

施氏鲟卵黄蛋白原及其相关蛋白的研究

张颖 曲秋芝 霍堂斌 孙大江

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

摘要: 采用凝胶柱层析、聚丙烯酰胺电泳、免疫印迹 (Western blotting) 和免疫扩散等方法对施氏鲟卵黄蛋白原 (Vitellogenin Vg) 及其相关蛋白 (Yolk protein YP) 进行了研究。结果表明, 施氏鲟血清 Vg 是一种糖脂磷蛋白, 其相对分子量为 410kD, 由分子量为 205kD 的两个同源亚基组成。Vg 的 3 种相关蛋白 YP1、YP2 和 YP3, 其中 YP1 相对分子量为 370kD, 是一种糖脂磷蛋白, 由相对分子量为 97kD 和 33kD 的两个亚基构成。YP2 是一种相对分子量为 144kD 的磷脂蛋白, 由相对分子量为 94kD 和 45kD 的 2 个亚基构成。YP3 为相对分子量为 66kD 的磷蛋白, 由相对分子量为 30kD 的同源亚基构成。

关键词: 施氏鲟; 卵黄蛋白原; 脂磷蛋白; 高磷蛋白

中图分类号: Q176 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)05-0750-10

卵黄蛋白原 (Vitellogenin Vg) 是存在于所有卵生和卵胎生动物血液中的雌性特异性蛋白, 在雌激素的作用下, 由肝脏分泌进入到血液循环, 被发育中的卵母细胞吸收后, 加工为卵黄蛋白^[1-3]。在两栖纲和鸟类中, Vg 在酶的作用下被降解为卵黄蛋白中的高磷蛋白 (Phosvitin Pv)、脂磷蛋白 (Lipovitellin Lv) 和糖蛋白 (Yolk glycoprotein YGP)^[4-6]。有关鱼类 Vg 和相关的卵黄蛋白 (Lipovitellin and phosvitin YPs) 之间的关系在多种鱼类中已经被证实, 如在花鲢鱼 (Killifish *Fundulus heteroclitus*)^[1]、虹鳟 (Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*)^[7]、冬鲮鱼 (Winter flounder *Paralichthys americanus*)^[8]、条纹鲈鱼 (Stripped bass *Morone saxatilis*)^[9, 10]、乌颊鲷鱼 (Gillhead sea bream, *Sparus aurata*)^[11]、罗非鱼 (Tilapia *Oreochromis mossambicus*)^[12] 和银鲑鱼 (Coho salmon *Oncorhynchus kisutch*)^[13] 等鱼类。De Vlaning 通过 SDS-PAGE 证实了金鱼 (*Carassius auratus*) 具有两种类型的 Lv, 其中的一种为高分子量 (105kD 和 110kD), 另外一种由分子量为 (19—25kD) 的四个亚基组成, 而高磷蛋白则是由 7.6kD 和 14.5kD 两个亚基组成^[14]。南极冰鱼 (Antarctic fish *Chaenoccephalus aceratus*) 被证实有 9 种不同的卵黄蛋白, 而

虹鳟、白点鲑 (*Salvelinus leucomaenis*)^[15]、大麻哈 (Chum salmon *Oncorhynchus keta*)^[16] 和银鲑 (Coho salmon *O. kisutch*)^[13] 则具有两种卵黄蛋白 E₁ (230—300kD) 和 E₂ (30—35kD)^[17], 其中 E₁ 为脂磷蛋白, E₂ 为高磷蛋白或 β 成分^[18]。对许多硬骨鱼类 YPs 的研究表明, 鱼类的 Lv 和 Pv 均来自于体外, 不同鱼类之间具有一定的相同特性^[1]。脂磷蛋白通常易溶于低盐溶液中, 含磷量低, 高磷蛋白分子量较低, 是含磷丰富的蛋白^[1, 2], 而 E₂ 不具有 Lv 和 Pv 的特性^[19], 其氨基酸的组成与脂磷蛋白和高磷蛋白不相同^[13, 18, 20], 但也来自于卵黄蛋白原^[2, 13]。

鲟鱼作为原始的脊椎动物之一, 在生物系统发育上具有特殊的分类学地位, 在研究卵生脊椎动物的进化上具有重要的研究意义。1998 年 4 月 1 日起, 联合国华盛顿公约 (CITES) 将全世界野生鲟鱼认定为濒临绝种的保护动物。其中施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 是黑龙江特有的重要经济鱼类, 属淡水定居种, 仅分布于黑龙江水系^[21, 22]。目前, 有关鲟鱼卵黄蛋白原及其相关卵黄蛋白研究报道较少, 仅见 Bilwell *et al.* 对美国白鲟 (*Acipenser transmontanus*) Vg mRNA 的研究和 Bilwell 与 Carlson 对美国白鲟 Vg cDNA 等方面的研究^[23, 24]。Fujii *et al.* 和 Hira-

收稿日期: 2006-09-14 修订日期: 2007-11-02

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2004BA526B0113) 资助

作者简介: 张颖 (1977—), 女, 满族, 黑龙江桦南县人; 硕士, 助理研究员; 研究方向为鱼类生殖生理学。E-mail: julezhang@hotmail.com

通讯作者: 孙大江, E-mail: Sundajiang0451@sohu.com

matsu *et al.* 分别于 1991年、2002年对杂交鲟 (*bestar Huso huso* × *A. cypencer n. henus*) Vg及其 YPs的研究报道^[25-26], 在其他鲟科鱼类未见报道。鲟鱼类在孵出后的 6—7d内, 其幼体完全依赖卵黄来满足营养的需要, 而无需摄取外源性营养, 卵黄蛋白数量和质量的改变对早期鲟鱼幼体的维持生命和生长发育至关重要。因此对施氏鲟 Vg及其相关卵黄蛋白理化性质的研究, 对今后开展鲟鱼的人工繁殖保护、饲养等方面具有重要理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验用施氏鲟鱼卵和血清均采自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 北京房山鲟鱼繁育技术工程中心。

1.2 试验方法

1.2.1 施氏鲟鱼卵粗提液和血清的制备 取施氏鲟卵 5g 加 3 倍体积预冷的提取缓冲液 20mmol/L Tris-HCl (20mmol/L NaCl 0.01% 的叠氮钠, pH8.0), 在冰浴条件下 10000r/min 匀浆 5min 取匀浆液 4℃ 12000r/min 离心 20min 取中间层上清液为卵粗提液。雌鱼血清的制备: 尾椎静(动)脉采血 20mL, 室温放置 30min 后, 4℃ 低温过夜, 3000r/min 离心 20min 抽取血清, 保存备用。

1.2.2 Vg与 YP的纯化 取施氏鲟雌鱼血清, 放入蒸馏水中透析, 2500r/min 4℃ 离心 15min 获得沉淀, 重复一次, 溶于 0.5mol/L NaCl 中。取葡聚糖 Sephadex G-200 用适量蒸馏水浸泡 12h 再以 100℃ 溶胀 5h 后, 抽气装柱 (1.8cm × 75cm), 用 pH7.5 10mmol/L PBS (含 0.5mol/L NaCl) 缓冲溶液平衡柱, 取蛋白液, 上样。平衡缓冲液洗脱, 控制流速为 1.0mL/min 部分收集器收集体积为每管 3mL, 紫外检测仪检测, 层析工作站记录分离曲线。自动收集器收集蛋白液, 20% 聚乙二醇 (6000) 浓缩蛋白溶液, 冷冻保存。层析标准蛋白为安玛西亚公司, 甲状腺球蛋白 669kD, 铁蛋白 440kD, 过氧化氢酶 232kD, 乳酸脱氢酶 140kD, 牛血清白蛋白 67kD。400kD 附近的蛋白洗脱峰为 Vg

取卵粗提蛋白, 上样。平衡缓冲液洗脱, 控制流速为 1.0mL/min 部分收集器收集体积为每管 3mL, 紫外检测仪检测, 层析工作站记录分离曲线。自动收集器收集蛋白液, 20% 聚乙二醇 (6000) 浓缩蛋白溶液, 冷冻保存。

1.2.3 纯化 Vg和卵黄蛋白分子量的测定 纯化蛋白的原态分子量采用葡聚糖凝胶层析和梯度凝胶

电泳测定, 亚基分子量采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。葡聚糖凝胶层析标准蛋白为安玛西亚公司提供 (66—669kD)。5%—15% 梯度凝胶电泳^[27], 高标准分子量蛋白为安玛西亚公司的 (669—669kD)。SDS-PAGE 浓缩胶 5%, 分离胶 12%, 低标准分子量标准蛋白为北京天为时代公司 (14.4—97.4kD)。制作层析方程和电泳方程计算分子量。

1.2.4 抗血清的制备 将收集层析峰 A、B 和 C 蛋白液, 聚乙二醇 (6000) 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 后进行第二次加强免疫, 与不完全福氏佐剂等体积混合, 10d 后第三次免疫, 5d 后耳静脉取血测效价。效价达到 1:32 以上, 次日心脏取血, 制备血清。

1.2.5 Western blotting 检测与免疫原性分析 纯化 Vg 与 YP 用 Western blotting 和免疫扩散检测, 卵黄蛋白及雌、雄血清经 12% SDS 聚丙烯酰胺电泳。卵黄蛋白稀释 5 倍, 血清稀释 10 倍, 样品与上样缓冲液以 2:1 混合。电泳结束后, 凝胶、专用滤纸和 NC 膜, 用转膜缓冲液平衡, 5min × 3 次。电转移恒压 (10V) 30min 转移后将 NC 膜用 0.01mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗, 5min × 3 次, 置入含 1% BSA 的 PBS 中室温封闭 2h。弃封闭液用 PBS 洗膜, 5min × 4 次, 之后放入 1:200 稀释的兔抗血清, 在 4℃ 下孵育 12h 以上 (阴性对照, 以 1% BSA 取代一抗, 其他步骤相同), 弃一抗将 NC 膜用 PBS 洗 5min × 4 次, 再放入按 1:500 稀释的过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (IgG-HRP) 溶液, 室温孵育 2h, PBS 充分洗涤后, 滴加 DAB 显色溶液 (50mL 0.01mol/L pH 7.4 PBS, 25mg DAB, 10μL H₂O₂) 室温避光显色 10min, 双蒸水终止显色反应。采用乌赫特朗尼免疫双扩散的方法^[17], 分析施氏鲟 Vg 与 YP 的免疫原性。

1.2.6 纯化蛋白的特殊染色 脂蛋白采用油红 O 染色法^[28-29], 糖蛋白和磷蛋白采用 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

2 结果

2.1 Vg的纯化

标准蛋白的 Sephadex G-200 的洗脱曲线和标准方程如图 1 和图 2 所示, 标准蛋白洗脱曲线呈

现五个洗脱峰(图 1), 分别是分子量为 669kD、440kD、342kD、144kD 和 66kD 的洗脱峰, 凝胶层析法测定蛋白分子量方程: $Y=3.640-0.015X$, $X: V_e$ (标准蛋白洗脱体积); $Y: \lg M$; M : 标准蛋白分子量。雌鱼血清 V_g 的洗脱曲线呈现单一对称峰(图 6), 且起峰时间略晚于标准蛋白 440kD 洗脱曲线的起峰时间, 证明纯化蛋白已是单一成分, 且其分子量低于标准蛋白 440kD, 经计算该蛋白的分子量为 410kD(图 1 图 2)。纯化后所得样品经梯度凝胶电泳检验, 在分子量约为 410kD 附近只有一条蛋白带, 经蛋白特殊染色表明该蛋白是一种糖脂磷蛋白为血清 V_g (图 3 图 4), Western-blotting 证实该蛋白只存在于卵黄发生期雌性血清中, 而不存在于雄性血清中, 由两个相对分子量为 205kD 同源的亚基组成(图 5、图 8)。兔抗 V_g 血清与雌鱼血清只出现一条沉淀线, 与雄鱼血清不发生免疫沉淀反应(图 7)。

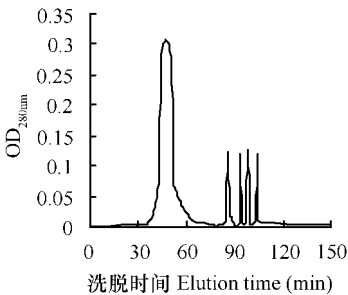


图 1 标准蛋白的层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of from SephadexG-200 gel filtration column standard protein

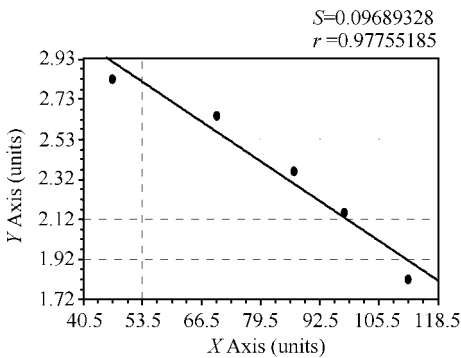


图 2 层析测定蛋白分子量方程

Fig. 2 Equation for measuring molecular weight of protein
 $X: V_e$ (标准蛋白洗脱体积); Y 标准蛋白分子量对数
 $X: V_e$; $Y: \lg M$

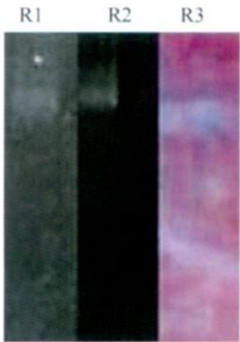


图 3 雌性蛋白特殊染色

Fig. 3 Specific stain for FSSP
R1: 磷蛋白染色; R2: 糖蛋白染色; R3: 脂蛋白染色
R1: Phosphoprotein Gel stain R2: Glycoprotein Gel stain
R3: Red oil stain for FSSP of V_g

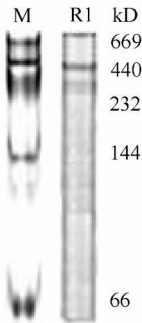


图 4 V_g 的梯度胶电泳

Fig. 4 5%—15% gradient native-PAGE
R1 雌性血清的 V_g M: 分子量标准
R1: V_g of female serum; M: Marker

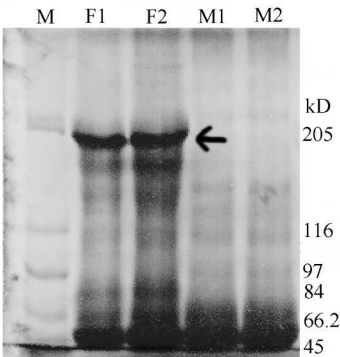


图 5 血清雌性蛋白

Fig. 5 FSSP in female serum of an ur Sturgeon column of V_g
M1-M2: 施氏鲟雄性血清蛋白电泳; M: 标准蛋白; F1-F2: 施氏鲟雌性血清蛋白电泳
M1-M2 Male serum; M: Marker F1-F2: Female serum

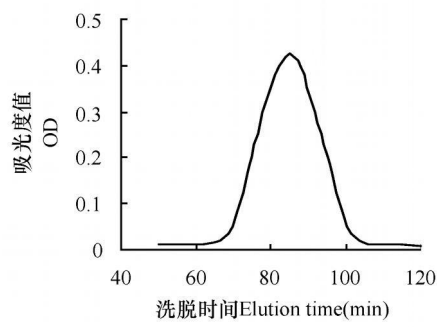


图 6 Vg的纯化洗脱曲线

Fig 6 Elution curve of from SephadexG-200gel filtration

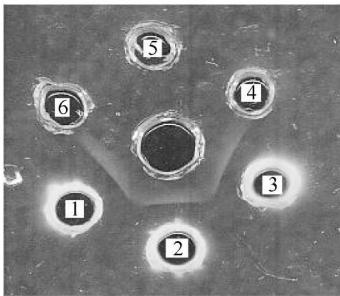


图 7 纯化 Vg与施氏鲟血清的免疫扩散

Fig 7 Immunodiffusion of sturgeon sera and purified vitellogenin
1—3 雌性血清; 4—6 雄性血清; 中间孔: 兔抗血清 Vg血清
1—3: Serum of female at vitellogenesis Stage; 4—6 Male serum; Central well Antiserum against Vitellogenin

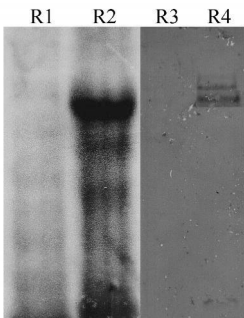


图 8 施氏鲟雌雄血清的 Western blotting

Fig 8 Western blotting for serum of female

R1 雄性血清; R2 雌性血清; R3-R4 雌性血清与雄性血清的免疫印迹

R1 Male serum; R2 Female Serum; R3 Western blotting for male serum; R4 Western blotting for female serum

2.2 卵黄蛋白的亚基组成及纯化

施氏鲟卵黄蛋白亚基的组成如图 9 所示 (降解 SDS-PAGE, 加巯基乙醇), 由 8 种亚基组成, 其亚基的相对分子量分布为 97.4kD、66.2kD、45kD、33kD、

30kD、26kD、16kD 和 15kD (A1, A2)。而非降解 (不加巯基乙醇) SDS-PAGE 表明卵黄蛋白由 4 种亚基组成, 其中分布于 30kD 谱带为降解亚基 (A3)。卵黄蛋白的洗脱曲线呈现三个洗脱峰 A、B、C (图 10), 其中峰 A 白色, 峰 B 淡黄色, 峰 C 无色。其中峰 B 和峰 C 的峰型较对称。

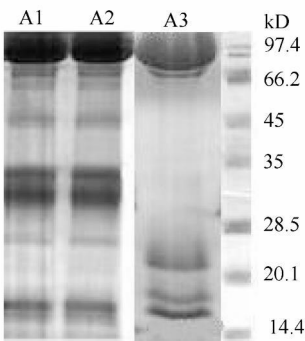


图 9 卵黄蛋白的亚基组成

Fig 9 The subunits of vitellin of amur sturgeon

A1 A2 降解卵黄蛋白; A3 非降解卵黄蛋白

A1 A2 Reduced vitellin; A3 Unreduced vitellin

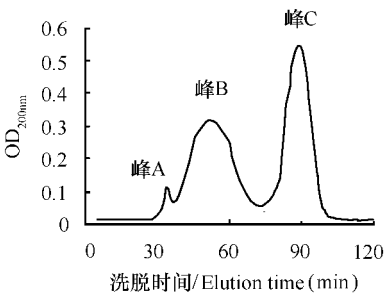


图 10 卵粗提液的层析洗脱曲线

Fig 10 Elution profile from SephadexG-200gel Filtration column of the egg crude extract from amur sturgeon

峰 A: YP1; 峰 B: YP2; 峰 C: YP3

2.3 YP1 的理化性质

洗脱峰 1 蛋白样品的梯度凝胶电泳 (图 11), 经计算卵黄蛋白粗提液峰 1 蛋白的表观分子量为 370kD, 电泳标准方程为: $Y = 2.85 - 1.69X$ (图 12)。X: Rf; Y: $\log M$; M: 分子量。SDS-PAGE 和 Western blotting 结果显示峰 1 蛋白是由分子量为 97kD 和 33kD 的两个亚基组成 (图 13)。Molecular Probes' Pro-Q® Emerald 300 G lycoprotein Gel stain 染色为阳性, 表明峰 1 蛋白为糖脂磷蛋白 (图 14)。该蛋白的兔抗血清与施氏鲟的雌、雄血清和纯化 Vg 均发生免疫沉淀反应 (图 15)。

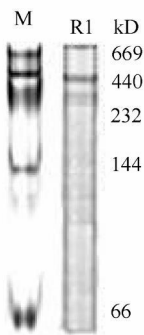


图 11 峰 1 蛋白梯度凝胶电泳

Fig 11 5%—15% gradient native-PAGE of the first peak's protein

M: 标准分子量; R1: 峰 A 蛋白

M: Marker; R1: Protein of first peak

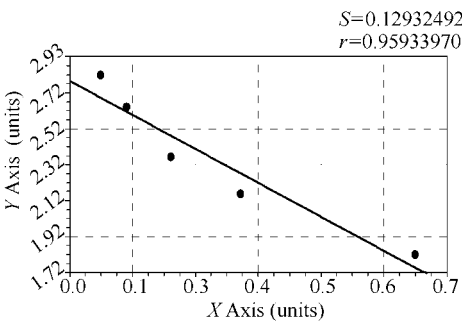


图 12 电泳测定蛋白分子量曲线方程

Fig 12 Equation of molecular weight of standard protein

X: 迁移率; Y: 分子量对数值

X: Rf; Y: lgM

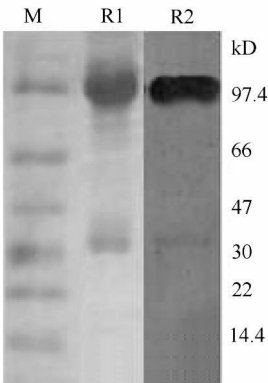


图 13 YP1 亚基组成

Fig 13 The subunits of YP1

M: 标准蛋白; R1: YP1 的亚基电泳图谱; R2: YP1 的免疫印迹图谱

M: Marker; R1: The subunits of YP1; R2: Western blotting of YP1

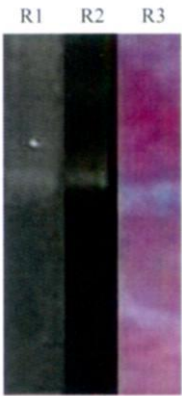


图 14 峰 1 蛋白的特殊染色

Fig 14 Specific stain for YP1

R1: 磷蛋白染色; R2: 糖蛋白染色; R3: 脂蛋白染色

R1: Phosphoprotein Gel stain; R2: Glycoprotein Gel stain; R3: Red oil stain for YP1

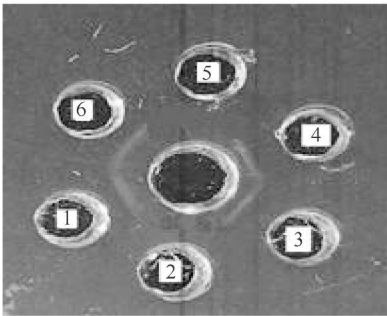


图 15 YP1 免疫扩散反应

Fig. 15 Precipitin reaction of amur sturgeon YP1

1, 4: 施氏鲟雌鱼血清; 2, 5: 雄鱼血清; 3, 6: 纯化 Yg 中央孔: 兔抗 YP1 血清

1, 4: Female serum of amur sturgeon; 2, 5: Male serum of amur sturgeon; 3, 6: Yg Antiserum to sturgeon YP1 (anti-YP1) was poured in the central well

2.4 YP2 的理化性质

洗脱峰 2 蛋白的梯度凝胶电泳 (图 16), 经计算卵黄蛋白峰 2 蛋白的表观分子量为 144kD, 电泳标准方程见 2.3。YP2 是由相对分子量分别为 97.4kD 和 45kD 两个亚基组成的磷脂蛋白 (图 17 图 18)。施氏鲟卵峰 2 蛋白抗血清与雌性血清中该蛋白发生免疫沉淀反应, 而与雄性血清不发生反应 (图 19)。

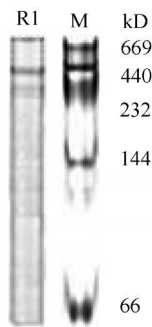


图 16 YP2梯度凝胶电泳

Fig. 16 Results of 5% — 15% gradient native-PAGE of YP2
M: 标准蛋白; R1: 纯化 YP2 蛋白
M: Marker R1 YP2

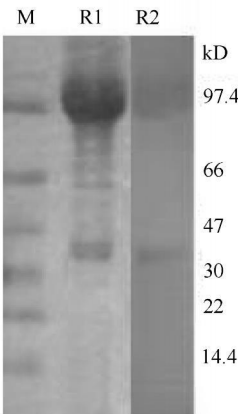


图 17 YP2亚基组成

Fig. 17 The subunits of YP2 of anur sturgeon
M: 标准蛋白; R1 YP2的亚基电泳; R2 YP2亚基的免疫印迹
M: Marker R1 The subunits of YP2 R2 Western blotting of YP2

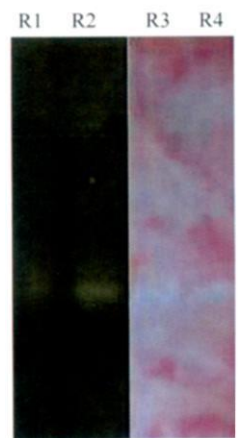


图 18 YP2磷脂蛋白染色

Fig. 18 Phosphoprotein Gel Stain for protein of YP2
R1-R2 YP2的磷蛋白染色; R3-R4: YP2的脂蛋白染色
R1-R2: Phosphoprotein and red oil Gel Stain for YP3; R3-R4: Red oil stain for YP3

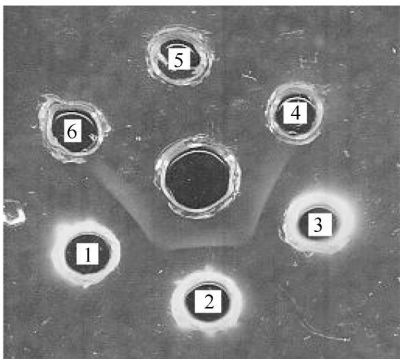


图 19 YP2免疫沉淀反应

Fig. 19 Precipitin reaction of anur sturgeon YP2
1, 3: 施氏鲟雌鱼血清; 2 Vg 4—6 雄鱼血清; 中间孔: 兔抗 YP2血清
1, 3 Female serum of anur sturgeon; 2 Vg 4—6 Male serum of anur sturgeon; Anti-YP2 poured in the central well

2.5 YP3的理化性质

洗脱峰 3 蛋白的梯度凝胶电泳 (图 20), 经计算卵黄蛋白峰 3 蛋白的表观分子量为 66kD, 电泳标准方程见 2.3. YP3 由 30kD 同源亚基组成 (图 21)。蛋白质特殊染色表明该蛋白是一种磷蛋白 (图 22), 与施氏鲟雌血清和纯化 Vg 发生免疫沉淀反应, 与雄性血清不发生反应, 但沉淀线较弱 (图 23)。

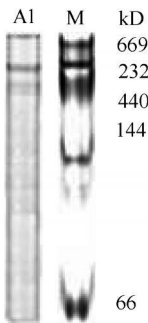


图 20 YP3 梯度凝胶电泳

Fig. 20 Results of 5% — 14% gradient native-PAGE of YP3
M: 标准蛋白; A1 纯化 YP3
M: Marker A1 YP3

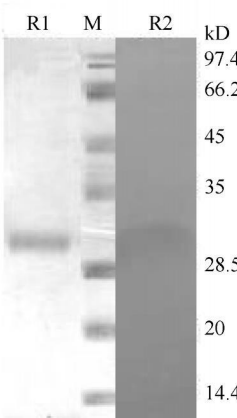


图 21 YP3 蛋白的亚基组成

Fig. 21 The subunits of YP3 of Amur sturgeon
R1: YP3 M: 标准蛋白; R2 YP3 的免疫印迹图谱
R1 YP3; M: Marker R2 Western blots for YP3

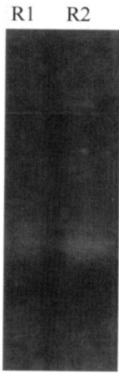


图 22 峰 3 蛋白的特殊染色

Fig. 22 Specific stain for the YP3

R1-R2 YP3 的磷蛋白染色

R1-R2 Phosphoprotein Gel stain for YP3

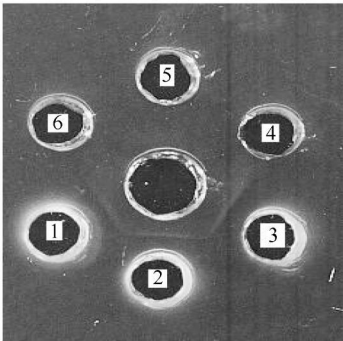


图 23 峰 3 蛋白的免疫沉淀反应

Fig. 23 The immunoprecipitation reaction of the YP3

1, 3: 施氏鲟雌性血清; 2 Yg 4—6 施氏鲟雄性血清; 中间孔: 免抗 YP3 血清

1, 3 Female serum of amur sturgeon 2 Yg 4—6 Male serum of amur sturgeon Anti-YP3 poured in the central well

3 讨论

Vg 最初是 Pan *et al.* 1969 年对雌性昆虫血液淋巴蛋白的特称, 后来这一名称被广泛用于特指雌性动物血浆中卵黄蛋白原, 是一种高分子量的含糖、含磷、含脂的蛋白^[30]。本研究表明, 施氏鲟卵黄发生期雌鱼的血清中只存在一种雌性蛋白 (FSSP) Vg。这与 Hiramastu *et al.* 认为杂交鲟血清中存在两种雌性蛋白, 一种是 Vg 另外一种是对分子量小于 Vg 与 Vg 不同或是 Vg 的降解片段的雌性蛋白的情况不同^[26]。Mastubara Kishida Specker 和 Hara *et al.* 对大菱鲆、罗非鱼和青鳉的血清雌性蛋白的研究过程中也都发现了该小分子量雌性蛋白的存在^[12 13 31], 而银鲫体内则存在两种 Vg^[32]。Vg 纯化

方法的选择与血清 Vg 浓度有关^[25], 与 Hiramastu *et al.* 使用羟基石灰石柱结合 Sephadex G-200 纯化血清 Vg 不同, 本试验所获的卵黄发生时期的血清中 Vg 浓度足以在蒸馏水中形成沉淀, 因此选用蒸馏水与 Sephadex G-200 结合的方法并获得了纯化的 Vg^[26]。

施氏鲟 Vg 的相对分子量 410kD 与美国白鲟的 400kD 相同, 低于杂交鲟和鲑科鱼类 (540—600kD)^[17 23 33 34]。这种分子量的不同可能与选择不同的测定方法有关, 如虹鳟 Vg 的相对分子量就有 600kD^[17]、470kD^[33]、535kD 和 550kD^[34] 等几种不同的报道。Hiramastu *et al.* 认为杂交鲟与白鲟 Vg 的相对分子量的不同与选择方法的不同和种类的不同有关, 而本试验采用 Sephadex G-200 和 Native 梯度凝胶电泳两种方法测定施氏鲟 Vg 的相对分子量均为 410kD, 表明其分子量的变异可能与种类无关。

施氏鲟 Vg 的亚基组成与鱼类 Vg 是以两个相同的 150—200kD 的亚基组成的同源二聚体形式存在形式相同^[3 35], 是由分子量为 205kD 的两个亚基组成, 为同源二聚体。而与金鱼和鳊鱼的 Vg 由 3—4 亚基组成和鲤科鱼类的非同源而具体组成方式不同^[36]。施氏鲟的 Vg 特异性显色显示施氏鲟 Vg 含糖、磷和脂, 这与其他鱼类的相关报道一致^[1—3 35]。

施氏鲟卵黄蛋白经 Sephadex G-200 后有三个洗脱峰, 且该洗脱蛋白的抗血清均与施氏鲟的雌性血清和纯化 Vg 发生免疫沉淀反应, 说明施氏鲟卵中的该三种卵黄蛋白都与其血清 Vg 相关, 这三种卵黄蛋白是包括鱼类在内的卵生脊椎动物血清 Vg 的代谢产物^[1—3]。Vg 分子内 N 端是由 1100 个残基组成脂磷蛋白 iv 部分, 中间是由富含磷酸化的丝氨酸的高磷蛋白部位, C2 段是脂磷蛋白、卵黄磷蛋白和卵黄糖蛋白部位。当入侵到卵母细胞中去后, 被蛋白酶水解为小分子的卵黄蛋白、卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白以及 β 组分或 E 组分 (约 19kD)^[29]。纯化施氏鲟 YP1 与卵黄蛋白原 C2 段的性质相似, 含有磷、脂和糖的特性, 且具有较大的分子量, 与杂交鲟报道的 YP1 为 Lv 不同^[26], 这可能与不同鱼类在第一次蛋白酶水解所产生的蛋白分子有差异有关, 但这种差异在功能上的意义还不清楚^[31]。YP2 为施氏鲟卵黄蛋白的主要成分, 且可以被油红 O 染色的特性与其他鱼类的 Lv 特性较为相似, 含脂丰富^[1—3], 但其分子量略高于鱼类脂磷蛋白 (30—120kD)。Vg 与 Lv 具有相同的抗原性质, 因此可以

用相同的抗血清互相定量检测^[35]。在本试验中, YP2的兔抗血清和羊抗血清(其他已投文章)均与YP2和V_g反应, 这与鲤鱼和冬鲱鱼等鱼类的报道一致^[36, 37]。许多研究表明, L_v就是缺少弱抗原P_v(高磷蛋白)片段的V_g, 因此它们具有相似的免疫学特性^[1, 3, 36, 37]。与其他的鱼类一样, 冬鲱鱼的L_v也具有相当的稳定性^[38], 这可能与雌鱼血清中的V_g存在时间要比L_v存在于卵中时间短有关。因此在免疫学应用上, 使用L_v检测V_g更具有优势^[36]。

与其他硬骨鱼类的P_v相同, 施氏鲟YP3具有较弱的抗原性, 在280nm也具有一定的吸光度^[35], 其分子量也高于对鱼类卵黄高磷蛋白(10—40 kD)。鱼类卵黄蛋白原的一般性质都很相似, 但其脂化、糖基化和磷酸化的程度差异较大, 因此其相应的卵黄蛋白的变化也较大^[29]。在本研究中, 施氏鲟卵黄蛋白尽管在性质上与其他鱼类相似, 但却具有其自己的特点。

在进行Sephadex G-200凝胶层析洗脱的过程中, YP2的洗脱样品为淡黄色, 这可能与卵黄蛋白结合运转类胡萝卜素的生物学功能有关。卵黄根据其来源不同, 可分为内源性卵黄和外源性卵黄两种, 其中外源的卵黄蛋白原通过血液循环进入卵巢, 并运输脂类等营养物质到卵巢中^[39]。红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)的仅在次级卵黄发生期出现的一种雌性特异高密度脂蛋白LP[⊕](认为它可以作为监控生殖过程的标志, V_g), 它在470nm处有吸收峰, 说明含有类胡萝卜素辅基, 可以单独或同LP_{iv}(一种在雌雄个体血淋巴中均有存在的高密度脂蛋白)一起负责将一些主要的脂类和(或)类胡萝卜素运进卵巢^[40], 且类胡萝卜素的存在可以影响卵黄蛋白的颜色^[29, 41]。

参考文献:

- [1] Wallace R A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates [M]. New York: Developmental Biology, 1985, 127—177
- [2] Munro S T P, Walsh P L. Vitellogenesis and oocyte assembly [A]. In: Hoar W S, Randall D J (Eds.), Fish Physiology vol XIA [M]. New York: Academic Press, 1988, 347—406
- [3] Specker J L, Sullivan C V. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives [A]. In: Perspectives in Comparative Endocrinology [M]. National Research Council, 1994, 304—315
- [4] Bengink E W, Wallace R A. Precursor product relationship between amphibian vitellogenin and the yolk proteins lipovitellin and phosvitin [J]. *J Biol Chem*, 1974, **249**: 2897—2903
- [5] Christian J L, Grayson M J. Comparative study of hen yolk phosvitin and plasma vitellogenin [J]. *Biochemistry*, 1977, **16**: 3250—3256
- [6] Yamamura J, Adachi T, Aoki N, et al. Precursor-product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: the 40 kD yolk plasma glycoprotein is derived from the C-terminal cysteine-rich domain of vitellogenin II [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1995, **1244**: 384—394
- [7] Tyler C R, Sumpter J P, Brumage N R. In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout *Salmo gairdneri* [J]. *J Exp Zool*, 1988, **246**: 171—179
- [8] Nagler J J, Idler D R. Comparison of tritiated vitellogenins prepared by *in vivo* and *in vitro* techniques for studies of ovarian uptake in fish [J]. *J Exp Zool*, 1992, **264**: 107—112
- [9] Kishida M, Anderson T R, Specker J L. Induction by β -estradiol of vitellogenin in Striped bass (*Morone saxatilis*): Characterization and quantification in plasma and mucus [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1992, **88**: 29—39
- [10] Tao Y, Hara A, Hodson R G, et al. Purification, characterization and immunoassay of Striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1993, **12**: 31—46
- [11] Camevali O, Mosconi G, Roncarati A, et al. Romano M and Limatola E. Changes in the electrophoretic pattern of yolk proteins during vitellogenesis in the gilthead sea bream *Sparus aurata* L. [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1992, **103B**: 955—962
- [12] Kishida M, Specker J L. Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): induction of two forms by estradiol; quantification in the plasma and characterization in oocyte extract [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1993, **12**: 171—182
- [13] Hara A, Sullivan C V, Dickhoff W W. Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. *Zool Sci*, 1993, **10**: 245—256
- [14] Shigenaga H T and Haschemeyer A E V. Purification of egg yolk proteins from the Antarctic fish *Chaenoccephalus aceratus* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1984, **80B**: 935—939
- [15] Hara A, Matsubara T, Sancyashi M, et al. Vitellogenin and its derivatives in egg yolk proteins of white-spotted char (*Salvelinus leucomaenis*) [J]. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ*, 1984, **35**: 144—153
- [16] Hara A. Studies on female specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts: Immunochemical, physicochemical and structural studies [J]. *Mem Fac Fish Hokkaido Univ*, 1987, **34**: 1—59
- [17] Hara A, Hirai H. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1978, **48B**: 389—399
- [18] Markert J R, Vanstone W E. Egg proteins of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Chromatographic separation and molecular weight of the major protein in the high density fraction and their presence in Salmon plasma [J]. *J Fish Res Board Can*, 1971, **28**: 1853—1856

- [19] Jared D W, Wallace R A. Comparative chromatography of the yolk proteins of teleosts [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1968, **24**: 437—443
- [20] Campbell C M, Idler D R. Characterization of an estradiol induced proteins from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological crossreactivity to ovarian yolk fractions [J]. *Biol Report*, 1980, **22**: 605—618
- [21] Qu Q Z, Sun D J, Ma G J, *et al*. Artificial reproduction of cultured *Acipenser schrenckii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9**(3): 277—279 [曲秋芝, 孙大江, 马国军, 等. 施氏鲟全人工繁殖研究初报道. 中国水产科学, 2002, **9**(3): 277—279]
- [22] Sun D J, Qu Q Z, Wang B Q, *et al*. Relationships between gonad development and sex steroids level at different age of *Acipenser schrenckii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, **11**(4): 307—312 [孙大江, 曲秋芝, 王丙乾, 等. 施氏鲟不同年龄性腺发育与性类固醇激素浓度关系. 中国水产科学, 2004, **11**(4): 307—312]
- [23] Bidwell C A, Kroll K J, Severud E, *et al*. Identification and preliminary characterization of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) vitellogenin mRNA [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, **83**(3): 415—424
- [24] Bidwell C A, Carlson D M. Characterization of vitellogenin from white sturgeon *Acipenser transmontanus* [J]. *Mol Evol*, 1995, **41**(1): 104—112
- [25] Fujii K, Hirose K, Hara A, *et al*. Use of vitellogenin level as a maturational indicator for artificial spawning of cultured hybrid sturgeon *Huso huso* × *Acipenser luteus* [A]. In: Williot P (Eds.), *Acipenser Anatomy Cedex* [M]. France: Cemagref Publishing, 1991, 381—388
- [26] Naoshi H, Kaori H, Kaori H, *et al*. Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, **131**(A): 429—441
- [27] 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]
- [28] Mang K Q, Xu N Z, Fang R X. Polyacrylamide gel electrophoresis [M]. Beijing: Science Press, 1975, 58—59 [莽克强, 徐乃正, 方荣祥. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975, 58—59]
- [29] Zhang S C, Sun X T, Li H Y. Review on vitellogenin [J]. *Marine Sciences*, 2002, **26**(7): 32—35 [张士瑾, 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]
- [30] Pan M L, Bell W J, Telfer W H. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body [J]. *Science N Y*, 1969, **165**: 393—394
- [31] Matsubara T, Adachi S, Yamachi *et al*. Changes of lipovitellin during in vitro oocytematuration in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fish Sci*, 1995, **61**: 478—481
- [32] Hu D, Gui J F. Induction, purification and characterization of vitellogenin (vg) from silver crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(2): 109—115 [胡东, 桂建芳. 银鲫卵黄原的诱导、分离纯化及其生化鉴定. 水生生物学报, 2002, **26**(2): 109—115]
- [33] Campbell C M, Idler D R. Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological crossreactivity to ovarian yolk fractions [J]. *Biol Report*, 1980, **22**: 605—618
- [34] Maitre J L, Guellec C L, Derrien S, *et al*. Measurement of vitellogenin from rainbow trout by rocket immunoelectrophoresis application to the kinetic analysis of estrogen stimulation in the male [J]. *Can J Biochem Cell Biol*, 1985, **63**: 982—987
- [35] Shimizu M, Fujiwara Y, Fukada H, *et al*. Purification and identification of a second form of vitellogenin from ascites of medaka (*Oryzias latipes*) treated with estrogen [J]. *J Exp Zool*, 2002, **293**(7): 726—735
- [36] Liang Y, Xu Y, Yang F X, *et al*. Induction, purification and electrophoretic comparison of vitellogenin from two cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*) and Wuchangfish (*Megalobrama amblycephala yih*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(4): 317—321 [梁勇, 徐盈, 杨方星, 等. 鲤和团头鲂幼鱼卵黄蛋白原的诱导、纯化及电泳比较. 水生生物学报, 2002, **26**(4): 317—321]
- [37] Bhakta M, Nath P. Isolation and identification of yolk proteins in Indian major carp, *Labeo rohita* [J]. *Journal of Biosciences*, 1996, **21**(5): 711—722
- [38] Hartling R C, Pereira J J, Kunkel J G. Characterization of a heat-stable fraction of lipovitellin and development of an immunoassay for vitellogenin and yolk protein in winter flounder (*Paralichthys americanus*) [J]. *The Journal of Experimental Zoology*, 1997, **278**(3): 156—166
- [39] Du N S, Lai W, Chen P C, *et al*. Studies on vitellogenesis of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Zool Sin*, 1999, **45**(1): 88—92 [堵南山, 赖伟, 陈鹏程, 等. 中华绒螯蟹卵黄形成的研究. 动物学报, 1999, **45**(1): 88—92]
- [40] Yehzekiel G, Chayoth R, Abdu U, *et al*. High density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2000, **127**: 411—421
- [41] Sun H F, Wang L, Qu Y B. Advances in the study of vitellin of crustacea [J]. *Journal of Shanxi University*, 2000, **23**(4): 369—372 [孙海峰, 王兰, 曲运波. 甲壳动物卵黄磷蛋白研究进展. 山西大学学报 (自然科学版), 2000, **23**(4): 369—372]

VITELLOGENIN-DERIVED YOLK PROTEINS OF AMUR STURGEON, (*ACIPENSER SCHRENCKII*): PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

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

(Heilongjiang Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070)

Abstract Sturgeon is an ancient family (Acipenseridae) of fishes close to the divergence fish that eventually evolved into terrestrial animals and those which evolved into modern teleost species. Amur sturgeon vitellogenin (Vg) and its corresponding yolk protein (YP) products, YP1, YP2 and YP3 were isolated from serum of female at vitellogenesis and eggs from ovulated amur sturgeon, respectively. Amur sturgeon Vg was purified from female serum by a combination of precipitation in DW and gel filtration on sephadex G-200. Vg was confirmed to be a lipoglycophosphoprotein by staining with Red oil, Molecular Probes' Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein Gel stain and Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain, which had an apparent molecular mass of 410 kD and appeared as one major band corresponding to 205 kD after native-PAGE and SDS-PAGE, and confirmed by western blotting. Three yolk proteins derived from vitellogenin (YP1, YP2 and YP3). Apparent molecular weights of YP1, YP2 and YP3 were 370 kD, 144 kD and 66 kD, respectively. After SDS-PAGE, YP1 appeared as two bands of 97 kD and 33 kD, while YP2 were resolved as two bands of 94 kD and 45 kD under reducing conditions. The characters of Yolk protein 1 is similar to amur sturgeon Vg, it is a lipoglycophosphoprotein that can be stained by Red oil, Molecular Probes' Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein Gel stain and Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain, while Yolk protein 2 was confirmed to be a phospholipoprotein. Yolk protein 3 appeared as one band of 30 kD, and it could be stained only by Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain. Antiserum to YP2 and YP3 cross reacted with vitellogenin suggested that YP2 and YP3 were the cleaved products of vitellogenin, while the characters of purified yolk protein indicated that YP2 and YP3 were anur sturgeon Lipovitellin and Phosvitin like, respectively. There are eight subunits of vitellin of anur sturgeon appeared in reduced SDS-PAGE, as four subunits in unreduced SDS-PAGE. The results of double immunodiffusion using anti-Vg showed that amur sturgeon Vg was composed of YP1 and YP2, and YP3 had less antigenicity against anti-Vg.

Key words *Acipenser schrenckii*; Vitellogenin; Lipovitellin; Phosvitin