

褐牙鲆卵黄囊期能量代谢与 生化物质变化特征研究*

线薇薇 张传骞 朱鑫华

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

卵黄囊期是鱼类早期发育中的一个重要阶段, 是鱼类由内源营养向外源营养转化的一个关键时期。从能量学的角度来分析, 则表现为主要能源物质在发育过程中有规律的变化, 各能量物质按一定顺序被利用。探讨卵黄囊期海洋硬骨鱼类的能量转化规律, 定量分析发育中生化成分和能量物质的变化, 预测维持仔鱼生命活动和提供生长所必需的合适饵料营养成分, 可为养殖生产中提高早期育苗成活率提供理论依据。作者着重探讨褐牙鲆卵黄囊期能量代谢特点及生化物质变化规律。

一、材料与方法

1. 实验材料

褐牙鲆受精卵取自山东省日照市水产研究所。自然产卵, 自然受精, 溢流法收集, 浮选去杂, 充氧密封, 立即运至我所实验室。

受精卵在 4 个棕色孵化桶中孵化; 水温控制在 $(17.4 \pm 0.3)^\circ\text{C}$; 盐度为 (31 ± 0.2) ; 微量充气, 可采用微气石; 遮光, 光照强度保持在 200 lx 左右。对仔鱼不进行投喂。仔鱼与受精卵的培育温度相同。在受精卵和卵黄囊期仔鱼发育的不同阶段, 取样后先低温速冻, 然后在 -35°C 保存, 以备生化测定。

2. 耗氧率和氨排泄率的测定

采用密闭呼吸测定法。用 4 个外径为 $25\text{cm} \times 6\text{cm} \times 6\text{cm}$ 的全封闭玻璃缸作为呼吸仪, 水浴控温。每次实验设 3 个平行样和 1 个空白样。每个平行样置 3 000 粒卵或 1 000 条仔鱼于呼吸仪中。光照约为 200 lx, 温盐度与孵化桶一致。实验持续时间为 4h。实验结束时各水样溶解氧的浓度采用 Winkler 碘量法测定, 氨浓度测定采用次溴酸钠氧化法。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4583 号。国家自然科学基金资助项目, 39670574 号
通信作者: 线薇薇, 女, 博士, E-mail: wxian@msio.qd.ac.cn.
收稿日期: 2003 年 4 月 30 日

3. 游离氨基酸、铵离子浓度和蛋白质的测定

将 100 粒受精卵或 100 尾仔鱼置于离心管中, 在 1 000 μ L 的 6%三氯乙酸 TCA 中抽提至少 3d。经离心(10 000r/min, 10min), 取上清液, 在氨基酸自动分析仪上测定游离氨基酸和 NH_3 的量。进样体积 50 μ L, 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$, 柱大小 150mm $\times$ 2.6mm, 柱树脂 2619 (磺化聚苯乙烯树脂), 衍生剂为茚三酮-二醇醋酸缓冲液, 衍生温度 98 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 570nm 和 440nm, 移动相为 IPH 系列缓冲液, 柱前压力 100~120atm^①, 柱后压力约为 20atm。取其下沉积物, 溶解在 1mol 的 NaOH 溶液中, 用牛血清蛋白作为基准测定蛋白质。

4. 总脂的测定

取受精卵或仔鱼 500~800 粒(尾), 加沙子研磨, 再加 10mL 氯仿-甲醇(1:2)继续匀浆, 静止约 5min 吸取上清液。余下部分继续抽提 5 次, 前两次加 5mL 氯仿和 5mL 甲醇, 接下来两次加 6mL 氯仿和 3mL 甲醇, 最后一次加 6mL 氯仿。然后, 分别获取抽提液中水溶性物质。先在总抽提液中加入相等体积蒸馏水, 放在冰箱中过夜, 分层, 吸取下层氯仿-甲醇液, 再继续加氯仿 0.5mL, 2~3 次。把全部溶有脂肪的氯仿-甲醇和氯仿液放在旋转蒸发器里蒸发。所得脂肪用乙醚溶解 2~3 次后(每次 0.5mL), 滴在已称重的塑料指管中, 经过硅胶真空干燥器干燥 12h 后称重, 总重量减去指管重量即为总脂重量。

5. 脂肪酸含量的测定

气相色谱分析。用与提总脂相同的方法对样品抽提 7 次, 旋转蒸发后用钾-甲醇(1.6g:100mL)在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下皂化 20h, 加入二十三烷甲酯作为内标, 用 5%盐酸-甲醇在 55 $^{\circ}\text{C}$ 酯化 30h。加水 1mL, 正己烷 4mL, 剧烈震荡, 上层溶液用硅胶薄层板纯化。将纯化的脂肪酸甲酯用 HP5880A 型气相色谱仪进行定量分析。柱温 210 $^{\circ}\text{C}$, 进样温度 240 $^{\circ}\text{C}$, 载气为纯氮气。

二、实验结果

1. 呼吸代谢

在受精卵发育阶段, 褐牙鲈耗氧率增长迅速; 孵化后继续增加, 并很快达到一个大约 6nmol/h 的水平(图 1)。在受精后 24h 之内, 氨排泄率一直很低, 但在孵化时, 氨排泄率猛增到 0.8nmol/h(图 1)。孵化后最初数小时内氨排泄率很低, 但最终稳定于 0.2 nmol/h 的水平。在开口后氨排泄率有升高的趋势。

2. 生化代谢

(1) NH_4^+

受精后 8h 褐牙鲈受精卵含有(17.8 $\pm$ 0.6)nmol 的 NH_4^+ 。此后, 逐渐累积, 到孵化前总共累积了 4.6nmol 额外的 NH_4^+ (图 2)。孵化后, 在最初的 44h 内减少了 16.28nmol (0.37nmol/h), 在接下来到开口之前的 32h 内减少了 0.48nmol (0.015 nmol/h)。

① 1atm=101 325 Pa

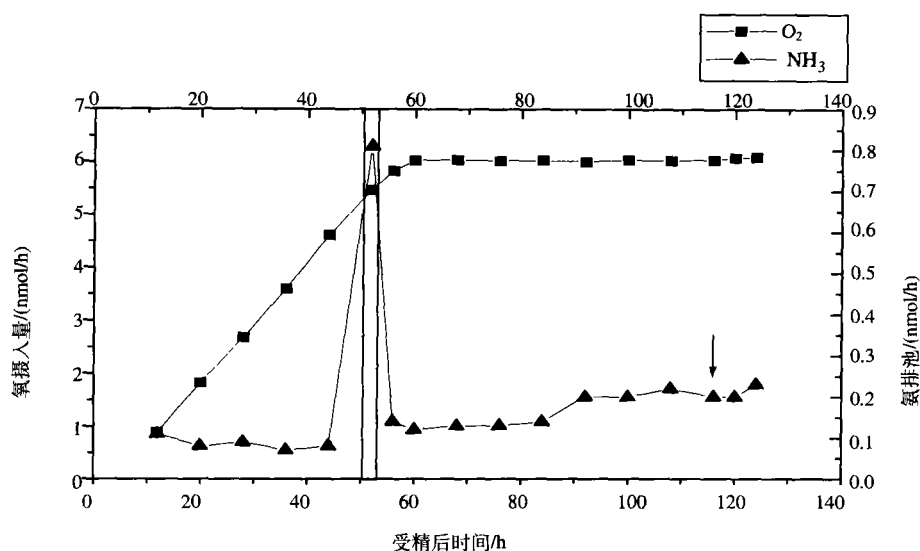
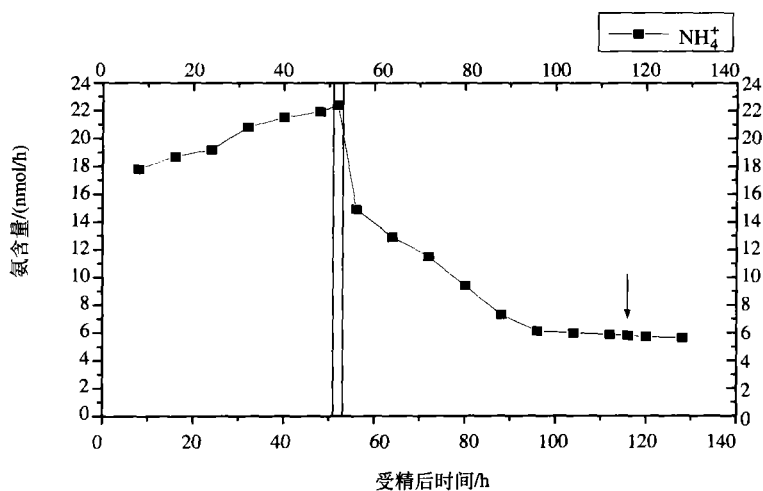


图1 褐牙鲆早期发育阶段耗氧率和排氨率的变化

图2 褐牙鲆早期发育阶段铵离子 NH_4^+ 的变化

(2) 游离氨基酸 FAA

褐牙鲆受精后 8h, 其受精卵中含有 57.3nmol 的总游离氨基酸(图 3), 其中大约 70%(41.5nmol)在接下来的 56h 内消失(0.74nmol/h)。从受精后 64~128h, 有 4.2nmol 的总游离氨基酸消失(0.07nmol/h)。在褐牙鲆总游离氨基酸中, 丙氨酸、丝氨酸和亮氨酸在含量上占优势, 约占总游离氨基酸的 34%。而此时必需氨基酸和非必需氨基酸各占总游离氨基酸的 50%。在褐牙鲆发育过程中, 大部分游离氨基酸呈下降趋势。与此相反的是, 磷酸丝氨酸有缓慢的增长, 而氨基酸类似物牛磺酸持续保持在 (2.5 ± 0.1) nmol 的水平, 在发育过程中变化很小, 只是占总游离氨基酸的含量由 4.6%(受精后 8h)增长为 20.8%(受

精后 128h)。

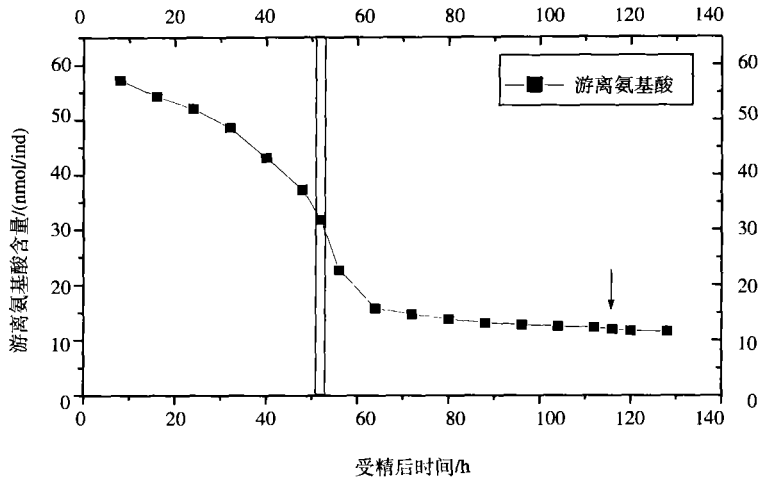


图3 褐牙鲈早期发育阶段总游离氨基酸 TFA 的变化

(3) 蛋白质

在褐牙鲈受精卵发育阶段,蛋白质的含量有所增加,从受精后 8h 的 $18.5\mu\text{g}$,增加到受精后 48h 的 $19.9\mu\text{g}$ 。孵化后,蛋白质的含量减少了 $6.3\mu\text{g}$ 。在卵黄囊期仔鱼的早期阶段,蛋白质含量相对稳定,受精 90h 后,含量逐渐减少(图 4)。

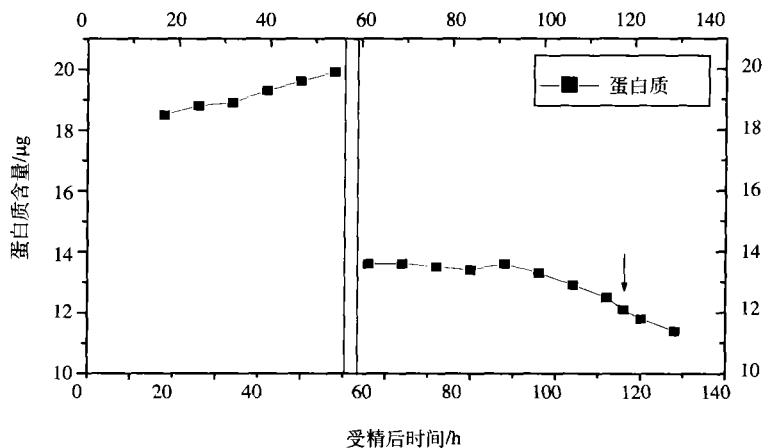


图4 褐牙鲈早期发育阶段蛋白质的变化

(4) 总脂与脂肪酸

褐牙鲈受精后 8h 总脂肪酸 TFA 在中性脂肪 NL 和磷脂 PL 中的含量分别为 $4.7\mu\text{g}$ 和 $2.5\mu\text{g}$, 在受精后 8h 之前,变化不是很明显。从受精后 8h 开始,这两部分脂肪酸在发育过程中都呈现减少,但中性脂肪酸 NL 减少的速度是磷脂 PL 的 3.6 倍(图 5)。在受精卵中,中性脂肪 NL 主要由下列脂肪酸构成,按含量(μg)由高到低的顺序依次

为 18:1(*n*-9), 16:0, 22:6(*n*-3)和 18:2(*n*-6)。磷脂 PL 中的主要脂肪酸按由高到低的次序依次为 22:6(*n*-3), 16:0, 18:1(*n*-9)和 20:5(*n*-3)。磷脂 PL 中的饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸在发育过程中减少的速度都很慢。与之相对的是, 中性脂肪 NL 中相应脂肪酸的减少比较显著, 尤其是 16:0, 18:1(*n*-9), 22:6(*n*-3), 18:2(*n*-6)。16:0 是褐牙鲆胚胎中含量最多的脂肪酸, 而且被证明在发育过程中减少最快。值得注意的是, 中性脂肪 NL 中脂肪酸水平的降低与磷脂 PL 中相应成分含量的升高并不同步, 尤其对必需脂肪酸 DHA 22:6(*n*-3)和 EPA 20:5(*n*-3)来如此。

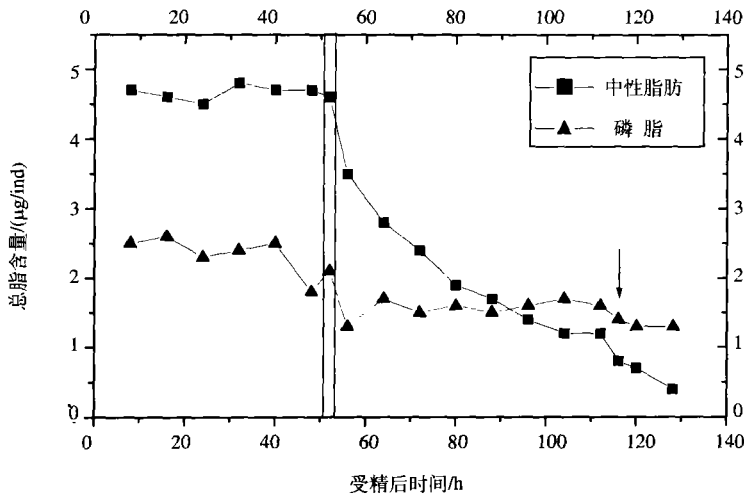


图5 褐牙鲆早期发育阶段总脂的变化

三、讨 论

在褐牙鲆的胚胎阶段, 游离氨基酸含量不断减少, 而蛋白质含量反而增加, 这表明此阶段代谢产生的氨是由游离氨基酸分解而产生的。根据得到的实验数据可以对发育过程中的内源营养物质进行定量的分析。根据丢失的总游离氨基酸中各成分的相对含量, 可以得到一个分子式为 $C_{4.79}H_{10.25}O_{2.41}N_{1.36}S_{0.03}$ 分子量为 121.25 的“平均氨基酸”。

在能量代谢的研究中, 氮熵 NQ(产生的 NH_3 的 mol 数与消耗的 O_2 的 mol 数的比值) 可用来分析能源物质。纯净蛋白质代谢的氮熵是 0.27 ± 0.01 (Gnaiger, 1983), 本实验中褐牙鲆“平均氨基酸”代谢的氮熵 0.26, 略低于这个值, 原因可能是褐牙鲆中富含氮的氨基酸如精氨酸、组氨酸、赖氨酸的含量比较少。当被分解的物质中不含氮的成分(如脂肪或碳水化合物)含量升高时, 氮熵趋于零。由于碳水化合物在鱼体中含量很低, 在能量代谢中的作用非常微小。如果忽略碳水化合物不计, 则从获得的氮熵 NQ 值可以计算出有氧分解代谢中脂类和氨基酸所占的比例 (Gnaiger, 1983)。根据氮熵的值, 可以得出氨基酸和脂肪酸在能量代谢中所占的比例(表 1)。

表 1 褐牙鲆早期发育阶段的氮熵 NQ 及氨基酸 AA 和脂类产生的能量

受精后时间/h	NQ	氨基酸产能/%	脂肪酸产能/%
8~40	0.15	58	42
40~52	0.13	50	50
88~116	0.03	12	88
116~128	0.04	15	85

随着发育逐渐降低的氮熵值 NQ 显示主要能源物质已开始由游离氨基酸向脂肪酸转变。在孵化时氨基酸构成了能量代谢的 50%，但在最后的卵黄囊期阶段，仅占大约 15%。在受精后大约 88h 时，消失的游离氨基酸产生的氨已少于仔鱼产生的氨。这说明从此时到受精后 116h，有大约 3.65nmol 的氨基酸，也就是大约 0.38 μ g 的蛋白质，被用来补充游离氨基酸。值得注意的是，褐牙鲆的仔鱼在蛋白质被用来参与能量代谢时，仍含有一个大约 2.07nl(35%)的油球。上述结果也在对大菱鲆(Rønnestad *et al.*, 1992)的研究中被证实。

孵化后油球吸收率的增长说明来自油球的脂类是褐牙鲆仔鱼在这个阶段的主要能源物质。油球的吸收发生于卵黄的吸收之后，对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和海鲈(*Lates calcarifer*)研究亦有类似的结果(Rønnestad *et al.*, 1992; Bagarino, 1986)。

从油球的吸收率和脂肪的利用可以得出：来自油球的中性脂肪的脂肪酸是褐牙鲆从孵化到开口这段时间主要的能源物质。磷脂的脂肪酸只是被很少的利用(为中性脂肪的 30%)。这是因为磷脂中富含高不饱和脂肪酸，尤其是 *n*-3 系列的高不饱和脂肪酸，而其主要在细胞膜的构架方面起作用(Sargent *et al.*, 1989)。

从热量的角度，中性脂肪，尤其是三酰甘油和蜡酯被认为是硬骨鱼类鱼卵中最重要的脂类储能物质(Boulekbache, 1981)，但是文献资料对这一点的证明并不是很直接。在整个受精卵发育阶段，冬鲱积累脂肪而在从孵化到开口摄食期间则呈现剧烈的下降态势(Cetta *et al.*, 1982)。而鲤鱼在卵裂阶段和器官发生期间利用胆固醇和磷脂进行组织合成和能量代谢(Kim, 1979)。条纹鲈仔鱼在发育阶段的主要能源物质是中性脂肪(Dergaleva *et al.*, 1977; Elbridge *et al.*, 1982)，虽然在胚胎发生的一个时期内它保持稳定(Elbridge *et al.*, 1982)。另一方面，红石首鱼(Vetter *et al.*, 1983)和真鲷(Kimata, 1983)的受精卵利用中性脂肪作为它的主要能量来源。对于大麻哈鱼来说，从受精卵到初孵仔鱼，中性脂肪中的三酰甘油和磷脂中的磷脂酰胆碱均呈现剧烈的下降(Cowey *et al.*, 1985)。

鲑鱼、鲱和大西洋鳕则不同，其受精卵总富含磷脂而总脂水平相对较低，表现为利用磷脂中的主要成分磷脂酰胆碱作为胚胎发生中主要的脂类能源物质，而对中性脂肪 NL 的利用则不是很显著(Rønnestad *et al.*, 1994)。在这些鱼类中，磷脂酰胆碱水解的代谢终产物并非全部被用作能源物质，并且，释放的高不饱和脂肪酸被中性脂肪保留以用于膜的合成。其他的代谢终产物，如游离的磷酸盐可被用来进行中间代谢，而胆碱可被用于甲基化代谢和神经介质传递中(Tocher *et al.*, 1984)。而在褐牙鲆的研究中，磷脂的含量比中性脂肪少得多。

综上所述，由褐牙鲆实验数据可得：游离氨基酸是其在受精卵发育阶段最重要的能源物质，而在孵化后油球中的中性脂肪酸被用作主要能源物质。由当前研究并

参考文献不难得出,主要能源物质是具有物种特异性的。对于含一个油球的鱼类来说,基于脂肪的能量代谢是重要的;而对于不含油球的鱼类来说,氨基酸的作用更为重要一些。这些研究对于仔鱼在开口时营养成分的确定及满足、死亡率的降低都是很有意义的。

参 考 文 献

- Bagarinao T, 1986. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of three tropical marine fish species reared in the hatchery. *Mar. Biol.*, **91**:449~459
- Boulekbache H, 1981. Energy metabolism in fish development. *Am. Zool.*, **21**: 377~389
- Cetta C M, 1982. Physiological and biochemical aspects of embryonic and larval development of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Mar. Biol.*, **71**:327~337
- Cowey C B, Bell J G, Konox D *et al.*, 1985. Lipids and lipid antioxidant systems in developing eggs of salmon (*Salmo salar*). *Lipids.*, **20**: 567~572.
- Dergaleva Z, Shatunovskiy M I, 1977. Data on lipid metabolism of the larvae and young of the striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Ichthyol (USSR)*, **17**: 802~804
- Elbridae M B, Whipple J A, Bowers M J, 1982. Bioenergetics and growth of striped bass, *Morone saxatilis*, embryos and larvae. *Fish Bull US*, **80**(3):461~474
- Gnaiger E, 1983. Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In: Gnaiger E, Forstner H eds Polargraphic oxygen sensors. Berlin: Springer Verlag. 337~345
- Kim Y D, 1979. The variability of phospholipids and cholesterol in the early ontogeny of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *J. Ichthyol (USSR)*, **19**: 163~166
- Kimata M, 1983. Changes of chemical composition during early development in red sea bream *Chrysophysis major* (Temminck et Schlegel) eggs and larvae. *Bull Jap Soc scient Fish*, **16**:213~223
- Rønnestad I, Finn R N, Groot E *et al.*, 1992. Utilization of free amino acids related to energy metabolism of developing eggs and larvae of lemon sole (*Microstomus kitt*) reared in the laboratory. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **88**: 195~205
- Rønnestad I, Koven W M, Tandler A *et al.*, 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilt head sea bream (*Sparus aurata*). *Mar. Biol.*, **120**: 187~196
- Sargent J R, Hendersen J R, Tocher D R, 1989. The lipids. In: Halver Jred. Fish nutrition. San Diego: Academic Press. 154~209
- Tocher D R, Sargent J R, 1984. Analyses of lipids and fatty acids in rip roes of some northwest European marine fish. *Lipids*, **19**: 492~499
- Vetter R D, Houdson R E, Arnold C, 1983. Energy metabolism in a rapidly developing marine fish egg, the Red Drum (*Scianops ocellata*). *Can. J. Fish. Aquat. Sciences.*, **40**: 627~634

Biochemical and Metabolic Changes of Embryonic and Larval Development of Bastard Halibut, *Paralichthys olivaceus* *

XIAN Weiwei ZHANG Chuanqian ZHU Xinhua

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

Abstract

Biochemical and morphological parameters of laboratory-reared developing eggs and larvae of bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) were measured for oxygen uptake, ammonia excretion, contents of free amino acids (FAA), fatty acids (FA) and accumulated ammonium, and volume of yolk-sac and oil globule at $(17.4 \pm 0.3)^\circ\text{C}$.

The bastard halibut had an obvious ammonium cumulation during its egg developmental stage. When hatching, the cumulated ammonia were released. Free amino acids (FAA) acted as the most important energy source during the egg developmental stage, and after hatching fatty acids (FA) of neutral lipids in the oil globule was used as the main energy substrate. Before start-feeding, protein began to supply energy base to some extent. Based on our results and accumulated information, it is concluded that the most important energy source has species-specialty in fish developmental biology and its bioenergetics and further research on this theme is urgent for interpretation of early life history pattern during recruitment of marine fishes.

* Contribution No. 4583 from Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences