

蛋白质电泳在动物分类学中的应用

杨幼凤 卢浩泉

(山东大学生物系)

现代分类学除了形态特征外,应综合其生态行为、地理分布以及根据实验分类的资料进行分类(郑作新,1982)。对种的概念应有生物学和种群概念。在实验分类学上,最近国内外应用各种电泳技术从分子水平进行动物分类,丰富了分类学领域,具有重要作用。Avisé于1974年根据电泳分析的材料论述了它在分类学研究的价值。并认为,种间的生化差异对描述和鉴定不同物种有一定的参考意义,并可使同属物种比较容易地分辨出,而超出了常规的分类准则。在分类学上应用电泳生物化学技术,可为形态分类增加比较客观的手段。当然还有染色体组型及分带、细胞中DNA含量、杂交实验和免疫学方法等。最近的研究表明,蛋白质不仅作为基因的产物而受到重视,而且它的电泳行为(泳动速度)和区带数目的变化可以隐藏着生物进化的历史。因此从电泳分析来看某些动物的分类地位,对目前的形态分类学及系统进化研究有重要的意义。

一、电泳技术向分类学的渗透

1937年, Tiselius 首先用界面电泳将血清蛋白质分离成五种成分,即白蛋白, α_1 球蛋白、 α_2 球蛋白、 β 球蛋白和 γ 球蛋白。这种方法中电泳是在没有支持物的液体中进行的,利用胶体溶液(蛋白质溶液)和溶剂(缓冲液)间能形成界面性质来观察电泳物质的移动和分离。此后20、30年,这一技术得到了迅速发展。1963年前大部分研究是阐述单一蛋白质的变异,现已用于分析同一生物的不同蛋白质。这些多位点的研究,都适于研究基因的变异性和种群结构。

国外60年代后期开始向分类学渗透。近数年间,开创了蛋白质各种显带染色法,许多蛋白质都能进行正确地鉴定。通过进一步捕捉蛋白质电泳图谱上发生的微小变化,可以更加深入地考虑物种的分类地位及进化发生的机制和原因。目前这方面的工作正在进行,国内外陆续发表了很多动物在电泳行为进化及分类上的研究成果。大多涉及脊椎动物的进化与分类,如周虞灿^[6-7]、杨玉华^[8]、鄂未远等^[10],把蛋白质电泳结果用于啮齿动物和两栖、爬行动物的分类,为我国动物分类研究的新发展起到了积极的推动作用。但动物界还有许多有争议的近缘种类有待于分析研究。

自从知道基因的本质是DNA,蛋白质是它的遗传信息产物,所以物种种群的分类地位和进化问题,在蛋白质水平上来研究则更为合适。由于蛋白质的一级结构不同,高级结构(构象)也就不同,在物理、化学和生物学性质方面自然有所差异。这些差异恰是分析鉴定蛋白质的理论基础。常用的分析方法有:淀粉凝胶电泳,醋酸纤维薄膜电泳,琼脂糖电泳,聚丙烯酰胺凝胶电泳和薄层等电聚集技术等。电泳技术的发展,使这些肉眼不可见的遗传变异研究成为可能,又因电泳法具有快速、经济、分辨力高的优点,在解决一些近缘种的分类地位方面已显示独特的效力,并成为分子分类学的一项基本技术。

二、几种重要生理功能蛋白质的特性及其应用

已成为分类学研究对象的蛋白质,一般分

为酶蛋白和非酶蛋白两类。

(一) 用于分类学的非酶蛋白质 血红蛋白, 铁传递蛋白, 血清蛋白是血液的主要蛋白质。是非酶蛋白质的中心^[12]。Lush 曾对 60 年代的研究状况有详细的总结。日本学者佐佐木清纲对属于畜牧种系的动物作了分类收集。此外, 许多学者还将肌浆蛋白、眼球晶体蛋白及蛇毒蛋白作为分类研究对象。

1. 血红蛋白 (Hemoglobin, Hb) Hb 是血液中运输氧的蛋白质, 含四条多肽链, 其中两条链为 α 链, 两条链为 β 链; 每条链环绕一个亚铁红素基团。Fyhn 等详细研究了亚马逊河流域某些鱼类血红蛋白(Hb)的异质性, 讨论了某些目、科之间Hb的变异程度; 周虞灿等^[6]首次把Hb电泳结果用于啮齿动物的分类, 他们根据电泳的(1)区带数目(成分)不同; (2)区带成分在电泳图谱上分布不同、反映泳动率(电泳行为)不同, 即蛋白质分子的结构不同; 进而反映了遗传型差异, 探讨了高原鼠兔的分类地位, 支持并证明了某些分类学家的观点, 把高原鼠兔从达乌尔鼠兔中分出来, 成为一个独立的种。史瀛仙等^[3]曾用薄层聚丙烯酰胺凝胶电泳对扬子鳄和密河鳄Hb比较, 从分子水平上看出扬子鳄与密河鳄是亲缘关系十分接近的两个种, 但毕竟还有细微差别, 所以仍支持它们为两个独立物种的观点。

2. 铁传递蛋白 (Transferrin, Tf) 它是一类能转运 Fe(III) 的铁结合蛋白, 在血液中约占 0.3%, 称血清铁传递蛋白(Seroferrin, Sero-Tf); 乳腺、泪腺分泌液中存乳铁传递蛋白(Lactoferrin, Lacto-Tf); 鸟类卵中发现有卵铁传递蛋白(Ovoferrin, Ovo-Tf)。其中研究最多的是 Sero-Tf, 其主要功能是作为铁的载体, 运载铁供网织红细胞进行血红蛋白的生物合成。近年来, Tf 生化多态性的比较也已为分类学家用于分类的一个重要指标, (Chapman)^[14] 许多大型哺乳动物, 如奶牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、鹿、猴等的 Tf 都有变异型; 鸟类 Tf 多态也有报道; Muller^[13] 小型哺乳动物 Tf 多态现象虽不及大型哺乳动物那样广泛,

但也有报道, 不过涉及的动物种类不多。至于野生种类研究则更是为数有限。Dobrowolska 等^[15]用电泳统计遗传学方法研究了波兰某地农田中共存的普通田鼠、黑线姬鼠、黄喉姬鼠的 Tf 变异, 结果三种鼠的电泳谱带各不相同。周虞灿等从青海省和新疆维吾尔自治区捕获的 8 种啮齿动物, 以圆盘电泳分析其 Tf 成分, 用铁的特异染色法鉴别 Tf, 分析 Tf 在 8 种鼠类中多态程度, 为利用蛋白质多态性进行分类提供了重要的参考值。

3. 血清蛋白 (Serum proteins) 血清蛋白是血液中的一组蛋白质。病理上常用测定血清蛋白值。Braun 等在报道树鼩生理数值一文中, 附带报道了血清蛋白电泳成分的百分比, 为树鼩目的分类地位提供了有价值的参考。周虞灿等利用电泳方法比较了三种鼠兔的血清蛋白质, 为鼠兔属的分类作了订正。他们的分析表明, 高原鼠兔和达乌尔鼠兔是两个不同的物种, 不应视为亚种。血清蛋白也已用于爬行动物分类^[5, 9]。有人^[9]曾用十二烷基磺酸钠 (SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 比较了黑线姬鼠长江亚种和华北亚种的血清蛋白质, 虽然 SDS-电泳分带较一般电泳区带多, 但显带程度清晰, 亚种间的差异鲜明可见。基于此, 血清蛋白用于分类是较好的生化指标。

4. 肌浆蛋白 (Myogen) 肌浆蛋白为横纹肌肌浆的水提取物。它们被认为是一类较稳定的蛋白质, 具有物种的特异性。在鱼类分类方面, 利用肌浆蛋白为研究对象报道较多。王可玲^[1]等分析了我国舟山近海带鱼极其同属异种的小带鱼的肌浆蛋白, 结果两种带鱼电泳图谱有较明显的种间差异。肌浆蛋白在种间和种内的变异型式和幅度也引起了重视。另外, 肌浆蛋白的 SDS-电泳应用于小型啮齿动物分类, 区带多而清晰, 种内差异不明显, 是鉴别种及种群的较好指标^[9]。

5. 眼球晶体蛋白 (Crystallin) 眼球晶体蛋白是眼球水晶体中的主要蛋白质。现已知有 α 、 β 、 γ 三种可溶性蛋白及不溶性硬蛋白。三种可溶性蛋白, 其中氨基酸的组成均不同, 多以聚

合体形式存在。

眼睛是动物界进化过程中首先发展和进化的视觉器官,它是研究发育和再生因果关系的理想对象。Rotmann 早就证实了晶状体组织本身的遗传特性。藤尾久芳、Markert^[17]、Lush^[16]及 Whitt^[20]等人在鱼类遗传学研究中也根据眼晶体中酶图谱,论述了各种鱼类的进化程度和分类地位。David 等人比较豹蛙眼等12种组织的肽酶同工酶时,眼睛的谱带表现特异性,作为说明眼睛进化速度快的典型例子;鄂未远等^[18],首次把晶体蛋白电泳结果用于我国两栖、爬行动物分类,探讨了蜥蜴科间某些种类的分类地位。分析了分类上有争议的林蛙类群以及几种湍蛙的眼晶体蛋白,找出了明显的差异,同时证实了不同产地的同种蛙或个体间的谱带相同,实验重复性也好,这进一步说明晶体蛋白在物种内较稳定,再次证明以晶体蛋白作研究对象进行分类的可行性。从动物生理角度看,眼晶体受病态、饥饿、个体等条件的影响较少,故以此为实验分类的材料较为理想。目前尚未见到在鸟类、哺乳类中此种材料与方法的报道,是否也会有类似的结果有待于探讨。

6. 蛇毒蛋白 (Venom proteins) 蛇毒蛋白是有毒爬行类分泌毒液中所含的主要成分,它随淋巴及血液扩散,引起中毒症。70年代以来,我国开始了蛇毒蛋白生化和蛇毒综合利用研究,近年来,已有将蛇毒蛋白的电泳等方法应用于毒蛇分类学研究的报道(赵尔宓等,1981;武天爱,1981)。蒙义文^[11]等报告了我国产蝮属8个样品及尖吻蝮属1个样品的双向电泳图谱的比较分析,并讨论其在毒蛇分类上应用的可能性。分析表明,蝮属内各种间的亲缘关系与双向电泳图谱上出现的斑点数关系不大,而与斑点的分布状况有关。不同地区采集的同一蛇种蛇毒样品的双向电泳图谱基本一致。随蛇种亲缘关系的疏远、亚种间、种间、属间样品的双向电泳图谱差异越来越大,说明蛇毒蛋白的双向电泳图谱在一定程度上反映了毒蛇的亲缘关系。无疑,经他们改良后具有高分辨力的双向电泳,为一些以形态分类有疑难的毒蛇,提供了

有价值的检测技术。

(二) 用于分类学的酶蛋白质 在生物种群中,有关酶的变异研究占有相当比例,因为酶在生物界普遍存在,而且微量样品也能检测出来。用电泳法识别的酶度异体,通常叫同工酶(isoenzyme)。这是 Markert 和 Moller 1959 年用淀粉凝胶电泳方法研究乳酸脱氢酶时,发现它可分为移动度不同的5条带而命名的。它是指基质相同,而对分子结构不同的同类酶蛋白而言。同工酶也是发育与进化的遗传标志。

1. 乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDE) 同工酶 这类同工酶是了解得最清楚的一种糖代谢的关键酶,也是比较生物化学研究和研究基因进化的理想蛋白质。60年代 Markert 研究了13个科中30种鱼的 LDH 同工酶,为将 LDH 同工酶用于分类学研究提供了理论基础^[17]。后来 Lush 等利用 LDH 同工酶谱讨论了鲮形目鱼类中3科12种鱼的亲缘关系。近年来,朱蓝菲^[15]对鲤科鱼类中部分种类的肌肉、心脏、晶状体、脑和肾脏的 LDH 同工酶进行比较研究,查清图谱在条带数、区带的迁移率、区带的间隔和活性强弱方面的差异,讨论这些鱼类的分类地位。在两栖类如大蟾蜍三个亚种之间、爬行类如扬子鳄与密河鳄、丽斑麻蜥和山地麻蜥等,对血液和几种组织中 LDH 同工酶的研究已有详细报道。哺乳类中,近年对小型啮齿类的 LDH 研究也在深入,其他动物种类还有待于研究。

2. 酯酶 (Esterase, Es) 同工酶 Es 是催化脂类化合物水解的酶系。由于它们能水解大量非生理存在的酯类化合物,包括一些药物,因此认为可能有去毒作用。肝脏是解毒器官,Es 的活性可能较高。在分类方面有资料表明,除肌浆蛋白、LDH 同工酶外,Es 在物种内也较稳定,具有物种特异性。有人^[1]曾分析我国舟山近海带鱼肝 Es 无明显的个体变化,电泳谱带仅一型;而小带鱼肝 Es 则有明显不同。后者肝 Es 为一个强带;前者则在一个强带前有一个清楚的较强带,其后尚有1—2个弱带,并且两者的迁移率也较大。这项结果清楚地表明了肝

Es 具有明显的种间差异。在无脊椎动物分类方面,以 Es 同工酶分析种间差异已有报道,如用电泳法证实了长期认为是两个独立种的耳萝卜螺和克氏萝卜螺为同物异名^[2]。有人曾对我国常见的 4 种室内蜚蠊作过 Es 同工酶分析,同样证实了其种间差异。

近年来,对眼晶体 Es 同工酶研究引起了人们的重视。在鱼类分类方面已有报道,认为眼晶体 Es 同工酶谱带清晰、稳定、再现性好。在小型啮齿类,对血清 Es 同工酶的变化也有人做过分析,发现物种内个体差异较大,似不宜为分类指标,这可能是血清 Es 同工酶不如眼晶体 Es 同工酶在遗传上稳定。利用血清 Es 多态程度进行分类也是值得重视的方面,尚有待研究。

3. 苹果酸脱氢酶 (Malate dehydrogenase, MDH) 同工酶 它是细胞中三羧酸循环中重要的脱氢酶之一。Bours^[43] 用薄层等电聚焦电泳法研究了兔眼睛体、虹膜和视网膜中 MDH 同工酶活性,指出该酶有三种同工酶。但是该酶用于动物分类的资料较少。叶炳辉^[4] 曾分析了室内 4 种蜚蠊前胸肌肉 MDH 同工酶,比较谱带条数和迁移率,尽管种间有差异,但不及同时分析的 Es 同工酶差异显著。所以这种酶能否作为动物其它种类分类的生化依据,尚待进一步探讨。

三、动物生化分类研究的展望

动物分类学在理论和实验方面近年来都有一定的发展。当今生物演化的主要过程和阶段已经了解,但许多有争议的近缘种类的研究、动物结构和机能的演化规律的研究、器官及其机能演化与环境相互关系的研究,还有广阔的前景。必须指出,形态特征在今后仍是分类学研究的基本依据,但有时难免因某种原因引起命名上的争议,这方面在动物分类领域不乏其例。形态分类确定的物种,用电泳方法来进一步检验是相互支持,而在形态分类有疑难的种间、种下类群的分类中又起重要作用。随着生物学各门学科互相渗透和促进,电泳研究方法和研究工具的进步,各种蛋白质(酶)的特异染色、扫

描、凝胶干片原始资料的保存等先进技术的使用,许多研究者正致力于电泳区带在各种动物中表现形式的研究。可认为,对于这些微观的结果象自然界百万号标本那样被保存下来,必将对动物进化及亲缘关系的判定,从分子水平提供科学依据。当然,电泳技术应用于动物分类,也有一定局限性 (Johnson, 1977),并非所有突变分子都能鉴别出来。一般认为电泳法能检测的分子突变值比实际值低。另外,该技术不象形态解剖分类那样受到动物取材的限制,如分析动物的年龄一般要求成年健康活体,因新生个体和病态个体有时会出现异常谱带;电泳分析样品要求新鲜,最好样品离体后马上进行电泳等等。至于其它分类学手段,作为形态分类的补充各有特点,鉴于这方面资料很多,在此不作赘述。综上所述,电泳技术的应用比形态和解剖方法具有更大的优越性。深入开展这方面的研究和应用,不仅在基础理论研究上,而且对农、医、分子遗传学、发生遗传学具有十分重要的意义。我们深信,电泳技术应用象其他技术应用研究一样,尚需继续探索,进一步开拓。

参 考 文 献

- [1] 王可玲等 1983, 舟山近海带鱼与小带鱼肌浆蛋白、乳酸脱氢酶同工酶和肝酯酶的变化 鱼类学论文集(第三辑),科学出版社 41—46
- [2] 王恩义 1984, 电泳方法在分类学上的应用——以酯酶分析萝卜螺属 (*Radix*) 三个种的初步研究 动物分类学报 9(3): 333
- [3] 史源仙等 1984 扬子鳄与密河鳄血清蛋白、血红蛋白和乳酸脱氢酶凝胶电泳的比较,两栖爬行动物学报 3(2):21—24
- [4] 叶炳辉 1984 四种室内常见蜚蠊酯酶同工酶和苹果酸脱氢酶的酶谱比较研究 动物学研究 5(4): 325—328
- [5] 朱蓝菲等 1983 20 种鲤科鱼类同工酶表型分析及有关进化问题的探讨,水产学报 7(2): 145—152
- [6] 周虞灿等 1981 三种鼠兔血清蛋白和血红蛋白的电泳比较 兽类学报 1(1): 39—42
- [7] ——1982 几种啮齿动物血清铁传递蛋白多态现象的比较研究 兽类学报 2(1): 43—49
- [8] 杨玉华 1983 我国大蟾蜍 (*Bufo bufo*) 三个亚种的 C 带, Ag-NOR 以及血清蛋白、乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶电泳的比较研究 两栖爬行动物学报 5(4): 1—9
- [9] 赵小凡等 1986 黑线姬鼠华北亚种长江亚种几项生化指标的观察 兽类学报 6(1): 57—62
- [10] 鄒末远等 1984 我国部分无尾两栖类眼晶状体蛋白