

口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*) 同工酶的组织特异性及生化遗传分析*

王春琳 母昌考[†] 丁爱侠[†] 王武^{††1)}

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 上海水产大学生命科学与技术学院 上海 200090)

[†](宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

^{††}(上海水产大学生命科学与技术学院 上海 200090)

摘要 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳方法, 研究分析了口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*) 肌肉、眼球、腹鳃、心脏和肝胰腺 5 种器官或组织中 LDH、ADH、MDH、SDH、MEP、POD、AMY、GDH、SCD、EST、GLDH 和 SOD 共 12 种同工酶的表达情况。结果表明, 口虾蛄同工酶的表达具有明显的组织特异性。对 12 种同工酶进行生化遗传分析, 获得了基本酶谱。12 种同工酶共记录出 35 个基因座位, 其中 11 个基因座位 *Ldh-3*、*Adh-1*、*Sdh-2*、*Est-1*、*Est-2*、*Est-3*、*Mdh*、*Mep-7*、*Gldh-1*、*Gldh-2* 和 *Scd-1* 为多态, 其多态座位比例为 31.43%。

关键词 口虾蛄, 同工酶, 组织特异性, 生化遗传分析

中图分类号 Q178.53

口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*) 隶属节肢动物门、甲壳纲、软甲亚纲、口足目、虾蛄科、口虾蛄属, 又名东方虾蛄、虾蛄, 广泛分布于中国、日本、韩国以及东南亚地区。口虾蛄个体大、肉味鲜美, 具有较高的经济价值。关于口虾蛄的生态学、生物学特征和繁殖习性的研究已有报道 (王春琳等, 1996)。同工酶作为一种重要的生化指标, 已被广泛应用于虾蟹类的物种及杂种鉴定 (张子平等, 1994; 张列士等, 2000)、物种间亲缘关系比较及系统分类 (赵金良等, 1999)、胚胎发育过程中的基因表达与调控 (李广丽等, 2001; 张志峰等, 1997) 等的研究。同工酶在虾蛄上的应用, 尚未见相关报道。作者研究了口虾蛄不同组织同工酶的表达并进行了口虾蛄同工酶的生化遗传分析, 期为口虾蛄群体生化遗传结构研究及其种质资源的合理开发利用与保护提供理论依据。

1 材料与方 法

口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*) 于 2001 和 2002

年取自宁波月湖农贸市场, 共 36 尾, 体长为 11.2—12.5cm。对每尾口虾蛄进行活体取样, 取眼球、肌肉、腹鳃、肝胰腺和心脏等 5 种组织或器官, 直接进行分析或经编号后放入高温灭菌样品管, 置超低温冰箱 (-71℃) 保存至分析。同工酶电泳采用聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳。使用的电极缓冲液为 Tris-甘氨酸、TG、pH = 8.3。样品的制备及结果处理参照相建海 (1999), 凝胶的制备及电泳方法参照周宗汉等 (1983), 凝胶染色参照胡能书等 (1985)、李思发 (1998)、相建海 (1999) 的方法。同工酶的缩写, 基因座位和等位基因的命名以及相关计算基本采用王中仁 (1996) 的方法。

2 结果

2.1 TG 缓冲体系对同工酶的筛选结果

在 TG 缓冲系统对 17 种同工酶进行筛选, 共选出 12 种同工酶用于口虾蛄的生化遗传分析: 乳酸脱氢酶 (LDH E.C. 1.1.1.27)、醇脱氢酶 (ADH E.C. 1.1.1.1)、酯酶 (EST E.C. 3.1.1.1)、

* 国家农业科技成果转化资金项目, 02EFN213310651 号; 浙江省自然科学基金资助项目, 302442 号。王春琳, 博士生, 教授, E-mail: chunlin504@263.net

1) 通讯作者, 王武, E-mail: wwang@shfu.edu.cn

收稿日期: 2003-04-02, 收修改稿日期: 2003-11-30

谷氨酸脱氢酶(GLDH E.C. 1.4.1.2)、苹果酸酶(MEP E.C. 1.1.1.40)、琥珀酸脱氢酶(SCD E.C. 1.3.99.1)、苹果酸脱氢酶(MDH E.C. 1.1.1.37)、淀粉酶(AMY E.C. 3.2.1.9)、葡萄糖脱氢酶(GDH E.C. 1.1.1.47)、过氧化物酶(POD E.C. 1.11.1.7)、山梨醇脱氢酶(SDH E.C. 1.1.1.14)和超氧化物歧化酶(SOD E.C. 1.15.1.1)。其他分析过的同工酶分别是:甘油-3-磷酸脱氢酶(G3PDH)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、三磷酸腺苷酶(ATPase)、过氧化氢酶(CAT),由于其图谱不够清晰,本文中只研究前述12种同工酶。

2.2 口虾蛄同工酶的表达及生化遗传分析

2.2.1 LDH(图1a)

四聚体酶,由 α 亚基和 β 亚基组成, α 亚基和 β 亚基的合成分别由A基因和B基因决定(吴鹤龄等,1983)。在口虾蛄中,LDH同工酶有5个基因座位编码。LDH的表达具有明显的组织特异性,肌肉中有*Ldh-2*和*Ldh-3*表达,心脏中有*Ldh-1*和*Ldh-3*表达,眼球中只有*Ldh-3*表达,肝胰腺中有*Ldh-4*和*Ldh-5*表达;腹鳃中表达很弱,未记录;*Ldh-3*在心脏中的表达最强。对肌肉中的两个基因座位进行分析发现,*Ldh-3*为多态,有100和110两个等位基因,本实验中只检测到100/100和100/110两种表型;*Ldh-2*为单态。

2.2.2 ADH(图1b)

二聚体酶,由三个基因座位*Adh-1*、*Adh-2*和*Adh-3*编码,具有较强的组织特异性,表达也不相同,*Adh-1*为多态,有100和105两个等位基因,只检测到100/100和105/105两种表型;*Adh-2*和*Adh-3*为单态。

2.2.3 EST(图1c)

二聚体酶,记录了四个基因座位,除*Est-4*为单态外,*Est-1*、*Est-2*和*Est-3*均为多态;*Est-1*有100和110两个等位基因,只检测到100/100和100/110两种表型;*Est-2*有100和110两个等位基因,有100/110和100/100两种表型;*Est-3*有100和105两个等位基因,检测到100/100和100/105两种表型。EST同工酶在肝胰腺中的表达最强,肌肉中最弱。

2.2.4 GLDH(图1d)

四聚体酶,分析了两个基因座位,*Gldh-1*为多态,仅在肌肉中有表达,有100和110两个等位基因,只检测到100/100和110/110两种表型;*Gldh-2*只在肝胰腺中表达,也为多态,具有100和110两个等位基因,检测到100/100和100/110两种表型。口虾蛄体内GLDH在肌肉、眼球和腹鳃分别各表达出一个基因座位,

具有明显的组织特异性。

2.2.5 MEP(图1e)

四聚体酶,分析了心脏中六个基因座位,其中*Mep-7*为多态,有75和100两个等位基因,只检测到75/100和100/100两种表现型;其余座位均为单态。口虾蛄MEP的表达具有明显的组织特异性,肌肉和腹鳃中有*Mep-3*和*Mep-6*两个基因座位表达,心脏中有*Mep-1*、*Mep-2*、*Mep-4*、*Mep-5*、*Mep-6*和*Mep-7*六个基因座位表达,眼球中只有*Mep-5*的表达,肝胰腺中未见表达;心脏中酶谱表达较强,其余组织中较弱,表现出明显的组织特异性。

2.2.6 SCD(图1f)

单体酶,两个基因座位编码,*Scd-1*为多态,有100和115两个等位基因,只检测到100/100和100/115两种表型,未发现115/115表型;*Scd-2*为单态。在肌肉中仅有*Scd-1*表达,而在其他组织中两个基因座位都有表达,在肝胰腺中表达最强。

2.2.7 MDH(图1g)

二聚体酶,在口虾蛄体内只发现迁移率较快的mMDH,由一个基因座位编码,多态,有90、95和100三个等位基因,检测到90/100、95/100和100/100三种表型。口虾蛄体内MDH在酶谱上具有明显的组织特异性,在眼、肌肉、腹鳃和心脏中均有表达,而肝胰腺中未见表达,肌肉和心脏中表达最强,腹鳃中较弱。

2.2.8 AMY(图1h,i)

淀粉酶,有 α 、 β 、Q和R四种,其功能都是分解淀粉。在口虾蛄中只检测R淀粉酶和Q淀粉酶两种,R淀粉酶在所有分析的组织中均有表达,而Q淀粉酶只在眼球中有表达,显示出明显的组织特异性。R淀粉酶记录了*Ramy-1*、*Ramy-2*、*Ramy-3*、*Ramy-4*、*Ramy-5*和*Ramy-6*共六个基因座位表达,均为单态。Q淀粉酶只在眼球中有表达,由*Qamy-1*和*Qamy-2*两个基因座位编码,也为单态(图1i)。

2.2.9 GDH(图1j)

二聚体酶,由一个基因座位编码,单态,只在肌肉中表达。

2.2.10 POD(图1k)

单体酶或二聚体酶,由*Pod-1*、*Pod-2*和*Pod-3*三个基因座位编码,均为单态;*Pod-1*只在肌肉中有表达,*Pod-2*在眼球、腹鳃、肝胰腺和心脏中都有表达,*Pod-3*只在眼球中有表达,表现出明显的组织特异性。

2.2.11 SDH(图1l)

二聚体酶,由两个基因座位*Sdh-1*和*Sdh-2*编码,*Sdh-1*为单态;*Sdh-2*为多态,有95、100和105三个等位基因,只检测到95/95、100/100和105/105三种表型。在肌肉中有

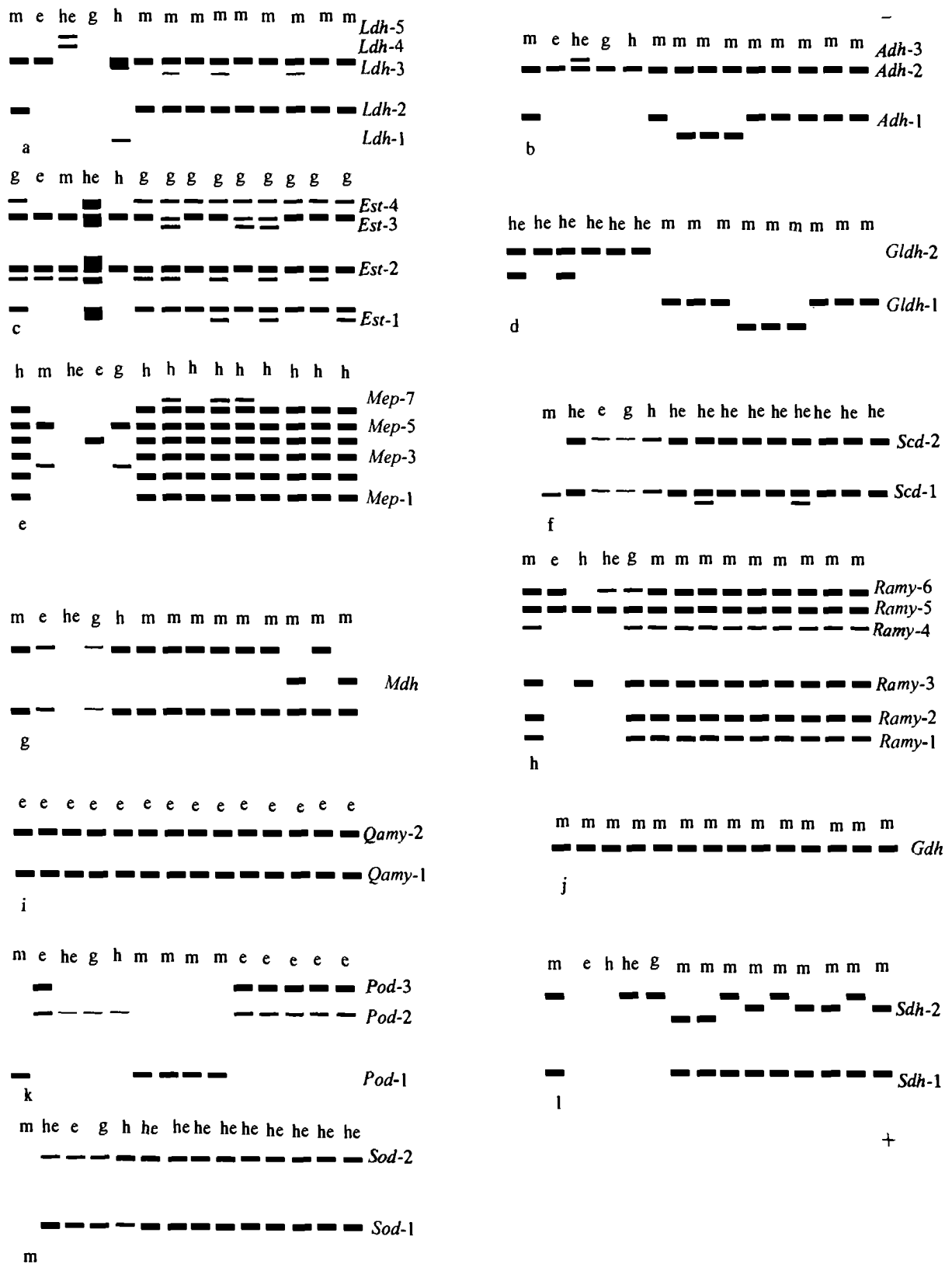


图1 口虾蛄同工酶电泳图谱

Fig.1 Electrophoretic patterns of isozymes on *O. oratoria*

各子图序号(左下角)分别表示:a. LDH;b. ADH;c. EST;d. GLDH;e. MEP;f. SCD;g. MDH;h. RAMY;i. QAMY; j. GDH;k. POD;l. SDH;m. SOD。图谱上方字母分别表示:m. 肌肉;e. 眼球;he. 肝胰腺;g. 腹鳃;h. 心脏

Sdh-1 和 *Sdh-2* 两个基因座位表达,肝胰腺和腹鳃中只有 *Sdh-2* 表达。心脏和眼球中未见表达。

2.2.12 SOD(图 1m) 二聚体酶,由 *Sod-1* 和 *Sod-2* 两个基因座位编码,均为单态,除肌肉中未见表达外,其余实验组织中均有表达。

综上所述,口虾蛄不同组织中 12 种同工酶的表达表现出组织间的差异,具有明显的组织特异性。本实验共记录了口虾蛄 12 种同工酶的 35 个基因座位,其中 *Ldh-3*、*Adh-1*、*Sdh-2*、*Est-1*、*Est-2*、*Est-3*、*Scd-1*、*Mep-7*、*Gldh-1*、*Gldh-2* 和 *Mdh* 11 个基因座位是多态,多态座位比例为 $P = (11/35) \times 100\% = 31.43\%$ 。

3 讨论

3.1 口虾蛄同工酶表达的组织特异性

同工酶是由生物体细胞内基因组编码、催化某类生化反应、而本身的分子结构有所不同的一组酶(黄灿华等, 1999)。在口虾蛄五种组织中,已经存在相当丰富的酶系统,它们不仅以同工酶的形式参与代谢和调节,而且在表型分布和活性上均表现高度的组织特异性,同时,这些酶所催化的性质已涉及糖代谢中的无氧酵解和三羧酸循环以及脂类的分解与合成,生物氧化和能量代谢等方面,表明口虾蛄已具备以上与高等动物相类似的基本代谢途径及调节方式。

甲壳动物的肝胰腺对食物的消化、代谢与吸收起着很重要的作用(王桂忠等, 1991),在作者的实验中也得到了证实,即在口虾蛄的肝胰腺中检测到了酯酶、淀粉酶和乳酸脱氢酶,说明口虾蛄也储存和利用类脂和碳水化合物。这是因为酯酶是分解类脂的酶,而其他两种则是糖代谢过程的酶。口虾蛄体内同工酶表达的差异反映了不同组织间功能的不同,肌肉的功能主要是运动,因此,在肌肉中,与运动供能相关的 LDH 的活性较高;由于腹鳃的功能是进行有氧呼吸,因此,在腹鳃中 LDH 的活性非常低,同时心脏中 LDH 酶活力较高,其原因可能与口虾蛄长期适应底栖低氧生存环境有关。口虾蛄的肌肉中的 LDH 表达出两条带,酶活力比肝胰腺中强,与相建海(1999)和王桂忠等(1991)分别在中国对虾和锯缘青蟹中报道的结果具有相似性。EST 在口虾蛄肝胰腺中表达最强,因为肝胰腺是酯类物质分解的主要场所。醇脱氢酶 ADH 是广泛存在于动植物和微生物中的一种同工酶,其生理作用是适应厌氧酵解的需要。

在口虾蛄肌肉中,ADH 活性较强,可能是口虾蛄长期对低氧生活环境适应的结果,与心脏中 LDH 活性强相一致。

苹果酸脱氢酶(MDH)是三羧酸循环中重要的脱氢酶之一,也是三羧酸循环中脱氢氧化的最后一步,广泛存在于动植物中。口虾蛄体内 MDH 同工酶的表达也是肌肉和心脏中最强,与相建海(1999)在中国对虾研究中报道的结果相一致。EST 同工酶是催化酯类化合物水解的酶系,其作用除维持细胞正常的能量代谢外,还能水解大量非生理正常存在的酯类化合物,被认为可能与机体的解毒作用密切相关(蔡完其等, 1994; 蔡完其, 1996; 李广丽等, 2001),本研究中,口虾蛄的肝胰腺中 EST 表达最强,各组织间表达的差异比较显著,与前述所报道的结果相似。

谷氨酸脱氢酶(GLDH)是催化体内氨基酸氧化脱氨基作用的酶之一,具体作用是催化谷氨酸氧化脱氨基生成 α -酮戊二酸和氨。GLDH 既催化氨基酸氧化脱氨基的分解代谢,又参与非必需氨基酸的合成反应,其活性与蛋白质合成与分解有直接的关系。在口虾蛄肌肉中,GLDH 的活性较强,说明肌肉中蛋白质的合成与分解活动比较旺盛。

超氧化物歧化酶(SOD)是一类金属酶,广泛存在于需氧和耐氧的生物体各组织内,能有效清除体内的 O_2^- 自由基,在防御氧的毒性抗辐射损伤以及预防衰老等方面起着重要的作用(李益新, 1989)。口虾蛄体内 SOD 的表达较广泛,说明 SOD 对口虾蛄生命的存在是至关重要的。过氧化物酶(POD)是一类能利用 H_2O_2 氧化供氢的酶类,它可使嘌呤、酚和胺等降解并减轻其毒性(陈康, 1995)。本实验发现口虾蛄体内 POD 和 SOD 的表达比较稳定,因此认为可考虑将 POD 酶结合 SOD 酶作为今后研究各种环境因子对口虾蛄生长发育影响的一种生理生化指标。

3.2 多态基因座位研究的意义

多态基因座位比例是种群遗传多样性的一个重要指标。中国沿海六个水系绒螯蟹群体多态位点比例均为 31.25%(赵金良等, 1999),中国对虾中国种群和韩国种群的多态座位比例分别为 15%和 20%(相建海, 1999),方蟹科七种蟹类的多态座位比例为 8.3%—33.3%(Gao *et al.*, 2000),脊椎动物中,带鱼为 12.5%—41.0%(王可玲等, 1994),鲈鱼为 25.8%(徐成等, 2001)。由

此可见口虾蛄多态座位比例 31.43%, 高于对虾, 与绒螯蟹和方蟹科相近, 这与口虾蛄资源处于尚未完全开发状态相一致。同时, 口虾蛄多态基因座位比例低于脊椎动物的平均值 46.9%, 与整个甲壳动物低水平遗传变异相一致 (相建海, 1999)。同时也提示, 在口虾蛄资源未受破坏之前, 应加强保护力度, 坚持口虾蛄资源的合理开发与保护并重的策略。

3.3 有效遗传标记的筛选

同工酶多态座位作为一种稳定而灵敏的遗传标记, 在增殖放流结果监测、种群鉴别、渔业管理等方面有良好的应用前景 (徐成等, 2001)。但是, 作为遗传育种中的遗传标记, 首先需要解决活体取样的关键技术 (尤锋等, 1999)。作者发现, 取自活的口虾蛄的腹鳃能检测出某些酶的活性, 有的也能获得较好的图谱, 例如, 在口虾蛄的腹鳃中, EST 的表达较清晰, 含有多态基因座位, 因此今后在口虾蛄研究中, 以腹鳃作为活体取样材料进行遗传标记很有前景。

参 考 文 献

- 王桂忠, 李少菁, 1991. 锯缘青蟹个体发育过程的同工酶谱的比较研究. 海洋学报, 13(30): 412—416
- 王可玲, 张培军, 刘兰英等, 1994. 中国近海带鱼种群生化遗传结构及其鉴别的研究. 海洋学报, 16(1): 93—104
- 王中仁, 1996. 植物等位酶分析. 北京: 科学技术出版社, 2—3
- 王春琳, 徐善良, 梅文骧等, 1996. 浙江沿海虾蛄生物学及其开发利用专辑. 浙江水产学院学报, 15(1): 3—80
- 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
- 李广丽, 朱春华, 2001. 罗氏沼虾个体发育早期的同工酶研究. 水生生物学报, 25(4): 338—343
- 李思发, 1998. 中国淡水主要养殖鱼类种质资源研究. 上海: 上海科学技术出版社, 189—193
- 李益新, 1989. 超氧化物歧化酶的结构与功能. 见: 方允中, 李文杰主编. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 111—126
- 吴鹤龄, 林锦湖, 1983. 遗传学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 147—153
- 陈 康, 1995. 动物细胞中过氧化物酶体的功能. 生物学通报, 30(1): 18—19
- 张子平, 王艺磊, 1994. 中国对虾 2 个种群的 F_1 的 LDH 和 MDH 同工酶初步分析. 热带海洋, 13(1): 87—90
- 张志峰, 马英杰, 廖承义等, 1997. 中国对虾幼体发育阶段的同工酶研究. 海洋学报, 19(4): 63—71
- 张列士, 瞿继军, 汪东冬, 2000. 长江、瓯江、辽河水系河蟹种群生态和形态特征及蟹种质量鉴别. 水产科技情报, 27(5): 20—205
- 周宗汉, 林金榜, 朱婉华, 1983. 介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法. 淡水渔业, (2): 35—40
- 相建海, 1999. 海洋动物细胞和种群生化遗传学. 济南: 山东科学技术出版社, 63—109
- 徐 成, 王可玲, 尤 锋等, 2001. 鲈鱼群体生化遗传学研究 I. 同工酶的生化遗传分析. 海洋与湖沼, 32(1): 42—49
- 赵金良, 李思发, 1999. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹 (中华绒螯蟹和日本绒螯蟹) 群体亲缘关系: 生化遗传差异分析. 水产学报, 23(4): 331—336
- 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, 70—85
- 黄灿华, 陈棣华, 1999. 中国对虾病虾体内同工酶表型变化的初步研究. 中国水产科学, 6(1): 45—48
- 蔡完其, 1996. 罗氏沼虾莫格球拟酵母病的病理研究. 水产学报, 20(1): 13—17
- 蔡完其, 陆宏达, 1994. 患爆发性病毒病的中国对虾肝胰脏病理变化. 上海水产大学学报, 3(1—2): 27—33
- Gao T X, Zhang X M, ATANABE Eiichi *et al*, 2000. Genetic relationship among seven grapsidae species. Acta Hydrobiologica Sinica, 24(6): 624—629

TISSUE SPECIFICITY AND BIOCHEMICAL GENETIC ANALYSIS OF ISOZYME ON CRUSTACEAN *ORATOSQUILLA ORATORIA*

WANG Chun-Lin, MU Chang-Kao[†], DING Ai-Xia[†], WANG Wu^{**}

(Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211;

Faculty of Life Sciences and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai, 200090)

[†](Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211)

^{**}(Faculty of Life Sciences and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai, 200090)

Abstract *Oratosquilla oratoria* is an economically valuable marine crustacean in northeast Asia, such as China, Japan and Korea. Prompted by the absence of any existing isozyme studies on *O. oratoria*, this paper studied the genetic expression of isozyme of *O. oratoria*. Thirty-six live *O. oratoria* were collected from Yuehu market of Ningbo, China during 2001 and 2002. In total, one hundred and eighty biochemical samples from five tissues and organs (eye, muscle, ventral gill, heart and hepatopancreas) were taken and, either stored immediately in ultra low temperature freezer, or tested directly in situ. The samples were washed with double distilled water and blotted with disinfected filter paper before storage or testing. Twelve isozymes (LDH, MDH, ADH, MEP, SDH, SCD, SOD, GDH, GLDH, AMY, EST, POD) in a buffer system of TG (Tris-Gly, pH8.3) were tested using vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Expression in 5 tissues and organ-tissues was also tested. Results showed that isozymes expression contained clear tissue specificity, indicating that variations between different tissues of *O. oratoria* was a common phenomenon. The basic function of muscle is to move; therefore LDH showed a strong activity in muscle. The function of ventral gills is to respire, MDH-making causing weak LDH's activity weak in ventral gills is much more strongly expressed in muscle and heart than in other tissues or organs, similar results to those for *Penaeus chinensis*. Biochemical genetics were analyzed in terms of their locus number, structure, alleles, etc. On the basis of these results, basic electrophoretic patterns of these twelve isozymes were obtained. Altogether, 35 gene loci were recorded, among which 11 gene loci included *Ldh-3* (alleles, 100, 110), *Adh-1* (alleles, 100, 105), *Sdh-2* (alleles, 95, 100, 105), *Est-1* (alleles, 100, 110), *Est-2* (alleles, 100, 110), *Est-3* (alleles, 100, 105), *Mdh* (alleles, 90, 100), *Mep-7* (alleles, 75, 100), *Gldh-1* (alleles, 100, 110), *Gldh-2* (alleles, 100, 110) and *Scd-1* (alleles, 100, 115) were polymorphic. In addition, the mean proportion of polymorphic loci was 31.43%, higher than that of *P. chinensis* (15% or 20%). Results of this study suggest that the current variation state of *O. oratoria* is good. We must protect well this valuable resource from being damaged.

Key words *Oratosquilla oratoria*, Isozyme, Tissue specificity, Biochemical genetic analysis