文章编号：1004 - 7271(2006)02 - 0140 - 04

池蝶蚌与三角帆蚌及其杂种 F_1 的同工酶鉴别

李晓英[1]，董志国[2]，程汉良[2]，李家乐[1]

（1.上海水产大学生命科学与技术学院，上海　200090；
2.江苏省海洋生物技术重点建设实验室，淮海工学院海洋学院，江苏 连云港　222005）

摘　要：通过对外来种池蝶蚌(C)、三角帆蚌(S)及其正反杂种 F_1 的肝脏同工酶进行垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳，分析了肝脏的 SOD 和 EST 同工酶谱带。结果表明，这两种蚌及其正反杂种 F_1 同工酶的表达既呈现出一些相似的特征，又有明显差异。这四种蚌中分别有 2～5 个 SOD 位点，其中 SOD－1 为一强带且仅见于 F_1SC 中，SOD－2 在 F_1SC 中为强带，但在 F_1CS 中较弱，而其双亲中则无该带；SOD－3 为一强带均保守的见于四种蚌中，SOD－4 为一强带但仅在杂种 F_1SC 中无表达，SOD－5 为一强带但仅在池蝶蚌中未检到；在两亲本与其杂种 F_1 中分别检测到 4～6 个 EST 同工酶位点，其中 EST－4 仅见于杂种 F_1SC 中，EST－5 在杂种 F_1CS 中无表达，其余均有不同强弱的表达。

关键词：池蝶蚌；三角帆蚌；杂种 F_1；同工酶
中图分类号：S 917　　**文献标识码**：A

Isozyme identification of *Hyriopsis schlegeli*, *Hyriopsis cumingii* and their reciprocal hybrids F_1

LI Xiao-ying[1], DONG Zhi-guo[2], CHENG Han-liang[2], LI Jia-le[1]
(*College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai* 200090, *China*;
2. *Key Constructing Lab of Marine Biotechnology of Jiangsu Province, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang* 222005, *China*)

Abstract: In the paper, isozymes(SOD, EST) from liver of alien species *Hyriopsis schlegeli*(C), *H. cumingii*(S) and their reciprocal hybrids F_1 were analyzed by vertical polyacrylamide gel electrophoresis. The results indicated that phenotype polymorphism in the isozymes electrophoresis meanwhile some common characters were observed among *H. schlegeli*, *H. cumingii* and their reciprocal hybrids F_1. There are 2－5 SOD loci in parental mussels and their reciprocal hybrids F_1. A strong activity of SOD－1 is visible only in F_1SC, and about SOD－2, a strong activity band in F_1SC, while a weak band in F_1CS but no band in parent is observed, respectively. There is a strong conservative band SOD－3 in all mussels and a strong band SOD－4 except in F_1SC, and a strong band SOD－5 except in *Hyriopsis schlegeli* are visible. 4－6 EST loci are visible in the 2 species mussels and their reciprocal hybrids F_1 and all loci have a varying degree of activity but EST－4 invisible in F_1SC and EST－5 invisible in F_1CS.

收稿日期：2005-10-08
基金项目：农业部"948"项目(2004－Z44)；上海市水产养殖重点学科资助项目(Y1101)；浙江省科技攻关重点项目(2004C22024)
作者简介：李晓英(1975－)，女，内蒙古海拉尔人，硕士研究生，专业方向为水产动物种质资源与种苗工程。
通讯作者：李家乐，E-mail：jlli@shfu.edu.cn

Key words: *Hyriopsis schlegeli*; *Hyriopsis cumingii*; hybrids F_1; isozymes

池蝶蚌(*Hyriopsis schlegeli*)隶属于蚌科(Uionidae)、帆蚌属(*Hyriopsis*),是日本特有种,1997年由江西省抚州市洪门水库开发公司从日本引进,目前在国内已进行了人工繁殖并获得成功[1],被认为是具有较高经济价值的物种[2]。与池蝶蚌同属的三角帆蚌(*H. cumingii*)为我国特有种,是我国淡水育珠普遍应用的一种蚌。二者在幼蚌早期非常相似,很难从外部形态上加以鉴别。而且研究表明,池蝶蚌在自然状况下就可以与三角帆蚌杂交并获得杂交后代[3],这将对三角帆蚌的种质造成严重的威胁,而国内目前还未有其潜在生态风险方面的研究报导。同工酶研究作为一种成熟的种质鉴定技术被作为遗传标记广泛应用于水生生物研究领域。而且在贝类研究方面已有成熟的应用,特别是海水贝类种质鉴定方面已取得了理想的结果[4-8]。本文应用该技术对外来种池蝶蚌与三角帆蚌及其杂种 F_1 进行了研究,分析其同工酶谱带,对这两种蚌及其杂交后代进行鉴别,为种质资源监测和保护提供依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

本试验材料所用三角帆蚌由浙江诸暨王家井珍珠养殖场提供,池蝶蚌系间接从日本引进,并于2003年5月21日在浙江诸暨王家井珍珠养殖场进行杂交繁殖。成功获得正反杂交及亲本自交后代,取经历两夏一冬的蚌用于本试验研究。试验材料标识如下:三角帆蚌(S)、池蝶蚌(C)、正交 F_1(三角帆蚌♀×池蝶蚌♂,SC),反交 F_1(池蝶蚌♀×三角帆蚌♂,CS)。

选用个体无损伤,喷水有力的健康蚌,各10只,小心洗刷去除表面附着物,暂养于事先准备好经充分曝气的实验室水族箱内。

1.2　同工酶提取

试验蚌于实验室水族箱内暂养一周,使其吐尽泥沙,活体解剖,取肝脏,电子天平称重,按1:3(W/V)加入酶提取液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0 + 0.6%巯基乙醇),在预冷的玻璃研钵内低温研磨,为了提高研磨效果,加入少许石英砂和一定量的液氮,15 000 r/min低温离心2次,每次30 min,取上清液 -70 ℃保存备用。

1.3　电泳及染色

采用北京六一仪器厂生产的稳压稳流型电泳仪进行不连续聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳。浓缩胶浓度为3.2%,0.5 mol/L Tris-HCl缓冲液,pH 6.7;分离胶浓度7.6%(SOD)和10.0%(EST),3 mol/L Tric-HCl缓冲液,pH 8.9;电泳缓冲液为0.005 mol/L Tris-Gly,pH 8.3。在200 V电压进行电泳分离,电泳时间:EST为3 h 20 min,SOD为4 h 30 min;同工酶染色液配方参考文献[9]。

2　结果与分析

2.1　三角帆蚌、池蝶蚌及其杂种 F_1 肝的SOD同工酶谱的比较与分析

图1、图2为三角帆蚌、池蝶蚌及其杂种 F_1 肝脏的SOD同工酶图谱,这两种蚌及其正反杂种 F_1 同工酶的表达既呈现出一些相似的特征,又有明显差异。且杂种后代中出现了两亲本中都未见的SOD同工酶谱带,杂种具有明显的变异。在两亲本与其杂种 F_1 中分别检测到2~5个位点,其中SOD-1位点编码的酶活性很强,在杂种 F_1SC中检测到很强的表达,为1条酶带。而在其它三种蚌中均没有表达,可以作为杂种 F_1SC的特异性谱带;SOD-2位点编码的酶活性在杂种 F_1SC中表达较强,但在 F_1CS中较弱,而其双亲中则无该带;SOD-3在四种蚌均得到极强的表达,说明具有较高的保守性,可能是维持正常生理功能的必需同工酶;SOD-4除了在杂种 F_1SC中无表达外,其余均有较强的表达;SOD-5除了在池蝶蚌中无表达外,其余均有一条较强的谱带,结果表明可以应用该图谱将这两亲本和其相应的杂交后代加以鉴别。

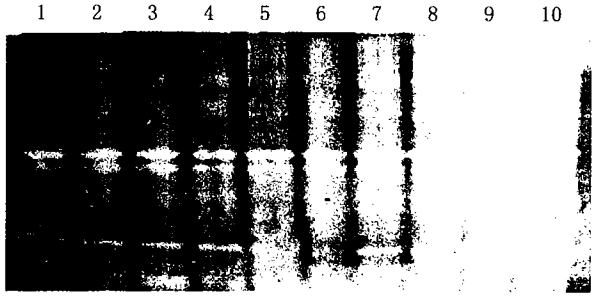

图1 三角帆蚌(1-4)、池蝶蚌(5-6)、杂交 F_1CS(7-8)和 F_1SC(9-10)肝脏的 SOD 同工酶电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of SOD in liver of *H. cumingii* (1-4), *H. schlegeli* (5-6), hybrids CS(7-8) and SC(9-10)

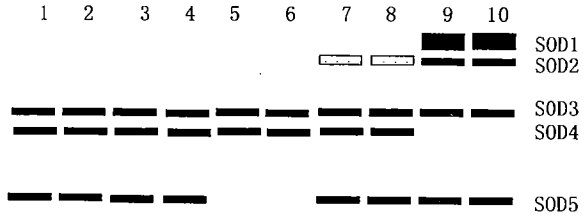

图2 三角帆蚌(1-4)、池蝶蚌(5-6)、杂交 F_1CS(7-8)和 F_1SC(9-10)肝的 SOD 同工酶模式图

Fig.2 Model graph of SOD in liver of *H. cumingii* (1-4), *H. schlegeli* (5-6), hybrids CS(7-8) and SC(9-10)

2.2 三角帆蚌、池蝶蚌及其杂种 F_1 肝的 EST 同工酶谱的比较与分析

图3、图4为三角帆蚌、池蝶蚌及其杂种 F_1 肝的 EST 同工酶的图谱，在两亲本与其杂种 F_1 中分别检测到4~6个位点，其中 EST-1 位点编码的酶活性较弱，且在池蝶蚌无表达谱带；EST-2 在四种蚌中均有表达，在三角帆蚌、池蝶蚌和杂种 F_1CS 中表达较弱，但在杂种 F_1SC 中表达较强；EST-3 在四种蚌均有表达，但以三角帆蚌最弱；EST-4 除了在杂种 F_1SC 中表达外，其余均无表达。EST-5 在杂种 F_1CS 中无表达而其余种类中有较弱的表达；EST-6 在四种类中均得到了极强的表达，在功能和进化上相对保守。

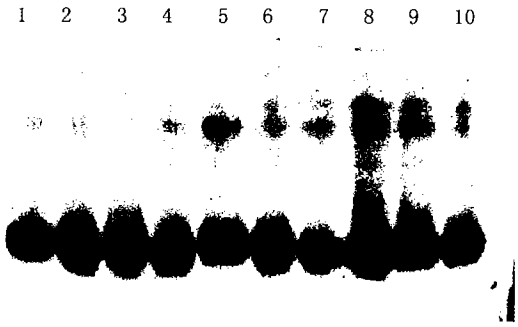

图3 三角帆蚌(1-3)、池蝶蚌(4-5)、杂种 F_1CS(6-7)和杂种 F_1SC(8-10)肝的 EST 同工酶电泳图

Fig.3 Electrophoretogram of EST in liver of *H. cumingii* (1-3), *H. schlegeli* (4-5), hybrids CS(6-7) and SC(8-10)

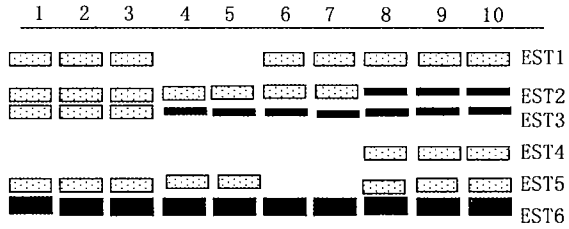

图4 三角帆蚌(1-3)、池蝶蚌(4-5)、杂种 F_1CS(6-7)和杂种 F_1SC(8-10)肝的 EST 同工酶模式图

Fig.4 Model graph of EST in liver of *H. cumingii* (1-3), *H. schlegeli* (4-5), hybrids CS(6-7) and SC(8-10)

3 讨论

3.1 同工酶谱的特征及在亲本与杂交子一代中的比较鉴定

本研究中发现这四种蚌在 SOD 和 EST 这两种同工酶上均存在差异，这为这两种淡水贝类的早期鉴定和防止种质污染提供了可能。本研究中发现池蝶蚌没有 SOD-5 这条带而在三角帆蚌中却存在。另外正反杂交蚌的变异却比较大，甚至出现了双亲均不具有的性状。如在杂种 F_1SC 中检测到很强 SOD-1 位点，而在其它三种蚌中均没有表达，可以作为杂种 F_1SC 的特异性谱带；SOD-2 位点编码的酶活性在杂种 F_1SC 中表达较强，但在 F_1CS 中较弱，而其双亲中则无该带；造成这种现象可能是由于位点间亚基杂合的产物。资料显示构成同工酶的位点间的亚基组合形成新的酶带现象是存在的，并且能够通过电泳组织化学染色方法检测出来，而这种类型的酶属于次生同工酶类，也具有相同的功能，是转录后饰

变的结果，而不是不同的位点造成的[10]。另外，每群体的 10 个样品间的酶谱带变异较小，但在杂交子代中有一定的变异，但本研究主要目的在于种间变异，所以文中将每个群体都共有的保守带作为考察种间差异的标准，而对种内 10 个样本间的细微差异不作考虑。因此，应用本试验结果中的 SOD 酶谱可以将四种蚌区别如下：①三角帆蚌：与池蝶蚌相区别为该蚌具有谱带 SOD－5，而在池蝶蚌中无表达谱带。与杂种 F_1CS 相区别为无谱带 SOD－2，与杂种 F_1SC 相区别为无谱带 SOD－1，SOD－2；②池蝶蚌：无谱带 SOD－5，可以将其与其它三种蚌区分开来；③杂种 F_1CS：无谱带 SOD－1 可以将其与杂种 F_1SC 相区别，而与亲本的区别同①和②；④杂种 F_1SC：有特异性谱带 SOD－1，且表达很强，可以做为其同工酶标记。应用本试验结果中的 EST 酶谱可以将四种蚌区别如下：①三角帆蚌：与池蝶蚌相区别为该蚌具有谱带 EST－1，而在池蝶蚌中无该谱带。与杂种 F_1CS 相区别为有谱带 EST－5，而杂种 F_1CS 无该谱带，杂种 F_1SC 有特异性谱带 EST－4，可以将其和三角帆蚌加以区分。②池蝶蚌：无谱带 EST－1，可以将其与其它三种蚌区分开来；③杂种 F_1CS：无谱带 EST－5 可以将其与亲本和杂种 F_1SC 相区别；④杂种 F_1SC：有特异性谱带 EST－4，可以和其它蚌加以区分。

3.2　组织样品和酶类的选择依据

考虑到取材方便、样品量大小及酶量多少等因素，曾对这几种蚌的鳃、闭壳肌、外套膜和肝脏等器官进行了同工酶检测，经筛选后，认为以肝组织为材料进行同工酶检测具有酶带清晰、重复性好、多态性明显等特点，因此采用了肝脏的同工酶谱。在对酶类选择上，LDH 被广泛应用于鱼类种质鉴定中，如我国现有的一些鲤科经济鱼类的种质标准[11,12]，大多应用了该酶作为种质鉴定的工具酶。但 LDH 酶带很弱且为一条带无多态性，由一个基因位点控制，这与鱼类的 LDH 有明显的不同。SOD 一般以同工酶的三种类型分布于机体内，按其结合的金属离子可将其分为 Fe－SOD、Mn－SOD 以及 CuZn－SOD，为二聚体酶，此三种类型的 SOD 可以确保氧自由基在各种条件下均能被有效清除，在动物体内稳定存在[13]，因此用作种质鉴定的标记酶有着可靠的应用价值。EST 绝大部分是由一个亚基组成的单体酶，在鱼类研究中变异较大，更适合于群体遗传结构分析和遗传多样性研究，而作为生化遗传标记进行种质鉴定则较少见，这可能与酯酶的酶带较多变异较大有关系，因此本研究中的酯酶酶谱可以和 SOD 酶谱的一起相互对照作为生化遗传标记来对三角帆蚌和外来种池蝶蚌及其杂交子一代进行鉴别。

池蝶蚌被引进我国之后，由于其具有壳、外套膜较厚，育成珍珠色泽、大小比一般淡水珍珠更为出色，已被证明是一种优质育珠材料[3]。进一步的研究结果表明，池蝶蚌♀×三角帆蚌♂后代生长，抗病及育珠方面均具有明显的杂种优势[2]。但应该足够重视的是：池蝶蚌一旦进入天然水体，有可能与三角帆蚌产生杂交，这就将会对我国淡水优良育珠母蚌三角帆蚌的种质造成污染。因此，应加强对外来种池蝶蚌的早期监测和风险评估，防止其进入天然水体对我国淡水贝类的生物多样性造成破坏。

参考文献：

[1] 徐毛喜.池蝶蚌的引种及繁育技术[J].南昌大学学报，2000，24(专辑)：21－24.

[2] 郑汉丰.三角帆蚌与池蝶蚌杂交 F_1 的形态生长与遗传差异研究[D].上海水产大学硕士论文，2004.

[3] 周春花，徐毛喜，欧阳珊.池蝶蚌(*Hyriopsis schlegeli*)与三角帆蚌(*H. cumingii*)若干生物学性状比较研究[J].江西科学，2003，21(2)：122－124.

[4] 王志铮，李太武，刘　艳.栉孔扇贝六种同工酶的生化遗传分析[J].海洋与湖沼，2004，33(3)：1－2.

[5] 王梅芳，叶富良，余祥勇.3 种江珧同工酶遗传标记[J].湛江海洋大学学报，2000，20(2)：1－2.

[6] Jonathan P A, Raymond J. High levels of shared allozyme polymorphism among strongly differentiated congeneric clams of the genus *Astarte* (Bivalve: Mollusca) [J]. Heredity, 1999, 82: 89－99.

[7] Diaz-Almela E, Boudry P, Launey S, *et al*. Reduced female gene flow in the European flat oyster *Ostrea edulis*[J]. J Hered, 2004, 95: 510－516.

[8] 王冬群，李太武，苏秀榕.缢蛏六个种群的生化遗传标记[J].水产科学，2004，23(4)：1－4.

[9] 胡能书，方贤国.同工酶技术及其应用[M].长沙：湖南科学技术出版社，1985.86－126.

[10] 李太武，孙修勤，刘　艳，等.中日栉孔扇贝杂交子一代群体的遗传变异[J].高技术通讯，2002，12(6)：101－105.

[11] 中华人民共和国水产行业标准，SC 1063－2003 青海湖裸鲤[S].

[12] 中华人民共和国国家标准，GB/T 16875－1997 兴国红鲤[S].

[13] 陈淮杨，刘望夷.从 SOD 的分布和结构看其分子进化[J].生物化学与生物物理进展，1996，23(5)：408－413.