

文章编号:1000-0615(2007)01-0001-06

三疣梭子蟹野生群体同工酶的遗传多态性分析

高保全^{1,2}, 刘 萍², 李 健², 戴芳钰²

(1. 中国海洋大学生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:采用聚丙烯酰胺不连续凝胶垂直电泳技术对三疣梭子蟹野生群体的同工酶进行检测。分析了48个样本的11种同工酶在三疣梭子蟹肌肉中的表达情况。11种同工酶(MDH、LDH、ME、SOD、EST、SDH、IDH、ADH、POD、CAT、AAT)共检测出20个基因座位,其中*Me-2*、*Sod-3*、*Cat-3*、*Ldh-2*共4个座位呈多态($P_{0.99}$),多态座位百分数 P 为20%。平均每个座位的有效等位基因数目 A_e 为1.230,预期杂合度 H_e 为0.094,实际杂合度 H_o 为0.175。同时还分析了三疣梭子蟹4个多态座位的Hardy-Weinberg遗传偏离指数 d 。与日本绒螯蟹、中华绒螯蟹等相比,三疣梭子蟹野生群体的遗传多样性水平较高,种质资源还处于较好的状态。

关键词:三疣梭子蟹; 野生群体; 同工酶; 多态性

中图分类号:Q 953

文献标识码:A

Isozyme polymorphism in *Portunus trituberculatus* from wild population

GAO Bao-quan^{1,2}, LIU Ping², LI Jian², DAI Fang-yu²

(1. College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: *Portunus triuberculatus* is an important economical species in China. In recent years, the wild stocks of *P. triuberculatus* along the coast of China have suffered fatal decrease in their resources due to the overfishing and cultivation. So it is very important to investigate the genetic diversity of *P. triuberculatus*. In October 2005, 48 individuals were collected from Zhoushan Gulf. Muscle was collected from each of the samples and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for detection. Muscle was homogenized in mercaptoethanol buffer(0.05%) at a ratio of 1:3 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) with ice-bath and centrifuged at $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ for 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatant was used as the isozyme source and electrophoresis was carried out on vertical polyacrylamide gels in Tris-gly buffer system (TG, pH 8.3) at 280 V for approximately 6 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The isozymes were analyzed by specific isozyme staining methods. The genetic variation was analyzed in terms of their locus number, structure, alleles, etc. Results showed that there were 20 loci by detecting eleven isozymes in this study. Among the scored loci, 4 loci (*Me-2*, *Sod-3*, *Cat-3*, *Ldh-2*) were polymorphic and the mean proportion of polymorphic loci (P) was 20%. The mean effective number of alleles per locus (A_e) was

收稿日期:2006-07-05

资助项目:山东省科技攻关项目(2005GG3205070);科技部基础研究专项资助(2004DKA30470)

作者简介:高保全(1980-),男,山东冠县人,硕士,主要从事海水养殖生物种质资源与遗传多样性研究

通讯作者:刘 萍, Tel:0532-85823291, E-mail:liuping@ysfri.ac.cn

1.230, and the mean expected heterozygosity per locus (H_e) and the mean observed heterozygosity (H_o) were 0.094 and 0.175, respectively. In the mean time, the deviation indexes from Hardy-Weinberg equilibrium (d) of four polymorphic loci (*Me-2*, *Sod-3*, *Cat-3*, *Ldh-2*) were analyzed with 1.000, 1.000, 0.818 and 0.333, respectively. The genetic variability of *Portunus trituberculatus* was higher than those of *Eriocheir japonica*, *Eriocheir sinensis*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; wild population; isozyme; polymorphism

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 是一种重要的海洋经济动物, 隶属甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、梭子蟹科 (Portunidae), 分布于中国、朝鲜、日本等海域^[1-2], 是我国重要的渔业资源。由于三疣梭子蟹具有独特的经济价值, 因此, 自 20 世纪 50 年代起国内有关三疣梭子蟹的养殖习性、生理生态、胚胎发育等方面的研究较多, 目前三疣梭子蟹侧重于人工苗种培育、人工养殖方法研究, 遗传特性方面虽做了一些工作^[3-12], 仍需进一步开展研究内容。本文应用同工酶电泳技术分析三疣梭子蟹的野生群体遗传多样性水平, 以期三疣梭子蟹的资源保护、遗传育种工作提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

三疣梭子蟹样品于 2005 年 10 月中旬取自浙江舟山海域, 北纬 30°53'11", 东经 122°31'5", 共 48 只。全甲宽 125.13 ~ 205.19 mm。活体解剖取适量肌肉组织, 编号, 迅速放入 -70 °C 保存。

1.2 电 泳 方 法

材料 取适量肌肉, 分别加入约 3 倍体积的 0.05% 巯基乙醇组织提取缓冲液, 在冰浴条件下匀浆, 4 °C 离心机中 12 000 r · min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液, 按需要量分装入小管中置于 -70 °C 超低温冰箱备用。

方法 同工酶电泳采用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。电泳在 4 °C 冰箱中进行。对凝胶浓度、电压、电极缓冲液、点样量的多少和染色条件进行摸索和优化, 最终确立电泳参数。

凝胶浓度 (T): $T_{\text{浓缩胶}} = 3.6\%$ (pH 6.7), $T_{\text{分离胶}} = 8.2\%$ (pH 8.9)。

电压: Tris-甘氨酸 (TG, pH 8.3) 系统, 恒压 280 V, 电泳时间 5 ~ 7 h。点样量视不同种酶类而异。染色方法参照王中仁^[13] 和胡能书等^[14] 的方法。染色结束后采用美国 BIO-RAD 公司制造的

GEL DOC. 1000 型号的凝胶成像系统拍照记录。

从所做的同工酶中选 11 种稳定清晰的用于常规分析。同工酶的名称及电泳情况见表 1。

表 1 三疣梭子蟹 11 种同工酶及电泳情况
Tab. 1 Names and electrophoretic methods of 11 analyzed isozymes in *Portunus trituberculatus*

同工酶 isozyme	酶国际代码 E. C. number	组织 tissue	缓冲系统 buffer system
苹果酸脱氢酶 MDH	1.1.1.37	肌肉 muscle	TG
乳酸脱氢酶 LDH	1.1.1.27	肌肉 muscle	TG
苹果酸酶 ME	1.1.1.40	肌肉 muscle	TG
超氧化物歧化酶 SOD	1.15.1.1	肌肉 muscle	TG
酯酶 EST	3.1.1.1	肌肉 muscle	TG
山梨醇脱氢酶 SDH	1.1.1.14	肌肉 muscle	TG
异柠檬酸脱氢酶 IDH	1.1.1.42	肌肉 muscle	TG
乙醇脱氢酶 ADH	1.1.1.1	肌肉 muscle	TG
过氧化物脱氢酶 POD	1.11.1.7	肌肉 muscle	TG
过氧化氢酶 CAT	1.11.1.6	肌肉 muscle	TG
天冬氨酸脱氢酶 AAT	2.6.1.1	肌肉 muscle	TG

1.3 结 果 记 录

同工酶的缩写、基因座位和等位基因的命名基本参照 Shaklee 等^[15] 和 Whitmore^[16] 方法。以同工酶名称缩写的大写代表酶蛋白, 小写代表编码基因。控制同一种酶的不同基因座位按照从阳极到阴极的顺序依次标记为 1、2、3... , 同一基因座位的不同等位基因按照从阳极到阴极的顺序依次标记为 a、b、c... 。

1.4 数 据 处 理

采用王中仁^[13] 和曾呈奎等^[17] 的数理统计方法。

(1) 多态座位比例 (P)

$$P = \text{多态座位数} / \text{所测座位总数} \times 100\%$$

多态座位以其主要的等位基因频率低于 0.99 为标准^[18]。

(2) 平均每个座位的等位基因的有效数目 (A_e)

$$A_e = \sum (1 / \sum q_i^2) / n$$

其中: q_i 为第 i 个等位基因的频率, n 为所测座位的总数。

(3) 平均每个座位的实际杂合度 H_o 和预期值 H_e

H_o = 观察到的杂和个体数/观察的个体总数

$$H_e = \sum_{i=1}^n (1 - \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2) / n$$

其中: q_{ij} 第 i 个座位上第 j 个等位基因的纯合基因型的频率, m_i 第 i 个位点上所测定到的等位基因的总数, n 所测定的位点的总数。

(4) 多态座位杂合度的实际值 (H_o) 和预期值 (H_e)

H_o = 观察到的杂合个体数/观察的个体总数

$$H_e = 1 - \sum q_i^2$$

其中: q_i 为该座位第 i 个等位基因频率

(5) Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (d)

$$d = (H_o - H_e) / H_o$$

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹同工酶表达

对三疣梭子蟹群体的 17 种同工酶进行了电泳分析。对显带清晰的 11 种同工酶进行分析。三疣梭子蟹同工酶电泳图谱见图 1。

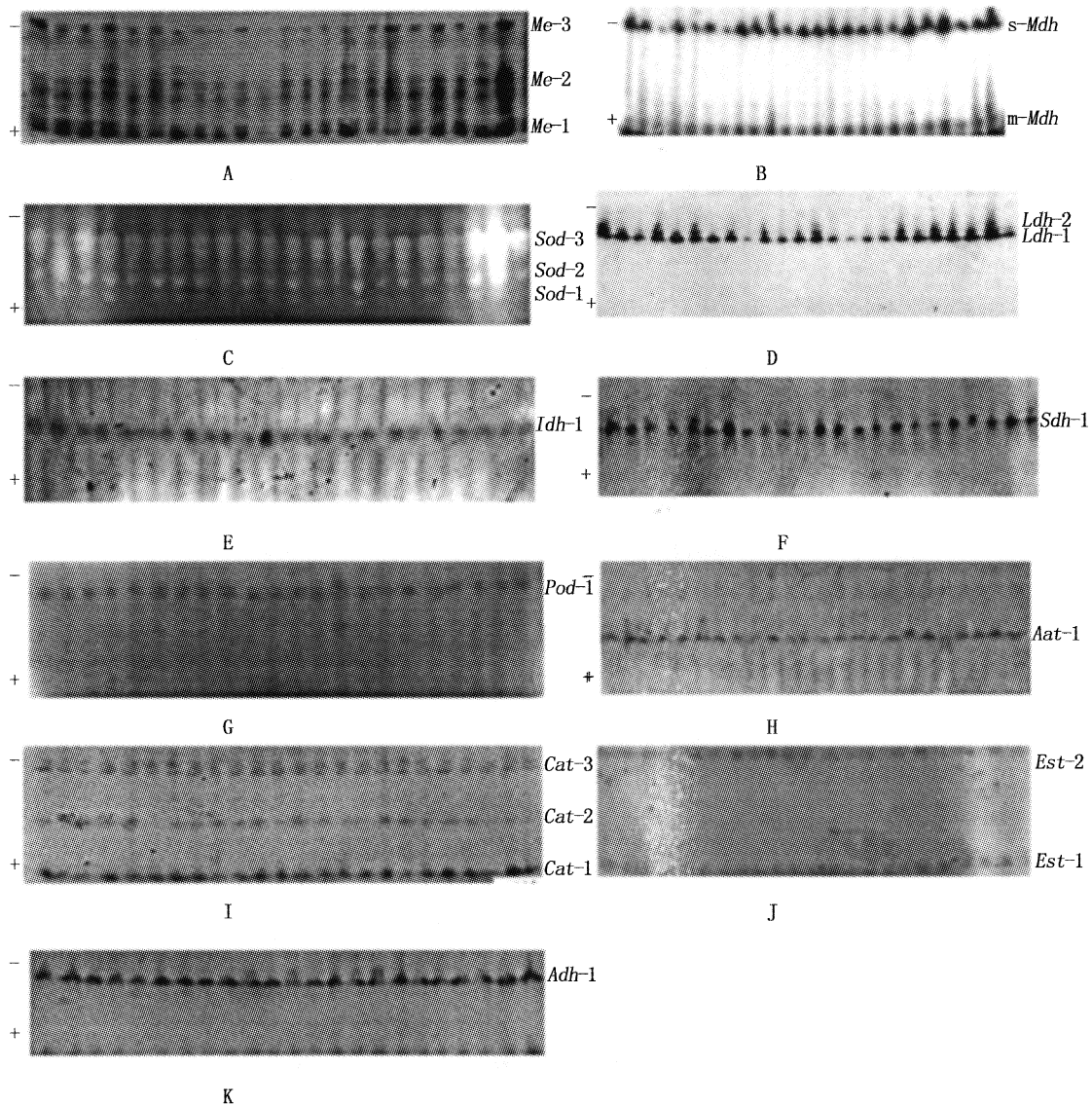


图 1 三疣梭子蟹同工酶的电泳图谱

Fig. 1 Kinds of isozyme electrophoregrams of *Portunus triuberbuculatus*

苹果酸酶(ME) 四聚体酶。在三疣梭子蟹中观察到3个基因座位。*Me-1*、*Me-3*都观察到一种等位基因 *a* 和一种基因型 *aa*。*Me-2*是个多态座位,由 *a*、*b* 一对等位基因编码,且个体间表达有差异。*Me-1*、*Me-3*两个座位活性大于座位 *Me-2*。电泳图谱见图 1-A。

苹果酸脱氢酶(MDH) 二聚体酶。在三疣梭子蟹中观察到线粒体型(*m-Mdh*)和上清液型(*s-Mdh*)。两种类型均有一个基因座位编码,而且每个座位都观察到一种等位基因 *a* 和一种基因型 *aa*。这和其他学者报到的三疣梭子蟹肌肉组织中只有一种类型 MDH 不同^[19]。电泳图谱见图 1-B。

超氧化物歧化酶(SOD) 二聚体和四聚体酶。三疣梭子蟹的超氧化物歧化酶表现为二聚体酶。三疣梭子蟹中观察到3个基因座位。*Sod-1*、*Sod-2*均观察到一种等位基因 *a* 和一种基因型 *aa*。*Sod-3*是个多态座位,观察到一对等位基因 *a*、*b* 和一种基因型 *ab*。电泳图谱见图 1-C。

乳酸脱氢酶(LDH) 四聚体酶。三疣梭子蟹中观察到2个基因座位,其中 *Ldh-2* 为多态座位,检测到 *aa*、*ab* 两种基因型。*Ldh-1* 由一种等位基因 *a* 编码。*Ldh-1* 在肌肉中超显性,活性很强。电泳图谱见图 1-D。

异柠檬酸脱氢酶(IDH) 二聚体酶。三疣梭子蟹中观察到一个基因座位,此位点由一种等位基因 *a* 编码,活性较弱。电泳图谱见图 1-E。

山梨醇脱氢酶(SDH) 单聚体酶。三疣梭子蟹中观察到一个基因座位,此位点由一种等位基因 *a* 编码,活性较弱。电泳图谱见图 1-F。

过氧化物酶(POD) 二聚体酶。三疣梭子蟹中观察到一个基因座位,一种等位基因 *a* 和一种基因型 *aa*。电泳图谱见图 1-G。

天冬氨酸脱氢酶(AAT) 二聚体酶。三疣梭子蟹中观察到一个基因座位,此位点由一种等位基因 *a* 编码。电泳图谱见图 1-H。

过氧化氢酶(CAT) 四聚体酶。三疣梭子蟹中观察到3个基因座位,其中 *Cat-3* 为多态,检测到 *a*、*b* 一对等位基因,检测到 *aa*、*ab* 两种基因型,*Cat-1* 和 *Cat-2* 2个基因座位由1种等位基因 *a* 编码,*Cat-2* 活性较弱。电泳图谱见图 1-I。

酯酶(EST) 二聚体酶。三疣梭子蟹中均观察到2个基因座位,*Est-1*、*Est-2* 2个基因座位均

只有一种等位基因 *a* 和一种基因型 *aa*,*Est-2* 座位活性很弱。电泳图谱见图 1-J。

乙醇脱氢酶(ADH) 二聚体酶。在三疣梭子蟹中观察到一个基因座位。此座位观察到一种等位基因 *a* 和一种基因型 *aa*。电泳图谱见图 1-K。

2.2 三疣梭子蟹群体的遗传参数

三疣梭子蟹同工酶的等位基因频率 三疣梭子蟹 11 种同工酶共检测到 20 个基因座位,其中 *Me-2*、*Cat-3*、*Sod-3*、*Ldh-2* 等 4 个位点为多态。所测基因座位及其等位基因频率见表 2。

多态座位的比例 *P* 根据表 2 的统计结果,分析的 11 种同工酶共记录了 20 个基因座位,其中 *Me-2*、*Cat-3*、*Sod-3*、*Ldh-2* 共 4 个位点是多态的,多态座位百分数为 20%。

平均每个座位的有效等位基因数 A_e 根据等位基因频率计算了三疣梭子蟹平均有效等位基因数为 1.230。

平均每个座位的实际杂合度 H_o 和预期值 H_e 根据等位基因频率得出三疣梭子蟹平均杂合度 H_o 为 0.175, H_e 为 0.094。多态座位杂合度的实际值(H_o)、预期值(H_e)和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(*d*)见表 3。

表 2 三疣梭子蟹 20 个同工酶基因位点的等位基因频率
Tab.2 Allelic frequencies of 20 enzymes loci in *Portunus trituberculatus*

基因位点 locus	等位基因 allele	基因频率 frequency
<i>Pod-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>s-Mdh-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>m-Mdh-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Sdh-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Ldh-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Ldh-2</i>	<i>a</i>	0.750 0
	<i>b</i>	0.250 0
<i>Sod-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Aat-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Sod-2</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Sod-3</i>	<i>a</i>	0.500 0
	<i>b</i>	0.500 0
<i>Est-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Est-2</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Cat-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Cat-2</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Cat-3</i>	<i>a</i>	0.550 0
	<i>b</i>	0.450 0
<i>Adh-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Idh-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Me-1</i>	<i>a</i>	1.000 0
<i>Me-2</i>	<i>a</i>	0.500 0
	<i>b</i>	0.500 0
<i>Me-3</i>	<i>a</i>	1.000 0

表3 多态座位的实际杂合度 H_o 、
预期值 H_e 和平衡偏离指数 (d)
Tab.3 The observed and expected heterozygosities
(H_o & H_e), divergent index (d)
at each polymorphic locus

座位 locus	H_o	H_e	d
<i>Ldh-2</i>	0.500	0.375	0.333
<i>Cat-3</i>	0.900	0.495	0.818
<i>Sod-3</i>	1.000	0.500	1.000
<i>Me-2</i>	1.000	0.500	1.000

3 讨论

3.1 三疣梭子蟹同工酶的表达

乳酸脱氢酶的表达 一般认为在脊椎动物中,LDH 同工酶为四聚体,由 A、B 两亚基随机合成 5 种 LDH 同工酶。但 LDH 在无脊椎动物组织中的表达则有较大差异。张洁等^[20]研究发现,中华绒螯蟹的 LDH 同工酶 A、B 亚基之间不形成杂聚体。本研究结果显示在三疣梭子蟹的肌肉组织中:*Ldh-1* 由一种等位基因编码,可能是迁移率慢的 *Ldhb₄*,也可能是迁移率快的 *Ldha₄*。*Ldh-2* 为多态座位,仅检测到 *Ldha₄* 和 *Ldhb₄* 两种同工酶,所以本实验也证实了三疣梭子蟹 LDH 同工酶 A、B 亚基之间不形成杂聚体。这和余红卫等^[7]的结果一致。

与养殖群体酶谱表达的差别的探讨 本实验在三疣梭子蟹的肌肉组织中检测到的 MDH 包括两种类型:*s-Mdh* 和 *m-Mdh*,而且还检测到活性比较强的 ADH。王国良等^[19]对三疣梭子蟹养殖群体同工酶分析中在肌肉中只检测到一种类型 MDH,并且肌肉组织中没检测到 ADH。两种结果存在较大的差异。究其原因可能有如下两种:(1) 本实验用的样品是野生的,取自浙江舟山群岛附近的海域,而王国良等的实验样品是养殖的,取自浙江舟山朱家尖梭子蟹养殖区。(2) 实验方法的不同,包括:分离胶的浓度、浓缩胶的浓度、染色方法、电泳的时间等都存在不同程度的差异。为了进一步说明问题,本作者对两种酶:ADH 和 MDH 进行了验证,按照王国良等^[19]的实验方法检测两种酶在三疣梭子蟹野生群体肌肉中表达情

况,结果同样能检测到清晰的 ADH 和 MDH,而且 MDH 表现为两种类型:*s-Mdh* 和 *m-Mdh*。因此作者认为:两种酶在三疣梭子蟹养殖群体和野生群体中表达的差异主要是实验材料不同造成的。

3.2 三疣梭子蟹的遗传多样性

常用的表示群体内变异水平的指标主要有多态位点的百分数、平均每个座位的等位基因的有效数目、平均每个座位的实际杂合度和预期值。本实验中三疣梭子蟹的多态位点比例为 20%,平均每个座位的等位基因的有效数目为 1.230,平均每个座位的实际杂合度为 0.175,平均每个座位的预期杂合度为 0.094。Gao 等^[21]研究结果表明,日本绒螯蟹的多态座位比例为 13.6%,中华绒螯蟹为 18.2%。野泽^[22]对 123 种甲壳类的研究表明,其预期杂合度在 0.040 左右。由此可知:三疣梭子蟹的多态比例在亲缘关系较近的物种中尚处于较高水平,平均每个座位的实际杂合度和预期值也比较高。综合这些数据表明舟山群体的三疣梭子蟹遗传多样性较高,处于野生种质资源维持较好的水平。

3.3 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 d 反映了杂合度的实际值 (H_o) 和预期值 (H_e) 之间的平衡关系。虽然目前没有明确的 d 值范围来表明是否符合 Hardy-Weinberg 遗传定律,但 d 值越接近于零,基因型分布越接近于平衡状态。 d 值为正则说明杂合子过剩, d 值为负则说明杂合子处于缺失状态。从本实验中可以看出三疣梭子蟹的杂合子处于过剩状态。作者认为有以下几点原因:(1) 样品中具有无效等位基因的个体,事实上是纯合的;(2) 这些杂合子过剩位点具有很高的突变率,出现了不同的等位基因。

同工酶作为基因表达的直接或间接产物,它们的丰富程度直接影响生物体的机能和对环境的适应能力。同工酶多态性越高,越复杂,表明其遗传多样性越丰富,群体更能适应环境。另外,同工酶多态性越高,其作为分子标记研究生物多样性就越有意义。

参考文献:

- [1] 戴爱云,冯钟琪,宋玉枝,等. 三疣梭子蟹渔业生物资源的初步调查[J]. 动物学杂志,1977,(2):30 - 33.
- [2] 戴爱云,杨思琼,宋玉枝,等. 中国海洋蟹类[M]. 北京:海洋出版社,1986.
- [3] 孙颖民,宋志乐,严瑞深,等. 三疣梭子蟹生长的初步研究[J]. 生态学报,1984,4(1):57 - 64.
- [4] 孙颖民,闫 愚,孙进杰. 三疣梭子蟹幼体发育[J]. 水产学报,1984,8(3):219 - 226.
- [5] 李太武. 三疣梭子蟹精子的发生及超微结构的研究[J]. 动物学报,1995,41(1):41 - 47.
- [6] 李太武. 三疣梭子蟹肝脏的结构研究[J]. 海洋与湖沼,1996,27(5):471 - 477.
- [7] 余红卫,朱东发,韩宝芹. 三疣梭子蟹不同组织同工酶的分析[J]. 动物学杂志,2005,40(1):84 - 87.
- [8] 朱冬发,余红卫,王春琳. 三疣梭子蟹个体发育早期的同工酶谱变化[J]. 水产学报,2005,29(6):751 - 756.
- [9] 朱冬发,王春琳,李志强,等. 三疣梭子蟹核型分析[J]. 水产学报,2005,29(5):649 - 653.
- [10] Allen R P, Feng X J, Colin R S. Genetic markers in blue crabs II. Complete mitochondrial genome sequence and characterization of genetic variation [J]. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 319: 15 - 27.
- [11] Mitsugu M Y. Complete mitochondrial DNA sequence of swimming crab *Portunus triuberbulatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) [J]. *Gene*, 2003,311:129 - 135.
- [12] 薛俊增,堵南山,赖 伟. 中国三疣梭子蟹 *Portunus triuberbulatus* Miers 的研究[J]. 东南海洋,1997,15(1):60 - 65.
- [13] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [14] 胡能书,万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1985:73 - 85.
- [15] Shaklee J B, Allendorf F W, Morizot D C, et al. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish [J]. *Trans Am Fish Soci*,1990,119:2 - 15.
- [16] Whitmore D H. Electrophoretic and isoelectric focusing technique in fisheries management [M]. Boston:CPC Press,1990:28 - 30.
- [17] 曾呈奎,相建海. 海洋生物技术[M]. 济南:山东科学技术出版社,1998:238 - 309.
- [18] Nei M. Genetic distance between population[J]. *Am Nat*,1972,106:283 - 292.
- [19] 王国良,金 珊,李 政,等. 三疣梭子蟹养殖群体同工酶的组织特异性及生化遗传分析[J]. 台湾海峡,2005,24(4):474 - 480.
- [20] 张 洁,陈立桥,周忠良,等. 中华绒螯蟹同工酶发育遗传学研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版),1996,(动物学专辑):38 - 42.
- [21] Gao T, Watanabe S. Genetic variation among local populations of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* De Haan [J]. *Fisheries Science*,1998,64(2):198 - 205.
- [22] 野 泽. 动物群体遗传学[M]. 名古屋:名古屋大学出版社,1994:329.