

大菱鲂(*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*

贾玉东 孟 振 刘新富 高淳仁 牛华欣 雷霖霖

(青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 以大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)为实验材料,研究其繁殖期内卵子和卵巢液中磷酸酶活性变化规律及其与受精率相关性。结果表明,在大菱鲂繁殖周期内,卵子碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性呈相反的变化趋势,且排卵中期卵子碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性分别显著低于和高于早期和晚期($P < 0.05$),而卵巢液中碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性呈同卵子中相反的变化趋势;此外卵子碱性磷酸酶和酸性磷酸酶及卵巢液酸性磷酸酶活性同受精率显著相关($P < 0.05$)。以上结果表明,大菱鲂卵子和卵巢液中碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性同受精率存在着显著相关性,其活性变化在一定程度上反映卵子质量优劣,可作为评判卵子质量辅助指标。

关键词 大菱鲂; 卵子; 卵巢液; 碱性磷酸酶; 酸性磷酸酶; 受精率

中图分类号 Q492

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)为原产于欧洲沿海的冷水性鲆科鱼类,其较高的经济价值使之成为重要海水养殖良种之一,自 1992 年被引进中国以来,在海水鱼类工业化养殖领域取得了重大成效,从而成为我国水产养殖业一个新的经济增长点(雷霖霖, 2005)。在大菱鲂等海水鱼类人工繁养殖过程中,卵子的质量是影响其繁殖性能的关键因素,它直接关系到胚胎的发育以及仔、稚、幼鱼的成活和生长,与养殖效率密切相关(Bobe *et al*, 2010; Kohn *et al*, 2012),而卵巢液(卵腔液)为卵子提供体内生存的微环境,对卵子发育成熟和精卵结合都有重要调控作用,其生化组成直接影响卵子质量(Lahnsteiner, 2002; Wojtczak *et al*, 2007; Rosengrave *et al*, 2009)。目前对大菱鲂等养殖海水鱼类卵子质量的评价通常是对其外观形态(色泽、沉浮性)及生产性状(受精率、孵化率和仔鱼畸形率)检测,对卵子和卵巢液的基础生化组成等方面的研究相对较少。因此,本实验分别对大菱鲂繁殖周

期内卵子和卵巢液中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)和酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)活性进行检测,并与其受精率进行了回归分析,以期为大菱鲂卵子质量评价及进一步完善海水鱼类种苗生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼选自烟台天源水产有限公司自行繁育的同一批大菱鲂亲鱼,选出健康、体长、体重和产卵量无明显差异的 4 龄雌性亲鱼 6 尾(表 1),置于实验用水池(300cm × 300cm × 80cm),水温 18℃,盐度 26,

表 1 实验用亲鱼平均体长、体重和产卵量
Tab.1 Body length, weight and fecundity of brood fish

体长(cm)	体重(kg)	产卵量(mL)
44.35 ± 1.83	4.11 ± 0.09	1017.50 ± 51.06

*国家鲆鲽类产业技术体系建设高效养殖模式专项资金项目, CRAS-50 号; 国家自然科学基金, 31302205 号; 中国博士后基金, 2012M511559 号, 2013T60690 号; 山东省自然科学基金, ZR2012CQ024 号; 山东省优秀中青年科学家基金, BS2013SW004 号。贾玉东, 博士, E-mail: jydspeed456@163.com

通讯作者: 雷霖霖, E-mail: leijilin@ysfri.ac.cn, leijilin@seacul.com

收稿日期: 2012-08-10, 收修改稿日期: 2012-11-21

24h 连续充气, 确保溶氧大于 6.0mg/L, 养殖用水为深井海水与自然海水经砂滤后混合使用。

1.2 实验方法

根据 Mcevoy(1984)、Mugnier 等(2000)和 Daniels 等(2010)方法, 结合亲鱼排卵频率(70—90h), 间隔 3—5d 人工挤卵 1 次, 繁殖期内平均排卵 9—12 次/尾, 按 10—15d 为一阶段, 将大菱鲆繁殖产卵周期划分为前期、中期和后期。分别收集大菱鲆繁殖产卵期内, 早期、中期、晚期的卵子和卵巢液, 同时对早期、中期、晚期卵子分别进行受精。为防止卵子过熟, 根据 Fauvel 等(1993)方法, 通过检测卵巢液 pH 变化, 来判断卵子成熟度, pH 低至 7.1 时为过熟卵, 弃去不用。精子来源于同一尾雄性亲鱼冷冻精液, 精液活性 >80%。受精 4h 后, 取浮性卵 100 粒, 根据受精后胚胎发育状况, 统计卵子受精率, 计算公式如下:

$$\text{受精率} = (\text{8—32 细胞期卵数} / \text{浮性卵数}) \times 100\%$$

1.3 样品制备

将卵子和卵巢液的混合物经筛网过滤后, 收集卵子 3—5g, 用蒸馏水冲洗 3 次, 滤纸吸干后, 置于 2mL 冻存管中, 储存于 -80℃ 备用。制样时, 卵子整体匀浆, 按照质量体积比 1 : 9 (g/mL) 加入 0.9% 生理盐水, 冰浴匀浆, 4℃, 12000r/min 离心 10min, 取上清, 分别储存于冰箱 -20℃ 保存。过滤后的卵巢液, 置于 2mL 冻存管内, 于液氮中保存。

1.4 分析方法

1.4.1 匀浆上清液和卵巢液蛋白定量测定

卵子匀浆上清液和卵巢液蛋白定量按照 BCA 法测定(试剂盒购于碧云天生物技术研究所)。

1.4.2 AKP 和 ACP 活性测定

AKP 和 ACP 活性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), 定义在 37℃, 每克组织蛋白与基质作用 15min 产生 1mg 酚为 1 个酶活力单位。

1.5 数据处理

所得数据采用 SAS(6.12 版本)软件中 GLM 过程进行方差分析和 Duncan 氏多重比较, 回归方程分析。数据以平均数 ± 标准误差表示, 检验误差为 5% 和 1% 水平。

2 结果与分析

2.1 大菱鲆繁殖周期内卵巢液 pH 变化

由表 2 可知, 在大菱鲆繁殖周期内, 所取样品卵巢液 pH 都高于 7.1, 这表明所取卵子没有过熟, 取样符合实验要求。

表 2 大菱鲆繁殖周期内卵巢液 pH 变化
Tab.2 Changes of pH during reproductive cycle of turbot ovary fluids

时期	排卵早期	排卵中期	排卵后期
pH	7.89 ± 0.05	8.01 ± 0.04	7.91 ± 0.04

2.2 大菱鲆繁殖周期内卵子 AKP 和 ACP 活性变化

由图 1 可知, 在大菱鲆繁殖周期中, 排卵中期卵子 AKP 的活性显著低于早期和晚期 ($P < 0.05$), 而 ACP 的活性中期卵子则显著高于早期和晚期 ($P < 0.05$), 同时早期和晚期卵子的 AKP 和 ACP 活性无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 大菱鲆繁殖周期内卵巢液 AKP 和 ACP 活性变化

由图 2 可知, 在大菱鲆繁殖周期中, 排卵中期卵巢液 AKP 的活性显著高于早期和晚期 ($P < 0.05$), 而早

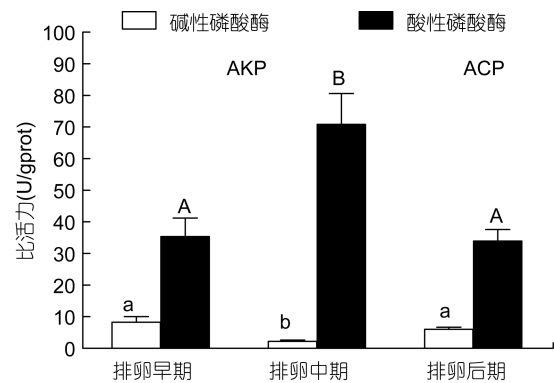


图 1 大菱鲆繁殖周期内卵子碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性变化

Fig.1 Changes of alkaline phosphatase and acid phosphatase activities during reproductive cycle of turbot eggs
不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)

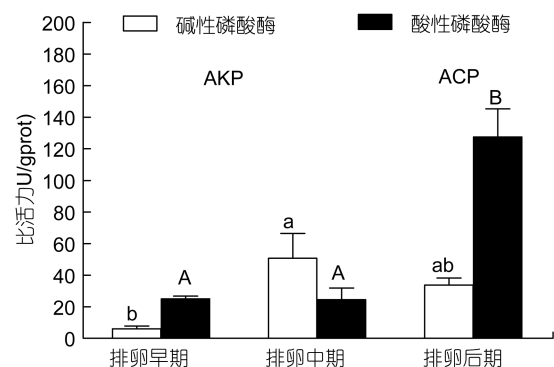


图 2 大菱鲆繁殖周期内卵巢液碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性变化

Fig.2 Changes of alkaline phosphatase and acid phosphatase activities during reproductive cycle of turbot ovarian fluids
不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)

期和晚期卵巢液的 AKP 活性无显著差异($P>0.05$); 晚期卵巢液 ACP 的活性显著高于早期和中期($P<0.05$), 同时早期和中期卵巢液 ACP 活性无显著差异($P>0.05$)。

2.4 大菱鲆繁殖周期内卵子和卵巢液磷酸酶活性与受精率相关性

2.4.1 大菱鲆繁殖周期内卵子受精率 由图 3 可知, 在大菱鲆繁殖周期中, 排卵中期卵子其受精率显著高于早期和晚期($P<0.05$), 排卵早期和晚期卵子在受精率上无显著差异($P>0.05$)。

2.4.2 大菱鲆繁殖周期内卵子、卵巢液 AKP 和 ACP 与受精率相关性 大菱鲆繁殖周期内卵子磷酸酶活性与其受精率显著相关($P<0.05$), 其中 AKP 活力与其受精率呈 Logarithmic 型曲线相关(图 4a), 受精率随着卵内 AKP 活力升高而降低, 曲线回归方程 $Y = 104.032 - 30.958 \ln X$, 判定系数 R^2 为 0.859, $P<0.05$; ACP 活力与其受精率呈 Inverse 型曲线相关(图 4b), 受精率随着卵内 ACP 活力升高而升高, 曲线回归方

程 $Y = 106.272 - 1996.846/X$, 判定系数 R^2 为 0.573, $P<0.05$ 。卵巢液 AKP 活性与受精率呈 Exponential 型曲线相关(图 4c), 受精率随着卵巢液 AKP 活力升高而升高, 曲线回归方程受精率 $\ln Y = \ln(38.109) + (0.011X)$,

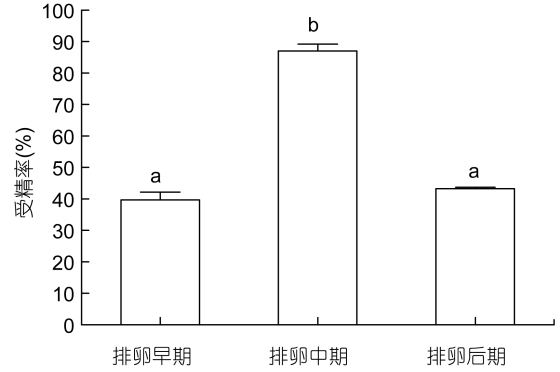


图 3 大菱鲆繁殖周期内受精率变化
Fig.3 Changes of fertilization rate during reproductive cycle of turbot
不同字母表示组间差异显著($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著($P>0.05$)

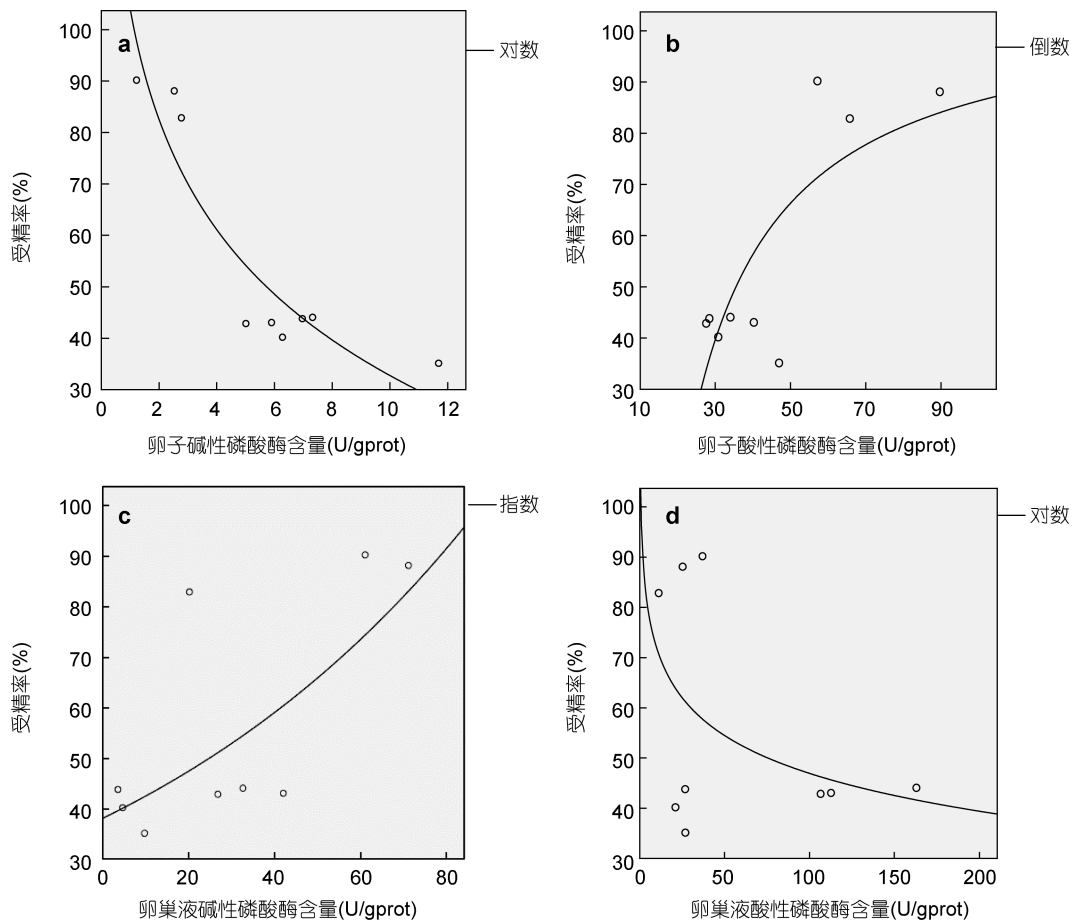


图 4 大菱鲆卵子和卵巢液磷酸酶活性与受精率关系曲线
Fig.4 Relationships between fertilization rate and phosphatase activity of egg and ovary fluid

判定系数 R^2 为 0.416, $P < 0.05$; 而卵巢液 ACP 活性与受精率不显著相关($P > 0.05$)(图 4d)。由以上曲线方程计算得出当卵子 AKP 的活性不高于 2.17U/gprot, ACP 的活性不低 76.01U/gprot, 且卵巢液 AKP 活性不低于 67.42U/gprot 时, 卵子受精率大于 80%。

3 讨论

磷酸酶在生物体内普遍存在, 与生命活动密切相关, 有众多的催化底物和复杂的生理学功能(Beck *et al.*, 2009; Barr *et al.*, 2011; Bruce *et al.*, 2012)。其中 AKP 和 ACP 作为物质代谢过程中两种重要调控酶类, 广泛参与生物体内物质的转运、吸收、生长、分泌等多种生理活动, 对生物体的生长和发育极为重要。AKP 是一类膜结合蛋白, 在碱性条件下催化磷酸基团的移除, 通过跨膜运输参与核酸、蛋白质与脂类物质代谢, 从而调控细胞的增殖、凋亡和分化(Low *et al.*, 1988; Harris, 1990; Ali *et al.*, 2005); 而 ACP 定位于溶酶体和内膜系统, 在酸性条件下催化磷酸单脂水解, 在代谢调节、能量转化及信号转导上起重要作用, 同时作为溶酶体标志酶, 参与生物大分子消化、凋亡或坏死细胞的清除, 在分解清除被吞噬异物和免疫保护方面发挥重要作用(Broeg, 2003; Kong *et al.*, 2012), 因此 AKP 和 ACP 活性的变化对生物体内复杂的生理活动有重要调控作用。

大菱鲂在同一繁殖周期内可分批产卵, 其卵母细胞的发育是不同步的, 在整个繁殖产卵期中, 雌性亲鱼在肝脏合成大量的蛋白、脂类和葡萄糖等营养物质, 这些营养物质经过血液循环运送至卵巢, 在卵巢细胞的内吞作用下, 被卵母细胞吸收储存, 为卵子成熟和早期胚胎的发育提供能量储备。而 AKP 和 ACP 通过参与上述营养物质的合成、分泌、转运和代谢过程, 调控卵子内营养物质的积累, 从而影响大菱鲂卵子发育成熟。鱼类繁殖周期内有关卵子 AKP 和 ACP 活性变化规律的研究较少, 其活性高低与卵子质量的相关性因种属不同存在差异。对湖鲮鱼(*Salmo trutta lacustris*)研究表明卵子 AKP 和 ACP 的活性改变并不影响其质量(Lahnsteiner *et al.*, 1999), 而金鲷(*Sparus aurata*)卵子 ACP 活性与卵子质量显著相关(Lahnsteiner *et al.*, 2004), 细点牙鲷(*Dentex dentex*)低质量卵子中 AKP 活性最高(Giménez *et al.*, 2006)。本实验中卵子 AKP 和 ACP 活性在大菱鲂繁殖周期内与受精率分别呈对数型和倒数型显著相关($P < 0.05$)(图 4a, b); 且二者活性变化规律呈现相反的变化趋势(图

1)。在排卵中期卵子 AKP 活性降至最低, 这表明此时期卵子已完成了其内部营养遗传物质积累, 磷酸化/去磷酸化的生理调控减少, 不需要较多的 AKP 参与代谢调控, 而卵子的成熟、排放, 是卵母细胞成熟分裂和滤泡破裂排卵协调配合过程, 卵子 ACP 活性在排卵中期最高, 无疑是和滤泡的解体相关, 此外较高的 ACP 活性也为卵子提供受精后免疫保护作用, 因而排卵中期的卵子处于最佳生理状态, 受精率显著高于早期和晚期(图 3)。

对大多数硬骨鱼类而言, 卵子成熟后释放到卵巢腔中, 由卵巢腔上皮细胞分泌的卵巢液为卵子提供了体内生存的环境。卵巢液具有信息素功能, 可诱导鱼类产卵行为反应, 同时卵巢液可以激活精子运动性, 适当延长卵子受精时限, 提高卵子受精率, 因而其生化组成与卵子成熟和精卵的结合密切相关(Stacey *et al.*, 1982; Wojtczak *et al.*, 2007; Rosengrave *et al.*, 2009)。大菱鲂为分批产卵鱼类, 其卵子发育时序的不同, 必然引起卵巢液的生化组成的改变, 进而影响卵子质量。Fauvel 等(1993)研究发现大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)卵子过熟同卵巢液的低 pH 显著相关; 对虹鳟卵子质量研究也得到了相似的结果(Lahnsteiner, 2000; Aegerter *et al.*, 2004)。而卵巢液中 AKP 和 ACP 活性对卵子受精率的影响, 因鱼类种属不同而存在差异。鲮鱼卵巢液中 AKP 的活性与受精率显著相关, ACP 活性则对受精率无显著影响(Lahnsteiner *et al.*, 1995); 而哲罗鲑鱼卵巢液中 AKP 和 ACP 活性与受精率无显著相关性(李雪等, 2012)。本研究中卵巢液 AKP 活性在大菱鲂繁殖周期内与受精率呈指数型显著相关($P < 0.05$), 而 ACP 活性与受精率无显著相关性, 且二者活性变化规律呈现相反的变化趋势(图 2)。在排卵中期卵巢液 AKP 活性升至最高, ACP 降至最低, 这表明卵巢液可能通过持续的物质代谢维系卵子在体内的最佳生理状态, 从而使得大菱鲂排卵中期的卵子受精率显著高于早期和晚期(图 3)。

综上所述, 在大菱鲂繁殖周期内, 卵子和卵巢液中 AKP、ACP 活性变化显著, 且卵子 AKP 和 ACP 活性及卵巢液 AKP 活性都与受精率显著相关, 因此 AKP 和 ACP 活性变化在一定程度上反映卵子质量优劣, 可作为评判卵子质量的辅助指标。卵巢液对卵子成熟和后期精卵结合有显著影响, 而卵子和卵巢液之间又是通过何种方式来进行物质、能量和信息的交流, 现在尚不得知, 因此尚需对卵子和卵巢液中的生

化组成进行深入研究,既可为探讨卵子和卵巢液之间的相互作用打下基础,又为卵子质量评价提供相关依据,从而为完善养殖鱼类种苗生产提供理论依据。

参 考 文 献

- 李 雪, 张 颖, 尹家胜, 2012. 哲罗鲤卵子和卵腔液的生化组成与其发眼率的相关性. 中国水产科学, 19(2): 223—228
- 雷霖霖主编, 2005. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 43—86
- Aegerter S, Jalabert B, 2004. Effects of post-ovulatory oocyte aging and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 231: 59—71
- Ali A T, Penny C B, Paiker J E *et al*, 2005. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1. Clin Chim Acta, 354: 101—109
- Barr F A, Elliott P R, Gruneberg U, 2011. Protein phosphatases and the regulation of mitosis. J Cell Sci, 124: 2323—2334
- Beck I M E, Berghe W V, Vermeulen L *et al*, 2009. Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. Endocr Rev, 30: 830—882
- Bobe J, Labbé C, 2010. Egg and sperm quality in fish. Gen Comp Endocrinol, 165: 535—548
- Broeg K, 2003. Acid phosphatase activity in liver macrophage aggregates as a marker for pollution-induced immunomodulation of the non-specific immune response in fish. Helgol Mar Res, 57: 166—175
- Bruce D L, Sapkota G P, 2012. Phosphatases in SMAD regulation. FEBS Lett, 586: 1897—1905
- Daniels H V, Watanabe W O, 2010. Practical flatfish culture and stock enhancement. Wiley-Blackwell, 126—139
- Fauvel C, Omnè M-H, Suquet M *et al*, 1993. Reliable assessment of overripening in turbot (*Scophthalmus maximus*) by a simple pH measurement. Aquaculture, 117: 107—113
- Giménez G, Estévez A, Lahnsteiner F *et al*, 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). Aquaculture, 260: 232—243
- Harris H, 1990. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. Clin Chim Acta, 186: 133—150
- Kohn Y Y, Symonds J E, 2012. Evaluation of egg quality parameters as predictors of hatching success and early larval survival in hapuku (*Polyprion oxygeneios*). Aquaculture, 342/343: 42—47
- Kong X H, Wang S P, Jiang H X *et al*, 2012. Responses of acid/alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus*. Aquat Toxi, 120/121: 119—125
- Lahnsteiner F, 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. Fish Physiol Biochem, 23: 107—118
- Lahnsteiner F, 2002. The influence of ovarian fluid on the gamete physiology in the Salmonidae. Fish Physiol Biochem, 27: 49—59
- Lahnsteiner F, Patarnello P, 2004. Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters. Aquaculture, 237: 443—459
- Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner R A, 1995. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta flacustris*, *Saivelinus alpinus* and *Hucho hucho*. Reprod Nutr Dev, 35: 456—474
- Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner R A, 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. Fish Physiol Biochem, 20: 375—388
- Low M G, Saliel A R, 1988. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. Science, 239: 268—275
- Mcevoy L A, 1984. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L. J Fish Biol, 24: 437—448
- Mugnier C, Guennoc M, Lebegue E *et al*, 2000. Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstock by implantation of a sustained-release GnRH-a pellet. Aquaculture, 181: 241—255
- Rosengrave P, Taylor H, Montgomerie R *et al*, 2009. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. Comp Biochem Physiol, 152A: 123—129
- Stacey N E, Goetz F W, 1982. Role of prostaglandins in fish reproduction. Can J Fish Aquat Sci, 39: 92—98
- Wojtczak M, Dietrich G J, Słowińska M *et al*, 2007. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Aquaculture, 270: 259—264

ACTIVITIES OF PHOSPHATASE IN EGGS AND OVARIAN FLUIDS AND ITS CORRELATION WITH THE FERTILIZATION RATE DURING THE REPRODUCTIVE CYCLE OF TURBOT (*SCOPHTHALMUS MAXIMUS*)

JIA Yu-Dong, MENG Zhen, LIU Xin-Fu, GAO Chun-Ren, NIU Hua-Xin, LEI Ji-Lin
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao, 266071)

Abstract We investigated the activity and variation of phosphatase in eggs and ovarian fluids during the reproductive cycle of turbot (*Scophthalmus maximus* L.), and explored whether and how phosphatase activity is influenced by fertilization rate. Results of experiments demonstrate that the activity and variation of the alkaline phosphatase and acid phosphatase in eggs was opposite in general to those in ovarian fluid. In eggs, alkaline phosphatase activity in ovulated metaphase was significantly lower than those of the early and late stage of ovulation. In contrast, acid phosphatase activity was strikingly higher than those of the early and late stage of ovulation. In addition, we found that the alkaline phosphatase activity in both eggs and ovarian fluid were closely related to fertilization rate, and acid phosphatase activity in ovarian fluid was much affected by fertilization rate. Therefore, activities of both alkaline and acid phosphatases in eggs and acid phosphatase activity in ovarian fluid were significantly related to fertilization rate, which may be applied to indicate the quality of turbot eggs.

Key words turbot *Scophthalmus maximus*; egg; ovary fluids; alkaline phosphatase; acid phosphatase; fertilization rate