

克氏原螯虾卵巢不同发育期大颚器法尼酸甲基转移酶活力分析

许进进¹, 万全^{1*}, 田铃², 吴旭干³,
成永旭³, 丁凤琴⁴, 李胜², 陆剑锋^{5*}

- (1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036;
2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032;
3. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
4. 安徽省农业科学院水产研究所, 安徽 合肥 230031;
5. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要:法尼酸甲基转移酶(farnesoic acid O-methyl transferase, FA-O-MeT)具有催化法尼酸(farnesoic acid, FA)转变成甲基法尼酯(methyl farnesoate, MF)的功能。运用放射化学法对克氏原螯虾不同发育期大颚器(mandibular organ, MO)FA-O-MeT的酶活进行了分析,并探讨了眼柄因子对FA-O-MeT酶活的调控。结果表明,克氏原螯虾MO中的FA-O-MeT酶活左、右侧对称,差异不显著($P > 0.05$);FA-O-MeT酶活随卵巢发育呈周期性变化,次级卵黄发生期的MO酶活最高,达到61.75 pmol/(p·h);镊烫法破坏眼柄内的X器官窦腺复合体后,FA-O-MeT酶活逐渐上升,第5天酶活达到最高;利用眼柄内的窦腺提取物体外培养处理MO,检测到其对FA-O-MeT酶活具有强烈的抑制作用($P < 0.01$)。研究表明,克氏原螯虾FA-O-MeT酶活与卵巢发育密切相关,且其生理活性受到眼柄X器官窦腺复合体的负调控。

关键词:克氏原螯虾;甲基法尼酯;法尼酸甲基转移酶;窦腺提取物;发育阶段

中图分类号: Q 55; S 917

文献标识码: A

甲壳动物大颚器(mandibular organ, MO)自1968年由LE ROUX^[1]首次提出之后,直至1987年才被证实具有合成和分泌甲基法尼酯(methyl farnesoate, MF)的功能^[2]。MO成对分布于大颚与几丁质肌腱相连处外侧,外观多为长条形或椭圆形,其分泌的MF是一种类似昆虫保幼激素Ⅲ(juvenile hormone, JHⅢ)的倍半萜,它被普遍认为是JHⅢ的前体结构^[3]。大量的研究表明,MF在甲壳动物的生长发育及繁殖过程中,如生殖、蜕皮、渗透压调节、蛋白代谢等方面,起到了十分重要的作用^[4-6]。

MF生物合成遵循甲羟戊酸途径:乙酰辅酶A(acetyl-CoA)经过硫解酶(thiolase)和羟甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)的作用生成甲羟戊酸(mevalonic acid, MA),再经过一系列的生成法尼酸(farnesoic acid, FA),最终在法尼酸转甲基

酶(farnesoic acid O-methyl transferase, FA-O-MeT)的作用下,将FA转甲基形成法尼酯(MF)^[7]。研究表明,FA-O-MeT是昆虫JH合成过程中一个重要的限速酶^[8],它在甲壳动物MF合成途径中同样起到了非常关键的作用^[9]。甲基转移酶通常以S-腺苷-甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)作为甲基供体催化FA向MF的转化。目前,关于FA-O-MeT在甲壳动物体内的分布说法不一,但通常认为其主要分布在MO中^[10]。

甲壳动物眼柄内的X器官窦腺(X-organ sinus gland, XO-SG)复合体是神经内分泌的主要调控中心,类似于高等脊椎动物脑垂体的神经内分泌腺体,主要合成与分泌高血糖激素家族(crustacean hyperglycemic hormone family, CHH家族),包括高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone,

收稿日期:2010-12-10 修回日期:2011-01-21

资助项目:国家自然科学基金项目(30901110);安徽省科技厅2008年重大科技专项(08010302071);上海市科委项目(08dz1206002);安徽省现代农业产业技术体系专项经费资助(20103040)

通讯作者:陆剑锋, E-mail: lujf@sibs.ac.cn; 万全, E-mail: ahwanquan@163.com

CHH)、蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone, MIH)、性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH)和大颚器抑制激素(mandibular organ-inhibiting hormone, MOIH)^[11]。在 MO 中, MF 的合成主要受到 XO-SG 分泌的甲壳类眼柄神经肽激素的调控,破坏或去除眼柄可消除其对 MO 的抑制作用。CHAVES^[12]推测眼柄对 MF 合成的抑制作用主要是通过抑制 FA-O-MeT 的活性来完成。

基于 FA-O-MeT 在 MF 合成途径中的重要作用,我们在前期研究的基础上,以克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)为实验材料,检测其不同卵巢发育阶段 MO 中的 FA-O-MeT 酶活变化,并进一步分析了眼柄镊烫法和窦腺提取物对 MO 酶活的影响。这不仅为我国克氏原螯虾的人工诱导繁育提供了科学依据,而且也丰富和完善了我国甲壳动物生殖内分泌的调控理论。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

克氏原螯虾购自上海东方国际水产中心,体长 4.60~9.20 cm,体质量为 5.20~42.30 g。在水族箱(80 cm×60 cm×40 cm)中暂养数日,期间定时投喂饲料和换水排污。采用 OLYMPUS 体视显微镜(SZ61),在预冷的龙虾生理溶液中解剖左、右侧 MO(生理溶液的配制按 LI 等^[13],pH 为 7.2)用于 FA-O-MeT 酶活测定。克氏原螯虾卵巢发育阶段的分类依据参考文献^[14],主要分为 7 个不同的发育阶段,即未发育期、发育早期、卵黄发生前期、初级卵黄发生期、次级卵黄发生期、成熟期和产卵后期。

1.2 化学试剂

法尼酸(FA)购自 Salt Lake City University; S-腺苷-甲硫氨酸(SAM)购自上海生工生物有限公司; H³-SAM 和闪烁液(OPTI-Fluor)购自 Perkin Emer 公司; DMEM 培养基购自 Sigma 公司。

1.3 放射化学法检测不同发育阶段 MO 内的 FA-O-MeT 酶活

FA-O-MeT 酶活力的测定参照 CLAERHOUT 等^[15]及刘影^[16]等建立的方法,略作修改:解剖取出 MO 后,立即放入含 200 μL 预冷的 FA-O-MeT 分析缓冲液(100 mmol/L pH 7.2 磷酸缓冲液,5 mmol/L EDTA,2.5 mmol/L 2-巯基乙醇,0.5%

明胶)的玻璃管中,冰上匀浆,在 4 °C、12 000 r/min 下离心 15 min,取上清 50 μL 于指形玻璃管中。在 28 °C 下避光预培养 10 min 后,加入 50 μL FA-O-MeT 底物缓冲液(含 85 μmol/L FA、0.5 μCi H³-SAM 和 0.2 nmol/L SAM 的 FA-O-MeT 分析缓冲液)。28 °C 水浴锅中继续培养 1 h,采用 400 μL 甲醇终止反应,加入 1 mL 正己烷涡旋震荡 1 min 后,8 000 r/min 离心 10 min,吸取上清 200 μL 于玻璃管中,加闪烁液 1 mL,避光 4 h 后测每分钟衰变(disintegration per minute, DPM)。每个样品取 3 对 MO,进行 3 次生物学重复。

1.4 不同发育阶段左、右侧 MO 内的 FA-O-MeT 酶活

根据上述 7 个不同发育阶段 MO 的 FA-O-MeT 酶活力测定结果,选取具有代表性阶段的发育早期、次级卵黄发生期和成熟期克氏原螯虾 MO 来研究左、右侧 MO 的 FA-O-MeT 酶活差异。首先活体解剖获得左、右侧 MO,然后按上述放射化学法来检测 FA-O-MeT 酶活。每个样品取 3 对 MO,进行 3 次生物学重复。

1.5 眼柄镊烫及窦腺提取液对 MO 内的 FA-O-MeT 酶活的影响

利用镊烫法破坏发育早期及成熟期的克氏原螯虾眼柄(去除眼柄因子),并正常饲养,分别取处理后不同日龄的克氏原螯虾解剖获得 MO,按上述放射化学法测定眼柄镊烫后对 MO 内 FA-O-MeT 的影响。每个样品取 3 对 MO,进行 3 次生物学重复。

冰上解剖发育早期和成熟期的 XO-SG,立即放入液氮冻结,加 2 mol/L 乙酸匀浆,12 000 r/min,4 °C,离心 10 min,取上清,加 NaHCO₃ 调节 pH 至 7.2,分装,置于 -80 °C 存备用。使用时每个当量为每对 MO 添加一个窦腺提取物。取 3 对 MO/样于添加了一定量窦腺提取物的无 Met 的 DMEM 培养基中,28 °C 避光培养 30 min。8 000 r/min,4 °C,离心 5 min 去培养基,按上述放射化学法测定 FA-O-MeT 酶活。每个样品取 3 对 MO,进行 3 次生物学重复。

1.6 FA-O-MeT 酶活的计算

DPM 直接反映了生成 H³-MF 的多少(1.1 × 10⁶ DPM = 0.5 μCi = 0.5 × 10⁻⁴ μmol),根据 H³-MF 所占 MF 的比例(0.5 × 10⁻⁴ μmol/SAM 的总量),可计算出生成的 MF 量。MO 的 FA-O-MeT

酶活力用 $\text{pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$ (p 为 pair 的缩写, 表示每对 MO) 表示。酶活力值 $[\text{pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})] = \text{DPM}/(1.1 \times 10^6) \times 0.5 \times 10^{-4}/(\text{H}^3\text{-SAM 占总 SAM 的比例}) \times \text{吸取相体积}/\text{溶解相体积}/\text{小时}/\text{MO 对数} \times 10^6 \times 4$ (所吸取匀浆液的比例)。

2 结果与分析

2.1 不同发育阶段 MO 的 FA-O-MeT 酶活变化

分别检测克氏原螯虾 7 个不同卵巢发育阶段 (未发育期、发育早期、卵黄发生前期、初级卵黄发生期、次级卵黄发生期、成熟期和产卵后期) 的酶活力状况, 其变化趋势见图 1。由图 1 可知, 在卵黄发生期之前, FA-O-MeT 酶活较低, 但随着发育时期的延续略有增长; 在初级卵黄发生期, 酶活开始明显加强, 直至次级卵黄发生期时达到最高值, 为 $61.75 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$; 成熟期的酶活值较次级发生期低, 但略高于初级发生期; 产卵后的酶活明显下降, 为 $11.45 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$ 。由此可见, 在克氏原螯虾的整个生长发育过程中, FA-O-MeT 酶活呈现有规律的变化趋势, 其原因可能与卵巢发育周期有关, 这也与我们早期对克氏原螯虾 MO 分泌和合成 MF 规律的研究结果一致。

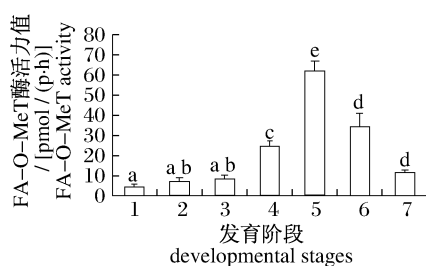


图 1 不同发育阶段 MO 的 FA-O-MeT 酶活变化

1. 未发育期; 2. 发育早期; 3. 卵黄发育前期; 4. 初级卵黄发生期; 5. 次级卵黄发生期; 6. 成熟期; 7. 产卵后期; 字母相同表示差异不显著, 字母不同表示差异显著; T -test, 下同。

Fig. 1 The change of MO FA-O-MeT activity at different developmental stages of *P. clarkii* ovary

1. the undeveloped stage; 2. the early developmental stage; 3. the pre-vitellogenesis stage; 4. the primary vitellogenesis stage; 5. the secondary vitellogenesis stage; 6. the maturity stage; 7. the post spawn stage. Same letters indicate no significant difference and different letters represent significant difference; T -test, the same below.

2.2 不同发育阶段左、右侧 MO 的 FA-O-MeT 酶活比较

按照头上尾下的位置区分克氏原螯虾左、右

侧 MO, 解剖处于卵巢发育早期、次级卵黄发生期、成熟期的左、右侧 MO, 并分别检测其 FA-O-MeT 的酶活力, 结果见图 2。处于卵巢发育早期的克氏原螯虾左、右侧 MO 酶活分别为 $10.37 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$ 和 $10.50 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$; 处于次级卵黄发生期的左、右侧 MO 酶活最高, 分别为 $56.41 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$ 和 $59.85 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$; 而处于成熟期的左、右侧 MO 酶活有所下降, 分别为 $33.05 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$ 、 $35.64 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$ 。由图 2 可知, 处于 3 个不同发育阶段的 FA-O-MeT 酶活差异较大 ($P < 0.01$), 但每个发育阶段的 MO 左、右侧酶活之间差异均不显著 ($P > 0.05$)。因此, 克氏原螯虾左、右侧 MO 的 FA-O-MeT 酶活接近 (或对称), 且其酶活值的大小可能与卵巢发育密切相关。

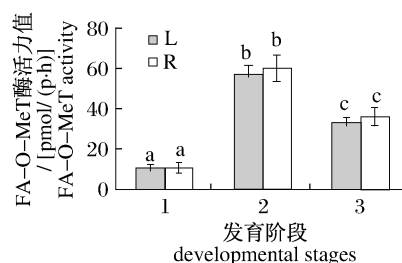


图 2 不同发育阶段左、右侧 MO 的 FA-O-MeT 酶活比较

1. 发育早期; 2. 次级卵黄发生期; 3. 成熟期; L. 左侧; R. 右侧; T -test。

Fig. 2 Comparison of MO FA-O-MeT activity between the left and right MO at different developmental stages of *P. clarkii* ovary

1. the early developmental stage; 2. the secondary vitellogenesis stage; 3. the maturity stage; L. left MO; R. right MO; T -test.

2.3 去除眼柄因子对 FA-O-MeT 酶活的影响

眼柄去除 (eyestalk ablation, ESA) 后, 相当于阻碍了 X 器官-窦腺复合体的调控作用。实验选择了处于卵巢发育早期及成熟期的克氏原螯虾进行 ESA 处理, 以 ESA 处理当天为第 0 天, 分别检测了 ESA 第 0、1、3、5、7 天的 FA-O-MeT 酶活变化 (图 3)。由图 3 可知, 正常组螯虾的酶活最低 (第 0 天), 自去眼柄后, 酶活呈逐渐上升的趋势; ESA 1 d 后, 酶活增长速率加快, 几乎呈直线增长模式, 至第 5 天达到最高峰, 其中成熟期和早期酶活分别为 $201.29 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$ 和 $105.13 \text{ pmol}/(\text{p} \cdot \text{h})$, 均相对于第 0 天酶活力值高了 13 倍左右; ESA 5 d 后, 可观察到酶活有缓慢恢复的

现象(逐渐趋于下降)。相比较而言,成熟期的克氏原螯虾被 ESA 5 d 后,其酶活的恢复速度相对较缓,这可能与克氏原螯虾自身的生理状况有关。但总体来说,两个不同时期的克氏原螯虾 ESA 处理后 MO 酶活的变化趋势十分相似。

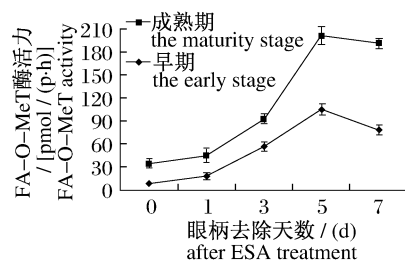


图3 ESA 处理后不同时期 MO 的 FA-O-MeT 酶活变化

Fig.3 The change of MO FA-O-MeT activity after ESA treatment of two different ovary developmental stages in *P. clarkii*

2.4 不同发育阶段 SG 提取液对 MO 的 FA-O-MeT 酶活影响

对处于卵巢发育早期及成熟期的克氏原螯虾 SG 进行匀浆抽提,检测这两个时期的 SG 粗提取液(0.5 个当量/样)对次级卵黄发生期(略偏成熟期)的克氏原螯虾 MO 酶活力影响(图 4)。由图 4 可知,正常 MO 在添加了抽提 SG 的溶液的培养基培养 30 min 后,FA-O-MeT 酶活与正常情况下差异不显著($P > 0.05$),表明添加了抽提 SG 的溶液对培养基的影响不显著;而两组添加了 SG 提取液的处理组与对照相比较均差异较大,酶活仅为对照组的 1/4,差异极显著($P < 0.01$)。此外,还发现早期 SG 提取液对 FA-O-MeT 酶活的抑制作用较成熟期略强,但差异不显著($P > 0.05$)。

2.5 早期 SG 提取液对去眼柄 5 d 后 MO 的 FA-O-MeT 酶活影响

SG 提取液对 MO 中 FA-O-MeT 酶活起到了明显的抑制作用。实验选取了抑制作用相对较好的卵巢发育早期 SG 提取液,对 ESA 5 d 后的克氏原螯虾进行处理(1 个当量/样),同时检测了处于同一时期的正常虾及 ESA 5 d 后 MO 酶活状况,结果见图 5。由图 5 可知,ESA 后的结果与去除眼柄因子对 FA-O-MeT 酶活的影响中的变化趋势相似,5 d 后酶活显著上升;ESA 组与 ESA + 溶液组之间的酶活差异不显著($P > 0.05$);而经 SG 提取液处理 30 min 后,FA-O-MeT 酶活显著下降($P < 0.05$),与正常虾的酶活水平相近。

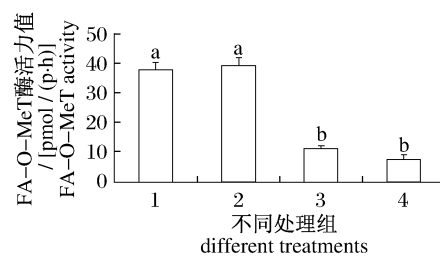


图4 不同发育时期 SG 提取液对 MO 的 FA-O-MeT 酶活影响

1. 正常组; 2. 正常 + 溶液; 3. 正常 + 成熟期 SG; 4. 正常 + 早期 SG; T-test。

Fig.4 The change of MO FA-O-MeT activity after SG extracts treatment of two different developmental stages in *P. clarkii* ovary

1. normal; 2. normal + solution; 3. normal + SG extractive in the maturity stage; 4. normal + SG extractive in the early stage; T-test.

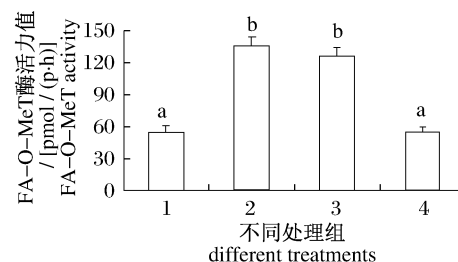


图5 早期 SG 提取液对 ESA 处理 5 d 后 MO 的 FA-O-MeT 酶活影响

1. 正常组; 2. ESA; 3. ESA + 溶液; 4. ESA + SG; T-test。

Fig.5 The change of MO FA-O-MeT activity after ESA 5 days by SG extracts treatment of the early developmental ovary stage in *P. clarkii*

1. normal; 2. ESA; 3. ESA + solution; 4. ESA + SG; T-test.

3 讨论

3.1 参与 MF 生物合成途径中的重要酶类

自甲壳动物体内 MF 被发现之后,其在生物体内发挥的重要作用逐渐体现,其生物合成途径也一直受到众多学者的关注,但至今未见有确定的生物合成途径模式。2001 年 BORST 等^[7]基于 GOLDSTEIN 和 BROWN 的无环异戊间二烯化合物合成的甲羟戊酸途径,提出了 MF 可能的生物合成途径。此生物合成途径中涉及到了众多酶类,而关于羟甲基戊二酰辅酶 A (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A, HMG-CoA) 和 FA-O-MeT 的相关研究较多^[17]。LI 等^[13]在研究美洲

螯龙虾(*Homarus americanus*) MO 时指出 ESA 处理虾体后, HMG-CoA 酶活性、FA-O-MeT 酶活性及 MF 合成水平分别上升了 3.1、5.7、10.7 倍, 而注射 SG 提取液后三者水平又有着不同程度的下降。由图 6 中可见, 以上三者分别处在该通路的不同位置, 其中 FA-O-MeT 处在 HMG-CoA 下游, 而 FA-O-MeT 直接影响着 MF 的合成水平。在这个合成途径中, 信号被逐渐放大这一说法可解释三者 ESA 处理后上升倍数的不同。在国内, 目前尚无对甲壳动物 FA-O-MeT 酶的研究报道, 本实验以克氏原螯虾为实验对象, 主要研究其 FA-O-MeT 酶活力在 MO 中的合成水平及受眼柄因子调控的情况, 从而更加深入地了解其在 MF 合成中的重要作用。

3.2 卵巢不同发育时期 MO 内 FA-O-MeT 酶活的变化

本实验检测了克氏原螯虾卵巢发育过程中, MO 的 FA-O-MeT 酶活力的变化状况。证明了其酶活力随着卵巢发育的变化呈现出周期性的变化趋势。在卵黄发生期时, FA-O-MeT 酶活力值高, 而产卵后酶活力值急速降低。此现象可由 MO 在卵巢发育周期中的组织结构变化来解释: 在卵黄发生期, MO 发育到达顶峰; 产卵后 MO 细胞开始解体^[18]。赵维信等^[19]曾报道在克氏原螯虾的卵巢发育周期中, 随着卵巢的发育, MF 合成的速率逐渐升高, 在卵黄次级发生期时, MF 达到最高值, 这与本实验检测到的 FA-O-MeT 酶活性的最高值相对应。此外, 克氏原螯虾卵黄发生期的 MO 提取物对卵巢发育的生物效应最强, MO 中的功能性物质具有促进性腺细胞发育的作用, 认为大颚器是促性腺生长发育的腺体^[20-21]。结合卵巢不同发育时期 MO 中的 MF 水平和 FA-O-MeT 酶活性变化可以得出, 在 MF 的合成上 FA-O-MeT 起到了重要的作用, 同时也可以知道两者与克氏原螯虾卵黄的发生也有着密不可分的联系。

3.3 左、右侧 MO 内 FA-O-MeT 酶活的比较

通过检测同一尾克氏原螯虾中的左、右侧 MO 中 FA-O-MeT 酶活性, 发现两侧 MO 酶活性差异不显著, 说明其在合成 MF 最后一步时, 左、右侧 MO 所起到的作用无明显差异。这与赵维信等^[19]在研究克氏原螯虾 MF 合成时提出左、右侧大颚器中甲基法尼酯的合成速率无明显差异的观

点相印证。

3.4 眼柄神经肽对 MO 内 FA-O-MeT 酶活的影响

作为甲壳动物神经内分泌的主要调控中心, 眼柄中的 X 器官腺体(XO-SG)复合体可能参与 MO 的调控活动。在 XO-SG 复合体分泌的高血糖家族中, 目前报导的对 MO 起到直接调控作用的是大颚器抑制激素(MOIH)^[22], 其他几种激素对 MO 活动能力也有一定的作用, 但是其作用的调控方式尚不明确。本实验利用眼柄镊烫法对克氏原螯虾眼柄进行灼烧处理, 阻碍了眼柄内的整个 XO-SG 复合体对 MO 的调控作用。由实验结果可知, ESA 处理后 FA-O-MeT 酶活力水平显著上升, 到第 5 天最高峰后开始缓慢下降。由此可见, XO-SG 复合体存在着抑制 FA-O-MeT 酶活力的物质, 且其抑制作用较强, 而 ESA 处理后 FA-O-MeT 酶活力会相应升高, 从而促进 MF 的合成, 这与 ESA 处理后的 MF 合成速率水平显著上升相吻合^[23]。

3.5 SG 提取液对 ESA 处理后 MO 内 FA-O-MeT 酶活的影响

CHAVES^[12]利用体内注射 SG 提取物, 15 min 即能检测到甲基转移酶受到的抑制作用, 并指出腺体提取物对 MO 的抑制作用是一个快速且长期的过程。由于 XO-SG 复合体合成与分泌抑制 MO 活动的神经肽激素, 本实验利用 SG 提取液体外处理克氏原螯虾正常 MO 及 ESA 处理后的 MO, 观察其 FA-O-MeT 酶活性的变化。实验结果表明, 0.5 个当量的眼柄 SG 提取物处理 30 min 就对 MO FA-O-MeT 酶活力起到了显著的抑制作用(抑制效果强烈); 但早期和成熟期的眼柄 SG 提取物对酶活力的抑制作用差异不明显。在 ESA 处理后的实验中, 1 个当量的提取物处理 30 min 后能将 ESA 处理 5 d 后的 MO 酶活力抑制到正常水平。

参考文献:

- [1] LE ROUX A. Description of organs mandibulaires nouveaux chez les Crustacés Décapodes [J]. C R Acad Sci Paris, 1968, 266D: 1414 - 1417.
- [2] LAUFER H, BORST D, BAKER F C, et al. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean [J]. Science, 1987, 235: 202 - 205.
- [3] 李胜, 赵维信. 甲壳动物的大颚器和甲基法尼酯

- [J]. 上海水产大学学报,2000,9(3):240-246.
- [4] CHANG E S, CHANG S A, MULDER E P. Hormones in the lives of crustaceans; an overview [J]. *Amer Zool*,2001,41(5):1090-1097.
- [5] NAGARAJU G P C. Is methyl farnesoate a crustacean hormone [J]. *Aquaculture*, 2007, 272: 39-54.
- [6] 陆剑锋,常国亮,吴旭干,等. 甲壳动物大颚器及其合成甲基法尼酯的放射化学测定法[J]. *水产科学*,2009,28(2):113-116.
- [7] BORST D W, ORGAN J, TSUKIMURA B, *et al.* Regulation of the crustacean mandibular organ [J]. *Amer Zool*,2001,41(3):430-441.
- [8] BURTENSHAWA S M, SU P P, ZHANG J R, *et al.* A putative farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) orthologue in *Drosophila melanogaster* (CG10527): Relationship to juvenile hormone biosynthesis [J]. *Peptides*,2008,29(2):242-251.
- [9] GUNAWARDENE Y I N S, CHOW B K C, HE J G, *et al.* The shrimp FAMeT cDNA is encoded for a putative enzyme involved in the methylfarnesoate (MF) biosynthetic pathway and is temporally expressed in the eyestalk of different sexes [J]. *Insect Biochem Mol Biol*,2001,31(11):1115-1124.
- [10] HOLFORD K C, EDWARDS K A, BENDENA W G, *et al.* Purification and characterization of a mandibular organ protein from the American lobster, *Homarus americanus*: a putative farnesoic acid O-methyltransferase [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004,34(8):785-798.
- [11] 杨济芬,朱冬发,沈建明,等. 甲壳动物高血糖激素家族生理功能研究进展[J]. *动物学杂志*,2009,44(1):151-158.
- [12] CHAVES A R. Effects of sinus gland extract on mandibular organ size and methyl farnesoate synthesis in the crawfish [J]. *Comp Biochem Physiol-Part A*,2001,128(2):327-333.
- [13] LI S, WAGNER C A, FRIESEN J A, *et al.* 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the lobster mandibular organ: regulation by the eyestalk [J]. *Gen Comp Endocrinol*,2003,134(2):147-155.
- [14] 李胜,赵维信. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化[J]. *上海水产大学学报*,1999,8(1):12-18.
- [15] CLAERHOUT T, BENDENA W, TOBE S S, *et al.* Characterization of methyl transferase activity in the mandibular organ of the American lobster, *Homarus americanus* [J]. *Bio Bull*,1996,191:304-304.
- [16] 刘影. 黑腹果蝇幼虫-蛹变态过程中保幼激素的生理功能和分子作用[D]. 上海:上海生命科学研究院,2009.
- [17] LI S, FRIESEN J A, HOLFORD K C, *et al.* Methyl farnesoate synthesis in the lobster mandibular organ: The roles of HMG-CoA reductase and farnesoic acid O-methyltransferase [J]. *Comp Biochem Physiol-Part A*,2010,155:49-55.
- [18] 李胜,赵维信. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化[J]. *上海水产大学学报*,1999,8(1):12-18.
- [19] 赵维信,白桦. 克氏原螯虾大颚器合成甲基法尼酯的研究[J]. *水产学报*,2001,25(3):193-196.
- [20] 赵维信,李胜. 克氏原螯虾大颚器对卵巢发育的影响[J]. *水产学报*,1999,23(3):229-233.
- [21] 陆剑锋,万全,丁凤琴,等. 克氏原螯虾大颚器促性腺发育作用研究[J]. *安徽农业科学*,2009,37(3):1130-1133.
- [22] CHUNG J S, ZMORA N, KATAYAMA H, *et al.* Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: Functions, titer, and binding to target tissues [J]. *Gen Comp Endocrinol*,2010,166:447-454.
- [23] 赵维信,白桦,陆剑锋. 克氏原螯虾大颚器生物合成甲基法尼酯的调控[J]. *水产学报*,2002,26(增刊1):1-7.

**Analysis of farnesoic acid O-methyl transferase(FA-O-MeT)
activity in mandibular organ (MO) of *Procambarus clarkii* at
different developmental stages**

XU Jin-jin¹, WAN Quan^{1*}, TIAN Ling², WU Xu-gan³,
CHENG Yong-xu³, DING Feng-qin⁴, LI Sheng², LU Jian-feng^{5*}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China;

2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China;

3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,
Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Institute of Fishery, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China;

5. College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Farnesoic acid O-methyl transferase(FA-O-MeT) catalyzes the methylation of farnesoic acid(FA) to methyl farnesoate(MF). Here we analyzed the activity of FA-O-MeT in mandibular organs(MOs) of *Procambarus clarkii* by the radiochemical assay, and also detected the regulation of eyestalk factor on the activity of FA-O-MeT. This work showed that there was no significant difference between the right and the left MO in the FA-O-MeT activity($P > 0.05$); During the different ovary developmental stages, the enzyme activity was also at different levels, and there was a peak at the secondary vitellogenesis stage, to 61.75 pmol/(p·h); Eyestalk factor removal increased FA-O-MeT activity, and the peak appeared on the 5th day. Furthermore, incubation MOs in the DMEM with the SG extracts significantly decreased the FA-O-MeT activity($P < 0.01$). These results indicated that the activity of FA-O-MeT is closely related to ovarian development and is negatively regulated by X-organ sinus gland complex in the eyestalk.

Key words: *Procambarus clarkii*; methyl farnesoate; farnesoic acid O-methyl transferase; SG extracts; developmental stages

Corresponding author: LU Jian-feng. E-mail: lujf@sibs.ac.cn;

WAN Quan. E-mail: ahwanquan@163.com