

# 中华绒螯蟹精英分级分离及其蛋白组分分析

程立均 康现江\* 穆淑梅 郭明申 赵晓瑜

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

**摘要:**对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)精英进行分级分离,获得的精液、精英基质和精子等不同组分,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法,对其可溶性蛋白成分进行比较分析。结果显示,中华绒螯蟹精英的各个组分均含有其特定的蛋白谱带。经糖蛋白特异染色发现,精液中含3种糖蛋白,精英基质中含2种糖蛋白。

**关键词:**中华绒螯蟹 精英蛋白 电泳

中图分类号:Q789 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)05-95-04

## The Fractionation of Spermatophore and Analysis of Proteins in Various Fractions in *Eriocheir sinensis*

CHENG Li-Jun KANG Xian-Jiang MU Shu-Mei GUO Ming-Shen ZHAO Xiao-Yu

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

**Abstract:** Various fractions of the spermatophore were isolated by the method of fractionation, and the soluble protein components of different fractions were analysed by SDS-PAGE in *Eriocheir sinensis*. Results showed that different parts of the spermatophore, including spermatophore matrix, seminal plasma and the whole sperm, had their own characteristic PAGE bands. In the staining of glycoproteins from seminal plasma and spermatophore matrix, there were three kinds of glycoproteins in seminal plasma and two in spermatophore matrix.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; Spermatophore proteins; Polyacrylamide electrophoresis

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,是我国特有的水产珍品,他以其优良的生物学品质、极高的营养价值和独特的风味蜚声海内外。近年来,随着河蟹养殖业在沿海各地蓬勃兴起,对其雄性生殖系统发育<sup>[1~4]</sup>、精子发生<sup>[5~7]</sup>及其形态结构<sup>[8~10]</sup>、精英形成<sup>[11~13]</sup>、胚胎发育<sup>[14]</sup>等方面进行了较详细的研究。但尚未见有对其精英蛋白组分方面的研究报道。鉴于此,本文对中华绒螯蟹的精英进行了分级分离,并对各部分的蛋白组成进行了 SDS-PAGE 分析,旨在为甲壳动物精子的发育与成熟机制及其精卵作用机制的研究提供资料。

## 1 材料与方法

**1.1 精英的获得及各部分的分级分离** 取成熟雄性河蟹(体重 80~100 g),解剖,从输精管和副性腺之间取得贮精囊。

用预冷的等渗 Tris-HCl 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)清洗贮精囊,置于离心管中,加缓冲液,剪碎,10 000 g 离心 10 min,上清即为精液,

基金项目 国家自然科学基金(No. 30371115),河北省自然科学基金(No. 303118);

\* 通讯作者, E-mail: xjkang@mail.hbu.edu.cn;

第一作者介绍 程立均,男,硕士研究生;主要研究方向:生殖生物学。

收稿日期 2004-12-20, 修回日期 2005-07-14

-20℃冻存以备电泳分析。

沉淀中加入预冷缓冲液,混匀,于培养皿中4℃静置1h后除去组织碎片,吸取分散精英至离心管中,用预冷的缓冲液漂洗,弃上清后,得到精英。

在精英沉淀中,加入5倍体积的预冷缓冲液(0.1 mol/L Tris 0.7% NaCl 0.5 mmol/L EDTA 0.1 mmol/L PMSF, pH 8.0),超声波冰浴匀浆,3 s × 5次(30 W),破碎精英使精子散出。静置10 min后,吸取沉淀上方的悬液,10 g离心10 min,以分离游离精子和凝聚沉淀的精英基质(含部分未破碎的精英),取上清同条件离心,然后再取上清,1 000 g离心10 min,将沉淀用预冷缓冲液离心洗涤3次以上,得到纯品精子,-20℃冻存。将精英基质沉淀再次进行超声波匀浆(破碎残留的精英),静置10 min,弃上清,用预冷缓冲液漂洗沉淀数次,沉淀即为精英基质,-20℃冻存。

在精英破碎的过程中,每一步处理后都进行显微镜检,以观察分离效果并拍照。

**1.2 SDS-PAGE 电泳分析** SDS-PAGE 采用7.5%凝胶浓度,对所有样品进行分析<sup>[15]</sup>。样品在浓缩胶中稳压100 V,进入分离胶后调整为150 V,4℃,电泳1 h左右。考马斯亮兰 R-250染色,7%乙酸中脱色。

精子、精英基质的电泳样品的制备:将SDS-PAGE 样品缓冲液加入沉淀的样品中,煮沸10 min后,反复多次通过7号注射针头,再煮沸10 min,10 000 g离心5 min后上样。

精液与样品缓冲液混合,100℃保温3 min

后直接上样。

**1.3 糖蛋白的检测** 电泳结束后,对精液、精英基质样品进行糖蛋白染色(PAS染色)<sup>[16]</sup>。方法如下:凝胶用1%高碘酸溶液氧化5 min,流水冲洗5 min,蒸馏水浸洗1 min,加入Schiff试剂染色15 min,入偏重亚硫酸钠漂洗液中脱色过夜,最后用蒸馏水浸洗。

## 2 结果与讨论

中华绒螯蟹雄性生殖系统主要由精巢、输精细管、贮精囊和射精管等几部分组成。输精细管的主要功能是分泌精液,而贮精囊分泌功能明显减弱,是储存精英的主要场所。成熟雄性河蟹贮精囊中充满精英与精液<sup>[13]</sup>,因此,本实验采用贮精囊为取材部位。成功地分离精英的不同组分是进行精英蛋白组分比较的前提,河蟹精英破碎的效果见图1。从图中可以看出,贮精囊剪碎后,大量精英散出,其精英呈椭圆形,由精子、精英基质组成,精子均匀分布于精英基质中,表面的精英基质浓缩成精英壁,故与内部精英基质之间并无明显界限(图1:a)。精英破碎后,大量精子散出并悬浮(图1:b),同时,油脂状无定形的精英基质凝聚沉淀下来(图1:c)。以上结果证明,本实验采用的分级分离方法能够较好地破碎精英,获得精子,同时沉淀精英基质。

在建立起分级分离精英蛋白组分方法的基础上,我们对中华绒螯蟹精英各部分的蛋白组分进行了初步分析。从图2可以看出,分级分离所

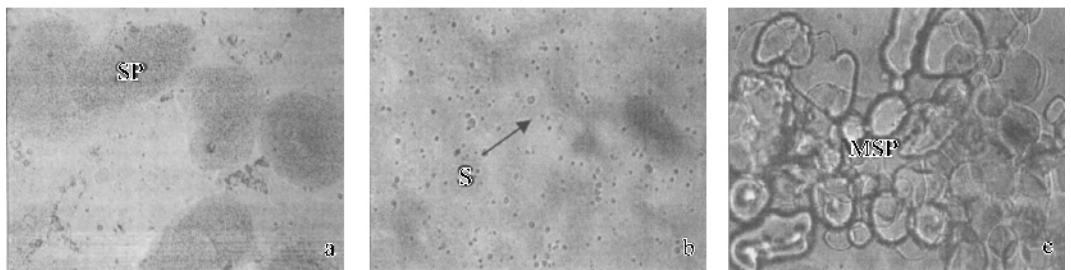


图1 精英破碎各阶段的显微镜图

a. 示贮精囊剪碎后,散出的精英×100;b. 示精英破碎后,散出的精子×250;c. 示精英破碎后,沉淀的精英基质×100;SP 精英;S 精子;MSP 精英基质。

得的精英不同部分(精子、精英基质、精液)的可溶性蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后,均有不同的特

征性谱带,且多次重复试验结果相近(图 2~4),因此,建立的分级分离方法是可行的。

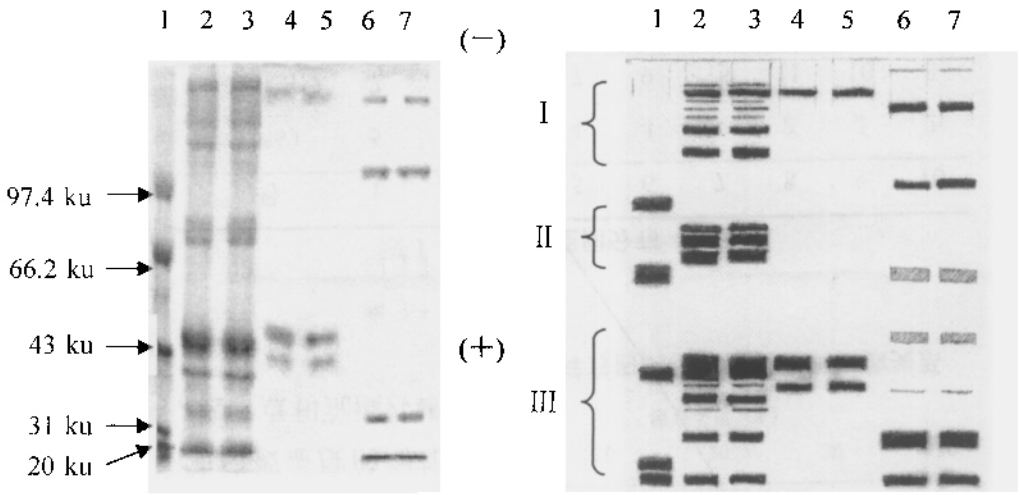


图 2 精英各部分蛋白组份的 SDS-PAGE 图谱(7.5%)  
1.Marker;2,3.精子(分为 I、II、III 3 个区);4,5.精英基质;6,7.精液。

中华绒螯蟹精子样品的 SDS-PAGE 电泳图谱显示的蛋白成分较多,可辨的主蛋白谱带约有 16 条,其他蛋白成分由于相对含量少,只显示了细弱的难以分辨的带纹。16 条主带从上至下大致可以分为 I、II、III 三个区(图 2:2,3):I 区 7 条蛋白带,分子量均在 97.4 ku 以上;II 区 3 条蛋白带,分子量在 66.2 ku 和 97.4 ku 之间;III 区 6 条蛋白带,分子量在 43 ku 以下。III 区相对有几条较深染的蛋白带,尤以第一条谱带宽、染色深、蛋白含量最大。而 I、II 区的蛋白成分相对含量较少。

精英基质经 SDS-PAGE 电泳分离后,主带约有 3 条(图 2:4,5),分子量 97.4 ku 以上 1 条,43 ku 左右 2 条。糖染显示分子量在 43 ku 左右的 2 条蛋白带为糖蛋白(由于 2 条带蛋白含量较大,且迁移率相近,所以看似 1 条带),说明精英基质的主要成分是粘多糖蛋白,碳水化合物是形成粘多糖物质的主要成分,因此有学者推测精英壁可能对精子也具有营养作用<sup>[12]</sup>。本实验的结果表明,精英基质主要由糖蛋白组成,但是,这些蛋白组分的功能,仍有待进一步研究。

从精液蛋白电泳图谱(图 2:6,7)可以看

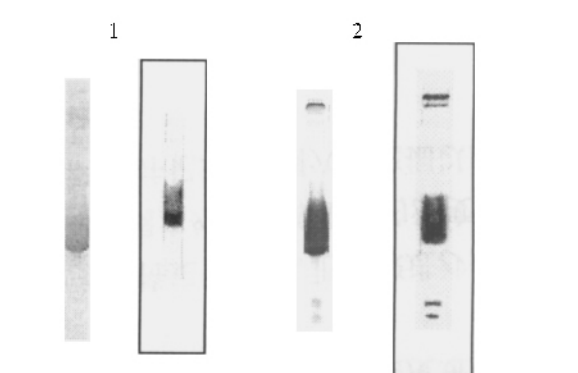


图 3 精英基质糖蛋白染色电泳图谱  
1.PAS 染色;2.考马斯亮蓝 R-250 染色。

出,泳道两端共有 5 条深染的主带,其中分子量在 97.4 ku 以上的 3 条,31 ku 左右的 2 条,中间则是一些很浅的蛋白带。比较精液和精子蛋白图谱发现,在部分蛋白带上,二者间具有一致性,比如 31 ku 左右的 2 条蛋白带虽含量不同,但迁移率相近,考虑到精子在输精管内移行过程中,精液中的某些蛋白组分会附着到精子上,从而成为精子蛋白的组分。糖染显示精液中含有 3 种糖蛋白组分(图 4)。精液作为精英和分散精子存活的生理环境,可能具有一定的营养功能,而精液蛋白多为糖蛋白,可能与此有关。

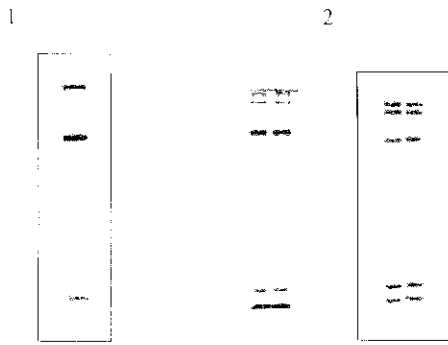


图4 精液糖蛋白染色电泳图谱

1. PAS 染色; 2. 考马斯亮蓝 R-250 染色。

在样品的制备过程中,对精荚超声波破碎的条件进行了摸索。通过不断镜检比较发现,精荚中加 5 倍体积缓冲液,超声波破碎效果较好。若缓冲液加的量少,容易造成精荚破碎不完全。另外,超声波匀浆处理精荚悬液,3 s × 5 次(30 W)的处理条件,可获得较理想的分离效果。若处理时间过短,大量精荚难以破碎,给精子收集造成困难;而处理时间过长,则可能对大量精子造成损伤,精子内可溶性蛋白溢出,破坏分级分离的效果。因此,3 s × 5 次(30 W)是较理想的条件。精荚匀浆后镜检发现,精子游离散出(图 1:b),而精荚基质相互聚集成块状物,与未破碎的精荚一起沉淀,将上清精子吸出后,通过对沉淀再次匀浆,破碎残留精荚,将游离精子洗去,就可以得到精荚基质(图 1:c)。这些发现将为甲壳动物精子悬液的获得提供借鉴。精子蛋白与遗传以及精子的质量密切相关,河蟹精子蛋白的研究对于河蟹的遗传育种具有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] 堵南山,薛鲁征,赖伟. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)雄性生殖系统的组织学研究. 动物学报, 1988, 34(4): 329 ~ 333.
- [2] 王群,赵云龙,陈立桥. 中华绒螯蟹雄性生殖系统生化组成及精子代谢. 水产学报, 2002, 26(5): 411 ~ 416.
- [3] 吴萍,楼允东,邱高峰. 中华绒螯蟹性腺发育的形态学、组织学和组织化学变化. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 106 ~ 112.
- [4] 王群,丁银娣,赵云龙等. 维生素 C 对中华绒螯蟹雄性生殖的影响. 动物学杂志, 2004, 39(2): 1 ~ 5.
- [5] 堵南山,薛鲁征,赖伟. 中华绒螯蟹精子的研究 II. 精子发生. 海洋与湖沼, 1988, 19(1): 71 ~ 75.
- [6] 吴萍,邱高峰,楼允东. 中华绒螯蟹促雄腺结构变化对精子发生的影响. 水产学杂志, 2002, 15(1): 88 ~ 92.
- [7] 王艺磊,张子平,李少菁. 甲壳动物的精子学研究概况 II. 精子发生与精子的生化组成. 动物学杂志, 1998, 33(4): 52 ~ 57.
- [8] 堵南山,赖伟,薛鲁征. 中华绒螯蟹精子的研究 I. 精子的形态及超微结构. 海洋与湖沼, 1987, 18(2): 119 ~ 124.
- [9] 刘芳,谈奇坤. 长江华溪蟹精子超微结构的研究. 动物学杂志, 1997, 32(1): 51 ~ 53.
- [10] 王艺磊,张子平,李少菁. 甲壳动物的精子学研究概况 I. 精子的形态与结构. 动物学杂志, 1998, 33(3): 35 ~ 43.
- [11] 王群,赵云龙,赖伟等. 中华绒螯蟹精荚的研究 I. 精荚发生的组织学与组织化学研究. 华东师范大学学报(自然科学版)动物学专辑, 1996, 12: 5 ~ 10.
- [12] 王群,赵云龙,黄勤等. 甲壳动物十足类精荚的研究概况. 海洋科学, 2000, 24(3): 22 ~ 25.
- [13] 王群,赵云龙,赖伟等. 中华绒螯蟹精荚形成的超微结构研究. 华东师范大学学报, 2000, (3): 98 ~ 103.
- [14] 田华梅,赵云龙,李晶晶等. 中华绒螯蟹胚胎发育过程中主要生化成分的变化. 动物学杂志, 2002, 37(5): 18 ~ 21.
- [15] 汪家政,范明主编. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.
- [16] 芮菊生,陈海明,李次兰等编著. 组织切片技术. 北京: 人民教育出版社, 1980.