

鹌鹑脏器、肌肉蛋白质多型座位电泳技术

郑惠玲¹, 常 洪², Akio Sano³, 刘小林¹, 李相运¹, 任战军¹

(1 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100; 2 扬州大学 畜牧兽医学院, 江苏 扬州 225009;

3 Gifu University, Gifu, Japan 500)

[摘 要] 将应用于家畜血液蛋白质多型座位的电泳技术加以改进, 成功地应用于鹌鹑脏器、肌肉蛋白质多型座位的检测, 使可检测的鹌鹑蛋白质多型座位数从国内报道的3个增至32个。详细介绍了检测32个鹌鹑脏器、肌肉蛋白质多型座位的淀粉凝胶电泳技术, 为客观评价鹌鹑遗传资源提供了科学的研究方法。

[关键词] 鹌鹑; 蛋白质多型; 淀粉凝胶电泳

[中图分类号] S813.9; S839

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)03-079-05

用淀粉凝胶电泳检测血液蛋白质多型的技术已应用于多种畜禽, 而在鹌鹑上的应用报道极少。国内报道中可检测的鹌鹑血液蛋白质多型座位只有3个^[1]。由于组织中的酶活性比血液中的酶活性高, 而且它们都具有相同的稳定性和遵守孟德尔遗传规律, 因此对于血液量少、易解剖的小动物用脏器、肌肉和脑等组织作试验材料研究蛋白质多型比用其血液作试验材料有显著的优越性。最早对人和果蝇组织的酶多型进行研究的是Harris^[2]和Lewontin^[3]。迄今为止, 国外已能对果蝇、小鼠、鹌鹑和黄鹌等多种小动物组织中的多种蛋白质进行电泳分离, 并确定其受控基因^[4~7]。家养鹌鹑的脏器、肌肉等组织中蛋白质多型试验在日本进行得较多, 如Hashiguchi等^[8]对鹌鹑肝脏酯酶同工酶进行的研究; Watanabe等^[9]和De-Xing Hou^[10]对鹌鹑胰脏蛋白质遗传变异的研究。

本试验将一些应用于畜禽血液蛋白质的电泳技术成功地改进并应用于鹌鹑脏器、肌肉蛋白质的电泳分离, 使可研究的鹌鹑中立突变座位数大大增多, 为客观评价和有效利用鹌鹑遗传资源提供更可靠的信息资料。

1 样品制备

参考文献^[11], 解剖鹌鹑, 取出肝脏、心脏、胰脏和胸肌, 按样: 水=1:1加水, 然后磨碎样品, 在0℃, 15 000 r/min条件下离心30 min, 取上层液, 放入低温冰箱中保存。

2 缓冲液的配制

通过多次试验发现, 要保证本试验的成功率, 必须严格控制各种缓冲液的pH值。本试验中需要4套凝胶缓冲液和电极缓冲液, 分别用BS (Bengtsson and Sandberg 的人名缩写)^[12]、AC (Amine-citrate 的缩写)^[13]、TC (Tris-citrate 的缩写)^[14]、Gahne (人名)^[15]表示。参考文献^[12~16], 保持其原有pH值, 改进配方, 使其配制更简单易行。改进后的方法如下所述。

(1) BS 电极缓冲液(pH 7.2) NaH₂PO₄ · 2H₂O 15.60 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 35.81 g, EDTA 1.265 g 混合加水至1 L。

(2) BS 凝胶缓冲液(pH 7.2) 取BS电极缓冲液50 mL加水700 mL。

(3) AC 电极缓冲液(pH 6.1) 0.04 mol/L Citric acid 用C₄H₈ON-(CH₂)₃NH₂调至pH值为6.1。

(4) AC 凝胶缓冲液(pH 6.0) 2 mmol/L Citric acid 用C₄H₈ON-(CH₂)₃NH₂调至pH值为6.0。或者用AC电极缓冲液20倍稀释。

(5) TC 电极缓冲液(pH 7.0) Tris 18.776 g, Citric acid 9.036 02 g, 加水至1 L。

(6) TC 凝胶缓冲液 pH(7.0) 取TC电极缓冲液66.7 mL加水933.3 mL。

(7) Gahne 电极缓冲液(pH 8.6) Tris 30.285 g, EDTA 3.722 4 g, Boric acid 2.473 2 g 加水至

[收稿日期] 2000-08-30

[基金项目] 国家自然科学基金国际合作研究资助项目(39510140973)

[作者简介] 郑惠玲(1969—), 女, 陕西西乡人, 讲师, 在读博士, 主要从事动物遗传育种研究

1 L。

(8) Gahne 凝胶缓冲液(pH 8.6) 取电极缓冲液 230 mL,加水 770 mL。

(9) 0.1 mol/L Phosphate 缓冲液(pH 7.0) 取 0.2 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 33.0 mL 和 0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 67.0 mL,加水至 400 mL。

(10) 0.05 mol/L Phosphate 缓冲液(pH 7.0) 将 0.1 mol/L Phosphate 缓冲液 2 倍稀释。

(11) 0.1 mol/L Acetate 缓冲液(pH 5.0) 取

0.2 mol/L Acetic acid 14.8 mL 和 0.2 mol/L Sodium acetate 35.2 mL,加水至 100 mL。

3 所检测座位名称和电泳条件

改变常规电泳用的玻璃板大小,使电泳结果更加清晰。本试验用长 16.5 cm,宽 12 cm 的玻璃板制胶。淀粉凝胶的浓度为 11.5%。制胶、点样、电泳、染色的方法同常规方法。所检测座位名称见表 1,各座位电泳条件见表 2。

表 1 所检测基因座位名称

Table 1 List of loci

中文名称 Chinese name	英文名称 English name	缩写 Abbreviation
乙醇脱氢酶	Alcohol dehydrogenase	Adh
酯酶-D	Esterase-D	Es-D
酯酶	Esterase	Es
苹果酸脱氢酶- I	Malate dehydrogenase- I	Mdh- I
苹果酸脱氢酶- II	Malate dehydrogenase- II	Mdh- II
磷酸葡萄糖异构酶	Phosphoglucose isomerase	Pgi
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	6-Phosphogluconate dehydrogenase	6-Pgd
α -乙二醇脱氢酶	α -Glycerophosphate dehydrogenase	α -Gpd
甘露糖-磷酸异构酶- I	Mannose-Phosphate isomerase- I	Mpi- I
甘露糖-磷酸异构酶- II	Mannose-phosphate isomerase- II	Mpi- II
酯酶- III、酯酶-4	Esterase	Es- III, Es-4
肌酸激酶-B、肌酸激酶-M	Creatine kinase	CK-B, CK-M
腺苷酸转移酶	Adenylate kinase	AK
磷酸葡萄糖变位酶	Phosphoglucomutase	Pgm
酸性磷酸酶	Acid phosphatase	Acp
异柠檬酸脱氢酶- I、异柠檬酸脱氢酶- II	Isocitrate dehydrogenase	Icdh- I, Icdh- II
天冬氨酸转氨酶- I、天冬氨酸转氨酶- II	Aspartate aminotransferase	Aat- I, Aat- II
乳酸脱氢酶-M、乳酸脱氢酶-H	Lactate dehydrogenase	Ldh-M, Ldh-H
血红蛋白- I、血红蛋白- II、血红蛋白- III	Heoglobin	Hb- I, Hb- II, Hb- III
白蛋白	Albumin	Alb
运铁蛋白	Transferrin	Tf
亮氨酸氨肽酶	Leucine aminopeptidase	Lap
山梨醇脱氢酶	Sorbitol dehydrogenase	Sdh
依赖辅酶 I 的苹果酸脱氢酶- I、 依赖辅酶 II 的苹果酸脱氢酶- II	Malic enzyme	Me- I, Me- II

表 2 各座位电泳条件

Tabel 2 Electrophoresis conditions

酶座位 Allozyme loci	所用样品 Sample	凝胶缓冲液类别 Gelbuffer	泳动方向 Electrophoresis direction	所需电压和电流/V, mA Voltage and current	泳动时间/h Electrophoresis time
Adh	肝	BS	—	75	5
Es	肝	BS	+	75	5
Mdh- I	肝	TC	±	150	4
Mdh- II	肝	TC	±	150	4
α -Gpd	肝	TC	±	150	4
Es-D	心	TC	+	150	4
Pgi	心	TC	—	150	4
6-Pgd	肌肉	TC	+	150	4
Mpi- I	肌肉	TC	±	150	4
Mpi- II	肌肉	TC	±	150	4
Es-4	胰	AC	—	200 25~30 mA	4
CK-B, CK-M	肌肉	AC	±	160 20 mA	4
AK, Pgm	肌肉	AC	—	160 20 mA	4

续表 2

酶座位 Allozyme loci	所用样品 Sample	凝胶缓冲液类别 Gelbuffer	泳动方向 Electrophoresis direction	所需电压和电流/V, mA Voltage and current	泳动时间/h Electropho- resis time
Acp	肌肉	AC	+	160 20 mA	4
Icdh- I, Icdh- II	肌肉	AC	-	160 20 mA	4
Aat- I, Aat- II	肌肉	Gahne	±	200	4
Ldh-M	肌肉	Gahne	+	200	4
Ldh-H	心	Gahne	+	200 20 mA	4
Hb- I, Hb- II, Hb- III	心	Gahne	+	20 mA	5
Alb, Tf	肝	Gahne	+	20 mA	4.5
Lap	肝	TC	+	20 mA	4.5
Sdh	肝	TC	-	20 mA	4.5
Me- I, Me- II	肌肉	TC	+	20 mA	4.5
Es- I	肌肉	TC	+	20 mA	4.5

4 各座位染色方法

参考文献[11], 并加以改进, 各座位最佳染色方法如下。

(1) Adh 0.05 mol/L Phosphate 缓冲液(pH 7.0) 6 mL, NAD 7 mg, PMS 3 mg, MTT 3 mg, 体积分数为 95% 的乙醇 1 mL, 质量分数为 1.5% 的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱中保存至带出现。

(2) Es 0.01 mol/L Tris-Malate 缓冲液(pH 6.8) 100 mL, α -Naphthyl Butylate 10 mg, Fast blueRR salt 100 mg, 放入 37 °C 恒温箱中保存至带出现。

(3) Es-D 0.1 mol/L Acetate 缓冲液(pH 5.0) 5 mL, 蒸馏水 5 mL, 质量分数为 1% 的 Mr. X 0.1 mL, 37 °C 保存 15 min, 紫外灯下判型。

(4) Pgi 0.6 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 3 mL, 0.2 mol/L $MgCl_2$ 3 mL, NADP 2 mg, PMS 2 mg, MTT 2 mg, Fructose-6-phosphate 20 mg, G6PDH 10 μ L, 质量分数为 1.5% 的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱中保存至带出现。

(5) 6-Pgd 0.1 mol/L Tris-Malate acid(pH 6.8) 10 mL, 质量分数为 10% 的 $MgCl_2$ 0.25 mL, NADP⁺ 2 mg, 6-phospho gluconate-3Na salt 10 mg, MTT 2 mg, PMS 2 mg, 质量分数为 1.5% 的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱中保存至带出现。

(6) α -Gpd 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.7) 6 mL, NAD 4 mg, PMS 3 mg, MTT 3 mg, EDTA-2Na 43 mg, α -glycerophosphate 50 mg, 质量分数为 1.5% 的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱中保存至带出现。

(7) Mdh- I, Mdh- II 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.1) 6 mL, DL-Malic acid 25 mg, NAD 7 mg, MTT 3 mg, PMS 3 mg, 质量分数为 1.5% 的 Agar

6 mL, 放入 37 °C 恒温箱中至带出现。

(8) Mpi- I, Mpi- II 0.3 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 5 mL, NADP 5 mg, PMS 1 mg, MTT 5 mg, M-6-P 5 mg, G6PDH 10 μ L, phos-phoglucose isomerase 5 μ L, 质量分数为 1.5% 的 Agar 5 mL, 放入 37 °C 恒温箱。

(9) Hb- I, Hb- II, Hb- III, Alb, Tf 用甲醇 500 mL, 乙醇 100 mL, 水 400 mL, 氨基黑 10B 10 g 配成的染色液染色 5 min, 然后用甲醇: 乙酸: 水 = 5: 1: 4 配制脱色液, 用此脱色液脱色数次至带出现。

(10) Acp 0.1 mol/L 乙酸缓冲液(pH 5.0) 50 mL, 质量分数为 10% 的 $MgCl_2$ 0.2 mL, 质量分数为 10% 的 $MnCl_2$ 0.2 mL, NaCl 1 g, Polyvinylpyrrolidone 250 mg, α -Naphthyl acid phosphate 50 mg, Fast Garnet GBC Salt 50 mg。

(11) Lap 0.04 mol/L Tris-Malate 缓冲液(pH 6.0) 50 mL, H_2O 50 mL, L-lencyl α -naphthylamide 20 mg, Fast Black K Salt 50 mg, 放入 37 °C 恒温箱。

(12) Sdh 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 6 mL, NAD 2 mg, PMS 1 mg, MTT 2 mg, D-sorbitol 40 mg, 质量分数为 1.5% 的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱。

(13) Me- I, Me- II 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.1) 5 mL, 0.2 mol/L $MgCl_2$ 1 mL, NADP 7 mg, PMS 3 mg, MTT 3 mg, malic acid 25 mg, 质量分数为 1.5% 的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱。

(14) Pgm 0.6 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 2.5 mL, 0.2 mol/L $MgCl_2$ 1.5 mL, NADP 4 mg, PMS 2 mg, MTT 2 mg, Glucose-1-phosphate 20 mg, G6PDH 10 μ L, 质量分数为 1.5% 的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱。

(15) Icdh- I, Icdh- II 1 mol/L Tris-HCl 缓冲

液(pH 8.0) 5 mL, 0.2 mol/L $MgCl_2$ 1 mL, NADP 4 mg, MTT 3 mg, PMS 3 mg, DL-Isocitric acid trisodium salt 40 mg, 质量分数为 1.5%的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱。

(16) Ldh-M, Ldh-H 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 6 mL, NAD 2.5 mg, PMS 2 mg, MTT 1 mg, 体积分数为 50%的 Sodium lactate 1 mL, 质量分数为 1.5%的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱。

(17) Aat- I, Aat- II 将 α -Ketoglutaric acid 150 mg, L-Asparatic acid 550 mg, EDTA 200 mg, Polyvinylpyrrolidone 2 g, Sodium Phosphate mono-basic 600 mg 混合加水至 200 mL, 从中取出 20 mL 加 Fast Garnet GBC salt 300 mg 制成染色液, 用染色液染色, 等显色后用水洗。

(18) CK-B, CK-M, AK 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 4.5 mL, 0.2 mol/L $MgCl_2$ 1.5 mL, NADP 5 mg, PMS 2 mg, MTT 3 mg, ADP 7.4 mg, Hexokinase 150 μ L, Glucose 12 mg, G6PDH 10 μ L, 质量分数为 1.5%的 Agar 6 mL, 放入 37 °C 恒温箱。

(19) Es-4, Es-III 0.01 mol/L Tris-Malate 缓冲液(pH 6.8) 100 mL, α -Naphthyl acetate 10 mg, Fast Blue RR Salt 100 mg, 放入 37 °C 恒温箱。

5 常见多型座位电泳模式图

蛋白质多型电泳技术中很重要的一个环节是电泳结果的判型, 判型准确与否, 直接影响试验结果和结论的得出。为了使判型依据更为直观统一, 参考文献[17, 18], 将国际判型标准用坐标表示(图 1)。

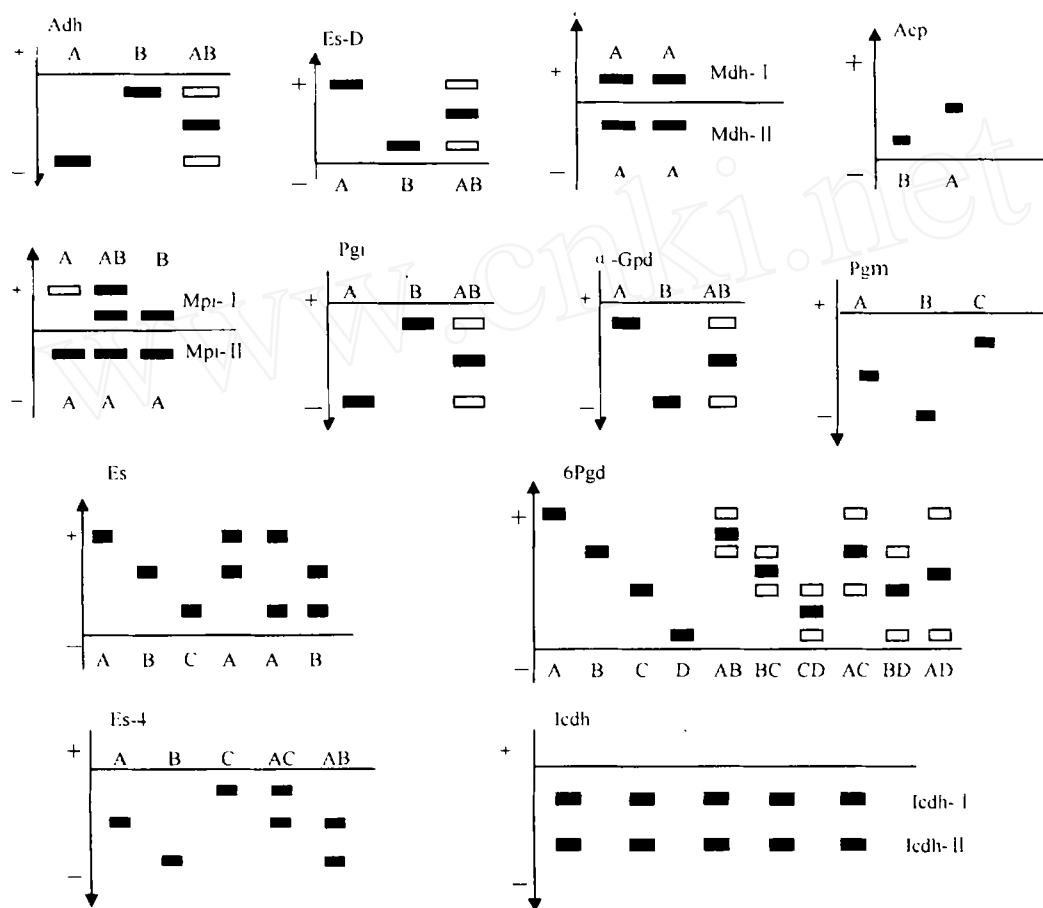


图 1 多型座位电泳模式图

Fig. 1 Model electrophoretogram of polymorphism loci

[参考文献]

- [1] 周德旺, 王 力. 鹌鹑生化遗传学的初步研究[J]. 中国饲料, 1992, (4): 61.
- [2] Harris H. Enzyme polymorphism in man[J]. Proc Roy Soc London B, 1996, 164: 298—310.
- [3] Lewontin R C, Hubby J L. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Protophila dseudoobscura*[J]. Genetics, 1966, 54: 595—609.
- [4] Corbin K W, Sibley C G, Ferguson A, et al. Genetic polymorphism in New Guinea starling of the genus *Apolonis*[J]. Condor, 1974, 76: 307—318.
- [5] Eriksson K, Halkka O, Lokki J, et al. Enzyme polymorphism in feral, outbred and inbred rat (*Rattus norvegicus*)[J]. Heredity, 1976, 37: 341—349.
- [6] Gillespie J H, Kojima K. The degree of polymorphisms in enzymes involved in energy production compared to that in nonspecific enzyme in two *Drosophila ananassae* populations[J]. Genet, 1968, 61: 582—585.
- [7] Corbin K W, Sibley C G, Ferguson A. Genic changes associated with the establishment of sympatry in orioles of genus *Icterus*[J]. Evolution, 1979, 33: 624—633.
- [8] Hashiguchi T, Yoshimitsu Y, Maeda Y, et al. Genetical studies on liver esterase isozymes of the Japanese quail *Coturnix coturnix japonica*[J]. Jpn J Breed, 1978, 28: 329—335.
- [9] Watanabe T, Wakasugi N. Genetic Variants of pancreatic α -amylase in the Japanese quail[J]. Jpn J Genet, 1976, 35: 55—57.
- [10] De-Xing Hou. Genetic studies on pancreatic Proteinase in Japanese Quail[J]. Biochemical Genetics, 1989, 27(7/8): 469—479.
- [11] 佐野晶子. 鹌鹑的家养化及系统分化研究[D]. 日本岐阜: 日本岐阜大学图书馆, 1995. 12—13.
- [12] Bengtsson S, Sandberg K. A method for simultaneous electrophoresis of four horse red cell enzyme systems[J]. Anim Blood Grps Bichem Genet, 1973, (4): 83—87.
- [13] Clayton J W, Tretiak D N. Amine-citrate buffers for pH control in the starch gel electrophoresis[J]. Fish Res Bd Can, 1972, 29: 1169—1172.
- [14] Shaw C R, Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes—A compilation of recipes[J]. Biochem Genet, 1970, (4): 297—320.
- [15] Gahne B. Studies of transferrins in serum and milk of Swedish cattle[J]. Anim Prod, 1961, (3): 135—145.
- [16] 木村正雄. ウズラの蛋白質多型について[J]. 家禽会志, 1982, 19: 211—221.
- [17] 佐野晶子, 福田博司, 木村正雄. コマル シヤル? ウズラ集団の遺伝的変異性[J]. 家禽会志, 1993, 30: 316—318.

Multiloci electrophoresis technique of protein in quail viscera and muscle

ZHENG Hui-ling¹, CHANG Hong², AKIO Sano³, LIU Xiao-lin¹, LI Xiang-yun¹, REN Zan-jun¹

(1 College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Husbandry and veterinary, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 3 Gifu University Gifu, 500 Japan)

Abstract: Multiloci electrophoresis technique of protein polymorphism in animal blood was improved and applied to detect protein polymorphism in quail viscera and muscle. So the number of protein loci which can be detected in quail viscera and muscle increased from 3 reported in China to 32. Starch gel electrophoresis technique of 32 protein loci in quail viscera and muscle is detailed in this paper. It provided a scientific method for the evaluation, conservation and exploitation of genetic resources of quail objectively.

Key words: quail; protein polymorphism; starch gel electrophoresis