

九孔鲍和杂色鲍等位酶的生化遗传分析

黎中宝^{1,2}, 田柱¹, 朱冬蕊¹, 叶承义¹

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要:应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)的养殖群体和杂色鲍(*H. diversicolor diversicolor*)的自然群体进行了10种等位酶的电泳检测和谱带遗传分析,在研究九孔鲍的18个等位酶位点和27个等位基因中,单态位点有 *Ldh*-1、*Adh*-1、*Sod*-1、*Sod*-2、*Sod*-3、*Est*-1、*Mdh*-2、*Me*-1、*Idh*-1、*Sdh*-1、*Sdh*-2、*Amy*-2、*Amy*-3,在这些位点只有一个等位基因(*Sdh*-2除外);有5个位点是多态的,它们是 *Est*-2、*Est*-3、*Mdh*-1、*Aat*-1、*Amy*-1 ($P_{0.99}$ 标准),多态位点的百分数为27.78%,在这些位点有2~4个等位基因。在研究杂色鲍的18个等位酶位点和26个等位基因中,单态位点有 *Ldh*-1、*Adh*-1、*Sod*-1、*Sod*-2、*Sod*-3、*Est*-1、*Mdh*-2、*Idh*-1、*Sdh*-1、*Sdh*-2、*Amy*-2、*Amy*-3,在这些位点只有一个等位基因;有6个位点是多态的,它们是 *Est*-2、*Est*-3、*Mdh*-1、*Me*-1、*Aat*-1、*Amy*-1 ($P_{0.99}$ 标准),多态位点的百分数为33.33%,在这些位点有2~4个等位基因。九孔鲍和杂色鲍在所有位点中共享大多数常见等位基因,因此在生化遗传上它们非常相似。本研究揭示了九孔鲍和杂色鲍群体等位酶位点及其等位基因带谱的变异式样,为九孔鲍和杂色鲍的遗传结构及遗传育种的研究提供了一批等位酶位点及其等位基因的参考图谱。

关键词:九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*);杂色鲍(*H. diversicolor diversicolor*);等位酶;生化遗传

中图分类号: Q343

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2004)02-0027-05

九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)和杂色鲍(*H. diversicolor diversicolor*)属软体动物门,腹足纲,前鳃亚纲,原始腹足目,鲍科,鲍属。本文应用等位酶电泳技术研究九孔鲍和杂色鲍等位酶的生化遗传规律,以期对九孔鲍和杂色鲍的遗传多样性、遗传结构、种质鉴定及其种质资源的保护和利用等方面的研究提供可靠依据。

1 材料和方法

2002年2月,杂色鲍(野生)取自海南省,共32粒,长4~8 cm;九孔鲍(养殖)取自福建省东山(一个群体)和漳浦(三个群体),每群体各取32粒,共128粒,长4~8 cm。样品活体当天带回实验室,活体解剖,取肌肉组织0.5 g样品加入约2~3倍体积的Tris-HCl组织缓冲液(0.01 mol/L, pH=7.0)冰浴研成匀浆,4℃ 12 000 r/min,离心15 min,弃去沉淀,上清液备用。

电泳采用垂直板型不连续聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳。本实验共检测16个酶系统,其中图片清

晰可供分析的有10个酶,18个等位酶位点,27个等位基因(九孔鲍)和26个等位基因(杂色鲍)(表1)。电泳条件和染色方法参照Taniguchi等^[1]、曾呈奎和相建海^[2]、王中仁^[3]的方法,等位酶的命名参照Shaklee等^[4]的方法,酶谱判译参照王中仁^[3]的方法。

在所附图片中,点样方式是:SOD、AMY、LDH、EST、ME、ADH的左边12个样品为九孔鲍,右边12个样品为杂色鲍;AAT、SDH、MDH、IDH的右边12个样品为九孔鲍,左边12个样品为杂色鲍。

收稿日期: 2002-08-28; 修回日期: 2003-06-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30231013);福建省自然科学基金资助项目(B0110036)。

作者简介: 黎中宝(1966-), 博士后, 副教授, 主要从事分子生态学、保护生物学和污染生态学研究, E-mail:

Lizhongbao@jmu.edu.cn

表 1 九孔鲍和杂色鲍群体研究用酶系统、E.C.代码、位点数目

Tab. 1 Enzyme systems E.C.No. numbers of loci in study of *H. diversicolor supertexta* and *H. diversicolor diversicolor*

酶系统	缩写	E.C.代码	位点数目		等位基因数目	
			九孔鲍	杂色鲍	九孔鲍	杂色鲍
超氧化物歧化酶	SOD	E.C.1.15.1.1	3	3	3	3
淀粉酶	AMY	E.C.3.2.1.1	3	3	4	4
天冬氨酸转氨酶	AAT	E.C.2.6.1.1	1	1	4	4
乳酸脱氢酶	LDH	E.C.1.1.1.27	1	1	1	1
山梨醇脱氢酶	SDH	E.C.1.1.1.14	2	2	3	2
异柠檬酸脱氢酶	IDH	E.C.1.1.1.42	1	1	1	1
酯酶	EST	E.C.3.1.1.-	3	3	6	5
苹果酸酶	ME	E.C.1.1.1.40	1	1	1	2
苹果酸脱氢酶	MDH	E.C.1.1.1.37	2	2	3	3
乙醇脱氢酶	ADH	E.C.1.1.1.1	1	1	1	1

2 结果

2.1 等位酶的表达

超氧化物歧化酶 (SOD, E.C.1.15.1.1) SOD 为四聚体酶,九孔鲍有 3 个明显的区带(负带),因此有 3 个位点编码;杂色鲍有 3 个明显的区带(负带),因此有 3 个位点编码;*Sod*-1 均由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Sod*-1a,基因型为 AA;*Sod*-2 均由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Sod*-2a,基因型为 AA;*Sod*-3 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Sod*-3a,基因型为 AA。九孔鲍在所测定的 128 个样品中只有 7 个样品具有 *Sod*-3 位点,杂色鲍在所测定的 32 个样品中只有 1 个样品具有 *Sod*-3 位点。*Sod*-2 所产生的等位酶的活性比 *Sod*-1 所产生的等位酶的活性强。SOD3 个位点的电泳图谱见图 1-1。

淀粉酶 (AMY, E.C.3.2.1.1) 九孔鲍和杂色鲍在 AMY 上表现一致,AMY 为单体酶,有 3 个明显的区带(负带),因此有 3 个位点编码,*Amy*-1 由纯合体和杂合体组成,含有 2 个等位基因 *Amy*-1a、*Amy*-1b,基因型为 AA、AB、BB;*Amy*-2 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Amy*-2a,基因型为 AA;*Amy*-3 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Amy*-3a,基因型为 AA,在 *Amy*-1 与 *Amy*-2 之间还有 2~5 条带不太清晰,在本文中没有统计。AMY3 个位点的电泳图谱见图 1-2。

天冬氨酸转氨酶 (AAT, E.C.2.6.1.1) 九孔鲍和杂色鲍在 AAT 上表现一致,AAT 为二聚体酶,含有一个明显的区带,因此由一个位点编码,*Aat*-1 有 4 个等位基因 *Aat*-1a、*Aat*-1b、*Aat*-1c、*Aat*-1d,均由杂合体组成,基因型为 AB、BD、CD。AAT 一个位点

的电泳图谱见图 1-3。

乳酸脱氢酶 (LDH, E.C.1.1.1.27) 九孔鲍和杂色鲍在 LDH 上表现一致,LDH 为四聚体,由一个位点编码,位点 *Ldh*-1 含有 1 个等位基因 *Ldh*-1a,均为纯合体,基因型为 AA。LDH 一个位点的电泳图谱见图 1-4。

山梨醇脱氢酶 (SDH, E.C.1.1.1.14) 九孔鲍和杂色鲍在 SDH 上表现一致,SDH 为单聚体,有二个位点编码,*Sdh*-1 有 1 个等位基因 *Sdh*-1a,均由纯合体组成,基因型为 AA。*Sdh*-2 有 2 个等位基因 *Sdh*-1a、*Sdh*-1b,由纯合体和杂合体组成,基因型为 AA、AB。九孔鲍在所测定的 128 个样品中只有一个样品具有 *Sdh*-1b 基因,为稀有等位基因,杂色鲍在所测定的 32 个样品中没有发现 *Sdh*-1b 基因。SDH 2 个位点的电泳图谱见图 1-5。

异柠檬酸脱氢酶 (IDH, E.C.1.1.1.42) 九孔鲍和杂色鲍在 IDH 上表现一致,IDH 为二聚体酶,有一个明显的区带,因此有一个位点编码,*Idh*-1 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Idh*-1a,基因型为 AA。IDH 一个位点的电泳图谱见图 2-1。

酯酶 (EST, E.C.3.1.1.-) 九孔鲍和杂色鲍在 EST 上表现一致,EST 为单体酶,由明显的 3 个区带,因此有 3 个位点编码,*Est*-1 有 1 个等位基因 *Est*-1a,均由纯合体组成,基因型为 AA;*Est*-2 含有 2 个等位基因 *Est*-2a、*Est*-2b,由纯合体和杂合体组成,基因型为 AA、AB、BB;*Est*-3 含有 3 个等位基因 *Est*-3a、*Est*-3b、*Est*-3c,由纯合体和杂合体组成,基因型为 AA、AB、BB、AC。EST 3 个位点的电泳图谱见图 2-2。

苹果酸酶 (ME, E.C.1.1.1.40) 九孔鲍和杂色

鲍在 ME 上表现一致, ME 为四聚体酶,有一个明显的区带,因此由一个位点编码, *Me - 1* 由纯合体组成,含有 2 个等位基因 *Me - 1a*、*Me - 1b*, 基因型为 AA、BB。ME 一个位点的电泳图谱见图 2-3。

苹果酸脱氢酶(MDH, E.C. 1.1.1.37) 九孔鲍和杂色鲍在 MDH 上表现一致, MDH 为二聚体酶,有 2 个明显的区带,因此由 2 个位点编码, *Mdh - 1* 由纯合体和杂合体组成,含有 2 个等位基因 *Mdh - 1a*、*Mdh - 1b*, 基因型为 AA、AB、BB。 *Mdh - 2* 均由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Mdh - 2a*, 基因型为 AA。在 *Mdh - 1* 与 *Mdh - 2* 之间还有 2~3 条带不太清晰,在本文中没有统计。MDH 2 个位点的电泳图谱见图 2-4。

乙醇脱氢酶(ADH, E. C. 1.1.1.1) 九孔鲍和杂色鲍在 ADH 上表现一致, ADH 为二聚体酶,有一个明显的区带,因此由一个位点编码, *Adh - 1* 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Adh - 1a*, 基因型为 AA。ADH 一个位点的电泳图谱见图 2-5。

2.2 多态位点

根据上述分析,在研究九孔鲍的 18 个等位酶位点和 27 个等位基因中,单态位点有 *Ldh - 1*、*Adh - 1*、*Sod - 1*、*Sod - 2*、*Sod - 3*、*Est - 1*、*Mdh - 2*、*Me - 1*、*Idh - 1*、*Sdh - 1*、*Sdh - 2*、*Amy - 2*、*Amy - 3*, 在这些位点只有一个等位基因(*Sdh - 2* 除外); 有 5 个位点是多态的, 它们是 *Est - 2*、*Est - 3*、*Mdh - 1*、*Aat - 1*、*Amy - 1* ($P_{0.99}$ 标准), 多态位点的百分数(P)为 27.78%, 这些多态位点分析到 2~4 个等位基因。在研究杂色鲍的 18 个等位酶位点和 26 个等位基因中, 单态位点有 *Ldh - 1*、*Adh - 1*、*Sod - 1*、*Sod - 2*、*Sod - 3*、*Est - 1*、*Mdh - 2*、*Idh - 1*、*Sdh - 1*、*Sdh - 2*、*Amy - 2*、*Amy - 3*, 在这些位点只有一个等位基因; 有 6 个位

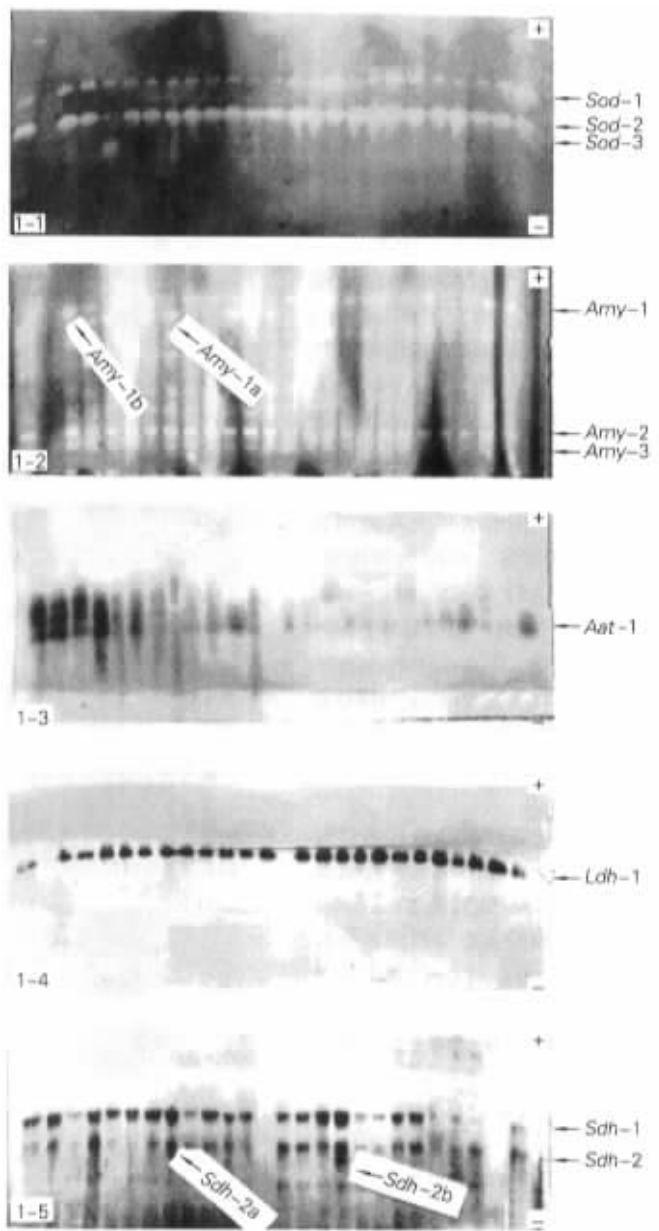


图 1 九孔鲍和杂色鲍的电泳图谱

Fig. 1 Allozyme electrophoretogram of *Haliotis diversicolor supertexta* and *H. diversicolor diversicolor*

1-1. SOD; 2. AMY; 1-3. AAT; 1-4. LDH; 1-5. SDH

点是多态的, 它们是 *Est - 2*、*Est - 3*、*Mdh - 1*、*Me - 1*、*Aat - 1*、*Amy - 1* ($P_{0.99}$ 标准), 多态位点的百分数(P)

为 33.33% ,这些多态位点中也分析到 2~4 个等位基因。

3 讨论

九孔鲍和杂色鲍在形态上和生态上非常相似。实验结果表明,九孔鲍和杂色鲍在所有位点中共享大多数常见等位基因。因此作者认为在生化遗传上它们也非常相似。外国学者 Fujino 等^[5]比较研究了皱纹盘鲍和盘鲍酶谱, Sasaki 等^[6]比较研究了日本海域 5 种鲍酶谱异同。我国学者杨锐等^[7]比较研究了太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 和山东褶牡蛎 (*C. plicatula*) 的遗传差异, 魏贻尧等^[8]比较研究了 3 种珠母贝的酶谱。

实验结果同时也表明九孔鲍和杂色鲍 SDH 为单体酶、AMY 为单体酶、EST 为单体酶、AAT 为二聚体酶。MDH 有细胞质 (s-MDH) 和线粒体 (m-MDH) 两种类型, 即本文中的 *Mdh*-1、*Mdh*-2。IDH 有细胞质 (s-IDH) 类型, 即本文中的 *Idh*-1。九孔鲍和杂色鲍的 AMY 的活性较强, 这与其以藻类为食相关。

多态位点的百分数是遗传多样性的主要指标之一, 海湾扇贝各养殖群体的多态位点的百分数在 27.27% ~ 36.36%^[9]。魁蚶的多态位点的百分数是 45.5% ~ 62.96%^[10]。合浦珠母贝的多态位点的百分数为 46.1%^[11]。褶牡蛎自然群体和太平洋牡蛎的多态位点的百分数分别为 55% ~ 60% 和 55%^[8]。皱纹盘鲍自然群体的多态位点的百分数为 31.3%^[12]。九孔鲍养殖群体和杂色鲍自然群体的多态位点的百分数分别是 27.78% 和 33.33%。由此可见, 九孔鲍和杂色鲍的多态位点的百分数在所研究的贝类中居中等的位置, 具体原因尚需进一步的研究。对多态位点的研究, 可将不同基因型的个体进行杂交, 能筛选出具优良性状 (抗病、促长等) 的子代, 人工优良新品系可定向地建立。

本研究揭示了九孔鲍和杂色鲍群体等位酶位点及其等位基因带谱的变异式样, 为九孔鲍和杂色鲍的

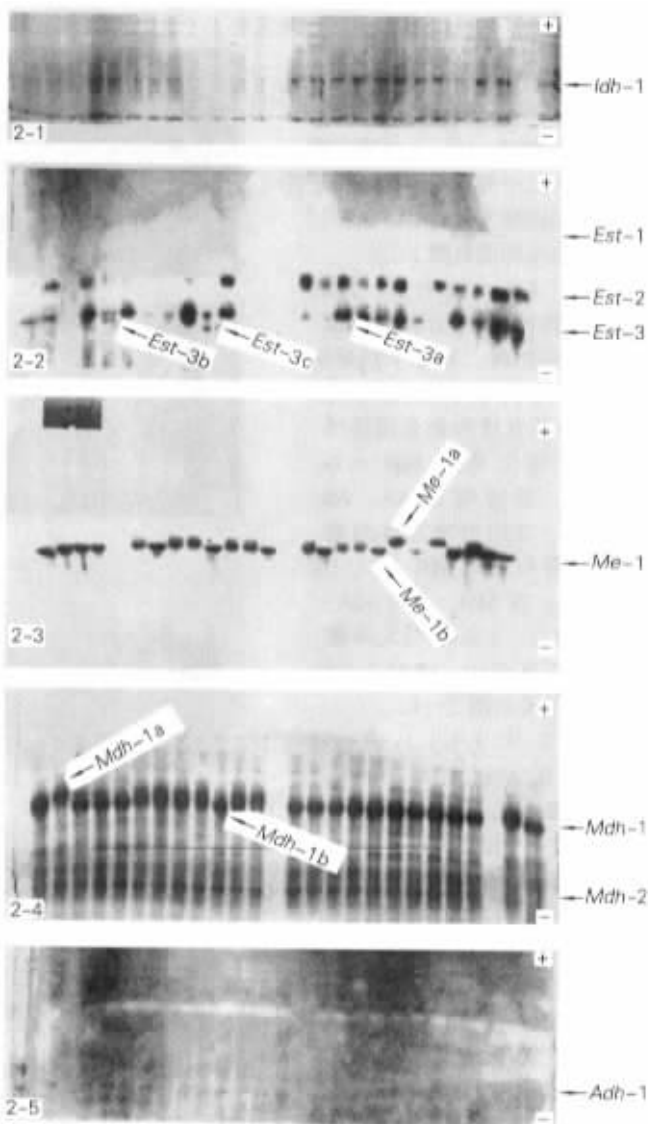


图 2 九孔鲍和杂色鲍的电泳图谱

Fig. 2 Allozyme electrophoretogram of *Haliotis diversicolor supertexta* and *H. diversicolor diversicolor*

2-1. IDH; 2-2. EST; 2-3. ME; 2-4. MDH; 2-5. ADH

遗传多样性、遗传结构及遗传育种的研究提供了一批等位酶位点及其等位基因的参考图谱。

参考文献:

- [1] Taniguchi N, Sugama K. Genetic variation and population structure of red sea bream in the coastal waters of Japan and the East China Sea[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56(7): 1 069-1 077.

- [2] 曾呈奎, 相建海. 海洋生物技术[M]. 济南: 山东科技出版社, 1998. 269 – 282.
- [3] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 77 – 119.
- [4] Shaklee J B, Allendorf F W, Morizot D C, *et al.* Genetic nomenclature for protein – coding loci in fish[J]. **Trans Amer Fish Soci**, 1990, 119: 2 – 15.
- [5] Fujino K, Sasaki K, Okumura S. Probable involvement of thermostability variations of enzymes in the mechanisms of occurrence of deficient abalone[J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1984, 50(4): 597 – 601.
- [6] Sasaki K. Zymogram differences among five species of abalones from the coasts of Japan[J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1980, 46(9): 1 169 – 1 175.
- [7] 杨锐, 喻子牛, 陈再忠, 等. 山东沿海褶牡蛎与太平洋牡蛎等位基因酶的遗传变异[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 130 – 133.
- [8] 魏贻尧, 姜卫国, 李刚. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大珠母贝种间人工杂交的研究[J]. 热带海洋, 1983, 2(4): 309 – 327.
- [9] 张喜昌, 梁玉波, 刘仁沿, 等. 海湾扇贝各养殖群体遗传多样性的研究[J]. 海洋学报, 2002, 24(2): 107 – 113.
- [10] 喻子牛, 孔晓瑜, 杨锐, 等. 魁蚶等位基因酶遗传变异的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1): 51 – 58.
- [11] 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.
- [12] Hara M, Kikuchi S. Genetic variability and population structure in the abalone, *Haliotis discus hannai*[J]. **Bulletin of Tohoku National Fisheries Research Institute**, 1992, 54(2): 107 – 111.

Biochemical genetic analysis of allozymes of *Haliotis diversicolor supertexta* and *Haliotis diversicolor diversicolor*

LI Zhong – bao^{1,2}, TIAN Zhu¹, ZHU Dong – rui¹, YE Cheng – yi¹

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. School of Ocean – Environment, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Aug., 28, 2002

Key words: *Haliotis diversicolor supertexta*; *Haliotis diversicolor diversicolor*; allozyme; biochemical genetics

Abstract Biochemical genetics were investigated using the assay of vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis in *Haliotis diversicolor supertexta* and *Haliotis diversicolor diversicolor*. Ten enzymes presumably encoded by 18 allozyme loci and 27 alleles were scored in *H. diversicolor supertexta*, the monomorphic loci were *Ldh* – 1, *Adh* – 1, *Sod* – 1, *Sod* – 2, *Sod* – 3, *Est* – 1, *Mdh* – 2, *Me* – 1, *Idh* – 1, *Sdh* – 1, *Sdh* – 2, *Amy* – 2, *Amy* – 3 (except *Sdh* – 2); and 5 loci with 2 ~ 4 alleles were polymorphic, they were *Est* – 2, *Est* – 3, *Mdh* – 1, *Aat* – 1, *Amy* – 1. The percentage of polymorphic loci ($P_{0.99}$) is 27.78%. Ten enzymes presumably encoded by 18 allozyme loci and 26 alleles were scored in *H. diversicolor diversicolor*, the monomorphic loci were *Ldh* – 1, *Adh* – 1, *Sod* – 1, *Sod* – 2, *Sod* – 3, *Est* – 1, *Mdh* – 2, *Idh* – 1, *Sdh* – 1, *Sdh* – 2, *Amy* – 2, *Amy* – 3, and 6 loci with 2 ~ 4 alleles are polymorphic, they are *Est* – 2, *Est* – 3, *Mdh* – 1, *Me* – 1, *Aat* – 1, *Amy* – 1. The polymorphic loci ($P_{0.99}$) percentage was 33.33%. *H. diversicolor supertexta* and *H. diversicolor diversicolor* shared most common alleles in all loci, they are biochemically genetically very similar. The bands represented loci and alleles of *H. diversicolor supertexta* and *H. diversicolor diversicolor* are showed in this paper. This paper shows the genetic diversity and structure of *H. diversicolor supertexta* and *H. diversicolor diversicolor* through comparative diagrams of allozymes.

(本文编辑 张培新)