

长牡蛎精子膜蛋白的提取及其部分生化性质的研究

刘丽燕^{1,2,3}, 杨爱国¹, 王清印¹, 周丽青¹, 刘志鸿¹

(1. 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, 山东 青岛 266071; 2. 上海水产大学 生命学院, 上海 200090; 3. 湛江恒兴南方海洋科技有限公司, 广东 湛江 524001)

摘要:从提取时间和 TritonX-100 浓度两个方面对长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 精子膜蛋白提取条件进行优化, 确定最佳提取条件: 将精液 150 g 离心去除精原细胞, 经 PBS 缓冲液和 Tris-HCl 缓冲液清洗后, 3 000 g 离心 10 min (4 ℃) 得精子悬液; 然后加入 3 倍体积含 1% TritonX-100 的膜蛋白提取液, 冰浴振荡 1 h; 50 000 g 离心 15 min (4 ℃), 收集上清液即为精子膜蛋白溶液。SDS-PAGE 电泳后, 考马斯亮蓝 R-250 染色检测到 21 种膜蛋白, 分子量在 26~156 kD 之间, PAS 染色检测到糖蛋白有 14 种, 苏丹黑 B 染色检测到脂蛋白有 17 种, 其中有 13 种膜蛋白既是糖蛋白又是脂蛋白。实验结果还发现 1 种分子量为 38 kD 的 r16 膜蛋白既为糖蛋白又为脂蛋白, 且高碘酸 - Schiff 试剂和苏丹黑 B 染色最深, 条带最清晰, 蛋白丰度最高, 与此相对的分子量为 55 kD 的 r12 膜蛋白, 考马斯亮蓝 R-250 染色也较深, 条带清晰, 但其糖蛋白和脂蛋白染色相对 r16 膜蛋白较浅, 说明 r16 和 r12 两种膜蛋白其蛋白丰度相差不大, 其糖基化程度及脂化程度可能相差较大, 此两种膜蛋白有待于进一步分离纯化。此研究结果可为长牡蛎精子膜蛋白在精子发生和受精过程中作用的研究提供基础资料。[中国水产科学, 2007, 14 (6): 889-895]

关键词:长牡蛎; 精子膜蛋白; 糖蛋白; 脂蛋白

中图分类号:S917 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2007)06-0889-07

长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 又称太平洋牡蛎, 是中国重要海水养殖贝类之一。对其精子膜蛋白的研究, 对于了解双壳贝类在精子获能、顶体反应、精卵识别等过程中的作用机制具有重要意义。有关长牡蛎细胞遗传学方面的研究早有报道^[1-7], 而对于其精子膜蛋白的研究在国内外还鲜见报道。Kelly 等^[8]的研究表明, 在动物的受精过程中, 精子与卵子的识别与结合是精卵细胞表面糖蛋白及其受体间的相互作用, 是全部受精过程发生的前提条件。对于一些哺乳动物, 如人^[9]、小鼠^[10-11]、牛^[12-13]、羊^[14]、猪^[15-16]等精子膜蛋白的研究也表明, 精子膜蛋白在精子获能、顶体反应、精卵识别等一系列受精过程中均起着非常重要的作用。从水产动物如海胆 (*Strongylocentrotus nudus*)^[17-18]、鲍 (*Haliotis*)^[19]、银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[20-21]、蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[22-23]等种类中也分离出了几种精子膜蛋白, 研究结果表明有些蛋白与精子的顶体反应和受精作用相关。

本研究利用含 Triton X-100 的膜蛋白提取液^[22]提取长牡蛎精子膜蛋白, 通过 SDS-PAGE 电泳分析优化提取条件, 分析提取效果, 用 Gel-pro 软件分析其分子量, 用考马斯亮蓝 R-250, 高碘酸 - Schiff 试剂和苏丹黑 B 3 种染料对精子膜蛋白进行染色分析其生化性质, 以期为深入研究双壳贝类受精机理提供基础资料, 也为精子膜蛋白在精卵识别过程中功能的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用雄性长牡蛎于 2006 年 5 月购自山东省青岛市南山市场, 2~3 龄, 壳长 7~8 cm, 性腺成熟饱满, 解剖获取精液。

EPS-300 电泳仪 (上海天能); DY3D-25B 垂直型电泳槽 (北京六一); DK-S26 型电热恒温水浴锅 (上海精宏); NU-6382E 型超低温冷冻冰箱 (NU-AIR); 高速冷冻离心机 (美国 Kendro); eppendorf

收稿日期: 2006-11-13; 修订日期: 2007-03-07.

基金项目: 国家科技攻关计划项目 (2004BA526B0103).

作者简介: 刘丽燕 (1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: lyliutianshi@163.com

通讯作者: 王清印 (1952-), 男, 博士生导师, 研究员. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

PCR仪(德国);TU-1901双光束紫外可见分光光度计(北京普析);凝胶成像系统(日本富士)。

1.2 实验方法

1.2.1 长牡蛎精子膜蛋白提取及条件优化 长牡蛎精子膜蛋白的提取参考文献[9, 16, 22-23]的方法,略有改进。取长牡蛎解剖,镜检后取雄性生殖腺,500目筛绢过滤获取精液;10 mL离心管分装,150 g离心10 min(4℃),取上清精液;沉淀用6 mL过滤海水悬浮,150 g离心10 min,去除底层精原细胞,取上清精液。合并两次离心的上清精液,3 000 g离心10 min;弃上层海水;向底部精子沉淀中加入6 mL预冷的PBS缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4, 含0.7%的NaCl)混匀;3 000 g离心10 min(4℃),弃上清缓冲液,反复清洗2次;向底部精子中加入6 mL预冷的Tris-HCl缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4, 含0.7% NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF),4℃静置15 min,3 000 g离心10 min(4℃);弃上清,反复2次;最后用1 mL Tris-HCl悬浮精液。

从Triton X-100浓度、提取时间2个方面对精子膜蛋白的提取条件进行优化。

Triton X-100浓度:向1 mL精子悬液中加入3倍体积含0.1%、0.5%、1%、2% Triton X-100的膜蛋白提取液(含0.1 mol/L Tris-HCl;0.1% SDS;0.7% NaCl;2 mmol/L MgCl₂;1 mmol/L EDTA;0.5 mmol/L PMSF;pH 8.0),冰浴振摇1.5 h。其中每个浓度各取2管样品。

提取时间:向1 mL精子悬液中加入3倍体积含1% Triton X-100的膜蛋白提取液(0.1 mol/L Tris-HCl;0.1% SDS;0.7% NaCl;2 mmol/L MgCl₂;1 mmol/L EDTA;0.5 mmol/L PMSF;pH 8.0),冰浴振摇0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h。其中每个时间点分别取2管样品。

冰浴振摇后分装到1.5 mL的EP管中,每管1 mL,分别以50 000 g离心15 min(4℃)。上清为精子膜蛋白溶液,沉淀为精子脱膜部分(主要为精子细胞核),用PBS反复清洗沉淀,-20℃保存,以备电泳分析。以上操作均在冰盒中进行。另取雄性长牡蛎性腺,重复上述实验3次。

精子膜蛋白溶液透析:蒸馏水透析24 h,其间更换数次蒸馏水;再换0.01 mol/L的Tris-HCl(pH 7.4)透析24 h后,取少量分析其蛋白质浓度,其余

-20℃保存,以备电泳分析。

1.2.2 牡蛎精子膜蛋白的SDS-PAGE鉴定 采用分离胶浓度10%,浓缩胶浓度3%的SDS-PAGE对透析后的精子膜蛋白溶液和精子脱膜部分样品进行电泳分析。将2倍体积的5×SDS-PAGE样品溶解液(60 mmol/L Tris;25%甘油;2% SDS;5% β-巯基乙醇;0.1%溴酚蓝,用1 mol/L HCl调pH至6.8)^[22]加入到精子脱膜部分中,煮沸10 min后,反复吹打,再煮沸10 min,3 000 r/min离心5 min(4℃),以备上样。将精子膜蛋白溶液与SDS-PAGE样品溶解液(1.6 mL 1 mol/L Tris-HCl pH 6.8;4 mL 10% SDS;1.2 mL β-巯基乙醇;2.5 mL 87%甘油;0.1 mL 溴酚蓝,用蒸馏水稀释至20 mL)^[24]以4:1的体积比混匀,煮沸5 min,3 000 r/min,离心5 min(4℃)后上样。

取上述处理后的精子膜蛋白溶液和精子脱膜部分(包含细胞质和细胞核中的蛋白),同时进行不连续的SDS-PAGE电泳^[24]。分离胶10%,pH 8.9;浓缩胶3%,pH 6.7;电极缓冲液Tris-Gly,pH 8.3。实验样品定量上样25 μL,标准蛋白上样10 μL,恒流电泳,开始电流20 mA,待指示剂进入分离胶后电流改为25 mA,电泳3 h。

1.2.3 精子膜蛋白部分生化性质的分析 取提取的精子膜蛋白溶液,经上述相同处理后,对称定量上样25 μL,标准蛋白上样10 μL,恒流电泳,开始电流20 mA,待指示剂进入分离胶后电流改为25 mA,电泳3 h。结束后,用解剖刀将凝胶分成两部分,有标准蛋白的一部分考马斯亮蓝R-250染色,另一部分高碘酸-Shiff试剂染色或苏丹黑B染色。

(1)分子量的测定 采用程玉祥^[25]的实验方法:把凝胶浸入固定液(45.4%甲醇,9.2%冰醋酸)中固定过夜,考马斯亮蓝R-250染色液(0.025%考马斯亮蓝R-250,40%甲醇,7%冰醋酸)染色1.5 h,倒掉染色液,加入脱色液I(40%甲醇,7%冰醋酸)冰浴振摇30 min,加入脱色液II(5%甲醇,7%冰醋酸)至背景无色后,凝胶成像系统拍照,Gel-pro 4.5 patch软件分析其分子量。

(2)糖蛋白的检测 高碘酸-Shiff试剂染色法^[26]:将凝胶放入10%冰乙酸-20%甲醇固定液固定1 h;3%冰乙酸浸洗2次,每次10 min;3%冰乙酸配制的1%高碘酸溶液4℃黑暗氧化1 h;3%冰乙酸浸洗5次,每次20 min;Shiff试剂染色1 h后于1%偏重亚硫酸钠中脱色。Shiff试剂的配制:将1 g碱性品红溶解于200 mL沸水中,摇荡5 min后冷却

至 50 ℃ 左右, 滤纸过滤; 向滤液中加入 20 mL 的 1 mol/L HCl, 冷却至 25 ℃, 加入 1 g 偏重亚硫酸钠, 将此溶液置于暗处使其反应 12 h 以上; 加入 2 g 活性炭, 混合静置 1 h 后过滤, 滤液 4 ℃ 保存。

(3) 脂蛋白的检测 SDS-PAGE 电泳后, 用 1% 苏丹黑 B 染色液染色检测脂蛋白。其具体方法参照杨安钢等^[27]的实验方法: 将凝胶放入 1% 的苏丹黑 B 染色过夜, 脱色液 (甲醇: 乙酸: 水 = 5: 5: 1, V/V) 洗脱至背景无色。1% 苏丹黑 B 染色液的配制: 2 g 苏丹黑 B 溶于 20 mL 丙酮、15 mL 乙酸和 165 mL 蒸馏水, 搅拌 30 min 后过滤, 4 ℃ 避光保存。

2 结果与分析

2.1 长牡蛎精子膜蛋白提取条件的优化

2.1.1 精子膜蛋白提取液中最佳 Triton X-100 浓度 同一批处理样品, 定量上样 25 μL, SDS-PAGE 电泳结果如图 1。含 1% Triton X-100 的精子膜蛋

白提取液提取的膜蛋白组分电泳条带最清晰, 染色最深, 说明膜蛋白含量最大。重复 3 次实验结果一致。据此认为, 膜蛋白提取液中 Triton X-100 的最佳浓度为 1%。

2.1.2 精子膜蛋白提取液的最佳处理时间 同一批处理样品, 定量上样 25 μL, SDS-PAGE 电泳如图 2 所示, 处理时间为 1 h、1.5 h 和 2 h 的提取效果比较好, 处理 0.5 h 和 2.5 h 组提取效果较差。重复 3 次实验结果一致。基于提取的膜蛋白纯度和浓度判断, 膜蛋白提取的最佳时间为 1 h。

上述结果表明, 长牡蛎精子膜蛋白提取的最佳条件为: 将精子悬液放入 3 倍体积含 1% Triton X-100 的膜蛋白提取液 (0.1 mol/L Tris-HCl; 0.1% SDS; 0.7% NaCl; 2 mmol/L MgCl₂; 1 mmol/L EDTA; 0.5 mmol/L PMSF; pH 8.0) 中冰浴振摇 1 h; 4 ℃, 50 000 g 离心 15 min, 收集上清精子膜蛋白溶液。

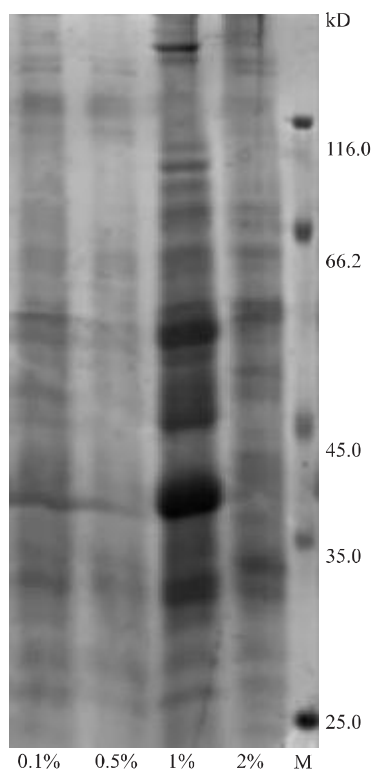


图 1 用含不同浓度 Triton X-100 的精子膜蛋白提取液所提取蛋白组分的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of sperm membrane protein extracted with different concentration of Triton X-100

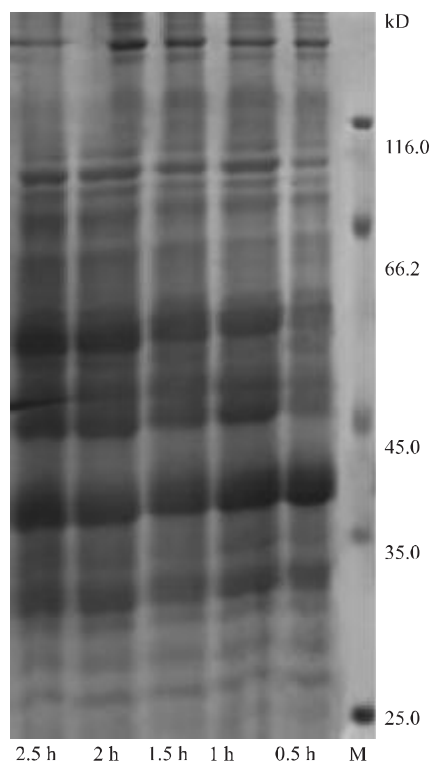


图 2 不同提取时间制备的精子膜蛋白组分的电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of sperm membrane protein extracted for different extraction time

2.2 SDS-PAGE 鉴定

采用 10% 浓度的分离胶对精子膜蛋白溶液和精子脱膜部分进行 SDS-PAGE 电泳(图 3),结果显示,精子脱膜部分的蛋白质有 6 种,有明显的脱尾现象;精子膜蛋白有 21 种,其蛋白数量和分子量差异甚大;3 次重复实验结果一致,说明本实验通过 Triton X-100 溶脱制备膜蛋白可重复性强,提取分离效果较好,表明采用去污剂 Triton X-100 提取精子膜蛋白的方法是可行的。

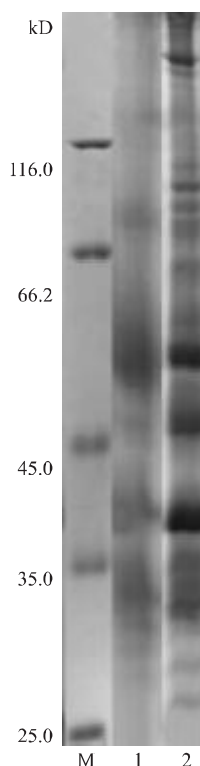


图 3 最佳提取条件下所提取精子膜蛋白组分与脱膜部分蛋白组分的电泳图谱(考马斯亮蓝 R-250 染色)

注:1:脱膜蛋白;2:膜蛋白。

Fig.3 Electrophoretogram of sperm membrane protein and left protein extracted under the optimized extracting condition (dyed by coomassie brilliant blue R-250)

Note: 1: left protein; 2: membrane protein.

2.3 牡蛎精子膜蛋白的生化性质

2.3.1 分子量 在 SDS-PAGE 电泳图谱(图 4、7)上,考马斯亮蓝 R-250 染色检测出长牡蛎精子膜蛋白主要有 21 种, Gel-pro 4.5 patch 软件分析其分子量在 26~156 kD 之间(表 1)。

2.3.2 糖蛋白 PAS 染色检测到糖蛋白有 14 种(图 5、7), Gel-pro 4.5 patch 软件分析,分子量为 38 kD 的蛋白带染色最清晰(图 5 箭头所示),说明此种糖蛋白含量较高。

目前高碘酸-Shiff 试剂(简称 PAS 染色)检测糖蛋白的方法最为常用,但其灵敏度相对较低,最低检测限为 40 μg ^[24]。由图 4、5、6 可见,糖蛋白的染色条带相对考马斯亮蓝 R-250 和苏丹黑 B 染色而言

最少。实验结果显示,在 21 种精子膜蛋白中共检测出 14 种糖蛋白,但由于其灵敏度较低,因此尚不能排除其余 7 种膜蛋白是糖蛋白的可能性。

2.3.3 脂蛋白 苏丹黑 B 染色检测到脂蛋白 17 种(图 6、7)。Gel-pro 4.5 patch 软件分析,分子量为 38 kD(图 6 箭头所示)的膜蛋白染色最清晰,说明此种脂蛋白蛋白含量较高。

表 1 长牡蛎精子膜蛋白的分子量

Tab.1 The molecular weight (MW) of sperm membrane proteins from *Crassostrea gigas*

条带 Band	分子量 MW	条带 Band	分子量 MW	条带 Band	分子量 MW
r1	155.90	r8	75.48	r15	45.73
r2	149.10	r9	64.39	r16	38.22
r3	130.54	r10	62.40	r17	34.18
r4	116.31	r11	58.41	r18	32.24
r5	103.94	r12	55.33	r19	30.38
r6	95.28	r13	51.52	r20	28.08
r7	84.76	r14	48.62	r21	26.31

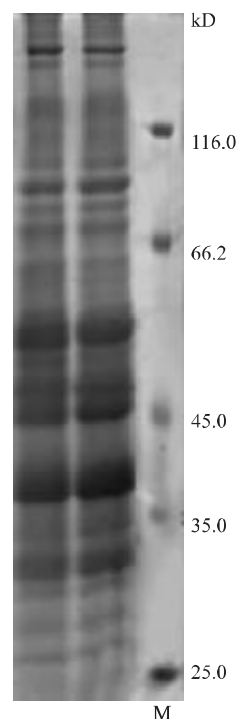


图 4 长牡蛎精子膜蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.4 The SDS-PAGE electrophoretogram of sperm membrane proteins from *Crassostrea gigas*

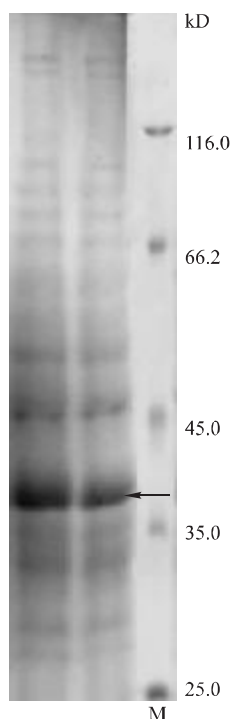


图5 长牡蛎精子膜蛋白糖蛋白的电泳图谱
Fig.5 Electrophoretogram of glycoprotein in the sperm membrane protein from *Crassostrea gigas*

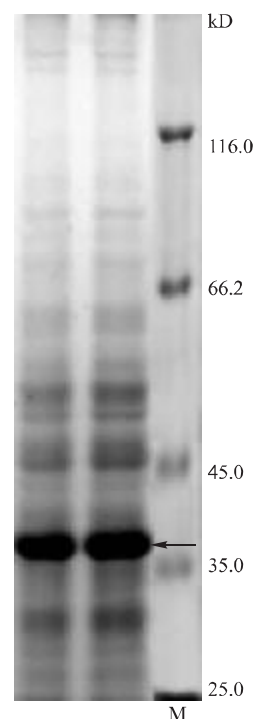


图6 长牡蛎精子膜蛋白脂蛋白的电泳图谱
Fig.6 Electrophoretogram of lipoprotein in the sperm membrane protein from *Crassostrea gigas*

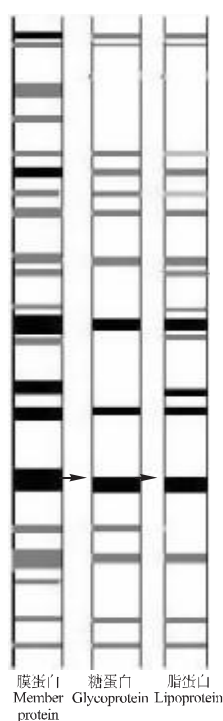


图7 长牡蛎膜蛋白、糖蛋白、脂蛋白示意图
Fig.7 The sketch map of membrane proteins, glycoprotein and lipoprotein from *Crassostrea gigas*

3 讨论

精子膜蛋白在提取的过程中,首先要保证精子的纯度。本实验所用的雄性长牡蛎性腺饱满,解剖后在显微镜下观察,精子活力很好,但精液里混有部分精原细胞,大约占5%左右。150 g离心后,再取上清精液显微观察,结果显示视野中仅有少数精原细胞(其含量<1%),从而保证了精子的纯度,在一定程度上消除了精原细胞对实验结果的影响。本实验先将精液通过0.1 mol/L PBS缓冲液清洗两次,再经0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液清洗两次,去除精子表面蛋白的影响。

精子膜蛋白在提取和纯化过程中常用去污剂,使膜蛋白从脂质双分子层结构中溶解下来。去污剂是一种双极性分子,可与膜蛋白形成分子团结构。本实验采用的膜蛋白提取缓冲液中含有1%的去污剂Triton X-100,并加入了少量SDS。Triton X-100可以将膜蛋白从精子膜的脂质双分子层结构中溶脱下来,而低浓度的SDS可以使膜结构暂时松散,更有利于膜蛋白的溶脱。程立均等^[22]也证明加入低浓度的SDS可提高Triton X-100对精子膜蛋白的

溶脱量,提高精子膜蛋白的提取效率。此外,本实验采用 50 000 g 离心去除脱膜精子部分。由于脱膜精子部分颗粒微小,又不能自动聚团因此较低的离心速度不能将其从上清中完全去除。预实验中发现,采用 20 000 g 离心 30 min 后, -20 ℃ 保存上清液,解冻做电泳分析,发现 EP 管中有少量点状物质,显微镜观察是精子脱膜物质;而采用 50 000 g 离心 15 min 后,反复冷冻解冻 2 次,显微镜观察均未发现精子脱膜物质,由此可见,50 000 g 离心可更进一步保证精子膜蛋白的纯度。

精子膜蛋白种类繁多,它们与脂质和糖类组成脂蛋白和糖蛋白^[28]。本研究检测到 21 种长牡蛎的精子膜蛋白,分子量在 26~156 kD 之间,其中 14 种为糖蛋白,17 种为脂蛋白,13 种既为糖蛋白又为脂蛋白。实验结果还发现一种分子量为 38 kD 的膜蛋白既为糖蛋白又为脂蛋白,且高碘酸-Shiff 试剂和苏丹黑 B 染色最深,条带最清晰,说明此种蛋白丰度最高,对此种膜蛋白有待于进一步分离纯化,分析其结构和功能及其在精卵识别中的作用。

参考文献:

- [1] 许伟定,胡庆明,隋锡林,等.太平洋牡蛎染色体核型的研究[J].水产科学,1992,11(2):14-15.
- [2] Nedemitsu S, Shinkawa H. On the chromosomes of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Chromosome Inf Serv, 1973, 15: 29-30.
- [3] Ahmed M, Sparks A K. A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*) [J]. J Fish Res Bd Canada, 1967, 24(10): 2155-2169.
- [4] Thitiot-Quiereux C, Ayraud N. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves de gasteropodes marins [J]. Mar Biol, 1982, 70: 165-175.
- [5] Thitiot-Quiereux C. Les caryotypes Ostreidae et Mytilidae [J]. Malacologia, 1984, 25(2): 465-476.
- [6] 郑小东,王如才,王昭萍,等.太平洋牡蛎二倍体与一倍体的核型研究[J].中国水产科学,2000,7(2):96-97.
- [7] 郑小东,王昭萍,王如才,等.太平洋牡蛎染色体 G-带和 Ag-NORs 的研究[J].中国水产科学,1999,6(4):104-105.
- [8] Kelly L S, Snell T W. Role of surface glycoproteins in mate-guarding of the marine harpacticoid *Tigriopus japonicus* [J]. Mar Biol, 1998, 130(4): 605-612.
- [9] Ma Xue-Hai, Shi Yu-Liang. A Patch Clamp Study on Reconstituted Calcium Permeable Channels of Human Sperm Plasma Membranes [J]. Acta Physiol Sinica, 1999, 51(5): 571-579.
- [10] Bleil J D, Wassarman P M. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein [J]. Dev Biol, 1983, 95: 317-321.
- [11] Catherine D T, Richard A C. Distinct membrane fractions from mouse sperm bind different zona pellucida glycoproteins [J]. Biol Reprod, 2002, 66: 65-69.
- [12] Bercegeay S, Allaire F, Jean M, et al. Differences in the macromolecular composition of zona pellucida isolated from bovine oocytes, embryo, and A23187 pretreated oocytes [J]. Reproduction, Nutrition, Development, 1993, 33(6): 567.
- [13] 周占祥,邓泽沛,孙秀华.牛精子膜麦芽凝集素结合糖蛋白的分离与定位[J].北京农业大学学报,1994,20(3):327-331.
- [14] Sarkar M, Majumder G C, Chatterjee T. Goat sperm membrane: Lectin-binding sites of sperm surface and lectin chromatography of the mature sperm membrane antigens [J]. Biochem Biophys Acta, 1991, 1070: 98-204.
- [15] Hermann J, Kail B. The isolation and characterization of a concanavalin A receptor from boar spermatozoa surface [J]. Biochem Biophys Acta, 1981, 643: 30-40.
- [16] 夏兴中,傅青岚,孙册,等.猪精子膜中一个糖蛋白的分离纯化[J].生物化学与生物物理学报,1991,23(4):325-329.
- [17] Podell S B, Vacquier V D. Purification of the Mr 80 000 and Mr 210 000 proteins of the sea urchin sperm plasma membrane [J]. J Biol Chem, 1985, 260(5): 2715-2718.
- [18] 阎隆飞,吴显荣.农业生物化学[M].北京:科学出版社,1986.
- [19] 刘慧慧,李太武,苏秀榕,等.鲍配子识别蛋白的研究[J].动物学杂志,2003,38(6):104-109.
- [20] 丁军,蒋一珪,单仕新,等.异源精子质膜蛋白质在银鲫卵雌核发育初级控制中的作用[J].科学通报,1993,38(5):455-458.
- [21] 杨彦豪,孙效文,雷清泉.精子膜蛋白在异精雌核发育银鲫中的作用[J].上海水产学报,2006,15(4):488-492.
- [22] 程立均,康现江,穆淑梅,等.中华绒螯蟹精荚分级分离及其蛋白组分分析[J].动物学杂志,2005,40(5):95-98.
- [23] 王琦.中华绒螯蟹精子膜蛋白提取、抗体制备及其免疫定位研究[D].河北:河北大学水生生物系,2005:6.
- [24] 周先碗,胡晓倩.生物化学仪器分析与实验技术[M].北京:化学工业出版社,2003.155-183.
- [25] 程玉祥.茶叶糖蛋白的研究[D].安徽:安徽农业大学茶学,2002:6.
- [26] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000.22-25.
- [27] 杨安钢,毛积芳,药立波.生物化学与分子生物学实验技术[M].北京:高等出版社,2001:42.
- [28] 陈大元.受精生物学受精机制与生殖工程[M].北京:科学出版社,2000:131-132.

Extraction and biochemical analysis of sperm membrane protein from pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

LIU Li-yan^{1,2,3}, YANG Ai-guo¹, WANG Qing-yin¹, ZHOU Li-qing¹, LIU Zhi-hong¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Minister of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 3. South Ocean Tech Co. Ltd. of Zhanjiang Evergreen Group, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: The extraction condition of sperm membrane proteins from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) were optimized in two aspects: the extraction time and the concentration of TritonX-100. The final optimized extraction conditions: sperms were centrifuged by 150 g to remove spermatogonia, cleaned twice in PBS buffer and tris-HCl buffer respectively, and centrifuged for 10 min at 3 000 g to obtain sperm suspension. Then the sperm suspension was put into triple volumes of extraction buffer including 1% TritonX-100, cooled in ice for 1 h, centrifuged for 15 min at 50 000 g, and the sperm membrane solution was finally collected. By SDS-PAGE gels electrophoresis, 21 kinds of sperm membrane proteins were dyed ranging from 26 kD to 156 kD by coomassie brilliant blue R-250, 14 kinds of glycoprotein were detected by periodic acid-schiff reagent (PAS), 17 kinds of lipoproteins were detected by Sudan Black B, and 13 kinds of membrane proteins were identified as either glycoprotein or lipoprotein. The results show that the r16 membrane protein was not only glycoprotein but also lipoprotein, whose molecular weight was 38 kD. This r16 membrane protein was dyed clearest by coomassie brilliant blue R-250, periodic acid-schiff reagent (PAS) and Sudan Black B. R12 membrane protein was dyed as clear as r16 membrane protein, whose molecular weight was 55 kD, but r12 membrane protein wasn't dyed clearer than r16 membrane protein. It proved that r16 membrane protein and r12 membrane protein were similar in protein abundance, however they were different in glycosylation and lipid. It is necessary to separate and purify these two membrane proteins. These results would provide useful information for separation and purification of sperm membrane protein in *Crassostrea gigas* and established further foundation for spermatogenesis and fertilization research. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 889 – 895]

Key words: *Crassostrea gigas*; sperm membrane protein; glycoprotein; lipoprotein

Corresponding author: WANG Qing-yin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn