

中国林蛙与黑龙江林蛙血清蛋白比较分析

朴忠万, 金建丽, 金志民, 杨春文, 闫兵 (牡丹江师范学院生物系, 黑龙江牡丹江 157012)

摘要 [目的]为林蛙种属的科学划分提供依据。[方法]以中国林蛙和黑龙江林蛙为材料, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法对其血清蛋白进行比较分析。[结果]从中国林蛙血清中共分离出 25 条蛋白带, 从黑龙江林蛙血清中共分离出 23 条蛋白带, 其中迁移率为 0.552、0.524、0.400、0.375、0.331、0.241、0.076、0.062、0.048 的 9 条蛋白带为中国林蛙特有; 迁移率为 0.517、0.269、0.228、0.214、0.127、0.069、0.041 的 7 条蛋白带为黑龙江林蛙特有, 迁移率为 0.621、0.469、0.434、0.359、0.317、0.297、0.200、0.172、0.159、0.145、0.124、0.103、0.090、0.055、0.028、0.014 的 16 条蛋白带为两者共有。[结论]中国林蛙与黑龙江林蛙应归于 2 个独立的蛙种。

关键词 中国林蛙; 黑龙江林蛙; 血清蛋白; 迁移率

中图分类号 S966.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)25-12039-02

Comparative Analysis on Serum Protein of *Rana chensinensis* and *Rana amurensis*

PIAO Zhong-wan et al (Biological Department of Mudanjiang Normal College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012)

Abstract [Objective] The study was to provide the basis for the scientific classification of rana species. [Method] With *Rana chensinensis* and *Rana amurensis* as the materials, their serum protein was comparatively analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis method. [Result] 25 protein bands were separated from *R. chensinensis* serum and 23 protein bands were separated from *R. amurensis* serum. 9 protein bands which mobility were 0.552, 0.524, 0.400, 0.375, 0.331, 0.241, 0.076, 0.062, 0.048 resp. were the particular bands of *R. chensinensis* and 7 protein bands which mobility were 0.517, 0.269, 0.228, 0.214, 0.127, 0.069, 0.041 resp. were the particular bands of *R. amurensis*. 16 protein bands which mobility were 0.621, 0.469, 0.434, 0.359, 0.317, 0.297, 0.200, 0.172, 0.159, 0.145, 0.124, 0.103, 0.090, 0.055, 0.028, 0.014 resp. were the mutual bands of *R. chensinensis* and *R. amurensis*. [Conclusion] *R. chensinensis* and *R. amurensis* should belong to 2 independent rana species.

Key words *Rana chensinensis*; *Rana amurensis*; Serum protein; Mobility

中国林蛙 (*Rana chensinensis*) 和黑龙江林蛙 (*Rana amurensis*) 均属两栖纲 (Amphibia) 无尾目 (Salientia) 蛙科 (Ranidae) 蛙属 (*Rana*), 中国林蛙主要分布于黑龙江、吉林、辽宁等省的森林中, 其中小兴安岭、张广才岭、长白山等地产的中国林蛙为上品; 黑龙江林蛙主要分布于黑龙江、吉林、辽宁。

胡文平等^[1-4]采用电泳方法对动物血清蛋白进行过研究。但目前为止, 运用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对中国林蛙与黑龙江林蛙血清蛋白进行的比较研究尚未见报道。

为此, 笔者采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法研究了中国林蛙与黑龙江林蛙血清蛋白的差异, 以期探究 2 种林蛙血液生化遗传表型的差异, 为林蛙种属的科学划分及林蛙与其他蛙种的亲缘关系识别积累资料^[1-3,5]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物。供试林蛙分别于 2006 年 9 月、2007 年 5 月采自黑龙江省牡丹江市牡丹峰。

1.1.2 仪器。三恒多用电泳仪 (Ecp3000), 垂直板电泳槽 (DYY-III 型), 高速冷冻离心机 (BECRMANTM COULTERTM64R Centrifuge), 高速分散均质机 (FJ-200), 微量移液枪 (RAININ Pipette SL-10 SL-100), 凝胶成像系统 (MultimageTM Light Cabinet Alpha Innotech Corporation)。

1.1.3 试验药品。凝胶缓冲液 (1 mol/L HCl 48 ml, Tris (三羟甲基氨基甲烷) 36.6 g, TEMED (N, N, N', N'-四羟基乙二胺) 0.23 ml), 凝胶贮液 (28% Acr-0.735% Bis 贮液), 0.14% 分析纯过硫酸铵 (AP)、Tris-甘氨酸电极缓冲液 (pH 值 8.3), 0.1% 酚蓝指示剂, 染色液 (0.05% 考马斯亮蓝 R-250 的

20% 磺基水杨酸染色液), 脱色液 (7% 的乙酸溶液), 保存液 (甘油 10 ml, 冰乙酸 7 ml, 加蒸馏水至 100 ml), 1% 琼脂糖溶液均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 血清制备。由林蛙心脏采血 (每只抽 1 ml 左右), 将血液立即注入小型离心管内静置 20 min 后离心 (4 000 r/min, 4 °C 离心 25 min), 吸取上清 (血清) 贮存于 4 °C 冰箱中待测。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[6]检测。

1.2.2.1 胶板制备。取出各种贮液, 平衡至室温, 按分离胶缓冲液:凝胶贮液:重蒸水:0.14% AP = 1:2:1:4 的比例配置 7% 凝胶。前 3 种溶液混合在 1 个小烧杯内, 0.14% AP 液单独置另 1 个小烧杯中, 将 2 杯中的液体抽气后轻轻混匀, 用注射器将分离胶溶液加到凝胶模长、短玻璃板之间的夹缝内, 加至距短玻璃板上缘约 0.5 cm 时停止加胶, 轻轻将样品槽模板插入。凝胶液在混合后 15 min 开始聚合, 0.5 ~ 1.0 h 完成聚合。聚合后取出样品槽模板, 用窄滤纸条轻轻吸去凹型槽中残留液体。在上、下 2 个电极槽内倒入电极缓冲液, 液面没过短玻璃板上缘约 0.5 cm (也可先加电极缓冲液, 然后拔出样品槽模板)。

1.2.2.2 分离胶预电泳。正式电泳前先预电泳除去残留物。预电泳电流为 10 mA, 电泳时间为 60 min 左右。

1.2.2.3 加样。为防止样品扩散, 需在样品中加入等体积的 40% 蔗糖 (内含少许溴酚蓝)。用微量移液器取 5 ~ 6 ml 上述混合液, 小心将样品加入凝胶凹型样品槽底部, 所有样品槽内加完样品后即可开始电泳。

1.2.2.4 电泳。开始电泳时将电流调至 10 mA, 样品进入分离胶时, 将电流调至 20 ~ 30 mA, 置 4 °C 冰箱中电泳, 当蓝色染料迁移至距玻璃板下缘 1 cm 时, 将电流调回零, 停止电泳, 取出胶板, 在胶板一端切除一角作为标记, 将胶板移至大

基金项目 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (10541235)。

作者简介 朴忠万 (1964 -), 男, 黑龙江庆安人, 硕士, 副教授, 从事动物生理教学与研究工作。

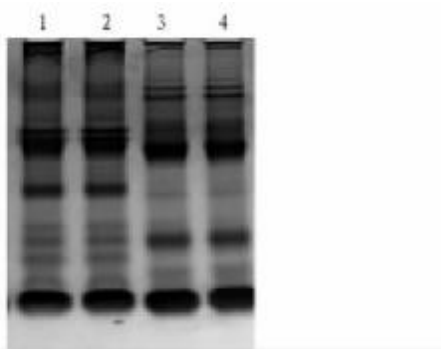
收稿日期 2009-05-04

培养皿中染色。

1.2.2.5 固定、染色、脱色、制备凝胶干板。用 0.05% 的考马斯亮蓝 R250 (内含 20% 磺基水杨酸) 于 37 °C 水浴中对凝胶染色 30 min, 染色与固定同时进行 (染色液没过胶板)。用 7% 冰醋酸 50 °C 浸泡漂洗数次, 脱色至蛋白带清晰为止。将脱色后的胶板浸泡在保存液中 3~4 h。用玻璃板包好胶板固定在玻璃板 (14 cm × 14 cm) 上, 平放、自然干燥 1~2 h, 完全干后除去玻璃板, 即得到平整、透明的干胶板。此干板可长期保存, 用于定量扫描^[4,7]。

2 结果与分析

2 种林蛙血清蛋白的电泳结果如图 1 所示, 血清蛋白各条带的电泳迁移率及谱带分布如表 1 所示。



注: 1、2 为黑龙江林蛙; 3、4 为中国林蛙。上为阴极, 下为阳极。

Note: 1 and 2, *Rana amurensis*; 3 and 4, *Rana chensinensis*; The upper end is cathode and the lower end is anode.

图 1 中国林蛙与黑龙江林蛙血清蛋白的电泳图谱

Fig. 1 The serum protein electrophoretogram of *Rana chensinensis* and *Rana amurensis*

3 结论与讨论

结合扫描和直接观察结果, 将染色相对较深的蛋白带称为强带, 相对强带染色较浅的蛋白带称为中强带, 相对中强带染色较浅的蛋白带称为弱带。

中国林蛙和黑龙江林蛙血清蛋白谱带的分布特点是: 2 种林蛙血清电泳出 32 条蛋白带, 其中, 中国林蛙的蛋白带有 25 条, 黑龙江林蛙的蛋白带有 23 条, 迁移率为 0.014、0.028、0.055、0.090、0.103、0.124、0.145、0.159、0.172、0.200、0.297、0.317、0.359、0.434、0.469、0.621 的 16 条蛋白带为 2 种林蛙共有谱带; 迁移率为 0.048、0.062、0.076、0.241、0.331、0.375、0.400、0.524、0.552 的 9 条蛋白带为中国林蛙特有; 迁移率为 0.041、0.069、0.127、0.214、0.228、0.269、0.517 的 7 条蛋白带为黑龙江林蛙特有。

中国林蛙和黑龙江林蛙血清蛋白迁移率相同但含量不同的蛋白带有: 迁移率为 0.028、0.103、0.124、0.200、0.359、0.434、0.469 的 7 条带, 其中, 迁移率为 0.028、0.103、0.124、0.469 的 4 条带在中国林蛙血清中的含量大于在黑龙江林蛙血清中的含量; 迁移率为 0.200、0.359 的 2 条带在中国林蛙血清中的含量小于在黑龙江林蛙血清中的含量; 其他共有蛋白带在 2 种林蛙血清中的含量基本相等。迁移率为 0.241 和 0.228 的 2 条带在 2 种林蛙血清中含量相当, 均为强带。从谱带总数、特征及带的宽度、染色深浅等方面分析, 中国林蛙与黑龙江林蛙的亲缘关系较近。但综合两者血清蛋白电泳图谱和形态学差异, 两者应归于不同的独立蛙种。

表 1 中国林蛙与黑龙江林蛙血清蛋白各条带的电泳迁移率及谱带分布
Table 1 The electrophoresis mobility of various bands and band distribution of serum protein from *Rana chensinensis* and *Rana amurensis*

血清蛋白电泳迁移率 Rm Electrophoresis mobility of serum protein	中国林蛙 <i>Rana chensinensis</i>	黑龙江林蛙 <i>Rana amurensis</i>
0.014		
0.028		
0.041		
0.048		
0.055		
0.062		
0.069		
0.076		
0.090		
0.103		
0.124		
0.127		
0.145		
0.159		
0.172		
0.200		
0.214		
0.228		
0.241		
0.269		
0.297		
0.317		
0.331		
0.359		
0.375		
0.400		
0.434		
0.469		
0.517		
0.524		
0.552		
0.621		

注: 表中线条粗细和颜色深浅代表蛋白质的含量。

Note: The thickness and color of lines stand for the content of protein.

蛋白质分子组成的差异受基因控制, 即是基因的生化表现型。电泳图谱的表型, 诸如带的数目、宽窄、染色深浅及

(下转第 12042 页)

骨重量与颅长均呈负异速生长 ($b < 1.0000$), 但是雄性掌、跖骨重量的 b 值均大于对应的雌性 b 值。

表2 Power模型的异速生长指数
Table 2 Allometry index of Power model

变量 Variable	性别 sex	1	2	3	4	5
Mc	♀	0.022 9	0.145 5	0.154 8	0.204 2	0.110 3
	♂	0.378 3	0.367 3	0.276 0	0.355 1	0.482 4
Mt	♀	0.160 3	0.077 0	0.160 9	0.142 5	0.154 5
	♂	0.290 7	0.358 4	0.380 4	0.320 0	0.296 2

3 讨论

在以往动物形态学研究中, 多采用异速生长分析的方法来研究颅骨、下颌骨、肩胛骨、长骨等变量在生长发育过程中的形态变化以及功能与环境的适应性^[7-10]。由表1可以看出, 雄性 Mc 的 Rsq 值较接近 1.000, F 检验统计量的概率 $Sig.$ 值小于 0.050, 曲线拟合程度较好, 由其 Mc 的重量来推测颅长(或体重)的应用价值比较高; 而雌性的 Rsq 值小, 拟合程度较差, 无应用价值。雄性 5Mc 最大, 为 0.885, 可知用它来推测颅长(或体重)效果最好。

两种拟合模型结果比较发现, 使用 Power 模型效果并不理想, 各掌、跖骨的拟合程度不比 Linear 模型拟合程度高。在以往异速生长分析的研究中很少出现这种情况, 这一点说明掌、跖骨重量与颅长的相关性很大, 接近线性关系。Gingerich 等曾报道, Power 模型比简单的 Linear 模型更适于描述两个变量之间的关系, 更符合实际的生长发育规律^[2]。可见, 这种情况并不一定适用于每个变量, 有些变量之间的线性模型可能优于其他的拟合模型。所以在定量研究动物的形状和大小时, 需认真考虑要解决的实际问题, 注意选择合适的变量, 尤其要选择反映这些变量间相互关系的拟合模型。

由表2可知, 太行山猕猴的掌、跖骨重量均与颅长呈负异速生长 ($b < 1.0000$), 也就是说, 在太行山猕猴的生长发育过程中, 随着掌、跖骨重量的变化, 颅长(体重)以较小的比例增长, 生长趋势与其功能相适应; 各掌、跖骨间的增长速度有差异, 雄性猕猴比雌性增长的速度快。表明掌、跖骨重量与颅长有更好的相关性, 雌雄之间存在着不同的生长模式, 这可能与社会结构和其各自的生活习性有关。

从很多资料来看, 对于 Power 模型的异速生长公式 $Y =$

aX^b 来说, 因变量 Y 的选择颇不相同。虽然因为体重涉及到身体构筑、运动、生态、种群结构、生活史、社会结构、性差及其他参数而通常被作为灵长类研究的基础, 但是有时研究异速生长时(尤其是研究化石时)最好的方法是用与身体构筑有关的其他变量, 如有的学者用肱骨最大长、颅骨最大长和下颌长等作自变量代表体重或个体大小^[7-12], 通过其他变量与这些变量之间的异速生长分析, 进而探讨它们与体重之间的相互关系。不直接用体重作因变量主要是因为直接引用灵长类野生体重比较困难或体重在化石中不能直接测量。然而, 在现存的动物种类中, 使用体重来进行比较研究被认为是很有效的方法。这些观点在赵晓进等的研究中已有论述^[10-12]。

综上所述, 该研究结果表明太行山猕猴掌、跖骨重量与颅长呈负异速生长 ($b < 1.0000$); 由雄性个体掌、跖骨重量变量来推测颅长(或体重)效果较好, 应用价值高; 在研究掌、跖骨重量与颅长(体重)的关系时, Linear 和 Power 两种模型较适合雄性个体, 对雌性个体不适用。由于国内外在掌、跖骨重量方面的研究还很少, 这项研究对雌雄间、掌跖骨间的差异探讨还不够深入, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] PILBEAM D R, GOULD S J. Allometry and early hominids [J]. Science, 1975, 189: 63-64.
- [2] GINGERICH P D, SMITH B H. Allometric scaling in the dentition of primates and insectivores [C]//JUNGERS W L. In size and scaling in primate biology. New York: Plenum Press, 1985: 257-272.
- [3] MCFADDEN D, BRACHT M S. The relative lengths and weights of metacarpals and metatarsals in baboons (*Papio hamadryas*) [J]. Hormones and Behavior, 2003, 43 (2): 347-355.
- [4] 赵晓进, 张岩, 安娜, 等. 太行山猕猴掌骨和跖骨形态学 [J]. 解剖学杂志, 2008, 31 (3): 412-415.
- [5] 邵象清. 人体测量手册 [M]. 上海: 上海辞书出版社, 1985: 30-65.
- [6] 吴汝康, 吴新智. 人体骨骼测量方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1965: 65-67.
- [7] 潘汝亮, 王红. 金丝猴长骨的异速生长研究 [J]. 动物学研究, 1989, 10 (1): 23-30.
- [8] 薛德明. 太行山猕猴肩胛骨变量间的相关性和异速生长分析 [J]. 兽类学报, 2000, 20 (1): 76-79.
- [9] 路纪琪, 薛德明, 吕九全, 等. 太行山猕猴颅骨变量的异速生长研究 [J]. 动物学报, 2001, 47 (S1): 172-177.
- [10] 赵晓进, 雷梦云, 赵玉廷, 等. 太行山猕猴肩胛骨和肱骨变量相关与异速生长分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25 (3): 162-164.
- [11] 翟鹏飞, 赵晓进, 雷梦云, 等. 太行山猕猴下颌骨的异速生长分析 [J]. 解剖学杂志, 2005, 28 (2): 219-221.
- [12] 雷梦云, 赵晓进. 太行山猕猴肩胛骨和肱骨性差的研究 [J]. 四川动物, 2008, 27 (5): 915-916.

(上接第 12040 页)

泳动率大小, 客观反映了谱带所对应等位基因的遗传本质, 带形相似的物种亲缘关系较近, 反之, 物种亲缘关系较远。

现代科学证实, 蛋白质组成与动物体内部的基本形态结构密切相关。同一纲或目的动物, 必然具有一定的特有结构, 而且, 其血清蛋白图谱具有种的特异性, 对于建立种质标准和遗传育种具有重要意义。

近年来, 以蛋白质及同工酶技术探讨基因表达, 以及了解生物群体遗传进化规律的研究日益受到人们的重视, 该研究结果表明, 以聚丙烯酰胺凝胶电泳分析林蛙血清蛋白质的方法简单易行、重复性好, 研究结果对林蛙的种属鉴定、良种选育、品种改良和遗传结构分析提供了试验依据。

参考文献

- [1] 胡文平, 连林生. 滇南小耳猪遗传多样性的血液蛋白电泳研究 [J]. 生物多样性, 1998, 6 (1): 22-26.
- [2] 王宗仁, 贾凤兰. 八种动物血清蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳和在进化中相互的关系 [J]. 遗传学报, 1988, 5 (4): 290-298.
- [3] 刘建强, 孟青妹. 青海蟾蜍血清蛋白质成分的电泳分析 [J]. 中国兽医科技, 2003, 3 (10): 64-65.
- [4] 罗桂花, 青海不同种群牦牛的血清蛋白电泳分析 [J]. 兽类学报, 1997, 17 (1): 48-52.
- [5] 许玉德, 杨宪孝. 红、白骆驼血清蛋白的比较研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1997 (6): 912-917.
- [6] 郭尧君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (1): 32-37.
- [7] 杨春文, 金建丽. 棕背鼠平研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 82-84.