

厦门港海区真刺唇角水蚤不同季节 种群的同工酶分析*

王桂忠 李少菁

(厦门大学海洋学系, 361005)

提要 于1989年10月—1990年1月在厦门港海区采集真刺唇角水蚤,对其不同季节种群4种酶的6个酶区,即:苹果酸酶(ME)、苹果酸脱氢酶(MDH)、醛氧化酶(AOX₁, AOX₂)和酯酶(EST₁, EST₂)进行了分析。结果表明,苹果酸酶和苹果酸脱氢酶是单态的,而其余的两种酶是多态的。除了EST₂之外,冬春种群与夏秋种群在其余5个酶区的等位基因频率非常相似;EST₂在有的个体不出现酶带,冬春种群的表达频率高于夏秋种群。温度对EST有明显的影响,在55℃中EST₁和EST₂全部失活;在45℃以下各温度组中EST₁的表达频率全部为1,但在EST₂则有所变化,变化规律与自然种群的相近。

关键词 真刺唇角水蚤 同工酶 种群

许多研究报道了真刺唇角水蚤在许多方面存在着季节差异,如:身体大小^[1]、产卵率^[2]、卵的孵化率^[3]等都有明显的季节变化。但是这些季节差异的内在机制是什么,尚无足够的资料来解释。同工酶是基因表达后的产物,是分子水平上的表型。本文试图通过对不同季节种群的真刺唇角水蚤进行同工酶分析,以探明这些季节变异的生化基础。

一、材料与方 法

真刺唇角水蚤(*Labidocera euchaeta* Giesbrecht)于1989年10月—1990年1月采自厦门海关码头附近海区。将10月捕获的动物作为夏秋种群,12—1月捕获的动物作为冬春种群,分析约700只。进行同工酶分析时,挑选健康成熟的个体,用重蒸水冲洗三遍后,单只置于15 μ l的萃取缓冲液中^[12]进行冰浴研磨,将组织匀浆移到聚丙烯酰胺凝胶的样品井中进行电泳。

采用北京六一仪器厂生产的DYY-III型平板电泳槽和DYY-III 2型恒流稳压电泳仪,在5℃的冰箱中电泳。凝胶尺寸为:120×200×1mm,每板28个样品井。使用20mA恒电流,电泳3h。

共分析了酯酶(Esterase,简称EST)、醛氧化酶(Aldehyde oxidase,简称AOX)、苹果酸脱氢酶(Malic dehydrogenase,简称MDH)和苹果酸酶(Malic enzyme,简称ME)4种酶的同工酶。这4种酶电泳分离所用的凝胶浓度及缓冲液系统见表1。酯酶和苹果酸脱氢酶的染色液按吴鹤龄等的配方配制^[2],醛氧化酶的染色液按Brewer的配方配

* 国家教委高校博士点专项科研基金资助项目,900938号。
接受日期:1990年12月10日。

制^[10], 苹果酸酶的染色液按 Bucklin 的配方配制^[11]。

染色后的凝胶用重蒸水漂洗, 在 7% 的乙酸中固定十几小时后制成干片保存。根据 Ayala^[7] 和 Wallace^[16] 所介绍的方法来计算真刺唇角水蚤冬春种群和夏秋种群 4 种酶 5 个酶区的等位基因频率。

表 1 4 种酶电泳分析的条件

Tab. 1 Electrophoresis conditions for four different enzymes in *L. euchaeta*

| 酶名称 | 凝胶浓度 (%) | 凝胶缓冲液 | 电极缓冲液 |
|-------------------|----------|----------------------------------|--|
| EST ^{a)} | 5 | 375m mol/L Tris-HCl, pH = 8.9 | 50m mol/L Tris-384m mol/L 甘氨酸, pH = 8.3 |
| AOX | 6.5 | 320m mol/L 甘氨酸; pH = 8.8 | 100m mol/L 甘氨酸, pH = 8.6 |
| MDH | 5 | 320m mol/L 甘氨酸, pH = 8.8 | 100m mol/L 甘氨酸, pH = 8.6 |
| ME | 5 | 320m mol/L 甘氨酸, pH = 8.8 | 100m mol/L 甘氨酸, pH = 8.6 |

a) 酯酶的凝胶缓冲液和电极缓冲液参考文献[2]的配方。

温度影响酯酶同工酶谱的实验是以冬春种群的个体作为对象。动物在匀浆之前, 先用重蒸水洗三遍后, 单只置于 100 μ l 的重蒸水中, 置于实验温度下恒温半小时后, 再将动物移入含有 15 μ l 的萃取缓冲液中进行匀浆。每只动物的组织匀浆置于一个样品井中进行电泳, 实验温度分别为 5, 15, 25, 35, 45 和 55 $^{\circ}$ C 6 组。

二、结 果

1. 真刺唇角水蚤 4 种酶的电泳表现型

(1) 苹果酸酶 该酶是单态的, 在所观察的 102 只个体中, 全部是纯合体, 均只出现迁移率完全相同的一个酶带 (图 1a)。

(2) 苹果酸脱氢酶 在所观察的 112 只个体中, 该酶有两种表现型。即: 迁移率快的纯合体 FF (图 1b 第 2 只个体) 和迁移率慢的纯合体 SS (图 1b 第 1 只个体)。

(3) 醛氧化酶 该酶有两个酶区。即: 迁移率快的酶区 AOX₁ 和迁移率慢的酶区 AOX₂ (图 1c)。该酶在 AOX₁ 有三种表现型: 纯合体 FF (图 1c 第 4 只个体) 和 SS (图 1c 第 5 只个体) 及杂合体 FS (图 1c 第 1, 2, 3 只个体)。AOX₂ 也有三种表现型: 纯合体 FF (图 1c 第 2, 5 只个体) 和 SS (图 1c 第 3, 4 只个体) 及杂合体 FS (图 1c 第 1 只个体)。AOX₁ 与 AOX₂ 的活性相当。

(4) 酯酶 该酶有两个酶区, 活性主要表现在迁移率快的 EST₁ 酶区。EST₁ 有三种表现型: 纯合体 FF (图 1d 第 5 只个体) 和 SS (图 1d 第 6 只个体), 杂合体 FS (图 1d 第 1, 2, 3, 4 只个体)。EST₂ 的活性很弱, 在有的个体只有一条迁移率快的酶带 (图 1d 第 3 只个体); 有的个体只有一条迁移率慢的酶带 (图 1d 第 4 只个体); 有的个体则同时出现迁移率快和慢的两条酶带 (图 1d 第 1, 5, 6 只个体); 但在有的个体则无酶带出现 (图 1d 第 2 只个体)。

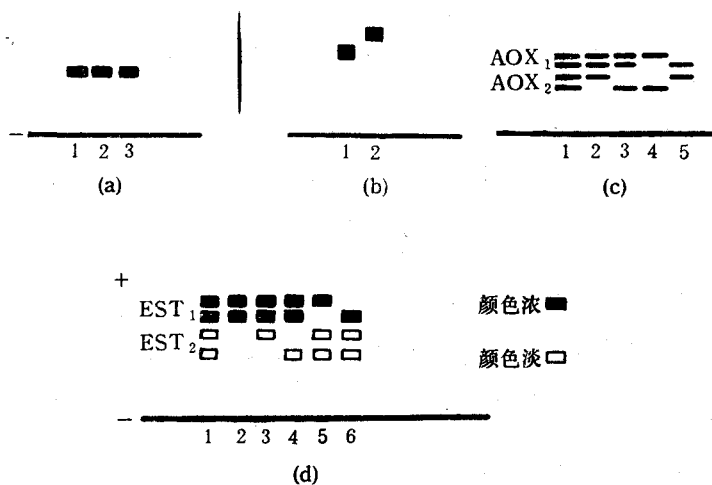


图 1 真刺唇角水蚤苹果酸酶(a)、苹果酸脱氢酶(b)、醛氧化酶(c)和酯酶(d)的同工酶谱

Fig. 1 Isozymic graph of ME(a), MDH (b), AOX(c) and EST (d) of *L. euchaeta*

2. 真刺唇角水蚤冬春种群与夏秋种群同工酶的比较

为了便于种群间的比较,根据 Ayala 和 Wallace 的方法,将真刺唇角水蚤冬春种群与夏秋种群上述 4 种酶 5 个酶区 (EST₂ 除外) 的同工酶表现型换算成等位基因频率(见

表 2 真刺唇角水蚤冬春种群与夏秋种群 4 种酶 5 个酶区的等位基因频率的比较

Tab. 2 Comparison of allelic frequency for five loci of four enzymes between winter-spring and summer-fall populations of *L. euchaeta* from Xiamen waters

| 酶 区 | 等位基因 | 等 位 基 因 频 率 | |
|------------------|----------------------------|-------------|-------|
| | | 冬春种群 | 夏秋种群 |
| ME ^{a)} | (<u>n</u>) ^{b)} | (53) | (49) |
| | F | 1 | 1 |
| MDH | (<u>n</u>) | (56) | (56) |
| | F | 1 | 0.982 |
| | S | 0 | 0.018 |
| AOX ₁ | (<u>n</u>) | (48) | (50) |
| | F | 0.406 | 0.48 |
| | S | 0.594 | 0.52 |
| AOX ₂ | (<u>n</u>) | (52) | (54) |
| | F | 0.529 | 0.528 |
| | S | 0.471 | 0.472 |
| EST ₁ | (<u>n</u>) | (55) | (53) |
| | F | 0.545 | 0.575 |
| | S | 0.455 | 0.425 |
| EST ₂ | 见 文 中 所 述 | | |

a) ME 在所有的个体中都只出现一条酶带。 b) (n) 为观察的动物个体数。

表 2)。可以看出,在厦门港海区真刺唇角水蚤所检测的 4 种酶 5 个酶区中,除了苹果酸酶和苹果酸脱氢酶是单态的之外,其余的 3 个酶区 (AOX₁, AOX₂, EST₁) 都是多态的 (多态的标准定为该酶区中最常见的等位基因频率不超过 0.95^[7]);除了 EST₂ 之外,冬春种群与夏秋种群在其余的 5 个酶区 (ME, MDH, AOX₁, AOX₂, EST₁) 的等位基因频率非常相似。由于 EST₂ 在有的个体不出现酶带,所以没有计算它的等位基因频率;但是我们发现夏秋种群 EST₂ 不表达酶带的个体多于冬春种群。在冬春种群,观察了 55 只个体,EST₂ 表达的 48 只,没表达的 7 只,表达频率为 0.87 (该酶区只要有一个酶带出现即为 EST₂ 表达,EST₂ 不表达是指该酶区没出现任何酶带。EST₂ 表达频率 = EST₂ 表达的个体数/观察的总个体数)。而在夏秋种群,观察了 53 只个体,EST₂ 表达的 29 只,没表达的 24 只,表达频率为 0.55。由此可见,厦门港海区真刺唇角水蚤的冬春种群与夏秋种群在这个酶区上有较大的区别。

3. 温度对酯酶同工酶酶谱的影响

为了验证 EST₂ 的表达是否与温度有关,以冬春种群的个体作为实验对象,进行了温度影响酯酶同工酶酶谱的实验。结果发现,EST₁ 除了在 55℃ 温度组中全部失活之外,在其它 5 个温度组中 (5, 15, 25, 35, 45℃) 的出现频率均为 1 (每组的实验动物个数与 EST₂ 的相同,见表 3),且活性也无明显差异。EST₂ 在 55℃ 温度组中全部失活,在 5, 15 和 25℃ 三个温度组的出现频率非常接近,且与自然界中的冬春种群 EST₂ 的表达频率 0.87 (见结果“2”)无明显差异。但在 35℃ 和 45℃ 的温度组中,EST₂ 的出现频率明显下降,与自然界中的夏秋种群的表达频率 0.55 相近 (表 3)。这说明 EST₂ 比 EST₁ 更易受到高温的影响。

表 3 温度对真刺唇角水蚤(冬春种群)酯酶 EST₂ 出现频率的影响

Tab. 3 Temperature effect on the expression of EST₂ of *L. euchaeta* (winter-spring population) from Xiamen waters

| 温 度 (°C) | 5 | 15 | 25 | 35 | 45 | 55 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| n (只) | 55 | 54 | 51 | 51 | 49 | 28 |
| 出现 EST ₂ 的个体数 (只) | 51 | 48 | 46 | 30 | 32 | 0 |
| EST ₂ 的表达频率 | 0.927 | 0.889 | 0.902 | 0.588 | 0.653 | 0 |

三、讨 论

首先应该指出,本文所报道的厦门港海区真刺唇角水蚤酯酶同工酶 EST₂ 在有些个体不表达,从而无法对该酶区进行等位基因频率的计算,这与 Bucklin 等所报道的美国大西洋沿岸浮游桡足类夏唇角水蚤 (*Labidocera aestiva*) 酯酶同工酶表现型难以进行遗传分析的现象极其相似^[11]。罗美中也曾报道过玉米酯酶同工酶 EST₃ 有无酶带型这个现象,并指出这个无酶带型是受 EST₃ 位点上的一个隐性等位基因所控制的^[9]。

鉴于真刺唇角水蚤冬春种群与夏秋种群在所研究的 4 种酶 5 个酶区 (ME, MDH, AOX₁, AOX₂, EST₁) 的等位基因频率上不存在明显差异,仅在 EST₂ 的表达频率上有较大的区别,且其出现频率又明显地受到温度的影响等现象,我们认为,真刺唇角水蚤冬

春种群与夏秋种群在 EST_2 上的差异是受环境因素所控制的,是非遗传方面的差异。同工酶非遗传变异的研究已有诸多报道,尤其是温度影响变温生物酶的质和量方面的研究更为详细。这是因为变温生物的体温随着环境温度的变化而变化,其生理功能和代谢活动极易受到温度的影响。生活在广温范围内的变温生物对温度变化都具有“补偿变化”(Compensatory changes)的能力^[4],这种能力反应在新陈代谢方面即称为“新陈代谢的温度补偿”(Metabolic temperature compensation)^[5]。人们普遍认为,这些补偿反应的分子机制无疑要包含着许多酶的变化^[3]。研究结果表明,温度不但影响这些变温生物酶的活性,而且也影响酶谱的表现型。例如: Borowsky 报道,三种钩虾属 (*Gammarus*) 端足类的绝大部分个体的淀粉酶是由两个独立基因位点 (*Amy-1* 和 *Amy-2*) 编码的;只有极个别的个体出现第三个酶带 (*Amy-x*),在寒冷季节捕获的个体中这个酶带表达频率高于温暖季节里获得的个体。他经过对 *Gammarus palustris* 进行深入的研究后发现,在高实验温度时(14—22℃), *G. palustris* 的淀粉酶以 *Amy-1* 占优势, *Amy-x* 则很少出现;当温度降低到 4℃,对 *Amy-x* 的表达则有不同程度的诱导;很显然,自然界中三种钩虾属端足类在冬春季 *Amy-x* 的表达频率高于夏秋季是由于温度的季节差异所引起的^[6]。对虹螯脑组织中的乙酰胆碱酯酶同工酶的研究表明,不同的温度会诱导出不同的乙酰胆碱酯酶同工酶^[8]。在小型胭脂鱼 (*Catostomus clarkii*) 和美洲小型鱼 (*Nortropis stramineus*) 中也发现,它们的酯酶同分异构体在耐温性方面存在着较大的差别^[9]。这些结果说明,变温生物种群内酶的同分异构体所存在的这些差异与这些生物生活的温度环境有着密切的关系。许多研究者都指出,那些在特定的温度环境中所表现出来的特殊型式的酶在那个特定的温度环境中一般都具有优化某种功能的催化能力,是变温生物“新陈代谢的温度补偿”的一种表现,是生物适应环境的结果。我们所研究的真刺唇角水蚤周年出现于厦门港海区,其环境温度年变化在 10—30℃,温度的季节变异比较明显。鉴于该海区冬春种群的真刺唇角水蚤酯酶 EST_2 的表达频率高于夏秋种群,且 EST_2 比 EST_1 更易受到高温的影响,可以认为 EST_2 是适应于较低温度的同工酶。可能就是由于这种分子上的差异(当然这仅是其中一方面),才使得厦门港海区真刺唇角水蚤冬春种群与夏秋种群表现出诸如个体大小^[3]、产卵率^[7]、孵化率^[1]等方面的季节差异。

温度影响酯酶同工酶酶谱的结果表明,55℃ 高温导致酯酶同工酶 EST_1 和 EST_2 全部失活;35℃ 和 45℃ 高温对 EST_1 无明显影响,但对 EST_2 的出现频率则有显著的影响。这说明了,厦门港海区真刺唇角水蚤不同的酯酶同工酶在耐温性方面的差异;但这并不说明真刺唇角水蚤的自然种群在如是温度环境中应有如是的同工酶表达频率,这是因为变温生物的“新陈代谢温度补偿”是一个很复杂的生理现象。一般都有一个时间过程。Maria 指出,已知“新陈代谢温度补偿”有 3 种不同类型的时间过程:①在有些生物,补偿可能在瞬间发生;②对于绝大多数生物,需经过一至数周的适应方有明显的补偿发生;③需经进化的时间跨度方能发生补偿^[10]。厦门港海区真刺唇角水蚤应属于哪一种类型,尚待深入实验研究。

参 考 文 献

[1] 李少菁等,1989,厦门海区浮游桡足类卵形态与孵化率的研究,厦门大学学报自然科学版,28(5): 538—543。

- [2] 吴鹤龄等主编, 1983, 遗传学实验方法和技术, 高等教育出版社, 260—275。
- [3] 郑重等, 1965, 中国海洋浮游桡足类(上卷), 上海科学技术出版社, 115—117。
- [4] 罗美中等, 1986, 玉米过氧化物酶同工酶 P_x, 位点和酯酶同工酶 Est₁ 位点的遗传基础研究, 遗传, 8(5): 19—21。
- [5] 林森杰等, 1989, 真刺唇角水蚤产卵率的饵料效应和自然种群繁殖特征, 厦门大学学报自然科学版, 28(2): 203—207。
- [6] 张兴忠等编译, 1988, 鱼类遗传与育种, 农业出版社, 70—92。
- [7] 蔡武城等译, 1987, 现代遗传学, 湖南科学技术出版社, 704—740。
- [8] Baldwin, J., 1971, Adaptation of enzymes to temperature: Acetylcholinesterases in the central nervous system of fishes, *Comp. Biochem. Physiol.*, 40B:181—187。
- [9] Borowsky, R., 1984, Environmental control of amylase phenotype in amphipods of the genus *Gammarus*, *Biol. Bull.*, 167:647—657。
- [10] Brewer, G. S., 1970, An Introduction to Isozyme Techniques, Academic Press, New York, pp. 62—137。
- [11] Bucklin, A. et al., 1985, Genetic differentiation of populations of the planktonic copepod *Labidocera aestiva*, *Mar. Biol.*, 84(3): 219—224。
- [12] Levin, D. et al., 1972, Protein polymorphism and heterozygosity in a population of the permanent translocation heterozygote *Oenothera biennis*, *Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A.*, 69: 1475—1477。
- [13] Maria Luiza Barcellos Schwantes et al., 1982, Adaptive features of ectothermic enzymes II. The effects of acclimation temperature on the malate dehydrogenase of the spot, *Leiostomus xanthurus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B: 59—64。
- [14] Shaklee, J. B. et al., 1977, Molecular aspects of temperature acclimation in fish: Contributions of changes in enzymes patterns to metabolic reorganization in the green sunfish, *J. Exp. Zool.*, 201:1—20。
- [15] Somero, G. N. et al., 1969, Isoenzymes and short-term temperature compensation in poikilotherms: activation of lactate dehydrogenase isoenzymes by temperature decrease, *Nature*, 223: 194—195。
- [16] Wallace, B., 1981, Basic Population Genetics, Columbia University Press, New York, pp. 78—94。

AN ISOENZYME ANALYSIS ON DIFFERENT SEASONAL POPULATIONS OF THE PLANKTONIC COPEPOD, *LABIDOCERA EUCHAETA*, IN XIAMEN WATERS

Wang Guizhong and Li Shaojing

(Oceanogr. Depart., Xiamen University, 361005)

ABSTRACT

Six loci of four enzymes, malic enzyme (ME), malic dehydrogenase (MDH), aldehyde oxidase (AOX₁, AOX₂) and esterase (EST₁, EST₂), were studied in the different seasonal populations of the planktonic copepod *Labidocera euchaeta* collected from Xiamen waters during Oct. 1989—Jan. 1990. ME and MDH are monomorphic, while AOX and EST are polymorphic. The allelic frequencies of five loci, except for EST₂, do not distinguish the winter-spring and summer-fall populations. EST₂ is not expressed in some individuals. The expression frequency of EST₂ is higher in the collections of winter and spring than those of summer and fall. Temperature exerts a remarkable effect on EST phenotype. All inactivation of EST₁ and EST₂ occurs at 55°C. The expression frequency in separated temperature groups below 45°C for EST₁ is 1, and is subject to variation for EST₂, being similar to the seasonal variation in natural populations.

Key words *Labidocera euchaeta*, Isoenzyme, Population.