

鲈鱼胚胎程序化冷冻保存的研究

于过才^{1,2} 陈松林^{1*} 孔晓瑜² 田永胜¹ 季相山¹

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所,青岛 266071)

(²中国海洋大学水产学院,青岛 266003)

摘要 对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)胚胎的程序降温冷冻保存进行了研究。通过稀释液的筛选实验,选择了一种培养效果好的稀释液 DS1 液。研究了不同发育阶段胚胎对抗冻液的毒性耐受力,表明肌肉效应期胚胎的耐受力最强。测定了心跳期胚胎在抗冻液 A₁、A₂、B₁、B₂ 中的平衡处理时间,为进行鲈鱼胚胎冻前平衡提供了参考时间。比较了植冰和不植冰对鲈鱼胚胎冷冻保存结果的影响及不同洗脱方法洗脱胚胎的效果。结果表明,在冷冻过程中诱导植冰的胚胎成活率高于未植冰组,两步法洗脱效果优于一步法和三步法。用不同降温速率进行了鲈鱼胚胎的超低温冷冻保存实验,结果表明,采用 1.5 °C/min 的降温速率降温,在液氮中冷冻保存 30 min 的 72 粒心跳期胚胎中有 3 粒成活,成活率为 4.2%。

关键词 鲈鱼 胚胎 程序冷冻

中图分类号 Q813.0959.483 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2004)01-0001-08

Study on programmed cryopreservation of sea perch embryos

YU Guo-cai^{1,2} CHEN Song-lin^{1*} KONG Xiao-yu²

TIAN Yong-sheng¹ JI Xiang-shan¹

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071)

(² College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT Programmed freezing of sea perch embryos was studied in this paper. We selected an effective extender-DS1 by treating closure stage of blastopore in 8 extenders for 10 h. The toxicity tolerance of embryos at various stages of development towards the solution containing 10% DMSO was examined. The result showed that embryos at muscular contraction stage tolerated the higher toxicity of the cryoprotectant than the others. Equilibration time that embryos were treated in solution A₁、A₂、B₁、B₂ was determined and this provided evidence for treating embryos in cryoprotective agents before cryopreservation. Comparing effects of seeding and no-seeding on cryopreservation and evaluating effects of different elution methods, we found that survival rate of seeding group was higher than that of no-seeding group and that two-step method (Embryos were first placed in 0.25 mol/L sucrose for 10min and then in sea water) was better than one-step method and three-step method. Cryopreservation of sea perch embryos

国家 863 高技术研究发展项目(2001AA621100)资助

* 通讯作者。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期 2003-05-28 接受日期 2003-11-02

作者简介:于过才(1976-)男,在读硕士研究生,主要从事鱼类胚胎发育及低温生物学研究。E-mail: Yuguocai-112@etang.com

was done with different cooling rates of 0.4 °C/min、1.0 °C/min、1.2 °C/min、1.5 °C/min、2.0 °C/min, respectively. The result showed that 3 embryos survived from 72 embryos at heartbeat stage that were cryopreserved with cooling rate of 1.5 °C/min and held in liquid nitrogen for 30 min before thawing, the survival rate was 4.2%.

KEY WORDS Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) Embryo Programmed freezing

鱼类配子和胚胎的冷冻保存对种质资源保护、低温生物学、遗传育种和水产养殖都具有重要的理论意义和应用价值。自20世纪50年代Blaxter(1953)开始大西洋鲑鱼精巢冷冻保存以来,经过几十年的努力,鱼类精子的冷冻保存已经取得了巨大成就,但在鱼类胚胎冷冻保存方面的研究进展不大。由于鱼类胚胎特别是海水鱼类胚胎体积大,含有大量的卵黄和水分,降温速率不一,给胚胎冷冻保存工作带来很大困难。Zhang等(1989)将鲤胚胎冷冻到-196 °C,在16枚解冻的胚胎中有4枚复活,其中3枚孵出鱼苗。张克俭等(1997)将心跳期泥鳅胚胎冷冻到-196 °C,在16枚胚胎中有1枚复活并孵出鱼苗,但这些结果目前尚难以重复。章龙珍等(2002)虽然用玻璃化法在液氮中冷冻泥鳅胚胎获得了成活,但没有孵化出苗。至于海水鱼类胚胎的冷冻保存研究目前尚未见成功报道。

程序冷冻法是利用程序降温仪,按照预先设计的降温程序将种质细胞所处的环境降至一定温度,然后将其投入液氮中保存。一般分为快速冷冻和慢速冷冻两种方法。程序冷冻法采用较低浓度的抗冻保护剂,对胚胎造成的毒性损害较小(梁成光,2001),并且方法可靠,适用于大量冷冻。程序冷冻法作为一种常用的哺乳动物胚胎冷冻保存方法,在冷冻保护剂的选择、平衡时间、植冰温度、降温速率、复温速率、洗脱方法等技术环节上已形成了一套完整的技术流程,在畜牧业生产中已作为一种常规的胚胎冷冻保存方法被广泛应用,但在鱼类胚胎程序冷冻研究方面进展不大。为攻克海水鱼类冷冻保存的难关,作者以我国重要海水养殖鱼类——鲈鱼为材料,进行了胚胎超低温冷冻保存的研究,以求为海水鱼类冷冻保存奠定基础。

1 材料与方法

1.1 鲈鱼胚胎来源及稀释液的筛选

实验在中国水产科学研究院黄海水产研究所小麦岛渔业科学实验基地进行。作者对鲈鱼亲鱼注射催产素进行催产,人工授精,受精卵在网箱中培养,待受精卵发育到实验所需要的发育阶段,取出胚胎进行实验。

为筛选合适的稀释液,在配制的8种稀释液中处理鲈鱼胚孔封闭期胚胎10 h,然后转移到海水中培养(室温18~20 °C)直到出膜,计算孵化率。同时用海水培养组作对照,每组胚胎20粒。为筛选适宜浓度的非渗透性抗冻剂,在上述所筛选的稀释液中分别添加1.0%~6.0%的葡萄糖和1.0%~8.0%的蔗糖,配成新稀释液,在新稀释液中处理心跳期胚胎8 h,计算成活率,同时用不加非渗透性抗冻剂的稀释液处理胚胎作对照组(室温18~20 °C)。

1.2 适宜胚胎发育阶段的筛选

用DS1作稀释液,配制成10%浓度的DMSO抗冻液,分别处理原肠中期、胚孔封闭期、肌肉效应期和出膜前期的鲈鱼胚胎60 min,然后再转入海水中培养直到出膜,计算孵化率。除原肠期胚胎每组用20粒外,其余都用10粒。

1.3 平衡处理时间的测定

室温下(17.5 °C)分别在抗冻液A₁、A₂、B₁、B₂(表1)中处理心跳期胚胎30 min、60 min、90 min,然后转到海水中培养,直到出膜,计算孵化率,同时用海水培养组作对照。

1.4 植冰与未植冰效果的比较

配制 H₁、H₂、H₃ 3 种溶液作为抗冻液(表 1)。先在 50% 抗冻液中分别处理植冰组和未植冰组心跳期胚胎 30 min, 再在 100% 抗冻液中分别处理 30 min, 然后把处理过的胚胎装入麦管, 密封, 一起用下列程序降温: 从初温 16 °C 先以 2.0 °C/min 的降温速率降到 -12 °C, 在 -12 °C 先平衡 5 min, 植冰组的麦管再植冰 5 min, 同时未植冰组麦管不植冰, 再平衡 5 min, 然后植冰组和未植冰组麦管一起以 1.5 °C/min 的降温速率降到 -20 °C, 保存 5 min。胚胎用 37 °C 水浴解冻, 0.25 mol/L 蔗糖洗脱液洗脱 10 min 后转入海水中培养, 计算成活率。

1.5 不同洗脱方法的效果比较

室温下(18 °C)在 A₂ 抗冻液中处理心跳期胚胎 45 min, 然后用下列程序降温: 从初温 16 °C 先以 2.0 °C/min 的降温速率降到 -7.0 °C, 在 -7.0 °C 平衡 15 min, 再以 1.0 °C/min 的降温速率降到 -11.0 °C, 在 -11.0 °C 植冰 1 min, 最后以 1.0 °C/min 的降温速率降到 -20 °C。把降温至 -20 °C 的胚胎快速取出, 37 °C 水浴解冻, 然后分别用不同方法洗脱。一步法: 直接进入海水; 两步法: 先进入 0.25 mol/L 蔗糖, 洗脱 10 min → 海水; 三步法: 先入 0.5 mol/L 蔗糖, 洗脱 5 min → 0.25 mol/L 蔗糖, 洗脱 5 min → 海水。

1.6 程序降温冷冻保存

用 A₂ 作抗冻液。先在 50% 低浓度抗冻液中平衡处理心跳期胚胎 30 min, 再转到 100% 高浓度抗冻液中平衡处理 20 min。然后把处理过的胚胎装入麦管中, 每管中大约 10 ~ 20 粒, 密封麦管, 用 Planer 程序降温仪(Kryo-360-1.7 型)进行程序降温。降温程序如下: 从初温 16 °C 先以 2.0 °C/min 的降温速率降到 -7.0 °C, 在 -7.0 °C 保温 5 min, 植冰 5 min, 再分别以 0.4 °C/min、1.0 °C/min、1.2 °C/min、1.5 °C/min、2.0 °C/min 的降温速率降到 -30 ~ -40 °C, 平衡 10 min, 然后快速投入液氮中保存 30 min。在冷冻过程中, 把在 -30 °C 平衡 10 min 的胚胎取出, 用 37 °C 水浴解冻, 两步法洗脱 10 min, 在液氮中保存 30 min 的胚胎也用上述方法解冻和洗脱, 最后都转到海水中培养, 计算成活率和孵化率。

表 1 抗冻液
Table 1 Cryoprotectants

A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	H ₁	H ₂	H ₃
10% DMSO	15% DMSO	10% DMSO	20% DMSO	9% PG + 6% Methanol	4% DMSO + 10% PG	7.5% Glycerol + 7.5% PG

注: B₁、B₂ 的稀释液为用 DS1 液配制的 0.5 mol/L 的蔗糖液, 其余的稀释液为用 DS1 液配制的 0.25 mol/L 的蔗糖液

2 实验结果

2.1 稀释液的筛选结果

稀释液的筛选结果见表 2。鲈鱼胚胎在稀释液 DS1 中培养的效果最好, 孵化率为 95%, 比对照组高 10%。DS3 液培养的效果比对照组稍差, 孵化率为 80%。胚胎在其他 6 种稀释液的孵化率都不高于 40%。在 DS1 液的基础上添加葡萄糖和蔗糖的实验结果见表 3。在添加 1.0%、1.5% 葡萄糖实验组中, 胚胎的成活率分别为 100% 和 95%, 都不低于对照组(成活率为 95%)。添加 3.0% 葡萄糖的实验组成活率为 90%, 比对照组略低。随着葡萄糖浓度的增加, 胚胎成活率降低, 当葡萄糖浓度 ≥ 4.0% 时, 胚胎无一存活, 说明添加少量的葡萄糖能提高鲈鱼胚胎的成活率, 但葡萄糖的浓度最好不要超过 3.0%。添加 1.0% ~ 8.0% 的蔗糖, 则对胚胎成活率无明显影响, 成活率都不小于 95%。添加葡萄糖和蔗糖都能提高鲈鱼的胚胎成活率, 但从总体上讲, 添加蔗糖的效果要好于葡萄糖。

表2 鲈鱼胚胎在不同稀释液中的平均孵化率(% $n=2$)Table 2 Mean hatching rates of sea perch embryos in various extenders(% $n=2$)

稀释液 Extender								
DS1	DS2	DS3	DS4	DS5	DS6	DS7	DS8	对照 Control
95	40	80	15	10	10	5	15	85

表3 不同浓度的葡萄糖与蔗糖对鲈鱼胚胎成活率的影响

Table 3 Effects of glucose and sucrose of different concentrations on survival rates of sea perch embryos

葡萄糖与蔗糖浓度(%) Glucose and sucrose concentration(%)	样本数(粒) Samples(Indi.)	成活胚胎(粒) Survival embryos(Indi.)	成活率(%) Survival rates(%)
葡萄糖 Glucose	1.0	20	100
	1.5	20	95
	3.0	20	90
	4.0	20	0
	5.0	20	0
	6.0	20	0
蔗糖 Sucrose	1.0	20	100
	2.0	20	100
	4.0	20	95
	8.0	20	95
对照组 Control	/	20	95

2.2 适宜胚胎发育阶段的筛选结果

由表4可看出,肌肉效应期胚胎对抗冻剂的耐受力最强,孵化率高达90%,最适合冷冻保存。原肠中期胚胎次之,孵化率为70%,胚孔封闭期和出膜前期胚胎耐受力最差,孵化率都仅为65%。

表4 不同发育阶段胚胎在10% DMSO中处理60 min的平均孵化率(% $n=2$)Table 4 Mean hatching rates of embryos at various stages treated in 10% DMSO for 60 min(% $n=2$)

项目 Item	原肠中期 Metaphase of gastrula	胚孔封闭期 Closure stage of blastopore	肌肉效应期 Muscular contraction stage	出膜前期 Prehatching stage
实验组 Experiment group	70	65	90	65
对照组 Control	87.5	87.5	100	100

2.3 平衡处理时间的测定结果

由表5可知,抗冻液A组和B组相比较,同时平衡处理90 min的胚胎,A组孵化率高于B组。在B组中,抗冻液B₁(10% DMSO)中的胚胎孵化率高于B₂(20% DMSO),这说明平衡时间相同,抗冻剂浓度越高,胚胎的孵化率越低。随着平衡时间的延长,各实验组胚胎的孵化率下降,为保证冷冻前胚胎有足够的成活率,胚胎在A₁、A₂、B₁、B₂中平衡时间最好不要超过90 min。因此,对于同一种抗冻剂来说,要根据其浓度的不同,确定合适的平衡时间,以保证胚胎在冷冻前有足够的成活率。

表 5 鲈鱼胚胎在不同抗冻液中平衡处理后的孵化率(%)
Table 5 Hatching rates of embryos treated in different cryoprotectants(%)

处理时间(min) Treatment time(min)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	对照组 Control
30	100	100	100	90	/
60	90	90	80	75	/
90	80	75	70	0	100

2.4 植冰效果与未植冰效果的比较

植冰组与未植冰组比较,在抗冻液 H₁、H₂、H₃ 中经植冰处理的胚胎,解冻后成活率分别为 80.00%、75.00%、41.67%,比未植冰组分别高 24.44%、17.86%、14.40%,由此可见,胚胎植冰的效果明显好于未植冰组(表 6)。

表 6 在不同抗冻液中胚胎植冰效果与未植冰效果的比较
Table 6 The comparison of effects of seeding and no-seeding for embryos in different cryoprotectants

保存温度 Storage temperature	处理 Treatment	成活率(%) Survival rate(%)		
		H ₁	H ₂	H ₃
-20 ℃	植冰组 Seeding group	80.00	75.00	41.67
	未植冰组 No-seeding group	55.56	57.14	27.27

2.5 不同洗脱方法的效果比较

不同洗脱方法的效果比较见表 7。用两步法洗脱解冻的胚胎效果最好,成活率为 75%,用一步法和三步法洗脱胚胎的效果都比较差,成活率均为 50%。

表 7 不同洗脱方法效果的比较
Table 7 The comparison of effects of different elution methods

洗脱方法 Elution methods	样本数(粒) Samples(Indi.)	成活胚胎(粒) Survival embryos(Indi.)	成活率(%) Survival rate(%)
一步法 One-step method	16	8	50
两步法 Two-step method	16	12	75
三步法 Three-step method	10	5	50

2.6 程序降温冷冻实验结果

用不同的降温速率进行的冷冻实验结果表明,1.5 ℃/min 的降温速率的效果最好,在 -30 ℃ 保存的胚胎成活率为 8.89%,在液氮温度下保存 30 min 的 72 粒胚胎中有 3 粒成活,成活率为 4.2%(见表 8)。用其他降温速率进行的冷冻实验,胚胎都没有获得成活。对成活胚胎进行显微镜观察,发现胚胎卵膜局部内陷,但能看到明显的心跳。

表 8 冷冻保存实验结果(1.5 ℃/min)
Table 8 Results of cryopreservation(1.5 ℃/min)

保存温度(℃) Storage temperature(℃)	样本数(粒) Samples(Indi.)	成活胚胎(粒) Survival embryos(Indi.)	成活率(%) Survival rate(%)
-30	45	4	8.9
-196	72	3	4.2

3 讨论

3.1 稀释液的筛选

鲈鱼属鲈形目(Percoidei) 鲈科(Serranidea) 花鲈属(*Lateolabrax* 胡先成 1997)。属于广盐性鱼类, 通常生活在河口地区, 也有直接进入半咸水、淡水湖泊的, 在盐度高达3.4的海域也可捕到鲈鱼。鲈鱼产卵时的盐度范围较广, 不仅可在近河的咸淡水交混水域产卵, 也可在高盐度(3.15~3.3)海区产卵, 因此, 其受精卵在盐度为1.3~3.5的范围内均能孵化, 适应环境能力很强。在稀释液的筛选实验中, DS1 稀释液处理的胚胎孵化率超过90%, 在添加1%~8%蔗糖的DS1 稀释液中(渗透压变化大)胚胎的耐受力也很强。

在DS1 中添加葡萄糖和蔗糖能提高胚胎的孵化率, 作者认为这是由于添加葡萄糖和蔗糖后使溶液的渗透压提高, 比较适合鲈鱼胚胎的发育。另外, 葡萄糖和蔗糖都是非渗透性抗冻剂, 添加葡萄糖和蔗糖还对胚胎有一定保护作用。Philippe(1991)认为0.5 mol/L 蔗糖能轻微提高太平洋牡蛎胚胎的冷冻耐受力, 并能减轻冷冻损伤。鲈鱼胚胎对高浓度的葡萄糖和蔗糖的耐受力不同, 对高浓度的蔗糖能适应, 而对高浓度的葡萄糖适应力很差, 作者认为这是由于葡萄糖分子量比蔗糖分子量小的多, 同浓度的蔗糖和葡萄糖, 葡萄糖的渗透压将近是蔗糖的2倍, 超出了鲈鱼胚胎的耐受范围。另外, 在实验中发现, 添加1.0%葡萄糖的DS1 液(简称DS1-1 液)比D-15(陈松林 1992)的效果要好, 而DS1-1 液与D-15 的渗透压差不多(DS1-1 的渗透压约为381.55 mosm, D-15 的渗透压约为370.50 mosm), 只是DS1-1 液多了CaCl₂的成分, 可见Ca²⁺对鲈鱼胚胎发育有一定影响。许多研究表明, 在无钙溶液中培养胚胎会抑制卵膜的硬化(Knibb 1994)。施兆鸿等(1995)研究发现, 黑鲷受精卵在没有Ca²⁺的海水中不能孵出仔鱼。而对于淡水鱼, 章龙珍等(1992)认为Ca²⁺、Mg²⁺对胚胎成活率影响不大, 主要是以NaCl、KCl为主产生的渗透压对胚胎的影响。可见, Ca²⁺对淡水鱼与海水鱼胚胎发育的作用是不一样的, Ca²⁺是海水鱼胚胎发育所必需的离子之一, 因此, 在配制海水鱼稀释液时, 要添加一定量的Ca²⁺。

3.2 鲈鱼胚胎的适宜冷冻保存阶段及冻前平衡处理时间

鱼类胚胎不同于哺乳类胚胎。哺乳类胚胎一般都是用早期胚胎(大多为囊胚)进行冷冻保存(何万红 2002)。而鱼类胚胎冷冻保存采用心跳期胚胎较多, 但也有学者认为用尾芽期及胚孔封闭期胚胎较好, 至今意见还不一致。Zhang等(1995)研究了斑马鱼不同发育时期的胚胎对冷冻降温的敏感性, 结果表明早期发育阶段的胚胎对冷冻最敏感, 心跳期胚胎对冷冻降温的耐受力最强。Robertson等(1988)认为似石首鱼的尾芽期胚胎对各种抗冻剂的耐受力比桑椹胚强。章龙珍等(2002)选用胚孔封闭期、肌肉效应期、胚体转动期的泥鳅胚胎进行了玻璃化冷冻保存实验, 认为胚孔封闭期胚胎在冻前脱水过程中, 原生质与卵黄脱水一致, 可以避免卵黄过度脱水解冻后破裂。综上所述, 虽然观点不尽相同, 但大体上都认为中期胚胎(胚孔封闭期到心跳期)冷冻耐受力较强, 适合冷冻保存。本实验结果也表明鲈鱼肌肉效应期胚胎适合冷冻保存。

胚胎冷冻前都要进行平衡处理, 使细胞脱水, 以防止冷冻过程中冰晶的形成, 减少冰晶损伤, 但要防止过度脱水而产生的溶液效应(王新庄 1996), 因此, 在冻前平衡胚胎时, 在抗冻剂中的处理时间应是最佳的。平衡处理时间的长短一般与抗冻剂的种类和浓度有关。由于抗冻剂都有毒性, 对于同种抗冻剂来说, 胚胎平衡处理时间随抗冻剂浓度的增加而缩短。胚胎在抗冻液中处理时间越长, 受到的毒害越大。在冻前平衡实验中, 胚胎在低浓度抗冻剂(A₁、A₂、B₁)中的平衡处理时间在90 min之内孵化率没有明显下降。

3.3 植冰及抗冻剂的洗脱

在冷冻过程中, 溶液温度降到冰点以下而不结冰, 会使溶液处于过冷状态, 若溶液进一步下降到一定程度时, 溶液会突然结晶而对胚胎造成机械损伤。因此, 在程序冷冻保存的操作中, 常采取植冰(置核)的措施, 即在抗冻液冰点略低温度人为诱导抗冻液结冰, 以降低整体溶液的过冷度, 避免溶液突然结冰造成的机械损伤。植冰还能减少融解热释放时引起的热能变化。一些研究发现生物细胞内的成核温度在-5~-15℃范围内(华泽钊 1994)。目前, 在人类及哺乳动物的冷冻保存中, 公认的适宜植冰温度为-6.5~-7.0℃, 因为此时

结冰迅速彻底(李媛 1996)。Xiang等(2002)在冷冻保存鼠的卵巢时,也是在 -7°C 诱导植冰。在植冰实验中,作者选择的植冰点为 -7°C 。

鱼类胚胎在冻前平衡和冷冻过程中,吸收了大量的抗冻剂,使其渗透压大为提高,如果将冷冻卵子或胚胎解冻后一步进入水中,由于渗透压相差太大,会导致细胞的溃解(陈松林 1991)。因此,解冻胚胎后,一定要逐步稀释去除胚胎里的抗冻剂,让胚胎过度到水中去。常用的洗脱方法主要有两种:一种是应用较高浓度的非渗透性抗冻剂,常用的是蔗糖。使用蔗糖去除抗冻剂的浓度范围很大,从 $0.25\sim 2.0\text{ mol/L}$ 。蔗糖在稀释细胞内抗冻剂时,维持了细胞外液较高的渗透压,使细胞内的抗冻剂缓和渗出,同时控制了细胞外水分渗入的速度和渗入量,减少了细胞渗透性休克现象的发生(石玉强 2002),这种方法操作简单。另一种是抗冻剂浓度递减的梯度稀释法,即分步骤将胚胎放在抗冻剂浓度由高到低的稀释液中洗脱,最后进入不含抗冻剂的等渗液中培养。这种方法操作繁琐,在去除哺乳动物胚胎内抗冻剂时应用较广。本实验采用前一种方法,结果表明,在 A_2 抗冻液中冷冻保存的胚胎用 0.25 mol/L 的蔗糖液两步法洗脱效果最好。

3.4 超低温冷冻保存

关于鱼类配子和胚胎的程序冷冻保存方法,目前常用的有分段慢速降温和分段快速降温。分段慢速降温一般是将样品从室温慢速($2\sim 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$)降到冰点温度,然后再以极慢的速率($0.05\sim 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$)降至约 -60°C 左右,再以约 $1\sim 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -85°C ,停留约 10 min ,最后快速降温至 -196°C 的保存温度。分段快速降温与分段慢速降温的主要差别就是从 $0^{\circ}\text{C}\sim -60^{\circ}\text{C}$ 采用 $2\sim 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率(陈松林 2002)。分段慢速降温在哺乳动物胚胎的冷冻保存中常用,大都获得了成功。Zhang等(1989)在进行鲤鱼胚胎的冷冻保存时也采用了这种降温模式,获得了液氮中保存的鲤鱼胚胎有 25% 复活并孵出鱼苗的成功实例。张克俭等(1997)对泥鳅等3种淡水鱼胚胎进行的冷冻保存实验表明,分段快速降温好于分段慢速降温。Guo等(1994)在研究牡蛎胚胎的冷冻保存时,认为 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率效果最好。作者在超低温冷冻保存实验中也采用 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率,在液氮中冷冻保存鲈鱼胚胎获得了成活。由此可见,鱼类胚胎种类不同,降温速率也不同,因此,应根据不同的胚胎采用不同的降温速率。本研究在液氮中冷冻保存鲈鱼胚胎而复活的实例,为利用程序控制冷冻法,攻克海水鱼类胚胎超低温冷冻保存的难关奠定了基础。

参 考 文 献

- 王新庄, 窦忠英. 1996. 影响哺乳动物胚胎冷冻效果的因素分析. 黄牛杂志, 24: 40~42
- 石玉强, 韩春芳, 潘庆杰. 2002. 哺乳动物胚胎冷冻技术的研究进展. 莱阳农学院学报, 19(1): 71~74
- 华泽钊, 任承盛, 等. 1994. 低温生物医学技术. 北京: 科学技术出版社
- 李媛. 1996. 卵子冻存技术. 国外医学妇产科学分册, 23(6): 338~342
- 何万红, 万五星, 张国红. 2002. 哺乳动物胚胎冷冻技术研究进展. 河北师范大学学报, 26(1): 85~89
- 张克俭, 楼允东, 张饮江, 等. 1997. 3种淡水鱼类胚胎低温保存及其降温和复温速率的研究. 水产学报, 21: 366~372
- 陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 1992. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究. 动物学报, 4: 413~424
- 陈松林, 刘宪亭. 1991. 鱼卵和胚胎保存研究进展. 淡水渔业, 1: 44~46
- 陈松林. 2002. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望. 水产学报, 26(2): 161~168
- 施兆鸿, 黄旭雄. 1995. 海水中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 含量对黑鲷胚胎及早期胚胎发育的影响. 海洋科学, 5: 33~38
- 胡先成, 曹双俊, 周忠良. 1997. 花鲈胚胎发育的研究. 重庆师范学院学报(自然科学版), 14(2): 51~56
- 梁成光, 崔建英, 薛晓先, 等. 2001. 利用不同冷冻方法建立大鼠胚胎保种库的研究. 内蒙古大学学报, 6: 653~656
- 章龙珍, 鲁大椿, 陈松林, 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, 22(1): 20~24
- 章龙珍, 鲁大椿, 柳凌, 等. 2002. 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究. 水产学报, 26(3): 213~217
- Blaxter T. H. S. . 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172: 189~190
- J. C. Gwo. 1994. Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Theriogenology*, 43: 163~174
- Knibb W. R., Alizur B. Moav *et al.*. 1994. Inhibition of egg chorion hardening of the marine teleost *Sparus aurata*. *Molecular Biology and Biotechnology*, 3: 23~29
- Philippe Renard. 1991. Cooling and freezing tolerances in embryos of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* methanol and sucrose effects. *Aquaculture*, 92:

43 ~ 57

Robertson S. M. ,Lawrence A. L. . 1988. Toxicity of the cryoprotectants glycerol , ethylene glycol , methanol , sucrose and sea salt solutions to the embryos of red drum. *The Prog. Fish-culturist* , 50 :148 ~ 154

X. S. Zhang , L. Zhao ,T. C. Hua , *et al.* . 1989. A Study on the cryopreservation of common carp embryos . *Cryo-letters* , 10 :271 ~ 278

Xiang Wang , Huifang Chen , Hang Yin *et al.* . 2002. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* , 415 :385

Zhang T. ,Rawson D M. . 1995. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* , 32(3) :239 ~ 246

启 示

各有关单位、各位读者：

《海洋水产研究》学报在科技部、农业部、中国水产科学研究院以及国家各级新闻出版部门的领导下,在广大读者的关心和支持下,稿源越来越多,期刊质量越来越高。最近,经国家科学技术部国科财函[2003]第34号文批准,从2004年开始,由原季刊改为双月刊。特此告知,并望广大读者踊跃投稿、订阅。

《海洋水产研究》编辑部

2004年1月

鲈鱼胚胎程序化冷冻保存的研究

作者: [于过才](#), [陈松林](#), [孔晓瑜](#), [田永胜](#), [季相山](#)
 作者单位: [于过才\(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛, 266071; 中国海洋大学水产学院, 青岛, 266003\)](#), [陈松林, 田永胜, 季相山\(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛, 266071\)](#), [孔晓瑜\(中国海洋大学水产学院, 青岛, 266003\)](#)
 刊名: [海洋水产研究](#) **ISTIC PKU**
 英文刊名: [MARINE FISHERIES RESEARCH](#)
 年, 卷(期): 2004, 25(1)
 被引用次数: 10次

参考文献(22条)

1. [王新庄; 窦忠英](#) [影响哺乳动物胚胎冷冻效果的因素分析](#) 1996(02)
2. [石玉强; 韩春芳; 潘庆杰](#) [哺乳动物胚胎冷冻技术的研究进展](#)[期刊论文]-[莱阳农学院学报](#) 2002(01)
3. [华泽钊; 任禾盛](#) [低温生物医学技术](#) 1994
4. [李媛](#) [卵子冻存技术](#) 1996(06)
5. [何万红; 万五星; 张国红](#) [哺乳动物胚胎冷冻技术研究进展](#)[期刊论文]-[河北师范大学学报\(自然科学版\)](#) 2002(01)
6. [张克俭; 楼允东; 张饮江](#) [3种淡水鱼类胚胎低温保存及其降温 and 复温速率的研究](#) 1997
7. [陈松林; 刘宪亭; 鲁大椿](#) [鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究](#) 1992
8. [陈松林; 刘宪亭](#) [鱼卵和胚胎保存研究进展](#) 1991
9. [陈松林](#) [鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望](#)[期刊论文]-[水产学报](#) 2002(02)
10. [施兆鸿; 黄旭雄](#) [海水中Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺含量对黑鲷胚胎及早期胚胎发育的影响](#) 1995
11. [胡先成; 曹双俊; 周忠良](#) [花鲈胚胎发育的研究](#) 1997(02)
12. [梁成光; 崔建英; 薛晓先](#) [利用不同冷冻方法建立大鼠胚胎保种库的研究](#)[期刊论文]-[内蒙古大学学报\(自然科学版\)](#) 2001(06)
13. [章龙珍; 鲁大椿; 陈松林](#) [鱼类胚胎冷冻保存前几个因子对其成活率影响的研究](#) 1992(01)
14. [章龙珍; 鲁大椿; 柳凌](#) [泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究](#)[期刊论文]-[水产学报](#) 2002(03)
15. [Blaxer T H S](#) [Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring](#) 1953
16. [J C Gwo](#) [Cryopreservation of oyster \(Crassostrea gigas\) embryos](#)[外文期刊] 1994
17. [Knibb W R; A Elizur B Moav](#) [Inhibition of egg chorion hardening of the marine teleost, Sparus aurata](#) 1994
18. [Philippe Renard](#) [Cooling and freezing tolerances in embryos of the pacific oyster, Crassostrea gigas: methanol and sucrose effects](#) 1991
19. [Robertson S M; Lawrence A L](#) [Toxicity of the cryoprotectants glycerol, ethylene glycol, methanol, sucrose and sea salt solutions to the embryos of red drum](#) 1988
20. [X S Zhang; L Zhao T C Hua](#) [A Study on the cryopreservation of common carp embryos](#) 1989
21. [Xiang Wang; Huifang Chen; Hang Yin](#) [Fertility after intact ovary transplantation](#)[外文期刊] 2002
22. [Zhang T; Rawson D M](#) [Studies on chilling sensitivity of zebrafish \(Brachydanio rerio\) embryos](#)[外文期刊] 1995(03)

本文读者也读过(10条)

1. [陈四清](#), [刘长琳](#), [庄志猛](#), [邹健](#), [李学文](#), [李迪](#), [齐国山](#), [CHEN Si-qing](#), [LIU Chang-lin](#), [ZHUANG Zhi-meng](#), [ZOU Jian](#), [LI](#)

Xue-wen, LI Di, QI Guo-shan 星突江鲮胚胎发育的研究[期刊论文]-渔业科学进展2009, 30(1)

2. 李健, 孙修涛, 刘德月, 戴芳钰, 赵法箴, 赵炳炎, 马云祥, 吴尚国, Li Jian, Sun Xiutao, Liu Deyue, Dai Fangyu, Zhao Fazhen, Zhao Bingyan, Ma Yunxiang, Wu Shangguo 不同养殖措施防治对虾暴发性流行病效果的初步研究[期刊论文]-海洋水产研究2000, 21(1)
3. 孙毅, 张秋金, 王义权, SUN Yi, ZHANG Qiu-Jin, WANG Yi-Quan 文昌鱼胚胎的程序化冷冻保存[期刊论文]-动物学报 2007, 53(3)
4. 高焕, 孔杰, 于飞, 王伟继, 罗坤, 孟宪红, 刘萍, 张天时, GAO Huan, KONG Jie, YU Fei, WANG Wei-ji, LUO Kun, MENG Xian-hong, LIU Ping, ZHANG Tian-shi 人工控制自然交尾条件下中国对虾父本的微卫星识别[期刊论文]-海洋水产研究 2007, 28(1)
5. 刘萍, 孔杰, 李健, 阎振广 白斑综合症病毒(WSSV)对中国对虾卵及各期幼体人工感染的试验研究[期刊论文]-海洋水产研究2001, 22(1)
6. 赵燕, 陈松林, 孔晓瑜, 田永胜, ZHAO Yan, CHEN Song-Lin, KONG Xiao-Yu, TIAN Yong-Sheng 几种因素对牙鲆胚胎玻璃化冷冻保存的影响[期刊论文]-动物学报2005, 51(2)
7. 田永胜, 陈松林, 于过才, 季相山, TIAN Yong-Sheng, CHEN Song-lin, YU Guo-cai, JI Xiang-Shan 大菱鲆胚胎的玻璃化冷冻保存[期刊论文]-水产学报2005, 29(2)
8. 史成银, 黄捷, 杨冰, 宋晓玲, 徐怀恕 应用PCR和RT-PCR技术对4种对虾病毒的检测[期刊论文]-海洋水产研究 2003, 24(1)
9. 陈松林, 田永胜, 沙珍霞, 季相山, 于过才, 赵燕, 王春花, 刘本伟 重要海水养殖鱼类精子和胚胎冷冻保存及种质冷冻库的建立[会议论文]-2005
10. 孙毅, 张秋金, 王义权 文昌鱼胚胎的冷冻保存[会议论文]-2006

引证文献(10条)

1. 田永胜, 刘本伟, 陈松林 牙鲆胚胎玻璃化冷冻及解冻过程中的温度因子与玻璃化率[期刊论文]-海洋水产研究 2008(5)
2. 王春花, 陈松林, 田永胜, 刘本伟, 邓寒 牙鲆胚胎程序化冷冻保存研究[期刊论文]-海洋水产研究 2007(3)
3. 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 张涛, 冯广朋, 赵峰 玻璃化液对锯缘青蟹不同时期幼体成活率的影响[期刊论文]-长江大学学报(自然科学版) 2005(8)
4. 黄晓荣, 庄平, 章龙珍, 冯广朋, 刘鉴毅, 张涛, 赵峰, 侯俊利 超低温冷冻对中华绒螯蟹胚胎形态结构的影响[期刊论文]-水产学报 2012(11)
5. 赵燕, 陈松林, 孔晓瑜, 田永胜 几种因素对牙鲆胚胎玻璃化冷冻保存的影响[期刊论文]-动物学报 2005(2)
6. 赵燕 牙鲆胚胎的玻璃化冷冻保存的研究[学位论文]硕士 2005
7. 丁浩, 田永胜, 武鹏飞, 刘洋, 陈松林 利用显微注射技术冷冻保存牙鲆胚胎[期刊论文]-中国水产科学 2008(5)
8. 赵燕, 陈松林, 孔晓瑜, 田永胜 几种因素对牙鲆胚胎玻璃化冷冻保存的影响[期刊论文]-动物学报 2005(2)
9. 孙毅, 张秋金, 王义权 文昌鱼胚胎的程序化冷冻保存[期刊论文]-动物学报 2007(3)
10. 孙毅, 张秋金, 王义权 文昌鱼胚胎的程序化冷冻保存[期刊论文]-动物学报 2007(3)

引用本文格式: 于过才, 陈松林, 孔晓瑜, 田永胜, 季相山 鲈鱼胚胎程序化冷冻保存的研究[期刊论文]-海洋水产研究 2004(1)