

两种沼虾胚胎发育中可溶蛋白的组成及含量变化

姚俊杰 赵云龙* 周忠良 汤亮 吕敢堂

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要:采用生物化学方法测定了罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、日本沼虾(*M. japonicus*)成熟卵细胞和胚胎发育时期可溶蛋白的组成及含量。结果显示,2种沼虾的可溶蛋白在组成和含量上体现了较高的相似特性。可溶蛋白的含量在胚胎发育过程中逐渐降低,在成熟卵细胞和胚胎期,可溶蛋白在组成上以89 ku和100 ku的卵黄磷蛋白(Vitellin, Vn)为主,同时还存在243 ku、181 ku、67 ku、54 ku和31 ku等其他一些蛋白亚基。40 ku蛋白亚基仅出现在成熟卵细胞中,推测可能参与执行了特定的生殖功能。可溶蛋白随着胚胎的发育呈现出蛋白亚基经水解逐渐由大分子变成小分子的趋势。前溞状幼体期和溞状幼体期出现的74 ku蛋白亚基可能与其在胚胎后期发育的功能有关。可溶蛋白在不同物种胚胎发育时期不同的变化,显示了每个物种在卵黄蛋白的组成、利用以及组织结构蛋白的形成中各自的特点。

关键词:罗氏沼虾;日本沼虾;胚胎发育;可溶蛋白;卵黄磷蛋白

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)02-09-06

Variation in Soluble Protein Composition and Content during Embryonic Development of Two Kinds of Prawns

YAO Jun-Jie ZHAO Yun-Long ZHOU Zhong-Liang TANG Liang LÜ Gan-Tang

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

Abstract: The composition and content of yolk proteins during embryonic development of *Macrobrachium rosenbergii* and *M. japonicus* were analyzed. The results showed that the soluble protein composition and content of the two kinds of prawns were similar. The soluble protein content decreased during embryonic development. Vitellin was a main component of soluble proteins. Besides, there were other soluble protein subunits such as 243 ku, 181 ku, 67 ku, 54 ku and 31 ku proteins. The 40 ku protein appeared only in mature egg, and it probably played an important role in the course of fertilization. Small protein subunits increased during late developmental stages. The 74 ku protein which appeared during protozoa and zoea stages may adapt their function to late embryonic development.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; *M. japonicus*; Embryonic development; Soluble protein; Vitellin

甲壳动物卵黄的发生和调控机制一直引起学者们的兴趣和关注。在已有的研究中,人们对虾和蟹等十足类动物卵黄蛋白的分离、理化特性及卵黄蛋白的合成部位等方面有了一定的认识。甲壳动物中卵黄蛋白主要为卵黄磷蛋白,分子量为300~500 ku,是雌虾在卵巢成熟时合成的主要卵黄蛋白,是蛋白、脂、磷和类胡萝卜素的复合体^[1-5]。雌虾的性成熟也主要以卵黄磷蛋白在卵巢中的快速积累为特征。在卵

细胞发育期,卵黄磷蛋白在卵细胞中积累^[6],其前体为卵黄蛋白原。罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和日本沼虾(*M. japonicus*)隶属甲

基金项目 国家自然科学基金(No.30270161),高校博士点基金(No.20010269002);

* 通讯作者, E-mail: ylzha@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 姚俊杰,男,博士研究生,研究方向:水生动物发育生物学, E-mail: junjieyao@163.com。

收稿日期:2005-10-13,修回日期:2006-01-16

壳纲 (Crustacea) 十足目 (Decapoda) 长臂虾科 (Palaemonidae) 沼虾属 (*Macrobrachium*), 两者皆为我国目前重要的经济虾类。在甲壳动物胚胎发育中, 卵黄蛋白是可溶蛋白的主要组成成分, 是胚胎发育的物质和能量基础, 因此研究可溶蛋白的理化特性及可溶蛋白在胚胎发育过程中的变化规律, 对虾、蟹的人工繁殖及育苗具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

罗氏沼虾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从缅甸引进, 日本沼虾购于农贸市场。罗氏沼虾于 28℃ 水温中饲养, 日本沼虾于室温养殖。日换水量 1/6 ~ 1/10, 充气泵增氧, 每天在 8:00 和 17:00 时左右投喂螺蛳和配合饲料, 并及时清除残饵和粪便等。亲虾交配后, 将雌虾移至水泥池内的小网箱 (1.0 m × 1.0 m × 0.5 m) 中饲养。雌虾抱卵后, 根据赵云龙等的方法^[7], 将罗氏沼虾和日本沼虾的胚胎发育分为受精卵期、卵裂期、囊胚期、原肠期、前无节幼体期、后无节幼体期、前溞状幼体期和溞状幼体期 8 个时期, 在解剖镜和显微镜下确定其胚胎发育期, 分别取材。材料取自 3 组抱卵虾, 每组中 10 只抱卵虾的 8 个不同发育时期的胚胎材料为一组, 实验设 3 个平行组, 各组的材料分别测定, 取其平均值。胚胎材料置于

-70℃ 冰箱中备用。用于电泳的成熟卵细胞在雌虾受精前取出, 除去卵巢膜, -70℃ 保存。

1.2 可溶蛋白含量及电泳

可溶蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法测定^[8]。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 浓缩胶的浓度为 5%, 分离胶浓度为 7.5%。浓缩胶电压为 100 V, 分离胶电压为 200 V, 银染色法染色。次高分子量标准蛋白 (Pharmacia), 蛋白名称和分子量依次为: 肌球蛋白重链 200 ku, 钙调素结合蛋白 130 ku, 兔磷酸化酶 97.4 ku, 牛血清白蛋白 66.2 ku, 兔肌动蛋白 43 ku。

Power-PAC 200 电泳仪和 Mini-PROTEAN 3cell 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; Hitachi 220 紫外分光光度计为日本 Hitachi 公司产品。

2 结 果

2.1 两种沼虾胚胎发育各时期可溶蛋白含量

2 种沼虾在胚胎发育时期, 卵黄蛋白基本上是可溶蛋白, 其含量变化见图 1。在罗氏沼虾胚胎期, 可溶蛋白含量下降较为平稳, 受精卵期可溶蛋白含量是胚胎干重的 43.26%, 到溞状幼体期下降为 29.90%, 降幅为 30.88%。在日本沼虾胚胎中, 可溶蛋白含量变化略有波动, 但总趋势仍逐步下降, 受精卵期可溶蛋白占胚胎干重的 47.03%, 到溞状幼体期下降为 17.31%, 降幅为 63.19%。

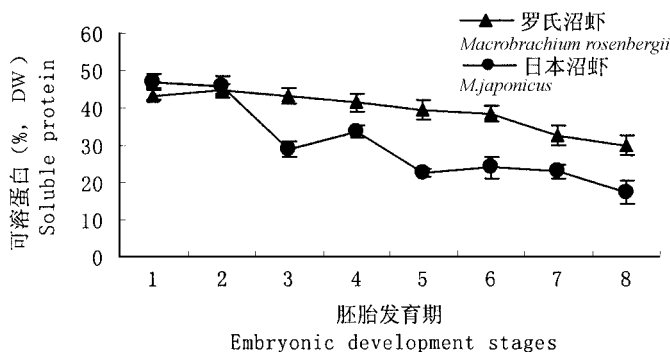


图 1 两种沼虾胚胎发育时期可溶蛋白含量

Fig. 1 Soluble protein content during embryonic development of *Macrobrachium rosenbergii* and *M. japonicus*

1. 受精卵期; 2. 卵裂期; 3. 囊胚期; 4. 原肠期; 5. 前无节幼体期; 6. 后无节幼体期; 7. 前溞状幼体期; 8. 溞状幼体期。

1. fertilized egg stage; 2. cleavage stage; 3. blastula stage; 4. gastrula stage; 5. egg nauplius stage;

6. egg metanauplius stage; 7. protozoa stage; 8. zoea stage.

2.2 成熟卵细胞与受精卵可溶蛋白的亚基组成及分子量 在 SDS-PAGE 中,罗氏沼虾成熟卵细胞的可溶蛋白主要组分是 100 ku、89 ku 和 40 ku 蛋白,受精卵可溶蛋白的主要组分是 100

ku 和 89 ku 蛋白。日本沼虾的电泳结果与罗氏沼虾相同,其成熟卵细胞的可溶蛋白的主要组分是 100 ku、89 ku 和 40 ku 蛋白,受精卵可溶蛋白的主要组分也是 100 ku 和 89 ku 蛋白(图 2)。

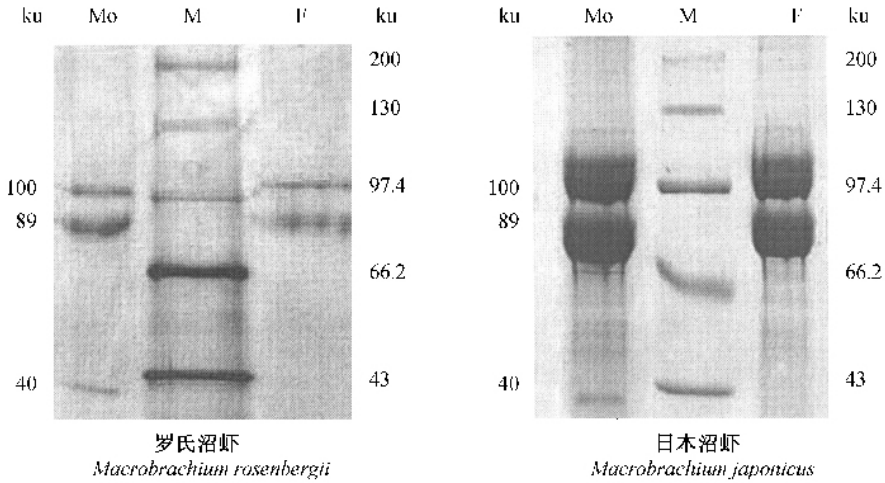


图 2 两种沼虾可溶蛋白 7.5% SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 2 Main soluble proteins in eggs of *Macrobrachium rosenbergii* and *M. japonicus* as revealed by 7.5% SDS-PAGE

M: 标准蛋白分子量; Mo: 成熟卵细胞; F: 受精卵。
M: markers; Mo: matured egg; F: fertilized egg.

2.3 胚胎时期可溶蛋白的亚基组成及分子量 在罗氏沼虾胚胎发育时期,可溶蛋白的组成成分较为丰富,SDS-PAGE 凝胶电泳显示出较多的亚基条带(图 3)。在整个胚胎发育时期中,可溶蛋白的主要组分为 100 ku 和 89 ku 蛋白。

此外,还有 243 ku、181 ku、54 ku 和 31 ku 等蛋白,其他一些蛋白的含量相对较少。在胚胎发育后期的第 7、8 期(即前溞状幼体期和溞状幼体期),新出现了 74 ku 蛋白,并且低分子量蛋白的含量在胚胎后期呈增加的趋势。

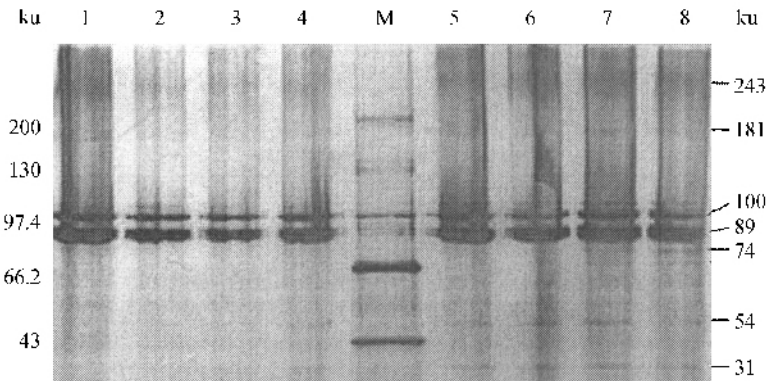


图 3 罗氏沼虾胚胎发育各时期可溶蛋白 7.5% SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 3 Main soluble proteins at different embryonic development stages of *Macrobrachium rosenbergii* as revealed by 7.5% SDS-PAGE

1. 受精卵期; 2. 卵裂期; 3. 囊胚期; 4. 原肠期; 5. 前无节幼体期; 6. 后无节幼体期; 7. 前溞状幼体期; 8. 溞状幼体期; M. 标准蛋白分子量。
1. fertilized egg stage; 2. cleavage stage; 3. blastula stage; 4. gastrula stage; 5. egg nauplius stage; 6. egg metanauplius stage; 7. protozoa stage; 8. zoea stage; M. markers.

日本沼虾胚胎发育时期的可溶蛋白组分同样也较为丰富(图 4)。在这些蛋白条带中,100 ku 和 89 ku 蛋白也是最主要的组成成分,含量明显高于其他组分。同罗氏沼虾相比,分子量

较高的组分中,也存在 243 ku 蛋白,但没有出现 181 ku 蛋白,在低分子量蛋白中,54 ku 蛋白含量也较高,但在原肠期后降低。在前溞状幼体期和溞状幼体期,也出现了 74 ku 蛋白。

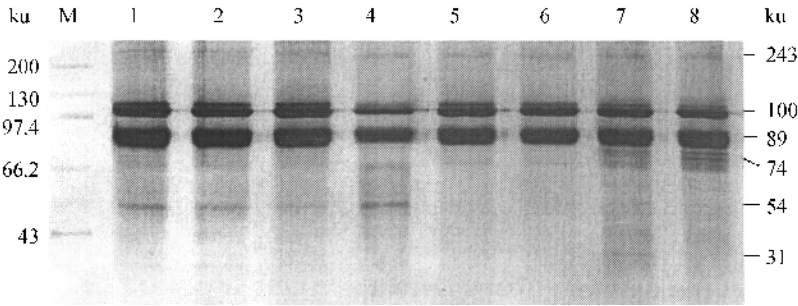


图 4 日本沼虾胚胎发育各时期可溶蛋白 7.5% SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 4 Main soluble proteins at different embryonic development stages of *Macrobrachium japonicus* as revealed by 7.5% SDS-PAGE

1. 受精卵期; 2. 卵裂期; 3. 囊胚期; 4. 原肠期; 5. 前无节幼体期; 6. 后无节幼体期;
7. 前溞状幼体期; 8. 溞状幼体期; M. 标准蛋白分子量。
1. fertilized egg stage; 2. cleavage stage; 3. blastula stage; 4. gastrula stage; 5. egg nauplius stage;
6. egg metanauplius stage; 7. protozoa stage; 8. zoea stage; M. markers.

3 讨论

3.1 胚胎期可溶蛋白的含量及组成变化 在甲壳动物中,卵黄蛋白存在于成熟卵细胞和胚胎发育各时期,是积累在卵黄颗粒中的主要蛋白组分。可溶蛋白在构成上以卵黄蛋白为主,是作为胚胎发育时期的主要营养源,在胚胎发育的过程中起着重要的作用,一方面为胚胎发育提供组织器官构建所必需的氨基酸,另一方面也为生理代谢过程提供能量^[9]。在本研究中 2 种沼虾受精卵期的可溶蛋白含量都占干重的 40% 以上,在溞状幼体期,罗氏沼虾和日本沼虾的可溶蛋白分别下降到 29.90% 和 17.31%。可溶蛋白的含量在胚胎发育过程中逐渐降低,可推测可溶蛋白逐渐被胚胎利用,为胚胎发育提供物质和能量。

甲壳动物卵黄蛋白的主要成分是卵黄磷蛋白(Vitellin, Vn),该蛋白由卵黄蛋白原水解形成,是甲壳动物胚胎发育期及早期幼体的内源性营养物质,同时它具有在血淋巴中携带并转运脂肪进入卵巢中卵母细胞的功能^[10]。甲壳

动物的卵黄磷蛋白分子量为 200 ~ 500 ku,不同种类的卵黄磷蛋白的亚基数目为 2 ~ 11 个不等。刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)卵黄磷蛋白的分子量为 350 ku,2 个主要组成亚基的分子量分别为 76 ku 和 102 ku^[11],凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)卵黄磷蛋白分子量为 388 ku,由 5 个亚基聚合而成,3 个主要亚基的分子量为 87、78 和 46 ku^[12]。Chang 等测得罗氏沼虾卵巢中卵黄磷蛋白由 89 ku 和 100 ku 2 个亚基组成^[4]。不同种类卵黄磷蛋白存在不同的亚基单位,说明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。随着胚胎的发育,卵黄蛋白仍继续处于不断的水解过程中,卵黄蛋白的大分子亚基含量在下降,小分子亚基含量在增加。卵黄蛋白由大分子片段水解成小分子片段,并在形成氨基酸的过程中,为胚胎发育提供能量,也产生了胚胎组织器官的构建物质。

3.2 40 ku 蛋白亚基及胚胎期蛋白亚基的变化

在甲壳动物中,卵黄主要由脂肪和蛋白质组成,它们在卵巢发育时期不断积聚直到卵细胞

成熟。实验结果显示,2种沼虾中以卵黄蛋白为主的可溶蛋白在胚胎发育时期含量较高,而且在组成上也较丰富,卵黄磷蛋白是卵黄蛋白的主要成分。甲壳动物不同物种的卵黄磷蛋白在分子量上存在较大差异,这是由于在亚基的组成数目及亚基分子量上存在较大差别造成的。在罗氏沼虾血淋巴中,卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)由3个亚基组成,分别是170 ku、100 ku和89 ku亚基^[5,43],卵黄磷蛋白只有100 ku和89 ku 2个亚基^[4,44]。本研究中,在2种沼虾成熟卵细胞和胚胎发育时期,可溶蛋白以100 ku和89 ku亚基构成的卵黄磷蛋白为主,而没有出现170 ku蛋白亚基。作者推测,在卵巢形成时期,卵细胞卵黄蛋白中的100 ku和89 ku可能直接来源于血淋巴中的这2个亚基,卵黄蛋白原中170 ku蛋白在进入卵细胞后,可能很快就分解成了其他亚基片段。

在2种沼虾卵巢的成熟卵细胞中,都出现了40 ku蛋白亚基。而在受精卵期及其以后的胚胎各时期,此亚基已不存在。从分子大小来看,40 ku蛋白亚基不属于卵黄磷蛋白,因此推测它的生理功能主要不是参与营养代谢,而是在这2种沼虾的受精过程中执行了特定的生殖功能。

在胚胎发育时期,可溶蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示了蛋白亚基的种类较多,除了卵黄磷蛋白(89 ku和100 ku)的蛋白亚基以外,还有224.7 ku、236 ku、181 ku和一些分子量较低的亚基。这些蛋白亚基在胚胎发育中或提供能量,或作为酶以分解卵黄物质,为胚胎发育的顺利进行提供保障。在对虾孵化后的36~48 h内,无节幼体完全依赖于留存在体内的卵黄为生^[15],罗氏沼虾和日本沼虾在溞状幼体期仍存在一定数量的卵黄颗粒,说明了这2种沼虾在孵化后摄食前的短时间内,仍然依赖于可溶蛋白中卵黄蛋白提供营养。2种沼虾在前溞状幼体期和溞状幼体期,新出现的74 ku等蛋白亚基可能与其在胚胎发育后期的功能有关,也可能是形成的组织蛋白。

3.3 两种沼虾胚胎期可溶蛋白的差异 同为

沼虾属的罗氏沼虾和日本沼虾,它们的亲缘关系较近。在胚胎发育时间上,与对虾在自然水温下一般不超过一天不同,罗氏沼虾胚胎发育时间为20 d左右,日本沼虾胚胎发育时间约为25 d。2种沼虾的可溶蛋白在成熟卵细胞和胚胎发育中表现出许多共同的特征外,也表现出一定的差异性。

罗氏沼虾可溶蛋白含量在胚胎发育期缓慢下降,只是在前溞状幼体期和溞状幼体期下降幅度略微增大,而日本沼虾在卵裂期和原肠期后下降幅度较大,体现了不同物种对可溶蛋白中卵黄蛋白的利用以及形成器官组织蛋白存在时间上的差异。罗氏沼虾可溶蛋白中含有181 ku蛋白亚基,它存在于胚胎发育的各个时期,而在日本沼虾中则未出现此蛋白亚基。在日本沼虾中,在胚胎发育前期54 ku蛋白亚基含量较高,后期含量降低;31 ku在后期含量增高。在罗氏沼虾中,这2种蛋白亚基含量较稳定。可溶蛋白在不同物种胚胎发育时期不同的变化,体现了每个物种在卵黄蛋白的利用和组织蛋白形成中各自的特点,这些差异所涉及的具体功能还待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wolin E M, Laufer H, Albertini D F. Uptake of the yolk protein, lipovitellin, by developing crustacean oocytes. *Dev Biol*, 1973, **35** (1): 160 ~ 170.
- [2] Meusy J J. Vitellogenin, the extraovarian precursor of the yolk protein in crustacean: a review. *Reprod Nut Dev*, 1980, **20** (3): 1 ~ 21.
- [3] Chang C F, Lee F Y, Huang Y S, et al. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol*, 1993a, **105B**: 409 ~ 414.
- [4] Chang C F, Tung W S, Huang Y S, et al. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol*, 1993b, **105B**: 609 ~ 615.
- [5] 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*. *Comp Biochem Physiol*, 1997, **117A**: 433 ~ 439.

- [6] Charniaux-Cotton C H. Vitellogenesis and its control in malacostracan crustacea. *Amer Zool* ,1985 **25**(1) :197 ~ 206.
- [7] 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. *动物学报* ,1998 **44**(3) :249 ~ 256.
- [8] Li J W ,Xiao N G ,Yu R Y , *et al.* Principal and Method of Biochemical Experiment. Beijing : Beijing University Press , 1994 ,174 ~ 176.
- [9] 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. *华东师范大学学报(自然科学版)* 2004 (1) :88 ~ 92.
- [10] Lubzens E. Isolation and characterization of the high-density lipoproteins from the hemolymph and ovary of the Penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan) apoproteins and lipids. *Exp Zool* ,1997 **278**(6) :339 ~ 348.
- [11] Qiu Y W ,NGTB ,Chu K H. Purification and characterization of vitellin from the ovaries of the shrimp *Metapenaeus ensis* (Crustacea : Decapoda : Penaeidae). *Invert Reprod Dev* ,1997 , **31**(1) :217 ~ 223.
- [12] Karina D , Gareia-Orozco , Francisco V A. Molecular characterization of vitellin from the ovaries of the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vanname* . *Comp Biochem Physiol* , 2002 **133B** :361 ~ 369.
- [13] Wilder M N , Okumura T , Suzuki Y , *et al.* Vitellogenin production induced by eyestalk ablation I juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and trial methyl farnesoate administration. *Zool Sci* ,1994 **11**(1) :45 ~ 53.
- [14] Derelle E ,Grosclaude J ,Meusy J J , *et al.* ELISA titration of vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn , *Macrobrachium rosenbergii* ,with monoclonal antibody. *Comp Biochem Physiol* ,1986 **85B** :1 ~ 4.
- [15] Chen C C ,Chen S N. Isolation and partial characterization of vitellin from the egg of the giant tiger prawn , *Penaeus monodon* . *Comp Biochem Physiol* ,1993 **106B**(1) :141 ~ 146.