

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.140442

尼罗罗非鱼卵黄脂磷蛋白的分离纯化与性质鉴定

单瑞后¹, 王松², 王骏³, 王军¹, 汝少国¹

1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
3. 山东出入境检验检疫局, 山东 青岛, 266002

摘要: 采用 Sephacryl S-300 过滤层析和 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析相结合的方法从尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)成熟卵子匀浆液中分离纯化出了一种高分子量的蛋白。该蛋白能被 Schiff 试剂、甲基绿和苏丹黑 B 着色, Western blot 显示能被金鱼卵黄脂磷蛋白(lipovitellin, Lv)多克隆抗血清特异性识别, 在非变性条件下分子量约为 560 kD, 在 SDS 变性条件下分子量约为 112 kD, 结果表明分离纯化的蛋白是一种含有糖、磷、脂基团的蛋白, 符合鱼类 Lv 的性质, 且与金鱼 Lv 有免疫交叉反应, 从蛋白的性质和免疫原性以及分子量大小等角度判断, 本研究获得的高纯度蛋白为尼罗罗非鱼卵黄脂磷蛋白; 纯化的罗非鱼 Lv 在反复冻融、37℃及 60℃处理条件下均未出现降解, 表明罗非鱼 Lv 比鱼类卵黄原蛋白(Vitellogenin, Vtg)更为稳定。研究结果为罗非鱼 Lv 抗体的制备奠定了基础。

关键词: 尼罗罗非鱼; 卵黄脂磷蛋白; 纯化; 性质鉴定

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)04-0638-07

鱼类卵黄原蛋白(Vitellogenin, Vtg)作为检测环境雌激素的重要生物标志物已经得到广泛应用^[1]。由于鱼类 Vtg 在纯化和保存过程中容易降解的特性对定量检测 Vtg 极为不利^[2-3], 因此有学者提出可以利用与 Vtg 具有相同免疫原性的卵黄脂磷蛋白(Lipovitellin, Lv)制备抗体并用于环境雌激素的检测^[4-6]。目前已纯化鉴定了金鱼(*Carassius auratus*)^[4]、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)^[5]、瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)^[6]等鱼类的 Lv, 但由于鱼种间的差异有必要对不同鱼种的 Lv 分别进行分离纯化及抗体制备。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)属于丽鱼科(Cichlidae), 具有耐低氧、食性杂、繁殖强、能够在淡水及盐分不同的咸水水域中生存等优点, 是野外检测环境雌激素的较好实验生物。Ndiaye 等^[7]已分离纯化了尼罗罗非鱼 Vtg 并制备其抗体, 但是尚未有关于罗非鱼 Lv 分

离纯化的报道。本研究分离纯化了尼罗罗非鱼 Lv, 并研究了其理化性质及免疫原性, 为罗非鱼 Lv 抗体制备及定量检测罗非鱼 Vtg 奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验选用 5 月龄性成熟的“新吉富”品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*), 购自青岛市国家尼罗罗非鱼良种场, 体重(45.2±2.4) g, 体长(12±2.8) cm。用 MS-222(0.075 g/L)麻醉罗非鱼, 解剖取雌鱼卵巢, 去除附着结缔组织后所得的成熟卵子用于 Lv 的纯化。

1.2 卵粗提液的制备

参照王军^[4]的方法, 收集卵巢中的成熟卵子, 加入 5 倍体积 4℃预冷的匀浆缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 内含 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA

收稿日期: 2014-10-27; 修订日期: 2015-01-06.

基金项目: 国家质检总局课题计划项目(2013IK196).

作者简介: 单瑞后(1989-), 男, 硕士研究生, 专业方向为生态毒理学. E-mail: man.hou@163.com

通信作者: 汝少国, 教授, 博士生导师. E-mail: rusg@ouc.edu.cn

和 1 mmol/L PMSF, pH 7.5)混合, 在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆, 10 000 g 离心 15 min, 收集上清液。向上清液中缓缓加入研细的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末至 70%的饱和度, 置于冰水混合物中盐析约 3 h, 以 8 000 g 离心 10 min, 弃去上清, 将沉淀重新溶解于 25 mmol/L Tris-HCl(内含 0.07 mol/L NaCl, pH 7.5), -80°C 超低温保存。以上实验均在 4°C 下进行。

1.3 卵黄脂磷蛋白的纯化

1.3.1 凝胶过滤层析 取 1 mL 卵粗提液进行丙烯酰胺葡聚糖凝胶 Sephacryl S-300 层析(GE Healthcare), 上样前用 200 mL 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(含 0.07 mol/L NaCl, pH 7.5)平衡层析柱(2.0 cm $\times$ 60 cm); 以流速 1 mL/min 洗脱层析柱, 以紫外检测仪(波长 280 nm, 上海青浦沪西仪器厂)同步检测, 并记录洗脱曲线, 以每管 4.0 mL 收集各洗脱峰, 对收集的等分试样进行 Native-PAGE, 将可能含 Lv 蛋白的洗脱液保存, 用于离子交换层析。以上实验均在 4°C 条件下进行。

1.3.2 离子交换层析 离子交换层析选用 DEAE-Sephacryl Fast Flow (GE Healthcare), 采用不连续洗脱法。上样前用 25 mmol/L Tris-HCl(含 0.07 mol/L NaCl, pH 7.5)缓冲液平衡 3 个柱体积。取上述保存的洗脱组分上样后, 继续用上述缓冲液洗脱 1 h。然后分别用含 0.1 mol/L、0.2 mol/L、0.3 mol/L 和 1 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(25 mmol/L, 含 1 mmol/L PMSF, pH 7.5), 流速为 1.0 mL/min, 每个梯度洗脱 1 h, 以紫外检测仪(波长 280 nm)同步检测, 出峰后以每管 4.0 mL 收集等分试样, 经 Native-PAGE 鉴定后, 将可能含 Lv 蛋白的组分 -80°C 超低温保存。以上实验均在 4°C 条件下进行。

1.4 特异性染色

Native-PAGE 按照 Davis^[8]的方法, 使用 AE-8130 型电泳仪与 AE-6450 型电泳槽(日本 Atto 公司), 分离胶浓度为 7.5%, 浓缩胶浓度为 4.0%, 样品与缓冲液(0.20 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 25%甘油, 0.1%溴酚兰)等体积混匀后上样 10 μL , 4°C 电泳, 电压为 150 V。电泳结束后, 对凝胶分别进行考马斯亮蓝 R-250、Schiff 试剂、甲基绿和苏

丹黑 B 染色^[4]。

1.5 免疫印迹

按照 Towbin 等^[9]的方法, 取纯化的罗非鱼 Lv 10 μL 进行 Native-PAGE (4%~9%), 电泳结束后把蛋白质转印到 PVDF 膜上(Osmonics, Inc., Minnetonka, MN, USA), 用 TBST (100 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.5)洗膜 10 min, 在 5%脱脂奶粉-TBST 中 4°C 封闭过夜; 使用王军^[4]制备的鼠抗金鱼 Lv 多克隆抗血清, 1:1 000 倍稀释后室温孵育 4 h, TBST 洗 3 遍; 再使用 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标二抗(北京索莱宝科技有限公司)室温孵育 4 h, TBS (100 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5)洗膜 2 次, 后将 PVDF 膜放入底物显色液 DAB(索莱宝), 待条带清晰时, 用蒸馏水洗膜终止反应, 晾干后避光保存。

1.6 分子量的测定

将蛋白 Marker 和样品在不同质量分数(5.5%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 9.0%)的分离胶中电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色。电泳使用的标准蛋白(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)成分为甲状腺蛋白(669 kD)、铁蛋白(440 kD)、过氧化氢酶(232 kD)、乳酸脱氢酶(140 kD)、牛血清蛋白(67 kD), 利用标准蛋白的分子量与相对迁移率, 根据线性回归计算蛋白质分子量。

SDS-PAGE 按照 Laemmli^[10]的方法, 用 4.0%浓缩胶, 10%分离胶, 样品与样品缓冲液(0.16 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 25%甘油, 0.1%溴酚兰, 4% SDS, 5%巯基乙醇)等体积混匀, 样品煮沸 5 min, 室温下电泳, 电压 200 V, 电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色。变性蛋白标准品(Fermentas, UAB)由分子量为 20~200 kD 的 12 种高纯蛋白组成。

1.7 稳定性检测

取纯化的罗非鱼 Lv 0.2 mL 装入 1.5 mL 离心管中, 分别进行以下处理: 取一管 37°C 加热 12 h, 取两管于 60°C 分别水浴 30 min 和 60 min; 另取一管于 -80°C 冻存 2 h 后, 取出置于 4°C 冰箱 1 h 如此反复 3 次。将经以上 3 种方式处理的 Lv 与 4°C 放置未处理的 Lv 同时进行非变性电泳检测, 观察

条带变化。

2 结果与分析

2.1 卵黄脂磷蛋白的纯化

2.1.1 凝胶过滤层析 卵粗提液的凝胶过滤层析结果表明在 280 nm 处可见 3 个主要洗脱峰(图 1-A), 洗脱过程中发现有环形、淡黄色的色带随洗脱向下移动, 但 Native-PAGE 经考马斯亮蓝 R-250 染色结果表明峰 a 和峰 c 没有蛋白条带检出, 峰 b 含有 1 条明显的蛋白条带(图 1-B), 故将其洗脱组分用于离子交换层析。

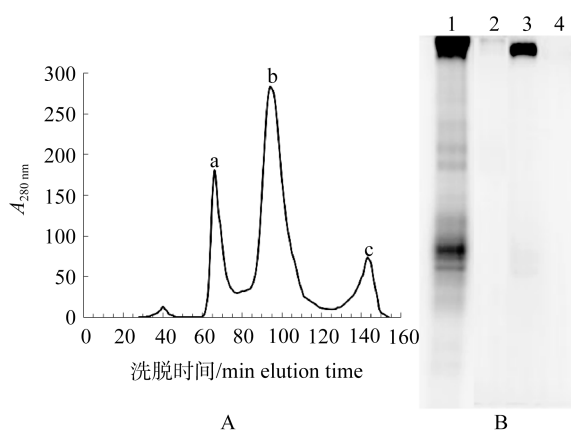


图 1 尼罗罗非鱼凝胶过滤层析洗脱曲线(A)与 Native-PAGE 结果(B)

条带 1: 卵粗提液; 条带 2: 峰 a; 条带 3: 峰 b; 条带 4: 峰 c.

Fig. 1 Elution profiles of the ovary extracts of Nile tilapia on a Sephacryl S-300 gel filtration chromatography column (A) and Native-PAGE (B)

Lane 1: Ovary extracts; Lane 2: Peak a; Lane 3: Peak b; Lane 4: Peak c.

2.1.2 离子交换层析 阴离子交换层析结果如图 2-A 所示, 在 0.1 mol/L NaCl 处出现了一个主洗脱峰, 经 Native-PAGE 后, 考马斯亮蓝 R250 染色结果表明该峰只有一条蛋白条带(图 2-B)。

2.2 糖、磷、脂特异性染色

特异性染色结果显示, 纯化的蛋白能同时被 Schiff 试剂, 甲基绿, 苏丹黑 B 染色(图 3), 证明其含有糖、磷和脂的基团。

2.3 免疫印迹

免疫印迹结果显示鼠抗金鱼 Lv 多克隆抗血清与纯化蛋白发生了阳性反应, 且只有 1 清晰条带(图 4)。

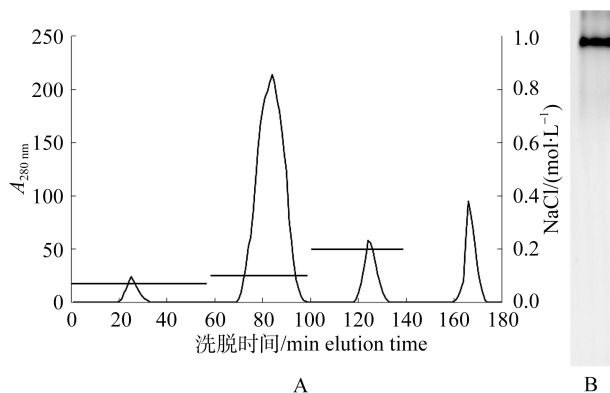


图 2 阴离子交换层析洗脱曲线(A)与 Native-PAGE 结果(B)
Fig. 2 DEAE anion exchange column of the Nile tilapia Lv (A) and Native-PAGE of the peaks eluted with buffer containing 0.1 mol/L NaCl (B)

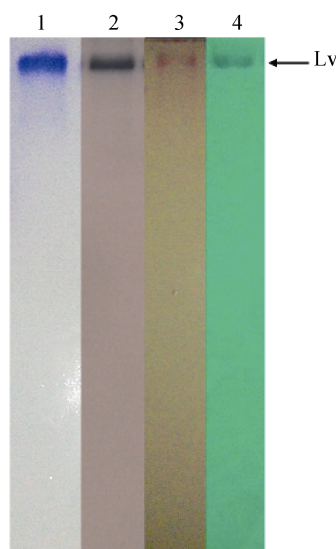


图 3 尼罗罗非鱼 Lv 糖、磷、脂特异性染色结果

条带 1: 考马斯亮蓝染色; 条带 2: 脂蛋白染色; 条带 3: 糖蛋白染色; 条带 4: 磷蛋白染色

Fig. 3 Determination of carbohydrate, lipid and phosphorus in the Nile tilapia Lv

Lane 1: stained by CBB G250; Lane 2: lipoprotein stained by Sudan black B; Lane 3: glycoprotein stained by Schiff reagent; Lane 4: phosphoprotein stained by methyl green.

2.4 分子量的测定

非变性条件下分子量测定结果显示, 尼罗罗非鱼 Lv 的分子量大约为 560 kD(图 5)。

SDS-PAGE 结果显示, 纯化的尼罗罗非鱼 Lv 仅有一个条带(图 6-A), 以 SDS 蛋白质标准品绘制标准曲线, 计算得其分子量为 112 kD(图 6-B)。



图 4 尼罗罗非鱼 Lv 与金鱼 Lv 抗血清的免疫印迹结果
Fig. 4 Western blot of the Nile tilapia Lv detected with anti-goldfish Lv antiserum

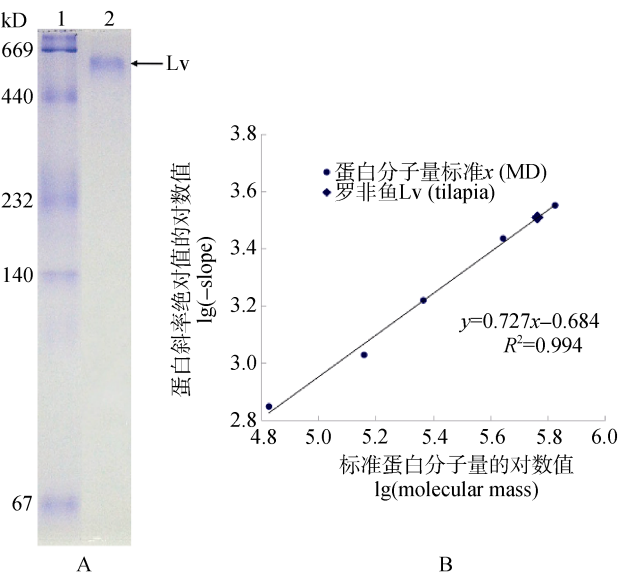


图 5 尼罗罗非鱼 Lv 的 Native-PAGE (A)和 Native-PAGE(B)测定分子量的标准曲线
条带 1: 标准蛋白; 条带 2: 尼罗罗非鱼 Lv.

Fig. 5 Molecular weight of the purified Nile tilapia Lv determined by Native-PAGE (A) and the standard curve of Native-PAGE (B)
Lane 1: protein marker; Lane 2: Nile tilapia Lv.

2.5 稳定性检测

纯化的尼罗罗非鱼 Lv 各处理组非变性电泳结果如图 7 所示, 各处理组均未出现降解片段, 与未处理组对比, 几乎没有变化, 可见纯化的尼罗罗非鱼 Lv 比较稳定。

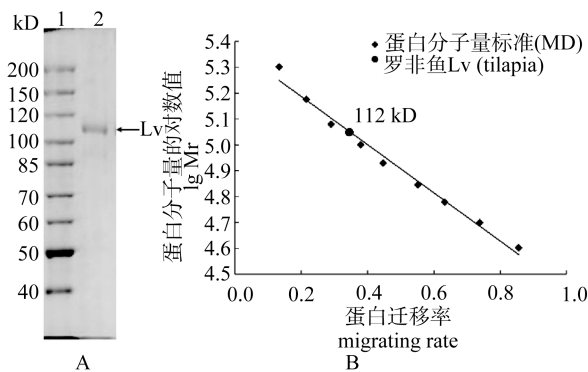


图 6 尼罗罗非鱼 Lv 的 SDS-PAGE (A)与 SDS-PAGE (B)测定分子量的标准曲线
条带 1: 标准蛋白; 条带 2: 尼罗罗非鱼 Lv.
Fig. 6 Molecular weight of the purified Nile tilapia Lv determined by SDS-PAGE gels (A) and the standard curve of SDS-PAGE (B)
Lane 1: protein marker; Lane 2: Nile tilapia Lv.

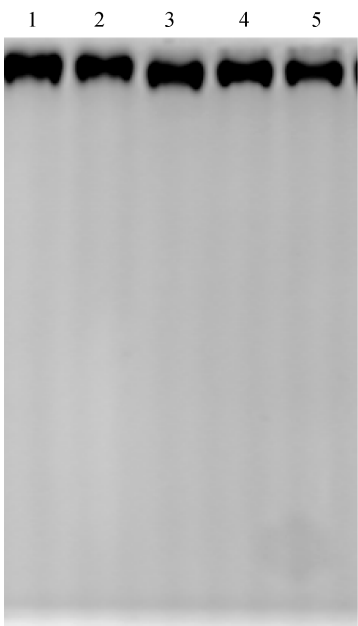


图 7 尼罗罗非鱼 Lv 的稳定性分析
条带 1: 未经处理的 Lv; 条带 2: 反复冻融处理的 Lv; 条带 3: 37℃处理 12 h 的 Lv; 条带 4: 60℃处理 30 min 的 Lv; 条带 5: 60℃处理 60 min 的 Lv.

Fig. 7 Stability detection of the Nile tilapia Lv
Lane 1: natural of Lv; Lane 2: Lv under the condition of multigelation; Lane 3: Lv incubated at 37℃ for 12 h; Lane 4: Lv incubated at 60℃ for 30 min; Lane 5: Lv incubated at 60℃ for 60 min.

3 讨论

目前有多种方法用于分离纯化鱼类 Lv, 常见的有凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析和

电泳法等^[11],其中以凝胶过滤与离子交换层析相结合的方法较为常用^[12],本实验室已利用此方法成功纯化了金鱼、美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)、真鲷(*Pagrosomus major*)等多种鱼类的 Vtg^[13-14]以及金鱼 Lv^[4],另外 Garnayak 等^[15]使用凝胶过滤层析的方法纯化了亚洲胡鲈 Vtg, Zhang 等^[16]利用凝胶过滤与离子交换层析相结合的方法纯化了玫瑰无须鲷 Lv,进一步证明该方法对于分离纯化鱼类 Vtg 及 Lv 具有良好的效果。本研究利用该方法分离纯化了尼罗罗非鱼卵匀浆液中的 Lv,经 Sephacryl S-300 层析后电泳结果显示获得了纯度较高、组分单一的蛋白,但条带较宽,可能含有部分杂蛋白,再经离子交换层析后电泳结果显示,获得的蛋白只有一条清晰的条带,两步纯化后获得了纯度高、成分单一的蛋白。

将上述得到的高纯度蛋白进行特异性染色,结果显示该蛋白能同时被 Schiff 试剂、甲基绿、苏丹黑 B 染色,证明是一种含有糖、磷、脂基团的蛋白。Vtg 被认为是一种祖先蛋白,完整的 Vtg 分子含有卵黄脂磷蛋白重链、卵黄高磷蛋白、卵黄脂磷蛋白轻链、 β' 组分和 C 端编码区^[17-18],其中鱼类 Lv 是 Vtg 的主要降解产物,与 Vtg 一样也是一种含有糖、磷、脂基团的高分子量蛋白^[19-20],由此可见,本研究分离纯化的蛋白与其他鱼类 Lv 的性质一致^[4-6, 19]。另外,研究表明 Vtg 在昆虫、线虫和脊椎动物中均有相对保守的结构域^[21],其中卵黄脂磷蛋白重链在不同物种间最为保守^[18],并且已证实多种鱼类的 Lv 与 Vtg 具有相同的免疫原性^[4-6],金鱼 Lv 多克隆抗血清与鲤科、石首鱼科、鲷科鱼类发生很好的免疫交叉反应^[4],本研究 Western Blot 结果显示,金鱼 Lv 抗血清能够与纯化的蛋白发生阳性反应,由于鼠抗金鱼 Lv 多克隆抗血清能够特异性识别纯化的蛋白,证明尼罗罗非鱼 Lv 与金鱼 Lv 抗血清有免疫交叉反应。

以上研究结果表明,分离纯化的尼罗罗非鱼蛋白是一种含有糖、磷、脂基团的蛋白,符合鱼类 Lv 的性质,且与金鱼 Lv 抗体具有免疫交叉反应。因此,从蛋白的性质和免疫原性角度判断本研究获得的高纯度蛋白为尼罗罗非鱼 Lv,其分子

量鉴定结果进一步佐证了我们的观点。不同鱼类的 Lv 分子量与亚基组成形式不尽相同,天然分子量一般在 300~500 kD,亚基分子量一般在 30~120 kD 范围^[22]。例如,师晓栋^[23]纯化鉴定了玫瑰无须鲷(*Puntius conchonius*)Lv 的分子量为 370 kD,由分子量 125 kD、110 kD 和 76 kD 的 3 个亚基组成;金鱼 Lv 的天然分子量为 385 kD,由分子量为 112 kD 的同源三聚体组成^[4];而日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)Lv 则由 4 个分子量为 85 kD 的亚基组成^[19]。Ndiaye 等^[7]分离纯化了尼罗罗非鱼血浆中的两种 Vtg, SDS-PAGE 结果显示,亚基分子量分别为 130 kD 与 170 kD,两种 Vtg 均由相同的亚基组成;Johanning 等^[24]对罗非鱼卵黄蛋白组成的研究表明,卵黄中含有亚基分子量为 116 kD 的卵黄脂磷蛋白。本研究纯化的尼罗罗非鱼 Lv,天然分子量约为 560 kD, SDS-PAGE 显示其亚基分子量约为 112 kD 的条带,结果显示,尼罗罗非鱼 Lv 的亚基组成与 Ndiaye 等^[7]关于罗非鱼 Vtg 的研究相似,均由一种亚基组成,亚基分子量与 Johanning 等^[24]的研究相比稍低,可能存在品系之间的差异,所以我们推测尼罗罗非鱼 Lv 可能是由 5 个相同亚基组成的同源五聚体。

鱼类 Lv 相对于 Vtg 通常具有更好的稳定性, Vtg 在纯化和保存过程中容易发生降解,如 Norberg^[2]发现庸鲈(*Hippoglossus hippoglossus*) Vtg 在-20℃保存时仍会降解;Arukwe 等^[25]认为, Vtg 的降解片段比 Vtg 表现出更多的免疫原性,导致 ELISA 标准曲线的斜率增大,从而给 Vtg 定量结果造成较大的误差。相比而言,鱼类 Lv 具有较好的稳定性,李育培等^[6]报道瓦氏黄颡鱼 Lv 在 60℃水浴中反复浸泡 10 次(2 min/次)仍相对稳定;王军^[4]的研究表明金鱼 Lv 在 60℃处理 1 h 的情况下仍未见降解。Kishida 等^[26]发现尼罗罗非鱼 Vtg 在保存过程中容易发生降解,而本研究结果表明纯化得到的罗非鱼 Lv 在反复冻融、37℃处理以及 60℃处理条件下均未出现降解现象,可见得到的 Lv 比尼罗罗非鱼 Vtg 更为稳定。研究结果为尼罗罗非鱼 Lv 抗体的制备及其作为外源雌激素生物标志物检测提供了基础理论依据。

参考文献:

- [1] Sumpter J P, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment[J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(7): 173–178.
- [2] Norberg B. Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) vitellogenin: induction, isolation and partial characterization[J]. Fish Physiol Biochem, 1995: 14(1): 1–13.
- [3] Komatsu M, Matsumoto W, Hayashi S. Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from eel *Anguilla japonica*[J]. Comp Biochem Physiol B, 1996, 113(3): 561–571.
- [4] Wang J. Purification and characterization identification of lipovitellin from *Carassius auratus* and preparation of polyclonal antisera[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [王军. 金鱼卵黄脂磷蛋白的分离纯化、性质鉴定及其多克隆抗血清的制备[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.]
- [5] Wen R S, Fang Z Q, Jiang S G, et al. Purification and immune analysis of lipovitellin from *Xiphophorus helleri*[J]. Journal of fisheries of China, 2007, 31(5): 647–654. [温茹淑, 方展强, 江世贵, 等. 剑尾鱼卵黄脂磷蛋白的纯化及免疫分析[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 647–654.]
- [6] Li Y P, Diao X M, Sheng X S, et al. Purification and characterization identification of lipovitellin from *Pelteobagrus vachelli* and preparation of anti-serum[J]. Journal of fisheries of China, 2010, 34(1): 116–125. [李育培, 刁晓明, 盛晓洒, 等. 瓦氏黄颡鱼卵黄脂磷蛋白(Lv)的纯化、性质鉴定及其抗血清的研制[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 116–125.]
- [7] 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 Eep Zool, 2006, 305A(7): 576–593.
- [8] Davis R. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins[J]. Ann N Y Acad Sci, 1964, 121: 404–427.
- [9] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(9): 4350–4354.
- [10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680–685.
- [11] 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(2): 361–368.
- [12] Tyler C R, Sumpter J P. The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin[J]. Fish Physiol Biochem, 1990, 8(2): 111–120.
- [13] Wang J, Bing X, Yu K, et al. Preparation of a polyclonal antibody against goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin and its application to detect the estrogenic effects of monocrotophos pesticide[J]. Ecotox Environ Safe, 2015, 111: 109–116.
- [14] Li Y. Vitellogenin purification of red drum and genuine porgy and the application in the detection of environmental endocrine-disrupting chemicals[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006. [李颖. 美国红鱼和真鲷卵黄原蛋白的分离纯化及在内分泌干扰物筛选中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.]
- [15] Garnayak S K, Mohanty J, Rao T V, et al. Vitellogenin in Asian catfish, *Clarias batrachus*: Purification partial characterization and quantification during the reproductive cycle by ELISA[J]. Aquaculture, 2013, 392–395: 148–155.
- [16] Zhang J, Zhang S C. Lipovitellin is a non-self recognition receptor with opsonic activity[J]. Mar Biotechnol, 2011, 12: 441–450.
- [17] Matsubara T, Nagae M, Ohkubo N, et al. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts[J]. Physiol Biochem, 2003, 28(1–4): 295–299.
- [18] Hiramatsu N, Matsubara T, Fujita T, et al. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments[J]. Mar Biol, 2006, 149(1): 35–47.
- [19] 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, 65(2): 315–320.
- [20] Wiley H S, Wallace R A. The structure of vitellogenin multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple forms of the yolk proteins[J]. J Biol Chem, 1981, 256(16): 8626–8634.
- [21] Chen J S, Sappington T W, Raikhel A S. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry[J]. Mol Evol, 1997, 44(4): 440–451.
- [22] Hiramatsu N, Hara A. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin Taimen (*Huchoperyil*)[J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 115(3): 243–251.
- [23] Shi X D. Purification, Characterization, immunoassay and function study of vitellogenin and lipovitellin from rosy barb (*Puntius conchoni*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2003. [师晓栋. 玫瑰无须鲃卵黄蛋白原及卵黄脂磷蛋白的纯化和免疫学鉴定[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.]
- [24] Johanning K M, Specker J L. Characterization of yolk proteins during oocyte development of tilapia, *Oreochromis*

- mossambicus*[J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 112B(2): 177–189.
- [25] 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]. Aquatic Toxicol, 2000, 49(3): 159–170.
- [26] Kishida M, Specker J L. Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis niloticus*): Induction of two forms by estradiol, quantification in plasma and characterization in oocyte extract[J]. Fish Physiol Biochem, 1992, 12(3): 171–182.

Purification, identification, and characterization of lipovitellin from tilapia (*Oreochromis niloticus*)

SHAN Ruihou¹, WANG Song², WANG Jun³, WANG Jun¹, RU Shaoguo¹

1. Marine Life Science College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China

Abstract: Lipovitellin (Lv) is the major proteolytic product of vitellogenin (Vtg) in the ovary and has been widely used in studies of endocrine disruption. In this paper, a high molecular weight protein was purified from the ovary extracts of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using gel filtration followed by ion-exchange chromatography. Results of native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), lipid staining with Sudan black B, carbohydrate staining with Schiff reagent, and phosphorus staining with methyl green identified the purified protein as a phosphoglycoprotein. Using western blotting, the protein was cross-reacted with the anti-goldfish Lv antisera. Native PAGE determined the molecular weight of the protein to be approximately 560 kD, and a single monomer of ~112 kD was detected by the sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE. Based on this characterization, immunogenicity, and molecular weight, this protein was identified as the Lv of the Nile tilapia. No degradation was observed under conditions of multigelation or incubation at 37°C or 60°C; thus, the purified Nile tilapia Lv exhibited a relatively higher stability than vitellogenin. To our knowledge, this is the first report of the purification and characterization of the Nile tilapia Lv. Results of the present study provide a theoretical foundation for the manufacture of polyclonal antisera against Nile tilapia Lv which could then be used to detect vitellogenin induction in tilapia.

Key words: *Oreochromis niloticus*; lipovitellin; purification; characterization

Corresponding author: RU Shaoguo. E-mail: rusg@ouc.edu.cn