

市售鱼鳔氨基酸及蛋白质成分分析

张金聚^{1,2}, 卢一泓^{1,2}, 何 倾^{1,2}, 吴孟华^{1,3}, 马志国^{1,2}, 张 英^{1,2*}, 曹 晖^{1,3*}

(1. 暨南大学岭南传统中药研究中心, 广东 广州 510632; 2. 国家中药现代化工程技术研究中心岭南资源分中心, 广东 广州 510632; 3. 广东省中医药信息化重点实验室, 广东 广州 510632)

摘要: **目的** 分析 16 批不同基原的市售鱼鳔中氨基酸及蛋白质成分。**方法** 建立一种 6-氨基喹啉基-*N*-羧基琥珀酰亚胺基甲酸酯柱前衍生、高效液相色谱法, 测定鱼鳔中 17 种氨基酸含量, 并对不同基原鱼鳔中氨基酸类成分进行分析; 采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析鱼鳔中的蛋白质分子量分布, 并采用蛋白质组学法鉴定鱼鳔中的蛋白质。**结果** 17 种氨基酸在一定浓度范围内线性关系良好 ($R^2 \geq 0.998\ 0$), 平均加样回收率 85.62%~109.60%, 精密度、稳定性、重复性 RSD 均小于 3.5%。16 批鱼鳔氨基酸组成与含量存在差异, 氨基酸总含量介于 468.31~620.05 mg/g; 从 16 批鱼鳔中共鉴定 688 种蛋白质, 包括 I 型在内的胶原蛋白多达 11 种, 此外, 鱼鳔中还含有较多分子质量 52~95 kDa 的低丰度蛋白。**结论** 该研究可为鱼鳔的质量评价和开发利用提供参考。

关键词: 鱼鳔; 氨基酸; 蛋白质; 高效液相色谱; 蛋白质组学

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2024)02-0499-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.024

Analysis of amino acid and protein components of commercial swim-bladders

ZHANG Jin-ju^{1,2}, LU Yi-hong^{1,2}, HE Qing^{1,2}, WU Meng-hua^{1,3}, MA Zhi-guo^{1,2},
ZHANG Ying^{1,2*}, CAO Hui^{1,3*}

[1. Research Center for Traditional Chinese Medicine of Lingnan (Southern China), Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine Lingnan Resources Branch, Guangzhou 510632, China; 3. Guangdong Key Lab of Traditional Chinese Medicine Information Technology, Guangzhou 510632, China]

ABSTRACT: **AIM** To study the amino acids and proteins in 16 batches of commercial fish swim-bladders with different origins. **METHODS** A high performance liquid chromatography method based on pre-column derivatization using 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) was developed for the determination of contents and components of 17 amino acids in fish swim-bladders. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to analyze the molecular weight distribution of proteins from different fish swim-bladders, and proteins in fish swim-bladders were identified by proteomics method. **RESULTS** The result showed that the determination of 17 amino acids had a good linear relationship ($R^2 \geq 0.998\ 0$). The average recovery rate was 85.62%–109.60% and the relative standard deviations of precision, stability and repeatability were less than 3.5%. The total content of the 17 amino acids in 16 batches of fish swim-bladders ranged from 468.31 mg/g to 620.05 mg/g. A total of 688 proteins including 11 collagens were identified from 16 batches of fish swim-bladder samples and a plenty of low-abundance proteins at 52–95 kDa were also detected in fish swim-bladders by SDS-PAGE. **CONCLUSION** This study provides a good reference for the quality evaluation and

收稿日期: 2023-01-17

基金项目: 全国名老中医药专家传承工作室 (国中医药人教函 [2022] 75 号); 广东省中医药信息化重点实验室项目 (2021B1212040007); 海洋经济发展 (海洋六大产业) 专项资金项目 (粤自然资合 [2022] 38 号)

作者简介: 张金聚 (1994—), 男, 博士生, 研究方向为中药质量评价。E-mail: jinjuzhang1101@163.com

* 通信作者: 张 英 (1976—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源、中药炮制学、中药材及饮片质量评价。E-mail: carolynzy@163.com

曹 晖 (1961—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药分子鉴定、中药质量评价、中药炮制学。E-mail: kovhuicao@aliyun.com

further utilization of fish swim-bladders.

KEY WORDS: fish swim-bladder; amino acid; protein; high performance liquid chromatography; proteomics

鱼鳔是一种传统的药食两用物质，又称鱼胶、鱼肚、鱼白、花胶等，在岭南地区尤为常用，其富含胶质，味道鲜美^[1]。中医药理论认为，鱼鳔可补肾固精、滋养筋脉、养血止血^[2-3]。现代研究表明，鱼鳔具有抗疲劳、清除自由基、抗氧化、改善便秘、抗癌、促进伤口修复等作用^[4-8]。

市售鱼鳔通常是将新鲜鱼鳔剖开，经去除血管及黏膜、洗净压扁、晒干等步骤制成。市场上的鱼鳔形态大小各异，价格相差悬殊，来源非常复杂^[9-10]。根据已有文献报道及实验室前期研究，市场上约 70% 的鱼鳔来源于石首鱼科的鱼类，此外，也可见来源于尖吻鲈科、刺鲀科等非石首鱼科的鱼鳔^[9-11]。目前，国内外学者对鱼鳔成分的研究主要集中于氨基酸、蛋白质、多糖等^[12-16]。如赵敏豪等^[17]通过氨基酸自动分析仪，发现大黄鱼鱼鳔等 7 种鱼鳔均含有 17 种常见的氨基酸，但总氨基酸含量存在差异。Kaewdang 等^[18]采用酸法和酶法提取了黄鳍金枪鱼鱼鳔中的胶原蛋白并进行了表征研究，发现鱼鳔中富含 I 型胶原蛋白。现有研究大多针对新鲜鱼鳔及少数种类的市售鱼鳔中的氨基酸、多糖及胶原蛋白进行成分测定和药理作用研究，缺少对来源复杂的市售鱼鳔开展系统的成分分析及对比研究，且对于鱼鳔中除胶原蛋白外的蛋白质分析尚为欠缺。因此，对多种市售鱼鳔的蛋白质和氨基酸成分进行全面的分析和对比，对于鱼鳔药效物质基础及质量控制研究具有重要意义，可为鱼鳔的开发利用和深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 16 批鱼鳔样品购自广东各药材市场，由暨南大学岭南传统中药研究中心张英副教授通过性状和 DNA 条形码鉴别基原，样品保存于暨南大学药学院中药标本馆。样品信息见表 1。

碳酸氢铵（分子生物学级）、尿素（分子生物学级）、甲酸（质谱纯）、三氟乙酸（质谱级）、乙腈（色谱纯）（美国 Sigma 公司）；Waters AccQ·Fluor™氨基酸测定试剂盒（货号 4034882751），包括 AccQ·Fluor 衍生剂粉末 2A、AccQ·Fluor 稀释剂 2B、AccQ·Fluor 硼酸缓冲液、AccQ·Fluor 醋酸盐-磷酸盐缓冲液、17 种氨基酸混合标准溶液〔天冬氨酸（Asp）、丝氨酸（Ser）、谷氨酸（Glu）、甘氨酸（Gly）、组氨酸（His）、精氨酸（Arg）、

表 1 鱼鳔样品信息

Tab. 1 The information of swim-bladder samples				
编号	商品名	基原	产地	收集地
S1	斗湖胶	<i>Leptomelanosoma indicum</i>	泰国	广州
S2	葫芦胶	<i>Sciades parkeri</i>	越南	广州
S3	鳗鱼胶	<i>Genypterus capensis</i>	南非	广州
S4	石斑鱼胶	<i>Pangasius sanitwongsei</i>	印度	广州
S5	鸡心胶	<i>Diodon liturosus</i>	广东	广州
S6	黄花胶	<i>Lates niloticus</i>	澳大利亚	广州
S7	黄花胶	<i>Lates niloticus</i>	广西	珠海
S8	大花胶	<i>Lates niloticus</i>	南海	珠海
S9	广公胶	<i>Otolithoides biauritus</i>	印度	广州
S10	北海胶	<i>Cynoscion acoupa</i>	广西	广州
S11	赤嘴胶	<i>Otolithoides biauritus</i>	广东	广州
S12	赤嘴胶	<i>Otolithoides biauritus</i>	泰国	广州
S13	鳘鱼胶	<i>Cynoscion acoupa</i>	浙江	广州
S14	鳘鱼胶	<i>Cynoscion acoupa</i>	智利	广州
S15	金兰胶	<i>Otolithoides biauritus</i>	澳大利亚	广州
S16	蜘蛛胶	<i>Boesemania microlepis</i>	马来西亚	广州

苏氨酸（Thr）、丙氨酸（Ala）、脯氨酸（Pro）、半胱氨酸（Cys）、酪氨酸（Tyr）、缬氨酸（Val）、甲硫氨酸（Met）、赖氨酸（Lys）异亮氨酸（Ile）、亮氨酸（Leu）、苯丙氨酸（Phe），浓度均为 2.5 mmol/L]，购于美国 Waters 公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白酶抑制剂混合物、测序级重组胰蛋白酶、蛋白质分子量标准（6.5~270 kDa）、6×蛋白上样缓冲液（上海碧云天生物技术有限公司）。

1.2 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪，配置 G7121A FLD 检测器（美国 Aglient 公司）；Milli-Q 超纯水系统（美国 Millipore 公司）；10 kDa 超滤离心管、EASY-nLC 1200 纳升级液相色谱仪、Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪（美国赛默飞世尔科技公司）。

1.3 方法

1.3.1 氨基酸含量测定

1.3.1.1 对照品溶液制备 精密移取适量浓度均为 2.5 mmol/L 的含 17 种氨基酸的对照品溶液，置于 1 mL 量瓶中，用超纯水将对照品溶液分别配制成浓度为 25.0、50.0、100.0、250.0、500.0、1 000.0、2 500.0 μmol/L 的系列对照品溶液。

1.3.1.2 样品溶液制备 取 0.05 g 已于 50 ℃烘干至恒重的鱼鳔样品，精密称定，置于耐压管中，加入 6 mol/L HCl 溶液 10 mL，120 ℃烘箱中反应

24 h，取出，冷却至室温，用 6 mol/L HCl 溶液补足减失的质量，得水解液；取 5 mL 水解液至蒸发皿中，80 ℃水浴蒸干，用 9 mL 超纯水分 3 次洗涤蒸干后的固体产物，将洗涤液转移至 10 mL 量瓶中并定容至刻度，过 0.22 μm 滤膜，即得。每个样品平行制备 3 份样品溶液。

1.3.1.3 衍生化 Waters AccQ·Fluor 衍生试剂的制备按照 Waters AccQ·FluorTM氨基酸测定试剂盒说明书进行操作。吸取 1 mL AccQ·Fluor 稀释剂 2B 加入到装有 AccQ·Fluor 衍生剂粉末 2A 的试剂瓶中，涡旋振荡 10 s，于 55 ℃恒温水浴锅中加热 8~9 min，制得衍生试剂。

衍生样品溶液和对照品溶液：分别吸取 10 μL 对照品溶液或样品溶液、70 μL AccQ·Fluor 硼酸盐缓冲液、20 μL 衍生试剂于 0.2 mL 离心管中，放置 1 min，涡旋振荡 10 s，于 55 ℃恒温水浴锅中加热 8~9 min，冷却，即得。

1.3.1.4 色谱条件 AccQ·FluorTM C₁₈ 色谱柱（150 mm×3.9 mm，4 μm）；使用超纯水将 AccQ·Fluor 醋酸盐-磷酸盐缓冲液（pH 4.95）按 1：10 稀释，作为流动相 A，60% 乙腈水溶液为流动相 B，梯度洗脱（0~0.5 min，0~2% B；0.5~15 min，2%~7% B；15~19 min，7%~10% B；19~32 min，10%~40% B；32~33 min，40% B；33~34 min，40%~100% B；34~37 min，100% B；37~38 min，100%~0 B）；体积流量 1.0 mL/min；进样量 5 μL；柱温 37 ℃；FLD 检测器激发波长 250 nm，发射波长 395 nm。

1.3.1.5 数据处理 采用 Excel 软件对测得的数据进行处理，氨基酸含量以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，采用 SPSS 26.0 软件进行主成分分析。

1.3.2 蛋白质 SDS-PAGE 分析

1.3.2.1 蛋白质提取 参考 Wiśniewski 等^[19]的方法并加以改进，称取 0.1 g 鱼鳔样品，加入 500 μL 含 1% 混合蛋白酶抑制剂的 PBS，常温浸泡 1 h，组织研磨仪 60 Hz 研磨 30 s，重复研磨 3 次，加入 500 μL 含 1% 混合蛋白酶抑制剂的 SDT 缓冲液（4% SDS，200 mmol/L DTT，200 mmol/L Tris/HCl，pH 7.6），60 Hz 研磨 30 s，冰上裂解 30 min，沸水浴 5 min，100 W 超声 5 s，间隔 5 s，循环超声 6 次，再次沸水浴 3 min，涡旋振荡，12 000 r/min 离心 10 min，取上清。按照试剂盒说明书，使用 BCA 法测定蛋白质浓度。

1.3.2.2 SDS-PAGE 分析 使用 SDT 缓冲液调整

鱼鳔蛋白样品液质量浓度为 1 mg/mL，取 20 μL 蛋白样品液置于 0.2 mL 离心管中，加入 6×蛋白上样缓冲液，在 100 ℃下煮沸 5 min，每孔上样量 10 μL，凝胶电泳于恒压模式下进行，开始时电压保持在 60 V，进入分离胶后调整电压为 120 V。电泳结束后，使用考马斯亮蓝 R-250 将胶片染色 1 h，于脱色液（含 50% 甲醇、10% 冰醋酸）中脱色 12 h。

1.3.3 蛋白质种类鉴定分析

1.3.3.1 蛋白质提取与酶解 参考 Wiśniewski 等^[19]的方法并加以改进，取“1.3.2.1”项下蛋白质样品，使用 SDT 缓冲液调整鱼鳔蛋白样品质量浓度为 1 mg/mL，取 200 μL 蛋白样品液加入到超滤离心管中，用 300 μL 8 mol/L 尿素稀释，12 000 r/min 离心浓缩 30 min，用 300 μL 8 mol/L 尿素置换一次；加入 100 μL 50 mmol/L 碘乙酰胺溶液，暗处反应 30 min，12 000 r/min 离心浓缩；8 mol/L 尿素置换 3 次；加入 300 μL 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液置换 2 次；加入胰蛋白酶（1：100），在 37 ℃酶解过夜；酶解完成后，12 000 r/min 离心收集流出液；用 10% 三氟乙酸酸化至终浓度 0.4% 时终止反应，样品脱盐后减压冷冻干燥，用 0.1% 甲酸水溶液复溶后上机测试。

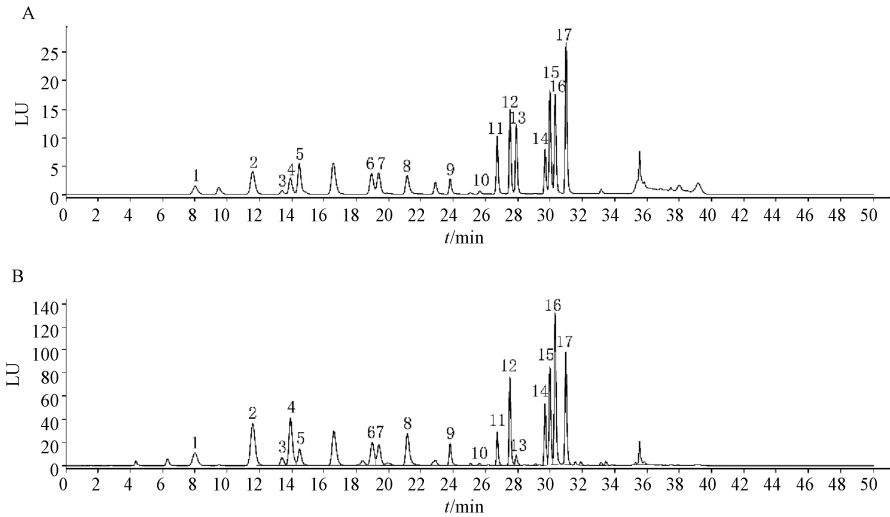
1.3.3.2 LC-MS/MS 数据采集 复溶后的混合多肽样品液采用 EASY-nLC 1200 纳升液相系统进行分离，色谱柱采用 Acclaim PepMap 100 RPLC C₁₈ 预柱（300 μm×5 mm，5 μm）和 Acclaim PepMap 100 RPLC C₁₈ 分离柱（75 μm×150 mm，3 μm）；流动相 2% 乙腈（含 0.1% 甲酸）（A）-80% 乙腈（含 0.1% 甲酸）（B），梯度洗脱（0~14 min，5%~12% B；14~40 min，12%~24% B；40~53 min，24%~38% B；53~54 min，38%~95% B；54~60 min，95% B）；体积流量 580 nL/min；进样量 3 μL。

样品经色谱分离后用 Orbitrap Fusion Lumos 采集数据，离子源为纳升源；喷雾电压 2.2 kV（正离子模式）；*m/z* 100.0~1 500.0；分辨率 60 000 at 400 *m/z*；隔离宽度为 3 *m/z*，归一化碰撞能量为 40 eV，选择丰度前 15 的离子采集二级质谱。

1.3.3.3 搜库 质谱分析原始数据采用 Proteome Discoverer 2.0 软件进行查库鉴定，数据库为 UniProt_Sciaenidae.fasta（共 66 963）、UniProt_Ariidae.fasta（共 1 410 条）、UniProt_Ophidiidae.fasta（共 554 条）、UniProt_Polynemidae.fasta（共 411 条）、UniProt_Pangasiidae.fasta（共 21 731 条）、

UniProt_ Diodontidae. fasta (共 344 条)、UniProt_ Centropomidae. fasta (共 58 460 条)。检索参数酶切为胰蛋白酶，最大漏切数为 2，无固定修饰，可变修饰设置为甲硫氨酸氧化、蛋白 N 端乙酰化，蛋白假阳性率≤1%。

2 结果与分析



注：1 为 Asp，2 为 Ser，3 为 Glu，4 为 Gly，5 为 His，6 为 Arg，7 为 Thr，8 为 Ala，9 为 Pro，10 为 Cys，11 为 Tyr，12 为 Val，13 为 Met，14 为 Lys，15 为 Ile，16 为 Leu，17 为 Phe

图 1 氨基酸标准品 (A) 和鱼鳔样品 (B) HPLC 代表色谱图

Fig. 1 Representative HPLC Chromatograms of amino acids standard (A) and swim-bladder sample (B)

2.1.2 线性关系考察 分别取“1.3.1.1”项下浓度为 25.0、50.0、100.0、250.0、500.0、1 000.0、2 500.0 μmol/L 的氨基酸对照品溶液 10 μL 进行衍生，在“1.3.1.4”项条件下进样测定，以各氨基酸标准品的峰面积为纵坐标 (Y)，其对应的浓度为横坐标 (X) 进行回归。如表 2 所示，在一定浓度范围内，17 种氨基酸线性关系良好，其相关系数在 0.998 3~0.999 9 之间，可以作为定量分析依据。

2.1.3 精密度试验 取浓度 100.00 μmol/L 的对照品衍生溶液，在“1.3.1.4”项条件下平行测定 6 次，计算 17 种氨基酸峰面积测定值的 RSD。结果显示，17 种氨基酸峰面积的 RSD 为 0.28% ~ 2.28%，表明该方法精密度较好，可用于鱼鳔样品中 17 种氨基酸的含量测定。

2.1.4 稳定性试验 取样品 S1 制备样品溶液，在“1.3.1.4”项条件下分别于 0、12、24、30 h 进样测定，计算不同时间点 17 种氨基酸峰面积测定值的 RSD。结果显示，17 种氨基酸在 30 h 内峰面积测定值 RSD 为 0.80% ~ 1.78%，表明样品在 30 h

2.1 氨基酸含量测定

2.1.1 系统适用性 取衍生化后的对照品工作液和样品溶液，在“1.3.1.4”项条件下进样测定。结果表明，衍生化后的 17 种混合氨基酸标准品和样品的色谱图峰形尖锐，分离度良好，可用于鱼鳔样品中氨基酸含量的测定，见图 1。

表 2 17 种氨基酸的标准曲线、相关系数及线性范围
Tab. 2 Calibration curves, correlation coefficients and linear ranges of 17 amino acids detected by HPLC

氨基酸	标准曲线方程	R ²	线性范围/(μmol·L ⁻¹)
Asp	Y=0.038X+23.11	0.999 5	25.0~2 500.0
Ser	Y=0.37X+4.52	0.999 3	25.0~2 500.0
Glu	Y=0.48X+11.09	0.999 9	25.0~2 500.0
Gly	Y=0.47X+0.66	0.999 9	25.0~2 500.0
His	Y=0.45X+14.73	0.999 7	25.0~2 500.0
Arg	Y=0.73X+12.9	0.999 7	25.0~2 500.0
Thr	Y=0.71X+8.58	0.998 3	25.0~2 500.0
Ala	Y=0.83X+19.89	0.999 7	25.0~2 500.0
Pro	Y=0.76X+12.28	0.999 5	25.0~2 500.0
Cys	Y=0.32X+5.63	0.999 7	25.0~2 500.0
Tyr	Y=0.86X+11.09	0.999 8	25.0~2 500.0
Val	Y=1.35X+17.69	0.999 6	25.0~2 500.0
Met	Y=1.04X+20.78	0.999 9	25.0~2 500.0
Lys	Y=0.82X-17.32	0.999 6	25.0~2 500.0
Ile	Y=17.40X-7.50	0.999 5	25.0~2 500.0
Leu	Y=1.11X+134.45	0.999 7	25.0~2 500.0
Phe	Y=1.68X+291.51	0.999 8	25.0~2 500.0

内稳定性良好。

2.1.5 重复性试验 取样品 S1 5 份，每份 0.05 g，平行制备 5 份样品溶液，在“1.3.1.4”项条件下

进样测定，计算 17 种氨基酸含量并计算 RSD。结果显示，17 种氨基酸含量计算值的 RSD 为 1.21%~3.25%，表明该方法的重复性较好。

2.1.6 加样回收率试验 取已知氨基酸浓度的样品 S1 6 份，每份约 0.01 g，精密称量，置于耐压管中，每 3 份为一组，第一组加入 1.0 mL 浓度均为 2.5 mmol/L 的 17 种氨基酸对照品溶液，第二组加入 150 μ L 浓度均为 2.5 mmol/L 的 17 种氨基酸对照品溶液，按照“1.3.1.2”项下方法水解样品，取 5 mL 水解样品，置于蒸发皿中，80 $^{\circ}$ C 水浴蒸干，用 4 mL 超纯水分 3 次洗涤蒸干后的固体产物，将洗涤液转移至 5 mL 量瓶中，用超纯水定容，过 0.22 μ m 滤膜，即得样品溶液。在“1.3.1.4”项条件下进样测定，通过第一组样品的测定结果，计算 Asp、Ser、Glu、Gly、Arg、Thr、Ala、Pro、Val、Lys、Leu 的回收率以及 RSD；通过第二组样品的测定结果，计算 His、Cys、Tyr、Met、Ile、Phe 的回收率以及 RSD。结果显示，Asp、Ser、Glu、Gly、Arg、Thr、Ala、Pro、Val、Lys、Leu 的平均加样回收率为 102.69%~109.60%，RSD 为 0.57%~3.46%；His、Cys、Tyr、Met、Ile、Phe 的平均加样回收率为 85.62%~108.00%，RSD 为 1.17%~4.43%，加样回收率较好，满足鱼鳔样品中氨基酸的含量测定要求。

2.1.7 鱼鳔样品中氨基酸含量测定 取 16 批鱼鳔样品各 3 份，每份 0.05 g，精密称量，平行制备 3 份样品溶液，在“1.3.1.4”项条件下进样测定，结果见表 3。16 批鱼鳔样品均检出 17 种氨基酸，但氨基酸总量存在差异，介于 468.31~620.05 mg/g 之间。在测定的氨基酸中，含量最高者为甘氨酸，达到 110.43~133.91 mg/g，约占总量的 21.50%~24.35%，其次为脯氨酸、精氨酸、谷氨酸和丙氨酸，上述 5 种氨基酸的含量占总量的 60.42%~69.61%，为鱼鳔中的优势氨基酸。大部分鱼鳔中含量最低的氨基酸为半胱氨酸，平均为 5.16 mg/g，与酪氨酸含量接近，这与段振华等^[20]的研究结果相似。

鱼鳔中的氨基酸与其风味和功效密切相关，鱼鳔具有特殊的鲜味，其鲜味来源于其中的谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸^[21]，6 种呈味氨基酸的含量占总量的 49.77%~52.98%。鱼鳔中精氨酸的平均含量为 56.26 mg/g，精氨酸能显著提高精子的数量以及活力，在治疗由于少精、精子活力低引起的男性不育症中有良好的

疗效^[22]。在临床应用中，鱼鳔常用于治疗少精和精子活力低导致的男性不育症，这可能与含有较高含量的精氨酸有关^[23]。

传统经验认为，石首鱼科鱼类的鱼鳔质量优于其它种类的鱼鳔，市场上石首鱼科的鱼鳔价格也相对较高^[9-10]。本研究所收集的 16 批鱼鳔共来源于 10 种鱼类，其中 S1~S8 来源于非石首鱼科，S9~S16 则来源于石首鱼科。不同基原的鱼鳔氨基酸含量存在一定的差异，如 S2 商品名为葫芦胶，来源于海鲇科的派氏沼海鲇，其氨基酸总含量最低，为 468.31 mg/g；氨基酸总含量最高的为 S12，来源于石首鱼科的长吻拟牙鲷，其氨基酸总含量可达 620.05 mg/g。虽然 S2 的总氨基酸含量低于 S12，但 S2 所含氨基酸中必需氨基酸占氨基酸总含量的 23.5%（110.23 mg/g），高于 S12 的 20.0%（124.10 mg/g）。进一步对 16 批鱼鳔中氨基酸含量进行了主成分分析并绘制散点图，结果见图 2，S1~S8 和 S9~S16 在第一和第二主成分上未能明显地区分开，初步表明石首鱼科和非石首鱼科的鱼鳔中的氨基酸成分差异并不明显。

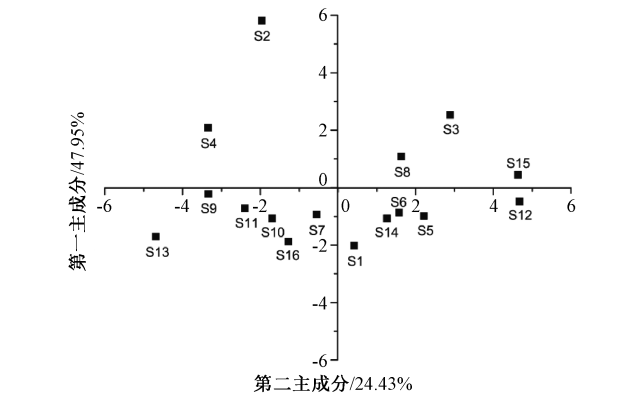


图 2 16 批鱼鳔样品氨基酸主成分分析图

Fig. 2 Principal component analysis of amino acids in 16 batches swim-bladder samples

市场上的鱼鳔种类繁多，对鱼鳔的真伪优劣评价仅依赖于传统的经验，缺乏统一的标准，氨基酸是鱼鳔的主要成分之一，氨基酸的组成及含量是衡量鱼鳔质量的重要指标，考虑到不同鱼种的鱼鳔氨基酸含量的差异，应将鱼鳔中含量较高的甘氨酸、脯氨酸、精氨酸、谷氨酸等作为重要指标，同时与其它指标，如脂肪酸和矿物质等的组成及含量进行结合，共同作为制定鱼鳔质量标准的依据，以全面、客观地评价鱼鳔的质量。

2.2 鱼鳔样品中蛋白质 SDS-PAGE 分析 由图 3 可知，16 批鱼鳔中蛋白质在分子质量 52~270 kDa

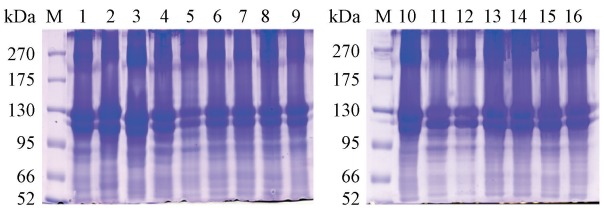
表 3 16 批市售鱼鳔中氨基酸种类及含量 (mg/g, n=3)

Tab.3 Kinds and contents of amino acids in 16 batches of commercially swim-bladders (mg/g, n=3)																
氨基酸	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
Asp	29.45	24.10	35.81	26.41	34.78	36.83	28.49	31.69	25.45	30.32	27.43	36.49	21.32	30.36	36.37	21.79
Ser	26.76	20.84	35.08	21.77	31.01	30.99	24.17	25.85	20.93	23.68	22.43	30.39	18.46	24.99	29.42	19.40
Glu	45.46	19.84	46.10	34.24	39.10	44.13	35.39	42.83	42.87	32.69	40.51	46.82	47.26	41.04	39.64	45.67
Gly	127.64	110.43	123.66	114.96	127.79	124.69	127.82	127.03	114.34	118.12	119.36	133.91	115.05	127.06	132.72	128.55
His	10.95	15.54	16.44	10.28	11.62	12.26	11.81	13.12	10.52	9.70	10.63	12.92	9.34	11.55	13.05	10.65
Arg	58.42	39.52	62.15	43.81	66.07	70.35	57.39	59.70	47.89	48.53	49.87	69.89	50.47	59.45	64.84	51.85
Thr*	17.03	14.67	15.99	12.97	19.40	18.35	14.34	15.11	13.85	15.92	14.56	20.11	11.62	16.18	19.05	14.16
Ala	65.99	53.41	54.41	50.02	64.14	63.52	66.25	62.69	57.25	59.22	60.16	71.39	54.36	64.21	70.48	60.02
Pro	74.52	59.74	67.61	63.17	73.48	73.84	76.70	73.22	64.29	68.21	66.56	79.75	67.66	78.21	77.62	75.19
Cys	4.86	5.67	5.22	5.01	5.25	5.21	5.35	5.22	5.65	4.23	5.36	6.66	4.80	6.49	3.50	4.07
Tyr	3.63	8.99	7.54	6.42	6.85	5.06	3.58	6.61	5.68	5.05	5.89	7.73	2.72	4.88	9.12	4.41
Val*	16.83	18.01	18.97	13.51	18.17	16.38	16.53	18.60	14.55	13.76	14.31	18.29	12.92	15.70	18.91	14.26
Met*	10.16	6.98	12.70	9.30	13.48	10.71	7.82	10.28	9.13	13.54	10.07	11.97	6.41	11.38	15.18	12.34
Lys*	24.77	20.25	23.92	19.44	23.51	21.42	21.98	23.87	19.66	24.31	21.08	26.29	21.42	27.57	26.39	24.61
Ile*	7.71	12.89	10.89	11.40	7.08	8.53	8.22	10.75	7.12	7.43	7.12	9.23	6.75	8.56	10.35	7.43
Leu*	16.92	19.87	19.82	18.96	17.16	18.13	17.54	20.42	17.12	17.55	16.83	20.84	16.26	19.40	21.75	17.74
Phe*	15.57	17.56	18.70	15.27	16.15	15.80	15.59	17.11	14.03	13.84	13.99	17.37	14.12	16.13	17.28	15.79
总含量	556.67	468.31	575.01	476.94	575.04	576.20	538.97	564.10	490.33	506.10	506.16	620.05	480.94	563.16	605.67	527.93
必需氨基酸总含量	108.99	110.23	120.99	100.85	114.95	109.32	102.02	116.14	95.46	106.35	97.96	124.10	89.50	114.92	128.91	106.33

注：* 为人体必需氨基酸。

内均有分布，且蛋白条带的颜色深浅有较高的相似性，表明不同的鱼鳔样品中的蛋白质成分比较接近。在分子质量 95~130 kDa 和 175~270 kDa 明显存在一些高丰度的蛋白，与 Cruz-López 等^[24]通过酸法、酶法提取出的鱼鳔中 I 型胶原蛋白相似。已有研究表明，鱼鳔中含量最多的蛋白质为由 2 条 α1 链和 1 条 α2 链组成的 I 型胶原蛋白，分子质量为 110~130 kDa，并含 2 条 α 链聚合的 β 链及 3 条 α 链聚合的 γ 链，且多肽链中最常见的三肽单位是 G-X-Y（G 为甘氨酸，X、Y 通常分别为脯氨酸和羟脯氨酸）^[25-26]。由图 3 可知，95~130 kDa 明显存在 2 种高丰度蛋白，应分别为 I 型胶原蛋白的 α1 链和 α2 链，175~270 kDa 范围内的高丰度蛋白则可能为 I 型胶原蛋白的 β 链和 γ 链，此结果与前述氨基酸含量的测定结果相吻合。

除 I 型胶原蛋白，在 52~95 kDa 范围内还存在较多的低丰度蛋白。研究表明，鱼鳔胶原蛋白具有组织相容性、低抗原性等特点，用于生物医用材料、高分子复合材料具有独特的优势^[27]，现有的工业超声波胶原蛋白提取系统可高效提取鱼鳔中的胶原蛋白，但后续的胶原蛋白纯化程度不够理想^[28]，本研究结果初步表明，鱼鳔中含有较多分子量 52~95 kDa 的蛋白质，其分子量较胶原蛋白小，因此，可考虑利用超滤技术，除去分子质量相对较小的杂蛋白，高效简便地实现胶原蛋白的纯化。



注：1~16 为 S1~S9，M 为 Marker。

图 3 鱼鳔蛋白质 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE patterns of proteins from swim-bladders

2.3 鱼鳔样品中蛋白质鉴定分析 通过蛋白质组学分析，在 16 批鱼鳔样本中共鉴定 688 种蛋白质，其中 547 种（80%）蛋白质分子量 ≤100 kDa（见图 4），表明鱼鳔中含有丰富的低分子量的蛋白质，与前述 SDS-PAGE 分析结果基本吻合。

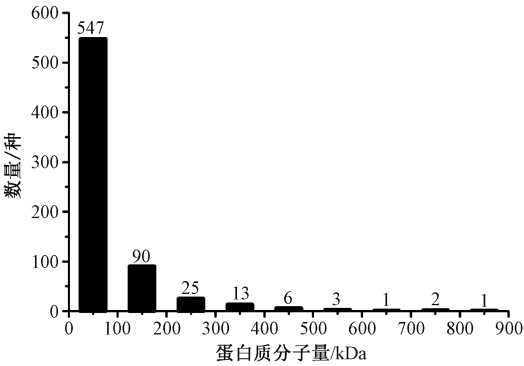


图 4 鱼鳔中蛋白质分子质量分布

Fig. 4 Molecular weight distribution of proteins in swim-bladder samples

共鉴定胶原蛋白有 11 种（表 4），其中，I 型胶原蛋白的 $\alpha 1$ 链和 $\alpha 2$ 链覆盖度均达到 40%，II 型、VI 型和 VII 型胶原蛋白覆盖度均 $\geq 10\%$ ，此外还有 IV 型、V 型等胶原蛋白。由此可见，鱼鳔中所含蛋白质以 I 型胶原蛋白为主，其它种类的胶原蛋白为辅。另外，鱼鳔中还含有多种非胶原蛋白质，如

作为细胞骨架的角蛋白，其与胶原蛋白类似，具有良好的生物相容性，可用于制作促进伤口愈合的复合材料等^[29]，具有良好的应用前景。对鱼鳔中蛋白质种类的全面鉴定分析可为更深入地研究和开发利用鱼鳔提供参考。

表 4 鱼鳔中鉴定得到的胶原蛋白
Tab. 4 Identified collagens in swim-bladders

胶原蛋白种类	蛋白质序列号	肽链	鉴定肽段数	Unique 肽段数	蛋白质长度	MW/kDa	q-value	覆盖度/%
I	A0A5J6XWD3	α 1	46	10	1 447	136. 5	0	40
	A0A5J6XX13	α 2	41	23	1 351	126. 7	0	40
II	A0A6G0J3M4	α 1	12	4	1 491	142. 4	0	13
IV	A0A4W6BQW9	α 2	2	2	1 360	136. 1	0	2
V	A0A4W6D1R3	α 2a	1	1	1 258	125. 6	0. 002	1
VI	A0A6G0IIP2	α 1	7	2	680	70. 5	0	10
	A0A4W6C9J4	α 2	15	7	1 014	107. 1	0	14
	A0A4W6FPT3	α 3	28	21	2 619	286. 0	0	13
XIII	A0A4W6E0V3	α 1	1	1	736	71. 9	0	2
IX	A0A6G0HMW3	α 1	1	1	815	79. 9	0. 009	1
X	A0A4U5TYI4	α 1	1	1	745	73. 2	0	2
XI	A0A6G0IHE2	α 1	1	1	1 812	185. 6	0. 013	1
VII	A0A0F8AGQ2	α 1	42	19	3 774	406. 2	0	12
XIV	A0A4W6CH24	α 1	1	1	1 488	163. 1	0. 001	1

3 结论

本实验建立了 AQC 柱前衍生结合超高效液相色谱同时测定鱼鳔中 17 种氨基酸的方法，该方法具有良好的精密度、重复性、稳定性和回收率。通过提取鱼鳔中蛋白质，采用 SDS-PAGE 对鱼鳔中蛋白质的分子量分布等特征进行研究，同时采用蛋白质组学的方法对鱼鳔中的蛋白质种类进行鉴定。结果表明，不同基原的鱼鳔均含有 17 种氨基酸，且含量非常丰富，氨基酸总含量的平均值达到 539. 47 mg/g，甘氨酸在鱼鳔中的含量最高，其次为脯氨酸、精氨酸、谷氨酸和丙氨酸。甘氨酸具有维持前列腺健康等功能，丙氨酸、谷氨酸可与甘氨酸组成复合制剂，用于治疗前列腺炎和前列腺肥大，精氨酸则能显著提高精子质量，常用于治疗男性不育症，鱼鳔中的优势氨基酸为其补肾固精、滋养筋脉等功效提供了一定的理论依据和物质基础。通过对鱼鳔中氨基酸含量进行主成分分析，结果显示不同的鱼鳔样品在第一和第二主成分上没有明显区分开，表明不同来源的鱼鳔中的氨基酸成分差异不明显。

鱼鳔中的蛋白质主要为 I 型胶原蛋白，SDS-PAGE 分析结果表明鱼鳔中蛋白质分子量在 52 ~ 270 kDa 均有分布，除 95 ~ 130 kDa 和 175 ~ 270 kDa

的丰度较高的 I 型胶原蛋白链外，在 52 ~ 95 kDa 还存在较多的低丰度蛋白，从蛋白条带的分子质量和颜色深浅分析，不同的鱼鳔中蛋白质成分具有较高的相似性。通过蛋白质组学对鱼鳔中的蛋白质种类进行鉴定，发现鱼鳔含有多达 11 种胶原蛋白，同时含有多种用途广泛的非胶原蛋白质，如角蛋白等。

综上所述，鱼鳔中氨基酸含量及蛋白质成分的系统分析，为鱼鳔的质量控制及品质评价提供了科学依据，也为其深层次的开发利用提供了新思路。

参考文献：

[1] 邓秋婷, 吴孟华, 张 英, 等. 鱼鳔的本草考证 [J]. 中药材, 2018, 41(3): 749-752.

[2] 刘美琪, 汤轶波, 郑燕飞, 等. 基于肾藏精理论对鱼鳔治疗男性不育症的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(6): 761-763; 834.

[3] 周斯仪, 屈 义, 钟赛意, 等. 鱼鳔类肝素提取工艺优化及抗凝血活性研究 [J]. 食品与机械, 2018, 34(7): 151-157; 219.

[4] Zhao Y Q, Zeng L, Yang Z S, *et al.* Anti-fatigue effect by peptide fraction from protein hydrolysate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) swim bladder through inhibiting the oxidative reactions including DNA damage [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(12): 221.

[5] Zheng J W, Tian X X, Xu B G, *et al.* Collagen peptides from

swim bladders of giant croaker (*Nibea japonica*) and their protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage toward human umbilical vein endothelial cells[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(8): 430.

[6] Li G J, Sun P, Wang R, *et al.* Preventive effect of polysaccharide of *Larimichthys crocea* swim bladder on reserpine induced gastric ulcer in ICR mice [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18(2): 183-190.

[7] Chen L H, Song J L, Qian Y, *et al.* Increased preventive effect on colon carcinogenesis by use of resistant starch (RS₃) as the carrier for polysaccharide of *Larimichthys crocea* swimming bladder[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(1): 817-829.

[8] Chen Y, Jin H, Yang F, *et al.* Physicochemical, antioxidant properties of giant croaker (*Nibea japonica*) swim bladders collagen and wound healing evaluation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 138: 483-491.

[9] da Silva C F, Daneluz C M, Camacho-Oliveira R B, *et al.* DNA barcode reveals mislabelling in the identification of marine fish swimming bladders for commercialization[J]. *Forensic Sci Int*, 2019, 299: 41-43.

[10] Tuuli C D, de Mitcheson Y S, Wai-Chuen N G. Molecular identification of croaker dried swim bladders (maw) on sale in Hong Kong using 16S rRNA nucleotide sequences and implications for conservation [J]. *Fish Res*, 2016, 174: 260-269.

[11] Zhang J J, Deng Q T, Liu X D, *et al.* Molecular identification of commercial fish maws by DNA sequencing of 16S rRNA and cytochrome c oxidase I genes[J]. *J Food Prot*, 2022, 85(10): 1439-1445.

[12] 李 娜, 林海燕, 吕世伟, 等. 3 种不同方式提取鳕鱼鱼鳔胶原蛋白与胶原蛋白肽的基本特性研究[J]. *中国海洋药物*, 2019, 38(3): 7-14.

[13] 袁初蕾, 邓尚贵, 励建荣, 等. 养殖大黄鱼鱼鳔的营养及安全评价[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(2): 217-222.

[14] 杨子帆, 张 科, 刘 莹, 等. 鲟鱼和草鱼鱼鳔酶溶性胶原蛋白的理化性质比较[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(15): 27-32.

[15] Gaurav Kumar P, Nidheesh T, Govindaraju K, *et al.* Enzymatic extraction and characterisation of a thermostable collagen from swim bladder of rohu (*Labeo rohita*) [J]. *J Sci Food Agric*, 2017, 97(5): 1451-1458.

[16] 屈 义, 周斯仪, 冯 陶, 等. 鱼鳔糖胺聚糖的提取及其吸湿保湿性能评价[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(16): 118-125.

[17] 赵敏豪, 黎 攀, 张豫粤, 等. 不同来源鱼鳔的营养成分比较分析[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(24): 12-17.

[18] Kaewdang O, Benjakul S, Kaewmanee T, *et al.* Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) [J]. *Food Chem*, 2014, 155: 264-270.

[19] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359-362.

[20] 段振华, 汪菊兰, 殷安齐, 等. 几种鱼鳔的营养成分分析与评价[J]. *食品研究与开发*, 2007(10): 62-65.

[21] Zhou X L, Guan Q L, Wang Y L, *et al.* Effect of different cooking methods on nutrients, antioxidant activities and flavors of three varieties of *Lentinus edodes*[J]. *Foods*, 2022, 11(17): 2713-2717.

[22] Zhang Y F, Yang J Y, Meng X P, *et al.* L-arginine protects against T-2 toxin-induced male reproductive impairments in mice [J]. *Theriogenology*, 2019, 126: 249-253.

[23] 吴建淮, 赵 雪, 马 乐, 等. 鱼鳔补肾丸改善男性精子DNA 碎片指数的 120 例临床观察[J]. *中国男科学杂志*, 2016, 30(9): 44-47.

[24] Cruz-López H, Rodríguez-Morales S, Enríquez-Paredes L M, *et al.* Comparison of collagen characteristic from the skin and swim bladder of gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*) [J]. *Tissue Cell*, 2021, 72: 101593.

[25] Weis M A, Hudson D M, Kim L, *et al.* Location of 3-hydroxyproline residues in collagen types I, II, III, and V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(4): 2580-2590.

[26] Perumal S, Antipova O, Orgel J P. Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2824-2829.

[27] Muhonen V, Salenius E, Haaparanta A M, *et al.* Articular cartilage repair with recombinant human type II collagen/poly lactide scaffold in a preliminary porcine study[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(5): 745-753.

[28] Yan M Y, Qin S, Li B F. Purification and structural aspects of type I collagen from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin[J]. *J Aquat Food Prod T*, 2017, 26(10): 1166-1174.

[29] Yan R R, Gong J S, Su C, *et al.* Preparation and applications of keratin biomaterials from natural keratin wastes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(7): 2349-2366.