

真鲷 (*Pagrosomus major*) 卵黄原蛋白的分离纯化及抗血清制备^①

郇 欣^{②*} 汝少国^{③*} 潘宗保^{*} 王 蔚^{*}

(* 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

(** 山东省材料化学安全检测技术重点实验室 济南 250103)

摘 要 采用分子筛和离子交换两步层析法分离纯化了真鲷 (*Pagrosomus major*) 的卵黄原蛋白 (VTG), 并采用非变性和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳测定了真鲷 VTG 的分子量, 发现真鲷 VTG 在非变性条件下的分子量大约为 450kDa; 在 SDS 变性条件下, 两条亚基的分子量大约分别为 170kDa 和 120kDa。Western-blot 检测结果表明这两条亚基都能够与真鲷 VTG 多克隆抗血清产生免疫反应, 而真鲷 VTG 的 170kDa 亚基是检测真鲷 VTG 的特异性条带, 且最低检出浓度为 $0.1\mu\text{g L}^{-1}$ 。鼠抗真鲷 VTG 多克隆抗血清对真鲷 VTG 具有良好的特异性, 这一结果为采用真鲷为模式生物检测海洋环境雌激素奠定了实验基础。

关键词 真鲷, 卵黄原蛋白, 分离纯化, 抗血清

0 引 言

鱼类卵黄原蛋白 (vitellogenin, VTG) 是雌鱼特异性蛋白, 通常只能在生殖期的雌鱼血浆中检测到。由于雄鱼也有 VTG 基因, 环境雌激素也能诱导雄鱼合成和分泌 VTG, 因而雄鱼 VTG 的产生是检测和筛选环境雌激素的重要生物标志物^[1,2]。但是 VTG 有很强的种间特异性, 不同鱼种间的分子量差异较大 (在 250kDa 和 600kDa 之间), 因此, 以 VTG 为生物标志物检测环境雌激素时, 需要制备不同种鱼类的 VTG 抗体, 而抗体制备的基础是获得分离纯化的 VTG。目前已成功分离和鉴定了多种海洋鱼类的 VTG, 如川鲮 (*Platichthys flesus*, L.)^[3]、海鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[4] 和鲑 (*Salmo salar* O.)^[5] 等, 但是还未检索到真鲷 (*Pagrosomus major*) VTG 抗体制备及应用的系统报道。真鲷在我国海域广泛分布, 也是主要的养殖鱼类; 真鲷为处于海洋食物链顶端的肉食性鱼类, 易于富集持久性有机污染物 (Persistent Organic Pollutants, POPs), 适宜用于环境雌激素的检测和筛选。本文采用分子筛和离子交换两步法对真鲷 VTG 进行了分离纯化, 利用凝胶电泳法测定了 VTG 的分子量, 在此基础上制备了鼠抗真鲷 VTG 多克隆抗血清, 并采用 Western-blot 技术检测了抗血清对真鲷 VTG 的特异性。

1 材料与方法

1.1 化学试剂与仪器

分子筛和离子交换柱分别为 Amersham 公司 (瑞典) 生产的 Sephacryl S-300 high resolution 型 ($2.0 \times 60\text{cm}$) 和 DEAE Sepharose fast flow 型 ($1.5 \times 20\text{cm}$)。17 β -雌二醇 (E_2) 购自 Sigma 公司 (98% 纯度, 美国), 丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺购自 Fluka 公司 (电泳极, 瑞士)。聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜为 Osmonics 公司 (美国) 产品, Tween-20、DAB、脱脂牛奶和 Tris 为 Amersco 公司 (美国) 产品。非变性聚丙烯酰胺分子量标准为 Amersham 公司 (瑞典) 生产; SDS 聚丙烯酰胺分子量标准为 Fermentas 公司 (美国) 生产。HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为北京鼎国生物技术有限责任公司产品。其余化学试剂皆为国产化学纯。

电泳仪为 DYY-III-4 型、垂直电泳槽为 DYY-III-28A 型、转印电泳槽为 DYCZ-40B 型 (北京六一仪器厂)。

1.2 真鲷与 VTG 诱导实验

真鲷购自青岛南山水产品市场, 于中国海洋大学海洋生态毒理实验室驯养 2 周后进行 VTG 诱导实验。真鲷体长 (25 ± 2) cm, 体重 (0.5 ± 0.05) kg。实验用水为连续曝气 24h 的近岸海水。腹腔注射 10mg E_2 (100% 酒精配制)。2 周后, 用 1% 肝素润洗

① 国家自然科学基金 (30200211, 30800844) 和山东省自然科学基金 (2007ZR01698) 资助项目。

② 男, 1977 年生, 博士; 研究方向: 环境生物学; E-mail: bingxinhaida@163.com

③ 通讯作者, E-mail: rusg@ouc.edu.cn

(收稿日期: 2008-09-18)

并预冷的 5mL 注射器从尾静脉取血,血样迅速离心 ($8000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5min), 取上层血浆分装后 -80°C 保存备用。

1.3 VTG 的分离纯化

VTG 的分离纯化过程在 4°C 下进行,全部 buffer 为含有 0.01M 的苯甲基磺酰氟(PMSF)的 25mM Tris-HCl (pH 7.5)缓冲体系。

1.3.1 分子筛层析

首先用含有 0.07 M NaCl 的平衡 buffer 平衡层析柱 1h, 然后加入 0.5mL E_2 诱导的真鲷血浆, 继续用平衡 buffer 进行洗脱, 收集 5mL 等分试样, -20°C 保存。平衡流速和洗脱流速皆为 $1\text{mL}/\text{min}$ 。等分试样用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

1.3.2 离子交换层析

离子交换层析采用不连续洗脱法。首先用含有 0.07 M NaCl 的平衡 buffer 平衡层析柱 1h。取分子筛层析 70 ~ 80min 样品 (10mL) 上样, 继续用平衡 buffer 结合 1h。用含有 0.1 M NaCl 的洗脱 buffer 洗脱 1h。然后用含有 0.2 M NaCl 的洗脱 buffer 洗脱 1h, 收集 0.2M NaCl 洗脱的 1mL 等分试样, -20°C 保存。平衡和洗脱流速皆为 $1\text{mL}/\text{min}$ 。等分试样用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳及 VTG 分子量的测定

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 4% 浓缩胶、7.5% 分离胶, 上样量 $10\mu\text{L}$, 电压 200V; SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 4% 浓缩胶、10% 分离胶, 上样量 $6\mu\text{L}$, 电压 200V。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳采用考马斯亮蓝染色法, SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳采用双胺银染色法。糖蛋白染色采用 Zaccarias^[6] 的方法; 脂蛋白染色采用 Prat^[7] 的方法; 磷蛋白染色采用 Cutting^[8] 的方法。采用郭尧君的方法测定真鲷 VTG 在非变性和变性条件下的分子量^[9]。

1.5 鼠抗真鲷 VTG 多克隆抗血清制备

雄性小白鼠购自青岛市药品检验所实验动物中心, 在实验室驯养 1 个月后进行免疫, 注射量约 $0.1\text{mL}/\text{只}$ 。首次免疫腹腔注射纯化的真鲷 VTG 50mg (等体积抗原与弗氏完全佐剂充分混匀)。两周后进行加强免疫, 腹腔注射抗原 10mg (等体积抗原与弗氏不完全佐剂充分混匀), 连续注射 5 周, 每周注射一次。采用双向扩散法测定抗血清效价达到 1:32 以上则放血, 收集血液于无菌试管中 4°C 过夜, 用无菌毛细滴管吸出血清, 分装后 -80°C 保存。

1.6 免疫印迹实验

首先取真鲷 VTG 纯品进行 SDS 变性聚丙烯酰

胺凝胶电泳, 并从凝胶转印到 PVDF 膜上 (转印 buffer: 15.6mM Tris, 120mM Gly, 10% 甲醇, 0.01% SDS, pH 8.3; 电压 30V, 进行 4h)。转印完成后用含 5% 脱脂奶的 TBST (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) 封闭 PVDF 膜上的非特异性结合位点, 室温振摇过夜。然后用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5min。用封闭 buffer (含 5% 脱脂奶粉的 TBST) 按 1:2000 的比例稀释抗血清, 室温振摇孵育 2h 以上。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5min。以 1:2000 的比例用封闭 buffer 稀释二抗, 室温振摇孵育 2h 以上。用 TBST 和蒸馏水各洗膜两次, 每次 5min。用显色 buffer (0.06% DAB 的 Tris-HCl, pH 7.6, 用前每 10mL buffer 加入 $10\mu\text{L}$ 30% 的双氧水) 进行显色反应, 室温振摇。待显出清晰条带后, 用蒸馏水终止显色反应。

2 结果与分析

2.1 VTG 的分离、纯化

E_2 诱导后血浆经分子筛层析后, 在 280nm 处有 3 个洗脱峰 (图 1), 收集第 2 个峰 (75-85min) 的样品, 用于离子交换层析; 在经过离子交换凝胶层析后, 0.2M NaCl 的洗脱 buffer 洗脱了 1 个明显的洗脱峰 (图 2), Native 电泳结果显示该峰流出物只含有一种蛋白, 没有其他杂蛋白或蛋白质降解产物 (图 3a)。

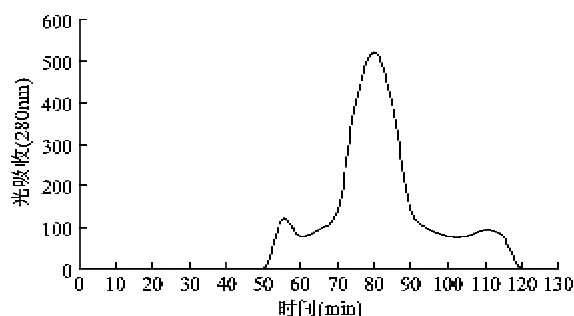


图 1 真鲷 VTG 的分离纯化分子筛层析图谱

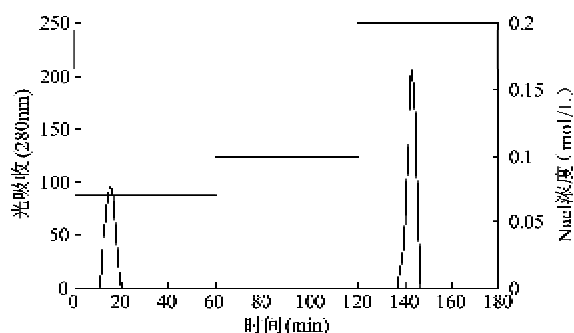
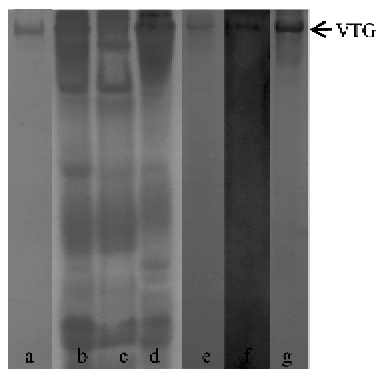


图 2 真鲷 VTG 的分离纯化离子交换层析图谱



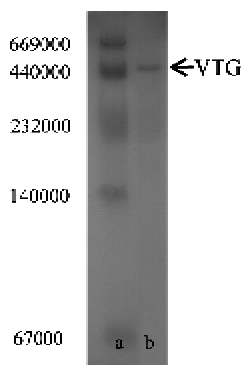
a. 纯化的真鲷 VTG; b. 雌鱼对照组; c. 雄鱼对照组; d. E_2 暴露组;
e. 糖蛋白染色; f. 磷蛋白染色; g. 脂蛋白染色

图 3 真鲷 VTG 糖磷脂染色结果

蛋白质的糖磷脂染色结果表明,分离、纯化的蛋白质能被糖磷脂染色法同时染色(图 3e-g),可见分离纯化的蛋白质含有糖、磷、脂的基团,而且发现这条蛋白条带在雌鱼对照组(图 3b)、 E_2 暴露组(图 3d)都有该蛋白条带,而在雄性对照组中没有这条蛋白带(图 3c),据此判断分离纯化的蛋白即为真鲷的 VTG。

2.2 VTG 分子量

采用 5% ~ 8% 的不同浓度的分离胶对真鲷分离纯化的 VTG 和蛋白质标准品进行电泳(图 4),获得不同浓度凝胶下的迁移率的标准曲线(图 5),计算得到真鲷 VTG 在非变性条件下的分子量大约为 450kDa。



a 蛋白标准, b 纯化的真鲷 VTG

图 4 真鲷 VTG 在非变性条件下的分子量测定的电泳图谱(4% ~ 6.5%)

采用 4% ~ 10% 的 SDS 凝胶电泳分离纯化的 VTG 和蛋白质标准品进行电泳(图 6),以蛋白质标准的迁移率作标准曲线(图 7),计算得到真鲷 VTG 在变性条件下形成的两个主要片段分子量大约为 170kDa 和 120kDa。

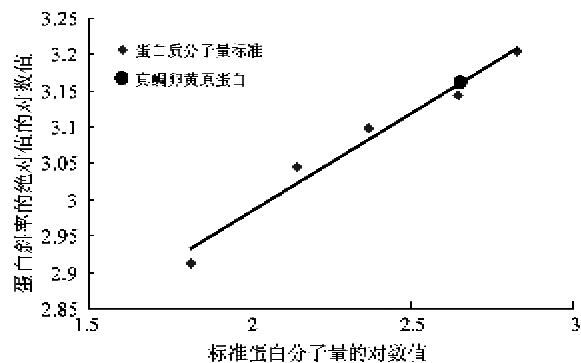
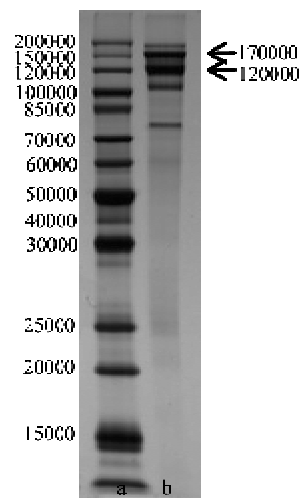


图 5 真鲷 VTG 在非变性条件下的分子量测定的标准曲线



a 蛋白标准, b 纯化的真鲷 VTG

图 6 真鲷 VTG 在 SDS 变性条件下的分子量测定的电泳图谱(4% ~ 10%)

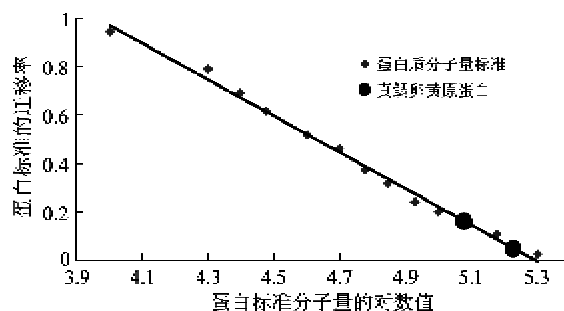
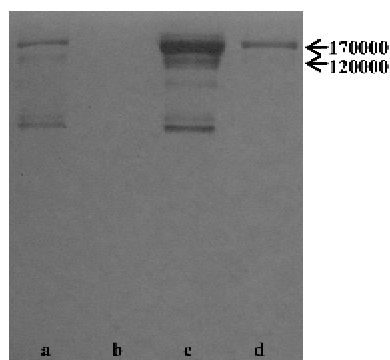


图 7 真鲷 VTG 在 SDS 变性条件下的分子量测定的标准曲线

2.3 VTG 免疫印记结果

由图 8 可见对照组雄鱼(图 8b)与真鲷 VTG 多克隆抗血清呈阴性反应,对照组雌鱼的免疫条带(图 8a)与 1.0 μ g/L 分离纯化 VTG(图 8c)相似,170kDa 和 120kDa 两条带都呈现了明显的免疫反应,0.1 μ g/L 真鲷 VTG(图 8d)只呈现 170kDa 一条免疫条带,可见多克隆抗血清的最低检出浓度为 0.1 μ g/L,与真鲷 VTG 具有高度的专一性。



a. 雌鱼对照组; b. 雄鱼对照组; c. 1.0 µg/L 真鲷 VTG;
d. 0.1 µg/L 真鲷 VTG

图 8 VTG 免疫印记结果

3 讨论

近年来,入海陆源排污口及其邻近海域环境激素污染严重。Hu 等在渤海柱状沉积物样品中检测到了 DDTs、烷基酚、多氯联苯等多种有机污染物^[10];谭培功等在莱州湾表层和深层水体中检测到 1.6 ~ 32.9 ng/L 的有机氯农药^[11]。而目前海洋环境中环境激素的检测主要以色谱技术等化学分析方法为主,虽然化学分析方法检测的灵敏度很高,但是不能指示污染物的环境激素效应,而以海洋鱼类等为主的生物检测方法可以弥补化学方法的不足。如英国主要采用鲆鲽科的鱼类检测海湾的污染情况^[12],而美国多采用大西洋鲑和虹鳟开展相关的研究^[13,14]。真鲷是我国主要的海水养殖鱼类并且分布广泛,取材相对简便,可以利用网箱设置在近海海域敏感点上,开展环境雌激素的检测,也可开展室内环境雌激素的筛选工作。

雄性鱼类 VTG 是检测和筛选环境雌激素的主要生物标志物,而对于 VTG 的分离纯化和性质的鉴定则是环境雌激素检测和筛选的基础。关于 VTG 的纯化方法,目前有较多报道。如采用选择性沉淀、快速蛋白液相色谱(FPLC)、亲和层析、膜层析等方法^[15,16]。基于目标分子的荷电量或相对分子质量大小而建立的两步或一步层析法已成为目前应用最广泛的 VTG 纯化方法。本文采用 Sephacryl S-300 型分子筛层析柱和 DEAE Sepharose fast flow 型离子交换层析柱分离纯化了真鲷的 VTG。这种方法的优势在于,VTG 在分子筛层析过程中得到了粗分,能够将分子量差异较大的蛋白分开,而离子交换层析能够使 VTG 得到进一步的有效分离,并有浓缩效应。由于鱼类 VTG 不稳定,需要严格控制分离纯化过程中的条件。Roubal 报道狭鳞庸鲽(*Solea solea* L.)的

VTG 在 2 ~ 4℃ 纯化时最稳定^[17]。为了减少真鲷 VTG 的分解,本文在所有分离 buffer 中加入了 PMSF 作为抑制剂,并保持分离纯化过程在 4℃ 下进行。经过分子筛和离子交换层析后,成功地从 E₂ 诱导的真鲷血浆中分离出了一种蛋白质,非变性聚丙烯酰胺电泳鉴定结果表明只含有一种蛋白,没有其他杂蛋白或降解产物。该蛋白的糖磷脂蛋白染色结果表明是一种糖磷脂蛋白(lipophosphoglycoprotein),符合鱼类 VTG 的性质^[18]。此外在对照组雌鱼和 E₂ 诱导组雄鱼血浆中电泳图谱中都发现该蛋白条带,而对照组雄鱼血浆中没有。综合以上两点证明分子筛和离子交换两步法获得了高纯度的 VTG。在进化过程中不同鱼种间的 VTG 差异很大^[19]。目前已经报道的海洋鱼类 VTG 主要有海鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*) 445 kDa^[4],大西洋鳕(*Gadus morhua*) 440 kDa^[20],海鲢(*Salmo trutta*) 440 kDa^[21],石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*) 520 kDa^[22],大西洋条鳉(*Macrozoarces americanus*) 580 kDa^[23],川鲽(*Platichthys flesus*) 550 kDa^[3],大西洋鲑(*Salmo salar*) 520 kDa^[5]等。本文获得的真鲷 VTG,在非变性条件下的分子量为 450 kDa,与海鲈鱼、大西洋鳕和海鲢的分子量相似。鱼类 VTG 通常是一种二聚体蛋白,含有两个亚基,Bowman 等发现(*Epinephelus malabaricus*) VTG 含有两个分子量为 180 kDa 和 160 kDa 的亚基^[24],Matsubara 指出条斑星鲽(*Verasper moseri*)有两种形式的亚基,分子量分别为 175 kDa 和 168 kDa^[25],大西洋鲑(*Salmo salar*) VTG 也有两种亚基分子量为 176 kDa 和 127 kDa^[5]。在变性条件下真鲷 VTG 有两个主要片段,其分子量分别为 170 kDa 和 120 kDa,与大多数海洋鱼类 VTG 亚基分子量相似,并结合免疫印记结果,作者认为 170 kDa 和 120 kDa 两条带是真鲷 VTG 的亚基。

为定性和定量检测 VTG,需要制备针对特定鱼类 VTG 的抗体。本文制备了鼠抗真鲷 VTG 多克隆抗血清,采用 Western-blot 技术检测了抗血清的特异性。结果表明,雌性真鲷血浆与纯化的真鲷 VTG 所呈现的带型基本相同,而雄鱼血浆无免疫条带,表明所制备的多克隆抗血清不含有能够与真鲷血浆中其他蛋白产生免疫反应的抗体,具有良好的特异性,真鲷 VTG 的最低检出浓度为 0.1 µg/L。另外,通过与真鲷 VTG 的 SDS 电泳图谱比对,170 kDa 条带所呈现的免疫反应比 120 kDa 强,这可能是由于两个亚基含有的抗原决定簇不同所造成的,而 0.1 µg/L 的真鲷 VTG 只有 170 kDa 条带有免疫反应,表明 170 kDa 条带可能是检测真鲷 VTG 的特异性条带。

参考文献

- [1] Sumpter J P, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of aquatic environmental. *Environ Health Perspect*, 1995, 107:173-178
- [2] 邴欣,汝少国,盛连喜.内分泌扰乱化学物质生物筛选技术研究进展.环境科学研究,2002, 15(5):38-42
- [3] Emmersen B K, Petersen I M. Natural occurrence, and experimental induction by estradiol-17- β , of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in Flounder (*Platichthys flesus*, L.). *Comparative Biochemistry and physiology*, 1976 (B), 54: 443-446
- [4] Mananos E, Zanuy S, Lemenn F, et al. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I-Induction, purification and partial characterization. *Comparative Biochemistry and physiology*, 1994(B), 107(2): 205-216
- [5] So Y, Idler D R, Hwang S J. Plasma vitellogenin in landlocked Atlantic salmon (*Salmo Salar* O.): isolation, homologous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. *Comparative Biochemistry and physiology*, 1985(B), 81:63-71
- [6] Zacharias R M. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, 1969, 30 (1):148
- [7] Prat J P, Lamy J N, Weill J D. Staining of lipoproteins after electrophoresis in polyacrylamide gel. *Bull Soc Chem Biol*, 1969(51):1367
- [8] Cutting J A. In methods in enzymology. New York: Academic Press, 1984, Vol.104: 451
- [9] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999
- [10] Hu J Y, Wan Y, Shao B, et al. Occurrence of trace organic contaminants in Bohai Bay and its adjacent Naipaiwu River, North China. *Marine Chemistry*, 2005, (95):1-13
- [11] 谭培功,赵仕兰,曾宪杰等. 莱州湾海域水体中有机氯化药和多氯联苯的浓度、水平和分布特征. 中国海洋大学学报, 2006, 36(3):439-446
- [12] Simpson M G, Parry M, Kleinkauf A, et al. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Marine Environmental Research*, 2000, 50:283-287
- [13] Madsen S S, Skovbølling S, Nielsen C, et al. 17- β -Estradiol and 4-nonylphenol delay smolt development and downstream migration in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquatic Toxicology*, 2004, 68:109-120
- [14] Lech J J, Lewis S K, Ren L. *In Vivo* Estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1996, 30:229-232
- [15] Hiramatsu N, Hara A. A relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comparative Biochemistry and physiology*, 1997, 115(A): 243-251
- [16] Shimizu M, Fujiwara Y, Fukada H, et al. Purification and identification of a second form of vitellogenin from ascites of Medaka (*Oryzias Latipes*) treated with estrogen. *J Exp Zool*, 2002, 293:726-735
- [17] Rouhal W T, Lomax D P, Willis M L, et al. Purification and partial characterization of English sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and physiology*, 1997 (B), 118(3): 613-622
- [18] 邴欣,汝少国,Isoda H,等. 17- β -雌二醇对雄性金鱼卵黄原蛋白的诱导作用.水产学报, 2004, 28(3):237-240
- [19] Byrne B M, Gruber M, Ab G. The evolution of egg yolk proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 1989, 53: 33-69
- [20] Plack P A, Pritchard D J. Egg proteins in cod serum: natural occurrence and induction by injections of oestradiol 3-benzoate. *Biochemical Journal*, 1971, 121: 847-856
- [21] Norberg B, Haux C. Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two *Salmo* species: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Sea trout (*Salmo trutta*). *Comparative Biochemistry and physiology*, 1985(B), 81(4): 869-876
- [22] Utarabhand P, Bunlipatanon P. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): Isolation and Properties. *Comparative Biochemistry and physiology*, 1996 (C), 115 (2): 101-110
- [23] Yao Z, Crim L W. A biochemical characterization of vitellogenins isolated from marine fish ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.), lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and physiology*, 1986(B), 113: 247-253
- [24] Bowman C J, Kroll K J, Hemmer M J, et al. Estrogen-induced vitellogenin mRNA and protein in Sheephead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 120: 300-313
- [25] 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, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Developmental Biology*, 1999, 213: 18-32

Pagrosomus major vitellogenin: purification and production of antiserum

Bing Xin^{* **}, Ru Shaoguo^{*}, Pan Zongbao^{*}, Wang Wei^{*}

(* College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(** Shandong Key Laboratory for Testing Technology of Material Chemical Safety, Jinan 250103)

Abstract

A double-step chromatography, the gel filtration and ion exchange chromatography, was used to purify the vitellogenin(VTG) from the serum of *Pagrosomus major*. Under the native-PAGE, the molecular weight of the native VTG was 450 kDa, and under the SDS-PAGE, the *Pagrosomus major* has two subunits, which have the molecular weights of 170 kDa and 120 kDa respectively. The results of the Western-blot test showed that the *Pagrosomus major* VTG's two subunits had the immunity reaction with antiserum against *Pagrosomus major* VTG, and the protein band of 170 kDa was the characteristic band for *Pagrosomus major* VTG. The detection limit for the purified standard VTG by the Western-blot method was 0.1 μ g L⁻¹. The results indicate that the antiserum had the good specificity with *Pagrosomus major* VTG, and this laid an experimental foundation for selecting *Pagrosomus major* as the test organism in screening of marine environmental estrogens.

Key words: *Pagrosomus major*, vitellogenin, isolation and purification, antiserum