

岳鲤(荷包红鲤♀×湘江野鲤♂)及其双亲的血红蛋白和血清蛋白的研究*

李万程 刘 筠

(湖南省生物研究所鱼类发育生物学研究室, 长沙)

提 要

岳鲤及其双亲有相似的血红蛋白电泳带谱;双亲的血清蛋白电泳结果存在差异,表现在主带和弱带上;F₁代岳鲤表现了亲本的血清蛋白,B₁区主带偏父本,B₂区主带除其中一条外均与母本相同。性别之间、个体之间的差异可辨。作者认为血清蛋白可用来作为鱼类育种中区别双亲、亲本及后代的遗传标记。

自从1945年 Deutsch & Grodloe^[8] 和 Moore^[12] 起始研究鱼类的血清和血浆蛋白电泳类型以来,已有不少研究者在这方面进行了工作。Hun^[13], Mawdesley-Thomas^[12]、Booke^[9] 及 Harris^[11] 等对此进行了很好的总结。纵观各作者之结果,其研究大都集中在两个方面:一是各种不同动物的血清(或血浆)蛋白电泳图谱的异同比较;二是某一特定鱼类的血清(血浆)蛋白成分的确定。前者的研究主要目的在于探讨各种动物的分类地位,然而近年来,在鱼类的杂交育种中,利用特定的血清蛋白电泳图谱作为标记来鉴定亲本、确定杂交后代已取得了积极的效果^[16]。后者的研究目的在于探讨鱼类的代谢及其与外环境作用的效应,即血清蛋白与温度、季节等因子变化的关系。

有关鲤鱼血清蛋白的电泳分析,陆续都在报道^[8,9,10,14,15]。所采用的分离介质不同,其结果也不一致。作者用 CS910 双波长扫描仪扫描、用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离岳鲤及其双亲的血红蛋白和血清蛋白,旨在研究岳鲤及其双亲的生化标准,并探讨它们在鱼类育种中作为鉴定亲本和后代标记的有效性。

材 料 和 方 法

1. **材料来源** 母本荷包红鲤和岳鲤均取自长沙市郊区岳麓渔场,为1—3龄鱼。湘江野鲤取自湘阴县东湖渔场,为1—4龄鱼。3种鱼雌、雄个体共55尾。实验鱼运回实验室后暂养,一周内全部用于实验。

2. **样本制备** 血红蛋白制备按 Ореховит^[4] 所介绍的方法进行。提取血红蛋白时,

* 本文系1985年由湖南省农业厅主持,鉴定的科研课题材料之一,本工作由湖南省水产局资助。
1985年10月28日收到。

用含有肝素的 5 毫升注射器抽取鱼的尾动脉血液 3 毫升,转入离心管中离心 15 分钟,弃去离心液,用 3 倍于红血球体积的生理盐水洗涤 3 次,摇匀,1000g 下离心 15 分钟。向红血球中添加等体积的水和氯仿,然后把混合物剧烈地搅匀 5 分钟,1000g 下离心 1 小时,红血球溶解物用微量注射器吸出保存在封口的青霉素瓶中,置于冰箱。72 小时内全部完成样品分析。

用 5 毫升注射器抽取 2—3 毫升血液转入小指瓶中静置 2—4 小时,待淡黄色血清析出后,用 1 毫升注射器吸出移入青霉素瓶中,置于冰箱。72 小时内完成样品分析。

3. 电泳分离 按李万程^[1]的方法电泳。分离血红蛋白的丙烯酰胺浓度为 2.5%,分离血清蛋白丙烯酰胺的浓度为 7.5%。

4. 染色及扫描 电泳完毕后,用考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染血红蛋白,用氨基黑 10B 染血清蛋白。染色于 37℃ 恒温条件下,持续 2 小时。考马斯亮蓝染色后毋须脱色,即可保存于 7% 的醋酸溶液中。氨基黑 10B 染色后,用 7% 的醋酸脱色,其后存于冰箱中。

分离得到的血红蛋白和血清蛋白图谱经 CS 910 双波长扫描仪扫描以确定电泳带的数目。

结 果

1. 血红蛋白电泳分离图谱

岳鲤及其双亲的图谱基本相同(图 1a, b),在 2.5% 的聚丙烯酰胺胶浓度下,分离出 3 条蛋白带。

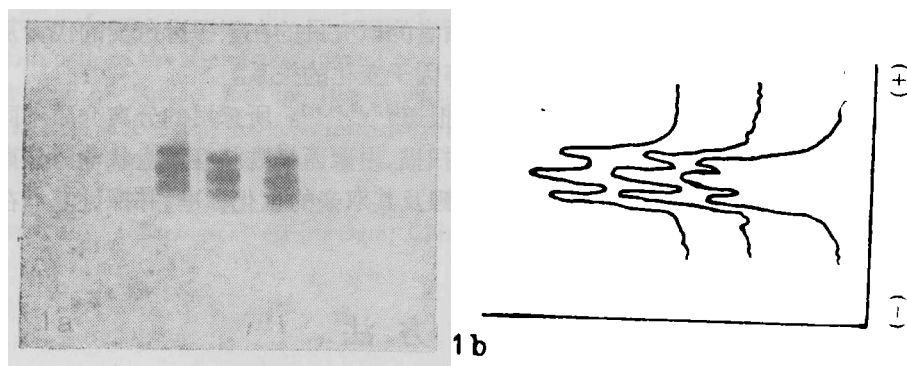


图 1a 血红蛋白电泳图谱(左:荷包红鲤:中:岳鲤:右:湘江野鲤)

Fig. 1a. Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of hemoglobins (left: *Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*; middle: Hybrid Yue-carp; right: *Cyprinus carpio xianjiangensis*)

图 1b 血红蛋白扫描图谱(顺序同上)

Fig. 1b: Densitometric scanning pattern of hemoglobins (arranged as Fig. 1a.).

2. 血清蛋白分离结果

为了便于比较,按照从阴极到阳极的方向,把 3 种鱼的血清蛋白电泳图谱对应地分为

3 个区(图 2—4), 以 B_1 、 B_2 和 B_3 表示。同时, 结合扫描结果和直接观察, 把染色相对较深的蛋白带称为 MA 带 (Major Band), 染色相对较浅或微弱的带叫 MI 带 (Minor Band)。

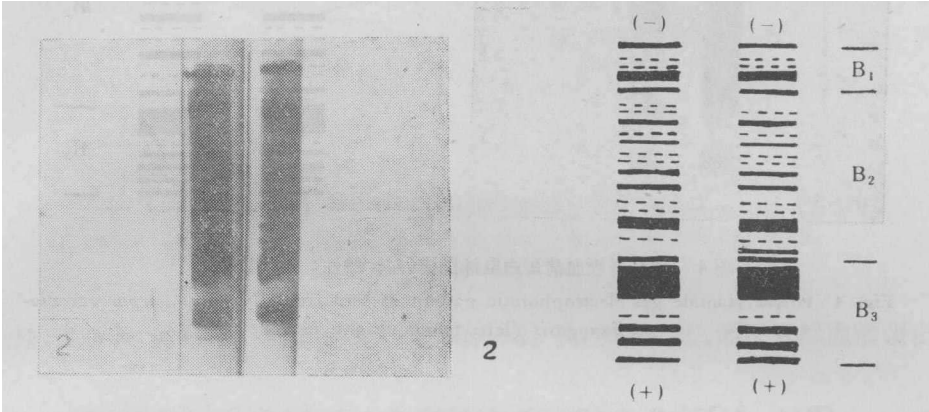


图 2 荷包红鲤血清蛋白电泳图谱(左: 雌性; 右: 雄性)

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of sera from *Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis* (left: female; right: male)

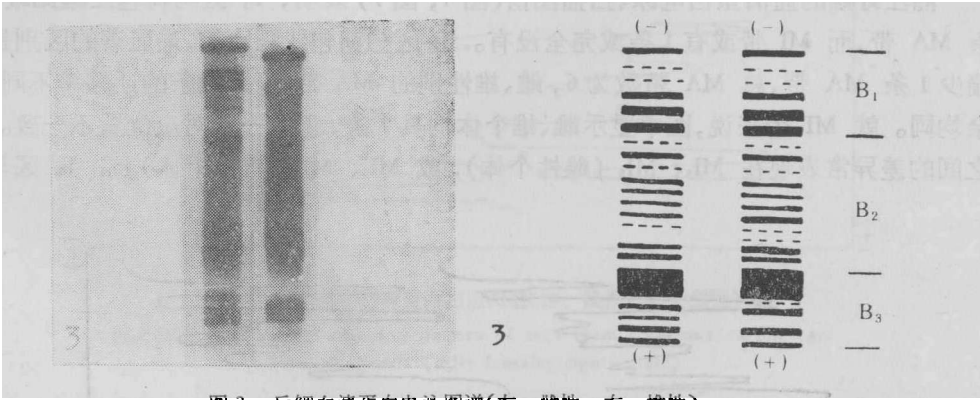


图 3 岳鲤血清蛋白电泳图谱(左: 雌性; 右: 雄性)

Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of sera from Hybrid Yue-carp (left: female; right: male)

荷包红鲤的血清蛋白电泳、扫描图谱(图 2, 图 5)表明, 在 B_1 区有 3 条 MA 带, 两条 MI 带(分别用实、虚线标于图上), 第 2、3 条带(方向同前面所述)常分离得不明显。 B_2 区的情况较复杂。雌、雄性别之间常在此区表现差别。雄性个体有 7 条 MA 带, 雌性个体则只有 6 条 MA 带, 比雄性少了一条, 其位置相当于雄性个体的第 6 条 MA 带。其它 MI 带数相同, 均为 7 条左右。个体之间的差异常表现在此区的 MI_1 、 MI_4 (雌性个体),

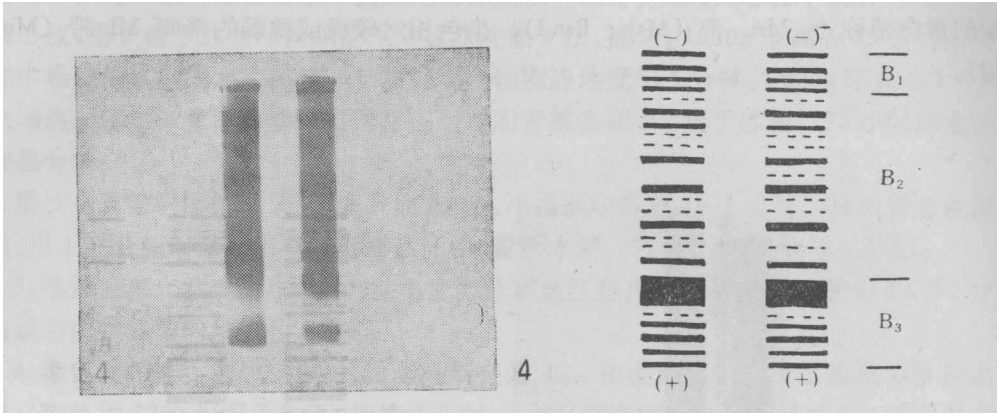


图4 湘江野鲤血清蛋白电泳图谱(左:雌性;右:雄性)

Fig. 4 Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of sera from *Cyprinus carpio* var. *xiangjiangensis* (left: female; right: male)

和 MI_3 、 MI_6 (雄性个体)上。 B_3 区与 B_1 区相比,雌、雄个体之间均有 4 条 MA 带, 1 条 MI 带。根据分析的全部样本,综合 B_1 、 B_2 、 B_3 区,荷包红鲤血清蛋白公式为:

$$\sigma, B_1 (3MA, 2MI) + B_2 (7MA, 7 \pm MI)^* + B_3 (4MA, 1MI)$$

$$\varphi, B_1 (3MA, 2MI) + B_2 (6MA, 8 \pm MI) + B_3 (4MA, 1MI)$$

湘江野鲤的血清蛋白电泳、扫描图谱(图 4, 图 7)表明, B_1 区与荷包红鲤比较,多 1 条 MA 带,而 MI 带或有 1 条或完全没有。 B_2 区与荷包红鲤比较,最显著的区别是阳极端少 1 条 MA 带,总 MA 带数为 6,雌、雄性别的 MA 带,除第六条的迁移率不同外,其余均同。就 MI 带来说,图中显示雌、雄个体均具 7 条,但有一条对应位置不一致。个体之间的差异常表现在 MI_3 、 MI_6 (雌性个体),或 MI_3 、 MI_6 (雄性个体)上。 B_3 区与荷包

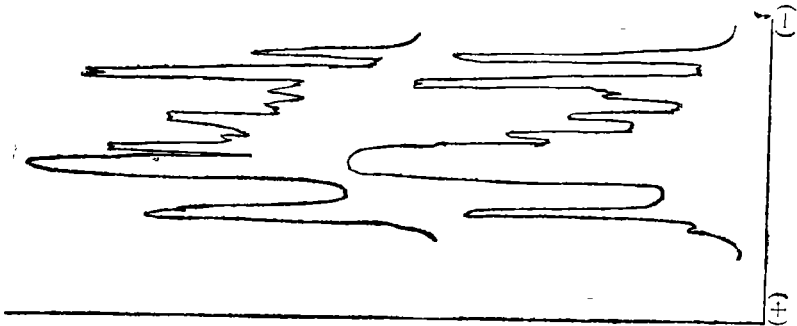


图5 荷包红鲤血清蛋白扫描图谱(左:雌性;右:雄性)

Fig. 5 Densitometric scanning pattern of sera from *Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis* (left: female; right: male)

* $7 \pm MI$ 表示 7 条左右的 MI 带,即有的个体多于 7 条,有的个体少于 7 条,下同。

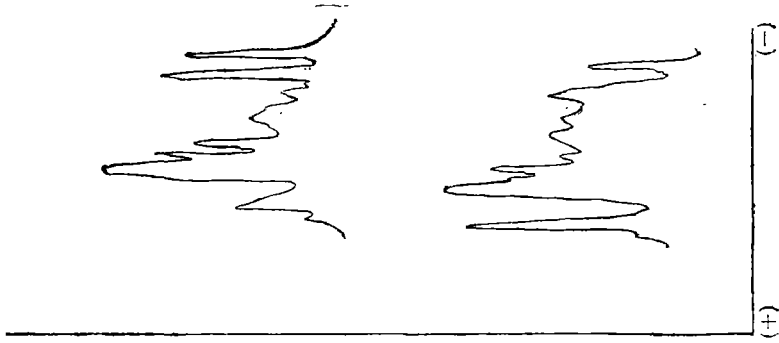


图6 岳鲤血清蛋白扫描图谱(左: 雌性; 右: 雄性)

Fig. 6 Densitometric scanning pattern of sera from Hybrid Yue-carp (left: female; right: male)

红鲤比较,多1条 MA 带。综合所分析样本的 B_1 、 B_2 和 B_3 区,湘江野鲤血清蛋白公式为:

$$\begin{aligned} \text{♂, } & B_1 (4MA, 1 \pm MI) + B_2 (6MA, 7 \pm MI) + B_3 (5MA, 1MI) \\ \text{♀, } & B_1 (4MA, 1 \pm MI) + B_2 (6MA, 7 \pm MI) + B_3 (5MA, 1MI) \end{aligned}$$

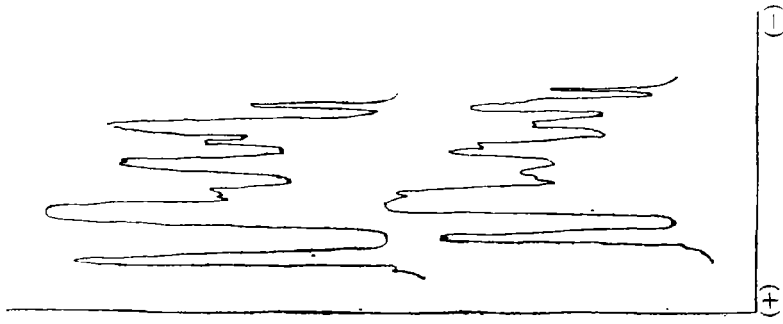


图7 湘江野鲤血清蛋白扫描图谱(左: 雌性; 右: 雄性)

Fig. 7 Densitometric scanning pattern of sera from *Cyprinus carpio* var. *Xiangjiangensis* (left: female; right: male)

岳鲤的血清蛋白分离结果如图3、图6所示。 B_1 区与父本 MA 带相同,但比父本多1—2条 MI 带。 B_2 区,阳极 MA 带(第七、八条)与母本相同,但在中间比母本多1条 MA 带(位于荷包红鲤的第三、四 MA 带之间),故 MA 带总数为8。MI 带在雌雄个体之间有差别,雌性个体少1条阳极 MI 带。此区 MI 带与亲本的比较,明显减少。个体之间的变化表现在 MI_2 上。 B_3 区雌性个体多1条 MA 带外。综合全部样本的 B_1 、 B_2 和 B_3 区,岳鲤的血清蛋白公式为:

$$\begin{aligned} \text{♂, } & B_1 (4MA, 2 \pm MI) + B_2 (8MA, 3 \pm MI) + B_3 (4MA, 1MI) \\ \text{♀, } & B_1 (4MA, 2 \pm MI) + B_2 (8MA, 2 \pm MI) + B_3 (5MA) \end{aligned}$$

讨 论

1. 岳鲤及其双亲血红蛋白、血清蛋白电泳特性

前人在鱼类的血红蛋白电泳分析中,根据电泳所反映的泳动率 (Motility) 之差别,把血红蛋白分成 1—3 种成分^[2]。桥本和松浦^[2] 1959 年分析鲤鱼的血红蛋白,得出不同的个体既有包括 1 个成分的,也有包含两个成分的。就两个成分的情况来说,Ⅰ为 73%,Ⅱ为 27%。作者分析岳鲤及其双亲的血红蛋白,在丙烯酰胺浓度为 3.5% 的情况下,均为 1 个成分;当丙烯酰胺浓度降为 2.5% 时,其电泳结果为 3 条电泳带 (图 1),其百分比分别是:Ⅰ 29%、Ⅱ 43%、Ⅲ 28%,其中 Ⅱ 总是占有较高的百分比。已知血红蛋白是大分子蛋白质。人体正常红细胞中有 3 种四聚体,即 H_bA 、 A_z 和 F 。这些四聚体均由两对肽链构成,其中一对是 α 链,另一对分别是 β , δ 和 γ 链^[3]。与人体血红蛋白比较,鱼类的血红蛋白也是由组蛋白 (Histone)、珠蛋白 (Globin) 以及含铁的载色基团正铁血红素 (Heme) 等组成的色素蛋白体。其差别表现在珠蛋白上。鱼类的珠蛋白具有较多的异亮氨酸,而组氨酸偏少^[2]。因此,当岳鲤及其双亲的血红蛋白在电场中泳动时,由于分子大的特性,在高浓度电泳介质条件下很难分开。在 2.5% 的丙烯酰胺条件下,分出的 3 种成份很可能是 3 种不同的四聚体而非同一四聚体亚单位的分离。

许多学者对鲤鱼的血清蛋白进行过电泳分析。Moore^[15]、Deutsch & Gooloe^[8] 用介面移动电泳 (Moving-Boundary Electrophoresis) 把鲤鱼的血清蛋白分离出前清蛋白 (Pre-albumin)、清蛋白 (Albumin)、二种 α -球蛋白 (α -Globulin)、一种 β -球蛋白和一种 γ -球蛋白。Sorvachev^[9]、Lysak & Wojcie^[19] 和 Fujiya^[14] 用纸电泳分析鲤鱼的血清蛋白,分出 4—9 种成分。作者用 7.5% 的聚丙烯酰胺凝胶分离岳鲤及其双亲的血清蛋白得到 20 种以上的蛋白成分,分出了更多的清蛋白和球蛋白因子,有利于找出种间、种内不同群体之间的差别。岳鲤及其双亲的血清蛋白电泳图谱表明:它们共同的特点是清蛋白所占的比重大,前人用纸电泳分离鲤鱼的血清蛋白也得到同样的结果 (48.7%)。根据 Nakayawa^[17] 的研究,清蛋白是一种脂蛋白。

电泳结果表明:同一种鱼雌、雄性别之间血清蛋白图谱有差异,表现在 MA 和 MI 带上:一是 MA 或 MI 带的有无;二是 MI 带的相对位置。个体之间的差异则集中在 MI 带上。亲本之间的差异则主要表现在 MI 带上,其中 B_1 区的阳极 MA 带是区别亲本的最好标志。 F_1 代与亲本比较 MA 带增多,而 MI 带减少。成熟个体的血清蛋白在不同的年龄无 MA 带变化,MI 带变化可从个体间的差异中反映出来。作者没有做季节性变化的对比实验。根据斋藤^[18]在鲤鱼中作的实验,其血清蛋白分离图谱无质的差异。

2. 血红蛋白和血清蛋白电泳分析在鱼类育种中的作用

Ligny^[7] 报道过,利用血红蛋白可以把不同种群的鱼鉴别出来。然而岳鲤及其双亲的血红蛋白分离图谱则表现出相反的结果。Cristini^[6] 曾用淀粉胶分离过竹筴鱼 (*Trachurus trachurus* L.) 不同种群的血红蛋白,得出的结果是,所有的种群都表现为 6 条区带。这似乎表明,把血红蛋白遗传多态性作为遗传标记要在某些种内区别种群是困难的。

由上述实验结果表明: 岳鲤及其双亲的血清蛋白在相同介质同一浓度下, 各有其特征性的血清蛋白电泳谱。因此, 利用血清蛋白电泳图谱来鉴别亲本和后代是十分有效的。

参 考 文 献

- [1] 李万程, 1985. 草鱼、三角鲂及其杂交一代的乳酸脱氢酶电泳分析. 湖南师范大学学报(自然科学版), (1): 31—35.
- [2] 许学龙等译(尾崎久雄著), 1982. 鱼类血液与循环生理. 48—52. 上海科学技术出版社.
- [3] 曾溢滔, 1981. 蛋白质和核酸遗传病. 61 页. 上海科学技术出版社.
- [4] 袁厚积、赵邦骅译 (Ореховит, В. Н., 著), 1980. 现代生物化学方法. 228 页. 人民教育出版社.
- [5] Booke, H. E., 1964. A review of variations found in fish serum proteins. *N. Y. Fish Game J.*, 11: 47—57.
- [6] de Cristini, F. and G. Graziosi., 1976. Electrophoretic analyses and denaturation tests of the haemoglobins of *Trachurus trachurus* (L.) *J. Fish. Biol.*, 9: 401—403.
- [7] de Ligny, W., 1969. Serological and biochemical studies on fish populations. *Oceangr. Mar. Bio. Ann. Rev.*, 1(7): 411—513.
- [8] Deutsch, H. F. and M. B. Goodloe, 1945. An electrophoretic survey of various animal plasmas. *J. Biol. Chem.*, 161: 1—20.
- [9] Deutsch, H. F. and W. H. McShan., 1949. Biophysical studies of blood plasma proteins-XII. Electrophoretic studies of the blood serum proteins. *J. Biol. Chem.*, 180: 219—234.
- [10] Fujiya, M., 1961. Use of electrophoretic serum separation in fish studies. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 33: 250—257.
- [11] Harris, J. E., 1971. Some aspects of the immune response of cyprinid fish with particular reference to their helminth parasites. Ph. D. thesis, University of Exeter. p9—11.
- [12] Hawkins, R. I. and L. E. Mawdesley-Thomas, 1972. Fish haematology-a bibliography. *J. Fish Biol.*, 4: 193—232.
- [13] Hunn, J. B., 1967. Bibliography on the blood chemistry of fishes. Res. Rep. U. S. Fish Wildl. Serv., 72: 1—32.
- [14] Lysak, A. and K. Wojcik, 1960. Electrophoretic investigations on the blood of carp fed with food containing various amounts of protein. *Acta Hydrobiol. Krakow*, 2: 49—61.
- [15] Moore, D. H., 1945. Species differences in serum protein patterns. *J. Biol. Chem.*, 161: 21—32.
- [16] Mova, R., Brody, T., Wohlfarth, G. and G. Hulata, 1976. Applications of electrophoretic genetic markers to fish breeding. I. Advantages and Methods. *Aquaculture*, 9: 217—218.
- [17] Nakagawa, H., Kayama, M. and S. Asakawa., 1976. Biochemical studies on carp plasma protein-I. Isolation and nature of an albumin. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 42(6): 677—685.
- [18] Saito, K., 1957. Biochemical Studies on the Fish Blood—VIII. on the Electrophoretic Specificity of Serum Proteins. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 22(12): 752—759.
- [19] Sorvachev, K. F., 1957. Changes in proteins of carp blood serum during hibernation. *Bioķhimiya*, 22: 872—877.

**STUDIES ON THE HEMOGLOBINS AND SERA OF HYBRID
YUE-CARP (*CYPRINUS CARPIO* VAR. *WUYUANENSIS*
♀, *CYPRINUS CARPIO* VAR. *XIANGJIANGENSIS* ♂)
AND ITS PARENTS.**

Li Wancheng and Liu Yun

(Laboratory of Developmental Biology of Fishes, Hunan Biology Research Institute, Changsha, Hunan, China)

Abstract

In combination with the scanning of CS 910 doublewave-length scanner, the hemoglobins (Hb) and sera of hybrid Yue-carp and its parents were analyzed with the polyacrylamide gel disc electrophoresis. The following results were obtained: i). Both hybrid Yue-carp and its parents had the similar electrophoretic spectra of Hb. ii). The sera between the parents were different in some major and minor bands. iii). The hybrid Yue-carp had the same major bands of serum as that of paternal fish in B₁ area and maternal fish in B₂ area, except for one major band. iv). The differences between sexes and among individuals were also detectable.

From above, it seems justified that serum can be used as a genetic marker to distinguish the male and female parents, as well as the parents and their hybrid during the process of fish breeding.

Key words Carp, hybridization, hemoglobin, serum, electrophoresis