

# 核质杂交试验中 用温度控制供体胚胎发育的尝试

方耀林 余来宁 赵文玲\* 张文臣\*

(中国水产科学研究院长江水产研究所 湖北沙市 434000)

**摘要** 以泥鳅为材料,成功地尝试了用温度调节供体受精卵的发育速度,以求达到其在核质杂交中与受体在时间上的良好配合。泥鳅的受精卵在 13—30℃ 之间的不同温度下发育至囊胚期,所需的时间差异达 9 小时,但囊胚细胞的成活率均在 90% 以上。采用极化注射法将各温度组的囊胚细胞与泥鳅成熟的未受精卵进行核质杂交试验,均得到了成活的核质杂交鱼。从而提示:该方法是一种解决供体与受体时间配合的有效途径。

在鱼类核质杂交试验中,受体卵的质量和以囊胚细胞核作供体的受精卵的质量都是非常重要的。另一方面,如何解决好供体与受体的时间配合也是人们探讨的问题之一。由于亲鱼性腺发育的个体差异以及外界环境因素的影响,要严格控制分别用于作供体和受体的亲鱼的产卵时间比较困难。用超低温保存供体囊胚细胞的试验为这一问题的解决提供了一个可能的途径。但可设想如果能通过温度的控制来调节供体受精卵的发育,使其与受体卵在时间上得到配合,将会更简便易行和更经济一些。为此,1991 年 4—5 月我们以泥鳅作材料,对用温度控制供体胚胎发育的可能性进行了试验,兹报告如下。

## 一、材料和方法\*

(一) **试验材料** 选取性成熟的泥鳅,40—80 克/尾,用绒毛膜促性腺激素(HCG)进行人工催产,雌雄鱼剂量分别为 600 IU/尾和 400 IU/尾。供体鱼卵用半干法授精,将受精卵置于不同温度下孵化。

### (二) 试剂

1. **Holtfreter 溶液** NaCl 350mg、KCl 5mg、CaCl<sub>2</sub> 10mg,溶于 100ml 重蒸水中,加 NaHCO<sub>3</sub> 20mg 调节 pH 为 7.0。

2. **细胞分离液** NaCl 350mg, KCl 5mg。

EDTA-Na<sub>2</sub> 56mg,溶于 100ml 重蒸水中,加 NaHCO<sub>3</sub> 20mg,调节 pH 为 7.0。

3. **电场液** 用 2mol/L 的甘露醇和 1mol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 配制而成。

4. **胰酶溶液** 250mg 胰蛋白酶溶于 100ml 细胞分离液中。

5. **细胞染色剂** 50mg 曲利本蓝(trypsin blue)溶于 10ml Holtfreter 液中。

(三) **试验方法** 将泥鳅受精卵分别置于 10℃、13℃、16℃、19℃、23℃、27℃、30℃、33℃ 共 8 个温度下发育至囊胚期。

1. 从各温度组中分别取 80 个受精卵观察其发育差异。

2. 从各温度组中分别取 20 个正常的囊胚期胚胎,计算囊胚细胞的成活率。方法为:用 0.25% 的胰酶脱去卵膜,分别用分离液和 Holtfreter 液吹打离心,制备细胞悬液。然后用 0.5% 的曲利本蓝染色细胞,用细胞计数器于显微镜下计数,白色透明的为活细胞,蓝色的为死细胞。

3. 各温度组分别留取一定数量的受精卵(119—266 粒),令其恒温孵育至开口,观察其受精率(以原肠中期统计)和出苗率。

\* 赵文玲,张文臣是四川水产学校在长江水产研究所的实习生。

4. 从各温度组中随机取一定数量(105—213粒)的发育至囊胚期的胚胎,逐步调节温度,令其于23℃下发育至开口期,比较各组分之间的差异。

5. 参照方法2制备细胞悬液,将细胞于电场液中清洗后,于电场液中混匀,然后用极化注射方法注入泥鳅未受精卵中,注射后的鱼卵置23℃下恒温孵化。

6. 试验进行时,各试验组均同时设有23℃恒温孵化对照组,试验组与对照组的材料均取自同一尾鱼,对照组的出苗率均在95—98%,因此可以认为各试验组所用的鱼卵质量均很好,且受精率高,孵化用水为同一水源,它们之间的差异均由试验温度的不同所引起。

7. 每组试验及对照组,均各用3个直径为

12.5cm的培养皿,使受精卵粘附其中,每个培养皿放卵100—150粒,盛水240ml。另各用一只容量1000ml烧杯盛曝气水,置同温度下预置,以备换水。各培养皿每次换水100ml,每隔4小时换水一次。孵化温度根据要求用恒温培养箱(日产三洋培养箱)严格控制,该温度系指培养箱中水温。

## 二、试验结果

(一) 泥鳅受精卵在不同温度下发育至囊胚期的时间 泥鳅卵在室温下(21—24℃)授精后,于培养箱中分别在10—33℃下发育至囊胚期时,观察各组的胚胎发育率,并通过染色制片、镜检囊胚细胞的成活率,结果见表1。

表1 泥鳅受精卵在不同温度下发育到囊胚期的时间

温度(℃)	10	13	16	19	23	27	30	33
胚胎发育率(%)*	0	81	85	92	93	94	94	87
胚胎发育所需时间(时·分)	/	11小时5分	8小时46分	6小时20分	5小时15分	3小时37分	2小时54分	2小时10分
囊胚细胞成活率(%)	/	95	97	94	95	91	90	88

\* 胚胎发育率(%) =  $\frac{\text{正常囊胚数}}{\text{总卵数}} \times 100\%$

由表1可见,温度不同,胚胎发育至囊胚期所需的时间亦不同。除10℃组停滞发育外,其余各组均有81%以上的受精卵发育至囊胚期,且有88%以上的囊胚细胞能成活,其中囊胚细胞成活率达95%以上的有3个温度组,以

16℃为最高(97%)。

(二) 泥鳅受精卵在不同温度下的恒温孵化 在上述8个温度梯度下,将泥鳅受精卵恒温孵化至出膜期,统计各组的受精率和出苗率,结果见表2。

表2 泥鳅胚胎在不同温度下的受精率和出苗率

温度(℃)	10	13	16	19	23	27	30	33
总卵数(粒)	167	266	122	155	119	182	151	189
受精卵数(粒)	0	126	104	143	111	172	142	127
受精率(%)	0	47	85	92	93	95	92	67
孵出鱼苗数(尾)	0	0	23	124	107	153	75	32
出苗率(%)	0	0	22	87	96	89	53	17

泥鳅卵于10℃下完全不能完成正常的胚胎发育,在13℃时,受精卵发育至原肠晚期后即死亡。而16℃、30℃及33℃组的出苗率亦较低,结合试验结果(一)的情况,此3个温度

组主要是影响了胚胎发育的后期。

(三) 不同温度下的泥鳅胚胎发育至囊胚期以后的变温处理 由于核质杂交试验中控制供体的发育速度是我们的目的,而对囊胚期以

前的胚胎采用升温或降温方式来调控胚胎发育至囊胚期，这种变温处理是否会影响胚胎发育的正常进行？我们选择了不同温度下发育至囊胚期的正常胚胎，通过逐步升温或降温处理，使其于23℃下发育至开口期，计数成活率。同时，

于23℃组中选择一定数量的囊胚期胚胎，置于8℃下分别处理0.5、1、2小时以后，再经4小时逐步恢复到23℃下发育至开口期，观察发育情况，结果见表3。

表3 各温度组的泥鳅囊胚在23℃时的发育状况

温 度(℃)	囊胚期之后的 变温处理*	各发育阶段的正常胚胎数(个)					出苗率(%)	
		囊胚期	原肠期	肌肉效应期	血液循环期	开口期		
10	/	/	/	/	/	/	0	
13	→15℃→18℃→20℃→23℃	213	183	183	182	180	85	
16	→18℃→20℃→23℃	173	159	157	154	154	89	
19	→21℃→23℃	159	159	157	157	155	97	
27	→25℃→23℃	160	153	153	152	152	95	
30	→27℃→25℃→23℃	105	97	97	96	95	90	
33	→30℃→28℃→26℃→23℃	125	115	92	92	90	72	
8℃ 下处理	0.5小时	→16℃→18℃→20℃→23℃	167	147	142	135	134	80
	1.0小时	→16℃→18℃→20℃→23℃	138	112	108	108	107	77
	2.0小时	→16℃→18℃→20℃→23℃	151	136	128	128	125	69

\* 变温处理中每个温度梯度的时间间隔为1小时。

在表3中，除10℃组胚胎不发育外，其它各组均能孵出鱼苗，且在13—30℃时其出苗率均可达85%以上。反之亦证实，虽然泥鳅胚胎在不同温度下发育至囊胚期，在此之后，如果孵化温度改善（如23℃），仍能获得较高的出苗率，用控温法处理胚胎发育的早期对胚胎发育的正常进行无显著影响。

#### (四) 几种温度处理后泥鳅囊胚细胞与泥鳅

**未受精卵的电融合。**采用极化注射法，将不同温度下发育的囊胚细胞与泥鳅成熟良好的未受精卵进行电融合试验，注射卵置23℃下孵化。在13—30℃温度下发育的囊胚细胞，经注射后均获得了核质杂交鱼，试验结果见表4。表明采用温度来控制供体发育速度以求达到其与受体的时间配合是完全可行的。

表4 各温度下的泥鳅囊胚细胞与泥鳅未受精卵的电融合

温度(℃)	10	13	16	19	23	27	30	33
注射卵数(粒)	/	966	1333	857	753	1081	810	934
原肠期数(粒)	/	258	291	245	201	367	231	278
注射率(%)	/	26.7	23.6	28.6	26.7	33.2	28.5	29.8
出苗数(尾)	/	1	2	1	4	2	2	0

### 三、讨论

(一) 温度对鱼类胚胎发育的影响是十分

明显的，在适温范围内，温度与胚胎发育的速度成正相关。泥鳅受精卵在13—33℃时，胚胎发育的速度随温度升高而加快，到达囊胚期时，

发育的时间差异最大可达9小时,且受精卵的胚胎发育率和囊胚细胞成活率均较高。在这一温度范围内,改变胚胎早期发育温度来加速或延缓受精卵发育至囊胚期的时间,为核质杂交试验的供体与受体的时间配合提供了条件。

(二)泥鳅胚胎在不同温度下恒温孵化时,以19—27℃范围的出苗率较高。低于或高于此温度范围,其出苗率较低或胚胎发育不能正常进行,尤其是在原肠期时,胚胎死亡率很高。表明泥鳅胚胎发育的适温范围是19—27℃。

(三)温度主要影响了囊胚期以后的胚胎发育,这包括了胚胎发育的速度和出苗率。各温度组的胚胎在其发育至囊胚期后,通过逐步升温或降温处理,于23℃下恒温孵化时,除10℃时鱼卵不能正常发育外,其它各组均能获得较高的出苗率。因此可以认为在囊胚期以前采用温度来控制鱼类胚胎早期发育的进程,对胚胎发育功能无不良影响。

(四)电融合试验表明,在13—30℃温度范围发育的泥鳅囊胚细胞,用于极化注射的注射率基本一致,且均能得到幼苗。表明采用控温法获得供体细胞是可行的,该供体与受体进行极化注射是成功的。

(五)用超低温保存的囊胚细胞作供体进行核质杂交试验,其操作较为繁琐。采用温度

控制供体的早期胚胎发育,方法简便经济易行。它可以作为解决供体与受体在时间上相配合的有效途径之一而应用于鱼类的核质杂交试验。

## 参 考 文 献

- 1 中国科学院北京动物研究所细胞室 1975 鱼类细胞核移植技术 动物学杂志(2): 34—47。
- 2 董第周 叶毓芬 杜森等 1980 硬骨鱼类的细胞核移植——鲤核和鲫质配合的杂种鱼 中国科学(4): 376—390。
- 3 严绍顺 陆德裕 杜森等 1984 硬骨鱼类的细胞核移植——鲤核和鲫质配合的杂种鱼 中国科学(8): 729—782。
- 4 汪和庭 鲁玉民 1985 电场诱导细胞融合 生物化学与生物物理进展(3): 52—58。
- 5 刘沛霖 汤沐兰 刘汉勤等 1988 鱼类细胞电融合的初步研究 水生生物学报 12(1): 94—96。
- 6 汤沐兰 刘沛霖 刘汉勤等 1988 鱼类囊胚细胞相卵的电融合 水生生物学报 12(2): 189—192。
- 7 陈宏溟 汤沐兰 陈敏容等 1986 鱼类细胞核发育潜能的研究 水生生物学报 10(1): 1—7。
- 8 余采宁 杨永铨 柳凌等 1989 用未去核卵做受体的鱼类细胞核移植研究 淡水渔业(3): 3—7。
- 9 柳凌 余采宁 1989 用超低温保存的囊胚细胞进行核移植试验 淡水渔业(4): 10—13。
- 10 郑文彪 1985 泥鳅胚胎和幼鱼发育的研究 水产学报 9(1): 37—47。