贝自然居群的这些差异结果与它们的形态学分类结果较为一致, 它们是隶属于栉孔扇贝种的不同地理亚种。由于生活在不同的地理区域, 其光照、温度、湿度、盐度、饵料和水流等各种生态因子都不尽相同, 为了适应不同的环境, 机体必须做出适当的调整。同工酶作为基因表达的直接或间接产物, 直接参与生物体的各种代谢途径, 它们的丰富程度直接影响生物体的机能和对环境的适应能力。同工酶多态性越多, 越复杂, 表明其遗传型越丰富, 机体更能适应环境。另外, 同工酶多态性越多, 其作为分子标记研究生物多样性就越有意义。

3.3 电泳方法对结果的影响

本次实验结果与刘保忠等(1999)的研究结果有所不同,例如在苹果酸酶和异柠檬酸脱氢酶结果中差异明显,其原因可能有3点:(1)不同电泳方法所致。刘保忠采用的是淀粉胶电泳,它省时省力,成本低,但均匀程度难控制,分辨率不高。而聚丙烯酰胺凝胶则分辨率高,谱带较淀粉胶更清晰易辨。两者各有优势,不同的实验目的可采用不同的方法。一般来说,淀粉胶多用于遗传多样性的分析,一次电泳可捕捉多个位点,而聚丙烯酰胺凝胶则由于分辨率高而多用于差异分析,也用于遗传多样性的分析,但耗时较多。(2)材料来源不同所致。刘保忠分析的是山东威海近海的野生种群,该群体与作者分析的群体间的关系是亚种水平的差异还是地理区域水平的差异,仍有待于进一步研究。(3)材料本身的差异所致。本次实验取样为排卵后1—3天的成体栉孔扇贝(日本种和中国种),排卵这一生理活动对生物体的机能、免疫力等有很大影响,进而对各种酶的生化特征产生影响。另外,材料的新鲜程度、保存方法等对结果也有一定的影响。

3.4 同工酶作为遗传标记的研究

同工酶的表现型作为物种生化群体遗传学和分子群体遗传学的一种遗传标记在育种方面及分类学研究中具有很重要的作用,该技术已广泛应用于鱼类的种群结构、遗传育种及种质鉴定等研究中,并起到了重要作用(王梅芳等,2000)。在传统的形态比较分类中,由于形态特征受多种外界因素影响作用,不同种群的外部差异相对变小,而遗传背景的差异在形态表型上往往不明显,因此,双壳类分类中,在种下群体或亚种的确定上存在较多的分歧。同工酶作为基因的产物可以在蛋白质水平揭示物种间的遗传差异,为分类学提供更有力的证据。

当然,同工酶分析也有一定的不足,例如:酶谱分析时主观性较大,对于某些位点的分析会因人而异;另外,同工酶的差异并不都是遗传差异造成的,基因最终表达为功能蛋白质要经过一些次级修饰,此环节受众多因素影响;同时,遗传差异也并不都表现在同工酶上,表达为酶的那一部分基因仅是基因组的一小部分。近年来,基于DNA水平的分子标记已广泛应用于生物学的基础研究和应用研究中,并取得了很好的结果(王晓梅等,1999;夏德全等,1999)。将这两种标记结果综合分析必定有助于相关领域研究的深入开展。

参 考 文 献

- 王昭萍,田传远,于瑞海等,1998.海水贝类养殖技术.青岛:青岛海洋大学出版社,30—53
- 王晓梅,宋文芹,李秀兰等,1999.鲫鱼种群的随机扩增多态DNA与遗传多样性分析.中国水产科学,6(2):26—28
- 王梅芳,叶富良,余祥勇,2000.3种江珧同工酶遗传标记.湛江海洋大学学报,20(2):1—5
- 尤 锋,王可玲,相建海等,1999.山东近海牙鲆同工酶的生化遗传分析.海洋与湖沼,30(2):127—133
- 刘保忠,相建海,张首临,1999.栉孔扇贝同工酶的生化遗传分析.贝类学论文集,Ⅷ:143—147
- 李 刚,姜卫国,魏贻尧,1983.合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究同工酶谱的比较研究.水产学报,24(4):321—327
- 李广丽,叶富良,2000.马氏珠母贝不同组织同工酶的比较.水产学报,24(5):417—421
- 邵健忠,项黎新,华志华等,1993.三角帆蚌十六种同工酶系统的表型及其在瘟病蚌中的病理变化.水产学报,17(3):199—208
- 胡能书,万贤国,1985.同工酶技术及其应用.长沙:湖南科学技术出版社,30—47
- 徐 成,王可玲,尤 锋等,2001.鲈鱼群体生化遗传学研究同工酶的生化遗传分析.海洋与湖沼,32(1):42—49

- 夏德全, 曹莹, 吴婷婷等, 1999. 用 RAPD 分析对罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用. 水产学报, 23(1): 27—32
- 熊全沫, 1992a. 鱼类同工酶谱分析(上). 遗传, 14(2): 41—44
- 熊全沫, 1992b. 鱼类同工酶谱分析(下). 遗传, 14(3): 47—48
- Gosling E M, 1982. Genetic variability in hatchery-produced Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 26: 273—287
- Patrick Durand, Katshihiko T Wada, Françoise Blane, 1993. Genetic variation in wild and hatchery stocks of the black pearl oyster *Pinctada margaritifera* from Japan. *Aquaculture*, 110: 27—40

BIOCHEMICAL GENETIC ANALYSIS OF SIX ISOZYMES ON *CHLAMYS FARRERI*

WANG Zhi-Zheng,

(Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

LI Tai-Wu

(Life Science and Biotechnology School, Ningbo University, Ningbo, 315211)

LIU Yan

(Life Science School, Liaoning Normal University, Dalian, 116029)

SUN Xi-Qin

(First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

GUO Hao

(Institute of Environment Protection of Oceanography, State Oceanic Administration, Dalian, 116023)

LI Chun-Mao

(Institute of Changhai Aquaculture, Dalian, 116500)

SONG Lin-Sheng, XIANG Jian-Hai

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Six isozymes (MDH, ADH, G-6-PDH, IDH, GDH, ME) in adductor muscle of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston) in two populations were analyzed by vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The live materials were collected from the natural seawaters of Dalian, China and Japan from 1998 to April, 1999. Dissected the samples, fetched the adductor muscle and stored them at -70°C . By homogenizing in ice and centrifuging at 4°C , 13000r/min, the supernatant of samples were extracted and stored at -20°C for electrophoresis (buffer system: Tris-Gly, pH= 8.3; voltage: 300V 40—50min in concentrated gel ($T=3.6\%$, pH= 6.7), 200V 4 hours in separated gel ($T=8.2\%$, pH= 8.9)). The results imply the biochemical genetic traits of 6 isozymes, including their locus number, structure, alleles etc. On these basis, the basic electrophoretic patterns of the 6 isozymes were gained. In two populations, altogether 18 gene loci and 28 alleles were recorded, among which the expression of 8 loci including *Idh-1*, *Idh-2*, *Adh-1*, *Adh-2*, *Me-1*, *Me-3*, *G-6-pdh-3* and *Mdh-3* were identical in all samples, the rest were different at different levels. At the same time, the individual difference existed in each population. This paper compared and discussed the result. Some bands only expressed in specific population, they can be used as effective genetic markers for all kinds of studies.

Key words *Chlamys farreri*, Isozyme, Biochemical genetic analysis