

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01293

## 金鱼胚胎发育过程中免疫相关酶活性及丙二醛含量的变化

孔祥会, 王书平, 江红霞, 聂国兴, 李学军

河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007

**摘要:** 以金鱼(*Carassius auratus*)胚胎为研究对象, 于受精卵发育 24 h 时开始取样, 以后每隔 24 h 分别取正常发育胚胎作为实验样品。采用生物化学方法分别测定金鱼胚胎发育不同时期溶菌酶和过氧化氢酶活性及丙二醛含量。结果显示, 溶菌酶(lysozyme, LSZ)活性在金鱼胚胎发育过程中呈现下降的趋势, 受精后 96 h 胚胎中 LSZ 活性降至最低点, 为 $(0.450 \pm 0.064)$  U/mg; 96 h 和以后的 120 h、144 h 胚胎 LSZ 活性均显著低于 24 h 胚胎 LSZ 活性( $P < 0.05$ )。过氧化氢酶(catalase, CAT)活性在胚胎发育过程中也呈现下降的变化趋势, 96 h、120 h 和 144 h 胚胎 CAT 活性显著低于 24 h 胚胎 CAT 活性( $P < 0.05$ )。而丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量在胚胎发育中呈逐渐增多的趋势, 96 h 后明显增多, 120 h 和 144 h 胚胎 MDA 含量显著高于 24 h 胚胎 MDA 含量( $P < 0.05$ )。金鱼胚胎发育过程中 LSZ 和 CAT 活性逐渐降低是由于这两种母源性的酶在胚胎发育中逐步消耗, 而自身酶合成系统尚未形成所致。CAT 活性降低导致活性氧自由基增多和 MDA 逐渐积累, 说明胚胎发育后期细胞内已发生一定的氧化应激反应。

**关键词:** 溶菌酶; 过氧化氢酶; 丙二醛; 胚胎发育; 金鱼

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1293-06

溶菌酶(lysozyme, LSZ, EC3.2.1.17)是一种十分重要的抗菌物质, 能催化细菌细胞壁的水解, 在鱼类的先天性免疫防御中发挥着十分重要的作用<sup>[1]</sup>。过氧化氢酶(catalase, CAT, EC 1.11.1.6)是生物体内抗氧化防御系统的一种酶, 该酶能催化  $H_2O_2$  转变成  $H_2O$  和  $O_2$ <sup>[2]</sup>, 以消除过氧化氢的损伤效应, 对于维持鱼类细胞的氧化还原状态及对氧化应激的防御起着关键的作用<sup>[3]</sup>。所以, CAT 酶活性变化可以在一定程度上反映鱼体的抗氧化水平。如果 CAT 酶活性降低, 则可能导致脂质过氧化(lipid peroxidation, LPO)的发生。脂质过氧化是细胞膜系统损伤的标志<sup>[4]</sup>, 其终产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量可以间接反映活性氧自由基过剩导致的氧化应激水平<sup>[5]</sup>。

金鱼(*Carassius auratus*)胚胎发育是其个体发育的最初阶段, 也是最为重要的阶段。胚胎发育

质量直接决定其个体存活能力。胚胎发育是其生命周期中最脆弱的时期, 对外界环境变化较为敏感, 维持其一定的抗菌和免疫能力, 对于其正常发育具有重要的作用<sup>[6]</sup>。同时, 胚胎发育过程中生理代谢活动十分活跃<sup>[7]</sup>, 以进行细胞增殖和组织构建等重要生命活动。在代谢过程中产生了大量的活性氧自由基, 其中  $H_2O_2$  就是重要的一种, 及时清除过多的  $H_2O_2$ , 对于胚胎发育具有重要作用, 否则可能导致脂质过氧化, 使 MDA 含量增多。因此, 研究胚胎发育过程中抗菌与抗氧化酶活性变化对于理解胚胎发育过程和代谢调控机制具有重要意义。本研究以金鱼胚胎为研究对象, 研究胚胎发育过程中溶菌酶和过氧化氢酶活性以及脂质过氧化反应产物丙二醛含量的变化, 以此探讨金鱼胚胎发育中一些重要酶的变化规律, 从而理解鱼类胚胎发育过程中自身免疫防护能力的变化和

收稿日期: 2010-11-21; 修订日期: 2011-01-21.

基金项目: 河南省科技厅重点科技攻关计划项目(072102130027); 河南省教育厅高等学校青年骨干教师资助计划(2007); 河南省科技厅水产养殖学重点学科(2009).

作者简介: 孔祥会(1968 - ), 男, 博士, 教授, 主要从事鱼类功能基因和环境响应研究. E-mail: xhkong@htu.cn

形成,同时为指导金鱼的人工繁殖和孵化提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 受精卵和胚胎采集

金鱼亲鱼成熟后,通过人工授精,获取受精卵,随机分为 3 组(即 3 个平行),每集约 600 粒,分别置于含 500 mL 实验用水的培养皿(直径 20 cm,高 3 cm)中。实验用水采用充分曝气的自来水,每 24 h 对实验用水进行更新,每次约更新 3/5。实验期间水温控制在 $(18\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。鱼卵受精 24 h 后开始取样(此时用肉眼能很好地区分出受精卵和未受精卵)。然后间隔 24 h,分别在 48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 时取受精卵 80 粒或胚胎 80 个,用滤纸吸干,置于离心管中,贮存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 中待用。胚胎发育过程中,及时清除未受精卵和异常胚胎。取样时仅取正常发育的受精卵或胚胎。

### 1.2 样品制备

制样时,受精卵或胚胎整体匀浆,按质量体积比 1:4 (g:mL)加入生理盐水,冰浴匀浆, $4^{\circ}\text{C}$ ,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,分装储存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 待测,并于 1 周内测完。

### 1.3 测定方法

**1.3.1 匀浆粗提液蛋白定量** 粗提液蛋白定量参照 Bradford(1976)测定方法<sup>[8]</sup>。以牛血清白蛋白(BSA,购于 AMRESCO 公司)作为标准蛋白。

**1.3.2 溶菌酶活性测定** 参考 Hultmark 等<sup>[9]</sup>和刘睿智等<sup>[10]</sup>的方法 将活化的溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)接种于液体培养基内, $37^{\circ}\text{C}$ 进行摇床培养 48 h 后取出,经 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 0.1 mol/L(pH6.4)无菌磷酸盐缓冲液配成底物悬液( $\text{OD}_{570}\approx 0.3$ ),置于 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。取 3 mL 菌悬液置于冰浴中的试管内,加入 50  $\mu\text{L}$  组织上清液混匀,利用分光光度计,测其 570 nm 处的吸光值,然后将试管于 $37^{\circ}\text{C}$ ,温浴 30 min 后取出,立刻置于冰浴中 10 min,以终止反应,然后测其 570 nm 处的吸光值。以 1 mg 酶粗提液蛋白 1 min 使混合液吸光值降低 0.001 为 1 个酶活

性单位(U/mg)。

**1.3.3 过氧化氢酶活性测定** 采用钼酸铵比色法<sup>[11]</sup>测定 CAT 活性。CAT 活性单位定义 反应体系中,1 min 1 mg 蛋白分解 1  $\mu\text{mol}$  过氧化氢为 1 个酶活性单位(U/mg)。

**1.3.4 丙二醛含量测定** MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法<sup>[12]</sup>,其方法主要是基于膜脂过氧化产物 MDA 可与硫代巴比妥酸(TBA)反应生成红色产物,该物质在 532 nm 处有最大吸收峰。MDA 含量单位为: nmol/mg。

### 1.4 数据处理

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm\text{SD}$ )( $n=6$ , 3 个平行, 2 个重复)表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和  $t$  检验进行统计分析。统计显著性水平设定为  $P=0.05$ 。

## 2 结果与分析

在显微镜下观察,水温 $(18\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下 24 h 时的金鱼胚胎大部分发育到原肠胚期;120 h 时至孵化期,胚胎大量孵化出来;至 144 h 时,胚胎已经全部孵化出来。总之,整个取样过程处于从原肠胚期至刚孵出仔鱼阶段。

### 2.1 溶菌酶活性变化

金鱼胚胎发育过程中 LSZ 活性变化呈现出下降的趋势(图 1)。受精后 24 h 胚胎 LSZ 活性最高,为  $(0.754\pm 0.092)$  U/mg,伴随着胚胎发育的进程,LSZ 活性逐渐减小,96 h 胚胎活性至最低点,为  $(0.450\pm 0.064)$  U/mg,且 96 h 与 24 h 胚胎 LSZ 活性存在显著性差异( $P<0.05$ );从 96 h 开始 LSZ 活性呈略微上升的趋势,至 144 h 时酶活性达到  $(0.539\pm 0.057)$  U/mg,但 96 h、120 h 和 144 h 彼此间没有显著性差异( $P>0.05$ )。

### 2.2 过氧化氢酶活性变化

金鱼胚胎发育过程中 CAT 活性也是呈现下降的趋势(图 2)。受精后 24 h 至 72 h 的金鱼胚胎,尽管其 CAT 活性没有显著的变化( $P>0.05$ ),但受精后 24 h 胚胎 CAT 活性最高,活性为  $(0.032\pm 0.002)$  U/mg,48 h 和 72 h 胚胎的 CAT 活性呈逐渐降低的趋势。96 h 胚胎 CAT 活性为  $(0.027\pm 0.002)$  U/mg,

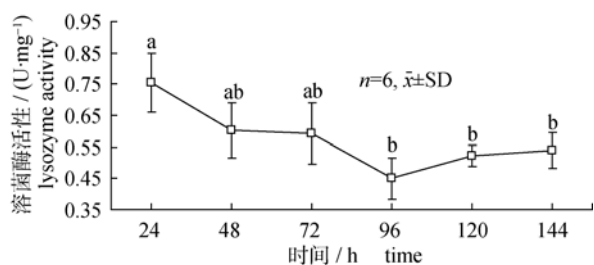


图 1 金鱼胚胎发育过程中溶菌酶活性变化

不同发育时间胚胎溶菌酶活性比较具有显著性差异( $P<0.05$ )时, 用不同英文字母表示; 含有相同英文字母则表示差异不显著( $P>0.05$ )。

Fig. 1 Change of lysozyme activity during embryonic development of *Carassius auratus*

The significant differences among different periods are shown in different letters ( $P<0.05$ ); the same letter appearing in signs refers to no significant difference ( $P>0.05$ ).

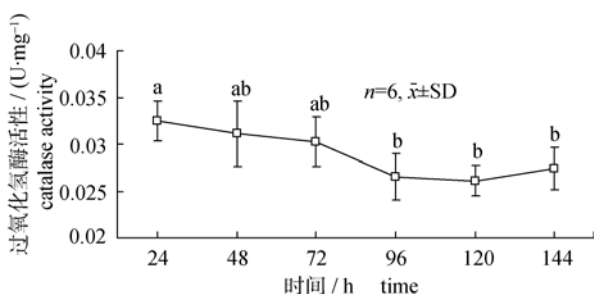


图 2 金鱼胚胎发育过程中过氧化氢酶活性变化

不同英文字母表示不同发育时间胚胎过氧化氢酶活性比较具有显著性差异( $P<0.05$ ); 含相同英文字母则表示差异不显著( $P>0.05$ )。

Fig. 2 Change of catalase activity during embryonic development of *Carassius auratus*

The significant differences among different periods are shown in different letters ( $P<0.05$ ); the same letter appearing in signs refers to no significant difference ( $P>0.05$ ).

与 24 h 胚胎 CAT 活性相比明显降低( $P<0.05$ ), 但与 48 h、72 h 胚胎 CAT 活性相比差异不显著( $P>0.05$ ); 至 120 h 孵化期, CAT 活性为  $(0.026 \pm 0.002)$  U/mg, 与 24 h 胚胎相比, 显著下降 ( $P<0.05$ ), 但与 48 h、72 h 和 96 h 胚胎相比, 差异不显著( $P>0.05$ )。受精后 144 h 的 CAT 活性为  $(0.027 \pm 0.002)$  U/mg, 与受精后 24 h 胚胎 CAT 活性相比变化较明显( $P<0.05$ ), 但与其他各时期 CAT 活性相比没有显著性差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 丙二醛含量变化

金鱼胚胎发育过程中脂质过氧化产物 MDA

含量呈逐渐增多的趋势(图 3)。受精后 24 h 胚胎的 MDA 含量最低, 为  $(0.059 \pm 0.006)$  nmol/mg; 48 h、72 h 和 96 h 的 MDA 含量分别为  $(0.069 \pm 0.008)$  nmol/mg、 $(0.072 \pm 0.009)$  nmol/mg 和  $(0.073 \pm 0.005)$  nmol/mg; 24 ~ 96 h 胚胎 MDA 含量没有显著性差异( $P>0.05$ )。在 120 h 孵化期时, MDA 含量显著上升, 达到  $(0.091 \pm 0.004)$  nmol/mg; 144 h 的 MDA 含量继续升高至  $(0.097 \pm 0.007)$  nmol/mg, 这两个时期的 MDA 含量均显著高于 24 ~ 96 h 各时期( $P<0.05$ )。尽管 144 h MDA 含量比 120 h 略有上升, 但二者间不存在显著性差异( $P>0.05$ )。

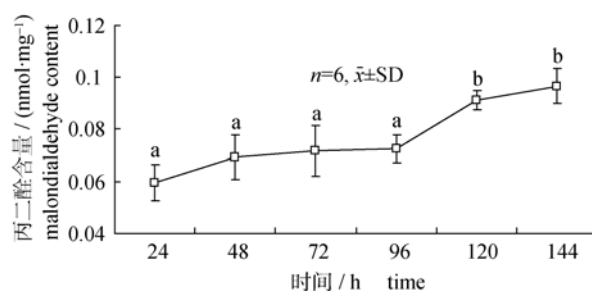


图 3 金鱼胚胎发育过程中丙二醛含量变化

不同英文字母表示不同发育时间胚胎丙二醛含量比较具有显著性差异( $P<0.05$ ); 相同英文字母则表示差异不显著( $P>0.05$ )。

Fig. 3 Changes of MDA content during embryonic development of *Carassius auratus*

The significant differences among different periods are shown in different letters ( $p<0.05$ ); the same letter appearing in different signs refers to no significant difference ( $P>0.05$ ).

## 3 讨论

### 3.1 金鱼胚胎发育过程中 LSZ 活性变化

LSZ 能催化水解细菌细胞壁肽聚糖 N-乙酰氨基葡萄糖与 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4-糖苷键, 并且是一种能抵抗病原菌入侵的先天性免疫分子<sup>[13]</sup>, 这种免疫分子对于鱼类的胚胎发育至关重要<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, 在金鱼胚胎发育过程中, 24 h 胚胎的 LSZ 活性最高, 从 24 h 至 96 h, LSZ 活性逐渐降低, 说明 LSZ 随胚胎发育, 在生理代谢过程中逐渐消耗。这是因为卵母细胞、受精卵和胚胎可能不具有合成溶菌酶分子的能力, 或者合成酶分子的能力十分微弱<sup>[14]</sup>, 所以溶菌酶活性逐渐降低。鱼类胚胎发育中溶菌酶活性变化, 至今还未见相关文

献报道,难以进行相关结果的比较。但已有报道<sup>[15-18]</sup>指出,雌鱼可以将LSZ作为先天性免疫成分传递给后代。96~144 h 胚胎LSZ活性升高,可能原因是:一方面胚胎逐步建立自己的溶菌酶合成系统,溶菌酶合成能力增强;另一方面,胚胎破膜孵出后直接接触外界环境从而诱导溶菌酶活性增加,以增强仔鱼的免疫力。

### 3.2 金鱼胚胎发育过程中CAT活性变化

鱼体有氧代谢过程中会产生活性氧分子(reactive oxygen species, ROS),其中 $H_2O_2$ 就是重要的ROS成员,过多的 $H_2O_2$ 则会导致机体的氧化应激,所以,必须及时清除。本研究中,CAT活性在金鱼胚胎发育过程中呈现下降的趋势,原因可能是,受精卵和胚胎合成CAT能力较弱,母源性CAT在生理代谢中逐渐消耗所致。也可能由于发育过程中基因表达与蛋白质合成旺盛,造成蛋白质含量总体水平升高,从而造成CAT比活下降<sup>[19]</sup>。Díaz等<sup>[19]</sup>研究发现鲟(*Acipenser naccarii*)受精卵发育至破膜孵出这一过程中CAT活性下降,这一研究结果与本研究中金鱼胚胎发育中CAT活性变化的结果是一致的。但Rudneva<sup>[20]</sup>研究发现有些水生动物胚胎发育过程中CAT活性增强,主要是应对活性氧对机体造成的损伤。这一报道与本研究结果不一致,这可能是由于物种种类和实验环境因子差异所致,这一方面还有待于进行更多的研究进行证实。

### 3.3 金鱼胚胎发育过程中MDA含量变化

MDA含量不仅可以间接反映组织细胞脂质过氧化的程度,而且还可以间接反映活性氧自由基产生的数量。本研究发现,金鱼胚胎发育初期(即96 h以前),MDA含量较低,并且彼此间无显著性差异,说明胚胎发育初期,抗氧化能力较强,如CAT活性较高,在胚胎内没有MDA的积累。但96 h以后MDA含量上升比较明显,说明胚胎内已发生氧化应激反应,氧化应激主要是由于生理代谢活动的增强导致ROS的增多,也可以由环境因子胁迫而增多<sup>[21]</sup>。从120 h开始,金鱼胚胎发育进入卵膜破裂阶段,这时生理代谢更为旺盛,产生的活性氧自由基则会增多;同时,刚破膜孵

出的仔鱼与水体环境直接接触,环境因子也会对其产生一定的影响,从而导致ROS增加。ROS增加则会引起脂质过氧化反应及产物MDA增多,这就造成胚胎发育120 h后MDA含量显著高于以前各个时期。Díaz等<sup>[19]</sup>研究发现鲟鱼胚胎发育过程中,其MDA含量也是增加的,与本研究的结果一致。另一方面,也说明随着胚胎发育时间的延长,胚胎内会发生一定的氧化应激反应,从而对胚胎发育产生不利的影响,因此,胚胎发育时间较长时,易于引起胚胎的死亡,如胚胎发育期间,温度的降低,延长了胚胎正常发育时间,即可导致胚胎的死亡率增加,这一现象即可基于本研究结果进行解释。同时,渔业实践中,要避免温度降低所导致的鱼类胚胎孵化时间的延长,对于鱼类胚胎发育要控制在适宜的孵化温度和孵化时间内,从而提高胚胎孵化率、成活率和仔鱼质量。

## 4 结论

本研究发现,在金鱼胚胎发育过程中溶菌酶活性和过氧化氢酶活性逐渐下降,说明金鱼受精卵和胚胎合成溶菌酶和过氧化氢酶能力较弱,胚胎发育中对这种酶的生理需求主要是母源性提供,随发育时间而逐渐消耗,导致96 h左右酶活性逐渐减少。CAT活性减少,说明清除活性氧自由基能力下降,最终导致96 h后MDA含量增加,说明胚胎内已经发生一定的氧化应激反应。所以金鱼胚胎发育96 h时,是胚胎抗菌和抗氧化能力较弱的阶段,应该在这一阶段细心管理和免受各种环境因子的应激,以确保胚胎的正常发育。

## 参考文献:

- [1] Skouras A, Broeg K, Dizer H. The use of innate immune responses as biomarkers in a programme of integrated biological effects monitoring on flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea[J]. Helgol Mar Res, 2003, 57: 190-198.
- [2] Monteiro D A, Rantin F T, Kalinin A L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829)[J]. Ecotoxi-

- cology, 2010, 19: 105–123.
- [3] Cooper R U, Clough L M, Farwell M N, et al. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2002, 279: 1–20.
- [4] 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 126–146.
- [5] Mendes R, Cardoso C, Pestana C. Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test[J]. Food Chem, 2009, 112: 1038–1045.
- [6] Brock J A, Bullis R. Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp[J]. Aquaculture, 2001, 197: 137–159.
- [7] Selman C, McLaren J S, Himanka M J, et al. Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal[J]. Free Radical Biol Med, 2000, 28(8): 1279–1285.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254.
- [9] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, et al. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae *Hyalophoracecropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106(1): 7–16.
- [10] 刘睿智, 郑榕辉, 张纪亮, 等. 苯并(a)芘、三丁基锡及其混合物对褐菖鲉溶菌酶活力的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(2): 253–256.
- [11] 程鲁京, 孟泽. 钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶[J]. 临床检验杂志, 1994, 12(1): 6–8.
- [12] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animals and tissues by thiobarbituric acid reaction[J]. Anal Biochem, 1979, 95(2): 351–358.
- [13] Yazawa R, Hirano I, Aoki T. Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resistance against bacterial diseases [J]. Transgen Res, 2006, 15: 385–391.
- [14] 王志平, 王家庆. 鱼类的母源性免疫及其在水产养殖中的应用[J]. 水产科学, 2010, 29(3): 184–186.
- [15] Swain P, Nayak S K. Role of maternally derived immunity in fish[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27: 89–99.
- [16] Yousif A N, Albright L J, Evelyn T P T. Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*[J]. Dis Aquat Organ, 1991, 10: 45–49.
- [17] Takemura A, Takano K. Lysozyme in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): its purification and some biological properties[J]. Fish Physiol Biochem, 1995, 14(5): 415–421.
- [18] Takemura A. Immunohistochemical localization of lysozyme in the prelarvae tilapia, *Oreochromis mossambicus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 1996, 6: 75–77.
- [19] Díaz M E, Furné M, Trenzado C E, et al. Antioxidant defences in the first life phases of the sturgeon *Acipenser naccarii*[J]. Aquaculture, 2010, 307: 123–129.
- [20] Rudneva I I. Antioxidant system of Black Sea animals in early development[J]. Comp Biochem Physiol, 1999, 122(C): 265–271.
- [21] Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes E M, et al. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois[J]. Mutation Res, 2009, 674: 3–22.

## Changes of the activities of enzymes related to immunity and the content of malondialdehyde during embryonic development of goldfish *Carassius auratus*

KONG Xianghui, WANG Shuping, JIANG Hongxia, NIE Guoxing, LI Xuejun

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

**Abstract:** Embryonic development is a critical period that determines the quality of juvenile fish. Our objective was to determine the mechanisms modulating metabolism during embryonic development in goldfish *Carassius auratus*. A number of key enzymes play an important role during the process of embryonic development, including lysozyme (LSZ) and catalase (CAT), both of which are involved in immunity. Similarly, malondialdehyde (MDA) content reflects the level of lipid peroxidation, which results from the reduction of antioxidant defenses. We collected healthy embryos at several stages following fertilization and measured LSZ and CAT activity and MDA content. LSZ and CAT activity decreased gradually during development of the embryos. LSZ activity was lowest after 96 h, i.e.  $(0.450 \pm 0.064)$  U/mg. Furthermore, LSZ activity was lower at 96, 120, and 144 h than that at 24 h ( $P < 0.05$ ). CAT activity also decreased significantly after 96, 120, and 144 h ( $P < 0.05$ ), relative to levels in 24 h old embryos. In contrast, MDA content increased gradually throughout embryonic development, with the largest increase occurring after 96 h. MDA content was significantly higher after 120 and 144 h than after 24 h ( $P < 0.05$ ). In summary, LSZ and CAT activities gradually decreased during development and were generally significantly lower than initial levels by 96 h. This decrease is likely due to metabolism of maternal enzymes and the poor ability of the embryos to synthesize new enzymes. The decrease in CAT activity likely resulted in a surplus of reactive oxygen species, leading to the accumulation of MDA. Our results suggest that the embryos were subject to certain level of oxidative stress. Furthermore, it appears that the first 96 h of embryonic development is critical in determining the future of embryonic development. Therefore, goldfish embryos should be handled with care during this period to minimize stress. The duration of embryonic development should also be maintained within a suitable range by manipulating temperature because the extension of developmental time will result in oxidative stress and increase the risk of mortality in the embryos.

**Key words:** lysozyme; catalase; malondialdehyde; embryonic development; *Carassius auratus*