

鱼类繁殖与发育生物学

(鱼类促性腺激素、性激素放射免疫测定技术)

姜 仁 良 等

上海水产大学

1985, 12,

目 录

1. 鲤鱼 (*Cyprinus Carpio* L.) 血清促性腺激素的放射免疫测定…………… (3)
2. 促黄体生成素释放激素类似物 (LRH—A) 对团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 诱导产卵时血清中促性腺激素 (GTH) 和 17β -雌二醇 (17β - E_2) 含量的动态研究…………… (15)
3. 草鱼、鲢鱼催产前后血液中促性腺激素含量的变动…………… (28)
4. 鲤鱼脑垂体中促性腺激素含量的周年变化…………… (34)
5. 鲤鱼产卵前后血液中促性腺激素含量的动态变化…………… (42)
6. 虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 排卵前后血清中性类固醇激素浓度变化的研究… (46)
7. 鲤鱼血清中促性腺激素、 17β -雌二醇含量的周年变化…………… (59)
8. 促性腺激素诱发大西洋鲑 (*Salmo salar*) 离体卵巢滤泡释放类固醇激素的过程…………… (65)
9. 大西洋鲑 (*Salmo salar*) 雄鱼活体和离体情况下性类固醇激素的研究…… (67)
10. 促性腺激素 (GTH) 诱发大西洋鲑 (*Salmo salar*) 卵黄发生期卵巢滤泡释放性类固醇激素的离体研究…………… (76)

课题概述与评议意见

本课题是合成促黄体生成素释放激素类似物(LRH—A)在家鱼人工催情产卵的广泛应用基础上,需要在理论上加以阐明的延伸研究课题项目,因此,从1975年被农林部水产局列入国家课题研究项目。于1976年在我国首次建立了鲤科鱼类促性腺激素(简称GTH)的放射免疫测定方法。继后,于1982年应用性激素放射免疫药盒,并在方法上经过改进和方法学上进行了鉴定,使之适用于测定鱼类血清中的性激素。

鱼类促性腺激素和性激素这二项放射免疫测试手段的建立,为我国鱼类繁殖生理的研究提供了崭新的测试技术和方法,揭示鱼类繁殖生理的内在机制创造了条件,并能为鱼类人工繁殖的技术措施提供理论依据。

鲤科鱼类混合垂体经一系列纯化,其最终GTH纯化品在聚丙烯酰胺电泳谱中显示为一条带,取得高纯度GTH抗原,并获得稀释度大,结合率高的GTH抗血清。GTH放射免疫检测范围为0.2—16毫微克。经家鱼LRH—A催产效果试验、心脏灌注试验、鲤鱼自然产卵(产前、产后血清中GTH含量变化)比较、使甲状腺激素释放激素(TRH)兴奋试验,鲤科鱼类促甲状腺激素(TSH)干扰试验,都证明所建立的GTH放射免疫测定方法的可靠性。

性激素(17β -雌二醇)放射免疫药盒经方法上的鉴定,其测定方法的准确性(回收率 $92.81 \pm 8.16\%$)、特异性(抗血清与雌酮、雌三醇的交叉反应分别为 $< 3.20\%$ 和 $< 2.99\%$)和灵敏度($2.36-2.50$ 微微克(μg)为最低检测量),标准曲线的回归标准差为 $0.023-0.051$,检测范围为 $10-400\text{Pg}$,完全适合鱼类血清中性激素(17β -雌二醇)的检测,方法可靠。

应用促性腺激素、性激素放射免疫测定方法已取得如下初步成果:

1.应用LRH—A对家鱼催情产卵试验及心脏灌注试验,初步阐明了鱼类垂体中GTH释放规律,也像其他脊椎动物一样,存在着丘脑下部——垂体——性腺轴的性功能调节机制。

2.初步阐明鱼类产卵时,血清中GTH阈值,不论泄殖自然产卵的鲤鱼和家鱼(文献报导鲢鳙鱼类也一样到达产卵阶段血液中GTH约增加到 $200-300$ 毫微克(ng)/毫升(ml),才能进行产卵,因此,可以在理论上加以说明家鱼在池塘只能培育成熟,不能自然产卵的原因是在于没有大量释放GTH所造成的,而垂体GTH储存量是充足的,主要是GTH释放量不足。过去,对这一规律性没有充分认识,也无法认识,只有在建立了GTH放射免疫测定方法后,才能真正认识到天然江河里家鱼能自然产卵,池塘里只能成熟,不能自然产卵的真正原因是垂体GTH释放量不足之故。

3.初步阐明鱼类性腺发育过程中 17β -雌二醇与卵母细胞卵黄发生调控关系。血液中 17β -雌二醇(17β - E_2)的含量增高,表示着卵母细胞卵黄积累的增加,紧跟着卵集成熟系数达到高峰,卵母细胞趋向于完全成熟从理论上进一步阐明了蓄养鱼类能自然成熟的内在原因是促使卵黄发生的激素—— 17β - E_2 能正常分泌,通过对 17β - E_2 年周期变化的研究,为亲

鱼的产前强化培育时间提出科学的依据。

从实验中，认识到凡是能促使增加垂体血液中GTH含量的方法，就能达到催产目的。注射LRH或者LRH—A和垂体等措施是使体内增加GTH以达到排卵、产卵的目的。注射LRH或LRH—A促使鱼类自身垂体释放内源GTH；注射HCG和垂体则属于直接给予外源的激素以增加鱼类血液中GTH含量为目的，所以在生产上可根据具体的对象（鱼的种类），对药物来源作选择。

迄今为止已取得了阶段性成果。参加工作的有黄世薰、赵维信、周洪琪同志。根据课题内容共写成十篇研究论文，汇编成单行本。其中七篇经有关专家教授共九人进行了书面评议，得到了对该项工作较全面的评价。专家教授评议意见如下

1. 鱼类促性腺激素、性激素放射免疫测定技术其实验设计严谨合理、方法准确可靠，分析、推理和理论合乎逻辑。应用本方法对于充分了解鱼类在性腺发育、成熟、排卵和产卵过程中激素的变化和它的作用机理是一种比较先进的实验手段。在为鱼类人工催产技术的研究上开辟了一条很好的技术途径。

2. 试验结果证实鲤鱼、草鱼和鲢鱼也与高等脊椎动物相似，确实存在丘脑下部——垂体——性腺轴的性功能调节机制。并对这种性功能调节轴提供了可贵的资料。这项研究工作，无论在理论上或者是生产实践上都具有重要的意义。

3. 实验结果证实鲤科鱼类，自然产卵抑或人工催情产卵，都表现为产卵前后血清中GTH变化，这种结果是符合客观事实的，能够阐明成熟、排卵和加速精子生成过程中GTH的释放规律。

4. 实验表明，鲤鱼脑垂体中GTH含量的周年变化的研究，将对我国鱼类人工繁殖生产实践中应用鲤鱼脑垂体剂量标准化创造了条件。

5. 鱼类促性腺激素、性激素放射免疫测定技术应用于鱼类繁殖生理学研究，在我国为首次，属于国内先进水平。

专家教授的建议

1. 鱼类促性腺激素、性激素放射免疫测定技术值得在进行鱼类繁殖生理学试验研究单位中推广应用。

2. 给予一定的科学技术奖励

3. 希望继续此项工作，深入研究，提高技术水平。

参加评议的专家教授是湖南师范大学副校长刘筠教授；珠江水产研究所钟麟研究员；中山大学生物系主任沐浩然教授；中国科学院武汉图书馆施琼芳副教授；中国水产科学院淡水渔业研究中心朱林庚副研究员；潮州市科委主任许步劭副研究员；北京市水产总公司黄绍瑞高级工程师；南京大学生物系苏炳仁副教授；江苏省淡水水产研究所李文杰副研究员。承蒙这些专家教授在繁忙工作之余写出诚挚的评议意见与忠肯的宝贵建议，它将对我们的进一步开展工作起着推动的作用。我们谨此表示深切的谢意和由衷的感谢！

另外，得到中国科学院上海生物化学研究所潘家秀副研究员等同志、上海计划生育研究所王忠兴同志和上海内分泌研究所张美云医师的大力支持，并提供实验条件和材料谨此深表谢意！

1985, 12, 25

鲤鱼(Cyprinus carpio)血

清促性腺激素的放射免疫测定

厦门水产学院鱼类生殖生理科研小组

中国科学院上海生物化学研究所多肽激素组

摘 要

本文报道用鲤、鲢等鲤科鱼混合垂体经乙醇抽提、DEAE-纤维素层析及葡聚糖凝胶过滤来纯化促性腺激素(GTH)的方法。所得GTH初步纯化品(SG-II-1)的产卵有效剂量为1微克/1克泥鳅体重。其最终纯化品(SG-II-2)在聚丙烯酰胺电泳谱中显示为一条带,可供作放射免疫测定系统中的标记抗原。GTH放射免疫测定法的检测范围为0.1~16毫微克。

在鲤鱼产卵季节,用放射免疫测定血清中GTH含量的变化,表明雌雄鱼在配组后血清中GTH含量逐渐上升,特别是雌鱼,在发情产卵时出现显著的高峰,随产卵活动的停止而下降,呈现出明显的产卵前后血清中GTH含量变化规律。这为研究鱼类生殖生理提供一些新的资料。

近几年来,我们普遍应用LRH-A(促黄体生成素释放激素类似物,焦谷、组、色、丝、酪、D-丙、亮、精、脯乙酰胺,进行鲢、青、鲢、鳙四大家鱼人工繁殖催产,取得了显著效果,深受广大水产养殖场的欢迎^{1,2}。随着渔业生产的不断发展,迫切要求进一步阐明LRH-A催情产卵的机制。这不仅为解决当前实际问题提供理论依据,而且还可以更好地指导生产。血清中GTH含量的测定,当是重要手段之一。为此,我们建立了GTH放射免疫测定方法,并初步应用于测定鲤鱼自然产卵前后血清中GTH含量的变化,对鲢、鳊鱼LRH-A催产前后血清中GTH的含量变化也进行初步测定。这将为进一步了解家鱼和池塘中自然产卵的鱼类垂体促性腺激素的合成、释放规律,以及了解各种鱼类对LRH-A的反应性提供可能性,为促进渔业生产、开展鱼类生殖生理研究创造条件。

本文1978年1月16日收到。

*本文工作得到中国科学院上海生物化学研究所潘家秀同志具体指导。

参加本试验工作有厦门水产学院黄世蕉、姜仁良、赵维信同志;中国科学院上海生物化学研究所多肽激素组王育西同志。承蒙该所其他同志的帮助,特此致谢!

材料和方法

一、GTH的提纯和鉴定^{3,4}

鲤、鲫、鲢、鳙等混合垂体，自水产养殖场及湖区收集。丙酮脱水后磨成干粉，用含有2% NaCl的57%乙醇溶液抽提三次。第一次抽提液体积是丙酮干粉重量的十倍，以后一次各为第一次体积的一半。每次搅拌均匀，抽提后静置数小时，然后以3000转/分钟，离心15分钟。将三次离心的上清液合并，用冰醋酸调至pH5.2，加无水乙醇，使乙醇的浓度上升至76%，静置过夜，以4000转/分钟，离心15分钟。沉淀为GTH粗品，得量约为脑垂体丙酮干粉的2.6%。沉淀用少量0.001M pH7.2甘氨酸钠缓冲液溶解，并对该液透析，换液四次。上DEAE—纤维素(DE-11)柱(2×40厘米)柱予先用上述缓冲液平衡，并以此液洗脱，得到第一峰(DEAE-I)后改用等体积的0.001M pH7.2甘氨酸钠缓冲液和含有0.5M NaCl的0.001M pH7.2甘氨酸钠缓冲液作直线梯度洗脱，可分离出三个峰(DEAE-II、III、IV)。此外，还曾分别用过含有0.25M或0.35M NaCl代替0.5M NaCl的0.001M pH7.2甘氨酸钠进行梯度洗脱。用0.25M NaCl梯度洗脱，峰III和峰IV虽相距较远但峰域宽；用0.35M NaCl二峰之间有一定距离；用0.5M NaCl者二峰均较集中，重叠部分较多，因此，以0.35M NaCl为宜。最后以含有1.0M NaCl的0.001M pH7.2甘氨酸钠缓冲液洗脱，出现一个高峰DEAE-V。参看图1。

各组分分别冻干。用泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)进行活力测定。其中DEAE-III有GTH主物活性，产卵有效剂量为24微克/10克雌鱼体重。峰DEAE-I、II、IV、V，均不显示生物活性。

取DEAE-III冻干粉，用少量0.001M NH_4HCO_3 液pH8.1溶解，并对其透析，换液四次。然后上二次葡聚糖凝胶(Sephadex) G-100柱，柱以同液平衡和洗脱，流速为3毫升/18分钟，得SG-I、II、III三个峰。SG-II和SG-III的 K_D 值分别是0.38和0.75，如图2所示，

将各组分分别冻干，仍以泥鳅测定活力，其中SG-II具有促性腺激素活性。SG-I和SG-III均无生物活性。第一次凝胶过滤分离到的SG-II(称SG-II-1)产卵的有效剂量为10微克/10克雌鱼体重，是脑垂体丙酮粉活力的20倍左右。SG-II-1和SG-II-2(第二次凝胶过滤分离到的)得率分别是脑垂体丙酮粉的1.6‰和0.73‰。

以上分离步骤均在4—6℃进行实例见图3。

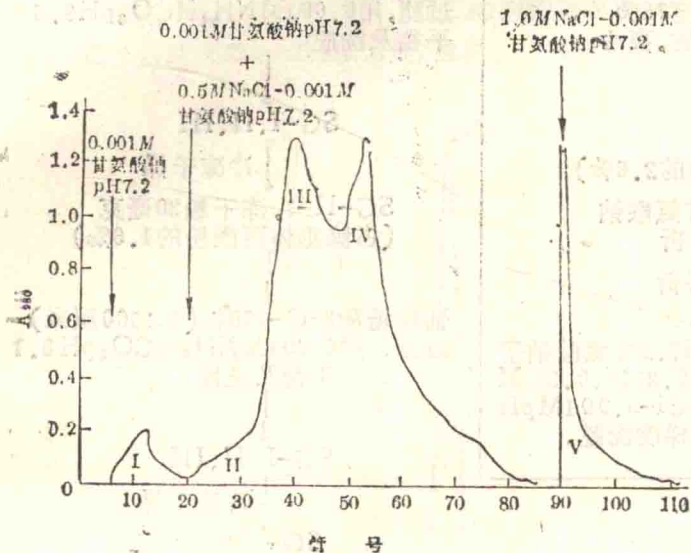


图1 DEAE-纤维素粉层析柱分离GTH组分

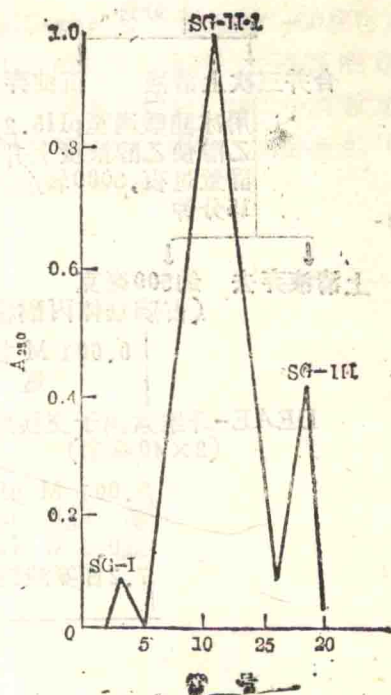


图2 组分DEAE-III经葡聚糖凝胶过滤的各组分

柱型: sephadex G-100

1×100厘米;

0.001 M NH_4HCO_3 pH 8.1

平衡、洗脱

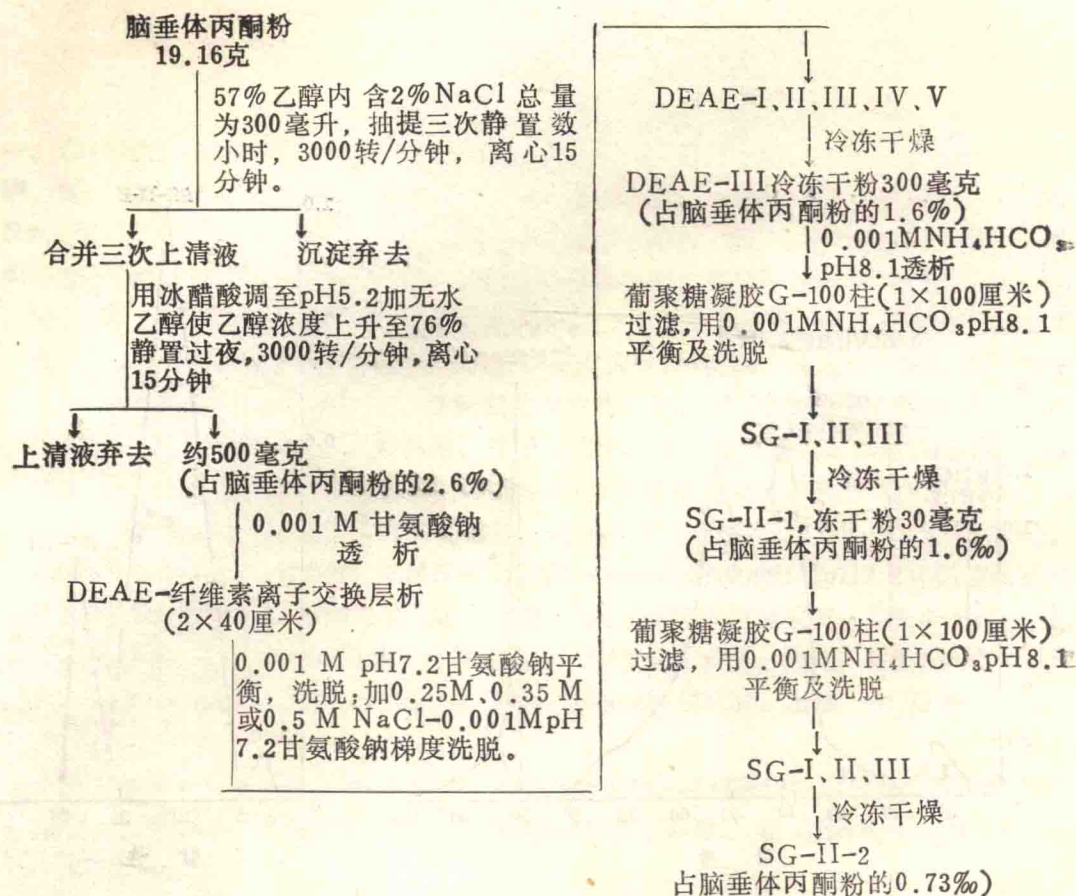


图3 GTH分离程序

为鉴定GTH纯度, 采用Davis聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳方法, 鉴定SG-II-2。分离浓度为7.5%, 样品量为100~200微克, 用考马斯亮兰R250染色。SG-II-2迁移率为0.79。出现染色很深的一条带。

二、兔抗GTH血清的制备

SG-II-1, 12毫克溶于6毫升水中, 与等体积福氏全佐剂磨成乳剂, 首次免疫四只家兔, 每只注射3毫升乳剂, 以后每兔每次注射1毫克SG-II-1。第一次在腹股沟淋巴结周围注射, 连续免疫四次, 每次间隔一个月。末次注射后8~10天, 自耳缘静脉取血, 检测抗血清滴度。抗血清放射免疫B/F值在0.5~1.0, 最终稀释度为1:20000以上, 而且亲和力高的兔子, 即可放全血, 分离血清, 低温(-20°C), 保存备用。

三、¹²⁵I-GTH的制备和分离^{5,6}

GTH的标记, 采用氯铵T法:

GTH (5微克)

25微升

Na¹²⁵I (2毫居里)

75微升

0.8% 氯铵T

50 微升

反应 3 分钟 (电磁搅拌)

0.48% 偏重亚硫酸钠

100 微升

1.0% 碘化钾

150 微升

以上各试剂均用0.05M pH7.5磷酸缓冲液配制。反应完毕后,立即转移到事先用0.05M pH7.5磷酸缓冲液平衡和1%卵白蛋白饱和的葡聚糖凝胶(Sephadex)G-25或G-50柱(1×30厘米),反应管中残留液则以0.4毫升1.0%碘化钾洗下追加上柱。然后用上述磷酸缓冲液洗脱,0.6毫升/分钟/管收集。在井型计数器相同几何位置情况下测定。得二个有效放射性的峰,第一峰为 ^{125}I -GTH,第二峰为游离的 $\text{Na}-^{125}\text{I}$ (图4)。按本方法制备的 ^{125}I -GTH比放射性为124~224微居里/微克, ^{125}I 的利用率为30%~56%。

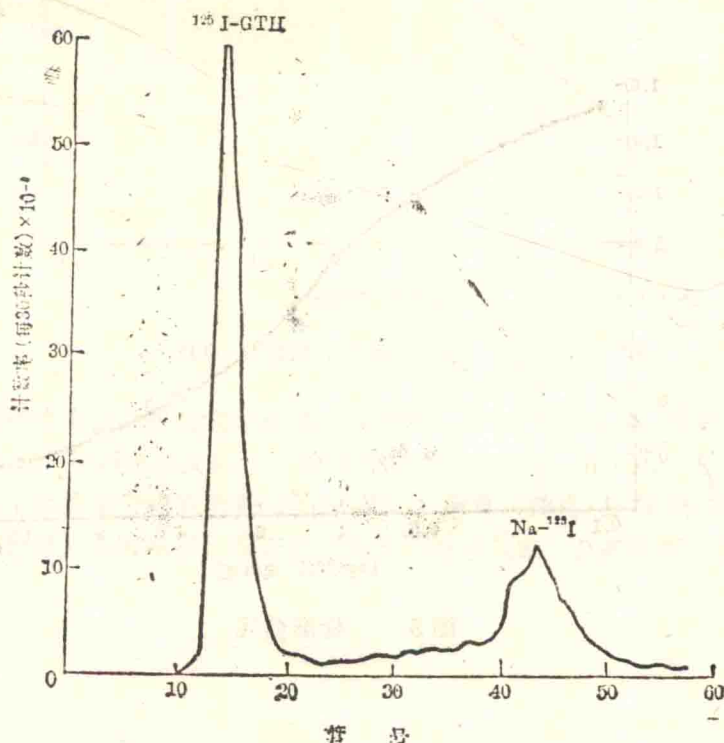


图4 ^{125}I -GTH和游离 $\text{Na}-^{125}\text{I}$ 经葡聚糖凝胶(Sephadex) G-25分离的峰形

四、标准曲线的建立与鉴定

按下列顺序分别加入各种试剂

1. 0.1 M EDTA-PBS

100 微升

2. 1.0% NRS-PBS

400 微升

3. 不同剂量的标准品GTH+PBS

(或欲测样品100微升+PBS200微升)

两者体积之和为:

300 微升

4. 兔抗 GTH 血清

100 微升

5. ^{125}I -GTH液约为15000cpm (脉冲数/分钟)

100 微升

加入后充分混匀, 总反应体积为 1 毫升, 4°C 温育二天。

6. 加羊抗兔-IgG 血清 (即第二抗体) -PBS (1 : 1)

100 微升

加入后, 充分混匀, 4°C 继续温育一天。

温育完毕后, 测定每管总cpm (T), 随后加0.8% NaCl冷溶液1.5毫升, 离心15分钟 (3500转/分钟) 后, 去上清液 (F), 测沉淀 (B) 的cpm, 计算 B/F 值。以GTH标准品剂量的对数值对 B/F 作图 (图5), 即得标准曲线。倘将标准曲线的纵坐标值作Logit变换, 然后对Log标准品剂量作图, 曲线直线化 (图6)。检测范围0.1~16毫微克。如果检测范围规定在0.5~8毫微克时, 则变异系数较小, 可提高检测精确度。

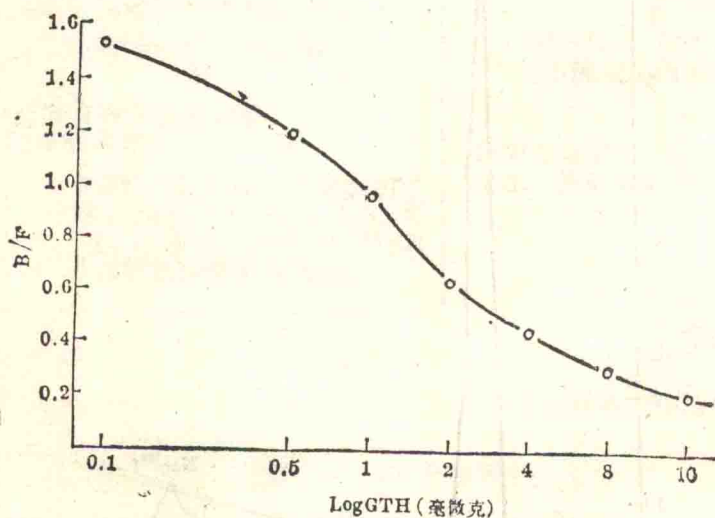


图5 标准曲线

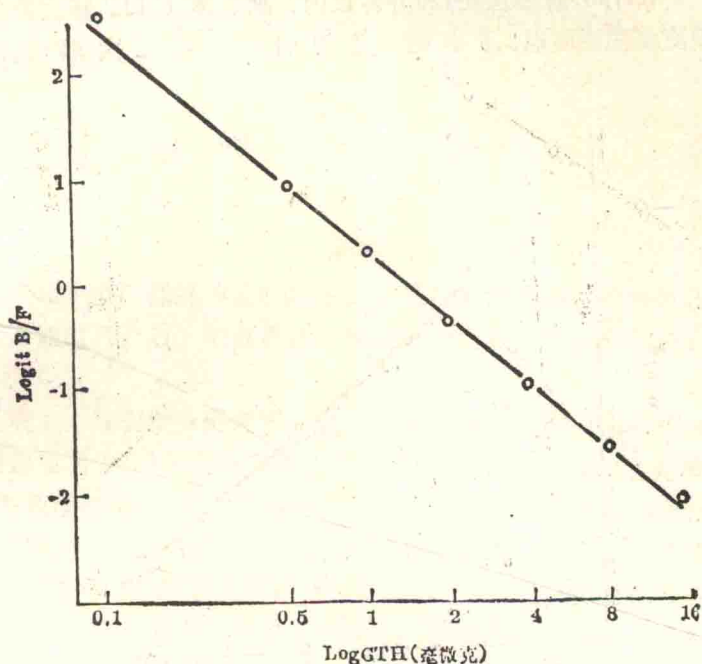


图6 标准曲线 Logit 变换

鉴定：为了验证本方法是否适宜作鲤鱼血液中的GTH含量的检测，进行下列鉴定。

1、LRH-A 及 TRH兴奋试验 取自产卵季节的鲤鱼，用LRH-A（剂量13微克/公斤体重鱼）、促甲状腺激素释放激素（简称TRH，剂量10微克/公斤体重鱼）或0.8% NaCl（剂量1毫升/尾）心脏灌注，灌注后间隔不同时间取血，分离血清，用放射免疫测定GTH含量。

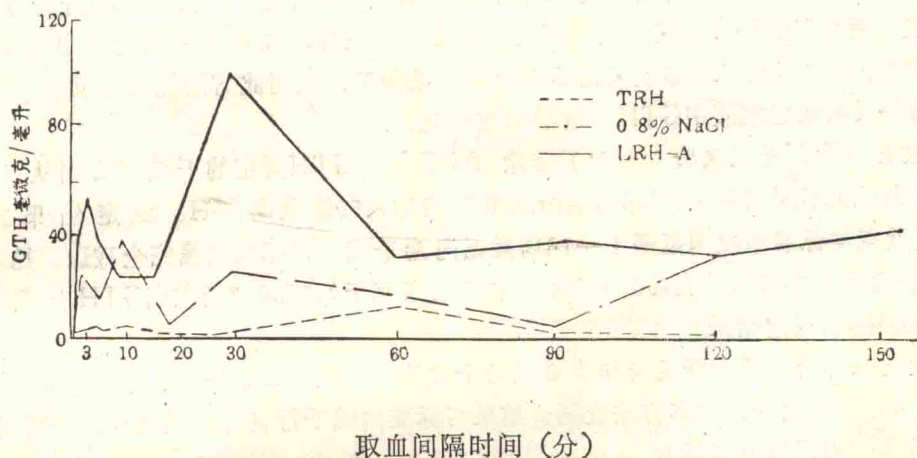


图7 鲤鱼垂体兴奋试验中血液GTH含量的变化个

结果表明，在产卵季节，鲤鱼心脏灌注0.8% NaCl，血液中GTH含量在120分钟以内一直处在一个低水平。TRH作心脏灌注在120分钟以内，脑垂体 GTH 释放量也同样一直维持在一个低水平，即使灌注后间隔3.5 小时，进行同剂量第二次灌注，在15 分钟内

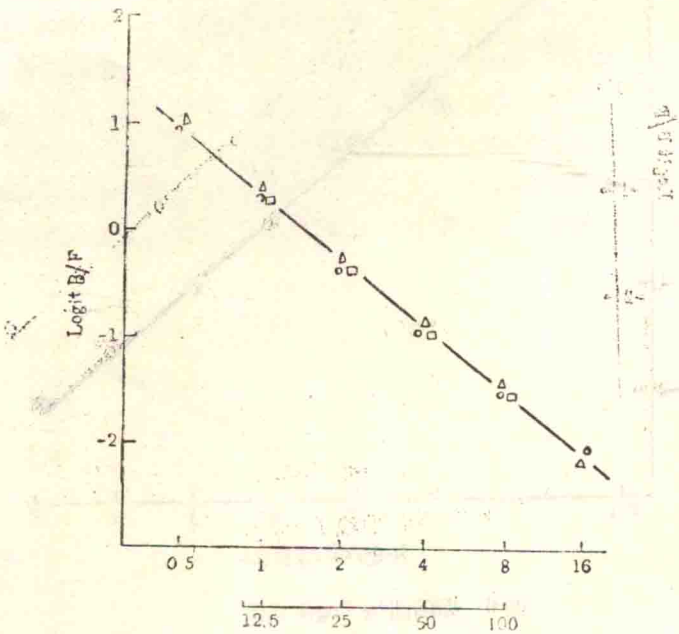


图8 鲤鱼血清（微升）
GTH放射免疫测定的专一性鉴定（标准曲线）

Δ—ΔT+GTH
O—OGTH
□—□鲤血清

仍未见血清中GTH含量有所变化。从实验证明，TRH灌注引起的内源性TSH升高对本方法无明显干扰。而用LRH-A心脏灌注，则反应敏感，灌注后，血液中GTH含量出现显著峰值，并在120分钟内其维持量亦较其他二组为高，见图7。表明此方法能正确反映产卵季节鲤鱼经LRH-A刺激后血液中GTH含量的动态变化。

2、鲤鱼 TSH 干扰试验 为了排除 TSH⁷，对GTH测定的干扰，又用从鲤鱼脑垂体提纯的TSH⁷在不同剂量GTH标准品检测范围内加入50毫微克TSH。测定结果表明，TSH 50毫微克在标准品检测范围1—16毫微克内无干扰，与标准曲线完全重合，见图8。即使TSH干扰量高达5000乃至10000倍时，才产生相当于0.1和0.3毫微克GTH干扰量，此干扰量不足以影响测定结果。

3. 鲤鱼血清的不同稀释度与标准曲线的平行性 取经LRH-A兴奋试验的鲤鱼血清12.5、25、50、100微升，按本方法检测，结果与标准曲线平行良好，见图8。表明测定样品与标准品具有相同的免疫活性。

五、样品的测定

在自然产卵季节自鱼的尾动脉、鳃弓动脉或心脏取血、分离血清，置低温（-20℃）冰箱保存。临用前，根据标准曲线检测范围，取原血清或以PBS缓冲液将原血清稀释，取0.1毫升测定。然后，参照标准曲线对应关系，求得样品GTH含量。若用稀释样品，则需折算到每毫升血清GTH的含量。

结果与讨论

一、结果

在池塘鲤鱼产卵季节，选择体重0.25~1.10公斤的成熟雌、雄鲤鱼，配组前，配组后（产卵前、发情产卵时和产后）抽取血液，用放射免疫测定法分析鲤鱼产卵前后血清中GTH含量的变化。

实验结果见表1。经初步分析表明，在自然产卵季节，配组前雌鲤鱼血清中GTH含量较低，配组后鲤鱼血清中GTH逐渐升高，至发情产卵时达到高峰。实际波动范围在200—300毫微克/毫升，约较配组前GTH含量增加几十倍，与配组后未产鲤鱼相比，GTH含量增加4~5倍，比流精雄鱼增加24倍以上，说明雌雄鱼有差异。停止发情产卵后，产卵鲤鱼血清中GTH含量又很快下降。如果以发情产卵时鲤鱼血液中GTH含量作为最高值，与未产雌鱼、流精雄鱼相比，根据均数差别的显著性测验P值均<0.01，证明彼此之间的差异显著。鲤鱼产卵前后血清中GTH含量的变化，与鲤鱼脑垂体GTH的有规律地释放趋势是一致的，这与鲤鱼繁殖生物学特征相适应、

表1 鲤鱼产卵前后血液中GTH含量的变化

1977.3.11~12. 19℃

组 别	取 血 时 间	鱼 数 (尾)	性 别	血液中GTH含量(毫微克/毫升) 均值±标准差	P 值
配 组 前	挤 不 出 卵	3	♀	4±2.83	
	挤 出 精 液	4	♂	3±1.85	
配 组 后	流 精	4	♂	10.5±6.61	<0.01
	未 产	3	♀	58±7.81	<0.01
	发 情 产 卵	4	♀	256±54.63	
	产 后	4	♀	12.8±3.78	

二、讨论

根据上述方法分离得到的 SG-II-1 具有相当高的促性腺激素生物活性；在葡聚糖凝胶(Sephadex) G-100过滤时的K_D值与文献中鲤GTH³的相符；在免疫双扩散试验中呈单

一沉淀线,因此,我们即以此作为放射免疫用的免疫原和标准品。

TSH在DEAE-纤维素层析和葡聚糖凝胶过滤分离过程中已经被除去,它的峰位在DEAE-IV³和SG-I⁷。根据TSH的干扰试验结果,表明本测定系统中的标记抗原与抗体的结合不受TSH干扰。此外,以兔抗SG-II-1抗血清,作鲤、鲢、鲟垂体促性腺激素细胞分泌颗粒的免疫定位研究,并与组织化学染色比较,证明该抗血清有高度的抗GTH特异性(未发表工作)。SG-II-2在聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈现一条沉淀带,证明SG-II-2已较纯。按本方法制备鲤、鲫、鲢、鳙等混合垂体的GTH与鲢、鳙、鲟、鲤各单一垂体层析分离图形未见有明显的差别^{3,8}。免疫扩散也未显示不均一性,因此鲤科鱼类GTH分子的种属差异性可能不太强。

在产卵季节,鲤鱼产卵前后血液中GTH含量变化规律,是与产卵活动有关的。从鱼类生殖生理角度来说,这是鱼类繁殖时的必然现象。在雌、雄鲤鱼配组后,脑垂体GTH规律性地释放,至开始产卵时达到高峰。此时,标志着鲤鱼发情产卵活动的出现,随着产卵活动的停止,血清中GTH含量又同步下降,这与回游性鲑、鳟鱼类脑垂体GTH释放规律相一致^{10,11}。例如鲑、鳟鱼类,特别是雌鱼在河口时,血清中GTH含量较低,随着回游的进行。到达产卵场所,临近产卵时,血清中GTH含量最高。产卵后又开始下降,是规律性变化。这种情况与我们上述实验,在产卵季节,鲤鱼配组后,血清中GTH含量变化规律相一致。大部分雌鱼,配组后在发情产卵时,GTH含量普遍存在一个高峰值,波动范围200~300毫微克/毫升。此峰直或许可作为鲤鱼发情产卵的生理指标。

与此同时,曾注意家鱼(鳊、鲢等)催产前后的情况,并作了一些初步检测,发现鳊、鲢鱼催产前后血液中GTH含量变化,同鲤鱼自然产卵前后血液中GTH变化规律相仿。不论鳊鱼或鲢鱼,当腹腔注射LRH-A后,血液中GTH含量都有不同程度的升高,临近发情产卵时达到高峰(未发表工作)。掌握了脑垂体释放GTH的规律性,将为合理使用LRH-A提供理论依据。

参 考 文 献

- 【1】经济鱼类激素应用研究协助组:一种新的高效能的鱼类催产剂-促黄体生成素释放激素类似物的应用。中国科学,1976,4,388。
- 【2】福建、江苏、浙江、上海淡水经济鱼类人工繁殖协作组:合成促黄体生成素释放激素的类似物(LRH-A)对家鱼催产效果的进一步探讨,生物化学与生物物理学报,1977,9,15。
- 【3】Burzawa-Gerard, E. Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de poisson teleosteen, la carpe (*Cyprinus carpio* L.) *Biochimie*, 1971, 53, 545。
- 【4】Donaldson, E.M. et al. Preparation of gonadotropin from salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrin.*, 1972, 18, 469。
- 【5】上海实验生物研究所、上海第一医学院华山医院同位素室:人绒毛膜促性腺激素(HCG)的放射免疫测定法。生物化学与生物物理进展,1975,1,31。
- 【6】Greenwood, F. C. and Hunter, W. M. The preparation of ¹³¹I-la-

belled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 1963, 89, 114.

- [7] Fontaine, Y. A. La spécificité zoologique des protéines hypophysaires capable de stimuler la thyroïde. *Acta Endocrin*, 1969, 60, Suppl, 136, p.43.
- [8] Sinha, V. R. P. Chromatography of fish pituitary extracts on Sephadex G-100. *J. Chrem.* 1969, 44, 624.
- [9] Sinha, V. R. P. Induced spawning in carp with fractionated fish pituitary. *J. Fish Biology*. 1971, 3, 263
- [10] Crim, L. W. et al. The plasma gonadotropin profile during sexual maturation in a variety of salmonid fishes. *Gen, Comp. Endocrin.*, 1975, 27, 62.
- [11] Crim, L. W. et al. Radioimmunoassay estimates of plasma gonadotropin levels in the spawning pink salmon. *Gen. Comp. Endocrin.*, 1975, 21, 69.

RADIOIMMUNOASSAY ON SERUM GONADOTROPIN OF CARP(*Cyprinus carpio* L.)

The Fish Reproductive Physiology Research
Group, Any Fisheries College And

The Peptide Hormone Group, Shanghai Institute
Of Biochemistry, Academia Sinica

ABSTRACT

The mixed pituitary glands of *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis* were extracted with ethanol. Then the crude gonadotropin was fractionated by chromatography on DEAE—cellulose and gel filtration. Biological activity as assayed by ovulation test of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in vivo was recognized only in the second fraction (Sephadex G—100). Effective dose of induced ovulation was 1 μ g/g body weight. The gonadotropin (SG—II—2) exhibited a single band on polyacrylamide gel electrophoresis. The determinable range of this gonadotropin radioimmunoassay was 0.1~16ng.

Serum gonadotropin levels of carp (*Cyprinus carpio*) have been determined by means of radioimmunoassay through the whole reproductive process. Particularly the female exhibited a significant and higher peak during the sexual behaviour and spawning. After the spawning, the serum gonadotropin levels have a quick drop down. This investigation provided some new data for reproductive physiology of fish.

促黄体生成素释放激素类似物(LRH-A) 对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)诱导 产卵时血清中促性腺激素(GTH)和 17β -雌二醇(17β -E₂)含量的动态研究*

姜仁良 黄世蕉 赵维信 周洪琪

(上海水产学院)

摘 要

本文报道了团头鲂血清中 17β -E₂放射免疫的测定方法,并对所建立的测定方法在鱼类血清中进行检测,与此同时对方法的准确性(回收率 $92.8 \pm 8.16\%$)、特异性(抗血清与雌酮、雌三醇的交叉反应分别为 $<3.20\%$ 、 $<2.99\%$)和灵敏度($2.36-2.50$ pg)作了鉴定。标准曲线的 $r = -0.998$, $s = 0.023-0.051$,检测范围为 $10-400$ pg/管。

团头鲂催产后血清中GTH含量增高,为产卵前的17倍左右,而未产个体GTH则为产卵前的3—5倍,血清中GTH与鲑、鲑鱼一样,需要达到一定的浓度水平方能实现产卵。

随着团头鲂卵巢的发育,血清中 17β -E₂含量和成熟系数同步逐渐上升,至第Ⅳ期卵巢发育成熟阶段,血清中 17β -E₂形成一个高峰,为 2004.11 ± 1136.31 pg/ml,可作为卵母细胞卵黄积累完成的指标。过后,血清中 17β -E₂略有下降,催产前为 1392.71 ± 399.09 和 1219.29 ± 420.51 pg/ml,产卵后,血清中 17β -E₂在短时间内迅速下降到 346.71 ± 129.51 和 324.28 ± 228.00 pg/ml。

雄鱼则与雌鱼相反, 17β -E₂含量,随精巢发育而逐渐下降,并一直维持在一个低水平。

从七十年代开始,人工合成的LRH-A(促黄体生成素释放激素类似物——焦谷、组、色、丝、酪、D-丙、亮、精、脯乙基酰胺)普遍应用于鱼类繁殖,至今已取得非常显著效

*参加本试验部分工作的还有杨先乐、杨斌、沈玲、李文和、杨志平、肖雨同学。

承蒙上海计划生育研究所王忠兴和上海内分泌研究所姜云同志的帮助,特此致谢!