

用梯度聚丙烯酰胺凝胶垂直板型电泳法对雌、雄梭鱼血清蛋白的研究*

刘荣臻

(南京大学生物系)

提 要

实验采用梯度和单一浓度聚丙烯酰胺凝胶垂直板型电泳的方法,对梭鱼血清蛋白进行分析,其中梯度浓度(4.75%+7%)凝胶分离梭鱼血清蛋白得30条区带,比单一浓度(4.75%、7%、10%)凝胶分离的效果好,区带清晰,带数明显增加。同时发现0号、2号、5号、8号和12号雌梭鱼血清蛋白电泳图型中发现有一明显深带,此深带在雄鱼的血清蛋白电泳图型中则没有发现。在数次的重复实验中,结果完全一致。作者认为此深带可能与雌性特异血浆蛋白有关。

近年来应用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行鱼的血清蛋白的分离工作日趋广泛。有关同种鱼类不同性别血清蛋白的差异现象,至今已有不少学者报道过。如 K. Aida 等^[1]发现雌性香鱼发育到一定时期,血液中出现某些雌性特异血浆蛋白。也可以用雌性激素处理雄鱼,使雄鱼血浆中也出现雌性特异血浆蛋白。A. Hara^[2]研究大麻哈鱼(Chum Salmon)雌性特异血浆蛋白,发现在雌鱼血清中有一特殊的蛋白质区带是雄鱼所没有的。

聚丙烯酰胺凝胶电泳具有分子筛和电荷的双重效应,蛋白质分子的体积和凝胶浓度之间的关系决定了分离效果,所以单一浓度凝胶常造成某些大分子成分的堆聚和重叠。据 Wright^[5]报道,不连续梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳对人血清蛋白的分离效果良好,同时操作方便。本实验采用 Wright 方法(作了一些修改)进行梭鱼血清蛋白的分离,并观察雌、雄梭鱼血清蛋白图型的差异。

材 料 和 方 法

实验所用的梭鱼,是1981年5月自江苏省赣榆县水产养殖场取得。其中雌鱼9尾,雄鱼5尾。它们是在低盐度2—3%池塘中养殖的,性腺发育为I—V期。

血清的制备:取性腺发育不同时期的梭鱼,将鱼体表面的水分擦干,剪断尾动脉使血

* 图3,4吸收光谱图由丁益同志协助测定,特此致谢

液流出,弃去前几滴血液后,立即用干燥的试管收集2—5毫升的血液,在室温条件下静置24小时,待血清析出,分出血清贮存冰箱备用。

电泳条件:采用Wright^[5]方法,改为二级梯度浓度凝胶,板面13厘米×15厘米×0.1厘米,同一次电泳可分析12个样品,缓冲液为Tris-gly液,pH8.3,电泳时间为4—6小时,起始电压200伏特,电流20毫安。当样品进入分离胶时电压调至250伏特,电流25毫安,以溴酚蓝作指示剂,电泳过程中当溴酚蓝指示剂到达离玻璃板末端1厘米时,关闭电源,取下凝胶板装置,用刀片轻轻从玻璃上剥离凝胶,移入瓷盘内,以0.5%氨基黑10B染色^[4],染色30分钟后,再以7%醋酸脱色,直至凝胶透明为止,置7%醋酸中保存。也可以用玻璃纸包裹,在室内使其自然凉干,制成干胶片保存。

凝胶的制备:先将洗净了的玻璃板进行干燥,从玻璃板外壁的阴极端3厘米处划一标线,然后将配制好的凝胶液混合均匀,通过一聚乙烯毛细管,使管口插入两玻璃板之间,来回移动注胶,待7%浓度凝胶接近标记刻度时,立即停止。然后缓慢地加入4.75%浓度的凝胶液,加胶时切勿冲击,此时胶面不断上升,当离玻璃板顶端2.5厘米时,停止加胶,胶面上盖一薄薄水层,在室温下静置40分钟,分离胶聚合完毕,除去水层,再加入浓缩胶1厘米后,插入梳板,复盖水层,放日光灯下进行光聚合。

加样:将聚合好了的胶板,装在电泳仪上,取出梳板,吸去水层,再用滤纸将点样槽内的水分吸干,然后用微量注射器将样品依次加入点样槽内,样品以20%甘油混合(体积比1:1),每次加稀释的梭鱼血清样品20微升。

结果和讨论

实验采用不连续二级梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离梭鱼血清蛋白,与Wright等作者的方法比较,本实验可明显区别出有脂蛋白、球蛋白、运铁蛋白、白蛋白和前蛋白五组分。二级梯度聚丙烯酰胺凝胶板型电泳分离梭鱼血清蛋白得到较好的效果,分离的区带数可达25—30条以上。此方法的主要特点是近阴极端为一层大孔胶(即4.75%),而近阳极端为一层小孔胶(即7%),这种二级梯度凝胶可使同一凝胶板上布有从大到小的凝胶孔径,使梭鱼血清中复杂的大分子得到有序的分。

采用聚丙烯酰胺单一浓度7%凝胶实验中,梭鱼血清蛋白分离结果得到17—18条区带,单一浓度7%凝胶分离梭鱼血清蛋白的实验中,对其中一些大分子成分分离效果不好,如球蛋白,脂蛋白的组分密集不分,有一些组分堆积在凝胶的阴极端。在单一浓度凝胶4.75%的实验中,白蛋白和前蛋白的区带重叠不分,其中较大的分子分离的较好。但在单一浓度4.75%凝胶分离梭鱼血清蛋白仅得到10—12带。本文作者曾对单一浓度凝胶分离梭鱼血清蛋白分辨率降低问题进行分析,认为单一浓度凝胶因为孔径是完全一致的,分子筛的作用只能使相应分子大小的局部组分得到分离,而对另一些组分不能很好的分离,因此造成某些组分的堆积,从而使分离的区带数降低。Wright^[5]等学者曾用不连续四级梯度凝胶分离人的血清与线性梯度凝胶和凝胶等电聚胶分离法进行过比较,他们认为对于血清蛋白分离而言,前者的分离效果比后者好,他们分离的蛋白质区带可达29—60条区带以上。

作者用不连续二级梯度聚丙烯酰胺凝胶板型电泳法对 14 尾梭鱼血的清进行了分析, 其区带数少者有 25—27 条(图 1-1), 多者 30 条(图 1-2)以上。现将实验结果比较如下:

凝胶浓度 区带数比较		二级梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳	单一浓度聚丙烯酰胺凝胶电泳		
		4.75% + 7%	4.75%	7%	10%
区带数	雌 鱼	28—30	12	18	20
	雄 鱼	25—27	10	17	17

如上表统计, 雌梭鱼和雄梭鱼的血清蛋白电泳图型基本相似, 但明显的差异是雌梭鱼血清蛋白图型比雄梭鱼血清蛋白带数高, 特别是发现雌鱼 2 号、5 号、8 号和 12 号(图 2)的血清蛋白电泳图型中有一明显的深带(图 1-2, 2 箭头标示处), 同时这四条雌鱼所出现的这一深带, 在所有的重复实验中得到的结果完全一致, 而在所有雄鱼中则没有发现。这种现象与 A. Hara 所报道在大麻哈鱼的血清中电泳分离雌鱼血浆中的结果完全一致, 作者认为雌鱼血清所显示的深色带可能与雌性特异血浆蛋白(FSPP)有关, 作者用 8 号雌鱼和 10 号雄鱼血清蛋白电泳的凝胶经 Unicam SP 1800 紫外分光光度计用波长 540nm 测定吸收光谱, 雌鱼吸收光谱可显示出雌性特异血浆蛋白的一个吸收高峰(图 3 箭头标示



图1 梭鱼的血清蛋白电泳图型
左示 10 号雄梭鱼的血清蛋白电泳图型
右示 8 号雌梭鱼的血清蛋白电泳图型,
箭头所指为雌性特异血浆蛋白区带。

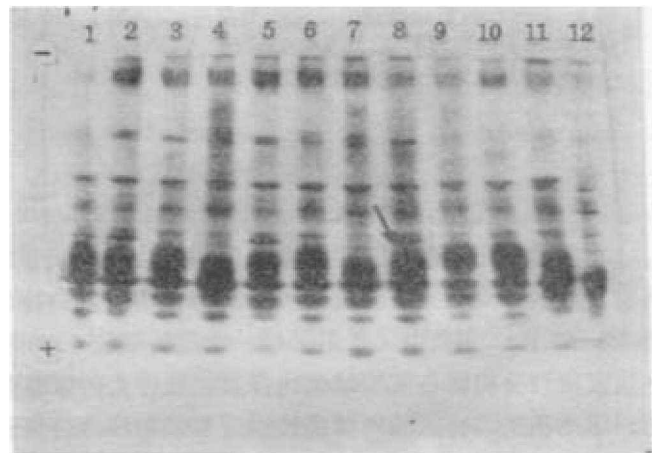


图2 梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分离雌、雄梭鱼血清蛋白图型的比较
(图中 2, 3, 5, 6, 8, 12 号为雌鱼; 10, 11, 4 号为雄鱼。
其中 2, 5, 8, 12 号显示一深色带, 如箭头所指。)

处),而雄鱼则不显示此高峰(图4)。实验结果表明梭鱼血清蛋白分带的变化,不只是个体差异和多态现象,更主要是由于性别不同所引起差异。K. Aida^[1]解释这种差异是由于卵黄发生和精子发生过程中的代谢的差别所致。

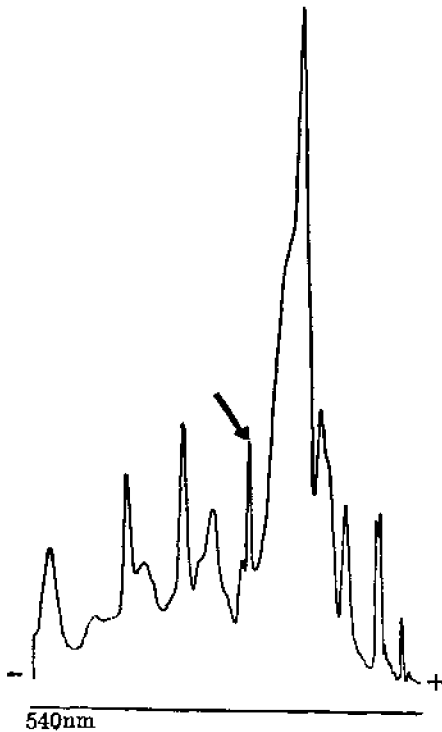


图3 8号雌梭鱼血清蛋白电泳图型在540nm波长的吸收光谱(箭头指处示雌性特异血浆蛋白的吸收光谱)

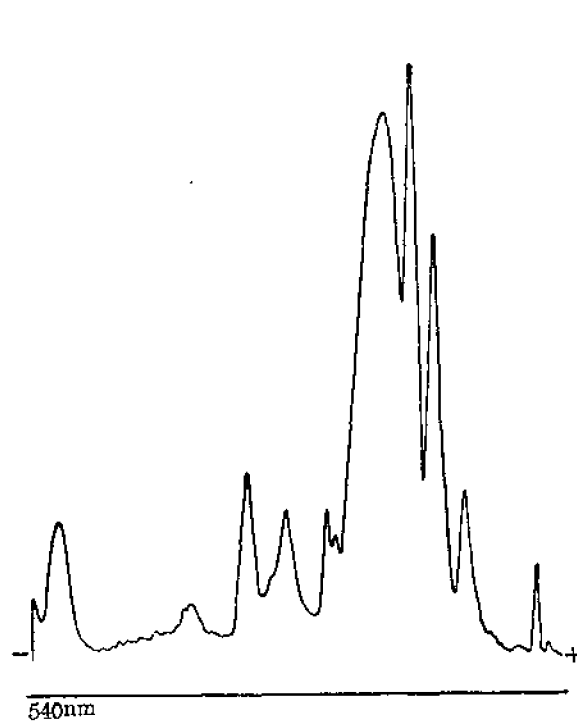


图4 10号雄梭鱼血清蛋白电泳图型在540nm波长的吸收光谱

结 论

本实验采用不连续二级梯度聚丙烯酰胺凝胶板型电泳,对14尾梭鱼血清蛋白的分离具有良好的分离效果,梯度凝胶分离雌鱼血清蛋白得28—30带(见图2),分离雄鱼血清得25—27带。实验中又采用了单一浓度的凝胶4.75%、7%、10%分离梭鱼血清蛋白,单一浓度凝胶分离的各实验结果比梯度凝胶分离的区带数低,而且图型的局部区带也不清晰,因此不连续梯度聚丙烯酰胺垂直板型电泳是分离鱼类血清较好的方法。此方法的主要优点是血清蛋白分带清晰,所含微量的成分也能显示出来。又因板型电泳的各样品同处在一个凝胶板上,其电泳条件一致,操作简便,重复性强,因此有推广价值。特别对复杂蛋白质的分离,具有分带清晰的优点。

二级梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离梭鱼血清蛋白的图型与Wright等^[4]学者分离人的血清蛋白的图型相比较,明显地观察到脂蛋白、球蛋白、运铁蛋白、白蛋白和前蛋白五个组分。实验中不论是用梯度凝胶还是单一浓度的凝胶,电泳结果均发现0号、2号、5

号、8 号和 12 号雌梭鱼血清电泳图型有一明显深带, 此深带在所有雄鱼实验中均未发现。因此经过雌雄鱼血清电泳图型的比较及吸收光谱分析作者认为这一深带与雌性特异血浆蛋白有关。

参 考 文 献

- [1] Aida, K. et al. 1973. Physiological studies on gonadal maturation of fishes. I. Sexual difference in composition of plasma protein of Ayu in relation to gonadal maturation. 日本水産學會誌, 39(11): 1091—1106.
- [2] Hara, A., 1978. Sexual differences in serum proteins of Chum Salmon and the Purification of female-specific serum protein. 日本水産學會誌, 44(6): 689—693.
- [3] Gordon, A. H., 1975. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. North-Holland publishing company, Amsterdam. 117.
- [4] Wright, G. L. et al., 1966. Differential Disc electrophoresis of serum proteins. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 123(1): 22—27.
- [5] Wright, G. L. et al., 1973. An evaluation of Gradient acrylamide gel electrophoresis and acrylamide gel isoelectric focusing for the primary separation of complex mixtures of proteins. Comparison of one- and two-dimensional analytical procedures. *Biochim. Biophys. Acta.* 295(2): 396—411.

INVESTIGATION OF GRADIENT POLYACRYLAMIDE GEL SLAB-ELECTROPHORESIS ON SERUM PROTEIN OF SEXUAL MULLETS (*MUGIL SO-IUY* BASILEWSKY)

Liu Rongzhen

(Department of Biology University of Nanjing)

Abstract

Whole sera of Mullet (*Mugil so-iuy* Basilewsky) analysed by electrophoresis acrylamide discontinuous gradient gel (4.75% + 7%) showed 25—30 bands.

The highest mobility fraction consists of albumin components and several preprotein components. The largest band is composed mainly of albumin components. Lipoproteins with large molecular size are localized at the negative pole.

A specific protein band was observed in the sera of the female fish by discontinuous gradient polyacrylamide gel but was not found in the males.

The specific female serum protein migrates as a protein of medium molecular size which is distinctly different from albumin and globulin. Thus discontinuous gradient polyacrylamide gel electrophoresis affords a highly sensitive and more practical technique for analysis of proteins.