نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲
ص ۱۷۷-۱۹۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۷/۱۷

تخلیص ویتلوژنین فیل‌ماهی (*Huso huso*) با استفاده از روش ترکیبی رسوب‌دهی انتخابی ($EDTA\text{-}Mg^{2+}$) و استخراج از ژل

❖ **مهدی پاک‌طینت:** فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران
❖ **باقر مجازی امیری:** استاد گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران
❖ **حمید فرحمند:** دانشیار گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران
❖ **مهوش خدابنده*:** استادیار گروه صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ایران

چکیده

ویتلوژنین یک گلیکو فسفو لیپو پروتئین پیش‌ساز پروتئین‌های زرده است که نقش اصلی را در مرحلهٔ زرده‌سازی بر عهده دارد. سطوح این پروتئین در ماهیان نابالغ و جنسیت نر به‌منزلهٔ شاخص مواجههٔ ماهی با ترکیبات اخلال‌گر سیستم درون‌ریز استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه شناسایی و تخلیص ویتلوژنین فیل‌ماهی (Huso huso) با استفاده از روش رسوب‌دهی انتخابی و استخراج از ژل است. در مطالعهٔ حاضر، نمونه‌های پلاسمای مورد نیاز از فیل‌ماهیان ماده در مرحلهٔ زرده‌سازی تهیه و ویتلوژنین با استفاده از ویژگی‌های خاص این پروتئین (محدودهٔ وزن مولکولی، اختصاصی‌بودن برای جنسیت ماده، قابلیت القا از طریق استروژن‌ها، رسوب این پروتئین در حضور EDTA، همچنین واکنش اختصاصی با آنتی‌بادی ویتلوژنین فیل‌ماهی) شناسایی شد. ویتلوژنین فیل‌ماهی با استفاده از روش‌های رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین ($EDTA\text{-}Mg^{+2}$) و استخراج از ژل preparative با درصد خلوص بالا تخلیص شد. نتایج فرایند تخلیص این پروتئین را در شرایط احیایی به صورت یک باند منفرد و با وزن مولکولی حدود ۲۰۰ KDa نشان داد. بر اساس نتایج، روش ترکیبی رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین و استخراج از ژل preparative کارایی بسیار مناسبی در شناسایی و تخلیص ویتلوژنین فیل‌ماهی دارد.

واژگان کلیدی: استخراج از ژل، تخلیص، رسوب‌دهی انتخابی، زرده‌سازی، فیل‌ماهی، ویتلوژنین.

* نویسندهٔ مسئول تلفن: ۰۲۱۴۴۵۸۰۳۵۵ دورنگار: ۰۲۱۴۴۵۸۰۳۹۹
Email: Saba@nigeb.ac.ir

۱. مقدمه

فیل‌ماهی (*Huso huso*) از گونه‌های بسیار باارزش کشور و حتی دنیا به شمار می‌آید و از لحاظ اقتصادی، زیست‌محیطی، و تکاملی دارای اهمیت درخور توجهی است. اهلی‌شدن سریع و آسان، پذیرش زندگی در اسارت، سازگاری بسیار خوب به غذاهای مصنوعی، و رشد سریع سبب شده است تا این گونه گزینهٔ بسیار مناسبی برای آبزی‌پروری محسوب شود، اما خصوصیات اکوفیزیولوژیک منحصر به فرد این گونه سبب شده است مشکلاتی در مسیر رسیدگی جنسی و تکامل گنادی این ماهی بروز کند، که واقع‌نشدن یا تکمیل‌نشدن مرحلهٔ زرده‌سازی مهم‌ترین و بارزترین ناهنجاری تولیدمثلی این گونه به شمار می‌رود (Mylonas and Zohar, 2007). بروز این ناهنجاری یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکنندهٔ توسعهٔ تکثیر و پرورش مصنوعی این گونه است.

مرحلهٔ زرده‌سازی طولانی‌ترین مرحلهٔ رشد تخمدانی فیل‌ماهی است که وابستگی کامل به تولید و تجمع پروتئین ویتلوژنین دارد. در جانوران تخم‌گذار، تکامل جنین وابسته به وجود ذخایر غذایی تخم است که طی مرحلهٔ زرده‌سازی و به صورت عمده با تجمع پروتئین پلاسما به نام ویتلوژنین اتفاق می‌افتد. ویتلوژنین یک گلیکو فسفو لیپو پروتئین است که تحت تأثیر استروئیدهای جنسی که اغلب ۱۷ بتا- استرادیول است در کبد تولید می‌شود (Tufail and Takeda, 2008). در سلول‌های کبدی، پلی‌پپتید ویتلوژنین تحت فرایند فسفریلاسیون، گلیکوزیلاسیون، و لیپیداسیون قرار می‌گیرد و برای انتقال به تخمدان به درون خون ترشح می‌شود (Mommsen and Walsh, 1988).

در کنار اهمیت درخور توجه ویتلوژنین در تأمین منابع غذایی و انرژی لازم برای تکامل جنین، این پروتئین از جنبه‌های دیگر نیز دارای اهمیت شایان توجهی است. ژن ویتلوژنین در هر دو جنسیت نر و ماده موجودات تخم‌گذار وجود دارد، اما در شرایط طبیعی این پروتئین تنها در جنسیت ماده ساخته می‌شود که دارای سطوح بالایی از هورمون‌های استروژنی از جمله ۱۷ بتا- استرادیول است. اختصاصی‌بودن ویتلوژنین برای جنسیت ماده و حساسیت بالای ژن‌های بیان‌کنندهٔ این پروتئین به استروژن‌ها سبب می‌شود بررسی سطوح ویتلوژنین در جنسیت نر و ماهیان نابالغ به صورت گسترده به‌منزلهٔ نشانگری زیستی برای مطالعهٔ آلاینده‌های اخلال‌گر سیستم درون‌ریز استفاده شود (Matozzo *et al.*, 2008).

علاوه بر این، ویتلوژنین در سامانهٔ ایمنی غیر اختصاصی بسیاری از موجودات نقش‌هایی را در برابر عوامل باکتریایی، ویروسی، و قارچی ایفا می‌کند (Zhang *et al.*, 2010). برای مثال، در رزی بارب (*Puntius conchonius*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) فعالیت ضد میکروبی این پروتئین به اثبات رسیده است (Shi *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). با این حال، پیچیدگی و اهمیت این پروتئین به اندازه‌ای است که عملکرد آن به این موارد نیز محدود نمی‌شود و برای این پروتئین نقش‌های دیگری نیز در سایر موجودات مشخص شده است. برای مثال، نقش این پروتئین در سازمان‌دهی اجتماعی، تنظیم پویایی‌شناسی هورمونی، و تغییر در پاسخ‌دهی حس چشایی در زنبور عسل به اثبات رسیده است (Amdam *et al.*, 2003; Amdam *et al.*, 2006; Guidugli *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2007). در نماتودها (*Caenorhabditis elegans*)

نیز عملکرد آنتی‌اکسیدانی ویتلوژنین تأیید شده است (Nakamura *et al.*, 1999).

همهٔ موارد ذکرشده نشان‌دهندهٔ اهمیت درخور توجه این پروتئین در بسیاری از سامانه‌های زیستی فیل‌ماهی و سایر موجودات تخم‌گذار است و این پروتئین در تحقیقات زیستی بسیاری شناسایی و مطالعه شده است. به همین دلیل دسترسی به روش‌های بهینه‌سازی‌شدهٔ تخلیص ویتلوژنین در موجودات گوناگون، که از بنیادی‌ترین و ضروری‌ترین بخش‌های تحقیقاتی مورد نیاز به حساب می‌آید، در اولویت برنامه‌های تحقیقاتی مرتبط با این پروتئین قرار دارد.

چندین شیوهٔ تخلیص بر پایهٔ خواص فیزیک‌وشیمیایی این پروتئین خاص برای جداسازی ویتلوژنین طراحی شده است. اولتراسانتریفیوژ (Redshaw and Follett, 1971)، کروماتوگرافی تعویض یونی (Norberg and Haux, 1985)، و ژل فیلتراسیون (Specker and Sullivan, 1994) از روش‌های رایج مورد استفاده در تخلیص ویتلوژنین‌اند. با وجود کارایی این روش‌ها در جداسازی ویتلوژنین گونه‌های مختلف، این روش‌ها بسیار پرهزینه و وقت‌گیرند و تخلیص سطوح پایین ویتلوژنین با استفاده از این روش‌ها به‌سادگی امکان‌پذیر نیست. علاوه بر این، تنوع بالا در تغییرات پس از ترجمهٔ این پروتئین، همچون فسفریلاسیون و لیپیداسیون، در بعضی از گونه‌ها منجر به رفتار غیر طبیعی این پروتئین در ستون‌های کروماتوگرافی خواهد شد. به همین دلیل دسترسی به یک روش تخلیص کارامد، ساده و کم‌هزینه برای تخلیص ویتلوژنین ضروری است. به همین منظور، این تحقیق با هدف بررسی کارایی روش ترکیبی رسوب‌دهی انتخابی ($EDTA\text{-}Mg^{2+}$) و استخراج از ژل Preparative برای تخلیص ویتلوژنین طراحی و اجرا شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیهٔ نمونه‌های پلاسمای مورد نیاز

نمونه‌های پلاسمای مورد نیاز از فیل‌ماهیان پرورشی مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید رجایی ساری تهیه شد. به منظور نمونه‌گیری از ماهیان ماده، نخست مرحلهٔ تولیدمثلی و وضعیت تکامل گنادی ماهی بر اساس بیوپسی انجام‌گرفته در مزرعه بررسی شد سپس، از مولدین ماده‌ای که در مرحلهٔ زرده‌سازی بودند خون‌گیری انجام شد. از پلاسمای فیل‌ماهیان نر وحشی موجود در مزرعه نیز به‌منزلهٔ نمونهٔ کنترل استفاده شد. علاوه بر این، چهار فیل‌ماهی نر نابالغ با ۵ mg/kg هورمون ۱۷ بتا- استرادیول به صورت محلول در اتانول و روغن کرچک در یک نوبت تزریق شدند و پس از هفت روز از این ماهیان خون‌گیری شد تا از نمونه‌های به‌دست‌آمده در شناسایی ویتلوژنین استفاده شود. خون‌گیری از محل پشت بالهٔ مخرجی و از سرخرگ دمی انجام شد و نمونه‌های به‌دست‌آمده در لوله‌های حاوی هپارین نگه‌داری شدند. نمونه‌ها در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد برای به‌دست‌آوردن پلاسما سانتریفیوژ شدند و پس از اضافه‌کردن آنتی پروتئاز آپروتینین (۰/۲ TIU/ml) به آنها با نگه‌داری در دمای $4 \leq {}^{\circ}C$ به آزمایشگاه منتقل شدند و پس از تقسیم نمونه‌های به‌دست‌آمده به حجم‌های ۰/۵ میلی‌لیتری تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

۲.۲. شناسایی ویتلوژنین فیل‌ماهی

شناسایی ویتلوژنین از میان پروتئین‌های پلاسما با

الکتروفورز نمونه‌ها در حضور SDS بر اساس روش Laemmli (1970) انجام شد. پس از پایان الکتروفورز، پروتئین‌های پلاسما با رنگ‌آمیزی از طریق کوماسی آبی (G250) رؤیت‌پذیر شدند و باندها با نشانگرهای وزن مولکولی مقایسه شدند. در این قسمت ویتلوژنین با درنظرگرفتن محدودهٔ وزن مولکولی (۱۶۰ تا ۲۰۰ kDa) (Denslow *et al.,* 1999)، اختصاصی‌بودن برای جنسیت ماده (Hiramatsu *et al.,* 2006)، قابلیت القا با استروژن‌ها (Hiramatsu *et al.,* 2002a)، رسوب‌کردن از طریق $EDTA\text{-}Mg^{+2}$ (Wiley *et al.,* 1979)، و واکنش اختصاصی باند شناسایی‌شده با آنتی‌بادی ویتلوژنین فیل‌ماهی شناسایی شد.

۳.۲. وسترن بلات

به منظور بررسی واکنش اختصاصی پروتئین شناسایی‌شده به‌منزلهٔ ویتلوژنین با آنتی‌بادی اختصاصی این پروتئین از آزمون وسترن بلات بر اساس روش Dunbar (1994) استفاده شد. نخست، باندهای پروتئینی با الکتروفورز نمونه‌ها از هم تفکیک شدند سپس، انتقال باندهای پروتئینی از ژل به غشای PVDF در شدت جریان ثابت ۸۶ میلی‌آمپر به مدت یک شب صورت گرفت. پس از انتقال پروتئین‌ها به غشا، جایگاه‌های اتصال پروتئین غشا با استفاده از محلول ۳ درصد BSA در بافر شست‌وشو به مدت ۲ ساعت مسدود شد. در ادامه آنتی‌بادی پلی‌کلونال ویتلوژنین فیل‌ماهی (Rabbit anti beluga vitellogenin) به نسبت ۱:۲۰۰۰ در آلبومین سرم گاوی ۱/۵ درصد به مدت ۲ ساعت و آنتی‌بادی ثانویه (HRP-labelled secondary antibody) به نسبت ۱:۲۰۰۰ در بافر شست‌وشو نیز به مدت ۲ ساعت روی غشا تیمار شدند. در نهایت پس از این مراحل غشا سه مرتبه با بافر شست‌وشو شسته شد و واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی با افزودن سوبسترا (4-Chloro-1-naphthol 0.03%) و ۱۵ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۵ درصد بررسی شد.

۴.۲. استفاده از روش ترکیبی رسوب‌دهی انتخابی $EDTA\text{-}Mg^{+2}$ و Gel Preparative برای تخلیص ویتلوژنین

به منظور رسوب‌دهی ویتلوژنین موجود در نمونه‌های پلاسما، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر پلاسما با EDTA 20 mM pH 7.7 ۲ میلی‌لیتر به‌آرامی مخلوط و با اضافه‌کردن ۰/۱ میلی‌لیتر محلول $MgCl_2$ 0.5 M رسوب ویتلوژنین آغاز شد. این محلول پس از چند دقیقه ساکن‌ماندن برای ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و رسوب ویتلوژنین از مایع رویی آن کاملاً جدا شد. در ادامه رسوب حاوی ویتلوژنین در محلول NaCl 1 M, Tris-Cl 50 mM pH 7.7 به‌آرامی حل شد. در مرحلهٔ بعد به منظور جداکردن اجزای نامحلول نمونهٔ به‌دست‌آمده به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. نمونهٔ به‌دست‌آمده از این مرحله حاوی ویتلوژنین و آلبومین بود که در ادامه برای جداسازی ویتلوژنین از آلبومین از الکتروفورز نمونهٔ به‌دست‌آمده در ژل Preparative استفاده شد. در این روش، پس از منتقل‌کردن قالب حاوی ژل به تانک الکتروفورز مقدار ۱ میلی‌لیتر نمونهٔ به‌دست‌آمده از مرحلهٔ رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین ($EDTA\text{-}Mg^{+2}$)، پس از حل‌شدن در ۱۲۵ میکرولیتر حلال نمونه (6X) و جوشاندن، در محل نمونه،

بارگذاری شد. علاوه بر نمونهٔ اصلی، از نشانگر وزن مولکولی نیز برای ردیابی ویتلوژنین استفاده شد. پس از پایان الکتروفورز در ولتاژ ۱۲۰ ولت، باند مربوط به ویتلوژنین ردیابی شد و با مشخص‌شدن مکان باند مربوط به ویتلوژنین این باند به همراه باندهای مجاور جدا شدند. سپس نوارهای جداشده حاوی باندهای مورد نظر به صورت جداگانه در ۳ میلی‌لیتر بافر تریس (50 mM Tris-Base, pH: 8) به صورت کامل از طریق هموژنایزر دستی له شد. در ادامه محلول‌های تهیه‌شده از هر نوار، درون فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و به مدت یک شب روی دستگاه شیکر قرار گرفتند. روز بعد محتویات هر فالکون به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و پس از جداشدن مایع رویی، به منظور بررسی میزان خلوص و غلظت ویتلوژنین در هر یک از نمونه‌ها، از روش الکتروفورز در حضور SDS استفاده شد.

۳. نتایج

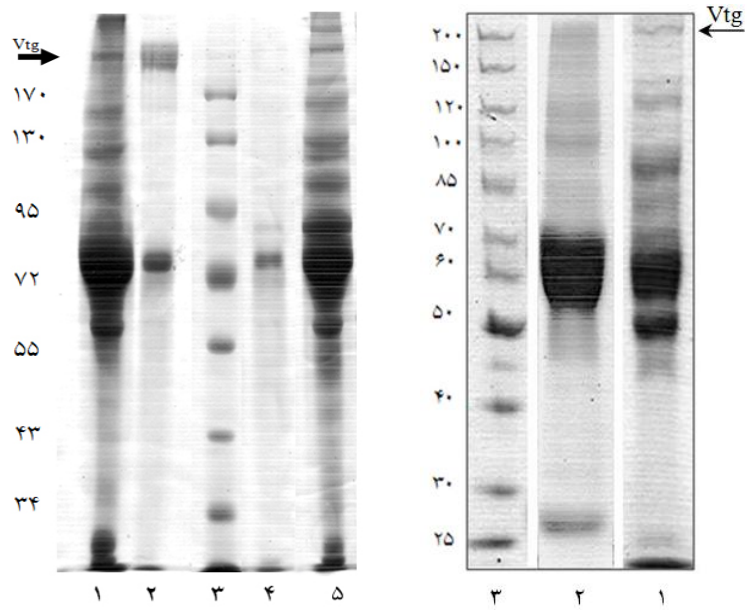
۱.۳. الکتروفورز نمونه‌های پلاسما و شناسایی ویتلوژنین

الکتروفورز نمونه‌های پلاسما به منظور شناسایی و بررسی حضور ویتلوژنین در نمونه‌های پلاسما صورت گرفت. نتایج الکتروفورز نمونه‌ها باندی را در محدودهٔ وزنی ۲۰۰ kDa (محدودهٔ وزن مولکولی مونومرهای ویتلوژنین) در نمونه‌های پلاسمای جنسیت ماده نشان داد که بر اساس خصوصیات ویتلوژنین به‌منزلهٔ ویتلوژنین فیل‌ماهی شناسایی شد. بر اساس شکل ۱. الف این باند تحرک کمی در شرایط الکتروفورز دارد و وزن مولکولی آن در حالت احیایی بسیار بالا (۲۰۰ kDa) است. اختصاصی‌بودن این پروتئین برای جنسیت ماده از دیگر خصوصیات ویتلوژنین بود که بر اساس شکل ۱. الف پروتئین مورد نظر تنها در نمونه‌های پلاسمای جنسیت ماده وجود دارد. نتایج روش رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین ($EDTA\text{-}Mg^{+2}$) نیز اختصاص باند مورد نظر به ویتلوژنین فیل‌ماهی را اثبات می‌کند (شکل ۱ الف).

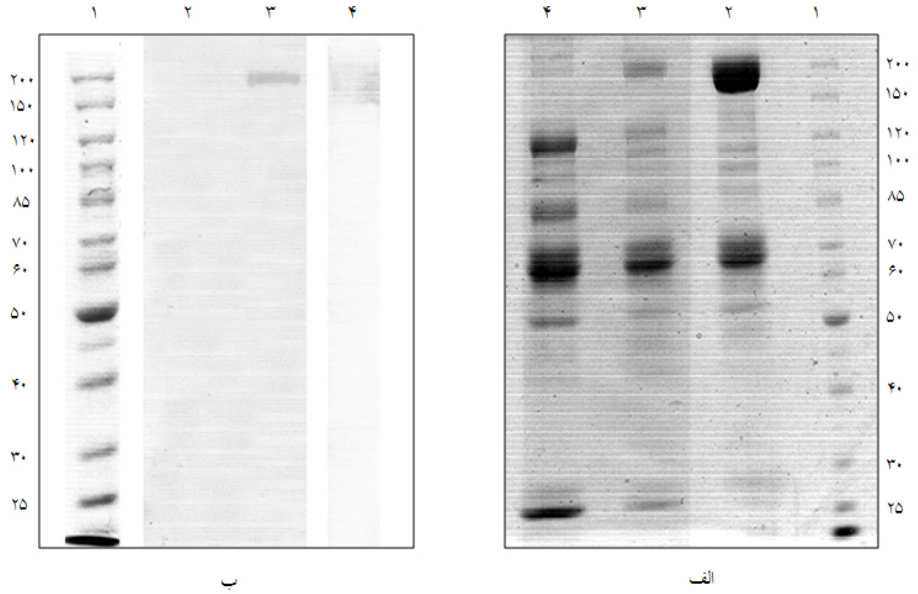
نتایج بررسی قابلیت القای این پروتئین با استروژن‌ها نیز در شکل ۱. ب ارائه شده است که نشان‌دهندهٔ توانایی استروژن‌ها در تحریک ساخت این پروتئین است. در نهایت بررسی واکنش اختصاصی باند شناسایی‌شده به‌منزلهٔ ویتلوژنین با آنتی‌بادی این پروتئین صحت این روش را تأیید کرد (شکل ۲).

۲.۳. وسترن بلات

در آزمون وسترن بلات که به منظور بررسی فعالیت اختصاصی آنتی‌بادی ویتلوژنین فیل‌ماهی با پروتئین تخلیص‌شده انجام گرفت نتیجهٔ مطلوبی کسب شد. با توجه به شکل ۲، آنتی‌بادی اختصاصی ویتلوژنین فیل‌ماهی با پروتئین تخلیص‌شده واکنش درخور توجهی نشان داد و هیچ واکنش غیر اختصاصی بین آنتی‌بادی و دیگر پروتئین‌های پلاسما همچنین، پروتئین‌های پلاسمای جنسیت نر مشاهده نشد. نتایج نشان‌دهندهٔ شناسایی صحیح ویتلوژنین و کارایی روش‌های شناسایی به‌کار گرفته‌شده است. از دیگر نتایج وسترن بلات کارایی بسیار مناسب روش رسوب‌دهی انتخابی در شناسایی ویتلوژنین و افزایش غلظت آن در نمونه‌هاست.



شکل ۱. الف) ژل SDS-PAGE 7.5% نمونه‌های حاصل از رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین؛ ۱- نمونهٔ پلاسمای ماده قبل از رسوب‌دهی؛ ۲- نمونهٔ رسوب‌داده‌شدهٔ پلاسمای ماده؛ ۳- نشانگر وزن مولکولی (kDa)؛ ۴- نمونهٔ رسوب‌داده‌شدهٔ پلاسمای نر؛ ۵- نمونهٔ پلاسمای نر قبل از رسوب‌دهی. ب) ژل SDS-PAGE 7.5% نمونه‌های پلاسمای فیل‌ماهی در پاسخ به تزریق ۱۷بتا- استرادیول؛ ۱- نشانگر وزن مولکولی (kDa)؛ ۲- نمونهٔ پلاسما قبل از تزریق ۱۷بتا- استرادیول؛ ۳- نمونهٔ پلاسما بعد از تزریق ۱۷بتا- استرادیول.



شکل ۲. نتایج واکنش اختصاصی ویتلوژنین تخلیص‌شده با آنتی‌بادی ویتلوژنین فیل‌ماهی در وسترن بلات. الف) الکتروفورز نمونه‌های پلاسمای فیل‌ماهی؛ ۱- نشانگر وزن مولکولی؛ ۲- نمونهٔ رسوب‌داده‌شدهٔ ویتلوژنین فیل‌ماهی؛ ۳- نمونهٔ پلاسمای فیل‌ماهی ماده؛ ۴- نمونهٔ پلاسمای فیل‌ماهی نر. ب) وسترن بلات حاصل از واکنش آنتی‌بادی با پلاسمای فیل‌ماهی در مرحلهٔ زرده‌سازی؛ ۱- نشانگر وزن مولکولی؛ ۲- نمونهٔ پلاسمای جنسیت نر؛ ۳- نمونهٔ پلاسمای جنسیت ماده؛ ۴- نمونهٔ رسوب‌داده‌شدهٔ ویتلوژنین.

۳.۳. جداسازی ویتلوژنین از طریق رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین با کاتیون‌های دو ظرفیتی ($EDTA\text{-}Mg^{2+}$)

در مرحلهٔ نخست تخلیص ویتلوژنین، از روش رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین به منظور افزایش سطح ویتلوژنین در نمونه‌ها و تخلیص نسبی استفاده شد. بر اساس شکل ۱. الف این مرحله نسبت به ویتلوژنین فیل‌ماهی به صورت تقریباً اختصاصی عمل می‌کند و تنها حضور مقادیری آلبومین در کنار ویتلوژنین مشاهده‌شدنی است. آلبومین موجود در نمونه‌های به‌دست‌آمده در مرحلهٔ بعد و با استفاده از روش استخراج پروتئین از ژل Preparative از ویتلوژنین جدا خواهد شد.

کارایی روش رسوب‌دهی انتخابی در افزایش سطح ویتلوژنین در نمونه‌ها با استفاده از تصویر حاصل از الکتروفورز نمونه‌های حاصل از رسوب‌دهی (شکل ۱. الف) و با نرم‌افزار AlphaEase FC version 6.0.0 ارزیابی شد که نتایج آن در جدول ۱ مشاهده می‌شود. بر اساس نتایج، استفاده از این روش سطح ویتلوژنین در نمونهٔ اولیه را از ۵/۵ درصد به ۴۰/۵ درصد از پروتئین‌های نمونه افزایش داده است. این روش منجر به افزایش ۷/۳۶ برابری سطح ویتلوژنین در نمونهٔ اولیه شد که تخلیص نهایی این پروتئین را ساده‌تر خواهد کرد.

جدول ۱. بررسی کارایی روش رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین در افزایش سطح ویتلوژنین در نمونه‌ها. لاین یک مربوط به آنالیز نمونه‌ها پیش از رسوب‌دهی و لاین دو مربوط به بعد از رسوب‌دهی است. داده‌های مرتبط به ویتلوژنین با نقطه‌چین مشخص شده است.

Lane: 1

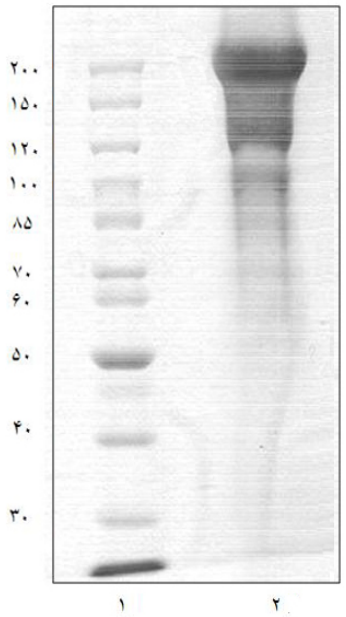
Lane	Peak	Dist	Width	Height	Area	%	Rf	Adj. Rf	Calc. M
1	1	21	22	132	2101	17.7	0.0360	0.0360	N/A
1	2	56	12	71	652	5.5	0.0959	0.0959	199.23
1	3	79	8	20	106	.9	0.1353	0.1353	181.54
1	4	110	15	55	604	5.1	0.1884	0.1884	155.78
1	5	133	11	27	253	2.1	0.2277	0.2277	135.33
1	6	147	12	50	533	4.5	0.2517	0.2517	125.88
1	7	171	10	6	44	.4	0.2928	0.2928	113.53
1	8	191	14	41	373	3.2	0.3271	0.3271	103.24
1	9	209	12	23	208	1.8	0.3579	0.3579	94.28
1	10	222	13	39	401	3.4	0.3801	0.3801	89.61
1	11	258	9	48	358	3.0	0.4418	0.4418	76.67
1	12	323	10	41	264	2.2	0.5531	0.5531	58.40
1	13	343	9	5	26	.2	0.5873	0.5873	54.01
1	14	387	11	60	560	4.7	0.6627	0.6627	47.80
1	15	438	12	32	369	3.1	0.7500	0.7500	40.99
1	16	449	10	43	385	3.3	0.7688	0.7688	39.68
1	17	468	18	67	1114	9.4	0.8014	0.8014	37.43
1	18	525	9	128	1075	9.1	0.8990	0.8990	N/A
1	19	530	8	120	884	7.5	0.9075	0.9075	N/A
1	20	542	18	95	1528	12.9	0.9281	0.9281	N/A

Lane: 2

Lane	Peak	Dist	Width	Height	Area	%	Rf	Adj. Rf	Calc. M
2	1	56	11	110	1033	40.4	0.0959	0.0959	199.23
2	2	257	10	162	1522	59.6	0.4401	0.4401	77.03

۴.۳. استفاده از روش Gel preparative برای تخلیص نهایی ویتلوژنین فیل‌ماهی

پس از تخلیص اولیهٔ ویتلوژنین با استفاده از روش رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین، نمونه‌های حاصل به منظور تخلیص نهایی روی ژل Preparative الکتروفورز شدند. پس از پایان الکتروفورز، باند مربوط به ویتلوژنین مطابق روش ارائه‌شده تحت فرایند استخراج پروتئین قرار گرفت که نتایج الکتروفورز نمونه‌های به‌دست‌آمده از این مرحله در شکل ۳ مشاهده می‌شود. با توجه به شکل ۳ مشخص است که این روش توانایی کاملاً مناسبی در تخلیص ویتلوژنین دارد. حضور باندهایی در مجاورت باند مربوط به ویتلوژنین در شکل ۳ به احتمال قریب به یقین پپتیدهای حاصل از تجزیهٔ ویتلوژنین طی دو مرحلهٔ الکتروفورز در حضور عوامل احیاکننده است.



شکل ۳. ژل SDS-PAGE 7.5% نمونه‌های تخلیص‌شده با استفاده از روش ترکیبی رسوب‌دهی انتخابی و استخراج از ژل preparative. ۱- نشانگر وزن مولکولی (kDa)؛ ۲- نمونهٔ ویتلوژنین تخلیص‌شده.

از دلایل ارائهٔ چنین ادعایی روش به‌کار گرفته‌شده در قسمت استخراج از ژل Preparative است، زیرا در این قسمت تنها باند موجود در محدودهٔ kDa ۲۰۰ از ژل جدا شد و امکان وجود ناخالصی‌هایی در محدودهٔ وزنی ۱۳۰ و kDa ۱۰۰ در پروتئین‌های استخراج‌شده بعید است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه که با هدف بررسی کارایی روش ترکیبی رسوب‌دهی انتخابی و استخراج از ژل Preparative در تخلیص ویتلوژنین فیل‌ماهی انجام گرفت، ویتلوژنین فیل‌ماهی با خلوص بالا و کارایی قابل قبول تخلیص شد.

استفاده از روش‌هایی چون کروماتوگرافی تعویض آنیونی و ژل فیلتراسیون، به‌رغم کارایی که می‌تواند در تخلیص این پروتئین داشته باشد، بسیار پرهزینه است و دشواری‌های متعددی دارد. به همین دلیل، روش‌های دیگری نیز با توجه به خصوصیات ویژهٔ ویتلوژنین به منظور جداسازی و تخلیص این پروتئین ارائه شده است. این روش که برای اولین‌بار به منظور تخلیص ویتلوژنین استفاده شد معایب روش‌های کروماتوگرافی را نداشت و کارایی قابل قبولی در تخلیص ویتلوژنین نشان داد.

۱.۴. بررسی نتایج الگوی پروتئینی نمونه‌های پلاسما

به منظور بررسی الگوی پروتئینی نمونه‌ها با توجه به سطح پایین ویتلوژنین موجود در نمونه‌ها، سطح بالای چربی در نمونه‌های پلاسما، و دسترسی‌نداشتن به سیستم‌های الکتروفورز دارای شیب غلظت

اکریلامید از رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین پیش از الکتروفورز نمونه‌ها در حضور SDS استفاده شد. استفاده از این روش شناسایی ویتلوژنین و بررسی الگوی پروتئینی نمونه‌های پلاسما را بسیار ساده‌تر کرد و، به دلیل حذف مقادیر درخور توجهی از پروتئین‌ها و عوامل مزاحم، نتیجهٔ رضایت‌بخشی به دست آمد (شکل ۱. الف).

۲.۴. شناسایی ویتلوژنین در نمونه‌های پلاسما

پس از تأیید کارایی روش رسوب‌دهی انتخابی در بررسی الگوی پروتئینی نمونه‌های پلاسمای مورد مطالعه، شناسایی باند ویتلوژنین در الگوهای پروتئینی به‌دست‌آمده با بررسی هم‌پوشانی چهار شیوه در تشخیص ویتلوژنین، و در نهایت بررسی واکنش اختصاصی باند شناسایی‌شده به‌منزلهٔ ویتلوژنین با آنتی‌بادی اختصاصی این پروتئین، انجام شد. ۱- محدودهٔ وزن مولکولی ویتلوژنین در دامنه‌ای است که پروتئین‌های بسیار نادری در این محدوده قرار دارند. محدودهٔ وزن مولکولی ۱۶۰kDa تا ۲۰۰ (Denslow *et al.*, 1999)، با توجه به شباهت‌های ساختاری بین‌گونه‌ای زیادی که در این پروتئین وجود دارد، تکرارشدنی است. علاوه بر این، در صورتی که پروتئینی در این محدودهٔ وزن مولکولی قرار گیرد هیچ‌گاه به سطوح پیش‌بینی‌پذیر برای ویتلوژنین نخواهد رسید. به همین دلیل از وزن مولکولی منحصر به فرد ویتلوژنین، به‌منزلهٔ یک عامل شناسایی مهم استفاده شد. ۲- ویتلوژنین پروتئینی مختص جنسیت ماده است که در شرایط طبیعی تنها در ماهیان ماده و در مرحلهٔ زرده‌سازی دیده می‌شود و در هیچ‌یک از مراحل زیست ماهیان نر دیده نمی‌شود (Denslow *et al.*, 1999). به همین منظور، مقایسهٔ نمونه‌های به‌دست‌آمده از فیل‌ماهی نر وحشی با نمونه‌های به‌دست‌آمده از فیل‌ماهیان ماده در مرحلهٔ زرده‌سازی حضور باندی را در نمونه‌های فیل‌ماهی ماده نشان داد که در نمونهٔ شاهد (نر) وجود نداشت. این موضوع احتمال اختصاص این باند به ویتلوژنین را افزایش داد. ۳- ویتلوژنین از پروتئین‌های القاشدنی با استروژن‌هاست (Tolar *et al.*, 2001). بر همین اساس، تعداد چهار عدد فیل‌ماهی نر نابالغ تحت تزریق ۱۷بتا- استرادیول قرار گرفتند و این تزریق منجر به تولید دو پروتئین مختلف و تغییراتی در سطوح دیگر پروتئین‌های پلاسما شد. یکی از پروتئین‌های القاشده با وزن مولکولی ۲۰۰ kDa (درست مطابق با وزن مولکولی باند مربوط به ویتلوژنین) و دیگری با وزن مولکولی حدود ۶۰ kDa (احتمالاً کوریوژنین) بود (شکل ۱. ب). بر این اساس، بار دیگر اختصاص این باند به ویتلوژنین، به دلیل قابلیت القا از طریق استروژن‌ها، تأیید شد. ۴- ویتلوژنین پروتئینی منحصر به فرد و دارای خصوصیات ویژه‌ای در مقایسه با دیگر پروتئین‌هاست. یکی از این خصوصیات ویژه اتصال مقادیر درخور توجهی یون کلسیم به این پروتئین است. این موضوع سبب شده است تا امکان رسوب‌دهی انتخابی این پروتئین با استفاده از عواملی همچون EDTA امکان‌پذیر شود (Hiramatsu *et al.*, 2006). استفاده از این روش رسوب‌دهی انتخابی برای ویتلوژنین سبب رسوب‌یافتن ویتلوژنین می‌شود. به همین دلیل، به‌کارگیری این روش رسوب‌دهی برای نمونه‌های پلاسمای نر و ماده موجب مشخص‌شدن ویتلوژنین از سایر پروتئین‌ها خواهد

شد. البته پروتئین آلبومین نیز از لحاظ اتصال به کلسیم دارای مشابهت ساختاری با ویتلوژنین بود و به همراه ویتلوژنین رسوب کرد. در این‌جا نیز اختلاف درخور توجهی که در وزن مولکولی این دو پروتئین وجود دارد (آلبومین با وزن مولکولی حدود ۷۰ kDa و ویتلوژنین با وزن مولکولی حدود ۲۰۰ kDa) به‌سادگی این دو پروتئین را از هم تفکیک کرد. این آزمایش نیز روی نمونه‌های پلاسما انجام شد و نتایجْ اختصاص باند درنظر گرفته‌شده را به ویتلوژنین تأیید کرد. نتایج این فرایند با مقایسهٔ نتایج نمونه‌های نر و ماده بیشتر تأیید شد (شکل ۱. الف).

در نهایت، استفاده از این چهار شیوه در تشخیص صحیح ویتلوژنین و هم‌پوشانی کامل نتایج و تطابق نتایج با نتایج وسترن بلات (شکل ۲) منجر به شناسایی ویتلوژنین در الگوهای پروتئینی به‌دست‌آمده شد. استفاده از این شاخص‌ها، که کارایی آنها در شناسایی صحیح ویتلوژنین در این مطالعه نیز به اثبات رسید، در مطالعات گوناگونی (Tolar *et al.,* 2001; Nishi *et al.,* 2002) برای شناسایی ویتلوژنین استفاده شده است.

باند ویتلوژنین شناسایی‌شده در شرایط احیایی دارای وزن مولکولی ۲۰۰ kDa بود که با استفاده از روش تطابق نقطه‌ای با نشانگرهای وزن مولکولی موجود در ژل تعیین شد. این وزن مولکولی با وزن مولکولی ویتلوژنین گونه‌های مشابه هم‌خوانی دارد. برای مثال، وزن مولکولی ویتلوژنین تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) در شرایط احیایی تعیین شد و دو پلی‌پپتید با وزن مولکولی ۱۹۰ و ۲۱۰ kDa شناسایی شد (Linares-Casenave *et al.,* 2003). وزن مولکولی ویتلوژنین تاسماهی آمور (*Acipenser schrenckii*) ۲۰۵ kDa (Zhang *et al.,* 2011)، گربه‌ماهی دوتنفسه (*Clarias gariepinus*) ۲۰۰ kDa (Manohar *et al.,* 2005)، ماهی قنات سرچرب (*Pimephales promelas*) ۱۵۶ kDa (Parks *et al.,* 1999)، برای ماهی بستر (*Huso huso*×*Acipenser ruthenus*) به صورت دو باند ۱۸۰ kDa و ۱۲۰ kDa (Hiramatsu *et al.,* 2002b) و ۱۵۴ kDa برای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) گزارش شده است (Watts *et al.,* 2003).

۳.۴. بررسی نتایج تخلیص ویتلوژنین

ویتلوژنین از پروتئین‌های حساس به تجزیهٔ پروتئولیتیک است و این حساسیت حتی در حضور عوامل آنتی‌پروتئاز نیز تا حدودی دیده می‌شود (Denslow *et al.,* 1999)، به همین دلیل، کاهش زمان تخلیص از مسائل اساسی در افزایش کارایی سیستم‌های تخلیص به حساب می‌آید. وجود چنین حساسیت‌هایی در کارکردن با ویتلوژنین سبب افزایش استفاده از روش‌های سریع و آسانی چون رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین شده است.

به طور کلی عملکرد این روش بر پایهٔ رسوب ویتلوژنین از طریق Mg^{+2} در حضور EDTA است. در این‌جا نقش اصلی را گروه فسفات متصل به دامنهٔ فسویتین ویتلوژنین بر عهده دارد. بر اساس مشاهدات انجام‌گرفته، اندازهٔ دامنهٔ فسویتین و در نهایت میزان فسفریلاسیون و محتوای کلسیم ویتلوژنین در مهره‌داران تکامل‌یافته بیشتر از مهره‌داران اولیه است (Wahli, 1988)، همین موضوع باعث کارایی پایین این روش در تخلیص ویتلوژنین ماهیان می‌شود

Specker and Sullivan, 1994; Magalhaes *et al.*, 2004). علاوه بر این، وجود مقادیر اندک ویتلوژنین در سرم کارایی این روش را در تخلیص ویتلوژنین کمتر می‌کند و این روش در شرایطی که سطوح درخور توجهی از ویتلوژنین در سرم وجود دارد برای تخلیص ویتلوژنین مناسب است (Norberg and Haux 1985). حضور سطوح شایان توجه گروه‌های فسفات در ویتلوژنین بعضی از گونه‌ها، همچون ماهیان خاویاری، استفاده از روش رسوب‌دهی انتخابی را برای تخلیص اولیه و افزایش سطح ویتلوژنین در نمونه‌ها امکان‌پذیر کرده است. تئوری کوچک‌بودن دامنهٔ فسویتین ویتلوژنین مهره‌داران پست دربارهٔ ماهیان خاویاری نقض شده است. اندازهٔ دامنهٔ فسویتین در ویتلوژنین تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) ۱۸/۳ kDa و وزن مولکولی ویتلوژنین ۱۸۵/۴ kDa برآورد شده است (Finn, 2007). این اندازه برای دامنهٔ فسویتین در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ۶/۲ kDa (وزن مولکولی ویتلوژنین این گونه ۱۴۶/۹ kDa) برآورد شد که بر اساس روند تکاملی مطرح‌شده برای دامنهٔ فسویتین درخور تأمل است. این موضوع وقتی توجه بیشتری را به خود جلب خواهد کرد که دامنهٔ فسویتین در گونه‌ای پیشرفته‌تر بررسی شود. اندازهٔ دامنهٔ فسویتین برای ماهی شانک قرمز (*Pagrus major*) ۱۴ kDa و وزن مولکولی ویتلوژنین این گونه ۱۸۵/۳ kDa برآورد شده است (Finn, 2007). کاملاً واضح است که ماهیان خاویاری با وجود جایگاه پایینی که در روند تکامل دارند دامنهٔ فسویتین بسیار بزرگی (حتی بزرگ‌تر از سوف‌ماهیان) دارند. این موضوع می‌تواند دریچه‌ای جدید را برای تحقیقات مرتبط با فیزیولوژی تولیدمثل و تکامل این ماهیان باز کند. در ماهی بستر (*Huso huso×Acipenser ruthenus*) نیز سطوح بالایی از اسید آمینهٔ سرین گزارش شده که نشان‌دهندهٔ بالابودن درخور توجه وزن مولکولی دامنهٔ فسویتین و تأیید نظریهٔ مطرح‌شده در بالاست (Hiramatsu *et al.*, 2002b). با توجه به این مطالب، با وجود ناکارایی روش رسوب‌دهی انتخابی ویتلوژنین در جداسازی ویتلوژنین اکثر گونه‌های ماهیان استخوانی، این روش کارایی خوبی را در رسوب انتخابی ویتلوژنین فیل‌ماهی نشان داد. این پدیده می‌تواند به دلیل بزرگ‌تربودن دامنهٔ فسویتین در این گونه (مانند دیگر گونه‌های خاویاری) و مقادیر بالای فسفات این مولکول باشد. از روش رسوب‌دهی انتخابی در اکثر مطالعات به‌منزلهٔ اولین مرحلهٔ تخلیص ویتلوژنین استفاده شده است. برای مثال، ویتلوژنین چهار گونه ماهی استخوانی کاد (*Gadus morhua*)، توربت (*Scophthalmus maximus*)، ماهی گرگی (*Anarhichas htpus*)، و قزل‌آلای رنگین‌کمان ابتدا با روش رسوب‌دهی انتخابی تا حدی تخلیص شد و تخلیص نهایی با استفاده از کروماتوگرافی تعویض آنیونی انجام گرفت (Silversand and Haux, 1995). در مطالعه‌ای دیگر از روش رسوب‌دهی انتخابی به منظور تخلیص اولیه و از رزین تعویض آنیونی DEAE-Sephacel به منظور تخلیص نهایی ویتلوژنین قزل‌آلای رنگین‌کمان و قزل‌آلای دریایی (*Salmo trutta*) استفاده شده است (Norberg and Haux, 1985).

پس از افزایش سطح ویتلوژنین در نمونه‌ها، به منظور تخلیص نهایی ویتلوژنین از روش استخراج از ژل Preparative استفاده شد که با توجه به شکل ۳

کارایی درخور توجهی در تخلیص ویتلوژنین فیل‌ماهی نشان داد. استفاده از روش استخراج از ژل Preparative معایب و مزایایی دارد. از معایب این روش ازبین‌رفتن شکل طبیعی و فعالیت زیستی پروتئین همچنین وجود اکریلامید در پروتئین تخلیص شده است. از مزایای این روش می‌توان به سهولت انجام این روش تخلیص، کارایی آن برای تخلیص ویتلوژنین اغلب گونه‌ها، خلوص بسیار بالای ویتلوژنین تخلیص‌شده با این روش (Watts *et al.,* 2003)، و دسترسی به پپتیدهای ویتلوژنین برای تولید آنتی‌بادی اشاره کرد. با توجه به این حقیقت که ویتلوژنین مولکولی حساس به تجزیه است و در شرایط نگه‌داری به پروتئین‌های کوچک‌تر تبدیل می‌شود، و بسیاری از تحقیقات روی نمونه‌های پلاسمای منجمدشده انجام می‌گیرد، استفاده از آنتی‌بادی تهیه‌شده علیه زیرواحدهای ویتلوژنین می‌تواند دسترسی به اپیتوپ‌ها را به حداکثر برساند (Watts *et al.,* 2003).

در مطالعه‌ای که به منظور تهیهٔ آنتی‌بادی اختصاصی برای ویتلوژنین سه گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*)، و کفشک پشت‌سبز (*Rhombosolea tapirina*) انجام گرفت، آنتی‌بادی پلی‌کلونال برای ویتلوژنین این سه گونه از طریق ژل فیلتراسیون و استخراج از ژل preparative با موفقیت و بدون واکنش غیر اختصاصی تهیه شد (Watts *et al.,* 2003). نتایج چنین مطالعاتی تأییدکنندهٔ کارایی قابل قبول این روش در تخلیص ویتلوژنین خصوصاً به منظور تولید آنتی‌بادی است.

References

[1]. Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2003. Social exploitation of vitellogenin. Proceedings of the national academy of sciences 100, 1799-1802.

[2]. Amdam, G.V., Norberg, K., Page, R.E., Erber, J., Scheiner, R., 2006. Down regulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honeybee workers (*Apis mellifera*). Behavioural brain research 169, 201-205.

[3]. Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L., 1999. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8, 385-398.

[4]. Dunbar, S., 1994. Protein Blotting, A practice approach. Oxford university press, 242 p.

[5]. Finn, R.N., 2007. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other sub domains in vitellogenins. Biology of Reproduction 76, 926-935.

[6]. Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G.V., Barchuk, A.R., Omholt, S., *et al.,* 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. FEBS Letters 579, 4961-4965.

[7]. Hiramatsu, N., Matsubara, T., Weber, G., Sullivan, C., Hara, A., 2002a. Vitellogenesis in aquatic animals. Fisheries science 68, 694-699.

[8]. Hiramatsu, N., Hiramatsu, K., Hirano, K., Hara, A., 2002b. Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*): identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. Comparative biochemistry and physiology part A 131, 429-441.

[9]. Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C.V., Hara, A., 2006. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. Marine Biology 149, 35-47.

[10]. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

[11]. Linares-Casenave, J., Kroll, K.J., Van Eenennaam, J.P., Doroshov, S.I., 2003. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon. Aquaculture 221, 645-656.

[12]. Liu, Q.H., Zhang, S.C., Li, Z.J., Gao, C.R., 2009. Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*). Immunobiology 214, 257-267

[13]. Magalhaes, I., Ledrich, M.L., Pihan, J.C., Falla, J., 2004. One-step, non-denaturing purification method of carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin. Journal of chromatography B 799, 87-93.

[14]. Manohar, D., Rao, G.D., Sreenivasulu, G., Senthilkumaran, B., Gupta, A.D., 2005. Purification of vitellogenin from the air breathing catfish, *Clarias gariepinus*. Fish Physiology and Biochemistry 31, 235-239

[15]. Matozzo, V., Gagne, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C., 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. Environment international 34(4), 531-45.

[16]. Mommsen, T.P., Walsh, P.J., 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), Fish Physiology, Vol. 9A. Academic Press, New York, USA, pp. 347-406.

[17]. Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in

farmed fish. In: Babin, P.J., Cerda, J., Lubzens, E. (Eds.), The fish oocyte, from basic studies to biotechnological applications. Springer publication, pp. 437-475.

[18]. Nakamura, A., Yasuda, K., Adachi, H., Sakurai, Y., Ishii, N., *et al.,* 1999. Vitellogenin is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*. Biochemical and biophysical research communications 264(2), 580-583.

[19]. Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E., Amdam, G.V., 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. Plos biology 5 (3), 673-677.

[20]. Nishi, K., Chikae, M., Hatano, M., Mizukami, H., Yamashita, M., Sakakibara, R., Tamiya, E., 2002. Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. Comparative biochemistry and physiology part C 132, 161-169.

[21]. Norberg, B., Haux, C., 1985. Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two Salmo species: rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). Comparative biochemistry and physiology part B 81, 869-876.

[22]. Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, D.A. Sullivan, C.V., 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative biochemistry and physiology part C 123, 113-125.

[23]. Redshaw, M.R. Follett, B.K., 1971. The crystalline yolk-platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian, *Xenopus laevis*. Biochemical journal 124, 759-766.

[24]. Shi, X.D., Zhang, S.C., Pang, Q.X., 2006. Vitellogenin is a novel player in defense reactions. Fish and shellfish immunology 20, 769-772.

[25]. Silversand, C., Haux, C., 1995. Fatty acid composition of vitellogenin from four teleost species. Journal of comparative physiology B 164, 593-599.

[26]. Specker, J.L., Sullivan, C.V., 1994. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In: Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Eds.), Perspectives in endocrinology. National Research Council, Ottawa, Canada. pp. 304-315

[27]. Tolar, J.F., Mehollin, A.R., Watson, R.D., Angus, R.A., 2001. Mosquito fish (*Gambusia affinis*) vitellogenin: identification, purification, and immunoassay. Comparative biochemistry and Physiology Part C 128, 237-245.

[28]. Tufail, M., Takeda, M., 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. Journal of insect physiology 54(12), 1447-1458.

[29]. Wahli, W., 1988. Evolution and expression of vitellogenin genes. Trends genet 4(8), 227-232.

[30]. Watts, M., Pankhurst, N.W., Pryce, A., Sun, B., 2003. Vitellogenin isolation, purification and antigenic cross-reactivity in three teleost species. Comparative biochemistry and Physiology Part B 134, 467-476.

[31]. Wiley, H.S., Opresko, L., Wallace, R.A., 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. Analytical biochemistry 97, 145-152.

[32]. Zhang, Y., Qu, Q., Sun, D., Liu, X., Suo, L., Zhang, Y., 2011. Vitellogenin in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*): induction, purification and changes during the reproductive cycle. Journal of applied ichthyology 27, 660-665.

[33]. Zhang, S., Wang, S., Li, H., Li, L., 2011. Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. The international journal of biochemistry and cell biology 43(3), 303-305.