

中国对虾及中华绒螯蟹多倍体诱导中 6-DMAP 在卵子中残留量的检测*

吴长功 张晓军 崔朝霞 周令华 相建海

(中国科学院海洋研究所)

海洋动物多倍体的诱导目前已成为海水养殖中品种改良的重要手段(楼允东,1984)。在美国,太平洋牡蛎和虹鳟的多倍体诱导已大规模应用于生产,并获得良好的经济和社会效益。我国也先后开展了鱼类(桂建芳等,1991;尤锋,1993)、中国对虾(戴继勋等,1993;相建海等,1992)、贝类(喻子牛等,1995)及中华绒螯蟹(陈立侨等,1997)等多种海洋动物多倍体诱导的研究,并取得了一些进展。6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)由于其低毒、经济和高效,目前已成为海洋动物多倍体诱导中经常使用的诱导剂,但至今,国内外尚无关于 6-DMAP 在卵子内的残留的报道。在环境保护和生物安全倍受关注的今天,人们非常关心多倍体诱导食物的安全性问题,本文首次利用高压液相色谱技术检测了在中国对虾和中华绒螯蟹多倍体诱导处理后,卵子和幼体内 6-DMAP 的残留量,并对检测结果进行了分析讨论。

一、材料与方法

1. 亲虾和亲蟹的获得

中国对虾亲虾于 1999 年 4 月取自山东省日照市养殖场,活体运回中国科学院海洋研究所海洋生物培育楼暂养,水温保持 18℃。按相建海等(1992)方法人工控光改变光照周期,诱使亲虾白天产卵,随时观察产卵情况,产卵后收集处理。中华绒螯蟹亲蟹于 1998 年 11 月取自山东省东营市山东中华绒螯蟹繁育有限公司,活体运回中国科学院海洋研究所海洋生物培育楼暂养,随时观察产卵情况,分离已产出尚未分裂的受精卵备用。所用试剂 6-DMAP 购自 SIGMA 公司,流式细胞仪为德国产 Partec PCA-III 型, Waters 高压液相色谱仪检测在中国科学院海洋研究所中心室进行。

2. 中国对虾三倍体的诱导

中国对虾产卵后约 10min(产卵水温 18℃),收集卵子放入以 18℃ 海水配制的含 300 μ mol/L 6-DMAP (6-Dimethylaminopurine C₇H₉N₅)的溶液中处理 10min,然后取出卵子以海水冲洗三次以上,放入孵化池中 20℃ 孵化,在无节幼体期以流式细胞仪检测三倍

* 中国科学院海洋研究所调查报告第 4258 号;国家 973 项目资助 1999012009 号。

收稿日期:2001 年 1 月 10 日。

体诱导率(详见相建海等著《海洋生物技术》)。

3. 中华绒螯蟹四倍体的诱导

取适时受精卵,放入以 18℃ 海水配制的含 $300\mu\text{mol/L}$ 的 6-DMAP 溶液中处理 15min,然后取出卵子以海水冲洗三次以上,放入孵化池中孵化,在原肠后期取样,以流式细胞仪检测四倍体诱导情况。

4. 6-DMAP 的检测

用于检测 6-DMAP 含量的卵子共有 5 组,分别是:(1)6-DMAP 未处理的受精卵,为对照组;(2)在 6-DMAP 溶液中处理后的卵;(3)在 6-DMAP 溶液中处理后,用正常海水冲洗 1 次的卵;(4)在 6-DMAP 溶液中处理后,用正常海水冲洗 2 次的卵;(5)在 6-DMAP 溶液中处理后,用正常海水冲洗 3 次的卵。每组样品各取 200 粒左右的卵子,加入 3ml 蒸馏水,以匀浆器研碎,5000r/min,离心 5min,取上清液,备用。对虾与中华绒螯蟹的取样方法相同。另取孵化中的对虾无节幼体约 50 只,离心去除海水,加入 3ml 蒸馏水,匀浆器研碎,5000r/min,离心 5min,取上清液备用。

以分析纯 6-DMAP 配制标准液,采用 Waters 高压液相色谱仪,以 Waters-NOVA PAK C_{18} 柱 $5\text{mm} \times 15\text{mm}$ 作固定相,以甲醇和水(1:1)为流动相,在 254nm 处检测 6-DMAP 的含量。

二、结果与讨论

在 18℃ 海水中,中国对虾产卵后 10~15min,收集卵子,用 $300\mu\text{mol/L}$ 6-DMAP 处理 10min,可以抑制第二极体释放,诱导产生中国对虾三倍体,最高诱导率可达 100%。在此种诱导条件下,使用高压液相色谱技术对残留在卵子内和附着在卵子表面的 6-DMAP 进行测量,最低检测值为 $0.003\mu\text{g/ml}$ 。实验结果表明处理后的卵子经过海水冲洗 3 次以上,便检测不出 6-DMAP 的存在(表 1)。

表 1 高压液相色谱检测中国对虾三倍体诱导中卵子中 6-DMAP 的残留量 (C_{18} 柱,甲醇:水=1:1,248nm)

序 号	检测结果($\mu\text{g/ml}$)	备 注
1	未检出	处理前卵
2	45	处理中卵
3	未检出	冲洗 1 次
4	未检出	冲洗 2 次
5	未检出	冲洗 3 次
6	未检出	处理前卵
7	57	处理中卵
8	未检出	冲洗 1 次
9	未检出	冲洗 2 次
10	未检出	冲洗 3 次
11	未检出	无节幼体

注:表中 11 个样品分 3 次检测,1~5 为第一次检测,6~10 为第二次检测,11 为第三次检测。

研究表明,使用 6-DMAP 亦可诱导产生中华绒螯蟹四倍体。高压液相色谱技术检测结果表明,处理后的卵子经过海水冲洗 2 次以上,便检测不出 6-DMAP 的存在。以海水

配制的 $49\mu\text{g/ml}$ 的 6-DMAP 处理液,在实验室条件下放置 30d 以后,6-DMAP 的含量降至 $27\mu\text{g/ml}$,说明 6-DMAP 在室温条件下,具有降解的能力,且降解速度较快。若经长期放置后,其最后残留量还有待作进一步的检测(表 2)。

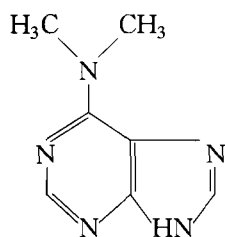
表 2 高压液相色谱检测中华绒螯蟹四倍体诱导卵子 6-DMAP 的残留量(C_{18} 柱,甲醇:水 = 1:1,248nm)

序 号	检测结果($\mu\text{g/ml}$)	备 注
1	49	处理中卵
2	未检出	冲洗 1 次
3	未检出	冲洗 2 次
4	未检出	冲洗 3 次
5	未检出	对照组 1
6	27	放置 30d 的处理液
7	未检出	放置 60d 的处理液
8	未检出	对照组 2
9	54	处理中卵
10	未检出	冲洗 1 次
11	未检出	冲洗 2 次
12	未检出	冲洗 3 次
13	未检出	对照组 3

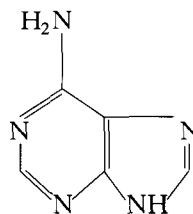
注:表中 13 个样品分 3 次检测,1~5 为第一次检测,6~8 为第二次检测,10~13 第三次检测。

使用高压液相色谱技术可以准确地检测多倍体诱导过程中卵子内 6-DMAP 的含量。由于 6-DMAP 易溶于水,通过冲洗可以很快将卵子携带的 6-DMAP 减少到检测不到的程度。在实验中可以看到,冲洗 1 次后,样品中 6-DMAP 浓度就小于 $0.003\mu\text{g/ml}$,高压液相色谱不能读出,但在放大的峰值图上可以看到 6-DMAP 位置上有一峰,经过 3 次冲洗,6-DMAP 峰就已经看不到而与处理前的卵子一样了。

关于 6-DMAP 的毒性,目前还没有毒理实验的报道。蔡国雄等(1996)提到 6-DMAP 是无毒的。Guo 等(1994)许多学者认为其毒性很低,比 CB 要安全得多。从分子结构看,6-DMAP 是一种嘌呤衍生物,与腺嘌呤相比,只是第 6 碳连接的氨基上两个氢替换为两个甲基。6-DMAP 的降解过程与其他嘌呤类似,首先在脱氨酶的作用下水解脱去氨基,然后依次变为次黄嘌呤,黄嘌呤,尿酸,尿囊素,尿素,最后分解为二氧化碳和氨。环境中的微生物中都具有腺嘌呤脱氨酶,这也是 6-DMAP 生物降解原因。6-DMAP 和腺嘌呤的分子式如下所示



6-DMAP



腺嘌呤

在实际诱导三倍体的过程中,冲洗卵子的次数都在 3 次以上,且卵子孵化及育苗过程

中不断换水,6-DMAP 被不断地稀释,不会对环境产生不良影响,而且由于 6-DMAP 本身在常温下有降解的过程,因此不会产生在环境中积累的问题,可以说使用 6-DMAP 进行多倍体的诱导是安全可靠的,又由于其价格较低、诱导效果较好,在未来海洋动物的细胞工程育种中会有广阔的应用前景。

三、结 论

通过高压液相色谱(HPLC)技术对卵子残留的 6-DMAP 进行检测的结果表明,HPLC 技术可以精确地测知 6-DMAP 在卵子中的残留量,精度达 $0.003\mu\text{g/ml}$ 。在上述检测条件下,用海水洗过的处理卵及处理得到的幼体中均检测不到 6-DMAP 的存在,而且 6-DMAP 在自然条件下可以降解,不会在环境中积累,说明 6-DMAP 在实验中的应用是安全的,且不会对环境产生毒害作用,是一种高效,低成本,安全的诱导剂。本研究首次成功利用 6-DMAP 诱导出了中国对虾及中华绒螯蟹的多倍体,而且探索出一种简便、快速、高精度的检测 6-DMAP 的方法。该多倍体诱导剂,在科研及生产中具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 尤蜂,1993,黑鲷三倍体的人工诱导研究,海洋与湖沼,24(3):248~255。
- 陈立侨、赵云龙、周忠良等,1997,中华绒螯蟹多倍体诱导的研究:II,热休克诱导中华绒螯蟹三倍体和四倍体胚胎,水产学报,21(1):19~25。
- 相建海、周令华、刘瑞玉,1992,中国对虾四倍体诱导的研究,海洋科学,4:55~61。
- 桂建芳、孙建民、梁绍昌等,1991,鱼类染色体组操作的研究:II,静水压与冷休克结合处理诱导水晶彩鲤四倍体,水生生物学报,15(4):333~342。
- 喻子牛、孔晓瑜、王如才,1995,海洋贝类多倍体存在机理与最新进展,海洋湖沼通报,5(4):72~79。
- 楼允东,1984,国外对鱼类多倍体育种的研究,水产学报,8(4):343~356。
- 蔡国雄、A. R. Beaumont,1996,用 6-甲基嘌呤诱导贻贝四倍体胚胎,热带海洋,4:26~30。
- 戴继勋、包振民、张全起等,1993,中国对虾三倍体诱导的研究,I:温度休克,遗传,15(5):15~18。
- Guo, X and Allen, Jr. S. K., 1994, Viable tetraploids in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (thunberg), produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(1):42~50.

**DETECTION OF 6-DMAP REMAINING IN TREATED
EGGS OF *PENAEUS CHINENSIS* AND *ERIOCHEIR
SINENSIS* IN POLYPLOID INDUCTION ***

Wu Changgong, Zhang Xiaojun, Cui Zhaoxia,

Zhou Linghua, Xiang Jianhai

(*Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences*)

ABSTRACT

The remained 6-DMAP in treated eggs during polyploid induction by 6-DMAP in *Penaeus chinensis* and *Eriocheir sinensis* was detected using high performance chromatography(HPLC). 100 % triploid embryos were induced by inhibiting the second polar body using 300 $\mu\text{mol/L}$ 6-DMAP in fertilized eggs in *P. chinensis*. Tetraploid of *Eriocheir sinensis* could be induced using 300 $\mu\text{mol/L}$ 6-DMAP inhibiting the first cleavage, and the highest ratio of tetraploid checked in blastosphere stage was 58 %. In HPLC detection, Waters-NOVA PAK C_{18} (5mm $\times$ 15mm) was used, and methanol: water (1:1) was used as dilution. 6-DMAP can be detected at 254nm, the minimum of detected 6-DMAP was 0.003 $\mu\text{g/ml}$. The treated eggs rinsed thrice in seawater, the remained 6-DMAP cannot be detected in HPLC at the given condition. During the hatching period, the remained 6-DMAP was diluted and rinsed again and again. 6-DMAP can be degraded in environment. The results indicated that using 6-DMAP to induce polyploid in the eggs of *Penaeus chinensis* and *Eriocheir sinensis* is effective and safe.

* Contributed No. 4258 from Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences.