

利用罗非鱼卵黄原蛋白建立雌激素 污染的检测方法

王松¹, 王骏^{2*}, 贾俊涛², 吕宁², 姜英辉²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071; 2. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266002)

摘要: **目的** 以尼罗罗非鱼为实验对象, 以卵黄原蛋白(Vg)为生物标志物开发环境雌激素的生物检测技术。**方法** 采用凝胶过滤与离子交换层析相结合的方法从17 β -雌二醇诱导后的罗非鱼血浆中分离纯化Vg, 对纯化的蛋白进行鉴定后制备多克隆抗血清, 建立Vg的酶联免疫吸附测定实验(ELISA), 并用于样品测定。**结果** 建立的ELISA工作范围为15.6~1000 ng/mL, 组内与组间差异分别为6.85%与6.79%, 能有效检测100、500、1000 μ g/L双酚A对雄鱼血浆Vg的诱导效应。**结论** 本研究建立的Vg ELISA具有较高的敏感度、特异性和精确度, 可为水体环境雌激素污染检测提供重要工具。

关键词: 环境雌激素; 卵黄原蛋白; 罗非鱼; 多克隆抗体

Establishment of estrogens detection method using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) vitellogenin

WANG Song¹, WANG Jun^{2*}, JIA Jun-Tao², LV Ning², JIANG Ying-Hui²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China;
2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

ABSTRACT: Objective To develop a bioassay method for monitoring environmental estrogens with Nile tilapia vitellogenin (Vg) as biomarker. **Methods** Vg was purified from the 17 β -estradiol induced plasma of Nile tilapia by gel filtration and anion-exchange chromatography, identified and made into polyclonal antibody. Then, a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to quantify Vg. **Results** The established ELISA had a working range from 15.6 to 1000 ng/mL, and the intra- and inter-assay coefficients of variations were 6.85% and 6.79%, respectively. The ELISA could effectively detect the estrogenic activity of bisphenol A. **Conclusion** The highly sensitive, specific and robust Nile tilapia Vg ELISA method is suitable for the detection of water environmental estrogens.

KEY WORDS: environmental estrogens; vitellogenin; *Oreochromis niloticus*; polyclonal antibody

1 引言

环境雌激素包括壬基酚、双酚A、己烯雌酚、17 α -乙炔雌二醇等外源化学物质和17 α -雌二醇、17 β -雌二醇、雌三

醇、雌酮等内源性雌激素^[1]。这类污染物能够造成鱼类性腺发育畸形、雄鱼雌性化, 进而导致鱼类种群数量下降^[2,3], 已经引起广泛关注。我国研究者发现长江、太湖中的野生鱼因受到雌激素污染出现了性早熟现象, 并出现雌性化风险^[4-6]。

基金项目: 国家质检总局项目(2013IK196, 2015IK202)

Fund: Supported by the General Administration of Quality Supervision Project (2013IK196, 2015IK202)

*通讯作者: 王骏, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: wjun52@126.com

*Corresponding author: WANG Jun, Senior Engineer, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: wjun52@126.com

此外, 雌激素类物质还能通过食物链的生物放大作用, 对人体健康造成不良影响。为了减少环境雌激素对人体和水生动物的危害, 有必要建立雌激素污染的检测技术。

目前, 环境雌激素的检测多采用化学分析的方法, 该方法虽然能够测定化合物的种类与含量, 但是无法指示污染物对生物体的综合效应。相比之下, 生物标志物能够更加敏感、准确地反映污染物对生物体的效应, 近年来被广泛用于环境雌激素的检测^[7]。鱼类卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)是最常用一种效应生物标志物, 研究者多利用酶联免疫吸附方法(ELISA)测定雄鱼或幼鱼血浆中的 Vg 含量, 评价水体的雌激素活性。Lu 等^[4,8]利用金鱼 Vg ELISA 方法评价了长江和太湖等淡水环境的雌激素活性。然而, 关于我国海洋环境雌激素生物标志物检测方法的研究未见报道。罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)具有耐低氧、食性杂、繁殖强、能够在淡水及盐分不同的咸水水域中生存等优势, 是一种检测环境雌激素的很好测试生物。本研究以尼罗罗非鱼为受试生物, 首次纯化获得了罗非鱼 Vg, 制备了高特异性的多克隆抗体, 建立了罗非鱼 Vg ELISA 检测方法, 并通过检测双酚 A 暴露对雄性罗非鱼血浆 Vg 的诱导效应, 检验方法的可靠性, 以期为我国海洋环境雌激素活性的检测提供有效手段。

2 材料与方 法

2.1 试剂与仪器

17 β -雌二醇(E₂, 美国 Sigma 公司); 3,3'-二氨基联苯胺(DAB, 美国 Amresco 公司); 羊抗兔 IgG-HRP(北京索莱宝公司); SDS 蛋白 Marker(美国 Thermo 公司); TMB 单组分显色液(北京索莱宝公司); 其余化学试剂均为分析纯。

Sephacryl S-300 与 DEAE Sepharose Fast Flow 层析柱(美国 GE Healthcare 公司); 酶标仪(Multiskan MK3, 美国 Thermo 公司); 凝胶成像系统(上海沪西仪器厂)。

2.2 实验动物

尼罗罗非鱼, 体重 350 \pm 16 g、体长 21.5 \pm 3.8 cm, 购自青岛市南山水产品市场。实验采用盛有 50 L 曝气 24 h 自来水的玻璃水族箱, 每天换水 30 L, 水温 27 \pm 1 $^{\circ}$ C, 溶解氧 7.0 \pm 0.1 mg/L, pH 7.6 \pm 0.2, 每日早晚投喂饲料。

2.3 实验方法

2.3.1 Vg 的诱导与纯化

采用腹腔注射 E₂ 的方法诱导 Vg 的生成, 尾静脉取血后, 离心获得血浆, 进行凝胶过滤层析, 收集各洗脱峰, 经 Native-PAGE 鉴定后, 将含有 Vg 的洗脱液进一步进行阴离子交换层析, 用分别含有 0.07、0.1 与 0.2 mol/L 的 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液继续洗脱, 收集 1 mL 等分试样。经 Native-PAGE 鉴定后, 存于-80 $^{\circ}$ C。

2.3.2 Vg 的电泳鉴定

Native-PAGE 参考 Wang 等^[9]的方法, 分离胶浓度为

7.5%, 上样量 10 μ L, 4 $^{\circ}$ C 电泳, 电压为 150 V。

2.3.3 抗体的制备与特异性分析

将纯化的 Vg (800 μ g, 0.5 mL)与弗氏完全佐剂等体积混匀后, 充分乳化后, 背部皮下多点注射新西兰大白兔, 此后每 2 w 用弗氏不完全佐剂加强免疫, 连续注射 4 次, 效价达到要求后心脏取血, 制备抗血清。利用 Western blot 检测抗血清对 Vg 的特异性^[10]。

2.3.4 竞争酶联免疫吸附反应(ELISA)

竞争 ELISA 方法与标准曲线的建立参照 Garnayak 等^[11]的方法, 以纯化的 Vg 包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日, 以 200 μ L PBST (0.01 mol/L PBS 缓冲液, 0.05% Tween-20)洗板 3 次后, 每孔加入 200 μ L 含 2%牛血清白蛋白的 PBST, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h; 以 PBST 洗板 4 次, 每孔加入 50 μ L 经缓冲液(PBS-1% BSA)稀释的标准品, 再加入 50 μ L 抗血清, 将板置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PBST 洗板 4 次, 向每孔加入 100 μ L 按 1:2000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP, 将板置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 经 PBST 清洗 5 次后, 每孔加入 100 μ L TMB 单组分显色液, 37 $^{\circ}$ C 显色 10 min 后, 每孔加入 100 μ L 1M H₂SO₄ 终止反应, 利用酶标仪测定 450 nm 波长下的吸光值。包被抗原与抗血清最佳工作浓度经预实验确定。采用 Maltais 等^[12]描述的方法测定 ELISA 的特异性与精确度。

2.3.5 双酚 A 暴露实验

将罗非鱼暴露于 10、100、500 与 1000 μ g/L 双酚 A (双酚 A 溶于 DMSO 中制备成储液)。每缸盛 50 L 曝气 24 h 的自来水, 每组暴露 10 尾鱼, 每天更换 20 L 水, 并补充相应的储液以保持双酚 A 的浓度, 同时设置 DMSO 溶剂对照组。暴露 21 d 后, 尾静脉取血, 离心分离血浆, 解剖辨认性别。采用建立的 ELISA 方法测定雄鱼血浆中的 Vg 含量, 每个样品测 2 次。

3 结果与分析

3.1 Vg 的纯化与鉴定

目前, 已经建立了多种鱼类 Vg 的纯化方案, 其中凝胶过滤和离子交换相结合的方法应用最广泛。本研究取 1 mL E₂ 诱导血浆进行凝胶过滤层析, 在 60~80 mL 时出现主洗脱峰(图 1A)。收集该峰洗脱液, 进一步进行离子交换层析, 在 0.2 mol/L NaCl 洗脱梯度下出现主洗脱峰(图 1B), 这与金鱼^[9]、真鲷和美国红鱼^[13]等鱼类 Vg 的洗脱图谱相近。

由图 2 电泳图显示, 两步层析法获得的蛋白仅含有单一的蛋白条带, 表明两步层析法获得了高纯度的蛋白。对照组雄鱼血浆中未检测到该蛋白条带, E₂ 诱导后的雄鱼血浆则含有该条带, 表明该蛋白是由 E₂ 诱导后生成的。Vg 是一种雌性特异性蛋白, 通常在雄鱼体内不存在, 但是雄鱼在外源雌激素的诱导下也能合成和分泌 Vg。因此判定从 E₂ 诱导后罗非鱼血浆中纯化的蛋白为 Vg。

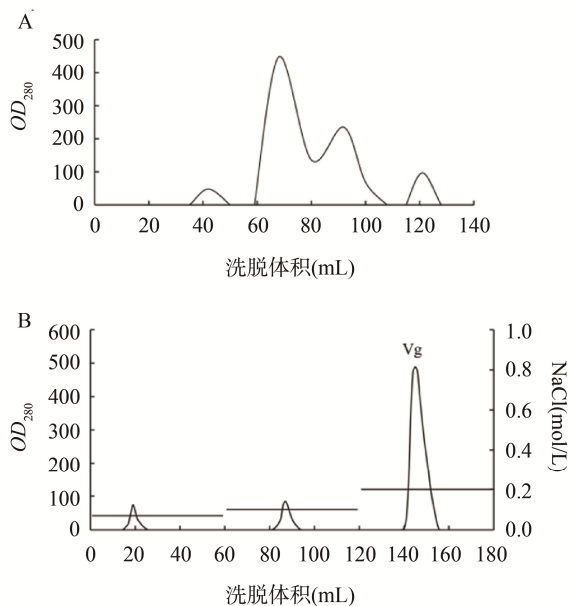


图 1 E₂ 诱导尼罗罗非鱼血浆的凝胶过滤 (A)与离子交换(B)洗脱曲线

Fig. 1 Gel filtration (A) and DEAE exchange chromatography (B) of E₂-induced plasma from Nile tilapia

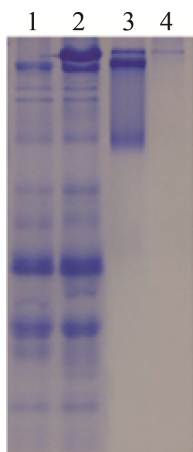


图 2 尼罗罗非鱼血浆与洗脱组分的 Native-PAGE 图谱

Fig. 2 Native-PAGE patterns of plasma and elution fractions of E₂-induced plasma from Nile tilapia

- 1: 对照雄鱼血浆; 2: E₂ 诱导雄鱼血浆; 3: 凝胶过滤洗脱峰蛋白;
- 4: 离子交换层析洗脱峰蛋白
- 1: plasma from control male; 2: plasma from E₂-induced male;
- 3: protein in main peak of Sephacryl S-300 chromatography;
- 4: protein in main peak of DEAE chromatography.

3.2 抗体的特异性

Western blot 检测结果显示, 兔抗 Vg 多克隆抗血清能够与纯化的 Vg 发生阳性反应, 呈现多条清晰的条带, 而且这些条带在 E₂ 诱导的雄鱼血浆中也可以观察到, 但

是对照组雄鱼血浆未检测到任何条带(图 3), 这与金鱼^[9]、亚洲鲶鱼^[11]和斑马鱼^[14]等鱼类 Vg 抗体的检测结果相近, 表明制备的多克隆抗血清对尼罗罗非鱼 Vg 具有很高的特异性, 可以用于 ELISA 的开发。

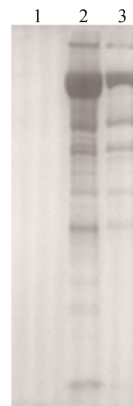


图 3 Western blot 检测 Vg 抗血清的特异性

Fig. 3 The specificity of rabbit anti-Vg serum by Western blot.

- 1: 对照雄鱼血浆; 2: E₂ 诱导雄鱼血浆; 3: 纯化的 Vg;
- 1: plasma from control male; 2: plasma from E₂-induced male;
- 3: purified Vg.

3.3 竞争 ELISA 的建立

以罗非鱼 Vg 的包被浓度为 200 ng/mL, 抗血清稀释倍数为 1:10000, 建立了罗非鱼 Vg 的竞争 ELISA。以标准品 Vg 浓度的对数值为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 用 Microsoft Excle 软件作标准曲线, 在结合率为 20%~80% 的范围内有良好的线性, 检测区间为 15.6~1000 ng/mL, 标准曲线的方程为 $Y = -32.18X + 121.5$ ($r^2 = 0.990$, 图 4), 这与瓦氏黄颡鱼^[15]、鲫鱼^[16]等鱼类 Vg ELISA 检测范围相近。

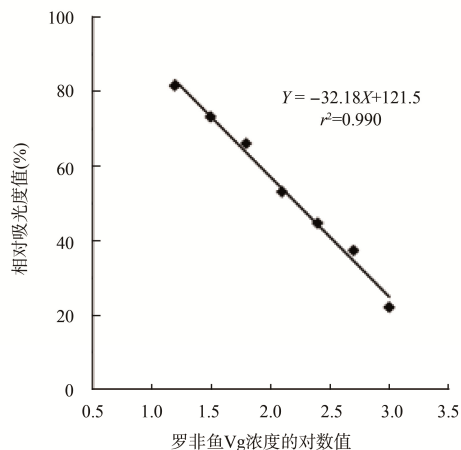


图 4 尼罗罗非鱼 Vg 间接竞争 ELISA 的标准曲线

Fig. 4 The standard curve of Vg in competitive ELISA

表 1 ELISA 标准曲线的组内差异与组间差异
Table 1 Variability of intra-assay and inter-assay of the ELISA calibration curve

组内(Intra-assay) (n=6)			组间(Inter-assay) (n=6)		
Vg 浓度(ng/mL)	标准差	CV (%)	Vg 浓度(ng/mL)	标准差	CV (%)
850.32	78.74	9.26	878.10	84.30	9.36
543.25	43.95	8.09	512.79	28.66	5.59
109.82	6.78	6.17	95.83	6.91	7.21
43.76	1.69	3.87	54.48	2.71	4.98
平均值		6.85			6.79

ELISA 的组内变异系数为 3.87%~9.26%，平均为 6.85%，组间变异系数为 4.98%~9.60%，平均为 6.79% (见表 1)。组内差异与组间差异均小于 10%，这与其它鱼类 Vg ELISAs 的结果相近^[11,17]，表明标准曲线在工作范围内表现出很高的重复性，达到 ELISA 检测的质量控制要求。

建立的 ELISA 能够测定 E₂ 诱导后雄鱼血浆中的 Vg，在 1:2000~1:256000 等比稀释区间内呈现良好的线性，并且协方差分析发现该回归曲线与 Vg 标准曲线具有很好的平行性(P=0.9583>0.05)，而对照雄鱼血浆未检测到 Vg (图 5)，表明建立的 ELISA 对 Vg 具有高度特异性，可以用于尼罗罗非鱼血浆 Vg 的定量。

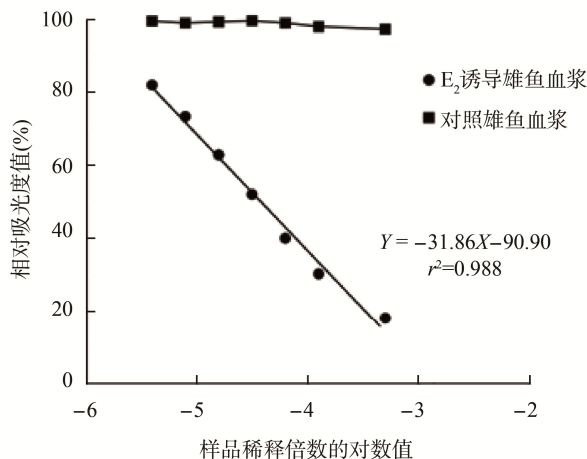


图 5 对照雄鱼与 E₂ 雄鱼血浆连续稀释液的 ELISA 测定曲线
Fig. 5 Binding curves of serial dilutions of plasma samples from untreated and E₂-induced male Nile tilapia

3.4 双酚 A 对雄性罗非鱼 Vg 的诱导效应

双酚 A 的大量生产与广泛使用，对水环境造成了严重的污染。研究证实双酚 A 对水生生物具有显著的雌激素效应，能够诱导雄性动物体内 Vg 的生成，引起雄性动物的雌性化效应^[18,19]。本研究发现对照组与 10 μg/L

暴露组雄鱼的 Vg 水平较低，分别为 69.21±36.7 ng/mL, 98.53±22.6 ng/mL; 100、500 与 1000 μg/L 暴露组雄鱼 Vg 水平分别为 5390±1201 ng/mL、38177±15669 ng/mL、824546±411780 ng/mL，均显著高于对照组水平(图 6)，可见高浓度双酚 A 暴露能显著诱导 Vg 的生成，表现出很强的雌激素活性。

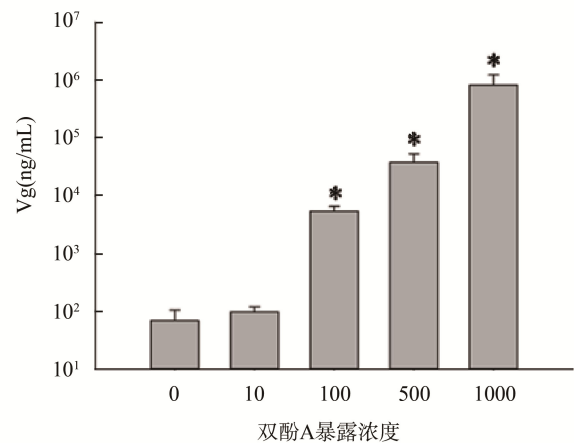


图 6 不同浓度双酚 A 暴露诱导雄性罗非鱼血浆 Vg 的含量(*P<0.05).

Fig. 6 Plasma Vg levels in male Nile tilapia after exposure to different concentrations of bisphenol-A

4 结 论

利用两步层析法从 E₂ 注射后的罗非鱼血浆中纯化获得了 Vg，并制备了高特异性的 Vg 多克隆抗体，利用纯化的罗非鱼 Vg 及其多克隆体建立了高敏感性、特异性与精确度的竞争 ELISA，其检测范围为 15.6~1000 ng/mL，组内与组间差异均小于 10%。该 ELISA 能够准确测定双酚 A 暴露对雄性罗非鱼的 Vg 诱导效应，发现 100 μg/L 双酚 A 就能表现出明显的雌激素活性。本研究建立的罗非鱼 Vg 定量方法可为下一步雌激素污染的检测提供可靠的工具。

参考文献

- [1] 孙小红, 李婕, 葛安靖. 环境雌激素的生殖和发育毒性研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, (4): 1-2.
Sun XH, Li J, Ge AJ. Progress in research on reproductive and developmental toxicity of environmental estrogens [J]. J Birth Health Heredit, 2013, (4): 1-2.
- [2] 冯碧, 邵建忠. 环境激素对动物生存的威胁 [J]. 四川动物, 2002, 21(1): 25-27.
Feng B, Shao JZ. The threat of environmental hormone on animal survival [J]. Sichuan J Zool, 2002, 21(1): 25-27.
- [3] Sumpter JP. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview [J]. Acta. Hydroch Hydrob, 2005, 33: 9-16.
- [4] Lu GH, Song WT, Wang C, et al. Assessment of in vivo estrogenic response and the identification of environmental estrogens in the Yangtze River (Nanjing section) [J]. Chemosphere, 2010, 80(9): 982-990.
- [5] Song W, Lu G, Qi P, et al. Estrogenic effects of water from the Yangtze River (Nanjing section) on goldfish (*Carassius auratus*) after an early life stage exposure [J]. J Environ Sci, 2011, 23(7): 1179-1185.
- [6] Yan Z, Lu G, Liu J, et al. An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2012, 84: 334-340.
- [7] OECD. Workshop report on OECD countries activities regarding testing, assessment and management of endocrine disrupters [R]. 2010.
- [8] Lu G, Yan Z, Wang Y, et al. Assessment of estrogenic contamination and biological effects in Lake Taihu [J]. Ecotoxicology, 2011, 20(5): 974-981.
- [9] Wang J, Bing X, Yu K, et al. Preparation of a polyclonal antibody against goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin and its application to detect the estrogenic effects of monocrotophos pesticide [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2015, 111: 109-116.
- [10] Wang J, Zhang X, Shan R, et al. Lipovitellin as an antigen to improve the precision of sandwich ELISA for quantifying zebrafish (*Danio rerio*) vitellogenin [J]. Compar Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharm, 2016, 185: 87-93.
- [11] Garnayak SK, Mohanty J, Rao TV, et al. Vitellogenin in Asian catfish, *Clarias batrachus*: purification, partial characterization and quantification during the reproductive cycle by ELISA [J]. Aquaculture, 2013, 392: 148-155.
- [12] Maltais D, Roy RL, Couillard CM. Hybrid ELISAs for vitellogenins of the endangered copper redhorse *Moxostoma hubbsi* and the shorthead redhorse *Moxostoma macrolepidotum* (*Cypriniformes*, *catostomidae*) [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2010, 73(5): 883-892.
- [13] Pan Z, Tian H, Wang W, et al. Identification, purification, and immunoassay of stone flounder (*Kareius bicoloratus*) vitellogenin [J]. J Korean Society Appl Biol Chem, 2012, 55: 219-227.
- [14] Wang J, Zhao F, Shan R, et al. Juvenile zebrafish in the vitellogenin blank period as an alternative test organism for evaluation of estrogenic activity of chemicals [J]. Environ Toxicol Chem, 2015, 12: 3328.
- [15] 李育培, 刁晓明, 盛晓洒, 等. 瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)卵黄蛋白原的纯化、性质鉴定及 ELISA 检测方法的建立 [J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(1): 91-98.
Li YP, Diao XM, Sheng XS, et al. Purification and characterization identification of vitellogenin from *Pelteobagrus vachelli* [J]. Oceanol Limnol Sin, 2010, 41(1): 91-98.
- [16] 李康, 周忠良, 于静, 等. 鲫鱼(*Carassius auratus*)卵黄蛋白原的 ELISA 检 [J]. 中国环境科学, 2003, 23: 276-280.
Li K, Zhou ZL, Yu J, et al. Development of ELISA for detecting *Carassius auratus* vitellogenin [J]. China Environ Sci, 2003, 23: 276-280.
- [17] Shao J, Shi G, Song M, et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for vitellogenin in Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Environ Int, 2005, 31(5): 763-770.
- [18] Stoker C, Rey F, Rodriguez H, et al. Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A [J]. General Compar Endocrinol, 2003, 133(3): 287-296.
- [19] Levy G, Lutz I, Krüger A, et al. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles [J]. Environ Res, 2004, 94(1): 102-111.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



王 松, 博士, 主要研究方向为食品营养与安全。

E-mail: wangosng75@163.com



王 骏, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: wjun52@126.com