

中华鲟囊胚细胞的长期保存及其克隆胚胎发育观察

余来宁¹, 杨东¹, 危起伟², 张繁荣¹, 姚雁鸿², 刘红艳¹

(1. 江汉大学 生命科学学院, 武汉 430056; 2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘要: 为保存濒危鱼类中华鲟种质资源, 在0、-20、-80、-196℃ 4种不同的温度下对其囊胚细胞进行了长期保存试验, 细胞存活期分别为10 d、30 d和2年, 在液氮中(-196℃)保存2年后仍有60.7%存活率; 用冷冻复苏后的细胞进行核移植, 并对克隆胚胎的发育进行了观察. 共移植417枚卵, 获得2尾克隆幼鲟, 成功率为0.48%, 表明长期冷冻保存的囊胚细胞仍具有发育全能性, 通过克隆技术能获得存活个体. 此项技术为濒危物种的保护开辟了新途径.

关键词: 中华鲟; 囊胚细胞; 低温保存; 克隆; 胚胎发育

中图分类号: Q954.4; S961.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-0143(2008)01-0060-03

中华鲟是地球上现存最古老的脊椎动物之一, 其化石始于2.3亿年前的中生代三叠纪初期. 中华鲟在2亿多年漫长的自然环境变迁中, 历经造山运动、海浸、海退等巨大的地质地貌变化, 顽强地生存下来并保持了当初的形态特征, 被誉为“活化石”, 这对研究鱼类的系统演化和生物的进化有极大的科学价值^[1]. 但从1981年至1999年间, 中华鲟的幼鲟补充群体和亲鲟群体分别减少了80%和90%^[2], 并仍在以惊人的速度锐减^[3]. 因此设法挽救濒临灭绝的中华鲟已迫在眉睫.

低温冷冻技术是保存生物细胞、组织、器官和胚胎的重要手段, 现广泛应用于生物实验材料和种质资源的保存. 在农业和畜牧业方面, 中国已建立多座低温种子库, 成功地保存了大量各类种质资源^[4], 并开展了多种动物的克隆技术研究^[5]. 但对鱼类囊胚细胞的长期保存研究甚少, 尚未见此类报导. 因此, 本课题研究中华鲟囊胚细胞的长期保存及其克隆技术, 旨在探索在细胞水平上保存濒危鱼类资源的新途径, 这对保护中华鲟以及其他珍稀濒危物种具有十分重要的意义.

1 材料与方法

1.1 细胞的来源和分离

实验材料由中国水产科学研究院长江水产研

究所中华鲟试验基地提供. 待中华鲟受精卵发育至囊胚期时, 将已去膜的卵(30枚左右)放于盛有5 mL生理盐水(0.9%)的离心管中, 用吸管吹打, 使细胞分散, 低速离心收集细胞备用.

1.2 主要试剂

1.2.1 稀释液 1 000 mL蒸馏水中含NaCl 8.00 g, KCl 0.40 g, CaCl₂ 0.14 g, MgSO₄·7H₂O 0.20 g, Na₂HPO₄·2H₂O 0.06 g, KH₂PO₄ 0.06 g, 葡萄糖1.00 g, NaHCO₃ 0.35 g.

1.2.2 分离液 100 mL蒸馏水中含NaCl 0.35 g, KCl 0.005 g, EDTA 55.80 mg, NaHCO₃ 0.02 g.

1.2.3 冷冻保护液 1,2-丙二醇(PG)为上海化学试剂公司产品, 羟乙基淀粉(HES)为天津氨基酸公司产品. 用上述稀释液作稀释剂, 配制冷冻保护液, 通过预备试验, 筛选出效果最佳的CP4号冷冻保护液, 其配方为: 7% PG + 6% HES.

1.3 冷冻方法

将细胞放入盛有0.1 mL冷冻保护液的冷冻管中, 置-7℃平衡30 min之后直接投入液氮(-196℃)中保存.

1.4 细胞活率检测

解冻后的细胞用台盼蓝拒染法检测其存活率.

1.5 细胞核移植方法

用经液氮保存的细胞解冻后作供体, 以中华

收稿日期: 2007-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370701)

作者简介: 余来宁(1948-), 男, 湖北武汉人, 教授, 博士生导师, 主要从事鱼类遗传育种方面的研究.

鲟未受精卵作受体进行核移植,方法参照文献[5].

1.6 克隆胚胎的发育观察

核移植后的胚胎置 Holtfreter's 液中培养,在显微镜下观察克隆胚胎的发育形态并进行拍照,记录各发育阶段的用时,同时与正常受精卵比较,并统计不同发育阶段的发育率,胚胎发育过程中水温保持在 20℃.

表 1 囊胚细胞不同温度的保存时间及存活率

温 度	保存期 (d) 的存活率/%							
	1d	5d	10d	30d	90d	182d	365d	730d
0℃	94.3	61.5	11.7	0	0	0	0	0
-20℃	90.2	64.2	38.5	20.5	0	0	0	0
-80℃	86.5	68.4	60.3	51.6	42.7	37.4	32.9	30.3
-196℃	79.5	71.6	68.9	67.4	65.0	64.8	62.5	60.7

存温度越低,保存的时间越长.在 0℃时,细胞只能存活 10 d; -20℃时细胞能存活 30 d; 在 -80℃时,可保存 2 年; 在液氮中 (-196℃) 保存的细胞 2 年仍有 60.7% 存活率,说明细胞在液氮中可长期保存.用 Excel 作图,图 1 反应了温度与保存时间对细胞存活率的影响(见图 1).

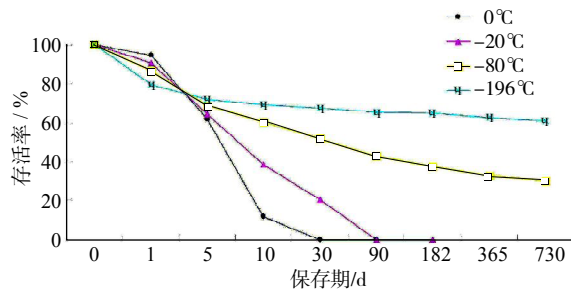


图 1 温度对细胞保存时间及存活率的影响

2.2 细胞复苏后的核移植及克隆胚胎发育观察

用经液氮(-196℃)保存了 2 年的囊胚细胞复苏后的细胞核作供体,以中华鲟未受精卵作受体进行了核移植实验,共移植 417 枚卵,获得 2 尾克隆幼鲟,成功率为 0.48%,表明长期冷冻保存的囊胚细胞仍具有发育全能性,借助核移植技术可以得到克隆鱼.通过对克隆胚胎发育状态的观察发现,克隆胚胎在移植后的初期(卵裂至原肠期)发育不正常,例如:分裂球不对称、大小不一、形状异常等,但经过原肠期,克隆胚胎渐渐自我调整到正常状态,这时克隆胚胎发育与正常胚胎发育基本一样,只是发育用时大为延长,克隆胚胎从卵裂发育至隙状胚孔期用时 33.7 h,而正常受精卵用时仅 24.7 h,延长

2 结果与分析

2.1 囊胚细胞在不同温度下的保存时间及存活率

用 CP4 冷冻保护液,在 0、-20、-80、-196℃ 4 种不同的温度下对中华鲟囊胚细胞进行了短期和长期保存试验,结果见表 1.从结果可以看出,随着保存期的延长,所保存细胞的存活率下降.保

了 9 h,即克隆胚胎发育用时多 36.4%,其差异有统计学意义($P < 0.05$);但后期的发育(隙状胚孔期至孵出期)两者用时十分接近,前者为 72.6 h,后者为 67.3 h,仅慢 5.3 h,即克隆胚胎发育用时多 7.9%,经统计学分析差异无统计学意义($P > 0.05$);另外在胚胎发育观察中可看出克隆胚胎的存活率很低,特别是在原肠期,克隆胚胎大量夭折,即克隆胚胎没能通过原肠期调整关,这可能是导致克隆胚胎存活率低的主要原因.克隆胚胎发育时期和距核移植的时间与正常受精卵的比较结果见表 2,克隆胚胎各时期的发育形态见图 2(见封 3).

表 2 中华鲟克隆胚胎与正常受精卵胚胎发育的比较(20℃)

序号	发育期	克隆胚胎		正常受精卵	
		距移核 时间/h	存活率 /%	距受精 时间/h	存活率 /%
1	刚移核卵	0	100	0	100
2	第 1 次卵裂	2.0	63.4	1.5	70.5
3	第 2 次卵裂	3.0	-	2.3	-
4	第 3 次卵裂	4.1	54.7	3.0	69.0
5	第 4 次卵裂	5.2	-	3.8	-
6	囊胚期	11.2	43.6	8.2	68.3
7	原肠期	19.8	27.3	14.5	66.9
8	大卵黄栓期	27.4	25.8	20.1	65.6
9	小卵黄栓期	31.7	22.4	23.2	64.3
10	隙状胚孔期	33.7	18.5	24.7	63.8
11	宽神经板期	38.6	16.6	28.3	63.0
12	神经管闭合期	44.8	15.2	33.5	62.1
13	眼突形成期	46.9	-	35.0	-
14	侧板联合、尾芽分离	54.8	11.4	42.5	60.9
15	心脏形成、搏动期	64.6	8.7	52.0	59.3
16	尾部接近心脏时期	68.4	4.3	55.6	58.5
17	胚体滚动期	91.3	-	77.5	-
18	孵出期	106.3	0.48	92.0	57.8

3 讨论

3.1 关于中华鲟的资源状况及挽救措施

中华鲟在地球上已生存了2亿多年,是世界27种鲟鱼中最珍稀的大型洄游性鱼类,为中国独有.中华鲟一生主要生长在海洋里,只有到了性成熟期(雌性14年以上,雄性8年以上),才从海洋进入长江,上溯2000~3000km到达长江上游至金沙江下游江段产卵繁殖.1981年葛州坝水利枢纽截流后,中华鲟产卵群体被阻隔在葛州坝以下江段,洄游江段缩短了26.5%~40.4%,中华鲟原有的繁殖生态条件被改变,这是导致其资源量下降的主要原因.为此中国将中华鲟列为国家一级保护动物,并采取了建立保护区、禁止捕捞以及人工增殖放流等多项措施.截止1998年已在长江人工放流中华鲟6300多万尾^[6].尽管如此,从1981年至1999年间,中华鲟的幼鲟补充群体和亲鲟群体仍分别减少了80%和90%.世界自然资源保护监测中心公布的调查报告称:中国“长江鱼王”中华鲟的资源量已不足3000尾,而且仍在以惊人的速度锐减.由于长江的生态环境发生了不可逆的改变,在自然环境中保存中华鲟已极其困难.因此,长期冷冻保存中华鲟胚胎细胞,若干年之后借助克隆技术恢复成个体,意义重大.这些工作可全部在实验室完成,相对于自然保护,该项技术可节省大量的人力、物力和资金,也为濒危物种的保护开辟了新途径.

3.2 关于长期超低温保存胚胎细胞的可行性

根据低温生物学的理论,低温能抑制生物体的生化活动,从而使生物体能在低温下长期保存.若生物体在4℃环境下能存活2h,那么按理论上推算,它在-40℃下能保存数日,在-80℃下可保存数月,而在-196℃(液氮温度)下可望保存几个世纪. Rowe AW将在液氮温度下保存了12年的红细胞复温后进行检查,没有发现任何生化和功能上的变异,证明了生物材料可以在低温下长期保存^[7].本研究用液氮(-196℃)保存2年后复苏的中华鲟囊胚细胞核和原肠细胞核作克隆实验,获得了成活的冷冻细胞克隆鱼,表明该途径是可行的.

致谢:感谢中国水产科学研究院长江水产研究所刘鉴毅副研究员、朱永久助理研究员、李罗新场长为本研究提供中华鲟的卵和胚胎等实验材料.

参考文献:

- [1] 邢湘臣.再说“中华鲟”[J].化石,1994(4):21-22.
- [2] 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[J].中国水产科学,2005,12(4):452-457.
- [3] 叶国标.中华鲟能顺利洄游产卵的已不足500尾[N].大众科技报,2005-03-03.
- [4] 卢新雄,陈晓玲.我国作物种质资源保存与研究进展[J].中国农业科学,2003,36(10):1125-1132.
- [5] 陈大元,孙青原,刘冀珑,等.大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育[J].中国科学:C辑,1999,29(3):324-330.
- [6] 常剑波,曹文宣.中华鲟物种保护的历史与前景[J].水生生物学报,1999,22(6):712-720.
- [7] 李广武,郑从义,唐兵.低温生物学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1998.

Cryopreservation Chinese Sturgeon's Blastula Cells Long-playing and Cloned Embryo Development Observation

YU Lai-ning¹, YANG Dong¹, WEI Qi-wei², et al.

(1. School of Life Science, Jiangnan University, Wuhan 430056, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, Hubei, China)

Abstract: To preserve the genetic resources of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), a kind of fish on the edge of extinction, its blastula cell have been cryopreserved in 0, -20, -80, -196℃ for longtime. The cell survival time were 10 days, 30 days and 2 years. The survival rates of cryopreserved cells are 60.7% that have been cryopreserved in -196℃ liquid nitrogen beyond 2 years. Revival blastula cell nuclear transplant has been made and cloned embryo development were observed, 417 ovums were transplanted respectively with a result of 2 suevival cloned fish, the success rate of nuclear transplant was 0.48%. It proves that the cryopreserved blastula cell nucleus still has the almightiness of growth. This technology makes a new approach for the protection of endangered species.

Key words: *Acipenser sinensis*; blastula cell; cryopreservation; clone; embryo development

(责任编辑:陈旷)