

中国对虾人工诱导雌核发育的研究*

II. 紫外线辐射对精子顶体反应和受精能力的影响

陈本楠 蔡难儿 李光友

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 研究了 365nm 波长紫外线辐射中国对虾精子对其顶体反应和受精能力的影响。结果表明,低剂量紫外线辐射促进精子发生顶体反应,大剂量辐射使精子丧失发生顶体反应的生理机能并死亡。365nm 波长紫外线能够透过精荚和纳精囊盖,对其内精子起到杀伤作用。精液稀释液在紫外线下辐射 5~8s,仍有部分精子具有受精能力,但胚胎在早期阶段即死亡。人工诱导雌核发育的过程中,紫外线辐射精液稀释液 5~8s,可获得遗传物质失活的精子(激活源)。经透射电镜观察分析,紫外线对精子遗传物质的损伤是一种使染色质变性的化学作用。

关键词: 对虾精子, 紫外线, 遗传物质失活

早在 1911 年, Hertwig 首先在蛙胚胎中发现了雌核发育现象^[1]为以后的人工雌核发育和遗传育种开辟了一个崭新的领域。我国中国对虾(*Penaeus chinensis*)人工雌核发育的研究在国际上处于领先地位,现已能够小批量培育出人工雌核发育的虾苗^[2]。但对虾而言,尚难以适应大规模生产的需要。其中一个难题是如何大批量获取遗传物质失活且仍具有受精能力的成熟精子——激活源。本文就此进行了一系列的基础研究,为寻找到一个适合中国对虾的大批量诱导精子遗传物质失活的方法提供一些实验方法和数据,以期尽快解决这个技术难关。

1 材料与方 法

1.1 材料

本实验所使用的中国对虾于 1993 年 11 月~1995 年 5 月分别购于胶南某养殖场的人工养殖虾和青岛市附近海区的天然海捕虾。

诱导精子遗传物质失活的紫外线光源为一支 125W、365nm 波长的高压紫外线灯管,购于上海市亚明灯泡厂。照射距离为 10cm,照射剂量的大小以照射时间为标准。裸露的精子释于消毒海水中直接在紫外灯下照射;精荚和纳精囊置于吸入消毒海水的脱脂棉上,下铺冰块,在紫外灯下照射。

人工授精的方法为处理过和未处理的成熟精子释于 5ml 的方杯中,未受精卵取自正在产卵的雌虾体腔中的游离卵,以吸管吸取少量卵子(约 200 粒左右)释于盛精液的方杯中,吸、释几下,

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3087 号。

收稿日期:1995 年 10 月 31 日

以使精、卵充分接触, 然后移入盛新鲜海水的结晶皿(250m l)中待发育。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外线辐射对精子顶体反应的影响 将实验材料(1)释出的性成熟的雄性对虾精荚内的精子; (2)性成熟的雄性对虾的精荚; (3)春季已交配过的雌性对虾纳精囊内的精子直接暴露于紫外线下照射不同时间。照射完毕, 计数顶体反应率 $A(\%)$ ^[4]。

1.2.2 紫外线辐射精子对其受精和孵化的影响 将释出的春季性成熟的雌性对虾纳精囊内的精子直接暴露于紫外线下照射不同时间。照射完毕, 进行人工授精。统计受精率 $F(\%)$ 和孵化率 $H(\%)$ 。

1.2.3 紫外线辐射对精子形态结构的影响 不同剂量紫外线照射的对虾成熟精子, 以 2.5 ~ 3.0% 戊二醛固定, 采用消毒过滤海水做为缓冲液。Agar 顶包埋, 1% O_3O_4 再次固定, 酒精系列脱水, Epon812 包埋, 瑞典 LKB Nova 切片机切片, 醋酸铀-柠檬酸铅染色。日立 H-500 透射电镜观察照像, 并进行损伤分析。

2 结果

2.1 紫外线辐射对精子顶体反应的影响

低剂量的紫外线辐射可以促进精子发生顶体反应, 而较高剂量的紫外线辐射能够使对虾精子丧失发生顶体反应的生理机能。裸露的对虾精子在 365nm 波长的紫外线辐射下经 3~ 10s 可以促进其发生顶体反应, 而超过 10s 将丧失正常的生理机能, 最终破裂, 见图 1a。365nm 波长的紫外线对甲壳质有一定的穿透能力, 并可以透过雄性对虾的精荚和雌性对虾的纳精囊, 对其内的精子起到损伤作用, 并诱导其内的精子发生顶体反应, 见图 1b, 图 1c。

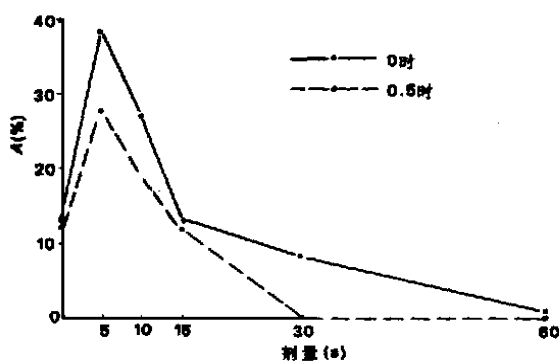


图 1a 紫外线辐射秋季雄虾精荚内的精子对其顶体反应的影响

Fig. 1a Effect of acrosome reaction with UV irradiated spermatozoa from spermatophore in autumn

注: 对照组为没有进行紫外线辐射的组, 剂量为 0。辐射剂量以时间“s”计。“0”时表示照射后立即观察, “0.5”时表示照射后“0.5h”观察。以下同。

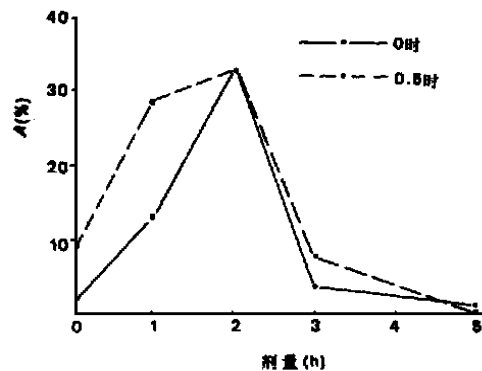


图 1b 紫外线直接辐射秋季性成熟雄虾精荚对精子顶体反应的影响*

Fig. 1b Effect of sperm acrosome reaction with UV irradiated spermatophore in autumn

注: 辐射剂量以 h 计。

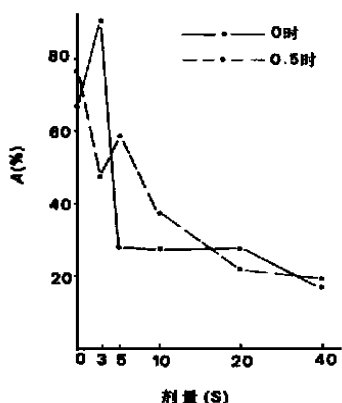


图 1c 紫外线辐射春季雌虾纳精囊内释出的精子对其顶体反应的影响

Fig. 1c Effect of acrosome reaction with UV irradiated spermatozoa from thelycum in spring

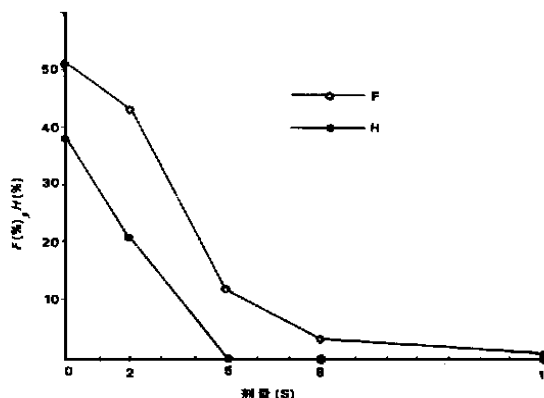


图 2 紫外线辐射纳精囊内释出的精子对其受精率和孵化率的影响

Fig. 2 Effect of fertilization rate and hatch rate with UV irradiated spermatozoa from thelycum

2.2 紫外线辐射精子对其受精和孵化的影响

365nm 波长的紫外线直接辐射精子, 低于“5s”剂量, 仍有部分精子没有受到损伤, 遗传物质并没有失活, 具有正常的受精能力, 仍有相当数量的胚胎正常孵化; 而在“5s”至“10s”剂量范围内, 精子均受到损伤, 精子的核内遗传物质遭到不同程度的破坏, 虽有部分精子可以激动卵子继续发育, 但不能正常受精, 产生正常二倍体胚胎而孵化出膜, 见图 2。因此获取人工雌核发育激活源——遗传物质失活的精子的紫外线辐射剂量范围为 5~8s。

2.3 紫外线辐射对精子形态结构的影响

经紫外线辐射损伤的精子, 如图 3③④所示, 与未进行紫外线辐射的精子相比较, 如图 3①②所示, 其精子形态较完整, 质膜较连续, 少数精子质膜缺失, 顶体部分正常; 核内染色质有局部分散现象, 分散部分染色质着色较浅(电子密度较低), 不够清晰; 损伤较严重的精子, 染色质分布不均匀, 局部散乱的染色质有集中凝聚现象。

3 讨论

人工雌核发育的研究包括两个主要步骤, 即激活源(遗传物质失活的同种或异种精子)的获得和染色体组人工加倍。在鱼类的研究中普遍采用紫外线直接辐射精液原液或少量稀释的精液, 以此作为激活源, 激动卵子发育, 便可以大批量生产雌核发育的鱼苗。然而, 对虾的精液量相当稀少, 且贮存于纳精囊内, 以紫外线直接辐射精液原液或稀释液的方法难以获得大批量的遗传物质失活的对虾精子, 而且人工授精也较为困难, 不易获得大批量的已被激动的对虾卵子。为此, 考虑可否直接照射活虾或离体纳精囊, 以达到损伤囊内精子的目的。这样, 待对虾自然产卵时, 便可以大批量获得已被激动的对虾卵子。以往的实验表明, 以 253.7nm 波长的紫外线做为辐射光源, 效果不理想, 难以穿透甲壳质的纳精囊盖, 达不到破坏其内精核中的 DNA 的目的, 而且照射时间过长, 影响对虾的成活。采用了穿透能力较强的 365nm 波长紫外线辐射纳精囊, 具有一定效果。

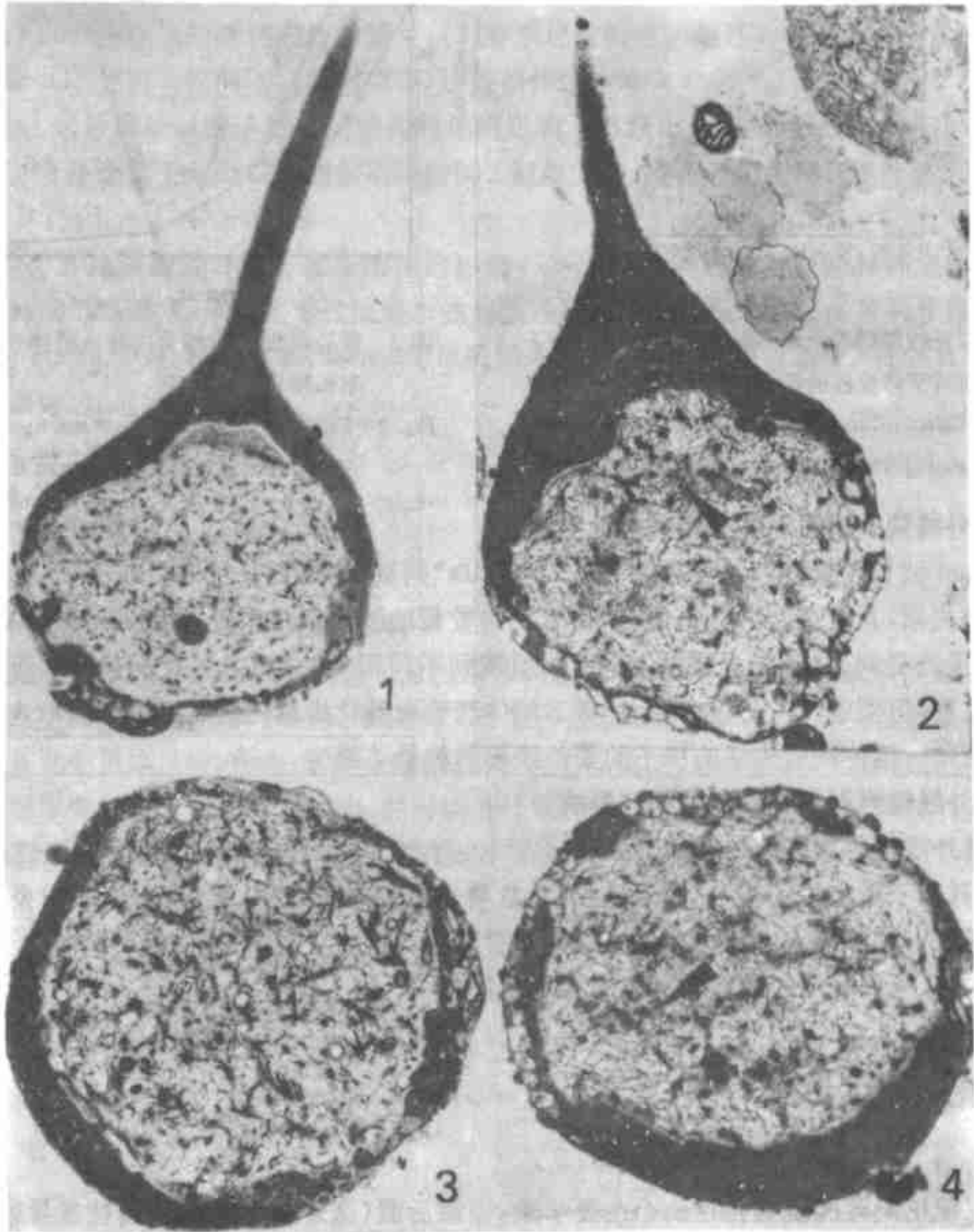


图3 中国对虾精子紫外线损伤透射电镜观察结果

① 没有进行紫外线辐射的正常精子,形态完整,9 000×。② 没有进行紫外线辐射的正常精子,示核体部;12 000×。③ 紫外线辐射 60s 的精子,形态较正常,顶体部正常,箭头示核内染色质散乱,10 000×。④ 紫外线辐射 60s 的精子,示核体部,箭头示染色质散乱且部分集中,12 000×。

Fig. 3 Injure resulting from TEM when Chinese shrimp sperm were exposed to UV irradiation

紫外线对甲壳质穿透能力如图 4 所示, 365nm 波长紫外线对于甲壳的穿透能力比 253.7nm 波长紫外线高 20 余倍。不同波长的紫外线, 其穿透甲壳质的能力不同, 随着波长的增加, 穿透能力逐渐增强。然而, 随着波长的增加, 紫外线对精核内的 DNA 的杀伤能力也逐渐减弱。这一矛盾的解决, 还有赖于今后更深入的探索和实验方法的改进, 找出合适的紫外线波长, 使其既能较好地穿透甲壳质, 又能最大限度地杀伤精核内的 DNA, 以达到大批量生产雌核发育对虾苗的目的, 为对虾的品种改良和杂交育种打好基础。

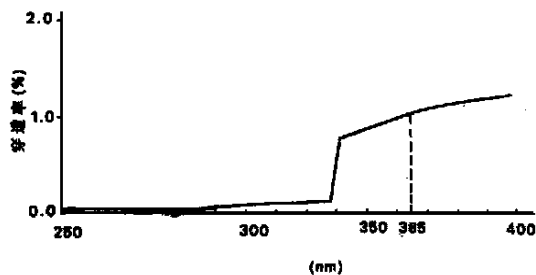


图 4 紫外线对于青虾纳精囊盖的透过率

Fig. 4 Transmission rate of UV light penetrated the telycum crust

Dan 的研究认为, 有尾精子发生顶体反应的条件为(1)精子的生理成熟; (2)钙离子的存在; (3)本种的卵或卵水(egg-water); (4)碱性条件; (5)接触^[5]。堵南山等人对中华绒螯蟹精子顶体反应的研究认为, 十足类无尾精子发生顶体反应的条件与 Dan 的研究结果相同^[7]。Tatbot 等人采用离子载体 A 23187 也成功地诱导了龙虾精子发生顶体反应^[9]。本文表明, 低剂量的紫外线辐射也能够诱导对虾这种无尾精子发生顶体反应。关于紫外线能否诱导所有

无尾和有尾精子发生顶体反应, 还需大量的实验去验证。关于低剂量紫外线辐射能够促进对虾精子发生顶体反应的生理机理, 本文未进行探究, 还有待于进行更深入的研究。

低剂量的紫外线辐射可使精子受到不同程度的损伤。损伤较轻者, 核内遗传物质没有完全失活, 在进入卵子后, 其精核与卵核结合, 合子的染色体组为非整倍体, 难以正常发育, 不能孵化出无节幼体; 损伤严重者, 其正常的生理机能丧失, 不能发生顶体反应, 因而无法进入卵子, 不能激动卵子进行成熟分裂。这样的卵发育不下去, 不能用于人工雌核发育。介于以上两种损伤情况之间的精子, 其核内遗传物质完全失活, 但仍能发生顶体反应。这类精子可以进入卵子, 激动卵子进行成熟分裂。然而其精核不能与卵核结合, 不进行正常意义的受精作用。卵子在没有精核参与的情况下, 自行卵裂, 成为单倍体胚胎^[21]。对虾的单倍体胚胎是难以孵化的, 一般在胚胎发育的早期阶段(囊胚期以前死亡, 有的发育至肢芽就死亡。如果对这类被激动的卵子行人工染色体组加倍处理, 便可得到人工雌核二倍体胚胎, 可以孵化出健康的对虾无节幼体。

以解剖镜观察胚胎的发育情况, “5s”以上剂量组的胚胎, 几乎难以发育至正常的四细胞期或八细胞期。部分卵子, 第 1 次卵裂的时间拖延, 分裂球散乱, 大小不均等。另一部分卵子, 第 1 次卵裂正常, 卵裂时间稍有拖延, 但发育至四细胞期或八细胞期时, 分裂球大小不均等, 出现散乱现象。这一部分卵子如果行染色体组人工加倍处理, 将正常发育并孵化, 成为雌核发育的个体。低于“5s”剂量的组别, 仍有部分胚胎可以正常发育乃至孵化出正常、健康的无节幼体来。因此, 根据图 2 可推断出, 采用 365nm 波长紫外灯(125 w), 获取人工雌核发育激活源的紫外线辐射剂量范围为 5~ 8s。

图 1c 中对照组的顶体反应率 A (%) 不论在“0h”刻还是在“0.5h”刻均远远高于前两个实验的对照组。对于这种现象, 我们有以下的解释: 图 1a 和 b 的实验数据采集于秋季 11 月份中下旬以后, 当时的气温、水温均较低(7~ 9℃)。而图 1c 的实验数据采集于春季 4 月份以后, 当时水温已超过 12℃。水温高, 发生顶体反应的整个生理过程加快。又由于精荚在雌虾纳精囊内度过很长一段时间(一般 5 个月左右), 精荚内的抑制精子发生顶体反应的物质逐渐散失, 待到春季雌虾纳精囊

内的精子一旦释出,精子由高度密集的状态一下转变为疏散状态,绝大部分的精子立即发生顶体反应。

关于紫外线辐射杀伤精子的机理也有许多研究报道。有人的实验认为低剂量的紫外线辐射可引起DNA中嘧啶二聚体形成^[8]。还有人的实验认为紫外线除上述杀伤作用外还能将染色质击碎成许多碎片^[1]。进一步的研究认为,在精子染色质这种DNA和核蛋白质的复合体中,组蛋白多被鱼精蛋白所代替。而高含量的精氨酸和半胱氨酸残基是鱼精蛋白的特点,它具有促使精细胞染色质保持高度浓缩的作用。并且鱼精蛋白中半胱氨酸残基间的二硫键对于染色质的浓缩起关键作用,而二硫键的脱氧作用导致染色质的离散。半胱氨酸对于紫外线辐射,尤其是低剂量紫外线辐射特别敏感,并且半胱氨酸含量越高,紫外线辐射对精子的损伤越强烈。实际上,精子染色质中高含量的半胱氨酸就是紫外线辐射的靶子^[6]。因此,紫外线辐射对精子的损伤是一种使得精核内染色质变性的化学作用,而不是击碎等物理作用。本实验2.3的电镜分析和照片(图3③④)显示,经过紫外线辐射的精子其染色质有散离现象。可以证明紫外线对精子遗传物质失活的机理是致使其染色质的化学组成和结构的改变,染色质变性,原有的生理机能丧失。

参考文献

- [1] 许国强、林岳光、李刚、姜卫国,1990。热带海洋 9(2):1~6。
- [2] 蔡难儿、林峰、柯亚夫、陈本楠,1995。海洋科学 3:35~41。
- [3] Chourrout, D. B., Cherassus Françoise Herioux, 1980. *Reprod Nuft. Develop.* 20(3A): 719-726.
- [4] Clark, W. H., P. Rabot and L. I. Y. Tudin, 1981. *J. Exp. Zool.* 218-279-291.
- [5] Dan, J. C., 1956. *International Review of Cytology* (ed. G. H. Bourne and J. F. Daniell). Academic Press Inc. New York. 5: 365-393.
- [6] Don, J. & Avtalion, R. R., 1993. *Journal of Fish Biology* 42: 1-14.
- [7] Du Nanshan (堵南山), Xue Luzheng (薛鲁征), 1987. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 5(2): 118-123.
- [8] Ljiri, K. I., 1983. *Journal of Radiation Research* 24: 184-195.
- [9] Talbot, P. & P. Chanmanon, 1980. *J. Ultrastruct. Res.* 70(3): 287-297.

ARTIFICIAL INDUCTION OF GYNOGENESIS IN CHINESE SHRIMP *Penaeus chinensis*

II. EFFECT IN ACROSOME REACTION AND FERTILIZATION ABILITY OF SPERM WITH ULTRAVIOLET IRRADIATION

Chen Bennan, Cai Naner and Li Guangyou

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Received: Oct. 31, 1995

Key Words: Shrimp sperm, Ultraviolet ray, genetic inactivation

Abstract

365nm Ultraviolet (UV) light was used to study the effect in acrosome reaction and fertilization ability of UV-irradiated Chinese shrimp sperm. The results are that, treatment of sperm with lower doses of UV irradiation successfully induced the acrosome reaction, however, the

treated sperm lost their physiological function of acrosome reaction and died with high doses. 365nm UV can penetrate into the spermatophore and the thelycum crust to infure the sperm. Even a part of spermatozoa had fertilization ability with UV irradiated the sperm delution for 5-8 seconds, but the activated eggs died in the early stages of embryonic development and could not hatch. This study also showed that, during artificial gynogenetic development of Chinese shrimp, the method of 365nm UV irradiating the sperm dilution for 5-8 seconds could be used to get the genetic inactive sperm which called activation. The transmission electron microscope (TEM) analysis of UV-irradiated shrimp sperm showed that the damage to the sperm was a kind of chemical change-chromosomal denaturation.