



鱼类雌性特异蛋白的分离与生化检验及其促进 鱼类繁殖能力的研究*

刘荣臻 王浩

(南京大学生物系, 210008)

STUDIES ON ISOLATION AND BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF FEMALE-SPECIFIC PROTEIN IN FISHES AND ITS PROMOTIVE EFFECT ON THE PROPAGATION RATE OF FISH

Liu Rongzhen and Wang Hao

(Department of Biology, Nanjing University, 210008)

关键词 雌性特异蛋白, 人工繁殖, 性腺

Key Words Female-specific protein, Artificial propagation, Gonad

Aida (1973) 首先报道了雌性香鱼的血清中含有雌性特异蛋白。Nath 等 (1981) 也报道了雌性鲢鱼的雌性特异蛋白的分离和鉴定。Wallace (1974) 论述了卵黄蛋白原(即雌性特异蛋白)在肝脏合成及在激素的作用下通过血流进入性腺的过程^[1-11]。作者自 1980 年以来先后报道过 10 种海水及淡水雌性鱼类血清中含有雌性特异蛋白, 对雌性特异蛋白各种氨基酸的含量和组成^[3-4]以及物理化学的特性也进行了分析测定, 并开展了应用雌性特异蛋白的科学实验。

材 料 和 方 法

应用 D 型凝胶大柱制备的电泳槽¹⁾。分离胶浓度为 5.6%, 浓缩胶浓度为 3.4%。将鱼的组织(血清则免去打碎步骤)、性腺、肝等经捣碎机打碎后, 用 1% 氯化钠稀释成 1:4 (重量: 体积), 再经过 1000r/min 冷冻离心 15min, 留上清液电泳。上

样体积为 3ml, 温度 4℃, 用 50 mA 稳流电泳, 经 tris-甘氨酸缓冲液循环, 电泳持续 44h。当溴酚蓝指示剂到达胶底时, 用部分收集器收集电泳液, 用紫外分光光度计在 280nm 测光吸收值。根据吸收曲线, 选出雌性特异蛋白, 再经电泳检查其纯度。同时, 应用生物化学方法测定其含磷量及蛋白质总氮含量(微量克氏定氮法 Micro-Kjeldahl)^[12], 并对提出的雌性特异蛋白进行了物理和化学性质的测定及红外线光谱分析。作者用雌鱼的性腺中提出的雌性特异蛋白对成熟的鲫、鳊等雌鱼进行腹腔注射(注射液系冻干的雌性特异蛋白提出物溶于生理盐水)注射 1—2 天后, 开始对其性腺发育及鱼苗的孵化等进行观察。

* 郑元文同志帮助雌性特异蛋白的部分工作, 特此表示感谢。

1) 华东师范大学、上海锦华实验器械厂研究生产。
1988 年 9 月 30 日收到。

实 验 结 果

(一) 纯雌性特异蛋白的理化特性的检查

雌性特异蛋白经理化处理, 其含磷 0.89%, 含氮 7.23%; 在紫外光 280nm 波长有吸收峰, 用电感耦合等离子直读光谱仪 (Icp) 分析, 其中每 ml 含 Ca 8.86 ppm、Al 7.04 ppm、Cu 0.16 ppm、Fe 3.34 ppm、P 163.4 ppm; 血清内雌性

特异蛋白和卵巢内的雌性特异蛋白在电泳带上迁移有些差别, 卵巢 FSP 电泳带迁移快, 这说明分子含量是有差异的。

(二) 雌性特异蛋白促进蟾蜍体外排卵

做蟾蜍离体排卵实验时发现雌性特异蛋白比蟾蜍的脑垂体、绒毛膜促性腺激素及释放素激素¹⁾的效果都明显^[1], 多次重复实验证明, 雌性特异蛋白(复合物)刺激蟾蜍排卵效果最好; 用生物统

表 1 鱼雌性特异蛋白促进蟾蜍体外排卵实验

Tab. 1 FSP effects on ovulation in vitro in the toad

实验/组别 Experiment/ group	剂 量 Dose (mg/ml or ml/ml)	卵总数 The whole no. of Egg	排卵数 (24h 内) No. of eggs ovulation in 24 h	排卵率 % of ovulation	统计处理(t:0.05)实验:对照 Statistical treatment (t:0.05) Experiment: control
对照 Control	生理盐水 Ringer Solution 1 ml/12 ml	90	2	2.2	不显著 No obvious effect
蟾蜍垂体 Toad Pituitary	2mg/10ml	90	12	13	$t > t_{0.05}$ 显著 An obvious effect
释放激素 (LH)	1mg/10ml	90	2	2.2	不显著 No obvious effect
绒毛膜促性腺激素 (HCG)	1mg/10ml	90	7	7.7	不显著 No obvious effect
雌性特异蛋白 (FSP)	2mg/10ml	90	15	16	$t > t_{0.05}$ 很显著 An obvious effect

表 2 注射雌性特异蛋白促鲫鱼性腺发育的观察

Tab. 2 Effects on oocyte growth in female *Carassius auratus* by injecting its own FSP solution

鲫鱼的编号 Fish No	体 长 Body length (cm)	体 重 Body weight (g)	注射雌性特异蛋白后 12 天 性腺重 (g) Gonad wt(g) of injected female specific protein after 12 days	注射雌性特异蛋白后 12 天 卵径大小 (μm) Mean oocyte diameter (μm) of injected female specific protein after 12 days
实验组 Experiment				
1	20	242.0	13.3	6.76 ± 8.2
2	21.5	264.3	18.2	7.71 ± 0.68
3	20.3	262.8	15.5	6.8 ± 0.2
4	20	242.5	15.9	5.56 ± 0.62
对照组 Control	体 长 Body length (cm)	体 重 Body weight (g)	注射生理盐水后 12 天 性腺重 (g) Gonad wt(g) of injected only saline solution After 12 days	注射生理盐水后 12 天卵 径大小 (μm) Mean oocyte diameter (μm) of injected saline solution after 12 days
6	19.4	204.7	14.7	5.46 ± 0.62
7	20.5	250.0	12.1	5.94 ± 0.72
8	20	226.2	12.6	5.19 ± 0.54
9	20.4	264.6	14.6	5.49 ± 0.60

1) 释放素激素 (LH), 绒毛膜促性腺激素 (HCG) 均为南京激素厂出品

表 3 注射雌性特异蛋白后对鳊鱼苗孵化率的观察

Tab. 3 Injecting FSP treatment in female *Aristichthys nobilis* and the effects on oocyte growth and hatching rate increase of fish fry

鱼的编号 Fish No.	鱼体量 Body weight(kg)	注射雌性特异蛋白的剂量 Injected female specific protein treatment dose in each fish (ml)	受精率 Fertilization rate (%)	孵化率 Hatching rate (%)	孵苗数 Hatching number
实验组 Experiment 1	10.5	3.5ml (0.3g)	89	89	96 万
2	11	3.9ml (0.35g)	90	90	104 万
对照组 Control 3	10.5	3.5ml(生理盐水)	88	65	55 万
4	11.5	3.5ml(生理盐水)	90	66	60 万

计方法对数据 t 检验 (paired, t-test), 效果明显, 即雌性特异蛋白和对照组比较 ($t > t_{0.05}$) 有显著差异(表 1)。同时发现, 注射雌性特异蛋白能加速脂磷蛋白和高磷蛋白的合成。作者认为, 鳊鲈离体排卵对于测定 FS 蛋白生物活性的效果最为简便适用。

(三) 雌性特异蛋白(复合物)促进性腺发育

对雌性鲫鱼进行腹腔注射雌性特异蛋白复合物 7—10 天后, 取出其卵子在显微镜下测定卵细胞的大小, 并与对照组比较, 其性腺重量及卵母细胞直径的大小都大于对照组, 如表 2 实验组 1、2、

3、4 共观察 138 个卵母细胞, 其卵径平均数为 $5.56 \pm 0.62 - 6.76 \pm 8.2(\mu\text{m})$, 对照组 6、7、8、9 共观察 189 个卵母细胞, 其卵径平均数仅为 $5.19 \pm 0.54 - 5.94 \pm 0.72(\mu\text{m})$; 实验组性腺重量为 $13.3 - 18.2(\text{g})$, 而对照组性腺重量只为 $12.1 - 14.7(\text{g})$ (表 2)。

(四) 雌性特异蛋白(复合物)提高鱼苗孵化率

作者自 1982—1988 年, 在孵化季节, 对江苏 11 个渔场、两个研究所的青、草、鲢、鲤、鳊、梭、黄鳝、对虾等进行腹腔注射雌性特异蛋白的实验, 发

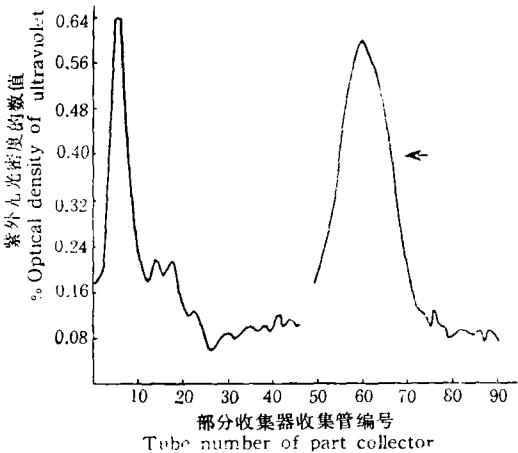


图 1 应用电泳方法提纯的 FSP 的洗脱液、紫外光吸收峰图(第一峰为溴酚蓝溶液的前沿, 第二峰在紫外线波长 280nm 处为 FSP 的吸收峰。)

Fig. 1 Curve of FSP ultraviolet absorption at 280 nm in *Carassius auratus cuvieri* (The first peak is forward position of bromphenol blue solution. Second peak is curve of FSP absorption.)

现其孵化率均可提高 20% 以上(表 3); 在草鱼孵化实验中, 还发现被注射雌性特异蛋白的亲鱼, 产卵后的死亡现象相对减少, 其鱼苗在长途运输中的死亡率也有所下降。

参 考 文 献

- [1] 朱 洗、王幽兰, 1958。蟾蜍体内卵和成熟与体外卵和成熟的比较研究。实验生物学, 6(2): 129—169。
- [2] 朱 检, 1981。生物化学实验。53—120 页。上海科学技术出版社。
- [3] 刘荣臻、王 浩, 1985。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。水产学报, 9(3): 265—273。
- [4] 刘荣臻、王 浩, 1985。黄鲮性别的自然反转现象与血清蛋白关系的初步研究。水生生物学报, 11(1): 22—27。
- [5] Aida, K, Phan-Van-Ngan and Takashi Ibiya 1973. Physiological studies on gonadal maturation of fishes-1 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。
- [6] Nath, P. and Sundararaj, B.I., 1981. Isolation and identification of female-specific serum lipophosphoprotein (vitellogenin) in catfish, *Heteropneustes fossilis*. Gen. Comp. Endocrinol., 43 (2): 184—190
- [7] Wallace, R. A. and Bergink, E. W., 1974. Precursor-product relationship between amphibian vitellogenin and the yolk proteins, lipovitellin and phosvitin. J. Biol. Chem., 249, (9): 2897—2903.