

·研究简报·

合浦珠母贝精子激活的离子选择性*

Selectivity of ions for spermatozoa activation of Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*

喻达辉 江世贵¹ 陈竞春 苏天凤

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

(1 中山大学生物系, 广州 510275)

Yu Dahui Jiang Shigui¹ Chen Jingchun Su Tianfeng

(South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510300)

(1 Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

关键词 合浦珠母贝, 精子激活, 离子选择

Keywords *Pinctada fucata*, sperm activation, selection of ion

合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)是我国海产珍珠最重要的母贝,其繁殖生物学有特殊之处,即人工解剖获得的精子在自然海水中不运动,没有受精能力,需用一定的化学物质激活才能受精^[1-3]。生产中常用一定浓度的氨海水来激活。但激活过程中有关离子的作用未见有文献报道,为此我们在合浦珠母贝精子实验生物学研究^[4]的基础上,对精子激活过程中对离子的选择性作一简要报道。

1 材料和方法

1.1 实验贝来源

合浦珠母贝分别于1996年8月12日、10月29日、12月23日、1997年4月14日和1998年2月16日购自深圳大亚湾东山珍珠场,运回后在水族箱内吊养,人工海水盐度30~35,水温16~29℃,定期排污、换水。

1.2 激活剂的筛选

考虑到氨水在合浦珠母贝精子激活中的特殊作用,选用氯化铵等几种铵盐。并根据海水的主要离子成分,选用Na⁺、K⁺的氯化物和硝酸盐、Mg²⁺、Ca²⁺的氯化物,以探讨它们在合浦珠母贝精子激活中的作用。

1.3 激活液的配制

1.3.1 不同pH的氨海水 自然海水(盐度33,高压灭菌)和人工配制的无Ca²⁺、Mg²⁺人工海水(盐度30),用氨水(NH₃·H₂O)调节pH,分别配成pH 8.0(对照组,未加氨水)、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0和11.5共8个不同pH组的氨海水,贮于滴瓶备用。

1.3.2 NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、NaNO₃、KNO₃、NH₄Cl、NH₄NO₃、

(NH₄)₂SO₄和(NH₄)₂CO₃溶液 用双蒸水分别配成浓度为1.0%、2.0%、3.0%、4.0%和5.0%的溶液储于滴瓶中备用。

1.3.3 不同盐度的氨海水 将自然海水浓缩至盐度45,然后分别稀释为盐度45、40、35、30、25、20、15和10共8个盐度组,用氨水调节pH为9.5。

1.3.4 胎盘绒毛膜促性腺激素(HCG)和促黄体素释放激素A₂(LHRH-A₂)溶液 分别用海水和蒸馏水配成浓度为25、50、75、100、125、250、500和1 000 IU/ml的HCG溶液和浓度为5、10、20、30 μg/ml的LHRH-A₂溶液。

1.4 激活实验

当贝壳张开时用镊子头部插入壳口,使之不能闭合,用解剖刀切断闭壳肌。性腺乳白色者一般为雄性,用注射针头取少许精液于载玻片上,然后加激活液稀释、激活,在显微镜下观察精子的激活情况。

用激活率的高低表示激活效果,激活率以运动精子数占精子总数的百分比表示。

2 结果

2.1 NH₄⁺对合浦珠母贝精子的激活作用

不同pH的氨海水对合浦珠母贝精子激活实验结果见图1。由图1可知,自然海水对精子没有激活作用,但随着氨水浓度的增加,激活率也增加。pH达9.5~10.5范围内激活率最高。不同盐度的海水配成相同pH的氨海水(pH 9.5)激活合浦珠母贝精子,结果见图2。结果表明,盐度在25~35范围内有利于提高精子的激活率。

收稿日期:1998-05-25

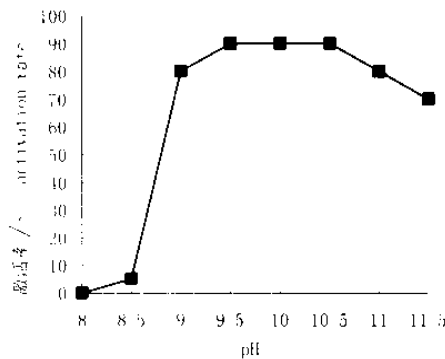


图1 氨海水 pH 对合浦珠母贝精子激活率的影响

Fig.1 Effect of pH of ammonia sea water on activation rate of *P. fucata* sperm

另外,用 NaOH 配成不同 pH 的海水进行激活,没有激活作用;用蒸馏水配制的氨水也没有激活作用;用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的人工海水配成的氨水可以激活。表明 pH 的高低不是精子激活的直接因素, NH_4^+ 也不是唯一的激活离子,还必需有海水中除 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 以外的离子参与才能激活。

2.2 几种主要阴离子对合浦珠母贝精子的激活作用

用双蒸水配制的 1.0% ~ 5.0% 的 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 盐溶液对合浦珠母贝精子的激活作用见表 1。仅 NH_4Cl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 有一定的激活作用。由于 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 属于强酸弱碱盐,偏酸性,会影响其激活效果,加入氨水调 pH 后,激活效果显著提高。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对精子的激活也受 pH 的影响,而 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 不论 pH 如何均不能激活。表明 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 在激活过程中起作用,而 CO_3^{2-} 则不起作用。另外,实验显示,尿素也不具有激活作用。

表 1 几种阴离子对合浦珠母贝精子的效果(pH 5.6~6.6)

Table 1 Effects of several main anions on activation of *P. fucata*'s sperm(pH 5.6~6.6)

激活剂 activator	浓度/ % concentration				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0*
NH_4Cl	-	-	+	+	-
NH_4NO_3	-	-	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	+	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	-	-	-	-	-

注: - 不激活 unactivated; + 激活 activated; 5.0% 的 NH_4Cl 其 pH 为 5.6 the pH of 5.0% NH_4Cl is 5.6.

2.3 几种主要阳离子对合浦珠母贝精子的激活作用

用 1.0% ~ 5.0% 的 NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 NaNO_3 和 KNO_3 的溶液对合浦珠母贝精子进行激活试验,发现都不能激活。将上述 3.0% 的溶液用氨水调 pH 至 10.5 后再试验,仅 NaCl 、 KCl 、 NaNO_3 和 KNO_3 可以激活。又调 pH 10.5 ~ 10.7 进行不同浓度

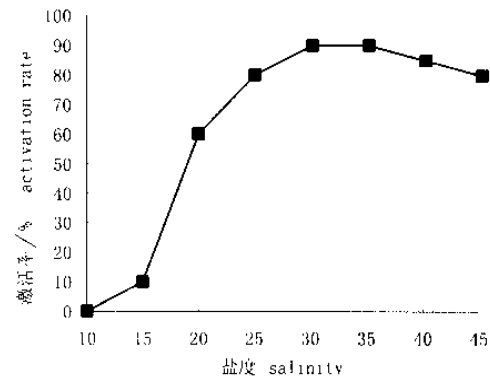


图2 盐度对合浦珠母贝精子激活率的影响(pH 9.5)

Fig.2 Effect of salinity on activation rate of sperm of *P. fucata*

的激活试验,结果见表 2。由表 2 可知, NaCl 、 KCl 的激活效果最好,但 NaCl 的最适浓度范围不如 KCl 大; NaNO_3 和 KNO_3 的激活效果次之。另外, KCl 、 KNO_3 激活后精子的运动时间较短。

表 2 不同浓度的 Na^+ 、 K^+ 对合浦珠母贝精子的激活效果(pH 10.5~10.7)Table 2 Effects of different concentrations of Na^+ and K^+ on activation of *P. fucata*'s sperm (pH 10.5~10.7)

激活剂 activator	浓度/ % concentration				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
NaCl	+	+++	+++	++	+
NaNO_3	+	++	++	++	+
KCl	+	+++	+++	+++	+++
KNO_3	-	+	+	+	+

注: - 表示不激活 unactivated; + 20% 以下激活 less than 20% activated; ++ 30% ~ 60% 激活 30% ~ 60% activated; +++ 60% 以上激活 more than 60% activated.

2.4 激素对合浦珠母贝精子的激活作用

用海水配制的 HCG 对合浦珠母贝精子具有激活作用,结果见图 3。当 HCG 浓度为 500 IU/ml 时激活效果最好,低于 100 IU/ml 时不能激活。与氨海水的激活情况有所不同,氨海水可以立即激活精子,而 HCG 则需 30 ~ 60 s 才能逐渐激活。用双蒸水配制的 HCG 不具激活作用。另外,实验显示 LHRH-A₂ 没有激活作用,有的批号的 HCG 也没有激活作用。

3 讨论

3.1 几种离子在合浦珠母贝精子激活中的作用

自然海水、 KCl 、 NaCl 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 NaNO_3 和 KNO_3 等对合浦珠母贝精子都没有激活作用,表明海水的主要离子成分 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等不能改变精子细胞膜的离子通透性,对精子激活没有作用。而非金属离子 NH_4^+ 具有激活作用,表明 NH_4^+ 可

以对精子细胞产生某种影响,是唯一能够激活合浦珠母贝精子的阳离子。但用双蒸水配制的氨水没有激活作用,表明只有 NH_4^+ 也不能激活,必须要有除 OH^- 以外的其它阴离子的存在,通过几种铵盐试验比较, Cl^- 是最必需的,是合浦珠母贝精子激活最重要的阴离子。

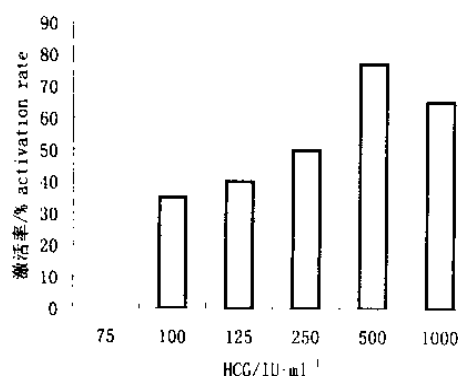


图 3 HCG 对合浦珠母贝精子激活率的影响

Fig. 3 Effect of hormone HCG on activation rate of *P. fucata* sperm

在 KCl 、 NaCl 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 NaNO_3 和 KNO_3 溶液中加入一定量的氨水后, KCl 、 NaCl 、 NaNO_3 和 KNO_3 能够激活合浦珠母贝精子。这一现象说明, Na^+ 、 K^+ 虽然不能激活精子,但在激活过程中起着不可或缺的作用,是离子交换的具体对象。而 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 则没有作用。从精子的运动时间来看, Na^+ 的作用比 K^+ 强。

3.2 合浦珠母贝精子激活的离子选择性

Na^+ 和 Cl^- 是参与合浦珠母贝精子激活的最主要离子,也是海水的主要离子成分。说明合浦珠母贝精子对离子的选择性是与海水的离子成分相适应的。在实验中发现,精子在 K^+ 溶液中的运动时间较 Na^+ 溶液的短,这与 K^+ 可延长淡水鱼类的鲤等精

子寿命的情况相反^[5]。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 在精子激活过程中可有可无,而单独存在时即使加入氨水也不能激活,这与某些淡水鱼类中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对精子活力的抑制情况相似^[6]。

在合浦珠母贝的受精生物学实验中发现,只要有一定量的 NH_4^+ 存在,精子能够存活十几个小时。而在载玻片上的激活实验中,由于 NH_4^+ 变成氨挥发,精子停止运动;重新加入 NH_4^+ ,精子又开始运动。说明精子的激活有赖于 NH_4^+ 的存在, NH_4^+ 能够维持其离子通道打开的持续状态。

3.3 激素 HCG 在合浦珠母贝精子激活过程中的作用

HCG 对合浦珠母贝精子的激活是一个缓慢的、渐进的过程,而 NH_4^+ 的激活在瞬间即完成。表明 HCG 的激活作用是间接的,而 NH_4^+ 的激活作用是直接的。

用双蒸水配制的 HCG 不能激活精子,说明 HCG 只改变精子细胞膜离子通道的通透性,而要使其激活则必须要有离子的实质参与,只有发生了离子的交换才会有能量的获得或释放,从而产生激活反应。

参 考 文 献

- 1 金启增,郭澄联,胡建兴,等.珍珠贝的种苗生物学.北京:海洋出版社,1992
- 2 金启增,魏贻尧,姜卫国.合浦珠母贝人工育苗的研究I.人工授精.南海海洋科学集刊,1981(2):107~115
- 3 Wada K T. Breeding study of Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. National Research Institute of Aquaculture, 1984, 6: 79~115
- 4 喻达辉,陈克春,苏天凤,等.合浦珠母贝精子的实验生物学初步研究.热带海洋,1998,17(1):83~87
- 5 严安生,王其和,李诗模.渗透压和钾对鲤、团头鲂精子活力的影响.淡水渔业,1993,23(3):19~21
- 6 严安生,宋贵文,闫拥军.鲤和团头鲂精子生理生态特性的研究II.钙、镁对精子活力的影响.淡水渔业,1993,23(5):5~7