

藏绵羊血红蛋白的组成及其对氧亲和力的研究*

周虞灿 刘国富

(中国科学院西北高原生物研究所)

藏来种血 I

绵羊分布于全世界,是主要的畜种之一。由于绵羊具有较高的经济价值,科学工作者一直十分重视,对其各项的研究开展得较早,既深入又全面。有关绵羊血红蛋白(Hb)的生理生化研究工作也是如此,早在本世纪五十年代就有较多报道, Harris 和 Warren (1955) 用纸电泳法(pH8.6 的巴比妥缓冲液)分析 12 头怀孕绵羊的 Hb 时就发现其非常不均一性。其中 5 头含有 2 个 Hb 成分, 3 头仅含 1 个快移动的 Hb 成分, 其余 4 头也只含 1 个慢移动的 Hb 成分。Evans 和 King (1956) 把向阳极快移动的成分称为 Hb-A, 把慢移动的成分称为 Hb-B。因此绵羊 Hb 具有 A、AB、B 3 种多态型。Helm 等 (1957) 报道中提到的绵羊 Hb-I 实际上就是上述的 Hb-B, Hb-II 是上述的 Hb-A。如果人为地致使绵羊患贫血病,则在具有 Hb-A 的绵羊血液中出现 Hb-C, 原来的 Hb-A 就因此而消失。而具 Hb-B 的绵羊则不因贫血而改变其 Hb 成分, 仍然是 Hb-B。绵羊的这几种 Hb 都是受遗传决定的,它们只有 1 个 α 位点,但 β 位点呈多态性,存在 β^A 和 β^B 等位基因。贫血后出现的 β^C 位点与 β^A 紧密相连,称为“超基因”或“重复基因”(Boyer 等, 1966)。这些肽链的氨基酸序列也已清楚。一级结构分析表明, β^A 链有 7 个残基不同于 β^B 链,有 16 个残基不同于 β^C 链,而 β^B 链有 21 个残基不同于 β^C 链,在氨基端 β^C 比 β^A 或 β^B 少 4 个残基 (Boyer 等, 1966)。新近 Vestri 等 (1983) 从绵羊 Hb 中又发现 2 种新的 α 链变体,其一是 α 链上第 113 或 114 位的亮氨酸被组氨酸取代,另一是第 8 位上的丝氨酸被丙氨酸取代。

Hb-A 和 Hb-B 在绵羊的自然群体中的分布及其生理功能也早有许多报道。Huisman 等 (1958) 作了氧亲和力的测定,发现 Hb-A 对氧的亲合力比 Hb-B 高,而且不管是用全血还是用 Hb 溶液进行测定, Hb-A 的氧解离曲线皆比 Hb-B 向左偏离,这与适应高海拔的动物其 Hb 氧解离曲线一般比低海拔动物向左偏移的情况是相似的。因此绵羊的 Hb-A 对高海拔具有适应意义。低氧耐力试验也证明具有 Hb-A 的绵羊对缺氧的耐力比具有 Hb-B 的绵羊大 (Dawson 等, 1966)。据统计,英国山地绵羊以 Hb-A 占优势,低地绵羊以 Hb-B 为显著,前者对高海拔和低营养的饲料有较好的适应 (Manwell 和 Baker, 1970)。调查不同品种绵羊 Hb^A 的频率也说明绵羊饲养地的海拔高低与 Hb^A 的频率有

* 此项工作承蒙夏武平教授的支持和指导,胡晓梅同志参加部分工作,孙振荣同志拍洗图片,在此一并致谢。
本文 1983 年 6 月 17 日收到。

一定的关系。通常海拔高的地区 Hb^A 的频率也高,海拔低的地区 Hb^A 的频率也低(佐佐木清纲, 1982)。

——如上所述,既然绵羊 Hb 成分的出现频率与饲养地区的海拔高低有关,特别是 Hb-A 具有适应高海拔的功能,那末我国青藏高原上饲养的藏绵羊应该更具有这些特点。因为藏绵羊的饲养地海拔较高,一般在 3000 米以上,显著高于国外文献报道的绵羊饲养地的海拔,其对于高原缺氧的适应也必将在 Hb 成分的频率和对氧亲和力的生理功能上得到更充分的反映。我们对藏绵羊的 Hb 进行电泳分析及其对氧亲和力的测定,其理由即寓于此。

一、材料与方 法

1. 血样来源

血样于 1982 年 9、10 两月采自青海省大通牛场冬宰绵羊。随机取样 2 次共 38 头,每头羊血约收集 10 毫升。所采血样的绵羊皆属成年个体,原放牧地一般在 3000 米以上。血样用 Alsever 液¹⁾ 抗凝(1:4),然后于冰壶中带回实验室处理。

2. 溶血液的制备

抗凝血样经离心弃去血浆,用生理盐水洗涤红细胞 3 次,去软层,最后加等体积的蒸馏水和 1/4 体积的四氯化碳,用力振摇 2 分钟,离心后取上层 Hb 液,4℃ 冰箱保存待用。

3. Hb 淀粉凝胶电泳

采用自制的青海马铃薯淀粉。淀粉水解,凝胶制备,电泳条件等详见周虞灿等(1981)的报道。

4. Hb 肽链的解离和醋酸纤维薄膜电泳

取 Hb 溶液 0.1 毫升,先加二巯代苏糖醇(DTT) 0.032 克(Verva 公司产品),再加尿素 0.074 克,用细玻璃棒充分搅匀,室温下解离 30 分钟。解离产物用醋酸纤维薄膜电泳分离,点样前先将薄膜浸泡于含尿素(8M),pH 为 8.6 的电极缓冲液(Tris-EDTA-硼酸, $\mu = 0.12$) 中 20 分钟。电泳电压为 30 伏/厘米,90 分钟。电泳后用氨基黑 10B 染色。

5. Hb 氧分压的测定和氧解离曲线的绘制

我们选用只含 Hb-A 和只含 Hb-B 的绵羊 Hb 溶液,采用混合技术测定法(Edwards 等, 1966) 和 Bjork 等(1954) 的开路张力器技术(Open-circuit tonometer technique) 分别进行测定。所谓混合技术测定法,是指把 1 种 Hb 溶液先分别制成无氧和氧合的 2 种溶液,再用此 2 种溶液作一系列的不同比例混合,并测定各混合液的氧分压值。所谓开路张力器技术,是指盛置 Hb 的球形玻璃容器的对称两侧各接出一短玻璃管,使空气自由出入。

测定前先将 Hb 溶液置透析袋中,对 pH 7.4 的磷酸缓冲液($\mu = 0.2$) 4℃ 透析 24

1) 葡萄糖 20.5 克,柠檬酸钠 8.0 克,食盐 4.2 克,加蒸馏水至 1 升。

小时。透析后的 Hb 溶液用氰高铁法 (Winterhalter, 1974) 测定其浓度, 然后用蒸馏水调得浓度为 4% 溶液。将此溶液分成 2 份, 其一加到小容量瓶内, 容量瓶与脱氧装置连接, 使充入氮气, 赶出氧气; 另一加到氧合张力器中, 让 Hb 充分与空气接触。两者同时在 37°C 水浴中平衡 30 分钟左右, 并不断用手转动容器, 直至前者得百分之百的无氧血红蛋白溶液, 后者得百分之百的氧合血红蛋白溶液 (HbO₂)。用专用注射器按不同比例吸取此 2 种 Hb 溶液, 充分混合后加样到 (注入) DH-100 型血气酸碱分析仪 (南京分析仪器厂出品) 测出氧分压 (pO₂) 值。作一系列不同比例的混合, 则测得一系列不同氧饱和度的氧分压值。专用注射器是用 1 毫升的蓝芯注射器改制, 在注射器后部套上一个有若干分格 (10 格左右) 的有机玻璃装置, 每格都能用档板固定, 注射器芯的后部到达每格档板时, 注射器内的容量均用蒸馏水在分析天平上标定出。按每次吸取的 2 种 Hb 溶液的容积比, 计算出混合 Hb 溶液的百分氧饱和度为纵座标, 以相应测得的 pO₂ 值 (毫米汞柱) 为横座标作图, 即得此种 Hb 成分的氧解离曲线图。

如所测 Hb 溶液并非单一成分时, 则需先把各 Hb 成分分离后才能进行上述测定。本实验所用试剂除 DTT 外均为国产分析纯。

二、实验结果

(1) 藏绵羊 Hb 淀粉凝胶电泳分离结果 (图 1)。呈现由 2 种 Hb 成分组成的 3 种 Hb 型。向阳极泳动快的谱带为 Hb-A, 泳动慢的为 Hb-B。只具 Hb-A 者为 A 型, 只具 Hb-B 者为 B 型, 二者同时兼有的为 AB 型。38 份样品中 A 型有 15 例, B 型 2 例, AB 型 21 例 (表 1)。如以基因频率表示 (斯特恩, 1979), 则 Hb^A 为 0.67, Hb^B 为 0.33。显然 Hb^A 的频率大于 Hb^B。

表 1 藏绵羊的 Hb 型及其基因频率

Table 1 Hemoglobin types and their gene frequencies of Tibetan sheep

测定绵羊数(头) Number	血 红 蛋 白 型 Hb types			基 因 频 率 The gene frequencies	
	A	B	AB	Hb ^A	Hb ^B
38	15	2	21	0.67	0.33

(2) 肽链解离和醋酸纤维薄膜电泳鉴定结果 (图 2)。Hb-A 和 Hb-B 经尿素解离后各得 2 条谱带。在 pH 8.6 的电泳条件下, 1 条向负极迁移, 其泳动速度较慢, 此即 α 链; 另 1 条向正极迁移, 其泳动速度较快, 此即 β 链。具有 Hb-AB 的样品经解离后呈 3 条谱带, 其中向负极迁移的 1 条 (α 链), 向正极迁移的 2 条, 快的为 β^A 链, 慢的 β^B 链。经比较, 3 份样品中向负极移动的 α 链泳动距离相等, 表明其理化性质相同。而向正极移动的 β 链泳动距离不等, 表明其一级结构不同。此结果说明藏绵羊的 Hb 与世界分布的其他绵羊一样也只有 1 个 α 位点, 而 β 位点存在 β^A 和 β^B 等位基因。绵羊 Hb 的多态现象, 其实质是 β 链的多态性。

(3) 浓度为 4% 的 Hb 溶液, 在 37°C, pH 7.4 时, 用血气酸碱分析仪测定不同的百分

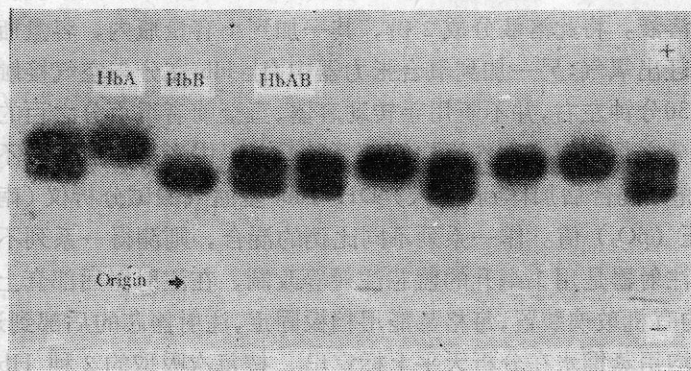


图1 藏绵羊血红蛋白淀粉凝胶电泳分离

Fig. 1 Starch-gel electrophoretic separation of the hemoglobins in Tibetan sheep

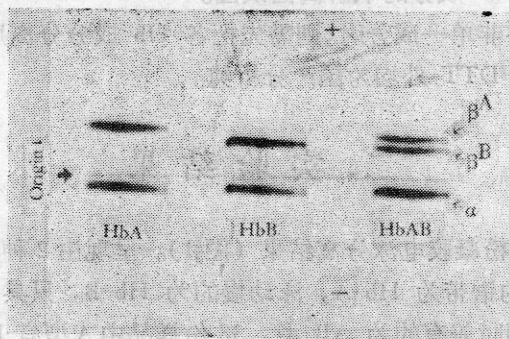


图2 血红蛋白肽链醋酸纤维薄膜电泳分离

Fig. 2 Cellulose acetate electrophoretic separation of the polypeptide chains of the hemoglobins

氧饱和度(即无氧 Hb 和氧合 Hb 的不同比例)时的氧分压值,结果见表2。以氧的百分饱和度为纵坐标,氧分压值为横坐标作图得 Hb-A 和 Hb-B 的氧解离曲线图(图3)。从图可见 Hb-A 氧解离曲线比 Hb-B 明显偏左,前者的半饱和分压(即50%的Hb为氧合Hb时的氧分压,以 P_{50} 表示)为19毫米 Hg,后者为28毫米 Hg,说明 Hb-A 对氧的亲和力比 Hb-B 强。

表2 Hb 不同氧饱和度下的氧分压值

Table 2 Oxygen pressures at different saturations of hemoglobins with oxygen

氧饱和度(%) percent saturation	14	27	40	52	65	81	95
Hb-A (mmHg)	8.5	11.6	16.3	20.8	24.8	32.3	50.0
Hb-B (mmHg)	12.0	18.8	22.0	30.0	37.0	49.5	80.0

P_{50} : A = 19mmHg, B = 28mmHg

三、讨 论

关于绵羊 Hb 的研究,多数报道是采用低海拔地区的品种。他们一般都发现绵羊有3种 Hb 型,并发现 Hb 的 β 链在遗传上呈多态性。我们对藏绵羊 Hb 的分析也得同样

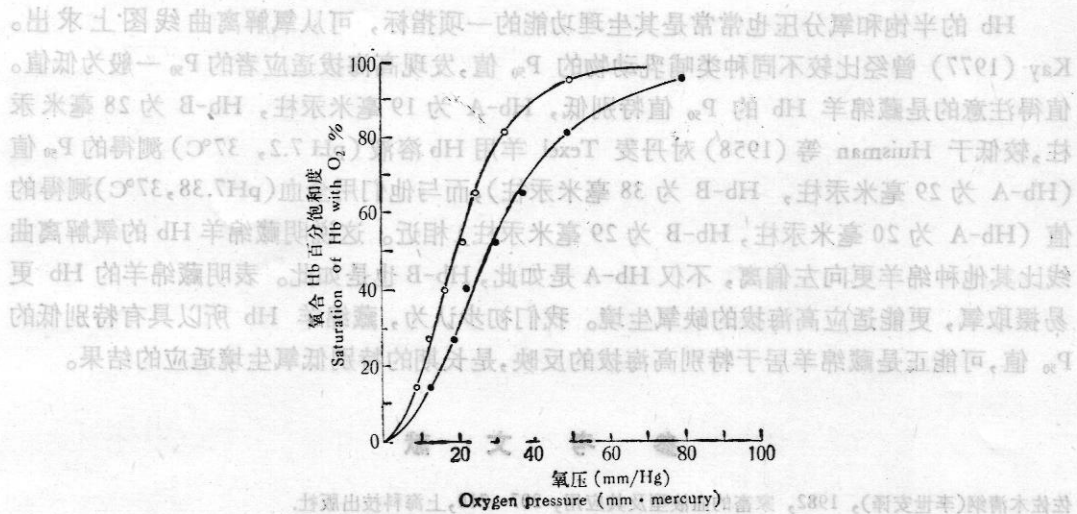


图3 藏绵羊血红蛋白A和B氧解离曲线

Fig. 3 Oxygen dissociation curves of the two hemoglobins in Tibetan sheep

的结果, A型和B型为纯合子, AB型为杂合子。Hb经裂解后, 肽链的电泳分析也证明藏绵羊Hb只有1个 α 位点, 而 β 位点存在 β^A 和 β^B 等位基因(图2)。我们的结果进一步说明分布于世界各地的绵羊, 尽管品种繁多, 环境各别, 但其Hb组成基本一致。Vliet等(1964)和Blunt等(1970)曾报道在严重贫血及急性缺氧时有Hb-C出现, 但我们对38份样品分析未见有Hb-C成分。这可能因为我们分析用的动物是正常的健康个体, 而且是世居青藏高原, 对高原缺氧早已适应, 不存在急性缺氧的情况。

我们分析的38份藏绵羊Hb样品, 其Hb^A的频率为0.67, Hb^B为0.33(表1), 可见前者明显高于后者。这一结果符合“高海拔地区Hb^A的频率高, 低海拔地区Hb^A的频率低”的一般性结论(Huisman等, 1958)。藏绵羊一般饲养在海拔3000米以上的青藏高原, 与现有文献材料相比, 居于最高海拔, 但其Hb^A的频率并非最高。如南司派尔羊生长在海拔150米的地方, Hb^A频率却达0.99之高; 代勒羊生长的海拔同样是150米, 其Hb^A频率为0.79, 略低于前者; 切维特羊的海拔750米, 比前二者高, 但其Hb^A频率只有0.51, 明显比前二者低(佐佐木清纲, 1982)。这3种绵羊的海拔都较低于藏绵羊, 而Hb^A频率只有切维特羊低于藏绵羊, 其余二者反而高于或较高于藏绵羊。可见Hb^A频率的高低除与海拔有关外, 还可能有品种间的差别。可惜目前还未见到绵羊种系相同而海拔不同的分析材料。海拔高低对同种绵羊的Hb^A频率究竟有多大的影响, 目前还难作出明确的回答。

从氧解离曲线(图3)可知藏绵羊Hb-A的曲线比Hb-B向左偏离, 表明Hb-A的氧亲和力比Hb-B强, 这与Vliet等(1964)的结果一致。对氧亲和力强意味着在氧分压低的情况下容易摄取氧, 满足机体耗氧的需要。绵羊Hb-A这一生理功能无疑是高海拔适应的结果。但是适应高海拔的Hb却不利于低海拔生存的个体, 因为它对氧的亲合力强, 使氧的释放增加困难。在低海拔下Hb-B的功能更有利于机体对氧的需要。绵羊具有这2种不同功能的Hb, 既能适应高海拔, 也能生存于低海拔, 这可称是绵羊所以能广泛分布的一个生理上的原因。

Hb 的半饱和氧分压也常常是其生理功能的一项指标,可从氧解离曲线图上求出。Kay (1977) 曾经比较不同种类哺乳动物的 P_{50} 值,发现高海拔适应者的 P_{50} 一般为低值。值得注意的是藏绵羊 Hb 的 P_{50} 值特别低, Hb-A 为 19 毫米汞柱, Hb-B 为 28 毫米汞柱,较低于 Huisman 等 (1958) 对丹麦 Texel 羊用 Hb 溶液 (pH 7.2, 37°C) 测得的 P_{50} 值 (Hb-A 为 29 毫米汞柱, Hb-B 为 38 毫米汞柱),而与他们用全血 (pH 7.38, 37°C) 测得的值 (Hb-A 为 20 毫米汞柱, Hb-B 为 29 毫米汞柱) 相近。这说明藏绵羊 Hb 的氧解离曲线比其他种绵羊更向左偏离,不仅 Hb-A 是如此, Hb-B 也是如此。表明藏绵羊的 Hb 更易摄取氧,更能适应高海拔的缺氧生境。我们初步认为,藏绵羊 Hb 所以具有特别低的 P_{50} 值,可能正是藏绵羊居于特别高海拔的反映,是长期的特别低氧生境适应的结果。

参 考 文 献

- 佐佐木清纲(李世安译), 1982, 家畜的血液型及其应用, 207—210, 上海科技出版社。
- 周虞灿、景增春、刘国富, 1981, 青海马铃薯淀粉用于淀粉凝胶电泳的试验, 《生物化学与生物物理进展》, (3)66—67。
- 斯特恩, C. (吴旻译), 1979, 人类遗传学原理, 145, 科学出版社。
- Björk, V. O. and H. J. Hilty, 1954, Microvolumetric determination of CO_2 and O_2 tension in arterial blood. *J. Appl. Physiol.* 6: 800—808.
- Blunt, M. H., Perry, M. and R. Lane, 1970, The production of haemoglobin C by sheep at stimulated high altitude. *Res. Vet. Sci.* 11: 191—193.
- Boyer, S. H., Hathaway, P., Pascasio, F., Orton, C., Bordley, J. and M. A. Naughton, 1966, Hemoglobins in sheep: multiple differences in amino acid sequences of three beta-chains and possible origins. *Science* 153: 1539—1543.
- Dawson, T. J. and J. V. Evans, 1966, Effect of hypoxia on oxygen transport in sheep with different hemoglobin types. *Am. J. Physiol.*, 210: 1021—1025.
- Edwards, M. J. and R. J. Martin, 1966, Mixing technique for the oxygen-hemoglobin equilibrium and Bohr effect. *J. Appl. Physiol.*, 21: 1898—1902.
- Evans, J. V. and J. W. B. King, 1956, Genetics of haemoglobin and blood potassium differences in sheep. *Nature* 178: 849—850.
- Harris, H. and F. L. Warren, 1955, Occurrence of electrophoretically distinct hemoglobin in ruminants. *Biochem. J.*, 60: XXIX.
- Helm, H. J. van der, Vliet, G. van and T. H. J. Huisman, 1957, Investigations on two different hemoglobins of the sheep. *Arch. Biochem. Biophys.*, 72: 331—339.
- Huisman, T. H. J., Vliet, G. van and T. Sebens 1958 Sheep haemoglobins. *Nature*, 182: 171—174.
- Kay, F. R., 1977, 2,3-diphosphoglycerate, blood oxygen dissociation and the biology of mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 57A: 309—316.
- Manwell, C. and C. M. A. Baker, 1970, Molecular biology and the origin of species: *heterosis, protein polymorphism and animal breeding*. 76—79 pp. Sidgwick and Jackson. London.
- Vestri, R., Giordano, P. C. and L. F. Bernimi, 1983, Duplication of the hemoglobin α -chain gene in sheep: characterization of a new α -chain variant present in animals possessing the α^{Lcu} and the Π^{Hb} chains. *Biochem. Genet.* 21: 25—35.
- Vliet, G. van and T. H. J. Huisman, 1964, Changes in the hemoglobin types of sheep as a response to anaemia. *Biochem. J.* 93: 401—409.
- Winterhalter, K. H., 1974, Hemoglobins, porphyrins and related compounds. In: Curtins, H. ch. and M. Roth (ed.) *Clinical biochemistry principles and methods*. 1305—1322pp. Walter, de Gruyter, Berlin, New York.

INVESTIGATIONS ON THE COMPONENTS AND OXYGEN AFFINITY OF HEMOGLOBIN IN TIBETAN SHEEP

Zhou Yucan Liu Guofu

(Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica)

Among the hemoglobins of domestic sheep there exist two genetically determined types, i.e. the hemoglobin A and B, the former has higher oxygen affinity than the latter. It has been suggested that the sheep with hemoglobin A have ability adapting to high altitude, so the hemoglobin A has adaptive significance. In this report we describe the obtained results from Tibetan sheep which live at high altitude above 3000 m.

On the pattern of starch gel electrophoresis two zones were observed. The component moving more rapidly towards the anode at pH 8.6 was called Hb-A, and the slower migrating component was called Hb-B. In 38 sheep, 40 percent of these animals had Hb-A, 5 percent Hb-B and 55 percent Hb-AB. The gene frequency of Hb-A is approximately 0.67.

The polypeptide chains of HbA and HbB were separated by cellulose acetate electrophoresis in urea (8M)-DTT-TEB buffer, pH 8.6, since a complete separation of the two basic polypeptide chains of these hemoglobins can be obtained with this technique. The results show that the two different type globins have one common polypeptide chain which move towards the cathode and identified as the α -chain, and the β -chains migrating towards the anode possess different electrophoretic mobility: the β^A is faster than the β^B . It indicates that the hemoglobins of Tibetan sheep also have only α locus, but there are two common alleles, β^A and β^B , at the β locus.

The oxygen dissociation curves of type HbA and type HbB have been determined in Tibetan sheep. It was found that the oxygen dissociation curve of type HbA was shifted to the left, indicating a higher oxygen affinity than HbB. It is worth noticing that the P50 values of Hb in Tibetan sheep are relatively low at pH 7.4, 37°C. The HbA is 19 mmHg and the HbB is 28 mmHg. We consider it is a possible reflection of particular adaptation to high altitude.