

施氏鲟卵黄蛋白的分离纯化及其性质

张年国^{1,2}, 张颖¹, 曲秋芝¹, 孙大江¹

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要: 采用组织匀浆、饱和硫酸铵分步沉淀和 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析的方法提取和纯化施氏鲟卵黄蛋白, 并对其性质进行了研究。结果表明: 采用 50% 和 70% 饱和度的硫酸铵分步沉淀与 Sephadex G-100 凝胶层析相结合的方法, 可以获得一种卵黄蛋白纯品。Native-PAGE 和 SDS-PAGE 分析表明, 该纯化蛋白纯度为 100%, 由一种同源亚基组成, 其亚基的相对分子质量约为 30 kD。油红 O、免疫印迹 (Western-blot) 和罗丹明 B 染色均为阳性, 表明该蛋白为施氏鲟卵中的一种脂磷蛋白。[中国水产科学, 2007, 14 (2): 309-314]

关键词: 施氏鲟; 卵黄蛋白; 分离纯化

中图分类号: Q959.46

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)02-0309-06

施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 是黑龙江特有的重要经济鱼类, 属淡水定居种, 仅分布于黑龙江水系^[1]。近年来, 随着鲟鱼人工养殖规模的扩大, 施氏鲟已成为国内鲟鱼养殖的主要种类, 相关研究也越来越深入。卵黄是鱼类胚胎发生期的主要营养物质, 鲟鱼类在孵出后的 6~7 d 内, 其幼体完全依赖卵黄来满足营养的需要, 而无需摄取外源性营养。卵黄的数量和质量对于早期幼体维持生命和生长发育是至关重要的。卵黄的组成十分复杂, 包括蛋白质、脂类、碳水化合物、游离脂肪酸、核苷酸和核酸等物质, 其主要成分是卵黄蛋白 (vitellin, Vn)^[2]。目前, 对鱼类卵黄蛋白前体—卵黄蛋白原 (vitellogenin, Vg) 的研究报道较多^[3-5], 而对施氏鲟卵黄蛋白的纯化及鉴定方法的研究, 尚未见报道。因此, 提取和纯化施氏鲟卵黄蛋白并了解其理化性质是深入了解卵黄发生的基础, 有助于在生理生化和分子水平上阐明鲟科鱼类的卵黄发生与调控机理, 对于探讨鲟科鱼类及其他鱼类在生理、遗传和进化上的关系等具有重要意义。

饱和硫酸铵分步沉淀法具有对蛋白活性损伤小、盐析作用强、沉淀可长时间保存、分段分离效果好、来源丰富、成本低等优点, 而被广泛的应用于生物分离的粗提纯阶段。凝胶色谱分离法具有操作方

便、不会使物质变性、可重复利用、分辨率高等优点, 因此在生物分离中占有重要的位置^[6-7]。本研究采用饱和硫酸铵分步沉淀与凝胶色谱相结合的方法, 从施氏鲟卵粗提液中纯化其卵黄蛋白, 以期建立一种操作简便、成本较低的卵黄蛋白的纯化方法, 旨在深入研究施氏鲟卵黄蛋白原和卵黄蛋白的种类、糖基、脂基、氨基酸组成等提供基础实验方法。

1 材料与方法

1.1 材料

施氏鲟取自中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心, 对雌性亲鱼催产获取成熟卵, 于 -80 ℃ 超低温冰箱中保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 全卵粗提液的制备 取施氏鲟卵 5 g, 加 3 倍体积预冷的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0 含 20 mmol/L NaCl, 0.01% 的叠氮钠), 在冰浴条件下 10 000 r/min 匀浆 5 min, 取匀浆液 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min, 取中间层上清液为卵粗提液^[6]。

1.2.2 卵黄蛋白的纯化

(1) 蛋白的硫酸铵沉淀 取卵粗提液 10 mL, 缓缓加入研细的硫酸铵粉末至终质量分数为 50% 后, 4 ℃ 盐析过夜, 5 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min 收集沉

收稿日期: 2006-06-19; 修订日期: 2006-09-04.

基金项目: 科技部“十五”攻关计划 (2004BA526B0113).

作者简介: 张年国 (1981-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物健康养殖.

通讯作者: 孙大江 (1955-), 从事冷水性鱼类人工繁育及养殖技术研究. E-mail: sundajiang0451@sohu.com

淀,溶于初始体积的缓冲液中。缓缓加入研细的硫酸铵粉分别配成30%、40%、50%、60%和70%的硫酸铵溶液,4℃盐析过夜,5 000 r/min 4℃离心15 min收集沉淀,溶于20 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0含20 mmol/L NaCl,0.01%叠氮钠)中。将各沉淀物溶于缓冲液中,装入透析袋中用蒸馏水4℃透析24 h, -20℃保存备用^[8]。

(2)饱和硫酸铵沉淀浓度的确定 采用SDS-PAGE确定沉淀用硫酸铵的最适浓度。取卵粗提液、每个梯度的上层清液和沉淀的溶解液各20 μL于含有10 μL上样缓冲液的0.5 mL塑料离心管中混匀,分离胶浓度为12%,浓缩胶浓度为5%,电泳后凝胶固定,考马斯亮蓝R250染色,脱色后,扫描,干燥保存^[8]。

(3)Sephadex G-100层析 Sephadex G-100葡聚糖凝胶用适量蒸馏水浸泡12 h,再100℃溶胀5 h,抽气装柱,用20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0,含20 mmol/L NaCl和0.01%的叠氮钠)缓冲溶液平衡柱,取电泳检测后,确定饱和硫酸铵沉淀浓度的蛋白,上样。平衡缓冲液洗脱,控制流速为1.0 mL/min,采用自动收集器来收集洗脱液,每管收集3 mL,紫外检测仪检测,层析工作站(上海金华公司产品)记录分离曲线。合并主峰,20%聚乙二醇(6 000)浓缩蛋白溶液,冷冻保存^[5]。纯化蛋白经Native-PAGE电泳,分离胶质量分数为10%,浓缩胶质量分数为5%。脂蛋白采用油红O染色法^[9-10]、磷蛋白采用甲基绿-钼氨酸染色法^[9],脱色后,薄层色谱扫描仪扫描,根据蛋白占有区带总面积的百分比计算蛋白的纯度,干燥保存。

1.2.3 抗血清的制备 新西兰兔2只,对大白兔首次免疫时,将峰B蛋白的浓缩液与弗氏完全佐剂等体积混合进行乳化。取峰B蛋白1 mg/kg背部皮下多点注射。4周后加强免疫,以后每2周加强1次。加强免疫所用佐剂为弗氏不完全佐剂,所用抗原总量及注射途径与初次免疫相同。于第2次加强免疫后耳缘静脉采血测效价,合格后(当兔子血清的效价达到1:8以上时)从家兔心脏穿刺取血,待血清析出后分离并加入0.01%的叠氮钠,于4℃冰箱保存备用。2只家兔于免疫前分别取耳血,留作阴性对照血清。

1.2.4 免疫印迹(Western-blotting) 施氏鲟全卵粗提液经Native-PAGE后,用水平半干转印系统电

转移至预处理硝酸纤维素膜上,电泳条件为10 V恒压,时间30 min。转移后以1% BSA为封闭液封闭2 h,然后加入一抗(兔抗施氏鲟IgG),4℃孵育12 h以上,然后经0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗涤后加入二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG)孵育2 h,经缓冲液洗涤后滴加DAB显色液避光显色5 min,蒸馏水终止反应^[8]。

2 结果与分析

2.1 全卵粗提液SDS-PAGE电泳

施氏鲟卵黄蛋白的亚基组成如图1所示,由8种亚基组成,其相对分子量分别为97.4 kD、66.2 kD、45 kD、33 kD、30 kD、26 kD、16 kD和15 kD,其中97.4 kD、33 kD和30 kD的蛋白带为强带型。

2.2 不同硫酸铵饱和度对卵黄蛋白得率的影响

卵黄蛋白经50%的硫酸铵沉淀后,再经30%~70%的硫酸铵处理后,电泳谱带范围明显缩小(图1、图2),在电泳图谱的相同位置均出现一条单一的强带型。在30%~60%的上清液中均有该谱带出现,而沉淀浓度为70%的硫酸铵溶液沉淀时,上清液中不含该蛋白。

2.3 卵黄蛋白的提取、纯化

由沉淀蛋白的洗脱曲线(图3)可知,Sephadex G-100的分离效果较好,可产生2个蛋白洗脱峰,两个组分峰A和峰B组分之间分离较开,达到了满意的分离效果。经Native-PAGE证实峰A与峰B均为单一的谱带,且峰A蛋白带型弱,而峰B带型强,经计算峰B的蛋白纯度为100%(图4)。取B峰洗脱液经20%聚乙二醇(6 000)浓缩后,洗脱曲线为单一的对称峰(图5)。

2.4 卵黄蛋白的电泳特征

纯化的卵黄蛋白经SDS-PAGE分析,显示为单一的蛋白谱带(图6),由一种亚基构成,其亚基分子量也为30 kD。

2.5 卵黄蛋白的特性分析

纯化蛋白经油红O和甲基绿-钼氨酸染色均呈现阳性反应,表明纯化所得蛋白是一种脂磷蛋白(图7)。将卵粗提液经电泳后,经免疫印迹检测,显示纯化蛋白只与施氏鲟卵粗提液中的一种蛋白发生免疫反应(图8),表明该纯化蛋白是在施氏鲟卵黄内存在的一种脂磷蛋白。

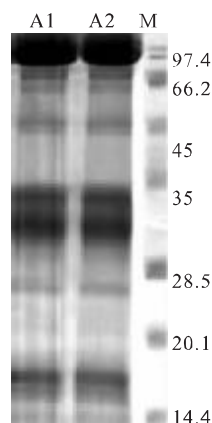


图1 施氏鲟全卵粗提液 SDS-PAGE 电泳图谱

A1、A2: 施氏鲟卵的粗蛋白

Fig.1 SDS-PAGE of the whole protein of egg dyed with R250

A1, A2: crude protein of Amur sturgeon's egg.

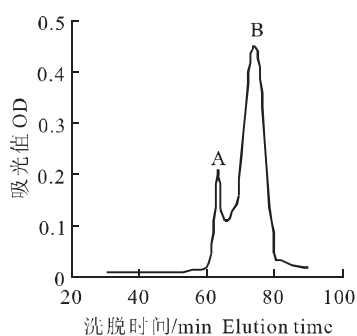


图3 卵粗提液饱和硫酸铵沉淀蛋白液 Sephadex G-100 凝胶层析洗脱曲线

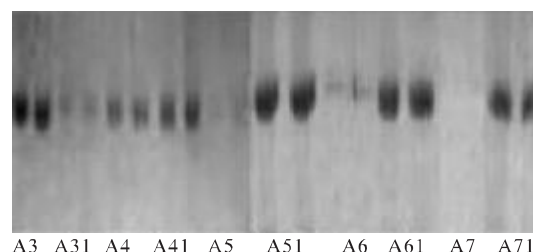
Fig.3 Analytic elution curve of column chromatography on Sephadex G-100 of protein of eggs crude extract from *Acipenser schrenckii*

图2 质量浓度 30%~70% 硫酸铵沉淀和上清液中蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

A3: 30% 上清; A31: 30% 沉淀; A4: 40% 上清; A41: 40% 沉淀; A5: 50% 上清; A51: 50% 沉淀; A6: 60% 上清; A61: 60% 沉淀; A7: 70% 上清; A71: 70% 沉淀.

Fig.2 Content of protein in supernatant sulphate and deposit at different percentages of ammonium sulphate saturation (30% - 70%)

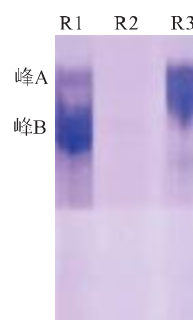
A3: supernate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 30%. A31: deposit, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 30%. A4: supernate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 40%. A41: deposit, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 40%. A5: supernate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 50%. A51: deposit, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 50%. A6: supernate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 60%. A61: deposit, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 60%. A7: supernate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 70%. A71: deposit, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation 70%.

图4 施氏鲟纯化后的蛋白 Native-PAGE 图谱

R1: 沉淀蛋白的电泳谱带; R2: 峰 A 蛋白的电泳谱带; R3: 峰 B 蛋白的电泳谱带.

Fig.4 Native-PAGE of purified protein from *Acipenser schrenckii*

R1: protein of deposit. R2: protein of peak A. R3: protein of peak B.

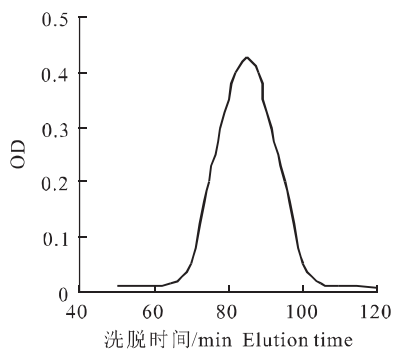


图5 峰B蛋白 Sephadex G-100 凝胶层析鉴定曲线

Fig.5 Identification elution curve from Sephadex G-100 gel filter column chromatography of peak B protein



图7 施氏鲟卵粗提液蛋白纯化后 Native-PAGE 罗丹明 B(a, 脂蛋白)、油红 O(b, 磷蛋白) 和考马斯亮蓝染色(c, 纯化蛋白)

Fig.7 Native-PAGE of purified protein from *Acipenser schrenckii* stained with Sudan bright B (a, lipid protein), red oil O (b, Phosphoprotein) and Coomassie blue (c, purified protein).

3 讨论

目前,对鱼类卵黄蛋白原的纯化研究方法较多,而对鱼类卵黄蛋白的分离纯化研究报道则较少。应用于鱼类血清中卵黄蛋白原的纯化方法,主要有蔗糖加 EDTA 匀浆-冷冻离心-饱和硫酸铵沉淀法、密度梯度超速离心法、凝胶过滤-离子交换层析法、D 型大柱聚丙烯酰胺电泳法等。其中,蔗糖加 EDTA 匀浆-冷冻离心-饱和硫酸铵沉淀法和密度梯度超速离心法,因其程序较为繁琐、沉淀效果重复性差等不足而应用较少,而凝胶色谱和离子交换层析法,具

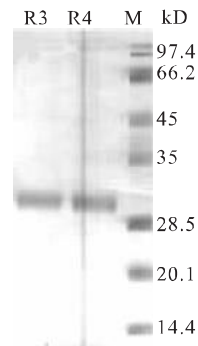


图6 峰B蛋白的 SDS-PAGE 图谱

R3, R4: 纯化蛋白; M: 蛋白 Marker.

Fig.6 SDS-PAGE of purified protein

R3, R4: purified protein; M: Marker.



图8 施氏鲟卵黄蛋白的免疫印迹图谱

Fig.8 Western blotting for protein from ovary of *Acipenser schrenckii*

有操作简单、纯化重复性好、并可反复利用等优点,被广泛的应用于蛋白纯化中。Wang^[10]利用 Ult rapac TSK2G 4 000 SW 柱提取了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 血清中卵黄蛋白原。而 Venugopal 等^[11]在纯化棉红蜡 (*Heteroptera pyrrhocoridae*) 卵细胞中的卵黄蛋白原时,则把此方法作为一个中间分离过程。饱和硫酸铵沉淀蛋白具有许多优点,而被广泛的应用于生物分离的初步分离中^[3]。因此,本实验采用饱和硫酸铵分步沉淀与凝胶色谱相结合的方法,对施氏鲟卵粗提液进行分离、纯化,以寻求一种简便、快捷、经济的卵黄蛋白纯化方法。施氏鲟卵黄粗提

液经饱和硫酸铵的沉淀浓度分别为 50% 和 70% 的饱和度沉淀后,再过 Sephadex G-100 凝胶柱可获得纯度较高的卵黄蛋白,说明使用饱和硫酸铵分步沉淀与 Sephadex G-100 凝胶柱层析相结合的方法适用于获得单一卵黄蛋白的纯化方法。

在进行 Sephadex G-100 凝胶层析洗脱的过程中发现,有环形、淡黄色的色带随洗脱向下移动,这可能与动物的卵黄蛋白结合运转类胡萝卜素有关。动物的卵黄根据其来源不同,可分为内源性卵黄和外源性卵黄两种^[12]。外源的卵黄蛋白原通过血液循环进入卵巢运输脂类到卵巢中。Yehezkel 等^[13]对红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 的研究结果表明,一种仅在次级卵黄发生期出现的雌性特异高密度脂蛋白 LP II,认为它可以作为监控生殖过程的标志,可能就是卵黄蛋白原,它在 470 nm 处有吸收峰,说明含有类胡萝卜素辅基,可以单独或同 LP I (一种在雌雄个体血淋巴中均有存在的高密度脂蛋白)一起负责将一些主要的脂类和/或类胡萝卜素运进卵巢。而 Komatsu 等^[14]和堵南山等^[15]的研究结果则表明,类胡萝卜素的存在可以影响卵黄蛋白的颜色。本实验凝胶层析洗脱过程中出现的环形、淡黄色色带,是否与类胡萝卜素有关,还有待进一步证实。

施氏鲟的卵黄蛋白由 8 种不同表观分子量的亚基组成,其表观分子量均低于 100 kD,这进一步证实了卵黄蛋白原入卵母细胞后,可被蛋白酶水解成为小分子的卵黄蛋白,其中包括卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白以及 β 或 E 成分等^[4-5],但在不同鱼类中,第一次水解卵黄原所产生的卵黄蛋白在分子大小上有所差异^[16]。鱼类的卵黄脂磷蛋白是含脂丰富的蛋白,分子量从 30 kD 到 120 kD 不等,而卵黄高磷蛋白则是磷酸化蛋白,大小不一,分子量从 10 kD 到 40 kD^[16],这与本实验通过使用饱和硫酸铵分步沉淀与凝胶色谱相结合的蛋白质纯化方法,获得了一种表观分子量约为 30 kD 的脂磷蛋白的研究结果相符。与王浩等^[17]对大阪鲫 (*Carassius auratus cuvieri* Temminck et Schlegel) 的卵黄脂磷蛋白 (H) 和 Hiramatsu 等^[7]对杂交鲟 (*Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂) 卵黄蛋白原及其相关蛋白的研究结果不同都是由不同表观分子量或相同表观分子量的多亚基构成的二聚体的结果不同,其中大阪鲫的卵黄脂磷蛋白 (H) 是由分子量 95.8 kD、90.7 kD、86.5 kD 和 26.9 kD 的 4 个亚基构成的二聚体,而杂交鲟的 3 种卵黄

相关蛋白均是由两个亚基构成的二聚体蛋白。本实验获得的纯化蛋白只与施氏鲟卵粗提液中的一种蛋白发生免疫反应,表明该蛋白可能是由单一亚基构成或是由同源亚基构成的二聚体或四聚体蛋白。

鱼类的 Vg 除了含有糖、磷、脂和其他营养成分外,还结合钙离子、锌离子、铁离子、镍离子等金属离子并运送到卵母细胞。研究发现,卵黄蛋白原中的脂磷蛋白结合锌离子,而高磷蛋白结合钙离子^[15]。油红 O 染色和罗丹明 B 染色表明,该卵黄蛋白为脂磷蛋白,因其表观分子量与对卵黄脂磷蛋白和卵黄高磷蛋白所报道的分子量略同,推测该蛋白可能是高磷蛋白或卵黄脂磷蛋白中的一种。鱼类卵黄蛋白原中脂和磷的含量分别为 20% 和 0.6%^[18]。从不同种属的鱼中分离得到的 Vg 在脂化、糖基化和磷酸化的程度上存在差别,由这种差别所引起的功能的不同目前还不清楚^[15]。

参考文献:

- [1] 孙大江,曲秋芝,王丙乾等.施氏鲟不同年龄性腺发育与性类固醇激素浓度关系[J].中国水产科学,2004,11(4):307-311.
- [2] 张成峰,蔡生力.对虾卵黄蛋白的生化性质及卵黄蛋白原合成部位的研究进展[J].上海水产大学学报,2003,12(2):168-173.
- [3] Fujii K, Hirose K, Hara A, et al. Use of vitellogenin level as a maturational indicator for artificial spawning of cultured hybrid sturgeon *Huso huso* × *Acipenser luthenus* [M]//*Acipenser Anatomy Cedex*, France: Cemagref Publishing, 1991: 381-388.
- [4] Hara A, Matsubara T, Sancyashi M, et al. Vitellogenin and its derivatives in egg yolk proteins of white-spotted char (*Salvelinus leucomaenis*) [J]. Bull Fac Fish Hokkaido Univ, 1984, 35: 144-153.
- [5] Hara A. Studies on female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts: Immunochemical, physicochemical and structural studies [J]. Mem Fac Fish Hokkaido Univ, 1987, 34: 1-59.
- [6] 刘铮,詹劲.生物分离过程科学[M].北京:清华大学出版社,2004:104-120.
- [7] Hiramatsu N, Hiramatsu K, Hirano K, et al. Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis [J]. Compar Biochem Physiol, 2002, 131 (A): 429-441.
- [8] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].科学出版社,2000.
- [9] 华家栓,西国良,易庆成.实用蛋白质化学技术[M].上海:上海科学技术出版社,1982:52-56.
- [10] Wang T, Zou J, Cunningham C, et al. Cloning and functional characterisation of the interleukin- β 1 promoter of rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2002, 1575: 108–116.
- [11] Venugopal K J, Kumar D. Vitellins and vitellogenins of *Dysdercus koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae)-identification, purification and temporal pattern [J]. *Comp Biochem Physiol: Part B*, 1999, 124: 215–223.
- [12] 周庆祥, 江桂斌. 卵黄蛋白原的分离测定及其在环境内分泌干扰物质筛选中的应用 [J]. *化学进展*, 2003, 15 (1): 67–73.
- [13] Roubal W T, Lomax D P. Purification and partial characterization of English sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin [J]. *Comp Biochem Physiol: Part B*, 1997, 118: 613–622.
- [14] Komatsu M, Ando S. A novel LDL with large amounts of phospholipid found in the egg yolk of crustacea sand crayfish *Ibacus oiliatus* its function as vitellogenin-degrading proteinase [J]. *Biochem Biophys Commun*, 1992, 186: 498–502.
- [15] 堵南山, 赖伟, 陈鹏程, 等. 中华绒螯蟹卵黄形成的研究 [J]. *动物学报*, 1999, 45 (1): 88–92.
- [16] 张士雄, 孙旭彤, 李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展 [J]. *海洋科学*, 2002, 26 (7): 32–35.
- [17] 王浩, 李朝军, 刘荣臻. 大阪鲫两种卵巢蛋白的纯化及其生化特性 [J]. *水产科技情报*, 1994, 21 (3): 103–107.
- [18] Yehezkel G, Chayoth R, Abdu U, et al. High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. *Compar Biochem Physiol: Part B*, 2000, 127: 411–421.

Purification and properties of vitellin from Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*

ZHANG Nian-guo^{1,2}, ZHANG Ying¹, QU Qiu-zhi¹, SUN Da-jiang¹

(1. Heilongjiang Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. Shanghai Fishery University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The yolk proteins of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) are chief supplemental nutrition and energy for embryo development. After organic mashing, saturation ammonium sulfate precipitating, and Sephadex G-100 gel chromatography, the pure sample of protein from eggs of *Acipenser schrenckii* was obtained. The results showed that through twice salt out of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and Sephadex G-100 gel chromatography, we found only one band in Native-PAGE and SDS-PAGE, molecular weight 30 kD, and this protein is composed of one subunit while SDS-PAGE of crude protein of amur sturgeon's eggs showed that there were eight bands. The purified protein could be stained by red oil O, luodan bright B, which meant that it was the phospholipoprotein. Sera anti-phospholipoprotein of Amur sturgeon had been prepared by repeatedly immunized New Zealand rabbits with purified protein, and titers of anti sera obtained up to 1:32 by immunodiffusion. The purified protein was detected in the protein crude extracts of amur sturgeon's eggs by Western blotting, indicative of having proteins in amur sturgeon's egg. In the paper, the results indicated that the method, using saturation ammonium sulfate precipitate protein from Amur sturgeon's egg at 50% and 70% reprecipitating saturation and further fractionated by filtration through a Sephadex G-200 column, is feasible in purification of fish egg protein. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (2): 309–314]

Key words: *Acipenser schrenckii*; vitellogenin; isolation and purification

Corresponding author: SUN Da-jiang. E-mail: sundajiang04511@sohu.com