

罗氏沼虾中等足类 AGH 类似物的分离与鉴定

张银华 徐 盈 张 菁 陆仁后

(中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 从 2130 尾性成熟的雄性罗氏沼虾体内采集雄性腺体 (AG), 匀浆后, 分离沉淀等电点为 4.5 左右的多肽, 用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法收集分子量从 17kDa 至 18kDa 的多肽条带。进一步应用高效液相色谱、无胶筛分高效毛细管电泳、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱、高效液相色谱-电喷雾电离-质谱等技术进行分离与鉴定。结果显示, 主要组分的分子量为 $17436 \pm 110u$, 在等电点 4.5 的条件下分离得到的罗氏沼虾 AG 组分中, 以分子量 17480u 的多肽组分为主, 与等足类 *Armadillidium vulgare* AGH 的分子量相似, 暂称为等足目 AGH 类似物。

关键词: 罗氏沼虾, 雄性腺体激素 (AGH), 等足目 AGH 类似物, 分离, 鉴定

中图分类号: S966.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2000)02-0167-05

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii* Man), 对虾等十足目甲壳动物不同性别个体的经济性状具有很明显的差异。为了使这类珍贵十足目甲壳动物的人工性控实用化, 在增加较少投资的前提下大幅度增加名贵水产养殖的经济效益, 必须要获得较廉价, 可保存, 使用简便的激素。已证实在等足目、端足目和十足目等甲壳动物的雄性腺体 (Androgenic gland, AG) 所分泌的雄性腺体激素 (AGH) 具有调控性别发育的功能^[1-4]。为此, 必须首先搞清十足目甲壳类 AGH 的活性成分。应用高效液相色谱 (HPLC)、无胶筛分高效毛细管电泳 (HPCE)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)、高效液相色谱-电喷雾电离-质谱 (HPLC-ESI-MS) 等技术对罗氏沼虾雄性腺体提取物进行分离与鉴定, 为进一步开展有关 AGH 的结构研究, 基因工程研究打下坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 罗氏沼虾中等足目 AGH 类似物的初提 从 2130 尾性成熟雄性罗氏沼虾体内采集雄

收稿日期: 1998-12-04; 修订日期: 1999-09-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 29575222)

作者简介: 张银华 (1964—), 男, 湖北仙桃人, 中国科学院水生生物研究所高级工程师, 主要从事色谱-质谱分析研究与应用工作, 现在湖北省公安厅刑事科学技术研究所从事法医毒物分析与物证鉴定研究。中国科学院上海生物化学研究所夏其昌研究员, 曾 嵘, 邵小霞, Finnigan 中国公司周克喻协助 HPLC-ESI-MS 测定, 中国科学院大连化学物理研究所梁鑫淼研究员, 邹法汉研究员, 张青博士协助 MALDI-TOF-MS, HPLC, HPEC 测定, 中国科学院水生生物研究所陈国胜, 刘建平, 张捷等同志协助本课题的部分样品采集工作, 在此一并表示衷心感谢!

性腺体。取雄性腺体以 1:5w/v 比例加入 0.1mol/L NaAc, 匀浆。匀浆液经过 12000r/min 离心 15min, 吸取上清液, 用 1mol/L HAc 调 pH 至 4.5; 澄清液变为混浊液, 离心收集沉淀。溶解于 0.01mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液中, 然后分步进行 35—85% 饱和度的硫酸铵沉淀, 离心收集沉淀, 沉淀经溶解用凝胶电泳分离, 收集 17kDa 至 18kDa 的条带, 电洗脱并透析即得等足目 AGH 类似物粗品。

1.2 高效液相色谱条件 美国 Waters 公司高效液相色谱仪, 600 型高压泵, 二极管阵列检测器, 色谱柱: Sperisorb C₈ 柱, 2mm × 150mm, 流动相: 10mmol/L NH₄Ac/HAc 缓冲液, pH4.5—6.2, 流速 0.20—0.40mL/min。

1.3 毛细管电泳 美国 Bio-Rad 公司 Bio-Focus 3000 毛细管电泳仪, 27cm × 50μm, 外径 375μm 未涂渍柱, 运行电压 15kV。将 7.5μL 等足目 AGH 类似物粗品, 25μL 样品缓冲液 (含 SDS), 15μL 去离子水及 2.5μL 苯甲酸内标, 放入 200μL 离心管中, 将盖子盖紧, 置于沸水中加热 10min, 离心 2min, 然后冷却至 4℃ 待测。

1.4 液相色谱-电喷雾质谱联用 美国 HP 公司 HP 1100 液相色谱仪与美国 Finnigan 公司 LCQ 离子阱质谱仪联用。液相色谱柱 HP C₈ 柱, 柱前压 12bar, 流动相 A: 0.02% 三乙胺 (TEA) 溶液, 流动相 B: 0.02% 三氟乙酸 (TFA) 的乙腈, 线性梯度洗脱: 12min 由 100%A 到 100%B。电喷雾离子源高压 4.5kV, 包覆气 40 单位, 金属毛细管温度 200℃。

2 结果与讨论

2.1 高效液相色谱法 (HPLC) 分离

图 1 为罗氏沼虾等足目 AGH 类似物组分的 HPLC 色谱图, 经空白对照实验证实峰 1 和峰 2 为罗氏沼虾等足目 AGH 类似物的两个主要成分。

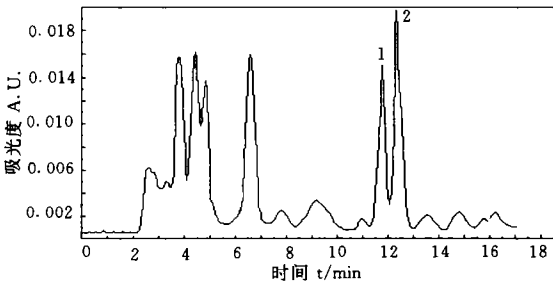


图1 罗氏沼虾中等足目AGH类似物的HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of the isopoda AGH analogue in *M. rosenbergii*
色谱柱: Sperisob C₈ 2 × 150mm
流动相: NH₄ Ac/HAc pH4.5
流速: 0.20mL/min.
peak 1: AGH; peak 2: AGH I (17480u)

流动相与流速的选择: 分别用 5mmol/L 和 10mmol/L NH₄Ac/HAc 为流动相, 控制其酸度为 pH4.5, 5.0 和 6.2, 流速为 0.20 和 0.40ml/min, 进行高效液相色谱条件优化选择。

表1 罗氏沼虾等足目AGH类似物的HPLC色谱图峰1和2的半高峰宽分离度

Tab.1 The separation of peaks 1 and 2 in the HPLC chromatogram of the isopoda AGH analogue in *M. rosenbergii*

流速 \ 流动相	NH ₄ Ac/HAc 10mol/L		
	pH4.5	pH5.0	pH6.2
0.20ml/min	2.33	1.95	1.55
0.40ml/min	1.85	2.00	1.22

实验表明流动相为 10mol/L NH₄Ac/HAc, pH4.5, 流速为 0.40mL/min时, 峰 1 和 2 的分离效能最高, 其半高峰宽分离度高达 2.33(表 1)。

检测器波长的选择: 在最佳流动相和流速条件下, 利用光电二极管阵列检测器进行扫描, 获得等足目 AGH 类似物的三维 HPLC 色谱图, 其中, 在 UV254nm 处的两个色谱峰有最大吸收。证实 UV254nm 为最佳检测波长。

2.2 毛细管电泳(CE)分离与鉴定

毛细管电泳中, 带电溶质电迁移率可以从如下方程算出:

$$\mu_{ep} = [L \times L_0 \times (1/t_0 - 1/t_r)]/V$$

其中, L 为毛细管总长度; L₀ 为毛细管有效长度; V 为电泳电压; t₀ 为电渗流 L₀ 长度所需时间; t_r 为带点物质迁移 L₀ 长度所需时间^[6]。t₀ 可以通过测定电中性物质保留时间得到, 我们通过测定苯甲酸的保留时间而得。

蛋白质, 核酸和多糖等具有生物活性的生物大分子在毛细管电泳中的电迁移已被证实与其分子量的负三分之二次方成正比^[5-7], 即

$$\mu_{ep} = cq(M_r)^{-2/3}$$

式中, q 为电荷, Mr 为分子量, c 为相关系数。

利用这两个方程式计算图 3 中峰 5, 6, 7 的分子量分别为 16349, 16727, 17436U。这一结果与电喷雾质谱法测得的分子量一致。该方法由于时间测量的不准确性和本身的不稳定性, 平均每 0.01s 的误差可导致分子量有 55u 的误差。

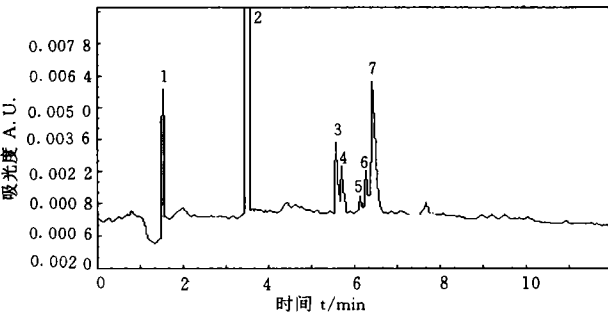


图 2 罗氏沼虾中等足目 AGH 类似物的 SDS-无胶筛分毛细管电泳图

Fig.2 HPCE chromatogram of the isopoda AGH analogue in *M. rosenbergii*
电泳条件: 27 × 50μm 未涂渍, 缓冲液: CE-SDS 蛋白大小分离运行缓冲液 (Bio-Rad), 进样: 12kV, - → +; 电压: 15kV, 柱温: 25℃, 检测: UV220nm 1: benzoic acid 3: Hen egg white lysozyme (14400u) 7: AGH I(17436u)

2.3 液相色谱-电喷雾电离-质谱联用技术(HPLC-ESI-MS)分析

图 3 为罗氏沼虾等足目 AGH 类似物粗品的 C₈柱反相 HPLC 色谱与电喷雾质谱联用所获得的电喷雾质谱图。其中分子量为 17480U 的蛋白质为罗氏沼虾等足目 AGH 类似物

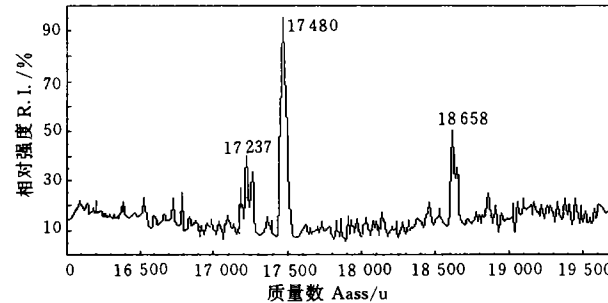


图 3 罗氏沼虾中等足目AGH类似物的 ESI-MS质谱图

Fig.3 ESI mass spectra of the isopoda AGH analogue in *M. rosenbergii*
AGH I: MW=17480;
AGH II: MW=18658

组分的主要组分之一,另外罗氏沼虾中等足目 AGH 类似物中还含有少量分子量为 17237U 和 18658U 等蛋白质。

在 HPLC-ESI-MS 实验中, HPLC 实验所得最佳分离条件下的流动相 10mol/L NH_4Ac / HAc (pH4.5),此时正电离 ESI-MS 的信号非常弱,说明 HPLC 的流动相与 ESI-MS 的缓冲液不相适应。为了获得 ESI-MS 信号,将缓冲液改为碱性的 0.02% 三乙胺 (TEA) 溶液,牺牲 HPLC 的最佳分离条件,使等电点为 4.5 左右的 AGH 在此碱性条件下带负电荷,易于用负电离 ESI-MS 进行检测,获得罗氏沼虾等足目 AGH 类似物组分的分子量信息。

2.4 激光辅助解吸-飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 的初步鉴定

MALDI-TOF-MS 具有准确、快速和简便等特点,而且其测量的质量范围理论上是无限制的,所以该技术发展非常迅速,成为有机质谱中发展最快和最活跃的一个领域。利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱测定了罗氏沼虾中等足目 AGH 类似物的质谱,其质谱图上显示的质量/电荷比为 6007u/e,指示罗氏沼虾中等足目 AGH 类似物分子在测试条件下带有 3 个电荷,表明罗氏沼虾等足目 AGH 类似物的分子量为 18000u 左右。

分别采用 SDS-PAGE、HPLC、HPCE、HPLC-ESI-MS 和 MALDI-TOF-MS 等多种技术分离与鉴定罗氏沼虾等足目 AGH 类似物。HPCE 结果显示,在 pH4.5 条件下提取的罗氏沼虾等足目 AGH 类似物的主要组分的分子量为 $17436 \pm 110\text{u}$,而经 HPLC-ESI-MS 技术鉴定为 17480u,所分离得到的罗氏沼虾等足目 AGH 类似物以含分子量 17480u 为主的混合蛋白质。在测定罗氏沼虾等足目 AGH 类似物分子量的多种技术中,HPLC-ESI-MS 的准确度为最优,HPCE 次之,而传统的 SDS-PAGE 为最差,这些方法的测量误差与理论值一致。蛋白质的分子量一般用 SDS-PAGE 法测定,其误差一般为 2~5% 左右。电喷雾质谱法测定蛋白质的分子量要精确得多,其误差只有 0.05~0.01% 左右,有时可以精确到 1u。这给鉴定各种蛋白质提供了极大的方便。

罗氏沼虾 AG 中存在与等足目 *A. Vulgare* AGH 的分子量和等电点相似的多肽组分。其生物活性检测结果将另文报道,其一级结构有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Nagamine C, Knight A W, Maggenti A, Paxman G. Masculinization of Female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), (Decapoda, Paluemonidae) by Androgenic Gland Implantation [J]. *Gen. Comp. End.*, 1980, **41**: 442—457
- [2] Sagi A, Cohen D, Milner Y. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Gen. Comp. End.*, 1990, **77**:15—22
- [3] Sagi A, Cohen D. Growth, maturation and progeny of sex-reversed *Macrobrachium rosenbergii* males [J]. *World Aquaculture Report*. 1990, **21**(4):87—90
- [4] Hasegawa Y, Hirose E, Katakura Y. Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in crustacea [J], *Am. Zool.*, 1993, **33**(3), 403—411
- [5] Richard E C, Strohl M M, Nielsen R G, et al. Correlation of electrophoretic mobilities from capillary electrophoresis with physicochemical properties of proteins and peptides [J], *Anal. Biochem.*, 1991, **197**: 197—207
- [6] 车发云,刘正宇,王克夷等. 毛细管电泳分离寡糖衍生物及其电泳行为研究 [J], *生物化学与生物物理学报*,

1998, 30(5): 495—500

[7] 车发云, 刘正宇, 王克夷等. 毛细管电泳分析常见单糖的 2-氨基嘧啶酮衍生物 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(3): 251—256

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF ISOPODA AGH ANALOGUE IN *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

ZHANG Yin-hua, XU Ying, ZHANG Jing and LU Ren-hou

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: The androgenic gland was collected from male *Macrobrachium rosenbergii*, then was homogenized with 0.1mol / L NaAc solution. The homogenate was centrifuged 15min at 12 000 r / min, the upper layer clear solution was adjusted to pH4.5, then was centrifuged again and the precipitate was collected. This precipitate was separated with SDS-PAGE method. The crude product of the isopoda AGH analogue (Androgenic Gland Hormone) of *M. rosenbergii* was collected from the protein belt which molecular weight range from 17k Da to 18k Da by SDS-PAGE method. The applications of new techniques such as HPLC, and MALDI-TOF-MS were carried out. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and HPLC-ESI-MS methods may provide a more sensitive and accurate determination for the molecular weight of AGH. The molecular weight of the isopoda AGH analogue is 17480u as identified by HPLC-ESI-MS and $17436 \pm 110u$ by capillary electrophoresis.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*, Androgenic gland hormone (AGH), Analogue of isopoda AGH, Separation, Identification