罗氏沼虾个体发育之初——受精卵特性的研究*

姚俊杰[1,2]，赵云龙[2]，胡先成[2,3]

(1. 贵州大学 动物科学学院，贵阳 550025；2. 华东师范大学 生命科学学院，上海 200062；
3. 重庆师范大学 生命科学学院，重庆 400047)

摘　要：采用石蜡切片和生化方法研究了罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)受精卵的特性。结果表明：受精卵中央区是一团致密的卵黄物质，卵表面初级卵膜内是一层细胞质。表层细胞质与中央区之间是连接紧密的卵黄颗粒。中央区与外周卵黄颗粒紧密相连，同时也透过卵黄颗粒间的细胞质与表层细胞质相连。卵黄物质的组成以蛋白质(18.67 ± 0.22(μg/卵))和脂类(13.52 ± 0.27(μg/卵))为主，分别占受精卵干重的45.86%和33.21%。在受精卵期较高的淀粉酶活力说明糖类在此期为主要的能源，迅速为受精卵的发育提供能量，蛋白酶类酶活力也较高，分解卵黄蛋白以供能，脂类在受精卵期不是主要的能源。罗氏沼虾受精卵期蛋白 SDS-PAGE 显示了包含卵黄磷蛋白两个亚基在内的 75.6 ~ 105KD 区域内的蛋白亚基含量丰富，是受精卵期蛋白质的主要成分，也是胚胎发育时期的蛋白营养源，此外，其他分子量的蛋白亚基种类也较多。

关键词：罗氏沼虾；受精卵；卵黄；卵黄磷蛋白

中图分类号：S945.4+1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1672-6693(2006)03-0070-06

Studies on the Fertilized Egg of *Macrobrachium rosenbergii*

YAO Jun-jie[1,2]，*ZHAO Yun-long*[2]，*HU Xian-cheng*[2,3]

(1. Zoology College, Guizhou University, Guiyang 550025；
2. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062；
3. College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract：Characteristics of fertilized egg in *Macrobrachium rosenbergii* was studied by using histological section and biochemical methods. The results showed that morphologically, a mass of dense yolk substance existed at the center zone of fertilized egg, and a layer cytoplasm lied in the superficial part of the egg. Between them were yolk granules. The center zone connected with either yolk granules or the superficial cytoplasm. Main components of yolk are protein and lipid (respectively, 18.67 ± 0.22(μg/egg), 13.52 ± 0.27(μg/egg)). Protease and amylase played a crucial role in fertilized egg, provided energy for embryonic development. Low lipase activity indicated that lipid was not the main energy source in fertilized egg. Fertilized egg protein SDS-PAGE indicated that vitellin was the main constituent of fertilized egg protein. Polypeptides, which between 75.6 KD and 105 KD, were main protein source during the embryonic development of *Macrobrachium rosenbergii*.

Key words：*Macrobrachium rosenbergii*；fertilized egg；yolk；vitellin

大多数甲壳动物是以抱卵的方式进行胚胎孵育，其受精卵内充满卵黄物质。卵黄物质是甲壳动物胚胎发育的营养基础。近年来，人们在研究甲壳动物胚胎发育中做了许多的工作，研究内容涉及胚胎发育的形态学[1~3]，发育时期的主要生化组成及含量[4~6]和消化酶活力[7,8]，卵巢及血淋巴中卵黄蛋白原和卵黄磷蛋白的分析[9~13]。但鉴于甲壳动物受精卵的特点，人们对此期的内部结构以及理化性质还了解甚少。甲壳动物胚胎内充满卵黄颗粒[1]，其主要成分是蛋白质和脂类[4~6]，卵黄蛋白是胚胎中非常重要的营养源，其主要的卵黄蛋白是卵黄磷蛋白(Vitellin, Vt)，分子量在 300 ~ 500 KD[9~13]，其

* 收稿日期：2005-12-23
资助项目：国家自然科学基金(No. 30270161)；高校博士点基金(No. 20010269002)
作者简介：姚俊杰(1968-)，男，贵州铜仁人，博士研究生，研究方向为发育生物学。

前体卵黄蛋白原(Vitellogenin,Vg)是一种雌体特异性蛋白(Female special protein, FSP)[9]。一些研究对血淋巴中卵黄磷蛋白进行了纯化和分析[10,11],并在卵母细胞发育期,对卵巢和血淋巴中的卵黄蛋白原和卵黄磷蛋白的情况进行了测定和分析[13]。但对甲壳动物受精卵及胚胎期卵黄蛋白的研究,至今未见报道。本工作研究了大型淡水虾——罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)受精卵时期的形态学和生物化学特性,以期能较全面地了解其受精卵特性,认识甲壳动物胚胎发育初期形态和理化性质。

1 材料与方法

1.1 取样

本实验用亲虾取自江苏省吴江市八都振兴水产良种场,该虾于2002年10月由浙江南太湖淡水水产种业有限公司(浙江湖州市省级罗氏沼虾良种场)从缅甸引进。将亲虾分成3组,每组10只雌虾、5只雄虾。共45只亲虾分别饲养于3个室内水泥池中,日换水量为1/6~1/10;28℃人工调控恒温;充气泵增氧;每天在8:00和17:00左右投喂螺蛳和配合饲料,并及时清除残饵和粪便等。在雌虾刚抱卵时,取部分受精卵用Bouin's液固定用于制作组织切片,另取受精卵约0.3 g用以测量其体积,其余用滤纸吸干水分后放入1.5 mL的Eppendorf管中,-70℃冰箱保存,用作生化成分的测定和电泳分析。材料取自3组抱卵虾,每组抱卵虾的胚胎材料为一组,实验设3个平行组,各组的材料分别测定,取其平均值。

1.2 胚胎体积与水分含量的测定

胚胎体积用下面公式计算:$V=1/6(\pi W^2 L)$[14]。

水分含量:取各期胚胎0.2 g左右,准确称重后于75℃烘干3 h,然后在105℃烘干至恒重,以胚胎初始体重与烘干后的体重的差值即为水分含量(μg)。

1.3 胚胎生化成分测定

蛋白质含量采用微量凯氏定氮法测定[15];总糖含量采用3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS)测定。总脂含量用Bligh和Dyes的方法测定[16]。中性脂和磷脂的提取采用溶剂法(液-液分离法)。按照潘鲁青[17]的方法进行酶活力测定。酶液蛋白浓度采用考马斯亮蓝法测定[18]。

1.4 组织切片

罗氏沼虾受精卵样品用Bouin's液固定24 h后,系列酒精梯度脱水、水杨酸甲酯与二甲苯透明,常规石蜡包埋,AO-B20切片机切成6 μm的连续切片,苏木精-伊红(即H. E)染色,Olympus显微镜观察并拍照。

1.5 电泳

SDS聚丙烯酰胺磷胶电泳(SDS-PAGE)浓缩胶的质量分数为5%,分离胶质量分数为7.5%。浓缩胶电压为100 V,分离胶电压为200 V。考马斯亮蓝R-250染色。

Power-PAC200电泳仪和Mini-PROTEAN3cell电泳槽均为美国BIO-Rad公司产品;Bio-Print图像处理仪为法国Viber公司产品;Hitach220紫外分光光度计为日本Hitach公司产品。

1.6 数据分析

实验数据用平均值±sd($n=3$)来表示。数据分析采用分析软件SPSS(11.0版),平均数的标准差用one-way ANOVA进行分析,然后进行多个数据的相关性检验(Turkey)。用Dunn氏检验来表示每组的显著性差异[26]。

2 结果与分析

2.1 外部形态

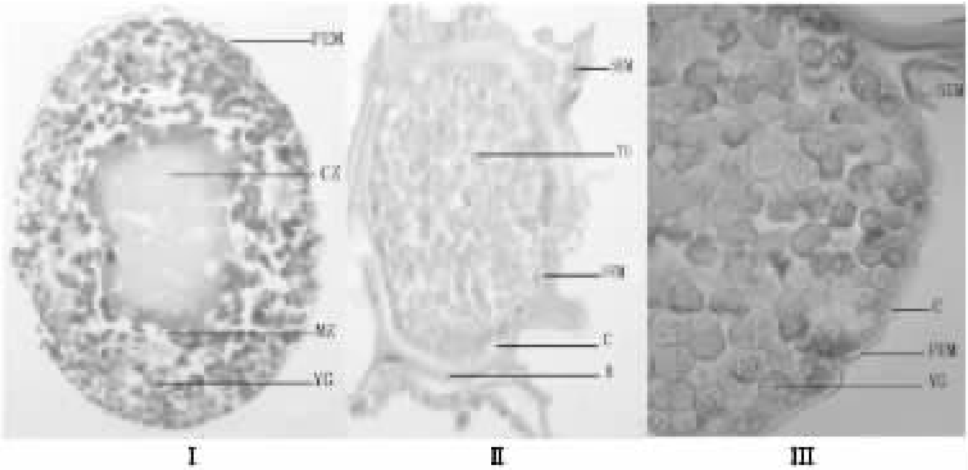
罗氏沼虾受精卵呈淡青色,表面光滑,卵外被一层坚韧的初级卵膜(first egg membrane)。受精卵籍有母体粘液腺分泌物所形成的次级卵膜(secondary egg membrane)相互粘连,聚集成团,粘连于腹肢的刚毛上,受精卵时期的这种粘连紧密。受精卵内充满卵黄颗粒,在光镜下,卵黄颗粒分布均匀且排列紧密(图1)。在28℃水温中,罗氏沼虾受精卵期持续3、4 h,然后开始卵裂。

图1 罗氏沼虾的受精卵外形

2.2 内部结构

罗氏沼虾的受精卵系中黄卵(mesolecithal egg)。卵内几乎全被卵黄占满,细胞质分布于卵的表面。受精卵的中央区逐渐成为一团致密的卵黄物质,在离卵中心约1/2的整个区域是致密的卵黄物质,致密的中央区卵黄物质区域内也分布着大小不

等的卵黄颗粒，中央区域与其外卵黄颗粒紧密相连，却界限分明，此区的特点是不含细胞质（图 2 – Ⅰ）。受精卵表层的初级卵膜与卵黄颗粒之间是一层细胞质，同时细胞质也贯穿于卵黄颗粒之间。相邻受精卵之间的初级卵膜的粘连紧密（图 2 – Ⅱ）。在 400 倍显微镜下，看到卵黄颗粒不是完全光滑的卵圆形，其表面有不同程度的突出或凹陷，受精卵表面细胞质透明（图 2 – Ⅲ）。



注：Ⅰ 过中心区纵切 Across center zone（100 ×）　Ⅱ 表面区纵切 Across marginal zone（100 ×）　Ⅲ 表面区纵切 Across marginal zone（400 ×）　FEM 初级卵膜（first egg membrane）　SEM 次级卵膜（scondary egg membrane）　CZ 中心区（center zone）　MZ 边缘区（marginal zone）　YG 卵黄颗粒（yolk granule）　B 交界处（boundary）　C 细胞质（cytoplasm）

图 2　罗氏沼虾受精卵的内部结构

2.3　生化组成

在罗氏沼虾受精卵中，水分占很大比例，是受精卵重量的 52.59 ± 1.44%。对每组 120 ~ 150 mg，上千粒受精卵的计量，共计量了 5 组，测得每个受精卵的平均重量为 85.86 μg。在受精卵的生化组成中，蛋白质和脂类平均重量分别为 18.67 ± 0.22 μg，13.52 ± 0.27 μg，是卵黄的主要组分（图 3），分别占受精卵干重的 45.86%，33.21%。其余为部分糖类和其他物质。在脂类中，中性脂占的比例较高，含量为 8.48 ± 0.27 μg，磷脂含量为 3.43 ± 0.11 μg。

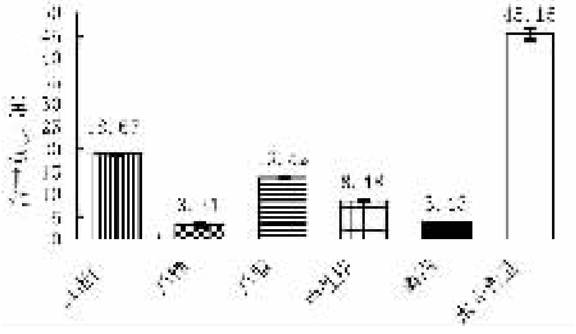
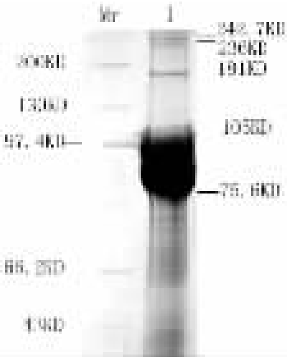


图 3　罗氏沼虾每个受精卵的主要组成成分

2.4　消化酶活力及蛋白分子特点

2.4.1　消化酶活力　对罗氏沼虾受精卵中胃蛋白酶（Pepsin）、类胰蛋白酶（Tryptase）、淀粉酶（Amylase）和脂肪酶（Lipase）4 种消化酶的活性进行了检测（表 1）。发现 4 种消化酶均具有酶活力，其中淀粉酶的酶活力最高，酶活力为 $34.48 \times 10^{-2} \pm 0.036$（U/卵），其次为两种蛋白酶：蛋白酶和类胰蛋白酶，脂肪酶在受精卵中却表现出很低的酶活力，仅为 $0.52 \times 10^{-3} \pm 0.0009$（U/卵）。

2.4.2　受精卵蛋白组分的分析　通过对受精卵中蛋白组分进行 SDS – PAGE 凝胶电泳（图 4），罗氏沼虾受精卵中蛋白质亚基主要集中在 75.6 ~ 105 KD 之间，此区域内蛋白浓度很高，在其余的蛋白亚基中分子量较高的数量少，有 242.7 KD、236 KD 和 181 KD 蛋白，而小于 75 KD 的亚基较多，条带丰富。



注：Mr 标准蛋白分子量 Marker；1 受精卵蛋白 Fertilized egg protein

图 4　受精卵蛋白 7.5% SDS-PAGE 凝胶电泳图

表1 罗氏沼虾受精卵的消化酶活力($X \pm SD, n=3$)

	胃蛋白酶 (U/卵)	类胰蛋白酶 (U/卵)	淀粉酶 (U/卵)	脂肪酶 (U/卵)
受精卵	$13.51 \times 10^{-2} \pm 0.007$	$8.81 \times 10^{-2} \pm 0.008$	$34.48 \times 10^{-2} \pm 0.036$	$0.52 \times 10^{-3} \pm 0.0009$

3 讨论

3.1 罗氏沼虾受精卵的形态学特性

罗氏沼虾的受精卵同多数十足目动物一样,依靠次级卵膜固着在第二至第五对腹肢的全部原肢和内肢上。就抱卵数而言,罗氏沼虾一般在10 000粒左右,一些沿岸浅海种的抱卵数很大,例如真龙虾属[*Palinurus*(Fabricius)]每个雌体抱卵数约为100 000粒,海蝲蛄属(*Homarus* Weber)约为40 000~91 000粒,而冷水及淡水种类抱卵数较少,如钩额拟玻璃虾(*Parapasiphae sulcatifrons*)抱卵数仅为15~19粒,但卵粒大,直径达4.2 mm[19]。罗氏沼虾受精卵的长径为0.57 mm,体积为0.072 mm^3,内含丰富的卵黄,其胚胎发育时间在28℃水温中约为20天。

在本研究中得到了较完整的受精卵中央区的切片,发现罗氏沼虾受精卵中央区存在致密的卵黄物质,不成颗粒状。由于甲壳动物受精卵中充满卵黄物质,在石蜡切片或电镜制片过程中,脱水后的受精卵内卵黄成粉状,在制作较薄的石蜡切片和电镜的超薄切片时,很难得到较完整的切面,因而对甲壳动物胚胎早期特别是受精卵期的内部结构了解较少。罗氏沼虾受精卵中央区致密的卵黄物质在形态和结构上明显有别于外周的卵黄颗粒,此区内与外周卵黄颗粒紧密相连,同时也透过卵黄颗粒间的细胞质与表层细胞质相连。推测此区域是在卵黄颗粒释放出卵黄物质,最早为胚胎发育所利用,但其利用过程和具体功能还有待于进一步研究。卵黄颗粒表面不同的形态,可能体现了其在准备向细胞质中释放卵黄物质过程中的形态变化。

3.2 受精卵卵黄物质的利用

胃蛋白酶、类胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶四种消化酶在刚产出的受精卵中都具有酶活力,并且淀粉酶、胃蛋白酶和类胰蛋白酶的酶活力都较高。说明这些酶并不是受精卵基因合成的,而是来源于母本,在受精时已经存在于卵内。在受精卵内父本的基因组还处于与母本基因组结合的时期,合子核的基因组还不能如此迅速的表达和合成这些酶类。在美国龙虾(*Homarus americanus*)[20]、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)[8]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)[7]受精卵消化酶活力的研究结果也证实了这一点。这些在卵母细胞形成过程中合成并储存于卵黄中的消化酶类,为胚胎早期发育中利用卵黄物质提供了保障。这一研究结果对于在罗氏沼虾育苗过程中强化母体营养具有重要意义。

虽然合子核基因在受精卵中还不能迅速表达和合成一些酶类,但在受精卵中依然进行着活跃的代谢过程,使受精卵在3~4 h后顺利地发育到卵裂期。在所研究的几种虾蟹受精卵的消化酶中,各种酶类的活力高低在数值上存在差别,这与物种的特性有关,体现了每个物种在具体物质利用上的特殊性。但利用卵黄蛋白的蛋白酶类和淀粉酶的酶活力都较高,酶的活力与其对卵黄物质的利用密切相关。

就受精卵内主要生化物质含量而言,*A. saxidomus*、*P. schmitti*、*Nauticaria mateiianice*、*Betaeus emarginatus* 脂类含量[21]均小于干重的20%,而罗氏沼虾脂类含量则较高,占受精卵干重的33.21%。因而罗氏沼虾胚胎发育时间较长,它具有前无节幼体期、后无节幼体期、前溞状幼体期和溞状幼体期4个膜内幼体时期,孵化后存活率相对较高。在罗氏沼虾受精卵中,主要是依靠水解糖类和蛋白质来保证胚胎发育的启动和进行。糖类的水解能较快地提供能量以保证卵裂等活动的进行。卵黄蛋白的水解同样也提供能量,并也参与器官原基的形成。在受精卵中有较高的脂类含量,而脂肪酶活力却很低,说明脂类不是罗氏沼虾胚胎发育早期的主要能量来源。

3.3 75.6~105 KD蛋白亚基

卵黄磷蛋白是甲壳动物卵黄中的主要物质,它作为胚胎发育及其早期幼体发育的内源性营养物质,也具有携带并转运脂肪的功能。在甲壳动物中,卵黄磷蛋白在不同种间有不同的构成形式。红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)卵巢中的卵黄磷蛋白是一个分子量为369 KD的多聚体,由分子量为85.4、80.6、76.6、73.7 KD的4个亚基组成[22]。凡纳对虾(*Penaeus vanname*)卵黄磷蛋白分子量为388 KD,由5个亚基聚合而成,3个主要亚基的分子量为87、78和46 KD[23]。Chang 等测得罗氏沼虾卵巢中卵

黄磷蛋白由 90 KD 和 104 KD 两个亚基组成[10]，Fang 等测得罗氏沼虾血淋巴中卵黄蛋白原分子量为 700 KD，是由 89、100、170 KD 3 个多肽组成的多聚体。卵黄磷蛋白两个亚基的分子量为 89 KD 和 100 KD[24]。不同种类间不同的亚基单位，说明它们在卵黄蛋白原在转化为卵黄磷蛋白时经历了不同的水解过程。

卵黄在甲壳动物雌体的卵巢发育成熟，卵黄磷蛋白最初均由卵母细胞合成，到了晚期则有细胞内和细胞外两种来源[10,25]。对斑节对虾（*Penaeus. mondon*）的研究表明，胞外合成的卵黄磷蛋白经微胞饮作用进入卵母细胞，而后解离成两个亚基，其中分子量较大的亚基部分降解后与较小亚基结合而转变为卵巢中成熟的卵黄磷蛋白[10]。在罗氏沼虾的受精卵中，分子量为 75.6～105 KD 范围内的蛋白亚基是其卵黄蛋白的主要成分，也正是包含了卵黄磷蛋白两个亚基（89 KD 和 100 KD）在内的蛋白亚基。研究表明，罗氏沼虾受精卵中蛋白质含量丰富，占受精卵干重的 45.86%，卵黄蛋白仍以卵黄磷蛋白为主，它来源于雌体成熟卵细胞中的卵黄磷蛋白，是罗氏沼虾胚胎发育的蛋白源，为胚胎发育提供构建物质和能量。

受精卵蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果，也显示了蛋白亚基的种类也很多，除了卵黄磷蛋白以外，还有一些其他多肽，如 224.7、236、181 KD 和许多分子量较低的多肽。在受精卵基因还未开始表达蛋白质的情况下，这些来源于卵母细胞的蛋白在胚胎发育的开始阶段或提供能量，或作为酶以分解卵黄物质，为胚胎早期发育的顺利进行提供保障。

参考文献：

[1] CELADA J D. Embryonic Development of the Freshwater Crayfish（*Pacifastacus Leniusculus* Dana）：A Scanning Electron Microscopic Study［J］. Anat Rec，1987，219（3）：304-310.

[2] 赵云龙，王群，堵南山，等. 罗氏沼虾胚胎发育的研究：Ⅰ. 胚胎外部结构形态发生［J］. 动物学报，1998，44（3）：249-256.

[3] 孟凡丽，赵云龙，陈立侨，等. 红螯螯虾胚胎发育研究Ⅰ. 胚胎外部结构的形态发生［J］. 动物学研究，2000，21（6）：468-472.

[4] CLARKE A，BROWN J H，HOLMES L J. The Biochemical Compostion of Eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in Relation to Embryonic Development［J］. Comp Biochem Physiol，1990，96B：505-511.

[5] ROSA R，MORAIS S，CSLADO R，et al. Biochemical Changes During the Embryonic Development of Norway Lobster，Nephrops Norvegicus［J］. Aquculture，2003，221：507-522.

[6] 罗文，周忠良，赵云龙，等. 红螯螯虾胚胎发育过程中蛋白质含量及氨基酸组成的分析［J］. 华东师范大学学报（自然科学版），2004（1）：88-92.

[7] 田华梅，王群，赵云龙，等. 中华绒螯蟹胚胎发育过程中的消化酶活力及氨基酸组成［J］. 中国水产科学，2003，10（5）：402-408.

[8] 李少菁，王桂忠，汤鸿，等. 锯缘青蟹胚胎发育过程中几种水解酶活力的比较研究［J］. 厦门大学学报（自然科学版），1995，34（6）：970-974.

[9] MEUSY J J. Vitellogenin，the Extraovarian Precursor of the Yolk Protein in Crustacean：a Review［J］. Reprod Nutr Dev，1980，20：1-21.

[10] CHANG C F，LEE F Y，HUANG Y S，et al. Purification and Characterization of Vitellin from the Mature Ovaries of Prawn，Penaeus monodon［J］. Comp Biochem Physiol，1993a，105B：409-414.

[11] CHANG CF，TUNG W S，HUANG Y S，et al. Purification and Characterization of Vitellin from the Mature Ovaries of Prawn，*Macrobrachium rosenbergii*［J］. Comp Biochem Physiol，1993b，105B：609-615.

[12] WOLIN E M，LAUFER H，ALBERTINI D F. Uptake of the Yolk Protein，Lipovitellin，by Developing Crustacean Oocytes［J］. Dev Biol，1973，35：160-170.

[13] LEE F Y，CHANG C F. The Concentrations of Vitellogenin（Vitellin）and Protein in Hemolymph，Ovary and Hepatopancreas in Different Ovarian Stages of the Freshwater Prawn，Macrobrachium Rosenbergii［J］. Comp Biochem Physiol，1997，117A：433-439.

[14] TURNER R L，LAWRENCE J M. Volume and Composition of Echinoderm Eggs：Implications for the Use of Egg Size in Life-history Models［A］. Reproductive Ecology of Marine Invertebrates［M］. Columbia：University of South Carolina Press，1979. 25-40.

[15] 刘宗柱，朱凤华，徐永立，等. 凯氏定氮法测定牙鲆肌肉粗蛋白含量方法的改进［J］. 实验与技术，1999（6）：1-3.

[16] BLIGH E G，DYER W J，A Rapid Method of Total Lipid Estraction and Purification Can［J］. J Biochem Physiol，1959，37：911-917.

[17] 潘鲁青，王奎琪. 三疣梭子蟹幼体消化酶活力及氨基酸组成的研究［J］. 水产学报，1997，21（3）：246-251.

[18] 李建武，肖能赓，余瑞元，等. 生物化学实验原理和方法［M］. 北京：北京大学出版社，1994. 174-176.

[19] 堵南山. 甲壳动物学（下册）［M］. 北京：科学出版社，

1993.718-722.

[20] BIESIOT P M. Changes in Midgut Gland Morphology and Digestive Enzyme Activities Associated with Development in Early Stages of the American Lobster *Homarus americanus*[D]. Woods Hole:Woods Hole Oceanographic Institution,1986.237.

[21] WEHRTMANN L S, GRAEVE M. LIPID Composition and Utilization in Developing Eggs of Two Tropical Marine Caridcan Shrimps (Decapoda: Caridea; Alpheidac: Palaemonidae)[J]. Comp Biochem Physiol,1998, 121B: 457-463.

[22] 李荷迪,周忠良,赵云龙. 红螯光壳螯虾卵黄磷蛋白的分离纯化和鉴定[J]. 动物学杂志,2004, 39(3):17-21.

[23] KARINA D, GARCIA-OROZCO F, VARGAS_A, et al. Molecular Characterization of Vitellin from the Ovaries of the White Shrimp Penaeus (Litopenaeus) Vannamei[J]. Comp Biochem Physiol,2002, 133B:361-369.

[24] FANG-YI L, TUANG-WEI S,CHANG C F. Isolation and Characterization of the Female-Specific Protein (Vitellogenin) in Mature Female Hemolymph of the Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*:Comparison with Ovarian Vitellin[J]. General and Comparative Endocrinology. 1997, 108 (3):406-415.

[25] 王玉凤. 罗氏沼虾卵母细胞细胞器与卵黄发生的关系[J]. 水生生物学报,1999,23 (1):24-27.

[26] ZAR J H. Biostatistical Analysis Prentice-Hall[M]. USA: Upper Saddle River, 1996.481.

(责任编辑　许文昌)