

中华绒螯蟹不同发育时期胚胎及流产胚胎的同工酶变化

贾守菊 应雪萍 陈艳乐 应建萍

(温州师范学院生命与环境科学学院 温州 325027)

摘要:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)不同发育时期胚胎及流产胚胎的6种同工酶(乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶、酯酶、淀粉酶和过氧化物酶)进行了研究。结果表明,不同发育时期胚胎的乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶、酯酶及淀粉酶酶谱表现出一定差异。受精卵中未检测到乳酸脱氢酶同工酶活性,卵裂期和囊胚期出现4条酶带,无节幼体及蚤状幼体期只有2条酶带。醇脱氢酶同工酶在中华绒螯蟹胚胎发育的各阶段均有表达,但表达的酶带数和活性有区别;在受精卵和蚤状幼体期无苹果酸脱氢酶酶带显示,卵裂期酶带数最多,酶活性相对也最强,以后随着发育的进行,酶带数和酶活性都有减弱的现象。酯酶同工酶的变化较为复杂,特别是囊胚期,酯酶酶带突然全部消失。淀粉酶有两种类型: α -淀粉酶和R-淀粉酶。从受精卵发育到幼体其酶带数不减反减。不同发育阶段均检测不到过氧化物酶的活性。第二次抱卵胚胎的酶活性和酶带数低于或有别于第一次抱卵的卵裂期胚胎。流产胚胎中醇脱氢酶、乳酸脱氢酶、淀粉酶与第一次抱卵胚胎不同发育时期的酶谱相比略有变化,而苹果酸脱氢酶、酯酶酶带数迅速减少。

关键词:中华绒螯蟹 胚胎 流产 同工酶

中图分类号:Q55.959 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)01-76-08

Isozyme Changes in Different Stage Embryos and Aborted Embryos in *Eriocheir sinensis*

JIA Shou-Ju YING Xue-Ping CHEN Yan-Le YING Jian-Ping

(School of Biological and Environmental Science, Wenzhou Normal College, Wenzhou 325027, China)

Abstract Six isozymes, LDH, ADH, MDH, EST, AMY, and POD, in different stage embryos and aborted embryos in *Eriocheir sinensis* were investigated with polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that the activities of LDH, ADH, MDH, EST and AMY were different in embryos at different developmental stages. LDH isozyme could not be detected in fertilized eggs, while four isozyme bands emerged in cleavage and blastulation stage embryos and two isozyme bands in nauplius and zoea stages; ADH isozyme was expressed in all stages of embryonic development, but there were differences in enzyme bands and enzyme activities. No MDH enzyme bands were observed in fertilized eggs and at zoea stages, while most bands and the strongest activities emerged at cleavage stages. With the development, the MDH enzyme bands and activities became weakened. The changes in EST isozyme were more complicated, with sudden disappearance at blastulation stage. The band number of AMY, both (α -AMY and R-AMY) decreased from fertilized eggs to larver stage. The POD activity could not be detected in all developmental stages. The

基金项目 温州市科技局基金资助项目(No. N2000A26),乐清市科技局基金资助项目;

第一作者介绍 贾守菊,女,副教授,主要从事生理生化研究。

收稿日期 2004-04-01, 修回日期 2004-10-18

enzyme activities and bands of the second spawning embryos were different from those of the first cleavage stage embryos. The ADH, LDH, and AMY isozyme bands of aborted embryos had slight differences compared to the first spawning embryos at different developmental stages, while MDH, EST isozyme bands decreased dramatically in aborted embryos.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Embryo; Abortion; Isozyme

同工酶是生物有机体的天然标记,可以把宏观的现象联系到微观的分子水平。通过同工酶的研究,有利于解释生长发育过程中某些阶段特有的代谢过程。有关甲壳动物发育过程中同工酶变化的研究,主要集中在虾类。如张志峰等^[1]对中国对虾(*Penaeus chinensis*)幼体发育阶段的同工酶进行了研究,李纯厚等^[2]曾研究了斑节对虾(*P. monodon*)个体发育早期的同工酶变化,卢建平^[3]、李广丽等^[4]及程惠贞等^[5]分别对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)胚胎发育、罗氏沼虾个体发育早期及产卵前后罗氏沼虾的同工酶进行了研究。Thebaul^[6]等对不同发育时期长臂虾(*P. serratus*)的乳酸脱氢酶同工酶进行了研究。蟹类发育过程中同工酶的变化研究仅见Morgan等^[7]、Sastry等^[8]、王桂忠等^[9]分别报道了哈氏扇蟹(*Rhithropanopeus harrera*)、黄道蟹(*Cancer irroratus*)及锯缘青蟹(*Scylla serrata*)个体发育过程的同工酶谱。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要的养殖种类。郑曙明等^[10]、乔新美等^[11]、许加武等^[12]和王丹等^[13]曾从不同角度研究分析了中华绒螯蟹不同组织或不同区系的同工酶,但未见其不同发育阶段同工酶的相关报道。本文对中华绒螯蟹不同发育阶段胚胎及流产胚胎的乳酸脱氢酶(LDH)、醇脱氢酶(ADH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、酯酶(EST)、淀粉酶(AMY)及过氧化物酶(POD)6种同工酶进行研究分析,旨在为中华绒螯蟹的发育生物学及流产机理的研究提供一定的基础资料。

表1 凝胶浓度及缓冲液

同工酶	分离胶浓度(%)	分离胶缓冲液	浓缩胶浓度(%)	浓缩胶缓冲液
MDH, POD	7	Tris-HCl(pH 8.8)	3	Tris-HCl(pH 6.8)
LDH, ADH, EST	7.5	Tris-HCl(pH 8.9)	2.5	Tris-HCl(pH 6.7)
AMY	6	Tris-柠檬酸(pH 8.9)	3	Tris-柠檬酸(pH 6.8)

电极缓冲液为pH 8.3的Tris-甘氨酸缓冲液(AMY为pH 8.7的低离子强度电极缓冲液)。用微量进样器加样,根据同工酶的不同,加样量分别为15~60 μ l/管。采用DYY-III 28A型垂直电泳槽和DYY-III-8B型恒流稳压电泳仪。在4℃冰箱中电泳。恒流,浓缩胶1 mA/管,分离胶3 mA/管。POD则一直稳流2 mA/管。电泳时间约4~8 h。

1 材料与方法

1.1 材料 中华绒螯蟹抱卵蟹于2001年12月取自乐清市清江养殖场。将抱对后已受精的雌蟹带回实验室,置盐度为23‰的自然水温中养殖。参照赵云龙等^[14]对中华绒螯蟹胚胎发育各期特征的描述,结合光学显微镜镜检进行胚胎发育各期的取材,胚胎发育分为受精卵、卵裂期、囊胚期、无节幼体期、蚤状幼体期等时期。取刚从生殖孔中排出的受精卵、卵裂期的胚胎(产卵后5~7 d)、囊胚期的胚胎(产卵后17~19 d)、无节幼体期(28~32 d)、蚤状幼体期(38~40 d)的标本各5 g。第一次抱卵胚胎孵化后进行二次抱卵时可取得二次抱卵、处于卵裂期的胚胎5 g。此外,在实验室中对处于囊胚期的抱卵蟹进行升温刺激,促使亲蟹流产,用筛网过滤可得处于囊胚期的流产卵5 g。将所有的标本置于-70℃保存,待用。

1.2 样品制备 取不同发育时期的胚胎各1.5 g,以1:2(体重:体积)比例加入样品提取液(POD为pH 8.0 Tris-HCl缓冲液,其余均为pH 7.4 Tris-HCl缓冲液)于冰浴下匀浆,匀浆液以10 000 r/min(4℃)离心30 min。取上清液各分装,保存于-70℃冰箱备用。

1.3 电泳 采用不连续垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行同工酶分析,所用凝胶浓度、缓冲系统及缓冲液pH值见表1。

1.4 显色 显色方法参照参考文献^[15,16],显色后的胶片固定于7.5%的冰醋酸或7.5%醋酸-30%乙醇-15%甘油的混合液中。

1.5 结果记录与分析 固定后胶片立即进行拍照,描绘电泳模式图,计算相对迁移率(Rf),并用岛津CS-930扫描仪扫描,扫描波长:MDH:560 nm;LDH:570 nm;ADH:380 nm;EST:550 nm;AMY:570 nm。

$R_f = I/L$ (其中: I = 酶带移动距离 (cm), L = 电泳结束时溴酚蓝移动距离 (cm))

2 结果

2.1 乳酸脱氢酶 (LDHE.C 1.1.1.27) LDH 同工酶谱

见图 1, 相对迁移率见表 2, 图 1 中共显示 P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4

和 P_5 5 条酶带。刚受精的卵中无酶带出现, P_1 和 P_3 存在于除受精卵以外的其他发育阶段的胚胎中, P_2 出现于第二次抱卵胚胎和流产胚胎中, P_4 和 P_5 仅出现于卵裂期和囊胚期的胚胎。除蚤状幼体的 P_1 、第二次受精胚胎的 P_3 、卵裂期和囊胚期的 P_5 所显示的酶活性较弱外, 其余酶带的活性都相对较强。

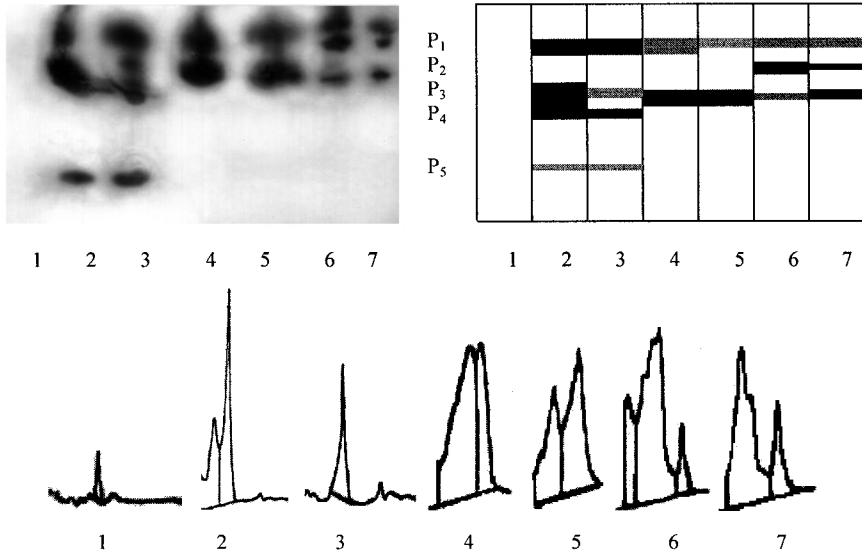


图 1 中华绒螯蟹不同发育时期胚胎及流产胚胎的 LDH 同工酶谱

1. 受精卵; 2. 卵裂期; 3. 囊胚期; 4. 卵内无节幼体; 5. 蚤状幼体; 6. 第二次抱卵胚胎; 7. 流产胚胎。(下同)

$P_1 \sim P_n$ 表示从负极到正极依次出现的酶带(下同)

表 2 LDH 同工酶相对迁移率

样品	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5
1	-	-	-	-	-
2	0.344 7	-	0.421 7	0.451 0	0.509 8
3	0.344 7	-	0.421 7	0.451 0	0.509 8
4	0.344 7	-	0.421 7	-	-
5	0.344 7	-	0.421 7	-	-
6	0.344 7	0.377 9	0.421 7	-	-
7	0.344 7	0.377 9	0.421 7	-	-

表中 1、2、3、4、5、6、7 代表不同发育期的中华绒螯蟹幼体(见材料说明);“-”表示未观察到酶带(下同)

2.2 醇脱氢酶 (ADH EC.1.1.1.1) 不同发育阶段 ADH 同工酶电泳图谱

见图 2 相对迁移率见表 3 图 2 中共有 5 条酶带。 P_1 存在于卵裂期到流产胚胎的各阶段; 在囊胚期和第二次抱卵胚胎阶段活性相对较弱; P_2 存在于除蚤状幼体期外的各个时期, 随着发育的进行酶活性经历了提高又相对减弱的过程; P_3 活性也经历逐渐增强又相对减弱的过程, 至第二次抱卵胚胎时消失, 在流产胚胎中重新出现; P_4 仅出现于卵裂期; P_5 仅

表 3 ADH 同工酶相对迁移率

样品	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5
1	-	0.396 6	0.450 8	-	-
2	0.323 3	0.396 6	0.450 8	0.738 5	-
3	0.323 3	0.396 6	0.450 8	-	0.815 2
4	0.323 3	0.396 6	0.450 8	-	-
5	0.323 3	-	0.450 8	-	-
6	0.323 3	0.396 6	-	-	0.815 2
7	0.323 3	0.396 6	0.450 8	-	-

出现于囊胚期和第二次抱卵胚胎中。

2.3 苹果酸脱氢酶 (MDH EC.1.1.1.37) MDH 同工酶谱

见图 3 相对迁移率见表 4, 图 3 中共有 7 条酶带。 受精卵和蚤状幼体中无任何酶带表现。 卵裂期共有 6 条酶带: P_1 、 P_2 、 P_4 、 P_5 、 P_6 和 P_7 ; 至囊胚期减少为 2 条: P_2 和 P_7 ; 到无节幼体期又增至 5 条: P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_6 和 P_7 。 第二次抱卵胚胎具 P_2 、 P_3 和 P_4 三条酶带, 流产胚胎有 P_2 和 P_3 带。 P_7 出现于卵裂期到无节幼体期, 表达差异不大, 活性均很强, 但随发育的进行酶活性有一定程度下降。

表 4 MDH 同工酶相对迁移率

样品	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇
1	-	-	-	-	-	-	-
2	0.547 2	0.589 5	-	0.648 3	0.663 1	0.688 5	0.811 0
3	-	0.589 5	-	-	-	-	0.811 0
4	-	0.589 5	0.616 4	0.648 3	-	0.688 5	0.811 0
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	0.589 5	0.616 4	0.648 3	-	-	-
7	-	0.589 5	0.616 4	-	-	-	-

2.4 酯酶(EST EC.3.11.1.1) 中华绒螯蟹不同发育阶段酯酶同工酶电泳图谱相当复杂,共显示 14 条酶带(图 4)。其中 受精卵具 4 条谱带 :P₃、P₈、P₁₀ 和 P₁₄, 卵裂期具 10 条谱带 :P₁、P₃、P₄、P₅、P₆、P₈、P₁₀、P₁₁、P₁₂ 和 P₁₄, 囊胚期不显示谱带或此期酶活性很弱而检测不到, 卵内无

节幼体期具 7 条酶带 :P₇、P₈、P₁₀、P₁₁、P₁₂、P₁₃ 和 P₁₄, 溞状幼体期具 8 条酶带 :P₂、P₃、P₅、P₈、P₉、P₁₀、P₁₃ 和 P₁₄, 第二次抱卵胚胎具 8 条酶带 :P₂、P₃、P₄、P₈、P₉、P₁₂、P₁₃ 和 P₁₄, 流产胚胎仅显示一条酶带 P₁₄。不同发育时期的胚胎所表达的酶活性各不相同。EST 同工酶相对迁移率见表 5。

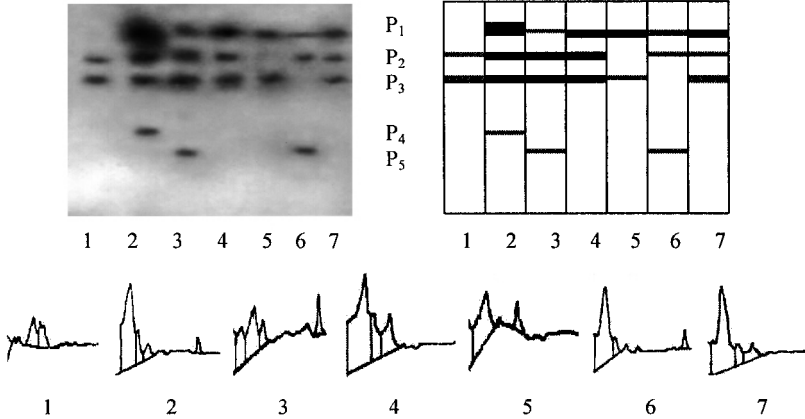


图 2 中华绒螯蟹不同发育时期胚胎及流产胚胎 ADH 同工酶谱

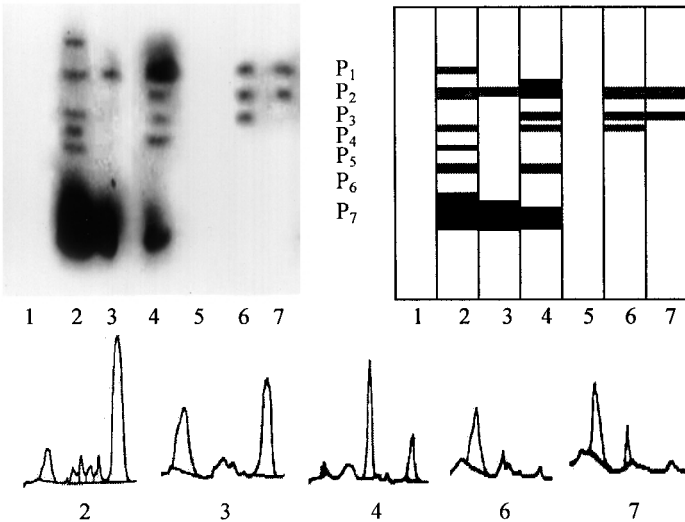


图 3 中华绒螯蟹不同发育时期胚胎及流产胚胎 MDH 同工酶谱

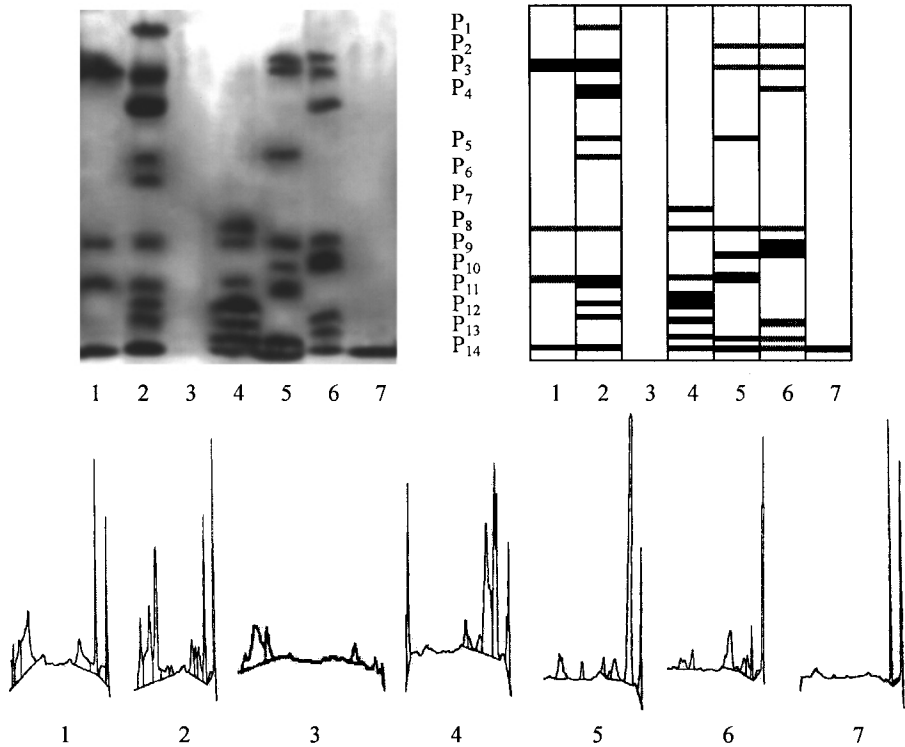


图 4 中华绒螯蟹不同发育时期胚胎及流产胚胎 EST 同工酶谱

2.5 淀粉酶(AMY EC.3.2.1.1) 中华绒螯蟹胚胎不同发育时期所表达的 AMY 同工酶谱有 2 种: α -AMY 和 R-AMY(图 5)。R-AMY 有 2 条: P_1 和 P_2 , 酶带呈蓝色, 从无节幼体开始减少为 1 条; α -AMY 只有 1 条, 为 P_3 , 是负带, 酶带为无色带, 卵裂期、无节幼体、第二次抱

卵胚胎为粉红色带, 说明在这几个阶段酶活性较弱, 淀粉水解不完全, 成为糊精, 故呈粉红色。AMY 同工酶相对迁移率见表 6。

2.6 过氧化物酶(POD EC.1.11.1) 在中华绒螯蟹胚胎不同发育时期及流产胚胎中均检测不到 POD 同工酶酶带。

表 5 EST 同工酶相对迁移率

样品	1	2	3	4	5	6	7
P_1	-	0.439 6	-	-	-	-	-
P_2	-	-	-	-	0.479 4	0.479 4	-
P_3	0.517 3	0.517 3	-	-	0.517 3	0.517 3	-
P_4	-	0.570 9	-	-	-	0.570 9	-
P_5	-	0.649 4	-	-	0.649 4	-	-
P_6	-	0.704 8	-	-	-	-	-
P_7	-	-	-	0.786 3	-	-	-
P_8	0.805 5	0.805 5	-	0.805 5	0.805 5	0.805 5	-
P_9	0.889 2	-	-	-	0.889 2	0.889 2	-
P_{10}	-	0.919 9	-	0.919 9	0.919 9	-	-
P_{11}	-	0.940 9	-	0.940 9	-	-	-
P_{12}	-	0.963 0	-	0.963 0	-	0.963 0	-
P_{13}	-	-	-	0.977 0	0.977 0	0.977 0	-
P_{14}	1.000 0	1.000 0	-	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0

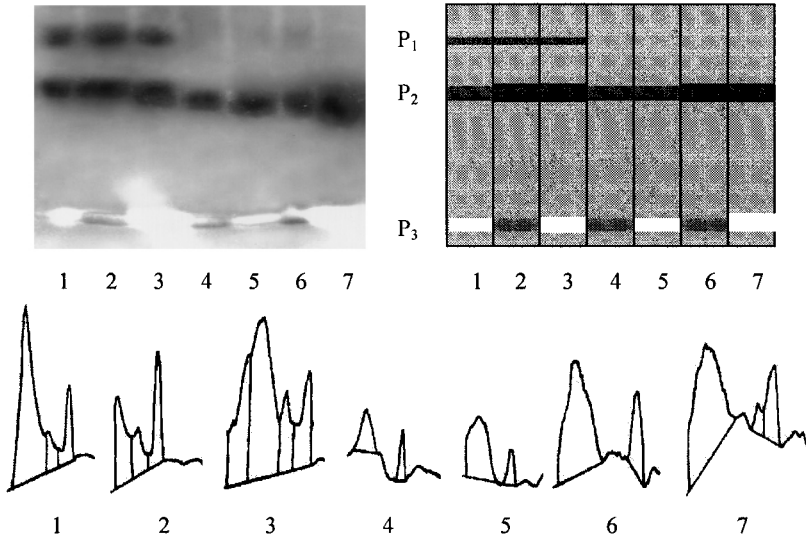


图5 中华绒螯蟹不同发育时期胚胎及流产胚胎 AMY 同工酶谱

表6 AMY 同工酶相对迁移率

样品	1	2	3	4	5	6	7
P ₁	0.543 8	0.543 8	0.543 8	-	-	-	-
P ₂	0.673 7	0.673 7	0.673 7	0.673 7	0.673 7	0.673 7	0.673 7
P ₃	0.922 4	0.922 4	0.922 4	0.922 4	0.922 4	0.922 4	0.922 4

3 讨论

3.1 不同发育时期胚胎同工酶的比较 机体在发育过程中会发生一系列复杂的同工酶变化,由单细胞受精卵阶段一个前体酶谱经不同的发育过程后,因不同细胞中特异基因的表达可产生成体组织中特异的同工酶谱,即同工酶的表达具有时间和空间上的特异性,生物个体发育过程中酶谱的变化能反映细胞组成和生理代谢的变化^[17]。中华绒螯蟹不同发育时期胚胎的 LDH、ADH、MDH、EST 及 AMY 等同工酶在发育过程中的明显变化,反映出其各发育阶段细胞分化与代谢的不同。

3.1.1 LDH 同工酶 一种参与糖酵解的酶,可在无氧或缺氧条件下催化乳酸与丙酮酸之间的相互转化。中华绒螯蟹 LDH 同工酶的表达具明显的时间特异性,受精卵中未检测到 LDH 同工酶的活性,在卵裂期和囊胚期出现了 4 条酶带,除 P₃ 外,其它酶带活性均较强。到无节幼体及溞状幼体期, P₄ 和 P₅ 带消失,但 P₃ 带活性有一定增强。中华绒螯蟹胚胎在不同发育阶段 LDH 同工酶的这种变化,与其体内在发育过程中碳水化合物含量的变化规律基本相符^[18],但与卢建平等^[3]的研究有所不同。这可能是由于 LDH 同工酶的表达与发育过

程中胚胎处于不同的温度有关,也可能与胚胎在不同发育过程中氧分压的变化有关,或与中华绒螯蟹在胚胎发育过程中对碳水化合物的利用有关。田华梅等^[18]认为,中华绒螯蟹胚胎发育过程中,碳水化合物只有部分是用于能量代谢,大部分则可能用于构建甲壳动物的几丁质骨骼。

3.1.2 ADH 同工酶 在中华绒螯蟹胚胎发育各阶段均有表达,只是表达的酶带数和活性有区别。ADH 在受精卵中只有两条酶带,且活性相对较弱,后面几个时期酶带数及酶活性都有不同程度的增加,至溞状幼体期,酶带数又减少到两条。ADH 与 LDH 一样,也是参与糖酵解的酶,通常在缺氧情况下,三羧酸循环的运行会受到阻碍,导致丙酮酸积累,过剩的丙酮酸脱羧形成乙醛,乙醛经 ADH 作用还原成乙醇,所以醇脱氢酶的生理作用是适应厌氧酵解的需要^[15],若有氧化取代糖酵解,就不再需要 ADH 的活动。因此,ADH 同工酶在中华绒螯蟹胚胎发育中的表达情况可能与 LDH 一样,也可能与不同发育时期氧分压的变化有一定关系。

3.1.3 MDH 催化苹果酸成草酰乙酸,是三羧酸循环中重要的脱氢酶之一,大部分集中于线粒体。中国对虾的 MDH 在无节幼虫期为 7 条,在溞状幼虫期由 6 条

增至 9 条, 酶带呈逐渐复杂趋势^[1]。卢建平等^[3]对罗氏沼虾胚胎发育过程中 MDH 同工酶的研究也有类似的结果。中华绒螯蟹 MDH 同工酶的变化有所不同, 在受精卵和溞状幼体期, 无酶带显示, 其原因有待进一步研究。卵裂期酶带数最多, 酶活性相对也最强, 以后随着发育的进行, 酶带数和酶活性都有减弱的现象。其中, P₂ 带存在于除受精卵和溞状幼体的其他各发育期, 表明其在维持正常代谢中的重要性。其他几条酶带只出现于发育的特定阶段, 可能与胚胎在发育过程中同工酶基因被激活的次序有关, 在完成相应的功能或代谢后又逐渐关闭。

3.1.4 EST 参与机体脂类物质代谢的重要酶类, 或与脂类化合物的水解和释放有关, 或与脂类化合物的转移有关。中华绒螯蟹胚胎发育过程中 EST 同工酶的变化较为复杂, 受精卵中 EST 酶带数较少, 仅为 4 条, 卵裂期酶带数迅速增加, 活性也有增强, 这可能是受精卵中充满卵黄和脂滴, 在进行卵裂时需要大量利用卵黄和脂滴, 因此, 有关的酶基因被激活而产生大量的 EST 同工酶。Hart 等^[9]进行定量同工酶电泳, 分析 *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, 发现一些酯酶在整个发育阶段皆存在, 而同时其他的酯酶则仅突然出现在形态分化的某个特定阶段。一般而言, 为满足细胞基本功能代谢所需的酶(管家酶), 其基因在发育各阶段基本上都有表达, 但中华绒螯蟹在囊胚期, 酶带突然全部消失。据报道, 水温对中华绒螯蟹胚胎发育的影响十分明显^[14], 在囊胚期至无节幼体期, 胚胎所处环境水温较低(自然水温), 致使胚胎代谢活动减弱, 发育缓慢, 酶活性也相应减弱, 这可能是此期检测不到酶带的原因。当胚胎发育至无节幼体和溞状幼体时, EST 的变化与李纯厚^[2]和张志峰等^[1]的研究结果相似, 总的酶带数从 7 条增到 8 条, 一些酶带消失, 又出现了一些新酶带。总之, 中华绒螯蟹 EST 在发育各期都有其特定的酶谱, 这种特定酶谱的变化可能反映不同发育阶段中华绒螯蟹对脂类物质利用的不同: 或是分解脂类, 参与细胞内代谢活动, 或是参与卵内卵黄和脂滴的分解代谢。

3.1.5 淀粉酶 其作用是将碳水化合物水解为二糖麦芽糖, 再进一步水解就成为单糖葡萄糖, 单糖可以被机体吸收利用。罗氏沼虾、中国对虾和锯缘青蟹幼体发育阶段的淀粉酶总的趋势是随着幼虫的发育, 酶谱逐渐复杂化^[14, 9]。但中华绒螯蟹不同发育阶段淀粉酶中仅有 α -AMY 和 R-AMY。从受精卵发育到幼体其酶带数不增反减。实验重复 5 次, 得到相同结果, 这可能与中

华绒螯蟹胚胎发育所需各种营养物质的不同有关。王桂忠等^[9]在对锯缘青蟹胚胎发育的研究中发现脂类和蛋白质都是其胚胎发育主要的能源物质。而据田华梅等^[18]的研究认为, 中华绒螯蟹受精卵内的卵黄在胚胎不断发育过程中, 逐渐分解为胚胎各期发育必需的物质和能量, 其中蛋白质的相对含量最大, 脂类次之, 碳水化合物最小。有关蛋白质降解的水解酶和胃蛋白酶的比活力远远高于脂肪酶, 故作为不是发育主要能源物质的碳水化合物, 参与其水解作用的淀粉酶, 就有可能在这一发育阶段的基因表达中不占重要地位。

中华绒螯蟹胚胎发育的各个阶段均未检测到 POD 同工酶, 这可能是中华绒螯蟹胚胎发育时期的 POD 同工酶活性很弱, 或受到某种抑制, 或是该酶基因表达较迟。吴力钊等^[20]在对白鲢个体发育过程中同工酶基因的表达和调控的研究中, 也未检测到 ADH 同工酶, 他们认为 ADH 基因的表达可能是受到某种抑制而延迟。

对中华绒螯蟹 LDH、ADH、MDH 同工酶的研究结果显示, 溞状幼体期的酶活性及酶带数或低于或有别于胚胎发育的其他各时期, 这与张志峰等^[1]对中国对虾幼体发育阶段的同工酶研究结果相似。其主要原因可能是, 当胚胎发育至溞状幼体期时, 母体的营养贮存已全部耗尽, 个体开始新的酶合成以消化由外界摄食的饵料物质。溞状幼体期有时无任何酶带出现, 可能是此期确无此酶的合成或幼体内该酶合成量较少。故有关甲壳动物溞状幼体期一些同工酶的变化规律与该期的特殊代谢之间的关系, 尚需要进一步深入的研究。

中华绒螯蟹胚胎发育过程中, 从受精卵→卵裂期→囊胚期→无节幼体期, 从附着在母体腹肢上, 到组织和器官的分化形成, 其发育主要依靠卵内丰富的营养物质, 主要是卵黄中的蛋白质和脂滴, 尤其是蛋白质, 这是胚胎发育中重要的结构物质和主要的能源物质^[21], 其可用于胚胎发育过程中组织的分化和器官的形成。成永旭等^[22]曾对胚胎发育期脂类及卵黄的形态及其变化进行研究, 发现这一时期的卵黄物质及脂滴发生很大的变化, 卵黄体中的磷脂和中性脂的含量均发生变化, 故反映在 6 种同工酶的表达上, 就有不同发育时间上的表达特异性。随着胚胎进一步发育, 卵黄和脂滴逐渐耗尽, 从无节幼体期→溞状幼体期, 幼体已脱离母体, 此时其营养物质来源发生改变。所以溞状幼体期的几种同工酶与前各期相比有较大的变化。

3.2 二次抱卵胚胎、流产胚胎与正常胚胎发育过程中同工酶的比较 取样时, 第二次抱卵胚胎大都停留在卵裂期, 从酶谱中可知第二次抱卵胚胎的酶活性和酶带数低于或有别于第一次抱卵胚胎卵裂期, 可能是两

次抱卵时机体内蛋白质、脂类、碳水化合物代谢机制有所改变,外界环境的影响也有所不同,以致机体对营养物的需求也有所不同。根据育苗经验,第二次抱卵胚胎由于母体消耗能量、体力较多,营养条件较差,其质量要低于第一次抱卵胚胎,育苗的成活率也低于第一次。本实验结果显示,第二次抱卵胚胎 ADH、LDH 和 AMY 与第一次抱卵胚胎卵裂期的酶谱相比,变化不大,但 EST、MDH 的酶活性和酶带数明显下降,这说明第二次抱卵胚胎中卵黄和脂滴的含量减少,相应的代谢活性也降低。

对抱卵蟹进行升温刺激可使胚胎脱落。根据资料^[4],水温对中华绒螯蟹的胚胎发育是十分明显的,温度过高,不仅卵裂停止,胚胎发育不正常,易出现畸形,同时胚胎尚未完成发育,雌蟹常已死亡。说明在一定范围内温度不仅影响到胚胎发育,对亲蟹的生理机制也会产生伤害作用。流产胚胎中 ADH、LDH 和 AMY 与第一次抱卵胚胎不同发育时期的酶谱相比,略有变化,但不很显著,说明流产胚胎与正常胚胎发育各期相比,糖类物质变化不大。而 MDH、EST 有显著变化,谱带数迅速减少,EST 中只有 1 条,MDH 中只有 2 条,这说明流产胚胎中的脂类物质与第一次抱卵胚胎有别,这也从一个侧面说明脂类物质对受精卵的正常发育起了较为重要的作用,这与应雪萍等^[23]对中华绒螯蟹受精卵和流产卵氨基酸和脂肪酸组成的比较研究相一致。造成这种现象的原因可能是温度的升高和养殖环境的改变,使受精卵适应能力减弱,造成细胞内的代谢活动紊乱,体内营养物质,特别是脂类物质的消耗量增大,以致胚胎缺乏营养造成流产,故 MDH、EST 的酶带数减少,但也可能是亲蟹生理机制的伤害作用反过来影响到胚胎发育的生理生化机制,因此在同工酶的表达上就有所表现。有关流产胚胎的系列同工酶研究有待于进一步深入。

参 考 文 献

- [1] 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. 海洋学报,1997,19(4):63~71.
- [2] 李纯厚,钟振如,陈敏. 斑节对虾个体发育早期的同工酶变化. 水产学报,1994,18(1):62~64.
- [3] 卢建平,姜乃澄. 罗氏沼虾胚胎发育过程中同工酶的研究. 东海海洋,2000,18(3):34~39.
- [4] 李广丽,朱春华. 罗氏沼虾个体发育早期的同工酶研究. 水生生物学报,2001,25(4):338~343.
- [5] 程惠贞,姚泊,林慧贤. 产卵前后罗氏沼虾某些组织细胞酯酶同工酶的比较研究. 广州师院学报(自然科学版),1997(1):74~79.
- [6] Thebault M T, Bemicard A. Variations in the lactate dehydrogenase activity during the development of the shrimp *Palaemon serratus*. *Comp Biochem Physiol*,1978,61B:379~384.
- [7] Morgan R P II, Sulkin S D. Biochemical changes during larval development of the xanthid crab *Rhithropanopeus harrisi* III. Isozyme changes during ontogeny. *Marine Biology*,1978,48:223~226.
- [8] Sastry A N, Ellington W R. Lactate dehydrogenase during the larval development of *Cancer irroratus* effect of constant and cyclic thermal regimes. *Experientia*,1978,34:308~309.
- [9] 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. 海洋学报,1991,13(3):412~416.
- [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] 乔新美,曹维孝,邹世平. 长江、瓯江中华绒螯蟹几种同工酶的分析比较. 淡水渔业,1994,24(5):10~13.
- [12] 许加武,李思发. 长江口中中华绒螯蟹与其他几种同科蟹的同工酶比较. 水产科技情报,1996,23(4):159~162.
- [13] 王丹,于伟君. 辽宁长江两水系中华绒螯蟹酯酶和乳酸脱氢酶同工酶的比较研究. 辽宁大学学报,1995,22(4):79~10.
- [14] 赵云龙,堵南山,赖伟. 不同水温对中华绒螯蟹胚胎发育的影响. 动物学研究,1993,14(1):49~53.
- [15] 胡能书,万贤国. 同工酶技术及其应用. 长沙:湖南科学技术出版社,1985.
- [16] 吴鹤龄,林锦湖. 遗传学实验方法及技术. 北京:高等教育出版社,1983:263~275.
- [17] 赖德 C C,泰勒 C B. (范培昌译). 生物学研究概说(同工酶). 北京:科学出版社,1987:35~54.
- [18] 田华梅,赵云龙,李晶晶等. 中华绒螯蟹胚胎发育过程中主要生化成分的变化. 动物学杂志,2002,37(5):18~21.
- [19] Hart N H, Cook M. Esterase isozyme patterns in developing embryos of *Brachydanio rerio* (Zebra danio). *Brachydanio albolineatus* (Pearl danio), and their hybrids. *J Exp Zool*,1977,193:109~128.
- [20] 吴力钊,王祖熊. 白鲢个体发育过程中同工酶基因的表达与调控研究. 水生生物学报,1997,21(1):49~58.
- [21] Babu D E. Observations on the embryonic development and energy source in the crab *Xantho bidentatus*. *Mar Biol*,1987,95:123~127.
- [22] 成永旭,堵南山,赖伟. 中华绒螯蟹卵巢和胚胎发育期脂类在卵黄物质中存在的形态及其变化. 动物学杂志,1999,34(1):51~57.
- [23] 应雪萍,罗媛媛,张永普. 中华绒螯蟹受精卵和流产卵氨基酸和脂肪酸组成的比较研究. 水生生物学报,2004,28(4):402~408.