

doi: 10.7541/2015.38

镉对河南华溪蟹卵黄磷蛋白在卵巢中表达含量的影响 及 ELISA 法的建立

杨 健¹ 刘冬梅² 何永吉¹ 汉斯·达姆斯³ 王 兰¹

(1. 山西大学生命科学学院, 太原 030006; 2. 山西医科大学基础医学院, 太原 030006;
3. 高雄医学大学生命科学院, 高雄 80708)

摘要: 为了探究镉对河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)的卵子发生的影响, 通过凝胶过滤层析法纯化了成熟卵巢中的卵黄磷蛋白(Vitellin, Vn), 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳确定了 Vn 亚基数量及分子量, 以纯化的 Vn 为抗原制备了 Vn 多克隆抗血清并建立了可靠的 Vn 含量测定的 ELISA 方法。采用氯化镉体外亚慢性染毒的方法, 运用 Vn-ELISA 方法检测镉暴露对卵巢组织中 Vn 含量的影响。实验设对照组和 5.8 mg/L 镉处理组, 处理时间分别为 10、15 和 20d。结果显示, (1) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明该蛋白由分子量为 102、84 和 70 kD 的 3 个亚基组成, 同时 Western-blotting 检测表明, 抗血清对该蛋白具有较强的免疫特异性; (2) 在 Vn-ELISA 中, Vn 抗体最佳稀释倍数为 1:100000, 该方法的工作浓度范围为 125—2000 ng/mL, 定性检测的灵敏度可达到 15.62 ng/mL; 卵巢中 Vn 含量测定的结果中各批次间没有显著差异, 且平均变异系数分别仅为 7.81%, 表示该法具有较高的稳定性和重复性; (3) 镉引起卵巢组织中 Vn 含量的显著降低, 与镉处理时间具有时间-效应关系, 说明了镉暴露可影响河南华溪蟹卵母细胞的成熟并对卵子发生产生抑制作用, 进而影响卵巢的正常发育。

关键词: 河南华溪蟹; 卵黄磷蛋白; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 酶联免疫吸附法; 镉

中图分类号: X174 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2015)02-0287-07

镉在工业中的大量使用导致其成为环境中大量存在的非必需金属元素之一, 同时也成为水体污染中一类典型的环境污染物。本实验室早期研究发现镉可以在河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)卵巢、肝胰腺、鳃以及肌肉等组织中富集, 导致生物体产生急性或慢性中毒, 造成组织器官出现不同程度的损害, 如镉诱导的细胞坏死、细胞凋亡和脂质过氧化反应^[1-4]。韩托等^[5]研究发现在镉富集的水域生物个体大量死亡, 这直接导致水生生物种群数量和生物多样性显著降低。此外, 研究发现镉会对鱼类、蟹类和鸟类的脂质、糖类和蛋白质代谢产生影响, 从而影响物种的迁徙和繁殖^[6-8]。同时由于镉的半衰期较长, 通过消化及呼吸系统进入机体后造成的

损伤是永久的, 这将会长期影响水生环境中物种的繁殖过程进而影响生物种群及生态系统, 因此探究可反映污染物对生物早期影响的繁殖参数是水生生态毒理学研究中急需解决的问题。

卵子发生是甲壳动物卵巢发育中的一个重要阶段, 表现为卵母细胞中卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)的形成和积累^[9]。在卵巢中, Vg 会通过进一步的修饰和加工形成包含有 Vg、脂类、碳水化合物和色素等物质的卵黄磷蛋白(Vitellin, Vn), 并在卵母细胞中积累形成卵黄体。Vn 是甲壳动物卵子存活和胚胎发育所需营养物质的主要来源, 卵巢中 Vn 积累的多少直接影响到其后生殖过程和幼体质量。因此, Vn 可作为研究甲壳动物繁殖的重要生物指标^[10]。此

收稿日期: 2014-09-04; 修订日期: 2014-12-07

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30870267, No. 30970361); 山西省回国留学人员科研项目(No. 2010015); 山西省普通高校特色重点学科建设项目(No. 2011-SXDX-SWX-003)资助

作者简介: 杨健(1988—), 男, 山西长治人; 博士; 主要从事环境重金属污染研究方向。E-mail: yangjian333001@126.com

通信作者: 王兰(1960—), 女, 山西太原人; 教授; 主要从事典型重金属污染的细胞与分子机制研究方向。E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

外,甲壳动物的卵黄发生过程由于受内分泌系统、外部环境的调节而具有较高的复杂性,目前对其内在的调控机制研究已成为甲壳动物研究热点和难点之一^[11, 12]。甲壳动物 Vn 已有的研究发现, Vn 含量与卵巢发育阶段具有一定的相关性,因此机体组织中 Vn 含量测定对于研究镉对甲壳动物卵巢发育和卵子发生的影响具有重要意义。

酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA)已被广泛用于甲壳动物 Vn 含量的测定^[13, 14]。不同的甲壳动物在 Vn 亚基数目、空间结构和分子量上通常存在一定差异,因此需要针对不同物种制备具有特异性的 Vn 抗体,并在此基础上建立适合该物种 Vn-ELISA 方法,为进一步研究甲壳动物卵黄发生及镉对卵巢发育的影响提供重要依据。目前,对于甲壳动物卵子发生和镉对卵巢发育的影响已进行了较为广泛的研究^[13-16]。然而河南华溪蟹在这方面的研究少有报道。因此,当前迫切需要建立一种较为可靠的方法以测定镉处理后河南华溪蟹卵巢中 Vn 含量。本研究分离并纯化了河南华溪蟹的 Vn,制备了 Vn 多克隆抗体,优化了 Vn 测定的 ELISA 参数,该方法不仅可以用于研究镉对河南华溪蟹卵巢中卵子发生的影响,还可作为深入研究河南华溪蟹生殖调控和环境监测的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

河南华溪蟹(简称“溪蟹”)于2013年10月购自山西省太原市五龙口水产批发市场。选取卵巢发育成熟的雌蟹置于实验室水族缸中暂养三周后进行活体解剖后将卵巢保存于-80℃冰箱中备用。

1.2 卵黄磷蛋白分离和纯化

卵巢粗提液的制备 溪蟹成熟卵巢中加入10倍体积预冷的匀浆缓冲液(0.02 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.01% EDTA, 0.1 mmol/L PMSF)冰浴匀浆,在4℃ 12000×g下离心30min后取橘黄色上清液并加入等体积的饱和硫酸铵溶液,冰浴1h后再次在4℃ 12000×g下离心30min,弃上清液,向离心管中加入2 mL的PBS缓冲液(0.1 mol/L KH₂PO₄, 0.1 mol/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L KCl, 0.01% EDTA, pH 7.7)溶解沉淀,然后重复“沉淀-离心-复溶”的步骤5次,最后将沉淀物溶解于1 mL PBS缓冲液中用于凝胶过滤层析分离纯化

蛋白。

卵黄磷蛋白提取 采用凝胶柱体积为260 mL(直径×高度=2.6 cm×100 cm,上海厦美生物科技发展有限公司生产),装入220 mL凝胶(型号Sephacryl™ S 100 HR,瑞典Pharmacia公司生产),纯化前首先采用PBS缓冲液溶液平衡凝胶柱,流速16 mL/h,平衡1h。用注射器上样2 mL Vn提取液,流速为16 mL/h,使用UVD-680-3紫外检测器(上海金达生化仪器厂)在280 nm条件下检测洗脱液的吸收值。当出现蛋白组分时开始收集,每2 mL收集1管,洗脱液于-80℃保存备用。使用SpectraMax M5多功能酶标仪(美国Molecular Devices分子仪器公司)对提纯后的卵黄蛋白溶液进行连续光谱扫描(700—200 nm)以检测类胡萝卜素。

1.3 卵黄磷蛋白亚基数量及分子量分析

将纯化蛋白进行变性聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE,分离胶质量浓度为10%,浓缩胶质量浓度为5%),然后用考马斯亮蓝R-250染色后,在Tanon-2500(上海天能公司)凝胶成像仪拍照,通过与蛋白标准比对并采用BandScan 5.0软件以确定溪蟹Vn各亚基的分子量。

1.4 抗体制备和免疫印迹

选用6—8周龄雌性BALB/c小鼠作为免疫动物,暂养1周后将纯化的Vn溶液与QuickAntibody等体积混合后用于免疫注射。每只小鼠于后腿小腿肌肉首次免疫注射100 μL(免疫抗原量25 μg)的抗原乳化液,此后第21天再次注射100 μL抗原乳化液进行加强免疫,第35天小鼠摘除眼球取血,室温静置1h待血液凝固后,于4℃ 12000×g离心10min后取上清,加入0.02% NaN₃,无菌分装于-80℃。

采用蛋白免疫印迹(Western-Blotting)检验抗体和抗原免疫反应的特异性。首先将纯化的Vn进行SDS-PAGE电泳,电泳条件同前。电泳结束后的凝胶在72 V电压下转膜1h。将鼠多克隆抗体按1:5000稀释,加样体积为1 mL,室温孵育1h;加入1:2000稀释的羊抗鼠IgG-IRP(Catalog No. HSA0004,上海麦约尔生物技术有限公司生产)作为二抗,室温孵育1h后用1 mL PBST(10 mmol/L PBS, 0.05% Tween-20, pH 7.2)洗涤3次,每次10min;采用DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒(德国Roche公司)显色3min后采用Tanon-2500凝胶成像仪拍照。

1.5 Vn 抗体效价检测和 Vn-ELISA 建立

采用间接包被法 ELISA 确定鼠多克隆 Vn 抗体的有效稀释倍数并建立 Vn-ELISA 标准曲线。主要包括抗原包被、封闭、加抗体、显色、反应终止和读数等步骤。(1)包被: 将纯化的 Vn 用包被缓冲液(0.05 mol/L Na₂CO₃, 0.05 mol/L NaHCO₃, pH=9.6)溶解成 1 μg/mL, 然后按每孔 100 μL 进行包被, 4 过夜后去除包被液;(2)封闭: 用 200 μL 的 PBST 重复清洗 3 次后, 每孔加入 200 μL 的封闭液(1%牛血清白蛋白)封闭 2h, 然后用 PBST 洗涤 3 次;(3)加抗体: 将纯化后的 Vn 抗血清按 1:1000、1:10000、1:100000 和 1:20000 用 1%的 BSA 进行稀释, 每孔加样 100 μL, 同时以不含 Vn 抗体的 1% BSA 为阴性对照, 37 反应 2h, 每孔用 200 μL PBST 洗涤 3 次后加 100 μL 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 作为二抗, 37 放置 1h 后用 PBST 洗涤 3 次;(4)显色: 加入 100 μL TMB 显色液(北京索莱宝科技有限公司), 室温避光放置 30min;(5)反应终止: 加 50 μL 终止液(2 mol/L H₂SO₄ 溶液);(6)读数: 采用 SpectraMax M5 多功能酶标仪测定 450 nm 的吸光度。

在上述实验的基础上进行标准曲线制备, Vn 稀释液的质量浓度分别为 7.81、15.62、31.25、62.5、125、250、500、1000、2000 和 4000 ng/mL, 每个质量浓度组各重复 3 孔, 同时设置 3 个阴性对照, 在酶标仪上读取 A₄₅₀。根据线性关系和变异系数, 选取具有良好重复性和质量浓度相关性的 Vn 浓度范围绘制标准曲线。

1.6 验证性实验

随机选择 5 只雌性溪蟹, 分别称重 0.1 g 左右的卵巢组织, 加入 10 倍体积预冷的匀浆缓冲液进行匀浆, 将匀浆液在 4 ℃、12000×g 下离心 15min, 取上清液 0.1 mL 用于 ELISA 测定。将匀浆液用包被缓冲液稀释后用于 ELISA 测定; 该实验重复进行 3 次, 然后分析批次间的误差及变异系数, 从而验证本实验建立 ELISA 方法的可靠性和稳定性。

1.7 样本染毒处理

选取处于卵巢发育期的成年雌性溪蟹进行染毒处理。实验设对照组和 5.8 mg/L 镉染毒组, 体外暴露 10、15 和 20d 后取样。各染毒时间组随机选取 5 只溪蟹迅速解剖, 取出卵巢组织后采用 Vn-ELISA 法以测定其 Vn 含量。每个实验进行 3 次独立的重复。

1.8 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件(SPSS Inc., Chicago, USA)对实验数据进行统计分析, 数据采用平均值±标准差表示。分别采用 Kolmogorov-Smirnov 和 Levene 法进行数据分布和方差齐性检验, 采用单因素方差分析中的 Dunnett's post-hoc 法对实验结果进行方差分析。采用 Test (independent samples Test)比较不同 Vn 抗体稀释倍数、不同 Vn 质量浓度和不同测定批次对结果是否存在显著差异, LSD 法进行染毒组与对照组两两比较, 以 P<0.05 为差异显著标准。

2 结果

2.1 河南华溪蟹 Vn 的分离纯化和亚基组成

溪蟹卵巢匀浆液凝胶柱层析结果显示成熟卵巢匀浆液主要含有 1 个蛋白质峰, 洗脱时间在 175—190min 时该蛋白组分大量被洗脱出峰。由于甲壳动物卵黄磷蛋白含有较多类胡萝卜素, 连续光谱扫描的结果显示卵黄磷蛋白在 470 nm 处有明显的光吸收, 故该蛋白峰可能为溪蟹的 Vn。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对该蛋白的进一步分析发现(图 1), 该蛋白由 3 个亚基组成, 他们的分子量分别为 102、84 和 70 kD。进一步通过 WesternBlotting 实验表明, 该蛋白及 3 个蛋白亚基均可与溪蟹 Vn 的多克隆抗体产生特异性免疫反应(图 1)。

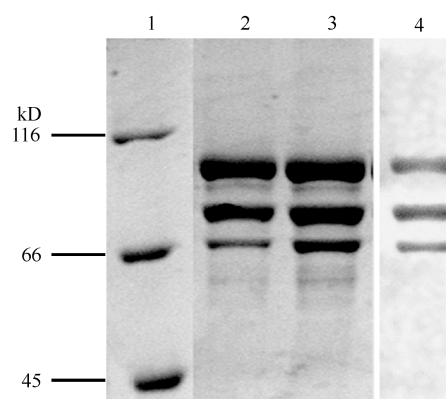


图 1 河南华溪蟹纯化后 Vn 的 SDS-PAGE 和 Western-blotting
Fig. 1 SDS-PAGE and Western-blotting of purified *S. henanense* vitellin

1. 标准蛋白; 2. 卵黄磷蛋白 0.6 mg/mL; 3. 卵黄磷蛋白 0.8 mg/mL; 4. 卵黄磷蛋白 Western-blotting
1. Molecular mass markers; 2. vitellin 0.6 mg/mL; 3. vitellin 0.8 mg/mL; 4. Vn Western-blotting

2.2 河南华溪蟹 Vn 抗体效价检测及标准曲线优化

由表 1 可见不同稀释倍数的溪蟹 Vn 抗体对 ELISA 读数的影响。抗体稀释 1000—200000 倍时,

A_{450} 读数均显著高于阴性对照且各浓度组差异显著。同时抗体稀释 20 万倍时, A_{450} 读数与阴性对照呈显著性差异, 这说明该抗体具体较高的效价。由于抗体稀释 10 万倍时, A_{450} 的差异系数仅为 4.18% 均低于各组, 因此本实验条件下的 Vn 抗血清最佳稀释倍数为 1 : 100000。在上述优化的 Vn 抗血清条件下, 将不同质量浓度的 Vn 包被液按样品直接包被法测定 A_{450} 值。

表 1 河南华溪蟹 Vn 抗体不同稀释倍数的 ELISA 反应的 A_{450} 值

Tab. 1 The A_{450} of ELISA by the different dilution rates of Vn antiserum

Vn 抗体稀释倍数 Vn anti-body dilution rate	A_{450} (Mean \pm SD, $n = 5$)	变异系数 Coefficient of variation (%)
1 : 1000	1.87 \pm 0.22 ^a	12.02
1 : 10000	1.63 \pm 0.07 ^b	4.55
1 : 100000	1.21 \pm 0.05 ^c	4.18
1 : 200000	0.83 \pm 0.13 ^d	7.23
BSA	0.54 \pm 0.04 ^e	8.20

注: 同列数据肩标含有不同上标字母为差异显著 ($P < 0.05$); n 代表样品量, 下同

Note: Values within a column having different superscript letter are significantly different ($P < 0.05$); n means sample number. The same applies bellow

表 2 结果显示在 Vn 浓度在 7.81—4000 ng/mL 时, A_{450} 值差异显著。由于 Vn 质量浓度为 7.81 ng/mL 时, A_{450} 值与阴性对照相比不存在显著差异。而当 Vn 质量浓度为 15.62 ng/mL 时, A_{450} 值显著高于 7.81 ng/mL 浓度组和阴性对照, 因此该方法检测 Vn 可检出值为 15.62 ng/mL 左右。

表 2 不同 Vn 质量浓度的 A_{450} 值
Tab. 2 The A_{450} of a serial of Vn concentration

Vn 质量浓度 Vn concentration (ng/mL)	A_{450} (Mean \pm SD, $n = 5$)	变异系数 Coefficient of variation (%)
Control	0.13 \pm 0.03 ^a	8.04
7.81	0.15 \pm 0.01 ^a	20.93
15.62	0.27 \pm 0.02 ^b	8.10
31.25	0.36 \pm 0.04 ^c	10.49
62.50	0.43 \pm 0.05 ^d	12.08
125.00	0.55 \pm 0.05 ^e	9.73
250.00	0.73 \pm 0.07 ^f	9.73
500.00	1.02 \pm 0.03 ^g	2.74
1000.00	1.43 \pm 0.12 ^h	8.58
2000.00	2.03 \pm 0.08 ⁱ	3.91
4000.00	2.03 \pm 0.06 ⁱ	2.73

Vn 质量浓度在 7.81—62.5 ng/mL 时, A_{450} 的变异系数较大不符合标准曲线的要求, 且在 4000 ng/mL 与 2000 ng/mL Vn 浓度组相比, A_{450} 值不存在显著差异, 因此选择 Vn 质量浓度为 125、250、500、1000 和 2000 ng/mL 制作标准曲线。图 2 结果表明在该范围内 Vn 质量浓度和 A_{450} 线性关系良好 ($y = 0.0008x + 0.5565$, $R^2 = 0.9763$, $P < 0.001$, x 和 y 分别代表 Vn 质量浓度和 A_{450}), 且各点的变异系数较低, 因此该标准曲线的重复性和线性相关性均符合要求, Vn 工作浓度范围为 125—2000 ng/mL。

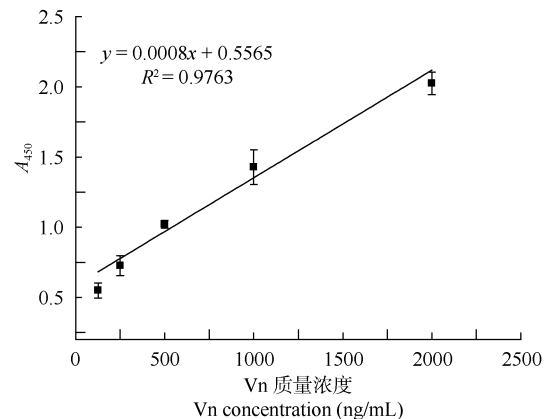


图 2 河南华溪蟹 Vn 的 ELISA 标准曲线

Fig. 2 The ELISA standard curve of purified Vn from the mature female *S. henanense*

2.3 验证性试验

根据建立的 Vn-ELISA 标准曲线, 随机取 5 只雌性溪蟹的卵巢组织进行验证性试验并重复 3 次。表 3 为验证性试验的结果, 批次间平均变异系数仅为 7.81%。批次间测定的 Vn 含量无显著差异, 因此本实验建立的 ELISA 测定方法具有较高的稳定性和可重复性。

表 3 河南华溪蟹卵巢中 Vn 的含量

Tab. 3 The Vn contents in the ovary of female *S. henanense* mg/g wet weight, $n = 5$

批次 Batch	Vn 质量浓度 Vn concentration (ng/mL)	变异系数 Coefficient of variation (%)
1	189.40 \pm 14.17 ^a	7.48
2	185.24 \pm 12.09 ^a	6.53
3	201.40 \pm 19.00 ^a	9.43
平均 Mean		7.81

2.4 镉对河南华溪蟹卵巢中 Vn 含量的影响

图 3 所示, 镉染毒后, 各处理组卵巢中 Vn 含量与对照组比较有显著性降低 ($P < 0.05$), 随着处理时

间的延长, 卵巢中 Vn 含量呈现逐渐降低的趋势, 并在镉处理 20d 染毒组中达到最低值(31.42 ± 7.25) mg/g。

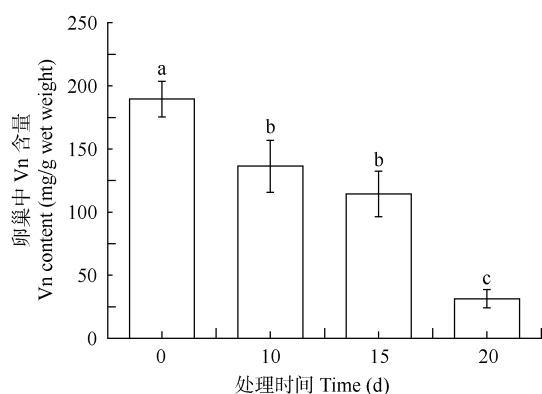


图 3 镉对河南华溪蟹卵巢 Vn 含量的影响

Fig. 3 Effect of cadmium on Vn in ovary of *Sinopotamon henanense*

3 讨论

在大多数的甲壳动物中仅存在一种形式的卵黄磷蛋白^[17, 18], 然而 Serrano-Pinto 等^[19]和 Laino 等^[20]的研究发现了两种存在形式的卵黄磷蛋白。在本研究中, 通过凝胶过滤层析法纯化了溪蟹成熟卵巢中的 Vn。在经过 SDS 处理后发现该蛋白分成 3 条多肽链, 分子量分别为 102、84 和 70 kD, 并且各亚基彼此差异明显, 这与其他甲壳动物的研究结果存在一定的差异。大量研究表明甲壳动物卵黄磷蛋白的分子量通常在 200—700 kD, 且多由 2—6 个亚基组成, 如中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)卵黄磷蛋白的分子量为 520 kD, 两种亚基的分子量分别为 97 和 74 kD^[13]; 锈斑蜉(*Charybdis feriatius*)Vn 两个亚基分子量分别为 105 和 76 kD^[21]; 陆蟹(*Potamoum potamios*) 3 个亚基分子量分别为 115、105 和 85 kD^[22]; 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) 3 个亚基分子量分别为 110、96 和 89 kD^[23]; 三疣梭子蟹卵黄磷蛋白的亚基数为三个, 分子量分别为 100、75 和 66 kD^[14]; 克氏原螯虾(*Cambarus clarkii*)Vn 分子量为 481 kD, 有六个亚基 (198、176、132、111、92、82 kD)^[24]。

以分离纯化后的溪蟹 Vn 为抗原, 制备了相应的 Vn 抗血清。Western-blotting 实验表明该抗血清可以特异地识别溪蟹中的 Vn。这种较高的特异性确保该抗体可用于溪蟹体内 Vn 的免疫学研究以建立一种 Vn-ELISA 法定量测定组织中的 Vn 的含量。当前的研究表明本文建立的 Vn-ELISA 法具有较高的灵敏度, 最低可检测到 15.62 ng/mL 的 Vn, 其最佳

的工作浓度范围为 125—2000 ng/mL。而在其他甲壳动物中, 由 Vn 特异多抗血清建立的 Vn-ELISA 研究结果与本文的基本类似。Volz 等^[25]在对桡足类动物 *Leptocheirus plumulosus* 的研究中建立 Vn-ELISA 工作范围为 31—1000 ng/mL, 精度为 1.9 ng/mL。在中华绒螯蟹的研究中, Chen 等建立了一个类似的 Vn-ELISA, 其测定范围为 8—500 ng/mL^[13]。牡蛎(*Crassostrea corteziensis*)Vn-ELISA 系统中的工作浓度为 10—400 ng/mL^[26]。验证性实验结果显示出本实验所建立的河南华溪蟹 Vn-ELISA 法在批次内和批次间不存在显著性差异, 同时具有较低的差异系数, 因此该法具有较高的稳定性和可重复性。与当前已经发表的研究结果比较, 本实验所建立的 Vn-ELISA 工作范围是可信和敏感的。该法所具有的较高的精确度使得可以在不同时间直接进行样本间卵黄磷蛋白含量的比较。为了使该法可以应用与不同卵黄磷蛋白浓度的测定, 本文将纯化好的卵黄磷蛋白稀释为不同的浓度以建立一条标准曲线, 这样可以定量测定在经过镉处理后溪蟹组织中的卵黄磷蛋白。本实验结果发现, 在经过镉的亚慢性染毒处理之后, 溪蟹卵巢中的 Vn 含量显著降低, 这表明镉暴露可抑制溪蟹中 Vn 的合成和积累。本实验室早期研究发现镉处理后溪蟹卵巢指数显著降低, 并认为这可能是溪蟹体内存储的大量能量物质被分解以用于能量合成的结果^[27]。Vn 作为溪蟹卵巢中重要的营养物质, 它的减少则可能是导致卵巢发育异常的重要原因。Revathi 等和 Rodriguez 等研究认为镉对 Vn 合成的抑制作用可导致卵巢中卵母细胞直径减小, 这可延缓卵母细胞的成熟和卵子的发生, 进而影响卵巢的正常发育和种群的繁殖^[28, 29]。

在大部分的昆虫中, 卵黄磷蛋白在卵巢外先合成为卵黄磷蛋白的前体蛋白, 然后通过血液循环系统输送到卵巢, 然后被卵母细胞吸收。当前关于甲壳动物卵黄蛋白原的合成位点还没有搞清楚, 一直都是研究的热点。关于十足类甲壳动物 Vg 合成部位的研究结果显示, 肝胰腺和卵巢是公认的主要的合成部位, 其次是血细胞和皮下脂肪体, 因此在甲壳动物中 Vg 的合成可能是内源的或外源的或两者兼有。在一些种类中, Vg 在卵巢中合成, 如短沟对虾(*Penaeus semisulcatus*)^[30]。而在另一些甲壳动物种类中, Vg 在肝胰腺中合成, 如一种溪蟹(*Oziothelphusa senex senex*)^[31]。对于不同种甲壳动物, Vg 合

成部位的研究结果不尽相同。当前关于河南华溪蟹卵黄磷蛋白的研究较少, 因此, 可以在本文研究的基础上, 进一步探讨河南华溪蟹卵黄发生部位和镉对 Vn 合成影响的机理。

致谢:

感谢邹恩民教授对论文的修改给予的指导帮助。

参考文献:

- [1] Wang Q, Wang L, Xi Y Y, *et al.* The acute toxicity and accumulation of Cd²⁺ in freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. *Journal Shanxi University* (Natural Science Edition), 2003, **26**(2): 176—178 [王茜, 王兰, 席玉英, 等. 镉对长江华溪蟹的急性毒性与积累. 山西大学学报(自然科学版), 2003, **26**(2): 176—178]
- [2] Wang L, Xu T, Lei W, *et al.* Cadmium-induced oxidative stress and apoptotic changes in the testis of freshwater crab, *Sinopotamon henanense* [J]. *PLOS One*, 2011, **6**(11): e27853
- [3] Liu D, Yan B, Yang J, *et al.* Mitochondrial pathway of apoptosis in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* exposed to cadmium [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, **105**(3-4): 394—402
- [4] Jin F F, Xu T, Qin S J, *et al.* Effects of cadmium on hepatopancreas mitochondrial antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation level in freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(6): 1019—1024 [金芬芬, 徐团, 秦圣娟, 等. 镉对长江华溪蟹肝胰腺线粒体抗氧化酶活力和脂质过氧化水平的影响. 水生生物学报, 2011, **35**(6): 1019—1024]
- [5] Han T, Wang Q, Wang L. Ecological investigation of freshwater crab and river pollution in the basin of Qinhe River [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2008, **27**(5): 804—806 [韩托, 王茜, 王兰. 沁河干流底栖动物生态调查与重金属积累. 四川动物, 2008, **27**(5): 804—806]
- [6] De Smet H, Blust R. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, **48**(3): 255—262
- [7] Pierron F, Baudrimont M, Bossy A, *et al.* Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, **81**(3): 304—311
- [8] Lucia M, André J M, Gonzalez P, *et al.* Effect of dietary cadmium on lipid metabolism and storage of aquatic bird *Cairina moschata* [J]. *Ecotoxicology*, 2010, **19**(1): 163—170
- [9] Wu X G, Yao G G, Yang X Z, *et al.* A study on the ovarian development of *Portunus trituberculatus* in East China Sea during the first reproductive cycle [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, **29**(4): 120—127 [吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究. 海洋学报, 2007, **29**(4): 120—127]
- [10] Ghanawi J, Patrick Saoud I. Molting, reproductive biology, and hatchery management of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. *Aquaculture*, 2012, **358-359**: 183—195
- [11] Kim D H, Kim S K, Choi J H, *et al.* The effects of manipulating water temperature, photoperiod and eyestalk ablation on gonad maturation of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* [J]. *Crustaceans*, 2010, **83**(2): 129—141
- [12] Tinikul Y, Poljaroen J, Tinikul R *et al.* Effects of gonadotropin-releasing hormones and dopamine on ovarian maturation in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and their presence in the ovary during ovarian development [J]. *Aquaculture*, 2014, **420-421**: 79—88
- [13] Chen L, Jiang H, Zhou Z, *et al.* Purification of vitellin from the ovary of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) and development of an antivitelin ELISA [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2004, **138**(3): 305—311
- [14] Zhang Y, Wu X G, Yang F, *et al.* Purification of vitellin and ELISA determination of vitellin of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, **35**(8): 1146—1157 [张艳, 吴旭干, 杨帆, 等. 三疣梭子蟹卵黄磷蛋白纯化及其 ELISA 测定方法. 水产学报, 2011, **35**(8): 1146—1157]
- [15] Allner B, von der Gönna S, Griebeler E M, *et al.* Reproductive functions of wild fish as bioindicators of reproductive toxicants in the aquatic environment [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2010, **17**(2): 505—518
- [16] Jones I, Kille P, Sweeney G. Cadmium delays growth hormone expression during rainbow trout development [J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, **59**(4): 1015—1022
- [17] Zheng H P, Zhang Q, Liu H L, *et al.* Cloning and expression of vitellogenin (Vg) gene and its correlations with total carotenoids content and total antioxidant capacity in noble scallop *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae) [J]. *Aquaculture*, 2012, **366—367**: 46—53
- [18] Jia X, Chen Y, Zou Z, *et al.* Characterization and expression profile of vitellogenin gene from *Scylla paramamosain* [J]. *Gene*, 2013, **520**(2): 119—130
- [19] Serrano-Pinto V, Vazquez-Boucard C, Villarreal-Colmenares H. Yolk proteins during ovary and egg development of mature female freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2003, **134**(1): 33—43
- [20] Laino A, Cunningham M L, Heras H, *et al.* Isolation and characterization of two vitellins from eggs of the spider *Polybetes pythagoricus* (Araneae: Sparassidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2011, **158**(2): 142—148
- [21] Mak A S C, Choi C L, Tiu S H K, *et al.* Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatus*: Hepatopancreas specific expression and farnesoic acid stimulation of vitellogenin gene expression [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2005, **70**(3): 288—300

- [22] Pateraki L E, Stratakis E. Synthesis and organization of vitellogenin and vitellin molecules from the land crab *Potamon potamios* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2000, **125**(1): 53—61
- [23] Mu S M. Yolk proteins of *macrobrachium nipponense* and effects on their accumulation by unilateral eyestalk ablation [D]. Thesis for Master of Science. Hebei University, 2004 [穆淑梅. 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)卵黄蛋白及切除眼柄对其积累影响的研究. 硕士学位论文, 河北大学, 2004]
- [24] Xie S, An J H, Liang X H, *et al.* Partial characterization of vitellin of crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Journal of Hebei University* (Natural Science Edition), 2006, **26**(2): 199—202 [谢松, 安建宏, 梁晓辉, 等. 克氏原螯虾卵黄蛋白的部分生化性质. 河北大学学报(自然科学版), 2006, **26**(2): 199—202]
- [25] Volz D C, Chandler G T. An enzyme-linked immunosorbent assay for lipovitellin quantification in copepods: a screening tool for endocrine toxicity [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2004, **23**(2): 298—305
- [26] Arcos F G, Ibarra A M, Rodríguez-Jaramillo M C, *et al.* Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity [J]. *Aquaculture Research*, 2009, **40**(6): 644—655
- [27] Yang J, Liu D, Jing W, *et al.* Effects of Cadmium on lipid storage and metabolism in the freshwater crab *Sinopotamon henanense* [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(10): e7756
- [28] Revathi P, Vasanthi LA, Munuswamy N. Effect of cadmium on the ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, **74**(4): 623—629
- [29] Rodríguez E M, Lopez Grego L S, Fingerman M. Inhibition of ovarian growth by cadmium, in the fiddler crab *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, **46**(2): 202—206
- [30] Avarre J C, Michelis R, Tietz A, *et al.* Relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complementary DNAs [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, **69**(1): 355—364
- [31] Girish B P, Swetha C H, Reddy P S. Hepatopancreas but not ovary is the site of vitellogenin synthesis in female fresh water crab, *Oziothelphusa senex senex* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **447**(2): 323—327

ESTABLISHED OF ELISA METHOD OF VITELLIN FROM FRESHWATER CRAB (*SINOPOTAMON HENANENSE*) AND EFFECT OF CADMIUM ON VITELLIN ACCUMULATION IN OVARY

YANG Jian¹, LIU Dong-Mei², HE Yong-Ji¹, Hans-Uwe Dahms³ and WANG Lan¹

(1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. School of Basic Medical, Shanxi Medical University, Taiyuan 030006, China; 3. School of Life Science, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung 80708, Taiwan, China)

Abstract: To explore the effect of cadmium (Cd) on oogenesis of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*), vitellin (Vn) and the method of Vn-ELISA was studied and established. Vn was purified from mature ovaries of *S. henanense* by gel filtration chromatography. Using SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the molecular weight and the quantity of Vn subunit were determined. Based on the purified Vn and Vn anti-serum, the reaction parameters for an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed. To explore the effect of cadmium on the Vn in the ovaries, freshwater crab *S. henanense* were treated with 5.8 mg/L Cd for 10, 15, and 20d. The results showed that Vn was composed of three subunits (116, 66 and 45 kD). Western-blotting confirmed the polypeptides had a specific reactivity with mouse polyclonal Vn anti-serum. The optimal dilution rates of Vn anti-serum were shown to be 1 : 100000. According to these optimal parameters, the standard linear equation was established for the determination of Vn concentration with a valid range of 125—2000 ng/mL, and qualitative detection can be 15.62 ng/mL. In verification experiments, Vn content in the ovaries showed no significant differences, and the mean coefficients of variation of inter-assay were 7.81%, suggesting that the developed ELISA of this study was precise, stable and repeatable. Moreover, Cd caused a time-dependend down-regulation of Vn level, and showed significant effects of Cd on vitellogenesis, which suggest that Cd slows down oocyte maturation and vitellogenesis in *S. henanense*.

Key words: *Sinopotamon henanense*; Vitellin; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; Enzyme-linked immunosorbent assay; Cadmium