

红螯螯虾雄性生殖系统组织蛋白酶的初步研究

樊玉杰, 郭占林, 赵云龙, 安传光, 马强

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 用福林酚法和复性电泳对红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 雄性生殖系统的组织蛋白酶 (Male Reproductive System Cathepsin, MRSC) 进行了定性和定量分析, 以探讨其在雄性生殖系统发育、精荚形成和精子释放过程中的作用。福林酚法测定结果显示: 仔虾精巢蛋白酶比活力分别在 pH6 和 pH10 时出现 2 个高峰, 而成虾精巢只在 pH10 时出现 1 个活力较高的峰。成虾雄性生殖系统的各部分在 pH10 ~ 12 的条件下有较强的蛋白酶比活力, 于碱性缓冲液中浸泡有助于其后输精管内含物的溶解。复性电泳分离到 4 个蛋白酶条带, 按分子量从大到小依次为: MRSC-A、MRSC-B、MRSC-C 和 MRSC-D。MRSC-A 和 MRSC-D 广泛分布于雄性生殖系统各部分, 其中 MRSC-A 为酸性蛋白酶, 而 MRSC-D 是碱性蛋白酶; MRSC-C 为酸性蛋白酶, 只分布于中输精管; MRSC-B 活性受 pH 值影响不大, 仅存在于后输精管。在红螯螯虾雄性生殖系统的不同发育阶段, 其组织蛋白酶的组成和活性不同。作为精荚的重要组成成分, 组织蛋白酶与精荚排出体外后的硬化有直接关系, 并促进随后精荚基质的水解以及精子的释放。[中国水产科学, 2009, 16(2): 192-198]

关键词: 红螯螯虾; 雄性生殖系统; 组织蛋白酶

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)02-0192-07

哺乳动物精巢中存在多种组织蛋白酶, 其表达受精巢内生殖细胞和支持细胞的调控^[1-3]。组织蛋白酶能促进细胞穿过血睾屏障, 有助于精子从生精上皮释放到管腔中, 并清除曲精细管内死伤精细胞和生精上皮的残留物^[4]。其功能的缺失与多种人类生殖系统疾病的发生密切相关^[5]。

甲壳动物的精子细胞需要经历繁杂的变形过程才形成精子, 再经由复杂的输精管排出体外^[6-7]。在精细胞的变形过程中, 原有的细胞结构发生改变, 部分胞质物质分解, 同时精子特有的结构逐渐形成^[8]。精细胞变形过程中蛋白质物质的分解和再利用必然与雄性生殖系统的组织蛋白酶活性有关。另有研究表明, 哺乳动物及短尾类甲壳动物的精浆中蛋白水解活性在精液授入雌体后的硬化和随后的液化过程中起到重要的作用^[9-13]。红螯螯虾 (*Cherax*

quadricarinatus) 的雌体没有纳精囊, 精卵在体外水环境中完成受精过程^[14-15], 与短尾类相比, 其雄性生殖系统组织蛋白酶的组成和功能必然存在一定差异。作者在对红螯螯虾生殖系统形态学研究的基础上, 采用蛋白酶活性测定和复性电泳的方法对红螯螯虾不同发育时期精巢的组织蛋白酶以及雄性生殖系统各部分的组织蛋白酶进行了定性和定量的研究, 以期初步了解红螯螯虾雄性生殖系统蛋白酶的种类和基本性质, 及其在雄性生殖系统发育中的表达情况, 为进一步探讨蛋白酶在甲壳动物精子发生、精液的凝固和水解过程中的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用虾取自浙江省淡水水产研究所养殖场,

收稿日期: 2008-09-21; 修订日期: 2008-11-26.

基金项目: 国家自然科学基金 (30670227); 上海市科技兴农重点攻关项目 [6-1 (2006)]; 上海市科学技术委员会重大项目 (08DZ1906401).

作者简介: 樊玉杰 (1979-), 女, 博士研究生, 主要从事水生动物发育生物学研究. E-mail: fanyujie29@gmail.com

通讯作者: 赵云龙, 教授. Tel: 021-62232153; E-mail: ylzha@bio.ecnu.edu.cn

暂养于上海市青浦区商榻镇华东师范大学水产实习基地。体长5~7 cm的仔虾暂养于30 cm×40 cm×15 cm的聚乙烯水族箱中,每箱15只,水深5 cm;体长8~13 cm的仔虾和体长超过13 cm的成虾分别暂养于80 cm×50 cm×50 cm的聚乙烯水族箱中,仔虾每箱10只,成虾每箱6只,水深30 cm。各水箱放置适量洗净的瓦片供虾遮蔽、躲藏,自然水温,连续增氧,每日投喂饵料(广东恒兴牌普通虾用颗粒饲料)及适量剪碎的螺蛳肉,次日吸去粪便、残饵,换水约1/3。

1.2 仔虾精巢与成虾生殖系统各部分组织蛋白酶活性测定

1.2.1 样品制备 本部分实验所用红螯螯虾仔虾的体长为(12.18±0.67) cm ($n=10$),头胸甲长(眼眶后缘至头胸甲末端)为(3.88±0.35) cm ($n=10$);成虾体长为(16.18±0.73) cm ($n=8$),头胸甲长(5.38±0.48) cm ($n=8$)。将虾迅速解剖后,取仔虾精巢及成虾精巢、前精管、中输精管、后输精管及后输精管管壁,称重、每种组织各取1 g,加入10 mL预冷的生理盐水冰浴匀浆后,低温10 000 r/min离心30 min,取其上清液以考马斯亮兰法测定组织蛋白浓度(试剂盒购自南京建成生物工程研究所),并将样品蛋白浓度调至1 mg·mL⁻¹用于下述蛋白酶活力测定。

1.2.2 测定方法 根据参考文献[9],以福林酚法测定精巢组织蛋白酶活力。反应缓冲液的pH梯度分别为pH5、pH6、pH7、pH8、pH9、pH10、pH11和pH12,各梯度浓度均为0.05 mol·L⁻¹。pH 5和pH 6是柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,pH7~9为Tris-HCl缓冲液,pH值为10~12碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液。每个反应设3个平行组。反应体系总体积为0.4 mL,其中含5 g·L⁻¹干酪素的缓冲溶液0.3 mL以及适当稀释的精巢蛋白样品0.1 mL。二者混匀后于40℃水浴1 h。水浴结束后每管各加0.2 mL 30%三氯乙酸中止反应,离心后取上清液0.5 mL加入2.5 mL福林酚甲溶液,混匀,于室温静置10 min后,各加0.25 mL福林酚乙溶液,混匀;室温静置30 min后,于650 nm波长分光光度计比色。每个pH值各设3个空白对照组。空白对照组中仅把0.3 mL含干酪素的缓冲液进行与实验组进行同等条件水浴,加三

氯乙酸终止反应的同时加入精巢蛋白样品0.1 mL。其他操作同实验组。按照酪氨酸标准曲线计算反应结束后体系中酪氨酸的实际浓度,减去空白对照组的本底后,计算各pH值条件下精巢蛋白酶活力。蛋白酶的活力定义为:在40℃下,每min水解产生1 μg酪氨酸为1个酶活力单位(U, μg·min⁻¹)。

1.3 蛋白酶复性电泳

以蛋白酶复性电泳法分析雄性红螯螯虾生殖系统各部分蛋白酶的组成。复性电泳用一号仔虾体长(4.66±0.54) cm ($n=18$),二号仔虾及成虾样品同1.2.1。仔虾精巢及成虾的精巢、中输精管和后输精管,各样品匀浆及蛋白浓度测定同1.2所述。复性电泳方法参照Heussen^[16]和Jayasanker^[9]的方法并稍加修改。电泳的操作方法及溶液配制与常规十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)基本相同^[17]。差别在于分离胶中加入干酪素,使其在胶中的最终质量分数为0.1%。组织匀浆的上清液与样品缓冲液混匀后,放入60℃的水中,缓慢加热至沸腾。采用分离胶质量分数为10%,浓缩胶质量分数为4%,蛋白上样量每孔50 μg。电泳后,用蒸馏水把胶洗3次,每次5 min。再将胶浸于2.5%的Triton X-100溶液内,于室温下轻摇1 h,其间每20 min换液1次。水洗3次后,再分别把胶浸没在pH6的0.05 mol·L⁻¹的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和pH10的0.05 mol·L⁻¹的碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液中,40℃恒温摇床中孵育20 min。孵育结束后考马斯亮蓝R-250常规染色、脱色。制干胶,透射扫描得电泳图谱。

1.4 成虾后输精管内含物的浸泡实验

将雄性成虾(同1.2.1)解剖后,迅速分离出后输精管,去掉透明的管壁,取其内含物。将内含物切成质量约0.1 g的小块,分别将其浸于1 mL浓度为0.05 mol·L⁻¹的系列缓冲液中(见1.2.2),于室温下保存24 min。浸泡结束后观察组织的形态变化,并将部分材料置于载玻片上用苏木精染色,水洗后制成临时装片,显微镜下观察并拍照。

1.5 数据统计与分析

蛋白酶活性测定结果均以3个平行组数据的平

均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示,用SPSS软件Duncan法进行显著性检验和多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同pH条件下仔虾与成虾精巢组织蛋白酶活性的差异

在pH 5~12的范围内,红螯螯虾仔虾和成虾精巢都表现出一定的蛋白酶活性(表1)。仔虾精巢的

组织蛋白酶比活力在pH 6和pH 10出现2个峰值,pH 6时比活力较高,为 $8.32 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白),pH 10时,比活力为 $3.91 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白);而成虾精巢的蛋白酶比活力主要在pH10时出现1个明显的峰值[$6.33 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)]。在7~9的pH值范围内,2种样品蛋白酶的比活力较低。在pH 9时,2个样品的蛋白酶比活力均达到各自的最低点。

表1 在不同pH值下红螯螯虾雄性生殖系统各部分组织蛋白酶比活力比较

Tab. 1 Protease specific activities in different tissues of *C. quadricarinatus* male reproductive system under different pH values
n=3; $\bar{x}\pm SD$; $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)

pH	仔虾精巢 Premature crayfish testis	成虾 Aldult crayfish				
		精巢 Testis	前输精管 Anterior vas defences	中输精管 Middle vas deferens	后输精管 Posterior vas deferens	后输精管管壁 Posterior vas deferens wall
5	4.13 ± 0.49^b	4.63 ± 0.53^b	12.47 ± 0.75^a	8.79 ± 0.15^a	11.11 ± 0.10^a	6.10 ± 0.13^a
6	8.32 ± 1.75^a	4.22 ± 0.49^{bc}	7.80 ± 1.64^{bc}	5.39 ± 0.15^b	4.33 ± 0.17^b	3.70 ± 0.52^b
7	1.95 ± 0.44^{de}	2.95 ± 0.57^d	11.00 ± 2.15^{ab}	3.44 ± 0.52^{cd}	3.91 ± 0.36^{cd}	3.33 ± 0.28^b
8	1.43 ± 0.29^{de}	3.43 ± 0.32^{cd}	10.49 ± 2.24^{abc}	3.78 ± 0.32^c	4.74 ± 1.01^c	3.36 ± 0.47^b
9	0.90 ± 0.45^e	2.76 ± 0.46^d	8.79 ± 1.21^{bc}	2.67 ± 0.51^d	3.11 ± 0.43^d	3.48 ± 0.43^b
10	3.91 ± 0.78^{bc}	6.34 ± 1.26^a	13.47 ± 0.91^a	8.08 ± 0.52^a	8.12 ± 0.72^b	5.83 ± 1.44^a
11	2.71 ± 0.38^{cd}	5.22 ± 0.92^{ab}	13.07 ± 3.19^a	8.89 ± 1.17^a	8.79 ± 0.37^b	6.26 ± 1.35^a
12	2.62 ± 0.40^c	5.29 ± 0.39^{ab}	7.60 ± 3.06^{bc}	9.05 ± 0.96^a	8.26 ± 0.42^b	5.98 ± 0.71^a

注:同列数值上标字母相同者表示差异不显著($P>0.05$),不同者表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Values with same superscripts in each column are not significantly different ($P>0.05$); values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

2.2 不同pH条件下成虾雄性生殖系统各部分的组织蛋白酶活性

红螯螯虾雄性生殖系统的5个部分都存在一定的蛋白酶活力(表1)。其中,前输精管蛋白酶活性最高,后输精管和中输精管次之,而精巢和后输精管管壁最低。

前输精管的组织蛋白酶比活力明显高于中、后输精管。前输精管蛋白酶比活力在pH值为5、7、8、10和11时活性较高,在pH 7和pH 10时形成2个高峰,分别为($11.00\pm 2.15 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)和($13.47\pm 0.91 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)。中输精管与后输精管蛋白酶活性的高低以及变化趋势极为相似,在pH 5~7时两者的蛋白酶比活力一致呈现减弱趋势。在pH 7~9时两者的组织蛋白酶保持较低的比活力,并在pH 9时

达到最低值,分别为($2.67\pm 0.51 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)和($3.11\pm 0.43 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)。二者的蛋白酶比活力在pH10~12范围内明显增强,与其他pH条件的下酶活性差异显著。后输精管的蛋白酶活性在pH 11时达到最大值,为($8.79\pm 0.37 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白);中输精管的蛋白酶活性在pH 12时达到最大值,为($9.05\pm 0.96 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)。

后输精管管壁和后输精管整体的组织蛋白酶比活力差异较大。总体上,管壁的组织蛋白酶比活力低于整体,仅在pH 5的条件下,管壁的比活力高于整体。在pH 6~9范围内,管壁的组织蛋白酶活力变化不大,介于 $3.33\sim 3.70 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白);而后输精管整体的组织蛋白酶活力较高,在 $3.11\sim 4.74 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)之间。pH 9时,两者的组织蛋白酶比活力都较低。在pH

10~12范围内,两者的组织蛋白酶比活力都有所增加,与pH 6~9下的蛋白酶比活力差异显著。管壁增加的幅度较小,并在pH 11时达到其最大值(6.26 ± 1.35) $U \cdot mg^{-1}$ (蛋白);而整体的组织蛋白酶活性显著增加,在pH 11时达到最大值(8.79 ± 0.37) $U \cdot mg^{-1}$ (蛋白)。

2.3 雄性生殖系统各部分蛋白酶复性电泳分析

根据蛋白酶活性测定结果,成虾精巢的活性在pH 10时达到最大值,而仔虾精巢的活性在pH 6时也比较高,故本次蛋白酶复性电泳中,电泳后的反应缓冲液分别设置为pH 6和pH 10。通过红螯螯虾雄性生殖系统复性电泳分析,共发现4条清晰可辨的条带,依照分子量从大到小分别命名为组织蛋白酶A、B、C和D(MRSC-A、MRSC-B、MRSC-C和MRSC-D),详见图1、2。

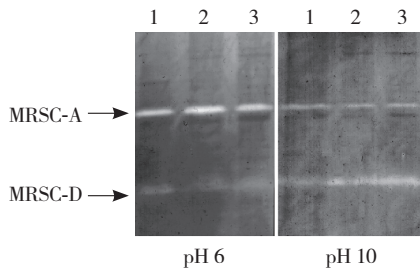


图1 红螯螯虾仔虾精巢与成虾精巢蛋白酶复性电泳图
1:1号仔虾精巢,体长(4.66 ± 0.54)cm; 2:2号仔虾精巢,体长(12.18 ± 0.67)cm; 3:成虾精巢,体长(16.18 ± 0.73)cm。

Fig. 1 Casein containing SDS-PAGE assay of cathepsins in testis of pre-mature and adult *Cherax quadricarinatus*
1,2: pre-mature individuals with bodylength of (4.66 ± 0.54) cm and (12.18 ± 0.67) cm respectively. 3: Mature individuals with bodylength (16.18 ± 0.73) cm.

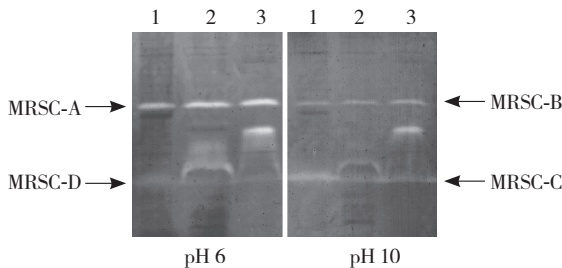


图2 红螯螯虾成虾雄性生殖系统各部分蛋白酶复性电泳图
1: 精巢 2: 中输精管 3: 后输精管

Fig. 2 Casein containing SDS-PAGE assay of cathepsins in male reproductive system of mature *Cherax quadricarinatus*
1. testis 2. middle vas deferens 3. posterior vas deferens

在pH 6和pH 10的环境条件下,在仔虾和成虾精巢中只检测到其中2个组织蛋白酶条带:MRSC-A和D(图1)。在pH 6时,MRSC-A的条带明显,显示较强的酶活性,仔虾精巢中MRSC-A的活性略高于成熟精巢,此条件下,MRSC-D的活性相对较弱;在pH 10时,与上述情况相反,各样品MRSC-A的活性较弱,而MRSC-D的活性较强。样品间对比发现,成虾精巢MRSC-D的活性比仔虾的强。

在pH 6和pH 10的条件下,MRSC-A和MRSC-D的活性条带也都存在于成虾输精管中(图2)。MRSC-A中、后输精管中的活性相当,都高于精巢。而MRSC-D与MRSC-A相反,其在精巢中的活性高于输精管。

在成虾输精管中检测到另外2种组织蛋白酶MRSC-B和MRSC-C(图2)。MRSC-B为后输精管所特有,其活性在酸性和碱性条件下相当。MRSC-C为中输精管所特有,其活性在pH 6时比pH 10时略高。

2.4 后输精管内含物浸泡结果

经过pH值为10~12的碱性缓冲液浸泡后,后输精管内含物的外部形态发生明显改变,材料变成半透明状,而经中性和酸性缓冲液浸泡后的材料变化不大,仍呈白色。

在浸泡后的、半透明的后输精管内含物中,索状精荚间基质的弹性和黏性减弱,可以用解剖针很容易地将索状的初级精荚分离开来。制成临时装片经苏木精染色后,在光镜下可见到分散开的索状初级精荚(图3)。而尚呈白色的后输精管分泌物中,初级精荚间的基质黏性仍然很强,由于初级精荚细弱,经不起牵拉,索状的精荚不能分离开来。

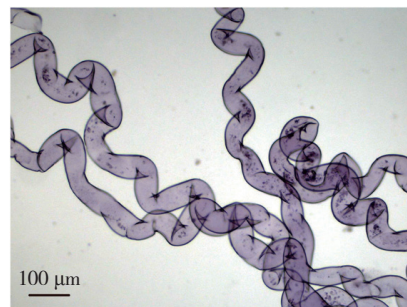


图3 红螯螯虾精荚

Fig. 3 Spermatophore of *C. quadricarinatus*

3 讨论

3.1 红螯螯虾雄性生殖系统组织蛋白酶的活性

在从酸性到碱性的pH范围内,仔虾精巢组织蛋白酶活性在pH6和pH10出现2个明显的峰值,而成虾精巢组织蛋白酶活性仅在pH10时出现1个峰值,但此时的酶活力强于仔虾精巢。仔虾的精巢尚处于发育过程中,其生理活动以细胞分裂为主,而成虾精巢中大多数生精小囊都完成了基本的减数分裂过程,进入精细胞变形、精子形成的阶段(另文发表)。精巢不同发育阶段下迥异的代谢过程必然对应着不同蛋白酶的表达和激活。

在不同的pH条件下,雄性生殖系统各部分组织蛋白酶的活性差异大、变化趋势复杂。雄性生殖系统各个部分都包含多种蛋白酶,每一种蛋白酶的最适pH值不同,因而其总活性在不同的pH值条件下呈现较大差异(表1)。在pH10~12的范围内,雄性生殖系统的各部分都表现出较高的蛋白水解活性。与后输精管整体相比,红螯螯虾后输精管管壁蛋白酶的活性较低,随pH变化,其活力变化不大。因此在碱性条件下蛋白酶活性高主要是输精管内含物而非管壁的特征。

据报道^[9]随着pH值的增加,锯缘青蟹(*Scylla serrata*)精浆的蛋白酶活力的变化趋势呈现钟形曲线,酶活性在pH 8时达到最大值。而红螯螯虾后输精管的蛋白酶活性虽然在pH 8时出现1个小的峰值,但其酶活性在pH 11时才达到最高。推测锯缘青蟹精液与红螯螯虾后输精管蛋白酶活性的差异主要有2个原因:第一,取材方面存在差异。在锯缘青蟹酶活测定时,取材仅限于输精管内的精液去除精荚后剩余的精浆;而本研究测定的是红螯螯虾后输精管的酶活,即精浆、精荚以及输精管壁的总合。第二,两者的繁殖习性不同,短尾类的锯缘青蟹雌体具有纳精囊,交配时雄体把精浆、精荚送入雌体的纳精囊,约半年后,雌蟹排卵时精子才从精荚中释放出来,完成受精^[18]。而长尾类的红螯螯虾雌体不具纳精囊,交配后精荚粘附于雌体头胸甲的腹面,经较短时间后,雌体排卵的同时精卵结合完成受精^[14]。

3.2 红螯螯虾雄性生殖系统蛋白酶的种类

本研究中蛋白酶复性电泳共发现4个有蛋白水解活性的条带。MRSC-C为中输精管特有,说明其仅在管壁中发挥其活性,而不随输精管内含物的下移在后输精管积累。而MRSC-B为后输精管特有,且其活性也存在于后输精管内含物。因此蛋白酶B为后输精管管壁产生并被分泌至管腔。红螯螯虾输精管的各个节段产生性质不同的分泌物,包围精子群,逐渐形成精荚^[15]。输精管各节段所产生的特异蛋白酶,是输精管分泌物的重要成分之一。

MRSC-A和MRSC-C为酸性组织蛋白酶,其活性在pH 6条件下较强,推测为溶酶体蛋白水解酶。而MRSC-B的活性受pH影响不大,MRSC-D在碱性条件下活性较高。MRSC-B和MRSC-D在组织细胞内的分布有待于进一步的研究。

红螯螯虾的雄性生殖系统一直连续不断地产生精子,精子发生过程中剧烈的形态变化以及生殖细胞在生殖管腔中的迁移均有赖于组织蛋白酶。因此雄性生殖系统中组织蛋白酶的种类较为丰富,且有些组织蛋白酶在不同部位以及在不同发育阶段还有不同形式的同功酶。在复性电泳中,蛋白酶的活性能否表现出来与酶蛋白本身是否容易复性有关,并且部分组织蛋白酶在体内往往以酶原形式贮存,需要一定的条件下激活后,才能表现相应的活力。因此,本次复性电泳极可能没有检测到输精管中所有的蛋白酶。

3.3 红螯螯虾雄性生殖系统蛋白酶在生殖交配过程的功能

交配后,红螯螯虾雄体排出的输精管内含物遇水先凝固成为一个白色的、坚固的胶块状结构,待到排卵后,此胶块状结构分解,释放出精子参与受精^[14]。雌体排卵时精子如何从精荚中释放出来至今尚不清楚。红螯螯虾的后输精管内含物蛋白质含量极为丰富^[19]。在碱性条件下,后输精管内含物的蛋白酶活性很高,其自身的蛋白成分被迅速分解,从而精荚间的基质变得疏松、黏性降低,索状的精荚才得以被分离开。故推测,蛋白水解酶在红螯螯虾精液胶块的

液化过程中起着重要的作用。

在生物体和自然水体中,碱性大于pH 10的环境极少见,但在雌虾排卵时,粘于雌体头胸部腹面的胶块状精荚某些部位或许可以形成局部的强碱性条件,激活组织蛋白酶原,已活化的蛋白酶通过自我催化作用以级联放大的形式触发精荚整体的组织蛋白酶活性,进而起到促进精荚解体、释放精子的作用。至于是哪一种或哪几种蛋白酶在此过程中起到主要作用、如何起作用,以及雌体的排卵对此过程的影响还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Luedtke CC, Andonian S, Igdoura S, et al. Cathepsin A is expressed in a cell- and region-specific manner in the testis and epididymis and is not regulated by testicular or pituitary factors [J]. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48 (8): 1 131-1 146.
- [2] Burdan F, Szumilo J, Dudka J, et al. The activity and immunorexpression of cathepsin D in rat male reproductive organs [J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2006, 65 (2): 111-115.
- [3] Odet F, Verot A, Le Magueresse-Battistoni B. The mouse testis is the source of various serine proteases and serine proteinase inhibitors (SERPINs): Serine proteases and SERPINs identified in leydig cells are under gonadotropin regulation [J]. *Endocrinology*, 2006, 147 (9): 4 374-4 383.
- [4] Anway MD, Wright WW, Zirkin BR, et al. Expression and localization of cathepsin K in adult rat sertoli cells [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70 (3): 562-569.
- [5] Gye MC, Kim ST. Expression of cathepsin L in human testis under diverse infertility conditions [J]. *Arch Androl*, 2004, 50 (3): 187-191.
- [6] 堵南山, 薛鲁征, 赖伟. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 雄性生殖系统的组织学研究 [J]. *动物学报*, 1988, 34 (4): 329-333.
- [7] Burton T E. The spermatid pathway and associated reproductive structures of the squat lobster *Thenus orientalis* (Lund, 1793) [J]. *Invertebr Reprod Dev*, 1995, 28 (1): 53-61.
- [8] 赵云龙, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾精子发生的研究 [J]. *动物学报*, 1997, 43 (3): 43-248.
- [9] Jayasankar V, Subramoniam T. Proteolytic activity in the seminal plasma of the mud crab, *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 116 (3): 347-352.
- [10] 管卫兵, 王桂忠, 李少菁. 蟹类精荚贮存和裂解研究进展 [J]. *水产学报*. 2007, 31 (1): 120-128.
- [11] Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein [J]. *J Clin Invest*, 1985, 76 (5): 1 899-1 903.
- [12] Lwaleed BA, Greenfield R, Stewart A, et al. Seminal clotting and fibrinolytic balance: a possible physiological role in the male reproductive system [J]. *Thromb Haemost*, 2004, 92 (4): 752-766.
- [13] Waheed A, Hassan M I, Eiten R L, et al. Human seminal proteinase and prostate-specific antigen are the same protein [J]. *J Biosci*, 2008, 33 (2): 195-207.
- [14] 赵云龙, 孟凡丽, 陈立侨, 等. 红螯螯虾繁殖习性的研究 [J]. *动物学研究*, 2000, 35 (5): 5-9.
- [15] 樊玉杰, 曾错, 赵云龙, 等. 红螯螯虾生殖系统的组织学研究 [J]. *上海师范大学学报: 自然科学版*, 2004, 33 (12): 42-47.
- [16] Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates [J]. *Anal Biochem*, 1980, 102: 196-202.
- [17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-92.
- [18] 康现江, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹精子碱性蛋白分布与受精 [J]. *动物学报*, 2001, 47 (专刊): 82-86
- [19] 丁银娣, 王群, 李恺, 等. 红螯螯虾雄性生殖系统的生化组成及精子代谢 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (5): 562-568.

Cathepsins in male reproductive system of red-craw crayfish, *Cherax quadricarinatus*

FAN Yu-jie, GUO Zhan-lin, ZHAO Yun-long, AN Chuan-guang, MA Qiang

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Cathepsins are necessary for male reproductive system to maintain normal function. The Folin-Phenol reagent method and casein containing SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) were used for preliminary qualitative and quantitative analysis of the cathepsins in male reproductive system of *Cherax quadricarinatus*, in order to better understand the functions of cathepsins during the development of male reproductive system, the formation and liquefaction of the spermatophore. The protease specific activities in premature and mature testis demonstrated different characters considering the pH value. At pH5–12, the activities of premature testis displayed two peaks respectively at pH 6 and 10; in mature testis only one peak of activity was observed at pH 10, of which the activity was higher those that in premature testis. In adults, the protease specific activities of vas deferens were higher than that in testis, among which anterior vas deferens had the highest activity. All parts of vas deferens showed high activities in alkaline pH range. Immersion in alkaline buffer of pH10–12 induced disassembly of the spermatophore matrix. As results of the casein containing SDS-PAGE assays, four bands with proteolytic activity were observed at pH6 and pH10, which were named MRSC (Male Reproductive System Cathepsin)–A, B, C and D coinciding with decreasing molecular weight. MRSC-A and D exhibited proteolytic activity within all tested parts of male reproductive system, including premature and mature testis as well as middle and posterior vas deferens of mature males. MRSC-A exhibited higher proteolytic activity in acidic pH range and the activities in middle and posterior vas deferens were higher than that in testis, by contraries MRSC-D was in alkaline pH range and it had higher activity in testis. Proteolytic activity of MRSC-C was detected exclusively in middle vas deferens, which was higher in acidic pH range. Activity of MRSC-B was exclusively in posterior vas deferens, which is slightly affected by pH. Cathepsin is an important ingredient of the spermatophore matrix of *Cherax quadricarinatus*. Given the facts that among most parts of male reproductive system of *Cherax quadricarinatus*, the proteolytic activities were considerably high in the alkaline pH range, and immersion in alkaline buffer of pH10–12 induced the disassembly of the spermatophore matrix to release the helix of primary spermatophore, we assume that the cathepsins in the male reproductive system of *Cherax quadricarinatus* are involved in the metamorphism of sperm cell, the coagulation and liquefaction of seminal plasma after the ejaculation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(2): 192–198]

Key words: *Cherax quadricarinatus*; male reproductive system; cathepsin

Corresponding author: ZHAO Yun-long. E-mail: ylzhao@bio.ecnu.edu.cn