

两种罗非鱼及其杂交种血清蛋白的 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及其 雌性特异蛋白氨基酸的分析

刘荣臻 王浩 陈洁平

(南京大学生物系)

提 要

本实验应用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳方法对莫桑比克罗非鱼(*Tilapia mossambica*)和尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)及其杂交种——福寿鱼(*T. mossambica* ♀ × *T. nilotica* ♂)的血清蛋白进行了分离,同时对其雌性特异蛋白进行了氨基酸组成分析。莫桑比克罗非鱼的血清蛋白电泳图型具有12—14条蛋白质带,尼罗罗非鱼有12—13条蛋白质带,杂交种——福寿鱼有12—15条蛋白质带;三种鱼血清蛋白电泳图型在雌、雄性别上有明显的差异。莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼的成熟雌鱼有两条新的蛋白质带,这些带都比同种的雄鱼所显示的颜色深。杂交种——福寿鱼的血清蛋白电泳图型,为其亲本的中介型。

此外,本文还对雌性特异蛋白的蛋白质带,进行了氨基酸组成分析。

用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法研究鱼类的血清过去已有不少报导,Aida, K.等^[1]用淀粉凝胶电泳研究香鱼,认为其血浆蛋白有12—15个组分,并发现随着成熟雌香鱼的性腺发育,血浆中有两个组分明显增加。Badawi, H. K.^[2]用电泳方法研究了四种罗非鱼(*Tilapia nilotica*、*T. Zillii gervis*、*T. galilaea artedi*和*T. aurea*)的血清蛋白,并观察到这四种罗非鱼之间血清蛋白各组分的迁移率是不同的。易健华等^[3]曾用聚丙烯酰胺凝胶电泳对两种罗非鱼(莫桑比克罗非鱼和加利略罗非鱼)的血清图型进行了比较,认为是有差异的。

莫桑比克罗非鱼(雌)与尼罗罗非鱼(雄)杂交产生的福寿鱼,比其亲本生长都快,所以许多地方利用这两种鱼的杂交优势,提高鱼的产量。目前,对于这三种鱼的形态,习性以及养殖等方面国外已有许多学者作过报导,但对莫桑比克罗非鱼,尼罗罗非鱼以及它们的杂交种——福寿鱼的血清蛋白的研究,尚未见报导。因此我们用聚丙烯酰胺盘状电泳方法对莫桑比克罗非鱼(*T. mossambica*)、尼罗罗非鱼(*T. nilotica*)及这两种鱼的杂交种——福寿鱼的血清蛋白进行了比较分析,并对从三种鱼血清中分离出的各种蛋白质带进行了特殊染色和鉴定。本文研究了上述三种鱼之间的差异和同一种鱼雌雄性个体血清蛋白之间的差异及雌性特异蛋白的氨基酸的测定。

材 料 和 方 法

1982年3月至7月共进行了9批实验,实验材料取自江苏省南京市水产研究所及南京保种场,共59尾,其中尼罗罗非鱼14尾(雌雄各半)莫桑比克罗非鱼29尾(雌13尾,雄13尾)、福寿鱼16尾(雌雄各半),鱼的性腺发育为III—IV期。

(1) 取血方法 将鱼体擦干,平放在白瓷盘内,用4号医用注射器,直接穿刺静脉窦,吸尽血液,置离心管中,在室温中静置2—3小时后,取出血清,置2—4°C冰箱中备用。

(2) 电泳条件 实验应用Davis的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳法^[4],凝胶浓度为7%,pH8.8,电流为3mA,电压为250伏,电泳时间为2.5—3小时。电泳完毕,取出凝胶柱,置于12.5%三氯醋酸中固定30分钟,然后分别进行染色。

(3) 染色方法 将三种鱼的血清在同一条件下电泳,对凝胶柱分别按下列方法染色:

血清蛋白的染色方法:用0.1%氨基黑10 B染1小时,再移入7%醋酸中电泳脱色至底色完全退掉,然后置7%醋酸中保存。对常染后的胶柱,进行紫外分光光度计扫描和照像。

糖蛋白的染色方法:将12.5%三氯醋酸中固定后的胶柱,以蒸馏水洗至pH呈中性,移至3%醋酸的1%过碘酸中1小时,再以蒸馏水洗涤(以硝酸银检查为阴性反应为止,然后将胶柱移入2%的Schiffs试剂中过夜,再取出胶柱用水洗3—5次,置于0.5%偏重亚硫酸钠中20分钟,再用水洗至底色消失为止(以上步骤均在暗处进行)。

脂蛋白的染色方法:将苏丹黑B(Sudan black B)与无水乙醇配成饱和溶液,并摇动使乙酰化,用前过滤,再按样品液的1/10量加入样品中使染色1小时,然后进行电泳。

雌性特异蛋白带的氨基酸组成分析:取同一次电泳的胶条1—2根进行氨基黑B染色,迅速用电泳法脱色。精确测量雌性特异蛋白区带的位置。然后将另一部分未经染色的胶条在相对应的位置进行切割,将切割下的胶条用水抽提,并振荡24小时以上取出胶条,加入6N盐酸1ml,在100°C沸水浴中酸解27小时,直至水蒸干,再加入柠檬酸钠盐酸缓冲液(pH2.2)^[5],然后将样品用日立835-50高速氨基酸自动分析仪进行分析。

结 果

1. 雌、雄莫桑比克罗非鱼的血清蛋白电泳分离比较

经电泳,莫桑比克罗非鱼的血清蛋白分离为12—14条蛋白质带;雌雄鱼血清蛋白谱带基本相似,但不完全相同。经氨基黑10 B染色,雌鱼有13—14条蛋白质带,雄鱼有12—13条蛋白质带。

将莫桑比克罗非鱼雌、雄鱼血清蛋白电泳图型进行比较,可看出雌鱼比雄鱼多一条带(图1,7带),另外雌鱼第3带颜色明显比雄鱼第3带深(图1)。经紫外分光光度计扫描,雌鱼第7带(图1)具有吸收高峰,而雄鱼则缺少此峰。雌鱼第3带(图1)比雄鱼第3带的吸收峰要高。莫桑比克罗非鱼血清蛋白经Schiffs试剂染色,雌、雄鱼电泳凝胶均显示出十条深红色糖蛋白带(图1的第1、2、4、8、9、10、11、12、13、14带),但第3、5、6、7四条

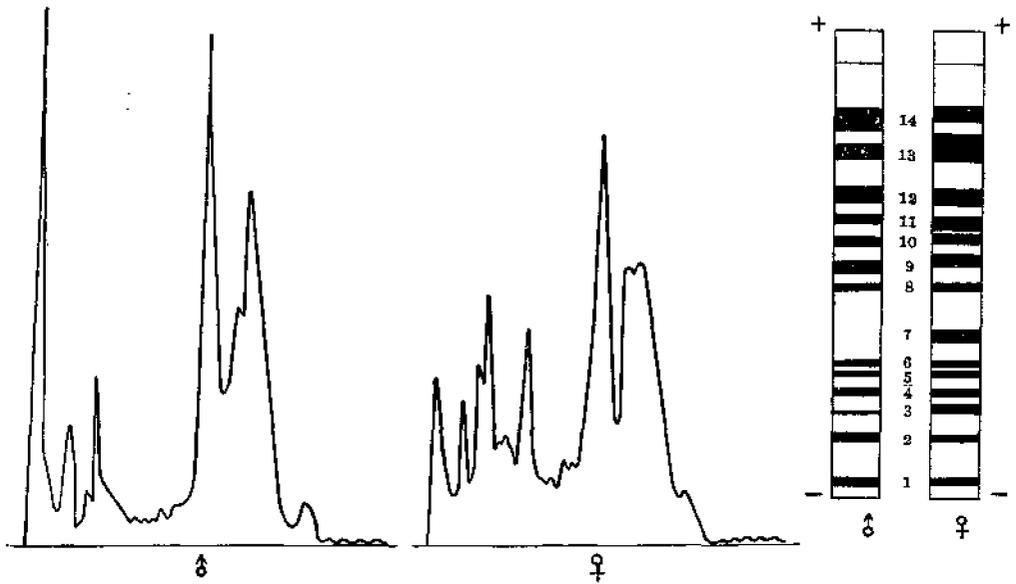


图1 莫桑比克罗非鱼血清蛋白电泳图型

带(图1)却不被染色。凝胶经苏丹黑B染色,显示出正极端第12条带(图1)和负极端第2条带(图1)均呈阳性反应,显示出脂蛋白的性质。

2. 雌、雄尼罗罗非鱼的血清蛋白电泳分离比较

雌、雄尼罗罗非鱼的血清,经7%聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离,氨基黑10B染色,其电泳图型显示为12—13条蛋白质带(图2),雌、雄鱼血清蛋白图型基本相似,标志着雌、雄差异的是在凝胶负极端的第2、3蛋白质带(图2),雌鱼的这两条蛋白质带明显比雄鱼色深,经紫外分光光度计扫描,雌鱼第2、3两带的吸收峰明显比雄鱼高,第10、11、12三条带可能是白蛋白带,个体之间常有变化,一般为3—4条带。尼罗罗非鱼血清蛋白经Schiffs试剂染色,雌、雄鱼均显示十条糖蛋白红色带,但第5、6、7三条带(图2)则呈阴性反应,不被染色。雄鱼第2、3带(图2)染色甚淡,尼罗罗非鱼血清蛋白电泳凝胶经苏丹黑B染色,第3、11带(图2)为脂蛋白性质,呈阳性反应,两条脂蛋白带迁移率与莫桑比克罗非鱼相同,这两条脂蛋白带分别靠近正负极两端,其它各带均呈阴性反应。

3. 雌、雄福寿鱼的血清蛋白电泳分离比较

用7%聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离杂交种——福寿鱼的血清蛋白,雌鱼为13—15条蛋白质带,雄鱼为12—14条蛋白质带。比较福寿鱼雌、雄鱼血清蛋白的电泳图型,雌鱼第2、6两带(图3)比雄鱼色深,经紫外分光光度计扫描,雌鱼第2、6两带的吸收峰比雄鱼高,第11、12、13三带可能为白蛋白带,个体之间亦有变化,一般为3—4带,第3、11带用苏丹黑B和Schiffs试剂染色均呈阳性反应,所以为糖脂蛋白性质,两条脂蛋白带(图2的第3、11带),迁移率与上两种鱼相似。

在福寿鱼血清蛋白电泳图型中出现了一个有趣的现象,福寿鱼的父本尼罗罗非鱼和

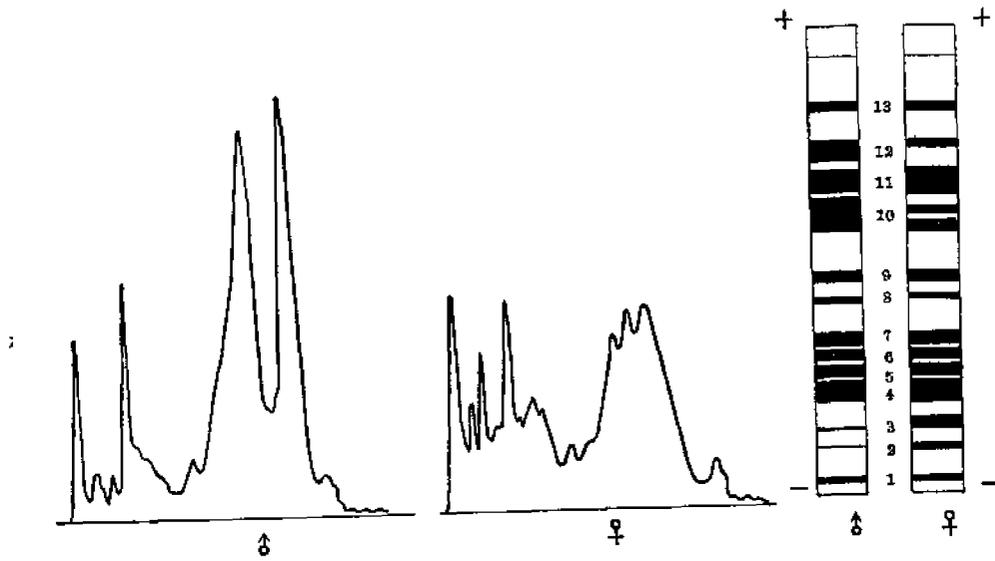


图2 尼罗罗非鱼血清蛋白电泳图型及扫描曲线

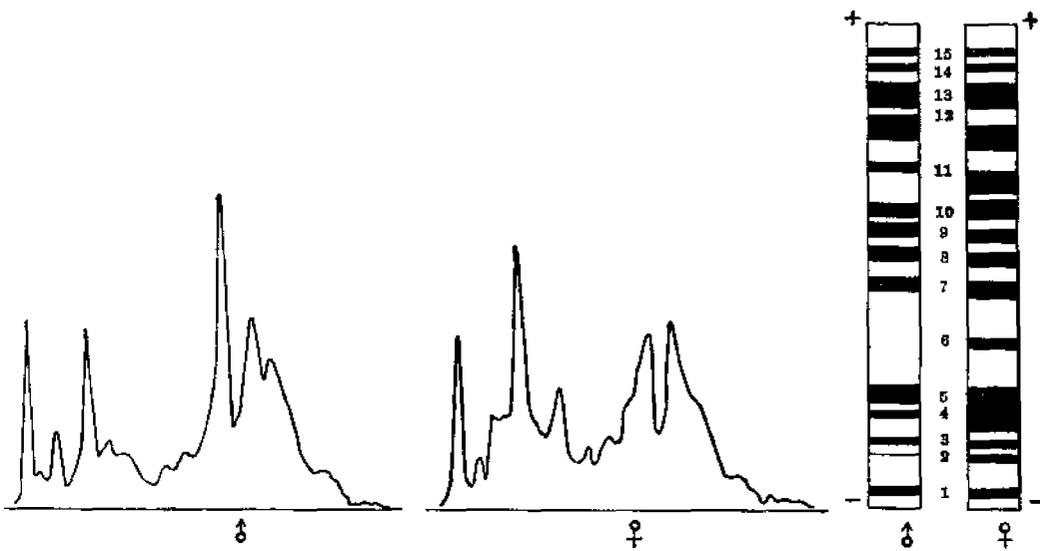


图3 杂交种——福寿鱼血清蛋白电泳图型及扫描曲线

它的母本莫桑比克罗非鱼所特有的蛋白质带,在它的血清电泳图型上都显示出来,例如莫桑比克罗非鱼的雌鱼血清第7带(图1)和尼罗罗非鱼第2、3带在福寿鱼血清电泳图型中均出现。其中尤以福寿鱼的雌鱼较明显,因此福寿鱼血清蛋白电泳图型表现为介于莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼之间的过渡性的多态现象,因此表现带数较多(12—15带)。凝胶经 Schiff's 试剂显色雌、雄鱼均显示13条带,其中第2、6两带不被染色。

4. 三种罗非鱼血清蛋白电泳图型的比较

本实验分离出的莫桑比克罗非鱼、尼罗罗非鱼及它们的杂交种——福寿鱼三种鱼的

血清蛋白电泳图型有着明显的差异。表现为靠近负极端的蛋白质带差异较大。从经氨基黑 10 B 染色的三种鱼雌鱼凝胶电泳图型的比较可以看出, 莫桑比克罗非鱼为 13—14 条蛋白质带, 尼罗罗非鱼为 12—13 条蛋白质带, 福寿鱼为 12—15 条蛋白质带, 莫桑比克罗非鱼的雌鱼比雄鱼多一条带(图 1 的第 7 带), 而尼罗罗非鱼的血清蛋白电泳图型中没有见到这一条带; 而福寿鱼血清蛋白的电泳图型中却又出现此带(图 3 的第 6 带)只是颜色稍淡, 介于莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼之间。而尼罗罗非鱼雌鱼血清蛋白电泳图型中的第 2 带(图 2)的颜色较深, 莫桑比克罗非鱼雌鱼血清蛋白图型中无此带, 而此带在福寿鱼雌鱼血清蛋白电泳图型图型隐约可见, 其颜色较淡也表现出它的中介性。三种鱼雄鱼血清蛋白电泳图型的比较也有明显差异, 莫桑比克罗非鱼雄鱼有第 3 带(图 1), 尼罗罗非鱼雄鱼无此带, 福寿鱼则为中介型, 即有此带但颜色较淡。尼罗罗非鱼雄鱼的第 2 带明显可见(图 2), 在莫桑比克罗非鱼雄鱼上则见不到此带, 而在福寿鱼雄鱼血清蛋白图型中又可见颜色较淡的此带, 也表现出它的中介性。

莫桑比克罗非鱼血清蛋白电泳的区带对 Schiff 试剂有强烈的嗜染性, 经 Schiff 试剂显色显示出十条深红色的糖蛋白带。福寿鱼糖蛋白带型比莫桑比克罗非鱼多 2—3 带, 但它的蛋白质带显色较淡。而尼罗罗非鱼 Schiff 试剂染色为十条带, 它的血清蛋白图型在靠近阴极端第 2、3 带处显色非常微弱, 几乎不能看见。同时莫桑比克罗非鱼第 3、5、6、7 四条带(图 1)和福寿鱼第 2、6 两条带(图 3)呈阴性反应而不被着色。用苏丹黑 B 染色时, 三种鱼的血清蛋白图型中均出现两条脂蛋白带, 这两条脂蛋白带在图型中的迁移率也是相似的。

实验结果证明雌性特异蛋白在雌鱼血清中表现出明显的差异, 三种雌鱼血清的雌性特异蛋白具有 15—17 种氨基酸不等(见表 1 和表 2 所示)。雌性莫桑比克罗非鱼和尼罗罗

表 1 血清雌性特异蛋白的氨基酸组成

氨基酸	莫桑比克罗非鱼		杂交鱼	
	N Mol $10^{-9}M/50\mu l$	NGram $10^{-3}克/50\mu l$	N Mol $10^{-9}M/50\mu l$	N Gram $10^{-3}克/50\mu l$
氨基乙磺酸	0.049	6.18	0	0
天门冬氨酸	0.745	99.13	0.549	73.02
苏氨酸	0.181	21.55	0.214	25.5
丝氨酸	0.528	55.49	0.553	58.07
谷氨酸	0.490	72.07	0.575	84.65
甘氨酸	111.900	2620.06	58.232	2608.20
半胱氨酸	0.201	48.3	0.105	25.40
缬氨酸	0.676	79.28	0.384	45.02
蛋氨酸	0	0	0.131	19.66
异亮氨酸	0.134	17.60	0.092	12.11
亮氨酸	0.199	26.08	0.207	27.19
苯丙氨酸	10.223	1688.97	5.172	854.46
γ -氨基酸丁酸	0.281	28.81	0.165	17.00
赖氨酸	0.067	9.92	0.103	15.11
精氨酸	0.221	38.52	0.268	46.71

表2 血清雌性特异蛋白的氨基酸组成

氨基酸	尼罗罗非鱼		杂交鱼	
	N Mol $10^{-9}M/50\mu l$	N Gram $10^{-2}克/50\mu l$	N Mol $10^{-9}M/50\mu l$	N Gram $10^{-2}克/50\mu l$
氨基乙酸	00542	67.87	0.097	12.14
天门冬氨酸	0.775	108.09	0.109	14.46
苏氨酸	0.215	25.58	1.118	138.14
丝氨酸	0.583	61.81	0.800	84.02
谷氨酸	0.298	43.89	0.959	126.35
甘氨酸	88.192	2621.43	109.579	2621.43
半胱氨酸	0.134	32.19	0.184	44.81
缬氨酸	0.402	47.12	0.759	89.08
蛋氨酸	0.166	24.91	0	0
异亮氨酸	0.079	10.39	0.193	25.36
亮氨酸	0.151	19.91	0.942	44.96
苯丙氨酸	1.320	218.09	0.895	147.90
γ -氨基丁酸	0.459	47.35	0.159	16.46
赖氨酸	0.044	6.52	0.107	15.71
精氨酸	0.217	37.95	0.399	69.56
色氨酸	0.132	26.98	0	0

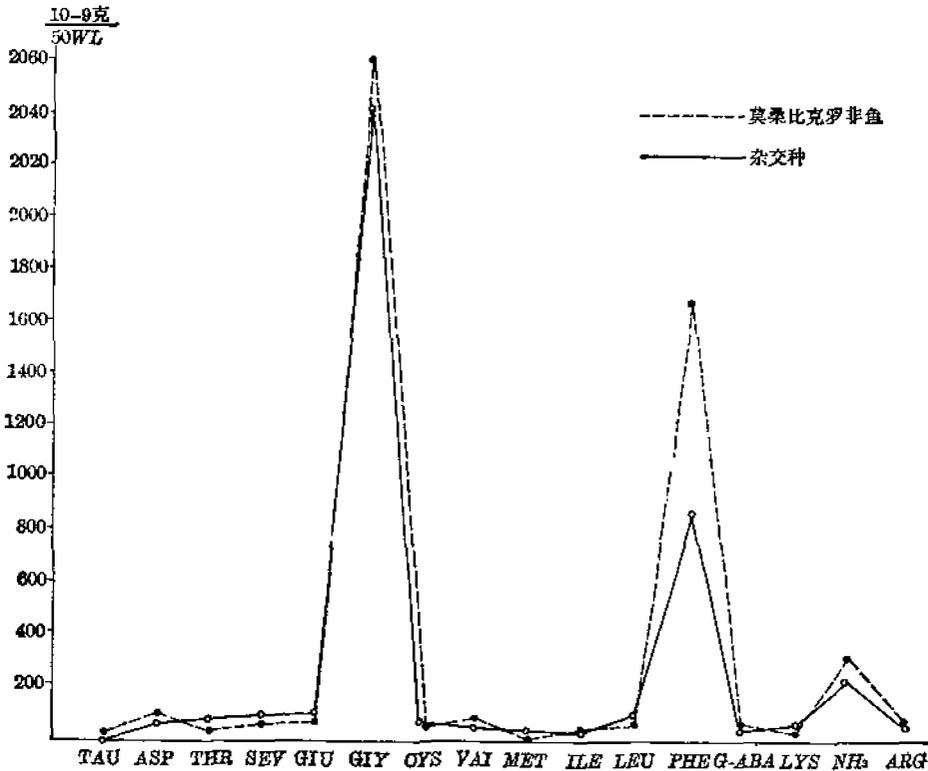


图4 莫桑比克罗非鱼及杂交种血清雌性特异蛋白的氨基酸组成的比较

非鱼血清中的雌性特异蛋白氨基酸组成相似,含量相近,其中甘氨酸含量最高,苯丙氨酸和氨的含量较高,具有三个高峰(图 4 图 5)。福寿鱼雌鱼的雌性特异蛋白的氨基酸组成和含量同莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼雌鱼都相近似,福寿鱼的各种氨基酸含量也表现出中介性的特征。

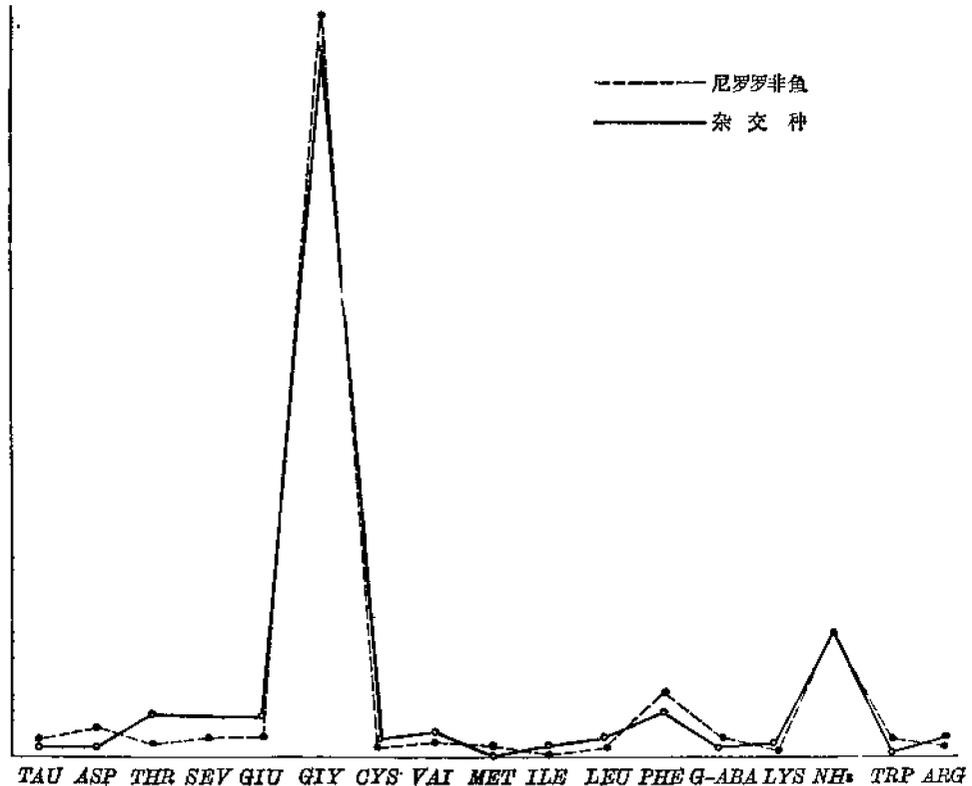


图 5 尼罗罗非鱼及杂交种血清雌性特异蛋白的氨基酸组成的比较

氨基酸组成分析的结果表明,三种鱼个别氨基酸的含量也存在差异,莫桑比克罗非鱼雌性特异蛋白的氨基酸组成缺少蛋氨酸而含有微量的牛磺酸,但福寿鱼在相应的区带(图 3 第 6 带)上具有微量蛋氨酸而缺少牛磺酸(表 1);尼罗罗非鱼的雌性特异蛋白具有 17 种氨基酸,蛋氨酸和牛磺酸全部存在;福寿鱼则缺少蛋氨酸和色氨酸(表 2);莫桑比克罗非鱼也缺少色氨酸。

讨 论

聚丙烯酰胺凝胶电泳对血清蛋白的分离,具有很高的分辨率,并兼分子筛和电荷双重效应。不过凝胶的 pH 和浓度对分离效果有明显的影响。实验中曾使用这三种浓度不同的凝胶,其中只有 $T=7\%$, $C=2\%$, $pH=8.8$ 的单一凝胶对雌性特异蛋白带的分离效果较好,而 $T=7.5\%$ 的标准胶分离效果不好,因此凝胶的 pH 和单体浓度应根据不同样品而进行选择,我们认为 7% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对鉴定这三种鱼的雌、雄性和种间

差异是一种比较好的方法。

2. 雌鱼和雄鱼的生殖生理是不同的,特别在性成熟时期,雌鱼卵母细胞的卵黄形成和雄鱼精子的发生和成熟,都受不同的性激素的调节和控制。在不同的发育阶段,新的蛋白质不断的合成,然后进入血液,诱导动物体内某些特殊的新陈代谢,所以分析雌、雄鱼的血清可以反映出雌雄差异。然而是否各个不同发育时期都存在着这种雌雄差异问题,由于本实验只作了三种鱼性腺发育 III—IV 期鱼的血清蛋白的分析,对于 I—II 期鱼的血清还有待进一步研究。

3. 三种鱼在形态上存在着明显的差异,杂交鱼在形态上和代谢上都表现为中介型,从遗传角度考虑,福寿鱼个体大是符合杂交优势,血清蛋白电泳图型显示出中介性多态现象,这种现象是由于福寿鱼同时携带两种鱼的基因,而血清蛋白的合成是受遗传基因控制的。

4. 7%聚丙烯酰胺凝胶电泳揭示了莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼成熟雌鱼两条新的蛋白质带,这个现象类似于 Aida, K. 等(1973),在香鱼血浆中观察到的结果^[2]。

5. 莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼血清蛋白电泳的胶柱经 Schiff's 试剂染色后均显示出十条深红色区带,而福寿鱼则显示 12—13 条红色带,但着色较弱。这说明三种鱼的血清中含有大量与多糖结合的蛋白质,作者认为这是由于在性腺成熟过程中由于糖蛋白激素(如促卵泡成熟激素等)在血液中大量存在所致。不过因我们仅仅使用了三种染色方法,莫桑比克罗非鱼中第 3、5、6、7 四条带(图 1)和福寿鱼第 2、6 两条带(图 3),经氨基黑 B 染色,显示出蛋白质的性质,但它们却不能被 Schiff's 试剂和苏丹黑 B 染色,这是一个非常有趣的问题。Aida, K 等(1973)认为卵生脊椎动物,在产卵期间血浆中还存在着一种与钙结合的蛋白质成分^[2],据此,我们设想上述不能被 Schiff 试剂和苏丹黑 B 染色的蛋白质带,是否就是这种类似的物质,这是值得进一步研究的问题。

参 考 文 献

- [1] 易健华等,1981. 聚丙烯酰胺盘状电泳在鱼类分类及雌雄鉴别上的初步研究. 淡水渔业,4:11—12.
- [2] 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. 日本水产学会誌, 39 (11):1091—1106.
- [3] Naka Gaw A, H. *et al.*, 1978. Biochemical Studies on carp plasma protein—II Amino acid composition of an albumin. 日本水产学会誌, 44(8):259—262.
- [4] Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404—427.
- [5] Gordon A. H., 1975. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. 34—42. New York.
- [6] Badawi, H. K., 1971. Electrophoretic Studies of Serum Proteins of four Tilapia species (pisces). *Mar. Biol.*(Berlin). 8(2): 96—98.

INVESTIGATION ON SEXUAL DIFFERENCE COMPOSITION OF SERUM PROTEIN OF TWO TILAPIA AND THEIR HYBRID

Liu Rongzhen, Wang Hao and Chen Jieping

(Department of Biology, University of Nanjing)

Abstract

Serum proteins of *Tilapia mossambica*, *Tilapia nilotica* and their hybrid (female *T. Mossambica* × male *T. nilotica*) were examined by using 7% polyacrylamide gel electrophoresis.

The *T. mossambica* serum was isolated into 12—14 protein bands, *T. nilotica* serum into 12—13 protein bands and the hybrid serum into 13—15 protein bands.

Sexual differences in the electrophoretic patterns of serum proteins of the two species and their hybrids were compared. The electrophoretic patterns of banding showed two new bands in the serum of mature female *T. mossambica*. They were not observed in the males. But in the females of *T. mossambica* and of *T. nilotica* the protein bands were broader and darker in colour than those of the males. The electrophoretic pattern of the hybrids was transient among several components.

Various staining methods were used: (a) for total proteins with amide black dye two new protein bands appeared; (b) for glycoproteins with the periodic acid-Schiff reaction, the two new protein bands were not visible. However, other protein bands showed red colour; (c) for lipoprotein with sudan black B there were two marked protein bands.

For scanning electropherograms on serum of the fish and amino acid composition of female specific serum protein, ultra-violet-spectro photometer was used. This female specific serum protein was characterized by relatively high contents of glycine, phenylalanine and amide NH₂, but the absence of histidine and tyrosine.