

中国对虾卵水的特性和精子的应答

孙修涛 李 健 李兆新 刘 萍 刘德月 王清印
(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 研究了我国对虾卵水的采集、保存方法、紫外吸收特性和有效期等方面的内容, 并应用卵水研究了交尾期雄虾、雌虾及产卵期雌虾精英或纳精囊中精子对卵水的应答开始时间、必要的反应时间等响应卵水的时间特性以及精子的存活期等。结果表明, 卵水经液氮保存或先经液氮后转入普通冰柜保持冻结状态 7 个月后诱导精子激活效力无显著差异。精子在自然温度(10℃)普通海水中可在 10h 内保持对卵水的响应能力。交尾期精子最初响应卵水有 5~10min 的迟延, 而产卵期精子延迟很短。

关键词 中国对虾, 卵水, 精子, 应答, 激活

The property of egg water and the response of sperm of *Penaeus chinensis*

Sun Xiutao, Li Jian, Li Zhaoxin, Liu Ping, Liu Deyue, Wang Qingyin
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Qingdao 266071)

ABSTRACT The shrimp, *Penaeus chinensis* used in this test was bought from Yellow Sea in March, 1995, for the collection of egg-water EW, as well as the autumn shrimp was bought in October of the same year. The shrimp was raised in marine laboratory and fed with Polychaeta and shellfish, the sand filtered sea water was used in the experiment. The egg water EW was collected and the characters were examined and reported as well. The results were composed of the collection, storing, life span of the egg water, and the response of sperm isolated from different parts of male reproductive system and mated female.

The results are ordered as follows.

- 1) The activating ability could be kept for 7 months or more as stored in liquid nitrogen or stored in refrigerator (-20℃) after inflicted in liquid N₂(-196℃); and it would lose the ability in normal temperature after 8-10 hours. It is a useful character on sperm quality checking in production.
- 2) The parallel examination indicates that EW is the only efficient inductor to activate sperm, compared with sea water, ovary wash liquid, ovary isolated liquid and distilled water.
- 3) The ultraviolet absorbancy of EW has high peak on 213.2 nm and a little peak on 268.0 nm.
- 4) The initial interval of sperm isolated from mated female responding to EW was 5-8 minutes in autumn but immediate in spring.
- 5) The activating rates of sperm induced by EW varied in 30%-80% in autumn, and superior to 90% in spring. There has been a 7%-13% space activation induced by sea water without EW.
- 6) The life span of sperm isolated from thylcum of autumn mated female was 10-10.5 hours limited under

国家攀登计划 B 资助项目(海养生物优抗研究专题对虾受精过程和胚胎发育的生物学研究), PDB-6-2-3 号。

第一作者简介: 孙修涛, 男, 1962 年 1 月生, 硕士, 副研究员。E-mail: sunxiutao@263.net.cn

收稿日期: 1998-12-08

natural temperature(9.5℃) bathed in sea water, and 6.0–8.5 hours in 17.0±1℃. The life span of sperm had no significance in male and female in autumn.

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, egg water, sperm, respons, activation

精子和卵子是动物界广泛存在的两种配子, 精卵之间的结合虽然持续时间一般不长, 但期间发生的生理生化反应十分复杂。人们通过对海胆、海盘车、水母、蛙类、仓鼠、灵长类及人类受精过程的研究, 已基本确立了动物精卵应答的模式^[1], 大意是: 卵子会产生并释放一种分子量较大(人: 50 000; 海星: 10 000 000)的多肽, 该多肽结合有糖基, 能诱导精子发生顶体反应, 因而被称作“顶体反应诱导物”(ARIS), 另有多种小分子量的辅助因子(如牛磺酸、碳酸氢盐和皂角苷等)也是诱导顶体反应所需要的, 被称作“辅因子”(CO-ARIS)。此外在卵子胶状物中, 还发现有一些次级的辅因子(多肽), 上述因子作用于精子表面上的受体, 引起顶体反应及前冲等一系列变化, 然后是精卵的结合, 接下来是卵子对精子作出回应, 并导致一系列反应而完成受精过程。海胆、对虾等水生动物产过卵的水体中含有诱导精子反应的活性成分, 称为卵水(egg water, EW)。关于卵水, Dan 在研究海胆精子的顶体反应时使用过^[2]。Griffin 用单肢虾(*Sicyonia ingentis*)的卵水诱导精子产生顶体丝, 此后又分析了卵水内活性物质的成份, 证明是一种糖蛋白, 其蛋白、糖基重量比约为 4:1, 其生化特性类似胰蛋白酶^[3,4]。此后 Pratoomchat 用卵水激活法判断斑节对虾(*P. monodon*)精子的质量^[5], Wang 等用卵水研究凡纳对虾(*P. vannamei*)的精子质量问题^[6]。有关中国对虾卵水的研究报道还很少, 本文研究了中国对虾(*P. chinensis*)卵水的一些外部特性, 为检验精子质量时合理使用卵水提供依据; 还利用卵水测定了精子对卵水响应的特性。王清印等曾研究过精英在添加抗菌素的海水所浸泡过的脱脂棉中之寿命^[7], 本文测定了在不加抗菌素的自然海水中(交尾期)以及 9℃冰箱中雌虾纳精囊内(产卵期)精子的寿命。

1 材料和方法

1.1 实验材料

于 1995 年 3 月自山东即墨沿海(黄海)购进体长 15~18cm 的海捕中国对虾用于产卵, 蓄养在本所小麦岛试验基地, 黑色 1m³ 圆塑料缸上遮以黑色编织帘, 常流水, 流量约 5m³/d, 饵料以杂鱼虾为主, 辅以沙蚕等。每天观察性成熟情况, 以便采集卵水。同年秋季于青岛郊区购进体长 11cm 左右的养殖中国对虾(雌雄兼有), 饲养方法相似但不必遮光。

1.2 卵水的采集

事先准备约 100mL 过滤海水于 100mL 烧杯中, 置冰箱(5℃)备用。对虾产卵时, 立即取出备用水, 将产卵虾头向下放入烧杯中(操作时产卵虾可能因受惊暂停产卵, 多数个体可在 10min 内恢复产卵), 产卵于烧杯内。当卵子足够量时或产完卵时, 取出虾, 摇动烧杯几次再静置于台面上, 让卵子及杂质下沉。数分钟后用吸管从上层吸取卵水, 装入塑料离心管, 每管约 1.5mL, 加塞后置液氮内保存备用。

1.3 精子的采集

雌虾纳精囊内之精子是用尖细的玻璃吸管从纳精囊中缝插入, 向两侧搅动, 使精液从组织中释出, 同时轻吸进管, 可见有乳白色液体即是。此时精子密度极高, 用干净海水稀释后使用。

雄虾精子是通过解剖出性腺后分段取样, 用玻璃匀浆器匀浆, 再用 40μm 孔径尼龙筛绢过滤后得到的。

1.4 精子激活的判断

对虾精子激活参照 Wang 等描述的白对虾精子反应特征判断^[6]。有效卵水不能激活的精子或激活

率接近空白水平时判精子死亡。相反, 新采集的成熟精子不受卵水激活则判卵水失效。

2 结果

2.1 卵水替代实验

实验分别用新采集的卵水、成熟卵巢冲洗海水、卵巢组织捣碎液、普通海水和自来水与产卵期纳精囊精子各 1 滴于载玻片上混合, 30min 后镜检, 结果只有卵水诱导精子发生激活, 其余均无反应。

2.2 卵水室温下的有效期

卵水解冻后于室温(22℃)下 7h 内多次用精子检验均能激活, 但最后几次, 精子激活速度变慢。另取两管卵水解冻, 其中 A 管室温(22℃)放置, B 管于 30min 后重置冰箱冻结。A 管到 8h 检验仍有效, 24h 后失效, B 管解冻后有效。此后 B 管分别于 26、30、32、53、78、103h 时解冻检验均有效(每次用前解冻后用重新冻结)。

2.3 卵水贮存方法对其有效期的影响比较

贮存方法有两种, 一是始终在液氮(-196℃)中, 二是在液氮中一个月后移到普通冰柜(-20℃)中保持冻结状态。表 1 比较了两种情况下 7 个月后卵水诱导交尾期纳精囊精子的激活率, 经 t 检验和 F 检验, 在 0.01 置信度下均无差异。

表 1 液氮和冰柜两种条件保存 7 个月后卵水性能的比较
Tab. 1 The inductivity comparison between the EW kept in liquid N₂(-196℃)
and refrigerator(-20℃) after 7 months

对虾体长(cm)	各取样点精子个数	精子外观合格率(%)	EW-N ₂ 激活率(%)	EW-Re激活率(%)	N	t 检验	F 检验
14.99±0.84	404±103	96.25±3.25	65.99±29.43	70.56±23.59	9	-0.34	1.56

2.4 卵水的紫外吸收

卵水在 265 型紫外分光光度计扫出的吸收曲线如图 1, 在 213.2 nm 处有一个较高的峰, 在 268.0 nm 处有一个较小的峰。因为 213nm 吸收峰接近肽键的特征吸收, 268nm 较小的吸收峰接近芳香族氨基酸和酪氨酸的特征吸收, 初步认为卵水活性物质是以蛋白质或多肽为主要成分的生物分子。

2.5 精子对卵水的应答开始时间

精液取出后立即置入 5mL 小烧杯中加数滴过滤海水稀释到乳白色很淡备用, 用秒表计时, 每隔一定时间取 1 小滴于载玻片上并加卵水 1 滴立即加盖玻片镜检, 从取样到检查在半分钟内完成。只要有激活即得最初的响应时间, 结果见表 2。由表 2 可知, 交尾期各种来源的精子离体并与海水接触后均不能立即响应卵水的诱导, 最短需要 5~6min 间隔, 一般 15min 后均能响应, 而产卵期几乎能立即激活。精子激活率交尾期为 30%~80%。

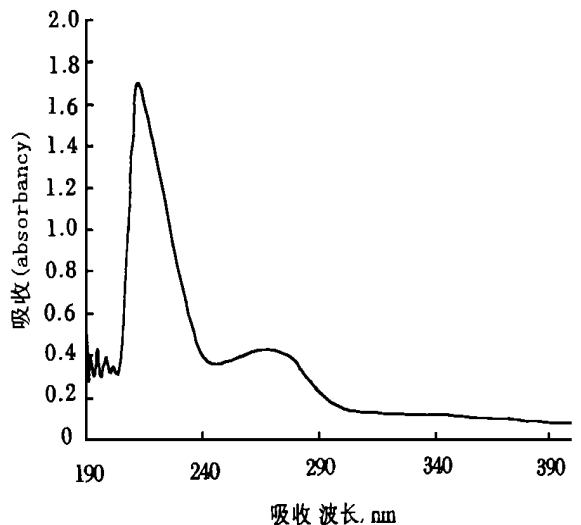


图 1 卵水的紫外吸收

Fig. 1 The ultraviolet absorption pattern of the egg water

产卵期高于 90%。交尾期所用雌虾系 10 天内交尾的, 温度 15℃, 海水盐度 33.7, pH 值 8.15。

表 2 精子对卵水的应答开始时间

Tab. 2 The initial time of sperms in responding to EW in mating period

精子来源	2min	4min	6min	8min	10min	15min	N
雌虾纳精囊精子 a	-	-	-	-	+	+	2
雌虾纳精囊精子 b	-	-	+	+	+	+	2
雄虾精英精子	-	-	-	-	+	+	2
雄虾贮精管中段精子	-	-	-	+	+	+	1
雄虾贮精管末段精子	-	-	-	+	+	+	1
雌虾纳精囊精子(产卵期)	+	+	+	+	+	+	5

注:“+”阳性,表示有顶体反应,“-”阴性无反应。

2.6 不同反应时间下的精子激活率

试验比较了精子与卵水混合反应 30min 和 60min 时的精子激活率, 结果列入表 3。经 t 检验和 F 检验, 30min 和 60min 时激活率无显著性差异, 可以认为反应 30min 已充分和必要。

表 3 不同反应时间精子激活率的比较

Tab. 3 The comparison between acrosomal reaction rates of the sperm in responding to the same EW with different intervals being incubated

平均每次精子数	30min 激活率(%)	60min 激活率(%)	N	t 检验	F 检验
373±84	40.48±16.81	43.16±18.59	13	-0.386	1.223

2.7 以卵水测定交尾后雌虾纳精囊内精子的寿命

2.7.1 自然温度下普通海水中精子的存活寿命

自然温度(9.5~10.5℃)下, 普通海水温度(盐度 32.7, pH8.16)中, 反应时间为 30min 精子存活寿命见图 2。图 2 中, 实线表示激活率随时间而波动情况, 虚线代表空白激活率 7.0%。图中两条线约在 10.5h 处交汇, 据此认为实验条件下纳精囊精子的存活期最长为 10.5h。

2.7.2 不同温度下雌虾纳精囊精子与雄虾精英精子在自然海水中的寿命及其比较

分别在自然温度(9.5~10.5℃)和水浴(17±1℃)条件下, 实验用精子分别取自 2 尾雌虾的纳精囊和 2 尾雄虾 4 个精英的匀浆液。表 4 为本实验统计后的结果, 其中连续 2 次以上低于空白激活率时即判精子死亡, 空白激活率表示用 1 滴海水代替卵水时的激活率。存活期以最后一个高于空白激活率的点的取样时间代表。从表 4 可以看出: (1) 温度较低的两种来源的精子存活时间长于温度高的, 分别为 10.0~10.5h(与前面结果一致)和 6.0~8.5h; (2) 温度低的组精子对卵水响应率略高于高温组; (3) 两种来源的精子的存活期差别较小。

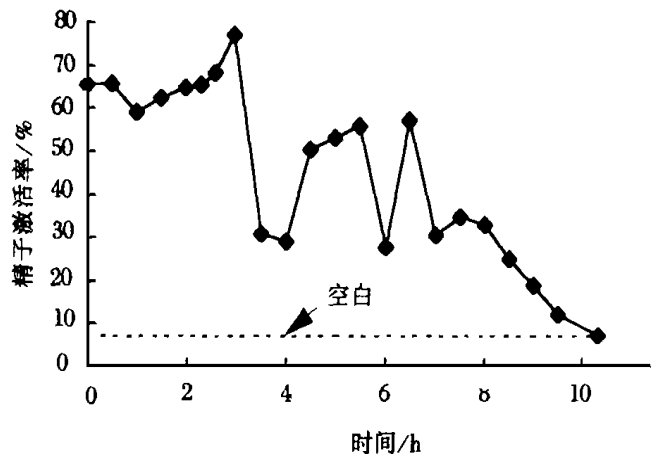


图 2 自然温度(9.5~10.5℃)下精子激活率随时间的变化

Fig. 2 The reaction rates of sperm in natural marine water with the air temperature (9.5~10.5℃)

表 4 雌虾纳精囊精子与雄虾精英精子在不同温度条件下的寿命比较
Table. 4 Comparison between the life span in different temperatures of the sperms collected from male and mated female prawn

精子来源	温度(°C)	N	平均精子个数	空白激活率(%)	平均激活率(%)	存活期(h)
♀	9.5±0.5	17	390±51	12.7	33.6±12.4	10.5
♀	17±1	14	350±94	13.9	28.2±18.5	6.0
♂	9.5±1	16	344±74	16.1	37.0±21.3	10.0
♂	17±1	10	322±71	13.6	29.3±19.5	6.0

2.8 产卵期精子的保存期限

准备一个 500mL 的烧杯, 其中加入约 350mL 过滤海水, 然后放进 9°C 的冰箱中备用。取雌虾一尾离水致死后用尖细的玻璃吸管从纳精囊中取出少量精子, 用卵水检验激活能力, 将此虾放于前面准备好的已降温至 9°C 的烧杯内保存, 然后分别在 2、4、6、8、24、26、30、32、53、78 和 102h 取样检验, 结果到 78h 时仍能激活, 102h 时外观无明显异常但不能激活。

3 讨论

3.1 关于卵水的贮存与应用

中国对虾卵水内能激活精子的活性物质在室温(22°C)下可在 8h 内保持有效, 根据在精子寿命实验中的情况判断有效期不超过 15h(10°C)而在冻结状态可保存 7 个月以上。卵水由液氮冻结或先经液氮冻结后移至普通冰柜中 6 个月后效力无差异, 这为卵水的保存和应用提供了方便。

3.2 卵水中活性物质的由来

由于成熟卵巢的冲洗液及捣碎液均不能激活精子, 因此卵水中的诱导物并不是产卵前就游离于卵子表面或组织间隙, 而是在产卵过程的某个阶段达到活性状态的。一般情况下精子是在其棘突(Spike)与卵膜接触时才启动顶体反应的^[8,9], 而精子的“触发”或海水接触均能启动卵子的皮层反应^[10], 从而释放皮质棒, 阻止了其余精子接近卵子, 避免多精受精^[11]。因此, 卵水内的诱导物有可能原本分布在卵子表面有关的部位^[3], 当卵子产出后短时间内遇到精子棘突上的诱导物受体时, 即使精子发生胞吐, 同时卵子被启动举起孵化膜^[10], 分布在膜上的其余诱导物分子被同时举起并最终释放在海水中去, 而最先激活的精子溶开孵化膜与卵子连结在一起^[9]。

3.3 精子应答卵水的迟延问题及所需反应时间

在中国对虾交尾期取出的精子加上卵水后, 一般要过 5~10min 才能开始激活, 无论精子是来自雄虾还是交过尾的雌虾, 而在产卵期, 几乎能立即发生激活。产卵期的单肢虾雌虾纳精囊精子在 2.5min 内激活率大于 65%^[4]。因此, 产卵期的精子明显地达到生理和功能的成熟, 而交尾期的雄虾精子和雌虾纳精囊内精子可能需要获能时间, 所以才出现对卵水响应的迟延现象。

精子与卵水的反应时间在各种报告中是不同的。Wang 等^[6]采用 30min, 而 Pratoomchat 等^[5]和 Griffin 等^[12]采用 60min。经过实验, 我们认为 30min 是精子与卵水反应的充分必要时间。用卵水判断精子质量时, 存在离散性较大的问题, 这一点在南美白对虾^[6]和斑节对虾^[5]中均不同程度地存在。因此, 使用时需要注意不同时期精子的迟延差异与离散性问题。

3.4 精子的空白激活率

中国对虾交尾期间从雄虾精英和雌虾纳精囊取出的精子与普通海水混合一段时间后(不加卵水)也

会有 7%~13% 左右的精子发生激活, 暂称之为空白激活率。这一点与单肢虾的 10% 相近^[3,13], 但与 Pratoomchat 等^[5]报道的斑节对虾(*P. monodon*) 差异较大, 其卵水诱导的激活率平均只有 2.8%。空白激活率说明有一部分精子在海水中能够不依赖卵子及卵水而自发激活。在产卵期间有时有很高的空白激活率, 推测与精子充分成熟或获能时间短有关。

关于卵水的化学性质, 本文仅初步涉及, 确切的生物化学组成有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Epel D, Mastroianni L JR. A summary of the symposium on "Gamete Dialogue in Fertilization: From Sea Urchin to Human" —in memory of Alberto Monroy. Biol Bull, 1988, 174: 186~ 190
- 2 Dan J C. Studies on the acrosome I. reaction to egg water and other stimuli. Biol Bull, 1952, 107: 54~ 66
- 3 Griffin F J, Clark W H, Crowe J H et al. Intracellular pH decreases during in vitro induction of the acrosome reaction in the sperm of *Sicyonia ingentis*. Biol Bull, 1987, 173: 311~ 323
- 4 Griffin F J, Clark W H, 1990. Induction of acrosomal filament formation in the sperm of *Sicyonia ingentis*. J Exp Zool, 1990, 254: 296~ 304
- 5 Pratoomchat B, Piyatitivorakul S, Menasveta et al. Sperm quality of pond reared and wild caught *Penaeus monodon* in Thailand. J World Aquac Soc, 1993, 24(4) 530~ 540
- 6 Wang Q-Y. Egg water induced reaction and bioassay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality. J World Aquac Soc, 1995, 26(3) 261~ 271
- 7 王清印, 杨丛海, 麻次松等. 中国对虾精英在常温条件下的保存及人工授精效果. 中国水产科学研究院学报, 1989, 2(1): 47~ 54
- 8 Clark W H, Kleve M G, Yudin A I. An acrosome reaction in natantian sperm. J Exp Zool, 1981, 218: 279~ 291
- 9 Barros C. Sperm egg interactions in the shrimp *Rhyncocinetes typus*. Gamete Research, 1986, 14: 171~ 180
- 10 Clark W H, Lynn J W, Yudin A I et al. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*. Biol Bull, 1980, 158: 175~ 186
- 11 Epel D. The program of and mechanisms of fertilization in the echinoderm egg. Am Zool, 1975, 15: 507~ 522
- 12 Griffin F J, Shigekawa K, Clark W H et al. Formation and structure of the acrosomal filament in the sperm of *Sicyonia ingentis*. J Exp Zool, 1988, 246: 94~ 102
- 13 Clark W H, Griffin F J. The morphology and physiology of the acrosome reaction in the sperm of the decapod, *Sicyonia ingentis*. Develop Growth & Differ, 1988, 30(5): 451~ 462