

弱阴离子交换 超滤两级纯化浓缩真鲷卵黄蛋白原*

刘宝敏 袁东星** 吴翠琴

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

摘 要 利用弱阴离子交换色谱, 从雌激素 17 β -雌二醇诱导的真鲷鱼血清中分离纯化出卵黄蛋白原粗组分, 以超滤法进一步除去杂质蛋白, 并脱盐浓缩, 获得纯度较高的卵黄蛋白原 (V_{tg}), 两级纯化得到的 V_{tg} 经常规聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE) 分析, 证实真鲷鱼 V_{tg} 有三种形式, 分子量分别为 665kDa、635kDa 和 355kDa。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析结果表明, 它们由 185kDa 左右的蛋白亚基组成。

关键词 弱阴离子交换色谱, 超滤, 卵黄蛋白原。

卵黄蛋白原 (V_{tg}) 是一种雌性特异蛋白。雌性动物在生殖周期内由下丘脑-垂体-性腺系统刺激卵巢分泌内源性雌激素 E₂, 在血液循环系统的作用下, E₂ 被转移至肝脏, 分散入肝细胞, 与雌激素受体结合, 刺激 V_{tg} 基因的转录, 合成了 V_{tg}^[1]。但是, 外源性内分泌干扰物 (EDCs) 也可以被雄性特定的靶组织器官吸收, 模拟正常激素的功能, 从而使雄性动物也产生 V_{tg}^[2]。因此, V_{tg} 可以作为环境雌激素的生物标志物, 对其纯化及分析也因此成为研究热点, 受到愈来愈多的关注。

V_{tg} 的分子量范围在 300—600kDa 之间, 它是一种二聚体磷脂大分子量蛋白质^[3], 对其纯化可采用凝胶渗透法^[4-5]。由于 V_{tg} 的多电荷性^[6], 也可以采用离子交换柱色谱法^[7-8] 或离子交换膜色谱法^[9] 进行纯化。大多数研究均采用离子交换与凝胶渗透两步来纯化 V_{tg}^[10-14], 其过程繁琐耗时, 且得到的 V_{tg} 浓度较低, 含盐量较高, 一般经过多次透析脱盐后, 冷冻干燥进一步纯化。

本研究采用弱阴离子交换色谱法从经雌二醇诱导的真鲷鱼血清中获取 V_{tg} 粗组分, 经超滤膜进一步除去杂质蛋白, 并脱盐浓缩。两级纯化获取的 V_{tg} 用常规聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE) 和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分析, 其分子量与文献^[15] 报道的基本一致, 可以用于实验室标样或后续分析。

1 材料与amp;方法

1.1 实验方法

取 1 月份的真鲷鱼 (*Pagrus major*) 15 尾 (平均体重 1.5kg), 饲养在厦门翔安区刘五店的网箱中, 每天投放小杂鱼饵料喂养。

将 17 β -雌二醇 (E₂, 美国 Fluka 公司) 按 4mg·m⁻¹ 溶解在无水乙醇中, 再加入等体积生理盐水。八尾饲养在网箱中的真鲷鱼按 1.9mg·kg⁻¹ 体重的剂量, 腹腔注射雌二醇。对照组只注射同样体积的无水乙醇-生理盐水。诱导 7d 后, 用一次性注射器从鱼尾静脉取血, 将 4ml 血液置于 5ml 离心管中, 并加入酶抑制剂苯甲磺酰氟 (PMSF) 和 EDTA, 使其最终浓度约为 1mmol·l⁻¹。血液凝聚过夜后, 于 4℃ 在 425g 离心 10min, 取上清液, 分装, -80℃ 保存。对照样血清以同样方法处理。

1.2 V_{tg} 的二级纯化

将阴离子交换树脂 DEAE-Sepharose Fast Flow (瑞典 Pharmacia 公司) 按照使用说明自行装柱 (30cm × 4.6mm), 并接入液相色谱系统 (美国 Waters 公司), 用于 V_{tg} 两级纯化法的第一级粗提。按谱峰分别接收粗组分, 储存于 4℃ 冰箱中备用。

取 3.5ml 粗组分 V_{tg} 置于 5ml 超滤管中, 于 4℃ 在 5000g 离心 8min, 进行二级纯化。将超滤膜截留液吸出后备用。超滤纯化前后的 V_{tg} 水溶液分别用 MiniQ 高分辨阴离子交换高效液相色谱分析, 验证其超滤效果。

* 国家自然科学基金 (20277030) 资助项目。 ** 联系人, E-mail: yuandx@xmu.edu.cn

高分辨阴离子交换高效液相色谱的色谱柱为 MiniQ; 流动相 A 为 $20\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 硼酸缓冲溶液 ($\text{pH} = 8.0$ 含 $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl), 流动相 B 为 $20\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 硼酸缓冲溶液 ($\text{pH} = 8.0$ 含 $0.6\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl), 流速为 $0.5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. 检测波长为 280nm . 梯度淋洗程序为 15min 内流动相 B 从 0% 线性增加至 100% , 进样量 0.1ml

1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

以 7% Native-PAGE 和 7% SDS-PAGE 测定两级纯化得到的 V_{tg} 分子量. 电泳前将蛋白适当稀释. 浓缩胶的浓度分别为 4% 和 5% . 凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后用图像扫描仪扫描成像.

2 结果与讨论

2.1 血清蛋白的第一级纯化

图 1 是真鲷鱼血清经弱阴离子交换初步纯化所得的色谱图. 经弱阴离子交换色谱分离后, 诱导样在 $24\text{--}30\text{min}$ 处出现一个明显的色谱峰, 而对照样血清无此色谱峰. 由此初步认定此色谱峰所对应的蛋白为 V_{tg} . 尽管 V_{tg} 是一种雌性特异蛋白, 但一般在生殖周期内才大量出现于雌性血清中. 由于本实验样品采集于 1 月份非真鲷鱼的生殖周期, 故图 1 中雌鱼对照样血清在 $24\text{--}30\text{min}$ 处并未出现明显的色谱峰. 诱导样的蛋白总量明显比对照样的多, 这与有关文献^[16] 的报道一致, 可能与鱼类卵母细胞的形成及能量的蓄积有关.

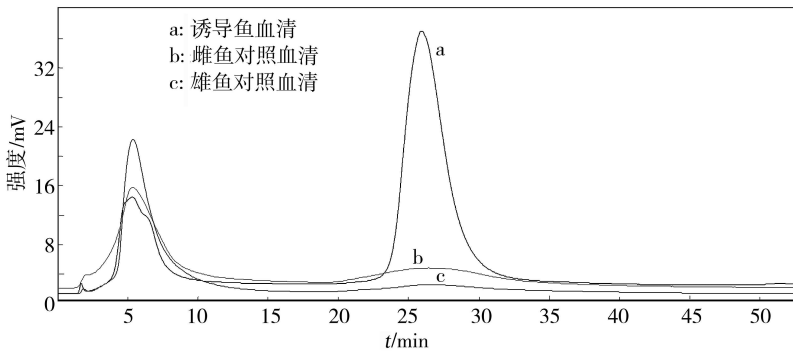


图 1 真鲷鱼血清蛋白的色谱图

Fig 1 Chromatograms of serum of *Pagrus major*

2.2 V_{tg} 的第二级纯化

收集得到的 V_{tg} 粗组分经过超滤膜进行第二级纯化, 截留液和滤过液与一级纯化得到的 V_{tg} 粗组分分别经高分辨阴离子交换高效液相色谱分析, 得到的色谱图示于图 2

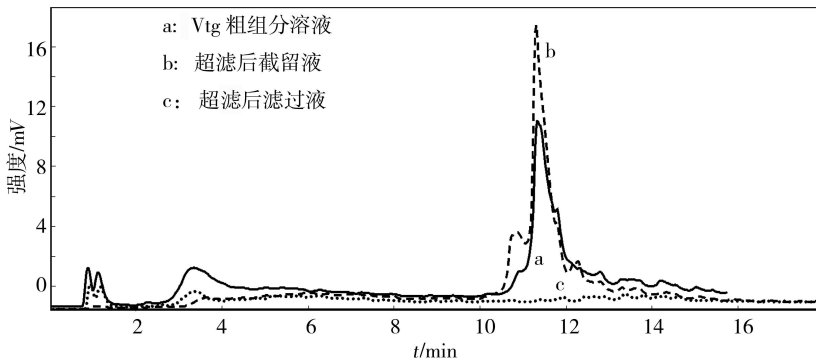


图 2 超滤纯化前后 V_{tg} 组分的液相色谱图

Fig 2 Chromatograms of V_{tg} before and after ultrafiltration

从图 2 可以看出, 粗纯化的 V_{tg} 样品在 11.8min 左右有一主峰 (图 2-a), 与按文献 [15] 方法纯

化得到的 V_{tg} 的保留时间完全一致, 进一步验证所提纯的蛋白为 V_{tg} 。另外, 粗纯化的蛋白样品经超滤膜进一步纯化后的截留液在 3.4min 左右几乎无峰 (图 2-b), 表明杂质蛋白含量很小, 而滤过液在 11.8min 左右几乎不含 V_{tg} (图 2-c), 提示两级纯化有效地去除了杂质蛋白, 而 V_{tg} 几乎无损失。两级纯化后的样品未见其它明显的蛋白峰, 说明两步纯化后的 V_{tg} 蛋白纯度较高。

2.3 V_{tg} 的聚丙烯酰胺分析

图 3(a) 是真鲷鱼血清蛋白及经两级纯化所得 V_{tg} 的 Native-PAGE 电泳图。从图中可以看出, 两级纯化得到的 V_{tg} 有三条蛋白带, 诱导样血清在相同位置也出现同样蛋白带, 而这些蛋白带在雄鱼对照样和雌鱼对照样中均未见, 说明该三条蛋白带是由雌激素 E_2 诱导产生的。根据蛋白分子量与其相对迁移率之间的关系, 得出这三条蛋白带的分子量分别为 665kDa、635kDa 和 355kDa, 与文献 [15] 结果接近, 但是, 分子量相对较大的 V_{tg} 分裂为分子量非常接近 (665kDa 和 635kDa) 的两条蛋白带, 这可能与 V_{tg} 的不稳定性及易降解分裂成小分子量的 β -成分有关 [16]。另外, 整个泳道中没有其它杂质蛋白带, 进一步说明两级纯化得到的 V_{tg} 纯度较高。

真鲷鱼血清经两级纯化所得 V_{tg} 的 SDS-PAGE 电泳图中 (图 3b), V_{tg} 亚基分子量为 185kDa, 这与文献报道其它硬骨鱼的情况相符。如鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) [9] 和鲮鱼 (*Pinephalaes promelas*) [17] 分别为 150kDa 和 160kDa。图中诱导样血清中也同样出现此亚基蛋白带, 而对对照样血清中并未出现, 这表明该蛋白带的出现与真鲷鱼受雌激素的诱导有很强的相关性。另外, 两级纯化 V_{tg} 分子量在 120kDa 左右有一浓度很低的蛋白带, 可以认为其为 V_{tg} 的主要降解产物 [15]。但此蛋白浓度很低, 说明本方法纯化过程能有效降低 V_{tg} 降解的可能性。

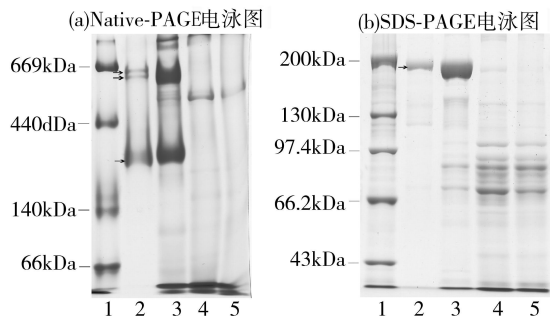


图 3 真鲷鱼血清和两级纯化后 V_{tg} 的 Native-PAGE 和 SDS-PAGE 电泳图

1. marker 2. 两级纯化的 V_{tg} 3. 诱导样, 4. 雄鱼对照, 5. 雌鱼对照

Fig 3 Native PAGE and SDS-PAGE of serum and V_{tg} purified from *Pagrus major* serum

3 结论

通过弱阴离子交换和超滤两级纯化, 得到了纯度和浓度较高、盐度较低的 V_{tg} 。纯化过程省时简单。两级纯化得到的 V_{tg} 的色谱、电泳行为及分子量与文献报道的基本一致, 为进一步将 V_{tg} 作为环境雌激素污染的生物标志物打下基础。

参 考 文 献

- [1] Tyler C R. Vitellogenesis in Salmonids. In: Scott A P, Sumpter J P, Kline D A et al., Reproductive Physiology of Fish. Sheffield Fish Symp 91, 1991, 355—357
- [2] Thorpe K L, Hetheridge M J, Hutchinson T H et al., Assessing the Biological Potency of Binary Mixtures of Environmental Estrogen Using Vitellogenin Induction in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.*, 2001, **35** (12): 2476—2481
- [3] Johnsen H K, Tveiten H, Willassen N P et al., Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) Vitellogenin: Development and Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Comp. Biochem. Physiol., part B*, 1999, **124** (3): 355—362
- [4] Hayakawa K, Yoshinaga T, Hinano M et al., Protein Determination by High-Performance Gel Permeation Chromatography: Applications to Human Pancreatic Juice, Human Bile and Tissue Homogenate. *J. Chromatogr. B*, 2001, **754** (1): 65—76
- [5] Reis Henriques M A, Cruz M M, Pereira J O, The Modulating Effect of Vitellogenin on the Synthesis of 17 Beta-Estradiol by Rainbow

- Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Ovary. *Fish Physiol. Biochem.*, 1997, **16**(3): 181—186
- [6] Tyler C R, Sumpter J P, The Purification and Characterization of Carp (*Cyprinus Carpio*) Vitellogenin. *Fish physiol. Biochem.*, 1990, **8**(2): 111—120
- [7] Paks LG, Cheek A O, Denslow N D et al., Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Vitellogenin Purification, Characterization and Quantitative Immunoassay for the Detection of Estrogenic Compounds. *Camp. Biochem. Physiol. Part C*, 1999, **123**(2): 113—125
- [8] Lamax D P, Roubal W T, Moore J D et al., An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Measuring Vitellogenin in English Sole (*Pleuronectes vetulus*): Development, Validation and Cross-Reactivity with Other Pleuronectids. *Camp. Biochem. Physiol. Part B*, 1998, **121**(4): 425—426
- [9] Shi G Q, Shao J, Jiang G B et al., Membrane Chromatographic Method for the Rapid Purification of Vitellogenin from Fish Plasma. *J. Chromatogr. B*, 2003, **785**(2): 361—368
- [10] Asturiano J F, Ramaguera F, Aragon P et al., Sandwich Immunoassay for Determination of Vitellogenin in Golden Grey Mullet (*Liza aurata*) Serum as a Field Exposure Biomarker. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **381**(6): 1152—1160
- [11] 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 (*Lepomis alburnus*). *J. Chromatogr. B*, 2000, **737**(1): 3—12
- [12] Hiramatsu N, Matsubara T, Hara A et al., Identification, Purification and Classification of Multiple Forms of Vitellogenin from White Perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.*, 2002, **26**(4): 355—370
- [13] Smith D S, Benfey T J, The Purification and Development of a Quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Measurement of Vitellogenin in Diploid and Triploid Brook Trout (*Salvelinus Fontinalis*). *Fish Physiol. Biochem.*, 2002, **24**(4): 287—298
- [14] Hennies M, Wiesmann M, Alther B et al., Vitellogenin in Carp (*Cyprinus Carpio*) and Perch (*Perca fluviatilis*): Purification, Characterization and Development of an ELISA for the Detection of Estrogenic Effects. *Sci. Total Environ.*, 2003, **309**: 93—103
- [15] 吴翠琴, 袁东星, 林庆梅, 真鲷卵黄蛋白原的诱导、纯化及初步鉴定. 厦门大学学报 (自然科学版), 2005, **44**(5): 688—692
- [16] Campbell CM, Idler D R, Characterization of an Estradiol Induced Protein from Rainbow Trout Serum as Vitellogenin by the Composition and Radioimmunoassay Cross-Reactivity to Ovarian Yolk Fraction. *Biology of reproduction*, 1980, **22**: 605—617

PURIFICATION AND CONCENTRATION OF VITELLOGENIN FROM *PAGROSOMUS* BY ANION EXCHANGE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND ULTRAFILTRATION

LIU Baomin YUAN Dongxing WU Cuiqin

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science Environmental Science Research Center
Xiamen University Xiamen, 361005 China)

ABSTRACT

With ultrafiltration and anion exchange liquid chromatography, a two-step method had been developed for purification of vitellogenin (Vtg) from the serum of *Pagrus major* induced by 17 β -estradiol (E₂). The results showed that most impurities could be removed during the first step by weak anion exchange liquid chromatography and further clean-up through ultrafiltration. In Native-PAGE, the Vtg purified by the two steps showed three forms with molecular weights approximately 665kDa, 635kDa and 355kDa, respectively. The result of SDS-PAGE indicated that the molecular weight of Vtg monomers was about 185kDa. High resolution anion exchange high performance liquid chromatography was applied to analyze the Vtg purified from the two-step method and approved the high purity. The purified Vtg could be used for further analysis.

Keywords weak anion exchange liquid chromatography, ultrafiltration, vitellogenin