

两种颜色栉孔扇贝卵及其早期胚胎磷脂和核酸含量的比较

周丽青, 杨爱国, 刘志鸿, 王清印

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:用钼蓝比色法和紫外分光光度法分别测定栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)两种颜色的卵子及其早期胚胎中磷脂含量和核酸含量, 并进行比较。结果表明, 橘红色卵子的 RNA 含量较浅黄色的略高, 而两种颜色卵子的 DNA 含量却非常相似; 在 2 细胞期, 高受精率的受精卵其 RNA 量迅速增加, DNA 和磷脂含量变化不大, 但低受精率的受精卵相对未受精卵而言, 其 DNA、RNA 和磷脂含量略有降低; 在 32~64 细胞期, 受精率高的胚胎中 DNA 和磷脂含量增加幅度大, RNA 基本保持恒定。磷脂含量与卵子或胚胎的颜色可能有关, 核酸、磷脂含量的变化与受精率高低有关。本实验旨在为鉴定扇贝卵子的质量提供了科学依据。[中国水产科学, 2006, 13(5): 745-748]

关键词:栉孔扇贝; 卵; 早期胚胎; 磷脂; 核酸

中图分类号:Q959.215 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)05-0745-04

磷脂与核酸作为结构性和功能性兼有的活性物质, 在生命活动中具有重要生理功能, 随着生物体生长、发育、衰老和死亡, 体内的磷脂和核酸的含量及其组分会相应地发生变化。扇贝卵子或胚胎内磷脂和核酸等成分在不同种类和不同发育阶段的含量均有所变化, 分析各成分含量可作为鉴定扇贝卵子成熟程度或胚胎发育时期的可靠依据。人工促熟雌性栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)存在两种颜色的性腺, 即橘红色和浅黄色, 它们分别产出相应颜色的卵子。在鱼类如鲑鳟鱼类^[1-3]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)^[4]和江鲈(*Platichthys flesus* L.)^[5]等、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)^[6]、蚕类^[7]和海胆(sea urchin)^[8]中有过生化组分与卵质之间关系的分析, 但多着眼于脂肪含量及组成成分, 或其他营养成分含量分析, 而关于两种颜色栉孔扇贝卵的磷脂和核酸含量与受精率和胚胎发育情况有无关系, 至今未见报道。为此, 笔者对两种颜色栉孔扇贝卵子及其早期胚胎的磷脂和核酸含量进行分析, 旨在为栉孔扇贝亲贝促熟和卵质鉴定提供基础资料和科学依据。但扇贝的卵子和早期胚胎体积都很小, 需大量富集以后才能进行一些生化成分的分离测定, 因此有一定的难度。

1 材料与方法

1.1 材料

2005 年 4 月 10 至 13 日, 栉孔扇贝亲贝取自山东省青岛市志诚水产科技开发有限公司, 其中具有橘红色卵巢的 6 只, 具有浅黄色卵巢的 6 只, 雄性若干只。

1.2 方法

测定参照张韵梅的研究方法^[9]。

(1) 雌贝单只放入 1 个容器中阴干刺激诱导产卵, 雌贝一旦产卵, 立即诱导雄贝排精, 从盛有雌贝容器里取出一些刚产出的卵子, 用 300 目筛绢洗涤, 500 目筛绢富集并移入已称量好的 1.5 mL 离心管中, 瞬时离心, 去除多余的海水。再向容器中剩余的卵子添加精液, 使其受精。所采用的精液属同一批, 质量相同, 因此受精率的高低可反映卵子的质量。在授精约 1 h 后以卵裂为受精标准计算各组的受精率(每组统计近 100 枚受精卵, 重复 3 次)。根据显微镜下所观察的情况, 再以相同的方法富集一些 2 细胞期胚胎和 32~64 细胞期胚胎, 将所获得的卵子和早期胚胎置于液氮罐中保存并运回实验室, 再转移至 -80 ℃ 超低温冰箱中保存。所取卵子和早期胚胎的质量 20~200 mg。

收稿日期: 2005-09-16; 修订日期: 2005-12-30。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2004AA603320-2); 国家科技攻关计划项目(2004BA526B0103)。

作者简介: 周丽青(1974-), 女, 硕士研究生, 从事贝类遗传育种研究。E-mail: zhouliq@ysfri.ac.cn

通讯作者: 杨爱国。E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

(2)分别取两种颜色卵子及它们的早期胚胎,用Mettler Toledo AB 104-N 电子天平(精确度 $d = 0.1 \text{ mg}$)称其鲜重。加入少量预冷的 20% 三氯乙酸(TCA),匀浆。用 10% (TCA) 约 1.5 mL 提取,4 000 r/min 冷冻离心 10 min,倾出离心液,再用 10% TCA 重复提取。

(3)将沉淀用 1.5 mL 预冷的无水乙醇提取 2 次,在冰浴中搅拌成悬浮液,4 000 r/min 冷冻离心 10 min,合并上清液。再用乙醇和乙醚按体积 3:1 混合液 1.5 mL 提取 2 次(从这一步开始可在室温下进行,而以前各步骤要求在 0~4℃ 进行),搅拌离心,合并所有脂溶性的提取物,供测定磷脂用。

(4)将已除去脂溶性物质的沉淀物作为提取 RNA 用,用 1.5 mL 1 mol/L NaOH 溶液使 RNA 降解为核苷酸。在 37℃ 恒温水浴上保温 4~5 h(如果溶解状态不均,则需延长到 8 h),当水解液呈均匀液体时,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液。在 1.5 mL 碱水解液中加入 6 mol/L HCl(按摩尔比为 HCl:NaOH=3:1)750 μL ,加 7.75 mL 水稀释至 NaCl 浓度为 0.15 mol/L,放置冷却,离心,上清液供测定

RNA 用,沉淀供测定 DNA 用。取全部沉淀物,加入 10% 高氯酸(PCA)95℃ 水解 15 min,冷却。

(5)用紫外分光光度法(波长 260 nm)测定 RNA 和 DNA 含量(以湿重计),并计算其 RNA/DNA 值。磷脂含量测定用钼蓝比色法,均用北京普析双光束紫外可见分光光度计 TU-1901 测定。样品中残留的海水会对所测磷脂和核酸的百分含量造成误差,但不会影响结果的分析。

(6)以上提取和测定至少重复 2 次。

1.3 统计分析方法

由于 $n_1 \leq n_2 \leq 10$,采用秩和的检验方法。

2 结果

6 只具有淡黄色卵巢的栉孔扇贝中,有 4 只大量产卵,并能受精,分别命名为 A、B、C 和 D,其中 A、B、C 的受精率都在 90% 以上,D 的受精率只有 55%;6 只具有橘红色卵巢的栉孔扇贝中,有 2 只大量产卵,并能受精,分别命名为 E 和 F,其中 E 的受精率高达 97%,F 的受精率很低,只有 30%。具体情况见表 1。

表 1 两种颜色栉孔扇贝卵子及其早期胚胎的核酸和磷脂湿重含量比较

Tab.1 Phospholipid and nucleic acid content and the fertilization rate in scallop *Chlamys farreri* eggs and their early embryos with two colors

发育期 Stage	项目 Item	淡黄色组 Yellow egg group				橘红色组 Orange egg group	
		A	B	C	D	E	F
卵 Egg	受精率/% Fertilization rate	93	90	92	55	30	97
	RNA/%	0.77±0.11	0.68±0.20	0.81±0.18	0.82±0.21	0.99±0.05	1.22±0.17
	DNA/%	0.23±0.03	0.27±0.07	0.24±0.05	0.23±0.05	0.22±0.06	0.27±0.09
	RNA/DNA	3.30±0.67	2.54±0.48	3.39±0.77	3.61±0.53	4.52±0.36	4.55±0.51
	磷脂/% Phospholipid	0.25±0.08	0.25±0.04	0.21±0.07	0.21±0.03	0.54±0.10	0.63±0.09
2 细胞期 2-cell stage	RNA/%	1.25±0.15	1.41±0.09	1.14±0.12	0.63±0.19	0.99±0.21	—
	DNA/%	0.21±0.05	0.25±0.07	0.25±0.08	0.15±0.10	0.18±0.09	—
	RNA/DNA	5.84±0.44	5.63±0.37	4.54±0.51	4.09±0.60	5.49±0.46	—
	磷脂/% Phospholipid	0.22±0.07	0.37±0.12	0.22±0.02	0.19±0.08	0.49±0.16	—
32~64 细胞期 32-64 cell stages	RNA/%	—	1.43±0.09	—	0.98±0.13	0.93±0.07	1.03±0.13
	DNA/%	—	0.36±0.11	—	0.25±0.03	0.29±0.04	0.37±0.09
	RNA/DNA	—	4.02±0.71	—	3.98±0.66	3.20±0.45	2.79±0.58
	磷脂/% Phospholipid	—	0.85±0.10	—	0.35±0.08	0.65±0.05	1.13±0.06

注:从液氮罐中把样品转移至超低温冰箱时,部分样品因离心管冻裂而缺失,因此 A 和 C 中都缺失了 32~64 细胞期胚胎样品,F 中缺失了 2 细胞期胚胎的样品。

Note: Some samples were lost from the broken eppendorf tubes while they were transferred from the liquid nitrogen tank to the ultra-low temperature freezer, so the embryo samples of 32 or 64-cell stage were absent in group A and C, the embryo samples of two cell stage were absent in group F.

经秩和检验($\alpha=0.05$)结果表明,橘红色卵子的RNA含量较浅黄色的略高,而两种颜色卵子的DNA含量却非常相似,因此橘红色卵子中RNA/DNA值较淡黄色的明显要高;两种颜色卵子的磷脂含量总体上是有显著性差异的,淡黄色卵子磷脂含量基本相似,橘红色卵子中的磷脂含量远远高于淡黄色的。

卵子受精后开始卵裂,在2细胞期,高受精率的受精卵其RNA量迅速增加,尤其浅黄色受精卵的RNA量增幅明显,其DNA和磷脂含量变化并不大,但低受精率的受精卵相对未受精卵而言,其DNA、RNA和磷脂含量甚至略有降低。因此,RNA/DNA值整体呈上升趋势;在32~64细胞期,受精率高的胚胎其DNA和磷脂含量增加幅度大,RNA基本保持在卵裂刚开始的水平上,RNA/DNA值又呈下降趋势。分析结果表明,两种颜色的卵子均能成熟,并可以受精,且两者的受精能力和孵化率没有本质区别,磷脂含量可能与卵子或胚胎的颜色有关,而核酸和磷脂含量的变化与受精率高低明显相关。

3 讨论

3.1 胚胎发育过程中核酸与磷脂含量的变化

成熟未受精卵中磷脂及核酸的含量明显低于受精卵,这可能是由于扇贝卵子受精后,胚胎逐渐形成,各种生化反应都被启动,尤其在蛋白激酶/蛋白磷酸酶对蛋白质合成、基因转录和翻译等调控后,控制细胞的增殖、分化、分泌和代谢等活动^[10]。卵内底物(如甘油、乙醇胺、ATP、磷酸乙醇胺等)生物合成磷脂,DNA复制并大量转录,使其磷脂和核酸含量明显高于未受精卵^[11]。在受精率低的2个组受精卵中核酸和磷脂含量增加不明显,甚至在2细胞期时略有降低,表明这2个组的卵子中有部分质量较差。加入精子后,质量差的卵子不能受精,磷脂和核酸含量没有增加,相对受精卵,磷脂和核酸含量略有降低。但Mes-Hartree等^[12]在研究爪哇卵、受精卵和胚胎中总磷含量、磷脂含量、中性脂与极性脂比例以及总的脂肪酸组成时并未发现不同阶段中的各参数间有显著差异。说明不同物种中决定卵子质量的因素可能不同。

3.2 颜色与磷脂和核酸含量的关系

产两种颜色卵的亲贝都是在室内池塘人工培育下促熟的,饵料种类基本一致,投喂量的计算是相同的,估计出现两种颜色的性腺和卵子,可能与种质有

关,即雌性扇贝的生殖腺和卵子本身就存在有橘红色和淡黄色两种性状。据观察,雌性扇贝性腺的颜色并不能完全区分为淡黄色和橘红色两种,而是在这两种颜色中由浅到深呈连续性变化。分析结果认为,淡黄色卵子的RNA含量和磷脂含量均较橘红色卵子为低,说明卵子和胚胎的颜色深浅可能与RNA和磷脂含量有关,橘红色卵子内含有大量的RNA,并翻译出合成磷脂的相关蛋白质。

3.3 成熟扇贝卵中物质积累与卵子质量的关系

卵细胞在成熟过程中,积累了大量的蛋白质、脂肪、多糖、核酸等物质,这些营养物质将在受精和胚胎发育中起作用,它们含量的多少和质量可能与卵子后续胚胎发育的优劣及苗种的质量密切相关。目前鉴定卵子质量可采用卵径、卵粒重和卵细胞中物质的多少作为衡量指标^[13]。室内池塘人工培育促熟的亲贝是经过严格筛选的,其个体年龄、大小和活力基本一致,加之它们所产的卵子太小,成熟后又直接排入到海水中,要测量并区分其卵径和卵粒质量难度较大且不准确。因此,期望采用物质含量的多少来鉴定卵质,所选用的物质都参与卵细胞生长发育过程中的代谢活动,并作为胚胎发育的营养物质,对于卵子质量的鉴定有理论意义。姜作发等^[1]对两种颜色虹鳟卵的氨基酸、脂肪酸含量进行比较,殷名称等^[3]研究了江鳊在卵和卵黄囊期仔鱼发育阶段生化成分的变化;马爱军等^[4]比较大菱鲆雌鱼在产卵盛期和晚期卵子卵径、卵粒质量、中性脂肪、磷脂等水平和孵化率等多方面因子,都未能真正寻找到鉴定卵子质量的标准。扇贝卵细胞中丰富的磷脂和核酸为贝类性腺发育和卵子的成熟提供重要的营养和结构组分,本实验结果表明磷脂和核酸含量的变化确实与卵子质量相关。但要建立一个简便易行的卵质鉴定指标尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 姜作发,刘永,卢彤岩,等.两种颜色虹鳟卵氨基酸、脂肪酸含量的比较[J].大连水产学院学报,2004,19(4):306-308.
- [2] 姜作发,卢彤岩,刘永,等.不同饲料对虹鳟卵中矿物质、维生素含量及胚胎发育的影响[J].吉林农业大学学报,2004,26(2):220-222,225.
- [3] 刘伟,王昭明,石连玉,等.虹鳟、金鳟亲鱼成熟群体卵质比较研究[J].水产学杂志,2000,13(2):9-13.
- [4] 马爱军,雷霖霖,陈四清,等.大菱鲆产卵季节对卵子的生物学及生化特征的影响[J].海洋与湖泊,2002,33(1):75-82.
- [5] 殷名称,哈维SM,佩克JCA.江鳊在卵和卵囊期仔鱼发育阶

- 段生化成分的变化[J]. 动物学报, 1993, 39(3): 272-279.
- [6] 罗文, 赵云龙, 王群, 等. 光照对红螯螯虾繁殖性能及其受精卵卵质的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(6): 675-681.
- [7] 李玉平, 宋广林, 肖乃康, 等. 桑树叶面喷施磷钾肥对原蚕产卵量及卵质的影响[J]. 北方农业, 2004, 25(100): 20-21.
- [8] Deguchi K, Kawashima S, Li I, et al. Water-soluble lipoproteins from yolk granules in sea urchin eggs. II. Chemical composition [J]. J Biochem(Tokyo), 1979, 85(6): 1519-1525.
- [9] 张韵梅. 测定昆虫卵巢内核酸、蛋白质等含量的方法研究[J]. 山东农业大学学报, 1987, 18(4): 49-54.
- [10] 陈大元. 受精生物学——受精机制与生殖工程[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 276-315.
- [11] 唐顺明, 张有微, 朱祥瑞, 等. 柞蚕催青期胚胎发育阶段的卵磷脂含量[J]. 中国蚕业, 2001, 22(4): 63-64.
- [12] Mes-Hartree M, Armstrong J B. Lipid composition of developing *Xenopus laevis* embryos[J]. Can J Biochem, 1976, 54(6): 578-582.
- [13] 温海深, 曹克卿, 王亮, 等. 辽河鲌种群生殖调节机制研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 53-57.

Comparison of phospholipid and nucleic acid content in scallop *Chlamys farreri* eggs and their early embryos with two colors

ZHOU Li-qing, YANG Ai-guo, LIU Zhi-hong, WANG Qing-yin

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The content change of phospholipid and nucleic acid in scallop *Chlamys farreri* eggs with two different colors and their early embryos were mensurated by molybdenum blue spectrophotometry and ultra-violet spectrophotometry respectively, and were compared at the same time. The result showed that the content of RNA in orange eggs was higher than that in yellow eggs; while the content of DNA in two different colors eggs was quite similar; eggs began division after fertilization, at two-celled stage, the RNA content of zygotes with higher fertilization rate grew faster, while the DNA and phospholipid content only varied a little, in those zygotes with lower developing rate, the DNA, RNA and phospholipid content even reduced a little; at 32 or 64-cell stage, the content of DNA and phospholipid in embryos with higher fertilization rate grew faster, while the RNA content kept constant. Though there is only some relation between the content of phospholipid and the colors of eggs and embryos, the content change of nucleic acid and phospholipid is connected with the fertilization rate. The result of this experiment could offer reliable data for identifying eggs quality. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 745-748]

Key words: *Chlamys farreri*; eggs; early embryos; phospholipid; nucleic acid