

文章编号: 1000-0615(2008)06-0817-08

## 鲟鱼 GtH 放射免疫测定方法的建立及催产前后 史氏鲟血清 GtH 含量的变化

胡红霞<sup>1</sup>, 刘晓春<sup>2</sup>, 朱 华<sup>1</sup>, 张 勇<sup>2</sup>

(1. 国家淡水渔业工程技术研究中心(北京)暨北京市水产科学研究所, 北京 100068;  
2. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 中山大学水生经济动物研究所暨  
广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 用蛋白质快速液相层析(FPLC)分离俄罗斯鲟鱼脑垂体促性腺激素(GtH), 共获得 GtH 纯化蛋白 4.6 mg。用 SDS-PAGE 变性胶电泳图谱初步分析纯化蛋白, 用反相高效液相色谱(rpHPLC)分离出两个亚基, 质谱测定  $\alpha$  亚基分子量: 15 603 ku, 两个  $\beta$  亚基分子量分别为 14 338 ku 和 14 694 ku。制备了鲟鱼 GtH 的兔抗血清多克隆抗体, 采用氯胺 T 法用 <sup>125</sup>I 标记抗原, 用羊抗兔  $\gamma$  球蛋白做二抗, 建立鲟鱼 GtH 的放射免疫测定方法。测定了催产前后不同时间史氏鲟血清中 GtH 含量的变化, 统计分析表明成功排卵的雌鱼比未排卵和阴性对照组在催产后 12 h 和 16 h GtH 分泌量升高显著, 最高达到  $234 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 催产效应时间与催产后血清中 GtH 的含量紧密相关。

**关键词:** 史氏鲟; 俄罗斯鲟; 促性腺激素; 放射免疫测定; 催产

**中图分类号:** S 917      **文献标识码:** A

鲟形目鱼类(Acipenseriformes)是一类古老的软骨硬鳞鱼类, 在鱼类进化史上占有重要地位, 有活化石之称<sup>[1]</sup>。分布于北半球北部, 为珍贵大型淡水经济鱼类, 具有重要的经济价值<sup>[2]</sup>, 在全球范围内均处于不同程度的濒危状态, 全部被列为《濒危动植物种国际贸易公约》附录 II 物种<sup>[3]</sup>。依靠进口和捕捞野生亲鱼繁殖是制约我国鲟鱼养殖持续发展的主要因素, 因此开展鲟鱼的全人工繁殖势在必行。

性腺成熟年龄的不稳定、卵巢发育不同步和雌雄鱼繁殖周期的不同是鲟鱼繁殖存在的问题, 因此有必要深入研究其繁殖生理学相关内容。促性腺激素(GtH)是研究繁殖生理学的重要指标之一。

促性腺激素(GtH)是由脊椎动物脑垂体分泌的促进性腺发育和繁殖的主要内分泌激素。脑垂体促性腺激素包括促滤泡激素(FSH)和促黄体激素(LH), 它们都是以非共价键相连接的  $\alpha$  和  $\beta$

两个亚基组成的二聚体结构, 其中  $\alpha$  亚基氨基酸组成相同, 而 2 种激素  $\beta$  亚基的氨基酸组成则明显不同, 具有特异的生物学作用<sup>[4]</sup>。

激素的放射免疫测定法(Radioimmunoassay, RIA)是检测相关激素含量的非常灵敏和可靠的一种方法。促性腺激素(Gonadotropin, GtH)存在种间特异性, 理论上应该建立每种鱼类的特异测定方法。目前已经建立鲤科、鲑科、鲟科、鲟科、罗非鱼属 GtH 的放射免疫测定法<sup>[5]</sup>。虽然也有利用鲤 GtH 成功用于测定鲟形目鱼类 GtH, 建立异源测定方法<sup>[6-7]</sup>, 但由于鲟形目鱼类特殊的分类地位, 与其他硬骨鱼类较远的亲缘关系, 还是需要建立鲟科鱼类特异的 GtH 测定方法。在我国, 随着养殖鲟鱼的规模化发展, 为提取鲟鱼脑垂体中的 GtH 提供了条件。

本实验进行了俄罗斯鲟鱼脑垂体 GtH 的纯化, 建立了鲟形目鱼类 GtH 放射免疫测定方法, 并成功

收稿日期: 2007-11-28

资助项目: 国家科技部“十五”863 现代农业技术主题(2001AA243061, 2004AA243060); 北京市科学技术委员会(954830400)

作者简介: 胡红霞(1972-), 女, 山西大同人, 博士, 从事鱼类生理及繁殖内分泌研究。E-mail: huhongxia1@yahoo.com.cn

地测定了人工催产后史氏鲟雌鱼血清中 GtH 含量的变化,为后续的有关繁殖生理研究奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

取 150 个人工养殖 7 龄俄罗斯鲟的脑垂体,其中雄性占 80%左右,已达到性成熟;雌性发育到 II 期卵巢。放入冻存管后用液氮激冻, -80 °C 保存。史氏鲟由北京市水产科学研究所国家级名优水产良种场从黑龙江购买的史氏鲟鱼苗养殖到 7 龄性成熟。

### 1.2 试剂和药品

250 mmol·L<sup>-1</sup> M PBS 缓冲液 400 mL(5×), 5 mol·L<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub> 1 mL(1 000×), 1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 200 mL, 0.2 mol·L<sup>-1</sup> PMSF(1 000×), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> HCO<sub>3</sub> 30 mmol·L<sup>-1</sup>, 抑肽酶(Sigma 公司), HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 pg (prap grade), FPLC (Amersham pharmacia biotech KTA), <sup>125</sup>I, 二抗(羊抗兔, Goat Anti-Rabbit γ-Globulin), BSA, Sephadex G-50, 巴比妥钠, 氯胺 T, 偏亚硫酸钠(SMS), 碘化钾(KI), NRS 稀释液由 0.5% BSA 稀释(1:50)正常兔血清(NRS)等。

### 1.3 GtH 的分离纯化

**糖蛋白粗分离** 将鲟鱼脑垂体(6.23 g)在液氮中研磨,然后在含有 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF、5 mmol·L<sup>-1</sup> 叠氮化钠以及 1 mL 抑酶肽的 PBS 缓冲液中置冰上超声波处理,超声 3 s,间隔 27 s,总时间 1 440 s。冰上搅动 3 h 左右低渗处理,18 000 r·min<sup>-1</sup> 4 °C 离心 20 min,收集可溶性总蛋白。上清用 50% 硫酸铵去除杂蛋白。15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,4 °C。糖蛋白不易沉淀,因此弃沉淀,留上清。上清用饱和硫酸铵沉淀糖蛋白,15 000 r·min<sup>-1</sup> 4 °C 离心 10 min。留沉淀。加 PBS 溶解沉淀,15 000 r·min<sup>-1</sup> 4 °C 离心 5 min,留上清待过柱;沉淀再次用 PBS 溶解,去除残渣,留上清待过柱。

**蛋白质快速液相色谱(FPLC)分离 GtH**

将上清经过 Superdex™ 75 分子筛,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,出现 2 个峰,分子量为 50~36 ku 和 30~20 ku 左右,分别收集两组峰的组分。用 DEAE-Sepharose 进行阴离子交换,用 30 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub> HCO<sub>3</sub> 平衡柱,未吸附蛋白用 30 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub> HCO<sub>3</sub> 洗脱,然后再用 30 mmol·L<sup>-1</sup> 和 1

mol·L<sup>-1</sup> 的 NH<sub>4</sub> HCO<sub>3</sub> 梯度洗脱吸附蛋白,大分子部分出现 5 个峰,分别收集到 1~5 号管。小分子部分出现两个峰,收集为 6、7 号两管。取 20 μL 样品进行聚丙烯酰胺凝胶和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 7 个收集样品,进行分子量和蛋白二聚体性质的初步鉴定。将电泳检测筛选的样品再次过 Sephadex G 75 分子筛,流速为 0.6 mL mol·min<sup>-1</sup>,在分子量为 30 ku 左右出现一个较大的峰,收集蛋白,冷干后称重。

### 1.4 反相高效液相色谱(rpHPLC)纯化和质谱测定分子量

rpHPLC 和质谱测定实验委托中国科学院过程工程研究所完成。反相柱 BioBasic-C18,颗粒大小 5 μm,孔径为 30 nm,100 mm × 1 180 mm;强阳离子交换柱 BioBasic SCX,颗粒大小 5 μm,孔径 30 nm,100 mm × 132 mm; rpHPLC 的流动相为 0.1% 三氟乙酸(0.1% TFA)。使用美国 Finnigan 的二维液质联用质谱仪(LC-MSPMS)测定分子量。

### 1.5 多克隆抗体的制备及效价测定

选取 2 kg 左右成年新西兰公兔制备鲟鱼 GtH 兔抗血清,每次抗原用 0.3~0.5 mg。第一次免疫前先取少量耳血,分离血清,以备阴性对照使用。第一针用弗氏完全佐剂,脚掌注射;以后都用弗氏不完全佐剂每隔十日注射一次,共注射五次;注射第三针一周后取血测效价,第五针注射一周后取全血,全血静置于 4 °C 冰箱过夜后,以 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后,取上层血清,采用间接法测定抗血清的效价。

### 1.6 鲟鱼 GtH 放射免疫测定方法(RIA)的建立

用 <sup>125</sup>I 标记抗原,第一抗体为兔抗鲟鱼血清(RastGtH),第二抗体为羊抗兔 γ 球蛋白血清(GAR)。建立竞争性放射免疫测定法<sup>[8]</sup>,以 stGtH(sturgeon GtH)为标记抗原和标准品。

**标记抗原** 将预浸泡的 Sephadex 摇匀,缓慢倒入硅化玻璃管内制备分离柱。采用氯胺 T 法用放射性同位素 <sup>125</sup>I 标记纯化的鲟鱼 GtH,根据 <sup>125</sup>I 放射性比强及本实验时的蜕变系数计算用量。收集 20 管左右分馏样,测定各管的放射性强度。取放射性最强的 3~4 管,每管加 200 μL 5% BSA 保护。4 °C 存放待用。标记效果采用 GtH 标记率=(总记数-反应管残留计数-无机峰计数)/(总记数-反应管残留计数);GtH 标记回收

率 = 标记柱第一峰值计数 / (总记数 - 反应管残留计数 - 无机峰计数) 进行评定。

**结合率实验** 将标记后的抗原用 0.5% BSA(牛血清白蛋白, Diluent) 稀释成 15 000 cpm (每分钟计数) / 200  $\mu\text{L}$ 。用 NRS 稀释液稀释一

抗, 浓度为: 1:25 000; 1:75 000; 1:125 000; 1:250 000。第二抗体(羊抗兔- $\gamma$  球蛋白血清) 工作浓度为 1:15。结合率实验同时确定 RastGtH 的滴度, 稀释液: 0.5% BSA。抗体和抗原结合率及一抗滴度的确定实验操作见表 1。

表 1 结合率实验程序

Tab. 1 The program of binding test

管号 tube No.	内容 content	稀释液 ( $\mu\text{L}$ ) diluent	一抗 ( $\mu\text{L}$ ) Rast GtH	标记抗原 ( $\mu\text{L}$ ) $^{125}\text{Ist GtH}$	二抗 ( $\mu\text{L}$ ) GAR(1:15)	备注 remark
1~4	TC			200		
5~8	零抗体	50	200 NRS	200	200	NSB
9~10	零激素	50	200 Rast I	200	200	SB I
11~12	零激素	50	200 Rast II	200	200	SB II
13~14	零激素	50	200 Rast III	200	200	SB III
15~16	零激素	50	200 Rast IV	200	200	SB IV

加样顺序: ①加 50  $\mu\text{L}$  diluent 或标准品和样品 ②NRS(0.5% BSA 稀释正常兔血清) 或一抗 ③ $^{125}\text{IstGtH}$ ; 混匀后在室温下放置过夜(约 18 h); 第二天加 GAR, 混匀后室温孵育 4 h, 除了 1~4 管直接测, 其他 4  $^{\circ}\text{C}$  4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心后弃上清, 用  $\gamma$  计数器(型号: COBRA II AUTO GAMMA) 测定 cpm(counting per minute) 值。非特异性结合率(NSB) = (5#~8#管 cpm 平均值) / (1#~4#管总计数 cpm 平均值)  $\times$  100%。特异性结合率(SB) = [(不同一抗 cpm 平均值) - (5#~8#管 cpm 平均值)] / [总计数 cpm 平均值 - (5#~8#管 cpm 平均值)]  $\times$  100%。NSB < 10%, SB 达到或大于 20% 时, 该标记物才可用于 RIA 的测定。选择 SB 最高的那管标记物稀释液以及合适的一抗浓度用来测定样品。

**标准曲线的建立和样品的测定** stGtH 标准品储存浓度为 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 用 0.5% BSA diluent 稀释标准品, 浓度为: 200; 100; 50; 25; 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.64  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 质控: 12.5; 1.25  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取 50  $\mu\text{L}$  标准品、质控和血清样品分别加入 200  $\mu\text{L}$  兔抗 stGtH 血清(RAst) 稀释液中(稀释度为 1:25 000), 混匀后在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育; 第二天加入 200  $\text{mL}^{125}\text{I}$  标记的 stGtH(15 000 cpm/200  $\mu\text{L}$  稀释液); 混匀后在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育; 第三天加入 200  $\mu\text{L}$  羊抗兔血清(GAR, 1:15), 24 h 内摇动 2 次, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育; 第四天

在 4  $^{\circ}\text{C}$  下进行冷冻离心 30 min(4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 去上清液后在 COBRA II AUTO GAMMA 计数仪上测 cpm, 以稀释度为横坐标, 以 B/B0 为纵坐标做标准曲线, 最后横纵坐标经对数转换。

### 1.7 数据处理和计算

应用 Microsoft Excel 软件, 计算出标准曲线的回归方程, 将样品 cpm 值换算成浓度。采用 SPSS 软件统计包中 ANOVA 的 Duncan 氏检验各组间 GtH 水平差异显著性( $P < 0.05$  认为差异显著)。

### 1.8 人工催产及血清样品收集

采用二次(间隔 12 h)注射 LHRH-A 催产性成熟的史氏鲟, 对照组注射鱼用生理盐水。分别在催产前, 一次注射 12 h 后(二次注射前), 一次注射 18 h 后, 46 h 后用 1 mL 注射器从尾静脉取血, 4  $^{\circ}\text{C}$  静止 4~6 h, 然后高速冷冻离心 10~15 min(7 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 分离血清, 在 -20  $^{\circ}\text{C}$  贮存待测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DEAE 阴离子交换纯化电泳检测结果

DEAE 阴离子交换共收集 7 个峰值, 由 SDS-PAGE 变性胶电泳图谱初步分析蛋白分子量和 GtH 二聚体的性质, 电泳检测结果 1、2、6 号可见解离出两个亚基, 分子量约为 15 ku 和 21 ku, 收集这三管样品进一步分离和分析(图 1)。

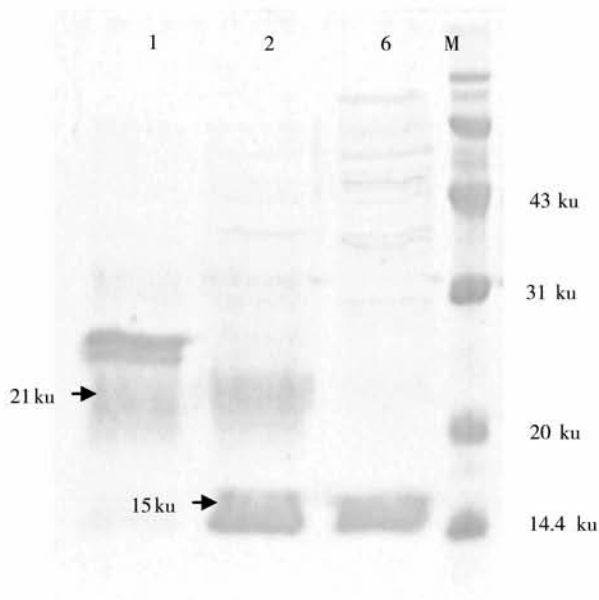


图1 DEAE收集样品 GtH 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of GtH obtained from DEAE- Sepharose

## 2.2 rpHPLC 分离结果

反相高效液相色谱结果显示,有五个比较明显的峰(图2),对照 Swanson 等<sup>[9]</sup>分离大麻哈鱼(Coho Salmon)GtH 的结果推测先洗脱下来的是 $\alpha$ 亚基,出现三个峰,后洗脱下来的两个峰应该是 $\beta_1$ 和 $\beta_2$ 。几管纯化蛋白目的峰洗脱时间一致,实验重复性好。分别收集目的峰,待测分子量。

## 2.3 液质联用串联质谱分析

结果显示 $\alpha$ 亚基只有一个明显的峰,分子量:15 603 u;两个 $\beta$ 亚基分子量分别为14 338 u和14 694 u(图3)。

## 2.4 多克隆抗体效价测定

将收集的两种 GtH 纯化蛋白共 4.6 mg 制备混合物的多克隆抗体。第三针注射后 7 d 效价 25 000,第五针注射后 7 d,取全血测定效价达到 22 万,能够满足建立放射免疫测定方法的要求。

## 2.5 $^{125}\text{I}$ 标记 GtH 的收集

标记反应经 Sephadex-G-50 柱洗脱,出现了明显的蛋白峰和无机  $\text{Na}^{125}\text{I}$  峰,并且蛋白峰和无机峰相隔较远表明该标记反应的效果较好(图4),符合放射免疫测定要求。收集有机峰中放射性最强的 7、8、9 三管,每管加 200  $\mu\text{L}$  5% BSA 保护,4  $^{\circ}\text{C}$  存放。标记率为 85.6%,回收率为:38.9%。

## 2.6 结合率实验结果

结合率实验结果显示,随着一抗浓度的降低,结合率下降,稀释度 1:25 000 和 1:75 000 特异性结合率为 31.9%和 22.4%,都符合下一步实验要求。选择 7# 标记物,兔抗 stGtH 血清(Rast,第一抗体)的工作浓度为 1:25 000(SB 为 31.9%)用于 RIA 测定。NSB=10.6%,满足实验要求。

## 2.7 人工催产史氏鲟血清 GtH 含量的变化

催产结果:催产 5 尾雌鱼,其中 3 尾排卵,效应时间分别为:产 1 为 27 h;产 2 和产 3 均为 42 h;2 尾没有排卵。效应时间最短的(27 h)史氏鲟血清 GtH 在第一次注射后 12 h,即二次注射前就迅速升高,达到 200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,二次注射后 6 小时,GtH 继续保持高水平(234  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )(图5)。统计分析表明即使 42 h 排卵的鱼 GtH 含量在 12 和 18 h 后也比对照组和未排卵的显著升高。

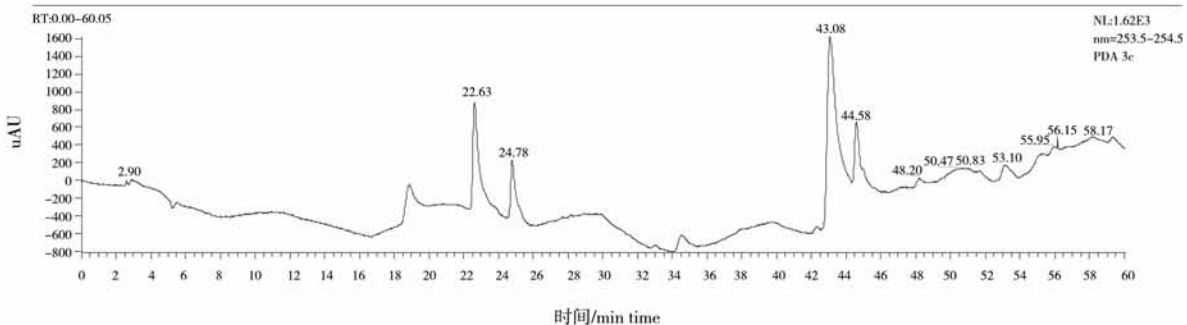


图2 纯化 GtH 的 rpHPLC 色谱图

Fig. 2 rpHPLC chromatograms of purified GtH

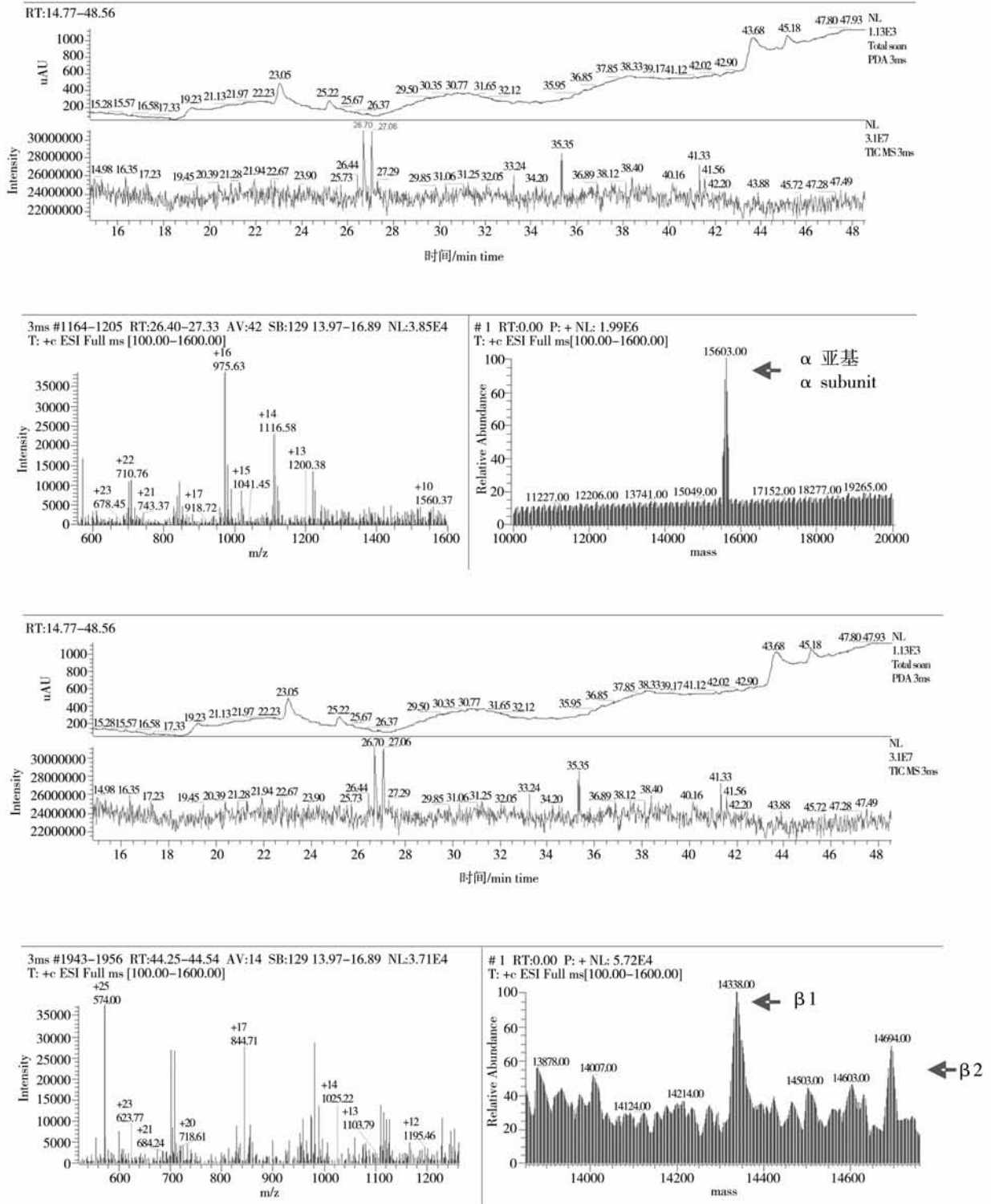


图3 LC-MS/MS分析两种 GtH 不同亚基分子量 Fig.3 LC-MS/MS molecular analysis of two GtH subunits



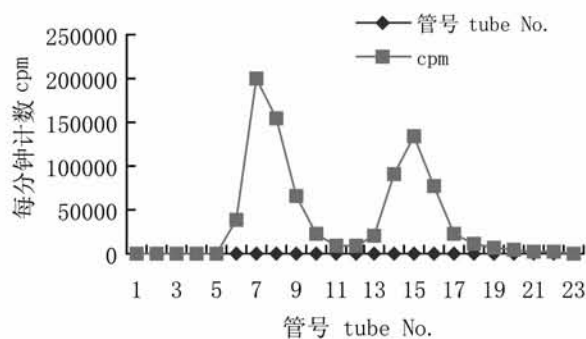
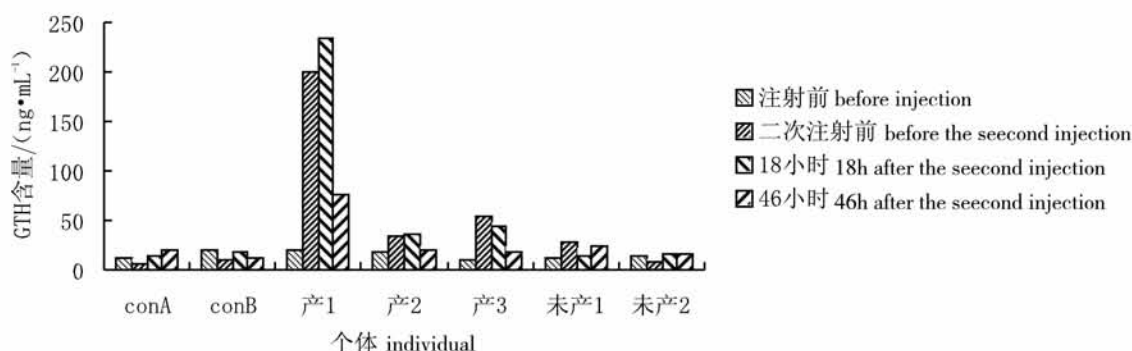
图4  $^{125}\text{I}$ 标记 GtH 的分离和收集Fig. 4 Collecting of labeled GtH with  $^{125}\text{I}$ 

图5 史氏鲟人工催产血清中 GtH 含量的个体变化

Fig. 5 Changes of serum GtH of individual Amur sturgeon by inducing ovulating

Barannikova<sup>[12]</sup>等检测到人工催产的闪光鲟血清 GtH 浓度超过  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;用鲟鱼脑垂体催产 1~3 h 就可检测到 GtH 的迅速升高,12 h 左右达到最高值( $40\sim 80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ );排卵前有所降低,但仍高于催产前;用 LHRH-A 催产鲟鱼 30 min 就可检测到 GtH 的升高,6~12 h 达到最高值( $20\sim 60 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),尤其二次注射后 GtH 释放量最高。本文测定的催产后史氏鲟血清 GtH 的释放规律与前人报道的基本一致,雌鱼催产后 12 h 到 18 h 保持释放 GtH 的高峰,最高超过  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,证明成功建立了鲟形目鱼类 GtH 的放射免疫测定方法,为今后研究鲟科鱼类繁殖生理的重要指标 GtH 的变化奠定基础。

早期研究认为鲟鱼只有一种 GtH 调节生殖发育的各个方面<sup>[13]</sup>。然而 Moberg 等分离出两种鲟鱼的 GtH,并证明其不同的生理学功能<sup>[14]</sup>,和高等硬骨鱼类一样,鲟鱼也是双重 GtH 系统来调节配子生成。本研究已经将两种 GtH 分别纯化出来,但由于材料所限,纯化的两种 GtH 没有分别制备抗体。取

### 3 讨论

本研究中分离纯化鲟鱼 GtH 的质谱结果与报道的大麻哈鱼<sup>[10-11]</sup>、银大麻哈鱼<sup>[9]</sup>等一致。两个  $\beta$  亚基的分子量分别是 14.338 ku 和 14.694 ku。 $\alpha$  亚基在 rpHPLC 中出现三个峰,推测  $\alpha$  亚基存在二级或三级结构不同导致的异构体。但一级结构即:氨基酸序列是一致的,因此具有相同的分子量。这与促性腺激素这类糖蛋白家族的研究一致:具有相同的  $\alpha$  亚基和特异性的  $\beta$  亚基<sup>[5]</sup>。

用的脑垂体大多来自性成熟的雄性俄罗斯鲟,因此得到的纯化蛋白量 GtHIII 高于 GtHI。在排卵和排精期间,脑垂体和血浆中 GtHIII 的浓度比 GtHI 多<sup>[15]</sup>,本实验建立的放射免疫测定方法主要显示出人工催产过程中 GtHIII 的变化。目前已经有西伯利亚鲟、史氏鲟等鲟科鱼类 GtHI 和 GtHIII 两个亚基 cDNA 序列的报道<sup>[16-17]</sup>,今后可以采用基因工程方法重组表达两种激素,分别建立两种激素的测定方法,能够更加深入地研究其生理功能。

用 LHRH-A 催产 5 尾史氏鲟,有 3 尾成功排卵。血清中 GtH 的释放量与效应时间成反比。排卵的雌鱼在催产后 12 h GtH 含量就显著高于对照组和排卵失败的鱼。鲟鱼雌鱼对激素的敏感性有差异<sup>[18]</sup>。对进行生殖洄游的自然成熟的闪光鲟和俄罗斯鲟催产也不能全部诱导排卵<sup>[19]</sup>。不能成功排卵的雌鱼表现在注射催产剂后 GtH 的含量也没有显著升高,说明 LHRH-A 没能成功诱导此类鱼脑垂体大量释放 GtH。鲟鱼自然繁殖对产卵场的要求很挑剔,往往是固定的产卵

场,要有特定的水温变化,水流速度,水的深度和透明度、底质等<sup>[20-22]</sup>。进行人工繁殖的鲟鱼有可能因为没有适宜的环境刺激而导致脑垂体 GnRH 受体活性不强或者存在个体差异。这也是完善鲟鱼人工繁殖需要深入研究的问题之一。

#### 参考文献:

- [1] Gardiner B G. Sturgeons as living fossils[M] // Eldredge N, Stanley S M ed. Living Fossils. New York: Springer Verlag Press,1984:148-152.
- [2] Bemis W E, Kynard B. An introduction to Acipenseriformes biogeography and life history [J]. Env Biol Fish, 1997, 48(1-4): 167-183.
- [3] Bemis W E, Findeis E K. The sturgeons plight [J]. Nature, 1994, 370: 602.
- [4] Li M D, Ford J J. A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the  $\alpha$  and  $\beta$ -subunits of glycoprotein hormone gene family [J]. J Endocrinol, 1998, 156: 529-542.
- [5] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广东:高等教育出版社, 1999: 158-165
- [6] 温海深,林浩然. 促黄体素释放激素和多巴胺拮抗物对鲟促性腺激素释放的作用[J]. 水产学报, 2001, 25: 393-397.
- [7] 周立斌,刘晓春,林浩然,等. 长臀鲟脑垂体和血清中促性腺激素的生殖周期变化[J]. 动物学报, 2003,49 (3):399-403,
- [8] Peter R E, Nahorniak C S, Chang J P, et al. Gonadotropin release from the pars distalis of goldfish, *Carassius auratus* transplanted beside the brain or into the brain ventricles; Additional evidence for gonadotropin release inhibitory factor [J]. Gen Comp Endocrinol, 1984, 55:337-346
- [9] Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H, et al. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropin, GtHI and GtHII[J]. Biol Reproduc, 1991,44:29-38.
- [10] Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from Chum salmon pituitary glands [J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 71:292-301.
- [11] Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins[J]. Gen Comp Endocrinol, 1988,71:302-306.
- [12] Barannikova I A, Bukovskaya O S. Hormonal control of sturgeon (*Acipenseridae*) reproduction [C]. Proc Fourth Int Symp Reprod Physiol Fish. The University of East Anglia, Norwich, UK, 7-12 July, 1991, 22-24.
- [13] Burzawa-Gerard E. L'hormone gonadotrope hypophysaire; un poisson chondrosteen, l'esturgeon (*Acipenser stellatus* pall). I. purification[J]. Gen Comp Endocrinol, 1975, 27:289-295.
- [14] Morberg G P, Waston J G, Papkoff H, et al. Development of radioimmunoassay for two sturgeon gonadotropins[C]. In Proc IVth Int Symp Reproduc Physiol Fish, 1991,11-12.
- [15] Moberg G P, Watson J G, Doroshov S, et al. Physiological evidence for two Sturgeon gonadotropins in *Acipenser transmontanus* [J]. Aquaculture, 1995, 135:27-39.
- [16] Quérat B, Sellouk A, Salmon C, et al. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*)  $\beta$ -subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone [J]. Biology of Reproduction, 2000,63:222-228.
- [17] 胡红霞,张勇,刘晓春,等. 史氏鲟两种促性腺激素  $\beta$  亚基 cDNA 克隆及序列进化分析[J]. 动物学报, 2006, 52(2):362-375
- [18] Goncharov B F. *In vitro* approach to studying the mechanisms of oocyte maturation in sturgeons: a review of fundamental and applied aspects [J]. J Appl Ichthyol, 2002, 18:368-374
- [19] Dettlaff T A, Ginsburg A S, Schmalhausen O I. Sturgeon fishes development biology and aquaculture [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1993: 65-153.
- [20] Kempinger J J. Spawning and early life history of lake sturgeon in the Lake Winnebago system [C]. Wisconsin Amer; Fish Soc Symp, 1988, 5: 110-122.
- [21] 四川省长江水产资源调查组. 长江鲟鱼类生物学及人工繁殖研究[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1988:90-110.
- [22] Kohlhorst D W, Botsford L W, Brennan L S, et al. Aspects of the structure and dynamics of an exploited central California population of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) [M]// Williot P, ed; Acts du Premier Colloque International sur l'Esturgeon, Centre National du Machinisme. 1991:277-293.

## Setting up radioimmunoassay for sturgeon gonadotropin GtH and assay of Amur sturgeon serum GtH after inducing ovulation

HU Hong-xia<sup>1</sup>, LIU Xiao-chun<sup>2</sup>, ZHU Hua<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>

(1. *National Freshwater Fisheries Engineering Technology Research Center, Beijing Fisheries Research Institute, Beijing 100068, China;*

2. *Institute of Aquatic Economic Animals, and Guangdong Province Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China*)

**Abstract:** Gonadotropin (GtH) protein was purified from the pituitary of Russian sturgeon using fast protein liquid chromatograph (FPLC). A total of 4.6 mg of Russian sturgeon GtH in dry weight was obtained. The purified protein was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. Two subunits of GtH were separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (rpHPLC). The molecular weight was determined through mass spectrograph. The  $\alpha$  subunit was 15 603 ku and the two  $\beta$ -subunits were 14 338 ku and 14 694 ku respectively. Rabbit anti-sturgeon GtH polyclone antibody was prepared; purified GtH was labeled by <sup>125</sup>I using chloramines T as labeled antigen; then the sturgeon GtH radioimmunoassay (RIA) method was set up using the goat anti-rabbit  $\gamma$ -globulin as the second antibody. After inducing ovulation, changes of serum GtH levels were detected. The secretion peak of female fish which ovulated successfully was sustained from 12 to 16 hours after first inducing injection and the serum GtH levels were increased significantly compared with control group and un-ovulated fish. The effect time of LHRH-A was related closely to the serum GtH levels.

**Key words:** Amur sturgeon; Russian sturgeon; gonadotropin (GtH); radioimmunoassay (RIA); induced ovulation