

文章编号: 0529-6579 (2000) S2-0093-03

# 罗氏沼虾眼柄性腺抑制激素 (GIH) 的分离纯化及性质的研究\*

林远声, 邓 锋, 廖家遗

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘 要:** 以加热离心的方法获得罗氏沼虾眼柄粗提取液及用凝胶层析和平板电泳等生化方法进一步分离纯化, 并分别对日本沼虾和罗氏沼虾卵母细胞进行体外培养, 发现其对卵母细胞发育均具有一定的抑制作用, 说明罗氏沼虾眼柄抽提液含有较多的 GIH, 且他们在结构和功能上具有属内相似性。

**关键词:** 罗氏沼虾; 眼柄; 性腺抑制激素 (GIH)

**中图分类号:** Q959.223 **文献标识码:** A

罗氏沼虾在动物分类学上属甲壳纲 (Crustacea) 长臂虾科 (Palaemonidae) 沼虾属 (*Macrobrachium*)。一年产卵多次, 只要水温适宜, 可常年产卵繁殖, 是一种重要的经济水产动物。随着社会的发展及生活水平的提高, 人们对罗氏沼虾的需求量不断上升。因此, 如何提高其产量和虾幼体成活率及如何调节控制其卵巢发育等, 是现时较热门的研究课题。在研究早期, 人们发现虾的内分泌系统对卵黄的发生具有重要的调节作用。有人早在 1943 年就已证明去除虾眼柄可诱导性腺早熟, 这种作用与去掉眼柄的一种神经激素有关, 这种激素就是本文提到的性腺抑制激素 (GIH)。通过卵巢组织的体外培养, 有意识地加入 GIH 或有关激素, 能发现 GIH 的显著作用, 这说明了 GIH 对卵母细胞卵黄发生作用具有直接或间接的抑制作用。

目前, 人们对 GIH 的研究在对虾、龙虾、螯虾和蟹等已进行了较多的研究, 并测定了其中某些 GIH 的相对分子质量 (3 000~9 000)、氨基酸组成等, 取得了不少有价值的成果, 而作为一种重要淡水经济虾类的罗氏沼虾, 其 GIH 则仅有赵维信等少数人进行了一些初步的研究<sup>[1]</sup>。故本实验对罗氏沼虾眼柄粗提液和经层析及电泳后的样品进行初步的分析和鉴定, 并通过对卵母细胞培养的方法, 研究了它对卵母细胞的影响。

## 1 材料与方法

(1) 材料: 繁殖期雌性罗氏沼虾, 卵巢发育 2, 3 期罗氏沼虾和日本沼虾卵母细胞。

试剂为丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, Tris, HCl, 考马氏蓝,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  等。

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670103)

收稿日期: 2000-10-15; 作者简介: 林远声 (1945~), 男, 副教授。

(2) 眼柄粗提液的制备: 眼柄→均浆→煮沸→冷却→离心→粗提液;  
 GIH 纯化: 凝胶过滤法<sup>[3]</sup>, 凝胶电泳法<sup>[3]</sup>, 活性鉴定——卵巢细胞体外培养法<sup>[2]</sup>.

## 2 结果

### 2.1 眼柄粗提液对虾卵母细胞的培养结果

取繁殖期雌性罗氏沼虾(20~40 g/只), 将其眼柄剪下, 加入适量水匀浆, 匀浆液经煮沸、冷却、离心, 取上清(75.2 mL 平均浓度为 10 个眼柄/mL). 然后, 分别取一定量眼柄粗提液对日本沼虾及罗氏沼虾的卵母细胞进行体外培养.

2.1.1 眼柄粗提液对日本沼虾卵母细胞培养结果 用卵巢发育第3期的日本沼虾卵母细胞为材料, 以眼柄粗提液的不同梯度对卵母细胞进行培养, 并记录培养后卵径的大小和检测值. 以鉴定眼柄液不同梯度对卵母细胞发育的影响程度, 结果见表1.

表1 眼柄粗提液对日本沼虾卵母细胞的影响<sup>1)</sup>

| 组别  | 卵径/ $\mu\text{m}$ |     |     |     | 平均值 | 标准差  | t 检验   |
|-----|-------------------|-----|-----|-----|-----|------|--------|
|     | 1                 | 2   | 3   | 4   |     |      |        |
| 空白  | 311               | 401 | 260 | 250 | 306 | 69.0 |        |
| 梯度1 | 265               | 391 | 252 | 200 | 277 | 81.0 | > 0.05 |
| 梯度2 | 280               | 375 | 255 | 208 | 280 | 70.3 | > 0.05 |
| 梯度3 | 265               | 362 | 237 | 223 | 272 | 62.7 | > 0.05 |

1) 空白为不加眼柄液的培养; 梯度1为0.001眼柄/mL; 梯度2为0.01眼柄/mL;

梯度3为1眼柄/mL; 为20个统计细胞的平均值

2.1.2 眼柄粗提液对罗氏沼虾卵母细胞的培养结果 用卵巢发育至第2, 3期的罗氏沼虾卵母细胞为材料, 以眼柄粗提液的不同梯度对其进行培养, 每20个细胞为一个统计单位(见表2).

表2 眼柄粗提液对罗氏沼虾卵母细胞的影响<sup>1)</sup>

| 组别  | 卵径/ $\mu\text{m}$ |     |     |     | 平均值 | 标准差  | t 检验   |
|-----|-------------------|-----|-----|-----|-----|------|--------|
|     | 1                 | 2   | 3   | 4   |     |      |        |
| 空白  | 227               | 261 | 208 | 260 | 239 | 26.0 |        |
| 梯度1 | 216               | 260 | 202 | 255 | 233 | 28.7 | > 0.5  |
| 梯度2 | 205               | 225 | 187 | 230 | 212 | 21.5 | > 0.05 |

1) 梯度1为0.01眼柄/mL; 梯度2为1眼柄/mL

### 2.2 眼柄层析样品及其对罗氏沼虾卵母细胞的影响

将眼柄粗提液进行凝胶层析, 由仪器录得2个层析峰I和II, 并将峰I和II分别对罗氏沼虾卵巢发育第3期的卵母细胞进行体外培养, 各峰样对卵母细胞发育的影响见表3.

表3 眼柄粗提液层析峰对卵母细胞发育的影响

| 组别  | 卵径/ $\mu\text{m}$ |     |     |     | 平均值 | 作用 | 标准差  | t 检验   |
|-----|-------------------|-----|-----|-----|-----|----|------|--------|
|     | 1                 | 2   | 3   | 4   |     |    |      |        |
| 空白1 | 137               | 167 | 145 | 171 | 155 |    | 16.6 |        |
| 峰1  | 130               | 147 | 145 | 185 | 152 | 小  | 23.4 | > 0.05 |
| 空白2 | 230               | 117 | 245 | 235 | 212 |    | 63.5 |        |
| 峰2  | 215               | 70  | 205 | 228 | 180 | 大  | 73.6 | > 0.05 |

### 2.3 眼柄电泳样品及其对罗氏沼虾卵母细胞发育的影响

眼柄粗提液用平板电泳, 所得的胶经染色液 (考马斯亮蓝, BBG-250) 染色, 出现 10 条电泳谱带, 收集其中 2 个含量较多的样品带 I 和 II, 并分别对罗氏沼虾卵母细胞进行体外培养, 结果见表 4.

表 4 眼柄粗提液电泳样品对罗氏沼虾卵母细胞发育的影响

| 组别   | 卵径/ $\mu\text{m}$ |     |     | 作用 | 标准差  | t 检验   |
|------|-------------------|-----|-----|----|------|--------|
|      | 1                 | 2   | 平均值 |    |      |        |
| 空白 1 | 134               | 177 | 156 |    | 30.4 |        |
| 峰 1  | 173               | 185 | 179 | +  | 8.5  | > 0.05 |
| 空白 2 | 179               | 184 | 182 |    | 3.5  |        |
| 峰 2  | 143               | 132 | 138 | -  | 7.8  | < 0.01 |

### 2.4 电泳样品洗脱液对色素细胞作用

将眼柄粗提液进行 PAGF 平板电泳后, 收集 2 条带的样品液, 分别取一定量注入日本沼虾体内, 结果发现样品 II 注射的虾表皮色素细胞的有明显的收缩作用, 而电泳样品 I 则没有此现象.

## 3 讨 论

从表 1, 2 结果可看出, 罗氏沼虾粗提液中, 不管哪个实验梯度, 对日本沼虾和罗氏沼虾的卵母细胞发育均具有不同程度的抑制作用, 且浓度越高, 抑制越明显, 即梯度为 1 个眼柄/mL 的粗提液就具有显著的抑制性. 这就证明了罗氏沼虾眼柄确实含有对其性腺发育具有抑制调控作用的性腺抑制激素 (GIH), 且说明罗氏沼虾中的 GIH 与日本沼虾的 GIH 具有结构和性质方面的相似性和通用性.

罗氏沼虾眼柄粗提液经凝胶层析中的仪器录得, 眼柄粗提液在层析时出现 2 个峰值 (I 和 II), 其中峰 I 较峰 II 矮, 而两者距离较近. 说明眼柄粗提液中主要含有 2 个小肽物质, 且其相对分子质量较近.

同时, 用层析样不同组分 (即峰 I 和 II) 分别对罗氏沼虾卵母细胞进行体外培养, 从表 3 数据显示, 层析样品峰 I 对卵母细胞抑制作用不明显或说基本没有抑制, 说明此峰不是 GIH 峰带或 GIH 含量极低. 而样品层析峰 II, 从表 3 数据表明, 对罗氏沼虾的卵母细胞发育具有较明显的抑制作用, 说明此层析峰为 GIH.

罗氏沼虾眼柄粗提液用 PAG 凝胶电泳后, 收集得 2 个明显样品带 I 和 II, 从表 4 结果表明, 样品带 I 对卵母细胞具有促进作用, 但不显著. 这说明眼柄中也含有促进卵母细胞发育的物质, 这种物质在纯化状态下具有促进活性, 而其对卵母细胞的促进作用远不如 GIH 对卵母细胞的抑制作用. 样品带 II 对罗氏沼虾卵母细胞体外培养结果表明, 卵母细胞发育受到显著的抑制作用, 说明此样品带含有较多的纯的 GIH, 在较纯的条件下具有很大的抑制活性.

罗氏沼虾眼柄含有对虾卵母细胞有抑制作用的性腺抑制激素 (GIH). 其粗提液经凝胶层析和 PAG 电泳后层析带 II 与电泳带 II 是含 GIH 较多的谱带, 对卵母细胞发育均具有显著的抑制作用.