

小体鲟卵黄雌性蛋白分离纯化及抗血清的研制

霍堂斌^{1,2}, 张颖¹, 孙大江¹, 曲秋芝¹

(1. 中国水产科学院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:采用凝胶柱层析法, 对小体鲟(*Acipenser ruthenus* Linnaeus)卵黄蛋白粗提液进行分离纯化。小体鲟卵黄蛋白粗提液的质量浓度为 25.04 mg/mL, 经 Sephadex G-200 层析后出现 3 个蛋白峰。用聚丙烯酰胺电泳、免疫印迹(Western-blotting)和免疫扩散等方法研究表明, 小体鲟卵黄蛋白由分子量分别为 132.1 kD、97.4 kD、85.9 kD、67.0 kD、59.2 kD、47.6 kD、30 kD、14.3 kD 和 12.8 kD 的 9 个亚基组成; 层析后峰 B 蛋白为卵黄雌性特异蛋白(yolk female specific protein, YFSP), 是一种糖脂磷蛋白, 具有雌性特异性和组织特异性, 抗体具有种属特异性。Western-blotting 结果表明, 卵黄雌性特异蛋白(YFSP)与血清雌性蛋白(FSSP)免疫印迹图谱上都显示分子量为 97.4 kD 和 30 kD 的 2 条杂交带, 可见两种蛋白在免疫原性上具有相似性, 可以用卵黄雌性蛋白抗血清代替卵黄蛋白原抗血清对卵黄蛋白原进行检测。[中国水产科学, 2007, 14(4): 532-539]

关键词:小体鲟; 卵; 卵黄蛋白; 卵黄雌性特异蛋白

中图分类号:Q959.46

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)04-0532-08

鲟(*Acipenser*) 在分类学上隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、硬鳞总目(Ganoidomorpha)、鲟形目(Acipenseriformes), 是一种非常古老的鱼类, 迄今已有一亿两千万年的历史^[1]。小体鲟(*Acipenser ruthenus* Linnaeus)主要分布于伏尔加河(俄罗斯)、乌拉尔河(俄罗斯、哈萨克斯坦)、库拉河(土耳其、格鲁吉亚和阿塞拜疆)和鄂毕河(俄罗斯)等水域, 在我国新疆北部水域也有分布, 有洄游和定栖两种类型。小体鲟虽然个体小, 生长较慢, 但性成熟早, 生殖能力强, 雌鱼每次怀卵量为 0.2 万~7 万粒/kg, 是一种很好的杂交亲本和鱼籽供体^[2]。自 1999 年于俄罗斯引进以后, 国内相继开展了其繁殖生理^[3]、营养生理^[4]、遗传多样性^[5]等方面的研究。

卵黄是鱼类胚胎发生期的主要营养物质, 卵黄的数量和质量对于早期幼体维持生命和生长发育至关重要, 其中卵黄蛋白(vitellin, Vn)是鱼类卵黄的主要组成物质^[6]。卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)是卵生动物卵黄蛋白的前体^[7-11], 1969 年 Pan 等^[12]首先提出卵黄蛋白原在鱼类中称为雌性特异血清蛋白(Female serum specific protein, FSSP), 是

雌性卵生动物特有的糖脂磷蛋白。目前关于鲟鱼卵黄蛋白的研究, 只在杂交鲟(*Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂)^[6]和高首鲟(*Acipenser transmontanus*)^[13]有过报道, 对小体鲟卵黄雌性特异蛋白的研究尚未见报道。因此, 本研究提取、纯化了小体鲟卵黄雌性特异蛋白, 并对其理化性质及免疫特性进行研究, 以便深入了解鲟科鱼类的卵黄雌性蛋白, 为今后开展鲟科鱼类卵黄蛋白的发生及合成途径等方面的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小体鲟 5 龄(♀/♂)鱼 6 尾, 体质量(2 360 ± 265)g, 施氏鲟(*Acipenser schrencki*) 10 龄(♀/♂)鱼 2 尾, 平均体质量 7 226 g, 均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, 对不同年龄雌、雄鱼采血获取血清; 性成熟哲罗鲑(*Hucho taimen*)体质量(3 560 ± 210)g, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)体质量(1 545 ± 120)g, 取自黑龙江水产研究所渤海试验站; 性成熟鲤(*Cyprinus carpio*)体质量(1 426 ± 94)g 和鲫(*Carassius*

收稿日期:2006-11-16; 修订日期:2007-01-22.

基金项目:国家“十五”科技攻关计划(2004BA526B0113).

作者简介:霍堂斌(1980-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类生殖生理学研究. E-mail: tbhuo@163.com

通讯作者:曲秋芝. Tel: 0451-84861424; E-mail: quqiuzhi@163.com

auratus) 体质量 (598 ± 57) g, 取自黑龙江水产研究所江北实验站, 采血获得血清, 样品分装于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。制备抗血清所用大白兔购置于哈尔滨兽医研究所实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 卵黄蛋白粗提液的制备 取小体鲟鱼卵 30 g 加入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 倍体积的 20 mmol/L Tris-HCl 预冷缓冲液 [内含 0.01% NaN_3 , 0.2 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), pH 8.0], 冰浴下 15 000 r/min 匀浆 3 min。匀浆液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 20 min, 去沉淀取上清 (重复 3 次), 最后收集上清液, 此为卵黄蛋白粗提液, 分装于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.2 蛋白含量的测定 采用 Bradford 法^[14]测定小体鲟卵黄蛋白粗提液蛋白含量, 用牛血清白蛋白作为标准。测量仪器为 UV-2401PC 分光光度计。

1.2.3 卵黄蛋白原的纯化 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 将卵黄蛋白粗提液用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 稀释至浓度为 20 g/mL, 通过葡聚糖凝胶柱 (Sephadex G-200, 1.6 cm $\times$ 75 cm) 洗脱, 洗脱速度 1.0 mL/min, 收集峰值洗脱液, 紫外检测仪监测, 记录洗脱曲线。

1.2.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 浓缩胶和分离胶质量分数分别为 4% 和 12%, SDS 质量分数为 10%, 样品适当稀释后, 于 100 V 恒压条件下电泳分析。电泳采用 Min-Protein 型电泳槽 (Bio-Rad)^[15-16]。

1.2.5 糖、磷、脂蛋白特异染色 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE)^[16], 浓缩胶和分离胶质量分数分别为 4% 和 7.5%, 电泳结束后染色。脂蛋白采用油红 O 染色法^[15-16]; 磷蛋白和糖蛋白采用 Invitrogen 公司的 2 种 SYPRO 荧光蛋白染色液, Molecular Probes' Pro-Q[®] Emerald 300 Glycoprotein Gel stain 和 Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Gel Stain。

1.2.6 兔抗血清的制备 选取新西兰大白兔制备抗血清。Sephadex G-200 柱层析, 收集峰 B 蛋白, 浓缩后 (质量浓度 2.0 mg/mL) 与完全福氏佐剂等体积混合, 充分乳化。采用背部皮下多点位注射, 每只大白兔注射 1 mL 抗原乳化液。20 d 后第 2 次加强免疫, 与不完全福氏佐剂等体积混合, 10 d 后第 3 次免疫, 5 d 后耳静脉取血测效价。效价达到 1:32 以上时, 次日心脏取血, 制备抗血清。

1.2.7 抗血清免疫球蛋白 (IgG) 的提取 20 mL 抗血清加入等量的预冷生理盐水, 混匀后加入 40 mL 预冷饱和硫酸铵, 冰浴 2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min 离心

15 min, 弃上清沉淀溶于 20 mL 冰生理盐水, 混匀后加入 10 mL 预冷饱和硫酸铵, 冰浴 2 h, 离心弃上清 (重复 3 次), 最后以 4 mL 冰生理盐水溶解沉淀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 透析 36 h。

1.2.8 免疫印迹 (Western blotting) 卵黄蛋白粗提液及雌、雄血清经 12% SDS-PAGE, 卵黄蛋白粗提液和血清分别稀释 5 倍和 10 倍后上样。电泳结束后, 在转膜缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 40 mmol/L 甘氨酸, 1.3 mmol/L SDS, 20% 甲醇) 中将凝胶中的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 恒压 10 V 30 min, 电转移后, 用 1.5% BSA $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。然后放入 1:200 (体积比) 稀释的兔抗 IgG, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h 以上 (阴性对照, 以 1.5% BSA 取代一抗, 其他步骤相同)。用 PBS 漂洗, 加入 HRP 标记的 2 抗 (体积比 1:4 000), 室温孵育 2 h, PBS 漂洗后, 加入 DAB 显色溶液 (50 mL 0.01 mol/L pH 7.4 PBS, 25 mg DAB, 10 μL H_2O_2) 室温避光显色 10 min, 双蒸水终止显色反应, 晾干后拍照保存。

1.2.9 抗血清效价的测定及抗原特异性分析 采用乌赫特朗尼免疫双扩散的方法, 加以改进后进行效价测定。中央孔为 20 μL 左右的纯化抗原, 外周第 1 个孔血清稀释度为 2^{-1} 至第 6 个孔稀释度为 2^{-6} 。

取卵黄发育后期雌性小体鲟鱼卵和肌肉、雄性小体鲟精巢、肌肉以及同科异种鱼类施氏鲟鱼卵按 1.2.1 方法提取总蛋白。另从雌、雄小体鲟, 雌性施氏鲟、哲罗鲑、虹鳟、鲫鱼和鲤鱼采集血液, 获取血清, 与兔抗小体鲟卵黄蛋白血清进行双向免疫扩散。

2 结果与分析

2.1 卵黄蛋白粗提液浓度

蛋白质量浓度标准曲线方程: $y = (x - 0.017) / 0.042$ (y 值范围 0 ~ 2 mg/mL), 其中 x 为吸光度值, y 为蛋白质量浓度 (mg/mL)。卵黄蛋白粗提液用 pH 8.0 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释 20 倍后测量吸光值, 计算得到卵黄蛋白粗提液的蛋白质量浓度为 25.04 mg/mL。

2.2 卵黄蛋白原的纯化

卵黄蛋白粗提液的 Sephadex G-200 洗脱曲线如图 1 所示, 洗脱曲线呈现 3 个洗脱峰 A、B、C, 3 个洗脱峰起峰时间相隔较长, 并且 3 个洗脱峰都比较对称, 可见采用此法可将 3 种物质完全分离开。多次收集峰 B 蛋白洗脱液, 浓缩后经 Sephadex G-200

再次洗脱,呈现单一的蛋白峰(图2),说明经二次层

析后可以达到纯化目的。

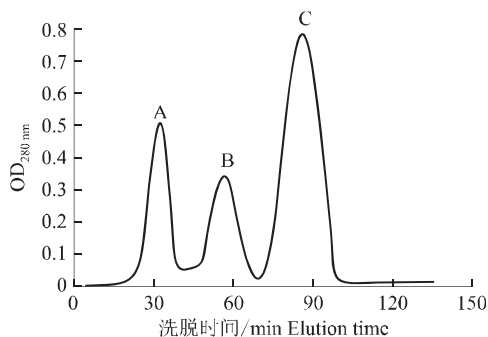


图1 小体鲟卵黄蛋白粗提液 Sephadex G-200 凝胶层析洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of column chromatography on sephadex G-200 for the egg crude extract of *A. ruthenus*

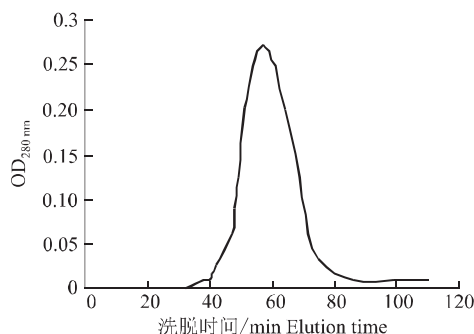


图2 图1中峰B蛋白 Sephadex G-200 凝胶层析曲线

Fig.2 Elution curve of column chromatography on sephadex G-200 for the peak B component in Fig.1

2.3 卵黄蛋白分子量

由蛋白条带在12% SDS-PAGE中的迁移率计算蛋白质相对分子质量的标准方程为: $y = 5.19 - 1.10x$ 。其中 x 表示迁移率(R_f); Y 表示 $\lg M$, M 为分子量。卵黄蛋白粗提液的12% SDS-PAGE电泳图

谱如图3所示,在凝胶上呈现9条谱带,根据标准曲线方程,计算其分子量分别为132.1 kD、97.4 kD、85.9 kD、67.0 kD、59.2 kD、47.6 kD、30 kD、14.3 kD和12.8 kD(图3)。经计算峰B蛋白两个亚基的分子量分别为30 kD和97.4 kD(图4)。

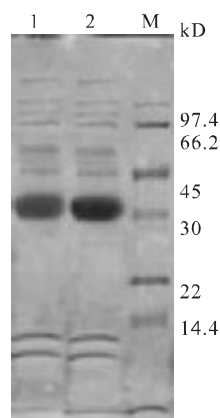


图3 小体鲟卵黄蛋白粗提液 SDS-PAGE 图谱
M: 标准蛋白;1、2: 小体鲟卵黄蛋白粗提液。

Fig.3 SDS-PAGE for the egg crude extract
M: Marker; Q: crude extract of *A. ruthenus*' s eggs

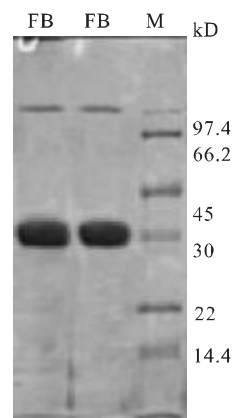


图4 峰B蛋白 SDS-PAGE 图谱
FB: 峰B蛋白;M: 标准蛋白。

Fig.4 SDS-PAGE for the peak B protein
FB: peak B component; M: Marker.

2.4 雌性血清特异蛋白分析

卵黄发育后期雌性血清和雄性血清12% SDS-PAGE结果见图5,其中雌性血清较雄性血清多出分子量为97.4 kD和30 kD的2条亚基蛋白条带。

2.5 糖、磷、脂蛋白特异染色

纯化的峰B蛋白糖、磷、脂蛋白特异染色结果如图6所示,峰B蛋白3种染色结果均为阳性。

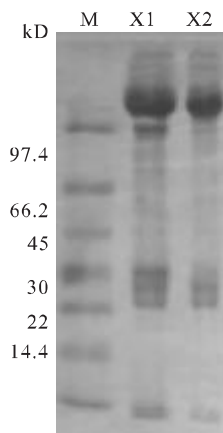


图5 小体鲟雌鱼与雄鱼血清 SDS-PAGE 图谱

M: 标准蛋白, X1: 卵黄形成后期雌鱼血清, X2: 雄鱼血清.

Fig.5 SDS-PAGE for serum of *Acipenser ruthenus* female and male

M: Marker; X1: serum of female in the late period of yolk forming; X2: serum of male.

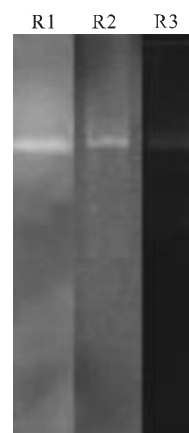


图6 峰B蛋白特殊染色

R1: 脂蛋白染色; R2: 磷蛋白染色; R3: 糖蛋白染色.

Fig.6 Specific stain for the peak B protein

R1: specific stain for lipoprotein; R2: specific stain for phosphoprotein; R3: specific stain for glycosidoprotein.

2.6 免疫印迹 (Western blot)

免疫印迹结果如7所示, 抗血清 IgG 可以特异性地识别卵黄蛋白粗提液中峰 B 蛋白条带, 与卵黄形成后期雌鱼血清, 产生分子量为 97.4 kD 和 30 kD 的 2 条杂交带。

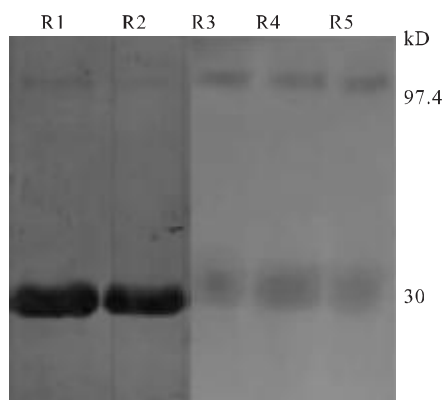


图7 特异性雌性蛋白的 Western blot

R1、R2: 卵黄蛋白粗提液; R3~R5: 卵黄形成后期雌鱼血清.

Fig.7 Western blotting for egg's FSSP

R1 and R2: crude extract of egg; R3 - R5: serum of female in the late period of yolk forming.

2.7 抗血清效价的测定及抗原特异性分析

如图8所示第6个孔仍有沉淀线出现, 表明峰 B 兔抗血清效价至少为 2^{-6} 即 1:64 以上 (图9)。

卵黄形成后期小体鲟雌鱼血清及卵黄蛋白粗提液都能与兔抗血清产生免疫沉淀反应 (图9), 而雄鱼血清、肌肉和精巢抽提液与兔抗血清不发生免疫沉淀反应。并且施氏鲟卵黄蛋白粗提液 (提取方法同 1.2.1) 和雌鱼血清, 哲罗鲑、虹鳟、鲤和鲫雌鱼血清与峰 B 兔抗血清均不发生沉淀反应 (图 10、11)。

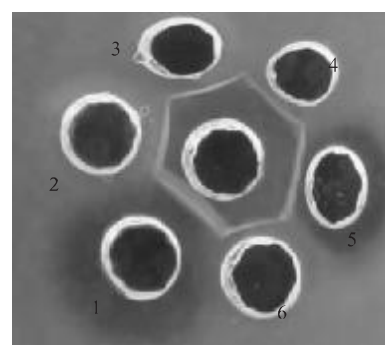


图8 峰B蛋白兔抗血清效价测定

中央孔: 峰B蛋白; 1~6孔: 稀释度依次为 1:2、1:2²、1:2³、1:2⁴、1:2⁴、1:2⁶ 的抗血清.

Fig.8 Titration of antiserum of peak B protein

Center pore: peak B protein; 1 - 6 pore: antiserum diluted by 1:2, 1:2², 1:2³, 1:2⁴, 1:2⁴ and 1:2⁶, respectively.

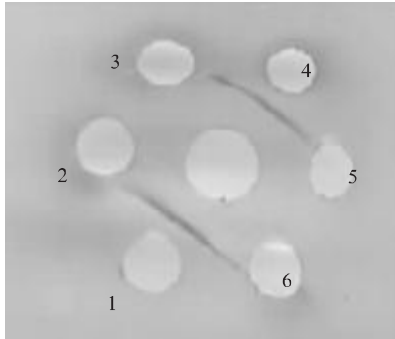


图9 小体鲟特异性雌性蛋白抗血清的免疫双扩散交叉反应

中央孔: 峰B蛋白抗血清; 1、4: 小体鲟卵黄形成后期雌鱼血清; 3、6: 小体鲟雄鱼血清。

Fig.9 Double immunodiffusion for FSSP of *A. ruthenus*
Center pore: antiserum of second peak's protein second peak;
1, 4: serum of female in the late period of yolk forming; 3, 6: serum of male.

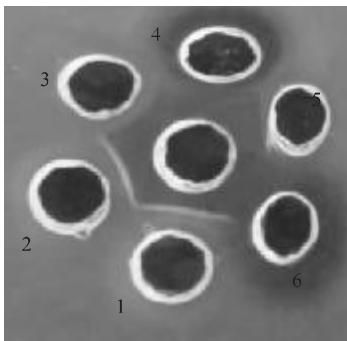


图10 小体鲟特异性雌性蛋白抗血清的组织特异性反应

中央孔: 峰B蛋白抗血清; 1: 峰B蛋白; 2: 小体鲟卵黄蛋白粗提液; 3: 小体鲟雌性肌肉粗提液; 4: 小体鲟雄鱼肌肉粗提液; 5: 小体鲟雄鱼精巢粗提液; 6: 施氏鲟卵黄蛋白粗提液。

Fig.10 Tissue specific reaction with FSSP of *A. ruthenus*

Center pore: antiserum of second peak's protein; 1: peak B protein; 2: crude extract of *Acipenser ruthenus*'s egg; 3: crude extract of female *Acipenser ruthenus* muscle; 4: crude extract of muscle of male *Acipenser ruthenus* muscle; 5: crude extract of *Acipenser ruthenus*'s sperm; 6: egg crude extract of *Acipenser schrenckii*.

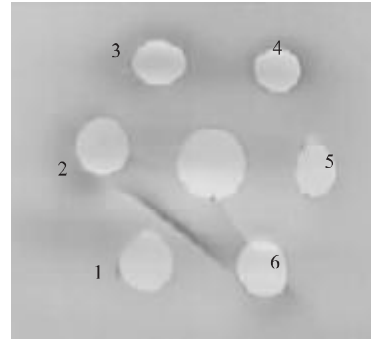


图11 小体鲟特异性雌性蛋白抗血清种属特异性反应
中央孔: 峰B蛋白抗血清; 1: 小体鲟卵黄形成后期雌鱼血清; 2: 施氏鲟雌鱼血清; 3: 哲罗鲑雌鱼血清; 4: 虹鳟雌鱼血清; 5: 鲤鱼雌鱼血清; 6: 鲫鱼雌鱼血清。

Fig.11 Species-specificity reaction with FSSP of *A. ruthenus*

Center pore: antiserum of second peak's protein; 1: serum of female *Acipenser ruthenus* the late period of yolk forming; 2: serum male of *Acipenser schrenckii*; 3: serum of male *Hucho taimen*; 4: serum of male *Oncorhynchus mykiss*; 5: serum of male *Cyprinus carpio*; 6: serum of male *Carassius auratus*.

3 讨论

3.1 小体鲟卵黄蛋白原的分离纯化

近年来,多种方法应用于卵黄蛋白原的纯化,比如选择性沉淀、离子交换层析、亲和层析、膜层析等^[17-19],而有关鱼类卵黄蛋白的纯化方法的相关报道较少。本研究采用了分离范围广泛、分级精细的Sephadex G-200对小体鲟卵黄蛋白进行多次层析纯化。在4℃加入0.2 mmol/L蛋白酶抑制剂PMSF的条件下,得到3种卵黄蛋白,其由9种不同分子量的亚基组成,这与Hiramatsu等^[6]对杂交鲟卵黄蛋白的研究结果相一致。杂交鲟主要具有YP1、YP2和YP3 3种卵黄蛋白,所不同的是它是由6种亚基组成。与鲟科鱼类不同的是,鲤科鱼类中鲫鱼的卵黄蛋白有两种,由5种亚基组成^[17]。昆虫的卵黄蛋白,通常只有一种,同样是由多个亚基组成的,如长角血蜱的卵黄蛋白只有一种,由8种亚基组成^[20]。这些都表明不同门类动物卵黄蛋白的种类组成是不同的,原因可能是卵黄蛋白原的产生、分泌及其裂解为卵黄蛋白的途径不同。

3.2 小体鲟卵黄雌性蛋白的鉴定

迄今为止,已在许多物种中发现雌性特异蛋白,在鱼类上也有同样的研究报道,如在斑马鱼

(*Brachydanio rerio*)、远东哲罗鱼(*Hucho perryi*)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)、星鲮(*Temminckiet schlegel*)、七鳃鳗(*Lampetra japonica*)、青鳉(*Oryzias latipes*)和文昌鱼(*Amphioxus torkes*)等多种鱼类中都含有雌性特异性蛋白^[13,21-24]。原因是鱼类卵黄形成期,肝脏在雌激素作用之下,合成卵黄蛋白前体卵黄蛋白原^[25]。本文在卵黄形成后期雌鱼血清中同样发现雌性特异蛋白—卵黄蛋白原。卵黄蛋白原入卵后在酶的作用下,裂解为卵黄的主要成分即卵黄脂磷蛋白(Lipovitell, Lv),高磷蛋白(Phosvitin, Pv)和 β' 成分^[26]。与其他硬骨鱼类一样,小体鲟卵黄蛋白中同样含有雌性特异蛋白。峰B蛋白糖、脂和磷蛋白染色均为阳性,是一种糖脂磷蛋白,这与鲫鱼、文昌鱼、哲罗和一种杂交鲟^[5,22-23,27]的卵黄蛋白原含糖、脂和磷的特点相一致,并且峰B蛋白兔抗血清只与卵黄发育后期雌鱼血清特异性反应,因此推断峰B蛋白为卵黄脂磷蛋白。

3.3 小体鲟卵黄雌性蛋白的免疫原性

Western blott 结果表明,卵黄脂磷蛋白抗血清IgG可以特异性地识别卵黄蛋白粗提液中峰B蛋白条带,并且与卵黄蛋白原产生分子量为97.4 kD和30 kD的2条杂交带,与鲑鱼和日本鳗鲡一样^[28-29],小体鲟卵黄脂磷蛋白抗血清和卵黄蛋白原都能发生特异性较好的交叉反应,说明卵黄蛋白原和卵黄脂磷蛋白在免疫原性上具有相似性,可以用卵黄脂磷蛋白抗血清代替卵黄蛋白原抗血清对卵黄蛋白原进行检测,这一点对生态毒理学研究非常有意义。鱼类血液中受雌性激素调控表达的卵黄蛋白原,是一种对内分泌干扰污染物反应极其灵敏的生物指标蛋白,利用卵黄蛋白原抗体对卵黄蛋白的合成进行检测是一种有效监测内分泌干扰物污染的良好方法^[30]。但是对于个体小,采集血液比较困难的鱼类,从血液中纯化卵黄蛋白原并制备抗体的规模受到很大限制。相比之下从卵巢中分离大量的卵黄脂磷蛋白和制备抗体相对比较容易,因此,可以用卵黄脂磷蛋白抗体替代卵黄蛋白原抗体,进行内分泌干扰物污染的监测。

研究表明,鱼类卵黄蛋白原抗体具有一定的种特异性^[29,31]。显然,小体鲟卵黄脂磷蛋白也是一种雌性特有的组织特异性蛋白,因为只有卵黄形成后期雌性小体鲟血清和卵黄粗提液与兔抗卵黄脂磷蛋白血清产生免疫沉淀反应,而雄性小体鲟血清和肌

肉抽提液以及精巢抽提液都不与兔抗卵黄脂磷蛋白血清发生反应。另外,同科异种雌性施氏鲟的血清及其卵巢粗提液、鲑科鱼类哲罗鲑和虹鳟雌鱼血清、鲤科鱼类鲤鱼和鲫鱼雌鱼血清也不能和兔抗卵黄脂磷蛋白血清发生反应,说明小体鲟卵黄脂磷蛋白抗体具有种属特异性。卵黄脂磷蛋白是卵黄蛋白原的裂解产物,卵黄蛋白原虽然是一种保守的蛋白^[32],但在鱼类中具有种特异性,由于卵黄脂磷蛋白和卵黄蛋白原具有非常相似的免疫原性,所以卵黄脂磷蛋白及其抗体也应该具有种属特异性。

参考文献:

- [1] 李思忠. 中国鲟形目鱼类地理分布的研究[J]. 动物学杂志, 1987, 22(4): 35-40.
- [2] 孙大江, 曲秋芝, 马国军, 等. 中国鲟鱼养殖概况[J]. 大连水产学院学报, 2003, 18(3): 216-227.
- [3] 张涛, 庄平, 章龙珍, 等. 人工养殖施氏鲟和小体鲟精浆微量元素分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(4): 350-352.
- [4] 叶继丹, 卢彤岩, 刘洪柏, 等. 六种鲟鱼消化酶活性的比较研究[J]. 水生生物学报, 2003, 9(6): 35-40.
- [5] 梁利群, 孙效文, 董崇智, 等. 5种鲟鲤鱼基因组DNA遗传多样性分析[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 273-276.
- [6] 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]. Comp Biochem Physiol, 2002, 131A: 429-441.
- [7] Brown, Carne A N, Chambers G. Purification partial characterization and peptide sequence of vitellogenin from a reptile the Tuatara (*Sphenodon punctatus*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 117B: 159-168.
- [8] Utarabhand P, Bunlipatanon P. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): isolation and properties [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 115C: 101-110.
- [9] Janeiro-Cinquini T R F, Ribolla P E M, Capurro M L, et al. Vitellogenin and yolk protein processing in *Bothrops jararaca* (Wied) a tropical venomous snake [J]. Comp Biochem Physiol, 1999, 122B: 189-198.
- [10] Holbech H, Andersen L, Petersen G I, et al. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 130C: 119-131.
- [11] Fenske M, Aerle R V, Brack S, et al. Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals [J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 129C: 217-232.
- [12] Pan M L, Bell W J, Telfer W H. Vitellogenic blood protein syn-

- thesis by insect fat body[J]. Science N Y, 1969, 165: 393–394.
- [13] Linares C J, Kroll K J. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon [J]. Aquaculture, 2003, 221: 645–656.
- [14] Cotelli F, Andronico F, Brivio M, et al. Structure and Composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus*) [J]. Ultrastruct Mol Struct Res, 1988, 99: 70–78.
- [15] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 53–59.
- [16] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77–122.
- [17] Fukada H, Fujiwara Y, Takayuki T, et al. Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay [J]. Comp Biochem Physiol, 2003, 134A: 615–623.
- [18] Shimizu M, Fujiwara Y, Fukada H, et al. Purification and identification of a second form of vitellogenin from ascites of Medaka (*Oryzias latipes*) treated with estrogen [J]. Exp Zool, 2002, 293: 726–735.
- [19] Shi G Q, Shao J, Jiang G, et al. Membrane chromatographic method for the rapid purification of vitellogenin from fish plasma [J]. Chromatography, 2003, 785: 361–368.
- [20] 杨小龙, 高志华, 胡永红, 等. 长角血蜱卵黄蛋白的纯化及其性质 [J]. 昆虫学报, 2004, 47 (3): 316–319.
- [21] 刘荣臻, 郑允文, 王浩. 大阪鲫鱼雌性特异血清蛋白生化特性及免疫细胞化学定位的研究 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1994, 26 (1): 95–104.
- [22] Holbech H, Andersen L, Petersen G I, et al. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Comp Biochem Physiol, 2001, 130C: 119–131.
- [23] Matsubara T, Ohkubo N, Andoh T, et al. Two forms of vitellogenin yielding two distinct lipovitellins play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder *Verasper moseri* a marine teleost that spawns pelagic eggs [J]. Developm Biol, 1999, 213: 18–32.
- [24] Shimizu M, Fujiwara Y, Fukada H, et al. Purification and identification of a second form of vitellogenin from ascites of Medaka (*Oryzias latipes*) treated with estrogen [J]. Exp Zool, 2002, 293: 726–735.
- [25] Specker J L, Sullivan C V. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives Perspectives in Comparative Endocrinology [M]. Canada Ottawa: National Research Council, 1994: 304–315.
- [26] Matsubara T, Sawano K. Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*) [J]. Exp Zool, 1995, 272: 34–45.
- [27] Hiramatsu N, Hara A. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin Taimen (*Hucho perryi*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 115A: 243–251.
- [28] Hara A, Hirai H. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1978, 48B: 389–399.
- [29] Hara A, Yamauchi K, Hirai H. Studies on female-specific serum protein and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1980, 65B: 315–320.
- [30] 张士瑾, 孙旭彤, 李红岩. 卵黄蛋白原研究进展 [J]. 海洋科学, 2002, 26 (7): 32–350.
- [31] Watts M, Pankhurst N W, Pryce A, et al. Vitellogenin isolation purification and antigenic cross-reactivity in three teleost species [J]. Comp Biochem Physiol, 2003, 134B: 467–476.
- [32] Nilsen B M, Berg K, Arukwe A, et al. Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring [J]. Mar Environ Res, 1998, 46: 153–157.

Isolation and purification of yolk female protein from *Acipenser ruthenus* and preparation of anti-serum

HUO Tang-bin^{1,2}, ZHANG Ying¹, SUN Da-jiang¹, QU Qiu-zhi¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. School of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Yolk is the primary nutrition material during the development of embryo of which vitellin is primary constituent element. At present only the yolk protein of *Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂ and *Acipenser transmontanus* had been studied in all of *Acipenser*. It had not been reported that yolk female specific protein (YFSP) of *Acipenser ruthenus* Linnaeus was studied. So in order to know the characters of yolk female protein from *Acipenseriformes*, the yolk protein was abstracted and purified and its properties were analysed. The crude extraction of yolk protein from *Acipenser ruthenus* Linnaeus serum was concentrated and its concentration was 25.04 mg/mL. The crude extract was purified by gel chromatography of Sephadex-G200. The results showed there were three protein peaks A, B and C by gel chromatography at 4 °C 0.2 mmol/L PMSF and three protein peaks were relatively symmetric. Then protein peak B was purified by more than one time Sephadex G-200 eluting. The properties of yolk protein were analyzed by the methods of polyacrylamide gel electrophoresis, western-blotting and immuno diffusion. Based on the 12% SDS-PAGE staining data, nine bands were detected with molecular weights of 132.1 kD, 97.4 kD, 85.9 kD, 67.0 kD, 59.2 kD, 47.6 kD, 30 kD, 14.3 kD and 12.8 kD, respectively. And protein peak B was composed of two subunits with molecular weights of 30 kD and 97.4 kD, respectively. Two extra bands with molecular weights of 30 kD and 97.4 kD also were found in serum of latter reproductive period of female adults of *Acipenser ruthenus* Linnaeus by 12% SDS-PAGE. The special dyeing analyses of phosphorus, lipid and carbohydrate showed protein B was a kind of carbohydrate phosphorus-lipid protein. The result of polyacrylamide gel electrophoresis, western-blotting and immuno diffusion showed protein B was a kind of YFSP. YFSP is a kind of phospholipins-glycoprotein and it had female specificity and tissue specificity and its antibody is species-specific. Immunity experiment showed that the vitellin only existed in reproductive latter period of female adults of *Acipenser ruthenus* Linnaeus. The result of Western-blotting showed IgG could identify protein B and two hybridization bands were detected with molecular mass 97.4 kD and 30 kD, respectively. These showed the immunogenicity of both YFSP and female serum specific protein (FSSP) was similar and its antibody was species-specific. So the anti-serum of Lipovitell (Lv) can replace the anti-serum of Vitelline to detect vitelline. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 532 – 539]

Key words: *Acipenser ruthenus*; egg; yolk protein; yolk female specific protein

Corresponding author: QU Qiu-zhi. E-mail: quqiu-zhi@163.com