

苏北南部沿海几种蟹类蛋白和同工酶的比较研究

程家骅 王云龙 许加武 凌建忠

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

刘昌元 周玉贵

(江苏省东台市人民医院, 东台 224200)

摘 要 本文对苏北南部沿海中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、天津厚蟹(*Helice tridens tientsinensis*)、红螯相手蟹(*Sesarma haematocheir*)和日本大眼蟹(*Macrophthalmus japonicus*)四种常见蟹的眼、肝、肌和卵组织以及中华绒螯蟹和天津厚蟹蟹苗的蛋白和LDH、ANEA同工酶进行了比较研究。结果表明, 四种蟹的蛋白和同工酶具明显的物种特异性和组织特异性; 两种蟹苗的蛋白和同工酶酶谱在谱带数量、迁移率及酶活性上都存在差异。

关键词 苏北南部沿海, 蟹苗, 同工酶

近年来河蟹养殖业在我国得到了发展, 但种苗的供给来源是发展过程中的一个主要制约因素。历史上长江口是我国天然蟹苗的主要产地, 曾是养殖河蟹种苗的主要来源。由于过度捕捞等诸多原因, 进入90年代后, 长江口蟹苗资源在波动中产量锐减, 至1996年基本上已无产量^[1,2]。于是蟹苗一方面依靠人工繁殖, 一方面转向开发毗邻长江口区其它河口的天然蟹苗资源, 因而苏北南部沿海的蟹苗资源也得以开发利用^[3]。但沿海的河蟹苗汛不同于进入长江口淡水生境的苗发, 其汛期间种类相对繁杂^[4]。为弄清苏北南部沿海河蟹苗汛的种类组成, 经东海区渔业资源咨询委员会的组织, 我们于1995年~1997年在该区域进行了为期3年的专题调查研究。于河蟹苗汛期前1~2月采集潮间带抱卵蟹, 于蟹苗汛期中采集沿海蟹苗, 然后对采集到的中华绒螯蟹、天津厚蟹、红螯相手蟹和日本大眼蟹四种常见抱卵蟹及组成蟹苗汛的绝对优势种中华绒螯蟹与天津厚蟹的蟹苗进行了蛋白和同工酶研究^[5], 以期揭示它们在生化遗传上的差异。

1 材料与方法

收稿日期: 1997-11-11。

1.1 试验材料

中华绒螯蟹、天津厚蟹、红螯相手蟹、日本大眼蟹四种抱卵蟹于1995年4月采自如东县东凌河口的潮间带,取活蟹眼、肝脏、肌肉和卵四种器官与组织。中华绒螯蟹和天津厚蟹蟹苗分别于1996年6月和1997年6月采自东台县黄港沿海。每种蟹苗取一定数量(200只)的个体,清洗吸干并称重。上述组织(或个体)经pH7.2(0.1mol/L)的Tris·HCl缓冲液漂洗,再加与组织(或个体)等体积的缓冲液于冰水浴中匀浆,10 000r/min离心15min,取上清液备用。

上述制备好的样品,同工酶检测在4h内完成,蛋白电泳在当天完成。

1.2 试验方法

1.2.1 电泳

蛋白电泳采用Clarke, J.T(1964)改良简化法^[8],系聚丙烯酰胺柱状电泳。分离胶浓度为7.5%,pH8.9;浓缩胶浓度为2.5%,pH6.7;缓冲液为Tris-甘氨酸,pH8.3;电压为150V,电流为5~7mA/每管,电泳时间为1.5h。

同工酶电泳,成蟹组织采用聚丙烯酰胺垂直平板电泳,胶浓度为7.5%,胶厚度为2mm。蟹苗采用琼脂糖凝胶电泳^[9],胶浓度为0.8%,胶厚度为1.6mm,胶体缓冲液为Tris·HCl,pH7.4,电泳缓冲液为巴比妥,pH8.6(0.06M)。

1.2.2 染色

蛋白用0.1%考马斯蓝染色,用7%醋酸漂洗。

同工酶染色,乳酸脱氢酶(LDH)采用吉田光孝法^[10],酸性非特异性酯酶(ANEA,以 α -醋酸萘酯为底物)采用小松英昭介绍的方法^[11]。

2 结果

2.1 成蟹的蛋白和同工酶

2.1.1 蛋白

在眼中,蛋白谱带较少,有3条明显的蛋白带,靠阳极的1条带在几种蟹间迁移率不同(图1)。红螯相手蟹除上述3条蛋白带外,还有1条活性较弱的谱带,位于上述2条带之间。在日本大眼蟹的眼中,未观察到蛋白带。

在肝脏中,蛋白谱带较多,迁移率各不相同(图2)。中华绒螯蟹蛋白带最多,为16条;天津厚蟹、红螯相手蟹和日本大眼蟹相对较少,分别观察到14条、11条和8条蛋白带。而红螯相手蟹在靠近阴极(原点)的位置有1条活性很强的致密宽带。

在肌肉中,蛋白谱带较多且清晰(图3)。中华绒螯蟹和天津厚蟹带型相似,都能观察到5条清晰的强带和7~8条弱带,其迁移率也基本相同。红螯相手蟹观察到13条谱带,日本大眼蟹观察到12条谱带。红螯相手蟹和日本大眼蟹的带型较为接近,日本大眼蟹在第6带和第7带之间(从阳极至阴极)较红螯相手蟹少1条蛋白带。

在蟹卵中,四种蟹的谱带及其迁移率各不相同(图4)。中华绒螯蟹有4条强带和7条弱带,其中1条强带为致密宽带;天津厚蟹有3条强带和6条弱带。红螯相手蟹有10条蛋白带,日本大眼蟹中未观察到谱带。

2.1.2 乳酸脱氢酶(LDH)

在眼中,四种蟹 LDH 同工酶均未检出。

在肝脏中(图 5),中华绒螯蟹、红螯相手蟹和日本大眼蟹 LDH 同工酶都为 2 条谱带,分别由 Ldh-A 和 Ldh-B 两个基因位点编码,两条编码的酶带分别为 A_4 和 B_4 。但三者的酶活性与迁移率是不同的,中华绒螯蟹 B_4 活性强, A_4 活性弱,迁移率 R_f 分别为 0.36 和 0.14,而红螯相手蟹和日本大眼蟹 B_4 活性弱, A_4 活性强,迁移率 R_f 分别为 0.90 和 0.12、0.96 和 0.90。中华绒螯蟹在 A_4 和 B_4 酶带间还有 1 条极弱的酶带,可能为 A、B 亚基的杂合体。天津厚蟹 LDH 同工酶为 1 条谱带,迁移率 R_f 为 0.90,该酶带为 Ldh-A 基因位点编码的 A_4 。

在肌肉中(图 6),四种蟹 LDH 同工酶都有 1 条强带,为 Ldh-A 基因位点编码的 A_4 ,其迁移率 R_f 分别为 0.45、0.45、0.50、0.45,还各有 1 条弱带,为 Ldh-B 编码的 B_4 。

在蟹卵中(图 7),LDH 同工酶分离效果不太好,只中华绒螯蟹、天津厚蟹和红螯相手蟹各检测到 1 条酶带,其中天津厚蟹活性较强。中华绒螯蟹和红螯相手蟹在靠近原点的位置有弥散的浅带,分离不清。在日本大眼蟹蟹卵中未观察到 LDH 同工酶。

2.1.3 酸性非特异性酯酶(ANEA)

在眼中,中华绒螯蟹和天津厚蟹都只有 1 条酶带。红螯相手蟹分离出 3 条酶带,迁移率 R_f 分别为 0.16、0.45、1.0,其活性基本相同。日本大眼蟹眼中未检测到 ANEA 同工酶(图 8)。

在肝脏中,四种蟹的 ANEA 同工酶差别较大(图 9)。中华绒螯蟹有 2 条酶带,活性 1 弱 1 强,迁移率 R_f 分别为 0.75 和 1.0。天津厚蟹有 3 条酶带,2 条活性较弱而弥散,1 条活性强,迁移率 R_f 分别为 0.17、0.45、1.0。红螯相手蟹有 4 条酶带,迁移率 R_f 分别为 0.17、0.75、0.80、1.0。日本大眼蟹有 5 条酶带,迁移率 R_f 分别为 0.17、0.45、0.50、0.75、1.0。

在肌肉中(图 10),中华绒螯蟹和日本大眼蟹都有 1 条酶带,活性几乎相同。天津厚蟹有 3 条酶带,活性 2 弱 1 强,迁移率 R_f 分别为 0.17、0.43、1.0。红螯相手蟹有 2 条酶带,迁移率 R_f 分别为 0.78 和 1.0,活性也差不多。

在蟹卵中(图 11),中华绒螯蟹有 3 条酶带,2 条活性较弱,1 条活性较强,迁移率 R_f 分别为 0.17、0.85、1.0,其它三种蟹的 ANEA 都未检测到。

2.2 蟹苗的蛋白和同工酶

2.2.1 蛋白

蟹苗的蛋白谱带较为复杂(图 12),中华绒螯蟹蟹苗有 9 条清晰的谱带,其中 1 条活性较强;而天津厚蟹蟹苗只有 7 条清晰的谱带,其中也有 1 条活性较强的带。在上述谱带之间,还有 3~4 条弥散的、分界不清的酶带。上述结果在 1996 年和 1997 年分别做了几次重复试验,酶谱都较稳定。

2.2.2 乳酸脱氢酶(LDH)

两种蟹苗的 LDH 同工酶都有 2 条酶带(图 13)。迁移率 R_f 都分别为 0.92 和 0.40,活性为 1 弱 1 强,中华绒螯蟹蟹苗酶活性明显高于天津厚蟹蟹苗。将制备的样液放置过夜后再电泳,它们的活性差异更为明显(图 14)。

2.2.3 酸性非特异性酯酶(ANEA)

该酶在两种蟹苗中都能检测到(图 15)。中华绒螯蟹蟹苗有 2 条酶带,迁移率 R_f 分别为 1.0 和 0.8,活性为 1 强 1 弱。天津厚蟹蟹苗有 4 条酶带,迁移率 R_f 分别为 1.0、0.8、0.6、0.5,活性为 1 强 3 弱,该酶的活性在天津厚蟹蟹苗中比中华绒螯蟹蟹苗强。

3 讨论

3.1 四种蟹的蛋白与同工酶具明显的物种特异性和组织特异性。蛋白和同工酶都是基因表达的产物,它们的合成与分布受基因的控制。不同种的生物,其基因及基因的表达与调控是不同的,因此作为基因表达的产物——蛋白与同工酶也存在差别。本次试验中,四种蟹同一组织的蛋白和同工酶存在很大差异,酶谱数量及迁移率都不一样,因此它们的蛋白与同工酶表现出明显的物种特异性。这种特异性一方面反映了生物体生命过程的多样性,另一方面也为物种(特别是相近物种)的分类鉴定提供了依据。

同一生物的不同组织中,由于生命活动过程的差异,其蛋白与同工酶的分布也不一样。比如 LDH 同工酶,它是由 Ldh-A、B、C 三个基因位点所控制,此酶为四聚体。在动物体的大多数组织中存在由 Ldh-A 和 Ldh-B 基因位点编码的 A、B 亚基,它们组成 5 种同工酶: B_4 、 AB_3 、 A_2B_2 、 A_3B 、 A_4 。虽然两种基因通常一起表达,但两者在不同的组织中表达的程度并不相同^[6]。Ldh-A 在主厌氧代谢的肌组织中优势表达,因此 A_4 活性较高;而 Ldh-B 在供氧充足的心肌中优势表达,因此 B_4 活性较高。这种分布的差别与各组织的代谢功能密切相关。本试验中,同一种蟹不同组织的蛋白和同工酶谱带差别很大,表现出明显的组织特异性,这种组织的特异性能使我们更好地了解各组织的生理功能。

3.2 从中华绒螯蟹和天津厚蟹蟹苗的蛋白和同工酶谱看,其物种特异性也是非常明显的。两种蟹苗的蛋白与 ANEA 同工酶谱带数量与迁移率都不一样,LDH 同工酶虽都有 2 条谱带,但其活性与迁移率也是不相同的,它们这种生化遗传的差别反映了对它们进行形态分类的准确性和可靠性,因而解决了曾经困扰生产的天然蟹苗的混杂问题。但仅靠蛋白和同工酶的差别对上述两种蟹苗进行分类鉴定是不可行的,因为单个蟹苗个体太小(约为 5mg 左右),其蛋白和同工酶靠电泳是检测不到的,要靠其它更为灵敏的分子生物学方法,如用 RAPD 技术对其进行 DNA 检测,以进一步揭示二者在遗传上的差别,达到区分鉴定的目的。

从两种蟹苗的蛋白和同工酶与其成蟹的蛋白和同工酶来看,蟹苗的谱带与成蟹的肌肉组织和肝脏组织的谱带更为接近,这可能说明蟹苗混合样品中,主要以肌、肝组织,特别是肌组织为主。但考虑到个体发育的不同阶段其蛋白与同工酶的种类与数量都有很大变化,所以上述结论还有待于进一步验证,特别是要进行发育同工酶的研究。

3.3 本试验中,LDH 同工酶在四种成蟹的肝组织中都观察到了,这可能与样品为新鲜组织且制样后电泳在短期内完成有关。我们曾用低温冷冻的肝组织进行 LDH 同工酶电泳,发现该酶活性极弱,不易观察到。即使制备好的样品,如果是放置过夜后再电泳,其活性也大为下降(图 14),甚至观察不到酶带。乔新美^[7]在进行河蟹 LDH 同工酶的研究时,也发现冰冻肝组织中 LDH 同工酶活性极弱,观察不到,可见该酶电泳样品以新鲜组织为宜,也可能表明该酶在某些组织中更易失活。另外,在红螯相手蟹肝脏的 LDH 同工酶中, A_4 酶带为致密宽带,活性很强,而在其蛋白谱带中也有 1 致密宽带,它们是否为同一酶带,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 施德龙等, 1994. 崇明县蟹苗汛生产教训和今后根本出路. 海洋渔业, 16(6): 217-218.
- [2] 凌建忠等, 1997. 1996年苏北沿海蟹苗汛动态调查报告. 现代渔业信息, 12(7): 16-17, 20.
- [3] 程家骅等, 1997. 苏北南部沿海蟹苗开发利用的现状及其发展前景. 海洋渔业, 19(3): 129-131, 140.
- [4] 王云龙等, 1997. 苏北南部沿海蟹类组成的初步调查及其与河蟹苗汛的关系. 水产科技情况, 24(1): 41-42.
- [5] 程家骅等, 1997. 江苏省东凌河口海水蟹苗种类组成及其淡水驯化初探. 中国水产科学, 4(1): 23-29.
- [6] 王金星、周才武, 1989. 鱼类的乳酸脱氢酶同工酶. 海洋湖沼通报, 1: 51-57.
- [7] 乔新美等, 1994. 长江、瓯江中华绒螯蟹几种同工酶的分析比较. 淡水渔业, 24(5): 10-13.
- [8] 中村正二郎, 1970. テイスク電気泳動法. 臨床病理特集, 11: 78-97.
- [9] 左田俊介, 1970. 寒い電気泳動法. 臨床病理特集, 11: 19-32.
- [10] 吉田光孝, 1971. LDHフハソザイム. 臨床病理特集, 12: 96-109.
- [11] 小松英昭, 1978. エステラーゼ脱水素酵素類およびホスホオリラゼの染色. 臨床病理特集, 34: 67-83.

A COMPARATIVE STUDY ON PROTEIN AND SOME ISOZYME IN SOME CRABS AND THEIR MEGALOPA FROM SOUTHERN COAST OF JIANGSU PROVINCE

Cheng Jiahua Wang Yunlong Xu Jiawu Ling Jianzhong

(East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Shanghai 200090)

Liu Changyuan Zhou Yugui

(People's Hospital of Dongtai, Dongtai 224200)

ABSTRACT The protein, LDH and ANEA in the tissues of eye, liver, muscle and egg of four common species such as *Eriocheir sinensis*, *Helice tientsinensis*, *Sesarma haematocheir*, *Macrophthal-mus japonicus* and the megalopa of *Eriocheir sinensis* and *Helice tientsinensis* sampled from southern coast of Jiangsu province, were studied in this paper. It was found that some significant genetic variation was expressed in the Protein, LDH and ANEA in the samples from different species and different tissues mentioned above. There were also some differences in the electrophoretograms and enzyme activity between the two megalopas of *E. sinensis* and *H. tientsinensis*, which was predicted to be applied to the species identification and classification in the crabs.

KEY WORDS Southern coast of Jiangsu province, Megalopa, Isozymes

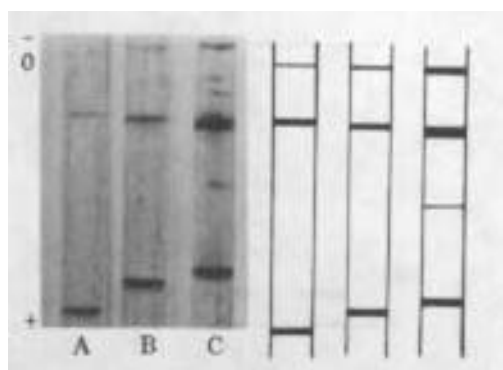


图 1 三种蟹眼蛋白电泳图谱

Fig.1 Electrophoretograms of protein in eye of three species of crab

图 1~12 A: 中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* B: 天津厚蟹 *Helice tridens tientsinensis* C: 红螯相手蟹 *Sesarma haematocheir* D: 日本大眼蟹 *Macrophthalmus japonicus*

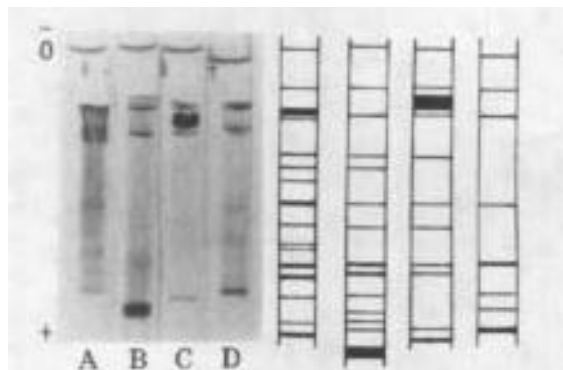


图 2 四种蟹肝脏蛋白电泳图谱

Fig.2 Electrophoretograms of protein in liver of four species of crab

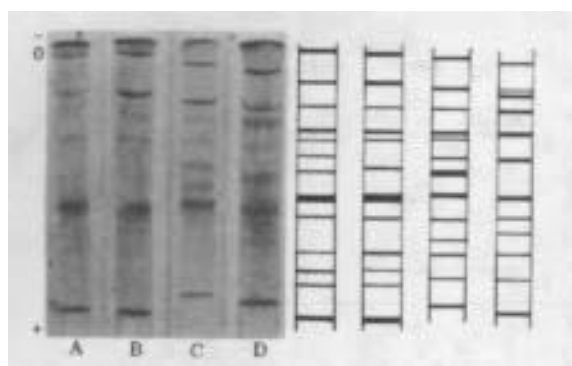


图 3 四种蟹肌肉蛋白电泳图谱

Fig.3 Electrophoretograms of protein in muscle of four species of crab

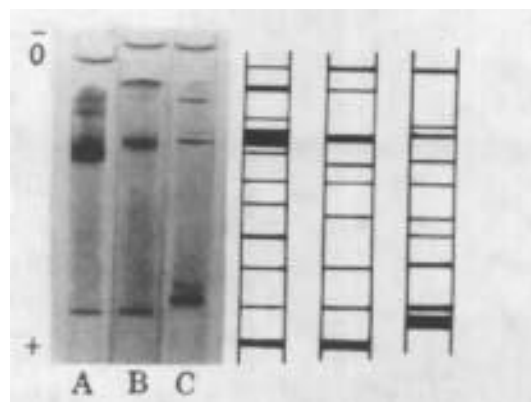


图 4 三种蟹卵蛋白电泳图谱

Fig.4 Electrophoretograms of protein in egg of three species of crab

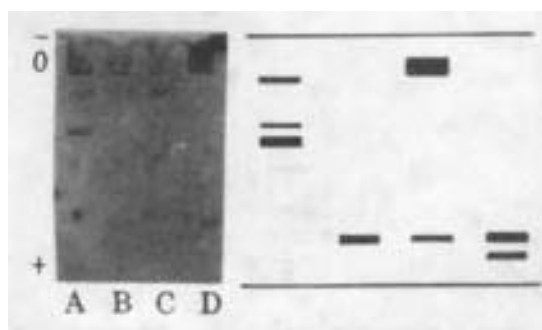


图 5 四种蟹肝脏 LDH 同工酶电泳图谱

Fig.5 Electrophoretograms of LDH isozymes in liver of four species of crab

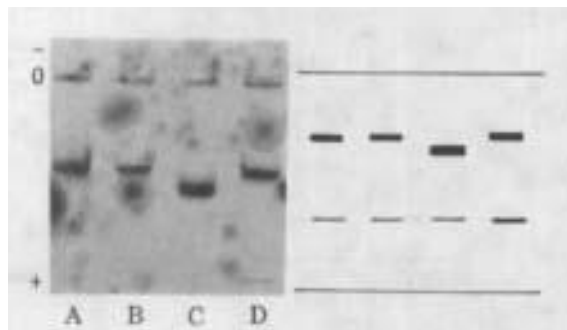


图 6 四种蟹肌肉 LDH 同工酶电泳图谱

Fig.6 Electrophoretograms of LDH isozymes in muscle of four species of crab

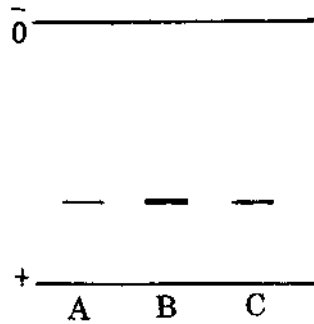


图 7 三种蟹卵 LDH 同工酶电泳图谱

Fig. 7 Electrophoretograms of LDH isozymes in egg of three species of crab

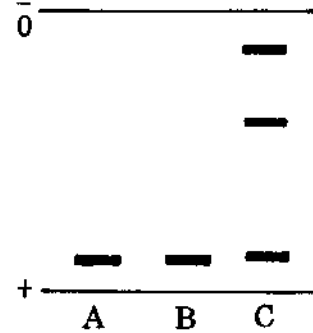


图 8 三种蟹眼 ANEA 同工酶电泳图谱

Fig. 8 Electrophoretograms of ANEA isozymes in eye of three species of crab

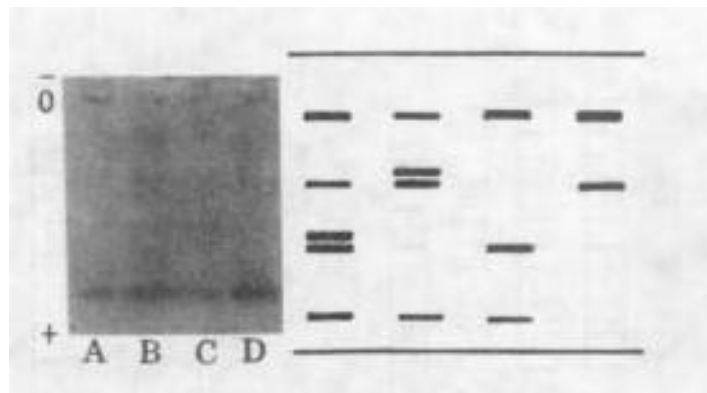


图 9 四种蟹肝脏 ANEA 同工酶电泳图谱

Fig. 9 Electrophoretograms of ANEA isozymes in liver of four species of crab

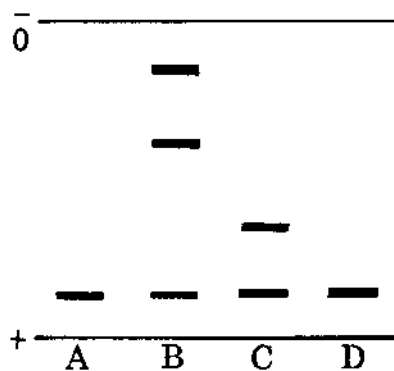


图 10 四种蟹肌肉 ANEA 同工酶电泳图谱

Fig. 10 Electrophoretograms of ANEA isozymes in muscle of four species of crab



图 11 中华绒螯蟹卵 ANEA 同工酶电泳图谱

Fig. 11 Electrophoretograms of ANEA isozymes in egg of *Eriocheir sinensis*

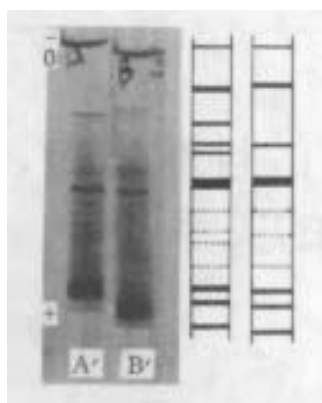


图 12 两种蟹苗蛋白电泳图谱

Fig. 12 Electrophoretograms of protein in megalopa of two species of crab

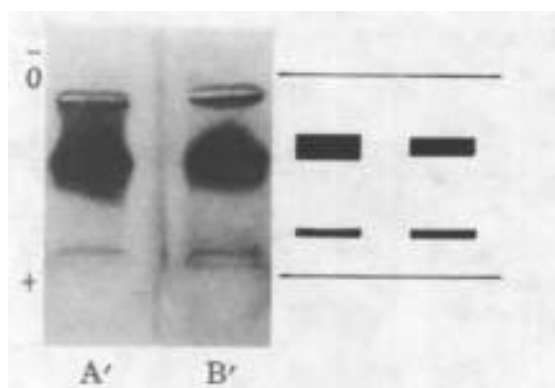


图 13 两种蟹苗 LDH 同工酶电泳图谱

Fig. 13 Electrophoretograms of LDH isozymes in megalopa of two species of crab

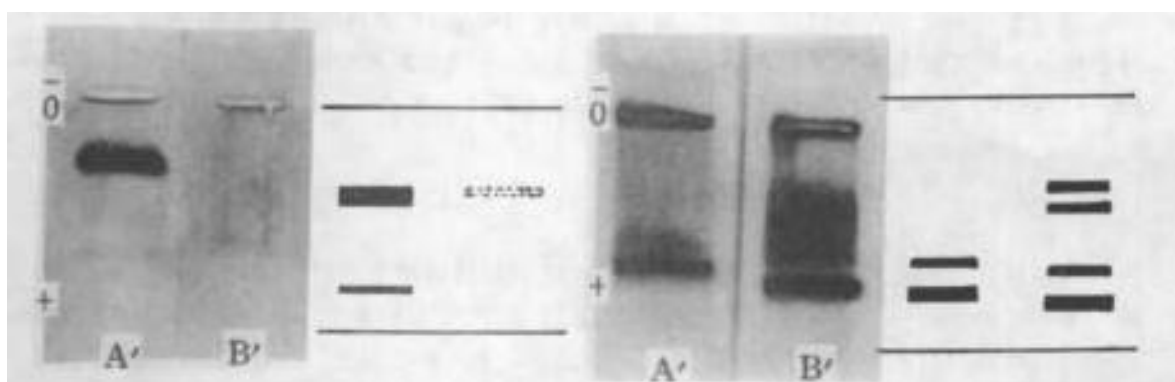


图 14 两种蟹苗制样放置过夜后 LDH 同工酶电泳图谱

Fig. 14 Electrophoretograms of LDH isozymes in megalopa of two species of crab after the prepared samples disposed overnight

图 15 两种蟹苗 ANEA 同工酶电泳图谱

Fig. 15 Electrophoretograms of ANEA isozymes in megalopa of two species of crab

图 13~15 A': 中华绒螯蟹蟹苗 *Megalopa of Eriocheir sinensis* B': 天津厚蟹蟹苗 *Megalopa of Helice tridens tientsinensis*