

西伯利亚鲟卵黄脂磷蛋白的分离纯化及性质

丁建文^{①②} 庄平^{①②*} 章龙珍^② 侯俊利^② 张涛^② 刘鉴毅^② 颜世伟^②

(^① 华东理工大学生物工程学院 上海 200237;

^② 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室 上海 200090)

摘要: 卵黄是鱼类胚胎发生期的主要营养物质, 卵黄的含量和质量对于早期幼体维持生命和生长发育至关重要。本研究采用 Sephacryl S 300 凝胶过滤层析法和蛋白质电泳技术分离纯化西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 卵黄脂磷蛋白 (lipovitellin, Lv), 层析洗脱共得到 7 个蛋白峰。对每个峰进行 SDS-PAGE 电泳及油红 O、甲基绿和 Schiff 试剂特异染色, 峰 b 蛋白均呈阳性, 表明峰 b 蛋白为西伯利亚鲟卵中的一种卵黄脂磷蛋白, SDS-PAGE 电泳分析表明, 其由 3 个亚基构成, 相对分子质量分别为 30.6 ku、40.8 ku 和 76.7 ku。对西伯利亚鲟 Lv 氨基酸组成进行分析, 证明是一种含有相对较多天冬氨酸、赖氨酸、谷氨酸、丝氨酸、缬氨酸和亮氨酸的蛋白, 并且所含鲜味氨基酸含量比其他鱼偏高。

关键词: 西伯利亚鲟; 卵黄脂磷蛋白; 凝胶过滤层析; 氨基酸

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2009)03-09-07

Purification and Partial Characterization of Lipovitellin from *Acipenser baerii*

DING Jian Wen^{①②} ZHUANG Ping^{①②*} ZHANG Long-Zhen^② HOU Jun-Li^②
ZHANG Tao^② LIU Jian-Yi^② YAN Shi-Wei^②

(^① East China University of Science and Technology, Shanghai 200237;

^② East Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: The yolk protein is the chief nutrition material during embryogenesis. The quantity and quality of yolk is crucial for early larval growth. We have used Sephacryl S 300 gel filtration chromatography to separate lipovitellin from the *Acipenser baerii*. There were seven protein chromatography peaks. The peak b protein was composed of three subunits with molecular weights of 30.6 ku, 40.8 ku and 76.7 ku, respectively as revealed by the SDS-PAGE electrophoresis analysis. Oil red O, Methyl green and the Schiff staining showed that the peak b protein was rich in glucose, lipid and phosphorus. Lipovitellin of *A. baerii* contained rich asparagines acid, lysine acid, glutamic acid, serine acid, leucine acid and valine acid. The quantity of flavor amino acids such as glutamic acid and asparagines acid in *A. baerii* was abundant when compared to that in other species.

Key words: *Acipenser baerii*; Lipovitellin; Gel filtration chromatography; Amino acids

基金项目 国家“863”计划项目(No. 2008AA10Z227), 农业科技成果转化基金项目(No. 2008GB23260408), 浙江省科技计划项目(No. 2007C12026) 及中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(No. 2007M01, 2007M023);

* 通讯作者, E-mail: pzhuang@online.sh.cn;

第一作者介绍 丁建文, 男, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类生理; E-mail: dingjianwen8429@yeah.net.

收稿日期: 2008-11-26, 修回日期: 2009-03-01

西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*) 隶属鲟形目(*Acipenseriformes*) 鲟科(*Acipenseridae*) 鲟属^[1], 是现存 27 种鲟类中的一种, 主要分布于俄罗斯西部的鄂毕河至东部的科雷马河之间的西伯利亚各河流之中^[2]。由于西伯利亚鲟有生长速度快、适应性强等特点, 已在世界范围内推广进行人工养殖, 中国鲟鱼养殖业自 20 世纪 90 年代以来发展迅猛, 西伯利亚鲟已成为我国淡水规模化商业养殖的优良新对象^[3]。近年来, 随着鲟鱼人工养殖范围的不断扩展, 西伯利亚鲟已成为我国第二大鲟鱼养殖鱼种^[4], 相关研究也越来越深入。

鲟鱼卵素有“黑黄金”之称, 其中的卵黄是鱼类胚胎发生期的主要营养物质, 卵黄的含量及质量对于早期幼体维持生命和生长发育至关重要^[5]。卵黄积累过程是鱼类性腺发育中的重要过程, 其为正在发育的胚胎提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、维生素、磷、硫及微量元素等营养物质^[6]。目前, 对于鲟鱼卵黄脂磷蛋白(*lipovitellin*, Lv) 的研究, 只在杂交鲟(*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*)^[5]、小体鲟(*A. ruthenus*)^[7]和施氏鲟(*A. schrenckii*)^[8]中有过报道。本研究分离纯化了西伯利亚鲟 Lv, 并对其部分理化性质及氨基酸组成进行了分析, 为进一步了解鲟科鱼类卵黄蛋白的组成、性质和卵黄的发生及合成提供一些理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料 西伯利亚鲟鱼卵取自杭州千岛湖鲟龙科技开发有限公司千岛湖养殖基地鱼子酱生产车间。取 12 尾西伯利亚鲟冰浴麻醉后, 分别收集鱼卵并去除内附脂肪, 用缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 冲洗干净, 于 -80℃超低温冰箱中保存待用。

1.1.2 主要试剂 低分子量标准蛋白购自大连宝生物工程有限公司, 成分为兔磷酸化酶 B 97.4 ku, 牛血清白蛋白 66.2 ku, 兔肌动蛋白 43.0 ku, 牛碳酸酐 31.0 ku, 胰蛋白酶抑制剂 20.1 ku。Sephacryl S-300 购自 GE Healthcare 公

司。叠氮钠和苯甲基磺酰氟购自上海捷瑞生物工程有限公司。甲基绿、碱性品红和油红 O 为国药集团化学试剂有限公司产品。其他试剂为进口分装或国产。

1.2 实验方法

1.2.1 西伯利亚鲟全卵粗提液的制备 取西伯利亚鲟鱼卵 50 g, 加入 2 倍体积预冷的匀浆缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl 含 0.1 mol/L NaCl、0.01% 的叠氮钠、0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, pH 8.0)。用玻璃匀浆器在冰浴条件下初步研碎后, 4℃条件下超声波细胞粉碎机破碎(宁波新芝超声波细胞破碎仪, 工作 15 次, 每次持续时间 3 s)。匀浆液在 4℃条件下经 12 000 g 离心 15 min, 取中间层清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用于层析分离。

1.2.2 凝胶过滤层析 取卵蛋白粗提取液上柱, 选取丙烯葡聚糖凝胶 Sephacryl S-300 作为填料, 柱子规格为 1.6 cm × 70 cm, 用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 含 0.1 mol/L NaCl) 匀速洗脱, 洗脱流速 0.8 ml/min。采用上海精科公司 HD-9704 型核酸蛋白检测仪在线检测(波长定于 280 nm), 电脑自动记录洗脱曲线。自动分部收集器以每管 2 ml 收集各洗脱峰, 洗脱完毕合并主峰。采用 EYELA FDU-1100 型冷冻干燥机对收集液进行浓缩(-45℃, 10 Pa), 于 -20℃下保存备用。

1.2.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 将浓缩的各洗脱峰分别进行变性聚丙烯酰胺电泳。分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 4%, 样品与上样缓冲液以 4:1 混合, 浓缩电压 100 V, 分离电压恒定为 180 V。待指示剂距分离胶末端 0.5 cm 处停止电泳。电泳后的凝胶用固定液(甲醇:冰醋酸:蒸馏水=5:1:4)浸泡 2 h, 然后于 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h, 再在脱色液(甲醇:冰醋酸:蒸馏水=1:1:8)中脱色至背景清晰。用 BIO-RAD 凝胶成像系统拍照保存^[9]。所分离的蛋白质的分子量采用 BIO-RAD 凝胶图像分析软件 Quantity One Version 4.5.2 完成。

1.2.4 脂蛋白特性鉴定 参照 Noble^[10] 的方法。将电泳后的凝胶放入 5% 乙酸中固定 20

min, 用水冲洗数次后, 放入油红 O 染液中过夜, 第二天将凝胶在 60% 酒精中浸洗 5 min, 最后用蒸馏水冲洗以除去底色, 用佳能数码相机拍照保存。

1.2.5 磷蛋白特性检测 参照 Cutting 等^[11] 的方法。将电泳后的凝胶转入 10% 磷基水杨酸中固定 1 h, 在 60℃ 条件下, 经 0.5 mol/L NaOH 溶液浸浴 30 min 后, 用 1% 钼酸铵洗涤 10 min, 然后再采用 1 mol/L HNO₃ 配置的 1% 钼酸铵溶液染色 30 min。最后用 0.5% 甲基绿染色液染色 30 min, 经 10% 磷基水杨酸脱色至磷蛋白条带清晰为止。

1.2.6 糖蛋白特性检测 参照 Fairbanks^[12] 和 Sun 等^[13] 的方法。将电泳后的凝胶放入 15% 的三氯乙酸中, 4℃ 下振荡过夜; 然后将凝胶放入 0.5% 的高碘酸中振荡 2 h。随后将凝胶移入 20 mmol/L 的高碘酸钠溶液中, 30 min 后用 5 mmol/L 高碘酸钠溶液洗涤 2 次, 每次 20 min。再用 5% 的乙酸洗涤 10 min, 将洗涤后的凝胶放入 Schiff 试剂中染色过夜。最后用 5 mmol/L 的 Na₂S₂O₅ (内含 10 mmol/L HCl) 溶液对凝胶进行漂洗, 至背景不再显示粉红色。

1.2.7 氨基酸组成分析 目的蛋白经浓缩后加入 6 mol/L HCl, 充氮气, 封管; 在 110℃ 条件下水解 24 h。开管, 样品抽真空干燥, 去离子水洗。水解后氨基酸样品用缓冲液稀释后上机, 用 Biochrom 20 型氨基酸自动分析仪分析。

2 结 果

2.1 卵粗提液 SDS PAGE 电泳 西伯利亚鲟全卵粗提液经 12% SDS-PAGE 电泳后共得 10 条带(图 1), 分子量分别是 145.6 ku、91.1 ku、76.7 ku、60.3 ku、47.1 ku、40.8 ku、37.1 ku、35.1 ku、30.6 ku 和 21.3 ku。其中分子量为 30.6 ku、40.8 ku 和 91.1 ku 的蛋白电泳为主带型。

2.2 卵黄蛋白的分离纯化 卵粗提液经 Sephacryl S-300 凝胶过滤层析的洗脱曲线如图 2 所示, 共得到 7 个洗脱峰 a、b、c、d、e、f 和 g。各峰之间分离效果良好, 经 SDS-PAGE 电泳后发现峰 b 有明显大分子主带出现, 如图 3 所示。

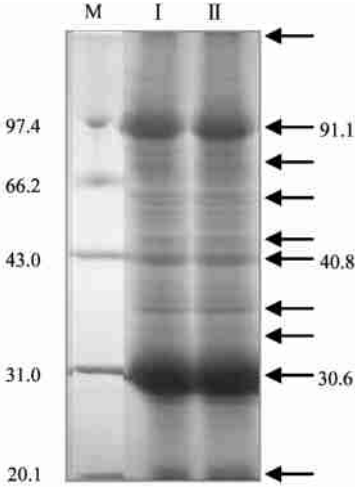


图 1 西伯利亚鲟卵粗提液 SDS PAGE 电泳图谱

Fig. 1 SDS PAGE for the egg crude extraction

M: 标准蛋白; I、II: 西伯利亚鲟卵粗提液。

M: Marker; I, II: Egg crude extract.

由于鱼卵中主要蛋白均为大分子量的 L_v, 从而初步推测峰 b 为可能的 L_v, 浓缩峰 b 蛋白洗脱液做进一步特异染色鉴定。将多次层析所得峰 b 蛋白经 Sephacryl S-300 再次洗脱, 结果显示为单一蛋白峰(图 4)。

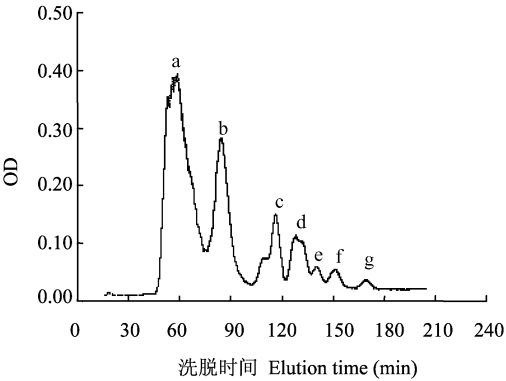


图 2 西伯利亚鲟卵粗提液 Sephacryl S-300

洗脱曲线

Fig. 2 Analytic elution curve of column chromatography on Sephacryl S 300 for egg crude extract of *Acipenser baerii*

2.3 峰 b 蛋白 SDS PAGE 电泳分析 将纯化所得的峰 b 进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 4), 峰 b 蛋白由 3 个亚基组成, 分子量分别为 30.6 ku、40.8 ku 和 76.7 ku。

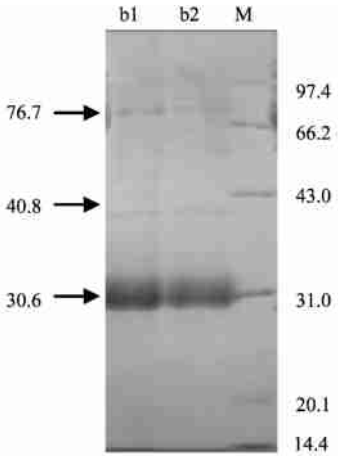


图 3 峰 b 蛋白 SDS PAGE 图谱

Fig. 3 SDS PAGE for the peak b protein

b1, b2: 峰 b 蛋白; M: 标准蛋白。
b1, b2: The peak b protein; M: Marker.

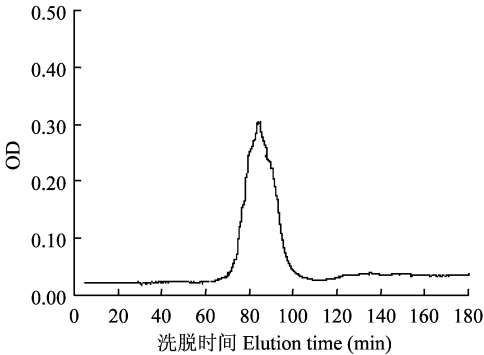


图 4 峰 b 蛋白 Sephacryl S 300 凝胶层析洗脱曲线

Fig. 4 Analytic elution curve of column chromatography on Sephacryl S 300 for peak b protein

2.4 糖、脂、磷蛋白特异染色 纯化所得的 *L_v* 经 Schiff、油红 O 和甲基绿-钼氨酸特异染色(图 5), 峰 b 蛋白均呈现阳性反应, 磷蛋白、脂蛋白和糖蛋白均在蛋白图谱的同一位置出现相同的带, 没有发现可以被 3 种染色方法同时染色的其他蛋白带, 表明纯化所得峰 b 蛋白确是一种卵黄脂磷蛋白。

2.5 *L_v* 氨基酸组成分析 西伯利亚鲟 *L_v* 的氨基酸组成与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[14] 和哲罗鱼(*Hucho perryi*)^[15] 的比较结果见表 1。结果显示, 西伯利亚鲟 *L_v* 中天冬氨酸(12.19%)、

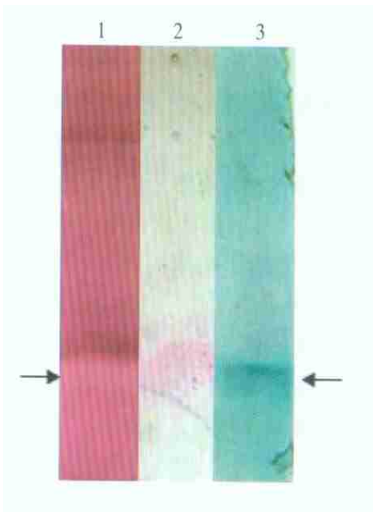


图 5 峰 b 蛋白特异染色

Fig. 5 The specific staining of peak b protein

1. 糖蛋白特异染色; 2. 脂蛋白特异染色;
3. 磷蛋白特异染色。
1. Glycosidoprotein staining; 2 Lipoprotein staining
3. Phosphoprotein staining

表 1 西伯利亚 鲟卵黄脂磷蛋白的氨基酸组成
及与其他鱼的比较(重量百分比%)

Table 1 Amino acid composition of the purified *L_v* from *Acipenser baerii* (weight%)

氨基酸 Amino acids	西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>	虹鳟鱼 ^[14] <i>Oncorhynchus mykiss</i>	哲罗鱼 ^[15] <i>Hucho perryi</i>
天冬氨酸 Aspartic	12.19	7.60	6.66
苏氨酸 Threonine	5.67	5.29	5.39
丝氨酸 Serine	9.60	4.77	4.22
谷氨酸 Glutamic	11.01	11.51	10.63
甘氨酸 Glycine	4.40	4.02	4.37
丙氨酸 Alanine	3.59	14.13	13.61
半胱氨酸 Cysteine	1.70	0.80	nd
缬氨酸 Valine	7.38	7.63	8.10
甲硫氨酸 Methionine	0.76	2.54	0.86
异亮氨酸 Isoleucine	5.35	5.87	6.64
亮氨酸 Leucine	6.71	10.33	10.22
酪氨酸 Tyrosine	5.28	2.87	3.23
苯丙氨酸 Phenylalanine	4.30	4.60	4.42
组氨酸 Histidine	2.51	2.19	2.13
赖氨酸 Lysine	11.62	6.23	6.59
精氨酸 Arginine	4.59	4.38	8.02
脯氨酸 Proline	3.35	5.32	4.91
氨基酸总量			
Total amino acids	100.01	100.08	100.00

nd= 未检出。nd= Not detected.

赖氨酸(11.62%)、谷氨酸(11.01%)和丝氨酸(9.6%)含量较高,这些极性氨基酸占蛋白总量的64.16%;非极性氨基酸缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和脯氨酸占总蛋白含量的35.84%,其中缬氨酸和亮氨酸含量较高,分别占蛋白总量的7.38%和6.71%。含量最少的是甲硫氨酸,只占到蛋白含量的0.76%,其次是半胱氨酸1.70%。

3 讨论

卵黄脂磷蛋白是鱼类卵黄的主要组成物质。卵黄形成主要有两种方式,一是可以在卵母细胞本身中合成,称为内源卵黄合成;二是在卵母细胞以外的地方合成,然后入卵母细胞,称为外源性卵黄合成。在卵黄形成期,鱼类肝在雌激素作用之下,合成Lv前体卵黄蛋白原^[16],分泌到血液中,由血液运送到卵巢,卵黄蛋白原入卵后在酶的作用下,裂解为卵黄的主要成分Lv,高磷蛋白(phosvitin, Pv)和 β 成分^[17]。

实验中西伯利亚鲟的卵粗提液经SDS-PAGE电泳,显示其由含有10种不同表观分子量的亚基组成,这表明卵黄蛋白原进入卵母细胞后,被蛋白酶水解成若干小分子的蛋白。在不同的物种或同属不同种之间,因为胚胎发育存在差异,其所需的营养成分及其含量各不一样,在卵巢的卵母细胞发育过程中卵黄蛋白原经过不同形式的加工形成了卵黄蛋白的多样性^[18]。

目前普遍应用于分离纯化Lv的方法很多,主要有EDTA加MgCl₂分级沉淀、凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析及电泳法等^[19]。现在已有若干鱼类的Lv被纯化鉴定。日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)的一种Lv是由4个分子量为85 ku的亚基构成^[20]。Fenske等对斑马鱼(*Danio rerio*)的Lv研究表明,其是由2种分子量分别为90 ku和86 ku的肽链构成^[21]。霍堂斌等对小体鲟卵黄脂磷蛋白的研究表明,其是由97.4 ku和30 ku的2个亚基组成^[7]。师晓栋研究证明了玫瑰无须(*Puntius conchonius*)的

Lv是由分子量分别为125 ku、110 ku和76 ku的3个亚基组成^{*}。姚静等对唐鱼(*Tanichthys albonubes*)的研究也表明,其Lv是由分子量分别为98 ku、96 ku和71 ku的3种亚基构成^[22]。

本研究开始采取了利用凝胶电泳来分离纯化Lv,但是这种方法处理蛋白时间过长,回收后蛋白大部分已变性或降解。后采用凝胶过滤层析方法来分离,通过比较不同填料的分离效果,最后选择了分离范围广泛、分级精细的Sephacryl S-300填料来对西伯利亚鲟Lv进行分离纯化,在4℃和0.2 mmol/L蛋白酶抑制剂PMSF的条件下,共层析分离得到7个蛋白峰,各峰之间分离效果明显,电泳分析表明,达到了很好地纯化西伯利亚鲟Lv的目的。经SDS-PAGE电泳分析表明,其由分子量分别为30.6 ku、40.8 ku和76.7 ku的3个亚基构成,这与前人对其他一些鱼类的研究结果^[7,21,22]相似。对分离纯化得到的西伯利亚鲟Lv进行糖、磷、脂特异性染色,结果均为阳性,进一步证实了西伯利亚鲟Lv是一种糖脂磷蛋白,这与小体鲟、施氏鲟和杂交鲟等^[5,7,8]鱼类的Lv含丰富的糖、脂和磷的特点一致。

首次对西伯利亚鲟Lv的氨基酸组成进行的分析,证明西伯利亚鲟Lv是一种含有相对较多天冬氨酸、赖氨酸、谷氨酸、丝氨酸、缬氨酸和亮氨酸的蛋白。在西伯利亚鲟Lv中鲜味氨基酸(谷氨酸、天冬氨酸)所占比率较大,比虹鳟^[14]和哲罗鱼^[15]Lv中的明显偏高,这说明西伯利亚鲟鱼卵确实是制作鱼子酱的一种良好材料,味道鲜美,经济价值高。一些氨基酸如甲硫氨酸(0.76%)、组氨酸(2.51%)、半胱氨酸(1.70%)、苏氨酸(5.67%)、甘氨酸(4.40%)、异亮氨酸(5.35%)和苯丙氨酸(4.30%)含量偏低,这与虹鳟^[14]和哲罗鱼^[15]Lv氨基酸组成中含量偏低的氨基酸种类及含量十分相近。西伯利亚鲟Lv中赖氨酸(11.62%)及丝氨酸(9.60%)含量比虹鳟鱼和哲罗鱼中相应氨基酸

* 师晓栋. 玫瑰无须 卵黄脂磷蛋白的纯化、免疫分析和功能研究. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2004

含量高,而非极性氨基酸如亮氨酸(6.71%)和丙氨酸(3.59%)含量偏低。西伯利亚鲟 L_v 中赖氨酸含量比其他鱼类丰富,赖氨酸能显著提高钙的吸收及其在体内的积累,加速骨骼生长,西伯利亚鲟骨板较多,富含大量的赖氨酸,可能有利于其骨板的健康发育。在西伯利亚鲟 L_v 中的非极性氨基酸总量(35.84%)比水蛭(42%)^[23]、螃蟹(43%)^[24]、蛙类(39%)^[25]、爬行类(37%)^[26]和鸟类(37%)^[27]的含量都稍低一些,这可能与它的脂蛋白功能有关^[28]。另外发现西伯利亚鲟 L_v 与已研究过的虹鳟^[14] L_v 中都有半胱氨酸被检出,可能主要与 L_v 中二硫键的形成有关,进而也证实了 L_v 是由多个亚基构成的一种复杂蛋白。这种复杂蛋白的发生与合成机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 张涛,章龙珍,赵峰等. 西伯利亚鲟不同性别与卵巢发育时期血液性类固醇激素的差异与判别分析. 海洋渔业, 2008, **30**(1): 20~ 27.
- [2] 张照斌,牛翠娟,朱华等. 室内饲养西伯利亚鲟的血清性类固醇激素的周年变化. 北京师范大学学报, 2003, **39**(4): 519~ 525.
- [3] 赵峰,庄平,李大鹏等. 盐度对施氏鲟和西伯利亚鲟稚鱼的急性毒性. 生态学杂志, 2008, **27**(6): 929~ 932.
- [4] 张涛,章龙珍,赵峰等. 基于血液生化指标判别分析西伯利亚鲟性别及卵巢发育时期. 中国水产科学, 2007, **14**(2): 236~ 244.
- [5] Hiramatsu N, Hiramatsu K, Hirano K, *et al.* Vitellogenin derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bster (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. *Comp Biochem Physiol A*, 2002, **131**: 429~ 441.
- [6] Hara A, Matsubara T, Sancyashi M, *et al.* Vitellogenin and its derivatives in egg yolk proteins of white spotted char (*Salvelinus leucomaenis*). *Bull Fac Fish Hokkaido Univ*, 1984, **35**: 144~ 153.
- [7] 霍堂斌,张颖,孙大江等. 小体鲟卵黄雌性蛋白分离纯化及抗血清的研制. 中国水产科学, 2007, **14**(4): 532~ 537.
- [8] 张年国,张颖,曲秋芝等. 施氏鲟卵黄蛋白的分离纯化及其性质. 中国水产科学, 2007, **14**(2): 309~ 314.
- [9] 汪家政. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2005, 53~ 59.
- [10] Noble R P, Hatch F T, Marzimas J A, *et al.* Comparison of lipoprotein analysis by agarose gel and paper electrophoresis with analytical ultracentrifugation. *Lipids*, 1969, **4**(1): 55~ 59.
- [11] Cutting J A, Roth T F. Staining of phosphoproteins on acrylamide gel electropherograms. *Anal Biochem*, 1973, **54**: 386~ 394.
- [12] Fairhanks G, Steck T L, Wallace D, *et al.* Electrophoretic analysis of the major polypeptide of the Human erythrocyte membrane. *Biochem*, 1971, **10**: 2 606~ 2 617.
- [13] Sun X T, Zhang S C. Purification and characterization of a putative vitellogenin from the ovary of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunense*). *Comp Biochem Physiol B*, 2001, **129**: 121~ 127.
- [14] Mourot B, Le Bail P Y. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin. *Immunoassay*, 1995, **16**(4): 365~ 377.
- [15] Hiramatsu N, Hara A. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin Taimen (*Hucho perryi*). *Com Biochem Physiol A*, 1996, **115**: 243~ 251.
- [16] 吴楠,张毅,李惠云等. 壬基酚和雌二醇干扰罗氏沼虾卵黄蛋白原 VTG 基因表达的效应. 动物学杂志, 2007, **42**(4): 1~ 7.
- [17] Byrne B M, Gruber M. The evolution of egg yolk protein. *Prog Biophys Mol Biol*, 1989, **53**: 33~ 69.
- [18] 张士瑾,孙旭彤,李红岩等. 卵黄蛋白原研究进展. 海洋科学, 2002, **26**(7): 32~ 35.
- [19] Shi G Q, Shao J, Jiang G, *et al.* Membrane chromatographic method for the rapid purification of vitellogenin from fish plasma. *Chromatography*, 2003, **785**: 361~ 368.
- [20] Hara A. Study on female specific serum proteins (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts: immunochemical, phycochemical and structural studies. *Mem Fac Hokkaido Univ*, 1987, **34**: 1~ 59.
- [21] Fenske M, Aerie R V, Brack S, *et al.* Development and validation of homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton Buchanan) vitellogenin enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp Biochem Physiol C*, 2001, **129**: 217~ 232.
- [22] 姚静,方展强,徐杰等. 唐鱼卵黄脂磷蛋白的纯化与免疫原性分析. 应用与环境生物学报, 2008, **14**(2): 69~ 73.
- [23] Baert J L, Britel M, Sbmianny M C, *et al.* Yolk protein in leech: identification, purification and characterization of vitellin and vitellogenin. *Eur J Biochem*, 1991, **201**: 191~ 198.
- [24] Lui C W, Connor J D. Biosynthesis of lipovitellin III. The incorporation of labeled amino acids into the purified

lipovitellin of the crab. *J Exp Zool*, 1977, **199**: 105~ 108.

[25] Montorzi M, Falchuk K H, Vallee B L. Xenopus laevis vitellogenin is a zinc protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **200**: 1 407~ 1 413.

[26] Dejaml R, Brookes V. Insect lipovitellin: chemical and physical characteristics of a yolk protein from the ovaries of *Leuophaea maderae*. *J Biol Chem*, 1972, **247**: 869~ 874.

[27] Brown M A, Came A, Chambers G K. Purification, partial characterization and peptide sequences of vitellogenin from a reptile, the tuatara (*Sphenodon pundatus*). *Comp Biochem Physiol B*, 1997, **117**: 159~ 168.

[28] Tao Y, Hara A, Modson R G, et al. Purification characterization, and immunoassay of striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin. *Fish Physiol Biochem*, 1993, **12**: 31~ 46.

凌云沼虾(*Macrobrachium lingyunense*)

凌云沼虾(*Macrobrachium lingyunense* Li, Cai & Clarke 2006) (封面图片) 是一种典型的洞穴沼虾。眼睛极度退化, 步足等外部形态特征及其他生物学特性也显示出真洞穴生物(troglobiont) 的特征, 包括缺乏体色素、附肢延长、繁殖无季节性、耗氧量降低、新陈代谢缓慢等。

凌云沼虾成体长 13~ 18 mm(步足长度不计在内)。头胸甲光滑, 额角直。额角平直, 伸至或稍长于鳞片末端, 上缘具 7~ 9 齿, 有 3~ 4 齿位于眼眶后缘的头胸甲上, 中部各齿间距离较宽; 下缘具 3~ 4 齿。眼下叶不明显。触角刺位于眼角腹侧, 肝刺位于触角刺下方。第 4 及第 5 腹节腹片具不明显横脊, 脊中部均具齿, 其中第 5 腹板齿较大。尾节末端呈尖刺状, 具两对背刺; 末端刺不长于后侧角刺。上唇非二裂状, 眼小, 眼柄高度退化, 角膜无色素。鳞片外侧平直。第一对步足腕节约为螯长的 1.5 倍。第二对步足两侧对称, 雄性各节表面光滑(雌性背侧稍粗糙), 具少量刚毛; 螯约为腕长的 1.9~ 2.1 倍; 指节约为掌节的 1.5 倍, 闭合时指端部相交; 指节切缘光滑, 只有近缘具一小齿, 闭合时无缝; 掌节近圆柱形, 短于腕节, 稍膨起; 长节与腕节长度相似。第三至第五对步足较细, 形态相似; 第三步足超过鳞片末端约 1/2 掌节长度, 腕节明显短于掌节; 第五步足细于第三步足, 超过鳞片末端约 7/10 掌节长度。凌云沼虾为杂食性动物, 主要以水生生物、单细胞生物、有机腐屑以及藻类的碎屑等为食。

凌云沼虾的正模标本是中国科学院动物研究所张春光研究员于 2001 年 11 月 26 日在广西壮族自治区凌云县沙洞发现并采集的。副模标本由澳大利亚动物学家阿瑟·克拉克(Arthur Clarke) 于 2000 年 10 月 11 日在同一洞穴采集。中国科学院动物研究所李 莼、新加坡国家园林管理局蔡奕雄、澳大利亚塔斯曼尼亚大学阿瑟·克拉克于 2006 年合作发表了这一物种。

凌云沼虾是中国报道的第一个洞穴沼虾。此前, 世界上沼虾属共报道 9 种洞穴物种, 分布在马来西亚(*M. gua*)、中美洲(*M. cationium*)、日本(*M. miyakoense*)、印度(*M. cavernicola*)、墨西哥(*M. villalobosi*)、西印度群岛(*M. lucifugum*)、美国(*M. acherontium*)、巴布亚新几内亚(*M. microps*)和印度尼西亚(*M. poeti*)。除去 *M. lucifugum* 分布在西印度群岛的几个岛上, 其余种类都只分布在 1~ 2 个洞内。这意味着一旦少数洞穴环境破坏, 就可能导致一个物种的灭绝。随着洞穴旅游等人类活动的加剧, 建立一套完整的洞穴生物保护机制十分必要。

作为世界上洞穴数量最多的区域, 中国也有可能是世界上洞穴生物物种最丰富的国家之一。仅中国科学院动物研究所无脊椎动物研究组在过去的 5 年中, 就陆续报道了 3 科 5 属 18 种洞穴虾类和 16 科 27 属 80 种洞穴蜘蛛。这些显然只是冰山的一角, 未来中国洞穴生物的发现与保护, 中国科学家义不容辞。

(封面图片摄影: 兰家湖、朱瑜 2008 年 4 月摄于广西壮族自治区河池市都安瑶族自治县下坳乡)

李枢强^① 朱 瑜^②

(^① 中国科学院动物研究所 北京 100101;
^② 广西水产畜牧学校 南宁 530021)