

中国科技核心期刊
中文核心期刊

ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

第36卷

VOL. 36

第5期 NO. 5

2015

中国水产科学研究院黄海水产研究所
中国水产学会
科学出版社

主办
出版

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(海洋水产研究更名为渔业科学进展)

第 36 卷 第 5 期

2015 年 10 月

中国科技核心期刊

中文核心期刊

全国优秀农业期刊

中国水产核心期刊

中文科技期刊数据库来源期刊

中国期刊全文数据库(CJFD)来源期刊

中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊

中国科技论文统计源期刊

中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊

中国生物学文献数据库来源期刊

英国《动物学记录》(ZR)收录期刊

《水科学和渔业文摘》(ASFA)收录期刊

目 录

研究论文

- 转录因子 *Runx2* 和 *Osterix* 在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)早期发育阶段的时序性表达分析 (1) 马 骞 庄志猛 冯文荣 柳淑芳
- 流沙湾水产养殖区浮游动物群落特征 (8) 郭永坚 李俊伟 罗昭林 颀晓勇 陈素文 朱长波 郭奕惠
- 黄海中南部狮子鱼种类的分析 (19) 杨 涛 单秀娟 陈云龙 戴芳群 周志鹏
- 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌(*Culter alburnus*)的生物学参数估算 (26) 张燕萍 吴 斌 方春林 陈文静 贺 刚 傅培峰 周辉明 王 生 俞泽溪
- 基于 BP 人工神经网络的大沽河湿地海水水质综合评价 (31) 徐 勇 赵 俊 过 锋 乔向英 张 艳 陈聚法
- 波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)的胚胎发育及初孵仔鱼的形态观察 (38) 陈猛猛 骆 剑 陈国华 文 鑫 吴光灿 李文深 韩玉龙
- 摄食豆豉对星斑川鲮(*Platichthys stellatus*)幼鱼肝脏蛋白表达的影响 (45) 宋志东 王际英 李培玉 乔洪金 张利民 郝甜甜
- 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)丝氨酸蛋白酶 I -1 基因多态性 (55) 付瑞雪 周纳宇 刘金相 王旭波 贺 艳 张全启 于海洋
- 滁州鲫(*Carassius auratus*)线粒体全基因组序列分析及系统进化 (63) 胡玉婷 胡 王 江 河 凌 俊 段国庆 潘庭双
- 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)组织样品常温保存液的筛选和优化 (71) 陈大恭 黄 捷 王海亮 李 晋
- 洪泽湖野生河蚬(*Corbicula fluminea*)线粒体 CO I 基因序列的遗传多样性分析 (81) 李大命 张彤晴 唐晟凯 钟立强 刘小维
- 吠喃西林代谢产物在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)体内的消除规律及其对代谢酶活性的影响 (87) 李东利 李 健 常志强 孙 铭 王 莹 葛红星
- 海星棘皮投喂仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)的效果 (95) 吴志宏 孙元芹 刘天红 李 晓 李红艳 王 颖
- 饲料中添加 3 种不同投入品对筏式浅海网箱刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖生长的影响 (102) 郝继光 王印庚 廖梅杰 李 彬 崔 浩 许 燕 邹安革 张 振
- 蓬菜玉参(*Apostichopus* sp.)体壁的营养成分分析及评价 (111) 刘长琳 王有廷 秦 搏 阮飞腾 陈四清 燕敬平 赵法箴 刘春胜 崔恒全
- 两种三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)养殖塘中浮游细菌的季节变化 (119) 陈逸斐 韦 梦 裘琼芬 蒋霞敏 王春琳
- 大海马(*Hippocampus kuda* Bleeker)幼体口吻部骨骼形态观察及其对摄食的影响 (126) 王子晖 徐永健 李 响
- 一株海洋中性蛋白酶高产菌 S-3685 的鉴定及产酶条件 (131) 马子宾 郑鸿飞 刘均忠 郝建华 孙 谧
- 基于 PIV 技术的方形网箱二维流场分析 (138) 崔 勇 关长涛 赵 侠 刘 超 黄 滨 李 娇
- 大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)鱼皮的营养成分分析 (145) 姜晓东 李红艳 王 颖 吴志宏 刘天红 李 晓 孙元芹
- 表面活性效应下强力霉素伏安行为及其检测 (151) 张旭志 刘文文 丁东生 郭萌萌 赵 俊 曲克明
- 通告
- 《渔业科学进展》图表的写作要求 (158)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.36 No.5 October 2015

- Temporal Expression of Transcription Factors *Runx2* and *Osterix* During Early Development of *Cynoglossus semilaevis* MA Qian, ZHUANG Zhimeng, FENG Wenrong, LIU Shufang (1)
- Characteristics of Zooplankton Community in Aquaculture Areas of Liusha Bay GUO Yongjian, LI Junwei, LUO Zhaolin, XIE Xiaoyong, CHEN Suwen, ZHU Changbo, GUO Yihui (8)
- Analysis of Liparidae Species in Central and Southern Yellow Sea YANG Tao, SHAN Xiujian, CHEN Yunlong, DAI Fangqun, ZHOU Zhipeng (19)
- The Estimation of Biological Parameters for *Culter alburnus* in the Waterway Connecting the Poyang Lake and the Yangtze River ZHANG Yanping, WU Bin, FANG Chunlin, CHEN Wenjing, HE Gang, FU Peifeng, ZHOU Huiming, WANG Sheng, YU Zexi (26)
- Integrated Quality Assessment of Dagu River Wetland Sea Water Based on Back Propagation (BP) Artificial Neural Network XU Yong, ZHAO Jun, GUO Feng, QIAO Xiangying, ZHANG Yan, CHEN Jufa (31)
- Embryonic Development and Morphologic Observations of Newly-Hatched *Cheilinus undulatus* Larvae CHEN Mengmeng, LUO Jian, CHEN Guohua, WEN Xin, WU Guangcan, LI Wenshen, HAN Yulong (38)
- Effects of Soy Peptide on Protein Expression in Liver of Juvenile Starry Flounder (*Platichthys stellatus*) SONG Zhidong, WANG Jiyong, LI Peiyu, QIAO Hongjin, ZHANG Limin, HAO Tiantian (45)
- The Polymorphism of Serine Protease I-1 in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) FU Ruixue, ZHOU Nayu, LIU Jinxiang, WANG Xubo, HE Yan, ZHANG Quanqi, YU Haiyang (55)
- Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of Chuzhou Crucian Carp (*Carassius auratus*) HU Yuting, HU Wang, JIANG He, LING Jun, DUAN Guoqing, PAN Tingshuang (63)
- Selection and Optimization of Simple and Convenient Sample Solutions for Shrimp Tissue Preservation at Normal Temperature CHEN Datian, HUANG Jie, WANG Hailiang, LI Jin (71)
- Genetic Diversity of Wild *Corbicula fluminea* Population in the Hongze Lake Analyzed by Mitochondrial DNA CO I Gene Sequence LI Daming, ZHANG Tongqing, TANG Shengkai, ZHONG Liqiang, LIU Xiaowei (81)
- The Elimination Rules of Nitrofurazone Metabolites and Its Effects on Activities of Metabolic Enzymes in *Fenneropenaeus chinensis* LI Dongli, LI Jian, CHANG Zhiqiang, SUN Ming, WANG Ying, GE Hongxing (87)
- The Effects of Asterias Echino-Skin as Additive Component of the Feed on *Apostichopus japonicus* WU Zhihong, SUN Yuanqin, LIU Tianhong, LI Xiao, LI Hongyan, WANG Ying (95)
- The Effects of Three Types of Feed Supplements on the Growth of *Apostichopus japonicus* Cultured in Cages HAO Jiguang, WANG Yingeng, LIAO Meijie, LI Bin, CUI Hao, XU Yan, ZOU Ange, ZHANG Zhen (102)
- Analysis and Evaluation of Nutrient Composition in the Body Wall of Penglai Sea Cucumber (*Apostichopus* sp.) LIU Changlin, WANG Youting, QIN Bo, RUAN Feiteng, CHEN Siqing, YAN Jingping, ZHAO Fazhen, LIU Chunsheng, CUI Hengquan (111)
- The Seasonal Variations of Bacterioplankton in Two Types of Ponds of *Portunus trituberculatus* CHEN Yifei, WEI Meng, QIU Qiongfeng, JIANG Xiamin, WANG Chunlin (119)
- The Skeletal Morphology of Snout Tube and Its Effect on Feeding of Juvenile Yellow Seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker WANG Zihui, XU Yongjian, LI Xiang (126)
- Identification of a Marine Bacterium S-3685 with High Neutral Protease and Optimization of Its Fermentation Conditions MA Zibin, ZHENG Hongfei, LIU Junzhong, HAO Jianhua, SUN Mi (131)
- Analysis of Two-Dimension Flow Field of the Square Cage Based on Particle Image Velocimetry (PIV) CUI Yong, GUAN Changtao, ZHAO Xia, LIU Chao, HUANG Bin, LI Jiao (138)
- The Analysis of Nutrient Components of *Oncorhynchus keta* Skin JIANG Xiaodong, LI Hongyan, WANG Ying, WU Zhihong, LIU Tianhong, LI Xiao, SUN Yuanqin (145)
- Voltammetric Behaviour of Doxycycline in the Presence of Surfactant and Its Determination ZHANG Xuzhi, LIU Wenwen, DING Dongsheng, GUO Mengmeng, ZHAO Jun, QU Keming (151)

转录因子 *Runx2* 和 *Osterix* 在半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 早期发育阶段 的时序性表达分析*



马 骞 庄志猛^① 冯文荣 柳淑芳

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 转录因子 *Runx2* 和 *Osterix* 在高等脊椎动物骨骼发育的调控过程中具有重要作用。本研究以 *Runx2* 和 *Osterix* 基因作为研究对象, 利用实时荧光定量 PCR 技术分析了两个转录因子在半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 成鱼的组织表达分布及其在早期发育阶段的表达水平变化。研究结果显示, *Runx2* 和 *Osterix* 在半滑舌鲷成鱼的 13 个组织中具有较广泛的分布, 并在脾组织中表达量最高, 在背鳍、脑等组织中次之, 在肝、肠、胃等组织中仅有微弱的表达。在半滑舌鲷早期发育阶段(卵期、仔鱼、稚鱼和幼鱼), *Runx2* 和 *Osterix* 的时序性表达特征如下: 1) 孵化前, *Runx2* 在卵裂期与原肠期的表达水平最高, 在胚胎期最低, 而 *Osterix* 表达水平呈逐渐升高的趋势并在胚胎期达到最大值, 表明两个基因功能作用的起始可能存在一定的时序性; 2) *Runx2* 和 *Osterix* 在 1-5 日龄仔鱼阶段的表达水平均呈现先升高后降低的趋势, 而在 10-90 日龄稚、幼鱼阶段未呈现特定的变动规律, 表达量在一定范围内呈波动变化; 3) 相关性分析结果显示, 两个基因的表达量在孵化后(1-90 日龄)存在显著的相关性。研究结果表明, *Runx2* 和 *Osterix* 基因可能共同参与半滑舌鲷早期发育阶段生长发育调控, 但其与骨骼发生、发育的相关性有待进一步研究。

关键词 半滑舌鲷; *Runx2* 基因; *Osterix* 基因; mRNA 表达; 早期发育阶段

中图分类号 S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0001-07

锌指蛋白(Zinc finger protein)、Runt 结构蛋白(Runt-domain protein)、HLH 蛋白(HLH protein)、亮氨酸拉链蛋白(Leucine zipper protein)等多种转录因子在哺乳动物成骨细胞增殖和分化过程中发挥着决定性作用(Aubin *et al*, 1996; 孙海飏等, 2009)。而不同类型细胞的分化途径也受到各自细胞谱系特异性转录因子的调控(Yamaguchi *et al*, 2000)。Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, *Runx2*) 又称核心结合因子 a1 (Core-binding factor a1, *CBFA1*), 是 Runt 结构域基因家族的转录因子(Nakashima *et al*,

2002; Nishimura *et al*, 2008)。已有研究表明, *Runx2* 在哺乳动物成骨细胞发育、分化及骨形成等过程中发挥着重要作用(Otto *et al*, 1997)。*Runx2* 基因纯合性缺失的小鼠表现出完全的成骨缺失(Komori *et al*, 1997)。此外, *Runx2* 基因缺失的小鼠其膜内骨化和软骨骨化均不能发生(Enomoto *et al*, 2004)。*Osterix* 作为哺乳动物骨形成所必需的成骨细胞特异性转录因子, 其编码产物为特异蛋白 7 (Specific protein 7, Sp7)。高等脊椎动物的 *Osterix* 主要表达于成骨细胞, 并且在成骨细胞分化晚期阶段起着决定性作用(Nakashima

* 国家自然科学基金(31201981)和中国博士后科学基金(2013M531658)共同资助。马 骞, E-mail: maqian@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 庄志猛, 研究员, E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-10-23, 收修改稿日期: 2014-12-10

et al, 2002)。例如, *Osterix* 基因敲除后小鼠完全缺乏骨, 而软骨发育正常, 可见 *Osterix* 作为决定成骨细胞定向的主导因子, 在调控成骨细胞的分化和增殖方面具有重要作用。Oh 等(2012)通过对软骨内骨化过程进行研究, 发现 *Osterix* 同样是软骨细胞分化为成骨细胞过程中的关键调控因子。此外, *Osterix* 对小鼠骨形成过程的调控涵盖了从胚胎期到出生后的不同发育阶段(Nishio et al, 2006)。

Nakashima 等(2002)报道, *Osterix* 缺失的小鼠可表达正常水平的 *Runx2*, 而在敲除 *Runx2* 基因的小鼠中, *Osterix* 的转录产物没有在骨骼元件中检测到, 由此可推测, *Osterix* 在 *Runx2* 的下游来控制成骨细胞分化。Nishio 等(2006)通过进一步研究证实, *Runx2* 通过与 *Osterix* 启动子区域 DNA 片段的特异性结合进而完成对 *Osterix* 的调节。由此可见, 上述两个转录因子在调控高等脊椎动物骨骼发生、发育的过程中密切相关。目前, 鱼类 *Runx2* 和 *Osterix* 的遗传学特征及功能研究鲜见报道, 两个转录因子在鱼类生长发育的调控过程, 尤其在骨骼发生、发育过程中是否发挥作用也有待深入研究。

鱼类早期发育过程中, 鱼体的形态特征、生态和生理变化相当剧烈。本研究所选择的卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期 4 个发育时期, 是鱼类数量最大、死亡最多、数量变化率最高的敏感时期(陈大刚, 1991; Blaxter et al, 1974)。鲽形目鱼类作为真骨鱼类的特化群, 其在从胚后仔鱼发育成长为稚鱼期间都会经历一个特殊的变态发育过程。伴随着发育过程中外部形态与游泳方式的改变, 鱼体的骨骼形态和位置亦发生显著变化。而鱼类的骨骼作为鱼体的基本结构之一, 其发生发育过程与个体的发育密不可分。鱼类早期发育阶段中骨骼的发生、发育决定了鱼类的游泳方式、游泳速度及摄食行为等生态习性。因此, 研究鱼类早期生长发育的调控机制, 尤其是骨骼发生、发育的调节机制, 对揭示其早期发育阶段的功能趋向及环境适应具有重要的理论意义和实践价值。

本研究选取半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)这一名贵的海水增养殖对象作为研究鱼类, 分析 *Runx2* 和 *Osterix* 基因在半滑舌鳎成鱼中的组织表达分布特征, 并进一步探讨两个转录因子 mRNA 在早期发育阶段(卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期)的表达水平变化规律及二者的相关性, 以期揭示两个转录因子在半滑舌鳎早期发育阶段的调节作用, 亦可为发掘鱼类骨骼发育的潜在调控因子奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

基因克隆和组织表达检测用半滑舌鳎取自山东莱州明波水产养殖有限公司, 取健康 3 龄鱼 12 尾(雌、雄鱼各 6 尾)。其中, 雌鱼体长、体重分别为(583.0±61.3) mm、(1479.2±280.8) g; 雄鱼为(333.3±14.3) mm、(170.3±16.9) g。解剖并分别取其脑、吻软骨、背鳍、鳃、性腺、心、肠、肾、肝、肌肉、脾、脊髓及胃共计 13 个组织, 立即将样品投入液氮中速冻, 在低温状态下转移至-80℃超低温冰箱中保存待用。此外, 根据陈大刚(1991)和万瑞景等(2004)对半滑舌鳎等鱼类早期发育阶段的划分标准, 选取用于早期发育阶段 *Runx2* 和 *Osterix* 基因表达水平分析用的半滑舌鳎样品(表 1)。上述样品均保存于液氮中用于后续总 RNA 的提取。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

将半滑舌鳎成鱼的组织样品和不同发育阶段的全鱼样品在液氮中研磨后, 利用 TRIzol 法(Invitrogen)提取总 RNA。经检测浓度和纯度, 以提取的总 RNA 为模板, 利用 PrimeScript RTase 试剂盒(TaKaRa)合成第一链 cDNA。

1.3 引物设计

根据本实验室前期克隆的半滑舌鳎 *Runx2* 和 *Osterix* 基因的 cDNA 全序列(GenBank 登录号: KC422342、KC422343), 设计用于实时荧光定量 PCR 检测的引物(*Runx2*-RT-F/R、*Osx*-RT-F/R), 引物序列信息见表 2。

1.4 *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 的组织分布及其在早期发育阶段的表达水平检测

应用实时荧光定量 PCR 的方法, 利用基因特异性引物 *Runx2*-RT-F/R 和 *Osx*-RT-F/R(表 2), 以半滑舌鳎第一链 cDNA 为模板, 检测 *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 在半滑舌鳎成鱼的组织分布以及不同发育阶段的表达变化。如表 2 所示, 分别选取延伸因子(Elongation factor 1-alpha, EF1A)和 18S 核糖体 DNA(18S ribosomal DNA, 18S)基因作为荧光定量 PCR 的内参基因(Ma et al, 2015)。实验流程参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒(TaKaRa)操作说明, 在 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪上进行。所有引物均经过扩增效率检测($E > 90\%$, $R^2 > 0.990$), 荧光定量 PCR 产物经测序验证, 每个样品设置 3 个重复。

表 1 早期发育阶段半滑舌鲷样品
Tab.1 Samples of *C. semilaevis* during the early developmental stages

取样 Sampling	卵期 Eggs				仔鱼期 Larvae		稚鱼期 Juvenile	幼鱼期 Fingerling
	卵裂期 Cleavage stage	原肠期 Gastrula stage	胚胎期 Embryonic stage	孵化期 Hatching stage	前期仔鱼 Early-stage larvae	后期仔鱼 Late-stage larvae		
时间 Time	3 hpf	13 hpf	22 hpf	32 hpf	1, 2 dph	3, 4, 5, 10 dph	20, 30, 40, 50 dph	90 dph
数量 Number	20 粒	20 粒	20 粒	20 粒	6 尾	6 尾	6 尾	6 尾

注: hpf 为受精后时龄; dph 为孵化后日龄
Note: hpf: Hours post-fertilization; dph: Days post-hatching

表 2 本研究所用的引物序列
Tab.2 Oligonucleotide primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	应用 Amplification target
Runx2-RT-F Runx2-RT-R	GTTTCAGTCCGCCGTCCAATAGC TGAAGGCAGGACCGAACAGAGAA	<i>Runx2</i> 的荧光定量 PCR 检测 Expression of <i>Runx2</i>
Osx-RT-F Osx-RT-R	CCCAGGACCCGTCTCTCTTA AGTTGGTGTGGAGTGGACG	<i>Osterix</i> 的荧光定量 PCR 检测 Expression of <i>Osterix</i>
EF1A-F EF1A-R	GACAAACTGAAGGCHGAGCG CAGCCTGAGAGGTTCCAGTGAT	mRNA 组织表达分布的内参 Expression of <i>EF1A</i>
18S-F 18S-R	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC CCAATTACAGGGCCTCGAAAG	早期发育阶段 mRNA 表达水平检测的内参 Expression of 18S

1.5 数据处理

根据荧光实时定量 PCR 测得的 C_t 值, 运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *Runx2* 和 *Osterix* 基因在半滑舌鲷的组织分布及其在早期发育阶段的 mRNA 表达模式。本研究所有结果均以平均值±标准误差(Mean±SD)表示, 并利用 SPSS 16.0 软件中的 One-Way ANOVA 分析 *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 表达量在各发育阶段间差异显著水平; 利用皮尔逊相关系数(R)指示两个基因在早期发育阶段 mRNA 表达量变动规律的相关性。

2 结果与分析

2.1 *Runx2* mRNA 的组织表达分布及其在早期发育阶段的表达水平

利用实时荧光定量 PCR 技术检测半滑舌鲷成鱼 *Runx2* mRNA 的组织表达分布。结果显示, *Runx2* mRNA 具有较广泛的组织分布特性, 并在脾组织中表达量最高, 其次在鳃、背鳍、脑有中等水平的表达, 在胃、肠和肝组织中有微弱表达(图 1)。半滑舌鲷脾组织中 *Runx2* 的 mRNA 表达水平可达胃、肠组织的 128 倍。

如图 2 所示, *Runx2* mRNA 在半滑舌鲷胚胎发育阶段的卵裂期和原肠期(3-13 hpf)具有较高的表达量

(1.00-1.17); 从胚胎发育的胚胎期(22 hpf)到 5 日龄仔鱼这一发育阶段, *Runx2* 的表达水平总体呈现先升高后降低的趋势; 在 10-90 日龄发育时期, *Runx2* 的表达量在中等表达水平上下波动(0.38±0.16)。在本研究的所有取样时间点, 半滑舌鲷 *Runx2* 在原肠期(13 hpf)表达量最高, 而在胚胎期(22 hpf)的 mRNA 表达水平最低, 原肠期的表达量约为胚胎期的 25 倍。差异显

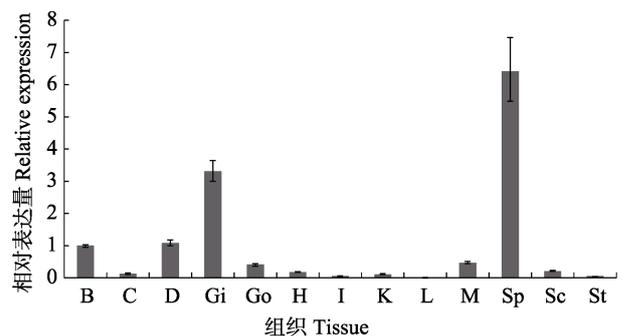


图 1 半滑舌鲷 *Runx2* mRNA 的组织表达分布
Fig.1 The expression of *Runx2* mRNA in various tissues of *C. semilaevis*

B: 脑; C: 吻软骨; D: 背鳍; Gi: 鳃; Go: 性腺; H: 心; I: 肠; K: 肾; L: 肝; M: 肌肉; Sp: 脾; Sc: 脊髓; St: 胃
B: Brain; C: Cartilage; D: Dorsal fin; Gi: Gill; Go: Gonad; H: Heart; I: Intestine; K: Kidney; L: Liver; M: Muscle; Sp: Spleen; Sc: Spinal cord; St: Stomach

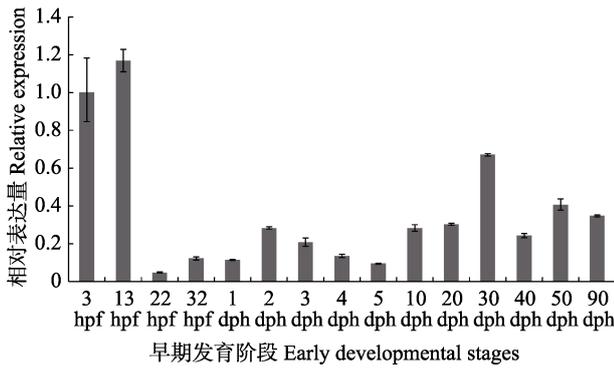


图2 *Runx2* mRNA 在半滑舌鲷早期发育阶段的表达水平
Fig.2 The *Runx2* mRNA expression level during the early developmental stages of *C. semilaevis*

hpf: 受精后时龄; dph: 日龄

hpf: Hours post-fertilization; dph: Days post-hatching

著性分析结果表明, *Runx2* mRNA 在卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期这 4 个早期发育阶段中的表达水平无显著差异。

2.2 *Osterix* mRNA 的组织表达分布及其在早期发育阶段的表达水平

如图 3 所示, 半滑舌鲷 *Osterix* mRNA 在脾组织中具有极高的表达水平, 其次在脊髓、性腺、背鳍、吻软骨、脑和肌肉有较低水平的表达, 在其余 6 个组织中表达量微弱。半滑舌鲷脾组织中 *Osterix* 的 mRNA 表达水平约为脊髓等组织的 17 倍。

在半滑舌鲷早期发育阶段中的卵期, *Osterix* mRNA 在卵裂期(3 hpf)、原肠期(13 hpf)表达量最低, 而在胚胎期(22 hpf)的表达量最高, 胚胎期的表达水

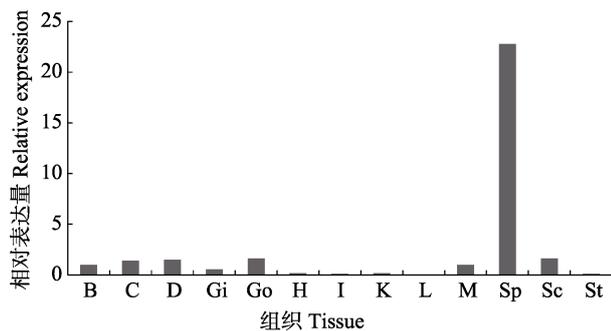


图3 半滑舌鲷 *Osterix* mRNA 的组织表达分布
Fig.3 The expression of *Osterix* mRNA in various tissues of *C. semilaevis*

B: 脑; C: 吻软骨; D: 背鳍; Gi: 鳃; Go: 性腺; H: 心; I: 肠; K: 肾; L: 肝; M: 肌肉; Sp: 脾; Sc: 脊髓; St: 胃
B: Brain; C: Cartilage; D: Dorsal fin; Gi: Gill; Go: Gonad; H: Heart; I: Intestine; K: Kidney; L: Liver; M: Muscle; Sp: Spleen; Sc: Spinal cord; St: Stomach

平约为胚胎发育早期(卵裂期、原肠期)的 16 倍; 从胚胎发育的孵化期(32 hpf)到 5 日龄仔鱼这一发育阶段, *Osterix* 的表达水平总体呈现先升高后降低的趋势; 在 10 日龄之后, *Osterix* mRNA 表达量在不同发育时期波动较大(36.31 ± 13.62)。此外, 30 日龄幼鱼中 *Osterix* 的表达量是各早期发育阶段中的最大值, 其次分别为 10 日龄仔鱼及胚胎期受精卵。差异显著性分析结果表明, *Osterix* mRNA 在卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期这 4 个早期发育阶段中的表达水平无显著差异。

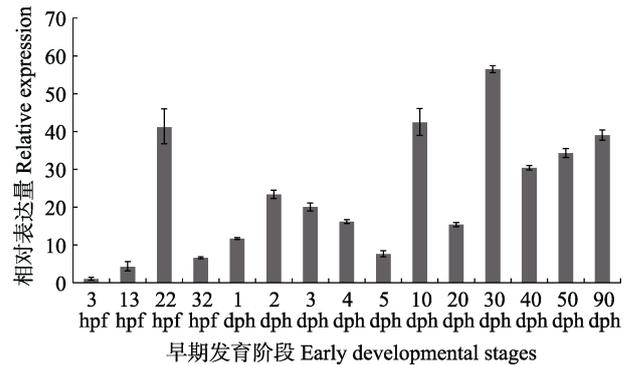


图4 *Osterix* mRNA 在半滑舌鲷早期发育阶段的表达水平
Fig.4 The *Osterix* mRNA expression level during the early developmental stages of *C. semilaevis*

hpf: 受精后时龄; dph: 日龄

hpf: hours post-fertilization; dph: days post-hatching

2.3 早期发育阶段中 *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 表达水平的变动规律

在半滑舌鲷早期发育阶段的不同时期, *Runx2* 和 *Osterix* 两个基因的表达水平存在一定的变动规律。首先, 在卵期的 4 个发育时期, *Runx2* 在卵裂期(3 hpf)与原肠期(13 hpf)的表达水平最高, 在胚胎期(22 hpf)最低; 而 *Osterix* 与之相反, 其在胚胎期表达量最高, 在卵裂期与原肠期最低。在 1-5 日龄仔鱼中, *Runx2* 和 *Osterix* 的表达水平均呈现先升高后降低的趋势, 而在 10 日龄后的稚、幼鱼中, *Runx2* 和 *Osterix* 的 mRNA 表达量未呈现特定的变动规律, 而是在一定范围内波动变化。通过对 *Runx2* 和 *Osterix* 基因在早期发育阶段的表达水平进行相关性分析, 结果表明两个基因的表达量在孵化后(1-90 日龄)存在显著的相关性($R=0.78, P=0.001$)。

3 讨论

Runx2 和 *Osterix* 被认为是高等脊椎动物骨发育和细胞成骨分化的两个关键转录因子(Nakashima *et al*,

2002; Nishimura *et al*, 2008)。近年来, 国内外学者针对哺乳动物 *Runx2* 的功能及作用机制开展了大量研究。例如, 敲除 *Runx2* 基因的小鼠出生后, 因没有肋骨导致呼吸困难而死亡(Gersbach *et al*, 2004); 而过表达 *Runx2* 能够促进细胞的成骨分化, 并有效提高新骨生成的速度和数量(Phillips *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2006)。此外, 大鼠骨髓间充质干细胞在成骨分化过程中 *Runx2* 的表达水平上调(胡晓青等, 2014)。由此可见, *Runx2* 的表达水平可影响成骨细胞分化和发育进程。在小鼠的不同发育阶段中, *Runx2* 的表达起始于胚胎发育第 9.5 天的脊索处, 在大约 13.5 d 时表达于软骨膜/骨膜处(Otto *et al*, 1997)。此后, *Runx2* 高水平的表达于所有骨的成骨细胞中, 包括软骨内成骨和膜内成骨方式所形成的骨中(Ducy *et al*, 1997; Inada *et al*, 1999)。

目前, 有关鱼类 *Runx2* 基因的相关研究十分有限。罗在礼(2011)¹⁾采用显微注射的方式将外源 *Runx2* 导入斑马鱼单细胞胚胎并观察融合蛋白的荧光表达, 结果表明, 融合质粒从 8 hpf 开始表达。此外, *Runx2* 基因在胸鳍部位的表达始于孵化后 2 日龄, 并且表达部位位于鳍条分化处(van der Meulen *et al*, 2005)。上述研究结果表明, *Runx2* 可能参与调控鱼类早期生长发育, 尤其是骨骼的发生、发育过程。因此, 本研究克隆了半滑舌鲷 *Runx2* 基因的 cDNA 序列并分析其早期发育阶段的表达水平。研究结果表明, 半滑舌鲷 *Runx2* 在卵裂期、原肠期胚胎(3–13 hpf)中具有最高水平的表达, 随后其表达水平显著降低, 表明 *Runx2* 基因很有可能在半滑舌鲷胚胎发育的早期阶段具有重要作用。此外, *Runx2* 在半滑舌鲷 1–5 日龄仔鱼的表达水平呈先升高后降低的趋势, 这与 Iimura 等(2012)在金鱼(*Carassius auratus*)中的研究相似, 即 *Runx2* 表达量在 1–3 日龄逐渐升高。

脊椎动物的生长发育过程受到不同层次多基因的协同调控。因此, 尽管 *Runx2* 在调控哺乳动物的生长发育过程, 尤其是成骨细胞分化早期, 发挥了十分重要的正向调控作用, 但其成骨细胞的最终成熟过程由 *Osterix* 主导(Liu *et al*, 2001; Zhang, 2012)。即 *Runx2* 与 *Osterix* 在骨发育的不同时期起作用。例如, Li 等(2009)根据骨骼标志基因表达的时序将斑马鱼骨骼发育分成 3 个有重叠的时期(Flores *et al*, 2006; Marks, 1989): 1)早期分化表达, *Runx2* 在斑马鱼软骨和骨骼原始细胞中的表达; 2)中期分化表达, 以 *Osterix* 起始表达为标志; 3)成熟期分化表达, *colla2* 和 *osn* 表

达。此外, *Osterix* 在调控过程中存在于 *Runx2* 的下游, 其功能仍受到 *Runx2* 的控制。在斑马鱼早期发育阶段, *Runx2* 的表达逐渐由头骨区域向其他骨骼部位扩展, 其表达常常也预示着 *Osterix* 和其他骨基质基因的表达(Li *et al*, 2009)。因此, *Osterix* 在鱼类早期发育阶段的表达可能晚于 *Runx2* 基因。

如图 2、图 4 所示, *Osterix* 在半滑舌鲷胚胎发育过程中高表达水平的出现晚于 *Runx2*, 即 *Runx2* 的表达水平在卵裂期(3 hpf)和原肠期(13 hpf)最高, 随后在胚胎期(22 hpf)显著降低; 而 *Osterix* 在胚胎期(22 hpf)之前, 其表达水平呈逐渐升高的趋势, 并在胚胎期达到最大值。由此可推测, 半滑舌鲷 *Runx2* 和 *Osterix* 在调节胚胎发育的过程中, 其功能作用的起始也存在一定的时序性, *Runx2* 的功能行使主要起始于卵裂期、原肠期; 而 *Osterix* 在胚胎发育阶段的表达滞后于 *Runx2*。而相关性分析结果表明, 在半滑舌鲷孵化后的仔、稚、幼鱼阶段, *Runx2* 和 *Osterix* 基因的 mRNA 时序性表达规律趋于一致并且显著相关, 表明上述两个转录因子的相互作用可能在孵化后逐渐趋于稳定, 二者协同参与鱼类早期发育阶段生长发育的调控。

此外, *Runx2* 和 *Osterix* 基因在半滑舌鲷成鱼不同组织的分布模式也极其相似, 二者均具有较广泛的分布而非特异性地表达于骨组织中(图 1、图 3)。尽管大量研究表明, *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 特异性地表达于骨组织中, Jeong 等(2008)报道了 *Runx2* 基因在人类非骨骼组织(脑、精子)中的表达, 表明该转录因子还可能参与生殖调控等其他内分泌调节过程。半滑舌鲷 *Runx2* 和 *Osterix* 基因在脾脏中极高水平的表达, 揭示了两个因子在其他生长内分泌调控中的潜在功能。

已有研究表明, *Runx2* 和 *Osterix* 的表达受到其他基因的调控。例如, 骨形态发生蛋白(BMPs)家族中的 BMP2、BMP4/7 异源二聚体和 BMP7 均可激活 *Runx2* 的表达(Kundu *et al*, 2002)。此外, BMP 2 也能同时诱导骨源性及非骨源性细胞的 *Osterix* 表达上调(Celil *et al*, 2005; Lee *et al*, 2003)。由此可见, 脊椎动物的骨骼发育是个复杂而有序、并受到多个细胞因子精密调控的过程, 参与调控作用的各细胞因子之间也存在一定的相互作用(Soltanoff *et al*, 2009)。因此, 骨骼发育关键调控基因的选取及其结构与功能分析可为揭示鱼类早期骨骼发生、发育的调控机制提供线索。本研究选取的 *Runx2* 和 *Osterix* 基因可能在半滑舌鲷早期发育阶段具有一定的调控作用, 并且二者之

1) 罗在礼. 外源 p204 和 cbfa1 对斑马鱼胚胎发育和骨生成的影响. 山东大学硕士研究生学位论文, 2011

间在表达水平上存在一定的相关性。然而,上述两个基因在半滑舌鳎成鱼中具有较为广泛的组织表达分布,并且在软骨组织中的 mRNA 表达水平较低。因此, *Runx2* 和 *Osterix* 是否与半滑舌鳎早期骨骼发生、发育有关,还有待通过进一步的原位杂交和功能分析进行验证。

参 考 文 献

- 万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鳎早期形态及发育特征. 动物学报, 2004, 50(1): 91-102
- 孙海飏, 刘强, 郭敏锋, 等. 神经递质 P 物质通过调控转录因子 *Osterix* 的表达促进成骨细胞分化. 西安交通大学学报, 2009, 30(6): 716-719
- 陈大刚. 黄渤海渔业生态学. 北京: 海洋出版社, 1991, 35-40
- 胡晓青, 张辛, 代岭辉, 等. 骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 *Runx2* 的表观遗传学修饰. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(2): 150-155
- Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds). Principles of Bone Biology. San Diego: Academic Press, 1996, 51-67
- Blaxter JHS, Ehrlich KF. Change in behaviour during starvation of herring and plaice larvae. The Early Life History of Fish, 1974, 575-588
- Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. J Cell Biochem, 2005, 95(3): 518-528
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell, 1997, 89(5): 747-754
- Enomoto H, Furuichi T, Zanma A, et al. Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. J Cell Sci, 2004, 117(3): 417-425
- Flores MV, Lam EYN, Crosier P, et al. A hierarchy of Runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish. Dev Dynam, 2006, 235(11): 3166-3176
- Gersbach CA, Byers BA, Pavlath GK, et al. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype. Exp Cell Res, 2004, 300(2): 406-417
- Iimura K, Tohse H, Ura K, et al. Expression patterns of Runx2, *sparc*, and *bgp* during scale regeneration in the goldfish *Carassius auratus*. J Exp Zool, B: Mol Dev Evol, 2012, 318(3): 190-198
- Inada M, Yasui T, Nomura S, et al. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. Dev Dyn, 1999, 214(4): 279-290
- Jeong JH, Jin JS, Kim HN, et al. Expression of Runx2 transcription factor in non-skeletal tissues, sperm and brain. J Cell Physiol, 2008, 217(2): 511-517
- Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell, 1997, 89(5): 755-764
- Kundu M, Javed A, Jeon JP, et al. *Cbfb* interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. Nat Genet, 2002, 32(4): 639-644
- Lee MH, Kwon TG, Park HS, et al. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. Biochem Biophys Res Comm, 2003, 309(3): 689-694
- Li N, Felber K, Elks P, et al. Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation. Dev Dynam, 2009, 238(2): 459-466
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, et al. Overexpression of *Cbfa1* in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. J Cell Biol, 2001, 155(1): 157-166
- Ma Q, Zhuang ZM, Feng WR, et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression during early development processes of the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Acta Oceanologica Sinica, 2015, DOI: 10.1007/s13131-015-0725-5
- Marks SC. Osteoclast biology: lessons from mammalian mutations. Am J Med Gen, 1989, 34(1): 43-54
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell, 2002, 108(1): 17-29
- Nishimura R, Hata K, Ikeda F, et al. Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. J Bone Miner Metab, 2008, 26(3): 203-212
- Nishio Y, Dong Y, Paris M, et al. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. Gene, 2006, 372: 62-70
- Oh JH, Park SY, de Crombrughe B, et al. Chondrocyte-specific ablation of Osterix leads to impaired endochondral ossification. Biochem Biophys Res Comm, 2012, 418(4): 634-640
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell, 1997, 89(5): 765-771
- Phillips JE, Guldberg RE, Garcia AJ. Dermal fibroblasts genetically modified to express Runx2/Cbfa1 as a mineralizing cell source for bone tissue engineering. Tissue Eng, 2007, 13(8): 2029-2040
- Soltanoff CS, Chen W, Yang S, et al. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression, 2009, 19(1): 1-46
- Van der Meulen T, Kranenbarg S, Schipper H, et al. Identification and characterisation of two runx2 homologues in zebrafish with different expression patterns. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2005, 1729(2): 105-117

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*, 2000, 21(4): 393–411

Zhang X, Yang M, Lin L, *et al.* Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose-

derived stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79(3): 169–178

Zhang C. Molecular mechanisms of osteoblast-specific transcription factor Osterix effect on bone formation. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2012, 44(5): 659–665

(编辑 冯小花)

Temporal Expression of Transcription Factors *Runx2* and *Osterix* During Early Development of *Cynoglossus semilaevis*

MA Qian, ZHUANG Zhimeng^①, FENG Wenrong, LIU Shufang

(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Transcription factors *Runx2* and *Osterix* play a vital role in the formation and differentiation of the skeleton in mammals. To date, there have been few reports on the regulatory mechanisms of the skeleton development in fish. In this study, we cloned the cDNA sequences of *Runx2* and *Osterix* in *Cynoglossus semilaevis*, and examined their expression patterns in 13 tissues of both female and male adults using qRT-PCR. The results showed that *Runx2* and *Osterix* mRNA were highly expressed in spleen, and moderately expressed in dorsal fin and brain. Next we detected and measured the levels of *Runx2* and *Osterix* mRNA at early developmental stages including the egg, larva, juvenile and fingerling stages. The temporal expression patterns are: 1) the mRNA level of *Osterix* was always significantly higher than *Runx2* during all developmental stages in this study; 2) at stages prior to hatching, the highest level of *Runx2* was observed in the cleavage and gastrula stages and then it dropped to a very low level, and the *Osterix* mRNA level increased and reached the peak in the embryonic stage; 3) at early larvae stages (1–5 days old), the expression of both *Runx2* and *Osterix* first increased followed by a decline; 4) as for the 10–90 day-old fish, there was no variation in the expression pattern of *Runx2* or *Osterix* mRNA. These results suggested that *Runx2* and *Osterix* could participate in the regulation of early development in *C. semilaevis*. However, further studies are needed to explore their roles in the skeleton development.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; *Runx2*; *Osterix*; mRNA expression; Early developmental stages

① Corresponding author: ZHUANG Zhimeng, E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

流沙湾水产养殖区浮游动物群落特征*



郭永坚 李俊伟 罗昭林 颀晓勇 陈素文 朱长波^① 郭奕惠

(中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300)

摘要 于2012年5月–2013年1月对流沙湾海区浮游动物进行了周年性的季度调查,共检出浮游动物41种、幼体17类,以桡足类居多(29种)。亚强次真哲水蚤(*Subeucalanus subcrassus*)、短尾类幼虫(*Brachyuran larva*)、长尾幼体(*Macruran larva*)在四季均有出现,并在3个季度中成为优势种。年均浮游动物丰度和生物量分别为48.12 ind./m³、13.43 mg/m³。扇贝主养区、鱼类网箱养殖区和珍珠贝养殖区的各季浮游动物丰度及生物量均低于对照区(非养殖区);大中型浮游动物主要出现在对照区,而在鱼、贝养殖区极少出现。冬季扇贝主养区多样性指数为各区最高,其浮游动物丰度、生物量迅速回升,高于鱼类网箱养殖区和珍珠贝养殖区,但仍低于对照区。研究结果显示,鱼、贝养殖区域流沙湾海区的浮游动物丰度及生物量比往年明显减小,浮游动物的小型化加剧。

关键词 流沙湾;浮游动物;扇贝;网箱;主成分分析

中图分类号 Q178.53 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0008-11

流沙湾地处广东省雷州半岛西南部(22°21′–22°31′N, 109°47′–110°1′E),海湾面积约69 km²,为北西向葫芦型半封闭海湾,腰部南北向的沙嘴将港湾分为内港与外港。内港为泄湖,港口宽750 m,树枝状港汊呈长尖形峡湾,中央为深10–20 m、长8 km的溺谷状深槽,底质多为砾石和砂;外港水域广阔,水深达5–20 m,底质多为淤泥(谢恩义等,2009)。流沙湾拥有大面积的海草床、珊瑚礁和红树林(杨国欢等,2013),是我国海水珍珠贝苗和海水珍珠的重要生产基地,也是我国“南珠”的主产区之一(梁飞龙等,2007)。然而,随着珍珠贝养殖业的持续衰退,流沙湾海域水产养殖结构已发生明显变化:2008年前主要以马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)为主(申玉春等,2010),其桩式延绳吊养面积高达1250 hm²;2012年调查显示,马氏珠母贝养殖面积剧降至272 hm²,墨西哥湾扇贝(*Argopecten irradians concentricus*)养殖面积则达到1132 hm²,网箱养殖面积为67.5 hm²(网箱数量超过4×10⁴个,且密布于湾口航道处)。

浮游动物通常具有生活史短、代谢活动强、分布

广泛等特点,对海洋环境的扰动非常敏感,是海洋生态系统长期变化的重要指示(Hays *et al.*, 2005; Beaugrand, 2009)。研究表明,水产养殖活动会对浮游动物群落产生重要影响(杜萍等,2011; Rey *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2012)。对流沙湾开展的环境调查时间主要集中于2005–2009年,且主要侧重于营养盐(王大鹏等,2011; 王增焕等,2011; 谢群等,2011)、浮游植物(程小倪等,2011; 张才学等,2012; 王大鹏等,2010)等,对浮游动物群落特征的研究则仅见于王彦等(2013)和张才学等(2013)的报道。在流沙湾养殖格局发生剧烈变化的背景下,对浮游动物群落结构展开研究,将有助于揭示流沙湾鱼贝养殖区浮游动物群落的生态学基本规律,并为该区域的水产养殖规划提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 采样站点的设定

分别于2012年5月(春季)、8月(夏季)、11月(秋

* 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-48)和广东省海洋渔业科技推广专项(A201101A06; Z201502)共同资助。
郭永坚, E-mail: gyjdxh@scsfri.ac.cn

^① 通讯作者:朱长波,副研究员, E-mail: changbo@ecowin.org

收稿日期:2014-10-27, 收修改稿日期:2014-11-26

季)及 2013 年 1 月(冬季)对流沙湾内港、外港进行季度性采样调查, 图 1 中数字 1-10 代表采样站位。

其中, 外港采样点为 1-7 号站位, 包括邻近扇贝吊养区(墨西哥湾扇贝)的 2、3、6、7 号站位, 作为对照区的 4、5 号站位, 以及外港最邻近港口的 1 号站位。8-10 号站位属于内港采样区: 8 号站位为港口航道内狭长的网箱(鱼排)养殖区, 10 号站位位于内港深处的珍珠贝插桩养殖区, 9 号站介于 8、10 之间。其中, 网箱(鱼排)主要养殖品种有卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)、紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)、石斑鱼(*Epinephelus* sp.)等。

1.2 浮游动物的采集与分析

浮游动物样品的采集与定量均按照《海洋调查规范 GB17763.7-2007》(中华人民共和国国家标准, 2007a)。定性样品采用浅水Ⅲ型浮游生物网自海底向海面垂直拖曳, 定量样品则用有机玻璃采水器收集表层及底层的水样(各 1L)进行混合, 现场经 5%浓度的福尔马林固定后, 于倒置显微镜下进行定量及定性分析。

物种多样性指数(H')采用 Shannon-Wiener 计算公式(Shannon *et al.*, 1963): $H' = -\sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$; 均匀度指数(J')采用 Pielou(1966)计算公式: $J' = H'/\log_2 S$; 优势度(Y)计算公式(孙军等, 2004): 为 $Y = (n_i/N) \cdot f_i$ 。

式中, s 为物种数, p_i 为第 i 物种在全部采样中的比例, n_i 为第 i 种的个体数, N 为所有种的个体总数, S 为样品种类总数, f_i 为第 i 种在各站点的出现频率。 $Y > 0.02$ 视为优势种。 N 为样品中所有总个体数。

1.3 环境因子的采集与分析

海水中溶氧(DO)、水温(T)、盐度(S)和 pH 采用美国 YSI-556 型多参数水质测量仪现场监测; 透明度(SD)采用 Secchi 盘测定。

营养盐水样经 -20°C 暂存后, 迅速带回实验室进行分析。其中, $\text{NO}_2\text{-N}$ 采用萘乙二胺分光光度法, $\text{NH}_4\text{-N}$ 采用次溴酸盐氧化法, $\text{NO}_3\text{-N}$ 采用铈-镉还原法, 活性磷酸盐($\text{PO}_4\text{-P}$)采用磷钼蓝分光光度法测定, TP 和 TN 采用过硫酸钾氧化法测定。以上方法均按照《海洋调查规范 GB17763.4-2007》(中华人民共和国国家标准, 2007b)指定方法进行。叶绿素 a (Chlorophyll- a , 简称为 Chl- a)和颗粒有机物(POM)样品分别采用丙酮萃取法(方志山等, 2007)和灼烧称重法(李振国等, 2006)测定。

1.4 数据处理和分析

图表采用 Origin 8.5 绘制。环境因子与浮游动物群落结构多样性的关系采用 CANOCO 4.5 软件进行分析。各季所有站点的环境因子数据及浮游动物丰度值除 pH 外均进行 $\lg(x+1)$ 转换。用于分析的浮游动物种类满足在各位点出现的频度 > 3 , 且在至少一个站点的相对丰度 $> 1\%$ (吕晋等, 2008)。满足上述筛选条件的物种按照拼音顺序编号, 并进行除趋势对应分析(DCA), 在此基础上, 对群落进行主成分分析(PCA)并绘制物种-样方双序图。采用 SPSS 20.0 对全年的浮游动物丰度、生物量及所有环境因子进行相关性分析, 依照 Pearson 相关系数两两比较, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性水平。

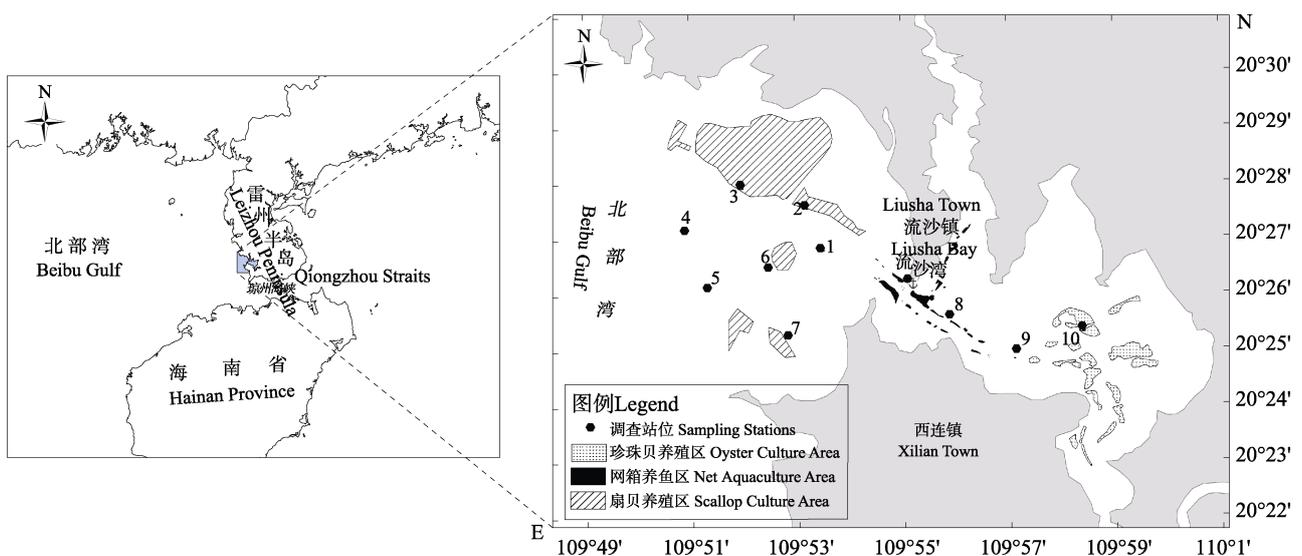


图 1 流沙湾采样站位

Fig.1 Sampling stations in Liusha Bay

2 结果

2.1 浮游动物的种类组成及丰度变化

调查结果显示, 2012–2013年流沙湾浮游动物共计7类41种, 各种幼体(包括鱼卵和仔鱼)17类。浮游动物以桡足类最多(29种), 尤以哲水蚤科为主, 其种类超过10属。十足类、毛颚类、枝角类分别为4、3、2种, 介形类、端足类、水母类各1种(表1)。

浮游动物丰度整体水平较低, 且具有明显的季节特征, 春夏两季平均水平相对较高(除对照区外, 丰度 $< 80 \text{ ind/m}^3$), 秋冬两季较低(丰度 $< 60 \text{ ind/m}^3$)。整体而言, 外港浮游动物丰度高于内港。对照区(4、5号站位)的浮游动物丰度普遍高于其他采样区域, 尤其在春夏两季; 春夏两季, 扇贝主养区(3号站位)的浮游动物丰度低于对照区和其他养殖区(图2)。

浮游动物生物量呈现明显的季节分化, 冬春两季相对较高(分别为 $8.58\text{--}31 \text{ mg/m}^3$, $12.58\text{--}68.02 \text{ mg/m}^3$),

表1 流沙湾浮游动物名录
Tab.1 Species list of zooplankton in the Liusha Bay

种类 Species	种类 Species	种类 Species	种类 Species
桡足类	Copepoda	端足类	Amphipoda
红眼纺锤水蚤	<i>Acartia erythraea</i>	螺赢蜚	<i>Corophium</i> sp.
刺尾纺锤水蚤	<i>Acartia spinicauda</i>	十足类	Decapoda
针刺拟哲水蚤	<i>Paracalanus aculeatus</i>	糠虾	<i>Mysidacea</i> sp.
强额拟哲水蚤	<i>Paracalanus crassirostris</i>	毛虾	<i>Acetes</i> sp.
小拟哲水蚤	<i>Paracalanus parvus</i>	汉森莹虾	<i>Lucifer hanseni</i>
海洋伪镖水蚤	<i>Pseudodiaptomus marinus</i>	宽额假磷虾	<i>Pseudeuphausia latifrons</i>
伪镖水蚤	<i>Pseudodiaptomus</i> sp.	枝角类	Cladocera
驼背隆哲水蚤	<i>Acrocalanus gibber</i>	肥胖三角溞	<i>Pseudevadne tergestina</i>
微驼隆哲水蚤	<i>Acrocalanus gracilis</i>	鸟喙尖头溞	<i>Penilia avirostris</i>
长角隆哲水蚤	<i>Acrocalanus longicornis</i>	幼体	Larvae
中华哲水蚤	<i>Calanus sinicus</i>	鱼卵	Fish eggs
孔雀丽哲水蚤	<i>Calocalanus pavo</i>	仔鱼	Fish larva
微刺哲水蚤	<i>Canthocalanus pauper</i>	桡足类幼体	Copepod larva
瘦尾胸刺水蚤	<i>Centropages tenuiremis</i>	莹虾幼体	Lucifer larva
弓角基齿哲水蚤	<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	长尾幼体	Macruran larva
精致真刺水蚤	<i>Euchaeta concinna</i>	长尾类无节幼虫	Nauplius larva (Macruran)
真刺水蚤	<i>Euchaeta</i> sp.	无节幼虫	Nauplius larva
真刺唇角水蚤	<i>Labidocera euchaeta</i>	蛇尾幼体	Ophiopluteus larva
瘦新哲水蚤	<i>Neocalanus gracilis</i>	棘皮动物幼体	Ectinodermata larva
细长腹剑水蚤	<i>Oithona attenuatus</i>	多毛类幼体	Polychaeta larva
筒长腹剑水蚤	<i>Oithona simplex</i>	磁蟹幼体	Porcellana larva
筒角水蚤	<i>Pontellopsis</i> sp.	小乌贼	Small cuttle fish
长刺小厚壳水蚤	<i>Scolecithricella longispinosa</i>	口足类幼体	Stomatophora larva
亚强次真哲水蚤	<i>Subeucalanus subcrassus</i>	长尾类溞状幼虫	Zoea larva (Macruran)
锥形宽水蚤	<i>Temora turbinata</i>	端足类幼体	Amphipoda Larva
钳形歪水蚤	<i>Totanus (Totanus) forcipatus</i>	异尾幼虫	Anomuran larva
驼背大眼剑水蚤	<i>Corycaeus gibbus</i>	藤壶幼体	Balanus larva
近缘大眼水蚤	<i>Corycaeus affinis Mcmurrichi</i>	短尾类幼虫	Brachyuran larva
强额孔雀水蚤	<i>Pavocalanus crassirostris</i>	腔肠动物辐射幼虫	Coelenterate actinula
水母类	Medusae	毛颚动物	Chaetognatha
球形侧腕水母	<i>Pleurobrachia globosa</i>	肥胖软箭虫	<i>Flaccisagitta enflata</i>
介形类	Ostracoda	百陶带箭虫	<i>Zonosagitta bedoti</i>
针刺真浮蜉	<i>Euconchoecia aculeata</i>	箭虫	<i>Zonosagitta</i> sp.

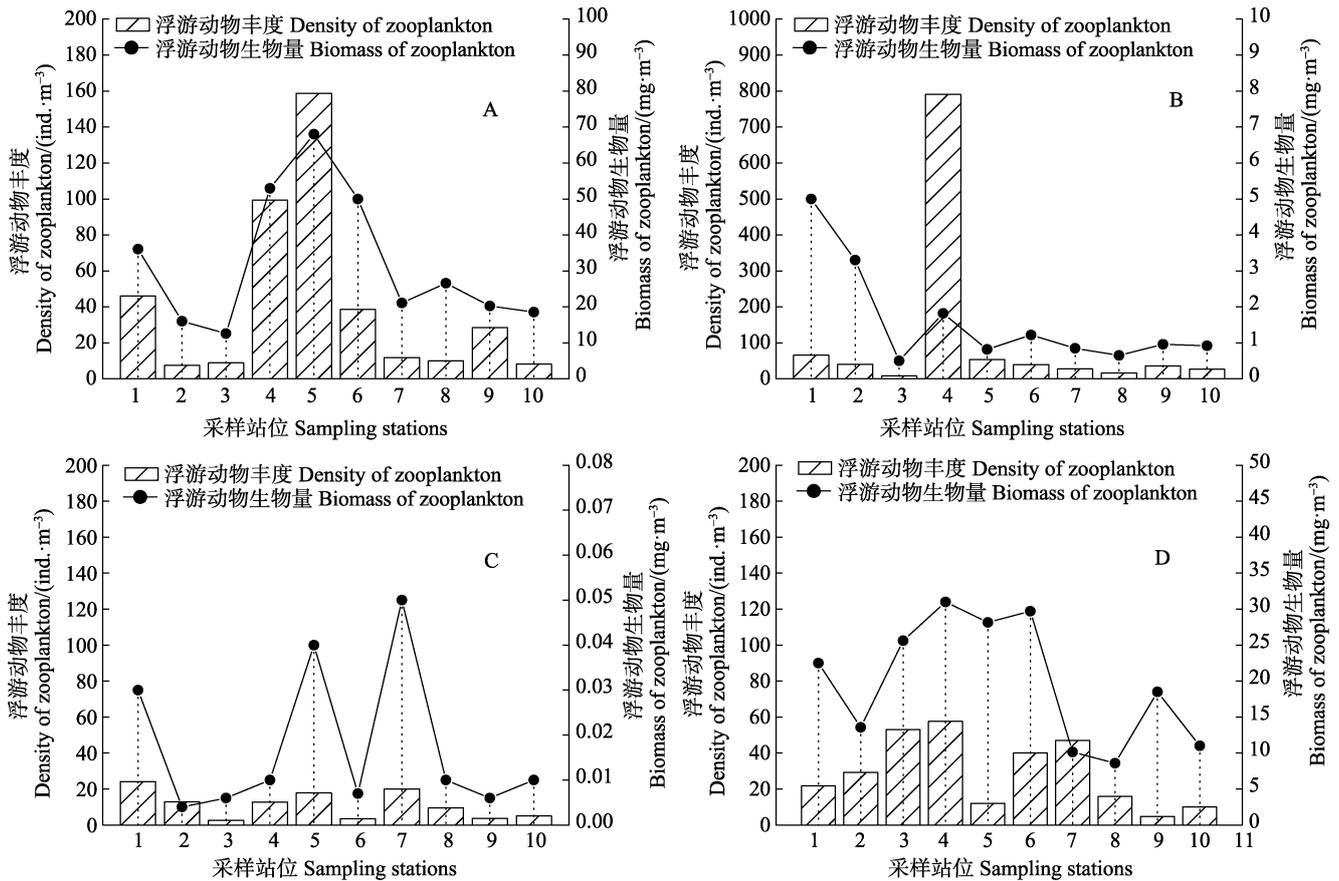


图 2 流沙湾各采样站位浮游动物丰度及生物量: 春(A), 夏(B), 秋(C), 冬(D)

Fig.2 The density and biomass of zooplankton at different sampling stations in the Liusha Bay: spring (A); summer (B); autumn (C); winter (D)

夏、秋两季则非常低(夏季 $0.5\text{--}5\text{ mg/m}^3$, 秋季 $0.00\text{--}40.05\text{ mg/m}^3$)。与丰度特征相似, 外港浮游动物生物量也普遍高于内港。春、秋两季对照区的浮游动物生物量高于其他站位。

2.2 优势种的季节变化

各季优势种变化差异明显, 且以桡足类种类最多(12种)。亚强次真哲水蚤(*Subeucalanus subcrassus*)、短尾类幼虫(*Brachyuran larva*)、长尾幼体(*Macruran larva*)在各个季节均有出现(表 2)。

2.3 浮游动物的多样性指数与均匀度的时空变化

春、夏两季位于内港的珍珠贝养殖区的多样性指数普遍高于外港平均水平; 而与夏季相比, 秋季多样性指数有所下降, 且表现为从外港向内港方向递减的趋势, 珍珠贝养殖区多样性指数仅为 0.72; 冬季除珍珠贝养殖区(1.85)外的各区多样性指数均值恢复至 2.5–3.0, 且数值较为接近(图 3)。

春、夏两季对照区(4、5号站)的浮游动物均匀度指数均值低于其他养殖区, 其中春季表现为外港向内

港方向递增; 进入秋季, 内港各区的均匀度指数低于外港; 冬季内港珍珠贝养殖区的均匀度指数有一定程度的升高(图 3)。

2.4 浮游动物丰度与采样站位、环境因子的相关性分析

采用 SPSS 软件对全年的浮游动物丰度、生物量及所有环境因子进行相关性分析, 依照 Pearson 相关系数两两比较(表 3)。浮游动物丰度与亚硝酸盐呈显著正相关($P < 0.05$), 与其他环境因子相关性不显著。与之相比, 浮游动物生物量与环境因子的相关性较好; 与亚硝酸盐呈显著正相关($P < 0.05$), 与总氮、氨氮、氮磷比、盐度呈极显著正相关($P < 0.01$); 与硝酸盐、叶绿素 *a*、颗粒有机物呈极显著负相关($P < 0.01$), 且与 pH 呈显著负相关($P < 0.05$)。

共计 28 种浮游动物满足 DCA 分析的筛选条件, 可进入梯度分析, 对物种按照拼音顺序编号(表 4)。

先对物种数据进行 DCA 分析, 结果显示, 春夏秋冬四季的前四排序轴以第一排序轴为最长, 其第一排序轴长分别为 1.988、2.025、2.463、2.545, 解释的

表 2 流沙湾浮游动物优势种优势度的季节变化
Tab.2 Seasonal variations in dominance of dominant species of zooplankton in Liusha Bay

种类 Species	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
红眼纺锤水蚤 <i>A. erythraea</i>			+	*
刺尾纺锤水蚤 <i>A. spinicauda</i>	*	+		*
驼背隆哲水蚤 <i>A. gibber</i>				++
微驼隆哲水蚤 <i>A. gracilis</i>	*		*	+
长角隆哲水蚤 <i>A. longicornis</i>		*	+	
筒长腹剑水蚤 <i>Oithona simplex</i>		+		
针刺拟哲水蚤 <i>Paracalanus aculeatus</i>		*		++
小拟哲水蚤 <i>Paracalanus parvus</i>			+	
强额孔雀水蚤 <i>P. cressirotris</i>		+	*	
亚强次真哲水蚤 <i>S. subcrassus</i>	+	*	+	+
钳形歪水蚤 <i>T. forcipatus</i>	*	+	*	
瘦尾胸刺水蚤 <i>C. tenuiremis</i>				+
螺赢蜚 <i>Corophium sp.</i>	++	*	+	
针刺真浮萤 <i>Euconchoecia aculeata</i>				++
肥胖软箭虫 <i>Flaccisagitta enflata</i>	*	+		
鱼卵 Fish eggs	+	*		++
仔鱼 Fish larva	++	*		
长尾幼体 Macruran larva	+	+	++	*
短尾类幼虫 Brachyuran larva	+	+	*	*

“*” 为 $Y < 0.02$, “+” 为 $0.02 \leq Y < 0.1$, “++” 为 $Y \geq 0.1$

“*” means $Y < 0.02$, “+” means $0.02 \leq Y < 0.1$, “++” means $Y \geq 0.1$

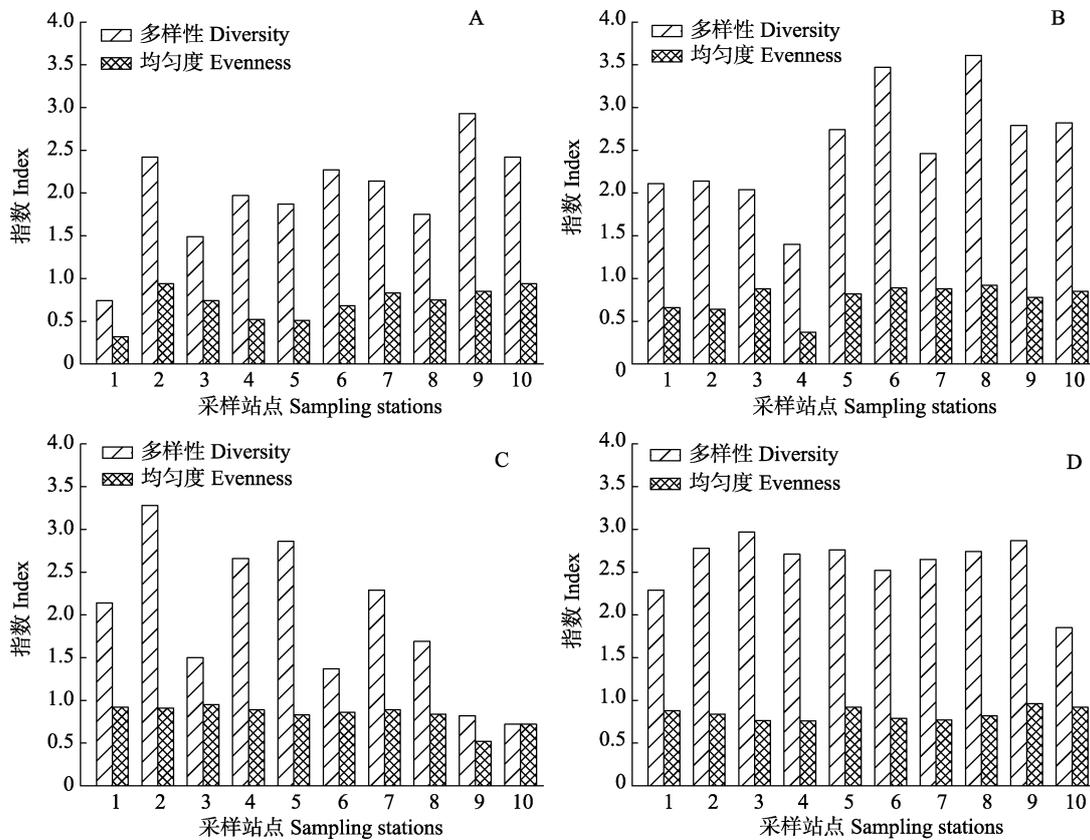


图 3 不同采样站位浮游动物多样性与均匀度指数: 春(A), 夏(B), 秋(C), 冬(D)
Fig.3 The diversity and evenness index of zooplankton at different sampling stations in Liusha Bay: spring (A); summer (B); autumn (C); winter (D)

表 3 浮游动物丰度、生物量与环境因子的相关性(N=10)

Tab.3 Correlation of zooplankton density, zooplankton biomass and environmental factors (N=10)

	NH ₄	NO ₂	NO ₃	TN	Chl- <i>a</i>	POM	S	pH	T	DO	SD	DIP	TP	N/P
丰度 Density	-0.064	0.398*	0.196	-0.097	-0.036	-0.238	0.079	-0.043	0.166	-0.023	0.134	0.114	0.007	-0.014
生物量 Biomass	0.442**	0.384*	-0.438**	0.479**	-0.410**	-0.464**	0.496**	-0.319*	-0.204	-0.073	0.187	-0.164	-0.241	0.464**

*表示在 0.05 水平上显著相关, **表示在 0.01 水平上显著相关

*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed); **Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

表 4 参与 DCA 分析的流沙湾浮游动物名录

Tab.4 Catalogue of zooplankton species in the Liusha Bay analyzed by DCA

编码 Codes	种类 Species	编码 Codes	种类 Species
Cop01	<i>A. erythroaea</i>	Lar01	<i>Brachyuran larva</i>
Cop02	<i>A. spinicauda</i>	Lar02	<i>Copepod larva</i>
Cop03	<i>A. gibber</i>	Lar03	Fish egg
Cop04	<i>A. longicornis</i>	Lar04	Fish larva
Cop05	<i>C. sinicus</i>	Lar05	Zoea larva (Macruran)
Cop06	<i>C. tenuiremis</i>	Lar06	Lucifer larva
Cop07	<i>E. concinna</i>	Lar07	Macruran larva
Cop08	<i>L. euchaeta</i>	Lar08	Porcellana larva
Cop09	<i>O. simplex</i>	Lar09	Ophiopluteus larva
Cop10	<i>P. aculeatus</i>	Lar10	Stomatophora larva
Cop11	<i>S. subcrassus</i>	Ost01	<i>E. aculeata</i>
Cop12	<i>T. forcipatus</i>	Cha01	<i>F. enflata</i>
Cop13	<i>P. parvus</i>	Cha02	<i>Z. sp.</i>
Cop14	<i>A. gracilis</i>	Amp01	<i>C. sp.</i>

物种变化率分别为 35.8%、43.6%、38.5%、47.5%。第一排序轴均<3, 适合线性模型(Estrada *et al.*, 2012)。

在 DCA 分析的基础上, 对群落进行 PCA 分析并绘制物种-样方双序图(图 4)。排序结果显示, 浮游动物群落具有明显的区域性差异。春季, 桡足类(尤其是亚强次真哲水蚤)以及鱼卵、仔鱼主要分布在对照区, 端足类(螺赢蜚)主要分布于外港靠近湾口的 1、6 号站位; 夏季, 靠近湾口的 1 号站位鱼卵最多, 而 4 号站位筒长腹剑水蚤分布最多, 5 号站位仔鱼和螺赢蜚最多; 秋季, 桡足类在 1 号站位有较多分布, 内港的长尾幼体分布多于外港; 冬季, 桡足类、鱼卵主要分布于外港采样区(尤其是 3 号站位), 仔鱼仅在 3、4、6 号站位出现, 针刺真浮萤在 3、4 号站位有较多分布。

3 讨论

3.1 浮游动物群落结构特征

北部湾浮游动物物种丰富, 且以水螅水母类(100

种)和桡足类居多(91 种)(郑白雯等, 2013)。2012–2013 年的调查显示, 流沙湾浮游动物共计 7 类 41 种, 其中桡足类最多(29 种, 占 70.73%)。作为半封闭型海湾, 流沙湾的浮游动物种类数远少于其西南侧的北部湾(370 种)以及湛江港湾(217 种)(张才学等, 2011), 接近于珠江口(李开枝等, 2005)、福清湾(林君卓, 2008)的调查结果。与 2008–2009 年的两次调查相比, 浮游动物种类数略低于张才学等(2013)的统计数据(49 种), 高于王彦等(2013)对内港的调查结果(19 种)(表 5)。由于后者调查区域仅限于内港, 其采集的样本量会相对偏少。以往的两次调查均使用浅水 I 型浮游生物网进行采集, 但该网主要用于个体较大的浮游动物(水母、箭虫、大型桡足类等)的采集, 对小型桡足类等个体较小的浮游动物的捕获效率则远低于中型网(Wu *et al.*, 2011), 甚至相差 10 倍以上(连喜平等, 2013)。考虑到 I 型浮游生物网对小型桡足类捕获的疏漏, 浅水 III 型采集的浮游动物种类可能比以往的两次调查更为减少。哲水蚤仍为流沙湾的优势种, 但主要的优势种已由针刺拟哲水蚤、小拟哲水蚤转变为亚强次真哲水蚤。阶段性的浮游动物频繁出现, 长尾、短尾幼体多次成为优势种。

整体而言, 浮游动物丰度、生物量和多样性指数均显示出秋季低于春、夏两季的趋势。在空间分布上, 浮游动物丰度和生物量普遍表现为外港高于内港, 秋季的浮游动物多样性指数及均匀度指数变化特征也与之相似。

依据饵料生物水平分级评价标准(陈作志等, 2011), 浮游动物生物量<10 mg/m³ 为低水平, 10–30 mg/m³ 为中低水平, 30–50 mg/m³ 为中等水平, 50–70 mg/m³ 为中高水平。因此, 春季外港的 1、4、5、6 号站点为中等水平, 其余各站均为中低水平; 夏季和秋季所有站点均处于低水平状态; 冬季绝大多数站点的饵料生物处于中低水平。

浮游动物年平均丰度和生物量分别为 48.12 ind./m³、13.43 mg/m³, 与珠江口、柘林湾、大鹏澳等海域相差 1 个以上数量级。浮游动物丰度明显低于 2008–2009

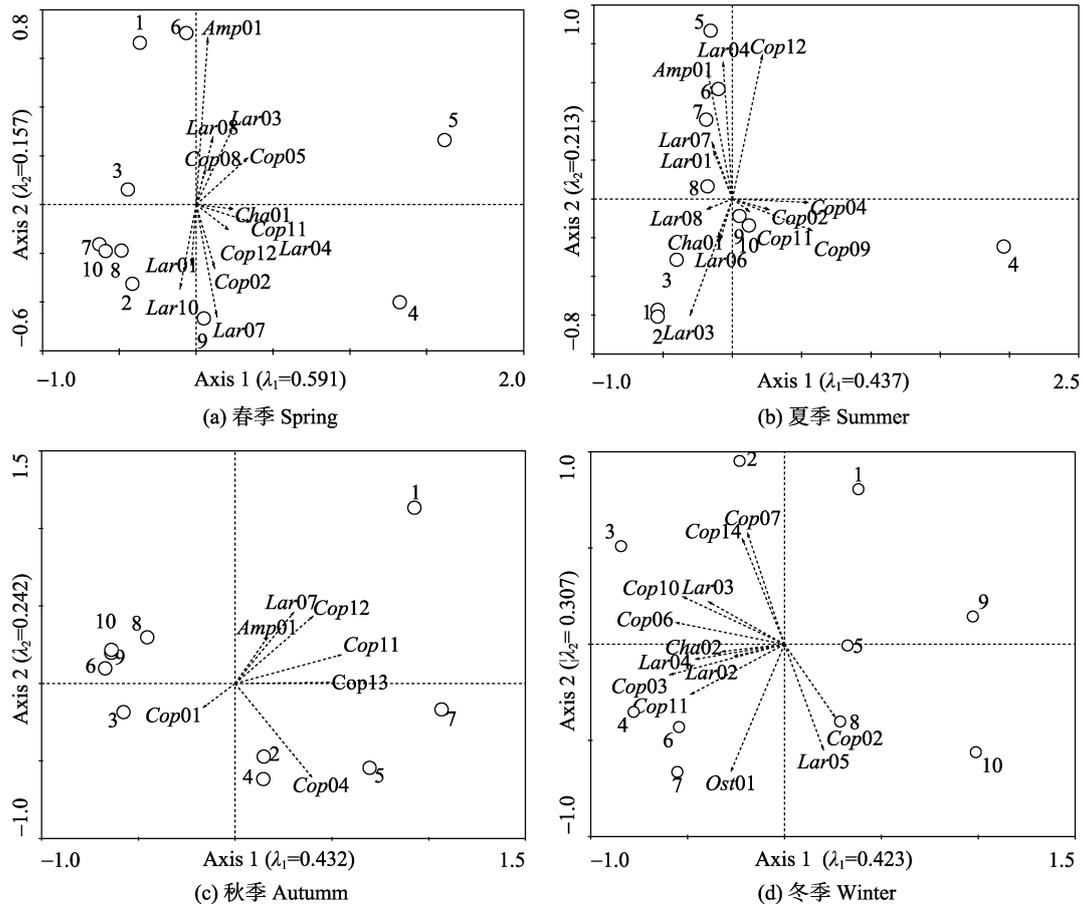


图4 浮游动物样方的PCA排序

Fig.4 PCA ordination of zooplankton community composition and samples

表5 流沙湾浮游动物群落结构与其他水体的比较

Tab.5 Comparison of community structure of zooplankton between the Liusha Bay and other waters

海域 Waters	调查时间 Investigation time	种类数 Species amount	丰度 Abundance (ind./m ³)	生物量 Biomass (mg/m ³)	多样性指数 Diversity index	文献 References
珠江口 Zhujiang River Estuary	2002-04-2002-09	49	1131	203	2.30	李开枝等, 2005
北部湾 Beibu Gulf	2000-10-2003-06	68	700	382	2.43	郑白雯等, 2013
三沙湾 Sansha Bay	2006-07-2007-11	370	—	—	—	刘育莎等, 2010
福清湾 Fuqing Bay	2007-02-2007-11	82	665	96	2.32-3.20	徐佳奕等, 2013
柘林湾 Zhelin Bay	2012-06-2011-05	71	244	—	2.02-3.12	林君卓, 2008
大鹏澳 Dapeng Cove	2005-10-2006-05	41	83	88	2.00-3.47	黄长江等, 2003
湛江港湾 Zhanjiang Bay	2001-04-2002-04	90	15800	228	2.20-2.87	邓邦平等, 2011
流沙湾 Liusha Bay	2007-05-2008-04	82	164-383	—	—	张才学等, 2011
	2009-02-2009-11	217	403(桡足类)	—	3.39	王彦等, 2013;
	2008-03-2009-02	19	8816000	0-7	0.11-0.60	张才学等, 2013
	2008-02-2008-11	49	85	132	2.29-3.39	
	2012-05-2013-01	41	48	13	0.72-3.61	

年的两次调查数据, 多样性指数与前两次调查相当, 但最高值与最低值间的差值加大。这种浮游动物种数、丰度和生物量跨年性的剧减现象同样见于广东省最大的网箱养殖基地—柘林湾: 2002 年调查显示浮游动物丰度为 $15.8 \times 10^3 \text{ ind./m}^3$ (黄长江等, 2003), 但 2006 年仅为 $12.00\text{--}313.33 \text{ ind./m}^3$, 种类也由 90 种降为 36 种 (马亚洲等, 2008)。

3.2 浮游动物群落与环境因子的相关性

温度和盐度是影响中国近海浮游动物群落结构最重要的环境因子 (杜明敏等, 2013)。尽管温度与浮游动物丰度和生物量之间的相关系数不高, 浮游动物种类的变化却与之密切相关: 偏暖温带近岸种类中华哲水蚤、小拟哲水蚤分别出现在温度适中的春 (28.84°C)、秋 (25.89°C) 两季, 且后者在秋季为优势种; 偏低温种类瘦尾胸刺水蚤在温度较低的冬季 (19.51°C) 成为优势种; 亚热带外海种类亚强次真哲水蚤在各季均有出现; 浮游动物幼体主要出现在水温相对较高的春季和夏季 (30.73°C), 并有较多种类在春季成为优势种。相关性分析显示, 盐度与浮游动物生物量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)。温度和盐度对浮游动物存活率有一定的交互作用, 温度的变化会改变动物对盐度的适应范围 (黄加祺等, 1986)。因此, 流沙湾海域冬季盐度最高 (32.13)、温度最低 (19.51°C), 亚热带外海种类如驼背隆哲水蚤、针刺拟哲水蚤、针刺真浮萤等均成为绝对优势种。

相关性分析显示, 浮游动物生物量与 N 元素的相关性较强 (主要表现为正相关), 而与 P 元素的相关性较弱。这种相关性的差异可能是由于 2008–2009 年流沙湾海区主要呈 N 限制 (N/P 比值为 $3.94\text{--}11.95$) (王彦等, 2013) 转变为 2012–2013 年的 P 限制 (N/P 比值为 $21.65\text{--}1287$) 所引起。研究表明, N/P 比值与浮游动物总种数、丰度、多样性指数均具有显著或极显著的正相关关系 (何本茂等, 2013)。

由于桡足类为主的浮游动物对浮游植物的摄食, Chl-*a* 浓度与浮游动物生物量呈极显著负相关 ($P < 0.01$)。这种负相关性同样见于黄凤鹏等 (2009) 对胶州湾海域的报道。与表征浮游植物现存量的 Chl-*a* 指标相比, 表征悬浮物的 POM 与浮游动物的生物量呈更高的负相关性, POM 与浮游动物生物量的相关系数为 -0.464 ($P < 0.01$), 这可能是由于浮游动物的食物来源除浮游植物外, 还包括细菌等, 尤其是冬季 (对细菌的摄食率达 71%) (夏洁等, 2006)。

3.3 养殖活动对浮游动物群落结构的影响

根据位置分布, 4 号、3 号、8 号、10 号站位分

别典型代表着对照区、扇贝主养区、鱼类网箱养殖区和珍珠贝养殖区。在 4 个季度的调查中, 上述鱼、贝养殖区的浮游动物丰度及生物量均低于对照区, 其差异在春夏两季尤为明显。PCA 分析结果 (图 4) 显示, 鱼、贝养殖区与对照区之间的浮游动物种类和丰度差异显著, 表明水产养殖活动会对浮游动物群落结构产生明显影响。研究表明, 滤食杂食性鱼类对大型桡足类的滤食可显著影响浮游动物群落 (陈炳辉等, 2012), 贝类则主要通过食物竞争使桡足类生物量降低 (王岩等, 1999)。

4 个典型区的群落结构以中小型桡足类为主, 大中型浮游动物种类较少。春季, 中华哲水蚤、亚强真哲水蚤、肥胖软箭虫、锥形宽水蚤等大中型浮游动物仅在对照区出现。其中, 亚强真哲水蚤在浮游动物群落中占绝对优势 (66.04%), 仔鱼在对照区为优势种而在鱼、贝养殖区极少分布; 夏季, 亚强真哲水蚤和肥胖软箭虫丰度最高值出现在对照区 (分别占总量的 0.3% 、 0.8%), 最低值出现在扇贝主养区 (分别占 0 、 0.2%), 中小型桡足类 (强额孔雀水蚤、筒长腹剑水蚤) 在对照区大量出现 (分别占 56.63% 、 27.08%), 其他典型区则极少出现; 秋季, 鱼类网箱养殖区和对照区检出少量的红眼纺锤水蚤, 而扇贝主养区则没有发现; 冬季, 对照区的大中型桡足类 (针刺拟哲水蚤、亚强真哲水蚤、驼背隆哲水蚤、微驼隆哲水蚤) 丰度最高, 扇贝主养区次之, 鱼类网箱养殖区和珍珠贝养殖区较小。水体富营养化的加重和营养盐结构的变化使近岸海域浮游植物群落构成趋于小型化, 并通过食物链的传递进一步引起主要摄食者浮游动物的小型化 (Pan *et al.*, 1997; 张才学等, 2011)。因此, 鱼、贝养殖活动 (尤其是扇贝养殖) 加剧了近岸海域浮游动物的小型化。

由于游泳行为的不同, 哲水蚤逃避捕食的能力要优于剑水蚤等其他桡足类 (赵萍萍等, 2012), 在相对较大的捕食压力和较低的食物竞争压力下, 容易成为优势种。亚强次真哲水蚤是代表性的藻滤食种, 其摄食率可达 19.76 ng/ind.d , 高于哲水蚤科、纺锤水蚤科等其他桡足类 (李开枝等, 2012), 但强额孔雀水蚤对浮游植物现存量的摄食压力更强, 几乎是亚强次真哲水蚤形成的摄食压力的 3 倍 (谭焯辉等, 2004)。春季亚强次真哲水蚤在对照区占绝对优势, 夏季强额孔雀水蚤在对照区出现高值而未在鱼、贝养殖区检出, 均表明对照区浮游植物资源较为丰富, 而鱼、贝养殖区则相对匮乏。

小型桡足类主要分布于水体表层, 春季小型桡足类在对照区出现高峰, 其不同的形态 (卵、无节幼体) 和丰富的种类可为仔鱼的存活与生长提供广谱性的

饵料(王荣等, 2002), 因此春季仔鱼在对照区也呈优势分布。秋季正值网箱养鱼收获期, 养殖区内浮游动物受到的捕食压力减小, 因此红眼纺锤水蚤最多出现于鱼类网箱养殖区。从春季至秋季, 受食物竞争的影响, 扇贝主养区浮游动物丰度及生物量一直较低, 随着扇贝的养成, 冬季扇贝主养区浮游动物的食物竞争压力骤减, 浮游动物的生物量、丰度迅速回升, 高于鱼类网箱养殖区和珍珠贝养殖区, 浮游动物多样性指数接近 3.0, 高于其他站位。

浮游动物缺乏发达的游泳器官, 只能随波逐流, 径流、海流等水文因素均会影响其分布 (Marques *et al.*, 2007), 因此除源自鱼、贝的摄食活动影响外, 水交换能力的好坏对浮游动物群落结构和时空分布的影响也不可低估(李开枝等, 2005)。流沙湾内港和外港间的水交换能力较弱(罗昭林等, 2014), 延绳、筏架、网箱等养殖设施可明显降低水流速度及交换速率 (O'Donncha *et al.*, 2013; Petersen *et al.*, 2008; 黄长江等, 2005), 并造成向下传输的营养物质显著减少, 因此内港的鱼类网箱养殖区及珍珠贝养殖区的浮游生物丰度和生物量均低于外港靠近港口的 1 号站位。

参 考 文 献

- 马亚洲, 陈丕茂. 洪灾影响下饶平柘林湾浮游动物群落结构的初步研究. 海洋与渔业, 2008(8): 14-15
- 王大鹏, 曹占旺, 何安尤, 等. 流沙湾珍珠养殖区营养盐时空分布现状及分析. 广西水产科技, 2011(4): 21-31
- 王大鹏, 曹占旺, 张益峰, 等. 两个珍珠养殖海区浮游植物种群特征及其比较. 广西水产科技, 2010(2): 16-23
- 王岩, 张鸿雁. 不同单养和混养海水实验围隔浮游生物的研究. 中国水产科学, 1999, 6(3): 49-54
- 王荣, 张鸿雁, 王克, 等. 小型桡足类在海洋生态系统中的功能作用. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 453-460
- 王彦, 申玉春, 叶宁, 等. 流沙湾浮游生物的群落结构与时空分布. 广东海洋大学学报, 2013, 32(6): 66-73
- 王增焕, 柯常亮, 王许诺, 等. 流沙湾贝类养殖海域环境质量评价. 南方水产科学, 2011, 7(3): 24-30
- 中华人民共和国国家标准. 海洋监测规范. 第 4 部分: 海水分析. 北京: 中国标准出版社, 2007, 57-121
- 中华人民共和国国家标准. 海洋监测规范. 第 7 部分: 近海污染生态调查和生物监测. 北京: 中国标准出版社, 2007, 84-85
- 方志山. 综合水产养殖池悬浮颗粒物的动态变化研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, 46(1): 131-134
- 邓邦平, 杨宇峰. 大鹏澳养殖海域表底层水环境及浮游动物群落结构的比较研究. 海洋环境科学, 2011, 30(4): 492-495
- 申玉春, 李再亮, 黄石成, 等. 流沙湾海域水产养殖结构与布局调查分析. 中国渔业经济, 2010, 28 (1): 105-109
- 吕晋, 郭红娟, 马学礼, 等. 武汉市湖泊蓝藻分布影响因子分析. 生态环境, 2008, 17(2): 515-519
- 刘育莎, 林元烧, 郑连明, 等. 福建省三沙湾饵料浮游动物生态特征研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2010, 49(1): 102-108
- 孙军, 刘东艳, 徐俊, 等. 1999 年春季渤海中部及其邻近海域的网采浮游植物群落. 生态学报, 2004, 24(9): 2003-2016
- 杜明敏, 刘镇盛, 王春生, 等. 中国近海浮游动物群落结构及季节变化. 生态学报, 2013, 33(17): 5407-5418
- 杜萍, 刘晶晶, 徐晓群, 等. 象山港不同生境冬季浮游动物生态特征比较研究. 水产科技情报, 2011, 38(2): 92-99
- 李开枝, 尹健强, 黄良民, 等. 珠江口浮游动物的群落动态及数量变化. 热带海洋学报, 2005, 24(5): 60-68
- 李开枝, 谭焯辉, 黄良民, 等. 珠江口浮游桡足类摄食研究. 热带海洋学报, 2012, 31(6): 90-96
- 李振国, 卢军, 王国祥, 等. 分光光度法测定浮游植物叶绿素 *a* 的比较研究. 中国环境监测, 2006, 22(2): 21-23
- 杨国欢, 侯秀琼, 孙省利, 等. 流沙湾食物网结构的初探—基于稳定同位素方法的分析结果. 水生生物学报, 2013, 37(1): 150-156
- 连喜平, 谭焯辉, 刘永宏, 等. 两种浮游生物网对南海北部浮游动物捕获效率的比较. 热带海洋学报, 2013, 32(3): 33-39
- 何本茂, 黎广钊, 韦蔓新, 等. 涠洲岛珊瑚礁海域氮磷比值季节变化与浮游生物结构的关系. 热带海洋学报, 2013, 32(4): 64-72
- 张才学, 孙省利, 陈春亮, 等. 流沙湾海草床海域浮游动物的群落结构和季节变化. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1386-1394
- 张才学, 陈慧妍, 孙省利, 等. 流沙湾海草床海域浮游植物的时空分布及其影响因素. 生态学报, 2012, 32(5): 1527-1537
- 张才学, 龚玉艳, 王学锋, 等. 湛江港湾浮游桡足类群落结构的季节变化和影响因素. 生态学报, 2011, 31(23): 7086-7096
- 陈作志, 蔡文贵, 徐姗楠, 等. 广西北部湾近岸生态系统风险评价. 应用生态学报, 2011, 22(11): 2977-2986
- 陈炳辉, 刘正文. 滤食杂食性鱼类放养对浮游动物群落结构的影响. 生态科学, 2012, 31(2): 161-166
- 林君卓. 福清湾及附近海域浮游动物的数量和分布. 台湾海峡, 2008, 27(1): 58-63
- 罗昭林, 朱长波, 郭永坚, 等. 流沙湾表层沉积物中碳、氮、磷的分布特征和污染评价. 南方水产科学, 2014, 10(3): 1-8
- 郑白雯, 曹文清, 林元烧, 等. 北部湾北部生态系统结构与功能研究 I. 浮游动物种类组成及其时空变化. 海洋学报, 2013, 35(6): 154-161
- 赵萍萍, 王志宏, 吴秋婷, 等. 洱海浮游桡足类群落结构对季节性休渔的响应. 应用与环境生物学报, 2012, 18(3): 421-425
- 夏洁, 高会旺. 南黄海东部海域浮游生态系统要素季节变化的模拟研究. 安全与环境学报, 2006, 6(4): 59-65
- 徐佳奕, 徐兆礼. 三沙湾浮游动物生态类群演替特征. 生态

- 学报, 2013, 33(5): 1413–1424
- 黄长江, 陈善文, 何歆, 等. 2001–2002 年粤东柘林湾浮游动物的生态学研究. 海洋与湖沼, 2003, 34(2): 117–130
- 黄长江, 董巧香, 吴常文, 等. 大规模增养殖区柘林湾叶绿素 *a* 的时空分布. 海洋学报, 2005, 27(2): 127–134
- 黄凤鹏, 黄景洲, 杨玉玲, 等. 胶州湾浮游桡足类时空分布. 生态学报, 2009, 29(8): 4045–4052
- 黄加祺, 郑重. 温度、盐度对厦门港春季主要桡足类呼吸率影响的实验研究. 海洋与湖沼, 1986, 17(2): 161–167
- 梁飞龙, 刘永, 邓陈茂, 等. 广东雷州流沙湾养殖企鹅珍珠贝多毛类寄生虫病的调查. 海洋水产研究, 2007, 28(2): 84–89
- 程小倪, 黄良民, 谭焯辉, 等. 流沙湾海域浮游植物群落结构的时空变化. 海洋环境科学, 2011, 30(1): 13–18
- 谢恩义, 申玉春, 叶宁, 等. 流沙湾的底栖大型海藻调查. 广东海洋大学学报, 2009, 29(4): 30–35
- 谢群, 张瑜斌, 孙省利. 流沙湾海域水质的综合评价与分析. 中国环境监测, 2011, 27(1): 77–83
- 谭焯辉, 黄良民, 董俊德, 等. 三亚湾秋季桡足类分布与种类组成及对浮游植物现存量的摄食压力. 热带海洋学报, 2004, 23(5): 17–24
- Beaugrand G. Decadal changes in climate and ecosystems in the North Atlantic Ocean and adjacent seas. Deep-Sea Res Part II: Topical Studies in Oceanography, 2009, 56(8): 656–673
- Dias J, Simões N, Bonecker C. Zooplankton community resilience and aquatic environmental stability on aquaculture practices: a study using net cages. Braz J Biol, 2012, 72(1): 1–11
- Estrada R, Harvey M, Gosselin M, *et al.* Late-summer zooplankton community structure, abundance, and distribution in the Hudson Bay system (Canada) and their relationships with environmental conditions, 2003–2006. Prog Oceanogr, 2012, 101(1): 121–145
- Hays GC, Richardson AJ, Robinson C. Climate change and marine plankton. Trends Ecol Evol, 2005, 20(6): 337–344
- Marques SC, Pardal MA, Pereira MJ, *et al.* Zooplankton distribution and dynamics in a temperate shallow estuary. Hydrobiologia, 2007, 587(1): 213–223
- O'Donncha F, Hartnett M, Nash S. Physical and numerical investigation of the hydrodynamic implications of aquaculture farms. Aquacult Eng, 2013, 52(1): 14–26
- Pan Y, Subba Rao DV. Impacts of domestic sewage effluent on phytoplankton from Bedford Basin, eastern Canada. Mar Pollut Bull, 1997, 34(12): 1001–1005
- Petersen JK, Nielsen TG, Van Duren LA, *et al.* Depletion of plankton in a raft culture of *Mytilus galloprovincialis* in Ría de Vigo, NW Spain. I. Phytoplankton. Aquat Biol, 2008, 4(2): 113–125
- Pielou EC. An introduction to mathematical ecology. New York: Wiley-Interscience, 1966: 1–286
- Rey DSP, Macrina TZ, Reiner E. Spatio-temporal variation of the zooplankton community in a tropical caldera lake with intensive aquaculture (Lake Taal, Philippines). Hydrobiologia, 2011, 64(1): 119–133
- Shannon CE, Weaver W. The mathematical theory of communication. London: University of Illinois Press, 1963: 125
- Wu CJ, Shin CM, Chiang KP. Does the mesh size of the plankton net affect the result of statistical analyses of the relationship between the copepod community and water masses? Crustaceana, 2011, 84(9): 1069–1083

(编辑 江润林)

Characteristics of Zooplankton Community in Aquaculture Areas of Liusha Bay

GUO Yongjian, LI Junwei, LUO Zhaolin, XIE Xiaoyong, CHEN Suwen,
ZHU Changbo^①, GUO Yihui

(Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

Abstract Seasonal investigations on zooplankton community in Liusha Bay were carried out from May 2012 to January 2013. A total of 41 species and 17 groups of pelagic larvae were recorded, in which the copepod was the majority (29 species). *Subeucalanus subcrassus*, Brachyuran larva and Macruran larva were the dominant species seasonally in three quarters. The annual average density and biomass were 48.12 ind./m³ and 13.43 mg/m³, respectively. In general, the density, biomass and diversity index of zooplankton were lower in autumn than those in spring and summer, and these indices in inner bay were lower than those in outer bay. The zooplankton density was barely positively correlated to nitrite, while the zooplankton biomass had significant correlations with multiple environmental factors such as nitrite, ammonium and total nitrogen. Compared with the control (non-culture area), the density and biomass in the main scallop culture area, the fish culture area and the oyster culture area were lower. Rarely found in culture areas, large and medium-sized zooplankton mainly appeared in the non-culture area. In autumn, the density of *Acartia erythraea* was higher in the fish culture area than those in the other areas. During winter, the diversity index of zooplankton in the main scallop culture area was the highest (2.97). Large and medium sized species of zooplankton mainly appeared in the control area in all reasons. In spring, *Subeucalanus subcrassus* appeared with absolute predominance (66.04%) in the control area. In summer, the biomass of *S. subcrassus* and *Flaccisagitta enflata* were the highest in the control area (accounting for 0.3% and 0.8%, respectively) and the lowest in the main scallop culture area (accounting for 0 and 0.8%, respectively). In autumn, a spot of *A. erythraea* were merely found in the control area and the fish culture area. The density and biomass in the main scallop culture area were rapidly increased from autumn to winter, although they were lower than those in the non-culture area but higher than those in the fish culture area and the oyster culture area. The results indicate an obvious decline in the density and biomass of zooplankton and a severe miniaturization of zooplankton in size in Liusha Bay with the culture of fish and shellfish.

Key words Liusha Bay; Zooplankton; Scallops; Fish cage; Principal components analysis

① Corresponding author: ZHU Changbo, E-mail: changbo@ecowin.org

黄海中南部狮子鱼种类的分析*



杨涛^{1,2,3} 单秀娟^{2,3①} 陈云龙^{2,3,4} 戴芳群^{2,3} 周志鹏²

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 基于在黄海中南部海域采集的 23 尾体色花纹各异的狮子鱼标本, 利用形态学和线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I 亚基因(CO I)相结合的方法, 对黄海中南部海域狮子鱼种类进行了分析。结果显示, 22 尾标本在可数性状和可量性状, 如背鳍、尾鳍、臀鳍、胸鳍、幽门盲囊、头长/体长、头长/吻长、眼间隔/眼径、体高/体长等, 属于细纹狮子鱼的范畴。其中 4 尾标本体表覆盖明显黑褐色横斑。5 尾体表覆盖不规则斑纹, 眼部存在放射性白色条带, 头部及尾部存在明显的纵纹。9 尾在头部或体侧具有褐色或者黑褐色细点, 臀鳍黑色, 尾鳍基部有 1 白斑。4 尾体表尾红褐色, 具有纵行细纹, 背鳍、尾鳍、臀鳍及胸鳍外缘灰黑色; 另 1 尾根据可数性状判断, 其属于网纹狮子鱼, 头部和体背部具有大小不等的白色小圆斑, 尾长形、后端圆凸, 背鳍基部两侧具有 6-7 个密集的斑点。CO I 分析也具有相同的结果, 其中 22 尾细纹狮子鱼之间的遗传距离为 0.002-0.003, 与网纹狮子鱼的遗传距离为 0.134, 与其他种类如戴氏狮子鱼、细尾狮子鱼、光皮狮子鱼等的遗传距离较近, 为 0.057-0.067。

关键词 狮子鱼; 形态学特征; 细胞色素氧化酶 I 亚基因 (CO I); 黄海中南部

中图分类号 Q938.08 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0019-07

狮子鱼类属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲉形目(Scorpaeniformes)、狮子鱼科(Liparidae), 其种类非常丰富, 包括 31 个属, 350 余种(Orr, 2004; Chernova *et al.*, 2004; Balushkin, 2012)。分布范围极其广泛, 从温带到极地, 从潮间带至超深渊海域(Chernova *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2010), 主要分布于北太平洋、南大洋以及极地海域, 在热带水域、温带和亚热带深水区域亦有分布, 但多为地方特有种(Stein *et al.*, 2001)。狮子鱼类的常见种多属于短吻狮子鱼属(*Careproctus*)、狮子鱼属(*Liparis*)、副狮子鱼属(*Paraliparis*)和瘦狮子鱼属(*Pseudnos*)等属的种类。在我国狮子鱼科有 2 属 7 种(Kido, 1985; 成庆泰等, 1987; 刘禅馨, 1987; Chernova *et al.*, 2004), 其中黄渤海有 1 属 5 种, 包括细纹狮子

鱼(*Liparis tanakae*)、网纹狮子鱼(*Liparis chefuensis*)、点纹狮子鱼(*Liparis newmani*)、斑纹狮子鱼(*Liparis zonatus*)、河北狮子鱼(*Liparis petschiliensis*)。目前, 随着黄渤海经济渔业种类资源的衰退, 狮子鱼类成为黄渤海大海洋生态系统中的优势种类(Jin *et al.*, 2010), 国内学者围绕黄渤海狮子鱼类的研究也广泛开展, 如摄食习性(姜卫民, 1996; 薛莹等, 2010; Jin *et al.*, 2010; 张波等, 2011)、生物学特征及其资源动态(陈大刚, 1991; 周志鹏等, 2012; 单秀娟等, 2014)、种群结构(陈云龙等, 2013)等。近年来, 在黄海调查中发现, 狮子鱼类存在部分体型类似, 但是体表花纹各异的个体, 在以往狮子鱼类形态学特征记录中并未发现相关的描述(张春霖等, 1955; 朱元鼎等, 1963; 刘禅馨等,

* 国家重点基础研究发展计划(2015CB453303)、国家国际科技合作专项项目(2013DFA31410)和山东省泰山学者专项基金共同资助。杨涛, E-mail: yangt_fish@126.com

① 通讯作者: 单秀娟, 副研究员, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-10-09, 收修改稿日期: 2015-01-05

1987)。因此,本研究基于黄海调查中获得的外表花纹各异的狮子鱼类标本,对其可数和可量性状进行测定,对其体表特征进行描述。同时,结合线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I 亚基因(CO I),对其种类归属进行鉴定,旨在为黄海狮子鱼类生态学研究提供分类学依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

本研究的样品为 2011 年黄海调查期间获取的体色各异的狮子鱼类标本,共 23 尾(编号为 S1-S23)。其中 12 尾标本酒精保存,11 尾标本冷藏保存,分别用于形态和分子鉴定。标本的体长范围为 70-295 mm。

1.2 分析方法

1.2.1 形态学特征 参考黄渤海鱼类调查报告(张春霖等,1955)、东海鱼类志(朱元鼎等,1963)、中国鱼类系统检索(成庆泰等,1987)、辽宁动物志:鱼类(刘禅馨等,1987)对狮子鱼类标本进行形态学鉴定,记录背鳍、胸鳍、臀鳍、尾鳍、幽门盲囊的数目,测量体长、体高、眼径、头长、吻长、眼间隔等,并对其体表花纹进行描述。

1.2.2 遗传学特征 采用标准酚/氯仿法提取狮子鱼样本的 DNA。选择 CO I 基因作为分子鉴定的目标基因,鱼类 CO I 通用引物设计参照 Ward 等(2005),由上海生工合成,引物序列为 F1 和 R1(表 1)。

表 1 实验所用引物及其序列

Tab.1 Primer sequences used for the PCR analysis

引物名称 Primers	引物序列 Nucleotide sequence(5'-3')
F1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
R1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA

PCR 反应体系为 25 μ l:10 \times 缓冲液 2.5 μ l;2.5 mmol/L dNTPs 2 μ l; 10 μ mol/L 引物 F1 和 R1 各 0.5 μ l; *Taq* DNA 聚合酶 0.125 U,总 DNA 的量为 50 ng。采用升式 PCR 反应程序:53 $^{\circ}$ C 退火 8 个循环;54 $^{\circ}$ C 退火 8 个循环;55 $^{\circ}$ C 退火 16 个循环。将 PCR 产物进行测序,测序公司为上海生工。

1.2.3 种间遗传距离分析 从 GenBank 基因库下载狮子鱼科 17 种狮子鱼的 CO I 序列(表 2)。

所得测序结果用 NCBI 的 Blast 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)进行相似性检索,确认实验所得序列为目的片段。利用 ClustalW2 软件对

表 2 17 种狮子鱼类 CO 序列

Tab.2 The CO sequences of 17 Liparidae species

物种 Species	拉丁学名 Scientific name	引用序列号 Reference sequences
细纹狮子鱼	<i>L. tanakae</i>	JF952785
斑点狮子鱼	<i>L. callyodon</i>	HQ712548
格林兰狮子鱼	<i>L. tunicatus</i>	HM421759
细尾狮子鱼	<i>L. gibbus</i>	HM421753
美狮子鱼	<i>L. pulchellus</i>	FJ164725
戴氏狮子鱼	<i>L. dennyi</i>	FJ164720
弗氏狮子鱼	<i>L. floriae</i>	GU440375
光皮狮子鱼	<i>L. fucensis</i>	GU440376
纵带狮子鱼	<i>L. mucosus</i>	EU403074
蝌蚪狮子鱼	<i>L. fabricii</i>	HQ712550
网纹狮子鱼	<i>L. chefuensis</i>	JQ738424
须吻狮子鱼	<i>Rhinoliparis barbulifer</i>	GU440505
蜂巢短吻狮子鱼	<i>Careproctus cypselurus</i>	FJ164439
喉肛狮子鱼	<i>Nectoliparis pelagicus</i>	FJ164906
圆胸副狮子鱼	<i>Paraliparis pectoralis</i>	FJ164977
短尾微盘狮子鱼	<i>Elassodiscus caudatus</i>	FJ164562
细鳍短吻狮子鱼	<i>Careproctus rastrinus</i>	JF952697

本研究所得序列和 GenBank 下载的相关序列进行排序,并辅以手工校正,去除边缘序列。用 MEGA 4.0 计算序列的碱基组成、种内和种间遗传距离。种间的平均遗传距离用 Kimura 双参数模型进行估算。

2 结果与讨论

2.1 形态学特征

从狮子鱼标本的可数性状和可量性状来看,如背鳍、尾鳍、臀鳍、胸鳍、幽门盲囊、头长/体长、头长/吻长、眼间隔/眼径、体高/体长等,有 22 尾属于细纹狮子鱼(表 3),其中 5 尾体表覆盖不规则斑纹,眼部存在放射性白色条带,头部及尾部存在明显的纵纹(图 1a),4 尾标本体表覆盖明显黑褐色横斑(图 1b),9 尾在头部或体侧具有褐色或者黑褐色细点,臀鳍黑色,尾鳍基部有 1 白斑(图 1c, e),4 尾体表红褐色,具有纵行细纹,背鳍、尾鳍、臀鳍及腹鳍期末外缘灰黑色(图 1d);另 1 尾属于网纹狮子鱼,其头部和体背部具有大小不等的白色小圆斑,尾长形、后端圆凸,背鳍基部两侧具有 6-7 个密集的斑点(表 3, 图 1f)。目前,黄海狮子鱼种类以细纹狮子鱼为主。本次获得的狮子鱼标本体表体色特征与文献资料记录中的差别较大,并且不同年代和不同海域的狮子鱼体表体色特征会有所不同,甚至差异明显,部分可数和可量性

状也有少量差异(张春霖等, 1955; 朱元鼎等, 1963; 成庆泰等, 1987; 刘禅馨等, 1987)。如细纹狮子鱼的斑纹形态和以前记录中的横纹形态差异较大, 并且体长相近时体色花纹各异。同一群体中不同个体的体色, 也可能因健康状况、性别以及生活环境等因素的不同而表现出不同(易新文, 2012¹⁾; 王成辉, 2012), 黄海细纹狮子鱼的这种体色及体表花纹的变异可能与其周围环境、营养状况及其不同的发育时期有关, 但这需要进一步研究证实。在调查中发现, 细纹狮子鱼可能还存在变色的情况, 少数个体刚捕获时全身表皮近透明状, 死亡后 1–2 h, 背鳍及背鳍基部变为褐色, 腹部变为黄色。另外, 由于细纹狮子鱼形态 b(图 1b)、形态 c(图 1c)和形态 e(图 1e)分别与斑纹狮子鱼和点纹狮子鱼的体色特征十分相近, 可能会导致调查过程种类的误判。

2.2 遗传学特征及种间遗传距离分析

CO I 条码序列能够有效的用于鱼类物种的鉴别和鱼类形态学分类系统的补充和修订(王中锋等, 2009), 在形态学特征鉴定与分子辅助分类相结合的

分类研究中已被广泛运用(柳淑芳等, 2010), 李渊等(2014)通过对福建省沿海鳎属鱼类标本的形态特征及线粒体 CO I 基因片段序列的研究, 发现该研究标本为福建沿海鳎属鱼类新纪录种—中国鳎, 张馨月等(2014)运用 CO I 基因 DNA 序列标记对我国西南大洋远洋渔业的部分渔获物鱼种的形态学鉴定结果进行分析, 发现智利长吻鳎属于长吻鳎属, 并选择 *Dipturus chilensis* 为其有效名。本研究采用 ClustalW2 对狮子鱼标本的 23 个 CO I 部分序列和 17 个已发表狮子鱼科鱼类 CO I 同源序列进行聚类 and 排序, 保留同源序列, 长度为 650–652 bp。利用 MEGA 4.0, 所有样本共检测到 3 个单倍型: S1、S3、S4、S9、S20、S22 为单倍型 I, S5–S8、S10–S19、S21 为单倍型 II, S2 为单倍型 III, 其中单倍型 I、II 与单倍型 III 差异较大。分析其 CO I 基因片段核苷酸组成, 4 种碱基的含量比例相近(图 2)。G 含量最低(17.8%, 18.1%), A+T 的含量(52.9%, 55.4%)均高于 G+C 含量(47.1%, 44.6%)。狮子鱼科平均碱基含量比例分别为 A: 23.1%, T: 31.4%, C: 27.7%, G: 17.8%。

结合形态学特征, 可确定单倍型 III 即样本 S2 单



图 1 狮子鱼样品的体表特征(a–f 分别为不同体表特征的狮子鱼个体)

Fig.1 Body characteristics of Liparidae specimens(a–f individuals represent Liparidae specimens with different body surface characteristics)

1) 易新文. 饲料营养影响大黄鱼体色的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 1–8

表 3 狮子鱼标本的形态学特征
Tab.3 Morphological characteristics of Liparidae specimens

编号 Number	体长 Body length (mm)	体表特征 Body characteristics	胸鳍 Pectoral fin	臀鳍 Anal fin	背鳍 Dorsal fin	尾鳍 Caudal fin	幽门盲囊 Pyloric caecum	头长/体长 Head length/Body length	体高/体长 Body depth/Body length	头长/吻长 Head length/Snout length	眼间隔/眼径 Interorbital space/Eye diameter
S1-S4	112-256	体表覆盖明显黑褐色横斑(图 1b)The surface of body is covered with transverse spots which are clear and black brown (Fig.1 b)	43-45	34-35	42-43	10-11, 长方形, 后端截形 Rectangle, posterior part of caudal fin truncated	54-55	0.23-0.25	0.21-0.23	2.4-2.5	3.1-3.5
S5-S9	110-246	体表具有不规则斑纹, 眼部存在放射性白色条带, 头部及尾部存在明显纵纹(图 1a) There are irregular dapples on the surface of the body, white radioactive stripes in margin of eye and clear longitudinal lines in the head and the caudal of body (Fig.1 a)	43-44	34-35	42-43	10-11, 长方形, 后端截形 Rectangle, posterior part of caudal fin truncated	54-56	0.23-0.24	0.22-0.23	2.5-2.6	3.6-3.9
S10-S13, S17, S19-S23	125-295	头及体侧具褐色或黑褐色细点, 臀鳍黑色, 尾鳍基部有 1 白斑(图 1c, e)There are many thin points in the head and both sides of the body which are brown or dark brown and a white spot in the base of the caudal fin; the anal fin is black (Fig.1 c, e)	44-45	34-35	42-43	10-11, 长方形, 后端截形 Rectangle, posterior part of caudal fin truncated	54-55	0.25-0.26	0.21-0.24	2.4-2.6	3.2-3.8
S14-S16, S18	108-274	体表为红褐色, 头、体具有许多纵行细纹, 背鳍、尾鳍、臀鳍及胸鳍鳍膜外缘灰黑色(图 1d)The surface of the body is red brown; there are many thin longitudinal patterns in head and body; outer margin of membrane of dorsal, caudal, anal and pectoral fin are black ((Fig.1 d)	43-46	34-35	42-43	10-11, 长方形, 后端截形 Rectangle, posterior part of caudal fin truncated	55-56	0.23-0.24	0.21-0.23	2.4-2.5	3.1-3.6
S2	70	头及体背部有很多大小不相等的白色圆斑, 背鳍基部两侧存在 6-7 个斑点, (图 1f) There are many unequal white round spots in the head and back of body and 6-7 spots in both sides of the base part of dorsal fin (Fig.1 f)	37	30	36	13, 长方形, 后圆凸形 Rectangle, posterior part of caudal fin rotund and convex	14	0.23	0.24	3.4	2.76

表 4 狮子鱼科 16 种鱼两两比对的种间、种内遗传距离
Tab.4 Genetic distance within-species and pairwise-species in 16 Liparidae species

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
细纹狮子鱼 <i>L. tanakae</i> (JF952785)	0.002																		
单倍型 I	0.002	0.003																	
单倍型 II	0.002	0.003	0.003																
单倍型 III	0.134	0.134	0.136	0.132															
斑点狮子鱼 <i>L. callyodon</i> (HQ712548)	0.117	0.119	0.119	0.115	0.139														
格林兰狮子鱼 <i>L. tuniatus</i> (HM421759)	0.090	0.092	0.092	0.088	0.142	0.121													
蝌蚪狮子鱼 <i>L. fabricii</i> (HQ712550)	0.880	0.090	0.090	0.086	0.138	0.119	0.014												
细尾狮子鱼 <i>L. gibbus</i> (HM421753)	0.066	0.067	0.067	0.064	0.132	0.113	0.055	0.053											
美狮子鱼 <i>L. pulchellus</i> (FJ164725)	0.119	0.121	0.121	0.121	0.151	0.154	0.123	0.115	0.123										
戴氏狮子鱼 <i>L. demmyi</i> (FJ164720)	0.060	0.062	0.062	0.059	0.134	0.111	0.056	0.055	0.008	0.121									
弗氏狮子鱼 <i>L. floriae</i> (GU440375)	0.136	0.134	0.138	0.134	0.136	0.101	0.130	0.126	0.128	0.158	0.128								
光皮狮子鱼 <i>L. fucensis</i> (GU440376)	0.059	0.060	0.060	0.057	0.134	0.113	0.058	0.056	0.009	0.123	0.002	0.130							
纵带狮子鱼 <i>L. mucosus</i> (EU403074)	0.148	0.148	0.150	0.146	0.164	0.145	0.127	0.121	0.142	0.130	0.136	0.159	0.138						
喉肛狮子鱼 <i>N. pelagicus</i> (FJ164906)	0.164	0.166	0.166	0.166	0.214	0.169	0.165	0.161	0.157	0.173	0.159	0.175	0.161	0.201					
蜂巢短吻狮子鱼 <i>C. cypselurus</i> (FJ164439)	0.156	0.158	0.158	0.154	0.169	0.150	0.148	0.140	0.152	0.167	0.154	0.166	0.156	0.159	0.168				
细鳍短吻狮子鱼 <i>C. rastrinus</i> (JF952697)	0.158	0.160	0.160	0.160	0.155	0.140	0.142	0.142	0.142	0.162	0.164	0.139	0.166	0.164	0.172	0.104			
圆胸副狮子鱼 <i>P. pectoralis</i> (FJ164977)	0.163	0.160	0.164	0.160	0.163	0.137	0.144	0.142	0.146	0.159	0.148	0.141	0.150	0.168	0.180	0.114	0.131		
短尾微盘狮子鱼 <i>E. caudatus</i> (FJ164562)	0.156	0.158	0.158	0.158	0.156	0.122	0.146	0.138	0.158	0.165	0.160	0.139	0.162	0.161	0.166	0.099	0.069	0.119	
须吻狮子鱼 <i>R. barbulifer</i> (GU440505)	0.144	0.146	0.146	0.142	0.157	0.126	0.124	0.121	0.136	0.157	0.138	0.137	0.140	0.157	0.155	0.100	0.119	0.097	0.111

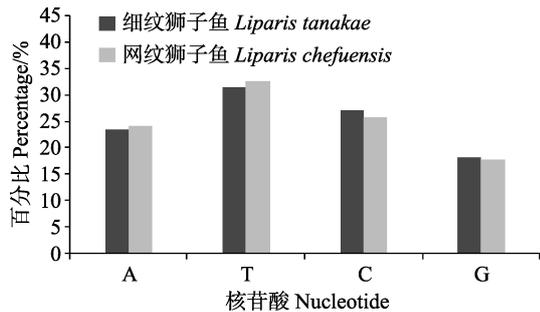


图2 细纹狮子鱼与网纹狮子鱼 CO I 基因片段的核苷酸组成

Fig.2 Nucleotide composition of partial sequences of CO I gene of *L. tanakae* and *L. chefuensis*

独为一种,即为网纹狮子鱼;单倍型 I 及单倍型 II 与已记录的细纹狮子鱼形态学特征存在少量差异。Herbert 等(2003)通过对动物界 11 个动物门的 13320 个物种分析认为,绝大多数种内遗传距离低于 0.020,大部分低于 0.010。本研究采用 MEGA 4.0,基于 Kimura-2-parameter 计算 16 种狮子鱼科鱼类的种内和种间遗传距离。单倍型 I、单倍型 II、细纹狮子鱼(JF952785)两两间的遗传距离为 0.002-0.003,远小于 0.020(Hebert *et al.*, 2003),即单倍型 I、单倍型 II 均为细纹狮子鱼。狮子鱼属内的种间遗传距离为 0.002-0.164,平均 0.108,小于科内平均遗传距离。细纹狮子鱼的种内遗传距离为 0.002-0.003,其与网纹狮子鱼遗传平均距离为 0.134(表 4),与戴氏狮子鱼、细尾狮子鱼、光皮狮子鱼距离仅为 0.057-0.067,遗传距离最大为喉肛狮子鱼,0.214。

本研究中,细纹狮子鱼小个体(100-200 mm)体表存在多种花纹,与点纹狮子鱼、斑纹狮子鱼相似,但 CO I 鉴定均为细纹狮子鱼,并且细纹狮子鱼部分标本的可数和可量性状也与历史文献中略有差异,这是否与自然海域存在杂交个体或者鱼类长期对环境的适应有关,还需要进一步研究。

致谢:中国水产科学研究院黄海水产研究所柳淑芳研究员协助测定了分子生物学的数据,资源室的同仁协助取样,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王中锋,郭昱嵩,陈荣玲,等.南海常见硬骨鱼类 CO I 条形码序列.海洋与湖沼,2009,40(5):608-614
- 王成辉.鱼类体色变异的遗传基础研究进展简述.上海海洋大学学报,2012,21(5):737-742
- 成庆泰,郑葆珊.中国鱼类系统检索.北京:科学出版社,1987,483-487
- 朱元鼎,张春霖,成庆泰.东海鱼类志.北京:科学出版社,1963,491-505
- 刘蝉馨,秦克静.辽宁动物志:鱼类.大连:辽宁科学技术出版社,1987,409-414
- 李渊,张丽艳,宋普庆,等.福建省沿海鳉属(*Sillago*)鱼类新纪录种—中国鳉(*Sillago sinica* Gao and Xue, 2011).应用海洋学报,2014,33(4):546-552
- 张波,金显仕,戴芳群.黄海中南部细纹狮子鱼的摄食习性及其变化.水产学报,2011,35(8):1199-1207
- 张春霖,成庆泰,郑葆珊.黄渤海鱼类调查报告.北京:科学出版社,1955,266-272
- 张馨月,刘岩,张秀梅,等.基于 CO I 基因的西南大西洋部分经济鱼类 DNA 条形码鉴定.水生生物学报,2014,38(6):1161-1167
- 陈大刚.黄渤海渔业生态学.北京:海洋出版社,1991,383-386
- 陈云龙,单秀娟,周志鹏,等.黄海细纹狮子鱼种群特征的年际变化.生态学报,2013,33(19):6227-6235
- 周志鹏,金显仕,单秀娟,等.黄海中南部细纹狮子鱼的生物学特征及资源分布的季节变化.生态学报,2012,32(17):5550-5561
- 单秀娟,陈云龙,周志鹏,等.黄海中南部细纹狮子鱼繁殖生物学特征的年际变化.渔业科学进展,2014,35(3):1-8
- 柳淑芳,陈亮亮,戴芳群,等.基于线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用.海洋与湖沼,2010,41(2):223-232
- 姜卫民.细纹狮子鱼的食性及其食物消耗量初探.中国水产科学,1996,3(3):8-15
- 薛莹,徐宾铨,高天翔,等.北黄海细纹狮子鱼摄食生态的初步研究.中国水产科学,2010,17(5):1066-1074
- Balushkin AV. Volodichthys gen. nov. new species of the primitive snailfish (Liparidae: Scorpaeniformes) of the southern hemisphere. Description of new species V. Solovjevae sp. nov. (Cooperation Sea, the Antarctic). J. Ichthyol, 2012, 52(1): 1-10
- Chernova NV, Stein DL, Andriashev AP. Family Liparidae Scopoli 1777-snailfishes. Calif Acad Sci Annotated Checklists of Fishes. 2004, 31: 1-72
- Fujii T, Jamieson AJ, Solan M, *et al.* A large aggregation of *Liparids* at 7703 meters and a reappraisal of the abundance and diversity of hadal fish. BioScience, 2010, 60(7): 506-515
- Hebert PD, Cywinsha A, Ball SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B, 2003, 270(1512): 313-321
- Jin XS, Zhang B, Xue Y. The response of the diets of four carnivorous fishes to variations in the Yellow Sea ecosystem. Deep Sea Res. (II Top Stud Oceanogr), 2010, 57(11-12): 996-1000
- Kido K. New and rare species of the genus *Paraliparis* (family Liparidae) from southern Japan. Jpn J Ichthyol, 1985, 31(4): 362-368
- Orr JW. *Lopholiparis flerxi*: A new genus and species of snailfish

(Scorpaeniformes: Liparidae) from the Aleutian Islands, Alaska. Copeia, 2004, (3): 551–555
 Stein DL, Chernova NV, Andriashev AP. Snailfishes (Pisces: Liparidae) of Australia, Including Descriptions of Thirty

New Species. Rec Aust Mus, 2001, 53(3): 341–406
 Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. Phil Trans R Soc B, 2005, 360: 1847–1857

(编辑 江润林)

Analysis of Liparidae Species in Central and Southern Yellow Sea

YANG Tao^{1,2,3}, SHAN Xiujuan^{2,3}①, CHEN Yunlong^{2,3,4}, DAI Fangqun^{2,3}, ZHOU Zhipeng²

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 4. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract To identify snailfish specimens collected in the central and southern Yellow Sea, both morphology method and cytochrome oxidase subunit gene I analysis were conducted in this paper. The results showed that 22 specimens were *Liparis tanakae* according to meristic and measurable characteristics, including the fin ray number of pectoral fin, anal fin, dorsal fin, caudal fin, the number of pyloric caecum, the ratios of head length/body length, body depth/body length, head length/snout length, interorbital space/eye diameter *etc.* In all *L. tanakae* specimens, 4 specimens were covered with obvious brown transverse spots. Five specimens had irregular spots, white radiation lines in ocular region, obvious longitudinal grain in the head and caudal fin. Nine specimens had the brown or black brown fine spots on the head and body side, one white patch in the base of caudal fin, and black anal fin. Another 4 specimens had reddish-brown with longitudinal striate, the fin membrane edge of dorsal fin, anal fin, pectoral fin, and caudal fin. There was one specimen belonged to *Liparis chefuensis* that had the irregular white spots in the head and body back, long caudal fin, the round convex at its back end, 6–7 dense spots in the two sides of the base of dorsal fin. These results were supported by the cytochrome oxidase subunit gene I analysis. The genetic distance between 22 *L. tanakae* specimens were 0.002–0.003, and the genetic distance between *L. tanakae* and *L. chefuensis* was 0.134. The genetic distance between *L. tanakae* and the other species, for example *L. dennyi*, *L. gibbus*, *L. fucensis* were 0.057–0.067. These findings indicated that Liparidae species in the Yellow Sea were mainly composed of *L. tanakae*.

Key words Liparidae species; Morphological characteristics; Cytochrome oxidase subunit gene I; Central and southern Yellow Sea

① Corresponding author: SHAN Xiujuan, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

鄱阳湖通江水道翘嘴鲌(*Culter alburnus*)的生物学参数估算*



张燕萍 吴斌 方春林 陈文静^① 贺刚 傅培峰
周辉明 王生 俞泽溪

(江西省水产科学研究所 农业部湖泊渔业资源环境科学观测实验站 南昌 330000)

摘要 利用2012年3月–2013年2月在鄱阳湖通江水道进行的定置网渔获物调查的数据,运用软件FiSAT II对翘嘴鲌(*Culter alburnus*)的生长参数以及种群补充模式进行了估算。结果显示,鄱阳湖通江水道翘嘴鲌体长范围为93–645 mm;体长(L , mm)和体重(W , g)的关系式为 $W = 0.9 \times 10^{-5} L^{3.029}$ ($R^2 = 0.975$, $n = 317$), von Bertalanffy生长方程的各参数:渐近体长 $L_{\infty} = 677.25$ mm, 生长系数 $K = 0.140$, 理论生长起点年龄 $t_0 = -0.854$ 。总死亡系数 $Z = 1.514/a$, 自然死亡系数 $M = 0.173/a$, 捕捞死亡系数 $F = 1.341/a$ 。鄱阳湖通江水道翘嘴鲌开发率 $E = 0.886$, 资源处于过度利用状态。种群补充模式表明,鄱阳湖通江水道翘嘴鲌种群补充期在4–8月。因此,建议适当延长鄱阳湖的禁渔期,以利于其资源的恢复与保护。

关键词 翘嘴鲌; 鄱阳湖; FiSAT II; 生长

中图分类号 Q178.53 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0026-05

通江水道始于湖口水域,止于水道末端的新乡池水域,全长约40 km,是连通鄱阳湖与长江的唯一通道,也是江湖鱼类交流的必由之路。作为长江干流仅存的两个大型通江湖泊之一,鄱阳湖是江湖洄游性鱼类重要的摄食、肥育场所,同时也是—些过河口洄游性鱼类的繁殖通道或繁殖场所,在长江鱼类种质资源和生物多样性保护方面发挥着重要作用(常剑波等,1999)。

翘嘴鲌(*Culter alburnus*)是鲌属中体型最大的一种,尤其在我国中东部平原地区的江河、湖泊和水库中,其产量最高,是我国内陆天然水域中的重要经济鱼类之一。翘嘴鲌在鄱阳湖中占有重要位置,近些年,由于过度捕捞,水域生态条件的变迁以及水质污染等原因,鄱阳湖天然野生翘嘴鲌种群资源量逐年下降并呈现低龄化、小型化的趋势。目前,关于鄱阳湖通江水道鱼类研究报道较少,有关鄱阳湖通江水道上翘嘴

鲌生长参数未见报道。本研究根据2012年3月–2013年2月鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的周年监测数据,建构了翘嘴鲌体长频率数据库,运用FiSAT II软件(杨少荣等,2010;吴斌等,2013;高春霞等,2014)中的相关模块估算了翘嘴鲌的生长和死亡参数,旨在探讨鄱阳湖通江水道生境条件下,鱼类的生存状况,进而为指导鄱阳湖翘嘴鲌的合理捕捞规格、繁殖保护和可持续利用提供科学依据,同时也为该湖泊鱼类资源的科学管理与合理开发提供参考建议,促进鄱阳湖渔业持续、健康发展。

1 材料与方法

1.1 数据来源

2012年3月–2013年2月每月中下旬在鄱阳湖通江水道屏峰段进行实地渔业资源调查,随机抽样定置

* 江西省科技重大专项(20114ABG01100-1-02-2)、江西省科技计划项目(20141BBF60036, 20135BBF61117)、赣鄱英才555工程刀鲚调查专项基金和农业部长江中上游渔业资源环境重点野外科学观测测试验站开放基金(YWTZ/(014-0)共同资助。张燕萍, E-mail: zhangyanpingxie@163.com

① 通讯作者: 陈文静, 研究员, E-mail: 418215117@qq.com

收稿日期: 2014-10-10, 收修改稿日期: 2015-01-20

网采集的翘嘴鲌,共测量了翘嘴鲌 73.74 kg、317 尾。对采集到的翘嘴鲌进行体长和体重测定,分别精确到 1 mm 和 0.1 g。

1.2 计算方法

1.2.1 体长和体重关系 采用幂函数关系拟合翘嘴鲌的体长和体重关系,关系式为: $W = aL^b$ (殷名称, 1995)。式中, W 为体重(g); L 为体长(mm); a 为条件因子; b 为幂指数。

1.2.2 生长参数推算 以 10 mm 为组距,将体长分为 56 组,依次为 90–100 mm、100–110 mm...630–640 mm、640–650 mm。分别采用 FiSAT II 软件中的 ELEFAN I 法、Shepherd's 法对鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的生长参数 L_∞ 、 K 进行估算(Gayanilo *et al*, 2005)理论生长起点年龄 t_0 ,是根据 Pauly(1980)经验公式获得。

$$\ln(-t_0) = -0.3922 - 0.2752 \ln L_\infty - 1.038 \ln K$$

式中, t_0 为理论生长起点年龄; L_∞ 为渐近体长; K 为生长系数。

运用 FiSAT 软件中的体长变换渔获曲线法估算

总死亡系数 Z ,采用 FiSAT II 中自然死亡率估算模块估算自然死亡率 M (Pauly *et al*, 1987; 詹秉义, 1995)。
 $\text{Log}M = 0.0066 - 0.279 \log L_\infty + 0.6543 \log K + 0.4634 \log T$ 。

1.2.3 种群补充模式 种群补充模式是依据其体长数据,利用 FiSAT II 软件进行推算,输入参数 L_∞ 、 K ,重构鱼类每年的种群补充期。

2 结果

2.1 体长和体重分布

通过周年监测发现,鄱阳湖通江水道翘嘴鲌体长范围为 93–645 mm,其中 120–180 mm 为优势体长组,250–310 mm 为次优势体长组,优势和次优势体长组的个体分别占总个体数的 46.37%和 24.61%。体重范围为 6.7–2650 g,优势体重小于 100 g,占总数的 51.74%。通江水道翘嘴鲌体长和体重分布见图 1 和图 2。

2.2 体长与体重关系

将鄱阳湖通江水道翘嘴鲌体长(L , mm)和体重(W , g)

表 1 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌每月渔获物生物学参数

Tab.1 Biological parameters of monthly catches for *Culter alburnus* in the waterway connecting the Poyang Lake and the Yangtze River

采样时间(月) Sampling time (Month)	数量 Number	体长 Body length (Mean±SD)	体重 Body weight (Mean±SD)
1 月(January)	26	20.8±8.3	168.2±169.6
2 月(February)	16	19.5±9.1	175.2±204.8
3 月(March)	52	18.4±8.5	113.1±164.7
4 月(April)	21	20.2±10.2	179.5±308.6
5 月(May)	19	21.5±8.9	173.5±230.2
6 月(June)	23	21.9±5.3	182.2±246.8
7 月(July)	57	22.2±9.8	200.2±415.9
8 月(August)	24	27.8±9.9	307.0±263.2
9 月(September)	12	23.9±8.6	215.8±237.7
10 月(October)	29	19.5±7.8	154.2±261.2
11 月(November)	20	28.8±7.8	359.1±251.5
12 月(December)	18	27.3±7.8	363.7±469.0

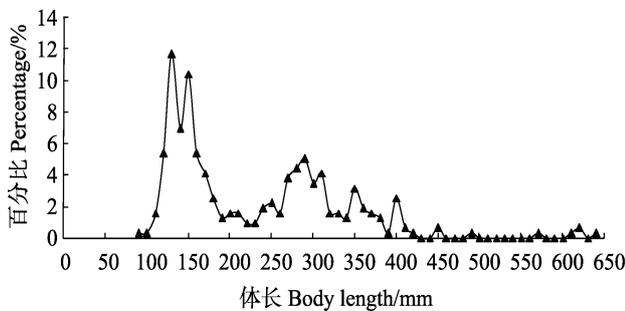


图 1 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌体长分布

Fig.1 Body length distribution of *C. alburnus* in the waterway connecting the Poyang Lake and the Yangtze River

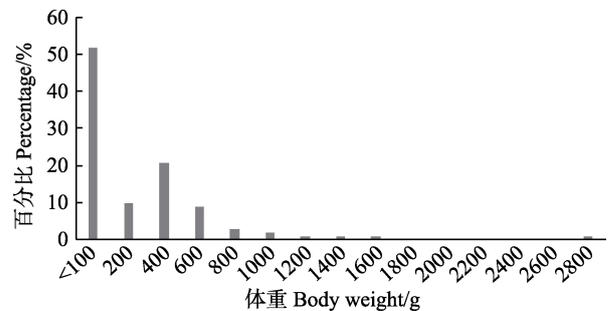


图 2 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌体重分布

Fig.2 Body weight distribution of *C. alburnus* in the waterway connecting the Poyang Lake and the Yangtze River

进行幂指数曲线拟合,结果表明,其体长和体重关系的最优回归方程为: $W = 0.9 \times 10^{-5} L^{3.029}$ ($R^2=0.975, n = 317$), 且其幂指数值为 3.029, 略大于 3 ($P>0.05$), 为等速生长类型(图 3)。

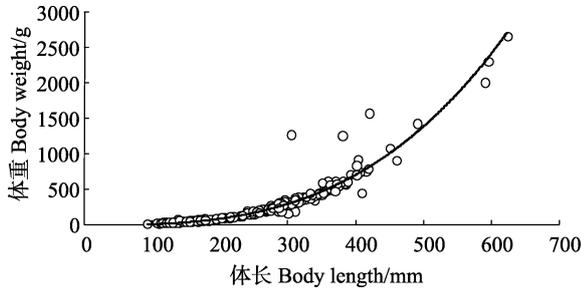


图 3 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌体长和体重关系式
Fig.3 Body length-weight relationship of *C. alburnus* in the waterway connecting the Poyang Lake and the Yangtze River

2.3 生长参数及生长方程

翘嘴鲌为等速生长(其幂指数值稍大于 3), 因此, 可以用 VBGF 生长方程来描述其生长规律。输入体长数据后, 运行 FiSAT II 软件中的 ELEFAN I 法或 Shepherd's 法中的 K 扫描模块均可得其渐近体长 677.25 mm, 生长参数 $K = 0.140$ 。进一步将上述结果代入公式, 得到鄱阳湖通江水道翘嘴鲌理论生长起点年龄 $t_0 = -0.854$, 因此, 其体长、体重生长方程分别为: $L = 677.25[1 - e^{-0.140(t+0.854)}]$; $W = 3377.4[1 - e^{-0.140(t+0.854)}]^{3.029}$, 并绘制出其生长曲线(图 4)。

根据体长变换渔获曲线法估算鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的总死亡系数(Z), 即以年龄表示的线性方程用体长来表示。回归数据点的选取以“未全面补充年龄段和全长接近渐近全长的年龄段不能用来回归”为

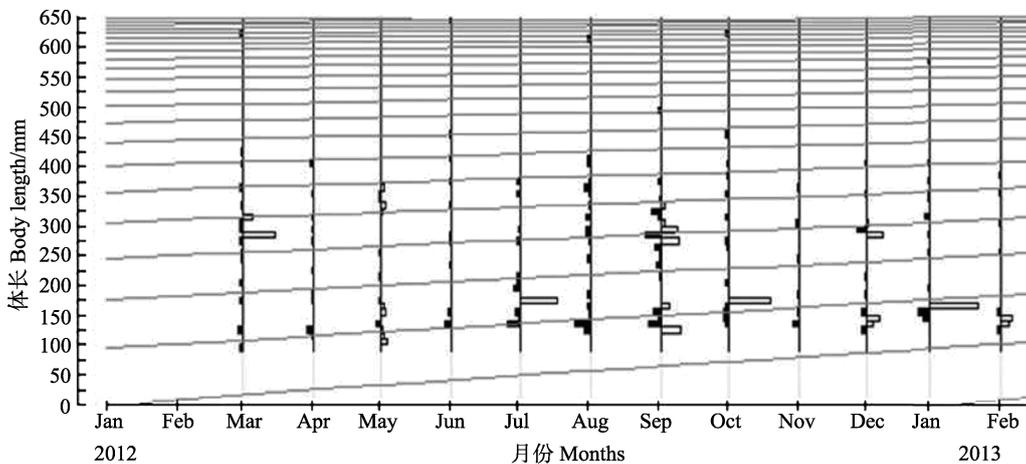


图 4 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的体长频率时间序列及应用 Shepherd's 方法估计的生长曲线
Fig.4 Size frequency of *C. alburnus* in the waterway connecting the Poyang Lake and the Yangtze River and growth curves estimated by Shepherd's method

原则, 选择了 16 个点进行线性回归(图 5), 拟合的直线方程为: $\ln(N/t) = -1.514t + 13.262$ ($R^2=0.9363$), 估算的总死亡系数 $Z=1.514$, 95%的置信区间为 1.740-1.287。

本研究还选择了另一个常用估算总死亡系数的方法, 即软件中的 B-H 模式, 鄱阳湖通长江水道 317 尾翘嘴鲌的平均体长为 229.08 mm, 最小体长为 93 mm。根据体长频率数据估算的生长参数 $L_{\infty} = 677.25$ mm, $K=0.140$, $T=19.0^{\circ}\text{C}$ (本研究采用实测月平均水温), 带入 Pauly(1987)经验公式计算得出, 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的自然死亡系数 $M=0.173$ 。总死亡系数 Z 为自然死亡系数 M 和捕捞死亡系数 F 之和, 本研究分别把体长变换渔获曲线法和 B-H 模式法估算的总死亡系数与自然死亡系数进行比较, 发现用 B-H 模式法估算的总死亡系数明显不合理, 因此取体长变换渔获曲线法所得的总死亡系数 $Z = 1.514$, 计算出捕捞死亡

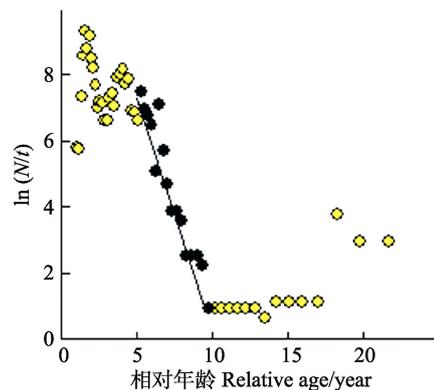


图 5 根据体长变换渔获曲线估算总死亡系数
Fig.5 Estimation of total mortality parameter from length converted catch curve

黑点(估算点)和黄点(舍弃点)均表示体长组
The body length group are shown respectively by black spots (estimation point) and yellow dots (cut-off point)

系数 $F=1.341$; 由 $E=F/Z$ 得出鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的开发率 $E=0.886$ 。为了量化平均水温、生长系数 K 和渐近体长 L_{∞} 对自然死亡系数 M 估算的影响, 本研究设计了不同的梯度水平下, 进行相关估算, 所得结果见表 2。

表 2 不同条件下鄱阳湖通江水道翘嘴鲌自然死亡系数的估算

Tab.2 Estimation of natural mortality parameter for *Culter alburnus* in the waterway connecting the Poyang Lake and the Yangtze River under different conditions

平均水温 Means of water temperature(°C)	18.0	18.5	19.0	19.5	20.0
M	0.168	0.170	0.173	0.175	0.177
K	0.160	0.150	0.140	0.130	0.120
M	0.188	0.180	0.173	0.164	0.156
L_{∞} (mm)	611.22	643.39	677.25	710.86	746.40
M	0.178	0.175	0.173	0.170	0.168

2.4 种群补充

种群补充模式表明, 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的种群补充是连续的, 即 4-8 月为主要补充期(图 6)。

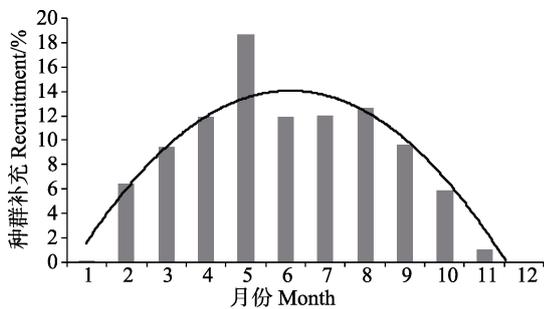


图 6 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌种群补充模式

Fig.6 Recruitment pattern of *C. alburnus* in the waterway connecting the Poyang Lake and the Yangtze River

3 讨论

多年调查资料显示, 2002 年以后, 鄱阳湖经济鱼类种群结构呈现低龄化、小型化; 渔获物个体偏小, 种群资源量不断下降。通过对鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的周年监测发现, 其优势体在 120-180 mm 和 250-310 mm, 体重主要集中在 100 g 以下。理论上推算, 鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的最大体长可达 677.25 mm,

体重可达 3377.4 g, 这表明通江水道翘嘴鲌的生长潜力远没有发挥出来, 这可能是因为其处于江、湖交流通道这一特殊生境, 水道的挖沙、吸螺等活动相对较频繁, 使得生态环境相对恶劣, 过度捕捞也进一步加剧了翘嘴鲌的小型化。

鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的渐近体长 L_{∞} (677.25 mm) 和渐近体重 (3377.4 g) 明显小于鄱阳湖湖区(张小谷, 2008)、兴凯湖(韩英等, 2005; 赵春霞等, 2006)、武湖(胡秋元等, 2000)、松花江水系(黄权等, 2003)以及徐家河水库(覃亮, 2009¹⁾)等水域的研究结果, 这与通江水道翘嘴鲌种群结构呈现低龄化、小型化趋势是相吻合的。该研究中鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的体长体重关系式中的 b 值为 3.029, 与兴凯湖、徐家河水库的研究结果相一致(韩英等, 2005; 赵春霞等, 2006; 覃亮, 2009¹⁾), 但小于鄱阳湖区、武湖等水域(胡秋元等, 2000; 张小谷, 2008²⁾), 表示不同水域翘嘴鲌的生长速度不同, 这可能与水域环境、饵料丰度及种质资源等有关。

从捕捞强度来看, 按照 Gulland(1971)提出的关于一般鱼类最适利用率为 0.5 来判断, 本研究中鄱阳湖通江水道翘嘴鲌的开发率 $E=0.886$, 说明资源处于过度利用。通江水道翘嘴鲌的生长参数值为 0.140, 小于鄱阳湖湖区(0.1667)(张小谷, 2008), 但明显大于武湖(0.10)(胡秋元等, 2000)、兴凯湖(0.093 和 0.117)(韩英等, 2005; 赵春霞等, 2006)及徐家河(0.0899)(覃亮, 2009¹⁾), 这可能与本研究是基于体长频率数据进行相关估算, 而其他研究是基于年龄结构数据进行推算有关。体长频率法是利用体长频率的时间序列对参数进行估算, 可以较好地反映鱼体 1 龄以内的生长情况, 而通过年龄拟合的生长曲线存在无法描述 1 龄以内鱼体生长的天然缺陷(高春霞等, 2014)。

目前鄱阳湖禁渔时间是 3 月 20 日-6 月 20 日, 本研究发现通长江水道翘嘴鲌种群补充期峰值是出现在 4-8 月, 而翘嘴鲌的繁殖高峰期在 6 月中旬-8 月上旬。因此, 为了给通江水道翘嘴鲌提供一个良好的繁衍栖息地, 应适当地延长鄱阳湖的禁渔期, 对翘嘴鲌资源的恢复与保护具有重大现实意义。

参 考 文 献

杨少荣, 马宝珊, 孔焰, 等. 三峡库区木洞江段圆口铜鱼幼鱼的生长特征及资源保护. 长江流域资源与环境, 2010, 19(2): 52-57

1) 覃亮. 徐家河水库翘嘴鲌年龄与生长和繁殖生物学研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2009, 13-44
2) 张小谷. 鄱阳湖四种鲌形态与生长的比较研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2008, 71-77

- 吴斌, 方春林, 贺刚, 等. FiSAT II 软件支持下的体长股分析法探讨. 南方水产科学, 2013, 10(4): 94-98
- 赵春霞, 王秀娜. 兴凯湖翘嘴红鲌的生物学特性及养殖研究现状. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18(5): 48-50
- 胡秋元, 陶仁勇, 龚世园, 等. 武湖翘嘴红鲌年龄和生长的研究. 水利渔业, 2000, 20(2): 46-47
- 殷名称. 鱼类生态学. 北京: 中国农业出版社, 1995, 1-200
- 高春霞, 田思泉, 戴小杰. 淀山湖刀鲚的生物学参数估算及其单位补充量渔获量. 应用生态学报, 2014, 25(5): 1506-1512
- 黄权, 刘春力, 赵静, 等. 松花江水系翘嘴红鲌生长模型的研究. 吉林农业大学学报, 2003, 25(1): 105-106
- 常剑波, 曹文宣. 通江湖泊的渔业意义及其资源管理对策. 长江流域资源与环境, 1999, 8(2): 153-157
- 韩英, 王昕阳, 尹海富. 兴凯湖翘嘴红鲌生长式型的研究. 大连水产学院学报, 2005, 20(3): 218-221
- 詹秉义. 渔业资源评估. 北京: 中国农业出版社, 1995, 312-315
- Gayanilo F, Sparre P, Pauly D. The FAO - ICLARM Stock Assessment Tools II (User's Guide). Rome: FAO Computerized Information Series (Fisheries) 2005,
- Gulland JA. Fish stock assessment: A manual of basic methods. New York: FAO/ Wile. 1971, Ser 1, 223
- Pauly D, Moggan GR. Length-based methods in fisheries research ICL ARM Conference proceedings. 1987
- Pauly D. On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temperature in 175 fish stocks. J Mar Sci, 1980, 39(2): 175-192

(编辑 江润林)

The Estimation of Biological Parameters for *Culter alburnus* in the Waterway Connecting the Poyang Lake and the Yangtze River

ZHANG Yanping, WU Bin, FANG Chunlin, CHEN Wenjing^①, HE Gang, FU Peifeng, ZHOU Huiming, WANG Sheng, YU Zexi

(Fisheries Research Institute of Jiangxi Province, Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment in Poyang Lake, Ministry of Agriculture, Nanchang 330000)

Abstract In the present study, monthly carapace length frequency data of *Culter alburnus* were collected from the set net fishery survey in the waterway connecting the Poyang Lake and the Yangtze River from March 2012 to February 2013. ELEFAN I and Shepherd's methods in the software package FiSAT II were used to analyze the growth, mortality rates and recruitment pattern of an unexploited population of *C. alburnus*. The results showed that the length of *C. alburnus* population ranged from 93 to 645 mm, and that the relationship between body length (L , mm) and body weight (W , g) can be expressed as $W=0.9 \times 10^{-5} L^{3.029}$ ($R^2=0.975$, $n=317$). The estimated parameter for von Bertalanffy growth equation was $L_{\infty}=677.25$ mm, $K=0.140$, and $t_0=-0.854$. Total mortality (Z) was 1.514/a, natural mortality (M) was 0.173/a, and fishing mortality (F) was 1.341/a. The exploitation rate of *C. alburnus* was 0.886, suggesting resources of *C. alburnus* were on the state of overexploitation in the study area. The recruitment pattern with less efficiency from April to August suggested that fishing ban period should be adjusted in order to restore and conserve the populations of *C. alburnus*.

Key words *Culter alburnus*; Poyang Lake; FiSAT II; Growth

① Corresponding author: CHEN Wenjing, E-mail: 418215117@qq.com

基于 BP 人工神经网络的大沽河湿地 海水水质综合评价*



徐 勇^{1,2} 赵 俊¹ 过 锋¹ 乔向英¹ 张 艳¹ 陈聚法^{1①}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 中国海洋大学化学化工学院 青岛 266100)

摘要 水体环境包含多个影响因素, 因素间大多具有非线性相关性, 为了能够客观地对大沽河湿地海水水质进行综合评价, 以神经网络为基础, 利用溶解氧、化学需氧量、无机氮、活性磷酸盐、石油类 5 个指标作为评价因子, 建立了 5×5×1 拓扑结构的 BP 人工神经网络模型, 通过该模型对大沽河湿地水质进行综合评价。同时采用单因子评价方法、内梅罗指数法对该海域环境状况进行评价, 以期更好的对比评价 BP 人工神经网络模型的优缺点。BP 人工神经网络模型评价结果显示, 大沽河河道内站点的水质均为劣Ⅳ类水质, 入海河流断面及其周边海域也达到了Ⅲ类及以上水质标准。调查海域无机氮含量超标严重, 劣Ⅳ类及以上站位的数量占总调查站位的 59.3%, 富营养化状态明显。通过单因子评价法、内梅罗指数法、BP 人工神经网络 3 种评价方法对大沽河湿地水质进行评价, 发现Ⅲ类及以上水质站位占总调查站位比例分别为 89%、96%、56%。与单因子评价法、内梅罗指数法相比, BP 人工神经网络模型设计合理、评价结果科学可靠, 是一种更加快捷、客观全面及实用的水体质量评价方法。

关键词 大沽河湿地; BP 人工神经网络; 海水水质; 综合评价

中图分类号 S938.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0031-07

科学构建水质评价方法, 是我国海洋环境安全评估研究的重要内容。但由于对水质风险的理解不同及区域差异, 水质安全评价指标的选取和评价等级的划分就各有不同(胡昌军, 2013)。目前水质安全评价的主要方法有层次分析评价法、主成分分析评价法、模糊数学评价法等, 然而这些方法的结果与评价指标密切相关, 其评价结果受到主观限制因素的影响较大, 在实际应用中存在一定的限制性(尹海龙等, 2008a)。

人工神经网络(Artificial Neural Network, ANN)是根据人脑神经网络结构及功能而建立的一种信息处理系统(从爽等, 1998; 李雪等, 2010), 能够在结果与前提条件之间建立一定的联系, 适于二者间无明确关系数据的评价。BP(Back Propagation)网络模型为反

向传播网络模型, 因其工作状态稳定, 算法先进, 成为 ANN 中最具代表性且被广泛应用的一种模型。它由输入层、输出层和隐含层 3 个层次组成, 不同层神经元之间均为单向互连。若输出结果与预期输出存在误差, 则会调整为反向传递并将误差值按连接路径逐层反向传播, 并修正各层连接权值。当不同训练模式均满足要求时, 则训练完成(Hanbay *et al*, 2008; 李雪等, 2010)。由于 BP 人工神经网络模型具有高度非线性映射特点, 能够有效减小主观因素的影响, 因而其被广泛用于环境质量、生态系统评价等领域(Ferreira *et al*, 2011; Kuo *et al*, 2007; Palani *et al*, 2008; 杨琴等, 2006)。基于目前尚无针对大沽河湿地水质的 BP 神经网络综合评价模型, 本研究尝试从水体石油烃、无机

* 山东省海洋生态环境与防灾减灾重点实验室开放基金资助项目(2012003)。徐 勇, E-mail: xuyong@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 陈聚法, 研究员, E-mail: chenjf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-11-24, 收修改稿日期: 2015-01-20

氮、活性磷酸盐、溶解氧、化学耗氧量等因素建立BP神经网络评价方法,并与单因子评价方法、内梅罗指数法进行对比,以期为大沽河湿地环境保护和管理规划提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

大沽河流域面积 7511.5 km²,是胶东半岛最大的河流。其年均径流量、降水量分别为 6.31×10³ m³、734.24 mm,5–9月降水量占年降水总量的80%左右,是胶州湾营养盐、重金属等污染因素的主要输入源(周召千等,2008)。大沽河湿地面积约 400 km²,位于大沽河下游,具有人工湿地与自然湿地的双重属性,为胶东地区典型的河口海湾型湿地。另外,大沽河湿地潮间带、浅海区域也是我国滩涂贝类的重要增殖区。本研究共设调查站位 27 个(图 1)。水体中石油烃、溶解氧、无机氮、活性磷酸盐、化学耗氧量含量均按照《海洋监测规范》(GB17378.4–2007)相关方法测定。

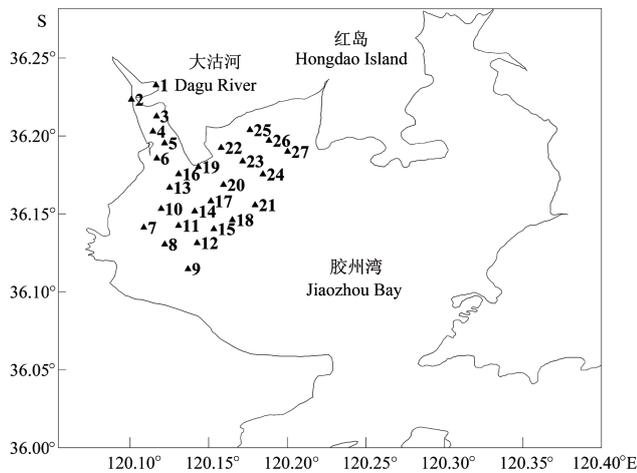


图 1 调查区域和采样站位
Fig.1 Surveyed area and sampling sites

1.2 BP神经网络评价方法

1.2.1 评价标准 本次采用《GB 3097–1997》作为BP神经网络模型的评价标准,对大沽河湿地水体中石油烃、无机氮、活性磷酸盐、溶解氧、化学耗氧量 5 个指标进行综合评价。在《GB 3097–1997》中石油烃、活性磷酸盐两个因子没有明确划分 2 类标准,为更好的对分类结果进行综合评价,利用取平均值法对这两个指标的 2 类标准进行划分,具体划分标准见表 1。

表 1 水质评价基本项目标准
Tab.1 Basic assessment standards of sea water quality

Sea water quality 海水水质标准(mg/L)					评价等级
溶解氧	化学需氧量	磷酸盐	无机氮	石油烃	Order of evaluation
DO	COD	PO ₄ ³⁻	DIN	TPHs	
6	2	0.015	0.2	0.025	I
5	3	0.0225	0.3	0.05	II
4	4	0.003	0.4	0.03	III
3	5	0.045	0.5	0.5	IV
2	6	0.06	0.6	0.7	劣IV

1.2.2 训练样本的建立及数据归一化处理 建立BP网络模型需要足量的样本数,如果训练样本数太少会导致最终的BP神经网络模型实用性不强,识别结果不够理想,因而需要对样本进行扩充以保证所建立模型的可靠性及正确度(楼文高,2002)。本研究对每个水质指标的分级区间内随机生成 110 个样本,5 个因子共获得 2750 个样本,从而保证BP神经网络模型的适用性、鲁棒性(杨芳等,2008)。由于BP神经网络的输出值在 0–1 之间,所以需将以上 5 个参数的样本进行归一化处理。数据归一化处理公式参照杨洁等(2004)方法进行。

1.2.3 BP神经网络模型学习 本研究BP神经网络评价模型输入层为 5 个神经元,其对应于表 1 中 5 项污染因子。输出层采用 1 个神经元,其 5 类因子的综合输出目标值为 0.2、0.4、0.6、0.8、1,以对应于 5 类评价等级(李雪等,2010)。隐含层神经元数量的确定采用目前较为普遍的Kolmogorv定理(董长虹,2005;赵振宁,1996)确定隐含层单元数,根据Kolmogorv定理经反复模拟,最终确定隐含层神经元个数为 5,因而创建的网络模型结构为 5×5×1。接下来利用Newff函数建立BP神经网络模型,其中trainlm为训练函数,learngdm为网络学习函数,mse为性能函数。输入层、隐含层之间的传递采用logsig函数,隐含层、输出层之间的传递采用purelin函数,通过trainlm函数得出训练结果。本研究设定训练次数为 5×10⁴次,学习速率为 0.05,训练误差达到 1×10⁻⁶。通过表 2 的训练结果可以发现,梯度为 0.0002,训练误差达到 1×10⁻⁸,实际输出值与预期值的相对误差均低于 1%,以上结果均满足训练要求。因而,本研究建立的BP神经网络模型运行稳定、可靠性强,能够满足大沽河湿地水质评价要求。

1.3 单因子评价法

单因子评价法是通过对照水体中各因素监测结果与其判定标准确定水质类别,并选取各因子的最差

表 2 BP 网络训练样本与学习结果

Tab.2 Training sample and learning result of BP network

评价等级 Order of evaluation	期望输出值 Desired output	网络输出值 Actual output	相对误差 Relative error	均方根误差 RMSE	梯度 Gradient
I	0	0.0005	0.0005		
I	0.2	0.2002	0.0002		
II	0.4	0.4001	0.0001	3×10 ⁻⁸	0.0002
III	0.6	0.6000	0.0000		
IV	0.8	0.7998	0.0002		
V	1.0	0.9998	0.0002		

类别作为评价结果(尹海龙等, 2008b)。本研究采用《海水水质标准》(GB3097-1997)对水质状况进行评价。

1.4 内梅罗水污染指数法

利用内梅罗水污染指数法对大沽河湿地水质进行评价(Nemerow, 1974), 其数学表达式为:

$$P = \sqrt{\frac{P_{\max}^2 + P_{\text{avg}}^2}{2}} \quad (1)$$

$$P_i = \frac{c_i}{s_i} \quad (2)$$

式中, P 为内梅罗综合评价指数; P_{\max} 为 P_i 的最大值, P_{avg} 为 P_i 的平均值。内梅罗水质污染指数等级划分如表 3 所示。

表 3 内梅罗污染指数等级划分

Tab.3 Water pollution degree based on Nemerow pollution index

水质等级 Pollution degree	I	II	III	IV	劣IV
P	$P \leq 0.6$	$0.6 < P \leq 1.0$	$1 < P \leq 2.6$	$2.6 < P \leq 5$	$P > 5$

2 结果与分析

以大沽河湿地海域 27 个站位(图 1)为例, 将石油烃、溶解氧、无机氮、活性磷酸盐、化学耗氧量 5 项污染因子的监测数据(表 4)进行归一化处理(杨洁等, 2004)。将归一化后的数值作为输入值, 通过 BP 人工

表 4 BP 网络海水水质评价模型测试实例

Tab.4 Sea water quality assessment model testing case of BP network

站位 Station	溶解氧 DO(mg/L)	化学需氧量 COD(mg/L)	磷酸盐 PO ₄ ³⁻ (mg/L)	无机氮 DIN(mg/L)	石油烃 TPHs(mg/L)	网络输出 Output	水质等级 Water quality
1	8.98	9.41	0.3880	0.5782	0.0955	0.8252	劣IV
2	8.63	12.85	0.3655	0.6581	0.0892	0.8348	劣IV
3	8.93	8.99	0.2939	0.7534	0.0750	0.8348	劣IV
4	8.82	8.65	0.2545	0.8296	0.0734	0.8348	劣IV
5	8.83	10.75	0.2026	0.8908	0.0121	0.8372	劣IV
6	9.16	10.58	0.1759	0.9867	0.0734	0.8348	劣IV
7	9.10	1.46	0.0157	0.9392	0.0203	0.4136	III
8	9.16	1.21	0.0133	0.8453	0.0185	0.4013	III
9	9.11	1.16	0.0101	0.6747	0.0145	0.4041	III
10	9.42	1.27	0.0129	0.9000	0.0151	0.4055	III
11	9.74	1.16	0.0104	0.8118	0.0156	0.4041	III
12	8.88	1.05	0.0087	0.7489	0.0166	0.4015	III
13	10.06	1.10	0.0242	0.7928	0.0198	0.3585	II
14	9.34	1.14	0.0182	0.0667	0.0262	0.0572	I
15	9.44	1.20	0.0129	0.6022	0.0335	0.4074	III
16	10.03	4.01	0.1028	1.0123	0.0435	0.6279	IV
17	9.84	2.57	0.0373	0.6051	0.0479	0.4638	III
18	9.54	1.07	0.0187	0.4565	0.0514	0.2786	II

续表 4

站位 Station	溶解氧 DO(mg/L)	化学需氧量 COD(mg/L)	磷酸盐 PO ₄ ³⁻ (mg/L)	无机氮 DIN(mg/L)	石油烃 TPHs(mg/L)	网络输出 Output	水质等级 Water quality
19	9.59	1.09	0.0171	0.2925	0.0093	0.1593	I
20	9.36	1.04	0.0132	0.2971	0.0198	0.1707	I
21	9.66	0.93	0.0073	0.3049	0.0277	0.1839	I
22	9.20	1.10	0.0143	0.2864	0.0209	0.1667	I
23	9.29	1.01	0.0127	0.2943	0.0191	0.1676	I
24	9.37	0.89	0.0101	0.3114	0.0161	0.1751	I
25	9.31	1.31	0.0256	0.3020	0.0166	0.1626	I
26	9.72	1.15	0.0163	0.3187	0.0162	0.1849	I
27	9.83	0.97	0.0145	0.3342	0.0156	0.1836	I

神经网络模型训练得到输出值,通过水质评价基本项目标准(表 1)进行水环境质量评价。

从 27 个站位生态环境综合评价结果的分布上看, BP 网络评价结果为 1-6 号站位水质最差,为劣 IV 类水质; 16 号站位为 IV 类水质, 7-12、15、17 号站位为 III 类水质; 13、18 号站位为 II 类水质, 其余均为 I 类水质。III 类及以上水质站位数量占总调查站位的 56%。从地理位置上看, 大沽河河道中 6 个站位污染最为严重, 其河道下游 15、16、17 三个站位的污染程度达到 III 类及以上污染水平。位于洋河入海口的 7-12 站位, 其 BP 网络评价结果为 III 类污染。而在受径流影响较小的东北部调查海域 BP 网络评价结果均为 I 类标准。从平面分布来看, 污染程度较重区域均在近岸的排污口及河口附近, 这些区域易受工业排污、生活废水及养殖废水影响, 汇集大量的污染物, 导致该水域海水污染程度非常严重。随着离岸距离的增加, 污染程度有逐渐减少的趋势。由整体趋势看, 大沽河湿地水质污染程度自大沽河入口向潮间带方向呈现辐射状减小趋势。由此说明, 大沽河湿地主要为点源污染, 污染源为入海废水。

由单因子评价结果(表 5)可以发现, 调查海域 16 个站点水质为劣 IV 类, 其他站位水质均为 II 类及以上程度污染, III 类及以上水质站位比例为 89%。单因子指数评价法以各污染指标最差类别作为判定水质类别依据, 在该海域决定单因子评价结果的是无机氮、磷酸盐两个因素, 从而导致单因子评价结果高于 BP 网络评价结果。调查海域无机氮含量超《海水水质标准》(GB3097-1997) II 类标准站位为 26 个, 劣 IV 类站位为 16 个, 占总调查站位的 59.3%, COD、活性磷酸盐劣 IV 类站位比例分别为 22.2%、22.2%, 无机氮是该调查海域主要污染指标。无机氮、活性磷酸盐含量较高, 主要由 3 个方面导致的。首先调查站位大多位于大沽

河口, 受大沽河入海径流影响明显。同时此区域也是胶州湾重要的水产养殖区域, 生物作用强烈, 营养盐的循环速率较大, 无机营养盐丰富。除此之外, 周边众多池塘养殖废水的排放无疑也是水中营养盐的重要来源之一。综合来讲, 调查区域处于海湾较浅的养殖区, 能够接纳周边主要河流带来的工农业废水、生活污水和养殖排水, 同时离湾口又远, 水交换率小且交换周期较长, 因此这些站位所处海域海水的营养盐含量较高, 富营养化状态非常明显。

内梅罗指数评价法结果显示(表 6), 大沽河湿地 25 个站位水质均为 II 类及以上污染程度, 其中劣 IV 水质站位为 7 个, IV 类水质站位 6 个, III 类站位 13 个, III 类及以上水质站位比例为 96%。与单因子评价方法相比, 内梅罗指数法相对能更准确的反映各项水质指标的污染状况。主要因为内梅罗指数法既考虑了最大污染因子, 同时又兼顾了各项污染因子平均值, 从而减少单项最大污染因子的影响, 增强了评价结果的可靠性。

跟单因子评价结果相比, BP 人工神经网络评价结果优于单因子评价结果。这主要是由于 BP 人工神经网络是对评价因子进行多次训练之后得出的综合评价结果, 而单因素评价法过分突出污染最重因子的权重, 忽略其他水质指标, 因而 BP 人工神经网络模型所获得的评价结果更加客观、可信, 接近实际。在污染因子浓度较高情况下, 内梅罗指数法与 BP 网络评价法结果相差不明显; 但在污染因子浓度相差较大的情况下, 内梅罗指数法评价结果偏高。内梅罗指数法虽然兼顾了最高值、平均值的影响, 但在评价指标数量较多或者评价指标数值差异较大时, 会过分放大最高值的作用, 削弱平均值对最终结果的影响力度。所以, 与以上两种方法相比, BP 人工神经网络评价方法既综合考虑了各种污染因子与水质标准的隶属

表 5 单因子评价法水质评价结果

Tab.5 Single-factor water quality evaluation results

站位 Station	溶解氧 DO	化学需氧量 COD	磷酸盐 PO ₄ ³⁻	无机氮 DIN	石油烃 TPHs	单因子评价 Single factor evaluation
1	I	劣IV	劣IV	劣IV	III	劣IV
2	I	劣IV	劣IV	劣IV	III	劣IV
3	I	劣IV	劣IV	劣IV	III	劣IV
4	I	劣IV	劣IV	劣IV	III	劣IV
5	I	劣IV	劣IV	劣IV	I	劣IV
6	I	劣IV	劣IV	劣IV	III	劣IV
7	I	I	III	劣IV	I	劣IV
8	I	I	I	劣IV	I	劣IV
9	I	I	I	劣IV	I	劣IV
10	I	I	I	劣IV	I	劣IV
11	I	I	I	劣IV	I	劣IV
12	I	I	I	劣IV	I	劣IV
13	I	I	III	劣IV	I	劣IV
14	I	I	III	I	I	III
15	I	I	I	劣IV	I	劣IV
16	I	IV	I	劣IV	I	劣IV
17	I	II	IV	劣IV	I	劣IV
18	I	I	III	IV	III	IV
19	I	I	III	II	I	III
20	I	I	I	II	I	II
21	I	I	I	III	I	III
22	I	I	I	II	I	II
23	I	I	I	II	I	II
24	I	I	I	III	I	III
25	I	I	III	III	I	III
26	I	I	III	III	I	III
27	I	I	I	III	I	III

表 6 内梅罗指数评价法评价水质结果

Tab.6 Water quality evaluation results of Nemerow pollution index

站位 Station	P_i					内梅罗指数 Nemerow index	水质等级 Water quality
	DO	COD	PO ₄ ³⁻	DIN	TPHs		
1	0.0	3.1	12.9	1.9	0.3	18.96	劣IV
2	0.0	4.3	12.2	2.2	0.3	17.96	劣IV
3	0.0	3.0	9.8	2.5	0.3	14.46	劣IV
4	0.0	2.9	8.5	2.8	0.2	12.59	劣IV
5	0.0	3.6	6.8	3.0	0.0	10.12	劣IV
6	0.0	3.5	5.9	3.3	0.2	8.93	劣IV
7	0.0	0.5	0.5	3.1	0.1	3.46	IV
8	0.0	0.4	0.4	2.8	0.1	3.11	IV
9	0.0	0.4	0.3	2.2	0.0	2.48	III
10	0.0	0.4	0.4	3.0	0.1	3.30	IV
11	0.0	0.4	0.3	2.7	0.1	2.98	IV
12	0.0	0.4	0.3	2.5	0.1	2.75	IV

续表6

站位 Station	P_i					内梅罗指数 Nemerow index	水质等级 Water quality
	DO	COD	PO_4^{3-}	DIN	TPHs		
13	0.0	0.4	0.8	2.6	0.1	2.95	IV
14	0.0	0.4	0.6	0.2	0.1	0.94	II
15	0.0	0.4	0.4	2.0	0.1	2.25	III
16	0.0	1.3	3.4	3.4	0.1	5.28	劣IV
17	0.0	0.9	1.2	2.0	0.2	2.40	III
18	0.0	0.4	0.6	1.5	0.2	1.77	III
19	0.0	0.4	0.6	1.0	0.0	1.14	III
20	0.0	0.3	0.4	1.0	0.1	1.15	III
21	0.0	0.3	0.2	1.0	0.1	1.16	III
22	0.0	0.4	0.5	1.0	0.1	1.12	III
23	0.0	0.3	0.4	1.0	0.1	1.13	III
24	0.0	0.3	0.3	1.0	0.1	1.18	III
25	0.0	0.4	0.9	1.0	0.1	1.35	III
26	0.0	0.4	0.5	1.1	0.1	1.24	III
27	0.0	0.3	0.5	1.1	0.1	1.28	III

程度,又使分类标准更加细致,并且数据更加具有连续性,从而使评价结果更加准确科学。另外, BP 网络评价方法运算速度快、建模简单,可以对大量的样本进行训练学习,方便快捷。

3 结论

本研究以大沽河湿地海域为研究区域,以该海域的溶解氧、营养盐、化学需氧量以及石油烃为评价因素,通过创建 BP 人工神经网络模型综合评价该区域水质污染状况。

以人工神经网络为基础,建立了 $5 \times 5 \times 1$ 结构的大沽河湿地 BP 神经网络水质评价模型。该模型对大沽河湿地水质综合评价结果显示,大沽河河道站点水质都为劣IV类水质,入海河流断面及其周边也达到了III类及以上水质标准。调查海域无机氮含量超标严重,劣IV类及以上站位的数量占总调查站位的59.3%,富营养化状态非常明显。因而,应该采取有效措施,降低养殖废水、工农业污水排放量,避免水质恶化,提高大沽河湿地水质质量,从而保证湿地区域的生态环境安全。

应用单因子、内梅罗指数法、BP 人工神经网络3种评价方法对大沽河湿地水质进行评价,结果显示,III类及以上水质站位比例分别为89%、96%、56%。BP 人工神经网络评价方法能够综合考虑各种污染因子与水质标准的隶属程度,降低最大污染因子对总体指标的影响力,提高各项指标平均值的权重,评价结

果更加客观、合理,同时分类标准进一步细致化,数据更加具有连续性,从而使评价结果更加准确科学。

综上所述,本研究建立的 BP 人工神经网络模型运行稳定、可靠性强,能够满足大沽河湿地水质评价要求。

参 考 文 献

- 从爽. 面向 Matlab 工具箱的神经网络理论与应用. 合肥: 中国科技大学出版社, 1998, 1-29
- 尹海龙, 徐祖信. 我国单因子水质评价方法改进探讨. 净水技术, 2008a, 27(2): 1-3
- 尹海龙, 徐祖信. 河流综合水质评价方法比较研究. 长江流域资源与环境, 2008b, 17(5): 729-733
- 李雪, 刘长发, 朱学慧, 等. 基于 BP 神经网络的海水水质综合评价. 海洋通报, 2010, 29(2): 225-230
- 杨芳, 原松. 基于 BP 神经网络的水环境质量评价模型的研建. 人民长江, 2008(23): 46-48
- 杨洁, 吴贻名, 万飏, 等. 汉江水质综合评价的 BP 网络方法. 武汉大学学报(工学版), 2004, 37(1): 51-54
- 杨琴, 谢淑云. BP 神经网络在洞庭湖氨氮浓度预测中的应用. 水资源与水工程学报, 2006, 17(1): 65-70
- 周召千, 刘素美, 戚晓红, 等. 胶州湾潮滩沉积物-水界面交换对海湾营养盐的影响. 海洋环境科学, 2008, 27(5): 422-426
- 赵振宇. 模糊理论和神经网络的基础与应用. 北京: 清华大学出版社, 1996
- 胡昌军. 双隐层 BP 神经网络模型在区域水安全评价中的应用. 水资源与水工程学报, 2013, 24(3): 196-200
- 海水水质标准(GB3097-1997). 北京: 环境科学出版社, 1997
- 海洋监测规范(GB17378.4-2007). 北京: 中国标准出版社, 2000

- 董长虹. MATLAB 神经网络与应用. 北京: 国防工业出版社, 2005
- 楼文高. BP 神经网络模型在水环境质量综合评价应用中的一些问题. 水产学报, 2002, 26(1): 90–96
- Ferreira NC, Bonetti C, Seiffert WQ. Hydrological and water quality indices as management tools in marine shrimp culture. *Aquaculture*, 2011, 318: 425–433
- Hanbay D, Turkoglu I, Demir Y. Prediction of wastewater treatment plant performance based on wavelet packet decomposition and neural networks. *Expert Systems with Applications*, 2008, 34: 1038–1043
- Kuo JT, Hsieh MH, Lung WS, *et al.* Using artificial neural network for reservoir eutrophication prediction. *Ecol Model*, 2007, 200(1–2): 171–177
- Nemerow NL. *Scientific stream pollution analysis*. McGraw Hill, 1974
- Palanis, Liong SY, Tkalich P. An ANN application for water quality forecasting. *Mar Poll Bull*, 2008, 56(9): 1586–1597

(编辑 江润林)

Integrated Quality Assessment of Dagu River Wetland Sea Water Based on Back Propagation (BP) Artificial Neural Network

XU Yong^{1,2}, ZHAO Jun¹, GUO Feng¹, QIAO Xiangying¹, ZHANG Yan¹, CHEN Jufa¹①

(1. *Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-Environment, Shandong Province, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071*; 2. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100*)

Abstract Most water environmental factors have a nonlinear correlation. To assess sea water quality, the Back Propagation (BP) artificial neural network model was established based on the concept and principle of artificial neural network. Taking DO, COD, DIN, PO_4^{3-} and petroleum as the evaluation factors, the BP neural network was established to evaluate the water quality for Dagu River wetland. The results indicated that the sea water quality of Dagu River was worse than the class IV water quality standard, and the water quality of its surrounding area were or exceeded the class III water quality standard. The survey sea area was mainly affected by inorganic nitrogen and phosphate. The study found that the number of inorganic nitrogen content that exceeded IV levels accounted for 59.3% of all respondents, and that eutrophication was obvious. These results indicated that BP neural network method was reasonable in design and higher in generalization compared with single factor evaluation and Nemerow pollution index, and that it is an objective, effective and practical environmental quality evaluation method. Thus, BP artificial neural network was a better level of fast, handy and valid ability to evaluate the sea water quality.

Key words Dagu River wetland; BP artificial neural network; Sea water quality; Integrated assessment

① Corresponding author: CHEN Jufa, E-mail: chenjf@ysfri.ac.cn

波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)的胚胎发育 及初孵仔鱼的形态观察*



陈猛猛 骆剑 陈国华^① 文鑫 吴光灿 李文深 韩玉龙

(海南大学海洋学院 热带生物资源教育部重点实验室 海口 570228)

摘要 波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)是世界著名的濒危礁栖鱼类,具有特殊的生物学特性和较高的经济价值。本研究对波纹唇鱼的胚胎发育及初孵仔鱼的形态进行了观察,将其全过程划分为胚盘形成、卵裂、囊胚、原肠-神经胚、器官发生和孵化6个阶段,共26个发育时期。波纹唇鱼的受精卵为无色透明的浮性卵,圆球形,卵径为(635.6±50.0) μm,具油球1个,其卵径显著小于多数海水鱼类。在水温27.7-29.0℃、盐度30的条件下,受精卵历时15 h 30 min 孵出仔鱼。初孵仔鱼全长为(1305.5±50.0) μm,卵黄囊前部长于仔鱼头部,且油球位于卵黄囊的最前端。结果显示,波纹唇鱼卵子较小,胚胎发育较快,其较快的胚胎发育与较小的初孵仔鱼可能是导致胚后发育阶段死亡率较高的主要原因。

关键词 波纹唇鱼; 胚胎发育; 卵径; 神经板; 初孵仔鱼

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0038-07

波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)属鲈形目、隆头鱼科、唇鱼属,又称苏眉鱼、拿破仑鱼,主要分布在非洲东岸、红海、印度洋以及太平洋等海域(Sadovy *et al.*, 2003),在我国主要分布在东海的南部,台湾附近海域以及海南等南海海域(沈世杰, 1993)。波纹唇鱼是体型最大的珊瑚礁鱼类、高级经济食用鱼类(Choat *et al.*, 1994),由于过度捕捞而濒临绝种,被列入CITES《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录II和IUCN(国际自然保护联盟)濒危动物红皮书。波纹唇鱼是一种社会性性逆转鱼类,是研究繁殖生物学的理想材料。国外学者对波纹唇鱼的资源分布(Sadovy *et al.*, 2003)、性逆转现象(Sluka, 2005)、栖息环境(Choat *et al.*, 2006)、人工繁殖(Dorenbosch *et al.*, 2006)等有报道,周丽青等(2010)对波纹唇鱼染色体与核型进行了研究, Hu 等(2013)报道了其微卫星分子标记,王永波等(2010)对其消化道黏液细胞进行了研究。

鱼类的早期生活史包括胚胎、仔鱼和稚鱼发育期,主要研究受精卵的特性及孵化、仔稚鱼生理和生

态习性(开口饵料、营养需求和饵料密度等因子),是保护鱼类野生资源增殖和人工养殖业种苗培育的基础。胚胎发育作为鱼类早期生活史的第一环节,对仔稚鱼的生长发育具有理论指导意义。唇鱼属鱼类有10余种,分布广泛,尚未见有关胚胎发育的报道。波纹唇鱼作为珊瑚礁生态系统中的稀有物种,本研究通过对其胚胎发育过程的观察,以期了解波纹唇鱼繁殖生理,为物种的保护与资源开发利用等提供基本参考资料。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源及培育

试验用波纹唇鱼亲鱼来自于海南三亚港渔排网箱人工暂养的野生个体。试验群体亲鱼16条,体重及特征见表1。亲鱼培育从2014年4月1日开始,选择海南三亚凤凰岛附近海域作为培育地点,海区水质条件良好,光照强度5000 lx、溶解氧6 mg/L左右、

* 国家“863”项目(2012AA10A414)和海南省重大专项(ZDZX2013009)共同资助。陈猛猛, E-mail: chfzeng8751@aliyun.com

^① 通讯作者: 陈国华, 教授, E-mail: chguh3240@aliyun.com

收稿日期: 2014-11-08, 收修改稿日期: 2015-02-06

表 1 试验用波纹唇鱼的性别、外形特征、重量及数量

Tab.1 Male and female, external physical characteristics, weight and quantity of *C. undulatus* in the test

性别 Sex	外表特性 Appearance characteristics	重量 Weight(kg)	数量 Quantity(ind.)
雌性 Female	呈橄榄色, 隆头不明显	5.0-15.0	11
雄性 Male	呈蓝绿色, 隆头明显	15.0-35.0	5

pH 值 8.0-8.2、水温 25-31℃、透明度 2.5-3.0 m、盐度 28-32。亲鱼放入网箱后当天不投喂, 次日开始强化培育。投喂的饵料有鲮科鱼类、螃蟹和对虾等。每天从 09:00 开始投喂, 每隔 2 h 投喂 1 次, 每次投喂量以亲鱼不再摄食为止。具体投喂方法: 将新鲜(冰冻)鲮科鱼类用干净淡水冲洗后投喂, 投喂遵循先快后慢的原则, 直到所有亲鱼不再摄食为止。培育至 5 月 10 日, 雌鱼腹部逐渐隆起, 改投鱿鱼和虾进行强化培育, 5 月 21 日亲鱼产卵。

1.2 亲鱼繁殖及受精卵的获得

本试验亲鱼为人工培育条件下自然交配产卵, 持续观察亲鱼发情追逐行为, 一旦产卵, 立即用 200 目纱绢网打捞。

1.3 受精卵的孵化与胚胎发育的观察

将捞到的卵放置在装有干净海水的 500 L 的孵化桶中充气, 海水盐度 30, 水温 27.7-29.0℃。随机取部分受精卵, Nikon MODEL YS100 光学显微镜(放大 40 倍)观察其受精发育状况。每次观察 20 颗发育正常的胚胎, 当有 50% 的胚胎发育到某一时期, 则认定为胚胎发育到该时期。描述并记录不同胚胎发育阶段的特征, 并用 Nikon 相机及时拍照。

1.4 卵径的测量及胚胎发育总积温的计算方法

显微镜下用测微尺测量受精卵卵径等数据(最小刻度为 0.01 mm)。胚胎发育总积温的计算: 胚胎发育总积温($H \cdot ^\circ C$)=胚胎发育全过程的时间(h)×水温($^\circ C$)。

1.5 初孵仔鱼的生物学特性及活力

显微镜下测量初孵仔鱼的全长、卵黄囊长径和短径, 用 1000 ml 烧杯取 20 尾初孵仔鱼, 观察其活力。

1.6 数据处理

受精卵和初孵仔鱼的可量性状数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 结果

2.1 波纹唇鱼强化培育、繁殖方式及受精卵情况

经过 30 d 的强化培育, 所有雌性个体的腹部膨

胀明显, 说明该亲鱼培育方法可行。强化培育的亲鱼 2014 年 5 月 21 日 15:30 进入发情期, 最大雄性个体不断驱逐另外 3 尾雌鱼, 直至赶至网箱角落表层。此后, 雄性最大个体开始追逐其中一条性腺发育较好的雌鱼(腹部膨胀明显), 持续追逐一段时间后, 16:40 双方游至水面, 尾部剧烈抖动 1-2 s 后繁殖行为结束, 可看到烟雾状的卵子和精子产出, 在水中弥散。此时立刻用 200 目的纱绢网打捞。共捞到卵约 10 g 左右, 镜检发现胚盘尚未形成, 持续观察到 16:52, 90% 的卵形成胚盘, 确定该批卵为正常受精卵。发现波纹唇鱼受精卵浮性, 呈圆形, 无色透明, 平均卵径为(635.6 ± 50.0) μm 。植物极有单一的油球, 静止状态下植物极朝上浮于水面, 油球的平均直径为(117.7 ± 50.0) μm 。

2.2 胚胎发育

受精卵在盐度 30.0、温度 27.7-29.0℃范围内的海水中孵化, 15 h 30 min 后, 开始有仔鱼孵化出膜。整个胚胎发育所需总积温为 424.7-444.7℃·h, 波纹唇鱼胚胎发育时序见表 2。

2.2.1 胚盘形成 波纹唇鱼的受精卵(图版 I-1)受精后 22 min, 卵质由植物极流向动物极并形成盘状突起, 称胚盘隆起(图版 I-2)。

2.2.2 卵裂阶段 受精后 32 min, 进行第 1 次卵裂, 胚盘中央由外向内缢裂为均等的两个分裂球(图版 I-3); 受精后 45 min-1 h 15 min, 进行了第 2-6 次分裂(图版 I-4-图版 I-8), 每一次形成的分裂面均与上一次的分裂面垂直。随着胚盘的分裂, 受精后 1 h 40 min, 分裂球小而多, 细胞之间的分界面不规则, 此时为多细胞期(图版 I-9)。受精后 2 h 19 min, 分裂球越分越小, 整体呈桑葚状, 进入桑葚胚期(图版 I-10)。

2.2.3 囊胚阶段 受精后 3 h 5 min, 分裂球更小, 细胞界限模糊不清, 由许多分裂球组成的囊胚层高举在卵黄上呈高帽状, 此时进入高囊胚期(图版 I-11)。随着胚层细胞不断分裂, 囊胚层表面细胞逐渐向下包, 细胞排列更紧密, 胚层高度下降, 囊胚腔可见, 进入低囊胚期(图版 I-12)。

2.2.4 原肠-神经胚阶段 低囊胚之后, 胚层细胞继续下包, 受精后 5 h 15 min, 胚层细胞抵达植物极卵黄 1/3 处, 胚环和胚盾出现, 此时为原肠早期(图版 I-13)。原肠作用继续进行, 受精后 6 h 10 min, 胚层细胞下

包卵黄达 2/3 时, 胚盾明显加长, 进入原肠中期, 从表面看, 发现此时胚盾的外胚层已分化出锥形的神经板(图版 I -14)。7 h 5 min, 隆起的胚盾不断向前推移, 下包卵黄 3/4, 进入原肠末期, 此时出现明显的神经板结构, 外观上前端宽钝而后端窄(图版 I -15)。发育到 8 h 10 min, 胚层细胞几乎下包整个卵黄, 神经板进一步发育, 形成圆筒形的神经管, 此时为神经胚期(图版 I -16)。此阶段, 由于在原肠中期已经出现神经板结构, 到原肠末期神经板结构已经完善, 故本研究将原肠期和神经胚期合称为原肠-神经胚阶段, 以表明其胚胎发育特点。

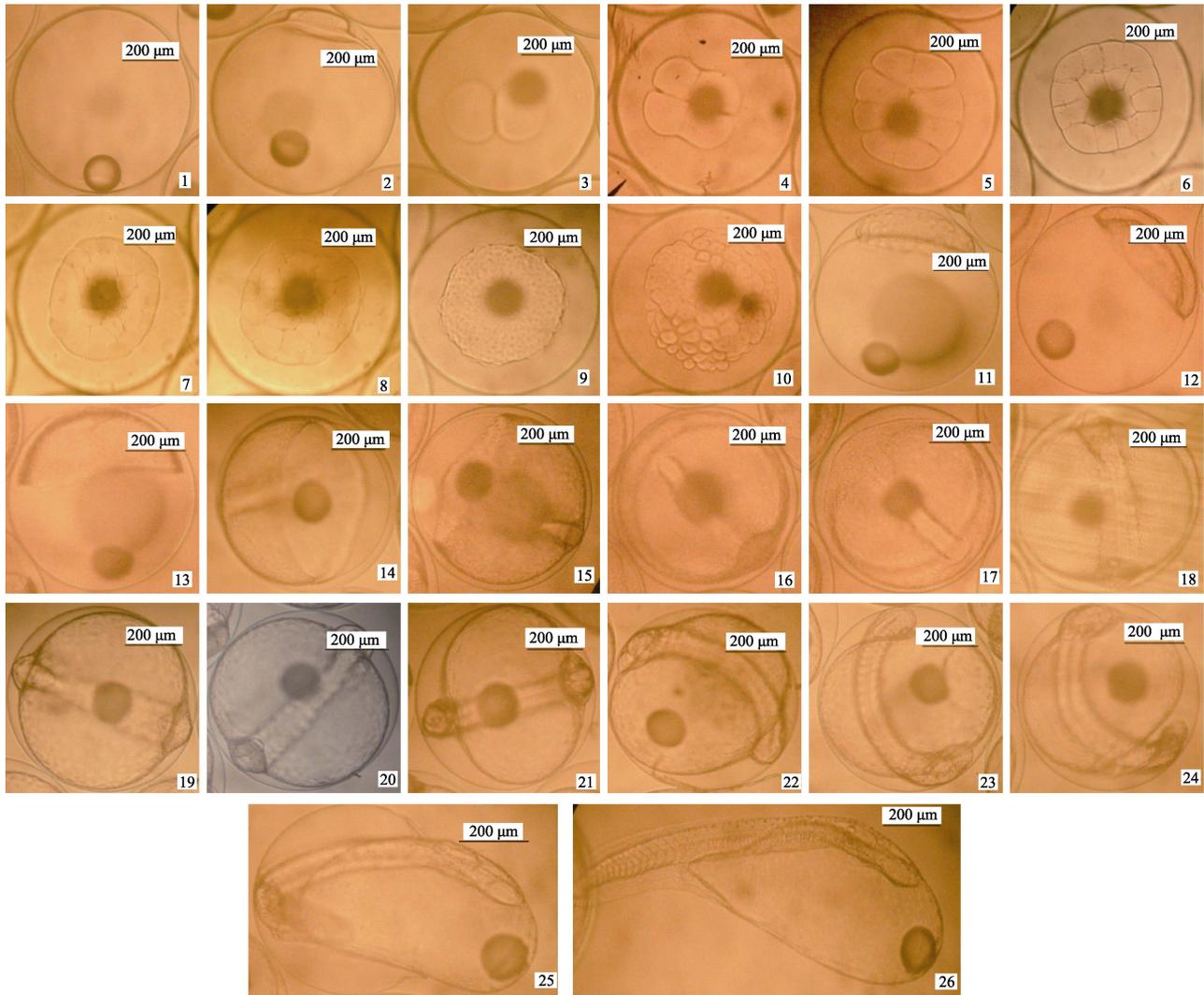
2.2.5 器官发生阶段 胚体发育至 8 h 55 min 进入眼基形成期(图版 I -17), 在胚体头部两侧出现 1 对肾形突起, 即眼的原基。受精后 9 h 20 min, 胚体中部出现 5 对体节, 尾部出现一空泡状结构, 为克氏泡, 此时为体节形成期(图版 I -18)。受精后 10 h 0 min 进

入眼囊期, 胚体头部形成长椭圆形的眼囊(图版 I -19)。距受精 10 h 29 min 进入尾芽期, 在胚体尾部, 圆锥形的尾芽形成并逐渐与卵黄囊分开(图版 I -20)。11 h 0 min, 在视杯口出现圆形的晶体, 胚体头部隆起明显, 脑可见, 此时为晶体形成期(图版 I -21)。受精后 11 h 23 min, 胚体开始表现出微弱的肌肉收缩, 肌节 12 对, 脑很清楚, 为肌肉效应期(图版 I -22)。随着发育的进行, 12 h 35 min 时, 在脊索前, 卵黄囊的前上方, 形成一串细胞即心脏原基, 此时为心脏形成期(图版 I -23)。在 13 h 6 min, 进入心跳期(图版 I -24), 心脏呈管状, 搏动有力。受精后 15 h 20 min, 胚胎的尾部间歇性剧烈摆动, 胚胎的头部率先出膜, 此为出膜期(图版 I -25), 15 h 30 min, 胚胎完全出膜, 尾部拉长, 头部在卵黄囊的后上方, 油球位于卵黄囊的前方, 此时为初孵仔鱼(图版 I -26)。

2.2.6 初孵仔鱼的生物学特性及活力 光学显微

表 2 波纹唇鱼胚胎发育全程(27.7-29.0℃)
Tab.2 Embryonic development schedule of *C. undulatus* (27.7-29.0℃)

受精后时间 Time after fertilization	胚胎发育时期 Embryonic development stage	发育特征 Developmental characteristics	图版 Plate
0	受精卵 Zygote	圆球形, 植物极具有 1 个光泽的油球	I -1
22 min	形成胚盘 Blastoderm formation	动物极的原生质向外凸起形成胚盘	I -2
32 min	2 细胞 2-cell	胚盘中央由外向内缢裂为相等的两个细胞	I -3
45 min	4 细胞 4-cell	在第 1 次分裂沟垂直的方向上进行第 2 次分裂	I -4
58 min	8 细胞 8-cell	与第 1 次分裂沟平行的方向上进行第 3 次卵裂	I -5
1 h 9 min	16 细胞 16-cell	经第 4 次分裂, 形成 16 个体积较小的细胞	I -6
1 h 15 min	32 细胞 32-cell	分裂面开始无序, 整个胚盘渐显圆形	I -7
1 h 28 min	64 细胞 64-cell	细胞间的分裂面更密, 有明显的分层现象	I -8
1 h 40 min	多细胞期 Multi-cell	细胞体积更小, 形成细胞团	I -9
2 h 19 min	桑葚胚期 Morula	细胞之间的缢裂面明显, 细胞团似桑葚球状	I -10
3 h 5 min	高囊胚 High blastaea	胚层与卵黄囊的分界面清晰可见, 呈帽状	I -11
4 h 8 min	低囊胚 Low blastaea	帽状胚盘高度下降, 有下包卵黄囊的趋势, 囊胚腔明显	I -12
5 h 15 min	原肠早期 Early archenteron	胚盘表面细胞下包卵黄囊, 背唇呈新月形, 胚环出现	I -13
6 h 10 min	原肠中期 Mid archenteron	胚层继续下包 2/3, 胚盾明显变长, 出现神经板锥形	I -14
7 h 5 min	原肠末期 Late archenteron	胚层下包卵黄 3/4, 胚盾变得更长, 神经板结构明显	I -15
8 h 10 min	神经胚期 Neurula stage	脊索可见, 神经胚头部明显膨大	I -16
8 h 55 min	眼基出现期 Primary eye appeared	胚体头部两侧, 出现 1 对半月形突起	I -17
9 h 20 min	肌节出现期 Myomere appeared	在胚体中部出现 5 对体节, 克氏泡出现	I -18
10 h 0 min	眼囊期 Optic vesicle stage	在视囊的后方出现 1 对听囊	I -19
10 h 29 min	尾芽期 Tail bud stage	胚体尾部逐渐与卵黄分离, 呈圆锥形	I -20
11 h 0 min	晶体出现期 Eye crystal appeared	在视杯口出现圆形的晶体, 胚体头部变大	I -21
11 h 23 min	肌肉效应期 Muscular contraction	胚胎开始表现微弱的肌肉收缩, 肌节 12 对	I -22
12 h 35 min	心脏出现期 Heart appeared	在脊索前, 形成一连串细胞, 即心脏原基	I -23
13 h 6 min	心跳期 Heartbeat stage	心脏呈管状, 搏动明显	I -24
15 h 20 min	孵化期 Hatching period	头部和胸部已出膜, 油球位于卵黄囊前端	I -25
15 h 30 min	初孵仔鱼 Newly-hatched larvae	胚胎破膜而出, 尾拉长, 头部膨大	I -26

图版 I 波纹唇鱼的胚胎发育时序及初孵仔鱼 ($\times 40$)Plate I Embryonic development and newly-hatched larvae of *C. undulatus* ($\times 40$)

1. 受精卵; 2. 胚盘隆起; 3. 2 细胞期; 4. 4 细胞期; 5. 8 细胞期; 6. 16 细胞期; 7. 32 细胞期; 8. 64 细胞期;
 9. 多细胞期; 10. 桑葚期; 11. 高囊胚; 12. 低囊胚; 13. 原肠早期; 14. 原肠中期; 15. 原肠末期; 16. 神经胚期;
 17. 眼基出现期; 18. 肌节出现期; 19. 眼囊期; 20. 尾芽期; 21. 晶体出现期; 22. 肌肉效应期; 23. 心脏形成期;
 24. 心跳期; 25. 孵化期; 26. 初孵仔鱼
1. Zygote; 2. Protuberant blastoderm; 3. 2-cell stage; 4. 4-cell stage; 5. 8-cell stage; 6. 16-cell stage; 7. 32-cell stage;
 8. 64-cell stage; 9. Multi-cell stage; 10. Morula stage; 11. High blastula; 12. Low blastula; 13. Early gastrula stage;
 14. Middle gastrula stage; 15. Late gastrula stage; 16. Neural embryo stage; 17. Appearance of primary eye;
 18. Myomere appeared; 19. Optic stage; 20. Tail-bud stage; 21. Crystal stage; 22. Muscular contraction;
 23. Formation of heart; 24. Heart pulsation stage; 25. Hatching stage; 26. Newly-hatched larvae

镜下观察, 初孵仔鱼胚体明显, 身体的前下方有一个大的椭圆形透明卵黄囊, 油球位于卵黄囊的最前端(图版 I -26)。测得初孵仔鱼的全长为 $(1305.5 \pm 50.0) \mu\text{m}$, 卵黄囊长径为 $(1108.7 \pm 50.0) \mu\text{m}$ 、短径为 $(370.4 \pm 50.0) \mu\text{m}$, 油球直径为 $(109.5 \pm 50.0) \mu\text{m}$ 。用 1000 ml 的烧杯取 20 尾初孵仔鱼肉眼观察, 初孵仔鱼头部向上, 侧躺悬浮于水体中, 偶尔尾部颤动做丫丫运动, 活力良好。

3 讨论

3.1 波纹唇鱼胚胎发育的特征

波纹唇鱼的胚胎发育符合一般硬骨鱼类胚胎发育特点(麦贤杰等, 2005), 但其胚胎发育过程中也具有该物种特有的发育现象: 原肠中期出现神经胚的雏

形,到原肠末期神经胚结构已经很明显。初孵仔鱼的卵黄囊位于其头部的前方,且油球位于卵黄囊的前端,这与同为礁栖性石斑鱼属的鱼类不同(图版 I -26)。

3.2 胚胎发育的速度

鱼卵的大小一般用其直径来表示,殷名称(1991)认为在鱼类早期生活史中,鱼卵的大小对其个体发育具有生态意义。鱼卵的大小对其发育速度有明显影响,卵径越大,其发育速率一般越慢。孵化天数(I)与卵径(D)的关系式为: $D=0.101I+0.67$ 。与许多珊瑚礁鱼类相比较,波纹唇鱼的卵径小,其胚胎发育速度较快,其所需总积温为 424.7–444.7°C·h,而在相近条件下,对比了 7 种石斑鱼属的鱼,包括豹纹鳃棘鲈(*Plectropomus leopardus*)(王永波等, 2009)、云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)(宋振鑫等, 2012)、点带石斑

鱼(*Epinephelus malabaricus*)(邹记兴等, 2003)、棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)(林彬等, 2010)、驼背鲈(*Cromileptes altivelis*)(区又君, 2006)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(周立斌等, 2006)及鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)(周玲等, 2010)的卵径、发育温度、胚胎发育所需时间及有效积温(表 3)。

波纹唇鱼与多种珊瑚礁鱼类相比较,其卵裂、囊胚以及原肠前中期的发育速率相近。而原肠中后期开始至出膜阶段,波纹唇鱼发育速率明显加快,表现在原肠中后期神经板已经形成(图版 I -15),而其他种类的神经板均在胚层下包整个卵黄后进入神经胚期才清晰可见。波纹唇鱼的卵径较小,使得卵裂期、囊胚期、原肠期以及神经胚期等时期的发育时间相对缩短,从而整个胚胎发育的速率相对加快。在发育环境条件相近的情况下,神经板在胚胎发育过程中出现的时间见表 4。

表 3 8 种礁栖鱼类受精卵的直径、胚胎发育过程的温度与发育所需时间

Tab.3 Fertilized egg diameter, temperature and time needed of embryonic development in 8 fish species

种类 Species	受精卵直径 Diameter of fertilized egg (mm)	发育温度 Development temperature(°C)	胚胎发育所需时间 Time for embryonic development	有效积温 Effective accumulated temperature(°C·h)
波纹唇鱼 <i>C. undulatus</i>	0.63±0.05	27.5–29.0	15 h 30 min	424.7–444.7
豹纹鳃棘鲈 <i>P. leopardus</i>	0.82±0.02	30.0–30.1	16 h 32 min	510.0–511.7
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	0.91±0.02	21.8–22.2	40 h 37 min	882.9–899.1
点带石斑鱼 <i>E. malabaricus</i>	0.76	25.0–27.6	21 h 0 min	525.0–579.6
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	0.82±0.02	27.0–28.0	21 h 16 min	594.0–616.0
驼背鲈 <i>C. altivelis</i>	0.81	25.0–27.0	24 h 10 min	600.0–648.0
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	0.78±0.16	25.0–28.0	25 h 40 min	625.0–700.0
鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	0.85	27.0–28.0	25 h 40 min	702.0–728.0

表 4 8 种礁栖鱼类的神经胚出现时间

Tab.4 Epoch of neural plate in 8 coral reef fish species

种类 Species	神经胚出现时间 Epoch of neural plate(h)
波纹唇鱼 <i>C. undulatus</i>	7
豹纹鳃棘鲈 <i>P. leopardus</i>	9
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	18
点带石斑鱼 <i>E. malabaricus</i>	10
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	8
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	10
驼背鲈 <i>C. altivelis</i>	9
鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	9

3.3 初孵仔鱼的生物学特征对其胚后发育的影响

本研究中,波纹唇鱼初孵仔鱼卵黄囊呈长椭圆形,位于仔鱼身体前下方,油球位于卵黄囊的最前端

(图版 I -26)。其他一些种类的珊瑚礁鱼类初孵仔鱼的卵黄囊一般不超过头部位置,且油球位于卵黄囊中部或后端,如点带石斑鱼(陈国华等, 2001)、七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)(区又君等, 2013)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)(刘付永忠等, 2001)以及斜带石斑鱼(张海发等, 2006)等。波纹唇鱼初孵仔鱼在开口之前是头部向上悬浮在水中,这种特殊的现象可能对后期的发育具有重要的意义。殷名称(1991)研究认为,初孵仔鱼的存活率与鱼卵的大小有关,卵径大的卵子卵黄相对较多,延长了其内源性营养向外源性营养转化的时间,有利于仔鱼的存活。再者,初孵仔鱼的大小也与卵径的大小相关。初次开口的仔鱼体长 L (mm)与卵径 D (mm)之间存在关系式: $L=4D$ 。个体大的仔鱼,主动摄食能力和逃避敌害的能力强,从而成活率高。波纹唇鱼初孵仔鱼的全长为(1.32±0.05) mm,小于斜带石斑鱼初孵仔鱼的全长(1.78±0.07) mm、七带

石斑鱼的全长(1.36±0.09) mm、棕点石斑鱼的全长(1.81±0.12) mm 以及云纹石斑鱼的全长(1.74±0.12) mm 等珊瑚礁栖鱼类。仔鱼个体小, 其口裂相对也小, 因而需要更小的开口饵料, 理论上其从内源性营养到外源性营养转化困难, 导致仔鱼期成活率低。本研究后期经过 4 次工厂化水泥池育苗, 均未能成功突破其内源性营养向外源性营养转化难题, 证明了上述观点。

参 考 文 献

- 王永波, 陈国华, 王珺, 等. 波纹唇鱼消化道黏液细胞的类型与分布. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 22–28
- 王永波, 陈国华, 林彬, 等. 豹纹棘鲷胚胎发育的初步观察. 海洋科学, 2009, 33(3): 21–26
- 区又君. 驼背鲈的胚胎发育. 海洋科学, 2006, 30(8): 17–19
- 区又君, 廖光勇, 李加儿, 等. 七带石斑鱼仔稚鱼的形态发育和生长特征. 应用海洋学学报, 2013, 32(4): 549–556
- 刘付永忠, 王云新, 黄国光, 等. 自然产卵的赤点石斑鱼胚胎及仔鱼形态发育研究. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(1): 81–84
- 麦贤杰, 黄伟健, 叶富良, 等. 海水鱼类繁殖生物学与人工繁殖. 北京: 海洋出版社, 2005, 49–52
- 邹记兴, 常林, 向文洲, 等. 点带石斑鱼的亲鱼培育、产卵受精和胚胎发育. 水生生物学报, 2003, 27(4): 378–384
- 沈世杰. 台湾鱼类志. 台北: 台湾大学动物学系, 1993, 444–456
- 宋振鑫, 陈超, 翟介明, 等. 云纹石斑鱼胚胎发育及仔、稚、幼鱼形态观察. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 26–34
- 张海发, 刘晓春, 刘付永忠, 等. 斜带石斑鱼胚胎及仔稚幼鱼形态发育. 中国水产科学, 2006, 13(5): 689–699
- 陈国华, 张本. 点带石斑鱼仔、稚、幼鱼的形态观察. 海南大学学报(自然科学版), 2001, 19(2): 151–156
- 林彬, 黄宗文, 骆剑, 等. 棕点石斑鱼胚胎发育的观察. 海南师范大学学报(自然科学版), 2010, 23(1): 87–92
- 周立斌, 邓妹芳, 张海发, 等. 斜带石斑鱼亲鱼培育和胚胎发育的研究. 惠州学院学报(自然科学版), 2006, 26(6): 36–41
- 周丽青, 杨爱国, 吴彪, 等. 波纹唇鱼染色体制备及核型的初步研究. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 54–58
- 周丽青, 杨爱国, 吴彪, 等. 波纹唇鱼染色体制备及核型的初步研究. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 54–58
- 周玲, 翁文明, 李金亮, 等. 鞍带石斑鱼胚胎发育及仔鱼形态发育、饵料转变的观察研究. 中国农学通报, 2010, 26(1): 293–302
- 殷名称. 鱼类早期生活史研究与其进展. 水产学报, 1991, 15(4): 348–358
- Choat JH, Bellwood DR. Wrasses and parrotfishes. In: Paxton JR and Eschmeyer WN(eds.), Encyclopedia of Fishes. University of New South Wales Press, Sydney, 1994, 211–215
- Choat JH, Davis CR, Ackerman JL, et al. Age structure and growth in a large teleost, *Cheilinus undulatus*, with a review of size distribution in labrid fishes. Mar Ecol Prog Ser, 2006, 318(1): 237–246
- Dorenbosch M, Grol MGG, Nagelkerken I, et al. Seagrass beds and mangroves as potential nurseries for the threatened Indo-Pacific humphead wrasse, *Cheilinus undulatus* and Caribbean rainbow parrotfish, *Scarus guacamaia*. Biol Conserv, 2006, 129(2): 277–282
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2004. 2004 IUCN Red List of Threatened Species. Electronic version available on: <http://www.redlist.org>
- Hu J, Zhu XP, Luo J, et al. Development and characterization of microsatellite loci in a threatened marine fish, *Cheilinus undulatus* (humphead wrasse). Genet Mol Res, 2013, 12(3): 2633–2636
- Parties to the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). Electronic version available on: <http://www.cites.org>
- Sadovy Y, Kulbicki M, Labrosse P, et al. The humphead wrasse, *Cheilinus undulatus*: synopsis of a threatened and poorly known giant coral reef fish. Rev Fish Biol Fish, 2003, 13(3): 327–364
- Sluka RD. Humphead wrasse (*Cheilinus undulatus*) abundance and size structure among coral reef habitats in maldies. Atoll Res Bull, 2005, 538: 189–198

(编辑 陈辉)

Embryonic Development and Morphologic Observations of Newly-Hatched *Cheilinus undulatus* Larvae

CHEN Mengmeng, LUO Jian, CHEN Guohua^①, WEN Xin, WU Guangcan,
LI Wenshen, HAN Yulong

(Key Laboratory of Tropic Biological Resources of Ministry of Education, Ocean College, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract The humphead wrasse, *Cheilinus undulatus*, is one of the most famous endangered reef fish in the world. As a social hermaphroditic fish, it has special biological characteristics and high economic value. In this study, we observed the embryonic development of *C. undulatus* and analyzed its features under a microscopy. Six periods, including zygote, cleavage, blastula, gastrula-neural, organogenesis, and hatching, were divided during the embryonic development of *C. undulatus*. These 6 periods include 26 stages, including zygote, blastoderm formation, multi-cell, morula, and tail bud stage *etc.* The results showed that *C. undulatus* had a float, transparent, spherical egg with a big oil globule. The diameter (635.6 ± 50.0) μm of the egg was obviously shorter than eggs of many marine fishes. The neural plate appeared in the mid to late gastrula stage, and the embryonic development of *C. undulatus* was remarkably quicker than other fishes under the same condition. The fertilized eggs were hatched after 15.5 h at water temperature of $27.7\text{--}29.0^\circ\text{C}$ and salinity of 30. The total length of newly-hatched larvae were (1305.5 ± 50.0) μm with an elliptic large yolk sac over the head and a shining oil globule in the front of it. These results suggest that the embryo development of *C. undulatus* was faster than many other fishes due to smaller egg. The special embryonic development features of the humphead wrasse may cause high mortality in the post embryonic stage.

Key words *Cheilinus undulatus*; Embryonic development; Fertilized egg diameter; Neural plate; Newly-hatched larvae

① Corresponding author: CHEN Guohua, E-mail: chguh3240@aliyun.com

摄食豆肽对星斑川鲷(*Platichthys stellatus*) 幼鱼肝脏蛋白表达的影响*



宋志东¹ 王际英^{1①} 李培玉² 乔洪金¹ 张利民^{1①} 郝甜甜²

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 烟台 264006; 2. 山东升索渔用饲料研究中心 烟台 265601)

摘要 为揭示饲料中添加豆肽对星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)幼鱼肝脏代谢产生的影响,利用大豆蛋白肽替代24%的鱼粉并以全鱼粉饲料为对照形成两种等氮等能的实验饲料,粗蛋白为(43.98±0.14)%、能量为(19.89±0.08) kJ/g。将240尾幼鱼分为两组,每组3个平行(40尾/桶),分别投喂两种饲料50 d后,提取肝脏蛋白进行双向电泳并用PDQuest分析差异蛋白。结果显示,在pH 4-7、分子量14.4-97.4 kDa范围内,共检测到448-470个肝脏蛋白点,有14个蛋白的表达呈两倍以上差异,其中3个为结构蛋白(中间纤维蛋白、II型细胞骨架8-样异构体X2、肌动蛋白),其他11种肝脏蛋白参与不同代谢活动。以摄食全鱼粉饲料的肝脏蛋白为对照,幼鱼摄食豆肽饲料后明显上调了9种代谢蛋白和3种结构蛋白,下调了两种代谢蛋白。本研究结果表明,星斑川鲷幼鱼摄食豆肽饲料后其肝脏代谢发生变化,即提高高密度脂蛋白的生成,增强糖酵解、降低糖原合成从而使代谢向产能方向进行,降低胰蛋白酶的合成和提高应激蛋白的生成。本研究利用比较蛋白质组学技术从肝脏蛋白表达的角度来揭示摄食豆肽对星斑川鲷幼鱼肝脏组织代谢的影响,为新型植物蛋白源的应用提供理论基础。

关键词 豆肽; 双向电泳; 肝脏蛋白; 肝脏代谢; 表达丰度

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0045-10

对海水肉食性鱼类来说,用植物蛋白替代鱼粉仍然存在较大的困难,尤其是在鲆鲽类饲料中,一些优质蛋白源包括玉米蛋白粉、豆粕、大豆浓缩蛋白替代鱼粉超过40%的比例则阻滞鱼类生长、降低饲料利用效率(Choi *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2006; Regost *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2011)。然而, Song等(2014)研究显示,酶解大豆蛋白替代饲料中70%的鱼粉对星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)幼鱼(5 g)的生长和饲料利用无负面影响,而在38%添加量的情况下还获得了比全鱼粉组更好的饲养效果。Mamaug等(2011)在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼(1 g)饲料中添加20%的大豆酶解物也获得了比全鱼粉更好的生长效果。同样,在其他酶解植物蛋白上也有类似的发现,如异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) (13 g)饲料中添加5%的酶解棉粕蛋白能促进幼鱼生长,并且提升了血清胰

岛素样生长因子的水平(Gui *et al.*, 2010)。在异育银鲫饲料中添加1.5%和3.0%的酶解棉粕促进了其生长并提高了胰蛋白酶mRNA表达水平(刘文斌等, 2006)。植物蛋白肽作为一种新型蛋白原料,虽然目前的研究显示能够对鱼体生长和消化产生积极的作用,但其对鱼体代谢的影响仍需进一步研究。

机体组织对一种营养调控的反应过程是复杂的,可能涉及多种基因和蛋白的表达或代谢途径的改变,比较蛋白质组学技术的引入使人们能够从蛋白质整体变化的角度来考虑动物生命活动的规律,为动物营养学提供了重要的研究手段和新的研究思路(李林等, 1999)。有研究显示,利用双向凝胶电泳(2-DE)和肽质谱鉴定技术可以揭示饲料营养素的改变所导致机体的一些组织蛋白表达的变化,如Martin等(2001)利用2-DE技术研究饥饿状态下虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)

* 烟台市科技发展计划项目(2013ZH348)和国家海洋公益项目(201205025)共同资助。宋志东, E-mail: szd892@126.com

① 通讯作者: 王际英, 研究员, E-mail: ytwjy@126.com; 张利民, 研究员, E-mail: ytzlm@126.com

收稿日期: 2015-02-17, 收修改稿日期: 2015-03-26

肝脏的蛋白表达的变化,发现 24 种蛋白丰度发生了改变,其中丝氨酸蛋白酶 D 在饥饿的状态下蛋白丰度显著提高,说明了饥饿所导致的鱼类代谢机制的适应性改变。Hamza 等(2010)在研究梭鲈(*Sander lucioperca*)肝脏对饲料磷脂浓度的响应时发现,56 种蛋白发生明显的改变,果糖二磷酸醛缩酶 B 和磷酸葡萄糖变位酶 1、丙酰基辅酶 A 羧化酶、肌氨酸脱氢酶以及 3 种应激蛋白的丰度随着磷脂浓度增加发生显著改变。而 Martin 等(2003)研究比较了虹鳟摄食两种含有不同比例植物蛋白饲料后肝脏蛋白的表达差异,通过分析其中 17 种蛋白的变化,揭示了饲料营养调控对虹鳟肝脏蛋白表达的影响。Rufino-Palomares 等(2011)采用比较蛋白质组学方法研究金头鲷(*Sparus aurata*)肝脏细胞对饲料中添加山楂酸的反应,发现 49 个蛋白点的丰度发生了变化,通过对其中的 10 种蛋白进行鉴定,从而解释了山楂酸对肝细胞产生作用的细胞信号通路。另外,国内的学者也已经对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(李凌云等, 2010)、大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)(吴海庆等, 2009)等几种经济鱼类肝脏组织建立了蛋白质组双向电泳技术并进行了条件优化。本研究借助双向电泳和肽质谱鉴定技术,研究摄食含有豆肽的饲料对星斑川鲈幼鱼肝脏蛋白表达的影响,并通过鉴定差异蛋白来揭示幼鱼肝脏的代谢变化。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

豆肽委托山东烟台山水海产有限公司利用大豆浓缩蛋白酶解制得(中性蛋白酶和风味酶, 50℃水解 6 h),蛋白含量为 65%,根据 Mamauag 等(2011)的方法测得水溶性氮含量约为 78%(22℃, pH=7.0)。以获得的豆肽替代 24%鱼粉,配制两种等氮等能的实验饲料:豆肽饲料(SPH)和鱼粉饲料(FM),蛋白含量为(43.98±0.14)%,能量为(19.89±0.08) kJ/g,饲料配方见表 1。

1.2 饲养管理

星斑川鲈幼鱼从山东省威海某养殖场购买,初重为(5.73±0.36) g,实验分为两组,每组设 3 个平行,每个平行 40 尾鱼,分别投喂两种配合饲料 50 d,实验在山东省海洋资源与环境研究院循环水养殖系统中进行,该循环系统带有冷凝和加热设备,可控制循环水系统温度。实验期间,每天投喂两次,每次目视鱼饱食后不再投喂。投饵 20 min 后,排掉残饵和粪便。在养殖期间,控制水温为(17.0±1.0)℃、盐度为

表 1 实验饲料的组成(%)

Tab.1 Ingredients and proximate composition of two experimental diets(%)

成分 Ingredients	豆肽饲料 SPH	鱼粉饲料 FM
鱼粉 Fishmeal	40	64
豆肽 Soy peptide	24	0
羧甲基纤维 Carboxymethyl cellulose	8.95	8.95
小麦粉 Wheat flour	8.8	8.0
α-淀粉 α-starch	4	4
鱼油 Fish oil	10	10
大豆卵磷脂 Soy lethin	1	1
硫代甜菜碱 Sulfbetain	0.5	0.5
复合维生素 Vitamin premix ^a	1	1
复合矿物质 Mineral premix ^b	2	2
抗氧化剂 Antioxidant	0.05	0.05
氯化胆碱 Choline chloride	0.5	0.5
蛋氨酸 Methionine	0.2	0
总计 Total	100	100
营养组成 Proximate composition		
粗蛋白 Crude protein	43.84	44.12
粗脂肪 Crude fat	12.93	12.56
能量 Energy(kJ/g)	19.97	20.01

a. 维生素预混料(mg/kg 饲料):维生素 A 醋酸酯, 38.0; 维生素 D3, 13.2; α-生育酚, 210.0; 维生素 B1, 115.0; 核黄素, 380.0; 维生素 B6 88.0; 泛酸, 368.0; 烟酸, 1030.0; 生物素, 10.0; 叶酸, 20.0; 维生素 B12, 1.3; 肌醇, 4000.0; 抗坏血酸, 500.0

a. Vitamin mixture (mg/kg diet): Retinol acetate, 38.0; Cholecalciferol, 13.2; α-Tocopherol, 210.0; Thiamin, 115.0; Riboflavin, 380.0; Pyridoxine 88.0; Pantothenic acid, 368.0; Niacin acid, 1030.0; Biotin, 10.0; Folic acid, 20.0; Vitamin B12, 1.3; Inositol, 4000.0; Ascorbic acid, 500.0

b. 矿物质预混料 Mineral mixture (mg/kg diet): MgSO₄·7H₂O, 3568.0; NaH₂PO₄·2H₂O, 25568.0; KCl, 3020.5; KAl(SO₄)₂, 8.3; CoCl₂, 28.0; ZnSO₄·7H₂O, 353.0; Ca-lactate, 15968.0; CuSO₄·5H₂O, 9.0; KI, 7.0; MnSO₄·4H₂O, 63.1; Na₂SeO₃, 1.5; C₆H₅O₇Fe·5H₂O, 1533.0; NaCl, 100.0; NaF, 4.0

32.0±1.2、溶氧>5.0 mg/L、NH₄⁺-N <0.10 mg/L。

1.3 样品采集

肝脏的采集取样和蛋白提取参照 Martin 等(2001)的方法,即将鱼用 MS-222 麻醉后重击头部,立即剪去尾部,挤压背部将血放干,以免干扰后续实验。肝脏取出后速冻在液氮中,立刻转移到-70℃冰箱中冻存。

在消毒好的研钵中放置适量液氮,将 5 尾鱼的肝脏样品转移到研钵中研磨(每组样品设 3 个平行),使其成粉末状,立即称出所需要的样品量,每 1 g 组织粉末

加入 2 ml 样品裂解液(9 mol/L 尿素、2% CHAPS、3 mmol/L EDTA、0.2% Bio-Lyte[®]Buffer、50 mmol/L DTT、40 μmol/L 亮抑酶肽、40 μmol/L 抑肽酶、1 mmol/L PMSF), 在室温下使用组织匀浆器匀浆 30 s, 组织悬液在 15°C、10000×g 离心 10 min 去除不溶的组织碎片, 上清液在 4°C、20000×g 超速离心 60 min, 用移液枪避开上层漂浮的脂质层, 插入中间部分吸取离心后的上清液, 再次在 6°C、20000×g 离心 50 min, 取离心上清液, 用生工生物工程有限公司(上海)的蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度后, 分装保存在 -70°C 冰箱中, 待 2-DE 分析时使用。

1.4 2-DE 分析

1.4.1 等点聚焦 将肝脏组织蛋白提取液 15 μl 与 115 μl 的上样缓冲液(8 mol/L 尿素、4% CHAPS、3 mmol/L EDTA、0.2% Bio-Lyte[®]Buffer、65 mmol/L DTT、0.001%溴酚蓝)混合, 加入到聚焦盘的泳道中, 每个泳道放置 1 条 7 cm 的 pH 为 4-7 的 IPG 胶条(Bio-Rad Laboratories, 美国), 将胶面向下覆盖样品液, 主动吸涨 1 h 后, 用 1.5 ml 左右的矿物油覆盖在每个胶条的表面, 6 个 IPG 胶条在 PROTEAN[®]i12[™]IEF Cell 等电聚焦电泳仪(Bio-rad Laboratories, 美国)上进行。优化后的等电聚焦程序见表 2。

表 2 7 cm IPG 胶条(pH 4-7)在等电聚焦电泳仪上的等电聚焦程序

Tab.2 The focusing procedure used of 7 cm IPG gel(pH 4-7) on protein isoelectric system

	电压 Voltage (V)	梯度 Gradient	电流 Current (μA)	时间 Time
水化 Rehydration	50	Hold	50	14 h
1	250	Linear	50	1 h 30 min
2	500	Rapid	50	1 h 30 min
3	4500	Linear	50	5 h
4	4500	Rapid	50	25000 (V-h)
5	500	Hold	50	

等电聚焦结束后, 将胶条取出, 用稍微浸湿的滤纸吸干胶条上的矿物油, -20°C 冰箱中保存, 供第二向 SDS-PAGE 电泳分析。

1.4.2 SDS-PAGE 电泳 等电聚焦过后的 IPG 胶条经两次平衡缓冲液的平衡, 每次 15 min, 在摇床上缓慢摇动, 平衡缓冲液母液组成为 6 mol/L 尿素、2% CHAPS、0.375 mol/L Tris-HCl (pH=8.8)、20%甘油, 分别加入 2%的 DTT 和 2.5%的碘乙酰胺。平衡后的胶条在浓度为 12.5%的聚丙烯酰胺凝胶上进行第二

向的电泳, 采用恒流电泳程序, 开始时采用 5 mA/条的电流直到蛋白完全从胶条上转移到凝胶中, 增大电流至 15 mA/条, 直到电泳结束。蛋白点的检测采用考马斯亮蓝 G250 进行染色(Anderson *et al*, 1991), 蛋白分子量的测定采用生工生物工程股份有限公司的中分子量 Marker(兔肌肉蛋白 97.4 kDa, 牛血清蛋白 66.2 kDa, 鸡卵白蛋白 42.7 kDa, 牛血红蛋白 31.0 kDa, 溶菌酶 14.4 kDa), 将其融化后取 15 μl 加入到 30 mm 滤纸片上, 待其晾干后随 IPG 胶条一起进行电泳。

1.4.3 双向电泳图谱分析和切点 获得的双向电泳凝胶使用 Powerlook 2100XL-USB(UMAX)扫描仪进行扫描, 图片以 TIF 的格式保存。图片经过软件 PDQuest[™] 2-D Analysis Software V8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, 美国)分析, 蛋白点的识别采用软件自动识别方式, 软件自动匹配后经人眼可见加以辨别, 对明显匹配错误的点采用人工方式编辑。蛋白的分子量在 14.4-97.4 kDa 之间, 等电点(pI)范围为 4-7。对蛋白丰度差异两倍以上则认为显著($P<0.05$)并进行鉴定。使用去头的移液枪挖取差异蛋白点, 而后放入离心管中记录并标记, 以供肽质谱鉴定。

1.4.4 肽图谱分析和蛋白鉴定 差异蛋白点委托博苑生物科技有限公司(上海)进行肽图谱分析, 用 Mascot 程序将待测蛋白质的多个肽段质量数据与数据库中已知蛋白质肽段质量数据进行比对。如果比对的结果有显著相关性($P<0.05$), 则蛋白质鉴定成功。串联质谱获得的肽段 PMF 和肽序列数据, 通过 GPS(Applied Biosystems, 美国)-MASCOT(Matrix Science, 英国)在 NCBI 数据库中搜索。Mascot 给出的>95%置信水平的蛋白为鉴定成功的蛋白质。

2 结果

2.1 肝脏表达差异蛋白的检测

星斑川鲮幼鱼的肝脏蛋白双向电泳凝胶图谱经 PDQuest 8.0 分析, 在 pH 4-7、蛋白质分子量 14.4-97.4 kDa 的范围内共鉴定出 448-470 个蛋白点, 匹配成功 378 个蛋白点, 以摄食 SPH 饲料幼鱼肝脏蛋白谱图中的一个图像作为点匹配的标准(图 1)。星斑川鲮摄食两种不同饲料 50 d 后, 肝脏中有 14 种蛋白表达出现显著性差异, 以摄食 FM 饲料的幼鱼的肝脏蛋白为对照, 摄食 SPH 饲料后显著上调了其中 12 种蛋白($P<0.05$), 分别为 7201、2901、4601、4002、1401、3901、0103、0801、0401 和 3 种结构蛋白(4102、3301、2304), 而显著下调了 2 种蛋白 9603 和 3802($P<0.05$)。

2.2 摄食两种饲料的星斑川鲮肝脏差异蛋白的鉴定

对 14 个显著差异的蛋白点分析鉴定(表 2), 并根

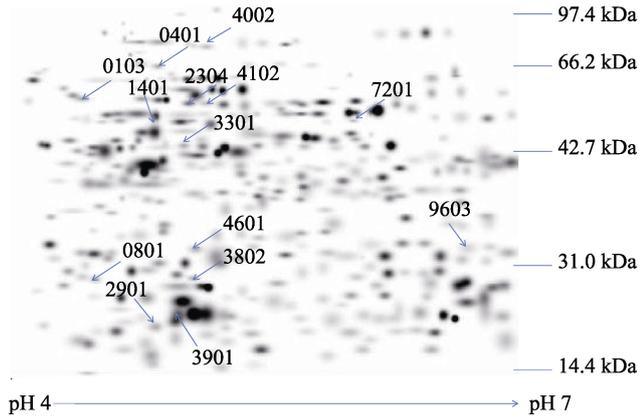


图1 幼鱼肝脏蛋白的参考双向电泳图谱
Fig.1 The reference 2D-electrophoresis profiles of juvenile fish liver

箭头所指为2倍差异的蛋白点及位置；右标为分子标准
Arrows indicated the numbers and location of the differently expressed protein spots; molecular weight markers are shown on the left

据其作用底物或参与的细胞生物学过程(黄秀清等, 2006; 王志强等, 2009; Novello *et al*, 1968; 任宝波等, 2005; 王镜岩等, 1980)将其分类, 结果显示, 分别为3种结构蛋白(中间纤维蛋白、II型细胞骨架8-样异构体X2、肌动蛋白)、1种脂类代谢调控蛋白(高密度载脂蛋白前体)、1种信号调节蛋白(蛋白磷酸酶4催化亚基A)、3种蛋白质代谢调控蛋白(蛋白二硫化物异构酶前体、蛋白酶体a5型亚单位、胰蛋白酶原2前体)、3种能量和糖代谢调控蛋白(α -烯醇化酶、核酮糖磷酸差向异构酶、UTP-葡萄糖焦磷酸化酶分型X1)和3种应激反应蛋白(热休克蛋白9、热休克蛋白70、葡萄糖调节蛋白)。

2.3 参与代谢的肝脏蛋白差异分析

11种参与肝脏代谢蛋白的表达出现了两倍以上差异, 其在双向电泳中的分布见图2。其中, 摄食豆肽饲料(SPH)的幼鱼肝脏中高密度载脂蛋白前体、蛋白磷酸酶4催化亚基A、蛋白二硫化物异构酶前体、蛋白酶体a5型亚单位、 α -烯醇化酶、核酮糖磷酸差向异构酶、热休克蛋白9、热休克蛋白70、葡萄糖调节蛋白等蛋白的表达高于摄食FM饲料的幼鱼, 而胰蛋白酶原2前体和羟基-2-酮戊二酸醛缩酶等则低于摄食FM饲料的幼鱼。各点的表现详细情况见图3, 量化情况见图4。

3 讨论

肝脏是动物体内的主要代谢组织, 各种营养物质

经肠道吸收后, 经血液进入肝脏后发生各种生化反应, 变成可利用的物质, 提供机体活动所需要的能量或材料。Song等(2014)已经证实, 饲料中添加适量的豆肽对星斑川鲷生长性能产生了积极的影响, 而本研究证明, 摄食24%的豆肽对星斑川鲷的一些肝脏蛋白表达产生了显著影响, 根据这些差异蛋白的生物学功能可以推测, 豆肽的摄入导致了幼鱼肝脏代谢活动发生了一定程度的适应性变化。

α 烯醇化酶、核糖-5-磷酸异构酶和UDP-葡萄糖焦磷酸化酶是糖酵解和糖原合成途径的3种关键酶。 α 烯醇化酶在大多数组织内表达, 既可以催化糖酵解过程中3-磷酸甘油酸向磷酸2-烯醇式丙酮酸转化, 又可在糖原的合成中, 催化逆向反应(Subramanian *et al*, 2000)。 α 烯醇化酶活性的降低能减少细胞的产能, 从而导致收缩功能降低(朱理安等, 2008)。一些在哺乳动物中的研究显示, 营养调控影响 α 烯醇化酶在机体组织中的表达, 从而控制糖脂代谢的方向。姜雪元等(2012)采用双向电泳技术分析不同精粗比日粮条件下泌乳山羊肝脏蛋白/酶表达谱的差异, 发现当精料比例提高时, 参与糖分解代谢的烯醇化酶的表达上调, 肝脏中糖脂分解代谢加强, 从而增加产奶量。而用蛋白质组学技术研究摄食锌缺乏的饲料的大鼠时发现, 海马体中 α 烯醇化酶的蛋白表达被明显下调(Liu *et al*, 2010)。另外, α 烯醇化酶还存在其他生物学活性, 如激活纤溶酶以促进肌肉生长(Lopez-Aleman *et al*, 2005)及参与机体免疫反应(Kinloch *et al*, 2005)。核糖-5-磷酸异构酶是磷酸戊糖途径中的关键酶, 参与机体产生NADPH, 提供能量和合成芳香族氨基酸的反应(Kruger *et al*, 2003; Herrmann *et al*, 1999), 并且在机体抗氧化机制中起重要作用(Tan *et al*, 2009; Liang *et al*, 2011)。UDP-葡萄糖焦磷酸化酶是糖元合成途径中的关键酶之一, 该酶受激素及底物浓度调控, 从而控制机体的糖原代谢和血糖水平(王镜岩等, 2002)。在本研究中, α 烯醇化酶和核糖-5-磷酸异构酶的提高说明摄食豆肽的星斑川鲷幼鱼的肝脏可能提高了糖酵解的代谢活动, 促进葡萄糖的利用, 产生更多的能量供组织细胞本身或其他组织生理活动消耗, 而UDP-葡萄糖焦磷酸化酶的下调则说明幼鱼减少了肝糖原的合成, 有利于肝脏整体代谢向着产生能量的方向发展。虽然目前的信息还无法完全解释豆肽对鱼体的影响, 但是发现摄食豆肽的大鼠提高了餐后碳水化合物的氧化和能量的支出(Ishihara *et al*, 2003)。Lu等(2012)、Yamada等(2012)研究揭示, 豆肽可能通过调控胰岛素受体或者PPAR α 系统, 提高氧化产生过程和控制动物机体的血糖平衡。

表 3 摄食 SPH 饲料幼鱼相对于摄食 FM 饲料幼鱼的肝脏表达差异蛋白点的鉴定结果
 Tab.3 The identified protein spots that differently expressed in the liver of fish fed SPH diet comparing to that of fish fed FM diet

序号 Spot	蛋白鉴定 Protein identity	登录号 Accession No.	理论值 MW(kDa)	Theoretical pI	得分 Mascot score	参考物种 Species	生物学功能 Biological function	变化 Change
3901	高密度载脂蛋白前体 Apolipoprotein AI Precursor	CAH59609	29.37	5.38	239	欧洲川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	脂类代谢 Lipid metabolism	上调 Up-regulation
4102	中间纤维蛋白 Intermediate Filament Protein ON ₃ -Like	XP_003963068	56.94	5.10	432	红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	结构蛋白 Structural protein	上调 Up-regulation
2304	Ii 型细胞骨架 8-样异构体 X2 Keratin, Type Ii Cytoskeletal 8-Like Isoform X2	XP_005800948	58.66	5.1	413	花斑剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	结构蛋白 Structural protein	上调 Up-regulation
3301	肌动蛋白 Beta-Actin	ACTB3_TAKRU	42.07	5.3	511	欧洲川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	结构蛋白 Structural protein	上调 Up-regulation
2901	核酮糖 5 磷酸 3 差向异构酶 Ribulose-5-Phosphate-3-Epimerase	AEM37723	25.06	5.10	238	褐石斑鱼 <i>Epinephelus bruneus</i>	能量代谢 Energy metabolism	上调 Up-regulation
9603	Utp-葡萄糖焦磷酸化酶分型 X1 Utp-Glucose-1-Phosphate Uridyltransferase Isoform X1	XP_003459904	56.65	8.51	230	罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	能量代谢 Energy metabolism	下调 Down-regulation
7201	α -烯醇化酶 α -Enolase 1	AAH59511	47.39	6.16	819	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	能量代谢 Energy metabolism; 信号传导 Signal transduction	上调 Up-regulation
4601	蛋白磷酸酶 4 催化亚基 a Protein Phosphatase 4 Catalytic Subunit A	A8WGP3	35.46	4.96	286	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	信号传导 Signal transduction	上调 Up-regulation
0801	蛋白酶体 $\alpha 5$ 型亚单位 Proteasome Subunit A Type-5	NP_991271	26.56	4.74	222	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	蛋白质代谢 Protein metabolism	上调 Up-regulation
0103	蛋白二硫化物异构酶前体 Protein disulfide-isomerase precursor	NP_998529	57.00	4.55	168	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	蛋白质代谢 Protein metabolism	上调 Up-regulation
3802	胰蛋白酶原 2 前体 Trypsinogen 2 precursor	ABS32240	26.90	5.29	265	石斑鱼 <i>Kareius bicoloratus</i>	蛋白质代谢 Protein metabolism	下调 Down-regulation
4002	热休克蛋白 9 Heat shock protein 9	AAH44175	74.25	7.06	389	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	应激反应 Stress response	上调 Up-regulation
1401	热休克蛋白 70 Heat shock protein 70	AAR01102	64.64	5.31	272	暗纹东方鲀 <i>Takifugu obscurus</i>	应激反应 Stress response	上调 Up-regulation
0401	葡萄糖调节蛋白 78 Glucose-regulated protein 78	ABG56392	72.36	4.97	307	牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	应激反应 Stress response	上调 Up-regulation

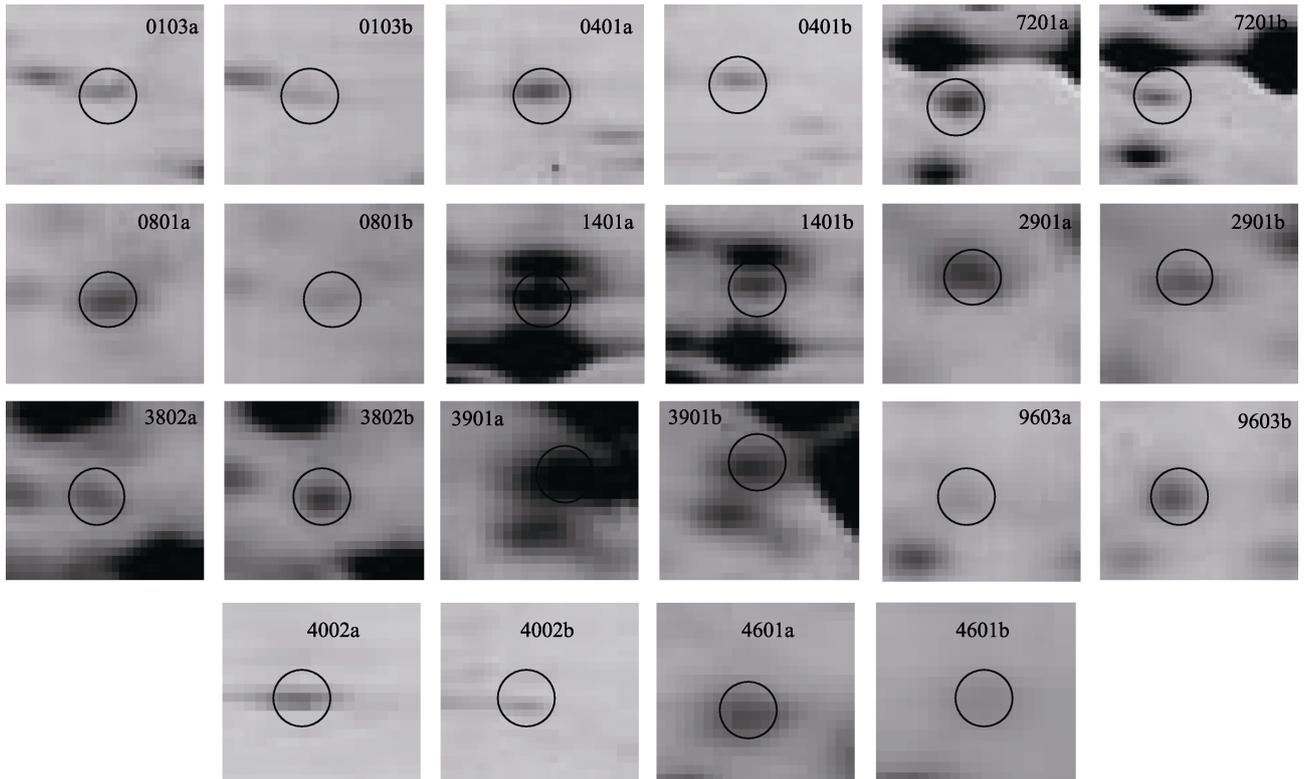


图 2 摄食 SPH(a)和 FM(b)饲料的幼鱼肝脏蛋白的双向电泳凝胶
Fig.2 2-D electrophoresis gel profiles of liver protein of fish fed diets SPH(a) and FM(b)

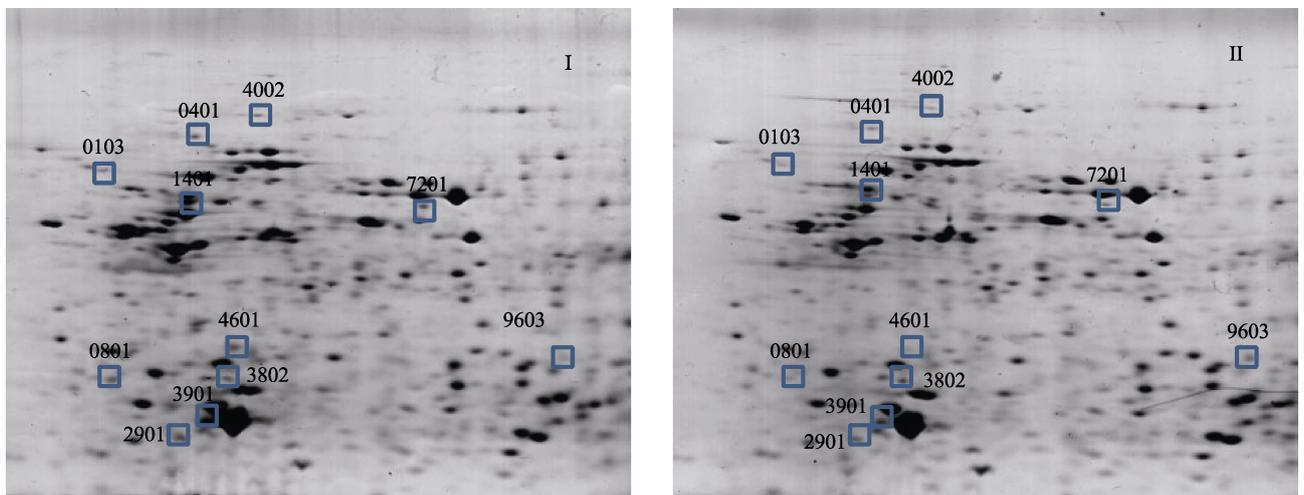


图 3 摄食 SPH(左)和 FM(右)饲料的幼鱼差异肝脏蛋白点局部放大对比
Fig.3 The magnified regions showing the differently expressed protein spots detected on 2-D images in fish fed diets SPH(left) and FM(right)

载脂蛋白 A1(Apo A1)是高密度脂蛋白(HDL)的主要结构蛋白,它可以去除细胞中的胆固醇,调节动物体的血脂代谢,促进动物的机体健康(Brouillette *et al.*, 2001)。在本研究中, HDL 前体蛋白在摄食豆肽饲料的幼鱼肝脏中被上调,说明肝脏细胞强化了高密度脂蛋白的合成,降低了机体脂肪。植物酶解蛋白的降脂效应在哺乳动物中也有报道, Aoyama 等(2000)发现,

SPH 能提高能量限制下小鼠血清中 HDL 水平,但是大豆分离蛋白则对 HDL 无影响。Revilla 等(2009)发现,利用酶解米糠中提取出来的肽混合物能够提高血清中的 HDL 水平。Martin 等(2003)研究发现,与摄食鱼粉相比,摄食豆粕的虹鳟肝脏 Apo A I 蛋白显著提高。而本研究结果显示,摄食大豆酶解蛋白的幼鱼肝脏 Apo A I 前体水平高于摄食大豆浓缩蛋白组,推

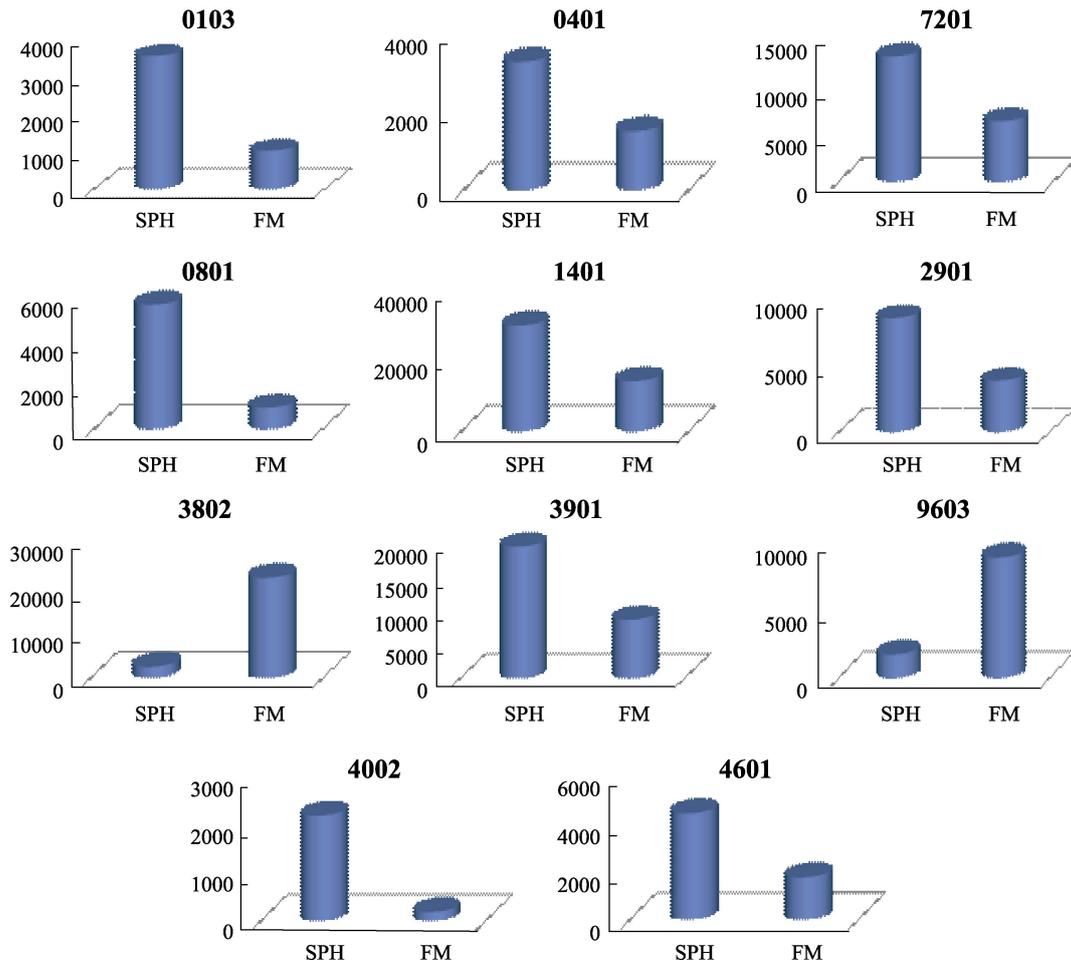


图 4 摄食 SPH 和 FM 饲料的星斑川鲮幼鱼肝脏差异蛋白的量化对比

Fig.4 The comparison of the quantity of liver proteins differently expressed in fish fed diet SPH and FM

图示为 3 个平行的均值

Cylinder height showed the average value of triplicate

测大豆酶解蛋白发挥了肽和大豆伴球蛋白的双重降脂效果。

HSP70 家族蛋白参与多种不同的功能,如新合成蛋白的折叠、错误折叠蛋白的修正、提呈蛋白供蛋白酶降解等生物学过程,在维持机体组织稳态方面发挥重要作用(Parsell *et al*, 1993; Hartl, 1996; Fink, 1999)。Carrizo 等(2006)研究发现,营养调控能够影响机体组织的 HSP 合成,如给大鼠饲喂低蛋白饲料会导致肾脏的 HSP70 含量显著降低,而饲喂正常蛋白含量的饲料后则 HSP70 升高。给大鼠静脉注射谷氨酰胺能够上调内毒性休克大鼠心脏、肺和肠等组织的 HSP70 和 HSP25 蛋白的表达,对动物机体形成保护(Wischmeyer *et al*, 2001)。另外,动物的能量代谢也影响 HSP 蛋白的表达,高糖饲料能通过增加体内的葡萄糖水平诱导鼠 HSP70 的合成表达,增加其对应激的耐受性(Kanazawa *et al*, 2003)。在水产动物上的

研究也发现,鱼类肝脏的 HSP 蛋白对饲料的营养调控较为敏感。Martin 等(2003)利用比较蛋白质组学技术研究摄食鱼粉型饲料和豆粕型饲料的虹鳟,结果发现,HSP70 在摄食豆粕型饲料的幼鱼肝脏中被显著下调,其原因是豆粕型饲料潜在的不适宜的消化吸收模式以及效率低下的蛋白质转换率。葡萄糖调节蛋白 78 也被称为 70 kDa 热休克蛋白 5(HSPA5)或免疫球蛋白结合蛋白(BiP),是 HSP 家族的一员(Clark *et al*, 2008),它是转膜机制的一种必要成分,能够将蛋白逆转运过内质网以供蛋白酶体降解。同时,它也能反馈抗炎信号给免疫网络来发挥抗炎作用(Shields *et al*, 2011)。Spindler 等(1990)和 Tillmah 等(1996)研究显示,限制能量摄入能降低葡萄糖调节蛋白的表达。在本研究中,摄食豆肽上调了 3 种 HSP 蛋白,暗示了营养应激现象出现,可能的原因是豆肽及大量氨基酸的摄入增强了体蛋白合成,这也导致了错误蛋

白或者待降解蛋白的增多,而机体为了维持稳态,相应增强了应激蛋白的合成来应对机体提高的蛋白代谢可能带来的负面效应。

蛋白磷酸酶通过作用于其底物包括蛋白激酶 B、蛋白激酶 C、p70 S6 激酶和钙调激酶、MAP 激酶等 (Lechward *et al*, 2001; Millward *et al*, 1999), 在细胞内广泛参与细胞分裂、基因表达调控、神经信息传递、肌肉收缩和细胞信号转导等重要生命过程 (Tesseraud *et al*, 2006; Zhao *et al*, 2010)。在摄食高豆粕饲料的虹鳟肝脏中,该蛋白的表达发现被显著提升 (Martin *et al*, 2003), 本研究中豆粕也增强了蛋白磷酸酶催化亚基的合成,可能是促进了细胞内细胞器的合成或者通过钠巴霉素靶 (TOR) 信号通路参与动物营养相关的生长调节 (Zhou *et al*, 2004)。另外, 本研究显示, 豆粕的添加可能对幼鱼肝脏的蛋白质代谢过程产生影响。蛋白质二硫键异构酶是存在于内质网中一种丰富的氧化还原酶, 它催化蛋白质形成二硫键(氧化活性)和催化错误配对二硫键的重排(异构酶活性), 并具有分子伴侣活性, 在蛋白质的合成和构象稳定方面具有重要作用 (王志强等, 2009; Hatahet *et al*, 2009), 而蛋白酶体主要位于细胞核和细胞质中, 是细胞用来调控特定蛋白质和除去错误折叠蛋白质的主要机制 (Peters *et al*, 1994)。本研究中, 星斑川鲮幼鱼长期摄食酶解植物蛋白, 显著提高了这两种酶蛋白的表达量, 说明摄食豆粕后, 肝脏的蛋白质代谢增强, 蛋白质合成代谢的加强诱导蛋白质二硫键异构酶和蛋白酶体等蛋白的合成, 从而提高对错误的校正。而胰蛋白酶为动物体内重要的消化酶, 在鱼类的肝胰脏中主要以胰蛋白酶原前体形式存在, 消化过程中作为胰液的成分而分泌 (Berger *et al*, 1970; 郑凯迪, 2007¹⁾; Psochiou *et al*, 2007; 丁岚等, 2012²⁾)。过高的饵料肽摄入能够促进胆囊收缩素 CCK 的大量释放 (Hira *et al*, 2011; Nakajima *et al*, 2012), 而 CCK 作为饱食调控因子能反馈性地抑制胰蛋白酶的合成和分泌 (Miyasaka *et al*, 1989), 推测正是这种原因造成了本研究中胰蛋白酶原前体合成降低的现象, 这也是鱼体肝脏应对富含肽和游离氨基酸的饲料的一种调整策略。

4 结论

本研究显示, 在星斑川鲮幼鱼饲料中添加大豆蛋白肽, 能够调控星斑川鲮幼鱼肝脏中参与脂类代谢、

能量代谢、蛋白质代谢以及应激反应的蛋白表达, 根据本研究中蛋白表达变化的结果, 可以推测, 星斑川鲮幼鱼摄食豆粕促进高密度脂蛋白的生成从而起到降低胆固醇的作用, 增强葡萄糖的降解作用促进能量的产生, 降低蛋白酶的合成和分泌, 同时适应性地提高应激蛋白的生成。对于上述蛋白表达的变化仍需要筛选蛋白, 在分子水平上进一步进行验证研究, 并相应的对鱼体肌肉组织的蛋白表达进行研究, 从而为理解鱼类对酶解植物蛋白的利用提供理论基础。

参 考 文 献

- 王志强, 周智敏, 郭占云. 蛋白质二硫键异构酶家族的结构与功能. 生命科学研究, 2009, 13(6): 548-553
- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学第三版(下). 北京: 高等教育出版社, 2002, 182-194
- 朱理安, 方宁远. α 烯醇化酶—古老的蛋白, 崭新的功能. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(4): 347-350
- 任宝波, 王玉艳, 王纯净, 等. HSP70 家族的分类及基因结构与功能. 动物医学进展, 2005, 26(1): 98-101
- 刘文斌, 王恬. 棉粕蛋白酶解物对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 消化、生长和胰蛋白酶 mRNA 表达量的影响. 海洋与湖沼, 2006, 37(6): 568-574
- 李林, 吴家睿. 蛋白质组学的产生及其重要意义. 生命科学, 1999, 11(2): 40-50
- 李明月, 冀德伟, 吴海庆, 等. 大黄鱼肝脏蛋白质组双向电泳技术的建立及优化. 水产科学, 2010, 29(1): 27-30
- 吴海庆, 李明月, 叶帅东, 等. 大弹涂鱼肝脏蛋白质双向电泳技术的建立及优化. 生命科学仪器, 2009, 7(8): 29-32
- 姜雪元, 张树坤, 张源淑. 不同精粗比日粮对泌乳山羊肝脏蛋白表达谱及物质代谢的影响. 畜牧与兽医, 2012, S1: 141
- 黄秀清, 宁丽峰, 龙治涛, 等. 蛋白磷酸酶 4 的组成与主要功能. 细胞生物学杂志, 2006, 28(6): 777-782
- Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, *et al*. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 2000, 16(5): 349-354
- Berger A, Schechter I. Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. Philos Trans R Soc Lond, 1970, 257B: 249-264
- Brouillette CG, Anantharamaiah GM, Engler JA, *et al*. Structural models of human apolipoprotein A-I: A critical analysis and review. BBA-Mol Cell Biol Lipids, 2001, 1531(1-2): 4-46
- Carnie JA, Rowsell EV, Maral K, *et al*. Comparative and developmental studies on 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase and hydroxyproline oxidase. Comp Biochem Physiol Part B,

1) 郑凯迪. 胭脂鱼胰蛋白酶原前体的 cDNA 克隆、序列分析及饲料对胰蛋白酶活性的影响. 西南大学硕士研究生学位论文, 2007, 34-36

2) 丁岚. 齐口裂腹鱼胰蛋白酶原前体 cDNA 的克隆、表达与序列分析. 重庆师范大学硕士研究生学位论文, 2012, 30-42

- 1982, 71(4): 681–687
- Choi SM, Wang X, Park GJ, *et al.* Dietary dehulled soybean meal as a replacement for fish meal in fingerling and growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquacult Res*, 2004, 35(4): 410–418
- Clark MS, Fraser KPP, Peck LS. Antarctic marine molluscs do have an HSP70 heat shock response. *Cell Stress Chaperones*, 2008, 13(1): 39–49
- Deng J, Mai KS, Ai QH, *et al.* Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2006, 258(1–4): 503–513
- Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, 1999, 79(2): 425–449
- Fu H. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996, 381(6583): 571–580
- Gui D, Liu W, Shao X, *et al.* Effects of different dietary levels of cottonseed meal protein hydrolysate on growth, digestibility, body composition and serum biochemical indices in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Anim Feed Sci Tech*, 2010, 156(3–4): 112–120
- Hamza N, Silvestre F, Mhetli M, *et al.* Differential protein expression profile in the liver of pikeperch (*Sander lucio-perca*) larvae fed with increasing levels of phospholipids. *Comp Biochem Physiol Part D: Genomics and Proteomics*, 2010, 5(2): 130–137
- Hatahet F, Ruddock LW. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(11): 2807–2850
- Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50(4): 473–503
- Hira T, Mori N, Nakamori T, *et al.* Acute effect of soybean beta-conglycinin hydrolysate ingestion on appetite sensations in healthy humans. *Appetite*, 2011, 57(3): 765–768
- Ishihara K, Oyaizu S, Fukuchi Y, *et al.* A soybean peptide isolate diet promotes postprandial carbohydrate oxidation and energy expenditure in type II diabetic mice. *J Nutr*, 2003, 133(3): 752–757
- Kanazawa M, Xue CY, Kageyama H. Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance. *Nutr Rev*, 2003, 61(S5): 27–33
- Kinloch A, Tatzer V, Wait R, *et al.* Identification of citrullinated α -enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(6): R1421–1429
- Kruger NJ, von Schaewen A. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organization. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6(3): 236–246
- Lechward K, Awotunde OS, Swiatek W, *et al.* Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. *Acta Biochim Pol*, 2001, 48(4): 921–933
- Liang W, Ouyang S, Shaw N, *et al.* Conversion of D-ribulose 5-phosphate to D-xylulose 5-phosphate: new insights from structural and biochemical studies on human RPE. *FASEB J*, 2011, 25(2): 497–504
- Liu J, Jiang Y, Huang C, *et al.* Proteomic analysis reveals changes in the hippocampus protein pattern of rats exposed to dietary zinc deficiency. *Electrophoresis*, 2010, 31(8): 1302–1310
- Lopez-Alemay R, Suelves M, Diaz-Ramos A, *et al.* Alpha-enolase plasminogen receptor in myogenesis. 2005, 10(1): 30–36
- Lu JL, Zeng Y, Hou W, *et al.* The soybean peptide aglycin regulates glucose homeostasis in type 2 diabetic mice via IR/IRS1 pathway. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(11): 1449–1457
- Mamaug REP, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Soy peptide inclusion levels influence the growth performance, proteolytic enzyme activities, blood biochemical parameters and body composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2011, 321(3–4): 252–258
- Martin SAM, Cash P, Blaney S, *et al.* Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. *Fish Physiol Biochem*, 2001, 24(3): 259–270
- Martin SAM, Vilhelmsson O, Médale F, *et al.* Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1651(1–2): 17–29
- Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24(5): 186–191
- Miyasaka K, Guan DF, Liddle RA, *et al.* Feedback regulation by trypsin: evidence for intraluminal CCK-releasing peptide. *Am J Physiol*, 1989, 257(2): 175–181
- Nakajima S, Hira T, Hara H. Calcium-sensing receptor mediates dietary peptide-induced CCK secretion in enteroendocrine STC-1 cells. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(5): 753–760
- Novello F, McLean AP. The pentose phosphate pathway of glucose metabolism—measurement of the non-oxidative reactions of the cycle. *Biochem J*, 1968, 107(6): 775–791
- Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genet*, 1993, 27: 437–496
- Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*, 1994, 269(10): 7709–7718
- Psochiou E, Sarropoulou E, Mamuris Z, *et al.* Sequence analysis and tissue expression pattern of *Sparus aurata* chymotrypsinogens and trypsinogen. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 147B(3): 367–377
- Regost C, Arzel J, Kaushik SJ. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 1999, 180(1): 99–117
- Revilla E, Maria CS, Miramontes E, *et al.* Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. *Food Res Int*, 2009, 42(3): 387–393
- Rufino-Palomares E, Reyes-Zurita FJ, Fuentes-Almagro CA, *et al.* Proteomics in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to elucidate the cellular response induced by the intake of maslinic acid. *Proteomics*, 2011, 11(16): 3312–3325
- Song Z, Li H, Wang J, *et al.* Effects of fishmeal replacement with soy protein hydrolysates on growth performance, blood biochemistry, gastrointestinal digestion and muscle composition of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture*, 2014, 426: 96–104
- Spindler SR, Crew MD, Mote PL, *et al.* Dietary energy restriction in mice reduces hepatic expression of glucose-regulated protein 78 (BiP) and 94 mRNA. *J Nutr*, 1990,

- 120(11): 1412–1417
- Subramanian A, Miller DM. Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5958–5965
- Tan SX, Teo M, Lam YT, *et al.* Cu, Zn superoxide dismutase and NADP(H) homeostasis are required for tolerance of endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(5): 1493–1508
- Tesseraud S, Abbas M, Duchene S, *et al.* Mechanisms involved in the nutritional regulation of mRNA translation: features of the avian model. *Nutr Res Rev*, 2006, 19(1): 104–116
- Tillmah JB, Mote PL, Dhahbi JM, *et al.* Dietary energy restriction in mice negatively regulates hepatic glucose-regulated protein 78 (GRP78) expression at the posttranscriptional level. *J Nutr*, 1996, 126(2): 416–423
- Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, *et al.* Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol*(1985), 2001, 90(6): 2403–2410
- Yamada Y, Muraki A, Oie M, *et al.* Soymorphin-5, a soy-derived μ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR α systems in diabetic KKAY mice. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*, 2012, 302(4): 433–440
- Ye J, Liu X, Wang Z, *et al.* Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Int*, 2011, 19(1): 143–153
- Zhao F, Kudo T, Zhang Y, *et al.* Role of the protein serine/threonine phosphatase dullard in cell differentiation. *Interface Oral Health Science*, 2010, 196–198
- Zhou G, Boomer JS, Tan TH. Protein phosphatase 4 is a positive regulator of hematopoietic progenitor kinase 1. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 49551–49561

(编辑 冯小花)

Effects of Soy Peptide on Protein Expression in Liver of Juvenile Starry Flounder (*Platichthys stellatus*)

SONG Zhidong¹, WANG Jiyong¹*, LI Peiyu², QIAO Hongjin¹, ZHANG Limin¹*, HAO Tiantian²

(1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006;

2. Shandong Shengsuo Aquatic Feed Research Center, Yantai 265601)

Abstract To investigate the effects of soy peptides on hepatic metabolism of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*), two isonitrogenous (43.98±0.14% dry weight) and iso-energetic (19.89±0.08 kJ/g dry weight) experimental diets were formulated to contain 0% SPH (control, FM) and 24% SPH (SPH) respectively. Two hundred and forty juvenile starry flounders (initial weight of 5.73±0.36 g) were randomly distributed to 2 groups with three replicates per group (40 fish/replicate). Each group was fed one diet for 50 days before collecting liver samples for analysis. The results showed that 448–470 protein spots were detected in the gel area of pH 4–7 and Mr 14.4–97.4 kDa after 2-dimensional gel electrophoresis. Among them, fourteen hepatic proteins showed over 2-fold difference in expression abundance including 3 structural proteins (intermediate filament protein ON₃-like, type II cytoskeletal 8-like isoform X₂ and β -actin) and 11 proteins involved in different metabolism. Nine metabolic proteins and 3 structural proteins were up-regulated by at least 2-fold and other 2 metabolic proteins were decreased by 2-fold in fish fed SPH diet compared those fed FM diet. The present results revealed that SPH affected hepatic metabolism by enhancing synthesis of high density lipoprotein and stress protein, promoting glycolysis metabolism for energy production while reducing synthesis of trypsin. The present study elucidated the global metabolic response of fish liver to soy peptides using comparative proteomics technology and provides a theoretical basis to apply the novel plant proteins in aquatic feed.

Key words Soy peptide; Two-dimensional electrophoresis; Hepatic protein; Hepatic metabolism; Expression abundance

① Corresponding author: WANG Jiyong, E-mail: ytwjy@126.com; ZHANG Limin, E-mail: ytzlm@126.com

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)丝氨酸蛋白酶 I-1 基因多态性*



付瑞雪 周纳宇 刘金相 王旭波 贺艳 张全启 于海洋^①

(中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 采用重测序方法,利用牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)野生个体,扩增了牙鲆丝氨酸蛋白酶(Serine protease) I-1 基因的编码区(CDS)和 2605 bp 的启动子序列。在牙鲆丝氨酸蛋白酶 I-1 基因(*PoSP I-1*)编码区中筛选出 9 个单核苷酸多态性位点(SNPs),同时在其启动子区筛选出 28 个 SNP 位点。对感染鳃弧菌的抗病牙鲆和易感牙鲆进行了部分 SNP 位点的分型,通过分析 CDS 中 SNP 位点的分布情况,发现 SNP365A/G 位点在抗病个体中的 AG 基因型的基因频率是 60%,高于易感个体的 40% ($P=0.01$)。qRT-PCR 结果显示,易感个体在细菌感染后,*PoSP I-1* 相对表达量相比对照组呈下降趋势。在抗病个体中,*PoSP I-1* 相对表达量相比对照组呈上升趋势,且高于易感个体。结果表明,丝氨酸蛋白酶基因在牙鲆抗鳃弧菌感染中发挥重要作用,该基因的 SNP365A/G 位点是与牙鲆鳃弧菌感染相关的候选位点,该位点可作为牙鲆抗鳃弧菌选择育种的潜在标记。

关键词 丝氨酸蛋白酶基因; 牙鲆; 鳃弧菌; 多态性

中图分类号 S96 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0055-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)在人工养殖条件下,极易暴发各种疾病,特别是细菌性疾病(曲凌云等,2000;于大国等,1998),鳃弧菌病是其中一种危害性较大的细菌性疾病,病原菌鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)在沿岸海水和海洋动物体中广泛存在。近年来,利用生物自身的蛋白酶、抗菌肽等加强其先天性免疫能力被认为是行之有效且天然绿色的方法。

丝氨酸蛋白酶是一类以丝氨酸为活性中心的蛋白水解酶,在先天性免疫系统中起着至关重要的作用,它可以通过补体系统、酚氧化酶原激活系统及血淋巴凝结和抗菌肽合成等途径识别异物;可以将信号级联放大,引起特定的免疫反应,从而快速启动相应的免疫防御系统;可以定时、定量、局部的抵御病原体的感染(Budayova-Spano *et al.*, 2002)。

SNP (Single nucleotide polymorphism)即单核苷酸多态性,是生物体基因组中的单碱基突变,往往与

许多生物体机能的改变和疾病的发生有关,目前被广泛用于海洋生物的分子生物学研究中。Li 等(2013)研究了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)溶菌酶基因的多态性,发现 Lysozyme 的 4 个 SNP 位点与其对鳃弧菌病的抗病/易感具有相关性,并提出了 4 个与抗病关联的基因型和单倍型。Wang 等(2011)和 Wan 等(2013a、b)利用呼肠弧病毒感染草鱼,研究了免疫相关基因 LGP2、RIG-1 及 Mx2 中的 SNP 位点,这 3 个基因中均存在与抗呼肠弧病毒具有显著相关性的 SNP 位点基因型。

本研究利用重测序的方法,扩增了牙鲆丝氨酸蛋白酶 I-1 基因的编码区序列(Coding sequence, CDS)及启动子序列,筛查了该基因 CDS 和启动子区的多态性位点,并对部分 SNP 位点在鳃弧菌感染的抗病个体和易感个体中进行了基因分型,以寻找与抗病相关性的多态性位点,为牙鲆抗病育种提供候选标记。

* 国家自然科学基金青年科学基金(31101891)资助。付瑞雪, E-mail: furuixue926@163.com

① 通讯作者: 于海洋, 副教授, E-mail: yuhaiyang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-03-09, 收修改稿日期: 2015-05-15

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验所用健康牙鲆混合家系取自山东省海阳黄海水产有限公司,平均体长为20 cm,注射鳃弧菌之前,在22℃的充气海水中暂养7 d。

鳃弧菌菌株(vib72)分离自挪威的Cod。鳃弧菌菌株由中国海洋大学海洋生命学院张晓华老师提供。

1.2 鳃弧菌注射

将鳃弧菌标准菌株进行活化、复壮和分离,接种在2216E固体培养基上,37℃培养24 h,用灭菌生理盐水震荡清洗,用平板涂布计数法测定菌液浓度,并配成 10^9 CFU/ml的菌悬液,用于腹腔注射。

注射鳃弧菌实验时,将90尾健康牙鲆平均分到3个1000 L的缸中,每缸30尾个体,两组为实验组,1组为对照组。实验组用于鳃弧菌的注射,每千克体重注射400 μ l鳃弧菌悬浮液(10^9 CFU/ml)。对照组注射生理盐水。所有的牙鲆在同等条件下饲养,前48 h,每4 h观察1次,48 h后,每2 h观察1次,记录死亡时间,立即取出死亡个体的肝、肾、脾、鳃免疫器官,放入液氮中冻存。若需长期保存,转入-80℃冰箱,用于RNA的提取。同时取出死亡个体的少量肌肉组织,在-80℃冰箱保存,用于DNA的提取。持续观察6 d,实验结束时,记录存活个体数量。实验结束后,用上述方法对存活个体进行取样。将早期死亡的牙鲆视为鳃弧菌易感个体,而在注菌实验中始终存活的个体为抗病个体。

1.3 基因组DNA的提取

基因组DNA的提取采用常规的酚-氯仿提取法(张全启等,2004)。取上述抗病和易感牙鲆个体的肌肉组织大约50 mg,放入1.5 ml离心管中,用手术剪将组织块尽量剪碎,加入550 μ l TNES裂解缓冲液和10 μ l蛋白酶K(20 mg/ml)。混匀后置于56℃水浴中直至肌肉组织消化完全。裂解物用等体积的饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提两次,12000 r/min离心15 min。取上清液加入1/10体积的3 mol/L NaAc和700 μ l异丙醇,置于-20℃沉淀2-3 h。之后,4℃、12800 r/min离心20 min沉淀DNA。沉淀物用无水乙醇洗涤两次,室温自然干燥。待乙醇挥发完全后,用适量TE溶液溶解。-20℃保存备用。

1.4 总RNA的提取和cDNA第一条链的合成

牙鲆的肝脏、肾脏、脾脏和鳃的总RNA的提取按照Solarbio公司的TRIzol Reagent说明书进行。得

到的总RNA按照TaKaRa公司的Recombinant DNase I的说明书进行基因组DNA的去除和RNA的纯化。采用Nanophotometer Pearl和琼脂糖凝胶电泳检测纯化后RNA的浓度和完整性。按照TaKaRa公司的反转录酶M-MLV的使用说明进行cDNA第一条链合成,并将cDNA置于-80℃冰箱备用。

1.5 *PoSP I-1* CDS及启动子区域的克隆及测序

根据*PoSP I-1* CDS序列(GenBank accession No. AB191200.1),使用Primer Premier 5.0软件设计扩增*PoSP I-1*全长的引物(表1)。该基因的启动子序列利用cDNA序列Blast牙鲆基因组测序数据获得。用筛选出的5尾抗病个体和5尾易感个体的cDNA进行*PoSP I-1* CDS中SNP筛选及其启动子的扩增。PCR反应体系:10 \times PCR Buffer(Mg²⁺) 2.5 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ l, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ l, 正反向引物(10 μ mol/L) 各0.5 μ l, *Taq* 酶(5 U/ μ l) 0.25 μ l, ddH₂O 17.75 μ l。PCR反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 28个循环; 72℃延伸10 min。使用Vector NTI Advance 10.11 (Invitrogen)软件用于测序结果的序列比对、注释及SNP的查找。使用TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/tfsearch.html>)进行*PoSP I-1*上游调控区域转录因子结合位点的分析。根据NCBI已发布的*PoSP I-1*的cDNA序列,结合已经发表的其他动物丝氨酸蛋白酶的cDNA序列,用MEGA 5.0软件的邻位相连法构建系统进化树,Bootstrap值为1000。

1.6 重测序、SNP的分型及其数据分析

利用攻毒实验中所获得的易感个体和抗病个体的cDNA样品,进行该基因的重测序和SNP位点的分型。设计牙鲆*PoSP I-1*基因的重测序引物(CCXSPI-1Fw和CCXSPI-1Rv)(表1)。退火温度为60℃,PCR扩增体系及反应条件见1.5。查找测序结果*PoSP I-1*的SNP位点(突变的较小等位基因频率MAF<0.03视为测序错误)。抗病个体和易感个体的频率差异用卡方检验分析,数据的显著性通过SPSS软件进行检验。

1.7 *PoSP I-1*在牙鲆对照、抗病及易感个体的表达

使用实时定量PCR(qRT-PCR)来分析*PoSP I-1*在注射生理盐水的对照个体以及注射鳃弧菌后呈现的易感个体和抗病个体中的表达水平。从上述的对照、易感和抗病牙鲆中提取获得肝脏、肾脏、脾脏和鳃的cDNA样品。18S rRNA基因用于内参基因(Zhong *et al*, 2008),引物及退火温度见表1。目的基因的Ct值与内参基因18S的Ct值进行比较,qRT-PCR结果分析使用 $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ 方法。

表 1 本研究所用到的引物
Tab.1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	产物长度 Product size (bp)	序列 Sequence(5'-3')	退火温度 Tm (°C)	用途 Usage
SPI-1Fw	717	TTCCTACTCATGCTGGTCTTTG	53	扩增 CDS 序列
SPI-1Rv		TTTAAACTCCAGTAATCCAGTCCC	56	扩增 CDS 序列
CCXSPI-1Fw	110	TGTCAGATCTATTCCCCATCC	60	重测序
CCXSPI-1Rv		ACTGTGAGGCAGCGACTCC	60	重测序
QDZSPI-1Fw	2690	TGGGCAGGAGAATACAAACAA	58	扩增启动子序列
QDZSPI-1Rv		CCAACAATACGAGAACCATCAG	57	扩增启动子序列
qSPI-1Fw	110	GTGCAGCTGATCTCTCTGAAA	60	qRT-PCR
qSPI-1Rv		TGAAGCGTGTGGGTAAGG	60	qRT-PCR
18SFw	100	GGTAACGGGGAATCAGGGT	60	qRT-PCR
18SRv		TGCCTTCCTTGGATGTGGT	60	qRT-PCR

2 结果

2.1 鳎弧菌感染牙鲈

在注射鳎弧菌 20 h 后, 实验组中开始出现死亡个体, 之后每 2 h 观察 1 次, 直至观察到第 6 天不再有死亡个体为止。对照组未发现牙鲈死亡。在实验组中, 共有 30 尾牙鲈死亡, 有 30 尾牙鲈始终存活。

2.2 *PoSP I-1* CDS 的扩增及 SNP 筛查

成功扩增 10 尾 *PoSP I-1* 的编码区(CDS)序列。

分析测序获得的 717 bp 的 *PoSP I-1* CDS, 共发现 9 个 SNP 位点, 相当于每 80 bp 有 1 个 SNP(图 1), 最小等位基因频率从 0.03 到 0.26。在这 9 个 SNP 中, 仅有 1 个位点是同义突变, 其余 8 个均为非同义突变(表 2)。非同义突变与同义突变的比例是 8, 表明 *PoSP I-1* 处于正向选择中。

通过构建进化树分析得知(图 2), 牙鲈中丝氨酸蛋白酶 I-1 基因首先与牙鲈的丝氨酸蛋白酶 2 聚为一支, 之后与其他鱼类, 如线鳢的丝氨酸蛋白酶 1 聚为一支, 同时丝氨酸蛋白酶 I-1 基因也和鱼类的其他丝氨酸

```

1      ATGCTGGTCTTTGTCTAAATGAAGCTGATGGTTCTCGTATTGTTGGCGGTAGAGATTCT
1      M L V F V L N E A D G S R I V G G R D S
61      G C C C C C A C T C A C G C C C T A C A T G C T T C G T G C A A G T C G G A G G T A G C C A T A A C T G T G G G
21      A P H S R P Y M A S L Q V G G S H N C G
121     G G A C T G G T G A A A G A A A A C T T G T C C T C A C T G C A G C A C A T T G T G C G A T A C C T G T G C C A
41      G A L V K E N F V L T A A H C A I P V P
181     T A C A C A G T T G T G C T C G G C G T T G A T T C C C T G T C A G G T A C G A G A C T A C A A A C A G G A A T T C
61      Y T V V L G V D S L S G T E T T K Q E F
241     A G A A C T G T C A G A T C T A T T C C C C A T C C C G A T T A T G A T C G A C A T T C A A A T G A T A T A C T G C T C
81      R T V R S I P H P D Y D R H S N D I M L
301     C T G A A G C T C A A T G G C A G T G C A C A A C T G A G C A G T G C A G C T G A T C T C T G A A A C C G
101     L K L N G S A Q L T E A V Q L I S L K A
361     A T C A G G G T G A G G A C A G G G A G T C G C T G C C T C A C A G T C G G C T G G G G G G C A T A G G G G A T A A C
121     I R V R T G S R C L T V G W G D I G D N
421     A A C A C C T T A C C C A A C A C G C T T C A G G A G T C A A C G T A A C C A C T G C C A C A G C G G A C A T G T
141     N T L P N T L Q E V N V T T L P Q R T C
481     C G C A G G A G A T G G G A T C A G T T C C C A T C A T A G A T C A A T G G T T G T G G T G T T G G G C C A G A
161     R R R W G S V P I T R S M V C G V G A R
541     A G G T T C A A G G C T T C T G C T C G G G G A T T C A G G T G G C C C T C T G G T G T G T A G T G A G C T G C A
181     R F Q G F C S G D S G G P L V C D G A A
601     G C A G G C G T T G T C T C T C T G G C A G G C G A T G C G G A G A C A A C A G G A C C C C T G A T G T C T A C
201     A G V V S F S G R R C G D N R T P D V Y
661     T C A A G T A T A C C T C C T C A G G G A C T G G A T T A C T G G A G T G T T A A C A G C A A A T A G
221     S S I S S F R D W I T G V L N S K *
    
```

图 1 *PoSP I-1* 的 CDS 及其氨基酸序列

Fig.1 CDS and the deduced amino acid sequence of *PoSP I-1*

起始密码子加粗表示, 终止密码子用*表示。SNP 位点用框表示

The initiation codon is in bold and the termination codon is marked with *. SNP sites are boxed

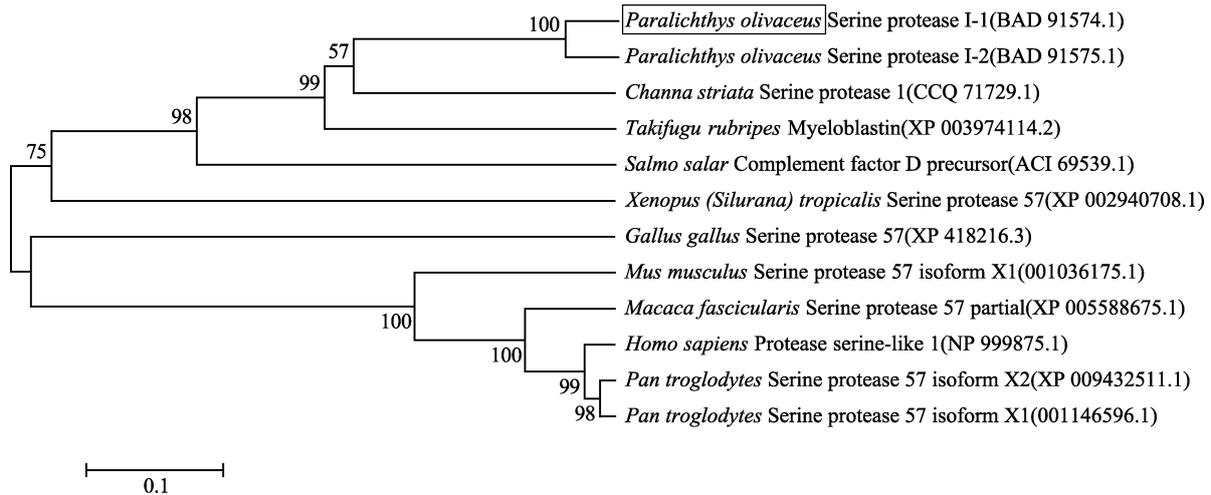


图 2 丝氨酸蛋白酶部分物种的系统进化树

Fig.2 The phylogenetic tree of serine proteases among some species

表 2 *PoSP I-1* CDS 中单核苷酸多态性位点(SNPs) (SNP 位置的命名从起始密码子开始)Tab.2 SNPs discovered in *PoSP I-1* (the position named from the start codon)

SNP	密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	较小等位基因频率率 Minor allele frequency	S/NS
SPI-1SNP62	GAC/GCC	Asp/Ala	0.05	NS
SPI-1SNP86	TCT/GCT	Ser/Ala	0.05	NS
SPI-1SNP223	ACT/ACC	Thr	0.18	S
SPI-1SNP365	ACG/GCG	Thr/Ala	0.21	NS
SPI-1SNP415	GCC/GAC	Ala/Asp	0.03	NS
SPI-1SNP417	CTA/ATA	Leu/Ile	0.03	NS
SPI-1SNP456	GAC/GAA	Asp/Glu	0.03	NS
SPI-1SNP502	AGA/GGA	Arg/Gly	0.05	NS
SPI-1SNP518	CCT/ACT	Pro/Thr	0.26	NS

蛋白酶家族中的部分基因相似度较高, 如红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 的 Myeloblastin 及大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的补体因子 D 基因, 与其在系统进化中的地位相符。

2.3 *PoSP I-1* 启动子区域的多态性

选取 5 尾抗病个体和 5 尾易感个体, 成功扩增了 *PoSP I-1* 上游 2605 bp 的片段。对测序结果进行比对, 共查找出 28 个 SNP (图 3)。通过 TFSEARCH 预测转录因子结合位点, 分析 28 个 SNP 位点与预测的转录因子结合位点的关系 (图 4)。

在 *PoSP I-1* 启动子区域位点-13 上, 存在 T/C 的多态性变化, 预测对应的转录因子为 SRY; 在位点-423, 存在 T/A 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 SRY; 同样地, 在-623 位点, 存在 C/A 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 SRY; 在位点-748 上, 存在 G/C 的多态性变化, 预测结合的转录因子为 CdxA; 在位点-809、-811、-813 存在 C_A_C/T_T_A 的单核苷酸多态性变化, 预测结合的转录因子为 CDP CR; 在-1358 位点, 存在 A/G 单核苷酸多态性, 预

测结合的转录因子为 CdxA; 在-1583 位点, 存在 T/C 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 SRY; 在-1658 位点, 存在 T/G 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 CdxA; 在-1782 位点, 存在 T/G 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 C-Ets-; 在-2199 位点, 存在 A/C 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 GATA-2; 在-2388 位点, 存在 A/T 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 CdxA。

2.4 *PoSP I-1* 多态性位点-365A/G 与牙鲆抗病和易感的关系

通过重测序, 发现在 *PoSP I-1* 中有一个重要的多态性位点: SNP365A/G (起始密码子位置视为+1) (图 5)。SNP365 是从苏氨酸到丙氨酸的非同义突变。在该位点, AA 在易感组的频率是 36.7%, 但在抗病组的频率是 16.7%。并且, 在易感组 AG 的频率是 40%, 而在抗病组的频率是 60%。GG 在抗病和易感组的频率均为 23.3%。其中, 用卡方检验分析 SNP365A/G, 结果显示存在显著差异 ($P=0.010$)。

CAGAGAAGAGTCGGAAAGCTTAAATAAAAACTACTAATGCTGCTCCAGCTGCCTCTACTTTCCAGTTTTGAAC TTCACTTTCTGGTTCTGTGTT
GCCAGTCTGTCTGTGCTTGACTGGGCAGGAGAATACAAACAATTCATCCTTAATAATGATAAATGACCTGAAGTGTGATCTGAAAATAATTTTTGGT
AACCTGTCATTCATGTCAAGCAGTCTAGCCACATTTTGGGTGTTTGGGATATTTTCAATTTGAGCTTTGTTTCGTCATCCAAATCATGAAGGAAT
T

TTAAATCATGCTTCTCCTCAAGCACAAACTTGAAACACAACACTGGCTACAAATAGGTATAGAAATGGTTTTAAAGCCCTAAATAAGCTTACTC
CTATACATGAGACACATTAGGCCTGTGTTTCAGGTGCTTTGGATATCCTTACTTGAGAACTTGAGTAGCAAGATCTTTAAAGGATGAAGTATCA
T

C

CATTTTGGCGGTCAAAGGTCAAAGGTCAAGGTCACGGTGACCTCACAAAGCACTTTTTTTTTGCCTTGCGAAGGTGATTTCTCTGGAACAGACAAAG
GAATCCTTTTACATTTATGGTACAAACATTCACCTGGAGTCAGTGATTAACCTCATTGATTTTCAATAAAATGATGTCTTACATTTTTTAAAGGG
TTTTTTCTCAGGATGTTGAAGGGGGCAGCGCCAGCTCCCATACTAAAAATTTCCCTTTTTTTTTTCCACTCCTCACCTGAATTTCTTAGC
G

TTTGGTTATCTCCTATGAGAAAAGTGAACAAACTGCCAGCAACAAAACCTAATGCTGAACCTTTGGATCAGTTCAAAGACTTAGAAATTCAGTAAAA
G

ATGTGGCTAGCTTTGGTATTCAGCAAAGAATATGAAGAATCTTAAACAGAGTTGGTGTATTTGTACAGTGGCATCTCTCTGGTTTCAGGAGGCC
C

GGGGCTCATGGGTAATATCCACTGTTTCAGTTGTGTTTCAGTTTCAGTGAGTGGCGTAAATGCAGCAATAGTCAACAGATTTTTTCTCTATATGATA
AACTTACTCAGTGGACATGGATCCCAACAGATCATCATATGTGGAATGGAAAATCTGCCGATTCAGTATTGGAGAGATACATTGTCATTTCTC
T

AAATTCATAATGAGTCTTTAACTGAAAATTAATAAAGAAACATTTGTTAATGGTCTGTATGTATATAGCGATTCCTAGTCTTGATGACCACT
G

CAAAGCGCTTCACCTACAGGTTATTTTCAAAAATGTGCTTTCCGGCTCCCAACAGAGTTCAGTTTCAGACTGTGGTATGTTGCATAACTCAAACC
G C

ACATTCCTTTCTCAGAACAGTCTTTAAACACAAGTATGTAACCTTGTGCGAAAAGAGGAAAGTATATAACTGTCATAACTTAAGCAATAACAAA
GGCCACATTTTTCTGATAAAGACAACCTAAATCCCATGAAAAGAGTTTGACCTTCAATTCATCACTGTGCGAAATTCGCGTAGTTTCAAACCTTA
T G

AAGATTTACAATAACATATTGTTTGTACATGTAACCGTATTTGTATTGTATTATATTTATATTTTGTCCCACTGTAGCATATTGTAGCAAATTATG
G

GTTATTACTGTACTGTGATAGCTAAATTTGTGTTGCACAAGATAGTTTGAACGAGCAGCTTGACATGATTAGATGGCGGATGCGGAGGAGCAACA
GTGGCGTCCATCCACTCCACACTAATATGCAAGTTCAACTTTAATGACCTAAAATGGCTTTGAGGTACAATCAATGTTGATGAATTTGGCTCAAC
T T T A

TGCTAATGAAATGAATAAAAACATAAAGTCTGGTATCAATTATAACACTAATTTTCAAAGTTGCTAAACCACTCAACCGATTTTATAGAGGTGGGG
C

CATAACCAAGAAAGAGCCCATTTGTAATTTGGTGCATATCAGAGGGTGACACCAGCAATTTCTTTTCAAAGTATGTACTAATCCTGATCATGATAA
A

AGACATTCAGACCAGACTGTTGGAGTCTGTGCAATTTGGTGCAGATCCAAATCCAAATCTGGATCAAGTGCTTTTAAATTAGGTTTTATAGGGGTG
G C

TAGGCTTTTTTCAAACACAAGTAACAAGCAGAGGAAACCAGTAACCTGACACTAATGTGTAGCTGAGAAACAATAATGTGGCCAGTGACCTGTTTCAA
A T

AGGAACGTGTTGGGCTTGGAGGATTCTACTGAGTGCAACCTAGTTTCTATTTTATTAGCAACGGTTTTGACACATATTTACTTAATAATAATTCT
C T

ACAGACAATTCCTAAAAGTGTAGACATGATTTCTGGGGGACACATAACAATAAACATGAATGAGAACTTGAGCCACTAAAGCTGTTGATGCATTAAAC
CACAACGTCCGGTTCATCAATTATGAAACCTGTTTTGAAAATAAACCCACGTCTTTTGTAAACAGCTTCAAAAATAGCATGTTAGCACATTCACT
GAAGCAATAAAGACCACAAAATAAGCAAGATGTTTTCTTCCAAATATTTATAAGACCAAGAGTGAAGGTAGATCAGAGCAGCGACCATGGCGG
A

TTGGTTTCTACTCATGCTGGTC
C

图 3 *PoSP* I-1 启动子序列的单核苷酸多态性
Fig.3 SNPs of serine protease I-1 promoter region in *P. olivaceus*
多态性位点用下划线表示, 多态性位点变化在下方表示
The polymorphism sites are underlined, and their variants are indicated

-2424	ATTTGAGCTT TGTTTCGTCA TCCAAATCAT GAAGGA <u>ATT</u> T AAATCATGCT	score
	----->	CdxA
-2226	TTAGGC <u>C</u> TGT GTTCAGGTGC TTTGGATA <u>T</u> TC CTTACTTGAG AAACCTGAGT	score
	----->	GATA-2
-1808	GCGCCCAGCT CCCCATACTA AAAAAT <u>T</u> TCC TCTTTTTTTT TCCCACTCCT	score
	----->	c-Ets-
-1662	AGAAT <u>T</u> TCAGT AAAAATGTGG CTAGCTTTGG TATTCAGCAA AGAATATGAA	score
	----->	CdxA
-1612	GAATTCCTAA CAGAGTTTGG TGTATTTGT <u>T</u> ACAGTGGCAT CTCTTCTGGT	score
	----->	SRY
-1366	CAAATTCT <u>A</u> T AATGAGTCTT TAACTGAAAA TTAAAAATAA AGAAACATTG	score
	----->	CdxA
-853	AATATGCAAG TTCAACTTTA AT <u>G</u> ACCTAAA ATGGCTTTGA GGTA <u>CAAT</u> CA	score
	----->	CDP CR
-753	GTCTG <u>G</u> TATC AATTATAACA CTAATTTTCA AAGTTGCTAA ACCACTCAAC	score
	----->	Cdx
-653	GTGCATATCA GAGGGTGACA CCAGCAATTT <u>C</u> TTTTCAAAG TATGTACTAA	score
	----->	SRY
-455	AGTAACTGAC ACTAATGTGT AGCTGAGAAA CATAATGTGG CCAGTGAC <u>C</u> T	score
	----->	SRY
-55	GACCAAGA <u>G</u> T GGAAGGTAGA TCAGAGCAGC GACCATGGCG GT <u>T</u> GGTTTCC	score
	----->	SRY

图 4 *PoSP* I-1 启动子区域预测的转录因子结合位点
Fig.4 Diverse of putative binding sites for transcription factors of *PoSP* I-1

TFSEARCH 数值在右侧表示，预测转录因子的结合位点的位置和方向用箭头表示，SNPs 用下划线表示
The TFSEARCH scores are presented on the right. The location and the orientation of putative binding sites for transcription factors are marked with arrowhead. SNPs are underlined

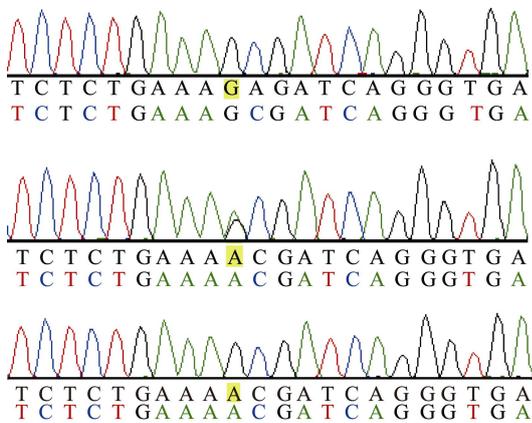


图 5 *PoSP* I-1 CDS 中 SNP365A/G 位点的色谱
Fig.5 Sequence analysis of serine protease I-1 gene in CDS with chromatograms showing SNP365A/G in *P. olivaceus*

表 3 *PoSP* I-1 SNP365 位点与牙鲆鳃弧菌抗病相关性的分析
Tab.3 Correlation analysis of SNP365 of *PoSP* I-1 with disease-resistance in *P. olivaceus*

个体 Individuals	样品数 Number	基因型 Genotype(%)			P
		AA	AG	GG	
易感个体 Susceptible	30	11(36.7)	12(40)	7(23.3)	
抗病个体 Resistant	30	5(16.7)	18(60)	7(23.3)	0.010

2.5 *PoSP* I-1 在牙鲆对照、抗病和易感个体的表达水平

使用鳃弧菌感染牙鲆后，*SP* I-1 基因在易感组牙鲆的肾脏中的相对表达量最高，其次是脾脏、鳃和肝脏。抗病组牙鲆，*PoSP* I-1 在所研究的免疫组织中均有表达，在肾脏中的相对表达量最高，其次是鳃、脾

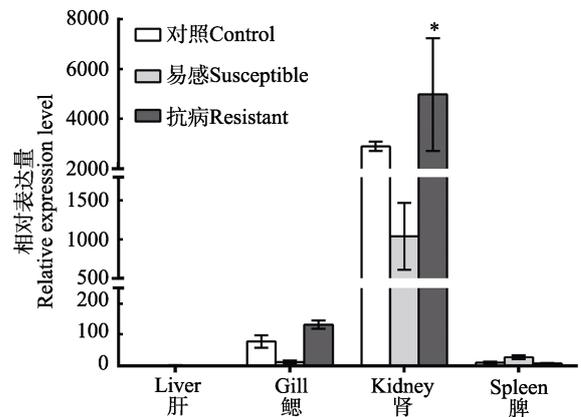


图 6 注射鳃弧菌后 *PoSP* I-1 在牙鲆对照个体、抗病个体和易感个体的肝、鳃、肾和脾组织的表达水平

Fig.6 The expression of serine protease I-1 mRNA in liver, gill, kidney and spleen in control, resistant and susceptible individuals of *P. olivaceus* after *V. anguillarum* injection

脏和肝脏。在易感组中, *PoSP* I-1 的相对表达量比对照组显著降低。抗病个体中的相对表达量显著高于易感个体和对照组个体。

3 讨论

近年来, 病害的频繁暴发给中国的牙鲆养殖业造成严重的经济损失, 牙鲆病害的防治方法亟需解决。牙鲆作为一种硬骨鱼类, 有一定的获得性免疫力, 国内已有抗病疫苗问世, 如抗淋巴囊肿病疫苗(郑风荣, 2006)¹⁾, 但对于牙鲆的主要细菌性病害如鳃弧菌病, 目前还没有行之有效的疫苗。目前, 分子标记技术已被广泛应用于水产生物的选择育种。多个与免疫相关的基因, 如主要组织相容性复合体(MHC)、甘露糖结合凝集素(MBL)等的多态性与动物个体对特定疾病的易感性/抗性相关。在鱼类中免疫相关基因的多态性位点与细菌、病毒感染的重要关系, 提示可以开发抗病候选基因的 SNP 位点作为抗病的潜在分子标记。但是, 目前对牙鲆病害抵抗的分子机制了解较少, 仅有关于 MHC 基因的多态性与牙鲆对鳃弧菌抗性的相关研究(Xu *et al.*, 2008)。因此, 辨别与病害抵抗相关的免疫基因可以为牙鲆的选择育种提供有力帮助。

丝氨酸蛋白酶相关基因编码区的突变, 特别是非同义的突变, 由于可以引起蛋白质结构或功能的变化, 可以作为疾病相关多态性标记的研究重点。本研究利用重测序的方法, 发现 *PoSP* I-1 CDS 有高多态性, 其 CDS 包含 9 个多态性位点, 相当于每 80 bp 有 1 个 SNP。同时发现了启动子区的 28 个 SNP 位点, 研究其转录因子结合位点发现, 部分 SNP 位点是转录因子 CdxA、CDP CR 等的结合位点, 而这些转录因子调控的基因往往与免疫有关: 如转录因子 CdxA 基因是免疫相关 SP-A 基因的调控因子。因此, 研究这些启动子区多态性与基因表达调控的关系, 将同样是下一步研究免疫候选基因的重要组成部分。本研究中, 牙鲆丝氨酸蛋白酶 I-1 基因 365A/G 颠换与牙鲆对鳃弧菌抗性的相关性分析显示, 该 SNP 位点基因型在易感个体中的频率与抗病个体有显著差异($P < 0.05$), 其差异主要是因为 AG 基因型在抗病个体中的频率显著高于易感个体, 表明 365A/G 基因型与牙鲆对鳃弧菌的抗性有关。SNP365 是非同义突变, 会引起从苏氨酸到丙氨酸的氨基酸序列的变化, 由于该变化是从疏水性氨基酸到亲水性氨基酸的变化, 这可能会引起蛋白质活性的改变, 如果该位点是关键的结构域, 则

这种改变会对蛋白的活性产生影响, 从而影响 *PoSP* I-1 的功能以及宿主抵抗病害能力。

qRT-PCR 结果显示, *PoSP* I-1 在免疫组织中广泛表达, 在肾组织中表达量最高, 其次是鳃、脾脏和肝脏。在易感个体中, *PoSP* I-1 相对表达量比对照个体显著降低, 提示易感个体 *PoSP* I-1 在受到细菌感染后处于下调状态, 这可能与易感个体感染细菌后迅速死亡的原因有关。而在抗病个体中, 相对表达量要显著高于易感个体和对照组个体, 尤其在抗病个体中, 肾的相对表达量是非常高的, 这一结果说明抗病个体的 *PoSP* I-1 在细菌感染后下调受到了抑制, 而且表达量有显著上升, 可能与其补体系统免疫能力有关。补体系统具有天然的免疫功能, 但其必须先通过丝氨酸蛋白酶的酶促级联反应激活后才能发生生物学效应。补体系统在哺乳动物的研究与肾脏疾病和炎症发病有着重要的关系, 在抗病个体的肾组织中的相对表达量大大升高可能与丝氨酸蛋白酶在补体系统中的作用有关, 但是仍然需要在牙鲆群体中进行基因分型的验证实验, 从而进一步揭示该基因相对表达量的变化与 SNP365A/G 基因型的关系。

综上所述, 本研究通过重测序的方法, 在 *PoSP* I-1 CDS 中发现 9 个 SNP 位点, 其中, 8 个位点为非同义突变, 揭示该基因可能存在正向选择。通过研究 365A/G 位点, 发现其 365 位点基因型频率在易感个体和抗病个体中具有显著差异, 其差异源于 AG 基因型在抗病个体中的频率显著高于在易感群体中的频率($P < 0.05$), 表明 365A/G 基因型与牙鲆对鳃弧菌的抗性显著相关, 提示此基因型可作为抗病相关的候选分子标记应用于牙鲆抗病育种。qRT-PCR 的结果进一步显示, 在注射鳃弧菌的牙鲆中, 在易感个体中该基因表达量下调, 而在抗病个体的主要免疫组织中 *PoSP* I-1 表达量上调, 且其相对表达量显著高于在易感个体中的相对表达量。以上结果揭示, *PoSP* I-1 是牙鲆抗鳃弧菌感染的重要候选基因, 其 CDS 中的 SNP365A/G 是一个重要的多态性位点, 有望成为牙鲆抗鳃弧菌病选择育种的候选标记。

参 考 文 献

- 于大国, 张宗伟, 孙永昌. 牙鲆仔鱼肠道白浊病及防治. 中国水产, 1998, 41(1): 41-42
 曲凌云, 孙修勤, 张进兴. 养殖牙鲆淋巴囊肿病毒的电镜观察. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 105-110
 张全启, 徐晓斐, 齐洁. 牙鲆野生群体与养殖群体的遗传多

1) 郑风荣. 淋巴囊肿病毒(Lymphovystis disease virus)核酸疫苗的免疫效果评价及安全性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2006, 68-78

- 样性分析. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2004, 34(5): 816–820
- Budayova-Spano M, Lacroix M, Thielens NM, *et al.* The crystal structure of the zymogen catalytic domain of complement protease C1r reveals that a disruptive mechanical stress is required to trigger activation of the C1 complex. *EMBO J*, 2002, 21(3): 231–239
- Li L, Zhao JM, Wang LL, *et al.* Genomic organization, polymorphisms and molecular evolution of the goose-type lysozyme gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Gene*, 2013, 513(1): 40–52
- Wan QY, Su JG, Chen XH, *et al.* Genomic sequence comparison, promoter activity, SNP detection of RIG-I gene and association with resistance/susceptibility to grass carp reovirus in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Dev Comp Immunol*, 2013a, 39(4): 333–342
- Wan QY, Wang L, Su JG, *et al.* Genetic structure, polymorphism identification of LGP2 gene and their relationship with the resistance/susceptibility to GCRV in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Gene*, 2013b, 521(1): 166–175
- Wang L, Su JG, Peng LM, *et al.* Genomic structure of grass carp Mx2 and the association of its polymorphisms with susceptibility/resistance to grass carp reovirus. *Mol Immunol*, 2011, 49(1–2): 359–366
- Xu TJ, Chen SL, Ji XS, *et al.* MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(3): 213–221
- Zhong QW, Zhang QQ, Wang ZG, *et al.* Expression profiling and validation of potential reference genes during *paralichthys-olivaceus* embryogenesis. *Mar Biotechnol*, 2008, 10(3): 310–318

(编辑 冯小花)

The Polymorphism of Serine Protease I-1 in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

FU Ruixue, ZHOU Nayu, LIU Jinxiang, WANG Xubo, HE Yan, ZHANG Quanqi, YU Haiyang^①

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, Ocean University of China
College of Marine Life Sciences, Qingdao 266003)

Abstract Serine proteases are enzymes that have serine, histidine and aspartic acid in their active domain and same catalytic mechanisms, which play important roles in many diseases and intracellular signal transduction. In this study, we amplified the coding sequence and promoter sequence (2605 bp) of serine protease I-1 from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (*PoSP* I-1). We identified 9 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 28 SNPs in the coding sequence and promoter sequence of *PoSP* I-1, respectively. The analysis of all SNPs indicated that the frequency of SNP365A/G in the coding sequence of *PoSP* I-1 is significantly different between the resistant group (60%) and the susceptible group (40%) ($P=0.01$). *Vibrio anguillarum* injection reduced the expression of *PoSP* I-1 in the susceptible individuals but induced its expression in the resistant individuals. Moreover, *PoSP* I-1 in the resistant individuals is higher than that in the susceptible individuals. These results implied that *PoSP* I-1 is involved in the resistance of Japanese flounder to *V. anguillarum*. 365A/G of *PoSP* I-1 is a potential marker associated with the resistant Japanese flounders. In conclusion, *PoSP* I-1 365A/G is a candidate marker that could apply to disease resistant selective-breeding of Japanese flounder in the future.

Key words Serine protease; Japanese flounder; *Vibrio anguillarum*; Polymorphism

① Corresponding author: YU Haiyang, E-mail: yuhaiyang@ouc.edu.cn

滁州鲫(*Carassius auratus*)线粒体全基因组 序列分析及系统进化*



胡玉婷 胡王^① 江河 凌俊 段国庆 潘庭双

(安徽省农业科学院水产研究所 合肥 230031)

摘要 为探讨天然三倍体滁州鲫的系统进化地位,采用直接测序法获得滁州鲫线粒体基因组。其序列全长为16581 bp,碱基组成为31.6% A、26.2% T、16.1% G和26.1% C,包括13个蛋白质基因、22个tRNA基因、2个rRNA基因和1个非编码区,各基因的位置及组成与已公布的鲤科鱼类一致。除tRNA-Ser^(AGY)外,其他21个tRNA的二级结构均具有典型的三叶草结构;13个蛋白编码基因中,除CO I起始密码子为GTG外,其余均以ATG为起始密码子;CO II、ND3、ND4和Cytb基因的终止密码子为不完整的T,其他9个基因均具有完整的终止密码子TAA或TAG。序列分析表明,滁州鲫与其他鲫属鱼类(方正银鲫A系和D系、鲫、淇河鲫、萍乡肉红鲫、黑鲫、日本白鲫和日本银鲫)在线粒体基因组上均具有较高的序列同源性(>94%)。以鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)为外类群,基于线粒体13个蛋白质基因的核苷酸与氨基酸序列构建上述鲫属鱼类的系统进化树,结果显示,滁州鲫与方正银鲫亲缘关系最近,与黑鲫最远。综合以上研究结果,认为滁州鲫应为银鲫亚种的一个地方种群。

关键词 滁州鲫;线粒体基因组;系统进化分析

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0063-08

动物线粒体基因组(Mitochondrial DNA, mtDNA)为闭合双链环状DNA,长度一般在15.7–19.5 kb,而鱼类mtDNA的长度大多在15–18 kb,其包括22个编码转运RNA基因(tRNA)、13个编码蛋白质基因、2个编码核糖体RNA基因(rRNA)和1个控制区(D-loop区)及散布于不同基因间的少量非编码序列。大多数脊椎动物mtDNA的组成相对较为稳定,但不同类群的基因组在结构和基因排列顺序上存在差异,这种差异性可能反映了真核细胞的不同进化路线(Saccone *et al*, 1999)。由于mtDNA具有结构简单、母系遗传、进化速度快等特点而成为分子系统学及群体遗传学研究极其有效的分子标记,被广泛用于硬骨鱼类间的亲缘关系及分类地位的研究(肖武汉等, 2000; 郭新红等, 2004; Miya *et al*, 2001; Caccone *et al*, 2004)。

滁州鲫(Chuzhou Crucian Carp)因产于安徽省滁州市而得名,是我国天然三倍体雌核发育(Gynogenesis)鲫(*Carassius auratus*)种群之一,也是滁州及安徽省特有的鲫鱼种群(张克俭等, 1995、1996; 徐广友等, 2009)。滁州鲫具有生长速度快、个体大、耐低氧、不易染病等特点,早在明朝的《滁县地方志》中,就有其“肉肥厚细嫩,味甘香醇,乌背金鳞,银光闪闪”的记载,是深受当地养殖户与居民喜爱的名贵经济鱼类,具有重要的科研与经济价值(凌武海等, 2011)。

近年来,由于环境污染、过渡捕捞等原因,滁州鲫野生资源锐减。但有关滁州鲫的研究远不够充分,且主要集中在传统的形态学(马明发等, 2009)、繁殖生物学(陈可东等, 2004; 袁兆祥等, 2010; 马明发等, 2010)等方面,对其分子生物学研究较少且方法落

* 安徽省财政专项资金项目(14D0508)、安徽省农业科学院成果推广项目(13E0504)和安徽省“115”产业创新团队(皖人才办[2009]2号)共同资助。胡玉婷, E-mail: huyuting1021@126.com

① 通讯作者: 胡王, 副研究员, E-mail: huwang101@sina.com

收稿日期: 2014-11-03, 收修改稿日期: 2014-12-03

后(姚纪花等, 1998; 凌武海等, 2009), 未能明确滁州鲫的系统地位, 限制了滁州鲫的资源保护、开发利用。胡玉婷等(2015)采用线粒体 DNA 控制区和细胞色素 b(Cytb)全序列探讨了滁州鲫与部分鲫属鱼类的遗传进化关系, 发现滁州鲫与方正银鲫(*Carassius auratus gibelio*)具有最近的亲缘关系, 而与白鲫(*Carassius cuvieri*)的亲缘关系最远。目前, 尚无滁州鲫 mtDNA 的研究报道。

本研究采用 PCR 扩增和 DNA 直接测序法, 测定了滁州鲫线粒体基因组 DNA 全序列, 并分析了其基因组的主要结构信息, 并与同属的一些鱼类进行比较, 以鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)为外类群, 构建了鲫属鱼类分子系统进化树, 进一步探讨滁州鲫的系统进化地位。研究结果将为进一步利用线粒体基因组分析鲫不同地理群体的遗传多样性、亲缘关系以及鲫属鱼类系统进化提供重要的基础信息, 对滁州鲫的保护和分类地位的确定以及资源开发利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料及总 DNA 的提取

滁州鲫为安徽省滁州市水产研究所保存的滁州鲫原种。取滁州鲫背部肌肉, 采用天根生化科技(北京)有限公司的普通动物基因组提取试剂盒(Universal Genomic DNA Extraction Kit), 按照试剂盒提示的操作步骤提取基因组 DNA, 并采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2 引物设计与 PCR 扩增、测序

参照鲫(*Carassius auratus auratus*)的线粒体基因组全序列(GenBank 登录号: AB111951), 用 Primer 5 软件设计可覆盖其线粒体全基因组的引物, 部分引物参考相关文献, 详见表 1。

采用 PCR 扩增线粒体 DNA 的目的片段。PCR 反应体系: $10\times$ Taq Buffer 5.0 μ l, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 4 μ l, dNTP(10 mmol/L) 4.0 μ l, 引物 1 和 2 (10 mmol/L)

表 1 滁州鲫线粒体基因组扩增引物及扩增条件

Tab.1 Primers and PCR conditions for amplification of the mitochondrial DNA of *C. auratus* in Chuzhou

引物 Primer	上游引物序列(5'-3') Upper primer sequence	下游引物序列(5'-3') Lower primer sequence	产物长度 Product length (bp)	扩增位置 Product site (bp)
P1	CCCTACGCTCAAAGAATCC	ACCGTGTTACGACTTGCCCTC	1209	16364-991
P2	ATAGAGTGTCCCTTTGAACCC	GCTTGTCCGATTTGGCTTAC	978	867-1844
P3	TGACAGACCTACCGAACCTG	CAAACGAACCCTTAATAGCG	1130	1447-2576
P4	ACGAGAAGACCCTTTGGAGC	TTGTTTCGGCTAGTGTGAG	1227	2227-3453
P5	TGACCTTATGAGCACCAATACC	TTCGGGCATTCAGAAGTGTA	1276	3120-4395
P6	GCGCAGTAGAAGCAACAAC	TGGCAGTAGTCCAAGGGTG	863	4196-5058
P7	TCCCCAATACAACCAACTC	TTGATGAAACACCTGCTAAATG	994	4957-5950
P8	AATAGTAGGAACCGCTTTAAGC	TAGACCCAGGAAGTGTGTGG	1219	5559-6777
P9	TGACTGGCTACACTTCACGGAG	CGGATACTAAGACACGGACTGG	1209	6445-7653
P10	ATTGCTCTACCATCCCTACG	GGCTCATTATGTCCTCCTAC	911	7413-8323
P11 ^a	AAAGCGTTGGCCTTTTAAGC	GTTAGTGGTCATGGCTTGGATC	951	7902-8852
P12	TTATCGGAATACGAAATCAACC	GTGGGAGTCAGAAAGAAATGG	1276	8457-9732
P13	CCGCTGCCTGATACTGACAC	AGGTGGGTCCGGTGAAATG	644	9506-10149
P14 ^b	AAGACCTCTGATTTCCGGCTC	TTCGTATTATCCGTATCC	1042	10039-11080
P15	CAAACCGAACGACTCAATG	AGACTAATCCGTGGGCAAT	553	10150-11332
P16	GCAGGGTCCATAGTACTAGC	ACTTGGATTGACCAAGAG	889	11038-11926
P17	ACATTACGGGACTCCAACC	GTGAAGGCGGATAAACAGG	1127	11630-12756
P18	ATCTGCCCTACTCCACTCAAG	TCGTTTGTAACCTTTGCTATGG	1008	12693-13700
P19	AATCATTCACCGACTCCTTCC	GTCAGCCGTAGTTTACATCTCG	1047	13560-14606
P20 ^b	GACTTGAAAAACCACCGTTG	CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC	1235	14332-15566
P21	GGACAAATCGCATCCGTCCT	ATCTTAGCATCTTCAGTG	1202	15425-45

注: 参考文献, a; 刘良国等, 2011; b; Xiao *et al.*, 2001

各 2 μl , 模板 DNA(50–100 ng/L) 2 μl , *Taq* DNA 酶(5 U/ μl) 0.3 μl , 灭菌超纯水 30.7 μl , 总体积为 50 μl 。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30–50 s、51–55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45–60 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45–60 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6–8 min。PCR 反应均设不含模板 DNA 的空白对照。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托上海生工生物工程有限公司进行纯化并直接测序, 测序引物同扩增引物。

1.3 序列拼接、注释与分析

测定的线粒体 DNA 片段结合软件 Chromas 2.13 (<http://technelysium.com.au/>)、Seaview (Galtier *et al.*, 1996)、Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) 进行序列校对和拼接。拼接好的线粒体基因组序列, 在 NCBI 数据库在线 Blast 分析序列同源性。采用在线软件 tRNA Scan-SE 1.21 (Lowe *et al.*, 1997) (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 并参照 GenBank 中已知的其他鲫属鱼类的线粒体基因组序列定位 tRNA 基因及其二级结构、蛋白质编码基因、rRNA 基因和 D-loop 区, 确定滁州鲫线粒体基因组的基因结构。采用软件 DnaSP 5.0 (Librado *et al.*, 2009) 及 MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2008) 等软件对序列信息进行分析。

1.4 系统发育分析

从 GenBank 下载一些鱼类的线粒体基因组全序列 (表 2)。以鲤为外类群, 截取 13 个蛋白质编码基因的核苷酸序列、氨基酸序列, 采用软件 MEGA 4.0 的最大似然法 (Maximum parsimony, MP) 和邻接法 (Neighbor joining, NJ) 分别构建系统进化树, 以确定滁州鲫在鲫属鱼类中的系统进化地位。系统树各分支的可靠性通过重抽样分析评价, 自展检验 (Bootstrap analysis) 设为 10000 次。

2 结果

2.1 基因组结构与组成

滁州鲫线粒体基因组全长为 16581 bp (GenBank 登录号: KM659025), 与其他鲫属鱼类线粒体基因组的长度相近 (表 2), 包括 37 个基因 (13 个蛋白编码基因、2 个 rRNA 基因和 22 个 tRNA 基因) 和 1 个控制区 (D-loop 区), 其基因序列大小以及在基因组中的排列顺序与硬骨鱼类 mtDNA 基本一致 (表 3)。基因间排列紧凑, 除控制区外, 基因间隔区有 13 处, 共计 68 bp, 其大小为 1–33 bp; 基因重叠区 10 处, 重叠碱基数在 1–7 bp 之间, 共计 28 bp。与其他脊椎动物线粒体基因结构特征一样, 除了 ND6 和 8 个 tRNA 在轻链 (L 链) 上编码, 其他的所有基因都在重链 (H 链) 上编码 (表 3)。

滁州鲫与其他鲫属鱼类的线粒体基因组均具有较高的序列同源性 (>94%), 其线粒体全基因组各碱基含量为 A (31.6%)、C (26.1%)、T (26.2%)、G (16.1%), A+T (57.8%) > C+G (42.2%); 线粒体 13 个蛋白质基因的 4 种碱基含量由高到低依次为 A (30.8%)、C (27.5%)、T (27.1%)、G (14.6%), 也显示为 A 的含量最高, 而 G 最低, A+T (57.9%) > C+G (42.1%), 表现出适度的 A+T 偏好性, 这与脊椎动物 A 或者 T 的密码子偏好性是一致的 (Broughton *et al.*, 2001; Cantatore *et al.*, 1994)。

2.2 蛋白质编码基因

滁州鲫 13 个蛋白编码基因中, 除 CO I 基因起始密码子为 GTG 外, 其余起始密码子均为 ATG, 与其他硬骨鱼类相一致。终止密码子有 9 个基因 3' 端由完全的 TAA (ND1、CO I、ATP6、CO III、ND4L、ND5)

表 2 滁州鲫与一些鱼类线粒体基因组序列的比较

Tab.2 The sequence comparison of the mitochondrial DNA of *C. auratus* in Chuzhou and other fishes

物种 Species	长度 Length (bp)	序列相似率 Similarity rate (%)	A+T 含量 A+T content (%)	登录号 Accession No.
方正银鲫 A 系 <i>C. auratus gibelio</i> A in Fangzheng	16580	99.77	57.8	JF496198
方正银鲫 D 系 <i>C. auratus gibelio</i> D in Fangzheng	16580	99.78	57.8	JF496197
鲫 <i>C. auratus auratus</i>	16580	98.55	57.8	JN105355
淇河鲫 <i>C. auratus</i> in Qihe River	16580	98.48	57.7	KJ476998
萍乡肉红鲫 <i>C. auratus</i> var. <i>pingxiangnensis</i>	16576	98.54	57.6	HQ875340
日本银鲫 <i>C. auratus langsdorfi</i>	16578	96.08	57.7	NC002079
日本白鲫 <i>C. cuvieri</i>	16581	95.22	57.4	AB045144
黑鲫 <i>C. carassius</i>	16597	94.16	58.8	JQ911695
鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	16581	89.90	56.7	NC018037

表 3 滁州鲫鱼线粒体基因组组成

Tab.3 The gene content, organization and features of the mitochondrial genome of *C. auratus* in Chuzhou

序号 No.	基因 Genes	位置 Location(bp)	长度 Length(bp)	间隔 Intergenic nucleotides	编码链 Strand	起始密码 Initiation condon	终止密码 Termination condon
1	tRNA-Phe	1-69	69	0	H		
2	12S rRNA	70-1023	954	0	H		
3	tRNA-Val	1024-1095	72	0	H		
4	16S rRNA	1096-2777	1682	0	H		
5	tRNA-Leu ^(UUR)	2778-2853	76	1	H		
6	ND1	2855-3829	975	4	H	ATG	TAA
7	tRNA-Ile	3834-3905	72	-2	H		
8	tRNA-Gln	3904-3974	71	1	L		
9	tRNA-Met	3976-4044	69	0	H		
10	ND2	4045-5091	1047	-2	H	ATG	TAG
11	tRNA-Trp	5090-5160	71	2	H		
12	tRNA-Ala	5163-5231	69	1	L		
13	tRNA-Asn	5233-5305	73	33	L		
14	tRNA-Cys	5339-5407	69	-1	L		
15	tRNA-Tyr	5407-5477	71	1	L		
16	CO I	5479-7029	1551	0	H	GTG	TAA
17	TRNA-Ser ^(UCN)	7030-7100	71	3	L		
18	TRNA-Asp	7104-7175	72	12	H		
19	CO II	7188-7878	691	0	H	ATG	T--
20	TRNA-Lys	7879-7954	76	1	H		
21	ATP8	7956-8120	165	-7	H	ATG	TAG
22	ATP6	8114-8797	684	-1	H	ATG	TAA
23	CO III	8797-9582	786	-1	H	ATG	TAA
24	tRNA-Gly	9582-9653	72	0	H		
25	ND3	9654-10004	349	-2	H	ATG	TAG
26	tRNA-Arg	10003-10072	70	0	H		
27	ND4L	10073-10369	297	-7	H	ATG	TAA
28	ND4	10363-11743	1381	0	H	ATG	T--
29	tRNA-His	11744-11812	69	0	H		
30	tRNA-Ser ^(AGY)	11813-11881	69	1	H		
31	tRNA-Leu ^(CUN)	11883-11955	73	3	H		
32	ND5	11959-13782	1824	-4	H	ATG	TAA
33	ND6	13779-14300	522	0	L	ATG	TAG
34	tRNA-Glu	14301-14369	69	5	L		
35	Cytochrome b	14375-15515	1141	0	H	ATG	T--
36	tRNA-Thr	15516-15587	72	-1	H		
37	tRNA-Pro	15587-15657	71	0	L		
38	D-loop	15658-16581	924	0	H		

或 TAG (ND2、ND3、ATP8、ND6)为终止密码子,其余 3 个基因终止密码子为不完整的 T (ND4、CO II、Cytb) (表 3)。这种不完全终止密码子在脊椎动物线粒体 DNA 中比较常见,一般认为,在转录加工过程中,mRNA 会利用其 PolyA 尾形成完整的终止密码子

UAA 从而终止翻译(Anderson *et al*, 1981)。

ND6 基因是唯一位于 L 链上的蛋白质编码基因。滁州鲫的蛋白质编码基因中共有 4 个重叠结构,ATP8 和 ATP6 之间有 7 bp 的共用碱基,ATP6 和 CO III 之间有 1 bp 的共用碱基,ND4L 和 ND4 之间有 7 bp 的共

用碱基, ND5 和 ND6 有 4 bp 的共用碱基。

2.3 rRNA 基因和 tRNA 基因

滁州鲫的 12S rRNA 位于 tRNA-Phe 和 tRNA-Val 之间, 长度为 954 bp, 其碱基组成为 A (31.7%)、T (19.9%)、C (26.3%) 和 G (22.1%); 16S rRNA 基因位于 tRNA-Val 和 tRNA-Leu^(UUR) 之间, 长度为 1682 bp, 其碱基组成为 A (36.3%)、T (20.5%)、C (22.8%) 和 G (20.4%), 它们与其他硬骨鱼类的碱基组成相似, 且均具有较高的保守性, 与鲤科其他已知物种在 mtDNA 中的位置相同, 长度基本一致。

滁州鲫的线粒体基因组包含 22 个 tRNA 基因(表 3), 它们在线粒体基因组中分散存在, 长度范围为 69–73 bp, tRNA-Gln、tRNA-Ala、tRNA-Asn、tRNA-Cys、tRNA-Tyr、tRNA-Ser^(UCN)、tRNA-Glu 和 tRNA-Pro 的编码基因位于 L 链上, 其余则位于 H 链上, 共转运 20 种氨基酸。除 tRNA-Ser^(AGY) 外, 所有的 tRNA 基因都能折叠成典型的三叶草型结构。

2.4 非编码区

类似于其他硬骨鱼类, 滁州鲫线粒体的非编码区除基因间少数几个碱基的间隔外还包括 D-loop 区和复制起始区(Origin of light strand replication, OL)

(Kumazawa *et al.*, 1999)两个区域。D-Loop 区域位于 tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 之间, 长度为 924 bp, 作为 DNA 复制和转录的相关序列, 它的结构与已报道的其他鲫属鱼类相似。该区域受进化选择压力较小, 进化速率快; 分析其碱基组成, 发现具有明显的 A+T 偏好性(65.8%), 并大于线粒体基因组其他区域的 A+T 含量; 其结构特征也包含 3 个区: 终止结合序列区(TAS-1、TAS-2、TAS-3)、中央保守区(D-box)和保守序列区(CBS-1、CBS-2、CBS-3) (Boore, 1999)。滁州鲫线粒体轻链(L链)上 tRNA-Asn 和 tRNA-Cys 之间的复制起始区(OL)长 33 bp, 这与已报道的硬骨鱼类长度相似(Oh *et al.*, 2008)。

2.5 系统分析

滁州鲫相关分子系统进化树见图 1。核苷酸序列和氨基酸序列的分析结果表明, 鲫属鱼类中, 滁州鲫与黑鲫的亲缘关系最远, 与方正银鲫的亲缘关系最近。

3 讨论

3.1 鲫属鱼类分类

鲫属(*Carassius*)鱼类广泛分布于欧亚大陆及其东部岛屿, 不仅表型变异大, 而且具有很高的遗传多

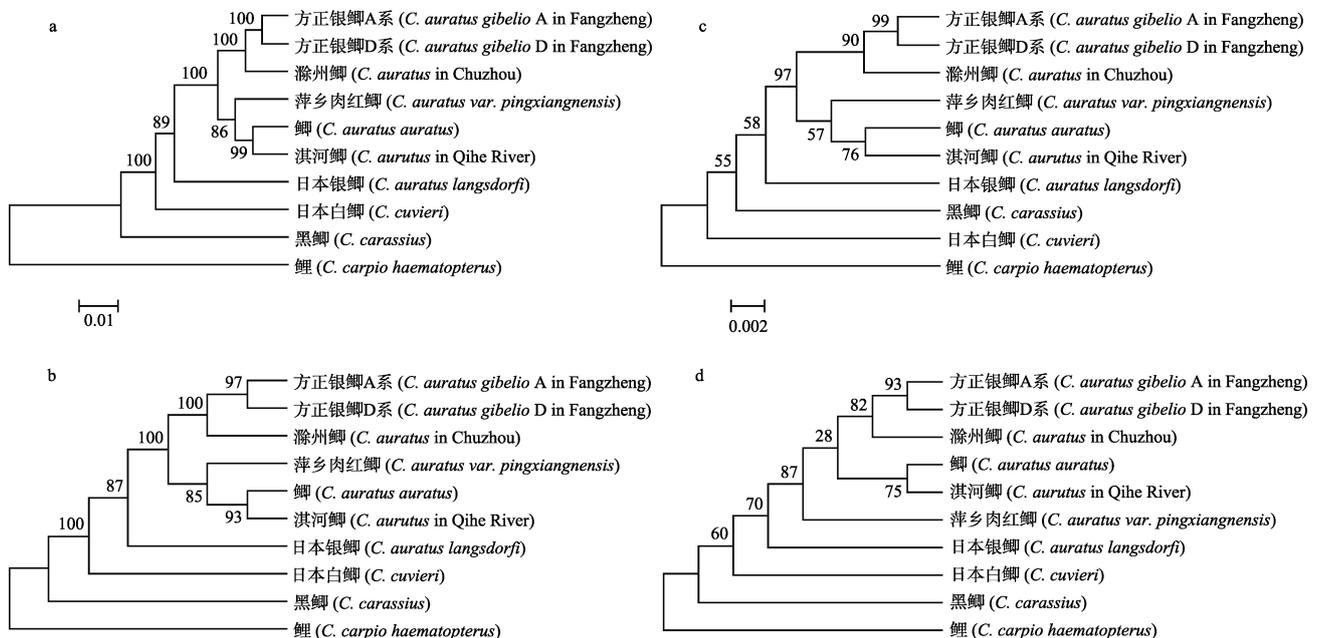


图 1 基于线粒体基因组 13 个蛋白质基因的核苷酸序列(a 和 b)和氨基酸序列(c 和 d)的系统进化树

Fig.1 The phylogenetic tree based on the nucleotide sequences (a and b) or amino acid sequences (c and d) of 13 protein-coding genes in *Carassius* fishes and *C. carpio haematopterus*

a 和 c: NJ 树; b 和 d: MP 树; 节点数字表示支持率
a, c: NJ-trees; b, d: MP-trees; Numbers in nodes means bootstrap value

样性,常表现出二倍体与三倍体共存、雌核发育与有性生殖两种生殖方式的情况(Gui *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011; Podlesnykh *et al.*, 2012)。又由于鲫属鱼类的分布受人为影响较大以及从鲫中选育的金鱼在许多地方的扩散,使鲫属鱼类尤其是鲫的遗传背景更为复杂(牟希东等, 2007; Wang *et al.*, 2013),其分类仍存在着一些争论(任慕莲等, 2002; Takada *et al.*, 2010)。鲫属鱼类可以划分为鲫(*C. auratus*)、黑鲫和分布于日本列岛及其周边的白鲫(*C. cuvieri*) 3个物种或者鲫与黑鲫两个物种(Murakami *et al.*, 2001; Hosoya, 2002; 程磊等, 2012)。该研究基于鲫属鱼类线粒体基因组 13 个蛋白质基因的核苷酸序列和氨基酸序列的系统进化树显示,黑鲫为高支持率的单系群,最先与其他鲫属类群分开;而白鲫(*C. cuvieri*)也是一个具有较高支持率的单系群,与其他鲫属类群的遗传距离均较远。因此,白鲫应为 *C. cuvieri* 而非 *C. auratus cuvieri*,是鲫属的一个有效种,本研究结果支持将鲫属鱼类分为 3 个物种。程磊等(2012)采用线粒体 CO I 部分序列(DNA 条形码)、王姝妍(2013)¹⁾采用线粒体 Cytb 和 D-loop 的鲫属鱼类相关研究也得到了相似的结果。

鲫可分为多个亚种(包括金鱼 *Carassius auratus* var.), 中国大陆鲫(*C. auratus*)可分为鲫(*C. auratus auratus*)指名亚种和银鲫(*C. auratus gibelio*)亚种(罗云林等, 2000; 桂建芳, 2007)。关于银鲫的含义,由于中国的雌核发育多倍体鲫鱼最初是在银鲫中发现的,后来一些学者将中国的雌核发育多倍体鲫鱼均称为银鲫(桂建芳, 2007; 沈俊宝等, 1997),但这种说法是不合适的,因为多倍体在遗传上更接近同域的二倍体而不是异域的多倍体(Apalikova *et al.*, 2011; Takada *et al.*, 2010);而且从本研究结果可以看出(图 1),不同地区多倍体间的亲缘关系较为复杂,可能包含多个遗传距离差异较大的群体。如,同属于天然雌核发育三倍体的方正银鲫、滁州鲫、淇河鲫、萍乡肉红鲫与二倍体普通鲫的亲缘关系差异较大,即:三倍体的淇河鲫与二倍体的普通鲫亲缘关系较近,而与相同倍性的方正银鲫、滁州鲫亲缘关系则较远。王姝妍(2013)¹⁾的研究结果显示,尽管一些群体受人为影响,鲫(*C. auratus auratus*)中大部分群体间的亲缘关系与其地理分布相关,而与倍性关系无关。这进一步说明了倍性在鲫属鱼类中不代表系统进化地位。所以,银鲫应仅指方正银鲫及其近缘群体,不包括中国大陆所有的多倍体鲫。

3.2 滁州鲫系统地位

鱼类线粒体的不同区域进化速率不同,线粒体各个基因的系统发育信息表现也有所不同(郭新红等, 2004; Zardoya *et al.*, 1996; Miya *et al.*, 2000)。在进行系统进化分析时,因为单个基因所包含的系统发育信息过少,不能全面反映整个生物的分子进化水平,现在研究者普遍认可利用更长的线粒体 DNA 序列可以获得更精确、更可靠的系统发生分析结果。将基因组中 13 个蛋白编码基因或轻链上的 12 个蛋白编码基因的氨基酸序列按照顺序连接起来构建系统进化树更为可靠(Miya *et al.*, 2001; Elmerot *et al.*, 2002)。

鲫属鱼类 13 个蛋白质编码基因的核苷酸和氨基酸的分子系统进化树显示,中国大陆鲫可分为两大类群,一类为鲫、萍乡肉红鲫和淇河鲫,另一类为方正银鲫(A 系和 D 系)和滁州鲫,这表明滁州鲫与方正银鲫具有最近的亲缘关系,两者可能具有相似的起源。这从彭泽鲫(*Carassius auratus*)与方正银鲫的系统关系也可知,蒋一珪等(1983)、张辉等(1998)、李名友等(2002)研究表明,彭泽鲫与方正银鲫 A 系具有基本相似的遗传背景,属于方正银鲫的一个地方品系,而方正银鲫 A 系和 D 系是直接由其种群内的遗传分化产生。胡玉婷等(2015)采用线粒体 Cytb 和控制区的研究结果显示,滁州鲫与方正银鲫(A 系)具有最近的亲缘关系,大于彭泽鲫与方正银鲫(A 系)的亲缘关系。马明发等(2009)比较研究了滁州鲫、方正银鲫和彭泽鲫 3 种群银鲫的形态特征,发现滁州鲫与方正银鲫在形态上也较滁州鲫与彭泽鲫间更相近,姚纪花等(1998)、凌武海等(2009)的研究也得到了相似的结果。这些研究结果均说明,不管是在形态上还是遗传上,滁州鲫比彭泽鲫更接近方正银鲫。综合相关研究结果,认为滁州鲫应为银鲫亚种的一个地方种群。

参 考 文 献

- 马明发, 张克俭, 凌武海, 等. 三种群银鲫形态特征的比较研究. 河北渔业, 2009(4): 17-19
- 马明发, 袁兆祥, 凌武海, 等. 滁州鲫生长特性的初步研究. 水产养殖, 2010, 31(5): 16-20
- 任慕莲, 郭焱, 张人铭, 等. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 2002, 145-162
- 刘良国, 杨品红, 杨春英, 等. 洞庭青鲫等 5 个鲫品系线粒体 ATPase 基因序列的比较分析. 淡水渔业, 2011, 41(1): 36-42

1) 王姝妍. 古环境的变化和人工选择对鲫属鱼类遗传结构的影响. 中国科学技术大学博士研究生学位论文, 2013, 1-118

- 牟希东, 白俊杰, 叶星, 等. 金鱼线粒体 DNA Cytb 基因序列分析及与鲫鱼亲缘关系探讨. 南方水产, 2007, 3(1): 26–30
- 李名友, 周莉, 杨林, 等. 彭泽鲫的分子遗传分析及其与方正银鲫 A 系的比较. 水产学报, 2002, 26(5): 472–476
- 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384–391
- 沈俊宝, 刘明华, 范兆廷. 黑龙江银鲫. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1997, 1–225
- 胡玉婷, 胡王, 江河, 等. 滁州鲫线粒体细胞色素 b 基因和控制区序列比较及其系统进化分析. 南方水产科学, 2015, 11(2): 101–108
- 张克俭, 万全, 李公行, 等. 滁州鲫的形态学和血清蛋白电泳谱型. 水产学报, 1996, 20(4): 352–356
- 张克俭, 万全, 李公行, 等. 滁州鲫染色体组型的研究. 中国水产科学, 1995, 2(4): 8–15
- 张辉, 董新红, 叶玉珍, 等. 三个三倍体鲫鱼品系及野鲫 mtDNA 的比较研究. 遗传学报, 1998, 25(4): 330–336
- 陈可东, 万全, 蔡玉龙. 滁州鲫夏花鱼种适宜蛋白质需求量的研究. 水利渔业, 2004, 24(2): 23–24
- 罗云林, 乐佩琦. 中国动物志(硬骨鱼纲·鲤形目·下卷). 北京: 科学技术出版社, 2000, 427–434
- 姚纪花, 楼允东, 江涌. 我国六个地区银鲫种群线粒体 DNA 多态性的研究. 水产学报, 1998, 22(4): 289–295
- 袁兆祥, 凌武海, 汪永忠, 等. 滁州鲫鱼人工繁育与苗种培育技术研究. 水产养殖, 2010, 31(3): 2–4
- 桂建芳. 鱼类性别和生殖的遗传基础及其人工控制. 北京: 科学出版社, 2007, 107–124
- 徐广友, 万全, 袁兆祥, 等. 滁州鲫雌核发育的细胞学研究. 安徽农业大学学报, 2009, 36(4): 533–537
- 凌武海, 马明发, 袁兆祥, 等. 滁州鲫、方正银鲫和彭泽鲫分子遗传差异的分析. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13482–13483, 13485
- 凌武海, 任信林. 天然滁州鲫氨基酸成分分析与营养价值评价. 水产养殖, 2011, 32(1): 50–52
- 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. 遗传学报, 2004, 31(9): 983–1000
- 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德, 等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学报, 1983, 8(1): 1–13
- 程磊, 常玉梅, 鲁翠云, 等. 鲫属鱼类 DNA 条码及种与亚种划分. 动物学研究, 2012, 33(5): 463–472
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290(5806): 457–465
- Apalikova OV, Podlesnykh AV, Kukhlevsky AD, *et al.* Phylogenetic relationships of silver crucian carp *Carassius auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri*, crucian carp, *Carassius carassius*, and common carp *Cyprinus carpio* as inferred from mitochondrial DNA variation. *Russ J Genet*, 2011, 47(3): 322–331
- Boore JL. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(8): 1767–1780
- Broughton RE, Milam JE, Roe BA. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res*, 2001, 11(11): 1958–1967
- Caccone A, Gentile G, Burns CE, *et al.* Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galápagos tortoises. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 31(2): 794–798
- Cantatore P, Roberti M, Pesole G, *et al.* Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J Mol Evol*, 1994, 39(6): 589–597
- Elmerot C, Arnason U, Gojobori T, *et al.* The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. *Gene*, 2002, 295(2): 163–172
- Galtier N, Gouy M, Gautier C. Seaview and Phylo_win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci*, 1996, 12(6): 543–548
- Gui JF, Zhou L. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio*. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(4): 409–415
- Hosoya K. Cyprinidae. Tokyo: Tokai University Press, 2002, 253–254
- Kumar S, Nei M, Dudley J, *et al.* MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 2008, 9(4): 299–306
- Kumazawa Y, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(6): 784–792
- Librado P, Rozas J. DnaSP V5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452
- Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(5): 955–964
- Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(11): 1993–2009
- Miya M, Nishida M. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol Phylogenet Evol*, 2000, 17(3): 437–455
- Murakami M, Matsuba C, Fujitani H. The maternal origins of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing. *Genes Genet Syst*, 2001, 76(1): 25–32
- Oh DJ, Kim SJ, Jung YH. Comparison of the mitochondrial genomes of East Asian *Pseudolabrus* fishes. *Mitochondr DNA*, 2008, 19(5): 453–460
- Podlesnykh AV, Apalikova OV, Brykov VA. Phylogenetic relationships of silver crucian carp in *Carassius auratus* complex based on mtDNA analysis. *Russ J Genet*, 2012, 48(12): 1207–1217
- Saccone C, Giorgi CD, Gissi C, *et al.* Evolutionary genomics in

- Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 1999, 238(1): 195–209
- Takada M, Tachihara K, Kon T, *et al.* Biogeography and evolution of the *Carassius auratus* complex in East Asia. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 7
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876–4882
- Wang SY, Luo J, Murphy RW, *et al.* Origin of Chinese goldfish and sequential loss of genetic diversity accompanies new breeds. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59571
- Xiao J, Zou TM, Chen YB, *et al.* Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters. *BMC Genetics*, 2011, 12(1): 20
- Xiao WH, Zhang YP, Liu HZ. Molecular systematics of Xenocyprinae (teleostei: cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 18(2): 163–173
- Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(7): 933–942

(编辑 冯小花)

Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of Chuzhou Crucian Carp (*Carassius auratus*)

HU Yuting, HU Wang^①, JIANG He, LING Jun, DUAN Guoqing, PAN Tingshuang

(Fishery Research Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract Chuzhou Crucian Carp (*Carassius auratus* in Chuzhou) is one of the natural gynogenetic crucian carp originated from Anhui Province in China. It belongs to the genus of *Carassius* within the family of Cyprinidae. To investigate the species status of this fish, we performed the direct DNA sequencing on the PCR products of the complete mitochondrial DNA (mtDNA). The total length of the mtDNA was 16581 bp, including 13 protein-coding genes, 22 transfer RNA genes, 2 ribosomal RNA genes and a non-coding control region. The composition and location of genes in the mitochondrial genome of Chuzhou Crucian Carp were consistent with those of Cyprinidae fishes published in GenBank. The tRNA genes formed typical secondary structures except for tRNA-Ser (AGY). The CO I gene had GTG as its initiation codon, and the other 12 protein-coding genes had ATG as the initiation codon. Among the 13 protein-coding genes, 9 had complete stop codons but CO II, ND3, ND4 and Cyt *b* had an incomplete T as the stop codon. Sequence analysis showed that there was high similarity between the mtDNA sequences of Chuzhou Crucian Carp and other species in genus *Carassius* recorded in GenBank (>94%). The nucleotide composition of Chuzhou Crucian Carp was 31.6% (A), 26.2% (T), 16.1% (G) and 26.2% (C). We conducted the phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes of 9 *Carassius* fishes and 1 *Cyprinus carpio*, based on their nucleotide and amino acid sequences of all protein-coding genes. The results indicated that the phylogenetic relationship between *C. auratus gibelio* in Chuzhou and in Fangzheng was the closest while *C. auratus gibelio* in Chuzhou and *Carassius carassius* was the farthest. Our study may provide basic data and contribute to the classification of *Carassius* and Cyprinidae fishes.

Key words Chuzhou Crucian Carp (*Carassius auratus*); Mitochondrial genome; Phylogenetic analysis

① Corresponding author: HU Wang, E-mail: huwang101@sina.com

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)组织样品 常温保存液的筛选和优化*



陈大恭^{1,2} 黄 健^{1,2,3①} 王海亮¹ 李 晋^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 以不同浓度乙醇为溶剂, 配制不同 pH 的硫酸铵和乙酸铵饱和溶液, 测试其对凡纳滨对虾组织的渗透效应和在常温条件下对 RNA 的保护作用。因为乙酸铵在乙醇中的溶解度远高于硫酸铵, 且其铵离子的摩尔浓度在 0-80% 的乙醇溶剂中比较稳定。研究结果显示, 乙酸铵比硫酸铵能更快渗透到整体的对虾组织中, 并达到更高的浓度。50%、70% 及以上的乙醇为溶剂的饱和硫酸铵、50% 乙醇为溶剂的饱和乙酸铵(pH=6.0)溶液保存 RNA 的完整性较好, RNA 拷贝数较大, 半衰期较长。综合分析, 推荐 50% 乙醇的饱和乙酸铵溶液(pH=6.0)作为对虾组织样品的常温保存液, 该结果为野外样品采集及常温运输提供了一种有效方法。

关键词 铵盐; 乙醇; 常温; RNA

中图分类号 Q-34 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0071-10

随着分子生物学技术的发展和日趋成熟, 其在水产动物疾病诊断及分子病理学研究中的应用也逐渐深入(贺电等, 2007; 张世秀等, 2007)。不论是传统的 PCR 还是荧光定量 PCR、原位杂交、等温扩增和基因芯片等检测技术都是建立在核酸的基础上, 所以提取到高质量的核酸是后续分子研究顺利进行的前提。而高质量核酸的提取是基于样品的有效保存, 因此采集样品得到合理保存成为核酸提取及后续研究的关键。

在实验室样品一般保存于-20- -80℃(2000; 王敏强等, 2009; 李维凯等, 2012), 在从样品采集现场到实验室的运输过程中, 需要提供低温环境如小型冰箱或其他设备, 但在样品量很大的情况下很难满足这样的要求。乙醇因其价格低、取用方便和较好的保存效果在样品的短期及长期保存中得到了广泛应用(罗晨玲等, 2001)。在陆生动物保存液的研究中, Lader 等(2001)公布了一项以硫酸铵为主要成分的 RNAlater 保存液专利, 证明了该保存液对小鼠 RNA 的保存效果。杜

迎彬等(2013)以铵盐为主要成分进一步优化了对凡纳滨对虾 RNA 具有保护作用的保存液。

在以上研究的基础上, 本研究通过对样品 RNA 的完整性及拷贝数的检测, 探索一种以铵盐、乙醇为主要成分、能在常温条件下有效保护水产动物样品的 RNA、配置简单、安全有效的保存液。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验用凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)于 2013 年 9 月 14 日购自山东省青岛市胶州某对虾养殖公司, 体长为(11.0±1.5) cm, 充氧暂养于塑料整理箱(50 cm×40 cm×30 cm)。每天投喂两次, 及时换水。

1.2 保存液的配制与保存方法

将硫酸铵、乙酸铵溶解于灭菌去离子水、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇中达到饱和状态, 并添加

* 公益性行业科研专项经费项目(201103034)、现代农业产业技术体系(CARS-47)、山东省泰山学者建设工程专项经费和农业部科研杰出人才及其创新团队专项经费共同资助。陈大恭, E-mail: datian.1011@163.com

① 通讯作者: 黄 健, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-27, 收修改稿日期: 2014-10-24

EDTA、柠檬酸钠分别达终浓度为 20、25 mmol/L。然后将每种饱和溶液用冰乙酸调节 pH 为 5.0、6.0 和 7.0，配制成 24 种保存液(表 1)。

取凡纳滨对虾的头胸部浸泡于 35 ml 保存液中，室温保存。分别以保存在 30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、RNAlater (Ambion, 美国)、37%甲醛、-20℃、

表 1 24 种待测保存液及其代号
Tab.1 Twenty-four preservation solutions and their codes

参数 Parameters	实验组 Groups																							
铵盐 Ammonium salt	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B		
溶剂 Solvent	0	0	0	3	3	3	5	5	5	7	7	7	0	0	0	3	3	3	5	5	5	7	7	7
酸度 Acidity	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7

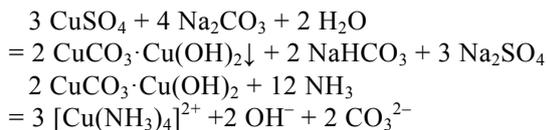
注：铵盐代号，A 为硫酸铵，B 为乙酸铵；溶剂代号，0 为去离子水，3 为 30%乙醇，5 为 50%乙醇，7 为 70%乙醇；酸度代号，5 为 pH=5.0，6 为 pH=6.0，7 为 pH=7.0

Note: Ammonium salt: A. Ammonium sulfate, B. Ammonium acetate; Solvent: 0. Deionized water, 3. 30% ethanol, 5. 50% ethanol, 7. 70% ethanol; Acidity, 5. pH=5.0, 6. pH=6.0, 7. pH=7.0

-80℃的凡纳滨对虾和新鲜组织为对照。

1.3 铵盐渗透效果的定性观察

配制 1%琼脂糖凝胶，在 0.5 mol/L CuSO₄ 溶液中浸泡约 30 min 使其浸透，去掉多余液体，胶略干燥后，在 0.5 mol/L Na₂CO₃ 中充分浸泡，使整个胶呈不透明的蓝白色，去掉多余液体，胶表层略干燥后，将被饱和硫酸铵和乙酸铵浸泡的凡纳滨对虾沿肠线切开后贴覆在胶表面 10 min，使虾体内的 NH₄⁺ 在碱性条件下生成 NH₃，与蓝白色碱式碳酸铜反应使胶呈透明的深蓝色，根据蓝色深浅判断虾体内的氨浓度。反应式如下：



1.4 肌肉组织中铵盐渗透效果的定量测定

取凡纳滨对虾肌肉组织，切成小块(0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm)，分别放入 1 ml 饱和硫酸铵、饱和乙酸铵，并分别在 30%乙醇、50%乙醇和 70%乙醇的饱和硫酸铵与乙酸铵中浸泡一定时间。取出浸泡的组织，用吸水纸吸去表层的液体，称量后加一定体积无氨水，研磨使铵盐溶出。取析出液稀释至 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷。取各梯度稀释液 1 ml，加 20 μl 酒石酸钾钠溶液(国标 GB747987)，混匀后加 30 μl 纳氏试剂(国标 GB747987)，混匀。放置 10 min 后，在 420 nm 波长处测定吸光度。由测得的吸光度减去零浓度空白管的吸光度后，对应标准曲线计算氨氮浓度。根据不同的稀释倍数计算虾体肌肉组织被铵盐溶液浸透时组织内的氨氮浓度。

1.5 对虾整体浸泡时铵盐渗透效应的定量测定

取全长为 10 cm 左右活的凡纳滨对虾若干尾，分别整只浸入 35 ml 的各种保存液。一定时间后，取虾体腹部甲壳下层肌肉组织及靠近肠道的肌肉组织(0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm)，用吸水纸吸干表层液体，称量后在 600 μl 无氨水中研磨。然后按 1.4 的方法测定肌肉组织中的氨氮含量。

1.6 RNA 的提取及其完整性检测

分别称取保存于每种保存液中样品的鳃组织约 20 mg，立即加入 800 μl TransZol (北京全式金生物技术有限公司)后充分研磨，室温静置 5 min，然后加入 160 μl 氯仿，剧烈振荡 15 s，室温孵育 5 min，4℃下 10000×g 离心 15 min。此时样品分成 3 层，小心吸取上层水相 400 μl 转移到新 EP 管中，并加入等体积的异丙醇，颠倒混匀，室温孵育 10 min 后 4℃下 10000×g 离心 10 min，去掉上清液，在管侧和管底形成胶状沉淀。加入 1 ml 75%乙醇(无 RNase 水配制)，剧烈涡旋后 4℃下 7500×g 离心 5 min，去掉上清后室温晾干沉淀，加入 30 μl 无 RNase 水溶解沉淀。取 RNA 溶液 5 μl 在 160 V 电压下电泳检测 RNA 完整性。

1.7 RNA 的定量检测

所得 RNA 溶液通过反转录试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)进行反转录，20 μl 反转录体系包括 1 μl 总 RNA (50 ng-5 μg)、1 μl 0.5 μg/μl Oligo(dT)₁₈ 引物、10 μl 2×TS 反应混合物、1 μl TransScript RT Enzyme Mix 和 1 μl gDNA Remover。于 42℃反应 30 min，85℃ 5 min 终止反应。得到的 cDNA 利用定量试剂盒 QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)进行荧光

定量, 反应 20 μl 反应体系包括 10 μl 2 \times QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix、10 $\mu\text{mol/L}$ Primer F 和 Primer R 各 1 μl 和 cDNA 1 μl , 其中引物 Primer F 序列为 5'-GCT TGC GTT CCC ATC CAC-3', 引物 Primer R 序列为 5'-CAA ACA CCC TCA CAG GCT CA-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 45 个循环。

2 结果

2.1 铵盐在水及不同浓度乙醇中的溶解度

对硫酸铵和乙酸铵室温下在水及不同浓度乙醇中的溶解度进行测定(图 1)。两种铵盐在乙醇中的溶解度均随乙醇浓度的升高而降低, 乙酸铵的溶解度远高于硫酸铵, 而且硫酸铵在 60% 以上的乙醇中的溶解度极低, 70% 左右乙醇中溶解度已经接近零。计算两种铵盐溶液中的 NH_4^+ 摩尔浓度, 结果显示, 硫酸铵和乙酸铵在水中的摩尔浓度比较接近, 分别为 7.8 mol/L 和 9.8 mol/L。但硫酸铵的铵离子摩尔浓度随溶剂中乙醇浓度的增加而快速下降, 40% 乙醇中溶解硫酸铵时, 铵离子的摩尔浓度下降到水中的一半以下; 而乙酸铵的铵离子在 0-80% 乙醇中溶解时的摩尔浓度相对稳定, 70% 乙醇中溶解乙酸铵时, 铵离子的摩尔浓度约为 7.4 mol/L, 接近水中硫酸铵的铵离子摩尔浓度。

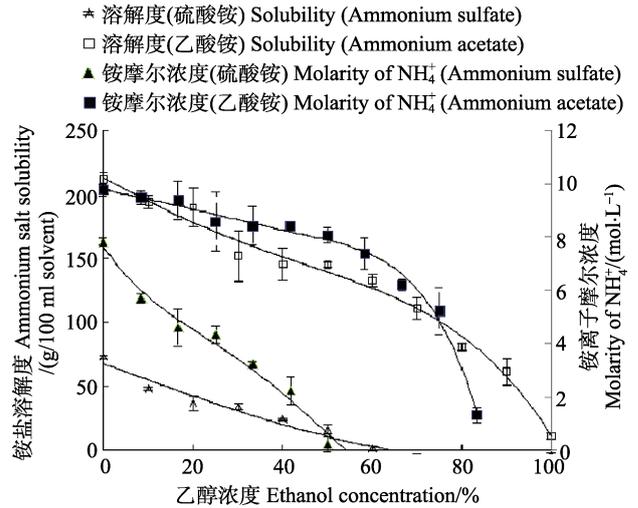


图 1 硫酸铵和乙酸铵在不同浓度乙醇溶剂中的溶解度和摩尔浓度

Fig.1 The solubility and molarity of ammonium sulfate and ammonium acetate in ethanol at different concentration

2.2 铵盐渗透效应的定性观察

铵盐对组织中核酸的保护作用首先需要铵盐能迅速有效地渗透入组织, 本研究采用琼脂糖凝胶中的碱式碳酸铜与组织中的铵盐在碱性条件下释放出的氨分子发生络和后产生颜色变化的原理, 建立了组织中铵盐存在情况的直观观察方法(图 2)。结果显示,

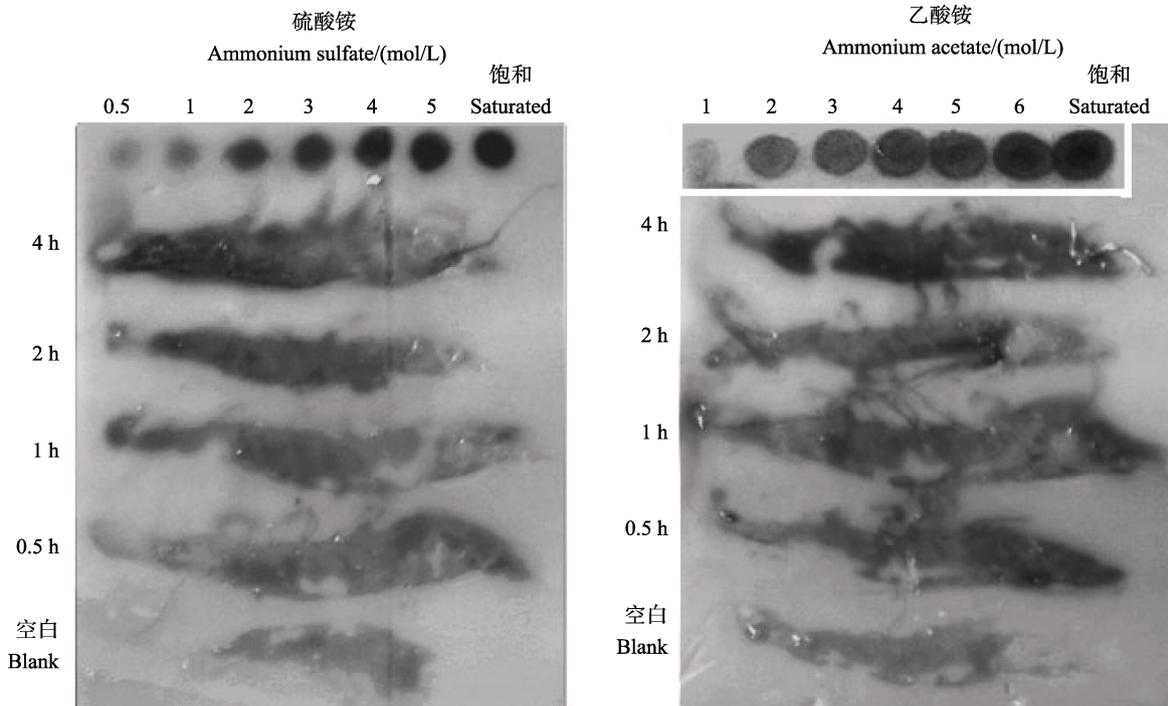


图 2 完整虾体浸泡铵盐饱和溶液后渗透效应的定性观察

Fig.2 Qualitative observation of the permeation in whole shrimp body immersed in ammonium salts solution

铵盐能使含碱式碳酸铜的不透明蓝白色琼脂糖凝胶变成深蓝色的半透明状,表明络合反应在此凝胶中得以有效进行。在 0.5–2 mol/L 范围内的铵盐溶液能在凝胶中显示出从浅到深的颜色差异,而高于 2 mol/L 的铵盐溶液在凝胶中产生的颜色变化差异不明显。未经铵盐浸泡的空白对虾在含碱式碳酸铜的凝胶中只能局部生成较浅的蓝色,这可能是虾体内代谢产生的少量氨,而浸泡在硫酸铵或乙酸铵饱和溶液中的虾体,随着浸泡时间的延长,经两种铵盐浸泡的虾体在凝胶中产生的蓝色都在加深。0.5 h 浸泡,铵盐浓度显示在虾头胸部首先出现升高,部分接近 2 mol/L 浓度,且在鳃部和头胸部尖端比较明显,说明铵盐能首先从比表面积较大的鳃部和头胸部尖端渗入;1 h 时部分腹节肌肉的凝胶颜色也在加深,节间区域较快,这可能是节间甲壳较薄的缘故;2 h 时,硫酸铵浸泡的虾腹节部位的凝胶颜色已基本出现均匀加深,4 h 时乙酸铵浸泡的整个虾体使凝胶中出现了很深的蓝色,硫酸铵浸泡的虾体也使凝胶中的蓝色普遍加深。需要注意的是,由于虾体不同部位与凝胶贴合的紧密程度存在差异,部分位置呈现出较浅的颜色可能并不代表真实的铵盐浓度。

2.3 铵盐对对虾肌肉组织的浸润作用

切取凡纳滨对虾肌肉小块在不同保存液中分别浸泡 1、2、4、8、12、24 h 后测定进入组织中的氨氮量(图 3),结果显示,肌肉组织小块内的氨氮浓度在浸泡后 1 h 内就已经基本达到了高峰,其中,硫酸铵(A0)和乙酸铵(B0)组均达到约接近 120 mg/g 组织的水平,

即 8.57 mol/kg,该浓度已达溶液中的饱和水平。而此后随着时间的延长,测得大部分实验组的组织中的氨氮浓度反而呈下降趋势。在 8 h 之后均趋于稳定,24 h 时硫酸铵(A0)约 70 mg/g 组织,乙酸铵(B0)约 85 mg/g 组织。含乙醇组的氨氮水平随乙醇量的增加而减低,其中硫酸铵组的氨氮水平比乙酸铵组减低得更显著,这与硫酸铵及乙酸铵在乙醇中的溶解性规律相符。

2.4 铵盐对完整虾体组织的渗透作用

完整的凡纳滨对虾在 8 种保存液母液中分别保存 1、2、4、8、12、24 h 后取不同部位的肌肉组织小块,检测其中的氨氮浓度。本研究选取了有代表性的紧贴甲壳的下方组织块和中间的组织块来测定。结果显示(图 4),硫酸铵和乙酸铵对完整虾体的渗透在 0–12 h 内均呈不断上升的趋势,12 h 后上升趋势减缓,硫酸铵对虾体的渗透效果显著低于乙酸铵,硫酸铵在浸泡 24 h 后的组织内氨氮浓度小于 7.5 mg/g,即 0.54 mol/kg (图 4-A0s);而乙酸铵浸泡 24 h 后组织内浓度达 36 mg/g 以上,即 2.6 mol/kg (图 4-B0s)。硫酸铵在组织中心和组织外层的铵盐浓度差异很小,乙酸铵在组织中心和组织外层的差异较明显。完整虾体与组织块浸泡的结果表明,完整的对虾甲壳对铵盐的渗透存在明显的阻碍作用,而乙酸铵更容易渗透入甲壳。

2.5 不同保存液保存的组织中 RNA 完整性的检测

凡纳滨对虾头胸部在室温条件下分别用 24 种保存液以及相应对照组中保存 1、3、7、14 d 后,提取组织 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 RNA 的完整

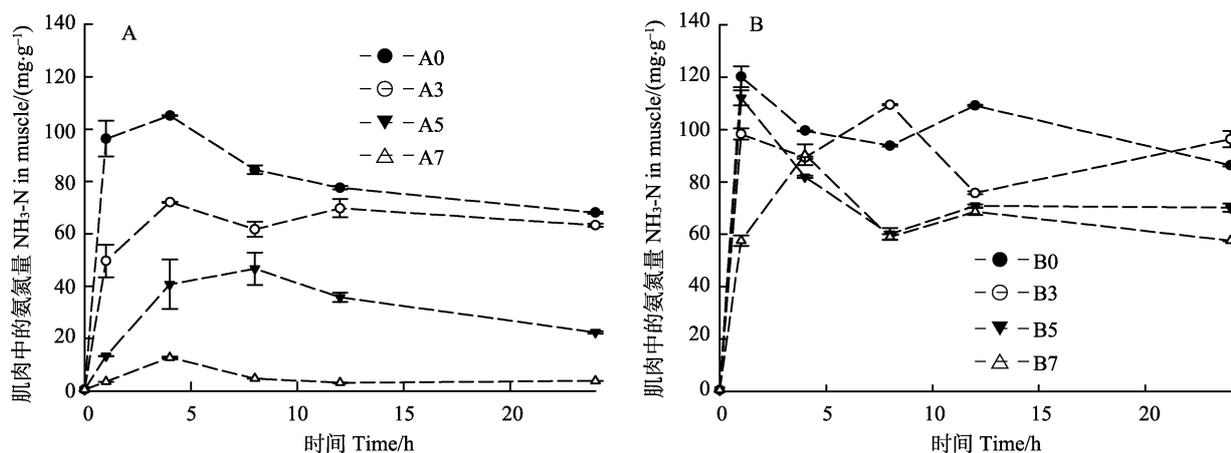


图 3 铵盐在组织小块中的渗透效应

Fig.3 Penetration of the ammonium salts in small pieces of shrimp tissues

A 表示硫酸铵, B 表示乙酸铵, 0 表示去离子水, 3 表示 30%乙醇, 5 表示 50%乙醇, 7 表示 70%乙醇

The legends indicate the solutions for preservation of the tissue pieces. The letters in the legends represent the solutes, of which "A" represents ammonium sulfate and "B" as ammonium acetate; the numbers in the legends represent the solvents, of which "0" represents water, "3" as 30% ethanol, "5" as 50% ethanol, "7" as 70% ethanol

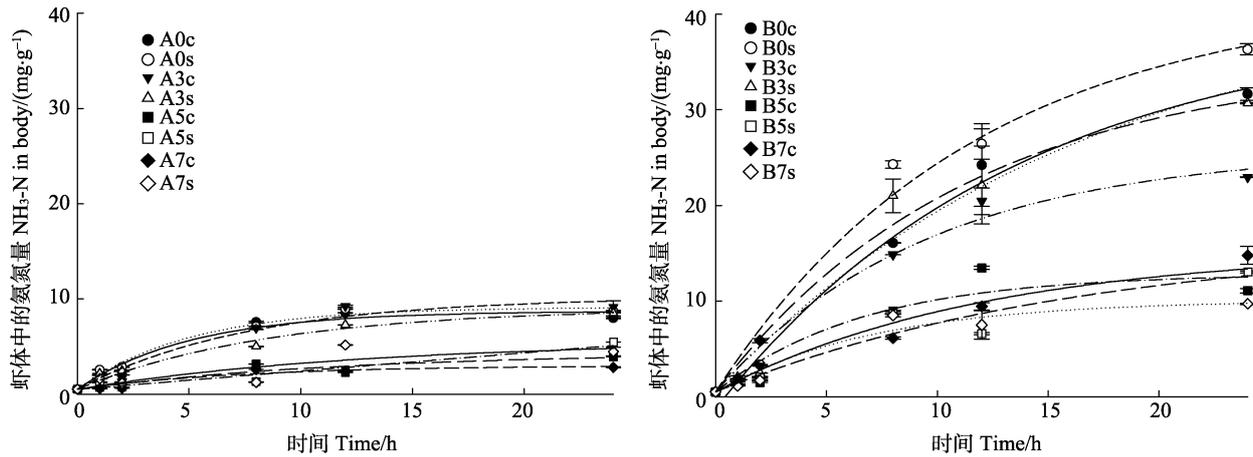


图 4 铵盐在虾体内的渗透效应

Fig.4 Penetration of the ammonium salts in intact bodies of *L. vannamei*

A 表示硫酸铵, B 表示乙酸铵; 0 表示去离子水, 3 表示 30%乙醇, 5 表示 50%乙醇, 7 表示 70%乙醇; c 表示内层组织, s 表示外层组织

The legends indicate the preserving solutions and the tissue locations. The capital letters in the legends represent the solutes, of which “A” represents ammonium sulfate and “B” as ammonium acetate; the numbers in the legends represent the solvents, of which “0” represents water, “3” as 30% ethanol, “5” as 50% ethanol, “7” as 70% ethanol; the lowercase letters in the legends represent the locations of the tissue, of which “c” represents the tissue taken at the center of the body and “s” represents the tissue taken from the superficial parties of the body

性。结果显示, 新鲜组织提取的 RNA 电泳结果可见清晰的两条 28S 和 18S 的区带(图 5)。

对照组保存的样品中, 甲醛保存的样品大多数情况下完全没有抽提出 RNA(图 6, a-d, 泳道 16-18); RNAlater、30%乙醇、-20℃冰冻等方式均未能完全阻止 RNA 的降解(图 6, a-d, 泳道 1-6 和 19-21); 50%乙醇保存以及 -80℃冻存对 RNA 的保存有所改善, 抽提的样品中大体可见 18S 和 28S 的条带(图 6, a-d, 泳道 7-9 和 22-24); 70%和 95%乙醇保存的样品抽提的 RNA 最完整, 两条区带最清晰(图 6, a-d, 泳道 10-15), 但偶尔有未抽提到 RNA 的情况出现(图 6-a, 泳道 13), 在保存 14 d 后, 核酸浓度也明显下降(图 6-d, 泳道 10-15)。

在不同的硫酸铵保存液的实验组中(图 7), 饱和硫酸铵水溶液保存 1-14 d 的 RNA 电泳结果均显示一定程度的降解, 总 RNA 中的 18S 和 28S 条带已经消

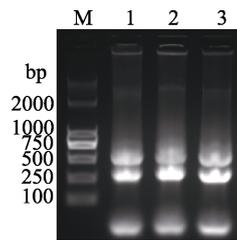


图 5 新鲜对虾头胸组织提取的总 RNA 电泳
Fig.5 Electrophoretogram of total RNA extracted from fresh tissue of shrimp cephalothorax

泳道 M: DL2000; 泳道 1、2 和 3 为新鲜组织提取的 RNA

Lane M: DL2000; Lanes 1, 2, and 3 are total RNA extracted from fresh tissue

失成为模糊一片(图 7, A05、A06 和 A07); 30%乙醇中的饱和硫酸铵溶液保存 1 d, 只有 pH=5.0 组有两条区带, 但在 3-14 d 的保存中, 不同 pH 的组还有可见条带及弥散区域(图 7, A35 和 A36); 50%乙醇中的饱和硫酸铵溶液保存的组织, 1 d 时提取的 RNA 有两条带, 随时间延长条带逐渐模糊, 平行组中部分样品存在重复性问题(图 7, A55、A56 和 A57); 70%乙醇中的饱和硫酸铵溶液保存 1-14 d 的组织中提取的 RNA 电泳, 多数结果显示, 28S 和 18S 条带界限清晰完整, 但与无硫酸铵的 70%乙醇的差异不大。

饱和乙酸铵的水溶液保存组织 1 d, 提取的 RNA 电泳结果中 18S 和 28S 条带清晰(图 8-a, B05、B06 和 B07), 3 种 pH 相比较, pH=6.0 的保存效果最好(B06); 30%乙醇中的饱和乙酸铵溶液保存组织 1 d, RNA 条带较微弱, 保存 3-14 d 后条带变得模糊, 在 pH=5.0 条件下稍好于其他 pH(图 8, B35); 50%乙醇中的饱和乙酸铵溶液保存组织 1 d, 提取的 RNA 电泳结果可见非常清晰的 3 条带, 而且 pH=5.2、pH=6.0 及 pH=7.0 的保存液提取的 RNA 条带亮度无明显差别, 但在 3 d 之后条带有所减弱, 7 d 后 28S 和 18S 的界限变得模糊, 28S 条带逐渐消失, 14 d 后 18S 也变得模糊(图 8, B55、B56 和 B57); 70%乙醇中的饱和乙酸铵溶液保存组织 1 d, RNA 28S 条带已很模糊, 只有 18S 条带, 随时间延长, 18S 条带也逐渐模糊, 劣于无乙酸铵的 70%乙醇的保存效果。

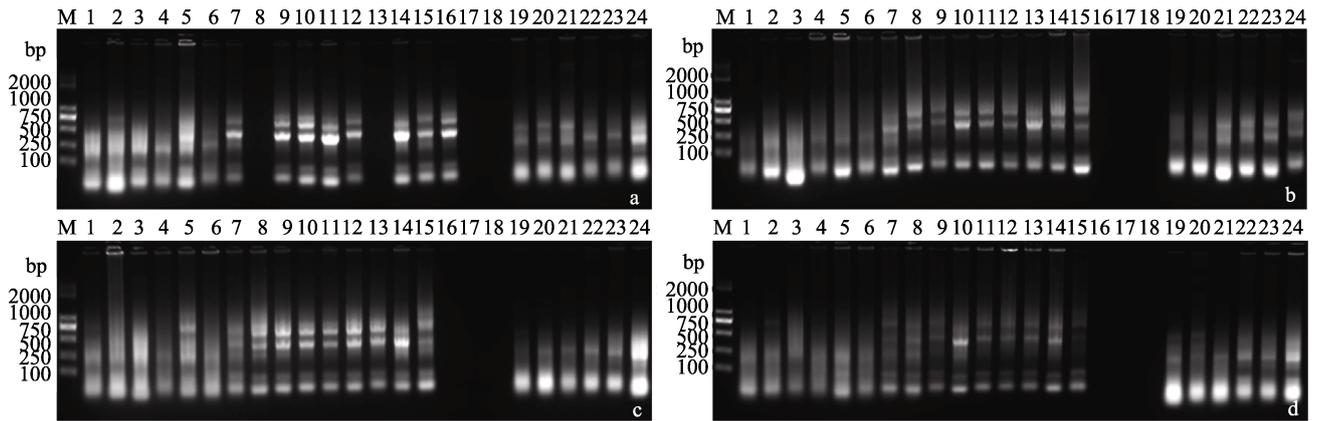


图6 对照保存1-14 d组织中提取的总RNA电泳

Fig.6 Electrophoretogram for total RNA extracted from tissues preserved for 1-14 d by control treatments

A: 1 d; B: 3 d; C: 7 d; D: 14 d; 泳道 M: DL2000; 泳道 1-3: RNA later; 泳道 4-6: 30%乙醇; 泳道 7-9: 50%乙醇; 泳道 10-12: 70%乙醇; 泳道 13-15: 95%乙醇; 泳道 16-18: 甲醛; 泳道 19-21: -20°C; 泳道 22-24: -80°C

A: 1 d; B: 3 d; C: 7 d; D: 14 d; Lane M: DL2000; Lane 1-3: RNA later; Lane 4-6: 30% ethanol; Lane 7-9: 50% ethanol; Lane 10-12: 70% ethanol; Lane 13-15: 95% ethanol; Lane 16-18: Formaldehyde; Lane 19-21: -20°C; Lane 22-24: -80°C

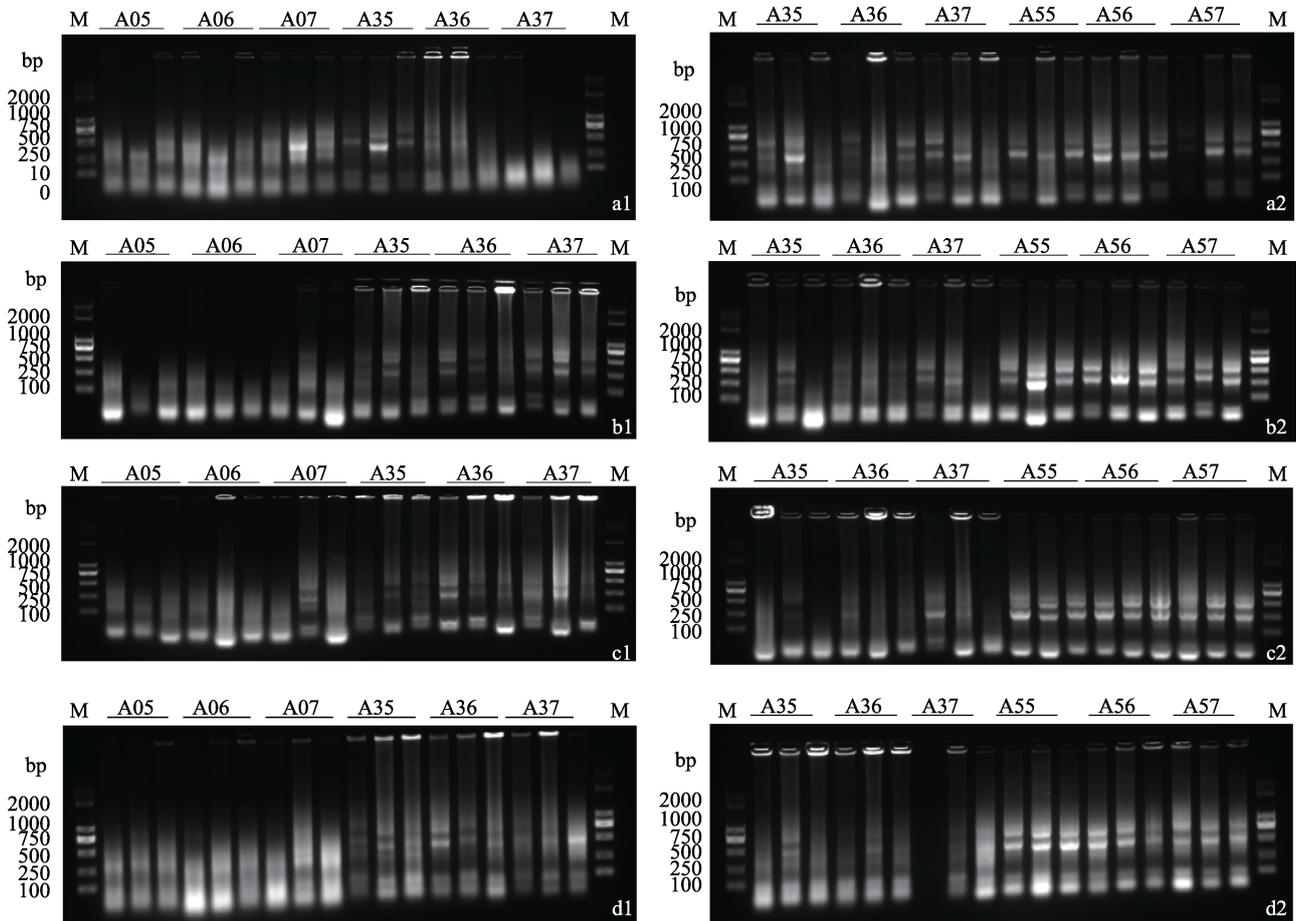


图7 硫酸铵保存液保存1-14 d的组织中提取的总RNA电泳

Fig.7 Electrophoretogram for total RNA extracted from tissues preserved in the ammonium sulfate solutions

a: 样品保存1 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 14 d; 泳道 M: DL2000; 每种保存液保存的组织提取的总RNA采用3个泳道进行电泳, 相应泳道上标注保存液代号

a: Stored for 1 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 14 d; M: DL2000. Each sample of the total RNA extracted from tissues preserved in different ammonium sulfate solutions was added in 3 lanes which was labeled with the code of the solutions

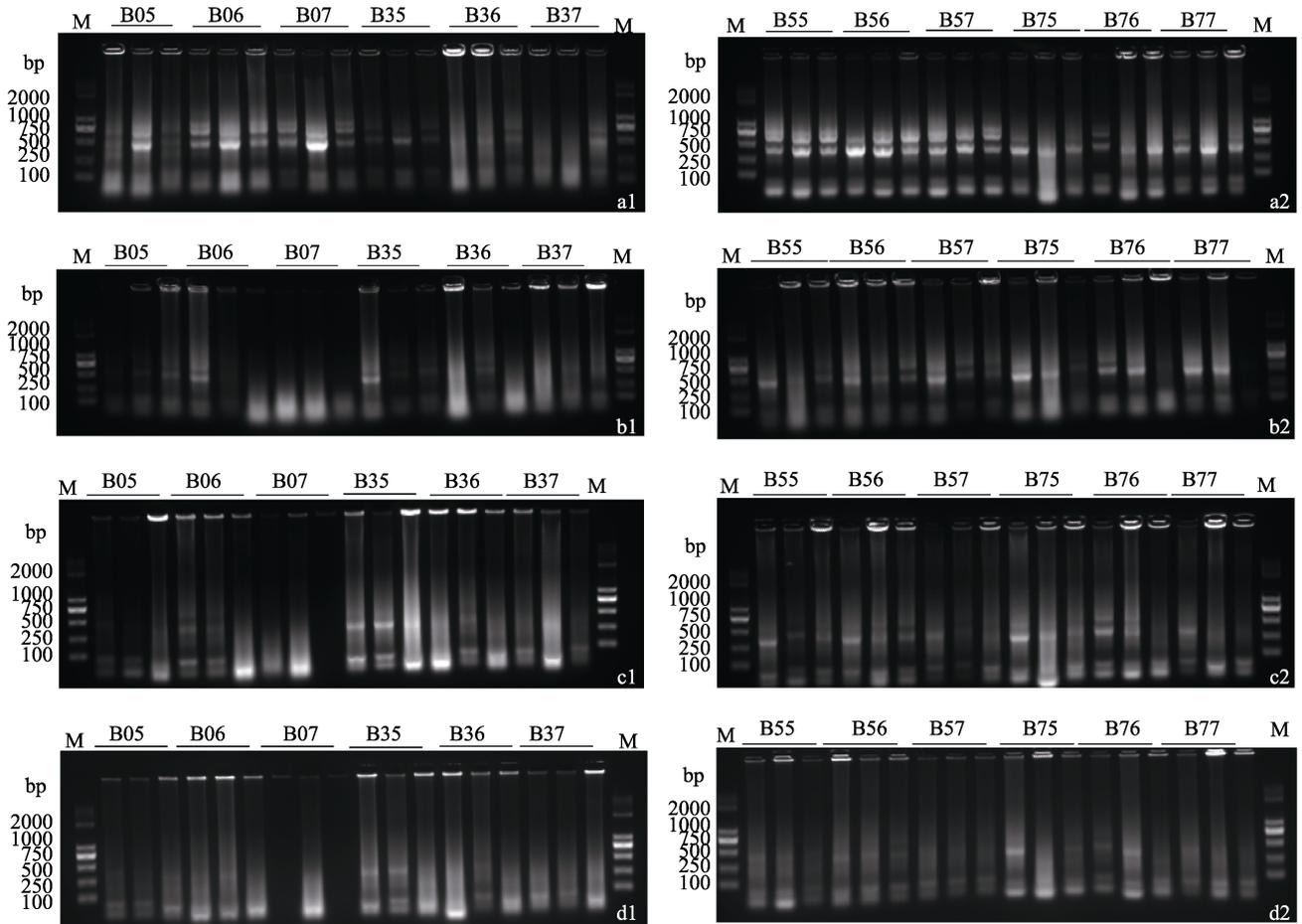


图 8 乙酸铵保存液保存 1-14 d 组织中提取的 RNA 电泳

Fig.8 Electrophoretogram for total RNA extracted from tissues preserved in ammonium acetate solution B05-B37 for 1-14 d

a: 1 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 14 d; 泳道 M: DL2000; 每种保存液保存的组织提取的总 RNA 采用 3 个泳道进行电泳, 相应泳道上标注保存液代号

a: 1 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 14 d; Lane M: DL2000. Each sample of the total RNA extracted from tissues preserved soaked in different ammonium acetate solutions was added in 3 lanes which was labeled with the code of the solutions

2.6 RNA 定量检测

利用荧光定量 PCR 仪对各保存液保存 0、1、3、7 d 的组织提取 RNA 的反转录产物进行定量, 单位质量组织中的核酸拷贝数对保存时间作图(图 9), 结果显示, 各保存组中组织 RNA 的降解速度在 1 d 以内速度很快, 3-7 d 的保存后组织中核酸拷贝数下降则相对缓慢, 硫酸铵各组间的差异性大于乙酸铵各组。组织中初始 3.2×10^9 copies/g 组织的 RNA 用 A75-A77、B55-B57、B75-B77 经 1 d 的常温保存, RNA 拷贝数均还在 10^9 copies/g 组织以上, 各种保存液保存 7 d 后的最终单位组织核酸拷贝数均在 10^7 - 10^8 copies/g 组织, 其中, 7 d 常温保存后 RNA 拷贝数下降不超过 20 倍的组包括 A37 (13.04)、A56 (7.25)、A57 (5.39)、A75 (3.51)、A76 (3.70)、A77 (3.65)、B05 (18.94)、B36

(8.44)、B37 (11.41)、B55 (18.78)、B56 (4.62)、B57 (11.46)、B75 (12.87)和 B76 (18.36)。对照组中, 70%和 95%乙醇组保存 1 d 后的 RNA 拷贝数在 10^9 copies/g 组织以上, 不同乙醇保存 7 d 后组织中 RNA 数量下降均不超过 20 倍, 分别是 30%乙醇(7.16)、50%乙醇(17.72)、70%乙醇(4.92)和 95%乙醇(6.29), 而甲醛保存的组织中所测得的 RNA 拷贝数下降最快, 3 d 后就已超过 1500 倍。

2.7 组织中 RNA 的半衰期

对上述 RNA 拷贝数的对数值与时间关系的变化进行线性回归, 并固定初始拷贝数对数值, 按自然衰减原理对各组 RNA 拷贝数的变化计算平均半衰期(图 10), 结果显示, 平均半衰期在 2 d 以上的组包括 A56 (2.15 ± 0.60 d)、A57 (2.26 ± 1.32 d)、A75 (3.22 ± 1.31 d)、A76

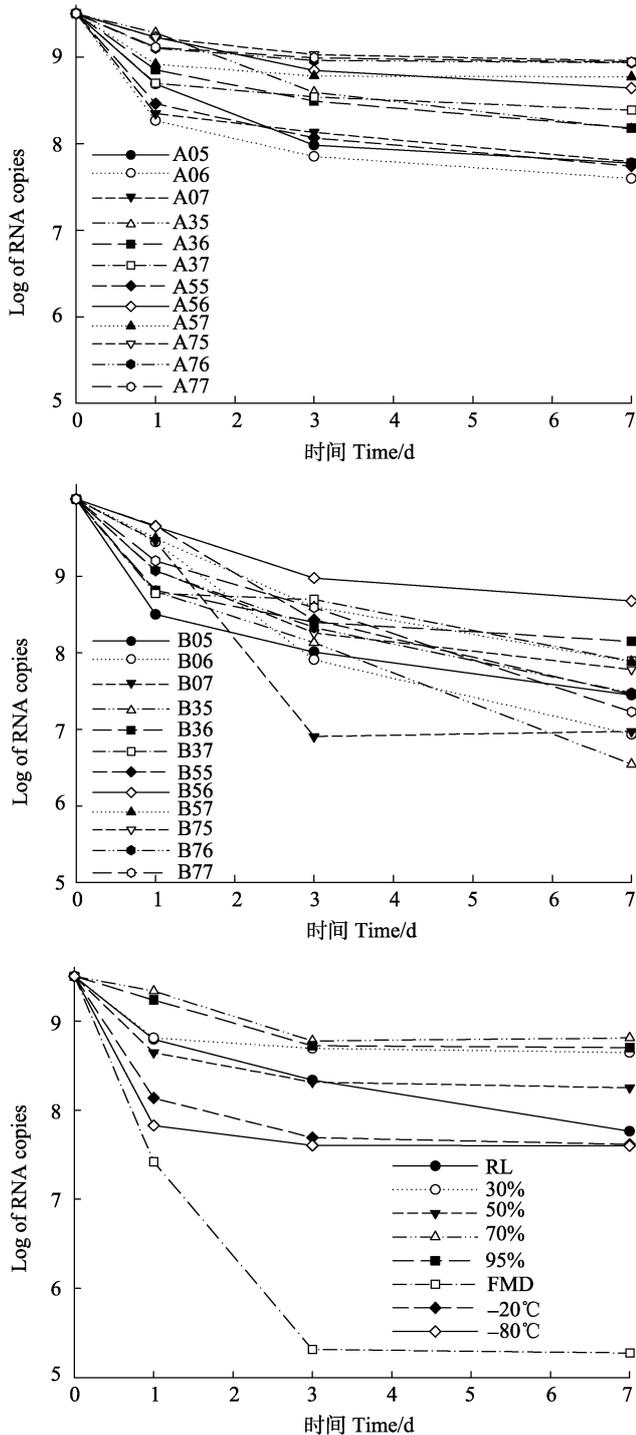


图9 各保存组的组织中RNA数量的荧光定量PCR检测结果

Fig.9 Results of FQ-PCR detection for the RNA copies in the tissues of each preservation group

A05-A77: 硫酸铵保存液; B05-B77: 乙酸铵保存液; RL: RNAlater; 30%-95%: 30%-95%乙醇; FMD: 甲醛
 A05-A77: preserved with ammonium sulfate; B05-B77: preserved with ammonium acetate; RL: preserved with RNAlater; 30%-95%: preserved with 30%-95% ethanol; FMD: preserved with formaldehyde

用可能主要是由于乙醇的保护作用所致,考虑到高浓度乙醇在运输中存在风险,以及由于硫酸铵在70%以上乙醇中溶解度太低,用70%清洗组织及提取的DNA时可能不容易将硫酸铵抽提出来,因此本研究推荐使用pH=6.0的乙酸铵的50%乙醇饱和溶液作为保存液。实验结果也表明,在特定的保存液缺乏、而运输风险不高的情况下,70%以上的乙醇能较好地保存其中的RNA,其效果优于RNAlater或-80℃冰冻。

3 讨论

目前对陆生动植物组织保存及核酸提取的研究很多(罗晨玲等, 2001; 王敏强等, 2009; 李维凯等, 2012; 路俊锋等, 2010; Bainard *et al*, 2010)。但针对组织与细胞结构都不同于陆生生物的水生动物的保存研究还少有报道。在海洋动物组织的保存中应用最多的是福尔马林和乙醇溶液。但福尔马林因其较强的挥发性,对实验人员眼睛、呼吸道及皮肤可能造成危害,危害身体健康;另外,很多研究指出,经福尔马林保存的组织中DNA和RNA提取效果不理想(方旅平等, 2005; 刘保忠等, 2001),虽然有学者已探索出一些方法将样品经过复杂的预处理后可以提取到能够应用于后续分子研究的核酸(方旅平等, 2005; 夏颖哲等, 2007; Rivero *et al*, 2006; de Bruyn *et al*, 2011),但由于其步骤繁杂、耗费时间较长而不能被广泛应用。本研究中利用甲醛保存组织提取的RNA电泳结果没有条带,保存3d后荧光定量实验表明回收的RNA拷贝数下降了1500倍以上,远低于新鲜组织和其他保存液。这种结果可能是由于甲醛对蛋白质以及核酸的氨基的固定作用,使核酸被牢牢地封固在组织中,保存后的组织在提取核酸之前只经过简单清洗操作,影响了甲醛保存样品中核酸的得率。另一种常见的保存液乙醇,特别是高浓度乙醇,因其价格低和使用方便而被广泛用于样品短期或长期保存,而且提取的核酸质量与完整性均能满足实验要求(方旅平等, 2005; 罗晨玲等, 2001)。但高浓度乙醇由于其易燃性的特点,在邮寄、国际货运、航空运输以及大量样品的集中存放中都受到严格限制。Lader等(2001)发明的RNAlater以及其他以高浓度铵盐(杜迎彬等, 2013)为主要成分的水相保存液为突破这些限制提供了较好的替代性选择,对陆生动物RNA有很好的保存效果(路俊锋等, 2010),对水生动物凡纳滨对虾的RNA的保存中常温保存7d后还能看到较模糊的RNA区带,但仍然存在保存样品中RNA含量短期内快速下降的问题,这一问题的原因可能是高浓度铵盐对组织的渗透速度(2.96±1.56 d)、A77 (3.03±1.54 d)、B56 (2.79±0.76 d)、

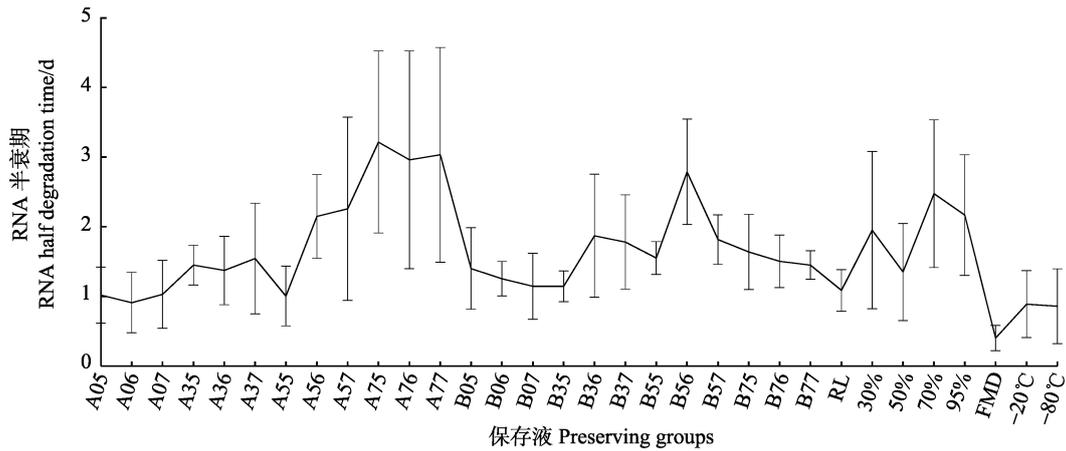


图 10 各组组织中 RNA 半数降解时间

Fig. 10 The RNA half degradation time of the each preserving group

A05–A77: 硫酸铵保存液; B05–B77: 乙酸铵保存液; RL: RNAlater; 30%–95%: 30%乙醇–95%乙醇; FMD: 甲醛
 A05–A77: preserved with ammonium sulfate; B05–B77: preserved with ammonium acetate; RL: preserved with RNAlater;
 30%–95%: preserved with 30%–95% ethanol; FMD: preserved with formaldehyde

70%乙醇(2.47 ± 1.06 d)和 95%乙醇(2.17 ± 0.87 d)。

根据上述铵盐渗透效应及 RNA 保存效果进行综合分析, 可见 50%乙醇中饱和硫酸铵和乙酸铵在 pH=6.0 的条件下对组织中 RNA 的保护效果均较好; 而硫酸铵的 70%乙醇饱和溶液也表现出优秀的保护效果, 但该溶液中硫酸铵浓度已经非常低, 其保护作用不够快所致(杜迎彬等, 2013)。但本研究中的 RNAlater 常温保存 1 d 的组织提取的 RNA 已经发生降解, 这可能是由于 RNAlater 对不同组织的渗透效应差异所致。因此探索一种能在常温条件下对水生动物核酸保存效果稳定、简便、安全的保存液对实验室样品采集及后续科研工作有重要意义。

一种好的保存液应该能快速地渗透组织, 但组织保存研究中很少对组织的渗透速度开展有效研究, 本研究通过测定渗透到组织中的保存液成分的浓度来检测各种保存液的渗透能力。组织小块中铵盐渗透效应的测定结果显示, 乙酸铵饱和溶液浸泡的组织小块中氨氮浓度能很快达到 85 mg/g 组织, 高于硫酸铵组的 70 mg/g 组织; 50%、70%乙醇溶液中的硫酸铵饱和溶液浸泡的组织块中氨氮浓度不到 20 mg/g 组织或更低, 而相应乙醇溶液中乙酸铵饱和溶液浸泡的组织块中氨氮可以达到 80 mg/g 组织或接近 60 mg/g 组织。在完整虾体中, 饱和乙酸铵浸泡的虾体中氨氮浓度可达到 36 mg/g 组织; 而饱和硫酸铵溶液组只有 7.5 mg/g 组织。上述结果表明, 甲壳对铵盐渗透虾体有一定的阻碍作用, 且乙酸铵较硫酸铵更容易穿透甲壳进入组织中。在使用 Davidson's AFA 固定对虾组织时, 需要首先对对虾肝胰腺和肌肉多点注射固定液, 然后再割开甲壳, 以便使固定液能尽快渗入组织中(Bell *et al.*,

1988), 因此, 采用本研究保存液对整体对虾进行保存时, 也可采用这种方法, 以使保存液能尽快渗透到组织中。

作为对照组, 本研究验证了不同浓度的乙醇保存的组织对 RNA 的保护效果, 结果显示, 30%乙醇不能有效保护组织中的 RNA; 50%乙醇在 1 d 内保存的效果较好, 随着时间延长, 保存效果逐渐变差。70%和 95%乙醇保存 14 d 后 RNA 的完整性依然很好, 验证了较高浓度的乙醇能对组织中的 RNA 起到良好的保存效果。70%乙醇配制的饱和硫酸铵溶液保存组织直到 14 d 均能得到清晰完整的 RNA 区带, 其平均半衰期在 2 d 以上, 在各实验组中表现出最好的保护效果, 但 70%乙醇中的硫酸铵浓度太低, 因此, 该溶液的保存效果可能主要来自于 70%乙醇。用 50%乙醇配制的饱和乙酸铵(pH=6.0)溶液保存的组织也可得到较完整的 RNA, 半衰期在 2 d 以上, 因该溶液中乙醇的含量较低, 因此在贮存和运输上均有比较好的安全性。此外, 考虑到后续核酸提取时可能有去除铵盐的需要, 而硫酸铵在 60%以上的乙醇溶液中溶解度极低, 所以在抽提核酸时, 不论是最初用乙醇清洗组织块还是最后用乙醇沉淀核酸, 都难以将硫酸铵完全清洗干净, 从而可能影响核酸提取效果及后续的分子学实验。综合考虑两种铵盐在对虾组织中的渗透能力、RNA 完整性和降解速率、后续提取操作以及高浓度乙醇在运输过程中存在的安全隐患, 推荐 50%乙醇配制的饱和乙酸铵(pH=6.0)作为对虾组织 RNA 样品常温保存液。此外, 研究表明, RNAlater 和饱和硫酸铵虽然在常温下有较好的 RNA 保存效果, 但低温更有利于长期保存(杜迎彬等, 2013), 因此, 在有条件进

行低温保存时,建议进行低温保存,不同温度下的保存效果有待进一步验证。

参 考 文 献

- 王敏强,王斌,刘晓玲.保存温度与时间对动物组织 DNA 提取质量的影响.安徽农业科学,2009,37(33):16407-16409
- 方旅平,林元烧,曹文清.不同保存条件下中华哲水蚤基因组 DNA 提取的比较.海洋科学,2005,29(2):1-4
- 李维凯,霍韬光,畅蓓,等.保存条件对大鼠海马组织总 RNA 质量的影响.化学研究,2012,23(5):93-96
- 刘保忠,宋林生.海湾扇贝样品不同保存条件下 DNA 的提取及 RAPD 扩增比较.海洋科学,2001,25(3):51-53
- 张世秀,张新中,谢珍玉,等.分子生物学技术在水产养殖动物细菌性病原检测中的应用.海南大学学报(自然科学版),2007,25(1):96-100
- 杜迎彬,王志杰,杨冰,等.对虾组织样品中 RNA 的铵盐常温保存法及其效果.渔业科学进展,2013,34(3):88-96
- 张丽荣,朱筱娟,杨绍娟,等.FineFix 固定液与福尔马林固定液对组织保存及固定的比较.临床与实验病理学杂志,2013,29(5):573-575
- 罗晨玲,陈清.不同固定液及保存温度、时间对小鼠组织 DNA 的影响.生物技术,2001,11(3):44-46
- 贺电,吴后波.分子生物学技术在水产养殖动物病原快速检测中的应用.海洋科学,2007,31(3):76-81
- 夏颖哲,张春光,陈宜瑜,等.福尔马林保存鱼类标本中大片段 DNA 的提取.水生生物学报,2007,31(4):485-491
- 路俊锋,陈宏,吴劲松,等.不同保存方法对脑胶质瘤和其周边组织 RNA 保存的研究.中国临床神经科学,2010,18(2):199-202
- Bainard LD, Klironomos JN, Hart MM. Differential effect of sample preservation methods on plant and arbuscular mycorrhizal fungal DNA. J Microbiol Methods, 2010, 82(2): 124-130
- Bell TA, Lightner DV. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1988
- de Bruyn M, Parenti LR, Carvalho GR. Successful extraction of DNA from archived alcohol-fixed white-eye fish specimens using an ancient DNA protocol. J Fish Biol, 2011, 78(7): 2074-2079
- Lader E. Methods and reagents for preserving RNA in cell and tissue samples. United States Patent. US6,204,375B1 (2001)
- Rivero ER, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, et al. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Pathol Res Pract, 2006, 202(7): 523-529

(编辑 冯小花)

Selection and Optimization of Simple and Convenient Sample Solutions for Shrimp Tissue Preservation at Normal Temperature

CHEN Datian^{1,2}, HUANG Jie^{1,2,3①}, WANG Hailiang¹, LI Jin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

Abstract Molecular biology technologies have been widely used in aquatic animal disease diagnosis and molecular pathology studies, which require high quality of nucleic acid. However, how to preserve sample quality at normal temperature is rarely investigated. In this study, we compared the preserving effect of RNA in the tissues of shrimp *Litopenaeus vannamei* stored in different preservation solutions at normal temperature to find one preservation solution that can be used at normal temperature and long-distance transportation. Saturated solutions of ammonium sulfate and ammonium acetate in a serial of solvents with different ethanol concentrations were used to preserve shrimp tissues. The results showed that ammonium acetate has higher solubility in ethanol solution than ammonium sulfate. The molarity of ammonium ion of ammonium acetate is steadier in 0-80% ethanol. Ammonium acetate penetrates into the tissue of intact shrimp faster and reaches a higher concentration than ammonium sulfate does. RNA with better integrity, higher copies, and longer half-life period was achieved in the tissue preserved in more than 70% ethanol, saturated ammonium sulfate in the solvent of 50% and 70% ethanol, saturated ammonium acetate in the solvent of 50% ethanol. These results suggest that the saturated ammonium acetate in 50% ethanol as the solvent (pH=6.0) can be used as sample preserving solution to preserve RNA in shrimp tissues at normal temperature.

Key words Ammonium salt; Ethanol; Normal temperature; RNA

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

洪泽湖野生河蚬(*Corbicula fluminea*)线粒体 CO I 基因序列的遗传多样性分析*



李大命 张彤晴^① 唐晟凯 钟立强 刘小维

(江苏省淡水水产研究所 江苏省内陆水体渔业资源与环境重点实验室 南京 210017)

摘要 利用线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (CO I) 分子标记对洪泽湖河蚬(*Corbicula fluminea*)野生种群的遗传多样性水平进行分析。采集洪泽湖野生河蚬 50 个个体,对 CO I 基因序列片段进行 PCR 扩增和序列测定。结果显示,长度为 614 bp 的 CO I 基因片段中,碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 22.6%、42.4%、21.0%和 14.0%,A+T 的含量(65.0%)显著高于 G+C 的含量(35.0%)。CO I 基因序列中有 67 个核苷酸变异位点,总变异率为 10.9%,其中简约信息位点 63 个,单一信息位点 4 个。50 条 CO I 基因序列共定义了 15 个单倍型,单倍型多样性指数(h)和核苷酸多样性指数(π)分别为 0.870 和 0.045,平均碱基差异数(K)为 27.370,单倍型序列间的遗传距离为 0.002–0.095。采用邻接法(NJ)和最大简约法(MP)构建 CO I 单倍型系统进化树,15 个单倍型聚为两个明显分支,表明洪泽湖河蚬种群出现了遗传分化。中性检验结果和歧点分布图显示,洪泽湖河蚬种群大小保持相对稳定,未经历种群扩张。本研究结果表明,洪泽湖河蚬种群具有较高的遗传多样性水平,该结果可为合理开发、利用及保护洪泽湖河蚬野生种质资源提供科学参考。

关键词 河蚬; 细胞色素氧化酶亚基 I; 遗传多样性; 洪泽湖

中图分类号 S932.6 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0081-06

河蚬(*Corbicula fluminea*)俗称沙蚬、蚬潦,隶属于瓣鳃纲(Lamellibranchia)、真瓣鳃目(Eulamellibranchia)、异齿亚目(Heterodonta)、蚬科(Corbiculidae)、蚬属(*Corbicula*),是一种栖息于江河湖泊中的常见双壳经济贝类,原产于我国和东南亚地区,20 世纪 30 年代引入北美,现已广泛分布于世界各地水域,是淡水水体中重要的底栖动物和常见的优势种类,对当地水生生态系统的物质循环有重要影响(Hakenkamp *et al.*, 1999)。河蚬营养丰富,味道鲜美,具有很高的食用价值和保健作用,深受我国东南沿海、日本、韩国和东南亚等国家居民的喜爱。近年来,国内外市场对河蚬需求量逐渐增大,河蚬养殖业已成为淡水经济贝类养殖的热点之一。由于过度捕捞、环境污染和富营养化等多种因素的影响,我国湖泊中河蚬天然资源量渐

趋贫乏(袁永浒等,1994;邓道贵等,2005;严维辉等,2007;蔡炜等,2010)。洪泽湖是中国第四大淡水湖泊,河蚬是其底栖软体动物中的第一优势种(张超文等,2012),也是洪泽湖出口创汇的重要水产品之一。随着湖泊污染和富营养化不断加剧,洪泽湖河蚬产量呈显著下降趋势,较大制约了河蚬产业的发展。

目前,国内有关河蚬的研究主要集中在其生物学、营养价值和作为环境指示生物等方面(丁怀宇等,2011),但有关河蚬种质资源遗传多样性的研究鲜有报道。线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)是一个环形 DNA 分子,因具有母性遗传、进化速度快、核苷酸替代率高、无组织特异性等特点,mtDNA 已成为分子系统学特别是群体遗传学及系统发育等研究的有效遗传标记(刘云国等,2009)。细胞色素氧化

* 江苏省 333 工程科研项目“河蚬资源增殖技术研究示范推广”(BRA2014319)和江苏省海洋与渔业局项目“内陆水体渔业资源与环境调查”共同资助。李大命, E-mail: ldm8212@126.com

^① 通讯作者: 张彤晴, 研究员, E-mail: zhtq3@126.com

收稿日期: 2014-10-22, 收修改稿日期: 2014-12-22

酶亚基 I (CO I) 是线粒体 DNA 标记中最常用的标记之一, 其进化速率中等, 被广泛用于鱼类和双壳类等水生生物的种群遗传学研究(史兼华等, 2006; 董丽娜等, 2011; 刘连为等, 2013)。目前, 该标记在河蚬地理系统进化关系研究上已有较多应用(Giribet *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005), 但迄今, 将 mtDNA 用于河蚬种群遗传多样性的研究尚未见报道。

为了保护河蚬资源, 2007 年 12 月在洪泽湖建立了首个国家级河蚬种质资源保护区。已有研究调查了洪泽湖河蚬资源的时空分布(袁永浒等, 1994; 严维辉等, 2007; 张超文等, 2012), 但尚无利用 mtDNA 序列分析洪泽湖河蚬遗传多样性的研究报道。本研究采用 CO I 基因片段作为分子标记, 分析洪泽湖河蚬遗传多样性水平和遗传结构, 以期为河蚬种质资源保护及合理开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料采集

本研究所用的河蚬于 2013 年 5 月采自洪泽湖野生种群。从河蚬样品中随机挑选 50 个个体, 用无水乙醇固定, 带回实验室, -20°C 保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取

采用苯酚-氯仿法提取外套膜肌肉组织基因组 DNA(Sambrook *et al.*, 2001), TE(pH=8.0)溶解, 置于 -20°C 冰箱保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, Eppendorf Biophotometer 核酸蛋白测定仪测定 DNA 的浓度和纯度。

1.3 PCR 扩增和测序

CO I 基因序列扩增引物为 LCO1490(5'-GGTCA-ACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 HCO2198(5'-TA-AACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994), 引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应体系总体积为 50 μl , 包括 50–100 ng 模板 DNA、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μl 、 $2\times\text{PCR mix}$ 25 μl (包含 *Taq* 酶 2.5 U、dNTPs 10 $\mu\text{mol/L}$ 、 MgCl_2 0.1 mmol/L), 其余体积用超纯水补足。PCR 反应程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 40 s, 50°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳缓冲液为 $0.5\times\text{TBE}$ (pH=8.0), 常温电泳, Goldview 染色, 凝胶成像系统下观察和拍照。将 PCR 产物纯化后送至上海生工生物技术有限公司进行双向测序。

1.4 数据处理

用 ClustalX 1.81 软件对 DNA 序列进行编辑和比对, 并辅以人工校对。多态位点数(Polymorphic sites, *S*)、单倍型数(Number of haplotype, *N*)、单倍型多样性指数(Haplotype diversity, *h*)、核苷酸多样性指数(Nucleotide diversity, π)、平均核苷酸差异数(Average number of nucleotide difference, *k*)等遗传多样性参数由 DNASP 4.0 软件计算。采用 MEGA 4.0 软件统计 DNA 序列的碱基组成和变异位点。利用 Kimura 双参数模型计算单倍型间的遗传距离, 采用 NJ 法和 MP 法构建 CO I 单倍型系统进化树, 并对所得系统树进行自检法检验(1000 次重复)。采用 Tajima's *D* 中性检验和核苷酸不配对分布图检测河蚬种群的历史动态。

2 结果

2.1 河蚬 CO I 基因片段序列分析

经 PCR 扩增、测序、比对得到 614 bp 的 CO I 基因序列, 其碱基 A、T、G 和 C 的平均含量分别为 22.6%、42.4%、21.0% 和 14.0%, A+T 的含量(65.0%) 明显高于 G+C 的含量(35.0%), 符合无脊椎动物线粒体 DNA 序列特征。在该编码序列片段使用的密码子中, A、T、G、C 在第 1、2、3 位点的平均含量差异很大, 其中 C 的平均含量变化最大, 在第 1、2、3 位分别为 15.0%、25.5%、1.6%, 表明密码子的碱基使用频率存在明显的偏向性。

2.2 河蚬 CO I 基因的遗传多样性分析

在 CO I 基因序列中, 共检出 67 个核苷酸变异位点, 占核苷酸总数的 10.9%, 其中包括 63 个简约信息位点和 4 个单一信息位点, 变异位点分布如图 1 所示, 没有插入或缺失位点, 转换/颠换比值为 2.83。50 条 CO I 基因序列中定义了 15 个单倍型, 其中, 单倍型 H9 和 H7 出现的频率较高, 分别为 26.0% 和 22.0%。河蚬种群的单倍型多样性为 0.870 ± 0.028 , 核苷酸多样性为 0.045 ± 0.002 , 平均核苷酸差异数为 27.370(表 1), 表明洪泽湖河蚬野生群体具有较高的遗传多样性。

2.3 单倍型聚类分析

对河蚬的 15 个 CO I 基因单倍型的核苷酸序列进行比对, 根据 Kimura 双参数模型计算单倍型间的遗传距离(表 2)。可以得出, 15 个单倍型之间的遗传距离在 0.002–0.095 之间, 表明单倍型之间的遗传距离差异较大。采用 NJ 法和 MP 法构建的洪泽湖河蚬 15 个单倍型分子系统树(图 2 和图 3)。两种方法构建

```

[          1111111 1222222222 2222333333 3333444444 4444445555 55555666]
[    334557788 8892344557 8011334456 6789001234 5567001235 5666890345 5679900]
[    4153021325 6864958172 1547284705 8462479519 2543062721 4016765214 6875817]
#H1  GAAATATGTA TACGATGACG TGTAGAGTGG GAAATACTCT TGATTGATGA AATTGAAAAA AATATTA
#H2  ...G.....
#H3  .....C..
#H4  .....C..
#H5  ....G....
#H6  .....T.....
#H7  .....G.....
#H8  A.....A..G.....C.....
#H9  AG..CTCAGG .G.A.AAGTA AAA.AGA.AA TGGTGGT.AC GA..AA.C.. GGC.AT.GG. GTCGA.G
#H10 AG..CTCAGG .G.A.AAGTA AAA.AGA.AA TGGTGGT.AC GA..AA.C.G GGC.AT.GG. GTCGA.G
#H11 AG..CTCAG .G.A.AAGTA AAA.AGA.AA TGGTGGT.AC GA..AA.C.. GGC.AT.GG. GTCGA.G
#H12 AG..CTCAGG .G.A.AAGTA AAA..GA.AA TGGTGGT.A. GA..AAGC.. GGC.AT.GG. GTCGA.G
#H13 AG..CTCAGG .G.A.AAGTA AAA.AGA.AA TGGTGGT.A. GA..AAGC.. GGC.AT.GG. GTCGA.G
#H14 AG..CTCAGG .G.A.AAGTA AAA.AGA.AA TGGTGGT.AC GA..AA... GGC.AT.GG. G.CGA.G
#H15 AGG.CT.AGG CG.AGAA.TA AAAGAGA.A. T.GTGGTCAC GA.CAA.C.. T.CCAT..G. .TCGACG
    
```

图 1 CO I 基因序列核苷酸变异位点分布

Fig.1 The distribution of variable sites in CO I gene sequence

表 1 河蚬 CO I 基因多态性指数

Tab.1 The haplotype and nucleotide diversity of CO I gene of *C. fluminea*

种群 Population	单倍型数 <i>N</i>	多态位点数 <i>S</i>	单倍型多样性 <i>h</i>	核苷酸多样性 π	平均核苷酸差异数 <i>k</i>
河蚬 <i>C. fluminea</i>	15	67	0.870±0.028	0.045±0.002	27.370

表 2 河蚬不同单倍型序列间的遗传距离

Tab.2 The genetic distance of different haplotypes in *C. fluminea*

单倍型 Haplotype	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15
H1	1.000														
H2	0.003	1.000													
H3	0.003	0.007	1.000												
H4	0.002	0.005	0.002	1.000											
H5	0.002	0.005	0.005	0.003	1.000										
H6	0.005	0.008	0.008	0.007	0.007	1.000									
H7	0.003	0.007	0.007	0.005	0.005	0.002	1.000								
H8	0.007	0.010	0.010	0.008	0.008	0.005	0.003	1.000							
H9	0.087	0.091	0.091	0.089	0.087	0.093	0.091	0.087	1.000						
H10	0.089	0.093	0.093	0.091	0.089	0.095	0.093	0.089	0.002	1.000					
H11	0.085	0.089	0.089	0.087	0.085	0.091	0.089	0.085	0.002	0.003	1.000				
H12	0.085	0.089	0.089	0.087	0.085	0.091	0.089	0.085	0.005	0.007	0.007	1.000			
H13	0.087	0.091	0.091	0.089	0.087	0.093	0.091	0.087	0.003	0.005	0.005	0.002	1.000		
H14	0.083	0.087	0.087	0.085	0.083	0.089	0.087	0.084	0.003	0.005	0.005	0.008	0.007	1.000	
H15	0.089	0.093	0.093	0.091	0.089	0.095	0.093	0.089	0.027	0.028	0.028	0.032	0.030	0.030	1.000

的系统树的单倍型的分布基本一致, 15 个 CO I 单倍型被分成两个分支, 其中分支 I 包括单倍型 H1-H8, 分支 II 包括单倍型 H9-H15。分支内单倍型间遗传距离较小, 而分支间单倍型遗传距离较大。

2.4 群体动态分析

采用 Tajima's *D* 中性检测和歧点分布分析洪泽湖河蚬是否经历种群扩张。结果显示, 洪泽湖河蚬种群

的检测中, 歧点分布(Mismatch-distribution)分析图谱呈现多峰型(图 4), 在中性检验中 Tajima's *D* ($D=2.724$, $P<0.01$) 值为正值, 且统计结果为显著, 表明洪泽湖河蚬种群大小保持相对稳定, 未发生明显的种群扩张。

3 讨论

A、T、C 和 G 碱基在线粒体基因组中的分布呈不均一性, 是动物线粒体基因组的共性(Thompson *et al*,

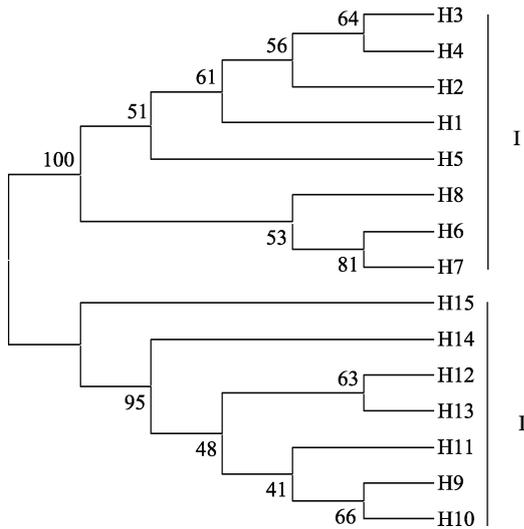


图2 河蚬 CO I 基因序列单倍型的 NJ 系统进化树
Fig.2 The neighbor-joining tree of CO I haplotypes in *C. fluminea*

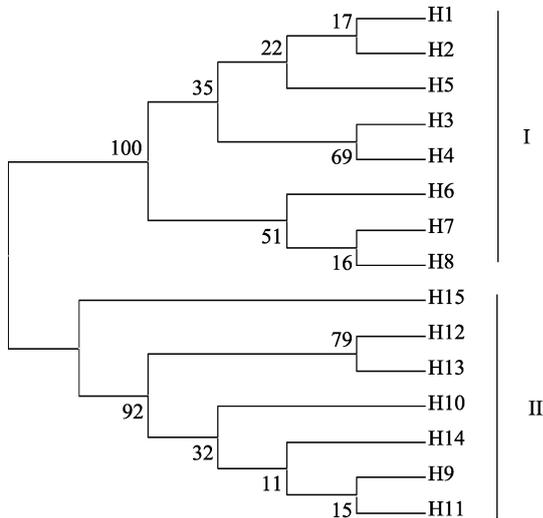


图3 河蚬 CO I 基因序列单倍型的 MP 系统进化树
Fig.3 The maximum-parsimony tree of CO I haplotypes in *C. fluminea*

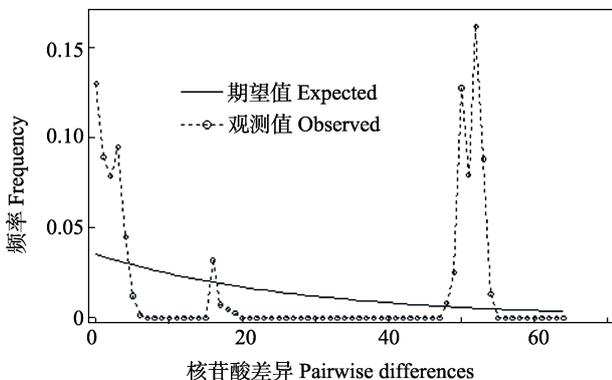


图4 洪泽湖河蚬种群的歧点分布
Fig.4 The mismatch-distribution analysis of *C. fluminea* population

1997)。洪泽湖河蚬的 CO I 序列中 A、T、G、C 碱基含量分别为 22.6%、42.4%、21.0%和 14.0%，A+T 的含量(65.0%)明显高于 G+C 的含量(35.0%)，表现出较为明显的碱基偏倚性。这与三角帆蚌(*Hyriopsisicum ingii*) (李家乐等, 2008)、褶皱冠蚌(*Cristaria plicata*) (贾名静等, 2009)、厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*) (毛阳丽等, 2014)、紫贻贝(*Mytilus edulis*) (沈玉帮等, 2011)、牡蛎(李咏梅等, 2009)等贝类线粒体 CO I 基因序列结果相似，也符合无脊椎动物线粒体 DNA 的序列特征。同时，4 种碱基在密码子的第 1、2 和 3 位的使用频率不同，特别是碱基 C，其在密码子第 1、2 位含量较高，而在第 3 位使用较少，表明河蚬 CO I 基因密码子的碱基使用频率存在很强的偏向性。

遗传多样性(Genetic diversity)是生物多样性的核心，又称为基因多样性(Gene diversity)。单倍型多样性指数和核苷酸多样性指数是评价种群遗传多样性的两个重要指标。本研究中洪泽湖 50 个河蚬个体共定义了 15 个单倍型，占个体总数的 30.0%，单倍型多样性指数和核苷酸多样指数分别为 0.870 和 0.045，平均核苷酸差异数为 27.370，表现出较高的遗传多样性。Grant 等(1998)根据鱼类线粒体 DNA 序列的遗传变异分析，将不同的单倍型多样性(h)和核苷酸多样性(π)间的组合分成 4 种类型(低 h ，低 π ；高 h ，低 π ；低 h ，高 π ；高 h ，高 π)。从本研究结果可以得出，洪泽湖河蚬种群具有较高 h 和 π ，说明洪泽湖河蚬种质资源遗传多样性比较丰富。从进化角度来看，洪泽湖河蚬种群遗传多样性的状况被认为可能是由一个大而稳定的种群经过长时间演化所形成的。另外，较大的种群数量、环境的多样性或具有适应种群快速增长的生活特征也有利于种群具备较高的遗传多样性(Nei, 1987)。河蚬是洪泽湖底栖动物中的常见和优势土著种类，资源量较大，在洪泽湖分布广泛，湖区间河蚬种群交流频繁，从而有利于形成和维持河蚬种群遗传多样性。

本研究共定义了 15 个单倍型(H1-H15)，单倍型间的遗传距离在 0.002-0.095 之间。根据 Hebert 等(2003)对动物界物种的线粒体 COI 基因序列比较分析后发现，大部分的种内遗传距离小于 0.010，最小种间遗传距离为 0.02，可见部分单倍型间的遗传距离已超过种间差异。基于遗传距离构建的 NJ 系统树和 MP 系统树均明显分为两支，其中单倍型 H1-H8 聚为一支(I)，H9-H15 聚为另一支(II)，分支内单倍型间的遗传距离非常低，而分支间的单倍型之间的遗传距离较高。根据遗传距离和系统树，推断洪泽湖河蚬 CO I 单倍型出现了较为明显的遗传分化，可以将河蚬种群

分化为两个亚种。一般认为, 具有浮游幼虫期的双壳贝类, 可以在广泛的区域内自由扩散, 从而具有较低的遗传分化水平(Arnaud *et al.*, 2000)。另外, 频繁的捕捞活动有利于洪泽湖不同湖区河蚬群体间的基因交流, 河蚬群体间也不存在地理隔离, 这些因素导致河蚬群体间遗传分化微弱。丁怀宇等(2011)通过微卫星技术分析了洪泽湖河蚬群体的遗传结构, 结果也表明不同湖区河蚬群体没有形成显著的遗传结构。因此, 分支内的单倍型遗传距离较小, 遗传变异较低。

群体遗传学研究认为, 引起群体分化的主要原因是遗传漂变和自然选择(郑向忠等, 1997), 同时也受到种群历史动态的影响(孙鹏等, 2011)。种群历史演化通常通过两种方法来检测, 其一是通过中性选择分析, 如 Tajima's *D* 检验(Tajima, 1989), *D* 呈负值并且有显著性意义时, 即显示种群经历过扩张事件; 其二是碱基不配对分析, 这种方法是基于无限位点模式(Infinite-site model), 对样本中两两序列进行差异分析, 个体间碱基不配对分布曲线呈明显的单峰型被认为种群历史有扩张现象, 反之, 如果种群呈稳定状态, 在歧点分布分析图谱上呈现多峰型。本研究结果显示, 洪泽湖河蚬种群的 Tajima's *D* 中性检验结果($D=2.724$)为正值, 且歧点分布图谱呈现多峰型, 这表明历史上洪泽湖河蚬种群较为稳定, 没有经历过种群扩张。但中性检验结果差异为极显著($P<0.01$), 说明河蚬种群进化过程偏离了中性选择, 部分种群发生了基因突变, 从而导致种群内部出现遗传分化, 进而不同种群间遗传距离上有较大差异。

物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。丰富的遗传多样性意味着较高的适应生存潜力, 蕴藏着较大的进化潜能, 遗传多样性的减少将会使一个物种降低对环境改变的适应能力, 降低群体中变异的丰富度, 导致渔业资源的匮乏, 甚至导致物种的灭绝。本研究结果表明, 洪泽湖河蚬种群具有较高的遗传多样性水平, 种质资源较为丰富。但人类活动(环境污染、过度捕捞)亦会导致洪泽湖野生河蚬资源量衰竭和遗传多样性下降, 因此有必要采取科学的保护和管理措施来维持河蚬野生资源的可持续开发和利用。

参 考 文 献

- 丁怀宇, 姜虎成, 冯建彬, 等. 河蚬微卫星引物筛选及洪泽湖野生群体遗传结构分析. 水产学报, 2011, 35(11): 1624-1632
- 毛阳丽, 宋娜, 高天翔, 等. 浙江和福建沿海厚壳贻贝 *Mytilus coruscus* 群体的 CO I 序列比较分析. 海洋湖沼通报, 2014(2): 82-88
- 邓道贵, 李洪远, 胡万明, 等. 巢湖富营养化对河蚬和环棱螺分布及种群密度影响. 应用生态学报, 2005, 16(8): 1502-1506
- 史兼华, 何毛贤, 万军伟. 海洋珍珠贝类遗传标记研究进展. 海洋通报, 2006, 25(3): 80-86
- 刘云国, 刘贤德, 高焕, 等. 水产生物 DNA 分子标记技术. 北京: 科学出版社, 2009, 59-62
- 刘连为, 许强华, 陈新军. 基于线粒体 DNA 分子标记的东太平洋茎柔鱼群体遗传多样性比较分析. 水产学报, 2013, 37(11): 1618-1625
- 孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 南海海区鲮鱼(*Mugil cephalus*) CO I 基因序列的遗传多样性分析. 海洋与湖沼, 2011, 42(1): 131-136
- 严维辉, 潘元潮, 郝忱, 等. 洪泽湖底栖生物调查报告. 水利渔业, 2007, 27(3): 65-66
- 张超文, 张堂林, 朱挺兵, 等. 洪泽湖大型底栖动物群落结构及其与环境因子的关系. 水生态学杂志, 2012, 33(3): 27-33
- 李咏梅, 陈秀荔, 彭敏, 等. 基于线粒体 CO I 基因序列探讨广西钦州湾牡蛎的遗传分化. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(3): 60-65
- 李家乐, 王建军, 汪桂玲, 等. 我国五大淡水湖三角帆蚌群体 mtDNA CO I 基因片段变异分析. 水生生物学报, 2008, 32(5): 779-782
- 沈玉帮, 张俊彬, 冯冰冰, 等. 基于线粒体 COI 序列分析对紫贻贝群体遗传多样性的研究分析. 海洋通报, 2011, 30(4): 435-440
- 郑向忠, 徐宏发, 陆厚基. 动物种群遗传异质性研究进展. 生物多样性, 1997, 5(3): 210-216
- 袁永浒, 王兴元, 陈安来, 等. 洪泽湖螺蚬资源调查报告. 水产养殖, 1994, (6): 15-16
- 贾名静, 李家乐, 牛东红, 等. 长江中下游褶纹冠蚌 10 个群体 CO I 基因序列变异分析. 动物学杂志, 2009, 44(1): 1-8
- 董丽娜, 黄梓荣, 艾红, 等. 北部湾 3 种金线鱼属鱼类 CO I 基因序列的比较分析. 中国水产科学, 2011, 18(3): 508-514
- 蔡炜, 蔡永久, 龚志军, 等. 太湖河蚬时空格局. 湖泊科学, 2010, 22(5): 714-722
- Arnaud S, Monteforte M, Galtier N, *et al.* Population structure and genetic variability of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* along Pacific coasts from Mexico to Panama. *Conserv Genet*, 2000, 1(4): 299-308
- Folmer O, Black M, Lutz R, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3(5): 294-299
- Giribet G, Wheeler W. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the *Bivalvia* (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebr Biol*, 2002, 121(4): 271-324
- Grant WS, Bowen BW. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insight from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered*, 1998, 89: 415-426

- Hakenkamp CC, Palmer MA. Introduced bivalves in freshwater ecosystems: the impact of *Corbicula* on organic matter dynamics in a sandy stream. *Oecologia*, 1999, 119(3): 445–451
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313–321
- Lee T, Siripattawan S, Ituarte CF, *et al.* Invasion of the clonal clams: *Corbicula* lineages in the New World. *Am Malacol Bull*, 2005, 20(1): 113–122
- Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. 1987
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 1989, 123(3): 585–595
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876–4882

(编辑 冯小花)

Genetic Diversity of Wild *Corbicula fluminea* Population in the Hongze Lake Analyzed by Mitochondrial DNA CO I Gene Sequence

LI Daming, ZHANG Tongqing^①, TANG Shengkai, ZHONG Liqiang, LIU Xiaowei

(Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Key Laboratory of Fisheries Resources in Inland Water, Nanjing 210017)

Abstract *Corbicula fluminea* is a common macrozoobenthos in the freshwater of the Hongze Lake, which plays an important role in the cycle of mass and energy fluxes of fresh water ecosystem. However, the wild source of *C. fluminea* has sharply decreased recently due to over-fishing and water pollution. The genetic diversity of *C. fluminea* in the Hongze Lake has not been widely investigated. The present study analyzed the genetic diversity of *C. fluminea* population in the Hongze Lake using mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I (CO I) gene molecular marker. The mitochondrial DNA CO I gene fragments were amplified and sequenced from 50 individuals of wild *C. fluminea* in the Hongze Lake. The contents of A, T, G and C in the 614-base pair fragments of CO I gene were 22.6%, 42.4%, 21.0% and 14.0%, respectively, and the content of A+T was significantly higher than that of G+C. Sixty-seven polymorphic sites were detected, accounting for 10.9% of the total sequences, and of which sixty-three were parsimony-informative sites and four were singleton sites. Fifteen haplotypes were defined in 50 individuals of *C. fluminea*. The mean haplotype diversity, nucleotide diversity, and the average number of nucleotide difference in the *C. fluminea* population were 0.870, 0.045 and 27.370, respectively. The genetic distance among fifteen haplotypes ranged from 0.002 to 0.095. Neighbor-joining (NJ) and maximum-parsimony (MP) trees divided fifteen haplotypes into two clades, suggesting that *C. fluminea* populations had significant genetic difference. Mismatch distribution analysis showed a multiple type, and Tajima's *D* value (2.724) of neutrality test is positive but significantly different, demonstrating that *C. fluminea* in the Hongze Lake hadn't experience a recent population expansion. These results suggest that the genetic diversity of *C. fluminea* population in the Hongze Lake is high, which provides scientific information for the conservation and sustainable exploitation of *C. fluminea*.

Key words *Corbicula fluminea*; Cytochrome oxidase subunit I; Genetic diversity; Hongze Lake

① Corresponding author: ZHANG Tongqing, E-mail: zhtq3@126.com

呋喃西林代谢产物在中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)体内的 消除规律及其对代谢酶活性的影响*



李东利^{1,2} 李 健^{2①} 常志强² 孙 铭² 王 莹² 葛红星²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)以 30 mg/kg 体重剂量投喂呋喃西林药饵 5 d 后,检测对虾各组织中呋喃西林代谢物氨基脒(Semicarbazide, SEM)浓度和肝胰腺中的药物代谢酶活性。结果显示,肝胰腺中药物起始和达峰浓度最大,远远高于其他各组织。20 d 实验结束时,SEM 浓度依次为肌肉>鳃>甲壳>血淋巴>肝胰腺,消除半衰期为肌肉(5.89 d)>甲壳(4.66 d)>鳃(2.95 d)>血淋巴(2.70 d)>肝胰腺(1.47 d),肝胰腺中 SEM 消除最快,肌肉中消除最慢,药物残留时间较长。与对照组相比,给药组肝胰腺中乙氧基香豆素-O-脱乙酰酶(ECOD)和氨基比林-N-脱甲基酶(APND)活性均呈现先下降后上升的趋势,停药 3 h 时,ECOD 活性极显著低于对照组($P<0.01$),酶活性被最大程度抑制,随后出现上升趋势,并分别于 48、72、96、120、240 h 时,ECOD 活性均极显著高于对照组($P<0.01$);APND 在停药 6 h 和 9 h 时活性最低,被抑制效应最大($P<0.01$),240 h 时极显著高于对照组($P<0.01$),之后 APND 活性降低并趋向对照组水平。结果表明,SEM 在中国对虾体内消除缓慢,消除半衰期较长,并对 ECOD、APND 酶活性有影响,推测 ECOD、APND 参与呋喃西林在中国对虾体内的代谢消除。

关键词 中国对虾;呋喃西林;氨基脒;消除规律;细胞色素 P450

中图分类号 S912 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0087-08

呋喃西林(Nitrofurazone, NFZ)是硝基呋喃类药物,曾用作饲料添加剂来防治水生动物疾病,也曾广泛应用于畜禽、水产养殖业中。NFZ 进入动物体内数小时就代谢为氨基脒(Semicarbazide, SEM)(樊新华等, 2010),对原药检测难度较大,因此,一般通过检测其代谢产物 SEM 来检测 NFZ 的残留。SEM 与动物体内蛋白质紧密结合形成稳定的化合物,该化合物不易被机体代谢消除,具有致癌、致突变作用,会对人体造成

危害(Bock *et al*, 2007; Barbosa *et al*, 2007)。自 20 世纪 90 年代中期起, NFZ 就被欧盟禁止用于食用动物的治疗(van Koten-Vermeulen *et al*, 1993),我国农业部于 2002 年发布第 193 号公告,将呋喃西林列入食品动物禁用兽药,2003 年又将水产品中硝基呋喃代谢物纳入残留监控计划中。近年来,中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)养殖过程中虾病频繁暴发,导致养殖对虾大量死亡,因此广大渔民对预防、治疗虾病的药物需

* 国家虾产业技术体系专项(CARS-47)、山东省自主创新专项(2013CXC80202)、国家高技术研究发展计划“主要养殖甲壳类良种培育”(2012AA10A409)、2013 年中国水产科学研究院院级基本科研业务费专项“鲆鲽鱼类磺胺药代谢模式及中间评估”(2013A1102)和公益性行业(农业)科研专项(201103034)共同资助。李东利, E-mail: 15063903531@163.com

① 通讯作者: 李 健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-11-21, 收修改稿日期: 2014-12-03

求迫切。硝基呋喃类药物虽已被禁用,但因其价格低廉、抗菌效果好、容易获得,在水产养殖中屡禁不止,违禁药物滥用使对虾产品质量存在安全隐患。因此,有必要研究 NFZ 在中国对虾体内的代谢消除规律。

药物在体内的代谢消除受到多种因素的影响,其中,药物代谢酶是药物体内代谢过程的关键因素。细胞色素 P450(CYP450)酶系参与药物代谢 I 相反应中多种内源性和外源性物质的转化和代谢,在机体解毒中起着重要作用(Werck-Reichhart *et al*, 2000)。在 CYP450 家族中, CYP 1-3 与外源物质的代谢有关,含量占肝 CYP450 酶总量的 70%(Ingelman, 2004),在维持机体内环境的稳态和代谢消除对机体有害物质中发挥重要作用。在甲壳动物中,通过测定 CYP1A 和 CYP2 标志酶 ECOD、APND 的活性来反应药物对机体影响的研究多有报道,如李小彦等(2010)研究发现,黄芩苷对中国对虾肝胰腺及鳃 APND、ECOD 酶活性均有不同程度的诱导作用,酶活性均呈现先升高后降低的趋势;Moutou 等(1998)研究了噁喹酸和氟甲喹等口服给药对虹鳟微粒体 CYP450 单加氧酶活性的影响,发现酶活性大大提高。CYP450 酶和药物代谢之间有着密切关系,药物可以诱导或抑制 CYP450 酶的活性,影响药物在体内的代谢消除速率和毒性反应。目前,硝基呋喃类药物在中国对虾体内的代谢消除与 CYP450 代谢酶类之间的关系鲜有研究报道。

本研究以中国对虾为实验对象,进行药饵给药,分析呋喃西林代谢物在中国对虾各组织中的残留消除规律,为 SEM 在中国对虾体内的代谢规律提供理论数据;从影响药物代谢的相关酶立足,初步确定参与该药物代谢的酶种类,有利于更深入了解该药物的代谢特点,对发现潜在的药物利用价值具有重要意义,也为进一步研究硝基呋喃类药物安全性评价提供相关资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康中国对虾由山东昌邑海丰水产养殖公司提供,实验前无用药史。平均体重为(8.12±1.58) g,实验前暂养 7 d,暂养期间投喂不含药物的配合饲料(六和,青岛)。试验用水为自然海水,试验期间每天换水 1 次,连续充氧,试验水温为(30±1)°C,盐度为 28。

1.2 药品与试剂

呋喃西林(含量≥98%)、7-乙氧基香豆素(含量≥99%)、7-羟基香豆素(纯度≥99%)、氨基比林、1-苯

基-2-硫脲(PTU, 98%)和同位素内标 SEM·HCl-¹³C-¹⁵N₂(纯度≥99%)均购自 Sigma 公司;考马斯亮蓝、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)、α-苯甲磺酰氟(PMSF)(99%)购自 Amreco 公司;1,4-二硫苏糖醇(DTT)(99.5%)购自 Merck 公司;还原型辅酶(NADPH)(99%)、牛血清白蛋白购自 Roche 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 各组织中 SEM 含量测定 按照农业部 783 号公告-1-2006 的标准,采用液相色谱-串联质谱法进行检测。

实验分给药组和对照组,给药组准确称取 1.5 g NFZ 药粉,混合不含药物的饲料配制成 1000 g 浓度为 30 mg/kg·bw 的药饵连续投喂中国对虾 5 d,每天早晚各投喂药饵 1 次;对照组投喂不含药物的配合饲料,其他条件均一致。于停药后 1、3、6、9、12、24、48、72、96、120、240、480 h 取样,每次随机取 20 尾虾,分别取其血淋巴、肝胰腺、鳃、甲壳、肌肉,立即保存于-20°C 冰箱,用于药物残留检测。

组织样品在室温下自然解冻,称重并记录,取 2 ml 血淋巴于 50 ml 离心管中,加入 0.05 ml 混合内标工作溶液,涡旋混合 50 s,再加入 5 ml 盐酸溶液和 0.15 ml 2-硝基苯甲醛溶液,涡旋振荡 50 s,置于恒温水浴振荡器中 37°C 避光振荡 16 h。取出离心管冷却至室温,加入 4 ml 磷酸氢二钾溶液,调节 pH 至 7.2,加入 4 ml 乙酸乙酯,涡旋 50 s,4000 r/min 离心 5 min,取上清液转移至 10 ml 离心管中;再加入 4 ml 乙酸乙酯,重复上述操作,合并上清液,于 40°C 下氮气吹干。准确加入 1.0 ml 甲醇溶液,涡旋振荡溶解残留物,过 0.45 μm 有机滤膜,待测。

色谱柱 Agilent XDB C₁₈(100 mm×2.1 mm, 5 μm),柱温为室温,进样量为 20 μl。流动相 A 为 0.002 mol/L 醋酸铵溶液, B 为甲醇,梯度洗脱见表 1,平衡时间为 5 min。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab.1 The gradient of the mobile phase

时间 Time(min)	A(%)	B(%)	流速 Flow rate(μl/min)
0.0	80	20	250
3.0	20	80	250
5.0	20	80	250
5.1	80	20	250
7.0	80	20	250

质谱条件为大气压电喷雾离子源(ESI),正离子模式;喷雾电压为 4100 V,雾化气压力为 35 psi;辅

助气流量为 3 L/min; 离子传输毛细管温度为 350℃; 源内碰撞诱导解离电压为 10 V; 选择反应监测(SRM)母离子、子离子及碰撞能量见表 2; Q1 半峰宽为 0.7 Da, Q3 半峰宽为 0.7 Da。碰撞气为氦气, 压力为 1.5 mTorr。

表 2 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

Tab.2 The parent and fragmentation combinations used for monitoring the selected reaction

目标化合物 Analyte	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	子离子 Production (<i>m/z</i>)	碰撞能量 Collision energy (eV)
SEM	209	166*	11
	209	192	13
SEM- ¹³ C- ¹⁵ N ₂	212	168*	11

* 定量离子碎片*Quantitative ion fragments

1.3.2 酶活性的测定 给药组、对照组分别在停药后 1、3、6、9、12、24、48、72、96、120、240、480 h 随机取 12 尾虾, 取其肝胰腺, 置于液氮中保存, 用于 APND、ECOD 酶活性检测。

肝胰腺 S₉ (9000 g supernatant) 的制备采用沈钧等 (1997) 改进的方法, 肝胰腺用 4℃ 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)(pH=7.4)反复冲洗, 尽可能除去血细胞, 用滤纸吸去肝组织表面的液体, 称重, 并按 1:5(W/V) 的比例加入预冷的匀浆缓冲液(0.1 mol/L、pH=7.5 的 PBS, 含 1 mmol/L EDTA-Na₂、1 mmol/L PMSF、1 mmol/L PTU、0.1 mmol/L DTT 和 15% 甘油), 将肝胰腺转入冷冻匀浆机, 4℃ 匀浆, 匀浆液在 4℃、13500 g 离心 25 min, 将漂浮的酯类物质用吸管除去, 将上清液转入预冷的离心管中, 即制成 S₉ 部分, 分装于冻存管中, 置于-80℃ 保存备用。

ECOD 活性测定(Oberdorster *et al.*, 2000): 反应在 96 孔酶标板(黑板)中进行, 取 0.1 mol/L PBS 匀浆缓冲液(含 2 mmol/L 7-乙氧基香豆素) 140 μl, 加入 S₉ 部分 10 μl, 27℃ 孵育 5 min, 测定管中加 10 mmol/L 的 NADPH 10 μl, 空白管加缓冲液, 37℃ 水浴 10 min, E_x=380 nm、E_m=460 nm 测定其产物 7-羟基香豆素的浓度。

APND 活性测定(Schenkman *et al.*, 1967): 取 0.1 mol/L PBS(pH=7.4)缓冲液 1.7 ml, 加 S₉ 蛋白悬液 0.1 ml, 氨基比林(24 g/L) 0.1 ml, 25℃ 水浴 2 min 后, 测定管中加 10 mmol/L 的 NADPH 0.1 ml, 空白管加双蒸水 0.1 ml, 25℃ 水浴 30 min。各管加 15% ZnSO₄ 0.35 ml, 混匀, 冰浴 5 min, 加饱和 Ba(OH)₂ 0.35 ml, 混匀, 室温放置 5 min 后 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2.0 ml, 加 Nash 试剂 2.0 ml, 60℃ 水浴 10 min,

自来水冷却, 紫外可见分光光度计于 420 nm 测定吸光值。

1.4 数据处理

实验所得数据采用 Microsoft Excel 2003 处理, 绘制药-时曲线, 求出消除速率常数(β)和消除曲线方程, 计算消除半衰期($t_{1/2}$)。用 SPASS 11.5 软件、样品 T 检验来分析酶活数据。

2 结果

2.1 SEM 含量检测

2.1.1 SEM 在中国对虾体内的分布及残留 药-时曲线见图 1, 各组织中 SEM 浓度随时间呈先增加后降低的趋势, 对照组各组织均未检出 SEM。其中, 肝胰腺中 SEM 残留量起始浓度和达峰浓度均最大, 1 h 时浓度为(832.62±3.06) μg/kg, 9 h 达到药物浓度高峰, 为(1554.61±6.29) μg/kg, 远远高于其他组织, 随后开始下降; 鳃中药物浓度分别在 3、12、48 h 表现出 3 个药峰, 浓度分别为(162.53±15.51)、(108.91±5.07)、(93.46±8.20) μg/kg, 3 个药峰浓度呈依次递减的趋势; 肌肉中药物浓度分别在 3 h、12 h 出现药峰, 药峰浓度依次为(149.95±11.28)、(87.04±7.02) μg/kg; 血淋巴中 SEM 浓度在 3 h 时达到最大值, 浓度为(56.12±12.79) μg/kg, 之后浓度逐渐降低; 甲壳中 SEM 浓度在 3 h 出现药峰, 之后降低, 从 9 h 又开始上升, 至 24 h 再次出现药峰, 其浓度高于 3 h 的药峰浓度。20 d 实验结束时, 各组织中残留量依次为肌肉(11.09±0.47) μg/kg>鳃(1.77±0.53) μg/kg>甲壳(1.56±0.66) μg/kg>血淋巴(0.69±0.13) μg/ml>肝胰腺(0.55±0.07) μg/kg,

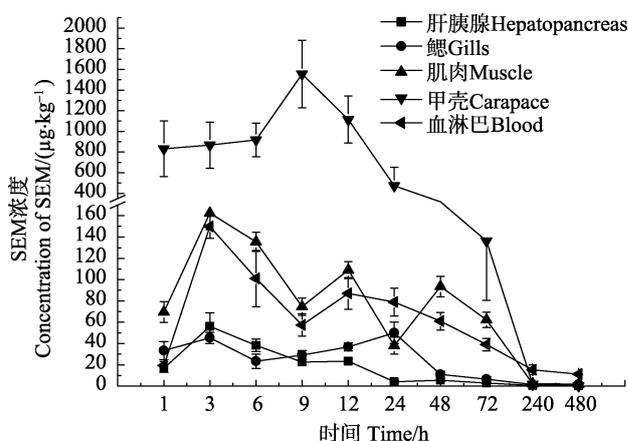


图 1 连续给药 5 d 后 NFZ 代谢物 SEM 在中国对虾各组织中的药物浓度

Fig.1 Concentrations of SEM in several tissues of *F. chinensis* after continuous dose of NFZ for 5 days

肌肉中残留量最多。

2.1.2 SEM 在中国对虾各组织中的消除 对给药组数据拟合, 得到 SEM 在中国对虾各组织中的消除方程、消除速率常数、相关系数和消除半衰期(表 3)。其中, SEM 在肝胰腺中消除半衰期最短, 消除速率最快; 在肌肉中消除半衰期最长, 消除也较慢, 消除半衰期依次为: 肌肉(5.89 d)>甲壳(4.66 d)>鳃(2.95 d)>血淋巴(2.70 d)>肝胰腺(1.47 d)。

表 3 SEM 在中国对虾各组织中的消除方程与消除参数
Tab.3 The equations of elimination curves and parameters of SEM in tissues of *F. chinensis*

组织 Tissue	消除方程 Equation	β	r^2	$t_{1/2}(\text{d})$
肌肉 Muscle	$C_{(t)}=82.983e^{-0.005t}$	0.005	0.819	5.89
甲壳 Carapace	$C_{(t)}=17.725e^{-0.006t}$	0.006	0.648	4.66
鳃 Gills	$C_{(t)}=100.275e^{-0.001t}$	0.010	0.844	2.95
血淋巴 Plasma	$C_{(t)}=16.916e^{-0.011t}$	0.011	0.786	2.70
肝胰腺 Hepatopancreas	$C_{(t)}=863.543e^{-0.02t}$	0.020	0.948	1.47

注: β 为最终消除速率常数, $t_{1/2}$ 为消除半衰期, r^2 为相关系数

Note: β . Final elimination rate constant; $t_{1/2}$. Elimination half-life; r^2 . Correlation coefficient

2.2 中国对虾肝胰腺 ECOD、APND 酶活性变化

2.2.1 肝胰腺 ECOD 酶活性变化 在连续药饵给药呋喃西林 5 d 后, 中国对虾肝胰腺 ECOD 活性与对照组相比呈先下降后逐渐上升的趋势(图 2), 随着时间延长其变化趋势逐渐变小, 停药 1 h 时, 给药组 ECOD 活性显著低于对照组水平($P<0.05$), 3 h 时极显著低于对照组水平($P<0.01$), 随后便恢复到对照组水平并继续升高; 从停药后 48 h 开始, 其活性便大于对照组, 并分别于 48、72、96、120、240 h 时, 给

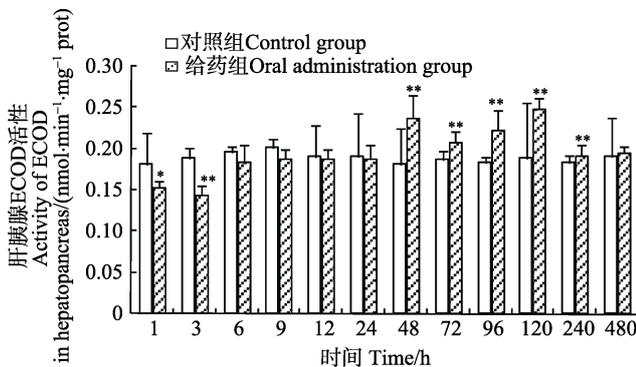


图 2 呋喃西林药饵给药后中国对虾肝胰腺 ECOD 活性变化

Fig.2 The variation of ECOD activity in hepatopancreas of *F. chinensis* after nitrofurazone oral administration

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, $n=6$

药组 ECOD 活性均极显著高于对照组($P<0.01$), 480 h 实验结束时, 给药组 ECOD 活性高于对照组水平, 但无显著性差异。

2.2.2 肝胰腺 APND 酶活性变化 中国对虾连续药饵给药呋喃西林 5 d 后, 中国对虾肝胰腺 APND 的活性如图 3 所示, 与对照组相比, 给药组 APND 活性大致出现先降低后升高的趋势。在停药后 6、9 h 时, 对 APND 活性抑制作用最大, 在这两个时间点, 其 APND 酶活性极显著低于对照组($P<0.01$); 9 h 后给药组 APND 活性逐渐升高, 短时间内与对照组相比无显著性差异。从 48 h 开始, 给药组 APND 活性高于对照组水平; 96 h 时, 给药组 APND 活性显著高于对照组($P<0.05$), 240 h 时极显著高于对照组($P<0.01$), 之后 APND 活性降低并低于对照组水平。

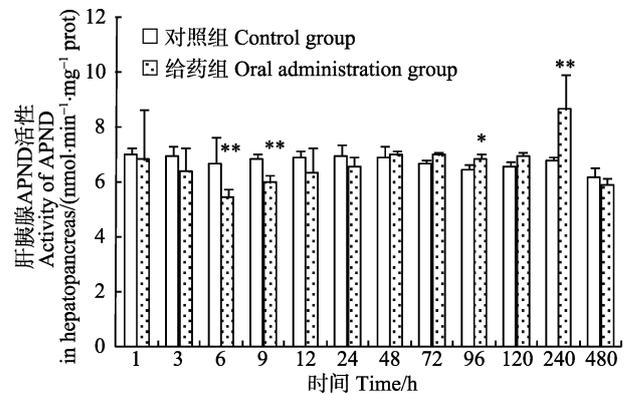


图 3 呋喃西林药饵给药后中国对虾肝胰腺 APND 活性变化

Fig.3 The variation of APND activity in hepatopancreas of *F. chinensis* after nitrofurazone oral administration

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, $n=6$

3 讨论

3.1 甲壳动物内源性 SEM

于慧娟等(2012)研究发现, 氨基脲作为内源性物质, 普遍存在于甲壳类水产品中, 并检测到虾类样品中 SEM 的含量在未检出-370.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。SEM 作为呋喃西林残留的监测指标, 由于甲壳动物内源性 SEM 的存在, 无疑会影响甲壳类水产品质量检测的准确性。因此, 在对虾呋喃西林残留的监控与研究中, 应该考虑内源性 SEM 的存在并作出相应的对策。本研究中, 对空白对虾各组织进行了检测, SEM 水平低于检测限。

3.2 多次给药后 SEM 在中国对虾体内的残留消除规律

停药后, 呋喃西林代谢物 SEM 在对虾各组织中

迅速蓄积(图 1), 残留量呈现随时间延长而降低的趋势, 肝胰腺中药物起始浓度最大, 残留量变化也最大, 这与肝胰腺是体内药物代谢的主要器官有关, 大多数药物在肝内经过生物转化而被清除。

杨先乐等(2005)认为, 一部分药物吸收后可能直接进入肝脏, 另一部分因首过效应使得流经血液的药物也被运送到肝脏中, 从而导致肝脏中的药物浓度一直处在比血浆中高的水平。蒋原等(2008)研究发现, 克氏螯虾药浴给药硝基呋喃类药物后, 其代谢物在腮组织中起始浓度最高, 其次是肝胰腺。药浴给药时, 腮组织直接接触水流, 药物吸收转化较快, 起始浓度也较高, 药物到达其他组织还存在代谢途径和时间上的差异, 所以给药方式的不同, 可能是造成中国对虾和克氏螯虾硝基呋喃代谢物起始浓度组织差异的原因。

本研究中, 9 h 时肝胰腺中 SEM 浓度达到最大, 为(1554.61±326.85) $\mu\text{g}/\text{kg}$, 达峰浓度高于其他组织, 这与呋喃西林代谢物在凡纳滨对虾体内代谢及残留结果大致相同, 但在同样的给药剂量和给药方式下, 凡纳滨对虾肝胰腺中 SEM 含量在停药后 12 h 后才达到最高峰(王明兴等, 2013), 相比之下, 中国对虾肝胰腺 SEM 浓度达峰时间提前, 出现这种现象的原因可能与养殖水温有关。温度变化 1 $^{\circ}\text{C}$, 药物代谢速度增加 10% (Ellis *et al.*, 1978), 本研究水温为(30±1) $^{\circ}\text{C}$, 而王明兴等(2013)的实验水温为(28±2) $^{\circ}\text{C}$, 水温升高, 可能导致中国对虾体内物质代谢水平提高, 药物降解速度较凡纳滨对虾快。药物在机体内的残留消除受各种因素的影响, 其中, 水温的影响尤其重要。因此, 用药及其休药期的制定需考虑水温的影响。

孙铭等(2011)研究诺氟沙星在中国对虾体内的残留及消除规律时发现, 药饵给药(30 mg/kg·bw)后, 中国对虾各组织中的消除半衰期分别为肝胰腺(32.75 h)>肌肉(31.01 h)>血淋巴(21.74 h)。方星星等(2004)研究恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在中国对虾体内的药代动力学中指出, 恩诺沙星在肝胰腺中分布较多, 在肝胰腺和肌肉中的消除半衰期分别为 52.7、19.7 h。李娜等(2008)研究指出, 米诺沙星在中国对虾肝胰腺、肌肉和血淋巴中的消除半衰期分别为 111.262、12.255 和 11.678 h。李静云等(2006)研究发现, 中国对虾药饵给药氟苯尼考后, 其肝胰腺、血淋巴和肌肉中的消除半衰期分别为 11.03、9.07 和 8.925 h。相比之下, 呋喃西林代谢物 SEM 在中国对虾肝胰腺中消除较快($t_{1/2}$ =35.28 h), 在其他组织中均比诺氟沙星、恩诺沙星、米诺沙星和氟苯尼考等药物消除慢。从本研究可以得出, 呋喃西林代谢物 SEM 在中国对虾可食组织肌肉中残留时间长, 并且短时间内不易消除, 停药

20 d 时, 肌肉、鳃、甲壳中 SEM 含量大于检测限, 血淋巴、肝胰腺中 SEM 含量已低于 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

蒋原等(2008)在研究硝基呋喃类药物在克氏螯虾组织中的消除规律发现, SEM 在克氏螯虾腮和虾肉中于 336 h 后无法检出, 肝胰腺中 168 h 后无法检出。邢丽红等(2012)研究呋喃西林在海参体内的代谢消除规律时发现, 300 d 时, SEM 含量才低于 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。刘书贵等(2013)发现, 呋喃西林药浴给药杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂), 60 d 后 SEM 在杂交鳢肌肉中低于检测限。谭志军等(2008)研究呋喃西林和呋喃唑酮代谢物在大菱鲆组织中的消除规律发现, 消除 185 d 后, 大菱鲆体内 SEM 的残留量仍高于检出限。因此, 通过本研究可以说明, 呋喃西林代谢物 SEM 在中国对虾体内消除速率比克氏螯虾慢, 但其消除速率比海参、杂交鳢和大菱鲆等快, 表明呋喃西林代谢物 SEM 在虾体内比鱼类消除较快, 表现出明显的种属差异。一般认为, 低等动物对药物的降解和排泄能力要远远弱于高等动物, 如鱼可通过肾脏和呼吸器官等进行扩散和消除, 哺乳动物以肾脏的主动运转予以消除。虾类对硝基呋喃类药物的代谢速度出现了相对较快的现象, 这可能与对虾开放式血液循环系统有关, 也可能与药物和血浆蛋白、组织结合的能力差异等有关, 还需要进一步研究。

3.3 组织中药物浓度的多峰现象

鳃、肌肉、血淋巴、甲壳等组织药-时曲线均出现药物吸收多峰的现象(图 1), 在哺乳动物中关于药物吸收多峰的现象的研究较多。水产动物体内也有一些相似报道, 氯霉素在牙鲆体内的药代动力学及残留消除规律(刘秀红等, 2003)、氯霉素在草鱼和复合四倍体异育银鲫体内的比较药代动力学(李爱华, 1998)都出现药物吸收多峰的现象。周怀梧(1989)在药物吸收多峰现象的动力学研究中, 把这种现象解释为肠-肝循环、胃肠循环、多部位吸收等, 其中, 肠-肝循环(EHC)被认为是产生吸收多峰现象最可能的一种机制。禁药氯霉素在哺乳动物体内代谢大部分是与葡糖醛酸相结合, 形成的葡糖苷酸代谢物随胆汁进入肠管, 经肠道细菌和酶水解后一部分再吸收, 另一部分被消除(李涛, 1985), 如果药物再吸收的量足够大, 则会导致血药浓度一次或再次升高, 药-时曲线则出现多峰。肠-肝循环等引起的药物再吸收会延长药物在体内的作用时间, 延缓消除, 使得药物在体内的过程变得复杂。本研究呋喃西林代谢过程中 SEM 难以消除并且药-时曲线出现多峰现象, 与药物肠-肝循环产生多峰、延缓消除机制相对照, 提示肠-肝循环是

导致呋喃西林主要代谢产物 SEM 在中国对虾体内消除缓慢和药-时曲线出现多峰现象的可能原因之一。

3.4 肝胰腺 ECOD、APND 酶活性的变化

本研究中,呋喃西林在中国对虾体内代谢消除过程中对肝胰腺 CYP450 酶 ECOD、APND 的活性表现出抑制作用($P<0.01$),之后活性开始升高,出现被诱导的情况,最后逐渐恢复至对照组水平,说明呋喃西林代谢过程中对 ECOD、APND 酶活性可能有“抑制后效应”,这可能与药物在体内的蓄积量有关,高浓度 SEM 抑制 ECOD 和 APND 的活性;SEM 降低到一定浓度,ECOD 和 APND 酶活性又开始升高。何秀婷等(2011)研究表明,诺氟沙星对阿部鲮鰈 APND 表现为低浓度诱导高浓度抑制的现象,与本结果类似。

ECOD、APND 都以 48 h 为界限,48 h 之前活性均被抑制,48 h 之后活性均被诱导,由此可以推断,ECOD 和 APND 在呋喃西林代谢过程中解毒作用机制可能相似。呋喃西林代谢物在 3 h 时对 ECOD 活性抑制作用最大,120 h 诱导程度最大;APND 活性在 6 h 时达到最大抑制水平,240 h 时诱导水平最大;呋喃西林代谢物对 APND 酶的影响需要一定时间才能达到最大程度,且 ECOD 发挥效应的时间较 APND 快,说明 ECOD 对呋喃西林代谢物的影响较为敏感。李小彦等(2010)在黄芩苷对中国对虾细胞色素 P450 酶及谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响中研究发现,中国对虾肝胰腺 ECOD 的活性先于 APND 酶活性达到最高诱导水平,说明不同 CYP450 酶的底物与药物结合可能存在竞争,药物对不同 CYP450 酶的作用效应在时间上具有选择性。李健等(2012)发现,诺氟沙星在中国对虾肝胰腺中需要一定时间才对 APND 酶表现出抑制作用,但要快于 ECOD 发挥抑制效应的时间。相对于本研究而言,造成这种差异的原因可能是诺氟沙星与呋喃西林的代谢机制不同,对先后参与代谢的肝药酶产生的影响也就不同。

CYP450 酶的活性受到药物的诱导或抑制,其中抑制作用可通过抑制蛋白的合成、降低 CYP450 含量、影响药物氧化过程中电子传递及辅酶的合成。起初,呋喃西林及其代谢产物蓄积量较多,抑制了 ECOD、APND 的活性,使得酶活性降低,酶活性的降低反过来减弱了药物代谢消除速率,导致药物残留量蓄积;随着时间延长,药物对酶的抑制作用减弱,ECOD、APND 酶含量增加,活性增大,药物代谢消除加速,体内 SEM 合成中断,残留量逐渐减小。由此可见,在一定范围内,中国对虾肝胰腺中 ECOD、APND 活性随 SEM 浓度增大其活性降低,SEM 浓度降低到一

定程度时则出现诱导现象,呋喃西林及其代谢产物 SEM 的代谢消除和 ECOD、APND 酶活性之间存在反向动态平衡即此消彼长的现象。

3.5 药物对 CYP450 酶活性的影响

CYP450 酶诱导可以改变药物在机体内的生物转化速率,使得药物的作用降低或代谢物活性化使其毒性增加;酶抑制则增加药物的浓度,延长药物对机体的作用时间,药物引起的毒性反应发生率也随之增加。药物代谢酶 ECOD 和 APND 可能会使呋喃西林某些基因在体内的代谢特征发生改变,对药物的消除和毒性产生影响,导致药物在体内不易消除。CYP450 酶以肝微粒体中含量最高(宋振玉等,1994),如脊椎动物肝脏中 CYP450 酶含量分布较多(Arukwe, 2002; Oniz-Delgado *et al*, 2002)。李国昌等(2004)在细胞色素 P450 酶系与药物的代谢中提到肝脏中 CYP450 酶活性决定药物的代谢速率,与药物的清除率有直接关系。所以在药物体内消除过程的研究中,药物代谢酶对其产生的作用不容忽视。

一些环境污染物如有机化合物和农药等对鱼类 CYP1A 有一定的诱导作用。药物对 CYP450 影响的研究多有报道,如氟苯尼考对鲫 CYP2E1 活性有显著的抑制作用(陈大健等,2007),诺氟沙星对中国对虾鳃和血清 APND、ECOD 活性均具有抑制作用(张喆等,2012),喹诺酮类药物对牙鲆肝 APND 活性也有显著的抑制作用(韩华等,2009),恩诺沙星在草鱼体内外显著抑制 CYP2E1 活性(王翔凌等,2008)。药物对动物体内 CYP450 酶或抑制或诱导,其影响不尽相同,多数表现为抑制作用。本研究结果表明,呋喃西林的代谢影响对虾体内 APND、ECOD 酶的活性,推测 ECOD、APND 参与呋喃西林在中国对虾体内的代谢反应,所以在研究该类药物的代谢消除过程中,应该考虑到药物代谢酶对其产生的影响,这些结果为鉴定呋喃西林代谢酶提供了资料。

4 结论

本研究结果表明,中国对虾肝胰腺对呋喃西林代谢物 SEM 富集能力强,消除能力也较强,表现出较快的消除速率;SEM 在可食肌肉组织中消除缓慢,长时间保持残留,停药 20 d 时肌肉中含量仍高于检测限;SEM 对药物代谢酶 ECOD、APND 均表现高浓度抑制、低浓度诱导的现象,且 ECOD 对 SEM 影响发挥效应的时间较 APND 快,表明 ECOD、APND 参与 SEM 的代谢消除,并在时间上具有一定的选择性。

参 考 文 献

- 于慧娟, 李冰, 蔡友琼, 等. 液相色谱-串联质谱法测定甲壳类水产品中氨基脲的含量. 化学分析, 2012, 40(10): 1530-1535
- 王明兴, 吴晓萍, 廖艳, 等. 呋喃西林代谢物在凡纳滨对虾体内代谢及残留. 食品与机械, 2013, 29(1): 76-80
- 王翔凌, 杨先乐, 张宁, 等. 草鱼肝细胞中 CYP2E1 活性的诱导研究. 水生生物学报, 2008, 32(4): 469-474
- 方星星, 王群, 李健. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在中国对虾体内的药代动力学. 水产学报, 2004, 28(B12): 35-41
- 邢丽红, 李兆新, 王英姿. 呋喃西林在海参体内的代谢消除规律研究. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(4): 44-49
- 刘书贵, 吴仕辉, 郑光明, 等. 呋喃西林代谢物在杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)体内的残留消除规律研究. 华南农业大学学报, 2013, 34(2): 248-253
- 刘秀红, 王群, 李健. 氯霉素在牙鲆体内的药代动力学及残留消除规律研究. 集美大学学报(自然科学版), 2003, 8(4): 305-310
- 孙铭, 李健, 张喆, 等. 诺氟沙星两种不同给药方式在中国对虾体内的残留及消除规律. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(5): 43-48
- 李小彦, 李健, 张喆, 等. 黄芩苷对中国对虾细胞色素 P450 酶及谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(3): 49-53
- 李国昌, 陈卫军, 蒲宇红. 细胞色素 P450 酶系与药物的代谢. 农垦医学, 2004, 26(1): 26-29
- 李娜, 李健, 王群. 米诺沙星在中国对虾体内的代谢动力学及在养殖系统中的消除. 安徽农业科学, 2008, 36(24): 10480-10483
- 李健, 梁俊平, 李小彦, 等. 黄芩苷在中国对虾体内对诺氟沙星消除及细胞色素 P450 酶的影响. 海洋科学, 2012, 36(3): 81-88
- 李爱华. 氯霉素在草鱼和复合四倍体异育银鲫体内的比较药代动力学. 中国兽医学报, 1998, 18(4): 372-374
- 李涛. 兽医药物动力学. 哈尔滨: 东北农学院出版社, 1985, 22, 29
- 李静云, 李健, 王群, 等. 氟苯尼考 3 种不同给药方式在中国明对虾体内的药代动力学研究. 海洋科学, 2006, 30(7): 64-68
- 杨先乐, 湛嘉, 康继韬. 氯霉素在罗非鱼体内的代谢和消除规律. 水生生物学报, 2005, 29(3): 266-271
- 何秀婷, 程章, 聂湘平, 等. 诺氟沙星对阿部鳊鰕鳃 I 相、II 相酶活性及 CYP1A 和 P-gp mRNA 表达影响. 环境科学学报, 2011, 31(4): 846-853
- 沈钧, 徐佩佩, 金锡鹏. 肝脏中细胞色素 P450 测定方法的改进. 工业卫生与职业病, 1997, 23(4): 236-238
- 宋振玉, 刘耕陶. 代药理学. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994, 74
- 张喆, 李健, 陈萍, 等. 诺氟沙星对中国明对虾鳃和血清 ECOD、APND 和 GST 活性的影响. 中国水产科学, 2012, 19(3): 514-520
- 陈大健, 王加才, 张萍, 等. 氟苯尼考对鲫鱼 CYP2E1 活性影响的药代动力学评价. 中国兽医科学, 2007, 37(3): 269-273
- 周怀梧. 药物吸收多峰现象的动力学研究. 现代应用药学, 1989, 6(2): 37-40
- 蒋原, 丁涛, 徐锦忠, 等. 硝基呋喃类药物在克氏螯虾组织中消除规律的研究. 畜牧与兽医, 2008, 40(2): 34-37
- 韩华, 李健, 李吉涛, 等. 喹诺酮类药物对牙鲆肝药物代谢酶活性的影响. 海洋科学, 2009, 33(11): 48-54
- 谭志军, 翟毓秀, 冷凯良, 等. 呋喃西林和呋喃唑酮代谢物在大菱鲆组织中的消除规律. 中山大学学报(自然科学版), 2008, 47(Z1): 63-69
- 樊新华, 郑浩, 钱伟, 等. 呋喃西林代谢物氨基脲在中华绒螯蟹体内的衰减研究. 江苏农业科学, 2010(6): 368-370
- Arukwe A. Complementary DNA cloning sequence analysis and differential organ expression of beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P4501A in Atlantic salmon (*Salmon salar*). Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol, 2002, 133(4): 613-624
- Barbosa J, Moura S. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode-array detection and liquid chromatography ion spray tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta, 2007, 586(1-2): 359-365
- Bock C, Gowik P, Stachel C. Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurans metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS. J Chromatogr B, 2007, 856(1/2): 178-189
- Ellis AE, Roberts RJ, Tytler P. The anatomy and physiology of teleost. In: Roberts RJ(Ed). Fish Physiol. Balliere Tindall, London, 1978
- Ingelman SM. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(4): 193-200
- Moutou KA, Burke MD, Houlihan DF. Hepatic P450 monooxygenase response in rainbow trout administered aquaculture antibiotics. Fish Physiol Biochem, 1998, 18(1): 97-106
- Oberdorster E, Brouwer M, Hoexum-Brouwer T, et al. Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. Environ Health Persp, 2000, 108(7): 641-646
- Oniz-Delgado JB, Sarasquete C, Behrens A, et al. Expression, cellular distribution and induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in gilt head sea bream *Spanls aurata* brain. Aquat Toxicol, 2002, 60(3-4): 269-283
- Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Mol Pharmacol, 1967, 3(2): 113-123
- van Kotten-Vermeulen JEM, Wouters MFA, van Leeuwen FXR. Report of the 40th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). Geneva: World health Organization, 1993, 85
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. Genome Biol, 2000, 1(6): 1-9

The Elimination Rules of Nitrofurazone Metabolites and Its Effects on Activities of Metabolic Enzymes in *Fenneropenaeus chinensis*

LI Dongli^{1,2}, LI Jian^{2①}, CHANG Zhiqiang², SUN Ming², WANG Ying², GE Hongxing²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract In this study we explored the elimination rules of semicarbazide (SEM) and its effect on the activities of hepatopancreas enzymes in *Fenneropenaeus chinensis*. Experimental shrimps were fed with a diet supplemented with nitrofurazone for five days before they were randomly selected from the tank and sampled in different days after the last oral administration. The concentrations of SEM in the hemolymph, hepatopancreas, gill, muscle and carapace were measured with LC-MS/MS, and the activities of ethoxycoumarin *o*-deethylase (ECOD) and aminopyrine N-demethylase (APND) in the hepatopancreas were examined with UV spectrophotometry and fluorospectrophotometry. The results showed that 1 h post treatment, the mean concentrations of SEM in the shrimp tissues were in the order of hepatopancreas>gill>carapace>muscle>plasma. At the end of the 20th day post treatment, SEM was still detectable in all tissues and the order of the concentration was muscle>gill>carapace>plasma>hepatopancreas. The half life of the elimination phase in the muscle, carapace, gill, plasma and hepatopancreas was 5.89 d, 4.66 d, 2.95 d, 2.70 d and 1.47 d respectively. Our results indicated that the elimination of SEM was the fastest in the hepatopancreas and the slowest in the muscle, and that SEM remained in the body of *F. chinensis* for long. Compared to the control, the activities of ECOD and APND in the experimental group were first reduced, followed by an increase, and finally returned to the normal levels. The activity of ECOD in the experimental group was significantly lower than the control 1 h post treatment ($P<0.05$), and the statistical significance was even greater than 3 h post treatment ($P<0.01$). Afterward the activity was enhanced and became significantly higher than the control at 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, and 240 h ($P<0.01$) post treatment. The activity of APND was significantly lower than the control at 6 h and 9 h ($P<0.01$) but obviously higher at 96 h ($P<0.05$) and 240 h ($P<0.01$), and the final level was lower than the control at 480 h. These data suggested that SEM was eliminated slowly in *F. chinensis* and had an impact on the activities of ECOD and APND. Moreover, ECOD and APND may be involved in the metabolism of nitrofurazone.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; Nitrofurazone; Semicarbazide; Elimination rules; CYP450s

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

海星棘皮投喂仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)的效果*



吴志宏 孙元芹 刘天红 李 晓 李红艳 王 颖^①

(山东省海洋生物研究院 青岛 266002)

摘要 在饲料中添加海星棘皮,与两组商品饲料分别投喂体重为 5.0–6.7 g 的仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka),进行 60 d 养殖试验,研究其对仿刺参平均增重率(AWGR)、特定生长率(SGR)、饲料系数(FCR)、摄食率(FR)和蛋白表观消化率(APD)的影响。结果显示,各组仿刺参生长良好,成活率无显著差异($P>0.05$);60 d 时,各组仿刺参的 AWGR 和 SGR 变化趋势相同,由高到低依次为市售 2 组、海星组、市售 1 组;海星饲料组仿刺参的 FCR 最低,与其他两组间差异不显著($P>0.05$);海星饲料组与市售 1 组的 FR 间差异不显著($P>0.05$),与市售 2 组 FR 间有显著差异($P<0.05$);海星饲料组仿刺参的饲料转化率(FE)明显高于其他两组($P<0.05$);海星饲料组仿刺参的 APD 最高,为 67.28%,与市售 1 组的 APD 差异显著($P<0.05$)。研究表明,添加海星棘皮可以较好地促进仿刺参的生长和提高饲料的利用,可添加到仿刺参幼参饲料中用作饲料源。

关键词 仿刺参;海星棘皮;生长

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2015)05-0095-07

海星 (*Asterias amurensis*) 属棘皮动物门 (Echinodermata)、海星纲 (Asterozoa), 为海洋底栖大型无脊椎动物, 是我国黄海沿岸一种极为普遍的海洋生物资源。海星体内富含蛋白质和脂肪, 氨基酸种类齐全, 棘皮中蛋白质含量为 29.49%, 脂肪含量为 1.54%, 氨基酸种类齐全, 牛磺酸含量较高, 且含有 Ca、Mg 等无机常量元素和丰富的 Zn、Fe、Cu、Mn 等微量元素 (徐均望等, 1995)。不仅富有营养、鲜香可食, 且具有补肾、壮阳、抗衰老、抗脂质硬化等生理功能 (王吉桥等, 2008), 具有较高的食用和药用价值。由于海星喜食牡蛎、文蛤、鲍、贻贝等软体动物, 被视为贝类养殖业的敌害, 同时海星的繁殖能力和再生能力强, 渔民捕捞作业时往往将海星捡出并弃入海中而未加以利用。若有效地进行开发利用, 既能变害为利、变废为宝, 又能保护贝类资源, 还能带来良好的经济效益 (郭文场等, 2013)。

仿刺参 (*Apostichopus japonicus* Selenka) 属于棘皮动物门, 为底栖碎屑食性生物, 其对营养的需求比其他水生动物低。近年来, 对于仿刺参的研究主要集中于仿刺参的养殖技术和饲料的配制。在仿刺参养成阶段, 主要使用大型海藻和人工配合饲料。大型海藻主要为鼠尾藻、马尾藻、石莼等, 由于这些海藻的大量开发及海区污染等因素, 使其天然资源日渐匮乏。目前在实际生产中, 主要使用海藻粉搭配一定比例的海泥作为基础饲料, 有的添加鱼粉、虾粉、淀粉、玉米面、豆饼、酵母等 (常忠岳等, 2003; 杨娟等, 2004; 王吉桥等, 2007)。此外, 根据其他水产动物的营养需求, 配制出多种刺参的人工饲料, 但出现效果良莠不齐、缺乏行业规范与管理、原料受制约等问题, 严重阻碍了刺参养殖业的发展。刺参饲料的开发越来越引起人们的重视, 开发营养丰富和低成本的新型饲料原料更是当务之急。

* 山东省科技攻关项目 (2012GHY11516) 和海洋公益性行业科研专项经费项目 (201205027-3) 共同资助。吴志宏, E-mail: wuzhihong@aliyun.com

① 通讯作者: 王 颖, 研究员, E-mail: food-rc@sina.com

收稿日期: 2014-09-17, 收修改稿日期: 2015-01-12

本实验旨在研究海星棘皮作为仿刺参饲料新来源的可行性与投喂效果,为开发新的刺参人工配合饲料的配料成分提供理论依据,进一步开发海星的饲料应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用仿刺参购于山东省即墨市鳌山卫育苗场,选取健康无病、体长为 3.9–5.5 cm、体重为 5.0–6.7 g 的幼参;海星采自山东省青岛市栈桥附近海域,采集后低温烘干并脱毒处理,将海星棘皮粉碎后过 200 目筛,制成干粉备用;海泥取自山东省即墨市鳌山卫镇附近海域表层浮泥,在 65℃ 下烘干,并过 40 目筛,低温保存备用;实验用海星饲料以浒苔、马尾藻、鱼粉为主要原料,添加 20% 海星棘皮干粉和海泥所配成,另选择两种市售商品饲料,饲料配方及营养成分如表 1 所示。

1.2 实验方法

本实验设 3 个处理组,每个处理组设 3 个重复,每个重复放养 20 头仿刺参,各实验组情况如表 1 所示。将仿刺参放入 70 L 聚乙烯养殖水箱中暂养 5 d,

期间不投喂饲料,待仿刺参体内残饵排空后,进行随机分组。饲养时间为 60 d。每天按各实验组仿刺参体重的 3% 进行投喂,早晚各投喂 1 次(09:00 和 17:00),每天早晨吸出水箱底部的残饵和粪便,视水质和残饵情况更换 1/3–1/2 的海水,每隔 10 d 彻底清洗仿刺参养殖水箱,并更换全部海水。实验期间水温控制在 (18.6±2.8)℃,盐度为 30–31,溶解氧 ≥ 6 mg/L, pH 为 8.2–8.4。

1.3 指标测定

每隔 10 d 更换全部海水时,对各组仿刺参称重,用捞网沥净水分,每组的沥水时间一致,以减少误差,用精密度为 0.01 g 的天平称重。

平均增重率 $AWGR(\%) = 100 \times (W_t/N_t - W_0/N_0) / (W_0/N_0)$

特定生长率 $SGR(\%/d) = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$

饲料系数 $FCR = C / (W_t - W_0)$

摄食率 $FR(g/g \cdot d) = 100 \times C / [t(W_t + W_0)/2]$

饲料转化率 $FE(\%) = 100(W_t - W_0) / C$

蛋白表观消化率 $APD(\%) = 1 - (F/D \times f)$

式中, W_0 为初始刺参总重; W_t 为 t 天时刺参总重; N_0 为初始刺参总头数; N_t 为 t 天时刺参总头数; C 为总饲料干重, t 为实验时间; F 为粪便中蛋白质百分含量; D 为饲料中蛋白质百分含量; f 为水产饲

表 1 实验饲料配方及营养成分

Tab.1 The ingredient and proximate composition of experimental diets

	海星饲料组 <i>Asterias echino-skin feed</i>	市售饲料 1 组 Commercial feed 1	市售饲料 2 组 Commercial feed 2
仿刺参总重 Total body weight(g/ind.)	130.5/20 137.3/20 125.2/20	128.0/20 125.6/20 120.8/20	104.4/20 102.6/20 97.8/20
饲料组成 Ingredients	海星 <i>A. japonicus</i> (20%)、浒苔粉 <i>E. prolifera</i> meal、马尾藻粉 <i>Sargassum</i> meal、鱼粉 Fish meal、多肽 Peptide、天然酵母 Natural yeast、复合维生素 Vitamin premix、复合矿物质 Mineral premix	天然海藻粉 Natural seaweed meal、生态活菌酶 Ecological living bacterium enzymes、鱼粉 Fish meal、微量元素 Trace elements、维生素 Vitamin、螺旋藻粉 <i>Spirulina</i> meal	天然活性物质 Natural active substance、天然褐藻粉 Natural <i>phaeophyta</i> meal、红藻粉 Floridean meal、绿藻粉 <i>Chlorophyta</i> meal、复合维生素 Vitamin premix、鱼粉 Fish meal
营养成分 Nutrient composition(%)			
粗蛋白 Crude protein	22.70	18.10	23.30
粗脂肪 Crude fat	2.50	2.20	2.30
粗纤维 Crude fiber	3.80	3.10	3.10
钙 Calcium	5.29	6.66	9.77
总磷 Total phosphorus	0.21	0.54	0.15
水分 Moisture	7.30	7.70	6.50
粗灰分 Crude ash	25.50	48.00	35.40
赖氨酸 Lys	0.70	0.49	0.49

料蛋白质消化系数。

1.4 数据处理

实验数据经 Excel 2007 初步整理后, 采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 时, 采用 Tukey 检验进行多重比较, 数据表示为平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)。

2 结果

2.1 对仿刺参体重和成活率的影响

由图 1 可以看出, 0–60 d, 投喂 3 组饲料的仿刺参长势较好。投喂添加海星棘皮饲料组刺参, 20 d 时体重为(183.85 \pm 7.79) g, 40 d 时体重为(211.18 \pm 8.42) g, 在 60 d 时, 添加海星棘皮饲料组刺参体重达到最大值, 为 262.13 g, 实验期间体重始终大于投喂市售饲料 1 组和饲料 2 组的刺参。在 50 d 和 60 d 时, 海星棘皮饲料组刺参与市售饲料 2 组刺参体重间有显著差异($P < 0.05$), 与市售饲料 1 组刺参体重间差异不显著($P > 0.05$)。

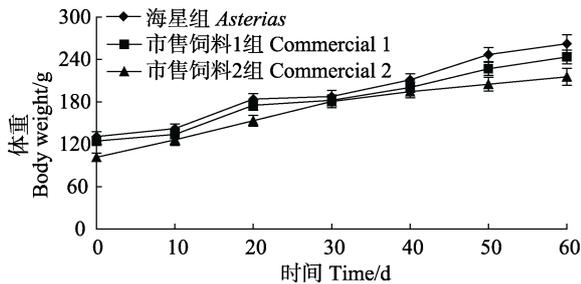


图 1 投喂不同饲料下仿刺参体重的变化

Fig.1 Body weight variations of *A. japonicus* fed with different feeds (Mean \pm SD)

由图 2 可知, 在相同环境条件下, 经过 30 d 投喂, 3 种不同饲料下仿刺参的成活率均为 100%, 在 40 d 时, 投喂市售 2 组饲料的仿刺参成活率为 95%。

2.2 对仿刺参 AWGR 和 SGR 的影响

由图 3 可以看出, 随着投喂时间的增长, 三组仿刺参的 AWGR 也逐渐增大。在 10–40 d, 投喂市售饲料 2 组仿刺参的 AWGR 显著高于添加海星棘皮饲料组和市售饲料 1 组($P < 0.05$)。在实验投喂期间, 添加海星棘皮饲料组与市售饲料 1 组仿刺参的 AWGR 差异不显著($P > 0.05$)。50–60 d, 添加海星棘皮饲料组仿刺参的 AWGR 高于市售饲料 1 组, 但仍低于市售饲料 2 组仿刺参的 AWGR。

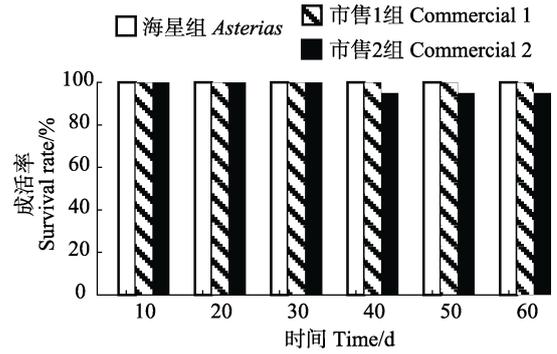


图 2 不同饲料对仿刺参成活率的影响

Fig.2 The survival rate of *A. japonicus* fed with different feeds

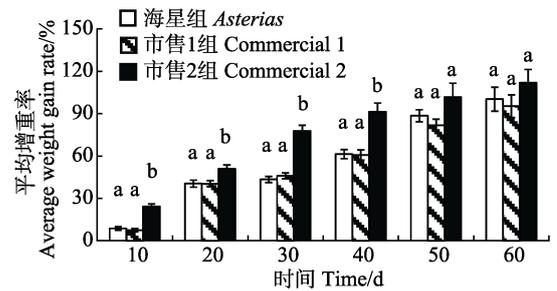


图 3 不同饲料对仿刺参平均增重率的影响

Fig.3 The average weight gain rate of *A. japonicus* fed with different feeds

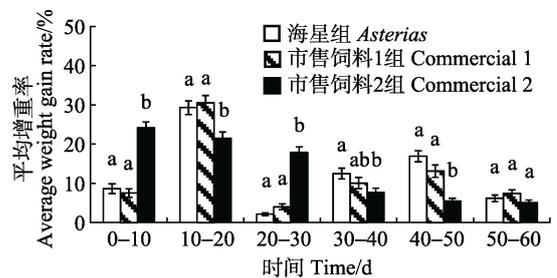


图 4 不同时间段和不同饲料对仿刺参平均增重率的影响

Fig.4 The average weight gain rate of *A. japonicus* fed with different feeds during different periods

由图 4 可以看出, 0–10 d, 添加海星棘皮饲料组仿刺参的 AWGR 显著低于市售饲料 2 组($P < 0.05$), 略高于市售饲料 1 组($P > 0.05$); 10–20 d 各组仿刺参的 AWGR 达到最大值, 分别为 29.29%、30.54%、21.47%, 海星棘皮饲料组仿刺参的 AWGR 略低于市售饲料 1 组($P > 0.05$), 与市售饲料 2 组仿刺参 AWGR 差异显著($P < 0.05$); 20–30 d, 海星棘皮饲料组的仿刺参 AWGR 显著低于市售饲料 1 组和市售饲料 2 组($P < 0.05$); 30–50 d 海星棘皮饲料组的仿刺参 AWGR 均高于市售饲料 1 组和市售饲料 2 组, 与市售饲料 2 组间差异显著($P < 0.05$); 50–60 d, 海星棘皮饲料组的仿刺参 AWGR 与市售饲料 1 组和市售饲料 2 组差异不显著($P > 0.05$)。

不同饲料对仿刺参体重和 SGR 的影响见表 2。投

喂实验进行 60 d 后,各实验组仿刺参的体重均得到了增长,实验结束时,平均体重均显著大于初始平均体重($P<0.05$);各实验组仿刺参 *AWGR* 大小依次为:市售饲料 2 组>海星组>市售饲料 1 组;不同饲料对仿刺参的 *SGR* 大小依次为:市售饲料 2 组>海星组>市售饲料 1 组。

由表 3 可以看出,0–10 d 投喂海星棘皮饲料组的仿刺参 *SGR* 低于市售饲料 2 组($P<0.05$),高于市售饲料 1 组;而在 10–20 d 时间段,添加海星棘皮饲料组 *SGR* 略低于市售饲料 1 组($P>0.05$),高于市售饲料 2 组($P<0.05$);20–30 d,添加海星棘皮饲料组 *SGR* 较低,明显低于其他两组($P<0.05$);30–40 d、40–50 d 添加海星棘皮饲料组的仿刺参 *SGR* 高于其他两组;50–60 d 添加海星棘皮饲料组仿刺参 *SGR* 低于市售饲料 1 组($P>0.05$),高于市售饲料 2 组($P<0.05$)。

2.3 对 *FCR*、*FR*、*FE* 和 *APD* 的影响

从表 4 可以看出,投喂添加海星棘皮饲料组的

FCR 最低,为 0.99,其次为市售饲料 1 组,最大为市售饲料 2 组,但三组间 *FCR* 差异不显著($P>0.05$)。各饲料组间,投喂海星棘皮饲料组与市售饲料 1 组的 *FR* 间差异不显著($P>0.05$),低于市售饲料 2 组的 *FR*($P<0.05$)。仿刺参对 3 种饲料的 *FE* 由高到低依次为:海星棘皮饲料组>市售饲料 1 组>市售饲料 2 组,海星棘皮饲料组的 *FE* 显著高于其他两组($P<0.05$)。从 *APD* 来看,投喂海星棘皮饲料组仿刺参的 *APD* 最高为 67.28%,与市售饲料 1 组的 *APD* 差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 海星棘皮营养成分与仿刺参营养需求的分析

蛋白质是构成动物体的主要物质,是维持生物体正常生命活动所必需的营养物质,同时也是能量的来源。因此,饲料中蛋白质的含量,对动物的生长发育起着极其重要的作用,可影响动物的摄食、生长、营养

表 2 不同饲料对仿刺参体重和特定生长率的影响

Tab.2 The initial and final body weight and specific growth rate of *A. japonicus* treated with three diets (Mean±SD)

指标 Index	海星棘皮饲料组 <i>Asterias echino-skin</i> feed	市售饲料 1 组 Commercial feed 1	市售饲料 2 组 Commercial feed 2
初始平均重量 Initial average body weight(g)	6.55±0.15	6.24±0.12	5.08±0.07
结束平均重量 Final average body weight(g)	13.11±0.82 ^a	12.18±0.74 ^a	10.77±0.52 ^b
平均增重率 <i>AWGR</i> (%)	100.25±16.55 ^a	95.32±7.84 ^a	111.91±11.26 ^a
特定生长率 <i>SGR</i> (%)	1.16±0.17 ^a	1.12±0.11 ^a	1.25±0.12 ^a

注:同一指标数据的上标小写英文字母不同表示相互之间存在显著差异($P<0.05$)

Note: Values in the same line with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$)

表 3 不同时间段和不同饲料对仿刺参特定生长率的影响

Tab.3 The specific growth rate of *A. japonicus* fed with different feeds during different periods

时间 Time (d)	海星棘皮饲料组 <i>Asterias echino-skin</i> feed	市售饲料 1 组 Commercial feed 1	市售饲料 2 组 Commercial feed 2
0–10	0.83±0.04 ^a	0.73±0.03 ^a	2.16±0.18 ^b
10–20	2.57±0.13 ^a	2.66±0.11 ^a	1.95±0.12 ^b
0–20	1.70±0.09 ^a	1.70±0.10 ^a	2.05±0.11 ^b
20–30	0.21±0.01 ^a	0.39±0.04 ^b	1.64±0.09 ^c
0–30	1.20±0.05 ^a	1.26±0.06 ^a	1.92±0.08 ^b
30–40	1.18±0.10 ^a	0.96±0.08 ^{ab}	0.74±0.03 ^b
0–40	1.20±0.08 ^a	1.19±0.09 ^a	1.62±0.07 ^b
40–50	1.56±0.03 ^a	1.23±0.08 ^b	0.53±0.06 ^c
0–50	1.27±0.14 ^a	1.20±0.03 ^a	1.40±0.17 ^a
50–60	0.60±0.02 ^a	0.72±0.01 ^a	0.49±0.03 ^b
0–60	1.16±0.14 ^a	1.12±0.09 ^a	1.25±0.12 ^a

注:同一指标数据的上标小写英文字母不同表示相互之间存在显著差异($P<0.05$)

Note: Values in the same line with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$)

表 4 不同饲料对饲料系数、摄食率、饲料转化率和蛋白表观消化率的影响

Tab.4 Feed conversion ratio, feeding rate, feed efficiency and apparent protein digestibility of *A. japonicus* fed with different feeds

指标 Index	海星饲料组 <i>Asterias echino-skin</i> feed	市售饲料 1 组 Commercial feed 1	市售饲料 2 组 Commercial feed 2
饲料系数 <i>FCR</i>	0.99±0.08 ^a	1.08±0.10 ^a	1.19±0.11 ^a
摄食率 <i>FR</i> (g/g·d)	0.080±0.003 ^a	0.085±0.004 ^a	0.102±0.005 ^b
饲料转化率 <i>FE</i> (%)	15.36±0.41 ^a	13.83±0.64 ^b	12.93±0.55 ^b
蛋白表观消化率 <i>APD</i> (%)	67.28±4.56 ^a	58.42±3.25 ^b	62.92±4.12 ^{ab}

注: 同一指标数据的上标小写英文字母不同表示相互之间存在显著差异($P<0.05$)

Note: Values in the same line with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$)

物质的消化与吸收等多种生理活动(李旭, 2013)¹⁾。宋志东等(2009)研究表明, 刺参从幼体发育到成体的过程中, 不断摄食藻类导致体内蛋白质含量增加, 饲料蛋白含量已是影响刺参生长的关键因素。

冯丹等(2014)研究表明, 刺参在投喂蛋白含量为 23%的饲料时, 表现出最大 *SGR*。由刺参的生长、食物贡献率和消化酶活力综合分析可知, 蛋白含量为 18%–23%时, 利于刺参生长。吴永恒等(2012)研究表明, 刺参在饲料粗蛋白含量为 16%时, 即达到最大的生长速度; 在饲料粗蛋白含量为 16%–24%时, 其 *FCR* 最低, 蛋白质效率最高。Sun 等(2004)认为, 刺参摄食蛋白含量为 21.5%饲料时, 获得最大的 *SGR*, 显著优于其他不同蛋白水平饲料组的生长效果。同样, 朱伟等(2005)研究发现, 刺参在摄食粗蛋白水平为 18.21%–24.18%和粗脂肪水平为 5%的饲料时, 获得最大生长率和最低脏壁比。王际英等(2009)研究发现, 当饲料脂肪水平为 3%时, 刺参稚参、幼参、成参对蛋白的需求量不同, 分别达到 28.79%、32.30%和 35.49%, 远高于上述研究, 其原因可能与脂肪含量有关。本研究中, 海星棘皮中蛋白含量为 29.49%, 添加 20%海星棘皮干粉的饲料中蛋白含量为 22.70%时, 对仿刺参进行投喂, 仿刺参长势较好, 体重始终大于投喂市售饲料 1 组和市售饲料 2 组的仿刺参; 在 50 d 和 60 d 时, 明显高于市售饲料 2 组刺参体重, 说明添加海星棘皮蛋白质和脂肪含量均达到仿刺参的营养需求范围。同时, Sun 等(2004)发现, 苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸等在刺参的生长中起着极为重要的作用, 刺参在摄食这些氨基酸较高的饲料后体重增长较快。海星所含氨基酸组成中的天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、亮氨酸、精氨酸含量较高, 种类齐全, 因此对刺参的生长具有积极的作用, 应该也是添加海星棘皮饲料组刺参的

SGR 较高的原因。同时, 添加海星棘皮饲料组仿刺参的 *FCR* 最低, *FE* 和 *APD* 高于市售饲料 1 组和市售饲料 2 组, 说明海星棘皮干粉中所含蛋白质适宜仿刺参对蛋白的吸收, 可作为动物性蛋白源添加到仿刺参饲料中。仿刺参平均增长率的最大值出现在蛋白含量最高的市售饲料 2 组, 其原因可能是市售饲料 2 组饲料中蛋白质含量最高。

水产动物配合饲料中脂类的营养作用仅次于蛋白质, 饲料脂肪水平过高或不足均会对其生长造成不良影响。Seo 等(2011)研究发现, 刺参生长所需的最佳饲料脂肪含量为 2%。朱伟等(2005)的研究表明, 适宜的粗脂肪水平为 5%, 低于王吉桥等(2009)的研究结果(5.35%–7.05%)。从饲料研究的角度考虑, 刺参配合饲料中需要的脂肪含量不高, 但从刺参棘皮脂肪酸的比例来看, 其对不饱和脂肪酸的含量要求较高(王际英等, 2009; 李丹彤等, 2006)。本研究中, 海星棘皮干粉中脂肪含量为 1.54%, 多不饱和脂肪酸占脂肪酸总量的 50.00%。其中, 高不饱和脂肪酸 EPA、DHA 的含量也较高, 具有非常高的营养价值, 添加 20%海星棘皮干粉的饲料中脂肪含量为 2.50%, 达到了 Seo 等(2011)对刺参脂肪研究的需求量。

3.2 海星棘皮作为仿刺参饲料添加成分的应用价值

海星棘皮作为水产养殖饲料源对鲍鱼、牙鲆的投喂研究表明, 将脱毒处理后的海星棘皮烘干粉碎成粉末掺入鲍鱼和牙鲆饲料中, 可显著提高其生长率、增重率及成活率(徐均望等, 1999、2002)。本研究将海星棘皮干粉添加到仿刺参幼参饲料中, 结果显示, 在 0–40 d, 投喂添加海星饲料组刺参的 *AWGR* 与市售饲料 1 组差异不明显, 40 d 后投喂海星饲料组刺参的 *AWGR* 高于市售饲料 1 组, 说明刺参在逐步适应添加海星饲料后, 对刺参促生长效果明显。实验 60 d 后,

1) 李旭. 刺参幼参饲料原料选择与蛋白质营养需求的研究. 扬州大学硕士研究生学位论文, 2013

各实验组刺参 *AWGR* 大小依次为：市售饲料 2 组>海星组>市售饲料 1 组；不同饲料对刺参的 *SGR* 大小依次为：市售饲料 2 组>海星组>市售饲料 1 组。*FE* 是反应动物所摄食饲料中用于增重的部分，*FE* 越高，说明该饲料营养用于生长的比例越高，使用效果也就越好。本研究表明，海星饲料组的 *FE* 高于市售饲料 1 组和市售饲料 2 组，说明该饲料中的营养物质应用于刺参生长的比例最大。

海星棘皮中蛋白质和脂肪含量丰富，氨基酸含量均衡，多不饱和脂肪酸占脂肪酸含量的比例高，还含有多种维生素及必需微量元素。As、Cd、Pb、Cu、Hg 等重金属的生物质量指数均符合环境质量评价标准，是一种营养丰富、安全的饲料源；添加海星棘皮饲料用于仿刺参幼参养殖试验，使幼参体重得到显著增加，喂养 60 d 后效果优于市售饲料 1 组，具有较好的促仿刺参生长作用。因此，海星棘皮可以添加到幼参饲料中用作饲料原料。

参 考 文 献

- 王吉桥, 赵丽娟, 苏久旺, 等. 饲料中脂肪及乳化剂含量对仿刺参幼参生长和体组分的影响. 大连水产学院学报, 2009, 24(1): 17-23
- 王吉桥, 隋晓楠, 顾公明, 等. 不同饲料搭配及投喂量对仿刺参稚、幼参生长和成活的影响. 水产科学, 2008, 27(2): 55-58
- 王吉桥, 蒋湘辉, 赵丽娟, 等. 不同饲料蛋白源对仿刺参幼参生长的影响. 饲料博览(技术版), 2007(17): 9-13
- 王际英, 宋志东, 王世信, 等. 刺参不同发育阶段对蛋白质需求量的研究. 水产科技情报, 2009, 36(5): 229-232
- 王际英, 宋志东, 王世信, 等. 刺参体壁的营养成分分析. 中国水产, 2009(5): 60-61
- 冯丹, 高勤峰, 董双林. 不同蛋白水平饲料对刺参生长和消化酶活性的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(2): 35-40
- 朱伟, 麦康森, 张百刚, 等. 刺参稚参对蛋白质和脂肪需求量的初步研究. 海洋科学, 2005, 29(3): 53-58
- 李丹彤, 常亚青, 陈炜, 等. 獐子岛野生刺参体壁营养成分的分析. 大连水产学院学报, 2006, 21(3): 278-282
- 李红艳, 李晓, 孙元芹, 等. 多棘海盘车营养成分分析及评价. 食品科学, 2014, 35(21): 207-211
- 杨娟, 于凯先, 郭相平, 等. 刺参池塘养殖技术. 齐鲁渔业, 2004, 21(11): 6-9
- 吴永恒, 王秋月, 冯政夫, 等. 饲料粗蛋白含量对刺参消化酶及消化道结构的影响. 海洋科学, 2012, 36(1): 36-41
- 宋志东, 王际英, 王世信, 等. 不同生长发育阶段刺参体壁营养成分及氨基酸组成比较分析. 水产科技情报, 2009, 36(1): 11-13
- 徐均望, 张天民, 郭占明, 等. 海星综合利用的研究. 齐鲁渔业, 1995, 12(1): 38-41
- 徐均望, 周少燕, 张天民, 等. 用海星棘皮作养鲍饵料添加成分的研究. 大连水产学院学报, 1999, 14(4): 24-28
- 徐均望, 路璧和, 宋志乐, 等. 海星棘皮用作饵料添加成分养牙鲆的研究. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2002, 15(3): 211-215
- 郭文场, 丁向清, 刘佳贺, 等. 中国海星资源的种类、分类与综合利用. 特种经济动植物, 2013(12): 9-13
- 常忠岳, 衣吉龙, 慕康庆. 影响刺参生长及成活的因素. 河北渔业, 2003, 128(2): 32-36
- Seo JY, Lee SM. Optimum dietary protein and lipid levels for growth of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Aquacult Nutr, 2011, 17(2): 56-61
- Sun HL, Liang MQ, Yan JP, et al. Nutrient requirements and growth of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management, 2004, 15: 327-331

(编辑 陈辉)

The Effects of *Asterias* Echino-Skin as Additive Component of the Feed on *Apostichopus japonicus*

WU Zhihong, SUN Yuanqin, LIU Tianhong, LI Xiao, LI Hongyan, WANG Ying^①

(Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266002)

Abstract To investigate the effects of different brands of commercial diets on the weight gain rate, specific growth rate, feed conversion ratio, feeding rate, and apparent protein digestibility of the juvenile sea cucumber, the juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) (initial wet weight 5.0–6.7 g) were fed with the diets containing various particle diameters of *Asterias* echino-skin powder (two commercial feeds as control) for 60 days. The results showed that the survival rate of *A. japonicus* is not impacted by diets ($P>0.05$). The trend of the average weight gain rate was same with the specific growth rate of sea cucumber, which was higher in commercial feed 2 group and lower in commercial feed 1 group. The feed conversion ratios (*FCR*) of sea cucumber fed with *Asterias* echino-skin was the lowest (0.993) but no significant difference with the other two groups ($P<0.05$). The feeding rate (*FR*) of sea cucumber was similar between *Asterias* echino-skin group and commercial feed 1 group ($P>0.05$), but it was significantly lower than that of the commercial feed 2 group ($P<0.05$). The feed efficiency of sea cucumber fed with *Asterias* echino-skin group was significantly higher than those of other two groups that have no significant difference ($P>0.05$). The highest apparent protein digestibility of sea cucumber was in *Asterias* echino-skin group (67.28%), which was significantly higher compared with commercial feed 1 group but without significant difference compared with the commercial feed 2 group ($P>0.05$). These findings indicate that supplementation of *Asterias* echino-skin in diets could improve the growth performance and feed utilization of *A. japonicus*, and the *Asterias* echino-skin powder can be used as a feed additive.

Key words Juvenile *Apostichopus japonicus*; *Asterias* echino-skin; Growth performance

① Corresponding author: WANG Ying, E-mail: food-rc@sina.com

饲料中添加 3 种不同投入品对筏式浅海网箱刺参 (*Apostichopus japonicus*) 养殖生长的影响*



郝继光^{1,2} 王印庚^{2①} 廖梅杰² 李彬² 崔浩²
许燕² 邹安革³ 张振⁴

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院
黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 山东安源水产股份有限公司 烟台 265600;
4. 青岛海昌生物科技有限公司 青岛 266400)

摘要 以刺参的存活率、增重率、特定生长率和肠道蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶及肠道组织结构变化为评价指标,通过 42 d 的养殖实验,研究了在基础饲料(空白组)中添加 20%生物胶为粘合剂制备粘性饲料(粘性饲料对照组),通过添加浒苔干粉(浒苔组)、微生态制剂(微生态制剂组)、中草药(中草药组) 3 种投入品对浅海筏式网箱养殖刺参生理及生长的影响。结果显示,在散失率方面,粘性饲料比空白组饲料散失率降低 33.42%,添加浒苔干粉、微生态制剂、中草药对饲料散失率的影响差异不显著($P>0.05$);在生长方面,中草药组的增重率和特定生长率均为最高,分别达到(41.50±1.39)%和(0.82±0.02)%/d,显著高于其他 4 个实验组;在存活率方面,微生态制剂组和中草药组的存活率显著高于空白组和粘性饲料对照组。其中,中草药组存活率最高,达到(94.03±2.28)%;在消化酶活性方面,浒苔组、微生态制剂组和中草药组的淀粉酶活性分别在第 10、20、30 天达到峰值,峰值分别为(1.70±0.05)、(1.60±0.04)、(1.77±0.04) U/mg prot;粘性饲料对照组的蛋白酶活性波动最大,其活性在第 10 天达到峰值为(1.78±0.09) U/mg prot;空白组、粘性饲料对照组和浒苔组的纤维素酶活性均呈现先升高后降低的趋势,在实验周期内中草药组的纤维素酶活性表现为持续上升,而微生态制剂组刺参的纤维素酶活性表现出先下降后上升的趋势,最低值为(0.14±0.01) μg/g·min;肠道组织结构方面,粘性饲料对照组的肠道黏膜上皮层厚度显著增加($P<0.05$),浒苔组的肌肉层厚度显著增加($P<0.05$),中草药组和微生态制剂组刺参肠道组织结构完整,上皮细胞分泌旺盛。研究表明,通过添加生物胶所制作的粘性饲料可显著降低饲料散失率,添加微生态制剂和中草药可显著提高网箱养殖刺参的成活率,并显著提高刺参个体的消化酶活力和增重率,添加浒苔对刺参生长影响不显著。

关键词 刺参;浅海网箱;生物胶;浒苔;微生态制剂;中草药;生长

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0102-09

近十几年,我国刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖地区的重要海水养殖品种。目前,刺参养殖主要包括池塘养殖、围堰养殖、工厂化养殖、浅海底播养殖和

* 国家“十二五”“863”项目(2012AA10A412-4)、国家自然科学基金项目(31202016)、山东省农业良种工程重大课题“速生、抗病、耐高温刺参良种选育”、青岛市战略性新兴产业培育计划项目(13-4-1-65-hy)和青岛市民生科技计划项目(14-9-3-3-hy)共同资助。郝继光, E-mail: spade.ahg@163.com

① 通讯作者:王印庚,研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期:2015-05-16,收修改稿日期:2015-07-13

网箱养殖等养殖方式。其中, 浅海网箱养殖是通过在自然海区中设置网箱, 依托自然环境和人工投饵进行高密度水产养殖的生产方式(王印庚, 2013; 刘潇波等, 2004)。网箱养殖中人工投喂的饵料基本为传统的刺参饲料, 以粉末或颗粒状为主, 存在散失率高的缺点。同时, 大规模高密度的网箱布局及半封闭的海水交换使养殖过程中投喂的饲料及养殖对象的代谢物在养殖区域内积累, 形成污染和海水的富营养化(蒋增杰, 2003), 成为阻碍该种养殖方式进一步发展的瓶颈。因此, 优化投喂和养殖工艺、保护养殖生态环境是目前亟需解决的问题。

本研究以具有良好粘性的生物胶为载体, 探讨了在浅海筏式网箱刺参养殖模式中制备粘性饲料, 并在此基础上添加浒苔、微生态制剂、中草药成分等添加剂对网箱养殖刺参生长和存活的影响, 以期优化筏式网箱刺参养殖工艺, 减少环境污染和网箱养殖刺参病害防控寻找新的方法和途径。

1 材料与方法

1.1 材料

实验场位于山东省青岛市胶州湾红岛浅海养殖区域(116°39'N, 39°93'E)。养殖方式为浅海筏式网箱养殖, 网箱规格为 3 m×3 m×2 m, 网衣目数为 20。实验用刺参选用该海域网箱养殖的健康 1 龄刺参, 平均规格为(20.0±5.0) g/头, 平均体长为(12.0±3.0) cm。

实验用基础饲料为青岛海昌生物科技有限公司生产的刺参配合饲料, 其主要成分及配比为: 马尾藻粉: 脱胶海带粉: 石莼粉: 发酵豆粕: 鱼粉: 扇贝边粉: 海泥=20: 20: 10: 10: 10: 10: 20。

生物胶购自青岛海昌生物科技有限公司, 从海带等海藻中提取的多糖类物质。

微生态制剂购自青岛中仁动植物药业有限公司, 主要菌株为: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和萎缩芽孢杆菌(*Bacillus*

atrophaeus)。

中草药为青岛汉河动植物药业有限公司生产的刺参抗病免疫双效中草药, 主要成分为: 穿心莲、大青叶、黄芪、板蓝根等。

簇状投喂器采用 4 mm 孔径的无结聚乙烯网片裁成 2000 mm×600 mm 的网片, 折叠后用绳约束成球状, 下端固定一颗 200 g 的纺锤形水产养殖专用陶瓷网坠。

1.2 方法

1.2.1 饲料制备 根据饲料中各组成成分的不同, 共制作了 8 种饲料, 各种饲料配比见表 1。饲料制作过程按表 1 中配方将饲料干粉混合均匀, 过 100 目网筛后加入 15.6 kg 清水搅拌至糊状, 均匀涂抹在聚乙烯材料制成的簇状投喂器上, 晾干后投放到相应的网箱中, 进行投喂实验。

1.2.2 实验设计 饲料散失率(Scatter ratio, *ScR*, %)测定共分两大类, 添加 20%生物胶的粘性饲料(Adhesive feed, AF)和未添加生物胶的普通饲料(Control feed, CF), 根据饲料中所含投入品的不同, 将实验组分为 8 个组: 含有生物胶的粘性基础饲料组(AF-b)、浒苔粘性饲料组(AF-en)、微生态制剂粘性饲料组(AF-mi)和中草药粘性饲料组(AF-h), 以及不含生物胶的基础饲料组(CF-b)、浒苔饲料组(CF-en)、微生态制剂饲料组(CF-mi)和中草药饲料组(CF-h), 各组饲料组成见表 1。在实验海域未投放刺参苗种的空网箱中投放携带有不同饲料种类的投喂器, 共设 3 个平行, 浸泡 120 h 后计算各投喂器携带饲料的散失率。

投喂实验: 取 CF-b(空白组)、AF-b(粘性饲料对照组)、AF-en(浒苔组)、AF-mi(微生态制剂组)和 AF-h(中草药组) 5 组进行投喂实验, 每组设 3 个平行; 实验共设置 15 个网箱, 随机将刺参苗种分组, 每个网箱放养 15 kg, 数量为 720 头。

1.2.3 养殖管理 实验时间为 2014 年 5 月 3 日–6 月 13 日, 共 42 d。实验期间, 水温为 17–22℃, 盐

表 1 各实验组饲料的组分
Tab.1 Diet composition of the 8 feed groups

组分 Ingredients	粘性饲料对照组 Adhesive feed				普通饲料组 Control feed			
	AF-b	AF-en	AF-mi	AF-h	CF-b	CF-en	CF-mi	CF-h
基础饲料 Traditional feed(%)	80	60	78	76	100	80	98	96
浒苔 Enteromorpha(%)	–	20	–	–	–	20	–	–
微生态制剂 Microecologics(%)	–	–	2	–	–	–	2	–
中草药 Chinese herbal medicine(%)	–	–	–	4	–	–	–	4
生物胶 Adhesive(%)	20	20	20	20	–	–	–	–

度为 30 ± 2 ，溶氧为 5.0 mg/L 以上，pH 为 7.6–8.1，透明度为 30–50 cm。

每 5 d 投喂 1 次，每 10 d 倒网箱 1 次，倒网箱时及时挑出化皮及排脏个体并消除敌害生物和杂物。

1.2.4 散失率的测算 未涂抹饲料的投喂器单独称重记为 m_0 ，涂抹有饲料并干燥后的投喂器称重记为 m_s ，在相应海域未投放刺参的空网箱浸泡 120 h 干燥后称重记为 m_e 。计算散失率公式如下：

$$ScR(\%) = (m_s - m_e) / (m_s - m_0) \times 100\%$$

1.2.5 增重率(Weight gain rate, WGR, %)和特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)的测算 分别在实验开始和结束时，从每个网箱中随机抽取 50 头刺参，按照廖梅杰等(2011)的方法，测量其总重，分别记为 W_0 和 W_T ，计算实验开始和结束时刺参个体平均体重分别为 $w_0 = W_0/50$ ，和 $w_T = W_T/50$ ，由此计算增重率和特定生长率，公式如下：

$$WGR = (w_T - w_0) / w_0 \times 100\%;$$

$$SGR = (\ln w_T - \ln w_0) / t \times 100\%;$$

式中， t 为实验时间。

1.2.6 存活率(Survival rate, SR, %)的测定 分别在实验开始和实验结束时，称量各网箱内刺参总重，分别记为 WW_0 和 WW_T ，由此可计算，实验开始时各网箱刺参个体数目 $N_0 = WW_0/w_0$ 和实验结束时各网箱刺参个体数目 $N_T = WW_T/w_T$ ，计算各实验组刺参的存活率，计算公式如为： $SR = N_T / (N_0 - 25) \times 100\%$ ，不含用于肠道消化酶测定抽出的 25 头的数目。

1.2.7 肠道消化酶活性测量 在实验期间，每 10 d 从各实验网箱中随机抽取 5 头刺参，剖取获得其肠道组织，用灭菌海水冲洗去除肠道内含物，取其前肠用于测定肠道淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的活性。淀粉酶活性、蛋白酶活性、纤维素酶活性以及样品蛋白质浓度的测定均使用南京建成生物工程研究所的试剂盒，测定方法及酶活计算公式参照试剂盒说明书。

1.2.8 刺参肠道组织结构观察 实验结束时，剪取 1.2.7 中所获得的前肠组织，用 Davidson's AFA 固定液固定 24 h，后转入 70%乙醇固定 36 h，经脱水、浸蜡、包埋、切片后进行 H.E.染色，使用 Nikon 公司的 Eclipse E800 Olympus 显微镜观察，用 Nikon DS-Fi1 摄像头结合 Nikon NIS-Elements 图像分析软件对组织进行显微拍照和标定。显微观察各组刺参肠道黏膜上皮层纹状缘的完整度、肠绒毛多寡及排列、结缔组织和肌纤维的结构等，显微测量肠道总厚度 H_0 、肠道黏膜上皮层(Mucosa)厚度 H_{mu} 、黏膜下皮层(Sub mucosa)厚度 H_{su} 、肌肉层(Muscular layer)厚度 H_{ml} 。计算各层

与肠壁总厚度的比值。

肠道黏膜上皮层厚度 H_{mu} 与肠壁总厚度 H_0 的比值： $h_{mu}(\%) = 100 \times H_{mu} / H_0$ 。

肠道黏膜下皮层厚度 H_{su} 与肠壁总厚度 H_0 的比值： $h_{su}(\%) = 100 \times H_{su} / H_0$ 。

肠道肌肉层厚度 H_{ml} 与肠壁总厚度 H_0 的比值： $h_{ml}(\%) = 100 \times H_{ml} / H_0$ 。

1.2.9 数据统计与分析 运用 SPSS 17.0 对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)，当组间差异显著时($P < 0.05$)用 Duncan 检验进行多重比较分析。各实验数据以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。

2 结果

2.1 饲料散失率

各实验组的饲料在网箱中的自然条件下浸泡 120 h 后，添加 20%生物胶的粘性基础饲料组(AF-b)、浒苔粘性饲料组(AF-en)、微生物制剂粘性饲料组(AF-mi)和中草药粘性饲料组(AF-h)的散失率为 47.46%–48.18%，且粘性饲料各组间差异不显著($P > 0.05$) (图 1)；而未添加生物胶的基础饲料组(CF-b)、浒苔饲料组(CF-en)、微生物制剂饲料组(CF-mi)和中草药饲料组(CF-h)的饲料在网箱中的自然条件下浸泡 120 h 后，散失率高达 81.60%–82.17%，四组间无显著差异($P > 0.05$)，但与添加 20%生物胶的粘性饲料组差异极显著($P < 0.01$)。由此可知，以生物胶作为粘合剂制备的粘性饲料可以显著减少浅海筏式网箱养殖过程中饲料的散失率。

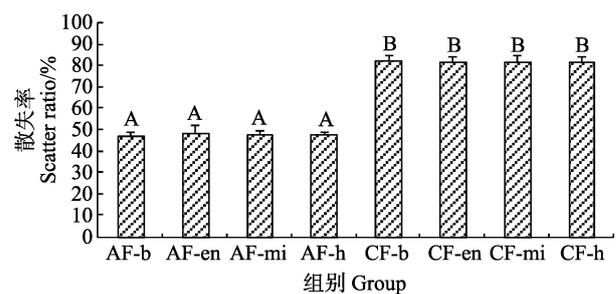


图 1 各组饲料的散失率

Fig.1 The scatter ratio (ScR) in different experimental groups

不同上标字母表示组间有极显著差异($P < 0.01$)
Different superscript capital letters represent highly significant difference among groups ($P < 0.01$)

2.2 增重率和特定生长率

经过为期 42 d 的养殖实验，粘性饲料对照组

(AF-b)、浒苔组(AF-en)、微生态制剂组(AF-mi)和中草药组(AF-h)刺参个体平均体重分别达到(27.94±0.19)、(27.80±0.30)、(28.83±0.38)、(29.60±0.31) g/头, 显著高于空白组(CF-b)($P<0.05$)(表 2); 这四组的增重率和特定生长率等方面也显著高于空白组(CF-b) ($P<0.05$), 在研究结束时, 中草药组(AF-h)刺参特定生长率达到(0.82±0.02)%/d, 显著高于粘性饲料对照组(AF-b)和浒苔组(AF-en)($P<0.05$), 而与微生态制剂组(AF-mi)仅在增重率上表现出显著差异($P<0.05$)。粘性饲料对照组(AF-b)、浒苔组(AF-en)和微生态制剂组(AF-mi)之间的刺参个体平均体重、增重率和特定生长率差异不显著($P>0.05$)。

2.3 存活率

至实验结束时, 粘性饲料对照组和浒苔组网箱中的刺参数量以及存活率与空白组之间无显著差异($P>0.05$, 表 3), 但微生态制剂组和中草药组的刺参数量和存活率与空白组和粘性饲料对照组之间均存在显著差异($P<0.05$)。其中, 中草药组的存活率达到(94.03±2.28)%, 为各组最高。

2.4 肠道消化酶活性测量

本研究测定了不同实验组刺参肠道淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶活性的变化。结果显示, 各组之间淀粉酶活性的比较: 空白组(CF-b)的淀粉酶活性在(1.10±0.05)–(1.5±0.04) U/mg prot 范围内波动, 研究周期内酶活性差异不显著($P>0.05$)(图 2); 粘性饲料对照组(AF-b)的淀粉酶活性逐渐下降, 由(1.55±0.07)降至(1.11±0.08) U/mg prot; 浒苔组(AF-en)的淀粉酶活性波动幅度较大, 最大值为(1.70±0.050) U/mg prot; 微生态制剂组(AF-mi)的淀粉酶活性呈现先上升后下降的趋势, 实验进行到第 20 天时达到最大值(1.60±0.04) U/mg prot, 在研究结束时下降至(1.18±0.04) U/mg prot, 低于同期的空白组; 中草药组(AF-h)的淀粉酶活性 20 d 之前变化不显著($P>0.05$), 30 d 后淀粉酶活性升高达到(1.77±0.04) U/mg prot, 显著高于其他各组($P<0.05$)。

各组之间蛋白酶活性的比较: 粘性饲料对照组(AF-b)蛋白质酶活性在 10 d 时迅速升高至(1.78±0.09) U/mg prot, 显著高于其他各组($P<0.05$)(图 3), 后迅速下降至(1.06±0.11) U/mg prot; 浒苔组(AF-en)

表 2 不同投入品对刺参增重率及特定生长率的影响

Tab.2 The influence of different inputs on weight gain rate (WGR) and specific growth rate (SGR) of sea cucumbers

评价指标 Evaluation index	空白组 (CF-b) Blank group	粘性饲料对照组 (AF-b) Adhesive feed	浒苔组 (AF-en) Enteromorpha	微生态制剂组 (AF-mi) Microecologics	中草药组(AF-h) Chinese herbal medicine
起始体重 Initial body weight w_0 (g)	20.84±0.15	20.85±0.10	20.78±0.07	21.10±0.06	20.92±0.09
最终体重 Final body weight w_1 (g)	26.68±0.59 ^a	27.94±0.19 ^b	27.80±0.30 ^{ab}	28.83±0.38 ^{bc}	29.60±0.31 ^c
增重率 WGR(%)	27.98±1.99 ^a	34.00±1.31 ^b	33.74±1.51 ^b	36.60±1.37 ^b	41.50±1.39 ^c
特定生长率 SGR(%/d)	0.59±0.03 ^a	0.69±0.03 ^b	0.69±0.02 ^b	0.74±0.02 ^{bc}	0.82±0.02 ^c

注: 同一行中, 不同上标字母表示组间有显著性差异($P<0.05$)

Note: Different superscript letters within each row represent significant difference among groups ($P<0.05$)

表 3 不同投入品对刺参存活率的影响

Tab.3 The influence of different inputs on survival rate (SR) of sea cucumbers

项目 Items	空白组 (CF-b) Blank group	粘性饲料对照组 (AF-b) Adhesive feed	浒苔组 (AF-en) Enteromorpha	微生态制剂组 (AF-mi) Microecologics	中草药组(AF-h) Chinese herbal medicine
起始刺参总数 N_0 (头) Initial number	721±3.21	722±7.57	720±9.54	720±5.51	723±5.13
最终刺参总数 N_T (头) Final number	657±10.44 ^{ab}	649±5.00 ^a	658±6.25 ^{ab}	669±11.00 ^{bc}	677±13.23 ^c
存活率 Survival rate (%)	91.01±1.06 ^{ab}	89.93±0.40 ^a	91.34±0.24 ^{ab}	92.92±0.93 ^{bc}	94.03±2.28 ^c

注: 同一行中, 不同上标字母表示组间有显著性差异($P<0.05$)

Note: Different superscript letters within each row represent significant difference among groups ($P<0.05$)

蛋白酶活性略有上升,并在实验结束时活性显著高于起始值($P<0.05$);微生态制剂组(AF-mi)的蛋白酶活性呈先上升后下降的趋势,在20 d达到最大值(1.45 ± 0.07) U/mg prot,后显著下降($P<0.05$);中草药组(AF-h)的蛋白酶活力在10 d后持续升高,并在研究结束时达到(1.48 ± 0.10) U/mg prot,显著高于其他各组($P<0.05$)。

各组之间纤维素酶活性的比较:空白组(CF-b)纤维素酶活性呈波动状态,平均酶活力为(0.26 ± 0.02) $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{min}$ (图4);粘性饲料对照组(AF-b)和浒苔组(AF-en)的纤维素酶活性呈上升再下降的趋势,无显著差异($P>0.05$);微生态制剂组(AF-mi)的纤维素酶活性逐渐下降,最低值为(0.14 ± 0.01) $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{min}$,但养殖过程不同测定时间

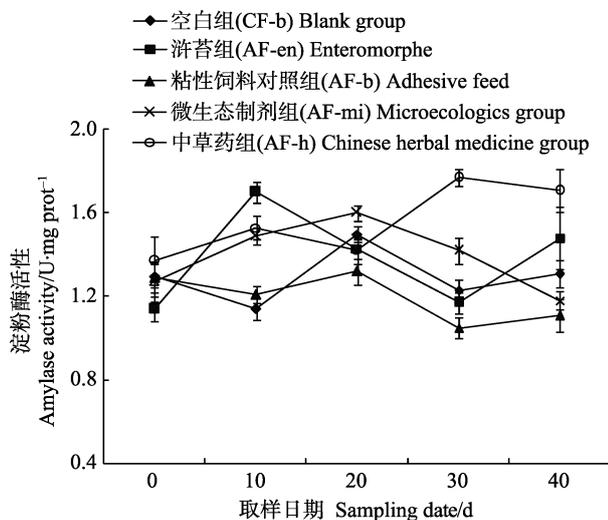


图2 不同投入品对刺参肠道淀粉酶活性的影响
Fig.2 The influence of different inputs on gut amylase activities of sea cucumbers

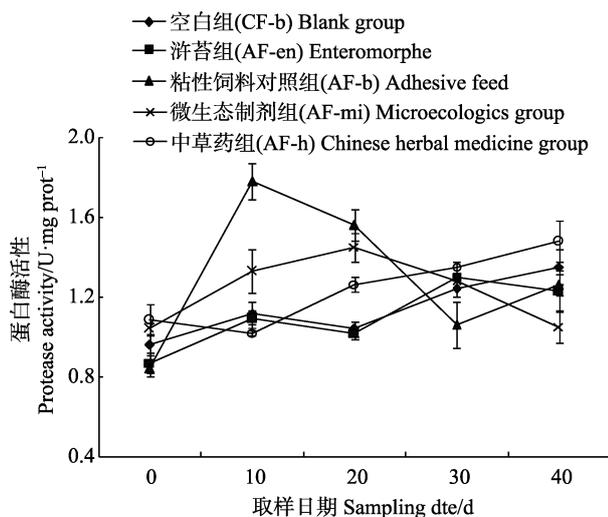


图3 不同投入品对刺参肠道蛋白酶活性的影响
Fig.3 The influence of different inputs on gut protease activities of sea cucumbers

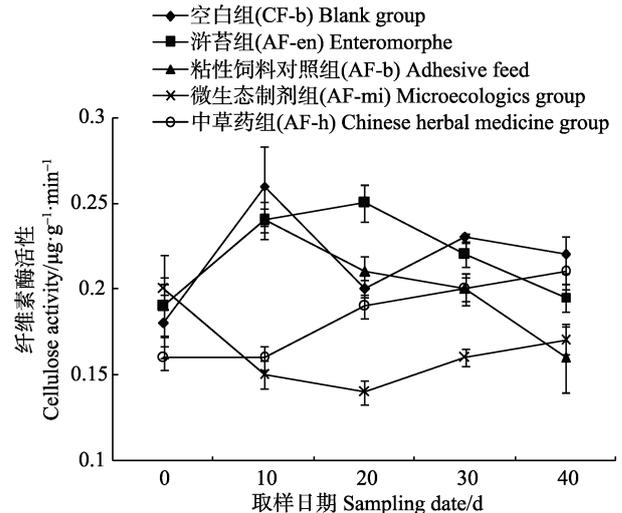


图4 不同投入品对刺参肠道纤维素酶活性的影响
Fig.4 The influence of different inputs on gut cellulose activities of sea cucumbers

点之间差异不显著($P>0.05$);中草药组(AF-h)的纤维素酶活性逐渐上升,最高达到(0.21 ± 0.01) $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{min}$ 。

2.5 不同投入品饲料对刺参肠道组织结构的影响

由各实验组所采集刺参肠道组织的显微观察可以看出,空白组(CF-b)黏膜上皮层褶皱均匀分布,纹状缘完整,细胞核清晰,染色为蓝紫色,位于柱状细胞的基部或偏细胞中部,胞质染色较浅;黏膜下层的结缔组织细胞数量少,分布均匀;肌肉层肌纤维纤细,纹路清晰,纵肌略不明显(图5-A)。粘性饲料对照组(AF-b)黏膜上皮层和肌肉层有明显增厚的现象,环肌纤维较空白组更粗(图5-B)。浒苔组(AF-en)环肌纤维增粗,纹路清晰(图5-C)。微生态制剂组(AF-mi)和中草药组(AF-h)与空白组相比较,除中草药组(图5-E)黏膜上皮层细胞数目增加,环肌纤维略有增粗之外无其它无组织结构的明显差异,但微生态制剂组和中草药组的肠道组织染色较深,细胞核体积增加(图5-D),表明这两组刺参肠道细胞分泌活动旺盛。

通过对肠道各组织层厚度的测量(表4)得知,粘性饲料对照组为 $h_{\text{mu}}=(46.24\pm 2.41)\%$,显著高于其他各组($P<0.05$),说明粘性饲料对照组的前肠黏膜上皮层厚度显著增加。各组结缔组织层厚度虽有差异,但差异不显著($P>0.05$)。浒苔组 $h_{\text{mi}}=(13.46\pm 0.61)\%$ 与其他各组存在显著差异($P<0.05$),说明浒苔组刺参前肠肌肉层有显著增厚的现象。

3 讨论

3.1 新式投喂方式与生物胶的应用

刺参营底栖生活,以所附着载体上的沉积物为

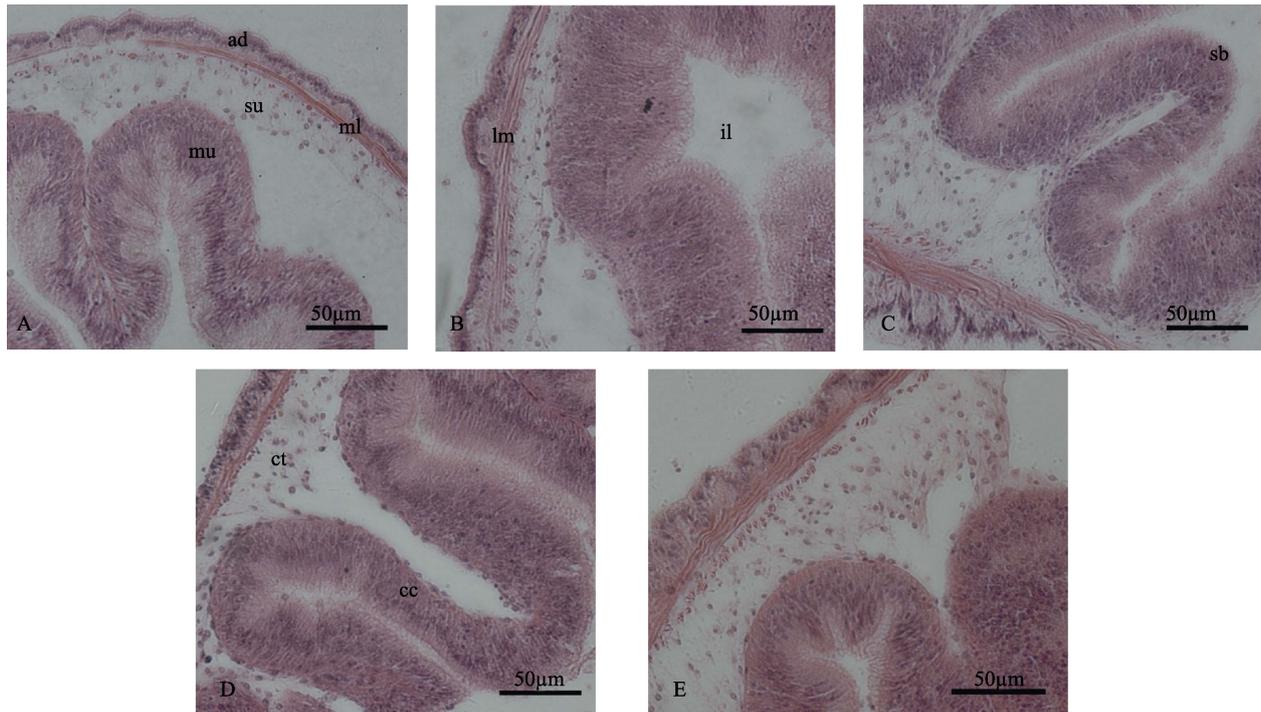


图 5 不同投入品对刺参前肠组织结构影响的显微观察(横切)

Fig.5 Microscopic observation of different inputs influence on foregut of sea cucumbers (Transverse sections)

A. 空白组(×200); B. 粘性饲料对照组(×200); C. 浒苔组(×200); D. 微生态制剂组(×200); E. 中草药组(×200)

A. Blank group (×200); B. Adhesive feed group (×200); C. Enteromorpha group (×200); D. Microecologics group (×200); E. Chinese herbal medicine group (×200)

mu. 黏膜上皮层 Mucosa; su. 黏膜下皮层 Sub mucosa; ml. 肌肉层 Muscular layer; ad. 外膜层 Adventitia; il. 肠腔 Intestine lumen; lm. 纵肌 Longitudinal muscle; cm. 环肌 Circular muscle; sb. 纹状缘 Striated border; cc. 柱状细胞 Columnar cell; ct. 结缔组织 Connective tissue

表 4 不同投入品对刺参前肠各组织层相对厚度的影响

Tab.4 The influence of different inputs on relative thickness of component layers of sea cucumber foregut

评价指标 Evaluation index	空白组 (CF-b) Blank group	粘性饲料对照组 (AF-b) Adhesive feed	浒苔组 (AF-en) Enteromorpha	微生态制剂组 (AF-mi) Microecologics	中草药组(AF-h) Chinese herbal medicine
黏膜上皮层的相对厚度 $h_{mu}(\%)$	25.40±2.75 ^a	46.24±2.41 ^b	31.10±2.52 ^a	26.29±2.16 ^a	25.62±3.03 ^a
黏膜下皮层的相对厚度 $h_{su}(\%)$	28.54±5.28	32.19±2.40	27.97±4.07	23.56±3.08	22.42±3.72
肌肉层的相对厚度 $h_{ml}(\%)$	8.74±0.66 ^a	10.26±1.10 ^a	13.46±0.61 ^b	9.81±0.87 ^a	9.62±0.79 ^a

注: 同一行中, 不同上标字母表示组间有显著性差异($P<0.05$)

Note: Different superscript letters within each row represent highly significant difference among groups ($P<0.05$)

食。对于浅海筏式网箱养殖, 刺参所栖息的网衣上附着的天然饵料较少, 无法满足高密度保苗或养成过程中刺参的营养需求, 而传统的刺参饲料以粉末饲料为主, 直接应用于网箱养殖存在散失率高的问题。虽然后来也有研究学者探讨了颗粒饲料或片状饲料在刺参养殖中的应用, 但固体饲料沉积到网箱底部易被水流冲击到边角, 造成饲料的堆积, 而且饲料在水中浸泡溶解后, 小粒径的饲料易漏出网箱, 不仅存在饲料散失率高的不足, 也对海洋环境造成影响(蔡惠文等,

2006)。

本研究探索性的以生物胶为载体, 将基础干粉饲料、生物胶粉与水按照一定比例混合, 制成糊状粘性饲料, 然后均匀地粘合在网衣材料制成的簇状投喂器上, 投放在养殖网箱中供刺参附着摄食。散失率研究表明, 生物胶具有良好的粘附效果, 饲料的散失率降低 33.42%以上, 证明添加了生物胶的饲料在水中粘合在簇状投喂器上更为稳定、不易松散, 可以将饲料有效的保留在刺参投喂器上, 在为刺参提供更丰富的

饵料源的同时可以降低对海域环境的污染。42 d 的养殖结果显示,在投喂粘性饲料的网箱中,刺参可以大量附着在投放的投喂器上,且带有粘性饲料的投喂器上可观察到明显的摄食斑块,刺参的增重率和特定生长率也显著高于对照组,这表明通过制备粘性饲料可以显著提高饲料的利用率。在本研究中,只添加生物胶的粘性饲料组的蛋白酶活力显著高于空白组,其原因可能是由于生物胶中的蛋白含量较高,刺参需要通过提高自身蛋白酶活力来进行食物中蛋白的消化(吴永恒等,2012)。粘性饲料组的刺参前肠黏膜上皮层厚度有明显增厚的现象,且肌肉层厚度也略有增加,推测所添加的生物胶成分对刺参肠道结构产生了一定的影响,使肠道黏膜上皮层增厚(王霞等,2007),肌纤维增粗,从而增加消化系统的消化能力。因此,通过制备粘性饲料可有效降低饲料损失,提高饲料利用率,这为浅海刺参网箱高效养殖提供了新思路。

3.2 在粘性饲料中添加浒苔对养殖刺参的生长影响

刺参养殖中广泛采用的饲料是以马尾藻、鼠尾藻为主要成分制成的干粉饲料。但随着刺参养殖规模的不断扩大,饲料需求量与日俱增,马尾藻、鼠尾藻的天然资源日益枯竭,饲料价格上涨,养殖成本增加。而近几年,浒苔绿潮的连续发生,如何在短时间内处理掉大量的浒苔也成为各相关行业人士所面对的棘手问题。有研究者尝试用浒苔替代传统饲料或添加剂中使用的藻类作为水产养殖用饲料或添加剂,梁萌青等(2009)使用添加了5%浒苔干粉的配合饲料养殖大菱鲆,发现大菱鲆的摄食率和特定生长率分别得到不同程度提高。朱建新等(2009)利用蛋白酶、纤维素酶、甲酸及自然发酵等方法处理浒苔并作为饲料投喂刺参,发现浒苔可以作为刺参的良好饲料;廖梅杰等(2011)研究表明,浒苔是一种高蛋白、低脂肪、矿物质元素含量丰富的安全藻类食品,可作为替代马尾藻、鼠尾藻、海带等作为一种优质的刺参养殖用饲料。郭娜(2011)¹⁾研究表明,投喂鼠尾藻饲料、浒苔饲料和动物性饲料的刺参特定生长率并无显著差异。本研究在粘性饲料中添加浒苔投喂浅海网箱养殖的刺参,与对照组相比,添加浒苔组的特定生长率和增重率虽然略小但差异不显著,推测出现该现象的原因可能是养殖刺参对饲料的变更存在一个适应过程(朱建新等,

2007)。添加浒苔组的淀粉酶活力波动较大,蛋白酶活力略有上升,与实验开始时组内的淀粉酶、蛋白酶活力存在显著差异;而纤维素酶活力与其他组相比无显著差异,这可能与浒苔中蛋白含量高有关。组织学观察表明,添加浒苔组的肠道组织结构与其他组相比较,肌肉层厚度明显增加,特别是环肌纤维变粗,证明添加浒苔后刺参肠道消化能力增加。因此,粘性饲料中添加浒苔投喂刺参可在一定程度上提高刺参前肠内的淀粉酶和蛋白酶活力,且不会对刺参的健康状况造成影响,证明浒苔可以作为替代品应用于刺参浅海网箱养殖中。

3.3 微生态制剂和中草药在网箱养殖中的应用效果

微生态制剂以微生态学理论为依据,具有调整生态失调、保持微生态平衡、有助于改善宿主健康状况的作用(贾治超,2014)²⁾。袁成玉等(2006)、阳钢(2012)³⁾的研究表明,在刺参饲料中添加微生态制剂,能够起到改善刺参肠道内环境,提高肠道内蛋白酶、淀粉酶的活性,促进消化吸收和个体生长的作用。随着养殖环境恶化、病原种类增加,网箱养殖模式中刺参疾病也时有发生,由于针对网箱养殖模式的病害防控手段缺乏,网箱养殖成活率不高。本研究借助粘性饲料载体,探讨了通过粘性饲料携带微生态制剂和中草药,达到“口服”用药效果,探索相应手段在网箱养殖病害防控中的可行性。本研究利用中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖与生态研究室开发的微生态制剂产品进行了网箱刺参养殖实验(王亚敏等,2008),研究表明,添加微生态制剂组的存活率和增重率均显著高于对照组,且淀粉酶活力和蛋白酶活力在实验中得到了显著提升,前肠黏膜上皮层结构完整,组织内分泌旺盛,说明实验组中所添加的微生态制剂提高了养殖刺参肠道内消化酶的活力,对刺参的生长和健康有一定的助益作用。而在实验后期,刺参前肠内消化酶活力有降低现象,纤维素酶活力明显低于其他各组,且该组的特定生长率有所下降,该现象可能与微生态制剂的使用频率和使用工艺有关,有待进一步研究。

中草药应用在水产养殖中主要以植物类中草药,如大黄、黄连、黄芪、苍术、大蒜、板蓝根等;在养殖用饲料中添加或单独对养殖对象使用中草药,可起

1) 郭娜. 不同饲料对刺参生长、消化生理和能量收支的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011

2) 贾治超. 微生态制剂对刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长、养殖水质及氮、磷收支的影响. 天津农学院硕士研究生学位论文, 2014

3) 阳钢. 几种微生态制剂对刺参养殖水体及刺参肠道菌群结构的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012

到改良养殖环境, 调动激发养殖对象机体内抗病因子(Santiago-cardona *et al.*, 2002), 提高器官组织功能, 增强抗御病原菌侵害的作用(王亮等, 2005), 并能促进养殖对象生长(樊英等, 2014)。目前, 中草药成分促进生长的作用机理尚不完全清楚, 本研究所选用的中草药为本实验室研发的具有抗菌、免疫双效中草药。添加中草药组在实验中的增重效果好于其他各组, 特定生长率保持较高水平, 前肠内淀粉酶、蛋白酶及纤维素酶活力有一定程度提升, 前肠黏膜上皮层结构完整、健康, 组织分泌旺盛, 可推断在粘性饲料中添加适量中草药成分, 对刺参生长和健康状态有积极效果。

另外, 在研究进行以及实际生产过程中, 投喂以基础干粉饲料制成的片状饲料的部分养殖刺参出现饵料易从肠道内滑落、粪便不成形等现象, 但粘性饲料对照组、浒苔组以及微生态制剂组和中草药组该现象较少, 可能是粘性饲料中的生物胶成分对刺参肠道结构产生了一定的影响, 使肠道黏膜上皮层增厚, 肌纤维增粗, 促进肠道蠕动, 从而减少刺参滑肠的发生。

综上所述, 与传统的片状饲料相比, 使用簇状投喂器的粘性饲料应用于浅海筏式网箱养殖刺参的生长效果得到提升, 浒苔、微生态制剂以及中草药成分对刺参生长也起到了助益效果。以本研究为基础, 今后还需从两个方面开展进一步的研究工作: 一是严格养殖实验, 延长实验周期, 根据 1 龄保苗刺参的营养和免疫需求, 科学配比, 完善饲料配方; 二是探究微生态制剂和中草药对养殖刺参肠道菌群结构的影响机制, 以期更好地将微生态制剂和中草药应用在浅海网箱养殖过程中。

参 考 文 献

- 王印庚. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2013, 66-67
- 王亚敏, 王印庚. 微生态制剂在水产养殖中的作用机理及应用研究进展. 动物医学进展, 2008, 29(6): 72-75
- 王亮, 吴立新. 中草药添加剂在水产养殖中的应用及存在问题. 中国饲料, 2005, (2): 28-29
- 王霞, 李霞. 仿刺参消化道的再生形态学与组织学. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 340-346
- 朱建新, 曲克明, 李健, 等. 不同处理方法对浒苔饲喂稚幼刺参效果的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 108-112
- 朱建新, 刘慧, 冷凯良, 等. 几种常用饵料对稚幼参生长影响的初步研究. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 48-53
- 刘潇波, 郑志勇, 高殿森. 网箱养鱼对水环境影响研究及展望. 北方环境, 2004, 29(4): 50-52
- 吴永恒, 王秋月, 冯政夫, 等. 饲料粗蛋白含量对刺参消化酶及消化道结构的影响. 海洋科学, 2012, 36(1): 36-41
- 袁成玉, 张洪, 吴垠, 等. 微生态制剂对幼刺参生长及消化酶活性的影响. 水产科学, 2006, 25(12): 612-615
- 梁萌青, 幸福言, 常青, 等. 以绿藻浒苔作为大菱鲆诱食剂的制备方法. ZL 200810249651.9, 2008
- 蒋增杰. 鱼类网箱养殖对水环境的影响. 现代渔业信息, 2003, 18(7): 3-5
- 蔡惠文, 孙英兰, 张学庆. 象山港网箱养殖对海域环境的影响及其养殖环境容量研究. 环境污染治理技术与设备, 2006, 7(11): 71-76
- 廖梅杰, 王印庚, 郝志凯, 等. 活体刺参体重测量方法. ZL 201010100781.3, 2010
- 廖梅杰, 郝志凯, 尚德荣, 等. 浒苔营养成分分析与投喂刺参试验. 渔业现代化, 2011, 38(4): 32-36
- 樊英, 于晓清, 李乐. 不同免疫增强剂对仿刺参肠道消化酶活性及组织结构的影响. 水产学杂志, 2014(4): 46-51, 59
- Santiago-cardona PG, Berríos CA, Ramírez F, *et al.* Lipopolysaccharides induce intestinal serum amyloid expression in the sea cucumber holothuria glaberrima. Dev Comp Immunol, 2002, 27(2): 105-110

(编辑 陈严)

The Effects of Three Types of Feed Supplements on the Growth of *Apostichopus japonicus* Cultured in Cages

HAO Jiguang^{1,2}, WANG Yingeng^{2①}, LIAO Meijie², LI Bin², CUI Hao², XU Yan²,
ZOU Ange³, ZHANG Zhen⁴

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. AnYuan aquatic Products co., Ltd, Yantai 265600; 4. Haichang Biological Technology co., Ltd, Qingdao 266400)

Abstract High scatter ratio (*ScR*) of feed diets and the lack of effective disease prevention and control method have been hindering the cage culture of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). In this study we used adhesive feed with bio-gel and 3 types of feed supplements (Enteromorpha, microecologies and Chinese herbal medicine) to evaluate their effects on the growth and survival of the cultured sea cucumbers. We designed two categories of feed (adhesive feed with 20% bio-gel and control feed without bio-gel), and divided them into eight groups including the blank adhesive feed (AF-b), the enteromorpha adhesive feed (AF-en), the microecologies adhesive feed (AF-mi), the Chinese herbal medicine adhesive feed (AF-h), the blank control feed (CF-b), the enteromorpha control feed (CF-en), the microecologies control feed (CF-mi), and the Chinese herbal medicine control feed (CF-h). The survival rates (*SR*), the weight gain rates (*WGR*), the specific growth rates, the activities of protease, amylase, cellulose, and the microstructure of foregut were measured as the indicators of the effects of feed supplements during the 42-day feeding experiment. The average *ScR* of the adhesive feed groups (AF-b, AF-en, AF-mi, and AF-h) was reduced by 33.42% compared to the control groups (CF-b, CF-en, CF-mi, and CF-h). There was no significant difference between the 3 groups with food supplements ($P>0.05$). The *WGR* and *SGR* of AF-h were $(41.50\pm 1.39)\%$ and $(0.82\pm 0.02)\%$ /d respectively, which were the highest among all groups and the values were significantly different from other 4 groups (CF-b, AF-b, AF-en, and AF-mi) ($P<0.05$). The *SR* of AF-h ($94.03\pm 2.28\%$) was the highest among all groups. The *SR*s of AF-h and AF-mi were significantly higher than that of CF-b and AF-b ($P<0.05$). The activity of amylase of AF-en, AF-mi and AF-h reached the maximum on the 10th, 20th and 30th day during the experiment, and the peak values were (1.70 ± 0.05) U·mg prot⁻¹, (1.60 ± 0.04) U·mg prot⁻¹ and (1.77 ± 0.04) U·mg prot⁻¹ respectively. Compared to the other 4 groups, the activity of protease of AF-b fluctuated tremendously and reached (1.78 ± 0.09) U·mg prot⁻¹ on the 10th day during the experiment. The activity of cellulose of CF-b, AF-en and AF-b first increased during the early stage and decreased later; the activity of cellulose of AF-h continued to increase during the entire experiment; the activity of cellulose of AF-mi decreased during the first 20 days and then increased in the later 20 days. The microstructures of the foregut of the 5 groups (CF-b, AF-b, AF-en, AF-mi, and AF-h) were normal. The microscopic observation revealed an intense secretion activity of the epithelial cells in AF-mi and AF-h. The relative thickness of the mucosa of AF-b and the muscular layer of AF-en increased significantly ($P<0.05$). These results indicated that the adhesive feed with bio-gel could effectively decrease *ScR* of feed diets, and that *WGR*, *SR* and digestion activities could be increased with the addition of microecologies and Chinese herbal medicine. Furthermore, Enteromorpha did not affect the growth of cage-cultured sea cucumbers, which indicated that it could be used as a substitute in the feed diets for sea cucumbers.

Key words *Apostichopus japonicus*; Cage-culture; Bio-gel; Enteromorpha; Microecologies; Chinese herbal medicine; Growth

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

蓬莱玉参(*Apostichopus* sp.)体壁的营养成分分析及评价*



刘长琳¹ 王有廷² 秦搏¹ 阮飞腾¹ 陈四清^{1①}
燕敬平¹ 赵法箴¹ 刘春胜¹ 崔恒全³

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 烟台海益苗业有限公司 烟台 265619; 3. 海阳市黄海水产有限公司 海阳 265122)

摘要 采用生化方法对蓬莱玉参(*Apostichopus* sp.)体壁营养成分进行了测定,并分析评价了这一水产养殖新品种的营养和开发价值。结果显示,蓬莱玉参体壁中水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量分别为91.29%、5.25%、0.23%和3.09%,其中,粗蛋白质和灰分高于刺参,粗脂肪低于刺参,具有高蛋白、低脂肪的特点;蓬莱玉参体壁中氨基酸总量为53.76%,明显高于刺参,氨基酸组成和含量接近于FAO/WHO的推荐模式,属于质量较好的蛋白质;蓬莱玉参体壁中呈味氨基酸含量为25.63%,占氨基酸总量的47.66%,且各种呈味氨基酸含量均高于刺参,鲜美程度要好于刺参。蓬莱玉参体壁中多不饱和脂肪酸含量(PUFA)为26.47%,DHA+EPA为12.08%,不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值(UFA/SFA)为3.19,均高于刺参,因此,脂肪质量优于刺参;蓬莱玉参体壁中常量及微量元素含量较高,Ca、P比例适宜,并富含V_{B6}和V_{B1},其中,V_{B1}含量为1.30 mg/100 g,含量远高于刺参。研究表明,蓬莱玉参营养价值优于刺参,具有较高的营养价值和保健作用。

关键词 蓬莱玉参;体壁;营养成分;营养评价

中图分类号 S965 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2015)05-0111-08

蓬莱玉参(*Apostichopus* sp.)是一种白色的刺参,一般生活在较深的海域,它对生存水质的要求极为苛刻,一旦海水受到轻微污染,就无法存活,所以导致自然界数量极少,民间流传着刺参“千年黑,万年白”的说法。蓬莱玉参背腹面均为白色,通体洁白如玉,与刺参(*Apostichopus japonicus*)背面为黄褐色或栗子褐色,腹面为浅褐色或赤褐色存在较大差异;除体色外,蓬莱玉参表皮外观也与刺参存在一定差异,蓬莱玉参背面体表除疣足外较为光滑,而刺参则有较多突起。目前,还未见蓬莱玉参的相关研究报道。烟台海益苗业有限公司对从蓬莱深海捕获的蓬莱玉参进行了人工培育,经过几代的繁殖证明,其生物学性状稳定,并形成了一定的养殖群体。本研究对蓬莱玉参

体壁的营养成分进行了测定,并与刺参的营养成分进行了分析比较,以期评估其营养和开发价值,同时为其高效配合饲料的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验样品于2014年4月取自烟台海益苗业有限公司,其中,蓬莱玉参湿重为(195.6±12.2) g(n=6),刺参湿重为(201.2±8.9) g(n=6)。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 将活体称重,解剖,去除内脏,

*烟台海益苗业有限公司横向课题资助。刘长琳, E-mail: liuchl@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 陈四清, 研究员, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-11-06, 收修改稿日期: 2015-03-30

用过滤海水冲洗,称重后将体壁捣碎。一部分置于105℃恒温箱烘干至恒重,另一部分冷冻干燥后,密封干燥保存备用。

1.2.2 营养成分含量测定 水分测定为105℃烘干恒重法(GB5009.3-85);粗蛋白的测定为凯氏定氮法(GB/T5009.5-1985);粗脂肪测定为索氏脂肪抽提法(GB/T5009.6-1985),采用丹麦福斯公司ST310脂肪测定仪测定;粗灰分测定为箱式电阻炉550℃灼烧法(GB/T5009.4-1985)。

冷冻干燥样品经6 mol/L HCl水解,充氮气后封管,置于110℃恒温箱水解24 h,减压蒸干后定容,应用异硫氰酸苯酯柱前衍生法,采用Agilent1100液相色谱仪测定氨基酸含量。异硫氰酸苯酯柱前衍生法:量取制备好的样品200 μl,置于1 ml离心管中,加入100 μl三乙胺溶液,异硫氰酸苯酯100 μl,混匀,室温放置1 h,然后加入400 ml正己烷振荡后放置10 min,取下层溶液,用0.45 μm膜过滤上HPLC。高效液相色谱条件: Venusil-AA氨基酸分析柱(4.6×250 mm, 5 μm),柱温为40℃,流动相A为0.1 mol/L醋酸钠(含7%乙腈);流动相B为80%乙腈,检测波长为254 nm,流速为1 ml/min梯度洗脱。

气相色谱条件:进样口温度为250℃,载气He,柱流速为0.81 ml/min,柱前压为73.0 kPa,柱起始温度为150℃,保持3.5 min,以20℃/min升至200℃,保持5 min,再以5℃/min升至280℃,保持15 min。分流进样1 μl,分流比为50:1。质谱条件:电子轰击源(EI),电子能量为70 eV,离子源温度为200℃,接口温度为250℃,全程离子碎片扫描(SCAN)模式,质量扫描范围为40-650,溶剂延迟3.5 min。测定仪器及柱子:QP2010GC/MS仪(日本SHIMADZU公司),30 mol/L×0.25 mm×0.25 μm SPB-50色谱柱(美国SUPELCO公司)。

依据GB/T5009-2003,准确称取一定量的样品于100 ml烧杯中,加入硝酸高氯酸于电热板加热消解,后定容至25 ml。采用Thermo Fisher Scientific ICP等元素发射光谱仪测定常量及微量元素的含量,其中,气化元素硒(Se)采用北京海光仪器公司AFS-9900全自动四通道氢化物原子荧光光度计测定。

冷冻干燥样品经皂化后,由萃取液(50%甲醇,40%正己烷三氯甲烷,10%四氢呋喃)萃取,经洗涤浓缩后用液相色谱安捷伦1100分析测定脂溶性V_A含量。水溶性V_{B1}、V_{B2}、V_{B3}、V_{B6}测定分别参照GB 5413.11、GB 5413.12、GB 5413.15、GB 5413.13-2010测定。

1.2.3 营养品质评价方法 根据联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)1973年建议的氨基酸评分

标准模式和全鸡蛋蛋白质的氨基酸模式分别按以下公式计算氨基酸评分(AAS)、化学评分(CS)(王颖等,2013)、必需氨基酸指数(EAAI)(董辉等,2011)、氨基酸的支/芳值[C(BCAA)/C(AAA)](刘世禄等,2002;区又君等,2010):

$$AAS = \frac{aa}{AA(FAO/WHO)} \times 100$$

$$CS = \frac{aa}{AA(Egg)} \times 100$$

$$EAAI = \sqrt[n]{\frac{100A}{AE} \times \frac{100B}{BE} \times \frac{100C}{CE} \times \dots \times \frac{100H}{HE}}$$

式中,aa为试验样品氨基酸含量(mg/g),AA(FAO/WHO)为FAO/WHO评分标准模式中同种氨基酸含量(mg/g),AA(Egg)为全鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量(mg/g),n为比较的必需氨基酸个数,A,B,C,⋯,H为样品肌肉蛋白质的必需氨基酸含量(% dry),AE, BE, CE, ⋯ HE为全鸡蛋蛋白质的必需氨基酸含量(% dry)。

1.2.4 数据处理 试验数据用Excel 2010和SPSS 13.0软件进行统计分析,结果用平均值±标准差(Mean±SD)表示。

2 结果与讨论

2.1 一般营养成分

由表1可知,蓬莱玉参体壁湿样中水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量分别为91.29%、5.25%、0.23%和3.09%,干样中粗蛋白、粗脂肪、灰分含量分别为60.23%、2.67%、35.53%,与刺参相比较,蓬莱玉参体壁粗蛋白和灰分含量较高,而水分和粗脂肪含量较低,与梅花参(*Thelenota ananas*)(王远红等,2010)、红参(*Holothuria* sp.)(苏秀榕等,2003)、海茄子(*Cucumaria cucumaria*)(苏秀榕等,2003)相比,蓬莱玉参干样中粗蛋白含量较高,仅次于梅花参,而粗脂肪含量则为最低。因此,蓬莱玉参具有高蛋白、低脂肪的特点。

2.2 氨基酸含量及营养品质评价

2.2.1 氨基酸含量与组成 由表2可以看出,在蓬莱玉参体壁中,除色氨酸在样品水解过程中被完全破坏外,共检测到17种氨基酸,氨基酸的组成较全面。其中,必需氨基酸(EAA)9种,非必需氨基酸(NEAA)8种。在这些氨基酸中,二者均是甘氨酸含量最高,蛋氨酸含量最低。此外,在蓬莱玉参中共有11种氨基酸高于刺参,其余6种氨基酸略低于刺参。蓬莱玉参体壁总氨基酸含量为53.76%,明显高于刺

表 1 蓬莱玉参与刺参体壁一般营养成分含量比较(湿重%)(平均值±标准差)

种类 Species	水分 Moisture	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid	灰分 Ash	参考文献 References
蓬莱玉参 <i>Apostichopus</i> sp.	91.29±0.57	5.25±0.14 (60.23±0.20)	0.23±0.01 (2.67±0.18)	3.09±0.07 (35.53±0.54)	本研究
刺参 <i>A. japonicus</i>	92.56±0.87	4.37±0.07 (58.77±0.72)	0.35±0.02 (4.72±0.11)	2.47±0.05 (33.25±0.34)	本研究
梅花参 <i>T. ananas</i>	—	(63.02)	(3.20)	(12.49)	王远红等(2010)
红参 <i>Holothuria</i> sp.	—	(51.41)	(8.80)	(12.56)	苏秀榕等(2003)
海茄子 <i>C. cucumaria</i>	—	(49.44)	(4.60)	(19.04)	苏秀榕等(2003)

注: 括号内数据为干重含量

Note: Data in bracket for dry weight content

参体壁总氨基酸含量(47.03%), 与粗蛋白的测定结果一致。

2.2.2 必需氨基酸组成 食品中蛋白质营养价值的评定取决于蛋白质含量、氨基酸种类和比例等因素(杨建敏等, 2003)。其中, EAA 的含量与组成是否符合人类膳食蛋白质模式是评价蛋白质质量的最重要指标。由表 2 可以看出, 蓬莱玉参体壁干样中必需氨基酸总量为 18.67%、非必需氨基酸总量为 35.11%、总氨基酸含量为 53.76%、支链氨基酸总量为 6.70%、芳香族氨基酸总量为 2.96%, 含量均高于刺参。蓬莱玉参和刺参的 EAA/TAA 分别为 34.73%和 37.21%, 而 WHO/FAO 推荐模式为 35.38%(李晓英等, 2010), 因此, 二者均接近于推荐模式, 都属于质量较好的蛋白质。

2.2.3 氨基酸支/芳值分析 蓬莱玉参和刺参氨基酸的支/芳比分别为 2.26 和 2.24, 结果无显著差异。正常人体的支/芳值为 3.0–3.5, 而当肝受损伤时, 则降为 1.0–1.5(刘世禄等, 2002), 因此, 蓬莱玉参和刺参体壁具有一定的保肝作用。

2.2.4 呈味氨基酸分析 水产动物蛋白质的鲜美程度主要取决于呈鲜味的谷氨酸、天冬氨酸以及呈甘味的甘氨酸和丙氨酸的组成与含量(区又君等, 2010; 董辉等, 2011)。由表 3 可以看出, 蓬莱玉参体壁呈味氨基酸中甘氨酸含量最高, 谷氨酸次之, 而刺参体壁中谷氨酸含量最高, 甘氨酸次之, 二者存在一定差异。蓬莱玉参体壁中各种呈味氨基酸含量均高于刺参, 且呈味氨基酸总量与氨基酸总量比值(FAA/TAA)为 47.66%, 也高于刺参的 45.04%, 因此, 蓬莱玉参的鲜美程度要好于刺参。

2.2.5 必需氨基酸组成评价 氨基酸评分(AAS)是目前广泛使用的一种评价食物营养价值的方法(王颖等, 2013)。由表 4 可以看出, 蓬莱玉参和刺参体壁的 AAS 均是胱氨酸 + 蛋氨酸最高, 均超过 100 分, 其次是苏氨酸, 得分超过或接近 100, 说明二者体壁中胱氨酸 + 蛋氨酸和苏氨酸符合 FAO/WHO 理想模式; 在化学评分(CS)方面, 蓬莱玉参是胱氨酸 + 蛋氨酸得分最高(89.73), 其次是苏氨酸(89.29), 而刺参是苏氨酸得分最高(85.83), 其次是胱氨酸 + 蛋氨酸最高(83.99)。

根据 AAS 可知, 蓬莱玉参和刺参体壁中均是赖氨酸得分最低, 其次是亮氨酸, 因此第 1 限制性氨基酸为赖氨酸, 第 2 限制性氨基酸为亮氨酸; 根据 CS 可知, 蓬莱玉参体壁赖氨酸得分最低, 其次是酪氨酸 + 苯丙氨酸, 第 1 限制性氨基酸为赖氨酸, 第 2 限制性氨基酸为酪氨酸 + 苯丙氨酸。因此, 蓬莱玉参体壁蛋白质中赖氨酸为第 1 限制性氨基酸, 亮氨酸和酪氨酸 + 苯丙氨酸同为限制性氨基酸。

必需氨基酸指数是评价食物蛋白质营养最常用的标准之一(林利民等, 2006; 王建新等, 2010), Oser(1951)提出当 $EAAI > 90$, 表示蛋白质的营养价值高, $EAAI$ 在 80 左右时, 表明蛋白质的营养价值良, 若 $EAAI < 70$, 则表示蛋白质的营养不充足。由表 4 可以看出, 蓬莱玉参体壁中 $EAAI$ 为 66.69, 刺参为 65.87, 二者均偏低, 表明蛋白质营养不够充分, 其主要原因可能是由于刺参供食用的主要部分是由胶原纤维构成的结缔组织, 而不是体壁肌肉有关(廖玉麟, 2001)。

2.3 脂肪酸组成与含量

由表 5 可以看出, 蓬莱玉参和刺参体壁中主要检测出 18 种脂肪酸, 包括 5 种饱和脂肪酸(SFA)(总量分别占脂肪酸总量的 16.51%和 19.02%), 4 种单不饱和脂肪酸(MUFA)(总量分别占脂肪酸总量的 26.20%和 35.86%), 以及 9 种多不饱和脂肪酸(PUFA)(总量分别占脂肪酸总量的 26.47%和 22.14%)。此外, 蓬莱玉参和刺参体壁中不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值(UFA/SFA)分别为 3.19 和 3.05。因此, 蓬莱玉参体壁脂肪酸中 PUFA 和 UFA/SFA 高于刺参, SFA 和 MUFA 含量低于刺参, 说明蓬莱玉参体壁脂肪酸的不饱和度

表 2 蓬菜玉参与刺参体壁中氨基酸组成及含量(干重, %)(平均值±标准差)
Tab.2 Composition and contents of amino acids in the body wall of *Apostichopus* sp. and *A. japonicus* (Dry weight, %) (Mean±SD)

氨基酸 Amino acids	蓬菜玉参 <i>Apostichopus</i> sp.			刺参 <i>A. japonicus</i>			刺参 <i>A. japonicus</i>		
	干样中含量 Contents in dry sample	粗蛋白中含量 Contents in crude protein	干样中含量 Contents in dry sample	干样中含量 Contents in dry sample	粗蛋白中含量 Contents in crude protein	干样中含量 Contents in dry sample	粗蛋白中含量 Contents in crude protein	干样中含量 Contents in dry sample	粗蛋白中含量 Contents in crude protein
苏氨酸 Thr	2.42±0.08	4.02±0.19	2.27±0.05	3.86±0.07	丙氨酸 Ala	3.65±0.10	6.06±0.10	2.93±0.08	4.99±0.08
蛋氨酸 Met	0.78±0.02	1.30±0.02	0.78±0.03	1.33±0.04	胱氨酸 Cys	1.76±0.03	2.92±0.03	1.54±0.02	2.62±0.02
缬氨酸 Val*	2.50±0.00	4.15±0.00	2.22±0.05	3.78±0.02	酪氨酸 Tyr#	1.27±0.08	2.11±0.08	1.26±0.05	2.14±0.05
异亮氨酸 Ile*	1.80±0.09	2.99±0.09	1.77±0.11	3.01±0.11	脯氨酸 Pro	4.05±0.12	6.72±0.12	3.50±0.15	5.96±0.15
亮氨酸 Leu*	2.40±0.02	3.98±0.03	2.43±0.02	4.13±0.01	必需氨基酸总量 EAA	18.67±0.53		17.50±0.53	
苯丙氨酸 Phe#	1.69±0.17	2.81±0.15	1.60±0.07	2.72±0.07	非必需氨基酸总量 NEAA	35.11±0.65		29.53±0.69	
赖氨酸 Lys	1.80±0.05	2.99±0.05	1.90±0.08	3.23±0.08	氨基酸总量 TAA	53.76±1.27		47.03±1.36	
精氨酸 Arg	3.96±0.06	6.57±0.06	3.40±0.12	5.79±0.12	支链氨基酸总量 BCAA	6.70±0.11		6.42±0.18	
组氨酸 His	1.32±0.03	2.19±0.03	1.13±0.02	1.92±0.02	芳香族氨基酸总量 AAA	2.96±0.25		2.86±0.12	
丝氨酸 Ser	2.40±0.11	3.98±0.11	2.05±0.05	3.49±0.05	支/芳比 BCAA/AAA	2.26		2.24	
天门冬氨酸 Asp	5.39±0.06	8.95±0.06	4.79±0.14	8.15±0.13	EAA/TAA	34.73		37.21	
谷氨酸 Glu	8.22±0.05	13.65±0.05	6.93±0.11	11.79±0.10	EAA/NEAA	53.18		59.26	
甘氨酸 Gly	8.37±0.10	13.90±0.10	6.53±0.09	11.11±0.09					

注: * 为支链氨基酸(BCAA), # 为芳香族氨基酸(AAA)

Notes: * means branched chain amino acids (BCAA), # means aromatic amino acids (AAA)

表 3 蓬莱玉参与刺参体壁中呈味氨基酸的含量对比(干重, %)(平均值±标准差)

Tab.3 Comparison of flavor amino acids contents in the body wall of *Apostichopus* sp. and *A. japonicus*

(Dry weight, %)(Mean ±SD)

种类 Species	天门冬氨酸 Asp	谷氨酸 Glu	甘氨酸 Gly	丙氨酸 Ala	呈味氨基酸总量 FAA	FAA/TAA
蓬莱玉参 <i>Apostichopus</i> sp.	5.39±0.06	8.22±0.05	8.37±0.10	3.65±0.10	25.63±0.31	47.66
刺参 <i>A. japonicus</i>	4.79±0.14	6.93±0.11	6.53±0.09	2.93±0.08	21.18±0.42	45.04

表 4 蓬莱玉参与刺参体壁中蛋白质必需氨基酸组成评价(平均值±标准差)

Tab.4 Evaluation of the composition of essential amino acids in the body wall of *Apostichopus* sp. and *A. japonicus*(mg/g)

(Mean ±SD)

必需氨基酸 EAA	氨基酸含量 Content(mg/g)		FAO 模式 FAO mode	氨基酸得分 AAS		鸡蛋蛋 白质 Egg protein	化学分 CS		必需氨基酸指数 EAAI	
	蓬莱玉参 <i>Apostichopus</i> sp.	刺参 <i>A.</i> <i>japonicus</i>		蓬莱玉参 <i>Apostichopus</i> sp.	刺参 <i>A.</i> <i>japonicus</i>		蓬莱玉参 <i>Apostichopus</i> sp.	刺参 <i>A.</i> <i>japonicus</i>	蓬莱玉参 <i>Apostichopus</i> sp.	刺参 <i>A.</i> <i>japonicus</i>
	异亮氨酸 Ile	29.89	30.12	40	74.71	75.29	49	60.99	61.46	-
亮氨酸 Leu	39.85	41.35	70	56.92	59.07	66	60.37	62.65	-	-
赖氨酸 Lys	29.89	32.33	55	54.34	58.78	66	45.28	48.98	-	-
胱氨酸 + 蛋氨酸 Cys+Met	42.17	39.48	35	120.49	112.79	47	89.73	83.99	-	-
苏氨酸 Thr	40.18	38.63	40	100.45	96.56	45	89.29	85.83	-	-
缬氨酸 Val	41.51	37.77	50	83.02	75.55	54	76.87	69.95	-	-
酪氨酸 + 苯丙氨 酸 Tyr+Phe	49.14	48.66	60	81.91	81.11	86	57.14	56.58	-	-
总含量 Total content	272.62	268.33	350	-	-	413	-	-	66.69	65.87

要高于刺参。研究表明, 部分碳链长度为 C12-C16 的 SFA 会增加心血管疾病的发病率(王建新等, 2010), 而 MUFA 具有降血糖、调节血脂、降低胆固醇和防止记忆下降的作用(张伟敏等, 2005), PUFA 具有明显的降血脂、降血压、抗肿瘤、抗炎、免疫调节和显著降低心血管疾病的发病率的作用(杭晓敏等, 2001), 因此, 脂肪质量主要取决于脂肪酸的不饱和度, 由此说明, 蓬莱玉参体壁脂肪质量要好于刺参。

在海洋生物中, DHA 在中枢神经系统和视觉系统起重要作用(Sargent *et al*, 1997、1999), EPA 是构成细胞膜和前列腺素前体细胞的重要组分(Bell *et al*, 2003), 因此, 二者是生长发育必不可少的脂肪酸(Sargent *et al*, 1999)。Reitan 等(1994)认为, DHA 与 EPA 的比例是一个非常重要的健康指标, 在通常情况下, 海洋鱼类的卵子和幼体中 DHA 与 EPA 的比例为 2:1, 较低的比例如 1:1 可以引起大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)体色的异常。马爱军等(2003)认为, 色素的形成既与 DHA 的含量有关, 也与 DHA 与其他脂肪酸的比值有关。由表 5 可以看出, 蓬莱玉参和刺参体壁 DHA 含量分别为 6.63 和 4.49, EPA 含量分别为 5.45 和 3.61, 蓬莱玉参均高于刺参, 而 DHA/EPA 比

值分别为 1.22:1 和 1.24:1, 比值相近。因此, 从蓬莱玉参和刺参体壁 DHA 和 EPA 含量和比值上看, 蓬莱玉参应不是刺参的一种白化现象, 同时在生产上发现, 蓬莱玉参经过几代繁殖, 均能够保持稳定的遗传性状, 后代无体色分离现象, 据此推测, 蓬莱玉参可能为仿刺参属的一个新品种。今后应通过遗传学、分子生物学等方法进一步研究确定蓬莱玉参是仿刺参属的一个新品种, 而不是刺参的一种白化现象。

2.4 常量及微量元素含量

由表 6 可知, 在蓬莱玉参体壁中 Na、K、Cu 3 种元素含量高于刺参, 其余元素含量则低于刺参, 且二者均是 Na 元素含量最高, 但在蓬莱玉参体壁中 K 含量次之, 而在刺参中 Mg 含量次之, 说明二者存在一定差异。Hill 和 Matron 提出, 理化性质相似的元素在生物学功能是相互拮抗的, 且当 Zn:Cu>10 及 Zn:Fe>1 时通常会发生拮抗作用(柳琪等, 1995)。蓬莱玉参和刺参体壁 Zn/Cu 分别为 20.15 和 26.88, 比值均偏高, 说明 Cu 元素含量偏低, 而 Zn/Fe 分别为 0.61 和 0.50, 比值较为合理, 因此, 在饵料配制时应适当调整饵料中 Cu 的含量, 以消除元素间的拮抗作

表5 蓬莱玉参与刺参体壁中脂肪酸的组成及含量
(干重, %)(平均值±标准差)

Tab.5 Composition and contents of fatty acids in the body wall of *Apostichopus* sp. and *A. japonicus*
(Dry weight, %)(Mean ±SD)

脂肪酸 Fatty acid	含量 Content	
	蓬莱玉参 <i>Apostichopus</i> sp.	刺参 <i>A. japonicus</i>
C14:0	1.03±0.02	1.21±0.05
C16:0	7.77±0.12	10.98±0.25
C16:1	6.27±0.13	10.08±0.24
C16:2ω4	0.09±0.00	0.08±0.00
C18:0	5.10±0.13	3.22±0.15
C18:1	11.19±0.08	15.86±0.12
C18:2	3.42±0.06	5.73±0.10
C18:3	0.53±0.00	0.66±0.01
C18:4ω3	0.21±0.00	0.21±0.00
C20:0	1.29±0.05	2.31±0.07
C20:1	7.01±0.13	8.96±0.08
C20:2ω6	0.42±0.05	0.28±0.01
C20:3ω6	0.31±0.00	0.34±0.00
C20:4	9.41±0.20	6.74±0.12
C20:5ω3 EPA	5.45±0.12	3.61±0.09
C22:0	1.32±0.09	1.30±0.05
C22:1	1.72±0.08	0.96±0.05
C22:6ω3 DHA	6.63±0.27	4.49±0.14
饱和脂肪酸总量 SFA	16.51±0.41	19.02±0.57
单不饱和脂肪酸总量 MUFA	26.20±0.60	35.86±1.01
多不饱和脂肪酸总量 PUFA	26.47±0.75	22.14±0.46
DHA+EPA	12.08±0.39	8.10±0.23
DHA/EPA	1.22	1.24
UFA/SFA	3.19	3.05

表6 蓬莱玉参与刺参体壁中常量及微量元素含量(干重, mg/kg)(平均值±标准差)

Tab.6 Contents of major and trace elements in body wall of *Apostichopus* sp. and *A. japonicus*
(Dry weight, mg/kg)(Mean ±SD)

种类 Species	Na	K	Mg	Ca	P	Fe	Zn	Se	Mn	Cu	Zn/Cu	Zn/Fe	Ca/P
蓬莱玉参 <i>Apostichopus</i> sp.	94646 ±152	7595 ±58.96	6022 ±87.45	4396 ±56.23	2751 ±87.85	26.84 ±3.57	16.32 ±0.58	2.15 ±0.26	1.75 ±0.15	0.81 ±0.02	20.15	0.61	1.60
刺参 <i>A. japonicus</i>	79075 ±236	6413 ±63.23	6977 ±69.38	8447 ±45.28	3230 ±54.89	41.66 ±2.85	20.70 ±0.86	2.72 ±0.34	3.19 ±0.29	0.77 ±0.01	26.88	0.50	2.62

表7 蓬莱玉参与刺参体壁中维生素含量(干重, mg/100 g)(平均值±标准差)

Tab.7 Contents of vitamins in the body wall of *Apostichopus* sp. and *A. japonicus* (Dry weight, mg/100 g) (Mean ±SD)

种类 Species	V _A	V _{B1}	V _{B2}	V _{B3}	V _{B6}
蓬莱玉参 <i>Apostichopus</i> sp.	0.56±0.02	1.30±0.05	0.10±0.03	1.20±0.10	5.35±0.05
刺参 <i>A. japonicus</i>	0.59±0.03	0.21±0.03	0.15±0.00	1.66±0.16	5.41±0.03

用, 进而提高矿物元素的利用率。一般认为, 对于需要高钙膳食供应的人, Ca/P 应在 1:1 到 2:1 之间, 如果 Ca/P 不协调, 就会引起生理障碍(何清等, 2006), 蓬莱玉参与刺参体壁中 Ca:P 分别为 1.60 和 2.62, 因此, 蓬莱玉参体壁中所含 Ca/P 比例适宜, 可作为补钙食物。

2.5 维生素含量

由表 7 可知, 蓬莱玉参与刺参体壁中含有丰富的维生素, 蓬莱玉参体壁中维生素含量高低次序为 $V_{B6} > V_{B1} > V_{B3} > V_A > V_{B2}$, 而刺参为 $V_{B6} > V_{B3} > V_A > V_{B1} > V_{B2}$, 二者存在一定差异。此外, 在蓬莱玉参体壁中 V_{B1} 含量为 1.30 mg/100 g, 远高于刺参, 其他维生素含量与刺参相比差异不显著。V_{B6} 为人体内某些辅酶的组成成分, 参与多种代谢反应, 尤其是与蛋白质和氨基酸代谢有密切关系, 对防治不安、失眠、多发性神经炎等具有一定作用(李靖, 1999)。V_{B1} 是糖代谢过程中关键性的物质, 大量资料证明, 缺乏 V_{B1} 会导致糖代谢紊乱, 临床表现为神经系统、消化系统、心血管系统的功能障碍, 是生命机体不可缺少的物质(简林凡, 2004)。

3 结论

蓬莱玉参体壁粗蛋白和灰分含量较高, 水分和粗脂肪含量较低, 具有高蛋白、低脂肪的特点; 蓬莱玉参体壁氨基酸组成较全面, 总氨基酸含量明显高于刺参, 氨基酸组成和含量接近于推荐模式, 属于质量较好的蛋白质; 蓬莱玉参体壁中各种呈味氨基酸含量均高于刺参, 鲜美程度要好于刺参。蓬莱玉参体壁脂肪酸中 PUFA 和 UFA/SFA 高于刺参, 脂肪酸的不饱和度较高, 脂肪质量要好于刺参。蓬莱玉参 DHA 和 EPA 含量远高于刺参, 且比值相近, 同时结合生产上体色

能够稳定遗传,推测蓬莱玉参可能为仿刺参属的一个新品种。蓬莱玉参体壁中常量及微量元素含量较高, Ca/P 比例适宜,可作为补钙食物,此外,蓬莱玉参体壁维生素含量丰富,且 V_{B6} 和 V_{B1} 含量较高,具有较好的保健作用。综上所述,蓬莱玉参营养价值优于刺参,应合理地开发利用。

参 考 文 献

- 马爱军, 雷霖霖, 陈四清, 等. 鲆鲽类白化机理的研究进展. 海洋水产研究, 2003, 24(3): 80-85
- 王远红, 于明明, 王冬燕, 等. 花刺参、梅花参和绿刺参营养成分分析. 营养学报, 2010, 32(4): 397-398
- 王建新, 邴旭文, 张成锋, 等. 梭鱼肌肉营养成分与品质的评价. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 60-66
- 王颖, 吴志宏, 李红艳, 等. 青岛魁蚶软体部营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 133-139
- 区又君, 李加儿. 驼背鲈肌肉营养成分的分析与评价. 台湾海峡, 2010, 29(4): 503-509
- 刘世禄, 王波, 张锡烈, 等. 美国红鱼的营养成分分析与评价. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 25-32
- 李晓英, 李勇, 周淑青, 等. 两种淡水螺肉的营养成分分析与评价. 食品科学, 2010, 31(13): 276-279
- 李靖. 维生素的生理作用及抗癌作用. 洛阳医学专学报, 1999, 17(3): 169-176
- 何清, 胡晓波, 周峙苗, 等. 东海绿藻缘管浒苔营养成分分析及评价. 海洋科学, 2006, 30(1): 34-38
- 苏秀榕, 娄永江, 常亚青, 等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究. 营养学报, 2003 25(2): 181-182
- 杨建敏, 邱盛尧, 郑小东, 等. 美洲帘蛤软体部营养成分分析及评价. 水产学报, 2003, 27(5): 495-498
- 张伟敏, 钟耕, 王炜. 单不饱和脂肪酸营养及其生理功能研究概况. 粮食与油脂, 2005(3): 13-15
- 杭晓敏, 唐涌濂, 柳向龙. 多不饱和脂肪酸的研究进展. 生物工程进展, 2001, 21(4): 18-21
- 林利民, 王秋荣, 王志勇, 等. 不同家系大黄鱼肌肉营养成分的比较. 中国水产科学, 2006, 13(2): 286-291
- 柳琪, 滕葳, 张炳春. 中华鳖氨基酸和微量元素的分析与研究. 氨基酸和生物资源, 1995, 17(1): 18-21
- 董辉, 王颀, 刘亚琼, 等. 杂色蛤软体部营养成分分析及评价. 水产学报, 2011, 35(2): 276-282
- 简林凡. 维生素 B1 缺乏与防治. 井冈山医学专学报, 2004, 11(3): 68-70
- 廖玉麟. 我国的海参. 生物学通报, 2001, 36(9): 1-3
- Bell JG, Sargent JR. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture, 2003, 218(1-4): 491-499
- Oser BL. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. J Am Diet Assoc, 1951, 27(5): 396-402
- Reitan KI, Rainuzzo JR, Olsen Y. Influence of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. Aquacult Int, 1994, 2(1): 33-48
- Sargent JR, McEvoy LA, Bell JG. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. Aquaculture, 1997, 155(1-4): 117-127
- Sargent JR, McEvoy LA, Estevez A, et al. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. Aquaculture, 1999, 179(1-4): 217-229

(编辑 陈严)

Analysis and Evaluation of Nutrient Composition in the Body Wall of Penglai Sea Cucumber (*Apostichopus* sp.)

LIU Changlin¹, WANG Youting², QIN Bo¹, RUAN Feiteng¹, CHEN Siqing^{1①},
YAN Jingping¹, ZHAO Fazhen¹, LIU Chunsheng¹, CUI Hengquan³

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Yantai Haiyi Seeds Co., Ltd, Yantai 265619; 3. Haiyang City Haiyang Aquatic Products Co., Ltd., Haiyang 265122)

Abstract Penglai sea cucumber (*Apostichopus* sp.) is a newly developed aquaculture species. The nutrient composition in the body wall of Penglai sea cucumber has not been investigated widely. The current study measured the nutrient composition of Penglai sea cucumber and compared with other sea cucumber species. Results showed that the contents of moisture, crude protein, crude fat, and crude ash of the body walls of Penglai sea cucumber were 91.29%, 5.25%, 0.23% and 3.09%, respectively. The contents of crude protein and crude ash were higher than those of *Apostichopus japonicus*, whereas the contents of moisture and crude fat were lower than those of *A. japonicus*. The total amino acids (TAA) content of Penglai sea cucumber was 53.76%, which was significantly higher than that of *A. japonicus*. Furthermore, the flavor amino acids (FAA) content was 25.63%, which accounted for 47.66% of TAA. The FAA contents were higher than those of *A. japonicus*, suggesting that Penglai sea cucumber might be more delicious than other sea cucumber species. In addition, the contents of PUFA and “DHA+EPA” were 26.47% and 12.08%, respectively and the UFA/SFA ratio was 3.19 in Penglai sea cucumber, which were higher than those in *A. japonicus*. The body wall of Penglai sea cucumber has great content in major and trace element, V_{B6}, V_{B1}, and suitable Ca/P ratio. The content of V_{B1} was 1.3 mg/100 g, which was higher than that of *A. japonicus*. In conclusion, Penglai sea cucumber bears better nutrition condition, and is a promising species for aquaculture and stock enhancement.

Key words Penglai sea cucumber; Body wall; Nutrient components; Nutritional evaluation

① Corresponding author: CHEN Siqing, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

两种三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)

养殖塘中浮游细菌的季节变化*



陈逸斐 韦 梦 裘琼芬^① 蒋霞敏 王春琳

(宁波大学海洋学院, 宁波 315211)

摘要 结合基于细菌 16S rRNA 基因的 T-RFLP 技术与克隆测序技术, 对象山港三疣梭子蟹、脊尾白虾混养模式下改良塘 M1(塘底铺网四周铺砂)以及传统塘 M2(土塘)水体不同季节细菌群落结构和多样性进行分析。结果显示, M1、M2 养殖塘水体细菌群落主要由变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)组成。养殖过程中, 细菌群落结构随时间发生了显著变化, 不同养殖塘水体细菌群落结构变化的方向不同。M1 养殖塘水体由放线菌门主导的群落结构向蓝藻菌门以及变形菌门主导的群落结构发展, M2 养殖水体由蓝藻菌门主导的向变形菌门主导的群落结构发展, 说明养殖后期改良塘水体有利于蓝藻细菌的生长。无论是 M1 还是 M2, 拟杆菌门在 8-9 月含量最高, 且养殖过程中在 M2 水体的含量始终高于 M1。随着养殖时间的推移, M1 养殖塘水体细菌群落由多样性指数高的稳定性结构向多样性指数低的不稳定性结构转变, 而 M2 水体养殖后期仍保持较高的多样性指数。PCA 分析结果显示, M1 养殖塘水体细菌群落差异性大于 M2, 说明 M2 水体细菌群落对环境变化的抵御能力大于 M1。相关性分析结果显示, 不同养殖塘水体细菌群落分布受环境的影响效应不同。

关键词 三疣梭子蟹; 水体; 细菌群落; T-RFLP

中图分类号 Q938 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0119-07

在养殖过程中, 为了提高产量, 饵料的投入往往高于实际需求, 这种做法往往导致养殖水体水质恶化, 尤其是在养殖中后期, 水质恶化更加严重(Sugiura *et al*, 2006; Ma *et al*, 2013)。水质的恶化给养殖对象的健康带来很大的压力, 常常会导致严重的疾病暴发和经济损失, 已成为威胁水产养殖发展的主要因素(Defoirdt *et al*, 2011)。近年来, 大量的证据表明, 浮游生物群落与养殖对象的健康密切相关, 在养殖生态系统中, 细菌与养殖生物的健康生长以及养殖环境关系密切。细菌群落和功能的变化受到环境因子的影响(Cotner *et al*, 2002), 同时又反过来影响各种环境因子, 如细菌种类和数量的动态变化导致环境中溶氧

(DO)、pH 等环境因子的变化, 同时环境的恶化可导致病害微生物更容易入侵养殖生物体, 对养殖生物的健康生长带来不良影响。研究表明, 在健康的虾群和病变的虾群中有明显不同的细菌群落(Lucas *et al*, 2010; Boutin *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2014)。微生物的组成可以作为诊断养殖对象病变的指标(Chytrý *et al*, 2002)。Berry 等(2012)研究表明, 细菌组成结构的变化对葡萄糖硫酸钠诱导的疾病有指示作用。Fortunato 等(2013)研究表明, 细菌分类指示具有季节性动态变化的特征。微生物的群落组成还可以反映环境的质量(Dang *et al*, 2008; Yeo *et al*, 2013), 沉积物中细菌的组成可指示污染程度(Xiong *et al*, 2014)。因此了解养殖

*国家海洋经济创新发展区域示范项目(2014-31)和宁波市农村科技创新创业资金项目(2014C92011)共同资助。陈逸斐, E-mail: 930737601@qq.com

^① 通讯作者: 裘琼芬, 讲师, E-mail: qiuqiongfen@nbu.edu.cn

收稿日期: 2015-04-16, 收修改稿日期: 2015-05-31

水体细菌群落的变化对掌握养殖状况有重要作用。关于宁波象山港三疣梭子蟹与脊尾白虾混养养殖水体细菌群落的研究尚未见报道。本研究通过 T-RFLP 技术结合克隆测序的方法,对象山港三疣梭子蟹脊尾白虾混养模式下改良塘(塘底铺网四周铺砂养殖塘)以及传统塘(土塘)水体不同季节细菌群落结构和多样性进行分析,探讨养殖过程中水体环境细菌群落的变化,对宁波象山港三疣梭子蟹养殖业的健康发展有重要意义。

1 材料与方法

1.1 水样采集

三疣梭子蟹养殖塘位于宁波市象山港东胜养殖区,养殖塘分两种类型:一为改良塘(M1),底铺网、四周铺砂,设置两个平行塘;二为传统土塘(M2),设置3个平行塘。单个塘面积为1600 m²,水深1.2 m,采用底部充氧方式增氧。2013年6月8日投放三疣梭子蟹4期自然种苗,放苗密度为6只/m²,同时每个塘投放1.75 kg 脊尾白虾亲虾进行虾蟹混养。

样品采集于2013年6–12月中旬,将单个塘中不同站位养殖水混合后,取200 ml水样过滤(0.22 μm, Millipore),所得滤膜用于微生物DNA的提取,水体用于氮、磷含量的分析。所有样品低温运回实验室,–20℃冻存备用。

1.2 理化分析

按照《海洋监测规范》原位测定养殖水体的水温、溶解氧、盐度、pH和透明度,实验室内测定过滤所得水体中的总氮、总磷、氨氮以及亚硝酸氮。

1.3 总DNA的提取和PCR扩增

将滤膜放于2 ml裂解管中进行养殖水总DNA的提取,提取方法参考Noll等(2005)。

1.4 T-RFLP分析

将乙醇沉淀法纯化后的PCR产物用限制性内切酶 *Msp* I(TaKaRa)进行酶切,反应体系及条件参考裘琼芬等(2013)。

1.5 克隆/测序和系统发育分析

选取M2养殖塘7月水体样品构建细菌16S rRNA基因克隆文库。采用无荧光标记的引物27f/907r进行PCR扩增,其余PCR条件同上。以凝胶纯化后PCR产物为模板,以pMD-19T Vector(TaKaRa)为载体,4℃过夜连接。连接产物转入到大肠杆菌JM109

感受态细胞中(TaKaRa),并在含X-gal、IPTG的LB培养基上进行蓝白斑筛选。分别筛选82个阳性克隆进行测序,所得测序结果利用ARB软件的NJ算法(Neighbor-Joining)进行系统发育分析。

1.6 数据处理

细菌16S rRNA基因T-RFLP图谱中每一个限制性片段(T-RF)为一个OTU(Operational taxonomic unit),以各个T-RF的相对峰高值(每个T-RF的峰高占累积峰高的百分比)为各个OTU的相对丰度,相对丰度低于5%的OTU不予考虑(Noll *et al.*, 2005)。计算细菌的Shannon多样性指数(H')和均匀度指数(E'),计算公式如下:

$$H' = -\sum P_i \ln P_i; E' = H' / \ln S$$

式中, P_i 为第*i*个OTU的相对丰度, S 为OTU总数。

取平行T-RF相对丰度的平均值,在Excel中绘制T-RFLP百分比图,利用Past软件对T-RFLP结果进行主成分分析,结合环境因子,利用CANOCO 4.5软件对各点进行冗余分析,同时利用Past进行细菌16S rRNA基因与环境相关性以及线性回归分析。

2 结果

2.1 基于T-RFLP的细菌群落结构分析

用荧光标记细菌16S rRNA基因的通用引物27f/907r扩增目的片段,并进行末端限制性片段多态性分析(图1)。结果显示,养殖过程中,养殖塘水体细菌主要由T-RF 490 bp、439 bp、150 bp、130 bp、94 bp、167 bp、69 bp组成,各个片段相对丰度变化不同。养殖初期,M1和M2水体细菌群落组成明显不同。在放苗的30d(6月),M1水体以69 bp、167 bp和439 bp为主,相对丰度分别为43.5%、31.8%和18.2%;而M2水体6月主要以490 bp为主,相对丰度占60%左右,其次到439 bp,其相对丰度为17%左右。同时,94 bp、130 bp、150 bp、167 bp也占3%–6%左右,但未出现69 bp片段。M1养殖水体细菌群落变化比M2大,出现了490 bp,且相对丰度达46%左右,69 bp和167 bp均略有降低,同时出现少量130 bp片段;M2水体7月较6月而言变化不是很明显,出现了69 bp片段,但丰度仅占4%左右,94 bp片段相对丰度有所升高。两种养殖塘水体8–9月细菌群落结构差异不大,相对丰度较大的片段均为490 bp、94 bp和439 bp。养殖后期(10–12月)两种养殖塘水体均以490 bp、439 bp为主,但二者在M1和M2中的相对

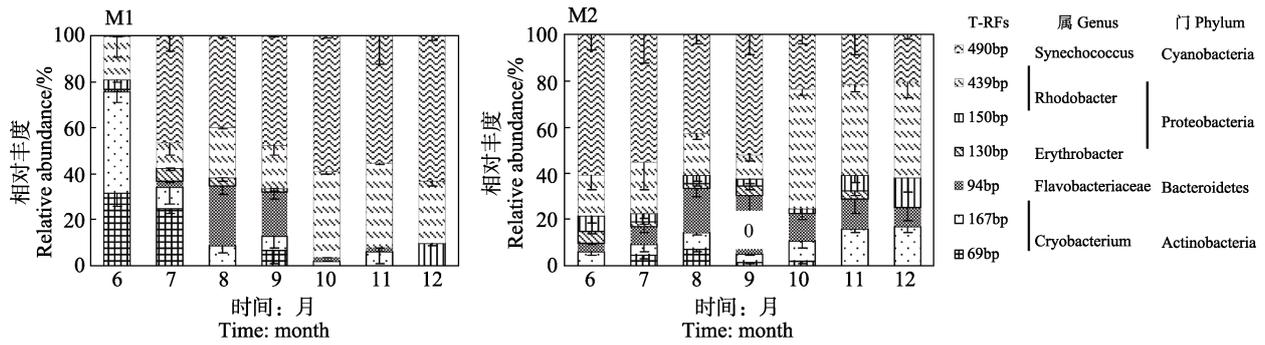


图 1 养殖塘水体细菌 T-RFLP 百分比

Fig.1 T-RFLP patterns of bacterial 16S rRNA genes of aquaculture water

丰度不同。490 bp 在 M1 和 M2 水体的相对丰度分别为 55%–65%和 20%–23%，439 bp 在 M1 和 M2 水体的相对丰度分别为 27%–37%和 40%–50%。养殖过程中各个 T-RF 百分比的变化说明，养殖水体细菌群落组成随时间发生变化，不同养殖塘水体在养殖初期就有不同的细菌群落组成，且不同养殖塘水体细菌群落结构随时间的变化不同。

从细菌 16S rRNA 基因的克隆和系统发育分析结果可知，养殖塘水体细菌群落主要有变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)以及浮霉菌门(Planctomycetes)。克隆文库中有 39.0%左右属于蓝藻门，13.4%属于变形菌门，17.1%属于拟杆菌门，20.7%属于放线菌门，2.4%属于浮霉菌门，剩下的为 γ -变形菌纲。在两种养殖塘水体中大量存在的 T-RF 490 bp 所代表的细菌属于蓝藻门、Chroococcales、聚球藻属(*Synechococcus*)，T-RF 439 bp、150 bp、130 bp 所代表的细菌分别属于变形菌门红细菌属(*Rhodobacter*)、*Leisingera*，变形菌门、深海细菌属(*Thalassobacter*)，鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaeae)、煮杆菌属(*Erythrobacter*)。T-RF 94 bp 属于拟杆菌门的黄杆菌科。T-RF 167 bp、69 bp 所代表的细菌均属于放线菌门、微杆菌科(Microbacteriaceae)的冷杆菌属(*Cryobacterium*)。

为了进一步比较两种养殖塘水体细菌群落结构的季节性变化，对各个时间点细菌 16S rRNA 基因的 T-RFLP 结果进行主成分分析，结果如图 2 所示。两种养殖塘水体细菌群落结构随季节演替存在一定的规律，从养殖初期到养殖末期，二者的细菌群落演替方向显著不同。M1 养殖塘水体细菌群落结构从放线菌门主导向蓝藻门主导的群落发展，而 M2 养殖塘水体细菌群落结构从蓝藻门主导的群落结构向变形菌门主导的群落发展。8、9 月时二者细菌群落组成重叠在一起，群落结构较为相似。从各个点在主轴上的分散程度可以看出，整个养殖过程中 M1 养殖塘水体

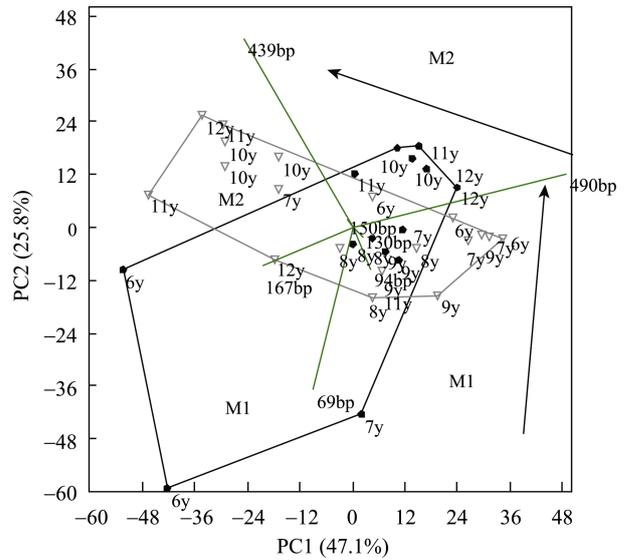


图 2 细菌 16S rRNA 基因 T-RFLP 的主成分分析

Fig.2 Principal component analysis for the bacterial 16S rRNA gene T-RFLP

细菌组成分布比 M2 广，说明从 6–12 月 M1 养殖塘水体细菌群落结构差异性大于 M2。

2.2 基于 T-RFLP 的细菌多样性分析

基于细菌 16S rRNA 基因 T-RFLP 的末端限制性片段长度的数目以及相对丰度，计算了 M1 和 M2 各个月份养殖水体中细菌的 Shannon 多样性指数 H' 以及均匀度指数 E' (表 1)。结果显示，M1 和 M2 水体细菌群落多样性 8 月最大。M1 养殖水体细菌群落多样性在养殖前期(6–9 月)大于养殖后期(10–12 月)，而 M2 水体细菌群落多样性在养殖初期(6–7 月)最小。M1 与 M2 二者相比较，养殖初期(6–7 月)和养殖中期(8–9 月)相差不是很明显，而到了养殖后期(10–12 月)，M2 养殖水体细菌多样性明显大于 M1。

2.3 细菌分布与环境因子的关系

为了研究环境因子对细菌群落结构变化的影响，

表 1 基于 T-RFLP 图谱的细菌多样性分析
(Mean±SE, n=3)

Tab.1 Analysis of bacteria diversity based on T-RFLP profiles (Mean±SE, n=3)

时间(月) Time(Month)	Shannon 多样性指数 H' Shannon Diversity index H'		均匀度指数 E' Evenness index E'	
	M1	M2	M1	M2
	6	0.96±0.01	1.18±0.09	0.64±0.04
7	1.15±0.05	1.05±0.13	0.68±0.07	0.65±0.15
8	1.37±0.06	1.49±0.11	0.85±0.05	0.83±0.06
9	1.29±0.02	1.26±0.11	0.86±0.04	0.71±0.05
10	0.83±0.01	1.23±0.03	0.60±0.01	0.81±0.04
11	0.87±0.05	1.26±0.07	0.87±0.08	0.75±0.02
12	0.86±0.01	1.33±0.21	0.79±0.01	0.88±0.11

将环境因子—水温、溶氧、盐度、pH、透明度、总氮、总磷、氨氮以及亚硝酸氮与 T-RFLP 结果进行 RDA 分析(图 3), 结果显示, 选取的 9 个环境因子对 M1、M2 养殖塘水体各时间点细菌分布的解释量分别为 58.4%和 39.1%, 其中主轴 RDA1 解释量分别为 33.2%和 25.2%, 说明所选取的环境因子对 M1 水体细菌分布的影响程度大于 M2 养殖水体。对于 M1 养殖水体, 总氮、pH、透明度、盐度、总磷、氨氮对 7-9 月细菌分布影响较大; 溶解氧、温度对 10-12 月细菌分布的影响较大, 同时亚硝酸氮对 10-11 月细菌分布的影响也较明显; 环境因子对 6 月细菌分布的影响较小, 不是很集中。对于养殖塘 M2, 6、8、9、10、11 月主要受亚硝酸氮、总磷影响; 12 月和 7 月主要受总氮、pH、透明度、DO、温度、氨氮以及盐度的影响, 但是影响效应不是很集中。从 RDA 分析可以看出, 各

个环境因子对不同养殖塘水体细菌群落动态变化的影响不同。

从各个 T-RF 与环境因子的相关性分析(表 2)可以得出, 相同的 T-RF 片段, 在不同养殖塘水体中, 受到环境因子的影响不同。放线菌门细菌在土塘(M2)中受环境的影响较大, 相对丰度随温度和透明度的降低而增加; 而在改良塘(M1)养殖塘中仅受透明度的影响较大, 但透明度高时相对丰度较大。拟杆菌门细菌在 M1 养殖环境中受环境影响较大, 温度、pH、透明度、总氮较高时, 抑制其生长, 而高氨氮促进其生长; 但在 M2 养殖塘中, 仅受 pH 的影响较为显著, 在 pH 较低时含量较高。放线菌门的各个科受环境的影响有差异, 在 M1 中, 深海细菌属(*Thalassobacter*)(150 bp)和赤杆菌属(*Erythrobacter*)(130 bp)受环境影响较大, 而在 M2 中, 红细菌属(*Leisingera*) (439 bp)受环境影响较大。在 M1 水体中, 随温度和透明度降低, 蓝藻门细菌含量增多, 总磷、溶解氧对其的影响与温度相反, 而在 M2 中, 蓝藻门细菌随温度升高含量增多, 溶解氧、透明度、总氮、总磷较低时, 含量较大。相关性分析表明, 同种菌种在不同的生态系统中受到环境的影响不同。

3 讨论

结合 T-RFLP 与克隆测序结果显示, 养殖过程中两种养殖塘水体细菌群落主要由变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、蓝藻门组成, 这些都是水体中普遍存在的细菌(Warnecke *et al*, 2004; Kirchman, 2002)。多数研究表明, 水体微生物群落结构具有高度时空动态

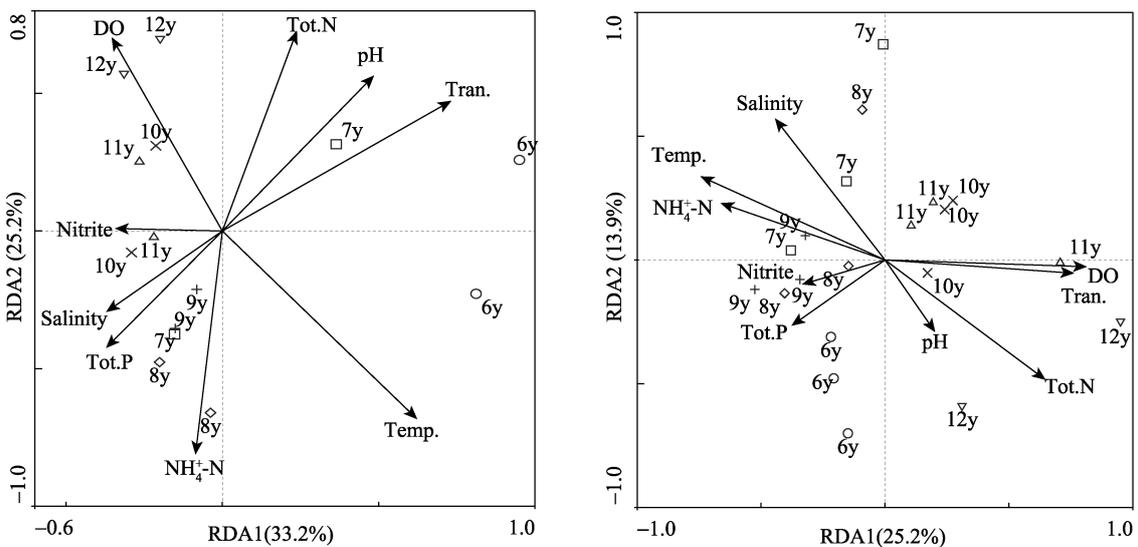


图 3 不同时间养殖塘水体细菌群落结构与环境因子的冗余分析

Fig.3 Redundancy analysis for bacteria community compositions and environmental factors of aquaculture water during different period

表 2 细菌 16S rRNA 基因与环境相关性以及线性回归分析

Tab.2 Correlation and linear regression analysis of bacterial 16S rRNA gene and environmental factors

		69 bp		167 bp		94 bp		130 bp		150 bp		439 bp		490 bp	
		M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
Temperature	r	0.421	0.321	0.493	-0.495	0.419	0.027	0.549	0.261	-0.479	-0.399	-0.623	-0.550	-0.681	0.733
	P	0.133	0.167	0.073	0.0263	0.134	0.907	0.042	0.266	0.082	0.081	0.017	0.012	0.007	<0.001
DO	r	-0.183	-0.221	-0.269	0.255	-0.755	-0.392	-0.095	-0.396	0.494	0.320	0.267	0.622	0.561	-0.479
	P	0.531	0.348	0.351	0.277	0.001	0.087	0.745	0.083	0.072	0.168	0.355	0.003	0.037	0.032
Salinity	r	0.016	0.365	-0.409	-0.243	0.272	0.300	0.608	-0.065	-0.519	-0.323	-0.354	-0.256	0.390	0.194
	P	0.957	0.114	0.145	0.301	0.347	0.198	0.021	0.786	0.057	0.164	0.214	0.276	0.167	0.413
pH	r	0.331	-0.183	0.303	-0.018	-0.529	-0.486	-0.100	-0.069	0.765	0.284	-0.316	-0.002	-0.269	0.262
	P	0.248	0.439	0.293	0.941	0.052	0.029	0.732	0.771	0.001	0.224	0.271	0.991	0.351	0.265
Tran.	r	0.360	-0.128	0.613	-0.539	-0.537	-0.276	-0.374	-0.448	0.704	0.076	-0.128	0.606	-0.603	-0.610
	P	0.207	0.589	0.019	0.014	0.047	0.237	0.187	0.047	0.004	0.749	0.661	0.004	0.022	0.004
Tot.N	r	0.001	-0.405	0.272	0.683	-0.719	-0.119	-0.699	-0.235	0.733	0.418	0.377	0.357	-0.112	-0.562
	P	0.998	0.007	0.346	<0.001	0.003	0.615	0.005	0.319	0.002	0.066	0.183	0.122	0.702	0.009
Tot.P	r	-0.290	-0.186	-0.236	-0.189	0.307	0.051	0.025	0.148	0.557	-0.162	0.364	0.462	0.532	-0.576
	P	0.314	0.433	0.415	0.423	0.286	0.831	0.932	0.531	0.038	0.494	0.200	0.040	0.025	0.008
NH ₄ ⁺ -N	r	-0.137	0.382	0.001	-0.275	0.965	0.390	0.409	0.225	-0.414	-0.188	-0.326	-0.534	-0.145	0.355
	P	0.640	0.096	0.996	0.240	<0.001	0.089	0.146	0.341	0.141	0.428	0.255	0.015	0.621	0.123
NO ₂ ⁻ -N	r	-0.331	-0.231	-0.159	-0.089	-0.080	0.335	-0.403	0.171	-0.334	-0.193	0.641	-0.207	0.267	0.135
	P	0.247	0.327	0.586	0.706	0.784	0.147	0.153	0.469	0.242	0.416	0.013	0.382	0.355	0.571

注: 黑体表示显著相关($P<0.05$) Note: Bold means significant correlation ($P<0.05$)

性(Gilbert *et al*, 2009; Or *et al*, 2012; Teeling *et al*, 2012)。微生物群落结构的变化与生态功能的改变有关, 研究表明, 微生物群落结构发生重大变化可能大幅度改变其生态功能(Xiong *et al*, 2010; Comte *et al*, 2011)。细菌群落组成与养殖对象的病变密切相关, 细菌群落组成在健康环境中与非健康环境中明显不同(Lucas *et al*, 2010; Boutin *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2014)。微生物调节系统对养殖生物体的健康十分重要, 浮游细菌群落骤然变化可能导致养殖对象病变暴发(Beardsley *et al*, 2011)。从两种养殖塘水体细菌群落结构的变化来看, 改良塘水体细菌群落结构变化幅度大于传统塘, 从微生物学角度预示着改良塘水体生态功能稳定性小于传统塘, 同时改良塘细菌群落骤然变化可能对养殖生物带来不利影响。

养殖过程中变化较为显著的有拟杆菌门、黄杆菌科(Flavobacteriaceae)和变形菌门、红细菌属、聚球藻属。两种养殖水体黄杆菌科相对丰度在高温天气时(8、9月)迅猛增多, 且在改良塘中变化幅度大于传统塘。黄杆菌科是异养生物, 专门降解复杂有机物, 为其他类群生物提供可利用底物(Teeling *et al*, 2012; Williams *et al*, 2013)。有研究表明, 黄杆菌科的大量减少导致有机物累积, 使微生物循环失衡(Abell *et al*, 2005)。

由此可见, 改良塘水体微生物循环平衡性小于传统塘。红细菌属是能够产生病毒样元件的微生物(Lang *et al*, 2007), 红细菌属与养殖对象的健康密切相关, 病原体如红细菌属能导致养殖生物体的大量死亡(Zhang *et al*, 2014)。养殖过程中, 两种养殖塘水体的红细菌属逐渐增多, 并与总磷呈正相关。Zhang 等(2014)研究表明, 病害塘与健康塘水体细菌群落的变化主要是由病害塘水体总磷以及化学需氧量(COD)显著升高引起。因此, 从红细菌属的变化来看, 到了养殖后期, 水体环境越来越不利于养殖对象的生长。蓝藻是与水质变化密切相关的一种细菌(王云波等, 2008), 蓝藻的大量繁殖会导致养殖水体水质恶化(姚延丹等, 2011)。从蓝藻细菌的变化来看, 改良塘水质逐渐变差, 而传统塘水质较养殖初期有改善。多样性指数是评价微生物群落多样性的有效方法(Stam *et al*, 2010)。两种养殖塘水体细菌群落多样性均在 8 月最大, RDA 分析发现, 8 月的细菌分布受氨氮显著影响。氨氮作为微生物可利用的有效氮素之一(Schimel, 2000), 8 月水体中较高浓度氨氮为细菌的生长提供有利条件。多样性指数的变化与水体环境的变化有关, 当群落结构从多样性指数较高的稳定结构向多样性指数较低的不稳定结构转变, 对应的环境变得相对脆弱, 增大养

殖病害暴发的几率(裘琼芬等, 2013)。从多样性指数的变化来看, 传统塘养殖环境的稳定性大于改良塘。

两种养殖塘水体细菌群落结构变化的不同可能与养殖塘底质有关。传统土塘土壤中本身含有氮等无机盐, 溶于水后增加了池塘水的肥力, 同时土壤中的有机物质经过微生物分解后溶于水变成了简单的无机盐等, 也能增加水体的肥力, 这为养殖初期蓝藻生长提供了良好的条件。而在改良塘中, 底铺网四周铺砂改良措施减少了土壤与水体接触的面积, 土壤中的有机物质等不能溶于水, 养殖初期时水体氮、磷等营养元素以及有机质含量相对较低, 不利于蓝藻门细菌的生长, 水体主要优势菌为放线菌。但随着时间的推移, 底泥的厚度不断增加, 养殖塘水体肥力不断增加(贾晓燕, 2006), 为蓝藻门细菌的生长提供了有利条件。而在传统土塘中, 随着养殖时间推移, 淤泥与土壤中的粘土矿粒结合在一起, 对水体中的一些离子状物质发生吸附作用, 并能与其他离子代谢达到动态平衡, 再加上养殖后期饵料投入的减少以及养殖生物体的减少, 使得水体中总磷含量下降, 这可能是土塘养殖后期水体蓝藻门细菌含量减少的原因。两种养殖塘泥土界面的差异也可能是群落变化差异的主要原因。泥水界面层是营养物质再生以及有机物矿化的重要场所(Hargreaves, 1997), 底铺网四周铺砂改良减少了泥水界面层的面积, 可能导致营养物质再生能力比传统土塘弱, 这可能是细菌群落结构的影响因素之一。养殖对象对底泥扰动的差异也可能导致两种养殖塘水体细菌群落结构的差异。底泥的扰动影响有效态磷的转化过程(李大鹏等, 2010), 氮、磷等营养盐是影响微生物群落结构的重要因素。底铺网四周铺砂改良措施减少了养殖对象对底泥的扰动, 同时也可能造成两种养殖塘氮、磷等营养盐物质循环的差异, 因而有可能导致这两种养殖塘水体细菌群落结构变化不同。综上所述, 三疣梭子蟹养殖塘水体浮游细菌群落结构随季节发生变化, 且在不同养殖塘水体变化明显不同。外界环境如温度、季节的变化等对传统土塘细菌群落的影响较小, 对改良塘细菌群落影响较大。

参 考 文 献

王云波, 谭万春. 水源蓝藻暴发的原因分析及水质安全保障措施. 中国农村水利水电, 2008(5): 37-40
李大鹏, 黄勇, 范成新. 底泥间歇扰动-沉降过程对静止水体中生物有效磷的影响. 环境科学, 2010, 31(8): 1795-1800
姚延丹, 李谷, 陶玲, 等. 复合池塘循环水养殖系统微生物群落结构分析. 中国水产科学, 2011, 18(2): 407-415
贾晓燕. 养殖池塘底质改良措施. 农家顾问, 2006 (7): 51-53
裘琼芬, 张德民, 叶仙森, 等. 象山港网箱养殖对近海沉积物

细菌群落的影响. 生态学报, 2013, 33(2): 483-491
Abell GJ, Bowman JP. Ecological and biogeographic relationships of class Flavobacteria in the Southern Ocean. FEMS Microbiol Ecol, 2005, 51, 265-277
Beardsley C, Moss S, Malfatti F, *et al.* Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. FEMS Microbiol Ecol, 2011, 77(1): 134-145
Berry D, Schwab C, Milinovich G, *et al.* Phylotypelevel 16S rRNA analysis reveals new bacterial indicators of health state in acute murine colitis. ISME J, 2012, 6: 2091-2106
Bore SI, Hedtkamp SIC, van Beusekom JEE, *et al.* Time and sediment depth-related variations in bacterial diversity and community structure in subtidal sands. ISME J, 2009, 3: 780-791
Boutin S, Bernatchez L, Audet C, *et al.* Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. PLoS One, 2013, 8: e84772
Chytrý M, Tichý L, Holt J, *et al.* Determination of diagnostic species with statistical fidelity measures. J Ve Sci, 2002, 13: 79-90
Comte J, del Giorgio P A. Composition influences the pathway but not the outcome of the metabolic response of bacterioplankton to resource shifts. PLoS ONE, 2011, 6, e25266
Cotner JB, Biddanda BA. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. Ecosystems, 2002, 5(2): 105-121
Dang H, Zhang X, Sun J, *et al.* Diversity and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing crenarchaeota in response to estuarine and environmental gradients in the Changjiang Estuary and East China Sea. Microbiology, 2008, 154, 2084-2095
Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Curr Opin Microbiol, 2011, 14(3): 251-258
Fortunato CS, Eiler A, Herfort L, *et al.* Determining indicator taxa across spatial and seasonal gradients in the Columbia River coastal margin. ISME J, 2013, 7: 1899-1911
Gilbert JA, Field D, Swift P, *et al.* Seasonal succession of microbial communities in the Western English Channel using 16S rDNA-tag pyrosequencing. Environ Microbiol, 2009, 11: 3132-3139
Kirchman DL. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 39(2): 91-100
Lang AS, Beatty JT. Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria. Trends Microbiol, 2007, 15, 54-62
Lucas R, Courties C, Herbland A, *et al.* Eutrophication in a tropical pond: Understanding the bacterioplankton and phytoplankton dynamics during a vibriosis outbreak using flow cytometric analyses. Aquaculture, 2010, 310(1-2): 112-121
Ma Z, Song X, Wan R, *et al.* A modified water quality index for intensive shrimp ponds of *Litopenaeus vannamei*. Ecol Indic, 2013, 24: 287-293

- Noll M, Matthies D, Frenzel P, *et al.* Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ Microbiol*, 2005, 7(3): 382–395
- Or A, Shtrasler L, Gophna U. Fine-scale temporal dynamics of a fragmented lotic microbial ecosystem. *Sci Rep*, 2012, 2: 207
- Schimel J. Global change: rice, microbes and methane. *Nature*, 2000, 403(6768): 375–377
- Stam MC, Mason PRD, Pallud C, *et al.* Sulfate reducing activity and sulfur isotope fractionation by natural microbial communities in sediments of a hypersaline soda lake (Mono Lake, California). *Chem Geol*, 2010, 278(1/2): 23–30
- Sugiura SH, Marchant DD, Wiggins T, *et al.* Effluent profile of commercially used low-phosphorus fish feeds. *Environ Pollut*, 2006, 140(1): 95–101
- Teeling H, Fuchs BM, Becher D, *et al.* Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, 2012, 336: 608–611
- Warnecke F, Amann R, Pernthaler J. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ Microbiol*, 2004, 6(3): 242–253
- Williams TJ, Wilkins D, Long E, *et al.* The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environ Microbiol*, 2013, 15: 1302–1317
- Xiong J, Wu L, Tu S, *et al.* Microbial communities and functional genes associated with soil arsenic contamination and rhizosphere of the arsenic hyper-accumulating plant *Pteris vittata* L. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 7277–7284
- Xiong J, Ye X, Wang K, *et al.* The Biogeography of the sediment bacterial community responds to a nitrogen pollution gradient in the East China Sea. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80: 1919–1925
- Yeo SK, Huggett MJ, Eiler A, *et al.* Coastal bacterioplankton community dynamics in response to a natural disturbance. *PLoS ONE*, 2013, 8, e56207
- Zhang D, Wang X, Xiong J, *et al.* Bacterioplankton assemblages as biological indicators of shrimp health status. *Ecol Indic*, 2014, 38: 218–224

(编辑 江润林)

The Seasonal Variations of Bacterioplankton in Two Types of Ponds of *Portunus trituberculatus*

CHEN Yifei, WEI Meng, QIU Qiongfeng^①, JIANG Xiamin, WANG Chunlin

(School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211)

Abstract The dynamic changes and diversity of bacterial communities in two types of ponds (M1: pond with sand around and netted bottom, M2: traditional soil pond) of *Portunus trituberculatus-exopalaemon carinicauda* polyculture in different seasons were investigated by the technology of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis based on bacterial 16S ribosomal RNA gene and cloning. The results showed that the bacterial communities in both M1 and M2 consisted of Proteobacteria, Bacteroidete, Actinobacteria, and Cyanobacteria. The composition of bacteria community changed dramatically with breeding time with various compositions in different ponds. The bacterial community in M1 is composed of Actinomycetes, Cyanobacterium and Proteobacteria, while the bacterial community in M2 included Cyanobacterium and proteobacteria, indicating that M1 was conducive to the growth of Cyanobacteria. The highest relative abundances of Bacteroidetes were in August and September in both M1 and M2, and M2 always has higher relative abundances of Bacteroidetes than M1 during the whole farming time. The bacterial community of M1 pond changed from high diversity index and stability structure to low diversity index and instability structure over breeding time, while bacterial community of M2 pond remained high diversity index in the late breeding time. PCA analysis showed that the seasonal variations of bacterioplankton were much more obvious in M1 than M2, indicating the greater ability of M2 to resist environmental change than M1. Correlation analysis results indicated that environmental factors have different effects on bacteria community of each pond water.

Key words *Portunus trituberculatus*; Aquacultural water; Bacteria community; T-RFLP

① Corresponding author: QIU Qiongfeng, E-mail: qiuqiongfeng@nbu.edu.cn

大海马(*Hippocampus kuda* Bleeker)幼体口吻部骨骼形态观察及其对摄食的影响*



王子晖 徐永健^① 李 响

(宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 通过对 10 尾 2–3 日龄的幼体海马的固定、染色、消化的研究,用显微镜对其摄食器官的构成进行详细观察,明确了幼体海马管状鼻内骨骼的结构。结果显示,幼体海马在摄食时,其舌骨角、后翼骨、方骨、上颌骨、续骨起到支撑等重要的作用;海马幼鱼期续骨与后翼骨之间的夹缝结构,可使略大的饵料通过。因此,可以在养殖过程中通过适当地增加饵料的粒径,有效地提高幼体摄食效率,从而提高存活率。

关键词 大海马幼鱼;口吻部;骨骼形态;摄食

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0126-05

海马(*Hippocampus kuda* Bleeker)为浅海小型鱼类,是一类名贵的海洋药源生物,素有“南方人参”之称。由于海马医疗保健功效显著,用途广,国内外需求量很大,仅依靠海洋捕捞获得远不能满足国内外日益增长的需求。仅中国内地、香港地区、台湾地区及新加坡,每年消耗的海马就达 1600 万只左右(高山,1996;马泽芳,1999;吴善,2005)。海马除直接用于治病外,还用于制造各种药品和保健品。我国出口的海马类药品,原料大部分靠进口(高山,1996;马泽芳,1999;严家彬等,2002;吴善,2005)。需求量远远大于供给量,因此,只有人工养殖才是解决供需矛盾的根本办法。

人工养殖研究发现,海马在幼体状态时,死亡率极高(谢莹等,1990;吴善,2005)。究其原因,很大一部分与摄食相关,幼苗的摄食能力极差,如果没有适宜和足够的食物,必然造成营养缺乏而死(Payne *et al.*, 2000)。近些年,关于对幼体海马的摄食研究也有很多报道,从饵料选择(魏祥东等,2003;白雪峰,2014¹⁾)、营养保证(Payne *et al.*, 2000)等,但是对幼体海马口吻部骨骼的形态结构、发育变化以及对其摄食

的影响等却鲜有报道。

结合已有相关研究对海马摄食器官结构的了解(Azzarelo, 1989),尤其是幼体海马,可以更熟悉海马幼体的摄食特性,根据其摄食特性构建出适合于海马幼体生长的环境条件与饵料特性,从而提高海马幼体人工养殖的成活率和生长率。解决当前产业存在的瓶颈问题,促进养殖产业的发展。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

大海马幼体于 2014 年 8 月 7 日取自宁波大学药源生物增殖与利用实验室人工培育的未发育成熟的幼体。选取 2–3 日龄,体表洁净,健康活力强的幼体,固定备用。

1.2 方 法

取 5 对不同亲体生产的海马幼体各 2 尾,共 10 尾幼体,全长为(1.13±0.05) cm。参照幼体鱼类的染色固定方法(Mook *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1995),并略

* 国家自然科学基金(31276123)资助。王子晖, E-mail: zihuiwang@yeah.net

^① 通讯作者: 徐永健, 教授, E-mail: xuyongjian@nbu.edu.cn

收稿日期: 2015-03-07, 收修改稿日期: 2015-05-01

1) 白雪峰. 海马开口饵料选择与培养. 鲁东大学硕士研究生学位论文, 2014, 19–27

作调整。制备成用于显微镜观察的海马幼体样品, 样品固定及消化的步骤如下:

将海马幼体固定 4% 的多聚甲醛溶液中, 4℃ 保存 48 h。然后, 用 PBS(0.1 mol/L, pH 为 7.0) 冲洗两次, 各 5 min; 移到 50% 的乙醇溶液中脱水 24 h; 再用 75% 和 100% 乙醇溶液各脱水 24 h。

取出脱水后的幼体, 放入已配制好的阿尔新蓝溶液(70 ml 100% 酒精+30 ml 100% 乙酸+20 mg 阿尔新蓝)中, 放入摇床, 室温下并伴随轻微摇动染色 24 h。目的是使软骨着色(对于无软骨的生物可以省略该步骤)。取出样品, 在饱和硼酸钠溶液(5 g 四硼酸钠+100 ml 温水)中浸洗 9 h; 并在 100 ml 漂白溶液(15 ml 3% H_2O_2 +85 ml 1% KOH)中漂白 20 min。

样品再在 100 ml 消化溶液(35 ml 饱和硼酸钠溶液+65 ml 蒸馏水+1 g 胰蛋白酶)中消化至样品 60% 澄清, 约 15 h。该过程可放入摇床, 室温下轻微摇动。

用配制好的茜素红溶液(0.1 g 茜素红+100 ml 1% KOH 溶液)染色 24 h, 并放入摇床, 室温伴随轻微摇动, 着色硬骨。

在胰蛋白酶溶液(35 ml 饱和硼酸钠溶液+65 ml 蒸馏水+1 g 胰蛋白酶)中再消化 24 h 进行脱色, 该过程可放入摇床轻微摇动。

取出样品, 保存在 pH=7.0, 2 mol/L 的 PBS 溶液中, 备用观察。

采用 OLYMPUS 照相显微镜(日本 OLYMPUS 公司), 从不同角度(整体观、侧面观、剖开观)对海马幼体的口吻部的骨骼构造进行观察并拍摄。并对某些重要的与摄食有关的骨骼进行了详细的观察分析。

2 结果

2.1 口吻部整体观

海马幼体的头部骨骼结构, 包括脑颅、鳃盖骨、管状鼻及舌骨角等(图 1)。与摄食有关的结构主要集中在管状鼻部位及附近。包括:

鳃盖: 椭圆状, 在呼吸和摄食时, 通过舒张做抽吸动作。

管状鼻: 呈圆筒形, 直径约为(0.35 ± 0.05) mm, 前宽后窄。该部位组成海马的口吻部, 细长的管状鼻使水进入口腔时流速更快, 使饵料进入时更加顺畅。因此, 管状鼻在摄食时起到重要的作用。

舌骨角: 舌骨角位于幼体海马管状鼻的后下方, 呈斜三角形, 处于弓形舌颌的后部, 与舌颌骨通过关节相连, 与短的尾舌骨通过韧带相连。在摄食时, 幼体海马头部顶端与舌骨角的动作是相关的, 当触碰头

顶部突起时, 舌骨角会有一定程度的收缩, 同时, 还会使下颚下压, 头部与胸部的角度增加, 并且使嘴部张开。因此, 其舌骨角和舌颌的结构对打开幼体海马嘴部的过程中起很大的作用。

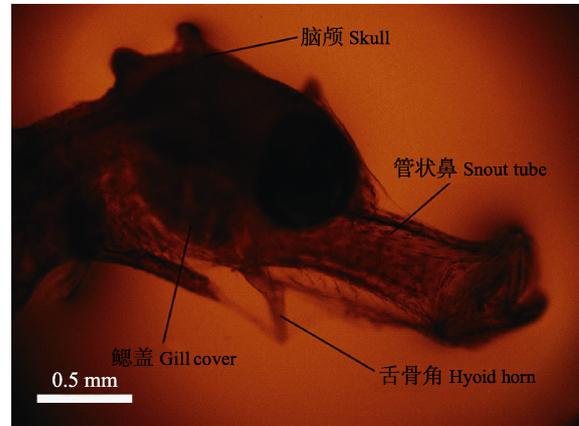


图 1 幼体海马头部整体观
(OLYMPUS 照相显微镜放大 5 倍)

Fig.1 The whole view of larval *H.kuda* head (OLYMPUS microscope photograph magnification 5×)

2.2 口吻部的支撑骨骼观察

支撑骨骼以硬骨为主, 图 2 中显示略微有点蓝色的骨骼, 包括:

后翼骨: 后翼骨、眶下骨与方骨围绕在续骨周围

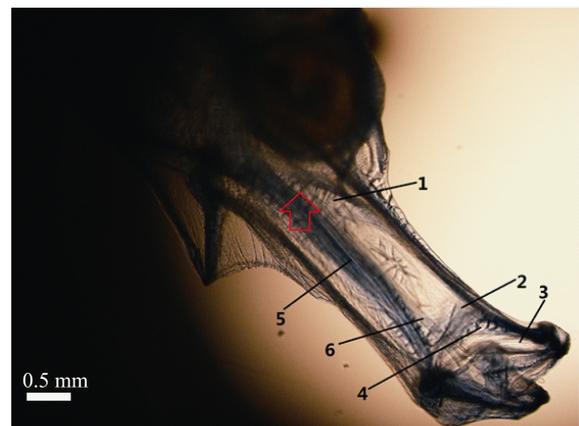


图 2 幼体海马管状鼻支撑骨骼
(OLYMPUS 照相显微镜, 放大 10 倍)

Fig.2 The skeletal view of the snout tube support of larval *H.kuda* (OLYMPUS microscope photograph magnification 10×)

1: 后翼骨; 2: 方骨; 3: 上颌骨; 4: 外翼骨; 5: 续骨; 6: 副蝶骨, 红色箭头为管状鼻最窄处
1: Metapterygoid; 2: Quadrate; 3: Maxilla; 4: Endopterygoid; 5: Symplectic; 6: Parasphenoid, the red arrow is the narrowest point of the snout tube

形成一个环状的通道即“管状鼻”。后翼骨宽而扁平，位于管状鼻末端，与续骨相连。沿斜向上的方向生长。呈鳞状，长约 0.3 mm，表面发生骨化。在幼体海马摄食时，后翼骨延伸构成运动杠杆，为“盖子”打开提供动力。后翼骨与续骨的末端构成的夹缝形成管状鼻的“最窄处”，经测量该处直径仅为 (0.3 ± 0.05) mm，在摄食过程中对饵料大小有一定限制。

方骨：呈船形，下方与 Meckel 软骨(米克氏软骨，图 3)相连，中间与外翼骨和内翼骨相连(内翼骨在以后发育中与后翼骨和眶下骨融合，另文发表)，在宽度上横跨整个管状鼻，起到架起海马管状鼻结构前段的作用。

2.3 口吻部展开面观察

将幼体海马“管状鼻”的立体结构沿舌骨角展开成一平面(图 3)，便于观察幼鱼管状鼻上下重叠的骨骼结构，以及一些颜色较浅的皮肤骨头(未充分骨化，呈软骨状)等。更清楚的了解幼体海马骨骼的构造、不同骨头存在的位置和在摄食过程中的作用。

上颌骨：呈梯形状，扁平，长约 0.4 mm，是组成海马管状鼻前端的“盖子”的一部分，是饵料进入管状鼻的第 1 关。也是管状鼻最前端的骨头，在“管状鼻”吮吸时，饵料会随水流一同被吸入口中，上颌

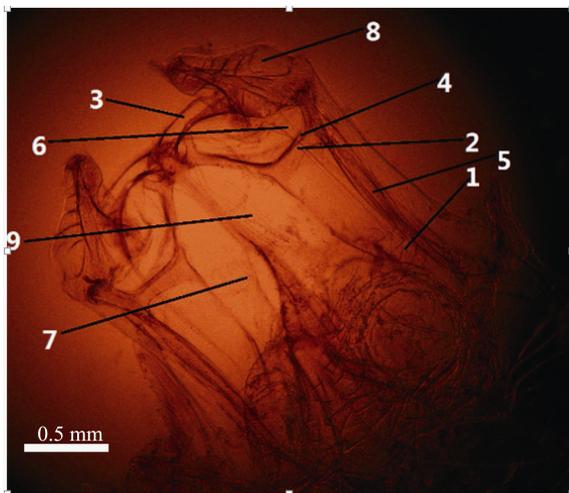


图 3 管状鼻结构展开(OLYMPUS 照相显微镜(放大 10 倍))
Fig.3 Developed view of Snout tube (OLYMPUS microscope photograph magnification 10×)

- 1: 后翼骨; 2: 方骨; 3: 上颌骨; 4: 外翼骨; 5: 续骨;
6: 副蝶骨; 7: 犁骨; 8: Meckel 软骨(米克氏软骨);
9: 泪腺
1: Metapterygoid; 2: Quadrate; 3: Maxilla; 4: Endopterygoid;
5: Symplectic; 6: Parasphenoid; 7: Vomer;
8: Meckel's cartilage; 9: Lacrimal

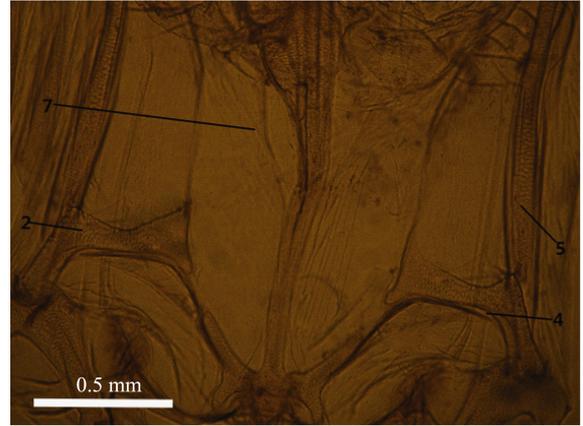


图 4 方骨及外翼骨细节
(OLYMPUS 照相显微镜, 放大 15 倍),
Fig.4 Detail view of quadrate and endopterygoid
(OLYMPUS microscope photograph; magnification 15×);

- 1: 后翼骨; 2: 方骨; 3: 上颌骨; 4: 外翼骨;
5: 续骨; 6: 副蝶骨; 7: 犁骨;
8: Meckel 软骨(米克氏软骨); 9: 泪腺
1: Metapterygoid; 2: Quadrate; 3: Maxilla; 4: Endopterygoid;
5: Symplectic; 6: Parasphenoid; 7: Vomer;
8: Meckel's cartilage; 9: Lacrimal

骨对摄入进来的饵料有一定的防漏作用。同时，“盖子”在保持管状鼻紧闭的过程中起很大的作用，会使管状鼻内构成一个水泵，方便饵料的吸入。

续骨：呈线状，细长的。长约 1 mm，由后翼骨和眶下骨环绕组成管状通道。贯穿海马的整个管状鼻，末端连接后翼骨。

外翼骨：外翼骨在方骨内侧，斜着沿颞骨贴向方骨内侧，颜色较浅。与方骨一同承担“管状鼻”前端的支撑作用(图 4)。

2.4 与摄食有关特殊骨骼观察

管状鼻是海马摄食时极其重要的器官，而海马管状鼻又是前宽后窄的结构。因此，在幼体海马摄食时，最窄处对饵料大小有很大的限制。研究发现，当幼体海马摄食时，下颞会偶尔鼓出来，后将幼体海马解剖后，手动时在下颞处施力，发现续骨末端上侧与后翼骨向上翘的末端下侧存在 1 条细长的梭形缝，宽约 0.06 mm。在幼体海马摄食时，它是一个备用之选，并不是每次摄食时都需要张开。只有在遇到较大饵料的时候，并在其可承受范围内，缝会撑开，使饵料通过，通过后又复原。因为这个缝的存在，幼体海马在一定程度上可以摄取比管状直径略大的饵料。这对于喂养幼体海马的饵料具有一定参考价值，可以适当的用较大粒径的饵料，使其摄食更加“经济”，从而提高幼体的存活率。

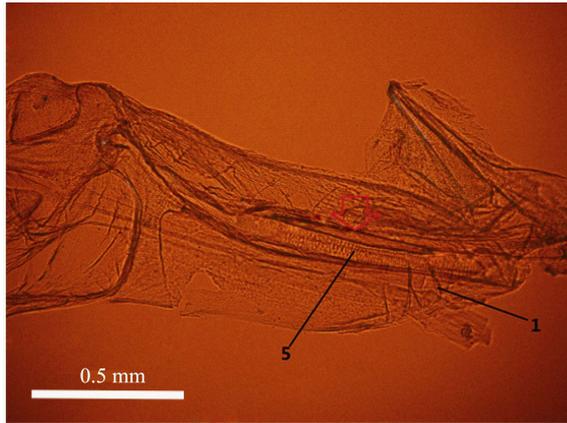


图5 管状鼻的夹缝(红色箭头处)

(OLYMPUS 照相显微镜, 放大 20 倍)

Fig.5 The snout tube's crevice (red arrows)

(OLYMPUS microscope photograph, magnification 20×)

3 讨论

3.1 从骨骼结构看海马的摄食方法

一直以来,海马如何摄食都存在着一些争议。Bergert(1997)的研究表明,其摄食是通过眼睛的舒张或鳃盖张合形成力,眼泡紧缩的时候使头部顶端受力,从而使进食的“盖子”打开。根据对海马运动学的研究,海马在摄食时会弯曲头部前端,嘴张开饵料被吸入,在头侧面膨胀的过程中,嘴一直保持紧闭从而确保吸力(水泵结构,保持封闭)。海马管状鼻中已经被证明存在一种机械联动装置即四连杆结构(四连杆结构是由尾舌骨、舌骨下颌弓、胸的围绕物、舌骨角4个点两两连接成线构成的4条线,即4条杆构成的机械传动装置)(Muller, 1987; Bergert, 1997)。4连杆结构可以解释海马管状鼻中肌肉活动,包括连接舌骨角动作与头颅顶端动作的关系。在捕食过程中,通过4连杆结构的传动将海马的管状鼻部分撑开,使其头抬高捕食(Muller, 1987; Bergert, 1997)。但海马管状鼻前端的“盖子”究竟如何打开并没有得到很好的解释。因此,作者认为,后翼骨的存在(它是一种在方骨肌后面向上延伸的骨头)对其“盖子”的张开、关闭有一定影响。在其摄食的过程中,除了4连杆结构,管状鼻内部可能还存在一种类似于杠杆的结构,通过杠杆作用使嘴部被“撬开”,从而摄食。而后翼骨可能就是杠杆作用的支点。通过眼球的收缩产生的力作用于后翼骨上,从而翘起管状鼻前端的上颌骨。另外,也有研究发现,海马与其他鱼类一样,靠鳃呼吸,产生力吸入水和饵料,然后将水从鳃部滤掉,留下饵料,进行觅食。但是,通过观察发现,海马鳃的舒张与盖子打

开的频率并不一致,却与舌骨角的活动有一定一致性。

3.2 续骨与后翼骨间的缝

海马管状鼻的前宽后窄结构(图2),最窄处的宽度对其饵料大小有很大的限制。但研究发现,在幼体海马续骨末端上侧与后翼骨末端下侧存在着1条细长的梭形缝(图5)。当幼体摄食较大粒径饵料时,缝会撑开,使其通过。这样便可以摄取较大的饵料。研究发现,如果饵料的粒径过大,就会造成幼体管状鼻部骨骼的损伤发炎,幼体不能进食,出现死亡的现象。该结构在较大日龄的海马骨骼(约30 d后就会消失)中并未发现,无人报道。在其生长的过程中,续骨与后翼骨间的那条梭形缝可能会与续骨或后翼骨融合。成年海马管状鼻已经成型,不会被饵料的大小限制。所以,这个缝只存在于日龄较小的幼体海马中,对自身是一种保护机制,这种机制是进化过程中形成的。

3.3 展望

幼体海马的死亡大部分原因是不能进食,即对饵料的不适,如饵料的大小、构成以及投饵密度等问题对脆弱的幼体海马都有很大的威胁。通过对其管状鼻骨骼结构的观察,摄食方式的分析以及对管状鼻最窄处的缝的研究,根据摄食的方式推断出合理的饵料密度、管状鼻的结构及最窄处的缝推断出适合的饵料大小,不会影响摄食效率(解涵等,2003)。这些参数应用到幼体海马的养殖上能够在一定程度上提高幼体的存活率。在此基础上,再对饵料究竟如何伤害吻部骨骼、怎样影响骨骼发育进行深入研究,从而解决幼体海马的高死亡率问题。

参 考 文 献

- 马泽芳. 海马的用途及国际贸易现状. 中国乳业, 1999(12): 7-8
- 严家彬, 马润娣, 于立坚. 海马的药用价值. 中国海洋药物, 2002(6): 48-52
- 吴善. 海马人工养殖与发展前景. 中国科协 2005 年学术年会—农业分会场, 2005
- 高山. 东南亚海域海马日减受关注. 东南亚南亚信息, 1996(19): 18-19.
- 谢莹, 邹贵发. 海马幼苗成活率的研究Ⅲ. 大海马幼苗死亡类型. 中药材, 1990, 13(5): 12-13
- 解涵, 解玉浩. 鱼类摄食的经济学. 河北渔业, 2003 (6): 11-14
- 魏祥东, 叶长明, 陈东红. 饵料对幼海马生长的影响. 中山大学学报, 2003, 42(3): 60-63
- Azzarelo YM. The pterygoid series in *Hippocampus zosterae* and *Syngnathus scovelli*. Copeia, 1989(3): 621-628

- Bergert BA, Wainwright PC. Morphology and kinematics of prey capture in the syngnathid fishes *Hippocampus erectus* and *Syngnathus floridae*. *Mar Biol*, 1997, 127(4): 563–570
- Mook D, Wilcox JR. Clearing and staining for larval fish. *Biol Sci*, 1999, 37(2): 71–72
- Muller M. Optimization principles applied to the mechanism of neurocranium elevation and mouth bottom depression in bony fishes. *J Theor Biol*, 1987, 126(3): 343–368
- Payne MF, Rippingale RJ. Rearing west Australia seahorse; *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. *Aquaculture*, 2000, 188(3–4): 353–361
- Song JK, Parenti LR. Clearing and staining whole fish specimens for simultaneous demonstration of bone, cartilage and nerves. *Copeia*, 1995, 1995(1): 114–118

(编辑 陈严)

The Skeletal Morphology of Snout Tube and Its Effect on Feeding of Juvenile Yellow Seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker

WANG Zihui, XU Yongjian^①, LI Xiang

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211)

Abstract The most effective way to protect wild life resources and to meet the market's demand is artificial aquaculture. The low survival rate of sea horse juvenile due to low food intake slowed down the development of the culture industry; however, the reasons that impact feeding behavior and its metabolism of the juvenile are unclear. To address this, ten 2- or 3-day-old juveniles of *Hippocampus kuda* were fixed in paraformaldehyde with PBS, and its skeletal morphology of the snout tube was observed and analyzed. The tube snout's profile and structure included metapterygoid, quadrate and symplectic, were important to juvenile's feeding. A hole composed of metapterygoid and the end of symplectic is the smallest diameter in the snout tube, which decided the size of the feeding food. In addition, there is a crevice between metapterygoid and symplectic, which could slightly compensate the limitation in the snout tube and can pass bigger food than the smallest diameter. These observations suggest that properly increasing the size of food might enhance feeding efficiency and promote survival rate.

Key words Seahorse juvenile; Snout tube; Skeletal morphology; Feeding

^① Corresponding author: XU Yongjian, E-mail: xuyongjian@nbu.edu.cn

一株海洋中性蛋白酶高产菌 S-3685 的 鉴定及产酶条件*



马子宾^{1,2} 郑鸿飞¹ 刘均忠¹ 郝建华¹ 孙 谡^{1①}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要 通过生理生化、分子生物学、单因子优化等方法研究了来自南海海域一株产中性蛋白酶菌株 S-3685, 并对其在 250 ml 摇瓶中的培养条件进行了优化。结果显示, 该菌株初步确定为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 发酵培养的最佳碳、氮源分别为葡萄糖 10 g/L 和豆面 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, 酵母膏 5 g/L。无机盐 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 Na_2CO_3 、 KH_2PO_4 最佳浓度分别为 0.2 g/L、2.0 g/L、1.0 g/L; 菌株在培养基起始 pH=7.0、4%接种量、15 ml/250 ml (v/v) 装液量和 30℃ 的条件下, 发酵 72 h 获得较高的酶产量。在最佳培养条件下产酶量为 4250 U/ml, 是优化前的 5 倍。

关键词 海洋微生物; 中性蛋白酶; 芽孢杆菌属; 鉴定; 培养条件优化

中图分类号 Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0131-07

海洋以其独特的低温、高压、高盐环境造就了海洋生物的多样性与独特性(肖峰等, 2011)。从海洋微生物中筛选所需的生物活性物质是近些年研究的热点。而海洋微生物酶的研究已经成为发达国家开发新型酶制剂的重要途径(孙谡等, 2000)。

中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程研究室从南海海水中筛选得到了产中性蛋白酶的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. S-3685。芽孢杆菌生长快、长势旺, 是重要的工业微生物菌种, 几乎 35% 的蛋白酶都是由芽孢杆菌生产的(Kalisz, 1988)。蛋白酶是一类非常重要工业用酶, 它在洗涤剂、饲料、制革脱毛、生丝脱胶、有机合成、酒类澄清、明胶及蛋白胨产生、肉质嫩化和医药治疗等方面广为应用(Rao *et al*, 1998), 约占酶制剂市场的 60%(Nascimento *et al*, 2004)。蛋白酶是目前工业化运用最成功、产量最大的一类酶。而中性蛋白酶是食品、饲料、医药、皮革加工及生物降解中不可或缺的一种酶。本研究通

过优化该菌产酶的条件以提高其单位酶产量, 为工业生产创造条件, 并为进一步的研究与应用打下良好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

菌株由中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋资源与酶工程室分离保藏。

活化培养基: 葡萄糖 1%, 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, pH 为 7.0;

基础发酵培养基: 配方与活化培养基相同。固体培养基添加 2% 琼脂粉。

1.2 菌株的鉴定

采用 16S rDNA 基因直接测序法进行分子生物学鉴定。总 DNA 的提取采用 CTAB 法(张爱联, 2008)。PCR 扩增采用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGT-

* 国际科技合作与交流(2014DFG30890)、国家自然科学基金(41376175)和青岛市科技计划项目(14-2-4-11-jch)共同资助。马子宾, E-mail: zibinma@163.com

① 通讯作者: 孙 谡, 研究员, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-05-19, 收修改稿日期: 2015-07-20

CAG-3')和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-TT-3')。PCR 反应条件: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 40 s, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 1.5 min, 30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物送生物工程(上海)有限公司完成纯化与测序工作。将所测定菌株的 16S rDNA 序列提交至 EzBioCloud 通过 BLAST 检索已有序列进行相似性比较分析, 下载与实验菌株亲缘关系较近的序列, 用 BioEdit 软件进行多序列比对, 采用 MEGA6.05 软件的邻接法(Neighbor-joining method)绘制系统发育树。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养方法 从保存的斜面上取一环菌体至 25 ml 液体种子培养基(250 ml 三角瓶), 30℃、200 r/min 培养 20 h, 转入基础培养基中, 同条件下培养 72 h。发酵结束后, 发酵液 10000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 稀释适当倍数后测活。

1.3.2 酶活力的测定方法 按照轻工行业标准(QBT 1803-1993)进行, 酶活力单位 U 定义为: 每毫升液体酶在 40℃、pH 为 7.0 条件下水解酪蛋白, 每分钟释放 1 μg 酪氨酸所需的酶量。

1.3.3 单因素试验设计(王萍, 2006)¹⁾ 保持其他发酵条件不变, 分别依次改变碳源、氮源、无机盐、接种量、装液量、起始 pH、发酵温度和发酵时间来确定各因素的最佳水平。每个实验重复两次, 每次设 3 个平行, 每组数据重复两次测定, 通过取各组数据的均值来评价各因素对产酶的影响(Genckal *et al*, 2006)。

2 结果与分析

2.1 高产中性蛋白酶菌株的鉴定

2.1.1 菌株 S-3685 生理生化特征 对菌株 S-3685 进行了生理生化鉴定实验, 根据《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》(1984)所述, 菌株 S-3685 耐盐性较好, 在 7% NaCl 培养液中生长良好, 10% NaCl 溶液中呈现弱生长。生长 pH 范围为 5.0–11.0。生长温度范围较宽, 在 4–40℃环境下均可良好生长。其他生理生化鉴定结果见表 1。

2.1.2 序列分析 PCR 扩增结果为 1422 bp 的基因序列, GenBank 登陆号为 KJ023685, 在 EzBioCloud 上经序列同源性检索, 得到相似度 95%以上均为芽孢杆菌, 通过 MEGA6.05 软件 Neighbor-joining 选项绘制发

表 1 菌株 S-3685 的生理生化特性
Tab.1 Physiological and biochemical properties of strain S-3685

特征 Characteristics	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	芽孢杆菌 S-3685 <i>Bacillus sp. S-3685</i>
革兰氏染色 Gram stain	+	+
鞭毛 Flagellum	侧生 Lateral	侧生 Lateral
宽度 Width (μm)	0.7–0.8	0.36–0.55
长度 Length (μm)	2–3	2.4–3.2
厌氧生长 Anaerobic growth	–	–
酪素水解 Hydrolysis of casein	+	+
葡萄糖产酸 Acid production of glucose	+	–
葡萄糖产气 Gas production of glucose	–	–
V.P 实验 V.P experiment	+	–
M.R. 实验 M.R. experiment	–	–
吲哚实验 Indole experiment	–	–
柠檬酸盐实验 Citrate experiment	+	+
H ₂ S 实验 H ₂ S experiment	–	–
淀粉水解实验 Hydrolysis of starch	+ ^a	–

育树, Bootstrap 重复 1000 次, 模型选择核酸 p-distance, 得到结果如图 1。由图 1 可以看出, S-3685 与 *Bacillus safensis* 在同一分支上, 在进化位置上最为接近。

因此, 根据生理生化鉴定结果和 16S rDNA 鉴定结果, 将此产中性蛋白酶的菌株 S-3685 鉴定为芽孢杆菌属。

2.2 单因素实验设计与分析

2.2.1 碳源对蛋白酶产量的影响 将培养基中的牛肉膏换为不同碳源, 即葡萄糖、糊精、麦芽糖、乳糖、蔗糖、玉米面、可溶性淀粉、马铃薯淀粉、牛肉膏、甘油、麸皮, 添加量为 10 g/L。

由图 2 可以看出, 以基础培养基为出发点, 将牛肉膏替换成不同种类碳源, 以基础培养基单位酶活力为 1。葡萄糖对酶活力的影响是较大的, 酶活力为标准的两倍多。葡萄糖是重要的碳源, 对众多菌种的培养有较好的促进作用, 如纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)。因此, 选用葡萄糖为最佳碳源, 筛选氮源。

2.2.2 氮源对蛋白酶产量的影响 使用多种氮源代替原培养基中蛋白胨, 如牛肉膏、酵母膏、鱼蛋白胨、胰蛋白胨、尿素、硫酸铵、豆面、酵母膏(10 g/L)+牛肉膏(10 g/L)、豆面(10 g/L)+酵母膏(10 g/L)+牛肉膏(10 g/L)等, 添加量为 10 g/L。

1) 王萍. 蛋白酶高产海洋酵母的筛选、发酵条件优化及酶性质的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2006

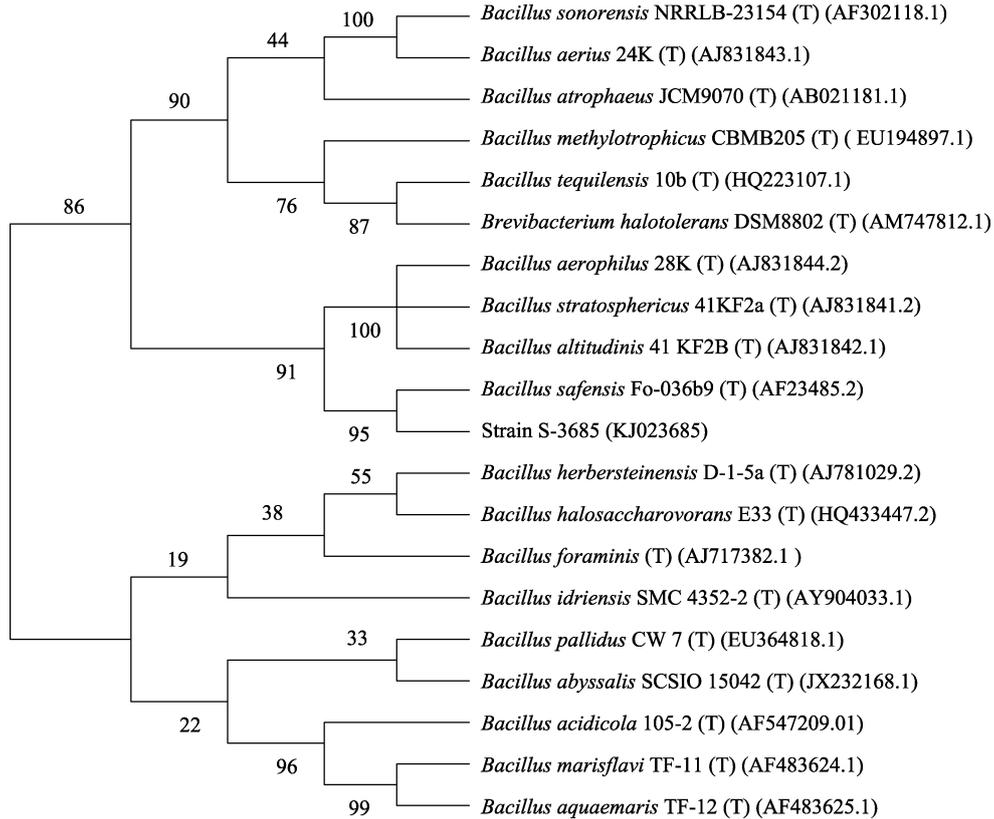


图 1 根据 16S rDNA 序列同源性构建菌株 S-3685 的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of strain S-3685 based on 16S rDNA sequence homology

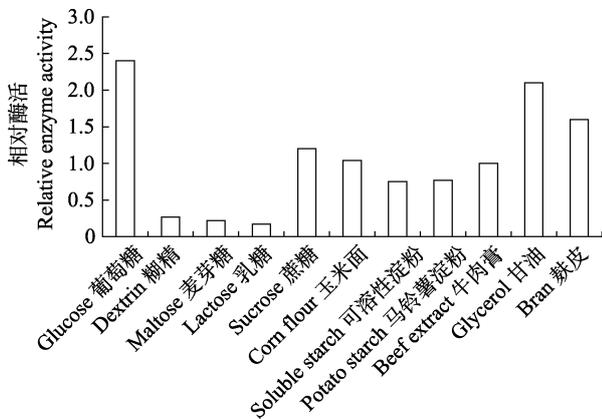


图 2 碳源种类对产酶的影响

Fig.2 Effect of carbon source on the production of protease

以葡萄糖、蛋白胨作为碳氮源的单位酶活力为 1。由图 3 可以看出，蛋白酶的产量和氮源的使用息息相关，在氮源添加量为 10 g/L 时，豆面、牛肉膏和酵母膏复合氮源对酶活力的影响是极大的，是蛋白胨的近 5 倍。通常有机氮源较无机氮源更适合用于提高碱性蛋白酶的产率(李祖明等, 2008)，可能是因为氨基酸或铵盐的快速代谢抑制了酶分子的合成。复合培养基除含有丰富的蛋白质、多肽和游离氨基酸外，还含有少量的糖类、脂肪、无机盐、维生素及某些生长因子

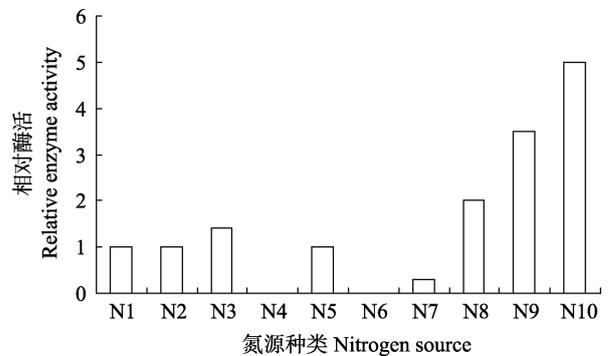


图 3 氮源种类对产酶的影响

Fig.3 Effect of nitrogen source on the production of protease

N1: Peptone(蛋白胨); N2: Beef extract(牛肉膏); N3: Yeast extract(酵母膏); N4: Fish peptone(鱼蛋白胨); N5: Nancreas peptone(胰蛋白胨); N6: Urea(尿素); N7: Ammonium sulfate(硫酸铵); N8: Bean flour(豆面); N9: Beef extract + yeast extract(酵母膏); N10: Bean flour(豆面) + beef extract(牛肉膏) + yeast extract(酵母膏)

(黄薇等, 2007)，所以选择豆面、牛肉膏和酵母膏复合氮源进行之后的试验。

2.2.3 碳氮源浓度的筛选 以 10 g/L 葡萄糖为碳源，添加不同浓度的豆面，筛选豆面的适宜添加量，

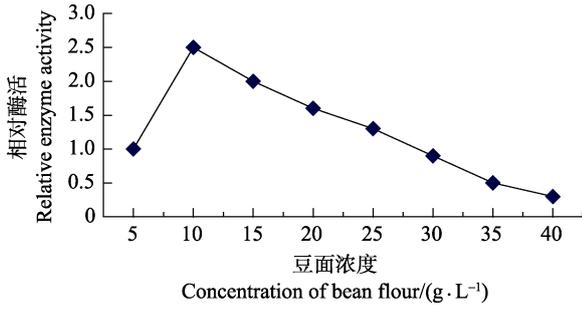


图 4 豆面浓度对产酶的影响
Fig.4 Effect of bean flour concentration on the production of protease

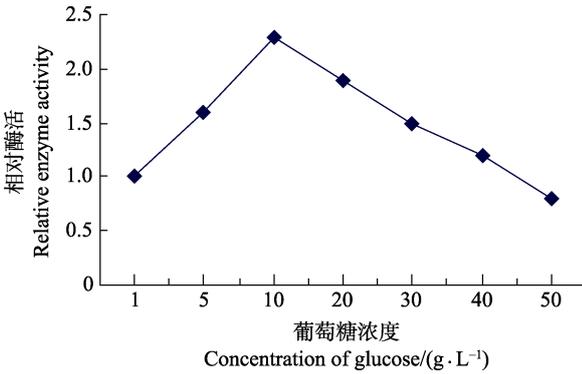


图 5 葡萄糖浓度对产酶的影响
Fig.5 Effect of glucose concentration on the production of protease

再以最适豆面浓度筛选葡萄糖浓度。结果显示：

以 10 g/L 葡萄糖和 5 g/L 豆面浓度为碳氮源时的单位酶活力为 1，逐渐增加豆面含量；随着含量的增加，单位酶活力也在缓慢增加，并在 10 g/L 浓度时达到最高值，随着豆面含量的增加，单位酶活力开始下降(图 4)。

以 1 g/L 葡萄糖和 10 g/L 豆面浓度为碳氮源时的单位酶活力为 1，随着葡萄糖浓度的增大，产量呈上升趋势，并在 10 g/L 含量处达到最大值；后再增加葡萄糖含量，产量反而有所下降，可知过高浓度的碳源或许是因溶氧的原因，或许是阻遏抑制的原因会导致单位酶活力的下降(包兴艳等, 2013)，因此，选取单位酶活力最高值时即葡萄糖 10 g/L 和豆面 10 g/L 的添加量为合适的培养基浓度图 5。

2.2.4 无机盐对发酵产中性蛋白酶的影响 主要考察 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2CO_3 (经试验验证 Na_2CO_3 比 NaCl 对酶活影响更大)不同添加量对产酶量的影响。由图 6-图 8 可以看出， KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2CO_3 分别在添加量为 0.1%、0.02%、0.2%时，菌株 S-3685 产酶量达到最高；高浓度 Na_2CO_3 对菌株 S-3685 产酶具有抑制作用。

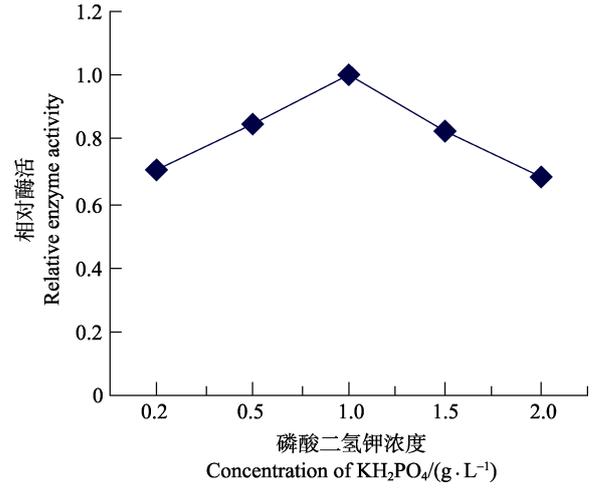


图 6 磷酸二氢钾浓度对产酶的影响
Fig.6 Effect of KH_2PO_4 on the production of protease

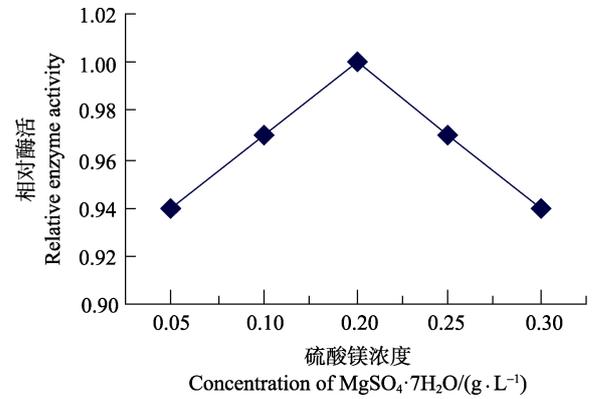


图 7 硫酸镁浓度对产酶的影响
Fig.7 Effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on the production of protease

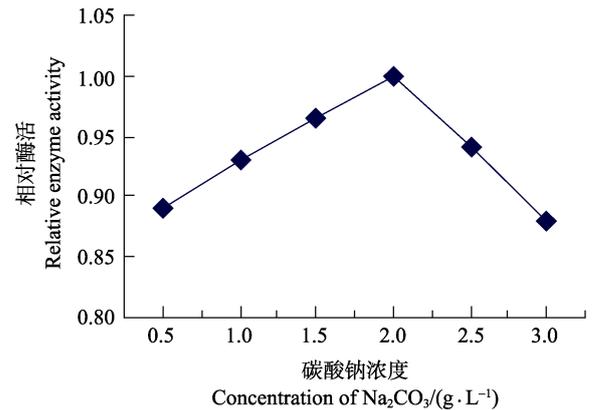


图 8 碳酸钠浓度对产酶的影响
Fig.8 Effect of Na_2CO_3 on the production of protease

2.2.5 接种量对发酵产中性蛋白酶的影响 在 250 ml 的发酵培养基中分别按照体积分数 1%、2%、3%、4%、6%、8%、10%接入种子培养液，由图 9 可知，发酵最佳接种量为 4%。

2.2.6 装液量对发酵产中性蛋白酶的影响 在 250 ml 三角瓶中考察不同装液量对 S-3685 产酶的影响, 由图 10 可知, 装液量对酶产量的影响相对较小。在较低装液量水平(≤ 50 ml)酶产量相对稳定; 在较高的装液量水平时, 酶产量减少, 这主要是由于溶氧较低, 供氧不足而造成的。

2.2.7 起始 pH 对发酵产中性蛋白酶的影响 其他条件不变, 考察发酵培养基的起始 pH 对菌株产酶的影响。由图 11 可知, 起始 pH 为 7 时, 酶产量相对较高。

2.2.8 发酵温度对发酵产中性蛋白酶的影响 考察不同温度(25、30、33、37、40 $^{\circ}$ C)对产酶的影响, 从

图 12 可以看出, 该菌在相对较低温度(30 $^{\circ}$ C)下, 产酶较高; 较高温度条件下(>33 $^{\circ}$ C), 产酶量明显下降。这与菌株 S-3685 来自海洋环境并长期适应低温环境有关。

2.2.9 发酵时间对发酵产中性蛋白酶的影响 从种子培养液中按 4%(v/v)接种入 15 ml/250 ml 三角瓶中, 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养, 间隔取样, 测定酶活力。结果如图 13 所示, 在培养 72 h 后, 酶产量达到最大, 因此, 在实验条件下, 最佳培养时间为 72 h。

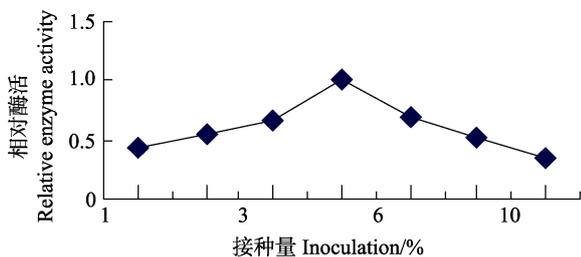


图 9 接种量对产酶的影响

Fig.9 Effect of inoculation on the production of protease

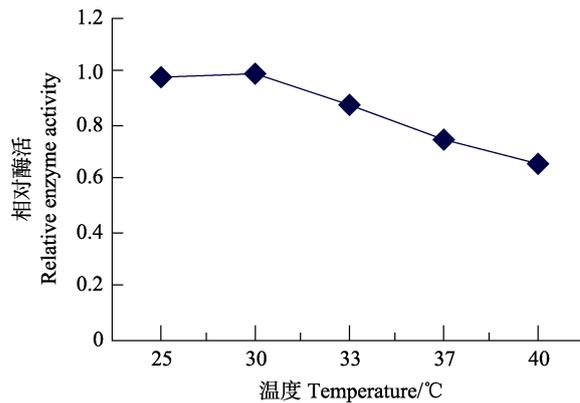


图 12 发酵温度对产酶的影响

Fig.12 Effect of temperature on the production of protease

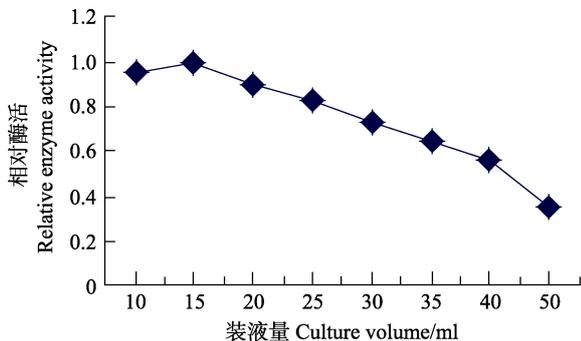


图 10 装液量对产酶的影响

Fig.10 Effect of culture volume on the production of protease

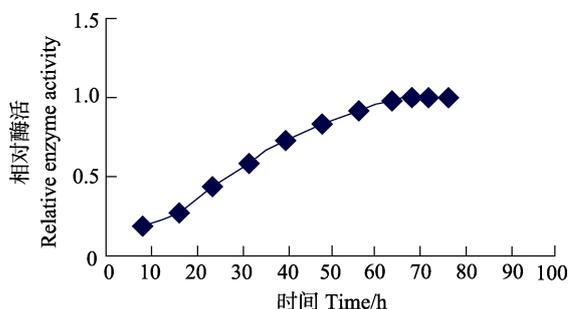


图 13 发酵时间对产酶的影响

Fig.13 Effect of culturing time on the production of protease

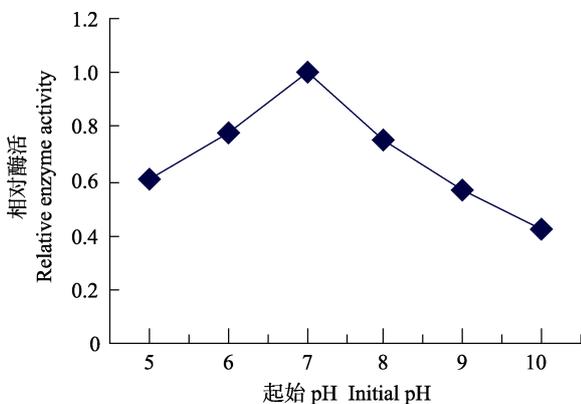


图 11 起始 pH 对产酶的影响

Fig.11 Effect of initial pH on the production of protease

3 讨论

目前, 国内外商品中性蛋白酶的生产以动、植物中提取和微生物发酵为主, 微生物发酵研究主要集中在菌株的筛选, 培养基和培养条件的优化, 考虑中性蛋白酶的应用, 仍需要寻找具有特殊酶学性质和酶分子结构的中性蛋白酶。Fujii 等(1983)从 *B.stearothermophilus* CU21 细菌中克隆得到中性蛋白酶基因, 并在另一菌株中成功表达, 使得酶活提高了近 15 倍。Tsuchiya 等(1997)将一个细胞的蛋白酶基因克隆表达在大肠杆菌中, 得到了适应性和产酶能力更强的菌株。Kim 等(1996)将具有溶纤作用的蛋白酶用于降解血栓。Hirokawa 等(2005)将中性蛋白酶用于血红蛋白

含量的测定。某种中性蛋白酶可以分解线虫角质层和明胶,在切断线虫病感染方面有潜在用途(Niu *et al.*, 2006)。本研究从南海海域的海水中筛选并保藏于实验室有蛋白酶活性的菌株,经反复筛选和纯化,得到产酶较高、较稳定的菌株 S-3685,经菌株部分生理生化实验和 16S rDNA 基因序列比较,将菌株鉴定为芽孢杆菌属。芽孢杆菌是生产蛋白酶的传统菌株,具有产蛋白酶量大、耐高温等特点(赵丹, 2006)¹⁾,是值得工业开发的一种菌。通过摇瓶发酵过程中对其培养基和培养条件的改变,确定了发酵培养的最佳碳氮源葡萄糖和豆面的浓度分别为 10 g/L 和 10g/L,无机盐 MgSO₄·7H₂O、Na₂CO₃、KH₂PO₄ 最适浓度分别为 0.2、2.0、1.0 g/L;在培养基起始 pH 为 7.0、4%接种量、15 ml/250 ml(v/v)装液量和 30℃的条件下,发酵 72 h 获得较高的酶产量。在最适培养条件获得酶产量 4250 U/ml,与未优化的 880 U/ml 相比,优化效果显著。目前,本实验室正在进行 S-3685 中性蛋白酶产酶的胁迫诱导、分离纯化、序列分析和酶学性质的研究工作。从现有的研究结果看,该酶具有其独特的酶学性质和分子结构,有进一步研究的价值。

参 考 文 献

- 包兴艳,郝建华,陈世建,等.产酯酶 B1 海洋枯草芽孢杆菌 C5 发酵条件优化.应用与环境生物学报,2012,18(6): 999-1003
- 李祖明,李鸿玉,荣瑞芬,等.碱性蛋白酶生产菌的育种及其液态发酵条件的研究.食品研究与开发,2008,29(5): 19-24
- 孙谧,王跃军,张云波,等.一株产低温碱性蛋白酶嗜冷海洋细菌 YS-9412-130 的分离和培养条件研究.海洋水产研究,2000,21(4): 1-6
- 肖峰,张浩,王斌,等.一株产中性蛋白酶海洋细菌的筛选与初步鉴定.食品与药品,2011,13(3): 89-93
- 张爱联.生物化学与分子生物学实验教程.北京:中国农业大学出版社,2008
- 中国科学院微生物研究所翻译组.伯杰细菌鉴定手册(第八版).北京:科学出版社,1984
- 中华人民共和国轻工业行业标准 QBT 1803-1993.工业酶制剂通用试验方法,129-133
- Fujii M, Takagi M, Imanaka T, *et al.* Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus steartherophilus* in a vector plasmid and its expression in *Bacillus steartherophilus* and *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1983, 154(2): 831-837
- Genckal H, Tari C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. Enzyme Microb Technol, 2006, 39(4): 703-710
- Hirokawa K, Shimoji K, Kajiyama N. An Enzymatic Method for the Determination of HemoglobinA_{1c}. Biotechnol Lett, 2005, 27(14): 963-968
- Kalisz HM. Microbial proteinases. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 1988(36): 1-65
- Kim W, Choi K, Kim Y, *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Appl Environ Microbiol, 1996, 6(2): 2482-88
- Niu QH, Huang XW, Zhang L, *et al.* A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. Arch Microbiol, 2006, 185(6): 439-448
- Nascimento WCA, Martins MLL. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp.. Braz J Microbiol, 2004, 35(1-2): 91-96
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge M, *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(3): 597-635
- Tsuchiya K, Ikeda I, Tsuchiya T, *et al.* Cloning and expression of an intracellular alkaline protease gene from alkaliphilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. Biosci, Biotech Biochem, 1997, 61(2): 298-303

(编辑 陈严)

1) 赵丹.产碱性蛋白酶芽孢杆菌的分离、发酵条件研究及其初步应用.中国农业大学硕士研究生学位论文,2006

Identification of a Marine Bacterium S-3685 with High Neutral Protease and Optimization of Its Fermentation Conditions

MA Zibin^{1,2}, ZHENG Hongfei¹, LIU Junzhong¹, HAO Jianhua¹, SUN Mi^{1①}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The S-3685 strain, a marine bacterium producing neutral protease, was screened from South China Sea. It was identified as a *Bacillus* sp. based on the morphology, the biochemical characteristics, and the 16S rDNA sequencing results. This strain was gram-positive, and the spore located in the middle had ellipse or columnar shapes. The bacterial colony was round, protuberance, and milk white on the agar culture-medium. The surface of the bacterial colony was smooth and moist (30°C, 24 h). Over time the colony slightly shriveled bumps in the middle. The length was 2.4–3.2 microns. The strain grew under the pH 5.0–11.0, and could grow normally at the temperature 4–40°C. We then explored the fermentation conditions using a 250 ml shake flask. The optimum sources of carbon and nitrogen were glucose (10 g/L) and pulse flour (10 g/L) respectively, plus the beef extract (5 g/L) and the yeast extract (5 g/L). The optimum concentrations of MgSO₄·7H₂O, Na₂CO₃ and KH₂PO₄ were 0.2 g/L, 2.0 g/L and 1.0 g/L respectively. The optimum initial pH of the culture medium for the protease production was 7.0. The optimized culture conditions were: inoculums at 4%, broth content at 15 ml/250ml(v/v), temperature at 30°C, and culture for 72 h. After the optimization, the productivity of protease was increased by 5 times (from 850 to 4250 U/ml).

Key words Marine microorganism; Neutral protease; *Bacillus* sp.; Identification; Culture optimization

① Corresponding author: SUN Mi, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

基于 PIV 技术的方形网箱二维流场分析*



崔勇 关长涛 赵侠 刘超 黄滨 李娇

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 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 方形重力式网箱在水流中会产生一定的阻流效应,研究不同类型网箱在不同流速下网箱周围的减流情况非常重要。本研究通过水槽试验,设计了 4 组不同网目形状与网目尺寸的网箱模型,利用粒子测速技术(PIV)与多普勒流速计(ADV)试验技术,分析方形网箱二维流场特性、流速分布及其减速情况。结果显示,水流经过 4 组网箱后均出现明显的流速衰减,衰减区的高度与网箱高度大致相当;而网箱底部则出现流速增大区。ADV 与 PIV 测量结果基本一致。当来流速度为 0.18 m/s 时,4 组网箱中心点的平均流速衰减系数在 0.5–0.8 左右。装配菱形网目的网箱流速衰减略大于方形网目网箱;小网目网箱的流速衰减则明显大于大网目网箱,而网箱的平均流速衰减系数随流速变化趋势不明显。结果表明,利用 PIV 技术给出经过网箱中心点铅垂面流场分布的云图呈现,可清晰看出网箱周围的水流流线分布疏密程度。

关键词 网箱;阻流效应;粒子测速;水槽试验

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0138-07

深水网箱布设的海域通常流速较大,因而,水流因素对网箱设施的稳定与养殖鱼类的安全至关重要。深水网箱内外水体交换好,鱼类能够在接近自然的环境中生长,可有效减少病害的发生,从而提高养殖品质。然而,流速过大将导致网箱有效养殖容积减少(万荣等, 2007; Zhao *et al.*, 2007; 崔勇等, 2010)以及网箱变形严重(Cui *et al.*, 2013),对鱼类的健康养殖带来不良影响。众多研究表明(Lee *et al.*, 2008; 崔勇等, 2011; 黄小华等, 2011),网箱结构所受到水流的作用力与流速的平方成正比,在计算水流对网箱结构作用时,如果忽略流速的变化将会产生较大的误差。此外,网箱周围流场的分布也会影响饵料物质的输送与代谢废物的转运。因此,有必要针对网箱结构的减流情况开展研究。

网箱的网衣部分由网线组成,具有结构直径细小、柔性易变形的特征,而且,网线表面并非光滑,对流态的影响也极为复杂。目前,针对网箱流场特性的研究多采用水槽试验来进行。黄六一等(2007)依据

渔具模型试验方法,设计并制作了浮式箱网模型来进行水槽试验。结果表明,箱网结构通过合理布设能够有效减小流速。李玉成等(2005)设计了 6 种重力式网箱模型,根据试验结果对这些网箱的阻流效应进行研究,分别得出了网箱内部与后部的阻流系数。近些年来,随着计算机软硬件技术的发展,国内外学者先后利用商业软件对网衣及网箱结构的流场变化进行仿真模拟。Patursson 等(2010)将网片结构看成多孔介质,并且假设网片结构固定不动,对网片的流场特性进行数值模拟。Zhao 等(2013)将网箱假定为多个不同角度网片的组合体,同样利用多孔介质模型,通过商业软件 Fluent 对网片及网箱结构周围流场变化进行研究。

为全面获取网箱周围流速变化规律及流场分布,本研究采用粒子图像测速技术(简称 PIV)与三维流速仪(ADV)定点测速相结合,对装配不同种类网衣的方形网箱进行流速测量。试验分别研究了网目形状、网目大小对方形网箱阻流效应的影响,研究结果可为今

* 国家自然科学基金(30972256、51239002)和现代农业产业技术体系建设专项(CARS-50-G05)共同资助。崔勇,
E-mail: cuiyong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-10-21, 收修改稿日期: 2014-12-21

后网箱的水动力学特性研究提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 试验设备

本研究于 2013 年 5 月 4 日在大连理工大学海岸和近海工程国家重点实验室波流循环水槽进行。水槽长 22 m、宽 0.45 m、高 0.6 m。试验利用 PIV 设备来获取经过网箱中心点铅垂面的流速分布情况。PIV 是一种瞬态、多点、无接触式的激光流体力学测速方法,能在同一瞬态记录下大量空间点上的速度分布信息,并可提供丰富的流场空间结构以及流动特性(Bi *et al.*, 2013)。PIV 系统主要由高分辨率 CCD 相机、双 ND:YAG 激光器、同步仪、图像采集卡以及计算机组成(图 1)。示踪粒子采用聚氯乙烯(PVC)粉末。利用 TSI 公司的 INSIGHT 3G™ 软件进行粒子图像分析。通过 CCD 照相机每次采集 8 组图像,每一组图像采集的时间间隔平均为 0.038 s,对采集到的图像进行整理分析处理就可得到网箱周围流场分布。此外,通过 ADV 流速仪监测来流速度以及测量不同设定点的流速,测量精度为 1 mm/s,采样频率为 50 Hz。

1.2 试验网箱

试验以 10 m × 10 m × 10 m 的方形网箱为原型,根据水槽的实际尺寸,尽量减少槽壁的影响。采用重力相似准则,确定模型试验的模型比尺为 1:50,试验水

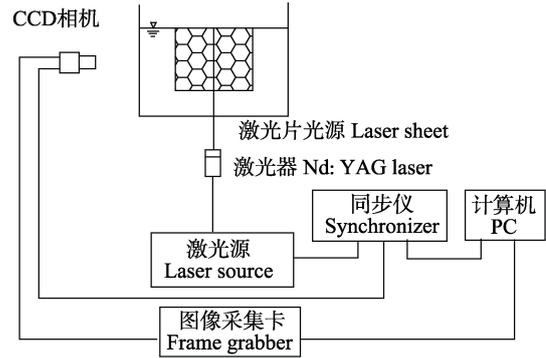


图 1 粒子图像测速(PIV)试验装置
Fig.1 PIV scheme of the experimental setup

深设定为恒定水深 0.4 m。模型网箱分别装配不同形式的网衣,图 2 为 4 种网箱在一定水流条件下的展开图,网衣参数见表 1,框架材料为直径 6 mm 的细钢管。

1.3 试验布置

试验网箱通过垂直杆固定在水槽上方的支架上,模型网箱布置于水槽中心位置,ADV 流速仪测量点的位置如图 3 所示。从图 3 可以看出,坐标原点位于水平面中心线距离网箱中心前 0.2 m 处,X 轴为水流方向,Z 轴为水深方向。模型试验设计 4 组流速 u_1 、 u_2 、 u_3 、 u_4 ,分别为 0.06、0.10、0.14、0.18 m/s,每组流速分别对 4 组网箱进行测量。每组数据重复 3 次,取平均值,每次测量间隔时间 30 s。位置点 1 测得的流速即为来流速度。

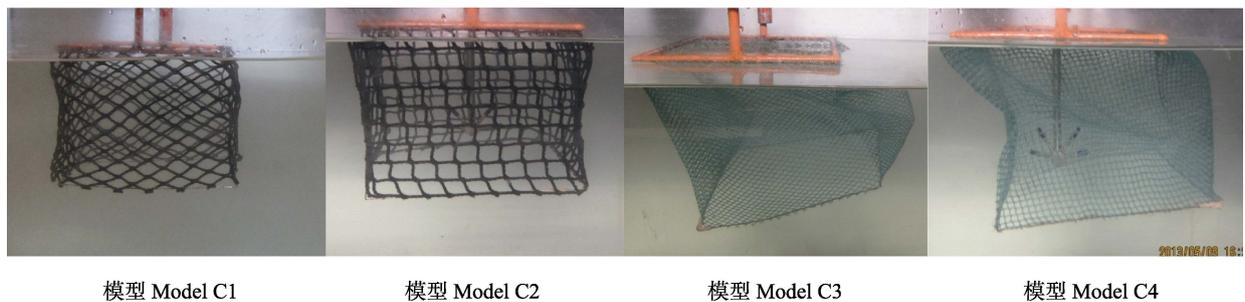


图 2 4 种不同类型网箱模型
Fig.2 Four kinds of cage models

表 1 模型网箱参数
Tab.1 Characteristics of the net models

网箱编号 Net No.	网目形状 Mesh shape	目脚长度 Bar length(mm)	网线直径 Twine diameter(mm)	结节情况 Knot	纵向缩节系数 Hanging ratio	网衣材料 Net material
C1	菱形 Diamond	20	2.5		0.67	PE
C2	方形 Square	20	2.5	无结节		PE
C3	菱形 Diamond	5	1	Kontless	0.6	PA
C4	方形 Square	5	1			PA

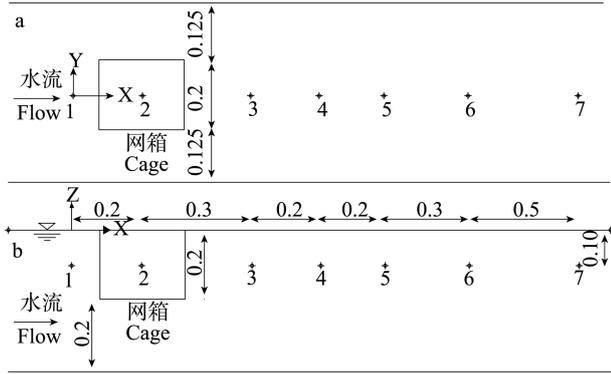


图3 网箱测量点

Fig.3 Physical model of a cage and general setting of the measurement points (unit: m)

(a)为俯视图; (b)为正视图
(a) horizontal view; (b) vertical view

2 结果与分析

2.1 ADV 测量结果

图4为4组网箱在设定点的ADV测速值。从图4中可以看出,不同位置点的流速变化比较明显,4

组流速在不同点位的流速变化趋势基本一致。不同来流速度通过网箱时的最低流速均出现在点位3与点位5之间,即距离网箱背流面1-3倍网箱长度范围内。沿水流方向点位5之后的流速逐渐增大,而点位7处的速度仍然小于来流速度,由此可见网箱的流速衰减范围较大(图3)。图5为4组网箱在不同点位流速衰减系数的比较,流速衰减系数为流速测量值 u 与来流速度 u_0 的比值(比值越小,流速衰减越大)。由图5可知,在流速衰减最大的区域,C3、C4两种网箱的流速衰减系数明显小于C1、C2两种网箱;通过比较可以发现,装配菱形网目的网箱流速衰减系数略小于方形网目网箱。其中,当来流速度为 u_4 时,网箱C1、C2、C3、C4中心点(点位2处)的流速衰减系数分别为0.73、0.79、0.53、0.64。图6为点位3与点位4处,4组网箱流速衰减系数随来流速度变化规律。从图6中可以看出,在点位3处,C1与C2两种网箱的流速衰减系数随来流速度变化不明显;在点位3和点位4处,C3的流速衰减系数均随着来流速度的增加而逐渐增大。

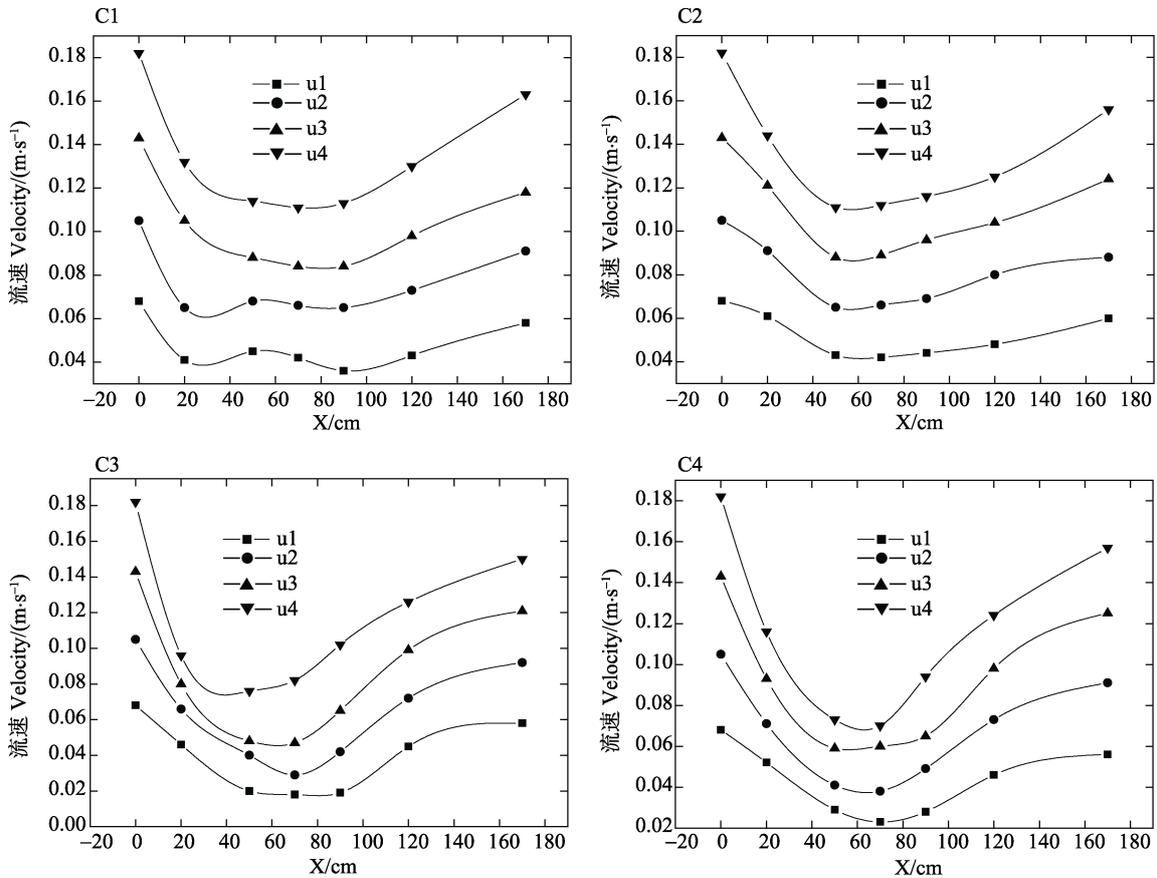


图4 4组网箱ADV测速结果

Fig.4 ADV measurement results of the four cages

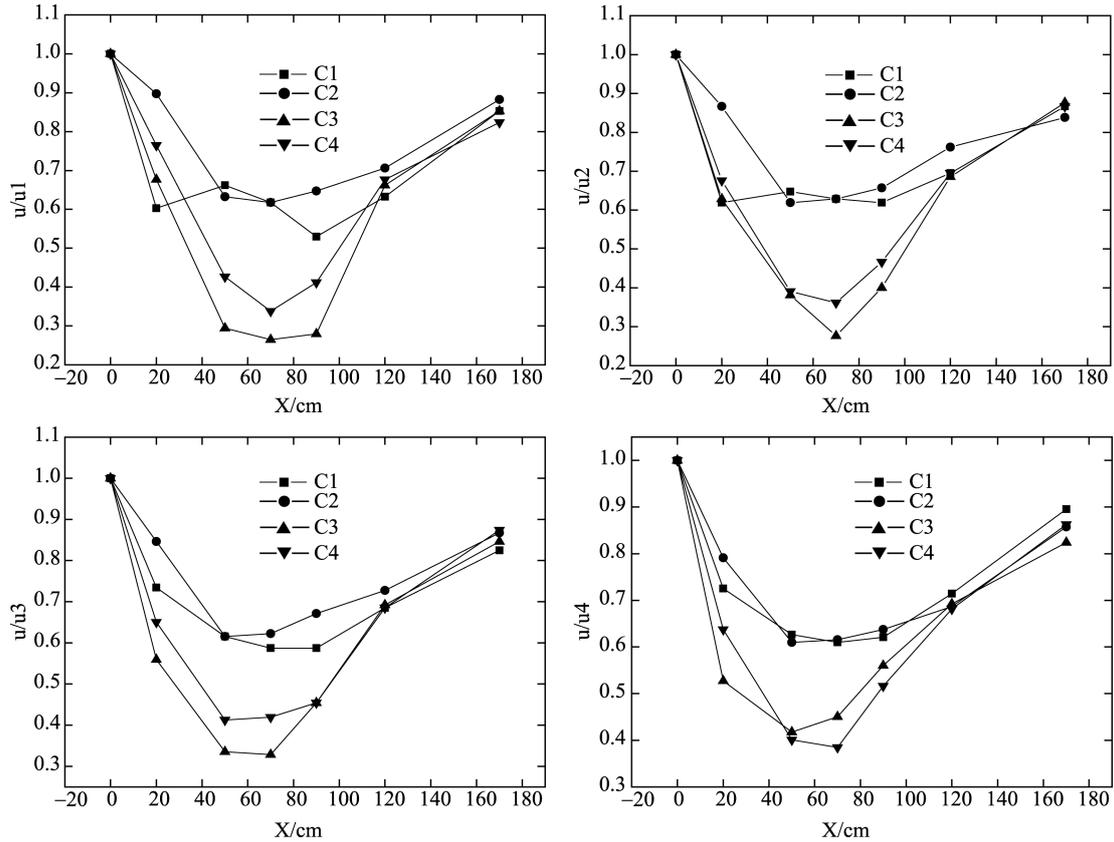


图 5 4 组网箱不同点位流速衰减系数

Fig.5 Flow-velocity reduction factor at different measurement points around four cage models

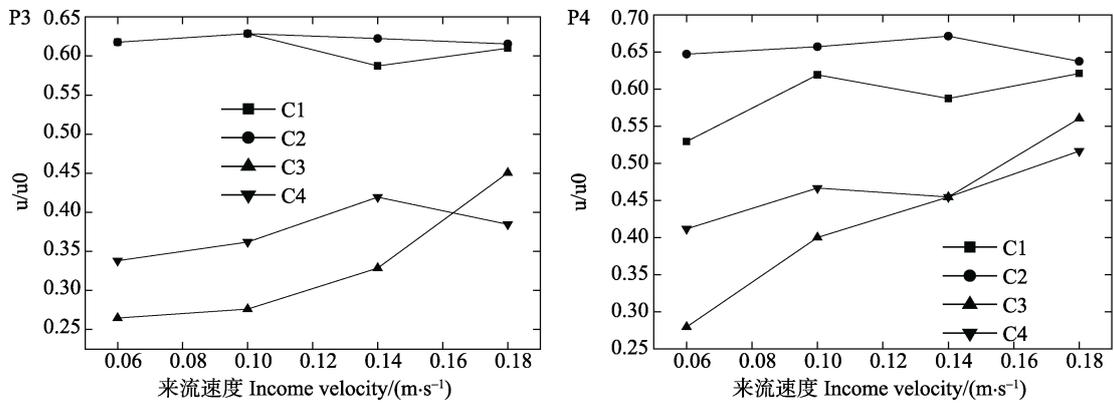


图 6 流速衰减系数随流速变化

Fig.6 Flow-velocity reduction factor for four income velocities

2.2 PIV 研究结果

PIV 研究结果显示, 在不同流速条件下, 网箱周围流场分布情况无明显差异。因此, 选取来流速度 0.18 m/s 为例, 分析网箱周围流场变化情况。图 7 为 PIV 分析结果与 ADV 测量结果的比较。图 7 中 PIV 分析结果显示, 流速随 X 轴呈现波动趋势, 这可能与网箱结构变形有关。如图 7 所示, 虽然 PIV 与 ADV

测速不是在同一时间进行, 但最终结果比较基本一致。其中, C3、C4 两组网箱在点位 3 处的比较值差异稍大, 原因可能是这两种网箱的背面网衣在此流速下变形较大, 从而引起水流扰动所致。图 8 水深为 -0.15 m 处, 流速沿 X 轴的变化趋势。从图 8 中可以看出, 水流通过 4 组网箱后均产生一定的流速衰减。其中, C3 和 C4 的衰减程度明显大于 C1 和 C2, 尤其在网箱内部区域, 流速衰减系数为最小。

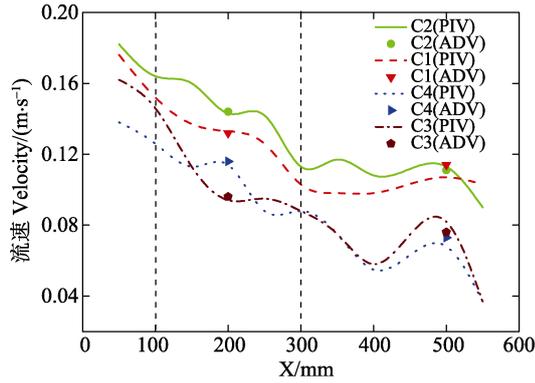


图 7 PIV 分析结果与 ADV 测量结果的比较
Fig.7 Comparison of PIV result and ADV result

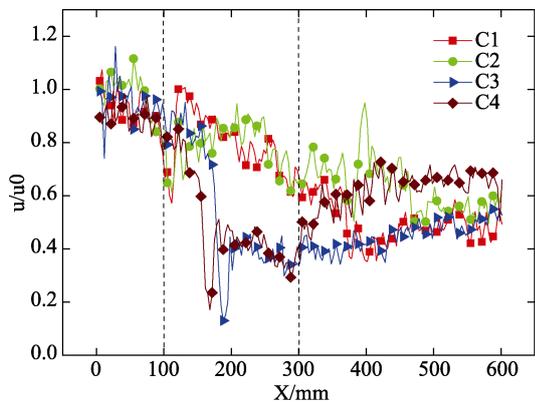


图 8 流速衰减沿 X 轴变化趋势(y = 0, z = -0.15 m)
Fig.8 Velocity along the line in the X direction

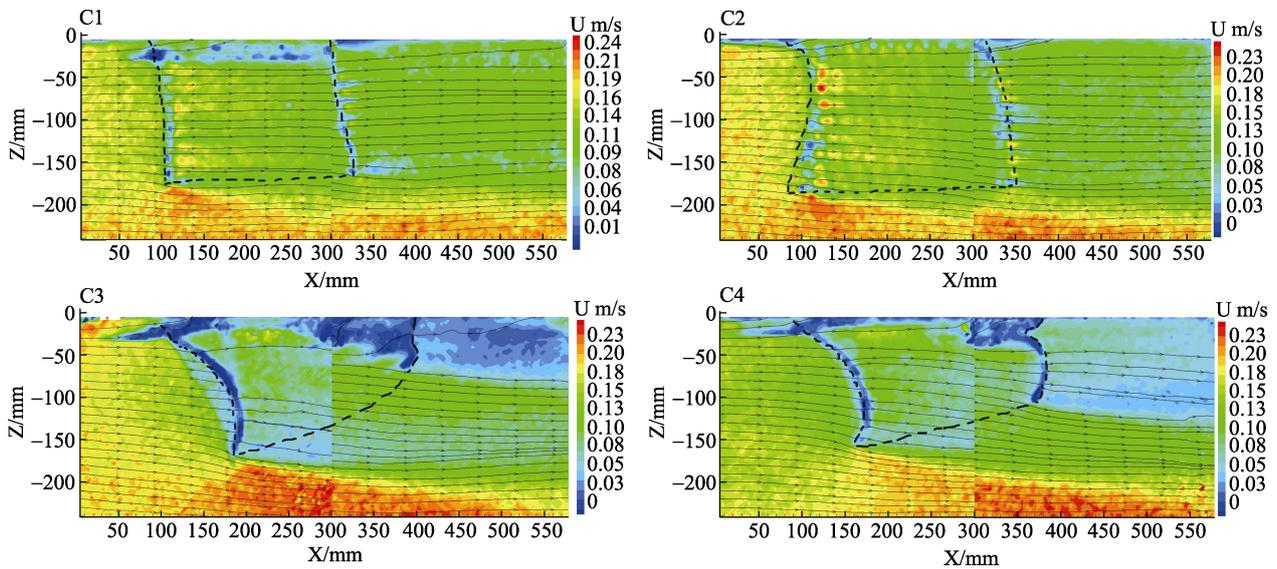


图 9 通过网箱中心点铅垂面的流场分布
Fig.9 Flow-velocity distribution on a vertical cut through the center of the cage

黄六一等(2007)对方形网箱进行水槽减流试验,结果显示,网箱后部的减流区域集中在通过网箱中心的铅垂面上,流速衰减为 20%–45%,与本研究结果

图 9 为通过 4 种网箱中心点铅垂面的流场分布云图呈现。从图 9 中可以看出,水流经过 4 组网箱后均出现明显的流速衰减,衰减区的高度与网箱高度大致相当。此外,研究发现,网箱底部出现明显的流速增大区。比较 4 组网箱流速衰减情况, C3 最为显著,然后依次为 C4、C2、C1。图中流线箭头方向表示水流方向,4 组网箱周围水流方向趋势基本一致,究其原因,可能由网衣部分网线直径较小,水流较容易通过所致。

3 讨论

目前,针对网箱阻流效应的研究方法除了物理模型试验外,还有海上实测与计算机数值模拟。Fredriksson 等(2007)对设置与开放海域的网箱进行实际观测,发现流速衰减接近 10%。网箱在实际海区中通常受到风、浪、流等多种载荷的共同作用,因此,海上实测对试验设备要求较高,难度也最大。在数值模拟试验方面,Zhao 等(2013)利用多孔介质模型来模拟网箱的网衣结构,计算结果显示,圆形网箱中心位置的流速衰减系数为 0.87。然而,将多孔介质与柔性的网衣相比较,其水动力特性还是存在一定的差异。由此可见,水槽模型试验仍然是研究网箱阻流效应的主要手段。

较为接近。李玉成等(2005)对 6 种不同组合形式的重力式网箱进行阻流效应研究,得出单体网箱网内与网后的流速衰减系数分别为 0.87 和 0.68,但其结果并

未给出具体的测量位置。Lader 等(2003)通过模型试验对网箱在水流作用下的受力与变形进行研究, 结果发现, 网箱内部的流速衰减平均值为 20%。上述研究均通过 ADV 流速仪进行单点式测量, 由于受到测量断面及测量点数量的限制, 无法对网箱内部及后部的流态分布进行详细分析。本研究通过 PIV 技术, 则可以同时获得网箱区任意剖面流场分布的云图与矢量图。其次, 上述研究通常只采用单种网箱模型, 并未对不同网目大小与网目形状的改变进行横向对比。黄六一等(2007)通过理论分析认为, 网目越小以及横向缩节系数越小, 则减流效果越好。本研究对比了 4 种不同规格网目的网衣, 结果显示, 小网目的网衣阻流效应明显大于网目网衣, 验证了上述观点; 同时, 研究还发现, 装配菱形网目的网衣阻流效应略大于方形网目网衣。究其原因, 可能与不同网衣结构的密实度有关(Bi *et al.*, 2013)。此外, 由于 C1 与 C2 模型采用 PE 材料, C3 与 C4 模型采用 PA 材料, PE 材料柔挺性好, 且网线较粗, 在流速较低时, 会减小模型网衣变化; 而 PA 网线细小、柔软, 模型网衣变化正常, 也会对试验结果产生影响, 其具体影响今后将进行深入研究。通过 PIV 流场云图分析可以看出, 小网目的阻流效应虽然大于大网目网衣, 但装配小网目网衣的网箱在水流冲击下变形也较大, 导致网箱有效养殖容积减小, 同时极易造成网衣破损。此外, 观察流场云图可见, 不同网箱底部均出现流速加速区域, 这对于及时带走养殖鱼类的残饵及排泄物, 加强网箱内外水体交换具有积极作用。本研究结果也可为网箱耐流特性模拟研究中的流速设定, 提供有益的参考(Lee *et al.*, 2008; 崔勇等, 2011; 黄小华等, 2011)。

参 考 文 献

万荣, 崔勇, 崔江浩, 等. 一种基于有限元原理的养殖网箱耐流特性的数值计算方法. 中国海洋大学学报(自然科学

- 版), 2007, 37(5): 709–712
 李玉成, 陈昌平, 李春柳, 等. 重力式网箱减流效应的研究. 中国造船, 2005, 46(增刊): 105–109
 崔勇, 关长涛, 万荣, 等. 基于有限元方法对波流场中养殖网箱的系统动力分析. 工程力学, 2010, 27(5): 250–256
 崔勇, 关长涛, 万荣, 等. 基于有限元方法对鲆鲽网箱耐流特性的数值模拟. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(6): 051–054
 黄小华, 郭根喜, 胡昱, 等. 波流作用下深水网箱受力及运动变形的数值模拟. 中国水产科学, 2011, 18(2): 443–450
 黄六一, 梁振林, 宋伟华, 等. 方形箱网结构减流效果试验. 中国水产科学, 2007, 14(5): 860–863
 Bi CW, Zhao YP, Dong GH, *et al.* Experimental investigation of the reduction in flow velocity downstream from a fishing net. *Aquacult Eng*, 2013, 57: 71–81
 Cui Y, Guan CT, Wan R, *et al.* Numerical simulation of a flatfish cage system in waves and currents. *Aquacult Eng*, 2013, 56: 26–33
 Fredriksson DW, DeCew JC, Tsukrov I, *et al.* Development of large fish farm numerical modeling techniques with in situ mooring tension comparisons. *Aquacult Eng*, 2007, 36(2): 137–148
 Lader PF, Enerhaug B, Fredheim A, *et al.* Modeling of 3D net structures exposed to wave and current. In: 3rd International Conference on Hydroelasticity in Marine Technology, 2003, : 19–26
 Lee CW, Kim YB, Lee GH, *et al.* Dynamic simulation of a fish cage system subjected to currents and waves. *Ocean Eng*, 2008, 35(14–15): 1521–1532
 Patursson Ø, Swift MR, Tsukrov I, *et al.* Development of a porous media model with application to flow through and around a plane net. *Ocean Eng*, 2010, 37(2): 314–324
 Zhao YP, Li YC, Dong GH, *et al.* Numerical simulation of the effects of structure size ratio and mesh type on three-dimensional deformation of the fishing-net gravity cage in current. *Aquacult Eng*, 2007, 36(3): 285 – 301
 Zhao YP, Bi CW, Dong GH, *et al.* Numerical simulation of the flow field inside and around gravity cages. *Aquacult Eng*, 2013, 52: 1–13

(编辑 陈严)

Analysis of Two-Dimension Flow Field of the Square Cage Based on Particle Image Velocimetry (PIV)

CUI Yong^①, GUAN Changtao, ZHAO Xia, LIU Chao, HUANG Bin, LI Jiao

(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The current in sea can maintain the water quality in the cage, but the strong current can cause serious deformation of the cage and reduce the effective volume of the cage. This study was conducted to research the reduction in flow velocity downstream from square cages in currents. The flow-velocity distribution downstream from cages was investigated with four different net mesh shapes and sizes. The reduction in flow velocity was recorded using both the Particle Image Velocimetry (PIV) and Acoustic Doppler Velocimetry (ADV). The results showed that there was an obvious reduction in flow velocity downstream in the four cage models. The height of the flow-reduction region was approximately the same as the height of the cage. The flow velocity increased at the bottom of the cage. The results achieved by PIV consistent with the data recorded by ADV. The average reduction factor of the four cage models was from 0.5 to 0.8 at 0.18 m/s the incoming velocity. The reduction in flow velocity of the cage with small meshes was greater than the cage with big meshes. The reduction in flow velocity of the cage with diamond meshes was slightly greater than the cage with square meshes. The average reduction factor was not obviously impacted by the incoming velocity. The results of the vertical plane through the center of the cage by PIV were visualized by the velocity nephogram. These findings will contribute to the understanding of the flow characteristics around the square cage.

Key words Fish cage; Flow-velocity reduction; Particle-image velocimetry; Flume experiment

① Corresponding author: CUI Yong, E-mail: cuiyong@ysfri.ac.cn

大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)鱼皮的 营养成分分析*



姜晓东 李红艳 王颖^① 吴志宏 刘天红 李晓 孙元芹

(山东省海洋生物研究院 青岛 266002)

摘要 本研究分析了大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)鱼皮的营养成分,评价了其营养品质。结果显示,大马哈鱼皮中粗蛋白含量最丰富(31.10%),粗脂肪、灰分和总糖含量分别为7.40%、1.20%和0.23%;氨基酸总量为682.1 mg/g,其中呈味氨基酸占氨基酸总量的53.7%,必需氨基酸占氨基酸总量的22.4%,甘氨酸含量最高(185.0 mg/g),其次是谷氨酸(75.8 mg/g);胶原蛋白含量为214.2 mg/g,占粗蛋白含量的68.9%,特征氨基酸——羟脯氨酸含量为19.3 mg/g;不饱和脂肪酸含量为10.8%,V_{B3}含量丰富(75 mg/kg),还富含钙、钠、铁、锌等多种无机元素。大马哈鱼皮营养较全面、胶原蛋白含量较高,是提取胶原蛋白的良好原料。

关键词 大马哈鱼皮;营养成分;氨基酸;胶原蛋白

中图分类号 Q501 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0145-06

大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)体大肥壮、肉质鲜美、营养丰富,是名贵的冷水性溯河洄游鱼类。大马哈鱼可鲜食,也可干制、熏制、加工罐头等,加工过程中产生的鱼皮、鱼骨等下脚料占总重量的60%左右,其中鱼皮约10%(李兵兵,2009),但鱼皮并没有被充分利用,大部分作为废弃物丢弃,不仅造成资源的浪费,还会污染环境(刘朝霞等,2011)。

胶原蛋白是动物体内含量最多的蛋白质,也是器官中结缔组织的主要成分,约占人体蛋白质的25%~33%(张其清等,1989),在体内一般作为组织的支持物和填充物,主动参与细胞的迁移、分化及增殖,并与创伤的修复及胚胎发育过程有关(杨斌等,2005;李贺等,2003;罗磊,1996)。胶原蛋白作为一种高档材料,广泛应用于医药、食品及化妆品领域。鱼皮胶原蛋白来源广、制备成本低、使用安全,近年来人们进行了广泛研究。但是,迄今为止,有关大马哈鱼皮营养成分的分析及其营养评价尚不全面。本研究测定了大马哈鱼皮的营养成分,包括基本成分、氨基酸、脂肪酸、维生素及矿物元素等,为大马哈鱼皮的开发利用、提高

大马哈鱼的营养价值、降低环境污染问题提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

大马哈鱼皮,鱼皮品种为粉鲑,产地为俄罗斯,由山东源达渔业公司提供。鱼皮于-20℃冻藏,进行试验时,将样品解冻、打浆后,进行分析测定。

1.2 仪器

AA 240FS 原子吸收光谱仪(美国瓦里安公司)、K9840 凯氏自动定氮仪(上海海能实验仪器科技有限公司)、UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司)、SZF-06A 脂肪仪(上海洪纪仪器设备有限公司)、A3000 型氨基酸自动分析仪(德国曼默博尔公司)等。

1.3 方法

1.3.1 营养成分分析 水分:依据 GB 5009.3-2010 食品中水分的测定;粗蛋白:依据 GB 5009.5-2010

* 国家海洋局海洋公益性行业科研专项(201205027-3)资助。姜晓东, E-mail: dejiaaa@126.com

^① 通讯作者:王颖,研究员, E-mail: yzsshipin@126.com

收稿日期:2014-11-07, 收修改稿日期:2014-12-01

食品中蛋白质的测定；粗脂肪：依据 GB/T 5009.6-2003 食品中脂肪的测定；总糖：依据 GB/T 5009.8-2008 食品中蔗糖的测定；灰分：依据 GB 5009.4-2010 食品中灰分的测定；氨基酸成分测定：依据 GB/T 5009.124-2003 食品中氨基酸的测定；脂肪酸成分测定：依据 GB/T 22223-2008 食品中总脂肪、饱和脂肪(酸)、不饱和脂肪(酸)水解提取-气相色谱法测定；维生素： V_A 、 V_E 依据 GB/T 5009.82-2003、 V_{B1} 依据 GB/T 5009.84-2003、核黄素依据 GB/T 5009.85-2003、泛酸依据 GB/T 5009.210-2008、烟酸依据 GB 5413.15-2010、 V_{B6} 依据 GB/T 5009.154-2003、 V_C 依据 GB/T 5009.86-2003 进行测定；矿物元素：铁、钠、钙、硒、无机砷、铅、铜、锌和镉分别依据 GB/T 5009.90-2003、GB/T 5009.91-2003、GB/T 5009.92-2003、GB 5009.93-2010、GB/T 5009.11-2003、GB 5009.12-2010、GB/T 5009.13-2003、GB/T 5009.14-2003 和 GB/T 5009.15-2003 进行测定。

1.3.2 氨基酸分及化学分计算方法 通过与 1973

年 FAO/WHO 建议的氨基酸的计分模式和以鸡蛋蛋白质作为理想蛋白质进行比较,由如下公式计算氨基酸分 AAS 和化学分 CS(王颖等, 2013)。

$$AAS = \frac{\text{每克待评蛋白质中必需氨基酸含量(mg)}}{\text{FAO/WHO模式中每克蛋白质相应必需氨基酸含量(mg)}} \times 100$$

$$CS = \frac{\text{每克待评蛋白质中必需氨基酸含量(mg)}}{\text{每克鸡蛋蛋白质中相应必需氨基酸含量(mg)}} \times 100$$

1.3.3 鱼皮胶原蛋白含量的测定 通过测定鱼皮中羟脯氨酸含量,乘以相应的系数计算胶原蛋白的含量。胶原蛋白含量=羟脯氨酸含量 \times 11.1(日本食品工业学会《食品分析法》编辑委员会, 1986)(沈同, 1991)。

2 结果与分析

2.1 大马哈鱼皮基本营养成分

大马哈鱼皮及其他鱼皮的一般营养成分见表1。

表1 大马哈鱼皮的营养成分(湿基)

Tab.1 The main nutrient composition of *O. keta* and other fishes skin (Wet weight)

种类 Species	水分 Moisture (%)	粗蛋白 Crude protein (%)	粗脂肪 Crude fat (%)	灰分 Crude ash (%)	总糖 Total carbohydrate (%)	参考文献 Reference
大马哈鱼皮 <i>O. keta</i> skin	61.20 \pm 3.63	31.10 \pm 0.72	7.40 \pm 0.36	1.20 \pm 0.10	0.23 \pm 0.09	本研究 This study
黄鳍金枪鱼皮 <i>Thunnus albacares</i> skin	54.57	32.66	8.98	1.29	0.08	杨树奇等, 2010
鲛鱼皮 <i>Lophius litulon</i> skin	75.60	28.70	0.37	0.43	0.26	陈小娥等, 2007
军曹鱼皮 <i>Rachycentron canadum</i> Linnaeus skin	65.03	28.53	1.57	1.25	0.06	杨树奇等, 2010
罗非鱼皮 <i>Oreochromis niloticus</i> skin	65.01	33.14	1.56	1.17	0.05	叶小燕等, 2008
虹鳟鱼皮 <i>Oncorhynchus mikiss</i> skin	62.30	28.10	8.80	1.13	—	刘丛力等, 2013
斑点叉尾鲷鱼皮 <i>Ictalurus punctatus</i> skin	65.41	21.32	12.38	0.22	—	毛艳贞, 2012

由表1可知, 大马哈鱼皮的主要营养成分具有以下特点: 除水分外, 粗蛋白含量最丰富, 占大马哈鱼皮湿重的31.10%。鱼皮中的蛋白质主要以胶原蛋白为主(Sadowska *et al.*, 2003; Guerard *et al.*, 2002), 可作为良好的蛋白质资源; 鱼皮中粗脂肪含量较高, 占湿重的7.40%, 远高于鲛鱼(*L. litulon*)鱼皮(陈小娥等, 2007)、军曹鱼(*R. canadum* Linnaeus)皮(杨树奇等, 2010)和罗非鱼(*O. niloticus*)皮(叶小燕等, 2008), 可能是大马哈鱼是冷水鱼类, 皮下聚集较多脂肪而抗寒力强、耐低氧的缘故; 鱼皮中灰分含量(占湿重的1.20%)高于鲛鱼皮、罗非鱼皮、虹鳟鱼(*O. mikiss*)

皮(刘丛力等, 2013)和斑点叉尾鲷(*I. punctatus*)鱼皮(毛艳贞, 2012)¹⁾, 表明其矿物质含量较丰富; 总糖含量所占比例最低, 与其他鱼类一致。

2.2 氨基酸组成与含量

大马哈鱼皮的氨基酸组成见表2。

由表2可知, 大马哈鱼皮中氨基酸含量丰富, 含有8种必需氨基酸。其中, 甘氨酸含量最丰富, 为185.0 mg/g, 其次为谷氨酸(75.8 mg/g)、脯氨酸(63.9 mg/g)和丙氨酸(58.0 mg/g), 组氨酸、酪氨酸和胱氨酸含量较少, 色氨酸含量最低, 仅为1.5 mg/g。甘氨酸和脯氨酸是胶

1) 毛艳贞. 斑点叉尾鲷鱼皮加工及营养成分分析. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2012, 25-26

原蛋白的特征氨基酸(杨树奇等, 2010), 甘氨酸含量占总氨基酸含量的30%左右, 符合胶原蛋白Gly-X-Y的特点, 即每隔两个其他氨基酸残基(X、Y)即有1个甘氨酸, 脯氨酸含量占总氨基酸含量的9.4%。可见, 大马哈鱼皮的蛋白质组成主要为胶原蛋白; 谷氨酸不仅是公认的鲜味氨基酸, 还参与脑内蛋白质和糖的代谢以及促进氧化过程(吴坚, 2011); 丙氨酸能促进血液中的酒精代谢, 增强肝功能。大马哈鱼皮中这4种氨基酸含量丰富对人体健康十分有益。

表 2 大马哈鱼皮氨基酸组成与含量(干基)
Tab.2 Amino acids composition and levels in the skin of *O. keta* (Dry weight)

氨基酸 Amino acids(mg/g)	氨基酸 Amino acids(mg/g)		
色氨酸 Trp [#]	1.5	酪氨酸 Tyr	10.7
天门冬氨酸 Asp [*]	47.4	苯丙氨酸 Phe [#]	17.0
苏氨酸 Thr [#]	21.0	赖氨酸 Lys [#]	32.5
丝氨酸 Ser	28.2	组氨酸 His	11.5
谷氨酸 Glu [*]	75.8	精氨酸 Arg	45.4
脯氨酸 Pro	63.9	总氨基酸 TAA	682.1
甘氨酸 Gly [*]	185.0	必需氨基酸 EAA	152.8
丙氨酸 Ala [*]	58.0	呈味氨基酸总量 DAA	366.2
胱氨酸 Cys-Cys	3.4	支链氨基酸总量 BCAA	64.1
缬氨酸 Val [#]	19.4	芳香族氨基酸总量 AAA	29.2
蛋氨酸 Met [#]	16.7	支/芳比 BCAA/AAA	2.2
异亮氨酸 Ile [#]	16.7	EAA/TAA	22.4
亮氨酸 Leu [#]	28.0	DAA/TAA	53.7

表示必需氨基酸; *表示呈味氨基酸
Essential amino acids, * Delicious amino acids

大马哈鱼皮中不仅氨基酸丰富多样, 呈味氨基酸比例高, 占总氨基酸含量的53.7%, 如鲜味氨基酸(谷氨酸和天门冬氨酸)占18.1%, 甜味氨基酸(甘氨酸和丙氨酸)占35.6%, 因此其味道鲜美, 可作为鲜味调料的提取原料。鱼皮中支链氨基酸总量为64.1 mg/g, 占总氨基酸含量的9.4%。研究表明, 支链氨基酸具有促进

鼻饲病人氮保留和蛋白质合成的作用(刘庆慧等, 2001), 可见大马哈鱼皮可能适宜鼻饲病人食用。此外, 大马哈鱼皮氨基酸的支/芳比较高, 高支、低芳氨基酸混合物具有保肝作用, 患肝病时很典型的依据就是支/芳比值降低(Kano *et al*, 1991), 推测大马哈鱼皮适宜肝病患者食用。

大马哈鱼皮中必需氨基酸与总氨基酸比为22.4%, 不符合FAO/WHO推荐的理想蛋白质模式, EAA/TAA在40%左右的氨基酸理想模式。显然, 大马哈鱼皮并不是传统营养学意义上的优质蛋白质。可采取与其他蛋白源复配的方法提高其蛋白质生物价, 或者通过大马哈鱼皮再加工利用, 制备胶原蛋白等产品, 提高其营养价值和利用率。

以FAO/WHO联合推荐的FAO模式和鸡蛋模式为参比, 大马哈鱼皮的氨基酸营养价值的评价结果见表3。

由表3可知, 8种氨基酸的含量均低于标准模式。由氨基酸评分可知, 大马哈鱼皮的第1限制性氨基酸为色氨酸, 得分为31, 第2限制性氨基酸为缬氨酸, 得分为52.8。由化学分结果可知, 第1限制性氨基酸为色氨酸, 得分为18.2, 第2限制性氨基酸为酪氨酸和苯丙氨酸, 得分为44.1。可见, 大马哈鱼皮蛋白质中氨基酸含量比例不平衡, 属于不完全蛋白质, 在食用时应注意根据氨基酸的互补性进行搭配。

2.3 大马哈鱼皮胶原蛋白含量

羟脯氨酸是胶原蛋白的特征成分之一, 仅存在于胶原蛋白、弹性蛋白和伸展蛋白中, 是衡量胶原蛋白品质的重要指标。大马哈鱼皮的羟脯氨酸及胶原蛋白含量见表4。由表4可知, 大马哈鱼皮中羟脯氨酸和胶原蛋白含量与文献报道的鲛鳕鱼皮(陈小娥等, 2007)、军曹鱼皮(杨树奇等, 2010)、黄鳍金枪鱼皮(杨树奇等, 2010)和罗非鱼皮(叶小燕等, 2008)含量基本一致, 其中, 黄鳍金枪鱼皮含量最高, 军曹鱼皮含量最低。大马哈鱼皮中胶原蛋白含量为214.2 mg/g, 占粗蛋白含

表 3 大马哈鱼皮必需氨基酸组成评价
Tab.3 Evaluation of essential amino acids in the skin of *O. keta*

项目 Items	必需氨基酸 EAA(mg/g)							
	异亮氨酸 Ile	亮氨酸 Leu	赖氨酸 Lys	半胱氨酸+蛋氨酸 Cys+Met	苏氨酸 Thr	色氨酸 Trp	缬氨酸 Val	酪氨酸+苯丙氨酸 Tyr+Phe
大马哈鱼皮 <i>O. keta</i> skin	21.9	38.3	43.8	27.3	28.4	3.1	26.4	37.9
FAO 模式 FAO evaluation mode	40	70	55	35	40	10	50	60
氨基酸分 AAS	54.5	54.7	79.6	78	71	31	52.8	63.2
鸡蛋蛋白质 Egg protein	49	66	66	47	45	17	54	86
化学分 CS	44.7	58	66.4	58.1	63.1	18.2	48.9	44.1

表4 大马哈鱼皮胶原蛋白含量(湿基)

Tab.4 Collagen contents in the skin of *O. keta* (Wet weight)

含量 Content	马哈鱼皮 <i>O. keta</i> skin (本研究 This study)	黄鳍金枪鱼皮 <i>T. albacares</i> skin (杨树奇等, 2010)	鲛鳕鱼皮 <i>L. litulon</i> skin (陈小娥等, 2007)	军曹鱼皮 <i>R. canadum</i> Linnaeus skin (杨树奇等, 2010)	罗非鱼皮 <i>O. niloticus</i> skin (叶小燕等, 2008)
羟脯氨酸 HYP(mg/g)	19.3	20.4	19.0	18.1	18.6
胶原蛋白 Collagen(mg/g)	214.2	226.4	211.0	206.5	206.5

量的68.9%，是提取胶原蛋白既经济又丰富的原料。

2.4 脂肪酸组成与含量

大马哈鱼皮中脂肪酸含量及组成如见表5。由表5可知，大马哈鱼皮中主要检测到12种脂肪酸，其中饱和脂肪酸3种，占总干物质的4%，不饱和脂肪酸9种，包括5种单不饱和脂肪酸和4种多不饱和脂肪酸，分别占总干物质的6.4%和4.4%。棕榈酸和油酸含量最高，各占2.8%，二十碳一烯酸、EPA、DHA次之，各占1.6%。

大马哈鱼皮中不饱和脂肪酸的含量显著高于饱和脂肪酸的含量，明显不同于陆生动物(赵敏, 2012)。不饱和脂肪酸具有调节血脂、清理血栓、维护视网膜、改善关节炎、降低心脑血管疾病的发病率等生理保健作用(Domingo *et al*, 2007; Usydus *et al*, 2008)。EPA具有清理血管中垃圾的功能，俗称“血管清道夫”，DHA具有软化血管、健脑益智、改善视力的功效，俗称“脑黄金”(张越华等, 2006)。临床应用研究发现，EPA和

DHA是人和动物生长发育的必需脂肪酸(朱成科等, 2013)，大马哈鱼皮中EPA和DPA总量占干基的3.2%。综上，大马哈鱼皮脂肪酸组成具有较高的营养价值。

2.5 维生素组成与含量

大马哈鱼皮中维生素含量如表6所示。

由表6可知，大马哈鱼皮中 V_{B3} 含量最丰富， V_{B5} 次之， V_A 和 V_C 未检出，这可能是 V_A 主要分布在肝脏中，鱼皮中 V_C 含量较少。 V_{B3} 为维生素B复合物之一，为抗糙皮病因子，缺乏时可产生糙皮病，表现为皮炎、舌炎、腹泻及烦躁失眠等异常症状，因此，大马哈鱼皮在促进消化系统、维护皮肤健康等具有一定功效。

2.6 矿物元素组成与含量

大马哈鱼皮中矿物元素含量见表7。由表7可知，大马哈鱼皮中钙的含量十分丰富，依次为钠、锌、铁、硒。生物体内的金属元素参与机体的许多生理活动

表5 大马哈鱼皮脂肪酸组成与含量(干基)

Tab.5 Fatty acid compositions and contents in the skin of *O. keta* (Dry weight)

脂肪酸 Fatty acids(%)		脂肪酸 Fatty acids(%)		脂肪酸 Fatty acids(%)	
豆蔻酸 $C_{14:0}$	0.8	油酸 $C_{18:1}$	2.8	亚油酸 $C_{18:2}$	0.4
棕榈酸 $C_{16:0}$	2.8	二十碳一烯酸 $C_{20:1}$	1.6	二十碳二烯酸 $C_{20:2}$	0.8
硬脂酸 $C_{18:0}$	0.4	芥酸 $C_{22:1}$	0.8	EPA	1.6
Σ SFA	4.0	二十四碳一烯酸 $C_{24:1}$	0.4	DHA	1.6
棕榈油酸 $C_{16:1}$	0.8	Σ MUFA	6.4	Σ PUFA	4.4

表6 大马哈鱼皮维生素含量(干基)

Tab.6 The vitamin contents in the skin of *O. keta* (Dry weight)

维生素 Vitamins(mg/kg)	V_A	V_C	V_{B1}	V_{B2}	V_{B3}	V_{B5}	V_{B6}
含量 Contents	ND	ND	0.15±0.02	11.7±0.5	75.0±2.8	39.1±1.3	2.8±0.3

ND为未检出; ND. not detected

表7 大马哈鱼皮矿物元素含量(干基)

Tab.7 The mineral elements contents in the skin of *O. keta* (Dry weight)

元素 Elements(mg/kg)	钙 Ca	钠 Na	铁 Fe	锌 Zn	硒 Se	铜 Cu	铅 Pb	镉 Cr	无机砷 As
含量 Contents	7660±202	2140±69	40.7±2.8	99.2±2.9	0.85±0.10	ND	0.20±0.03	ND	0.08±0.01

ND为未检出; ND. not detected

及物质能量代谢(杨凤影等, 2009), 特别是微量元素。它们在人体内的含量不多, 却与人的生存与健康息息相关。钙是生物必需的元素, 人的肌肉、神经、体液和骨骼中都有与 Ca^{2+} 结合的蛋白质, 是神经传递、肌肉收缩、血液凝结、激素释放和乳汁分泌等必需的元素, 钠、锌、铁等亦有助于提高人体免疫、维持正常细胞代谢及参与合成血红蛋白等(贾建萍等, 2013)。硒具有一定的抗癌作用(蔡宝玉等, 2004)。总体上看, 大马哈鱼皮富含钙、钠、锌、铁等多种矿物质元素, 具有较高的营养价值。

重金属元素具有较大毒性, 严重危害人体神经系统、消化系统、造血系统等, 大马哈鱼皮中未检出镉、铅、无机砷, 含量均低于GB 2762-2012食品中污染物限量以及欧盟食品中重金属限量标准, 食用安全无毒。

3 结论

大马哈鱼皮中粗蛋白含量十分丰富, 占湿重的31.10%, 是较为经济的潜在蛋白质资源; 氨基酸种类齐全, 总含量为 682.1 mg/g, 其中呈味氨基酸占氨基酸总量的 53.7%, 其风味良好、味道鲜美, 但必需氨基酸与总氨基酸比仅为 22.4%, 不是营养意义上的优质蛋白; 甘氨酸含量高(185 mg/g)、脯氨酸(63.9 mg/g)和羟脯氨酸(19.3 mg/g)含量丰富(以湿基计), 胶原蛋白含量为 214.2 mg/g (以湿基计), 占粗蛋白含量的 68.9%, 可作为提取胶原蛋白的原料; 大马哈鱼皮中不饱和脂肪酸含量占干基的 10.8%, EPA 和 DPA 总量占干基的 3.2%; 含有人体所需的维生素和矿物元素, 其中 V_{B_3} 含量为 75 mg/kg, Ca 含量为 7660 mg/kg, Na、Fe、Zn 等含量也较为丰富; 重金属含量极低, 无重金属污染, 食用无安全风险。

大马哈鱼皮蛋白质组成主要为胶原蛋白, 是提取胶原蛋白、制备胶原蛋白生物材料以及制备有生理功能活性肽的良好原料, 优于陆生哺乳动物胶原蛋白及其制品的应用安全性(Helcke, 2001)和可接受性。目前有利用稀碱处理大马哈鱼皮限制性酶解制备胶原蛋白的报道(陈美娟, 2006)。有效利用大马哈鱼皮提取高价值的胶原蛋白, 可以变废为宝, 提高大马哈鱼加工产业附加值和经济效益, 促进水产养殖业的可持续发展。

参 考 文 献

王颖, 吴志宏, 李红艳, 等. 青岛魁蚶软体部营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 133-139
日本食品工业学会《食品分析法》编辑委员会. 食品分析法

(下). 重庆: 四川科学技术出版社, 1986, 74-77
叶小燕, 曾少葵, 余文国, 等. 罗非鱼皮营养成分分析及鱼皮明胶提取工艺的探讨. 南方水产, 2008, 4(5): 55-60
朱成科, 黄辉, 向泉, 等. 泉水鱼肌肉营养成分分析及营养学评价. 食品科学, 2013, 34(11): 246-249
刘丛力, 李娟, 张双灵, 等. 虹鳟鱼皮营养成分及其胶提工艺探讨. 食品研究与开发, 2013, 34(8): 97-99
刘庆慧, 刘丛力, 王彩理. 鱼鳞营养成分的分析及对高脂饲料大鼠血脂水平的影响. 中国水产科学, 2000, 7(4): 56-59
刘朝霞, 陈海光, 黄东雨. 鱼皮胶原蛋白的提取及其应用. 广东农业科学, 2011, 38(20): 100-102
李兵兵. 浅谈淡水水产品废弃物的加工利用. 渔业致富指南, 2009(6): 12-14
李贺, 刘白玲. 胶原在组织工程中的应用. 中国皮革, 2003, 32(5): 10-12
杨凤影, 张弼. 不同地理群体栉孔扇贝营养成分的比较分析. 安徽农业科学, 2009, 37(9): 4073-4075
杨树奇, 曾少葵, 周春霞, 等. 3 种鱼皮的基本成分及氨基酸组成分析. 广东海洋大学学报, 2010, 30(1): 97-100
杨斌, 陈抗. 胶原蛋白贴敷料在美容皮肤的临床研究. 中国热带医学, 2005, 5(4): 803-804
吴坚. 亚油酸: 清除血管垃圾. 大众医学, 2011(8): 41
沈同. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1991, 126
张其清, 王彭延, 朱明华, 等. 胶原材料的生物学评价. 生物医学工程学杂志, 1989, 6(3): 216-218
张越华, 曾和平. 脂肪酸在生命过程中的作用研究进展. 中国油脂, 2006, 31(12): 11-16
陈小娥, 方旭波, 钟秋琴. 鲛鳃鱼皮中胶原蛋白的提取工艺研究. 食品工业科技, 2007, 28(3): 131-133
陈美娟. 大马哈鱼皮胶原蛋白制备和表征. 药物生物技术, 2006, 13(4): 290-292
罗磊. 医用胶原蛋白的临床应用. 国外医学(口腔医学分册), 1996, 23(1): 41-44
赵敏. 鲢鱼鳞营养成分分析及营养学评价. 安徽农业科学, 2012, 40(28): 14002-14004
贾建萍, 周彦钢, 林赛君, 等. 金枪鱼骨营养成分分析. 食品工业科技, 2013, 34(10): 334-337
蔡宝玉, 王利平, 王树英. 甘露青鱼肌肉营养分析和评价. 水产科学, 2004, 23(9): 34-35
Domingo JL, Bocio A, Falo G *et al.* Benefits and risks of fish consumption. Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-fatty acids and chemical contaminants. *Toxicol*, 2007, 230(2-3): 219-226
Guerard F, Guimas L, Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B-Enzym*, 2002, 19-20(2): 489-498
Helcke TG. The food technologist's friend or foe? *Int Food Ingred*, 2001(1): 6-8
Kano T, Nagaki M, Takahashi T, *et al.* Plasma free amino acid pattern in chronic hepatitis as sensitive and prognostic index. *Gastroenterol Jpn*, 1991, 26(3): 344-349
Sadowska M, Kolodziejska I, Niecikowska C. Isolation of

collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chem, 2003, 81(2): 257–262
Usydus Z, Szlinder-Richert J, Polak-Juszczak L, et al. Food of

marine origin: between benefits and potential risks. Part I. Canned fish on the Polish market. Food Chem, 2008, 111(3): 556–563

(编辑 陈辉)

The Analysis of Nutrient Components of *Oncorhynchus keta* Skin

JIANG Xiaodong, LI Hongyan, WANG Ying^①, WU Zhihong, LIU Tianhong, LI Xiao, SUN Yuanqin
(Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266002)

Abstract The current study measured the contents of main nutrient components in the skin of *O. keta* by focusing on proteins, common amino acids, hydroxyproline, fat, vitamins, and mineral ions. The results showed that the contents were composed of 31.10% crude protein, 7.40% crude fat, 1.20% ash, 0.23% of total carbohydrate, and various delicious amino acids. There was 682.1 mg/g total amino acids in dry sample having the highest Gly content (185.0 mg/g), followed by Glu (75.8 mg/g) and then hyp (19.3 mg/g). The ratio of EAA/TAA is 22.4% and the ratio of DAA/TAA is 53.7%. The skin has rich collagen content of 214.2 mg/g based on wet weight, accounting for 68.9% of the crude protein. The content of UFA was 10.8%, and the results also indicated that the skin of *O. keta* was also rich in vitamin B₃ (75 mg/kg) and mineral ions such as Ca, Na, Fe, Zn, etc. In summary, the skin of *O. keta* has high nutritional value, which is a good source for extracting collagen that is widely used in medical, food and chemical industry.

Key words *Oncorhynchus keta* skin; Nutrient components; Amino acids; Collagen

① Corresponding author: WANG Ying, E-mail: yzsshipin@126.com

表面活性效应下强力霉素伏安行为 及其检测*



张旭志¹ 刘文文² 丁东生¹ 郭萌萌¹ 赵俊¹ 曲克明^{1①}

(1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 中国海洋大学化学化工学院 青岛 266003)

摘要 研究了表面活性效应对强力霉素(DOC)伏安行为的影响及表面活性剂存在下该分子的伏安检测方法。以 B-R 缓冲溶液(pH=2.0)为支持电解质, 2.0×10^{-4} mol/L 十二烷基苯磺酸钠(SDBS)的存在将明显有助于 DOC 的富集。在该实验条件下, DOC 在导电碳黑糊电极上发生 1 质子、2 电子转移的不可逆氧化, 过程受扩散控制。对表面活性剂种类及其浓度、缓冲液种类及 pH 值、富集电位及时间等影响伏安分析的因素进行了研究。优化条件下, DOC 的氧化峰电流与其浓度在 1.0×10^{-7} – 2.3×10^{-5} mol/L 范围内呈良好的线性关系, 检测限为 4.5×10^{-8} mol/L ($S/N=3$)。将该电化学方法应用于淡水渔业水样中痕量 DOC 的检测, 得到了较满意的结果(平均回收率为 97.44%–105.28%)。

关键词 强力霉素; 伏安行为; 表面活性剂; 电分析; 渔业环境监测

中图分类号 O657.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0151-07

强力霉素(Doxycycline, DOC)又名脱氧土霉素、多西环素, 是一种长效广谱的半合成四环素类抗生素(Maryam *et al*, 2014; Ariza *et al*, 1992; Gurler *et al*, 2013), 除对革兰氏阳性菌和阴性菌有作用外, 还可抑制立克次体、肺炎支原体、砂眼支原体、阿米巴原虫等, 曾经被广泛应用于畜牧与水产养殖(Gurler *et al*, 2013; Oka *et al*, 1997; Kang *et al*, 2013)。一般情况下, 水产养殖生产中, 此类抗生素常作为饵料添加成分投放。大约只有 30% 的药物会被养殖生物进食(其中部分将残留于生物体内), 其余量则长期残留在水体及沉积物环境中(Kim *et al*, 2006)。在食品源生物体内及环境中残留的 DOC 将直接或间接对人类健康造成威胁(Kang *et al*, 2013; Gajda *et al*, 2009; Attia *et al*, 2011)。因此, 中国和欧盟制定了严格的限量标准(Le *et al*, 2012)。为确保食品安全和自然生态健康, 对各种食材及农产品原产地环境中该药物的检测与控制

都具有重要意义。

针对定量测定 DOC, 基于色谱、质谱、光谱、电化学原理的多种仪器分析方法已经得到研究与应用(Attia *et al*, 2011; Zhu *et al*, 2014; Surudee *et al*, 2006)。其中色谱及色-质联用和光谱方法具有高灵敏度、高特异性优点, 但因仪器贵重、操作繁琐、成本高而不易在一般实验室推广(Attia *et al*, 2011; Zhu *et al*, 2014)。比较而言, 基于电化学的方法, 包括毛细管电泳和电化学传感器, 具有仪器便携、检测成本低、应用能耗低等特点, 使得现场、廉价、快检技术的开发成为可能(Gupta *et al*, 2011)。近年来, Gurler 等(2013)研究了 DOC 在分子印迹电极上的伏安行为; Attia 等(2011)研究了 DOC 在玻碳电极和碳糊电极上的伏安响应, 并建立了检测方法; Surudee 等(2006)报道了利用镍掺杂金刚石电极检测 DOC 的方法; Vega 等(2007)研究了 DOC 在碳纳米管修饰电极上的伏安行

* 青岛市市南区科技发展资金(2013-12-012-ZH)资助。张旭志, E-mail: zhangxz@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 曲克明, 研究员, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-11-21, 收修改稿日期: 2015-02-03

为并建立了一种电流型检测方法; Shoukry 等(1987)研制并表征了具有较好特异性的 DOC 离子选择性电极。这些电化学方法都具有响应快、灵敏度较高等优点, 但操作仍然较为繁琐, 成本有待进一步降低。

研究发现, 一些种类表面活性剂的存在可以有效增强诸如二硝基苯酚(Wang *et al.*, 2006)和苯酚(Wang *et al.*, 2008)的伏安检测响应, 然而, 迄今为止, 还没有表面活性剂有助于电化学测定 DOC 的研究报道。本研究中, 以具有较高电活性面积和较低背景电流的导电碳黑糊电极 CCBDE(Zhang *et al.*, 2011、2012)为工作电极, 研究了阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸钠(SDBS)对 DOC 伏安行为的影响, 并建立了一种操作简便、低成本的电化学检测方法, 进而应用于环境水样中痕量 DOC 定量测定。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

电化学实验采用 CHI660C 电化学分析仪(上海辰华仪器有限公司)。三电极系统由自制 CCBDE 工作电极(\varnothing 3.3 mm)、饱和甘汞参比电极和铂丝对电极组成。pHS-25 型数显 pH 计(上海雷磁仪器厂)用以测定溶液 pH 值。

DOC、导电碳黑和石蜡油分别购自德国奥德斯堡公司、山东淄博华光化工厂和天津市广成化学试剂有限公司。其他试剂购自上海试剂有限公司, 均为分析纯, 未经进一步纯化。实验用水为超纯水(厦门锐思捷中试纯水系统制备)。

1.2 电化学实验

CCBPE 工作电极的制备和更新参照 Zhang 等(2011、2012)的方法。如无特殊说明, 循环伏安法(CV)测定时扫速为 0.100 V/s。富集和扫描过程中待测液皆静止无搅拌。所有检测实验在(25±1)°C 条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 DOC 的伏安响应

以 pH=2.0 的 B-R 缓冲液为支持电解质, 1.0×10^{-5} mol/L DOC 在 CCBPE 上于 0.0–1.0 V 扫描范围内只出现 1 个氧化峰(图 1 曲线 a), 其氧化峰电位(E_{pa})为 0.636 V, 氧化峰电流(i_{pa})为 2.206 μ A。该电位比其在分子印迹电极(Gurler *et al.*, 2013)、玻碳电极、碳糊电极(Attia *et al.*, 2011)、镍掺硼金刚石电极(Surudee *et al.*, 2006)和碳纳米管修饰电极(Vega *et al.*, 2007)上都低, 表

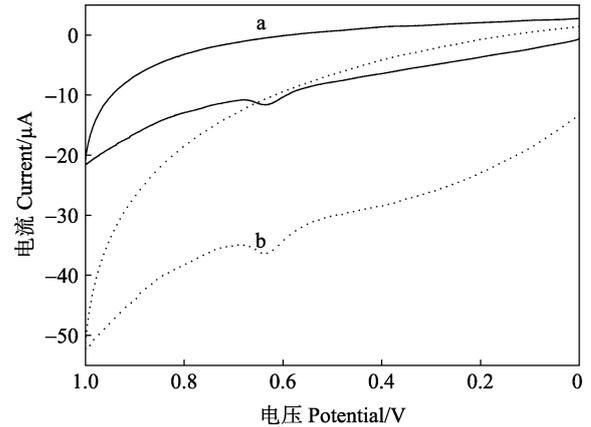


图 1 1.0×10^{-5} mol/L DOC 在 CCBPE 上的循环伏安曲线
Fig.1 Cyclic voltammograms of 1.0×10^{-5} mol/L DOC on the CCBPE in the absence (a) and presence (b) of 2.0×10^{-4} mol/L SDBS

Supporting solution: B-R buffer solution of pH 2.0.
Accumulation time: 180 s. Accumulation potential: -1.300 V. Scan rate: 0.100 V/s. Quiet time: 5 s

明 CCBPE 对 DOC 的电氧化具有较好的催化活性。该氧化电流也明显高于先前报道各种电极上的氧化电流(Attia *et al.*, 2011; Surudee *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2007), 表明 CCBPE 测定 DOC 具有更好的灵敏度。

在 2.0×10^{-4} mol/L SDBS 存在下, 1.0×10^{-5} mol/L DOC 在 CCBPE 上的循环伏安曲线如图 1 曲线 b 所示。较之于曲线 a, E_{pa} 稍有下降(0.633 V), 说明该情况下 DOC 的电氧化过程中电子传递得到改善; i_{pa} 值达到 4.309 μ A, 约为曲线 a 数值的 1.95 倍, 表明阴离子表面活性剂 SDBS 对 DOC 的富集具有协同作用。

2.2 SDBS 作用机理探讨

SDBS 是一个具有长链疏水性基团的阴离子型表面活性剂, 该长链疏水性基团易于吸附在同样疏水性的 CCBPE 表面(Wang *et al.*, 2006), 形成一层负电荷中心分布在外的自组装分子膜。而 DOC 隶属四环素类抗生素(化学结构式见图 2-A), 具有 3 个 pK_a 值: 3.3、7.7 和 9.7, 因此, 在不同的 pH 条件下其形态和空间结构各异。pH=2.0 时, 其主要呈阳离子形态。所以, 基于静电效应, SDBS 自组装分子膜层的存在有利于其在电极表面的富集(图 2-B)(Zhang *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2005)。同时, 可能由于自组装分子膜的存在改变了电极表面双电层的结构, 使得 DOC 氧化过程电子传递更加容易, 因而 E_{pa} 稍有下降。为了验证这个假设, 进行了另外一组实验: 将裸 CCBPE 在 2.0×10^{-4} mol/L SDBS 溶液中浸泡 180 s 后, 再用于 CV 扫描 1.0×10^{-5} mol/L DOC, 结果显示, E_{pa} 为 0.633 V, i_{pa} 值达到 3.938 μ A, 因此印证了 SDBS 吸附层的增敏效应。此外, 选用十

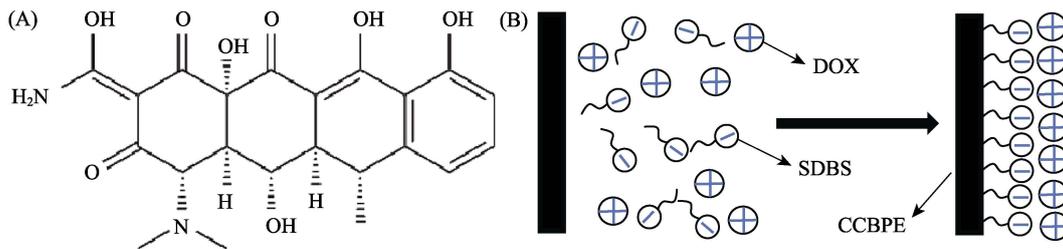


图 2 DOC 化学结构式(A)和表面活性效应作用示意(B)

Fig.2 Chemical structure of DOC (A) and the illustration of the surface activity effect on the accumulation of DOC on the CCBPE

二烷基三甲基氯化铵和十六烷基三甲基氯化铵做对比实验, 结果表明, 这两种阳离子表面活性剂致使 DOC 的 i_{pa} 值具有不同程度的降低, 这应该是因为其正电性自组装层阻碍了底物的传质过程(Zhu *et al*, 2014)。该实验从另一方面验证了所做假设的合理性。

2.3 表面活性效应下 DOC 的电化学行为

在 2.0×10^{-4} mol/L SDBS 存在下, 实验研究了 DOC 在 CCBPE 上的电化学行为。0.010–0.160 V/s 范围内, 不同扫速下 DOC 的循环伏安响应如图 3 所示。其电流值与扫速 v 的平方根呈线性关系(图 3), 回归方程为 $i_{pa}(\mu A) = 14.822v^{1/2} - 0.337 (R^2 = 0.9985)$, 表明此条件下电极反应的过程主要受扩散控制, 结论与 Attia 等(2011)和 Wangfuengkanagul 等(2004)的报道吻合。

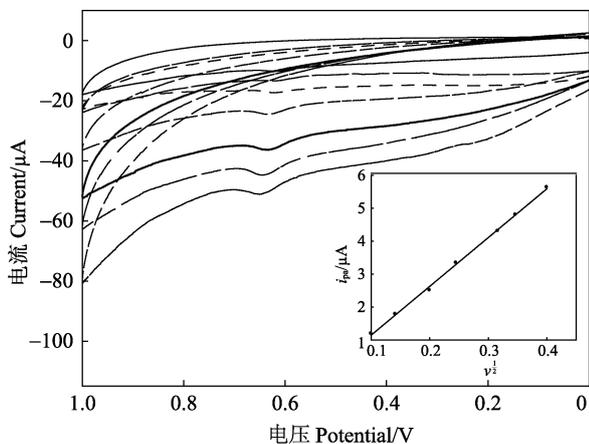


图 3 DOC 在 CCBPE 上于不同扫速下的循环伏安
Fig.3 Cyclic voltammograms of 1.0×10^{-5} mol/L DOC at the CCBPE in the presence of 2.0×10^{-4} mol/L SDBS Scan rate (V/s, from inside to outside): 0.010, 0.020, 0.040, 0.060, 0.100, 0.120 and 0.160. Inset: The plot of E_{pa} vs. $v^{1/2}$

扫速 v 对 E_{pa} 的影响结果显示(图 3), 在 0.010–0.160 V/s 范围内, E_{pa} 随扫速 v 的增加而增加, 且其值与扫速 v 的自然对数值 $\ln v$ 之间存在良好的线性关系, 回归方程为 $E_{pa}(V) = 0.0096 \ln v + 0.6615 (R^2 = 0.9927)$ 。pH 值对 DOC 伏安响应的影响结果见图 4, pH 在 1.8–2.4

范围内, E_{pa} 随 pH 值的增加而负移, 二者线性回归方程为 $E_{pa}(V) = -0.0316 \text{ pH} + 0.697 (R^2 = 0.9890)$, 表明 DOC 的电氧化过程有质子参加(Zhang *et al*, 2012)。

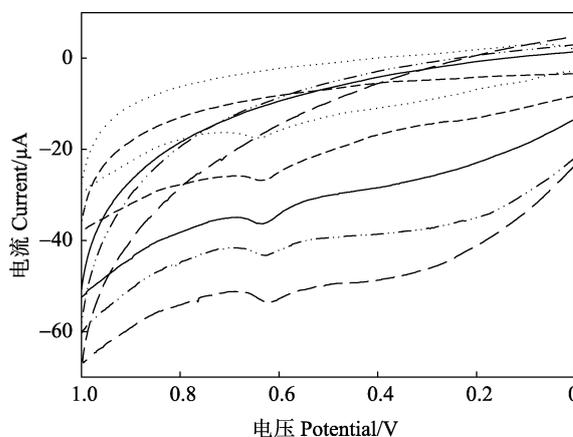


图 4 DOC 在 CCBPE 上于不同 pH 下的循环伏安响应
Fig.4 Cyclic voltammograms of 1.0×10^{-5} mol/L DOC at the CCBPE in B-R buffer solution of different pH

pH (from top to bottom): 1.8, 1.9, 2.0, 2.2, and 2.4. Other conditions are as in Fig.3

对于参加电极反应的质子数与电子数, 由不可逆波峰电位方程式(Bard *et al*, 1980):

$$E_p = E^0 + \frac{RT}{\alpha n F} \left[0.780 + \ln \frac{D^{1/2}}{K_s} + \ln \left(\frac{\alpha n F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (1)$$

式中, α 为电子转移系数, D 为反应物的扩散系数, K_s 为电极反应的速率常数, F 为法拉第常数, n 为电子转移数, E^0 为标准电极电位。

由(1)式可以推导出(2)式(其中 K 为常数):

$$E_p = K + \frac{1}{2} \frac{RT}{\alpha n F} \ln \frac{\alpha n F v}{RT} \quad (2)$$

再根据 E_p 与 $\ln v$ 的关系:

$$E_p = 0.6615 + 0.0096 \ln v \quad (3)$$

由(2)和(3)式可以得到:

$$\frac{1}{2} \frac{RT}{\alpha n F} = 0.0096 \quad (4)$$

根据不可逆吸附体系峰电流 i_p 与吸附电量 Q 关系式:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma v A}{4RT} = \frac{nFQv}{4RT} \quad (Q = nFA\Gamma) \quad (5)$$

式(5)中, Q 为循环伏安单一过程的氧化峰面积, A 为电极面积, Γ 为电极表面电活性物质的覆盖率, R 为摩尔气体常量, T 为热力学温度。利用 0.100 V/s 扫速下 CV 图上的氧化峰面积, 求得 $n=1.96 \approx 2$, 即在电极反应中有 2 个电子参与反应。又由(4)式可求得 $\alpha = 0.67$ 。再根据 Nernst 方程:

$$E_p = E^0 - 0.059 \frac{m}{n} pH \quad (6)$$

计算得知, $m=1.05 \approx 1$, 即参与 DOC 电氧化反应的质子数为 1。

2.4 测定条件的优化

2.4.1 表面活性剂种类与浓度影响 实验采用循环伏安法研究了 SDBS 和十二烷基硫酸钠两种阴离子表面活性剂对 DOC 伏安响应电流的影响, 结果显示, 二者都有增敏作用, SDBS 的增敏效果优于后者。进而研究共存 SDBS 浓度对增敏效果的影响(图 5), 在 $(0-2.0) \times 10^{-4}$ mol/L 范围内, i_{pa} 值随共存 SDBS 浓度的增加而增加; 当 SDBS 的浓度超过 2.0×10^{-4} mol/L 后, 其增敏效果反而下降。所以其他实验采用 SDBS 浓度皆为 2.0×10^{-4} mol/L。

2.4.2 支持电解质的选择 分别以 HAc-NaAc 缓冲溶液、B-R 缓冲溶液、Tris-HCl 缓冲溶液、PBS 缓冲溶液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液和 KCl 溶液为支持电解质, 在相同参数下扫描, 获得 1.0×10^{-5} mol/L

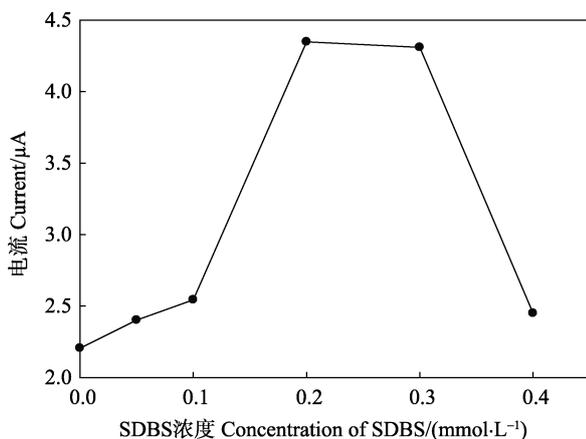


图5 DOC 的电流响应值与共存 SDBS 浓度的关系

Fig.5 The plot of peak current of DOC vs. concentration of SDBS

Other conditions are as in Fig.3

DOC 的 CV 响应, 结果表明, 只有在酸性电解质溶液中才会出现氧化峰, 结论与 Gurler 等(2013)、Surudee 等(2006)和 Vega 等(2007)的报道一致。在 B-R 缓冲液中峰形最好, 灵敏度最高, 且背景值较低。分别测得同浓度 DOC 在系列 B-R 缓冲液(pH 1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8)中的 i_{pa} 值, 结果与 Gurler 等(2013)报道的一致, 其在 pH=2.0 体系中具有最灵敏响应; 当 pH 高于 2.7 后, CV 曲线上没有可见氧化还原峰出现。其他实验中均以 pH=2.0 的 B-R 缓冲液为支持电解质。

2.4.3 富集电位与富集时间 一般情况下, 向工作电极施加适当的电位和选择合适的富集时间有助于在保证检测效率的同时提高灵敏度。按照作者以前报道的方法(Zhang *et al*, 2012、2014), 研究了富集电位和富集时间对检测的影响。结果显示: 1) 预设负电位有助于 DOC 的富集; 2) 在 $-1.0 - -1.3$ V 范围内, 相同富集时间条件下, i_{pa} 值随富集电位的增加而增加(这应该源于静电效应), 当电位低于 -1.3 V 时, 效果反而降低(图 6-A); 3) 在 0-180 s 范围内, i_{pa} 值随着富集时间的延长而快速增大, 然后增加值趋于减弱(图 6-B)。为了兼顾灵敏度和检测效率, 其他实验中富集电位和富集时间分别设定为 -1.3 V 和 180 s。此外, 实验还发现, 即使检测液中没有 SDBS 共存, 在工作电极上预设负电位也有助于 DOC 的富集, 但效果远逊于具有表面活性效应情况下。这说明 SDBS 自组装分子膜层对 DOC 的富集具有显著协同效应。

2.5 工作曲线

在最优条件下, 采用 CV 模式, 研究不同浓度 DOC 在缓冲溶液中的电流响应, 结果显示: 在 $1.0 \times 10^{-7} - 2.3 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内, 其浓度与 i_{pa} 呈良好的线性关系, 回归方程为 $i_{pa} (\mu A) = 0.2836 C_0 (\mu mol/L) + 1.0668 (R^2 = 0.9977)$, 检出限为 4.5×10^{-8} mol/L ($S/N=3$), 本方法的灵敏度优于已有报道(Attia *et al*, 2011; Surudee *et al*, 2006; Vega *et al*, 2007)。按照 Zhang 等(2011、2012)的方法, 研究 CCBPE 的再生性能及本检测方法的重现性, 结果显示: 相同条件下, 采用反复再生的同一枚电极测定同一份 1.0×10^{-5} mol/L DOC, 所得 i_{pa} 的相对标准偏差(RSD)为 7.71% ($n=6$); 用 6 枚同批制备的 CCBPE 检测同一份 1.0×10^{-5} mol/L DOC, 所得 i_{pa} 的 RSD 为 6.15% ($n=6$)。上述结果表明, 该方法具有较好的重现性和稳定性。

2.6 干扰实验

考察了实际淡水渔业水样中常见共存物质对

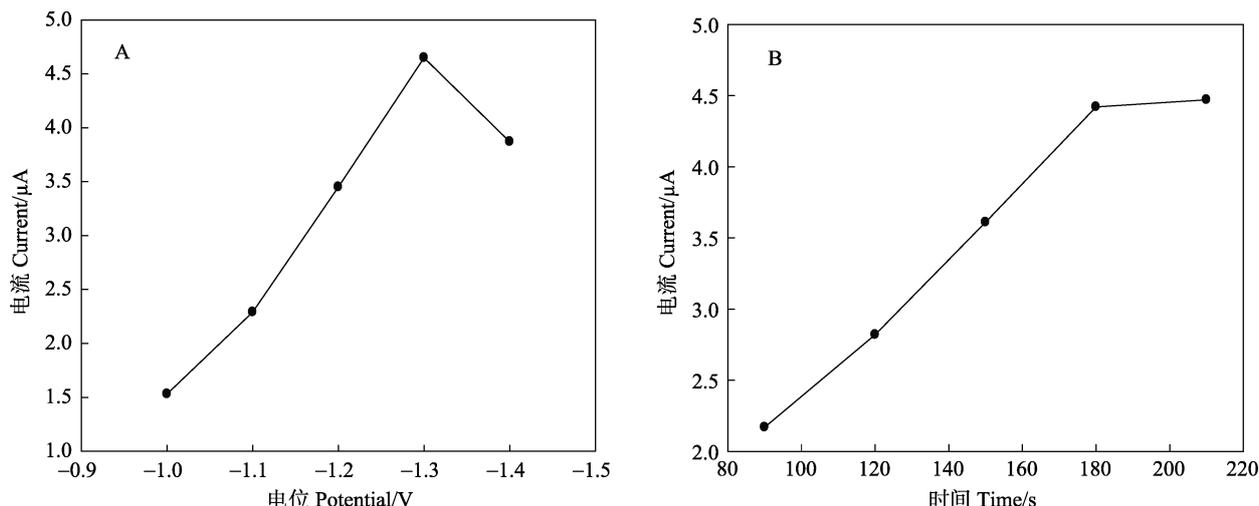


图 6 峰电流与富集电位(A)和富集时间(B)的关系

Fig.6 The plots of peak current vs. accumulation potential (A) and peak current vs accumulation time (B)

DOC 测定的影响(表 1)。一定浓度的无机盐离子(K⁺、Na⁺、NO₃⁻、PO₄³⁻等)对其检测没有产生明显影响。然而,可能是基于竞争吸附的原因,一些有机分子(特别是阳离子型的有机分子和含有苯环结构的有机分子)的存在会明显降低检测灵敏度。

2.7 实际样品中痕量 DOC 的检测

将所建立的电化学方法应用于淡水渔业水体中 DOC 检测。水样首先用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,然后取 5 ml 样品与等体积 B-R 缓冲液(pH=2.0)混合,最后采用 CV 模式扫描。用加标法得到平均回收率(表 2)。由平均回收率可以看出,本方法具有较好的准确度。

表 1 不同共存物质在 DOC 检测中的干扰水平

Tab.1 The effect of co-existing species on the detection of DOC

干扰物质 Co-existing species	浓度 Concentration (μmol/L)	i _{pa} 改变量 i _{pa} change(%)
Ca ²⁺ , Mg ²⁺	100	+2.1
Na ⁺ , K ⁺	100	+2.8
NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻	50	+1.7
抗坏血酸 Ascorbic acid	20	-19.8
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	20	-28.5
钙黄绿素 Calcein	20	-23.7
孔雀绿 Malachite green	20	-16.2

表 2 实际淡水渔业水样样品的测定结果

Tab.2 Detecting results of samples from fresh fishery water

样品 Samples	检测值 Detected (μmol/L)	加标值 Added (μmol/L)	测得值 Measured (μmol/L)	平均回收率 Average recovery rate (% n=5)	RSD (%, n=5)
A	未检出 Not detected	5.00	5.09±0.29	102.32	4.54
B	未检出 Not detected	5.00	4.87±0.32	97.44	5.16
C	1.23	5.00	6.35±0.38	104.44	4.33
D	未检出 Not detected	5.00	4.93±0.34	99.12	5.12
E	未检出 Not detected	5.00	5.36±0.52	105.28	7.97
F	2.09	5.00	7.32±0.29	102.2	9.51

3 结论

CCBPE 工作电极上, DOC 具有灵敏的氧化峰。由于表面活性效应的协同作用, SDBS 对 DOC 的氧化具有明显的增敏作用。SDBS 共存下, 在 pH=2.0

的 B-R 缓冲溶液中 DOC 发生 1 质子、2 电子转移的不可逆氧化, 过程受扩散控制。在优化条件下, DOC 的检测限可达 4.5×10⁻⁸ mol/L, 优于以前报道的电化学方法。将该方法应用于淡水渔业水样中该物质的检测, 取得了满意结果。与基于色谱、质谱、光谱原理

的各种方法(Zhu *et al*, 2014; Granados-Chinchilla *et al*, 2012; Guo *et al*, 2012)相比,本电化学方法具有操作简便、费用低、响应快等明显特点,因而具有重要潜在推广价值。

参 考 文 献

- Ariza J, Gudiol F, Pallares R, *et al*. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin A randomized, double-blind study. *Ann Intern Med*, 1992, 117(1): 25–30
- Attia AK, Saber RA. Differential pulse voltammetric assay of antibacterial drug doxycycline hyclate. *Anal Bioanal Electrochem*, 2011, 3(3): 291–301
- Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, New York: Wiley&Sons, 1980, 222
- Gajda A, Posyniak A. Tetracyclines and their epimers in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2009, 53(2): 263–267
- Granados-Chinchilla F, Sanchez J, Garcia F, *et al*. A novel green chemistry method for nonaqueous extraction and high-performance liquid chromatography detection of first-, second-, and third-generation tetracyclines, 4-epitetracycline, and tylosin in animal feeds. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(29): 7121–7128
- Guo L, Chen YQ, Zhang LY, *et al*. Development and validation of a liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for determination of chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline, and doxycycline in animal feeds. *J AOAC Int*, 2012, 95(4): 1010–1015
- Gupta VK, Jain R, Radhapyari K, *et al*. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—a review. *Anal Biochem*, 2011, 408(2): 179–196
- Gurler B, Ozkorucuklu SP, Kir E. Voltammetric behavior and determination of doxycycline in pharmaceuticals at molecularly imprinted and non-imprinted over oxidized polypyrrole electrodes. *J Pharmaceut Biomed*, 2013, 84: 263–268
- Huang W. Voltammetric determination of bisphenol A using a carbon paste electrode based on the enhancement effect of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). *B Kor Chem Soc*, 2005, 26(10): 1560
- Kang YJ, Kim DS, Kim KH. Evaluation of treatment efficacy of doxycycline and albendazole against scuticociliatosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2013, 417: 192–195
- Kim SC, Carlson K. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed. *Water Res*, 2006, 40(13): 2549–2560
- Le T, Zhao ZW, Wei W, *et al*. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of doxycycline in chicken muscle, liver and egg. *Food Chem*, 2012, 134(4): 2442–2446
- Maryam G, Ghodrattollah A. Fast removal and determination of doxycycline in water samples and honey by Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *J Iran Chem Soc*, 2014, 12(1): 1
- Oka H, Ikai Y, Ito Y, *et al*. Improvement of chemical analysis of antibiotics. XXIII. Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by electrospray high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 693(2): 337–344
- Surudee T, Anchana P, Narong P, *et al*. Use of nickel implanted boron-doped diamond thin film electrode coupled to HPLC system for the determination of tetracyclines. *Talanta*, 2006, 68: 1329–1335
- Shoukry AF, Badawy SS. Determination of tetracycline and related compounds using plastic membrane ionselective electrodes. *Microchem J*, 1987, 36(1): 107–112
- Vega D, Agüí L, González-Cortés A, *et al*. Voltammetry and amperometric detection of tetracyclines at multi-wall carbon nanotube modified electrodes. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(3): 951–958
- Wangfuengkanagul N, Siangproh W, Chailapakul O. A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode. *Talanta*, 2004, 64(5): 1183–1188
- Wang XG, Wu QS, Ding YP. Enhancement of surfactants in the electrochemical determination of phenols and the mechanisms research. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2008, 329(1): 119–124
- Wang XG, Wu QS, Liu W, *et al*. Simultaneous determination of dinitrophenol isomers with electrochemical method enhanced by surfactant and their mechanisms research. *Electrochim Acta*, 2006, 52(2): 589–594
- Zhang S, Wei S. Electrochemical determination of ciprofloxacin based on the enhancement effect of sodium dodecyl benzene sulfonate. *B Kor Chem Soc*, 2007, 28(4): 543–546
- Zhang XZ, Cui Y, Lv ZL, *et al*. Carbon nanotubes, conductive carbon black and graphite powder based paste electrodes. *Int J Electrochem Sci*, 2011, 6(12): 6063–6073
- Zhang XZ, Gu XL, Qu KM, *et al*. Voltammetric behavior of semicarbazide at graphene modified electrode and application to detection. *J Chin Chem Soc*, 2014, 61(6): 687–694
- Zhang XZ, Li M, Cui Y, *et al*. Electrochemical behavior of calcein and the interaction between calcein and DNA. *Electroanalysis*, 2012, 24(9): 1878–1886
- Zhu JH, Liu SP, Liu ZF, *et al*. A highly sensitive and selective assay of doxycycline by dual wavelength overlapping resonance Rayleigh scattering. *Spectrochim Acta A*, 2014, 124: 237–24

Voltammetric Behaviour of Doxycycline in the Presence of Surfactant and Its Determination

ZHANG Xuzhi¹, LIU Wenwen², DING Dongsheng¹, GUO Mengmeng¹, ZHAO Jun¹, QU Keming¹^①

(1. *Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;*
2. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003*)

Abstract The effects of surfactant on the voltammetric behavior of doxycycline (DOC) were investigated using conductive carbon black paste electrode (CCBPE) as working electrode. A new electrochemical method for determining DOC in aqueous solution was developed with the help of surfactant. The electrostatic interaction between the DOC molecules and the sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS) by self-assembled on the surface of CCBPE promoted the accumulation of the analyte. In B-R buffer solution of pH 2.0, the presence of 2.0×10^{-4} mol/L SDBS significantly improved the sensitivity of detection of DOC. In the presence of SDBS, the voltammetric behavior of DOC was investigated by cyclic voltammetry. An irreversible and adsorption-controlled electrode reaction occurs with 1 proton and 2 electrons participation. Under the optimum conditions, the anodic peak current of DOC is proportional to its concentration in the range of 1.0×10^{-7} – 2.3×10^{-5} mol/L with a detection limit of 4.5×10^{-8} mol/L ($S/N=3$). Inorganic ions do not have negative effects on the determination, while organic molecules have positive effects probably due to the competitive adsorption function. The average recoveries in the range of 97.44%–105.28% were obtained. Thus, the developed method for the determination of DOC possesses advantages such as simple operation, fast response, low detection limitation, good recovery, and repeatability.

Key words Doxycycline; Voltammetric behavior; Surfactant; Electroanalysis; Fishery environmental monitoring

① Corresponding author: QU Keming, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

《渔业科学进展》图表的写作要求



图的要求

为方便审稿、编辑、阅读,提高论文发表质量,图要直观、简明、清晰,只看图、图题和图例,不阅读正文,就可理解图的含义。可根据需要印刷彩图。

图的大小要符合本刊的要求,格式、体例、标注要符合国家出版规范,具体要求如下:

(1) 本刊接受 tif 或 EPS 图件,分辨率为 300–600 ppi,请确保放大后仍然清晰。

(2) 图的尺寸:

一般为宽 7.7–8.0 cm(半栏)或宽 16.5–17.0 cm(通栏)。

(3) 图中文字的字号、字体:

字号为 8,上下标字号为 9。中文为方正宋体,英文、数字为 Times New Roman。注意区分上下标、斜体等。

图中所有标记内容(横坐标、纵坐标、图例、图注等)均需中文、英文两种语言。图中说明性文字尽量少,如需要,可作为图注放在图题下面。

图中的数据、方程等要与文中一致。

图中采用的不同图例之间反差要明显,易于分辨。如需要,请制作彩色图件。

(4) 图的横、纵坐标需符合规范,包括中英文标目、单位(如有)。

如:时间 Time/d; 存活率 Survival rate/%; 磷酸盐浓度 Concentration of phosphate/(mg·L⁻¹); 吸光度

Absorbance

(5) 制作完成的 tif 图件请插入论文 Word 文档的相应位置,供审稿专家审阅。

(6) 同时,文中所有图需提供可编辑的原始图,方便排版时进行编辑。

线条图、柱状图等要求提供矢量性质的图,即用数据形成的图直接转成 emf、wmf、eps、Excel、surf 或 ai 等格式的文件,也可提供作者原始软件做的图。

照片图(jpg、tif 格式)需提供 ppt 文件,要求每张照片单独成张,照片中的线、点、箭头、文字等是可编辑的。

(7) 投稿时,请将所有图件的 tif 图和原始图分别打包,作为两个附件上传。

表格的格式要求

1. 统一使用三线表(顶线、表头线、底线),必要时可加辅助线。

2. 其表题、表注等内容必须用中、英文双语标注。所有表格要在正文中叙述。

3. 表格的序号按照在文中出现的先后次序连续编码。核实表格序号与正文叙述部分是否一一对应。所用文字、符号、单位要与正文一致。

4. 表格中的数据精确度(小数点后位数)请保持一致,并按照相关规则进行四舍五入,一般情况下,小数点后的数字最多不超过 3 位。

5. 同列中数据请按小数点或“±”对齐。

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主 编 Editor-in-Chief 唐启升 TANG Qisheng

副主编 Associate Editors-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi 麦康森 MAI Kangsen 孙 松 SUN Song 孔 杰 KONG Jie

顾 问 Advisors (以姓名笔画为序)

苏纪兰 SU Jilan 林浩然 LIN Haoran 赵法箴 ZHAO Fazhen 徐 洵 XU Xun

曹文宣 CAO Wenxuan 雷霖霖 LEI Jilin 管华诗 GUAN Huashi

编 委 Members (以姓名笔画为序)

于志刚 YU Zhigang	戈贤平 GE Xianping	方建光 FANG Jianguang	王清印 WANG Qingyin
王新鸣 WANG Xinming	包振民 BAO Zhenmin	司徒建通 SITU Jiantong	关瑞章 GUAN Ruizhang
刘占江 LIU Zhanjiang	刘海金 LIU Haijin	孙效文 SUN Xiaowen	孙 谧 SUN Mi
庄 平 ZHUANG Ping	曲克明 QU Keming	江世贵 JIANG Shigui	何建国 HE Jianguo
吴常文 WU Changwen	吴淑勤 WU Shuqin	张士瑾 ZHANG Shicui	张全启 ZHANG Quanqi
张国范 ZHANG Guofan	张显良 ZHANG Xianliang	李来好 LI Laihao	李杰人 LI Jieren
李 健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	杨红生 YANG Hongsheng	邹桂伟 ZOU Guiwei
陈立侨 CHEN Liqiao	陈松林 CHEN Songlin	陈雪忠 CHEN Xuezhong	周永灿 ZHOU Yongcan
林 洪 LIN Hong	俞志明 YU Zhiming	姚 杰 YAO Jie	相建海 XIANG Jianhai
赵宪勇 ZHAO Xianyong	徐 皓 XU Hao	桂建芳 GUI Jianfang	殷邦忠 YIN Bangzhong
秦 松 QIN Song	贾晓平 JIA Xiaoping	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
黄 健 HUANG Jie	董双林 DONG Shuanglin	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	魏宝振 WEI Baozhen

编辑部 Editorial Office 常 青 (编辑部主任) CHANG Qing (Chief)

江润林 (责任编辑) JIANG Runlin (Responsible Editor)

冯小花 FENG Xiaohua 陈 辉 CHEN Hui 陈 严 CHEN Yan

渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第36卷 第5期 2015年10月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.36 No.5 Oct. 2015

主管单位 中华人民共和国农业部

主办单位 中国水产学会

中国水产科学研究院黄海水产研究所

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

<http://www.yyqxjz.cn>

E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

印 刷 青岛星球印刷有限公司

国内发行 青岛市邮政局

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Supervised

Sponsored

Published

Edited

Editor-in-Chief

Printed

Domestic Distributed by

Subscription

Overseas Distributed by

by Ministry of Agriculture, P.R. China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries

by Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

<http://www.yyqxjz.cn>; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

Tang Qisheng

by Qingdao Xingqiu Printing Co., Ltd.

Post Office of Qingdao

Post Offices All Over China

China International Book Trading Corporation

P.O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定 价: 30.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986156

10>