

小体鲟血清卵黄蛋白原和 Ca^{2+} 浓度与卵巢发育的关系

齐茜^{1,2}, 曲秋芝¹, 张颖¹, 索力³, 孙大江¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 上海海洋大学, 上海 201300; 3. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 采用 ELISA 方法、分光光度计法和组织学方法, 系统研究了不同年龄小体鲟(*Acipenser ruthenus*) 血清卵黄蛋白原 (Vitellogenin, Vg)、血清钙离子 (Calcium, Ca^{2+}) 含量与卵巢发育变化的关系。结果表明: 血清 Vg 浓度、 Ca^{2+} 浓度与卵巢的发育时期相关; 在卵黄沉积期内, 血清中 Vg 浓度与 Ca^{2+} 浓度呈线性正相关 ($R^2=0.9264$); 卵黄生成前期和沉积初期, 血清中 Vg 浓度和 Ca^{2+} 含量较低; 卵黄沉积期内, 卵母细胞由沉积初期的 0.56 mm 增大到卵黄沉积末期的 2.01 mm, 血清 Vg 质量浓度由 110.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 上升到 242.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 血清 Ca^{2+} 浓度由 2.34 mol/L 增大到 2.72 mol/L。对同年龄的雌、雄小体鲟血清 Vg 浓度和 Ca^{2+} 浓度测定表明, 根据血清中 Vg 和 Ca^{2+} 含量差别, 可以区分出沉积期小体鲟的性别。[中国水产科学, 2009, 16 (6): 967-974]

关键词: 小体鲟; ELISA; 血清卵黄蛋白原; 血清钙离子; 卵巢发育

中图分类号: S96

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)06-0967-08

小体鲟(*Acipenser ruthenus*) 的商业养殖开始于 20 世纪 80 年代, 中国于 1999 年开始引进养殖。小体鲟具有性成熟早, 生殖能力强, 雌鱼怀卵量大等优点, 是较为理想的育种材料和鱼子酱生产材料^[1]。近些年的研究表明, 小体鲟适合大水面增殖和池塘养殖^[2]。与其他鲟鱼一样, 成熟的小体鲟也无副性征, 生产上通常采用手术的方法鉴别雌雄。由于手术操作耗时费力、对亲鱼也有损伤, 因此一些非介入性的雌雄鉴别方法成为目前的研究热点^[3]。血清卵黄蛋白原检测作为一种非介入性鉴别方法, 在鲟亲鱼管理和鱼子酱生产上具有重要的研究意义^[3-5]。

与其他卵生动物一样, 鲟鱼的卵黄蛋白原也是由雌激素诱导产生的^[6]。Kroll 等^[7]和 Bidwell 等^[8]先后研究了高首鲟(*Acipenser transmontanus*) 的血清 Vg, Cuisset 等^[9]建立了西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*) 血清 Vg 的 ELISA 检测方法, 测定了卵巢成熟期血清

Vg 浓度的变化, Fujii 等^[10]采用双向免疫扩散的方法测定了杂交鲟(*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*) 血清卵黄蛋白原的浓度^[11]。Linares 等^[3]报道了高首鲟血清卵黄蛋白原与其钙离子的关系。霍堂斌等^[12-13]研究了小体鲟 Vg 的性质和代谢途径等内容。而小体鲟血清 Vg ELISA 方法的建立, 以及利用 Vg 浓度与血清 Ca^{2+} 浓度来鉴别卵黄生成期鲟鱼性别等研究内容尚未见报道。本研究拟通过建立血清 Vg 的双抗夹心 ELISA 检测法, 详细研究小体鲟卵黄发育过程中血清 Vg 与 Ca^{2+} 浓度的变化关系及规律, 为研究鲟鱼非介入性性别的检测方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用鱼均采自中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心的小体鲟养殖群体(1~7 龄), 全年养殖

收稿日期: 2009-05-06; 修订日期: 2009-07-14.

基金项目: “十一五” 国家支撑计划资助项目(2006BAD03B08); 黑龙江水产研究所基本业务费(2008HSYZX-SJ-04).

作者简介: 齐茜(1983-)女, 硕士研究生, 从事水产动物健康养殖研究.

通讯作者: 孙大江. E-mail: sundajiang0451@sohu.com

水温 1~28 ℃。随机取雌鱼 60 尾,雄鱼 10 尾,每尾鱼采血 2 mL,将血液室温静置 1 h,4 ℃过夜,8 000 r/min 离心 10 min,取血清,加入适量蛋白酶抑制剂 PMSF (浓度约为 1 mmol/L),保存于 -80 ℃。

实验用兔抗小体鲟卵黄脂磷蛋白(Lv)和豚鼠抗小体鲟Lv抗血清均来自本实验室。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的制作 根据文献[10,14],将小体鲟的纯化豚鼠抗Lv稀释,按每孔 100 μL 加入到 96 孔酶标板中,各设 3 个复孔,4 ℃过夜。用 PBS 缓冲液(0.14 mol/L NaCl,0.015 mol/L KH₂PO₄,0.075 mol/L, Na₂HPO₄,0.027 mol/L KCl, pH 7.3)溶解 3% 的牛血清白蛋白(BSA)封闭液封闭(每孔 100 μL),4 ℃过夜。取适量倍比稀释的小体鲟纯化Lv,每孔加 100 μL,室温孵育 1 h; TPBS (含 0.05% Tween-20 的 PBS)洗涤 3 次加入兔抗Lv血清(每孔 100 μL),37 ℃孵育 30 min,洗涤 3 次。加入 100 μL 稀释 2 000 倍的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体,室温孵育 1 h 后,洗涤 3 次,加入 100 μL 邻苯二胺(OPD,0.4 mg/mL)显色液显色 15 min;用 50 μL 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应,492 nm 处测定吸光度,绘制标准曲线。

1.2.2 ELISA 法测定血清中的 Vg 含量 用豚鼠抗Lv抗体包被酶标板(每孔 100 μL),4 ℃过夜。弃

去包被液,用 PBST 洗涤 3 次,每次 2 min。加入 3% BSA 室温封闭 1 h (每孔 100 μL)后洗涤 3 次。加入待检血清(每孔 100 μL),37 ℃孵育 30 min,洗涤 3 次。加入兔抗小体鲟Lv血清(每孔 100 μL),37 ℃孵育 30 min,洗涤 3 次。加入山羊抗兔 IgG-HRP (每孔 100 μL),37 ℃孵育 30 min,洗涤 3 次。加入 OPD 底物显色液(每孔 100 μL),室温避光静置 15 min。在每个孔中加入 50 μL 终止液(2 mol/L H₂SO₄)。492 nm 波长下测各孔的 OD 值。

1.2.3 血清中 Ca²⁺ 含量的检测 利用钙离子试剂盒(南京建成),1.5 mL 工作试剂(R1 邻甲酚酞络合酮与 R2 碱性试剂等量混合物)分别加入 20 μL 标准液及样品,于 578 nm 波长测定吸光度值。

1.2.4 卵巢发育分期 卵巢用 Bouin 氏液固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋;同时用松油醇透明,石蜡包埋;切片厚度为 4~8 μm;火棉胶涂膜,苏木素-伊红染色;显微镜下观察、测量(包括计数)。卵巢发育的分期依据,采用苏联学者 Деглаф 和孙大江等提出的分期标准,把卵巢发育分为 I - VI 期;卵巢发育各期的界定,是以在卵巢切面中所占面积超过 50% 的生殖细胞的时相为准^[15-16]。表 1 和图 1 中 A-B 和 C-F 代表卵黄沉积前期和卵黄生成期。

表 1 小体鲟雌鱼卵巢的发育状况

Tab. 1 Classification of ovarian maturity by micro- and macroscopic appearance of the advanced oocytes in sterlet sturgeon broodstock sampled in March

卵黄沉积不同期 Ovarian stage	时期 Stage	划分标准 ^[15-16] Dividing standard ^[15-16]
A II Ovarian II stage	卵母细胞的内源生长期	缺少放射带和卵黄板,细胞质嗜碱性,卵非常小,肉眼看是透明的。
B III早 Ovarian early stage - III	绒毛膜的合成期	放射带 PAS 反应弱阳性,细胞质囊状缺少卵黄板,卵小半透明。
C III中 Ovarian mid stage - III	卵黄沉积初期	放射带单层,细胞质外周出现少量卵黄板,卵小白色。
D III晚 Ovarian late stage - III	卵黄生成早期	放射带两层,细胞质充满卵黄板,但缺少色素颗粒,卵中等大小,黄色或桔黄色。
E IV早 Ovarian early stage - IV	卵黄生成中期	放射带两层,细胞质外周充满色素颗粒,胚泡位于卵中央,卵大,球状,灰色。
F IV中 Ovarian mid stage - IV	卵黄生成后期	胚泡移向动物极端,植物极端充满大的卵黄板和油球,卵大,卵圆形,黑色。

1.5 数据处理

用 SPSS12.0 对数据进行处理, 并对组间数据进行 t 检验。数据用平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 ELISA标准曲线

以标准 L_v 溶液浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 用 Microsoft Excel 软件, 作标准曲线。由图 1 可见, L_v 的 ELISA 标准曲线略呈“S”形, 而采用标准曲线计算 V_g 浓度时, 仅取曲线中部呈线性的一段。该 ELISA 对 V_g 检测的线性范围为 $39 \sim 2\,500 \text{ ng/mL}$ 。 V_g 浓度在 $39 \sim 2\,500 \text{ ng/mL}$ 范围内有较好的线性关系, 低于 39 ng/mL 或超过 $2\,500 \text{ ng/mL}$ 线性关系较差。

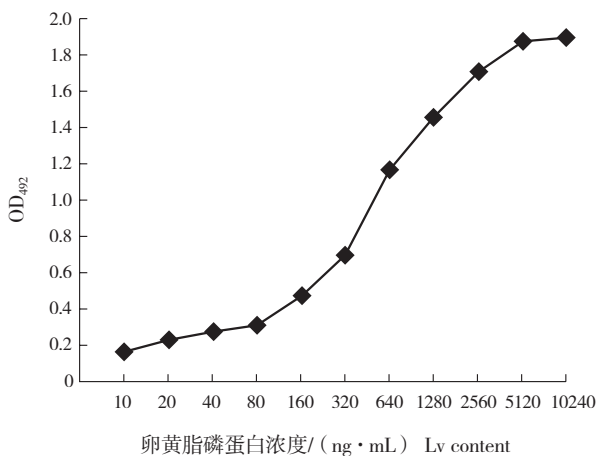


图 1 卵黄磷脂蛋白 ELISA 标准曲线

Fig. 1 Calibration curves of the ELISA

2.2 血清 V_g 浓度与血清 Ca^{2+} 含量和卵巢发育时期的关系

养殖小体鲟检测样本中有 19 条卵巢发育为卵黄生成前期 (A-B), 41 条卵黄生成期 (C-F)。A 时期 1~2 龄; 体质量 (0.39 ± 0.12) kg; B-F 时期 3~7 龄; 体质量 (2.24 ± 0.39) kg。

从 A 期到 F 期, 卵径由 0.21 mm 增大到 2.01 mm (表 2)。A-B 时期血清 V_g 浓度较低, 卵黄沉积初期 (C) 血清 V_g 的浓度升高。当卵母细胞的直径大于 1 mm 并且胞质中有卵黄板聚集形成时 (D-F), 血清

V_g 的浓度显著增加 ($P < 0.05$), 见图版 I 和表 2。D、E 和 F 时期血清 V_g 浓度无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 2。血清中 Ca^{2+} 浓度变化趋势与血清 V_g 浓度变化相似, A-B 时期, 血清 V_g 浓度与 Ca^{2+} 浓度较低, 无相关性。C 期 -F 期内, 血清 Ca^{2+} 浓度随 V_g 浓度升高而升高, 且线性相关 ($y = 0.007\,0x + 1.205\,8, R^2 = 0.926\,4$), 见图 2。

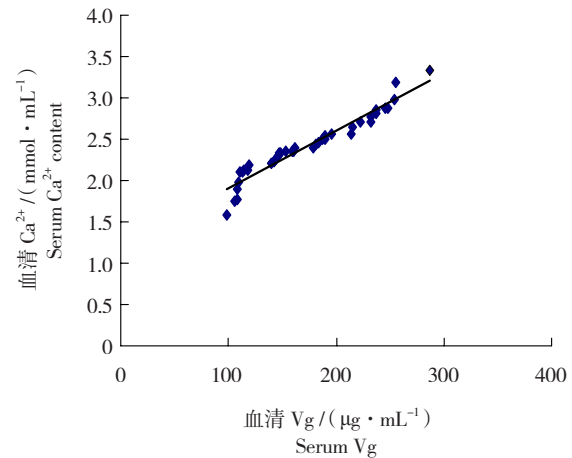


图 2 小体鲟卵黄生成期血清 V_g 浓度和 Ca^{2+} 含量相关性
Fig. 2 Correlation between serum V_g and Ca^{2+} on stages of vitellogenesis of *Acipenser ruthenus*

10 尾随机采样的雄鱼中血清 V_g 含量不可测或很微量, 而雌性个体卵黄生成前期的血清 V_g 浓度可测, Ca^{2+} 浓度高于 A 期雌鱼 (表 2)。

2.3 性别鉴定

卵黄生成前期 (A-B, $n=19$) 和卵黄生成期 (C-F, $n=41$) 血清 V_g 的平均值分别为 (81.2 ± 7.36) $\mu\text{g/mL}$ 和 (173.0 ± 51.54) $\mu\text{g/mL}$ 。检测个体中, 血清 V_g 浓度大于 $82 \mu\text{g/mL}$ 的个体, 85% 是雌鱼, D-F 时期 100% 是雌鱼 (图 3)。A-B 期和 C-F 期血清 Ca^{2+} 浓度分别为 (1.67 ± 0.23) mol/L 和 (2.40 ± 0.38) mol/L。检测个体中, 血清 Ca^{2+} 浓度大于 1.7 mol/L 的个体, 80% 是雌鱼, D-F 期是雌性 98% (图 4)。但是利用血清钙离子和 V_g 浓度不能对卵黄生成期 (D、E 和 F) 进行具体分期。

表 2 小体鲟血清 Vg 浓度与 Ca²⁺ 浓度和卵径的关系
 Tab. 2 Serum metabolites VTG and Ca²⁺ and egg diameter of sturgeon broodstock

性别 Sex	分期 Stage	<i>n</i>	Ca ²⁺ / (mol · L ⁻¹) Ca ²⁺ concentration	Vg / (μg · mL ⁻¹) Vg concentration	卵径 / mm Egg diameter
雌性 Femal	A	10	1.55 ± 0.67 ^a	77.88 ± 6.22 ^a	0.21 ± 0.07 ^a
	B	9	1.91 ± 0.48 ^a	85.56 ± 5.03 ^a	0.32 ± 0.03 ^{ab}
	C	10	2.18 ± 0.2 ^b	110.65 ± 5.97 ^b	0.56 ± 0.07 ^b
	D	13	2.34 ± 0.31 ^{bc}	156.4 ± 16.55 ^c	0.97 ± 0.21 ^c
	E	8	2.43 ± 0.41 ^{cd}	192.67 ± 29.82 ^c	1.54 ± 0.06 ^d
	F	10	2.72 ± 0.38 ^d	242.22 ± 21.94 ^c	2.01 ± 0.13 ^f
雄性 Male		10	1.62 ± 0.19	ND	

注：同一行肩标不同小写字母为差异显著 ($P < 0.05$), 末标肩标表示差异不显著 ($P > 0.05$) .

n: 表示每组测得尾数 . ND: 表示浓度小于最小检出限 .

Note: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$) ; no capital letter superscripts mean not significant difference ($P > 0.05$) .

n: the number of each dectect team; ND: below detection limit.

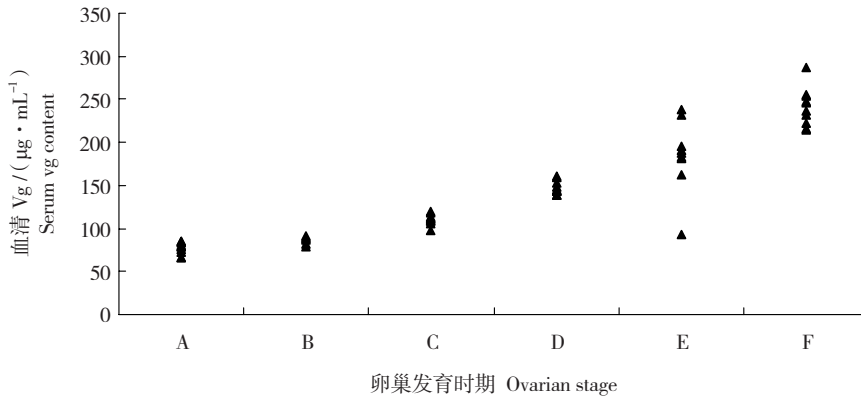


图 3 不同卵巢发育时期血清 Vg 水平分布图

Fig. 3 Scatter plots of serum vitelogenin concentrations in different ovarian stages

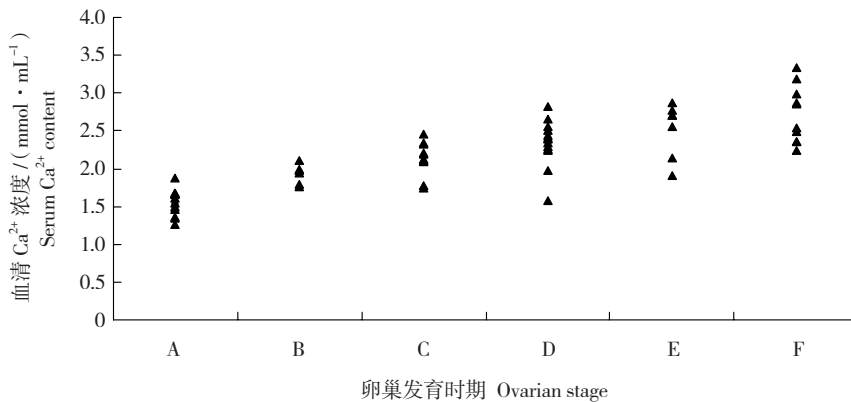


图 4 不同卵巢发育时期血清 Ca²⁺ 浓度分布图

Fig. 4 Scatter plots of serum calcium concentrations in different ovarian stages

3 讨论

鱼类血清中 Vg 浓度的定量分析方法有多种,包括 ELISA、碱不稳定法、单向免疫扩散法等,其中 ELISA 法因具有特异性强,灵敏度高等优点,被广泛应用于鱼类 Vg 的定量分析^[17-20]。Lv 作为鱼类 Vg 的降解片段,具有较高免疫原性,以 Lv 为抗原建立的鱼类血清 VgELISA 检测法在鲫(*Carassius auratus*)^[21]、鳕(*Gadus morhua*)^[22]、冬鲱(*Pleuronectes americanus*)^[23]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[24]、比目鱼(*Paralichthys californicus*)^[25]和剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)^[26]等多种鱼类中都有研究。Hartling 等以 Lv 为抗原建立的 ELISA 对冬鲱血清 Vg 的工作浓度为 25~300 ng/mL,本实验建立的 ELISA 的工作浓度 39~2 500 ng/mL,略高于前者,与剑尾鱼的工作浓度 32.5~2 000 ng/mL 相近。

鲟的 Vg 由雌激素诱导肝脏合成^[6],然后分泌到血液中随血液循环到达卵巢,进而被发育中的卵母细胞通过受体介导的内吞作用而吸收^[2]。因此,鱼类的卵巢发育伴随其血清 Vg 浓度的变化。Fujii 等^[11]采用单向免疫扩散的方法检测了杂交鲟(*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*)血清 Vg 与卵巢发育的关系,指出血清 Vg 浓度是杂交鲟卵巢发育的一个良好指示物。对沟鲈(*Ictalurus punctatus*)^[27]、河豚(*Siganus canaliculatus*)^[28]、瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)^[29]和远东哲罗鲑(*Hucho perryi*)^[30]等鱼类的研究表明,随着卵巢发育,其血清 Vg 发生对应变化。本研究表明,小体鲟卵黄沉积前期(A-B)到卵黄生成末期(F),血清 Vg 浓度由低到高,这种变化趋势和其他研究者一致。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、高首鲟和本实验的小体鲟等鱼类的研究结果相同,血清 Vg 合成开始于鱼类卵巢发育的卵黄蛋白沉积前期,即卵母细胞的内源生长期(A)和绒毛膜的合成期(B)的血清 Vg 浓度均较低^[3,31]。

赵兵等^[32]对 E_2 诱导的鲫鱼幼鱼(*Carassius auratus*),李朝军等^[33]对经苯甲酸雌二醇诱导的雄性大阪鲫(*Carassius auratus cuvieri*)、Gillespie 等^[34]对胖头鱼(*Pimephales promelas*)和 Mugiya 等对 goldfish(*Carassius auratus*)^[35]的研究表明,硬骨鱼类卵巢卵

黄生成期血清 Vg 浓度与 Ca^{2+} 浓度相关,血清中钙含量随 Vg 增加而增加,这种关系在卵黄蛋白形成早期不明显^[33-34]。本研究中,卵巢发育的早期(A-B),受其他钙结合蛋白和个体内游离钙的影响,血清中 Ca^{2+} 浓度和血清 Vg 浓度关系不是很明显。卵黄生成期 C-F 期,由于血清中游离 Ca^{2+} 和 Vg 部分结合,当血清中 Vg 的浓度大于 82 $\mu\text{g/mL}$ 时,血清中 Ca^{2+} 浓度增大高于一定水平,血清 Ca^{2+} 浓度和血清中 Vg 浓度明显线性相关,且血清中 Ca^{2+} 浓度随着小体鲟卵巢发育时期的变化而变化。

目前,较为常用的鲟鱼性别鉴别方法为手术法,尽管其鉴别的准确率和成活率均较高,但该方法具有损伤鱼体、操作不便、应用繁琐等问题。而一些不损伤鱼体的非介入性方法如 B 型超声波、内窥镜、血液性类固醇激素和卵黄蛋白原等的研究日益受到研究者的关注。鲟鱼的卵黄蛋白原的研究始于美国的高首鲟^[6-8]。对高首鲟(*Acipenser transmontanus*)^[4]、闪光鲟(*Acipenser stellatus*)^[5]和密苏里铲鲟(*Scaphirhynchus albus*)^[6]等鲟鱼血清中 Vg 浓度和 Ca^{2+} 含量的研究表明,Vg 或 Ca^{2+} 含量可以鉴别卵黄沉积期该种鱼类的性别,准确率达 95% 以上^[4-5],这与本研究的结果一致,即血清中 Vg 浓度和 Ca^{2+} 浓度可以有效鉴别卵黄生成时期的小体鲟性别。

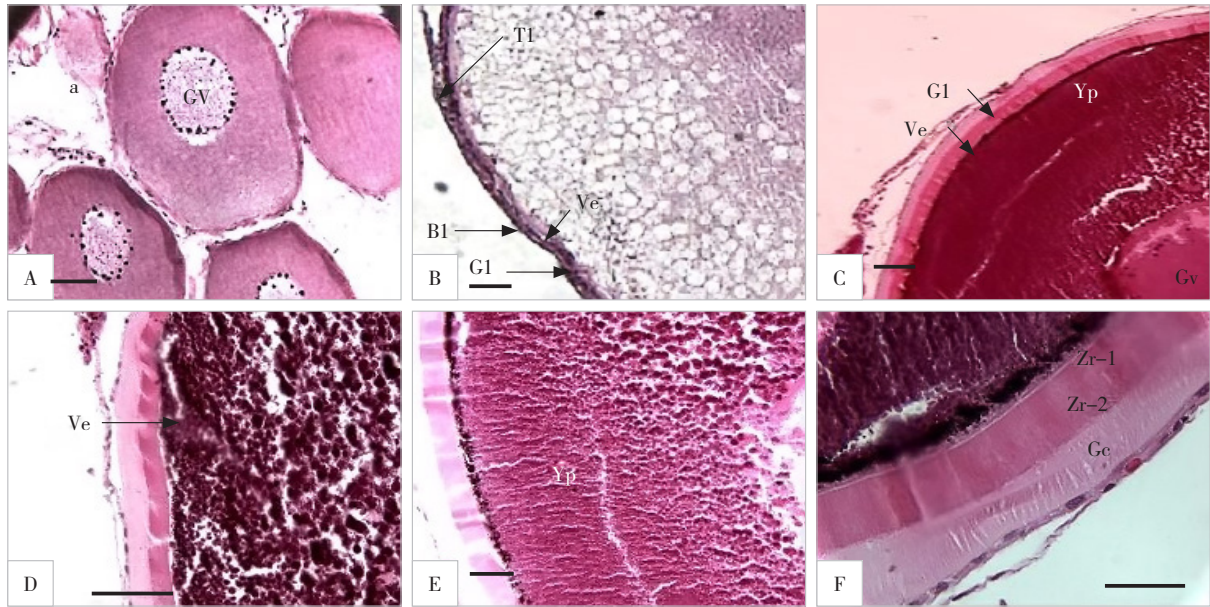
参考文献:

- [1] 谢忠明主编. 鲟鱼养殖技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 226-237.
- [2] 孙大江, 曲秋芝, 马国军, 等. 中国鲟鱼养殖概况 [J]. 大连水产学院学报, 2003, 18 (3): 216-227.
- [3] Linares-Casenave J, Kroll K J, Van eenennaan J P, et al. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon [J]. Aquaculture. 2003, 221: 645-656.
- [4] Ceapa C, Williot P, Le Menn F, et al. Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas) during spawning migration in the Danube River [J]. Journal of Applied Ichthyology, 2002, 18 (4-6): 391-396.
- [5] Mark L, Wildhaber D M, Papoulias A J, et al. Development of Methods to Determine the Reproductive Status of Pallid Sturgeon in the Missouri

- River [J]. *J Appl Ichthyol*, 2006, 23 (4): 411.
- [6] Moberg G P, Watson J G, Papkoff H, et al. Development of radioimmunoassays for two sturgeon gonadotropins [A] // Scott A P, Sumpter J P, Kime D E, et al (eds.), Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Sheffield, England, 1991: 11–12.
- [7] K J Kroll. Preliminary characterization of vitellogenin and yolk proteins of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) [D]. California: University of California, 1990: 84.
- [8] Bidwell CA, Kroll KJ, Severud E, et al. Identification and preliminary characterization of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) vitellogenin mRNA [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, 83: 415–424.
- [9] Bidwell C A, Carlson D M. Characterization of vitellogenin from white sturgeon, *Acipenser transmontanus* [J]. *J Mol Evol*, 1995, 41: 104–112.
- [10] Cuisset B, Pelissero C, LeMenn F, et al. ELISA for Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) vitellogenin [C] // Williot, P. (ed.), *Acipenser*. Proceedings of the First International Sturgeon Symposium, 3–6 October 1989, Bordeaux CEMAGREF, Publ, 1991: 107–111.
- [11] Fujii K, K Hirose, A Hara, et al. Use of vitellogenin level as a maturational indicator for artificial spawning of cultured hybrid sturgeon *Huso huso* × *Acipenser ruthenus* [A] // Williot P (ed.), *Acipenser*, Bordeaux CEMAGREF Publ, 1991: 381–388.
- [12] 霍堂斌, 张颖, 孙大江, 等. 小体鲟卵黄雌性蛋白分离纯化及抗血清的研制 [J]. *中国水产科学*, 2007, 14 (4): 532–538.
- [13] 霍堂斌, 张颖, 孙大江, 等. 小体鲟卵黄蛋白生化特性及合成途径的研究 [J]. *水生生物学报*, 2009, 33 (1): 67–75.
- [14] 董胜张, 高秀云, 程正贤, 等. 蝶蛹金小蜂卵黄蛋白单克隆抗体的制备及其应用方法的建立 [J]. *昆虫学报*, 2007, 50 (9): 871–877.
- [15] Делтаф Т А, Гинэбург А. 张贵寅, 赵尔必译. 鲟鱼类的胚胎发育与其养殖问题 [M]. 北京: 科学出版社, 1958: 26–46.
- [16] 孙大江, 曲秋芝, 吴文化, 等. 史氏鲟人工繁殖及养殖技术 [M]. 北京: 海洋出版社, 1985: 26–46.
- [17] Lee F Y, Shih T W, Chang C F. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: comparison with ovarian vitellin [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1997, 108 (3): 406–415.
- [18] Lomax D P, Roubal W T, Moore J D, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 121B: 425–436.
- [19] Sun B, Pankhurst N W, Watts M. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin measurement in greenback flounder *Rhombosolea tapirina* [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2003, 29: 13–21.
- [20] Mitsui N, Kawahara T O. A Sandwich ELISA for quantification of *Xenopus laevis* vitellogenin and albumin and their application to measurement of estradiol-17 effects on whole animals and primary-cultured hepatocytes [J]. *Comp Biochem Physiol: Part C*, 2003, 135: 305–313.
- [21] 李康, 周忠良, 于静, 等. 鲫鱼 (*Carassius auratus*) 卵黄蛋白原的 ELISA 检测 [J]. *中国环境科学*, 2003, 23 (3): 276–280.
- [22] Joseph G K. Serum and egg vitellogenin measurement in the Atlantic cod *Gadus morhua* and its relationship to ovarian development [R]. CMER NOAA/NMFS RESEARCH TOPICS, 1996: 98–103.
- [23] Hartling R C, Pereira J J, Kunkel J G. Characterization of a heat-stable fraction of lipovitellin and development of an immunoassay for vitellogenin and yolk protein in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) [J]. *Experim Zool*, 278 (3): 156–166.
- [24] Holbech H, Andersen L, Petersen G I, et al. Development of an ELISA for Vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Comp Biochem Physiol: Part C*. 2001, 130 (1): 119–131.
- [25] Vázquez-Boucard C, Burgos-Aceves M, Arcos-Ortega F, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for measuring vitellogenin in California halibut (*Paralichthys californicus*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2008, 27 (7): 1614–1620.
- [26] 温茹淑, 方展强, 江世贵, 等. 剑尾鱼卵黄蛋白原的 ELISA 检测 [J]. *环境科学研究*, 2007, 20 (4): 144–149.
- [27] Pacoli C Q, Grizzle J M, Bradley J T. Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish *Ictalurus punctatus* [J]. *Aquaculture*, 1990, 90: 353–367.
- [28] Hoque M M, Takemura A, Takano K. Annual changes in oocyte development and serum vitellogenin level in the rabbitfish *Siganus canaliculatus* (Park) in Okinawa, southern Japan [J]. *Fisheries Science (Japan)*, 1998, 64 (1): 44–51.
- [29] 王友惠, 李云. 瓦氏黄颡鱼血清蛋白磷与性腺发育关系的研究 [J]. *水产科学*, 2004, 23 (10): 5–8.
- [30] Hiramatsu N, Hara A. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin Taimen (*Hucho perryi*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1996, 115A: 243–251.
- [31] Lancaster P M, Tyler C R. Developmental expression and modulation of the vitellogenin receptor in ovarian follicles of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Exp Zool*, 1994, 269: 458–466.
- [32] 赵兵, 刘征涛, 徐章法, 等. E₂ 诱导的鲫鱼 (*Carassius auratus*) 幼

齐茜等：小体鲟血清卵黄蛋白原和 Ca^{2+} 浓度与卵巢发育的关系

QI Qian et al: Effect of ovarian stage on serum Vitellogenin and Calcium in cultured Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*)



图版 I 小体鲟卵巢发育的不同时期

A—卵母细胞的内源生长(卵非常小,细胞质嗜碱性); B—绒毛膜的合成; C—卵黄沉积初期; D—卵黄生成早期; E—卵黄生成中期; F—卵黄生成晚期。Bl: 基膜; Gl: 颗粒层; Gv: 胚泡; Zr-1: 内层放射带; Zr-2: 外层放射带; Gc: 透明带; Pg: 色素颗粒; Tl: 滋养层; Ve: 卵膜; Yp: 卵黄板。标尺=100 μ m。

Plate I Ovarian stages of sterlet sturgeon

A—Oocytes in endogenous growth phase (stage A: smaller oocytes with basophilic cytoplasm; B—vitelline envelope synthesis (higher magnification); C—oocyte at the onset of yolk deposition; D—oocyte in mid-vitellogenesis; E—oocyte in late vitellogenesis; F—oocyte in late vitellogenesis). Bl: basal lamina; Gl: granulosa layer; Gv: germinal vesicle; Zr-1: zona radiata interna; Zr-2: zona radiata externa; Gc: gelatinous coat; Pg: pigment granules; Tl: theca layer; Ve: vitelline envelope; Yp: yolk platelets. Scale bar=100 μ m.

- 鱼血清中卵黄蛋白原和钙含量相关性研究[J]. 环境科学研究, 2006, 19(2): 23-26.
- [33] 李朝军, 刘荣臻, 王浩, 等. 大阪鲫卵黄蛋白原和钙离子关系的初步研究[J]. 水产学报, 1993, 17(4): 297-303.
- [34] Gillespie D K, Peyster Ann de. Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004, 58: 90-95.
- [35] Mugiya Y, Watabe N. Studies on fish scale formation and resorption II: effects of estradiol on calcium homeostasis and skeletal tissue resorption in the goldfish and killfish [J]. Comp Biochem Physiol (Part A), 1977, 57: 197-202.

Effect of ovarian stage on serum Vitellogenin and Calcium in cultured Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*)

QI Qian^{1,2}, ZHANG Ying¹, QU Qiu-zhi¹, SUO Li³, SUN Da-jiang¹

(1. Heilongjiang Fishery Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Haerbin 150070, China; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201300, China; 3. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Sturgeon is an ancient family (*Acipenseridae*) of fishes close to the divergence fish that eventually evolved into terrestrial animals and those which evolved into modern teleost species. An enzyme immunoassay and flame photometry were used to measure the level of serum vitellogenin (Vg) and calcium of sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*), cultured in Fishery Academy of China Sturgeon Propagation of Technology and Engineering Center, Fangshan, Beijing, respectively. The assay, based on polyclonal rabbit and mouse antibody to purified Lv, was tested for specificity and applied on sturgeon broodstocks (age 1-7 years). Serum Vg concentrations were correlated with total serum calcium and stage of ovarian maturity. Females in the previtellogenic ovarian stage and at the onset of yolk deposition had low Vg concentrations, but serum Vg and calcium increased after onset of yolk deposition in the oocytes. During vitellogenesis the oocytes diameter increased from 0.56 mm to 2.01 mm, and the serum Vg levels changed from 110.65 µg/mL to 242.22 µg/mL and the serum Ca²⁺ levels increased from 2.34 mol/L to 2.72 mol/L. Total serum calcium exhibited a linear relationship with serum Vg concentration. Concentrations of both metabolites in serum discriminate previtellogenic and vitellogenic females, but fail to discriminate specific stage of ovarian vitellogenesis. The immunoassay for serum Vg or flame photometry for total plasma calcium can be utilized to segregate vitellogenic females in cultured sterlet sturgeon. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(6): 967-974]

Key words: sterlet; ELISA; serum Vg; serum calcium; ovarian stage