

小体鲟卵黄蛋白生化特性及合成途径的研究

霍堂斌 张 颖 孙大江 曲秋芝

(中国水产科学院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

摘要: 使用葡聚糖凝胶 (Sephadex G-200) 从小体鲟鱼卵粗提液中, 提纯卵黄脂磷蛋白 (Lipovitellin Ly) 和卵黄高磷蛋白 (Phosvitin Pv)。卵黄脂磷蛋白 (含糖、磷和脂, 等电点 7.50) 具有雌性特异性, 分子量为 144 kD 由 97.4 kD 和 30 kD 的大小 2 个亚基组成。卵黄高磷蛋白 (含糖、磷, 等电点 8.30) 其分子量为 66 kD 其具有两个亚基, 分子量分别为 47.6 kD 16.8 kD。制备卵黄脂磷蛋白兔抗血清, 采用免疫组化方法对不同年龄小体鲟的肝脏、肠、卵 (II—V 期卵巢) 及血涂片, 进行免疫组织化学定位研究。小体鲟卵巢发育到 IV 期前, 卵黄蛋白主要靠卵母细胞自身合成, 这个时期内源性合成卵黄蛋白; 当卵巢发育到 IV 期, 卵母细胞自身不合成卵黄蛋白, 主要是通过肝脏合成卵黄蛋白原, 通过血液循环运送到卵巢, 被卵母细胞吸收后, 裂解为卵黄蛋白, 这个时期外源性合成卵黄蛋白。

关键词: 小体鲟; 卵黄蛋白; 生化特性; 免疫组织化学; 合成途径

中图分类号: Q176 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)01-0067-09

鲟形目 (Acipenseriformes) 是一类古老的软骨硬鳞鱼类, 鲟形目在鱼类乃至整个脊椎动物进化史上都占有很重要的地位^[1]。小体鲟 (Acipenser ruthenus Linnaeus) 个体小, 生长较慢, 但性成熟早, 生殖能力强, 是一种很好的杂交亲本和鱼籽的供体^[2]。自 1999 年于俄罗斯引进以后, 国内对其繁殖生理^[3]、营养生理^[4]、分子生物学^[5]等方面的研究相继开展起来。在国外, Linares^[6]对高首鲟卵黄蛋白原的免疫原性及与血浆中钙离子沉积的关系进行过研究, Hiramatsu^[7]研究表明杂交鲟具有三种卵黄蛋白, 但国内、外对小体鲟卵黄蛋白 (Yolk protein) 的研究尚未见报道。

许多种属的鱼类卵黄蛋白原和卵黄脂磷蛋白已经被纯化和鉴定, 并且对部分鱼类的卵黄蛋白原的合成途径有过研究^[8], 但对小体鲟卵黄蛋白的组成及合成途径等方面国内还尚未开展研究。因此, 本文从小体鲟鱼卵中获得了纯化的卵黄脂磷蛋白, 并制备抗血清, 对不同年龄小体鲟卵黄蛋白原和卵黄脂磷蛋白在组织内的存在情况进行了研究, 以探索卵黄蛋白的合成方式。

1 材料与方法

1.1 实验材料 小体鲟取自中国水产科学研究院

鲟鱼繁育技术工程中心, 对雌性亲鱼催产获取成熟卵。对不同年龄雌、雄鱼采血获取血清, 样品分装于 -80℃ 冰箱保存备用。取性腺发育 II—V 期小体鲟雌、雄鱼, 肝脏、肠 (前、中、后)、性腺等组织块, 4% 多聚甲醛低温固定 24 h。

1.2 卵黄蛋白的提纯 取小体鲟鱼卵 20 g 加入 4℃ 预冷 2 倍体积的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (内含 0.01% NaNO₃, 2 mmol/L EMSF, pH 8.0), 冰浴下 15000 r/min 匀浆 3 min。匀浆液于 4℃ 12000 r/min 离心 20 min 去沉淀取上清液 (重复 3 次)。4℃ 下, 卵黄蛋白粗提液 (浓度 20 g/mL) 通过葡聚糖凝胶 (Sephadex G-200) (1.6 cm × 75 cm) 的凝胶柱洗脱^[9], 洗脱速度 1.0 mL/min 收集峰值洗脱液, 紫外检测仪监测, 记录洗脱曲线。

1.3 卵黄蛋白的电泳检测 Native-PAGE 梯度电泳^[10], 浓缩胶和分离胶浓度分别为 4% 和 4%—10%, 样品适当稀释后, 开始电泳 100 V 30 min 之后每过 20 min 加压 20 V。SDS-PAGE 电泳^[11], 浓缩胶和分离胶浓度为 4%, SDS 浓度为 10% 和 12%, 于 100 V 恒压条件下电泳分析。电泳采用 Mini-Protein II 型电泳槽 (BioRad)。

1.4 卵黄蛋白的等电点的测定 采用聚丙烯酰胺

收稿日期: 2006-11-08 修订日期: 2008-01-12

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划 (2004BA526B0113); 农业科技成果转化资金项目 (04EFN216900380) 资助

作者简介: 霍堂斌 (1980—), 男, 汉族, 黑龙江哈尔滨人; 硕士研究生; 研究方向为鱼类生理生态学。E-mail: bhu@163.com

通讯作者: 曲秋芝, E-mail: quqiu@163.com

等电聚焦法^[12],凝胶浓度 2.4%,两性载体 pH范围 3.5—9 阳极缓冲液为 1mol/L磷酸,阴极缓冲液为 1mol/L氢氧化钠,4℃条件下,先恒压 60V 15min之后 120V 1h最后电压上升至 300V 维持 3—3.5h 电泳结束后固定凝胶,考马斯亮兰 R250染色,脱色后,凝胶成像系统拍照。

1.5 糖、磷、脂蛋白分析 磷蛋白和糖蛋白采用 Invitrogen公司的 SYPRO 荧光蛋白染色液, Molecular Probes' Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein Gel stain和 Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain 脂蛋白采用油红 O 染色法^[12]。

1.6 卵黄脂磷蛋白抗血清的制备及抗血清免疫球蛋白(Ig)的提取 选取新西兰大白兔制备抗血清。收集层析蛋白峰 B 浓缩后(浓度 2.0mg/mL)与完全福氏完全佐剂等体积混合,充分乳化。采用背部皮下多位点注射,每只大白兔注射 1mL 抗原乳化液。20d后进行第 2次加强免疫,与不完全福氏佐剂等体积混合,10d后第 3次免疫,5d后耳静脉取血测效价。效价达到 1:32 以上,次日心脏取血,获得抗血清。兔抗 Ig 采用饱和硫酸铵选择性沉淀法提取。

1.7 免疫印迹(Western blotting) SDS-PAGE电泳后,在转膜缓冲液(50mmol/L Tris 40mmol/L 甘氨酸, 1.3mmol/L SDS 20% 甲醇, pH8.0)中将凝胶中的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,恒压 10V 30min 电转移后,用封闭液于室温封闭 2h 然后放入 1:200 稀释的兔抗 Ig 4℃ 孵育 12h 以上(阴性对照 I: 以免疫前兔血清代替一抗; 阴性对照 II: 将一抗用纯化的峰 B 蛋白吸附后,低温离心取上清代替一抗,其他步骤相同),弃一抗用 PBS 漂洗,再放入按 1:500 稀释的过氧化物酶标记的羊抗兔 Ig (Ig-HRP)溶液,室温孵育 2h PBS 洗涤后,加入 DAB 显色溶液(50mL 0.01mol/L pH 7.4 PBS 25mg DAB 20μL H₂O₂)室温避光显色 10min 双蒸水终止显色反应^[10-11],待干后拍照保存。

1.8 免疫组织化学 4%多聚甲醛(10mmol/L pH 7.2 PBS 配制)固定肝脏、肠、性腺三种组织块,进行普通石蜡切片,切片厚度 5μm 切片 0.3% 甲醇-H₂O₂ 灭活,柠檬酸-柠檬酸钠(10mmol/L pH 6.0 沸水浴 50min 进行抗原修复, 1.5% 牛血清白蛋白封闭后,4℃一抗(Ig 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 双蒸水终止反应后,苏木精复染 5min 脱水、透明中性树胶封片观察^[13-14]。

血涂片甲醇固定,其他同上。
每次反应后均使用 10mmol/L pH 7.6 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 卵黄蛋白的提纯及鉴定

由图 1 可见,三个蛋白峰比较对称,分离效果较好。梯度 Native-PAGE 的标准方程为: $Y=5.80-1.72 \times M$ 分子量; $\lg R_f = \lg M$ 。经计算峰 B 分子量为 144 kD 峰 C 蛋白分子量为 66 kD(图 2)。SDS-PAGE 的标准方程为: $Y=5.19-1.10 \times M$ 分子量; $\lg R_f = \lg M$ 峰 B 蛋白两个亚基,分子量分别为 30 kD 97.4 kD 峰 C 蛋白两个亚基,分子量分别为 47.6 kD 16.8 kD(图 3)。

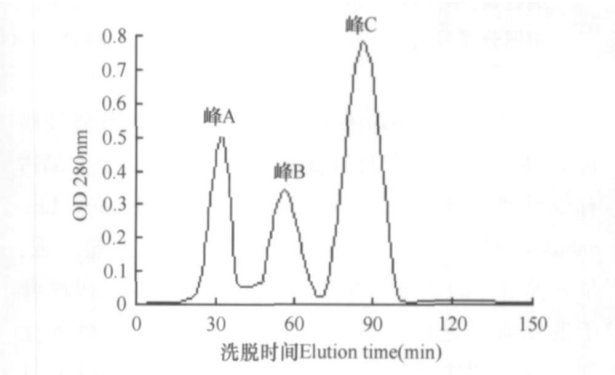


图 1 卵黄蛋白粗提液 Sephadex G-200 凝胶层析洗脱曲线
Fig. 1 Elution curve of column chromatography On sephadex G-200 for the original extract of yolk of *Acipenser ruthenus*

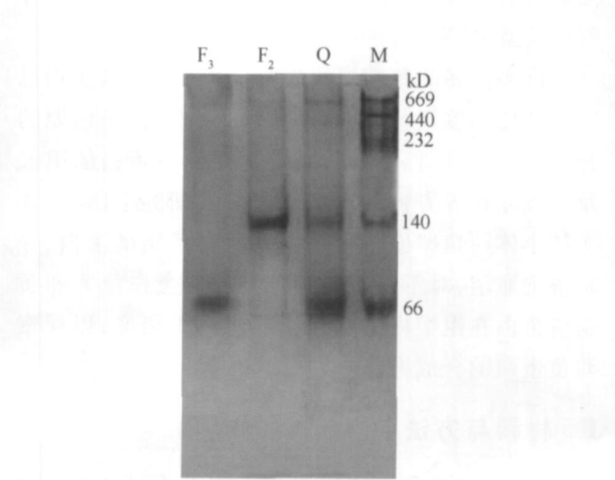


图 2 卵黄蛋白 4%—10% 梯度 Native-PAGE
Fig. 2 4%—10% Native-PAGE on yolk protein
M: 标准蛋白; Q: 全卵粗提液; F₂: 峰 B 蛋白; F₃: 峰 C 蛋白
M: Marker, Q: Original extract of full oocyte; F₂: The second of protein peak; F₃: The third of protein peak

糖、磷、脂蛋白特异染色结果如图版 I -1、2 所示, 峰 B 蛋白三种染色方法都是阳性结果, 峰 C 蛋白糖、脂蛋白染色结果是阳性。峰 B 峰 C 蛋白等电点分别为 7.50、8.30 (图 4)。

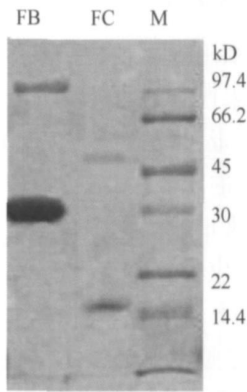


图3 卵黄蛋白 12% SDS-PAGE

Fig. 3 12% SDS-PAGE on yolk protein

M: 标准蛋白; FB: 峰 B 蛋白; FC: 峰 C 蛋白

M: Marker; FB: Protein of the second peak; FC: Protein of the third peak

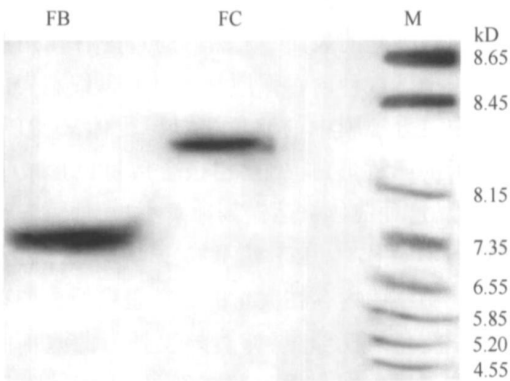


图4 卵黄蛋白等电点

Fig. 4 Isoelectric point on yolk protein

M: 标准蛋白; Q: 卵黄蛋白; FB: 峰 B 蛋白; FC: 峰 C 蛋白

M: Marker; Q: Yolk protein; FB: Protein of the second; FC: Protein of the third peak

2.2 免疫印迹 (Western blotting)

卵黄蛋白免疫印迹结果 (图 5) 兔抗峰 B 蛋白与卵黄蛋白粗提液的 Western blotting 反应为阳性, 未出现其他杂带, 只在峰 B 蛋白电泳相应的位置出现蛋白杂交带, 两个亚基分子量分别为 97.4 kD 和 30 kD。两个阴性对照, 都未出现杂交带。

2.3 免疫交叉反应

如图 6 所示, 兔抗小体鲟卵黄脂磷蛋白血清可以与 IV 期雌鱼血清发生免疫沉淀反应, 而与性成熟雄鱼血清及 III 期雌鱼血清不发生免疫沉淀反应。

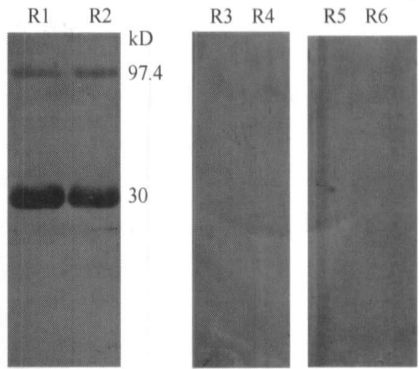


图5 特异性雌性蛋白的 Western blotting

Fig. 5 Western blotting for specificity of female Protein

R1, R2: 卵黄蛋白粗提液; R3, R4: 阴性对照 I; R5, R6: 阴性对照 II

R1, R2: Yolk protein; R3, R4: Negative control I; R5, R6: Negative control II

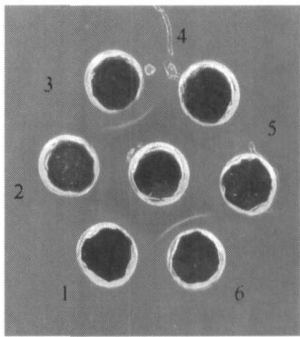


图6 峰 B 蛋白抗血清的免疫双扩散交叉反应

Fig. 6 Double immunodiffusion on anti-serum of B protein

中央孔: 峰 B 蛋白抗血清; 2, 5: 小体鲟雄鱼血清; 3, 6: 小体鲟卵巢

VI 期雌鱼血清; 1, 4: 小体鲟卵巢 III 期雌鱼血清

Medium pore: Anti-serum on the second of protein; 2, 5: Male serum of *Acipenser ruthenus*; 3, 6: VI period ovary of female; 1, 4: III period ovary of female serum

2.4 免疫组化

在 IV 期及 IV 期后的雌鱼肝细胞内都出现阳性反应 (图版 I -3), 阳性反应主要发生在肝细胞胞质内。性未成熟、性成熟雄性肝细胞、IV 期前的雌鱼肝细胞及阴性对照均呈阴性反应 (图版 I -4、5)。

在性腺发育到 IV 期及 IV 期后的雌鱼血细胞表面出现阳性反应 (图版 I -6), 而性成熟雄性血细胞、IV 期前的雌鱼血细胞及阴性对照均呈阴性反应 (图版 I -7、8)。性成熟雌、雄鱼前肠、中肠、后肠的肠细胞中均呈阴性反应 (图版 I -9、10)。

II 期卵巢, 卵母细胞呈多角圆形, 细胞质呈嗜碱性, 核内含有大量阳性反应物 (图版 II -1); III 期卵巢, 以第 3 时相进入大生长期的初级卵母细胞为主, 可以分为早、中、晚 3 个相的发育阶段。早期细胞质

嗜碱性减弱,核内含有大量阳性反应物(图版II-2),中期核内阳性反应物减少,细胞质内出现阳性反应物(图版II-3),晚期细胞呈椭圆形,细胞质内阳性反应物增加(图版II-4);IV期卵巢,核内无阳性反应物,卵黄颗粒呈阳性反应(图版II-5);V期卵巢,卵母细胞内存在着大量的卵黄颗粒,卵黄颗粒呈阳性反应(图版II-6),阴性对照均呈阴性反应(图版II-8)。

3 讨论

Matsubara^[15]和 Mewes^[16]研究表明,硬骨鱼卵黄蛋白原入卵后降解成卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白和 β' 组分(β' 组分 Campbell et al.^[17]定义为与卵黄蛋白原相关的一种不含磷和脂的小分子卵黄蛋白)三种卵黄蛋白。但在小体鲟卵黄蛋白特殊染色结果中,并未发现不含磷和脂的小分子卵黄蛋白。根据小体鲟卵黄蛋白的成分及峰C蛋白的生化特性,推测峰C蛋白为卵黄高磷蛋白,分子量为66 kD,具有47.6 kD、16.8 kD两个亚基,等电点为8.30,是一种弱碱性蛋白。与斑马鱼^[18]、星鲮鱼^[15]等鱼类卵黄脂磷蛋白一样,小体鲟卵黄脂磷蛋白(峰B蛋白)也富含脂肪和碳水化合物,是一种大分子糖脂蛋白,等电点为7.50。Western blotting和免疫交叉反应表明小体鲟卵黄脂磷蛋白,具有雌性特异性,分子量为144 kD,是由30 kD和97.4 kD两个亚基组成。卵黄蛋白原是卵黄脂磷蛋白的前体,现已发现多种动物(如斑马鱼^[9,18]、哲罗鱼^[19])包括小体鲟,卵黄脂磷蛋白和卵黄蛋白原在免疫原性上具有相似性,所以可以利用卵黄脂磷蛋白的抗体探测卵黄蛋白原的存在。

内源性卵黄合成是指卵黄在卵母细胞内合成,其过程中一般观察不到卵黄蛋白原的产生。从正在发育的卵母细胞内细胞器的形态变化中可以观察到内源性卵黄蛋白的合成。Suzuki^[20]从太平洋牡蛎卵的卵黄中纯化了卵黄蛋白,并制备了卵黄蛋白的特异性抗体。免疫定位结果显示,只在卵母细胞中有阳性反应,卵巢外其他的组织均不与抗血清发生反应,表明太平洋牡蛎的卵黄蛋白是内源性合成的。本研究在IV期前雌鱼的肝细胞、血细胞表面都未检测到卵黄蛋白原的存在,这段时期雌鱼血清与卵黄脂磷蛋白抗血清不发生免疫沉淀反应,但是在II、III期鱼卵中却有阳性反应,并且随着卵母细胞的不断发育,阳性反应物从卵黄核中逐渐向胞质转移,说明小体鲟在IV期前卵母细胞可以自身合成卵黄蛋白。

在很多脊椎动物中卵黄蛋白原是在肝脏合成,分泌到血液中,运送到卵巢,被卵母细胞吸收后裂解成卵黄蛋白。但是有实验表明鱼类的卵母细胞既能自身产生卵黄蛋白,也能通过胞饮内吞作用积累外源性合成的卵黄蛋白原^[21]。本研究在IV期及IV期后雌鱼的肝细胞、血细胞表面都检测到卵黄蛋白原的存在,在肠细胞并未检测到卵黄蛋白原,这段时期雌鱼血清与卵黄脂磷蛋白抗血清产生免疫沉淀反应,揭示IV期及IV期后的雌鱼在肝脏细胞内产生卵黄蛋白原,血细胞可以携带卵黄蛋白原。在IV期卵巢,卵黄核内已无阳性反应物,表明在卵巢发育到IV期后,卵黄蛋白主要依靠肝脏合成,这段时期卵黄蛋白原在肝细胞内合成,并通过血液循环到达卵巢,被卵母细胞吸收后裂解为卵黄蛋白。

某些两栖类(蛙类)其内源性卵黄在卵母细胞线粒体内合成,到卵黄发生后期才开始有外源性卵黄合成,即依靠肝脏合成卵黄蛋白原。合成好的卵黄蛋白原先通过分布在滤泡层的微细管网进入滤泡,卵黄蛋白原离开微血管后通过滤泡细胞间的管道到达卵母细胞的表面^[22],然后通过内吞作用进入卵母细胞中。这种内吞作用是通过卵母细胞表面的多糖蛋白复合被膜中的卵黄蛋白原受体来实现的。受体吸附的卵黄蛋白原,互相融合后可以形成原始卵黄小板,这种前体被运送到卵黄小板,即可慢慢形成成熟的卵黄体^[23]。李朝军^[24]研究发现,在大阪鲫鱼的滤泡细胞内存在大量的卵黄蛋白原或卵黄脂磷蛋白。鲟鱼V期卵巢,卵黄外膜由滤泡细胞突起形成胶膜层。细胞质突起变细,伸入卵黄外膜内形成放射管道,并构成卵黄内膜,完成了胶膜、卵黄外膜和卵黄内膜等3层卵膜结构。膜上具有众多纵向分布的微管而形成放射带,一般认为放射带是由卵母细胞和滤泡细胞的微绒毛及细胞膜突起互相伸入共同形成的,卵母细胞通过这层膜与外界进行物质和信息交换^[25]。作者在小体鲟卵膜外膜和内膜表面均发现阳性反应物(图版II-7),根据小体鲟卵膜的结构和功能,推测卵黄蛋白原可能是在滤泡细胞内分解、重组为卵黄蛋白,进入卵母细胞的过程可能和两栖类类似。

结论:小体鲟属于兼性卵黄蛋白合成方式,小体鲟在IV期前,卵母细胞在卵黄核内合成卵黄蛋白。随着卵母细胞的发育,卵黄蛋白并不断向胞质内运送。当卵巢发育到IV期,卵母细胞停止合成卵黄蛋白,肝细胞开始大量合成卵黄蛋白原,然后经血液循环运送至卵巢,被卵母细胞吞入后,裂解形成卵黄

蛋白。

参考文献:

- [1] Bemis W E, Findeis E K, Grande L. An overview of Acipenseriformes[J]. *Envl Fish Biol* 1997 **48**: 25—71
- [2] Sun D J, Qu Q Z, Ma G J et al. The status of sturgeon culture in China[J]. *Journal of Dalian Fisheries University* 2003 **18**(3): 216—227[孙大江, 曲秋芝, 马国军, 等. 中国鲟鱼养殖概况. 大连水产学院学报, 2003 **18**(3): 216—227]
- [3] Zhang T, Zhang P, Zhang L Z et al. Microelement content in seminal plasma of cultured *Acipenser schrenckii* and *Acipenser ruthenus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China* 2003 **10**(4): 350—352[张涛, 庄平, 章龙珍, 等. 人工养殖施氏鲟和小体鲟精浆微量元素分析. 中国水产科学, 2003 **10**(4): 350—352]
- [4] Ye J D, Lu T Y, Liu H B et al. Comparative study on activities of digestive enzyme in *A. schrenckii*, *A. ruthenus*, *A. baeri*, *A. gueldenstaedti* hybrid sturgeon and *A. sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 2003 **9**: 35—40[叶继丹, 卢彤岩, 刘洪柏, 等. 六种鲟鱼消化酶活性的比较研究. 水生生物学报, 2003 **9**: 35—40]
- [5] Jiang L Q, Sun X W, Dong C Z et al. PCR analysis on genetic diversity of five species of *Acipenser* idea and Huso[J]. *Journal of Fishery Sciences of China* 2002 **9**(3): 273—276[梁利群, 孙效文, 董崇智, 等. 5种鲟鳇鱼基因组 DNA遗传多样性分析. 中国水产科学, 2002 **9**(3): 273—276]
- [6] Linares C J, Kroll K J. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon[J]. *Aquaculture* 2003 **221**: 645—656
- [7] Naoshi Hiramatsu, Kaori Hiramatsu, Kaori Hiranop et al. Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon hester (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*). Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis[J]. *Compar Biochem Physiol* 2002 **131**(A): 429—441
- [8] Zhang S C, Sun X T, Li H Y. Review on vitellogenin[J]. *Marine Sciences* 2002 **26**(7): 32—35[张士瑞, 孙旭彤, 李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展. 海洋科学, 2002 **26**(7): 32—35]
- [9] Fenske M, Aerte R V, Black 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 **129**C: 217—232
- [10] Guo Y J. Experiment manual of protein electrophoresis[M]. Beijing: Science Press 2005: 53—59[郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社. 2005: 53—59]
- [11] Wang J Z, Fan M. Protein technology protocol[M]. Beijing: Science Press 2000: 77—122[汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社. 2000: 77—122]
- [12] 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
- [13] Dang S S. Collection of usual experiment technique on medical [M]. Xi an World Literary Press 2004: 32—59[党双锁. 医学常用实验技术精编. 西安: 世界图书出版公司. 2004: 32—59]
- [14] Wang T H, Qi J G. Chemical theory and technique of cell tissue [M]. Beijing: Science Press 2005: 38—61[王廷华, 齐建国. 组织细胞化学理论与技术. 北京: 科学出版社. 2005: 38—61]
- [15] Matsubara T, Ohkubo N, Andoh T et al. Two forms of vitellogenin in yielding two distinct lipovitellins play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder *Verasperomus*, a marine teleost that spawns pelagic eggs[J]. *Dev Biol* 1999 **213**: 18—32
- [16] Mewes K R et al. Vitellogenin from female and estradiol stimulated male river lampreys (*Lamprocyba fluviatilis* L.) [J]. *J Exp Zool* 2002 **292**: 52—72
- [17] Campbell C M, Elder D R. Characterization of an estradiol induced protein from rainbow trout vitellogenin by the cross reactivity to ovarian yolk fractions[J]. *Biol Reprod* 1980 **22**: 605—617
- [18] 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* 2001 **130**C: 119—131
- [19] 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
- [20] Suzuki T, Hara A. Purification and immuno-localization of vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Marine Biology* 1992 **113**: 239—245
- [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**: 440—451
- [22] Dumont J N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). VI The route of injected tracer transport in the follicle and developing oocyte[J]. *Exp Zool* 1978 **204**(2): 193—217
- [23] Byrne B M, Gruber M. The evolution of egg yolk protein[J]. *Prog Biophys Mol Biol* 1989 **53**: 33—69
- [24] Li Z J, Liu Y Z, Wang H et al. The immuno/cytochemical localization of lipovitellin and yolk protein in *Carassius auratus* ovary[J]. *Acta Zoologica Sinica* 1994 **40**(3): 324—331[李朝军, 刘荣臻, 王浩, 等. 大阪鲫两种卵黄蛋白免疫细胞化学的研究. 动物学报, 1994 **40**(3): 324—331]
- [25] Qu Q Z, Sun D J, Wang B Q et al. Histological observations on the ovarian development of *Acipenser schrenckii* [J]. *Journal of Fisheries of China* 2004 **28**(5): 487—492[曲秋芝, 孙大江, 王丙乾, 等. 施氏鲟卵巢发育的组织学观察. 水产学报, 2004 **28**(5): 487—492]

STUDY ON THE BIOCHEMICAL CHARACTER AND SYNTHESIS PATHWAY YOLK PROTEIN IN ACIPENSER RUTHENUS

HUO Tang-Bin, ZHANG Ying, SUN Da-Jiang and QU Qiu-Zhi

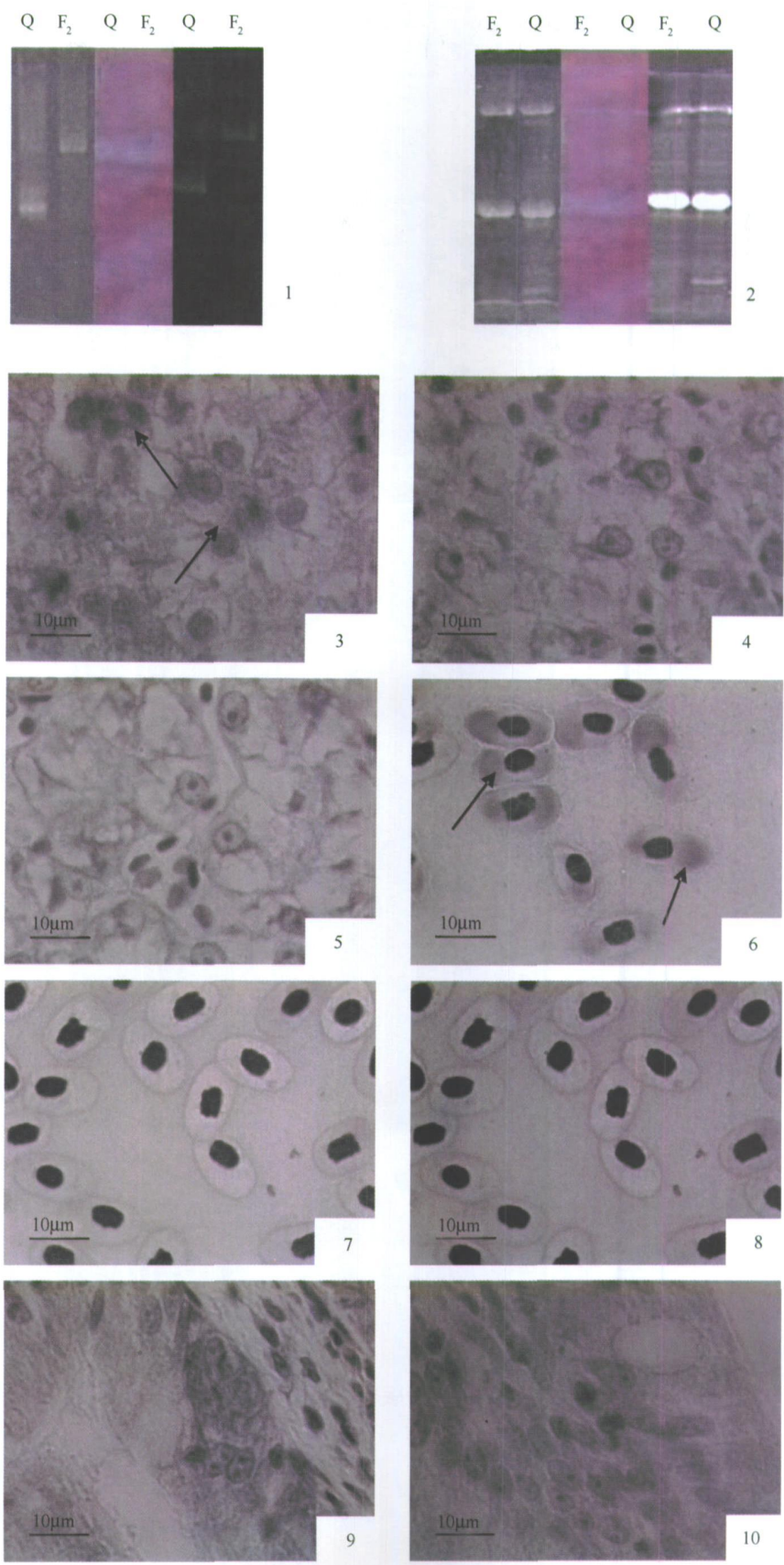
(Heilongjiang River Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences Harbin 150070 China)

Abstract Yolk is the primary nutrition material during the development of embryo of which vitellin is primary constitute element. In order to know the biochemical characters and synthesis pathway of yolk protein from *Acipenser ruthenus*, the yolk protein was abstracted. The biochemical character and synthesis pathway of yolk protein from *Acipenser ruthenus* were studied by chromatography with Sephadex G-200, polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting and immunohistochemistry. The results showed that yolk protein was composed of lipovitellin, yolk immunoglobulin and phosphovitin. Lipovitellin was a kind of glycosyl phosphorus and lipid protein and it was same as female serum specific protein (FSSP). It had female specificity and its antibody had genus and tissue specificity. The molecular weight of Lipovitellin was 144 kD, which was composed of two subunits with molecular weight of 97.4 kD and 30 kD, respectively. Its isoelectric point was 7.50. Phosvitin was made up of two subunits with molecular weight of 47.6 kD and 16.8 kD, respectively. Its molecular weight was 66 kD and isoelectric point was 8.65.

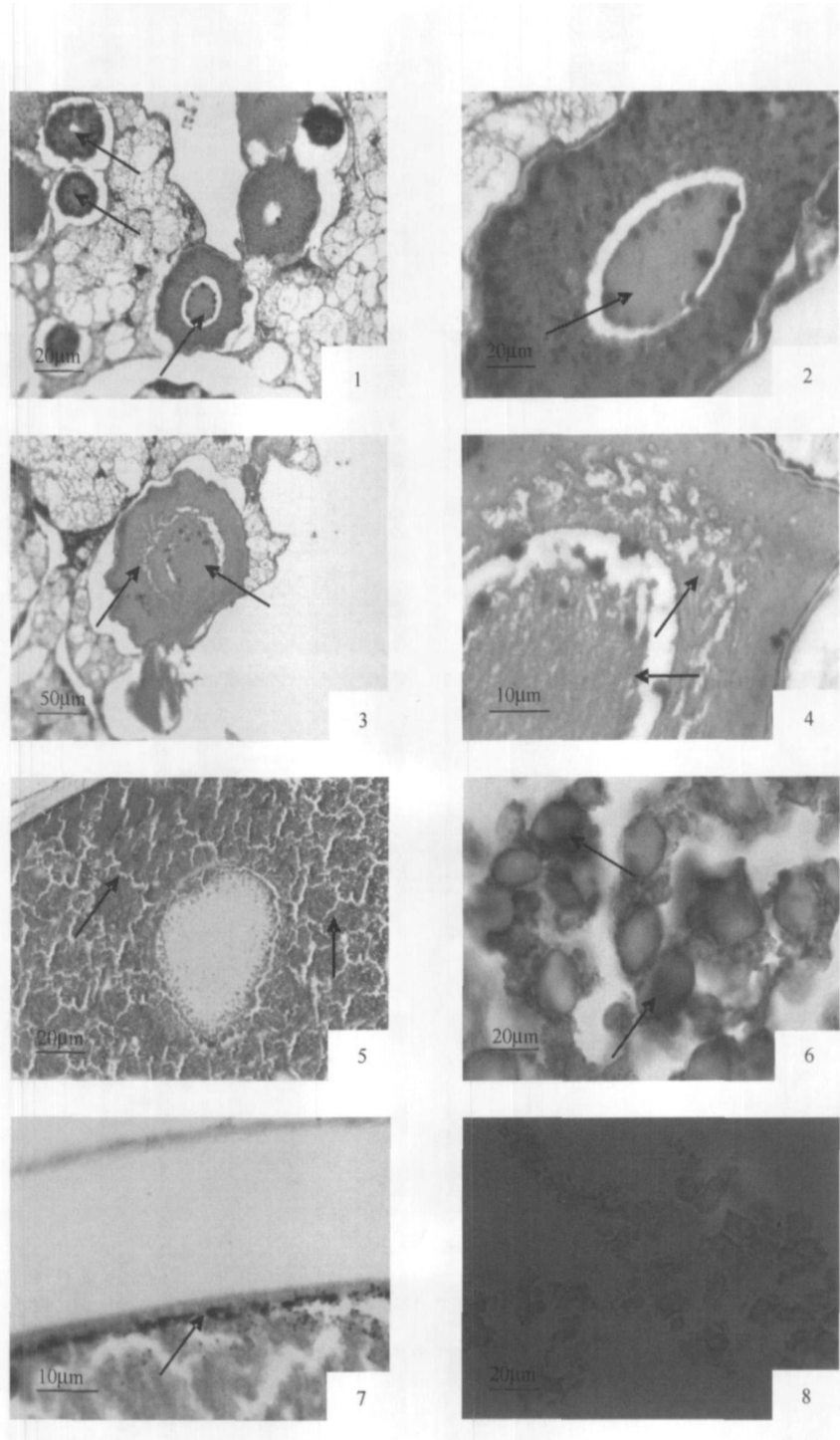
The rabbit antiserums of Lipovitellin were prepared and immunohistochemistry location was investigated in liver, intestine, egg (II—V period ovary) and blood smears at different age. The results showed that liver cells of female sturgeon at IV stage ovary and above IV stage ovary were immunostained with DAB, which indicated the liver cells were positive to special antibody and positive reaction occurred mainly in the cytoplasm of liver cells. No special immunostaining was observed either in liver cells of male sturgeon and female sturgeon which ovary was during I—III period or in control group. The surface of blood cells of female sturgeon which gonad was at IV—V stage was positive to special antibody. In contrast, the surface of blood cells of mature male sturgeon, female sturgeon during I—IV period ovary and negative control were negative to special antibody. The intestine cells of anterior intestine, midintestine and posterior intestine before maturing in both male and female sturgeon were also negative to special antibody. There were a lot of positive reaction substances in nucleus during II period ovary. Grand growth Phase 3 primary oocyte occupied the greater part of III stage ovary which could be divided into nonage, metaphase and anaphase stage. A lot of positive reaction substances existed in nucleus at nonage stage of III stage ovary. When the ovary developed to metaphase, positive reaction substances of nucleus began to decrease, whereas, it appeared in cytoplasm. The cells were oval and the positive reaction substances increased at anaphase stage. There were no positive reaction substances at IV stage ovary but yolk granule appeared positive reaction. A lot of yolk granule which were positive in oocyte appeared in V stage ovary.

In conclusion, the synthesis style of yolk protein from *Acipenser ruthenus* Linnaeus was belonged to facultative. Before IV stage of ovary, the yolk protein was mainly synthesized by oocyte oneself which was autophoresis. When ovary developed to IV stage, oocytes stopped to synthesize yolk protein and liver cells began to synthesize vitellogenin which was transported to ovary by blood circulation. After endocytosis by developing oocytes, vitellogenin was enzymatically converted into egg yolk protein which was endogenesis.

Key words: *Acipenser ruthenus*; Yolk protein; Biochemical character; Immunohistochemistry; Synthesis pathway



图版 I



图版 II

图版I Plate I

1. 卵黄蛋白磷脂糖蛋白特殊染色 Native-PAGE 梯度范围 4%—10%, 依次为磷脂糖蛋白染色, Q 卵粗提液; F₂ 峰 B蛋白; 2. 卵黄蛋白磷脂糖蛋白特殊染色 SDS-PAGE 浓度 12%, 依次为磷脂糖蛋白染色, Q 卵粗提液; F₂ 峰 B蛋白; 3. 小体鲟IV期雌鱼肝细胞卵黄脂磷蛋白的阳性反应×100Q 4. 小体鲟III期雌鱼肝细胞卵黄脂磷蛋白的阴性反应×100Q 5. 小体鲟雄鱼肝细胞卵黄脂磷蛋白的阴性反应×100Q 6. 小体鲟IV期雌鱼血细胞表面卵黄脂磷蛋白的阳性反应×100Q 7. 小体鲟III期雌鱼血细胞表面卵黄脂磷蛋白的阴性反应×100Q 8. 小体鲟雄鱼血细胞表面卵黄脂磷蛋白的阴性反应×100Q 9. 小体鲟IV期雌鱼肠道细胞卵黄脂磷蛋白的阴性反应×100Q 10. 小体鲟性成熟雄鱼肠道细胞卵黄脂磷蛋白的阴性反应×100Q 箭头所指为卵黄脂磷蛋白阳性反应部位

1. 4%—10% Native-PAGE of specific staining on phospholipins glycoprotein of yolk protein phospholipins glycoprotein staining Q Original fluid of egg F₂: The second of protein 2. 12% SDS-PAGE of specific staining on phospholipins glycoprotein of yolk protein phospholipins glycoprotein staining Q Original fluid of egg F₂: The second of protein 3. Positive reaction multiple 1000 on lipovitellin of liver cell of female Acipenser ruthenus during IV period 4. Positive reaction multiple 1000 on lipovitellin of liver cell of female Acipenser ruthenus during III period 5. Negative reaction multiple 1000 lipovitellin of liver cell of female Acipenser ruthenus 6. Positive reaction multiple 1000 on lipovitellin of blood corpuscle of female Acipenser ruthenus during IV period 7. Negative reaction multiple 1000 on lipovitellin of blood corpuscle of female Acipenser ruthenus during III period 8. Negative reaction multiple 1000 on lipovitellin of blood corpuscle of male Acipenser ruthenus 9. Negative reaction multiple 1000 on intestines cell of female Acipenser ruthenus during IV period 10. Negative reaction multiple 1000 on intestines cell of female Acipenser ruthenus The arrow shows the positive reaction site of lipovitellin

图版II Plate II

1. 小体鲟II期卵巢卵母细胞核内卵黄脂磷蛋白的阳性反应×40Q 2. 小体鲟III期卵巢卵母细胞早期核内卵黄脂磷蛋白的阳性反应×40Q 3. 小体鲟III期卵巢卵母细胞中期核内及核周围卵黄脂磷蛋白的阳性反应×10Q 4. 小体鲟III期卵巢卵母细胞晚期核内及核周围卵黄脂磷蛋白的阳性反应×100Q 5. 小体鲟IV期卵巢卵母细胞晚期核周围卵黄脂磷蛋白的阳性反应×40Q 6. 小体鲟V期卵巢卵黄颗粒卵黄脂磷蛋白的阳性反应×40Q 7. 小体鲟IV、V期卵巢卵膜卵黄脂磷蛋白的阳性反应×40Q 8. 小体鲟V期卵巢卵黄颗粒卵黄脂磷蛋白的空白反应×40Q 箭头所指为卵黄脂磷蛋白阳性反应部位

1. Positive reaction multiple 400 on lipovitellin in oocyte nuclei of Acipenser ruthenus during II period of intranuclear 2. Positive reaction multiple 400 on lipovitellin in nonage oocyte nuclei of Acipenser ruthenus during early III period of intranuclear 3. Positive reaction multiple 100 on lipovitellin in and around metaphase oocyte nuclei of Acipenser ruthenus during middle III period of intranuclear and intranuclear 4. Positive reaction multiple 1000 on lipovitellin in and around advanced stage oocyte nuclei of Acipenser ruthenus during latter III period of intranuclear and intranuclear 5. Positive reaction multiple 400 on lipovitellin around advanced stage oocyte nuclei of Acipenser ruthenus during latter IV period of intranuclear and intranuclear 6. Positive reaction multiple 400 on lipovitellin of vitellus of Acipenser ruthenus during V period 7. Positive reaction multiple 400 lipovitellin of ovary membrane of Acipenser ruthenus during IV & V period 8. Contrast reaction multiple 400 lipovitellin of vitellus of Acipenser ruthenus during V period The arrow shows the positive reaction site on lipovitellin