

研究简报

淡水鱼类血清转铁蛋白遗传多态性研究

STUDIES ON GENETIC POLYMORPHISMS OF FRESHWATER FISH SERUM TRANSFERRINS

龙 华 汤伏生 曾 勇 王朝元

(淡水鱼类种质资源与生物技术实验室,荆沙市 434000)

Long Hua, Tang Fusheng, Zeng Yong and Wang Chaoyuan

(State Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology, Jinsha 434000)

关键词 淡水鱼类,转铁蛋白,多态性,耐低氧

KEYWORDS Freshwater fish, Transferrin, Polymorphism, Lower oxygen concentration resistance

血清转铁蛋白(Transferrin, 简写 Tf)是血清中一种重要的 β -球蛋白,它的生理功能是把铁离子(Fe^{3+})运输到成红细胞供合成血红蛋白用,是脊椎动物体内铁的运输者。自 Smithies[1957]首次在人血清中发现 Tf 以来,人们又先后发现了乳 Tf(哺乳类)和卵 Tf(鸟类),Davis 等[1962]研究了这种铁链蛋白的铁结合特性,Fletcher 等[1968]研究了 Tf 传递铁的功能。到了八十年代,人们对各种 Tf 的结构与功能及其蛋白质部分和糖基部分均做了大量研究[Salzman 等,1982],从而证实了 Tf 结合铁、传递铁的生理功能。

在鱼类血清 Tf 多态性研究方面,Fine 等[1965]、M Φ ller 等[1966]和 Koehn[1967]分别研究了鳗鲡、鲑鱼及巨口胭脂鱼的血清 Tf 遗传多态性,国外也有一些关于鱼类 Tf 多态性的研究报道[Kirpichnikov,1987],而且发现在外部环境发生变化以及生物体发育的不同阶段,体内转铁蛋白水平及活性均会改变[Vatatis,1980;尾崎久雄,1982]。国内对鱼类血清 Tf 的研究只有零星报道[龙 华等,1991;沈志民等,1991],鱼类转铁蛋白多态性与鱼类耐低氧的关系的研究也有报道[张 辉等,1993]。由于鱼类血清 Tf 与鱼类耐低氧的生理功能密切相关,研究鱼类血清 Tf 多态性,对了解鱼类血清 Tf 的基因型分布特点以及鱼类在低氧条件下的行为和生理功能都十分重要。本文分析、比较了几种淡水养殖鱼(主要是鲤科鱼类)血清 Tf 的特点及其多态性,并改进了鱼类血清 Tf 染色分析方法。

1 材料与方 法

1.1 血清样品制备

试验鱼从本单位试验场捕获,少数在市场购买(均为本地种)。将接触血清的注射器、针头和离心管等用肝素钠(1 000 单位/毫升)及柠檬酸钠(3%)溶液冲洗,尾动脉取血,5 000 转/分离心 3 分钟,上清置-30℃冰

收稿日期:1995-05-22。

箱过夜,次日待血清解冻后,用针头挑去纤维蛋白,5 000 转/分离心 3 分钟,上清液置 4℃ 冰箱备用。使用前需摇匀。

1.2 试剂

转铁蛋白(Tf,人),上海东风生化试剂公司产;血红蛋白(Hb,牛),华美生物工程公司产;Nitroso-R,美国 Aldrich 化学公司产;血清铁及铁结合能力试剂盒,中科院生物物理所中生公司产;利凡诺(Rivanol)及胺黑-10B 等,均为国产 AR 级试剂。

1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 3.75%,样品胶用 10%甘油和 0.1%溴酚蓝配制,电极缓冲液为 Tris (0.025M)-甘氨酸(0.192M)缓冲系统(pH8.3)。血清点样量为 5 微升,采用 BIO-RAD 3000Xi 型电泳仪和垂直电泳槽进行电泳,电压为 150 伏,时间为 5 小时左右。凝胶经染色后,用 BIO-RAD 583 型平板凝胶干燥仪干燥保存。

1.4 含铁蛋白质专一染色

按 Muelle[1962]方法略加改进,即将电泳前在血清中加入少量柠檬酸铁胺颗粒,待溶解后,电泳,染色 1-2 小时改为先直接用纯血清电泳,染色,再在脱色液中加入少许柠檬酸铁胺颗粒显色 10-15 分钟,呈淡绿色带。染色剂为 Nitroso-R 液(每 100 毫升溶液中含 1.0 克盐酸羟胺,2.7 克三水乙酸钠,1.5 毫升冰乙酸及 0.5 克 Nitroso-R),脱色剂为水/甲醇/冰乙酸(比例为 5/5/1)。

1.5 Rivanol 沉淀法

按 Boettcher[1958]和 Herschberger[1970]方法,用 Rivanol 溶液沉淀血清中的清蛋白及大部分 γ -球蛋白,使 Tf 保留在上清液中,从而减少血清中非 Tf 的含铁蛋白质(如血红蛋白、细胞色素 C、含铁酶类及辅酶类等)。Rivanol(2-乙氧-6,9-二氧基吡啶乳酸)溶于 0.005M Tris-HCl(pH8.8)缓冲液中,浓度为 0.4%。Rivanol 溶液与血清的比例为 2:1,摇匀后室温放置过夜,10 000 转/分离心 5 分钟,取上清液置 4℃ 备用。电泳点样量需按比例加倍。

1.6 血清铁及铁饱和度测定

用试剂盒测血清铁浓度(微克/分升),未饱和铁结合力(微克/分升),总铁结合力(微克/分升)及铁饱和度(%)。样品的前处理、试剂的配制、测定及计算等均按说明书进行(略)。要注意的是:操作时要严格防止所用器皿和试剂被铁质污染。血清铁浓度(即血清中转铁蛋白的结合铁)表示血清中转铁蛋白的活性,铁饱和度表示血清中铁的利用率。采用美国 Beckman 仪器公司产 DU-7 紫外分光光度计测试,波长为 540nm。

2 结果

2.1 染色方法的改进和血清 Tf 区的确定

将改进前后的两种方法的显色结果进行比较(图 1),结果表明:改进前的 6 号样品与改进后的 5 号样品处于同一染色水平,即改进后的染色方法较原方法灵敏度提高一倍左右。

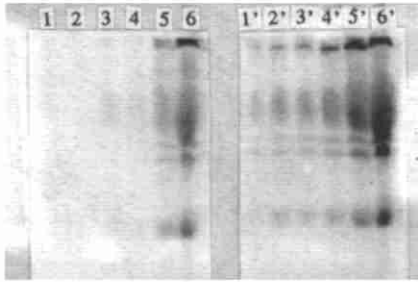


图1 鲫鱼血清 PAGE 专一染色方法改进试验

Fig.1 Modification of the specific stain methods after *Carassius auratus* serum PAGE

左 1~6 为按 Mueller 方法染色结果;

右 1'~6' 为按改进的方法染色结果。

1~6 分别为 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 微升的血清点样量。

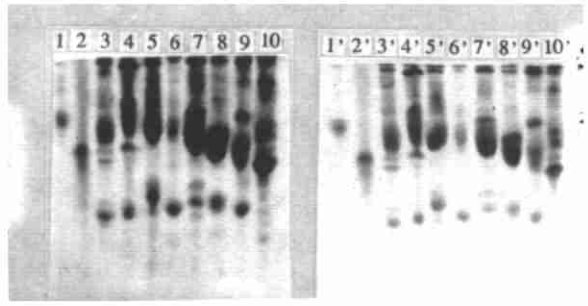


图2 八种淡水鱼血清 PAGE 染色方法对比试验

Fig.2 Comparison of two stain methods after eight freshwater fish serum PAGE

左 1~10 为胺黑-10B 染色结果;

右 1'~10' 为 Nitroso-R 染色结果, 1~10 分别为 Tf(人)、Hb(牛)、

鲤、鲫、白鲢、鳙、草鱼、团头鲂、短盖巨脂鲤、尼罗罗非鱼样品。

胺黑-10B 染色法与 Nitroso-R 染色法的对比试验(图2)结果表明:胺黑-10B 染色的血清蛋白带在 30 条以上,而 Nitroso-R 染色的血清蛋白带只有 10 条左右,后者的结果中蛋白质带明显少于前者。

为进一步确定鱼类 Tf 区的位置,我们用 Rivanol 溶液处理鱼类血清(见方法 1.5),并做 PAGE(图3),根据有关文献[Herschberger, 1970; Kirpichnikov, 1987]的分带方法,我们确定鱼类血清 Tf 区大致分布在以 Tf(人)及 Hb(牛)为蛋白标准的范围内。

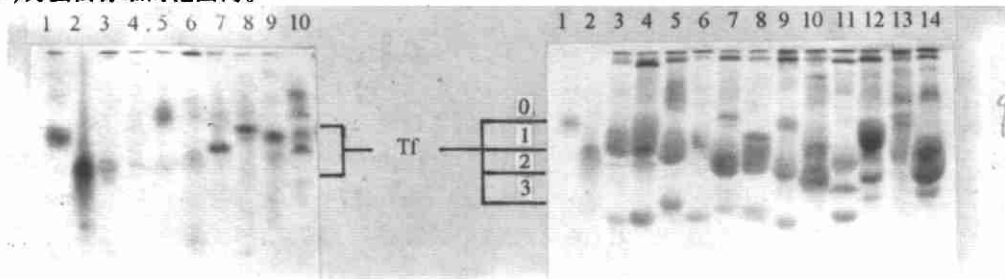


图3 8种淡水鱼血清经 Rivanol 溶液处理后的 PAGE 结果

Fig.3 Results of eight freshwater fish serum PAGE after treated with Rivanol solution

1~10 分别为 Tf(人)、Hb(牛)、鲤、鲫、白鲢、鳙、团头鲂、草鱼、尼罗罗非鱼、短盖巨脂鲤样品。

图4 12种淡水鱼血清 Tf 带型比较(PAGE)

Fig.4 Comparison of twelve freshwater fish serum transferrin types(PAGE)

1~14 分别为 Tf(人)、Hb(牛)、鲤、鲫、白鲢、鳙、团头鲂、草鱼、短盖巨脂鲤、尼罗罗非鱼、乌鳢、胡子鲇、泥鳅、黄颡鱼样品。

2.2 十二种淡水鱼血清 Tf 带型及活性比较

我们比较了 6 种鲤科鱼类(包含各种栖息水层)和 6 种其它鱼类(均为底层鱼)的血清 PAGE 图谱(图4),确定了它们的血清 Tf 带型(我们将它们分为 Tf-0、Tf-1、Tf-2、Tf-3 四个区),并比较了它们的血清 Tf 的相对活性(表1)。

表 1 12 种淡水鱼血清 Tf 带型及活性

Table 1 Types and activity of twelve freshwater fish serum transferrins

鱼的种类	鲤科鱼类						其它鱼类					
	鲤	鲫	白鲢	鳊	团头鲂	草鱼	短盖巨脂鲤	尼罗罗非鱼	乌鳢	胡子鲇	泥鳅	黄颡鱼
栖息水层	底层	底层	中上	中上	中下	中下	底层	底层	底层	底层	底层	底层
Tf-0	-	-	-	-	++	-	++	-	+	-	++	+
Tf-1	+++	+++	++	+	-	++	-	++	-	+++	-	++
Tf-2	+	+	-	-	++	++	++	+++	++	+	+	+++
Tf-3	-	-	-	-	+	-	-	++	++	++	-	++

注: +表示活性较低; ++表示活性中等; +++表示活性较高; -表示无活性。

以上结果表明:鲤科鱼类血清 Tf 的活性主要表现在 Tf-1 和 Tf-2 两个区域,其它 6 种底层鱼的血清 Tf 活性则表现在 Tf-0 至 Tf-3 的四个区域;在 6 种鲤科鱼类中,白鲢和鳊的血清 Tf 活性低于团头鲂和草鱼的血清 Tf 活性,而后者又低于鲤和鲫的 Tf 活性。

2.3 三种鲤科鱼血清 Tf 多态性的表现型和基因型分析

我们从大量实验材料中分析鉴定出 8 类鲤、6 类鲫及 3 类白鲢血清 Tf 特异类型(图 5),并列出它们的表现型种类、基因型种类,计算出它们的基因频率和基因型频率(表 2 和表 3)。

从血清 Tf 表现型来看,它们均有一个 Tf-1 区(带较宽),鲤和鲫还有一个 Tf-2 区(带较窄),而白鲢无 Tf-2 区。基因频率和基因型频率分析结果表明:在 Tf-1 区,鲤、鲫和白鲢均有 6 个基因型,基因频率分布比较类似,即 $a > b > c$ 。基因型频率分布亦比较类似: $aa > bb > cc$, $ab > ac > bc$,而且纯合体的基因型频率均少于 50% ~ 60%,即 $(aa + bb + cc) < (ab + bc + ac)$ 。在 Tf-2 区,鲫基因型只有鲤的一半。

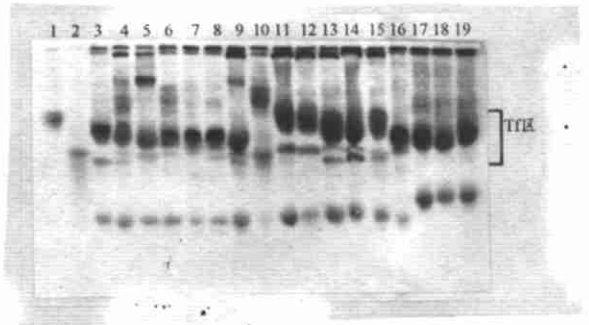


图 5 鲤、鲫和白鲢血清 Tf 多态性比较(PAGE)

Fig.5 Comparison of *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus* and *Hypophthalmichthys molitrix* serum transferrin polymorphisms(PAGE)

1 为 Tf(人);2 为 Hb(牛);3 ~ 10 为 8 类鲤血清样品;
11 ~ 16 为 6 类鲫血清样品;17 ~ 19 为 3 类白鲢血清样品。

表 2 鲤、鲫和白鲢血清 Tf 表现型

Table 2 Phenotypes of serum transferrins from *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus* and *Hypophthalmichthys molitrix*

鱼的种类	鲤								鲫						白鲢			
	表现型编号	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	1	2	3
采样数量(尾)	8	7	11	5	4	7	6	2	5	11	21	7	3	3	3	18	9	
Tf-1 表现型种类	ac	ac	ab	ab	bb	bb	aa	bb	bc	bb	ac	aa	bc	ab	ab	aa	bc	
Tf-2 表现型种类	aa	ab	bb	bc	cc	bc	ab	ab	bb	bb	ab	ab	ab	bb	-	-	-	

表3 鲤鱼、鲫鱼和白鲢血清 Tf 基因频率和基因型频率分布

Table 3 Gene frequency and genotype frequency distribution of serum transferrins from *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus* and *Hypophthalmichthys molitrix*

基因位点		鲤	鲫	白鲢
Tf-1	基因型频率			
	aa	0.1849	0.1444	0.4225
	bb	0.1764	0.1089	0.0400
	cc	0.0225	0.0841	0.0225
	ab	0.3612	0.2508	0.2600
	bc	0.1260	0.1914	0.0600
	ac	0.1290	0.2204	0.1950
基因频率	a	0.43	0.38	0.65
	b	0.42	0.33	0.20
	c	0.15	0.29	0.15
Tf-2	基因型频率			
	aa	0.0961	0.0961	-
	bb	0.2401	0.4761	-
	cc	0.0400	-	-
	ab	0.3038	0.4278	-
	bc	0.1960	-	-
	ac	0.1240	-	-
基因频率	a	0.31	0.31	-
	b	0.49	0.69	-
	c	0.20	-	-

2.4 四种鲤科鱼类血清 Tf 活性及铁利用率比较

将鲤、鲫、白鲢和鳙四种鲤科鱼类血清分别测定并计算出它们的血清铁浓度、未饱和铁结合力、总铁结合力及铁饱和度(表4)。

表4 鲤、鲫、白鲢和鳙血清铁、铁结合力和铁饱和度测定结果

Table 4 Results of the iron concentrations, the iron binding capacities and iron saturation degrees of serums from *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*

血清来源	血清铁浓度 ($\mu\text{g/dl}$)	未饱和铁结合力 ($\mu\text{g/dl}$)	总铁结合力 ($\mu\text{g/dl}$)	铁饱和度 (%)
鲤	158.45 ± 3.23	201.22 ± 4.53	359.67 ± 6.53	44.05 ± 3.25
鲫	154.58 ± 3.81	80.86 ± 4.19	235.44 ± 3.22	65.66 ± 4.29
白鲢	85.54 ± 4.02	178.00 ± 3.43	263.54 ± 5.14	32.46 ± 2.78
鳙	110.29 ± 2.91	163.14 ± 5.10	273.93 ± 2.71	40.44 ± 3.80

从表中可以看出,所测的四种鲤科鱼类的血清铁浓度顺序为:鲤 > 鲫 > 鳙 > 白鲢,即鲤和鲫血清 Tf 活性

高于鳙和白鲢,而白鲢的血清 Tf 活性最低。

从铁利用率来看,所测的四种鲤科鱼类的血清 Tf 铁饱和度顺序为:鲫 > 鲤 > 鳙 > 白鲢,结果与血清铁含量稍有不同,即鲫血清铁饱和度高于鲤的血清铁饱和度,而白鲢仍为最低。

3 讨论

(1)Mueller 和 Koehn 等均用 Nitroso-R 染色液染色淀粉胶中的蛋白质带,而我们用此法染色 PAGE 中的蛋白质带,仍然十分清楚。经改进后的染色方法不仅提高了灵敏度,而且也不会由于血清中过量的铁离子扩散到凝胶中而造成凝胶背景染色加深,同时还发现染色液由于没有过量的铁离子影响而提高了重复使用率。由此可见,Nitroso-R 染色液染色含铁蛋白质是研究含铁蛋白质的可靠方法。此外,我们用三氯化铁代替柠檬酸铁胺显色,获得同样的结果(即显淡绿色带),说明染色方法中较为重要的因子-铁离子(Fe^{3+})是可以由不同的三价铁盐代替的。

(2)从 12 种淡水鱼类血清 Tf 带型及活性分析来看,鱼类血清 Tf 区有如下特点:①底层鱼类血清 Tf 区较中下层鱼类血清 Tf 区复杂,而后者又较中上层鱼类血清 Tf 区复杂,这是由于底层鱼类生活在氧容量低于表层水域的底层水域中而使血清中 Tf 含量高而且带型多样化,因而更能适应各种环境;②不同种的鱼都有自己 Tf 区的特定位置,因而就确定了它的生存环境及生活习性,显然 Tf 区活性强而且带型多样化,表明其生存能力较强,更能耐低氧。

(3)根据有关文献[张兴忠等,1988]介绍的资料,鲤科鱼类血清 Tf 的多态性最为复杂,大多数种的血清 Tf 等位基因数在 5~10 之间。从基因型来看,由于在鱼类染色体中仅有一个 Tf 基因位点表达,但却具有多个等位基因及相应的蛋白质异构型,因此,血清电泳时,这种多态性表现出一个或几个 Tf 区(许多变异体在 PAG 中只是一些淡的阴影),不同的是有的 Tf 区活性较高,而有的 Tf 区活性较低。

在自然选择中,由于基因频率的随机变动,出现蛋白质的过渡性多态现象。转铁蛋白的遗传多态性、基因频率和基因型频率分布的类似性以及杂合体数量在群体中的高比例,说明鱼类存在着蛋白质变异的保持机制,也说明了鱼类 Tf 传递铁离子这一主要生理功能是非常稳定的。

(4)血清中的血清铁浓度、铁饱和度和铁结合能力在临床上是诊断人类血液疾病的重要指标。在渔业生产中,由于近年来鱼类生存环境不断受到破坏,各种暴发性、大规模性的鱼病不断出现,我们运用这些数据不仅可以诊断鱼类血液生理功能缺陷的疾病,也可以判断鱼类生存环境(水体)中影响鱼体吸收铁离子的因素,对渔业生产将会有很大帮助。

(5)由上可知,淡水鱼类血清 Tf 多态性与血清铁浓度、铁饱和度有明显的正比关系。由于血清 Tf 多态性的存在,使 Tf 的等位基因频率分布不同、血清 Tf 活性及 Tf 带型存在差异,使它们处于不同的栖息水层,并具有各自的生理行为。鱼类血清 Tf 活性高、铁利用率高,表明鱼类血清中 Tf 结合铁离子能力强,运输铁离子的功能也强。在鲤科鱼类中,鲤和鲫血清 Tf 多态性复杂,Tf 活性强,铁的利用率高,Tf 表现型和基因型多样化,因而是耐低氧鱼类,而白鲢和鳙则是非耐低氧鱼类。

姚 红同志协助本文照片处理工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 龙 华等,1991. 鲤鱼血清转铁蛋白的电泳分析及纯化鉴定. 淡水渔业, 6:33~36.
- [2] 沈志民等,1991. 白鲢鱼与黄鳍鱼血清转铁蛋白的分离纯化及其结构和性质的比较. 生物化学杂志, 7(3):269~274.
- [3] 张兴忠等,1988. 鱼类遗传与育种, 45~50. 农业出版社(京).
- [4] 张 辉等,1993. 鲤转铁蛋白和血清酯酶多态性研究. 水生生物学报, 17(3):278~281.
- [5] 尾崎久雄(许学龙等译),1982. 鱼类血液与循环生理, 67~151. 上海科学技术出版社.
- [6] Boettcher, E. W., et al., 1958. Method of isolating the B₁-metal-combining protein from human blood plasma. *Nature*, 181:490.

- [7] Davis, B., et al., 1962. The stability constants of the iron – transferrin complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **8**:56.
- [8] Fletcher, J., et al., 1968. Function of transferrin. *Nature*, **218**:1211.
- [9] Herschberger, W. K., 1970. Some physicochemical properties of transferrins in brook trout. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **1**:207 ~ 218.
- [10] Kirpichnikov, V. S., 1987. Genetics and selection of fishes, chapter 5; The biochemical genetics of fishes, pp. 176 ~ 239. *Leningrad "Nauta" Publishers Leningrad Branch*.
- [11] Koehn, R. K., 1967. Serum transferrin and serum esterase polymorphisms in an introduced population of the bigmouth buffalofish. *Copeia*, **4**:805 ~ 808.
- [12] Mueller, J. O., et al., 1962. Transferrin variation in Columbidae. *Genetics*, **47**:1385 ~ 1392.
- [13] Møller, D., et al., 1966. Serum transferrins in some gadoid fishes. *Nature*, **210**:317 ~ 318.
- [14] Saltman, P. et al., 1982. The Biochemistry and physiology of iron, section I; Structure and function of transferrins, pp.3 ~ 97. *Elsevier Science Publishing Co., Inc. (New York)*.
- [15] Smithies, O., 1957. Variations in human serum beta-globulins. *Nature*, **180**:1432.
- [16] Vataitis, A. P., 1980. Changes in transferrin during the red cell replacement in Amphibia. *Developmental Biology*, **80**:56 ~ 63.