

梭鱼卵黄蛋白原的化学发光免疫检测法

吴美琴¹, 和田竜典², 罗雯姝², 盛田祐加², 平松尚志², 原彰彦², 钟俊生^{1*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 日本北海道大学水产学部, 函馆 041-8611)

摘要:运用建立化学发光免疫(chemiluminescence immunoassay, CLIA)检测法,对梭鱼血清中主要卵黄蛋白原(Vg)类型(B类型;VgB)进行定量测定。梭鱼VgB CLIA法按两步法操作进行,使用纯化的梭鱼VgB制备特异型抗血清(a-VgB)。优化抗体浓度和培育时间等检验条件后,检验范围设定为3.91~500 ng/mL。卵黄发生期的梭鱼雌鱼血清和雌激素处理后的梭鱼稚鱼血清稀释曲线与纯化的梭鱼Vg曲线平行,而梭鱼雄鱼稀释血清中几乎不发生相应的免疫学反应。对天津原种场养殖的10尾梭鱼血清VgB水平的定量检测结果表明,在雌鱼(9尾)血清中检测到VgB但个体间差异较大,变化范围为3.0~2 700.1 μg/mL,并表现出随着卵巢发育而增长的变化趋势。相对而言,成熟梭鱼雄鱼血清VgB水平则极低(2.7 μg/mL),表明在其生长环境中不存在雌激素活性。另外,所有个体的组织学观察也未呈现出明显的性腺异常情况。研究为梭鱼主要雌激素诱导生物标志物(VgB)的量化提供了一种新的手段,较以往的检验方法具有更高的灵敏度,有助于建立多元化的水生环境中雌激素活性的检测体系。

关键词:梭鱼;生物标志物;卵黄蛋白原;化学发光免疫;雌激素

中图分类号:S 917

文献标识码:A

内分泌干扰物质(endocrine disrupting chemicals, EDCs)是指环境中存在的能干扰生物体内正常内分泌系统诸环节并导致异常效应的物质^[1-5],类雌激素则是其中一类能模拟内源性雌激素生理、生化作用的化合物^[6-7],因其广泛分布和对人类及野生动物生殖内分泌系统造成性别决定、性腺发育、生产力和繁殖过程等方面潜在危害而受到国际社会的广泛关注^[8-10]。类雌激素种类繁多,同时在环境中存在的浓度很低,常规的理化检测存在很大的难度,事实上,多种类雌激素污染物混合后对鱼类产生的综合效应要远远大于单一内分泌干扰物^[11]。因此建立经济、方便、灵敏的环境类雌激素混合物活性检测方法,特别是寻找高效、特异、灵敏的生物标志物^[12-14]已成为环境内分泌干扰物质研究的焦点。

鱼类的卵黄蛋白原(vitellogenin, Vg)是在雌二醇(estradiol-17β, E₂)作用下经肝脏合成后分泌

到血液中的卵黄前驱蛋白。通常情况下,Vg是雌鱼在卵黄形成时期血液中出现的雌特异性血清蛋白,但雄鱼和稚鱼在外源性雌激素作用下同样能诱导体内Vg的生成^[15-18]。根据这一特性,Vg除了可作为判断性别和雌鱼成熟度的指示蛋白^[19-20]外,也可通过检测雄鱼体内的Vg合成来评价水域环境中外源性雌激素物质(环境激素)的影响^[21-22]。

梭鱼(*Liza haematocheila*)隶属于鲷科,广泛分布于西北太平洋海域、河口及沿岸水域,喜食底栖藻类及沉积有机碎屑,易受生息环境影响,被认为是检测东南亚水域环境中EDCs污染的主要监测物种^[23]。近年来,Fukada等^[24-25]建立了用吡啶黄嘌呤酯为标记的硬骨鱼生长激素CLIA检测方法,此后又建立了相应的测定鲑和鲤Vg的CLIA法^[26-27],检测到的Vg浓度可达纳克级。Hong等^[23]用单向免疫扩散法检测了雌激素诱导

和野外调查中类雌激素的活性,虽然检测了成熟雌鱼和部分受雌激素诱导的雄鱼或稚鱼体内的 Vg,但并没有解决成熟雄鱼血清中低水平 Vg 的检测。本文旨在以建立的灵敏且针对 VgB(梭鱼的主要 Vg 类型)^[23]的 CLIA 检测体系为基础,检测成熟雄鱼中低水平的 Vg;同时探明养殖梭鱼血清中 VgB 水平的变化趋势。

1 材料与方法

1.1 实验动物及血清和组织采集

采集天津原种场梭鱼活鱼 10 尾,记录体长体重后,立即进行尾部静脉抽血,血液在 4 ℃ 过夜处理后,在 10 000 × g 下离心 10 min,取上层血清, -30 ℃ 保存,用于 VgB 的定量检测。称量性腺,并计算性腺指数 [GSI = (性腺重/体重) × 100],置于波恩氏液中固定保存用于组织学的观察。

1.2 E₂ 处理鱼血清

E₂ 按 5 mg/kg 从背筋处注入梭鱼(体长 24 cm、体重 190 g)体内,4 d 后二次注射,再过 4 d 后抽取腹水及尾部静脉抽血,按上述方法离心制得血清。

1.3 VgB 的纯化

按 Hong 等^[23]的方法用 10 mL E₂ 诱导处理梭鱼的腹水为原材料,纯化 VgB。

1.4 抗血清的制备

按 Hong 等^[23]的方法制备抗血清。

1.5 免疫学方法

Mancini 法 按 Mancini 等^[28]和 Hong 等^[23]的方法,以纯化的 VgB 为标准蛋白,并以牛血清蛋白(BSA, Sigma Chemical Co, USA)作为基准使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Pierce, USA)测定标准蛋白的浓度。

CLIA 法 IgG 和 F(ab')₂ 的制备依照 Nagae 等^[29]的方法,通过阴离子交换色谱 DE-52(Whatman, UK)从家兔抗梭鱼 VgB 血清中纯化出 IgG。F(ab')₂ 的制备则参照 Kato 等^[30]用安装在 FPLC 系统上的 Superdex 200 凝胶过滤柱(Amersham Pharmacia, Sweden)分离 F(ab')₂ 和 Fc 片断。根据 280 nm 处的吸光率计算出 F(ab')₂ 的总量。

Acridinium 标记 F(ab')₂, 用 N, N-dimethylformamide 溶解 Acridinium (Dojindo Laboratories, Japan) 为 1 mg/mL 的溶液,每 1 毫

克 F(ab')₂ 中加入 11.65 μL 上述溶液,暗室室温反应 15 min。加入足量的 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5),与反应体系中过量的 Acridinium 反应,再加入 0.01 mol/L PB (pH 6.3, 含有 0.15 mol/L NaCl、0.1% NaN₃) 透析过夜,除去过量的 Acridinium。

CLIA 程序 (1) 吸附,将 10 μg/mL IgG 添加到 96 孔板(LIA 板, Greiner, Germany) 中,每孔 150 μL,室温下包被反应 4 h。(2) 封闭,每孔用 200 μL 含 0.1% Tween 20 的磷酸缓冲盐溶液 PBS(PBS-Tween) 和 PBS 各清洗 2 次后,加入 200 μL 含 1% BSA 的 PBS(PBS-BSA) 封闭,4 ℃ 过夜。(3) 一次反应,重复 PBS-Tween 和 PBS 的清洗步骤后,每孔加入 100 μL 用 PBS-BSA 稀释的浓度梯度标准蛋白溶液(0.98 ~ 1 000 ng/mL),室温,摇床上培育 3 h。一般雄鱼血清从稀释 10 倍、雌鱼血清稀释 5 000 倍起制作稀释梯度用于样品的浓度测定。(4) 二次反应,重复 PBS-Tween 和 PBS 的清洗步骤后,每孔加入 100 μL 用 PBS-BSA 稀释 40 000 倍的 Acridinium 标记 a-VgB F(ab')₂, 室温,摇床上反应 3 h。(5) 发光量测定,重复 PBS-Tween 和 PBS 的清洗步骤后,设置自动发光测量仪 Luminescencer-JNR AB-2100(ATTO, Japan),每孔中加入试剂 1(0.5% H₂O₂、0.1 mol/L HNO₃; Siemens, USA) 和试剂 2(acetyl trimethylammonium chloride、0.25 mol/L NaOH) 各 25 μL,从机器中注入各孔,测定各孔的相对发光量(relative light unit, RLU)。根据标准曲线计算出样品的 VgB 浓度。按照 Fukada 等^[26]对建立的 CLIA 检测系进行精确度检验。

1.6 组织学观察

按照 Hashimoto 等^[31]的组织学分析方法,用波恩氏液固定卵巢和精巢,经连续的酒精梯度脱水,二甲苯清洗和石蜡包埋,5 ~ 7 μm 厚度切片, H.E 染色后置于光学显微镜(Olympus, Japan) 下进行形态学观察。按 Fujita 等^[32]和会田勝美^[33]划分性腺发育阶段。

2 结果

2.1 CLIA 法的确立

包被过程中的抗体浓度 为确定固相化抗体的最适浓度,在 96 孔板固相化反应中分别加入 5、10、20、40 μg/mL 浓度的抗体。比较各自的标

准曲线(图 1),各浓度组均取得良好的标准曲线,未观察到发光量有明显的变化。为确保充分固相化且不浪费抗体,我们将固相化抗体的浓度设定在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

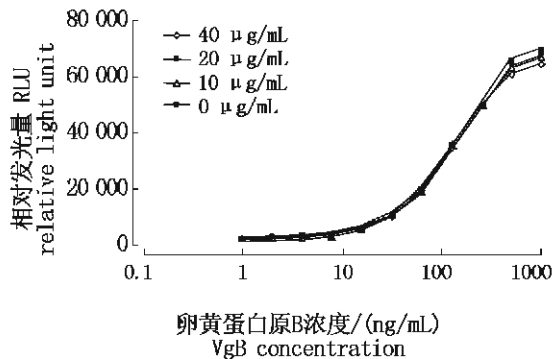


图 1 抗体包被浓度对 CLIA 卵黄蛋白原 B (VgB) 标准曲线的影响

Fig. 1 Effects of coating concentration of IgG on standard curves for vitellogenin B (VgB) CLIA

初次反应的培育时间 比较室温初次反应需要的时间,分别设定为 1、2、3、4 h。发光量随反应时间的增加而增加,但 4 h 的发光量低于 3 h 的发光量(图 2)。结果显示初次反应时间设为 3 h 可获得最佳的发光量测定感度。

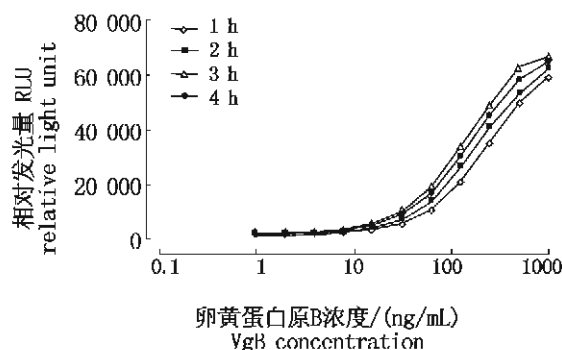


图 2 初次反应(样品和标准蛋白培育)的培育时间对 CLIA 卵黄蛋白原 B (VgB) 标准曲线的影响

Fig. 2 Effects of incubation time for primary reaction (sample and standard incubation) on standard curves for vitellogenin B (VgB) CLIA

二次反应的抗体稀释倍率 将标记抗体分别稀释 40 000 倍和 80 000 倍反应,结果显示稀释 80 000 倍的发光量较低,稀释 40 000 倍的反应组显示出良好的标准曲线(图 3)。因此,标记抗体的稀释倍数确定为 40 000 倍。

二次反应的培育时间 设定初次反应的时间全部为 3 h,比较室温二次反应的培育时间。1

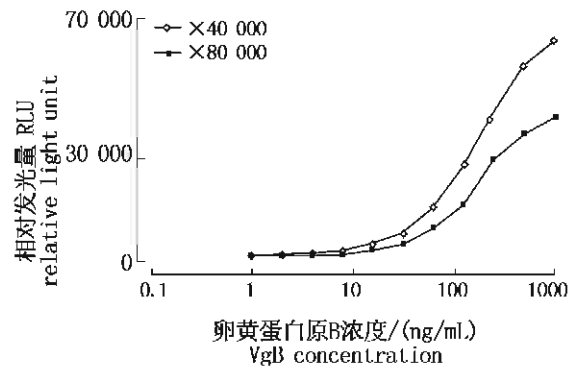


图 3 被标记的第二抗体的稀释倍数对 CLIA 卵黄蛋白原 B (VgB) 标准曲线的影响
Fig. 3 Effects of dilution of labeled secondary antibody on standard curves for vitellogenin B (VgB) CLIA

和 2 h 反应发光量低,不能获得良好的标准曲线。3 和 4 h 显示出良好的标准曲线,且据发光量测定范围无明显差异(图 4),为节约实验时间,选择 3 h 为二次反应的培育时间。

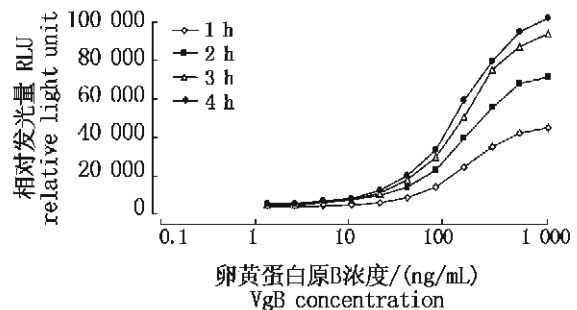


图 4 二次反应(培育被标记的第二抗体)的培育时间对 CLIA 卵黄蛋白原 B (VgB) 标准曲线的影响
Fig. 4 Effects of incubation time for secondary reaction (incubation of labeled secondary antibody) on standard curves for vitellogenin B (VgB) CLIA

标准曲线 根据以上优化的反应条件,得出范围为 3.91 ~ 500 ng/mL 的 CLIA 典型标准曲线(图 5)。梭鱼雌雄血清及 E_2 处理鱼血清的免疫交叉性观察结果显示,雌血清及 E_2 处理鱼血清的稀释曲线与标准曲线平行,而雄鱼血清几乎不与其发生免疫交叉反应(图 6)。

精确度检验 CLIA 检测法的组内和组间变动系数结果如表 1 所示。组内变动系数为 1.60% ~ 5.62%,组间为 1.26% ~ 7.63%,测定系的精确度确立。

2.2 样品测定

梭鱼性腺各发育阶段如图版所示。根据梭鱼

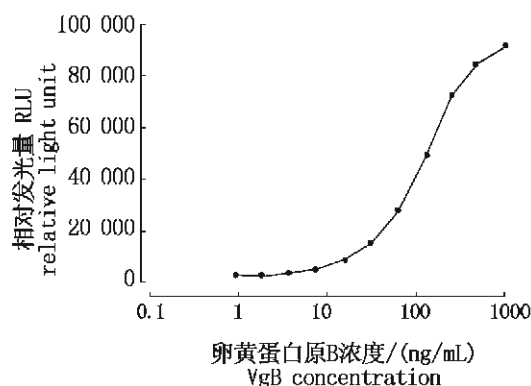


图5 纯化 VgB 的 CLIA 典型标准曲线

Fig. 5 A typical standard curve for the CLIA of purified vitellogenin B (VgB)

不同时期卵巢内卵母细胞所含物质(如卵黄)出现时间、数量、大小和分布状况以及细胞形态变化等,将卵巢划分为 5 个阶段:卵黄形成前期(pre-vitellogenic stage),一定数量的核仁沿核膜周边分布,卵母细胞开始发育;卵黄形成早期(early vitellogenic stage),油球与滤泡层之间出现卵黄标志着卵黄积累的开始;卵黄形成中期(mid vitellogenic stage),卵黄球的数量和体积不断增加;卵黄形成晚期(late vitellogenic stage),卵黄球充满整个卵母细胞质;完全成熟期(full-grown stage),卵母细胞继续发育成排卵前卵母细胞,卵黄积累完毕。

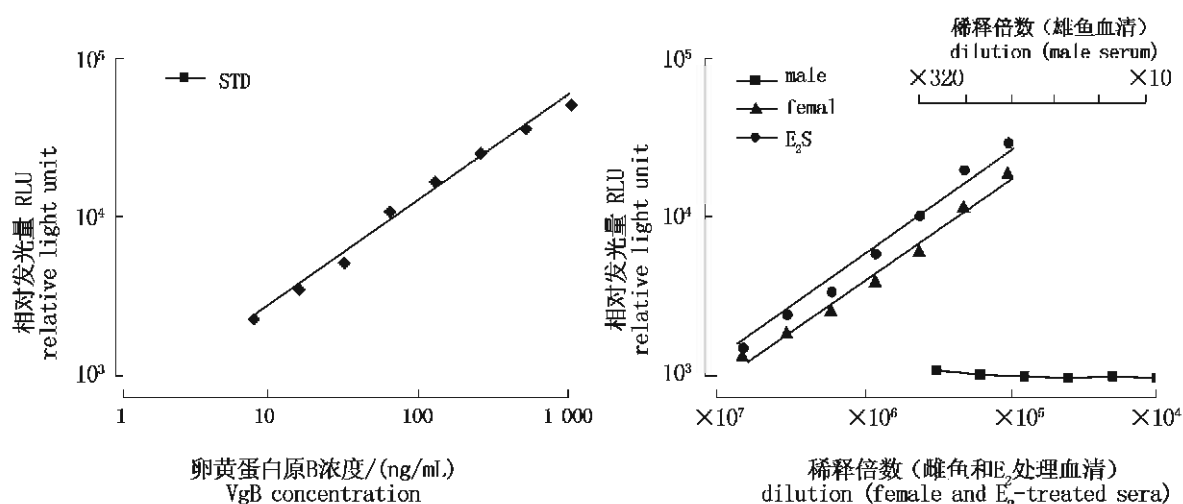


图6 纯化卵黄蛋白原 B (VgB) 和连续稀释梭鱼血清的 CLIA 典型标准曲线

Fig. 6 A typical standard curve(STD) for the CLIA of purified vitellogenin B (VgB) and serial dilutions of mullet sera

表 1 测定系精确度检验

Tab.1 Precision tests of the assays

变动 variation	卵黄蛋白原浓度 (ng/mL) VgB concentration (mean ± SD)	测定数 number of determinations	变动系数 (%) coefficient of variation
intra-assay	275.16 ± 9.41	5	3.42
	154.24 ± 2.47	5	1.60
	78.01 ± 2.17	5	2.78
	29.15 ± 0.98	5	3.36
	15.38 ± 0.42	5	2.73
	7.98 ± 0.37	5	4.64
	4.09 ± 0.23	5	5.62
	274.55 ± 6.58	5	2.40
inter-assay	161.03 ± 5.70	5	3.54
	72.27 ± 0.91	5	1.26
	32.00 ± 0.75	5	2.34
	14.89 ± 0.33	5	2.22
	7.57 ± 0.21	5	2.77
	3.67 ± 0.28	5	7.63

梭鱼雌鱼 Vg 浓度变化范围较大: 3.0 ~ 2 700.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 2), Vg 水平和 GSI 之间存在

一定程度的正相关趋势(图 7)。随卵巢的发育, Vg 浓度呈现出递增的趋势(图 8, 每个阶段的 Vg 平均水平用实线连接), 特别在卵黄形成中期至

完全成熟期, 表现出急速增长趋势。

仅采集到的 1 尾雄鱼中, 精巢处于成熟期, 无异常, Vg 浓度为 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 1)。

表 2 梭鱼生物学指标

Tab. 2 Biological information of red lip mullet collected from Tianjin, China

采样日期 sampling date	样品编号 sample No.	全长 TL (cm)	体重 BW (g)	性腺重 GW (g)	性腺指数 GSI (%)	性别 sex	卵黄蛋白原浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) VgB concentration	性腺阶段 gonadal stage
2008-4-3	1	53.0	1190.0	30.8	2.6	♀	808.3	卵黄形成中期
2008-4-3	2	50.4	1060.0	13.0	1.2	♀	160.5	卵黄形成早期
2008-4-3	3	58.3	1635.0	49.2	3.0	♀	1890.7	卵黄形成晚期
2008-4-3	4	43.6	575.0	2.7	0.5	♀	387.2	卵黄形成前期
2008-4-30	5	46.8	880.0	114.3	13.0	♀	794.7	卵黄形成晚期
2008-4-30	6	52.4	1230.0	131.0	10.7	♀	2700.1	卵黄完全成熟期
2008-4-30	7	51.4	1205.0	105.5	8.8	♀	1273.3	卵黄形成晚期
2008-4-30	8	49.1	1015.0	27.0	2.7	♀	3.0	卵黄形成中期
2008-4-30	9	48.8	960.0	116.1	12.1	♀	1787.4	卵黄完全成熟期
2008-4-30	10	48.7	980.0	68.1	6.9	♂	2.7	成熟精巢

Notes: TL. total length; BW. body weight; GW. gonad weight; GSI. gonad and somatic index.

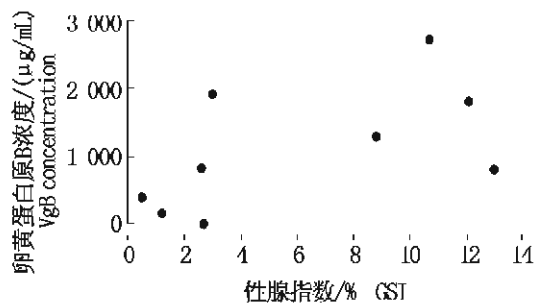


图 7 梭鱼雌鱼性腺指数 (GSI) 与血清卵黄蛋白原 B (VgB) 水平间的关系
Fig. 7 Relationship between gonad somatic index (GSI) and serum vitellogenin B (VgB) level in female red lip mullet

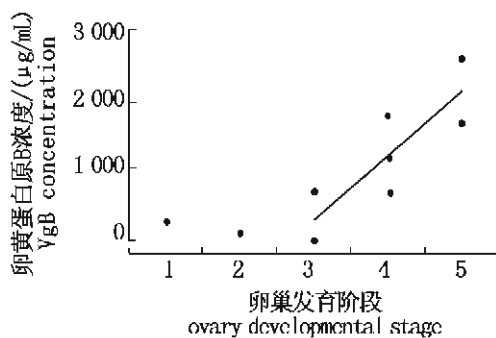


图 8 梭鱼雌鱼血清卵黄蛋白原 B (VgB) 水平的变化
1. 卵黄形成前期; 2. 卵黄形成早期; 3. 卵黄形成中期; 4. 卵黄形成晚期; 5. 卵黄完全成熟期

Fig. 8 Changes of serum vitellogenin B (VgB) level in female red lip mullet

1. pre-vitellogenic stage; 2. early vitellogenic stage; 3. mid vitellogenic stage; 4. late vitellogenic stage; 5. full-grown stage

3 讨论

建立关于梭鱼 VgB 的特异性免疫检测 CLIA 法, 分别就使用的抗体浓度、培育时间等不同情况进行了比较并确定了最佳反应条件; 固相化抗体的浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 初次反应的培育时间为 3 h; 二次反应的抗体稀释倍率为 40 000 倍; 二次反应的培育时间为 3 h。根据优化后的条件反应, CLIA 能检测到的梭鱼 VgB 最小阈值为 3.91 ng/mL(图 5)。以往使用的鱼类 Vg 检测方法^[19]如放射免疫法 (RIA) 虽灵敏度高但却因具放射性而对操作人员的身体健康存在威胁; 酶联免疫法 (ELISA) 则需要大量的抗体 (二次抗体稀释 5000 倍)^[11, 34]。本研究建立的 CLIA 检测系, 两次反应仅需少量的抗体 (固相化抗体浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 二次反应抗体稀释 40 000 倍) 即可得到良好的标准曲线, 大大节约了抗体的使用量。综合比较操作手法、反应速度、安全性、可量范围及灵敏度等方面, 梭鱼 VgB 的 CLIA 法明显优于以往建立的鱼类 Vg 检测方法^[18], 而且测量范围 (3.91 ~ 500 ng/mL) 与 Fukada 等^[26]关于鲑 Vg 的 CLIA 法测量范围相似。

本研究建立的梭鱼 VgB CLIA 法, 加上 Hong 等^[23]建立的单向免疫扩散检测法, 检测范围由纳克每毫升至数百微克每毫升, 测量范围广, 适用于梭鱼体内 Vg 的大幅变化。本检测系更是首次报导灵敏度达纳克每毫升水平的针对特异性抗体 (VgB 抗体) 反应的定量方法, 不仅能检测污染水

体中梭鱼 VgB 水平,也可用于干净水体中梭鱼不同发育阶段的 VgB 检测。

从研究结果来看,雌鱼血清 Vg 变化极为明显(表 1),从卵黄形成前期到卵黄完全成熟期,Vg 的升高过程与卵巢发育阶段相联系(图 8),同时又可以看出这也是卵巢从开始发育至卵黄大量累积的过程。在卵巢发育过程中,卵巢分泌 E₂ 刺激肝细胞不断合成 Vg 分泌进血液,又经血液输送至卵巢,被卵母细胞吸收,卵黄积累,卵巢膨大,GSI 指数也不断增大^[35]。雄鱼和稚鱼肝脏内也存在雌激素受体,但其体内较低水平的雌激素不足以诱导出可测量的卵黄蛋白原,因此正常的雄鱼和稚鱼体内 Vg 含量很低或没有。而环境类雌激素可模拟内源性雌激素的作用,作用于肝脏的雌激素受体诱导卵黄蛋白原的合成,因此雄鱼和稚鱼体内高水平的 Vg 可以很好的指示具有雌激素活性的污染物的暴露^[11]。Hashimoto 等^[31]在北太平洋采集到的大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*),东京湾采集到的比目鱼(*Pleuronectes yokohamae*),Soyano 等^[36]在日本博多湾采集到的鲷,其雄鱼均表现出异常高浓度的 Vg,且精巢中均发现了卵母细胞的存在,但 Vg 浓度与性腺异常之间的关系有待于进一步探讨。

天津梭鱼原种场作为国家级原种场,对梭鱼这一渤海重要渔业资源的保护,同时对周边地区梭鱼的繁育和养殖生产具有重要意义,其养殖环境的良好与否将直接关系到梭鱼原种的质量,因此有必要对该水域环境进行准确的评价。研究结果显示天津原种场采集的梭鱼目前暂未受到环境类雌激素污染物的影响。虽然仅采集到 1 尾雄鱼,但 Vg 浓度较低,且精巢发育正常,未出现精巢—卵子的情况,同样雌鱼卵巢也未表现出异常。尽管雌鱼体内 Vg 浓度波动较剧烈,但卵巢不同发育阶段的雌鱼 Vg 水平界限也较明显,本研究中卵黄完全成熟期的梭鱼雌鱼 Vg 浓度最高值为 2 700.1 μg/mL(表 1),若野外调查采集到的相同发育阶段的雌鱼 Vg 含量远远大于此值,可认为其暴露于类雌激素污染的水域中。因此雌鱼体内 Vg 变化同样可以作为环境类雌激素效应的标志。Hiramatsu 等^[35]确立了部分种类雄鱼 Vg 水平的基线(baseline),其中鲷的基线值为 10 μg/mL,任何野生或养殖的鲷血清 Vg 量超过此基线值的,可被认定为曾暴露于类雌激素化学物质污染的水

域环境中,但对于梭鱼的基线水平还未有报导,未曾暴露于类雌激素混合物中的“正常”雄鱼和雌鱼 Vg 的基线水平,对正确评估环境类雌激素的污染尤为重要。

综上所述,本研究建立了梭鱼 VgB 的特异性免疫 CLIA 检测法,灵敏度达到纳克每毫升水平,为检测暴露于类雌激素环境中的梭鱼 Vg 水平提供了有力的手段。同时,利用此检测系对天津梭鱼原种场的样品进行了检测,结果表明该原种场采集到的梭鱼目前暂未受到环境类雌激素污染物的影响。

参考文献:

- [1] Roefer P, Snyder S, Zegers R E, et al. Endocrine-disrupting chemicals in a source water [J]. Journal of American Water Works Association, 2002, 92 (8): 45 - 53.
- [2] 姜安玺,李文兰,李丽. 环境荷尔蒙的研究现状及趋势[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2001, 17(2): 23 - 26.
- [3] Hutchinson T H, Matthiessen P. Endocrine disruption in wildlife: identification and ecological relevance [J]. The Science of the Total Environment, 1999, 233(1 - 3): 220.
- [4] Colborn T, vom Saal F S, Soto A M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans [J]. Environ Health Perspect, 1993, 101(5): 378 - 384.
- [5] Key S W. New study highlights hazards on hormone disrupting chemicals[J]. World Disease, 1998, 9: 11 - 12.
- [6] Sharp R M, Skakkebaek N E. Are estrogens involved in falling sperm count and disorders of male reproductive tract[J]. Lancet, 1993, 341: 1392 - 1395.
- [7] Allen Y. The extent of estrogenic contaminants in the UK estuarine and marine environments further surveys of founder[J]. The Science of the Total Environment, 1999, 233: 5 - 20.
- [8] Colborn T, Dumanoski D, Wyers J P, et al. Our stolen future: Are we threatening our fertility, intelligence, and survival? Scientific detective story [M]. New York: Dutton Books, 1996: 306.
- [9] Vlock R J. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States [J]. Chemosphere, 1999, 39 (8): 1227 - 1236.

- [10] Stone R. Environmental estrogens stir debate [J]. *Science*, 1994, 265(5170): 308-310.
- [11] Hiramatsu N, Cheek A O, Sullivan C V, *et al.* Vitellogenesis and endocrine disruption [J]. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2005, 6: 431-471.
- [12] Lee C, Na J G, Lee K C. Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 61(3-4): 233-241.
- [13] 宋福永, 李杰. 应用卵黄蛋白原检测内分泌干扰物质的研究进展 [J]. *环境与健康杂志*, 2004, 21(4): 264-266.
- [14] Bolger R, Wiese T E, Ervin K, *et al.* Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(9): 551-557.
- [15] Urist M R, Schjeide A O. The partition of calcium and protein in the blood of oviparous vertebrates during estrus [J]. *General Physiology*, 1961, 44: 743-756.
- [16] Utter F M, Ridgeway G J. A serologically detected serum factor associated with maturity in the English sole, *Parophrys vetulus* and *Pacific halibut*, *Hippoglossus stenolepis* [J]. *U S Fish and Wildlife Service*, 1967, 66: 47-48.
- [17] Hara A. Studies on female-specific serum proteins (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts: Immunochemical physicochemical and structural studies [J]. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, 1987, 34: 1-59.
- [18] Hiramatsu N, Hiramatsu K, Hirano K. Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2002, 131: 429-441.
- [19] Specker J L, Sullivan C V. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives [M]//*Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa, Ontario: National Research Council, 1994, 304-315.
- [20] Hiramatsu N, Shimizu M, Fukada H, *et al.* Transition of serum vitellogenin cycle in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1997, 118(2): 149-157.
- [21] Jobling S, Sumpter J P. Detergent components in sewage effluents are weakly estrogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes [J]. *Aquatic Toxicology*, 1993, 27: 361-372.
- [22] Sumpter J P, Jobling S. Vitellogenin as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1995, 103: 173-178.
- [23] Hong L, Fujita T, Wada T, *et al.* Choriogenin and vitellogenin in red lip mullet (*Chelon haematocheilus*): Purification, characterization, and evaluation as potential biomarkers for detecting estrogenic activity [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2009, 149: 9-17.
- [24] Fukada H, Hiramatsu N, Kitamura M, *et al.* Chemiluminescent immunoassay for salmon growth hormone [J]. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1997, 12: 271-275.
- [25] Fukada H, Ban M, Chiba H, *et al.* Immune complex transfer two-site chemiluminescent immunoassay for serum growth hormone in alewife chum salmon [J]. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1998, 13: 107-111.
- [26] Fukada H, Haga A, Fujita T, *et al.* Development and validation of chemi-luminescent immunoassay for vitellogenin in five salmonid species [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2001, 130: 163-170.
- [27] Fukada H, Fujiwara Y, Takahashi T, *et al.* Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2003, 134: 615-623.
- [28] Mancini O, Carbonara A O, Heremans J F. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion [J]. *Immunochemistry*, 1965, 2: 235-254.
- [29] Nagae M, Fuda H, Hara A, *et al.* Changes in serum immunoglobulin M (IgM) concentrations during early development of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) as determined by sensitive ELISA technique [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 1993, 106: 69-74.
- [30] Kato Y, Hamaguchi Y, Fukui H, *et al.* Enzyme-linked immunoassay. I. Novel method for synthesis of the insulin- β -D-galactosidase conjugate and its applicability for insulin assay [J]. *Biochemistry*, 1975, 78: 235-237.
- [31] Hashimoto S, Kurihara R, Strüssmann C A, *et al.* Gonadal histology and serum vitellogenin levels of

- bigeye tuna *Thunnus obesus* from the Northern Pacific Ocean-absence of endocrine disruption bio-indicators [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46: 459 - 465.
- [32] Fujita T, Hamaura W, Takemura A, *et al.* Histological observation of annual reproductive cycle and tidal spawning rhythm in the female porcupine fish, *Diodon holocanthus* [J]. *Fish Sci*, 1997, 63: 715 - 720.
- [33] 会田勝美. 魚類生理学の基礎 [M]. 东京: 恒星社厚生閣, 2002: 155 - 166.
- [34] Heppell S A, Jackson L F, Weber G M, *et al.* Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in temperate basses (Genus Morone): plasma and *in vitro* analyses [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1999, 128: 532 - 541.
- [35] Hiramatsu N, Matsubara T, Fujita T, *et al.* Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments [J]. *Marine Biology*, 2006, 149: 35 - 47.
- [36] Soyano K, Yoneyama K, Hojo T, *et al.* Endocrine and sexual disruptions in wild grey mullet [C]. Seattle: Abstract of the 4th International Symposium on Fish Endocrinology, 2000: 96.

Development of chemiluminescent immunoassay for vitellogenin in red lip mullet, *Liza haematocheila*

WU Mei-qin¹, WADA Tatsunori², LUO Wen-shu², MORITA Yuka²,
HIRAMATSU Naoshi², HARA Akihiko², ZHONG Jun-sheng^{1*}

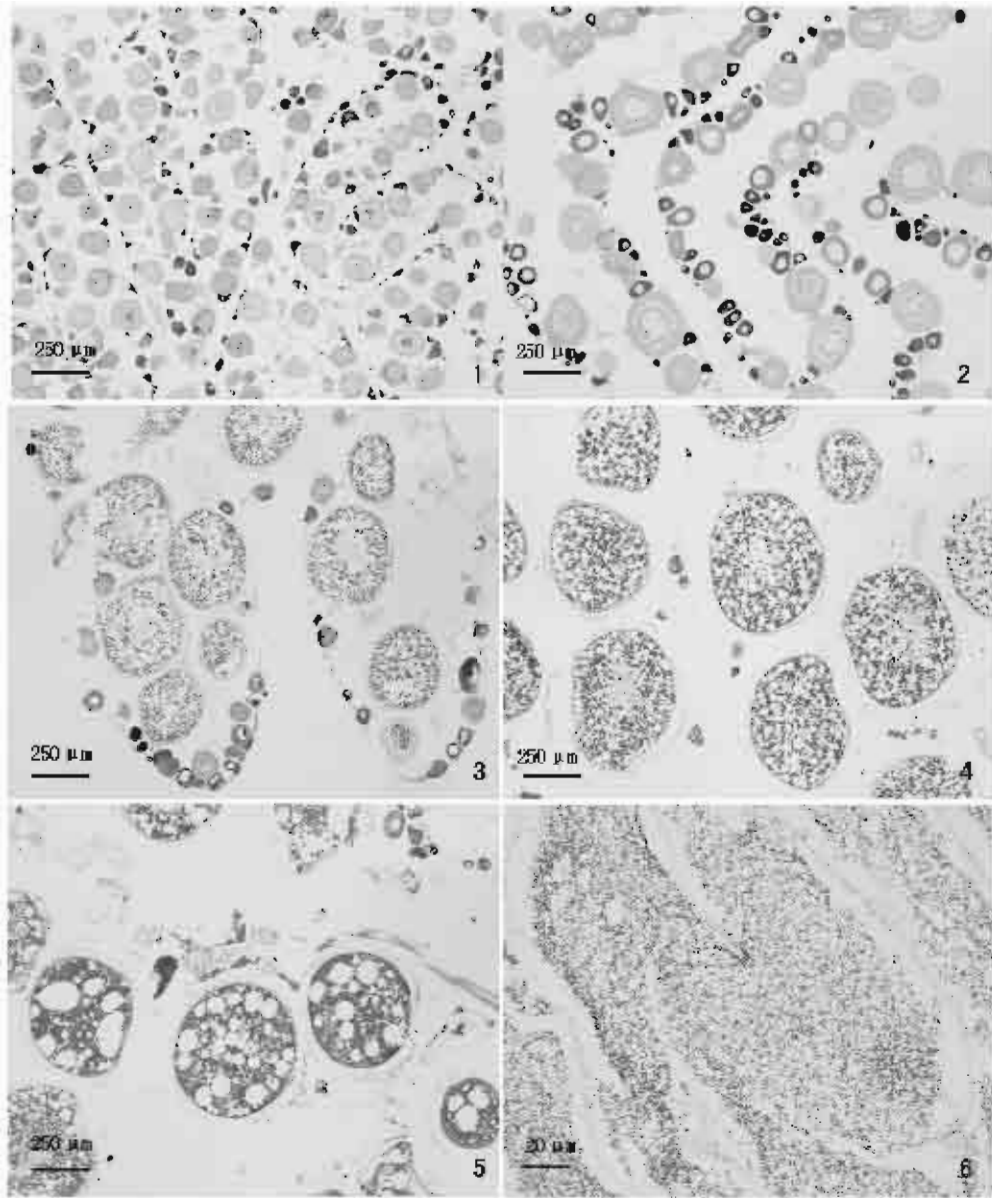
(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan)

Abstract: A specific and sensitive chemiluminescent immunoassay (CLIA) was developed for quantification of a major vitellogenin (Vg) subtype (B-type Vg; VgB) in the serum of red lip mullet (*Liza haematocheila*). The mullet VgB CLIA was performed using two-site method, with subtype-specific antiserum developed for purified red lip mullet VgB (a-VgB). Assay conditions were optimized with regard to antibody concentration, as well as incubation time, resulting in the typical assay range from 3.91 to 500 ng/mL. Dilution of vitellogenic female mullet serum and the serum from estrogen-treated juvenile mullet appeared to be parallel to purified mullet Vg, while dilution of male mullet serum hardly revealed any positive immunoreactivity in the developed CLIA. Serum levels of VgB were quantified in 10 individuals of red lip mullet reared in an aquaculture center in Tianjin City, China. In females ($n=9$), production of VgB was evident but varied in their serum, the levels were ranged from 3.0 to 2 700.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, showing a typical trend of increase during the ovarian growth. In contrast, serum level of VgB in a matured male mullet was extremely low (2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), indicating no sign of estrogenic activities in this environment. In addition, no trace of gonadal abnormality was evident when histological observation was performed for all individuals. The present study provided a new tool for the quantification of the major estrogen-inducible biomarker (i. e. , VgB) in red lip mullet, which appeared to be better in the sensitivity in comparison with our previous assay and thus enabled us to evaluate a variety level of estrogenic activities in aquatic environment. Basic information such as typical, albeit preliminary, reproductive changes in circulating VgB levels were also provided and will endow to set a "normal" baseline, which is necessary to be established prior to interpreting "abnormal" inductions of this biomarker.

Key words: red lip mullet; biomarker; vitellogenin; chemiluminescent immunoassay; estrogen

Corresponding author: ZHONG Jun-sheng. E-mail: jszhong@shou.edu.cn



图版

卵巢: 1. 卵黄形成前期; 2. 卵黄形成早期; 3. 卵黄形成中期; 4. 卵黄形成晚期; 5. 卵黄完全成熟期; 精巢: 6. 成熟精巢。

Plate

ovary: 1. pre-vitellogenic stage; 2. early vitellogenic stage; 3. mid vitellogenic stage; 4. late vitellogenic stage; 5. full-grown stage; testis: 6. matured testis.