

中华绒螯蟹胚胎发育过程中的消化酶活力及氨基酸组成

田华梅, 王 群, 赵云龙, 罗 文, 樊玉杰

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要:采用生物化学方法测定了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)胚胎发育过程中7个发育期的5种水解酶(类胰蛋白酶、胃蛋白酶、淀粉酶、脂酶和纤维素酶)活力和氨基酸的组成。结果表明,胚胎发育各阶段消化酶活力及氨基酸组成的变化与其发育关系密切。在整个胚胎发育过程中,类胰蛋白酶、胃蛋白酶和纤维素酶的活力呈“高-低-高”的变化趋势,脂酶则呈现逐渐上升的趋势,而淀粉酶的变化趋势不明显。但在原蚤状幼体期,5种酶的活力均显著升高,这与孵化后幼体开口摄食的自身调控机理有关。可溶性蛋白质的含量呈“低-高-低”的变化趋势,明显与相关酶的活力有关。氨基酸含量在前6期变化不大,在原蚤状幼体期显著下降。所有氨基酸中,谷氨酸的含量最高;必需氨基酸中以亮氨酸的含量最高,并且单个必需氨基酸含量与必需氨基酸总量的比值(A/E)在胚胎发育不同阶段略有差异,但基本趋于一致。

关键词:中华绒螯蟹;胚胎发育;消化酶活力;氨基酸

中图分类号:Q959.225

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)05-0404-05

大多数虾蟹的胚胎发育是以卵黄作为营养源,卵黄的质和量以及它的消耗利用与胚胎发育密切相关。近年来,国内外对甲壳动物胚胎发育的研究大多局限于形态学观察,有关胚胎发育过程中营养物质利用等生理生化方面的研究较少^[1-4]。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,是我国重要的经济甲壳动物之一。但针对河蟹胚胎发育阶段的有关研究几乎是空白。因此,本研究在基本了解河蟹胚胎形态发育的基础上^[5],对其胚胎发育过程中的主要生化成分及一些相关水解酶活性进行了探讨,以期进一步了解胚胎对其储存营养物质的利用情况,以期为提高河蟹胚胎孵化率和幼体成活率提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

取自上海市崇明河蟹养殖场,均为未繁殖过的长江种群个体,其中雌性个体重125 g左右,雄性个体重150 g左右。2001年12月~2002年4月间蓄养于华东师范大学生物站的水族箱(50 cm×80 cm×50 cm)内,每缸各放雌雄蟹1只促产、抱卵。饲养用水盐度18,日换水量1/6~1/10,人工调控恒温24℃,充气泵增氧,每天均在8:00和17:00左右投喂鱼块或配合饲料,并及时消除残饵和粪便等。待雌蟹抱卵后,则将雌蟹单独在上述条件下常规饲养管理。据堵南山^[5]等的方法,将中华绒螯蟹的胚胎分为受精卵、卵裂期、囊胚期、原肠期、卵内第1无节幼体期、卵内第2无节幼体期和原蚤状幼体期等7个时期。取样前经过镜检确定发育期,然后取一定量的湿样,用滤纸吸干水分后放入1.5 mL的doff管中,-70℃冰箱保存备用。每次取样后抱卵蟹继续暂养,以备下次取样。实验共设4个平行组,各平行组7个时期的胚胎材料均取自该组的同一抱卵蟹,

收稿日期:2002-09-16; 修订日期:2003-04-01.

基金项目:国家自然科学基金(30270161);教育部骨干教师计划基金和高等学校博士点基金(20010269002).

作者简介:田华梅(1975-),女,硕士研究生,从事水生经济甲壳动物发育生物学研究.

通讯作者:赵云龙. E-mail:zhaoyunlong1963@263.net

且均为第一次所产的卵。

1.2 方法

1.2.1 酶活力 取各期胚胎各约 400 mg, 加入 10 倍体积的预冷重蒸水, 冰浴匀浆, 部分用于脂肪酶活力的测定, 剩余部分冷冻离心 (9 000 ~ 10 000 r/min) 30 min, 上清液用作胃蛋白酶、类胰蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力测定。5 种酶活力测定参照潘鲁青^[6]等方法。

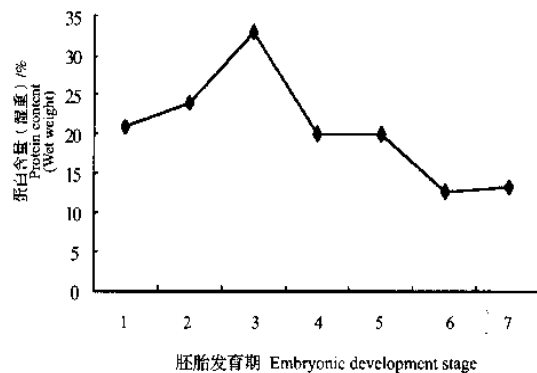
酶液蛋白浓度测定以酪蛋白作标准, 用福林-酚试剂法测定。4 个平行组的样品分别测定, 取其平均值。

1.2.2 氨基酸含量 将各期胚胎置于 70 ℃ 烘箱中烘干至恒重, 精确称重后放入玻璃水解管, 加入 6 mol/L HCl 8 mL, 抽真空 10 min, 封口, 110 ℃ 水解 24 h, 冷却后定容至 50 mL, 双层滤纸过滤, 取 1 mL 滤液于 10 mL 烧杯中, 60 ℃ 水浴真空干燥。根据样品的量和蛋白含量, 加入一定体积的 0.02 mol/L HCl, 抽真空 30 min, H835-50 氨基酸自动分析仪测定氨基酸的含量。4 个平行组的样品分别测定, 取其平均值 (% , 干重)。

2 结果

2.1 可溶性蛋白含量的变化

结果如图 1 所示, 中华绒螯蟹胚胎发育过程中, 可溶性蛋白含量在胚胎发育早期逐渐升高, 其中受精卵期为 20.75%, 卵裂期为 23.95%, 囊胚期达到最高, 为 33.11%。但随着胚胎的进一步发育, 可溶性蛋白含量逐渐降低, 至原蚤状幼体期时仅为 13.36%, 整个变化呈现“低-高-低”的趋势。



1. 受精卵; 2. 卵裂期; 3. 囊胚期; 4. 原肠期; 5. 卵内第 1 无节幼体期; 6. 卵内第 2 无节幼体期; 7. 原蚤状幼体期。

1. Fertilized egg; 2. Cleavage; 3. Blastula; 4. Gastrula; 5. Egg-nauplius; 6. Egg-metanauplius; 7. Prezoa.

图 1 中华绒螯蟹胚胎发育过程中可溶性蛋白含量的变化

Fig. 1 Soluble protein content at different embryonic development stages in *E. sinensis*

2.2 5 种消化酶活力的变化

结果见表 1。在中华绒螯蟹胚胎发育过程中, 各期消化酶活力表现出 3 种变化模式。胃蛋白酶、类胰蛋白酶、纤维素酶活力随着胚胎发育的逐渐深入均呈现缓慢下降而后逐渐升高的趋势, 即“高-低-高”的趋势, 并且都在胚胎发育的后 2 期出现明显的升高, 至最后 1 期时酶比活力分别达到 10.73/4.27 和 2.26 U/mg 蛋白。脂酶活力在整个胚胎发育过程中呈缓慢上升趋势, 而淀粉酶活力在整个胚胎发育中无规律性的变化。

表 1 中华绒螯蟹胚胎发育各期消化酶活力比较

Table 1 Comparison of digestive activities during embryonic development of *E. sinensis*

$\bar{X} \pm SD, n = 4$

发育期 Stage	胃蛋白酶 Pepsin	类胰蛋白酶 Trypsin	淀粉酶 Amylase	纤维素酶 Cellulase	脂酶 Lipase
受精卵 Fertilized egg	2.05 ± 0.02	2.19 ± 0.19	5.29 ± 1.18	1.89 ± 0.22	0.0067 ± 0.0007
卵裂期 Cleavage	1.18 ± 0.05	1.53 ± 0.14	7.15 ± 1.77	1.61 ± 0.37	0.0161 ± 0.0014
囊胚期 Blastula	2.02 ± 0.69	1.41 ± 0.37	3.42 ± 1.24	1.56 ± 0.42	0.0123 ± 0.0003
原肠期 Gastrula	2.37 ± 0.16	1.66 ± 0.301	4.34 ± 0.76	1.72 ± 0.23	0.0217 ± 0.0005
卵内第一无节幼体期 Egg-nauplius	2.33 ± 0.05	0.44 ± 0.09	4.08 ± 0.96	1.76 ± 0.03	0.0230 ± 0.0005
卵内第二无节幼体期 Egg-metanauplius	7.05 ± 1.26	1.93 ± 0.20	8.08 ± 1.42	2.53 ± 0.14	0.0365 ± 0.0085
原蚤状幼体期 Prezoa	10.73 ± 2.46	4.27 ± 0.181	7.18 ± 2.40	2.26 ± 0.01	0.0470 ± 0.0048

注: 酶活力以比活力表示, 即 U/mg 蛋白。表中数值以 4 次数据的标准差表示。

Note: The data shows the enzyme activities, unit U/mg (protein).

2.3 氨基酸组成与含量变化

结果见表2、3。必需氨基酸的总量随中华绒螯蟹胚胎发育的深入而逐渐减少。在必需氨基酸中,除色氨酸被酸水解破坏不能测出外,在各个发育期含量最高的为亮氨酸,最低的为蛋氨酸,它们含量由高到低依次为亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸。在胚胎发育过程中,亮氨酸的降幅最大,由4.27%降到2.97%,蛋氨酸的降幅最小,由1.73%降到1.16%(表2)。单个必需氨基酸与必需氨基酸总量的比值(A/E)在不同胚胎发

育期基本趋于一致(表3),表明不同必需氨基酸之间存在着一种相对稳定的比例关系,这种比例不受胚胎发育及氨基酸总量的影响。而半必需氨基酸中精氨酸含量较高,为组氨酸含量的2~3倍(表2)。

非必需氨基酸的含量变化与必需氨基酸之间略有差异,在原肠期和卵内第2无节幼体期有所升高。而非必需氨基酸中以谷氨酸含量最高,胱氨酸最低。整个胚胎发育过程中除脯氨酸含量上升外,其他几种氨基酸的含量均有所降低(表2)。

表2 中华绒螯蟹不同胚胎发育期氨基酸的变化(n=4)

Table 2 Changes of amino acids content during embryonic development of *E. Sinensis* (n=4)

氨基酸 Amino acids	% ,Wet weight							
	未受精卵 Egg cell	受精卵 Fertilized egg	卵裂期 Cleavage	囊胚期 Blastula	原肠期 Gastrula	卵内第1无节幼体期 Egg-nauplius	卵内第2无节幼体期 Egg-metanauplius	原蚤状幼体期 Prezoea
* 亮氨酸 Leu	4.27	4.47	4.39	4.42	4.30	4.25	4.14	2.97
* 缬氨酸 Val	3.44	3.56	3.48	3.53	3.56	3.42	3.36	2.46
* 赖氨酸 Lys	2.98	3.29	3.22	3.24	3.06	3.13	3.26	2.36
* 苏氨酸 Thr	2.65	2.49	2.57	2.67	2.65	2.55	2.47	1.89
* 异亮氨酸 Ile	2.55	2.69	2.63	2.68	2.55	2.58	2.48	1.73
* 苯丙氨酸 Phe	2.49	2.55	2.47	2.49	2.68	2.44	2.38	1.69
* 蛋氨酸 Met	1.73	1.90	1.86	1.85	1.70	1.78	1.67	1.16
* 精氨酸 Arg	4.06	4.09	4.07	4.11	4.10	4.01	3.98	3.99
* 组氨酸 His	1.46	1.42	1.36	1.36	1.63	1.32	1.35	1.04
谷氨酸 Glu	6.87	7.00	7.03	6.94	7.05	6.85	7.00	5.81
天冬氨酸 Asp	4.98	4.94	4.95	4.91	5.19	4.73	4.71	3.40
甘氨酸 Gly	2.83	2.73	2.71	2.76	2.87	2.55	2.85	2.42
丙氨酸 Ala	2.81	2.92	2.80	2.84	2.76	2.70	2.71	2.30
脯氨酸 Pro	2.63	2.63	2.27	2.09	2.12	1.92	3.57	4.07
丝氨酸 Ser	2.35	2.06	2.35	2.52	2.10	2.26	1.99	1.39
酪氨酸 Tyr	2.01	1.81	1.81	1.75	1.71	1.78	1.77	1.39
胱氨酸 Cys	0.54	0.51	0.56	0.56	0.54	0.52	0.54	0.45
氨基酸总量 Total content of AA	50.65	51.06	50.53	50.72	50.57	48.79	50.23	39.52
必需氨基酸总量 Total content of EAA	20.11	20.95	20.62	20.88	20.50	20.15	19.76	14.26
非必需氨基酸总量 Total content of IEAA	30.54	30.11	29.91	29.84	30.07	28.64	30.47	25.26

* 必需氨基酸; + 半必需氨基酸

* means essential amino acid; + means semi-essential amino acid

3 讨论

3.1 胚胎发育中的水解酶

虾蟹的卵富含卵黄,在胚胎发育过程中卵黄物质的分解、运输和利用与酶的种类及活性变化密切相关。研究表明,胚胎发育的基因调控受卵源性mRNA和自身合子基因的双重影响^[7],在胚胎发育初期主要依赖卵源性mRNA合成各种蛋白质,而合子基因影响甚微;Biesiot^[8]的研究也指出,美国龙虾

的胚胎在孵出幼体之前已有酶合成细胞和酶分泌细胞的存在,而胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的升高可能与其胚胎发育后期肝胰腺的成熟和进一步分化有关。本研究发现5种水解酶从受精卵期开始就有活力,表明母体在卵母细胞形成过程中已将相关的酶或卵源性mRNA转运并储存在卵黄中,为胚胎发育早期卵内物质的水解提供保障。然而,随着胚胎发育的不断深入,卵源性mRNA持续消耗,母体提供的相关酶类随之减少,而此时的胚胎尚未形成完整

的消化系统,自身不能合成相关酶类,从而导致随后的发育期(卵裂期、囊胚期、原肠期和卵内第1无节幼体期)酶活性不断降低。至卵内第2无节幼体期和原蚤状幼体期,河蟹肝胰腺已开始发育并具有一定的功能^[5],而合子基因的转录活动不断增强,新合成的mRNA不断累积并控制了胚胎的发育,从而使

相关酶的活性逐渐升高。此外,酶活力(纤维素酶除外)在孵化前2期的显著提高,表明胚胎已为幼体的开口摄食作好准备,这也进一步表明消化酶的产生是受基因控制而不是饵料刺激所致,而Hammer^[9]的相关研究也证实了这一点。

表3 中华绒螯蟹不同胚胎发育期A/E的比较(n=4)
Table 3 Comparison of A/E during embryonic development of *E. sinensis* (n=4) %

氨基酸 Amino acids	未受精卵 Egg cell	受精卵 Fertilized egg	卵裂期 Cleavage	囊胚期 Blastula	原肠期 Gastrula	卵内第1无节幼体期 Egg-nauplius	卵内第2无节幼体期 Egg-metanauplius	原蚤状幼体期 Prezoea
亮氨酸 Leu	16.66	16.89	16.85	16.77	16.39	16.68	16.50	16.24
缬氨酸 Val	13.42	13.45	13.36	13.40	13.57	13.42	13.39	13.45
赖氨酸 Lys	11.63	12.43	12.36	12.30	11.67	12.28	12.99	12.90
苏氨酸 Thr	10.34	9.41	9.87	10.13	10.10	10.01	9.84	10.33
异亮氨酸 Ile	9.95	10.17	10.10	10.17	9.72	10.13	9.88	9.46
苯丙氨酸 Phe	9.71	9.64	9.48	9.45	10.22	9.58	9.49	9.24
蛋氨酸 Met	6.75	7.18	7.14	7.02	6.48	6.99	6.66	6.34
精氨酸 Arg	15.84	15.46	15.62	15.60	15.63	15.74	15.86	16.35
组氨酸 His	5.70	5.37	5.22	5.16	6.21	5.18	5.38	5.67

* A/E 比值为单个必需氨基酸/总必需氨基酸之和的百分数。

* A/E is the ratio of single essential amino acid content to total essential amino acids content.

中华绒螯蟹原蚤状幼体期孵出的幼体以肉食性为主,蛋白酶的作用显得十分重要,因此中华绒螯蟹胚胎发育至原蚤状幼体期,胃蛋白酶和类胰蛋白酶的比活力都很高,且胃蛋白酶的活力高于类胰蛋白酶的活力。而锯缘青蟹(*Scylla serrata*)幼体^[10]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)幼体^[6]、中华绒螯蟹和长江华溪蟹(*Sinopotamon yangtsekiense*)成体^[11]的相关研究发现,类胰蛋白酶的活力要高于胃蛋白酶,表明胚胎发育期在营养物质的利用上有其自身的特殊性。

在中华绒螯蟹胚胎发育过程中,2种糖类水解酶(淀粉酶和纤维素酶)均有活力,且淀粉酶的活力较高,但这2种酶活性没有显著的变化。Hirche 和 Anger^[3]认为,高的淀粉酶活力并不是对食物生化组成成分利用的反映,而可能是部分原始草食性动物幼体系统发育的残余,而纤维素酶即便是在一些草食性鱼类中也不存在,甲壳动物是否能真正分泌纤维素酶尚有争议,有待于深入研究。

Berner 等^[12]和 Nachlas 等^[13]发现,已研究的无脊椎动物中,只有一半的种类具有脂酶活力,但都具有酯酶活力。Lovett 和 Felder^[14]也认为刺毛对虾只有酯酶而无脂酶。而本研究也发现脂酶的活力极低,说明脂酶在该蟹胚胎发育中的作用较小。

3.2 可溶性蛋白与酶的相关性

除淀粉酶和脂酶外,胃蛋白酶、类胰蛋白酶和纤维素酶的活力均呈“高-低-高”的变化规律,这与可溶性蛋白含量变化正好相反。可溶性蛋白与酶活力之间存在着明显的相关性,即酶活力降低,可溶性蛋白含量增加,而酶活力增加,则可溶性蛋白含量降低。胚胎发育早期可溶性蛋白的逐渐增加与母体提供的相关酶类不断分解卵黄物质有关,它为胚胎发育提供了组织或器官的构建物质及必要的能量;而在随后的发育期中可溶性蛋白的快速降低,表明胚胎已进入胚胎组织或器官的形成阶段。因此,由母体提供的卵子中的酶类在胚胎发育的启动以及前期卵黄物质的利用中具有重要作用,它为胚胎发育过程中组织或器官的形成提供了前期保障。故而强化母体的营养以提高卵子质量,对胚胎发育的顺利进行至关重要。

3.3 胚胎发育中的氨基酸

氨基酸含量随胚胎发育而降低的结果表明,卵黄中的蛋白质被不断分解,它为新组织、新器官的形成和生长提供了物质和能量基础。值得一提的是,在中华绒螯蟹胚胎发育过程中均以谷氨酸的含量最高(占总氨基酸的5.81%~7.05%),谷氨酸可与水产动物的蛋白质代谢物NH₃结合,并在谷氨酰胺酶的作用下将NH₃排放到体外^[15],保证了胚胎发育的顺利进行。但是从单个必需氨基酸含量与必需氨

氨基酸总量的比值(A/E)来看,在河蟹胚胎发育不同时期基本趋于一致,这表明不同必需氨基酸之间存在着一种相对稳定的比例关系。

参考文献:

- [1] Biesiot P M, Capuzw J M. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne Edwards[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1990, 136: 107 - 122.
- [2] Subramoniam T. Yolk utilization and esterase activity in the mole crab *Emerita asiatica* [A]. Crustacean Egg Production [M]. Rotterdam; A A Balkema, 1991. 19 - 30.
- [3] Hirohe H J, Anger K. Digestive enzyme activities during larval development of *Hyas araneus* [J]. Comp Biochem Physiol, 1987, 87B(2): 297 - 302.
- [4] 李少菁, 王桂忠, 汤 鸿, 等. 锯缘青蟹胚胎发育过程中几种水解酶活性的比较研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(6): 970 - 974.
- [5] 堵南山, 赵云龙, 赖 伟. 中华绒螯蟹胚胎发育的研究[A]. 中国甲壳动物学会, 甲壳动物学论文集(第三辑)[C]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992. 128 - 135.
- [6] 潘鲁青, 王奎琪. 三疣梭子蟹幼体消化酶活力及氨基酸组成的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(3): 246 - 251.
- [7] Briggs R, Cassens G. Accumulation in the oocyte nucleus of a gene product essential for embryonic development beyond gastrula[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1966, 55: 1 103 - 1 109.
- [8] Biesiot P M. Changes in midgut gland morphology and digestive enzyme activities associated with development in early stages of the American lobster *Homarus americanus* [D]. Institute of Technology, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, Massachusetts, 1986. 237.
- [9] Hammer S. Activities of three digestive enzymes during development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda) [J]. J Crustacean Biol, 2000, 20(4): 614 - 620.
- [10] 汤 鸿, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹幼体消化酶活力[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(1): 88 - 93.
- [11] 薛俊增, 赵 艳, 张燕平, 等. 四种蟹成蟹消化酶的研究[J]. 东海海洋, 1998, 16(4): 8 - 13.
- [12] Berner D L, Hammond E G. Phylogeny of lipase specificity[J]. Lipids, 1970, 5: 558 - 562.
- [13] Nachlas M M, Seligman A M. Evidence for the specificity of esterase and lipase by use of three chromogenic substrates[J]. J Biol Chem, 1949, 181: 343 - 355.
- [14] Lovett D L, Felder D L. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidea) [J]. Biology Bulletin, 1990, 178: 144 - 159.
- [15] 沈 同, 王镜岩. 生物化学(下册)[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2000. 217 - 255.

Digestive enzyme activities and amino acids composition during embryonic development of *Eriocheir sinensis*

TIAN Hua-mei, WANG Qun, ZHAO Yun-long, LUO Wen, FAN Yu-jie

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The adult *Eriocheir sinensis*, belonging to Changjiang population and never breeding before, were collected from a crab culture farm in Shanghai. In this experiment, the specific activities of pepsin, trypsin, amylase, lipase and cellulase were determined, as well as their amino acids composition during seven development stages of the embryo. The results indicate that the activities of digestive enzymes and amino acids content closely correlate with the embryonic development stages. During the whole embryonic development of *E. sinensis*, the activities of pepsin, trypsin and cellulase have a change of 'high-low-high', while the activity of lipase increases and there is no obvious change in amylase activity. But at the prezoa larval stage, the activities of the five enzymes increase obviously, which has some correlation with the self-adjusting mechanism at the onset of feeding. The content of dissolvable proteins has a trend towards 'low-high-low', which obviously correlates with the activities of concerned enzymes. The content of amino acids had little change at the first six stages but decreased significantly at the last stage. Among all the amino acids, has Glu the highest content, and has Leu the highest EAA content. There was little difference between the ratios of single EAA content to total EAA content at different embryonic development stages.

Key words: *Eriocheir sinensis*; embryonic development; digestive enzyme activities; amino acids

Corresponding author: ZHAO Yun-long. E-mail: zhaoyunlong1963@263.net