

真鲷卵黄蛋白原的诱导、纯化及初步鉴定

吴翠琴², 袁东星^{1, 2*}, 林庆梅²

(1. 近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 2 厦门大学环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用腹腔注射 17 β 雌二醇(E₂), 使真鲷雌鱼在一星期内产生大量卵黄蛋白原(Vtg); 利用阴离子交换高效液相色谱系统分离纯化 E₂ 诱导后的 Vtg. Native PAGE 电泳结果表明, 真鲷有两种形式的 Vtg, 分子量分别为 570 kDa 和 360 kDa; SDS PAGE 电泳结果表明, 它们由两个不同的亚基构成, 分子量分别为 180 kDa 和 115 kDa; 磷、脂、糖蛋白分析证实, 所获取的 Vtg 是一类含磷、脂、糖的大分子蛋白. 同时考察了 4 壬基酚(4 NP)对真鲷 Vtg 的诱导作用.

关键词: 卵黄蛋白原; 真鲷; 17 β 雌二醇; 4 壬基酚

中图分类号: Q 513

文献标识码: A

文章编号: 0438 0479(2005)05 0688 05

卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vtg)是雌性特异性蛋白. 硬骨鱼类的 Vtg 受到雌激素的调控, 在肝脏中合成, 经血液运输到卵巢, 经过修饰后, 成为鱼卵生长发育的营养物质——卵黄蛋白. 一般情况下, 雌鱼在卵黄生成期可产生大量 Vtg, 但在雌鱼的其它生长期间, 鱼体内 Vtg 的含量很低. 研究人员利用雌激素或人工雌激素诱导雌鱼产生大量 Vtg, 以获得 Vtg 标样^[1, 2]. 雄鱼也有 Vtg 基因^[3~5], 但其内源性雌激素水平低, 血清中 Vtg 的量很少. 当雄鱼暴露于外源雌激素或雌激素类似物时, 血清中 Vtg 水平将显著提高. 目前, 国际上有关 Vtg 研究的报道很多, 但研究对象多为淡水鱼类, 海洋鱼类较少^[6], 关于真鲷的报道甚少. 真鲷是一种鲈形目鲷科的海鱼, 主要分布于北太平洋西部, 由于它肉质鲜美, 经济价值高, 在我国沿海除了自然生长外, 还有大量的人工养殖.

壬基酚聚氧乙烯醚是使用最广泛的非离子表面活性剂之一, 经生物代谢后生成壬基酚. 壬基酚的毒性比壬基酚聚氧乙烯醚的大, 对内分泌有干扰作用即产生雌激素效应.

本研究采用 E₂ 诱导真鲷雌鱼, 使其在非排卵期产生大量 Vtg, 以阴离子交换树脂分离纯化诱导产物, 并对其进行较系统的鉴定, 证明所获得的纯化蛋白即为真鲷的卵黄蛋白原. 同时考察 4 NP 对真鲷 Vtg 的诱导作用.

1 材料与方法

收稿日期: 2004 07 09

基金项目: 国家自然科学基金(20277030)资助

作者简介: 吴翠琴(1977-), 女, 博士研究生.

* 通讯作者: yuandx@jnxian.xmu.edu.cn

1.1 实验动物

4~5 月份的雌性真鲷(*Pagrosomus major*) 12 尾(4 尾对照, 4 尾 E₂ 诱导, 4 尾 4 NP 诱导), 雄性真鲷 8 尾(4 尾对照, 4 尾诱导), 平均体质量为 1.25 kg, 饲养在厦门同安刘五店的网箱中, 每天投放饵料.

1.2 仪器和试剂

德国 Eppendorf 5804 R 冷冻离心机; 美国 Waters 公司高效液相色谱系统, 包括 510 恒流泵、梯度控制仪、484 可变波长检测器; 瑞典 Pharmacia 公司 Hoferminive 电泳仪; 英国 Syngene 公司全自动凝胶成像分析系统. 17 β 雌二醇(美国 Fluka 公司); 4 壬基酚(美国 Acros 公司); 肝素钠(上海伯奥生物科技有限公司); 苯甲磺酰氟(PMSF)(进口分装, 上海源聚生物科技有限公司); 电泳试剂(均为进口分装, 北京华美公司); 高分子量蛋白质标准(66 669 kDa)、阴离子交换树脂 DEAE Sepharose Fast Flow(瑞典 Pharmacia 公司); 罗丹明 B(进口分装, 上海维思化学有限公司); 苏丹黑 B(进口分装, 上海维编科贸有限公司); 其它普通试剂为国产生化或分析纯试剂.

1.3 卵黄蛋白原的诱导

按 1.9 mg/kg 体质量的剂量, 把溶解在 1:1 的无水乙醇和生理盐水中的 E₂ 注射入雌鱼腹腔, 对照组只注射同样体积的无水乙醇和生理盐水, 诱导 7 d 后, 用经 1 250 U/mL 肝素钠润洗后的一次性注射器从鱼的尾静脉取血, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入酶抑制剂 PMSF 和 EDTA, 使其最终浓度均为 1 mmol/L. 血液在 4℃ 静置 2 h 后, 4℃ 2 000 r/min 下离心 10 min; 取上清, 分装, -80℃ 保存.

1.4 卵黄蛋白原的 Mg²⁺-EDTA 沉淀纯化^[7]

取 E₂ 诱导后的雌鱼血浆 2 mL, 加入 8 mL pH 为

7.7的20 mmol/L EDTA 和 0.4 mL 0.5 mol/L 的 MgCl₂ 溶液,即产生白色沉淀.在 4℃ 5 000 r/min 下离心 15 min,倾去上清液,加入 0.6 mL 1.0 mol/L NaCl 溶液溶解沉淀,再加入 20 mL 反渗透水重新沉淀,离心.沉淀溶解在 2 mL 1.0 mol/L 的 NaCl 溶液中,待进一步提纯和电泳分析.

1.5 卵黄蛋白原的色谱分离纯化

为防止蛋白的降解,系统运行时将色谱柱浸入冰水混合液中.将阴离子交换树脂 DEAE Sepharose Fast Flow 按使用说明自行装柱(30 cm×1 cm),接入液相色谱系统.样品溶液和流动相都用 0.45 μm 滤膜过滤.流动相 A 为 Tris HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH8.0),流动相 B 为含 1 mol/L NaCl 的 Tris HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH8.0),流速为 2 mL/min.检测器波长 280 nm.梯度洗提程序为流动相 A 保持 1 min,9 min 内流动相 B 从 0% 线性增加到 10%;10 至 65 min,流动相 B 从 10% 增加到 30%.按谱峰分别接收流出液,储存在 -20℃.

1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

以 7% 常规聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native PAGE)和 7% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE)检验所得蛋白的纯度并测定纯化蛋白的分子量.电泳分析前宜将样品适当稀释.采用非连续系统,浓缩胶的浓度分别为 4% 和 3%.凝胶用考马斯亮蓝 G 250 染色,脱色后用全自动凝胶成像分析系统拍照.

1.7 磷蛋白分析⁸⁾

纯化蛋白经 7% Native PAGE 电泳后,用钼酸铵和罗丹明 B 染色,在 1 mol/L 盐酸中脱色.

1.8 脂蛋白分析

纯化蛋白经 7% Native PAGE 电泳后,用苏丹黑 B 饱和的 60% 乙醇水溶液染色,在 50% 乙醇溶液中脱色.

1.9 糖蛋白分析

纯化蛋白经 7% Native PAGE 电泳后,加入过碘酸溶液室温下在摇床上缓慢振荡过夜,次日换用冰醋酸($\phi = 10\%$ CH₃COOH)三氯乙酸($\rho = 1\%$ CCl₃COOH)水溶液漂洗 8 h,期间更换漂洗液 3 次.漂洗后的凝胶用 Schiff 试剂在暗处染色 16 h.染色后的凝胶保存在 5% 冰醋酸溶液中,待拍照.

2 结果与讨论

2.1 血浆蛋白的色谱分离

雌鱼对照、雄鱼对照和 E₂ 诱导雌鱼的血浆的色谱图,示于图 1.

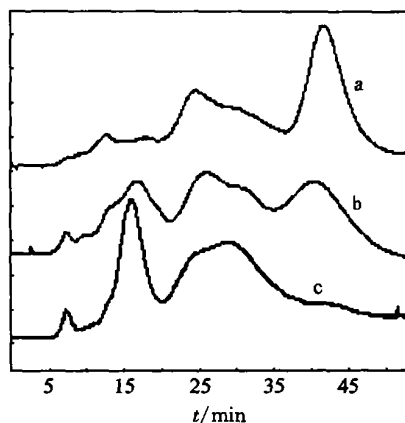


图 1 真鲷血浆蛋白的色谱图

a: E₂ 诱导后的雌鱼血浆; b: 雌鱼对照血浆; c: 雄鱼对照血浆

Fig. 1 HPLC chromatograms of protein in plasma of *Pagrosomus major*

从图中色谱图各峰的相对比例可以看出,在保留时间 15 min 前,雄鱼对照血浆的色谱峰很明显,而雌鱼对照血浆次之, E₂ 诱导后的雌鱼血浆最弱.在保留时间 37~45 min, E₂ 诱导后的雌鱼血浆有一个非常明显的色谱峰,雌鱼对照血浆的次之,而对于雄鱼对照血浆则几乎看不到此峰.由此说明,此色谱峰对应的蛋白为雌性特异性蛋白,它只存在于成熟的雌鱼血浆中,而在雄鱼血浆中不存在,能够被雌激素 E₂ 诱导产生.因此初步认为此色谱峰对应 Vtg. 接收该组分作为纯化的 Vtg, 并进行后续的进一步分析验证.

2.2 电泳分析

图 2 是真鲷血浆和经不同方法纯化的 Vtg 的 Native PAGE 电泳图.

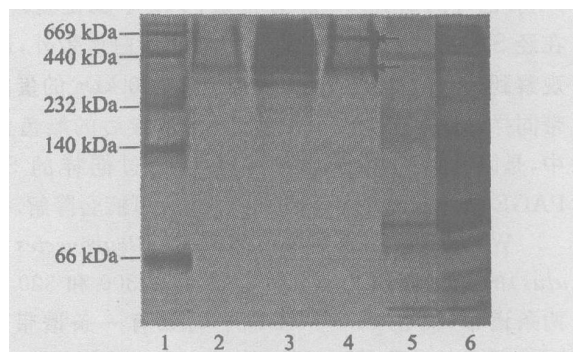


图 2 真鲷血浆和纯化的 Vtg 的 Native PAGE 电泳图

1: 蛋白分子量标准; 2: 经 Mg²⁺ EDTA 沉淀及色谱分离; 3: 只经 Mg²⁺ EDTA 沉淀; 4: 只经色谱分离; 5: 雄鱼对照血浆; 6: 雌鱼对照血浆; 箭头所指为 Vtg

Fig. 2 Native PAGE of plasma and purified Vtg from *Pagrosomus major*

从图2可以清楚地看出,经色谱纯化的 E_2 诱导的蛋白含有两条谱带(4),在雌鱼对照血浆的同一位置也出现了这两条蛋白带(6),而雄鱼对照血浆中未见(5),说明它们是雌性特异性蛋白.根据蛋白分子量与其相对迁移率之间的关系,得出它们的分子量分别为570 kDa左右和360 kDa左右. Nobuyuki等^[9]曾对日本刺鰕虎鱼(*Acanthogobius flavimanus*)的Vtg进行研究,发现血浆中有两种形式的Vtg, Vtg 530 kDa和Vtg 320 kDa. William等^[10]报道英国鳎鱼(*Pleuronectes vetulus*)的Vtg在Native PAGE中呈现300和320 kDa两条谱带.由此可见,570 kDa和360 kDa的两条谱带可能是真鲷血浆中的两种形式的Vtg. Shigeki等^[11]发现真鲷血浆中的Vtg在分辨率较高的POROS HQ柱上呈现两个未完全分离的色谱峰,证明真鲷可能有两种形式的Vtg. Matsubara等^[12]也报道,大部分产浮性卵的海鱼有两种形式的Vtg.

从图2还可看出,只经 Mg^{2+} -EDTA沉淀纯化的蛋白(3)和只经色谱分离纯化的蛋白(4)均在同样的位置出现蛋白谱带,说明Vtg能被 Mg^{2+} -EDTA沉淀,这与文献报道相符^[7].从图中得知,仅经色谱分离(4)与经沉淀后再经色谱分离(2)的效果几乎相同.因此认为,只需经过色谱分离就能得到较纯的真鲷Vtg样品.

图3是真鲷血浆和纯化蛋白的SDS-PAGE电泳图.从图中可见,所得的纯化蛋白呈现3条带,根据蛋白分子量与其相对迁移率之间的关系,得它们的分子量大约分别为180 kDa, 115 kDa和70 kDa.根据以下的电泳图及未呈现的其它电泳图可知,180 kDa和115 kDa才是雌性特异性蛋白,而70 kDa可能是它的降解产物.国外的研究^[9,13]亦曾报道,Vtg不稳定易降解,在经SDS-PAGE电泳后除可见亚基蛋白谱带外,还可观察到其它的小分子量蛋白谱带.这70 kDa的蛋白谱带同样出现在雌鱼对照血浆和 E_2 诱导后的雌鱼血浆中,是因为它们本身含有Vtg,在经过同样的SDS-PAGE样品处理时,血浆中的Vtg也可能会降解.

William等^[10]曾报道英国鳎鱼(*Pleuronectes vetulus*)的Vtg在Native PAGE中呈现300和320 kDa两条谱带,而在SDS-PAGE中则只有一条谱带130 kDa,明显的分子量不相符,他们认为这是因为Vtg用SDS处理后脱脂的缘故.另外Nobuyuki等^[9]曾对日本刺鰕虎鱼(*Acanthogobius flavimanus*)的Vtg进行研究,发现血浆中有两种形式的Vtg: Vtg 530 kDa和Vtg 320 kDa,而经SDS和 β 巯基乙醇处理后,Vtg 530 kDa在110 kDa呈现一主要的蛋白带外,还有一些其它小分子量的蛋白带,而Vtg 320 kDa则在127

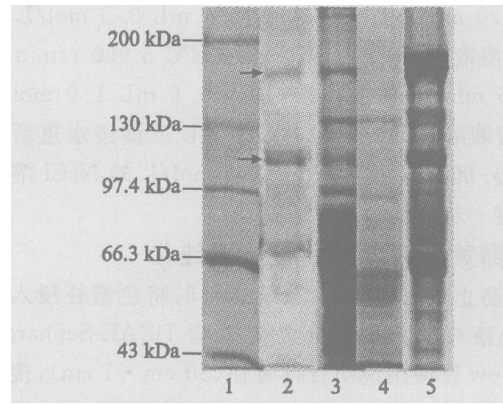


图3 真鲷血浆和纯化的Vtg的SDS PAGE电泳图谱
1: 蛋白分子量标准; 2: 纯化蛋白; 3: 雌鱼对照血浆; 4: 雄鱼对照血浆; 5: E_2 诱导后的雌鱼血浆; 箭头所指为Vtg

Fig. 3 SDS PAGE of plasma and purified Vtg from *Pagrosomus major*

kDa呈现一主带.本实验中,真鲷的两种形式的卵黄蛋白原在经SDS处理后,究竟各自对应于哪条蛋白带或者都有,还有待进一步研究.

2.3 磷、脂、糖分析

所获得的Vtg经7% Native PAGE电泳后,分别进行磷蛋白分析、脂蛋白分析和糖蛋白分析,以进一步确认其成份,结果分别示于图4中的2、3、4.从图中可看出所获得的Vtg在这3种特异性凝胶染色方法中均显色.由此确定,所获得的蛋白是一类含磷、含脂、含糖的蛋白.

综上所述,有以下5点可以证实所得的纯化蛋白为真鲷Vtg: 1) 该蛋白未出现在雄鱼对照血浆中,而出现在雌鱼对照血浆中,且能够被 E_2 诱导大量产生; 2)

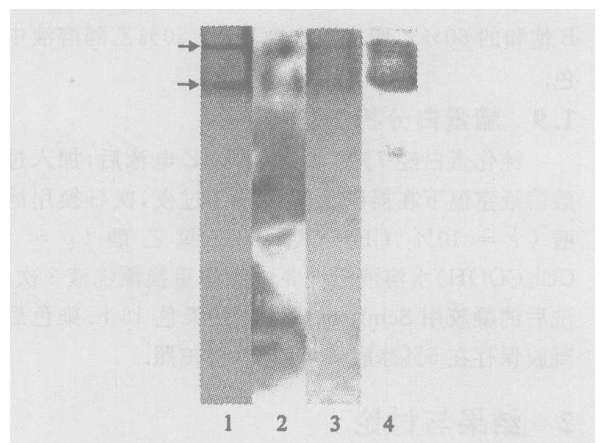


图4 Vtg的生化分析
1: 考马斯亮蓝G 250染色; 2: 磷蛋白分析; 3: 脂蛋白分析; 4: 糖蛋白分析; 箭头所指为Vtg

Fig. 4 Biochemical analysis of Vtg

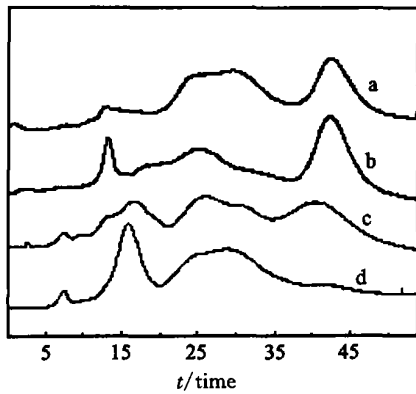


图5 真鲷血浆蛋白色谱图

a: 4 NP 诱导后的雄鱼血浆; b: 4 NP 诱导后的雌鱼血浆; c: 雌鱼对照血浆; d: 雄鱼对照血浆

Fig. 5 HPLC chromatograms of protein in plasma of *Pagrosomus major*

Native PAGE 电泳结果表明它是大分子蛋白,分子量大小与国外报道的其它硬骨鱼的 *Vtg* 相符; 3) *SDS-PAGE* 电泳结果表明它的亚基的分子量与国外报道的其它硬骨鱼的 *Vtg* 相似; 4) 磷、脂、糖蛋白分析表明它含磷、含脂、含糖; 5) 能够被 Mg^{2+} -EDTA 沉淀。

2.4 4 NP 对真鲷的诱导作用

以 115~170 mg/kg 体质量的剂量,把溶解在 1 ml 的无水乙醇和生理盐水中的 4 NP 注射入雌鱼和雄鱼的腹腔。诱导 7 d 后,按 1.3、1.5、1.6 的步骤,提取真鲷的血浆,分别进行液相色谱分离和 *PAGE* 电泳分析。如图 5 所示,4 NP 诱导后的真鲷雄鱼血浆(a)和雌鱼血浆(b)均在保留时间 37~45 min 处出现了较高的 *Vtg* 蛋白的色谱峰。

示于图 6 的 *PAGE* 电泳结果表明 4 NP 诱导后的雌鱼血浆(2 和 5)和雄鱼血浆(3 和 6)中也同样出现了 *Vtg* 的蛋白谱带。可以推断,4 NP 是一种环境雌激素,能诱导真鲷 *Vtg* 的产生。

3 结论

本实验较系统地研究了真鲷血浆中的卵黄蛋白原,研究结果表明:

1) 采用阴离子交换高效液相色谱系统,可以快速地分离纯化真鲷的 *Vtg*。

2) 真鲷的 *Vtg* 有两种形式,分子量分别为 570 kDa 左右及 360 kDa 左右。它由两个不同的亚基组成,亚基的分子量分别为 180 kDa 左右及 115 kDa 左右。

3) 真鲷的 *Vtg* 是一类含磷、含脂、含糖的蛋白。

4) 4 壬基酚能诱导真鲷 *Vtg* 的产生,是一种环境雌激素。

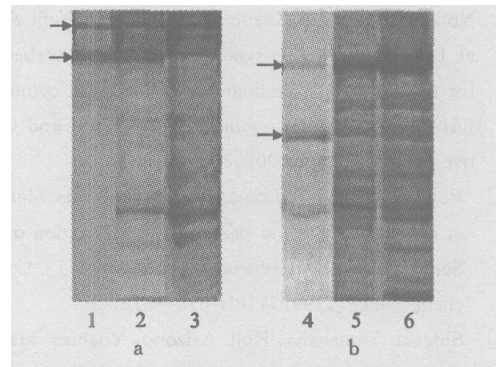


图6 4 NP 诱导后的真鲷血浆和已获得的纯化 *Vtg* 的 *PAGE* 电泳图比较

a: 7% *Native PAGE*; b: 7% *SDS PAGE*

1、4: 纯化的 *Vtg*; 2、5: 4 NP 诱导后的雌鱼血浆; 3、6: 4 NP 诱导后的雄鱼血浆; 箭头所指为 *Vtg*

Fig. 6 *PAGE* of 4 NP treated fish plasma and purified *Vtg* from *Pagrosomus major*

参考文献:

- [1] Tyler C R, Van der Eerden B, Jobling S, et al. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish [J]. *J. Comp. Physiol. B*, 1996, 166: 418 - 426.
- [2] Tolar Joseph F, Mehollin Amy R, Watson R Douglas et al. Mosquitofish (*Gambusia affinis*) vitellogenin: identification, purification, and immunoassay [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2001, 128: 237 - 245.
- [3] Heppell S A, Denslow N D, Folmar L C, et al. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens [J]. *Environ. Health Perspec.*, 1995, 103: 9 - 15.
- [4] Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, et al. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor gene [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, 1997, 48: 317 - 323.
- [5] Wahli T, Meier W, Segner H, et al. Immunohistochemical detection of vitellogenin in male brown trout from Swiss rivers [J]. *Histochem. J.*, 1998, 30: 758 - 759.
- [6] Ketil Hylland. Effects of environmental oestrogens on marine fish species [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 1997, 16: 606 - 612.
- [7] Johnsen Helge K, Tveiten Helge, Willassen Nils P, et al. Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 1999, 124: 355 - 362.
- [8] Debruyne I. Staining of alkali labile phosphoproteins and alkaline phosphatases on polyacrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1983, 133: 110 - 115.

- [9] Nobuyuki Ohkubo, Kazunhiko Mochida, Shinji Adachi, et al. Development of enzyme linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 3: 353 – 364.
- [10] Roubal William T, Lomax Daniel P, Willis Maryjean L, et al. Purification and partial characterization of English Sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, 118B: 613 – 622.
- [11] Shigeki Yamanaka, Koji Arizono, Yoshiro Matsuda, et al. Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, 62: 1196 – 1200.
- [12] Matsubara T, Nagae M, Ohkubo N, et al. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28: 295 – 299.
- [13] Parks L G, Cheek Ann O, Denslow Nancy D, et al. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization, and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds [J]. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 1999, 123: 113 – 125.

Induction, Purification and Initial Characterization of Vitellogenin (VTG) from *Pagrosomus major*

WU Cui qin², YUAN Dong xing^{1, 2*}, LIN Qing mei²

(1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science (Xiamen University),

2. Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Vitellogenin (Vtg) was largely induced in female *Pagrosomus major* in a short time by only one intraperitoneal injection of 17β estradiol (E_2). With anion exchange high performance liquid chromatography (HPLC), the Vtg was effectively purified from the plasma of female *Pagrosomus major* injected with E_2 . The results of Native PAGE showed that the Vtg of *Parosomus major* had two forms, with molecular weights around 570 kDa and 360 kDa, respectively. With SDS PAGE, the Vtg was reduced into two different monomers with molecular weights approximately 180 kDa and 115 kDa, respectively. The analyses of phosphorus, lipid and carbohydrate showed the Vtg a phospholipoglycoprotein. The further study indicated that the Vtg in *Pagrosomus major* could also be induced by 4 nonylphenol, this shows that 4 nonylphenol is a kind of environmental estrogens.

Key words: vitellogenin; *Pagrosomus major*; 17β estradiol; 4 nonylphenol