

暗纹东方鲀卵子磷酸酶等生化指标分析与卵质评估

赵艳飞^{1,2}, 马爱军^{1*}, 何伟国¹, 马得友¹, 毛美霖³, 王新安¹, 刘大勇⁴, 郭正龙⁴

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,
青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003;

3. 中国海洋大学附属中学, 山东 青岛 266003;

4. 江苏中洋集团股份有限公司, 江苏 海安 226600)

摘要: 为了研究暗纹东方鲀卵子可发育能力与其生化指标的关系, 用生化分析方法对暗纹东方鲀未受精卵子基本成分、磷酸酶活力、苹果酸脱氢酶(MDH)活力、唾液酸(SA)、氨基酸含量进行分析, 同时用 GC-MS 方法对脂肪酸组成及相对含量进行检测, 并对各物质变化规律与其孵化率的相关性进行分析。结果显示, 酸性磷酸酶活力(ACP)、SA 含量与孵化率显著相关, 碱性磷酸酶(AKP)与孵化率显著负相关; C14:0 与孵化率显著相关, 并呈现递减趋势; ARA、DHA 与孵化率均显著相关, 并呈现先递增后递减的变化趋势; n-3 脂肪酸、DHA 与 EPA 之比、EPA 与 ARA 之比均与孵化率存在显著相关。结果表明, 磷酸酶、SA、脂肪酸等物质变化规律与卵子孵化率存在相关性, 且 ACP 活力值在 68.045 ~ 141.038, AKP 活力值在 2.298 ~ 7.241, SA 含量在 9.081 ~ 19.973, C14:0 含量在 0.485 ~ 0.658, ARA 含量在 1.371 ~ 2.498, DHA 含量在 13.838 ~ 18.469 时, 均可作为卵子孵化率不低于 50% 的参考指标, 据此可在一定程度上反映暗纹东方鲀苗种繁育生产中所用卵子的可孵化价值, 亦可作为参考指标对其卵子质量进行初步的客观评价。

关键词: 暗纹东方鲀; 卵子; 磷酸酶; 唾液酸; 脂肪酸; 孵化率

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)为江海洄游性底层鱼, 亲鱼性成熟时溯游至长江中下游河段产卵, 幼鱼于当年秋或次年春季返回近海生长, 为一次性产卵鱼类。考虑到经济成本, 人工养殖的暗纹东方鲀往往在淡水中育苗, 幼鱼也在盐度较低的环境中养成。在暗纹东方鲀人工繁育中, 亲鱼所产卵子的质量影响着育苗工作的成败, 而在人工培育亲鱼期间, 亲鱼性腺内卵母细胞的营养积累及卵细胞形成过程对外界环境的波动较敏感, 使人工培育亲鱼所产卵子质量参差不齐, 进而影响后续卵子受精、孵化及仔稚鱼的存活、生长^[1]。

目前对暗纹东方鲀卵子质量的预估主要通过如外观色泽、卵子弹性等经验性指标特征进行判

断, 尚且没有一个严谨、科学的评价标准可供参考。研究学者从形态学^[2-3]、卵质成分^[4-5]、代谢酶类^[6]等方面对多种经济鱼类的卵子质量做了相关研究, 也发现一些可作为卵子质量高低参考的指示性物质或形态特征, 这为一些养殖鱼类卵子评估及育苗工作提供了可靠的指导参数, 但这些结果往往具有种属特异性, 只能针对某些种类做出一定评判, 对暗纹东方鲀及其他种类鱼育苗工作中的卵质评估没有太大参考意义。

因暗纹东方鲀为卵生型鱼类, 卵子自受精到孵化的整个胚胎发育过程所需催化酶类、蛋白、脂肪酸等几乎所有物质均由卵子自身提供, 且胚胎自身遗传物质的转录、翻译直至分裂到囊胚中期

收稿日期: 2015-02-06 修回日期: 2015-05-14

资助项目: 江苏省科技支撑计划(BE2013345); 江苏省水产三新工程(Y2013-12); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022012005)

通信作者: 马爱军, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

才开始启动^[7],因此卵子内部母源性营养、遗传物质在卵子受精及整个胚胎发育过程中起着至关重要的作用。卵子内磷酸酶在生物体内普遍存在,是非特异性的磷酸单脂水解酶^[8],也是动物体内重要的解毒酶系,对细胞调节和营养物质的吸收、转运过程极为重要^[9],因此卵子内部磷酸酶含量出现异常将可能影响卵子内部单脂水解、卵子形成过程中的营养物质积累、抵抗外源物质入侵等过程的顺利进行,进而影响卵子的正常功能;唾液酸(sialic acid, SA)属于糖类,广泛存在于各种生物组织中,其通常位于糖蛋白和糖脂的糖基化非还原末端,是糖复合物结构和功能多样化的重要物质基础^[10],同时 SA 也是卵子皮质囊泡内的主要成分^[11],其可从皮质囊泡中释放进入卵周隙内并对外界环境产生渗透压梯度,直至卵子绒毛膜硬化,进而达到渗透压平衡^[12],由此可知 SA 在卵子入水后的硬化过程中起到关键作用;苹果酸脱氢酶(malate dehydro-genase, MDH)为三羧酸循环关键酶,在卵内物质代谢和能量转化过程中极为重要,保证着卵子及胚胎的正常发育;总氨基酸含量在一定程度上可反映卵子内部氨基酸代谢水平,其含量可间接反映卵子内部氨基酸代谢状态;脂肪不仅是卵子重要的储能物质,其多种脂肪酸在卵子代谢中还是多种重要的代谢、免疫等功能性物质的前体^[13-14],为卵子及胚胎正常发育的物质基础。因此本研究选取了酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、苹果酸脱氢酶、唾液酸、氨基酸等 5 种对卵子正常发育有重要作用的代谢物质及脂肪酸作为暗纹东方鲀卵质的评价指标,对其未受精卵取样、检测,并与其受精率、孵化率进行数据分析,以期发现一些规律及可影响卵质的指示性物质,并为暗纹东方鲀的卵质评价及苗种繁育技术推广提供客观性的实践资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验用卵子在人工培育条件下获得,实验用亲鱼于 2014 年 3 月中下旬选自江苏中润农业有限公司,共选出腹部性腺轮廓明显的健壮 3 龄雌鱼 33 尾、体质健壮的 3 龄雄鱼 5 尾置于催产池(7 m × 7 m × 0.8 m),雌性亲鱼大小无明显差异,雌鱼平均体质量(1 188.75 ± 109.64) g,体长(29.80 ±

1.79) cm,养殖用水为过滤池塘淡水,水温 20 ~ 21 °C,溶氧 8 mg/L 以上。采用两针注射法催产,并于 2014 年 4 月 20—22 日采用腹部挤压法人工授精(授精前每条雌鱼取未受精卵各 5 mL,用蒸馏水冲洗干净,滤纸吸干后于离心管内 -80 °C 保存,并镜检精液,保证所用精子活力达 90% 以上)。人工繁育中,暗纹东方鲀雌性亲鱼在排卵时会把卵子一次性排净,不存在同一亲鱼在一个季节有多次排卵的现象。针对生产中同一培育条件下不同亲鱼所产卵子的孵化率常出现较大波动这一现象,为使卵子质量在各实验组间出现差异,查明这些卵子间是否存在一些生化成分上的差异,进而找出与卵子质量变化规律相近的生化指标参数,本实验以每一尾雌鱼所产卵子为一组,为更易出现各实验组间卵子发育能力参差不齐的现象,本实验所用亲鱼在 20 尾以上,具体如下。

本次人工授精共选取 27 尾雌鱼,产卵量(355 ± 74.67) g,其余 6 尾因产卵量过低或未能产卵而排除,选择 1 尾精液充足、精子活力达 90% 以上的雄性亲鱼(体质量:1 142.5 g,体长:28.5 cm,精液量 57 mL),将精液挤于干净、光滑烧杯内。产卵时,每尾雌性亲鱼所产卵子为一组,实验一共 27 组。用量筒量取 5 mL 未受精卵于洁净瓷碗,每组加入等量高活力精液,摇匀后加入 10 mL 生理盐水,轻轻搅拌 5 min,布卵于 10 L 体积锥形孵化网中流水孵化,底部充气,流水来自同一水源。调节气流速度使受精卵在水中能均匀分散涌起,水温 20 °C。

1.2 繁殖性状统计

因鱼类卵子存在假受精现象,未受精卵亦可自行发育至囊胚中期,待胚胎发育至原肠前期统计受精率:

$$\text{受精率}(\%) = \frac{\text{囊胚后期及原肠期胚胎数}}{\text{总卵数}} \times 100\%$$

由于同批卵子存在出膜期不同步现象,在胚胎开始破膜 24 h 后,根据初孵仔鱼数,统计孵化率:

$$\text{孵化率}(\%) = \frac{\text{初孵仔鱼数}}{\text{受精卵数}} \times 100\%$$

因胚胎在淡水中孵化时存在正常胚胎感染水霉现象,孵化过程中需要反复淘去霉卵,以防水霉影响正常胚胎孵化。每组受精率、孵化率重复统计 3 次。

1.3 样品制备及分析

匀浆液制备 取 1 g 左右卵子,按照质量

体积比 1:9 加入预冷 0.9% 生理盐水,冰水浴手工匀浆,2 500 r/min 离心 10 min,制成 10% 匀浆上清液。

卵子干重、水分、蛋白及总脂含量测定 卵子干重、水分、蛋白和总脂含量参照 AOAC^[15] 标准方法测定。取 100 粒卵子称重计为 m_1 (mg/100 粒),并于冻干机(冷冻干燥机 ALPHA 1-4 LD,克莱斯特,德国)内干燥到恒重 m_2 ,即为卵子干重 (mg/100 粒); 卵子水分含量 (%): $m_1/m_2 \times 100\%$; 蛋白定量按照 BCA 法测定(试剂盒购于赛默飞世尔科技有限公司),通过换算可得 1g 卵子干重的蛋白含量 (mg/g); 脂肪的测定:取一定量卵在冻干机中冻干,称取 0.1 g 卵冻干粉,参照 Folch 等^[16] 的氯仿甲醇提取法测定。

匀浆液蛋白、总氨基酸(AA)、SA 定量测定及 ACP、AKP、MDH 活性检测 AA 定量测定采用铜离子络合比色法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司),在一定波长下络合物颜色深浅与总氨基酸含量成正比,通过换算得到 1 g 湿重卵内总氨基酸含量 (mmol/g); SA 定量测定采用 5-甲基苯二酚络合比色法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司),通过测定络合物吸光度与标准即可计算出 1g 湿重卵内 SA 含量 (mg/g); ACP 和 AKP 活力测定采用铁氰化钾比色法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司); MDH 活力测定采用底物催化反应体系法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司)。

样品甲酯化 取 0.1 g 冷冻干燥卵子,加入 1 M KOH-甲醇溶液 3 mL 于 80 °C 水浴 20 min,冷却后加入 2 M HCl-甲醇溶液 3 mL,80 °C 水浴 20 min; 冷却后加正己烷 1 mL,振荡萃取,静置分层,取上清液样品于气相-质谱仪(GCMS-QP2010,岛津,日本)检测。

脂肪酸种类及含量分析 气相条件:色谱柱:Rxi-1MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) 毛细管柱; 升温程序:初始温度 150 °C,以 15 °C/min 升至 200 °C,再以 2 °C/min 升至 250 °C; 进样口温度:250 °C; 载气(He)流量:1 mL/min; 自动进样,进样体积 1 μL,分流比:20:1; 溶剂切除时间:2.5 min。质谱条件:电子轰击离子源,离子源温度 230 °C,接口温度 280 °C,电子能量 70 eV,质量扫描范围 45 ~ 500 m/z。

通过 NIST08.LIB 谱库进行检索,确定脂肪酸组成(匹配度高于 80%),根据目标脂肪酸与内标峰面积比得出其在总脂中的相对含量。

1.4 数据处理

用 SPSS 17.0 对所得数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用 Duncan 氏多重比较进行差异显著性检验,并进行 Pearson 相关系数及简单回归方程分析,以找到卵质生化参数与其质量相关性,并确定几种可判定卵子孵化率不低于 50% 的生化指标(为保证苗种繁育生产中的经济效益,本实验将每尾亲鱼所产卵子最终孵化率不低于 50% 作为衡量其有孵化价值的标准)。数据以平均数 ± 标准误 (mean ± SE) 表示, $P < 0.05$ 为差异显著性水平, $R^2 > 0.4$ 可判定为存在相关性。

2 结果与分析

对 27 个实验组受精率、孵化率数据处理显示,各实验组间受精率差异不显著 ($P > 0.05$),孵化率差异显著 ($P < 0.05$),组内孵化率均具有方差齐性 ($P > 0.05$),说明孵化率具有统计学意义; 然而因受精率在各组间差异不显著,此后将不再用作卵子质量参考指标。为更简单明了地分析卵子质量与生化参数的关系,将各实验组按孵化率高低分为 1(孵化率 ≥ 80%)、2(80% > 孵化率 ≥ 50%)、3(孵化率 < 50%) 3 个孵化水平(表 1),孵化水平 1 有 13 个实验组,孵化水平 2 有 6 个实验组,孵化水平 3 有 8 个实验组。

2.1 受精率、孵化率与卵子干重、水分、蛋白及总脂含量变化

对 3 个孵化水平方差分析显示,各水平之间具有显著性差异 ($P < 0.05$),水平内具有方差齐性。各实验组间、组内受精率均波动不大,差异不显著 ($P > 0.05$); 不同孵化水平的暗纹东方鲀卵子内基本成分均无显著差异,卵子干重也无显著性变化(表 1)。

2.2 不同孵化水平间卵子内磷酸酶活力变化

孵化水平 1 组卵子内 ACP 活力明显高于孵化水平 2、3 组,孵化水平 2、3 组间 ACP 活力无显著差异; AKP 活力在 3 个孵化水平间均有显著差异,孵化水平 1 组 AKP 活力最低,孵化水平 2 次之,孵化水平 3 组 AKP 活力最高,平均活力值达 7.91 U/gprot,为孵化水平 1 组 AKP 活力 2 倍(表 2)。

表 1 暗纹东方鲀胚胎受精率、孵化率与卵子内基本成分变化 (mean ± SE)
Tab.1 *T. obscurus* fertilization rate, hatching rate and composition changes of egg

	孵化水平 1 hatching level 1	孵化水平 2 hatching level 2	孵化水平 3 hatching level 3
组数/组 number of egg batches	13	6	8
受精率/% fertilization rate	87.69 ± 1.42 ^a	82.47 ± 1.82 ^a	82.89 ± 1.45 ^a
孵化率/% hatching rate	88.96 ± 0.86 ^a	62.16 ± 3.55 ^b	33.54 ± 2.49 ^c
干重/(mg/100 粒) dry weight	6.17 ± 0.37 ^a	6.24 ± 0.08 ^a	6.11 ± 0.13 ^a
水分含量/% moisture content	90.44 ± 0.77 ^a	90.08 ± 0.09 ^a	90.25 ± 0.16 ^a
蛋白含量/% protein content	14.85 ± 0.41 ^a	14.56 ± 0.13 ^a	13.94 ± 0.61 ^a
脂肪含量/% fat content	17.05 ± 0.13 ^a	17.35 ± 0.29 ^a	17.29 ± 0.11 ^a

注:不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 下同

Notes: different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$), the same letter indicates no significant difference ($P > 0.05$), the same as below

表 2 不同孵化水平间卵内几种酶活
及代谢物质的含量变化

Tab.2 The content changes of some enzyme activity
and metabolites in different hatching levels

	孵化水平 1 hatching level 1	孵化水平 2 hatching level 2	孵化水平 3 hatching level 3
ACP/(U/gprot)	112.90 ± 3.65 ^a	75.01 ± 10.02 ^b	71.70 ± 6.23 ^b
AKP/(U/gprot)	3.89 ± 0.29 ^a	6.24 ± 0.49 ^b	7.91 ± 0.38 ^c
MDH/(U/mgprot)	0.59 ± 0.02 ^a	0.57 ± 0.04 ^a	0.62 ± 0.03 ^a
SA/(mg/g)	17.04 ± 0.55 ^a	13.69 ± 0.25 ^b	10.82 ± 0.93 ^c
AA/(mmol/g)	1.03 ± 0.07 ^a	1.14 ± 0.18 ^a	0.91 ± 0.20 ^a

2.3 不同孵化水平间卵子内代谢参数变化

MDH 活力在各孵化水平间有变化, 但均无显著性差异; SA 在 3 个孵化水平间呈现显著性变化, 具体表现为孵化率越高, SA 含量也越高; AA 在各孵化水平间变化很小, 差异不显著 (表 2)。

2.4 不同孵化水平间卵子脂肪酸种类及比例变化

C18:0、C18:1、C18:3n-3 和 C20:2n-6 在 3 个孵化水平间均无显著性差异 ($P > 0.05$); C14:0 和 C16:0 在不同孵化水平间均表现出显著性差异; C16:1n-7 在孵化率高的卵子组脂类中的比例明显偏高, 与低孵化率组呈现显著性差异 ($P < 0.05$), 而其在孵化水平 2 的比例与 1、3 均无显著性差异; C18:2n-6 在孵化水平 1、2 间差异显著 ($P < 0.05$), C20:1n-9 在孵化水平 1、2 间也表现出显著差异 ($P < 0.05$); ARA、DHA、C22:5n-3 在孵化水平 1、2 间没有显著变化 ($P > 0.05$), 但在孵化水平 3 却表现出与 1、2 显著的差异 ($P < 0.05$); EPA 在孵化水平 1 中的含量均与 2、3 水

平存在显著性差异 ($P < 0.05$), 孵化水平 2、3 之间差异却很小 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 不同孵化水平间卵子脂肪酸组成变化

Tab.3 The content changes of fatty acids

	孵化水平 1 hatching level 1	孵化水平 2 hatching level 2	孵化水平 3 hatching level 3
C14:0	0.53 ± 0.12 ^a	0.64 ± 0.01 ^b	0.68 ± 0.02 ^c
C16:0	16.41 ± 0.17 ^a	15.15 ± 0.23 ^b	15.76 ± 0.11 ^c
C16:1n-7	8.60 ± 0.28 ^a	7.85 ± 0.14 ^{a,b}	7.24 ± 0.24 ^b
C18:0	5.19 ± 0.06 ^a	5.14 ± 0.05 ^a	5.16 ± 0.06 ^a
C18:1	34.87 ± 0.1 ^a	34.50 ± 0.31 ^a	34.77 ± 0.14 ^a
C18:2n-6	3.30 ± 0.13 ^a	3.76 ± 0.15 ^b	3.48 ± 0.06 ^{a,b}
C18:3n-3	0.62 ± 0.05 ^a	0.63 ± 0.02 ^a	0.62 ± 0.03 ^a
C20:1n-9	2.36 ± 0.03 ^a	2.49 ± 0.05 ^b	2.45 ± 0.03 ^{a,b}
C20:2n-6	0.32 ± 0.04 ^a	0.34 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.02 ^a
C20:4n-6(ARA)	1.65 ± 0.0 ^a	1.65 ± 0.06 ^a	1.37 ± 0.05 ^b
C20:5n-3(EPA)	2.70 ± 0.06 ^a	2.96 ± 0.10 ^b	3.07 ± 0.83 ^b
C22:5n-3	7.37 ± 0.02 ^a	7.35 ± 0.05 ^a	7.22 ± 0.33 ^b
C22:6n-3(DHA)	15.55 ± 0.28 ^a	15.32 ± 0.68 ^a	13.63 ± 0.11 ^b
SFA	22.15 ± 0.16 ^a	20.92 ± 0.23 ^b	21.60 ± 0.15 ^c
PUFA	31.55 ± 0.44 ^a	32.00 ± 0.93 ^a	29.76 ± 0.26 ^b
MUFA	45.77 ± 0.30 ^a	44.84 ± 0.22 ^b	44.45 ± 0.24 ^b
n-3	26.28 ± 0.34 ^a	26.26 ± 0.82 ^a	24.53 ± 0.18 ^b
n-6	5.27 ± 0.15 ^a	5.75 ± 0.13 ^b	5.23 ± 0.12 ^a
n-3;n-6	5.01 ± 0.11 ^a	4.57 ± 0.09 ^b	4.71 ± 0.10 ^{a,b}
PUFA,SFA	1.43 ± 0.03 ^a	1.53 ± 0.06 ^b	1.38 ± 0.01 ^a
DHA;EPA	5.71 ± 0.12 ^a	5.17 ± 0.16 ^b	4.47 ± 0.11 ^c
EPA;ARA	1.67 ± 0.07 ^a	1.80 ± 0.08 ^a	2.25 ± 0.08 ^b

通过对以上脂肪酸统计发现, 其中饱和脂肪酸 (SFA) 在脂类中的比例在不同孵化水平全都呈

现显著性差异 ($P < 0.05$); 多不饱和脂肪酸 (PUFA)、总 n-3 PUFA 在孵化水平 1、2 中的比例均较高, 无显著差异 ($P > 0.05$), 然而其在孵化水平 3 中的比例却显著低于孵化水平 1、2 ($P < 0.05$); 单不饱和脂肪酸 (MUFA) 在孵化水平 1 中显著高于孵化水平 2、3 ($P < 0.05$), 孵化水平 2、3 之间并无显著性变化 ($P > 0.05$); 总 n-6 PUFA 在孵化水平 2 中的比例显著高于孵化水平 1、3 ($P < 0.05$), 孵化水平 1、3 之间无显著性差异 ($P > 0.05$); n-3:n-6、PUFA:SFA、DHA:EPA 和 EPA:ARA 在不同孵化水平间也都存在不同的显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.5 不同实验组孵化率的波动与各组卵子生化参数变化的相关性分析

研究发现, 27 组卵子内部磷酸酶、SA、脂肪酸等多种生化参数的变化有着一定的统计学意义, 为找出其与各自孵化率的波动是否存在一定的相关性, 本实验分别将 27 组卵子的磷酸酶、SA、脂肪酸等生化参数建立回归模型, 发现 ACP 活力、SA 含量与卵子孵化率呈正相关 ($R_1^2 = 0.501$, $P < 0.05$; $R_2^2 = 0.406$, $P < 0.05$, 表 4), AKP 活力

与孵化率呈负相关 ($R^2 = 0.690$, $P < 0.05$); 而对卵子氨基酸含量、MDH 活力分析结果未显示出其与孵化率存在相关性。对脂肪酸相对含量回归分析发现, C14:0 在脂类中的比例在不同组随孵化率升高而降低 ($R^2 = 0.684$, $P < 0.05$); ARA 在高孵化率组较低孵化率组的比例低, 与孵化率呈反比关系 ($R^2 = 0.447$, $P < 0.05$); DHA 在脂类中的比例在 13.3 ~ 16.7 范围内与孵化率成正比, 然而在 16.7 之后孵化率未能继续上升 ($R^2 = 0.710$, $P < 0.05$)。另统计显示, 多不饱和脂肪酸及 n-3 脂肪酸或受 DHA 影响, 表现出与 DHA 相似的回归曲线; DHA 与 EPA 之比在 4 ~ 7 之间, 并与孵化率表现出正相关 ($R^2 = 0.722$, $P < 0.05$); EPA 与 ARA 之比在 1 ~ 2 之间, 与孵化率表现出负相关 ($R^2 = 0.550$, $P < 0.05$)。另外 C16:0、C16:1n-7、C18:2n-6、EPA、C22:5n-3、SFA、MUFA 也表现出与孵化率存在一定的相关性, 但相关性均较低 ($0.1 < R^2 < 0.4$, $P < 0.05$)。C18:0、C18:1、C18:2n-6、C18:3n-3、C20:1n-9、C20:2n-6 均未表现出与孵化率的相关性。

表 4 各生化参数与孵化率相关性

Tab. 4 The correlation of biochemical parameters and hatching rates

自变量 independent variable	回归模型 regression model	R^2	F	P
ACP	$y = 0.685x + 3.389$	0.501	27.11	0.001
AKP	$y = -10.114x + 123.239$	0.690	58.957	0.000
SA	$y = -1.165^2 + 33.848x - 161.307$	0.406	9.883	0.001
C14:0	$y = 334.713x^2 - 670.420x + 346.324$	0.684	29.097	0.000
C16:0	$y = 17.449x^2 - 538.853x + 4213.668$	0.319	7.083	0.004
C16:1n-7	$y = -1.685x^2 + 43.295x - 170.830$	0.340	7.688	0.003
C18:2n-6	$y = 59.332x^2 - 442.270x + 877.111$	0.223	4.741	0.018
ARA	$y = -110.649^2 + 428.170x - 329.084$	0.447	11.522	0.000
EPA	$y = 41.301x^2 - 290.248x + 556.241$	0.264	5.653	0.010
C22:5n-3	$y = -140.899 + 2197.339x - 8466.658$	0.386	9.159	0.001
DHA	$y = -7.783x^2 + 251.442x - 1939.075$	0.710	32.857	0.000
SFA	$y = 14.725x^2 - 624.037x + 6667.079$	0.195	4.159	0.028
PUFA	$y = -3.250x^2 + 215.714x - 3489.229$	0.402	9.737	0.001
MUFA	$y = 2.063x^2 - 172.803x + 3659.782$	0.292	6.365	0.006
n-3	$y = -5.324x^2 + 290.529x - 3873.617$	0.509	14.452	0.000
DHA:EPA	$y = -7.863x^2 + 114.302x - 312.636$	0.722	34.798	0.000
EPA:ARA	$y = -55.395x + 170.312$	0.550	32.820	0.000

注: $P < 0.05$, $R^2 > 0.4$ 表示该模型有意义, R^2 越大, 模型吻合性越大

Notes: $P < 0.05$, $R^2 > 0.4$ indicates that the model has the significance, the bigger the R^2 , the greater the significance of the model

2.6 几种重要的可作为卵质评估依据的生化指标总结

暗纹东方鲀卵子内 ACP、AKP、SA、C14:0、ARA 和 DHA 这 6 种生化指标以及 PUFA、总 n-3、DHA:EPA、EPA:ARA 4 种脂肪酸统计参数均与各实验组的孵化率表现出较好相关性 ($R^2 > 0.4$),且在 ACP 活力范围不低于 68.045 时,卵子孵化率可达到 50% 以上,且随 ACP 活力

的升高而升高,相关系数 $R^2 = 0.501$; 与之相反,AKP 活力范围在 2.298 ~ 7.241 时,卵子孵化率也可保持在 50% 以上,但孵化率随着 AKP 活力的升高呈现降低趋势,相关系数 $R^2 = 0.690$; SA 含量在 9.081 ~ 19.973 时,孵化率呈现先升高后降低的趋势,相关系数 $R^2 = 0.406$; 孵化率在 50% 以上时,脂肪酸中的 C14:0 含量一般在 0.485 ~ 0.658,且呈现递减趋势(表 5)。

表 5 几种重要的生化指标与孵化率(y)的相关性

Tab.5 The correlation of some significant biochemical parameters and hatching rates

自变量 x independent variable	50 ≤ y ≤ 100 时 x 取值范围 the data range of x when 50 ≤ y ≤ 100	R ²	y 随 x 的变化趋势 variation trend of y along with the change of x
ACP	68.045 ≤ x ≤ 141.038	0.501	递增 increase progressively
AKP	2.298 ≤ x ≤ 7.241	0.690	递减 decrease progressively
SA	9.081 ≤ x ≤ 19.973	0.406	先递增后递减 first increase and then decrease progressively
C14:0	0.485 ≤ x ≤ 0.658	0.684	递减 decrease progressively
ARA	1.371 ≤ x ≤ 2.498	0.447	先递增后递减 first increase and then decrease progressively
DHA	13.838 ≤ x ≤ 18.469	0.710	先递增后递减 first increase and then decrease progressively
PUFA	29.670 ≤ x ≤ 36.704	0.402	先递增后递减 first increase and then decrease progressively
n-3	24.547 ≤ x ≤ 30.022	0.509	先递增后递减 first increase and then decrease progressively
DHA:EPA	4.678 ≤ x ≤ 6.662	0.722	递增 increase progressively
EPA:ARA	1.269 ≤ x ≤ 2.172	0.550	递减 decrease progressively

3 讨论

在暗纹东方鲀雌鱼性成熟阶段,其肝脏大量合成蛋白质、脂肪等营养物质,并经血液循环运至卵巢,为卵子的成熟和早期发育提供母源性营养和遗传物质。磷酸酶通过参与上述营养物质在未成熟卵内积累的过程^[17],影响着暗纹东方鲀卵子的成熟度,而且因 ACP 定位于溶酶体和内膜系统^[18],在酸性环境中其还可破坏表面带有磷酸酯的外源异物,具有非特异性免疫的功能^[19]; AKP 是一类膜结合糖蛋白,通过细胞跨膜运输,在 RNA、蛋白质、脂类等物质转运和代谢中有着重要作用^[20]。贾玉东等^[17]对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) 卵子磷酸酶活性研究发现,大菱鲆成熟卵子内部 ACP 活性明显强于前期卵子,而 AKP 在卵子营养物质积累过程中活力最高,待营养物质积累完成,成熟卵子内部活力明显下降,这与 ACP 和 AKP 在卵子形成及早期发育过程中所起的生理功能相吻合。本实验中暗纹东方鲀高孵化率的卵子内部 ACP 活性显著升高,这表明成熟卵子内部高活力的 ACP 可为其提供良好的免疫作用,从而保证胚胎正常孵化; AKP 活力随孵化率升高而降低则是因为暗纹

东方鲀是通过人工催产并腹部挤压法人工授精,此时可能尚有部分卵子未达最佳成熟状态,卵子内部营养物质转运尚未结束,AKP 活力处于较高状态,具体表现为低孵化率卵子内部具有较高 AKP 活力,这一结论与贾玉东等^[17]的研究结果一致。一些学者在金头鲷(*Sparus aurata*) 卵子的研究中得出,SA 含量在一定程度上可影响其胚胎孵化率,并表现为对数型正相关^[21]。本实验中暗纹东方鲀受精卵孵化率随 SA 含量上升表现为先升高后略微下降趋势,这 2 个结果均表明 SA 含量的上升在一定程度上有助于卵内糖代谢过程,或者有助于卵子正常吸水硬化的发生,从而保证卵子入水后的正常孵化,这与 SA 在卵子吸水及硬化过程中所扮演的生理功能相一致。而 MDH、AA 及卵子基本成分并未表现出与孵化率具有显著相关性,但这不能说明其含量的波动不影响胚胎的正常孵化,鱼类的胚胎发育是极其复杂的生理生化系统运转的过程,对卵子单一物质的研究并不能提供一个可信度高的功能性研究结果。

脂肪是鱼卵中最重要的储能物质,可分为 SFA、MUFA 与 PUFA。鱼类卵子脂类中富含不饱和脂肪酸。其中 ARA 是 n-6 PUFA 的一种,为

前列腺素和白三烯生理活性物质的前体,而这 2 种物质在胚胎发育、孵化及幼体生长中起着重要的调节作用^[13]; EPA 和 DHA 是 n-3 PUFA 的 2 种活性形式,均是细胞膜磷脂的重要组成物质,对细胞膜系统转运物质有重要影响^[14]。研究显示,卵子中 DHA 与 EPA 之比的波动可对胚胎发育产生影响^[22]。此外因 n-6 与 n-3 脂肪酸代谢过程所需酶相同,二者代谢过程将不可避免发生竞争^[23],并产生不同的类二十烷酸,因此 n-6 与 n-3 脂肪酸比例直接关系到不同类二十烷酸的比例,而 ARA 所产类二十烷酸具有促炎作用,EPA 所产类二十烷酸具有抗炎作用^[24],胚胎中两者比例的不同将直接关系到胚胎抗感染能力的强弱。C14:0、C16:0 及 C18:0 等饱和脂肪酸在大菱鲆、金头鲷等鱼类胚胎发育中作为重要能源首先被利用^[25],更长链的不饱和脂肪酸作为能源的利用率很低。

在本实验中发现,暗纹东方鲀卵子内 ARA 与孵化率呈现显著负相关,DHA 与孵化率呈显著正相关,显然这与 ARA、DHA 生理特性有关,ARA 含量的增加导致促炎性类二十烷酸含量的增加,进而使胚胎更易感染病菌,增加死亡率,DHA 与 ARA 作用正相反,可降低胚胎的病菌感染率,从而提高孵化成功率;DHA 与 EPA 之比和孵化率表现出的正相关,EPA 与 ARA 之比和孵化率表现出的负相关亦表明脂肪酸组成及比例对卵子胚胎发育有着重要的影响;C16:0、C16:1n-7、C18:2n-6、EPA、C22:5n-3、SFA 和 MUFA 也表现出与孵化率存在一定的相关性。对大菱鲆研究显示,其卵子内 C16:0、C16:1n-7、C20:5n-3 与 C22:6n-3 在产卵中期含量最高,此时卵子的孵化率也最高^[26],与本实验结果一致。另外在其他鱼类卵子研究中,也同样发现脂肪酸种类及比例与孵化率的显著相关性^[27-28]。这表明脂肪酸组成在鱼类卵子质量评价中具有一定的参考价值。

暗纹东方鲀人工繁育中,卵子的孵化率波动很大,从外观上看,质量极差的卵子常出现结块现象,其孵化率在 10% 以下。但生产经验表明,孵化率在 20%~30% 以上的卵子与质量差的卵子外观并无显著差异,经验不足的育苗人员常常难以判断其潜在发育价值,这给暗纹东方鲀育苗行业规范化及卵子质量标准化带来一定难度。本实验结果表明,ACP、AKP、SA 及脂肪酸中的 C14:0、

ARA 和 DHA 这几种生化参数与孵化率存在重要相关性,并在一定程度上可作为判定暗纹东方鲀卵子孵化率高低的生化指标,且在暗纹东方鲀苗种人工繁育中,ACP 活力值在 68.045~141.038,AKP 活力值在 2.298~7.241,SA 含量在 9.081~19.973,C14:0 含量在 0.485~0.658,ARA 含量在 1.371~2.498,DHA 含量在 13.838~18.469 时,卵子才具有一定的繁育价值,即孵化率在 50% 以上,据此可对暗纹东方鲀卵质进行初步的客观评价,为暗纹东方鲀育苗行业健康发展提供了一定的参考资料。

以上物质对卵子孵化率有显著影响,但各物质之间有无关联性,本实验中其他未能体现出与孵化率相关性的生化参数是否隐藏着现有统计手段未察觉到的关联性,现在尚不得而知。且不同鱼类在各自卵子成熟过程中易受环境波动而影响卵子发育能力的脆弱性指标尚不清晰,未来还需深入研究。

参考文献:

- [1] Kohn Y Y, Symonds J E. Evaluation of egg quality parameters as predictors of hatching success and early larval survival in hapuku (*Polyprion oxygeneios*) [J]. *Aquaculture*, 2012, 342-343: 42-47.
- [2] Thorsen A, Trippel E A, Lambert Y. Experimental methods to monitor the production and quality of eggs of captive marine fish [J]. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 2003, 33(9): 55-70.
- [3] Ma A J, Lei J L, Wang X A, et al. Quality evaluation of broodstock, gametes and larvae in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Marine Science*, 2011, 35(1): 98-104. [马爱军, 雷霖霖, 王新安, 等. 大菱鲆亲鱼, 配子和仔稚鱼的质量评价. *海洋科学*, 2011, 35(1): 98-104.]
- [4] Mansour N, Lahnsteiner F, McNiven M A, et al. Relationship between fertility and fatty acid profile of sperm and eggs in Arctic char, *Salvelinus alpinus* [J]. *Aquaculture*, 2011, 318(3-4): 371-378.
- [5] Jia Y, Meng Z, Liu X, et al. Biochemical composition and quality of turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs throughout the reproductive season [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(4): 1093-1104.
- [6] Lahnsteiner F. Carbohydrate metabolism of vitellogenic follicles and eggs of *Serranus cabrilla* (Serranidae) and *Mullus barbatus* (Mullidae) and of

- embryos of *Sparus aurata* (Sparidae) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2006, 32 (2): 131 - 139.
- [7] Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165 (3): 535 - 548.
- [8] Wang S P, Kong X H, Jiang H X, et al. Changes in activities of acid phosphatase and alkaline phosphatase during embryonic development of goldfish, *Carassius auratus* [J]. Fisheries Science, 2011, 30(7): 405 - 408. [王书平, 孔祥会, 江红霞, 等. 金鱼胚胎发育过程中磷酸酶活性的变化. 水产科学, 2011, 30(7): 405 - 408.]
- [9] Barr F A, Elliott P R, Gruneberg U, . Protein phosphatases and the regulation of mitosis. Journal of Cell Science, 2011, 124(14): 2323 - 2334.
- [10] Cheng C, Gao C F. Research progress of sialic acid and its biological significance in the liver diseases [J]. Laboratory Medicine, 2013, 28(4): 333 - 336. [程斌, 高春芳. 唾液酸的生物学意义及其在肝病中的研究进展. 检验医学, 2013, 28(4): 333 - 336.]
- [11] Mansour N, Lahnsteiner F, Patzner R A. Physiological and biochemical investigations on egg stickiness in common carp [J]. Animal Reproduction Science, 2009, 114(1-3): 256 - 268.
- [12] Alderdice D F. 3 Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae [J]. Fish Physiology, 1988, 11: 163 - 251.
- [13] Bell J G, Sargent J R. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities [J]. Aquaculture, 2003, 218 (1 - 4): 491 - 499.
- [14] Tocher D R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish [J]. Aquaculture Research, 2010, 41(5): 717 - 732.
- [15] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International [M]. 16th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- [16] Folch J, Lees M, Sloane S G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1957, 226(1): 497 - 509.
- [17] Jia Y D, Meng Z, Liu X F, et al. Activities of phosphatase in eggs and ovarian fluids and its correlation with the fertilization rate during the reproductive cycle of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44 (6): 1530 - 1535. [贾玉东, 孟振, 刘新富, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 繁殖期卵子和卵巢液中磷酸酶活性变化及其与受精率相关性. 海洋与湖沼, 2013, 44(6): 1530 - 1535.]
- [18] Kong X, Wang S, Jiang H, et al. Responses of acid/alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus* [J]. Aquatic Toxicology, 2012, 120 - 121: 119 - 125.
- [19] Liu Z H, Mou H J, Wang Q Y. Research progress of immune related enzymes in mollusca [J]. Marine Fisheries Research, 2003, 24(3): 86 - 90. [刘志鸿, 牟海津, 王清印. 软体动物免疫相关酶研究进展. 海洋水产研究, 2003, 24(3): 86 - 90.]
- [20] Ali A T, Penny C B, Paiker J E, et al. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3 - L1 [J]. Clinica Chimica Acta, 2005, 354(1-2): 101 - 109.
- [21] Lahnsteiner F, Patarnello P. Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters [J]. Aquaculture, 2004, 237(1-4): 443 - 459.
- [22] Furuita H, Tanaka H, Yamamoto T, et al. Effects of high levels of *n*-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2002, 210(1-4): 323 - 333.
- [23] Shearer G C, Harris W S, Pedersen T L, et al. Detection of omega-3 oxylipins in human plasma and response to treatment with omega-3 acid ethyl esters [J]. Journal of Lipid Research, 2010, 51(8): 2074 - 2081.
- [24] Chiolerio R L, Berger M M. Omega-3 fatty acids in acutely ill patients [J]. Clinical Nutrition Supplements, 2007, 2(3): 9 - 10.
- [25] Xu S L, Wang Y J, Wang D L, et al. The study of fatty acid components in early developmental stage of *Oplegnathus fasciatus* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 438 - 444. [徐善良, 王亚军, 王丹丽, 等. 条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 发育早期的脂肪酸组成变化研究. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 438 - 444.]
- [26] Jia Y, Meng Z, Liu X, et al. Biochemical composition and quality of turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs throughout the reproductive season

- [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40 (4):1093 – 1104.
- [27] Jerez S, Rodríguez C, Cejas J R, *et al.* Influence of age of female gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstock on spawning quality throughout the reproductive season [J]. *Aquaculture*, 2012, 350 – 353(1):54 – 62.
- [28] Lanes C F C, Bizuayehu T T, Bolla S, *et al.* Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks [J]. *Aquaculture*, 2012, 324 – 325:267 – 275.

Analysis of phosphatase and other biochemical parameters of egg and its quality determination in *Takifugu obscurus*

ZHAO Yanfei^{1,2}, MA Aijun^{1*}, HE Weiguo¹, MA Deyou¹, MAO Meilin³, WANG Xin'an¹,
LIU Dayong⁴, GUO Zhenglong⁴

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences;
Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture;
Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China;
2. Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
3. The Affiliated Middle School of Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
4. Jiangsu Zhongyang Group Limited by Share Ltd Hai'an 226600, China)

Abstract: To investigate the relationship between the developmental capacity and biochemical parameters of egg in *Takifugu obscurus*, the basic components, phosphatase activity, malate dehydrogenase activity, sialic acid, amino acid content in unfertilized eggs of *T. obscurus* were measured by means of biochemical analysis, also fatty acids composition were measured by means of GC-MS, and the correlation between components and hatching rates were analysed. Results of experiments showed that activity of acid phosphatase, sialic acid content and the hatching rate were significantly correlated, alkaline phosphatase and hatching rate were significantly negative correlated. C14:0 and hatching rate were significantly negative correlated, and showed a decline trend. ARA, DHA and hatching rates were significantly correlated, and both of them showed a tendency of first increasing and then decreasing with the hatching rate. The content of n-3 fatty and the ratio of DHA and EPA and the ratio of EPA and ARA all had significant correlation with the hatching rate. The results demonstrated that phosphatase, sialic acid, fatty acid and egg hatching rate have correlation, also when the activity of ACP were in the range of 68.045, 141.038, the activity of AKP in the range of 2.298 – 7.241, the content of SA in the range of 9.081 – 19.973, the content of C14:0 in the range of 0.485 – 0.658, the content of ARA in the range of 1.371 – 2.498, the content of DHA in the range of 13.838 – 18.469, all of them could be the references of which hatching rates were no less than 50%. Accordingly these references could reflect the developing value of *T. obscurus*' egg in breeding production, which could also be used as reference index for embryo and objective evaluation of the quality of its egg.

Key words: *Takifugu obscurus*; eggs; phosphatase; sialic acid; fatty acid; hatching rate

Corresponding author: MA Aijun. E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

Funding projects: Jiangsu Province Sci-Tech Support Plan (BE2013345); Jiangsu Province Three New Aquaculture Engineering (Y2013 – 12); The Central Level, Scientific Research Institutes For Basic R & D Special Fund Business(20603022012005)