

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)卵黄蛋白原的纯化、性质鉴定及 ELISA 检测方法的建立*

李育培^{1,2} 刁晓明¹ 盛晓洒¹ 权恒¹ 翟旭亮¹ 李云¹

(1. 西南大学动物科技学院水产科学系 淡水鱼类生殖与发育教育部重点实验室 重庆 400716;

2. 江苏畜牧兽医职业技术学院 泰州 225300)

摘要 腹腔注射 17 β -雌二醇(E₂), 使瓦氏黄颡鱼雄鱼在 7 天内产生卵黄蛋白原(Vtg)。采用凝胶过滤和离子交换两种层析技术, 从 E₂ 诱导的雄性瓦氏黄颡鱼血浆中分离、纯化出 Vtg。采用糖、磷、脂蛋白染色技术证明分离、纯化的蛋白为 Vtg, 该 Vtg 在非变性条件下分子量约为 240kDa, 在 SDS 变性条件下分子量约为 143kDa。纯化的瓦氏黄颡鱼 Vtg 经检测显示可能含有类胡萝卜素, 但没有二硫键, 对热相对稳定。利用纯化的瓦氏黄颡鱼 Vtg, 制备了兔抗瓦氏黄颡鱼 Vtg 多克隆抗血清。用双向免疫扩散法测得抗血清的纯度较高, 效价为 1:32; Western blotting 检测显示抗血清的特异性较好。以瓦氏黄颡鱼 Vtg 多克隆抗血清为抗体, 以纯化的瓦氏黄颡鱼 Vtg 为抗原, 建立了间接酶联免疫吸附反应(ELISA)方法检测瓦氏黄颡鱼体内 Vtg 的含量, 标准曲线线性部分的线性方程为 $y = 0.099x + 0.4529$ ($R^2 = 0.9327$), 该方法检测的灵敏度为 15.6ng/ml, 工作范围为 31.2—4000ng/ml, 在此范围内, 标准曲线具有良好的线性。

关键词 瓦氏黄颡鱼, 卵黄蛋白原, 纯化, 多克隆抗血清, 酶联免疫吸附反应(ELISA)

中图分类号 Q956

卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vtg)是卵生脊椎动物的一种雌性特异性蛋白, 是卵黄蛋白的前体(Wallace, 1985)。鱼类的 Vtg 是一种高分子量的磷酸脂糖蛋白, 在雌激素 17 β -雌二醇的刺激下由肝脏产生, 并随血液循环系统进入卵巢, 被卵巢吸收后分解成卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白和 α -组分, 是胚胎发育主要的营养来源(Mañanós *et al*, 1994; Hiramatsu *et al*, 1997; Romano *et al*, 2004)。通常 Vtg 只能在繁殖期的雌鱼血浆中检测到, 但是由于雄鱼和幼鱼体内也含有 Vtg 基因, 因而在外源雌激素(Tyler *et al*, 1990)或者雌激素类似物的诱导下, 雄鱼和幼鱼也能分泌 Vtg(Folmar *et al*, 2000; Gimeno *et al*, 1998)。在血浆中, Vtg 连接 Ca²⁺、Mg²⁺和 K⁺为鱼类的生长发育提供矿物质, 另外 Vtg 的主要降解产物在调控硬骨鱼类卵的水合作用和浮性方面也起着重要作用(Matsubara *et al*, 1999)。近

年来, Vtg 作为环境内分泌干扰物质(Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, EEDCs)的“生物标志物”的研究成为热点, 对其测定方法的报道很多, 比如: 酶联免疫吸附(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)、蛋白印迹、化学发光免疫、荧光免疫、免疫电泳等。在这些方法中, ELISA 方法由于具有较高的灵敏度、特异性、无污染、易操作等优点, 被普遍用于环境污染物的检测。目前, 许多硬骨鱼类的 Vtg 相应的 ELISA 方法已经建立。

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)隶属于鲶形目(Siluriformes)、鲿科(Bagridae)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus* Bleeker), 是一种底栖性经济鱼类, 广泛分布于我国的江河湖泊, 尤其是长江水系和珠江水系(丁瑞华, 1994)。选择当地有代表性的土著物种, 在其生活周期内, 通过检测其雄性血浆中的 Vtg 含量变化就

* 国家自然科学基金资助项目, 30670266 号。李育培, 硕士, E-mail: liypei@sina.com

通讯作者: 刁晓明, E-mail: diaoxiaoming1965@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-19, 收修改稿日期: 2009-03-26

可以反映当地水环境受 EEDCs 污染的程度(An *et al.*, 2007), 因此, 瓦氏黄颡鱼可以作为检测其生活的水域受 EEDCs 污染的理想试验鱼类, 但目前利用瓦氏黄颡鱼 Vtg 作为“生物标志物”检测 EEDCs 的研究还未见报道。本研究提取、纯化了瓦氏黄颡鱼的 Vtg, 对其理化性质及免疫特性进行研究, 并制备其多克隆抗血清, 建立其 ELISA 检测方法, 这不仅使人们更深入了解鲶形目鱼类的卵黄雌性蛋白, 为今后开展鲶形目鱼类卵黄蛋白的发生、合成途径、退化及 Vtg 在胚胎发育过程中的作用等方面的研究提供理论基础, 还可以利用瓦氏黄颡鱼 Vtg 监测其分布的水域受 EEDCs 污染的情况。

1 材料与方法

1.1 试验药品与仪器

17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E₂)为 sigma 公司(美国)生产; 聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶过滤介质(sephacryl S-300 high resolution)、二乙胺基乙基琼脂糖纤维素离子交换层析介质(DEAE sepharose Fast Flow)和非变性蛋白分子量 Marker 购自 Pharmacia 公司(瑞典); 变性蛋白分子量 Marker 购自大连宝生物工程有限公司; 其余试剂购自北京鼎国公司和重庆吉元化学有限公司, 均为化学分析纯。

Universad Hood 型凝胶成像系统(Bio-Rad)、MC99-3 自动液相色谱分离层析系统(上海沪西分析仪器厂)、电转移仪(Bio-Rad)、Model 680 型酶标仪(Bio-Rad)、电泳仪(Bio-Rad)、电泳槽(Bio-Rad)、TGL-16G 型高速冷冻离心机(重庆泰坦贸易有限公司)、UV-1700 型紫外可见分光光度计(岛津)。

1.2 试验鱼与卵黄蛋白原的诱导

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)于 2008 年 4 月 1 日购自嘉陵江白庙子江段, 共 15 尾(体重 80 ± 5 g、体长 16 ± 1 cm), 分别暂养在 3 个水容量为 50L 的桶中。其中 1、2 号桶各暂养 5 条雄鱼, 3 号桶暂养 5 条雌鱼。试验用水为连续曝气 24h 的自来水, 用充氧机持续向各桶充气, 水温为 25 ± 1 °C, 每天投喂水蚯蚓并换水。

瓦氏黄颡鱼暂养一周后, 1 号桶中的雄鱼腹腔注射 E₂(浓度为 1mg/ml, 溶解于生理盐水-乙醇混合溶液中, $V_{\text{生理盐水}}/V_{\text{乙醇}} = 1/1$), 注射剂量为 10 μ g/g 体重, 为试验组; 2 号桶中的雄鱼腹腔注射同等体积的生理

盐水-乙醇混合溶液, 3 号桶中的雌鱼不注射, 2、3 号桶中的鱼为对照组。暴露 7 天后, 用肝素化的注射器从鱼尾静脉取血, 小心转入 10ml 离心管中, 加入三倍体积的 Tris-HCl (含 0.07mol/L NaCl, 1mmol/L PMSF 和 600 μ /ml 肝素钠, pH 7.5), 然后, 将血液在 4 °C、8000r/min 离心 5min, 取上清血浆, 分装在三个离心管中, -80 °C 保存备用。

1.3 卵黄蛋白原的分离纯化

参照邢欣(2006)¹⁾的方法, 采用凝胶过滤层析(sephacryl S-300 high resolution)和离子交换(DEAE sepharose Fast Flow)两步法分离、纯化瓦氏黄颡鱼的 Vtg。

1.4 卵黄蛋白原的分子量的测定

非变性/SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳按照汪家政等(2000)的方法进行。蛋白 Marker 和样品都分别在不同浓度(5%、6%、7.5%、9%、10%)分离胶中电泳, 经染色、脱色后, 置于凝胶成像系统中拍照, 根据蛋白 Marker, 由凝胶成像系统的凝胶图像分析软件完成 Vtg 相对分子量的计算, 取平均值。

1.5 卵黄蛋白原部分性质的检测

1.5.1 卵黄蛋白原含糖、脂、磷特性的鉴定 对纯化后的 Vtg 做 Native-PAGE 凝胶电泳, 分别进行糖蛋白、脂蛋白、磷蛋白染色。糖蛋白染色参照 Fairbanks 等(1971)和 Sun 等(2001)的方法进行; 脂蛋白染色参照杨安钢等(2001)方法; 磷蛋白染色参照谢松等(2006)的方法。

1.5.2 类胡萝卜素、二硫键和热稳定性检测 类胡萝卜素、二硫键和热稳定性的检测参照李育培等(2010)的方法。

1.6 瓦氏黄颡鱼卵黄蛋白原多克隆抗血清的制备

1.6.1 动物免疫实验 参照邢欣(2006)¹⁾的方法。

1.6.2 双向免疫扩散法测定抗血清效价及抗血清专一性 参照邢欣(2006)¹⁾的方法。

1.6.3 Western blotting 检测卵黄蛋白原与抗血清的结合 Western blotting 检测卵黄蛋白原与抗血清的结合参照李育培等(2010)的方法。

1.7 间接法酶联免疫吸附反应(ELISA)

包被: 用包被缓冲液将提纯的 Vtg 稀释成不同浓度, 包被酶标板(每孔 100 μ l), 于湿盒中 4 °C 孵育过夜; **洗涤**: 弃去包被液, 用每孔 300 μ l PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; **封阻**: 加入 5%牛血清白蛋白 37 °C 封阻 2h

1) 邢欣, 2006. 金鱼卵黄原蛋白多克隆抗血清制备及在内分泌扰乱化学物质检测中的应用. 中国海洋大学博士学位论文

(每孔 200 μ l); 抗血清稀释一定的浓度加入板孔(每孔 100 μ l), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 抗体与酶标抗原反应; 板用 PBST 洗涤 3 次, 加入一定浓度的羊抗兔 LgG-HRP(每孔 100 μ l) 1 : 1000 倍稀释, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h; 显色: PBST 洗板 5 次, 在各孔中加入 OPD 底物显色, 50 μ l 2mol/L 的硫酸终止反应; 测定: 于 490nm 波长下测各孔的吸光值。

1.7.1 抗血清和包被抗原最佳工作浓度筛选 用棋盘滴定法测定, 用经倍比稀释的 Vtg, 纵向包被酶标板, 阴性对照不包被 Vtg, 按间接竞争 ELISA 方法将不同浓度的抗血清横向逐孔加入板孔, 将 OD_{490} 值在 1.0 左右的抗原抗体组合进一步做标准曲线, 以确定抗血清和包被抗原最佳工作浓度。

1.7.2 标准曲线的制作 按间接竞争 ELISA 方法进行, Vtg 稀释至最佳工作浓度后包被酶标板; 用 PBS 倍比稀释的 Vtg(制作标准曲线)或经稀释后的样品(检测样品)以 1 : 1 与一定浓度的抗血清混合, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 抗血清的最终浓度应为其最佳工作浓度; 把孵育后的混合液加入经过封阻的酶标板(每孔 100 μ l), 阳性对照直接加入抗血清, 阴性对照不包被 Vtg, 分别设置 4 个重复。

2 结果与分析

2.1 卵黄蛋白原的诱导

对未经 E_2 诱导的雄鱼、经 E_2 诱导的雄鱼和自然状态下的雌鱼血浆样品进行 Native-PAGE 电泳, 考马

斯亮蓝 R-250 染色(图 1a), 结果发现经 E_2 诱导的雄鱼血浆中出现了一条新的蛋白带(对照组雄鱼没有), 对照组雌鱼在相同的位置也出现了这条蛋白带, 4 月份瓦氏黄颡鱼雌鱼的卵巢正处于发育成熟期, 其血浆中可能存在大量的 Vtg, 所以初步确定这条蛋白带为 Vtg 蛋白带。

2.2 卵黄蛋白原的纯化

E_2 诱导的雄鱼血浆经过 sephacryl S-300 high resolution 凝胶过滤层析后, 产生了三个洗脱峰, 而对照雄性血浆只有两个洗脱峰。根据洗脱峰的形状和出现的时间, 诱导组的第 1 个洗脱峰和对照组的第 1 个洗脱峰对应, 诱导组的第 3 个洗脱峰和对照组的第 2 个洗脱峰对应, 经过对比诱导组和对照的层析图后, 很明显地看出诱导组比对照组多出了一个洗脱峰, 即诱导组的第 2 个洗脱峰。Native-PAGE 电泳发现诱导组的第 2 个洗脱峰对应的洗脱液中含有大分子蛋白(图 1b), 因此, 诱导组第 2 个洗脱峰对应的洗脱液中很可能含有大量被诱导的高分子量的 Vtg, 所以收集此峰对应的洗脱液。经过离子交换柱分步洗脱后出现了两个洗脱峰, 对这两个洗脱峰进行 Native-PAGE 电泳检测, 发现第 2 个洗脱峰对应的洗脱液, 即 0.2mol/L NaCl 洗脱下的洗脱峰对应的洗脱液含有较纯的大分子条带, 经 Native-PAGE 电泳蛋白 Marker 测定其分子量为 240kDa(图 1b); SDS-PAGE 电泳显示它只有一个分子量为 143kDa 的亚基(图 1c), 因此初步确定第 2 个洗脱峰对应的洗脱液中的蛋白为瓦氏

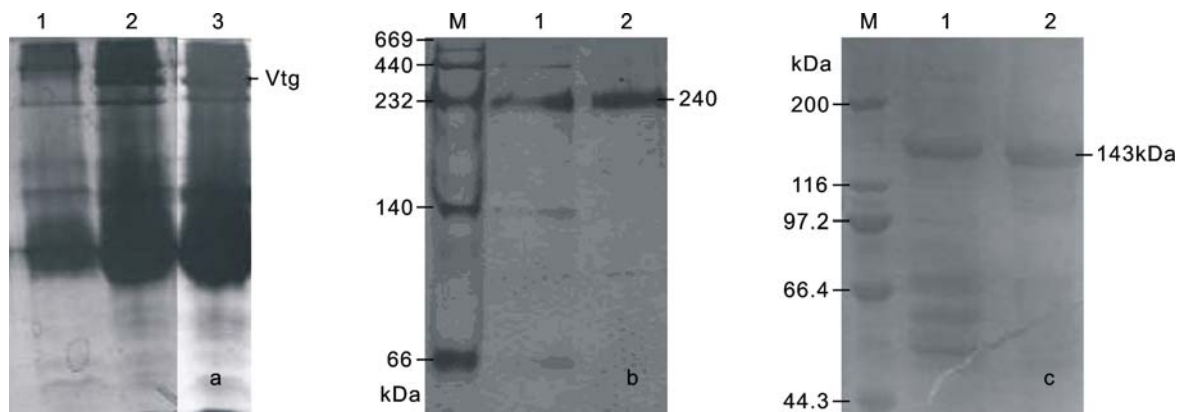


图 1 对照组与试验组瓦氏黄颡鱼血浆 Native-PAGE (a)和纯化的瓦氏黄颡鱼 Vtg Native-PAGE (7.5%) (b)、Vtg SDS-PAGE (7.5%) (c)电泳图

Fig.1 Native-PAGE analysis on the plasma of *P. vachelli* (a) treated groups and control groups, purified *P. vachelli* Vtg (7.5%) (b), SDS-PAGE analysis of purified *P. vachelli* Vtg (7.5%) (c)

a 图: 1. 对照组雄鱼; 2. 试验组雄鱼; 3. 对照组雌鱼。b、c 图: M. 蛋白质标准; 1. 经凝胶过滤层析预分离的 Vtg; 2. 经离子交换层析进一步纯化的 Vtg

黄颡鱼的 Vtg, 将其脱盐冻干, -80 保存。

2.3 卵黄蛋白原部分性质的测定

2.3.1 卵黄蛋白原的特异性染色 采用糖、磷、脂蛋白特异性染色的方法对经过离子交换柱分步洗脱出现的第 2 个洗脱峰对应的洗脱液进行 Native-PAGE 电泳后的 Vtg 做进一步鉴定。结果显示三种染色方法都呈阳性。因此, 瓦氏黄颡鱼的 Vtg 具有含糖、含磷和含脂的特性, 是一种典型的磷脂糖蛋白。

2.3.2 卵黄蛋白原类胡萝卜素检测 采用 190—1000nm 连续光谱扫描经过离子交换柱分步洗脱后出现的第 2 个洗脱峰对应的洗脱液中纯化的 Vtg, 在 276nm 处有明显的吸收峰, 说明 Vtg 含有类胡萝卜素。

2.3.3 卵黄蛋白原的二硫键检测 用 γ -巯基乙醇处理过的纯化的 Vtg 和未用 γ -巯基乙醇处理过的纯化的 Vtg 经 SDS-PAGE 电泳检测显示, 瓦氏黄颡鱼的 Vtg 没有发现含有二硫键。

2.3.4 卵黄蛋白原热稳定性检测 热处理过的纯化的 Vtg 和未经热处理过的纯化的 Vtg 经 Native-PAGE 电泳检测显示, 两个泳道的 Vtg 条带差别不大, 说明纯化后的 Vtg 相对稳定。但作者发现未纯化的 Vtg 极为容易降解, 将含有 Vtg 的血浆在 25 恒温培养箱中存放 24h 后, 经 Native-PAGE 电泳检测显示, Vtg 条带已经变得很模糊, 而在 -80 下存放的含有 Vtg 的血浆的 Vtg 条带则很清晰, 形成鲜明对比。

2.4 卵黄蛋白原抗血清效价和抗血清专一性检测

双向免疫扩散试验测得的免抗 Vtg 多克隆抗血清的效价为 1:32。试验结果显示, 在 1:2 和 1:4 两个梯度稀释孔的抗血清与中央孔纯化的 Vtg 之间出现了较宽且浓的免疫沉淀线, 这是由于抗体过量而导致抗原抗体复合物在较宽的范围内沉淀所形成的; 在 1:16 和 1:32 两个梯度稀释孔的抗血清与中

央孔纯化的 Vtg 之间出现了较淡的免疫沉淀线, 这可能与抗体过少所致; 而在 1:8 这个梯度稀释孔的抗血清与中央孔纯化的 Vtg 之间出现的免疫沉淀线明显且清晰, 说明抗原抗体比例适合。

双向免疫扩散试验检测抗血清纯度的结果显示: 制备的多克隆抗血清可以与 E_2 诱导的瓦氏黄颡鱼雄鱼血浆中的 Vtg 发生免疫反应, 形成了一条明显的免疫沉淀线; 但与对照组雄鱼血浆中的蛋白不发生免疫反应, 因而, 制备的免抗瓦氏黄颡鱼 Vtg 多克隆抗血清对瓦氏黄颡鱼的 Vtg 有很高的专一性。

2.5 抗体特异性检测结果

对照组雄鱼血浆、 E_2 诱导的雄鱼血浆和纯化的 Vtg 经 Western-Blotting 检测表明: 制备的免抗 Vtg 多克隆抗血清与纯化的瓦氏黄颡鱼 Vtg 发生阳性反应, 而且这条蛋白带在 E_2 诱导的雄性瓦氏黄颡鱼血浆中也可以观察到, 但是与对照组雄性瓦氏黄颡鱼血浆不发生任何交叉反应。由此可见, 制备的多克隆抗血清对瓦氏黄颡鱼 Vtg 有高度的特异性。

2.6 抗血清和包被抗原最佳工作浓度的确定

对最适工作浓度判断的标准为阳性孔的 OD_{490} 值约为 1, 阴性对照孔的 OD_{490} 值小于 0.1, 而抗原抗体浓度最低即为最适工作浓度。用棋盘法测定的结果见表 1。将 OD_{490} 值在 1.0 左右的抗原、抗体组合进行比较后, 选择 Vtg 抗血清的稀释度为 1:32000、1:64000 和 1:128000 三个浓度再进一步确定最佳的抗体浓度和标准曲线的范围。取 Vtg 浓度为 8000、4000、2000、1000、500、250、125、62.5、31.2 和 15.6ng/ml 等 10 个倍比稀释后浓度包被酶标板, 每个抗体浓度在同一板上做 3 个重复, 滴定结果见表 2。表 2 所给出的是每个抗体浓度的 3 个重复在 OD_{490} 处的吸光度值的平均值。Vtg 按上述倍比稀释, 经比较, 当抗体浓

表 1 Vtg 与 Vtg 抗血清棋盘滴定结果
Tab.1 Results of the checkerboard titration of Vtg and Vtg antiserum

包被 Vtg 的 浓度(ng/ml)	抗血清稀释度								
	1:256000	1:128000	1:64000	1:32000	1:16000	1:8000	1:4000	1:2000	1:1000
1000	1.619	1.632	1.652	1.663	1.883	1.921	2.228	2.406	2.673
500	1.247	1.272	1.258	1.284	1.323	1.430	1.559	1.836	2.469
250	1.147	1.105	1.181	1.430	1.219	1.189	1.265	1.693	1.746
125	0.921	1.017	0.990	0.991	1.102	1.077	1.164	1.610	1.447
62.5	0.911	0.906	0.989	1.002	0.856	1.087	1.163	1.285	1.338
31.2	0.806	0.837	0.858	0.897	0.831	0.939	1.032	1.141	1.257
15.6	0.605	0.746	0.764	0.770	0.771	0.783	0.837	0.861	0.925
阴性对照	0.039	0.032	0.033	0.046	0.061	0.066	0.075	0.083	0.092

表 2 不同质量浓度的抗原、抗体组合下的棋盘滴定结果
Tab.2 Results of the checkerboard titration of different combinations of coating antigen and anti-serum dilutions

抗血清 稀释度	包被 Vtg 浓度(ng/ml)											
	0	7.8	15.6	31.2	62.5	125	250	500	1000	2000	4000	8000
1: 32000	0.030	0.429	0.474	0.514	0.531	0.589	0.677	0.720	0.854	1.001	1.289	1.757
1: 64000	0.031	0.637	0.616	0.651	0.687	0.755	0.767	0.860	1.044	1.136	1.366	1.657
1: 128000	0.029	0.657	0.641	0.706	0.712	0.718	0.839	0.909	0.948	1.177	1.364	1.594

度为 1: 64000 时, 曲线的灵敏度和检测范围都较好。因此, 在 ELISA 检测中, 采用 1: 64000 的抗体浓度。

2.7 卵黄蛋白原标准曲线的制作

在上述最佳条件下, 将标准 Vtg 溶液按间接 ELISA 方法进行测定。以标准 Vtg 溶液浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 用 Microsoft Excel 软件, 作标准曲线, 标准曲线线性部分的线性方程为 $y = 0.099x + 0.4529$ ($R^2 = 0.9327$)。采用标准曲线计算 Vtg 浓度时, 仅取曲线中部呈线性的一段(Lee *et al.*, 1997)。该 ELISA 对 Vtg 检测的线性范围为 31.2—4000ng/ml。卵黄蛋白原浓度在 31.2—4000ng/ml 范围内有较好的线性关系, 低于 31.5ng/ml 或超过 4000ng/ml 线性关系不好, 出现误差。

3 讨论

目前已有报道指出, 鱼类的 Vtg 是雌性特异性蛋白, 是一种糖磷脂蛋白, 正常的雄鱼不能合成和分泌, 但是在雌激素的诱导下也可合成 Vtg(Wallace, 1985)。在本试验中, 利用凝胶过滤层析和离子交换层析两步法, 通过与对照组雄鱼层析图和非变性电泳检测后对比, 从试验组雄性瓦氏黄颡鱼血浆中分离纯化出一种高分子量的蛋白, 它能够同时被糖蛋白、脂蛋白和磷蛋白的染色方法染色(邢欣等, 2004), 表明其含有糖基、脂基和磷酸基团, 与硬骨鱼类的 Vtg 特征一致, 因此确定这种高分子量的蛋白即为瓦氏黄颡鱼的 Vtg。

Vtg 的分离纯化有多种方法, 为了提高分离纯度和降低费用, 许多学者都采用了凝胶过滤和离子交换两步层析法来分离纯化 Vtg(Korsgaard *et al.*, 1998; 李康等, 2003; Roy *et al.*, 2004; 邢欣, 2006¹⁾), 本试验也采用了这种方法。本试验在层析的缓冲液和样品中都加入了蛋白酶抑制剂 PMSF, 整个层析过程都在 4 低温下进行, 使 Vtg 的降解程度降到最低。在凝

胶过滤层析中收集的第 2 个洗脱峰的样品含有多种蛋白, 而经过离子交换层析后, 这些蛋白得到进一步分离, 由 Native-PAGE 结果可知 0.2mol/L NaCl 的洗脱液中只含有一种高分子量的蛋白, 且蛋白带很清晰, 说明浓度很高, 经 Vtg 特征染色后证实为瓦氏黄颡鱼的 Vtg, 因而本试验所采用的两步分离法能够有效地分离瓦氏黄颡鱼的 Vtg。

Vtg 是种间特异性蛋白, 不同的鱼种其分子量和结构是不同的。目前已经分离出了多种鱼类的 Vtg, 它们的分子量在 250—800kDa 之间(邢欣, 2006¹⁾)。作者得到的瓦氏黄颡鱼 Vtg 的分子量为 240kDa, 相对于其它鱼类的 Vtg 分子量有点偏低, 是目前已报道硬骨鱼类 Vtg 分子量较小的。目前还没见到鲶形目鱼类 Vtg 分子量的报道。至于为什么瓦氏黄颡鱼 Vtg 分子量如此低, 是否鲶形目鱼类的 Vtg 分子量都这么低, 是否与这种鱼类所处的分类地位有关等等, 这些问题还有待进一步研究。在大部分两栖类、鸟类和鱼类中, Vtg 通过是由两个 150—250kDa 的同源二聚体组成(Specker *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 2002), 本试验经 SDS-PAGE 电泳测定瓦氏黄颡鱼 Vtg 只有一个亚基, 分子量为 143kDa, 因此认为瓦氏黄颡鱼的 Vtg 是由两个相同亚基构成的同源二聚体。

Croisille 等(1974)认为甲壳类的 Vtg 是一种糖脂类胡萝卜素蛋白; 柳峰松等(2001)试验证明中国明对虾的卵黄蛋白中含有类胡萝卜素; Vtg 能与类胡萝卜素和核黄素结合并把它们运至卵母细胞(Babin, 1992; Azuma *et al.*, 1993)。本试验通过 190—1000nm 连续光谱扫描瓦氏黄颡鱼 Vtg, 发现在 276nm 处有明显的吸收峰, 因此推测瓦氏黄颡鱼 Vtg 可能结合有少量的类胡萝卜素, 但瓦氏黄颡鱼 Vtg 到底含有类胡萝卜素与否以及含有多少类胡萝卜素, 还需进一步的试验证明。

Bast 等(1985)报道, 用 E₂ 诱导产生的一种鲶(*Thammophis sirtalis*)的 Vtg 由 124kDa 和 149kDa 的

1) 邢欣, 2006. 金鱼卵黄原蛋白多克隆抗血清制备及在内分泌扰乱化学物质检测中的应用. 中国海洋大学博士学位论文

两个亚基通过二硫键连接。目前还没看到有关于鱼类 Vtg 具有二硫键的报道,本试验对瓦氏黄颡鱼 Vtg 二硫键进行检测,发现瓦氏黄颡鱼的 Vtg 没有二硫键。未用 β -巯基乙醇处理过的 Vtg 蛋白带较淡,可能是 Vtg 没有完全被还原。

Vtg 高度不稳定,在冷冻-解冻的过程中也可能引起 Vtg 的物理性降解(Parks *et al*, 1999)。作者在试验的过程中也发现,未纯化的瓦氏黄颡鱼 Vtg 极易降解,含有 Vtg 的血浆保存在 25 的培养箱里经过 24h 后里面的 Vtg 几乎降解完全。但把纯化的瓦氏黄颡鱼 Vtg 在 60 水浴中浸泡 2min,再转入 0 冰水浴浸泡 2min,如此反复 10 次后进行非变性胶电泳检测,发现经热处理后的 Vtg 蛋白带和未经热处理过的 Vtg 蛋白带变化不大,说明纯化后的瓦氏黄颡鱼 Vtg 相对稳定。因此认为,血浆中的 Vtg 在常温下容易降解,很可能是由于血浆中含有各种消化酶或者是其它物质,在这些物质的作用下,Vtg 降解加速了。

抗原的纯度对多克隆抗血清的专一性有很大的影响,如果抗原纯度较低并含有其它抗原,则制备的多克隆抗血清可能与试验对象血浆中的多种成分发生反应,进而影响试验结果(郇欣, 2006¹⁾)。本试验采用双向免疫扩散法检测多克隆抗血清的专一性,结果发现:抗血清只与 E_2 诱导的雄性瓦氏黄颡鱼血浆发生阳性反应,而与雄性对照组血浆不发生任何免疫反应。可见本试验制备的兔抗瓦氏黄颡鱼 Vtg 多克隆抗血清具有较高的纯度和专一性,可以应用到内分泌扰乱化学物质的筛选中。

Vtg 的定量测定方法有多种,酶联免疫吸附试验法(ELISA)因具有特异性强、操作方便、快速和灵敏度高等优点而被广泛应用。目前对斑马鱼(*Danio rerio*)(Henrik *et al*, 2001)、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)(温茹淑等, 2007)、日本青鳉(*Oryzias latipes*)(Kazuto *et al*, 2002)等多种鱼类建立了 ELISA 方法来检测鱼体内的 Vtg。本文以 Vtg 作为抗原,Vtg 抗血清为抗体建立间接 ELISA 方法,包括抗血清和包被抗原最佳工作浓度筛选及 ELISA 标准曲线的绘制等。结果表明,所建立的间接竞争 ELISA 检测浓度范围为 31.2—4000ng/ml,灵敏度为 15.6ng/ml,在此范围内标准曲线具有良好的线性和重复性,可以用于对 EEDCs 的检测。

参 考 文 献

- 丁瑞华, 1994. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社, 448—468
- 李康, 周忠良, 于静等, 2003. 鲫鱼(*Carassius auratus*)卵黄蛋白原的 ELISA 检测. 中国环境科学, 23(3): 276—280
- 李育培, 刁晓明, 盛晓洒等, 2010. 瓦氏黄颡鱼卵黄脂磷蛋白(Lv)的纯化、性质鉴定及抗血清的研制. 水产学报, 34(1): 174—183
- 杨安钢, 毛积芳, 药立波, 2001. 生物化学与分子生物学试验技术. 北京: 高等教育出版社, 40—42
- 郇欣, 汝少国, Isoda Hirok 等, 2004. 17 β -雌二醇对雄性金鱼卵黄原蛋白的诱导作用. 水产学报, 28(3): 236—240
- 汪家政, 范明, 2000. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 77—122
- 柳峰松, 武金霞, 谢松等, 2001. 成熟中国对虾卵巢中卵黄蛋白的纯化. 河北大学学报(自然科学版), 21(4): 406—410
- 温茹淑, 方展强, 江世贵等, 2007. 剑尾鱼卵黄蛋白原的 ELISA 检测. 环境科学研究, 20(4): 144—149
- 谢松, 安建宏, 梁晓辉等, 2006. 克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)卵黄蛋白的部分生化性质. 河北大学学报(自然科学版), 26(2): 199—202
- Azuma M, Irie T, Seki T, 1993. Retinoids and retinoids induced by estrogen in the blood plasma of *Xenopus laevis*. J Exp Biol, 178: 89—96
- Babin P J, 1992. Binding of thyroxine and 3, 5, 3-triiodothyrene to trout plasma lipoproteins. Am J Physiol, 262: 712—720
- Bast R E, Gibson A R, 1985. Characterization of reptilian vitellogenin: subunit composition and molecular weights of vitellogenin from the colurid snake *Thamnophis sirtalis*. Comp Biochem Physiol, 80B: 409—418
- Croisille Y, Junera H, Meusy J J *et al*, 1974. The female-specific protein (vitelogenic protein) in crustacean with partic μ lar reference to *Orchestia gammarell* (Amphipoda). Amer Zool, 14: 1219—1288
- Fairbanks G, Steck T L, Wallice D F H, 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptide of the human erythrocyte membrane. Biochem J, 10: 2606—2617
- Folmar L C, Hemmer M, Hemmer R *et al*, 2000. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an *in vivo*, male sheepshead minnow (*Cyprinus variegates*), vitellogenin bioassay. Aquat Toxicol, 49: 77—88
- Gimeno S, Komen H, Gerritsen G M *et al*, 1998. Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. Aquat Toxicol, 43: 77—92
- Henrik Holbech, Lene Andersen, Gtte I Petersen *et al*, 2001.

1) 郇欣, 2006. 金鱼卵黄原蛋白多克隆抗血清制备及在内分泌扰乱化学物质检测中的应用. 中国海洋大学博士学位论文

- Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C*, 130: 119—131
- Hiramatsu N, Hara A, 1997. A relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comp Biochem Physiol*, 115A: 243—251
- Kazuto Nishi, Miyuki Chikae, Yasuhiko Hatano *et al*, 2002. Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C*, 132: 161—169
- Korsgaard B, Pedersen K L, 1998. Vitellogenin in *Zoarces viviparus*: Purification quantification by ELISA and induction by estradiol-17 and 4-nonylphenol. *Comp Biochem Physiol*, 120: 159—166
- Lee F Y, Shih T W, Chang C F, 1997. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: comparison with ovarian vitellin. *Gen Comp Endocrinol*, 108(3): 406—415
- An Lihui, Hu Jianying, Zhu Xiuyi *et al*, 2007. Crucian carp (*Carassius carassius*) VTG monoclonal antibody: Development and application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148—153
- Mañanós E, N ú nez J, Zauny S *et al*, 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp Biochem Physiol*, 107B: 217—223
- Matsubara T, Ohkubo N, Andoh T *et al*, 1999. Two forms of Vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper mosri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev Biol*, 18—32
- Parks L G, Cheek A O, Denslow N D *et al*, 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comp Biochem Physiol*, 123(C) : 113—125
- Romano M, Rosanova P, Anteo C *et al*, 2004. Vertebrate yolk proteins: a review. *Mol Reprod Dev*, 69: 109—116
- Roy R L, Morin Y, Courtenay S C *et al*, 2004. Purification of vitellogenin from smooth flounder (*Pleuronectes putnami*) and measurement in plasma by homologous ELISA. *Comp Biochem Physiol*, 139: 235—244
- Shimizu M, Fujiwara Y, Fukada H *et al*, 2002. Purification and identification of a second form of vitellogenin from ascites of Medaka (*Oryzias latipes*) treated with estrogen. *J Exp Zool*, 293: 726—735
- Specker J L, Sullivan C V, 1994. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In: Davey K G, Peter R E, Tobe S S ed. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council, Canada, Ottawa, 304—315
- Sun X T, Zhang S C, 2001. Purification and characterization of a putative vitellogenin from the ovary of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*). *Comp Biochem Physiol*, 129B: 121—127
- Tyler C R, Sumpter J P, 1990. The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiol Biochem*, 8: 111—120
- Wallace R A, 1985. Vitellogenesis and oocytes growth in non-mammalian vertebrates. In: Browder L W ed. *Developmental Biology*. Plenum Press, New York, 127—177

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION IDENTIFICATION OF VITELLOGENIN FROM *PELTEOBAGRUS VACHELLI*

LI Yu-Pei^{1,2}, DIAO Xiao-Ming¹, SHENG Xiao-Sa¹, QUAN Heng¹,
ZHAI Xu-Liang¹, LI Yun¹

(1. Department of Fisheries Science, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Key Laboratory of Reproductive and Developmental of Freshwater fish, Ministry of Education, Chongqing, 400716;
2. Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Taizhou, 225300)

Abstract 7-day after intraperitoneal injection of 17 β -estradiol (E₂), male *Pelteobagrus vachelli* produced vitellogenin (Vtg); and later the Vtg from the E₂ treated *P. vachelli* plasma was isolated and purified by gel filtration and ion-exchange chromatography. With phosphor-, lipo- and glycol-protein staining methods, we verified this protein as Vtg, in molecular weight of about 240kDa detected by Native-PAGE. In SDS-PAGE, the Vtg broke into 2 same subunits, each at 143kDa. The purified Vtg contained carotenoid of non-disulfide bond, relatively stable to heat. To make use of purified Vtg, we prepared polyclonal antiserum against *P. vachelli* Vtg. Double immunodiffusion determined that the titre for Vtg antisera was 1 : 32; and western-blotting demonstrated that polyclonal antiserum had preferably specific effect. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been then established for detecting the Vtg. The technique was developed using Vtg-resistant antiserum as antibody and Vtg as antigen in working range of 31.2—4000ng/ml, and the sensitivity at 15.6ng/ml. The equation linear part of a typical ELISA calibration curve is $y=0.099x + 0.4529$ ($R^2 = 0.9327$), which shows good linearity in the working range.

Key words *Pelteobagrus vachelli*, Vitellogenin, Purification, Polyclonal antiserum, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)