

中国对虾(*Penaeus chinensis*)精子 ATP 酶活力与生殖关系的探讨*

冯北元¹ 徐慕禹¹ 朱谨钊² 周岭华² 刘旭东²

(¹ 中国科学院动物研究所 北京 100080)

(² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 首次报道了中国对虾精子存在有 Na,K-ATP 酶及 Mg-ATP 酶活力,并对其生物功能进行了探讨。对来自不同季节的雌虾纳精囊中精子的两种 ATP 酶活力进行了测定。酶分析的结果为春虾精子的 Na,K-ATP 酶活力为 $1.145 \pm 0.229 \mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{h}$,秋虾则为 $1.058 \pm 0.431 \mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{h}$;春虾精子的 Mg-ATP 酶活力为 $1.647 \pm 0.691 \mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{h}$,秋虾则为 $1.584 \pm 0.315 \mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{h}$ 。因此在表现上,春虾精子的两种 ATP 酶活力均略高于秋虾,但差异不够显著。

关键词 中国对虾,精子,ATP 酶

有关对虾雄性生殖生物学方面的研究,多数是采用形态学、组织学或组织化学的方法^[3,8],很少有生化水平的工作报道。迄今对虾类的生殖过程的本质还缺乏足够的理解,因此阻碍着大量有效繁殖工作的进展,例如已知雄虾精英中的精子自然情况下是在秋季交配后置入雌虾纳精囊内至次年春季才获得生育能力。这种与哺乳类精子需要在雌性生殖道内获能(Capacitation)的生理过程十分相似。虽然目前对哺乳类精子的“获能”已研究得比较透彻^[9],但对虾类精子的这种生理过程却依然所知甚少。最近 Lindsay, L. L 等对单肢虾(*Sicyonia ingentis*)精子的获能、顶体反应的机理开展了生化水平的研究^[5]。

ATP 酶是参与活细胞能量转换及离子转运的关键酶类,在哺乳类精子细胞中的 Na,K-ATP 酶及 Mg-ATP 酶均与精子的获能及顶体反应有关^[2,6,9],但目前对虾类精子中是否存在有 ATP 酶这一根本性的问题还未能得到答复,就更难讨论它们的生理功能。因此作者对中国对虾(*Penaeus chinensis*)精子是否存在有 ATP 酶,以及它们在精子获得生育能力过程中的变化进行了初步探讨,以填补对虾生殖生物学研究的这一空白,并预期对虾类的繁殖育种具有潜在的指导意义。

* 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室(EMBL)资助课题。瑞士 LKB 公司提供部分资助。实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 104 号。

收稿日期 1994 年 11 月 19 日

1 材料与方 法

1.1 材料 由中国科学院海洋研究所提供分别于春季(5月)及秋季(10月)在黄海捕捞的活对虾(剥离的纳精囊)。

1.2 药品 ATP二纳盐(Adenosine 5-Triphosphate, Disodium Salt)购自美国Sigma试剂公司。鸟本苷(Ouabain)为德国E. Merck厂出品。其他试剂均为分析纯。

1.3 收集精子 用眼科剪刀仔细剥离活体雌虾的纳精囊,立即置低温冰箱(-20℃)内保存。借助尖头镊子自冰冻的纳精囊内取出嵌在其中的精英,置入冰冷的人工海水内挤压出储存的精液。用擦镜纸过滤的精子悬浮液通过离心以收集沉淀(K,70 800g, 4℃,10min),并用人工海水洗涤2次,最后所得纯净的精子沉淀仔细悬浮在少量人工海水中分装后低温保存(-20℃)。每批精子制备均用伊红活细胞染色法,在光镜下检查证实95%以上为活的无鞭毛精子。

1.4 分析ATP酶活力 采用本实验室常规的ATP酶微量测定方法^[1],每管100μl酶的保温溶液中含NaCl 150mmol/L,KCl 20mmol/L,MgCl₂ 2mmol/L,Tris-HCl 50mmol/L,pH 7.4,在抑制Na,K-ATP酶的管中含有鸟本苷0.5mmole/L。各管置37℃水浴保温15min,加入冰冷的15%的三氯乙酸50μl以终止反应。无机磷含量的测定采用Muszbek方法^[7],蛋白质含量则采取Hartree^[4]的修正方法。酶活力单位表示方法为μmol Pi/mg·h,根据不加或加鸟本苷试管含磷量之差计算出Na,K-ATP酶活力。

2 结果与讨论

由于对虾在秋季交配后,雌虾纳精囊内的精子经过越冬到次年春季才获得受精能力,故将春季及秋季收集的雌虾纳精囊内的精子,作为获能及未获能的材料分别进行了ATP酶活性的测定。结果表明处于两种不同生理状态下的对虾精子均含有明确的能被镁离子激活的Mg-ATP酶,以及能被钠、钾离子激活并可被鸟本苷所专一抑制的Na,K-ATP酶活力。活力数据见表1、表2。

表1 春季对虾精子的各类ATP酶活力

Tab. 1 Mg, Na, K-ATPase in spermatozoa of *Penaeus chinensis* in spring

实验编码	ATP酶活力(μmol Pi/mg·h)	
	Mg-ATP酶	Na, K-ATP酶
1	2.557	1.040
2	1.803	1.498
3	1.438	0.938
4	1.498	0.920
5	1.219	0.920
6	2.377	1.338
7	2.557	0.938
8	0.679	1.258
9	0.699	1.458
平均值±SD	1.647±0.691	1.145±0.229

实验结果表明,春虾精子(已成熟及获能的精子)的Mg-ATP酶活力为1.647±0.691 μmol Pi/mg·h。而秋虾(应是尚未成熟及获能)则为

表2 秋季对虾精子的各类ATP酶活力

Tab. 2 Mg, Na, K-ATPase in spermatozoa of *Penaeus chinensis* in autumn

实验编码	ATP酶活力(μmol Pi/mg·h)	
	Mg-ATP酶	Na, K-ATP酶
1	1.262	0.668
2	1.389	0.668
3	1.732	0.612
4	1.533	0.650
5	1.533	0.614
6	0.848	0.613
7	1.587	1.279
8	2.002	1.731
9	1.714	1.585
10	1.371	1.623
11	2.164	0.830
12	1.317	1.658
13	1.858	0.883
14	1.822	1.478
15	1.623	0.974
平均值±SD	1.584±0.315	1.058±0.431

1.584±0.315 μmol Pi/mg·h; 春虾精子的 Na, K-ATP 酶活力为 1.145±0.229 μmol Pi/mg·h, 而秋虾为 1.058±0.431 μmol Pi/mg·h。从不同季节的对虾精子两种 ATP 酶活力的对比看来, 表观上春虾(即获能后)略高于秋虾(获能前), 但差别不够显著。

对实验结果的分析, 作者认为首先是证实了对虾精子存在有明显的 Na, K-ATP 酶及 Mg-ATP 酶活力。关于这些酶类在精子的受精过程中所承担的生物功能在哺乳类中已得到证实。如 Mrsny, R. J 等^[6]发现地鼠精子在获能过程中 Na, K-ATP 酶活力逐步上升, 他认为该酶与控制精子在获能及顶体反应过程中 K⁺的内流有关, 因为 K⁺的内流对完成获能或顶体反应是需要的, 并推论了依赖 K⁺内流产生的 H⁺质子外流改变了顶体细胞内的 pH 值, 这可能是激活顶体水解酶的机理, 顶体水解酶被激活则保证了精子穿卵并与之融合的过程。从作者的实验数据看来, 春虾精子(获能后)的两种 ATP 酶活力虽略高于秋虾(获能前), 但差别不够显著。这主要由于对虾类精子的获能所需要的时间还很了解, 因此如果今后能把取精子材料的时间选择为秋季的雄虾精英, 以及交配后很短一段时间内雌虾纳精囊的精子, 则有可能对精子在获能过程中的关键时刻(Critical time)内 ATP 酶活力的动态变化有新的更有意义的发现。

参考文献

- [1] 冯北元等, 1981. 生物化学与生物物理进展 2:48.
- [2] 杭海英, 1990. 中国科学 B 辑:28.
- [3] Haley Samuel R., 1986. *J. Morphol.* 190(1):81-92.
- [4] Hartree, E. F., 1972. *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
- [5] Lindsay, L. L Clark, W. H. Jr clark, 1992. *J. Exp. Zool* 262(2):219-29.
- [6] Mrsny R. J. and Meigel, S., 1981. *J. Cell Biol.* 91:77-82.
- [7] Muszbek, L. et al., 1977. *Anal. Biochem.* 77: 286-288.
- [8] Prudence Talbot, et al., 1980. *J. Ultrastructure Res.* 70: 287-297.
- [9] Yanagimachi R., 1988. Mammalian Fertilization, in "The Physiology of Reproduction". edited by E. Knobil and J. Noill et al., Raven Press Ltd. New York. PP. 135-185.

STUDIES OF THE RELATIONSHIP BETWEEN ATPASE AND RE- PRODUCTION IN SPERMATOOZOA OF *Penaeus chinensis*

Feng Beiyuan¹, Xu Mu Yu¹, Zhu Jinzhao², Zhou Linghua² and Liu Xudong²

(¹Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

(²Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Nov. 19, 1994

Key Words: *Penaeus chinensis*, Spermatozoa, ATPase

Abstract

This is a first reported that Na, K-ATPase and Mg-ATPase do exist in the spermatozoa of *Penaeus chi-*

nensis. The authors further investigated the changes of these enzymes during sperm maturation and/or capacitation in order to find the biological functions of them.

The preliminary results showed that the ATPase activity of sperm collected from spring season (Na, K-ATPase: 1.145 ± 0.229 $\mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{h}$; Mg-ATPase: 1.647 ± 0.991 $\mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{h}$) were higher than those from autumn (Na, K-ATPase: 1.058 ± 0.431 $\mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{h}$; Mg-ATPase: 1.584 ± 0.315 $\mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{h}$), however, the difference was not with statistical significance.

We have suggested that the changes of ATPase activity in shrimp sperm during autumn to next spring (represent before and after maturation and/or capacitation, respectively) might throw a light of the role of them in these biological process, because it is known that these enzymes are responsible for the energy support and ion flux transmembrane.