

用盘状电泳分离贝类血液蛋白质的研究

李映溪 金荣一

辽宁师范学院

一九八二年九月

用盘状电泳分离贝类血液蛋白质的研究

李映溪 金荣一

(辽宁师范学院 生物系)

生物形态和分子结构在进化过程中,向着多样化和专一化的方向发展。但是现代的蛋白质还保存着祖先遗留下来的结构与功能关系上的痕迹,为我们提供了研究进化的进程和鉴定种属的线索。因此,用蛋白质化学、免疫化学的方法探讨不同物种蛋白质的差异是近年来动物分类学的研究课题之一。

Frair(1964)用醋酸纤维素膜电泳对不同种的龟血清蛋白质进行了比较研究,证明解剖学相似的龟,血清学上也相似。

Sibley(1970)用淀粉凝胶电泳分离鸟类卵清蛋白进行分类学的研究。刘如笋(1979)根据几种鸭的凝胶电泳谱,探讨了北京鸭的起源。赵尔密等(1981)应用蛇毒蛋白电泳法鉴别毒蛇的亲缘关系。

应用蛋白质和同功酶的电泳法对无脊椎动物分类的研究,在国内外刊物上均有报道。研究的动物包括蜜蜂(吴友吕1965;李绍文等1982)、蚕(吴友吕等1968)、长臂虾(长谷川1977)、钉螺(Davis 1967、许学积等1980、1982)。但对软体动物螺类的研究尚无报道。

本实验是在经典分类学的研究基础上,运用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离螺类中七种贝类的血清蛋白,探讨电泳法在贝类化学分

类上应用的可能性及供试动物中在分类上有争议的某些种类的分类地位。

材料与方 法

一、材料：本实验用血液取于 4 科 6 属 7 种成熟活体动物即：

- 1、毛蚶 *Arca (Anadara) subcrenata* Lischke
(蚶科 *Arcoidea* 蚶属 *Arca*)。
- 2、四角蛤蜊 *Macra quadrangularis* Deshayes
(蛤蜊科 *Macridae* 蛤蜊属 *Macra*)。
- 3、日本棱蛤 *Trapezium japonicum* Pilsbry (棱
蛤科 *Libitridae* 棱蛤属 *Trapezium*)。
- 4、伊豆布目蛤 *Protothaca jedoensis* (Lischke),
(帘蛤科 *Veneridae* 布目蛤属 *Protothaca*)。
- 5、青蛤 *Cyclina sinensis* (Gmelin) (帘蛤科
Veneridae 青蛤属 *Cyclina*)。
- 6、杂色蛤仔 *Venerupis variegata* (Sowerby)
(帘蛤科 *Veneridae* 蛤仔属 *Venerupis*)。
- 7、菲律宾蛤仔 *V. philippinarum* (Adams &
Reeve) (帘蛤科 *Veneridae* 蛤仔属 *Venerupis*)。

二、采血方法：

将大连产上述七种成熟活体动物，经严格的形态分类鉴定后，
分别进行取血。取血时打开贝壳后先用脱脂棉球将外套腔中的液体

擦净，之后分别用1 mL卡介苗注射器从围心腔中抽出血液，置冰箱（1 °C）中保存，实验前离心（3000转/分）10分钟取上清液进行分组加样实验。

关于蛤仔属的杂色蛤仔和菲律宾蛤仔二种动物除上述取血分组实验外，又以形态特征分为三组取血进行比较实验，见表1。按三组类型分别取血液进行实验。

表1

形态特征 分组	小月面形状	韧带形状	壳的厚度
第一组 典型杂色蛤仔	小月面呈梭针形 不明显	韧带细长，稍突出	壳薄
第二组 中间类型	小月面呈梭形 明显	韧带细长，突出	壳稍厚
第三组 典型菲律宾蛤仔	小月面呈卵圆形 明显	韧带细长，突出	壳厚

三、聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳

电泳仪：SCR—3 稳流稳压电泳仪

电泳槽：提篮式

凝胶配制：分离胶凝胶浓度 (T) % = 30.8%，交链度 C % = 2.5%，配胶用 PH 8.9 Tris-HCL 缓冲液。浓缩胶凝胶浓度 (T) % = 12.5%，交链度 C % = 20%，配胶用 PH 6.7 Tris-HCL 缓冲液。分离胶长 8 Cm，浓缩胶长 1 Cm。装胶用玻璃管内径 0.5 Cm 长 10 Cm。

电泳：取离心后的血液上清液 0.2 mL 加样，于电泳柱中，电极用 PH 8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液，以溴酚兰作电泳标记。上槽为负极，下槽为正极。电流强度为 30 mA (2.5 mA/每胶柱)，电压 100—200 V。电泳时间为 3 小时 50 分。

固定、染色、脱色：7% 三氯醋酸固定 3—5 分钟。0.125% 考马斯亮兰的 7% 醋酸、40% 乙醇溶液，染色 3 小时，7% 醋酸，40% 乙醇溶液脱色 14 小时。

结果与讨论

一、七种贝类血清蛋白电泳比较：

七种贝类的血清蛋白电泳结果如图 I

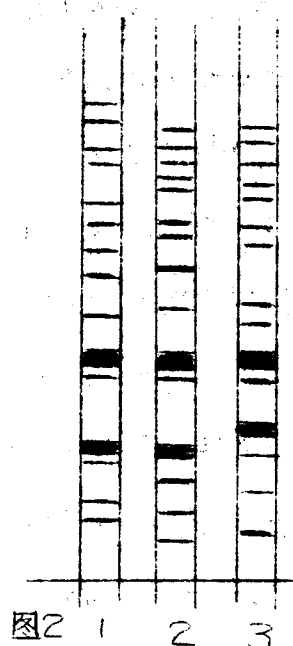
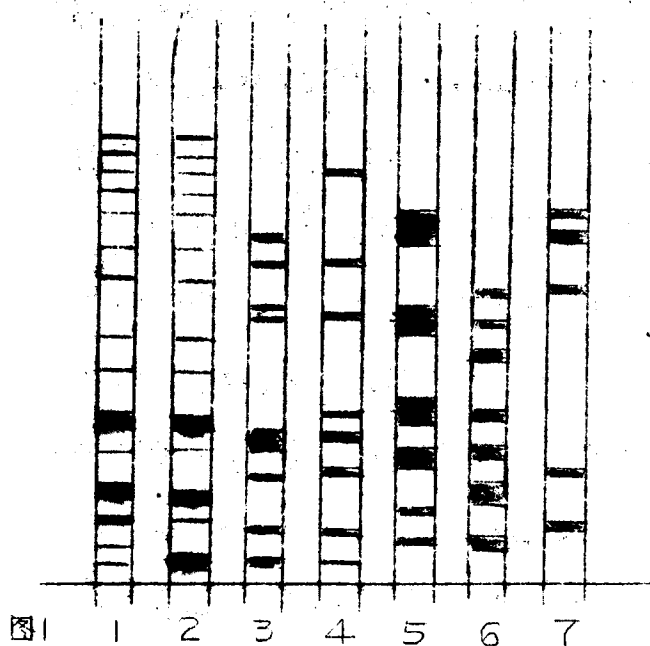


图 I

- | | |
|----------|----------|
| 1. 杂色蛤仔 | 2. 菲律宾蛤仔 |
| 3. 青蛤 | 4. 伊豆布目蛤 |
| 5. 毛蚶 | 6. 四角蛤蜊 |
| 7. 日本横纹蛤 | |

图 II

- | | |
|------------|---------|
| 1. 典型杂色蛤仔 | 2. 中间类型 |
| 3. 典型菲律宾蛤仔 | |

1. 毛蚶 *Arca (Anadara) subcrenata* Lischke

图 I—5 可分辨出 6 条带。向正极的前沿带有 2 带较细，其泳动率

(R m)依次为0.93 Cm, 0.87 Cm, 第3、4、5、6带都比较宽, 其泳动率(R m)依次为0.80 Cm, 0.72 Cm, 0.57 Cm和0.42 Cm。

2. 四角蛤蜊 *Macra quadrangularis* Deshayes

图1—6: 可分辨出7条带, 向正极的前沿带均较宽, 尤以第二带最宽, 其末尾二条带稍细。其泳动率(R m)依次为0.94 Cm,

0.92 Cm, 0.72 Cm, 0.66 Cm, 0.62 Cm, 0.56 Cm 和 0.51 Cm。

3. 日本棱蛤 *Trapezium japonicum* Pilsbry

图1—7: 可分辨出5条带, 向正极的前沿带及其他各带均较细。

只第4条带稍有加宽。其泳动率(R m)依次为0.91 Cm, 0.82 Cm, 0.50 Cm, 0.42 Cm 和 0.37 Cm。

4. 伊豆布目蛤 *Protothaca jedoensis* (Lischke)

图1—4: 可分辨出8条带, 向正极的前沿带二条较细, 第3、4

条带稍宽其余均较细。其泳动率(R m)依次为0.96 Cm, 0.91 Cm,

0.81 Cm, 0.75 Cm, 0.71 Cm, 0.55 Cm, 0.46 Cm 和 0.30 Cm。

5. 青蛤 *Cyclina sinensis* (Gmelin) 图1—3:

可分辨出8条带, 除第4条带加宽外, 向正极前沿带及其他各带均较细, 其泳动率(R m)依次为0.97 Cm, 0.91 Cm, 0.82 Cm,

0.77 Cm, 0.62 Cm, 0.53 Cm, 0.45 Cm 和 0.41 Cm。

6. 杂色蛤仔 *Venerupis variegata* (Sowerby)

图1—1: 可分辨出15条带, 除第4、6条带加宽外, 向正极前

沿带及其他各条带均较细，其泳动率（ R_m ）依次为0.97Cm, 0.94Cm, 0.90Cm, 0.85Cm, 0.78Cm, 0.73Cm, 0.63Cm, 0.58Cm, 0.48Cm, 0.43Cm, 0.37Cm, 0.33Cm, 0.30Cm, 0.27Cm和0.23Cm。

7、菲律宾蛤仔 *V. philippinarum* (Adams & Reeve)

图1—2：与前种极相似，可分辨出15条带，除第4、6条带加宽外，向正极前沿带及其他各带均较细，其泳动率（ R_m ）依次为0.98Cm, 0.95Cm, 0.88Cm, 0.86Cm, 0.76Cm, 0.73Cm, 0.63Cm, 0.58Cm, 0.48Cm, 0.42Cm, 0.37Cm, 0.33Cm, 0.30Cm, 0.27Cm和0.23Cm。

七种贝类的血清蛋白质电泳区带的泳动率（ R_m ）比较如表2

表2

泳动率 种类 R_m	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
毛 蚶	0.93	0.87	0.80	0.72	0.57	0.42									
四角蛤蜊	0.94	0.92	0.72	0.66	0.62	0.56	0.51								
日本襴蛤	0.91	0.82	0.50	0.42	0.37										
伊豆布目蛤	0.96	0.91	0.81	0.75	0.71	0.55	0.46	0.30							
青 蛤	0.97	0.91	0.82	0.77	0.62	0.53	0.45	0.41							
杂色蛤仔	0.97	0.94	0.90	0.85	0.78	0.73	0.63	0.58	0.48	0.43	0.37	0.33	0.30	0.27	0.23
菲律宾蛤仔	0.98	0.95	0.88	0.86	0.78	0.73	0.63	0.58	0.48	0.42	0.37	0.33	0.30	0.27	0.23

二、杂色蛤仔和菲律宾蛤仔三组血清蛋白电泳结果如图 II。从图 II 可见三组都分辨出 15 条带，各组都有三条较细的向正极的前沿带，并且第 4、6 带都加宽形成主带，其余各带均较细，三组的区带极相似，只是各带的泳动率 (R_m) 稍有差异 (见表 3)。从表 3 可见第 1 带一三组相同，第 6 主带三组都相同，第 10、11 带一三组相同。

表 3

泳动率 种类	区带	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
第一组		0.91	0.87	0.80	0.78	0.72	0.63	0.55	0.48	0.45	0.40	0.36	0.30	0.27	0.22	0.20
第二组		0.93	0.88	0.83	0.79	0.66	0.63	0.54	0.47	0.42	0.41	0.33	0.31	0.28	0.27	0.23
第三组		0.91	0.85	0.78	0.75	0.66	0.63	0.57	0.53	0.42	0.40	0.36	0.32	0.28	0.26	0.23

讨 论

从我们应用聚丙烯酰胺盘状电泳分离的七种贝类血清蛋白质谱带的特点 (图 I) 可以看出在形态、结构、分类位置有明显差异的种类中，区带的数目、宽度和泳动率都有明显的差异。我们对同种血清在电泳条件基本一致情况下，进行多次电泳 (最少 2 次，一般 5 次，蛤仔属 15 次)，所得电泳区带重复性极好。在黄海 (大连湾)、渤海 (夏家河子) 的不同海域采集的标本，其电泳图，都非常相近，看不出差别。可见，同种动物的蛋白质区带受地域性影响不

大。因此，我们认为应用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质可以作为鉴定贝类亲缘关系的方法之一。

杂色蛤仔和菲律宾蛤仔它们形态相似，经典分类法定为两个种，但是，我们对两种不同个体的血清进行15次重复实验，结果表明：区带数、带宽和泳动率都极为相似（见图I、II）特别是图I中两者除1—4带泳动率有0.01—0.02 cm的微小差异外，其它11条带的泳动率都完全一致，因此，我们认为二者可定为一种。

事实上，Grabau, A. W. and King, S. G (1928) 在北戴河的贝类 (Shells of peitaho) 一文中，将 *Tapes philippinorum* 鉴定为 *Tapes variegatus*，可见，Grabau 等人在1928年就根据形态结构特点，将这两种动物归属为同一物种。（见张玺等1960年南海的双壳类软体动物 157—158）。

关于杂色蛤仔和菲律宾蛤仔的归属问题，50年代前文献均分属缀锦蛤属 (*Tapes*)，1955年后，国内外学者的著述才将其转为蛤仔属 (*Venerupis*)，关于这一属级 (genus group) 问题，有待进一步探讨。

川勝(1977)在对扁形动物 *Dugesia* 属的分类学研究中，建议用染色体倍数性观察确定种，亚种。我们建议在贝类学研究中，对形态结构相近，并在分类地位上有争议的种类。用蛋白质化学，免疫化学的方法确定种、亚种。

参 考 文 献

吴友吕 1965 蜜蜂血淋巴蛋白质的淀粉凝胶电泳, 昆虫知识
9(2): 101-102

李绍文等 1982 蜜蜂与中蜂血淋巴蛋白质成分的研究 昆虫
学报 25(2): 185-190

许学积等 1982 各地钉螺以一種甘油脱氢酶和酯酶同工酶变
异的研究 动物学杂志 2: 1-4

许学积等 1980 用盘电泳和等电聚焦方法分离钉螺足肌蛋白
质的研究 中国医学科学院学报 2(3): 209-
211

赵尔宓等 1981 我国不同地区的聚丙烯酰胺凝胶电泳比较
动物学报 27(3): 213-216

Fratr. W. 1979 动物分类与生物化学—应用血清试验鉴定龟科
的亲缘关系, 生物科学动态 4: 91-92

刘如笋等 1979 鸭属中几种鸭卵蛋白质的比较—对北京鸭起
源的探讨 动物学报 25(3): 288-291

长谷川正美 1977 日本産テナガエビ類の比較生化学
的研究 日本動物学杂志 86(4): 532

川勝正治 1977 東南アジアの *Dugesia* 属の染色体と
分類 日本動物学杂志 86(4): 528

田村幸子 1977 東南アジアの *Dugesia* 属の染色体上分類・

日本産ナミグスミシの染色体, 日本動物学雑誌・

86(4): 528

Grabau, A. W. & S. G. King: 1928 shells of
Pectatzo

