

银鲫卵黄原的诱导、分离纯化及其生化鉴定

胡 东 桂建芳

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 以雄性银鲫为实验材料, 通过雌二醇(Estradiol- 17β E₂)的多次诱导, 使得 E₂ 诱导产物成为血清中的主要蛋白。而后, 在快速蛋白液相色谱(FPLC)系统上, 利用高交换量的阴离子交换层析 Q 柱, 成功的从血清中提纯了与雌性特异蛋白相一致的 E₂ 诱导产物。糖、磷、脂蛋白分析表明, 它是一类糖脂蛋白大分子。同时, 它能被 Mg^{2+} -Ethylenediamine tetraacetic acid(Mg^{2+} -EDTA)部分沉淀, 这进一步证明, 与雌性特异蛋白相一致的 E₂ 诱导产物就是卵黄原(Vitellogenin, VTG)。聚丙烯酰胺凝胶电泳表明, 银鲫有两种 VTG 分子。

关键词: 银鲫; 雌二醇; 卵黄原; FPLC; 蛋白纯化; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: S965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)02-0109-007

近年来, 内分泌干扰物(EDCs)对人类和野生生物的有害效应已引起了人们的广泛关注。美国环保局已把它列为六大最优先研究的领域之一, 并专门成立了 EDCs 筛选和检测顾问委员会。许多专家开始着手建立潜在 EDCs 的筛选方法。目前, 已有多种筛选方法得以应用。但是, 它们都是建立在对鱼类或爪蟾的部分和整个生命周期测试的基础上, 如生长速度, 发育不正常等。由于不可避免的会受到其他毒理机制的影响, 因而不具备特异性。建立在鱼类血清中 VTG 水平的筛选方法, 因其特异性, 正越来越受到科学家们的青睐^[1, 2]。

VTG 是卵黄蛋白的前体。硬骨鱼类中, 它是在雌鱼肝脏中合成的, 并受到卵巢分泌的雌激素调控^[3-7]。雄鱼也有 VTG 基因。但是, 由于内源性雌激素水平低, 血清中 VTG 的量很少。然而, 当雄鱼暴露于外源雌激素或雌激素类似物时, 血清中 VTG 水平显著提高, 并由于 VTG 清除机制的缺乏而一直保持着。据报道, 暴露于造纸厂等排出的污水中的雄鱼血清中, 已检测到 VTG 的合成^[8, 9]。

血清中 VTG 的定量方法有多种。酶联免疫吸附实验法(ELISA)因具有特异性强、灵敏度高、操作方便、快速等优点而受到广泛应用^[10, 11]。但是, 由于 VTG 是一类复杂的大分子, 其免疫决定簇变异很大。因此, 有必要建立每种鱼特异的分析方法。这就需要较大量纯的 VTG, 用于 ELISA 中标准曲线的绘制^[12]。而后, 即可利用 ELISA 法测定雄性鲫鱼血清中 VTG 的水平, 进而开展对环境中 EDCs 的筛选。本研究的主要目的, 一是通过人工诱导探讨 VTG 产生的机制, 二是由此试图得到纯化的 VTG, 为实用检测方法的建立奠定基础。

收稿日期: 2000-12-14; 修订日期: 2001-11-14

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 39870430); 国家重点基础研究项目(G1999053908)资助

作者简介: 胡东(1975—), 男, 福建省莆田县人; 硕士研究生; 研究方向: 鱼类生化遗传学

通讯作者: 桂建芳

1 材料和方法

1.1 取材 以银鲫(*Silver crucian carp*)同源精子受精所产生后代(一龄鱼)中的雄性银鲫^[13, 14]为材料,共8尾,平均体重达到300g,取自水生所关桥养殖基地。

1.2 E₂ 诱导 把E₂溶于无水乙醇中,终浓度达到25mg/mL;然后,将E₂——无水乙醇与菜油按1:4混合(E₂——无水乙醇覆盖在菜油上),加热使无水乙醇挥发后腹腔注射,每尾鱼的注射剂量达5mg;每5d注射一次,共注射四次。

1.3 制备血清 最后一次注射后5d,抽血,分别加入Aprotinin和Phenylmethylsulfonylfluorid(PMSF)(终浓度分别为1Trysin Inhibit Unit和0.1mol/L),以抑制蛋白酶活性;4℃,静置1h后,离心,3500r/min,15min;取上清,分装,-80℃保存。

1.4 与雌性特异蛋白相一致的E₂诱导产物的纯化 在FPLC系统(伯乐公司)上进行纯化,整个过程的温度控制在4℃左右。首先,用50mL 4℃预冷的缓冲液A(0.1mol/L Tris-HCl, pH8.5, 含1mmol/L PMSF)平衡预装柱:高容量阴离子交换层析Q柱(伯乐公司,柱的直径为1.5cm,柱床的高度为3.5cm);然后,取0.2mL血清与0.8mL缓冲液A混合后上样;接着,用25mL含50mmol/L NaCl的缓冲液A把未结合在柱上的蛋白洗下来;再进行NaCl线性梯度(0—0.5mol/L)洗脱(洗脱体积:100mL);最后,用25mL含1mol/L NaCl的缓冲液A清洗柱子。上述层析步骤,流速均控制在2mL/min;收集的蛋白组分(1mL/管)在50%甘油中-20℃下保存。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 7.5% PAGE和7.5% SDS-PAGE检测E₂诱导的效果及纯化的E₂诱导产物。电泳在恒压(150V)下进行,电泳缓冲液配方为:25mmol/L Tris, 192mmol/L glycine, pH8.3;上样缓冲液配方为:0.1mol/L Tris, pH6.8, 20% glycerol, 0.2% Bromophenol blue;浓缩胶缓冲液配方为:0.5mol/L Tris-HCl, pH6.8;分离胶缓冲液配方为:1.5mol/L Tris-HCl, pH8.8;电泳后,胶转移至0.25%考马斯亮蓝R-250(溶解在脱色液中)中染色,直至蛋白带清晰可见为止;而后,用脱色液(配方:甲醇:水:冰醋酸=45:45:10)进行脱色。

1.6 Mg²⁺-EDTA 沉淀^[15, 16] 在4℃下操作。取1mL血清和4mL 20mmol/L EDTA (pH7.7)混合后,加入50μL 1mol/L MgCl₂颠倒数次,静置10min,观察有无沉淀产生。若无沉淀产生,则继续加入1mol/L MgCl₂(每次加入的体积为50μL),直至有明显的沉淀产生;而后,离心(5,000r/min, 15min);去上清,沉淀重新溶解在1mL 1mol/L NaCl中;再加入10mL双蒸水,离心(5,000r/min, 15min);去上清,用1mL 1mol/L NaCl重新溶解沉淀;7.5% PAGE检测沉淀的效果。

1.7 脂蛋白分析 7.5% PAGE后,用苏丹黑B饱和的60%乙醇溶液染色;而后,在50%乙醇溶液中脱色。

1.8 磷蛋白分析^[17] 7.5% PAGE电泳后,用异丙醇-醋酸-水(25:10:65)溶液固定胶,1h后更新一次;胶转到异丙醇-醋酸-水(25:10:65)溶液(含0.5mol/L CaCl₂),20min后用双蒸水快速清洗,去除过量的CaCl₂;加入热的0.5mol/L NaOH(至少80℃),平衡,30min后用双蒸水快速清洗,去除过量的NaOH;加入80mmol/L 钼酸铵溶液,平衡,20min后更新一次;而后,用双蒸水快速清洗,去除过量的钼酸铵;加入新鲜配制的显色溶

液(40mL 5mol/L HCl; 40mL 34mmol/L 钼酸铵; 115mL 双蒸水; 5mL 0.1% 罗丹明 B) 显色; 最后, 在 1mol/L HCl 中脱色, 1h 后更新一次。

1.9 糖蛋白分析-地高辛(DIG) 标记法 用 DIG Glycan/Protein Double label kit (购自宝林曼公司) 进行。具体步骤如下: 7.5% PAGE 电泳后, 利用水浴式电印迹装置(伯乐公司) 将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 转移电压恒定, 为 100V, 转移时间为 60min, 转移缓冲液配方为: 25mmol/L Tris, 192mmol/L glycine, 20% 甲醇, pH8.3; 转移后, 用磷酸缓冲盐溶液(PBS, pH6.5) 洗膜, 5min/次, 共 3 次; 加入含 0.01mol/L 高碘酸钠的 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液(pH5.5), 氧化 20min; 同样用 PBS 缓冲液(pH 6.5) 洗膜, 5min/次, 共 3 次; 加入 10mL 混有 2 μ L DIG 的 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液(pH5.5), 标记 1h; 用 Tris 缓冲盐溶液(TBS) 洗膜, 5min/次, 共 3 次; 加入 10mL 混有 20 μ L 过氧化物酶(POD) 标记的地高辛抗体的 TBS 缓冲液, 结合 1h; 用 TBS 缓冲液洗膜, 5min/次, 共 3 次; 加入 10mL 混有 50 μ L 4-(1,4,7,10-Tetraoxadecyl)-1-naphthol(TETON) 和 6 μ L H₂O₂ 的 Tris 缓冲液(pH8.0) 中。当显色合适时, 加双蒸水终止显色反应, 并在空气中自然干燥后保存。

2 结果

2.1 E₂ 诱导 第一次注射 E₂, 4d 后抽少量血并制备血清。而后, 利用 7.5% PAGE 电泳检测, 发现在雄性银鲫的血清中出现三条新的蛋白带, 其中有两条约蛋白带与雌性特异蛋白的位置相一致。随着 E₂ 注射次数的增加, 因诱导而出现的蛋白带越来越浓。(图 1)

2.2 与雌性特异蛋白相一致的 E₂ 诱导产物的纯化

在 FPLC 系统上, 利用高交换量的阴离子交换柱 Q, 成功地从受 E₂ 多次诱导的雄性银鲫血清中提纯了与雌性特异蛋白相一致的 E₂ 诱导产物。从层析图谱(图 2) 上可以看出, 与雌性特异蛋白相一致的 E₂ 诱导产物在 0.27mol/L NaCl 时被洗脱下来。7.5% PAGE 电泳(图 3, a) 表明, 所收集的蛋白组分(对应于第二个主峰) 即为与雌性特异蛋白相一致的 E₂ 诱导产物, 呈两条带。7.5% SDS-PAGE 电泳图谱(图 3, b, c) 中, 则有一条很浓的主带, 一条较弱的次带, 位置与未受 E₂ 诱导的雌性银鲫血清中的雌性特异蛋白相一致。

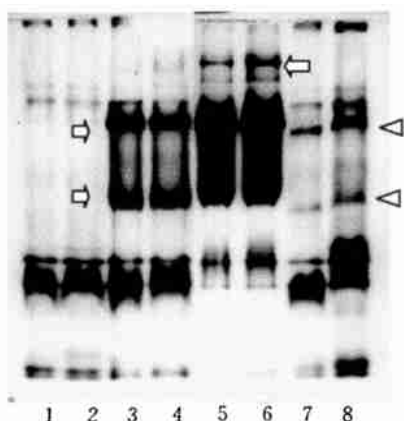


图 1 E₂ 诱导的 PAGE(7.5%) 检测

1, 2. 未受诱导的雄性银鲫血清(对照组); 3, 4. 第一次注射 E₂ 4d 后的雄性银鲫血清(实验组); 5, 6. 注射 E₂ 四次后的雄性银鲫血清(实验组); 7, 8. 对照的雌性银鲫血清。上样量均为 4 μ L。三角形表示雌性特异蛋白带, 共有两条。箭头表示 E₂ 诱导产生的新蛋白带, 共有三条, 其中有两条约与雌性特异蛋白相一致

Fig. 1 Examination of the product induced by E₂ treatment on 7.5% PAGE

1, 2. Serum from untreated control males; 3, 4. Serum from first time E₂-treated males at 4 days; 5, 6. Serum from four time E₂-treated males; 7, 8. Serum from females. The loaded volume was 4 μ L for each sample. The arrows indicate the induced products by E₂. The triangles indicate the specific serum protein in female

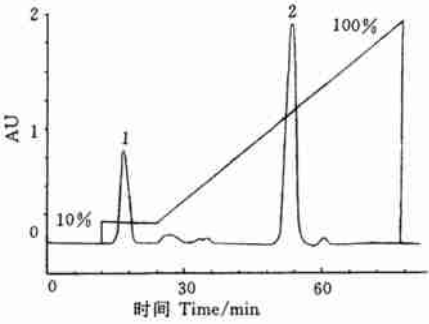


图 2 E₂ 诱导产物的纯化

接受 E₂ 诱导的雄性银鲫血清经高交换量的阴离子交换层析(Q 柱)的层析后, 共有两个主峰, 其中第二个主峰为接受 E₂ 诱导的雄性银鲫血清所特有, 在 0. 27 mol/L NaCl 时被洗脱下来

Fig. 2 Purification of the product induced by E₂

The serum from the induced males was being fractionized through high capacity anion exchanger(Q column). There are two major peaks in the elution profile of plasma from E₂-treated male silver crucian carp. The second protein peak was specific for the induced males, and eluted at 0. 27 mol/L NaCl

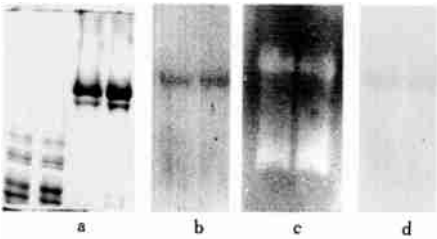


图 4 E₂ 诱导产物的生化分析

(a) 蛋白用考马斯亮蓝 R-250 染色; (b) 糖蛋白分析(地高辛标记法); (c) 磷蛋白分析; (d) 脂蛋白分析(苏丹黑 B 染色)

Fig. 4 Biochemical analysis of purified product

(a) Stained with Coomassie Brilliant Blue R-250(0. 25%); (b) DIG-label method for carbohydrate analysis; (c) Phosphorous analysis; (d) Stained with Sudan Black B for lipid analysis

3 讨论

实验以雄性银鲫为实验材料, 主要基于以下几点考虑: 首先, 雌鱼体内存在卵黄原的清除机制, 而雄鱼体内不存在该机制, 这样, 就可以通过多次诱导, 使 VTG 成为雄鱼血清

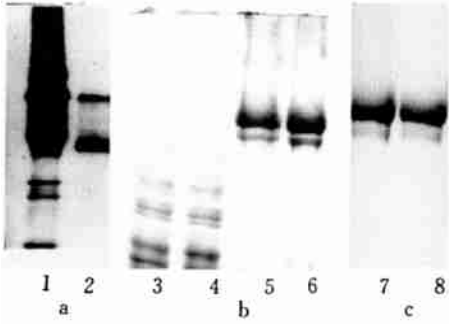


图 3 电泳检测纯化结果

(a) 7. 5% PAGE; (b, c) 7. 5% SDS-PAGE。1. E₂诱导的雄性银鲫血清; 2. 纯化的产物; 3, 4. 未受 E₂ 诱导的雄性银鲫血清; 5, 6. 雌性银鲫血清; 7, 8. 纯化的产物

Fig. 3 Examination of the purification

(a) 7. 5% PAGE; (b, c) 7. 5% SDS-PAGE. 1. Serum from E₂-treated male; 2. Purified product; 3, 4. Serum from untreated control males; 5, 6. Serum from untreated females; 7, 8. Purified product

2. 3 与雌性特异蛋白相一致的 E₂ 诱导产物的鉴定

提纯与雌性特异蛋白相一致的 E₂ 诱导产物后, 即对它进行了 VTG 鉴定。Mg²⁺-EDTA 沉淀结果表明, 当 Mg²⁺ 与 EDTA 的比达到 5 2 时, E₂ 诱导产物能够被沉淀。但是, 沉淀不完全, 即上清中还含有大量的 E₂ 诱导产物(电泳图谱未给出)。苏丹黑 B 染色(图 4, d) 证明 E₂ 诱导产物是种脂蛋白, 磷蛋白分析(图 4, c) 则表明 E₂ 诱导产物是磷蛋白。地高辛标记法(图 4, b) 分析结果, E₂ 诱导产物同时也是一种糖蛋白。

中的主要蛋白, 从而便于纯化; 其次, 便于进行 VTG 的鉴定; 最后, 取材可以不受季节的限制。通过多次 E_2 诱导, 在雄性银鲫血清中检测到了诱导产物。如下证据表明, 与雌性特异蛋白相一致的 E_2 诱导产物就是 VTG: (1) 能受 E_2 诱导, 且在 7.5% PAGE 和 7.5% SDS-PAGE 电泳图谱上的位置与雌性特异蛋白相同; (2) 生化分析表明, 它们是一类糖磷脂蛋白大分子; (3) 能够被 Mg^{2+} -EDTA 沉淀。

关于 VTG 的纯化方法, 目前有较多报道^[12, 16, 18—22]。 Mg^{2+} -EDTA 选择性沉淀法因具有快速、简便, 不需要特殊设备等特点而成为首选。但是, 利用该法纯化 VTG 的关键在于, 血清中 VTG 的浓度要足够高^[12]。本实验表明, 受 E_2 诱导的雄鱼血清中的 VTG 浓度不够高, 不能利用沉淀法来提纯。基于目标分子的电荷和/或大小而建立的两步或一步层析法已成为目前应用最广泛的 VTG 纯化方法。在大多数情况下, 第一步是采用凝胶过滤层析, 第二步则进行阴离子交换层析。对某些鱼, 一步阴离子交换层析就能得到纯的 VTG。作为一类大分子, VTG 极易降解。同时, 当它从血清中分离出来时, 由于离开了血清所提供的蛋白酶抑制环境, 很容易酶解。因此, VTG 的不稳定性已成为 VTG 纯化中的一大难题。

本实验中, 首先进行阴离子交换层析, 主要有如下考虑: 所采用的预装柱的交换容量大, 达到了 175mg, 这样就可以把样品稀释后直接上样; 可采用离子线性梯度洗脱来提高分辨率; 若层析后电泳检测到 VTG 已降解, 可以再进行凝胶过滤层析, 以去除已降解的分子。层析结果表明, 所采用的策略是正确的。一步层析, 使得纯化所用的时间大大缩短, 同时, 层析时蛋白酶抑制剂 PMSF 的使用, 都有效的避免了 VTG 的降解, 这可以从电泳结果看出来。7.5% PAGE 上呈两条带, 即诱导所产生的, 而在 7.5% SDS-PAGE 上, 主带与次带非常接近, 次带不可能是降解产物。Carnevali et al.^[22]曾报道了普通鲤 VTG 的纯化。然而, 步骤繁琐, 且最后所得的 VTG 已部分降解成许多小分子。

到目前为止, 在鱼类和两栖类中, 均发现了多个 VTG 基因。而对于鲫鱼, 则未见报道。因此, 只能判定, 银鲫有两种 VTG 分子。究竟它们是来自两个不同的 VTG 基因, 或者是由同一个 VTG 基因转录而来, 只是翻译后的修饰不同, 有待从分子水平进一步验证。在得到纯的 VTG 分子后, 即可利用它作为标准, 建立 ELISA 法, 来评价环境中化学物质的潜在雌激素效应。目前, 兔抗 VTG 的多克隆抗体正在制备之中。

参考文献:

- [1] Joseph J K, Michael D K, Kathleen M J, et al. Fathead minnow vitellogenin: complementary DNA sequence and messenger RNA and protein expression after 17 β -estradiol treatment[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, **19**(4): 972—981
- [2] Tyler C R, van Aerle R, Hutchinson T H, et al. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, **18**: 337—347
- [3] Teo B Y, Tan N S, Lam T J, et al. Synergistic effects of nuclear factors-GATA, VBP and ER in potentiating vitellogenin gene transcription[J]. *FEBS Letters*, 1999, **459**: 57—63
- [4] Teo B Y, Tan N S, Lam T J, et al. A novel piscine vitellogenin gene: structural and functional analyses of estrogen-inducible promoter[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1998, **146**: 103—120
- [5] Brooks S, Tyler C R, Sumpter J P. Egg quality in fish: what makes a good egg? [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1997, **7**: 387—416

- [6] Corthesy B, Claret F -X, Wahli W. Estrogen receptor level determines sex-specific *in vitro* transcription from the *Xenopus* vitellogenin promoter[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**: 7878—7882
- [7] Wahli W. Evolution and expression of vitellogenin genes[J]. *Trends in Genetics*, 1988, **4**: 227—232
- [8] Mellanen P, Soimasuo M, Holmbom B, et al. Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.) exposed to effluents from pulp and paper mills[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1999, **43**, 133—137
- [9] Harries J E, Sheahan D A, Jobling S, et al. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, **16**: 534—542
- [10] Parks L G, Cheek A O, Denslow N D, et al. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization, and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds [J]. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 1999, **123**: 113—125
- [11] Bon B, Barbe U, Rodriguez N, et al. Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): establishment and validation of an ELISA[J]. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1997, **117**(1): 75—84
- [12] 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
- [13] 桂建芳. 银鲫天然雌核发育机理研究的回顾与展望[J]. 中国科学基金, 1997, **11**(1): 11—15
- [14] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) as revealed by RAPD assays[J]. *J. Mol. Evol.* 2000, **50**, in press
- [15] Wiley H S, Opresko L, Wallace R A. New methods for purification of vertebrate vitellogenin[J]. *Analytical Biochemistry*, 1979, **97**: 145—152
- [16] Silversand C, Hyllner S J, Haux C. Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1993, **267**: 587—597
- [17] Debruyne I. Staining of alkali-labile phosphoproteins and alkaline phosphatases on polyacrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1983, **133**: 110—115
- [18] Matsubara 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]. *Developmental Biology*, 1999, **213**: 18—32
- [19] Janeiro-Cinquini T R F, Ribolla P E M, Winter C E, et al. Vitellogenin and yolk protein processing in *Bothrops jararaca* (Wied), a tropical venomous snake[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. B*, 1999, **122**: 189—198
- [20] Roubal W T, Lomax D P, Willis M L, et al. Purification and partial characterization of English sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin[J]. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1997, **118**: 613—622
- [21] Yao Z, Crim L W. A biochemical characterization of vitellogenins isolated from the marine fish ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.), lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1996, **113**(2): 247—253
- [22] Carnevali O, Belvedere P. Comparative studies of fish, amphibian, and reptilian vitellogenins [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1991, **259**: 18—25

INDUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VITELLOGENIN(VTG) FROM SILVER CRUCIAN CARP

HU Dong and GUI Jian-fang

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences; State Key Laboratory of Freshwater
Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072*)

Abstract: Eight male silver crucian carps were treated by intraperitoneal injections every five day with 5mg estradiol-17 β each fish. Native PAGE (7.5%) of the serum indicated that three new bands which were absent in untreated male silver crucian carp appeared at four days after the first injection. Two of them were identical to the specific serum protein in female. The amount of the products of E₂ treatment ascended with injection going on. Twenty-five days after the first hormone injection, serum was collected and prepared. Aprotinin (1 TIU) and PMSF (0.1mol/L) were added to serum to inhibit protease activity. High capacity anion exchanger Q connected to a fast protein liquid chromatography system (FPLC system) was developed to purify the products of E₂ treatment from the serum. The purification was conducted at low temperature (4 °C). And PMSF was added to all solutions pumped onto the Q column. The induced serum protein was eluted at 0.27mol/L NaCl. Native PAGE (7.5%) suggested that the purity of the purified product was enough. There were only two closely bands on SDS-PAGE (7.5%), which suggested that the purified protein did not degrade during purification. So the one-step purification protocol was successful. The purified protein was characterized as a phospholipoglycoprotein by native PAGE (7.5%), staining the gel for lipid with Sudan Black B, phosphoprotein staining method for phosphorus and DIG-label method for carbohydrate. Furthermore, it could be partly precipitated by Mg²⁺-EDTA. And it was corresponding to the protein specific for female in silver crucian carp. So it can be concluded that the induced product by E₂ treatment is vitellogenin. Silver crucian carp has two kinds of vitellogenin molecules.

Key words: Silver crucian carp; Estradiol-17 β ; Vitellogenin; FPLC; Protein purification; PAGE