

# 角类肥蛛体躯不同部位酯酶同工酶的比较分析

程圆圆 陈建\* 刘凤想

(湖北大学生命科学学院 武汉 430062)

**摘要：**运用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法对角类肥蛛(*Lariniodes cornuta*)头胸部和腹部的酯酶同工酶酶谱进行了比较分析。结果表明,角类肥蛛的酯酶是单体酶,头胸部和腹部的酯酶酶谱差异显著。腹部的酯酶呈现4个位点 Est-1、Est-2、Est-3、Est-4。Est-1 和 Est-4 位点为纯合基因型,Est-2 和 Est-3 位点为杂合基因型。头胸部的酯酶仅表现出2个位点 Est-2 和 Est-3,且这2个位点是纯合基因型。不同个体之间头胸部的酯酶没有明显差异,Est-2b 和 Est-3a 可以作为鉴别角类肥蛛的特征酶带,腹部的酯酶则存在明显的个体差异,在 Est-2 和 Est-3 位点的基因杂合度为  $h_2 = h_3 = 0.4779$ 。由此可见,酯酶同工酶可以作为角类肥蛛遗传变异的分子标记,是研究个体间遗传差异、居群的遗传结构以及种间进化关系的基础。

**关键词：**角类肥蛛 酯酶同工酶 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号 Q955 文献标识码 A 文章编号 0250-3263(2007)03-97-05

## Differences in Esterase Isozymes in Different Parts of *Lariniodes cornuta*

CHENG Yuan-Yuan CHEN Jian LIU Feng-Xiang

(Faculty of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** The genetic structure of esterase colorimetric (EST) in cephalothorax and abdomen of *Lariniodes cornuta* was studied by using isozyme analysis with polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). As a result, EST in *L. cornuta* was a monomeric enzyme and there were some important differences between cephalothorax and abdomen in the EST zymogram. EST in abdomen presented Est-1, Est-2, Est-3, Est-4 loci. Est-1 and Est-4 were homozygote while the others (Est-2 and Est-3) were heterozygote. However, EST in cephalothorax only stated two loci: Est-2 and Est-3. Both of them were homozygote. Furthermore, the EST zymogram of cephalothorax was alike in different individuals. And Est-2b and Est-3a could be used as the characteristic zymogram for differentiating *L. cornuta*. Nevertheless, some differences appeared in the abdomen zymogram of different individuals. The frequency of heterozygote ( $h_i$ ) for the Est-2 and Est-3 was 0.4779. Besides we also discussed the significance of our findings for further studies on analyzing genetic variation in individuals and in populations and phylogenetic analysis.

**Key words:** *Lariniodes cornuta*; EST; PAGE

1966年,同工酶电泳技术首次用于人类和果蝇天然居群的遗传结构分析。迄今为止,自然种群中大量的变异和遗传结构的资料几乎全都来自于同工酶分析<sup>[1]</sup>。同工酶作为一类蛋白质,广泛存在于生物的同一种属或同一个体的不同组织,甚至同一组织、同一细胞中。由于同工酶是基因的产物,并且能直接反映基因的异同,易于观察研究<sup>[2]</sup>。目前,它在研究生物居群

的遗传结构<sup>[3]</sup>、遗传多样性、繁育系统<sup>[4]</sup>和地理变异<sup>[5]</sup>,以及种间界线<sup>[6]</sup>和标本鉴定等方面都有着巨大的应用潜力。

基金项目 国家自然科学基金项目(No.30370206);

\* 通讯作者, E-mail: panhui\_hb@tom.com;

第一作者介绍 程圆圆,女,硕士,研究方向:动物生态学; E-mail: alicyuanren@yahoo.com.cn

收稿日期 2006-09-11,修回日期 2007-03-16

1959 年, Markert 和 Moller 报道了乳酸脱氢酶在不同组织、不同个体以及不同的种内以不同的形式存在。即编码同一种酶的不同基因位点在不同的亚细胞分室、不同器官、不同发育阶段或不同生理状态下的表达存在差异。陈有华<sup>[7]</sup>等对鲢鱼(*Silurus asotus*) 9 种组织的 5 种同工酶进行了研究, 结果表明 5 种同工酶在各种组织均有不同程度的表达。张永普<sup>[8]</sup>等的研究也表明丽纹龙蜥(*Japalura splendida*) 的 5 种同工酶存在组织特异性。然而, 白海艳<sup>[9]</sup>等的研究则表明酯酶同工酶在两种盲蝽(长毛草盲蝽 *Lygus rugulipennis* 和西伯利亚草盲蝽 *Lygus sibiricus*) 体内不存在组织特异性。因此, 在用同工酶资料进行遗传学分析比较时, 所选用材料的器官、组织、部位等都应该尽量相同。在此基础上, 本文首次对蜘蛛体躯不同部位的酯酶同工酶进行了详细的比较分析, 此项研究也是进一步分析探讨蜘蛛遗传变异的基础。

目前, 酯酶同工酶电泳技术已广泛应用于昆虫分类学研究。诸多的研究报道已证明酯酶同工酶谱带丰富清晰, 在不同物种之间差异明显, 可有效地区分不同的物种<sup>[10-12]</sup>, 具有鉴别性的意义。

角类肥蛛(*Lariniodes cornuta*) 属于节肢动物门蛛形纲蜘蛛目园蛛科园蛛亚科类肥蛛属。在全国的大部分地区都有分布, 脱皮 6 次, 有 7 个龄期, 傍晚或夜间结网, 结大型斜形圆网, 昼伏夜出, 以网捕食食物。

本文应用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法研究了角类肥蛛体躯不同部位, 头胸部与腹部酯酶同工酶, 并对酶谱进行了详尽的比较分析。旨在为角类肥蛛的遗传多样性、地理变异以及种属鉴定等方面的研究提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料来源与样品的制备 角类肥蛛采于武汉沙湖边。在普通试管底部放入海绵, 使其吸足水分, 将蜘蛛放入试管中, 加入活的果蝇, 然后用棉花塞住管口, 放入培养箱中饲养(温度 25℃)。在实验中选择个体大小相似的 19 只雌

性成蛛。实验前取饥饿 3 d 或者 3 d 以上的角类肥蛛, 将其分成头胸部和腹部, 分别加入 300  $\mu$ l Tris-HCl 提取液, 并对其进行研磨匀浆, 结束后装入离心管, 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 然后以上清液与 40% 甘油为 10:1 的比例加入甘油(增加沉降系数且防冻), 每离心管分装 20  $\mu$ l 的样品量, 置于 -20℃ 下保存备用。

1.2 方法 采用垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳技术<sup>[13]</sup>, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 4%。电极缓冲系统为 Tris-Gly(pH 8.3), 35 mA 恒流, 4℃ 电泳 2~3 h。染色方法参照何忠效<sup>[14]</sup>的方法有所改变, 具体染色方法为: 称取 150 mg 醋酸-1-萘酯和 50 mg 醋酸-2-萘酯溶解于 10 ml 丙酮溶液中, 另称取 200 mg 坚固牢蓝 RR 盐溶于 10 ml 丙酮(坚固牢蓝溶液过滤, 可以提高清晰度), 溶解后将坚固牢蓝先倒入 200 ml 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.4)中, 震荡均匀后倒入萘酯, 最后放入电泳后的 PAGE 凝胶, 在 37℃ 下染色 30~60 min 至条带清晰后取出。

## 2 结果与分析

酯酶通常存在于细胞液中, 是单体酶或二聚体酶, 有 2~10 个位点<sup>[1]</sup>。从染色后不同个体的酯酶图谱(图 1)可以看出, 角类肥蛛的酯酶是单体酶, 酶谱带共有 6 条(图 2)。依照国际通用的方法记录酶谱<sup>[1]</sup>, 从阳极到阴极依次记为: Est-1、Est-2a、Est-2b、Est-3a、Est-3b、Est-4, 即角类肥蛛的酯酶有 4 个基因位点, 在位点 Est-1 和 Est-4 均为单个等位基因, 在 Est-2 和 Est-3 位点各有 2 个等位基因。6 条酶带的迁移率依次为: 0.895 3、0.749 6、0.606 3、0.353 4、0.256 6 和 0.129 5。

分析角类肥蛛腹部的酯酶同工酶酶谱(图 2 A)得出, 腹部酯酶在 Est-1、Est-2、Est-3 和 Est-4 位点均有酶带。个体之间的差异主要表现在两个方面: (1) Est-1 位点仅出现在第 3、9、15、16、17 和 19 个体 而第 2、4、6、7、8 和 11 个体在 Est-4 位点则没有酶带; (2) 大多数个体在 Est-2

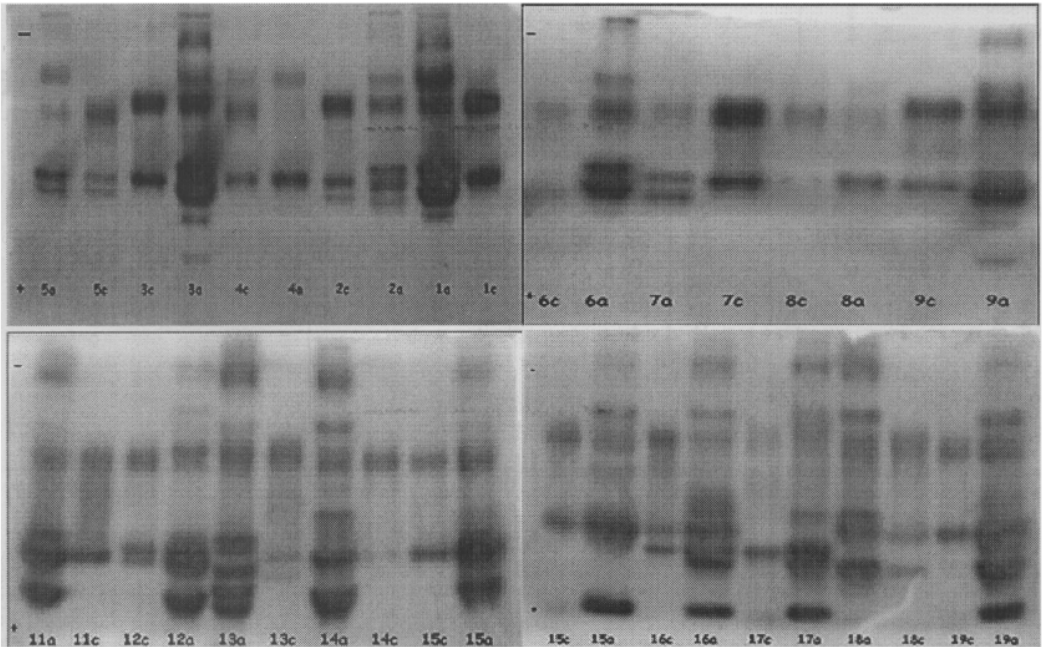


图 1 角类肥蛛头胸部与腹部酯酶同工酶酶谱

Fig. 1 The EST zymograms of cephalothorax and abdomen in *L. cornuta*  
图中数字表示不同个体的编号；a 腹部；c 头胸部。后图同。

The number represents the different spider individuals a abdomen c cephalothorax. The followings are the same.

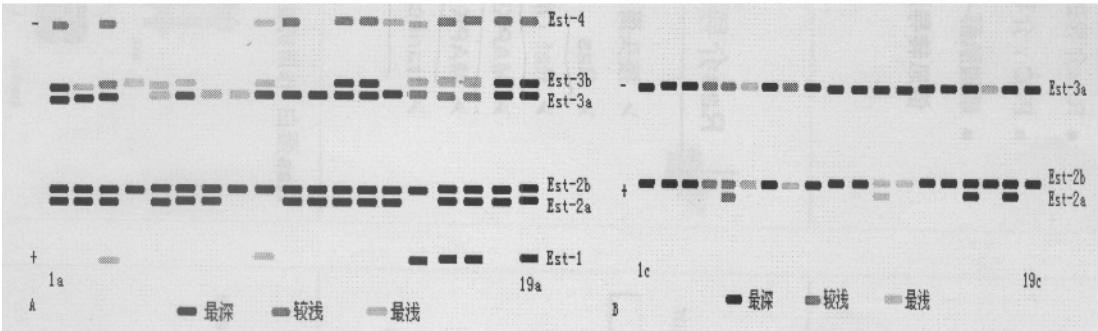


图 2 角类肥蛛腹部(A)头胸部(B)酯酶酶谱模式图

Fig. 2 The EST zymograms of abdomen (A) and cephalothorax (B) in *L. cornuta*

和 Est-3 位点都是杂合基因型 ab,基因的杂合度为  $h_2 = h_3 = 0.4779$ ,仅有少数个体表现为纯合基因型 aa 和 bb(如第 4、8 号个体)。  
角类肥蛛头胸部的酯酶酶谱结果如图 2 : B,不同个体之间头胸部的酯酶同工酶没有明显的差异。在 Est-2 和 Est-3 位点大多是单等位基因,分别为 bb 和 aa。 仅在第 5、12、16、18 个

体中表现出 Est-2a。  
通过比较分析角类肥蛛头胸部与腹部的酯酶酶谱(图 2)得出,头胸部与腹部的酯酶差异显著。头胸部仅在 Est-2 和 Est-3 位点有酶带分布,并且表现出纯合基因型 而腹部的酯酶表现出 4 个位点,且在 Est-2 和 Est-3 位点是杂合基因型。

### 3 讨 论

比较分析角类肥蛛个体的头胸部与腹部酯酶同工酶的酶谱发现,酯酶同工酶在角类肥蛛的头胸部和腹部之间存在明显的差异,这可能是因为酶在同一个体中存在分布差异,即同一个角类肥蛛个体的头胸部与腹部酯酶的差异是由于同工酶在同一个体的不同部位或者不同组织中酶的存在形式不同<sup>[15]</sup>。一般认为,酶的生物合成(即酶基因的表达)是受遗传基因和代谢物双重控制。所以某些酶基因只在特定的器官或组织中、特定的发育阶段表达,显出活性。腹部是蜘蛛消化食物的主要部位,Est-2a 和 Est-3b 仅存在于腹部,由此推测这两种酶是角类肥蛛消化猎物、进行新陈代谢所必需的酶。Est-1 和 Est-4 仅在腹部有所表达,推测它们可能是与蜘蛛分解消化猎物有关的酶。但是 Est-1 和 Est-4 在不同个体之间表现出有和无的差别,因而 Est-1 和 Est-4 的存在与角类肥蛛个体的遗传结构、生理状况、捕食猎物<sup>[16]</sup>有关。

角类肥蛛不同个体的头胸部酯酶同工酶酶谱大致相同,说明角类肥蛛头胸部的酯酶在不同个体之间没有明显的差异,即均表现为迁移率相同的两条带 Est-2b 和 Est-3a。所以,在角类肥蛛的头胸部酯酶没有个体差异,酶带具有可重复性和稳定性。此外,综合分析结果中的 4 个酶谱图(图 1)可知,角类肥蛛不同体躯部位的酯酶都存在 Est-2b 和 Est-3a 谱带,并且都比较稳定,即不同的个体、不同的体躯部位都会出现这两条谱带,而且迁移率相同,所以在居群结构和系统分析的研究中,Est-2b 和 Est-3a 可以作为鉴别角类肥蛛的特征谱带。

然而,不同个体角类肥蛛的腹部酯酶同工酶酶谱存在较大的变化,腹部的酯酶同工酶表现出显著的个体差异,即不同的个体酶带的分布有所不同。这在分析种类的遗传进化中,可以用来计算不同位点的等位基因频率,从而可以计算不同种间的遗传距离<sup>[17]</sup>,得出不同种间的系统进化关系。

此外,在模式图(图 2)中省略了一些非遗

传性的或人为干扰产生的谱带。因为实验中观察到的酶谱是凝胶上显示出的色带,它们是基因表达的产物,是酶蛋白质基因的表现型,并不是基因本身,由于实验方法或操作的原因,在一定的情况下会形成次生的、额外的非遗传性的带。原因在于,在大多数情况下,由 DNA 核苷酸编码的多肽链直接形成酶蛋白,但有时某些酶在按照 DNA 的编码顺序合成多肽链以后,在形成蛋白质以前,会与其他多肽链结合,或被加上一些较小的类酯化合物片段,或由于材料的采取和贮存的原因,染色时酶谱上出现了非遗传性的或人为的带<sup>[1]</sup>。

同工酶是基因变化的一个标志,同工酶分析是在居群、种甚至属的水平上研究生物遗传多样性的重要方法,也是系统进化研究的一种有力手段。但单纯的酶资料所获取的证据都只是事物的一个方面,只有不断地综合各方面的知识,结合来自形态学、地理学、生态学、细胞学等各方面的证据,才能使科学研究逐渐接近复杂的、不断变化着的生物界的客观实际。

### 参 考 文 献

- [1] 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] Choh M S, Yap C K. Morphological and allozyme studies of small terrestrial snails (*Opeas* sp., *Subulina* sp., and *Huttonella bicolor*) collected from peninsular Malaysia. *Russian Journal of Genetics*, 2006, 42(1): 40 ~ 48.
- [3] Alarcon J A, Alvarez M C. Genetic identification of sparid species by isozymes markers: application to interspecies hybrids. *Aquaculture*, 1999, 173(1-4): 95 ~ 103.
- [4] Montoya-Burgos J I, Weber C, Bail P Y Le. Phylogenetic relationships within *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) and related genera based on mitochondrial D-loop sequences. *Rev Suisse Zool*, 2002, 109(2): 369 ~ 382.
- [5] 王鹭骁, 王志勇, 柯才煊等. 不同地理种群杂色鲃的同工酶分析. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44(1): 98 ~ 101.
- [6] Zawadzki C H, Reis R E, Renesto E. Allozyme discrimination of three species of *Loricariichthys* (Siluriformes: Loricariidae) from southern Brazil. *Rev Suisse Zool*, 2000, 107(4): 1 ~ 12.
- [7] 陈有华, 闫初, 赵光年等. 鲃鱼不同组织同工酶的组织特异性的初步研究. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(2): 48 ~ 50.

- [8] 张永普,贾守菊,陈艳乐等.丽纹龙蜥不同组织的同工酶.河南师范大学学报(自然科学版),2003,31(4):89~94.
- [9] 白海艳,郎冬梅.两种盲蝽不同部位酯酶同工酶的研究.晋东南师范专科学校学报,2002,19(5):21.
- [10] 阎一林.棉铃虫和烟青虫的酯酶同工酶比较.昆虫学报,1987,30(3):341~344.
- [11] 张迎春,郑哲民.五种瓢虫酯酶同工酶的比较研究及其在分类上的应用.昆虫分类学报,1999,21(2):123~127.
- [12] 李静,董建臻等.八种盲蝽酯酶同工酶的比较研究.河北农业大学学报,2003,26:170~172.
- [13] 郭晓君.蛋白质电泳实验技术.北京:科学出版社,2005.
- [14] 何忠效,张书政.电泳.北京:科学出版社,1999.
- [15] 余红卫,朱冬发,韩宝芹.三疣梭子蟹不同组织同工酶的分析.动物学杂志,2005,40(1):84~87.
- [16] 肖春.取食对对锥腹肖蛸雌蛛体内同工酶的影响.湖北农学院学报,1996,16(2):121~124.
- [17] 李春选,马恩波,郑先云.中国四种蝗虫不同种群的遗传分化.遗传学报,2003,30(3):234~244.