

红螯光壳螯虾卵黄磷蛋白的分离纯化和鉴定*

李荷迪 周忠良 赵云龙**

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要: 采用凝胶层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法对红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 卵巢中的卵黄磷蛋白进行了分离、纯化和鉴定。结果显示该虾的卵黄磷蛋白是一个分子量为 369 ku 的多聚体, 由分子量为 85.4、80.6、76.6、73.7 ku 的四个亚基组成。染色分析表明卵黄磷蛋白为糖-磷-类胡萝卜素结合的复合蛋白。氨基酸组成分析显示天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu) 为主要氨基酸。

关键词: 红螯光壳螯虾; 卵黄磷蛋白; 卵黄蛋白

中图分类号: Q956 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2004)03-17-05

Purification and Characterization of Vitellin from the Redclaw Crayfish, *Cherax quadricarinatus*

LI He-Di ZHOU Zhong-Liang ZHAO Yun-Long

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Vitellin from ovaries of freshwater redclaw (*Cherax quadricarinatus*) was purified and characterized by chromatography, PAGE and SDS-PAGE. Results indicated that vitellin had a molecular mass of 369 ku and contained four polypeptides with molecular masses of 85.4, 80.6, 76.6 and 73.7 ku, respectively. On the base of PAGE staining, we suggest that the purified vitellin is a glyco-phospho-carotenoprotein. The amino acid composition of vitellin was also analyzed.

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

卵黄磷蛋白 (vitellin, 简称 Vt) 是一种雌性特异性蛋白 (female special protein, FSP), 为甲壳动物卵黄中的主要物质。卵黄磷蛋白可作为胚胎发育及其早期幼体发育的内源性营养物质, 具有携带并转运脂肪的功能^[1,2], 且可促进性腺的发育和幼苗的顺利孵化^[3]。由于卵黄磷蛋白在虾蟹类甲壳动物中所具有的重要生理作用, 迄今已有不少关于卵黄磷蛋白分离纯化的报道^[4-6]。

红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 又称澳洲淡水龙虾、红螯螯虾, 原产于澳大利亚北部的热带地区。该虾具有食性广、生长快、适应能

力强等特点, 颇具养殖前景。我国自 20 世纪 90 年代引进该虾后对其生物学特性进行了较为细致的研究^[7,8], 但有关其生殖发育过程中卵黄磷蛋白组成及相关特性的研究却鲜有报道。本文就红螯光壳螯虾的卵黄磷蛋白进行了分离、纯化和鉴定。

* 上海市教委曙光计划和国家自然科学基金 (No. 30270161) 资助;

** 通讯作者, E-mail: zhaoyunlong1963@263.net;

第一作者介绍 李荷迪, 女, 24 岁, 硕士研究生; 研究方向: 动物生理生态。

收稿日期: 2003-11-11, 修回日期: 2004-03-15

1 材料与amp;方法

1.1 材料 红螯光壳螯虾于2002年9月取自浙江省淡水水产研究所养殖场,在实验室内暂养。一段时间后,解剖性成熟的雌虾,获取饱满、呈墨绿色的成熟卵巢, -70℃保存备用。

1.2 主要试剂 所用试剂均为分析纯级。氟化磺酰苯甲烷(PMSF)为德国Merck公司产品;十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺为上海华美生物工程公司进口分装;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。

1.3 主要仪器 Power-PAC200电泳仪和Mini-PROTEAN 3cell电泳槽均为美国Bio-Rad公司产品;Bio-Print图像处理仪为法国Vilber公司产品;蛋白质纯化系统(FPLC)和Sephacry-300层析柱为Amershan Pharmacia公司产品;Hitachi220A紫外分光光度计为日本Hitachi公司产品。

1.4 卵黄磷蛋白的分离和纯化 将卵巢和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。匀浆液在4℃, 12 000 r/min离心10 min,取中层清液,该步重复两次。取离心后的清液3~5 ml,上Sephacry-300柱,在蛋白质纯化系统(FPLC)上分离。流动相采用pH 7.4的磷酸缓冲液(0.01% EDTA, 0.1 mol/L NaCl, pH 7.4),流速为0.8 ml/min。收集的卵黄磷蛋白用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析纯度,分装后于-70℃保存。以考马斯亮蓝法^[9]测定蛋白含量,牛血清白蛋白作标准参照。

1.5 电泳 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE):浓缩胶浓度为5%,分离胶浓度为7.5%。浓缩电压为60 V,分离电压恒定为160 V。考马斯亮蓝R-250染色。

SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):浓缩胶浓度为5%,分离胶浓度为7%。浓缩电压为60 V,分离电压恒定为150 V。考马斯亮蓝R-250染色。

1.6 蛋白的染色

糖蛋白:电泳后的凝胶经固定液(甲醇:乙酸:水 = 40:7:53)固定30 min,分别用7%冰乙酸平衡1 h,1%过碘酸-乙酸液孵育1 h,7%乙酸平衡1 h,Schiff染色1 h,糖蛋白即被染成红色区带。酸性偏重硫酸钠溶液中脱色后,保存于7%乙酸溶液。

脂蛋白:用乙酰苏丹黑预染样品后,再上样电泳。样品上清液与饱和的乙酰苏丹黑以10:1(W/W)的比例混合,37℃水浴中保温30 min,加入样品体积1/2量的40%蔗糖液,混合后即上样电泳,7%乙酸保存。

磷蛋白:电泳后,经固定液(甲醇:冰乙酸:水 = 45:10:45)固定6 h,50%甲醇中漂洗1 h,然后转至新配制的全染料(Stain-all)中过夜,去离子水漂洗24 h(换液数次)。染色和漂洗在黑暗中进行,拍照前置于自然光下,使背景红色褪去(约15 min)。

1.7 卵黄磷蛋白的氨基酸组成测定 由中科院上海生化研究所分析测定。取适量纯化的卵黄磷蛋白样品于5.6 mol/L HCl消化24 h,再加蒸馏水蒸干,用0.02 mol/L HCl溶解后,以Hitachi 835-50型高速氨基酸自动分析仪分析测定氨基酸组分及含量。

2 结果与分析

2.1 卵黄磷蛋白的分离与纯化 成熟红螯光壳螯虾卵巢粗提液的Sephacry-300凝胶过滤图

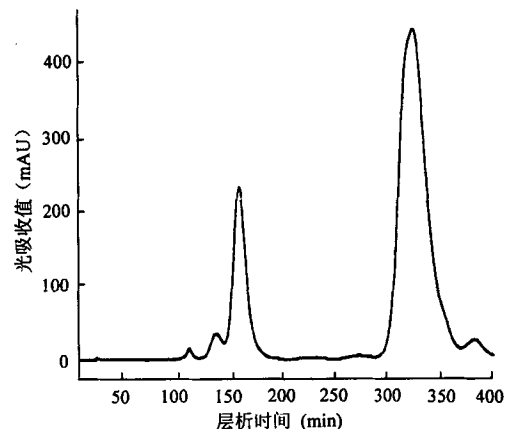


图1 卵黄蛋白的Sephacry-300分离图

谱见图1。在280 nm检测下,粗提液经Sephacry-300柱后出现5个峰,收集各半峰高样品浓缩后进一步进行分析鉴定。

2.2 卵黄磷蛋白鉴定 层析后各峰样品经7.5% PAGE后发现,前三峰样品可被考马斯亮蓝染色,其中第三峰样品与卵匀浆中含量最高的条带迁移率相同。对该峰样品进行Schiff和Stain-all染色后均出现红色条带,而苏丹黑染色未出现明显条带(图2)。

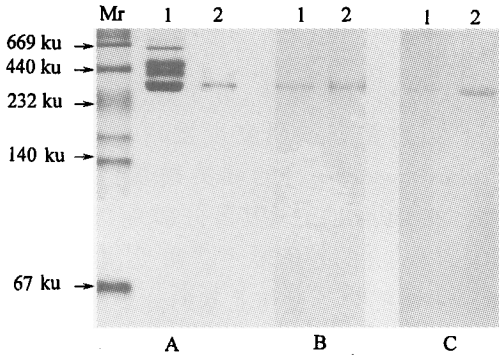


图2 卵黄磷蛋白的7.5% PAGE图

A. AGE 考马斯亮蓝 G-250 染色; B. Schiff 试剂染色; C. Stain-all 染色。Mr: 标准蛋白分子量; 1: 卵巢匀浆; 2: 卵黄磷蛋白

在波长为200~600 nm之间对第三峰样品进行光谱扫描(图3),显示在480 nm附近有吸收峰,表示其含有类胡萝卜素。说明第三峰样品为糖-磷-类胡萝卜素结合的蛋白,确定其为卵黄磷蛋白,分子量为(369.40 ± 8.50)ku。在流动相PBS流速0.8 ml/min下,该峰的洗脱保留时间为163.5 min。

第三个峰收集液经SDS-PAGE,显示4条带(图4),分子量分别为(85.44 ± 0.35)ku、(80.59 ± 0.24)ku、(76.57 ± 0.23)ku和(73.66 ± 0.49)ku,说明卵黄磷蛋白包含四种亚基。

2.3 卵黄磷蛋白的氨基酸组成和含量 卵黄磷蛋白氨基酸的组成和含量见表1。必需氨基酸总量(ΣEAA)占总氨基酸含量(ΣAA)的50.22%,略高于非必需氨基酸总量(ΣNEAA, 49.78%)。卵黄磷蛋白氨基酸组成的特点是,天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)含量较高,分别达

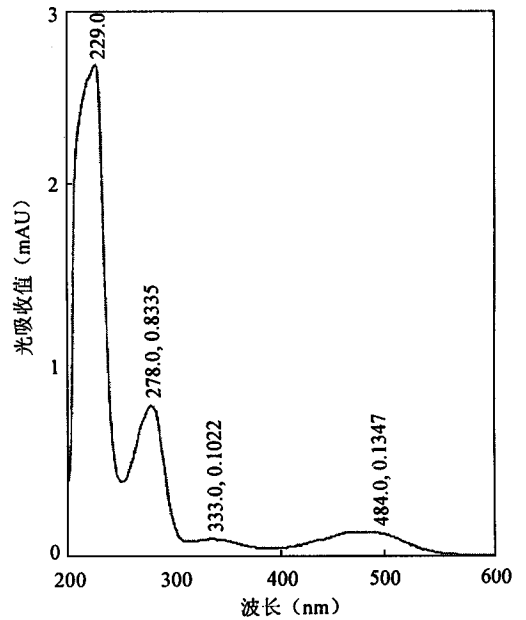


图3 纯化卵黄磷蛋白的紫外-可见光谱扫描图

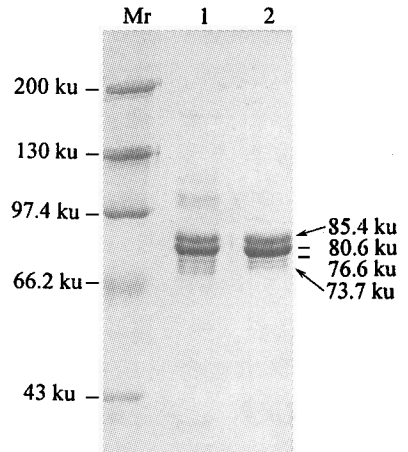


图4 纯化卵黄磷蛋白7% SDS-PAGE图

Mr: 标准蛋白分子量; 1: 卵巢匀浆; 2: 卵黄磷蛋白

15.05%和11.64%,其余依次为亮氨酸(Leu)、缬氨酸(Val)和组氨酸(His),含量分别为8.20%、7.78%和6.51%;而蛋氨酸(Met)、鸟氨酸(Orn)和牛磺酸(Tau)含量较低,分别只有0.25%、0.28%和0.09%。样品中没有检测出半胱氨酸(Cys)。

表 1 卵黄磷蛋白的氨基酸组成和含量

氨基酸 (EAA)	百分含量	氨基酸 (NEAA)	百分含量
Lys	6.03	Asp	15.05
His	6.51	Ser	2.71
Arg	5.84	Glu	11.64
Thr	4.31	Pro	4.25
Val	7.78	Gly	6.20
Met	0.25	Ala	6.23
Ile	5.07	Orn	0.28
Leu	8.20	Tyr	3.34
Phe	6.23	Tau	0.09
ΣEAA	50.22	ΣNEAA	49.78

EAA 为必需氨基酸, NEAA 为非必需氨基酸

3 讨论

3.1 卵黄磷蛋白的分离纯化 目前, 分离纯化卵黄磷蛋白的方法较多, 主要有沉淀、层析、电泳洗脱等方法^[4,5,10]。本文利用凝胶层析的方法从成熟红螯光壳螯虾的卵巢中分离纯化了卵黄磷蛋白。在对卵巢进行前处理的过程中, 先采用了硫酸铵沉淀处理, 但处理后的样品上柱后, 没有出现洗脱峰。这可能是由于卵黄磷蛋白不够稳定, 在沉淀、复溶及透析的过程中已经被分解。故本实验改用多次离心后的卵巢匀浆液直接上 Sephacry-300 柱, 在 FPLC 上进行分离洗脱。一共出现 5 个洗脱峰, 对各峰样品浓缩后进行电泳分析, 前三峰可被考马斯亮蓝染色, 为蛋白质, 后二峰不被考马斯亮蓝染色, 且在 254 nm 处光吸收值较高, 应为核酸物质。

另外, 在分离卵黄磷蛋白的过程中, 观察到匀浆液离心后呈浅黄色, 这与甲壳动物其它种属的橙黄色卵黄磷蛋白类似^[11], 而层析后的卵黄磷蛋白溶液几乎无颜色。可能因为提纯后, 卵黄磷蛋白复合物中各个部分间的结合力下降, 与颜色物质——类胡萝卜素结合的分子间作用力减弱, 导致溶液颜色变浅。

3.2 卵黄磷蛋白的合成及亚基组成 本研究结果显示, 红螯光壳螯虾的卵黄磷蛋白在自然状态下是一个分子量为 369 ku 的多聚体, 经 SDS 和 β-巯基乙醇处理后, 分成 4 条多肽链, 分子量位于 70 ~ 90 ku 之间, 彼此较为接近。这同

其它甲壳动物的研究结果有一定的差异。一般甲壳动物的卵黄磷蛋白分子量在 240 ~ 800 ku 之间, 由 2 ~ 8 个亚基组成^[12]。如凡纳对虾 (*Penaeus vannamei*) 的卵黄磷蛋白分子量为 388 ku, 由 5 个亚基聚合而成, 三个主要亚基的分子量为 87、78 和 46 ku^[6]。Ching-Fong Chang 等^[4]对罗氏沼虾的研究也发现, 卵巢中分离检测到了 3 种形式的卵黄磷蛋白, 分子量分别为 240、2 450 和 3 800 ku, 但它们都由相同的两个亚基 (90 和 104 ku) 聚合而成。在蟹类中, 美味优游蟹 (*Callinectes sapidus*) 的卵黄磷蛋白经 SDS-PAGE 后得到两种亚基, 分子量分别为 168 和 86 ku^[13]。对螯虾的研究也发现, 非洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) 的卵黄磷蛋白分子量为 360 ku, SDS-PAGE 显示其可分解为 110、105、94、90、81 和 78 ku 的 6 条带^[14]。可见, 非洲螯龙虾卵黄磷蛋白的分子量与亚基的分子量都和红螯螯虾的比较相似。

不同的提纯方法和测定方法也会引起所测分子量及亚基数的不同。如在斑节对虾中, Ching-Fong Chang^[4]测得卵黄磷蛋白分子量为 492 ku; 而 Quintio E T^[15]测得的分子量则为 540 ku。

红螯光壳螯虾的卵黄磷蛋白经 Schiff 和 Stain-all 染色后均出现红色条带, 而苏丹黑染色未出现条带, 同时在波长 480 nm 附近有吸收峰, 说明其为一种糖-磷-类胡萝卜素结合的复合蛋白, 而一般的甲壳动物为糖-脂-类胡萝卜素的复合蛋白。在实验过程中观察到, 红螯光壳螯虾的卵巢匀浆液上浮厚厚一层金黄色的油脂, 说明脂类物质大部分以油球的形式存在于卵黄中, 卵黄磷蛋白中没有结合脂类成分。

3.3 卵黄磷蛋白的氨基酸组成 关于甲壳动物卵黄磷蛋白的氨基酸组成和含量目前研究尚不多见。本研究对卵黄磷蛋白的氨基酸组成分析表明, 除色氨酸 (Trp) 在前处理过程中被破坏而未检出外, 红螯光壳螯虾卵黄磷蛋白的氨基酸组成和其它甲壳动物比较相似^[4,5,15]; 谷氨酸 (Glu)、天冬氨酸 (Asp)、丙氨酸 (Ala) 和亮氨酸 (Leu) 为构成卵黄磷蛋白的主要氨基酸, 而半胱

氨酸(Cys)和蛋氨酸(Met)的含量则较低。

参 考 文 献

- [1] Quackenbush L S. Vitellogenesis in the shrimp, *Panaeus vannamei* in vitro studies of the isolated hepatopancreas and ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1989a, **94B**(2):253 ~ 261.
- [2] Quackenbush L S. Yolk protein production in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 1989b, **9**:509 ~ 516.
- [3] 王浩,刘荣臻.雌性特异蛋白复合物促性腺发育、提高黄鳍孵化率.水产学报,1989,**13**(4):353 ~ 355.
- [4] Chang C F, Lee F Y. Purification and characterization of vitelline from the mature ovaries of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Bio-chemistry and Physiology*, 1993a, **105B**(3-4): 609 ~ 615.
- [5] Chang C F, Lee F Y. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1993b, **105B**(2): 409 ~ 414.
- [6] 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*, 2002, **133B**:361 ~ 369.
- [7] 赵云龙,孟凡丽,陈立侨等.红螯螯虾繁殖习性的研究.动物学杂志,2000,**35**(5):5 ~ 9.
- [8] 顾志敏,许谷星,黄鲜明等.红螯螯虾的室内人工育苗.水产学报,2003,**27**(1): 32 ~ 37.
- [9] 汪家政,范明.蛋白质纯化技术.北京:科学出版社,2000,42 ~ 46.
- [10] 彭宇,胡萃,赵敬钊等.真水狼蛛(*Pirata piraticus*)卵黄蛋白的研究.浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,**26**(1):69 ~ 74.
- [11] Yepiz-Plascencia G M, Sotelo-Mundo R, Vazquez-Moremo L, et al. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone: Isolation and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1995, **111B**(2):181 ~ 187.
- [12] Yepiz-Plascencia G, Vargas-Albores F, Higuera-Ciagara I. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture*, 2000, **191**:177 ~ 189.
- [13] Lee C Y, Watson R D. In vitro study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): site and control of vitellin synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, 1995, **271**(5):364 ~ 372.
- [14] Tsukimura Brian, Waddy Susan L, Vogel Jacalyn M, et al. Characterization and quantification of yolk proteins in the lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, **292**(4):367 ~ 375.
- [15] Quintio E T, Hara A, Yamanchi K, et al. Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 1990, **17**: 221 ~ 227.