

泥蚶(*Tegillarca granosa*) 个体发育过程中同工酶基因表达与调控的研究*

苏秀榕 吕振明 李太武 林志华[†] 柴雪良[‡]

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

[†](浙江省海洋水产养殖研究所 温州 325005)

提要 采用不连续垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳法,对泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus) 19个发育阶段的ADH、LDH、EST、IDH、ALP、MDH、GDH、POD、ATPase和ME等10种同工酶的基因表达进行检测分析。结果表明,泥蚶在个体发育过程中随着机体分化和生理活动的改变,同工酶基因的表达呈现出显著的时序变化。在10种酶中,LDH和ATPase两种酶的所有酶带及EST、MDH和ME等的部分酶带在各个发育阶段持续表达,其他酶带只出现在发育阶段的某一或某些阶段,并且表现出了与泥蚶营养方式、代谢形式等生理活动的关联性。在泥蚶的个体发育阶段过程中,IDH、MDH、GDH、ME、ALP等5种酶在32细胞期表达的酶带数剧增,因此32细胞期可能是合子基因表达启动的时间;ADH、EST、LDH、MDH、GDH、ME等6种酶在泥蚶的附着变态期酶带大幅减少或产生新酶带,可能与泥蚶附着期运动方式、代谢强度及生活环境的改变有关。

关键词 泥蚶, 个体发育, 同工酶基因表达与调控

中图分类号 Q789

生物体的个体发育是由一个受精卵产生一个复杂的成体的变化过程,该过程最基本的特征是细胞分化并由此产生一系列的细胞类型。许多研究表明,基因在不同细胞类型和相同细胞类型的不同发育时期有着不同的表达,而且这种差异表达可由基因的表达产物同工酶表现出来(肖义军等,1996;李纯厚等,1994;Hart *et al.*,1997)。Frankel等(1977)认为,发育过程实际上是一个有程序的基因表达过程,发育中同工酶基因在生活史的某个阶段突然表达,而又在某个阶段突然停止往往与特定的生理功能相关。蒋晓华等(1996)也发现,滇池高背鲫体内碱性磷酸酶的出现与肝组织的分化以及功能的建立之间表现出高度的同步性,并认为此酶带的出现与新个体生命活力的加强,尤其与因摄食活动开始后消化系统的肝、肠和胃等结构与功能的分化有关。

目前有关贝类在个体发育过程中同工酶变化的研究在国内的报道较少。李清漪等(1995)发

现,大瓶螺肝脏同工酶在不同的生长发育期有着不同的表型;刘艳等(2002)分析了栉孔扇贝稚贝和成贝10种同工酶的表达,发现稚贝的同工酶酶谱与成贝相比表型有相近的一面,但也有一定的差异,稚贝只拥有其亲本的部分条带。泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus)属瓣鳃纲(Lanellibranchia)列齿目(Taxodonta)蚶科(Arcidae)动物,是一种重要的海水养殖经济贝类,对于它的研究目前主要集中在养殖技术及苗种培育等方面,在个体发育的生化分析上还未见报道。作者分析了泥蚶发育过程中10种同工酶的时序变化,旨在揭示泥蚶基因在其发育过程中的选择性表达与调控机制,为进一步对泥蚶的发育生物学、遗传学等研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus)各个发育时期的样品取自浙江省海洋水产养殖研究所(温州),分

* 国家自然科学基金资助项目,30371095号。苏秀榕,教授,E-mail:suxiurong@hotmail.com

收稿日期:2004-02-19,收修改稿日期:2004-06-28

19 个时期取样, 具体取样时期及发育过程见表 1。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 准确称取各时期样品, 蒸馏水漂洗后, 以 1:3 的比例(体重: 体积, g: ml) 加入 0.05% 巯基乙醇水溶液, 冰浴下匀浆, 匀浆时幼虫为未去贝壳样品, 而成体为去贝壳的软体部组织, 4℃ 冷冻离心机中 12000r/min 离心 30min, 取上清, 加入适量溴酚兰后分装, 样品放入 -70℃ 超低温

冰箱中保存备用。

1.2.2 电泳 采用不连续垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 具体方法参照胡能书等(1985); 同工酶显色方法参照王中仁(1996), 略有改动。染色完毕后用 7.5% 冰醋酸溶液固定, 生物电泳图像系统进行摄影记录, 每种酶至少重复 3 次实验。

1.2.3 同工酶的命名 同工酶的命名参考李广丽等(2002)的方法进行。

表 1 泥蚶个体发育样品采集时期及主要特征

Tab. 1 *T. granosa* sample collecting time and description

发育时期	样品号	取样时机	主要特征
配子期	1	未成熟卵子(解剖获得)	形状不甚规则, 胚泡尚未破裂
	2	成熟卵子(催产获得)	形状呈圆形, 胚泡破裂
	3	成熟精子(催产获得)	尾部运动活跃, 入水后密集成云雾状
胚胎发育期	4	受精卵	受精膜举起, 卵质开始流动
	5	卵裂初期	部分受精卵分裂成 2—4 个细胞
	6	32 细胞期	受精卵分裂成 32 个小细胞
	7	囊胚与原肠期	胚体密生纤毛, 胚胎开始转动, 部分胚胎植物极内陷
	8	担轮幼虫期	体表有纤毛环, 游动活跃, 壳腺外翻并开始分泌贝壳
	9	D 形幼虫初期(摄食外源食物前)	贝壳包裹全身, 成 D 字形, 卵黄逐渐耗尽, 未开始摄食
	10	D 形幼虫后期(摄食外源食物后)	卵黄基本耗尽, 开始摄食外界食物
	11	壳顶初期	壳顶逐渐隆起, 但不甚明显
	12	壳顶后期	壳顶隆起明显, 贝壳前后不对称
稚贝及幼贝期	13	附着变态期	面盘萎缩, 幼虫分泌足丝营附着生活
	14	放射肋形成期	壳表面开始出现放射肋
	15	幼贝期(壳长 2mm 左右)	壳长 2 毫米左右, 具备成贝形态
成贝期	16	性腺积累期(3 月份样品)	微量摄食, 性腺开始发育, 个体生长基本停滞
	17	排放期(5 月份样品)	性腺饱满, 覆盖整个内脏团
	18	性腺耗尽期(5 月份样品)	性腺呈透明水泡状并开始萎缩
	19	繁殖后机体复苏期(7 月份样品)	性腺基本退化, 个体恢复生长

2 结果

2.1 醇脱氢酶(ADH, E. C. 1. 1. 1. 1)

ADH 是参与糖酵解的重要酶类, 它的生理作用是适应厌氧酵解的需要。泥蚶的 ADH 在配子细胞及胚胎发育的初期阶段活性都很强, 表现为两条酶带 a 和 b, 且两条带靠得很近。到了附着变态期, 该酶活性消失, 直到成蚶阶段才又出现, 但与胚胎时相比活性有所降低, 如图 1 所示。

2.2 乳酸脱氢酶(LDH, E. C. 1. 1. 1. 27)

LDH 也是一种参加糖酵解的重要酶类, 由图 1 可知, LDH 在泥蚶的配子及整个发育过程中都

表现为两条酶带 a 和 b, 其中 a 的活性较弱, 而 b 的活性较强, 在各个发育时期该酶活性也略有不同, 在未成熟卵开始到壳顶后期 LDH 酶活性保持稳定, 从附着变态期开始活性有下降趋势, 到成体该酶活性又有一定回升。

2.3 酯酶(EST, E. C. 3. 1. 1. 1)

泥蚶的 EST 在配子及整个发育过程中共表达出近 18 条酶带, 其中 n 和 o 这两条酶带在各个阶段中都有表达, 应属于管家酶系列, 其他酶带则都存在着阶段性表达, 如图 1 所示。

从总体上说, 配子阶段和胚胎发育初期阶段

EST 表型较复杂, 有些酶带如 b—d 及 h—k 等都是这两个阶段所特有的, 但这些酶带随着发育的进行也逐渐退化; D 形幼虫后期(摄食后)却产生了一些新的酶带, 如 e、f 和 g 等, 这些酶带一直维持到成体阶段; 附着变态期及幼贝期的酶带相对简单, 主要是一些管家酶在表达, 成体阶段 EST 酶带数及活性又有回升的迹象, 在稚贝期及幼贝期曾丧失的酶带 l、m 等在此期又重新开始出现。

从个别时期来看, 精子细胞的 EST 活性最弱, 可能与精子的代谢特征相关; 壳顶幼虫时期有较强的 q 带的表达; 而在放射肋形成前后未见酶带的明显变化。

2.4 异柠檬酸脱氢酶(IDH, E. C. 1. 1. 1. 42)

如图 1 所示, 泥蚶的 IDH 在配子及整个发育过程中共出现 8 条酶带, 其中酶带 c 在绝大多数发育时期中都有活性, 而且也是各个时期的主要酶带, 该酶带在壳顶期及成体活性都很强; 酶带 a 只出现于受精卵中; 酶带 b 只存在于某些时期的成体中; 而剩下的酶带都只在 32 细胞期表达。在未成熟卵子、卵裂初期及囊胚和原肠期始终未见 IDH 同工酶的表达。

2.5 碱性磷酸酶(ALP, E. C. 3. 1. 3. 1)

泥蚶的 ALP 基因表达存在明显的阶段性, 该基因除在 32 细胞期有微弱的 b、c、d 三条酶带表达外, 只在壳顶初期到成体阶段有所表达, 且均表现为一条窄的酶带 a, 而在其他阶段未见该基因的表达, 如图 1 所示。

2.6 苹果酸脱氢酶(MDH, E. C. 1. 1. 1. 37)

泥蚶的 MDH 在各个发育时期中的变化较复杂。酶带 a—d 在各个时期都有表达且活性较强, 应是管家酶系列, 其中酶带 b 是一条宽阔的酶带, 在附着变态期后开始分化成两条较窄的酶带, 至成蚶又融合为一条宽阔的酶带; 酶带 e、f 只在少数的几个时期没有表达或表达很弱; 酶带 g 活性也较弱, 只存在于成体中, m、n 也是两条活性很弱的酶带, 只存在于 32 细胞期至 D 形幼虫的几个时期, 而其他酶带则只在极个别的时期中有所表达, 如 j 只在放射肋形成期有所表达, i、k、l 只在 32 细胞期有所表达等, 如图 1 所示。

2.7 谷氨酸脱氢酶(GDH, E. C. 1. 4. 1. 2)

泥蚶的 GDH 表达活性很弱, 仅在 32 细胞期和附着变态期才有较弱的表达, 其中 32 细胞期表现为 a、b 两条酶带, 而附着变态期表现为 b、c、d

三条酶带, 如图 1 所示。

2.8 过氧化物酶(POD, E. C. 1. 1. 1. 7)

POD 在泥蚶的整个发育过程中共表现出 3 条酶带, 即 a、b、c, 其中 a、b 是靠得很紧密的两条酶带。在未成熟卵中只有一条酶带 a, 而 a、b、c 同时分布于成体中(排放后亲蚶除外), 其他阶段未检出该酶活性, 如图 1 所示。

2.9 腺苷 5'-三磷酸激酶(ATPase, E. C. 3. 6. 1. 8)

泥蚶的 ATPase 在整个发育过程中共表现出 3 条酶带, 即酶带 a、b、c, 在酶带数量上各发育阶段无显著差异, 但在酶带活性上存在着一定差异, 其中未成熟卵的 ATPase 酶相对较弱, 从成熟卵以后至 D 形幼虫这个期间 ATPase 的活性都较强, 再往后 ATPase 的活性开始减弱, 并且这种活性一直维持到成体, 如图 1 所示。

2.10 苹果酸酶(ME, E. C. 1. 1. 1. 40)

泥蚶的 ME 表型较为复杂, 在泥蚶的各个发育阶段都有较强的表达。从图 1 可以看出, 其中有些酶带如 b、d 和 e 自始至终存在并稳定表达, 因此应为管家酶系列; 而酶带 a 较弥散, 可能不止由一条酶带组成, 该酶带在绝大部分时期中都存在; 其他酶带则只存在于个别的发育时期, 如酶带 f 只存在于附着变态期, 酶带 i、j 只存在于 32 细胞期和囊胚原肠期, 酶带 g 仅存在于 32 细胞期, 酶带 h 只存在于配子时期等等。与 MDH 和 IDH 等类似, 该酶 32 细胞期的酶带也是最多的。

3 讨论

从本研究的泥蚶 10 种同工酶在配子及个体发育时期的表型来看, 除了 LDH、ATP 等少数几种酶外, 大多数酶基因的表达都表现出了极明显的阶段性差异, 这与其他生物体的研究结果相类似(Morgan *et al.*, 1978; 卢建平等, 2000)。在这些有阶段特异性的酶中, 有些酶带是各个发育阶段都具有的, 如 EST 中的 n、o 酶带、MDH 中的 a—d 的四条酶带等, 而有些酶带只是某一阶段或某些阶段所特有的, 如 IDH 酶中的 d—h 及 MDH 酶中的 i、k、l 等, 这些酶带是个体在发育过程中随着机体分化、细胞类型的日益异化产生特殊的生理需要而相应产生的, 是机体基因逐渐激活表达的产物。因此通过对同工酶的研究, 有利于了解生物体基因表达时序及其调控方式, 也有利于解释发育过程中某些阶段所特有的机体代谢方式。

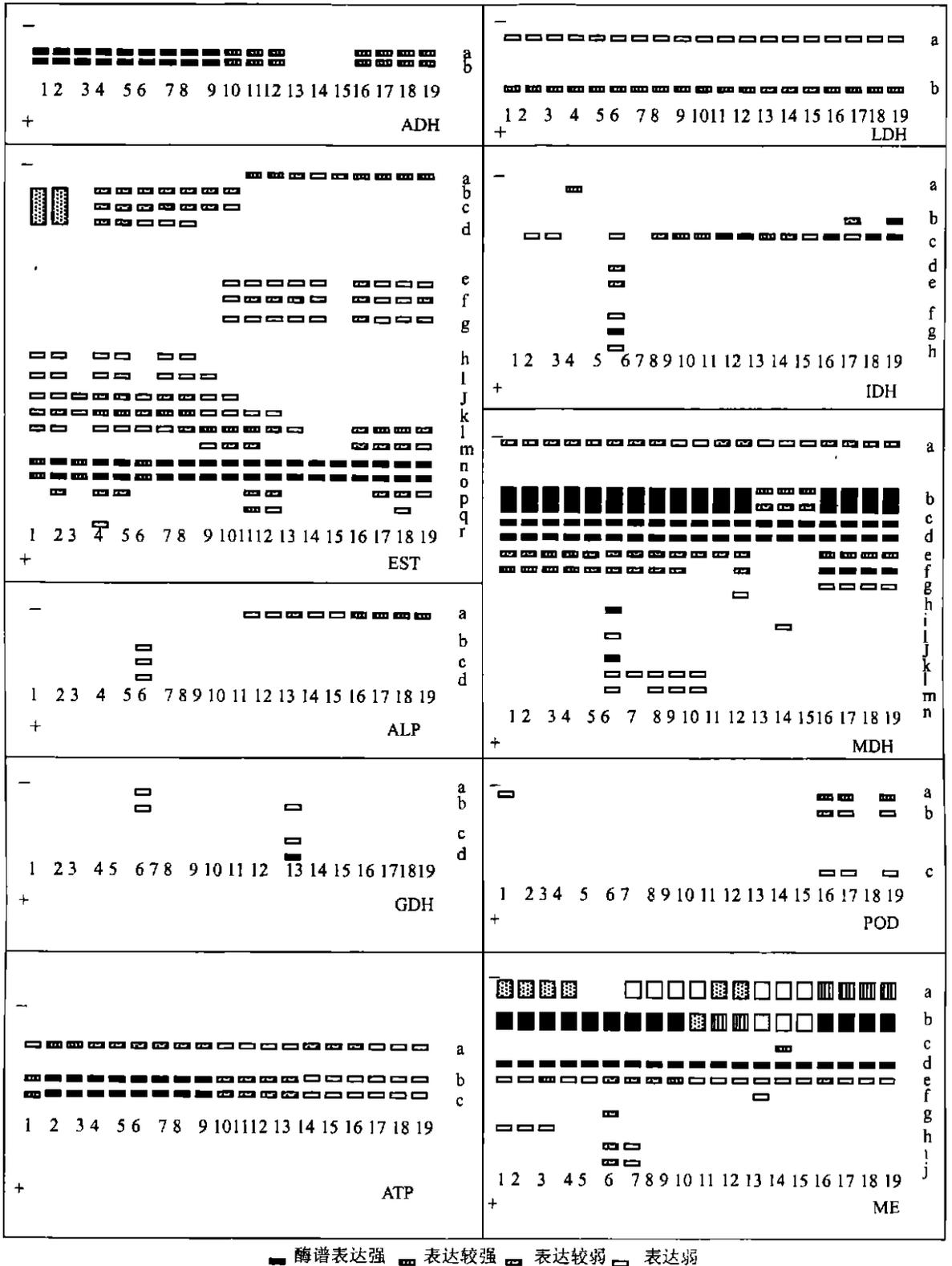


图1 泥蚶 19 个发育时期 10 种同工酶表达模式图

Fig. 1 Electrophoretogram of 10 isozymes expressed in 19 different development stages of *T. granosa*

3.1 泥蚶合子基因表达的启动时间

发育生物学中有关棘皮动物和两栖动物的资料表明, 在胚胎发育早期蛋白质的合成主要受母本基因的影响, 合子基因在卵裂晚期即囊胚期阶段对发育的影响还不是很显著(丁汉波等, 1987)。对于贝类合子基因在胚胎发育过程中的确切启动时间的研究目前国内尚未见报道。同工酶是基因表达的直接产物, 合子基因作为区别于母体基因的遗传信息一旦被激活, 必然会产生大量区别于母体效应的同工酶酶带, 因此从个体发育的同工酶表型的变化上就应该可以看出合子基因与母本基因交替控制的痕迹。从本研究的泥蚶个体发育同工酶图谱来看, 大量的特殊酶带表达开始于 32 细胞期, 如泥蚶的 IDH、MDH、GDH、ME、ALP 等同工酶中的许多酶带所示, 说明泥蚶合子基因的大量表达很可能在 32 细胞期已经开始, 而并不是像棘皮动物和两栖动物那样发生在囊胚期, 也不像同样是水生生物鱼类(斑马鱼)发生在 10 细胞周期以后, 在这一点上泥蚶倒有点像哺乳动物, 即胚胎基因的大量表达发生在卵裂早期, 当然哺乳动物合子基因的大量表达出现得更早些(2—16 细胞期)(朱新产等, 2000), 这在贝类中是否属于普遍现象还有待于进一步的研究。当然对于合子基因的大量表达并不代表合子基因的最早激活时间, 合子基因的最早激活时间可能还会早些, 如哺乳动物在 1—8 细胞期合子基因就开始最早转录, 对于泥蚶来说情况如何, 可能还要结合其他分子生物学手段才能检测出。

3.2 酶谱变化与营养方式的转变

随着机体分化而产生的同工酶酶谱的变化是与机体特定发育时期的生理功能相联系的。一般在双壳类贝类个体发育过程中, 都有一个从内养型营养方式向外养型营养方式转变的过程, 因而这一过程中必然会引起相关酶类的显著变化, 其中表现最典型的是 EST。它是催化酯类化合物水解并进入中间代谢的重要酶类, 这从图 1 可以看出。酯酶在胚胎发育初期酶谱相当复杂, 但随着发育的进行, 酶谱有逐渐简化的趋势。如 EST 中的 b—d 及 h—k 等酶带只在胚胎发育早期存在, 到了 D 形幼虫后这些酶带基本消逝, 而受精卵到 D 形幼虫期间恰好是泥蚶依靠分解卵黄供给能量的时期, 因此推测这几条到后期消失的酶带可能与卵黄的分解活动有关。与此相反, 从 D

形幼虫开始出现的一些早期胚胎所不具有的酶带, 如 e、f 和 g 等, 这些酶带的出现的时间正好与 D 形幼虫后期泥蚶开始摄食外源性食物的时间相符, 因此可以作为泥蚶从内源性营养转向外源性的一个分子标记。

ALP 也是一种水解各种磷酸酯的酶类, 这种酶可以分别在酸性条件下水解食物中的酯类物质供给机体的需要。从图 1 可知, 这种酶在胚胎发育早期除 32 细胞期有过表达外, 基因基本处于关闭状态, 到了壳顶期后这种酶才开始大量表达, 并且一直维持至成体, 从该酶开始表达的时间来看, 基本上也与泥蚶转向外源性营养的时间大体相符, 表现出了酶基因的激活与生理活动改变的一致性。

3.3 同工酶酶谱的变化与运动方式、代谢强度、生活环境的改变

由本研究的同工酶酶谱可以看出, 在泥蚶整个个体发育过程中酶带除在 32 细胞期有一个激变外, 在附着变态期大部分酶也有一个较剧烈的变化, 如 ADH、EST、LDH、MDH、GDH、ME 等同工酶所示。与 32 细胞期这些酶的表达情况相反, 这些酶带并不是大量增加, 而是有酶带减少、活性变弱的趋势, 或者产生了新的酶带。分析其原因可能有以下几条: (1) 运动方式的改变。泥蚶在附着变态后, 面盘脱落开始营底栖生活, 从原来的游泳生活变为相对静止温和的生活, 这时原先与面盘运动有关的酶随着面盘的脱落开始精简。(2) 生活环境的改变。泥蚶在附着变态以前是在水中游泳生活的, 附着期后开始潜伏到水底生活, 因此生活环境的激变理应在同工酶中反映出来。(3) 代谢强度的改变。泥蚶附着前的发育阶段在整个泥蚶生活史中只占极小的部分, 但在这短暂的时期中却完成了从一个圆形的受精卵到复杂的成体形态的转变, 这种巨大的改变是附着变态后泥蚶所不能比拟的, 因此在这短暂的时期中胚胎的相对(相对于机体大小)代谢强度肯定比附着以后的泥蚶要大, 所以表现为胚胎早期酶带比附着后泥蚶酶带多而活性更强。

3.4 泥蚶个体发育基因表达的调控

同工酶是基因表达的直接产物, 同工酶的变化反映了基因的选择性表达。这种选择性表达是生物体内外因子对基因调控的结果。这种调控不仅限于从受精卵到成体这个机体细胞剧烈分化的时期, 而且还延伸到形态变化不大的配子及成体

形成后的各个时期。从各同工酶图谱可以看出,未成熟卵与自体排出的成熟卵在有些同工酶酶带上是不完全一样的,如ATPase、POD等。这说明在卵子趋于成熟的过程中,在貌似静止的卵细胞内部仍有部分同工酶基因的开启和关闭或激活与抑制。对于这些酶基因的调控机制,目前一般认为是母体激素类物质及促成熟因子(MPF)等在转录和转录后水平上对蛋白质合成起了调节作用(丁汉波等,1987)。在成体中,机体在形态学上已经趋于稳定,但在机体内部仍然起着深刻的变化,如本研究的EST、IDH和POD等同工酶所示,这些酶与泥蚶的酯类、碳水化合物代谢及能量代谢密切相关,因此容易因生物体的生理代谢强度的改变而变化。本研究所取的成体泥蚶分别为处于低温环境中代谢水平较低的3月泥蚶、处于产卵盛期的亲蚶、产卵后体质较弱的亲蚶及体质已经恢复的7月泥蚶等几个特殊生理时期,因此相应的同工酶也有显著的变化。虽然对这些成蚶同工酶基因表达的调控机制还不清楚,但推测可能与海域温度、饵料丰度等环境因子及产卵期体内激素的调节作用有关,因为这些因素可以作为基因调控的信号(郑国,1998)。至于胚胎期及幼体的同工酶表达调控,从本次的研究来看也可能是类似的内外因素对蛋白质合成在转录和转录后水平上协同作用的结果。

参 考 文 献

丁汉波,全允栩,黄浙,1987.发育生物学.北京:高等教育出版社,66—301

王中仁,1996.植物等位酶分析.北京:科学出版社,95—112

卢建平,姜乃澄,2000.罗氏沼虾胚胎发育过程中同工酶的研究.东海海洋,18(3):34—39[Lu J P, Jiang N C, 2000. The isozyme patterns in embryo development of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergh*. Donghai Marine Science, 18(3):34—39]

朱新产,张涌,2000.胚胎发育合子型基因激活(ZGA)的调控机制.西北农业大学学报,28(2):91—97[Zhu X C, Zhang Y, 2000. Regulating mechanism of zygotic gene activation in embryonic development. Journal of Northwest University of Agriculture, 18(2):91—97]

刘艳,李太武,孙修勤,2002.栉孔扇贝稚贝的同工酶的基因表达.辽宁师范大学学报,25(2):174—177 [Liu Y, Li T W, Sun X Q, 2002. Biochemical genetic analysis of isozyme in juvenile scallop, *Chlamys farreii*. Journal of Liaoning Normal University, 25(2):174—177]

李纯厚,钟振如,陈敏,1994.斑节对虾个体发育早期的同工酶变化.水产学报,18(1):62—64[Li C H, Zhong Z R, Chen M, 1994. Isozyme changes during early ontogeny of *Penaeus monodon*. Journal of Fisheries of China, 18(1):62—64]

李清漪,刘堰,1995.大瓶螺四种同工酶的电泳分析.水产学报,19(2):184—186[Li Q Y, Liu Y, 1995. The electrophoretic analysis of 4 isoenzymes of *Anpularis gigas*. Journal of Fisheries of China, 19(2):184—186]

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[Li G L, Ye F L, 2000. The comparison of isozymes in different tissues of *Pinctada martensii*. Journal of Fisheries of China, 24(5):417—421]

肖义军,高建民,傅文庆,1996.大鳞副泥鳅LDH同工酶的发育遗传学研究.遗传,18(6):6—8[Xiao Y J, Gao J M, Fu W Q, 1996. A developmental genetic study of LDH isozymes in *Paramisgurnus dabryanus*. Hereditas, 18(6):6—8]

郑国,1998.细胞生物学.北京:高等教育出版社,478—481

胡能书,万贤国,1985.同工酶技术及其应用.湖南科学技术出版社,70—85

蒋晓华,咎瑞光,1996.滇池高背鲫同工酶发育遗传学研究.云南大学学报,18(2):114—117[Jiang X H, Zan R G, 1996. Study on the developmental genetics of isozymes in Dianchi high-back crucian carp (*Carassius auratus*). Journal of Yunnan University, 18(2):114—117]

Frankel J S, Hart L N H, 1977. Actate dehydrogenase ontogeny in the Genus *Brachydanic*. Hered, 68: 81—86

Hart N H, Cook M, 1997. Esterase isozymes patterns in developing embryos of *Brachy danio rerio* (zebra danio), *Brachy danio abolineatus* (pearl danio) and their hybrids. Exp Zool, 193: 109—128

Morgan R P II, Sulk in SD, 1978. Bio-chemical changes during larval development of the xanthid crab *Rhithrop anopeus harnisi* III, Isozyme changes during ontogeny. Mar Biol, 48: 223—226

EXPRESSIONS AND REGULATION OF ISOZYME GENES DURING ONTOGENY OF BLOODY CLAM *TEGILLARCA GRANOSA*

SU Xiu-Rong, L. Zhen-Ming, LI Tai-Wu, LIN Zhi-Hua^{*}, CHAI Xue-Liang^{*}

(College of Life Science and Biotechnology of Ningbo University, Ningbo, 315211)

^{*}(Institute of Zhejiang Mariculture Zhejiang, Wenzhou, 325005)

Abstract Bloody clam *Tegillarca granosa*, distributes along the south and west Pacific Ocean, belonging to Mollusca, Bivalvia, Arcoida, Arcidae, is one of four traditional culture species of shellfish in China. Containing abundant protein and vitamin B12, also being tasty and delicious, it has been farmed in a large scale along the south coast of China. In recent years, expanding culture in area and scale, some diseases in *T. granosa* population are causing heavy harm in some farms. Except for the deterioration of the ocean environment, degradation of the genetic resource of *T. granosa* is thought to be responsible for the problem, demanding better breeding and seeding technology for *T. granosa*, which is also, to study in its bioenergetics. The analysis of isozyme gene expression is not only important for the discovery of certain functional gene and its regulation mechanism but also useful for exiting some special physiological phenomenon happened during early life stage of an organism. Many previous cases reported that certain gene expression pattern in ontogeny is related to some important physiological events. *T. granosa* is an important economical shellfish in China seas. Although many researches have been done on this species, but yet there is no study reported on isozyme gene expression pattern in its ontogeny. In this study, mechanism of the isozyme gene expression change in ontogeny of *T. granosa*. 10 isozymes were chosen to carry out the experiment by vertical polyacrylamide gel electrophoresis. They are lactate dehydrogenase (LDH), malic enzyme (ME), malate dehydrogenase (MDH), ester (EST), alcohol dehydrogenase (ADH), isocitrate dehydrogenase (IDH), alkaline phosphatase (ALP), glutamate dehydrogenase (GDH), adenosine triphosphatase (ATPase) and peroxidase (POD). Samples from 19 different life stages of *T. granosa* were collected from the Institute of Zhejiang Mariculture. In laboratory, the samples were homogenized in 0.05% mercaptoethanol buffer at ratio of 1:3 (W/V) with ice-bath immediately and centrifuged by 12000r/min for 30 minutes at 4°C. The supernatant was collected and used for the experiment. Like other organisms, the expression of isozyme genes in *T. granosa* showed significant changes in different life stages and physiological activity. In general, the enzymes could be divided into two types. The first type was found in all stages of individual development, which may be coded by "house keeping genes"; the second type was found only in some special stages, whose expression showed certain connection with special physiological activities. Our analysis on the changes of all zymograms revealed that there are two basic changes in 19 stages of embryo development. One appears in the stage of 32-cell period, in which the amount of enzyme bands increased rapidly, suggesting that the 32-cell period is the expression start of zygote genes, the other happened in the stage of metamorphosis period, in which the amount of enzyme bands decreased rapidly, it may be related with changes of moving fashion, intensity of metabolism and living environment of *T. granosa* larva. The regulative mechanism of isozyme gene of *T. granosa* was also discussed in this paper, which may give a reference to further research of gene regulations in other organisms.

Key words Bloody clam *Tegillarca granosa*, Ontogeny, Isozyme gene expression and regulation