**分类号** 密 **级**

**U D C**   **编 号**



**硕 士 学** 位 论 **文**

褐牙鲆卵黄蛋白原的诱导及在环境激素检测中的应用

刘志峰

**（1114026）**

指导教师姓名 雷霁霖 院士 /郝振林 讲师

专 业 名 称 水产养殖

论文答辩日期 2014 年 6 月 4 日

学位授予日期 2014 年 6 月

**MASTERAL DISSERTATION**

**Induction of vitellogenin and its application in the environmental estrogen detection**

**Supervisor: Jilin Lei / Zhenlin Hao**

**Master candidate: Zhifeng Liu**

**Major: Aquaculture**

**LIFE SCIENCE AND TECHNOLOGY INSTITUTE, DALIAN OCEAN UNIVERSITY, DALIAN, LIAONING**， **P. R. CHINA**

**JUNE 2014**

摘 要

卵黄蛋白原（Vg）是一种大分子的磷脂糖蛋白，作为卵生脊椎动物卵黄蛋白的前体，在雌激素的调控下合成。一般情况下，只存在于成熟的雌性个体中，为发育中的胚胎提供主要的营养物质，但当受到外源雌激素或具有雌激素效应的物质的诱导时，雄性个体和未成熟的雌性个体也能表达大量的Vg，因此Vg可以作为一种良好的生物标志物来监测环境雌激素的污染。本文克隆了褐牙鲆卵黄蛋白原基因的全长序列，并建立Real-Time PCR的方法对雌二醇（E2）和塑化剂（DIOP）诱导下褐牙鲆肝脏组织中Vg mRNA的表达量进行检测，不仅为水产健康养殖提供理论指导也可为水环境内分泌污染的生物监测提供理论依据，对生产养殖和水环境质量评估都具有较大的应用价值和社会效益。

本研究通过基因克隆，得到全长cDNA序列，序列全长5066bp，开放阅读框5037bp，编码1677个氨基酸，对氨基酸序列分析发现，序列中存在从N末端开始的信号肽序列，

vitellogenin区域、多聚丝氨酸区域及三个N-糖基化位点。与其他物种多重比较分析时发现，序列中存在两个保守的N-糖基化位点和26个保守的半胱氨酸残基。进化树同源性分析发现，实验得到的褐牙鲆卵黄蛋白原属于卵黄蛋白原B（VgB），与鲽形目、鲈形目同源性分析在80%以上，与鳉形目、鳕形目同源性分析在60%-70%之间，与两栖类、爬行类、鸟类、关系较远。

本实验使用不同浓度（0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/L）的E2和DIOP对褐牙鲆幼鱼进行连续35d的诱导实验，并对实验期间内，1h、3h、6h、12h、1d、2d、3d、5d、7d、

14d、21d、28d、35d、进行取样，RT-PCR结果显示，在E2和DIOP的诱导下，各诱导组肝脏中VgB mRNA都有明显的表达，E2处理组中的各浓度组中的表达量要普遍高于塑化剂处理组中的各浓度组中的表达量。在E2和DIOP诱导的三个不同浓度组中，卵黄蛋白原mRNA的表达量都呈现出先上升后下降的趋势，在第三天时达到最高值。

另外对0.1μmol/L和1μmol/L的E2和DIOP处理组的褐牙鲆幼鱼的鳃、肝、肾进行组织切片，观察雌激素类诱导物对褐牙鲆器官组织的影响，切片结果发现，在两种诱导物的暴露下，鱼体组织都会产生损伤，并存在剂量、时间效应。切片显示，E2处理组鳃小片弯曲变细，末端弯曲膨大，鳃小片断裂，细胞坏死、脱落；肝细胞排列紊乱，肝细胞出现肿胀现象，伴随着空泡化和脂肪变性；肾小管形态崩解，肾小管变细，肾小管管腔变大，肾小球结构遭到破坏。DIOP组鳃小叶之间发生组织增生、粘连，鳃小叶末端弯曲膨大，出现非组织性空腔；肝细胞出现轻微的脂肪变性和空泡化现象；肾小管形态遭到破坏，出现管细胞受损或不可见现象。

结果表明，褐牙鲆卵黄蛋白原在雌激素或者具有雌激素效应物质的暴露下，具有良好的诱导效应，并可以通过RT-PCR的方法进行灵敏准确高效的检测，其结果可直接反映污染物对鱼体的危害，对生产养殖和水环境质量评估都具有较大的应用价值和社会效益，因

此褐牙鲆卵黄蛋白原可以作为一种良好的生物标志物来监测海水雌激素的污染。

**关键词：**褐牙鲆； 卵黄蛋白原； 基因克隆； 实时荧光定量； PCR； 生物标志物； 组织切片

Abstract

**Abstract**

Vitellogenin, a kind of macromolecule phospholipids glycoprotein, is synthetic under the regulation of estrogen, being the precursor of ovipary vertebrates yolk protein. In general, vitellogenin only exists in the mature female, providing the main nutrients for a developing embryo. But the males and immature female can also produce a large number of vitellogenin, when was induced in estrogen or someting with estrogen effect. We cloned the complete sequnence of Paralichthys olivaceus Vg cDNA, and establish the method of Real - Time PCR for testing vitellogenin mRNA expression quantity of Paralichthys olivaceus liver. The young fish was induced by E2 and plasticizer (DIOP). It can not only develop a way to health aquiculture, but also develop a kind of basis to monitor the pollution in water. It can bring great application value and social benefit for water quality.

In this study, the method of rt-pcr and RACE were used for Paralichthys olivaceus vitellogenin gene cloning. The full-length cDNA sequence, obtained by sequencing and splicing, with the length of 5066 bp sequence, has open reading frame of 5037 bp abd encode 1677 amino acids and forecast its amino acid. It can be found by sequence a signal peptide sequence, a sequence of vitellogenin area, an serine-rich region and three N-glycosylation sites exisited indeduced sequnence. While multiple comparison analysis with other species, two conservative sequence of N-glycosylation sites and 26 conservative cysteine residues were deduced in this sequnence. It can be found by homology analysis and evolutionary tree analysis that the obtained sequnence belong to VgB. It was close to pleuronectiformes and perciformes with the homology of 80% above. It was relative close to cyprinodontiformes and gadiformes, with homology between 60% to 70%. It was far away from amphibians, reptiles and birds.

In this experiment, several different concentration (0.1μmol/L, 1μmol/L, 10μmol/L) of E2 and plasticizer (DIOP) were used to treat immature Paralichthys olivaceus for continuous 35 days. During the period of the experiment, the sample was taken at 1h, 3h, 6h, 12h 1d, 2d, 3d, 5d, 7d,14d,21d,28d,35d. From real-time PCR results, it showed that the liver vitellogenin mRNA expression under the induction of E2 and plasticizer, was both obvious. The level of vitellogenin mRNA expression in the E2 teatment groups were generally obvious higher than DIOP treatment groups. In the three groups of different concentrations of induction of E2 and DIOP, vitellogenin mRNA expression both showed a downward trend after rising first

Basicly, and a maximum was found on the third day.

In addition, the immature *Paralichthys olivaceus* under the exposure of 0.1μmol/L and 1μmol/L E2 and plasticizer were anatomied. And tissue sections from gill, liver and kidney were made to observe the influence by estrogen. Experimental results showed that exposed to the two kinds of pollutants, the fish can produce tissue damage, and with the serious damage when increasing of concentration and the extension of time. Paraffin section showed that the gill lamella became bend and thin with intumescent terminal, and even became fractured with deciduous and necrosis cell in the group of E2. Disordered arrangement of liver cell, swollen liver cell, fatty degeneration and cavitation appeared and renal tubular form became disintegrated, which renal tubule becoming thinner, lumen of renal tubule becoming bigger and glomerular structure being destroyed in the group of E2. While in the group of plasticizer, intumescent and bend terminal of the Gill lamella, abnormal cavity appeared with hyperplasia and adhesion of the Gill lamella. In addition, slight fatty degeneration and cavitation also appeared, and renal tubular form was destroyed with damaged or invisible tubular cells.

The results showed that Paralichthys olivaceus vitellogenin have good induction effect when is exposed by estrogen or estrogen material with effect, and can be detected by the method of Real-Time PCR sensitively, accurately and efficiently. The result can make derectly response of the degree of pollution. So vitellogenin of *Paralichthys olivaceus* can serve as a good biomarker for monitoring water pollution of estrogen.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus* vitellogenin gene cloning Real-Time PCR; Biomarkers tissue section

目 录

[摘 要](#_Toc686407665) 2

[Abstract](#_Toc686407666) 2

**[Abstract](#_Toc686407667)** 3

[前 言](#_Toc686407668) 4

[第一章 文献综述](#_Toc686407669) 4

[1.1 卵黄蛋白原的诱导与合成](#_Toc686407670) 4

[1.1.1 卵黄蛋白原的诱导](#_Toc686407671) 4

[1.1.2 卵黄蛋白原的合成](#_Toc686407672) 5

[1.2 卵黄蛋白原的结构特性](#_Toc686407673) 5

[1.2.1 脊椎动物卵黄蛋白原的结构](#_Toc686407674) 5

[1.2.2 无脊椎动物中的卵黄蛋白原的结构](#_Toc686407675) 5

[1.3 卵黄蛋白原的Th物学功能](#_Toc686407676) 5

[1.4 卵黄蛋白原的检测分析方法](#_Toc686407677) 6

[1.5 卵黄蛋白原作为环境指示Th物的应用](#_Toc686407678) 6

[1.6 研究意义及展望](#_Toc686407679) 6

[第二章 褐牙鲆卵黄蛋白原基因的克隆](#_Toc686407680) 6

[2.1 实验材料和试剂](#_Toc686407681) 6

[2.1.1 实验材料](#_Toc686407682) 6

[2.1.2 耗材和试剂](#_Toc686407683) 7

[2.2 实验方法](#_Toc686407684) 7

[2.2.1 总RNA的提取及cDNA模版的合成](#_Toc686407685) 7

[2.2.2 cDNA克隆及序列分析](#_Toc686407686) 8

[2.3 实验结果](#_Toc686407687) 12

[2.3.1 特异性引物设计](#_Toc686407688) 12

[2.3.2 RNA提取结果](#_Toc686407689) 14

[2.3.3 核心序列克隆中的PCR结果](#_Toc686407690) 14

[2.3.4 cDNA末端快速扩增反应引物设计及实验结果](#_Toc686407691) 14

[2.3.5 褐牙鲆卵黄蛋白原基因序列的特征及其编码的蛋白结构预测](#_Toc686407692) 15

[2.3.6 卵黄蛋白原氨基酸序列分析及进化树同源性分析](#_Toc686407693) 18

[2.4 讨论](#_Toc686407694) 19

[第三章 卵黄蛋白原的诱导及其表达分析](#_Toc686407695) 19

[3.1 材料与方法](#_Toc686407696) 19

[3.1.1 实验材料](#_Toc686407697) 19

[3.1.2 实验方法](#_Toc686407698) 19

[3.2 实验结果](#_Toc686407699) 21

[3.2.1 引物设计结果](#_Toc686407700) 21

[3.2.2 RNA的提取结果](#_Toc686407701) 22

[3.2.3 Real-Time PCR结果](#_Toc686407702) 22

[3.3 讨论](#_Toc686407703) 23

[第四章 雌二醇（E2）与塑化剂（DIOP）对褐牙鲆幼鱼组织损伤](#_Toc686407704) 23

[4.1 材料与方法](#_Toc686407705) 23

[4.1.1 实验材料](#_Toc686407706) 23

[4.1.2 实验方法](#_Toc686407707) 23

[4.1.3 取样与样品处理](#_Toc686407708) 23

[4.2 结果](#_Toc686407709) 23

[4.2.1 E2与DIOP对牙鲆幼鱼致死率的影响](#_Toc686407710) 23

[4.2.2 E2与DIOP对褐牙鲆的组织损伤](#_Toc686407711) 24

[4.3 讨论](#_Toc686407712) 28

[4.3.1 对鳃组织的损伤](#_Toc686407713) 28

[4.3.2 对肝组织的损伤](#_Toc686407714) 28

[4.3.3 对肾脏的损伤](#_Toc686407715) 28

[第五章 小结](#_Toc686407716) 28

[参考文献](#_Toc686407717) 29

前 言

近年来，随着工农业的发展，人口的迅猛增长，随之而来的是大量工业废水、生活污水和农药的排放，对水环境造成了严重的污染。在这些污染物中，存在大量的具有雌激素效应的物质，可以干扰动物和人体的内分泌活动，给正常的生理活动造成巨大的危害[1]，它对生态环境和人类健康造成的巨大威胁引起了国际社会的普遍关注。因此需要一种有效的方法来完成对水环境中外源性雌激素污染物的监测。

卵黄蛋白原是卵生脊椎动物卵黄蛋白的前体，是一种大分子的磷脂糖蛋白，在雌激素的调控下合成，一般情况下，只存在于成熟的雌性个体中。但是当存在外源雌激素或者具有雌激素效应的物质的诱导下，雌性的幼体个体和雄性个体都可以产生大量的卵黄蛋白原

[2, 3]，甚至可以达到雌性成熟个体的水平。可以利用卵黄蛋白原的这一特点，通过对其诱

导表达含量的检测就可以反映出环境雌激素的含量，卵黄蛋白原作为生物标志物已有相关的研究，其中在鱼类中研究比较广泛。对卵黄蛋白原的检测一般分为两种方法，一种是通过直接对血液中的卵黄蛋白原的含量进行检测，以此实现对环境雌激素的反应，对血液卵黄蛋白原的检测多使用依赖于抗原-抗体反应的ELISA方法，目前在很多鱼类研究中建立了ELISA的检测方法[4]。另外，在脊椎动物中卵黄蛋白原的合成一般发生在动物肝脏中的肝细胞中，合成后经过血液循环运往卵巢，被卵母细胞吸收后变成卵黄蛋白，为发育中的胚胎提供营养物质，因此肝脏中卵黄蛋白原mRNA的表达量可以反映出外源雌激素或者雌激素类似物的诱导量，对肝脏中卵黄蛋白原mRNA的检测一般采用Total RNA提取

-cDNA合成-Real-Time PCR检测表达量的方法，该方法准确性好，灵敏度高，可以检测到极微的表达量，因此是一种比较理想的检测方法，应用比较广泛。

褐牙鲆，隶属鲽形目、鲆科、牙鲆属，分布范围较广，主要分布于我国北部、朝鲜半岛、日本沿海等，不仅是一种名贵的海水养殖鱼类，还是一种重要的放流鱼类。本论文对卵黄蛋白原蛋白结构进行了详细的介绍，对卵黄蛋白原诱导、合成及分泌过程进行了系统阐述，深度揭示了卵黄蛋白原的生物学功能和在生物标志物中的应用。通过对褐牙鲆卵黄蛋白原基因的克隆、分析，以及检测外源雌激素或雌激素类似物诱导下肝脏中卵黄蛋白原

mRNA的表达量，建立了Real-Time PCR的检测方法，分析褐牙鲆卵黄蛋白原作为外源雌激素污染物的生物标志物的可行性，为海水雌激素的预警和监测提供一种有效的方法。

# 第一章 文献综述

卵黄蛋白原指的一种特异性蛋白，广泛存在于雌性卵生非哺乳性动物的成熟个体血液中，在部分无脊椎动物中也有存在，可以作为卵黄蛋白的前体。卵黄蛋白原“Vitellogenin”一词最早是由Pan等（1969）[5]提出，用来描述一种无脊椎动物雌性昆虫血淋巴中的特异性蛋白质，后来在大量的研究中被用于形容卵生动物雌性个体在卵黄形成的过程中，其血浆中大量存在的大分子的磷脂糖蛋白。

## 1.1 卵黄蛋白原的诱导与合成

卵黄蛋白原最早发现于成熟雌性动物的血浆中，因此起初被认为是一种特异在存在与雌性动物中的卵黄蛋白的前体，称为“雌性特异性蛋白”。研究发现，在外源17-β雌二醇刺激下，雄鱼肝细胞也能合成卵黄蛋白原[6]。大量的实验证明，卵黄蛋白原并不仅存在于雌性成体的蛋白，在许多未成熟的雌鱼体和雄鱼内也检测到卵黄蛋白原的存在[7-11]。

### 1.1.1 卵黄蛋白原的诱导

对卵黄蛋白原的诱导已经有很多的相关研究，尤其在鱼类和两栖类中。通过使用生物化学和分子生物学的方法，对卵黄蛋白原的雌激素诱导和调控进行大量的研究。鱼体在17-β雌二醇的刺激下会诱导卵黄蛋白原在肝细胞中的合成，进而导致卵黄蛋白原在血液中的积累[12]，（Flouriot etal.,1993）[13]对虹鳟鱼卵黄蛋白原的研究时发现，肝细胞在E2的诱导下，可导致卵黄蛋白原mRNA的表达。大量的体外实验表明17-β雌二醇是体外培养肝细胞卵黄蛋白原合成的重要诱导剂[14-17]，体外培养的雄性青鳉鱼的肝细胞，对1-100

nmol/L乙炔基雌二醇中做连续6天的暴露处理，卵黄蛋白原被诱导合成，诱导作用可以维持1个月以上[18]。

### 1.1.2 卵黄蛋白原的合成

在卵子形成的过程当中，卵黄的形成可以为发育中的胚胎提供必须的需营养物质，卵黄形成过程中需要的卵黄蛋白原的有两种不同的合成方式，一种是合成发生在自卵母细胞自身中，这种合成被称为内源性卵黄合成。另外一种卵黄蛋白原的合成发生在卵母细胞以外的地方，如肝脏、脂肪体等，合成后经血液循环进入卵母细胞，这种方式被称为外源性卵黄合成。Bailey等人（1957）[19]通过对金鱼的研究，第一次对卵黄生成作用提出了雌激素诱导鱼类合成卵黄蛋白原的假设，后经一系列的研究得到验证，激素经脑垂体分泌后，通过血液循环运送到卵巢，促性腺激素作用于使其释放雌激素，雌激素通过血液循环的方

式到达肝脏，肝细胞表面雌激素受体受到刺激后导致卵黄蛋白原的合成[20-22]，合成的蛋白经血液循环运送到卵巢，以受体介导的内吞作用方式被卵母细胞吸收，并进一步水解为卵黄蛋白成分[23-25]。卵黄蛋白原在细胞中的合成在激素的严格控制之下[26]，与激素特异性结合的受体细胞与卵黄的生成方式有关，在卵黄蛋白原的内源性合成中，激素的受体细胞为卵母细胞，而在卵黄蛋白原外源性合成中，受体细胞通常为体腔细胞、肠细胞、滤泡细胞和肝细胞等，虽然激素的受体细胞有不同的种类，但激素诱导细胞合成卵黄蛋白原的作用方式并没有很大的差别。

内源性卵黄蛋白原合成发生在自身的卵母细胞中，从形态学上对发育中的卵母细胞内细胞器进行观察，可以发现卵黄蛋白原的合成，内质网、高尔基体和线粒体是参与卵黄蛋白原形成的主要细胞器。对巢沙蚕(*Diopatra cuprea*)卵黄蛋白原的研究中发现，细胞质中的粗面内质网比较发达，卵黄的形成在高尔基体中发生。甲壳类河虾的卵黄蛋白原的合成发生在在粗面内质网中，合成后被运送到光面内质网的中，经修饰变成成熟的卵黄蛋白。对太平洋牡蛎（*Crassostrea gigas*）的卵黄的研究中发现，当使用卵黄蛋白的特异性抗体进行ELISA分析时，只有卵巢组织发生了明显的反应，其它组织都不产生明显反应，太平洋牡蛎卵黄蛋白原形成过程因此被认为仅发生在卵母细胞[27]。

外源性卵黄蛋白原的合成，主要体现在一系列形成的过程上，其中包括卵黄蛋白原的合成、分泌过程，卵母细胞的胞饮作用、进入细胞后的裂解、卵黄的形成等过程。最普遍的方式是，先在卵巢外的其他器官中合成卵黄蛋白原，然后经内分泌系统进入到血液循环系统，经过血液循环系统的运输作用，卵黄蛋白原被运送到卵巢组织，进而被卵母细胞吸收，一般通过受体介导的胞饮作用进行吸收，最终在卵母细胞内经酶的水解作用，形成卵黄蛋白。次合成过程在卵生脊椎动物中非常常见，在多种动物中都有存在，在无脊椎动物中也发现存在外源性的卵黄蛋白原合成，研究发现在甲壳类、海胆、线虫、部分软体动物、大多数昆虫等都存在外源性的合成。卵黄蛋白原在糙面内质网中合成，随后进行糖基化和磷酸化[28, 29]，在脊椎动物中，如鱼类、两栖类和鸟类等，卵黄蛋白原由肝脏合成后分泌到血液中，经血液循环运输到卵母细胞后被吸收，经酶的水解作用作用形成卵黄蛋白。在多肽合成之后内质网中约30%的磷酸盐残基共价结合到卵黄蛋白原上。对鸡卵黄蛋白原的研究中发现，翻译后修饰途径包括：多肽的合成-糖基化-磷酸化-分泌途径[30]。在非洲爪蟾

（*Xenopus laevis*）的卵黄蛋白原的研究中发现，新合成的完整的卵黄蛋白原多肽释放到糙面内质网腔后首先进行部分磷酸化，从细胞超微结构中发现，随后被隔离在内质网萌发的光滑平面区域，当小囊泡转移到高尔基体的时候，额外的磷酸化发生在C末端区域，然后卵黄蛋白原被包装成分泌小泡，磷酸化作用停止。一种包含甘露糖的寡糖残基通过N-糖基化作用也被结合到卵黄蛋白原多肽上，糖基化发生在天冬酰胺与N-乙酰葡萄糖胺之间，在多肽转化成卵黄蛋白原后，寡糖链经历了几次酶的水解，但并没有水解所有的甘露糖，这是修饰步骤发生相对较慢，一般在高尔基体中发生，在完成分泌之前需要进行连续添加N-乙酰葡萄糖胺和半乳糖残基[29, 31]。对昆虫中卵黄蛋白原的合成研究中发现，昆虫卵黄蛋白原是在脂肪体内合成的，体内合成的途径与卵生脊椎动物相似，在粗面内质网上

合成后被运输到高尔基体，转运过程中经翻译后修饰，如糖基化、磷酸化、硫基化等，然后包装成分泌小泡，经高尔基体分泌到血淋巴内[32]，然后被输送到卵巢，通过受体介导的胞饮作用由卵母细胞吸收[33]。线虫的卵黄蛋白原的合成地点是肠细胞，合成后运输到卵巢，被卵母细胞吸收[34]，而海胆卵黄蛋白原的合成地点是体腔细胞和消化道细胞中，合成后被运往体腔液，到达卵巢后被卵母细胞吸收[35]。

## 1.2 卵黄蛋白原的结构特性

卵黄蛋白原是一种高分子量蛋白质，含糖、含磷、含脂，在不同的物种中，卵黄蛋白原的分子量处在150kda到600kda之间，一般的，卵黄蛋白原是卵黄蛋白的前体，可由激素诱导可产生，是雌性特有的特异型血清或者血浆蛋白，可以携带脂质和离子成份。在不同门类动物中，如昆虫、甲壳类、鱼类、两栖类、和鸟类等都有相关的研究。卵黄蛋白原的结构和功能具有一定的相似性，同时也具有一定的特异性，例如无脊椎动物线虫，卵黄蛋白原由170kda的同源二聚体组成，合成发生在成熟线虫的肠细胞中[36, 37]；脊椎动物中如两栖类、鱼类，卵黄蛋白原分子结构上是由两个分子量约170-220kda的同源二聚体组成，合成发生在肝脏中的肝细胞中；介于脊椎动物和无脊椎动物之间的文昌鱼，卵黄蛋白原是由两个160kda的同源二聚体组成[38]。在大多数脊椎动物中，卵黄蛋白原单体分子通常存在三个主要的结构域，N端通常有一保守的磷脂蛋白成份，在中间位置卵黄高磷蛋白区域有一多聚丝氨酸的高磷区域，C端则主要包括由磷脂蛋白结构、卵黄磷蛋白结构和卵黄糖蛋白结构[39]。

### 1.2.1 脊椎动物卵黄蛋白原的结构

对卵黄蛋白原结构的研究，脊椎动物中主要存在于鱼纲、两栖纲和鸟纲中。部分鱼类、两栖类、爬行类和鸟类的卵黄蛋白原的cDNA全序列或者部分序列已经被克隆，进而可以推导出其氨基酸序列，并进行蛋白的功能的预测。在硬骨鱼类中，有很多物种的卵黄蛋白被分离并鉴定[40-42]。在两栖类和鸟类中发现卵黄蛋白原进入卵母细胞后，被降解为脂磷蛋白、高磷蛋白和卵黄糖蛋白。Hara和Hirai (1978)[22]，Idler等人（1980）[43]使用沉淀和凝胶色谱的方法从成熟的雌性虹鳟鱼和经雌激素诱导的不同性别的幼体虹鳟鱼（*Oncorhynchus*

*mykiss*）中分离出卵黄蛋白原，并通过生物化学、免疫学、电泳的方法对其进一步鉴定，结果显示血液卵黄蛋白原与卵黄高磷蛋白、卵黄磷脂蛋白之间有很强的相关性。Hiramatsu等人（1996）[44]从库页岛雌性罗非鱼中分离得到了卵黄蛋白原和其三种蛋白组分，卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白和β组分，第一次有了免疫学的证据证明鱼类的卵黄蛋白原包含三个部分，纯化的卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白和β组分分子量分别为330、23、30kda. Jared和Wallace[45]通过TEAE纤维素柱层析蒸馏法鉴定了一种卵黄蛋白没有脂质和磷的组分-β组分，他们提出β组分是一种血清蛋白。与此相反，Markert和Vanstone[46]通过凝胶过滤在水

和硫酸铵沉淀法发现了一种类似的卵黄蛋白。这种蛋白被称为β组分，放射免疫分析后被认定为是一种和卵黄蛋白原相关的蛋白，Campbell等人（1980）[47]将β组分定义为是与卵黄蛋白原相关但是不含有磷脂的小分子蛋白。对爬行动物斑点龟(*chrysemys picta*)研究发现，在外源17-β雌二醇诱导下，雌龟与雄龟个体中都可以合成卵黄蛋白原，合成的卵黄蛋白原是由两个同等大小分子量为210-220KDa的亚基构成[48]。Wang(1983)[49]等人对雌激素诱导的鸡血中的卵黄蛋白原Vg进行纯化，得到了三种不同的类型Vg1、Vg2和Vg3，并对这三种蛋白进行多种结构预测和分析，发现三种蛋白之间一级序列有明显差异，另外结构不同、分子量大小也不同，Vg3纯化后分析发现，在氨基酸组成上不同于Vg1和Vg2,仅用11种氨基酸组成，Vg3也是一种磷蛋白质，但是只包含了44mol的磷，对比Vg1和Vg2都含有

116mol的磷，部分免疫印迹图谱显示在抗Vg1与Vg2和Vg3之间没有反应，在抗Vg2与Vg1

和Vg3之间没有反应，放射免疫印记显示在抗Vg3与Vg1和Vg2之间没有明显反应，推断出

Vg3是一种独特的卵黄蛋白原，由第三种基因编码，因此表明鸟类Vg至少由三种Vg基因编码合成。

### 1.2.2 无脊椎动物中的卵黄蛋白原的结构

对于卵黄蛋白原的研究，无脊椎动物中主要存在与甲壳类和昆虫类。对昆虫来说，卵黄蛋白原是通常是在脂肪体内合成，后经分泌作用进入血淋巴，通过受体介导的胞吞作用被由发育中的卵母细胞吸收。在昆虫的卵黄蛋白原的结构中，糖类约占1％-14％，脂类约占6％-16％，氨基酸约占84％，是一种大分子的糖磷脂蛋白。脂类多以磷脂、中性脂和胆固醇等形式存在，糖类主要为参与N-糖基化的甘露糖，通常以3个甘露糖残基相连，氨基酸主要包括天冬氨酸和谷氨酸。昆虫类的卵黄蛋白原以一种寡聚糖磷脂蛋白的状态存在

[50]. 许多昆虫，如家蚕、棉铃虫、蜜蜂的卵黄蛋白原氨基酸序列可在NCBI上查到，分析时发现，序列之间存在明显的差异，同时也存在着一定的同源性，例如昆虫动物的卵黄蛋白原与脊椎动物的相似，都含有几个多聚丝氨酸区域。对意大利蜂卵黄蛋白原cDNA研究时发现，其全长cDNA编码1770个氨基酸，同其他昆虫Vg序列的比较中可以发现存在许多保守区域[51]。

研究发现，许多动物的卵黄蛋白原在结构上都具有一定的同源性和保守性，同时还保留高度的特异性，例如不同科不同属的鱼类之间的卵黄蛋白原和其他的抗体很少发生免疫交叉反应，显示出了卵黄蛋白原明显的特异性[52] 。

## 1.3 卵黄蛋白原的Th物学功能

卵黄蛋白原可以为正在发育的卵母细胞提供多种营养物质，如脂肪、氨基酸、碳水化合物、磷、硫及微量元素，还可以提供多种功能性物质。除此之外，研究发现卵黄蛋白原还可以参与了多个生理学过程，具有多种生物学功能。

不同种类的的动物，脊椎动物如鱼类、两栖类，爬行类和鸟类等卵生动物，无脊椎动物包括昆虫类、甲壳类，卵黄蛋白原在结构组成上具有一定的同源性，因此可能具有相似的生物学功能。Jones（1978）发现卵黄蛋白原及其产物对卵母细胞的生长和分化具有明显的促进作用[53]。研究发现卵黄颗粒中的蛋白经酶水解后产生多种物质，除了可以为胚胎细胞发育提供营养的部分，还有部分可分泌到正在发育的胚胎的胞外介质中，并行使一定的功能[54, 55]。卵黄蛋白原不仅存在于成熟的雌性动物血浆中，在外源雌激素及类似物的刺激下，也会出现在未成熟的雌鱼和雄鱼的肝脏中，研究表明有许多未成熟的雌鱼和雄鱼未受外源雌激素或雌激素类似物的刺激下，体内也会产生少量的卵黄蛋白原[3]。Unuma（1998）通过使用免疫组化和免疫印记的方法，在雌雄海胆(*Echinoidea*)的性腺中都发现了卵黄蛋白原的合成，在性腺发育的过程中，精巢中的卵黄蛋白原逐渐消失，相反的卵巢中的卵黄蛋白原经过一系列的分解作用最终形成卵黄蛋白，另外研究还发现精巢中卵黄蛋白原可以为精子的形成提供营养物质[35]。Matsubara（1999）对条斑星鲽(*Verasper moseri*)的卵母细胞的研究时发现，在其成熟过程中，卵黄蛋白分解形成的游离氨基酸对细胞内外的渗透压平衡具有重要的调节作用，可以保持卵母细胞在水中的漂浮状态[56]。

卵黄蛋白原与卵生动物的繁殖有着紧密的关系，不仅仅是因为卵黄蛋白原可以为胚胎发育提供必须的营养物质，而且还可以行使非极性分子的载体的功能[57]。从卵黄蛋白原的结构中可以发现，其中含有许多脂类成分，如环节动物卵黄蛋白中含有5％的糖类和16％的脂类物质[58]，这些脂类物质不仅可以为发育中的胚胎提供营养物质，还可以对卵母细胞的生长与发育起到加速的作用。

研究发现，硬骨鱼类、蛙类的卵黄蛋白原与人类的一种LDL家族成员结构上相似同属于脂转运蛋白超家族，具有运输脂类的功能。许多鱼类卵黄蛋白原中脂类含量比较高，一般都含有约20％的非极性脂类，作为一部分用来构成卵黄脂磷蛋白。卵黄蛋白原除了能够结合脂类充当脂类的转运载体之外，还可以作为类胡萝素、维生素A、甲状腺素的载体并将它们运送带卵母细胞[59-61]。

此外，卵黄蛋白原还具有离子载体的功能，如Ca2+、Zn2+、Fe2+、Fe3+等金属离子可以通过与卵黄蛋白原的结合，从而被运送到卵母细胞中，在此过程中，卵黄蛋白原充当了离子载体的功能。例如Montorzi等人（1994）[62]对爪蟾（*Xenopus laevis*）的研究中发现，卵黄蛋白原中的脂磷蛋白可以与Zn2+部分结合，而卵黄蛋白原中的高磷蛋白结可以Ca2+结合。

研究发现，卵黄蛋白原还具有一些与酶相关的活性，如在一些甲壳类动物的卵黄蛋白原中发现其与酶相似的活性，对螯虾(*Sandcrayfish*)的卵黄蛋白原功能的研究中发现，其卵黄蛋白原具有潜在的蛋白酶活性并具有Ca2+依赖性，当卵黄蛋白原被卵内带有蛋白酶活性的低密度脂蛋白降解后，这种活性才能够表现出来[63, 64]。

卵黄蛋白原除了为发育的卵母细胞提供营养功能和充当多种物质的载体外，还具有一定的免疫功能。在线虫及海胆中研究发现，存在一种凝集蛋白，该蛋白在免疫防御机制中起重要作用，在分类上属于卵黄蛋白原超家族[65]。昆虫中缺少特异性的免疫功能，抗菌蛋白由于带有凝集活性可以参与非特异性免疫。Raikhel等（2002）[66]在对黄热病蚊（*Aedes*

*aegypti*）的卵黄形成过程的研究中发现，卵黄蛋白原基因的调控区序列可以产生高水平的防御素和抗菌因子，以此来参与和增强免疫功能。Shi等人（2006）[67]从玫瑰无须鲅

（*Puntiusconchonius*）中纯化得到了卵黄蛋白原，经过一系列体外试验和分析，发现了卵黄蛋白原具有抗菌作用和凝血作用，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等细菌的生长有明显的抑制作用。对于卵黄蛋白原发挥抑菌等免疫作用的机理，Li等（2008, 2009）[68, 69]证明了卵黄蛋白原可以促进巨噬细胞对细菌的吞噬，并详细阐明了卵黄蛋白原的杀菌机理。

## 1.4 卵黄蛋白原的检测分析方法

对卵黄蛋白原的分析方法主要有两个方面，一个是对卵黄蛋白原的纯化后，建立在抗原抗体免疫反应基础上的分析方法，主要包括酶联免疫吸附法(ELISA)、放射性免疫分析法(RIA)和蛋白印迹法(Western Blotting)等，应用最多的分析方法是ELISA法，但是以抗体为基础的分析方法有着一定的缺陷，由于需要纯化各种卵黄蛋白原同时制备各种相应的抗体、进而进行抗体与抗原之间杂交反应，过程比较繁琐。另外一种是建立在对卵黄蛋白原

mRNA的表达量的分析基础上的方法，即通过RNA的提取，cDNA的反转录，实时荧光定量的检测等技术实现对卵黄蛋白原mRNA的检测，该方法反应灵敏，操作简单，是一种比较理想的检测方法，被大量用在各种生物标志物卵黄蛋白原的检测上。

Louise等人（1999）[4]用雌二醇对雄性的黑头呆鱼（*Pimephales promelas*）进行诱导处理，然后通过阴离子交换层析从血液中分离并纯化卵黄蛋白原，并且制备卵黄蛋白原特异性抗体，使用ELISA的方法，利用卵黄蛋白原特异性抗体对未经激素处理的血浆进行检测，结果没有发现卵黄蛋白原存在，从而建立了这种ELISA的方法，可以用于对水体环境中激素类污染物的检测。Akihiro（2001）[70]使用不同浓度的17-β雌二醇对罗非鱼(*Tilapia*)进行诱导，从血液中分离纯化后，使用ELISA的方法进行检测分析，结果发现Vg的表达量有很大不同，同时不同形式的Vg的相对含量也有不同程度的改变。王凤等（2009）[71]对哲罗鲑(*Hucho taimen*)的卵黄脂磷蛋白进行研究，采用电泳、蛋白免疫印迹和柱层析等方法，建立了ELISA的方法，可以用来检测血清卵黄蛋白原浓度的变化。姚静等（2010）[72]以卵黄脂磷蛋白( Lv)抗血清为抗体，以纯化的Lv作为抗原，建立了间接酶联免疫吸附测定(ELISA)的方法，可以用来对雄性唐鱼( *Tanichthys albonubes*)整体匀浆液中的卵黄蛋白原进行检测，从而完成对环境雌激素污染物的检测。

除了利用免疫学方法对卵黄蛋白原进行检测外还可以利用对鱼类肝组织中卵黄蛋白原mRNA的水平变化的检测来衡量环境中内分泌干扰物的含量[73]。例如，雌激素和外源性类雌激素都可以诱导卵黄蛋白原基因的表达，雌激素可以诱导雄蛙成体体内卵黄蛋白原的表达但却不能诱导幼蛙体内卵黄蛋白原的表达。分别用外源性BPA[74]和NP[75]对雄性东方铃蟾（*Bombina orientalis*）的肝细胞进行诱导处理，然后采用实时荧光定量PCR的方法检测卵黄蛋白原mRNA的含量，结果发现两种外源性雌激素均可以导致雄性东方铃蟾肝细胞中卵黄蛋白原mRNA表达水平的提高，并且可以达到成体雌性中的卵黄蛋白原表达水平。

Scholz等（2004）[76]使用实时荧光定量PCR的方法，对雌激素和雌激素类污染物暴露下的青鳉原代培养的肝细胞中卵黄蛋白原mRNA表达水平进行定量分析，结果发现外源性雌激素污染物与卵黄蛋白原mRNA之间在基因水平上有一定的关系。

## 1.5 卵黄蛋白原作为环境指示Th物的应用

随着社会在不断地发展，工业、农业也在相应不断的发展，由此产生的大量的废物废料，再加上越来越多的生活污水，对环境污染巨大。随着环境污染的日益严重，人类的健康和生物的生存都受到了严重的威胁。污染物中有很多化学物质属于内分泌干扰物的范畴，这一类物质能够干扰动物的内分泌系统，使得动物的内分泌系统不能正常运行，进而波及到动物的生长、发育、繁殖等一系列重要的生理生命活动。当今，对于这些内分泌干扰物的研究已经得到足够的重视，成为人类和环境健康科学的一个重要领域。内分泌干扰物（Endocrine disrupting chemicals, EDCs）指的是能够效仿或拮抗自然产生的激素作用的化学物质，环境雌激素就是内分泌干扰物中的一种，环境雌激素可以模仿体内E2的作用而引起体内雌激素效应。除了天然雌激素外，不同种类的工业、农业废料会产生各种各样的类雌激素，例如聚乙氧基烷基苯酚、多氯化联二苯、及杀虫剂、乙炔基雌二醇、壬基酚、双酚A、BPA、全氟辛烷磺酸、二乙基己烯雌酚等[77-80]。对外源性雌激素进行大量研究后表明，此类物质可以提高鱼体组织中甾类性激素水平并可以激活激素诱导的蛋白质合成作用[11, 81-86]。内分泌干扰物可以造成动物体内激素和蛋白水平发生变化，根据这种变化可进行有效的检测环境雌激素污染物的含量，因此动物体内发生相关变化的蛋白可以作为一种检测雌激素类污染物的良好的生物标志物。

为了能够准确快速的对内分泌干扰物进行检测，需要一种操作方便，反应灵敏，结果准确的检测系统。在外源性雌激素污染物暴露下动物体内可检测到变化的几种蛋白可以作为检测内分泌干扰物的生物标志物。卵黄蛋白原就是其中一种，并且在应用领域比较广泛。卵黄蛋白原结构特点和形成方式促使其成为一种良好的生物标志物，卵黄蛋白原的合成在雌激素或类雌激素的严格调控之下；卵黄蛋白原的合成机制得到广泛的研究并被一致认为是在甾类激素调控下完成；外源雌激素的暴露程度不同导致不同程度的卵黄蛋白原的合 成；卵黄蛋白原在正常情况下一般存在于成熟的卵生雌性动物中，在雄性和未成熟的雌性动物体内几乎检测不到存在，但是在外源污染物暴露下，雄性体内和未成熟的雌性体内也会产生卵黄蛋白原，并且可以达到成熟雌性的水平。因此，通过检测幼鱼体内卵黄蛋白原的表达情况就可以完成对水环境中内分泌干扰物污染情况的监测[87-89]. Pelissero等（1993）使用几种化学类的雌激素对虹鳟鱼进行体外诱导实验，并通过检测卵黄蛋白原的表达完成对雌激素的检测。酚类污染物可以影响肝细胞ER和卵黄蛋白原的异常表达，BPA可诱导肝细胞中ER合成，呈剂量-依赖效应，ER的合成过程中同时伴随着卵黄蛋白原的生成[85]。刘

萍等（2010）[90]通过使用基酚、辛基酚、双酚Ａ和2, 4－二氯酚4种酚对雄性金鱼卵黄蛋白原进行诱导实验，并检测卵黄蛋白原表达的变化，结果发现表达量与浓度有很好的效应关系，因此推断金鱼卵黄蛋白原是一种良好的生物标志物。一些杀虫剂如DDT等和一些工业化学物如塑化剂等都可以不同程度的诱导卵黄蛋白原的合成。

## 1.6 研究意义及展望

卵黄蛋白原的合成受到激素的严格控制[26]。卵黄蛋白原的合成包括激素的释放，运输到卵巢并导致雌激素的释放，雌激素经血液循环到达靶细胞，与受体结合后可诱导卵黄蛋白原的合成，因此可以看出诱导合成过程涉及到激素与激素受体的结合过程并完成了卵黄蛋白原基因的表达。由此可见，对卵黄蛋白原合成机制的研究对激素调控基因表达的研究有着很大的帮助。另外卵黄蛋白原具有离子载体的功能，可以结合并转运多种离子，如可以结合锌离子，同时锌离子可以作用于雌激素受体，因此卵黄蛋白原有可能间接参与了由甾类激素所介导的信号转导过程。

卵黄蛋白原结构在不同物种之间存在较高的同源性，在很多动物都有相对保守的区域，如卵黄蛋白原N端序列、信号肽、多聚丝氨酸区域，还有比较保守的半胱氨酸位点，编码卵黄蛋白原的基因同在一个基因家族中，在这个基因家族中，有很多编码脂蛋白受体和低密度脂蛋白的基因，基因表达的产物可以参与参与脂类的运输和代谢，因此可以通过对卵黄蛋白原基因序列和卵黄蛋白原结构的比较，来了解脂类代谢机理。卵黄蛋白原保守序列中的N端序列是卵黄蛋白原全长序列中最保守的部分，在许多动物中卵黄蛋白原N端的氨基酸序列都已经测序完成，加上卵黄蛋白原在不同生物中的同源性较高，卵黄蛋白原N端保守序列在不同物种中的差别，可以反映出动物在系统进化中的分类学地位。另外，由于卵黄蛋白原基因的表达在雄性与雌性中有一定的差异性，可以利用这一特点来鉴别动物的性别。

随着环境污染日趋加重，环境中的EDCs即环境中存在的能干扰生物体内分泌系统并导致异常效应的物质，能够通过影响生物体内激素的合成、分泌、转运及代谢等环节，干扰生物体正常的内分泌功能，并引起多种毒性效应，其对生态环境和人类健康造成的巨大威胁引起了国际社会的普遍关注。内分泌干扰物主要包括多氯化的化合物、有机氯农药、烷基酚、性激素及塑化剂等水体环境中杀虫剂、化学活性剂、去污剂以及其他化工产品。这些污染物可以干扰激素正常的合成及其活性，严重影响动物的生殖和发育，所以需要一种有效的检测和监测方法。卵黄蛋白原就是这样一种比较理想的生物标志物，其反应灵敏，操作简单，检测结果准确的特点使卵黄蛋白原在外源性污染物检测中应用十分广泛。由于未成熟的雌性动物和雄性动物在雌激素或者雌激素类似物的诱导下也可以大量合成，可以通过对幼鱼体内卵黄蛋白原表达水平的检测来反应环境中污染物的含量，其中应用最广的方法主要有免疫反应的ELISA方法和卵黄蛋白原mRNA的检测的方法。

大量的实验证明卵黄蛋白原在免疫防御中起到一定的作用，比如卵黄蛋白原具有凝血

和抑茵作用，另外还具有清除体内自由基的作用等。通过分析卵黄蛋白原氨基酸序列，结构等特点，研究卵黄蛋白原的免疫功能对动物的免疫系统的研究具有很大的帮助。

鱼类卵黄蛋白原是受雌激素诱导在肝脏内合成的一类雌性特异血清蛋白，不仅以卵黄蛋白的前体的形式参与鱼类配子形成和早期发育等重要生理过程，而且还是采用鱼类作为指标生物监测环境雌激素及其类似物污染的重要生物标志物，其生成、结构以及功能方面的研究，对鱼类养殖生产、渔业资源评估以及环境污染监测等研究领域都具有重要意义。

褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)属鲽形目，鲽亚目，牙鲆科，牙鲆属，体扁，长卵圆形，左右不对称，吻部较长。两眼均位于头左侧，有眼侧两鼻孔位于眼间隔正中的前方。牙尖锐，呈锥状，有眼一侧被栉鳞，无眼一侧被圆鳞，奇鳍鳍条部被小鳞，胸鳍有眼侧较大，腹鳍左右略微对称，尾鳍呈双截形。有眼一侧暗褐色，体部较少黑斑或深褐色斑点，无眼侧白色。奇鳍上有暗色斑纹。

牙鲆为冷温性底层海水鱼类，成鱼生长的适温范围14-23℃，最适温度为21℃，养殖温度低于13℃及高于23℃时食欲减弱，易大量死亡。牙鲆属广盐性鱼类，能在盐度低于

8的河口水域生活，主要食物为桡足类的无节幼体及无脊椎动物的卵。

牙鲆为我国名贵海水鱼类，分布范围较广，主要分布于我国北部、朝鲜半岛、日本沿海等，不仅是一种名贵的海水养殖鱼类，还是一种重要的放流鱼类。本文对卵黄蛋白原蛋白结构进行了详细的介绍，对卵黄蛋白原诱导、合成及分泌过程进行了系统阐述，深度揭示了卵黄蛋白原的生物学功能和在生物标志物中的应用。通过对褐牙鲆卵黄蛋白原基因的克隆、分析，以及检测外源雌激素或雌激素类似物诱导下肝脏中卵黄蛋白原mRNA的表达量，建立了Real-Time PCR的检测方法，分析褐牙鲆卵黄蛋白原作为外源雌激素污染物的生物标志物的可行性，为海水雌激素的预警和监测提供一种有效的方法。

# 第二章 褐牙鲆卵黄蛋白原基因的克隆

卵黄蛋白原是在卵生脊椎动物和无脊椎动物中发现的主要卵黄蛋白的的前体，是一种在雌激素（主要是17-β雌二醇）的控制下，合成的大分子的糖酵解的磷脂蛋白[91, 92]。促性腺激素释放到血液中经血液循环到达卵巢并作用于卵巢组织，促使产生17-β雌二醇，雌激素复合体和雌激素受体识别位于卵黄蛋白原基因上游具有控制转录活性的雌激素反应元件[93]。卵黄蛋白原被分泌到血液中后，被运输到卵巢中，通过受体介导的胞吞作用被卵母细胞吸收，并成为发育中的卵母细胞的一部分[94]。随后，卵黄蛋白原经酶水解后成为更小的蛋白，在鸟类和两栖类中被水解成卵黄脂磷蛋白和卵黄高磷蛋白[91, 92]，在鱼类中被水解成卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白和β组分[44, 95]，这些水解产物可为早期胚胎的发育提供营养物质。一般的，血液中的卵黄蛋白原水平在成熟雌鱼卵黄生成作用中增加，在外源性雌激素的诱导下[2, 96-99]，未成熟的雌性和雄性鱼体中也能产生卵黄蛋白原，因此卵黄蛋白原的水平可以作为外源性污染物的指示物。

褐牙鲆，属鲽形目，鲽亚目，牙鲆科，牙鲆属，牙鲆为冷温性底层海水鱼类，分布范围较广，又是重要的放流种类之一，可以作为一种比较理想的生物标志物。本研究重点对褐牙鲆卵黄蛋白原cDNA全场序列进行克隆和分析，对其编码的氨基酸和形成的二级三级结构进行推断，并进行同源性分析和进化树分析，为建立RT-PCR的检测外源雌激素的方法提供基础的数据。

## 2.1 实验材料和试剂

### 2.1.1 实验材料

实验用鱼养殖与烟台天源水产有限公司，解剖后切取肝脏组织放入液氮中，后转入

-80℃保存备用。

### 2.1.2 耗材和试剂

提取RNA所用耗材：无水乙醇、异丙醇、氯仿为国药分析纯试剂，细胞破碎液（takara）、一次性研磨棒、Rna-free水、1.5mlEP管、枪头均为RNase-free制品（AXYGEN）。

琼脂糖凝胶电泳：TAE缓冲液、琼脂糖、EB核酸染料。

反转录试剂：RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621,（生工生物）。PCR: Master Mix（tiangen）。

胶回收：柱式（SanPrep）DNA胶回收试剂盒（生工生物）。连接转化：pMDTM18-T Vector Cloning Kit(takara)。

RACE: SMARTer™RACE cDNA Amplification Kit User Manual（clonetech）。实验中使用到的引物由生工生物工程股份有限公司合成。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 总RNA的提取及cDNA模版的合成

#### 2.2.1.1 总RNA的提取

（1）直接将组织切成100mg的小块，装进冻存管快速置于液氮中，可以直接进行RNA提取或者放入-70oC冰箱贮存。

（2）用液氮给EP管预冷降温，快速加入冰冻组织，用一次性研磨棒彻底匀浆，研磨过程中注意补充液氮保持冰冻。

（3）在EP管中先加入200μl Trizol进行研磨，再补充至1ml继续研磨，匀浆后上下颠倒混匀，室温下静置5min。

（4）加入200μl氯仿（每1mlTrizol），手持颠倒数分钟，室温静置3min，使其自然分相。

（5）4oC下13000rpm离心15min，上层无色水相中含有RNA，中层含有蛋白，下层黄色物质为有机相。

（6）小心吸取上层水相（约500ul）到另一EP管中，加入等体积预冷的异丙醇，混匀沉淀

RNA，室温下静置10min，4oC，13000rpm 15min，可延长至20min。

（7）弃上清，收集RNA沉淀，加入1ml 75%的冷乙醇，稍稍颠倒冲洗，小心弃乙醇，室温

15min干燥。

(8)在沉淀中加入20/50ul ddH2O或TE buffer，-70oC保存。

#### 2.1.1.2 cDNA的合成

cDNA的合成采用生工试剂盒RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621，向

PCR小管中加入如下体系：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 |  | 用量 |
| Template RNA Primer  RNase-free H2O | Total RNA Oligi(dT)18primer  Total volume | 0.1ng-5μg 1μl  To 12μl 12μl |

轻轻混匀后，65℃进行5min的水浴后，立即置于冰上，加入下述混合物与反应体系中：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 5×Reaction Buffer RiboLock RNase Inhibitor 10 mM dNTP Mix RevertAid M-MuL V  Reverse Transcripatase(200u/ul) | 4μl 1μl 2μl 1μl |
| Total volume | 20μl |

轻微混匀后，42℃温育60分钟后，70℃，5分钟终止反应。反转录的产品可以直接进行PCR反应，也可以储存在-20℃备用，也可以在-70℃长期保存。

### 2.2.2 cDNA克隆及序列分析

#### 2.2.2.1 设计引物进行PCR扩增

参照GenBank中几种鱼类卵黄蛋白原序列：条斑星鲽*Verasper moseri*（检索号

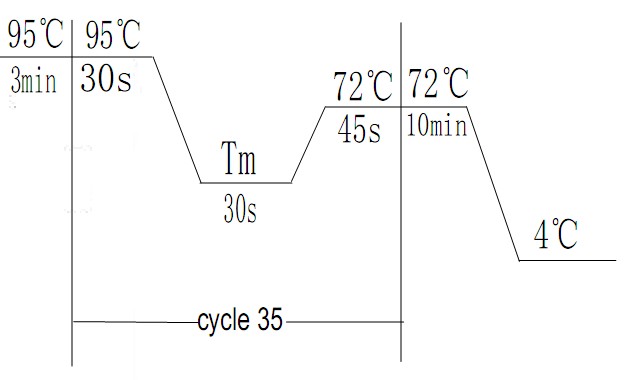
BAD9396.1）、大西洋庸鲽*Hippoglossus*(检索号ABQ58114.1)、欧洲鲈鱼*Dicentrachus*

*labrax*(检索号AFA26670.1)、条纹石鮨*Morone saxatilis*（检索号ADZ57173.1）设计合成引物。

以合成的cDNA为模板，用设计合成的引物进行PCR扩增反应，反应体系包括：

|  |  |
| --- | --- |
| 项目 | 剂量 |
| H2O：  Template: 5’ primer：  3' primer: Master Mix： | 7μl 1μl 1μl 1μl 10μl |
| Total | 20ul |

PCR反应条件：



#### 2.2.2.2 琼脂糖凝胶电泳检测

琼脂糖凝胶的制作：称取0.8g琼脂糖放入锥形瓶中，加入80ml的TAE缓冲液，使用微波炉加热2min，摇匀，分两次加热，每次一分钟，当液体变得透明，在光下观察不到杂质的时候停止加热，适当冷却后，加入核酸染料，摇匀后倒入事先插好梳子的制胶槽中，待凝胶冷却凝固后便可以使用。

琼脂糖凝胶电泳：将制好的琼脂糖凝胶放入盛有TAE缓冲液的电泳槽中，缓冲液没过凝胶，用移液枪取5μl的Maker和PCR产物点入琼脂糖凝胶的小孔中，接通电源，120V，持续21min左右，在放射自显影下观察扩增结果。

#### 2.2.2.3 胶回收纯化

（1）通过琼脂糖凝胶电泳分离目的DNA片段，在紫外灯的照射下用干净的刀片快速将琼脂糖凝胶块（含有目的DNA片段）切下，以免造成紫外线对DNA的损伤，然后放入事先称重的1.5 ml离心管中，并进行再次称重。

（2）根据琼脂糖凝胶的浓度和重量，加400μl的加入Buffer B2（每100 mg琼脂糖）。(由于使用的凝胶浓度在1%和1.5%之间，每100 mg凝胶加入400ul Buffer B2)。

（3）将离心管放入水浴锅中，50℃持续5-10 min，胶块完全融化后进行下一步的操作。

（4）当目的片段不足500bp时，加入异丙醇的量为所使用的Buffer B2体积1/3的，混匀。当目的片段超过500bp时，可以不用加入异丙醇。

（5）待琼脂糖凝胶融化完全后，将所得的溶液全部转移到吸附柱，以8000×*g*的速度进行离心，离心时间持续30s。

（6）向吸附柱中加入500μl的Wash Solution溶液，以9000×*g*的速度进行离心，离心时间持续30s。

（7）再次按步骤6进行一次。

（8）收集管和空吸附柱离心（9000×*g*）1 min。

（9）在吸附膜中央加入15-40ul Elution Buffer，室温静置1-2 min，9000×*g*离心1 min，将所得到的DNA溶液置于-20℃保存或用于后续试验。

#### 2.2.2.4 回收产物的连接和重组质粒的转化

（1）在200μl离心管中配制下述溶液。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| PMD18-T Vector\*1 Insert DNA\*3 | 1μl  0.1 pmol-0.3 pmol |
| dH2O | Up to 5μl |

加入5ul（等量）的Solution I。

(2) 16oC反应30分钟（PCR仪）。

(3)全量（10ul）加入至100ul 大肠杆菌感受态细胞中，稍稍旋转混匀，冰中放置30min。

(4)离心管在42oC条件下加热45s，冰浴1min。

(5)加入890μl LB不含抗生素培养基，37oC培养60-90min，使菌体复苏。

(6)将离心管中的菌液混匀，吸取200ul菌液在抗氨苄的LB固体培养基上进行涂布。当菌液被培养基全部吸收后，将平板倒置于恒温培养箱中，37oC条件下连续培养12h以上。剩余菌液可在4oC冰箱中保存，需要时可可以再次被利用。

#### 2.2.2.5 重组质粒的鉴定和测序

从完成培养平板上挑取若干生长良好个单菌落转入盛有LB液体培养基的离心管中，该培养基中含1/1000氨苄，震荡培养中37oC培养1-2h。用相应引物进行检测，菌液PCR检测体系包括：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积 |
| ddH2O 10×PCR Buffer  DNTP (2.5 mmol/L)  上下游引物  rTaq  菌液 | 14.2μl 2.0μl 1.6μl  各0.5μl  0.2μl 1.0μl |



反应程序：

使用琼脂糖凝胶电泳的方法对菌液PCR结果进行检测克隆，选取克隆效果良好的结果对应的菌液进行测序。

使用DNASTAR软件对测序结果进行比对，确定是否是需要的序列。

#### 2.2.2.6 VgB基因的RACE扩增

1）引物设计

根据已获得的褐牙鲆卵黄蛋白原部分序列设计特异性引物进行VgB的RACE扩增。

2）总RNA提取

提取方法同2.1.1，用Nano VueTM Plus超微量分光光度计检测RNA的浓度和A260/A280

的比值，用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量，选取质量良好的RNA进行cDNA第一链的合成。

3）cDNA的第一链扩增

cDNA第一链的扩增用SMARTer™RACE cDNA Amplification Kit User Manual试剂盒（clonetech）进行，操作步骤如下：

##### （1） 准备足够的缓冲液混合物，为每个10ul的cDNA合成反应，混合下述试剂，稍稍旋转混合，然后适温置于一边，在步骤7中使用。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 5× First-Strand Buffer DTT(20Mm)  DNTP Mix(10uM) | 2.0μl 1.0μl 1.0μl |
| Total | 4.0μl |

##### （2) 分别在不同的管中混合下述试剂：

|  |  |
| --- | --- |
| 5'-RACE | 3'RACE |
| 1.0-2.75μl RNA  1.0μl 5'-CDS Primer | 1.0-3.75μl RNA  1.0μl 3'-CDS |

加入RNA的总量应保持在10ng-1μg之间。

(3)在5'-RACE的反应管中加水到3.75ul，在3'-RACE的反应管中加水到4.75μl。

(4)混匀，在微型离心机中离心。

(5) 72℃反应3min后，42℃保持2min，14000g短暂离心10s，收集管底的组分，在反应进行时可以进行第7步的操作。

(6)在5'-RACE反应体系中加入1μl SMARTer IIA oligo。

(7)分别为5'-RACE和3'-RACE准备足够的下述混物，在室温下混合。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| Buffer Mix from step1 RNase inhibitor(40U/ul) SMARTScribe Reverse  Transcriptase (100 U) | 4.0μl 0.25μl 1.0μl |
| Tatal | 5.25μl |

(8)在3'-RACE中，将第7步的混合物加入到第5步的反应液中，在5'-RACE中，将第7步的

混合物加入到第6步的反应液中，使最终的反应体系为10μl。

(9)混匀，稍稍旋转，离心收集管底组分。

(10)在PCR仪中，42℃反应90min，70℃反应10min。

(11)用Tricine-EDTA Buffer稀释反应产物，当起始总RNA小于200ng时，添加200μl稀释液，当起始总RNA不小于200ng时，添加100μl稀释液。

(12)反应产物可以直接用来进行PCR扩增，也可以放在-20℃保存。

4）cDNA末端的快速克隆

##### （1）为每个50ul的PCR反应体系准备足够的Master Mix，可用于5'-RACE和3'-RACE，Master

Mix组成如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| PCR-Grade Water  10× Advantage 2 PCR Buffer dNTP Mix(10Mm)  50× Advantage2 Polymerase Mix | 34.5μl 5.0μl 1.0μl 1.0μl |
| Total Volume | 41.5μl |

##### （2）稍稍混匀，尽量避免产生气泡，使用小型离心机进行短时间的离心。

##### （3）加入下述试剂，分别组成5'-RACE，3'-RACE 50μl体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 5'-RACE-Ready cDNA UPM(10×)  反义特异性引物GSP1(10uM) Master Mix | 2.5μl 5μl 1μl 41.5μl |
| Total Volume | 50μl |
| 试剂 | 用量 |
| 3'-RACE-Ready cDNA UPM(10×)  正义特异性引物GSP2(10uM) Master Mix | 2.5μl 5μl 1μl 41.5μl |
| Total Volume | 50μl |

##### （4）当GSP Tm值在60℃-70℃之间时，反应程序如下：



##### （5）琼脂糖凝胶检测RACE反应产物，若条带清晰，则进行胶回收（参照2.2.1.2），连接转化、检测（参照2.2.1.3和2.2.1.4），最后对菌液进行测序处理。

5）巢式PCR验证序列

将PCR反应初级产物用Tricine-EDTA buffer依据其浓度大小稀释约50-100倍，用稀释后的产物作为巢式PCR的模板，反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 稀释后5'或3'-RACE-Ready cDNA  5'或3'巢式特异性引物(10μM)  NUP  Master Mix | 5.0μl 1.0μl 1.0μl 41.5μl |

琼脂糖凝胶检测RACE反应产物，若条带清晰，则进行胶回收（参照2.2.2.3），连接转化（参照2.2.2.4和2.2.2.5），最后对菌液进行测序处理。

## 2.3 实验结果

### 2.3.1 特异性引物设计

根据条斑星鲽*Verasper moseri*（检索号BAD9396.1）、大西洋庸鲽*Hippoglossus*（检索号

ABQ58114.1)、欧洲鲈鱼*Dicentrachus labrax*(检索号AFA26670.1)、条纹石鮨*Morone saxatilis*

（检索号ADZ57173.1）设计的引物如下表：

表2-1 基因克隆引物设计表

Table 2-1 chart of primers for gene cloning

| 引物名称 | 引物序列 |
| --- | --- |
| VgB01F | CTCTTGCCGATGCCCTCT |
| VgB01R | AGCCTTCCTGCCATAACTG |
| VgB08F | TCCGTCGTATCATTCCCAC |
| VgB08R | TCTTGCCTCAATCTTTCCAG |
| VgB11F | CGAGAAATGCGTGGAGTGT |
| VgB11R | TAGCAGAAACCATACGGAGC |
| VgB12F | TACGAGTTTGGCAGCGAGC |
| VgB12R | CCAGGGGTTGTGATAGGCAT |
| VgB13F | TCTTGCTGGGCTACGGC |
| VgB13R | AGCGGTGGGAATGATACG |
| VgB14F | CATTGCCCGTATTGCTCG |
| VgB14R | GCCTCTGCCTCTTCCTGTAT |
| VgB15F | GCCGTGACTGTTCTCATTCG |
| VgB15R | GCTCCTGACTTTGGTCCCTC |
| VgB21F | TGCTGAGGTCCGTCGTAT |
| VgB21R | GCTGGTGGATGTGGTTCT |
| VgB22F | AGGCTCTTTCTGATTGG |
| VgB22R | TTGTGTGAACTCTGGCTC |
| VgB24F | TGTCAAGAGCCAGAGTTCAC |
| VgB24R | AGGTCCTTTGCGTAGCG |
| VgB30F | ACTACAGATGTCAAGGGAGGC |
| VgB30R | CGAGCAATACGGGCAATG |

引物设计的位点如下图所示：







图2-1 设计引物所在位置示意图

01F、01R分别代表VgB01F、VgB01R，08F、08R分别代表VgB08F、VgB08R，11F、11R分别代表

VgB11F、VgB11R，12F、12R分别代表VgB12F、VgB12R，13F、13R分别代表VgB13F、VgB13R，14F、

14R分别代表VgB14F、VgB14R，15F、15R分别代表VgB15F、VgB15R，21F、21R分别代表VgB21F、

VgB21R，22F、22R分别代表VgB22F、VgB22R，24F、24R分别代表VgB24F、VgB24R，30F、30R分别代表VgB30F、VgB30R。

Fig. 2-1 The location of primer in comparison of severral sequnence

01F and 01R on behalf of VgB01F and VgB01R respectively, 08F and 08R on behalf of VgB08F and VgB08R respectively, 11F and 11R on behalf of VgB11F and VgB11R respectively, 12F and 12R on behalf of VgB12F and VgB12R respectively, 13F and 13R on behalf of VgB13F and VgB13R respectively, 14F and 14R on behalf of VgB14F and VgB14R respectively, 15F and 15R on behalf of VgB15F and VgB15R respectively, 21F and 21R on behalf of VgB21F and VgB21R respectively, 22F and 22R on behalf of VgB22F and VgB22R respectively, 24F and 24R on behalf of VgB24F and VgB24R respectively, 30F and 30R on behalf of VgB30F and VgB30R respectively.

### 2.3.2 RNA提取结果

RNA提取后经1%的琼脂糖凝胶电泳检测质量，由于未使用变性电泳，电泳槽和电泳仪都是正常情况下使用，没有经DEPC水专门处理，因此凝胶电泳时使用电压150V，持续时间9min就可以对RNA的质量进行检测。用于克隆的RNA提取结果如下图：



图2-2 用于基因克隆的RNA提取结果

其中数字1代表Maker2000，数字2-4是从褐牙鲆肝脏中提取的RNA，用于基因克隆。

Fig. 2-2 Result of extraction of total RNA for gene cloning

The number 1 is on behalf of Maker2000, number 2-4 are the result of extractied RNA from *Paralichthys olivaceus* liver for gene cloning.

### 2.3.3 核心序列克隆中的PCR结果

由于克隆的序列较长，故需要使用多对引物进行多次PCR反应，因此得到大量PCR的凝胶电泳图片，在此不一一列出，部分电泳图片如下：



图2-3 核心序列克隆中的PCR结果

数字1代表使用引物VgB11F、VgB11R得到的PCR结果，数字2代表使用引物VgB12F、VgB12R得到的PCR结果，数字3代表使用引物VgB13F、VgB13R得到的PCR结果，数字4代表使用引物VgB14F、VgB14R得到的PCR结果，数字5代表使用引物VgB15F、VgB15R得到的PCR结果，数字6和数字9都代表

Maker2000，数字7代表使用引物VgB21F、VgB21R得到的产物经胶回收之后的结果，数字8代表使用引物VgB22F、VgB22R得到的产物经胶回收之后的结果。

Fig. 2-3 The PCR result of cloning core sequnence.

Number 1 is on behalf of the PCR result by using primer VgB11F and VgB11R. Number 2 is on behalf of the PCR result by using primer VgB12F and VgB12R. Number 3 is on behalf of the PCR result by using primer VgB13F and VgB13R. Number 4 is on behalf of the PCR result by using primer VgB14F and VgB14R. Number 5 is on behalf of the PCR result by using primer VgB15F and VgB15R. Number 6and 9 are on behalf of Maker2000. Number 7 is on behalf of the result of extraction from gels to PCR production by using primer VgB21F and VgB21R. Number 8 is on behalf of the result of extraction from gels to PCR production by using primer VgB22F and VgB22R.

### 2.3.4 cDNA末端快速扩增反应引物设计及实验结果

根据已获得的cDNA部分核心序列，为5’-RACE和3’-RACE设计特异性引物，进行cDNA末端快速扩增反应。引物设计如下表：

表2-2 cDNA末端快速扩增反应引物设计

Table 2-2 Primer resign for RACE

| 引物名称 | 序列 |
| --- | --- |
| RACE-F1 | GTCCGTCGTATCATTCCCACCGCT |
| RACE-F2 | GTGGGTAAACAGCCTGCTTTCCGC |
| RACE-F3 | CGGAGTAGAAATCCCCATCAACAACC |
| RACE-R4 | CACTCCACGCATTTCTCGGTGTAAGCC |
| RACE-R5 | ACAGCGGTGGGAATGATACGACGGAC |
| RACE-R7 | GCAACCAGAGTGCCGTAGCCCAGC |

在cDNA末端快速扩增反应过程中，PCR的产物凝胶电泳部分放射自显影图像如下：



图2-4 cDNA末端快速扩增反应结果电泳图

数字1和5代表Maker2000，数字2代表使用引物RACE-F1得到的PCR电泳结果，数字3代表使用引物RACE-F2得到的PCR电泳结果，数字4代表使用引物RACE-F3得到的PCR电泳结果，数字6代表使用引物RACE-R4得到的PCR电泳结果，数字7代表使用引物RACE-R5得到的PCR电泳结果，数字8代表使用引物RACE-R7得到的PCR电泳结果。

Fig. 2-4 The result ofgel electrophoresis from RACE

Number 1 and 5 are on behalf of Marker2000. Number 2 is on behalf of the PCR reuslt by using primer RACE-F1. Number 3 is on behalf of the PCR reuslt by using primer RACE-F2. Number 4 is on behalf of the PCR reuslt by using primer RACE-F3. Number 6 is on behalf of the PCR reuslt by using primer RACE-F4.

Number 7 is on behalf of the PCR reuslt by using primer RACE-F5. Number 8 is on behalf of the PCR reuslt by using primer RACE-F7.

### 2.3.5 褐牙鲆卵黄蛋白原基因序列的特征及其编码的蛋白结构预测

通过RT-PCR与5’RACE、3’RACE的方法得到不同的序列片段，经过序列拼接得到卵黄蛋白原Vgb cDNA全长序列，cDNA序列全长5066bp，开放阅读框（ORF）5034bp，编码

1677个氨基酸，5’UTR长度14bp，3’UTR长度为118bp，在3’UTR中含有一个加尾信号

AATAAA；预测多肽链分子量为184.021Kda，等电点为9.45，含有6个跨膜肽段，第1-15个氨基酸为信号肽序列，信号肽切割位点在15个氨基酸G和16个氨基酸Y之间，在N端有一

vitellogenin保守区域，氨基酸序列中有三个N-糖基化位点，其中两个位点与其他物种间比较保守，有一多聚丝氨酸区域，有26个半胱氨酸保守位点。其中氨基酸组成如下图：



图2-5 氨基酸组成

Fig. 2-5 The composition of amino acid

1 GACATCCACCAGCC ATGAGGGTGCTCCTTCTAGCTCTTGCTGTGGCTCTTGCAGCCGGGT信号肽M R V L L L A L A V A L A A G

61 ATCAGGTCAGCCTGGCCCCAGAATTTGCTCTTGGAAAGACCTACGTGTACAAATATGAAG Y Q V S L A P E F A L G K T Y V Y K Y E

vitellogenin结构域

121 CAGTTCTTATGGGTGGCTTGCCAGAGGAAGGACTGGCAAGGGCCGGACTAAAAGTCCGGA A V L M G G L P E E G L A R A G L K V R

181 GCAAAGTTTTGATCCATGCTGCCGCTGCCGACATCTTCATGCTGAAGCTTGTAGACCCTG S K V L I H A A A A D I F M L K L V D P

241 AAATCTTTGAGTACAGTGGAATTTGGCCCAAAGATGCTTTCATCCCGGCCACCAAGCTCA E I F E Y S G I W P K D A F I P A T K L

301 CCTCAGCCCTGGCTGCTCAGCTCTTGACACCCATCAAGTTTGAGTATGCTAACGGTGTTG T S A L A A Q L L T P I K F E Y A N G V

361 TCGGCAAAGTGTTTGCCCCGGCTGGTATCTCTGCAACTGTGCTGAATATCCTGAGGGGAG V G K V F A P A G I S A T V L N I L R G

421 TCCTTAACATCTTACAGCTGAACATCAAGAAGACCCAGAACGTGTACGAGCTGCAGGAGC V L N I L Q L N I K K T Q N V Y E L Q E

481 CTGGTGCTCAGGGTGTGTGCAAGACCCACTACGTCATCAGTGAGGATGCAAAGGCTCAAC P G A Q G V C K T H Y V I S E D A K A Q

541 GCATTCTTCTCAGCAAGACCAAGGACCTGAACAATTGTCAGGAGAGAATCATTAAGGACA R I L L S K T K D L N N C Q E R I I K D

601 TTGGCCTGGCTTACACCGAGAAATGCGTGGAGTGTGAGGCTAGAGGAAAGACCCTGAAGG I G L A Y T E K C V E C E A R G K T L K

661 GAGCCGCTGCATTTAACTATGTCTTGAAGCCAGCAGCCACCGGTGCTCTGATCCTGGAGG G A A A F N Y V L K P A A T G A L I L E

721 CAACCACTACAGAGCTCATTCAGTTCTCTCCTTTCAACATCTTGAATGGTGCTGCCCAAA A T T T E L I Q F S P F N I L N G A A Q

781 TGGAAGCTAAGCAAGTCCTGAGCTTTGTGGAGATTGAGAAGATTCCAGTGGAGCCCATCA M E A K Q V L S F V E I E K I P V E P I

841 AAGCTGAATATCTTCACCGTGGATCCCTGCAGTACGAGTTTGGCAGCGAGCTTCTCCAGA K A E Y L H R G S L Q Y E F G S E L L Q

901 CACCCATCCAGCTTCTGAGGATCAGCAATGCCGAGGCTCAGATTGTTGAGACTCTGAACC T P I Q L L R I S N A E A Q I V E T L N

961 ACCTGGTGACCTACAATGTGGCCAAGGTCCATGAAGATGCCCCTCTGAAGTTTATTGAGC H L V T Y N V A K V H E D A P L K F I E

1021 TCATCCAGCTGTTGCGTGTGGCCAGATTTGAGAGTATTGAGGCTCTCTGGACTCGGTTCA L I Q L L R V A R F E S I E A L W T R F

1081 AAGCTAGACCCGATCACAGGCACTGGATGCTGAATGCCGTCCCCGCCATTGGAACTCACA K A R P D H R H W M L N A V P A I G T H

1141 CTGCTCTGAGGTTCATCAAGGAGAAGTTCCTGATTGGTGAGCTGACTATTGCTGAAGTTG T A L R F I K E K F L I G E L T I A E V

1201 CTCAAGCTCTGCTGGCATCTGTGCACATGGTGACAGCTGACCTGGAAGCCATCAAGCTTA A Q A L L A S V H M V T A D L E A I K L

1261 TTGAGGGCCTGGCTATGAACCGCCTCATCCAAGAAAACCCAGTCCTGCGCGAGATCGTCT I E G L A M N R L I Q E N P V L R E I V

1321 TGCTGGGCTACGGCACTCTGGTTGCCAAATACTGTGCACAGAATCCAATTTGCCCTGCTG L L G Y G T L V A K Y C A Q N P I C P A

1381 AGCTTGTGAGGCCCATTCATGAACTTGCTGTCGAGGCTCTTGCCAAAGGTAAAGTTGAGG E L V R P I H E L A V E A L A K G K V E

1441 AGCTTATCGTCCTTCTGAAAGTTCTGGGTAATGCTGGACATCCTGCCAGCCTTAAACCAA E L I V L L K V L G N A G H P A S L K P

1501 TTTTGAAGCTCCTGCCTGGCTTTGGAAGTGCTGCTACTAATCTGCCACTCAGAGTTCACA I L K L L P G F G S A A T N L P L R V H

1561 TTGATGCTGTTTTGGCTTTGAGGAACATTGCAAAGAAAGAGCCCAAGATGATCCAAGATA I D A V L A L R N I A K K E P K M I Q D

1621 TTGCCATTCAGCTGTTCATGAGCAAGGCTCTGCACCCAGAGCTCCGTATGGTTTCTGCTA I A I Q L F M S K A L H P E L R M V S A

1681 TTGTGCTGTTTGAGACAAAGCTGCCCATGGGTCTGGTGACCACTCTTGCTGATGCCCTCT I V L F E T K L P M G L V T T L A D A L

1741 TGAAAGAAAAAAACCTGCAAGTCGTTAGCTTTGTCTACTCTTACATGAAGGCCATGACCA L K E K N L Q V V S F V Y S Y M K A M T

1801 AGAACACTGCTCCCGACTTCGCTTCTGTTGCTGCGGCTTGCAATGTTGCTGTGAAGATCC K N T A P D F A S V A A A C N V A V K I

1861 TCAGCCCTAAATTCGACAGACTGAGCTATCGCTTCAGCAAAGCTCTCTATGTGGATGCCT L S P K F D R L S Y R F S K A L Y V D A

1921 ATCACAACCCCTGGATGATGGGTGCTGCCGCCTCTGCCTTCTATGTTAACGATGCTGCAA

Y H N P W M M G A A A S A F Y V N D A A 1981 CACTTCTGCCAAGAGCCATCGTGGCCAAAGCTCGCACCTACCTGGCTGGAGCATACGCTG

T L L P R A I V A K A R T Y L A G A Y A 2041 ATGTTCTTGAGGTTGGAGTGAGAGCTGAAGGAGTCCAGGAAGCCCTTCTGAAAATCAAGG

D V L E V G V R A E G V Q E A L L K I K 2101 AGGCTCCTGAAAATGCTGACAGAATCACCAAGATGAAACAAGTTATAAAGGCTCTTTCTG

E A P E N A D R I T K M K Q V I K A L S 2161 ATTGGAGGGCTCATCCTTCCAGCCAGCCCCTGGGCTCTCTGTATGTGAAATTCTTTGGAC

D W R A H P S S Q P L G S L Y V K F F G 2221 AGGAAATTGCATTTGCCAACATCGACAAAGCTATTGTTGATCAGATCATTGAGCTGGCCA

Q E I A F A N I D K A I V D Q I I E L A 2281 CTGGACCTGCACTTCACAGTTATGGCAGGAAGGCTTTGGATACCCTGCTGTCCGGCATTG

T G P A L H S Y G R K A L D T L L S G I 2341 CTCTGCATTATGCTAAACCAATGCTGGTTGCAGAGGTCCGTCGTATCATTCCCACCGCTG

A L H Y A K P M L V A E V R R I I P T A 2401 TTGGTCTGCCAATGGAGCTGAGTTTCTACACAGCTGCTGTGGCTGCTGCATCTGTTGAGT

V G L P M E L S F Y T A A V A A A S V E 2461 TCCAAGCTACTGTGACACCACCTCTGCCTGCGAACTTCCATCCTGCTCAGCTTCTGAAGT

F Q A T V T P P L P A N F H P A Q L L K 2521 CTGACGTCAACATGAGGGCTGCAATTGCTCCAAGTGTTTCCATGCACACCTATGCAGTTA

S D V N M R A A I A P S V S M H T Y A V 2581 TGGGTGTGAATACTGCTCTTATCCAAGCCACCCTGGTGTCAAGAGCCAGAGTTCACACAA

M G V N T A L I Q A T L V S R A R V H T 2641 TTGTTCCTGCAAAGATTGAGGCAAGAATTGACATGATCAAGGGCAACTTCAAGCTTCAGT

I V P A K I E A R I D M I K G N F K L Q 2701 TGCTGCCTGTCCAGGGCATCGATAAGATCGCATCTGCAATTGTTGAGACTTATGCTGTTG

L L P V Q G I D K I A S A I V E T Y A V 2761 CAAGAAATGTGGAAGACCTCACAGCTGCCAAGATCACACCAATGATTCCTGCTCAAGCCA

A R N V E D L T A A K I T P M I P A Q A 2821 CACTACAGATGTCAAGGGAGGCCTCTTCAAGGATGTCATCCTCAATGGCTGATGACGTTT

T L Q M S R E A S S R M S S S M A D D V 2881 CAGTATCATCTGAACTCATTTCTCAACTGCCAAGAAAGATTGTCAACAAACTGAAATTCC

S V S S E L I S Q L P R K I V N K L K F 2941 CCAAGGGCTTTGACAAGAAAATGTGTGCTGCATTTGAAACCTTTGGAATAAAGGCTTGCA

P K G F D K K M C A A F E T F G I K A C 3001 CTGAGATTGAATCCCGTAATGCTGCCTTCATCAAGGACTGTCCACTCTATGCCATCATTG

T E I E S R N A A F I K D C P L Y A I I 3061 GAAAACATGCTGTCTTGGTTGAGGTTGCTCCAGCTGCTGGACCAGTCATCGAGAAGATTG

G K H A V L V E V A P A A G P V I E K I 3121 AAATCGAGATTCAGCTTGGAGACAAAGCGGCAGAAAAGATCATCAAAGTGATTAATCTGA

E I E I Q L G D K A A E K I I K V I N L 3181 GCGAGGAAGAGGAGATTCTAGAGGACAAAAACATCCTGATGAAGCTCAGGAAAATCTTGG

S E E E E I L E D K N I L M K L R K I L 3241 TTCCTGGTCTGAAGAACAGCTCAGCTTCCTCCAGCTCCAGCAGCTCTCGTTCAAGCTCCT

V P G L K N S S A S S S S S S S R S S S

多聚丝氨酸区域

3301 CCTCGTCTGTATCATCCCAGTCTTCCTCCAGTTCCTCCTCTCGCCGTGCAAGCAAAATGG S S S V S S Q S S S S S S S R R A S K M

3361 TCAACATTGATGCCCCAAAGAAATCAAAGAGACTGACCAGCCGCTCCAGCAGCTCCTCCA V N I D A P K K S K R L T S R S S S S S

3421 GCGAGCGTTCAAGCAGCTCCTCCAGCTCCTCTTCAAGCAGCCGTTCATCTGCCCAGTCCA S E R S S S S S S S S S S S R S S A Q S

3481 GCAGCAAGTCCATGTCCAAGCAAAAGCTGCATGACATGAAGTTTACCAAGAACCACATCC S S K S M S K Q K L H D M K F T K N H I

3541 ACCAGCATGCCGTCTCCACAGCTCGTGCAAACAGCAAGAGCAGTGCCTACAGCTTAGAAG H Q H A V S T A R A N S K S S A Y S L E

3601 CTATTTACAATAAGGCAAAGTACCTGGCTAACACTGTTGCTCCTGCTGTGACTGTTCTCA A I Y N K A K Y L A N T V A P A V T V L

3661 TCCGTGCCGTGAGAGCCGACCACAAGGTTCAGGGATACCAGATTGCTGCCTACTTTGACA I R A V R A D H K V Q G Y Q I A A Y F D

3721 AAGCCACTGCCAGACTGCAGGTTATCTTTGCCAACCTGGCTGAGAATGACCACTTCAGAA K A T A R L Q V I F A N L A E N D H F R

3781 TCTGTGCTGATGGTGTGATGCTAAGCAGCCACAAGCTGATGGCCAAGATCGCTTGGGGCA I C A D G V M L S S H K L M A K I A W G

3841 CTGAATGCAAGCAGTACGAGACTGAGATCACAGCTGAAACTGGTCTTGTGGGTAAACAGC T E C K Q Y E T E I T A E T G L V G K Q

3901 CTGCTTTCCGCCTGAAGCTGACCTGGGAAAAACTTCCAAAGAACATGCAGCGCTATGCAA P A F R L K L T W E K L P K N M Q R Y A

3961 AGGACCTCTCTGAGTACATTGCCCGTATTGCTCGCGAAGCCGGAGTCAGCCTGGCAAAGG K D L S E Y I A R I A R E A G V S L A K

4021 TCAAGAATGTTCGTAACCAGCTCAGACTGACTGTGGCTGTTGCATCTGAAACCAGTCTGA V K N V R N Q L R L T V A V A S E T S L

4081 ATGTTATTCTGAAGACACCAAAGAAGACAATTTACAAGCTTGGAGTGGGTATCCCCGTTT N V I L K T P K K T I Y K L G V G I P V

4141 CTCTGCCAATGGGGGAAACTGCAGTTGAGTTGGAACCATACCAGGATAACTGGACTGATA S L P M G E T A V E L E P Y Q D N W T D

4201 AGATCATCTACATGCTCACCAAGGCTCATTCGGCTGAGTGCACCATGACCAAGGACACAG K I I Y M L T K A H S A E C T M T K D T

4261 TGATCACATTTAACAACAGGAAATACAAGAACGAGATGCCTCACTCTTGTTACCAGGTCT V I T F N N R K Y K N E M P H S C Y Q V

4321 TGGCTCAGGATTGCACCCCAGAACTCAAATTCATAGTTCTGCTGAAGAGGGACCAAAATC L A Q D C T P E L K F I V L L K R D Q N

4381 AGGAACAAAACCAGATCAATGTGAAGATTGCAAACATTGATGTTGACATGTATCCAAAGG Q E Q N Q I N V K I A N I D V D M Y P K

4441 ACGACGCCATTGTGGTGAAGGTTAACGGAGTAGAAATCCCCATCAACAACCTGCCTTATC D D A I V V K V N G V E I P I N N L P Y

4501 AGCATCCCGAAGGCACTATTCAGATCAGGCAGAAAGAAGAGGGTATCGCTCTCCATGCTC Q H P E G T I Q I R Q K E E G I A L H A

4561 CCAACCATGGTCTTCAGGAGGTCTTCCTCAATGTGAACTCACTGAAGGTCAAAGTTGTGG P N H G L Q E V F L N V N S L K V K V V

4621 ACTGGATGAGAGGCCAGACTTGTGGACTCTGTGGAAAGGCTGACGGGGAAATCAGACAAG D W M R G Q T C G L C G K A D G E I R Q

4681 AGTACCGCACACCCAATGAGCGCATGTCAAAGAATGCAGCCAGTTATGCTCATTCCTGGG E Y R T P N E R M S K N A A S Y A H S W

4741 TTCTGCCTGGAAAGAGCTGCCGTGATGCCTCTGAGTGCTACATGAAGCTTGCATCTGTGA V L P G K S C R D A S E C Y M K L A S V

4801 AGCTGGAGAAGCAGATGATCCTGCACGGTGAGGAGTCCAAGTGCTACTCTGTGGAGCCTG K L E K Q M I L H G E E S K C Y S V E P

4861 TGCTGCGCTGTCTGCCTGGCTGTATGCCAGTGAGAACCACCACTGTCACTGTTGGCTTCC V L R C L P G C M P V R T T T V T V G F

4921 ACTGCCTGCCTGCTGATTCTAACATGAACACCCCTGAGAGTCTGAGAAGTATCTACCAGA H C L P A D S N M N T P E S L R S I Y Q

4981 AGAGCACTGACATACAGGAAGAGGCAGAGGCTCACCTGGCCTGTCGTTGCAACGCTCAAT K S T D I Q E E A E A H L A C R C N A Q

5041 GCGTTTAATCCAAACACCTTCAGGAACAAAATGTGTTTTTTTCTGTTTTCTGCAAGTATT

C V \*

5101 ATCGGACTGTATCATAAATAAATGGCAAACGAACCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

多聚腺苷酸信号序列

5161 AAAAAA

图2-6 褐牙鲆卵黄蛋白原Vgb基因的cDNA核苷酸序列和推测的氨基酸序列

ATG和TAA分别代表起始密码子和终止密码子，信号肽序列用黄色标出，多聚腺苷酸信号序列用灰色标出，保守结构域Vitellogenin N用紫色标出，多聚丝氨酸区域用蓝色标出，红色部分代表3个推测的N-糖基化位点，绿色部分标出的是C末端的16个半胱氨酸残基。

Fig. 2-6 The sequnence of Vg gene and the predicted amino acid sequnence of*paralichthys olicaceus*

ATG and TAA are on behalf of initiation codon and termination codon respectively. A predicted signal peptide is shown in yellow shaded box. Polyadenylation signals is shown in grey shaded box. The region of Vitellogenin N is shown in purple shaded box. The serine-rich region is shown in blue shaded box. Putative N-glycosylation sites are shown in red shaded box. The sixteen cysteine residues of the C-terminal region are shown in green shaded box.

### 2.3.6 卵黄蛋白原氨基酸序列分析及进化树同源性分析

在NCBI数据库中使用在线BLAST工具进行protein blast，搜索卵黄蛋白原Vgb同原序列，并利用MEGA6.0软件中的Neighbor-joining法构建系统进化树，结果显示褐牙鲆卵黄蛋

白原属于VgB一族，与鲽形目鱼类的同源性较高，与条斑星鲽（*Verasper moser*）和大西洋庸鲽（*Hippoglossus*）的同源性均为89%；与鲈形目鱼类的条纹鲈的同源性为82%，与美洲狼鲈（*Morone americana*）的同源性为81%，与真鲷(*Pagrus major*)的同源性为80%，与小口棘隆头鱼(*Centrolabrus exoletus*)的同源性为75%；与鳉形目中的艾氏异仔鳉（*Xenotoca*

*eiseni*）的同源性为65%，与食蚊鱼（*Gambusia affinis*）的同源性为63%；与鳕形目中的黑线鳕（*Melanogrammus aeglefinus*）的同源性为64%；与鲻形目中的鲻鱼（*Mugil cephalus*）的同源性为59%；与鲑形目中的红点鲑（*Salvelinus leucomaenis*）的同源性为59%；与鲤形目中的锦鲤（*Cryprinus carpiod*）的同源性为56%。

褐牙鲆卵黄蛋白原Vgb在与其他类似序列进行多重比较时发现，卵黄蛋白原VgB具有

26个保守的半胱氨酸残基和2个N-糖基化位点。









图2-7 保守半胱氨酸位点与保守的糖基化位点

注：VgPo指的是褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) VgB，VgVm指的是条斑星鲽(*Verasper moser*) VgB，VgHh指的是大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*) VgAb，VgDl指的是欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*) VgAb，第一个VgMs指的是条纹石鮨

（*Morone saxatilis*）VgAb，VgMa指的是美洲狼鲈（*Morone americana*）VgB，VgPm指的是真鲷(*Pagrus major*) VgB, VgCe指的是小口棘隆头鱼(*Centrolabrus exoletus*) VgAb1，VgLm指的是布谷鸟隆头鱼（*Labrus mixtus*）Ab2，VgXe指的是艾氏异仔鳉（*Xenotoca eiseni*）VgB，VgGa指的是食蚊鱼（*Gambusia affinis*）VgB，VgMa指的是黑线鳕（*Melanogrammus aeglefinus*）VgB，第二个VgMs指的是条纹石鮨（*Morone saxatilis*）VgAa，VgAMa指的是美洲狼鲈（*Morone americana*）

VgA，VgTt指的是金枪鱼(*Thunnus thynnus*) VgB。绿色部分代表同源性较差区域，红色的矩形框代表26个保守的半胱氨酸残基，蓝色的矩形框代表两个推测的保守N-糖基化位点。

Fig. 2-7 The putative N-glycosylation sites and sites of cysteine residues

NOTE: VgPo means VgB of *Paralichthys olivaceus*. VgVm means VgB of *Verasper moser*. VgHh means VgB of

*Hippoglossus hippoglossus*. VgDl means VgAb of *Dicentrarchus labrax*. The first VgMs means VgAb of *Morone saxatilis*. VgMa means VgB of *Morone americana*. VgPm means VgB of *Pagrus major*. VgCe means VgAb1 of *Centrolabrus exoletus*. VgLm means VgAb2 of *Labrus mixtus*. VgXe means VgB of *Xenotoca eiseni*. VgGa means VgB of *Gambusia affinis*. VgMa means VgB of *Melanogrammus aeglefinus*. The second VgMs means VgAa of *Morone saxatilis*. VgAMa means VgA of *Morone americana*. VgTt means VgB of *Thunnus thynnus*). The green part mean low similarity among each other. Twenty-six cysteine

Residues are marked using red rectangle boxes. Two putative N-glycosylation sites are makered with blue rectangle boxes.



图2-8 基于Vg氨基酸序列构建的系统进化树

克隆序列用方框标出，显示在进化树中的位置。

注：*Morone americana*代表美洲狼鲈，*Thunnus thynnus*代表金枪鱼，*Mugil cephalus*代表鲻鱼，*Verasper moseri*代表条斑星鲽，*Labrus mixtus*代表布谷鸟隆头鱼，*Gadus chalcogrammus*代表黑线鳕，*Xiphophorus hellerii*代表剑尾鱼，*Gambusia affinis*代表食蚊鱼，*Pagrus major*代表真鲷，*Xenopus laevis*代表非洲爪蟾，*Gallus gallus*代表原鸡，*Chelonia mydas*代表绿海龟。

Fig. 2-8 Phylogenetic tree based on Vg amino acid sequnences

The cloned sequnence is makered with rectangle, showing its location in polygenetic tree.

## 2.4 讨论

通过RT-PCR的方法和cDNA末端快速扩增的方法得到部分核心序列的片段和3’端、5’端部分序列片段，使用clc-sequenceviewer软件进行拼接，从而得到褐牙鲆卵黄蛋白原cDNA全序列，根据所得到的cDNA序列对其氨基酸序列进行预测，根据氨基酸序列对其特殊结构进行预测和分析。结果发现有一Vitellogenin结构域、一多聚丝氨酸结构域、三个糖基化位点、和26个半胱氨酸残基。Vitellogenin结构域位于N端区域，该区域相对保守，在许多物种卵黄蛋白原中都存在，并且同源性很高，是卵黄蛋白原N端的稳定结构，作为LvH的一部分，由约600个氨基酸组成，可以形成一定的螺旋结构域和折叠结构域[100]。多聚丝氨酸区域，由多个丝氨酸聚集形成，位于卵黄高磷蛋白区域，在大部分脊椎动物中处于LvⅠ和LvⅡ之间，多聚丝氨酸结构域在不同的鱼类中发现，如剑尾鱼[101]、日本鳗鱼[102]等，丝氨酸的位置的大小在不同的物种之间存在差异性[103]，该区域主要与卵黄蛋白原的磷酸化有关，可能是酪氨酸蛋白激酶Ⅱ的磷酸化位点[104, 105]，Wahli W.（1988）在对昆虫研究时发现，该结构域很可能与其被卵母细胞吸收时的跨膜运输有关，可能参与了受体介导的内吞作用[93]，Nardelli D等（1987）[106]发现，在脊椎动物中，该区域可能具有磷酸和离子载体的功能，并参与骨的形成。

Hiramatsu等（2003）[107]暂时提出一种分类方法，将卵黄蛋白原分为三个类型，VgA、

VgB、和VgC，其中VgA和VgB是主要的形式，VgC缺少卵黄蛋白高磷区域。三种不同类型的卵黄蛋白原可在食蚊鱼、真鲷、鲻鱼、条纹石鮨等鱼类中检测到[107, 108]。本实验中对所得到的氨基酸序列进行同源性分析和进化树分析时发现，其属于VgB的一种，与VgA和

VgC不在一个进化树分支上，对比与VgC的距离，与VgA相对较近。在同族的比较中，所得到的褐牙鲆Vg氨基酸序列在鱼类中进化关系较近，其中与鲽形目和鲈形目关系较近，与鳕形目和鳉形目关系较远。在与其他物种的比较分析中可以发现，两栖类、爬行类、鸟类距离之间相对较近，但与所得的鱼类的卵黄蛋白原进化关系很远，在进化树上处于VgA和VgC之间。由于卵黄蛋白原作为卵生脊椎动物卵黄蛋白的前体分布较广，在不同物种之间不仅有特殊的保守位点，又存在明显的差别和特异性，因此可以作为一种特殊的分子标记，用于系统进化的研究[109]。

另外研究还发现，外源性雌激素可以诱导鱼类肝脏中卵黄蛋白原mRNA的表达，因此可以通过对卵黄蛋白原mRNA表达量的检测，来反应环境雌激素的含量。Pelissero等（1993）使用几种化学类的雌激素对虹鳟鱼进行体外诱导实验，并通过检测卵黄蛋白原的表达完成对雌激素的检测。酚类污染物可以影响肝细胞ER和卵黄蛋白原的异常表达，BPA可诱导肝细胞中ER合成，呈剂量-依赖效应，ER的合成过程中同时伴随着卵黄蛋白原的生成[85]。本实验中对褐牙鲆卵黄蛋白原cDNA完成了全测列测定，可以根据其设计特异性引物，通过Real-Time PCR的方法对其肝脏mRNA表达水平进行检测，为其作为生物标志物建立良好的基础。

# 第三章 卵黄蛋白原的诱导及其表达分析

环境中的内分泌干扰物是环境中存在的能干扰生物体内分泌系统并导致异常效应的物质，能够通过影响生物体内激素的合成、分泌、转运及代谢等环节，干扰生物体正常的内分泌功能，其对生态环境和人类健康造成的巨大威胁引起了国际社会的普遍关注。外源性激素可以可以干扰人类[110]和野生动物[111, 112]的生长和发育，对这种外源性激素的敏感性可以发生在很多水平上，包括激素生物合成、运输、新陈代谢等[112, 113]，异质类化学物质可能是竞争性的或者是抗性的与激素受体结合，导致基因表达的改变[114]。外源性的化学物质与可溶性的受体反应，如雌性激素受体、雄性激素受体、甲状腺激素受体等[115]。化学物质与雌激素受体反应最大的特征是它们具有可以结合雌激素受体并刺激转录的能力[116, 117]，转录激活作用可发生在很多不同的重组受体系统，如人类、老鼠、鱼类的重组雌激素受体[114]。

卵黄蛋白原在卵生脊椎动物中的表达，特别的雄性动物中的表达，可以作为一种对雌激素反应混合物的优越的生物标志物。卵黄蛋白原通过雌激素应激产生，是卵黄的前体蛋白，在鱼类中，正常状态下产生在成熟雌性动物的肝脏中，雄性鱼类在外生的雌激素的作用下也能产生这种应激蛋白[118]。一般认为，雄性鱼类正常状态下不会产生卵黄蛋白原，但在鱼类血液中可以发现非常低水平卵黄蛋白原的存在，从虹鳟鱼的40ng/ml到鲤鱼的

550ng/ml[119]，雄性鱼类在自然雌激素或者人工雌激素的暴露下，可以导致高水平的血液卵黄蛋白原含量，因此使用单克隆抗体对雄鱼血液中的卵黄蛋白原含量进行检测是一种对环境刺激素良好的检测方法[120]。除了检测卵黄蛋白原的蛋白水平外，还可以在分子水平上检测肝脏中卵黄蛋白原mRNA的表达[120-123]，检测反映出环境外源雌激素的含量。

Bowman(2000)[124]通过检测E2诱导的杂色将鳉（*Cyprinodontidae*）肝脏中卵黄蛋白原

mRNA的方法，来反映诱导物含量与卵黄蛋白原mRNA表达的关系。

本研究中使用不同浓度的外源性内分泌干扰物E2和塑化剂（DIOP）对褐牙鲆幼体进行诱导处理，通过RT-PCR的方法对肝脏中卵黄蛋白原mRNA的表达量进行相对定量分析，以此来反应外源污染物的含量，为海水雌激素的检测和预警提供一种新的方法。

## 3.1 材料与方法

### 3.1.1 实验材料

#### 3.1.1.1 实验动物

实验动物褐牙鲆购自烟台天源水产有限公司，体长4±0.5cm，体重1.2±0.3g。暂养于

25L方形水槽中，水温19oC, pH值8.0，每日换水一次，投饵两次。

#### 3.1.1.2 主要试剂

实验诱导剂：17β-雌二醇(E2)、邻苯二甲酸二异辛酯(DIOP)。实验助溶剂：丙二醇(Propylene Glycol)

提取RNA所用耗材：无水乙醇、异丙醇、氯仿为国药分析纯试剂，细胞破碎液

（TAKARA），一次性研磨棒，Rnase水，1.5mlEP管、枪头均为RNase-free制品（AXYGEN）。琼脂糖凝胶电泳：琼脂糖、TAE缓冲液、核酸染料

反转录试剂：TAKARA实时荧光定量用试剂盒

Real-Time PCR试剂：SYBR®Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) TAKARA

### 3.1.2 实验方法

#### 3.1.2.1 诱导方法

主要采用水体中添加试剂的方法实施干扰物对褐牙鲆的诱导实验。实验分为E2组、

DIOP组和对照组，每个处理都分成3个平行。E2组和DIOP组分别设有3个实验浓度，为0.1μmol/L、1μmol/L和1μmol/L。因为室温下E2和DIOP的水溶性较低，所以先将E2和DIOP溶解于丙二醇中再倒入养殖水体中。对照组分为空白对照和原始对照，空白对照组水体中加入等剂量的助溶剂丙二醇，而原始对照组中则不添加任何试剂。

#### 3.1.2.2 取样与样品处理

在实验进行1h、3h、6h、12h、24h(D1)、D2、D3、D5、D7、D14、D21、D28、D35

后对每个处理组进行解剖并将肝脏组织进行取样，加入RNA保存液-80℃保存。

#### 3.1.2.3 实时荧光定量PCR与基因表达分析

1）设计特异性引物

根据已得到的卵黄蛋白原Vgb全长cDNA序列设计引物进行实时荧光定量PCR反应，设计原则包括引物长度17～25bp；扩增序列长度90～150个碱基；GC含量40～60%；Tm值58℃～60℃，Forward Primer和Reverse Primer的Tm值不能相差大于2℃；引物序列A、G、

C、T整体分布尽量均匀，不要有部分的GC rich或AT rich（特别是3′端），避免T/C或A/G的连续结构。使用BLAST检索确认引物的特异性并选择特异性高的序列作为引物；另外将所得到的卵黄蛋白原Vgb全长cDNA序列与斑马鱼Vg序列进行比较，然后将斑马鱼Vgb序列与

斑马鱼染色体Genomic基因进行比较，所得到的的结果用来推测卵黄蛋白原Vgb序列中跨内含子的位置，设计的引物序列最好在跨越内含子的位置。根据以上原则，使用Express

primer3.0设计引物Real-time F5'GCCCAGTCCAGCAGCAAGTC3'和Real-time R

5'GCTGTAGGCACTGCTCTTGCT3'（见表3-1）。

根据褐牙鲆18sRNA的序列，在设计基本原则的基础上设计内参的引物HCPF 5' GCATTCGTATTGTGCCGCT 3'和HCPR 5' ACCTCCGACTTTCGTTCTTGAT 3'. （见表3-1）

2）总RNA的提取

见2.2.1.1.

3）cDNA的合成

cDNA的合成使用TAKARA公司的试剂盒PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)，操作步骤如下：

##### （1）去除基因组DNA反应

在冰上配制去除基因组DNA反应混合液，一般的在配制混合液时，都会选择比目的反应数多出1到2个的量配制Master Mix，混匀后再进行分装，最后在分装好的反应管中加入

RNA样品。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| 5×gDNA Eraser Buffer gDNA Erase  Total RNA  RNase Free dH2O | 2.0Ul 1.0ul  <1ug  Up to 10ul |

在PCR仪上，42℃反应2min，4℃保存待用。

##### （2）反转录反应

反应液配制应该全程保持在在冰上进行，进行各项反应时，一般的会配制比目的反应数多一个Master Mix的量，然后再进行分装，将其转入不同的反应管中，这样可以保证反应溶液配制的准确性，稍稍混合后后立即进行反转录反应。反应混合液的配制（20ul体系）按如下成分进行：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |

|  |  |
| --- | --- |
| 步骤1的反应液  PrimeScript RT Enzyme Mix I RT Primer Mix 5×PrimeScript Buffer2  RNase Free dH2O | 10.0Ul 1.0ul 1.0ul 4.0ul  4.0ul |
| Total | 20ul |

在PCR仪上，37℃反应15min，85℃反应5s，反应结束后放入-20℃保存。

4）实时荧光定量PCR反应

##### （1）PCR反应液的配制

实时荧光定量PCR反应采用TAKARA试剂盒SYBR®Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)，反应混合液配制在冰上进行，反应液组分如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
| SYBR® Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)（2×）  PCR Forward Primer(10 uM) PCR Reverse Primer(10 uM)  DNA模板（<100 ng）  dH2O（灭菌蒸馏水） | 10.0Ul 0.8ul 0.8ul 2.0ul 6.4ul | 1×  0.4Um  0.4uM |
| Total | 20.0ul |  |

##### （2）Real-Time PCR反应

Real-Time PCR反应在Ependorf，反应采用两步法进行，反应条件，反应条件如下：



## 3.2 实验结果

### 3.2.1 引物设计结果

根据已获得的褐牙鲆cDNA全序列设计得到的用于实时荧光定量PCR的特异性引物，与根据褐牙鲆18sRNA设计的内参引物如下：

表3-1 实时荧光定量PCR引物设计

Table 3-1 Primer resign for RT-PCR

| 引物名称 | 序列序列 |
| --- | --- |
| Real-time F | GCCCAGTCCAGCAGCAAGTC |
| Real-time R | GCTGTAGGCACTGCTCTTGCT |
| 18s-F | GCATTCGTATTGTGCCGCT |
| 18s-R | ACCTCCGACTTTCGTTCTTGAT |

### 3.2.2 RNA的提取结果



图3-1 RNA提取结果（部分）

矩形框圈起的部分为不同处理组肝脏组织的RNA提取结果。

Fig. 3-1 Result of RNA extracction(part of result)

The part of in rectangle shows result of RNA extracction from different treatment Group's livers.

### 3.2.3 Real-Time PCR结果

#### 3.2.3.1 标准曲线的制作



图3-2 使用RT-PCR引物获得的标准曲线和溶解曲线

Y(CT) =-3.394x(模板浓度) +30.55，效率值0.97，R2=0.999

Fig. 3-2 standard curve and melting curve using primer for RT-PCR Y(CT) =-3.394x(amount copies) +30.55，Effciency 0.97，R2=0.999





图3-3 使用内参引物得到的标准曲线和溶解曲线

Y(CT) =-3.350x(模板浓度) +25.02，效率值0.99，R2=0.999

Fig. 3-3 standard curve and melting curve using primer for housekeeping gene Y(CT) =-3.350x(amount copies) +30.55，Effciency 0.97，R2=0.999

#### 3.2.3.2 RT-PCR结果

以E2组第1天的表达量作为1，使用ORIGEN8.0对相对表达量进行作图，结果显示，在原始对照组和空白对照组中，卵黄蛋白原基因Vgb不表达，对比原始对照组和空白对照组，在E2组中，不同浓度的诱导下导致了卵黄蛋白原基因Vgb不同程度的表达，在1小时到35天的过程中，不同浓度的诱导组在第三天时都达到了最大值，其中1μmol/L和0.1μmol/L组均发现了相对表达量先上升后下降的趋势，10μmol/L组由于在第三天时全部死亡，所以未能呈现出下降的趋势（3-4, 3-5, 3-6）另外，还可以发现在三个浓度组中，相对表达量在12h和在3d时都出现大幅度上升的现象。使用SPSS18.0软件进行显著性检验分析，结果显示，

0.1μmol/L浓度组第12h，第1d、2d、7d，14d、21d、27d、35d与1μmol/L浓度组中第12h、

1d、2d、14d，10μmol/L浓度组中的12h、1d、2d差异不显著；0.1μmol/L浓度组中的3h、6h与1μmol/L浓度组中的3h、6h，10μmol/L浓度组中的1h、3h、6h差异不显著；0.1μmol/L浓度组中的3d与1μmol/L浓度组中的3d差异不显著；1μmol/L浓度组中的3d与10μmol/L浓度组中的3d差异不显著；其余各处理组之间相对表达量差异显著（P<0.05）。

在2个塑化剂组中，对比原始对照组和空白对照组，不同浓度的诱导下也导致了卵黄蛋白原基因Vgb 不同程度的表达，在1小时到35天的诱导过程中，0.1μmol/L浓度组、1μmol/L浓度组10μmol/L浓度组的相对表达量在3d时都达到了最大值，并且都出现了先上升后下降的趋势；在第2d和第3d时，三个浓度组的相对表达量都出现了大幅度上升的现象（如图3-8, 3-9, 3-10）。使用SPSS18.0软件进行显著性检验分析，其中相对表达量低于0.005的各组，如0.1μmol/L浓度组中的第1h、3h、6h、1d、14d、21d、28d、35d，1μmol/L浓度组的10μmol/L浓度组中的1h、3h、6h、1d、5W，1h、3h、6h、1d、21d、28d、35d，相对表达量与空白对照组、原始对照组相差无几，可视为不表达，故未进行显著性差异；另外，0.1μmol/L浓度组中的2d、5d与1μmol/L浓度组中的5d、10μmol/L浓度组中的5d差异不显著；1μmol/L浓度组中的2d与10μmol/L浓度组中的2d差异不显著；其余各处理组之间的相对表达量差异显著（P<0.05）。

## 3.3 讨论

卵黄蛋白原广泛存在于卵生雌性成熟脊椎动物血液中，在外源雌激素的干扰下，雄性和未成熟的雌性个体也可以产生卵黄蛋白原。鱼体在17-β雌二醇的刺激下会诱导卵黄蛋白原在肝细胞中的合成，进而导致卵黄蛋白原在血液中的积累[8]，大量的体外实验表明17-β雌二醇是体外培养肝细胞卵黄蛋白原合成的重要诱导剂[10-13]，Flouriot 等（1993）[9]对虹鳟鱼卵黄蛋白原的研究时发现，肝细胞在E2的诱导下，可导致卵黄蛋白原mRNA的表达。由于这一特点，卵黄蛋白原被广泛用来反应水环境中雌激素污染物的含量，卵黄蛋白原在很多鱼类中都有相关研究，并确定这些鱼类的卵黄蛋白原可以相关生物标志物的一种[90,

125]. 本实验中使用的诱导剂E2和EIOP对褐牙鲆肝脏的卵黄蛋白原都起到了诱导作用，导

致其肝脏卵黄蛋白原mRNA的表达，其中E2的诱导作用较强，导致在同一浓度同一时间组的比较中，mRNA的表达量明显高于塑化剂组，也间接说明了塑化剂存在类雌激素的效应，只是没有达到E2的诱导水平。在E2处理组的3个不同浓度组中，基本都呈现出表达量先上升后下降的趋势，不同浓度组都在3d时达到了最大值，并且远远高于2d的表达量，另外尽管在第12h时，三个浓度组都出现了明显的上升，但是相对表达量较低；在塑化剂处理组中出现类似的现象，3个不同浓度组中，基本都呈现出表达量先上升后下降的趋势，不同浓度组都在第三天时达到了最大值，不同的是，3d对比2d尽管有明显的上升，但是并没有像E2中那样显著的跃迁。

由于褐牙鲆卵黄蛋白原mRNA在外源雌激素或者雌激素的类似物的诱导下可以明显检测到表达量的升高，反应灵敏度高，检测结果准确性也比较好，并且在某一个固定的时间达到表达量的最大值，因此褐牙鲆卵黄蛋白原可以作为一种良好的生物标志物，由于幼体褐牙鲆在正常情况下肝脏的卵黄蛋白原mRNA的表达量极低甚至没有，因此可以幼体将褐牙鲆放入海水中一段时间后（如三天），对其肝脏中的卵黄蛋白原mRNA水平进行检测，就可以反映出海水中雌激素或者类雌激素的污染程度，以此来建立Real-Time PCR的检测方法，为海水雌激素的监测和预警提供新的手段。

第三章卵黄蛋白原的诱导及其表达分析



图3-4 0.1umol/lE2处理组 图3-5 1umol/l E2处理组 图3-6 10umol/l E2处理组 图3-7对照组

Fig. 3-4 E2 of 0.1umol/l treatment group

Fig. 3-5 E2 of 1umol/l treatment group

Fig. 3-6 E2 of 10umol/l treatment group

Fig. 3-7 Control group



图3-8 0.1umol/l塑化剂处理组 图3-9 1umol/lE2处理组 图3-10 10umol/lE2处理组 图3-11对照组

Fig. 3-8 DIOP of 0.1umol/l teatment group

Fig. 3-9 DIOP of 1umol/l teatment group

Fig. 3-10 DIOP of 10umol/l teatment group

Fig. 3-11 Control group

47

# 第四章 雌二醇（E2）与塑化剂（DIOP）对褐牙鲆幼鱼组织损伤

环境中的内分泌干扰物是环境中存在的能干扰生物体内分泌系统并导致异常效应的物质，能够通过影响生物体内激素的合成、分泌、转运及代谢等环节，干扰生物体正常的内分泌功能，并引起多种毒性效应[1, 126, 127]，其对生态环境和人类健康造成的巨大威胁引起了国际社会的普遍关注[128-131]。内分泌干扰物主要包括多氯化的化合物、有机氯农药、烷基酚、性激素及塑化剂等，其中塑化剂是一种增加材料柔软性或是材料液化的添加剂，种类繁多，主要为邻苯二甲酸酯类的化合物。2011年中国台湾地区爆发塑化剂污染食品事件，随后又陆续在香港和内陆的方便面、保健食品甚至药品中检出塑化剂，对人类健康造成了巨大的威胁。研究表明，塑化剂在人体和动物体内发挥着类似雌激素的作用，可扰乱内分泌系统，造成生殖和发育障碍，并能诱发动物肝组织病变[132]；人类食入后会干扰雄性激素的分泌，产生免疫力和生殖力下降等危害[133]。邻苯二甲酸二异辛酯(DIOP)，主要作为纤维素树脂及合成橡胶的主增塑剂，也可用于制造薄膜、片材、挤塑片和增塑糊。DIOP目前不属于国家管制试剂，广泛存在于主流烟气中，有刺激性，具有潜在致癌作用，对环境特别是水环境存在较大潜在危害[134]。17β-雌二醇是生物体内代表性雌激素，主要起到刺激性器官生长和第二性特征的发育以及调节促性腺激素分泌的作用[10, 135]。过量E2能够导致雌性动物雄性化[136]，鱼类性畸形，性腺发育缓慢[137]，免疫系统损伤，可严重影响鱼类的生长发育[138-140]。鱼类拥有与高等脊椎动物相似的内分泌系统，且具有代谢周期短、对干扰物反应灵敏的特点，因此是研究环境内分泌干扰物影响的理想模式生物[141-145]。

褐牙鲆属鲽形目，鲽亚目，牙鲆科，牙鲆属，分布范围广，为冷温性底层海水鱼类，肉味鲜美，营养丰富，为我国名贵海水养殖鱼类，也是我国重要的放流经济鱼种。本研究通过暴露诱导实验，开展E2和DIOP等内分泌干扰物对褐牙鲆幼鱼的组织损伤研究，其结果可直观反映污染物对鱼体的危害，不仅为水产健康养殖提供理论指导也可为水环境内分泌污染的生物监测提供理论依据，对生产养殖和水环境质量评估都具有较大的应用价值和社会效益。

## 4.1 材料与方法

### 4.1.1 实验材料

见第三章

### 4.1.2 实验方法

同第三章类似，但在本实验中仅对0.1μmol/L浓度组和1μmol/L浓度组进行研究。同时对每组的死亡率进行测定。

### 4.1.3 取样与样品处理

在实验进行1h、3h、6h、12h、24h(D1)、D2、D3、D5、D7、D14、D21、D28、D35后对每个处理组鳃、肝、肾进行取样，用波恩氏液固定24小时，转入70%酒精中保存，经脱水，石蜡包埋，连续切片（厚度5-7μm），HE染色，中性树胶封片，镜检观察后拍照。

## 4.2 结果

### 4.2.1 E2与DIOP对牙鲆幼鱼致死率的影响

原始对照组与空白对照组牙鲆幼鱼生长较好，在实验五周内始终保持着较低的死亡率。与对照组相比较，E2和DIOP对牙鲆幼鱼都有较高的致死率。实验开始第一天即在E2高浓度组，E2低浓度组和DIOP高浓度组中发现死亡牙鲆幼鱼，实验第12天在DIOP低浓度组发现第一尾死亡牙鲆幼鱼；随E2与DIOP胁迫时间的延长，各组对牙鲆幼鱼的致死率都呈增长趋势，其中E2高浓度组对牙鲆幼鱼影响最大，在实验第21天对牙鲆幼鱼的致死率达到100%，其余各胁迫组在21天后，对牙鲆幼鱼的致死率都趋于稳定。本实验结果表明，E2对牙鲆幼鱼的毒性要大于DIOP, E2高浓度组对牙鲆幼鱼致死率最高，其次为E2低浓度组，DIOP低浓度组的致死率最低。



图4-1 E2与DIOP对褐牙鲆幼鱼致死率的影响

Fig. 4-1 Effects of E2 and DIOP on the mortality of juvenile flounder

### 4.2.2 E2与DIOP对褐牙鲆的组织损伤

#### 4.2.2.1 鳃的损伤

对照组褐牙鲆幼鱼鳃丝结构完整，排列密集有序，鳃丝两侧有很多鳃小片，呈平行排列分布，鳃小片上的柱细胞及柱细胞间的血隙，在五周的实验期内没有发生明显异常变化

（图2-1, 2-2, 2-3, 2-4）。在E2暴露下，低浓度组在5d开始出现鳃小片弯曲变细现象

（如图2-5），在第二周时鳃小片严重变细（图2-7）；高浓度组在1d时出现鳃小片弯曲变细现象（图2-6）；在第二周时，鳃小片变细现象严重并伴随鳃丝组织细胞坏死、脱落现象（图2-8）。在DIOP暴露下，低浓度组在7d时出现鳃小片末端弯曲膨大现象（2-9），在第二周时鳃丝开始出现非组织性空腔（图2-11），在第五周时非组织性空腔现象加重（图2-13）；高浓度组在5d时出现鳃小片末端弯曲膨大现象（图2-10），在第二周时鳃丝开始出现非组织性空腔现象（图2-12），在第五周时非组织性空腔现象加重，鳃小片之间出现组织增生、粘连现象（图2-14, 2-15）。

#### 4.2.2.2 肝脏损伤

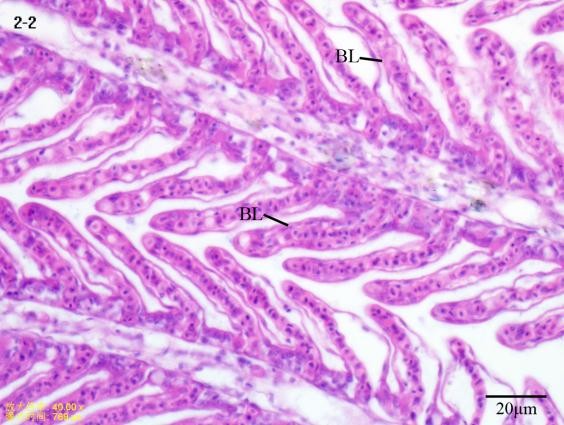
实验期内，对照组褐牙鲆幼鱼肝脏组织学观察没有发现明显异常现象，肝细胞呈索状有序排列，细胞结构清晰，胞质均匀，细胞核清晰可见（图3-1, 3-2, 3-3, 3-4）。在E2

暴露下，低浓度组在24h、高浓度组在12h，即开始出现肝细胞排列紊乱，肝细胞肿胀，并伴随脂肪变性和空泡化现象（图3-5, 图3-6）；到实验第二周时，低浓度组和高浓度组牙鲆幼鱼都出现肝细胞都排列紊乱，脂肪变性和细胞空泡化程度加重，细胞膜破裂，核溶解，并出现红色团块坏死物凝固（图3-7, 图3-8）。在DIOP暴露下，低浓度组在5d，高浓度组在3d时开始出现肝细胞脂肪变性和空泡化现象（图3-9, 图3-10），在第二周时空泡化现象加重，开始出现肝细胞排列紊乱现象（图3-11, 图3-12），在第五周时空泡化现象加重，空泡体积变大，细胞结构遭破坏，细胞膜溶解，细胞核溶解消失（图3-13, 图3-14）。

#### 4.2.2.3 肾脏损伤

鱼类正常的肾脏由肾小管和肾小球组成，周围有造血组织围绕，并有未成熟的红细胞分布其中，肾小管内有很多管状细胞。本实验对照组在实验期内牙鲆幼鱼肾脏组织学观察未发现明显异常变化（图4-1, 4-2, 4-3, 4-4）。E2暴露下，低浓度组在2d，高浓度组在1d时牙鲆幼鱼肾小管出现管壁变细，管腔变大现象（图4-5, 图4-6），在第二周时管壁变细、管腔变大现象加重，肾小球结构遭到破坏，肾小球内出现红色坏死物质（图4-7, 图4-8）。DIOP暴露下，低浓度组与高浓度组肾脏受损程度没有明显差异，都在第二周时开始出现管细胞受损或不可见现象（图4-9, 图4-10），在第五周时出现管细胞受损或不可见现象，还出现轻微的肾小管变细现象（图4-11, 图4-12）。





|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

图4-2 干扰物暴露作用后牙鲆幼鱼鳃组织观察

Fig. 4-2 Gill filaments of untreated and EDCs exposed flounder(*Paralichthys olivaceus*)

2-1原始对照组1h鳃组织结构；2-2原始对照组5w鳃组织结构；

2-3空白对照组1h鳃组织结构；2-4空白对照组5w鳃组织结构；

2-5低浓度E2处理组5d鳃组织结构，鳃小片变细（箭头处）；

2-6高浓度E2处理组1d鳃组织结构，鳃小片变细（箭头处）；

2-7低浓度E2处理组2w鳃组织结构，鳃小片变细现象加重（箭头处）；

2-8高浓度E2处理组2w鳃组织结构，鳃小片变细现象严重，伴随鳃小叶不规则弯曲（箭头处），细胞脱落等现象（三角处）；

2-9低浓度DIOP处理组7d鳃组织结构，鳃小片末端膨大弯曲（箭头处）；

2-10高浓度DIOP处理组5d鳃组织结构，鳃小片末端膨大弯曲（箭头处）；

2-11低浓度DIOP处理组2w鳃组织结构，出现非组织性空腔现象（三角处）；

2-12高浓度DIOP处理组2w鳃组织结构，鳃小片末端弯曲膨大（箭头处），出现非组织性空腔现象（三角处）；

2-13低浓度DIOP处理组5w鳃组织结构，非组织性空腔现象严重（三角处）；

2-14,2-15高浓度DIOP处理组5w鳃组织结构，非组织性空腔现象严重（三角处）；出现鳃小片之间增生粘连现象（五星处）；

鳃小片（BL）

2-1 Control group, 1h; 2-2 Control group, 5w;

2-3 Blank-control group, 1h; 2-4 Blank-control group, 5w;

2-5 0.1μmol/L E2-exposed group 5d, gill lamella became thin (arrow); 2-6 1.0μmol/L E2-exposed group 1d, gill lamella became thin (arrow);

2-7 0.1μmol/L E2-exposed group 2w, gill lamella became thinner (arrow);

2-8 1.0μmol/L E2-exposed group 2w, gill lamella became bend and thinner (arrow), with the dropped cells (triangle);;

2-9 0.1μmol/L DIOP-exposed group 7d, the terminal of gill lamella became intumescent and bend (arrow);

2-10 1.0μmol/L DIOP-exposed group 5d, the terminal of gill lamella became intumescent and bend (arrow)

2-11 0.1μmol/L DIOP-exposed group 2w, abnormal cavity appeared (triangle);

2-12 1.0μmol/L DIOP-exposed group 2w, the terminal of gill lamella became intumescent and bend (arrow), abnormal cavity appeared (triangle);

2-13 0.1μmol/L DIOP-exposed group 5w, phenomenon of abnormal cavity became serious (triangle); 2-14,2-15 1.0μmol/L DIOP-exposed group 5w, phenomenon of abnormal cavity became more serious

(Triangle) with hyperplasia and adhesion of the Gill lamella ( pentagon); Gill lamella (BL)



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  |  |
|  |  |

图4-3 干扰物暴露作用后牙鲆幼鱼肝组织观察

Fig. 4-3 Livers of untreated and EDCs exposed flounder(*Paralichthys olivaceus*)

3-1原始对照组1h肝组织结构；3-2原始对照组5w肝组织结构；

3-3空白对照组1h肝组织结构；3-4空白对照组5w肝组织结构；

3-5低浓度E2处理组1d肝组织结构，肝细胞排列紊乱，脂肪变性，细胞空泡化（箭头处）；

3-6高浓度E2处理组12h肝组织结构，肝细胞排列紊乱，脂肪变性，细胞空泡化（箭头处）；

3-7低浓度E2处理组2w肝组织结构，肝细胞排列紊乱，脂肪变性严重，细胞空泡化严重，细胞结构遭破坏，出现红色团块坏死物凝固（箭头处）；

3-8高浓度E2处理组2w肝组织结构，肝细胞排列紊乱，脂肪变性严重，细胞空泡化严重，细胞结构遭破坏，出现红色团块坏死物凝固（箭头处）；

3-9低浓度DIOP处理组5d肝组织结构，细胞空泡化（箭头处）；

3-10高浓度DIOP处理组3d肝组织结构，细胞空泡化（箭头处）；

3-11低浓度DIOP处理组2w肝组织结构，肝细胞排列出现紊乱，细胞空泡体积变大（箭头处）；

3-12高浓度DIOP处理组2w肝组织结构，肝细胞排列出现紊乱，细胞空泡体积变大（箭头处）；

3-13低浓度DIOP处理组5w肝组织结构，肝细胞排列紊乱，细胞空泡体积变大，空泡化严重，细胞结构遭到破坏（箭头处）；

3-14高浓度DIOP处理组5w肝组织结构，肝细胞排列紊乱，细胞空泡体积变大，空泡化严重，细胞结构遭到破坏（箭头处）；

肝组织（HT），中央静脉（CV），血细胞（RBC）

3-1 Control group, 1h; Ⅲ-2 Control group, 5w;

3-3 Blank-control group, 1h; Ⅲ-4 Blank-control group, 5w;

3-5 0.1μmol/L E2-exposed group 1d, disordered arrangement of liver cell, swollen liver cell, fatty degeneration and cell cavitation appeared (arrow);

3-6 1.0μmol/L E2-exposed group 12h, disordered arrangement of liver cell, swollen liver cell, fatty degeneration and cell cavitation appeared (arrow);

3-7 0.1μmol/L E2-exposed group 2w, the phenomenon of disordered arrangement of liver cell, swollen liver cell, fatty degeneration and cell cavitation became serious, and cell structure was destroyed with the appearance of red death things (arrow);

3-8 1.0μmol/L E2-exposed group 2w, the phenomenon of disordered arrangement of liver cell, swollen liver cell, fatty degeneration and cell cavitation became serious, and cell structure was destroyed with the appearance of red death things (arrow);

3-9 0.1μmol/L DIOP-exposed group 5d, cell cavitation appeared (arrow); 3-10 1.0μmol/L DIOP-exposed group 3d, cell cavitation appeared (arrow);

3-11 0.1μmol/L DIOP-exposed group 2w, disordered arrangement of liver cell appeared and cell cavitation became bigger (arrow);

3-12 1.0μmol/L DIOP-exposed group 2w, disordered arrangement of liver cell appeared and cell cavitation became bigger (arrow);

3-13 0.1μmol/L DIOP-exposed group 5w, the phenomenon of disordered arrangement of liver cell, cell cavitation became serious, and cell structure was destroyed (arrow);

3-14 1.0μmol/L DIOP-exposed group 5w, the phenomenon of disordered arrangement of liver cell, cell cavitation became serious, and cell structure was destroyed (arrow);

Hepatic tissue(HT)，the central vein (CV), red blood cell (RBC)



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

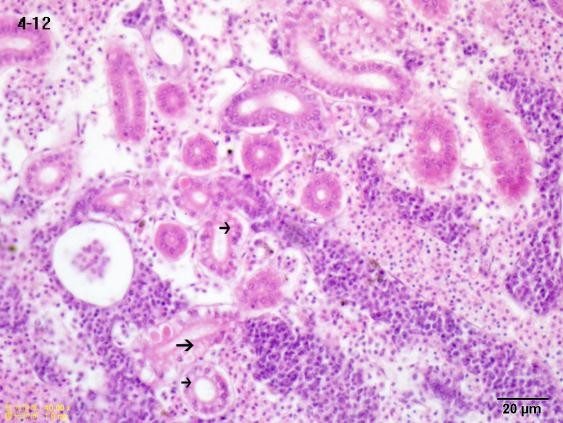


图4-4 干扰物暴露作用后牙鲆幼鱼肾组织观察

Fig. 4-4 Kidneys of untreated and EDCs exposed flounder(*Paralichthys olivaceus*)

4-1原始对照组1h肾组织结构；4-2原始对照组5w肾组织结构；

4-3空白对照组1h肾组织结构；4-4空白对照组5w肾组织结构；

4-5低浓度E2处理组2d肾组织结构，肾小管管腔变大，管壁变细现象（箭头处）；

4-6高浓度E2处理组1d肾组织结构，肾小管管腔变大，管壁变细现象（箭头处）；

4-7低浓度E2处理组2w肾组织结构，肾小管管腔变大、管壁变细现象加重（箭头处），肾小球出现红色坏死物质（三角处）；

4-8高浓度E2处理组2w肾组织结构，肾小管管腔变大、管壁变细现象加重（箭头处），肾小球形态遭破坏（三角处）；

4-9低浓度DIOP处理组2w肾组织结构，肾小管形态遭破坏，管细胞受损或不可见现象（箭头处）

4-10高浓度DIOP处理组2w肾组织结构，肾小管形态遭破坏，管细胞受损或不可见现象（箭头处）

4-11低浓度DIOP处理组5w肾组织结构，肾小管形态遭破坏，管细胞受损或不可见（箭头处），开始出现轻微肾小管腔变大，管壁变细现象

4-12高浓度DIOP处理组5w肾组织结构，肾小管形态遭破坏，管细胞受损或不可见（箭头处），开始出现轻微肾小管腔变大，管壁变细现象

肾小球（g），肾小管（t），管细胞（tb）

4-1 Control group, 1h; Ⅳ-2 Control group, 5w;

4-3 Blank-control group, 1h; Ⅳ-4 Blank-control group, 5w;

4-5 0.1μmol/L E2-exposed group 2d, renal tubule becoming thinner, lumen of renal tubule becoming bigger and glomerular structure being destroyed (arrow shown);

4-6 1.0μmol/L E2-exposed group 1d, renal tubule becoming thinner, lumen of renal tubule becoming bigger and glomerular structure being destroyed (arrow shown);

4-7 0.1μmol/L E2-exposed group 2w, the phenomenon of thinner renal tubule, and bigger lumen of renal tubule became serious(arrow) and red death things appears in glomerular (triangle);

4-8 1.0μmol/L E2-exposed group 2w, the phenomenon of thinner renal tubule and bigger lumen of renal tubule became serious(arrow) and glomerular structure was destroyed (triangle);

4-9 0.1μmol/L DIOP-exposed group 2w, renal tubular form was destroyed with damaged or invisible tubular cells (arrow);

4-10 1.0μmol/L DIOP-exposed group 2w, renal tubular form was destroyed with damaged or invisible tubular cells (arrow);

4-11 0.1μmol/L DIOP-exposed group 5w, renal tubular form was destroyed with damaged or invisible tubular cells(arrow), with sight phenomenon of thin renal tubule and big lumen of renal tubule;

4-12 1.0μmol/L DIOP-exposed group 5w, renal tubular form was destroyed with damaged or invisible tubular cells(arrow), with sight phenomenon of thin renal tubule and big lumen of renal tubule;

Glomerulus(g), Kidney tubules(t), Tube cells(tb)

## 4.3 讨论

### 4.3.1 对鳃组织的损伤

鳃是多数水生生物的呼吸器官，同时还是重要的排泄器官，参与代谢产物排泄、体液渗透平衡和酸碱平衡调节等生理活动，[鳃组织的病变将造成氨氮](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E6%B0%A8%E6%B0%AE&amp;fr=qb_search_exp&amp;ie=utf8)的排泄受阻，血液中[氨氮](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E6%B0%A8%E6%B0%AE&amp;fr=qb_search_exp&amp;ie=utf8)含量升高，将影响到鱼体内[渗透压调节](http://zhidao.baidu.com/search?word=%E6%B8%97%E9%80%8F%E5%8E%8B%E8%B0%83%E8%8A%82&amp;fr=qb_search_exp&amp;ie=utf8)机能[146, 147]。另外化学污染物发挥毒性作用时对鳃造成的危害很大，对其结构和生理造成的变化可以作为水体受污染程度的一种有效指示。鱼鳃组织暴露在存在有毒物质的水环境中后，可对其造成不同程度的一系列损伤，损伤基本可划分为两类：一是为了抵御外界不良的环境进行应激反应而产生的损伤，包括鳃丝上皮细胞肥大、增生，鳃小片的呼吸上皮水肿等，如经高浓度有机污染物全氟辛烷磺酸暴露后，斑马鱼鳃丝以及鳃小片分泌物增多，鳃小片融合，与外界接触面积降低，上皮组织水肿、隆起并伴有部分坏死脱落[148]；二是直接造成的损伤，包括鳃上皮细胞坏死和脱落等，如高浓度的对硝基酚致使泥鳅鳃小叶基部、中部和顶部的细胞均大量坏死脱落，鳃丝中出现非组织性空腔，鳃丝卷曲，顶部膨大[139]。Jiraungkoorskul等（2003）[149]使用草甘膦除草剂对尼罗罗非鱼进行暴露处理后，发现鳃小片顶端膨大，上皮细胞增生，鳃小片间发生组织增生粘联现象。吴玲玲等（2007）[150]利用组织切片方法对菲暴露下的斑马鱼的鳃组织结构进行研究，观察到当菲达到一定浓度时鳃上皮细胞发生坏死、脱落。王少博等（2007）[151]将草鱼苗暴露于重金属镉、铬中后，观察到鳃丝弯曲，鳃小片顶部出现增生现象，鳃丝甚至出现非组织性空腔。本研究发现在E2暴露下，产生的损伤多为直接损伤，如褐牙鲆鳃小叶弯曲变细，末端出现弯曲膨大，鳃小叶断裂，鳃上皮细胞坏死、脱落等，而且随着浓度增大、时间的加长，损伤程度越来越大；在塑化剂邻苯二甲酸二异辛酯暴露下，会产生直

接损伤，如鳃小片顶端弯曲膨大，出现非组织性空腔，也有轻微的鳃小叶变细现象，同时也存在为了防御反应产生的损伤，如鳃小叶之间组织增生、粘连，并且受损伤的程度与浓度和时间呈正比例关系。由此可见，E2与塑化剂对褐牙鲆鳃组织的损伤不尽相同，但是在这两种污染物中暴露一段时间后，污染物在鳃组织高浓度积累，都会造成严重的直接损伤，破坏鳃小片细胞代谢功能，造成呼吸阻碍、代谢紊乱、最终死亡等各种急性中毒症状。

### 4.3.2 对肝组织的损伤

鱼的肝脏是鱼类进行物质代谢的重要枢纽，是鱼体内重要的解毒器官，抵御外源性污染物的侵袭，还具有保持生理平衡的功能。当鱼体肝脏受损后，往往会造成食欲不振，生长缓慢，抵抗力下降甚至死亡等现象[152]。由于外源异生物质主要在肝中进行生物转化，鱼类在污染的水环境中长期存在时，肝组织在结构和生理方面都会产生相应的变化。鱼类受到外源毒物作用后，肝细胞通常会发生肿大、坏死和细胞空泡化现象[149]。斑马鱼在菲的暴露下，肝细胞发生肿大，细胞形状变得不规则，细胞核发生严重萎缩变形及偏离细胞中心，胞质空泡化，部分肝细胞的核溶解或细胞溶解造成肝组织发生局部坏死[149]。本实验中，在

E2暴露下，肝细胞排列紊乱，肝细胞肿胀，出现脂肪变性和空泡化，细胞结构遭到破坏，细胞膜破裂，核溶解，胞质中出现红色团块状坏死物，并随着浓度和时间的增加变得更加严重。在塑化剂邻苯二甲酸二异辛酯暴露下也出现的肝细胞脂肪变性和空泡化现象，高浓度组出现细胞结构遭到严重破坏的现象，损伤程度与浓度和时间呈正比例关系。E2通过干扰脂类代谢，造成脂质在肝脏中的积累，导致肝脏脂肪变性[137]，塑化剂组也导致了肝脏脂肪变性，表明塑化剂邻苯二甲酸二异辛酯可能存在与E2类似的毒理作用。

Gingerich( 1982)[153]认为肝细胞内物质的合成速度与释放速度不平衡会导致细胞空泡化。

Wester（1986）[154]认为肝糖原在肝细胞中积累，肝组织中水与脂质都会产生相应的变化，因此会形成细胞空泡化。实验结果显示塑化剂与E2对褐牙鲆肝脏组织的损伤类型基本相同，在同等浓度和时间条件下，E2对肝组织的损伤较大，这与E2组死亡率较高相一致，同时也可以看到，在高浓度塑化剂长时间的暴露下，褐牙鲆肝脏也已经产生了巨大的损伤，如肝细胞坏死等现象。

### 4.3.3 对肾脏的损伤

鱼类肾脏由许多肾单位构成，不仅是重要的排泄器官，还可以维持水盐平衡，进行渗透压调节，是鱼类是用来调节内环境稳定主要器官，污染的水环境会造成其组织结构和生理变化[155]。当污染物浓度超过肾脏的调节范围时，会对肾脏组织造成直接的损伤。如暴露在一定浓度汞毒液下的鲤鱼，肾组织出现肾小球萎缩，肾组织局部坏死等现象[155]。重金属

Cu2+可使半滑舌鳎肾脏组织出现肾小管形状损坏，管细胞部分增生肥大，血细胞融合等现

象[156]。本实验中，E2暴露下，肾小管形态崩解，肾小管变细，肾小管管腔变大，肾小球结构遭到破坏，并且随着浓度的增大和时间的加长，损伤程度逐渐变大；塑化剂暴露下，肾小管形态遭到破坏，出现管细胞受损或不可见现象，高浓度下还出现肾小管管壁变细、管腔缩小的现象，损伤程度与浓度和时间呈正比例关系。在两种污染物的暴露下，肾组织受到的损伤不尽相同，说明毒理机制不同，从损伤程度来看，塑化剂对肾脏的损伤较小。

# 第五章 小结

本研究利用RT-PCR和RACE的方法对褐牙鲆卵黄蛋白原基因进行克隆，通过测序和拼接得到全长cDNA序列，序列全长5066bp，开放阅读框5037bp，编码1677个氨基酸，并对其氨基酸序列进行预测和多种相关分析，如同源性分析、多重比较、进化树分析，发现其在结构上有一定的同源性，如包含多个保守区域及位点，同时在不同物种之间也存在特异性，因此可以作为一种分子标记，用于生物系统进化的研究。

根据获得的卵黄蛋白原全长cDNA序列为Real-time PCR设计特异性引物，建立了建立了Real-Time PCR的检测方法。对使用不同浓度的E2和塑化剂DIOP进行暴露处理的不同时期的褐牙鲆肝脏中的卵黄蛋白原mRNA的表达进行相对定量分析，发现在外源性污染物与褐牙鲆卵黄蛋白原的表达量之间存在剂量、时间效应关系。

对E2和塑化剂DIOP暴露处理的幼体褐牙鲆进行解剖，并对其鳃、肝、肾进行组织切片，观察雌激素对褐牙鲆器官组织的影响，结果发现，在两种污染物的暴露下，鱼体组织出现较严重的损伤，验证了塑化剂DIOP具有类雌激素效应。

研究结果可直接反映污染物对鱼体的危害，对生产养殖和水环境质量评估都具有较大

的应用价值和社会效益，因此褐牙鲆卵黄蛋白原可以作为一种良好的生物标志物来监测海水雌激素的污染。

参考文献

[1] De Coster S, Van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action [J]. Journal of environmental and public health, 2012, 2012

[2] Pacoli C Q, Grizzle J M, Bradley J T. Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish *Ictalurus punctatus* [J]. Aquaculture, 1990, 90(3): 353-367.

[3] Goodwin A E, Grizzle J M, Bradley J T, et al. Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish ( *Ictalurus punctatus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1992, 101(3): 441-446.

[4] Parks L G, Cheek A O, Denslow N D, et al. Fathead minnow ( *Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1999, 123(2): 113-125.

[5] Pan M, Bell W J, Telfer W H. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body [J]. Science, 1969, 165(3891): 393-394.

[6] Copeland P, Sumpter J, Walker T, et al. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout ( *Salmo gairdneri* richardson) at various stages of the reproductive cycle [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1986, 83(2): 487-493.

[7] So Y P, Idler D R, Hwang S J. Plasma vitellogenin in landlocked atlantic salmon ( *Salmo salar* ouananiche): isolation, homologous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1985, 81(1): 63-71.

[8] Ackermann G E, Schwaiger J, Negele R D, et al. Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquatic toxicology, 2002, 60(3): 203-21.

[9] Lv X, Zhou Q, Song M, et al. Vitellogenic responses of 17β-estradiol and bisphenol A in male Chinese loach ( *Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Environmental toxicology and pharmacology, 2007, 24(2): 155-159.

[10]温茹淑， 方展强， 陈伟庭. 17β-雌二醇对雄性唐鱼卵黄蛋白原的诱导及性腺发育的影响[J]. 动物

学研究, 2008, 29(1): 43-48.

[11]黄晔，任华，孙竹筠，等. 壬基酚和双酚A对雄性斑马鱼(Danio rerio) 卵黄蛋白原mRNA 的诱导效应[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(3): 274-279.

[12] De Vlaming V. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts [J]. Control processes in fish physiology, 1983, 176-199.

[13] Flouriot G, Vaillant C, Salbert G, et al. Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates [J]. Journal of Cell Science, 1993, 105(2):

407-416.

[14] Maitre J-L, Valotaire Y, Guguen-Guillouzo C. Estradiol-17βstimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes [J]. In vitro cellular & developmental biology, 1986, 22(6): 337-343.

[15] Kwon H-C, Mugiya Y. Involvement of Growth Hormone and Prolactin in the Induction of Vitellogenin Synthesis in Primary Hepatocyte Culture in the Eel, *Anguilla japonica*[J]. General and comparative endocrinology, 1994, 93(1): 51-60.

[16] Vaillant C, Le Guellec C, Pakdel F, et al. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes [J]. General and comparative endocrinology, 1988, 70(2): 284-290.

[17] Peyon P, Baloche S, Burzawa-Gérard E. Synthe sis of Vitellogenin by Eel ( *Anguilla anguilla* L.) Hepatocytes in Primary Culture: Requirement of 17β-Estradiol-Priming [J]. General and comparative endocrinology, 1993, 91(3): 318-329.

[18] Kordes C, Rieber E, Gutzeit H. An in vitro vitellogenin bioassay for oestrogenic substances in the medaka ( *Oryzias latipes*) [J]. Aquatic toxicology, 2002, 58(3): 151-164.

[19] Bailey R E. The effect of estradiol on serum calcium, phosphorus, and protein of goldfish [J]. Journal of Experimental Zoology, 1957, 136(3): 455-469.

[20] Plack P, Fraser N. Effect of oestradiol 3-benzoate on the biosynthesis of egg proteins by cod [J]. Biochem J, 1970, 118: 13Pb-14P.

[21] Emmersen B K, Petersen I M. Natural occurrence, and experimental induction by estradiol-17-β, of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder ( *Platichtys flesus, L*.) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1976, 54(4): 443-446.

[22] Hara A, Hirai H. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdner*i) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1978, 59(4): 339-343.

[23] Campbell C, Jalabert B. Selective protein incorporation by vitellogenic [J]. 1979, 19:429-437

[24] Ng T B, Idler D R." Big" and" little" forms of plaice vitellogenic and maturational hormones [J]. General and comparative endocrinology, 1978, 34(4): 408-420.

[25] Bun Ng T, Campbell C, Idler D. Antibody inhibition of vitellogenesis and oocyte maturation in salmon and flounder [J]. General and comparative endocrinology, 1980, 41(2): 233-239.

[26] Tata J R. The expression of the vitellogenin gene [J]. Cell, 1976, 9(1): 1-14.

[27] Suzuki T, Hara A, Yamaguchi K, et al. Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the Pacific oyster Crassostrea gigas [J]. Marine Biology, 1992, 113(2): 239-245.

[28] Wallace R A. Studies on amphibian yolk IX. Xenopus vitellogenin [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects, 1970, 215(1): 176-183.

[29] Gottlieb T, Wallace R. Intracellular phosphorylation of vitellogenin in the liver of estrogen-stimulated

Xenopus laevis [J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(8): 4116-4123.

[30] Wang S-Y, Williams D. Biosynthesis of the vitellogenins. Identification and characterization of nonphosphorylated precursors to avian vitellogenin I and vitellogenin II [J]. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(7): 3837-3846.

[31] Gottlieb T A, Wallace R A. Intracellular phosphorylation of vitellogenin in the liver of estrogen-stimulated Xenopus laevis[J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(8): 4116-4123.

[32] Raikhel A S. Monoclonal antibodies as probes for processing of the mosquito yolk protein; a

High-resolution immunolocalization of secretory and accumulative pathways [J]. Tissue and Cell, 1987, 19(4): 515-529.

[33] Raikhel A S, Dhadialla T. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes [J]. Annual review of entomology, 1992, 37(1): 217-251.

[34] Sharrock W J. Yolk proteins of *Caenorhabditis elegans* [J]. Developmental biology, 1983, 96(1): 182-188.

[35] Unuma T, Suzuki T, Kurokawa T, et al. A protein identical to the yolk protein is stored in the testis in male red sea urchin, Pseudocentrotus depressus [J]. The Biological Bulletin, 1998, 194(1): 92-97.

[36] Kimble J, Sharrock W J. Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans* [J]. Developmental biology, 1983, 96(1): 189-196.

[37] Sharrock W J. Cleavage of two yolk proteins from a precursor in *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of molecular biology, 1984, 174(3): 419-431.

[38]张士璀， 孙旭彤， 李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 32-35.

[39] Wallace R A, Hoch K L, Carnevali O. Placement of small lipovitellin subunits within the vitellogenin precursor in *Xenopus laevis* [J]. Journal of molecular biology, 1990, 213(3): 407-409.

[40] Plack P, Pritchard D, Fraser N. Egg proteins in cod serum. Natural occurrence and induction by injections of oestradiol 3-benzoate [J]. Biochem J, 1971, 121:847-856.

[41] Nath P, Sundararaj B I. Isolation and identification of female-specific serum lipophosphoprotein (vitellogenin) in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) [J]. General and comparative endocrinology, 1981, 43(2): 184-190.

[42] L De Vlaming V, Wiley H S, Delahunty G, et al. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: Induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1980, 67(4): 613-623.

[43] Idler D, Hwang S, Crim L. Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (Salmo salar) plasma by radioimmunoassay [J]. Journal of the Fisheries Board of Canada, 1979, 36(5): 574-578.

[44] Hiramatsu N, Hara A. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen *(Hucho perryi*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1996, 115(3): 243-251.

[45] Jared D, Wallace R. Comparative chromatography of the yolk proteins of teleosts [J]. Comparative

Biochemistry and physiology, 1968, 24(2): 437-443.

[46] Markert J, Vanstone W. Egg proteins of coho salmon (Oncorhynchus kisutch): chromatographic separation and molecular weights of the major proteins in the high density fraction and their presence in salmon plasma [J]. Journal of the Fisheries Board of Canada, 1971, 28(12): 1853-1856.

[47] Campbell C, Idler D. Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross reactivity to ovarian yolk fractions [J]. Biology of reproduction, 1980, 22(3): 605-617.

[48] Irwin L K, Gray S, Oberdörster E. Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol [J]. Aquatic Toxicology, 2001, 55(1): 49-60.

[49] Wang S, Smith D E, Williams D L. Purification of avian vitellogenin III: comparison with vitellogenins I and II [J]. Biochemistry, 1983, 22(26): 6206-6212.

[50] Sappington T W, S Raikhel A. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors [J]. Insect biochemistry and molecular biology, 1998, 28(5): 277-300.

[51] Piulachs M, Guidugli K, Barchuk A, et al. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies [J]. Insect biochemistry and molecular biology, 2003, 33(4): 459-465.

[52] Watts M, Pankhurst N W, Pryce A, et al. Vitellogenin isolation, purification and antigenic

Cross-reactivity in three teleost species [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 134(3): 467-476.

[53] Jones R E. The vertebrate ovary. Comparative biology and evolution [M]. Plenum Press., 1978.

[54] Gratwohl E K-M, Kellenberger E, Lorand L, et al. Storage, ultrastructural targeting and function of toposomes and hyalin in sea urchin embryogenesis [J]. Mechanisms of development, 1991, 33(2): 127-138.

[55] Reimer C L, Crawford B J. Identification and partial characterization of yolk and cortical granule proteins in eggs and embryos of the starfish, Pisaster ochraceus [J]. Developmental biology, 1995, 167(2): 439-457.

[56] Matsubara T, Ohkubo N, Andoh T, et al. Two Forms of Vitellogenin, Yielding Two Distinct Lipovitellins, Play Different Roles during Oocyte Maturation and Early Development of Barfin Flounder, *Verasper moseri*, a Marine Teleost that Spawns Pelagic Eggs [J]. Developmental biology, 1999, 213(1): 18-32.

[57] Roubal W T, Lomax D P, Willis M L, et al. Purification and Partial Characterization of English Sole (*Pleuronectes vetulus*) Vitellogenin [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 118(3): 613-622.

[58] Baert J L, Sautiere P, Porchet M. Purification and characterization of oocyte vitellin from Perinereis cultrifera (polychaete annelid) [J]. European Journal of Biochemistry, 1984, 142(3): 527-532.

[59] Babin P J. Binding of thyroxine and 3, 5, 3′-triiodothyronine to trout plasma lipoproteins [J]. Am J

Physiol, 1992, 262(Part 1): E712-E720.

[60] Azuma M, Irie T, Seki T. Retinals and retinols induced by estrogen in the blood plasma of Xenopus

Laevis [J]. Journal of experimental biology, 1993, 178(1): 89-96.

[61] Ando S, Hatano M. Distribution of carotenoids in the eggs from four species of salmonids [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1991, 99(2): 341-344.

[62] Montorzi M, Falchuk K H, Vallee B L. *Xenopus laevis* Vitellogenin Is a Zinc Protein [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1994, 200(3): 1407-1413.

[63] Komatsu M, Ando S. A novel low-density lipoprotein with large amounts of phospholipid found in the egg yolk of crustacea sand crayfish ibacus ciliatus: Its function as vitellogenin degrading proteinase [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1992, 186(1): 498-502.

[64] Komatsu M, Hayashi S. Proteinase activity of vitellogenin from crustacean sand crayfish Ibacus ciliatus as a latent form [J]. Fisheries Science, 1994, 60(6):753-757

[65] Soderhall K. Defence reactions in a crustacean [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1997, 21(2): 137.

[66] Raikhel A S, Kokoza V A, Zhu J, et al. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity [J]. Insect biochemistry and molecular biology, 2002, 32(10): 1275-1286.

[67] Shi X, Zhang S, Pang Q. Vitellogenin is a novel player in defense reactions [J]. Fish & shellfish immunology, 2006, 20(5): 769-772.

[68] Li Z, Zhang S, Liu Q. Vitellogenin functions as a multivalent pattern recognition receptor with an opsonic activity [J]. Plos One, 2008, 3(4): e1940.

[69] Li Z, Zhang S, Zhang J, et al. Vitellogenin is a cidal factor capable of killing bacteria via interaction with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid [J]. Molecular immunology, 2009, 46(16): 3232-3239.

[70] Takemura A, Kim B H. Effects of estradiol-17βtreatment on in vitro and in vivo synthesis of two distinct vitellogenins in tilapia [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2001, 129(2): 641-651.

[71]王凤， 张颖， 佟广香，等. 哲罗鲑生殖周期中血清卵黄蛋白原浓度的ELISA 检测[J]. 上海海洋大

学学报, 2009, 6）: 673-679.

[72]姚静，方展强. 唐鱼卵黄蛋白原的ELISA检测方法的建立[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3): 242-246.

[73] Celius T, Matthews J B, Giesy J P, et al. Quantification of rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using real-time PCR after in vivo treatment with estradiol-17βor

α-zearalenol [J]. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2000, 75(2): 109-119.

[74] Gye M, Kim D. Bisphenol A induces hepatic vitellogenin mRNA in male Bombina orientalis [J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2005, 75(1): 1-6.

[75] Kang H, Noh J, Gye M. Effect of nonyphenol on the expression of hepatic vitellogenin mRNA in male

Bombina orientalis (Boulenger) [J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2006, 77(1): 15-20.

[76] Scholz S, Kordes C, Hamann J, et al. Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka ( *Oryzias latipes*): comparison of gene expression and protein levels [J]. Marine environmental research, 2004, 57(3): 235-244.

[77] Kime D E. Endocrine disruption in fish [M]. Springer, 1998.

[78] Sumpter J. Environmental control of fish reproduction: a different perspective [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1997, 17(1-6): 25-31.

[79] Arcand‐Hoy L D, Benson W H. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine

Disruption [J]. Environmental toxicology and chemistry, 1998, 17(1): 49-57.

[80] Arukwe A, Goksøyr A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: h epatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption [J]. Comparative hepatology, 2003, 2(1): 1-21.

[81] Allen Y, Matthiessen P, Scott A, et al. The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments—further surveys of flounder [J]. Science of the Total Environment, 1999, 233(1): 5-20.

[82] Harries J E, Sheahan D A, Jobling S, et al. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1997, 16(3): 534-542.

[83] Hashimoto S, Bessho H, Hara A, et al. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan [J]. Marine Environmental Research, 2000, 49(1): 37-53.

[84]王宏元， 巨荣菊， 白瑶， 等. 壬基酚对雄性中国林蛙肝细胞中雌激素受体和卵黄蛋白原的影响[J].

陕西师范大学学报： 自然科学版, 2012, 39(6): 54-59.

[85]白瑶， 张育辉， 翟丽丽，等. 双酚A 诱导雄性中国林蛙肝细胞雌激素受体表达和卵黄蛋白原合成

[J]. 动物学研究, 2011, 32(3): 317-322.

[86]钱鑫英， 潘娜， 刘文金， 等. 印染污水对银鲫卵黄蛋白原和金属硫蛋白水平的影响[J]. 2011

（6）:95-99

[87] Palmer B D, Selcer K W. Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens: a review [J]. Environmental Toxicology and Risk Assessment: Biomarkers and Risk Assessment, vol, 1996, 5:3-22.

[88] Tyler C, Van Der Eerden B, Jobling S, et al. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish [J]. Journal of Comparative Physiology B, 1996, 166(7): 418-426.

[89] Kime D, Nash J, Scott A. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics [J]. Aquaculture, 1999, 177(1): 345-352.

[90]刘萍， 李正炎， 李江玲. 酚类污染物对金鱼卵黄蛋白原诱导的雌激素效应研究[J]. 中国海洋大学

学报（自然科学版）, 2010, 40(11): 134-140

[91] Wallace R A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates [M]. Oogenesis. Springer. 1985: 127-177.

[92] Byrne B, Gruber M, Ab G. The evolution of egg yolk proteins [J]. Progress in biophysics and molecular biology, 1989, 53(1): 33-69.

[93] Wahli W. Evolution and expression of vitellogenin genes [J]. Trends in Genetics, 1988, 4(8): 227-232.

[94] Schneider W J. Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family [J]. International review of cytology, 1996, 166:103-137.

[95] Matsubara T, Sawano K. Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (Verasper moseri) [J]. Journal of Experimental Zoology, 1995, 272(1): 34-45.

[96] Van Bohemen C G, Lambert J, Peute J. Annual changes in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. General and comparative Endocrinology, 1981, 44(1):

94-107.

[97] Mananos E, Nunez J, Zanuy S, et al. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II—Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1994, 107(2): 217-223.

[98] Bon E, Barbe U, Rodriguez J N, et al. Plasma Vitellogenin Levels during the Annual Reproductive Cycle of the Female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Establishment and Validation of an ELISA [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 117(1):

75-84.

[99] Kokokiris L, Menn F, Kentouri M, et al. Seasonal cycle of gonadal development and serum levels of vitellogenin of the red porgy, Pagrus pagrus (Teleostei: Sparidae) [J]. Marine Biology, 2001, 139(3):

549-559.

[100] Anderson T, Levitt D, Banaszak L. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein [J]. Structure, 1998, 6(7): 895-909.

[101]刘春， 李凯彬， 耿冬雨， 等. 剑尾鱼2 种卵黄蛋白原全长cDNA 的克隆及序列分析[J]. 中

国水产科学, 2010 (1): 31-43.

[102] Mikawa N, Utoh T, Horie N, et al. Cloning and characterization of vitellogenin cDNA from the common Japanese conger (*Conger myriaster*) and vitellogenin gene expression during ovarian development [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 143(4): 404-414.

[103] Lim E H, Teo B Y, Lam T J, et al. Sequence analysis of a fish vitellogenin cDNA with a large phosvitin domain [J]. Gene, 2001, 277(1): 175-186.

[104] Kuenzel E, Mulligan J, Sommercorn J, et al. Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides [J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(19):

9136-9140.

[105] Meggio F, Pinna L A. Phosphorylation of phosvitin by casein kinase-2 provides the evidence that phosphoserines can replace carboxylic amino acids as specificity determinants [J]. Biochimica et Biophysica

Acta (BBA) -Bioenergetics, 1988, 971(2): 227-231.

[106] Nardelli D, Gerber-Huber S, Van Het Schip F D, et al. Vertebrate and nematode genes coding for yolk proteins are derived from a common ancestor [J]. Biochemistry, 1987, 26(20): 6397-6402.

[107] Hiramatsu K, Hiramatsu N, Hara A, et al. Multiple vitellogenins in white perch (Morone americana) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28(1-4): 347-348.

[108] Matsubara T, Nagae M, Ohkubo N, et al. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28(1-4): 295-299.

[109]叶海燕， 黄原. 卵黄蛋白原在系统进化中的应用[J]. 陕西农业科学, 2005 (5)：67-70.

[110] Herbst A L, Ulfelder H, Poskanzer D C. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women [J]. New England journal of medicine, 1971, 284(16): 878-881.

[111] Guillette Jr L J, Gross T S, Masson G R, et al. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida [J]. Environmental health perspectives, 1994, 102(8): 680.

[112] Ankley G, Mihaich E, Stahl R, et al. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti‐) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1998, 17(1): 68-87.

[113] Colborn T, Vom Saal F S, Soto A M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans [J]. Environmental health perspectives, 1993, 101(5): 378.

[114] Zacharewski T. In vitro bioassays for assessing estrogenic substances [J]. Environmental science & technology, 1997, 31(3): 613-623.

[115] Gillesby B E, Zacharewski T R. Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1998, 17(1): 3-14.

[116] Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, et al. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 1995, 15(2): 143-151.

[117] Petit F, Le Goff P, Cravédi J -P, et al. Trout oestrogen receptor sensitivity to xenobiotics as tested by different bioassays [J]. Aquaculture, 1999, 177(1): 353-365.

[118] Mommsen T P, Walsh P J. Vitellogenesis and oocyte assembly [J]. Fish physiology, 1988, 11(part A): 347-406.

[119] Purdom C, Hardiman P, Bye V, et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works [J]. Chemistry and Ecology, 1994, 8(4): 275-285.

[120] Folmar L C, Denslow N D, Rao V, et al. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (Cyprinus carpio) captured near a major metropolitan sewage treatment plant [J]. Environmental Health Perspectives, 1996, 104(10): 1096.

[121] Denslow N, Chow M, Chow M, et al. Development of biomarkers for environmental contaminants

Affecting fish [J]. Chemically induced alterations in functional development and reproduction of fishes Setac,

Pensacola, Fla, USA, 1997, 73-86.

[122] Denslow N D, Bowman C J, Robinson G, et al. Biomarkers of endocrine disruption at the mRNA level [J]. ASTM SPEC TECH PUBL, 1999, 1364): 24-35.

[123] Denslow N D, Chow M C, Kroll K J, et al. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics [J]. Ecotoxicology, 1999, 8(5): 385-398.

[124] Bowman C J, Kroll K J, Hemmer M J, et al. Estrogen-Induced Vitellogenin mRNA and Protein in Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2000, 120(3): 300-313.

[125]李建寅， 李凯彬， 刘春， 等. 卵黄蛋白原在剑尾鱼体内不同组织的分布及雌激素作用对其表达

的影响[J]. 中国水产科学, 2009(5): 705-711.

[126] Cooper R L, Kavlock R J. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview [J]. Journal of endocrinology, 1997, 152(2): 159-166.

[127] Kuo C-H, Yang S-N, Kuo P-L, et al. Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals [J]. The Kaohsiung journal of medical sciences, 2012, 28(7): S37-S42.

[128]窦大营， 赵红卫， 姚思德. 环境雌激素问题概述[J]. 科技导报, 2001, 8(2): 15.

[129]张岚，黄承武. 水中内分泌干扰剂的危害及其去除方法[J]. 中国卫生工程学, 2004, 3(1)：57-59.

[130]杨再福， 赵晓祥. 环境雌激素对水生动物的影响研究进展[J]. 生态环境, 2005, 14（1）：

108-112.

[131] 李瑞霞. 环境雌激素对动物的影响与对策[J]. 四川动物, 2006,25( 3): 673-676

[132] Muncke J. Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: an updated review of exposure, effect and risk assessment [J]. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2011, 127(1): 118-127.

[133] Bang D Y, Kyung M, Kim M J, et al. Human Risk Assessment of Endocrine‐Disrupting

Chemicals Derived from Plastic Food Containers [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2012, 11(5): 453-470.

[134]柳春红， 孙远明， 杨艺超，et al. 邻苯二甲酸酯类增塑剂的污染及暴露评估现状[J]. 现代食品

科技, 2012, 28(3): 339-341.

[135]周立斌，刘晓春，叶卫，等. 17β-雌二醇和甲基睾酮对离体长臀鮠脑垂体促性腺激素分泌的影响[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2)：113-118.

[136]张晓彦，刘海金. 17β-雌二醇对半滑舌鳎性分化和生长的影响[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(6)：67-72.

[137]张续， 黎娟， 刘雅思，等. 三-(2, 3-二溴丙基) 异氰脲酸酯和17β-雌二醇复合暴露对雄性斑马

鱼的毒性效应[J]. 2012,32(2):450-456

[138]李云，朱志强，叶勤, et al. 17β-雌二醇对雄性瓦氏黄颡鱼(Pelteobagrus vachelli)的雌激素效应水[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(2): 195-200.

[139]雷忻，李宗强，廉振民, et al. 双酚A和对硝基酚对泥鳅的急性毒性效应[J]. 生态学杂志, 2009, 11): 2257-2261.

[140]杨丽丽， 张晶， 方展强. 雌二醇， 壬基酚， 多氯联苯， 镉和锌及其混合物对唐鱼的雌激素效应

比较[J]. 水产学报, 2011, 35(6): 838-845.

[141] Liu J, Wang R, Huang B, et al. Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China [J]. Environmental pollution, 2011, 159(10): 2815-2822.

[142] Torres-Duarte C, Viana M T, Vazquez-Duhalt R. Laccase-Mediated Transformations of endocrine disrupting chemicals abolish binding affinities to estrogen receptors and their estrogenic activity in zebrafish [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2012, 168(4): 864-876.

[143] Söffker M, Tyler C R. Endocrine disrupting chem icals and sexual behaviors in fish-a critical review on effects and possible consequences [J]. Critical reviews in toxicology, 2012, 42(8): 653-668.

[144] Liu C, Yan W, Zhou B, et al. Characterization of a bystander effect induced by the

Endocrine-disrupting chemical 6-propyl-2-thiouracil in zebrafish embryos [J]. Aquatic Toxicology, 2012, 118:108-115.

[145] Kramer V, Miles-Richardson S, Pierens S, et al. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17β-estradiol [J]. Aquatic Toxicology, 1998, 40(4): 335-360.

[146]蔺玉华， 关海虹. 甲基汞对鲤鱼鳃组织及氯细胞的影响[J]. 水产学杂志, 2003, 16(1)：53-56.

[147]胡毅，黄云，钟蕾，等. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝Na^+/K^+-ATP酶，组织结构及血清部分生理生化指标的影响 [J]. 水产学报, 2012, 36(4): 538-545.

[148]胡芹，周珍，周群芳，等. 全氟辛烷磺酸(PFOS)急性暴露对斑马鱼鳃显微结构的影响[J]. 2009,4(4):530-536

[149] Jiraungkoorskul W, Upatham E, Kruatrachue M, et al. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (Oreochromis niloticus) [J]. Environmental toxicology, 2003, 18(4):

260-267.

[150]吴玲玲，陈玲，张亚雷，等. 菲对斑马鱼鳃和肝组织结构的影响[J]. 生态学杂志, 2007, 26(5)：688-692.

[151]王少博， 王维民， 郭亚楠， 等. 重金属镉和铬对草鱼苗的急性和慢性毒性效应[J]. 兰州大学

学报： 自然科学版, 2007, 43(4): 60-64.

[152]曹娜，魏华，吴陵广，等. 双酚A对斑马鱼肝脏和性腺的作用[J]. 生态学杂志, 2010, 29(11): 2192-2198.

[153] Dalich G M, Larson R E, Gingerich W H. Acute and chronic toxicity studies with monochlorobenzene in rainbow trout [J]. Aquatic toxicology, 1982, 2(3): 127-142.

[154] Wester P, Canton J. Histopathological study of *Oryzias latipes* (medaka) after long-term

β-hexachlorocyclohexane exposure [J]. Aquatic Toxicology, 1986, 9(1): 21-45.

[155] 马陶武, 王子健, 陈剑锋, 等. 乙炔基雌二醇对稀有鮈鲫肾脏的毒性效应[J]. 2004, 24(3): 487-491

[156]徐永江， 柳学周， 于志刚， 等. 几种重金属离子对半滑舌鳎组织损伤的研究[J]. 海洋水产研

究, 2005, 26(6):11-16

攻读硕士期间发表的论文

1.刘志峰，洪磊，郝振林，雷霁霖，雌二醇（E2）与塑化剂（DIOP）对褐牙鲆幼鱼组织损伤比较研究.海洋湖沼通报（已接收）

独创性说明

作者郑重声明：本硕士论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包括其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得大连海洋大学或其他单位的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

作者签名：

年月日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者和指导教师完全了解大连海洋大学有关保留、使用学位论文的规定：即学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人同意大连海洋大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索、交流。

学位论文作者签名：导师签名：

签字日期：签字日期：

致 谢

不知不觉中三年的研究生生活即将画上句点，一路走来，有过挫折和坎坷，但更多的收获和感恩，感谢我的导师雷霁霖院士和郝振林老师的关怀和悉心指导，以及其他老师、师兄师姐、同学、朋友的帮助和支持。

首先，感谢我的导师雷霁霖院士和郝振林老师对我的培养和教导，导师渊博的学术知识、开阔的学术眼光、严谨的治学态度、忘我的工作热情、高尚的人格时刻激励着我，感染着我，是我在人生路上前进的指路明灯。在研究生阶段的学习和生活中，导师给予了我无私的帮助和谆谆教诲，给我提供了十分良好的科研学习平台，让我受益匪浅。在此，向我的导师表达最诚挚的谢意。

感谢洪磊老师在我实验研究过程中、论文写作以及生活中所提供的帮助和指导。

感谢黄海水产研究所鱼类室和大连海洋大学重点实验室的各位老师、师兄师姐、同学对我的帮助，他们是刘新富老师、高淳仁老师、丁福红、刘滨、孟振、贾玉东、牛化欣、王峰、韩明明、曾霖、高小强、胡鹏、王国栋、甘玲玲、乔玮、韩建、臧坤、黄亮华、于洋洋、田晓飞、王双耀。

感谢我挚爱的父亲、母亲、哥哥、姐姐以及所有关爱我的家人、朋友，感谢他们在我求学路上给我的理解、支持和鼓励。

也要感谢曾经遇到，带给我欢乐、带给我伤感的人。

最后，再次向所有给予我关心、帮助和鼓励的老师、家人、同学和朋友致以我最诚挚的感谢。