

几种鲑鳟鱼血清蛋白非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的研究*

杨贵强 徐绍刚 王建 高云奇 王占全

(北京市水产科学研究所暨国家淡水渔业工程技术研究中心 北京 100068)

提要 采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法分析了硬头鲑、金鲑、虹鲑、北极红点鲑和溪红点鲑血清蛋白的组成成分及其含量。结果显示,硬头鲑、金鲑和虹鲑三者之间的遗传距离最小,硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与溪红点鲑的遗传距离最大;硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与北极红点鲑处于同一亚组,而溪红点鲑独处于另一亚组。研究结果表明硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与溪红点鲑的亲缘关系远于与北极红点鲑的关系;同时还表明,以聚丙烯酰胺凝胶电泳分析鲑鳟鱼血清蛋白的方法简单易行、重复性好。本研究结果对鲑鳟鱼的种属鉴定、良种选育、品种改良和遗传结构分析提供了试验依据;虹鲑的繁养殖需进一步规范化和标准化,减少蛋白遗传基因的流失,从根本上预防大规模疾病的暴发。
关键词 硬头鲑;金鲑;虹鲑;北极红点鲑;溪红点鲑;血清蛋白;非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳
中图分类号 S91

虹鲑(*Salmo gairdneri*)是鲑鳟鱼的主养品种之一,分陆封型(终生在河川、湖泊中生活)和降海型[即通常指入海生长的硬头鲑],通常所说的虹鲑是陆封型虹鲑,而硬头鲑是降海洄游性的虹鲑(Neal *et al.*, 2007)。金鲑是日本从陆封型虹鲑的突变种选育出的金黄色品系,与虹鲑是同一种鱼类,我国于1996年引进后根据其体色特征命名为“金鲑”。北极红点鲑(*Salvelinus alpinus* Linnaeus)(郑维中等, 2003)和溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis* Mitchill)(杨贵强等, 2009)是我国引进的冷水鱼新品种,两者均体色艳丽,比虹鲑鱼更耐寒,因此备受我国山区渔民的青睐。

血清蛋白的电泳图谱及其量的变化可以反映动物的亲缘关系及健康、营养状况,也可用于动物的疾病诊断。动物血清中含有多种蛋白质,它们各自有独特的结构和分子量,因而在pH相同的同一种缓冲液和同一电场中它们的带电性质和带电量有所不同,通过电泳的方法可将血清中不同种类的蛋白质分离开。国内外许多学者对一些鱼类的血清蛋白进行了电泳分析,发现它们的血清蛋白可分为纤维蛋白原、白

蛋白、 α_1 球蛋白、 α_2 球蛋白、 β_1 球蛋白、 β_2 球蛋白和 γ -球蛋白等多种成分(李万程等, 1986; 李传武, 1991; 张克俭等, 1994; 王军萍等, 2000),且已被证实为白蛋白和多种球蛋白。现代科学证实,动物血清蛋白图谱具有种的特异性,对于建立种质标准和遗传育种具有重要意义。近年来,以蛋白质及同功酶技术探讨基因表达,以及了解生物群体遗传进化规律的研究日益受到人们的重视(王忠华等, 2002; 殷宗俊等, 2005; 安家嘉, 2010; 孙源等, 2010),本文采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对几种鲑鳟鱼的血清蛋白图谱进行了分析,旨在为鲑鳟鱼的种属鉴定、良种选育、品种改良和遗传结构分析提供基础试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用鱼均采自北京市水产科学研究所玉渡山冷水鱼基地。取2龄硬头鲑、金鲑、虹鲑、北极红点鲑和溪红点鲑各10尾,采用梅特勒ML204分析天平在采血前进行体重称量,平均体重分别为(176.5±

* 农业部公益性行业科研专项, 201003055-05号;北京市重大项目, D121100003712002号;农业部都市农业(北方)重点实验室项目, 99124120号。杨贵强, 工程师, E-mail: ygq418@126.com

收稿日期: 2012-06-17, 收修改稿日期: 2012-08-24

8.2)g、(147.5±7.5)g、(145.0±9.6)g、(154.0±6.4)g 和 (121.5±8.4)g, 采样时水温为 12—16℃。

1.2 血清制备

用肝素钠溶液润洗注射器后, 每尾鱼尾部静脉采血约 1mL 置于 1.5mL 试管中, 室温下放置 1h 后, 4℃ 冰箱过夜。待血清充分析出后, 3500r/min 离心 20min, 收集每种鱼的上清液, 混匀后等量分装, -20℃ 冰箱速冻保存。

1.3 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)(汪家政等, 2000; 郭尧君, 2005), 采用分离胶浓度为 7.5%, 浓缩胶浓度为 4%。样品与上样缓冲液以 4:1 混合(上样缓冲液包括 0.3mol/L Tris-HCl, 25% 甘油, 0.05% 溴酚蓝, pH 6.8), 每个泳道上样 10μL, 4℃ 条件下电泳, 恒压 100V 电泳 2h 左右。电泳采用 Min-Protein 型电泳槽(Bio-Rad), 当前沿跑至底部 0.5cm 时停止电泳。取出凝胶放入考马斯亮蓝 R-250 染色液(0.1% 考马斯亮蓝, 45% 甲醇, 10% 冰乙酸)中染色 15min 左右, 再用脱色液(甲醇 乙酸 蒸馏水 = 1 1 8)脱色, 待背景干净后, Bio-Rad 凝胶成像系统拍照保存。蛋白分子量 Marker 采用同样的方法与样品同时电泳来测定蛋白样品的天然状态和各个亚基的分子量。Native-page 高分子量标准: 甲状腺球蛋白(Thyroglobulin, 669kDa), 铁蛋白(Ferritin, 440kDa), 过氧化氢酶(Catalase, 232kDa), 乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, 140kDa)和牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, 66kDa)。

1.4 数据处理

通过美国 BIO-RAD 凝胶成像系统(Gel Doc™ XR+)Image lab 软件对鲑鳟鱼血清蛋白各组分的分子量及其含量进行了计算。鲑鳟鱼血清蛋白的相似系数与遗传距离的计算依据王宗任等(1988)和俞纯方等(1996)的方法, 鲑鳟鱼之间的相似系数 F 和遗传距离 D 的计算公式分别为 $F=2N_{AB}/(N_A+N_B)$ 和 $D=-\ln F$, 其中 N_A 和 N_B 分别为两种间 Rf 值不同的各自的谱带条数, N_{AB} 是两种鱼具有相同 Rf 值谱带的共有条数(俞纯方等, 1996)。用 UPGMA 法对所得数据进行聚类分析。

2 结果

2.1 几种鲑鳟鱼血清蛋白的电泳图谱及分析

参考李传武(1991)的方法, 将鲑鳟鱼血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳胶板从阳极到阴极分为 A、B、C 三个带区(图 1), 鲑鳟鱼血清蛋白各带的分子量与正常人

血清蛋白电泳图谱中各带的分子量相对照, 依次相应分为纤维蛋白原、球蛋白、白蛋白(表 2)。鲑鳟鱼血清蛋白电泳结果比较见表 1 和表 3。

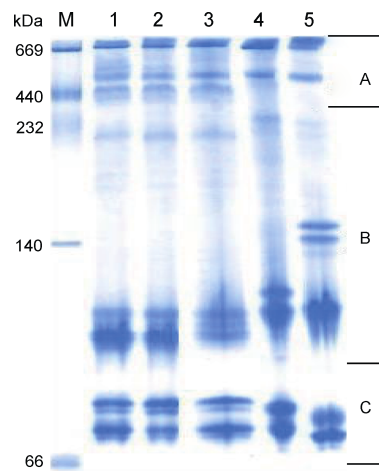


图 1 几种鲑鳟鱼血清蛋白的非变性凝胶电泳

Fig.1 Native polyacrylamide gel electrophoresis of serum protein in several salmon

1. 硬头鲑, 2. 金鲑, 3. 虹鲑, 4. 北极红点鲑, 5. 溪红点鲑, M. 分子量标准

表 1 几种鲑鳟鱼血清蛋白电泳结果的比较

Tab.1 The comparison of native polyacrylamide gel electrophoresis of serum protein in several salmon

| 鱼的种类 | 谱带总数 | 各区谱带数 | | |
|-------|------|-------|---|---|
| | | A | B | C |
| 硬头鲑 | 9 | 3 | 3 | 3 |
| 金鲑 | 9 | 3 | 3 | 3 |
| 虹鲑 | 9 | 3 | 3 | 3 |
| 北极红点鲑 | 7 | 2 | 3 | 2 |
| 溪红点鲑 | 7 | 2 | 3 | 2 |

由图 1 和表 1、表 2 和表 3 可见, 几种鲑鳟鱼血清蛋白 A 区、B 区和 C 区内血清蛋白的谱带及谱型各有异同。其中硬头鲑、金鲑和虹鲑均有 9 条血清蛋白谱带, 北极红点鲑和溪红点鲑都有 7 条血清蛋白谱带; 硬头鲑、金鲑和虹鲑的血清蛋白谱型相同, A 区 3 条带, 分子量分别为 669.0、519.5、455.9kDa, B 区 3 条带, 分子量分别为 222.4、110.1、100.8kDa, C 区 3 条带, 分子量分别为 81.2、79.0、73.3kDa; 但硬头鲑、金鲑和虹鲑的血清蛋白各谱带分区的含量却各不相同, 硬头鲑 B 区谱带总含量最高, 虹鲑 A 区和 C 区谱带总含量最高, 金鲑各谱带分区的含量介于两者之间; 北极红点鲑和溪红点鲑仅有 3 条相同的谱带, 分

子量分别为 669.0、519.5、110.1kDa; 北极红点鲑和溪红点鲑谱型存在差异, 北极红点鲑和溪红点鲑 A 区 2 条带, 分子量分别为 669.0、519.5kDa; 北极红点鲑 B 区 3 条带, 分子量分别为 256.8、118.4、108.9kDa, 溪红点鲑 B 区 3 条带, 分子量分别为 150.1、141.6、108.9kDa; 北极红点鲑 C 区 2 条带, 分子量分别为 79.0、73.3kDa, 溪红点鲑 C 区 2 条带, 分子量分别为 77.5、71.9kDa。

2.2 相似系数与遗传距离

从表 4 可以看出, 硬头鲑、金鲑和虹鲑三者之间

的遗传相似程度最大, 硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与溪红点鲑的遗传相似程度最小。硬头鲑、金鲑和虹鲑三者之间的遗传距离最小, 硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与溪红点鲑的遗传距离最大。

2.3 类平均聚类分析

根据几种鲑鲑鱼血清蛋白的遗传距离矩阵(表 4), 采用 UPGMA 法对所得数据进行聚类分析(图 2)。硬头鲑、金鲑和虹鲑处在同一组, 它们的遗传距离为 0, 这表明硬头鲑、金鲑和虹鲑属于同一种。硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与北极红点鲑处于同一亚组, 而溪红

表 2 几种鲑鲑鱼血清蛋白成分分子量(kDa)

Tab.2 The molecular weight (kDa) of serum protein components in several salmons

| 谱带分区 | 血清蛋白成分 | 硬头鲑 | 金鲑 | 虹鲑 | 北极红点鲑 | 溪红点鲑 |
|------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 纤维蛋白原 | 669.0 | 669.0 | 669.0 | 669.0 | 669.0 |
| | | 519.5 | 519.5 | 519.5 | 519.5 | 519.5 |
| | | 455.9 | 455.9 | 455.9 | | |
| B | 球蛋白 | 222.4 | 222.4 | 222.4 | 256.8 | 150.1 |
| | | 110.1 | 110.1 | 110.1 | 118.4 | 141.6 |
| | | 100.8 | 100.8 | 100.8 | 108.9 | 108.9 |
| C | 白蛋白 | 81.2 | 81.2 | 81.2 | | |
| | | 79.0 | 79.0 | 79.0 | 79.0 | 77.5 |
| | | 73.3 | 73.3 | 73.3 | 73.3 | 71.9 |

表 3 几种鲑鲑鱼血清蛋白成分含量(mg/mL)

Tab.3 The contents of serum protein components in several salmons (mg/mL)

| 谱带分区 | 血清蛋白成分 | 硬头鲑 | 金鲑 | 虹鲑 | 北极红点鲑 | 溪红点鲑 |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A | 纤维蛋白原 | 23.26 | 19.23 | 50.24 | 93.05 | 28.60 |
| | | 10.53 | 14.91 | 16.59 | 31.94 | 23.14 |
| | | 9.16 | 27.23 | 22.47 | | |
| B | 球蛋白 | 14.76 | 26.17 | 21.55 | 20.15 | 20.52 |
| | | 55.54 | 14.27 | 24.68 | 25.89 | 17.04 |
| | | 142.62 | 90.36 | 29.74 | 74.34 | 194.95 |
| C | 白蛋白 | 33.53 | 67.43 | 56.27 | 56.93 | |
| | | 7.12 | 20.81 | 17.13 | 53.25 | 36.41 |
| | | 59.02 | 75.09 | 116.88 | | 34.79 |
| A | 纤维蛋白原 | 42.94 | 61.37 | 89.31 | 124.99 | 51.73 |
| B | 球蛋白 | 212.92 | 130.81 | 75.98 | 120.38 | 232.51 |
| C | 白蛋白 | 99.67 | 163.32 | 190.28 | 110.18 | 71.20 |

表 4 几种鲑鲑鱼血清蛋白的遗传相似系数与遗传距离

Tab.4 Genetic similarity coefficient and genetic distances of serum protein in several salmons

| 鱼的种类 | 硬头鲑 | 金鲑 | 虹鲑 | 北极红点鲑 | 溪红点鲑 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 硬头鲑 | — | 1 | 1 | 0.625 | 0.375 |
| 金鲑 | 0 | — | 1 | 0.625 | 0.375 |
| 虹鲑 | 0 | 0 | — | 0.625 | 0.375 |
| 北极红点鲑 | 0.470 | 0.470 | 0.470 | — | 0.429 |
| 溪红点鲑 | 0.980 | 0.980 | 0.980 | 0.846 | — |

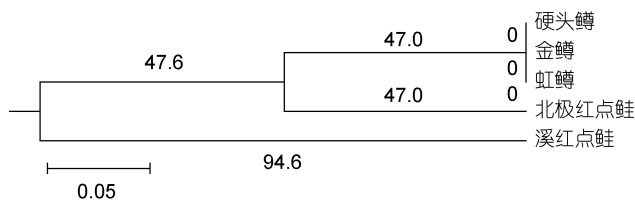


图 2 几种鲑鳟鱼的聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of several salmon

点鲑独处于另一亚组, 这表明在亲缘关系上, 硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与溪红点鲑的亲缘关系远于与北极红点鲑的关系。

3 讨论

蛋白质分子组成的差异受基因控制, 即是基因的生化表现型。蛋白质电泳图谱的表型(王宗任等, 1988; 张贵斌等, 1994; 俞纯方等, 1996), 诸如带的数目、宽窄, 带色的深浅及泳动率的大小, 可客观地反映该谱带所对应的等位基因的遗传本质, 谱带型相似的物种亲缘关系较近, 而谱带型相差较大的物种亲缘关系较远。王宗任等(1988)应用 PAGE 分析了在分类学上隶属于不同高级分类阶元的动物血清蛋白分子量相似分子的比率, 发现动物差异随起源时间而增大, 在分类学上亲缘关系相近的动物, 它们血清蛋白的共有区带所占比例就越大。本研究发现硬头鲑、金鲑和虹鲑属于同一种, 硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与溪红点鲑的亲缘关系远于与北极红点鲑的关系。同时, 研究结果还表明, 以聚丙烯酰胺凝胶电泳分析鲑鳟鱼血清蛋白的方法简单易行、重复性好, 研究结果对鲑鳟鱼的种属鉴定、良种选育、品种改良和遗传结构分析提供了试验依据。

本研究中硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与北极红点鲑处于同一亚组, 而溪红点鲑独处于另一亚组, 这表明在亲缘关系上, 硬头鲑、金鲑和虹鲑三者与溪红点鲑的亲缘关系远于与北极红点鲑的关系, 这与它们原产地分布相一致。虹鲑原产于加拿大、美国、墨西哥的太平洋沿岸部分水域, 在哥伦比亚的河流里也有分布(Neal *et al*, 2007)。本研究中的北极红点鲑系育空金北极红点鲑, 是由加拿大西北特区的乃育克湖的北极红点鲑和加拿大马尼托巴省的拉约克湖北极红点鲑杂交选育而成(郑维中等, 2003), 其中哥伦比亚省与西北特区和马尼托巴省是加拿大西部邻近的省份。溪红点鲑主要分布在加拿大东部以及美国东北部大部分水域(Nadir, 2004; Perry *et al*, 2004; Ohlund *et*

al, 2008), 与哥伦比亚省和西北特区相距较远。

血清蛋白包含纤维蛋白原、白蛋白和球蛋白, 具有维持血管内正常胶体渗透压和酸碱度、运输多种代谢物、调节被运输物质的生理作用等多种功能, 其中球蛋白与机体的免疫功能有着密切的关系(吴垠等, 1995)。本研究中血清蛋白 B 区蛋白为球蛋白, 具有免疫功能。硬头鲑血清蛋白 B 区的蛋白含量高于金鲑和虹鲑, 表现为较强的抗逆能力, 这可能与其降海型生活史比较丰富和在我国的养殖时间较短有关。有学者检测到对虾的血清中存在能够与人的某些抗体发生作用后产生沉淀反应的物质, 且某些因子与机体免疫功能有直接相关性, 一些结果显示, 虾血清内可能有类 IgG、类 IgA、类 IgM 等免疫球蛋白样物质的存在(王伟庆等, 1998)。而本研究中虹鲑血清蛋白 B 区蛋白遗传基因流失比较严重, 这就有可能大大削弱虹鲑的抗逆和抗病能力。目前, 我国引进的虹鲑由于长期高密度养殖和近亲繁殖引发了疾病频发、种质退化等一系列严重问题, 广大虹鲑养殖企业和渔民损失惨重。因此, 虹鲑的繁养殖有待进一步规范和标准化, 减少蛋白遗传基因的流失, 从根本上预防大规模疾病的暴发。

参 考 文 献

- 王伟庆, 李爱杰, 1998. 用免疫消浊法比浊法测定中国对虾血清中的免疫因子. 水产学报, 22(2): 170—174
- 王军萍, 韩希福, 谢松, 2000. 中华鳖血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳的初步分析. 中国水产科学, 7(2): 98—99
- 王忠华, 柳小春, 施启顺, 2002. 猪血浆蛋白(酶)多态性与杂种优势的关系. 湖南农业大学学报(自然科学版), 28(5): 421—424
- 王宗任, 贾风兰, 1988. 八种动物血清蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳和在进化中的相互关系. 遗传学报, 15(4): 290—298
- 安家嘉, 2010. 284 例肝病患者血清蛋白电泳结果分析与探讨. 检验医学与临床, 8(4): 481—483
- 孙源, 孙中武, 尹洪滨, 2010. 哲罗鱼同工酶的研究. 水产学杂志, 23(2): 46—47
- 李万程, 刘筠, 1986. 岳鲤及其双亲血红蛋白和血清蛋白的研究. 水生生物学报, 10(4): 365—372
- 李传武, 1991. 兴国红鲤、草鱼及其杂交一代血清蛋白质的电泳分析. 淡水渔业, 6: 13—14
- 杨贵强, 徐绍刚, 王跃智等, 2009. 温度和摄食对溪红点鲑幼鱼呼吸代谢的影响. 应用生态学报, 20(11): 2757—2762
- 吴垠, 张峰, 1995. 几种养殖鱼类越冬生理生化指标的变化——血清蛋白组分. 大连水产学院学报, 10(4): 19—26
- 汪家政, 范明, 2000. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 77—122

- 张克俭, 何玉明, 张景龙等, 1994. 兴淮鲫及其双亲血清蛋白的电泳分析. 上海水产大学学报, 3(2): 75—77
- 张贵斌, 赵铭山, 王惠杰等, 1994. 三种黄鼠血清蛋白的电泳比较研究. 中国地方病防治杂志, 9(4): 139—140
- 郑维中, 崔 禾, 康 梅, 2003. 养殖新品种——育空金北极红点鲑. 中国水产, 9: 64—65
- 俞纯方, 张荣强, 苏敦峰, 1996. 用血清蛋白电泳分析研究家兔的品种起源. 黑龙江畜牧兽医, 4: 11—13
- 殷宗俊, 杜志强, 陈宏权, 2005. 安徽地方猪种血液蛋白多态性研究. 中国畜牧杂志, 41(11): 48—50
- 郭尧君, 2005. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 122—161
- Nadir B, 2004. The early development of brook trout *Salvelinus fontinalis*: survival and growth rates of alevins. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28: 297—301
- Neal A G J, Edward S R, Doran M M, 2007. Diet, feeding rate, growth, mortality, and production of juvenile Steelhead in a Lake Michigan Tributary. North American Journal of Fisheries Management, 27: 578—592
- Ohlund G, Nordwall F, Degerman E *et al*, 2008. Life history and large-scale habitat use of brown trout (*Salmo trutta*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*)—implications for species replacement patterns. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 65(4): 633—635
- Perry G M L, Tarte P, Croisetière S *et al*, 2004. Genetic variance and covariance for brook charr (*Salvelinus fontinalis*) weight and survival time of furunculosis (*Aeromonas salmonicida*) exposure. Aquaculture, 235: 263—271

SERUM PROTEIN OF SEVERAL SALMONS BY NATIVE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

YANG Gui-Qiang, XU Shao-Gang, WANG Jian, GAO Yun-Qi, WANG Zhan-Quan
(Beijing Fisheries Research Institute—National Engineering Technology Research Center for
Freshwater Fisheries, Beijing, 100068)

Abstract The serum protein composition and its content of steelhead (*Salmo gairdneri*), golden trout (*Salmo gairdneri*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Arctic char (*Salvelinus alpinus* Linnaeus), and brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchill) were analyzed by native polyacrylamide gel electrophoresis. The results show least genetic distance among the steelhead, golden trout, and rainbow trout, and the largest genetic distance trouts (steelhead, golden trout, rainbow trout) and brook trout, and were in the same subgroup with Arctic char, indicating that trouts and brook trout have closer phylogenetic relationships in comparison with Arctic char. Electrophoretogram analysis on serum protein in several salmon was proved as a simple, reproducible method, for providing experimental data for species identification, breeding selection, varieties improvement, and genetic structure analysis of salmon. Rainbow trout propagation and culture need to be further standardized in order to reduce the loss of protein genes, and prevent large-scale disease outbreaks of trouts.

Key words steelhead; golden trout; rainbow trout; Arctic char; brook trout; serum protein; native polyacrylamide gel electrophoresis