

# 罗氏沼虾 MSG 蛋白对精子明胶水解活性影响的功能

杨帆<sup>①\*</sup>, 钱叶青<sup>①\*</sup>, 马文明<sup>②</sup>, 李晔<sup>③</sup>, 杨劲树<sup>①</sup>, 杨卫军<sup>①†</sup>

① 濒危野生动物保护遗传与繁殖教育部重点实验室, 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058;

② 浙江大学舟山海洋研究中心, 舟山 316021;

③ 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波大学生命科学与生物工程学院, 宁波 315211

\* 同等贡献

† 联系人, E-mail: w\_jyang@cls.zju.edu.cn

2012-02-14 收稿, 2012-05-31 接受

国家重点基础研究发展计划(2010CB833803)、国家自然科学基金(40730212, 30901093)和浙江省海洋生物技术产业科技创新团队基金(2010R50029, 2012R10029-14)资助

**摘要** 雄性生殖系统中的蛋白酶被认为在生殖过程中起着十分关键的作用. 不同于哺乳动物生殖系统的蛋白酶, 甲壳类精子酶类的研究相对较少. 在先前的研究中, 我们鉴定了一种新型的罗氏沼虾精子明胶酶(MSG), 发现它可以特异地被 MRPINK 抑制. 然而, MSG 参与到生殖过程的功能仍未阐明. 本研究 Western blotting 的结果显示, MSG 蛋白分布在雄性生殖系统的输精管和壶腹中, 在精巢中没有分布; 免疫组化和免疫荧光技术结果表明, MSG 只分布在输精管和壶腹的内壁表皮细胞核精子的基部. 为进一步研究 MSG 在罗氏沼虾体内的生理功能, 采用 RNA 干涉的方法使 MSG 基因沉默, 通过半定量 PCR 和 Western blotting 检测发现, 干涉后个体内 MSG 核酸水平和蛋白水平与对照组相比均下降了 80% 以上. 利用明胶 SDS-PAGE 和明胶薄层分析方法发现, 干涉后精子的蛋白水解活力明显降低. 以上结果表明, MSG 在罗氏沼虾精子的水解蛋白活性方面起着重要作用.

## 关键词

受精  
RNAi  
精子蛋白水解酶  
雄性生殖系统

哺乳动物精子的蛋白酶参与受精过程的理论被广泛接受, 这是因为蛋白酶抑制剂和蛋白酶的基因敲除会对受精过程有负调控<sup>[1]</sup>. 在小鼠模型中, 许多蛋白酶备受关注, 包括 Acrosin, TESP5/PRSS21 及纤溶酶原激活剂(PA)<sup>[2-4]</sup>. Acrosin 是一种顶体酶, 它的缺失将导致体外实验中受精早期精子穿过透明带的延迟<sup>[5]</sup>. TESP5/PRSS21 是另外一种精子丝氨酸蛋白酶, 作为一种 GPI 锚定蛋白定位在精子膜上<sup>[3]</sup>. 缺失 Prss21 小鼠(*Prss21*<sup>-/-</sup>)的附睾精子在体外实验中的受精能力严重缺陷<sup>[6]</sup>. 除了哺乳动物精子酶类的研究, 精子蛋白酶也从许多非哺乳动物中获得, 比如鸟类<sup>[7]</sup>、鱼类<sup>[8]</sup>、海鞘类<sup>[9]</sup>和虾类<sup>[10,11]</sup>. Spermisin 是一种来自海鞘精子的、类似于 trypsin 的蛋白酶, 它参与了海鞘精子穿透卵黄膜这一受精过程<sup>[12]</sup>. 此外, 在

岩虾(*Rhynchocinetes typus*)的精子抽提物中, 一种类似于 trypsin 的蛋白酶被认为是精子穿透卵黄膜的参与者<sup>[10]</sup>.

哺乳动物的受精涉及一系列复杂的分子和细胞活动, 包括精子穿过卵丘、附着在透明带上、顶体反应的发生、精子穿过透明带和最后的精子和卵子质膜的融合, 最终形成一个受精卵<sup>[13,14]</sup>. 与哺乳动物运动型的精子不同, 非运动型的精子系统研究很少, 特别是在十足目甲壳纲中(比如小龙虾、螃蟹、龙虾和对虾)<sup>[15]</sup>. 再者, 十足目生物的受精过程与那些运动型精子的生物有很大程度的差异. 正如上面提到的, 十足目甲壳类的精子是非运动型的, 没有鞭毛, 所以不具有像运动型的精子一样游向卵子的能力. 除此之外, 十足目甲壳类生物的受精发生在体外, 这又是区

**引用格式:** 杨帆, 钱叶青, 马文明. 罗氏沼虾 MSG 蛋白对精子明胶水解活性影响的功能. 科学通报, 2013, 58: 1492-1497

**英文版见:** Yang F, Qian Y Q, Ma W M, et al. MSG is involved in sperm gelatinolytic activity in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Chin Sci Bull, 2013, 58: 2113-2118, doi: 10.1007/s11434-012-5597-x

别于哺乳动物的一大显著特征。因此,在非运动型精子这样一个模型中揭示涉及蛋白酶和蛋白酶抑制剂的受精机制显然十分有趣。

在前期的研究中,我们鉴定了一种罗氏沼虾雄性生殖相关的 Kazal 型蛋白酶抑制剂(MRPINK)<sup>[16]</sup>,它能够抑制罗氏沼虾的精子的明胶和蛋白水解活性。除此之外,我们还发现,一种新型的精子明胶酶(MSG)可以被 MRPINK 特异性地抑制<sup>[11]</sup>。Northern blotting 结果显示,MSG 基因特异地表达在雄性生殖系统中:精巢、输精管、壶腹。原位杂交结果说明,MSG 的 mRNA 定位在输精管和壶腹的上皮分泌细胞。然而,MSG 在罗氏沼虾受精过程中的作用仍然有待阐明。

本研究揭示了 MSG 蛋白在雄性生殖道及精子上的分布情况。为了研究 MSG 的功能,我们采用了 RNA 干涉的方法。精子的明胶水解活性、受精率和胚胎发育情况等多项指标被检测。我们也对 MSG 可能具有的功能进行了讨论。

## 1 材料和方法

(i) 实验材料。成熟的罗氏沼虾购于浙江省杭州市袁浦罗氏沼虾养殖基地(体重 20~35.5 g)。实验进行之前罗氏沼虾在水循环系统(通氧, 28±1 °C, 光照:黑暗=14:10 h)中至少培养一周以上,每天投饵 2 次。

(ii) 抗体制备。根据罗氏沼虾 MSG 的 cDNA 序列,设计两条引物 MSG-PF (5'-CGCGGATCCGACGAAGACCTTGCTTCCGAA-3', 带有 *Bam*H I 酶切位点)和 MSG-PR (5'-CCGGAATTCCTCACTGCTTCTTCTTGGGACA-3', 带有 *Eco*R I 酶切位点)扩增 MSG 的 ORF。将扩增后的片段接入 pET-28a(+)(Novagen)载体。在 *E. coli* BL21 (DE3)中诱导表达带有 His6-tag 的 MSG 融合蛋白。利用 Ni-NTA(Qiagen)纯化后,对兔子进行免疫获得 MSG 的多克隆抗体(HuaAn Biotechnology Co. Ltd.)。

(iii) SDS-PAGE 和 Western blotting。将性成熟的雄性罗氏沼虾置于冰浴中 1~2 min,轻微麻醉后取其雄性生殖系统,分段后分别冻于液氮中。各部分样品于液氮中研磨成粉末后,用 2×Protein loading buffer (0.2 mmol L<sup>-1</sup> DTT, 4% (W/V) SDS, 0.2% (W/V) 溴酚蓝, 20% (V/V) 甘油, 0.1 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6.8)溶液提取总蛋白。样品上样量 50 μg 于 12.5%凝

胶中电泳分离蛋白质样品。电泳结束后,使用半干转系统将经电泳分离的蛋白转至 PVDF 膜上。随后分别将膜转移到含有 MSG 一抗和 α-tubulin 一抗的溶液中, 4 °C 过夜杂交。杂交信号检测按照 BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Roche Diagnostics GmbH)说明书进行。

(iv) 免疫组化。输精管和壶腹组织包埋于 TissueTek OCT 复合物(Sakura Finetechical Co. Ltd)中,在冷冻切片机上切成 8 μm 厚的切片。经乙醇梯度脱水后,分别与 MSG 一抗和羊抗兔 AP-conjugated 二抗(Promega Corporation)共同孵育,加入显色底物 NBT/BCIP 暗处显色。

(v) 免疫荧光定位。取成熟的雄性罗氏沼虾,用镊子轻轻挤压第 5 步足基部,取出精荚,切成断片,碾碎以释放出精子。用血涂片法将精子均匀地涂布在载玻片上,室温干燥。将涂有精子的载玻片在多聚甲醛中固定 10 min, PBS 洗涤 2 次。按照前述免疫组化的方法进行抗体杂交,二抗使用带有绿色荧光标记的羊抗兔 IgG (1:100),充分洗涤之后,荧光显微镜下观察。

(vi) RNA 干涉。根据罗氏沼虾 MSG 分子的 cDNA 序列设计 RNAi 用引物 RNAi-PF (5'-GCTC-TAGACGGTGGGAATCCTCTTGTTT-3', 带有 *Xba* I 酶切位点)和 RNAi-PR (5'-CGGGATCCGGCGTCAA-TGATGCTTACCA-3', 带有 *Bam*H I 酶切位点),以壶腹组织的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。将得到一段 350 bp 的 DNA 片段接入 pET-T7 载体中。同时通过引物 GFP-F (5'-GGAATTCAACTTACCCTTAATTTA-TTTGC-3')和 GFP-R (5'-GCTCTAGAGCCATTCTT-TGGTTTGTCTC-3')扩增一段 359 bp 的 GFP 序列,也将其导入 pET-T7 载体。MSG 双链 RNA 和 GFP 双链 RNA 的制备参照文献[17]。

取健康成熟的雄性罗氏沼虾(体重 25~35 g)进行 RNAi 实验。根据第 5 步足生殖孔的有无选择 40 只雄性罗氏沼虾,注射前在培养箱中适应一星期。而后,取 20 只雄虾每只经头胸甲基部腹膜注射 2 μL (10 μg MSG 双链 RNA 溶于 0.9% (W/V)生理盐水中);对照组也取 20 只雄虾每只注射等量的 GFP 双链 RNA。实验组和对照组均放回水循环培养系统中培养,4 周后进行干扰效率检测。

(vii) 明胶 SDS-PAGE。根据文献[10]报道的方法,配制含 0.1%明胶的 SDS-PAGE 分离胶(12.5%)。

破碎壶腹中的精英, 于 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.4 的缓冲液中冰浴超声破碎 10 min. 产物于 4℃, 12000 × g 离心 10 min, 上清液即精子抽提物, 储存于 -80℃ 备用. 取 20 μg 的精子提取物上样, 在 20 mA, 4℃ 和非变性条件下电泳. 电泳结束后, 将凝胶置于 2.5% Triton-X-100 的 0.1 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液中, 室温平衡 1.5 h. 用 0.1 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液充分洗涤后, 将凝胶置于含 5 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 和 0.2 mol L<sup>-1</sup> NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液中于 37℃ 反应过夜. 最后, 凝胶用考马斯亮蓝染色, 脱色.

(viii) 明胶薄层分析. 根据文献[18]报道, 精子对明胶的水解作用通过明胶薄层法进行分析. 取出壶腹中的精英, 破碎后得到游离的精子. 取 40 μL 实验组和对照组的精子悬液均匀地涂布在明胶薄层上, 室温下水平放置 10 min. 然后将此明胶板放于湿盒内, 37℃ 反应过夜. 明胶板在倒置显微镜(Nikon Eclipse TE2000-S)下观察.

## 2 结果

### 2.1 MSG 蛋白在雄性生殖系统中的分布和组织定位

利用 Western blotting 的方法检测 MSG 蛋白在罗氏沼虾雄性生殖系统不同部分中的分布情况(图 1(A)). 结果表明, MSG 蛋白分布在雄性生殖系统的输精管和壶腹中, 精巢中没有分布(图 1(B)). 免疫组化检测结果显示, MSG 蛋白分布在输精管和壶腹内壁表皮分泌细胞和精子中(图 1(C), a 和 b), 在精荚壁上没有分布.

### 2.2 MSG 在精子上的定位

取罗氏沼虾壶腹部的精子进行免疫荧光检测. 成熟的罗氏沼虾精子呈浅漏斗形, 包含锥形的基部(base)和细长的棘状部(spike)<sup>[19]</sup>. 免疫荧光结果显示, 精子基部的突出部位有很强的荧光信号, 而在棘状部信号很弱. 没有与 MSG 抗体共同孵育的精子则检测不到信号(图 2).

### 2.3 MSG 干涉后的罗氏沼虾精子明胶水解活性明显下降

取雌性罗氏沼虾进行 MSG 基因的 RNAi 干涉,

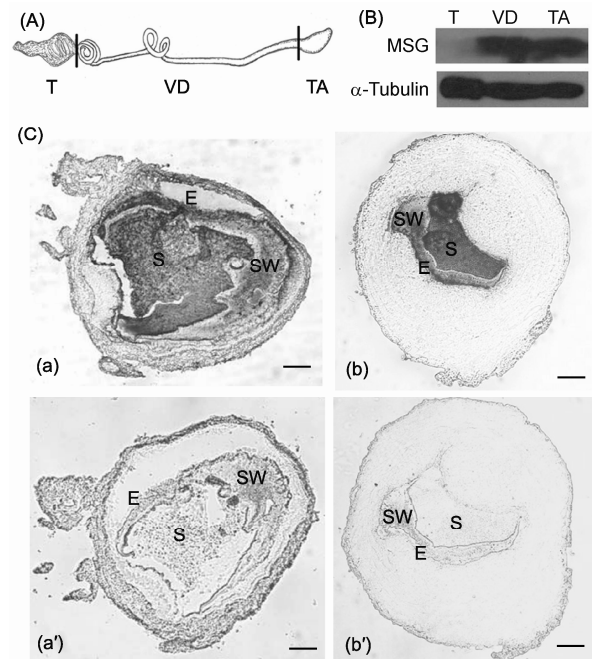


图 1 MSG 蛋白在雄性生殖系统中的分布和组织定位 (A) 罗氏沼虾雄性生殖系统简图. T, 精巢; VD, 输精管; TA, 壶腹. (B) MSG 蛋白在雄性生殖系统中 3 个部位的分布. 上样量均为 50 μg, 使用抗 MSG 抗体杂交. 肌动蛋白抗体作为对照. (C) 免疫组化分析. 输精管(a)和壶腹(b)样品切片使用抗 MSG 抗体检测. 在未使用 MSG 抗体检测的切片中没有信号. 比例尺, 50 μm. VD, 输精管; TA, 壶腹; E, 分泌细胞; SW, 精荚壁; S, 精子

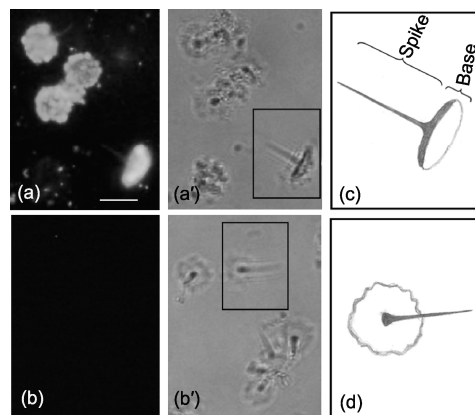


图 2 MSG 蛋白在精子上的免疫定位 在精子的基部突出部位观察到免疫荧光信号(a). 在没有和抗 MSG 抗体共同孵育的精子样品中没有观察到荧光信号(b). (a')和 (b')光学显微镜下的精子图像. (c)为(a')的局部放大示意图. (d)为 (b')的局部放大示意图

注射后不同时期取壶腹组织样品, 检测 RNA 干涉效率. 为了去除已经存在壶腹部的先前生成的精子的干扰, 取样前将雄虾与雌虾进行 3~5 轮的交配. 结果

显示, 在干扰后的样品中, MSG 基因水平和蛋白水平, 与对照相比, 均下降 80%以上(图 3(a)和(b)).

虽然 MSG 干扰后的精子和对照组精子在受精能力以及后续的胚胎发育过程没有明显区别(结果未显示), 但是我们发现干扰组的精子的明胶水解活性有显著的降低. 我们通过明胶 SDS-PAGE 和 Western blotting 的结果, 对照确定 MSG 的位置. 结果发现, 对照组的明胶图谱上主要形成 2 个降解带, 大的约为 20 kD, 小的则为 18 kD, 这 2 个条带在干扰组中几乎都消失(图 3(c)), 其中 20 kD 大小的条带确认为 MSG. 与此同时, 通过明胶薄层分析, 我们发现 95%的对照组精子可以形成晕轮, 而干扰组的精子无法形成晕轮. 这个结果表明 MSG 主要负责明胶降解活性, 并提示其在受精过程中可能参与了精子的活性(图 4).

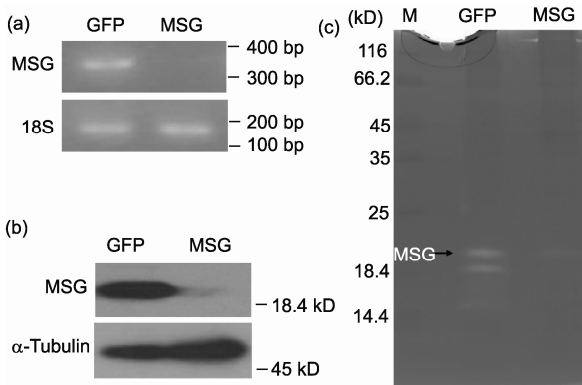


图 3 MSG 干扰组及 GFP 干扰组精子抽提物的区别

(a) MSG RNA 干扰组和 GFP 对照组 MSG mRNA 水平检测. (b) MSG RNA 干扰组和 GFP 对照组 MSG 蛋白水平检测. 肌动蛋白抗体作为对照. (c) 明胶 SDS-PAGE 图谱. 图中箭头所指为 MSG. MSG 条带在 MSG RNA 干扰组中没有发现. M 示分子量 marker

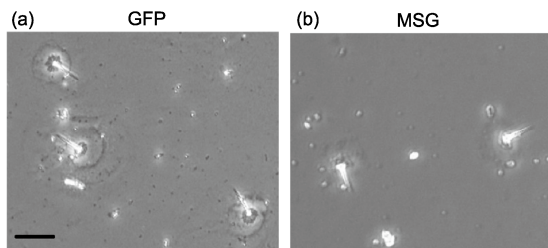


图 4 GFP 和 MSG 干扰组精子在明胶薄层分析中的明胶水解酶活力

(a) 对照组精子. 可以在精子基部看到清晰的晕轮. (b) RNA 干扰后产生的精子不产生晕轮. 比例尺, 15  $\mu\text{m}$

### 3 讨论

有很多研究者报道虾类的受精过程中有蛋白酶的参与, 但是与受精相关的蛋白酶的分子特征只在罗氏沼虾中有被报道<sup>[11]</sup>. 选择精子明胶酶作为研究目标的主要原因是它会被同处于雄性生殖道中的蛋白酶抑制剂 MRPINK 特异性地抑制. 在前期的研究中, 我们确定了 MSG 的序列和 mRNA 水平的表达特征. 然而, MSG 在受精过程中的作用仍未被阐明<sup>[11]</sup>.

本研究利用 Western blotting 的方法研究了 MSG 蛋白在雄性生殖道中的分布情况, 结果发现其仅在输精管和壶腹中有分布, 而在精巢中没有分布(图 1(B)). 免疫组化结果显示, MSG 蛋白定位于输精管和壶腹的上皮内分泌细胞和精子中(图 1(C)). 这些结果与我们原先的研究结果一致: (1) MSG 的 mRNA 表达在输精管和壶腹中; (2) MSG 原位杂交的信号分布在输精管和壶腹的上皮分泌细胞. 通常, 生殖系统的上皮细胞会分泌许多复杂的调节因子进入到管腔中, 修饰已存在的蛋白或者维持精子成熟所需的特殊微环境<sup>[20]</sup>. MSG 的氨基酸序列信息分析显示其 N 末端含有一个 20 个氨基酸的信号肽, 推测 MSG 在生物体内可能是以分泌型蛋白的形式存在<sup>[11]</sup>. 因为 MSG 蛋白定位在精子上, 我们推断 MSG 不是来源于精子的, 而是精子在雄性生殖道转运过程中从上皮分泌细胞中获得的.

罗氏沼虾的精子没有鞭毛, 属于非运动型, 在外形上呈浅漏斗形, 可分为锥形的基部和细长的棘状部. 基部主要是杯状核物质, 棘状部主要是蛋白质<sup>[19]</sup>. 免疫荧光结果显示, MSG 主要定位在精子基部(图 2). MRPINK 的定位类似于这个结果, 也是定位在精子基部<sup>[11]</sup>. 考虑到 MSG 的活性会特异性地被 MRPINK 所抑制, 我们推测 MSG 在雄性生殖道中受到 MRPINK 的调节.

本研究利用 RNA 干扰技术进一步开展 MSG 在受精过程中的功能研究. 将体外合成双链 RNA 注射到成熟的雄性罗氏沼虾体内, 将这些 MSG 基因沉默的雄性罗氏沼虾与正常的雌虾交配后, 发现由这些 RNAi 干扰组的雄虾交配产生的胚胎发育过程也和对照组的没有区别(结果未显示). 然而精子抽提物的明胶电泳发现, 干扰组精子的 MSG 明胶水解活性远远低于对照组的精子(图 3(c)). 对照组的精子可以在明胶薄层上形成晕轮, 而 RNA 干扰组的精子却无法形

成晕轮(图 4)。这些现象表明, MSG 与单个精子明胶水解酶活力相关。这个结果也与我们先前的研究相吻合: MRPINK 处理过的精子失去了降解明胶的能力<sup>[11]</sup>。因此, 我们推测 MSG 在精子的蛋白水解活性方面起到了很重要的作用。

为什么尽管干扰组的雄虾在体外精子有功能缺陷, 但与正常雌虾交配后受精率却没有变化? 可能如 Cesari 等人<sup>[21]</sup>假设的那样, 一个酶的活性的关闭则会引发另一个酶活性的替代行为。最经典的例子是 acrosin, 长期以来都被认为是参与有限的透明带水解过程, 从而保证成功的精卵受精的一个酶。然而, acrosin 缺失(*Acr*<sup>-/-</sup>)的雄性小鼠是完全可育的, 说明 acrosin 对精子穿过透明带和受精都不是必需的<sup>[2]</sup>。Yamashita 等人<sup>[6]</sup>和 Kawano 等人<sup>[22]</sup>也报道了类似的结果。PRSS21 缺失(*Prss21*<sup>-/-</sup>)或 Acrosin/PRSS21 同时缺失(*Acr*<sup>-/-</sup>/*Prss21*<sup>-/-</sup>)的雄性小鼠虽然在体外有明显的精子功能缺陷, 但都具有正常的生育能力。有趣的是, 在体外这两个缺失型小鼠附睾精子的功能缺陷却可以通过将精子暴露于子宫微环境或在体外与子宫液处理得到补偿。因此, 我们推测雌虾在产卵过程中

会分泌一些母体物质来补偿精子 MSG 的功能缺失。

罗氏沼虾受精过程中, 精子的基部首先接触卵子表面, 在这个过程中, 并没有观察到有酶类降解卵膜的现象。取而代之的是, 棘状部的末端会与卵膜接触, 导致棘状部发生明显的弯曲, 此时在卵膜上形成一道裂缝, 随着精子入卵这道裂缝不断扩大。研究者认为在棘状部末端存在着一种酶, 在精子基部接触卵子时被激活, 随后释放。根据这些结果, 我们推测定位在精子基部的酶(如本文中的 MSG)可能被棘状部的酶解活动激活, 为最后的精卵融合提供了便利。

## 4 结论

综合以上实验结果表明, MSG 蛋白与精子的明胶水解活力相关, 但对正常受精或胚胎发育可能不是必需的。另一种可能性是, MSG 沉默的效应可能通过雌虾分泌的母体物质得到了补偿。在罗氏沼虾的受精过程中 MSG 可能不是关键酶, 如果后者假设成立, 那么研究并鉴定棘状部的末端这种未知的酶类(可能定位在棘状部的末端)将会为罗氏沼虾精卵受精机制提供新的视角。

## 参考文献

- 1 Deppe M, Morales P, Sanchez R. Effect of protease inhibitors on the acrosome reaction and sperm-zona pellucida binding in bovine sperm. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43: 713-719
- 2 Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, et al. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem*, 1994, 269: 31845-31849
- 3 Honda A, Yamagata K, Sugiura S, et al. A mouse serine protease TESP5 is selectively included into lipid rafts of sperm membrane presumably as a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J Biol Chem*, 2002, 277: 16976-16984
- 4 Uhrin P, Schofer C, Zaujec J, et al. Male fertility and protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI): Localization of PCI in mouse testis and failure of single plasminogen activator knockout to restore spermatogenesis in PCI-deficient mice. *Fertil Steril*, 2007, 88: 1049-1057
- 5 Yamagata K, Murayama K, Okabe M, et al. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J Biol Chem*, 1998, 273: 10470-10474
- 6 Yamashita M, Honda A, Ogura A, et al. Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes Cells*, 2008, 13: 1001-1013
- 7 Slowinska M, Olczak M, Liszewska E, et al. Isolation, characterization and cDNA sequencing of acrosin from turkey spermatozoa. *Comp Biochem Physiol B*, 2010, 157: 127-136
- 8 Ciereszko A, Dabrowski K, Mims S D, et al. Characteristics of sperm acrosin-like activity of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum). *Comp Biochem Physiol B*, 2000, 125: 197-203
- 9 Sawada H. Ascidian sperm lysin system. *Zool Sci*, 2002, 19: 139-151
- 10 Rios M, Barros C. Trypsin-like enzymes during fertilization in the shrimp *Rhynchocinetes typus*. *Mol Reprod Dev*, 1997, 46: 581-586
- 11 Li Y, Ma W M, Dai J Q, et al. Inhibition of a novel sperm gelatinase in prawn sperm by the male reproduction-related Kazal-type peptidase inhibitor. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75: 1327-1337
- 12 Kodama E, Baba T, Kohno N, et al. Spermisin, a trypsin-like protease from ascidian sperm: cDNA cloning, protein structures and functional analysis. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 657-663

- 13 Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J D, eds. *Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1994. A189–A317
- 14 Stein K K, Go J C, Lane W S, et al. Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics*, 2006, 6: 3533–3543
- 15 Lynn J W, Clark W H Jr. A morphological examination of sperm-egg interaction in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol Bull*, 1983, 164: 446–458
- 16 Cao J X, Dai J Q, Dai Z M, et al. A male reproduction-related Kazal-type peptidase inhibitor gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Molecular characterization and expression patterns. *Mar Biotechnol*, 2007, 9: 45–55
- 17 Yodmuang S, Tirasophon W, Roshorm Y, et al. YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341: 351–356
- 18 Liu D Y, Baker H W. Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol Reprod*, 1993, 48: 340–348
- 19 Lynn J W, Clark W H Jr. The fine structure of the mature sperm of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol Bull*, 1983, 164: 459–470
- 20 Dacheux J L, Castella S, Gatti J L, et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, 2005, 63: 319–341
- 21 Cesari A, Monclus MdeL, Tejon G P, et al. Regulated serine proteinase lytic system on mammalian sperm surface: There must be a role. *Theriogenology*, 2010, 74: 699–711
- 22 Kawano N, Kang W, Yamashita M, et al. Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile *in vitro*. *Biol Reprod*, 2010, 83: 359–369