

牙鲆群体生化遗传学研究*

—— II. 等位酶的生化遗传分析

黎中宝 邹志华 常建波

(集美大学水产学院 厦门 361021)

摘 要 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对牙鲆 [*Paralichthys olivaceus* (T. et S.)] 养殖群体进行 10 种等位酶的电泳检测和谱带遗传分析, 确定了 21 个等位酶位点和 25 个等位基因, 单态位点有 *Est-2*、*Est-3*、*Aat-2*、*Sod-1*、*Sod-2*、*Ldh-1*、*Mdh-1*、*Me-1*、*Adh-2*、*Sdh-2*、*Sdh-3*、*Idh-1*、*Idh-2*、*Amy-1*、*Amy-2* 和 *Amy-3*, 而这些位点仅有 1 个等位基因。仅有 *Aat-1*、*Sdh-1*、*Adh-1*、*Est-1* 和 *Est-4* ($P_{0.99}$ 标准) 5 个位点是多态的, 多态位点的百分数为 23.81%, 而这些位点有 2 个等位基因。揭示了牙鲆群体等位酶位点及其等位基因带谱的变异式样, 为牙鲆遗传育种及遗传结构的研究提供一批等位酶位点及其等位基因参考图谱。

关键词 牙鲆 等位酶 生化遗传

Biochemical genetics of *Paralichthys olivaceus* population— II. Biochemical genetic analysis of allozymes. LI Zhong-Bao, ZOU Zhi-Hua, CHANG Jian-Bo (Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021), *CJEA*, 2003, 11(3): 9~12

Abstract Biochemical genetics was investigated using the assay of vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis in *Paralichthys olivaceus*, ten enzymes were presumably encoded by 21 allozyme loci and 25 alleles were scored. The monomorphic locus with one allele is *Est-2*, *Est-3*, *Aat-2*, *Sod-1*, *Sod-2*, *Ldh-1*, *Mdh-1*, *Me-1*, *Adh-2*, *Sdh-2*, *Sdh-3*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Amy-1*, *Amy-2* and *Amy-3*; and 5 loci with two alleles are polymorphic. They are *Aat-1*, *Sdh-1*, *Adh-1*, *Est-1*, and *Est-4*. The percentage of polymorphic loci ($P_{0.99}$) is 23.81%. The bands representing loci and alleles of *P. olivaceus* are showed in the paper and the genetic diversity and genetic structure of *P. olivaceus* with comparative diagrams of allozymes are provided.

Key words *Paralichthys olivaceus*, Allozyme, Biochemical genetic

牙鲆 [*Paralichthys olivaceus* (T. et S.)] 隶属于脊椎动物门、硬骨鱼纲、鲽形目、鲽亚目、鲆科、牙鲆亚科、牙鲆属, 牙鲆属鱼类多分布在南、北美洲东西两岸, 近 20 种。亚洲沿岸仅有牙鲆 1 种, 主要分布于我国渤海、黄海、东海和南海。近年来过度捕捞已使其资源严重衰减, 其增殖养殖业的迅猛发展对牙鲆自然群体遗传本质、种质资源和遗传多样性产生了不可低估的影响。本实验应用等位酶电泳技术研究牙鲆等位酶的生化遗传规律, 为牙鲆种质资源保护、合理利用和遗传育种研究提供科学依据。

1 实验材料与方法

牙鲆于 2002 年 5 月取自福建省东山, 共 48 尾, 其中 9 尾为白化个体, 39 尾为正常个体, 平均长 6.8cm × 宽 3cm, 活体当天解剖, 取其肌肉组织 0.5g 样品加入约 2~3 倍体积的 Tris-HCl 组织缓冲液 (0.01mol/L, pH = 7.0) 冰浴研成匀浆, 1.2 万 r/min 4℃ 离心 15min, 弃去沉淀上清液备用。采用垂直板型不连续聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳, 共检测 18 个酶系统, 其中图片清晰可供分析的有 10 个酶, 即天冬氨酸转氨酶 (AAT, E. C. 2.6.1.1)、酯酶 (EST, E. C. 3.1.1.-)、苹果酸酶 (ME, E. C. 1.1.1.40)、苹果酸脱氢酶 (MDH, E. C. 1.1.1.37)、超氧化物歧化酶 (SOD, E. C. 1.15.1.1)、乳酸脱氢酶 (LDH, E. C. 1.1.1.27)、山梨醇脱氢酶 (SDH, E. C. 1.1.1.6)、乙醇脱氢酶 (ADH, E. C. 1.1.1.1)、异柠檬酸脱氢酶 (IDH, E. C. 1.1.1.42)、淀粉酶 (AMY, E. C. 3.2.1.1)。电泳条件参照莽克强等、朱蓝菲方法^[1,2], 染色方法参照 Harris H. 等、曾呈奎等和王中仁方法^[4,5,9], 等位酶的命名、缩写参照 Shaklee J. B. 等方法^[12], 酶谱判译参照王中仁方法^[5]。所附图片中有 7 个酶 (AAT、ME、LDH、ADH、IDH、AMY、EST) 的点样方式是右边 9 个样品为白化牙鲆, 左边 15 个样品为正常

* 福建省重点科技攻关项目 (2002N020) 资助

收稿日期: 2002-10-28 改回日期: 2002-11-22

牙鲈;另有 3 个酶(SOD、MDH、SDH)的点样方式是左边 9 个样品为白化牙鲈,右边 15 个样品为正常牙鲈。

2 结果与分析

2.1 等位酶的表达

超氧化物歧化酶(SOD,E.C.1.15.1.1)为二聚体酶,有 2 个明显区带(负带),故由 2 个位点控制,*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-2* 所产生的等位酶活性高于 *Sod-1* 所产生的等位酶活性。SOD 2 个位点电泳图谱见图 1。乳酸脱氢酶(LDH,E.C.1.1.1.27)为四聚体,且在本研究中极为稳定,由 1 个位点控制,位点 *Ldh-4* 含有 1 个等位基因 *Ldh-4a*,均为纯合体,基因型为 AA(此位点的确定相对于心脏和眼睛 2 个组织器官)。LDH 1 个位点电泳图谱见图 2。天冬氨酸转氨酶(AAT,E.C.2.6.1.1)为二聚体酶,含有 2 个明显区



图 1 牙鲈 SOD 的电泳图谱

Fig.1 Electrophoretogram of SOD in *Paralichthys olivaceus*

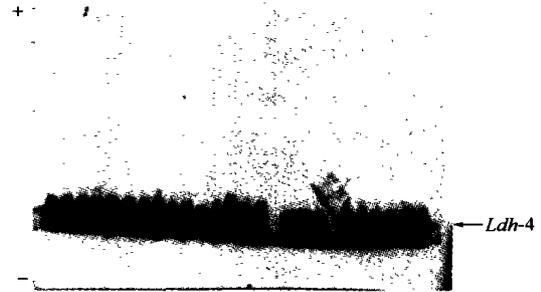


图 2 牙鲈 LDH 的电泳图谱

Fig.2 Electrophoretogram of LDH in *Paralichthys olivaceus*



图 3 牙鲈 AAT 的电泳图谱

Fig.3 Electrophoretogram of AAT in *Paralichthys olivaceus*



图 4 牙鲈 SDH 的电泳图谱

Fig.4 Electrophoretogram of SDH in *Paralichthys olivaceus*

带,故由 2 个位点控制,*Aat-1* 有 2 个等位基因 *Aat-1a* 和 *Aat-1b*,均由杂合体组成,基因型为 AB。*Aat-2* 有 1 个等位基因 *Aat-2a*,均由纯合体组成,基因型为 AA。AAT 2 个位点电泳图谱见图 3。山梨醇脱氢酶(SDH,E.C.1.1.1.6)为二聚体,且在本研究中极为稳定,由 3 个位点控制,*Sdh-1* 有 2 个等位基因 *Sdh-1a*、*Sdh-1b*,由纯合体或杂合体组成,基因型为 AA 和 AB。*Sdh-2* 有 1 个等位基因 *Sdh-2a*,均由纯合体组成,基因型为 AA。*Sdh-3* 有 1 个等位基因 *Sdh-3a*,均由纯合体组成,基因型为 AA。SDH 3 个位点电泳图谱见图 4。淀粉酶(AMY,E.C.3.2.1.1)为单体酶,有 3 个明显区带(负带),故由 3 个位点控制,*Amy-1* 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Amy-1a*,基因型为 AA。*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。AMY 3 个位点电泳图谱见图 5。酯酶(EST,E.C.3.1.1.-)为单体酶,有明显 4 个区带,故由 4 个位点控制,*Est-1* 有 2 个等位基因 *Est-1a*、*Est-1b*,均由杂合体组成,基因型为 AB。*Est-2*



图 5 牙鲈 AMY 的电泳图谱

Fig.5 Electrophoretogram of AMY in *Paralichthys olivaceus*

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 1 个等位基因 *Est-3a*,均由纯合体组成,基因型为 AA。*Est-4* 含有 2 个等位基因 *Est-4a*、*Est-4b*,由纯合体或杂合体组成,基因型为 AA、AB。*Est-3* 所产生的等位酶活性高于 *Est-1*、*Est-2* 和 *Est-4* 所产生的等位酶活性。EST 4 个位点电泳图谱见图 6。苹果酸酶(ME,E.C. 1.1.1.40)为四聚体酶,有 1 个明显区带,故由 1 个位点控制,*Me-1* 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Me-1a*,基因型为 AA。ME 1 个位点电泳图谱见图 7。苹果酸脱氢酶(MDH,E.C.1.1.1.37)为二聚体酶,有 1 个明显区带,故由 1 个位点控制,*Mdh-1* 均由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Mdh-1a*,基因型为 AA。MDH 1 个位点电泳图谱见图 8。乙醇脱氢酶(ADH,E.C.1.1.1.1)为二聚体酶,有 2 个明显区带,故由 2 个位点控制,*Adh-1* 由纯合



图 6 牙鲆 EST 的电泳图谱

Fig.6 Electrophoretogram of EST in *Paralichthys olivaceus*

体或杂合体组成,含有 2 个等位基因 *Adh-1a*、*Adh-1b*,基因型为 AA、AB。*Adh-2* 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Adh-2a*,基因型为 AA。ADH 2 个位点电泳图谱见图 9。异柠檬酸脱氢酶(IDH,E.C.1.1.1.42)为二聚体酶,有 2 个明显区带,故由 2 个位点控制,*Idh-1* 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Idh-1a*,基因型为 AA。*Idh-2* 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Idh-2a*,基因型为 AA。IDH 2 个位点电泳图谱见图 10。

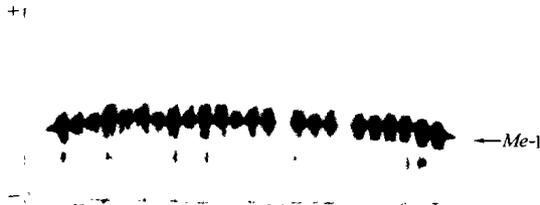


图 7 牙鲆 ME 的电泳图谱

Fig.7 Electrophoretogram of ME in *Paralichthys olivaceus*

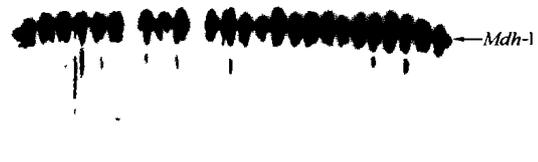


图 8 牙鲆 MDH 的电泳图谱

Fig.8 Electrophoretogram of MDH in *Paralichthys olivaceus*

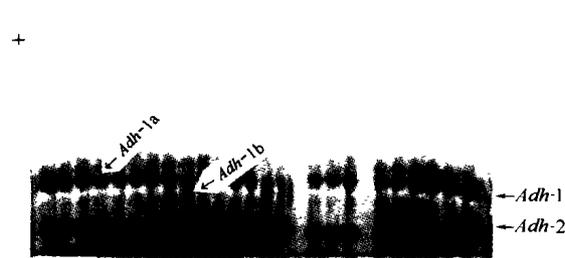


图 9 牙鲆 ADH 的电泳图谱

Fig.9 Electrophoretogram of ADH in *Paralichthys olivaceus*



图 10 牙鲆 IDH 的电泳图谱

Fig.10 Electrophoretogram of IDH in *Paralichthys olivaceus*

体或杂合体组成,含有 2 个等位基因 *Adh-1a*、*Adh-1b*,基因型为 AA、AB。*Adh-2* 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Adh-2a*,基因型为 AA。ADH 2 个位点电泳图谱见图 9。异柠檬酸脱氢酶(IDH,E.C.1.1.1.42)为二聚体酶,有 2 个明显区带,故由 2 个位点控制,*Idh-1* 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Idh-1a*,基因型为 AA。*Idh-2* 由纯合体组成,含有 1 个等位基因 *Idh-2a*,基因型为 AA。IDH 2 个位点电泳图谱见图 10。

2.2 多态位点的百分数

在所研究牙鲆的 21 个等位酶位点和 25 个等位基因中,单态位点有 *Est-2*、*Est-3*、*Aat-2*、*Sod-1*、*Sod-2*、*Ldh-1*、*Mdh-1*、*Me-1*、*Adh-2*、*Sdh-2*、*Sdh-3*、*Idh-1*、*Idh-2*、*Amy-1*、*Amy-2* 和 *Amy-3*,且这些位点仅有 1 个等位基因。仅有 5 个位点是多态的,即 *Aat-1*、*Sdh-1*、*Adh-1*、*Est-1* 和 *Est-4*($P_{0.99}$ 标准),多态位点的百分数(P)为 23.81%,且这些位点有 2 个等位基因。

3 小结与讨论

本实验结果表明 ADH 由 2 个位点控制,SDH 由 3 个位点控制,SOD 由 2 个位点控制,ME 由 1 个位点

控制,MDH 由 1 个位点控制(s-MDH)。尤锋等^[7]研究认为牙鲆的 ADH 由 1 个位点控制,SDH 由 1 个位点控制,SOD 由 3 个基因座位编码,且仅在心脏中表达,MDH 由 2 个位点控制(s-MDH 和 m-MDH 2 种类型),ME 由 2 个基因座位编码。在比较等位酶分析结果时应考虑支持基质的性质、电泳条件、缓冲系统及组织器官等是否一致。因用于等位酶分析的电泳主要有聚丙烯酰胺凝胶电泳和淀粉胶电泳 2 种方法,淀粉胶电泳方法的分辨率低,有些等位基因无法检测到,对活性较弱或组成复杂的等位酶尚难检测,而聚丙烯酰胺凝胶电泳方法分辨率高,即电泳支持基质的性质不同则产生不同的电泳结果。

LDH 在本研究中极为稳定,由 1 个位点控制,位点 *Ldh-4* 含有 1 个等位基因 *Ldh-4a*,均为纯合体,基因型为 AA。此位点 *Ldh-4* 的确定相对于心脏和眼睛 2 个组织器官,*Ldh-1*、*Ldh-2* 基因位点在眼睛中表达,分别由等位基因 *Ldh-1a*、*Ldh-2a* 构成。*Ldh-3* 基因位点在眼睛和心脏中表达,由等位基因 *Ldh-3a* 构成。仅有 *Ldh-4* 基因位点在所分析的 9 种组织中均有表达,由等位基因 *Ldh-4a* 构成^[3]。

牙鲆的淀粉酶、酯酶为单体酶,天冬氨酸转氨酶、乙醇脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、超氧化物歧化酶、山梨醇脱氢酶为二聚体酶,苹果酸酶、乳酸脱氢酶为四聚体酶。在所研究牙鲆的 21 个等位酶位点和 25 个等位基因中单态位点有 16 个,仅有 5 个位点 *Aat-1*、*Sdh-1*、*Adh-1*、*Est-1*、*Est-4* 是多态的($P_{0.99}$ 标准),多态位点的百分数为 23.81%,且多态位点有 2 个等位基因。遗传多样性主要指标之一是多态位点的百分数,脊椎动物的多态位点百分数为 15%~30%^[10]。海水鱼类中尖吻鲈多态位点的百分数为 34.8%^[11],鲈鱼多态位点的百分数为 25.8%^[6],带鱼多态位点的百分数为 12.5%~41%^[8]。牙鲆多态位点的百分数(23.81%)在海水鱼中居中等水平。本研究揭示了牙鲆群体等位酶位点及其等位基因带谱的变异式样,为牙鲆遗传多样性和遗传育种研究提供一批等位酶位点及其等位基因的参考图谱。若取样数量充足时,则获得结果更精确。

致谢 本实验得到集美大学 2002 届邓书林、朱冬蕊、田柱、丁洋、许秀芹和叶承义学生帮助,谨表谢意!

参 考 文 献

- 1 莽克强,徐乃正,方荣祥. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京:科学出版社,1975. 26~47
- 2 朱蓝菲. 鱼类同工酶和蛋白质的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法. 水生生物学报,1992,16(2):183~185
- 3 黎中宝. 牙鲆群体生化遗传学研究 I. 组织特异性研究. 中国生态农业学报,2003,11(2):1~5
- 4 曾呈奎,相建海. 海洋生物技术. 济南:山东科学技术出版社,1998. 269~282
- 5 王中仁. 植物等位酶分析. 北京:科学出版社,1996. 77~119
- 6 徐 成,王可玲,尤 锋等. 鲈鱼群体生化遗传学研究 I. 同工酶的生化遗传分析. 海洋与湖沼,2001,32(1):42~49
- 7 尤 锋,王可玲,相建海等. 山东近海牙鲆同工酶的生化遗传分析. 海洋与湖沼,1999,30(2):121~133
- 8 王可玲,张培军,刘兰英等. 中国近海带鱼种群生化遗传结构及其鉴别的研究. 海洋学报,1994,16(1):93~104
- 9 Harris H., Hopkinson D. A. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. Amsterdam, Oxford:North Holland Publishing Com, 1976
- 10 Kirpichnikov V. S. Genetic Bases of Fish Selection. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1981. 143~200
- 11 Shaklee J. B., Salini J. P. Genetic variation and population subdivision in Australian Barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). Aust J Mar Fish Res., 1985, 36:203~218
- 12 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