

中国几个金鱼品系血清抗原性的探讨

梁前进 彭奕欣
(北京师范大学生物系, 100088)

摘 要 利用醋酸纤维薄膜电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳比较了鲫和几个金鱼品系(金鲫、草金鱼、红文鱼、红龙睛和红头蛋鱼)的血清蛋白成分,并用兔抗鲫血清对这几个品系进行了双向免疫扩散和对流免疫电泳分析。结果表明:(1)鲫和几个金鱼品系的血清蛋白成分及抗原性在很大程度上相似;(2)对电泳图谱的详细分析以及用高效价抗血清测定可以看出它们之间还存在不同程度的差别,并与演化地位相当一致。

关键词 金鱼,血清,抗原性,电泳

以中国为原产地的金鱼(*Carassius auratus Var.*)是倍受国内外人士欢迎的观赏鱼,还是学者们研究种内演化的理想实验材料[陈 楨 1959]。它最早发现于公元 265~420 年,经 1000 多年的演变、家化,现在至少有 200 多个品种[徐金生等 1980、1981,王春元和李延龄 1983]。对于金鱼各品系的比较研究报道很多[梁前进 1995]。

抗原、抗体的结合不仅可在体内也可在体外发生,产生各种血清学反应。Matsui [1934] 早就发表了金鱼的血清沉淀反应结果,认为金鱼与鲫反应相同。免疫扩散和电泳结合起来分析抗原性,是很有效的手段[龙振洲等 1996],本研究拟以醋酸纤维薄膜(CAM)和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、双向免疫扩散和对流免疫电泳测定几个金鱼品系的抗原性,并用它们同鲫加以比较。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性大白兔(2 500~2 750g)、雄鸡(2000g)和鲫(50~65g)购自北京北太平庄市场;金鲫、草金鱼、红文鱼、红龙睛和红头蛋鱼(均重 50~65g)来自北京官园鱼鸟市场和中科院发育生物学研究所。各金鱼品系的英文名称与梁前进和彭奕欣[1994]一致。

1.2 样品制备

鱼血清取自尾动脉和心脏;兔抗血清取自心脏。用作蛋白分子量电泳标记的鸡肉材料取自胸大肌,其电泳样品制法同梁前进和彭奕欣[1994]。

1.3 电泳

1.3.1 醋酸纤维薄膜电泳

按北京师范大学生物系生物化学教研室[1982]的方法。取试验鱼血清 5 μ L 分别滴于 2cm

×8cm 的醋酸纤维膜(浙江黄岩曙光化工厂)无光泽面,距一端 1.5cm,同时电泳,以近样端为负极端。用北京试验设备厂的 JD-I 型电泳仪,电极缓冲液是离子强度 0.07、pH8.6 的巴比妥缓冲液,电泳条件:105V、40 分钟。染色液用 0.086%氨基黑 10B-16.7%甲醇-10%乙酸,染色时间 7 分钟。

1.3.2 SDS-聚丙烯酰胺电泳

采用平林民雄等[1988]的方法,点样量 5 μ L/样品槽。用北京六一仪器厂 DYY-II 电泳槽,pH8.3 的 Tris-Gly(加 0.1% SDS)作电极缓冲液。浓缩条件是 30mA,分离条件是 60mA、6 小时。用 0.25%考马斯亮蓝-45.5%甲醇-9.2%乙酸染色 1 小时。

1.4 抗原、抗体反应

1.4.1 兔抗鲫血清制备

用 20 条鲫混合血清作抗原,分别给兔 1、2 做每隔一周注射一次的连续四次皮下注射。免疫注射方法见潘文石等[1982]的方法。抽取对照兔(未免疫)的血清用作阴性对照。收集的抗血清封存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱或即用。

1.4.2 抗血清效价测定

取 4mL 熔化的离子琼脂(净化琼脂:离子强度 0.05pH8.6 巴比妥缓冲液=1.5g:100mL)铺于 2.5cm×7.5cm 玻片上,凝后打孔:中央一孔,半径 5mm 处均匀打 6 孔,孔径 4mm。中央孔加 20 μ L 鲫混合血清,周孔分别加入 20 μ L 的 1:2⁰、1:2¹、1:2²、1:2³ 等一系列稀释度的抗血清(生理盐水稀释),37 $^{\circ}$ C 扩散 24 小时。用出现沉淀线的最高稀释倍数作抗血清效价。染色液用 0.25%考马斯亮蓝-45.4%甲醇-9.29%乙酸,染 1 小时。

1.4.3 双向免疫扩散

用鲫和各品系金鱼血清作抗原,分别与抗血清进行扩散试验。方法见测效价步骤。中央孔加抗血清,周孔依次加相应鱼的 2 倍连续稀释的不同浓度血清作抗原。以能发生沉淀反应的抗原稀释倍数最高一孔的稀释度作相应品系鱼的反应效价。

1.4.4 对流免疫电泳

琼脂板上加抗原及抗体血清的孔直径为 4mm,相对应孔对间距 5mm,共打 10 对孔,排成两排。抗原血清从 1:2⁰ 按连续 2 倍稀释法释至 1:2⁹,依次加于 10 个抗原孔,与同一稀释度的抗血清反应。每孔加样 20 μ L。用 DYY-III 型电泳仪(北京六一厂),抗原端接负极、抗体端接正极,以离子强度 0.05pH8.6 巴比妥缓冲液作电极液,电压 210V 电泳 1.5 小时,染色同 1.4.2。

2 结果

2.1 醋酸纤维薄膜电泳结果分析

从图 1 上看,鲫、金鲫和草金鱼三者的电泳带数目、位置都基本相同,都呈现两个主要带 1 和 2,而且大致都有 5 个带,只是在含量上有差别;从带 2 的含量上看,三者有较大差异。

红文鱼、红龙睛和红头蛋鱼与鲫相比,差别就很大了:(1)红文鱼的谱带在大致相当于鲫的带 4 处,分为两个带 4a 和 4b;(2)红龙睛谱带相当于鲫的带 2、3 两处几乎合为一个带(带边缘分界不清);带 4 处分为 3 个带:4a、4b、4c;(3)红头蛋鱼谱带相当于鲫带 4 处分为 4a、4b、4c 三带。野生鲫通过金鲫发展为草金鱼,再向不同方向分化出文、龙、蛋等品系[李 璞 1959]。上

述结果同金鱼演化关系是一致的。

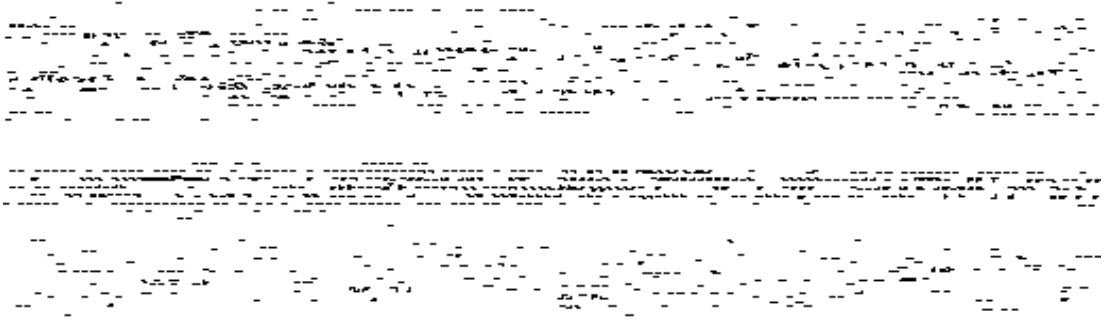


图1 醋酸纤维薄膜电泳图谱

Fig. 1 Cellulose acetate membrane electrophoresis grams

2.2 SDS—聚丙烯酰胺电泳结果分析

用鸡的肌肉蛋白作分子量标记蛋白[平林民雄等 1988]。为了便于分析,将电泳图谱按分子量分为 I~V 五个区,鲫和几个金鱼品系多数区带是相同的,仅有几条带不同(图 2)。

(1) I 区(分子量 $\geq 200\text{kd}$):各品系都出现 I_1 、 I_2 、 I_3 三组极细微的多重带,看不出显著差异;(2) II 区(分子量 $67 \sim 200\text{kd}$):分子量稍大于 67kd 处有 2~3 条带,但各品系有差异。在鲫中,有三条明显的带 II_1 、 II_3 和 II_5 ;在金鲫中是 II_2 、 II_4 和 II_5 ;在草金鱼和红文鱼中是 II_1 、 II_2 和 II_5 ;在红龙睛与红头蛋鱼中是 II_3 和 II_5 ,分辨不出第三条带。因此,鲫和 5 个品系金鱼在电泳带的迁移率(反映了蛋白成分分子量)上有差别;(3) III 区(分子量 $43 \sim 67\text{kd}$):鲫和各品系金鱼在分子量稍小于 67kd 处都有两条带 III_1 和 III_2 ,除金鲫中 III_2 是双重带外,其余 4 个品系和鲫完全一样;(4) IV 区($25 \sim 43\text{kd}$):在红文鱼有清晰的 IV_1 带,而其余品系与鲫除在该处附近分辨不清的浅带(看不出差别)外,未出现这条清晰带;(5) V 区($13.7 \sim 25\text{kd}$):各品系及鲫均有分子量约为 25kd 的带,但红龙睛与红头蛋鱼的这条带 L_1 比其他鱼的 L_2 分子量稍大。

将上述考虑到的有差别的带($II_1 \sim II_5$, IV_1 , L_1 和 L_2)都算在内,用公式: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 表示,其中 N_x 和 N_y 分别是品系 x 和 y 的电泳带数,而 N_{xy} 是二者共有带数。计算各金鱼品系与鲫的相似系数 F [Aquadro 和 Avise 1981] 如下:

金鲫对鲫 $F_{12} = 2 \times 1 / (3 + 3) = 0.33$ (双重带 III_2 算作一条带),



图2 血清蛋白 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 2 SDS—polyacrylamide gel electrophoresis—grams of serum proteins

草金鱼对鲫 $F_{13} = 2 \times 1 / (3 + 3) = 0.33$
 红文鱼对鲫 $F_{14} = 2 \times 1 / (3 + 4) = 0.29$
 红龙睛对鲫 $F_{15} = 2 \times 0 / (3 + 2) = 0$
 红头蛋鱼对鲫 $F_{16} = 2 \times 0 / (3 + 2) = 0$

从相似系数看, 金鲫和草金鱼与鲫相似程度最大, 红龙睛和红头蛋鱼同鲫相似性最小。几个金鱼品系按同鲫由亲到疏的次序可能是: (1)金鲫和草金鱼、(2)红文鱼、(3)红龙睛和红头蛋鱼。

2.3 双向免疫扩散结果分析

图3是双向免疫扩散示意图。表1是兔抗鲫血清效价测定结果。对照兔0呈阴性结果; 由于兔1第四次免疫8~10天后反应活性下降, 故弃去不用; 兔2在各次测试中血清效价呈上升趋势, 在第四次免疫后10、12、14天, 效价保持在1:32, 于是用这样的抗血清进行实验。每次冰冻后的抗血清经5 000 r/min离心, 只使用一次。

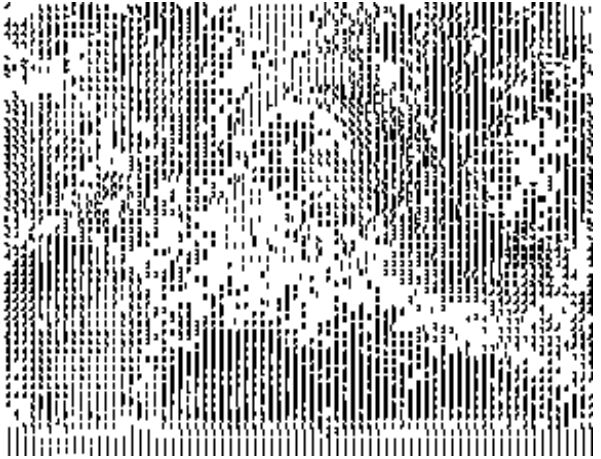


图3 双向免疫扩散结果示意图
 (除右下方一组外都有反应沉淀)

Fig. 3 Photos the results of dual directional immune diffusion
 (Each group but the bottom right one produces sediment)

表1 兔抗鲫血清效价的测定

Tab. 1 Efficacy estimate about anti-crucian carp serum from rabbit

动物	时间	抗血清的稀释度						
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
实验兔1	三次免疫后5天	+	+	+	-	-	-	-
	四次免疫后6天	+	+	+	-	-	-	-
	四次免疫后8天	+	+	+	+	-	-	-
	四次免疫后10、12、14天	+	+	+	-	-	-	-
实验兔2	三次免疫后5天	+	+	+	-	-	-	-
	四次免疫后6天	+	+	+	-	-	-	-
	四次免疫后8天	+	+	+	+	-	-	-
	四次免疫后10、12、14天	+	+	+	+	+	+	-
对照兔0	未免疫	-	-	-	-	-	-	-

用抗原血清稀释法测得的各实验鱼的效价是: 鲫 $1/2^{19}$, 金鲫 $1/2^{16}$, 草金鱼 $1/2^{14}$, 红文鱼 $1/2^{11}$, 红龙睛 $1/2^{13}$, 红头蛋鱼 $1/2^{13}$ (表2)。由于抗体、抗原都未经纯化, 故常出现多条沉淀线。由此得知各实验鱼由亲到疏与鲫的关系次序是: (1)金鲫、(2)草金鱼、(3)红龙睛和红头蛋鱼、(4)红文鱼。

表 2 双向免疫扩散试验的结果

Tab. 2 The results of dual directional immune diffusion

抗血清稀释度	抗血清效价(对应于相应实验鱼)					
	鲫	金 鲫	草金鱼	红文鱼	红龙睛	红头蛋鱼
1:2 ²⁰	—	—	—	—	—	—
1:2 ¹⁹	+	—	—	—	—	—
1:2 ¹⁸	+	—	—	—	—	—
1:2 ¹⁷	+	—	—	—	—	—
1:2 ¹⁶	+	+	—	—	—	—
1:2 ¹⁵	+	+	—	—	—	—
1:2 ¹⁴	+	+	+	—	—	—
1:2 ¹³	+	+	+	—	+	+
1:2 ¹²	+	+	+	—	+	+
1:2 ⁰⁻¹¹	+	+	+	+	+	+

2.4 对流免疫电泳结果分析

对照兔的血清与各实验鱼血清均呈阴性反应。稀释度为 1:2^x 的抗血清与各实验鱼的血清反应时,用抗原稀释法测得的效价如下:x=4 时,各实验鱼抗原血清效价都不低于 1:2⁹;x=5 时,鲫不低于 1:2⁹,金鲫的是 1:2⁸,草金鱼的是 1:2⁷,红文鱼、红龙睛和红头蛋鱼呈阴性反应;x=6 时,各实验鱼均呈阴性反应(表 3)。

由于对流免疫电泳用电场限制了抗原、抗体的自由扩散,所以比扩散法敏感得多。对流电泳结果显示各品系金鱼同鲫的关系由亲到疏的次序是:金鲫、草金鱼,然后是红文鱼、红龙睛和红头蛋鱼。

表 3 对流免疫电泳的结果

Tab. 3 The results of convective immune electrophoresis

抗血清稀释度	抗原血清稀释度	反 应 效 价					
		鲫	金鲫	草金鱼	红文鱼	红龙睛	红头蛋鱼
1:2 ⁶	1:2 ⁰⁻⁹	—	—	—	—	—	—
1:2 ⁵	1:2 ⁹	+	—	—	—	—	—
	1:2 ⁸	+	+	—	—	—	—
1:2 ⁴	1:2 ⁰⁻⁷	+	+	+	—	—	—
	1:2 ⁰⁻⁹	+	+	+	+	+	+

3 讨论

金鱼的几个品系(金鲫是最“原始”品系,草金鱼类草种鱼,红文鱼类文种鱼,红龙睛属龙种鱼,红头蛋鱼类蛋种鱼)以及它们和鲫(野生鲫是中国金鱼的祖先)间抗原相似性很大,同时也可检测出它们间不同程度的差别。金鱼自野生鲫起源后,仍处在鲫种内,但品种的分化看来在血清蛋白成分及抗原性上是可测的。

从电泳和免疫反应结果看,与鲫亲缘关系最近的是金鲫和草金鱼,尤其是金鲫属于从野生鲫到金鱼的中间环节;其余三个品系(红文鱼、红龙睛和红头蛋鱼)同鲫关系较远。这与陈桢[1959]和徐金生等[1981]的结论相符。

聚丙烯酰胺电泳得出红文鱼与鲫的关系比红龙睛和红头蛋鱼近;免疫扩散的结果与之不符。这种实验结果或许符合文种鱼是从草金鱼单独分化的一支的看法[李 璞 1959]。另外,

本实验显示红龙睛与红头蛋鱼抗原性没有明显差别。

Matsui[1934]的研究发现金鱼和鲫的血清抗原的反应性相同,说明了它们亲缘关系密切。实际上,金鱼的分化没有超出鲫这一物种。本实验则说明品种分化在血清抗原上有反映,且与分类关系相关。差异的显示是由于抗血清效价相当高。

梁前进和彭奕欣[1994]曾用 SDS—PAGE、等电聚焦和双向电泳方法研究了鲫和上述5个金鱼品系的肌肉蛋白组分,结果表明:它们的肌肉蛋白组分大部分相同,这同本研究中抗原和抗血清在较低稀释度时显示不出品系差异是相符的(各品系和鲫在抗原性上相似程度很高);从等电聚焦和双向电泳的结果显示的部分蛋白成分的差异来看,同鲫亲缘关系最近的是金鲫,其余品系则同鲫亲缘关系远些,同本研究结果也相符。另外,肌肉蛋白分析也显示红龙睛与红头蛋鱼很相似。与本文双向免疫扩散结果不同的是,对肌肉蛋白进行的等电聚焦分析显示红文鱼比红龙睛和红头蛋鱼更加相似于鲫。

免疫血清的产生与免疫动物的生理状况有关,鱼类血液中的蛋白成分跟饥饿、繁殖、季节等有关,抗原抗体反应还存在可逆性[华家桢等1982]。由于抗原—抗体复合物沉淀线,可因抗原或抗体过剩而溶解,免疫扩散、对流电泳都可能出现假阴性反应。所以,要使结论更合实际,实验条件的均一性很重要。正由于每种实验手段都有一定局限性,多种实验方法结合才显得更为重要。

程晓莉同志处理部分文字,谨此致谢。

参 考 文 献

- 王春元,李延龄.1983.我国现有的金鱼品种的分类及其系统发育的探讨.动物学报,29(3):267~277.
- 北京师范大学生物系生物化学教研室.1982.基础生物化学实验.北京:高等教育出版社.48~49,116~119.
- 华家桢,奚国良,易庆成.1982.实用蛋白质化学技术.上海科学技术出版社.9~15.
- 龙振洲.1996.医学免疫学(第二版).北京:人民卫生出版社.204~206.
- 李 璞.1959.我国金鱼的品种及其在系统发生上的关系.动物学杂志,6:248~251.
- 陈 桢.1959.金鱼的家化与变异.北京:科学技术出版社.1~45,133~135.
- 徐金生,徐世英,厉春鹏.1980.我国的主要金鱼品种.淡水渔业,9(6):21~24.
- 徐金生,厉春鹏,徐世英.1981.中国金鱼.北京:农业出版社.1~9.
- 梁前进.1995.金鱼起源及演化的研究.生物学通报,30(3):14~16.
- 梁前进,彭奕欣.1994.野生鲫鱼和五个金鱼代表品种的肌肉蛋白电泳分析.动物学研究,15(2):68~75.
- 潘文石,陈丽蓉,肖能庚.1982.大熊猫与各种动物的血清学研究.北京大学学报,(1):79~88.
- 平林民雄,大石正道,宫崎淳一.1988.厂ガロース.アクリルアミド2次元電気泳動法——細胞の全タンパク質分析のために.化学と生物,26(8):536~541.
- Aquadro C F, Avise J C. 1981. Genetic divergence between rodent species assessed by using two dimensional electrophoresis. Proc Ncad Sci USA, 78(6):3784~3788.
- Matsui Y. 1934. Genetical studies on goldfishes of Japan. Jour of Imp Fisheries Inst, 30:1~96.

AN EXPLORATION ON THE ANTIGENICITY OF THE SERUM OF SEVERAL STRAINS OF GOLDFISHES FROM CHINA

LIANG Qian-Jin, PENG Yi-Xin

(Department of Biology, Beijing Normal University, 100088)

ABSTRACT Cellulose acetate membrane and SDS—polyacrylamide gel electrophoresis were used to compare the serum components among crucian carp and several strains of goldfishes (gold crucian, grass goldfish, red wen goldfish, red dragon-eye goldfish and red oval goldfish) from China. Furthermore, these strains were analysed by dual immune diffusion and convective immune electrophoresis in which anti-crucian carp serum from rabbit was used. The results are as follows: (1) The serum components and antigenicity of crucian carp and these strains of goldfishes are similar in a high degree. (2) It is demonstrated that there are some differences in these fishes by the analysis of electrophoretic grams and the determination with highly efficient anti-serum. These differences considerably are consistent with the evolutionary positions among these fishes.

KEYWORDS *Carassius auratus* Var., Serum, Antigenicity, Electrophoresis