

东方鲀属鱼类肌浆蛋白的种间差异 及其聚类的分析*

王可玲 张培军 尹青

(中国科学院海洋研究所)

生物体内能够提供生物演化历史资料的化学成分,主要是核酸和蛋白质。这些生物大分子,受遗传信息的控制而复制、合成,同时也随遗传的变异而变化。近十多年来,根据蛋白质和同工酶的构成及遗传分析,在鱼类的演化、亲缘关系的探讨、种群鉴别以及渔业管理等方面的研究日益增多^[2,3,5,8-20]。由于形态的差异不一定都遗传,而遗传物质的差异也不一定都能在形态上表现出来^[19],所以生化的资料有助于区分形态上相似的种上和种下的分类单元^[3,14]。现代分类学,不但要求形态解剖方面的资料,也需要累积生化方面的资料。

关于鱼类肌浆蛋白的研究,1953年 Connell 用移界电泳对鳕鱼、青鱼和鲤鱼等20种鱼类进行过分析。由于方法限制,因而所得种的特异性结果不明显。1960年,Thompson 用淀粉凝胶电泳对鳕鱼、马舌鲆(*Hippoglossus standeipis*)等鱼类的分析表明种间差异极为明显^[8]。其后 Jones^[15], Tsuyuki^[20]和谷口^[9]等用淀粉胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对多种不同类型的鱼类进行了大量的研究。其结果进一步肯定了肌浆蛋白电泳资料对鱼类分类和亲缘关系探讨的意义。但对中国沿海东方鲀属(*Fugu*)鱼类肌浆蛋白的研究尚未见报道。

东方鲀属系北太平洋西部地区性鱼类,其中半数以上为中国特有的地方性种类,分布范围较窄、分化较大,以往分类比较紊乱。成庆泰等^[4]曾以头骨和外部形态等资料整理记述了中国东方鲀属鱼类15种,并以形态资料绘制了表明属内种间分化的系谱树图。为进一步探讨并累积有关生化资料,我们收集了中国沿海东方鲀属鱼类的肌肉、脑等组织的生化样品,以电泳方法分析了它们的肌浆蛋白和LDH等同工酶。本文仅就肌浆蛋白的资料作一初步分析,并试用数量分类的方法给出了一个按肌浆蛋白电泳资料聚类的谱系图。

材料和方 法

1978—1980年,先后在山东青岛、石岛,江苏沙州县双山岛,上海南汇,浙江舟山,福建三沙和海南岛崖县等地,共收集了东方鲀属13种鱼类274尾鱼的样品。

本文所用样品都是在捕捞现场,取自活鱼。肌肉样品是在背鳍基前,体侧中线上,取去皮的白色肌肉(1克左右)装入小塑料袋内,封口后放入干冰内带回实验室, -20℃保

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1041号。此项工作是在成庆泰教授指导下进行的;刘瑞玉教授和熊全沫副教授审阅了本文底稿;李茂堂、孙雪兴两同志帮助收集过资料;李爱杰、孙继仁、田明诚副教授,李淑震、邹永水、李春生和孙道元等同志提出过宝贵意见,均此致谢。

收稿日期:1983年6月24日。

藏至分析。

肌浆蛋白是以 0.5 克左右肌肉,加等量海砂和 4 倍的 pH 7.4, 0.01 M 磷酸缓冲液置研钵中在冰浴上研成糜状物,然后 $20,000 \times g$ 4°C 离心 20 分钟,当日取上清液进行电泳分析。每尾鱼分析两个平行样品;如发现新型电泳图谱则再重复分析两个样品。

分析采用聚丙烯酰胺圆盘电泳^[6]。凝胶浓度浓缩胶为 3.1%,分离胶 7.2%;前者以光聚合,后者以化学聚合。电极缓冲液用 Tris-甘氨酸系统, pH 8.3, 电流从 1mA 逐渐加大到 2.5 mA/管。电泳结束后,胶条在 7% 三氯醋酸中固定 15 分钟氨基黑染色 2 小时,然后移入 7% 醋酸中浸泡过夜,次日 100mA 电脱色两次,7% 醋酸中保存。示踪染料溴酚蓝易褪色,必需随即照相记录,进而测量各电泳区带位置,确定带级(共分 8 级,1 级区带最宽、着色最深,8 级最弱)。电泳胶条的扫描,使用国产 DGS-I 型电泳光密度扫描仪。

聚类分析选用下列公式计算距离系数^[4,7]。

$$dik = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^V (X_{ij} - X_{kj})^2}{V}}$$

$$i, k = 1, 2, \dots, n; \quad i \neq k。$$

式中 X_{ij} 为第 i 个鱼种第 j 个已标准化的指标数值。 n 为供实验用的鱼种数目; V 是指标的数目。

数据标准化采用极差变换法^[4]:

$$\text{标准化数据} = \frac{\text{原始数据} - \text{最小数据}}{\text{最大数据} - \text{最小数据}}$$

结果与讨论

1. 13 种东方鲀属鱼类肌浆蛋白的电泳图谱

分析结果表明,其电泳图谱各具特点,互不混淆,种的特异性明显(见图 1, 2)。

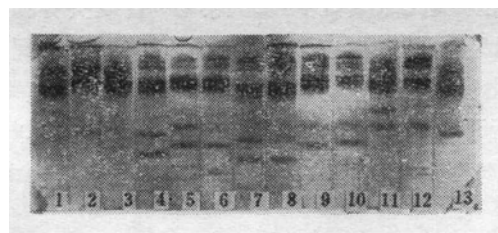


图 1 13 种东方鲀肌浆蛋白电泳图谱

1. 紫色东方鲀; 2. 虫纹东方鲀; 3. 网纹东方鲀; 4. 双斑东方鲀;
5. 暗纹东方鲀; 6. 菊黄东方鲀; 7. 横纹东方鲀; 8. 黄鳍东方鲀;
9. 假睛东方鲀; 10. 弓斑东方鲀; 11. 星点东方鲀; 12. 铅点东方鲀;
13. 豹纹东方鲀。

肌浆蛋白电泳结果与成庆泰等^[4]按形态分种的结果(包括两个新种)基本一致。每个种各有自己的图谱,但其中有几个种,如星点东方鲀和铅点东方鲀等,其电泳图谱在种内仍可进一步分型。如把这两个种内肌浆蛋白不同类型的个体分开,则可发现形态上也存在某些不同。这些差异是否意味着可进一步分种,尚有待于进行深入地研究探讨。另外,

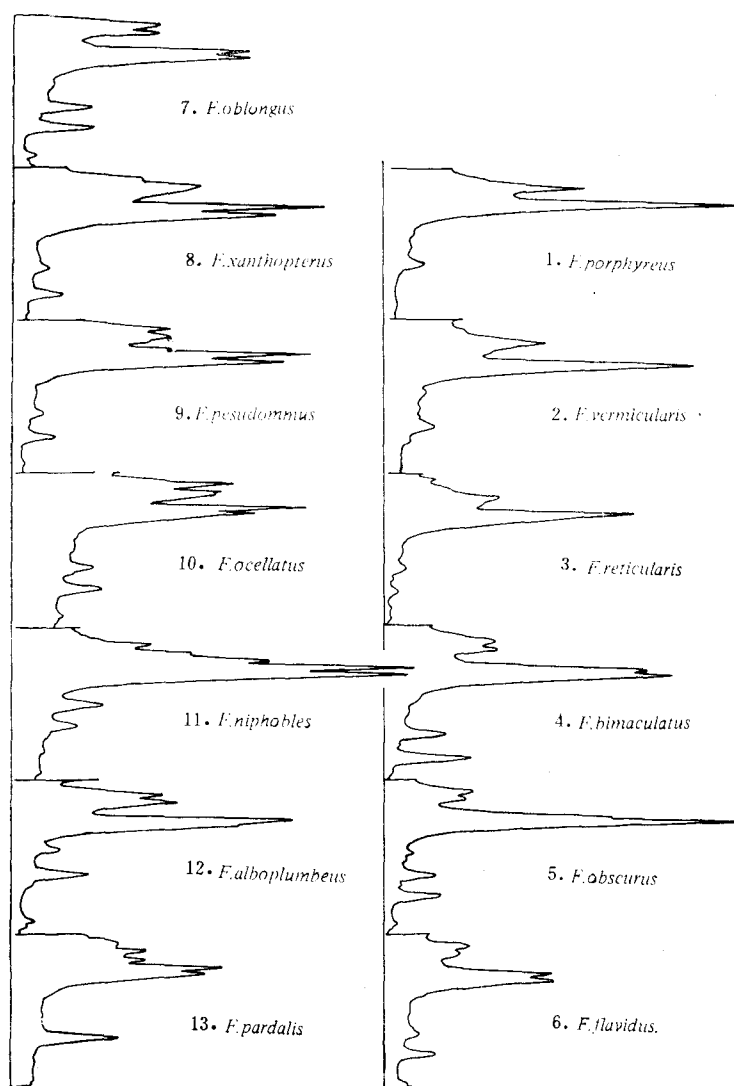


图2 13种东方鲀肌浆蛋白电泳结果光密度扫描图(图例同图1)

我们分析过冰藏7天的红鳍东方鲀,其肌浆蛋白电泳图谱与冰藏5天的假睛东方鲀差异甚微。由于没有采到红鳍东方鲀活鱼的样品,故在本文所有图表资料中都没有应用它的材料。

2. 鱼类肌浆蛋白是生化分类的较好材料

东方鲀属鱼类肌浆蛋白较稳定,在 -20°C 的保藏条件下,一年内其电泳图谱没有观察到明显的变化。对照分析假睛东方鲀冰藏5天和 -20°C 保藏两个月的样品,以及黄鳍东方鲀活鱼和死后冰藏4小时的样品,其电泳图谱也没有明显的变化。此外,在分析过的14种东方鲀属鱼类的个体中,其肌浆蛋白的电泳图谱不随鱼体的长度、性别以及性腺成熟状况等因子的影响而变化。这些与桥本周久^[8]、谷口^[9]、露木、Connell和Robertson^[8]等人的报道是一致的。

从上述结果可见,肌浆蛋白在保藏期间变化不大,对保藏条件要求不高,电泳图谱个体差异较小,种的特异性强是鱼类种和种群生化鉴别的较好材料之一。它是一类多种蛋白质的混合物,亦即是许多位点表达的产物,虽不能像同工酶那样进行更准确的遗传分析与计算(基因频率、遗传距离等),但却有可能比单一蛋白(例如一种酶)的分析会较全面地反映着生物的变异。目前,对同工酶的电泳资料要求进行 20 个位点以上的分析^[14],工作量较大。同时,同工酶易于变化、等位酶(allozyme)的计数较难,需要一定的训练和经验,加之某些组化显色试剂价格昂贵、国内较难购买等困难,也使同工酶工作的开展受到了一定的限制。因而从比较生化的角度探讨肌浆蛋白与鱼类低级分类单元的关系,仍有一定的实用价值^[2,8,9,15,16]。

3. 属内种间分化的聚类分析

蛋白质是表信息分子,它们之间的变异是遗传变异的结果。由于蛋白质的变化必然导致其电荷和组成成分的改变,这是电泳可以检测出来的,因而具有种的特异性的肌浆蛋白电泳资料,在某种程度上也反映着鱼类种间的分化。

生物分类从更广的意义上被数学家理解为聚类。近十几年来,生物化学和分子生物学的发展,已开始从分子水平上直接寻求生物分类的重要依据,生物分类突破了形态学向其他方面扩展。同时,先进技术和现代仪器的应用,使得生物的描述开始数量化。电泳结果给出的电泳图谱即完全可以用数据来描述。它可直接用来进行聚类分析,不像形态分类的某些指标(如颜色、花纹、形状等)那样,还需要进行数据转换。我们对肌浆蛋白的电泳图谱使用了三个指标,即区带数目、光密度和迁移率。鉴于东方鲀属鱼类的肌浆蛋白氨基黑染色的区带,可明显地分成前后两个区域。一般前区(向正极泳动的区带)着色较浅,呈蓝灰色;后区(近负极端)染色较深,呈深蓝色,区带较紧密。将前后区带分别对待,则每一种电泳图谱即有 6 个指标:

- (1) 前区区带数目(7, 8 级带较弱,容易产生偶然误差,取 6 级以上区带计算);
- (2) 后区区带数目(亦取 6 级以上区带);
- (3) 前区区带光密度的总和;
- (4) 后区区带光密度的总和;
- (5) 前区最前一个 5 级以上区带的迁移率;
- (6) 后区最前一个 5 级以上区带的迁移率。

将上述指标的数据按极差变换法标准化后,代入距离系数公式,所得数值列成了相关矩阵(表 1)。

根据距离系数的相关矩阵,进行群分析^[14]得聚类图——谱系图(图 3)。

把东方鲀肌浆蛋白聚类分析所得的谱系图与以往按形态和分布特征归纳的系谱树比较,可以看到虫纹东方鲀与紫色东方鲀,以及双斑东方鲀与暗纹东方鲀和成庆泰等^[4]的结果是相同的;其他则不尽一致。另外,虽然红鳍东方鲀因缺乏活鱼的材料未列入正式的聚类分析,但从假睛东方鲀冰藏 5 天的材料与 -20°C 保藏的材料对照分析的结果表明二者的电泳图谱并无明显的差异,可见红鳍东方鲀冰藏 7 天的材料还是有一定价值的。所以,从假睛东方鲀与红鳍东方鲀冰藏材料电泳图谱差异甚小的结果推论,两者的亲缘关系也应该是最近的。这也与成庆泰等的结果一致。

表 1 东方鲀属 13 种鱼类肌浆蛋白的相关矩阵

鱼种名称	代号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
豹纹东方鲀 <i>Fugu pardalis</i>	1													
星点东方鲀 <i>F. niphobles</i>	2	23.8												
假睛东方鲀 <i>F. pseudommus</i>	3	56.8	55.6											
网纹东方鲀 <i>F. reticularis</i>	4	54.4	62.2	55.2										
紫色东方鲀 <i>F. porphyreus</i>	5	49.3	56.5	45.7	35.5									
菊黄东方鲀 <i>F. flavidus</i>	6	38.8	48.8	42.0	44.9	60.0								
黄鳍东方鲀 <i>F. xanihopterus</i>	7	36.8	51.5	58.2	51.7	64.5	24.4							
双斑东方鲀 <i>F. bimaculatus</i>	8	55.9	63.7	31.4	53.4	66.1	24.7	46.0						
弓斑东方鲀 <i>F. ocellatus</i>	9	50.0	48.7	37.1	30.1	37.9	48.3	60.0	52.3					
暗纹东方鲀 <i>F. obscurus</i>	10	51.7	59.6	29.1	10.4	62.0	22.9	43.5	5.2	48.8				
虫纹东方鲀 <i>F. vermicularis</i>	11	39.8	48.8	55.0	36.9	18.1	50.3	55.2	56.2	40.6	50.8			
铅点东方鲀 <i>F. alboplumbus</i>	12	16.3	36.6	54.0	51.2	46.1	36.0	32.6	51.7	48.0	47.2	35.8		
横纹东方鲀 <i>F. oblongus</i>	13	40.7	50.8	37.0	36.1	51.2	17.1	26.0	27.8	36.9	42.6	43.5	35.5	

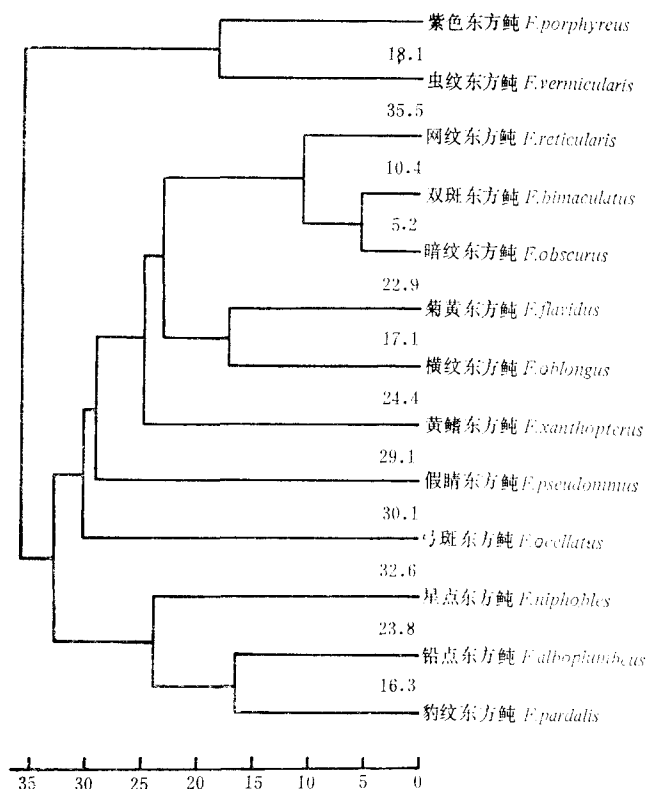


图3 13种东方鲑肌浆蛋白的谱系图

有关的研究表明,在生物进化的过程中,两个水平——形态解剖(包括染色体)和分子水平——的演化存在不平衡的现象^[5,16,19]。以往对肌浆蛋白的研究, Tsuyuki 等认为鲑鳟类的电泳结果与形态资料不尽一致,并提出了对分类的修正意见^[8];谷口^[9]对鲟科鱼类的研究则认为二者基本相同。本文对于中国近海东方鲑属鱼类肌浆蛋白的电泳分析,还是初步的,有关东方鲑同工酶的电泳分析,尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院地质研究所, 1975. 数学地质引论. 科学出版社, 60—165 页。
- [2] 王可玲、尹青, 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 页。
- [3] 刘如笋、钦俊德, 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。
- [4] 成庆泰、王存信、田明诚、李春生、王玉纲、王奇, 1975. 中国东方鲑属鱼类分类研究. 动物学报 21(4): 359—738。
- [5] 李树深, 1981. 分子演化与分类学. 国外医学分子生物学分册, 第三卷, 第五期, 201—210 页。
- [6] 莽克强、徐乃正、方荣祥, 1975. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 科学出版社, 1—75 页。
- [7] 徐克学, 1980. 数量分类学的发展. 生物科学动态 1981(1): 1—12。
- [8] 日本水产学会, 1975. 鱼类種族の生化学的判別. 恒星社厚生閣, 32—93 頁。
- [9] 谷口順彦, 1974. 電気泳動法による魚類の種分化および系群分析に関する研究. 高知大学水産実験所研究報告. 第1号, 1—145頁。
- [10] 沼知健一, 1978. 魚類アイソザイムの変異と進化. 昭和51、52年度文部省科学研究費補助金総合研究(A)研究成果報告書, 14—18 頁。

- [11] Altukhov, Yu. P., 1981. The stock concept from the viewpoint of population genetics. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **38**: 1523—1538.
- [12] Avise, J. C., 1974. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* **23**: 465—481.
- [13] Buth, D. G., 1980. Evolutionary genetics and systematic relationships in the Catostomid genus *Hypentelium*. *Copeia*, **2**: 280—290.
- [14] Ihssen, R. E., H. E. Booke, J. M. Casselman, J. McGlade, N. R. Payne and F. M. Utter, 1981. Stock identification: materials and methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 1838—1855.
- [15] Jones, B. W. and I. M. Mackie, 1970. An application of electrophoretic analysis of muscle myogen to taxonomic studies in the genus *Merluccius*. *Comp. Biochem. Physiol.* **32**: 267—273.
- [16] King, M. C. and A. C. Wilson, 1975. Evolution at two levels in Humans and Chimpanzees. *Science* **188**: 107—116.
- [17] Love, R. M., 1974. *The Chemical biology of Fishes*. Academic press, pp. 127—207.
- [18] Mackie, I. M. and A. H. Ritchie, 1981. Differentiation of Atlantic cod *Gadus morhua morhua* and Pacific cod *Gadus morhua macrocephalus* by electrophoresis and by isoelectric focusing of water-soluble proteins of muscle tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* **68B**: 173—175.
- [19] Nei, M., 1975. *Molecular Population Genetics and Evolution* Amsterdam, Oxford, New York, pp. 175—207.
- [20] Tsuyuki, H. and E. Roberts, 1966. Interspecific relationships within the genus *Oncorhynchus* based on biochemical systematics. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **23**: 101—107.

STUDIES ON THE INTERSPECIFIC DIFFERENCES OF MYOGEN AND CLUSTER OF THE GENUS *FUGU**

Wang Keling, Zhang Peijun and Yin Qing

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

The present paper deals with the interspecific differences of 13 species of the genus *Fugu* (Pisces, Tetodontidae) in the electrophoretic patterns of the myogen. The species were collected from the coastal waters of China and lower reaches of the Changjiang River during 1978—1980. The myogen analysis was made by polyacrylamide disc electrophoresis. The results are summarized as follows:

The electrophoretic patterns of the myogen are not in confusion among 13 species. These results fundamentally agree with Cheng et al's on the comparative morphology of the skull, the dermal spines and the disposition of the spines areas.

Fresh specimens kept in the deep freezer at -20°C were stable for 12 months. The electrophoretic patterns of the myogen were hardly influenced by factors such as growth, sex and the gonad development stages.

Cluster analysis method was used in speciation study of the genus *Fugu*. Distance coefficient was calculated with the formula:

$$dik = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^v (X_{ij} - X_{kj})^2}{V}}$$

Where, $i, k = 1, 2, \dots, n, i \neq k$.

The indices are the zone numbers, mobility and density in the electropherograms. The dendrogram obtained by cluster analysis in the myogen electropherograms is somewhat similar to that obtained by morphology and distribution characteristics of the genus *Fugu* of China.

* Contribution No. 1041 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.