

文章编号:1000 - 0615(2002)02 - 0161 - 08

综述 ·

鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望

陈松林

(中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

关键词:鱼类;配子;胚胎;冷冻保存

中图分类号:Q954.4;S917 文献标识码:A

Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos

CHEN Song-lin

(Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources Certificated by the Ministry of Agriculture,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: The current status and importance of preserving fish germplasm resources were described. The basic principle of cryobiology and its application potentials in preservation of aquatic germplasm resources were examined. The mechanism of cryodamage was discussed. The recent advances and major problems in finfish gamete and embryo cryopreservation were reviewed. The prospects for cryopreservation research in fish gametes and embryos were looked into. The important research directions in cryopreservation of aquatic organisms were proposed.

Key words: fish; gametes; embryos; cryopreservation

种质资源是水产养殖生产、优良品种培育及水产养殖业可持续发展的重要物质基础。我国是一个水生生物种质资源较为丰富的国家,丰富多样的水生生物种质资源和遗传多样性对于我国水产养殖业的快速发展起到了非常重要的作用。然而,由于渔业资源的过度捕捞、无序利用及人工放流等,造成了某些鱼类资源的衰退和濒临灭绝,如不及时采取保护措施,若干年后,在自然界中将难以找到上述鱼类原种、良种的遗传资源;由于忽视鱼类种质保护及品种选育的工作,养殖鱼类近亲交配越来越严重,造成种质退化,遗传多样性减少,生长速度减缓,品质下降,对病害和环境胁迫的防御能力降低,病害发生日趋严重,造成巨大的经济损失。因此,水产养殖种类优良品种种质保存及遗传多样性保护已成为水产养殖业中亟待攻克的重要科技问题。

低温生物学是探索低温条件下生命现象的特征和规律,以及生物体保存的一门科学。它是随着生物学、物理学和工程技术的深入发展,相互渗透而产生的一门新兴的边缘学科。由于生物细胞、组织、器官、胚胎甚至个体在超低温(-196℃)状态下代谢完全停止,生命以静止的形式可以在这种状态下得以长期保存。因此,低温生物学技术在生物医学、优生学及畜牧、兽医和水产等领域均具有重要意义和应用价值。低温生物学在鱼类养殖、遗传育种及种质资源保存中的作用主要表现在三个方面:首先,低温冷冻技术在鱼类种质保存上意义重大,通过建立优良养殖鱼类或濒临灭绝鱼类的

收稿日期:2002-01-16

资助项目:国家“十五”863 课题资助(2001AA621100)

作者简介:陈松林(1960-),男,湖北黄陂人,研究员,博士,博导,主要从事鱼类低温生物学、胚胎干细胞和基因工程等方面的研究。

E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

冷冻精子库、细胞库或胚胎库,可将优良鱼类的原良种长期保存起来,从而避免由于捕捞过度、生态破坏或环境污染而造成的鱼类物种灭绝或因长期养殖、近亲交配而造成的种质退化和遗传变异现象;其次,通过配子的低温保存可以使不同生殖期或地理间隔的鱼类品系得以交配,解决雌、雄鱼不同步成熟的问题,也可以使性转换的个体得以自交,使鱼类的人工受精和远缘杂交更加方便可行;第三,通过配子和胚胎的冷冻保存,可为鱼类遗传育种和生物技术研究不间断地提供材料,大大方便鱼类遗传育种研究的进行。鉴于此,自从20世纪50年代初英国学者 Blaxter^[1]首次成功冷冻保存大西洋鲑精巢以来,世界各国许多学者对鱼类配子和胚胎的冷冻保存进行了大量研究,在抗冻剂的保护机理、稀释液配制、抗冻剂种类和浓度、冷冻降温方法和解冻复活技术等方面进行了一系列的研究,并取得很大进展。本文拟对鱼类配子和胚胎低温冷冻保存的原理、研究进展、存在问题及今后的发展方向作一综合介绍,重点是鱼类胚胎的冷冻保存。

1 低温冷冻损伤效应

低温技术是一把双刃剑,在应用得当时,低温可以长期保存生物;而在应用不当时,低温又可以产生严重损伤、杀死生物。因此,要想利用低温技术有效保存生物细胞,必须了解低温损伤的机理,根据生物材料的性质和类型,制定相应的冷冻保存方法,尽量减少冷冻损伤造成的危害。归纳起来,生物材料在冷冻降温和解冻复温过程中的冷冻损伤主要包括过冷休克、冰晶损伤、高渗休克和抗冻剂毒性等4个方面。

1.1 过冷休克

当生物细胞在水溶液中冷却时,温度一般先降到细胞和培养液的冰点以下,然后才发生冻结,即细胞和培养液均要处于过冷状态。在大多数情况下,细胞的过冷程度比周围溶液更深。当细胞处于过冷状态时,细胞膜上的脂类物质会从液态转变为固态,同时,细胞膜的不等收缩会导致机械性的膜破裂及膜表面结构的改变,从而导致细胞死亡。

1.2 冰晶损伤

在快速冷冻时,细胞内的水份因为来不及移到细胞外,而在细胞内结冰。胞内冰晶会刺伤细胞内结构及细胞膜,导致细胞死亡,冰晶损伤在 $-5 \sim -60$ 温区时最易发生。

1.3 高渗休克

在慢速降温时,细胞内的水份有足够时间移出细胞外,减少胞内冰晶的形成,但如果降温过慢,细胞外的水份逐渐结冰,溶质浓缩造成细胞外环境渗透压升高,产生渗透休克,同样会导致细胞死亡。

1.4 抗冻保护剂的毒性作用

大多数抗冻剂(如二甲亚砜、甘油和乙二醇)在高浓度使用时,对生物细胞都有些毒性。研究表明,甘油对牛精子顶体和颈部有损伤作用,导致尾部弯曲,精子缩短;抗冻剂处理可明显降低淡水鲤科鱼类卵子的受精率和孵化率,DMSO对鲑鱼卵也有毒性作用。抗冻剂对细胞的毒性与其种类、使用浓度及平衡时间有关。抗冻剂对细胞的毒性作用主要发生在冻前和冻后处理阶段。

2 鱼类精子冷冻保存的主要成果及存在问题

2.1 鱼类精子冷冻保存的主要成果

鱼类精子冷冻保存开始于20世纪50年代初期。英国学者 Blaxter^[1]用干冰(-79°C)保存6个月的大西洋鲑精巢,解冻后受精获得了80%的受精率,这是鱼类精液长期冷冻保存的第一个成果。随后鱼类精液冷冻保存研究在鲤科、鲑科、鲟科等多种鱼类上开展。由于鱼类精子个体小,抗冻剂容易进入其内,冷冻保存较易成功。用于鱼类精液冷冻保存的稀释液包括基础溶液和抗冻剂二部分。基础溶液主要由 NaCl 、 NaHCO_3 、 KCl 、葡萄糖或磷脂等几种成分按不同比例混合而成,关键是给鱼类精子提供一个渗透压和pH值适宜的环境。抗冻剂主要使用二甲亚砜和甘油两种。在抗冻剂的保护机理方面,陈松林等^[2,3]率先报道抗冻剂二甲亚砜(DMSO)进入淡水鱼类精子后,明显升高精子渗透压,当DMSO的浓度为10%时,鲤精子的渗透压可以升高至 1500 mOsm L^{-1} ,相当于鲜精的4倍多,相应地,冰点下降至 -5.25°C 。在冷冻方法上,目前主要使用4种方法:(1)颗粒冷冻法^[4,5];(2)麦管冷冻法^[6,7];(3)玻璃安瓶冷冻法^[8,9];(4)塑料离心管冷冻法^[3]。其中,颗粒冷冻法由于冷冻量小、操作较麻烦等原因,目前较少采用。玻璃安瓶法虽然体积较大,效果也不错,但瓶口封口操作比较麻烦,加之在解冻时,安瓶容易爆裂,故其使用也受到限制。而麦管冷冻法和塑料离心管冷冻法,由于具有冷冻量大、操作简便、安全等特点,因而在鱼类精液冷冻保存和精子库建立中展现出良好的应用前景。经过40多年的摸索与研究,鱼类精子冷冻保存技术日趋成熟。迄今,已分别建立了鲤科鱼类、鲑科鱼类、青鳞、斑马鱼、罗非鱼、鲟科

鱼类及鲟鱼等 20 余种淡、海水鱼类精子冷冻保存技术,并建立了淡水鲤科鱼类冷冻精子库。有些淡水鱼类冷冻精子的活力达到 60% 以上^[10],受精率达到或接近鲜精的水平。现将近几年来在鱼类精液冷冻保存上取得的主要结果汇总于表 1。

表 1 最近几年报道的某些鱼类冷冻精液的受精结果

Tab. 1 Fertility of frozen-thawed sperm of some fish reported in recent years

种类 species	冻精受精率 % (冻存时间) fertility of frozen sperm % (storage period)	文 献 references
巴西鲷脂鲤 (<i>Prochilodus scrofa</i>)	92(20d) ^a , 102(720d) ^b , 93(720d) ^a , 102(20d) ^b	[11]
点带石斑鱼 (<i>Epinephelus malabaricus</i>)	85(17d) ^a , 96.7(1d) ^b , 79.7(291d) ^a	[6]
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	99 ^b	[12]
草鱼 (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	86.9 ± 6.2 (360d) ^a , 73.3 ± 3.1 (720d) ^a	[3]
鲢 (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	94 ± 2.3 (6d) ^a , 64.2 ± (360d) ^a	[3]
鲤 (<i>Cyprinus carpio</i>)	69.7 ± 8.4 (360d) ^a , 80 ± 3.8 (5d) ^a	[3]
团头鲂 (<i>Megalobrama amblycephala</i>)	80.9 ± 3.5 (5d) ^a , 78.1 ± 9.4 (11d) ^a	[3]
红点鲑 (<i>Salmo alpinus</i>)	75 ^a	[5]
欧洲鲶 (<i>Silurus glanis</i>)	64 ^a	[13]
斑点叉尾鲴 (<i>Ictalurus punctatus</i>)	97(2d) ^b	[14]
鳊胡鲶 (<i>Clarias batrachus</i>)	87(360d) ^a	[15]
茴鱼 (<i>Thymallus thymallus</i>)	90 ~ 100 ^b	[16]
多瑙哲罗鱼 (<i>Hucho hucho</i>)	90 ^a	[16]
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	89.6 ± 16 ^a	[17]
河鲈 (<i>Salmo trutta fario</i>)	93.8 ± 6.4 ^a	[17]
湖鲈 (<i>Salmo trutta lacustris</i>)	92.8 ± 2.4 ^a	[17]
欧白鲑 (<i>Coregonus albula</i>)	85.0 ± 8.4 ^a	[17]
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	58 ^a	[18]
鲤 (<i>Cyprinus carpio</i>)	99.6 ^b	[19]
青鳉 (<i>Oryzias latipes</i>)	96 ~ 100 ^b	[20]
欧鳊 (<i>Abramis brama</i>)	23.8 ~ 92.5 ^a	[21]
多瑙哲罗鱼 (<i>Hucho hucho</i>)	87.5 ^a	[22]
赤梢鱼 (<i>Aspius aspius</i>)	49 ~ 62 ^a	[23]
美洲大绵鲛 (<i>Macrcoarces americanus</i>)	59.6(24h) ^a	[24]

注: a. 绝对受精率 (absolute fertility); b 相对于对照组的百分率 (fertility compared to control)

2.2 鱼类精子冷冻保存中存在的主要问题

由表 1 可见, 尽管许多淡水鱼类以及一些海水鱼类精液的冷冻保存已取得较大成功, 在冻精用量足够大时, 冻精受精率达到或接近鲜精的水平。不过, 由于抗冻剂 (如 DMSO、甲醇等) 进入精子内, 大大提高了冷冻精液的渗透压^[2, 3], 导致冻精的激活 - 抑制规律发生了变化, 原来抑制鲜精运动的高渗溶液 (如 1.0% ~ 2.0% NaCl 溶液), 对冻精来说却是很好的激活剂^[25]。精子在冷冻过程中, 冷冻损伤造成精子头部和尾部的质膜破裂, 细胞死亡^[26]; 同时冷冻损伤还导致精子膜破损, 使冷冻精子谷草转氨酶和其他蛋白质大量进入精浆中^[9], 使冷冻精子内异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、激酶、乳酸脱氢酶及 ATP 酶的含量明显低于新鲜精液^[27]。因此, 冷冻精液的活力与质量总难以达到鲜精的水平。今后的研究重点应该是继续研究精子的冷冻损伤机理及筛选更有效的抗冻保护液配方, 尽量减少精子在冷冻过程中的损伤效应, 提高冻精的复活率, 使之达到或接近鲜精的水平。

3 鱼类胚胎低温冷冻保存的主要影响因子及研究进展

鉴于鱼类胚胎冷冻保存在鱼类种质保存、遗传多样性保护及鱼类育种研究等领域所具有的重要意义和应用价值, 近 20 年来, 鱼类胚胎低温和超低温保存的研究引起人们的广泛关注和高度重视。尽管许多学者对鱼类胚胎的冷冻损伤机理、适宜冷冻的胚胎发育阶段、抗冻保护剂的种类和浓度、冷冻降温方法和解冻复活技术等进行了大量实验研究, 也取得明显进展, 但目前尚未取得真正的突破。下面对影响鱼卵和胚胎冷冻成活的主要因子及鱼类胚胎冷冻保存的主要进展作一评述。

3.1 影响鱼卵和胚胎冷冻成活的主要因子

鱼卵和胚胎由于体积大(直径为1~6mm)、含水量多、卵膜通透性差、卵黄含量高,冷冻保存较哺乳类胚胎困难得多。根据一些学者的研究结果,影响鱼类胚胎冷冻成功的主要因子包括如下几个方面。

3.1.1 胚胎发育阶段的影响

不同发育时期的鱼类胚胎对抗冻剂的敏感性及对冷冻降温的耐受力均不一样。许多学者对多种鱼类不同发育阶段胚胎的耐冻能力进行了大量的实验研究。结果表明似石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)尾芽期胚胎比桑椹期胚胎更能经受冷冻保存^[28];草鱼原肠期以前的胚胎对低温和DMSO非常敏感,在原肠期以后,随着胚胎发育的进行,胚胎对低温及DMSO的耐受力也逐步提高^[29]。Zhang等^[30]研究了斑马鱼不同发育时期胚胎对冷冻降温的敏感性,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。Hagedorn等^[31]也表明斑马鱼早期胚胎(受精后1.25~2h)比晚期胚胎(胚盘下包50%~100%及三个体节期)更易遭受冷冻损伤。因此,选取发育阶段适宜的胚胎进行冷冻保存,是成功地进行冷冻保存的重要一步。

3.1.2 冻前处理及抗冻剂种类和浓度

鱼类精子很小,抗冻剂能很快进入其内,故无需平衡期。然而,鱼卵和胚胎体积较大(直径1~6mm),又具有2层膜,抗冻剂进入其内速率很慢,这就给其冷冻保存带来不便。要想使抗冻剂充分进入鱼卵和胚胎内,起到升高卵内渗透压,降低冰点的作用,就必须在冷冻保存前,将鱼卵或胚胎放在高浓度的抗冻保护剂中平衡一定时间,让抗冻剂有较充分的时间渗入胚胎内,强迫胚胎吸收足够的抗冻剂。研究表明,将鲑鱼卵放在甲醇中2h,只达到预期平衡值的23%,而DMSO和甘油的渗入则更慢^[32]。由于大多数抗冻剂都有毒性,如胚胎在高浓度抗冻剂中暴露时间过长,就会影响胚胎的成活。Robertson等^[28]比较了甘油、二甲亚砜和甲醇对似石首鱼胚胎的毒性作用,表明尾芽期胚胎对这几种抗冻剂的最大耐受浓度分别为 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油、 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二甲亚砜和 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲醇,甘油的毒性作用大于二甲亚砜和甲醇。另有研究表明,甘油、二甲亚砜、乙二醇和甲醇对草鱼胚胎都有毒性,浓度越高、处理时间越长,毒性越大,在室温和0℃,草鱼胚胎对DMSO耐受的极限浓度为16%和20%,对甘油的耐受浓度为4%和5%,对乙二醇为12%和12%^[29]。Zhang和Rawson^[33]比较了几种抗冻剂对斑马鱼胚胎的毒性作用,表明1,2-丙二醇和甲醇的毒性最低,在22℃和0℃时将胚胎置于 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1,2-丙二醇和 $5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲醇中处理30min,观察不到对胚胎的损伤作用。因此,筛选出毒性低、渗透力强的抗冻剂,或将不同抗冻剂混合使用,从而降低单种抗冻剂的浓度,减轻毒性作用,这对于鱼类胚胎的冷冻保存是至关重要的。

3.1.3 卵膜的通透性

影响鱼卵和胚胎冷冻保存成功的另一个重要限制因子就是卵膜对水份和抗冻保护剂的通透性低,在胚胎尚未吸足抗冻剂前,由于抗冻剂的毒性作用,而导致胚胎死亡。因此,了解有关鱼卵和胚胎内水份的分布规律、各部分的通透性差异及探索提高卵膜通透性的技术途径,对于克服鱼卵和胚胎的通透性障碍,建立成功的冷冻保存技术是非常重要的。Hagedorn等^[31]研究了斑马鱼胚胎中水份的分布及其通透性,表明鱼类胚胎是一个由胚盘和一个大的卵黄囊组成的复杂的多室系统,胚盘细胞和卵黄囊中的水份含量是不相同的。在6个体节阶段,胚胎中的水份含量为74%,胚盘细胞中为82%,而卵黄囊中却只有42%。分析表明,原肠期到3个体节形成期,卵膜的通透性相对保持恒定,处于较低水平,而在6个体节期,膜的通透性则增加近2倍。

Zhang和Rawson^[34]也研究了斑马鱼胚胎对水份和甲醇的通透性。表明去膜的斑马鱼胚胎对水份的通透性在不同发育阶段保持相对稳定,对甲醇的通透能力则随着胚胎发育的进行而下降。Hagedorn等^[35]研究了斑马鱼胚胎通透性障碍的特征,他们测定了胚盘和卵黄囊对水份和DMSO的通透性,表明胚盘和卵黄囊对水份的通透力相差不大,但卵黄囊对DMSO的通透率则要比胚盘低3个数量级,分别为 $5\times 10^{-6}\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 $1.5\times 10^{-3}\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$ 。卵黄囊对溶质的通透性也比胚盘低,从而预示着卵黄囊更易遭受冷冻损伤。

3.1.4 冷冻降温方法

关于鱼卵和胚胎的冷冻方法,目前常用的有分段慢速降温、分段快速降温和玻璃化法3种。分段慢速降温一般为将样品从室温慢速($2\sim 5\text{min}^{-1}$)降到冰点的温度,然后再以极慢的速率($0.05\sim 0.5\text{min}^{-1}$)降至约-60℃左右,再以约 $1\sim 2\text{min}^{-1}$ 降至-85℃,停留约10min,最后快速降温至-196℃的保存温度。Zhang等^[36]在进行鲤鱼胚胎冷冻保存时,就是采用这种降温方式,获得了液氮中保存胚胎有25%复活并孵出鱼苗的成功实例。分段快速降温与慢速降温的主要差别就是从0℃到-60℃,采用 $2\sim 5\text{min}^{-1}$ 的降温速率。在草鱼和泥鳅胚胎冷冻保存中,也发现分段快速降温优于分段慢速降温^[37,38]。第三种冷冻降温方法就是玻璃化冷冻法。所谓玻璃化即液体在冷冻过程中借助粘度的提高而形成玻璃状非结晶的固体。这种方法主要借助于极快速降温,使细胞内外的液体越过结冰过程,而直接形成玻璃状固

体,从而可以避免细胞内形成冰晶。这种冷冻法在鼠、牛和羊胚胎冷冻保存中获得不错的效果^[39],但在鱼类胚胎冷冻保存上的应用才刚刚起步。Chao 等^[40]比较了几种玻璃化液对斑马鱼胚胎冷冻保存的影响,表明 DAP2B (2mol L⁻¹ DMSO + 1mol L⁻¹ 乙酰胺 + 3 mol L⁻¹ 丙二醇)的效果优于 VSI (20.5% DMSO + 15.5% 乙酰胺 + 10% 丙二醇)的效果; Zhang 和 Rawson^[33]研究了斑马鱼胚胎玻璃化冷冻保存的可行性,表明丁二醇可以形成玻璃化的最低浓度为 3mol L⁻¹,几种不同抗冻剂的混合物可以形成玻璃化;尽管未获得完全复活的斑马鱼胚胎,但胚胎在玻璃化液中的形态保持正常。章龙珍等^[41]观察了泥鳅胚胎在不同玻璃化液中的存活时间,从中筛选出了几种较理想的玻璃化液,胚胎在这些玻璃化液中的存活时间可以长达 70 min。尽管玻璃化技术在鱼类胚胎冷冻保存中应用时间不长,目前尚未取得突破性的进展,但玻璃化冷冻法却展现出良好的应用前景。可以预计在不久的将来,玻璃化冷冻法将在鱼类胚胎冷冻保存中获得成功。

3.1.5 解冻及冻后处理

解冻是冷冻降温的逆步骤,冷冻降温中出现的一些冷冻损伤效应(如胞内冰晶形成)在解冻复温中同样存在。解冻过程中要防止细胞内重结晶。关于冷冻胚胎的解冻方法,目前报道的主要有快速解冻(40~150 min⁻¹)和慢速解冻(2~8 min⁻¹)2种。Zhang 等^[36]在鲤鱼胚胎冷冻保存中发现慢速解冻(8 /min)优于 148 min⁻¹的快速解冻。而 Harvey 等^[42]在斑马鱼胚胎冷冻保存中,则发现 43 min⁻¹和 2 min⁻¹的解冻速率,无明显差异。张克俭等^[38]则发现冷冻泥鳅胚胎在 40 °C 水浴中解冻的效果明显优于在 25 °C 和 4 °C 的解冻效果。

鉴于鱼卵或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。因此,解冻后一定要逐步稀释去除细胞里的抗冻剂,让胚胎逐步过渡到水中去。Stoss 等^[43]用 1mol L⁻¹ DMSO 冷冻虹鳟受精卵,解冻时让其分别在 0.5 和 0.25mol L⁻¹ DMSO 中各平衡 5 min,然后进入水中孵化,获得不错的效果。张克俭等^[38]将解冻后的鱼胚胎放在含不同浓度抗冻剂的稀释液中,从高浓度到低浓度作逆向浸泡,最后进入水中培养,获得较好结果。解冻后分步平衡,逐渐脱去冻胚中的抗冻剂,是胚胎冷冻保存能否获得成功的重要影响因素之一。因此,必须根据胚胎的类型,所用抗冻剂的种类和浓度,合理配制解冻平衡液。

3.2 鱼卵和胚胎低温冷冻保存的主要成就

尽管鱼卵和胚胎冷冻保存的难度大,影响因素多,但国内外仍有许多学者对鱼类胚胎冷冻保存的损伤机理、抗冻剂种类与浓度、冷冻降温速率、解冻复温方法等开展了大量研究,并取得很大进展。现将近年来在鱼类胚胎冷冻保存上取得的主要结果汇总于表 2。由表可见,鲤科鱼类胚胎在 -60 °C 以上温度的冷冻保存,已获得较稳定的复活率;即使体积很大的 鲑鳟鱼胚胎(直径达 4 mm),目前也突破 -25 °C 的界限。特别是鲤鱼和泥鳅胚胎的冷冻保存已突破了液氮温区。Zhang 等^[36]将鲤胚胎冷冻到 -196 °C,在 16 个解冻的胚胎中有 4 个复活,其中 3 尾孵出鱼苗。张克俭等^[38]将心跳期泥鳅胚胎冷冻到 -196 °C,在 16 个胚胎中,有 1 个完全复活并孵出鱼苗。这些结果尽管目前尚难以重复,但仍然给鱼类低温生物学工作者以鼓舞和信心。当然,要想使鱼类胚胎冷冻保存真正突破 -196 °C 的难关,建立一套结果稳定、可重复的超低温冷冻保存技术和方法,还必须经过大量的实验探索。

4 鱼类精子和胚胎冷冻保存的研究方向

水产生物遗传多样性保护、水产养殖和遗传育种研究对鱼类精子和胚胎冷冻保存技术的需求日益增长,从而极大促进了该领域研究工作的进行。同时,随着低温显微镜、核磁共振显微镜等仪器的应用,为鱼类胚胎冷冻保存的研究提供了新的技术手段和研究思路。根据鱼类胚胎的结构特点及低温生物学相关领域的发展现状,笔者认为如下几个方面将是今后相当长一段时期内鱼类配子和胚胎冷冻保存的主要研究方向。

4.1 鱼类胚胎低温生物学基础研究

鱼类胚胎冷冻保存研究至今只有约 20 年的历史,过去研究人员往往只注重冷冻保存技术本身,而对鱼类胚胎低温损伤机理、膜的通透性规律等缺乏足够了解。尽管偶尔获得过成功事例,但由于未掌握其规律,难以重复。因此,加强鱼类胚胎低温生物学的基础研究,阐明鱼类胚胎冷冻损伤机理,揭示胚胎各部分对水和抗冻剂的通透性规律,制定相应的冷冻降温技术方法,这对于攻克鱼类胚胎冷冻保存的技术难关将具有重要作用。

4.2 加强玻璃化冷冻保存技术的研究

玻璃化冷冻法在牛羊等家畜胚胎冷冻保存上已获成功。而这种方法在鱼类上的应用才刚刚起步。与常规冷冻方法相比,玻璃化冷冻法不需要昂贵的冷冻降温设备,其操作也较容易,因而在鱼类胚胎冷冻保存上具有很大的应用潜力。今后的研究重点应该是进一步优化玻璃化溶液的配方组成,筛选低毒高效的抗冻剂,尽量减少抗冻剂的毒性,提高玻璃化程度;同时寻找抗冻剂的中和剂,降低抗冻剂的毒性效应。

表 2 某些鱼类冷冻保存胚胎的成活率

Tab. 2 Survival rate of cryopreserved embryos of some fish

种 类 species	胚胎阶段 embryo stage	抗冻剂种类及浓度 cryoprotectant concentration	保存温度和时间 storage temperature and duration	成活率 survival (%)	文 献 references
银大麻哈鱼 (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	受精卵	1 mol L ⁻¹ DMSO	- 10 , - 20 , - 30	61.6, 6.4, 0	[43]
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	受精卵	1.4 ~ 2.1 mol L ⁻¹ DMSO	- 7 , - 12 , - 20	95, 20, 0	[44]
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	发眼卵	14 % DMSO	- 20 , - 25	17 ~ 88, 10 ~ 26	[45]
鲤 (<i>Cyprinus carpio</i>)	尾芽期	2 mol L ⁻¹ DMSO	- 30 , - 12 , 30min , 15min , - 196 , 20min	46.7, 13.4, 18.7	[36]
斑马鱼 (<i>Brachydanio rerio</i>)	心跳期	3 mol L ⁻¹ DMSO	- 15 , - 20 , - 25 , - 30	72, 43, 8, 0	[46]
团头鲂 (<i>Megalobrama amblycephala</i>)	出膜前期	8 % DMSO + 5 % 蔗糖	- 40 , 16min	14	[37]
青鱼 (<i>Mylopharyngodon piceus</i>)	心跳期	8 % DMSO + 5 % 蔗糖	- 30 , 15min	12.5	[37]
泥鳅 (<i>Misgurnus anquilicaudatus</i>)	心跳期	2.5 mol L ⁻¹ DMSO	- 60 , 1h, , 1h , - 196 , 1h	25, 10, 5	[38]
银鲫 (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	心跳期	2.5 mol L ⁻¹ DMSO	- 60 , 1h, , 1h , - 196 , 1h	30, 15, 0	[38]
草鱼 (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	心跳期	2.5 mol L ⁻¹ DMSO	- 60 , 1h, , 1h , - 196 , 1h	20, 10, 0	[38]
虹鳟 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	胚盘	1.4 mol L ⁻¹ 1,2-丙二醇	- 196	88 ~ 95	[47]

4.3 抗冻蛋白作为抗冻保护剂

抗冻蛋白是存在于美洲大鲈等耐冻鱼类体内的一种糖蛋白。研究表明,抗冻蛋白在抑制冷冻溶液中的冰晶形成方面具有很好的效果。Carpenter 和 Harsen^[48]表明低浓度的抗冻蛋白能够提高人红血球冷冻存活率。Rubinsky 等^[49]在冷冻保存猪胚和鼠胚时,使用抗冻糖肽分别将冷冻胚胎的存活率提高了 25 % 和 82 %。由于化学抗冻剂(包括二甲亚砜、乙二醇和甘油等)在高浓度时,对胚胎都有毒性,因此,寻找无毒高效的生物抗冻剂,也是鱼类胚胎冷冻保存的研究方向之一。将化学抗冻剂和抗冻蛋白结合起来使用,将有可能降低化学抗冻剂的使用浓度,提高鱼类胚胎冷冻保存的存活率,这方面的研究值得探索。

4.4 冷冻保存对配子、胚胎遗传结构的影响

鱼类配子、胚胎冷冻保存的主要目的是保存鱼类的基因型。因此,有关冷冻保存对鱼类遗传结构的影响也是一个重要的议题。只有确保冷冻保存对配子和胚胎的遗传结构没有影响时,这项技术才可以在生物多样性保护和物种恢复中得到有效应用。今后在进行鱼类配子和胚胎冷冻保存时,应该借助 RAPD 和同功酶等分子生物学和生化遗传学技术对冻精或冻胚的遗传结构进行分析评价。

4.5 鱼类囊胚细胞和胚胎干细胞在种质保存上的应用

鉴于鱼类胚胎体积大、膜通透性低,完整胚胎冷冻保存难度大的实际情况,有些学者提出通过冷冻保存鱼类囊胚细胞达到保存种质资源的目的。Calvi 和 Maisse^[46]将发育到 Ballar 6A - 6C 期的虹鳟囊胚细胞进行了冷冻保存实验。解冻后细胞的成活率高达 88 % ~ 95 %。如将囊胚细胞冷冻保存与细胞核移植技术结合起来,这条途径不失为长期保存鱼类种质的可靠方法。与此相类似,胚胎干细胞由于具有发育的潜能性,又可以在体外进行大量培养、扩增,因此,在鱼类种质保存上也有重要应用价值^[50]。通过建立优良、珍稀濒危鱼类的胚胎干细胞库,可以将某些鱼类的基因型长期保存起来,这方面的研究同样值得探索。

4.6 核磁共振显微术在冷冻保存中的应用

大多数多室 (multicompartment) 生物材料的冷冻保存迄今都未完全成功。其中一个重要限制因子就是缺少抗冻剂到不同部分(如胚盘和卵黄囊)的通透性数据。Hagedorn 等^[31]应用核磁共振显微术和光谱术直接测定了抗冻剂到斑马鱼胚胎不同部分(胚盘细胞和卵黄囊)的渗透率。这是鱼类胚胎低温生物学研究手段的一个重要改良。如在我国水产养殖鱼类胚胎冷冻保存上应用这套技术,将有可能阐明限制抗冻剂向鱼类胚胎渗透的关键部位和因子,这对于突破鱼类胚胎冷冻保存的技术难关将会很有帮助。

4.7 冷冻保存与其它生物技术的结合

鱼类精液冷冻保存与雄核发育技术的结合是保存珍稀、濒危鱼类基因型、恢复物种的另一有效途径。淡水鱼类雄核发育技术目前已有一些成功的报道^[51]。因此,通过建立优良、珍稀养殖鱼类的冷冻精子库,待需要时,再解冻进行雄核发育,是可以达到长期保存鱼类种质资源和遗传多样性的目的。另外,将含有外源基因的转基因精液或经过紫外线照射的精液冷冻保存起来,待需要时进行解冻使用,将大大方便鱼类遗传育种研究。这样的技术结合在水产养殖、遗传育种研究中将具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Blaxter T H S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring[J]. Nature, 1953, 172:1189 - 1190.
- [2] Chen S L, Zhang L Z, Guo F. Effect of cryoprotectant DMSO on osmotic pressure and motility of spermatozoa of fish[J]. Freshwater Fisheries, 1987, 17(5):17 - 21. [陈松林, 章龙珍, 郭峰. 抗冻剂二甲亚砷对鱼类精子生理特性影响的初步研究. 淡水渔业, 1987, 17(5):17 - 21.]
- [3] Chen S L, Liu X T, Lu D C, et al. Cryopreservation of spermatozoa of silver carp, common carp, blunt snout bream and grass carp[J]. Acta Zool Sin, 1992, 38:413 - 424. [陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液超低温冷冻保存的研究. 动物学报, 1992, 38:413 - 424.]
- [4] Stoss J. Short-term and cryopreservation of rainbow trout sperm[J]. Ann Biol Anim Bioch Biophys, 1978, 18:1077 - 1082.
- [5] Piironen J. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) [J]. Aquac, 1993, 116(2 - 3):275 - 285. [6] Chao N H, Tsai H P, Liao I C. Short- and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the group, *Epinephelus malabaricus*. Asian Fish Sci, 1992, 5:103 - 116.
- [7] Baynes S M, Scott A P. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post - thaw fertility[J]. Aquac, 1987, 66:53 - 56.
- [8] Chambeyron F, Zohar Y. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. Aquac, 1990, 90(3 - 4):345 - 352.
- [9] Leung L K P, Jamieson B G M. Live preservation of fish gametes[M]. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge Uni Press, Cambridge, United Kingdom, 245 - 269.
- [10] Chen S L, Liu X T, Lu D C, et al. Cryopreservation of Chinese carp spermatozoa. Aquac, 1993, 111:324 - 325.
- [11] Kavamoto E T, Fogli D S W, Godinho H M, et al. Fertilization of *Prochilodus scrofa* with cryopreserved sperm in liquid nitrogen[J]. Bol Inst Pesca Sao Paulo, 1989, 16:29 - 36.
- [12] Park H Y, Yoon J M. Studies on genetic and breeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): 7. Fertilization of fresh eggs with cryopreserved sperm and ultrastructural changes[J]. Bull Korean Fish Soc, 1992, 25(2):79 - 92.
- [13] Linhart O, Billard R, Proteau, J P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis*) spermatozoa[J]. Aquac, 1993, 115:347 - 359.
- [14] Tiersch T R, Goudie C A, Carmichael G J. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trial, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm[J]. Trans Am Fish Soc, 1994, 123(40):580 - 586.
- [15] Padhi B K, Mandal R K. Cryopreservation of spermatozoa of two Asian freshwater catfishes, *Heteropistes fossilis* and *Clarias batrachus*[J]. J Aquacult Trop, 1995, 10(1):23 - 25.
- [16] Lahnsteiner F, Weimann T, Patzner R. Cryopreservation of grayling and Danube salmon semen[J]. Oesterr Fisch, 1995, 48(11 - 12):257 - 261.
- [17] Lahnsteiner F, Weimann T, Patzner R. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta lacustris*, *Coregonus* sp[J]. Aquacult Res, 1995, 26(11):801 - 807.
- [18] Conget P, Fernandez M, Herrera G, et al. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing [J]. Aquac, 1996, 143:319 - 329.
- [19] Magyary I, Urbanyi B, Horvath L. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm: 2. Optimal condition for fertilization[J]. J Appl Ichthyol, 1996, 12(2):117 - 119.
- [20] Aoki K, Okamoto M, Tatsuimi K. Cryopreservation of medaka spermatozoa. Zool Sci, 1997, 14(4):641 - 644.
- [21] Glogowski J, Babiak I, Goryczko K, et al. Properties and cryopreservation of Danube salmon (*Hucho hucho*) milt[J]. Arch Pol Fish, 1997, 5(2):235 - 239.
- [22] Glogowski J, Babiak I, Kucharczyk D, et al. The effects of individual male variability on cryopreservation of bream (*Abramis brama*) sperm [J]. Pol Arch Hydrobiol, 1997, 44(1 - 2):281 - 285.
- [23] Babiak I, Glogowski J, Kujava R. Cryopreservation of sperm from asp *Aspius aspius*[J]. Prog Fish-Cult, 1998, 60(2):146 - 148.
- [24] Yao Z, Crim L W, Richardson G F. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus*) sperm after cryopreservation[J]. Aquac, 2000, 181:361 - 375.

- [25] Chen, S L, Liu X T, Lu D C, et al. The activation and insemination methods of cryopreserved sperm from several chinese carps [J]. J Fish China, 1992, 16(4) :337 - 346. [陈松林,刘宪亭,鲁大椿,等. 家鱼冷冻精液激活、授精方法的研究. 水产学报, 1992, 16(4) :337 - 346.]
- [26] Zhao W X, Jiang R L, Liu X Y, et al. Observation on freezing damage of sperm and embryos from several Chinese carps by scanning electron microscope[J]. Freshwater Fisheries, 1992, 22:3 - 5. [赵维信,姜仁良,刘修英,等. 几种鲤科鱼类精子和胚胎冷冻损伤的扫描电镜研究[J]. 淡水渔业, 1992, 22:3 - 5.]
- [27] Maisse G. Comparison of different carbohydrates for the cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm[J]. Aquat Living Res, 1994, 7(3) :217 - 219.
- [28] Robertson S M, Lawrence A L. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose and sea salt solutions to the embryos of red drum[J]. The Prog Fish-Culturist, 1988, 50:148 - 154.
- [29] Zhang L Z, Liu X L, Lu D C, et al. Effects of several factors on the survival rate of fish embryo before cryopreservation[J]. Freshwater Fisheries, 1992, 22:20 - 24. [章龙珍,刘宪亭,鲁大椿,等. 鱼类胚胎冷冻保存前几个因子对其成活率影响的研究[J]. 淡水渔业, 1992, 22:20 - 24.]
- [30] Zhang T, Rawson D M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos[J]. Cryobiology, 1995, 32(3) :239 - 246.
- [31] Hagedorn M, Hsu E, Kleinhans F W. New approaches for studying the permeability of fish embryos: Toward successful cryopreservation [J]. Cryobiology, 1997, 34(4) :335 - 347.
- [32] Harvey B, Ashwood S. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. Cryobiology, 1982, 19:201 - 205.
- [33] Zhang T, Rawson D M. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos[J]. Cryobiology, 1996, 33(1) :1 - 13.
- [34] Zhang T, Rawson D M. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol [J]. Cryobiology, 1998, 37(1) :13 - 21.
- [35] Hagedorn M, Kleinhans F W, Artemov D, et al. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo[J]. Biol Reprod, 1998, 59:1240 - 1250.
- [36] Zhang X S, Zhao L, Hua T C, et al. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos[J]. Cryo Letters, 1989, 10: 271 - 278.
- [37] Zhang L Z, Liu X T, Lu D C, et al. Study on cooling rate of cryopreservation for fish embryos[J]. Freshwater Fisheries, 1994, 24:3 - 5. [章龙珍,刘宪亭,鲁大椿,等. 鱼类胚胎低温冷冻保存降温速率研究[J]. 淡水渔业, 1994, 24:3 - 5.]
- [38] Zhang K J, Lou Y D, Zhang Y J, et al. Studies on cryopreservation of three freshwater fishes embryos[J]. J Fish China, 1997, 21:366 - 372. [张克俭,楼允东,张饮江,等. 三种淡水鱼类胚胎低温保存及其降温和复温速率的研究[J]. 水产学报, 1997, 21:366 - 372.]
- [39] Massip A, Van Der Zwalmen P, Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos[J]. Theriogenology, 1987, 27(1) :69 - 79.
- [40] Chao N H, Chen Y R, Hsu H, et al. Pretreatment and cryopreservation of zebrafish embryos[J]. Cryobiology, 1997, 35(4) :340.
- [41] Zhang L Z, Lu D C, Liu L, et al. Effects of vitrification solution on survival of mud fish[J]. Freshwater Fisheries, 2001, 31:43 - 44. [章龙珍,鲁大椿,柳凌,等. 玻璃化液对泥鳅胚胎成活率的影响[J]. 淡水渔业, 2001, 31:43 - 44.]
- [42] Harvey B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms and intact embryos of the zebrafish to - 196 [J]. Cryobiology, 1983, 20(4) :440 - 447.
- [43] Stoss J, Donaldson E M. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout and coho salmon[J]. Aquac, 1983, 31:51 - 61.
- [44] 芳我幸雄. 鱼类受精卵的低温保存方法[J]. 特许公报, 1983, 482:69 - 73.
- [45] Erdahl D A. Preservation of spermatozoa and ova from freshwater fish [D]. Thesis of University of Minnesota, U. S. A. 1986.
- [46] Zhang T, Rawson D M, Morris G J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. Aquat Living Resour, 1993, 6(2) :145 - 153.
- [47] Calvi S L, Maisse G. Cryopreservation of rainbow trout blastomeres[J]. Cryobiology, 1997, 35(4) :340.
- [48] Carpenter J F, Hansen, T N. Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: mediation through influence in ice crystal growth[J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A., 1992, 89(19) :8953 - 8957.
- [49] Rubinsky B, Arav A, Devries A. Cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes[J]. Cryobiology, 1992, 29:69 - 79.
- [50] Chen S L. Progress of researches on embryonic stem cells in fish [J]. J Fish Sci China, 2000, 7:93 - 98. [陈松林. 鱼类胚胎干细胞研究进展[J]. 中国水产科学, 2000, 7:93 - 98.]
- [51] Zhao Z S, Wu Q J. Artificial induced the production of androgenetic diploid clones in *Paramisgurnus dabryanus*[J]. Acta Genet Sin, 1998, 25: 416 - 421. [赵振山,吴清江. 人工诱导大鳞副泥鳅雄核发育二倍体克隆鱼的产生[J]. 遗传学报, 1998, 25:416 - 421.]