

再刊編號:5

Reprint No. 5

抽印自 中華民國貝類學報

第十四卷

Reprinted from

Bulletin of Malacology, ROC

Vol. 14. pp. 9-18, 1989

5

同功異構 在臺灣鮑螺科的研究

巫文隆·孫琪

Isozyme study of the Taiwan abalone (Gastropoda:Haliotidae)

國科會補助計畫編號:

NSC-76-0201-B001-31

- 51 -

同功異構酶在臺灣鮑螺科的研究

巫文隆·孫琪

中央研究院動物研究所

關鍵詞：腹足綱—鮑螺科，同功異構酶。

Key words: Gastropoda—Haliotidae, Isozyme.

一、前言

鮑螺是本省相當重要的食用經濟性貝類(Ho 1959; Kuo 1964; Wu and Chang 1976)。自古以來，鮑螺即列名八珍之一，所謂“鮑參翅肚”，係備受國人歡迎的高級料理(Peng 1986)。很遺憾的有關本省鮑螺科的分類記錄甚少，且科內各種間的親緣關係之記載，更是缺如。Kuroda (1941) 根據其所採集的標本，認為本省鮑螺科有四種：*Haliotis asinina*, *H. varia*, *H. discus* 及 *H. japonica*。他同時認為 *diversicolor*, *supertexta*, *gruneri* 和 *aquatilis* 均為 *H. japonica* 的同種異名；而 *planata* 則為 *H. varia* 的同種異名。然而 *H. discus* 應屬於溫帶的大型種鮑螺，不應該出現在本省的蘇澳與高雄兩地。Wang (1979) 也根據臺灣省立博物館館藏標本報告了本省鮑螺科貝類有五種及一亞種，分別為 *H. asinina*, *H. ovina*, *H. varia*, *H. planata*, *H. diversicolor diversicolor* 和 *H. diversicolor aquatilis*。這兩篇報告有差異存在，因為都是只根據外殼來作分類鑑

定的依據，很容易造成認知上的差距，沒有一個較為客觀的分類檢索表可供對照與遵循。

本文嘗試利用生化電泳技術來分析鮑螺科的同功異構酶。雖然本實驗室已經建立了對本省文蛤的同功異構酶電泳系統(Wu and Liu 1987)，然而根據經驗，文蛤適用的生化電泳系統不一定適用於鮑螺。因此希望藉此再建立並評估一套同功異構酶電泳分析系統，以供爾後鮑螺科系統分類研究之用。

二、材料與方法

(一) 材料—由台東縣成功，蘭嶼；台北縣貢寮及澎湖縣七美等地沿海採集鮮活的鮑螺科貝類，計有九孔(*H. diversicolor*)，七星(*H. varia*)及石孔(*H. planata*)各十隻左右。鮮活標本帶回實驗室，立即解剖取下包括有外套膜邊緣(Mantle edge)，右殼肌(Right shell muscle)，足肌(Foot muscle)，消化腺(Digestive gland)及生殖腺(Gonad)等部位的組織(Fig. 1)，以供同功異構酶的萃取。

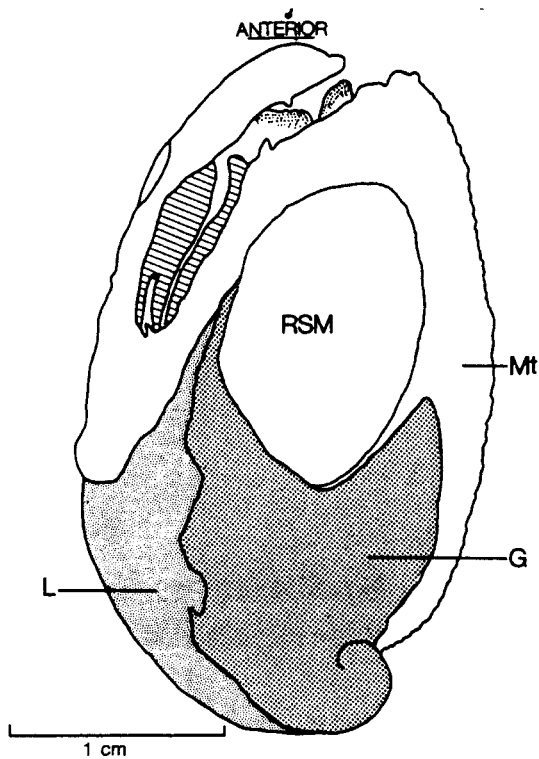


Fig. 1. Different tissues of Taiwan abalone are used for isozyme study.

(二)方法

1. 同功異構酶萃取—新鮮組織取下後，加入雙倍量的萃取液(Extraction buffer-Tris, EDTA, NADP)，再以超音波研磨器 (Sonicator) 將組織充分研磨，細胞打破，如此可以使組織中的同功異構酶釋放於萃取液中，再放入冷凍離心機，以 4℃，11,000rpm (10281.1g) 離心 45 分鐘後，取上層清液，再分裝於 1 cc 小瓶中，貯於 -70℃ 低溫冷凍櫃中儲存備用。
2. 電泳膠片 (Gel) 製備—取 12% 的澱粉液 (Divall 1984) 置於抽氣過濾三角瓶 (Suction filtering flask) 中，利用電爐一邊加熱 (1200 v)，一邊搖動使澱粉完整而均勻溶解呈

透明粘稠狀，經由真空抽出氣泡，倒入正方形模子 (19×19×1 cm) 中，冷卻後置於冰箱中備用。

3. 電泳過程—用 Whatman No.1 filter paper 0.7×0.9cm 吸取離心後的上層清液，分別插於膠片上，放入置於低溫冰櫃 (4~6℃) 的電泳槽中，利用淨電荷的不同，即可使同功異構酶分離出來。電泳跑完後 (電泳過程參看圖二)，取出膠片，以水平方向橫向切割 4~5 片的 1~1.5 mm 厚的薄片。將此薄片置於自行設計的酵素顯色盒中，分別加不同酵素之顯色基質。

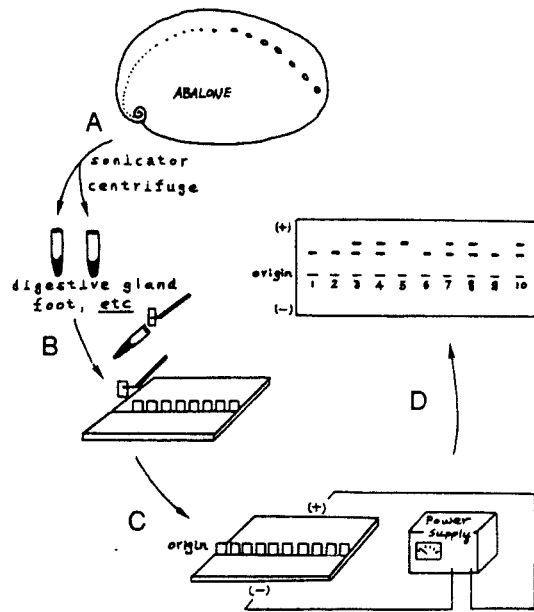


Fig. 2. Basic electrophoretic and laboratory procedures.

4. 緩衝液系統 (Buffer system) — 鮑螺的緩衝液系統，採用 12 種配方，係根據 Shaw and Prasad (1970) 及 Wu and Liu (1987) 的配方稍加修正而來的：

A. Electrode buffer: 135 mM tris, 43 mM

- citric acid, pH 7.0.
Gel buffer: 9 mM tris, 2.9 mM citric acid, pH 7.0.
- B. Electrode buffer: 250 mM tris, 50 mM citric acid, pH 8.0.
Gel buffer: 9.6 mM tris, 1.9 mM citric acid, pH 8.0.
- C. Electrode buffer: 100 mM tris, 100 mM maleic acid, 10 mM EDTA, 20 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4.
Gel buffer: 10 mM tris, 10 mM maleic acid, 1 mM EDTA, 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4.
- D. Electrode buffer: 129 mM tris, 3 mM EDTA, 70 mM boric acid, pH 7.5.
Gel buffer: 45 mM tris, 1 mM EDTA, 25 mM boric acid, pH 7.5.
- E. Electrode buffer: 129 mM tris, 3 mM EDTA, 70 mM boric acid, pH 8.6.
Gel buffer: 45 mM tris, 1 mM EDTA, 25 mM boric acid, pH 8.6.
- F. Electrode buffer: 200 mM sodium acetate (adjust pH with acetic acid), pH 5.6.
Gel buffer: 1:22 dilute of electrode buffer.
- G. Electrode buffer: 30 mM lithium hydroxide, 190 mM boric acid, pH 8.1.
Gel buffer: 1:9 mixture of stock A and B.
Stock A – 30 mM lithium hydroxide, 190 mM boric acid, pH 8.1.
Stock B – 50 mM tris, 8 mM citric acid, pH 8.4.
- H. Electrode buffer: 130 mM tris, 43 mM citric acid, pH 8.0.
Gel buffer: 5 mM histidine, pH 8.0.
- I. Electrode buffer: 40 mM citric acid (adjust pH with N-(3-aminopropyl)-morpholine), pH 6.1.
Gel buffer: 2 mM citric acid (adjust pH with N-(3-aminopropyl)-morpholine), pH 6.1.
- J. Electrode buffer: 40 mM citric acid (adjust pH with N-(3-aminopropyl)-morpholine), pH 8.0.
Gel buffer: 2 mM citric acid (adjust pH with N-(3-aminopropyl)-morpholine), pH 8.0.
- K. Electrode buffer: 40 mM citric acid (adjust pH with N-(3-aminopropyl)-morpholine), pH 8.5.
Gel buffer: 2 mM citric acid (adjust pH with N-(3-aminopropyl)-morpholine), pH 8.5.
- L. Electrode buffer: 40 mM citric acid (adjust pH with N-(3-aminopropyl)-morpholine), pH 9.0.
Gel buffer: 2 mM citric acid (adjust pH with N-(3-aminopropyl)-morpholine), pH 9.0.
5. 電泳的電壓 (Voltage) · 時間及顯色基質 (Substrate) 如下:
- a. Phosphohexose isomerase (Pgi):
 1. Buffer system
 - 1) buffer system A, B, 100 v, 16 hr.
 - 2) buffer system C, 120 v, 16 hr.
 - 3) buffer system D, E, 300 v, 8 hr or 180 v, 16 hr.
 - 4) buffer system G, 200 v, 6 hr.
 2. Substrate, Fructose-6-phosphate.
 - b. Phosphoglucosmutase (Pgm):
 1. Buffer system
 - 1) buffer system A, B, 100 v, 16 hr.
 - 2) buffer system C, 120 v, 16 hr.
 2. Substrate, Glucose-1-phosphate.
 - c. Malate dehydrogenase (Mdh):
 1. Buffer system
 - 1) buffer system A, B, 100 v, 16 hr.
 - 2) buffer system C, 120 v, 16 hr.
 - 3) buffer system D, E, 300 v, 8 hr or 100 v, 16 hr.
 - 4) buffer system F, I, J, K, L, 150 v, 16 hr.
 2. Substrate, Sodium-malic acid.
 - d. Isocitrate dehydrogenase (Idh):
 1. Buffer system

- 1) buffer system H, I, J, K, L, 200 v, 16 hr.
- 2) buffer system A, B, 100 v, 18 hr.
- 2. Substrate, Sodium-isocitrate.
- e. Aminoaspartate transperase (Aat):
 - 1. Buffer system
 - 1) buffer system A, B, F, G, H, I, J, K, L, 150 v, 16 hr.
 - 2. Substrate, Aspartic acid, α -ketoglutarate, pyridoxial-5-phosphate, fast blue BB salt.
- f. Malic enzyme (Me):
 - 1. Buffer system
 - 1) buffer system A, B, 100 v, 16 hr.
 - 2) buffer system D, E, 100 v, 16 hr.
 - 3) buffer system H, I, J, K, L, 180 v, 16 hr.
 - 2. Substrate, Sodium-L-malic acid, pH 7.0.
- 6-phosphagluconate dehydrogenase (6-Pgdh):
 - 1. Buffer system
 - 1) buffer system A, B, C, D, E, H, I, J, 150 v, 16 hr.
 - 2. Substrate, 6-Phosphagluconia acid.

三、結果

一、九孔

在本實驗中，總共測試了十二種緩衝液系統及七種同功異構酶，結果綜合於表一中：在 Tris, Citric acid, pH 7.0 緩衝液系統中，只有 Me 分離效果尚可，也有多態現象(polymorphism)；而 Pgm 不但分離效果差，同時也未見多態現象。在 Tris, Citric acid, pH 8.0 緩衝液系統中也只有 Me 具有相同的結果。在 Tris, maleic acid, EDTA, pH 7.4 緩衝系統中，只有 Pgi 及 Pgm 分離效果尚可，然而 Pgi 才有多態現象。在 Tris, EDTA, boric acid, pH 7.5 緩衝系統中也有類似的結果。在 E 到 I 的緩衝液系統中，分離效果都不理想。在 citric acid, pH 8.0 緩衝系統中也只有 Me 分離效果尚可，也有多態現象；同樣結果也發生在 citric acid, pH 8.5 緩衝液系統中。當 citric acid 的 pH 值提高到 9.0 時 Me 分離效果特佳同時也具有多態現象。

Table 1. Validation on various buffer system for isozyme separation of *Haliotis diversicolor*

Isozyme	Buffer system											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Mdh	- o	- o			- o	- o	-	-	- o	- o	- o	- o
Me	+ o	+ o			- o	- o		- o	- o	+ o	+ o	++ o
Idh	- o	- o							- o	- o	- o	- o
Pgi	- x	- x	+ o	+ o							-	-
Pgm	- x	- x	+ x	+ x							-	-
Aat	- o	- o	- o	- o					- o	- o	- o	- o
6-Pgdh	- o	- o	- o						- o	- o	- o	- o

++: Separation well +: Separation -: No separation o: Polymorphism x: No polymorphism

二、石孔

在石孔研究中亦進行十二種緩衝液系統及七種同功異構酶，結果整理於表二中，在 Tris, citric acid, pH 7.0 緩衝液系統中，Mdh 及 Me 的分離效果尚可，同時也具有多態現象；而 Tris, citric acid, pH 8.0 的條件下也具有類似的結果。在 tris, maleic acid, EDTA, pH 7.4 條件下，Pgi 及 Pgm 分離效果很好，但是只有 Pgi 可以顯示出多態現象；類似的結果在

tris, EDTA, boric acid, pH 7.5 狀況下也出現。在緩衝液系統 E, F, G 及 I 條件中，雖然 Mdh, Me, Aat 及 6-Pgdh 可以顯示多態現象，然而其分離效果均不甚理想。在 tris, citric acid, pH 8.0 而 Gel buffer 改為 Histidine 時 Mdh 及 Me 分離效果尚佳，也均具有多態現象。而在 citric acid 中利用 N-(3-aminopropyl)-morpholine 調整 pH 值越高時 Mdh 及 Me 的分離效果越好，也具有相當滿意的多態現象。

Table 2. Validation on various buffer system for isozyme separation of *Halioris planata*

Isozyme	Buffer system											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Mdh	+	+		-	-	-	-	+	-	-	+	++
	o	o		o	o			o	o	o	o	o
Me	+	+		-	-			+	-	+	+	++
	o	o		o	o			o	o	o	o	o
Idh	-	-							-	-	-	-
	o	o									o	o
Pgi	-		+	+								-
			o	o								o
Pgm	-		+	+								-
			x	x								x
Aat	-		-						-	-	-	-
	o		o						o	o	o	o
6-Pgdh	-	-	-					-	-	-	-	-
	o	o	o						o	o	o	o

++: Separation well
 +: Separation
 -: No separation
 o: Polymorphism
 x: No polymorphism

三、七星

七星的結果請參看表三：在 tris,

citric acid, pH 7.0 及 pH 8.0 中，Mdh 及 Me 的分離效果不錯，也可以顯示出多態現

象來。在 tris, maleic acid, EDTA, pH 7.4 及 tris, EDTA, boric acid, pH 7.5 條件中，雖然 Pgi 及 Pgm 分離效果均很好，但是只有 Pgi 可以出現多態現象。在緩衝液系統 E, F, G 及 I 中，分離效果甚差。在 tris, citric acid, pH 8.0 所用 Gel

buffer 為 Histidine 時，Mdh 及 Me 的分離效果尚可，同時亦可出現多態現象。在 citric acid 利用 N-(3-aminopropyl)-morpholine 來調整 pH 值時，發現 pH 值越高時，對 Mdh 及 Me 的分離效果越好，且有明顯的多態現象出現。

Table 3. Validation on various buffer system for isozyme separation of *Haliotis varia*

Isozyme	Buffer system											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Mdh	+	+		-	-	-	-	+	-	-	+	+
	o	o		o	o			o	o	o	o	o
Me	+	+		-	-			+	-	+	+	++
	o	o		o	o			o	o	o	o	o
Idh	-	-				-	-	-	-	-	-	-
	o	o						o	o	o	o	o
Pgi	-		+	+								-
			o	o								o
Pgm	-		++	+								-
			x	x								x
Aat	-		-			-	-		-	-	-	-
	o		o						o	o	o	o
6-Pgdh	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
	o	o	o					o	o	o	o	o

++: Separation well
 +: Separation
 -: No separation
 o: Polymorphism
 x: No polymorphism

在 Malic enzyme (Me) 系統中 (Fig. 3)，成功與貢寮的九孔以及澎湖的七星與蘭嶼的石孔雖然都具有三條電泳帶，但成功與貢寮的九孔電泳帶位置顯然與澎湖的七星及蘭嶼的石孔有很大的差異，而且澎湖的七星與蘭嶼的石孔其電泳帶也有所不同

，因此利用 Me 同功異構酶應可區分三種鮑螺 (九孔、七星與石孔) 的不同。在 Fig. 3 亦顯示同一種的九孔，雖分別採自貢寮與成功但是却没有差異存在。

在 Malate dehydrogenase (Mdh) 系統中 (Fig. 4)，雖然成功與貢寮的九孔的

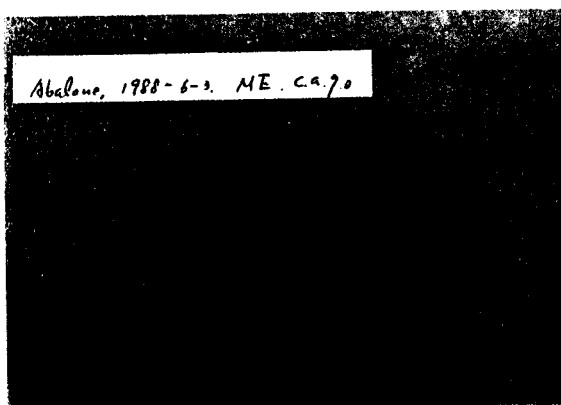


Fig. 3. Malic enzyme (Me) electrophoresis zymograms of *Haliotis* spp.

電泳帶分離效果不理想，但是整體而言，九孔的電泳帶高於蘭嶼的石孔及澎湖的七星；同時石孔與七星的電泳帶也具有差異存在。

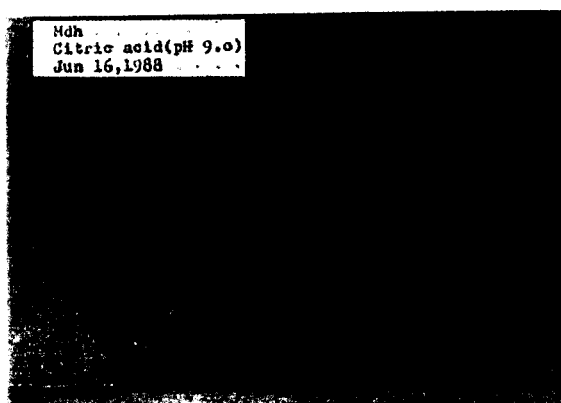


Fig. 4. Malate dehydrogenase (Mdh) electrophoresis zymograms of *Haliotis* spp.

在 Isocitrate dehydrogenase (Idh) 系統中 (Fig. 5)：雖然分離效果不甚理想，但是仍然可以分辨出來成功與貢寮的九孔電泳帶沒有差異存在，而蘭嶼的石孔與澎湖的七星電泳帶有甚大的差異存在，並且與九孔的電泳帶位置亦不同。

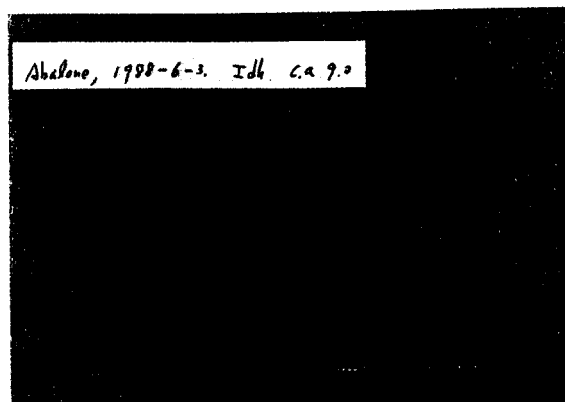


Fig. 5. Isocitric dehydrogenase (Idh) electrophoresis zymograms of *Haliotis* spp.

綜合本文的結果 (表一～表三)，若以電泳的多態性分析 (Polymorphism)，Pgm 在各種緩衝系統中均無多態性的結果。其餘的 Mdh，Me，Idh，Pgi，Aat 及 6-Pgdh 大部分均可顯出多態性結果，然而 Idh，Aat 及 6-Pgdh 的分離效果顯然比 Mdh，Me 及 Pgi 來得不理想，其中 Idh 的電泳結果 (Fig. 5) 也有差強人意的結果。所以 Mdh，Me 及 Pgi 三種若在適當的緩衝溶液配合下，對於鮑螺科貝類即可得分離效果好而且又具有多態性表現的理想組合。

四、討論

同功異構酶在國外被認為是研究動物系統分類及族群遺傳相當重要而且有效的工具，例如 Fujino (1978a, 1978b)，Koehn *et al.*, (1976)。然而目前本省有關同功異構酶應用於海洋生物系統分類研究報告相當缺乏，如 Lee *et al.*, (1987) 利用 Mdh，Ldh 及 Aat 判定臺灣產葉鯛屬魚類的分類地位。本省軟體動物研究方面，Wu (1982) 曾利用水溶性肌肉蛋白質的電泳來比較本省蚌科貝類的類緣關係。同功異構酶基礎的

電泳分離技術也由Wu and Liu (1987)建立，Liu (1988)更利用已經建立的電泳系統完成本省文蛤族群判定，可以確定的是同功異構酶的生化電泳分析是相當可行而有效的方法，更可以補充傳統形態分類的不足與缺憾。

Fujino *et al.*, (1980)研究太平洋鮑螺(Pacific abalone)時，應用11種同功異構酶，發現只有二種酵素適用於種別判定，因為其餘的均缺乏多態現象。但在我們的研究中，發現在 Tris, citric acid, pH 7.0 下分離 Mdh 時，並沒有多態性，然而却在 citric acid, pH 9.0 下蘭嶼的石孔及澎湖的七星其 Mdh 均可以清楚地分出 Cytoplasm及Mitochondria的酵素(Fig. 4)，因此 Fujino *et al.*, (1980) 的實驗中，不適用於應用的同功異構酶如Aldehyde oxidase; Tetrazolium oxidase 等，也許同本實驗一樣，在改變緩衝液系統的情況下，應可將位點(loci)分離清楚，即可廣泛地應用此電泳技術作為族群判定或種別鑑定研究上。

Wilkins (1980)的研究指出，不同亞種的Pacific abalone其Pgm有不同的熱穩定性(thermostability)而且和棲息的海域有很大的相關性。在本研究中，Pgi 在三種鮑螺 (Table 1, 2, 3) 中並沒有差異。臺灣地處亞熱帶，今後當可嘗試本省南、北部採集的鮑螺種類，作熱穩定性方面的研究，或許亦可作為將來族群判定的指標之一。

綜合表一、二及三的結果以及 Me (Fig. 3), Mdh (Fig. 4) 及 Idh (Fig. 5) 的電泳圖結果可以明確的判定：依傳統形態學分類為同類的成功與貢寮的九孔，在

生化系統上亦歸屬於同一種，而澎湖的七星與蘭嶼的石孔不但在形態上有別於九孔；在生化系統上也有甚大的差異存在，且七星與石孔二者形態差異不大，但生化電泳結果，則可明確地區分出來。因此以本文所使用的 Me, Mdh及Idh 的電泳結果，有助於種別的判定。

五、謝辭

筆者感謝中央研究院動物所周延鑫所長的鼓勵，同所李信徹教授提供有關電泳實驗的設備與方便，標本來源感謝台北縣海產種苗繁殖中心楊正義主任，臺灣省水產試驗所台東分所及澎湖分所有關同仁之協助，部份經費獲得行政院國家科學委員會專題補助(NSC 76-0201-B001-31)，特此致謝。

六、參考文獻

- Divall, G. H. 1984. Starch gel electrophoresis of proten. In *Methods in Molecular Biology* (J. M. Walker ed.), pp. 97-105.
- Ho, T. Y. 1959. A list of edible mollusks of Taiwan. *Rep. Inst. Fish. Biol. and Minst. Econ. Aff. NTU*, 3(1):42-47.
- Fujino, K. 1978a. Genetic studies on the Pacific abalone - I. Inbreeding and overdominance as evidence by biochemical polymorphism in a wild population. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 44:357-361.
- Fujino, K. 1978b. Genetic studies on the Pacific abalone - II. Exclusive homozygosity in deficient animals. Proc XVIth internatl. conf. Animal Blood Gr. Biochem. Polynonph. Leiningrad.
- Fujino, K., Sasaki, K. and Wilkins, N. P. 1980. Genetic studies on the Pacific abalone - III. Difference in electrophoretic patterns between *Haliotis discus*. *Bull. Japan Soc.*

- Sci. Fish.* 46:543–548.
- Koehn, R. K., Milman, R. and Mitton, J. B. 1976. Population genetic of marine pelecypods— IV. Selection migration and genetic differentiation. *Evolution*, 30:2.
- Kuo, H. 1964. An investigation on Taiwan economic mollusks. *Spec. Publ., Counc. Agri. Taiwan*, ROC, 38:1–104.
- Kuroda, T. 1941. A catalogue of molluscan shells from Taiwan (Formosa), with descriptions of new species. *Mem. Fac. Sci. and Agri., Taihoku Imp. Univ., Formosa* 22(4):65–216.
- Lee, S. C., Tsoi, S. C. M. and Chao, W. C. 1987. Systematic status of the fishes of *Glaucosoma* in Taiwan. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica* 26(3):195–200.
- Liu, H. P. 1988. Population discrimination and reproductive ecology of *Meretrix* in Tan-shui and Lu-kang area. M. Sc. Thesis, Inst. Fish. Sci., Natl. Taiwan Univ. 159 pp.
- Peng, C. Y. 1986. Edible mollusks: abalone. *Agric. Week.*, 12(40):13–18.
- Shaw, C. R. and Prasad, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzyme— A compilation of recipes. *Bioch. Genet.* 4:297–320.
- Wang, I. 1979. Haliotidae in Taiwan. *Ann. Sci. Rep. Taiwan Mus.*, 22:151–155.
- Wilkins, N. P., Fujino, K. and Sasaki, K. 1980. Population genetics on the Pacific abalone— IV. Thermostability difference among phosphoglucosmutase variants. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 4:549–553.
- Wu, W. L. 1982. Phylogenetic studies of Taiwan freshwater mussels (Bivalvia:Unionidae). *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica* 21(2):145–153.
- Wu, W. L. and Chang, K. H. 1976. Statistical analysis of the yield of mollusks in Taiwan. *Bull. Malacol. R.O.C.* 3:79–94.
- Wu, W. L. and Liu, H. P. 1987. Malacological research on *Meretrix* resources in Taiwan— I. Preliminary report on isozyme study. *Bull. Malacol. R.O.C.* 13:1–7.

Isozyme Study of the Taiwan Abalones (Gastropoda : Haliotidae)

Wen-lung Wu and Chyi Sun

Institute of Zoology, Academia Sinica

Allozyme variations of *Haliotis* abalones from Kong-liao (Northeastern Taiwan), Cheng-kon (Eastern Taiwan) and Peng-hu (Western Taiwan) were studied by starch gel electrophoresis on 7 isozymes with 12 different buffer systems.

When the adjustment of Me (Malic enzyme) and Mdh (Malate dehydrogenase) in citric acid pH 7.0 and 9.0, with N-(3-aminopropyl)-morpholine to pH 8.5 and 9.0 respectively; Pgi (Phosphohexose isomerase) in tris-maleic-EDTA pH 7.4 and tris-boric-EDTA pH 7.5 buffer system were employed, the separation of bands are better effective. Therefore, these three isozymes are recommend to do further systematic study on *Haliotis*.