

锯缘青蟹等位酶的生化遗传研究*

黎中宝 李少菁 王桂忠 孔祥会

(集美大学水产学院 厦门 361021) (厦门大学海洋与环境学院 厦门 361005)

摘要 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对锯缘青蟹 6 个自然群体进行 11 种等位酶电泳检测和谱带遗传分析结果表明,所研究的锯缘青蟹 22 个等位酶位点和 30 个等位基因中有 15 个单态位点,即 *Ldh*⁻¹、*Sod*⁻²、*Aat*⁻¹、*Aat*⁻²、*Skd*⁻¹、*Skd*⁻²、*Idh*⁻¹、*Sdh*⁻¹、*Adh*⁻¹、*Me*⁻¹、*Me*⁻³、*Mdh*⁻¹、*Amy*⁻¹、*Amy*⁻² 和 *Amy*⁻³,而这些位点仅有 1 个等位基因;有 7 个多态位点,即 *Est*⁻¹、*Est*⁻²(此位点厦门锯缘青蟹为单态位点)、*Est*⁻³、*Sod*⁻¹、*Me*⁻²、*Mdh*⁻²(此位点厦门锯缘青蟹为多态位点)和 *Mdh*⁻³,而这些位点有 2~3 个等位基因。6 个锯缘青蟹自然群体所有位点中共享大多数常见等位基因,其生化遗传非常相似。

关键词 锯缘青蟹 等位酶 生化遗传

Biochemical genetic analysis of allozymes of mud crab, *Scylla serrata*. LI Zhong-Bao (Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021), LI Shao-Jing, WANG Gui-Zhong, KONG Xiang Hui (School of Marine and Environmental Studies, Xiamen University, Xiamen 361005), *CJEA*, 2004, 12(2): 61~64

Abstract Allozyme was investigated using the assay of vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis in *Scylla serrata*. Eleven enzymes presumably encoded by 22 allozyme loci and 30 alleles are scored in *S. serrata*, the monomorphic loci with one allele are *Ldh*⁻¹, *Sod*⁻², *Aat*⁻¹, *Aat*⁻², *Skd*⁻¹, *Skd*⁻², *Idh*⁻¹, *Sdh*⁻¹, *Adh*⁻¹, *Me*⁻¹, *Me*⁻³, *Mdh*⁻¹, *Amy*⁻¹, *Amy*⁻², and *Amy*⁻³; and 7 loci with 2~3 alleles are polymorphic, they are *Est*⁻¹, *Est*⁻²(the monomorphic locus in Xiamen population), *Est*⁻³, *Sod*⁻¹, *Me*⁻², *Mdh*⁻²(the polymorphic locus in Xiamen population), and *Mdh*⁻³. *S. serrata* in six samples shares most common alleles in all loci, their biochemical genetic are very similar.

Key words *Scylla serrata*, Allozyme, Biochemical genetic

锯缘青蟹[*Scylla serrata* (Forsk 1)]隶属于甲壳纲、十足目、短尾亚目和梭子蟹科,分布于我国浙江、福建、台湾、广东、广西和海南省(区)沿岸水域,也分布于东南亚、澳大利亚、日本、印度和南非等国海域。锯缘青蟹个体大、生长快和适应性较强,且营养丰富和商品价值高,是我国东南沿海重要的海洋经济蟹类之一。目前对锯缘青蟹生理学、繁殖学、营养学和养殖生态学的研究已多见报道^[1~4,11,12],而有关系统研究我国广大分布区域内锯缘青蟹生化遗传学尚未见报道。本实验应用等位酶电泳技术研究揭示了锯缘青蟹群体等位酶位点及其等位基因的变异,为锯缘青蟹遗传多样性、遗传结构、杂合性及遗传育种等研究提供理论依据。

1 实验材料与方法

锯缘青蟹采自浙江省宁海、福建省连江和厦门、广东省深圳、广西壮族自治区北海和海南省三亚地区 6 个自然种群,每种群随机采成蟹样本 26~38 个,每种群样本平均体重分别为 128.8g(宁海)、163.5g(连江)、180.6g(厦门)、212.5g(深圳)、181.1g(北海)和 182.7g(海南)。样品活体当天带回实验室解剖,取其活体肌肉组织 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,置 4℃ 下 1.2 万 r/min 离心 15min 后弃去沉淀,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,浓缩胶和分离胶浓度分别为 25g/kg 和 70g/kg, pH 值分别为 6.7 和 8.9。本实验共检测 16 个酶系统,其中可供分析有 11 个酶系统、22 个酶位点和 30 个等位基因(见表 1)。电泳条件和染色方法参照 Taniguchi N. 等,曾呈奎等,王中仁方法^[5,6,13],等位酶命名参照 Shaklee J. B. 等方法^[14],酶谱判译参照王中仁方法^[6]。

*国家自然科学基金项目(40376044)、国家海洋(863)计划项目(2002AA603013)、福建省重中之重项目“福建海岸优良种质生物学和生物活性物质的基础应用研究”和集美大学校长基金项目“锯缘青蟹遗传变异与分化的研究”共同资助

收稿日期:2003-07-29 改回日期:2003-08-23

表1 锯缘青蟹种群研究所用酶系统、位点与等位基因数

Tab.1 Enzyme systems, number of loci and alleles in study of *S. serrata* populations

酶系统 Enzyme system	E. C. 代码 E. C. No.	位点数 Number of loci	等位基因数 Number of alleles	酶系统 Enzyme system	E. C. 代码 E. C. No.	位点数 Number of loci	等位基因数 Number of alleles
天冬氨酸转氨酶(AAT)	E. C. 2. 6. 1. 1	2	2	乳酸脱氢酶(LDH)	E. C. 1. 1. 1. 27	1	1
酯酶(EST)	E. C. 3. 1. 1. -	3	7	山梨醇脱氢酶(SDH)	E. C. 1. 1. 1. 14	1	1
乙醇脱氢酶(ADH)	E. C. 1. 1. 1. 1	1	1	淀粉酶(AMY)	E. C. 3. 2. 1. 1	3	3
苹果酸酶(ME)	E. C. 1. 1. 1. 40	3	4	莽草酸脱氢酶(SKD)	E. C. 1. 1. 1. 25	2	2
苹果酸脱氢酶(MDH)	E. C. 1. 1. 1. 37	3	5	异柠檬酸脱氢酶(IDH)	E. C. 1. 1. 1. 42	1	1
超氧化物歧化酶(SOD)	E. C. 1. 15. 1. 1	2	3				

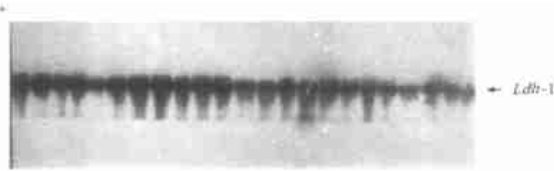


图1 乳酸脱氢酶电泳图谱*

Fig.1 Allozyme electrophoretogram of LDH

*图中点样方式为从左至右1、2、3、4泳道为宁海样品,5、6、7、8泳道为连江样品,9、10、11、12泳道为厦门样品,13、14、15、16泳道为深圳样品,17、18、19、20泳道为北海样品,21、22、23、24泳道为三亚样品,下同。

2 结果与分析

2.1 等位酶的表达

乳酸脱氢酶(LDH, E. C. 1. 1. 1. 27)。6个样地锯缘青蟹样品乳酸脱氢酶表现一致,为四聚体酶,由1个位点控制,位点 *Ldh-1* 含有 *Ldh-1a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA。乳酸脱氢酶1个位点电泳图谱见图1。

酯酶(EST, E. C. 3. 1. 1. -)。锯缘青蟹酯酶为单聚体酶,有明显3个区带,由3个位点控制,位点 *Est-1* 含有 *Est-1a*、*Est-1b* 和 *Est-1c* 3个等位基因,由纯合体和杂合体组成,基因型为AB、AC、BB和BC;位点 *Est-2* 含有

Est-2a 和 *Est-2b* 2个等位基因,由纯合体和杂合体组成,基因型为AB和BB;位点 *Est-3* 含有 *Est-3a* 和 *Est-3b* 2个等位基因,由杂合体组成,基因型为AB。酯酶3个位点电泳图谱见图2。

超氧化物歧化酶(SOD, E. C. 1. 15. 1. 1)。锯缘青蟹超氧化物歧化酶为二聚体酶,有2个明显区带(负带),由2个位点控制;位点 *Sod-1* 含有 *Sod-1a* 和 *Sod-1b* 2个等位基因,由杂合体组成,基因型为AB。*Sod-2* 含有 *Sod-2a* 1个等位基因,基因型为AA,由纯合体组成。超氧化物歧化酶2个位点电泳图谱见图3。

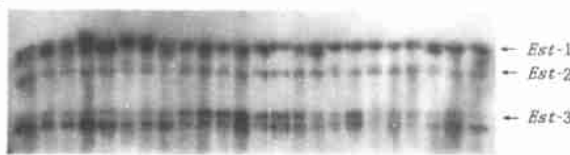


图2 酯酶电泳图谱

Fig.2 Allozyme electrophoretogram of EST

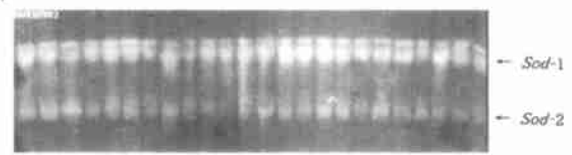


图3 超氧化物歧化酶电泳图谱

Fig.3 Allozyme electrophoretogram of SOD

天冬氨酸转氨酶(AAT, E. C. 2. 6. 1. 1)。6个样地锯缘青蟹样品天冬氨酸转氨酶表现一致,为二聚体酶,含有2个明显区带,由2个位点控制, *Aat-1* 有 *Aat-1a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA。*Aat-2* 有 *Aat-2a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA。天冬氨酸转氨酶2个位点电泳图谱见图4。

异柠檬酸脱氢酶(IDH, E. C. 1. 1. 1. 42)6个样地锯缘青蟹样品异柠檬酸脱氢酶表现一致,为二聚体酶,有1个明显区带,由1个位点控制,位点 *Idh-1* 含有 *Idh-1a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA。异柠檬酸脱氢酶1个位点电泳图谱见图5。

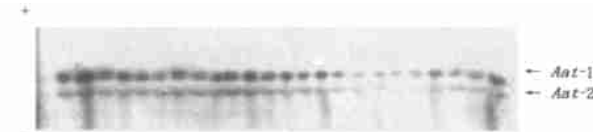


图4 天冬氨酸转氨酶电泳图谱

Fig.4 Allozyme electrophoretogram of AAT



图5 异柠檬酸脱氢酶电泳图谱

Fig.5 Allozyme electrophoretogram of IDH

山梨醇脱氢酶(SDH,E.C.1.1.1.14)。6个样地锯缘青蟹样品山梨醇脱氢酶表现一致,为单聚体酶,由1个位点控制,位点 *Sdh-1* 有 *Sdh-1a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA。山梨醇脱氢酶1个位点电泳图谱见图6。

乙醇脱氢酶(ADH,E.C.1.1.1.1)。6个样地锯缘青蟹样品乙醇脱氢酶表现一致,为二聚体酶,有1个明显区带,由1个位点控制,位点 *Adh-1* 含有 *Adh-1a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA。乙醇脱氢酶1个位点电泳图谱见图7。



图 6 山梨醇脱氢酶电泳图谱

Fig. 6 Allozyme electrophoretogram of SDH



图 7 乙醇脱氢酶电泳图谱

Fig. 7 Allozyme electrophoretogram of ADH

苹果酸酶(ME,E.C.1.1.1.40)。6个样地锯缘青蟹样品苹果酸酶表现一致,为四聚体酶,有3个明显区带,由3个位点控制,位点 *Me-1* 含有 *Me-1a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA;位点 *Me-2* 含有 *Me-1a* 和 *Me-1b* 2个等位基因,由杂合体组成,基因型为AB;位点 *Me-3* 含有 *Me-3a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA。苹果酸酶3个位点电泳图谱见图8。

苹果酸脱氢酶(MDH,E.C.1.1.1.37)。锯缘青蟹苹果酸脱氢酶为二聚体酶,有3个明显区带,由3个位点控制,位点 *Mdh-1* 含有 *Mdh-1a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA。位点 *Mdh-2* 含有 *Mdh-2a* 和 *Mdh-2b* 2个等位基因,由纯合体和杂合体组成,基因型为AB和BB。位点 *Mdh-3* 含有 *Mdh-3a* 和 *Mdh-3b* 2个等位基因,由杂合体组成,基因型为AB。苹果酸脱氢酶3个位点电泳图谱见图9。

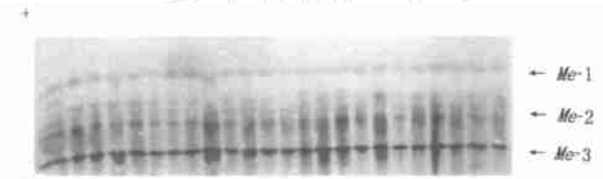


图 8 苹果酸酶电泳图谱

Fig. 8 Allozyme electrophoretogram of ME

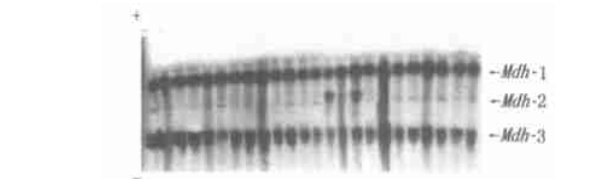


图 9 苹果酸脱氢酶电泳图谱

Fig. 9 Allozyme electrophoretogram of MDE

淀粉酶(AMY,E.C.3.2.1.1)。6个样地锯缘青蟹样品淀粉酶表现一致,为单聚体酶,有3个明显区带(负带),由3个位点控制,位点 *Amy-1* 含有 *Amy-1a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA;*Amy-2* 含有 *Amy-2a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA;位点 *Amy-3* 含有 *Amy-3a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA;在位点 *Amy-2* 与 *Amy-3* 之间还有2~5条区带不太清晰,故本文未统计。淀粉酶3个位点电泳图谱见图10。

莽草酸脱氢酶(SKD,E.C.1.1.1.25)。6个样地锯缘青蟹样品莽草酸脱氢酶表现一致,为单聚体酶,有2个明显区带(负带),由2个位点控制,位点 *Skd-1* 含有 *Skd-1a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA;位点 *Skd-2* 含有 *Skd-2a* 1个等位基因,由纯合体组成,基因型为AA;在位点 *Skd-1* 与 *Skd-2* 之间还有3~4条区带不太清晰,故本文未统计。莽草酸脱氢酶2个位点电泳图谱见图11。

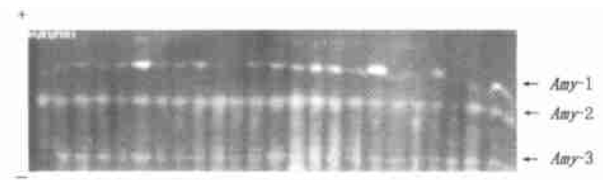


图 10 淀粉酶电泳图谱

Fig. 10 Allozyme electrophoretogram of AMY



图 11 莽草酸脱氢酶电泳图谱

Fig. 11 Allozyme electrophoretogram of SKD

2.2 多态位点

所研究的锯缘青蟹22个等位酶位点和30个等位基因中有15个单态位点,即 *Ldh-1*、*Sod-2*、*Aat-1*、*Aat-2*、*Skd-1*、*Skd-2*、*Idh-1*、*Sdh-1*、*Adh-1*、*Me-1*、*Me-3*、*Mdh-1*、*Amy-1*、*Amy-2* 和 *Amy-3*,而这些位点仅有1个等位基因;有7个多态位点,即 *Esr-1*、*Esr-2*(此位点厦门锯缘青蟹为单态位点)、*Esr-3*、*Sod-1*、*Me-2*、*Mdh-2*(此位点厦

门锯缘青蟹为多态位点)和 *Mdh-3*,而这些位点有 2~3 个等位基因。

3 小结与讨论

等位酶分析结果表明 6 个锯缘青蟹种群所有位点中共享大多数常见等位基因,因此它们的生化遗传非常相似;锯缘青蟹的酯酶、山梨醇脱氢酶、莽草酸脱氢酶和淀粉酶为单聚体酶,天冬氨酸转氨酶、超氧化物歧化酶、苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和乙醇脱氢酶为二聚体酶,苹果酸酶和乳酸脱氢酶为四聚体酶;锯缘青蟹的酯酶、苹果酸脱氢酶、苹果酸酶和淀粉酶有 3 个位点,超氧化物歧化酶、天冬氨酸转氨酶和莽草酸脱氢酶有 2 个位点,乙醇脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、山梨醇脱氢酶和乳酸脱氢酶有 1 个位点。其中天冬氨酸转氨酶、乙醇脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和乳酸脱氢酶的位点数均与 Keenan C. P.^[15]在青蟹属 4 个种(*S. serrata*, *S. paramamosain*, *S. olivacea*, *S. tranquebarica*)的研究结果相一致,但苹果酸脱氢酶的位点数与其研究结果不一致(苹果酸脱氢酶有 2 个位点)。而天冬氨酸转氨酶、乙醇脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、乳酸脱氢酶和山梨醇脱氢酶的位点数与 Sugama K.^[16]等在青蟹属另 3 个种(*S. paramamosain*, *S. olivacea*, *S. tranquebarica*)的研究结果相一致,但酯酶、超氧化物歧化酶和苹果酸脱氢酶的位点数与其研究结果不一致(酯酶和超氧化物歧化酶有 1 个位点,苹果酸脱氢酶有 2 个位点)。造成这种差异的原因除物种自身差别外,可能与不同电泳支持基质有关,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,而淀粉胶电泳方法分辨率低,有些等位基因无法检测到,对组成复杂或活性较弱的等位酶难以检测,而聚丙烯酰胺凝胶电泳方法分辨率高^[7,8]。绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)的酯酶、超氧化物歧化酶和苹果酸脱氢酶分别为 4 个位点、4 个位点和 3 个位点^[9]。

所研究的 22 个等位酶位点中有 *Esr-1*、*Esr-2*(此位点厦门锯缘青蟹为单态位点)、*Esr-3*、*Sod-1*、*Me-2*、*Mdh-2*(此位点厦门锯缘青蟹为多态位点)和 *Mdh-3* 7 个多态位点,而这些位点有 2~3 个等位基因。但 *S. paramamosain*, *S. olivacea* 和 *S. tranquebarica* 的酯酶和超氧化物歧化酶 2 个酶系统均表现为单态位点^[16]。而中华绒螯蟹酯酶具多态性^[9,10]。若高频率的多态位点和优良性状(抗病、促长等)连锁,可利用分子标记辅助育种筛选出优良性状的子代,人工优良新品系可定向建立^[8]。

参 考 文 献

- 1 王桂忠,林淑君,林琼武等. 盐度对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)幼体存活与生长发育的影响. 水产学报, 1998, 22(1): 89~92
- 2 王艺磊,张子平,李少菁. 锯缘青蟹精子发生的超微结构. 动物学报, 1997, 43(3): 249~254
- 3 李富花,李少菁. 锯缘青蟹肝胰腺的观察研究. 海洋与湖沼, 1998, 29(1): 29~34
- 4 成永旭,李少菁,王桂忠等. 锯缘青蟹胚胎发育期脂类变化的研究. 海洋学报, 2000, 22(增): 433~442
- 5 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
- 6 王中仁. 植物等位酶分析. 北京:科学出版社, 1996. 77~119
- 7 黎中宝. 南美白对虾等位酶的遗传控制. 虾类养殖研究. 北京:海洋出版社, 2002. 335~338
- 8 黎中宝,邹志华,常建波. 牙鲆群体生化遗传学研究——等位酶的生化遗传分析. 中国生态农业学报, 2003, 11(3): 9~12
- 9 赵金良,李思发. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系:生化遗传差异分析. 水产学报, 1999, 23(4): 331~336
- 10 郑曙明,吴青. 中华绒螯蟹同工酶的研究. 水生生物学报, 1994, 18(2): 183~185
- 11 Li Shaojing, Wang Guizhong, Zeng Chaochu. Investigations into breeding biology of mud crab, *Scylla serrata*. Proc. PACON, 1993. 93
- 12 Li Shaojing, Zeng Chaochu, Huang Jiannan, et al. Bacterial production in the water and sediments of mudcrab, *Scylla serrata*, farming ponds: Its ecological implications. PACON, 1997. 141
- 13 Taniguchi N., Sugama K. Genetic variation and population structure of red sea bream in the coastal waters of Japan and the East China Sea. Nippon Surisan Gakkaishi, 1990, 56(7): 1069~1077
- 14 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
- 15 Keenan C. P. The fourth species of scylla. Brisbane: Mud Crab Aquaculture and Biology, 1999, 78: 48~58
- 16 Sugama K., Hutapea J. H. Genetics characterisation in the mud crab *Scylla* (Brachyura: Portunidae). Brisbane: Mud Crab Aquaculture and Biology, 1999, 78: 43~47