

华中农业大学硕士学位论文

养殖中华鲟卵黄发生初步研究

STUDIES ON VITELLOGENESIS OF CULTURED CHINESE
STURGEON

研究生: 甘芳

指导教师: 危起伟 教授

陈细华 研究员

指导小组: 危起伟 教授

陈细华 研究员

李创举 副研究员

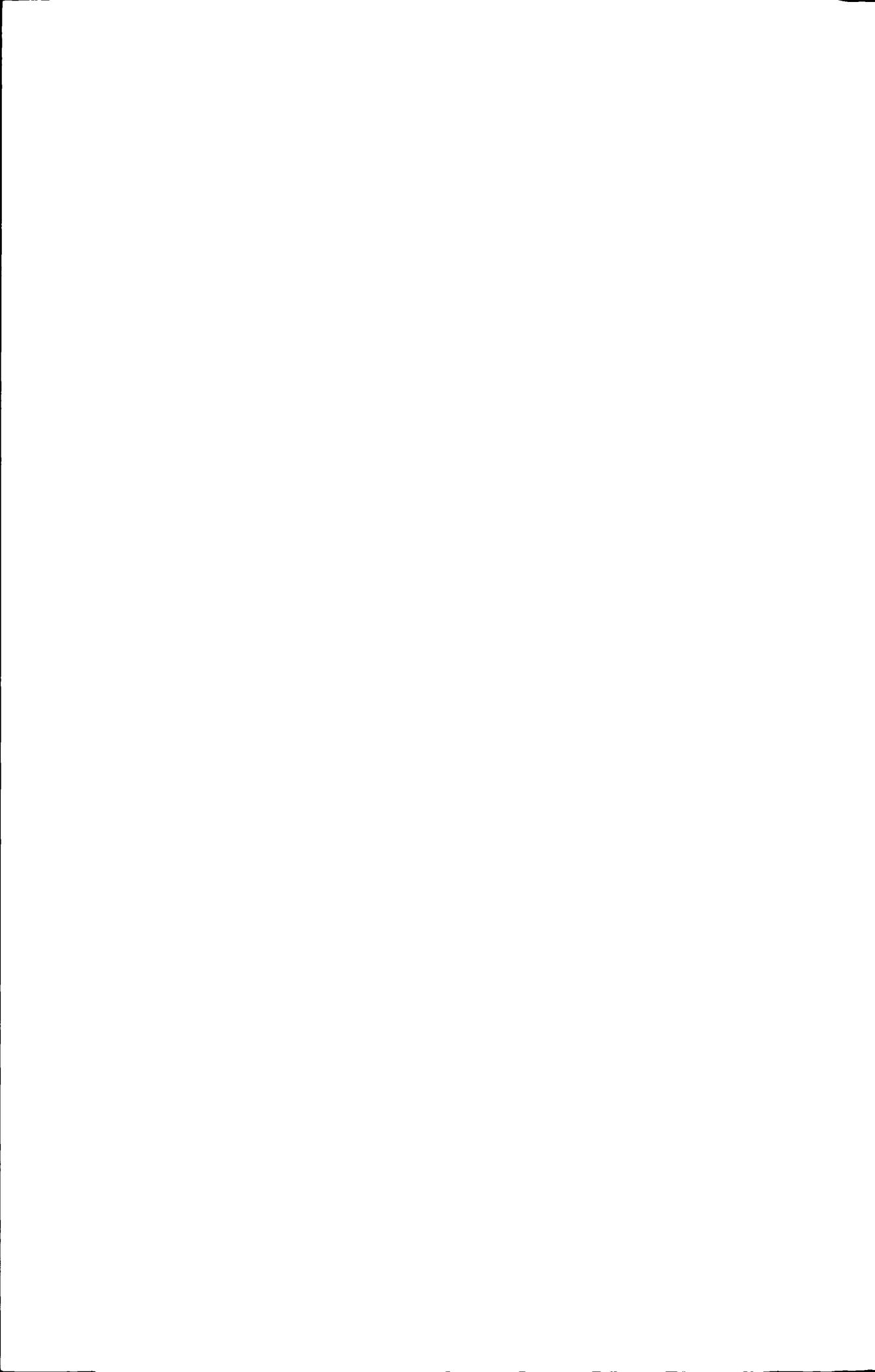
专业: 湿地资源与环境 研究方向: 珍稀鱼类繁殖生理学

获得学位名称: 农学硕士 获得学位时间: 2010年6月

华中农业大学水产学院

二〇一〇年六月





目 录

摘 要	1
ABSTRACT	3
第一章 文献综述	5
1.1 鲟鱼类生物学概述	5
1.1.1 鲟鱼起源和地理分布	5
1.1.2 分类地位	5
1.1.3 鲟鱼种类	5
1.1.4 鲟鱼类生活史	5
1.1.5 鲟鱼性腺发育特性及繁殖生理学研究进展	6
1.2 中华鲟生物学及繁殖生物学研究	7
1.2.1 中华鲟生物学特征	7
1.2.2 中华鲟性腺发育及繁殖生物学研究	7
1.3 动物卵黄发生研究进展	8
1.3.1 卵黄发生的类型	8
1.3.2 鱼类卵黄发生的研究进展	9
1.3.3 鲟鱼类卵黄发生的研究进展	10
1.4 动物卵黄蛋白原的研究进展	10
1.4.1 卵黄蛋白原的特征	10
1.4.2 鱼类卵黄蛋白原的研究	11
1.4.3 鲟鱼类卵黄蛋白原的研究	12
1.4.4 研究卵黄蛋白原的意义	13
1.5 本研究的目的是和意义	13
第二章 养殖中华鲟性腺的组织学	15
2.1 前言	15
2.2 材料与方法	15
2.2.1 材料来源	15
2.2.2 组织切片方法	15
2.3 结果	16
2.3.1 养殖中华鲟生长情况	16
2.3.2 养殖中华鲟性腺发育	17
2.4 讨论	18
第三章 中华鲟卵黄发生超微结构观察	20
3.1 前言	20
3.2 材料与方法	20
3.2.1 各年龄中华鲟来源	20
3.2.2 电镜切片方法	20
3.3 结果	21
3.3.1 卵原细胞的结构特征	21
3.3.2 早期初级卵母细胞的结构特征	21
3.3.3 后期初级卵母细胞的结构与卵黄发生的机理	22
3.4 讨论	23
3.4.1 卵原细胞和卵母细胞的区分	23

3.4.2 内源性卵黄发生和外源性卵黄发生	24
第四章 中华鲟卵黄蛋白原合成部位研究.....	28
4.1 前言	28
4.2 材料与方法	28
4.2.1 各年龄中华鲟来源	28
4.2.2 试验方法	29
4.3 结果	30
4.3.1 卵巢发育分期的观察	30
4.3.2 RT-PCR 结果	30
4.4 讨论	32
结 论	34
参考文献	35
附 录	44
致 谢	45

摘 要

中华鲟 (*Acipenser sinensis* Gray) 为典型的溯河产卵洄游鱼类, 是现生 27 种鲟形目鱼类中分布最南部的种类, 主要分布于我国东海、黄海、珠江和长江干流。在海水中生长成熟, 在淡水中繁殖。近年来由于水污染、大型水利工程等因素的影响, 野生中华鲟资源量急剧下降。目前野生中华鲟人工繁殖技术已经取得成功, 这对人工增殖放流的实施具有重要作用。另据报道中华鲟全人工繁殖技术于 2009 年获得初步进展, 但对中华鲟性腺发育规律以及影响到中华鲟幼鱼发育到成熟过程中至关重要的卵黄发生过程尚未见过报道。本论文通过对养殖中华鲟性腺的组织学观察和卵黄发生过程的电镜观察, 并采用分子生物学手段从微观水平来印证中华鲟内源性和外源性卵黄来源途径, 对中华鲟组织中卵黄物质之一卵黄磷蛋白的前体-卵黄蛋白原合成部位进行了分析, 主要得出以下结果:

1、对目前长江水产研究所养殖中华鲟进行性腺发育监测, 本实验采到的中华鲟最大个体为 1999 年人工繁殖的子一代, 即 10 年龄。此时的卵母细胞最大直径可达到 500um, 大部分介于 200-400um 之间。这些细胞外围出现一层滤泡层, 个别有两层。组织学观察表明养殖中华鲟雌性个体性腺发育仍处于 II 期, 个别性腺发育可能达到了 II 期末向 III 期转化的过程。因此, 卵黄的发生和积累是中华鲟性腺成熟的关键。

2、通过光镜和透射电镜对中华鲟早期卵黄发生过程进行观察, 发现中华鲟也存在内源性和外源性卵黄发生过程。结果表明: 中华鲟的卵黄发生起始于初级卵母细胞, 并且在卵原细胞时期就观察到卵子发生的特征物——类核周体; 而且, 可以根据类核周体在胞质中分布与线粒体的关系将早期卵母细胞划分为不同发育时期。在初级卵母细胞发育早期, 类核周体逐渐消失, 线粒体增多, 细胞外具有质膜和结缔组织。初级卵母细胞后期, 卵黄核消失, 通过电镜观察发现线粒体、内质网、高尔基体等细胞器参与了中华鲟的卵黄形成过程, 在细胞质中出现了卵黄颗粒和脂滴, 随后卵黄颗粒相互融合形成大卵黄颗粒。通过对卵母细胞质膜的微观观察, 发现外源性卵黄物质主要通过质膜的微吞饮作用和微绒毛的吸收作用进入卵母细胞, 并且与卵母细胞内已有卵黄颗粒融合形成大卵黄颗粒。

3、对中华鲟内源性和外源性卵黄来源问题进行分子生物学印证, 本实验以 1-10 龄雌性中华鲟和 6 个年龄段雄鱼为实验材料, 先根据组织学观察确定其发育状况。再从中华鲟不同年龄段性腺和肝脏中提取总 RNA, 用 RT-PCR 方法初步探讨了不同年龄段中华鲟卵巢和肝脏中卵黄蛋白原 mRNA 的表达, 确定是否存在卵黄蛋白原的合成功能。结果发现: 中华鲟雌性和雄性个体性腺中均存在卵黄蛋白原 mRNA 的表达。对 1-10 龄中华鲟雌鱼性腺观察发现, 其性腺组织中是存在卵黄蛋白原

mRNA 的表达, 并且表达量随着年龄呈不断增加的趋势。1 龄、2 龄时表达量最弱, 至出现较微弱条带, 10 龄中华鲟性腺中卵黄蛋白原 mRNA 表达量最强, 其表达强度明显高于其他年龄段, 且明显高于性腺已达 IV 期成熟的野生中华鲟性腺中卵黄蛋白原 mRNA 表达量。实验结果说明, 10 龄中华鲟雌鱼随着卵巢的发育已进入卵黄蛋白原合成的增强期。由于受到材料的限制, 只对 1-7 龄中华鲟肝脏中卵黄蛋白原 mRNA 表达量进行了实验, 结果显示除 1 龄以外的 2-7 龄的中华鲟雌鱼肝脏中都存在卵黄蛋白原 mRNA 的表达, 并且表达量之间不存在明显差异; 本实验还对 1 龄, 3 龄, 4 龄, 5 龄, 9 龄, 12 龄中华鲟雄性个体性腺进行了卵黄蛋白原 mRNA 表达情况的分析, 发现除 1 龄以外其他年龄中华鲟雄性个体性腺中是存在卵黄蛋白原 mRNA 的表达, 并且表达量之间不存在明显差异, 结果说明了在中华鲟雄性个体中正常情况下存在少量卵黄蛋白原, 这也证实了精巢中 VTG 是为精子发生提供营养物质这一观点。

4. 本研究结果证实了中华鲟卵黄来源存在外源性和内源性两种合成途径, 并且在到性腺发育后期可能以内源性合成途径为主。现有的人工养殖的 10 龄中华鲟性腺仍未发育成熟, 可见, 中华鲟的子一代人工驯养和亲鲟的培育关键在于如何能使性腺更快积累卵黄。因此, 中华鲟性腺发育的营养物积累过程是中华鲟全人工繁殖技术突破的关键, 本实验的开展对子一代中华鲟的人工驯养有指导意义。

关键词: 中华鲟; 性腺发育; 卵黄发生; 卵黄蛋白原; 合成位点; mRNA 表达

ABSTRACT

Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) is one of the largest anadromous species. It was mainly distributed in East China Sea, Yellow Sea, Pearl River and the trunk stream of Yangtze River. It spends most of its life in the sea, but spawns in the rivers, mainly in the Yangtze River. In the recent years, dramatic decline in the wild sturgeon's population was attributed to the dam construction, overfishing and water pollution. Artificial propagation of the wild Chinese sturgeon has achieved success, which was very important for the implementation of artificial enhancement. Besides, according to a news report, the close-cycle captive breeding of Chinese sturgeon was completed in 2009. However, the gonadal development rule of Chinese sturgeon and the vitellogenesis which is critical for the juvenile developing to mature have not been reported yet. This thesis analyzed the site of vitellogenin synthesis by histological observation of gonad and electron microscope observation of the process of vitellogenesis, and corroborating endogenous and exogenous vitellogenesis by molecular techniques. Conclusions from the studies are as follows:

1. The gonadal development of cultured Chinese sturgeon (age:1-10 years) was observed 10 years old female has the maximal oocyte diameter, which was about 500um. However, most of oocyte diameter were from 200 to 400 um. There were one or two follicle velums around the oocytes. Most of them were in the gonadal development stage II, some were in the process from late stage II to III. The vitellogenesis and deposition of the yolk are critical for Chinese Sturgeon developing to mature

2. Early Oogenesis in Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*) was observed by light microscope and transmission electron microscope. The results indicated that the vitellogenesis started in the primary oocyte phase, and the characteristic substance of oogenesis (Nucleoli-like body) occurred in the oogonia phase. Moreover, according to the relationship between the distribution of Nucleoli-like body in cytoplasm and mitochondria, early oocyte can be divided into different development stages. In early oocyte development stage, Nucleoli-like body disappeared gradually, mitochondria increased, and extracellular plasma membrane and connective tissue appeared. In late primary oocyte phase, yolk nucleus had disappeared, and the observation by electron microscopy found that mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi body and other organelle were involved in the formation of Chinese sturgeon yolk, yolk granules and lipid droplets appeared in the cytoplasm, and finally yolk granules merged into large yolk

granules. The oocyte ingest extracellular material via micropinocytotic pits and vesicles. These structures apparently fuse to form tubules which then coalesce into large yolk droplets.

3. Endogenous and exogenous vitellogenesis was corroborated by molecular techniques. Cultured female Chinese sturgeon from 1 to 10 years old and 6 age-group male individuals were used to confirmed the gonadal development stage by histology. In the present study, total RNAs were isolated from ovary and hepatic of cultured Chinese sturgeon at different ages. Expression of vitellogenin mRNA was identified by RT-PCR amplification method. Successful amplification was accomplished by using both ovary and hepatic. It could be concluded that both female and male individuals were the specific site of vitellogenin synthesis. The expression of vitellogenin mRNA increased in the ovary with age increasing from 1 to 10 years old. The expression of vitellogenin mRNA of the 1 and 2 years old juveniles was the lowest, but the expression of vitellogenin mRNA was the highest in 10 years old sturgeon, and was obviously higher than the expression of the wild Chinese sturgeon vitellogenin mRNA in the ovary. The expression of vitellogenin mRNA in the female Chinese sturgeon hepatic was tested. Excepted the 1 year-old juveniles, the expression of vitellogenin mRNA was identified in all 2 -7 years' juveniles, and there were no significant differences in the expression. The expression of vitellogenin mRNA in the male Chinese sturgeon gonad was also tested in 1, 3, 4, 5, 9, 12years old sturgeons, and it was found that excepted 1 year-old juveniles, the expression of vitellogenin in mRNA was identified in all of the other juveniles, and no significant differences exist in the expression. Under normal condition, a little VTG existed in male sturgeon. This also confirmed that vitellogenin in testis supplied nutrition to the sperm of the male sturgeon.

4. Experimental results had verified that there were two synthetic modes of Chinese sturgeon vitelline, including endogenous and exogenous vitellogenesis. And endogenous vitellogenesis was the main source of vitelline -in the late gonadal development. The gonad of Chinese sturgeon which was cultured 10 years had not matured yet. This suggested that the key factor which was related to domestication of First Filial Generation and Brood stock Culture of Chinese sturgeon was how to speed up the gonada development and deposition of the yolk. So the deposition of the nutrition for gonadal development in Chinese sturgeon was critical for the close-cycle captive breeding. This experiment was instructional for the artificial domestication of First Filial Generation of Chinese sturgeon.

Key words: *Acipenser sinensis*; gonadal development; vitellogenin; synthesis site mRNA expression

第一章 文献综述

1.1 鲟鱼类生物学概述

1.1.1 鲟鱼起源和地理分布

鲟鱼类,即鲟形目鱼类,是一种起源最早的脊椎动物(Bemis et al.,1997; Bemis et al.,1997b)是目前现存硬骨鱼纲中唯一的大型软骨硬鳞鱼类。通过化石分析推断鲟形目鱼类出现在约2亿年前中生代侏罗纪时代(Bemis et al.,1997b),从起源的地理分布上来看,所有已知化石种和现生种均来源于全北区(Holarctic)(Bemis et al.,1997b),除了中国珠江中华鲟种群越过了北回归线以外,其他所有种均分布于北半球北回归线以北(Bemis et al.,1997)。采用最新生物地理学的统计分析方法发现,鲟鱼类发源于欧洲,而不是原先所认为的亚洲(Bemis et al.,1997; Choudhury et al.,1998)。

1.1.2 分类地位

鲟形目(Acipenseriformes)隶属于脊椎动物门、有头类亚门(Craniata)、有颌总纲(Gnathostomata)、硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、软骨硬鳞下纲(Chondrostei),是软骨硬鳞下纲中的唯一现存目。因鲟鱼种类的背鳍和臀鳍的鳍条数目多于其支鳍骨数,故亦被称古鳍鱼类(Palaeopterygii)(孟庆闻等,1995;陈细华,2007)。

1.1.3 鲟鱼种类

鲟形目鱼类现存2科(白鲟科、鲟科)6属共27个种,其中白鲟科有2属2种,分别是北美的匙吻鲟和我国长江的白鲟;鲟科有4属25种,其中数鲟属的种类最多,为17种(Billard et al.,2001;陈细华,2007)。在鲟属中,西伯利亚鲟还具有3个亚种,大西洋鲟具有2个亚种。

1.1.4 鲟鱼类生活史

目前所有27种鲟形目鱼类都在淡水中产卵繁殖,并且一些鲟鱼种类终生生活在淡水中,而另有一些鲟鱼种类则需要洄游到河口、海水或咸水水域中摄食生长,到繁殖季节再洄游到淡水中产卵(Bemis et al.,1997)。参考Bemis等人1997年将

鲟形目鱼类的生活史分为了三种类型：（1）溯河产卵洄游型（Anadromous / Anadromy）：在淡水与咸水之间洄游，生活史的主要阶段在海洋中度过，性成熟时上溯到淡水河流中产卵，繁殖后亲鱼再返回海洋，幼鱼也行降河洄游，进入河口咸淡水后陆续进入海洋生长。鲟鱼的大多数种类属于这种生活史类型，如里海海域地区的俄罗斯鲟、欧洲鳇、闪光鲟；（2）河流河口生活型（咸淡水迁移型 Freshwater amphidromous / Freshwater amphidromy），根据 McDowall（2007）对咸淡水迁移（Amphidromy）鲟鱼类特征的定义是：这类鲟鱼中是在淡水中繁殖，待仔鱼出生后再洄游入海，在海洋中生长数月后，幼鲟再回到淡水中继续摄食生长和发育。目前属于这类生活史类型的鲟鱼种类不多，目前只确定短吻鲟是属于这类洄游型鲟鱼；（3）纯淡水生活型（河川洄游型 Potamodromous / Potamodromy），这类鲟鱼是在淡水中洄游，再在淡水中完成摄食和产卵，如铲鲟和匙吻鲟、拟铲鲟类。另外还有少数一些鲟鱼类具有多种类型的生活史，如西伯利亚鲟一般多喜栖息在河流的中、下游，然后进入半咸水区域，栖息到北冰洋的海湾，也可以进入海洋；只有 Baikal 湖的西伯利亚鲟是属于纯淡水生活。另外高首鲟也同时具有江海洄游型和纯淡水生活型两种类型。鲟形目鱼类由于在地理分布上，存在历史分布区和目前分布区的问题，因此，一些鲟种也可能存在丢失生活史类型的问题（危起伟，2003；陈细华，2007）。

1.1.5 鲟鱼性腺发育特性及繁殖生理学研究进展

对于鲟形目鱼类来说，其初次性成熟年龄大多在 10 年以上，而且性成熟年龄的个体差异明显。它们一生多次产卵，但并非每年产卵，鲟鱼人工繁殖及其性腺发育起始于前苏联科学家。1958 年者 Dettlaff 和 Ginsburg 对前苏联 3 种重要经济鲟鱼-闪光鲟、小体鲟、俄罗斯鲟胚胎发育进行了细致的研究（Dettlaff *et al.*, 1958）。Conte 等（1988 年）对高首鲟（*Acipenser transmontanus*）的性腺发育进行了研究，并将高首鲟性腺发育分为四个时期。1991 年 Le Menn 等人对养殖西伯利亚鲟卵细胞发育的显微和超微结构过程做了较详细深入的研究（Le Menn *et al.*, 1991）。Doroshov 等 1997 年推测养殖高首鲟组织学上出现性腺分化的是在 18 月龄（Doroshov *et al.*, 1997）。随后 Van Eenennaam 和 Doroshov（1998 年）又将大西洋鲟的卵巢发育和精巢发育进行过研究。1999 年 Hochleithner 和 Gessner 在总结前三位的基础上，修订出一套鲟性腺分期标准。Bruch 等在 2001 年对湖鲟（*Acipenser fulvescens*）的精巢和卵巢发育进行了分期，对于养殖条件下鲟鱼性腺发育做过较为系统的研究工作仅见俄罗斯的西伯利亚鲟、小体鲟与欧洲鳇的杂交种和美国的高首鲟（Doroshov, 1997; Van Eenennaam *et al.*, 2001; Williot, 1991）。国内养殖条件下鲟鱼类性腺发育的研究报道较少，2002 年章龙珍等人对养殖施氏鲟（*Acipenser schrenckii*）进行了性腺发育组织学观察，推测了养殖雌性施氏鲟在 5-6 龄就可以达

到成熟, 并认为养殖雄性施氏鲟性成熟年龄比野生的提早 3-4 年(章龙珍等, 2002)。2004 年曲秋芝对人工养殖条件下的施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 进行过组织学观察, 对养殖 1-8 龄施氏鲟卵巢发育进行了分期, 并得出了施氏鲟卵巢再次成熟的周期为 3-4 年(曲秋芝等, 2004)。对于养殖中华鲟性腺发育的研究, 2004 年陈细华等人曾用组织切片方法研究了人工养殖中华鲟的性腺发育以及性别分化, 发现中华鲟发育至 9 月龄时才出现性腺分化(陈细华等, 2004)。对于中华鲟精子的超微结构已经做过研究。(厉萍, 2007)。

1.2 中华鲟生物学及繁殖生物学研究

1.2.1 中华鲟生物学特征

中华鲟隶属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes)、辐鳍亚纲 (Actinopterygii)、鲟形目 (Acipenseriformes), 鲟科 (Acipenseridae), 是起源最早的脊椎动物类群之一, 为世界上鲟科鱼类中个体最大、分布纬度最南的种类(四川省长江水产资源调查组, 1988; Bemis et al., 1997; 危起伟, 2003)。为我国国家一级重点保护动物, 国际自然保护联盟 (IUCN) 濒危级 (EN) 物种, 国际濒危动植物种贸易公约 (CITES) 附录 II 保护物种。

中华鲟近代分布于我国近海及长江、珠江、闽江、钱塘江、黄河等大江河。目前黄河、闽江、钱塘江均已绝迹, 珠江种群近乎绝迹(乐佩琦, 1998 年)。在近海中生长, 为大型溯河洄游性鱼类, 性成熟后进入江河, 在长江每年秋季 10-11 月份产卵繁殖。每年的 7-8 月亲鲟游入长江口, 溯河而上, 在此期间, 亲鲟停止摄食, 消耗体内储备的营养和能量来供性腺的生长发育, 于第二年的 10-11 月份到产卵场产卵繁殖, 这一过程需历时 1 年。在到达产卵场后, 其体内性腺组织发育至 IV 期, 受精卵经过几天的孵化后, 幼苗随江漂流, 在翌年的 4 月到 10 月即会出现在长江口, 然后进入大海。产卵后的亲鲟也立即降河洄游返回大海。完成整个产卵繁殖全过程, 中华鲟需要长达 15 个月以上的时间(危起伟, 2003)。一般中华鲟寿命较长, 1998-2004 年(除 2002 年外)用于人工繁殖的中华鲟雌鲟年龄在 15-30 龄之间, 平均为 22.3 龄, 雄鲟年龄在 12-26 龄之间, 平均为 20.6 龄(刘鉴毅等, 2007)。由于葛洲坝等大型水利工程的兴建、过度捕捞、水体污染、水路运输、挖沙等人为因素的影响, 使野生中华鲟资源量急剧下降, 产卵面积缩小。

1.2.2 中华鲟性腺发育及繁殖生物学研究

中华鲟初次性成熟雌性个体年龄一般在 14-26 龄, 平均年龄为 18 龄, 雄性个

体年龄一般在 9~18 龄, 平均年龄为 12 龄(邓中彝等, 1985)。葛洲坝建立以前, 从长江上游和金沙江下游捕获的野生中华鲟的卵巢发育情况, 推测中华鲟卵巢性腺发育是相隔两年, 甚至更长时间, 而且并不是每年都重复一次(四川省长江水产资源调查组, 1988)。葛洲坝建立后不久, 1986 年余志堂等人在进行中华鲟年龄鉴定时, 推测至少间隔 5~7 年中华鲟才重复产卵。而陈细华在 2001 年则发现了 1 尾中华鲟雌鱼重复产卵间隔只相差两年(陈细华, 2007)。

对于中华鲟性腺发育较为系统的研究, 见于四川省长江水产资源调查组 1988 年编著的《长江鲟鱼类生物学及人工繁殖研究》, 是目前关于我国鲟鱼类基础研究的唯一一本专著。葛洲坝截留后不久, 1985 年柯福恩等人就观察到葛洲坝下野生中华鲟产卵群体存在性腺退化现象; 而易继舫 1999 年对从葛洲坝下获取的 III 期的野生中华鲟进行了暂养, 对其性腺发育情况进行了观察和描述。2005 年危起伟等人对葛洲坝截留 24 年以后, 中华鲟产卵群体结构进行了分析, 发现野生中华鲟种群性别比发生了变化, 性别失调。

对于中华鲟的性腺发育以及繁殖生物学等方面的报道, 2004 陈细华等人对养殖中华鲟性腺进行了组织学研究, 发现养殖中华鲟幼鲟到 9 月龄时, 在组织学水平才出现性腺分化, 精巢于 1.8-2.2 年龄, 卵巢于 2.5-3.0 年龄进入性腺发育 II 期, 5-5.6 年龄时, 所有的性腺肉眼可以辨识, 但其性腺发育仍处于 II 期。刘鉴毅等人 2007 年对 1998 年-2004 年从葛洲坝下捕获的 57 尾野生中华鲟进行了分析, 发现目前中华鲟繁殖群体自然繁殖力大幅下降。2007 年刘鉴毅等人又对几种不同浓度的离子及单糖对中华鲟精子活力进行了测试, 为提高中华鲟人工繁殖力而寻求高质量的授精介质。厉萍(2007)对中华鲟精液进行冷冻保存, 发现要想获得高的受精率, 精子活力必须很高。在 2009 年甘芳等人对在不同离子溶液作为授精介质时中华鲟卵受精率进行了实验, 发现只有适量的阳离子和葡萄糖作为激活授精介质时中华鲟卵受精率都有所提高。说明目前中华鲟存在卵子、精子质量下降的问题, 对选择合适授精介质显得尤为重要。

1.3 动物卵黄发生研究进展

1.3.1 卵黄发生的类型

卵黄发生为卵母细胞的生长、胚胎发育提供所需要的氨基酸、脂、钙和能量等营养和功能性物质, 对动物的生殖至关重要。卵黄来源分为内源性和外源性两种途径: 内源性卵黄发生, 是指卵黄物质由自身卵母细胞细胞质中合成的卵黄颗粒沉积而成, 卵母细胞中的线粒体、高尔基体、内质网、核糖体等细胞器参与该过程; 外源性卵黄发生, 是指由卵母细胞外的组织, 如肝脏, 合成的卵黄蛋白前体-卵黄蛋白

原经血液循环运输到滤泡细胞，然后合成卵黄蛋白并加工成卵黄颗粒。卵黄颗粒内还含有遗传物质，对胚胎发育起到调控作用（王玉凤等，1999），并且不同动物间，其卵黄合成方式不同。

内源性和外源性卵黄来源是指分别由卵母细胞、肝脏合成或者二者均参与合成，王玉凤等人对罗氏沼虾内源性卵黄来源进行了观察，发现了细胞核，内质网、核糖体、溶酶体、线粒体、微丝等在内源性卵黄合成过程中的作用。应用激素结合方法 Maitre 等人（1985 年）对虹鳟（*Salmo gairdneri*）肝细胞质中特定雌激素受体上进行过实验，证实了关于卵母细胞外卵黄合成机制，即肝脏中合成的机制问题。

1.3.2 鱼类卵黄发生的研究进展

1955 年 Yamamoto 教授就对淡水鱼类青鳉的卵子发生形态学及细胞化学进行了研究，并将硬骨鱼卵母细胞生长中产生的内含物统称为卵黄物质，根据其出现的先后顺序以及形态和性质不同，分别称为卵黄泡、脂滴和卵黄球，这些区别与 1961 年 Raven 教授提出的碳水化合物卵黄、脂肪卵黄和蛋白质卵黄相符。Droller 和 Roth（1966 年）用电镜观察虹鳉的卵黄形成，把虹鳉中卵黄来源分为内源性卵黄、外源性卵黄两种类型，内源性卵黄是由卵母细胞自身合成的，主要有卵黄泡和脂滴，外源性卵黄是由身体其他器官合成后转移到卵母细胞内的，也是卵黄物质的重要组成部分。1988 年 Selman 等人用电镜、抗体免疫等方法，证实了在底鳉卵母细胞早期出现的卵黄泡不属于卵黄成分，并将底鳉的卵母细胞生长分为五个时期：生长初期、卵黄泡期、卵黄形成期、成熟期和成熟卵子。在国内由于虾蟹中卵黄经济价值高，我国对虾蟹卵母细胞的研究较多，并以对卵母细胞组织学见多，且大多数学者广泛运用的分期标准来源于前苏联提出的分期法，但这种分期标准随着电镜技术的广泛应用，不完全适合于超微结构的研究。对鱼类卵母细胞的超微结构变化的研究，国内较早见于王爱明教授，他于 1994 年在对莫桑比克非鲫卵母细胞的电镜观察时，将卵母细胞发育分为四个时期：卵母细胞生长早期；卵黄泡形成期；卵黄积累期和卵黄积累完成期，这种分期又相当于传统的时相分期法的小生长期第 II 时相、大生长期的第 III 时相早期、第 III 时相晚期、第 IV 时相，同时他也赞成 Selman 等人认为卵黄泡不属于卵黄成分的观点，并证明了在卵黄形成过程中卵黄核的重要作用。方永强等人（2001 年）对鳊鱼早期卵子发生进行了超微观察，分析了粗线期、双线期、网状期卵原细胞和初级卵母细胞的结构特点。而 2004 年方永强等人用组织切片的方法，将池养鳊的卵巢发育和卵子发生过程分为了六个时期，并分析了各个时相的生物学特点，描述了卵黄发生过程卵母细胞内重要细胞器的生理作用。2006 年张贤芳等人用透射电镜对圆口铜鱼早期卵母细胞进行了超微结构观察，对早期圆口铜鱼卵子发生过程进行了描述；林国辉等人（2007 年）对鳊鱼卵母细胞发育的组织学和超微结构进行了观察，他将鳊鱼发育过程也分为了六个时期，并分析了鳊鱼卵黄颗

粒的发生与卵膜形成的关系。鱼类卵母细胞卵黄物质通常存在三种类型：油滴、卵黄囊、卵黄球。

1.3.3 鲟鱼类卵黄发生的研究进展

鲟鱼的人工繁殖及胚胎发育起始于前苏联科学家们的工作，到二十世纪五十年代，Dettlaff 和 Ginsburg 对前苏联的 3 中重要经济鲟鱼-闪光鲟、俄罗斯鲟和欧洲鳇的胚胎发育做了较为细致的研究，已出版的《鲟鱼类的胚胎发育及其养殖问题》（中译本，1958）一书，对小体鲟性腺发生过程作了简单的描述（陈细华，2004）。在 1991 年，Le Menn 等人对人工养殖条件下的西伯利亚鲟卵母细胞的发育进行了显微和超显微结构观察，并将卵母细胞的发育分为六个时期：卵原细胞期、滤泡 I 期、滤泡 II 期、滤泡 III 期、滤泡 IV 期和滤泡 V 期。Doroshov 教授等人在 1997 年详细阐述了高首鲟卵巢发育及其性腺周期的组织学以及若干生物化学过程。

1.4 动物卵黄蛋白原的研究进展

1.4.1 卵黄蛋白原的特征

卵黄蛋白原（Vitellogenin VTG）是具有种特异性的高分子量磷脂蛋白，是几乎所有卵生动物中卵黄蛋白（Yolk protein）的前体（Utarabhand et al., 1996）。卵黄生成期间雌鱼在雌激素作用下诱导肝脏生成卵黄蛋白原，后经血液循环运输到滤泡细胞，再经过卵母细胞吸收加工后形成卵黄蛋白。早在近一个世纪前就有人对卵黄蛋白原进行了研究，Uhlenhuth 和 Kodamal 1914 年将性腺发育成熟的雌性鲤鱼中的一种特异血清蛋白称为“ovumin”（李兆杰，2009）；Roepke 和 Hughes、Laskowski 将产卵期禽血清磷蛋白称为“vitellin”（李兆杰，2009）。1969 年，Pan 等人第一次使用“Vitellogenin”来描述这种血清蛋白（Pan, 1969）。后来被广泛应用。卵黄蛋白原是一种高分子蛋白，在不同门类动物中，如甲壳类（Pateraki et al., 1997）、昆虫（Venugopal et al., 1999）、棘皮动物、两栖类（Yoshizaki et al., 1998）、鸟类、鱼类（Johnsen et al., 1999）等都已经分别纯化得到了卵黄蛋白原。Norberg 在 1995 年就检测出鱼类卵黄蛋白原中，含脂、磷。1988 年 Baker 等人在无脊椎动物线虫 *Caenorhabditis elegans* 和脊椎动物蛙 *Xenopus laevis* 中扩展出其卵黄蛋白原的部分片段。卵黄蛋白原不仅只为胚胎发育提供营养，还具有较复杂的生物学功能。卵黄蛋白原不仅存在相似性，还具有种间的特异性。从无脊椎动物到脊椎动物，无论是鱼类、鸟类还是蛙类等所有的非哺乳类卵生动物，其卵黄蛋白原在结构和功能上

相似很高的,说明了卵黄蛋白原虽然存在于不同的生物体内但行使相似的生物学功能。研究还表明卵黄蛋白原可以为正在发育的胚胎提供氨基酸、碳水化合物、脂肪、维生素、硫、磷及微量元素等营养和功能物质。还参与了生物体内多个生理过程,具有很多种生物学功能,促进培养中的动物卵母细胞的生长和分化,还作为甲状腺素、维生素、类胡萝卜素以及卵黄素的结合蛋白,并能结合铁离子、钙离子、锌离子、镍离子等金属离子并将其运送到卵母细胞等,还能为精巢中精子的发生提供营养(张士瑾等,2002)。

1.4.2 鱼类卵黄蛋白原的研究

对于鱼类中卵黄蛋白原的研究从上世纪已开始,鱼类中的卵黄蛋白原通常存在于成熟雌性硬骨鱼的血浆中,但在正常情况下雄鱼和幼体中其卵黄蛋白原基因不存在表达,但如果在外源雌激素或者雌激素类似物的刺激作用下,雄性硬骨鱼的卵黄蛋白原基因能够被启动表达。一般外源性的卵黄蛋白原由肝脏中合成,然后分泌到血液中,经血液运输到卵巢后,被卵母细胞通过受体介导的内吞作用或者微泡饮作用吸收到卵母细胞内(Chen,1997),从而储存起来为将来的胚胎发育提供营养和能量。

Uhlenhuth 和 Kodamal(1914年)在成熟的雌性鲤鱼血浆发现了卵黄蛋白原(李兆杰,2009)。在早期鱼类研究中发现,一般通过注射雌激素诱导血浆中卵黄蛋白的产生(Bailey 1957;Ho et al., 1961;Urist et al., 1961; Utter et al., 1967),最初这种存在鱼类血液中的特异蛋白名称并不相同(李兆杰,2009)。在硬骨鱼中已经通过电泳、色谱层析以及免疫化学方法对卵黄蛋白原进行了较多的定性研究,部分鱼类的卵脂磷蛋白和高磷蛋白都已经被纯化和鉴定。Hara 和 Hirai 1976 年对虹鳟鱼(*O.mykiss*)和大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)的雌性血浆中,发现了这种特异性血清蛋白。Emmersen 和 Petersen(1976年)在比目鱼(*Platichthys flesus*)卵黄生成期,从其血清中部分纯化了这种蛋白。后来从虹鳟鱼中,纯化得到的卵黄蛋白原,并且第一次从免疫学上做了鉴定(Hara et al., 1978)。Hiramatsu 等人也从罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)中,分离出卵黄蛋白原以及相关蛋白(Hiramatsu et al., 1996),Campbell 等人发现其中的 β 组分是另一种卵黄蛋白,并与卵黄蛋白原密切相关,它是一种小分子蛋白(Campbell et al., 1980)。随着科技仪器等进步,应用高灵敏度的放射性免疫法,1985年在未成熟雌鱼和雄鱼体内,So 等人检测到极微量的卵黄蛋白原(So et al., 1985),利用免疫分析的方法,Copeland 从雄性虹鳟鱼体内检测到卵黄蛋白原,后来被证实了与其雌性的相同,并进行了纯化,后来被证实了是来源于肝脏组织(Copeland, 1986)。到目前为止,通过多种不同的生物化学和免疫学方法可以纯化和鉴定卵黄蛋白原(Wallace,1985; Mommsen et al., 1988; Specker et al., 1994)。

对于鱼类中卵黄蛋白原与卵黄蛋白之间的关系研究的较多, 国外已经纯化和鉴定了一些如虹鳟、罗非鱼等重要经济鱼类之间的这种关系 (Wallace, 1985; Tyler et al., 1988; Naglar et al., 1992, Kishida et al., 1992; 张颖等, 2008)。De Vlaming 通过分析纯化得到了金鱼 (*Carassius auratus*) 中卵黄蛋白 (Shigeura et al., 1984)。2008年 Yoon 等人对日本少鳞鲷 (*Sillago japonica*) 中的 Vg 进行了研究, 并克隆出整个卵黄蛋白原的 cDNA 全序列 (Yoon et al., 2008)。我国也纯化得到了一些重要经济鱼类的卵黄蛋白原。(胡东等, 2002; 师晓栋, 2003; 梁勇等, 2006; 吴鹰等, 2006; 詹翠琼等, 2007; 姚静等, 2008), 卵黄蛋白原还可以作为环境敏感指示物, 2006年李杰斐等人选用环境敏感雌激素炔雌醇对斑马鱼的卵黄蛋白原以及性腺发育影响做过研究, 发现卵黄蛋白原是该种环境雌激素的最敏感指标。

1.4.3 鲟鱼类卵黄蛋白原的研究

国外对于鲟鱼类的卵黄蛋白原的研究较多, 如高首鲟、闪光鲟、西伯利亚鲟、杂交鲟做过相关研究工作。1991年 Bidwell 等用雌二醇诱导了高首鲟卵黄蛋白原的发生, 对其 mRNA 进行了鉴定, 得到了其 mRNA 全序列。Pelissero 等人在 1991 年对西伯利亚鲟研究时, 发现饲料中添加大豆后, 西伯利亚鲟中卵黄蛋白的含量有所增加。Ng 等人 (1994 年) 对高首鲟的卵磷蛋白进行了分析。Bidwell 等人 (1995 年) 又对高首鲟的卵黄蛋白原特征进行了鉴定, 发现雌二醇可以同时诱导雌性和雄性高首鲟 mRNA 的表达, 并且特性也相同。在 1996 年 Amiri 对人工养殖条件杂交鲟进行了研究, 测定了其雌性个体血清中 VTG 的含量。Hiramatsu 等 (2002) 对胚胎生成期的杂交鲟 (*Huso huso x Acipenser ruthenus*) 卵黄蛋白进行了分离鉴定。Ceapa 等 (2002 年) 对产卵群体中的闪光鲟进行了研究, 并对其血清中 Vg 含量的进行了测定。Latonnelle (2002 年) 在对虹鳟和西伯利亚鲟的研究中, 发现类雌激素可以改变这些鱼类体内 VTG 的含量, 推测鱼类摄食类雌激素的成分会干扰其肝脏内雌激素感应器。Linares-Casenave (2003) 研究发现在高首鲟中, 卵黄蛋白原的含量与性腺发育时期、体内血液中 Ca^{2+} 含量成正相关 (张艳珍, 2009)。

有关鲟鱼卵黄蛋白原及其相关卵黄蛋白的研究, 国内主要集中在小体鲟和施氏鲟, 对中华鲟卵黄蛋白原的研究报道较少。仅见 2008 年张艳珍对中华鲟血清中卵黄蛋白原的含量进行了测定和 2005 年张兆斌等人对用 17β -雌二醇和 4-壬基酚诱导中华鲟幼鲟卵黄蛋白原 mRNA (Zhang et al., 2005; 张艳珍等, 2008)。国内对于其他鲟鱼卵黄蛋白原的研究在 2007 年以后的研究报道见多, 如张年国、霍堂斌等人, 2007 年张年国等人对施氏鲟进行了研究, 并从其卵中纯化得到了一种脂磷蛋白。同样霍堂斌等 (2007 年) 对小体鲟卵黄蛋白进行了分析纯化, 并得到其卵黄蛋白的 9 个亚基。张颖等人在 2008 年对施氏鲟卵黄蛋白原及其相关蛋白进行过研究, 并分离出了施氏鲟卵黄蛋白原的 3 种相关蛋白。齐茜等人 2009 年采用 ELISA 方法、分光光度计法和组

织学方法,系统研究了不同年龄小体鲟(*Acipenser ruthenus*)血清卵黄蛋白原、血清钙离子含量与卵巢发育变化的关系。(齐茜等,2009)。张艳珍等2009年对不同年龄段中华鲟血清中的卵黄蛋白原进行了测定,发现低龄中华鲟VTG含量偏低,最低值在5龄,随后增加,成熟后达到最大。雌性个体在II~V期VTG的含量增加,II~III期增加速度较快,V期达到最高水平,VI期降低;而雄性个体在II~IV期VTG的增加量很少,IV期达到最高水平。繁殖雌鱼产前VTG含量最高,产后低于产前。此外,发现产后鲟鱼卵巢液中含量低于其血清中含量,但高于其他年龄组血清中的水平(张艳珍等,2009)。

1.4.4 研究卵黄蛋白原的意义

卵黄蛋白原是一种特异性蛋白,是几乎所有卵生动物卵黄蛋白的前体。最初是Pan等1969年对雌性昆虫血淋蛋白的特称,后来被广泛应用。后来把雌性个体血浆这种特异蛋白描述为卵黄蛋白原,其是含脂、磷、糖的大分子蛋白。提供动物胚胎发育,以及促进卵母细胞生长发育的营养性物质,如碳水化合物、氨基酸、维生素、脂肪、硫、磷,还有一些微量元素。后来随着进一步研究,VTG还具有其它一些生物学功能,如促进卵母细胞分化,除含糖、磷等营养成分,VTG还可携带卵母细胞外的金属离子,如锌、铁、钙、镍等,并将其运输至细胞内(张年国等,2007)。卵黄蛋白原与鱼类发育密切相关,它不仅为胚胎时期的鱼类提供营养物质,对鱼类性成熟也至关重要。一般情况下,鱼类中VTG存在成熟雌性个体中,雄鱼和幼鱼表达量较少或不表达。但如果存在外源性刺激,如外源性雌激素,或者与雌激素有相同功能的化学物质,此时雄性VTG可能会启动。一般鱼类中卵黄蛋白原是在肝脏合成,然后经过血液,运输到卵巢中,卵母细胞通过微泡饮或者内吞等细胞活动吸收,在卵母细胞内加工成卵黄蛋白,最后沉积成卵黄颗粒(Chen et al., 1997),为将来受精后的胚胎发育做营养和能量准备。卵黄蛋白原不仅被认为是一种理想的雌激素和类雌激素标志物,近年来被广泛应用于环境的内分泌干扰物的筛选及环境毒理、污染调查等研究中(周庆祥等,2003)。并且卵黄蛋白原结构在许多动物中相对保守,所以研究和比较不同动物卵黄蛋白原结构和基因序列,可以进一步确定动物在系统发育中的分类学地位。

1.5 本研究的目的是和意义

目前世界上现存的鲟形目鱼类共27种,其中6种处于易危状态,17种处于濒危或极危状态,少数几种处于近危或无危。我国长江流域分布的达氏鲟、中华鲟、白鲟处于极危或濒危状态,如何有效地保护这些珍稀濒危鱼类在我国乃至全世界范围内

都引起了广泛关注。近年来由于长江水域环境污染以及水利工程的建设等人类活动的影响对中华鲟物种生存构成了进一步的威胁。目前对中华鲟关注较多，研究的内容较广，但对中华鲟卵黄来源以及整个卵子发生过程还没有深入研究。目前养殖中华鲟已到12龄，已有的研究是主要集中在早期发育时期，陈细华2004年在其博士论文中主要对中华鲟性腺进行了组织观察，但受试验材料限制只做到5-6年龄即II期性腺阶段。而据研究报道，中华鲟上溯洄游到长江中产卵繁殖期间是不摄食，并且整个产卵繁殖全过程长达15个月之久，在这期间中华鲟是如何维持其卵母细胞营养来源来促进对卵母细胞发育至成熟期。动物卵子的卵黄形成为后续的个体发育提供物质和能源，卵黄的合成、集聚、多寡、分布以及组分等对其胚胎和幼体发育至关重要，卵黄不仅是受精卵所必需的营养物质的能量来源，而且在动物的发育中起着重要的作用，卵黄的发生不仅涉及卵母细胞内部的物质和生理变化，而且可能与亲鱼的营养供给、滤泡细胞作用的复杂过程有关。虽然据新闻报道中华鲟全人工繁殖已于2009年取得成功，但其对养殖条件下中华鲟能够成熟的机制尚未研究，本研究主要对中华鲟1龄-10龄鱼卵黄积累过程进行研究，目前性腺发育处于II期，但有些已有向III期启动的趋势，这为人工养殖条件下能够实现中华鲟全人工繁殖的提供理论基础。本论文对中华鲟卵黄积累的过程进行了电镜观察，并研究在其不同年龄段，不同组织，不同性别中华鲟VTG基因表达量的变化，为了解中华鲟卵子成熟过程以及为实现中华鲟全人工繁殖研究积累理论数据。并且中华鲟作为最古老的脊椎动物之一，在分类中占有重要地位，研究卵黄蛋白原可与其他鱼类以及更高等动物进行对比，进而从基因水平阐释中华鲟特殊的进化地位。

第二章 养殖中华鲟性腺的组织学

2.1 前言

中华鲟是我国特有种，具有典型江海洄游性鲟鱼之一，在淡水中繁殖在海水中生长，长期以来，我国缺乏规模化的人工养殖中华鲟群体，而且性成熟时间较长，其雌性初次性成熟年龄达 14~26 年。葛洲坝截留后，柯福恩等人观察到坝下中华鲟产卵群体性腺退化现象，《长江鲟鱼类生物学及人工繁殖研究》一书中曾对中华鲟性腺发育的全过程进行了分期描述，但都是基于肉眼观察，陈细华等曾对早期养殖中华鲟性腺发生与分化组织学进行过研究，发现 9 月龄性腺出现组织学上的两性分化，但对中华鲟性腺发育过程缺乏系统和深入了解。

本实验通过石蜡包埋切片的方法对各年龄段中华鲟性腺发育程度进行了研究，以了解目前养殖条件下中华鲟性腺发育状况，为后面章节中中华鲟电镜观察卵黄发生过程及对中华鲟卵黄蛋白原合成位点分析提供参照资料。

2.2 材料与方法

2.2.1 材料来源

样品来源：2008 年 6 月至 2009 年 12 月长江水产研究所中华鲟养殖基地、北京海洋馆、厦门中华鲟繁育保护基地养殖的中华鲟组。

取样方法：通过腹部外科手术活体采样获取性腺组织样品（陈细华等，2004），切取小块性腺组织，所得样品放入波恩氏液保存。由于中华鲟比较珍贵，为尽量减少鱼体受到影响，部分高年龄段中华鲟未获取性腺组织。

此外，我们获得了一尾野生中华鲟成熟雌鱼的性腺组织。野生中华鲟来自 2005 年 11 月产卵后，2009 于北京海洋馆再次成熟的野生中华鲟，性腺组织为 IV 期雌性中华鲟的卵粒，取材方法为用挖卵器挖取，后经波恩氏液、酒精及戊二醛（电镜取样）固定保存，以用于鉴别中华鲟发育程度、发育时期以及卵子质量等。

2.2.2 组织切片方法

采用石蜡包埋切片方法：通过外科手术获取性腺后经波恩氏液固定，24 小时后经各梯度乙醇脱水，在二甲苯中透明 2 小时，60℃恒温箱中透蜡 3 小时，包埋、切片后，用苏木精-伊红染色法染色，Euparal 树胶封片，光学显微镜观察拍照。具体

步骤如下:

取材与固定: 通过外科手术获取性腺后经波恩氏液固定

脱水透明: 由低浓度到高浓度酒精作脱水剂, 逐渐脱去性腺组织中的水份。再将性腺组织放入的透明剂二甲苯中透明, 二甲苯的目的是置换出性腺组织的中酒精。

浸蜡包埋: 将透明过的性腺组织放入已溶化的石蜡中, 放入 60℃ 恒温箱中。待石蜡完全浸入性腺组织中后进行包埋, 将溶化了的石蜡放入已预先制备好的容器内, 将已浸透石蜡的性腺迅速放入其中。待石蜡冷却凝固成块放入切片机上切成薄片。

切片与贴片: 将包埋好的蜡块固定于切片机上, 切成薄片, 一般为 5-8 微米厚。切下的薄片再放到加热的水中烫平, 再贴到载玻片上, 放 45℃ 恒温箱中烘干。

脱蜡染色: 常用 HE 染色。染色前, 须用二甲苯脱去切片中的石蜡, 再经由高浓度到低浓度酒精, 最后入蒸馏水, 就可染色。

HE 染色过程是: 将已入蒸馏水后的切片放入苏木精水溶液中染色数分钟。酸水及氨水中分色, 各数秒钟。流水冲洗 1 小时后入蒸馏水片刻。70% 和 90% 酒精中脱水各 10 分钟。酒精伊红染色液染色 2—3 分钟。

脱水透明: 染色后的切片经纯酒精脱水后再经二甲苯透明。

封固: 将已透明的切片滴上 Euparal 树胶封片。

石蜡包埋切片封片后, 在 Leica 显微镜下观察, 判定性别, 对中华鲟雌性个体发育时相进行分期、后直接连接计算机拍照。

2.3 结果

2.3.1 养殖中华鲟生长情况

从表 2.1 中可以看出, 中华鲟体长、体重增长与年龄成正相关。目前最大的个体为一尾 1997 年出生的雄鱼, 取样时其年龄为 12 龄, 其全长、体长、体重分别为 183cm、144.5cm 及 40.4kg。

大部分鲟科鱼类雌鱼性成熟在 9-17 龄, 而中华鲟雌性个体初次性成熟年龄需要 14-26 年。通过表 2.1 测量的中华鲟基本生物学指标也可以发现, 在目前养殖条件下, 各中华鲟基地养殖的中华鲟从基础生物学指标上就反映出目前的养殖中华鲟距离性成熟还是有一定差距。

表 2.1 不同年龄中华鲟生物学指标及发育情况

Tab. 2.1 Chinese Sturgeon of different ages in the experiment

年龄 (year) age	样本数 (n)Num.	生物学指标(X±SD) Biological indexes			可知的发育情况 Knowable developmental condition	
		平均全长(cm) Average TL	平均体长(cm) Average BL	平均体重(kg) Average BW	性别及数量 sex and Num.	发育期/尾数 Development stage/specimen Num.
1	4	69.75 ±2.75	59.38 ±2.39	1.58±0.22	♂2, ♀2	I /2
2	2	90±11.31	72±9.9	3.08±1.17	♂1, ♀1	I /1
3	4	120±12.3	98.75±10.81	10.44±7.74	♂2, ♀2	II/2
4	4	149±17.03	124.25±14.24	23.79±12.93	♂2, ♀2	II/2
5	6	152.5±10.19	128±8.05	22.5±5.99	♂2, ♀4	II/4
6	2	152.5±7.78	127±9.9	21.15±4.6	♀2	II/2
7	2	174±1.41	143±4.24	36.5±12.3	♂1, ♀1	II/1
8	2	210.5±2.12	170.5±6.36	56.85±6.86	♀2	II/2
9	5	190.4±13.85	159.6±10.74	42.2±6.77	♂2, ♀3	II/2; II末/1
10	94	199±13.58	166.42±12.1	57.6±7.4	♂51, ♀43	II-II末
12	1	183	144.5	40.4	♂1	---
野生 成熟	1	360	310	327	♀1	IV/1

2.3.2 养殖中华鲟性腺发育

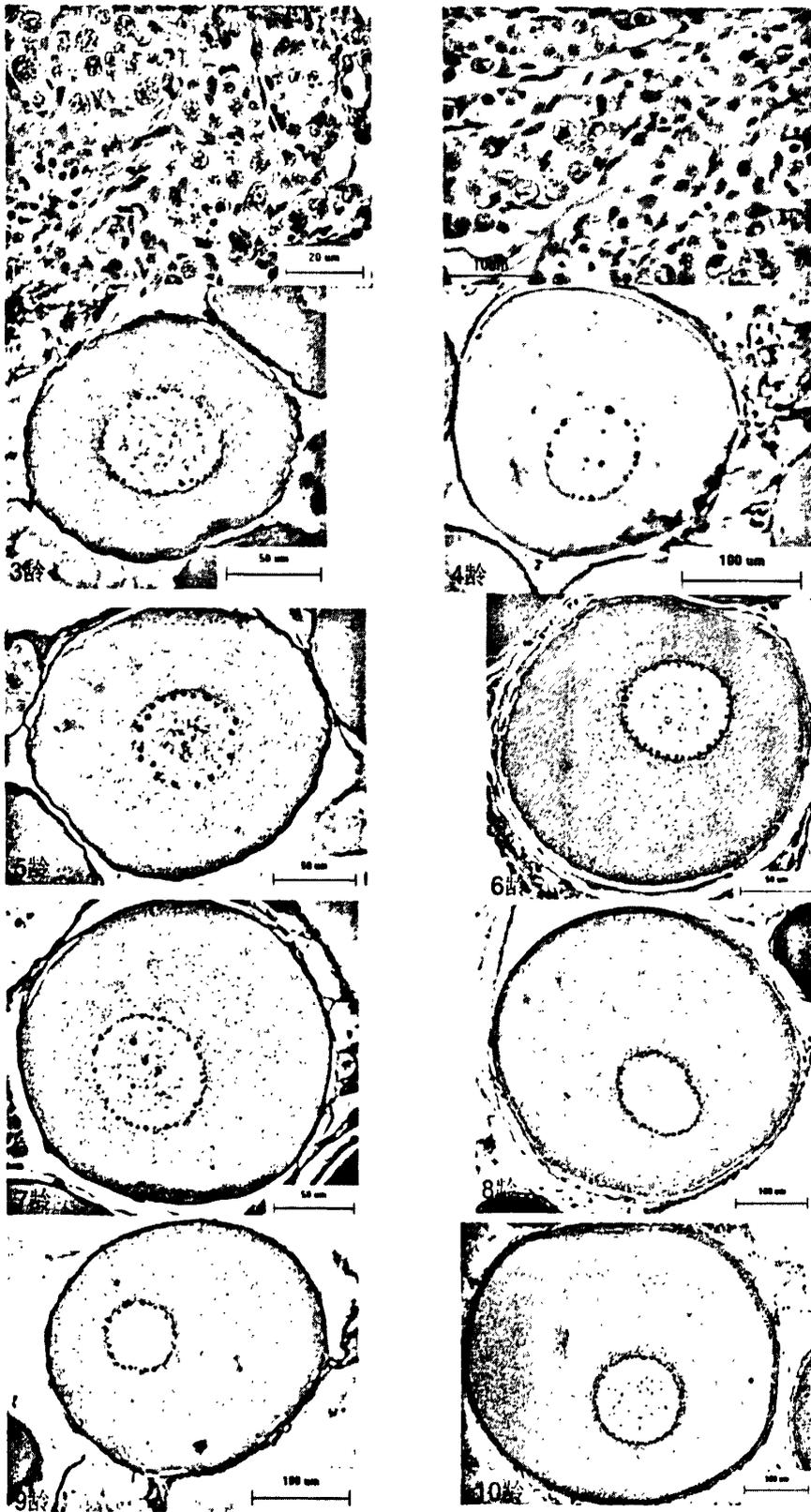
从性腺组织切片结果来看，目前养殖中华鲟仍未达到性成熟。10 龄雌性个体大部分处于性腺发育 II 期末，只有一尾在北京海洋馆产后再次发育成熟的野生雌性中华鲟发育至 IV 期中，其余养殖中华鲟均未达到性成熟。通过组织切片未检测到性腺发育至 III 期养殖中华鲟。基于中华鲟比较珍贵，有些年龄未进行雌性中华鲟（如 1997 年）的外科手术，因此无法鉴定该年龄段中华鲟性腺发育状况，并且对大多数高年龄段的中华鲟很多没有进行肝脏等其他组织的取样。

通过观察各年龄的中华鲟性腺组织切片（图 I）发现，低年龄段（1 龄及 2 龄）细胞中，细胞核占据细胞的大部分，细胞内正进行卵原细胞的有丝分裂。3 龄中华鲟卵母细胞中，卵原细胞已发育至卵母细胞，细胞中细胞核占据细胞的一半以上。卵径在 50-100um 之间。4 龄-7 龄卵母细胞中，核径与卵径比约为 1/4-1/3 之间，卵母细胞卵径约为 80-240um。高年龄段（10 龄）中华鲟雌性个体的卵母细胞最大直径已经达到约 500µm，并且绝大部分在 200-400µm，细胞核仁增多。通过观察发现这些卵母细胞外围均披有一层滤泡膜，并且其放射带明显增厚，在个别极少数卵母

细胞外围出现两层，这些都显示目前养殖条件下高年龄的中华鲟发育正常且已发育到Ⅱ期末期，随着体长体重增加有望达到下一发育时期。通过组织切片图版仔细观察还可以发现，2龄及低于2龄的中华鲟性腺发育为Ⅰ期，整个性腺细小、透明状，卵母细胞成线状，细胞核占据细胞大部分，并可见细胞分裂各期，也可观察到早期初级卵母细胞。2龄-5龄为中华鲟性腺发育为Ⅱ期早期，肉眼可辨识雌雄，经波恩液浸泡后更可清晰判断，组织切片后光镜观察可见一个个初级卵母细胞，5龄以后细胞外出现一层滤泡细胞，到10龄时部分卵母细胞直径明显增大，可以判定已进入Ⅱ期末期，经波恩液浸泡后可见白色小卵粒，出现卵黄颗粒的生成，但此年龄段主要还是以Ⅱ期时相细胞为主。

2.4 讨论

中华鲟是我国一级保护动物，对其性腺发育状况的研究对于今后养殖过程中的亲鱼培育、催产、采卵等工作提供理论指导。大多数硬骨鱼类性成熟是在3-5龄，大部分的鲟鱼鱼类雌鱼性成熟在9-17龄（曲秋芝等，2004）。首次产卵后，硬骨鱼的卵巢发育周期为1年，鲟科鱼类卵巢发育周期为3-6年。自然水域中的中华鲟雌性成熟年龄为14-26年（陈细华等，2004），曾有学者对中华鲟性腺发育的全过程进行过分析描述（陈细华等，2004）。本文受材料限制主要对养殖中华鲟1-10龄进行了组织切片，通过组织切片观察目前2龄及2龄以下中华鲟性腺发育为Ⅰ期；2-10龄中华鲟性腺发育处于Ⅱ期，有些10龄鱼中性腺发育可能达Ⅱ期末期。本实验中华鲟生长发育至9月龄时才能区分雌雄性别，与2004年陈细华等人做的早期中华鲟性腺分化结果一致，通过组织切片发现中华鲟性腺发育至10龄时有些个体性腺已发育至Ⅱ期末期，有望进一步发育至Ⅲ期。本实验的主要目的是为后面中华鲟卵黄发生和卵黄蛋白原合成位点分析提供发育状态依据。



图版 I 卵巢组织切片图

Plate I the ovaries of different ages

第三章 中华鲟卵黄发生超微结构观察

3.1 前言

中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 是一种典型的江海洄游性鱼类, 1988 年被列为我国国家一级重点保护动物, 1994 年被 IUCN 名录列为濒危级物种。对于鲟形目鱼类性腺的发生过程, 前苏联 Dettlaff 和 Ginsburg 曾对小体鲟进行过描述 (Dettlaff et al, 1958), Omoto 等 2001 年对高首鲟的性腺发育进行了组织学观察 (Omoto et al., 2001), 2004 年陈细华等对养殖中华鲟的性腺发生进行了组织学观察 (陈细华等, 2004), 但中华鲟卵子发生的超微结构研究尚未见报道。对于卵子发生过程中卵黄物质形成的研究, 有助于掌握中华鲟性腺成熟及发育规律。卵黄物质是动物胚胎发育中重要营养来源, 国内外学者对硬骨鱼类初级卵母细胞发育过程中的卵黄发生、滤泡细胞、卵膜结构及变化做过大量研究, 主要探讨了卵母细胞在卵黄发生过程中的功能和作用 (Ravagli et al, 2002; 魏刚等, 2003; 方永强等, 1995; Miranda et al, 1999)。本研究对中华鲟早期卵子发育过程进行了显微和超微结构观察, 研究中华鲟卵黄发生的过程, 有助于了解中华鲟性腺发育规律以期为微观中华鲟卵子发育分期提供科学依据, 丰富中华鲟繁殖生物学内容, 指导中华鲟全人工繁殖技术。

3.2 材料与方法

3.2.1 各年龄中华鲟来源

养殖中华鲟性腺组织来源于 2007 年 6 月至 2009 年 12 月长江水产研究所濒危物种保护中心中华鲟养殖基地、北京海洋馆、厦门中华鲟繁育保护基地, 共包括 12 个年龄组, 性腺组织样品主要通过腹部外科手术活体采样 (陈细华等, 2004) 取得, 取性腺切成小块, 在冷 2.5% 戊二醛中固定。中华鲟比较珍贵, 为尽量减少鱼受到影响, 部分年龄鱼未进行手术采取性腺组织。

此外, 我们获得了部分野生中华鲟成鱼的性腺组织。野生中华鲟来自 2005 年 11 月产卵后, 2009 年于北京海洋馆再次成熟的野生中华鲟, 性腺组织为 IV 期雌性中华鲟的卵粒, 取材方法为用挖卵器挖取, 戊二醛 (部分样品) 固定保存。

3.2.2 电镜切片方法

透射电镜超薄切片: 外科手术取性腺后, 在冷 2.5% 戊二醛中固定 4h 后至于 1% 锇

酸中后固定, 0.1mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 系列乙醇或丙酮梯度脱水, 乙醇或丙酮/Epon812 1:1 浸透 2-3h, 纯 Epon812 包埋, Leica Ultracut 超薄切片机切片后用醋酸双氧铀、柠檬酸铅双染色, JEM-1230 型电子显微镜观察, 照相。

具体步骤如下:

前固定: 冷 2.5% 的戊二醛固定 4 小时;

冲洗: 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 间隔 10 分钟;

后固定: 1% 锇酸固定 2 小时;

冲洗: 磷酸缓冲液冲洗 3 次, 间隔 15 分钟;

脱水: 50%、70%、80%、90% 100% 乙醇或丙酮梯度脱水, 间隔 10-15 分钟, 100%脱水两次, 间隔 20 分钟;

浸透: 乙醇或丙酮/Epon812 1:1 浸透 2-3 小时, 纯 Epon812 过夜;

包埋: 包埋于胶囊中, 60℃聚合 48 小时;

切片: Ultracut 超薄切片机切片;

染色: 醋酸双氧铀、柠檬酸铅双染。

观察: 电镜结果在JEM-1230型透射电子显微镜观察, 直接连接计算机照相。

3.3 结果

通过中华鲟卵巢组织切片结果显示, 所取中华鲟卵巢属 I - II 期, 即卵原细胞时期和小生长期。

3.3.1 卵原细胞的结构特征

光镜观察中华鲟第 I 时相的卵原细胞, 此时已经进入第一次成熟分裂前期联会丝复合体期的粗线期 (pachytene stage), 细胞呈椭圆形或卵圆形, 体积很小, 被一层质膜包裹, 细胞质染色较深, 核内同源染色体配对变粗 (图版 II-1)。透射电镜观察结果与光镜观察结果一致, 中华鲟卵原细胞紧靠基底膜, 细胞为椭圆形, 体积很小, 核占据整个细胞的大部分, 核周间隙明显, 核内分散有染色质较深的细小颗粒。细胞质中细胞器发育较差, 高尔基体高度不发达, 仅见少许分散存在的高尔基体液泡。此时期线粒体发达, 数量较多, 基质电子密度较高 (图版 II-2)。随着粗线期结束, 联会丝复合体消失, 卵原细胞进入第一次成熟分裂前期的双线期 (diplotene stage), 然后发育为早期初级卵母细胞。

3.3.2 早期初级卵母细胞的结构特征

早期卵母细胞是从第一次成熟分裂前期的双线期之后至卵黄发生前期 (小生长

期), 光学显微镜观察为中华鲟第Ⅱ时相的卵母细胞, 此时相细胞形状为卵圆形, 细胞核卵圆形, 细胞质中可见内质网及高尔基体, 核仁沿核周贴近核内膜分散分布, 数目较多, 都超过 10 个以上, 电子染色较深, 为高电子密度, 核内可见分散的染色质(图版Ⅱ-3)。此时期的超微结构特点是胞质中核仁样体(nucleolus-like bodies)或称类核周体或称卵黄核(yolk nucleus), 是由电子致密纤维和颗粒物质所组成, 电镜观察到卵黄核最早出现在胞质中是在卵原细胞尚未进入成熟分裂, 位于核膜基部, 其呈卵圆形, 与线粒体的位置非常靠近(图版Ⅱ-4), 随着早期卵母细胞进一步生长发育, 胞质中卵黄核由大变小, 并开始逐渐消失, 线粒体数量增加(图版Ⅱ-5)。电镜下还可观察到电子染色深的大颗粒物质在球状体内呈有规则的聚集, 线粒体数目较卵黄核多, 且分布多集中在卵黄核周围(图版Ⅱ-5)。部分线粒体形状不规则, 从一侧开始松弛缩细, 且基质密度较低, 缩细出现缢痕, 在线粒体变形部分周围可见较多空泡(图版Ⅱ-5)。初级卵母细胞细胞膜外结缔组织较厚, 有电子染色较深的物质组成。

3.3.3 后期初级卵母细胞的结构与卵黄发生的机理

光镜下观察卵母细胞体积增加, 核内核仁增大, 数量略有增加, 沿核内膜分布(图版Ⅱ-6)。透射电镜下观察后期的初级卵母细胞超微结构发现, 此期卵母细胞体积逐渐增大, 近圆球形, 由于卵黄合成致使其体积增大, 本时相为卵黄发生前期卵母细胞, 其中内质网、核糖体等细胞器已活跃参与了卵黄物质的合成(图版Ⅱ-7)。此时在初级卵母细胞质膜内已看不见卵黄核。

3.3.3.1 内质网是内源性卵黄形成的主要细胞器

在卵黄发生前期卵母细胞胞质内, 粗面内质网较发达, 多呈管状, 腔内含高电子密度的卵黄颗粒, 随后内质网不断膨大, 断裂, 生成许多小内质网囊泡(图版Ⅱ-7)。小囊泡不断融合形成大的内质网囊泡, 大囊泡内卵黄颗粒继续聚集、融合形成网状卵黄粒, 直至充满整个囊泡状粗面内质网(图版Ⅱ-8)。粗面内质网另一变化就是管状内质网卷曲, 融合, 形成环状粗面内质网。环状粗面内质网腔内合成、沉积环状卵黄粒。粗面内质网还积极地参与了脂滴的形成, 脂滴即可以在卵黄沉积物中形成也可以在整个囊泡状内质网中演变为脂滴(图版Ⅱ-9)。滑面内质网通过表面附着核糖体而演变成粗面内质网和与粗面内质网相互融合这两种方式参与内源性卵黄的形成。

3.3.3.2 线粒体活跃参与卵黄的形成

线粒体的主要作用是维持卵母细胞呼吸代谢, 为内源性和外源性的卵黄发生提供能量(图版Ⅱ-10)。线粒体主要通过两种方式直接参与内源性卵黄形成(1)衰老线粒体与初级溶酶体发生融合形成自噬泡而被消化, 营养物质沉积于泡内逐渐演变

为卵黄粒或释放到胞质中参与内源性卵黄的发生(图版 II-11)(2)部分线粒体解体、嵴和内膜消失,形成空泡,空泡内沉积高电子密度的颗粒并聚集成卵黄颗粒(图版 II-12; 13)。

3.3.3.3 核糖体参与内源性卵黄的形成

细胞质中含有大量核糖体,有些核糖体是以游离状态存在的,这种游离型核糖体上可合成电子致密度较高的细颗粒,这些颗粒相互聚拢成小团后进入囊泡,与囊泡结合,由小变大(图版 II-11),有的聚合成多聚核糖体参与到内源性卵黄发生,其合成的卵黄蛋白质达到一定浓度即在细胞质中形成卵黄颗粒(图版 II-14)。

核糖体参与内源性卵黄形成的另一重要方式就是作为与粗面内质网结合参与到内源性卵黄发生(图版 II-15)。

3.3.3.4 高尔基体与卵黄发生

中华鲟卵黄发生卵母细胞的细胞质中高尔基体细胞器极不发达,仅见个别较典型的高尔基体细胞器,可见一些高尔基体小泡与粗面内质网靠近,发生融合参与到卵黄颗粒的形成(图版 II-16, 8)。

3.3.3.5 细胞膜参与外源性卵黄的形成

外源性卵黄物质主要通过质膜的微吞饮作用和微绒毛的吸收租用进入卵母细胞,然后相互融合、扩张、形成卵黄粒或与细胞内已有卵黄粒发生融合而参与到卵黄发生。细胞膜能直接从卵母细胞外界环境中吸收部分营养物质参与外源性卵黄发生过程(图版 II-17, 18)。

3.4 讨论

3.4.1 卵原细胞和卵母细胞的区分

在光镜下很难区分中华鲟卵原细胞和早期初级卵母细胞,二者形态相似,均具有一个核仁。在卵原细胞中只能观察到线粒体,而在卵母细胞中除线粒体外,还可以发现参与卵黄合成的重要细胞器,如内质网和高尔基体等,这一结果与徐革峰、Grier 等人对卵母细胞时期特征的描述一致(徐革峰等, 2007; Grier, 2000)。中华鲟性腺发育从性腺分化到早期初级卵母细胞期间都没有卵黄发生的迹象,这就表明中华鲟早期卵母细胞发育不充分,外部结构及内部细胞器发育不完善。这与徐革峰(徐革峰等, 2007)细鳞鱼电镜观察的结果一致。Azevede 用电镜技术结合放射自显影技术,观察到剑尾鱼卵原细胞进入第一次成熟分裂前期各个时期卵黄核在胞质中分布与线粒体的关系,这种关系可作为划分早期卵母细胞不同发育时期的形态学依据

(Azevedo,1984)。本文根据类核周体即卵黄核在细胞质中分布以及与线粒体的关系来区分,在早期初级卵母细胞中可见卵黄核存在于细胞质中,并且周围有多个线粒体,随着早期卵母细胞进一步生长发育,胞质中卵黄核由大变小,并开始逐渐消失,而在后期初级卵母细胞时期,卵黄核在胞质中消失,存在于放射膜外且与线粒体不相联系,这与方永强(方永强等,2001)等人对鲮鱼的观察结果相似。

3.4.2 内源性卵黄发生和外源性卵黄发生

根据 Droller 和 Roth 对虹鳞卵黄形成的电镜观察发现,他们将卵黄的来源分为内源性和外源性卵黄两种,而且认为内源性卵黄是指由卵母细胞自身合成产生的,外源性卵黄是指在卵母细胞外其他细胞器合成后转运到卵母细胞内而形成的(Droller et al,1966)。内源性卵黄首先在内质网上合成后在高尔基体进行加工和修饰,在中华鲟早期卵母细胞中能够观察到卵黄物质的内源性积累,这在我们对中华鲟中卵黄蛋白原合成位点分析中也得到了印证(甘芳等,尚未发表)。本研究通过电镜观察中华鲟卵子发生过程,发现最初形成的卵黄核与线粒体的变化有关,此时的线粒体从一端开始松弛缩细,基质密度降低,缩细处出现缢痕,并且在其变形部分形成空泡,而后线粒体膜向一侧突出形成突出泡,突出泡与线粒体脱离后形成球状的卵黄核。这与王爱明对莫桑比克非鲫、魏刚等对大鳍鱠以及等张贤芳对圆口铜鱼在电镜下观察其卵黄核的形成相似(王爱民,1994;魏刚等,2004;张贤芳等,2006)。卵黄核是多种细胞器(线粒体、高尔基体、内质网等)形成、增殖和聚集的中心,主要是由线粒体组成。在线粒体大量增殖后和外源性卵黄开始积累前,卵黄核逐渐扩散或溶解到细胞质中。Pfanestiel 等认为卵母细胞质膜中微卵黄物质是通过内吞而进入卵母细胞膜的(Pfanestiel et al.,1982)。Landim 等认为外源性卵黄是经血液循环运送到卵巢后,先通过滤泡细胞间隙,然后通过卵母细胞表面的微绒毛作用被吸收(Cruz-Landim et al.,2001)。Amor 等认为外源性卵黄来源于滤泡细胞并积累在两质膜空隙间(Amor et al.,2004)。中华鲟外源性卵黄来源于其他硬骨鱼类一样,是由卵黄前体-卵黄蛋白原在肝脏中合成后,经血液循环运输到卵巢,这在分子实验中对中华鲟卵黄蛋白原合成位点分析也得到印证,在颗粒细胞层经加工修饰成颗粒物质,再通过质膜间隙到达卵母细胞膜,最后通过微泡饮作用被卵母细胞吸收。来自外源的卵黄蛋白原进入已囊泡化得线粒体后,积累、粘合形成小的致密颗粒,再聚集到同心多层膜形成的泡体内,形成卵黄前体,后经过不断积累形成卵黄颗粒,最后不断融合形成更大的卵黄粒,随机分布在卵母细胞质中,最后充满整个细胞质。

图版 II 说明

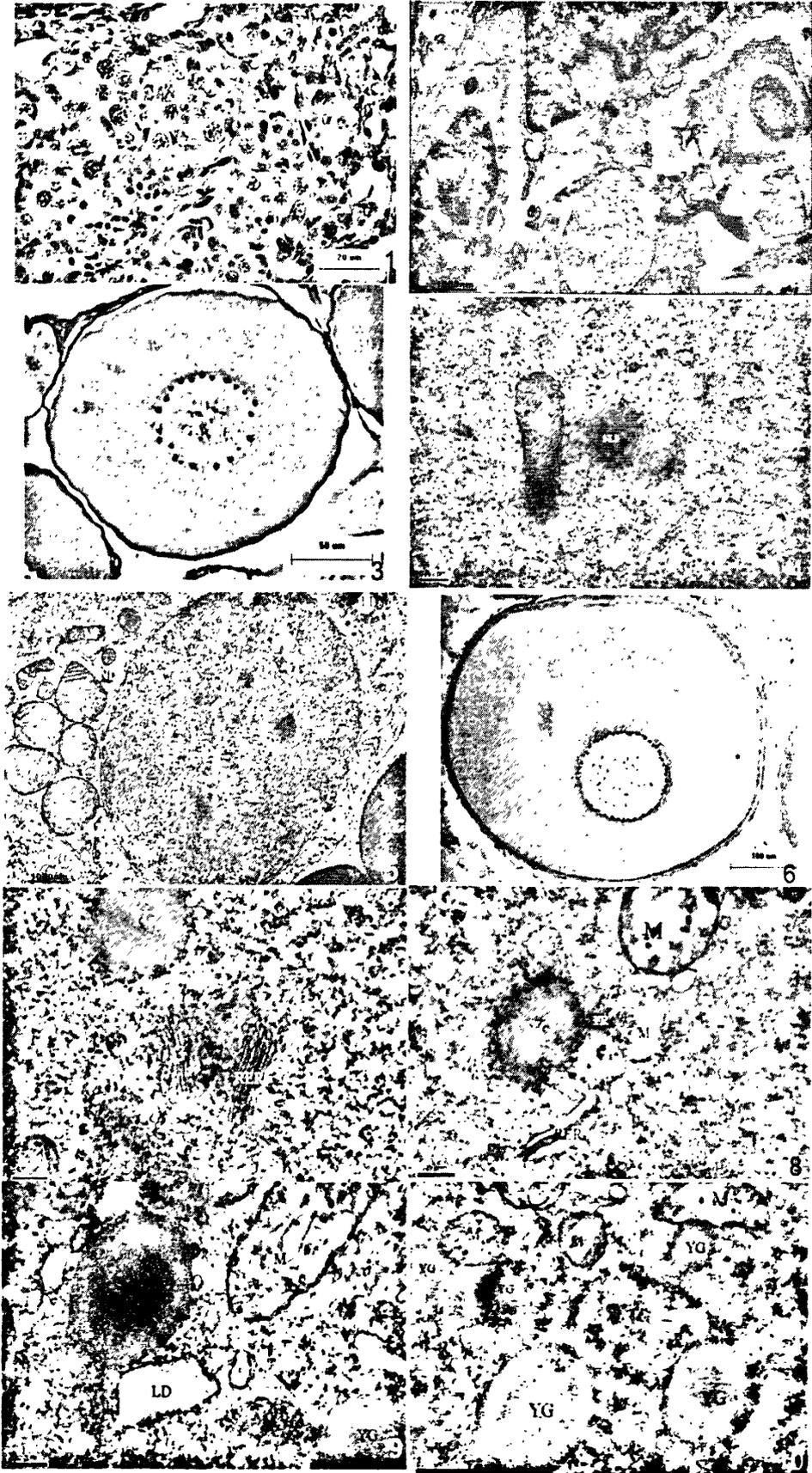
OG: 卵原细胞; N: 细胞核; M: 线粒体; OOC: 卵母细胞; Nu: 核仁; NLB: 类核周体(卵黄核); G: 高尔基体; np: 核孔; ne: 核膜; YG: 卵黄粒; LD: 脂滴; RER: 粗面内质网; R: 核糖体; FR: 游离核糖体; Gve: 高尔基体小泡; ZR: 放射带; Fc: 滤泡细胞; ER: 内质网; Er: 内质网小泡; fn: 扁平细胞核; fe: 滤泡上皮; mv: 微绒毛; th: 鞘组织。

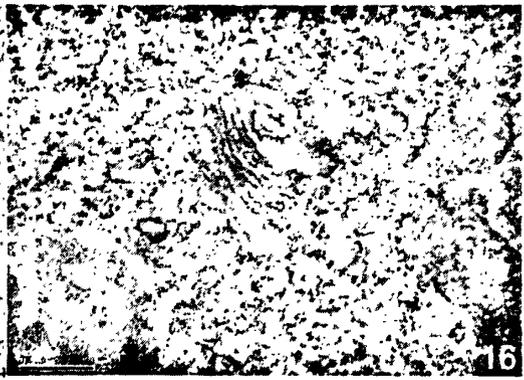
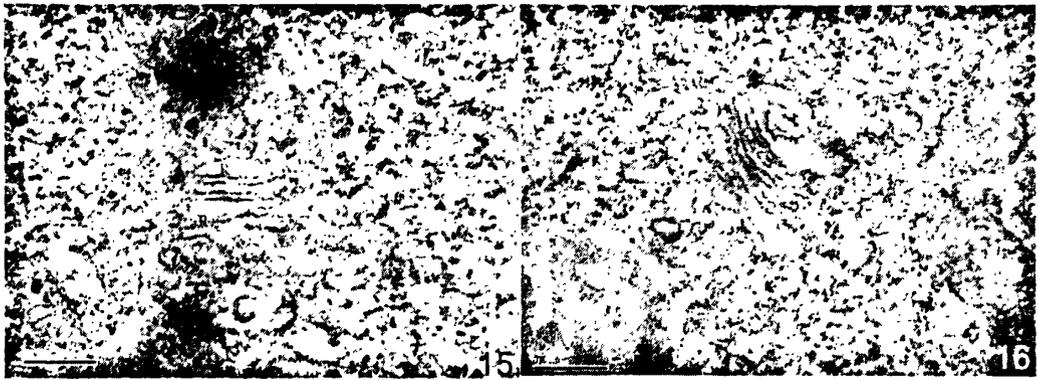
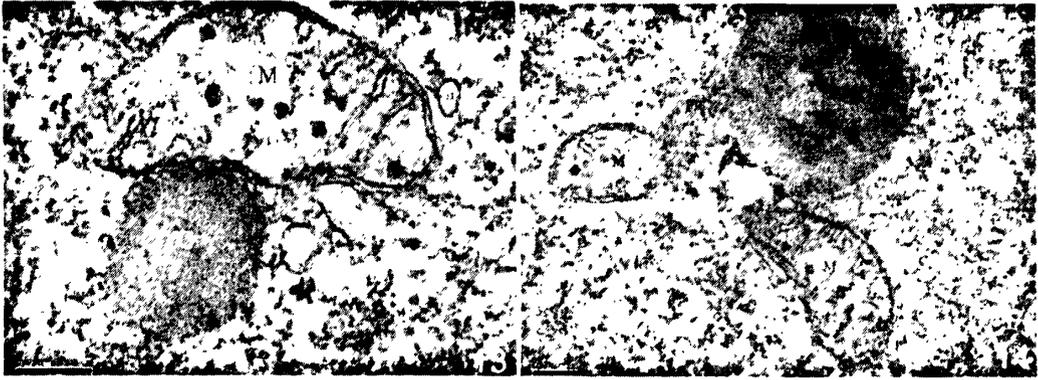
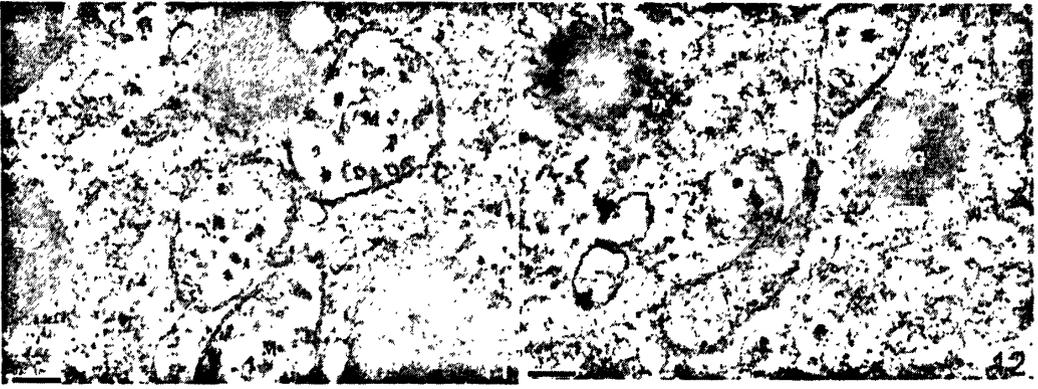
OG: Oogonium; N: Nucleus; M: Mitochondrion; OOC: Oocyte; Nu: Nucleoli; NLB: Nucleoli-like body; G: Golgi; np: nuclear pore; ne: nuclear envelope; YG: Yolk granule; LD: Lipid droplets; RER: Rough endoplasmic reticulum; R: Ribosome; FR: Free Ribosome; Gve: Golgi vesicle; ZR: Zona radiata; Fc: Follicle cell; ER: Endoplasmic reticulum; Er: Endoplasmic reticulum vesicle; fn: flattened nucleus; fe: follicular epithelium; mv: microvilli; th: thecal tissue

1.第 I 时相卵原细胞×100; 2.电镜下卵原细胞, 可见细胞核和线粒体×8000; 3.早期初级卵母细胞×20; 4.早期初级卵母细胞中出现了类核周体×40 000; 5.早期初级卵母细胞可见核、线粒体以及与胞质相连的核孔, 类核周体逐渐变小×8000; 6.后期初级卵母细胞可见核、核仁×20; 7.后期卵母细胞参与卵黄发生的细胞器, 高尔基体与粗面内质网相互靠近, 参与到卵黄颗粒的形成×50 000; 8.参与卵黄发生的粗面内质网, 不断生成囊泡参与卵黄合成, 可见游离核糖体参与卵黄合成×50 000; 9.囊泡装内质网参与脂滴合成×50000; 10.大量线粒体直接参与内源性卵黄合成×30000; 11.线粒体慢慢衰老成空泡变为卵黄粒并不断融合的过程×50 000; 12.解体的线粒体参与卵黄粒合成×50 000; 13.解体的线粒体, 嵴消失, 变成空泡参与卵黄粒的形成×80 000; 14.游离的核糖体进入解体后成囊泡的线粒体, 参与到卵黄粒的合成×50 000; 15.核糖体与内质网结合形成粗面内质网×80 000; 16.参与卵黄颗粒形成的高尔基以及高尔基小泡×80 000; 17.通过微泡饮作用吸收外源性卵黄物质, 可见微绒毛、滤泡细胞、放射带以及鞘结缔组织×10 000; 18.进一步放大的滤泡细胞, 微绒毛×40 000

1.Oogonium in phase I ×100; 2. nucleus and mitochondrion were observed in Oogonium by electron microscope ×8000; 3. Early primary oocyte ×20; 4. Nucleoli-like body appeared in early primary oocyte ×40 000; 5. Nucleus, mitochondrion and nuclear pore connected with the cytoplasmic were observed in early primary oocyte, Nucleoli-like body became smaller and smaller×8000; 6. Nucleus, nucleoli were observed in late primary oocyte×20; 7. In the organelle of late primary oocyte which involved in vitellogenesis, Golgi and rough endoplasmic reticulum approach each other and involved in the formation of yolk granule×50 000; 8. Rough endoplasmic reticulum which involved in vitellogenesis continuously generated vesicles to participate yolk synthesis, free ribosomes involved in yolk synthesis were observed×50 000; 9. Vesicle-like endoplasmic reticulum involved in synthesis of lipid droplets×50000; 10. A large number of mitochondria directly involved in the synthesis of endogenous yolk×30000; 11.Mitochondria senesced slowly into vacuole, then turned into yolk granule, and kept merging ×50 000; 12.Disintegrated mitochondria involved in yolk synthesis×50 000; 13.Disintegrated Mitochondria, where cristae disappeared, turned into vacuole to participate the formation of yolk granules ×80 000; 14. Free ribosome entered into the vesicles disintegrated from mitochondria, and participated in the synthesis of yolk granules×50 000; 15. Ribosomes and endoplasmic reticulum combined to form rough endoplasmic reticulum ×80 000; 16. Golgi and Golgi vesicle involved in the formation of yolk granules ×80 000; 17. Exogenous yolk were absorbed via microendocytosis, microvilli, follicular cells, radiation belts, and connective tissue

were observed $\times 10\ 000$; 18. Further enlarged follicular cells, microvilli $\times 40\ 000$





第四章 中华鲟卵黄蛋白原合成部位研究

4.1 前言

卵黄蛋白原是一种普遍存在于卵生非哺乳动物血液中的蛋白,是几乎所有卵生动物中卵黄蛋白的前体。最初由 Pan 1969 年等对雌性昆虫血液淋巴蛋白的特称(Pan et al., 1969),后来广泛的把这种在卵生动物的卵黄形成过程中,雌性个体血浆中大量存在的含糖、磷、脂的大分子蛋白描述为卵黄蛋白原。在雌激素的作用下,由肝脏分泌进入到血液循环,被卵母细胞吸收后,加工为卵黄蛋白。一般认为肝胰腺和脂肪体是卵黄蛋白原的合成部位,但在甲壳动物中发现,卵巢也能进行卵黄蛋白原的合成(张成峰等, 2006)。鲟鱼作为原始的脊椎动物之一,有关鲟鱼卵黄蛋白原相关研究报道较少, Bidwell 1991 年曾对高首鲟通过有机硅橡胶植入产生雌二醇诱导卵黄发生,通过琼脂糖凝胶电泳和体外转译方法鉴定出高首鲟卵黄蛋白原 mRNA 为 5.7Kb 大小 (Bidwell et al, 1991)。Bidwell 和 Carlson (Bidwell et al., 1995) 测序出高首鲟卵黄蛋白原 cDNA 序列,并被用来研究高首鲟基因表达。Fujii 等和 Hiramatsu 等分别于 1991 年、2002 年对杂交鲟 Vg 及其 YPs 进行了研究。2008 年张颖等人利用凝胶柱层析、聚丙烯酰胺电泳等方法对施氏鲟卵黄蛋白原及其 3 种相关蛋白进行了研究。而齐茜 2009 年系统研究了不同年龄小体鲟血清卵黄蛋白原、血清钙离子含量与卵巢发育变化的关系。对于中华鲟卵黄蛋白原的研究仅见 2008 年张艳珍通过碱不稳定性蛋白结合磷法测定了不同年龄中华鲟血清中卵黄蛋白原的变化情况。而对中华鲟合成部位研究尚无人涉及,而中华鲟为我国特有珍稀濒危物种,对其卵黄蛋白原合成部位的研究为今后苗种培育、亲本饲养投喂等具有指导作用。本文采用 RT-PCR 方法初步检测不同年龄段卵黄蛋白原的合成部位,为研究中华鲟在淡水养殖能够成熟提供科学依据,同时进一步从分子水平阐述中华鲟的卵黄发生过程。

4.2 材料与方法

4.2.1 各年龄中华鲟来源

实验养殖中华鲟性腺组织来源于 2007 年 6 月至 2009 年 12 月长江水产研究所濒危物种保护中心中华鲟养殖基地、北京海洋馆、厦门中华鲟繁育保护基地,共包括 12 个年龄组,性腺组织样品主要通过腹部外科手术活体采样(陈细华, 2004)取得,部分中华鲟样本取肌肉、肝脏。

4.2.2 试验方法

(1) 石蜡切片的制作：同步进行的石蜡切片及组织学的观察见第二章；

(2) RT-PCR 分析：

总RNA的提取：取性腺、肝脏、肌肉切成小块约0.2~0.4g，立即放入装有1ml Trizol(Invitrogen)的匀浆器中，匀浆后放入无RNA酶的冷冻管中并在-20℃短暂保存带回实验室后提取不同年龄段性腺、肝脏样品中的总RNA，肌肉组织中的总RNA作为对照样品。用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA完整性，总RNA样品保存于-70℃超低温冰箱。

cDNA 第一链的合成：用 Promega 公司 M-MLV 反转录酶进行反转录扩增，得到的 cDNA 第一链，直接用于 PCR 扩增或保存于-20℃备用。

引物的设计及合成 从 GenBank 中查找到中华鲟卵黄蛋白原的片段 cDNA 序列，以中华鲟(AJ745099)卵黄蛋白原的 cDNA 的序列为主。序列如下：

```
AACATGCTGCAACTAACCATCAAGACCACACAGAATGTGTACGGTCTGCAGG
AGAATGGCATTGCAGGTATCTGTGAGGCAAGCTATGTCATCCAGGAAGACAGG
AAAGCTAATAAAATCATTGTCACAAAATCCAAAGATCTGAATAACTGCAACGAG
AAAATCAAGATGGATATTGGCATGGCTTATTCACATACATGCTCAAAGTGCAGAA
AGATTAGAAAGAACACCAGGGTACTGCTGCCTACACTTACATCCTGAAGCCCA
CAGACGCTGGCACTCTGATCACTCAAGCTACTTCACAGGAGGTGCACCAGCTCA
CTCCATTCAATGAAATGACTGGCGCTGCCATCACTGAAGCAAGGCAGAAGCTTG
TTTTGGAGGATGCTAAAGTAGTCCACGTAAGTCCAGAGCAAGAGTTAAAGA
ACCGAGGGTCTATTCAGTACCAGTTTGCCTCT
```

应用 Primer v5 软件在中华鲟卵黄蛋白原基因序列进行特异性引物设计，引物序列（预期产物 207bp）如下：

上游引物 (20nt, Tm=57.8℃)：5'-CTGCCTACACTTACATCCTG-3'

下游引物 (20nt, Tm=57.8℃)：5'-ACTGAATAGACCCTCGGTTG-3'

同时，以中华鲟 *β-actin* 作为内部扩增对照，根据中华鲟 *β-actin* 的 cDNA 序列设计引物如下：

上游引物 (20nt, Tm=57.8℃)：5'-GGTATTGTGATGGACTCTGG-3'

下游引物 (20nt, Tm=59.85℃)：5'-TTTCTCTCTCGGCTGTGGTG-3'

引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

RT-PCR 扩增：RT-PCR 扩增主要参照 Li et al (in press, available online)。首先确定 RT-PCR 反应的循环数：进行 10 个平行 PCR 反应，循环数 17-35 个不等，分别取 5 μL PCR 产物进行电泳分析，在线性扩增期内选取 33 个循环作为 RT-PCR 反应的循环数。随后，以 3 倍稀释的一链 cDNA 为模板，用特异引物进行扩增，PCR 反应体系 (25μL)：2.5μL 10 ×Taq Buffer，2μL 25mM MgCl₂，0.5μL 2.5mM dNTP，上游引物 (20μM) 0.5μL、下游引物 (10μM) 0.5μL，1μL cDNA 模板，0.5 μL Taq DNA Polymerase (1U /μL, Fermentas)。PCR 反应条件为起始 94 °C 变性 4min，接着 33

个循环: 94℃变性 30 s, 55℃退火 35 s, 72℃延伸 30 s。最后再于 72℃延伸 7min。取 5 ul PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 以 TaKaRa 公司的 DL2000 为标准参照。

4.3 结果

4.3.1 卵巢发育分期的观察

卵黄的形成是卵母细胞发生中极为重要的现象和过程, 因此基于卵巢的形态学观察及石蜡切片, 综合国内外其它学者对卵巢发育分期研究的基础上对进行实验的中华鲟个体进行了分期, 详细情况见第二章。

4.3.2 RT-PCR 结果

以中华鲟 5 龄性腺的 RT-PCR 产物为代表, 扩增的 PCR 产物回收、连接、克隆测序后得到的片段与 Genbank AJ745099 吻合, 相似度 100%。将提取的总 RNA 用于 RT-PCR 扩增 34 个循环, 比较了不同年龄段卵巢和肝脏卵黄蛋白原表达量的变化情况。不同年龄段卵巢和肝脏在 200bp 左右都有 PCR 产物出现, 且没有其他杂带出现, 对照组只有引物二聚体, 没有条带。

从中华鲟雌鱼性腺组织切片来看, 1 龄和 2 龄的中华鲟性腺发育为 I 期, 2-10 龄为 II 期, 部分 10 龄中华鲟性腺发育至 II 期末。通过分子学手段分析不同年龄段卵黄蛋白原表达含量变化可以得出如下结果:

4.3.2.1 不同年龄段中华鲟雌性个体卵黄蛋白原在性腺中表达含量的变化

从不同年龄段中华鲟雌鱼卵黄蛋白原扩增结果(图 4.1)可以看出, 不同年龄段均有扩增产物出现。在 ACTIN 亮度一致情况下比较不同年龄段扩增产物的相对亮度发现: 1 龄、2 龄卵巢发育时期出现较弱条带, 3-10 龄中华鲟卵黄蛋白原表达量呈不断增加趋势, 10 龄中华鲟表达量最强, 到 IV 期野生中华鲟表达量有所降低。

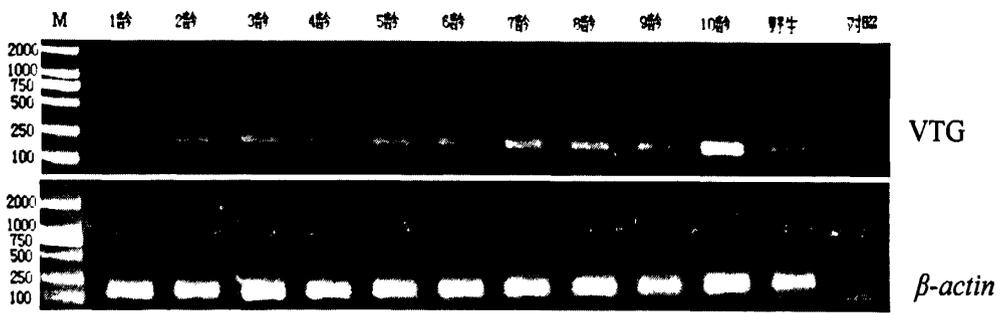


图 4.1 不同年龄段中华鲟雌性性腺中卵黄蛋白原 mRNA 表达量的变化

Fig 4.1 the expression of vitellogenin mRNA in different age of female Chinese sturgeon gonad

4.3.2.2 不同年龄段中华鲟雌性个体卵黄蛋白原在肝脏中表达量的变化

由于中华鲟为国家一级保护动物，并受传统观念影响，很难获取肝脏。所以由于受到材料等限制。只对 1-7 龄的中华鲟通过外科手术获取了肝脏，年龄大的中华鲟由于数量较少，更为珍贵，因此没有获取肝脏。通过对 1-7 龄鱼肝脏中卵黄蛋白原扩增结果可以看出（图 4.2），在 ACTIN 亮度一致的情况下，1 龄中华鲟雌性肝脏不存在卵黄蛋白原的表达，从 2 龄到 7 龄中华鲟肝脏中都存在卵黄蛋白原 mRNA 的表达，且各年龄段之间表达量没有明显差异。

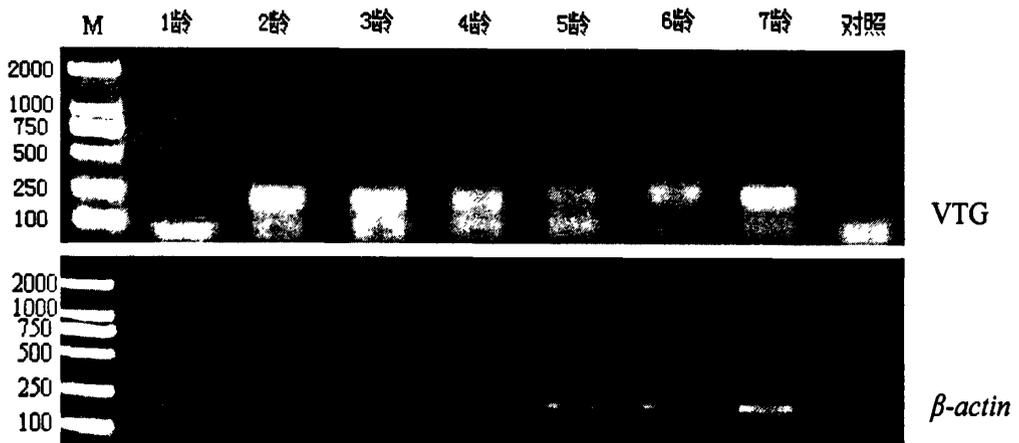


图 4.2 不同年龄段中华鲟雌性肝脏中卵黄蛋白原 mRNA 表达量的变化

Fig 4.2 the expression of vitellogenin mRNA in different age of female Chinese sturgeon hepatic

4.3.2.3 不同年龄中华鲟雄性个体性腺中卵黄蛋白原表达量的变化

由于受材料限制，只对 1 龄，3 龄，4 龄，5 龄，9 龄，12 龄中华鲟雄性个体进行了卵黄蛋白原 mRNA 表达情况的分析，见图 4.3。通过图 4.3 对中华鲟雄性个体性腺卵黄蛋白原 RT-PCR 结果所示，除了 1 龄中华鲟雄性个体在约 200bp 处没有出

现相应的条带, 3 龄, 4 龄, 5 龄, 9 龄, 12 龄在相应位置都出现了条带, 且没有杂带出现。说明在中华鲟雄性个体性腺中是存在卵黄蛋白原的 mRNA 的表达。并且在相同 ACTIN 亮度下, 对应的雄性个体卵黄蛋白原表达量不存在显著差异。

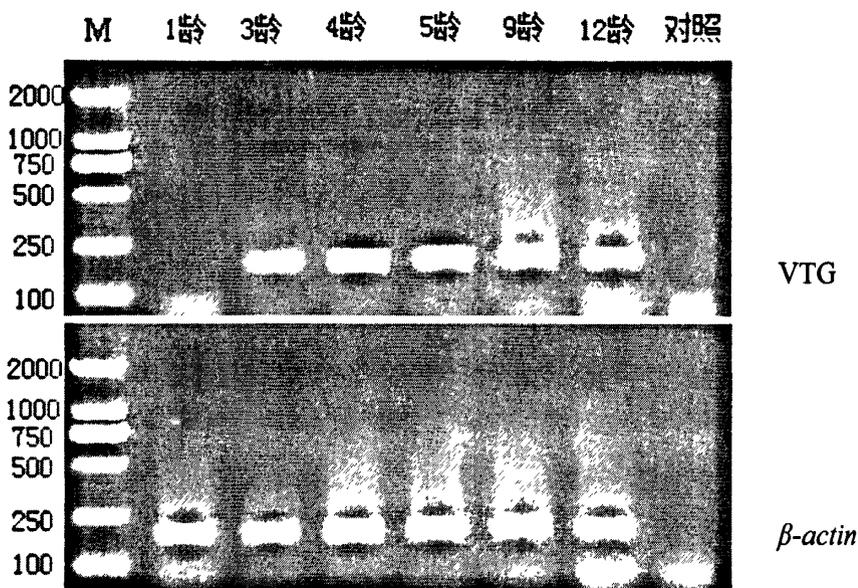


图 4.3 不同年龄段中华鲟雄鱼性腺中卵黄蛋白原 mRNA 表达量的变化

Fig 4.3 the expression of vitellogenin mRNA in different age of male Chinese sturgeon gonad

4.4 讨论

从无脊椎动物到脊椎动物, 包括蠕虫、海胆、鱼类、蛙类和鸟类等所有的卵生或卵胎生动物均具有卵黄蛋白原 (Vitellogenin, VTG), 它们在不同的动物体内具有相似的结构, 行使相似的生物学功能。卵黄蛋白原为卵黄蛋白的前体, 不仅为正在大于得胚胎提供氨基酸、脂肪、糖水化合物、磷和硫等营养和功能性物质, 还能促进培养中的动物卵母细胞的生长和分化 (Deuchar, 1963; Mancuso, 1964; William, 1967; 张年国等, 2007)。关于鲟鱼中卵黄蛋白的研究, 国外从上世纪 90 年代就开始有研究, 对于高首鲟的研究比较多, 对西伯利亚鲟、闪光鲟和一些杂交鲟也都有了一定的研究, 但大多数是对卵黄蛋白的分析鉴定以及卵黄蛋白原含量水平等方面的研究 (Ng et al., 1994; Pelissero et al., 1991; Amiri et al., 1996; Hiramatsu et al., 2002; Ceapa et al., 2002; Latonnelle et al., 2002; Linares-Casenave et al., 2003)。对鲟鱼卵黄蛋白原合成部位研究报道较少, 仅见 Bidwell (1991) 对高首鲟卵黄蛋白原的 mRNA 进行了分离克隆并对其特性进行初步研究。Bidwell (1995) 对高首鲟卵黄蛋白原特性进行研究, 根据 cDNA 分析了 VTG 的合成和分布。

通过本文的研究发现,在中华鲟雌性个体肝脏、性腺中都存在卵黄蛋白原的表达,实验以 ACTIN 亮度的相同情况确定对中华鲟 1-10 龄 CDNA 量,发现中华鲟卵黄蛋白原性腺中 1-10 龄表达含量呈递增的趋势,而 10 龄相对野生 IV 期中华鲟表达量高。而从组织切片中发现 1 龄和 2 龄的中华鲟性腺发育为 I 期,2-10 龄为 II 期,部分 10 龄为 II 期末期,说明 II 期末中华鲟性腺发育状态下的卵黄蛋白原表达量高于卵黄积累完成期,即 IV 期,这与张成峰 2006 年对中国对虾中卵黄蛋白原合成研究的结果相似。由于材料的限制,仅对 1-7 龄中华鲟雌鱼卵黄蛋白原肝脏中表达量变化进行了分析,发现从 1 龄到 7 龄中华鲟肝脏中都有卵黄蛋白原的表达,但表达量没有明显差异。由于受到材料限制,本实验另外还发现,3 龄,4 龄,5 龄,9 龄,12 龄中华鲟雄鱼个体中也存在卵黄蛋白原的表达,这与 Bidwell 等人通过雌二醇诱导也检测出高首鲟雄鱼中存在卵黄蛋白原 mRNA 的表达结果一致;并与 Copeland 等,(1986)、Goodwin 等(1992 年)研究表明很多雄鱼和未成熟的雌鱼在正常情况下体内存在少量 VTG;并与 Shyu (1986)在雄性海胆性腺也发现存在 VTG mRNA 的表达,后来 Unuma 1998 用免疫法证实了雌雄海胆性腺中均有 VTG 合成,只不过精巢中 VTG 的量少,首次提出了精巢中 VTG 为精子发生提供营养物质。从本实验也雄性个体中也存在 VTG 表达也验证了这一观点。

结 论

中华鲟是我国特有种，具有典型江海洄游性鲟鱼之一，在淡水中繁殖在海水中生长，长期以来，我国缺乏规模化的人工养殖中华鲟群体，而且性成熟时间较长，其雌性初次性成熟年龄达 14-26 年。因此对其卵黄发生过程的电镜以及采用分子手段对其卵黄蛋白原合成位点的分析对研究中华鲟内源性及外源性卵黄来源至关重要。本文观察通过电镜观察与分子生物学手段研究中华鲟卵黄发生过程，卵黄发生的两种类型内源性卵黄发生和外源性卵黄发生都得到了印证。主要结论如下：

(1) 对于内源性卵黄来源的印证，通过电镜观察发现多种细胞器参与了内源性卵黄颗粒的合成，这一类型卵黄的积累过程也通过分子手段得到证实，发现中华鲟雌性个体从 1 年龄开始就存在卵黄蛋白前体-卵黄蛋白原的 mRNA 的合成。

(2) 对于外源性卵黄来源的印证，通过电镜观察到卵黄膜存在微泡饮作用吸收卵母细胞外即肝脏等合成通过血液转运过来的卵黄蛋白原，被卵母细胞微泡饮吸收后加工（主要是糖基化）形成卵黄磷蛋白，通过分子手段发现在中华鲟雌鱼肝脏中确实存在卵黄蛋白原的 mRNA 的表达。实验还发现中华鲟雄性个体性腺中也存在卵黄蛋白原的 mRNA 的表达，这也证实很多学者提出的 VTG 为精子发生提供营养物质。

参考文献

1. 陈细华. 鲟形目鱼类生物学与资源现状. 北京: 海洋出版社, 2007
2. 陈细华. 中华鲟胚胎发育和性腺早期发育的研究. [博士学位论文]. 广州: 中山大学生命科学学院. 2004 年
3. 陈细华, 危起伟, 杨德国等. 养殖中华鲟性腺发生与分化的组织学研究. 水产学报, 2004, 28(6): 633-639.
4. 邓中彝, 余志堂, 许蕴珩等. 中华鲟年龄鉴别和繁殖群体结构的研究. 水生生物学报, 1985, 9(2): 99-110
5. 方永强, 林君卓, 翁幼竹等. 池养鳙的卵巢发育和卵子发生过程. 水产学报, 2004, 28(4): 353-359
6. 方永强, Welsch U. 文昌鱼卵巢中滤泡细胞超微结构及功能的研究. 中国科学(B集), 1995, 25(10): 1 079-1 085.
7. 方永强, 翁幼竹, 洪万树等. 鲮鱼早期卵子发生的超微结构研究. 水生生物学报, 2001, 25(6): 583-589.
8. 甘芳, 杜浩, 危起伟等. Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和葡萄糖溶液作为授精-激活介质对中华鲟精子受精率的影响. 动物学杂志, 2009, 44(1): 106~111.
9. 胡东, 桂建芳. 银鲫卵黄原的诱导、分离纯化及其生化鉴定. 水生生物学报, 2002, 26: 109-115
10. 霍堂斌, 张颖, 孙大江等. 小体鲟卵黄雌性蛋白分离纯化及抗血清的研制. 中国水产科学, 2007, 14(4): 532-539
11. 柯福恩, 胡德高, 张国良等. 葛洲坝下中华鲟产卵群体性腺退化的观察. 淡水渔业, 1985, 15(4): 38-42.
12. 乐佩琦, 陈宜瑜. 中国濒危动物红皮书-鱼类. 北京: 科学出版社. 1998: 13.
13. 李兆杰. 鱼类卵黄蛋白原的免疫功能研究. [博士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学海洋生命学院. 2009
14. 李洁斐, 李卫华, 杨健等. 17- α 炔雌醇对斑马鱼的卵黄蛋白原及性腺发育的影响. 毒理学杂志, 2006, 20(1): 9-12; 13
15. 厉萍. 中华鲟精子结构特征及其精液超低温冷冻保存技术研究. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学水产学院, 2007.
16. 梁勇, 徐盈, 杨方星等. 鲤和团头鲂幼鱼卵黄蛋白原的诱导、纯化及电泳比较. 水生生物学报, 2006, 22: 317-320.
17. 林国辉, 方展强. 鳊鱼卵母细胞发育的组织学和超微结构观察. 华南师范大学学报(自然科学版), 2007, (1): 99-103
18. 刘鉴毅, 危起伟, 陈细华等. 葛洲坝下中华鲟繁殖生物学特性及其人工繁殖效果. 应用生态学报, 2007, 18(6): 1397-1402.

19. 刘鉴毅, 甘芳, 危起伟等. 几种不同浓度的离子及单糖对中华鲟精子活力的影响. 水生生物学报, 2007, 31(6): 849-854.
20. 鲁大椿, 柳凌, 方建萍等. 中华鲟精液的生物学特性和精浆的氨基酸成分. 淡水渔业, 1998, 28(6): 18-20.
21. 孟庆闻, 苏锦祥, 繆学祖. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社, 1995, 117-120.
22. 齐茜, 曲秋芝, 张颖, 索力, 孙大江. 小体鲟血清卵黄蛋白原和 Ca^{2+} 浓度与卵巢发育的关系. 中国水产科学, 2009, 16(6): 967-974
23. 曲秋芝, 孙大江, 王丙乾等. 施氏鲟卵巢发育的组织学观察. 水产学报, 2004, 28(5): 487-492..
24. 师晓栋. 玫瑰无须鲃卵黄蛋白原及卵黄脂磷蛋白的纯化和免疫学鉴定. 青岛: 中国海洋大学, 2003
25. 四川省长江水产资源调查组. 长江鲟鱼类生物学及人工繁殖研究.. 成都: 四川科学计数出版社, 1988, 92-93
26. 王爱明. 莫桑比克非鲫卵黄形成的电镜观察, 水生生物学报 1994, 18(1) 26-31
27. 王玉凤, 堵南山, 赖伟. 罗氏沼虾卵母细胞细胞器与卵黄发生的关系. 水生生物学报, 1999, 23(1): 24-28
28. 魏刚, 戴大临, 黄林等. 大鳍初级卵母细胞的超微结构. 西南农业大学学报, 2003, 25(4): 339-341.
29. 魏刚, 戴大临, 蒲德永等. 大鳍鱊早期卵子发生的超微结构. 西南师范大学学报(自然资源版), 2004, 29(2): 273-277.
30. 危起伟. 中华鲟繁殖行为生态学与资源评估. [博士学位论文]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所. 2003
31. 危起伟, 陈细华, 杨德国等. 葛洲坝截流 24 年来中华鲟产卵群体结构的变化. 中国水产科学, 2005, 12: 452 - 457
32. 吴鹰, 孟艳玲, 周忠良. 河川沙塘鳢 *Odontobutis potamophila* (Günther) 卵黄蛋白原(Vtg)和卵黄脂磷蛋白(LV)生化特性的比较. 山西师大体育学院学报研究生论文专刊, 2006, 21: 160-162
33. 徐革峰, 陈松波, 牟振波. 细鳞鱼的卵黄发生. 中国水产科学, 2007, 14(3): 377-382.
34. 姚静, 方展强, 徐杰. 唐鱼卵黄蛋白原的诱导、纯化与鉴定. 生态毒理学报, 2008, 3(2): 155-161
35. 易继舫, 常剑波, 唐大明等. 长江中华鲟繁殖群体资源现状的初步研究. 水生生物学报, 1999, 23(6): 554-559
36. 余志堂, 许蕴珩, 邓中彝等. 葛洲坝水利枢纽下游中华鲟繁殖生态的研究. 见: 中国鱼类学会编辑, 鱼类学论文集(第五辑). 中国海洋湖沼学会第四届会员代表大会及有关二级学会的学术年会, 青岛, 1984, 北京: 科学出版社, 1986, 1-14.

37. 詹翠琼, 黄絮洁, 方展强等. 多氯联苯对孔雀鱼卵黄蛋白原的诱导及检测. 生态毒理学报, 2007, 2: 333 -338
38. 张成峰, 刘红, 高祥刚等. 中国对虾卵黄蛋白原合成部位的研究. 海洋水产研究. 2006, 27(6): 7-13.
39. 张辉. 中华鲟自然繁殖的非生物环境. [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学水产学院, 2009.
40. 章龙珍, 庄评, 张涛等. 人工养殖施氏鲟性腺发育观察. 中国水产科学, 2002, 9(4): 323-327.
41. 张年国, 张颖, 孙大江等. 卵黄蛋白原的发生、结构及功能研究现状. 水产学杂志, 2007, 20(1): 97-106
42. 张士瑾, 孙旭彤, 李红岩. 卵黄蛋白原研究进展. 海洋科学, 2002, 26 (7): 32 - 35
43. 张贤芳, 张耀光, 甘光明等. 圆口铜鱼早期卵母细胞发生的超微结构. 西南师范大学学报(自然资源版), 2006, 31(1): 119-124.
44. 张艳珍. 养殖中华鲟性腺发育及血液相关生理指标变化的观察. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学水产学院, 2009.
45. 张艳珍, 陈细华, 危起伟等. 中华鲟血清卵黄蛋白原水平初步观察. 淡水渔业, 2008, 38(5): 10-14.
46. 张颖, 曲秋芝, 霍堂斌等. 史氏鲟卵黄蛋白原及其相关蛋白的研究. 水生生物学报, 2008, 32(5): 750-759.
47. 周庆祥, 江桂斌. 卵黄蛋白原的分离测定及其在环境内分泌干扰物质筛选中的应用. 化学进展, 2003, 15(1): 67-73.
48. Amiri B M, Maebayashi M, Adachi S. Testicular development and serum sex steroid profiles during the annual sexual cycle of the male sturgeon hybrid, the bester. *Journal of Fish Biology*, 1996, 48(6): 1039-1050
49. Amor M J, Ramón M, Durfort M. Ultrastructural studies of oogenesis in *Bolinus brandaris* (*Gastropoda: Muricidae*). *Scientia Marina*, 2004, 68 (3) : 343-353.
50. Azevedo C. evelopment and ultrastructural autoradiographic studies of nucleolus-like bodies (nuages) in oocytes of a viviparous teleost (*Xiphophorus heneri*). *Cell Tissue Res*, 1984, 238: 121-128
51. Bailey, R E. The effect of estradiol on serum calcium, phosphorus, and protein of goldfish. *J. Exp. Zool*, 1957, 136: 455~469
52. Baker M E. Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human low-density lipoprotein and human lipoprotein lipase? *Biochem J*, 1988 Nov 1, 255(3): 1057~1060

53. Bemis W E, Findeis E K, Grande L. An overview of Acipenseriformes. *Environ Biol Fish*, 1997b 48:25-71
54. Bemis W E, Kyard B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Environ Biol Fish*, 1997, 48:167-183
55. Bidwell C A, Carlson D M. Characterization of vitellogenin from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *J Mol Evol*. 1995, 41, 104-112
56. Bidwell C A, Kroll K J, Severud E, et al. Identification and preliminary characterization of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) vitellogenin mRNA. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, 83(3):415-424.
57. Billard R, Leconte G. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Rev Fish Biol Fisheries*, 2001, 10:355-392
58. B V C Gomes R S Scarpelli, F P Arantes, Y Sato, et al. Comparative oocyte morphology and early development in three species of trahiras from the Sao Francisco. River basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 2007, 70:1412-1429.
59. Campbell C M, Idler D R. Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout as vitellogenin by the cross reactivity to ovarian yolk fractions. *Biol Reprod*, 1980, 22: 605-617
60. Ceapa C, Williot P, Le Menn F. Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas) during spawning migration in the Danube River. *J Appl Ichthyol*. 18, 2002: 391-396
61. Chen J S, Sappington T W, Raikhel A S. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *Mol. Evol*, 1997, 44: 440 - 451.
62. Choudhury A, Dick T A. The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, paleontology and palaeogeography. *J Biogeogr*, 1998, 25:623-640
63. Christopher A B, Carlson D M. Characterization of vitellogenin from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Journal of Molecular Evolution*, 1995, 41
64. Conte F S, Doroshov S I, Lutes P B. Hatchery manual for the white sturgeon. Oakland: Publication 3322, University of California Press, 1988. 104.
65. Copeland, P A. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout at various stages the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol*, 1986, 83: 487-493
66. Cruz-Landim C, Cruz-Höfling M A. Ultrastructure of ovarian follicular epithelium of the amazonian fish *Pseudotyrannoceros microps* (Teleostei belontiidae): Morphological and histochemical characterization of the intercellular deposits. *Rev Brasil Biol*,

- 2001, 61 (1) :133 -140.
67. Deng Z L, Xu Y G, Zhao Y. Analysis on *Acipenser sinensis* spawning ground and spawning scales below Gezhouba Hydroelectric Dam by means of examining the digestive contents of benthic fishes. In: Williot P ed., *Acipenseridae*. Paris, France: Cemagres- Dicova Publ,1991,243-250.
 68. Dettlaff T A, Ginsburg A S *Sturgeon Fishes: embryonic development and aquaculture*. Beijing: Science Press,1958-27.
 69. Deuchar E M. Tracing amino acids from yolk protein into tissue protein. *Acta Embryol Morphol.Exp*, 1963, 6: 311-323.
 70. Doroshov S. Culture of white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. p. 126. In Book of Abstracts. World Aquaculture '97. February 19-23, 1997, Washington State Convention Center, Seattle, Washington, U.S.A. 1997.
 71. Doroshov S J, Moberg G P, van Eenennaam J P. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon.*Acipenser transmontanus*. *Enviro Biol Fish*. 1997,48:265-278.
 72. Droller M J, Roth T F. An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus Goppyi*. *The Journal of Cell Biology*,1966, 28:209-232
 73. Emmersen, B.K. and I.M. Petersen. Natural occurrence and experimental induction by estradiol-17b, of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*, L.). *Comp. Biochem. Physiol*, 1976, 54B: 443~446
 74. Goodwin A E, Grizzle J M, Bradley J T, et al. Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish(*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol*, 1992, 101B:441-446.
 75. Grier H. The ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae). *J Morphol*, 2000, 243(3):265 -281.
 76. Hara A, H Hirai. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol*, 1978, 59B: 339~343
 77. Hara A, H Hirai. Iron-binding activity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmogairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochim. Biophys. Acta*,1976, 437: 549~557
 78. Hiramatsu N, Hara A. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin Taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol*, 1996, 115A:

79. Hiramatsu N, Hiramatsu K, Hirano K, et al. Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso* x *Acipenser ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 131: 429-441
80. Hochleithner M, Gessner J. The Sturgeons and Paddlefishes (*Acipenseriformes*) of the World. *Biology and Aquaculture* (Aqua Tech Publication, Austria), 1999:1-207.
81. Ho C W. and W E. Vanstone. Effect of estradiol monobenzoate on some serum constituents of maturing sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *J. Fish. Res. Board Can*, 1961, 18:859~864
82. Holcik J. General Introduction to Fishes, *Acipenseriformes*. The Freshwater Fishes of Europe (Aula-Verlag, Wiesbaden), 1989, 1: 148-443
83. Johnsen H K, Tveiten H. Willassen N P, Arnesen A M. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay, *Comp. Bioch. Physiol. Part B*, 1999, 124 : 355 - 362.
84. Kishida M, Anderson T R, Specker J L. Induction by β -estradiol of vitellogenin in Striped bass (*Morone saxatilis*): Characterization and quantification in plasma and mucus. *Gen Comp Endocrinol*, 1992, 88:29-39.
85. Le Menn F, Pelissero C. Histological and ultrastructural studies of oogenesis of the Siberian sturgeon. Williot P ED. *Acipenser*, Cemagraef Press 1991, 113-117.
86. Linares-Casenave J, Kroll K J, Van Eenennaam J P, et al. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon. *Aquaculture*, 2003, 221: 645-656
87. Maitre J L, Derrien S, Tenniswood M, et al. Measurement of vitellogenin from rainbow trout by rocket immunoelectrophoresis. Application to the kinetic analysis of estrogen stimulation in the male. *Can J Biochem Cell Biol* 1985,63:982 - 987
88. Mancuso V. Ultrastructural changes in the cytoplasm of *Ciona ontosternalis* oocytes. *Acta. Embryol Morphol. Exp*, 1964, 7: 269 - 295.
89. McDowall R M. On amphidromy, a distinct form of diadromy in aquatic organisms. *Fish Fisheries*, 2007,8(1):1-13.
90. Miranda A C, Bazzoli N, Rizzo E, et al. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue Cell*, 1999, 31 (5) :480 -488.
91. Mommsen T P, P.J. Walsh. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and A.P. Farrell. *Fish Physiology*, Vol. XIA. San Diego, CA: Academic Press,

1988. 347~406
92. Naglar J J, Idler D R. Comparison of tritiated vitellogenins prepared by *in vivo* and *in vitro* techniques for studies of ovarian uptake in fish. *J Exp Zool*, 1992, 264:107-112.
 93. Ng W K, Hung S S O. Amino acid composition of whole body, egg and selected tissues of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture*, 1994,126: 329-339
 94. Norberg B. Atlantic halibut vitellogenin: Induction, isolation, and partial characterization. *Fish. Physiol. Biochem*, 1995, 14: 1~13
 95. Omoto N, Maebayashi M, Mitsuhashi E R I. Histological observation of gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon. the bester. *Fisheries Science*, 2001, 67 : 1104 -1110
 96. Pan M L, Bell W J, Telfer W H. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science*, 1969, 165: 393~394
 97. Pateraki L E, Stratakis E. Characterization of vitellogenin and vitellin from land crab *Potamon potamios*: identification of a precursor polypeptide in the molecule. *J. Exp. Zool.* 1997, 279 : 597 - 608.
 98. Pelissero C, Le Menn F, Kaushick S. Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *General and Comparative Endocrinology*, 1991, 83: 447-457
 99. Pfanestiel H, Grunig C. Yolk formation in an annelid (*Ophriot rochapuerilis*), *polychaeta*. *Tissue Cell*, 1982, 14 :669-680.
 100. Ravaglia M A , Maggese M C. Oogenesis in the swamp eel *Synbranchus marmoratus* (Bloch ,1795) (Teleostei;synbranchidae):Ovarian anatomy ,stages of oocyte development and micropyle structure . *Biocell*, 2002, 26(3) :325 -337.
 101. Raven C. in *Oogenesis: The storage of developmental information*. London, Pergamon Press, 1961, 98.
 102. Rees S.W, Olive P. Photoperiodic changes influence the incorporation of vitellin yolk protein by oocytes of the semelparous polychaete *Nereis (Neanthes) Viren*. *Comp. Bioch. Physiol. Part A* , 1999, 123 : 213 - 220
 103. Selman K, Wallace R A, Barr V. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. V. The relationship of vesicles and cortical alveoli. *J. Exp. Zool.* 1988, 246:42-56
 104. Shigeura H T, Haschemeyer A E V. Purification of egg yolk proteins from the Antarctic fish, *Chaenocephalus aceratus*. *Comp Biochem Physiol*, 1984, 80B: 935-939.
 105. Shyu A B, Raff R A. Blumenthal T. Expression of the vitellogenin gene in female

- and male sea urchin. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* ,1986,83:3865-3869
- 106.So Y P, Idler D R, Hwang S J. Plasma vitellogenin in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* Ouaninche): isolation, homologous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. *Comp. Biochem. Physiol*, 1985, 81B: 63~71
- 107.Specker J L, C V Sullivan. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In: K.G. Davey, R.E. Peter and S.S. Tobe. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council, 1994. 304~315
- 108.Tyler C R, Sumpter J P, Bromage N R. *in vivo* ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Exp Zool*, 1988, 246:171-179.
- 109.Unuma T, Suzuki T K, Yamamoto Y, et al. A protein identical to the yolk protein is stored in the testis in male red sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Biol. Bull*, 1998, 194: 92-97.
- 110.Urist M R and A O Schjeide. The partition of calcium and protein in the blood of oviparous vertebrates during estrus. *J. Gen. Physiol*, 1961, 44: 743~756
- 111.Utarabhand P, Bunlipatanon P, Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): isolation and properties. *Comp. Biochem. Physiol*, 1996, 115C: 101~110
- 112.Utter F M, G J Ridgeway. A serologically detected serum factor associated with maturity in the English sole, *Parophrys vetulus* and Pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis*. *US Fish Wildl. Serv. Fish. Bull*, 1967, 66: 47~48
- 113.Van Eenennaam J P, Bruch R, Kroll K. Sturgeon sexing, staging maturity and spawning induction. *Proceedings of the 4th International Symposium on Sturgeon*. Oshkosh, Wisconsin, 2001, 2-44.
- 114.Venugopal K J, Kumar D. Vitellins and vitellogenins of *Dysdercus koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) identification , purification and temporal pattern , *Comp.Biochem. Physiol. Part B* , 1999 , 124 : 215 - 223.
- 115.Wallace R A. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. In: L.W.Browder. *Developmental Biology 1*. New York: Plenum Press, 1985. 127~177
- 116.Williams J. Yolk utilization In " *The Biochemistry of Animal Development*" (R. Weber, Ed.) . New York /London: Academic Press, 1967, Vol. II : 343 - 378.
- 117.Xiao H, Liu D, Tang D, et al. Structural and quality changes in the spawning stock of the Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* below the Gezhouba Dam(Yangtze River) *J Appl Ichthyol*, 2006,22(Suppl.1):111-115.
- 118.Yamamoto T S. Morphological and cytochemical studies on the oogenesis of the

- resh-water fish, medake (*Oryzias Latipes*). *JPN.J.Ichthyol*, 1955,4:170-181
- 119.Yoon S H, Itoh Y, Kaneko G. Molecular Characterization of Japanese Sillago Vitellogenin and Changes in Its Expression Levels on Exposure to 17 β -Estradiol and 4-tert-Octylphenol. *Marine Biotechnology*, 2008, 10:19-30
- 120.Yoshizaki N. , Moriyama A.Yonezawa S. . Purification and properties of embryonic cysteine proteinase which participates in yolk-lysis of *Xenopus laevis*. *Comp. Bioch. Physiol Part B*, 1998, 119 : 571 - 576.
- 121.Zhang Z B,Hu J Y, An W,et al. Induction of vitellogenin mRNA in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray)treated with 17-estradiol and 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol.Chem*, 2005, 24(8):1944-1950.

附 录

攻读硕士学位期间发表的论文:

[1] 甘芳, 杜浩, 危起伟, 陈细华, 刘鉴毅, 郑跃平. Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和葡萄糖溶液作为授精-激活介质对中华鲟精子受精率的影响. 动物学杂志, 2009, 44(1):106~111.

[2] 甘芳, 陈细华, 杜浩, 李创举, 危起伟, 李罗新, 石莹. 中华鲟早期卵子发生的显微和超微结构观察. 已投稿至中国水产科学, 需修改。

[3] 甘芳, 周宇晶, 危起伟, 樊思源, 杜浩. 水生野生动物自然保护区河流生态系统服务功能价值评价—以长江湖北宜昌中华鲟自然保护区为例. 自然资源学报, 2010, 25(4):574~584.

致 谢

本论文是在导师危起伟研究员精心指导下完成的。三年的硕士生涯中，导师治学严谨，知识渊博，思想深邃，视野熊阔，忘我的工作热情，诲人不倦的育人作风为学生营造了一种良好的学习氛围，并深深启迪着我。授人以鱼不如授人以渔，置身其间，耳濡目染，潜移默化，使我不仅接受了全新的思想观念，树立了宏伟的学术目标，领会到了发散的思考方式，掌握了科学的研究方法，还明白了许多待人接物、为人处世的道理。其中的点点滴滴岂是三言两语能够说清，世界上最美妙的语言也无法淋漓尽致地表达我的敬意，只能深深埋于心底，化作一句虔诚的祝福：愿导师幸福快乐，一生平安。

陈细华研究员是我的第二导师，其严以律己、宽以待人的崇高风范、朴实无华，平易近人的人格魅力，令人倍感温馨。陈老师是整个实验过程的主要参加人，他亲自主刀完成了外科手术取材，并对显微镜下性腺分期进行了技术指导。在此，我对陈老师表示衷心的感谢。

感谢李创举博士在整个实验过程中提供的帮助，从实验设计、样品取样，实验过程都提供的大力帮助，他指导了整个分子实验的研究过程，实验中出现的种种困难都悉心耐心的帮助我解决，在此表示深深的谢意。

本论文的顺利完成还得到了许多老师和同学的帮助。感谢刘志刚工程师、李罗新工程师，他们在实验材料的采集中给予了极大的帮助和关怀；感谢好友石莹、沈丽、周琼、钱慧在实验取材及论文写作方面提供了帮助，张辉师兄、孙庆亮、邹远超，张艳珍、邱实、胡佳、杨璐、李艳华、王成友以及 08、09 级各位师弟师妹们不仅在在实验中给予了我很多帮助，在学习、工作、生活中给予了热情的关心，伴我度过了美好的研究生生涯，在此对他们表示深深的谢意。

感谢水生生物研究所袁秀萍老师为我的给我拍了清楚、直观的电镜图片。感谢长江水产研究所的张洁明老师、张涛同学为我的组织学实验拍照提供了实验仪器，并给予了指导。感谢长江水产研究所濒危物种保护中心中华鲟养殖基地、厦门及广州中华鲟繁育保护基地以及北京海洋馆为我提供了宝贵的实验材料，使我的实验能够顺利完成，各基地养殖工人在实验中给予了很大帮助，在此一并致谢。

感谢我的父母，他们用劳动和智慧换来了我今天良好的生活条件，是他们的支持和信赖使我能顺利完成我的学业，他们的坚忍和乐观的精神也会让我受用一生！

感谢我的爱人杜浩，他在生活、学习、工作中一直不断的鼓励我，才使我的论文得以完成，在我读研的 3 年时间跟着我受罪，为我付出了太多的辛苦。是他的默默关爱和鼓励，使我顺利完成学业。

还有许多给予我支持、帮助、关心的老师和同学，在此向他们表示衷心的感谢！

甘芳

2010 年 5 月 8 日于华中农业大学

