天津野生鲫鱼卵黄蛋白原的研究

胡建英*,安立会,孙晓航,张海峰,邓宝山 (北京大学环境学院,北京 100871)

摘要：用 HPLC 方法提纯经雌二醇诱导的鲫鱼卵黄蛋白原,用 SDS-PAGE 凝胶电泳测定其分子量为 160Kda 左右.在建立卵黄蛋白原(VTG)的 HPLC 分析方法(检测下限为 0.025mg/mL)的基础上,对北京排污河天津段的野生和养殖鲫鱼血浆中的 VTG 进行检测.在所捕获的 12 尾野生鲫鱼中(其中 2 尾为雄性鲫鱼),都检测出了 VTG,浓度范围为 0.284~5.971mg/mL;对同期捕获的 35 尾天津养殖鲫鱼包括 1 尾雄性鲫鱼中的 VTG 也进行了检测,浓度范围为 0.119~0.250mg/mL.而同期在实验室饲养的雌雄鲫鱼血浆中,均未检测出 VTG.结果表明,北京排污河(天津段)的野生鲫鱼受到类雌激素物质的污染.

关键词：内分泌干扰物；鲫鱼；卵黄蛋白原；生物标志物

中图分类号：X703.5 文献标识码：A 文章编号：1000-6923(2003)03-0281-04

Investigation of vitellogenin in wild crucian (*Carassius auratus*) Tianjin. HU Jian-ying, AN Li-hui, SUN Xiao-hang, ZHANG Hai-feng, DENG Bao-shan (College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871, China). *China Environmental Science*, 2003,23(3)：281~284

Abstract：Vitellogenin (VTG) in crucian (*Carassius auratus*) induced by injection of 17â-estradiol was purified using HPLC method, and its molecular weight was determined to be about 160Kda using SDS-PAGE. Based on the HPLC analysis method of vitellogenin established (its low limit of detection was 0.025ì g/mL), the VTG in the plasma of wild and cultured crucians from Beijingpaiwu River in Tianjin area was detected. Vitellogenin was detected in all of 12 caught wild fishes, (including 2 male fishes) and the concentration ranged from 0.284 to 5.971mg/mL. Vitellogenin was also detected in all of 35 cultured fishes including 1 male, catched in same period and the concentration ranged from 0.119 to 0.250mg/mL; but no vitellogenin was detected in both male and female cultured in laboratory in same period. The wild crucian from Beijingpaiwu River in Tianjin was contaminated by estrogenic matter.

Key words：endocrine disruptors；crucian；vitellogenin；biomarker

在低浓度内分泌干扰物质的长期暴露下导致水生生物生殖异常现象已经引起科学界的重视.研究野生动物所受内分泌干扰物质的暴露水平成为环境科学的研究方向之一.目前检测环境中内分泌干扰物质有仪器检测和生物检测两种方法.仪器检测能准确检测各种环境介质中已知物质,而生物检测方法可以检测环境中各种物质的综合作用效应.卵黄蛋白原(VTG)是繁殖前成熟雌鱼特有的蛋白.在类雌激素类物质暴露下,雄鱼及幼鱼体内也能产生 VTG.因此可以通过检测鱼体血液中是否存在 VTG,来评价生物受内分泌干扰物的暴露程度[1-3].实验室暴露结果表明,雄鱼体内的 VTG 积累到一定程度以后,会引起各种组织病变(如肝、肾病变)[4].因此,鱼体内的 VTG 已经成为检测水生生物类雌激素暴露下的一个重要生物标志物.

作者建立了 HPLC 检测鲫鱼(*Carassius auratus*)体内 VTG 的方法,将此方法应用于我国天津地区野生鲫鱼血液中 VTG 的水平调查,研究此流域生物所受类雌激素类物质的污染水平.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 2690 型高效液相色谱仪(HPLC)、冷

收稿日期：2002-09-25

基金项目：国家杰出青年科学基金资助项目(49925103);环保“863”(2001AA646010-5)

* 通讯联系人

冻离心机 MR1822、Bio-Rad 电泳仪;雌二醇、抑酞酶、电泳标准蛋白(43Kda-200Kda)、BSA(牛血清白蛋白)为 Sigma 产品;Tris(超纯)、肝素钠为华美公司产品.

1.2 毒理诱导

试验用鲫鱼(平均体长 18.6cm,体重 110g)购自北京市朝阳区水产科技园,饲养于不锈钢水槽中,暂养 1 周后做毒理诱导,将雌二醇用 95%的乙醇溶解,与等体积的生理盐水混匀.按照 2mg/kg 的注射剂量由鱼的腹腔注射,每隔 5d 注射 1 次,共注射 3 次.对照鱼不注射.在最后 1 次注射后的第 3d 取血.试验用水(16~20℃)为充分曝气的自来水,试验期间每天换水、吸底,隔天投饵.光周期为 14h(光):10h(暗).

1.3 血浆制备

用经肝素钠处理的一次性注射器从鱼的尾静脉处采血,然后立即转移至 1.5mL 的试验小管中(事先加入含抑酞酶 8×10^4KIU/mL、肝素钠 1.85U/mL 的 0.1mL 生理盐水).在 4℃,15500r/min 条件下离心 15min.将上层血浆转移至另一个 1.5mL 的试管中[事先加有含抑肽酶 8×10^4KIU/mL 的 Tris-HCl 缓冲溶液(20mol/L, pH=8.0)],混匀后,用于 HPLC 分析或贮存于-80℃冰箱中备用.

1.4 分析和制备 VTG

采用 HPLC 法分析、制备血浆中的 VTG[5].所使用的色谱柱为 4.6mm I.D.×100mm POROS-HQ 阴离子柱 (Applied Biosystems, Cambridge, USA); HPLC 是附设 UV-2487 型紫外检测器的 Waters 2950 型(801-C 梯度洗脱程序);波长为 280nm.流动相 A 是 Tris-HCl 溶液(20mol/L, pH=8.0);流动相 B 是含有 1.5mol/L NaCl 的 Tris- HCl 溶液(20mmol/L, pH=8.0).流动相梯度条件为开始 2min 内保持流动相 A 为 100%;2~3min 内流动相 B 从 0%增加到 10%;3~4min 内保持流动相 B 在 10%;4~10min 内流动相 B 从 10%增加到 80%; 10~11min 内,流动相 B 从 80%增加到 100%.

为了防止阻塞分离柱,样品和流动相分别用孔径为 0.3ìm 硝化纤维滤膜(北京化工学校附属工厂)、0.45ìm 的混合纤维素滤膜过滤(上海兴亚净化材料厂).样品分析时,流速为 2.5mL/min,进样量为 250ìL;制备时,流动相流速为 10mL/min,进样量为 1.0mL.制备时的提取液在 PBS 缓冲液(pH 值 7.2~7.4)、4℃透析 24h,冷冻干燥,将蛋白保存在-80℃冰箱中备用.以此蛋白用作 HPLC 测定野生鲫鱼血浆中 VTG 的标准蛋白,蛋白浓度采用紫外分光光度法测定[6].

1.5 SDS-PAGE 凝胶电泳

对 VTG 做 SDS-PAGE 凝胶电泳[6],7.5%的分离胶和 4%的浓缩胶,考玛斯亮蓝 R-250 染色.

1.6 野生鲫鱼血浆中 VTG 的检测

10 月 22 日由北京排污河天津段(北运河)捕获野生鲫鱼 12 尾(平均体长 13.1cm,平均体重 58.97g),11 月 15 日从天津某养殖场(用于饲养的水一部分来自永定新河)捕获人工养殖鲫鱼 35 尾(平均体长 16.76cm,平均体重 114.97g).按照上述处理方法采血、保存血浆、分析.对照鲫鱼购自北京朝阳区水产科技园,在实验室条件下饲养.

2 结果与分析

2.1 血浆中 VTG 的分离提纯

未经雌激素诱导的雄鱼和雌鱼血浆 HPLC 色谱图如图 1a 和图 1b 所示.雌雄鱼血浆的色谱图非常相近,在保留时间 4~8min 内出现了 2 个明显的峰,以后的保留时间未见色谱峰.而诱导后除了在 4~8min 出现色谱峰以外,还在保留时间 10.3min 附近出现 1 个很明显的色谱峰(图 1c).此峰是由于雌激素诱导后产生的物质.这和 Yamanaka[5]、Silversand[7]和 Susca[8]等的研究结果非常相似.说明在正常情况下 10 月份的鲫鱼处于非繁殖季节,即使雌鲫血浆中也未能检出 VTG.用液相色谱法将此色谱峰分离提取,再用 HPLC 检测提纯后的 VTG 纯度,检测结果如图 1d 所示,只在保留时间 10.3min 处发现了 1 个色谱峰,证明所提取蛋白纯度较高.

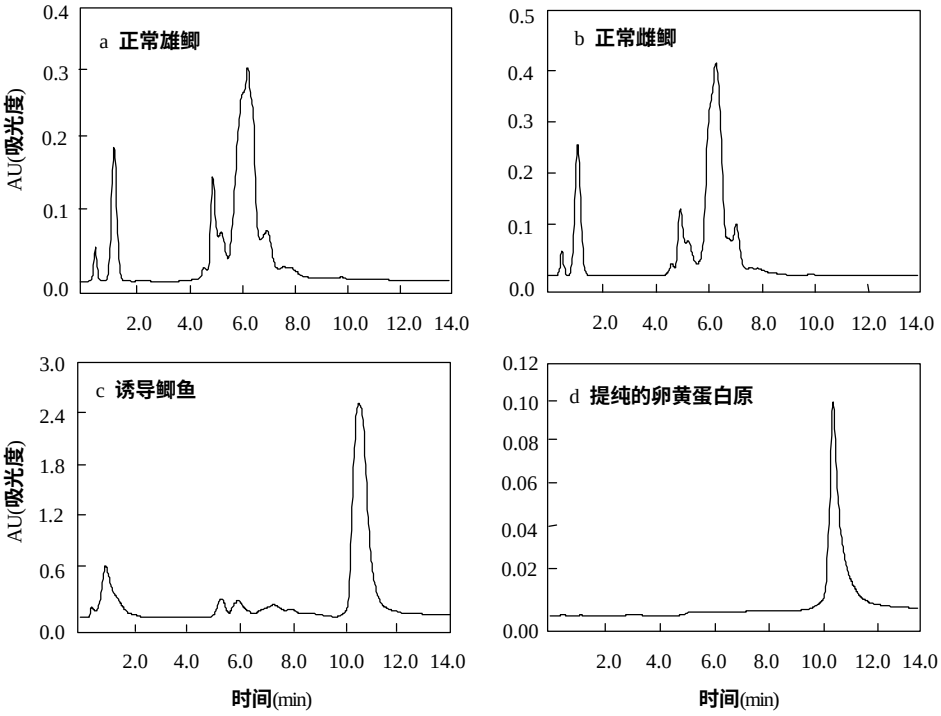

图 1　鲫鱼血浆蛋白色谱图

Fig.1　HPLC chromatogram of proteins in blood of crucian

2.2　鲫鱼 VTG 分子量的测定

将提取的 VTG 作 SDS-PAGE 凝胶电泳,根据蛋白分子量与其相对迁移率之间的关系,得鲫鱼 VTG 的分子量在 160Kda 左右.

2.3　野生鲫鱼血浆中 VTG 的分析检测

2.3.1　VTG 的 HPLC 法检测下限　以提纯的 VTG 作为 HPLC 定量分析的标准蛋白,浓度在 0.025~6.4mg/mL,获得很好的相关性(r^2=0.99),VTG 的 HPLC 的检测下限为 25ì g/mL.

2.3.2　野生鲫鱼血浆中的 VTG 浓度　12 尾野生鲫鱼,其中 2 尾是雄鱼,在所有被捕鱼的血浆中都检测出了 VTG(表 1).图 2a 为 1 尾体长 18.0cm、体重 113.3g 的雌性鲫鱼血浆色谱图.在保留时间 10.3min 出现了明显的 VTG 峰,浓度为 5.971mg/mL.其他 9 尾雌性鲫鱼也都检测出 VTG,浓度在 0.284~1.846mg/mL.另外 2 尾雄性鲫鱼血浆中也检测出 VTG,浓度分别为 0.301 和 0.433mg/mL.同期捕获的 35 尾天津养殖场鲫鱼血浆中也都检测出了 VTG(图 2b),浓度在 0.119~0.250mg/mL,普遍低于北京排污河中野生鲫鱼血浆中浓度.35 尾养殖鲫鱼中,唯一的 1 尾雄鱼血浆中也检测出了 VTG,浓度为 0.152mg/mL.

表 1　天津野生鲫鱼的 VTG 水平

Table 1　The VTG level of wild crucian in Tianjin

编号	性别	体长 (cm)	体重 (g)	性腺指数 (%)	肝胰脏指数(%)	VTG (mg/mL)
1	雌	18.0	113.31	9.16	2.49	5.971
2	雄	15.5	88.49	3.42	9.19	0.301
3	雌	11.5	41.90	4.55	6.30	0.453
4	雌	13.0	64.23	4.81	4.76	0.571
5	雌	15.0	80.70	1.84	6.34	0.476
6	雌	11.5	47.14	6.42	3.37	0.461
7	雌	12.0	43.86	3.51	4.17	1.846
8	雌	12.0	41.69	4.05	4.00	0.485
9	雌	13.0	56.11	0.46	5.04	0.450
10	雌	12.0	44.59	4.18	4.98	0.284
11	雄	12.0	42.64	1.43	2.76	0.433
12	雌	11.5	43.00	6.44	5.25	0.497

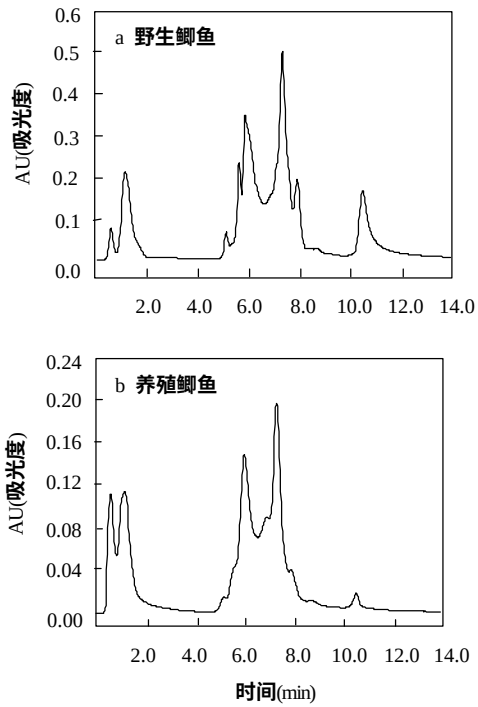

图 2 环境鲫鱼血浆色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of proteins in blood of wild fish

同期从北京市朝阳区水产科技园购买的雌、雄鲫鱼血浆中都未检测出VTG(图1a,图1b),因此天津地区北京排污河水体中的雌、雄鲫鱼血浆中VTG浓度显示其受到类雌激素物质的暴露.养殖鲫鱼中检测出VTG可能是由于养殖所用水和饲料中残留内分泌干扰物质引起.

3 结论

3.1 HPLC 法提取的 VTG 具有较高的纯度,电泳测得鲫鱼 VTG 的分子量在 160Kda 左右.

3.2 野生鲫鱼血浆中最高 VTG 浓度为 5.971mg/mL,平均浓度(1.019±1.61mg/mL)高于养殖鲫鱼血浆中 VTG 平均浓度(0.183±0.029mg/mL);鉴于同期实验室鲫鱼无 VTG 检出,证明野生鲫鱼所产生的 VTG 是由此流域中类雌激素物质诱导所致.

参考文献:

[1] Kime D E. Endocrine disruption in fish [M]. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, 1998.238-39.

[2] Kime D E, Nash J P, Scott A P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics [J]. Aquaculture, 1999, 177:345-352.

[3] Smeets J M W, Rankouhi T R, Nichols K M. *In vitro* vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti) estrogenic activity of xenobiotics [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1999,157:68-76.

[4] Folmar L C, Gardner G R, Schreibman M P, *et al*. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*paralichthys dentatus*) [J]. Aquatic Toxicology, 2001,51:431-441.

[5] Yamanaka S, Arizono K, Masuda Y, *et al*. Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998,62(6):1196-1200.

[6] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术 [M]. 北京:高等教育出版社, 1996.

[7] Silversand C, Hyliner S J, Carlhaux. Isolation, immunochemical detection, and obsercations of the instability of vitellogenin from four teleosts [J]. The Journal of Experimental Zoology, 1993,267: 587-597.

[8] Susca V, Corriero A, Bridges C R. Study of the sexual maturity of female bluefin tuna: purification and partial characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J. of Fish Biology, 2001,58:815-831.

作者简介:胡建英(1965-),女,浙江慈溪人,北京大学环境学院教授,主要从事环境及饮水中有毒有害化学物质研究.发表论文 70 余篇.