

文章编号: 1000-0615(2006)02-0156-05

## 五种海洋生物葡萄糖磷酸变位酶和磷酸葡萄糖异构酶的同工酶分析

王伟继<sup>1</sup>, 杨翠华<sup>1,2</sup>, 孔杰<sup>1</sup>, 王清印<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**采用水平淀粉凝胶电泳方法对虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)、刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)和虾夷扇贝(*Pecten yessoensis*)不同组织中的葡萄糖磷酸变位酶(PGM)和磷酸葡萄糖异构酶(GPI)进行了检测分析。结果发现, 虾夷马粪海胆肌肉组织和成熟性腺组织中的PGM有较强的表达活性和表达位点差异, 两种组织中GPI活性稍差。刺参的肠道组织和肌肉组织只有PGM和GPI表达活性的差异, 而无位点差异。半滑舌鲷肌肉组织检测到两个PGM位点, 三个GPI位点。文蛤闭壳肌组织PGM表现出非常高的多态性, 而GPI表现为单态。虾夷扇贝闭壳肌组织的PGM和GPI各只检测到一个位点, 遗传变异程度比较低。以PGM和GPI为指标, 对我国北方5种重要海水养殖品种的同工酶遗传变异水平和其它相关遗传参数进行了分析, 对群体遗传结构可能的变化规律以及与某些性状的相关性进行了探讨, 这些参数对它们的遗传选育有一定的指导作用。

**关键词:** 虾夷马粪海胆; 刺参; 半滑舌鲷; 文蛤; 虾夷扇贝; 同工酶; 葡萄糖磷酸变位酶; 磷酸葡萄糖异构酶

中图分类号: S917 文献标识码: A

## Isozyme analysis of PGM and GPI in five marine organisms

WANG Wei-ji<sup>1</sup>, YANG Cui-hua<sup>1,2</sup>, KONG Jie<sup>1</sup>, WANG Qing-yin<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Marine Life College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Horizontal starch gel electrophoresis was used to detect the genetic variation of PGM and GPI in five marine organisms, sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*), sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka), sole (*Cynoglossus semilaevis*), hard clam (*Meretrix meretrix*) and scallop (*Pecten yessoensis*). For sea urchin, the PGM showed high expression activity in muscle and mature gonad and the loci number was different in the two tissues, while the activity of GPI was rather low. The isozyme demonstrated the same number of loci in the muscle and intestines of sea cucumber, but their activity was quite different. Two PGM loci and three GPI loci were detected in sole's muscle. For the hard clam adductor, the PGM showed high polymorphism and GPI showed monomorphism. One PGM locus and one GPI locus were detected in adductor muscle of the scallop, indicating the low variation of two enzymes. The genetic parameters and genetic variation of PGM and GPI were analyzed for these marine cultured species in Northern China. The genetic structure and relationship between genetic parameters and economic traits were discussed, which will be important in selective breeding programs.

**Key words:** *Strongylocentrotus intermedius*; *Apostichopus japonicus*; *Cynoglossus semilaevis*; *Meretrix meretrix*; *Pecten yessoensis*; isozyme; PGM; GPI

收稿日期: 2005-01-04

资助项目: 科技部基础性研究项目《重要海水养殖动物种质资源收集、整理与保存(2003-2005)》

作者简介: 王伟继(1972-), 男, 陕西韩城人, 硕士, 主要从事海水主要养殖动物遗传育种和分子生物学研究。Tel: 0532-85823291,

E-mail: wangwj@ysfi.ac.cn

同工酶技术自从 20 世纪 60 年代产生以来, 在遗传学、发育生物学、疾病检测等方面得到了广泛的应用。在海洋生物中, 主要应用于群体遗传分析<sup>[1-3]</sup>, 发育生物学<sup>[4]</sup>, 组织表达差异<sup>[5]</sup>, 细胞工程<sup>[6]</sup>, 遗传育种<sup>[7]</sup>和病害检测等方面。在海洋生物遗传分析中, 经常检测的同工酶种类包括乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、苹果酸酶(ME)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)、磷酸葡萄糖变位酶(PGM)和葡萄糖磷酸异构酶(GPI)。这些酶由于在能量代谢和营养物质的转换利用过程中起着非常关键的作用, 酶活性表达比较强, 因而也成为主要的分析酶类。其中 PGM 和 GPI 分析检测的频率在这些酶中更显突出。据统计, PGM 和 GPI 在贝类的研究频率高达 90%<sup>[8]</sup>。PGM 在能量代谢过程中, 催化机体的葡萄糖-1-磷酸生成葡萄糖-6-磷酸, 这个反应是一个可逆的过程, 生成的葡萄糖-1-磷酸和葡萄糖-6-磷酸分别是合成糖原和葡萄

糖的前体。GPI 在糖代谢的过程中催化 6-磷酸葡萄糖转变为 6-磷酸果糖。虾夷马粪海胆、刺参、半滑舌鲷、文蛤和虾夷扇贝是我国北方沿海几种重要的海水养殖物种。本文研究了 PGM 和 GPI 在上述 5 个物种部分组织的表达情况, 并对其控制位点和群体遗传结构进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

虾夷马粪海胆、刺参、半滑舌鲷、文蛤和虾夷扇贝样品采集时间和地点如表 1。

### 1.2 实验方法

样品活体运回实验室解剖, 取其各种器官组织, 分装到 1.5 mL 离心管中, -76 °C 保存。样品的制备、水平淀粉凝胶的制备、电泳、染色和位点的命名统计等参照文献[1, 2]方法进行。

表 1 样品采集时间和地点  
Tab. 1 Sampling time and locations

序号 no.	样品 samples	数量 number	地点 location	时间 time
1	虾夷马粪海胆 <i>Strongylocentrotus intermedius</i>	50	辽宁大连海域 Dalian sea area, Liaoning	2004-11-10
2	刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	50	山东省荣成海域 Rongcheng sea area, Shandong	2004-11-15
3	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	50	山东海阳黄海水产有限公司 Huang Hai Aquaculture Co. Ltd. Haiyang, Shandong	2002-10-16
4	文蛤 <i>Meretrix meretrix</i>	50	辽宁大连海域 Dalian sea area, Liaoning	2004-08-10
5	虾夷扇贝 <i>Pecten yessoensis</i>	50	辽宁大连海域 Dalian sea area, Liaoning	2004-08-09

## 2 结果

### 2.1 虾夷马粪海胆

对虾夷马粪海胆雄性个体和雌性个体的成熟性腺组织和口器的肌肉组织分别取样分析。肌肉组织 PGM 只有 *Pgm-2* 一个位点表达, 表现为单态。雄性性腺组织中 PGM 有 *Pgm-1*, *Pgm-2* 和 *Pgm-3* 三个位点表达, 其中 *Pgm-1* 为多态位点(图版-1), 在该位点检测到 4 种等位基因, 位点杂合度观测值  $He(P_{0.99})$  为 0.34, 杂合子平衡偏离指数  $D$  为 +0.0474。雌性性腺组织的 PGM 表达和雄性相同。GPI 在海胆肌肉组织和性腺组织均表达为 3 个位点, 其中 *Gpi-1* 和 *Gpi-2* 为单态位点,

*Gpi-3* 为多态位点。

### 2.2 刺参

分析了刺参体壁的肌肉组织和消化道组织的 PGM 和 GPI。PGM 在肌肉组织的活性稍高于在肠道中的活性, 但是比肠道少 *Pgm-3* 位点。肠道 *Pgm-1* 为多态位点, 该位点检测到四种等位基因, 杂合子观测值  $He(P_{0.99})$  为 0.38, 杂合子平衡偏离指数  $D$  为 -0.3045。 *Pgm-2* 和 *Pgm-3* 为单态位点(图版-2)。GPI 在刺参肌肉组织和肠道组织中的表达一致, 1 个位点表达, 多态(图版-3), 检测到 4 种等位基因。杂合子观测值  $He(P_{0.99})$  为 0.14, 杂合子平衡偏离指数  $D$  值的为 +0.057。

### 2.3 半滑舌鳎

半滑舌鳎肌肉组织中 PGM 检测到两个位点, 其中迁移比较快的 *Pgm-1* 位点表达非常弱, 可能是样品保存时间过长所致, 迁移比较慢的 *Pgm-2* 位点活性表达很强(图版-4), 均为单态位点。半滑舌鳎肌肉组织 GPI 检测到 3 个位点, 酶活性比较高(图版-5), 其中 *Gpi-1* 为多态位点, 在该位点检测到至少 3 种等位基因, 杂合子观测值  $He(P_{0.99})$  为 0.20, 杂合子平衡偏离指数  $D$  为 +0.0146。 *Gpi-2* 和 *Gpi-3* 为单态位点。

### 2.4 文蛤

PGM 和 GPI 在文蛤的闭壳肌中活性表达非常高。PGM 闭壳肌中检测到 1 个位点, 表现出非常高的多态性(图版-6), 检测到 5 种等位基因, 杂合子观测值  $He(P_{0.99})$  为 0.72, 杂合子平衡偏离指数  $D$  为 0.0737。GPI 分析为 2 个位点, 均为为单态位点(图版-7)。

### 2.5 虾夷扇贝

PGM 和 GPI 在虾夷扇贝肌肉组织中的活性强于消化腺中的活性, 无组织差异性。PGM 在闭壳肌中表现为 1 个位点, 多态(图版-8), 4 个等位基因, 杂合子观测值  $He(P_{0.99})$  为 0.28, 杂合子平衡偏离指数  $D$  为 -0.2670。GPI 在闭壳肌中表达为 1 个位点, 单态(图版-9)。

## 3 讨论

### 3.1 PGM 和 GPI 位点在 5 种海洋生物中的遗传结构分析

虾夷马粪海胆的 *Pgm-1* 位点表现为杂合子过剩。这种杂合子过剩现象一方面表明所分析群体处于不稳定的遗传状态, 从另一方面说明该位点为杂合子的个体在生存中相比纯合子的个体处于一定的优势。当然这种推断需要进行生长对比实验后才能证明。刘思阳等<sup>[9]</sup>在分析牙鲆 *Idh-1* 位点时, 发现杂合子和牙鲆的存活率存在相关性。虾夷马粪海胆原产于日本北海道及以北沿海, 上世纪 90 年代被引进到我国北方沿海进行大规模养殖, 有关详细引进资料只有大连水产学院于 1989 年 5 月引进 500 个稚胆的报道, 在此基础上, 到 1997 年已经培养获得 500 万个稚胆和成胆<sup>[10]</sup>。通过对遗传变异比较活跃的位点进行分析, 掌握该批引进虾夷马粪海胆群体经过近十年之后的遗传结构变化是非常有价值的。

刺参的 *Pgm-1* 位点检测到 4 种等位基因, 表现为杂合子缺失现象。刺参为活动能力比较弱的底栖海洋生物, 主要生活在底栖藻类比较繁盛的海域, 以藻类和植物碎屑为食。其能量的代谢应该以多糖类的物质为主, 而 PGM 是催化糖代谢过程中的一个非常重要变位酶, *Pgm-1* 位点等位基因的丰富性使海参对于营养物质的吸收有更多选择的余地。海参有夏眠的习性, 11 月份应该是海参结束夏眠, 摄食比较活跃的季节, 这也是海参 PGM 活性比较高的原因。刺参肠道组织的 GPI 检测到 4 种等位基因, 其预期基因型应该为 10 种, 但是实际只检测到 4 种基因型个体, 表现为杂合子过剩状态( $D = +0.057$ )。作者分析应该是某些基因型, 特别是某些纯合型的个体在竞争中处于不利地位导致个体消亡, 从而出现杂合子相对过剩的现象。

由于样品保存时间过长(2002 年 10 月采集的样品), 半滑舌鳎 *Pgm-1* 位点只有很弱的酶带被检测到(作者在 2002 年以新鲜样品进行实验时, 能够检测到酶活比较强的 *Pgm-1* 位点), 可能是 *Pgm-1* 位点的稳定性不如 *Pgm-2* 位点所致, 这种现象在扇贝的异柠檬酸脱氢酶中也有发现<sup>[11]</sup>。半滑舌鳎肌肉组织 GPI 检测到 3 个位点, *Gpi-1* 为多态位点, 表现为轻微的杂合子过剩状态。对于某些基因位点, 一旦以稀有等位基因的形式出现, 往往在群体中无法检测到纯合型个体的存在, 而是以杂合子的形式存在, 这种情况经常造成了杂合子过剩的现象。 *Gpi-2* 和 *Gpi-3* 为单态位点。

文蛤 PGM 位点表现出非常丰富的等位基因, 本实验中检测到 5 种等位基因, 7 种以上的基因型个体。在该位点表现为轻微的杂合子过剩现象。文蛤成体营底栖半固着生活, 但是在其十多天的浮游生活阶段, 海水洋流使不同遗传背景的文蛤得到了充分的交流, 因而也创造出基因型丰富的群体。贝类的 PGM 具有丰富的遗传多样性是很普遍的现象, 薛钦昭等<sup>[12]</sup>利用 PGM 对海湾扇贝 6 个不同的地理群体进行了遗传分析, 检测到 6 种等位基因, 观测到多达 12 种基因型, 发现不同地理群体的杂合子和纯合子的存活率是有差异的, 不同基因型个体在体高、体长和体宽的生物学指标方面是有差异的, 而这种差异和 *Pgm* 位点等位基因的变化存在一定的相关性。文蛤 GPI 检测到两个位点, 都是单态位点, 表达比较单一。

虾夷扇贝肌肉组织的 PGM 检测到 4 种等位基因, 5 种基因型。虾夷扇贝是 20 世纪 80 年代我国从日本引进的 1 种经济型贝类, 主要在我国北方沿海进行养殖。本文 PGM 位点表现为杂合子缺失状态, 和高悦勉<sup>[13]</sup>对大连沿海 4 个海区的虾夷扇贝 5 种同工酶(CAT, SOD, MDH, ME, EST)的分析结果相一致, 在人工养殖生产中存在由于亲本个体少导致的近交和遗传漂变现象的发生。虾夷扇贝肌肉组织的 GPI 检测到一个位点, 单态。表明 GPI 在扇贝肌肉组织中是一种非常保守的酶类, 这对于维持机体糖类的代谢稳定非常重要。

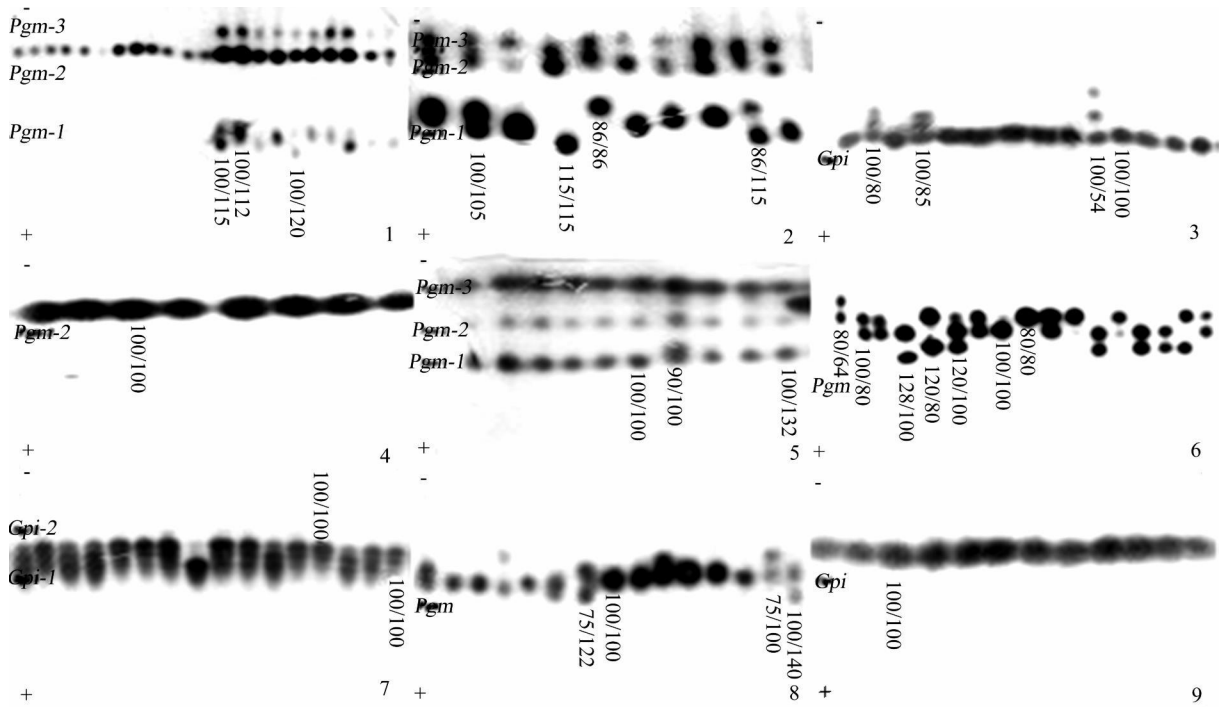
### 3.2 PGM 和 GPI 在遗传分析中的应用

PGM 和 GPI 是海洋生物表达非常活跃的两种酶类, 往往在染色开始的几分钟之内就可以观察到酶带的出现, 其活性在合适的条件下往往可以保持很长时间。由于具有非常高的遗传变异水平, PGM 和 GPI 是衡量物种遗传变异水平很重要的两种酶类。对于某些遗传变异水平比较低的物种, 比如中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*), 往往一个群体的 Hardy-Weinberg 平衡指数会因为 PGM 或者 GPI 位点杂合子平衡偏离指数的变化而变动<sup>[1]</sup>。利用某些同工酶位点和等位基因的丰富性, 用一种酶来衡量种群的遗传变异规律, 并且利用其作为生物体某些性状的生化指标<sup>[9, 12]</sup>, 这在选种育种中是非常有意义的。同样, 利用基因某些位点等位基因的多态性, 比如文蛤 PGM 位点, 实验中检测到五种等位基因, 理论上可以有 15 种基因型组合, 在家系选育过程中, 可以将来自不同基因型亲本产生的不同家系混养在一起, 利用个体的基因型将不同家系区分开来, 从而可以使所有家系的环境因子相同, 排除分开养殖而形成的环境差异, 同时可以节约大量的养殖设施。这与利用微卫星技术对亲本和子代进行分子标识

的原理一样。

### 参考文献:

- [1] Wang W J, Kong J, Bao Z M, *et al.* Isozyme variation in four populations of *Penaeus chinensis* shrimp [J]. *Biodiversity Science*, 2001, 9 (3): 241- 246.
- [2] 王伟继, 孔 杰, 庄志猛, 等. 真鲷野生群体和人工繁殖群体的同工酶遗传差异 [J]. *生物多样性*, 2000, 8 (4): 391 - 396.
- [3] 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的遗传变异[J]. *水产学报*, 2000, 24 (2): 130- 133.
- [4] 张志峰, 马英杰, 廖承义, 等. 中国对虾幼体发育阶段的同工酶研究[J]. *海洋学报*, 1997, 19(4): 63- 71.
- [5] 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.
- [6] 赵 俊, 崔 森, 庆 宁, 等. 雌核发育彭泽鲫子代及双亲组织同工酶的比较研究[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2004, 1: 96- 101.
- [7] Sbordoni V, Mattheais E D, Cobdli. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda) [J]. *Aquaculture*, 1986, 57: 239- 251.
- [8] 吕振明. 泥蚶同工酶的时空表达与遗传变异研究[D]. 宁波大学硕士论文, 2003.
- [9] 刘思阳, 池田实, 藤尾芳久. 牙鲆群体 *Idh-1* 基因座位杂合型个体选择性优势[J]. *武汉大学学报(自然科学版)*, 2000, 46 (4): 495- 499.
- [10] 常亚青, 王子臣. 虾夷马粪海胆筏式人工养殖研究[J]. *大连水产学院学报*, 1997, 12 (2): 7- 14.
- [11] 陈再忠. 中国北方沿海栉孔扇贝(*Chlamys farreri* (Jones & Preston) 三个自然群体遗传变异的初步研究[D]. 中国海洋大学硕士论文, 1999.
- [12] 薛钦昭, Sheila Stiles, 张福绥, 等. 海湾扇贝不同种群在磷酸葡萄糖变位酶基因位点的遗传结构与性状[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30 (4): 381- 390.
- [13] 高悦勉, 李国喜, 张银丽. 大连沿海虾夷扇贝养殖群体遗传结构的研究[J]. *大连水产学院学报*, 2004, 19 (2): 142 - 145.



图版 Plate

1. 虾夷马粪海胆肌肉组织和雄性性腺组织的 PGM 电泳图谱(从左到右, 前 12 个样品为虾夷马粪海胆肌肉组织, 后 10 个样品为雄性性腺组织); 2. 刺参肠道组织的 PGM 电泳图谱; 3. 刺参肠道组织的 GPI 电泳图谱; 4. 半滑舌鲷肌肉组织 PGM 电泳图谱; 5. 半滑舌鲷肌肉组织 GPI 电泳图谱; 6. 文蛤肌肉组织的 PGM 电泳图谱; 7. 文蛤肌肉组织的 GPI 电泳图谱; 8. 虾夷扇贝闭壳肌 PGM 的电泳图谱; 9. 虾夷扇贝闭壳肌 GPI 的电泳图谱

1. Zymogram of PGM in muscle and male gonad of sea urchin, respectively( The first 12 samples were muscle samples from left to right; the other 10 samples were male gonad tissue); 2. Zymogram of PGM in intestinal tract of *Apostichopus japonicus*; 3. Zymogram of GPI in intestinal tract of *Apostichopus japonicus*; 4. Zymogram of PGM in muscle of *Cynoglossus semilaevis*; 5. Zymogram of GPI in muscle of *Cynoglossus semilaevis*; 6. Zymogram of PGM in muscle of *Meretrix meretrix*; 7. Zymogram of GPI in muscle of *Meretrix meretrix*; 8. Zymogram of PGM in muscle of *Pecten yessoensis*; 9. Zymogram of GPI in muscle of *Pecten yessoensis*