

## 中华绒螯蟹促性腺释放激素类似物的初步分离纯化与免疫鉴定

王承志, 邱高峰\*

(上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306)

**摘要:** 应用反向高效液相色谱法(RP-HPLC)从中华绒螯蟹脑组织提取液初步分离了促性腺释放激素(GnRH)类似物, 使用章鱼促性腺释放激素抗体(anti-octGnRH)对分离组分进行免疫斑点印迹实验鉴定, 获得了免疫反应呈阳性分离组分, 表明脑组织粗提液中含有 GnRH 类似物分离组分。对该 GnRH 类似物进行基质辅助激光解吸/电离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF MS)分析, 结果显示多肽物质分子量范围在 800~1 400 u, 主要由 8 种小分子多肽组成, 其中一种组分的分子量与章鱼促性腺释放激素(octGnRH)分子量接近。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 反向高效液相色谱法; 免疫斑点印迹; 促性腺释放激素

中图分类号: S 917

文献标志码: A

脊椎动物的促性腺释放激素(GnRH)是下丘脑分泌的神经多肽激素, 由 10 个氨基酸组成, GnRH 作为下丘脑-垂体-性腺轴关键信息分子, 通过与脑垂体中的 GnRH 特异受体相结合, 从而刺激促性腺激素(GSH)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)的产生与释放, 起着调节生殖活动的作用。自从 1971 年 Schally 等<sup>[1]</sup>在猪下丘脑中发现 GnRH 之后, 国外研究者迄今在不同物种中陆续鉴定出 29 种类型 GnRH<sup>[2]</sup>, 其中在脊椎动物中发现有 14 种, 在无脊椎动物中发现 15 种, 它们分别来自章鱼(*Octopus vulgaris*)、海兔(*Aplysia californica*)、海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)、帽贝(*Lottia gigantea*)、海蠕虫(*Capitella teleta*)、水蛭(*Helobdella robusta*)以及 3 种被囊类(*Chelyosoma productum*, *Ciona intestinalis*, *Ciona savignyi*)。近年国外学者应用免疫组化定位方法证明在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)<sup>[3]</sup>、斑节对虾(*Penaeus monodon*)<sup>[4]</sup>、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)<sup>[5]</sup>等十足类甲壳类动物中枢神经系统也存在 GnRH 类似物, 但是还没有相关 GnRH 分离纯化的报道。本研究利用反相高效液相色谱方法初步分离鉴定了中

华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)脑组织中 GnRH 类似物, 可为进一步研究 GnRH 在中华绒螯蟹卵母细胞成熟过程中的作用提供物质基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 蟹脑组织粗提液制备

中华绒螯蟹购于上海当地养殖场, 选取四肢健全性成熟期的雌性个体, 体质量 100~150 g, 冰上迅速解剖脑组织, 将 50 只蟹脑组织加入 1%三氟乙酸水溶液 10 mL, 冰上匀浆, 4 °C 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 浓缩后-80 °C 保存。

#### 1.2 蟹脑组织粗提液的 RP-HPLC 分离

应用日本岛津(SHIMADZU)Prominence 高效液相系统对蟹脑组织粗提液进行分级分离, 采用二元流动相梯度洗脱法进行洗脱, 即流动相 A: 1%三氟乙酸水溶液; 流动相 B: 1%三氟乙酸乙腈溶液。所用流动相均预先超声处理, 系统流速: 1 mL/min; 色谱柱: 岛津 VP-ODS(150 L × 4.6)C-18 色谱柱, 柱温: 25 °C, 进样量: 150 μL。使用自动组分收集器分别收集每分钟分离组分, 收集组分浓缩后-40 °C 保存。

收稿日期: 2011-12-05 修回日期: 2012-02-10

资助项目: 国家自然科学基金项目(30972242); 国家教育部博士点科研项目(20093104110003); 上海市科委重点科研项目(09391911100); 上海市教育委员会海洋生物学重点学科建设项目(J50701)

通讯作者: 邱高峰, E-mail: gfqiu@shou.edu.cn

### 1.3 免疫斑点印迹检测

将硝酸纤维素膜(NC 膜)浸泡于 EBM 缓冲液( $2.5 \times 10^{-2}$  mol/L 三羟甲基氨基甲烷, 0.2 mol/L 甘氨酸, 5.0 mol/L 甲醇)中 15 min, 室温晾干约 5 min 后, 将 1  $\mu$ L 样品依次水平点在 NC 膜上, 样点相距 1 cm 左右, 每个样品设 3 个平行实验; 放置室温干燥 60 min, 浸入小牛血清(1:10)封闭 60 min, 弃去血清, 用 TTBS(0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷, 0.15 mol/L 氯化钠,  $2.8 \times 10^{-4}$  mol/L 吐温 80, 用盐酸溶液调节 pH 至 7.5)漂洗 3 次, 每次 8 min; 随后浸入含有章鱼 GnRH 抗体(由美国科罗拉多大学 Tsai Pei-San 教授赠送)的 TTBS 缓冲液中孵育, 放置于水平摇床, 室温低速摇晃过夜; 次日用 TTBS 漂洗 3 次, 每次 8 min, 加入含有 HRP 标记二抗, 室温孵育 60 min; TTBS 漂洗 3 次, 每次 8 min, 最后用 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色。阴性对照组使用正常兔血清代替一抗(章鱼 GnRH 抗体), 空白对照组不使用任何血清。

### 1.4 分子量检测

免疫鉴定阳性的纯化样品送上海中科新生命公司, 使用基质辅助激光解吸/电离串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF/TOF MS, Applied Biosystem 4800 型)进行质谱分析。

## 2 结果

### 2.1 蟹脑组织粗提液免疫鉴定

取 50 只蟹脑组织粗提液 10  $\mu$ L 进行免疫斑点印迹实验, 结果显示实验组免疫反应呈明显阳性反应(图 1-a), 而空白对照组免疫反应为阴性(图 1-b), 阴性对照组也几乎未检测到信号(图 1-c), 以

上实验结果表明在蟹脑组织粗提液中可能含有 GnRH 类似物。

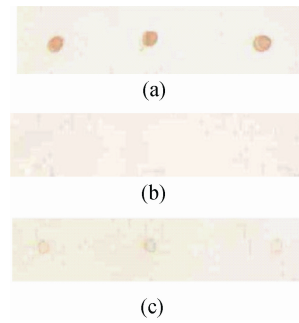


图 1 中华绒螯蟹脑组织粗提液免疫斑点印迹实验 (a)免疫斑点印迹实验组; (b)空白对照实验组; (c)阴性对照实验组。  
**Fig. 1 Immunological dot blot analysis of the brain extracts using antibody against octGnRH**  
 (a) immunological dot blot experimental group; (b) blank control experimental group; (c) negative control experimental group.

### 2.2 蟹脑粗提液 RP-HPLC 分级分离及免疫鉴定

为了获得蟹脑组织粗提液中的 GnRH 类似物, 本实验采用 RP-HPLC 方法对其进行分级分离。对 RP-HPLC 的梯度洗脱条件进行优化, 最终确定参数为 50 min 内流动相 B 在洗脱相中的含量从 5%到 35%按线性关系增长时获得分离效果最佳。RP-HPLC 色谱图显示粗提液分离后主要分为 9 个峰(图 2), 使用自动组分收集器收集每分钟 RP-HPLC 分离产物。对每一收集组分进行免疫斑点印迹鉴定, 结果表明只有 19~20 min 收集组分免疫反应呈阳性(图 3), 其余分离组分免疫反应均呈阴性, 空白对照组与阴性对照组免疫反应也均为阴性。实验中 19~20 min 分离组分对应色谱图中的第 7 号峰, 这表明该分离峰内含有 GnRH 类似物。

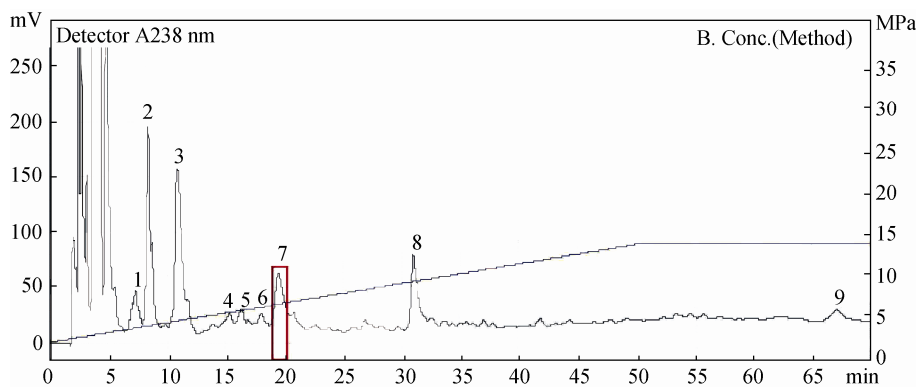


图 2 中华绒螯蟹脑组织粗提液经 RP-HPLC 分离的色谱图  
 1-9 为主要分离峰; 红色方框. 免疫鉴定呈阳性分离组分, 保留时间为 19~20 min。

**Fig. 2 RP-HPLC on a C-18 analysis column chromatography of the brain extracts of *E. sinensis***  
 1-9. the serial numbers of 9 isolated fractions; red box. immunological identification of positive isolated fraction, retention time of 19-20 min.

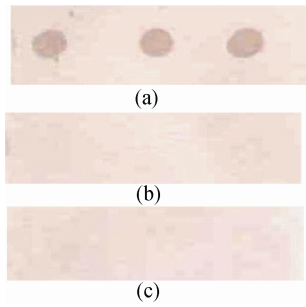


图3 中华绒螯蟹脑组织粗提液经 RP-HPLC 分离后第 7 号峰(保留时间: 19~20 min)的免疫斑点印迹实验 (a) 免疫斑点印迹实验组; (b) 空白对照实验组; (c) 阴性对照实验组。

Fig. 3 Immunological dot blot analysis of the seventh RP-HPLC peak(retention time of 19-20min)of the brain extracts of *E. sinensis* (a) immunological dot blot experimental group; (b) blank control experimental group; (c) negative control experimental group.

为了进一步纯化 19~20 min 分离组分中 GnRH 类似物, 将初次分离后所得第 7 号峰(保留时间:

19~20 min)再次进行 RP-HPLC 分离, 实验中梯度洗脱参数确定为 45 min 内流动相 B 在洗脱相中的含量从 1%到 10%按线性关系增长。结果表明第 7 号峰可以再分离出 10 个峰(图 4), 分离效果良好。对每一分离产物进行免疫斑点印迹实验, 结果显示再次分离后的第 5 号分离峰免疫反应呈阳性(图 5), 其余分离组分免疫反应均成阴性。表明只有第 5 号分离峰的分离组分中存在 GnRH 类似物, 其保留时间为 29~30 min。

根据上述实验条件下获得数据, 通过液相系统富集 RP-HPLC 再次分离的第 5 号峰组分, 制备完成后进行 RP-HPLC 检测, 结果显示为明显单一峰值, 不能再分离出其他杂峰, 并且保留时间与第 5 号分离峰相一致(图 6), 表明已制备出纯度较高的中华绒螯蟹脑组织 GnRH 类似物, 该组分应用紫外吸收法测定多肽浓度为 0.11 mg/mL。

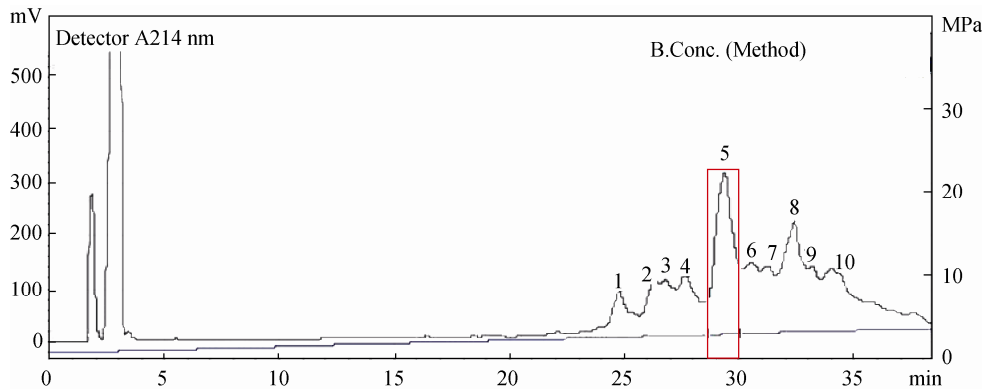


图4 中华绒螯蟹脑组织粗提分化分离液相色谱图

脑组织粗提液初次分离后所得第 7 号峰(保留时间: 19~20 min)再经 RP-HPLC 分离的色谱图; 1~10 为主要分离峰; 红色方框: 免疫鉴定呈阳性分离组分, 保留时间为 29~30 min。

Fig. 4 Partial separation chromatography of the brain extracts of *E. sinensis* RP-HPLC on a C-18 analysis column of the seventh peak (retention time of 19-20 min) from initial separation chromatography of the brain extracts of *E. sinensis*; 1-10: the serial numbers of 10 isolated fractions; red box: immunological identification of positive isolated fraction, retention time of 29-30 min.

### 2.3 GnRH 类似物分子量测定

MALDI-TOF/TOF MS 测定 RP-HPLC 分离样品中多肽分子量范围(图 7), 结果显示分离组分主要由 8 种小分子多肽组成, 分子量范围为 8 00~1 400 u, 其氨基酸组成为 6~12 肽。分子量鉴定结果表明初步分离到与 anti-octGnRH 免疫反应呈阳性的小分子量多肽。



图5 RP-HPLC 再次分离中第 5 号峰免疫斑点印迹实验 保留时间: 29~30 min。

Fig. 5 Immunological dot blot analysis of the fifth RP-HPLC peak from initial separation retention time: 29-30 min.

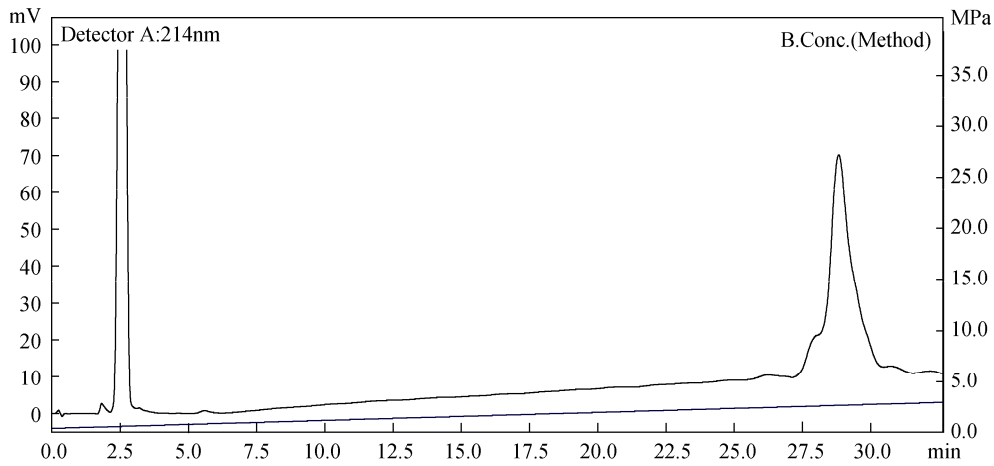


图 6 GnRH 类似物的 RP-HPLC 谱图  
Fig. 6 RP-HPLC chromatography of GnRH-like substance

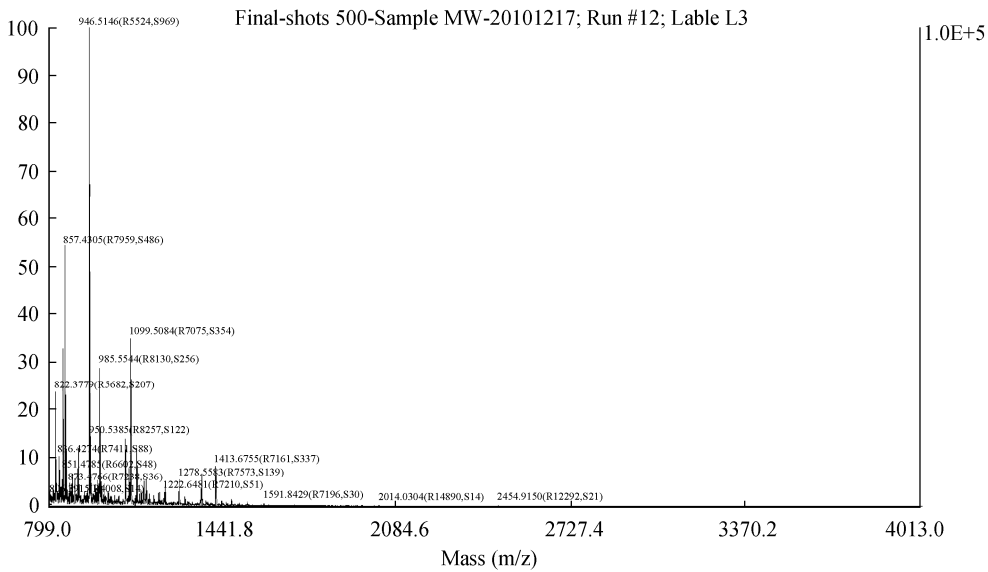


图 7 GnRH 类似物的基质辅助激光解吸/电离串联飞行时间质谱图  
Fig. 7 Matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry of the GnRH-like substance

### 3 讨论

近年来多肽分离研究应用多种技术, 例如蛋白电泳、离子交换色谱、亲和色谱、分子筛等, 但在分离效果、灵敏度、选择性等方面存在一定局限性, 很难解决分离高纯度单一组分问题。随着高效液相色谱法应用于多肽分离研究的不断发展改进, 可以根据分子量大小、性质状态从复杂的多肽混合物中分离出单一分离组分。RP-HPLC 技术与其他液相方法不同, 由于以组分之间极性差异为依据进行分离, 因此可以进行分子量和结构十分接近组分的分离, 并且分离过程中不受分子量大小限制特别适用于低分子量多肽分离纯化。例如, 在海

参(*Apostichopus japonicus*)中应用 RP-HPLC 方法分制备了五肽与七肽并证实具有促进卵母细胞成熟及排卵作用<sup>[6]</sup>。在小分子量蛋白及多肽研究领域 RP-HPLC 技术已经成为应用最广的一种分离方法。现有研究表明, GnRH 为低分子量多肽, 现在已经发现的 29 种类型的分子量为 1.2~1.4 ku, 因此本实验采用 RP-HPLC 技术作为分离方法, 并且获得良好分离效果。

GnRH 作为一种高度保守神经多肽家族, 不同类型之间具有相似度极高的氨基酸序列, 这为在其他物种中应用免疫学鉴定方法寻找类似物提供了可能。目前国外研究显示, 在被囊类<sup>[7]</sup>、章鱼<sup>[8]</sup>等物种 GnRH 的研究中, 采用 RP-HPLC 与免疫鉴

定实验相结合的研究方式,已经成功分离纯化出 GnRH 类似物,此外,在斑节对虾、罗氏沼虾、日本囊对虾,采用章鱼的 GnRH 抗体进行免疫组化实验证实了脑与胸神经节存在 octGnRH 类似物,但尚未进行分离纯化。本文采用 RP-HPLC 技术与免疫斑点印迹方法相结合方式,从中华绒螯蟹脑组织粗提液中初步分离获得了 GnRH 类似物,质谱分析表明 GnRH 类似物样品中多肽物质分子量范围在 800~1400 u,主要由 8 种小分子多肽组成,特别是组分中包含有分子量为 1 413.6 u 多肽与章鱼 octGnRH 分子量 1 443.5 u 相接近,该组分的进一步的纯化分析和二级质谱分析表明其氨基酸序列(未发表,申请专利阶段)与章鱼 octGnRH 非常相近。

GnRH 在生殖调控中的中枢地位毋庸置疑。脊椎动物的卵巢发育、排卵、受孕等生殖过程都是通过下丘脑 GnRH 的释放或垂体对 GnRH 的应答来完成的,同样,已有研究表明在无脊椎动物中 GnRH 具有相似效果,例如,人工合成的 mGnRH 能刺激田螺(*Helisoma trivolvis*)产卵量增加<sup>[9]</sup>; mGnRH 和 cGnRH- 能够促进被囊类(*Ciona intestinalis*)离体培养性腺中性类固醇激素的释放<sup>[10]</sup>; tGnRH- 可以刺激半索动物(*Saccoglossus bromophenolosus*)配子释放<sup>[11]</sup>。虽然无脊椎动物中缺乏下丘脑-垂体-性腺轴调控通路,但是这些实验结果均提示 GnRH 参与无脊椎动物生殖过程调控。在斑节对虾中注射 LHRH、sGnRH、lGnRH- 后具有明显促进卵巢成熟作用,而且在拟穴青蟹<sup>[12]</sup>及锯缘青蟹<sup>[13]</sup>的脑组织中应用免疫组化定位方法证实有 FSH 和 LH 类似物存在,推测甲壳类动物卵巢发育也是通过 GnRH 类似物进行调控<sup>[14]</sup>, GnRH 可能作为一种上游调控因子,通过调控下游激素释放来促进卵母细胞成熟。由于本研究分离获得的 GnRH 量有限,虽然尚未确认其在中华绒螯蟹卵母细胞成熟过程中的作用,但为将来采用人工合成多肽的方法进一步研究 GnRH 功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Schally A V, Arimura A, Kastin A J, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones[J]. *Science*, 1971, 173(4001): 1036-1038.
- [2] Roch G J, Busby E R, Sherwood N M. Evolution of GnRH: Diving deeper[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 171(1): 1-16.

- [3] Ngermsoungnern A, Ngermsoungnern P, Kavanaugh S, *et al.* The identification and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the central nervous system and ovary of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Invertebrate Neuroscience*, 2008, 8(1): 49-57.
- [4] Ngermsoungnern A, Ngermsoungnern P, Kavanaugh S, *et al.* The presence and distribution of gonadotropin-releasing hormone-like factor in the central nervous system of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(3): 613-622.
- [5] Amano M, Okumura T, Okubo K, *et al.* Biochemical analysis and immunohistochemical examination of a GnRH-like immunoreactive peptide in the central nervous system of a decapod crustacean, the kuruma prawn (*Macrobrachium japonicum*)[J]. *Zoological Science*, 2009, 26(12): 840-845.
- [6] Kato S, Tsurumaru S, Taga M, *et al.* Neuronal peptides induce oocyte maturation and gamete spawning of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. *Developmental Biology*, 2009, 326(1): 169-176.
- [7] Powell J F, Reska-Skinner S M, Prakash M O, *et al.* Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(19): 10461-10464.
- [8] Iwakoshi E, Takuwa-Kuroda K, Fujisawa Y, *et al.* Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 291(5): 1187-1193.
- [9] Young K J, Chang J P, Goldberg J I. Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the freshwater snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: possible involvement in reproduction[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 1999, 404(4): 427-437.
- [10] Di Fiore M M, Rastogi R K, Ceciliani F, *et al.* Mammalian and chicken I forms of gonadotropin-releasing hormone in the gonads of a protochordate, *Ciona intestinalis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(5): 2343-2348.
- [11] Cameron C B, Mackie G O, Powell J F F, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone in mulberry cells of *Saccoglossus* and *Ptychodera* (Hemichordata: Enteropneusta) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 114(1): 2-10.
- [12] Ngermsoungnern A, Ngermsoungnern P, Weerachatanukul W, *et al.* The existence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactivity in the ovary and the effects of GnRHs on the ovarian maturation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 2008, 279(1-4): 197-203.
- [13] 韩师昭. 拟穴青蟹 FSH 和 LH 生殖作用的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [14] 叶海辉, 黄辉洋, 李少菁, 等. 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)脑中 FSH 和 LH 的免疫识别[J]. *自然科学进展*, 2006, 16(6): 768-770.

## Partial isolation and immunological characterization of a GnRH-like peptide from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

WANG Cheng-zhi, QIU Gao-feng\*

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by Ministry of Agriculture,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In this study a gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-like peptide was partially isolated by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) from the brain extract of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Immunological dot blot analyses from RP-HPLC fractions using the anti-octGnRH revealed that one of fractions is immune reaction positive, suggesting that the fractions of brain extract contain GnRH-like substance. Eight kinds of small peptides, with molecular weight ranging from 800 to 1 400 u, were further identified in this fraction by using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS). One of peptides in MS component shared similar molecular weight with the octGnRH.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; reversed phase high performance liquid chromatography; immunological dot blot; gonadotropin-releasing hormone

**Corresponding author:** QIU Gao-feng. E-mail: gfqiu@shou.edu.cn