



# 鱼类胚胎低温保存

## THE CRYOPRESERVATION OF FISH EMBRYOS

赵尚林

(上海水产大学渔业学院, 200090)

Zhao shang-lin

(Fisheries College, SFU, 200090)

**关键词** 胚胎, 低温保存

**KEYWORDS** emlorgo, Cryopreservation

低温生物学技术的问世,为人类控制利用生物资源提供了有效的手段。畜牧业、医疗保健已率先尝受到了这一技术成果,当今家畜胚胎的低温保存令人振奋鼓舞,其应用程度已遍及全球了。然而鱼类胚胎的冷冻保存研究进展几乎是停滞的,原因不外现行试验研究手段受限以及鱼卵与胚胎的自身特性所致。近年我们对此也进行了初步的探索,并就此课题的研究前景借本文一并讨论。

### 1 材料与方法

自92年至94年期间,我们于每年的人工育苗季节,自上海郊区养殖场获取几种家鱼人工繁殖的胚体进行试验,鱼胚种类包括异育银鲫、团头鲂、白鲢、鳙、草鱼等。试验选用国产与进口的聚丙烯塑料冻存管(容量1.8 ml),每管分装保存液1.2 ml,容胚体8~10粒。保存液由扩展液(exterder)和低温保护剂组成,降温处理采用酒精干冰浴法或步进式手工控制的气相氮降温系统,以 WNY-150 数字温度显示器显示温度,以温水浴复苏。胚胎复苏后通过过渡孵化液处理适时,再入池水以平皿或烧杯内的自制纱网(简称烧杯网)气泵充气孵化,最后计算实验胚胎的成活率与孵化率。

上述降温处理中采用的慢速降温程序为:

$0^{\circ}\text{C} \xrightarrow{0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}} -7^{\circ}\text{C} \xrightarrow{0.2^{\circ}\text{C}/\text{分}} -15^{\circ}\text{C} \xrightarrow{1^{\circ}\text{C}/\text{分}} -20^{\circ}\text{C} \text{ 或 } -30^{\circ}\text{C}$   
(平衡5分钟或植冰) (平衡15分钟) (平衡30分钟)

本试验偶尔采用快速降温,其程序为:

$0^{\circ}\text{C} \xrightarrow{2^{\circ}\text{C}/\text{分}} -20^{\circ}\text{C} \sim -60^{\circ}\text{C} \xrightarrow{10^{\circ}\text{C}/\text{分}} -196^{\circ}\text{C}$   
(平衡15分钟) (存放10分钟)

## 2 结果

本文工作中共选用三种扩展液(E、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>)其基本成分是生理盐液,其中E<sub>2</sub>另含羟甲基氨基甲烷与牛血清白蛋白,E<sub>3</sub>为1640组织培养液,E<sub>1</sub>组成较简单,但从几种鱼类胚胎的试验结果看其效果更好些(见表 I ~ N),其组成(mg/100ml)如下:

NaCl 900、KCl 50、CaCl<sub>2</sub>200、MgCl<sub>2</sub>60

低温保护剂的试验结果显示,二甲亚砜(DMSO)与甲醇等量混用效果较好(见表 II),但在不同试验组合中也出现在采用等量浓用的扩展液中,单一 DMSO 比其 DMSO 与甲醇混用组效果好(见表 I)。在借鉴他人工作基础上,本试验选用的 DMSO 的浓度为4~10%,据有关报道 DMSO 浓度用量过高,特别是冷冻材料处于非冻结状态下显示明显的毒性[章龙珍等,1992]。以现存试验资料表明适宜于鱼胚冻存的低温保护剂仍有待发掘。

从本试验的异育银鲫结果(见表 N)可看出鱼类胚胎发育期在冻存中显示明显影响,从原肠期到出膜前期胚胎随发育进展,复苏后的成活率渐高,其中以心跳期保存效果最佳。

目前鱼胚冻存的低温极限仍停留在-25℃左右,且终温存放时间是暂短的。个别报道有突破[张新生等,1987],但结果难以重复。此外,我们还对 DMSO 进口的与国产的,冻存管进口的与国产品进行过对比试验,结果表明无差异,但国产的冻存管因产品规格欠规范,使用中多有不便。

## 3 讨论

本试验共选用5种鱼类胚胎进行试验,由于试验中诸因素各异,非同步进行的,故难以比较。从有关资料报道鱼卵经大小对胚体成活率有影响[Loeffler & Lortrup, 1970],但本试验结果差异不明显,胚体发展阶段的影响试验结果显示是显著的。

扩展液亦即盐液,其作用在于维持胞体内外的渗透压平衡,对配子精、卵而言可使其不被激活。学者们普遍认为扩展液组成越简单越好,我们的试验结果也证实了这点。不过面对鱼胚冻存研究的现状,考虑适当补加些有机成分是值得探讨的。

鱼类胚胎低温保存研究进展如此迟缓,原因不外鱼卵过大,鱼胚组织结构透水膜层次复杂,就目前选用的低温保护剂性能而言,从其它生物材料的低温保存效果看二甲亚砜较为理想,但对鱼类而言,它的分子量偏大,在短期内不可能渗透到鱼胚的各个组织层次,据 Havey 与 Ashwood-Smith[1982]有关鲑类鱼卵的研究表明,既使利用目前低温保护剂中分子量最小的甲醇,在2小时内只能达到所期望平衡浓度的23%[Harvey 和 Ashwood-smith, 1982]。为此,本试验中基本上选用慢速降温,以延长保护剂渗透的时间,可是即使以低于0.01℃/分的速率致冷(这在目前是难以达到的),也很难使保护剂渗透到全胚。这是造成鱼胚胞内严重失水,胚体表皱缩,细胞分离[赵维信等,1992]至使鱼胚死亡的根本原因所在。94年我们曾对鱼胚增加在0℃的平衡渗透时间进行过试验,结果发现平衡时间在2~4小时内对胚体无显著伤害,但越过5小时平衡则导致胚胎中毒出现畸型。章龙珍等[1992]曾报道过超过180分钟后胚胎会出现中毒症状。

鉴于上述,不少学者对现行鱼胚冻存前景感到失望,于是思路开拓,另寻其它途径,集思广义,百家争鸣有益于学术进展,面对鱼胚冻存研究现状,如此举措,或许在拯救濒于绝灭的物种中,为未来人类的水产事业增添光明。

表1 鲢鳙胚胎低温保存试验结果

Table 1 Results of cryopreservation test from Hypophthalmichthys and Aristichthys nobilis embryos

种类	胚总数(个)	终温(°C)	扩展液	保护剂(%)	成活率(%)	孵化率(%)
胚孔封闭期	10	-5	E <sub>2</sub>	DMSO 8	0	0
	10	-5	E <sub>1</sub>	DMSO 8	10	10
眼泡期	17	-7	E <sub>1</sub>	{ DMSO 8 甲醇 8	94	91
	22	-7	E <sub>1</sub>	{ DMSO 8 蔗糖 10	80	56
	18	-7	E <sub>1</sub>	DMSO 10	47	33
	10	-5	E <sub>2</sub>	DMSO 8	60	0
晶体出现期	10	-5	E <sub>1</sub>	DMSO 8	70	30
	14	-7	E <sub>1</sub>	{ DMSO 8 甲醇 8	100	64
	14	-7	E <sub>1</sub>	{ DMSO 8 蔗糖 10	88	50
鲢	14	-7	E <sub>1</sub>	DMSO 10	60	47
	10	-5	E <sub>2</sub>	DMSO 8	70	
	10	-5	E <sub>1</sub>	DMSO 8	60	
	10	-15	E <sub>2</sub>	DMSO 8	10	
	10	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8	20	
	10	-20	E <sub>2</sub>	DMSO 8	0	
	10	-20	E <sub>1</sub>	DMSO 8	10	
	10	-25	E <sub>2</sub>	DMSO 8	0	
	10	-25	E <sub>1</sub>	DMSO 8	0	
	10	-5	E <sub>2</sub>	DMSO 8	50	20
10	-5	E <sub>1</sub>	DMSO 8	80	40	
鳙	40	-7	E <sub>1</sub>	{ DMSO 8 甲醇 8	30	25
	40	-7	E <sub>1</sub>	{ DMSO 8 蔗糖 10	15	15
	40	-7	E <sub>1</sub>	DMSO 10	10	10
	40	-15	E <sub>1</sub>	{ DMSO 8 甲醇 8	8	8
	40	-15	E <sub>1</sub>	{ DMSO 8 蔗糖 10	5	5
	40	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 10	2.5	2.5

表2 草鱼胚胎低温保存试验结果  
 Table 2 Results of cryopreservation test from *Ctenophayngodon ideltas* embryos

胚期	胚总数(个)	终温(°C)	扩展液	保护剂(%)	成活率(%)	孵化率(%)
尾芽期	10	-5	E <sub>2</sub>	DMSO 8	90	80
	10	-5	E <sub>1</sub>	DMSO 8	100	50
	10	-15	E <sub>2</sub>	DMSO 8	80	50
	10	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8	90	50
	10	-20	E <sub>2</sub>	DMSO 8	0	0
	10	-20	E <sub>1</sub>	DMSO 8	0	0
	10	-25	E <sub>2</sub>	DMSO 8	0	0
	10	-25	E <sub>1</sub>	DMSO 8	0	0
晶体出现期	10	-5	E <sub>1</sub> +E <sub>2</sub>	DMSO 8	100	70
	10	-5	E <sub>1</sub> +E <sub>2</sub>	{ DMSO 8 甲醇 8	80	30
	10	-15	E <sub>1</sub> +E <sub>2</sub>	DMSO 8	70	40
	10	-15	E <sub>1</sub> +E <sub>2</sub>	{ DMSO 8 甲醇 8	50	30
心跳期	10	-15	E <sub>1</sub> +E <sub>2</sub>	DMSO 8	90	20
	10	-15	E <sub>1</sub> +E <sub>2</sub>	{ DMSO 8 甲醇 8	20	20
	10	-20	E <sub>1</sub> +E <sub>2</sub>	DMSO 8	50	10
	10	-20	E <sub>1</sub> +E <sub>2</sub>	{ DMSO 8 蔗糖 8	0	0

表3 团头鲂胚胎低温保存试验结果  
Table 3 Results of cryopreservation test from *Megalobrama amblycephala* embryos

胚期	胚总数 (个)	终温 (C)	扩展液	保护剂 (%)	成活率 (%)	孵化率 (%)	附注
眼基出现期	65	-7	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 甲醇 8	86	63	
	41	-7	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 蔗糖 10	80	54	
	74	-7	E <sub>1</sub>	DMSO 10	77	50	
	62	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 甲醇 8	16	3	
	47	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 蔗糖 10	11	0	
	48	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 10	8	0	
	61	-23	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 甲醇 8	5	7	
	68	-23	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 蔗糖 10	1	0	
	63	-23	E <sub>1</sub>	DMSO 10	0	0	
	40	-7	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 甲醇 8	90	67	
39	-7	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 蔗糖 10	82	5		
40	-7	E <sub>1</sub>	DMSO 10	70	4		
40	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 甲醇 8	20	5		
40	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 蔗糖 10	10	3		
40	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 10	15	8		
肌肉效应期	10	-5	E <sub>2</sub>	DMSO 8	70		
	10	-5	E <sub>1</sub>	DMSO 8	80		
	10	-15	E <sub>2</sub>	DMSO 8	20		
	10	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8	30		
	10	-20	E <sub>2</sub>	DMSO 8	0		
	10	-20	E <sub>1</sub>	DMSO 8	20		
	10	-25	E <sub>2</sub>	DMSO 8	0		
	10	-25	E <sub>1</sub>	DMSO 8	0		
	10	-30	E <sub>1</sub>	DMSO 8	0	0	烧杯网孵化
	10	-30	E <sub>3</sub>	DMSO 8	0	0	烧杯网孵化
心跳期	10	-30	E <sub>3</sub>	DMSO 4, 甲醇 4	10	0	烧杯网孵化
	10	-40	E <sub>1</sub>	DMSO 8	10	0	烧杯网孵化
	10	-40	E <sub>3</sub>	DMSO 8	0	0	烧杯网孵化
	10	-0	E <sub>3</sub>	DMSO 4, 甲醇 4	10	0	烧杯网孵化
	10	-100	E <sub>3</sub>	DMSO 8	0	0	快速降温, 孵化同上
	10	-100	E <sub>3</sub>	DMSO 4, 甲醇 4	0	0	快速降温, 孵化同上
	10	-196	E <sub>3</sub>	DMSO 8	0	0	快速降温, 孵化同上
	10	-196	E <sub>3</sub>	DMSO 4, 甲醇 4	0	0	快速降温, 孵化同上

表4 异育银鲫胚胎低温保存试验结果  
Table 4 Results of cryopreservation test from *Carassius auratus* embryos

胚期	胚总数 (个)	终温 (°C)	扩展液	保护剂 (%)	成活率 (%)	孵化新 (%)	附注
原肠期	12	-10	E <sub>1</sub>	DMSO 8	0	0	
	12	-10	E <sub>1</sub>	甲醇 8	0	0	
尾芽期	10	-10	E <sub>1</sub>	DMSO 8	0	0	
	10	-10	E <sub>1</sub>	甲醇 8	0	0	
晶体出现期	10	-10	E <sub>1</sub>	DMSO 8	20	0	
	10	-10	E <sub>1</sub>	DMSO 8	10	0	
	10	-5	E <sub>2</sub>	DMSO 8	90	70	
	10	-5	E <sub>1</sub>	DMSO 8	60	60	
	10	-15	E <sub>2</sub>	DMSO 8	20	20	
	10	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8	100	90	
	10	-20	E <sub>2</sub>	DMSO 8	40	30	
	10	-20	E <sub>1</sub>	DMSO 8	20	50	
	10	-25	E <sub>2</sub>	DMSO 8	0	0	
	10	-25	E <sub>1</sub>	DMSO 8	80	40	
肌肉效应期	10	-5	E <sub>2</sub>	DMSO 8	80	0	
	10	-5	E <sub>1</sub>	DMSO 8	100	50	
	10	-15	E <sub>2</sub>	DMSO 8	40	0	
	10	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8	30	10	
	10	-20	E <sub>2</sub>	DMSO 8	20	10	
	10	-20	E <sub>1</sub>	DMSO 8	30	0	
	10	-25	E <sub>2</sub>	DMSO 8	10	0	
	10	-25	E <sub>1</sub>	DMSO 8	10	0	
心跳期	11	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8	90	90	DMSO 为国产品
	10	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8	90	90	
	10	-15	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 甲醇 8	60	50	
	18	-23	E <sub>1</sub>	DMSO 8	85	85	DMSO 为国产品
	10	-23	E <sub>1</sub>	DMSO 8	80	80	
	10	-23	E <sub>1</sub>	DMSO 8, 甲醇 8	80	80	

本文工作曾得到楼允东教授的资助,92至94学年的应届毕业生周凯、邢振江、葛绮群曾参与该题工作。在此一并致谢。

### 参 考 文 献

- [1] 张新生等,1987.鲤鱼胚胎冷却至-196°C的试验.上海机械学院学报,9(3):83-91.
- [2] 章龙珍等,1992.鱼类胚胎冷冻保存前几个因子对其成活率影响的研究.淡水渔业,(1):20-24.
- [3] 赵维信等,1992.几种鲤科鱼类精子如胚胎冷冻损伤的扫描电镜研究.淡水渔业,(5):3-5.
- [4] Loeffler, C. A. & S., Lortrup, 1970. Water balance in the Salmon egg. J, Exp. Biol. 52: 291-8
- [5] Harvey, B. & M. J., Ashwood-smith, 1982. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. Cryobiology, 19:29-40.