

文章编号:1000-0615(2001)01-0005-06

罗氏沼虾脑促性腺激素的初步分离及活性检测

廖家遗, 张艳, 孙继贤, 林远声

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要:用 Sephadex G-50 对罗氏沼虾脑抽提液进行了柱层析, 发现洗脱液中的第二个峰中的 63~74 组分可非常显著地促进体外培养的罗氏沼虾卵母细胞直径增大。进一步检测, 发现其中仅 63~65 组分可显著地促进体外培养的罗氏沼虾卵巢的总蛋白合成, 进行日本沼虾肌肉注射可显著地促进其卵巢发育。63 组分的分子量在 7kD 以下。结果表明, 罗氏沼虾脑中存在蛋白质性质的促性腺激素。

关键词: 罗氏沼虾; 脑; 促性腺激素; 分离; 活性检测

中图分类号: Q575+.12; S917 **文献标识码:** A

Partial isolation and bioassay of gonad-stimulating hormone from the brain of *Macrobrachium rosenbergii*

LIAO Jia-yi, ZHANG Yan, SUN Ji-xian, LIN Yuan-sheng

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The extracts of brain of *Macrobrachium rosenbergii* were applied on a Sephadex G-50 column (1.6cm × 50cm). Two large peaks of protein, peak and peak, were obtained. The c (63-74 fractions) of peak were able to increase oocyte diameter of *M. rosenbergii* *in vitro* very significantly. The 63-65 fractions from c of peak significantly accelerated the total protein synthesis of the prawn ovary *in vitro*. By injecting the 63-65 fractions into muscle of *M. nipponense* the ovary maturation was promoted significantly after 15 days. The molecular weight of the protein in the fraction 63 was below 7kD. The results show that the gonad-stimulating hormone is present in the brain of *M. rosenbergii*.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; brain; gonad-stimulating hormone; isolation; bioassay

研究已证明, 虾、蟹的脑及胸神经节移植或其抽提液注射可促进其卵巢发育^[1-4]。Yano^[5]报道日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 脑中有促性腺激素 (Gonad-stimulating hormone, GSH)。罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 是一种重要的淡水经济虾类, 但至今未见有这方面的研究报道。本研究对该虾脑中的促性腺激素进行了初步的分离和其生物活性的研究。

1 材料和方法

1.1 罗氏沼虾脑抽提液的凝胶层析

将性成熟的雌罗氏沼虾冰浴后, 快速解剖出脑, 冰浴中匀浆, $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心 10min, 取上清

收稿日期: 2000-02-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670103)

第一作者: 廖家遗 (1943-), 男, 江西遂州人, 副教授, 主要从事甲壳动物学研究。E-mail: ls66@zsu.edu.cn

液用罗氏沼虾生理盐水^[6]稀释成每毫升约 200 个虾脑,蛋白质浓度为 3mg mL^{-1} ,每次 1mL 上 Sephadex G-50 柱(1.6cm ×50cm),用 0.01mol L^{-1} 的碳酸氢铵洗脱,洗脱速度为 12mL h^{-1} ,每管收集 2mL 作为一个组分。层析在 4 层析冷柜中进行。各组分合并,冰冻干燥,保存于 -38°C 备用。

1.2 生物活性鉴定

1.2.1 鉴定 GSH 存在于洗脱液何部分

培养基:RPMI 1640 培养基与罗氏沼虾生理盐水(体积比 = 1:2)混合而成,加小牛血清达 4% 及青霉素和链霉素。除菌后备用。

培养用卵巢小块:选取卵巢发育期为中期^[7]的罗氏沼虾。虾体表消毒后解剖出卵巢,用生理盐水冲洗后,取中间膨大的部分均分成约 $2\text{mm} \times 2\text{mm} \times 3\text{mm}$ 小块,放入各个小培养皿(直径 2cm)中,皿中有 1mL 上述培养基。

体外培养及检查:将脑抽提液层析后的峰 II 各组分合并成三个部分,即 II_A (由第 41 至第 52 组分合并而成)、 II_B (由第 53 至第 62 组分合并而成)、 II_C (由第 63 至第 74 组分合并而成)。调节这三个部分以及峰 I(由第 13 至第 26 组分合并而成)和对照物(罗氏沼虾肌肉抽提液)的蛋白质浓度达 $2\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (考马斯亮蓝 G-250 结合定蛋白法), $0.2\mu\text{m}$ 的滤膜除菌后,各取 $100\mu\text{L}$ 分别加入以上各培养皿中,在 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养 24h。共设 5 个平行组,每组均包括对照、峰 I 及 A 、 B 和 C 五个处理。同组的各个实验处理均采用同只虾的卵巢小块。培养后,在培养皿中加入 5% 甲醛生理盐水溶液固定。用双盲法对各培养皿重新编号,随机选取 20 个较大的卵母细胞,于当日在解剖镜下用显微测微尺测量直径。

1.2.2 鉴定 GSH 存在于洗脱液的何组分

体外培养及卵巢总蛋白合成的测量:将约 500 个虾脑抽提液上柱层析分离得到的各组分分别合并和冻干后,分别用 $600\mu\text{L}$ 的蒸馏水溶解,调节作为对照的虾肌肉抽提液及峰 I 的蛋白质浓度与峰 II 蛋白质浓度最高的组分接近相等(用 Ultrospec2000 紫外分光光度计测量蛋白质浓度),滤膜除菌备用。根据准备实验的结果,严格挑选罗氏沼虾中期卵巢,卵巢块大小同上,培养时间 12h。培养基为 100mLA 液(葡萄糖浓度为 $0.753\text{g } \cdot\text{L}^{-1}$ 、HEPES 浓度为 $4.766\text{g } \cdot\text{L}^{-1}$ 的罗氏沼虾生理盐水)内添加 $100\mu\text{L}$ 的 RPMI1640 培养基,内含 H^3 标记的 L-亮氨酸,放射浓度为 $3\mu\text{Ci mL}^{-1}$ 培养基。取对照、峰 I 和峰 II 每隔 1 管的组分各 $100\mu\text{L}$ 分别加到有 1mL 培养基和卵巢块的培养板(24 孔)的小孔中。对照、峰 I 和峰 II 各组分均设 5 个平行。培养结束后,卵巢块中总蛋白的抽提、液闪计数参考文献[8]的方法,测蛋白质浓度用考马斯亮蓝 G-250 结合定蛋白法。计算出 $\text{DPM } \mu\text{g}^{-1}$ 总蛋白。

GSH 活性组分的活体注射:约 500 个虾脑抽提液按同上方法上柱,各组分冻干后,合并已测出可能有 GSH 活性的第 63 至 65 组分,溶解于 5mL 蒸馏水中。调节肌肉抽提液及峰 I 的蛋白质浓度与含 GSH 活性组分的溶度相等。卵巢为早期的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)分 3 组(即对照、峰 I 和 GSH 活性组分),每组 15 只虾,每只虾分别放养于一个塑料水族箱($16.5\text{cm} \times 9\text{cm} \times 12\text{cm}$)内,并置入充气的水池($3\text{m} \times 1.2\text{m} \times 1\text{m}$)内。在日本沼虾腹部靠近侧甲处注射。每次每虾注射 $50\mu\text{L}$,每 3d 注射一次,共注射 4 次。分别于第三次注射后(即第 10d)和实验结束时(第 15d)记录各组虾卵巢发育情况。对每组虾卵巢发育情况的观察参照文献[7]的方法,并将各存活虾及其解剖出的卵巢分别用电子天平称重,求出性腺指数(Gonad-somatic index, GSI)。

1.2.3 数据处理

数据以 $\bar{X} \pm \text{SE}$ 表示,其中 \bar{X} 代表平均值,SE 代表标准误。差异显著性用 t 检验, $P < 0.05$ 有显著差异, $P < 0.01$ 有非常显著差异。

1.3 GSH 活性组分子量测定

柱:TOSOH TSK-GEL G2000SW($300\text{mm} \times 7.5\text{mm}$)(该柱具分子筛效应);流动相: 0.1mol L^{-1} 硫酸

钠,0.05mol L⁻¹磷酸二氢钠,0.05%叠氮钠(pH 6.8);流速:0.6mL·min⁻¹;检测波长:280nm;仪器:SSI201 DETECTOR/SSISERIES PUMP;标准分子量对照物:细胞色素 C、抑肽酶、维生素 B₁₂及核黄素(分子量分别 12 400,6 500,1 355, 376D);测定方法:将标准分子量对照物溶液注入该高效液相色谱仪,由对照物分子量的对数对保留时间作标准曲线并求出标准曲线的方程;另同法测定活性组分,根据标准曲线求出其分子量。

2 结果

2.1 脑抽提液的凝胶层析

罗氏沼虾脑抽提液的凝胶层析结果见图 1。由洗脱曲线可看到:罗氏沼虾脑抽提液上 Sephadex G-50 柱得到两个峰,峰 I 与峰 II。峰 I 蛋白质含量明显高于峰 II,而峰 II 的形状略呈马鞍型。

2.2 GSH 存在于洗脱液的何部分

由表 1 可看出,与罗氏沼虾脑抽提液层析后的峰 II 的 C 部分一起培养的罗氏沼虾卵母细胞直径有非常显著的增大,而峰 I 及峰 II 的 A、B 则没有促进卵母细胞直径增大的作用,因此可初步确定 GSH 存在于洗脱曲线 II C 部分的洗脱液(即 63-74 组分)中。

表 1 峰 I 及峰 II 的 II_A、II_B 和 II_C 对外体培养的罗氏沼虾卵母细胞直径的影响(n=20)

Tab.1 Effects on the diameters of oocytes of *M. rosenbergii* in vitro of peak I and II_A, II_B, II_C of peak II

组别	卵母细胞直径(μm)			
	虾 1	虾 2	虾 3	虾 4
对照组	218 ±7	254 ±13	214 ±16	314 ±16
峰 I	220 ±16	256 ±10	218 ±19	306 ±13
II _A	224 ±15	248 ±18	222 ±19	318 ±17
II _B	220 ±9	254 ±16	224 ±20	320 ±16
II _C	236 ±11 *	282 ±17 *	248 ±13 *	344 ±15 *

注: *为 P<0.01。

2.3 GSH 存在于洗脱液的何组分

由表 2 和图 1 可看出,罗氏沼虾脑抽提液层析所得峰 II 每隔一管选取的各组分中,第 63 和第 65 组分对卵巢的总蛋白合成与其它组分对卵巢的总蛋白合成相比显著增高(P<0.05),尤其是第 63 组分差异非常显著(P<0.01)。

以含 GSH 活性组分对日本沼虾的活体注射,性腺指数测定结果见图 2。注射 GSH 活性组分与对照组、注射峰 I 组的性腺指数平均数之间均有显著的

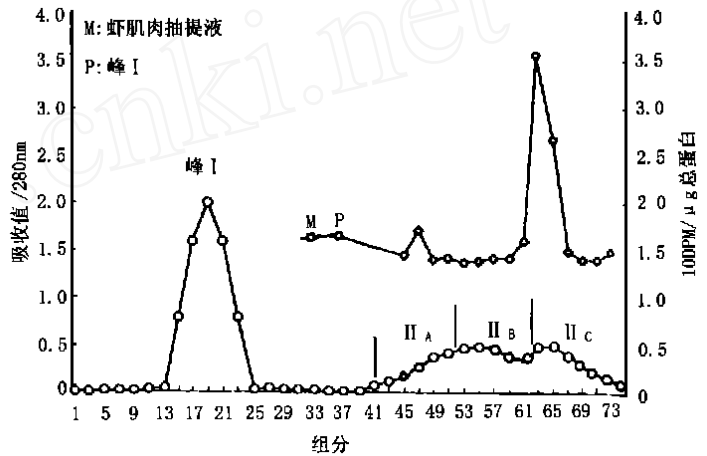


图 1 罗氏沼虾脑抽提液柱层析的洗脱曲线及峰 II 各组分对该虾卵巢总蛋白合成的影响

Fig. 1 Gel filtration profile on a Sephadex G-50 column of brain extracts of *M. rosenbergii* and effects on synthesis in vitro of the prawn total ovary protein of fractions from peak II - 洗脱组分的吸收值; - 总蛋白的合成

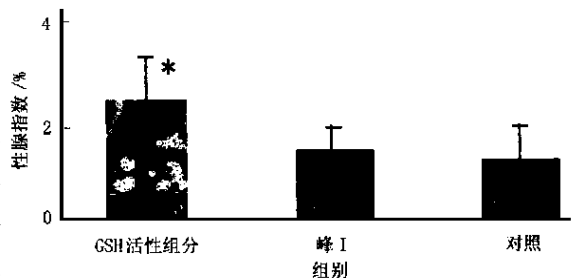


图 2 注射 GSH 活性组分对日本沼虾卵巢性腺指数的影响
Fig. 2 Effects on GSI of *M. nipponense* of injecting GSH fraction
注: * P<0.05

差异 ($P < 0.05$)。如表 3 所示,注射 GSH 活性组分的日本沼虾在第 10d(即第三次注射后)和第 15d(即第四次注射后),均较注射肌肉抽提液和峰 组有较多的虾的卵巢达到了更好的发育或成熟。

表 2 峰 各组分对卵巢总蛋白合成(DPM μg^{-1} 总蛋白)的影响($n = 5$)

Tab. 2 Effects on the synthesis of ovary total protein of fractions in the peak (DPM μg^{-1} total protein)

组分及其蛋白浓度 ($\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$)	$\bar{X} \pm \text{SE}$	组分及其蛋白浓度 ($\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$)	$\bar{X} \pm \text{SE}$	组分及其蛋白浓度 ($\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$)	$\bar{X} \pm \text{SE}$
对照		53		65	
(1.484)	16.20 \pm 1.82	(1.240)	13.88 \pm 2.63	(1.219)	26.85 \pm 7.56 *
峰		55		67	
(1.512)	16.53 \pm 2.03	(0.868)	14.05 \pm 2.42	(0.847)	15.11 \pm 3.88
45		57		69	
(0.227)	14.60 \pm 1.94	(0.765)	14.26 \pm 2.62	(0.427)	14.15 \pm 2.29
47		59		71	
(0.413)	17.22 \pm 2.39	(0.537)	14.27 \pm 2.17	(0.248)	14.15 \pm 2.29
49		61		73	
(0.661)	14.15 \pm 3.63	(1.095)	16.15 \pm 4.06	(0.207)	16.91 \pm 3.99
51		63			
(0.91)	14.25 \pm 2.11	(1.178)	35.83 \pm 8.92 * *		

注: * $P < 0.05$; * * $P < 0.01$ 。

表 3 注射 GSH 活性组分对日本沼虾卵巢发育的影响

Tab. 3 Effects on ovary maturation of *M. nipponense* of injecting GSH fraction

时间	组别	处于各卵巢发育期的虾个体数				存活率(%)
		期	期	期	期	
实验中	GSH 活性组分	6	8	0	0	93.3
	峰	11	2	0	0	86.7
	对照	10	3	0	0	86.7
实验未	GSH 活性组分	0	3	6	3	80.0
	峰	0	10	1	0	73.3
	对照	0	9	2	0	73.3

2.4 GSH 的分子量

63 组分经高效液相色谱柱洗脱曲线如图 3,根据方程计算,该组分中蛋白质的最高分子量为 7kD,因此,GSH 的分子量在 7kD 以下。

3 讨论

检测激素对虾类卵巢发育的作用的方法主要源于眼柄中性腺抑制激素的研究,分体外培养和活体注射两种。

体外实验的方法可分为三种:将激素与卵巢小块一起培养。培养后检查卵母细胞直径的变化^[9]。

在体外培养卵巢的培养基中掺入同位素标记的亮氨酸,并通过测培养后单位重量的卵巢总蛋白的液闪计数值,而得到卵巢总蛋白合成的变化情况^[3]。和 一样加入同位素,用卵黄磷蛋白(Vitellin, Vn)的抗血清免疫沉淀出总蛋白中的 Vn,用液闪计数,得到 Vn 的合成情况^[10]。

活体注射的方法有两种:按一定的时间间隔给卵巢不成熟的虾注射激素,一段时间以后,观察卵巢发育情况并测量 GSI。给虾注射激素,48h 后抽取虾的血清与卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)的抗血清一起进行火箭免疫电泳,测虾血清中 Vg 的含量变化^[11]。体外实验的方法与活体注射方法各有所长。体外实验的方法比较省时,不受虾体内其它因素干扰,方法 可更直观地反映激素的作用。方法 与方法 直接反映激素对卵母细胞 Vn 或 Vg 合成的作用。以上方法常结合使用。

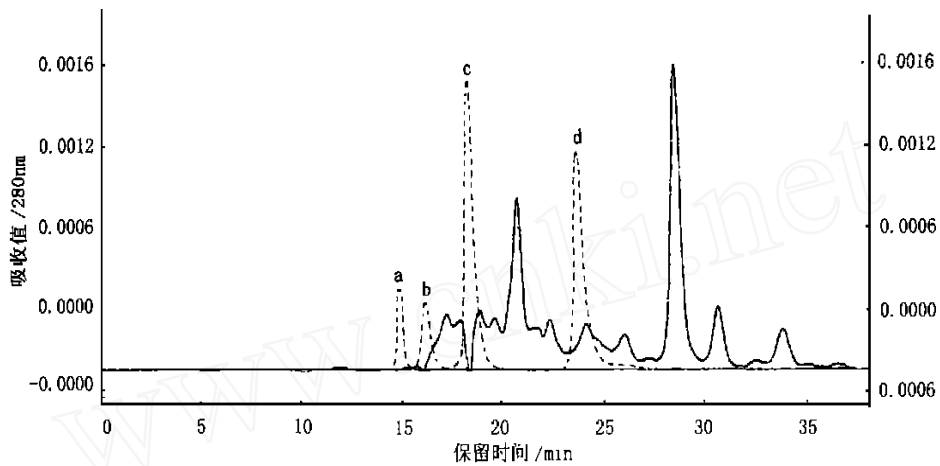


图3 63组分的分子量测定(300mm ×7.5mm)

Fig. 3 Measurement of molecular weight of fraction 63 by column TOSOH TSK-GEL G2000SW

注:—63组分的洗脱曲线; ···标准分子量对照物的洗脱曲线

a:细胞色素 C; b:抑肽酶; c: 维生素 B₁₂; d:核黄素

在本实验中由于未能得到罗氏沼虾 Vn 的抗血清,所以不能应用方法 , ,而采用方法 、 和相结合的办法检测 GSH 的活性作用,从整个研究来看,三种方法的结果是一致的,因而表明三种方法在本研究中是可靠可行的,并证明罗氏沼虾脑中是存在 GSH 的,而且就在 63 - 65 组分中。

对体外培养卵母细胞直径的测量方法,我们还做了改进,即不按 Tsukimura 和 Kamemoto^[9]那样测量卵巢石蜡包埋切片后的卵母细胞的直径,而是直接用虾生理盐水配成的甲醛溶液进行固定后,当天测卵母细胞直径。多次试验证明用这种方法处理不会使卵母细胞变形,能较准确地反映卵母细胞直径的变化,测定也更为简便。

在体外培养总蛋白合成的实验中,肌肉抽提液、峰 和峰 的 53 组分的蛋白质浓度比峰 的 63、65 组分的还高,但它们处理的卵巢的总蛋白合成量并不比 63、65 组分处理的高,说明加入的 10μL 液体,仅其中的蛋白质浓度高并不能使总蛋白合成量增加。因此,63、65 组分处理的卵巢,其 DPM μg⁻¹ 总蛋白高于峰 中其它组分,也不应是由于其中的蛋白质含量不同,而是由于其中含有 GSH 成分的缘故。GSH 活性成分可使体外培养的卵母细胞直径增大、总蛋白合成增加,提示该激素可直接作用于卵巢或卵母细胞。

本研究经过凝胶层析和活性试验,已将虾脑中的大部分蛋白质和 GSH 分离,从而达到了 GSH 的初步纯化。但从测分子量的结果来看,63 ~ 65 组分含有的成分还较多,因此我们正在对其作进一步的分离和纯化。

参考文献:

- [1] Otsu T. Bihormonal control of sexual cycle in the freshwater crab, *Potamon dehaani*[J]. Embryologia, 1963, 8: 1 - 20.
- [2] Hinsh G W, Bennent D C. Vitellogenesis stimulated by thoracic ganglion implants into destalked immature spider crab, *Libinia emarginata*[J]. Tissue and cell, 1979, 11: 345 - 351.
- [3] Eastman-Reks S, Fingerman M. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugilator*[J]. Comp Biochem Physiol, 1984, 79A: 679 - 684.
- [4] Yano I, Tsukimura B, Sweeney J N, et al. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion[J]. J World Aquac Soc, 1988, 19: 204 - 209.
- [5] Yano I. Ultraintensive culture and maturation in captivity of penaeid shrimp[A]. McVey J P, ed: CRC handbook of mariculture: Crustacean aquaculture (2nd ed) [C]. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1993, 289 - 313.

- [6] Nagamine C, Knight A W, Maggenti A, et al. Effects of androgenic gland on male primary and secondary sexual characteristic in the Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* (deMan) (Decapoda, Palaemonidae) with first evidence of induced feminization in a non-hermaphroditic decapod [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1980, 41 :423 - 441.
- [7] Damrongphol P, Eangchuan N, Poolsanguan B. Spawning cycle and oocyte maturation in laboratory-maintained giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Aquac*, 1991, 95 : 347 - 357.
- [8] Quackenbush L S, Keeley L L. Regulation of vitellogenesis in the fiddler crab, *Uca pugilator*[J]. *Biol Bull*, 1988, 175 :321 - 331.
- [9] Tsukimura B, Kamemoto F I. *In vitro* stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. *Aquac*, 1991, 92 :59 - 66.
- [10] Riley L G, Tsukimura B. Yolk protein synthesis in the ricefield tadpole shrimp, *Triops longicaudatus*, measured by *in vitro* incorporation of H³-Leucine[J]. *J Exp Zool*, 1998, 281 : 238 - 247.
- [11] Yano I. Effect of 17 α -hydroxy-progesterone on vitellogenin secretion on kuruma prawn, *Penaeus japonicus*[J]. *Aquac*, 1987, 61 :49 - 57.