

研究简报

斑节对虾个体发育早期的同工酶变化

ISOZYME CHANGES DURING EARLY ONTOGENY OF *PENAEUS MONODON*

李 纯 厚 钟 振 如 陈 敏

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

Li Chunhou, Zhong Zhenru and Chen Min

(South China Sea Fisheries Institute, CAFS, Guangzhou 510300)

关键词 斑节对虾, 个体发育, 酯酶同工酶

KEYWORDS *Penaeus monodon*, ontogeny, esterase isozyme

斑节对虾是东南亚国家最普遍养殖、生长最快的种类。池塘养殖时, 3cm 长的虾苗经 5 个月可长到 75~100g(密度 5000 ind/ha)。同时它也是世界上最大的对虾之一, 体长可达 314mm, 有重要的商业销售市场价值。

我国从 80 年代初起逐步开展较大规模的对虾养殖业, 经过 10 来年的发展, 目前在对虾的育苗技术、饲料工业、大水面养殖、疾病防治等方面均取得了突破性的进展。但对斑节对虾个体发育阶段的生化分析等方面的研究却很薄弱, 目前尚未见有报道。因此, 本文以斑节对虾为材料, 描述了其幼体发育阶段的酯酶同工酶变化, 旨在为进一步开展对虾种群遗传学、渔业资源学及水产养殖技术的研究提供一定的参考。

一、材料和方法

1. 样本采集 斑节对虾各期幼体均采自南海水产研究所深圳盐田试验基地虾苗场。无节幼体(N)为孵化后 20 小时左右的个体, 蚤状幼体为 Z_2 期, 糠虾幼体为 M_2 期, 仔虾期幼体为 P_{4-5} 和 P_{11-12} 两种类型。幼体采到后, 用筛绢包好贮存于液氮生物容器内运回实验室。

2. 样品制备 从液氮生物容器内取出样品, 用适量蒸馏水融化在洁净培养皿内, 分别置于解剖镜下观察挑选出同期的幼体样品约 10mg, 放入 2ml 玻璃匀浆器内, 加入 0.5ml 20% 蔗糖溶液, 冰浴匀浆。匀浆液在 10°C 环境下 13,000xg 离心 10 分钟, 吸取上清液用作样品供分析用。电泳前还应将样品与 0.025% 溴酚蓝-50% 甘油标记指示物以 4:1 体积比混合后再使用。

3. 电泳与显色 电泳用 DY-3B 型双稳、定时电泳仪, XF17 型双面垂直平板电泳槽(均为江苏兴化分析仪器厂生产), 按常规方法进行[吴鹤龄等, 1983; 胡能书、万贤国, 1985]。中性 pH 不连续聚丙烯酰胺凝胶, 胶浓度 7.5%, 缓冲液为 0.057M Tris-HCL pH 7.5, 化学聚合。电极缓冲液为 0.008M Tris-0.030M 巴比妥 pH 7.0。用微量生物进样器加样, 50 μ l/孔。电泳在 8-10°C 恒温下进行, 电压 220 伏,

时间 2—3 小时。显色采用谢力、朱涤芳[1989]的方法, 染色好的胶片用双蒸水漂洗 3 次, 然后放入 7.5% 乙酸-30% 乙醇-15% 甘油凝胶固定液固定(约 1 小时)。

4. 结果记录与分析 显色、固定后胶片应立即进行拍照、描图并计算相对迁移率 Rf 值[赖德、泰勒, 1987 年中译本]。

$$Rf = \frac{l}{L}$$

其中: l = 酶带移动距离(cm), L = 电泳结束时溴酚蓝移动距离(cm)。

5. 胶片保存 可将胶片在 10% 甘油中浸泡片刻后制成干胶片永久保存[陆士伟、赖天斌, 1987]。

二、研究结果

斑节对虾个体发育早期的酯酶同工酶变化如图 1。从无节幼体期到仔虾 P_{11-12} 期共出现 14 条同工酶带。N 期(无节幼体)和 Z_2 期(溞状幼体)有 2 条酶带, M_2 期(糠虾幼体)有 4 条酶带, P_{4-5} 期有 5 条酶带, P_{11-12} 期有 6 条酶带。其中, N 期与 Z_2 期有 1 条相同酶带 E_{14} , M_2 与 P_{4-5} 及 P_{11-12} 也出现 1 条相同酶带 E_{13} ; P_{4-5} 和 P_{11-12} 间有 3 条相同酶带 E_2 、 E_3 及 E_{12} , 不过前者的 E_2 与 E_3 均为一级宽带, 而后者 E_2 为一级窄带, E_3 为三级宽带。

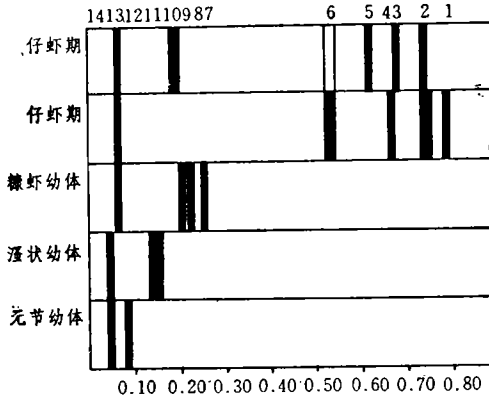


图 1 斑节对虾不同发育时期的酯酶同工酶

Fig. 1 Electropherograms of esterase (EST) during development of *Penaeus monodon*

进一步分析发现, 酶带 E_2 和 E_3 极为接近, Rf 值分别为 0.67 和 0.66; 酶带 E_2 、 E_3 与 E_{10} 及 E_{11} 与 E_{12} 也都较为接近; 酶带 E_{13} 正好间插于 E_{12} 与 E_{14} 间且互相接近。很明显, 从 N 期到仔虾期其酯酶同工酶酶谱特征显然不同, 显示出明显的发育差异性。

由于实验样品取样量是接近的, 因此其差异性并非材料量的变化所致, 而是由于其幼体发育阶段的不同而形成的。

三、讨 论

发育是指在一稳定的遗传信息库中基因经过选择性的表达由单细胞受精卵产生一个复杂的成体的过程。这种过程的主要特征是组织分化, 由此产生许多细胞类型。每一类细胞又都有其自己特征和代谢性, 从而使成年机体具有既分工又统一的整体功能。特异的基因表达产生了成体组织特异的同工酶谱, 且这类同工酶谱都是由单细胞阶段的一个前体酶谱产生的, 因此, 在机体发育过程中显然会发生一系列复杂的同工酶变化[赖德、泰勒, 1987 年中译本]。

同工酶学应用于发育上不仅因其最后的组织分布是代谢分化的一项主要特征,而且还因能在发育早期分辨出易消逝的同工酶谱,从而利于解释发育过程的这些阶段特有的代谢问题,因此便产生了发育同工酶学。

有关发育中同工酶变化的研究颇多。Morgan[1978]在研究一种扇蟹 *Rhithropanopeus harrisi* 幼体发育阶段的生化变化时比较了其个体发育过程中同工酶的变化,他分6个时期分析了EST, LDH, MDH, ALP, PGI及ACP等6种同工酶系统。他的研究指出,在这种扇蟹的发育过程中,6种同工酶系统的数量及其表达均显示出明显的发育差异性,不同发育阶段同工酶谱明显不同。这说明在其发育过程中,随着组织分化,产生出不同细胞类型,从而显示不同的同工酶谱。

Hart和Cook[1977]研究了 *Brachydanio rerio* (Zebra danio) *Brachydanio albolineatus* (Pearl danio)及其杂交后代胚胎发育过程中的酯酶同工酶类型,其定量同工酶电泳分析表明某些酯酶在整个发育阶段均存在,而同时其它酯酶则仅突然出现在形态分化的某个特定阶段。

王桂忠、李少菁[1991]也曾比较了锯缘青蟹个体发育过程中的同工酶谱。他分早(5g)、中(50g)、晚(500g)三个时期比较了酯酶(EST)、醛氧化酶、 α -淀粉酶及乳酸脱氢酶(LDH)四种同工酶谱。在不同发育阶段青蟹肝脏中的EST电泳表现型很稳定,4条酶带;而肌肉中的同工酶与肝胰脏同工酶比较,两者则存在很大差别,EST有3条酶带,显示出明显的组织器官及发育特异性。

本文对斑节对虾幼体发育阶段的研究结果同样显示出明显的发育特异性,同时由于文内仅涉及其个体发育早期的几个阶段,因此还有待今后进一步研究其整个发育时期的同工酶变化并同时开展对虾发育同工酶学的研究。

中国水产科学研究院基金项目部份研究内容。

参 考 文 献

- [1] 王桂忠、李少菁,1991。锯缘青蟹个体发育过程中同工酶谱的比较研究。海洋学报,13(3):412—416。
- [2] 陆士伟、赖天斌,1987。同工酶在农业上的应用,114—115。广东科技出版社(穗)。
- [3] 赖德,C. C.; 泰勒,C. B. (范培昌译),1987。生物学研究概说(同工酶),35—54。科学出版社(京)。
- [4] 吴鹤龄等,1983。遗传学实验方法和技术,147—153。高等教育出版社(京)。
- [5] 胡能书、万贤国,1985。同工酶技术及其应用,30—47。湖南科学技术出版社(长沙)。
- [6] 谢力、朱涤芳,1989。十八种赤眼蜂同工酶的比较研究。昆虫天敌,11(2):77—81。
- [7] Hart, N. H. and M. Cook, 1977. Esterase isozyme patterns in developing embryos of *Brachydanio rerio*(zebra danio), *Brachydanio albolineatus*(pearl danio), and their hybrids. *J. Exp. Zool.*,193:109—128.
- [8] Morgan, R. P. II et al., 1978. Biochemical changes during larval development of the Xanthid crab *Rhithropanopeus harrisi*. III. Isozyme changes during ontogeng. *Marine Biology*, 48: 223—226.