

• 研究简报 •

## 西施舌同工酶的组织特异性与多态性初步研究

孔令锋, 李琪

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 采用垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对西施舌 (*Coelomactra antiquata*) 闭壳肌、鳃、外套膜、消化腺和足肌 5 种组织的 18 种同工酶进行组织特异性分析, 并对其中 11 种同工酶进行了多态性的筛选。结果表明, 西施舌同工酶的表达具有明显的组织特异性。消化腺与肌肉组织中的 11 种酶 (ADH、AK、DIA、EST、GPI、IDH、MDH、PGM、SDH、SOD 和 XDH) 可以得到稳定而清晰的酶谱。在 11 种酶的 17 个基因位点中有 6 个位点 (*ADH*、*EST-1*、*MDH-1*、*PGM*、*SOD-1* 和 *XDH*) 为多态位点, 多态位点比例为 35.3%。平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 和预期杂合度 ( $H_e$ ) 分别为 0.360 和 0.519, 平均等位基因数目 ( $N_s$ ) 为 4.40。[中国水产科学, 2008, 15(1): 178-182]

**关键词:** 西施舌; 聚丙烯酰胺电泳; 同工酶; 组织特异性; 多态性

**中图分类号:** Q959.215

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2008)01-0178-05

西施舌 (*Coelomactra antiquata*) 隶属软体动物门 (Mollusca)、瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、真瓣鳃目 (Eulamellibranchia)、异齿亚目 (Heterodonta)、蛤蜊科 (Mactridae)、腔蛤蜊属 (*Coelomactra*), 主要分布于太平洋西部、印度支那半岛、中国和日本沿海, 是中国名贵的海珍品<sup>[1]</sup>。然而近年来由于海域污染、栖息地破坏与过度捕捞使得西施舌资源已趋近枯竭。在 2004 年, 中国西施舌产量约为 50 t, 仅占 10 年前总产量的 1%<sup>[2]</sup>。现在中国的许多地区如辽宁、河北、浙江和广西等省已很难发现野生的西施舌, 保护和恢复西施舌资源刻不容缓。

国内一些研究人员从 20 世纪 60 年代开始先后对西施舌的生态习性、繁殖生物学、资源保护、人工繁育及养殖等方面进行了基础理论和应用生物学的研究<sup>[3-5]</sup>, 但关于西施舌种质资源与遗传多样性方面的研究至今没有报道。本研究利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对西施舌 5 种组织的 18 种同工酶进行了检测分析, 并以山东即墨鳌山群体为研究对象对 11 种同工酶多态性进行了初步研究, 以期为进一步研究西施舌种群遗传多样性及分化提供理论基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

西施舌于 2005 年 6 月取自山东即墨, 壳长

7.1~8.0 cm, 活体带至实验室后, 用海水清洗泥沙后立即解剖, 取闭壳肌、鳃、外套膜、消化腺和足肌 5 种组织, -80℃超低温冰箱保存备用。

#### 1.2 方法

**1.2.1 粗酶液的制备** 准确称量 200 mg 闭壳肌、鳃、外套膜、消化腺和足肌 5 种组织, 以 1:5 (W/V) 的比例加入预冷的匀浆缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.0, 含 0.1% 的  $\beta$ -巯基乙醇), 用玻璃匀浆器在冰浴下匀浆, 匀浆液在 4℃条件下, 15 000 r/min 离心 30 min, 上清液分装后保存于 -40℃冰箱备用。

**1.2.2 电泳** 采用北京市六一仪器厂生产的稳压电泳仪 (型号为 DYY6C) 和电泳槽 (型号为 DY CZ-24D) 进行非连续梯度垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶浓度为 7.5% (pH 8.9), 浓缩胶浓度为 4.5% (pH 6.8), 缓冲液系统采用 Tris-甘氨酸缓冲液 (0.025 mol/L Tris, 0.2 mol/L 甘氨酸, pH 8.3)。电泳在 4℃冰箱内进行, 25 mA 恒流, 时间约 1 h。染色参照 Richardson 等<sup>[6]</sup>的方法, 略有改动。染色完毕后于 7.5% 的乙酸溶液中固定 30 min, 生物电泳图像系统进行摄影记录。用 18 种酶 (表 1) 对西施舌闭壳肌、鳃、外套膜、消化腺和足肌 5 种组织做组织特异性分析。检测出适合西施舌同工酶分析的酶和组织, 以即墨鳌山群体的 31 个西施舌个体对其进行初步的多态性分析。

收稿日期: 2007-03-26; 修订日期: 2007-08-02.

基金项目: 国家高技术研究发展 863 计划 (2006AA10A409); 国家自然科学基金 (30571442).

作者简介: 孔令锋 (1978-), 男, 博士, 主要从事贝类遗传育种研究. E-mail: klfyx@yahoo.com.cn

通讯作者: 李琪. Tel: 0532-82031622; E-mail: qili66@mail.ouc.edu.cn

表 1 西施舌同工酶组织特异性实验所分析的酶的名称、缩写和编号

Tab.1 Names, abbreviations and E. C. numbers of enzymes used in tissue specificity analysis of *Coelomactra antiquata*

| 酶<br>Enzyme                             | 缩写<br>Abbr. | 编号<br>E. C. No. |
|-----------------------------------------|-------------|-----------------|
| 天冬氨酸转氨酶<br>Aspartate aminotransferase   | AAT         | 2.6.1.1         |
| 酸性磷酸酶<br>Acid phosphatase               | ACP         | 3.1.3.2         |
| 乙醇脱氢酶<br>Alcohol dehydrogenase          | ADH         | 1.1.1.1         |
| 碱性磷酸酶<br>Alkaline phosphatase           | AKP         | 3.1.3.1         |
| 腺苷酸激酶<br>Adenylate kinase               | AK          | 2.7.4.3         |
| 过氧化氢酶<br>Catalase                       | CAT         | 1.11.1.6        |
| 还原型辅酶 I 心肌黄酶<br>NADH Diaphorase         | DIA         | 1.6.99.2        |
| 酯酶<br>Esterase                          | EST         | 3.1.1.1         |
| 谷氨酸脱氢酶<br>Glutamic dehydrogenase        | GDH         | 1.4.1.2         |
| 葡萄糖磷酸异构酶<br>Glucose-phosphate isomerase | GPI         | 5.3.1.9         |
| 异柠檬酸脱氢酶<br>Isocitrate dehydrogenase     | IDH         | 1.1.1.42        |
| 乳酸脱氢酶<br>Lactate dehydrogenase          | LDH         | 1.1.1.27        |
| 苹果酸脱氢酶<br>Malate dehydrogenase          | MDH         | 1.1.1.37        |
| 苹果酸酶<br>Malic enzyme                    | ME          | 1.1.1.40        |
| 葡萄糖磷酸变位酶<br>Phosphoglucomutase          | PGM         | 5.4.2.2         |
| 山梨醇脱氢酶<br>Sorbitol dehydrogenase        | SDH         | 1.1.1.14        |
| 过氧化物歧化酶<br>Superoxide dismutase         | SOD         | 1.15.1.1        |
| 黄嘌呤脱氢酶<br>Xanthine dehydrogenase        | XDH         | 1.1.1.204       |

1.2.3 数据处理 用 GENEPOP 3.4 软件<sup>[7]</sup> 计算等位基因频率、观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ ) 并检测各位点是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。采用

FSTAT 2.9.3 软件<sup>[8]</sup> 计算平均等位基因数目 ( $N_a$ )。

2 结果与分析

2.1 西施舌同工酶组织特异性

本研究共检测了西施舌 5 种组织 18 种酶,其中 CAT、GDH、LDH 等 3 种酶在 5 种组织中均未显示酶的活性, AAT、ACP、AKP 和 ME 等 4 种酶活性弱或者不稳定,其余 11 种酶显示出清晰而稳定的酶带并表现出组织特异性 (表 2)。其中 6 种酶 (ADH、DIA、EST、IDH、SDH 和 XDH) 仅存在于消化腺; AK 存在于闭壳肌、外套膜和足肌,鳃和消化腺中未见活性; GPI、MDH 和 PGM 在 5 种组织种皆有表达,但活性强弱不同,在闭壳肌和足肌中活性最强,外套膜、鳃和消化腺的活性较弱; SOD 同样存在于 5 种组织中,但在消化腺的活性最强。

表 2 11 种酶在西施舌 5 种组织和器官的表达情况

Tab.2 Expression of 11 enzymes in five tissues or organs in *Coelomactra antiquata*

| 酶<br>Enzyme | 组织 Tissue              |           |               |                        |                   |
|-------------|------------------------|-----------|---------------|------------------------|-------------------|
|             | 闭壳肌<br>Adductor muscle | 鳃<br>Gill | 外套膜<br>Mantle | 消化腺<br>Digestive gland | 足肌<br>Foot muscle |
| ADH         | —                      | —         | —             | ++                     | —                 |
| AK          | ++                     | —         | +             | —                      | +                 |
| DIA         | —                      | —         | —             | +++                    | —                 |
| EST         | —                      | —         | —             | +++                    | —                 |
| GPI         | +++                    | +         | ++            | +                      | +++               |
| IDH         | —                      | —         | —             | ++                     | —                 |
| MDH         | +++                    | +         | +             | +                      | ++                |
| PGM         | +++                    | +         | +             | +                      | ++                |
| SDH         | —                      | —         | —             | +++                    | —                 |
| SOD         | +                      | +         | +             | ++                     | +                 |
| XDH         | —                      | —         | —             | ++                     | —                 |

注: “+++” 显示酶的活性为强; “++” 为中; “+” 为弱; “—” 为无带; \* 显示筛选出的组织。  
Note: “+++”, represent strong enzyme expression; “++”, moderate; “+”, weak; “—”, no reaction; \*, tissue selected.

2.2 西施舌即墨鳌山群体的同工酶多态性与遗传变异

对 11 种酶进行了多态性的初步分析,结果表明,11 种酶共记录了 17 个基因座位,其中 ADH、EST-1、MDH-1、PGM、SOD-1 和 XDH 等 6 个基因

座位呈多态,多态位点比例为 35.3%,酶谱如图 1 所示。平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 和预期杂合度 ( $H_e$ ) 分别为 0.360 和 0.519,平均等位基因数目 ( $N_a$ ) 为 4.40 (表 3)。 $F_{IS}$  值显示位点 *SOD-1* 和 *XDH* 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P<0.05$ ,表 3)。

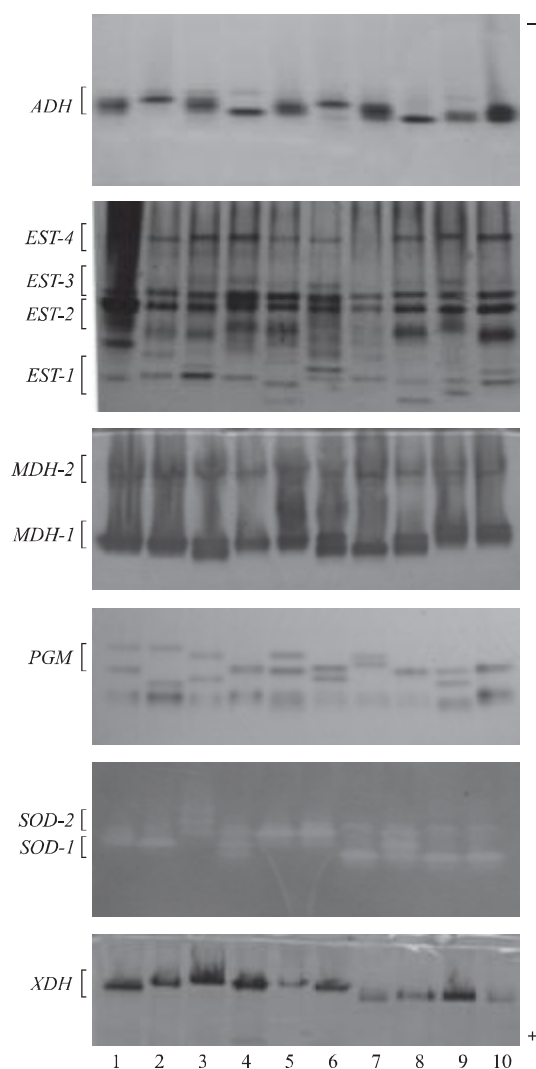


图 1 西施舌 6 种酶的电泳图谱,其中 *ADH*、*EST-1*、*MDH-1*、*PGM*、*SOD-1* 和 *XDH* 为多态位点,1-10 代表不同的个体

Fig. 1 Electrophoresis patterns of the six enzymes in *Coelomactra antiquata*. *ADH*, *EST-1*, *MDH-1*, *PGM*, *SOD-1* and *XDH* were polymorphic loci; 1-10 represent different individuals

表 3 西施舌即墨群体 6 个同工酶多态位点的基因频率、平均等位基因数 ( $N_a$ )、观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ ) 与固定指数 ( $F_{IS}$ )

Tab.3 Allozyme allele frequencies, mean allele number ( $N_a$ ), observed heterozygosities ( $H_o$ ), expected heterozygosities ( $H_e$ ) and Wright's fixation index ( $F_{IS}$ ) at 6 allozyme loci for Jimo population of *Coelomactra antiquata*

| 位点<br>Locus  | 等位<br>基因数<br>Allele nos. | 基因频率<br>Allele<br>frequency | 检测<br>个体数<br>$n$ | 固定<br>指数<br>$F_{IS}$ |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|------------------|----------------------|
| <i>ADH</i>   | 90                       | 0.033                       | 30               | 0.026                |
|              | 100                      | 0.367                       |                  |                      |
|              | 110                      | 0.600                       |                  |                      |
| <i>EST-1</i> | 80                       | 0.107                       | 28               | 0.200                |
|              | 90                       | 0.321                       |                  |                      |
|              | 100                      | 0.339                       |                  |                      |
|              | 110                      | 0.125                       |                  |                      |
| <i>MDH-1</i> | 120                      | 0.107                       | 31               | 0.008                |
|              | 90                       | 0.032                       |                  |                      |
|              | 100                      | 0.581                       |                  |                      |
| <i>PGM</i>   | 110                      | 0.387                       | 31               | 0.184                |
|              | 80                       | 0.048                       |                  |                      |
|              | 90                       | 0.177                       |                  |                      |
|              | 100                      | 0.387                       |                  |                      |
| <i>SOD-1</i> | 110                      | 0.242                       | 31               | 0.550 †              |
|              | 120                      | 0.145                       |                  |                      |
|              | 90                       | 0.355                       |                  |                      |
|              | 100                      | 0.468                       |                  |                      |
| <i>XDH</i>   | 110                      | 0.161                       | 31               | 1.000 †              |
|              | 120                      | 0.016                       |                  |                      |
|              | 95                       | 0.258                       |                  |                      |
|              | 100                      | 0.645                       |                  |                      |
| $N_a$        | 4.40                     |                             |                  |                      |
| $H_o$        | 0.360                    |                             |                  |                      |
| $H_e$        | 0.519                    |                             |                  |                      |

†: 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P<0.05$ ).

†: Significant departures from Hardy-Weinberg equilibria ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

本研究结果表明,在西施舌的 5 种组织中已存在较丰富和完整的酶系统,而且在表型、分布和活性上均表现出高度的组织特异性,这种差异可能与西施舌组织的生理功能与代谢方式相关。同工酶在多种双壳贝类中显示出组织特异性,如合浦

珠母贝 (*Pinctada martensii*)<sup>[9-10]</sup>、泥蚶 (*Tegillarca granosa*)<sup>[11]</sup>、3 种 蛭 类 (缢蛭, *Sinonovacula constricta*; 细长竹蛭, *Solen gracilis*; 长竹蛭, *Solen strictus*)<sup>[12]</sup> 和企鹅珠母贝 (*Pteria penguin*)<sup>[13]</sup>, 但不同种双壳贝类的同工酶在表达上又存在较大差异, 如合浦珠母贝、泥蚶与企鹅珠母贝的 EST 酶在各种组织中都有表达, 而西施舌仅在肝脏中存在, 并且这四种贝类 EST 酶在消化腺中所表达的酶带的数量也截然不同。产生这种差异的原因可能是因不同种类的进化过程及栖息环境不同而导致<sup>[11]</sup>。另外, 在酶组织特异性研究中, 存在于消化腺或肌肉中的酶染色清晰而稳定, 这表明消化腺与肌肉组织 (闭壳肌或足肌) 是西施舌同工酶研究的理想材料。

多态位点比例、等位基因数量和杂合度是评价种群遗传变异的重要参数。多态位点比例指多态的同工酶位点占全部位点的比例; 等位基因数量指在群体水平上, 1 个基因座位包含的所有等位基因的个数; 而杂合度是指每个基因座位为杂合子的平均频率。这 3 个遗传学参数的大小反映了群体遗传多样性的高低。本研究中西施舌的多态位点比例为 35.3%, 与合浦珠母贝 (38.46%~48.15%)<sup>[14]</sup>、软壳蛤 *Mya arenaria* (33%)<sup>[15]</sup> 接近, 低于太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* (47.1%~85.7%)<sup>[16]</sup>。西施舌平均每个位点的等位基因数目 ( $N_e$ ) 为 4.40, 平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 为 0.519, 高于双壳贝类的平均水平 (等位基因数量和期望杂合度范围分别为 1.27~4.00, 0.088~0.030)<sup>[17]</sup>。另外,  $F_{IS}$  值与 0 值是否显著偏离可以衡量位点是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡。本研究中  $F_{IS}$  值显示位点 *SOD-1* 和 *XDH* 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 正的  $F_{IS}$  值表明杂合子缺失导致了这两个位点的偏离。杂合子缺失在双壳贝类中普遍存在, 造成杂合子缺失的主要原因有选择、无效等位基因、近交和华伦得效应 (Wahlund effect)<sup>[18]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 王如才. 中国水生贝类原色图鉴 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1988.
- [2] 孟学平, 程汉良, 董志国. 我国西施舌研究现状及展望 [J]. 河北科技师范学院学报, 2005, 19(4): 71-75.
- [3] 刘德经, 谢开恩. 西施舌的繁殖生物学 [J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 10-15.
- [4] 刘德经, 王家滂, 谢开恩, 等. 西施舌盘架式人工立体育苗 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 39-42.
- [5] 吴进锋, 张汉华, 梁超愉, 等. 广东沿海西施舌资源及增值保护对策 [J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(3): 68-69.
- [6] Richardson B J, Baverstock P R, Adams M. Allozyme electrophoresis: a handbook for Animal Systematics and Population Studies [M]. Sydney: Academic Press, 1986, 410.
- [7] Raymond M, Rousset F. GENEPOP Version 1.2, a population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. J Hered, 1995, 86: 248-249.
- [8] Goudet J. FSTAT Version 2.9.3, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices [EB/OL]. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>, 2001.
- [9] 李广丽, 叶富良. 马氏珠母贝不同组织同工酶的比较 [J]. 水产学报, 2000, 24(5): 417-421.
- [10] 李广丽, 杜晓东, 叶富良. 合浦珠母贝同工酶的电泳分析 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(2): 17-22.
- [11] 李太武, 吕振明, 林志华, 等. 泥蚶同工酶谱在不同组织的差异研究 [J]. 海洋学报, 2004, 26(4): 125-132.
- [12] 王冬群, 李太武, 苏秀榕. 三种蛭不同组织同工酶的比较分析 [J]. 台湾海峡, 2004, 23(2): 131-137.
- [13] 余祥勇, 王梅芳, 梁飞龙, 等. 企鹅珠母贝不同组织同工酶表达的差异 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 201-206.
- [14] 杜晓东, 李广丽, 刘志刚, 等. 合浦珠母贝 2 个野生种群的遗传多样性 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 100-105.
- [15] Lasota R, Hummel H, Wolowicz M. Genetic diversity of European populations of the invasive soft-shell clam *Mya arenaria* (Bivalvia) [J]. J Mar Biol Ass UK, 2004, 84: 1051-1056.
- [16] English L J, Maguire G B, Ward R B. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia [J]. Aquaculture, 2000, 187: 283-298.
- [17] Laudien J, Flint N S, van der Bank F H, et al. Genetic and morphological variation in four populations of the surf clam *Donax serra* (Roding) from southern African sandy beaches [J]. Biochem Syst Ecol, 2003, 31: 751-772.
- [18] Gallardo M H, Penaloza L, Clasing E. Gene flow and allozymic population structure in the clam *Venus antiqua* (King of Broderip), (Bivalvia, Veneriidae) from Southern Chile [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1998, 230: 193-205.

## Allozyme tissue-specificities patterns and polymorphisms of xishishe clam, *Coelomactra antiquata*

KONG Ling-feng, LI Qi

(The Key Laboratory of Mariculture of the Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Vertical polyacrylamide gel electrophoresis was employed to investigate the tissue-specificities of allozyme and screen the polymorphic loci in the natural populations of xishishe clam, *Coelomactra antiquata* in Jimo, Shandong Province. Eighteen enzyme systems were screened preliminarily in 5 tissues including adductor muscle, gill, mantle, digestive gland and foot muscle. The results showed that the screened enzymes displayed remarkable tissue-specificities and 11 enzyme systems (ADH, AK, DIA, EST, IDH, GPI, MDH, PGM, SDH, SOD and XDH) from the muscle or digestive gland could be reliably scored. Eleven enzymes systems were encoded by 17 loci, and 6 of them revealed polymorphism among the tested 31 individuals, i.e., *ADH*, *EST-1*, *MDH-1*, *PGM*, *SOD-1* and *XDH*. The proportion of polymorphic loci was 35.3%. The average observed and expected heterozygosities were 0.360 and 0.519 respectively and the mean allele number ( $N_a$ ) was 4.40. These six allozyme marker loci would be useful for the assessment of genetic variation and population structure of this species. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (1): 178–182]

**Key words:** *Coelomactra antiquata*; polyacrylamide gel electrophoresis; allozyme; tissue-specificity; polymorphism

**Corresponding author:** LI Qi. E-mail: [qili66@mail.ouc.edu.cn](mailto:qili66@mail.ouc.edu.cn)

---

## 书 讯

由中国水产科学研究院东海水产研究所副所长、博士生导师、庄平研究员等 13 位专家撰写的专著《长江口鱼类》已由上海科学技术出版社出版。该书是我国第一部全面科学系统地论述长江口鱼类资源的著作。全书共分六章。第一章：长江口的地理特征及其生态环境；第二章：长江口的鱼类资源；第三章：主要淡水鱼类，介绍了 46 种鱼类；第四章：主要洄游鱼类和河口定居性鱼类，介绍了 53 种鱼类；第五章：主要海洋鱼类，介绍了 48 种鱼类；第六章：长江口鱼类检索，包括长江口鱼类检索表和形态图检索。书末附有鱼类彩色原图。该书为读者提供一个全面了解长江口鱼类资源及其与之相关生态环境的窗口，是一本内容丰富、全面翔实，图文并茂、通俗易懂、阅读性强的书籍。该书可供渔业资源管理人员、科研人员和大专院校师生阅读与参考，也可以作为大众的读物。全书共 80 多万字，彩色插图 12 页，定价 100 元。

由于数量有限，如需订购，请速与东海水产研究所《现代渔业信息》杂志编辑部联系。订书款可直接邮寄到编辑部或通过银行汇入东海水产研究所帐号，另加邮寄费 15 元。

联系人：徐吟梅

电 话：021-55530500

Email: [xuym\\_8@hotmail.com](mailto:xuym_8@hotmail.com)

开户银行：农业银行上海市杨浦控江路支行

开户名称：中国水产科学研究院东海水产研究所

银行帐号：03—368100040018022