

文章编号: 1674-5566(2010)01-0028-06

中华绒螯蟹促雄性腺素分离、纯化的初步研究

肖美南, 徐佳念, 蔡生力, 刘红

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 将中华绒螯蟹促雄性腺的蛋白提取物经凝胶过滤后所得到的各个组分分别进行促雄性腺素 (AGH) 生物活性的初步检测, 以输精管和精巢的蛋白提取物作为阴性对照, 保幼激素 (JHIII) 作为阳性对照, 结果发现其中 7 个组分对卵巢组织的氨基酸吸收具有明显的抑制作用, 且与磷酸缓冲液 (PBS) 存在显著差异, 初步判断该 7 个组分可能存在 AGH 生物活性; 阴性对照组对卵巢组织的氨基酸吸收没有抑制作用, JHIII 阳性对照与 PBS 差异极为显著。再将上述可能具有 AGH 活性的 7 个组分分别注射到中华绒螯蟹雌性幼蟹体内, 观察是否真正具有 AGH 活性, 结果其中 2 个样品注射后雌性幼蟹产生了性别逆转现象, 证明该 2 个样品组分中确实存在中华绒螯蟹促雄性腺素。

关键词: 中华绒螯蟹; 促雄性腺素; 生物活性检测; 性别逆转

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Preliminary study on isolation and purification of the androgenic gland hormone of *Eriocheir sinensis*

XIAO Meinan, XU Jianian, CAI Shengli, LIU Hong

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In the present study, the androgenic gland (AG) of *Eriocheir sinensis* was extracted for protein. The crucial protein AG extract was conducted for the gel filtration. Then the fractions from gel filtration were used for the primary bioassay for the androgenic gland hormone (AGH) activity. The juvenile hormone III (JHIII) was used as the positive control and the protein extractions of posterior vas deferens (PVD) and the testes (TE) as the negative control. It was found that 7 fractions showed significant inhibition in the uptake of amino acid by ovary tissue compared with the PBS control during the in vitro tissue culture. These fractions are the potential androgenic gland hormone (AGH) fractions. The PVD and TE groups showed no significant difference compared with PBS, while the JHIII was significantly higher compared with the PBS group. Then these potential AGH fractions were injected into the female juvenile crabs to confirm the AGH activity. The sex reversal was observed in crabs of two treatments. So the two fractions are improved to include AGH.

Key words: *Eriocheir sinensis*; androgenic gland hormone; bioassay; sex reversal

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称大闸蟹, 肉质鲜美, 是我国主要的淡水蟹类养殖种类, 具

收稿日期: 2009-06-10

基金项目: 上海市教育委员会重点学科建设项目 (50701)

作者简介: 肖美南 (1983-), 女, 硕士研究生, 专业方向为水产动物的繁殖与发育生物学。E-mail: xiaomeinan0327@hotmail.com

通讯作者: 刘红, E-mail: hli@shou.edu.cn

有较高的经济价值。目前在中华绒螯蟹养殖过程中主要采用的是雌雄混养的传统模式。混养早期,由于雄性的生长速率明显高于雌性,两性之间的残杀无疑造成了雌蟹较高的死亡率。混养后期,雌蟹的早熟导致了成蟹规格变小。因此,中华绒螯蟹的单性养殖可能成为解决这一问题的有效途径。促雄性腺作为中华绒螯蟹雄性性征发育相关激素的唯一来源,不仅控制雄性生殖系统的分化而且调节雄性第二性征的发育。此外,促雄性腺还起到控制雄性形态特征分化的功能。迄今为止国内外并未有其分离纯化方面的相关报道。本实验通过对中华绒螯蟹促雄性腺素的初步分离、纯化得到了部分纯化的促雄性腺素,并寻找到一种方便、快捷、高效的生物活性检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的中华绒螯蟹雄性成蟹于2007年11月—12月在上海市图们路农贸市场购得,实验中共解剖485只,壳宽为 (6.4 ± 0.2) mm,体重为 (121.8 ± 8.0) g,解剖得到其促雄性腺。

实验所用的幼蟹于2008年6月下旬在江苏吕泗育苗基地取得,室内置于 80 mm \times 60 mm \times 60 mm的暂养箱中暂养,水温控制在 (25 ± 1) °C,PH为 7.0 ± 0.1 。暂养箱内的水深 15 mm左右,水体上层浮有一层水葫芦和几片沙网,每天投喂鲢鱼糜和幼蟹专用的配合饲料2次,投喂1 h后吸残饵换水,换水量为总水体的 $1/3$ 左右。幼蟹饲养10 d后挑选刚刚完成性别分化的雌蟹进行注射实验。注射后的雌蟹放在 35 mm \times 25 mm \times 10 mm的塑料盒中,按处理组分开饲养,具体饲养方法同前。

实验所用的卵巢二次发育雌蟹取自第一次排卵当日的中华绒螯蟹,于2008年4月上旬在江苏吕泗育苗基地取得,平均壳长为 (6.1 ± 0.2) mm,体重 (104 ± 9.8) g,置于 80 mm \times 60 mm \times 60 mm的暂养箱中暂养,暂养箱底部铺有 10 mm左右的细砂层,并设置了躲避处,水深 $15 \sim 20$ mm。每日早晚投喂蚤螺(*Sinonovacula constricta*)活体各一次。实验期间每日去残饵,换水一次,换水量为 50% 左右,水温控制在 (18 ± 2) °C左右,与亲蟹排卵前水温相似,PH为 7.0 ± 0.2 。

1.2 实验试剂

甲壳类生理盐水参照Grau等^[1]及Toulliec等^[2]的配方配制;蛋白提取液、磷酸缓冲液参照分子克隆试验指南附录^[3];洗脱液参照GE公司凝胶柱使用手册配制;保幼激素III(IHIII, Sigma J2000);培养基参见Cu等^[4]在锯缘青蟹中体外组织培养的配方;L-[4,5-³H]-亮氨酸(L-[4,5-³H]-leucine)。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白质的抽提

蛋白质的抽提参照文献[3]。蛋白质的浓度由紫外分光光度法和BCA(Sigma公司生产)两种方法测得。

1.3.2 凝胶层析

实验采用凝胶柱1:Amersham Biosciences公司生产的Superdex 75 10/300 GL,凝胶柱2:GE Healthcare Biosciences公司生产的HLoad 16/60 Superdex75 prep grade,都采用BioRad公司的凝胶层析仪进行样品的分离与接收。

1.3.3 生物活性的初步检测

实验的具体方法参照Cu等^[4]的体外组织培养方法。雌性亲蟹的选择则在前期实验后确定,具体参见文献[5]。

1.3.4 生物活性的最终确定

将上述实验中存在显著差异的蛋白质组分别注射到刚完成性别分化的中华绒螯蟹雌性幼体的体内,其壳宽为 (7.1 ± 0.2) mm,部分处理组约50只,部分约35只,培养观察是否有雌体雄性化现象。

2 结果

2.1 蛋白质的提取

将308对中华绒螯蟹促雄性腺加入提取液中匀浆提取蛋白, 4 °C, $16\ 000$ rpm离心 20 min,取上清再次离心 20 min,最后上清即为促雄性腺蛋白提取液。相同的方法提取输精管(posterior vas deferens, PVD)和精巢(testes, TE),作为对照组,然后都放在 -20 °C保存。最终,促雄性腺的蛋白提取物的终浓度为 2.19 mg/mL,体积为 2.2 mL。

2.2 凝胶层析

样品经过凝胶柱1过滤后的层析图谱见图

1. 上样体积为 50 μL , 重复 2 次凝胶层析, 由图可见, 1.5 个柱体积 36 mL 的层析过程中共出现 11 个峰。上样后约 12 min 时出现 3 个峰 (图 1 中

1~3), 22 min 开始连续出现了 5 个峰 (图 1 中 4~8), 30 min 以后出现 3 个峰 (图 1 中 9~10)。

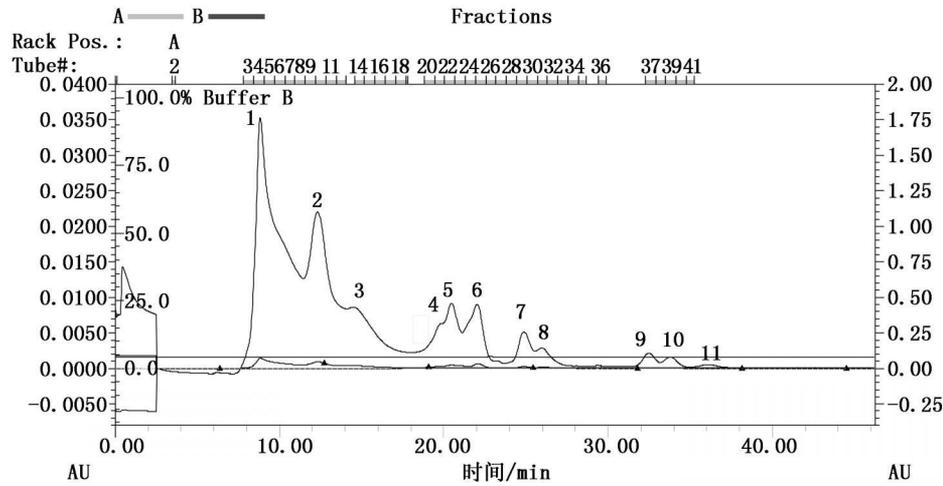


图 1 蛋白层析图谱
Fig 1 The chromatography of protein

2.3 生物活性的初步检验

将样品经过凝胶过滤后的各个组分分别进行了促雄性腺素生物活性的初步检测, 结果发现有 7 个组分与 PBS 对照组相比差异显著, 其中两组差异极为显著。JHIII 作为阳性对照与 PBS 也存在极显著的差异。输精管和精巢提取液作为阴性对照与 PBS 无显著差异。具体结果见表 1、图 2。

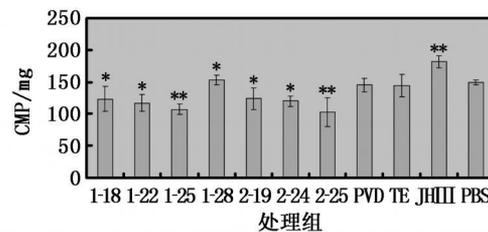


图 2 生物活性初步检测结果
Fig 2 Results of primary bioassay of AGH

表 1 中华绒螯蟹对 L-[4,5- ^3H]亮氨酸的吸收
Tab 1 Uptake of L-[4,5- ^3H]-Leucine by ovary slices of *Eriocheir sinensis*

处理组	CPM(mg)	P值 (与 PBS 相比)	抑制率 (%)
1-18	123 53 \pm 19.16	0.045*	17.22
1-22	117 33 \pm 12.75	0.0107*	21.38
1-25	107 34 \pm 7.83	0.00062**	28.07
1-28	153 37 \pm 7.22	0.0357*	-2.77
2-19	123 83 \pm 16.63	0.0377*	17.02
2-24	120 10 \pm 7.74	0.0186*	19.52
2-25	103 03 \pm 22.81	0.00049**	30.96
PVD	145 56 \pm 10.54	0.448	2.5
TE	144 26 \pm 17.95	0.428	3.3
JHIII	182 13 \pm 9.43	0.00873**	-22.04
PBS	149 23 \pm 3.5	-	-

注: *表示显著性差异 ($P < 0.05$); **表示极显著差异 ($P < 0.01$); 抑制率 (%) = $(\bar{y}_1 - \bar{y}_2) / \bar{y}_1 \times 100$ \bar{y}_1 为 PBS 处理中每毫克组织的 CPM 值; \bar{y}_2 为其他处理中每毫克组织的 CPM 值; 1-18 表示第 1 次凝胶过滤时, 接收的第 18 管样品, 同组其它数据标注方法类似; 2-19 表示第 2 次凝胶过滤时, 接收的第 19 管样品, 同组其它数据标注方法类似。

由表 1、图 2 明显看出, 与 PBS 对照组相比, 其中 1-25 和 2-25 两组差异极为显著, 说明它们可能具有促雄性腺素活性。

2.4 分离蛋白质样品的浓度测定

由于凝胶柱 1 分离所得的样品浓度太低, 考虑到下面生物活性最终确定部分的成功率, 采用凝胶柱 2 进行重新凝胶层析过滤, 并结合凝胶柱 1 生物活性的初步检验结果, 筛选出 3A~9A 组分。测得样品的浓度如下表。

表 2 中华绒螯蟹促雄性腺的分离蛋白质样品的浓度
Tab 2 Concentration of protein separation sample of androgenic gland in *Eriocheir sinensis*

分离样品名称	蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	体积 (mL)
3A	0.05	0.8
4A	0.05	0.8
5A	0.021	0.8
6A	0.025	0.8
7A	0.018	0.8
8A	0.0144	0.8
9A	0.011	0.8

2.5 生物活性的最终确定

表 3 为饲养 20 d、40 d、60 d 和 90 d 时的雌蟹存活情况及观察统计结果。总的存活率分别为 20%、15%、8%、3% 左右。其中, 注射样品 3A

和 5A 后的雌蟹在饲养了 20 d 时观察到腹部出现了雄性附肢, 此时的幼蟹进过了一次褪壳, 如图 3。

表 3 中华绒螯蟹幼体注射实验

Tab 3 Summary of injection experiment in *Erpochirus sinensis*

注射样品	注射个数	3 d 内死亡数(率)	20 d 成活数(率)	40 d 成活数(率)	60 d 成活数(率)	90 d 成活数(率)	雄性化个体数
3A	33	2(6.06%)	4(12.12%)	3(9.68%)	1(3.23%)	1(3.23%)	3
4A	34	7(20.59%)	3(8.8%)	2(7.41%)	1(3.7%)	1(0%)	0
5A	48	8(16.67%)	5(10.42%)	3(7.5%)	2(5%)	0(0%)	1
6A	45	10(22.22%)	5(15.11%)	1(2.86%)	1(2.86%)	1(2.86%)	0
7A	47	10(21.28%)	9(19.15%)	2(5.40%)	1(2.7%)	1(2.7%)	0
8A	47	9(19.15%)	4(8.51%)	2(5.26%)	1(2.63%)	0(0%)	0
9A	48	10(20.83%)	13(27.08%)	7(18.42%)	3(7.89%)	2(5.26%)	0
PBS	49	5(10.2%)	6(12.24%)	5(11.36%)	3(6.82%)	0(0%)	0
全雄组	53	9(16.98%)	17(32.08%)	16(36.36%)	10(22.73%)	5(11.36%)	—
未处理组	36	2(5.56%)	17(47.22%)	14(41.18%)	7(20.59%)	2(5.88%)	0
总计数	387	63(16.28%)	66(17.05%)	39(10.08%)	20(5.17%)	8(2.07%)	4

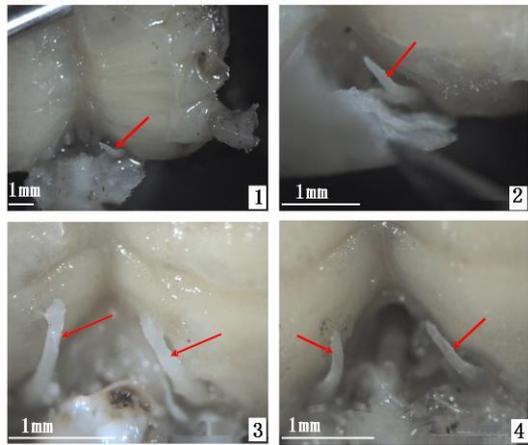


图 3 注射促雄性腺提取物组分 3A 和 5A 后 20 d 雌性个体出现雄性附肢

Fig 3 The male appendage was observed in female juvenile crab after the injection of AG fractions 3A and 5A on the 20 th day

注: 1~3 表示注射 3A 后的观察; 4 表示注射 5A 后的观察; 箭头表示雄性附肢。

3 讨论

3.1 促雄性腺生物活性初步检测

促雄性腺素尽管普遍的存在于甲壳纲软甲亚纲中, 并且在普通卷甲虫 (*Amadillidium vulgare*) 中已获得基因序列, 但在十足目生物中进行相似研究则困难得多。进行蛋白质分离纯化, 其中最关键的问题就是有一套相对方便快捷的

生物活性检验方法。等足目普通卷甲虫不但可以完全在实验室中进行传代培养, 而且生活周期短, 幼体注射后 5~15 d 即可观察到外部雄性化特征的出现。而十足目一般生活周期较长, 在中华绒螯蟹的幼体注射实验中, 外部雄性化特征的出现时间相对较长, 通常在 40~50 d 甚至更长。同时, 由于十足目具有较长的生活周期, 所需特定发育阶段的研究对象不易获得, 一般一个生物季节 (通常一年) 只能进行一次生物活性的检测实验, 重复实验则必须等待下一生物季节才有可能。十足目的幼体需要通过蜕皮来完成生长发育的过程, 生物蜕皮的整个过程中都需要大量能量来维持, 对于生物来说每一次蜕皮, 都是生死攸关的大事, 稍有差错就会导致个体的死亡, 在实验过程中唯有增加处理个体的数量才能确保实验结束时得到有效的结果。此外, 样品经过凝胶层析后所得到的组分数量极多, 如果全部进行幼体注射, 势必造成实验难度成指数般增长。正是由于以上种种原因, 在十足目中, 生物活性的检测成为制约促雄性腺素分离纯化研究的主要障碍, 因此, 非常需要一套相对方便、快捷、高效的促雄性腺素生物活性的检测方法来加快对十足目促雄性腺素的研究。而我们实验室所用的促雄性腺素活性初步筛选方法即先采用相对快捷的卵巢组织体外培养的方法筛选出所有可能具有促雄性腺素活性的组分, 大大减轻了后期注

射时的工作量,而且可以在同一个生物季节中先作初步筛选,再做最后鉴定。

3.2 促雄性腺生物活性的最终确定

日本、法国等在对普通卷甲虫促雄性腺素生物活性的检测中一直沿用 Katakura等^[6]所采用的幼体注射法。对于罗氏沼虾、红螯螯虾促雄性腺的研究大多数集中于摘除、植入或是摘除后再次移植促雄性腺所产生的影响及个体变化^[7-10]。而蟹类与等足目、对虾和龙虾相比,促雄性腺摘除实验几乎不太可能,使得蟹类的促雄性腺素的研究工作相对自然落后。对普通滨蟹(*Carcinus maenas*)^[11]、沙蟹(*Ocyropsis*)^[12]和日本绒螯蟹(*Eriocheir japonicus*)^[13]移植或注射促雄性腺提取物,均发现有雌蟹雄性化现象,因此本实验也采用通用的促雄性腺素幼体注射方法。

3.3 生物活性检测中实验对象所处发育阶段的选择

本实验中中华绒螯蟹促雄性腺素的鉴定包含了两部分的检测工作。中华绒螯蟹卵巢的体外组织培养和雌性幼体注射。在第一部分中,采用的是二次发育的卵巢。在前期实验中,我们发现在首次发育的中华绒螯蟹雌蟹中,处于不同部位的卵巢发育并不同步^[5]。如果采用首次发育的中华绒螯蟹进行体外组织的培养,不同部位的卵巢对培养基中氨基酸的吸收也不同,从而实验数据本身的差异掩盖了实验差异的可能性。根据以往在锯缘青蟹中的研究发现:首次排卵后的青蟹卵巢发育(即二次发育)同步性高于卵巢首次发育的雌蟹,我们将实验材料确定在二次发育的中华绒螯蟹雌体亲蟹的卵巢上。本实验室通过对中华绒螯蟹卵巢二次发育的连续性研究,找出了最适宜用作生物活性初步检测的卵巢发育阶段。

器官的发生有特定的时期^[14],第二部分中,幼体注射对象为刚刚完成性别分化的中华绒螯蟹幼蟹,注射之后,幼蟹经过大约一次蜕皮,实验幼蟹中就能观察到雄性化现象。因此,选择相对适当的注射时期是很重要的。

3.4 存活率

Li等^[15]所做的实验中,注射过样品的中华绒螯蟹幼蟹饲养40~50d后存活率在10%~12%。十足目之所以实验结束时存活率较低,与

其较长的发育周期有着很大的联系。普通卷甲虫只需5~15d即能观察到雄性化的现象,而在十足目的虾、蟹中则需要较长周期。从本次的实验结果来看,发现注射后的中华绒螯蟹幼蟹生长的前20d会有一个极高的死亡率,40d以后是个相对稳定的时期。因而,为了确保实验结束时实验对象的数量,努力减少前期的死亡率尤为为重要。为此,一方面,加大实验初期的实验数量是切实可行的;另一方面,养殖期间尽量少观察幼蟹的变化情况,目的是为了减少机械损伤,提高成活率。

3.5 注射剂量和变异时间

研究表明,注射相当于1只促雄性腺量的匀浆物,能使淡水螯虾产生雄性生殖孔^[16]。Li等^[15]研究发现,注射相当于0.14只中华绒螯蟹促雄性腺或0.06只锯缘青蟹促雄性腺量的匀浆物,能够出现中华绒螯蟹雌体雄性化现象。这表明较低剂量的促雄性腺素即诱导雄性化现象的发生。对于普通卷甲虫,注射10U的促雄性腺提取物几乎不能使内部器官发生雄性化^[17],只有提高到一定剂量时才起作用。本实验分别注射0.125^{ng}和0.0525^{ng}的相对纯化蛋白,前一组的变异率是后组的3倍,同样说明了相对高浓度的促雄性腺素更能诱导雄性化现象的发生。

本实验室观察结果表明注射过促雄性腺提取物的部分蟹,经过一次蜕皮后就发现有雄性化现象。在螯虾的研究中,注射过促雄性腺匀浆提取物在一次蜕皮后能观察到性逆转现象^[18]。与本实验的中华绒螯蟹观察到雄性化现象变异时间基本一致。

3.6 实验室幼蟹的养殖

实验室与自然环境中相比幼蟹的养殖死亡率明显较高,因而所用幼蟹最好在实验室暂养一段时间后,再进行实验。在幼蟹的饲养过程中,最好动物型饵料配合植物饵料,同时也可以加少量的配合饲料一起投喂。水花生作为植物型饵料不但补充了营养上的不全面,更为幼体提供了一定的遮蔽场所,减少了幼体之间的互相残杀,降低了死亡率。少量的PVC管也为幼蟹提供了栖息常所,尤其在蜕皮期间还具有遮蔽作用。

参考文献:

- [1] Gau SM, Cooke JM. Peptideergic neurons of the crab *Car-*

- soma canifex in defined culture maintain characteristics morphologies under a variety of conditions [J]. *Cell & Tissue Research* 1992, 270: 303—317
- [2] Toulllec J Y Crozat Y Patrois J et al Development of cell culture from the penaeid shrimp *Penaeus vannamei* and *P. indicus* [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1996, 16: 643—649
- [3] 萨姆布鲁克 J 拉塞尔 DW. 分子克隆指南 [M]. 黄培堂, 译. 北京: 北京科学教育出版社, 2001: 1570
- [4] Cui Z X, Liu H, Ting Sze L, et al Inhibitory effects of the androgenic gland on ovarian development in the mud crab *Scylla paramamosa* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2005, Part A, 140: 343—348
- [5] 徐佳念, 蔡生力, 肖美南, 等. 中华绒螯蟹初次排卵后卵巢发育的组织学初步研究 [J]. *上海海洋大学学报*, 2009, 18 (1): 28—34
- [6] Katakura Y, Hasegawa Y. Masculinization of females of the isopod crustacean *Amadillidium vulgare* following injections of an active extract of the androgenic gland [J]. *General and Comparative Endocrinology* 1983, 48: 57—62
- [7] Nagamine C, Knight A W, Maggenti A, et al Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1980, 41: 423—441.
- [8] Nagamine C, Knight A W, Paxman G. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation [J]. *General and Comparative Endocrinology* 1980, 41: 442—457
- [9] Sagi A, Snir E, Zimmernann S. Effects of androgenic gland ablation on somatic growth and sex reversal in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) males [J]. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 1995, 24: 300—309.
- [10] Sagi A Y, Soroka A C, Khalifa I. Ovarian protein synthesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* does ovarian vitellin synthesis exist [J]. *Invertebrate Reproduction and Development* 1995, 27: 41—47
- [11] Chaux-Cotton H. Contrôle de la différenciation du sexes et la reproduction chez les Crustacés supérieurs [J]. *Bull Soc Zool France* 1958, 83: 314—336
- [12] Sarjini S. Comparison of the effects of androgenic hormone and testosterone propionate on the female oocyte mat [J]. *Curr Sci* 1963, 48: 411—412
- [13] Lee T H, Shigesawa R, Yamazaki F. Partial masculinization of female *Eriocheir japonicus* (*Brachyura*: *Gammaridae*) by androgenic gland implantation [J]. *Suisanzoshoku* 1993, 41: 311—319.
- [14] Suzuki S, Yamazaki K. Sexual bipotentiality of developing ovaries in the terrestrial isopod *Amadillidium vulgare* (*Malacostraca*: *Crustacea*) [J]. *Gen Comp Endocrinol* 1997, 107: 136—146
- [15] Liu H, Cai S L, Zhang C F, et al. Masculinization of female *Eriocheir sinensis* by injecting the extract of androgenic gland of *E. sinensis* and *Scylla paramamosa* [J]. *J Fisheries of China* 2006, 30 (5): 577—585.
- [16] Taketani Y, Muraia M, Miyawaki M. Androgenic gland and secondary sexual characters in the crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *J Crust Biol* 1990, 10: 492—497
- [17] Martin G, Juchault P. Androgenic hormone specificity in terrestrial isopod (*Oniscidea*): systematic involvements [J]. *J Crustacean Biol* 1999, 19: 684—689
- [18] Fowler R J, Leonard B V. The role and regulation of the androgenic gland in the freshwater crayfish *Cheax destructor* (*Palaemonidae*) [C] // *Book of Abstracts World Aquaculture '99*, the Annual International Conference and Exposition of the World Aquaculture Society 1999: 271.