



草鱼肠系膜脂肪沉积量的测定与分析

姜 鹏*, 樊佳佳, 李胜杰, 杜金星, 雷彩霞
(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用
与养殖重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 为精确且批量测定草鱼肠系膜脂肪(肠脂)沉积量, 避免传统人工刮取称量方法耗时费力、量化粗糙等问题, 实验利用脂溶性染料油红 O 可特异性着色脂肪的特性, 探索开发出一种便捷定量草鱼肠脂含量的新方法。结果发现, 麻醉解剖 200 尾平均体重约 80 g 的草鱼, 取出整个内脏团简单处理并塞入 PIT 个体识别标记后, 样品集中进行多聚甲醛固定、无水乙醇脱水、油红 O 染液定染, 可在维持样品组织完整的基础上, 实现肠脂组织的特异性、均一化批量染色处理。各染色样品再分别通过无水乙醇溶剂完全萃取, 萃取液吸光度测定, 并依据绘制的标准曲线 ($y = 0.0276x + 0.0403$, $R^2 = 0.9997$), 即可精确获得个体肠脂沉积的相对含量, 是以萃取出的油红 O 质量来表示。对比发现, 样品肠脂组织染色-萃取量化结果与传统刮取称量数据保持了较高的相关性 ($n = 20$, $r = 0.80$)。进一步的统计分析显示, 对于同塘养殖体重变异系数 8.93% 的草鱼群体 ($n = 200$), 萃取测定的肠脂沉积量变异系数达到 24.49%, 预示该性状具有丰富变异特征及遗传改良潜力。相关与聚类分析显示, 肠脂沉积量与内脏质量相关性最高 ($r = 0.60$), 并且聚为一类, 符合二者同属脏器关联指标的预期。多元线性回归分析显示, 利用简单易测的形态指标只能解释肠脂沉积量的少量变异 ($R^2 = 0.20$), 表明基于表型性状的拟合回归方程进行间接预测的效果不佳, 直接测定是该性状精准量化的有效途径。本研究为草鱼体脂性状改良提供了一种性状精确测定方法。

关键词: 草鱼; 肠系膜脂肪组织; 油红 O; 沉积量; 定量分析

中图分类号: S 965.112

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国重要的大宗淡水养殖品种, 年供应量超过 550 万 t^[1], 为满足广大民众对优质动物蛋白的营养需求发挥着不可替代的作用。近年来, 随着高产高效集约化养殖模式的推广, 养殖草鱼长速加快, 上市周期缩短, 但也常出现体脂过度沉积现象^[2], 导致鱼体自身健康状况及食用品质下降等问题^[3-5]。尤其腹腔内的肠系膜脂肪组织, 作为草鱼贮存能量, 蓄积脂肪的主要功能部位^[6], 过度沉积不仅造成

饲料资源的浪费, 也直接加剧肥胖体型, 影响鲜活产品的销售^[7-8]。

针对上述产业问题, 科研人员尝试从营养与饲料、遗传育种等多方面开展调控机理与应用技术研究^[2, 9-11]。在研发过程中, 通常涉及鱼体肠系膜脂肪沉积量的测定与比较, 用于量化评价调控方案实施效果及优化技术参数。然而, 草鱼腹腔内脂肪组织紧随肠管附着延伸, 而草食性鱼类肠道细长, 盘旋回折多, 导致该性状难以直接计量。

收稿日期: 2021-11-23 修回日期: 2022-04-12

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2021XT0301); 国家自然科学基金 (31902357; 31902365); 广东省自然科学基金 (2020A1515011334); 现代农业产业技术体系专项 (CARS-45-04)

通信作者: 姜鹏(照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: jiangpeng85@126.com



传统方法是利用解剖刀等工具将黏连在肠壁周围的脂肪组织进行人工刮取剥离, 再集中称量分析。该方法虽然简单直接, 但在实际操作时, 易发生肠管破裂, 使得肠道内容物混杂其中而导致数据出现较大误差。尤其当处理样品数量较多或实验鱼规格较小时, 该方法存在耗时费力, 操作失误率高, 量化数据粗糙等问题。

为此, 本实验拟利用脂溶性染料油红 O 可特异性着色脂肪的特性^[12], 探索开发一种精确、便捷定量草鱼肠系膜脂肪组织含量的新方法, 以满足研究实践需要; 同时对测定数据进行统计分析, 以评估度量性状的基本特征。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验所用草鱼取自中国水产科学研究院珠江水产研究所水生生物技术有限公司养殖基地。从正常饲养的养殖群体中随机挑选健康个体, 体重范围约为 75.0~95.0 g, 数量 200 尾。所有实验鱼均出自同一批水花苗种, 并在同一个池塘进行培育, 以保证饲养环境条件的一致性。本研究获得了中国水产科学研究院珠江水产研究所实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守伦理规范, 并按照中国水产科学研究院珠江水产研究所伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 主要试剂与仪器

油红 O 干粉购自 Sigma-Aldrich 公司; 无水乙醇(分析纯)购自天津市百世化工有限公司; 多聚甲醛固定液(中性)购自武汉塞维尔生物科技有限公司; 多功能酶标仪(型号 Cytation-5)购自美国伯腾仪器有限公司; 电子天平采用梅特勒托利多科技(中国)有限公司产品(精度: 1 mg; 0.1 mg)。PIT 电子芯片标记购自安徽瑞佰创物联科技有限公司。油红 O 染液的配置是按比例将 1.0 g 油红 O 干粉充分溶解于 5.0 kg 无水乙醇溶剂中, 经 300 目滤网过滤后, 密封备用。

1.3 性状测量与样品处理

麻醉后称量草鱼体重(BW), 并利用游标卡尺测量实验鱼体长(BL)、躯干长(TRL)、体高(BH)、尾柄高(CPH)和体宽(BWD)等体尺性状, 然后解剖取出整个内脏团(不含鱼鳃、性腺)称取重量(VW), 摘除胆囊器官; 将 PIT 电子芯片塞入鱼肠

道内, 记录样品编码等信息, 再把已标记的内脏团样品放入多聚甲醛固定液进行集中保存。待全部样品(内脏团)采集完毕, 统一固定 6 h; 然后将固定样取出集中, 加入适量无水乙醇试剂进行快速脱水操作, 试剂需浸没全部样品, 时长 15 min; 倒掉脱水废液, 样品沥干 2 min 后, 加入提前配置好的油红 O 染液进行染色处理, 染液需浸没全部样品, 时长 9 min; 倒掉染色废液, 终止染色, 样品沥干 2 min 后, 加入适量无水乙醇进行快速漂洗, 时长 30 s; 倒掉漂洗废液, 样品沥干 5 min 后, 将染色样品分别放入提前备好的加盖密封萃取瓶(含 80.0 g 无水乙醇试剂, 其质量计为 w_e), 进行 28 h 静置萃取; 当萃取完毕, 吸取 1.6 ml 萃取液至离心管, 100 000 r/min, 离心 1 min; 再从中吸取 200 μ L 上清液至酶标板, 在波长 510 nm 处测定吸光度 OD 值, 每个样品检测 3 次, 取平均值。实验遵守本实验室的物伦理规范。

1.4 标准曲线的绘制

称量 25.0 mg(精确到 0.1 mg, 下同)油红 O 固体粉末, 充分溶解于约 100.0 g 的无水乙醇试剂中, 配成油红 O 质量分数为 250 μ g/g 的标准母液。定量吸取标准母液稀释于无水乙醇溶剂中, 配成质量分数 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 和 5.5 μ g/g(以油红 O 质量计)的工作液, 此标准溶液相当于上述 80.0 g 萃取液中含有油红 O 质量分别为 0、40、80、120、160、200、240、280、320、360、400 和 440 μ g。工作液梯度范围需包含所要检测样品萃取液的浓度极值。取 200 μ L 各梯度工作液置于酶标板, 在波长 510 nm 处测定吸光度, 以油红 O 质量分数为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。重复 3 次。

1.5 统计分析

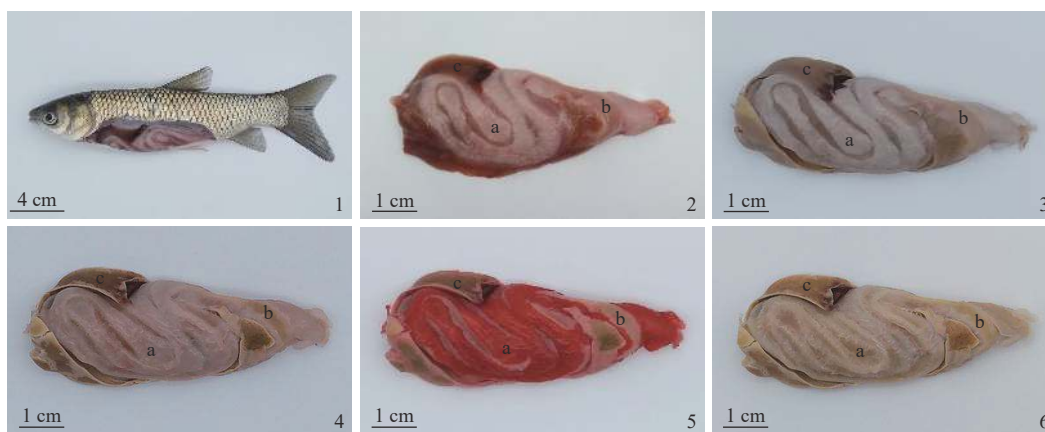
在本研究中, 草鱼个体肠系膜脂肪沉积量是以样品吸附并萃取出的油红 O 质量来表示, 计算公式: $w_o = \omega \times w_e$, 式中, ω 为利用标准曲线计算出的样品萃取液油红 O 质量分数(μ g/g); w_e 为萃取所用无水乙醇的质量(g), 本研究所有样品的萃取液用量统一设置为 80.0 g; w_o 为样品萃取出的油红 O 质量(μ g)。另外, 为了进一步判断萃取量化结果的可靠性, 随机取少量萃取后内脏团样品, 将尚存的肠系膜组织剥离称重, 检验其与传统刮取法定量数据的关联程度。

使用 SPSS 19.0 软件对观测数据进行描述性统计、Pearson 相关分析、系统聚类以及多元逐步回归分析。其中, 采用 Kolmogorov-Smirnov 检验判断数据正态性。采用 R 型聚类对观测变量进行分析, 聚类方法选择最远邻元素法结合 Pearson 相关性。多元回归分析采用双向逐步回归方法, 设定自变量引入或剔除方程的概率值分别为 0.05 和 0.10。

2 结果

2.1 样品的染色与萃取效果

草鱼内脏团解剖、固定、脱水、染色等操作



图版 草鱼肠系膜脂肪组织的油红 O 染色与萃取效果

1. 草鱼解剖; 2. 内脏团初始样品; 3. 样品固定; 4. 样品脱水; 5. 样品油红 O 染色; 6. 萃取后样品; a. 肠系膜脂肪组织; b. 肠; c. 肝胰脏。

Plate Oil red O staining and extraction of mesenteric adipose tissue of *C. idella*

1. dissected *C. idella*; 2. original visceral mass; 3. sample fixation; 4. sample dehydration; 5. oil red O staining; 6. Sample after extraction; a. Mesenteric adipose tissue. b. Intestine; c. Hepatopancreas.

2.2 标准曲线的绘制

通过酶标仪测定 12 个不同浓度油红 O 标准液在 510 nm 波长下吸光度值, 绘制标准曲线。结果如图 1 所示, 油红 O 浓度 (质量分数) 与吸光度值之间呈现近乎直线的线性关系, 求得拟合回归

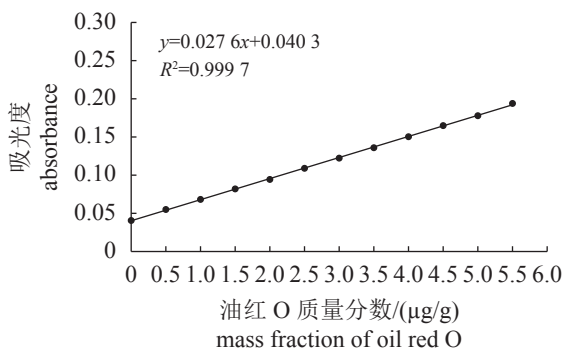


图 1 油红 O 的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of oil red O

对肠系膜脂肪组织的结构完整性影响较小, 脂肪细胞内脂质物质得到较好保留。如图版-5 所示, 内脏团样品经 9 min 定时浸染, 油红 O 染料可对草鱼肠系膜脂肪组织特异性、均一化染色, 染料渗透性强, 匀染性好; 脂肪组织得以充分着色, 而肠道、肝胰脏等脏器组织则着色轻微。从图版-6 可见, 染色样品经无水乙醇萃取后, 吸附在脂肪组织内的油红 O 染料被完全抽提。以上实验结果表明, 利用油红 O 脂溶性染料的固有特性, 可实现草鱼肠系膜脂肪组织的定向充分染色; 良好的抽提效果则为后续精确定量提供了必要条件。

方程: $y = 0.0276x + 0.0403$, $R^2 = 0.9997$ 。当油红 O 质量分数在 0 ~ 5.5 $\mu\text{g/g}$ 范围内时, 可以依据此方程进行样品定量分析。

2.3 肠系膜脂肪沉积量的测定

依据建立的标准曲线方程, 将萃取液吸光度值换算为油红 O 质量分数 ($\mu\text{g/g}$); 在已知萃取液质量 (80.0 g) 的前提下, 通过简单的乘法运算即可获得溶液中油红 O 的质量。由整个操作流程可知, 萃取的油红 O 源于样品起始阶段所吸附的油红 O, 而吸附量与样品肠脂组织总量密切相关, 因此, 肠系膜脂肪沉积量可由萃取出的油红 O 质量来表示。

为了进一步检验油红 O 萃取法, 将 20 尾个体萃取后样品的肠脂组织直接刮取称量, 与萃取量化结果进行对比。由图 2 散点图可知, 传统刮取称重与萃取量化数据具有较高的相关性 ($r = 0.80$, $P < 0.01$), 这也一定程度表明本研究染色-

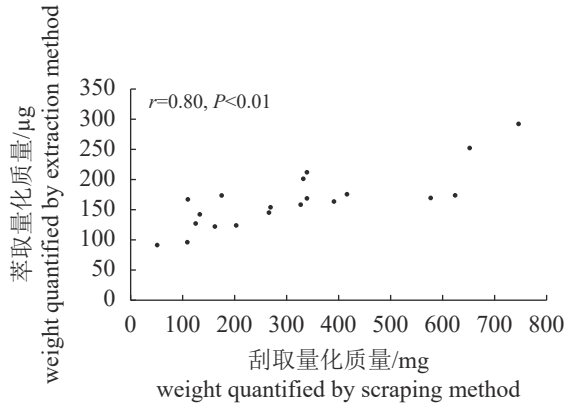


图2 草鱼肠系膜脂肪组织萃取与刮取量化方法的关系

Fig. 2 The relation between extraction method and scraping method of quantifying mesenteric adipose tissue of *C. idella*

萃取测定方法的可靠性。

2.4 度量性状的描述性统计

对采集的 200 尾草鱼性状表型值进行描述性统计分析, 结果见表 1。在度量的 8 个数量性状中, 体重、内脏质量和肠系膜脂肪沉积量的变异系数 (8.93% ~ 24.49%) 整体要高于体长等体尺性状 (3.17% ~ 4.25%)。尤其是, 在体重变异系数为 8.93% 的草鱼群体中, 肠系膜脂肪沉积量的变异系数达到 24.49%, 表明该性状具有丰富变异特征及遗传改良潜力。另外, 所有性状表型值经过 K-S 检测, P 值均大于 0.05 显著性水平, 表明符合正态分布。

表 1 草鱼 8 个数量性状的描述性统计 ($n=200$)Tab. 1 Descriptive statistics of eight quantitative traits in *C. idella* ($n=200$)

性状 trait	均值 mean	标准差 SD	最小值 min	最大值 max	变异系数 CV
体重/g BW	80.42	7.18	67.20	99.50	8.93
体长/cm BL	17.39	0.55	16.13	18.94	3.17
躯干长/cm TRL	9.03	0.35	8.27	10.01	3.88
体高/cm BH	3.72	0.14	3.30	4.03	3.79
尾柄高/cm CPH	1.92	0.08	1.73	2.12	4.09
体宽/cm BWD	2.44	0.10	2.20	2.83	4.25
内脏质量/g VW	4.91	0.62	3.58	6.41	12.56
肠脂沉积量* μ g MFW	173.44	42.48	92.66	318.07	24.49

注: *肠脂沉积量(MFW)是指肠系膜脂肪组织染色-萃取出的油红O质量, 下同。

Note: * Mesenteric fat weight (MFW) refers to the weight of oil red O extracted from the stained mesenteric adipose tissue. The same below.

2.5 相关与聚类分析

Pearson 相关分析结果显示, 体重与观测的各体尺性状间呈高度正相关 ($r = 0.73 \sim 0.92$, $P < 0.01$), 其中与体长相关性最高; 内脏质量与各体尺性状呈中等正相关 ($r = 0.51 \sim 0.70$, $P < 0.01$), 其中与体高相关性最高; 肠系膜脂肪沉积量则与各体尺性状呈低度正相关 ($r = 0.33 \sim 0.42$, $P < 0.01$)(表 2)。上述各性状间的相关关系反映出草鱼的形态学特征。此外, 在肠系膜脂肪沉积量与其他各性状间, 肠系膜脂肪沉积量与内脏质量的相关系数最大 ($r = 0.60$, $P < 0.01$)。

表 2 草鱼 8 个数量性状的相关分析 ($n=200$)Tab. 2 Correlation analysis of eight quantitative traits in *C. idella* ($n=200$)

性状 trait	BW	BL	TRL	BH	CPH	BW	VW	MFW
BW	1							
BL	0.92**	1						
TRL	0.82**	0.90**	1					
BH	0.83**	0.73**	0.67**	1				
CPH	0.73**	0.66**	0.62**	0.74**	1			
BW	0.75**	0.68**	0.65**	0.66**	0.65**	1		
VW	0.72**	0.67**	0.60**	0.70**	0.51**	0.51**	1	
MFW	0.41**	0.33**	0.38**	0.42**	0.40**	0.39**	0.60**	1

注: **表示相关性达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

Note: ** indicates highly significant correlation at the level of 0.01.

R 型变量聚类更为直观的展现各观测性状间的关系结构 (图 3)。其中, 肠系膜脂肪沉积量与内脏质量单独聚为一支, 反映了二者紧密联系, 说明采用新方法获得的肠系膜脂肪量化数据属于脏器关联指标, 同实际情况相符。

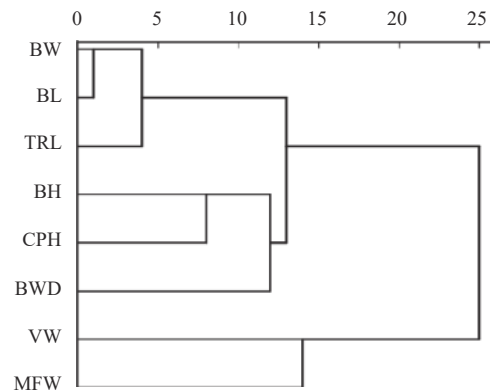


图 3 草鱼 8 个数量性状的 R 型聚类图

Fig. 3 Dendrogram of R-cluster analysis of 8 quantitative traits in *C. idella*

2.6 逐步回归分析

以肠系膜脂肪沉积量为因变量, 以体重、体长等 6 个形态指标为自变量, 开展多元逐步回归分析 (表 3)。结果显示, 只有体高、体宽 2 个显著性自变量得以保留, 剩余指标变量因无显著性而被剔除, 但建立的二元回归方程决定系数 R^2 仅有 0.20, 意味着简单易测的形态指标只能解释肠系膜脂肪沉积量变异的 20%, 表明基于形态指标的回归模型预测肠系膜脂肪沉积量的效果不佳。

表 3 草鱼肠系膜脂肪沉积量与各形态指标的逐步回归分析 ($n = 200$)

Tab. 3 Stepwise regression analysis between mesenteric fat weight and various morphological indexes in *C. idella* ($n = 200$)

模型 model	非标准化系数 unstandardized coefficients	标准化系数 standardized coefficients	t-检验 t-test	决定系数 R^2 determination coefficient R^2	F-检验 F-test
常数 constant	-347.90	-	-4.65**		
BH	85.44	0.28	3.33**	0.20	24.34**
BWD	83.45	0.20	2.39*		

注: * 表示达到显著水平 ($P < 0.05$); ** 表示达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

Notes: * indicates significant difference at the level of 0.05; ** indicates significant difference at the level of 0.01.

3 讨论

3.1 油红 O 染料的特性与应用研究

油红 O 是一种脂溶性偶氮染料, 可高度溶解于脂类物质, 并能够使其特异性着色, 因此常被用于细胞内脂滴的定位与指示变化, 涉及冰冻组织切片^[13]、细胞鉴定^[14-15]、大体染色^[16-17]等技术内容, 用以揭示脂质代谢与机体生理、病理过程的联系。本研究利用油红 O 有色溶液可量化的另一特性^[18], 基于朗伯-比尔定律, 通过萃取液吸光度检测, 首次将其拓展应用于鱼类肠系膜脂肪沉积量的定量分析。

3.2 染色-萃取定量方法的操作要点

与传统刮取称量方法相比, 本研究开发的草鱼肠系膜脂肪定量方法, 具有取样完整, 操作便捷, 量化精准的特点, 尤其适用于批量、小规格实验鱼采样需求。简要操作流程: 鱼体麻醉解剖、内脏团采集、个体标记、样品固定、脱水、染色、漂洗、萃取和定量分析。具体实施步骤中, 需要说明的: (1) 内脏团中胆囊的摘除, 是防止有色胆

汁可能对染色过程、萃取液吸光度检测造成干扰。(2) 实施芯片标记操作, 不仅用于识别区分个体, 也为后续共同染色提供必要条件, 以达到样品处理时间、处理环境的一致性。(3) 实施组织固定操作, 主要是防止取样时间较长引发的组织自溶, 避免细胞内脂质流失, 为大批量采样提供宽松的时间。(4) 染色前实施脱水操作, 是先期让样品快速大幅脱水, 显著缓解后续无水乙醇操作环境中样品自行脱水可能引起的干扰。(5) 选择无水乙醇作为染色、萃取过程的溶剂, 主要是乙醇与油红 O 具有良好的相溶性, 而且乙醇相比其他醇类易于获得, 价格低廉、低毒性、刺鼻气味轻微。(6) 实施漂洗步骤, 是去除样品表面残留的工作液, 防止残液影响定量分析。(7) 通过绘制的标准曲线, 可将测定的萃取液吸光度值转换为相应的油红 O 浓度 (质量分数), 而拟合的标准工作曲线决定系数 R^2 达到 0.9997, 充分表明样品检测过程可靠, 量化数据精准。(8) 该定量方法可拓展应用于不同规格实验草鱼或其他鱼类, 而样品染色时间、萃取乙醇用量等参数以及标准曲线的绘制也应根据实际情况作出相应调整。例如, 样品染色时间, 既要保证鱼体脂肪组织获得充分染色, 又要防止染色时间过长导致非脂肪组织被动着色问题; 萃取乙醇用量则以能够将染样里的油红 O 萃取完全为准。

在本研究中, 草鱼个体肠系膜脂肪沉积量是以样品吸附并萃取出的油红 O 质量来表示。由于所有草鱼测试样品是在同一环境条件下处理, 染液浓度、染色时间等关键参数一致, 所以测定结果能够较为精准的展示出样品间脂质沉积的差异程度。需要说明的是, 虽然染色-萃取量化结果与传统刮取称重保持了较好的相关性, 但新测定方法属于相对定量范畴, 所获数据代表个体肠系膜脂肪沉积的相对含量, 仅适用于同批次或相同处理条件下样品的比较分析。

3.3 草鱼肠系膜脂肪沉积量的特征

采集同一养殖环境的 200 尾草鱼性状表型值, 统计分析发现, 利用染色-萃取方法测量草鱼肠系膜脂肪沉积量范围为 92.66 ~ 318.07 μg , 变异系数达到 24.49%, 对比体重等其他表型性状 3.17% ~ 8.93% 的变异系数, 显示出较为丰富的变异特征, 为遗传改良奠定了良好的物质基础。实际上有文献显示, 采用传统刮取定量方法, 在体重变异系

数 10.13% 的商品规格草鱼群体中, 肠系膜脂肪性状的变异系数也达到 21.30%, 同样预示草鱼体脂性状具有较大选育潜力^[2]。

进一步的相关与聚类分析表明, 肠系膜脂肪沉积量与内脏质量相关性最高, 并且聚为一类, 符合预期的脏器关联因子, 但与各体尺性状的相关性较低, 而且多元线性回归分析显示, 简单易测的表型指标对肠系膜脂肪沉积量的变异解释程度较低, 说明通过间接预测途径获取性状表型值的可信度不高, 这也意味着该性状的精确测量可能无法避免宰杀活体。另一方面, 虽然有研究报道腹腔内脂肪组织可以实现无损定量检测, 如核磁共振成像技术对鱼类脂肪组织的可视化研究^[19], 但该技术依赖昂贵的大型仪器以及较复杂的软件程序, 限制了其应用范围。

综上所述, 本研究利用脂溶性染料油红 O 可特异性着色脂肪的特性, 开发出一种精确、便捷定量草鱼肠系膜脂肪组织含量的新方法。基于操作步骤论述及采样数据分析, 显示出本定量方法的可靠性及适用范围, 也为草鱼体脂性状改良提供了技术参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2021[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook-2021[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [2] 姜鹏, 卢薛, 李胜杰, 等. 草鱼体脂性状的变异特征及相关性[J]. 水产学报, 2019, 43(7): 1626-1634.
- Jiang P, Lu X, Li S J, *et al.* Phenotypic variability and correlation analysis of lipid traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(7): 1626-1634 (in Chinese).
- [3] 董小林, 钱雪桥, 刘家寿, 等. 饲料蛋白质和小麦淀粉水平对中大规格草鱼生长性能及肝脏组织结构的影响[J]. 水生生物学报, 2019, 43(5): 983-991.
- Dong X L, Qian X Q, Liu J S, *et al.* Effects of dietary protein and wheat starch on growth and liver structure of

grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(5): 983-991 (in Chinese).

- [4] 郭小泽, 梁旭方, 方刘, 等. 饲料中非蛋白能量源对草鱼血清生化指标和肝脏组织的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(3): 582-587.
- Guo X Z, Liang X F, Fang L, *et al.* Effects of non-protein energy sources on serum biochemical indices and histology of liver in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 582-587 (in Chinese).
- [5] Guo X Z, Liang X F, Fang L, *et al.* Effects of dietary non-protein energy source levels on growth performance, body composition and lipid metabolism in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.) [J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(5): 1197-1208.
- [6] 陈拥军, 邹滔, 林仕梅, 等. 草鱼体组成的数学描述[J]. 水产学报, 2016, 40(4): 566-576.
- Chen Y J, Zou T, Lin S M, *et al.* Quantitative description of body composition in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(4): 566-576 (in Chinese).
- [7] 田丽霞, 刘永坚, 刘栋辉, 等. 葡萄糖和玉米淀粉对草鱼生长和肠系膜脂肪沉积的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(5): 438-441.
- Tian L X, Liu Y J, Liu D H, *et al.* Effects of glucose and corn starch on growth and the fat deposition in the mesentery of grass carp[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(5): 438-441 (in Chinese).
- [8] Tian L X, Liu Y J, Hung S S O. Utilization of glucose and cornstarch by juvenile grass carp[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2004, 66(2): 141-145.
- [9] 田丽霞, 刘永坚, 冯健, 等. 不同种类淀粉对草鱼生长、肠系膜脂肪沉积和鱼体组成的影响[J]. 水产学报, 2002, 26(3): 247-251.
- Tian L X, Liu Y J, Feng J, *et al.* Effect of different types of starch on growth, the deposition of mesenteric fat and body composition of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(3): 247-251 (in Chinese).
- [10] Dong G F, Zou Q, Wang H, *et al.* Conjugated linoleic acid differentially modulates growth, tissue lipid deposition, and gene expression involved in the lipid metabolism of grass carp[J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 181-191.
- [11] 程辉辉, 谢从新, 李大鹏, 等. 种青养鱼模式下的草鱼

- 肌肉营养成分和品质特性[J]. 水产学报, 2016, 40(7): 1050-1059.
- Cheng H H, Xie C X, Li D P, *et al.* The study of muscular nutritional components and fish quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in ecological model of cultivating grass carp with grass[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(7): 1050-1059 (in Chinese).
- [12] Mehlem A, Hagberg C E, Muhl L, *et al.* Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(6): 1149-1154.
- [13] 王肖燕, 王金泉, 姚刚, 等. 脂肪组织冰冻切片油红O滴染法的建立[J]. *家畜生态学报*, 2014, 35(8): 58-60,96.
- Wang X Y, Wang J Q, Yao G, *et al.* Drop method of Oil red O staining on adipose tissue frozen section[J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2014, 35(8): 58-60,96 (in Chinese).
- [14] Deutsch M J, Schriever S C, Roscher A A, *et al.* Digital image analysis approach for lipid droplet size quantitation of Oil Red O-stained cultured cells[J]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 445: 87-89.
- [15] Kinkel A D, Fernyhough M E, Helterline D L, *et al.* Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note[J]. *Cytotechnology*, 2004, 46(1): 49-56.
- [16] Escorcía W, Ruter D L, Nhan J, *et al.* Quantification of lipid abundance and evaluation of lipid distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile red and oil red O staining[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2018, 133: e57352.
- [17] Beattie J H, Duthie S J, Kwun I S, *et al.* Rapid quantification of aortic lesions in ApoE^(-/-) mice[J]. *Journal of Vascular Research*, 2009, 46(4): 347-352.
- [18] Ramírez-Zacarias J L, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O[J]. *Histochemistry*, 1992, 97(6): 493-497.
- [19] Wu J L, Zhang J L, Du X X, *et al.* Evaluation of the distribution of adipose tissues in fish using magnetic resonance imaging (MRI)[J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 112-122.

Determination and analysis of the amount of mesenteric fat deposition in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

JIANG Peng*, FAN Jiajia, LI Shengjie, DU Jinxing, LEI Caixia

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, 510380, China)

Abstract: Mesenteric fat weight (MFW) is a representative index used to reflect body lipid level in *Ctenopharyngodon idella*. However, the traditional measurements by artificial scrape and weighing are time-consuming, labor intensive and having high operating errors, especially when many samples are to be handled. To avoid such limitations, this study developed a rapid and sensitive method for the quantitation of mesenteric fat utilizing the lysochrome dye oil red O. The initial operation procedures included: fish anesthetization, sample collection of visceral mass, PIT-tag implantation, sample fixation, sample dehydration, oil red O staining. After the above steps, mesenteric fat could be specifically stained by oil red O dye, and all the samples were stained uniformly. After sample extraction and absorbance measurement of extraction liquid, the weight of oil red O extracted from the stained sample could be accurately obtained according to the standard curve of oil red O ($y = 0.0276x + 0.0403$, $R^2 = 0.9997$). The oil red O weights were used as MFWs in this study, and had good consistency with the fat weights quantified by the conventional scraping method ($r = 0.80$). Furthermore, data analysis showed that the coefficient of variation for MFW (24.49%) was greater than that for body weight (8.93%) in the cultured population of *C. idella* ($n = 200$), indicating a significant potential for its genetic improvement. Correlation and cluster analysis showed that MFW was positively correlated with all the observed traits, of which visceral weight (VW) had the highest correlation coefficient of 0.60 ($P < 0.01$), and was clustered into one group. The results were as expected that both MFW and VW belonged to viscera-related indexes. Multiple linear regression analysis showed that morphological indexes could explain only a small amount of variation for MFW ($R^2 = 0.20$), indicating that the regression prediction was unsatisfactory, and direct measurement remained an effective approach. This study provided an accurate quantitative method for genetic improvement of body lipid traits in *C. idella*.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; mesenteric adipose tissue; oil red O; deposition amount; quantitative analysis

Corresponding author: JIANG Peng. E-mail: jiangpeng85@126.com

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2021XT0301); National Natural Science Foundation of China (31902357; 31902365); Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (2020A1515011334); China Agriculture Research System (CARS-45-04)