

中华绒螯蟹精子线粒体的检测

范丽君, 周忠良, 陈东华, 赵云龙, 王群

(华东师范大学 生命科学院, 上海 200062)

摘要:以中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肌肉、鳃和精巢为对照,从线粒体标志酶 SDH 活性、线粒体特异性荧光探针(Rh123)以及线粒体 16S rDNA PCR 扩增 3 个途径,探讨了该蟹精子线粒体的存在状况。研究发现,肌肉和鳃 SDH 酶活性较高,精巢 SDH 酶活性显著低于肌肉和鳃,而精子 SDH 酶活性则无法检测到。使用 Rh123 检测发现,精巢中有较强的荧光,而精子中则无法观察到。通过 GenBank 中的中华绒螯蟹线粒体 16S rDNA 序列设计引物,利用 PCR 扩增方法,以 beta-actin 做内参,检测了中华绒螯蟹肌肉、鳃、精巢和精子中线粒体 16S rDNA 扩增情况,发现各组织或细胞 beta-actin 扩增片段大小、条带宽度和亮度基本一致,表明各模板 DNA 量基本一致;而在同一 DNA 浓度下,16S rDNA 的扩增片段长度虽一致,但其产物量存在明显差异,精子 16S rDNA 产物量显著低于其他 3 种组织,其条带宽度和亮度很弱;16S rDNA 扩增产物经测序分析及比对证明与已有序列完全吻合。上述结果表明,中华绒螯蟹精子中存在线粒体,但其线粒体的数量极显著低于精巢和其他组织,这也是利用灵敏度较低的 SDH 酶活性和 Rh123 探针以及常规的组织学和超微结构观察法难以检测到其精子线粒体的原因。[中国水产科学,2007,14(1):139—143]

关键词:中华绒螯蟹;精子;线粒体;SDH;Rh123

中图分类号:Q959.223

文献标识码:A

文章编号:1005—8737—(2007)01—0139—05

线粒体作为生物体新陈代谢的重要细胞器,在机体的整个生命活动中起着重要作用,它所产生的能量用于各种细胞器的功能活动。就大部分有鞭毛精子(如人和哺乳动物)而言,鞭毛的运动能力与其线粒体的多寡及其功能密切相关。因此,线粒体功能也就成了评价该类精子质量的重要依据之一^[1]。然而,甲壳动物的精子属无鞭毛精子,几乎不具有鞭毛精子的运动能力^[2],因此,该类精子是否存在线粒体以及线粒体能否作为该类精子质量评价的依据,尚需进一步探讨。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,其精子亦属无鞭毛精子。相关的研究发现,该蟹成熟精子中仅有线粒体衍生物,而无典型的线粒体结构^[3]。这在其他甲壳动物中也有相关报道^[4—8]。但对于十足类动物成熟精子中是否存在线粒体以及线粒体的功能的认识仍存在较大分歧^[9]。本研究利用线粒体标志酶 SDH 活性、线粒体特异性荧光探针 Rh123 以及线粒体 16S rDNA 的 PCR 扩增等方法,检测该蟹精子线粒体的存在情况,并探讨线粒体作

为精子质量评价指标的有效性,同时也为甲壳动物精子质量评价研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成熟 2 龄雄性中华绒螯蟹于 2005 年 10 月购自上海市长风集贸市场,解剖后迅速取出输精管,刺破输精管壁挤出精英,置于无钙离子人工海水(Ca^{2+} -FASW)中反复洗涤 3 次,0.125%胰酶处理 5 min,离心获得游离精子^[10]。用伊红染色法检测精子成活率,伊红终质量分数为 0.5%,染色时间 10 min,活精子率在 90%以上。同时,取同一个体的肌肉、鳃、精巢等组织,用于 PCR 和酶测定的材料置于-20℃保存,部分新鲜样品直接用于荧光探针的检测。

1.2 试剂及仪器

琥珀酸脱氢酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),罗丹明(Rh123)(Sigma 公司),蛋白酶 K(Merck 公司),SDS(Sigma 公司),DTT(Genview 公司),琼脂糖(Promega 公司),饱和酚、Taq 酶、dNTP

收稿日期:2006—01—13; 修订日期:2006—04—03。

基金项目:国家自然科学基金项目(30300265,30271012)。

作者简介:范丽君(1979—),女,硕士研究生,主要从事水生动物生殖生物学研究。E-mail:junjun888_0@163.com

通讯作者:王群。E-mail:qwang@bio.ecnu.edu.cn

(上海生工),德国产 TGRADIENT 型 PCR 仪,DY-CP-31D 琼脂糖水平电泳槽(北京六一仪器厂),UV-VIS7500 紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),Olympus BX 51 型荧光显微镜。

1.3 琥珀酸脱氢酶检测

琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)活性测定具体方法详见该产品说明书。SDH 酶活性以每毫克蛋白每分钟使反应体系的吸光度降低 0.01 为 1 个比活力单位。每个样品设 3 个平行组,重复 3 次。

1.4 线粒体荧光探针检测

利用线粒体特异性荧光探针 Rh123 检测精子线粒体的方法如下:调精子密度为 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个/mL,取 2.5 μ L 0.1 mg/mL 的 Rh123 加入到 400 μ L 精子悬液中,静置 25 min 以使 Rh123 进入线粒体,取一滴于洁净的载玻片上,荧光显微镜观察拍照,并以光镜照片做空白对照,具体方法详见该产品说明书;此外,精巢染色前采用直接压片法,而其染色方法与精子相同。精巢染色仅作为参照,以确定该方法的可靠性。

1.5 PCR 检测

1.5.1 总 DNA 的提取 提取中华绒螯蟹肌肉、鳃、精巢、精子 4 种组织或细胞的总 DNA,方法参照萨姆布鲁克^[5],精子 DNA 抽提时 DNA 裂解液中加入 7 μ L 1 mol/L DTT^[6]。1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,并测定其纯度和浓度。

1.5.2 PCR 扩增 从 GenBank 中检索到中华绒螯蟹线粒体 16S rDNA 的序列(AJ250642^[13]、AF312718^[14]),应用 Primer5.0 软件设计引物,上游引物为 5'-CCTGCCCACTGATTGATAG-3',下游引物为 5'-

TTCAACATCGAGGTCGCA-3',该引物的理论扩增片段长度为 436 bp;此外,从 GenBank 中检索到中华绒螯蟹 beta-actin 序列(AY910691),用同一软件设计引物,上游引物为 5'-TCGT-GCTCGACTCTGGTG-3',下游引物为 5'-GCAGCTCGTAAGACTTCTCC-3',该引物理论扩增片段长度为 276 bp。引物均由上海生工生物技术服务有限公司合成。

PCR 反应在 PCR 扩增仪上进行,反应体系为 20 μ L:2.0 μ L 10 $\times$ buffer,0.3 μ L Primer(20 μ mol/L),0.96 μ L Mg^{2+} (25 mmol/L),0.4 μ L dNTP (10 mmol/L),0.2 μ L Taq 酶(5 U/ μ L),3 μ L 模板 DNA(100~130 ng)。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后进行 35 个循环,每个循环的反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,52 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,最后 1 个循环结束后,72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。同时以 beta-actin 做阳性对照,反应程序同上。

取 10 μ L PCR 扩增产物,1%的琼脂糖凝胶在 0.5% TBE 缓冲液中 100 V 电泳 40 min,EB 染色,VILBER LOURMAT 凝胶成像系统观察拍照。扩增产物由上海鼎安生物公司测序分析,以确定所扩增片段与目标片段的一致性。

2 结果与分析

2.1 SDH 酶活性

SDH 酶活性测定结果见表 1。SDH 酶活性以肌肉最高,为 114.55 U/(mg prot);鳃次之,为 93.72 U/(mg prot),但两者差异不显著($P>0.05$)。精巢中 SDH 酶活性仅为 28.06 U/(mg prot),显著低于肌肉和鳃($P<0.05$);精子中 SDH 酶活性未能测出。

表 1 中华绒螯蟹部分组织 SDH 酶活性测定结果

Tab. 1 The results of SDH activity in *Eriocheir sinensis* partial tissues

$n=3; \bar{X} \pm SD; U/mg$ 蛋白 protein

项 目 Item	肌肉 Muscle	鳃 Branchia	精巢 Testis	精子 Sperm
SDH 活性 SDH Activity	114.55 $\pm$ 31.199 ^a	93.72 $\pm$ 2.565 ^a	28.06 $\pm$ 2.40 ^b	—

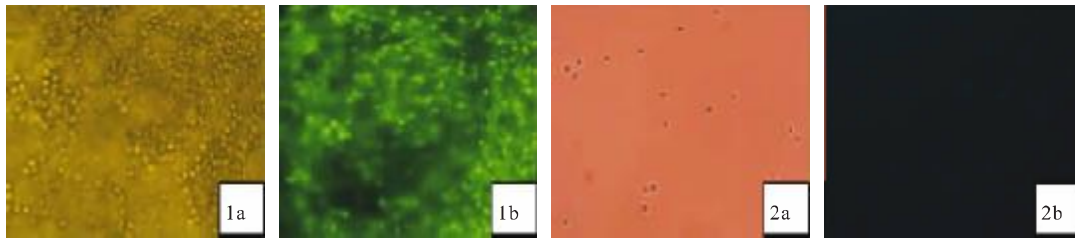
注:“—”代表未测出,上标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Note: “—” means undetectable. Values with different letters show significant difference ($P<0.05$).

2.2 Rh123 检测结果

精巢和精子 Rh123 的检测结果见图 1。经 Rh123 染色后,正常光镜下精巢或精子样品中均能

看到细胞,但在荧光显微镜下精巢组织呈现较强的荧光反应,而精子样品中则未见类似荧光。

图1 Rh123 染色精巢和精子在光镜和荧光显微镜下($\times 200$)

1:精巢;2:精子(a:光镜;b:荧光镜)

Fig. 1 Testis and sperm stained by Rh123($\times 200$)

1: testis; 2: sperm (a: optical microscope; b: fluorescent microscope)

2.3 PCR 检测

总 DNA 纯度($A_{260/280}$ 值)均在 1.8~2.0 之间,经 1% 琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后,呈清晰完整条带。

各组织或细胞 PCR 产物凝胶电泳结果见图 2。beta-actin PCR 扩增产物均接近 300 bp, 片段长度一致,而亮度和宽度亦基本一致。线粒体 16S rDNA PCR 扩增片段长度均在 400~500 bp 之间,各组织或细胞扩增出片段长度一致,但条带的亮度和宽度明显不同,其中肌肉和鳃的 PCR 扩增产物的条带较亮且宽度基本一致,精巢略低,而精子的扩增产物条带则在亮度和宽度上明显弱于其他 3 种组织。此外,测序结果表明,各组织线粒体 16S rDNA PCR 扩增片段的长度均为 436 bp,其序列与长度与 Gen-Bank 上的序列完全吻合。

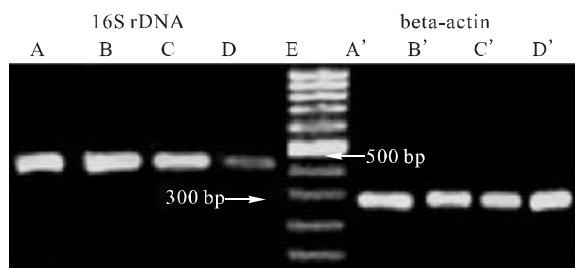


图2 中华绒螯蟹精子线粒体 16S rDNA 和 beta-actin 的扩增电泳图

A, A': 肌肉; B, B': 鳃; C, C': 精巢; D, D': 精子; E: marker

Fig. 2 PCR analysis of 16S rDNA and beta-actin genes expression in various tissues of *E. sinensis*

A, A': muscle; B, B': branchia; C, C': testis; D, D': sperm; E: marker

3 讨论

3.1 关于中华绒螯蟹精子线粒体

琥珀酸脱氢酶(SDH)位于线粒体内膜,是线粒体的标志酶之一,其活性的高低在一定程度上反映了细胞线粒体的功能^[15]。本研究发现,中华绒螯蟹肌肉和鳃中 SDH 酶活性较高,这与该组织的功能相吻合;精巢中 SDH 活性相对较低,表明精巢中线粒体的数量或活性明显低于肌肉和鳃,但精子中则未检测到该酶活性的存在,暗示着精子中线粒体量极少或活性极低。在红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)精子代谢的研究中也得到相同的结果^[16]。

Rh123 是一种阴离子亲脂性荧光染料,对膜具有通透性,由于活细胞线粒体内外膜之间存在着跨膜电位,因而能特异性地聚集于线粒体。Rh123 荧光强度降低,反映线粒体数量减少和/或线粒体膜电位的降低或丧失^[17]。由于 Rh123 只对完整且有线粒体膜的细胞起作用,故常与 EB、PI 等染料联合使用来检测哺乳动物精子的质量^[1, 18-21]。本实验发现,精巢中荧光相对较强,而精子则几乎没有荧光,这一结果与 SDH 酶活性的检测结果相似。

16S rDNA 是线粒体进化过程中比较保守的基因^[22],因而根据已有的中华绒螯蟹 16S rDNA 序列设计引物,以肌肉、鳃、精巢和精子总 DNA 为模板, beta-actin 作为内参,对其进行了扩增。结果发现上述 4 种组织或细胞的 beta-actin 和 16S rDNA 均能得到有效扩增,其中 beta-actin 的条带宽度和亮度基本一致,表明各样品的 DNA 模板量基本相同,而 16S rDNA 的扩增产物在前三者之间无显著差异,但精子的扩增条带宽度和亮度显著低于其他 3 种组织。这一结果表明,中华绒螯蟹精子中确实存在线粒体,但其数量显著低于其他组织,这也是用 SDH

酶活性和 Rh123 等方法以及常规的组织学和超微结构观察无法检测到精子线粒体的根本原因。

此外,中华绒螯蟹精巢中 SDH 酶活性和 PCR 扩增产物均低于肌肉和鳃的原因,可能与其发育程度以及精巢中同时存在各个不同发育时期的细胞有关,尤其是精巢发育至后期,早期富含线粒体的细胞如初级和次级精母细胞明显减少。

3.2 中华绒螯蟹精子线粒体在其精子质量评价中应用的探讨

和其他许多甲壳动物相似,中华绒螯蟹精子为无鞭毛精子,且在雄体内被精荚所包裹,故该精子不具备运动能力,从而使得常规精子质量评价中精子运动能力等的检测指标无法应用于该类精子,而本实验证实,该类精子中线粒体数量极少,极难检测到。因此,有鞭毛精子的质量评价方法在该类精子质量评价中无法得到有效应用,从而有必要探讨该类精子质量评价的其他途径,以找到适合无鞭毛精子质量评价的有效方法。

参考文献:

- [1] 霍立军,杨增明.哺乳动物精子质量的评价方法[J].动物学杂志,2002,37(2):89—93.
- [2] 管卫兵,王桂忠,李少菁.甲壳动物精子质量和活力评价[J].海洋通报,2003,22(2):83—88.
- [3] 堵南山,薛鲁征,赖伟.中华绒螯蟹精子的研究Ⅱ 精子发生[J].海洋与湖沼,1988,19(1):71—75.
- [4] 洪水根,李祺福,郭永刚,等.斑节对虾精子发生的超微结构[J].动物学报,1998,44(1):1—4.
- [5] 杨万喜.日本沼虾三种细胞器在精子发生中变化的研究[J].应用与环境生物学报,1998,4(1):49—54.
- [6] 张子平,王艺磊.对虾精子的研究—成熟精子的形态与超微结构[J].厦门水产学院学报,1991,13(2):1—9.
- [7] 王兰,堵南山,赖伟.长江华溪蟹精子发生过程中线粒体的超微结构研究[J].动物学报,1997,43(2):113—118.
- [8] 上官步敏,李少菁.锯缘青蟹精子超微结构的研究[J].动物学报,1994,40(1):7—11.
- [9] Yasuzumi G, Kaye G I, Pappas G D, et al. Nuclear and cytoplasmic differentiation in developing sperm of the crayfish, *Cambaroides japonicus* [J]. Z Zellforsch, 1961, 53: 141—158.
- [10] 马强,王群,李恺,等.胰蛋白酶消化法和机械匀浆法获得河蟹 (*Eriocheir sinensis*) 游离精子的比较研究[J].华东师范大学学报:自然科学版,2006,2:82—87.
- [11] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1998.
- [12] 李红霞,刘宏,刘超,等. mtDNA 测序技术在法医检案中的应用[J].中国法医学杂志,2002,17(增刊):30—31.
- [13] Schubart C D, Cuesta J A, Diesel R, et al. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of nonmarine lineages within the American grapsoid crabs (Crustacea, Brachyura) [J]. Mol Phylogenet. Evol, 2000, 15(2): 179—190.
- [14] 邱高峰,徐巧婷,王丽卿,等.四种绒螯蟹分子分类与系统发育[J].动物学报,2001,47(6):640—647.
- [15] 薛小萍,商学军,傅健,等.精子线粒体琥珀酸脱氢酶的检测及意义[J].中华男科学杂志,2003,9(8):601—603.
- [16] 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—567.
- [17] Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, et al. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis[J]. Biochem Biophys Acta, 2003, 1606(1—3): 137—146.
- [18] Papaioannou K Z, Murphy R P, Monks R S, et al. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry[J]. Theriogenology, 1997, 48: 299—312.
- [19] Windsor D P, White I G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage[J]. Animal Reproduction Science, 1995, 40(1—2): 43—58.
- [20] Garner D L, Thomas C A, Joerg H W, et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa[J]. Biol Reprod, 1997, 57(6): 1401—1406.
- [21] Gravance C G, Garner D L, Miller M G, et al. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function[J]. Reproduct Toxicol, 2000, 15(1): 5—10.
- [22] 孙红英,周开亚,杨小军.从线粒体 16S rDNA 序列探讨绒螯蟹类的系统发生关系[J].动物学报,2003,49(5):592—599.

Detection of sperm mitochondria in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*

FAN Li-jun, ZHOU Zhong-liang, CHEN Dong-hua, ZHAO Yun-long, WANG Qun

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

Abstract: Three methods, which were SDH activity, specific fluorescent probe(Rh123) and mitochondrial 16S rDNA gene amplification, were used to detect sperm mitochondria of *Eriocheir sinensis*, and three tissues—muscle, branchia and testis, were investigated as control. SDH activity in testis was only 28.06 U/mg prot, which was significantly lower than that in muscle(114.55 U/mg prot) and in branchia(93.72 U/mg prot), while it was too low to be detected in sperm. Strong fluorescence was detected in testis by Rh123 but nothing was observed in sperm. Primers used in PCR were designed based on the sequence of mitochondrial 16S rDNA(AJ250642 and AF312718) and beta-actin(AY910691) of *Eriocheir sinensis* which had been deposited in GenBank. PCR analysis using total DNA from muscle, branchia, testis and sperm indicated that 16S rDNA exhibited different expression in the four samples. Beta-actin gene was detected plentiful in all the four tissues/cells and exhibited the same expression pattern. 16S rDNA gene amplification was detected at high levels in muscle and branchia, appreciable low in testis and very low in sperm. The PCR products of 16S rDNA gene were sequenced and aligned with the sequence of 16S rDNA from GenBank(AJ250642 and AF312718), and the alignment result showed there was no difference between them. All the results suggest that there are mitochondria in *Eriocheir sinensis* sperm but much fewer than those in testis and other tissues, and this may be the reason why SDH activity and Rh123 as well as common histology and ultrastructure research can not detect the existence of mitochondria in *Eriocheir sinensis* sperm. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 139—143]

Key words: *Eriocheir sinensis*; sperm; mitochondria; SDH; Rh123

Corresponding author: WANG Qun. E-mail: qwang@bio.ecnu.edu.cn