

盘鲍和皱纹盘鲍等位酶的生化遗传分析

黎中宝^{1,2}, 邓书林¹, 许秀芹¹, 丁 洋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, 对盘鲍(*Haliotis discus discus*)和皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)的养殖群体进行了10种等位酶的电泳检测和谱带遗传分析。确定了盘鲍的18个等位酶位点及21个等位基因, 单态位点有15个; 仅有3个位点是多态的, 它们是*Sod-1*, *Est-3*, *Mdh-1* ($P_{0.99}$ 标准), 多态位点的百分数为16.67%, 这些多态位点分析到2个等位基因。确定了皱纹盘鲍的18个等位酶位点及20个等位基因, 单态位点有16个; 仅有2个位点是多态的, 它们是*Sod-1*, *Est-3* ($P_{0.99}$ 标准), 多态位点的百分数为11.11%, 这些多态位点中也分析到2个等位基因。盘鲍和皱纹盘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。该研究揭示了盘鲍和皱纹盘鲍养殖群体等位酶位点及其等位基因带谱的变异式样, 为盘鲍和皱纹盘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: 盘鲍(*Haliotis discus discus*); 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*); 等位酶; 生化遗传

中图分类号: Q55; Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096-(2004)04-0043-05

盘鲍(*Haliotis discus discus*)和皱纹盘鲍(*H. discus hannai*), 属软体动物门, 腹足纲, 前鳃亚纲, 原始腹足目, 鲍科, 鲍属(*Haliotis*)。近年来, 盘鲍和皱纹盘鲍增殖养殖业的迅猛发展, 对盘鲍和皱纹盘鲍的种质资源及遗传多样性产生了不可低估的影响。作者应用等位酶电泳技术研究盘鲍和皱纹盘鲍等位酶的生化遗传特征, 以期对盘鲍和皱纹盘鲍的遗传多样性、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, 皱纹盘鲍(养殖)取自山东省荣成市, 共36粒, 体长3~5 cm; 盘鲍(养殖)取自福建省东山, 共36粒, 体长3~5 cm。所有样品活体(充氧)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 °C 离心15 min, 12 000 r/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。该实验共检测16个酶系统, 其中图片清晰可供分析的有10个酶, 18个酶位点、21个等

位基因(盘鲍)和20个等位基因(皱纹盘鲍), 见表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, AAT, IDH, EST和MDH的左边12个样品为盘鲍, 右边12个样品为皱纹盘鲍; LDH, SDH, ME和ADH的右边12个样品为盘鲍, 左边12个样品为皱纹盘鲍。

2 结果

2.1 等位酶的表达

SOD: 盘鲍和皱纹盘鲍在SOD上表现一致, SOD为四聚体酶, 有2个明显的区带(负带), 因此由2个位点编码, *Sod-1*均由杂合体组成, 含有2个等位

收稿日期: 2003-04-14; 修回日期: 2003-06-10

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-), 男, 河南咕始人, 副教授, 博士后, 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

基因 *Sod-1a*、*Sod-1b*, 基因型为 AB; *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-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。SOD 二个位点的电泳图谱见图 1-1。

表 1 盘鲍和皱纹盘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.discus discus* and *H.discus hannai*

酶系统(缩写)	E. C. 代码	位点数目		等位基因数目	
		盘鲍	皱纹盘鲍	盘鲍	皱纹盘鲍
超氧化物歧化酶 (SOD)	E.C.1.15.1.1	2	2	3	3
淀粉酶 (AMY)	E.C.3.2.1.1	3	3	3	3
天冬氨酸转氨酶 (AAT)	E.C.2.6.1.1	3	3	3	3
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	1	1	1	1
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	4	4
苹果酸酶 (ME)	E.C.1.1.1.40	1	1	1	1
苹果酸脱氢酶 (MDH)	E.C.1.1.1.37	2	2	3	2
乙醇脱氢酶 (ADH)	E.C.1.1.1.1	1	1	1	1

AMY: 盘鲍和皱纹盘鲍在 AMY 上表现一致, AMY 为单体酶, 有 3 个明显的区带(负带), 因此由 3 个位点编码, 均为单态; 图谱下面还有 2 条带不太清晰, 在该文中没有统计。AMY 3 个位点的电泳图谱见图 1-2。

AAT: 盘鲍和皱纹盘鲍在 AAT 上表现一致, AAT 为二聚体酶, 含有 3 个明显的区带, 因此由 3 个位点编码, 均为单态。AAT 3 个位点的电泳图谱见图 1-3。

LDH: 盘鲍和皱纹盘鲍在 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。

SDH: 盘鲍和皱纹盘鲍在 SDH 上表现一致, SDH 为单聚体, 由一个位点编码, *Sdh-1* 有 1 个等位基因 *Sdh-1a*, 均由纯合体组成, 基因型为 AA。SDH 一个位点的电泳图谱见图 1-5。

IDH: 盘鲍和皱纹盘鲍在 IDH 上表现一致, IDH 为二聚体酶, 有一个明显的区带, 因此由一个位点编码, *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。

EST: 盘鲍和皱纹盘鲍在 EST 上表现一致, EST 为单体酶, 有明显的 3 个区带, 因此由 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 1 个等位基因 *Est-2a*, 均由纯合体组成, 基因型为 AA; *Est-3* 含有 2 个等位基因 *Est-3a*, *Est-3b*, 由纯合体和杂合体组成, 基因型为 AA, AB, BB。EST 3 个位点的电泳图谱见图 2-2。

ME: 盘鲍和皱纹盘鲍在 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 1 个等位基因 *Me-1a*, 基因型为 AA。ME 一个位点的电泳图谱见图 2-3。

MDH: 盘鲍和皱纹盘鲍在 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, 盘鲍的 *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 AB, BB; 皱纹盘鲍的 *Mdh-1* 由纯合体组成, 含有 1 个等位基因 *Mdh-1b*, 基因型为 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。MDH 2 个位点的电泳图谱见图 2-4。

ADH: 盘鲍和皱纹盘鲍在 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。

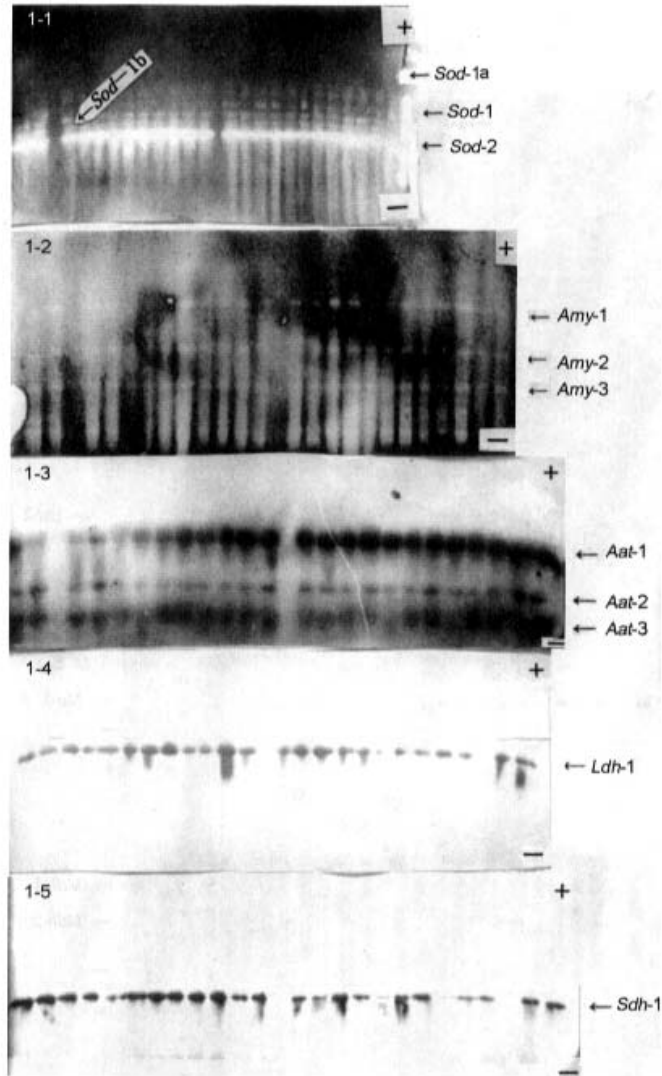


图1 盘鲍和皱纹盘鲍的电泳图谱

Fig.1 Allozyme electrophoretogram of *Haliotis discus discus* and *H. discus hannai*
1-1.SOD; 1-2.AMY; 1-3.AAT; 1-4.LDH; 1-5.SDH

2.2 多态位点

根据上述分析, 在研究盘鲍的 18 个等位酶位点和 21 个等位基因中, 单态位点有 15 个; 仅有 3 个

位点是多态的, 它们是 *Sod-1*, *Est-3*, *Mdh-1* ($P_{0.99}$ 标准), 多态位点的百分数为 16.67%, 这些多态位点分析到 2 个等位基因。在研究皱纹盘鲍的 18 个

等位酶位点和 20 个等位基因中, 单态位点有 16 个;
仅有 2 个位点是多态的, 它们是 *Sod-1*, *Est-3* ($P_{0.99}$

标准), 多态位点的百分数为 11.11%, 这些多态位点中也分析到 2 个等位基因。

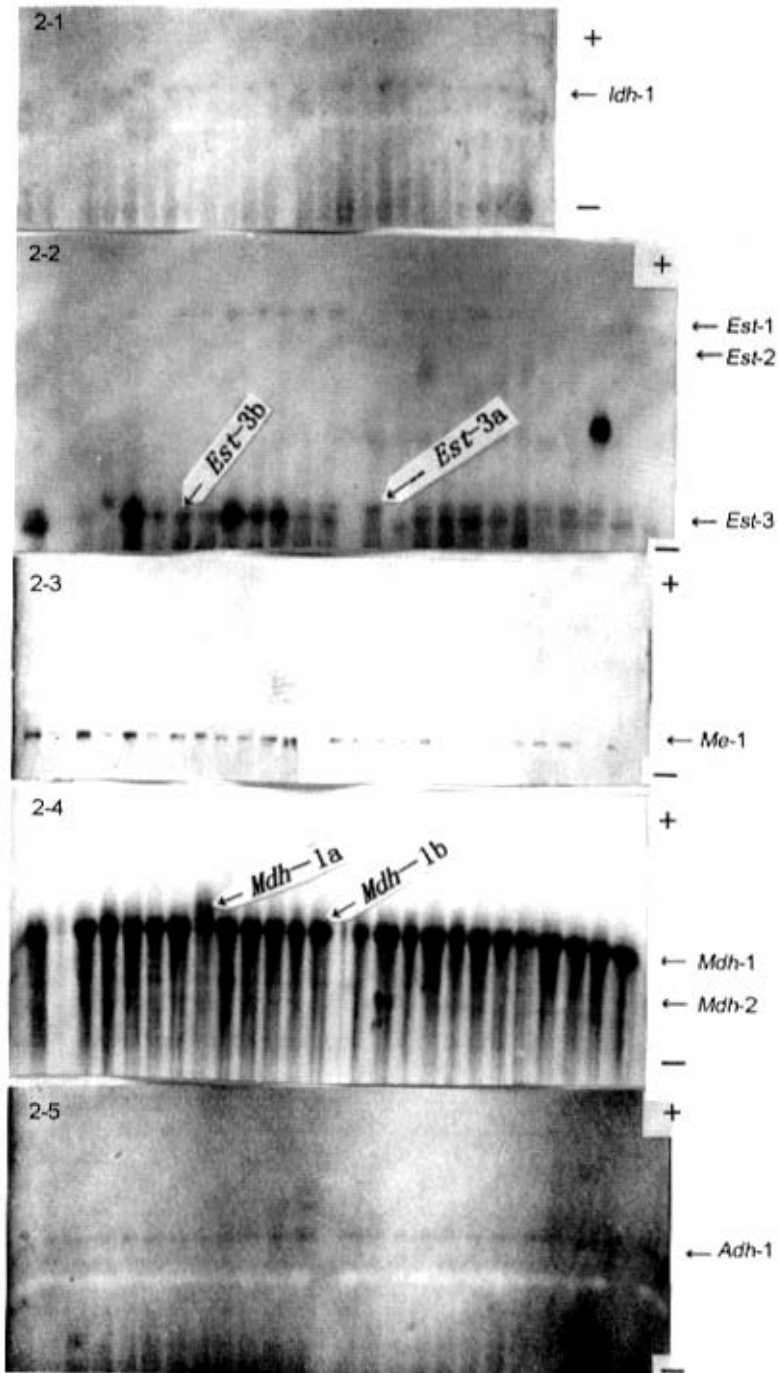


图 2 盘鲍和皱纹盘鲍的电泳图谱

Fig.2 Allozyme electrophoretogram of *Haliotis discus discus* and *H. discus hannai*
2-1.IDH; 2-2.EST; 2-3.ME; 2-4.MDH; 2-5.ADH

3 讨论

盘鲍和皱纹盘鲍在形态上和生态上非常相似。该实验结果表明盘鲍和皱纹盘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。九孔鲍和杂色鲍在所有位点中共享大多数常见等位基因,它们在生化遗传上非常相似^[5]。外国学者也比较研究了日本海域5种鲍酶谱异同^[6]以及皱纹盘鲍和盘鲍酶谱^[7]。中国学者比较研究了3种珠母贝的酶谱^[8]以及太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)和山东褶牡蛎(*C. plicatula*)的遗传差异^[9]。另外,盘鲍和皱纹盘鲍的SOD(Sod-1为杂合体),SDH, AAT(3个位点均为纯合体)的位点数目分别有2, 1, 3。而九孔鲍和杂色鲍的SOD(Sod-1为纯合体),SDH, AAT的位点数目分别有3, 2, 1^[5]。因此,用SOD, SDH, AAT 3种酶可作为盘鲍和皱纹盘鲍同九孔鲍和杂色鲍群体的生化遗传标记。

实验结果同时表明盘鲍和皱纹盘鲍的SOD为四聚体酶、EST为单体酶。盘鲍和皱纹盘鲍的MDH有细胞质(s-MDH)和线粒体(m-MDH)2种类型,即文中的*Mdh-1*, *Mdh-2*; IDH只有细胞质(s-IDH),这和九孔鲍和杂色鲍的结果一致^[5]。盘鲍和皱纹盘鲍的AMY的活性较强,这与其以藻类为食相关,九孔鲍和杂色鲍亦然^[5]。

遗传多样性的主要指标之一是多态位点的百分数,海湾扇贝各养殖群体的多态位点的百分数在27.27%~36.36%^[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%, 55%^[9]。魁蚶的多态位点的百分数是45.5%~62.96%^[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33.33%, 35.3%^[5]。而盘鲍和皱纹盘鲍养殖群体的多态位点百分数分别是16.67%, 11.11%。由此可见,盘鲍和皱纹盘鲍的多态位点的百分数在所研究的贝类中较低。皱纹盘鲍自然群体的多态位点的百分数为31.3%^[13],大于其养殖群体多态位点的百分数(该研究为11.11%)。造成皱纹盘鲍和盘鲍的多态位点的百分数较低可能与养殖有关,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,可

定向地建立人工优良新品系。

该研究揭示了盘鲍和皱纹盘鲍群体等位酶位点及其等位基因带谱的变异式样,为盘鲍和皱纹盘鲍的遗传多样性、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. *Trans Amer Fish Soci*, 1990, 119: 2-15.
- [5] 黎中宝, 田柱, 朱冬蕊, 等. 九孔鲍和杂色鲍等位酶的生化遗传分析[J]. 海洋科学, 2004, 28(2): 27-32.
- [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] 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.
- [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] 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.
- [10] 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): 107-11.
- [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] 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.
- [13] 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): 107-114.

(下转第75页)



- son of ASE and SPE with Soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter[J]. *Anal Chem*, 1997, **69**(11): 2 171-2 180.
- [22] Richter B E, Jones B A, Ezzell J L, *et al.* Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation[J]. *Anal Chem*, 1996, **68**(6): 1 033-1 039.
- [23] Erland B, Tobias N. Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2000, **19** (7): 434-445.
- [24] Saim N, Dean J R, Abdullah M P, *et al.* An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction[J]. *Anal Chem*, 1998, **70** (2): 420-424.
- [25] Kenny D W, Olesik S V. Extraction of lignite coal fly ash for polynuclear aromatic hydrocarbons: modified and unmodified supercritical fluid extraction, enhanced-fluidity solvents, and accelerated solvent extraction[J]. *J Chromatogr Sci*, 1998, **36**: 59-65.

(本文编辑: 张培新)

(上接第 47 页)

Biochemical genetic analysis of allozymes of *Haliotis discus discus* and *Haliotis discus hannai*

LI Zhong-bao^{1,2}, DENG Shu-lin¹, DING Yang¹, XU Xiu-qin¹

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

Received: Apr., 14, 2003

Key words: *Haliotis discus discus*; *H. discus hannai*; allozyme; biochemical genetics

Abstract : Biochemical genetics was investigated using the assay of vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis in *Haliotis discus discus* and *H. discus hannai*. Ten enzymes presumably encoded by 18 allozyme loci and 21 alleles are scored in *H. discus discus*, the monomorphic loci are *Ldh-1*, *Adh-1*, *Sod-2*, *Est-1*, *Est-2*, *Mdh-2*, *Me-1*, *Idh-1*, *Sdh-1*, *Aat-1*, *Aat-2*, *Aat-3*, *Amy-1*, *Amy-2*, *Amy-3*; and 3 loci with two alleles are polymorphic being, *Sod-1*, *Est-3*, *Mdh-1*. The percentage of polymorphic loci ($P_{0.99}$) is 16.67%. And ten enzymes presumably encoded by 18 allozyme loci and 20 alleles are scored in *H. discus hannai*, the monomorphic loci are *Ldh-1*, *Adh-1*, *Sod-2*, *Est-1*, *Est-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Me-1*, *Idh-1*, *Sdh-1*, *Aat-1*, *at-2*, *Aat-3*, *Amy-1*, *Amy-2*, *Amy-3*, and 2 loci with two alleles are polymorphic, which are *Sod-1*, *Est-3*. The percentage of polymorphic loci ($P_{0.99}$) is 11.11%. *H. discus discus* and *H. discus hannai* shared most of common alleles in all loci, Therefore they are very similar in biochemical genetic. This study revealed the basic genetic diversity and genetic structure of *H. discus discus* and *H. discus hannai* and provided comparable diagrams of allozymes for the researchers in this field.

(本文编辑: 张培新)