

文章编号: 1674-5566(2024)03-0623-12

DOI: 10.12024/jsou.20230804298

## 美洲鲟IV、V期卵巢营养成分、卵黄蛋白原、组织蛋白酶D及其mRNA表达的比较分析

袁新程, 施永海, 徐嘉波, 于爱清, 邓平平, 张之文, 蒋飞

(上海市水产研究所, 上海市水产技术推广站, 上海 200433)

**摘要:** 为探明美洲鲟(*Alosa sapidissima*)雌鱼发育后期卵巢内营养物质的变化规律, 提高卵子受精率, 采用生化分析、酶联免疫吸附及荧光定量PCR等方法, 对性腺发育期IV期和V期的卵巢内氨基酸、脂肪酸、卵黄蛋白原(VTG)和组织蛋白酶D(CTSD)含量及其mRNA表达量进行对比分析。结果显示, IV期卵巢中水分含量(75.73%)显著低于V期(90.64%), 而粗蛋白含量(16.07%)、粗脂肪含量(2.86%)和粗灰分含量(1.28%)均显著高于V期(5.83%、1.25%、0.81%)。在IV、V期卵巢内各检测出18种氨基酸, 其中谷氨酸含量最高(8.64%和8.13%); 8种必需氨基酸中, IV期苏氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸和色氨酸含量均显著高于V期, 且二者第一限制氨基酸均为色氨酸; IV期氨基酸总量(TAA)、半必需氨基酸(HEAA)和非必需氨基酸总量(NEAA)均显著高于V期。两期卵巢内共检测出19种脂肪酸, IV期C17:0、C20:1n9、C20:4n6和C20:5n3含量显著高于V期; 其中 $\Sigma$ MUFA、 $\Sigma$ PUFA、 $\Sigma$ UFA、 $\Sigma$ n3PUFA和EPA+DHA含量均大于V期,  $\Sigma$ UFA(70.54%)达到显著性差异。IV期卵巢中VTG含量高于V期, 但不显著; 而IV期卵巢中CTSD含量明显比V期低。V期卵巢VTG基因表达量是IV期的13.88倍; 而V期肝脏内VTG基因表达明显低于IV期, 是IV期的25%。从IV期至V期, 卵巢中CTSD mRNA表达出现下调, 肝脏中CTSD mRNA表达出现上调, 但均不明显。因此, 当前养殖条件下, 美洲鲟雌鱼亲本后期发育过程中, 卵巢内营养物质积累不均衡, 建议适当调整饲料配方, 提高限制性氨基酸色氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸及含量较低的赖氨酸、苏氨酸比例和调高多不饱和脂肪酸C20:3n6、C20:4n6(AA)、C22:6n3(DHA)和C20:5n3(EPA)比例, 降低C18:2n6c的比例, 保证卵巢后期发育所需营养的均衡。

**关键词:** 美洲鲟; 卵巢; 营养成分; 卵黄蛋白原; 组织蛋白酶D; mRNA表达

**中图分类号:** S 965.2      **文献标志码:** A

美洲鲟鱼即美洲西鲱(*Alosa sapidissima*), 属于鲱形目(Clupeiformes)鲱科(Clupeidae)鲟亚科(Alosinae)西鲱属(*Alosa*), 自然分布于北美大西洋西岸和美国加州至阿拉斯加州的太平洋沿岸地带, 为典型溯河产卵洄游鱼类<sup>[1-2]</sup>。其与我国长江鲟(*Tenualosa reevesii*)同属一个亚科, 它与长江鲟不仅在形态上相似, 且在味道和口感上均可相媲美, 美洲鲟肥嫩鲜香, 深受消费者们喜爱<sup>[3]</sup>。由于养殖经济效益突出, 国内美洲鲟养殖面积逐年扩大, 但苗种供应不足以成为制约其养殖业快速发展的瓶颈<sup>[4]</sup>。虽然美洲鲟人工繁育技术已获得

突破, 但受精率、孵化率、苗种培育前期存活率均较低<sup>[5-6]</sup>。因此, 为了获得优质美洲鲟鱼卵, 提高育苗成活率, 十分有必要对美洲鲟性腺发育后期鱼卵内营养成分进行研究分析。

鱼卵内含有大量卵黄蛋白原(Vitellogenin, VTG), 是卵黄蛋白的前体, 由肝脏产生, 经血液运至卵巢, 在卵黄产生期迅速积累, 提供鱼体早期发育所需的营养物质, 其含量大小对早期胚胎发育和初孵仔鱼成活率起着十分重要的作用<sup>[7-9]</sup>。组织蛋白酶D(Cathepsin D, CTSD), 作为酸性溶酶体内切酶, 在鱼类卵、肝和盲囊中含量较丰

收稿日期: 2023-08-21      修回日期: 2023-11-25

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2021-02-08-00-12-F00788); 上海长江口主要经济水生动物人工繁育工程技术研究中心项目(13DZ2251800)

作者简介: 袁新程(1989—), 男, 工程师, 研究方向为水产动物繁育与营养学及环境监测。E-mail: xcyuan2016@163.com

通信作者: 施永海, E-mail: yonghais@163.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

富<sup>[10]</sup>,在细胞内蛋白质代谢及酶原激活和早期胚胎发育中起着十分重要的作用<sup>[9,11]</sup>。研究<sup>[12-13]</sup>表明鱼类胚胎质量和仔鱼的存活率同卵子的生化组成、VTG含量和CTSD含量密切相关,当组织蛋白酶D缺陷时,动物在出生后4周内就会死亡。因此,分析美洲鲟鱼卵在卵黄发生时期的营养成分、VTG含量和CTSD含量,有助于了解胚胎发育和仔稚鱼的营养需求。目前对美洲鲟鱼卵营养价值的相关研究已有报道<sup>[14-15]</sup>,但对美洲鲟性腺发育后期卵巢中氨基酸、脂肪酸、VTG和CTSD含量及其基因表达量的研究,尚未见报道。为此,本研究对美洲鲟雌鱼IV和V期卵巢中的营养成分、VTG含量、CTSD含量及VTG、CTSD基因表达量进行测定和分析,以探明美洲鲟雌鱼发育后期卵巢内营养物质和相关基因表达的变化规律,以期进一步了解美洲鲟卵巢成熟发育规律和对外源性营养需求,为美洲鲟全人工繁殖提供基础数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用鱼为上海市水产研究所奉贤科研基地人工繁殖并养至2龄的美洲鲟雌性成鱼。养殖期间所投喂饲料为浙江省明辉饲料有限公司提供的海水鱼膨化饲料,其一般营养成分:水分(7.40±0.30)%、灰分(11.08±0.06)%、粗蛋白(42.56±5.03)%、粗脂肪(5.62±0.38)%。氨基酸和脂肪酸检测结果见表1。

美洲鲟成鱼养殖和培育方法依照施永海等<sup>[4]</sup>,每日8:30和15:00进行投食饲料,一次投食量以1h摄食完为准。每14天换水1次,每次换水60cm。养至4月中旬,随机选取大肚挤压有游离卵流出的雌鱼9尾[V期(图1b)],此期鱼体腹部隆起明显,卵巢极度发育且松软,部分细胞透明,轻轻挤压鱼体腹部,泄殖孔处有卵粒流出<sup>[5]</sup>,体质量均值为(1 297.78±165.83)g,体长均值为(41.62±4.14)cm]和大肚无游离卵的雌鱼9尾[IV期(图1a)],此期鱼体腹部稍隆起,卵巢为浅橘色,体积膨大,呈囊状,肉眼可见增大的卵粒,颗粒饱满,卵巢表面的细小血管随着发育逐渐减少<sup>[5]</sup>,体质量均值为(1 296.78±197.77)g,体长均值为(39.10±2.04)cm],进行样品的采集。

### 1.2 样品采集与处理

#### 1.2.1 样品采集

首先利用MS-222(0.5 mg/L)对9尾V期(图1b)雌鱼进行麻醉,随机选3尾为一组,用清水冲净,吸干体表水分,置于冰盘之上,解剖取出肝脏和卵巢,从每3尾雌鱼中随机取出2g肝脏和2g卵巢,分别作为1个样本,共计3个平行样品,用无菌DEPC水冲洗后,放于液氮中迅速冷冻,标记为A<sub>1</sub>样品,用于CTSD和VTG mRNA表达的测定。然后再随机取出5g肝脏和5g卵巢分别置于PE管中,分别作为1个样本,共计3个平行样品,标记为A<sub>2</sub>样品,用于CTSD和VTG含量测定。将剩下卵巢对应3尾作为1个平行样,共计3个平行样品,标记为A<sub>3</sub>样品。利用相同方法和操作步骤对IV期(图1a)的9尾雌鱼进行采样,制备完毕后均保存于-80℃超低温冰箱中待测。

#### 1.2.2 样品处理

将-80℃冰箱中A<sub>3</sub>样品取出称重后放于冷冻干燥机(SIM FD5-3,美国)中进行干燥至恒等质量,再用30~300目的CS-700型高速粉碎机进行粉碎和混匀,之后将每一平行样均分为2份,1份用来测定氨基酸和脂肪酸组成,另1份用来测定一般营养成分。将A<sub>2</sub>样品取出放于4℃冰箱中解冻,将解冻好的样品用事先准备好的生理盐水(0~4℃,0.86%)冲洗干净,吸干水分后称重,按照1:9(质量比)的比例加入事先预冷的生理盐水,置于混合型研磨机(上海必横生物科技公司)中进行匀浆混匀(频率60 Hz,时间60 s),制成10%原浆液,后移入4℃的高速离心机中,设3 500 r/min 10 min,之后移取上层液体进行VTG和CTSD含量检测。

### 1.3 营养成分测定及评价方法

#### 1.3.1 一般营养成分测定

利用真空冷冻干燥法测定卵巢中水分含量;利用550℃灼烧法检测样品中粗灰分含量(GB/T 5009.4—2003);运用凯氏定氮法测定卵巢中粗蛋白含量(GB/T 6432.4—1994);利用氯仿甲醇法检测样品中粗脂肪含量<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.2 氨基酸测定

卵巢内色氨酸的测定方法:利用碱水解法对样品进行前处理(GB/T 18246—2019),之后再利用反相高效液相色谱法对样品进行检测;其他17种常规氨基酸含量测定方法参照施永海等<sup>[14]</sup>。

表1 美洲鲟亲鱼饲料的氨基酸和脂肪酸组成及含量(干质量基础)

Tab. 1 Composition and content of amino acids and fatty acids in broodstock diet of *Alosa sapidissima* (dry mass basis) %

氨基酸 Amino acid	百分比 Percentage	脂肪酸 Fatty acid	百分比 Percentage
天冬氨酸 Asp	3.93	C12:0	0.04
苏氨酸 Thr*	1.59	C14:0	1.61
丝氨酸 Ser	1.76	C15:0	0.16
谷氨酸 Glu	6.36	C16:0	13.94
甘氨酸 Gly	2.5	C16:1	1.93
丙氨酸 Ala	2.32	C17:0	0.07
胱氨酸 Cys	0.82	C18:0	4.08
缬氨酸 Val*	2.17	C18:1n9t	0.08
蛋氨酸 Met*	0.79	C18:1n9c	25.82
异亮氨酸 Ile*	1.65	C18:2n6t	0.02
亮氨酸 Leu*	3.37	C18:2n6c	41.55
酪氨酸 Tyr	1.1	C20:0	0.01
苯丙氨酸 Phe*	1.84	C18:3n6	0.07
赖氨酸 Lys*	2.83	C20:1n9	0.32
组氨酸 His**	1.08	C18:3n3	4.66
精氨酸 Arg**	2.34	C20:3n6	0.03
脯氨酸 Pro	1.99	C22: 1n9	0.06
色氨酸 Trp*	0.45	C20:4n6	0.22
氨基酸总量 TAA	38.43	C22:2	0.16
必需氨基酸 EAA	14.69	C24:0	0.04
半必需氨基酸 HEAA	3.42	C20:5n3(EPA)	2.68
非必需氨基酸 NEAA	20.78	C22:5n3(DPA)	0.30
EAA / TAA	38.23	C22:6n3(DHA)	1.61
EAA / NEAA	70.69	∑ SFA	19.95
		∑ MUFA	28.24
		∑ PUFA	51.30
		∑ UFA	79.54
		EPA + DHA	4.29
		∑ n3PUFA	9.25
		∑ n6PUFA	41.89
		∑ SFA / ∑ UFA	0.25
		∑ n3PUFA / ∑ n6PUFA	0.22

注:TAA为氨基酸总量;EAA为必需氨基酸总和;HEAA为半必需氨基酸总和;NEAA为非必需氨基酸总和;\*为必需氨基酸;\*\*半必需氨基酸;SFA为饱和脂肪酸;MUFA为单不饱和脂肪酸;PUFA为多不饱和脂肪酸;UFA为不饱和脂肪酸。

Notes: TAA is total amino acids; EAA is total essential amino acids; HEAA is total half-essential amino acids; NEAA is total non-essential amino acids; \* is essential amino acid; \*\* is half-essential amino acid; SFA is saturated fatty acids; MUFA is mono-unsaturated fatty acids; PUFA is poly-unsaturated fatty acids; UFA is unsaturated fatty acids.

### 1.3.3 脂肪酸测定

首先运用氯仿-甲醇法进行粗脂肪提取,再运用气相色谱仪(AGILENT 6890)(GB/T 22223—2008)进行脂肪酸组成检测,最后利用色谱图中峰面积运算得出每个脂肪酸的相对含量<sup>[15]</sup>。

### 1.3.4 营养评价方法

依据联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/

WHO)提出的必需氨基酸均衡标准模式以及蔡完其提出的全鸡蛋蛋白质的评分标准模式<sup>[16-17]</sup>,对第IV、V期美洲鲟卵巢的氨基酸评分(Amino acid score, AAS)和化学评分(Chemical score, CS)进行运算,计算公式:

$$A_{AS} = a_a / A_{(FAO/WHO)} \quad (1)$$

$$C_S = a_a / A_{(egg)} \quad (2)$$

式中:  $a_n$  为样品氨基酸含量 (mg/g, 干质量基础), 样品氨基酸含量 (mg/g) = 6.25 × 卵巢氨基酸含量 (mg, 干质量基础) / 卵巢粗蛋白含量 (g, 干质量基础);  $A_{(FAO/WHO)}$  是 FAO/WHO 提出的标准评分模式中相同氨基酸含量 (mg/g, 干质量基础);  $A_{(egg)}$  为蔡完其提出的标准评分模式中相同氨基酸含量 (mg/g, 干质量基础)。

## 1.4 VTG 和 CTSD 测定方法

### 1.4.1 含量的测定

将卵巢和肝脏的匀浆上清液取出, 采用酶联免疫吸附法, 利用南京建成生物工程研究所提供的鱼卵黄蛋白原测定盒和鱼组织蛋白酶 D 检测盒对 VTG 和 CTSD 含量进行检测, 具体操作过程严格按照试剂盒说明书进行, 在 BioTek Synergy 酶标仪 450 nm 和 600 nm 波长下测定各自吸光度 (OD 值), 然后通过标准曲线算出各组织内 VTG、CTSD 的含量。

### 1.4.2 相对表达量测定

取出 -80 °C 冰箱中  $A_1$  样品, 参照 Trizol Reagent Kit (RNA Extraction Kit, Invitrogen) 试剂盒说明书进行肝脏和卵巢组织总 RNA 提取。然后测定提取总 RNA 的质量和浓度, 等量混合为

cDNA 反转录所需的 RNA 模板, 根据 PrimeScript™ Real-time PCR Kit 试剂盒 (TaKaRa) 步骤进行反转录反应, 获得所需的 cDNA 模板。反转录反应体系是 20  $\mu$ L, 包括 4  $\mu$ L 5 × PrimeScript™ Buffer, 1  $\mu$ L PrimeScript™ RT Enzyme Mix, 1  $\mu$ L Oligo dT Primer (50  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L Random 6 Primers (100  $\mu$ mol/L) 和总 RNA 500 ng, 最后用 RNase free water 补充至终体积为 20  $\mu$ L。反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 10 s, 4 °C +  $\infty$ 。反应结束后, 利用紫外分光光度计检测反转录好的 cDNA 模板浓度, 并用 RNase free water 将终浓度统一调整为 200 ng/ $\mu$ L, 后置于 -20 °C 冰箱中储存备用<sup>[18]</sup>。

基于美洲鲈 CTSD 和 VTG 基因的 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物 (表 2), 利用天根生化科技 (北京) 有限公司生产的 Talent 荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green) 在 StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国) 上开展 qRT-PCR 反应。反应体系和条件参照该检测试剂盒说明书进行设置, 1 个样品做 3 次技术重复, 以美洲鲈  $\beta$ -actin 为内参基因, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算美洲鲈 CTSD 和 VTG 基因 mRNA 的相对表达量。

表 2 实时荧光定量 PCR 扩增引物序列及相关信息

Tab. 2 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification primer sequences and related information

引物名称 Primer	引物序列 (5' -3') Primer sequence	退火温度 Annealing temperature/°C
$\beta$ -actin	F: CGGGATATCATCAGCCTGTAA R: CTGTCCTTCTGTCCCATACCA	66
VTG	F: CACCCAGCGGCTACCAGACCAA R: GGAGGCAACCAGGCAGACAACG	61
CTSD	F: GAGGAACCGACCCAAAGTA R: ACCCAGGACGAAGGAAATG	58

## 1.5 数据处理

实验结果均用均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 来表述, 利用软件 SPSS 17.0 进行独立样本  $t$  检验运算, 对 IV、V 期美洲鲈亲本卵巢、肝脏进行差异显著性分析,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 一般营养成分比较

美洲鲈 IV、V 期卵巢的一般营养成分含量如表 3 所示, 结果表明 IV 期卵巢水分含量明显低于 V 期 ( $P < 0.05$ ), 而检测出的灰分、粗脂肪和粗蛋白均明显大于 V 期 ( $P < 0.05$ )。

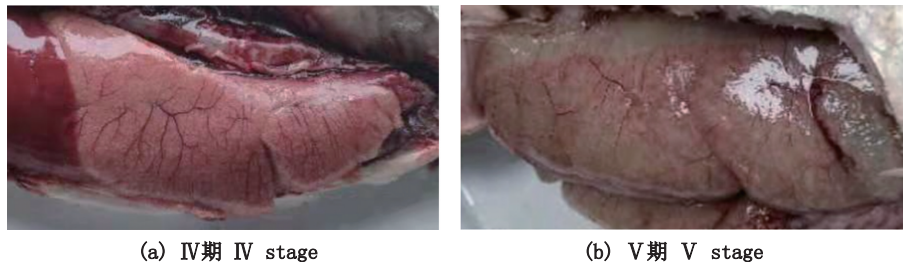
表 3 美洲鲈 IV、V 期卵巢一般营养成分的比较 (鲜重基础)

Tab. 3 Common nutrient composition in the IV stage and V stage ovaries of *Alosa sapidissima* (fresh weight basis)  $n=3, \%$

一般营养成分 Common nutrient composition	IV 期 IV stage	V 期 V stage
水分 Moisture	75.73 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>	90.64 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
灰分 Crude ash	1.28 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
粗脂肪 Crude lipid	2.86 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
粗蛋白 Crude protein	16.07 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	5.83 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>

注: 同行中标有不同小写字母的值表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: Mean values within same line followed by different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).



(a) IV期 IV stage

(b) V期 V stage

图1 美洲鲈IV期和V期卵巢

Fig. 1 Stage IV and V ovaries of *Alosa sapidissima*

## 2.2 氨基酸组成比较与评价

表4显示,美洲鲈IV、V期卵巢中均检测出了18种氨基酸,其中谷氨酸含量最高,其次为亮氨酸。除了胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)、酪氨酸(Tyr)、组氨酸(His)及脯氨酸(Pro)外,其他13种氨基酸,IV、V期之间均存在明显差异( $P < 0.05$ )。IV期卵巢中丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)及亮氨酸(Leu)相对含量显著低于V期( $P < 0.05$ ),而其他9种的相对含量均明显高于V期( $P < 0.05$ )。其中IV期必需氨基酸中的苏氨酸(Thr)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)及色氨酸(Trp)相对含量均明显高于V期( $P < 0.05$ ); Met

含量,IV、V期无显著差异,其他3种氨基酸(Val、Ile及Leu)相对含量,IV期显著低于V期( $P < 0.05$ )。2种半必需氨基酸中,IV期精氨酸(Arg)相对含量明显高于V期( $P < 0.05$ ),而His无明显差异( $P > 0.05$ )。

IV、V期卵巢氨基酸总量(TAA)分别为64.07%和62.41%,两者之间存在显著差异( $P < 0.05$ ) (表4)。IV期卵巢中HEAA总量和NEAA总量均明显高于V期( $P < 0.05$ ),而两者之间的EAA总量无显著差异( $P > 0.05$ )。V期EAA与TAA比值(0.45)和EAA与NEAA比值(0.90)均明显大于IV期(分别为0.43和0.85) ( $P < 0.05$ )。

表4 美洲鲈IV、V期卵巢的氨基酸组成及含量(干质量基础)

Tab. 4 Amino acid composition and content in the IV stage and V stage ovaries of *Alosa sapidissima* (dry weight basis) n = 3, %

氨基酸 Amino acid	IV期 IV stage	V期 V stage	氨基酸 Amino acid	IV期 IV stage	V期 V stage
天冬氨酸 Asp	5.97 ± 0.17 <sup>a</sup>	5.19 ± 0.12 <sup>b</sup>	苯丙氨酸 Phe*	2.45 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.21 ± 0.05 <sup>b</sup>
苏氨酸 Thr*	4.40 ± 0.06 <sup>a</sup>	4.21 ± 0.07 <sup>b</sup>	赖氨酸 Lys*	4.49 ± 0.07 <sup>a</sup>	4.08 ± 0.06 <sup>b</sup>
丝氨酸 Ser	3.51 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.01 ± 0.02 <sup>b</sup>	组氨酸 His**	1.38 ± 0.03	1.32 ± 0.03
谷氨酸 Glu	8.64 ± 0.12 <sup>a</sup>	8.13 ± 0.13 <sup>b</sup>	精氨酸 Arg**	3.12 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.03 <sup>b</sup>
甘氨酸 Gly	2.64 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.04 <sup>b</sup>	脯氨酸 Pro	3.34 ± 0.09	3.32 ± 0.01
丙氨酸 Ala	5.33 ± 0.23 <sup>b</sup>	6.18 ± 0.09 <sup>a</sup>	色氨酸 Trp*	0.66 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.02 <sup>b</sup>
胱氨酸 Cys	1.06 ± 0.12	1.08 ± 0.09	氨基酸总量 TAA	64.07 ± 0.87 <sup>a</sup>	62.41 ± 0.53 <sup>b</sup>
缬氨酸 Val*	4.45 ± 0.06 <sup>b</sup>	4.68 ± 0.06 <sup>a</sup>	必需氨基酸 EAA	27.70 ± 0.42	27.91 ± 0.23
蛋氨酸 Met*	1.71 ± 0.06	1.62 ± 0.04	半必需氨基酸 HEAA	4.50 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.92 ± 0.06 <sup>b</sup>
异亮氨酸 Ile*	3.25 ± 0.18 <sup>b</sup>	3.69 ± 0.04 <sup>a</sup>	非必需氨基酸 NEAA	32.53 ± 0.51 <sup>a</sup>	31.18 ± 0.28 <sup>b</sup>
亮氨酸 Leu*	6.30 ± 0.24 <sup>b</sup>	6.83 ± 0.06 <sup>a</sup>	EAA / TAA	43.23 ± 0.47 <sup>b</sup>	44.72 ± 0.04 <sup>a</sup>
酪氨酸 Tyr	2.04 ± 0.08	1.98 ± 0.04	EAA / NEAA	85.16 ± 0.15 <sup>b</sup>	89.53 ± 0.26 <sup>a</sup>

注:TAA为氨基酸总量;EAA为必需氨基酸总和;HEAA为半必需氨基酸总和;NEAA为非必需氨基酸总和;\*为必需氨基酸;\*\*为半必需氨基酸。

Notes: TAA is total amino acids; EAA is total essential amino acids; HEAA is total half-essential amino acids; NEAA is total non-essential amino acids; \* is essential amino acid; \*\* is half-essential amino acid.

从表5可以看出,以AAS作为评价标准,第IV、V期卵巢中第1限制氨基酸均是Trp,第2限制氨基酸均是Phe和Tyr;将CS作为评价标准,第IV、V期卵巢的第1限制氨基酸也均是Trp,而第2限制氨基酸

均是Met和Cys。第IV和第V期卵巢中的8种必需氨基酸含量分别为2 615.34 mg/g和2 780.34 mg/g N,均大于FAO/WHO评分模式的2 190 mg/g N,但均小于全鸡蛋蛋白模式2 960 mg/g N。

表5 美洲鲷IV、V期卵巢的必需氨基酸评价

Tab. 5 Evaluation of essential amino acids composition in the stage IV and V ovaries of *Alosa sapidissima* mg/g

必需氨基酸 EAA	IV期 IV stage	V期 V stage	FAO/WHO 评 分模式 FAO/WHO evaluation model	全鸡蛋蛋白 模式 Whole egg protein model	IV期 IV stage		V期 V stage	
					AAS	CS	AAS	CS
苏氨酸 Thr	415.28	422.42	250	292	1.66	1.42	1.69	1.45
缬氨酸 Val	420.00	449.51	310	410	1.35	1.02	1.45	1.10
异亮氨酸 Ile	306.74	370.24	250	331	1.23	0.93	1.48	1.12
亮氨酸 Leu	594.61	685.30	440	534	1.35	1.11	1.56	1.28
赖氨酸 Lys	423.78	409.38	340	441	1.25	0.96	1.20	0.93
色氨酸 Trp	62.29	59.20	60	99	1.04 <sup>I</sup>	0.63 <sup>I</sup>	0.99 <sup>I</sup>	0.60 <sup>I</sup>
蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys	261.44	270.91	220	386	1.19	0.68 <sup>II</sup>	1.23	0.70 <sup>II</sup>
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	423.78	420.41	380	565	1.12 <sup>II</sup>	0.75	1.11 <sup>II</sup>	0.74
总量 Total content	2615.34	2780.34	2190	2960	1.19	0.88	1.27	0.94

注：“I”为第一限制性氨基酸；“II”为第二限制性氨基酸。

Notes: “I” represent the first limiting amino acid; “II” represents the second limiting amino acid.

### 2.3 脂肪酸组成比较

对美洲鲷亲本IV、V期卵巢脂肪酸组成进行检测,共测定出5种SFA(饱和脂肪酸)、4种MUFA(单不饱和脂肪酸)以及10种PUFA(多不饱和脂肪酸)(表6)。5种SFA中C14:0相对含量为1.80%,V期比IV期明显高( $P<0.05$ );而其他4种SFA(C15:0、C16:0、C17:0、C18:0)之间不存在

显著差异( $P>0.05$ )。4种MUFA中C18:1n9t含量(0.22%),V期比IV期明显高( $P<0.05$ );而其他3种MUFA(C16:1、C18:1n9c、C20:1n9)含量,V期比IV期稍低,但均不存在显著差异( $P>0.05$ )。在10种PUFA中C20:3n6和C20:4n6含量,IV期比V期明显高( $P<0.05$ );而其他8种PUFA含量无明显差异( $P>0.05$ )。

表6 美洲鲷IV、V期卵巢的脂肪酸组成及含量(干质量基础)

Tab. 6 Fatty acids composition and content in the IV stage and V stage ovaries of *Alosa sapidissima* (dry weight basis) n = 3, %

脂肪酸 Fatty acid	IV期 IV stage	V期 V stage	脂肪酸 Fatty acid	IV期 IV stage	V期 V stage
C14:0	1.54±0.07 <sup>b</sup>	1.80±0.10 <sup>a</sup>	C20:4n6	2.03±0.14 <sup>a</sup>	1.14±0.04 <sup>b</sup>
C15:0	0.22±0.02	0.27±0.03	C22:2	0.45±0.04	0.54±0.25
C16:0	22.89±1.39	24.21±2.69	C20:5n3(EPA)	3.19±0.28 <sup>a</sup>	2.35±0.04 <sup>b</sup>
C16:1	1.97±0.13	1.89±0.08	C22:5n3(DPA)	0.63±0.15	0.57±0.05
C17:0	0.45±0.04 <sup>a</sup>	0.25±0.07 <sup>b</sup>	C22:6n3(DHA)	19.05±1.85	16.72±1.42
C18:0	4.31±0.75	5.22±0.47	∑SFA	29.40±0.94	31.74±2.98
C18:1n9t	0.13±0.01 <sup>b</sup>	0.22±0.05 <sup>a</sup>	∑MUFA	24.05±2.99	22.89±0.41
C18:1n9c	21.61±3.13	20.47±0.53	∑PUFA	46.50±2.72	43.95±2.11
C18:2n6t	0.99±0.30	1.00±0.10	∑UFA	70.54±0.85 <sup>a</sup>	66.84±1.89 <sup>b</sup>
C18:2n6c	17.28±1.12	17.53±1.26	EPA + DHA	22.25±2.05	19.07±1.45
C18:3n6	0.35±0.14	0.29±0.05	∑n3PUFA	24.43±1.93	21.18±1.47
C20:1n9	0.33±0.06	0.31±0.04	∑n6PUFA	21.62±1.43	22.23±1.41
C18:3n3	1.55±0.07	1.54±0.23	∑SFA / ∑UFA	0.42±0.02	0.46±0.05
C20:3n6	0.97±0.36 <sup>a</sup>	2.26±0.12 <sup>b</sup>	∑n3PUFA / ∑n6PUFA	1.13±0.10	0.96±0.09

注:同行中标有不同小写字母的值表示差异显著( $P<0.05$ )。

Notes: Mean values within same line followed by different letters were significantly different ( $P<0.05$ ).

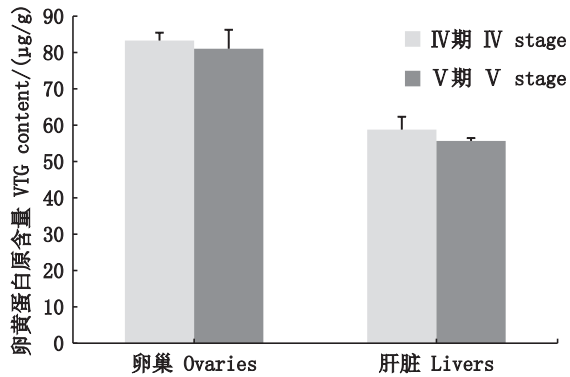
对两期卵巢脂肪酸组成进行比较,IV期卵巢中∑MUFA、∑PUFA、∑UFA、∑n3PUFA和EPA+

DHA含量均大于V期,其中IV期的∑UFA总含量(70.54%)比V期(66.84%)明显高( $P<0.05$ )。

IV期的 $\Sigma$ SFA/ $\Sigma$ UFA比值(0.42)低于V期(0.46),而 $\Sigma$ n3PUFA与 $\Sigma$ n6PUFA的比值(1.13)大于V期(0.96),但均不存在明显差异( $P>0.05$ )。

#### 2.4 CTSD和VTG含量及其mRNA表达的比较

对美洲鲈亲本IV、V期卵巢、肝脏中VTG和CTSD含量进行检测。如图2所示,卵巢和肝脏中的VTG含量在卵巢发育IV期和V期之间均未出现明显差异( $P>0.05$ )。而图3中显示,V期卵巢中CTSD含量明显比IV期高,而肝脏中CTSD含量明显比IV期低( $P<0.05$ )。



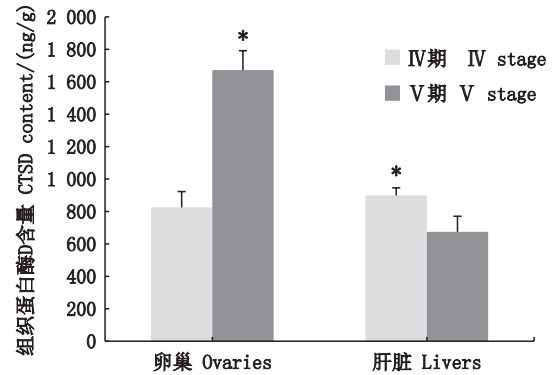
同组织标有\*表示IV期和V期差异显著( $P<0.05$ ),无\*表示无显著差异( $P>0.05$ )。

Mean values within same organ followed by \* were significantly different between stage IV and Stage V ( $P<0.05$ ), and no \* were no significantly different ( $P>0.05$ ).

图2 美洲鲈卵巢发育IV期与V期的卵巢、肝脏中VTG含量比较

Fig. 2 VTG content comparison in IV stage and V stage ovaries and livers of *Alosa sapidissima*

对VTG和CTSD基因的相对表达量进行了检测(图4),结果发现美洲鲈亲本卵巢和肝脏中VTG基因表达从IV期发育至V期均发生了明显变化,与IV期相比,V期卵巢中VTG基因表达明显上调,相对表达量是IV期的13.88倍;与IV期肝脏相比,V期肝脏中VTG基因表达明显下调,相对表达量是IV期的25%。由图5可知,美洲鲈卵巢和肝脏中CTSD基因表达从IV期发育到V期均未发生明显变化,V期卵巢中CTSD基因表达出现下调,但无明显差异( $P>0.05$ );而V期肝脏中CTSD基因表达出现上调,也未出现显著差异( $P>0.05$ )。

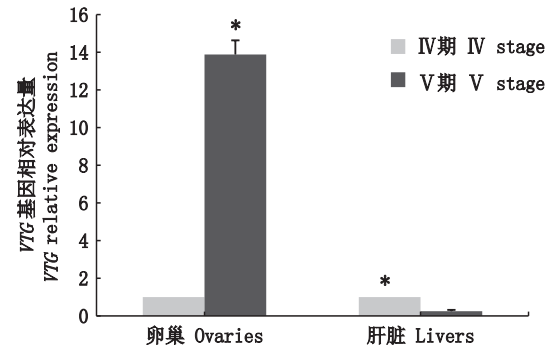


同组织标有\*表示IV期和V期差异显著( $P<0.05$ ),无\*表示无显著差异( $P>0.05$ )。

Mean values within same organ followed by \* were significantly different between stage IV and Stage V ( $P<0.05$ ), and no \* were no significantly different ( $P>0.05$ ).

图3 美洲鲈卵巢发育IV期与V期卵巢、肝脏中CTSD含量比较

Fig. 3 CTSD content comparison in IV stage and V stage ovaries and livers of *Alosa sapidissima*



同组织标有\*表示IV期和V期差异显著( $P<0.05$ ),无\*表示无显著差异( $P>0.05$ )。

Mean values within same organ followed by \* were significantly different between stage IV and Stage V ( $P<0.05$ ), and no \* were no significantly different ( $P>0.05$ ).

图4 美洲鲈卵巢发育IV期与V期的卵巢、肝脏中VTG基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of VTG gene in IV stage and V stage ovaries and livers of *Alosa sapidissima*

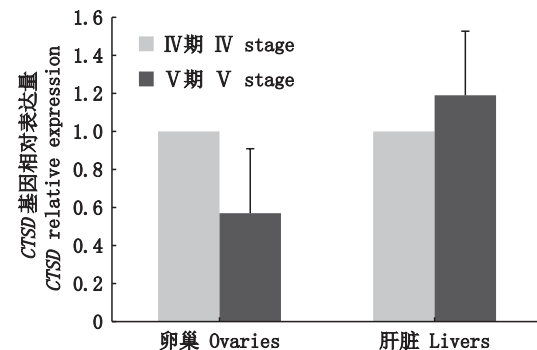


图5 美洲鲈IV期与V期卵巢、肝脏中CTSD基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of CTSD gene in IV stage and V stage ovaries and livers of *Alosa sapidissima*

### 3 讨论

#### 3.1 一般营养成分比较

鱼卵内储存的蛋白质及脂肪在其早期胚胎发育中起着十分重要作用,它们不但为早期胚胎提供基础能量物质,而且也是构成生物膜的重要组成部分<sup>[19]</sup>。本实验对美洲鲈雌鱼亲本Ⅳ、Ⅴ期卵巢一般营养成分测定发现,Ⅴ期卵巢中水分含量(90.64%)明显高于Ⅳ期(75.73%),而粗蛋白含量(5.83%)、粗脂肪含量(1.25%)和粗灰分(0.81%)含量均明显低于第Ⅳ期(16.07%、2.86%、1.28%),导致此结果的主要原因一方面为Ⅴ期性腺发育至成熟,卵巢中存在大量游离卵,游离卵虽未吸水膨胀,但随着卵与卵之间缝隙变大,缝隙间存在的大量水分而导致卵巢水分含量较高,而经过冷冻干燥后Ⅴ期卵巢干物质比率降低,从而导致营养物质含量降低,这与施永海等<sup>[14]</sup>的研究结果相似;另一方面由于鱼卵内营养成分含量与亲本摄食的饲料成分密切相关<sup>[20]</sup>,因此可能与养殖过程中使用的膨化饲料中蛋白和脂肪含量均不能满足其性腺发育所需要的量有关。

#### 3.2 氨基酸组成比较

必需氨基酸构成及含量高低决定了其营养价值高低,其在鱼类繁育过程中发挥着重要作用<sup>[21]</sup>。本研究中,检测结果显示美洲鲈亲本Ⅳ、Ⅴ期卵巢干物质中必需氨基酸总量EAA无明显差异,分别为27.70%和27.91%;但Ⅳ期氨基酸总量TAA(64.07%)显著高于Ⅴ期(62.41%),两期卵巢的TAA均明显高于游离卵中TAA(61.41%)<sup>[14]</sup>,这可能是因为卵巢中游离卵排出体外后吸水膨胀,水分含量较高(91.88%),经过冷冻干燥后卵中干物质比率降低,从而导致氨基酸总含量有所降低<sup>[14]</sup>。

同时,从检测结果来看,美洲鲈Ⅴ期卵巢在后期发育过程中所需各必需氨基酸构成比例不均衡,第Ⅴ期卵巢内8种必需氨基酸中Val、Ile和Leu均明显高于Ⅳ期,Met之间无明显差异,而Thr、Phe、Lys和Trp含量均明显低于Ⅳ期,但必需氨基酸总量之间无差异;但与投喂的膨化饲料相比,饲料中必需氨基酸相对含量均较低。研究<sup>[22]</sup>表明饲料中提高必需氨基酸EAA含量可增加鱼类产卵期间的亲本体内EAA种类和含量,对鱼类卵巢发育和卵子质量具有重要影响。本研究

中美洲鲈饲料中EAA含量为14.69%,明显低于第Ⅳ、Ⅴ期卵巢中的27.70%和27.91%,其中饲料内Trp、Met、Phe、Lys和Thr的含量明显低于第Ⅳ、Ⅴ期卵巢,这与在“太湖鲂鲌”(翘嘴鲌 *Culter alburnus*♀×三角鲂 *Megalobrama terminalis*♂)<sup>[23]</sup>和山女鱊(*Oncorhynchus masou*)<sup>[24]</sup>中的研究结果相类似。另外,参照AAS和CS评价标准,此两期卵巢的第1限制氨基酸均是Trp,第2限制氨基酸均是Phe和Met。所以低含量的Trp、Phe、Lys和Thr极有可能影响后期卵子正常发育和成熟,影响受精率,推测这也正是导致美洲鲈鱼卵受精率偏低的主要原因之一<sup>[25]</sup>。因此,建议今后在饲料配制上要适当提高Trp、Met和Phe以及含量较低的Lys、Thr的比率,以保证美洲鲈卵巢后期发育过程中所需氨基酸营养的均衡。

#### 3.3 脂肪酸组成比较

脂肪酸作为鱼类机体主要能量来源之一<sup>[26]</sup>,在鱼卵中可为鱼类卵子受精后胚胎发育提供重要能量支持,同时也是细胞膜重要组成成分<sup>[27]</sup>。从美洲鲈第Ⅳ、Ⅴ期卵巢整体脂肪酸组成来看,饱和脂肪酸(SFA)中C16:0含量均最高,C17:0含量却明显低于第Ⅳ期;所有单不饱和脂肪酸内以C18:1n9c含量最多,多不饱和脂肪酸内以C18:2n6c和C22:6n3(DHA)含量最为丰富,但第Ⅴ期C20:3n6、C20:4n6(AA)和C20:5n3(EPA)含量显著低于第Ⅳ期,推测可能是由于亲本培育饲料的多不饱和脂肪酸构成比例及含量相对较低而造成的,这需要更进一步研究。同时,有研究发现在鱼类机体内的C20:4n6(AA)、C20:5n3(EPA)和C22:6n3(DHA)对鱼类整个繁育和生长起着十分重要的调节作用<sup>[14, 27]</sup>。HENROTTE等<sup>[28]</sup>对欧亚鲈(*Perca fluviatilis*)卵巢及PENNEY等<sup>[29]</sup>对大西洋鲑(*Gadus morhua*)卵巢研究均证明C22:6n3对其胚胎发育和仔鱼生长及成活具有重要作用,C20:5n3与C20:4n6的含量比率对卵的质量造成直接影响。本研究结果中,美洲鲈第Ⅳ期卵巢内C20:4n6、C20:5n3及C22:6n3含量均大于第Ⅴ期,其中C20:4n6和C20:5n3含量显著大于第Ⅴ期,表明美洲鲈卵巢在后期发育过程中多不饱和脂肪酸积累严重不足,可能会导致后期的受精率较低。这与施永海等<sup>[15]</sup>研究发现美洲鲈亲本培育和产卵期间,需增加投喂富含多不饱和脂肪酸(尤其是DHA)的饲料,及时增加到亲本的卵巢和



鱼卵中,提高美洲鲌开口前仔鱼的成活率的结果相一致。导致此结果原因主要是由于国内目前还未研发和生产美洲鲌鱼专用饲料,现在美洲鲌养殖投喂的是常规的海水鱼膨化配合饲料,脂肪酸等营养成分含量不能完全符合美洲鲌亲本卵巢发育需求而导致的<sup>[14]</sup>。

饲料营养组成和含量与美洲鲌雌鱼所产卵子的营养组成和含量有密切关联,尤其是脂肪酸类,直接影响美洲鲌卵巢和卵子受精后胚胎的发育<sup>[14]</sup>。同时也影响初孵仔鱼内部脑和视神经的快速发育,需要丰富的C22:6n3(DHA)、C20:4n6(AA)等供其生长需求<sup>[30]</sup>。本研究中美洲鲌饲料中C18:2n6c含量为41.55%,明显大于第IV、V期卵巢中的(17.28%和17.53%),而C20:3n6、C20:4n6(AA)和C22:6n3(DHA)含量分别为0.03%、0.22%和1.61%,大幅低于两期卵巢的(IV期0.97%、2.03%和19.05%,V期2.62%、1.14%和19.05%),特别是C22:6n3(DHA)含量相差甚远,相似研究结果也出现在施永海等<sup>[14]</sup>的研究中。因此,为更好地培育美洲鲌亲本,促进其卵巢正常发育,提高卵子质量,需对美洲鲌亲本的饲料配方进行相应调整,要适当降低C18:2n6c含量,适当提高C20:3n6、C20:4n6(AA)和C22:6n3(DHA)比例,特别要提高C22:6n3(DHA)含量比例,同时需要提高C20:5n3(EPA)比例以调高其与C20:4n6(AA)的比值。

### 3.4 VTG和CTSD含量及其mRNA表达量对比

鱼类VTG是由肝脏产生,经血液运送至卵巢,并在卵巢中大量积累,其含量多少标志着卵巢发育的成熟度<sup>[7]</sup>。本实验对美洲鲌第IV期和V期卵巢和肝脏中VTG含量进行测定,结果发现,在IV期发育至V期时,肝脏中VTG含量出现下降,分析主要是因为美洲鲌性腺发育至第V期,当VTG沉积到一定程度时,其机体就会通过自身的负反馈调节作用,抑制肝脏产生卵黄蛋白原,从而导致肝脏产生VTG能力减弱,所以VTG浓度也随之逐渐降低,此结果与李加敏等<sup>[31]</sup>研究发现河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophilus*)性腺发育过程中肝脏内VTG浓度变化的结果相类似。同时卵巢第V期VTG含量也表现出降低的变化趋势,但降低不明显,这与河川沙塘鳢<sup>[31]</sup>雌鱼性腺从IV期发育至V期的VTG含量变化不显著的结果相一致,但与罗明坤等<sup>[32]</sup>研究发现的尼罗罗非

鱼(*Oreochromis niloticus*)卵巢发育至第V期与IV期时VTG含量显著升高的结果不同,导致此结果的原因可能是由于美洲鲌雌鱼性腺发育至V期,甚至在IV期末时,卵巢中的卵母细胞逐渐发育成熟,VTG作为卵黄蛋白的前体,开始逐渐转化为卵黄蛋白,为后续受精卵及胚胎发育作营养储备<sup>[33]</sup>。本研究还发现美洲鲌卵巢和肝脏中VTG mRNA均有表达,表明卵巢和肝脏均能合成VTG,推测美洲鲌雌鱼具有VTG内源性合成途径,相似结果也出现在尼罗罗非鱼<sup>[33]</sup>和斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[34]</sup>中。结果还显示V期卵巢内VTG mRNA表达出现明显上调,而肝脏内mRNA表达出现明显下调。导致此结果的主要原因是VTG既可通过自身产生也可通过外部摄取食物合成,但在性腺发育不同时期VTG产生的部位均不同<sup>[7]</sup>。因此,美洲鲌雌鱼卵巢发育至V期时,VTG合成和积累的场所主要集中在卵巢内,进而导致V期肝脏内VTG mRNA的表达量急剧下调,卵巢内VTG mRNA的表达量显著上调。

CTSD是一种天冬氨酸蛋白酶,具有不同的异构体,可溶快速解卵黄蛋白,具有蛋白水解酶活性,在成年机体的卵、皮肤黏膜、肠和肝脏中表达较丰富<sup>[9,35]</sup>。本研究发现美洲鲌雌鱼卵巢和肝脏内CTSD含量丰富,在卵巢V期时,CTSD含量显著升高,表明随着性腺发育成熟,卵巢中卵黄蛋白原大量积累,CTSD随之也开始大量积累,为后期卵子产出、受精卵发育和孵化做准备。而肝脏内V期CTSD含量显著降低,这可能是因为肝脏中产生的CTSD均通过血液运输至卵巢内,这也是导致第V期卵巢中CTSD浓度显著升高的原因之一。而第V期卵巢中CTSD mRNA的表达出现下调,肝脏中CTSD mRNA的表达出现上调,这是因为卵巢中CTSD含量达到一定水平时,机体通过负反馈调节,抑制卵巢和肝脏内CTSD的合成和积累<sup>[9]</sup>。所以,卵巢中CTSD mRNA表达量开始出现下调,肝脏中CTSD mRNA表达量上调幅度减小。

综上,在当前养殖条件下,为保证美洲鲌卵巢后期发育过程中所需氨基酸和脂肪酸的均衡。建议适当调整饲料配方,提高限制氨基酸色氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸及含量较低的赖氨酸、苏氨酸的比率,适当调高C20:3n6、C20:4n6(AA)、C22:6n3(DHA)和C20:5n3(EPA)比例,降低C18:2n6c比例。

## 参考文献:

- [1] 施永海, 徐嘉波, 刘永士, 等. 敞口池塘和遮荫池塘养殖美洲鲈当年鱼种的生长规律和差异[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(2): 161-170.  
SHI Y H, XU J B, LIU Y S, et al. Growth regularity and difference of young fish American shad *Alosa sapidissima* cultured in outdoor and shaded ponds [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(2): 161-170.
- [2] 洪孝友, 朱新平, 陈昆慈, 等. 美洲鲈胚胎及仔稚鱼的发育[J]. 水生生物学报, 2011, 35(1): 153-162.  
HONG X Y, ZHU X P, CHENG K C, et al. Study on the development of the embryo and larva of American shad, *Alosa sapidissima* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(1): 153-162.
- [3] 徐嘉波, 税春, 施永海, 等. 池养美洲鲈1<sup>+</sup>龄鱼种生长特性的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(1): 55-63.  
XU J B, SHUI C, SHI Y H, et al. Study of growth characteristics of pond-reared one-year-old *Alosa sapidissima* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018, 27(1): 55-63.
- [4] 施永海, 徐嘉波, 谢永德, 等. 池塘培育美洲鲈初次性成熟亲本的生长特性[J]. 广东海洋大学学报, 2019, 39(2): 45-52.  
SHI Y H, XU J B, XIE Y D, et al. Growth characteristics of the first sexual maturation broodstock of *Alosa sapidissima* cultured in greenhouse structured pond [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(2): 45-52.
- [5] 洪孝友, 朱新平, 陈昆慈, 等. 池养美洲鲈卵巢周年发育和血清激素变化研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(10): 2696-2701.  
HONG X Y, ZHU X P, CHEN K C, et al. The study of ovary development and hormone changes in American shad *Alosa sapidissima* [J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(10): 2696-2701.
- [6] 袁新程, 蒋飞, 施永海, 等. 高温胁迫对美洲鲈1<sup>+</sup>龄鱼种抗氧化与非特异性免疫相关指标的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2021, 47(1): 107-117.  
YUAN X C, JIANG F, SHI Y H, et al. Effects of high temperature stress on antioxidative and non-specific immunity indices of one-year-old *Alosa sapidissima* [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2021, 47(1): 107-117.
- [7] LEONARDI M, VERA J, TARIFEÑO E, et al. Vitellogenin of the Chilean flounder *Paralichthys adspersus* as a biomarker of endocrine disruption along the marine coast of the South Pacific. Part I: induction, purification, and identification [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2010, 36(3): 757-765.
- [8] 张士瑾, 孙旭彤, 李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 32-35.  
ZHANG S C, SUN X T, LI H Y. Review on vitellogenin [J]. Marine Sciences, 2002, 26(7): 32-35.
- [9] 袁新程, 戴习林, 朱其建, 等. 罗氏沼虾5个专门化品系选择系繁殖力的比较分析[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(5): 674-681.  
YUAN X C, DAI X L, ZHU Q J, et al. Comparative analysis of fecundity of 5 specialized strains of shrimp *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(5): 674-681.
- [10] 陈荣. 文昌鱼组织蛋白酶D基因的克隆、鉴定及功能研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.  
CHEN R. Cloning, expression and functional analysis of cathepsin D in amphioxus *Branchiostoma japonicus* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [11] 陈玲. 半滑舌鳎基因CathepsinB、D和L的鉴定与表达分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2012.  
CHEN L. Identification and expression analysis of *Cynoglossus semilaevis* Cathepsin B, D and L [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012.
- [12] KOIKE M, SHIBATA M, OHSAWA Y, et al. Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D deficient mice [J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2003, 22(2): 146-161.
- [13] RODRÍGUEZ C, PÉREZ J A, DÍAZ M, et al. Influence of the EPADHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development [J]. Aquaculture, 1997, 150(1/2): 77-89.
- [14] 施永海, 徐嘉波, 谢永德, 等. 美洲鲈鱼卵营养成分分析及评价[J]. 水产科学, 2020, 39(3): 407-413.  
SHI Y H, XU J B, XIE Y D, et al. Nutritional composition analysis and evaluation of eggs in American shad *Alosa sapidissima* [J]. Fisheries Science, 2020, 39(3): 407-413.
- [15] 施永海, 徐嘉波, 严银龙, 等. 美洲鲈内源性营养阶段脂肪酸组成及利用[J]. 海洋渔业, 2022, 44(3): 303-314.  
SHI Y H, XU J B, YAN Y L, et al. Composition and utilization of fatty acids during the endogenous nutrient stage of *Alosa sapidissima* [J]. Marine Fisheries, 2022, 44(3): 303-314.
- [16] Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee on Energy and Protein Requirements. Energy and protein requirements [M]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1973: 52.
- [17] 桥本芳郎. 养鱼饲料学[M]. 蔡完其, 译. 北京: 中国农业出版社, 1980: 114-115.  
QIAOBEN F L. Fisheries feed [M]. CAI W Q, trans. Beijing: China Agriculture Press, 1980: 114-115.

- [18] 董福霖, 黄天晴, 刘恩慧, 等. 高温胁迫对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝脏中抗氧化酶活性和免疫相关基因表达的影响[J]. 海洋与湖沼, 2023, 54(1): 225-232.
- DONG F L, HUANG T Q, LIU N H, et al. Effect of thermal stress on activity of antioxidant enzymes and expression of immune-related genes in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2023, 54(1): 225-232.
- [19] CRUZADO I H, HERRERA M, QUINTANA D, et al. Total lipid and fatty acid composition of brill eggs *Scophthalmus rhombus* L. relationship between lipid composition and egg quality [J]. Aquaculture Research, 2011, 42(7): 1011-1025.
- [20] 周洲, 杨兴, 孔杰, 等. 西伯利亚鲟成熟及过熟卵的营养成分[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(7): 84-86, 91.
- ZHOU Z, YANG X, KONG J, et al. Nutritive components of maturational eggs and overripe eggs of *Acipenser baerii* [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2016, 44(7): 84-86, 91.
- [21] 施永海, 张根玉, 张海明, 等. 河川沙塘鳢肌肉营养成分的分析和评价[J]. 食品科学, 2015, 36(4): 147-151.
- SHI Y H, ZHANG G Y, ZHANG H M, et al. Evaluation of nutritional quality and nutritional components in muscle of *Odontobutis potamophila* [J]. Food Science, 2015, 36(4): 147-151.
- [22] 李文文, 黄天晴, 谷伟, 等. 六个虹鳟代表性繁育群体肌肉营养成分分析[J]. 水生生物学报, 2023, 47(9): 1425-1434.
- LI W W, HUANG T Q, GU W, et al. The analysis of muscle nutrient composition of six representative breeding population of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(9): 1425-1434.
- [23] 姜建湖, 沈斌乾, 陈建明, 等. “太湖鲂鮳”及其亲本肌肉营养成分的分析与评价[J]. 水生生物学报, 2019, 43(2): 388-394.
- JIANG J H, SHEN B Q, CHEN J M, et al. Analysis and evaluation of nutritional composition in muscle of hybrid f1 of female *Culter alburnus* × male *Megalobrama terminalis* and its parent fish [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(2): 388-394.
- [24] WANG C A, XU Q Y, BAI Q L, et al. Comparison of growth performances, nutritional composition in muscle of diploid and triploid masu salmon (*Oncorhynchus masou*) [J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2015, 15(1): 127-135.
- [25] 罗兴, 毕清竹, 孟晓雪, 等. 高脂饲料中添加含硫氨基酸对大菱鲆脂肪代谢的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(4): 893-905.
- LUO X, BI Q Z, MENG X X, et al. Effects of supplementation of sulfur-containing amino acids in high-lipid diets on lipid metabolism of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(4): 893-905.
- [26] 黎原谷, 李慷, 刘利平. 人工繁殖条件下日本鳗鲡鱼卵营养成分分析及评价[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(2): 190-199.
- LI Y G, LI K, LIU L P. Nutritional analysis and evaluation of eggs from the artificially induced maturation *Anguilla japonica* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(2): 190-199.
- [27] BOBE J, LABBÉ C. Egg and sperm quality in fish [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(3): 535-548.
- [28] HENROTTE E, MANDIKI R S N M, PRUDENCIO A T, et al. Egg and larval quality, and egg fatty acid composition of Eurasian perch breeders (*Perca fluviatilis*) fed different dietary DHA/EPA/AA ratios [J]. Aquaculture Research, 2010, 41(9): e53-e61.
- [29] PENNEY R W, LUSH P L, WADE J, et al. Comparative utility of egg blastomere morphology and lipid biochemistry for prediction of hatching success in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. [J]. Aquaculture Research, 2006, 37(3): 272-283.
- [30] JOHNSON J R, LOESCH J G. Morphology and development of hatchery-cultured American shad, *Alosa sapidissima* (Wilson) [J]. Fishery Bulletin, 1983, 81(2): 323-339.
- [31] 李加敏, 朱嘉洁, 杨崑, 等. 河川沙塘鳢雌性成熟过程中卵黄蛋白原含量变化[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2013, 30(2): 17-21.
- LI J M, ZHU J J, YANG W, et al. The variation of the Vtg level in the process of sexual maturity of the female fish of *Odontobutis potamophila* [J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2013, 30(2): 17-21.
- [32] 罗明坤, 赵金良, JEERAWAT T, 等. 尼罗罗非鱼卵巢发育过程中性类固醇激素与卵黄蛋白原含量变化及Vtg mRNA表达特征[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1123-1132.
- LUO M K, ZHAO J L, JEERAWAT T, et al. Changes in sex steroid hormones, vitellogenin content, and Vtg mRNA expression during ovarian development in *Oreochromis niloticus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1123-1132.
- [33] 周忠良. 河川沙塘鳢卵黄蛋白结构特征及其在积累代谢过程中变化的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 1998: 1-59.
- ZHOU Z L. Structural characteristics of vitellin and its changes in the process of accumulation and metabolism in *Odontobutis potamophila* [D]. Shanghai: East China Normal University 1998: 1-59.

- [34] LIU K C, WU R S S, GE W. Luteinizing hormone receptor (*lhcr*) as a marker gene for characterizing estrogenic endocrine-disrupting chemicals in zebrafish ovarian follicle cells[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 192: 89-94.
- [35] ROMANO M, ROSANOVA P, ANTEO C, et al. Vertebrate yolk proteins: a review [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2004, 69(1): 109-116.

## Comparison and analysis of nutrient components, vitellogenin, cathepsin D and its mRNA expression in stage IV and V ovaries of *Alosa sapidissima*

YUAN Xincheng, SHI Yonghai, XU Jiabo, YU Aiqing, DENG Pingping, ZHANG Zhiwen, JIANG Fei  
(Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** In order to study the change rule of nutrient substance in ovaries of female *Alosa sapidissima* at the late stage of development and improve the fertilization rate of eggs, the contents of amino acids, fatty acids, vitellogenin (VTG) and cathepsin D (CTSD) and their mRNA expression in the ovaries of female *Alosa sapidissima* at the stages IV and V of gonadal development were compared and analyzed by biochemical analysis, enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescence quantitative PCR. The results showed that the water content (75.73%) in stage IV ovary was significantly lower than that (90.64%) in stage V ovary, while the crude protein content (16.07%), crude fat content (2.86%) and crude ash content (1.28%) were significantly greater than those (5.83%, 1.25%, 0.81%) in stage V ovary. Among the 18 amino acids detected in the ovaries of stages IV and V, the content of glutamic acid was the highest (8.64% and 8.13%). Among the 8 essential amino acids, the contents of threonine, phenylalanine, lysine and tryptophan in stage IV were significantly higher than those in stage V, and the first limiting amino acid of both was tryptophan. The total amino acid (TAA), semi-essential amino acid (HEAA) and total non-essential amino acid (NEAA) in stage IV were significantly higher than those in stage V. A total of 19 fatty acids were detected in the ovaries of the two stages, and the contents of C17:0, C20:1n9, C20:4n6 and C20:5n3 in stage IV were significantly higher than those in stage V; the contents of  $\sum$  MUFA,  $\sum$  PUFA,  $\sum$  UFA,  $\sum$  n3PUFA and EPA + DHA in stage IV were greater than those in stage V, and  $\sum$  UFA (70.54%) reached significant differences. The content of VTG in stage IV ovary was higher than that in stage V ovary, but it was not significant, while the content of CTSD in stage IV ovary was significantly lower than that in stage V ovary. The expression of VTG gene in stage V ovary was significantly higher than that in stage IV, 13.88 times of that in stage IV, while the expression of VTG gene in liver was significantly lower than that in stage IV, accounting for 25% higher than that in stage IV. From stage IV to stage V, CTSD mRNA expression showed down-regulation in the ovary and up-regulation in the liver, but none of them was significant. Therefore, under the current aquaculture conditions, the accumulation of nutrients in the ovary is uneven during the late development of the *Alosa sapidissima*, and it is recommended to appropriately adjust the feed formula, increase the ratio of limiting amino acids tryptophan, methionine, L-Phenylalanine and lysine and threonine with lower content, increase the ratio of polyunsaturated fatty acids C20:3n6, C20:4n6 (AA), C22:6n3 (DHA) and C20:5n3 (EPA), and decrease the ratio of C18:2n6c in order to ensure the balance of nutrients required for the late development of the ovary.

**Key words:** *Alosa sapidissima*; ovaries; nutrition facts; vitellogenin; cathepsin D; mRNA expression