

反相高效液相色谱法分离中华绒螯蟹性腺抑制激素的初步研究

马奎, 康现江, 穆淑梅, 张亮, 温秀荣

(河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要:采用反相高效液相色谱层析法 (RP-HPLC) 分离中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 眼柄视上神经节中的性腺抑制激素, 收集在高血糖激素家族区域内出峰的洗脱液组分, 得到 7 组单一的样品组分。通过活体注射的方法, 观察和统计每一组分对去眼柄中华绒螯蟹卵母细胞直径大小的影响, 以检验每个分离组分的性腺抑制活性。结果发现, 其中的第 7 组分对中华绒螯蟹的卵巢发育具有最强的抑制作用, 推测这一组分为中华绒螯蟹的性腺抑制激素。[中国水产科学, 2007, 14 (2): 331–335]

关键词:中华绒螯蟹; 性腺抑制激素; 反相高效液相色谱; 卵母细胞

中图分类号: Q959.223

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)02–0331–05

X 器官-窦腺复合体 (X organ-sinus gland system, XO-SG) 位于甲壳动物眼柄视上神经节, 是甲壳动物的重要神经内分泌器官。XO-SG 合成和分泌的甲壳动物高血糖激素 (Crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、蜕皮抑制激素 (Molt-inhibiting hormone, MIH)、性腺抑制激素 (Gonad-inhibiting hormone, GIH) 和大颚器官抑制激素 (Mandibular organ-inhibiting hormone, MOIH) 等多种神经多肽类激素。这些激素同属于 CHH 家族, 它们的成熟肽都由 71~78 个氨基酸残基组成, 并具有相似的氨基酸序列, 有 6 个位置保守的半胱氨酸, 形成 3 个链内二硫键^[1–5]。

近年来对甲壳动物激素的研究已经成为国内外相关研究的热点^[6]。国外对甲壳动物所特有的高血糖素家族神经激素尤其是 CHH 和 MIH, 在分子水平上进行了深入的研究, 积累了大量的基础性资料^[7–11]。国内有关甲壳动物眼柄神经内分泌系统的研究还停留在对甲壳动物眼柄神经内分泌系统的组织学和细胞学观察^[12–15]。在生物化学和分子生物学方面研究较少, 仅对中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的 MIH 编码基因利用同源克隆方法进行了序列分析^[16–18], 对中华绒螯蟹融合蛋白表达进行了研究^[19], 但对于甲壳动物眼柄内 GIH 分离纯化的研究尚未见报道。

中华绒螯蟹 (以下简称河蟹) 是中国特有的水产

养殖动物, 在中国地理分布较广^[20], 但在各地养殖过程中普遍发生一龄蟹性早熟现象。性早熟直接导致了河蟹生长缓慢甚至停滞、个体小、死亡率高, 从而给经济生产带来了巨大的损失^[21]。导致河蟹性早熟发生的机制非常复杂, 通常认为是外在因素和内在因素综合作用的结果。其中河蟹的生殖内分泌调控被认为是导致河蟹性早熟的主要内在因素^[22], 而 GIH 的分泌和代谢失调与性早熟有着密切的关系。GIH 是一种具有酸性等电点的热稳定性产物, 它不仅能够抑制雌体的卵黄发生及性腺刺激因子的生成, 还能抑制雄体的促雄性腺的活性以及肝胰腺合成卵黄蛋白及大颚器合成甲基法尼醇^[23]。由于在河蟹眼柄中神经多肽激素的合成很少, GIH 在 XO-SG 中的含量甚微, 给分离、纯化工作造成了困难。本研究采取高效液相色谱法对河蟹眼柄的粗提液进行分离, 并将分离所得到的组分注射到去眼柄的河蟹体内, 通过观察其对卵巢发育的影响, 检验其生物学活性, 旨在为进一步研究河蟹 GIH 的特征及其对生殖的调控机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

河蟹购于白洋淀, 选取未性成熟的河蟹 (体质量 20~30 g) 于水族箱 (100 cm×40 cm×50 cm) 中暂养, 水位 10 cm 左右, 充气泵充氧保证水中溶氧充

收稿日期: 2006–07–31; 修订日期: 2006–10–23.

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (303118); 河北大学青年科学基金资助项目 (2005Q13).

作者简介: 马奎 (1981–), 男, 硕士研究; 细胞生物学专业. E-mail: mkhorse@sina.com

通讯作者: 康现江, 教授, 研究方向: 甲壳动物生殖、发育及其调控. Tel: 086–0312–5079362; E-mail: xjkang@mail.hbu.edu.cn

足,规律性饲喂混合食物(小鱼、土豆、水草等),每天换水以清除食物残渣和排泄物,保持良好的水质。

在注射实验前,选取大小相近,处于同一发育阶段的未性成熟的雌性河蟹,分9组饲养于9个水族箱中,每组5只。

1.2 激素蛋白粗提液的制备

将25只未性成熟河蟹(不区分性别)的眼柄从基部剪断,在预冷的 Tris-HCl 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4, 含0.7%的 NaCl)中解剖出视上神经节,去除结缔组织后置于1.5 mL的离心管中,超声波破碎(180W, 5 s × 15 次间隔 5 s),将破碎后的匀浆液离心,取上清液 85 ℃ 热水浴 5 min,使其中的非耐热蛋白沉淀下来,然后将上清液再次离心,所得上清液即为粗提液^[3]。

1.3 粗提液的分离

将粗提液通过 Amersham Pharmacia 公司的 AKTA explorer100 型蛋白液相色谱仪的反相柱进一步分离,分离条件见表1,收集每个分离峰备用。

表1 粗提液反相层析具体分离条件

Tab.1 Conditions for crud extract isolation by RP-HPLC

项目 Item	分离条件 Separating condition
分离柱 Column	RESOUREC™ RPC 3 mL
检测波长 Wave length	215 nm, 280 nm
进样量 Sample volume	0.5 mL
平衡液 Balanced solution	0.05% 三氟乙酸水溶液 0.05% TFA water solution
平衡体积 Balanced volume	15 mL
流速 Flow rate	2 mL/min
洗脱液 Eluent	0.05% 三氟乙酸的乙腈溶液 0.05% TFA acetonitrile solution
洗脱液用量 Eluent requirement	0~100% 洗脱液 60 mL 0~100% Eluent 60 mL

1.4 各组分的生物学活性检验

1.4.1 注射前期处理

(1)分离组分的处理:将反相层析分离所得组分冷冻干燥后-70 ℃保存,注射前每组分用200 μL 灭菌蒸馏水溶解以备活体注射实验。

(2)河蟹处理:选取大小相近的未性成熟的雌性河蟹,分为1个正常组(不剪除眼柄的正常河蟹,不注射)、1个对照组(剪除眼柄的河蟹,不注射)和1个实验组(剪除眼柄,注射),每组5只。在25 ℃的

养殖缸中驯养4 d,每天喂食。注射实验前剪除对照组和所有实验组河蟹的双侧眼柄,并以镊烫法处理伤口,处理之后于水族箱中驯养3 d。

1.4.2 注射 驯养后的河蟹于剪除眼柄后的第3天进行注射,每只河蟹注射各分离组分5 μL,注射部位为第三步足动关节膜处。第5天和第7天各重复注射1次。

1.4.3 观察与统计 各组河蟹在剪除眼柄后第9天解剖取出卵巢,正常组同时取卵巢。将取出的每只河蟹的卵巢一部分直接在倒置显微镜下测量并统计其40个卵母细胞的直径,另一部分作石蜡切片,经固定、脱水、包埋、切片(7 μm)、HE染色并封片保存。制好的切片在显微镜下随机测量并统计40个卵母细胞直径。结果以卵母细胞平均直径±标准差表示,数据统计采用origin7.0软件通过单因素方差分析和t-检验将实验组与对照组数据进行差异显著性比较,并计算各注射组分对卵母细胞生长的抑制率。抑制率按下列公式计算: $R_I = (D_0 - D_I) / D_N$ 。式中, R_I 代表抑制率; D_0 代表对照组卵母细胞直径; D_I 代表注射组卵母细胞直径; D_N 代表正常组卵母细胞直径。

2 结果与分析

2.1 RP-HPLC对河蟹眼柄激素蛋白粗提液的分离

河蟹眼柄粗提液在反相层析后经色谱分析共得到13个峰(图1),选取CHH家族出峰范围内的组分重点收集,共收集了洗脱体积在26~40 mL之间的7个分离组分如表2所示。

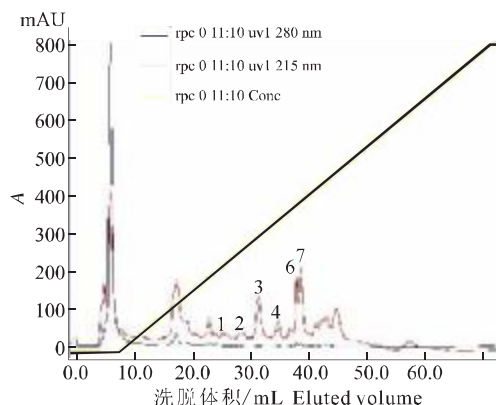


图1 河蟹眼柄粗提液层析图谱
1-7: 组分编号。

Fig.1 RP-HPLC of crude extract of crab's optic ganglia
1-7: the serial numbers of 7 isolated fractions.

表 2 7 种 PR-HPLC 分离组分的洗脱体积
Tab.2 Eluted volumes of 7 isolated fractions by RP-HPLC mL

组分 1 Fraction 1	组分 2 Fraction 2	组分 3 Fraction 3	组分 4 Fraction 4	组分 5 Fraction 5	组分 6 Fraction 6	组分 7 Fraction 7
26-27	28-30	30-31	31-33	33-35	35-38	38-39.4

2.2 注射实验
2.2.1 直接观察 在注射第 9 天取出河蟹位于头胸部背甲下部的卵巢, 制作直接涂片在倒置显微镜下测量其卵母细胞直径。将统计结果进行单因素方差分析, 结果显示, 正常组的卵母细胞直径为 $(7.45 \pm 1.15) \mu\text{m}$, 要远小于对照组的 $(11.75 \pm 0.84) \mu\text{m}$; 注射组除组分 1 外, 其他卵母细胞直径都小于对照组, 并且抑制率以组分 7 最高(表 3)。同时 t -检验的结果表明, 注射组分 2 与对照组有显著差异 ($P < 0.05$), 组分 3 到组分 7 与对照组有极显著差异 ($P < 0.01$)。
2.2.2 石蜡切片 取出河蟹卵巢及时固定制作石蜡切片, 测量其卵母细胞直径, 结果显示, 正常组的卵母细胞直径为 $(4.81 \pm 0.08) \mu\text{m}$, 显著 ($P < 0.05$) 小于对照组的 $(8.57 \pm 0.11) \mu\text{m}$; 注射组的卵母细胞直径都小于对照组, 抑制率仍然是以组分 7 最高(表 3)。 t -检验的结果表明所有注射组分都与对照组有极显著差异 ($P < 0.01$)。

表 3 激素蛋白粗提液不同组分对卵母细胞的影响
Tab.3 Effects of crude hormone extract fraction to oocyte $n = 40; \bar{X} \pm \text{SD}$

组别 Treatment	直接涂片 Direct smear		石蜡切片 Paraffin section	
	卵径 / μm Diameter of oocyte	抑制率 /% Inhibition	卵径 / μm Diameter of oocyte	抑制率 /% Inhibition
正常 Normal	7.45 ± 1.15	—	$4.81 \pm 0.08^*$	—
对照 Control	11.75 ± 0.84	—	8.57 ± 0.11	—
1	13.53 ± 1.57	—	$7.7 \pm 0.11^{**}$	18.09
2	$11.25 \pm 1.01^*$	6.71	$7.9 \pm 0.11^{**}$	13.93
3	$10.00 \pm 1.09^{**}$	23.49	$6.75 \pm 0.08^{**}$	37.84
4	$9.55 \pm 0.93^{**}$	29.53	$6.05 \pm 0.12^{**}$	52.39
5	$9.03 \pm 1.42^{**}$	36.51	$5.92 \pm 0.07^{**}$	55.09
6	$8.95 \pm 1.26^{**}$	37.58	$5.95 \pm 0.07^{**}$	54.47
7	$7.60 \pm 1.19^{**}$	55.70	$4.79 \pm 0.08^{**}$	78.59

注: 1) 第 1~7 组为注射组, 数字对应于图 1 中各组分编号。
2) * 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$); ** 与对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$)。
Note: 1) Treatments 1-7 are correspondent with the fraction numbers in Fig.1, meaning injection treatments.
2) * Significant difference compared with control ($P < 0.05$); ** Extremely significant difference compared with control ($P < 0.01$)

3 讨论

十足目甲壳动物的性腺抑制激素 (GIH) 为一种具有酸性等电点的热稳定性产物, 由 71~78 个氨基酸残基构成, 分子量在 2 000~3 000 D 之间^[24]。根据它的热稳定性, 在提取粗提液时采取热水浴的方法可以有效的去除一部分杂蛋白的干扰, 为接下来的层析分离奠定了基础。GIH 是具有酸性等电点的小分子多肽, 因此采用酸性环境、连续浓度梯度的乙腈作为洗脱液, 280 nm 和 215 nm 监测, 通过蛋白液相色谱仪的反相柱 RESOUREC™ RPC 对眼柄粗

提液进行进一步的分离, 分离的效果明显。收集单个峰, 得到了 13 个组分(图 1)。层析图谱结果与 Soyez 等^[25]采用 RP-HPLC 分离美洲龙虾 (*Homarus americanus*) 的 GIH 和 Manuel 等^[26]采用 RP-HPLC 分离并获得了墨西哥小龙虾 (*Procambarus bourier*) 的 GIH 的结果相一致。可见, 本实验所采用反相高效液相色谱的分离条件是适用于河蟹眼柄内高血糖激素家族的研究的, 并且能够达到有效分离的目的。
十足目甲壳动物 CHH 家族神经激素是甲壳动物特有的多肽激素。这一家族神经肽的一级结构有

许多相同之处,并具有相近的理化性质,在 RP-HPLC 分离图谱中表现出相似的特征峰,并且出峰时分布接近、区域集中^[31]。通过 RP-HPLC 分析十足目甲壳动物 CHH 家族,是目前比较成熟的方法^[29],具有灵敏性高、稳定性好等特点^[32-33]。虽然不同种类的层析图谱不尽相同,但是作为 CHH 家族中的一员,GIH 的特征峰总是处于 CHH 家族的峰值范围之中。因此在实验中,从 CHH 家族出峰范围中找到目的 GIH 的方法是可行的。

采用活体注射的方法鉴定各分离组分对河蟹性腺发育的抑制作用,从结果中可以观察到去除双侧眼柄的对照组河蟹的卵母细胞直径明显大于未去除眼柄的正常组(表 3),说明去除河蟹眼柄能明显的加快卵巢发育。十足目甲壳动物眼柄视上神经节是 XO-SG 之所在,它分泌并储存多种神经分泌激素,对多种生理功能有重要调节作用。其中分泌的 GIH 主要抑制性腺(卵巢或精巢)发育。眼柄切除后,去除了眼柄内激素 GIH 的调节作用,使性腺的发育不受抑制,从而加快了卵巢发育。这与顾志敏等^[27]、康现江等^[28-29]、崔青曼等^[30]所得到的结果是相吻合的。

在注射 RP-HPLC 所分离的组分时,本实验选取的是洗脱体积在 26~40 mL 之间的属于 CHH 家族的 7 个分离组分。活体注射之后,将河蟹饲养 6 d 之后再解剖,目的是使其卵巢充分的发育。通过对每只河蟹卵母细胞直径的观察和统计发现,组分 1 不具有对河蟹卵巢发育的抑制作用(表 3)。而组分 2 到组分 7 都有一定程度的性腺抑制作用。推测河蟹的神经内分泌激素之间具有一定的相互调节作用,甲壳动物的生殖调控是在多激素的基础上进行的,它们直接或间接地影响着性腺的发育。

卵母细胞直径的增大是卵巢发育的标志^[34],所以卵母细胞的直径是衡量卵巢发育的一个重要指标。由于石蜡切片要经过一系列的处理步骤,因此通过石蜡切片所得到的卵母细胞直径的大小与直接观察到的结果有一定的差异,但是不管是石蜡切片还是直接涂片观察,实验结果都显示出在所有的注射组分中,组分 7 对河蟹卵巢的发育具有最高的抑制率(表 3),注射组分 7 的河蟹卵母细胞直径明显要小于注射其他组分的河蟹,并且十分接近于正常的河蟹。显然组分 7 对河蟹卵巢的发育和卵黄蛋白的合成具有最强的抑制作用,符合甲壳动物 GIH 的生物学特性。因此推测在特定条件下(表 1)出峰体

积在 38~39.4 mL 的组分 7 为河蟹眼柄中所储存的性腺抑制激素。

参考文献:

- [1] Cooke I M, Sullivan R E. Hormones and neurosecretion [M] // Bliss D E, Atwood H L, Sandeman D C. The biology of crustacean neurobiology: structure and function. New York: Academic Press, 1982, 3: 205-290.
- [2] De Kleijn D P V, Van Herp F. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacea [J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 112B: 537-579.
- [3] Keller R. Crustacean neuropeptides: structure, functions and comparative aspects [J]. Experientia, 1992, 48: 439-448.
- [4] Lacombe C, Greve P, Martin G. Overview on the subgrouping of the crustacean hyperglycemic hormone family [J]. Neuropeptides, 1999, 33: 71-80.
- [5] Van Herp F. Molecular, cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycaemic hormone family [M] // Coast G M, Webster S G. Recent Advances in Arthropod Endocrinology. Cambridge: Cambridge University Press, Society for Experimental Biology Seminar Series, 1998, 65: 53-70.
- [6] 张爱萍. 虾蟹类眼柄激素的生理生化及基因克隆研究进展 [J]. 水产学杂志, 2001, 14 (1): 11-20.
- [7] Sun P S. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei* [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3: 1-6.
- [8] Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H, et al. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Zool Sci, 1997, 14: 785-789.
- [9] Lu W, Wainwright G, Olohan L A, et al. Characterization of cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer pagurus*; expression of MIH in non-X-organ tissues [J]. Gene, 2001, 278 (1-2): 149-159.
- [10] Lu W, Wainwright G, Webster S G, et al. Clustering of mandibular organ-inhibiting hormone and moult-inhibiting hormone genes in the crab, *Cancer pagurus*, and implications for regulation of expression [J]. Gene, 2000, 253 (2): 197-207.
- [11] Chan S M, Chen X G, Gu P L. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab (*Charybdis feriatus*) [J]. Gene, 1998, 224: 23-33.
- [12] 上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹 X 器官神经分泌细胞的细胞学研究 [J]. 海洋学报, 1994, 16 (6): 116-121.
- [13] 上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹腺显微和超微结构研究 [J]. 动物学报, 1995, 41 (4): 341-346.
- [14] 姚泊. 罗氏沼虾一种有髓鞘神经纤维的电镜观察 [J]. 动物学杂志, 1995, 30 (3): 7-9.
- [15] 康现江, 李阳. 中国对虾眼柄的神经分泌结构 [J]. 河北大学学报, 1998, 18 (1): 45-48.
- [16] 邱高峰, 张爱萍, 楼允东. 锯缘青蟹蜕皮抑制激素 cDNA 的分

- 子克隆及其表达分析[J]. 水产学报, 2003, 27 (3): 207-212.
- [17] 王在照, 焦传珍, 张晓军, 等. 中国对虾蜕皮抑制激素全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 遗传学报, 2003, 30 (2): 128-134.
- [18] 宋霞, 周开亚, 马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (MIH1) 基因的 cDNA 片段克隆和 Northern 印迹分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10 (5): 353-358.
- [19] 郭豫杰, 周开亚, 马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (Ers-MIH1)-GST 融合蛋白在大肠杆菌中的表达[J]. 中国水产科学, 2004, 11 (1): 9-13.
- [20] 刘健晖, 金春华, 李爱芬. 饥饿对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 幼体发育的影响[J]. 生态科学, 2005, 24 (1): 15-17.
- [21] 金刚, 李钟杰, 方榕乐等. 早熟河蟹的养殖生态学及渔业价值评估[J]. 水生生物学报, 1998, 22 (2): 143-147.
- [22] 堵南山, 赖伟, 陈鹏成, 等. 南春容中华绒螯蟹卵黄形成的研究[J]. 动物学报, 1999, 45 (1): 88-92.
- [23] 宋霞, 周开亚. 甲壳类的眼柄神经激素[J]. 水产学报, 1998, 22 (2): 134-161.
- [24] Soyez D, Le Caer J P, Noel P Y, et al. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus* [J]. *Neuropeptides*, 1991, 20: 25-32.
- [25] Soyez D, Kleijn D. Isolation and characterization of a Vitellogenesis-Inhibiting Factor from Sinus Glands of the Lobster, *Homarus americanus*. *J Exp Zool*, 1987, 244: 479-484.
- [26] Manuel B A, Quackenbush L S, Hunt D D T, et al. Identification, purification and initial characterization of the Vitellogenesis-Inhibiting Hormone from the Mexican Crayfish *Procambarus Bouvier* (Ortmann) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1992, 102B, N (3): 491-498.
- [27] 顾志敏, 何林岗. 切除单侧眼柄对中华绒螯蟹蜕皮, 生长, 成熟的影响[J]. 淡水渔业, 1991, 5: 10-13.
- [28] 康现江, 米娅, 刘彬彬, 等. 摘除眼柄对中华绒螯蟹精巢发育及氨基酸含量的影响[J]. 台湾海峡, 2000, 19 (3): 360-364.
- [29] 康现江, 孙辉建, 米娅, 等. 摘除眼柄对中华绒螯蟹肝脏结构及其氨基酸含量影响的研究[J]. 东海海洋, 1998, 16 (4): 35-39.
- [30] 崔青曼, 袁春营, 吴婷婷. 眼柄切除及注射黄体酮对中华绒螯蟹幼蟹卵巢发育的影响[J]. 海洋水产研究, 2004, 25 (6): 30-34.
- [31] 王在照, 相建海. 甲壳动物 CHH 家族神经激素结构和功能研究进展[J]. 水产学报, 2001, 25 (2): 175-180.
- [32] Treeratrakool S, Udomkit A, Eurwilaichitr L, et al. Expression of Biologically Active Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris* [J]. *Mar Biotechnol*, 2003, 5: 373-379.
- [33] Wang Y J, Hayes T K, Holman G M, et al. Primary structure of CHH/MIH/GIH-like peptides in sinus gland extracts from *Penaeus vannamei* [J]. *Peptides*, 2000, 21 (4): 477-484.
- [34] 孙继贤, 廖家遗. 罗氏沼虾胸神经结中促进卵母细胞发育的激素的初步分离[J]. 湖泊科学, 2003, 15 (1): 63-67.

Primary study of GIH isolation in *Eriocheir sinensis* by RP-HPLC

MA Kui, KANG Xian-jiang, MU Shu-mei, ZHANG Liang, WEN Xiu-rong

(College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: The gonad inhibiting hormone (GIH) is a member of Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) peptide family. It plays a significant role in inhibiting development of crab's gonad. In this research, the crude hormone extract of crab's optic ganglia was further isolated by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Seven single fractions were obtained. The biological activity of each fraction was assayed through injecting *in vivo* to the crabs whose optic ganglia were removed. After 6 days of injection the diameter of crab's oocytes was recorded and statistically analyzed. The results showed that among the 7 isolated fractions, fraction 7 had the greatest biological activity to suppress the development of crab oocytes, which indicated that this fraction was the GIH of *Eriocheir sinensis*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (2): 331-335]

Key words: *Eriocheir sinensis*; gonad inhibiting hormone; RP-HPLC; oocyte

Corresponding author: KANG Xian-jiang. E-mail: xjkang@mail.hbu.edu.cn