

## 扇贝精子及卵子的受精生物学特性

周丽青<sup>1</sup> 杨爱国<sup>1</sup> 刘志鸿<sup>1</sup> 吴彪<sup>1</sup> 程鹏<sup>1,2</sup> 王华<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 深圳华大基因研究院, 830052)

(<sup>3</sup> 中国检验认证集团山东有限公司, 青岛 266071)

**摘要** 采用扫描电子显微镜和普通光学显微镜观察方法, 结合全光谱扫描分析方法, 对栉孔扇贝和虾夷扇贝的精子及卵子的受精生物学特性进行了详细的观察, 包括精卵产出后形态学变化、卵水的特性、精子顶体反应、卵子皮层反应以及精子分级分离组分对卵子的作用 5 个方面。结果表明, 这两种扇贝精卵生物学特性没有本质的区别, 扇贝精子排入海水中 10min 以内, 外形没有太大的变化, 但 30min 以后约有 1/4 的精子出现头部膨大变成圆球形的现象, 受精能力明显下降; 扇贝卵子产入海水中 1h 以内受精能力没有变化, 但 2h 以后, 约 1/3 的卵子出现卵裂现象, 未见极体的排放, 且卵裂多停止在 2 细胞期, 少数达到 4 细胞期, 基本属于均等卵裂, 并失去受精能力; 滴入卵水中的精子极易发生自溶解体, 未解体的精子发生凝集, 10min 之后卵水中基本检测不到完整的精子, 卵水和钙离子载体 A23187 均能诱导精子发生顶体反应; 精子分级分离组分分别为精浆、精子头部和精子尾部, 这三部分除了少数精子头部能够附着在卵子表面外, 其他都不具备激活卵子的作用。对扇贝精子和卵子的生物学特性的研究将为解释不同种扇贝的精卵相互识别并受精的现象提供基础资料。

**关键词** 扇贝 精子 卵子 卵水 顶体反应 皮层反应

**中图分类号** Q954.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0075-07

## Fertilization biology of eggs and sperms in two scallop species, *Patinopecten yessoensis* and *Chlamys farreri*

ZHOU Li-qing<sup>1</sup> YANG Ai-guo<sup>1</sup> LIU Zhi-hong<sup>1</sup>

WU Biao<sup>1</sup> CHENG Peng<sup>1,2</sup> WANG Hua<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> Beijing Genomics Institute, Shenzhen 830052)

(<sup>3</sup> China Certification & Inspection Group Shandong Corporation Ltd., Qingdao 266071)

**ABSTRACT** The fertilization biology characteristics of eggs and sperms in two scallop species, *Patinopecten yessoensis* and *Chlamys farreri*, including morphological changes of gametes after release, egg water characteristics, sperm acrosome reaction, egg cortical reaction, and the effect of the sperm fractional separation components on the eggs, were observed using electronic microscopy, optical microscopy, and spectrum scanning analysis and insemination. The results

黄海水产研究所基本科研业务费项目(2060302/2-TS10)、国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(2006AA10A408)、国家科技支撑计划专题项目(2006BAD01A00)和青岛市科技规划应用基础研究计划项目(09-1-3-12 jch)共同资助

收稿日期:2009-12-12;接受日期:2010 01-15

作者简介:周丽青(1974-),女,助理研究员,主要从事水产动物增殖和遗传育种方面的研究。E-mail:zhouliq@ysfri.ac.cn, Tel:(0532)5811982

showed that there were no significant difference in biological characteristics between *P. yessoensis* and *C. farreri*. No obvious appearance changes in the scallop sperms within 10min after release in the seawater. However, 30 minutes later, 25% of the sperms became head-enlarged to near spherical and the fertilization ability was weakened. While the fertilization ability of the scallop eggs did not change within 1 hour after release in the seawater, and about 33% of the eggs became cleaved but without appearance of polar body in two hours. Most egg cleavage were equal cleavage terminated at the 2-cell stage and some at the 4-cell stage, and the fertilization ability of the eggs at this phase were lost. Most sperms dropped into the egg water were autolyzed, and other sperm agglutinated. No intact sperm individual was seen after being transferred into the egg water for 10 minutes. The sperm acrosome reaction was induced by the egg water or calcium ionophore A23187. Although a few sperm heads attached to the surface of the eggs, the components of sperm including seminal plasma, sperm head, and sperm tail, could not activate the eggs. This research on biological characteristics of eggs and sperms in scallop are expected to provide basic data for understanding why sperm and eggs from different species of scallops could recognize each other and fertilize.

**KEY WORDS** Scallop Sperm Egg Egg water Acrosome reaction  
Cortical reaction

扇贝生殖细胞数目巨大,属于体外受精的无脊椎动物,其精卵细胞表面必定存在某种特殊的物质使两性细胞能在广阔的水体中得以识别并结合。经前人研究发现,配子细胞表面的糖蛋白在此识别过程中发挥了重要作用(刘慧慧等 2004)。栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 与虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis* 杂交育种的成功,使作者对不同种属扇贝的精子与卵子之间的识别产生了浓厚的兴趣,为了进一步了解扇贝精卵识别的机制,从而更有效地开展杂交育种的研究,我们对扇贝精子和卵子的生物学特性进行了详细的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2009年3月,性腺充分成熟的虾夷扇贝和栉孔扇贝取自山东长岛,2009年9~10月,性腺发育成熟的栉孔扇贝购自青岛新贵都农贸市场,洗净贝壳后,虾夷扇贝(壳高9~12cm)暂养水温10℃左右,栉孔扇贝(壳高5~8cm)暂养水温15℃左右。饲以金藻、硅藻和螺旋藻粉,择适当的时机进行催产。

分别采用流水刺激和阴干刺激诱导虾夷扇贝和栉孔扇贝产卵排精,用筛绢多重过滤得干净的精子和卵子。

### 1.2 样品的获取及固定

#### 1.2.1 两种扇贝精子和卵子的采集、固定

每隔一段时间收集产至海水中的精子和卵子1次,每次取两份,直至3h,采用4%多聚甲醛和1%戊二醛(50%戊二醛10ml,多聚甲醛20g,Tris 3.029g,溶于500ml海水)固定,待所取样品沉降稳定后,更换1次固定液,置4℃冰箱中保存。

#### 1.2.2 钙离子载体 A23187 诱导栉孔扇贝精子顶体反应

钙离子载体 A23187 (Sigma 公司)先用二甲亚砜溶解,后用过滤海水(S=26, pH=8.32)稀释成200μg/ml的工作母液(二甲亚砜终浓度为4%)保存备用。取含有精子的海水到200μg/ml的工作母液中,使钙离子载体 A23187 终浓度达到50μg/ml(含1%二甲亚砜)。

### 1.2.3 两种扇贝卵水的收集及其对精子顶体反应的诱导作用

卵子产至海水中 20 min 之后,用 500 目筛绢过滤移去卵子及其他颗粒物之后,所获得的海水,本文中称之为卵水。取部分卵水保存至  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中,用于光谱扫描分析。收集卵水后 0~2h 期间,向卵水中加入新鲜的精子,取样固定观察卵水对精子的激活作用。

### 1.2.4 人工授精

将新鲜的精子和卵子按适当比例混合于 1 000 ml 烧杯中进行人工授精,受精卵密度约为 300 个/ml,受精卵发育温度控制在  $16\sim 18^{\circ}\text{C}$ 。取样固定用于观察卵膜的变化及皮层反应。

### 1.2.5 栉孔扇贝精子各组分的分级分离

在  $4^{\circ}\text{C}$  下,吸取含有海水的新鲜精液 100ml,以 2 000g 离心 5min,收集上清液 50ml,文中称之为精浆,其余样品用 12 号注射针头反复吹打 20 余次,使鞭毛与精子头部分离。然后以 4 000g 离心 5min,沉淀为精子头部,向沉淀中加入 50ml 过滤海水混合均匀备用,收集上清液,以 12 000g 离心 10min 得到鞭毛沉淀,鞭毛沉淀中亦加入 50ml 过滤海水,混合均匀备用。为确保各组分的纯度和分离效果,我们一般都通过多次前期实验的涂片及显微观察确定离心参数。然后收集 4 份 500 ml 栉孔扇贝卵子(300 个卵子/ml),分别加入 50ml 精子、精浆、精子头部、鞭毛,搅匀,普通光学显微镜下观察卵子的形态变化。

以上各实验水温均控制在  $14\sim 16^{\circ}\text{C}$ ,所取样品均用 4% 多聚甲醛和 1% 戊二醛固定,取样固定时间安排见表 1。每次取两份,每份样量 1~1.5ml,待所取样品沉降稳定后,更换 1 次固定液,置  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

表 1 实验样品种类及样品固定时间的设定  
Table 1 Experimental samples and sampling time

样品 Sample	取样时间 Sampling time (min)										
精子 Sperm	0	10	20	30	40	50	60	80	100	120~180	
卵子 Eggs	0	10	20	30	40	50	60	80	100	120~180	
A23187 与精子混合 Mixture of A23187 and sperm	0	5	10	20	30	40	50	60	--	--	
卵水与精子混合 Mixture of egg water and sperm	0	5	10	20	30	40	50	60	--	--	
受精卵 Zygote	0	2	5	10	20	30	60	90	120		
精子分级分离组分 与卵子混合 Mixture of eggs and sperm components	精浆 Sperm plasma	2	5	10	20	30	60	90	120		
	精头 Sperm head	2	5	10	20	30	60	90	120		
	鞭毛 Sperm tail	2	5	10	20	30	60	90	120		

## 1.3 电子显微镜和普通光学显微镜观察

电镜固定样品 1 份经酒精系列脱水,入乙酸异戊酯,HCP-零界点干燥仪干燥,IB-3 型离子溅射仪镀金后,于 S-520 型扫描电镜下观察拍照。电镜固定样品 1 份于普通光学显微镜(NIKON E800)下观察其形态变化及发育阶段。

## 1.4 卵水的全光谱扫描

冻存或新鲜卵水以海水为对照,北京谱析 TU-1901 型紫外分光光度计,190~900nm 全光谱扫描分析。

## 2 结果

### 2.1 卵子和精子产出后的形态学变化

普通光学显微镜观察结果表明,栉孔扇贝的卵径和精子头部大小相比虾夷扇贝的略小,但二者的形态及寿

命并没有显著的区别,不同批次的卵子间及精子间因为成熟程度的不同,其受精能力和形态变化会有差异。虾夷扇贝可能是因为属于冷水性贝类,精子在较高的水温(15℃以上)寿命更短一些(25min以内)。综合8次催产结果发现,扇贝卵子产入海水中至1.5h期间,外部形态均没有发生显著的变化,并保持较高的受精能力;约2h后,1/3的卵子自行出现卵裂现象,未见有极体的排放,且卵裂多停止在2细胞期,少数卵子还发展到4细胞期,基本属于均等卵裂,而不是常规的不均等卵裂(图1)。扇贝精子从刚产入到海水至5min时,因为黏液过多,精子聚集呈絮团状,且精子头部圆锥略钝,如不搅动海水,精子分散缓慢;产入海水中5~10min,头部因为黏液的去除,形态变成长圆锥形,活动剧烈;10~20min,精子头部外形没有太大的变化,仍保持旺盛的活力;但30min以后约有1/4的精子出现头部膨大变成圆球形的现象以及精子自溶解体现象,精子活力明显下降,并聚集成团(图2)。

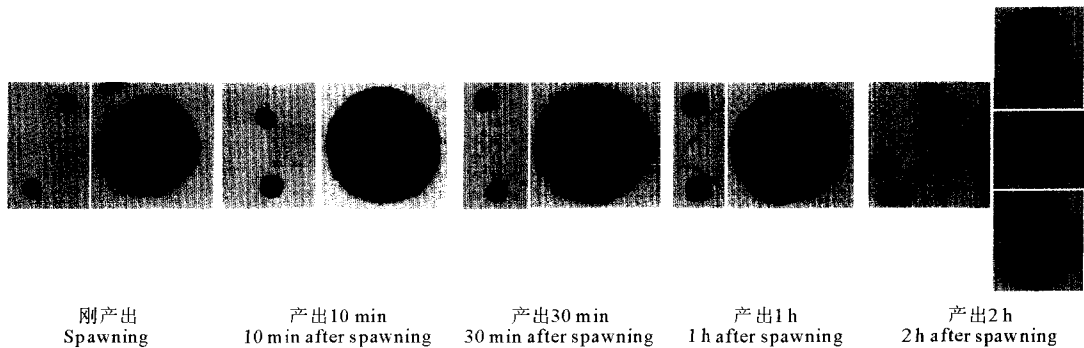


图1 虾夷扇贝卵子产至海水中的形态及受精能力变化

Fig. 1 Change of appearance and fertilization ability of *P. yessoensis* scallop eggs after spawning

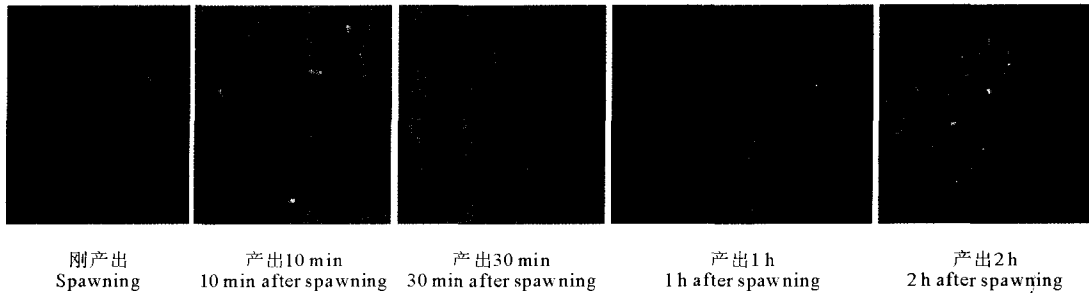


图2 虾夷扇贝精子产至海水中的形态及受精能力变化

Fig. 2 Change of appearance and fertilization ability of *P. yessoensis* scallop sperm after spermiation

## 2.2 卵水对精子的影响

无论虾夷扇贝还是栉孔扇贝,滴入这两种扇贝卵水中的精子均极易发生自溶解体的现象。例如,虾夷扇贝精子滴入栉孔扇贝卵水中5min后,卵水中可观察到的游离的、形态完整的精子数目非常少,精子多出现凝集的情况,卵水诱导精子顶体反应率为 $80.61\% \pm 3.17\%$ ;10min之后的卵水中基本上检测不到完整的精子,卵水诱导精子顶体反应率降至 $15.33\% \pm 2.15\%$ ,维持正常形态的精子数目减少至 $11.64\% \pm 3.89\%$ ,其余的精子出现头部变成球形、尾部脱落、自溶解体等现象,精子凝集的情况也少见,卵水比较混浊。30min之后,卵水中几乎观察不到精子,卵水浑浊。说明卵水具备诱导扇贝精子顶体反应的能力,且精子遇见卵水反应剧烈。这与精子遇见卵子时的现象相吻合。

## 2.3 钙离子载体 A23187 诱导栉孔扇贝精子顶体反应

50 μg/ml 的钙离子载体 A23187 处理 20 min 时,能有效诱导精子顶体反应,获得  $78.11\% \pm 4.57\%$  的顶体

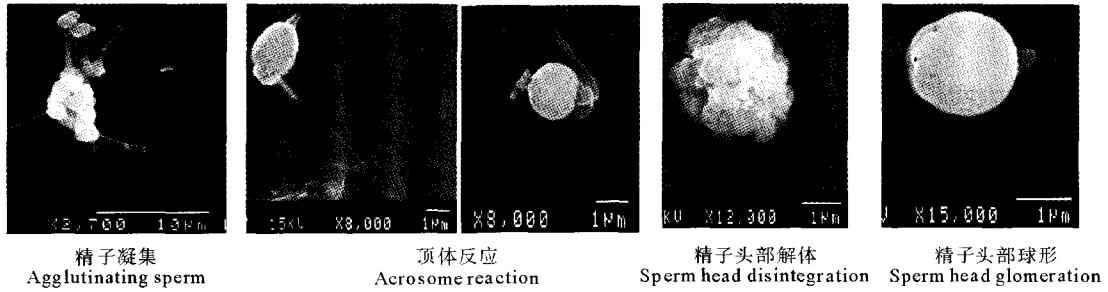


图 3 栉孔扇贝卵水对虾夷扇贝精子的作用  
 Fig. 3 Effects of *C. farreri* egg water on *P. yessoensis* sperm

反应诱导率,但处理到 30min 时,顶体反应诱导率降低到  $30.89\% \pm 2.74\%$ ,约有 30%的精子出现了自溶解体的现象,也出现精子凝集现象,仅个别精子形态正常。A23187 处理精子 60min 后,溶液浑浊,完整形态的精子数目非常少,估计发生自溶解体现象,未见有鞭毛的残痕。

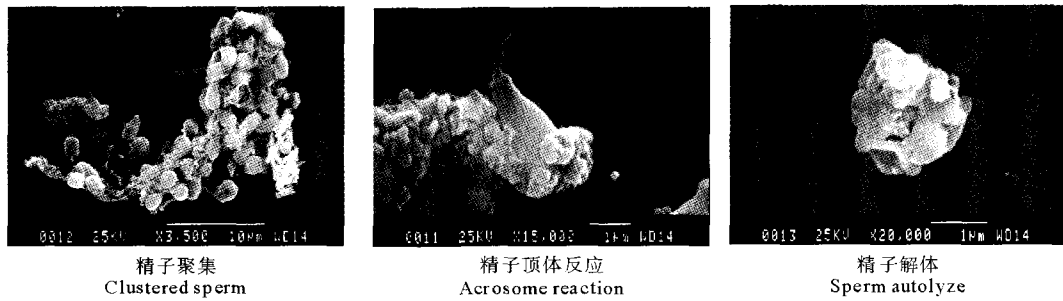


图 4 钙离子载体 A23187 诱导栉孔扇贝精子顶体反应  
 Fig. 4 *C. farreri* sperm acrosome reaction induced by calcium ionophore A23187

2.4 卵水峰值的检出

190~900nm 全光谱扫描结果见图 5。扇贝卵水的峰值检出范围在 211.1~215.5nm,栉孔扇贝与虾夷扇贝峰值检出的位置非常接近,栉孔扇贝峰值检出范围在 211.1~215.2nm,虾夷扇贝峰值检出范围在 212.7~215.5nm,吸收峰值高低的区别与浓度有关,这与产生卵水的卵子浓度有关。因为所测吸收峰接近肽键的特征吸收,初步认为卵水中的这种活性物质是以蛋白质或多肽为主要成分的生物分子。

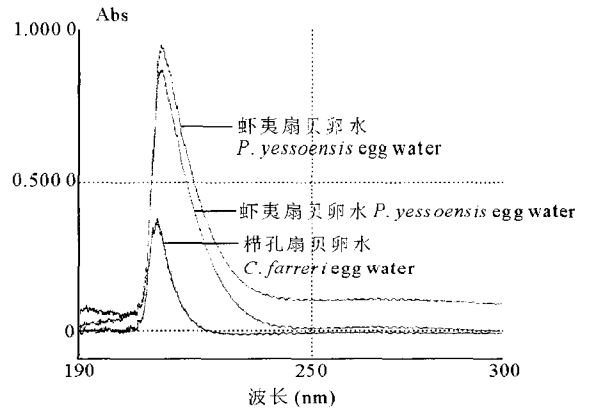


图 5 扇贝卵水的全光谱扫描(截取 190~300nm)  
 Fig. 5 Spectrum scanning of scallop egg water (intercept of 190~300nm)

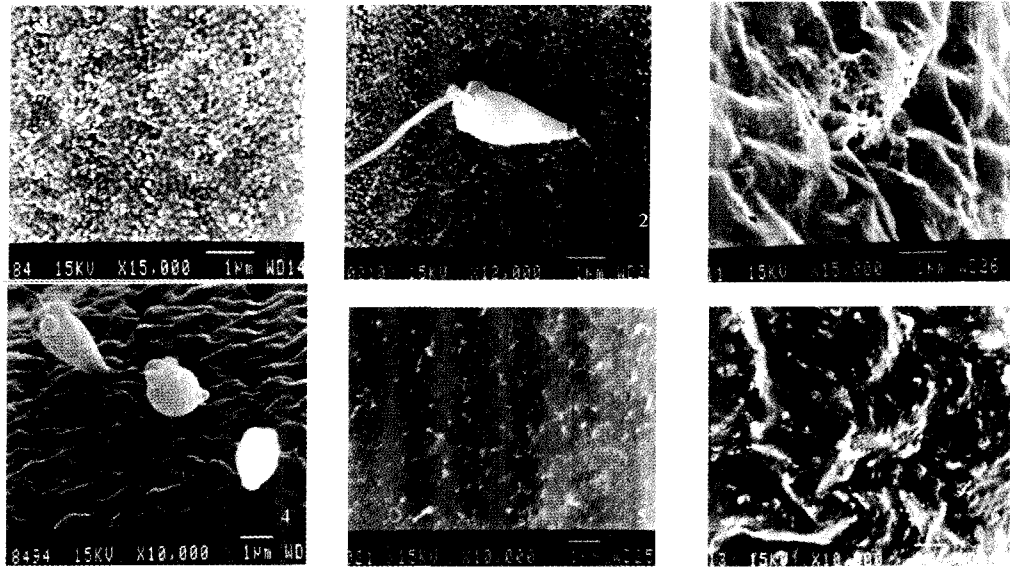
2.5 栉孔扇贝精子分级分离组分对卵子的激活作用

栉孔扇贝精子分级分离各组分均对卵子无明显的激活诱导作用,仅见个别精子头部附着于卵膜上面,但卵子并未出现排放极体和卵膜变化的现象。由此可见,只有活力强、形态完整的精子才能够使卵子受精。

2.6 卵子的皮层反应

通过对栉孔扇贝♀×虾夷扇贝♂、栉孔扇贝♀×栉孔扇贝♂、虾夷扇贝♀×栉孔扇贝♂、虾夷扇贝♀×虾夷扇贝♂几种组合受精过程的电镜观察发现,这两种扇贝精卵相互作用过程中出现的卵子皮层反应没有本质

上的区别。卵子未受精时,卵膜结构由外而内分别为薄薄的胶质状卵黄膜、充满卵质膜绒毛的卵周隙和卵质膜(图 6-1)。卵子的皮层反应是由于卵子受到精子(图 6-2)或外源物质的刺激下,卵子质膜下层的皮层颗粒胞吐产生的现象。皮层颗粒胞吐时会形成不规则的棘状突起,顶起或穿透卵黄膜,并释放一些物质,使得卵子表面由原来较为平缓变得凹凸不平。精子完全进入卵子之后,在卵膜黄膜上留下一个孔洞的痕迹(图 6-3),但很快就被修复,此时皮层反应消失,卵黄膜变成受精膜后增厚并趋于平缓而完整,从而阻止其他精子的进入(图 6-4)。扇贝卵子的皮层反应无明显方向性,也无规律性,皮层反应或轻微(图 6-5)、或剧烈(图 6-6)或不发生皮层反应(图 6-3);皮层反应可覆盖整个卵子表面,也有局部发生皮层反应的现象。



1. 未受精卵卵膜表面;2. 刚加入精子后的卵膜表面;3. 受精孔洞痕迹及卵膜表面;  
4. 受精膜阻止多精入卵;5. 卵子皮层反应轻微;6. 卵子皮层反应激烈

1. Egg membrane before insemination;2. Egg membrane after insemination;3. Fertilization hole trace and egg membrane;  
4. Fertilization membrane preventing polyspermy;5. Slight cortical reaction;6. Intense cortical reaction

图 6 扇贝卵子的皮层反应

Fig. 6 Egg cortical reaction of scallop

### 3 讨论

#### 3.1 扇贝精卵识别过程中精子与卵子的作用

多次杂交组合研究结果表明,扇贝卵水具有诱导精子顶体反应的作用,精子只有在遇到卵子或其顶体部位钙离子通道被打开的时候才能发生顶体反应,而精子分级分离的各个组分却不能引发卵子的皮层反应,说明只有完整而有活力的精子才能识别卵子并附着于卵子表面。精卵的识别是相互的,卵子不能运动,但卵子表面及卵子释放出来的物质具有吸引精子靠近并引发精子顶体反应的作用,而精子的运动恰恰就是辅助精卵识别的主要动力来源,不运动的精子完全失去受精能力,以至于精子头部都不能附着在卵子表面上,也就不会发生精卵识别这一事件了。扇贝精子与卵子的识别不具备方向性,精子可在卵子的任意部位入卵,精子入卵的方向也不确定,可垂直也可倾斜进入。另外,扇贝精卵的识别不存在严格的种属特异性,只要精子具有足够的运动能力,卵子释放吸引精子的物质,扇贝精子和卵子就能相互作用,虾夷扇贝(周丽青等 2003)、华贵栉孔扇贝 *Chlamys nobilis* 的精子能使栉孔扇贝卵子受精(孙长森等 2007);刘宪杰等(2006)研究发现,栉孔扇贝、海湾扇贝 *Argopecten irradians*、虾夷扇贝和华贵栉孔扇贝之间,在适温范围内各杂交组正、反交均可受精;还有研究表明,长牡蛎 *Crassostrea gigas* 精子也能进入栉孔扇贝卵内(任建峰等 2005)。

### 3.2 扇贝精子和卵子的寿命及其受精能力

本研究结果表明,扇贝育苗的成功与否与扇贝生殖细胞的活动力及寿命有很大的关系,一般主张采用产出2h之内的卵子和产出0.5h之内的精子进行育苗生产。扇贝需要依靠亲贝将精、卵排入水中,在水中受精、发育。而通常雄性扇贝对外界刺激反应灵敏,所以排精常常先于产卵,精子在水中的出现也能诱导雌性扇贝产卵(王如才等 1998)。因此,在扇贝育苗生产上,受精时间的把握显得尤其重要。实验中观察到少数精子产出4~5h之后仍有活动能力,但已经失去了受精能力。卵子产出2h之后,部分卵子自行出现卵裂现象,未发生卵裂的卵子授以新鲜的精液时,不能受精从而失去受精能力,个别卵子出现排放极体和卵裂的现象,但多停止在4细胞期或发育成畸形胚胎。精子一旦被诱发顶体反应之后即面临自溶解体的结局。

### 3.3 卵水的作用及其生化组分

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,基本确立动物精卵应答的模式(Epel *et al.* 1988):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,被称为“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),为诱导顶体反应所需,被称作“辅因子”(CO-ARIS)。卵子胶状物中,还发现有一些次级的辅因子(多肽),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,从而实现精卵的结合,卵子对精子也作出相应的回应,导致一系列反应而完成受精过程。通常人们把海胆、对虾等水生动物产过卵的水体,称为卵水(Egg-water,EW),并证明其中含有诱导精子反应的活性成分。本研究结果表明,扇贝卵水也有相同的作用,通过对卵水全光谱扫描发现,卵水在紫外区段(211.1~215.5nm)具有明显的吸收峰,与对虾卵水吸收峰值(213.2nm)接近,也与肽键的特征吸收峰值接近,但并没有出现其他的小的吸收峰。栉孔扇贝与虾夷扇贝卵水吸收峰值如此相近,说明这两种扇贝卵子释放的物质非常相似,因而对彼此精子的吸引和诱导作用是一致的,从而进一步证明栉孔扇贝与虾夷扇贝杂交是真正的精卵结合。本试验初步试验结果认为扇贝卵水活性物质以蛋白质或多肽为主,其具体生化组分需进一步实验才能确定。

Griffin等(1987、1990)用单肢虾 *Sicyonia ingentis* 的卵水诱导精子产生顶体丝,并证明卵水内活性物质的成分是一种糖蛋白,其蛋白、糖基重量比约为4:1,其生化特性类似胰蛋白酶。孙修涛等(2000)和朱冬发等(2004)分别对中国对虾卵水的特性和三疣梭子蟹卵水诱导精子顶体反应进行了研究,均认为卵水具有诱发精子顶体反应的作用,但虾类的精子顶体反应时间较长,一般为30min,而扇贝精子一经遇到卵水或钙离子载体A23187便发生精子顶体反应,并很快出现自溶解体的现象。

## 参 考 文 献

- 王如才,王昭萍,张建新. 1998. 海水贝类养殖学. 青岛:青岛海洋大学出版社,172~180
- 刘慧慧,李太武,苏秀榕. 2004. 贝类配子细胞识别物的初步研究. 水产科学,23(5):10~14
- 刘宪杰,常亚青. 2006. 扇贝种间杂交的可行性及幼体早期发育的初步研究. 大连水产学院学报,21(4):346~349
- 朱冬发,王春琳,余红卫,周 帅. 2004. 三疣梭子蟹精子顶体反应过程中的形态和结构变化. 动物学报,50(5):800~807
- 任建峰,杨爱国,董迎辉,刘志鸿,周丽青. 2005. 栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)受精过程的荧光显微观察. 中国水产科学,12(5):643~647
- 孙修涛,李 健,李兆新,刘 萍,刘德月,王清印. 2000. 中国对虾卵水的特性和精子的应答. 水产学报,24(1):1~6
- 孙长森,包振民,王 师,战文斌,汪小龙,胡景杰. 2007. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)与华贵栉孔扇贝(*C. nobilis*)远缘杂交子代的胚胎发生及幼虫生长发育的初步研究. 海洋与湖沼,38(3):227~233
- 周丽青,杨爱国,刘志鸿,杜方勇,王清印. 2003. 栉孔扇贝(♀)×虾夷扇贝(♂)精子入卵过程的电镜观察. 中国水产科学,10(3):189~194
- Epel, D., and Mastroianni, L. Jr. 1988. A summary of the symposium on "Gamete Dialogue in Fertilization: From Sea Urchin to Human"-in memory of Alberto Monroy. Biol. Bull. 174: 186~190
- Griffin, F. J., Clark, W. H. Jr., Crowe, J. H., and Crowe, L. M. 1987. Intracellular pH decreases during the *in vitro* induction of the acrosome reaction in the sperm of *Sicyonia ingentis*. Biol. Bull. 173: 311~323
- Griffin, F. J., and Clark, W. H. Jr. 1990. Induction of acrosomal filament formation in the sperm of *Sicyonia ingentis*. J. Exp. Zool. 254(3):296~304