

鲤和团头鲂幼鱼卵黄蛋白原的诱导、纯化及电泳比较

梁 勇 徐 盈 杨方星 王剑伟

(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: 采用腹腔注射人工雌激素 17α 乙炔基雌二醇 (17α ethinyloestradiol, EE_2) 的方法, 在鲤幼鱼和团头鲂幼鱼体内诱导生成卵黄蛋白原; 并结合利用阴离子交换介质 DEAE Sepharose CL-6B 和液相层析技术分离纯化了诱导后的鲤幼鱼和团头鲂幼鱼血浆中的卵黄蛋白原; SDS-PAGE 电泳结果表明所分离的两种鲤科鱼类卵黄蛋白原其亚基的分子量分别为 170KD 和 150KD。

关键词: 卵黄蛋白原; 鲤科鱼类; 阴离子交换; 内分泌干扰物

中图分类号: Q176 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)04-0317-05

卵黄蛋白原是具有种特异性的高分子量磷脂蛋白。卵黄生成期间的雌鱼分泌雌激素, 诱导肝细胞生成卵黄蛋白原, 卵黄蛋白原通过血液循环系统, 运输到卵巢, 在经过修饰后, 成为鱼卵生长发育的营养物质-卵黄蛋白。雌鱼在卵黄生成期可生成大量卵黄蛋白原, 但在雌鱼的其他生活期间, 鱼体内的卵黄蛋白原的含量却很低^[1]。雄鱼和幼鱼在大剂量的人工雌激素作用下, 以及在低剂量的类雌激素长期作用下, 都能诱导体内卵黄蛋白原的生成^[2, 3]。另外, 某些内分泌干扰物具有抗雌激素的作用, 其干扰雌鱼体内卵黄蛋白原的生成, 使雌鱼血液中卵黄蛋白原的含量比正常时低^[4]。因而利用雄鱼和幼鱼及非卵黄生成期的雌鱼体内生成的卵黄蛋白原水平的变化作为环境中类雌激素存在的生物标志物成为当前国际上研究的前沿和热点^[5]。

目前已经建立了多种酶联免疫吸附法 (ELISA) 来测定多种硬骨鱼体内卵黄蛋白原的含量^[6, 7], 但由于卵黄蛋白原具有种特异性, 不同鱼种的卵黄蛋白原有很大的差异, 因而对每种实验动物都需要纯化一定量的卵黄蛋白原, 以便作为 ELISA 方法的标准。据报道, 纯化卵黄蛋白原的方法有: 超速梯度离心^[8]; EDTA 加 $MgCl_2$ 分级沉淀^[9]; 离子交换柱^[10]; 用 HPLC 分离^[11] 和用 FPLC^[12] 制备。这些方法操作繁杂, 耗时费剂, 不利于研究工作的扩展。在本实验中, 采用了国内广泛分布的鲤和团头鲂作为实验动物, 用乙炔基雌二醇 (EE_2) 诱导鱼体生成卵黄蛋白原, 并结合利用阴离子交换树脂 (DEAE Sepharose CL-6B) 和液相层析技术分离了上述两种鱼血浆中的卵黄蛋白原。

收稿日期: 2001-08-22; 修订日期: 2001-09-04

基金项目: 中国科学院知识创新项目 KZCX-410 资助

作者简介: 梁勇 (1976—), 男; 硕士; 研究方向为水生态毒理学

通讯作者: 徐盈, E-mail: xuying@ihb.ac.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物 鲤(*Cyprinus carpio* L.) 均购于本所关桥渔业实验基地, 一龄幼鱼重量为 $83\text{g} \pm 12\text{g}$ 。团头鲂(*Megalotrama amblycephala* Yih) 购于湖北汤逊湖渔场, 一龄幼鱼重量为 $210\text{g} \pm 23\text{g}$ 。所有实验鱼购买回来后均在实验室鱼池内饲养 1—2 周, 水温 20°C , 光照强度为 12h/d 。同时定期投放少量饵料。

1.2 仪器与试剂 美国 Bio Rad Mini-Protein II 电泳仪; 德国 Waters 501 高压液相色谱泵; 德国 LAUDA E100 循环水冷却箱; 日本 HITACHI CF-15R 高速冷冻离心机; 美国惠普公司 HP8453 分光光度计(带 DAD 二极管阵列检测器); 色谱柱购于上海锦华层析设备厂; DEAE-Sepharose CL-6B 购于美国 Pharmacia 公司。麻醉剂: 对氨基苯(甲)酸乙酯(Benzocaine)和 EE_2 均购自美国 Sigma 公司。酶抑制剂: 苯甲基磺酰氟(PMSF) 购自德国 Roche 公司。

1.3 卵黄蛋白原的诱导 用麻醉剂 Benzocaine 把实验鱼轻度麻醉, 按 5mg/kg 体重的剂量把溶解于豆油中的乙炔基雌二醇(EE_2) 注射入鱼的腹腔。对照组仅腹腔注射豆油。诱导期内, 不投喂饵料。诱导 7—10d 后, 用麻醉剂把实验鱼深度麻醉, 再用经 0.1% 的肝素溶液润洗后的注射器从鱼尾脊柱处穿刺取血, 取出的血液置于 1.5mL 肝素化的离心管中, 加入一定量的酶抑制剂 PMSF, 使酶抑制剂的最终浓度为 1mmol/L 。血液在 4°C 下静置 2h 后, 在 8500r/min , 4°C 离心 15min。取上清, -70°C 保存。

1.4 卵黄蛋白原的分离纯化 采用阴离子交换树脂 DEAE-Sepharose CL-6B 柱($40\text{cm} \times 1.7\text{cm}$) 分离鲤和团头鲂血浆中的卵黄蛋白原。上样前, 用 0.025mmol/L , $\text{pH}7.5$ 的 Tris-HCl 缓冲液预淋洗平衡过夜。上样后, 用 NaCl/Tris-HCl 洗脱缓冲液($0.1\text{—}0.5\text{mol/L NaCl}$, $0.025\text{mmol/L Tris-HCl}$, $\text{pH}7.5$) 进行梯度洗脱, 为防止卵黄蛋白原的酶解, 在洗脱缓冲液中加入酶抑制剂 PMSF, 使酶抑制剂的最终浓度为 2mmol/L 。洗脱速度为 1.5mL/min , 每隔 2min 收集洗脱组分。用 HP8453 分光光度计检测洗脱液中组分的变化和蛋白质的浓度。因为卵黄蛋白原对热敏感, 购买的色谱柱带有冷凝水夹套, 且所有的操作都在低温下进行, 洗脱缓冲液都要先置于 4°C 冰箱中预冷。

1.5 血浆中蛋白质总量的测定 血浆中蛋白质总量的测定采用 Bradford 法^[13], 用牛血清白蛋白作为浓度标准。测量仪器为 HP8453 分光光度计。

1.6 卵黄蛋白原的电泳检测 Native PAGE 和 SDS-PAGE 电泳采用 Laemmli^[14] 的非连续系统, 在其基础上稍微加以修改。浓缩胶和分离胶的凝胶浓度分别为 4% 和 7% , 在电泳分析前, 将样品进行适当的稀释, 以获得最佳的电泳结果。凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后, 用凝胶成像系统拍照保存。

2 结果与讨论

2.1 卵黄蛋白原的诱导

鲤幼鱼对照组的血浆蛋白含量为 $18.4 \pm 7.2\text{mg/mL}$ ($n=4$), 经过 EE_2 诱导后鲤幼鱼血浆蛋白的含量增加到 $39.2 \pm 10.4\text{mg/mL}$ ($n=12$)。团头鲂幼鱼对照组的血浆蛋白含量为 $30.6 \pm 11.2\text{mg/mL}$ ($n=4$), 经过 EE_2 诱导后团头鲂幼鱼血浆蛋白的含量增加到 47.2 ± 11.8

mg/ mL(n= 11) 。

由图 1 可以清楚地看出, 诱导前后两种硬骨鱼血浆中蛋白质的组成发生了很大的改变。用人工雌激素诱导后的团头鲂和鲤都特异生成了一种含量很高的蛋白质, 经过阴离子交换柱分离纯化该蛋白质后, 利用 SDS PAGE 电泳检测其亚基的分子量分别为 150KD 和 170KD 左右。图 1 也表明卵黄蛋白原是种特异蛋白, 鲤和团头鲂的卵黄蛋白原电泳行为差异很大, 鲤的卵黄蛋白原可能由两个不同的亚基(170KD 和 165KD) 组成, 而团头鲂的卵黄蛋白原则可能只含有两个大小相同的亚基(150KD) 。分离后的组分在不同的条件下电泳, 都不呈单一条带, 这是因为卵黄蛋白原很不稳定, 即使加入酶抑制剂, 也不能防止蛋白质的部分降解。作者也研究了卵黄蛋白原的降解情况, 证明图 1 中分离组分(3 和 5) 染色较弱的条带其实是卵黄蛋白原的多种降解产物, 这和国外的相关研究结果吻合^[10]。

2.2 两种鱼类血浆蛋白的洗脱图谱和电泳图谱

由图 2 和图 4 可以看出, 结合利用阴离子交换树脂(DEAE-Sepharose CL- 6B) 和液相层析技术的盐浓度梯度洗脱, 可以把卵黄蛋白原与血浆中的其他杂蛋白很好地分开。由于卵黄蛋白原是一种磷脂蛋白, 它可与阴离子交换树脂紧密结合, 因此洗脱时间较长。通过改变色谱柱的长度和淋洗缓冲液离子强度变化的速率, 得到了较好的分离结果; 用 SDS-

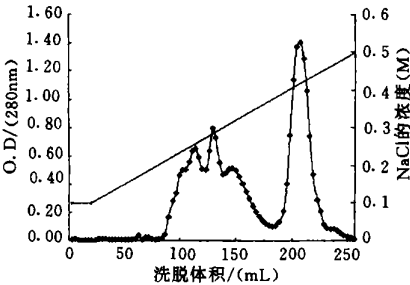


图 2 经 EE₂ 诱导的团头鲂幼鱼血浆中蛋白质的洗脱图谱

Fig. 2 The elution pattern of immature Wuchang fish plasma protein induced by EE₂. DEAE-Sepharose CL- 6B 柱(400× 17mm) 梯度洗脱: 洗脱条件: NaCl(100-500mM) (25mmol/ L Tris-HCl buffer, pH 7. 5) , 2 mmol/ L PMSF, 流速 90 mL/ h 每 2 min 收集一管

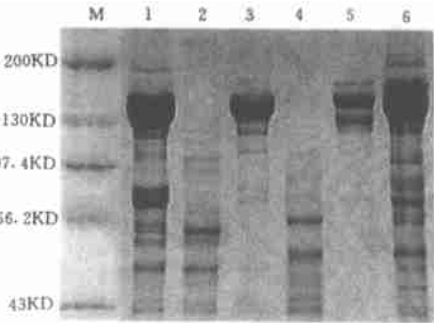


图 1 诱导前后鲤和团头鲂血浆中蛋白质的 SDS PAGE 电泳图谱

Fig. 1 SDS PAGE pattern of carp and Wuchang fish plasma protein before and after induction.

M: 蛋白质分子量标准; 1. 诱导后的团头鲂幼鱼; 2. 团头鲂幼鱼; 3. 分离纯化的团头鲂卵黄蛋白原; 4. 鲤幼鱼; 5. 分离纯化的鲤卵黄蛋白原; 6. 诱导后的鲤幼鱼



图 3 经 EE₂ 诱导的团头鲂幼鱼血浆中蛋白质的洗脱组分 Native PAGE 电泳图谱

Fig. 3 Native PAGE pattern of immature Wuchang fish plasma protein elution fractions.

1. 鲤幼鱼; 2, 4, 5. 诱导后的团头鲂幼鱼; 3, 15. 团头鲂幼鱼; 6-14 不同的洗脱组分

PAGE 电泳和 Native PAGE 电泳检测了图 2、图 4 中第二个大峰的主要组分(图 3 的 6—14, 图 5 的 6—13), 发现洗脱出来的蛋白质为 EE₂ 诱导生成的卵黄蛋白原, 其分子量都很大, 表明所分离出来的两种鲤科鱼类的卵黄蛋白原的基本特性与国外报道的其他硬骨鱼相似。

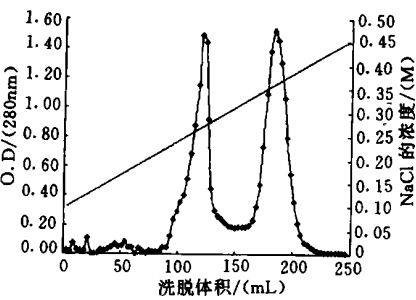


图 4 经 EE₂ 诱导的鲤幼鱼血浆中蛋白质的洗脱图谱

Fig. 4 The elution pattern of immature carp plasma protein induced by EE₂. DEAE-Sepharose CL-6B 柱 (400×17 mm) 梯度洗脱: 洗脱条件: NaCl (100—500 mmol/L), (25 mmol/L Tris HCl buffer, pH7.5), 2 mmol/L PMSF, 流速 90 mL/h

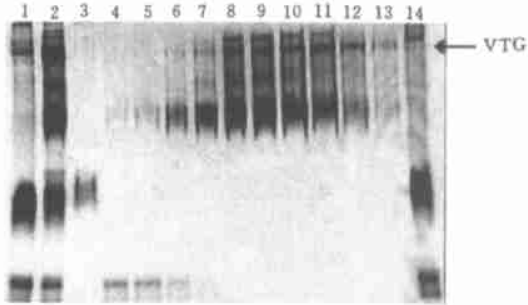


图 5 经 EE₂ 诱导的鲤幼鱼血浆中蛋白质的洗脱组分 Native PAGE 电泳图谱

Fig. 5 Native PAGE pattern of immature carp plasma protein elution fractions.
1, 14. 鲤幼鱼; 2 诱导后的鲤幼鱼; 3—13. 不同的洗脱组分

图 5 的 3—5 为图 4 中前一大峰的主要组分, 根据电泳和 HP8453 分光光度计的检测结果, 认为他们与图 2 中前一大峰的组分相似, 为鱼血浆中其他小分子量的蛋白质和色素。

2.3 结论

本研究结果表明: 利用阴离子交换树脂 DEAE-Sepharose CL-6B 和液相层析技术来分离两种鲤科鱼血浆中经 EE₂ 诱导产生的卵黄蛋白原是一种快速、有效的提取方法, 适当增加色谱柱的长度并缓慢提高淋洗缓冲液的离子强度, 能更好的分离鱼血浆中的卵黄蛋白原。

参考文献:

[1] Copeland P A et al. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at various stages of the reproductive cycle [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1986, **83**: 487—493
[2] Solé M et al. vitellogenin induction and other biochemical responses in carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 α ethynylestradiol [J]. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2000, **38**: 494—500
[3] Purdom C E et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works [J]. *Chem. Ecol.* 1994, **8**: 275—285
[4] Jean M W et al. In vitro vitellogenin production by carp(*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (Anti) estrogenic activity of xenobiotics [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1999, **157**: 68—76
[5] Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) final report [R]. 1998, EPA/ 742/ R—98/ 003
[6] Heppell S A et al. “ Universal” assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens [J]. *Environ. Health Perspect.* 1995, **103**: 9—15

- [7] Charles R et al. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin [J]. *Environ Toxicol Chem*. 1999 **18**: 227—347
- [8] Janssen P A H et al. Environmental pollution caused elevated concentrations of oestradiol and vitellogenin in the female flounder, *Platichthys flesus* (L.) [J]. *Aquatic Toxicology*. 1997 **39**: 195—214
- [9] Oliana Carnevali et al. Comparative studies of fish, amphibian, and reptilian vitellogenins [J]. *J. Experimental Zoology*. 1991, **259**: 18—25
- [10] Louise G P et al. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds [J]. *Comp Biochem Physiol*. 1999, **123C**: 113—125
- [11] Christer Silversand et al. Isolation, immunochemical detection and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts [J]. *J. Experimental Zoology*. 1993, **267**: 587—597
- [12] Francois B 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] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Anal. Biochem*. 1976, **72**: 248—254
- [14] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*. 1970, **227**: 680—685

INDUCTION, PURIFICATION AND ELECTROPHORETIC COMPARISON OF VITELLOGENIN FROM TWO CYPRINID FISH SPECIES: CARP (*CYPRINUS CARPIO*) AND WUCHANGFISH (*MEGALOBrama AMBLYCEPHALA YIH*)

LIANG Yong, XU Ying, YANG Fang-xing and WANG Jian-wei

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences;

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

Abstract: Vitellogenin was induced in immature common carp (*Cyprinus carpio* L.) and immature Wuchangfish (*Megalobrama amblycephala* Yih) by intraperitoneal injection of xenobiotic estrogen 17 α ethinyloestradiol. By using the anion exchange chromatography on a DEAE-Sephharose CL-6B column, the vitellogenin in plasma from two cyprinid fish species was effectively purified. The results of SDS-PAGE show that the molecular weights of vitellogenin monomer in two cyprinid fish species are around 170KD and 150KD respectively.

Key words: Vitellogenin; Cyprinid fish; Anion exchanger; Endocrine-disrupting chemicals