

文章编号: 1004-7271(2006)04-0488-05  
·研究简报·

## 精子膜蛋白在异精雌核发育银鲫中的作用

杨彦豪<sup>1,2</sup>, 孙效文<sup>1</sup>, 雷清泉<sup>3</sup>

- (1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023;
3. 哈尔滨理工大学材料科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘 要** 通过对雄性银鲫的新鲜精液进行分级抽提得到精子的不同组份,包括精浆、精头的膜、鞭毛和脱膜精头等,在荷包红鲤和雌性银鲫杂交时加入其中的可溶性精头膜蛋白组分,研究精子膜蛋白在雌核发育银鲫异源受精中的作用。研究发现,加入同源精子膜蛋白后的雌核发育银鲫异源受精卵的孵化率比对照组低很多,并且在子代培育过程中,发现了生长速度快、表型和父本相似、基因型基本和父本基因型相同的特殊子代。在某种程度上表明,精子膜蛋白可能是雌核发育银鲫卵子进行雄核发育的关键因素。

**关键词** 银鲫 精子膜蛋白;异精雌核发育;雄核发育

中图分类号 S 917 文献标识码: A

## Effect of the sperm proteins in allogynogenetic *Carassius auratus gibelio*

YANG Yan-hao<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-wen<sup>1</sup>, LEI Qing-quan<sup>3</sup>

- (1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070, China;
2. Life Science and Technology College, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China;
3. Material Science and Engineering College, Harbin Science and Technology University, Harbin 150080, China)

**Abstract** The sperm proteins were extracted from the fresh spermatid fluid of male gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) and various fractions were collected, the fractions include sperm plasma, sperm head membrane, flagella, and demembrated sperm head etc. in order to reveal the roles of the homologous sperm head membrane proteins to allogynetic fertilization in gynogenetic silver crucian carp. The soluble protein components of the sperm head membrane were mixed with sperms of purple red carp (*Cyprinus carpio* var *vuyuanensis*) and then this cocktail was fertilized to eggs of silver crucian carp. The obtained results show that the hatching ratio of the experimental group is lower than that of the control group. Furthermore, during the filial generation breeding, two special individuals which grow faster were found, the special individuals have the similar phenotype and genotype to their father. To a certain degree, sperm head membrane maybe is the key factor to the androgenesis of the gynogenetic silver crucian carp eggs.

**Key words** *Carassius auratus gibelio*; sperm membrane protein; allogynogenesis; androgenesis

收稿日期 2005-12-05

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30271010)

作者简介 杨彦豪(1979-),男,河北石家庄人,硕士研究生,专业方向为水产动物遗传育种学。E-mail: fhaoyh@sohu.com

通讯作者 孙效文, Tel: 0451-84862646; E-mail: sunxw2002@163.com

银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 是一种独特的雌核发育两性型种群, 具有天然雌核发育的生殖方式, 但又区别于营雌核发育生殖的其它单性物种。当其卵子用其它鱼类精子受精时, 其后代全为雌性, 而当其卵子与同种雄性个体的精子受精时, 后代中的雄性个体可达 20% 左右。目前细胞学上已经证明, 异源精子在银鲫卵子中精核高度固缩, 在整个受精卵发育过程中不发生变化, 而银鲫同源精子则可以解凝并能在一定程度上发育为雄性原核并与雌性原核接合, 从而实现一定的遗传物质的交换<sup>[1]</sup>。

近年来, 有关精子蛋白研究取得了很大进展, 在精膜、鞭毛和精子的细胞质及精子头部等部位均发现了具有与受精过程相关的功能性蛋白成分。其中精膜表面上存在的多种糖蛋白或糖复合物与精卵识别、结合以及质膜融合等受精活动密切相关<sup>[2]</sup>。如小鼠的 SP56、ZRK (p95) 和人、猪、马、狗的精子黏合素等在受精过程中要和卵子透明带进行特异性结合, 才能完成授精<sup>[3]</sup>; 人的受精素 (fertilin)、海胆的 MI、鲍的溶解素 (lysin) 等在精子进入卵子后与卵质膜相遇, 通过粘附作用使精子和卵子融合<sup>[3]</sup>。本研究通过对同源雄性银鲫的新鲜精液进行分级抽提, 分离出精子膜蛋白, 于银鲫异源精子受精时加入, 在对子代比较分析的基础上探讨雌核发育银鲫的特殊遗传方式是否与精子膜蛋白有关, 从而为深入研究银鲫遗传的分子机制提供线索。

## 1 材料和方法

实验所用银鲫和荷包红鲤均取自中国水产科学院黑龙江水产研究所江北养殖试验基地。

### 1.1 精子可溶性蛋白的分级分离

取性成熟的雄性银鲫, 以 500 IU/kg 的人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin, HCG) 进行催情, 在注射激素 12 h 后挤取精液, 收集于 1.5 mL 离心管中, 在 4 °C 下经过离心、洗涤、抽提液抽提等过程得到不同部位的可溶性蛋白, 具体操作步骤参照参考文献 [4]。用紫外分光光度计确定蛋白的浓度。为保证组分的纯度和分离效果, 在分级分离后, 通过 PAGE 凝胶电泳分析所得组分的纯度, 再进行下一步工作。

### 1.2 雌性银鲫异源受精

取发育成熟的雄性荷包红鲤和雌性银鲫注射性激素催情, 所用激素及其剂量同上。注射激素 12 h 后挤出精液和卵子, 分别置于干净平皿中, 取部分精液和卵子正常受精作为对照组; 剩余的精液和卵子在受精时加入分离得到的精子膜蛋白作为实验组。受精卵在 21 ~ 24 °C 的水浴中培育直至鱼苗破膜而出。

### 1.3 DNA 的提取

当获得的鱼苗在鱼池中养至 100 g 左右, 取其鳍条约 0.1 g, 经过经典的酚/氯仿抽提法提取得到基因组 DNA<sup>[5]</sup>。

### 1.4 PCR 扩增及电泳分析

PCR 扩增引物采用 Yue 等<sup>[6]</sup>分离得到的部分微卫星引物 (表 1)。建立 25  $\mu$ L PCR 反应体系, 含有 50 mmol/mL KCl, 10 mmol/mL Tris · Cl (pH 8.0), 1.5 mmol/mL MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ g/mL 的明胶, 4 种 dNTP 各 100  $\mu$ mol/mL, 上下游引物终浓度为 0.25  $\mu$ mol/mL, Taq 酶 1 U, 模板 30 ~ 50 ng。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。反应于 PE9700 型 PCR 仪上进行, 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

## 2 结果

### 2.1 受精卵发育过程的观察结果

在受精卵发育过程中,实验组受精卵大量死亡,到鱼苗能水平游动为止,实验组受精卵共孵化出鱼苗 50 尾(孵化率为 5.5%),其中 50% 为畸形苗。对照组受精卵在发育过程中虽然死亡也很严重,但相对于实验组,死亡率要小很多。

表 1 8 对微卫星引物及其 PCR 反应条件

Tab.1 Primers of eight microsatellites DNA and conditions of PCR

位点	引物序列(5'-3')	重复序列	产物大小(bp)	退火温度(℃)
Cca02	F: ATGCAGGGCTCATGTTGCTCATAG R: GCAGACAGACACGTTGCTTCTCG	(TA) <sub>20</sub>	173 ~ 194	50
Cca04	F: ATCCCTTACCGCCCTGTGT R: AGCTGAAAAACGCTGTCAGG	(TA) <sub>24</sub>	224 ~ 258	50
Cca67	F: GTAGCCCCAAAAGATGTAGCA R: TGGTCAAAGTTCAGAGGCTGTAT	(CA) <sub>30</sub>	228 ~ 254	55
Cca72	F: CAGGCCAGTACTATCATCATCAA R: CTGCTGTTGGATATGCACTACATC	(GATA) <sub>9</sub>	244 ~ 299	55
Cca80	F: ACCGAACGGAGACTCTCACCTTCC R: CTCGCCATCTTCCTCTGCCTCCTC	(GAA) <sub>9</sub>	144 ~ 184	50
Cca84	F: GTGGCCAGCGCTGATGTGT R: CGAGCCGGAAGAGTTGAGTGATG	(CA) <sub>7</sub>	103 ~ 103	50
Cca86	F: GTATTCTCTGCTTTCACAAA R: CACTTCATGCACTCGTTCACC	(AC) <sub>10</sub>	186 ~ 196	55
Cca90	F: CCTCTGCCACAGTGCCAGTG R: AGGCCACAGACAAGATACCA	(AC) <sub>12</sub>	207 ~ 215	55

### 2.2 鱼苗培育生长过程的观察结果

实验组在鱼苗培育过程中,畸形苗全部死亡,在存活的鱼苗中发现 2 尾特殊个体,它们除体色之外的其它表型特点均和其父本荷包红鲤相似(图 1),正常同组个体见图 2,在培育过程中发现此 2 尾鱼的生长速度明显比同组的其它个体快(表 2)。在对照组中,并未发现特殊个体,并且对照组中的个体生长速度也比实验组低。

### 2.3 PCR 扩增结果

利用 8 对微卫星引物对实验组亲本和子代基因组进行 PCR 扩增分析,发现在实验组中除了其中的鲤鱼型个体的基因型和母本不一样外,其他子代的基因型和母本的基因型是一样的。在 Cca04 位点上,鲤鱼型个体的基因型由母本和父本的基因型组合而成(图 3),在 Cca02、Cca67 等其他 7 个位点上,可明显看出鲤鱼型的个体的基因型和其父本相同,而其他个体的基因型和其母本相同(图 3)。



图 1 实验组得到的鲤鱼表型子代个体

Fig. 1 Special individual in the experimental group

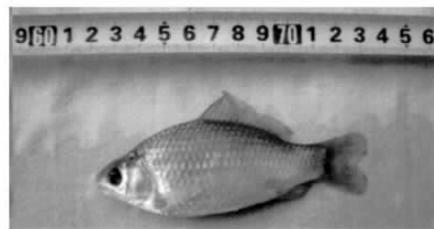


图 2 实验组得到的正常银鲫个体

Fig. 2 Normal silver crucian carp individual in the experimental group

### 3 讨论

在自然界中,雌核发育是动物界少有的繁殖方式,银鲫就是一种雌核发育鱼类。在种间杂交时,异源精子在银鲫卵中不能启动发育,精核高度固缩,从而呈现出典型的雌核发育过程,而在种内自交情况下,同源精子则可以解凝,并能与卵核接合。但是,鱼类雌核发育作为一种特化的繁殖适应机制,它的进化地位与有性繁殖和孤雌生殖保持联系。因此,雌核发育机制具有相对稳定性<sup>[7]</sup>,在特定条件下,雌核发育鱼类也许会表现出两性杂交或雄核发育。人工诱导获得酷似母本的异育银鲫四倍体杂种<sup>[8]</sup>和具有一整套父本红鲤染色体的复合四倍体异育银鲫(出现率为0.2%)<sup>[8,9]</sup>的发现便是很典型的例子,证明银鲫雌核发育也是具有相对稳定性的<sup>[9]</sup>。

表2 实验组中特殊个体和正常个体体长、体重对比

Tab.2 Contrast between special individual and normal individual on their length and weight

正常个体	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	特殊个体
体长(cm)	12.5	10.5	12.5	11	10	11	10.5	10.5	11.06	19.5
体重(g)	26.7	22.9	30.6	22.6	19.9	22.1	23.3	22.3	23.8	133.1

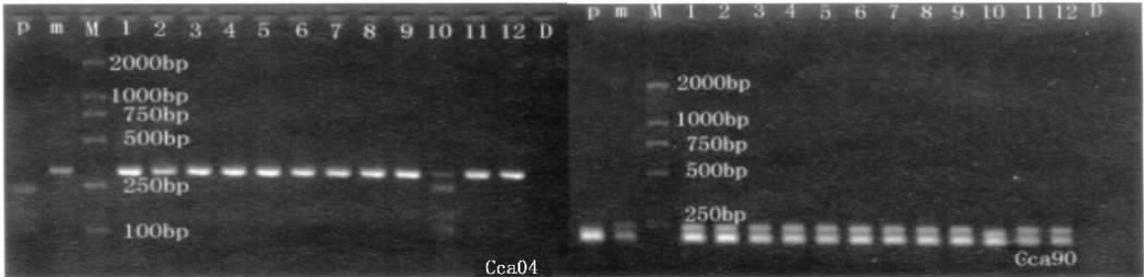


图3 引物 Cca04、Cca90 扩增的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.3 Electrophoretogram of microsatellite marker amplified by Cca04 and Cca90  
p:父本(红鲤);m:母本(银鲫);M:Marker;1-12:个体(第10个为特殊个体)

关于银鲫雄核发育的报道目前还不多,1985年进行异育银鲫(♀)和兴国红鲤(♂)人工杂交时,获得占0.61%的杂交种,其中有1尾为无须鲤,当其性成熟后产卵与鲫(♂)杂交后,获得了大量正常的银鲫杂交种<sup>[10]</sup>。单仕新<sup>[11]</sup>等也报道在三倍体方正银鲫(♂)和二倍体红鲤(♀)杂交时,获得2尾体色青灰色的鲫鱼,此2尾鱼也可能是雄核发育的结果。俞豪祥等<sup>[12]</sup>在用鲫(♀)和异育银鲫(♂)杂交时产生了部分雄核发育异育银鲫,他们推测独特的天然雌核发育生殖背景的异育银鲫,其部分精子既脱离了卵质的抑制作用,同时又得益于近亲鲫相似遗传背景的特殊条件,很可能受到雌核发育调控系统和两性生殖调控系统的双重影响,其结果表现出一定比例的雄核发育。

在本实验中,出现了2条特殊子代,根据特殊子代的鲤鱼表型和所检测7个位点与父本鲤鱼的基因型相同,推断这两尾鲤鱼表型的个体是鲤鱼精子的雄核发育产生的个体,对于有1个位点检测所得鲤鱼表型个体的基因型由父、母本基因型组成,可能解释为受精卵在雄核发育过程中可能融入了部分母本基因。与过去相比,本实验采用方正银鲫(♀)和荷包红鲤(♂)的杂交组合,并且产生雄核发育子代的比例相当高(占8%左右),但是鉴于得到的子代成活个体数较少,这一比例还有待于进一步验证;与对照组相比,实验组中出现了雄核发育特殊个体,而对照组中未发现雄核发育个体。从某种程度上可以推测,精子膜蛋白在雌核发育银鲫异源受精产生雄核发育特殊子代过程中起着非常重要的作用。当然,本实验结果虽然可以认为精子膜蛋白在雌核发育银鲫异源受精产生雄核发育特殊子代过程的作用很重要,

但是到目前还不能确定精子膜蛋白是通过什么途径、什么机理来起作用的。精子膜蛋白是通过具体哪个可溶性组分来起作用的,而且产生的特殊子代还需要对其性别、生殖方式等继续作深入研究。因此,要全面了解银鲫雄核发育的遗传学机制,得出正确的结论,还需要更为深入的探索。

#### 参考文献:

- [1] 葛伟,桂建芳,朱蓝菲,等. 复合四倍体异育银鲫两种不同生殖方式的细胞学观察[J]. 动物学报,1994,40(1):69-76.
- [2] 赵明,孙册. 猪精子中与卵透明带糖蛋白 ZP3 结合的蛋白质[J]. 生物化学与生物物理学报,1996,28(2):145-152.
- [3] 程立均,康现江,赵晓瑜. 精子膜表面蛋白的研究进展[J]. 动物学杂志,2003,38(6):125-128.
- [4] 杨书婷,桂建芳. 雌核发育银鲫和两性生殖彩鲫精子蛋白组份的比较研究[J]. 动物学报,2001,47(1):79-84.
- [5] Sambrook, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Yue G H, Ho M Y, Laszlo Orban, et al. Microsatellite within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp[J]. Aquaculture, 2004, 234: 85-98.
- [7] 蒋一珪,梁绍昌,陈本德,等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应[J]. 水生生物学集刊,1983,8(1):1-13.
- [8] 俞豪祥,徐皓,关宏伟,等. 鱼类染色体工程的研究——人工诱导天然雌核发育异育银鲫四倍体杂种[A]. 全国生物农业应用学术讨论会论文集[C]. 北京:中国科学技术协会学会部,1995. 309-313.
- [9] 丁军,蒋一珪,单仕新,等. 复合四倍体异育银鲫产生的细胞学机制[J]. 水生生物学报,1992,16(2):186-188.
- [10] 俞豪祥,张海明. 雌核发育银鲫出现杂种[J]. 水产科技情报,1994,21(3):471-479.
- [11] 单仕新,梁绍昌,蒋一珪,等. 三倍体方正银鲫(♂)同二倍体红鲫(♀)杂交胚胎的非整倍体发育[J]. 水产学报,1985,9(2):199-202.
- [12] 俞豪祥,吴锦忠,李平,等. 雄核发育异育银鲫及其初步应用[J]. 水产学报,2000,24(1):17-22.

### 欢迎订阅 2007 年《动物学报》

《动物学报》于 1935 年创刊,由中国动物学会和中国科学院动物研究所共同主办,是我国动物学领域中历史最悠久、最具权威性的学术刊物之一,在国内国外有广泛的影响。据中国科学技术信息研究所 2004 年公布的数据,本刊影响因子为 0.873,在 51 种生命科学期刊中排名第 6,在 1576 种源刊物中排名第 96,并获得“百种国家杰出期刊”荣誉称号。

《动物学报》为动物学研究领域的综合性学术期刊,主要刊登原创性的研究论文,优先发表创新突出、理论性强和有关中国特有动物的研究论文,并刊登特定研究领域中的综述(以特约稿为主)。主要领域包括:生态学和行为学,系统学和动物地理学,生理学和生物化学,生殖、发育和衰老生物学,遗传、细胞和分子生物学,主要栏目为综述、研究论文、观点与方法、研究简报。

《动物学报》可全文免费下载网址([www.actazool.org](http://www.actazool.org)),双月刊,大 16 开本,双月下旬出版,国内、外发行,每期定价 49 元。邮发代号 2-497,全国各地邮局均可订阅,也可与编辑部联系补订或补刊等有关事项。

地 址:100080 北京海淀北四环西路 25 号《动物学报》编辑部

电 话:010-62624530,

E-mail:zool@ioz.ac.cn