

罗氏沼虾个体发育早期的同工酶研究

李广丽 朱春华

(湛江海洋大学水产学院 湛江 524025)

摘要: 采用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳技术, 对罗氏沼虾个体发育早期 9 个时期的八种同工酶系统(EST、ALP、AMY、GDH、MDH、LDH、SOD、ME) 进行研究, 结果表明: SOD、ME 在早期发育过程中酶谱相对稳定, SOD 表现为三条谱带, ME 表现为两条谱带; 而 EST、ALP、AMY、GDH、MDH、LDH 则随发育其酶谱表现出明显差异, 酶谱渐趋复杂。

关键词: 罗氏沼虾; 电泳; 个体发育; 同工酶

中图分类号: S945.4⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)04-0338-06

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*), 又名马来西亚大虾, 原产于印度洋—太平洋热带地区, 常生活于各种类型的淡水或咸淡水水域中, 是淡水中个体最大的虾, 为主要的水产养殖对象。目前对它的研究主要集中在组织学、养殖技术及苗种培育等方面^[1-3]。有关甲壳类在发育过程中同工酶变化的研究国内外已有一些报道。张志峰等对中国对虾进行了幼体发育阶段的 8 种同工酶研究^[4], 王桂忠等对锯缘青蟹个体发育中 4 种同工酶谱进行过比较研究^[5], 李纯厚等对斑节对虾个体发育早期酯酶同工酶进行了研究^[6]。本实验对罗氏沼虾个体发育早期 9 个时期八种同工酶系统进行检测分析, 旨在为罗氏沼虾的发育生物学、遗传学、幼体发育变态过程中的营养生理学、水产养殖技术等提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集 罗氏沼虾各期幼体采自茂名市金山育苗场。样品分为胚胎发育早期、胚胎发育晚期、第 I 期、第 III 期、第 V 期、第 VII 期、第 IX 期、第 XI 期蚤状幼体和仔虾共九个时期。上述各期幼体分别从育苗池中收集并放入盛有过滤咸淡水的大塑料袋内充氧后, 扎紧袋口运回实验室, 经 4—5 h 空胃, 分样后制样。

1.2 样品制备 取各期活体, 每期约 0.3 g, 以 1:3(体重 g / 体积 mL) 加入 0.3% NAD 液, 在冰浴下匀浆, 匀浆液置于高速冷冻离心机中以 17,000 r/min(4 °C) 离心 20 min, 取上清液各分为 2 份, 分装于干净的塑料离心管中, 一份放入 4 °C 冰箱保存, 另一份则置于低温冰箱保存以备核查。

1.3 电泳与显色 参照朱蓝菲方法^[7], LDH、MDH、ALP、ADH 同工酶系统所用凝胶梯

度为4—15%，其他同工酶系统所用凝胶梯度为4—25%。采用北京六一仪器厂生产的DYY-III 6B 稳压稳流型电泳仪进行电泳，每点样孔加样量为20μL，另加等量20%蔗糖溴酚蓝溶液，电泳在4℃左右以稳压(200V)进行15h。染色参照 philipp^[8]的方法，稍加改进，以显带清楚为宜，取出后放入1%冰醋酸中保存以待拍照。

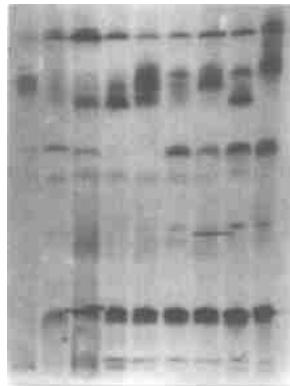
1.4 同工酶的命名及谱型分析 以向阳极方向涌动最快的酶谱带开始，依次命名为1, 2, 3, ……酶谱分析采用王中仁^[9]总结的基本原则。

2 结果

2.1 酯酶(EST, E. C. 3. 11. 1. 1)

罗氏沼虾个体早期的酯酶同工酶较复杂，显示出七个区共8—17条谱带(图1)，可能为单体酶，这些酶带在各期的分布是：

胚胎发育期：表现10条谱带，早、晚期在第二区有差别，早期是Est-7、Est-9、Est-10、Est-12，而晚期则为Est-9、Est-11，且晚期多一条Est-22。



	早期	晚期	I 期	II 期	V 期	VII 期	IX 期	XI 期	仔虾
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

图1 罗氏沼虾不同发育时期EST同工酶电泳

Fig. 1 Electropherograms of EST during development of *M. rosenbergii*

I—V期：各有12条相同的谱带，即Est-1, Est-2, Est-3, Est-7, Est-9, Est-12, Est-15, Est-19, Est-20, Est-21, Est-22, Est-25，第II期增加Est-4, Est-23, Est-24，第V期在此基础上再增加1条Est-11谱带。

VII期至IX期：各有16条酶带，IX期比V期增加Est-6, Est-8两条谱带，但Est-11, Est-12消失。

X期：在第三和第四区间出现三条极细的谱带Est-16至18。

仔虾期：出现前期所没有的EST-5和EST-13。

2.2 苹果酸酶(ME, E. C. 1. 1. 1. 40)



	仔虾	IX期	XI期	VII期	V期	III期	I期	晚期	早期
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

图2 罗氏沼虾不同发育时期ME同工酶电泳

Fig. 2 Electropherograms of ME during development of *M. rosenbergii*

苹果酸酶在各期变化不显著,均有两条谱带,Me-1在仔虾期谱带增宽,活性增强(图2)。

2.3 谷氨酸脱氢酶(GDH, E.C. 1.4.1.2)

谷氨酸脱氢酶在胚胎发育早期未见表达, 胚胎发育晚期至仔虾期出现三条谱带, Gdh-1从IX期开始活性增强(图3)。

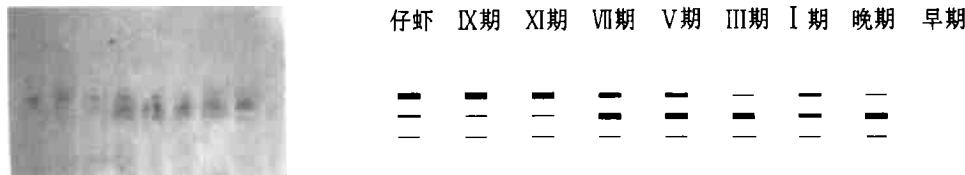


图 3 罗氏沼虾不同发育时期 GDH 同工酶谱

Fig. 3 Electropherograms of GDH during development of *M. rosenbergii*

2.4 淀粉酶(AMY E.C. 3.2.1.1)

在罗氏沼虾个体发育的九个阶段共检测出四条透明 α - 淀粉酶谱带(图 4), 从胚胎发育早期至 I 期淀粉酶没有表达, II 期开始随发育谱带数目增多且活性增强, 未见 R-AMY 及 Q-AMY 的表达。

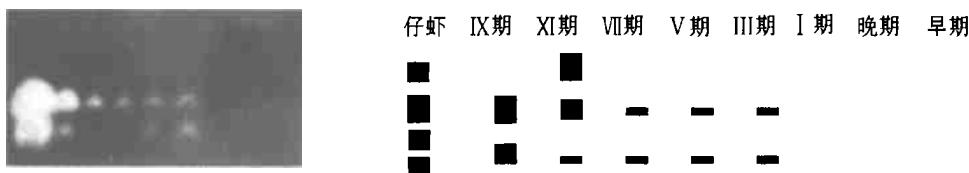


图 4 罗氏沼虾不同发育时期 AMY 同工酶谱

Fig. 4 Electropherograms of AMY during development of *M. rosenbergii*

2.5 苹果酸脱氢酶(MDH E.C. 1.1.1.37)

苹果酸脱氢酶为二聚体酶,分为线粒体型和细胞质型,在胚胎发育期MDH表达无差异,s型出现一条谱带,m型出现两条谱带;I期、II期谱带数目最多,s型出现三条深带三条浅带,m型表达不变;V型—仔虾期s型表达差异不大,而m型有所变化,IX期开始出现Mdh-9和Mdh-10(图5)。



图 5 罗氏沼虾不同发育时期 MDH 同工酶谱

Fig. 5 Electropherograms of MDH during development of *M. rosenbergii*

2.6 乳酸脱氢酶(LDH E.C. 1.1.1.27)

乳酸脱氢酶为四聚体酶，明显分为两个区，第一区的谱带染色较淡，第二区染色较深，仔虾期没有第一区的4—6条细而均匀的谱带（图6）。

2.7 超氧化物歧化酶(SOD E.C. 1.15.1.1)

超氧化物歧化酶为透明带,在整个个体发育早期阶段谱带简单,为一个位点编码的二聚体酶,均表现为三条带,未随发育而变化(图7)。

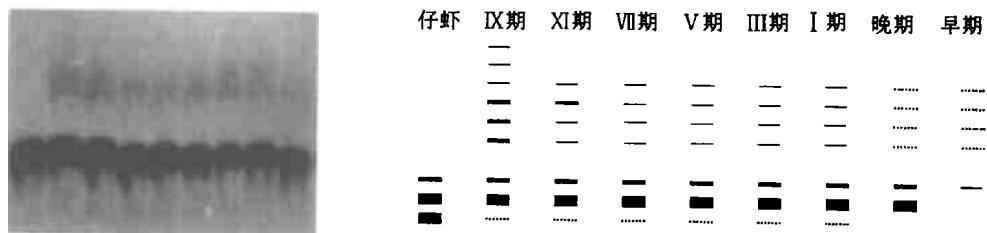


图 6 罗氏沼虾不同发育时期 LDH 同工酶谱

Fig. 6 Electropherograms of LDH during development of *M. rosenbergii*

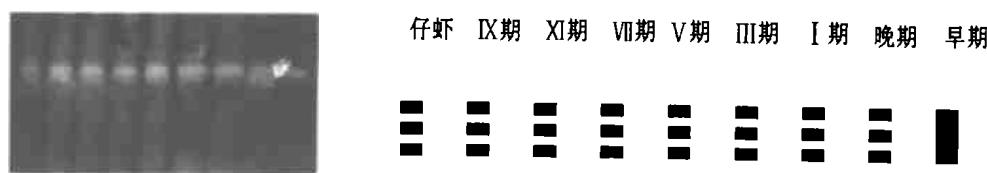


图7 罗氏沼虾不同发育时期SOD同工酶谱

Fig. 7 Electropherograms of SOD during development of *M. rosenbergii*

2.8 碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP, E.C. 3.1.3.1)

碱性磷酸酶分为两个区,第一区随个体发育渐趋复杂,而第二区则随发育谱带渐窄、染色渐淡,为二聚体酶(图8)。

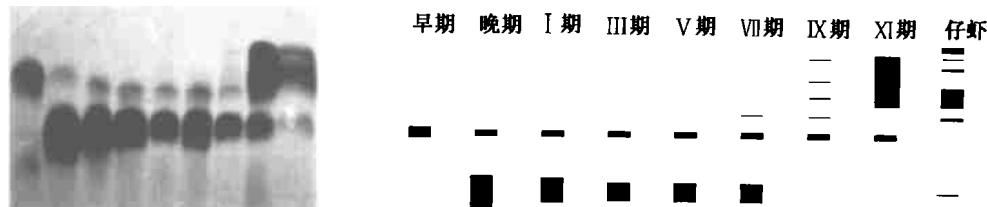


图8 罗氏沼虾不同发育时期 ALP 同工酶谱

Fig. 8 Electropherograms of ALP during development of *M. rosenbergii*

3 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异的特征和代谢性,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^[10]。

同工酶具有空间和时间的特异性,不同发育时期的同工酶具有显著的差异性。张志峰等^[4]对中国对虾幼体的发育同工酶研究表明,EST 在无节幼中期只有 1 条酶带,至仔

虾期增至 6 条, 且酶活性随发育而渐增。李纯厚等^[6]对斑节对虾早期发育中酯酶的研究亦表明 EST 同工酶谱随发育日渐复杂。对罗氏沼虾个体发育早期 9 个期的酯酶同工酶研究表明, EST 在胚胎发育期各有 10 条酶带, 至仔虾期为 17 条, 且活性随发育而逐渐增强, 与前人的研究结果相似。

在罗氏沼虾个体发育早期 GDH 的研究中, GDH 共显现 3 条谱带, 而在中国对虾中, GDH 共显现 8 条谱带^[4]。谷氨酸脱氢酶是蛋白质代谢的重要酶类, L- 氨基酸通过转氨酶作用变成 L- 谷氨酸, 最后经过 GDH 催化脱氨, 释放 NH₃。像其他甲壳动物一样, 罗氏沼虾是排氨型代谢动物, 蛋白质代谢的最终含氮代谢废物大部分以 NH₃ 的形式排出体外, 它们主要借助触角腺或小颚腺排氨。GDH 在各期活性较弱, 这可能与幼体的代谢机制不完善有关。

从 LDH 同工酶谱可见, 罗氏沼虾的 LDH 并没有显示出经典的五条谱带, 而是分成两个区, 表明其并非由 A、B 亚基组成的异四聚体, 染色较浅的第一区可能是由需氧型 B 亚基及其变异基因编码, 染色深的第二区则由厌氧型 A 亚基编码并占据优势, 到了仔虾期只有 A 亚基编码的四条谱带。这与中国对虾不同发育阶段 LDH 的表达有所不同^[4]。LDH 同工酶谱的这种变化, 提示罗氏沼虾仔虾期以后各期对氧的要求已经不再象胚胎及幼体发育期对溶氧的要求那么严格。

淀粉酶是碳水化合物水解的酶系, 可将淀粉分解为麦芽糖, 再由其他糖酶将其分解为单糖而被机体吸收。张志锋等^[4]对中国对虾幼体发育阶段的淀粉酶研究表明, 淀粉酶随发育出现明显变化, 对锯缘青蟹淀粉酶的研究^[5]亦有相似的结果。而对罗氏沼虾的淀粉酶的检测中只发现 a- 淀粉酶, 并随发育而渐趋复杂, 与前述研究者的结论是一致的。

据报道, 甲壳类动物储存和利用的有机物质主要是碳水化合物和类脂^[11-13], 作者的实验也证实了这一点。在罗氏沼虾个体发育早期, 分别检测到了参与脂类、碳水化合物和蛋白质代谢的酶系。所检测的八种同工酶系统中, M E、SOD 表现相对稳定, AMY、ALP、EST、LDH 等随发育逐渐复杂。Morgan^[14]等对哈氏扇蟹发育过程中 EST、MDH、LDH、PGI、ALP 和 ACP 等同工酶系统的研究表明, 六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, 同时指出, 同工酶的变化可能与短尾类对食物的需求有关。而罗氏沼虾上述同工酶在个体发育早期的酶谱变化, 说明其体内蛋白质、脂类、碳水化合物代谢机制随发育有所改变, 同时也反映出随个体发育, 机体对三大营养物的需求也有所不同。从 I 期到 III 期, 上述酶类谱带数开始增多, 而此时, 恰是母体营养储存已经耗尽, 个体需要摄食以满足自身营养需求的转折时期, 因此需要开始新的酶的合成以消化由外界摄取的饵料物质, 且这种差异往往随发育的进程表现出更明显的差异。

在罗氏沼虾的育苗生产中, 一般从第二期开始投喂单胞藻、轮虫及刚孵化出的卤虫无节幼体, 四期后开始投喂蒸蛋, 到六期开始投喂鱼糜, 根据罗氏沼虾淀粉酶的研究结果提示, 罗氏沼虾幼体从第三期开始已经具备消化一定量淀粉的能力, 因此在生产中可从此期开始适当投喂少量发酵面粉, 或用面粉拌和奶粉投喂, 既可作为粘合剂又可作为饵料以满足幼体对碳水化合物的需求, 从而节约生产成本。

参考文献:

- [1] 赵云龙. 罗氏沼虾胚胎发育的研究: 1. 胚胎外部结构形态发生 [J]. 动物学报, 1998, 44(3): 249—256

- [2] 朱淑琴. 罗氏沼虾池塘养殖实验报告[J]. 水产科学, 1997, **16**(2): 23—27
- [3] 张国强, 于伟君, 宣明春. 罗氏沼虾人工孵化育苗实验[J]. 水产科学, 1997, **16**(6): 8—11
- [4] 张志峰, 马英杰, 廖承义等. 中国对虾幼体发育阶段的同工酶研究[J]. 海洋学报, 1997, **19**(4): 63—71
- [5] 王桂忠, 李少菁. 锯缘青蟹个体发育过程中同工酶谱的比较研究[J]. 海洋学报, 1991, **13**(3): 412—416
- [6] 李纯厚, 钟振如, 陈敏. 斑节对虾个体发育早期的同工酶变化[J]. 水产学报, 1994, **18**(1): 62—64
- [7] 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[J]. 水生生物学报, 1992, **16**(2): 183—185
- [8] Philipp D P et al. Evolution of pattern of differential gene expression: a comparison of the temporal and spatial patterns of isozyme locus expression in two closely related fish species (*Nothonotus* largemouth bass, *Micropodus* salmoides, and smallmouth bass, *micropodus* dolomieu) [J]. *J. Exp. Zool.* 1979, **210**: 473—488
- [9] 王中仁. 植物等位酶分析[M], 北京: 科学出版社, 1996, 10—23, 140—144
- [10] 赖德 C C, 泰勒 C B (范培昌译). 生物学研究概说(同工酶)[M], 北京: 科学出版社, 1987, 35—54
- [11] Vonk H J. Digestion and metabolism, *The physiology of crustacea* [M], Eds., Wateman, T H, New York and London: Academic Press, 1960, 291—316
- [12] Nagabhushanam R. Mobilization of protein, glycogen and lipid during ovarian maturation in marine crab [J], *Scylla serrata* (Forskal), Indian Journal of Marine Science, 1981, **11**(2): 184—186
- [13] Ezhilarasi S. Esterases activity in *Scylla serrata* (Forskal) during ovarian development [J], *J. Exp. Mar. Ecol.*, 1984, **83**(1): 1—12
- [14] Morgan, R P 11. Biochemical changes during larval development of the xanthid crab *Rhithropaeopaeus harrisii*, III. Isozyme changes during ontogeny [J]. *Marine Biology*, 1978, **48**(3): 223—226

STUDIES ON ISOZYMES DURING EARLY ONTOGENY OF *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

LI Guang-li and ZHU Chun-hua

(Fisheries College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, 524025)

Abstract: Eight isozymes of *Macrobrachium rosenbergii* during early ontogeny were being analysed by using technique of polyacrylamide gradient gel electrophoresis, the results showed that SOD and ME isozymes expressed firmly SOD isozyme had three bands, and ME isozyme two band; the remainder isozymes became complicated during early ontogeny.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; Electrophoresis; Ontogeny; Isozyme