

团头鲂卵壳蛋白的分离与纯化

黎 雯 徐 盈

(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:报道了一种从团头鲂卵壳中提取卵壳蛋白的有效方法。该提取液经 SDS-PAGE 电泳鉴定后, 证明有三条主要的蛋白带, 其分子量分别为 64kDa, 56kDa 和 52kDa, 借助于制备型 SDS-PAGE 电泳和电洗脱分离纯化技术, 获得了三种高纯度的卵壳蛋白。

关键词: 团头鲂; 卵壳蛋白; 提取; 电洗脱; 纯化

中图分类号: Q176 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3207(2003)02-0132-004

环境激素因能模仿自然荷尔蒙的作用干扰人类和野生生物正常的内分泌代谢而受到国际上日益关注。环境雌激素的种类很多, 包括有机氯杀虫剂如 PCB, 表面活性剂, 增塑剂, 及一些天然植物雌激素等^[1]。诱导蛋白的转录和翻译是生物体对雌激素的刺激产生的最直接的反应之一。在这些反应中, 研究较多的是在雄性脊椎动物中对卵黄蛋白原 (Vitellogenin, 简称 Vtg) 的诱导^[2]。雄鱼和幼鱼体内卵黄蛋白原的水平变化已被认为是指示环境中类雌激素存在的一种极为灵敏和专一的生物标志物^[3,4]。近年来的国外最新研究表明, 用另一种具有雌性化标志的蛋白——卵壳蛋白 (Eggshell zona radiata protein, 简称 Zrp) 作为评价环境类雌激素暴露生物标志物比卵黄蛋白原更灵敏, 因而也是目前国际上研究的前沿和热点^[5-7]。

像卵黄蛋白原一样, 卵壳蛋白也是雌鱼在性成熟期受分泌的雌激素刺激, 在肝脏诱导合成的^[8]。通过血液循环系统, 运输到卵巢构建卵壳, 卵壳不仅可以阻止多精受精, 而且还可保护胚胎的发育使其免受外来损伤。尽管国际上已从鳙鱼和鳊鱼中分离纯化得到了卵壳蛋白^[9,10], 并以此建立了一些环境雌激素的检测方法, 而我国在这一方面还是空白。本研究将蛋白提取分离技术与电洗脱技术相结合, 分离纯化了团头鲂 (*Megalobrama amblycephala* Yih) 卵壳中的蛋白组分, 获得了三种高纯度的卵壳蛋白, 为下一步在我国建立环境雌激素的免疫检测方法或试片奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 发育成熟的雌性团头鲂购于武汉牛山湖渔场, 重量为 500g 左右。成熟的雌性团头鲂卵巢饱满, 呈乳白色。鱼卵取出后迅速放入冰冷的缓冲液 A (100mmol/L EDTA 和 500mmol/L NaCl, pH= 8.5) 中, 以防卵壳硬化^[9]。

1.2 仪器及试剂 美国 Bio-Rad Mini Protean III 电泳仪; 美国 Bio-Rad 422 型垂直电洗脱仪; 日本 HITACHI CF-15R 高速冷冻离心机; 美国惠普公司 HP8453 分光光度计。

1.3 卵壳的制备 所有操作在 4℃ 下进行。采用较松的玻璃匀浆器对缓冲液 A 中的鱼卵进行轻轻挤压匀浆使卵细胞中的卵黄自卵壳逸出。将匀浆后的卵壳置于 500mmol/L 的 NaCl 溶液中润洗 24h, 洗净卵壳中残留的内容物, 其间更换盐溶液 5 次且每次超声 6s。然后将用盐洗净的卵壳置于去离子水中润洗 5h, 洗去卵壳上的盐分, 其间更换去离子水 5 次。洗净后的卵壳经冷冻干燥后于室温密封保存。

1.4 卵壳蛋白的提取 称取冷冻干燥后的卵壳 1—2mg, 加入 1mL Tris 缓冲提取液 B (Tris-HCl 100mmol/L, pH= 8.8, 8mol/L 尿素, 2% SDS, 300mmol/L 2-巯基乙醇和 10mmol/L EDTA), 于 70℃ 水浴加热 20min, 然后于室温下超声溶解 30s, 获得卵壳蛋白的粗提液。

1.5 卵壳蛋白的鉴定 分别取卵壳蛋白的提取液和鱼卵匀浆后的上清液进行不连续聚丙烯酰胺凝胶

收稿日期: 2002-08-27; 修订日期: 2002-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 20177032); 武汉市晨光计划项目 (No. 995004096G); 国家 863 项目 (No. 2001AA640601) 资助

作者简介: 黎 雯 (1966—), 女, 湖北省洪湖市人; 副研究员; 主要从事持久性有机污染物的生态毒理学研究

通讯作者: 徐 盈, E-mail: xuying@ihb.ac.cn

垂直板电泳(SDS-PAGE),电泳的浓缩胶和分离胶的凝胶浓度分别为4%和9%,样品在电泳前,都进行了适当的稀释,以获得最佳电泳结果。

1.6 电泳洗脱纯化卵壳蛋白 按1.5方法电泳分离卵壳蛋白,选用厚胶,增加提取液的浓度进行制备型SDS-PAGE垂直平板电泳,泳毕取下凝胶,用冰冷的KCl溶液浸泡后,切下含欲回收蛋白的凝胶条,切碎装入电洗脱槽的玻璃管中进行洗脱3—5h,回收透析膜中的液体,用丙酮沉淀法制备纯化蛋白并用SDS-PAGE对纯化结果进行鉴定。

2 结果

2.1 卵壳蛋白的鉴定

卵壳蛋白的提取液经SDS-PAGE电泳后,电泳图谱见图1。从电泳图谱1上可见在95KDa以上除了呈现出较深的黑色背景外,没有明显的蛋白条带。而在电泳图谱上45KDa至66KDa之间,有三条明显的蛋白带。根据其迁移率值,计算其分子量分别为64,56和52KDa。

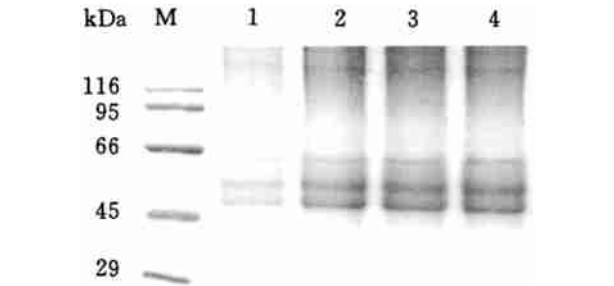


图1 卵壳蛋白提取液的SDS-PAGE电泳图谱
M. 分子量标准; 1. 2. 3. 4. 不同稀释倍数的卵壳蛋白提取液
Fig.1 SDS-PAGE pattern of Zp extractions from Bluntnose black bream
M. Molecular marker; 1. 2. 3. 4. Zp extractions with different dilution

图2为鱼卵匀浆上清液和卵壳蛋白提取液的SDS-PAGE电泳比较图谱。从电泳图谱2上发现鱼卵匀浆液主要有三条明显的蛋白条带,其分子量均在66KDa以上,而且这三条蛋白带在卵壳蛋白提取液中是不存在的。而卵壳蛋白提取液中的三条主要蛋白带在鱼卵匀浆液中也未出现,进一步确认了这三条带来自卵壳。

2.2 电泳洗脱纯化卵壳蛋白

卵壳蛋白提取液经制备型SDS-PAGE电泳分离后,分别切下上述三条卵壳蛋白带,放入电洗脱槽中进行电洗脱,将洗脱液进行光谱扫描,在280nm处有吸收峰,证明有蛋白存在,再将洗脱液经浓缩后进行SDS-PAGE检测,检测结果见图3。A,B和C分别为

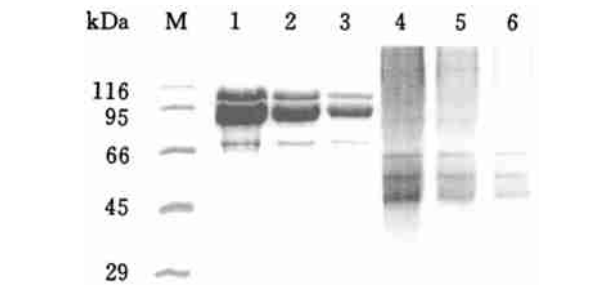


图2 鱼卵匀浆上清液和卵壳蛋白提取液的SDS-PAGE电泳图谱
M. 分子量标准; 1. 2. 3. 不同稀释倍数的匀浆液;
4. 5. 6. 不同稀释倍数的卵壳蛋白提取液

Fig. 2 SDS-PAGE pattern of egg homogenization supernatant and Zrp extractions from Bluntnose black bream
M. Molecular marker; 1. 2. 3. Egg homogenization supematant with different dilution; 4. 5. 6. Zrp extractions with different dilution

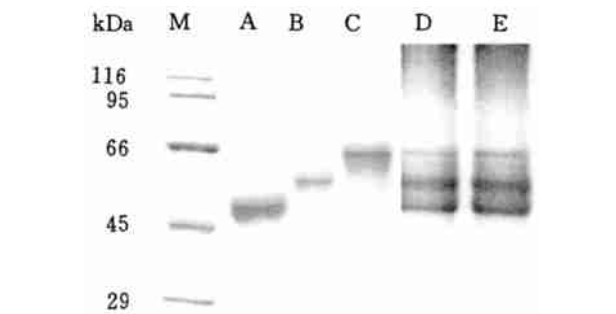


图3 电洗脱后卵壳蛋白各组分的SDS-PAGE电泳图谱
A. B. C. 电洗脱蛋白组分; D. E. 卵壳蛋白提取液
Fig. 3 SDS-PAGE pattern of purified Zrps with electrophoretic elution
M. Molecular marker; A. B. C. Purified Zrps; D. E. Zrp extractions

纯化后的卵壳蛋白,D,E为卵壳蛋白提取液。从电泳图谱上可见,三条纯化后的卵壳蛋白分别对应于卵壳蛋白提取液中的三条主要蛋白,证明回收到了高纯度的卵壳蛋白。

3 讨论

由于鱼类卵壳蛋白在普通缓冲液中的溶解度很低,因而卵壳可溶性蛋白的获得成为对其生化分析的关键。文献报道的溶解卵壳的方法因不同的鱼种而不同^[11,12]。本实验在得到纯净、完整的卵壳后,经过多次尝试确定了采用去垢剂与还原剂结合的方法处理才获得了卵壳的可溶性蛋白粗提液。该粗提液清澈、透明,表明卵壳蛋白得到了完全溶解。

从得到的卵壳可溶性蛋白SDS-PAGE电泳图谱(图1)上,发现在95KDa以上部分除了呈现出较深的黑色背景外,没有明显的蛋白条带。这可能是因为团头鲂鱼卵粘性较大,这些粘性物质与卵壳蛋白均溶解于卵壳蛋白的粗提液中,故在电泳图谱上方出现较深的背底。而在电泳图谱上45KDa至66KDa

之间,有三条明显的蛋白带,其分子量分别为: 64, 56 和 52KDa。为了进一步确认这三种蛋白来自卵壳,同时对鱼卵上清液和卵壳提取液进行了电泳分离,获得了电泳图谱 2。发现卵壳提取液中的三条主要蛋白带在鱼卵匀浆液中并不存在,反之亦然。这一结果不仅证明了团头鲂卵壳中存在三条主要的卵壳蛋白,同时也证明了在卵壳制备过程中采用的轻微匀浆和盐洗脱方法是十分理想的。既保存了卵壳的完整性,又达到了使卵壳与其内容物完全分离的目的。这一步对随后的卵壳蛋白的鉴定、分离纯化极为关键。

从文献报道看,不同的鱼种卵壳蛋白的组分也不同,有两条蛋白带的,有三条蛋白带的,有的甚至更多^[9, 10, 12-14]。不同鱼种卵壳蛋白的分子量也不同,但大多数鱼种的卵壳蛋白分子量分布在 50 至 80KDa 之间。可见本研究所鉴定的卵壳蛋白与国外文献的报道是一致的。

由于本研究采用了去垢剂和还原剂相结合的方法来溶解卵壳,因而利用常规的层析方法很难分离纯化卵壳蛋白组分。将制备型 SDS-PAGE 分离术与电洗脱技术相结合来进行蛋白质的分离纯化,获得了高纯度的卵壳蛋白(图 3),为下一步在我国建立环境雌激素的免疫检测方法或试片奠定了基础。

参考文献:

- [1] McLachlan J A. Estrogens in the environment II [M]. New York: Elsevier, 1985
- [2] Lang Y, Xu Y, Yang F X. et al. Induction, purification and electrophoretic comparison of vitellogenin from two cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*) and wuchang fish (*Megalobrama amblycephala*) [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]
- [3] Palmer B D, Palmer S K. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red eared turtle and African clawed Frog [J]. *Environ. Health Perspect*, 1995, **103**(Suppl. 4): 19—25
- [4] Sumpter J P, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contaminants of the aquatic environment [J]. *Environ. Health Perspect*, 1995, **103**(Suppl. 7): 173—178
- [5] Anukwe A, Knudsen F R, Goksøyr A. Fish zona radiata (Eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens [J]. *Environ. Health Perspect*, 1997, **105**: 418—422
- [6] Anukwe A, Celius T, Walther B T, et al. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, **49**: 159—170
- [7] Anukwe A, Celius T, Walther B T, et al. Plasma levels of vitellogenin and eggshell zona radiata proteins in 4-nonyphenol and o,p'-DDT treated juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Environ. Res*, 1998, **46**(1—5): 133—136
- [8] Oppert Bentsen D O, Olsen S O, Rong C J et al. Plasma levels of eggshell zone proteins, estradiol-17 β , and gonadotropins during an annual reproductive cycle of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *J. Experimental Zoology*, 1994, **268**: 59—70
- [9] Oppert Bentsen D O, Grann Jensen Z, Walther B T. Zona radiata proteins are synthesized by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes in response to oestradiol-17 β [J]. *J. Endocrinology*, 1992, **135**: 293—302
- [10] Hyllner S T, Oppert Bentsen D O, Helvik J V, et al. Oestradiol-17 β induces the major vitelline envelope proteins in both sexes in teleosts [J]. *J. Endocrinology*, 1991, **131**: 229—236
- [11] Hierten S, Wu B L. Studies of the fish zona pellucida by high performance ionexchange chromatograph on agarose columns and free zone electrophoresis [J]. *J. Chromatogr*, 1985, **341**: 295—304
- [12] Yang S T, Gui J F. Comparative analysis on the protein composition of egg chorions between gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp and the changes during fertilization [J]. *Hereditas*, 2000, **22**(4): 221—224 [杨书婷, 桂建芳. 雌核发育银鲫与两性生殖彩鲫卵壳蛋白组分的比较分析及其受精前后的变化. 遗传, 2000, **22**(4): 221—224]
- [13] Cotelli F, Andronico F, Brivio M, et al. Structure and Composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus*) [J]. *J. Ultrastructure and Molecular Structure Research*, 1988, **99**: 70—78
- [14] Oppert Bentsen D O, Melvik J V, Walther B T. The major structural proteins of cod (*Gadus morhua*) eggshells and protein crosslinking during teleost egg hardening [J]. *Developmental Biology*, 1990, **137**: 258—265

EXTRACTION AND PURIFICATION OF ZONA RADIATA PROTEINS (ZRPS) FROM
BLUNTNOSE BLACK BREAM (*MEGALOBrama AMBLYCEPHALA* YIH)

LI Wen and XU Ying

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

Abstract: This study deals with an effective procedure for extraction and purification of zona radiata proteins (Zrps) from eggshells of Bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). To avoid harding resulting from parthenogenic activation, unfertilized eggs were immediately immersed in a large volume of ice cold buffer A. After homogenization and washing, the eggshells were frozen dry and solubilized in buffer B. The SDS-PAGE electrophoretic migration pattern shows the solubilized Zrps consiste mainly of three protein bands with the apparent molecular weight of 64KDa, 56KDa and 52KDa. To purify these three Zrps, the solubilized eggshell proteins were subjected to preparative SDS-PAGE. The protein bands were visualized using an ice cold KCl solution. The opaque bands were excised from the gel and extracted using extraction buffer with electro elution. SDS-PAGE pattern of purified Zrps shows highly purified Zrps were acquired and sufficient for further studies with immunoassay.

Key words: Bluntnose black bream; Zona radiata proteins; Extraction; Electro elution; Purification