

三疣梭子蟹卵黄磷蛋白纯化及其 ELISA 测定方法

张艳¹, 吴旭干¹, 杨帆², 刘智俊¹, 成永旭^{1*}

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点试验室, 上海 201306;

2. 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310012)

摘要: 采用凝胶过滤层析法纯化了三疣梭子蟹成熟卵巢的卵黄磷蛋白(vitellin, Vn), 采用变性凝胶电泳(SDS-PAGE)确定了Vn亚基数量和分子量, 以纯化的Vn为抗原, 制备了三疣梭子蟹Vn多克隆抗血清, 纯化后得到Vn抗体, 在此基础上比较和优化了三疣梭子蟹Vn测定的酶联免疫吸附法(ELISA)参数, 建立了稳定的三疣梭子蟹Vn含量测定的ELISA方法。结果表明:(1) SDS-PAGE显示三疣梭子蟹成熟卵巢中的Vn含有分子量为100、75和66 ku的3个亚基, Western-blotting检测表明, 这3个亚基均具有较强的免疫特异性;(2) 样品直接包被法比双抗体夹心法具有更高的线性相关性, Vn抗体最佳稀释倍数为1:90 000, 最佳包被时间为8 h, 一抗和二抗反应时间分别为2 h和1 h, 显色时间为20 min;(3) 该方法定性检测的灵敏度为14.9 ng/mL左右, 标准曲线方程为 $y = 0.0009x + 0.3991$ ($R^2 = 0.9861$), 其中 x 和 y 分别代表Vn浓度和OD₄₅₀值, 工作范围为200~900 ng/mL;(4) 应用该方法测定三疣梭子蟹卵巢中Vn含量, 结果表明, 批次内和批次间平均变异系数分别为3.59%和3.10%, 重复性良好。

关键词: 三疣梭子蟹; 卵黄磷蛋白; 纯化; 酶联免疫吸附法; 优化参数

中图分类号: Q 956; S 917.4

文献标志码: A

甲壳动物的卵巢发育主要是通过卵黄发生过程合成卵黄蛋白原(vitellogenin, Vg), 进而在卵母细胞中积累卵黄体和脂滴^[1-2]。卵黄体主要由卵黄磷蛋白(vitellin, Vn)组成, 其含量占卵黄体的90%左右, Vn主要由Vg、脂类、碳水化合物和色素等物质加工而成^[3-4]。Vn的主要合成和积累部位为卵巢组织, 而Vg的合成位点具有一定的种间特异性, 主要包括卵巢、肝胰腺和脂肪体等组织^[5-7]。由于甲壳动物的卵黄发生调控过程相当复杂, 通常受内分泌系统、营养条件和环境因子的调节^[8-10], 目前, 对其内在的调控机制研究已成为甲壳动物繁殖生理学的研究热点和难点之一^[10-12]。此外, 甲壳动物卵巢中卵黄积累的多少直接影响到其后生殖过程和幼体质量^[13], 因此, 深入研究卵黄发生的调控机制对于经济甲壳动物的人工繁殖具有重要的现实意义。

先前的研究表明, 甲壳动物卵巢、血淋巴和肝

胰腺中的Vn/Vg含量通常与甲壳动物卵巢发育阶段、营养条件和环境因子等具有一定的相关性^[12-14], 因此测定组织中Vn/Vg含量对于研究甲壳动物卵巢发育规律和卵黄发生机制具有重要意义^[14-16]。酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA)具有特异性、灵敏性和易重复性等优点, 被广泛用于甲壳动物Vn/Vg含量的测定^[3, 15-18]。由于不同甲壳动物Vn的亚基数目、空间结构和分子量通常存在一定差异^[11, 14-15], 因此需要针对不同甲壳动物制备其特异性Vn抗体, 在此基础上建立该物种Vn/Vg测定的ELISA方法, 是研究甲壳动物卵黄发生机制和评价卵巢发育状况的重要基础。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国重要的经济蟹类, 由于人工养殖亲本通常存在卵巢发育不良和生殖性能差等缺点, 故目前繁殖亲本主

收稿日期:2011-03-06 修回日期:2011-05-07

资助项目:国家自然科学基金青年基金项目(40806068);上海高校创新团队项目:水产动物营养饲料与养殖环境(第二期);教育部博士点基金(200802640002)

通讯作者:成永旭, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn.

要来源于野生^[19-20]。因此,深入研究三疣梭子蟹的卵黄发生调控机制显得十分迫切。本研究分离和纯化了三疣梭子蟹的 Vn,制备了 Vn 多克隆抗体,优化了 Vn 测定的 ELISA 参数,其结果不仅可为深入研究三疣梭子蟹的卵黄发生规律和生殖调控提供方法依据,也可用于研究环境污染物对三疣梭子蟹 Vn/Vg 合成的生态学和毒理学评价。

1 材料与方法

1.1 实验用蟹和解剖

三疣梭子蟹于 2009 年 3 月中旬购自浙江温岭渔港(N28°04',E121°20'),精心挑选肢体健全、卵巢发育良好的雌体三疣梭子蟹 20 只,体质量为(228.7±64.7)g,依据刘智俊等^[21]的方法进行暂养。实验用蟹暂养两周后进行活体解剖。精确称重(精确到 0.1 g)后解剖取出卵巢和肝胰腺,称重并记录颜色,根据吴旭干等^[1]的方法对卵巢发育阶段进行分期。解剖后的卵巢和肝胰腺保存于-70℃冰箱中备用。

1.2 试剂

匀浆缓冲液:1 mol/L Tris-HCl(pH=7.6)10 mL、NaCl 2.925 g;EDTA:0.05 g 和 100 mmol/L PMSF 0.5 mL,用蒸馏水定容至 500 mL;PBS 缓冲液:KH₂PO₄ 0.1 g、Na₂HPO₄·12H₂O 1.45 g、NaCl 4.0 g 和 KCl 0.1 g,用蒸馏水定容至 500 mL;TBST 缓冲液:1 mol/L 的 Tris-HCl(pH=7.5)10 mL、NaCl 8.8 g 和 20% Tween 20 2.36 mL,用蒸馏水溶解至 1 000 mL);包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液,pH=9.6):Na₂CO₃ 0.795 g 和 NaHCO₃ 1.465 g,用去离子水定容至 500 mL;PBST 洗涤缓冲液(0.15 mol/L 的 PBS,pH=7.4):KH₂PO₄ 0.1 g、Na₂HPO₄·12H₂O 1.45 g、NaCl 4.0 g、KCl 0.1 g 和 0.05% 的 Tween-20 0.25 mL,加蒸馏水定容至 500 mL;1% 的 BSA 封闭液:牛血清白蛋白(BSA)1g 用洗涤缓冲液定容至 100 mL;底物缓冲液(pH=5.0~5.4 磷酸柠檬酸缓冲液):0.2 mol/L Na₂HPO₄(28.4 g/L)25.7 mL、0.1 mol/L 柠檬酸(19.2 g/L)24.3 mL 和蒸馏水 50 mL;TMB(四甲基联苯胺)显色液:0.5 mL 的 TMB(T0759,上海生工生物工程有限公司生产)二甲基亚砷溶液(TMB 浓度为 2 mg/mL DMSO)、底物缓冲液 8 mL 和 3% H₂O₂ 8 μL(武汉博士德公司生产),最后用底物

缓冲液定容到 10 mL;终止液(2 mol/L H₂SO₄ 溶液):98% 的浓硫酸(密度为 1.84 g/mL)21.7 mL 逐滴加入在 150 mL 蒸馏水,最后定容至 200 mL。

1.3 卵黄磷蛋白分离和纯化

取 2.0 g 左右三疣梭子蟹的成熟卵巢,加入 5 mL 预冷的匀浆缓冲液冰浴匀浆,在 4℃ 下离心(离心力=12 000×g)30 min 后取橘黄色上清液 2~3 mL,并加入等体积的饱和硫酸铵溶液,冰浴 2 h 后再次在 4℃ 下离心(离心力=12 000×g)30 min,弃上清液,向离心管中加入 2 mL 的 PBS 缓冲液溶解沉淀,然后重复“沉淀—离心—复溶”的步骤 3 次,最后将沉淀物溶解于 1 mL PBS 缓冲液中,待用于凝胶过滤层析。采用 BIO-RAD 全自动蛋白质和多肽的纯化仪(型号:BioLogic DouFlow™,美国 Bio-Rad 公司生产)对卵巢提取物进行分离纯化。其中凝胶柱体积为 120 mL(直径×高度=2 cm×40 cm,上海厦美生物科技发展有限公司生产),装入 30 mL 凝胶(型号 Sphacryl™ S-300 HR,瑞典 Pharmacia 公司生产),纯化前首先采用 PBS 溶液平衡凝胶柱,流速 3 mL/min,平衡 3 min。用注射器上样 1 mL Vn 提取液(蛋白浓度约为 1 mg/mL),流速为 0.6 mL/min,在 280 nm 和 470 nm 条件下检测洗脱液的吸光度(OD),当出现蛋白组分时每 1 毫升收集一次。洗脱液于-70℃保存备用。

1.4 卵黄磷蛋白亚基数量和分子量确定

采用变性聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)确定三疣梭子蟹 Vn 的亚基数量及分子量。电泳前 Vn 浓度为 1 mg/mL,凝胶浓度 8%,150 V 条件下电泳 1 h。然后用考马斯亮蓝 R-250 染色后,在 Bio-Rad(型号:Universal Hood II,美国 Bio-Rad 公司生产)凝胶成像仪拍照,采用 BandsScan V 5.0 软件计算各个亚基的分子量。

1.5 抗体制备和免疫印迹

采用两只雄性新西兰兔作为免疫动物,暂养 1 周后,将纯化的 Vn 溶液(质量浓度 1 mg/mL 左右)与福氏完全佐剂(型号 F5506, Sigma 公司生产)等体积混合后用于注射,每只动物首次注射 0.5 mL 的抗原乳化液,此后第 20、34 和 49 天分别注射 0.5 mL 的抗原乳化液进行加强免疫,第 60 天从动脉取血 50~100 mL,血液在室温静置 1 h 后,4℃ 过夜使血液凝固,析出的血清在 4℃ 下(离心力=10 000×g)离心 10 min,取上清液采用

0.22 μm 滤膜过滤后用于纯化。采用 Protein A 葡聚糖凝胶柱(体积 5 mL, 美国 GE 公司生产)纯化抗血清, 凝胶型号为 Protein A-Sepharose CL-4B (美国 Amersham Biosciences 公司生产), 纯化前首先用 Buffer A (0.05 mol/L PBS, pH = 7.4) 平衡凝胶柱, 流速 1 mL/min, 平衡时间为 20 min。抽滤后的血清 10 mL 加 Buffer A 等比例稀释, 用 Buffer B (0.2 mol/L Glycine-HCL, pH = 3.0) 洗脱抗体, 洗脱后的抗体用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

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, 电泳时间 85 min。电泳结束后的凝胶在 72 V 电压下转膜 1 h。将兔多克隆抗体按 1:500 稀释, 加样体积为 1 mL, 室温孵育 1 h; 加入 1:5000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP (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 1 h 后用 1 mL TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 采用 Potent ECL 试剂盒 (Cat#: P142, 杭州联科生物技术有限公司生产) 显色, 显色 3 min 后采用 Bio-Rad 凝胶成像仪拍照。

1.6 样品直接包被法和抗体夹心法 ELISA 比较

样品直接包被法 ELISA 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。包被: 将纯化的 Vn (抗原) 用包被缓冲液稀释为 200、300、400、500、600、700 ng/mL, 包被于 96 孔板中, 每质量浓度重复 3 个孔, 每孔加样 100 μL , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜后去除包被液。封闭: 用 200 μL 的 PBST 重复清洗 3 次后, 每孔加入 200 μL 的封闭液封闭 2 h, 然后用 PBST 洗涤 3 次。加抗体: 每孔加入 1:20000 稀释的抗血清 100 μL 作为一抗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h, 每孔用 PBST 200 μL 洗涤 3 次后加 100 μL 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 作为二抗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h 后用 PBST 洗涤 3 次。显色: 加入 TMB 显色液 100 μL , 室温避光放置 30 min。反应终止: 加 50 μL 终止液。读数: 采用 Bio-Rad 酶标仪(型号 iMarkTM Microplate Reader, 美国 Bio-Rad 公司生产)测定 450 nm 的吸光度 (OD_{450})。同时设立 3 个阴性(空白对照)对照, 加入 100 μL 不含 Vn 的包被缓冲液进行包被, 其余步骤同上。

抗体夹心法主要步骤与样品直接包被法类似, 不同之处为采用抗体进行两次包被。首先每

孔采用 100 μL 经过稀释的抗体进行包被, 封闭后每孔加入不同稀释浓度的 Vn (抗原) 100 μL 进行反应, PBST 洗涤 3 次后每孔再次加入 100 μL 经稀释的兔多克隆抗体进行二次反应, 其他步骤同样品直接包被法。

1.7 ELISA 反应条件优化

采用样品直接包被法 ELISA 检验兔多克隆抗体的效价。首先将纯化的 Vn 用包被缓冲液溶解成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 然后按每孔 100 μL 进行包被; 将纯化后的 Vn 抗血清按 1:200、1:1000、1:5000、1:10000、1:20000、1:60000、1:240000 用 1% 的 BSA 进行稀释, 每孔加样 100 μL , 其余步骤同样品直接包被法 ELISA。采用棋盘滴定法确定抗体和抗原的最适工作质量浓度^[22], 抗原 Vn 包被液的质量浓度梯度为 8.05、16.09、32.19、64.38、128.75、257.50、515.00 和 1030.00 ng/mL, 每个浓度横向加样 9 个孔, 同时设置一列作为阴性对照, 添加不含 Vn 的包被缓冲液; Vn 抗体稀释倍数分为 1:10000、1:20000、1:30000、1:40000、1:50000、1:60000、1:70000、1:80000 和 1:90000, 纵向添加, 其余方法同样品直接包被法。根据棋盘法 ELISA 结果, 进一步在 64.38、128.75、257.50、515.00 和 1030.00 ng/mL 5 个 Vn 包被浓度下进行 ELISA 比较, 确定 Vn 抗体的最佳稀释倍数。最后分别比较了不同包被时间、一抗和二抗反应时间、显色时间对 ELISA 读数的影响, 优化 ELISA 的参数。

1.8 标准曲线制备

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 14.9、29.8、59.5、119.1、238.2、476.3、952.5、1905.0、3810.0 和 7620.0 ng/mL, 采用优化的 ELISA 参数进行测定, 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 OD_{450} 。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, 采用等间距质量浓度梯度进行 ELISA, 然后绘制标准曲线。

1.9 验证性实验

随机选择 4 只三疣梭子蟹的卵巢, 分别称重 0.2 g 左右的组织, 加入 2 mL 预冷的匀浆缓冲液进行匀浆, 将匀浆液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心(离心力 $12000\times g$) 15 min, 取上清液 1.5 mL 左右用于 ELISA 测定。取匀浆液 0.1 mL 用包被缓冲液稀释后用于

ELISA 测定,每个样品重复 4 个孔,同时每样设置一个阴性对照;连续重复测定 4 次,然后分析批次内和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。

1.10 数据分析

采用 SPSS 11.5 软件对实验数据进行统计分析,数据采用平均值 \pm 标准差表示,用 Levene 氏法进行方差齐性检验,不满足齐性方差时对百分比数据进行反正弦或者平方根处理,采用 ANOVA 对实验结果进行方差分析,采用 Tukey 氏法进行多重比较。当数据转换后仍不满足齐性方差时,然后采用 Games-Howell 进行非参数多重比较。采用 *T*-test (independent samples *T*-test) 比较不同稀释倍数、不同包被方法和不同测定批次对结果是否存在显著差异,以 $P < 0.05$ 为差异显著标准。

2 结果

2.1 Vn 纯化和亚基数量

图 1 为三疣梭子蟹卵巢匀浆液凝胶柱层析结果,OD₂₈₀ 结果显示成熟卵巢匀浆液主要含有 3 个蛋白质峰(紫色线条图谱),其中第一个峰蛋白含量最高,洗脱时间在 50 ~ 100 min 时该蛋白组分大量被洗脱出峰。进一步通过 OD₄₇₀ 检测显示第一个和第二个蛋白峰的 OD₄₇₀ 数值最大,但是第二个峰的蛋白含量较低。由于三疣梭子蟹卵黄磷蛋白(Vn)含有较多类胡萝卜素,因此 OD₄₇₀ 数值较大,故第一个蛋白峰可能为三疣梭子蟹的 Vn。因此,收集该蛋白组分并进一步进行验证。由图 2 可知,该蛋白由 3 个亚基组成,他们的分子量分别为 100、75 和 66 ku。进一步通过 Western-blotting 实验表明,这 3 个蛋白亚基均可与三疣梭子蟹 Vn 的多克隆抗体产生特异性免疫反应(图 3)。因此,该蛋白为三疣梭子蟹的卵黄磷蛋白,由 3 个亚基组成。

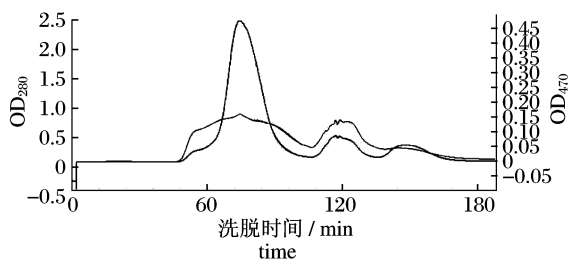


图 1 三疣梭子蟹成熟卵巢提取液凝胶柱层析结果
Fig. 1 Gel filtration elution profiles of the ovarian extracts of mature female *P. trituberculatus*

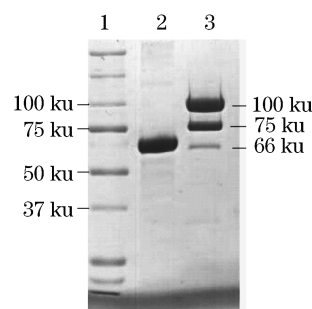


图 2 三疣梭子蟹纯化后 Vn 的 SDS-PAGE 图

1. 标准蛋白; 2. BSA 1 mg/mL; 3. Vn 1 mg/mL。

Fig. 2 SDS-PAGE of purified Vn of mature female *P. trituberculatus*

1. Marker protein; 2. BSA 1 mg/mL; 3. Vn 1 mg/mL.

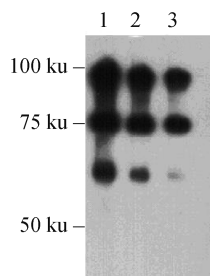


图 3 三疣梭子蟹纯化后 Vn 的 Western-blotting 图

1. Vn 0.5 mg/mL; 2. Vn 0.2 mg/mL; 3. Vn 0.1 mg/mL。

Fig. 3 Western-blotting of purified Vn of mature female *P. trituberculatus*

1. Vn 0.5 mg/mL; 2. Vn 0.2 mg/mL; 3. Vn 0.1 mg/mL.

2.2 样品直接包被法和抗体夹心法 ELISA 效果

由表 1 可知,抗体夹心法和样品直接包被法 ELISA 的 OD₄₅₀ 值均具有良好的重复性,前者和后者的平均变异系数分别为 2.68% 和 2.57%,两种方法 OD₄₅₀ 值的变异系数并无显著差异。图 4 和图 5 为两种方法下 Vn 质量浓度和 OD₄₅₀ 的回归曲线,可见样品直接包被法比抗体夹心法具有更高的线性相关性,因此,样品直接包被法 ELISA 更适合于三疣梭子蟹 Vn 含量的测定。

2.3 ELISA 反应条件优化

根据“2.2”的结论,采用样品直接包被法检验 Vn 抗体效价,表 2 为 Vn 抗体不同稀释倍数对 ELISA 读数的影响,可见抗体稀释 2 ~ 24 万倍时,OD₄₅₀ 读数仅相差 0.19; 当抗体稀释 24 万倍时,OD₄₅₀ 读数仍然高达 1.54,这说明该抗体具体较高的效价,在稀释 2 万倍以上仍然可用于三疣梭子蟹 Vn 含量的 ELISA 测定。进一步采用棋盘滴定

表 1 样品直接包被法和抗体夹心法 OD₄₅₀ 的比较
 Tab.1 Comparison of OD₄₅₀ between the sample direct coating ELISA and the anti-body sandwich coating ELISA

Vn 质量浓度/(ng/mL) Vn concentration	抗体夹心法(n=3) anti-body sandwich coating		样品直接包被法(n=3) sample direct coating	
	OD ₄₅₀ ($\bar{X} \pm SD$)	变异系数/% coefficient of variation	OD ₄₅₀ ($\bar{X} \pm SD$)	变异系数/% coefficient of variation
200	0.92 ± 0.01 ^a	1.09	0.93 ± 0.03 ^a	3.46
300	1.02 ± 0.03 ^b	3.10	1.07 ± 0.02 ^b	2.19
400	1.33 ± 0.06 ^c	4.49	1.24 ± 0.02 ^{c*}	1.84
500	1.47 ± 0.06 ^d	3.93	1.31 ± 0.06 ^{c*}	4.39
600	1.50 ± 0.02 ^d	1.02	1.43 ± 0.01 ^{d*}	0.86
700	1.48 ± 0.04 ^d	2.45	1.47 ± 0.04 ^d	2.67
平均 mean		2.68		2.57

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

Notes: Values within a column having different superscript letter are significantly different and Values within a line with “*” are significantly different($P < 0.05$); n means sample number. The notes of the following tables are the same with this.

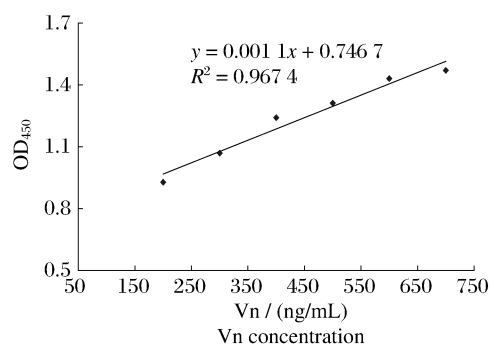


图 4 样品直接包被法 Vn 质量浓度和 OD₄₅₀ 回归曲线

Fig.4 The relationship of Vn concentration and OD₄₅₀ by the sample direct coating

ELISA of mature female
P. trituberculatus

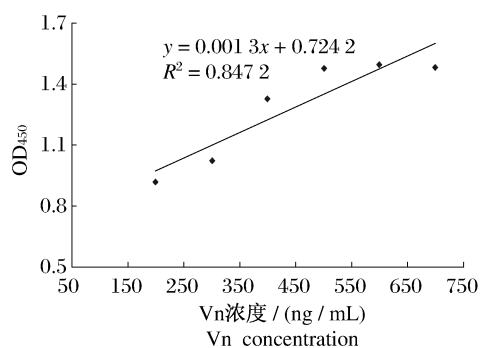


图 5 抗体夹心法 Vn 质量浓度和 OD₄₅₀ 回归曲线

Fig.5 The relationship of Vn concentration and OD₄₅₀ by the anti-body sandwich coating

ELISA of mature female
P. trituberculatus

表 2 Vn 抗体不同稀释倍数的 ELISA 反应的 OD₄₅₀ 值
 Tab.2 The OD₄₅₀ of ELISA by the different dilution rates of Vn anti-serum

Vn 抗体稀释倍数 Vn anti-body dilution rate	OD ₄₅₀
1:200	2.60
1:1 000	2.30
1:5 000	2.14
1:10 000	2.02
1:20 000	1.73
1:60 000	1.67
1:240 000	1.54
BSA	0.07

法确定抗体和抗原结合的最适工作浓度,结果见表 3。最适工作浓度判断标准为阳性孔 OD₄₅₀ 为 1 左右,阴性对照孔的 OD₄₅₀ 小于 0.1。由表 3 数据可见 Vn 抗体稀释倍数在 1:80 000 和 1:90 000 时候 OD₄₅₀ 数值符合判断标准,且 OD₄₅₀ 和 Vn 包被浓度相关性较好。因此,进一步比较 Vn 抗体稀释 1:80 000 和 1:90 000 倍的回归曲线,由图 6 和图 7 可知,尽管在同一 Vn 包被浓度下,1:80 000 稀释条件下的 OD₄₅₀ 略高于 1:90 000,但是后者回归曲线的相关性 ($R^2 = 0.9558$) 显著高于前者 ($R^2 = 0.8889$)。因此,本实验条件下的 Vn 抗血清最佳稀释倍数为 1:90 000。

表 3 不同质量浓度 Vn 抗体和 Vn 结合的棋盘滴定法 OD₄₅₀
 Tab.3 The OD₄₅₀ of the checkerboard titration of different concentration combinations of Vn anti-body and Vn

Vn 抗体稀释倍数 Vn anti-body dilution rate	Vn 包被质量浓度/(ng/mL) Vn coating concentration								
	0	8.05	16.09	32.19	64.38	128.75	257.5	515	1 030
1:10 000	0.067	0.282	0.416	0.558	0.842	1.191	1.627	1.820	2.066
1:20 000	0.054	0.224	0.320	0.439	0.674	0.990	1.273	1.632	1.777
1:30 000	0.058	0.197	0.264	0.382	0.559	0.848	1.118	1.378	1.734
1:40 000	0.045	0.193	0.240	0.353	0.484	0.681	1.028	1.327	1.638
1:50 000	0.043	0.309	0.319	0.318	0.411	0.666	1.055	1.243	1.566
1:60 000	0.037	0.182	0.194	0.297	0.384	0.589	0.875	1.166	1.371
1:70 000	0.032	0.172	0.207	0.283	0.370	0.549	0.818	1.072	1.341
1:80 000	0.036	0.164	0.210	0.257	0.358	0.519	0.762	1.001	1.215
1:90 000	0.033	0.189	0.206	0.368	0.345	0.519	0.780	1.092	1.290

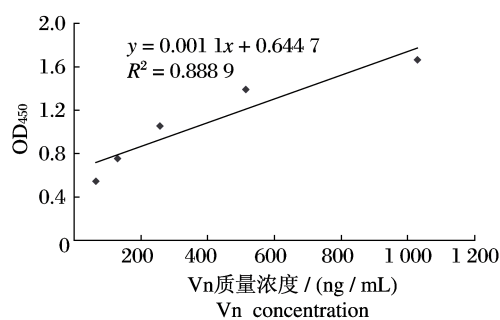


图 6 Vn 抗血清 1:80 000 稀释的
ELISA 回归曲线

Fig.6 Regression curve of ELISA between
Vn concentration and OD₄₅₀ with
1:80 000 dilution of Vn anti-serum

表 4 为样品(抗原)不同包被时间对 OD₄₅₀ 的影响,可见在 4 °C 下样品包被 8 h 和 18 h 对 OD₄₅₀ 没有显著影响,因此,在 4 °C 下样品包被 8 h 即可。表 5 为一抗不同反应时间对 OD₄₅₀ 的影响,在两个 Vn 包被浓度条件下,随着一抗反应时间的

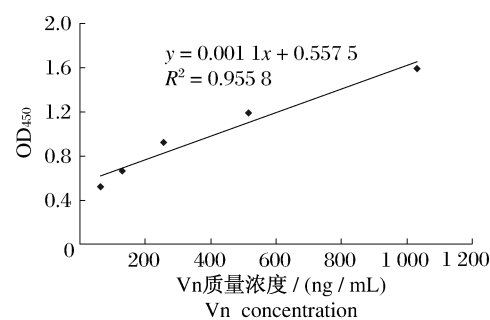


图 7 Vn 抗血清 1:90 000 稀释的
ELISA 回归曲线

Fig.7 Regression curve of ELISA between
Vn concentration and OD₄₅₀ with
1:90 000 dilution of Vn anti-serum

延长,OD₄₅₀ 均出现上升趋势,但当一抗反应时间为 3 h,两组 OD₄₅₀ 均略有下降;当一抗反应时间延长到 4~6 h,高质量浓度 Vn 组(762 ng/mL)的 OD₄₅₀ 上升并不显著($P>0.05$)。因此综合考虑 OD₄₅₀ 值和操作方便性,一抗最适反应时间为 2 h 左右。

表 4 样品不同包被时间对 OD₄₅₀ 的影响

Tab.4 The effects of different coating periods on OD₄₅₀

包被时间/h coating period	Vn 包被质量浓度 300 ng/mL(n=4) Vn coating concentration 300 ng/mL		Vn 包被质量浓度 500 ng/mL(n=4) Vn coating concentration 500 ng/mL	
	OD ₄₅₀ ($\bar{X} \pm SD$)	变异系数/% coefficient of variation	OD ₄₅₀ ($\bar{X} \pm SD$)	变异系数/% coefficient of variation
8	0.74 ± 0.02	3.35	1.09 ± 0.06 *	4.92
18	0.73 ± 0.04	4.83	1.06 ± 0.02 *	3.07

表 5 一抗不同反应时间对 OD₄₅₀ 的影响Tab. 5 The effects of different reaction periods of the first antibody on OD₄₅₀

一抗反应时间/h reaction period of the first antibody	Vn 包被质量浓度 381 ng/mL (<i>n</i> = 4)		Vn 包被质量浓度 762 ng/mL (<i>n</i> = 4)	
	Vn coating concentration 381 ng/mL		Vn coating concentration 762 ng/mL	
	OD ₄₅₀ (<i>X</i> ± SD)	变异系数/% coefficient of variation	OD ₄₅₀ (<i>X</i> ± SD)	变异系数/% coefficient of variation
1	0.477 ± 0.004 ^a	0.75	0.697 ± 0.040 ^{a*}	5.75
2	0.899 ± 0.016 ^c	1.74	1.177 ± 0.055 ^{c*}	4.70
3	0.824 ± 0.018 ^b	2.18	1.096 ± 0.021 ^{b*}	1.95
4	0.918 ± 0.005 ^c	0.50	1.209 ± 0.026 ^{c*}	2.12
5	0.989 ± 0.019 ^d	1.97	1.255 ± 0.055 ^{c*}	4.47
6	1.075 ± 0.022 ^e	2.03	1.249 ± 0.056 ^{c*}	4.46

表 6 为二抗不同反应时间对 OD₄₅₀ 的影响, 在两个 Vn 包被质量浓度条件下, 随着二抗反应时间的延长, OD₄₅₀ 均出现上升趋势, 但二抗反应时间在 1 h 和 1.5 h 时, OD₄₅₀ 差异不显著; 尽管二抗反应时间延长到 2 h 后, 两组 Vn 质量浓度的 OD₄₅₀ 均有所上升, 但是二抗反应时间在 2 h 和 3 h 时, 两组 Vn 浓度的 OD₄₅₀ 无显著差异, 因此二抗最佳反应时间为 1 h 左右。

表 7 为显色剂不同反应时间对 OD₄₅₀ 的影响,

在两个 Vn 包被质量浓度下, 随着显色剂反应时间的延长, OD₄₅₀ 均出现先上升后下降趋势, 当显色剂反应时间为 20 min 时, 两组 Vn 质量浓度的 OD₄₅₀ 均达最大值, 且高质量浓度 Vn 组 (762 ng/mL) 的 OD₄₅₀ 值显著高于低质量浓度组 ($P < 0.05$), 此后高质量浓度组的 OD₄₅₀ 值显著下降, 导致两个质量浓度组之间无显著差异。因此显色剂最佳反应时间为 20 min 左右 (图 8)。

表 6 二抗不同反应时间对 OD₄₅₀ 的影响Tab. 6 The effects of different reaction periods of the second antibody on OD₄₅₀

二抗反应时间/h reaction periods of the second antibody	Vn 包被质量浓度 381 ng/mL (<i>n</i> = 4)		Vn 包被质量浓度 762 ng/mL (<i>n</i> = 4)	
	Vn coating concentration 381 ng/mL		Vn coating concentration 762 ng/mL	
	OD ₄₅₀ (<i>X</i> ± SD)	变异系数/% coefficient of variation	OD ₄₅₀ (<i>X</i> ± SD)	变异系数/% coefficient of variation
0.5	0.691 ± 0.053 ^a	7.62	0.834 ± 0.004 ^{a*}	0.48
1.0	1.041 ± 0.037 ^b	3.35	1.251 ± 0.018 ^{b*}	1.42
1.5	1.018 ± 0.036 ^b	3.56	1.306 ± 0.061 ^{b*}	4.69
2.0	1.789 ± 0.052 ^c	2.91	1.897 ± 0.046 ^c	2.40
2.5	1.953 ± 0.054 ^d	2.75	2.153 ± 0.035 ^{d*}	1.63
3.0	2.079 ± 0.128 ^d	6.17	2.367 ± 0.196 ^e	8.27

表 7 显色剂不同反应时间对 OD₄₅₀ 的影响Tab. 7 The effects of different reaction periods of color development solution on OD₄₅₀

反应时间/min different reaction periods	Vn 包被质量浓度 381 ng/mL (<i>n</i> = 4)		Vn 包被质量浓度 762 ng/mL (<i>n</i> = 4)	
	Vn coating concentration 381 ng/mL		Vn coating concentration 762 ng/mL	
	OD ₄₅₀ (<i>X</i> ± SD)	变异系数/% coefficient of variation	OD ₄₅₀ (<i>X</i> ± SD)	变异系数/% coefficient of variation
10	0.629 ± 0.011 ^a	1.67	0.844 ± 0.021 ^{a*}	2.53
20	1.006 ± 0.032 ^c	3.13	1.375 ± 0.024 ^{d*}	1.75
30	0.986 ± 0.058 ^c	5.88	1.083 ± 0.025 ^c	2.28
40	1.019 ± 0.045 ^c	4.38	1.143 ± 0.087 ^c	7.59
50	0.945 ± 0.019 ^b	2.00	0.924 ± 0.063 ^b	6.84

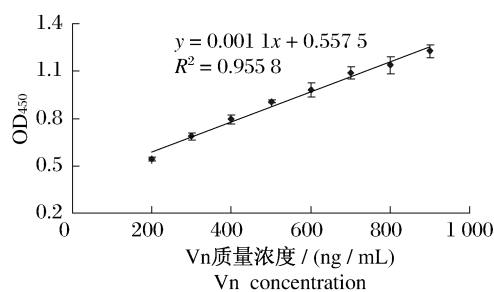


图 8 三疣梭子蟹 Vn 的 ELISA 标准曲线

Fig. 8 The ELISA standard curve of purified Vn from the mature female *P. trituberculatus*

2.4 标准曲线

在上述优化的 ELISA 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 OD_{450} 值,结果见表 8。3 个阴性对照孔的平均 OD_{450} 仅为 0.062,符合阴性对照孔 OD_{450} 必须小于 0.1 的要求;当 Vn 质量浓度为 14.9 ng/mL 时, OD_{450} 值显著高于阴性对照值,因此该方法检测 Vn 可检出值为 14.9 ng/mL 左右。尽管 Vn 质量浓度在 14.9 ~ 952.5 ng/mL 时,Vn 质量浓度和 OD_{450} 呈显著线性关系 ($y = 0.0009x + 0.1422$, $R^2 = 0.9677$, $P < 0.001$, x 和 y 分别代表 Vn 质量浓度和 OD_{450}),但是当 Vn 质量浓度在 14.9 ~ 119.1 ng/mL, OD_{450} 的变异系数均大于 5% (表 8),不符合标准曲线的要求。因此,选择 Vn 质量浓度为 200、300、400、500、600、700、800、900 ng/mL 制作标准曲线,结果表明在该范围内 Vn 质量浓度和 OD_{450} 线性关系良好,各点的变异系数均小于 5%,平均变异系数仅为 3.36%,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 200 ~ 900 ng/mL。

表 8 不同 Vn 质量浓度的 OD_{450} 值和变异系数
Tab. 8 The OD_{450} and its coefficient of variation of a serial of Vn concentration

Vn 质量浓度/ (ng/mL) Vn concentration	OD_{450} ($\bar{X} \pm SD, n=4$)	变异系数/% coefficient of variation
阴性对照 control	0.062 ± 0.003	4.83
14.9	0.111 ± 0.025	22.57
29.8	0.132 ± 0.020	14.96
59.5	0.168 ± 0.019	11.24
119.1	0.285 ± 0.025	8.69
238.1	0.415 ± 0.018	4.34
476.3	0.667 ± 0.023	3.52
952.5	0.961 ± 0.036	3.70
1905.0	1.165 ± 0.108	9.27
3810.0	1.512 ± 0.073	4.81
7620.0	1.623 ± 0.058	3.54

2.5 验证性试验

根据 2.3 优化的 ELISA 反应条件和 2.4 的标准曲线,随机取 4 只三疣梭子蟹的卵巢组织(卵巢发育处于 IV ~ V 期)进行验证性试验。表 9 为验证性试验的结果,4 只个体批次内和批次间平均变异系数分别为 3.59% 和 3.10%,均符合变异系数小于 5% 的要求。同一个体,批次间和批次内测定的 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 9 三疣梭子蟹卵巢中 Vn 含量

Tab. 9 The Vn contents in the ovary of female *P. trituberculatus* mg/g wet weight, $n=5$

样品编号 sample no.	批次内 intra-assay		批次间 inter-assay	
	Vn 质量浓度 Vn concentration	变异系数/% coefficient of variation	Vn 质量浓度 Vn concentration	变异系数/% coefficient of variation
1	279.31 ± 10.39	3.68	276.92 ± 12.77	4.61
2	284.42 ± 11.25	3.96	277.37 ± 5.82	2.10
3	281.50 ± 10.77	3.82	280.27 ± 4.54	1.62
4	211.16 ± 6.07	2.88	207.20 ± 8.40	4.05
平均 mean		3.59		3.10

3 讨论

3.1 不同蟹类 Vn 特性比较

本研究通过 SDS-PAGE 测定表明成熟三疣

梭子蟹成熟卵巢中 Vn 由 100、75 和 66 ku 3 个亚基组成,但 66 ku 亚基含量较少。然而 YANG 等^[11]研究结果表明,三疣梭子蟹卵巢中 Vn 由 102、100 和 85 ku 3 个亚基组成。造成这种差异的

可能原因是两者采样的卵巢发育阶段不同,本研究采用成熟卵巢进行纯化 Vn,平均卵巢指数高达 13.4%,而 YANG 等^[11]采用的主要是Ⅳ期卵巢,卵巢指数均小于 10%。甲壳动物卵巢发育过程中,卵黄蛋白原被分裂成亚基后,这些亚基在卵母细胞中只有被糖基化(glycosylation)后,才能与脂类及色素等相连,最终形成卵黄体^[3]。因此成熟卵巢中 Vn 亚基上存在的糖基和脂类等结合位点多,这可能会加速亚基在电泳条件的移动速度,导致 SDS-PAGE 测定的分子量偏小^[14],这可能是本研究测定亚基分子量小于文献[11]中所报道的主要原因。类似的现象在美国蓝蟹(*Callinectes sapidus*)上也有发生^[12,14]。因此采用 SDS-PAGE 测定的 Vn 亚基分子量并不精确,因为受到亚基及其它基团等化学键的影响。例如 ZMORA 等^[14]采用 SDS-PAGE 研究表明美国蓝蟹成熟卵巢中 Vn 亚基分子量均小于 100 ku,进一步采用 N 端—氨基酸序列分析显示,实际上美国蓝蟹 Vn 含有 3 个亚基,分子量分别为 119.42、87.9 和 78.5 ku^[14]。

大量研究表明甲壳动物 Vn 亚基的分子量通常在 70 ~ 230 ku^[23]。如锈斑螯(*Charybdis feriata*) Vn 两个亚基分子量分别为 105 和 76 ku^[23];中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) Vn 两个亚基分子量则为 97 和 74 ku^[15];地溪蟹(*Potamon potamios*) 3 个亚基分子量分别为 115、105 和 85 ku^[24];日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) 3 个亚基分子量分别为 110、96 和 89 ku^[25]。有关甲壳动物 Vn 亚基数量和分子量的差异是否和进化有关,则需要进一步深入研究。

3.2 样品(抗原)直接包被法和抗体夹心法

间接 ELISA 法具有灵敏度高、特异性强、易操作、无放射性污染等优点,因此该方法被大量用于水生动物卵黄磷蛋白(Vn)和卵黄蛋白原(Vg)的定量检测^[14,22,26]。间接 ELISA 法有两种常见的包被方式——样品(抗原)直接包被法和抗体夹心法,两者的差别在于前者使用样品(抗原)直接包被后加一抗,后者采用 Vn 抗血清(一抗)进行包被后加样品,然后再次加一抗进行反应,因此称之为夹心法^[27]。尽管两种包被方法都被用于水生动物 Vg/Vn 的 ELISA 中^[26],但尚未见两种方法测定效果的比较研究。本研究比较了三疣梭子蟹 Vn/Vg 测定(ELISA)的两种包被方法。结

果表明,两种方法的 OD₄₅₀ 批内变异系数均较低(均小于 5%),但样品直接包被法比抗体夹心法具有更高的线性相关性,因此以后的 ELISA 参数优化、标准曲线制作和样品测定过程均采用样品直接包被法进行,这样能大大提高了实验的精确度和可重复性。

3.3 影响 ELISA 测定的主要因素

ELISA 测定步骤较多,任何影响抗原抗体反应和显色的因素都会影响 OD₄₅₀ 值,从而影响测定结果的准确性和可重复性。样品包被时间、抗体稀释倍数、抗体反应时间和显色时间是影响测定结果的主要参数^[22,26],本研究对上述条件进行了优化,取得了较好的效果,测定结果稳定可靠,多次重复测定的变异系数都在 5% 以下。抗体的效价和纯度对 ELISA 反应具有极其重要的作用^[27],本研究制备抗体时,分别采用 Vn 对免疫动物进行 4 次强化免疫,取血清后采用凝胶柱进行纯化,最后采用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,这样保证了抗体效价和纯度。采样棋盘法优化 ELISA 反应的抗体稀释倍数,通常要求 Vn 样品组(中等质量浓度)的 OD₄₅₀ 值在 1 左右,阴性对照的 OD 值小于 0.1^[22,26],本研究中 OD₄₅₀ 值均符合这一要求。

此外,本研究还显示,一抗和二抗与抗原(Vn)的不同反应时间均会显著影响 OD₄₅₀ 值,因此有必要对他们的反应时间进行优化,综合考虑 OD₄₅₀ 变异系数、不同质量浓度组 OD₄₅₀ 的差异、可重复性及操作时间等因素,本研究确定三疣梭子蟹 Vn 的 ELISA 测定,在 37 °C 条件下一抗和二抗反应时间分别为 2 h 和 1 h,这和美国蓝蟹^[14]和剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)^[22]的 ELISA 反应时间一致,但是长于中华绒螯蟹^[15]的反应时间。实际上,一抗和二抗的最佳反应时间主要与抗体效价、Vn 质量浓度及特异性结合位点有关,因针对不同动物的抗血清和抗原,均需要对一抗和二抗反应时间进行优化。显色剂最佳反应时间主要和显色剂中四甲基联苯胺(TMB)及双氧水的浓度有关,本研究预实验结果表明,10 mL 显色剂中添加 1 mg 的 TMB 和 8 μL 双氧水为宜,该显色剂的最佳显色反应时间为 20 min。值得注意的是,不同厂家及同一厂家不同批次生产的同样含量/质量浓度的 TMB 和双氧水对 OD₄₅₀ 读数有较大的影响,如:北京中杉金桥公司和武汉博士德公司

生产的 3% 的双氧水用于 ELISA 实验, Vn 质量浓度在 381 ng/mL 时候, 两者的 OD₄₅₀ 相差 34.43%, 因此每次更换 TMB 和双氧水药品时候, 需要重新制作标曲线。此外, 配制好的显色剂不能长时间放置, 长时间放置后容易导致 TMB 氧化和 OD₄₅₀ 值下降, 因此, 建议 TMB 溶液应该现配现用。

尽管 Vn 质量浓度在 14.88 ~ 952.50 ng/mL 时, Vn 浓度和 OD₄₅₀ 呈显著线性关系 ($R^2 = 0.9677$, $P < 0.001$), 但是当 Vn 质量浓度在 14.9 ~ 119.1 ng/mL, OD₄₅₀ 的变异系数均大于 5% (表 8), 因此, 低质量浓度 Vn 定量测定的可重复性差; 当 Vn 质量浓度在 200 ~ 900 ng/mL 时, OD₄₅₀ 的平均变异系数仅为 3.36%, 该范围内的标准曲线具有良好的稳定性和重复性。

参考文献:

- [1] 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 [J]. 海洋学报, 2007, 29: 120 - 127.
- [2] 成永旭, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹卵黄发生期卵泡细胞和卵母细胞之间的结构变化 [J]. 动物学报, 2002, 48(1): 80 - 92.
- [3] LEE R F, WALKER A. Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. Journal of Experimental Zoology, 1995, 271(5): 401 - 412.
- [4] WALKER A, ANDO S, LEE R F. Synthesis of a high-density lipoprotein in the developing blue crab (*Callinectes sapidus*) [J]. Biological Bulletin, 2003, 204: 50 - 56.
- [5] OKUMURA T, YAMANO K, SAKIYAMA K, et al. Vitellogenin gene expression and hemolymph vitellogenin during vitellogenesis, final maturation, and oviposition in female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2007, 147(4): 1028 - 1037.
- [6] TIU S H K, HUI J H L, MAK A S C, et al. Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 2006, 254(1-4): 666 - 674.
- [7] YANG W J, OHIRA T, TSUTSUI N, et al. Determination of amino acid sequence and site of expression of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Experimental Zoology, 2000, 287(6): 413 - 422.
- [8] COCCIA E, LISA E, CRISTO C D, et al. Effects of estradiol and progesterone on the reproduction of the freshwater crayfish *Cherax albidus* [J]. Biological Bulletin, 2010, 218(1): 36 - 47.
- [9] WU X G, CHENG Y X, SUI LY, ZENG C S, et al. Effect of dietary supplementation of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), female broodstock [J]. Aquaculture, 2007, 273(4): 602 - 613.
- [10] 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]. Crustaceana, 2010, 83(2): 129 - 141.
- [11] YANG F, XU H T, DAI Z M, et al. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2005, 142(4): 456 - 464.
- [12] ZMORA N, TRANT J, ZOHAR Y, et al. Molt-inhibiting hormone stimulates vitellogenesis at advanced ovarian developmental stages in the female blue crab, *Callinectes sapidus* 1: An ovarian stage dependent involvement [J]. Saline Systems, 2009, 5: 7.
- [13] WOUTERS R, LAVENS P, NIETO J, et al. Penaeid shrimp broodstock nutrition: An updated review on research and development [J]. Aquaculture, 2001, 202(1-2): 1 - 21.
- [14] ZMORA N, TRANT M, CHAN S, et al. Vitellogenin and its messenger RNA during ovarian development in the female blue crab, *Callinectes sapidus*: Gene expression, synthesis, transport, and cleavage [J]. Biology of Reproduction, 2007, 77(1): 138 - 146.
- [15] CHEN L Q, JIANG H B, ZHOU Z L, 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.
- [16] YANO I, HOSHINO R. Effects of 17 β -estradiol on the vitellogenin synthesis and oocyte development in

- the ovary of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 144(1):18-23.
- [17] SAGI A, KHALAILA I, ABDU U, *et al.* A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 115(1):37-45.
- [18] GHEKIERE A, FENSKE M, VERSLYCKE T, *et al.* Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2005, 142(1):43-49.
- [19] WU X G, CHENG Y X, ZENG C, *et al.* Reproductive performance and offspring quality of the first and the second brood of female swimming crab, *Portunus trituberculatus* [J]. *Aquaculture*, 2010, 303(1-4):94-100.
- [20] WU X G, CHENG Y X, ZENG C S, *et al.* Reproductive performance and offspring quality of wild-caught and pond-reared swimming crab *Portunus trituberculatus* broodstock [J]. *Aquaculture*, 2010, 301(1-4):78-84.
- [21] 刘智俊, 吴旭干, 成永旭, 等. 三疣梭子蟹卵巢发育期间 Y 器官组织学变化[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(3):314-320.
- [22] 温茹淑, 方展强, 江世贵, 等. 剑尾鱼卵黄蛋白原的 ELISA 检测[J]. 环境科学研究, 2007, 20(4):144-149.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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[J]. 河北大学硕士论文, 2004:18-21.
- [26] 李培育, 刁晓明, 盛晓洒, 等. 瓦氏黄颡鱼卵黄脂磷蛋白(Lv)的纯化、性质鉴定及其抗血清的研制[J]. 水产学报, 2010, 34(1):116-125.
- [27] 焦奎, 张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004:81-90.

欢迎订阅 2012 年《中国渔业质量与标准》

《中国渔业质量与标准》是由农业部主管、中国水产科学研究院主办的综合性学术刊物。本刊宗旨是刊载我国渔业领域质量安全和标准等方面的政策法规、技术资讯及研究成果, 搭建渔业质量与标准工作沟通交流的平台, 提高渔业质量和标准水平, 促进渔业可持续发展。主要收录水产品质量安全研究和标准研究等方面的具有创新性和学术价值的研究论文、综述等。

本刊现为季刊, 大 16 开, 每逢 3、6、9、12 月出版, 自办发行, 每期定价 18 元, 全年价 72 元, 加邮费全年定价共计 80 元。国际标准刊号: ISSN 2095-1833, 国内统一刊号: CN 11-6018/S。凡需订阅本刊者, 可直接与编辑部联系。

编辑部地址: 北京丰台区永定路南青塔 150 号《中国渔业质量与标准》编辑部(邮编: 100141)

联系人: 穆迎春, 许玉艳

联系电话: 010-68690728

Website: www.fisheryqs.com

Purification of vitellin and ELISA determination of vitellin of swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

ZHANG Yan¹, WU Xu-gan¹, YANG Fan², LIU Zhi-jun¹, CHENG Yong-xu^{1*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Vitellin is the most important nutrient and energy source for the development of oocytes as well as developing embryos. The quality and quantity of vitellin in the mature ovary play a vital role in the crustacean reproduction and offspring quality. The swimming crab, *Portunus trituberculatus*, is a commercially important fisheries resource and mariculture species in East Asian countries. Because of overfishing, destruction of coastal spawning and nursery grounds and marine pollution, the landing of this crab has shown a declined trend in East China Sea since 1990s. The decline in natural stock and increase in market demands have driven substantial aquaculture interests for the crab species. However, the seed production of the crab is dependent on wild-caught broodstock, which could become a constraint to the sustainable development of this crab aquaculture. Our previous studies have shown pond-reared female broodstock have poor ovarian development and worse reproductive performance compared to wild females. Therefore, it is very urgent to understand the mechanism of vitellin synthesis and accumulation for female *P. trituberculatus*. The present study was conducted to purify vitellin from mature ovary of female *P. trituberculatus* by gel filtration chromatography, and the elution process was monitored at wavelength of 280 nm and 470 nm, respectively. The number and molecular weight of subunits were identified by sodium dodecyl sulphate-PAGE (SDS-PAGE) and marker protein, respectively. Then, the rabbit polyclonal vitellin anti-serum was prepared and purified. Based on the vitellin anti-body, we optimized the reaction parameters of Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA), and then the stable and standard ELISA was developed for female *P. trituberculatus*. The results showed that vitellin was divided into three major polypeptides with molecular weight of 102, 75, and 66 ku, respectively by the denatured SDS-PAGE. The Western-blotting confirmed all three major polypeptides had specific reactivity with vitellin anti-body. The higher linear relationship could be found on the sample direct coating ELISA than the antibody sandwich coating ELISA. Then, the optimal dilution rate of purified vitellin antibody and coating period were shown to be close to 1:90 000 and 8 hours at 4 °C, respectively. At 37 °C, the appropriate reaction duration of the first antibody and the second antibody were 2 hours and 1 hour, respectively, while the best color development solution was around 20 minutes. Furthermore, based on these parameters, the standard linear equation, $y = 0.0009x + 0.3991$ ($R^2 = 0.9861$, x and y represent Vn concentration and OD₄₅₀ value, respectively), was established for the determination of female *P. trituberculatus* vitellin concentration with the valid range of 200–900 ng/mL. The susceptibility of this ELISA was around 14.9 ng/mL for Vn contents. Finally, the ELISA was used to determine ovarian Vn contents for the identification of validity of this assay. The results demonstrated the mean coefficients of variation of intra-assay and inter-assay were 3.59% and 3.10%, respectively. In conclusion, the developed ELISA of this study is precise, stable and repeatable.

Key words: *Portunus trituberculatus*; vitellin; purification; ELISA; parameter optimization

Corresponding author: CHEN Yong-xu. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn