

红螯光壳螯虾胚胎及仔虾发育过程中 卵黄磷蛋白的 ELISA 检测

李荷迪^① 周忠良^{②*} 赵云龙^②

(^①浙江大学宁波理工学院生物与制药工程系 宁波 315100;

^②华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要:建立了间接竞争酶联免疫吸附反应(ELISA)方法,对红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)胚胎及仔虾发育过程中的卵黄磷蛋白含量及其亚基组分进行了研究。该方法对卵黄磷蛋白具有良好的特异性,有效检测范围为31.25~250 ng/ml。结果表明,在发育初期胚胎先降解分子量比卵黄磷蛋白大的蛋白,亚基中,分子量较大和较小的亚基都先被消耗,胚胎内卵黄磷蛋白含量总体上呈下降趋势,其中在卵裂囊胚阶段后略有上升(3.19%),至后无节幼体期卵黄磷蛋白含量达最高(4.67%),之后不断下降,到仔虾离开母体独立生活时,含量只剩下卵裂期的1/4。

关键词:红螯光壳螯虾;ELISA;卵黄磷蛋白;卵黄蛋白

中图分类号:Q951.2 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)06-01-06

Detection of Vitellin Concentration Changes during Embryonic and Laval Development of Redclaw Crayfish, *Cherax quadricarinatus*, by ELISA

LI He-Di^① ZHOU Zhong-Liang^② ZHAO Yun-Long^②

(^① Department of Biological & Pharmaceutical Engineering, Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100;

^② School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: An indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting vitellin in embryonic and laval Redclaw Crayfish, *Cherax quadricarinatus* was developed. This method was sensitive to the vitellin, with the effective range of 31.25 - 250 ng/ml. The results indicated that, during embryonic development, proteins with a molecular weight larger than that of vitellin were degraded and both large and small molecular weight protein subunits were consumed first. The concentration of vitellin decreased during development. Its concentration was a little increased at cleavage stage and blastula stage (3.19%), reached the highest level in nauplius stage (4.67%), and then decreased remarkably when the laval could live independently at which time the concentration of the vitellin was only 1/4 of that in fertilized eggs.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; ELISA; Vitellin; Yolk protein

卵黄磷蛋白(vitellin, Vt)是一种雌性特异蛋白。由于其在虾蟹类甲壳动物生长发育中所具有的重要生理作用,迄今已有不少有关卵黄磷蛋白的研究报道^[1-3]。酶联免疫吸附反应(ELISA)因其特异性强、灵敏度高等特点,近年来开始应用于卵黄磷蛋白的含量测定^[4-6]。红

螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)又称澳洲淡

基金项目 上海市教委曙光计划,国家自然科学基金(No. 30270161);

* 通讯作者, E-mail: zhouz@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 李荷迪,女,研究方向 动物生理生态。

收稿日期 2006-05-22, 修回日期 2006-09-02

小龙虾,属甲壳纲,十足目,长尾亚目,拟河虾科。其具有个体大、食性广、生长快、肉味鲜美、适应能力强等优点,是一种极具推广养殖价值的优良品种。作者在对红螯光壳螯虾的卵黄磷蛋白进行分离、纯化和鉴定的基础上^[7],采用 ELISA 方法跟踪了红螯光壳螯虾胚胎和仔虾发育过程中卵黄磷蛋白含量及组分的变化。以期了解卵黄磷蛋白在红螯光壳螯虾生长发育过程中所起的生理作用,来指导仔虾开口饵料和投喂时间的选择,为进一步提高红螯光壳螯虾的胚胎孵化率和仔虾成活率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 性成熟亲虾购自浙江省湖州市德清县,饲养于实验室,按雌雄 2:1 的比例放养在 28℃ 恒温水族箱交配待产。间歇式增氧,每天 16:30 时投喂夹碎的螺蛳,次日上午 9:00 时吸去粪便残饵,换水 1/3。亲虾于 6 月起陆续抱卵,雌虾抱卵后将其单独饲养。在解剖镜和显微镜下根据胚胎的形态特征^[8],将胚胎发育分为 6 个时期(受精卵期、卵裂囊胚阶段、原肠期;前无节幼体期、后无节幼体期、准备孵化期),同时根据卵黄囊变化将胚后发育分为 4 个阶段(刚孵化仔虾、孵出 3 d 仔虾、孵出 7 d 仔虾、孵出 10 d 仔虾)。各时期取胚胎或仔虾 0.4 g (约 100 个),磷酸缓冲液冲洗后, -70℃ 保存备用。雄性新西兰白兔购自复旦医学院实验动物中心。

1.2 主要试剂 所用试剂均为分析纯。氟化磺酰苯甲烷(PMSF)为德国 Merck 公司产品;次高分子量标准蛋白质为上海丽珠东风生物技术有限公司产品;高分子量标准蛋白质为 Amershan pharmacia 公司产品;羊抗兔 IgG-HRP 为华美生物工程公司产品。

1.3 主要仪器 Power-PAC200 电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品;Bio-Print 图像处理仪为法国 Vilber 公司产品;ELx800 酶标仪为美国 Bio-tek 公司产品;96 孔酶标板为美国 Costar 公司产品。

1.4 卵黄磷蛋白抗体的制备 参考文献[9],提纯的卵黄磷蛋白与弗氏完全佐剂按 1:1 体积

比混合,第 1 d 用混合物皮下注射 2 只驯养 2 周后的雄性新西兰白兔,背部多点注射(每只 1 ml)在第 14、28、42、54、和 68 d 用弗氏不完全佐剂加强免疫。第 42、54 和 68 d 收集血样(1.5 ml)用双向免疫扩散方法测定效价。当抗体效价足够高时,采用颈动脉放血法将兔子处死。将血液置于室温下 1 h 后,4℃ 过夜使血液凝固,析出血清离心后 -70℃ 分装保存。

1.5 免疫印迹反应 将聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质电转印至硝酸纤维素膜(NC 膜)。NC 膜于 PBST-5% 牛血清白蛋白中 37℃ 封阻 1 h。加入 1:3 000 稀释的卵黄磷蛋白抗体,37℃ 孵育 2 h。PBST 洗 3 次,每次 5 min。将 NC 膜移至 Tris 缓冲液中,室温孵育 10 min。再将 NC 膜与 1:50 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 在 37℃ 反应 1 h。用 Tris 缓冲液洗 3 次,每次 5 min。加入 DAB 底物液显色 2~3 min,清水漂洗后拍照。

1.6 间接竞争酶联免疫吸附反应(ELISA) 将不同浓度的卵黄磷蛋白和样品横向包被 96 孔酶标板(每孔 100 μ l),湿盒中 4℃ 孵育过夜。弃去包被液,加入 1% BSA 37℃ 封阻 1 h。弃去 BSA, PBST 洗 4 次。将不同稀释浓度的卵黄磷蛋白抗体(1:1 000~1:20 000)横向加入孔内,37℃ 孵育 2 h。PBST 洗 4 次。加入 1:1 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP,37℃ 孵育 1 h。弃去羊抗兔 IgG-HRP, PBST 洗 4 次。加入 DAB 底物显色液,室温孵育。每孔加入 50 μ l 的终止液终止反应,492 nm 测定吸光度。

1.7 卵黄磷蛋白含量测定 将各期样品称重后和 3 倍体积的提取缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA)混匀,用玻璃匀浆器在冰浴中匀浆 15 s, 12 000 r/min 离心 10 min,离心重复 2 次。取上清液适当稀释后进行 ELISA 检测,根据标准曲线计算卵黄磷蛋白的含量。

2 结果与分析

2.1 ELISA 方法的建立

2.1.1 免疫印迹反应 由图 1 可知,制备的卵黄磷蛋白抗血清与纯化的卵黄磷蛋白有交叉反

应,且能识别卵巢匀浆液中的相应条带,与其他杂蛋白没有明显的沉淀反应,说明抗血清对卵黄磷蛋白具有良好的特异性。

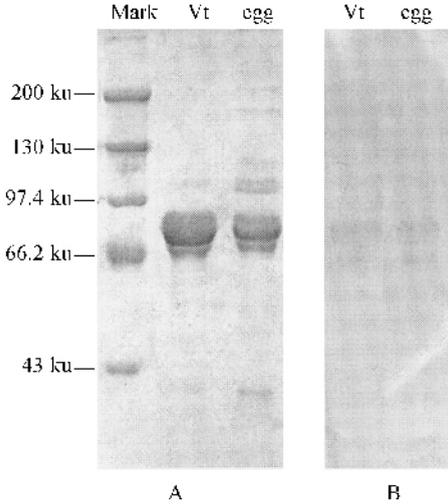


图1 红螯光壳螯虾卵黄磷蛋白 SDS-PAGE 和免疫印迹反应

Fig. 1 SDS-PAGE and Western blotting assay patterns of purified vitellin from the *C. quadricarinatus*

A SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色图; B:免疫印迹图; Mark 标准蛋白; Vt:卵黄磷蛋白; egg:卵匀浆。

A SDS-PAGE; B:Western blotting; Mark Protein marker; Vt:Vitellin; egg:Egg extract.

2.1.2 ELISA 标准曲线 图2所示,将标准抗原(提纯卵黄磷蛋白)倍比稀释,浓度范围是2~4 000 ng/ml,反应后比较,当抗体的稀释度为1:400时,曲线的灵敏度和检测范围都较好。因此在ELISA检测中,采用1:400的抗体稀释度。

卵黄磷蛋白的完整标准曲线呈“S”形(图2)而采用标准曲线计算卵黄磷蛋白含量时,仅取曲线中部呈线性的一段^[5]。由图3得出,ELISA方法对卵黄磷蛋白检测量的有效范围为31.25~250.00 ng/ml,如检测样品中卵黄磷蛋白的含量超出了该范围,则需先稀释一定的倍数使之处于该范围后再检测,稀释倍数依样品中卵黄磷蛋白的含量不同而不同。

2.2 不同发育时期卵黄磷蛋白亚基组分和含量的变化

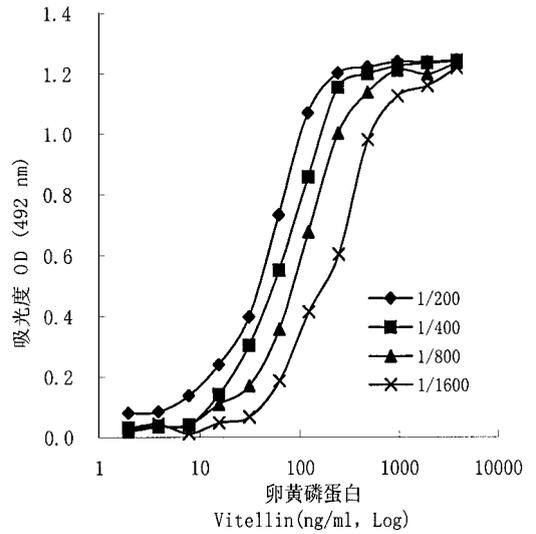


图2 不同浓度抗体和 Vt 组合下的 ELISA 标准曲线
Fig. 2 Trial calibration curves for ELISA evaluation by combining the combinations of coating antigen with anti-serum dilutions

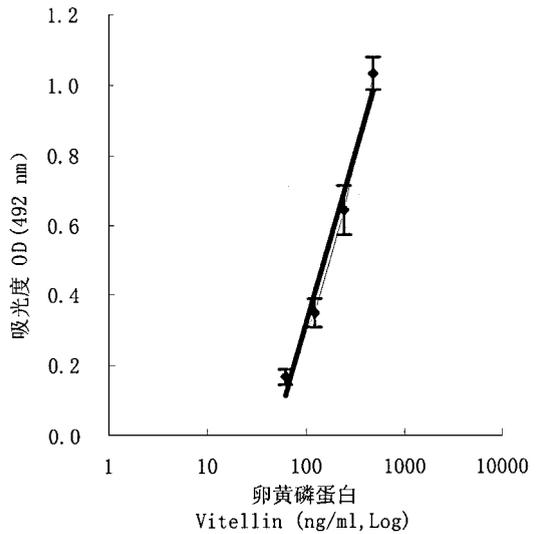


图3 ELISA 标准曲线线性部分
Fig. 3 The linear part of a typical ELISA calibration curve

2.2.1 卵黄磷蛋白结构的变化 各期样品的电泳结果显示,在自然状态下,卵黄磷蛋白的分子量随发育的进程并没有发生变化,只是含量不断减少(图4)。在发育早期,胚胎中含有较多分子量比卵黄磷蛋白大的蛋白,这部分蛋白逐渐被消耗利用,在发育后期的电泳样品中已

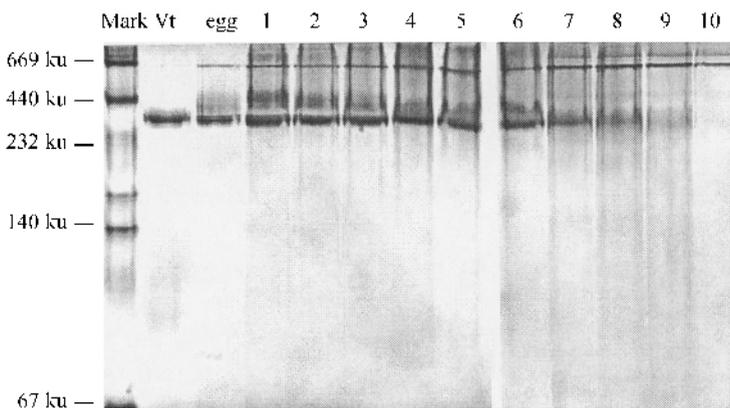
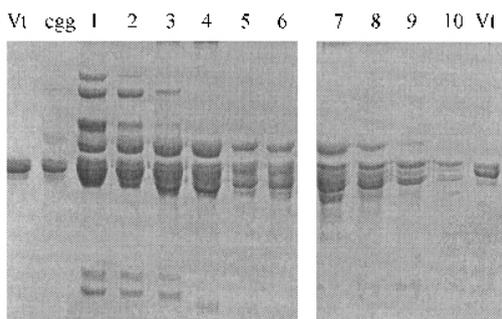


图 4 红螯光壳螯虾不同发育阶段卵黄蛋白的 7.5% PAGE 图

Fig. 4 7.5% PAGE patterns of yolk protein at different developmental stage in *C. quadricarinatus*

1. 受精卵期; 2. 卵裂囊胚阶段; 3. 原肠期; 4. 前无节幼体期; 5. 后无节幼体期; 6. 准备孵化期; 7. 刚孵化; 8. 孵出 3 d 仔虾; 9. 孵出 7 d 仔虾; 10. 孵出 10 d 仔虾; Vt 纯化卵黄磷蛋白; egg 卵匀浆; Mark 标准蛋白。

1. Fertilized egg stage; 2. Cleavage stage and blastula stage; 3. Gastrula stage; 4. Nauplius stage; 5. Metanauplius stage; 6. Prepare-hatching stage; 7. Hatching stage; 8. Three days after hatching; 9. Seven days after hatching; 10. Ten days after hatching; Vt :Vitellin; egg :Egg extract; Mark :Protein marker.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

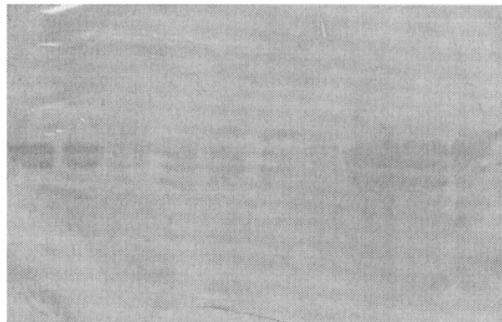


图 5 红螯光壳螯虾不同发育阶段卵黄蛋白的 SDS-PAGE (上) 和免疫印记图 (下)

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blotting assay patterns of yolk protein at different development stages in *C. quadricarinatus*

1. 受精卵期; 2. 卵裂囊胚阶段; 3. 原肠期; 4. 无节幼体期; 5. 后无节幼体期; 6. 准备孵化期; 7. 刚孵化; 8. 孵出 3 d 仔虾; 9. 孵出 7 d 仔虾; 10. 孵出 10 d 仔虾; Vt 纯化卵黄磷蛋白; egg 卵匀浆。

1. Fertilized egg stage; 2. Cleavage stage and blastula stage; 3. Gastrula stage; 4. Nauplius stage; 5. Metanauplius stage; 6. Prepare-hatching stage; 7. Hatching stage; 8. Three days after hatching; 9. Seven days after hatching; 10. Ten days after hatching; Vt :Vitellin; egg :Egg extract.

无这些蛋白的条带出现。但是,各期样品经 SDS 解聚后发现,亚基含量变化较大,其中分子量较大和较小的亚基都先被降解(图 5)。

2.2.2 卵黄磷蛋白含量的变化 发育过程中卵黄磷蛋白含量总体上呈下降趋势(图 6),其中在卵裂囊胚阶段(3.19%)后略有上升,至后无节幼体期时卵黄磷蛋白含量(4.67%)达到最高,之后不断下降,到仔虾孵出 10 d 能离开母体独立生活时,卵黄磷蛋白含量只有受精卵期的 1/4 左右。

3 讨论

3.1 卵黄磷蛋白 ELISA 的建立 本研究借鉴了其他十足目甲壳动物卵黄磷蛋白免疫检测的

方法^[7],先纯化成熟亲虾卵巢的卵黄磷蛋白,在制备卵黄磷蛋白抗体的基础上,建立了一套比较适合红螯光壳螯虾卵黄磷蛋白检测的方法,检测的特异性和精确度均较好,并以此确定了其适宜的检测范围和稀释倍数。该方法具有较好的可重复性,可为其他十足目甲壳动物卵黄磷蛋白的免疫定量研究提供参考。

在建立 ELISA 方法的过程中,作者发现了

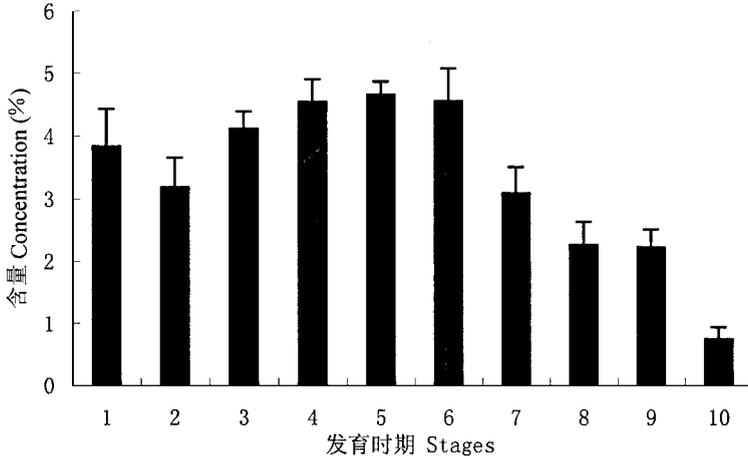


图 6 红螯光壳螯虾不同发育阶段卵黄磷蛋白的含量

Fig. 6 Change in vitellin titre at different developmental stages in *C. quadricarinatus*

1. 受精卵期; 2. 卵裂囊胚期; 3. 原肠期; 4. 前无节幼体期; 5. 后无节幼体期; 6. 准备孵化期; 7. 刚孵化; 8. 孵出 3 d 仔虾; 9. 孵出 7 d 仔虾; 10. 孵出 10 d 仔虾。
1. Fertilized egg stage; 2. Cleavage stage and blastula stage; 3. Gastrula stage; 4. Egg nauplius stage; 5. Egg metanauplius stage; 6. Prepare-hatching stage; 7. Hatching stage; 8. Three days after hatching; 9. Seven days after hatching; 10. Ten days after hatching.

3.2 不同发育时期卵黄磷蛋白亚基组分和含量的变化 甲壳动物胚胎和仔虾中卵黄磷蛋白含量的变化实际上反映了其发育过程中营养物质的消耗状况。目前对甲壳动物母体卵巢中卵黄磷蛋白的积累已有一些研究^[10,11],而对卵黄磷蛋白在胚胎和仔虾发育过程中的消耗则少有报道^[12],其实这两者是密切相关的,母体卵巢中卵黄磷蛋白的积累为胚胎和仔虾的发育提供了营养来源,而胚胎和仔虾中卵黄磷蛋白的消耗状况则直接影响到发育的进程。红螯光壳螯虾胚胎和仔虾发育过程中卵黄磷蛋白含量的变化表明,发育进程和卵黄磷蛋白的含量之间存在密切关系,随着发育的进程,作为重要营养物质和能量物质来源的蛋白质含量在不断下降。

红螯光壳螯虾不同于其他甲壳动物的特点:该虾的卵黄磷蛋白很难被硝酸纤维素膜转印,可能是其带有较多的脂类分子,从而阻碍了蛋白质与膜的结合。在本文的蛋白质印迹中,转印的是 SDS-PAGE 凝胶上的卵黄磷蛋白亚基。蛋白解离后,亚基的转移率比自然状态下的蛋白要高很多。

红螯光壳螯虾的受精卵发育至原肠期,主要是胚胎各种器官原基的形成阶段,期间胚胎对能量的需求并不是很大,ELISA 结果显示卵黄磷蛋白含量没有出现太大的变化。原肠期后为各种器官系统形成的主要时期,胚胎相继出现消化系统、循环系统和神经系统等结构,胚胎新陈代谢旺盛^[8]。但本研究结果表明,该阶段 ELISA 检测到的卵黄磷蛋白含量下降并不明显,估计是大分子量蛋白和卵黄磷蛋白中的结合脂成分作为能量消耗物质。比较总蛋白和卵黄磷蛋白的含量变化可以发现^[13],蛋白质作为重要的能量物质,含量不断下降,但作为蛋白质主要组成的卵黄磷蛋白含量变化不明显,说明胚胎发育过程中消耗的是其他蛋白。仔虾破膜后,个体较小,腹部仍带有较大的桔黄色卵黄

囊,活动能力较弱,要悬挂于母体腹部达 10 d 左右,不摄食,但仔虾生长较快。该阶段仍以消耗卵黄物质为主,ELISA 结果也显示此时卵黄磷蛋白含量急剧下降。

与一般甲壳动物的发育方式不同,胚后的仔虾发育才是红螯光壳螯虾的大生长期,该阶段卵黄磷蛋白大量快速降解,仔虾个体迅速增大。因此,增强母体营养,使受精卵带有更多的卵黄磷蛋白,可使仔虾在离开母体、开口摄食阶段赢得更多的时间和机会。这对提高仔虾的成活率及其对环境的适应能力具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Chang C F, Shih T W, Hong H H. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 1993, **105** (3 - 4) : 609 ~ 615.
- [2] Chang C F, Lee F Y, Huang Y S. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 1993, **105** (2) : 409 ~ 414.
- [3] Karina D, Garcia-Orozco, Francisco Vargas-Albores, *et al.* Molecular characterization of vitellin from the ovaries of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2002, **133** (3) : 361 ~ 369.
- [4] Derelle E, Grosclaude J, Meusy J J, *et al.* ELISA titration of vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, with monoclonal antibody. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 1986, **85** (1) : 1 ~ 4.
- [5] Lee F Y, Chang C F. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 1997, **117** (4) : 433 ~ 439.
- [6] Sagi A, Khalaila I, Abdul U, *et al.* A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, **115** : 37 ~ 45.
- [7] 李荷迪,周忠良,赵云龙.红螯光壳螯虾卵黄磷蛋白的分离纯化和鉴定. *动物学杂志*, 2004, **39** (3) : 17 ~ 21.
- [8] 孟凡丽,赵云龙,陈立桥等.红螯光壳螯虾胚胎发育的研究: I 胚胎外部结构的形态发生. *动物学研究*, 2000, **21** (6) : 1 ~ 6.
- [9] 李康,周忠良,于静等.鲫鱼(*Carassius auratus*)卵黄蛋白原的 ELISA 检测. *中国环境科学*, 2003, **23** (3) : 276 ~ 280.
- [10] Qiu Y W, Ng T B, Chu K H. Purification and characterization of vitellin from the ovaries of the shrimp *Metopenaeus ensis* (Crustacea : Decapoda : Penaeidae). *Invertebrate Reproduction and Development*, 1997, **31** : 217 ~ 223.
- [11] Vazquez-Boucard C V, Levy P, Cecealdi H J, *et al.* Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2002, **281** : 63 ~ 75.
- [12] Vania Serrano-Pinto, Celia Vazquez-Boucard, Humberto Villarreal-Colmenares. Yolk proteins during ovary and egg development of mature female freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 2003, **134** : 33 ~ 43.
- [13] 罗文,周忠良,赵云龙等.红螯螯虾胚胎发育过程中蛋白质含量及氨基酸组成的分析. *华东师范大学学报(自然科学版)* 2004 (1) : 88 ~ 92.