第1集 高原生物学集刊 No. 1
1982年5月 ACTA BIOLOGICA PLATEAU SINICA May, 1982

高原鼠兔血红蛋白多态型的空间分布*

周虞灿 景增春
(中国科学院西北高原生物研究所)

血红蛋白（Hb）的多态现象虽然在许多脊椎动物中存在，但不是所有物种都有，就小哺乳动物而言，Hb 呈现多态者为数并不多（Lush, 1970）。小家鼠（*Mus musculus*）是世界性分布的种类，取材容易，Hb 多态现象的报道多一些（Selander, 1970; Myers 1974）。其他如褐家鼠（*Rattus norvegicus*）(Brdicka, 1966)，棉鼠（*Peromyscus gossypinus*）(Foreman, 1966)、鹿鼠（*Peromyscus maniculatus*）(Rasmussen 等，1968）等的 Hb 多态现象也见有报道。

蛋白质生化多态现象的研究一般都采用电泳法，早期常见于淀粉凝胶电泳法，近年来也见于聚丙烯酰胺凝胶盘电泳法。电泳技术之所以为种群生物学家广泛应用，是因为基因产物可直接通过电泳图谱得到辨认。在此，表现型是与基因型一致的（Johnson, 1977）。

自从蛋白质生化多态现象被广泛研究之后，人们逐渐注意到多态型的分布频率因地域(空间)、季节（时间）以及种群密度而异（Selander 等，1973; Smith 等，1978; Gaines 等，1971）。这类研究作为一种生物学工具现在不仅用于种群遗传学，而且也已用于蛋白质进化和分子分类学等方面的研究（Buettner, 1970; Hafner 等，1979）。

高原鼠兔(*Ochotona curzonicae*）是青藏高原牧区啮齿动物的一个优势种，为该地区主要的害鼠之一。我国科学工作者对高原鼠兔的生态学已有较多的研究，并积累了丰富的资料(施银柱等，1978; 王祖望等，1979; 刘季科等 1980)。我们则从生物化学角度，以淀粉凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶盘电泳法对其蛋白质(包括血红蛋白，血清蛋白、各种酶蛋白)生化多态现象进行研究，借以探讨其种群遗传特征以及生态地理因子的影响。本文仅对其血红蛋白多态现象空间分布的研究结果作一报道。

材料和方法

1. 实验动物来源

本实验选用青海省3个地区的野生样品。(1) 门源样本：捕于门源县风匣口地区，海拔约3,250米，北纬约37°20′，东经约101°40′。从1979年10月至1980年7月4次共捕获34只，以下简称门源种群。(2) 同德样本：捕于同德县巴滩地区，海拔约3,290米，

* 本研究得到夏武平教授热忱支持和指导，本所害鼠防治组，海北定位站均为我们提供方便，大力协助，在此一并表示谢意。

北纬约 35°10′，东经约 100°28′。1979 年 9 月和 1980 年 5 月 2 次捕获 20 只，以下简称同德种群。(3) 天峻样本：捕于天峻县快尔玛地区，海拔约 3,500 米，位于北纬 37°10′，东经 99°00′左右。1979 年 8 月、1980 年 4 月和 7 月 3 次共捕获 17 只。以下简称天峻种群。

2. 红细胞溶血物的制备

动物经乙醚轻度麻醉后，颈部放血。抗凝剂为 4.5% 的柠檬酸钠溶液，离心（每分钟 4,000 转左右）分离血浆后，红细胞沉淀物用生理盐水洗涤 4 次，最后按每毫升红细胞加入无离子水 1 毫升，四氯化碳 0.6 毫升，剧烈振摇 1 分钟左右，离心后用注射器吸出上层红色溶血液，放置冰箱，24 小时内进行电泳分析。

3. 聚丙烯酰胺凝胶盘电泳法

参照 Maurer（1971）介绍的 Hb 盘电泳分析法，略作修改。凝胶浓度 5.6%，凝胶玻璃管管长 16 厘米，内径 0.6 厘米。阴极（上槽）缓冲液为 pH 9.1 的 Tris-EDTA-硼酸缓冲系统[1]。阳极（下槽）缓冲液为 pH8.6 的巴比妥缓冲系统[2]。加样时每管同时加入牛血清清蛋白（BSA）约 0.002—0.003 毫克，作为参考标记物，以计算 Hb 各成份的相对泳动度（Fyhn 等，1979）。电泳时每管电流控制在 4 毫安以内，电泳进行约 4.5 小时。

4. 电泳结果的记录

（1）染色前记录。因为溶血物是深红色的蛋白质溶液，电泳后 Hb 各成分的红色区带清楚可见，不用染色就能获得可靠的结果。我们采用透光摄影法记录图谱，透光箱自行设计，规格如下：长 52 厘米，宽 28 厘米，高 25 厘米。内装 3 支 15 瓦日光灯管，内壁刷白漆，以增加白光强度，上盖普通玻璃。

（2）染色后摄影记录。盘电泳的 Hb 染色方法很多，但一般不用特异的联苯胺法。由于染色剂的限制，我们选用溴酚兰染色法。溴酚兰 1 克，溶于 500 毫升乙醇冰醋酸水溶液（体积比是 200:30:270）。染色时间 1 小时左右，然后用5%的醋酸溶液洗涤，更换洗液多次，至无蛋白区透明为止。

实 验 结 果

门源、同德、天峻 3 个种群的高原鼠兔，经分析，它们的 Hb 皆呈多态性，共发现 7 种多态型（图 1），其中门源种群的 Hb 多态型最多，达 6 种（AA, AB, BB, BC, CC, CD）；同德种群只发现 3 种（AA,BB, DD）；天峻种群也只发现 3 种型（AA, BB, BC）。7 种型中只有 AA 和 BB 这两种型为 3 个种群所共有；BC 型为门源、天峻 2 个种群所共有；AB、CC、CD 3 种型只发现于门源种群，DD 型只发现于同德种群。

Hb 7 种多态型的成分数以及各成分的相对泳动度见图 2。Hb 各多态型在每一种群内的频率见表 1。

---

1) 上槽缓冲液的配制：Tris 25.2 克，EDTA 2.5 克，硼酸 1.9 克，加无离子水至 1 升，放置冰箱。
2) 下槽缓冲液的配制：巴比妥钠 5.15 克，巴比妥 0.92 克，加无离子水至 1 升，放置冰箱。

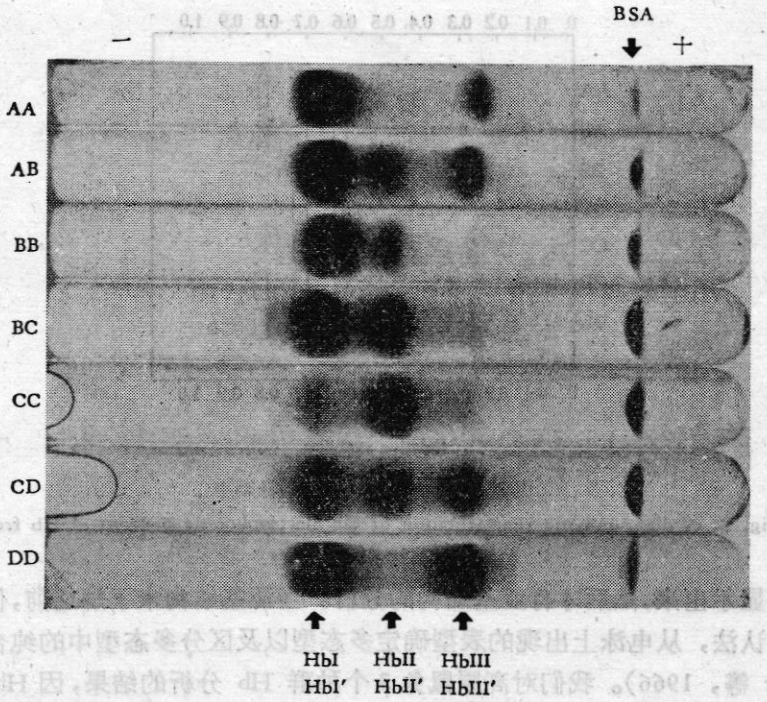

图 1 高原鼠兔 Hb 多态型电泳图谱

Fig. 1 Electropherogram of the Hb polymorphic types in *Ochotona curzonicae*.

表 1 Hb 7 种多态型的频率

Table 1 The frequency distribution of 7 observed Hb phenotypes in **Ochotona curzonicae.**

种群名称 Population name	数量(只) number	AA	AB	BB	BC	CC	CD	DD
门源种群 Menyuan population	34	0.03	0.12	0.32	0.18	0.23	0.12	
同德种群 Tongde population	20	0.55		0.25				0.20
天峻种群 Tianjun population	17	0.06		0.71	0.23			

讨　论

从电泳图谱上可见，相同位置上(泳动度相同)的区带颜色有显著的深浅之分，区带宽窄悬殊也很大，而且是颜色深的区带宽，颜色浅的区带窄，这无疑是 2 种态。是否两者是同一成分，只是不同个体的相对含量不同而已，还是具有相同泳动度的 2 种成分，则有待亚基结构分析后才能确定。Chapman 和 Morgan (1973) 分析各种血浆蛋白质时也有类似情况，他们认为这是常染体上共显的等位基因控制的多态现象。现代对 Hb 多态的认识已达到亚基结构 (α 链或 β 链)水平，以亚基结构的差异来表达。当然多态现象首先在

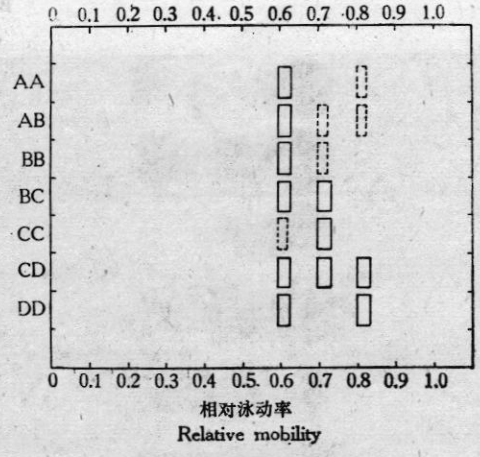

图 2 各型 Hb 成分的相对泳动率

Fig. 2 A diagrammatic representation of the electrophoretic patterns of Hb from *Ochotona curzonicae*.

电泳图谱上显示出来，然后才有亚基结构的分析。当亚基结构未了解之前，仍然需要按一般的多态辨认法，从电泳上出现的表型确定多态型以及区分多态型中的纯合表型和杂合表型（Boyer 等，1966）。我们对高原鼠兔 3 个种群 Hb 分析的结果，因 Hb 各成分的亚基结构尚未分析，所以不能以亚基结构来叙述，而是按电泳表型确定其多态型，并以此讨论它们因长期的生态地理的差异在 Hb 上的反映。

高原鼠兔 Hb 成分按泳动速度从慢到快分别以 HbI, HbII, HbIII 称之，而区带窄颜色浅者相应地以 HbI′, HbII′ 和 HbIII′ 表示。这样各型的 Hb 组成的差异就明显可见：AA 型为 Hb(I + III′)；AB 型为 Hb(I + II′ + III′)；BB 型为 Hb(I + II′)；BC 型为 Hb(I + II)；CC 型为 Hb (I + II′)；CD 型为 Hb(I + II + III)；DD 型为 Hb(I + III)。

聚丙烯酰胺盘电泳分析 Hb 时，前沿部位（即泳动最快的成分）常常出现 2 条区带，一粗在后，一细在前，粗者深红色、细者浅红色、二者几乎紧挨在一起，这在染色前清晰可见，透光摄影记录的图谱尚能清楚识别（图 3 箭头所示）。由于两者相距较近，染色后界线不清，成为 1 条区带。当计算成分数时，染色前的区带数皆比染色后多 1 条。但此成分以 1 个或 2 个计，各型之间的差别不变，不影响型别，本文暂以 1 个计之（图 2）。上述情况常见于各类鼠兔的 Hb，这个现象是否属假阳性，有待进一步验证。其它成分的计算，本文都以染色前的红色区带数为依据，染色后出现的区带不计其内。如图 1 中 BC 和 CC 图谱

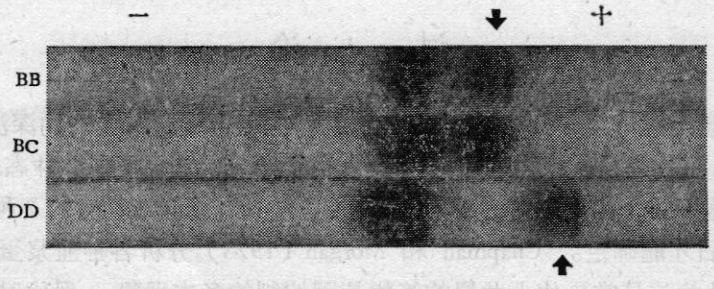

图 3 染色前透光摄影的 Hb 电泳图谱

Fig. 3 Non-stained electropherogram of the Hb polymorphic types in *Ochotona curzonicae*.

的正极端出现模糊的区带，这是染色后出现的，由于没有洗净血清蛋白污染所致。在此部位染色前肉眼见不到任何红色成分，从透光摄影图能够说明这一点(图 2，BB 和 BC)。

Hb 多态型我们用双字母标记，2 个字母相同者代表纯合体遗传型，不同者代表杂合体遗传型。显然，上述 7 种 Hb 多态型中，4 种是纯合的（AA、BB、CC、DD），3 种是杂合的（AB、BC、CD）。从纯合型的数目可知等位基因的位点数目，二者是相等的。这就是说高原鼠兔的 Hb 至少有 4 个等位基因，属复等位基因类型。根据 Hardy-Weinberg 法则，在随机交配中可能产生的基因型数目按公式 $\frac{1}{2}[n\times(n+1)]$ 计算而得，式中 n 代表等位基因数。具有 4 个 Hb 等位基因，它的多态型数目应有 10 种。这暗示除我们已发现的 7 种多态型外，可能还有 3 种多态型(包括隐型)尚未发现。当然，有 2 种可能，未发现的多态型或者由于频率甚低，以致 71 个分析样品中未能见到 1 例，或者可能在其他毗邻地区的种群中存在。

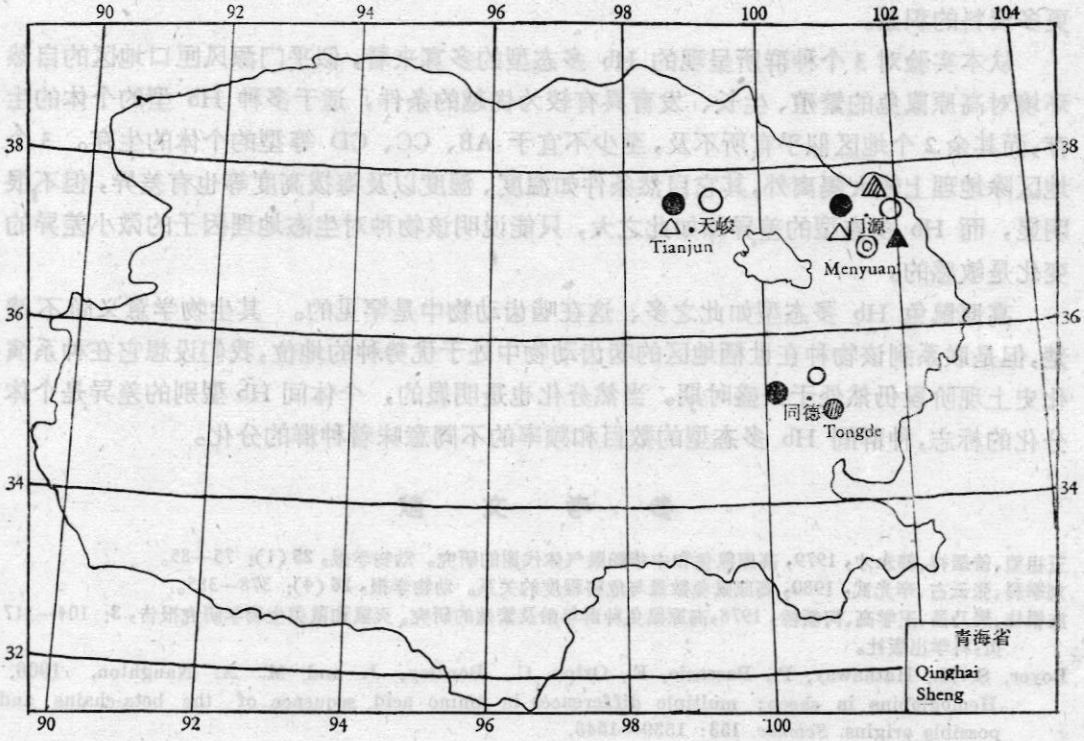

图 4 高原鼠兔三个种群 Hb 多态型的地理分布

Fig. 4 The geographical distribution of polymorphic type of Hb in *Ochotona curzonicae*.

● AA ▲ AB ○ BB △ BC ◎ CC ◬ CD ◍ DD

已发现的 7 种 Hb 多态型在所分析的 3 个种群中的分布是非常悬殊的（图 4），反映出由于地理的隔离，多态型空间分布的差异。门源种群占有 7 型中的 6 型、只缺 DD 型；同德种群占 7 型中的 3 型、缺 AB、BC、CC、CD 型；天峻种群也只占 7 型中的 3 型，缺 AB、CC、CD、DD 型。从表 1 可见，AA 型和 BB 型是 3 个种群所共有，但频率不同。门源种群和天峻种群以 AA 型频率最低，BB 型频率最高，分别为 0.32 和 0.71。同德种

群与此相反，以 AA 型频率最高、达 0.55。Selander (1970) 曾分析同一地区不同仓库的小家鼠 Hb 多态型，发现其 Hb 的"单一型"和"扩散型"的频率在各仓库间非常不同。我们研究的高原鼠兔是地理上较大隔离的 3 个种群，不仅发现多态型的频率非常不同，而且发现种群间 Hb 多态型的严重缺失。

如上所述 AA 型和 BB 型在 3 个种群中都存在，而且频率也较高，可以认为这 2 型所代表的 2 个等位基因是该物种的共同等位基因，所谓共同等位基因是指一个种在它的所有繁殖区域都存在的等位基因。同样，门源种群的 CC 和同德种群的 DD 应是这 2 个种群分别具有的限于局部分布的稀少等位基因。

3 个种群 Hb 多态型的频率，若按纯合型和杂合型区分，显然前者的频率较大于后者，两者比为 4:1。Selander (1970) 分析野生小家鼠和棉鼠 (*Peromyscus polionotus*) 的酶和非酶蛋白的多态现象时，发现杂合的多态型只有 8%，比我们的结果 (25%) 更低。Chapman 和 Morgan (1973) 分析野兔血清中运铁蛋白多态现象时，其杂合型的频率同样比纯合型低。是否野生哺乳类动物的蛋白质生化多态型中杂合型频率都低于纯合型，这有待更多资料的积累。

从本实验对 3 个种群所呈现的 Hb 多态型的多寡来看，似乎门源风匣口地区的自然环境对高原鼠兔的繁殖、生长、发育具有较为优越的条件，适于多种 Hb 型的个体的生存，而其余 2 个地区似乎有所不及，至少不宜于 AB、CC、CD 等型的个体的生存。3 个地区除地理上较大隔离外，其它自然条件如温度、湿度以及海拔高度等也有差异，但不很明显，而 Hb 多态型的差异却如此之大，只能说明该物种对生态地理因子的微小差异的变化是敏感的。

高原鼠兔 Hb 多态型如此之多、这在啮齿动物中是罕见的。其生物学意义尚不清楚，但是联系到该物种在世栖地区的啮齿动物中处于优势种的地位，我们设想它在种系演化史上现阶段仍然处于兴盛时期。当然分化也是明显的，个体间 Hb 型别的差异是个体分化的标志，种群间 Hb 多态型的数目和频率的不同意味着种群的分化。

参 考 文 献

王祖望、曾缙祥、韩永才，1979，高原鼠兔和中华鼢鼠气体代谢的研究。动物学报，**25** (1): 75—85。

刘季科、张云占、辛光武，1980，高原鼠兔数量与危害程度的关系。动物学报，**26** (4): 378—385。

施银柱、樊乃昌、王学高、何新桥，1978，高原鼠兔种群年龄及繁殖的研究。灭鼠和鼠类生物学研究报告，**3**: 104—117 页，科学出版社。

Boyer, S. H., Hathaway, P., Pascasio, F., Orton, C., Bordley, J. and M. A. Naughton, 1966, Hemoglobins in sheep: multiple differences in amino acid sequence of the beta-chains and possible origins. *Science*. **153**: 1539—1543.

Brdicka, R., 1966, Genetics of the rat hemoglobin. Pro. Xth. Conf. Europ. Soc. Blood Group Res. 407—411.

Buettner-Janusch, J., 1970, Evolution of serum protein polymorphism. *Ann. Rev. Genet.* **4**: 47—68.

Chapman, J. A. and R. P. Morgan, 1973, Systematic status of the cottontail complex in western Maryland and nearby West Virginia. Wildlife Monographs **36**: 6—52.

Foreman, C. W., 1966, Inheritance of multiple hemoglobins in *Peromyscus*. *Genetics* **54**: 1007—1012.

Fyhn. U. E. H. et al., 1979, Hemoglobin heterogeneity in Amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**: 39—66.

Gaines, M. S. and C. J. Krebs., 1971, Genetic change in fluctuating vole populations. *Evolution*, **25**: 702—723.

Hafner, D. J., Hafner, J. C. and M. S. Hafner, 1979, Systematic status of Kangaroo mice, genus *Microdipodops*: morphometric, chromosomal, and protein analyses. *J. Mammal.* **60** (1): 1—10.

Johnson, G. B., 1977, Assessing eletrophoretic simiarity: the problem of hidden heterogeneity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **8**: 309—328.

Lush, I. E., 1970, The extent of biochemical variation in mammalian populations. *Symp. Zool. Soc. Lond.* **26**: 43—71.

Maurer, H. R., 1971, Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 151.

Myers, J. H., 1974, Genetic and social structure of feral house mouse populations on Grizzly Island, California. *Ecology* **55**(4): 747—759.

Rasmussen, D. I., Jensln, J. H. and R. K. Koehn, 1968, Hemoglobin polymorphism in the deer mouse, *Peromyscus maniculatus. Biochem. Genet.* **2**: 87—92.

Selander, R. K., 1970, Biochemical polymorphism in populations of the house mouse and old-field mouse. *Symp. Zool. Soc. Lond.* **26**: 73—91.

Selander, R. K. and W. E. Johnson, 1973, Genetic variation among vertebrate species. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **4**: 75—92.

Smith, M. H., Manlove, M. N. and J. Joule. 1978, Spatial and temporal dynamics of the genetic organization of small mammal populations. In "populations of small mammals under natural condition", the Pymatuning Symposia in Ecology **5**: 99—113.

SPATIAL DYNAMICS ON HEMOGLOBIN POLYMORPHISM OF *OCHOTONA CURZONICAE*

Zhou Yucan Jing Zengchun

(*Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica*)

The plateau mouse hare (*Ochotona curzonicae*) is an endemic small mammal as well as one of the main pest rodents on the Qinghai-Xizang (Tibet) Plateau. In recent years Chinese ecologists have made some investigations on its ecology. We are emphatically studying the biochemical polymorphism of its protein. In this experiment the specimens were obtained from three areas in Qinghai province: Fengxiakou Menyuan County, Batan Tongde County, Kuaierma Tianjun County. The spatial dynamics of hemoglobin polymorphism was analysed by means of polyacrylamide gel disc electrophoresis. The results are as follows:

1. The hemoglobin patterns indicate that the polymorphism was appeared in all of three populations. In the hemoglobin of 71 specimens, seven polymorphism types were found. Their distribution are: Menyuan population contains six of the seven types; Tongde and Tianjun populations possess respectively three of the seven types.

2. Among seven polymorphism types, four are homozygous, and the others are heterozygous. The frequency of heterozygote is less than that of homozygote, occupying only 25%.

3. Four alleles were found on hemoglobin polymorphism loci of this mouse hare. There are two alleles called common allele for they exist in three populations. The other two only exist in Menyuan and Tongde populations respectively, so called rare alleles.

4. On the basis of geographical distribution difference of hemoglobin polymorphism, the genetics, differentiation, habitat enviroment of this species, and its sensitivity to eco-geographical factors are discussed.