

文章编号:1005-8737(2001)02-0017-06

## 合浦珠母贝同工酶的电泳分析

李广丽,杜晓东,叶富良

(湛江海洋大学水产学院,广东湛江524025)

**摘要:**采用聚丙烯酰胺梯度凝胶垂直板电泳技术和特异性染色方法,对合浦珠母贝外套膜、闭壳肌、肝脏和鳃组织中的15种同工酶系统进行分析,结果表明:a-GPDH、ADH在4种组织中均未见表达;AK、AMY、PGM、ALP、GDH和LDH只在肝脏中表达,而ME、SOD、EST、MDH、G6PD、6PGD和AAT则有较广泛的组织分布,其中12个座位(Aat-1、Aat-2、Sod-1、Sod-2、Sod-3、Sod-4、m-Mdh-c、G6pd-2、6Pgd-2、Ak-1、Gdh-1、Me-2)具有多态性,多态位点比例为46.1%,平均杂合度 $0.1122 \pm 0.0576$ 。

**关键词:**合浦珠母贝;同工酶;多态位点;平均杂合度;电泳  
**中图分类号:** Q959.215 **文献标识码:** A

合浦珠母贝(*Pinctada martensii* Dunker),又称马氏珠母贝,主要分布于我国广东、广西、海南、福建东山沿海以及日本沿海,是我国人工海水育珠的主要母贝。近年来,由于过度捕捞和栖息环境恶化,使得合浦珠母贝的物种资源受到严重破坏,人工养殖品种个体变小,影响育珠质量。这些都迫切要求对其种质资源进行系统的研究。但目前国内外对合浦珠母贝的生化遗传研究较少,只见到零星的报道<sup>[1,2]</sup>。本实验利用同工酶电泳技术,对野生合浦珠母贝4种组织中的15种同工酶系统进行分析,旨在积累生化遗传学资料,为种质标准的制订、资源保护提供参考资料;为遗传改良和优良品种选育等生产实践提供理论指导。

### 1 材料和方法

#### 1.1 样本采集与保存

实验所用的合浦珠母贝分别为采自北部湾及大亚湾海区的野生贝。活贝运回实验室后暂养1夜,各随机选取10只1.5~4龄成贝,体重为38.4~

54.7 g。解剖取鳃、闭壳肌、肝脏和外套膜4种组织,用磷酸缓冲液清洗后放入塑料离心管中,置于低温冰箱(-75℃)保存待用。

#### 1.2 样品制备

用电子天平分别称取各部位组织0.4 g左右,以0.333 g/ml质量浓度加入0.05 mol/L Tris-0.38 mol/L Gly(pH 8.3)匀浆液,在冰浴下于玻璃匀浆器中匀浆,匀浆液倒入塑料离心管中,4℃下,17 000 r/min离心20 min(肝脏离心2次)。取上清液分2份装于塑料离心管中,一份置4℃冰箱中保存(样品使用不超过2 d),另一份存于低温冰箱以备日后核查。

#### 1.3 电泳方法

采用北京市六一仪器厂生产的DYY-III 6B型稳压稳流电泳仪及DYY-III 21型垂直电泳槽,进行聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳。方法主要参考朱蓝菲的报道<sup>[3]</sup>。

样品按1:1加入质量分数为0.2的蔗糖溴酚蓝溶液,加样量为20~30 ul/孔,以200 V稳压于4℃冰箱中电泳15 h。

#### 1.4 染色

染色参照王中仁<sup>[4]</sup>的方法,稍加改进。

电泳结束后,立即将凝胶放入染色液中,并在

收稿日期:2000-09-11

基金项目:广东省教育厅重点科技攻关项目

作者简介:李广丽(1967-),女,讲师,硕士,主要从事水产经济动物生理生态学研究。

37℃ 恒温箱中保温,染色至谱带清楚为宜。取出后放入 1% 的冰醋酸中保存以待拍照。

### 1.5 酶位点与等位基因的编号

为便于统计分析,对各位点或等位基因按 Allendorf & Utter<sup>[5]</sup>的方法予以编号,即把出现最多的位点或等位基因编为 100,其余的均按相对于位点或等位基因 100 的相对迁移率的百分比来命名。

### 1.6 基因变异的度量

用多态位点比例( $P$ )、每个位点的平均杂合度( $H$ )来度量,其计算公式分别为: $P = \text{多态位点数} / \text{总位点数}$ ;  $H = \sum (1 - \sum X_i^2) / n$ ;  $X_i$ —等位基因  $i$  的频率; $n$ —所测位点数。

## 2 结果

本实验所检测的 15 种同工酶中, a - GPDH、ADH 未显示出任何活性的区带; AK、AMY、PGM、ALP、GDH 和 LDH 仅在肝脏中表达,而 ME、SOD、EST、MDH、G6PD、6PGD 和 AAT 则有较广泛的组织分布,本文报道的是显带清楚的由 26 个位点编码的 12 种酶的测定结果。

### 2.1 磷酸葡萄糖变位酶(PGM, E.C.2.7.5.1)

PGM 在肝脏中染色淡,表现 2 条带,为单体酶,无多态,因谱带过浅,只有示意图(图 1)。

### 2.2 谷氨酸脱氢酶(GDH, E.C.1.4.1.2)

肝脏中 GDH 染色很淡,可能由 2 个位点编码,表现 3 条谱带,无多态,同样只有示意图(图 2)。

### 2.3 乳酸脱氢酶(LDH, E.C.1.1.1.27)

LDH 在肝脏中只出现 1 条很淡的谱带,由 1 个位点编码,未见多态。仅有示意图(图 3)。

### 2.4 腺苷酸激酶(AK, E.C.2.7.4.3)

合浦珠母贝的 AK 是由 1 个位点编码的单体酶,由 2 个等位基因编码,有多态,见图 4,左为示意

图,右为电泳照片(后面的图相同)。

### 2.5 碱性磷酸酶(ALP, E.C.3.1.3.1)

ALP 为由 2 个位点编码的单体酶,Alp-2 无多态,Alp-1 有多态现象(图 5)。

### 2.6 淀粉酶(AMY, E.C. 3.2.1.1)

合浦珠母贝的 AMY 由 2 个位点编码,共显现 6 条谱带,无多态(图 6)。

### 2.7 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD, E.C. 1.1.1.44)

6PGD 分布较广,所测 4 种组织中均有表达,肝脏中活性最强,表现为 2 条带,由 2 个位点编码,肌肉中 6Pgd-1 有多态(图 7)。

### 2.8 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD, E.C.1.1.1.49)

肝脏中活性最强,各组织中均有 G6pdh-2,肌肉中个别个体出现 G6pdh-1,有多态(图 8)。

### 2.9 天冬氨酸转氨酶(AAT, E.C.2.6.1.1)

合浦珠母贝各种组织中 AAT 活性均很强,Aat-2 座位出现两种表型,未见杂合带,而 Aat-1 座位可能有一活性等位基因,出现 1 条带或无带,2 个座位均有多态(图 9)。

### 2.10 苹果酸脱氢酶(MDH, E.C.1.1.1.37)

合浦珠母贝的 MDH 由 s-MDH 和 m-MDH 两种类型编码,前者编码的 3 条谱带在 4 种组织中均出现,而 m-Mdh-c 座位具有多态性(图 10)。

### 2.11 苹果酸酶(ME, E.C.1.1.1.40)

ME 在肝脏中表现 4 条谱带,而在其他组织中只出现 2 条谱带,可能由 2~4 个位点编码,Me-2 在外套膜中有多态(图 11)。

### 2.12 超氧化物歧化酶(SOD, E.C.1.5.1.1)

合浦珠母贝 SOD 由 4 个座位编码,各座位均有多态现象,为二聚体(图 12)。

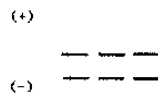


图 1 肝脏中 PGM 同工酶谱示意图(大亚湾)

Fig.1 The PGM isozyme patterns in liver of *P. martensii*

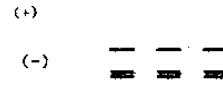


图 2 肝脏中 GDH 同工酶谱示意图(大亚湾)

Fig.2 The GDH isozyme patterns in liver of *P. martensii*



图 3 肝脏中 LDH 同工酶谱示意图(大亚湾)  
Fig.3 The LDH isozyme patterns in liver of *P. martensii*

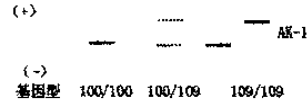


图 4 肝脏中 AK 同工酶谱及其座位多态性示意图(北部湾)  
Fig.4 The AK isozyme patterns and diagram of polymorphism of Ak loci in liver of *P. martensii*

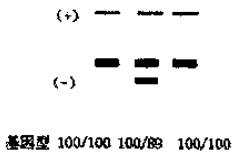


图 5 肝脏中 ALP 同工酶谱及 Alp-1 座位多态性示意图(大亚湾)  
Fig.5 The ALP isozyme patterns and diagram of Polymorphism of Alp-1 loci in liver of *P. martensii*



图 6 肝脏中 AMY 同工酶谱(大亚湾)  
Fig.6 The AMY isozyme patterns in liver of *P. martensii*

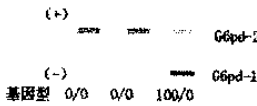


图 7 6PGD 同工酶谱及闭壳肌 6Ggd-1 座位多态性示意图(大亚湾)  
Fig.7 The 6PGD isozyme patterns and diagram of Polymorphism of 6Pgd-1 loci in muscle of *P. Martensii*

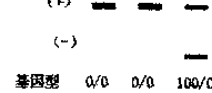


图 8 G6PD 同工酶谱及闭壳肌 G6pd-1 座位多态性示意图(大亚湾)  
Fig.8 The G6PD isozyme patterns and diagram of polymorphism of G6pd-1 loci in muscle of *P. martensii*

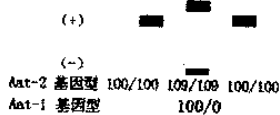


图 9 AAT 同工酶谱及闭壳肌 Aat-1,2 座位多态性示意图(北部湾)  
Fig.9 The AAT isozyme patterns and diagram of polymorphism of Aat-1,2 loci in muscle of *P. martensii*

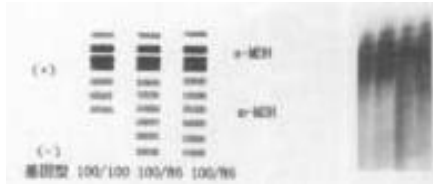


图 10 MDH 同工酶谱及外套膜 m-Mdh-c 座位多态性示意图(大亚湾)  
Fig.10 The MDH isozyme patterns and diagram of polymorphism of m-Mdh-c loci in mantle of *P. martensii*

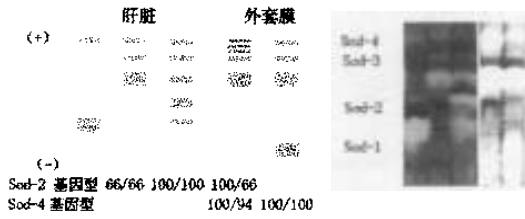


图 11 ME 同工酶谱及外套膜 Me-2 座位多态性示意图 (北部湾)

Fig. 11 The ME isozyme patterns and diagram of polymorphism of Me-2 loci in mantle of *P. martensii*

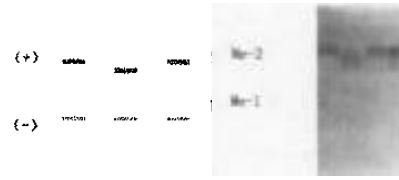


图 12 SOD 同工酶谱及肝脏、闭壳肌 Sod 座位多态性示意图 (大亚湾)

Fig. 12 The SOD isozyme patterns and diagram of polymorphism of Sod loci in liver and muscle of *P. martensii*

表 1 合浦珠母贝各组织基因座位的基因型分布, 等位基因频率及  $\chi^2$  检验

Table 1 Tests for genotypic distribution, allelic frequencies and chi-square of loci in different tissues of *P. martensii*

基因座位 Loci	基因型 Genotypes	观察值 Observed number	预期值 Expected number	$\chi^2$	P	等位基因频率 Allelic frequencies	
Sod-4	100/100	19	19.0	0	1	100	94
	100/94	1	1.0			0.975	0.025
	94/94	0	0				
Sod-3	100/100	19	18.05	20	<0.005	100	0
	100/0	0	1.9			0.95	0.05
	0/0	1	0.05				
Sod-2	100/100	14	13.6	0.398	0.3~0.5	100	66
	100/66	5	5.8			0.825	0.175
	66/66	1	0.6				
Sod-1	100/100	1	0.05	20	<0.005	100	0
	100/0	0	1.9			0.05	0.95
	0/0	19	18.05				
Ak-1	109/109	1	0.45	0.930	0.2~0.3	100	109
	109/100	4	5.1			0.85	0.15
	100/100	15	14.45				
Alp-1	100/100	18	18.05	0.055	0.75~0.9	100	89
	100/89	2	1.9			0.95	0.05
	89/89	0	0.05				
Aat-1	100/100	0	0.025	0.028	0.75~0.95	100	0
	100/0	1	0.95			0.05	0.95
	0/0	9	9.025				
Aat-2	100/100	8	6.4	10	<0.005	100	109
	100/109	0	3.2			0.8	0.2
	109/109	2	0.8				
m-Mdh-c	100/100	6	7.55	2.254	0.1~0.25	100	86
	100/86	10	6.9			0.687	0.313
	86/86	0	1.6				
G6pd-1	0/0	8	8.1	0.062	0.75~0.95	100	0
	100/0	2	1.8			0.9	0.1
	100/100	0	0.1				
6Pgd-1	0/0	8	8.1	0.062	0.75~0.95	100	0
	100/0	2	1.8			0.9	0.1
	100/100	0	0.1				
Me-2	100/100	9	8.1	9.1	<0.005	100	94
	100/94	0	0.9			0.9	0.1
	94/94	1	0.1				

### 2.13 酯酶(EST, E.C.3.1.1.1)

EST 在肝脏中活性最强而在肌肉中活性最弱,至少由 5 个座位编码,由于 EST 各位点的等位基因变化较不规则,在此不计入计算。

合浦珠母贝不同组织基因座位的基因型分布、等位基因频率及  $X^2$  检验结果见表 1。

从表 1 中可见,合浦珠母贝的同工酶基因座位具有明显的多态性。12 种同工酶系统所代表的 26 个座位中,8 种同工酶系统(AK、ALP、MDH、G6PD、6PGD、ME、AAT、SOD)共 12 个座位具有多态性,多态位点酶的比例为 66.7%,其中 8 个多态性基因座位上观察到的基因型频率与 Hardy-Weinberg 定律相符。平均杂和度为  $0.1122 \pm 0.0576$ 。

### 3 讨论

同工酶表型及其基因座位的研究目前主要见于脊椎动物的 GDH、MDH、G6PD、6PGD、IDH、ADH、AKP 和 EST 等<sup>[6]</sup>,在本研究所检测的 15 种同工酶中, $\alpha$ -GPDH、ADH 在 4 种组织中均未见表达,AK、AMY、PGM、ALP、GDH 和 LDH 只在肝脏中表达,而 ME、SOD、EST、MDH、G6PD、6PGD 和 AAT 则有较广泛的组织分布,与这些同工酶系统相比较,ALP、PGM、AK 呈现单体酶的特性,MDH、SOD 呈现二聚体酶的特征,表明这些同工酶系统在合浦珠母贝中存在与脊椎动物相似的遗传性状,而在三角帆蚌中上述同工酶系统也表现出相似的特性<sup>[7]</sup>。淀粉酶在合浦珠母贝肝脏中活性较强,可能由 2 个座位编码,这与贝类可消化碳水化合物的食性相符。软体动物中曾有 EST 的报道,已证实螺类 EST 有 7 个座位至少 14 个独立的等位基因参与遗传<sup>[8]</sup>,而在合浦珠母贝组织中,EST 表型复杂,尚需进一步研究。在所检测的同工酶系统中,G6PD、6PGD、SOD 和 AAT 都发现有“0”等位基因的存在。这种现象在鱼类的 LDH<sup>[9]</sup>、AAT<sup>[10]</sup>等酶的基因座位上有过报道。对于具有“0”等位基因的多态座位来说,如果由该座位上的基因编码的酶为单体酶,当“0”等位基因处于纯合状态时,电泳图谱上不显示谱带,当活性等位基因处于杂合状态或纯合状态时,则显现一条谱带,但前者的染色活性高于后者,根据杂合体和纯合体的一般分布频率来看,上述酶显现出来的酶带可能是杂合体。值得一提的是 ALP,它参与贝壳及珍珠质前身的形成、矿化作用<sup>[11]</sup>,但本实验中 ALP 在分泌珍珠质的主要组织——外套膜中无表达,只

在肝脏中显示,原因不明。而  $\alpha$ -GPDH、ADH 无表达是由于它们在贝类中极易失活或者是点样量不足或是所用的缓冲系统与之不匹配,则有待研究。

同工酶技术可以揭示种群内和种群间,甚至种群以下不同个体或亲缘种之间的遗传上的变异,从基因水平上发现这些变化。利用多态性基因座位的不同基因型及等位基因频率作为生化指标,可以对合浦珠母贝的遗传结构进行分析。利用多态性基因座位作为遗传标记,将不同基因型的纯合体采用不同的组合进行人工交配,有望从中筛选出具有优良性状的子代,进而定向地建立稳定的人工优良繁殖品系。多态性基因座位愈多,可供选择的机会也就会愈大。而平均杂合度,是度量遗传变异的最简单、最直接、最富信息的方法,由于它与测定样品的大小的关系不太大,因而比多态位点要好些<sup>[12]</sup>。在合浦珠母贝所测 26 个位点中,多态位点比例为 46.1%,高于脊椎动物多态位点比例(15%~30%)<sup>[13]</sup>。多态位点酶的比例为 66.7%,与中国大陆钉螺多态位点酶的比例(67%)相近<sup>[14]</sup>。平均杂合度为  $0.1122 \pm 0.0576$ ,与李刚等<sup>[2]</sup>测得的数值相近,比巴拿马珠母贝<sup>[15]</sup>和牡蛎的研究报道的数值低<sup>[16-18]</sup>。

### 参考文献:

- [1] Katsuhiko Wada. Genetic variability at four polymorphic loci in Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, selected for six generations[J]. Aquaculture, 1986, 59:139-146.
- [2] 李刚,金启增,姜卫国,等.合浦珠母贝和长耳珠母贝的生化遗传变异[J].遗传学报,1985,12(3):204-212.
- [3] 朱蓝菲.鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法[J].水生生物学报,1992,16(2):183-185.
- [4] 王中仁.植物等位酶分析[M].北京:科学出版社,1996.95-106.
- [5] Allendorf F W, Utter F M. Population genetics[A]. Fish physiology[M]. New York:Academic Press, Vol, 18, 1979. 407-454.
- [6] 陈惠黎.同工酶的分子生物学[J].国外医学(分子生物学分册),1981,3(4):158-167.
- [7] 邵健忠,项黎新,华志华,等.三角帆蚌十六种同工酶系统的类型及其在瘟病蚌中的病理变化[J].水产学报,1993,17(3):199-208.
- [8] 许学积,郭源华.各地钉螺  $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶的酶同工酶变异的研究[J].动物学杂志,1982,26(3):26-28.
- [9] Engel W, Schmidtke J, Vogel W, et al. Genetic polymorphism of Lactate dehydrogenase isozymes in the carp (*Cyprinus carpio*) apparently due to a "null allele" [J]. Biochem Genet, 1971, 8(3): 281-289.
- [10] Stoneking M, May B, Wright J E. Loss of duplicate expression in salmonids: Evidence for a null allele polymorphism at the duplicate aspartate aminotransferase loci in brook trout (*Salvelinus*

- ontinalis][J]. Biochem Genet, 1981, 19(11/12):1 063-1 067.
- [11] 石安静, 吴宗文. 3种淡水育珠河蚌外套膜的组织化学研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1994, 31(珍珠研究论文集):29-35.
- [12] Philipp D P. Management implications for different genetic stocks of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in the United States [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1981, 38:1 715-1 723.
- [13] Kirpichnikov V S. Genetic bases of fish selection [A]. The biochemical genetics of fish [M]. Berlin: Springer - Verlag, 1981. 143-199.
- [14] 张仪, 冯婷, George M Davis. 中国大陆钉螺分子遗传学研究 I. 多位点酶电泳初步分析 [A]. 贝类学论文集(5/6) [C]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1995. 170-173.
- [15] 李刚, Hedgecock D. 巴拿马珠母贝两个群体的生化遗传变异比较 [J]. 热带海洋, 1991, 10(4):56-61.
- [16] Saavedra C, Zapata C, Guerra A, et al. Allozyme variation in European populations of the oyster, *Ostrea edulis* [J]. Mar Biol, 1993, 115:85-95.
- [17] Saavedra C, Zapata C, Alvarez G. Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster, *Ostrea edulis* [J]. Mar Biol, 1995, 122:95-104.
- [18] Saavedra C, Guerra A. Allozyme heterozygosity, founder effect and fitness traits in cultivated population of the European oyster, *Ostrea edulis* [J]. Aquaculture, 1996, 139: 203-224.

## Analysis on isozymes electrophoresis of *Pinctada martensii*

LI Guang-li, DU Xiao-dong, YE Fu-liang

(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** Fifteen isozymes in 4 tissues (gill, adductor muscle, liver and mantle) of Marten's pearl oyster *Pinctada martensii* were analysed by gradient gel electrophoresis on polyacrylamide and specific dye measures. The results showed that a-GPDH and ADH were not found expressing in the 4 tissues; AK, AMY, PGM, ALP, GDH and LDH isozymes only had positive bands in liver, while MDH, ME, SOD, EST, G6PD, 6PGD and AAT isozymes have wide distribution in the 4 tissues; among those isozymes, 12 loci (Aat-1, Aat-2, Sod-2, Sod-3, Sod-4, m-Mdh, G6pd-2, 6Pgd-2, Ak-1, Gdh-1, Me-2, Sod-1) had polymorphisms and the proportion of polymorphic loci ( $P$ ) was 46.1%, and the average heterozygosity ( $H$ ) was  $0.1122 \pm 0.0576$ .

**Key words:** *Pinctada martensii*; isozymes; electrophoresis; polymorphic loci; heterozygosity

## 深切缅怀徐怀恕教授

青岛海洋大学海洋生命学院海洋生物系原系主任、联合国教科文组织中国海洋生物工程中心主任、联合国教科文组织生物工程委员会委员、中国生态学会理事、中国微生物学会理事、山东省微生物学会副理事长、博士生导师 徐怀恕 教授于 2001 年 6 月 14 日因病去世, 终年 65 岁。

我们《中国水产科学》编辑部在与徐怀恕教授的交往中, 深切感受到他独特的人格魅力, 他为人正直、热情, 思维敏捷, 治学严谨, 对事业执着追求。徐怀恕教授毕生在我国海洋科学教育园地中辛勤耕耘, 教学与科研工作成绩卓著, 硕果累累, 指导、栽培博士后、博士研究生、硕士研究生数十名, 桃李满天下。他的逝世是我国海洋科学教育事业的重大损失! 他那种热爱海洋科学教育事业并为之奋斗终生的精神永远值得我们学习并发扬光大。

我们沉痛悼念徐怀恕教授! 深切缅怀徐怀恕教授!

《中国水产科学》编辑部