

剑尾鱼卵黄蛋白原基因片段克隆、表达及蛋白检测方法的建立

刘春^{1,2}, 李凯彬¹, 王芳¹, 聂湘平³, 吴淑勤¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2. 上海水产大学, 上海 200090; 3. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510630)

摘要:本研究通过对剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*) 卵黄蛋白原基因片段的克隆和表达, 建立了剑尾鱼卵黄蛋白原蛋白检测方法。根据已发表的底鳉 (*Fundulus heteroclitus*) 卵黄蛋白原 mRNA 序列设计引物, 利用 RT-PCR 法扩增出 1 段 1 118 bp 的剑尾鱼卵黄蛋白原 cDNA 片段, 序列分析表明该片段与其他鱼类卵黄蛋白原基因序列相似性较高, 其中与底鳉和食蚊鱼 (*Gambusia affinis*) 的同源性分别达 87.4% 和 96.7%。在对该片段所编码氨基酸序列可能抗原位点分析的基础上, 进行 PCR 改造构建原核表达载体, 预期得到 258 个氨基酸的表达蛋白。表达载体转入大肠杆菌 DH5 α , 经热诱导后, SDS-PAGE 分析有 29 kD 的表达蛋白产生, 与预期相符。以重组蛋白免疫新西兰大白兔, 获得抗血清。雌激素 (β -雌二醇) 对剑尾鱼诱导后, 用重组蛋白抗血清作一抗, 进行 Western blot 分析。结果表明, 该抗血清能与剑尾鱼卵黄蛋白原特异结合, 可应用于剑尾鱼卵黄蛋白原的检测。卵黄蛋白原是环境雌激素研究中较为特异、灵敏的生物标志物, 剑尾鱼卵黄蛋白原检测方法的建立, 为剑尾鱼环境监测应用提供良好基础。[中国水产科学, 2007, 14 (6): 883–888]

关键词: 剑尾鱼; 卵黄蛋白原; 原核表达; 检测

中图分类号: S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005–8737–(2007)06–0883–06

有关环境雌激素污染监控及其生态环境安全评价已成为当今环境科学研究热点, 而建立方便、经济、灵敏的环境雌激素检测方法, 特别是寻找高效、特异、灵敏的生物标志物已成为该领域研究的重点。鱼类生活于水中, 是污染物环境毒理学研究的理想实验材料, 而鱼类卵黄蛋白原 (Vitellogenin, Vtg) 是一种受到广泛关注并具有良好的应用前景的生物标志物^[1]。Vtg 是卵黄蛋白的前体, 成熟雌鱼在体内雌激素 17 β -雌二醇的刺激下由肝脏合成, 经过血液的运输到达卵巢并加工成卵黄蛋白。雄鱼和幼鱼在正常情况下不合成 Vtg, 但当受到雌激素刺激时也可合成这种蛋白, 并且由于没有卵巢可以有效地清除 Vtg, 会造成体内 Vtg 浓度的升高。因此, 可通过检测雄鱼和幼鱼肝细胞 Vtg 非正常表达, 来评价环境雌激素的作用^[2–3]。

剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*) 属花鳉科剑尾鱼属, 有体型小、繁殖力强、易于在实验室饲养等特点。研究表明, 剑尾鱼在环境雌激素污染物监测中有一

定的优势, 剑尾鱼对多氯联苯 (PCBs) 胁迫的敏感程度比国际标准化组织推荐使用的斑马鱼 (*Danio rerio*) 和黑头软口鲷 (*Pimephales promelas*) 要高, 其组织的 Na⁺/K⁺-ATPase 活性和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性可作为环境风险评价的有效生物学标记^[4]; 剑尾鱼对酚类、烷基苯类、硝基苯类和消油剂也有较好的敏感性, 是一种适合于在实验室开展毒性研究的实验生物^[5]; 剑尾鱼对对壬基苯酚的敏感性优于日本青鳉 (*Oryzias latipes*), 不同浓度的对壬基苯酚对雄性剑尾鱼性腺发育影响具有剂量-效应相关关系^[6], 剑尾鱼雌雄个体间形态差异大, 容易判别, 在环境雌激素效应方面研究时可以考虑推广使用。剑尾鱼的实验动物化研究历经多年, 目前代表品系 RR-B 系近交至第 27 代。近交剑尾鱼的遗传均一性较高, 饲养过程已实现营养标准化管理规范化, 保障了不同个体间反应的一致性和实验的可重复性^[7]。本实验通过剑尾鱼 Vtg 部分基因序列的克隆, 构建原核表达工程菌, 用其表达的重组蛋

收稿日期: 2007–03–07; 修订日期: 2007–06–04.

基金项目: 科技部公益项目 (2004DIB1J029).

作者简介: 刘春 (1982–), 男, 硕士, 从事水产动物病害免疫方面的研究. E-mail: lc5173483@163.com

通讯作者: 吴淑勤. E-mail: wushuqin001@21cn.com

白制备抗血清,应用于剑尾鱼 Vtg 的检测,为剑尾鱼在污染物激素效应研究中的应用提供了基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

剑尾鱼,4~5月龄,为珠江水产研究所培育。

1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α 及原核表达质粒 pBV220 由本实验室保存。pGEM-T Easy Vector System 为 Promega 公司产品。

1.3 工具酶和试剂

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、DNA 分子 Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;SV Total RNA Isolation System 购自 Promega 公司;限制性内切酶、T4 DNA Ligase 购自 NEB 公司;Taq DNA 聚合酶、琼脂糖、二甲基亚砜(DMSO)等相关试剂购自威佳科技有限公司; β -雌二醇购自 Sigma 公司;其他试剂为国产分析纯试剂。

1.4 剑尾鱼 Vtg 的诱导及总 RNA 的提取

剑尾鱼腹腔注射 β -雌二醇(50 μ g/g 鱼体质量,以 DMSO 为溶剂),1 周后按照 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法提取剑尾鱼肝脏总 RNA。

1.5 引物设计与 RT-PCR 扩增

根据 GenBank 已登录的底 β (*Fundulus heteroclitus*)、青 β (*Oryzias latipes*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 等鱼类 Vtg mRNA 序列,设计合成下列引物:P1: 5'-TggARYTCAgggWgTgTgC-3', P2: 5'-CCTCTTKgCAATKYTCCTCA-3'。以提取的剑尾鱼总 RNA 为模板,按照试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 方法,合成 cDNA 第一链。以 cDNA 第一链为模板,P1、P2 为引物进行 PCR 扩增,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,经 94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.6 基因克隆与测序

PCR 产物经 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 纯化后,用 T4 DNA Ligase 与 pGEM-T Easy Vector 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。转化大肠杆菌 DH5 α ,蓝白斑筛选重组子。重组质粒用 EcoR I 酶切鉴定,具体方法见文献[8],并在 ABI PRISM TM3730 全自动荧光测序仪上进行测序。DNA 分

析软件 Vector NTI Suite 10 分析测序结果。

1.7 原核表达载体构建

用在线分析软件 TMpred 分析该片段所编码氨基酸的可能抗原位点,在此基础上设计末端含有 EcoR I 和 BamH I 酶切位点的接头引物:P3: 5'-CGGAATTCATGCTGACCAAGACCA-3', P4: 5'-CGGGATCCTTAGACAACTTCACGC-3'。预计 PCR 改造片段大小为 793 bp,编码 258 个氨基酸,重组蛋白分子量大小为 29 kD。以含剑尾鱼 Vtg 基因片段的质粒为模板,P3、P4 为引物进行 PCR 扩增。扩增产物经纯化后,用 EcoR I 和 BamH I 双酶切,酶切产物定向插入同样双酶切后的表达质粒 pBV220,转化大肠杆菌 DH5 α ,蓝白斑筛选重组子。阳性质粒经双酶切鉴定后再测序验证。

1.8 原核表达及目标蛋白的获得

将含重组质粒的菌株接种于加 Amp 的 LB 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 培养 3 h (OD_{600 nm} 0.4~0.6) 后,快速升温至 42 $^{\circ}$ C,诱导培养 5 h,取菌悬液,5 000 r/min 离心 10 min,收集菌体。分别接种 DH5 α 菌和含空质粒 pBV220 的 DH5 α 菌 30 $^{\circ}$ C 培养 3 h 后,42 $^{\circ}$ C 诱导培养 5 h,收集菌体。以诱导后的 DH5 α 菌、诱导后含空质粒 pBV220 的 DH5 α 菌和未诱导的重组菌作对照,与诱导后的重组菌进行 SDS-PAGE 分析,检测蛋白的表达。

选取表达菌扩大培养,热诱导后离心收集菌体,菌体用超声波低温破碎,10 000 r/min 离心 15 min,收集包涵体,包涵体经 2 mol/L 脲素洗涤 3 次,再用 8 mol/L 脲素、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) 室温溶解 2 h,溶解液在脲素、Tris-HCl、甘油缓冲液中透析复性后,进行 SDS-PAGE 检测。

1.9 抗血清制备

将复性的重组蛋白与等体积弗氏佐剂(初次免疫用完全佐剂,加强免疫用不完全佐剂)混合充分乳化,皮下多点注射新西兰大白兔,免疫 4 次后,琼扩法检测,当抗体效价达到 1:32 时,颈动脉采血制备抗血清。

1.10 雌激素的诱导

实验用鱼为 4~5 月龄剑尾鱼,健康无病,已具备性特征,饲养于玻璃箱中。实验用水为曝气后的自来水,水温 23~28 $^{\circ}$ C, pH 7.6。实验分处理组和两个对照组,每组 10 尾,处理组用鱼为雌性剑尾鱼,暴露液为 100 μ g/L 的 β -雌二醇(溶解于 DMSO),对照组 1 和对照组 2 的实验用鱼分别为雌性剑尾鱼和

雄性剑尾鱼, 加入同样浓度 DMSO (终浓度 <0.01%), 暴露时间为 20 d, 每隔 1 d 更换全部暴露液。实验期间正常投喂。

诱导结束后, 分别取实验鱼肝脏于玻璃匀浆器中, 称量, 加入 5 倍体积的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.5), 冰浴下匀浆。将匀浆液 4 ℃ 10 000 r/min 离心 15 min。收集上清液, 分装后立即进行后续实验或于 -80 ℃ 冰箱中冻存。

1.11 免疫印迹分析

SDS-PAGE 电泳参照常规方法, 浓缩胶和分离胶的浓度分别为 4% 和 7.5%。样品适当稀释后, 100 V 恒压电泳 2 h。电泳完毕后, 将凝胶中的蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上 (恒流 200 mA, 3 h)。电转移后, 硝酸纤维素膜用丽春红预染, 以检查电转效率。漂洗后用 5% 的脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜, 漂洗后加入一抗 (兔抗重组蛋白血清, 1:500 稀释) 室温孵育 2 h, TBST (pH 8.0) 洗涤, 加入二抗 (HRP 标记的羊抗兔 IgG, 1:1 000 稀释) 室温孵育 1 h, 漂洗后 DAB 显色液显色, 拍照。

2 结果与分析

2.1 剑尾鱼 Vtg cDNA 片段的克隆及序列分析

RT-PCR 产物电泳结果见图 1, 目的片段约为 1 100 bp, 大小与预期相符合; 克隆测序后得到 1 118 bp 的片段 (见图 2), 序列分析表明该片段与食蚊鱼、底鳉 Vtg 基因的同源性为 87.4%、96.7%, 初步推断, 所获得序列为剑尾鱼 Vtg 基因片段。通过氨基酸亲水性分析软件 TMpred 对其编码氨基酸序列分析, 结果表明在 200~250 位氨基酸之间亲水性较强, 可构成主要抗原决定簇。

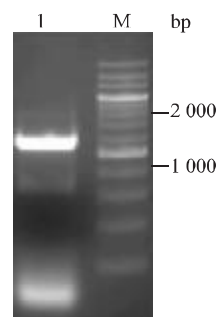


图 1 Vtg 基因部分序列扩增结果
1: VtgPCR 产物; M: 200 bp DNA 分子量标记。

Fig.1 PCR product of partial Vtg gene

1: PCR products of Vtg; M: 200 bp DNA Ladder Marker.

```

      G T Q G V C K T L Y S I S E D A R N E N I L L T K T R D L N
1  TGGAAGTCAAGGGTGTGTGCAAGACCTCTACTCCATCAGTGAAGATGCACGTAATGAGAATCCTTCTGACCAAGACCGAGGACCTGAAC
   N C Q E R L I K D M G L A Y T E K C E K C Q E E T K N L R G
92  AACTGCCAGGAAGACTCATTAAAGACATGGGATTGGCATACACTGAGAAGTGTGAAAAGTGCCAGGAGGAACCAAAACCTGAGAGGT
   T T T F S Y T L K P V A N A I M I L K V D V N E L I Q F L P
182 ACCACAACATTCAGCTACACCTTGAACACGTCGCTAATGCCATCATGATCCTGAAAGTGGACGTTAATGAGCTGATCCAGTTCTTACCT
   F S E D N G A T Q M R T K Q S F E F L E I Q K D P I T P I N
272 TTCTCTGAGGATAATGGAGCTACTCAATGAGGACCAAGCAGTCTTTGAGTTCCTTGAGATTGAGAAAGACCCATTACACCTATCAAC
   A V Y R H R G S L K Y E F S N E L L Q T P I K L V K I S N A
362 GCTGTATATAGACCCGTGGATCTCTCAAGTACGAGTCTCCAACGAAGTCTTTCAGACACCCATTAAGCTTGCAAGATCAGCAATGCA
   K A Q T A E V M N Q L A T I N V E N L H E N A P M K F L E L
452 AAGGCCACGACTGCAGAGGTCATGAATCAGCTTGCCACCATCAACGTGGAGAATCTTCATGAAAATGCACCTATGAAGTTTTTGGAACTG
   V Q L L R L A R Y E D L E M Y W N Q Y K K M S P H R H W F L
542 GTACAGCTCCTCCGTCTTGCTCGCTATGAAGATTGGAAATGTACTGGAACCAAGTACAAAAGATGTCCCTCAGACACTGGTCTCTG
   D T I P A A G T P A A F R F I K E K F M A E E I N T A E A V
632 GATACCATCCCTGCTGCTGGCACTCCGCTGCTTTTAGATTATCAAGAGAAGTTTCATGGCTGAGGAAATAAACACTGCTGAGGCTGTT
   Q A L V A A V H M V T A D P E V I K L F E N L L A S D K V E
722 CAAGCATGGTTCAGCTGTGCACATGGTGAAGTGTGACCCGAGGTTATCAAGCTGTTTCGAGAAGCTGTAGCGAGCGACAAAGTAGAG
   R N P L L R E I V F L G Y G T M V Y K Y C N E T A A C P A E
812 AGAAATCCACTTCTCGGTGAGATTGTCTTCTTGGATACGGTACAATGGTTTACAAATATTGTAATGAGACAGCAGCTGTCCAGCTGAA
   L I K P I Q E R L S N A V A K N E E E N I I L Y I K V L G N
902 CTTATAAAGCCTATTCAAGAACGACTTTCAAATGCTGTGCAAGAATGAGGAAGAAACATCATCTGTACATAAAGGTTTTGGGAAAT
   A G H P S S F K G V S E I M P I H G T A A A S L P M R I H V
992 GCTGGACATCCATCTAGCTTCAAGGGGTGAGTGAGATCATGCCCATCCATGGCACGTCCGCTGCATCTCTGCCAATGAGAATTCATGTT
   E A I M A L R N I A K K
1 082 GAAGCCATCATGGCTTTGAGGAACATTGCAAGAAGG

```

图 2 剑尾鱼 Vtg cDNA 部分序列及推导出的氨基酸序列

Fig.2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *Xiphophorus helleri* Vtg

2.2 原核表达质粒的构建

以含有剑尾鱼 *Vtg* 核心片段的克隆质粒为模板, P3、P4 为引物, PCR 扩增得到改造片段, 插入原核表达质粒 pBV220 后, 获得阳性重组质粒。用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切重组质粒 DNA, 得到的插入片段约 800 bp, 与 PCR 改造片段大小相同 (图 3)。测序验证表明插入片段与预期目标序列完全一致, 可用于诱导表达。重组质粒命名为 pBVsvtg。

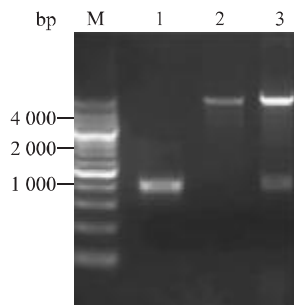


图3 重组质粒 pBVsvtg 的酶切鉴定

M: 200 bp DNA 分子量标记; 1: *Vtg* PCR 改造产物; 2: pBV220 质粒; 3: pBVsvtg 经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切后的结果。

Fig.3 Identification of the recombinant vector pBVsvtg by enzymerestriction

M: 200 bp DNA Ladder Marker; 1: PCR products of *Vtg* gene; 2: pBV220; 3: the result of pBVsvtg digested by *EcoR* I and *Bam* H I.

2.3 目的蛋白的表达及获得

将测序正确的重组阳性菌株进行诱导表达。SDS-PAGE 结果显示, 经 42 ℃ 诱导 5 h, 含重组质粒 pBVsvtg 的大肠杆菌 DH5 α 在约 29 kD 位置有一条明显的蛋白条带, 与预计重组蛋白分子量大小一致。而经诱导的不含质粒的 DH5 α 菌、经诱导含空质粒 pBV220 的 DH5 α 菌和未经诱导的重组菌均无此变化 (图 4)。诱导表达后的重组菌经过破碎、洗涤、溶解、透析, 得到初步纯化的目的蛋白, 蛋白的 SDS-PAGE 结果见图 4。

2.4 制备的抗血清对剑尾鱼卵黄蛋白原的识别

通过雌激素诱导实验, 得到肝总蛋白。将重组蛋白抗血清与肝总蛋白进行 Western-blot 分析, 结果显示, 雌鱼在相对分子量 180 kD 处有棕色特异性条带, 经雌激素诱导的雄鱼分别在 180 kD 和 95 kD 处出现棕色特异性条带, 而未诱导的雄性剑尾鱼未见明显条带 (图 5)。这表明所制备的抗血清能特异识别剑尾鱼 *Vtg*, 可应用于 *Vtg* 定量检测中。

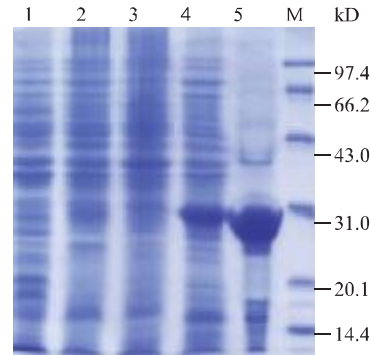


图4 重组质粒 pBVsvtg 表达产物的 SDS-PAGE 分析
1: DH5 α (诱导后); 2: pBV220 (诱导后); 3: pBVsvtg (诱导前); 4: pBVsvtg (诱导后); 5: 纯化后重组蛋白; M: 蛋白分子量标记。

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expression products of the recombinant vector pBVsvtg

1: DH5 α after induced; 2: DH5 α (pBV220) after induced; 3: DH5 α (pBVsvtg) before induced; 4: DH5 α (pBVsvtg) after induced; 5: purified recombinant protein; M: protein marker.



图5 重组蛋白的 Western-blot 分析

1: 未诱导的雄性剑尾鱼; 2: 雌性剑尾鱼; 3: β -雌二醇诱导的雄性剑尾鱼。

Fig.5 Western-blot analysis of recombinant *Vtg*

1: liver of male *Xiphophorus helleri*; 2: liver of female *Xiphophorus helleri*; 3: liver of male *Xiphophorus helleri* treated with β -estradiol.

3 讨论

环境雌激素与体内雌激素结构相似, 微量环境雌激素进入生物体后, 能与肝脏内的雌激素特异性受体结合, 诱导 *Vtg* 的合成, 因此, *Vtg* 可作为环境雌激素对生物体胁迫检测的生物标志物。目前, 这种生物标志物检测方法已经在鱼类上得到了良好的应用。对黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*)^[9]、青

[10]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) [11]、大西洋鲑 (*Salmo salar*) [12]、大西洋牙鲈 (*Paralichthys dentatus*) [13]等的研究表明, 通过鱼类 Vtg 浓度的检测, 能敏感而有效地筛选雌激素样物质。鱼类 Vtg 的获得是环境雌激素污染物检测应用的基础, 目前普遍从鱼类血液中分离。由于剑尾鱼体型小, 血液采集非常困难, 不易分离纯化到足够的 Vtg 用于制备抗血清, 使其在水环境雌激素污染监测方面的应用受到一定限制。分子生物学技术的发展为蛋白的定量检测提供了新思路, 通过基因克隆, 原核或真核表达目标蛋白, 制备特异性抗体用于蛋白检测, 已有较成熟的方法并得到良好应用, 如鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 生长激素 [14] 和大西洋鲑 MHC 家族 II β 链等的检测方法建立 [15]。因而本研究克隆了剑尾鱼 Vtg 基因核心序列, 并构建了 Vtg 原核表达载体, 重组蛋白所制备的抗血清可特异地识别剑尾鱼体内 Vtg。这是剑尾鱼 Vtg 定量检测的基础, 为剑尾鱼在环境污染监测的应用提供良好平台。

目前已经有十几种硬骨鱼 Vtg 分离、纯化的报道, 不同鱼类 Vtg 的分子量在 120~211 kD 范围之间变动 [16]。本研究通过 Western-blot 分析表明, 雌性剑尾鱼以及经 β -雌二醇诱导的雄鱼在 180 kD 左右有特异性条带出现, 而对照雄鱼组没有发现该条带; 本实验克隆到的剑尾鱼部分 Vtg 序列与食蚊鱼同源性很高, 因此可认定该特异条带为剑尾鱼 Vtg, 依据 GenBank 登录的食蚊鱼 Vtg 氨基酸序列推导其分子量大小为 186 kD, 也就是说剑尾鱼 Vtg 的分子量约为 180 kD。

鱼类 Vtg 是一种含糖、含磷、含脂的蛋白, 由于其分子量大、结构比较复杂, 在体外容易降解。Ndiaye P 等 [17] 研究发现, 保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) Vtg 可降解为许多的小分子带 [17]; 黄鳍刺虎鱼 (*Acanthogobius flavimanus*) Vtg 的 Western-blot 分析显示也有一些小的降解带产生 [18]; 青鳉 Vtg 的 Western-blot 分析发现一条约 150 kD 的降解带 [10]。本实验制备的抗血清进行 Western-blot, 发现经雌激素诱导的雄鱼在约 95 kD 处也有特异反应条带 (图 5), 推测可能为 Vtg 降解产生。

参考文献:

- [1] Kime D E, Nash J P, Scott A P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics [J]. *Aquaculture*, 1999, 177: 345–352.
- [2] Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J. et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works [J]. *Chem Ecol*, 1994, 8: 275–285.
- [3] Sumpter J P, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment [J]. *Environ Health Perspect*, 1995, 103: 173–178.
- [4] 方展强, 张凤君, 郑文彪, 等. 多氯联苯对剑尾鱼 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响 [J]. *水产学报*, 2004, 28 (1): 89–92.
- [5] 卢玲, 沈英娃. 酚类、烷基苯类、硝基苯类化合物和环境水样对剑尾鱼和稀有鱼句鲫的急性毒性 [J]. *环境科学研究*, 2002, 15 (4): 57–59.
- [6] 王宏, 沈英娃. 对壬基苯酚的环境雌激素效应研究 [C]. 首届水生实验动物专业委员会论文集, 2001. 18–22.
- [7] 吴淑勤, 黄志斌, 李凯彬, 等. 水生实验动物——剑尾鱼 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南: 第 2 版 [M]. 北京: 科学出版社, 1993: 34–70.
- [9] Panter G H, Hutchinson T H, Lange R. et al. Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-) estrogenic substances [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2002, 21: 319–326.
- [10] Nishi K, Chikae M, Hatano Y. et al. Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2002, 132 (2)C: 161–169.
- [11] Schultz I R, Orner G, Merdink J L. et al. Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17 α -ethynylestradiol [J]. *Aquat Toxicol*, 2001, 51: 305–318.
- [12] Arukwe A, Celius T, Walther B T. et al. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2000, 49: 159–170.
- [13] Folmar L C, Gardner G R, Schreiber M P. et al. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2001, 51: 431–441.
- [14] 刘小青, 陈荣忠, 杨丰. 重组鲈鱼生长激素的酶联免疫测定方法 [J]. *高技术通讯*, 2002, 12 (2): 40–42.
- [15] Koppang E, Hordvik I, Bjerkas I. et al. Production of rabbit antisera against recombinant MHC class II β chain and identification of immunoreactive cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2003, 14: 115–132.
- [16] 马陶武, 龚双姣, 万小琼, 等. 稀有鱼鲫卵黄蛋白原电泳表征 [J]. *高技术通讯*, 2005, 15 (1): 93–96.
- [17] Ndiaye P, Forgue J, Lamothe V. et al. Tilapia (*Oreochromis niloticus*) vitellogenins: development of homologous and heterologous ELISAs and analysis of vitellogenin pathway through the ovarian follicle [J]. *J Exp Zool*, 2006, 305 (7): 576–593.
- [18] Ohkubo N, Mochida K, Adachi S. et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 131: 353–364.

Vitellogenin of swordtail fish *Xiphophorus helleri*: cloning, expression and an assay development

LIU Chun^{1,2}, LI Kai-bin¹, WANG Fang¹, NIE Xiang-ping³, WU Shu-qin¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 3. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Endocrine disruption seems to be related to high vitellogenin (Vtg) levels in male fish, thus a vitellogenin immunosorbent assay would be likely to give an adequate prediction of endocrine disrupter activity in environmental systems. For the vitellogenin immunosorbent assay development, the vitellogenin cDNA of swordtail fish *Xiphophorus helleri* were cloned. Total RNA was isolated from swordtail fish treated with β -estradiol, the cDNA of swordtail fish vitellogenin gene was obtained by using RT-PCR amplification with a special primer pair from total RNA, the amplified sequence was ligated into pGEM T-Easy vector by using T4 ligase and a 1 118 bp sequence was obtained. Alignment of the deduced amino acids of vitellogenin cDNA showed 93.3% and 81.7% identities with *Fundulus heteroclitus* and *Gambusia affinis* respectively. The cDNA was modified by PCR and a 793 bp sequence was linked into prokaryotic expression vector pBV220 to constructed expression plasmid pBVsvtg, and the plasmid pBVsvtg was transformed into *E. coli* (DH5 α). After temperature inducement, a special protein about 29 kD in molecular weight was detected by SDS-PAGE analysis. The recombinant protein was induced and purified, and immunized the new Zealand rabbits for antiserum produced. Western-blot analysis showed the antiserum can recognize the vitellogenin of swordtail fish specifically. This study provide a basis to establish a quantitative detection method of swordtail fish Vtg. The results also indicate that the swordtail fish could be utilized as a useful model for assessing estrogenic effects of endocrine disrupting compounds in aquatic environment. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 883 – 888]

Key words: *Xiphophorus helleri*; vitellogenin; prokaryotic expression; detection

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com

2007 年《中国水产科学》综合引证年度报告

根据 2007 年《中国学术期刊综合引证年度报告》的统计数据,《中国水产科学》的影响因子为 1.199,5 年的影响因子为 1.375。即年指标为 0.063,他引总引比为 0.90,基金论文比为 1.00。该年度报告数据是根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006 年 6500 余种统计刊源析出的 290 余万条中国期刊引文数据及 CNKI“中国期刊网”中心网站 2006 年 112 月全文下载记录(2.1 亿余篇次)的大样本数据统计分析得到的,它从科学文献计量与网络计量学角度反映了期刊的学术影响力和社会影响力。