

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

李育培^{1,2}, 刁晓明^{2*}, 盛晓洒², 权恒², 翟旭亮², 李云²

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏泰州 225300;

2. 西南大学动物科技学院水产科学系, 淡水鱼类生殖与发育教育部重点实验室, 重庆 400716)

摘要:采用凝胶过滤和离子交换两种层析技术,从瓦氏黄颡鱼IV期卵巢粗提液中分离、纯化出卵黄脂磷蛋白(Lv),采用糖、磷、脂蛋白染色技术验证分离、纯化的蛋白为Lv,该Lv在非变性条件下分子量约为230 ku,在SDS变性条件下分子量约为106 ku。纯化的瓦氏黄颡鱼Lv经检测显示含有类胡萝卜素,但没有二硫键,对热相对稳定。利用纯化的瓦氏黄颡鱼Lv,制备了兔抗瓦氏黄颡鱼Lv多克隆抗血清。通过双向免疫扩散法测得Lv抗血清的效价为1:32,还发现瓦氏黄颡鱼卵黄蛋白原(Vtg)和Lv之间有明显的免疫交叉反应性,说明两者具有相同的免疫原性;Western-blotting检测显示抗血清的特异性较好,并能特异性地识别Vtg。

关键词:瓦氏黄颡鱼;卵黄脂磷蛋白;纯化;免疫分析

中图分类号: TQ 93; S 917

文献标识码: A

硬骨鱼类的卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vtg)在卵巢中降解成卵黄脂磷蛋白(Lipovitellin, Lv)、卵黄高磷蛋白(Phosvitin, Pv)和 β' -组分(β' -component) 3种卵黄蛋白^[1]。Lv是卵黄蛋白的主要组成部分,和Vtg一样,Lv富含脂肪和碳水化合物^[2]。现已纯化出多种鱼类的Lv^[3-16],并证明Lv和Vtg之间存在相同的免疫原性^[3-5]。但是关于瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)Lv方面的研究尚未见报道,本文将对瓦氏黄颡鱼的Lv进行纯化、鉴定其理化性质和对其进行免疫学方面的研究。纯化瓦氏黄颡鱼Lv并了解其理化性质是深入了解瓦氏黄颡鱼卵黄发生的基础,有助于在生理生化和分子水平上阐述鲶形目鱼类的卵黄发生与调控机理,对于探讨鲶形目鱼类及其他鱼类在生理、遗传和进化上的关系具有重要意义;同时对瓦氏黄颡鱼Lv进行纯化、性质鉴定以及进行免疫学方面的研究结果,对瓦氏黄颡鱼Vtg作为对外界雌激素或其它内分泌干扰物作用下鱼类体内一种生物标志物的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验药品与仪器

聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶过滤介质(sephacryl S-300 high resolution)、二乙胺基乙基琼脂糖纤维素离子交换层析介质(DEAE sepharose Fast Flow)和非变性蛋白分子量Marker购自Pharmacia公司(瑞典);变性蛋白分子量Marker、辣根酶标记山羊抗兔LgG-HRP、DAB显色剂、PVDF膜购自大连宝生物工程有限公司;脱脂奶粉、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、0.45 mm孔径滤膜、叠氮钠、考马斯亮蓝R-250、PMSF、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、琼脂糖、Tween-20、苏丹黑B、罗丹明B等购自北京鼎国生物技术有限公司;钼酸铵、冰乙酸购自重庆精细化工厂;甲醇、无水乙醇购自重庆吉元化学有限公司,以上试剂均为化学分析纯。试验中所用到的瓦氏黄颡鱼卵黄蛋白原和卵黄蛋白原多克隆抗血清为本实验室自制。

收稿日期:2009-04-17 修回日期:2009-08-10

资助项目:国家自然科学基金项目(30670266)

通讯作者:刁晓明, E-mail: diaoxiaoming1965@yahoo.com.cn

Universad Hood II 型凝胶成像系统 (Bio-Rad)、MC99-3 自动液相色谱分离层析系统(上海沪西分析仪器厂)、电转移仪 (Bio-Rad)、Model 680 型酶标仪 (Bio-Rad)、电泳仪 (Bio-Rad)、电泳槽 (Bio-Rad)、TGL-16G 型高速冷冻离心机(重庆泰坦贸易有限公司)、UV-1700 型紫外可见分光光度计(岛津)。

1.2 卵黄粗提液的制备

瓦氏黄颡鱼购自重庆市北碚区嘉陵江白庙子江段体重(80±5) g、体长(16±1) cm,取已发育成熟的瓦氏黄颡鱼的卵(Ⅳ期)和未性成熟的卵(Ⅱ期)于-80℃超低温冰箱中保存备用。

各取卵巢5 g,加3倍体积预冷的25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0 含20 mmol/L NaCl,1.5 mmol/L 的叠氮钠,0.2 mmol/L EDTA),在冰浴条件下匀浆,取匀浆液4℃10 000 r/min 离心30 min,除去上层脂肪,取中间层上清液为卵黄粗提液,于-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.3 卵黄脂磷蛋白的分离纯化

凝胶过滤层析和离子交换两步法纯化卵黄脂磷蛋白 采用凝胶过滤层析和离子交换两步法分离、纯化瓦氏黄颡鱼的Lv。采用280 nm的吸光值测量从凝胶过滤和阴离子交换柱所得的洗出液。蛋白浓度根据Bradford法确定,以牛血清白蛋白作标准。所有洗脱缓冲液均由0.45 mm孔径的滤膜过滤并除去气体。为避免试验过程中Lv的水解,在缓冲液中加入1 mmol/L的PMSF。层析过程在4℃下进行。

凝胶过滤层析 采用Sephacryl S-300层析柱预分离Lv。首先用200 mL 25 mmol/L 含0.07 mol/L NaCl的Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液平衡层析柱(2.0 cm×60 cm)。加入卵巢粗提液1 mL,用上述缓冲液以流速1 mL/min 冲洗层析柱,收集5 mL 每管。洗脱峰对应的洗脱液通过非变性聚丙烯酰胺电泳鉴定,含有Lv的收集液-20℃保存以进行离子交换层析进一步分离。

离子交换层析 离子交换层析(DEAE sepharose Fast Flow)采用不连续洗脱法。首先用含有0.07 mol/L NaCl的Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液平衡层析柱1 h。取上述凝胶过滤层析分离的Lv样品5 mL上样,继续用平衡缓冲液结合1 h。用含0.1 mol/L NaCl的25 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液进行洗脱1 h,然后用含0.2 mol/L

NaCl的25 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液进行洗脱1 h,收集1 mL等分试样,等分试样用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定,将含有Lv样品的收集液放入透析袋中,对25 mmol/L Tris-HCl(含有1 mmol/L PMSF,pH 7.5)缓冲液进行透析脱盐24 h,然后冻干,-80℃保存。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳、染色及分子量测定

非变性/SDS变性聚丙烯酰胺凝胶电泳按照汪家政等^[17]的方法进行。蛋白Marker和样品都在不同浓度(5%、6%、7.5%、9%、10%)分离胶中电泳,经染色、脱色后,置于凝胶成像系统中拍照,根据蛋白Marker,由凝胶成像系统的凝胶图像分析软件完成Lv相对分子量的计算,取平均值。

1.5 卵黄脂磷蛋白部分性质的检测

卵黄脂磷蛋白含糖、脂、磷特性的鉴定 对纯化后的Lv做Native-PAGE凝胶电泳,分别进行糖蛋白、脂蛋白、磷蛋白染色。糖蛋白染色参照Fairbanks等^[18]和Sun等^[19]的方法进行;脂蛋白染色参照杨安钢等^[20]方法;磷蛋白染色参照谢松等^[21]的方法。

类胡萝卜素检测 用岛津UV-1700紫外可见分光光度计对提纯后的Lv溶液(1 mg/mL)进行连续光谱扫描(190~1 000 nm)。

二硫键检测 将用含有β-巯基乙醇的SDS-PAGE样品缓冲液和不含有β-巯基乙醇的SDS-PAGE样品缓冲液分别对纯化的Lv进行处理后采用SDS-PAGE(分离胶7.5%)进行电泳检测,并比较二者的亚基数目变化情况。

热稳定性检测 取纯化的Lv 0.1 mL放入1.5 mL离心管中,将口封住,在60℃水浴中浸泡2 min,转入0℃冰水浴浸泡2 min。如此反复10次,然后与未经过热处理的样品进行非变性电泳检测。

1.6 瓦氏黄颡鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗血清的制备

动物免疫实验 雄性新西兰白兔2只在实验室驯养1个月后进行首次免疫。每只兔子皮下注射纯化的瓦氏黄颡鱼Lv 150 mg(等体积抗原与弗氏完全佐剂充分混匀),选取兔子背部皮肤6点,消毒后每点注射25 mg Lv。两周后进行第2次免疫,每只兔子皮下多点注射抗原100 μg(等体积抗原与弗氏不完全佐剂充分混匀)。以后每

周注射1次,连续注射3周,注射量为每只100 μg 。于第5次注射后,在1周内连续注射抗原2次以加强免疫效果,注射量为每只100 μg 。然后试血,如效价达到要求则立即对动物进行放血。免疫周期为7周。

双向免疫扩散法测定抗血清效价和卵黄脂磷蛋白与卵黄蛋白原免疫原性分析 在100 mL的0.85%生理盐水中加入0.8 g琼脂糖,加热溶解至透明,然后在清洁的小培养皿中进行浇制,琼脂糖板厚2~3 mm。冷却后在琼脂板上打孔,孔径约为3 mm,孔距约为5 mm。将兔抗瓦氏黄颡鱼Lv抗血清按二倍稀释法稀释成1:2、1:4、1:8、1:16、1:32和1:64的不同浓度。用微量进样器在中央孔加入10 μL (1 mg/mL)的瓦氏黄颡鱼Lv溶液,周围孔依次加入连续稀释的抗血清10 μL 。然后放入湿盒内,置37 $^{\circ}\text{C}$ 的温箱中经24 h观察沉淀线出现的情况,以出现明显的沉淀线的最高稀释度为该抗体的效价。

琼脂糖凝胶制板方法同上,待琼脂糖冷却后在凝胶中间部位平行打长60 mm、宽3 mm的槽孔,在槽孔的上下15 mm处各打一个孔径4 mm的小孔,将孔内琼脂挑出。孔槽上方的小孔内加入试验组雄性瓦氏黄颡鱼的血浆,孔槽下方小孔内加入对照组雄性瓦氏黄颡鱼的血浆,孔槽内加入兔抗瓦氏黄颡鱼Lv多克隆抗血清,加样量平于琼脂表面,置于湿盒中,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育24 h进行双向扩散。

Western blotting 检测卵黄脂磷蛋白抗血清的特异性 将纯化的Vtg、纯化的Lv和IV期卵巢粗提液进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后把凝胶转印到PVDF膜上,转印后的PVDF膜用蒸馏水淋洗1~2 min,然后用50 mL TBST洗10 min,在5%的脱脂奶粉中4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜;然后用200 mL TBST洗膜(2 \times 10 min),用1:1 000倍稀释的兔抗瓦氏黄颡鱼Lv多克隆抗血清4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用200 mL PBST洗膜(4 \times 10 min),用1:1 000倍稀释的辣根酶标记山羊抗兔LgG-HRP 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;用200 mL TBST洗膜(2 \times 5 min),然后用TBS淋洗以除去Tween-20,最后将PVDF膜置于底物显色液中,待达到最佳对比度后,用大量蒸馏水冲洗以终止反应,然后拍照,洗涤后晾干,避光保存。

2 结果

2.1 卵黄脂磷蛋白的纯化

对IV期与II期卵巢粗提液进行Native-PAGE电泳后发现(图1),II期卵巢粗提液的泳道出现的蛋白带较多,估计是Vtg在卵巢内转化为成熟卵黄过程中产生的中间物质;IV期的泳道出现了3条蛋白带是II期所没有的。IV期的泳道出现的第3条较浓的蛋白带初步怀疑是Lv。

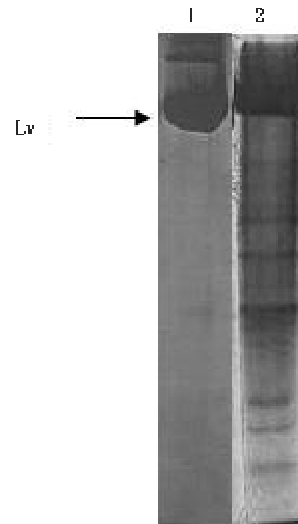


图1 IV期与II期卵巢粗提液Native-PAGE电泳图

1. IV期卵巢;2. II期卵巢

Fig.1 Native-PAGE analysis of stage IV and stage II of ovarian extract

1. stage IV of ovarian;2. stage II of ovarian

IV期卵巢粗提液经过sephacryl S-300 high resolution凝胶过滤层析后,产生了3个洗脱峰I、II和III(图2),由于卵黄蛋白主要由卵黄脂磷蛋白组成,因此初步怀疑峰III对应的洗脱液含有Lv,所以收集峰III蛋白溶液,经过离子交换柱分步洗脱后出现了两个洗脱峰:峰A和峰B(洗脱曲线见图3)对2个洗脱峰进行非变性胶电泳检测,发现峰B,即0.2 mol/L NaCl洗脱下的蛋白峰内含有单一的大分子蛋白带,经非变性胶电泳蛋白Marker测定其分子量为230 ku(图4);SDS-PAGE显示它只有一个分子量为106 ku的亚基(图5),因此初步确定峰B蛋白为瓦氏黄颡鱼的Lv,将其脱盐冻干,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,以备进一步分析。

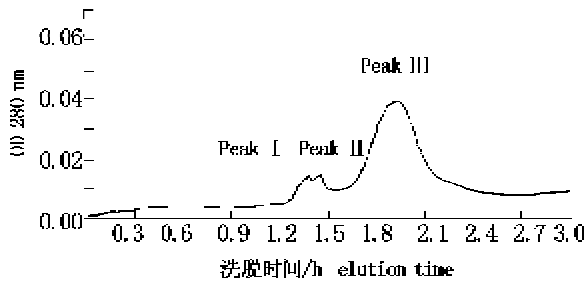


图2 利用葡聚糖 sephacryl S-300 high resolution 对瓦氏黄颡鱼IV期卵巢Lv进行纯化
Fig.2 Gel filtration of the stage IV ovary extract from *P. vachelli* on a sephacryl S-300 high resolution column

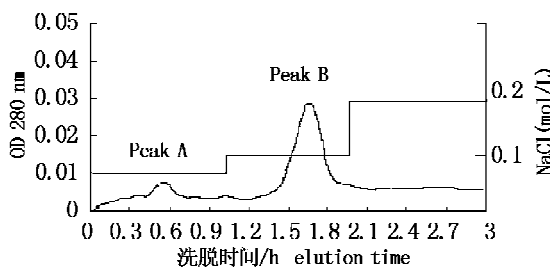


图3 利用 DEAE sepharose Fast Flow 纤维素离子交换层析进一步纯化瓦氏黄颡鱼的Lv
Fig.3 Anion exchange chromatography of the Lv-containing contents (Fig. 2 Peak III) on a DEAE sepharose Fast Flow

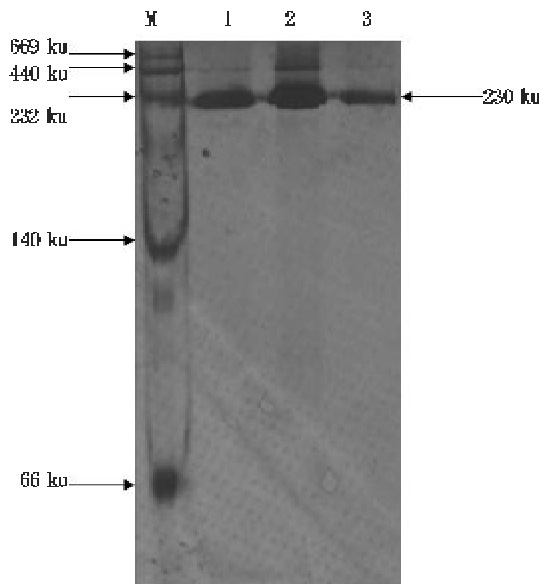


图4 纯化的瓦氏黄颡鱼Lv Native-PAGE电泳图(9%)
M. 蛋白标准;1. 经凝胶过滤层析预分离的Lv(Peak III);2. IV期卵巢粗提液;3. 经离子交换层析进一步纯化的Lv(Peak B)
Fig.4 Native-PAGE analysis of purified *P. vachelli* Lv
M. Marker; lane 1. Lv (Peak III) purified by sephacryl S-300 high resolution column; lane 2. stage IV ovarian extract; lane 3. Lv purified by DEAE sepharose Fast Flow column (Peak B)

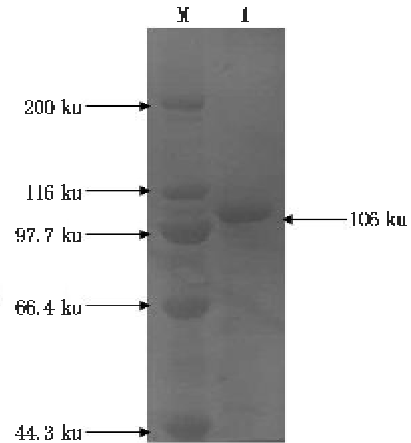


图5 纯化的瓦氏黄颡鱼Lv SDS-PAGE电泳图(7.5%)
M. 蛋白标准; 1. 经离子交换层析进一步纯化的Lv
Fig.5 SDS-PAGE analysis of purified *P. vachelli* Lv
M. Marker; lane 1. Lv purified by DEAE sepharose Fast Flow column

2.2 卵黄脂磷蛋白的部分性质检测

卵黄脂磷蛋白的特异性染色 采用1.5所述糖、磷、脂蛋白特异性染色的方法对非变性胶电泳后的Lv做进一步鉴定(图6)。3种染色方法都是阳性结果,说明纯化的峰B蛋白就是Lv,瓦氏黄颡鱼的Lv具有含糖、含磷和含脂的特性,是一种典型的磷脂糖蛋白。

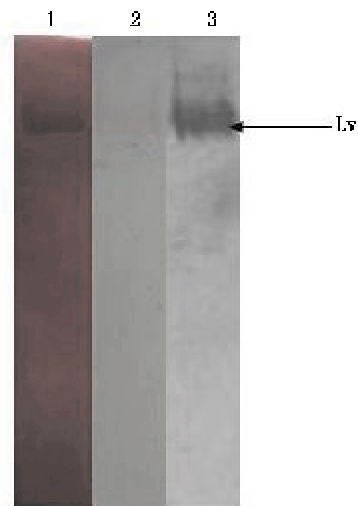


图6 纯化后的瓦氏黄颡鱼Lv含糖、磷和脂的测定
1. 用高碘酸-Schiff试剂进行糖蛋白染色;2. 用罗丹明B进行磷蛋白的染色;3. 用苏丹黑B进行脂蛋白的染色

Fig.6 Determination of lipid, carbohydrate and phosphorus components in *P. vachelli* Lv

The purified Lv was run on 7.5% Native PAGE, and stained with periodic acid-Schiff's reagent (lane 1) for carbohydrate, Rhodamine B (lane 2) for phosphorus and Sudan black B (lane 3) for lipid

卵黄脂磷蛋白类胡萝卜素检测 纯化的Lv经过190~1000 nm连续光谱扫描后在273 nm处有明显的吸收峰(图7)。

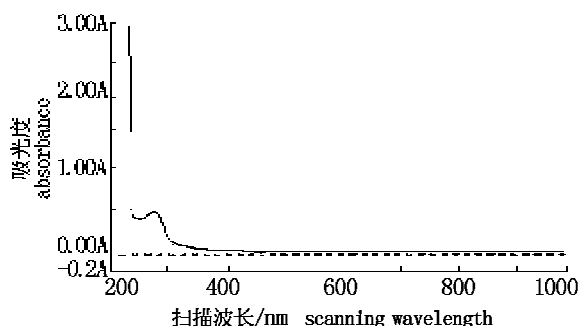


图7 瓦氏黄颡鱼Lv的光谱扫描图

Fig.7 Scanning spectrum of *P. vachelli* Lv

卵黄脂磷蛋白的二硫键检测 用β-巯基乙醇处理过的Lv和未用β-巯基乙醇处理过的Lv经变性胶电泳检测显示,瓦氏黄颡鱼的Lv没有发现含有二硫键。

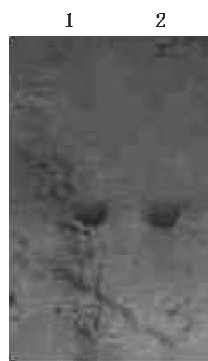


图8 瓦氏黄颡鱼Lv二硫键的检测

1. 未用β-巯基乙醇处理过的Lv; 2. 用β-巯基乙醇处理过的Lv

Fig.8 Detection of disulfide bond of *P. vachelli* Lv

Lane 1. Lv by β-mercaptoethanol untreated; lane 2. Lv by β-Mercaptoethanol treated

卵黄脂磷蛋白热稳定性检测 热处理过的Lv和未经热处理过的Lv经非变性胶检测显示,蛋白条带变化不大(图9),说明纯化后的Lv相对稳定。

2.3 卵黄脂磷蛋白抗血清效价检测

双向免疫扩散试验测得的抗血清效价为1:32(图版-1)。

2.4 卵黄脂磷蛋白与卵黄蛋白原免疫原性分析

双向免疫扩散试验表明,Lv抗血清能够特异性的识别Vtg,与纯化的Vtg发生免疫沉淀反应

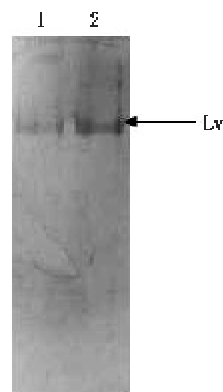


图9 瓦氏黄颡鱼Lv的热稳定性检测

1. 热处理过的Lv; 2. 未经热处理过的Lv

Fig.9 Detection of heat stability of *P. vachelli* Lv

Lane 1. heated treated of Lv; lane 2. natural of Lv

(图版-2),同样Vtg抗血清能够特异性的识别Lv,与纯化的Lv发生免疫沉淀反应(图版-3);如图版-4所示,Lv抗血清能与E₂诱导的雄性瓦氏黄颡鱼血浆发生免疫沉淀反应,而与对照组雄性瓦氏黄颡鱼血浆却没有反应。

2.5 Lv抗血清特异性检测

利用Lv抗血清作为一抗对瓦氏黄颡鱼IV期卵巢粗提液、纯化的Lv和纯化的Vtg做非变性电泳和免疫印迹(图10),结果显示,Lv抗血清能够特异性识别纯化的抗原、卵巢粗提液和纯化的Vtg,只显示一条杂交带,杂交信号专一,说明抗体的特异性较好,而且能够特异性地识别Vtg,与Vtg产生交叉免疫反应。

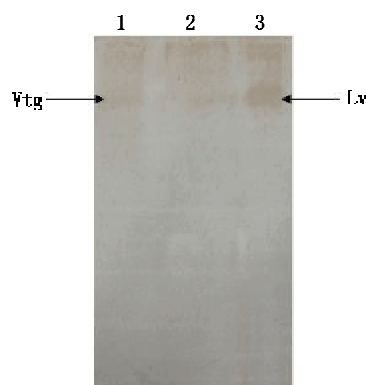


图10 利用非变性胶电泳和免疫印迹对Lv抗血清特异性的测定

1. 纯化的Vtg; 2. 纯化的Lv; 3. IV期卵巢粗提液

Fig.10 Specificity of the anti-Lv sera using 7.5% native-PAGE and Western-blotting

Lane 1. purified Vtg; lane 2. purified Lv; lane 3. stage IV ovarian extract

3 讨论

3.1 瓦氏黄颡鱼卵黄脂磷蛋白(Lv)的纯化

目前纯化卵黄蛋白原、卵黄脂磷蛋白的方法很多,常见的方法有选择性沉淀、密度梯度超速离心、亲和层析、膜层析、金属亲和层析、凝胶过滤离子交换两步层析法^[22]和聚丙烯酰胺凝胶电泳^[5],凝胶过滤层析和离子交换层析两步法由于适用范围广、纯化效果相对较好成为应用最多的一种纯化方法^[23-27]。师晓栋^[3]、温茹淑等^[4]利用凝胶过滤层析和离子交换层析两步法成功分离纯化出了玫瑰无须鲃(*Puntius conchonius*)、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)的Lv。本试验也利用凝胶过滤层析和离子交换层析两步法成功分离纯化出了瓦氏黄颡鱼的Lv(由于纯化的蛋白能同时被糖蛋白、脂蛋白和磷蛋白染色^[28],表明其含有糖基、脂基和磷酸基团,因此确定这种高分子量的蛋白为瓦氏黄颡鱼的Lv),证明凝胶过滤层析和离子交换层析两步法能分离出较纯的Lv,是一种分离Lv较为理想的方法。

3.2 瓦氏黄颡鱼卵黄脂磷蛋白(Lv)的结构

鱼类Lv通常以二聚体形式存在于卵内,天然聚丙烯酰胺凝胶电泳显示Lv二聚体分子量在300~500 ku之间,其单体一般由分子量在31~120 ku之间的两条肽链组成^[28]。鱼类的Lv在非变性条件下多数种类只有1种类型^[3-16],但也有例外,如星鲃(*Veras permoseri*)^[8]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[16]的Lv有2种类型,鲮(*Mugil cephalus*)^[14]的Lv甚至有4种之多。本研究结果表明,瓦氏黄颡鱼的Lv只有一种类型,其富含糖和脂,磷含量相对较少(图6),非变性分子量为230 ku,比Vtg的分子量略小(本实验室纯化的瓦氏黄颡鱼Vtg分子量为240 ku);变性胶电泳显示瓦氏黄颡鱼的Lv只有一个分子量为106 ku的亚基,因此推测Lv由两个相同的同源二聚体组成。瓦氏黄颡鱼的Lv的分子量相对于其它鱼类^[3-16]的Lv分子量有点偏低,目前还没见到有关鲮形目鱼类Lv分子量的报道,至于瓦氏黄颡鱼Lv分子量较低的原因还有待进一步研究。

柳峰松等^[29]试验证明中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的卵黄蛋白中含有类胡萝卜素;Yehezkel等^[30]对红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)一种仅在次级卵黄发生期出现的

雌性特异高密度脂蛋白LP II的研究表明,该蛋白在470 nm处有吸收峰,说明含有类胡萝卜素辅基,它可以单独或同LP I一起负责将一些主要的脂类和(或)类胡萝卜素运进卵巢;张年国等^[9]在进行Sephadex G-100凝胶层析洗脱施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)卵黄蛋白的过程中发现有环形、淡黄色的色带随洗脱向下移动,他们认为这可能与动物的卵黄蛋白结合运转类胡萝卜素有关;Vtg能与类胡萝卜素和核黄素结合并把它们运至卵母细胞^[31]。本试验通过190~1 000 nm连续光谱扫描瓦氏黄颡鱼Lv,发现在273 nm处有明显的吸收峰,我们也用同样的方法对瓦氏黄颡鱼Vtg进行了扫描,发现在276 nm处出现了吸收峰,因此推测瓦氏黄颡鱼Lv可能结合有少量的类胡萝卜素,而这些类胡萝卜素来源于Vtg。

3.3 瓦氏黄颡鱼卵黄脂磷蛋白抗体免疫原性的意义

目前已有许多研究表明,Lv是Vtg在卵巢内降解后的主要部分,Vtg和Lv之间具有相同的免疫原性也已经在唐鱼(*Tanichthys albonubes*)^[5]、玫瑰无须鲃(*Puntius conchonius*)^[3]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[32]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[33]等多种鱼中被证实,并用于酶联免疫检测。本试验利用双向免疫扩散法和Western-blotting对Lv是Vtg之间的免疫原性做了研究,发现它们之间可以发生免疫交叉反应,Vtg抗血清和Lv,Lv抗血清和Vtg都能发生特异性较好的免疫交叉反应,说明Vtg和Lv具有相同的免疫原性,可以用Lv抗血清替代Vtg抗血清对Vtg进行检测。对于个体较小,采血比较困难的鱼类,从血液中纯化Vtg并制备抗体的规模受到很大的限制,相比之下从卵巢分离大量的Lv和制备抗体相对比较容易,因此,可以利用Lv抗血清替代Vtg抗血清进行内分泌干扰物污染的检测。

参考文献:

- [1] Matsubara T, Sawano K. Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*) [J]. J Exp Zool, 1995, 272: 34-45.
- [2] Mommsen T P, Walsh P J. Vitellogenesis and oocyte assembly [M]//Hoar W S, Randall D J. Fish Physiology XIA, New York: Academic Press, 1988:

- 347-406.
- [3] 师晓栋. 玫瑰无须鲷卵黄蛋白原和卵黄脂磷蛋白的纯化、鉴定、免疫分析和功能研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [4] 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.
- [5] 姚静, 方展强, 徐杰, 等. 唐鱼卵黄脂磷蛋白的纯化鉴定与免疫原性分析[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(1): 69-73.
- [6] 王浩, 李朝军, 刘荣臻. 大阪鲫两种卵巢蛋白的纯化及其生化特性[J]. 水产科技情报, 1994, 21(3): 103-107.
- [7] 顾建华, 孟艳玲, 吕军开. 河川沙塘鳢卵母细胞发育过程中卵黄脂磷蛋白的变化[J]. 水产科学, 2007, 26(1): 43-47.
- [8] Matsullara 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]. *Devel Biol*, 1999, 213: 18-32.
- [9] 张年国, 张颖, 曲秋芝, 等. 施氏鲟卵黄蛋白的分离纯化及其性质[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 309-314.
- [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 C*, 2001, 130: 119-131.
- [11] Ohkubo N, Sawaguchi S, Nomura K, *et al.* Utilization of free amino acids, yolk protein and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *Aquaculture*, 2008, 282: 130-137.
- [12] Hara A, Yamauehi K, Hirai H. Studies on female-specific senln1 protein and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 1980, 65: 315-320.
- [13] Amano H, Kitamura M, Fujita T, *et al.* Purification and characterization of lipovitellin from Pacific saury *Cololabis saira* [J]. *Fisheries Science*, 2008, 74(4): 830-836.
- [14] Amano H, Fujita T, Hiramatsu N, *et al.* Egg yolk proteins in gray mullet (*Mugil cephalus*): Purification and classification of multiple lipovitellins and other vitellogenin-derived yolk proteins and molecular cloning of the parent vitellogenin genes [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics and Physiology*, 2007, 307: 324-341.
- [15] Sawaguchi S, Kagawa H, Ohkubo N, *et al.* Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, 73(6): 719-736.
- [16] Fujiwara Y, Fukada H, Shimizu M, *et al.* Purification of two lipovitellins and development of immunoassays for two forms of their precursors (vitellogenins) in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 143(3): 267-277.
- [17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-122.
- [18] Fairbanks G, Steck T L, Wallice D F H. Electrophoretic analysis of the major polypeptide of the human erythrocyte membrane [J]. *Biochem J*, 1971, 10: 2606-2617.
- [19] Sun X T, Zhang S C. Purification and characterization of a putative vitellogenin from the ovary of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, 129B: 121-127.
- [20] 杨安钢, 毛积芳, 药立波. 生物化学与分子生物学试验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 40-42.
- [21] 谢松, 安建宏, 梁晓辉, 等. 克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*) 卵黄蛋白的部分生化性质[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2006, 26(2): 199-202.
- [22] 周庆祥, 江桂斌. 卵黄蛋白原的分离测定及其在环境内分泌干扰物质筛选中的应用[J]. 化学进展, 2003, 15(1): 67-74.
- [23] 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.
- [24] Roubal W T, Lomax D P, Maryjean L, *et al.* Purification and partial characterization of English Sole (*Pleurohectes vetulus*) vitellogenin [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 118B: 613-622.
- [25] Ohkubo N, Andoh T, Mochida K, *et al.* Deduced primary structure of two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 137: 19-28.

- [26] Brion F, Rogerieux F, Noury P, *et al.* Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*) [J]. *Journal of chromatography B*, 2000, 737:3-12.
- [27] Tyler C R, Sumpter J P. The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1990, 8:111-120.
- [28] 邴欣, 汝少国, Isoda Hiroko, 等. 17 β -雌二醇对雄性金鱼卵黄原蛋白的诱导作用[J]. *水产学报*, 2004, 28(3):236-240.
- [29] 柳峰松, 武金霞, 谢松, 等. 成熟中国对虾卵巢中卵黄蛋白的纯化[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2001, 21(4):406-410.
- [30] Yehezkel G, Chayoth R, Abdu U, *et al.* High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the nymph of the crayfish *Chemx quadricarinatus* [J]. *Compar Biochem Physiol Part B*, 2000, 127:411-421.
- [31] Babin P J. Binding of thyroxine and 3, 5, 3-triiodothyrene to trout plasma lipoproteins [J]. *Am J Physiol*, 1992, 262:712-720.
- [32] Hara A, Yamauehi K, Hirai H. Studies on female-specific vitellogenin protein and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 1980, 65:315-320.
- [33] Gerber H S, Nardelli D, Haefliger J A, *et al.* Precursor-product relationship between vitellogenin and the yolk proteins as derived from the complete sequence of a *Xenopus* vitellogenin gene [J]. *Nucl Acids Res*, 1987, 15:4737-4760.

Purification and characterization identification of lipovitellin from *Pelteobagrus vachelli* and preparation of anti-serum

LI Yu-pei^{1,2}, DIAO Xiao-ming^{2*}, SHENG Xiao-sa², QUAN Heng², ZHAI Xu-liang², LI Yun²

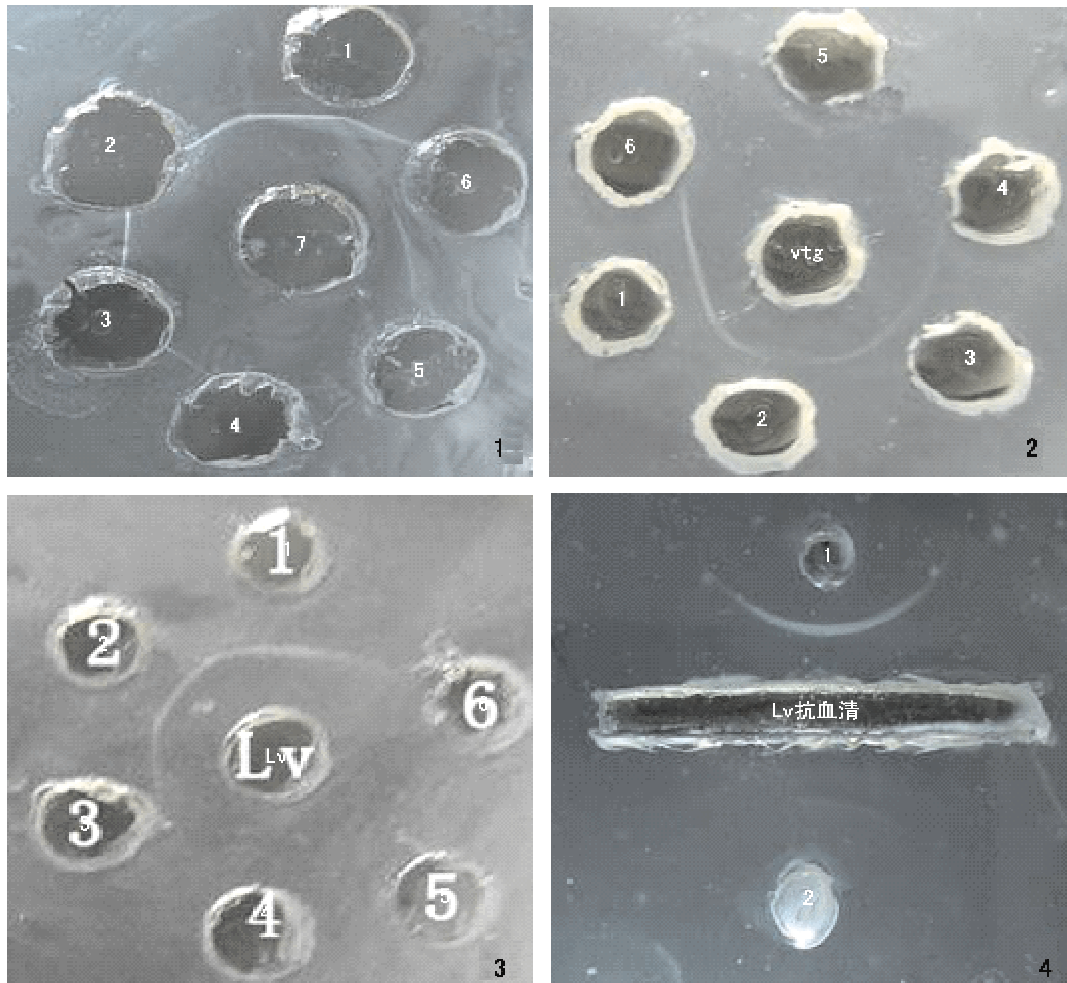
(1. Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Taizhou 225300, China;

2. Department of Fisheries Science, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Key Laboratory of Reproduction and Development of Freshwater Fish, Ministry of Education, Chongqing 400716, China)

Abstract: Lipovitellin (Lv) is one of the major proteolytic products of vitellogenin (Vtg) after it is taken up by growing ovary in the manner of receptor-mediated endocytosis, which provides nutrient storage for the developing embryos and larvae. In this paper, we purified the Lv from ovarian extract of the *Pelteobagrus vachelli* in stage IV by two steps of chromatography elution method. The first step of purification was to use Sephacryl S-300 column, and 3 elution peaks were showed. We are suspicious that the 3th elution peak contained Lv through analysing the Native-PAGE chart and elution curve of stage IV ovarian extract. The second step of purification was to use DEAE-cellulose column in ion-exchange chromatography elution, and there were 2 elution peaks. We found that the 2th elution peaks (in 0.2 mol/L NaCl gradient) contained single high concentration of protein by Native-PAGE analysing of the sample. The Lv characterized as a phosphorlipoglycoprotein by Native-PAGE and stained of gels for carbohydrates with periodic acid-Schiff's reagent, for phosphorus with Rhodamine B, and for lipids with Sudan black B. The molecular weight of Lv is about 230 ku detected by Native-PAGE. The Lv broke into 2 same subunits in Sodium dodecyl sulphate-PAGE, each with a molecular weight of 106 ku. In 190 – 1 000 nm continuous spectrum scanning, the purified Lv of *P. vachelli* obviously showed absorb peak in 273 nm, and it demonstrated that the Lv contained carotenoid. Native-PAGE analysis of the purified Lv of *P. vachelli* show that there is no disulfide bond. It is relatively stabilized by heated treatment. We prepared the rabbit polyclonal antiserum against *P. vachelli* Lv by using purified Lv. The titre for Lv polyclonal antisera was 1:32 in double immunodiffusion assay detection. It was showed that the purified Vtg which was induced by E₂ in male *P. vachelli* serum could react with the rabbit antisera against *P. vachelli* Lv and the purified Lv could react with the rabbit antisera against *P. vachelli* Vtg and a single immunoprecipitin line was formed. The plasma from the control male *P. vachelli* have no reaction. The normal existence of the female-specific reactivity for *P. vachelli* Lv can be confirmed. The test also demonstrated that both purified Vtg and stage IV ovarian extract from the *P. vachelli* can cross-react with the rabbit Lv polyclonal antiserum by the analyses of Native-PAGE and Western-blotting. We are sure that the rabbit Lv polyclonal antiserum has preferable specificity with Vtg and Lv.

Key words: *Pelteobagrus vachelli*; lipovitellin; purification; immune analysis

Corresponding author: DIAO Xiao-ming. E-mail: diaoxiaoming1965@yahoo.com.cn



图版 利用双向免疫扩散法测定 Lv 抗血清的效价、Lv 抗血清和纯化的 Vtg 之间的免疫反应、Vtg 抗血清和纯化的 Lv 之间的免疫反应及 Lv 抗血清与血浆中 Vtg 免疫反应

1. 中央孔: 7. 纯化的 Lv, 1~6 孔从 1:2 ~ 1:64 稀释度的抗血清; 2. 中央孔: 纯化的 Vtg, 1~6 孔从 1:2 ~ 1:64 稀释度的 Lv 抗血清; 3. 中央孔: 纯化的 Lv, 1~6 孔从 1:2 ~ 1:64 稀释度的 Vtg 抗血清; 4. 1: E₂ 诱导的雄性瓦氏黄颡鱼血浆, 2: 对照组雄性瓦氏黄颡鱼血浆

Plate Determination of titre for Lv antisera with purified antigen, immunity reactivity analysis between Vtg and Lv antisera, immunity reactivity analysis between Lv and Vtg antisera and immunity reactivity analysis between Vtg and Lv antisera by double immunodiffusion

1. Central well: 7. purified Lv, 1-6 well, 1:2 - 1:64 diluted antisera; 2. Central well: purified Vtg, 1-6 well, 1:2 - 1:64 diluted Lv antisera; 3. Central well: purified Lv, 1-6 well, 1:2 - 1:64 diluted Vtg antisera; 4. 1: E₂ induced male *P. vachelli* serum, 2: control male *P. vachelli* serum