

## 不同倍性虹鳟卵黄蛋白原的组织定位

韩英<sup>1</sup>, 王琨<sup>2</sup>, 张颖<sup>3</sup>, 霍堂斌<sup>3</sup>, 张澜澜<sup>1</sup>, 刘蔓<sup>1</sup>, 张贵学<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 黑龙江生物科技职业学院, 黑龙江 哈尔滨 150025;

3. 中国水产科学院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

**摘要:** 采用分步沉淀法提纯虹鳟卵黄蛋白, 以同发育期二倍体虹鳟为对照, 用免疫组化法对不同发育阶段的三倍体虹鳟性腺、肝脏、血液和肠道进行卵黄蛋白原(Vg)的细胞化学定位研究。试验结果表明: 所纯化蛋白为与卵黄蛋白原具有相似免疫原性的卵黄脂磷蛋白, 呈雌性特异性。性腺发育Ⅲ~Ⅴ期的二倍体雌性虹鳟, 血液和肝细胞呈卵黄蛋白原阳性, Ⅳ~Ⅴ期卵巢呈卵黄蛋白原阳性, 各发育期肠组织呈卵黄蛋白原阴性; 性腺发育至Ⅰ~Ⅴ期的三倍体雌雄虹鳟及雄性二倍体虹鳟, 其性腺、肝脏、血液和肠道组织呈卵黄蛋白原阴性。二倍体虹鳟外源性卵黄蛋白原在肝细胞内合成, 经血液运送至卵巢, 最终在卵母细胞中形成卵黄颗粒。由于三倍体雌性虹鳟卵巢发育受阻, 无滤泡细胞分化, 生殖细胞与体细胞的互作缺失, 不能分泌足量的 $17\beta\text{-E}_2$ 以诱导Vg的合成, 因而肝脏的Vg阴性并不能说明肝脏不具备合成Vg的能力, 从卵黄发生的角度分析, 卵黄蛋白原的缺乏不是导致三倍体虹鳟雌性不育的原因, 而是其卵泡败育的结果。

**关键词:** 虹鳟; 二倍体; 三倍体; 卵黄蛋白原; 免疫组织化学; 组织定位

**中图分类号:** Q 954; S 917

**文献标识码:** A

卵黄蛋白原(vitellogenin, Vg)是卵生动物卵黄蛋白(yolk protein)的前体, 是一种具有种属特异性的含磷、糖、脂的大分子蛋白。卵黄蛋白原进入卵母细胞后, 在酶的作用下裂解为卵黄脂磷蛋白(lipovitell, Lv)、卵黄高磷蛋白(phosvitin, Pv)和 $\beta'$ 成分(不含磷和脂的小分子蛋白), 成为卵黄的主要成分。卵子发生过程中, 卵黄的形成对于胚胎发生、发育至关重要。卵黄发生主要有两种方式: 一是卵母细胞自身合成, 即内源性卵黄合成或自动合成(autosynthesis); 二是卵母细胞外的组织合成, 然后进入卵母细胞, 为外源性卵黄合成(heterosynthesis)。几乎所有的卵生脊椎动物如两栖类、爬行类、鸟类以及绝大多数鱼类的卵黄合成均以外源性为主<sup>[1]</sup>。Mouchel等<sup>[2]</sup>研究了二倍

体虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的卵黄发生。有关三倍体鱼类卵黄蛋白原的研究, 在三倍体溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)、异源三倍体鲫等已有报道<sup>[3-4]</sup>。三倍体虹鳟的卵黄发生鲜有报道。本试验采用饱和硫酸铵分步沉淀与凝胶色谱相结合的方法, 从虹鳟卵粗提液中分离、纯化了与卵黄蛋白原具有相似免疫原性的卵黄脂磷蛋白, 制备兔抗血清, 对不同发育阶段的二倍体与三倍体虹鳟卵黄蛋白原进行了免疫组织化学定位研究, 以期从卵黄发生的角度探索三倍体虹鳟雌性不育机制。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 试验材料

三倍体虹鳟诱导制种采用热休克法, 二倍体

收稿日期: 2007-11-19

资助项目: 黑龙江省科技攻关项目(GA06B203-4-3)

作者简介: 韩英(1963-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 教授, 主要从事水生生物学及鱼类学研究。Tel: 0451-55190283, E-mail: hangying\_606@163.com

通讯作者: 张贵学, Tel: 0451-55191372, E-mail: Gxzhang@neau.edu.cn

虹鳟为同期人工繁殖获得,4~18℃水温下流水饲养。取4月龄、13月龄、21月龄、31月龄、35月龄二倍体和三倍体虹鳟雌、雄各5尾,分别采集其性腺、肠、血液和肝脏。取虹鳟成熟卵,于-80℃超低温下保存备用。

## 1.2 试验方法

**虹鳟卵黄蛋白的提纯** 卵黄蛋白的分离纯化参照 Hiramatsu 等<sup>[5]</sup>和 Roubal 等<sup>[6]</sup>的方法。取成熟卵20g,加入2倍体积的4℃预冷20mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液(内含0.01%NaN<sub>3</sub>,2mmol·L<sup>-1</sup> PMSF,pH 8.0),冰浴下15000r·min<sup>-1</sup>匀浆3min。匀浆液于4℃12000r·min<sup>-1</sup>离心20min,取上清液(重复3次)。4℃下,卵黄蛋白粗提液(浓度20g·mL<sup>-1</sup>)通过葡聚糖凝胶(Sephadex G-2000)(1.6cm×75cm)的凝胶柱洗脱,洗脱速度为1.0mL·min<sup>-1</sup>,收集峰值洗脱液并浓缩。紫外检测仪监测,色谱信号采集器记录洗脱曲线。

**抗血清的制备** 收集层析蛋白峰B,浓缩后(浓度2.0mg·mL<sup>-1</sup>)分别与完全福氏、完全佐剂等体积混合,充分乳化。新西兰白兔背部皮下多点位注射,每只1mL抗原乳化液;20d后,与不完全福氏佐剂等体积混合第2次加强免疫;30d后第3次免疫;35d后耳静脉取血测其效价,达到1:32以上后,次日心脏取血,析出抗血清。

**兔抗虹鳟卵黄蛋白IgG的提取** 饱和硫酸铵分步沉淀法<sup>[7]</sup>提取抗血清免疫球蛋白(IgG)。

**免疫组化检测** 免疫组织化学参照 Wahli 等<sup>[8]</sup>的方法。4%多聚甲醛(10mmol·L<sup>-1</sup>,pH 7.2的PBS配制)固定肝脏、肠、性腺组织块,石蜡切片厚度为5μm。0.3%甲醇-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>灭活切片,柠檬酸-柠檬酸钠(10mmol·L<sup>-1</sup>,pH 6.0)沸水浴50min进行抗原修复,1.5%牛血清白蛋白封闭,4℃一抗(IgG 1:500稀释)孵育12h以上,然后依次加HRP标记的二抗(1:4000)室温孵育2h,DAB室温避光显色15min,双蒸水终止反应。苏木精复染5min,脱水、透明、中性树胶封片观察。血涂片用甲醇固定,其它步骤同上。每次反应后均使用10mmol·L<sup>-1</sup>、pH 7.6的PBS漂洗,阴性对照。一抗用1.5%牛血清白蛋白替代。PBS中含有0.5%Triton-X100以利于免疫复合物的形成。

## 2 结果

### 2.1 卵黄蛋白的洗脱

由沉淀蛋白的洗脱曲线(图版-1)可见,Sephadex G-2000的分离效果较好,产生3个蛋白洗脱峰,峰A、峰B与峰C组分之间分离较彻底。其中峰B蛋白呈淡黄色,糖、磷、脂蛋白特异染色均呈阳性,Native-PAGE检测其分子量为123.2ku,为卵黄脂磷蛋白。收集B峰溶液并进行浓缩。

### 2.2 抗血清效价

如图版-2所示,中央孔为20μL左右的纯化抗原,外周孔1为2<sup>-1</sup>(1:2)稀释血清,至孔6为2<sup>-6</sup>(1:64)。即兔抗卵黄峰B蛋白血清效价至少为2<sup>-6</sup>(1:64)以上。卵黄形成后的虹鳟雌鱼血清(孔1~6)与兔抗峰B蛋白血清(中央孔)产生免疫沉淀反应,而性成熟雄鱼血清与兔抗血清、峰A和峰C蛋白不发生免疫沉淀反应,表明峰B蛋白为雌性特异性蛋白(图版-3)。

### 2.3 卵黄蛋白原的免疫组化定位

4月龄、13月龄、21月龄、31月龄、35月龄二倍体虹鳟性腺分别发育至I期、II期、III期、IV期和V期。性腺发育至III~V期的二倍体雌鱼肝细胞质中呈Vg阳性反应(图版-4~图版-6),I~II期雌鱼肝细胞、各期雄鱼肝细胞呈阴性反应;III~V期雌鱼血细胞呈阳性反应(图版-7~图版-9);I~II期雌鱼血细胞和各期雄鱼血细胞呈阴性反应;各期雌雄鱼前、中、后肠的肠细胞呈阴性反应;IV~V期卵巢呈阳性反应(图版-10、图版-11);各期精巢呈阴性反应。

各发育期三倍体雌、雄虹鳟的肝细胞、血细胞、性腺、肠道均呈Vg阴性反应(图版-12~图版-15)。

## 3 讨论

### 3.1 虹鳟卵黄脂磷蛋白的纯化

鱼类卵黄蛋白原纯化有多种方法,如选择性沉淀、FPLC、亲和层析、膜层析凝胶过滤与离子交换两步层析法等。Wang 等<sup>[9]</sup>利用Ultrapac TSK2G4000SW柱提取了虹鳟血清中卵黄蛋白原,效果较为理想。本试验采用饱和硫酸铵分步沉淀与凝胶色谱相结合的方法对虹鳟卵粗提液进行了分离纯化,纯化的峰B蛋白富含磷、脂肪和

糖,其分子量为 123.2 ku,为卵黄脂磷蛋白。卵黄脂磷蛋白抗血清在无外源诱导物存在的条件下,只与雌鱼血浆中的 Vg 反应,呈雌性特异性。卵黄脂磷蛋白是卵黄蛋白原的主要组成部分,与卵黄蛋白原具有相似的免疫原性,其抗血清能够代替卵黄蛋白原抗血清对 Vg 进行检测<sup>[10]</sup>。

### 3.2 二倍体虹鳟卵黄的发生

鱼类卵黄发生始于Ⅲ时相初级卵母细胞,从卵母细胞内质网、高尔基体和线粒体等细胞器的形态变化中可以观察到内源性卵黄蛋白的合成,由于其含量较低,一般难以检测。随着卵母细胞的发育,卵黄积累转以外源性为主,首先是卵巢滤泡细胞对促性腺激素 GtH 应答生成雌二醇 ( $17\beta\text{-E}_2$ ),随后  $17\beta\text{-E}_2$  与血清中类固醇结合蛋白或清蛋白结合,通过扩散进入肝脏,在肝细胞内合成 Vg 并由血液运送到卵巢,被滤泡细胞吸收,经裂解、重组后进入透明带,与受体结合,通过卵母细胞微绒毛的微胞饮作用(micropinocytosis)摄入卵质,被酶切加工成为卵黄脂磷蛋白和卵黄高磷蛋白<sup>[1]</sup>。试验结果表明,4月龄、13月龄二倍体雌性虹鳟性腺处于未成熟的Ⅰ~Ⅱ期,外源性卵黄尚未发生,故其肝脏、血液和卵巢呈 Vg 阴性反应;卵巢发育至Ⅲ期后,二倍体雌性虹鳟肝脏和血液呈 Vg 阳性反应,卵巢阳性反应滞后于肝脏,出现于Ⅳ~Ⅴ期(31月龄后)。Ⅲ期卵巢卵黄已发生,而在Ⅳ期卵巢中才检测到 Vg,分析是由于在 21~31月龄之间缺少样本的缘故。卵黄蛋白原组织定位结果显示,二倍体虹鳟外源性卵黄发生于肝脏合成 Vg,随血液循环进入卵巢,在卵母细胞中积累。各发育阶段在肠道中均未发现 Vg 的存在,说明 Vg 的合成和运输与肠道无关。

### 3.3 三倍体虹鳟的卵黄蛋白原

各发育期三倍体雌性虹鳟的肝脏、血液、性腺及肠道组织中卵黄蛋白原均呈阴性,显示其肝脏没有合成 Vg 或合成能力极弱。三倍体雌性虹鳟肝体指数 HSI 和性体指数 GSI 明显低于同期二倍体<sup>[11]</sup>,从另一角度表明三倍体虹鳟肝脏中没有大量的生物合成和营养物质贮存,肝脏与性腺之间没有明显的物质和能量转化关系。染色体三倍化效应,导致了包括虹鳟在内的大多数三倍体鱼类雌性不育,其原因不同学者观点各异。Liu<sup>[4]</sup>、Zhang 等<sup>[12]</sup>认为,三倍体鱼类雌性不育是减数分裂失败所致;Basant 等<sup>[13]</sup>认为,三倍体鲑科鱼类

雌性不育是由于雌性类固醇分泌不足或卵黄蛋白原分泌不足,属于机能性和激素不育。Kobayashi 等<sup>[14]</sup>发现,外源性  $17\beta\text{-E}_2$  能够诱导三倍体雌性虹鳟 Vg 的合成;Krisfalusi 等<sup>[15]</sup>试验证明,外源  $17\beta\text{-E}_2$  虽然可使三倍体虹鳟血清中 Vg 水平升高,但对卵子发生没有促进作用。上述研究表明,三倍体虹鳟肝脏有合成卵黄蛋白原的能力。

三倍体雌性虹鳟卵巢发育至Ⅱ期后卵母细胞败育,卵原细胞被基质细胞包围,没有滤泡细胞的分化,导致发育阻滞。卵巢中虽残存少量正常卵泡,能分泌少量的  $17\beta\text{-E}_2$ ,但不足以诱导肝细胞合成大量的 Vg。三倍体雌性虹鳟 Vg 的阴性反应显示其肝脏没有合成足量的卵黄蛋白原,这并不能说明肝脏没有合成 Vg 的能力,而是由于其卵巢结构异常,不能分泌足量的  $17\beta\text{-E}_2$  以诱导 Vg 的合成;由于生殖细胞与体细胞之间缺乏互作,即使产生了 Vg 也不能进入卵母细胞,不能使卵母细胞正常发育。从卵黄发生的角度分析,三倍体虹鳟卵黄蛋白原的缺乏不是导致其雌性不育的原因,而是其卵泡败育的结果。

最初的研究认为,Vg 是仅存在于雌性动物血液中的雌性特异性蛋白。随着研究的深入,人们发现雄鱼也有 Vg 基因,雄鱼及未成熟雌鱼受雌性激素或类似物刺激后也能在体内合成卵黄蛋白原。本试验结果表明,性腺发育至Ⅰ~Ⅴ期的二倍体和三倍体雄性虹鳟,其性腺、血液、肝脏和肠细胞均呈 Vg 阴性反应,说明环境中不存在诱导卵黄蛋白原非正常表达的刺激因子。

### 参考文献:

- [1] 张士瑾,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.
- [2] Mouchel N, Trichet V, Betz A, et al. Characterization of a fish (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin [J]. Gene, 1996, 174: 59-64.
- [3] Schafhauser S D, Benfey T J. The purification and development of a quantitative enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of vitellogenin in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2002, 24: 287-298.
- [4] Liu S J. Triploid crucian carp-allotetraploid hybrids ( $\delta$ )  $\times$  goldfish ( $\text{♀}$ ) [J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31 (1): 31-38.

- 
- [5] 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.
- [6] Roubal W T, Lomax D P, Maryjean L, et al. Purification and partial characterization of English Sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin [J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 118(3): 613 - 622.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [8] Wahli T, Meier W, Segner H, et al. Immunohistochemical detection of vitellogenin male brown trout from Swiss rivers [J]. Histochemical Journal, 1998, 30: 753 - 758.
- [9] Wang T, Zou J, Cun N H, et al. Cloning and functional characterisation of the interleukin- $\beta$ 1 promoter of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Biochem Biophys Acta, 2002, 1575: 108 - 116.
- [10] 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.
- [11] 韩英, 刘蔓, 张澜澜, 等. 不同倍性雌性虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 性体指数与肝体指数的关系 [J]. 渔业经济研究, 2008, (2): 62 - 64.
- [12] Zhang C, He X X, Liu S J, et al. Chromosome pairing in meiosis I in allotetraploid hybrids and allotriploid crucian carp [J]. Acta Zoologica Sinica, 2005, 51(1): 89 - 94.
- [13] Basant K, Tiwary R K, Arun K R. Plasma levels of Gonadotropin-II and gonadal sex steroids in triploid catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2001, 24: 9 - 14.
- [14] Kobayashi T, Fushiki S, Sakai N, et al. Oogenesis and changes in the levels of reproductive hormones in triploid female rainbow trout [J]. Fish Sci, 1998, 64: 206 - 215.
- [15] Krisfalusi M, Cloud J G. Effects of exogenous estradiol-17 $\beta$  on early growth and gonadal development of diploid and triploid female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Dev Genet, 1996, 19: 302 - 308.

---

## Histological localization of the vitellogenin from different ploidy rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*)

HAN Ying<sup>1</sup>, WANG Kun<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>3</sup>, HUO Tang-bin<sup>3</sup>, ZHANG Lan-lan<sup>1</sup>,  
LIU Man<sup>1</sup>, ZHANG Gui-xue<sup>1</sup>

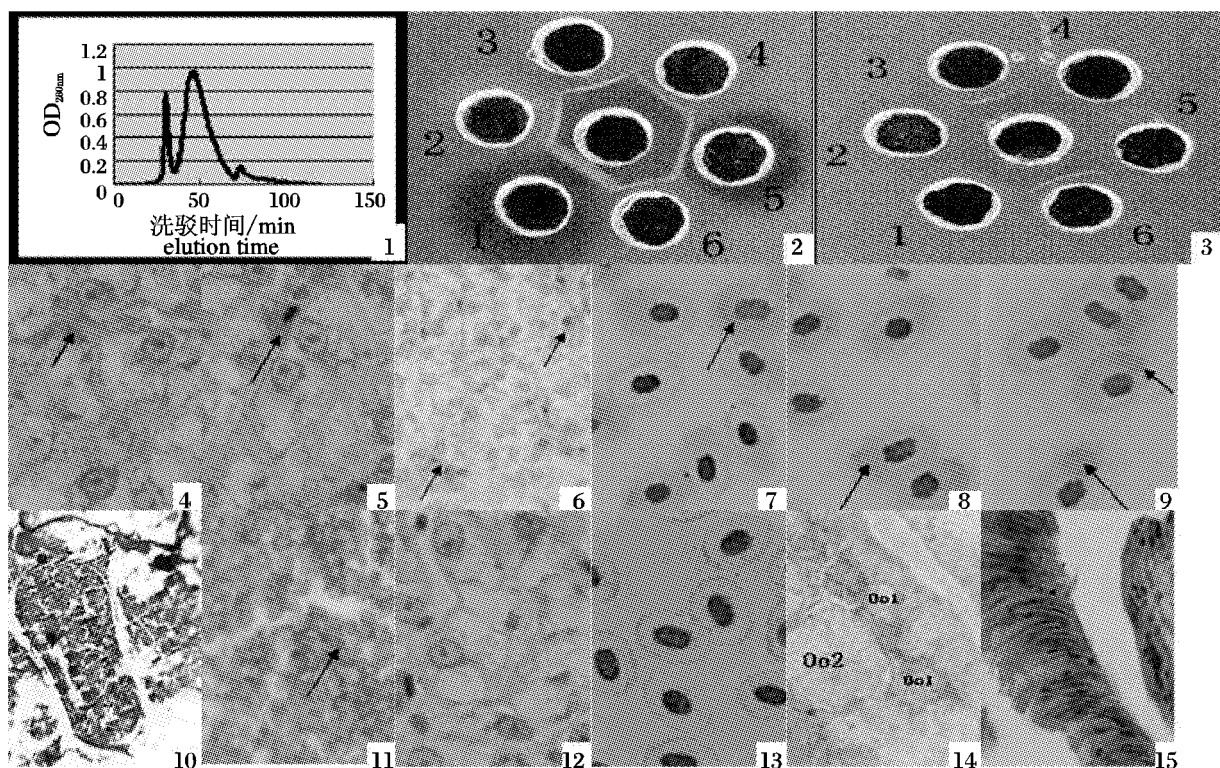
(1. *College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;*

2. *Heilongjiang Vocational College of Biology Science and Technology, Harbin 150025, China;*

3. *Heilongjiang Fishery Research Institute, Harbin 150070, China*)

**Abstract:** Vitellogenin of rainbow trout was extracted and purified by step precipitation method and the cytochemistry locations of Vg of triploid rainbow trout were studied in the gonad, liver, blood and intestine at different developmental stages by immuno-histochemical method with contrast group of diploid rainbow trout at the same stages. The results were shown as follows: the purified albumen was lipovitellenin and female-specific, which had the similar immunogenic characteristics to Vg. The Vg-positive reaction appeared in blood and hepatocytes of the female diploid rainbow trout at the III – V stages and in the ovaries at the IV – V stage, and the Vg-negative reaction occurred in intestine. The female and male triploids and male diploids were all Vg-negative in the blood, liver, blood and intestines at I – V stages. The exogenous Vg was originally composed by the liver cells and transported into the ovary through the blood circulation in which the yolk particles were produced finally. The Vg-negative reaction of the triploid female rainbow trout could not provide full evidence for the impossibility of liver to synthesize Vg. That Vg was not synthesized resulted from insufficient estradiol due to the retardation of ovaries development, the un-differentiation of follicular cells and the lost interaction of germ cell and somatic cells. It could be concluded from yolk genesis that the shortage of female triploid rainbow trout's Vg resulted from the abortive oocidium, but did not result in sterility.

**Key words:** *Oncorhynchus mykiss*; diploid; triploid; vitellogenin; immunohistochemistry; histological localization



### 图版 Plate

1. 卵黄蛋白洗脱曲线; 2. 抗血清效价; 3. 纯化蛋白的雌性特异性; 4. Ⅲ期二倍体雌性虹鳟肝脏阳性显色,  $\times 1000$ ; 5. Ⅳ期二倍体虹鳟雌性肝阳性显色,  $\times 1000$ ; 6. Ⅴ期二倍体雌性虹鳟肝阳性显色,  $\times 400$ ; 7. Ⅲ期二倍体雌性虹鳟血液阳性显色,  $\times 1000$ ; 8. Ⅳ期二倍体雌性虹鳟血液阳性显色,  $\times 1000$ ; 9. Ⅴ期二倍体雌性虹鳟血液阳性显色,  $\times 1000$ ; 10. 二倍体虹鳟Ⅳ时相卵母细胞阳性显色,  $\times 50$ ; 11. 二倍体虹鳟Ⅴ时相卵母细胞卵黄颗粒阳性显色,  $\times 1000$ ; 12. 21月龄三倍体雌性虹鳟肝脏阴性,  $\times 1000$ ; 13. 35月龄三倍体雌性虹鳟血液阴性,  $\times 1000$ ; 14. 21月龄三倍体虹鳟卵巢阴性, Oo1: I 时相卵母细胞末期, Oo2: II 时相卵母细胞,  $\times 1000$ ; 15. 35月龄三倍体雌性虹鳟肠阴性,  $\times 500$

注: 箭头所指为阳性反应信号颗粒

1. Vitellogenin washout curve; 2. Titre of antisera; 3. Female specificity of purified protein; 4. Vg positive in the liver of stage III diploid rainbow trout (female),  $\times 1000$ ; 5. Vg positive in the liver of stage IV diploid rainbow trout (female),  $\times 1000$ ; 6. Vg positive in the liver of stage V diploid rainbow trout (female),  $\times 400$ ; 7. Vg positive in the blood of stage III diploid rainbow trout (female),  $\times 1000$ ; 8. Vg positive in the blood of stage IV diploid rainbow trout (female),  $\times 1000$ ; 9. Vg positive in the blood of stage V diploid rainbow trout (female),  $\times 1000$ ; 10. Vg positive in the oocyte of phase IV diploid rainbow trout,  $\times 50$ ; 11. Vg positive in the eggs yolk granulation of phase V diploid rainbow trout,  $\times 1000$ ; 12. Vg negative in the liver of 21 months tiploid rainbow trout (female),  $\times 1000$ ; 13. Vg negative in the blood of 35 months tiploid rainbow trout (female) was negative, 1000; 14. 13. Vg negative in the ovary of 21 months tiploid rainbow trout, Oo1: Phase I oocyte, Oo2: Phase II oocyte, 1000; 15. Vg negative in the bowels of 35 months tiploid rainbow trout (female),  $\times 500$

Notes: The arrow is fingers of positive reaction