

鱼类胚胎冷冻的研究进展

周波¹ 胡洋²

(1. 动科 1061, 2. 07 级研究生)

摘要: 随着胚胎移植的商业化, 胚胎冷冻已被广泛应用, 同时胚胎冷冻在家畜育种、濒危动物等遗传资源的保护、动物克隆方面的地位日益重要。随着胚胎冷冻技术的逐步成熟, 许多学者对鱼类的胚胎冷冻保存进行了大量研究, 并且在抗冻剂、冷冻降温方法和解冻复活技术等方面取得很大进展。本文拟对鱼类胚胎低温冷冻保存的原理、冷冻保护剂的选择、冷冻方法以及影响鱼类胚胎冷冻的主要因子等方面作一综述。

关键词: 鱼类; 胚胎冷冻

自 1949 年英国生物学家 Polge 和 Smih^[1]发现存在于甘油溶液中的动物精子能够在低温下长期存活这一现象以后, 人类开始了对生物在低温环境下的生物学的研究。低温生物学在医疗、生物种类保存及品种繁殖等方面取得了巨大的成就。在哺乳动物精子和胚胎的低温保存研究方面, 自从 1972 年 Whittingham^[2]发明慢速冷冻法成功地冻存了小鼠胚胎, 随后胚胎冷冻技术不断的得到了发展, 目前利用胚胎冷冻技术已经能够长期保存小鼠、牛、绵羊、山羊、兔、大鼠、猪、人等的胚胎^[2-6]

畜牧业方面哺乳动物胚胎的低温保存, 为家畜优良品种种质的保存和运输提供了极大的方便, 也使濒危物种遗传物质得以保存。这一技术在哺乳动物中得到广泛运用的同时, 研究者也将胚胎冷冻技术应用到了鱼类的胚胎保存中。自从 20 世纪 50 年代初英国学者 Blaxter(1953)^[7]首次成功冷冻保存大西洋鲜精巢以来, 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。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。本文主要就胚胎冷冻保存中的相关问题作一简要概述。

1 低温生物学原理

低温生物学(cryobiology)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。^[8]它包括的内容十分广泛, 几乎所有在低于正常(生物适于生存的)温度下进行的与生物有关的实验研究或理论探索都属于低温生物学的范畴。

低温保存就是通过低温抑制细胞代谢, 使细胞由常温下的高能耗、强代谢状态, 进入一种能量消耗、新陈代谢降至最低点的休眠状态。其中细胞自身发生可逆性变化, 蛋白质、酶以及其它细胞结构均未被破坏, 复温后就能恢复活力。一般认为在 0 — 60℃ 的温度区间细胞内水分子会重新移动按一定次序排列成冰晶, 造成损伤细胞的不可逆变化, 故该区间应以适宜速率尽快越过; 而低于 -60℃ 后, 细胞内的水分无序排列不再移动, 进入坚硬、均质、

团块状的玻璃化状态, 该可逆状态对细胞结构不会造成损伤(李纯等, 2000)^[9]。

在大多数情况下,细胞的过冷程度比周围溶液更深, 细胞外溶液先结冰,使溶质浓缩, 导致细胞外环境渗透压升高。如果降温足够慢的话, 可以通过脱水来维持细胞内外环境渗透压平衡。但是如果降温过慢, 细胞长时间处于高渗环境中, 对细胞产生渗透休克; 如果降温过快, 细胞内水分又来不及移到细胞外, 而在细胞内形成冰晶, 冰晶会破坏细胞器, 刺破细胞膜,导致细胞死亡。通过冻前在稀释液中加入一定浓度的低温保护剂, 让细胞在保护剂中平衡并适当脱水, 可将损伤降到最低限度。胚胎细胞内水分含量达 80%以上, 在冷冻过程中有 90%的水分形成游离水, 而游离水在低温下易形成冰晶。一般胚胎在冷冻过程中不可避免要形成细胞内冰晶, 但只要不形成大冰晶, 而是维持微晶状态, 细胞将不受伤害。

胚胎在冷冻过程和解冻过程中两次通过易形成冰晶的危险温区(-15℃~50℃), 采取适当的冷冻方法和低温保护剂, 使胚胎安全通过危险温区,胚胎在冷冻前进行处理, 向保存液中加入保护剂如甘油或蔗糖等, 改变细胞膜渗透性和溶液渗透压, 防止溶液效应和渗透压差异, 减少降温和复温过程冰晶的形成。常规的冷冻保存胚胎一般在胚胎脱水以前诱导结晶, 然后缓慢降温脱水, 解冻时快速复温到常温。现今通用的玻璃化冷冻法,高浓度的渗透性保护剂组成的玻璃化液是一种粘稠的玻璃态物质, 低温时它不结晶就可固化。胚胎在这种溶液中脱水一定程度, 可引起内源性大分子和已渗入的保护剂浓缩, 从而使细胞在急剧降温过程中得以保护。

低温技术是一把双刃剑, 应用得当时, 可以长期保存生物; 应用不当时, 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。归纳起来, 生物材料在降温和复温过程中的冷冻损伤机制主要包括过冷休克、冰晶损伤、高渗休克和抗冻剂毒性等 4 个方面。

如今, 人们已经能够成功地超低温冷冻保存多种生物细胞及组织, 甚至包括多种哺乳动物的卵母细胞和胚胎都已经有了比较成熟的超低温冷冻保存技术。但是, 鱼类胚胎及哺乳动物主要器官等的超低温冷冻保存仍然还是有待进一步研究解决的课题。

2 胚胎冷冻方法

2.1 胚胎冷冻降温方法

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三种。

2.1.1 分段慢速降温 在哺乳动物胚胎冷冻中, 这是最早建立的一种冷冻法。一般为将样品从室温慢速(2~5℃·min⁻¹)降到冰点的温度, 然后再以极慢的速率(0.05~0.5℃·min⁻¹)降至约-60℃左右, 再以约 1~2℃·min⁻¹ 降至-85℃, 停留约 10min, 最后快速降温至-196℃的保存温度。在鱼类的胚胎冷冻保存研究中, Zhang 等^[10]1989 年就使用此方法进行过鲤鱼的胚胎冷冻保存研究, 并获得了液氮中保存胚胎有 25%复活并孵出鱼苗的成功实例。

2.1.2 分段快速降温 此方法于与慢速降温法又很多相似点, 其主要差别就是从 0℃到-60

℃, 采用 $2\sim 5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的降温速率。章龙珍等^[11]比较了两种降温方法对鱼类胚胎的影响, 结果表明在白鲢和草鱼的胚胎冷冻保存中, 分段快速降温法优于分段慢速降温法; 而张克俭等^[12]在 1997 年的研究表明, 在泥鳅和银鲫的胚胎冷冻保存中, 也发现分段快速降温优于分段慢速降温

2.1.3 玻璃化冷冻法 所谓玻璃化即液体在冷冻过程借助于极快速降温, 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。这种冷冻法在小鼠、牛和羊胚胎冷冻保存中获得不错的效果^[13], 但在鱼类胚胎冷冻保存上的应用才刚刚起步。陈松林等最早将玻璃化冷冻法引入鱼类胚胎冷冻保存研究(陈松林等, 1991)^[14], 之后章龙珍等开展了淡水鲤科鱼类胚胎的玻璃化冷冻保存研究(章龙珍等, 1996)^[15], 并在泥鳅胚胎冷冻中利用玻璃化冷冻方法获得冷冻复活的泥鳅胚胎, 但解冻后胚胎未能继续发育成育苗(章龙珍等, 2002)^[16], 田永胜等(2003)^[17]使用 GP 与 Met 配制的玻璃化液冷冻妒鱼胚胎获得了成活胚, Chen 和 Tian(2005)^[18] (使用 PG 和 Met 配制的玻璃化液冷冻保存牙坪胚胎获得成功。Chao 等^[19]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 $\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO+1mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰胺+3mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 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^[20]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 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 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^[21]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 70min。赵燕等(2005)^[22]以牙鲆为实验对象, 研究认为, 含有多种抗冻剂的玻璃化液 PMDD(2% PVP), 玻璃化稳定, 脱玻璃化率较低, 适宜进行玻璃化冷冻。刘本伟^[23]利用筛选到的混合抗冻剂 35%PMD, 加入 5%的蔗糖配成玻璃化液, 采用玻璃化颗粒冷冻保存方法, 对牙鲆尾芽期和心跳期胚胎进行超低温冷冻保存, 冻存时间超过 12h, 在三次冷冻中, 解冻后获得 4 粒复活胚胎, 4 粒胚胎均孵化出正常仔鱼, 最长存活 15 天, 最短存活 11 天。玻璃化冷冻技术在鱼类胚胎冷冻保存中应用时间不长, 但是一直都在向前发展, 因其所具有的优点, 相信在可预见的未来必定有着良好的应用前景。

3 影响鱼类胚胎冷冻的主要因子

由于鱼卵和胚胎体积大(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 保护剂

胚胎在冷冻保存时, 向保存液中加入冷冻保护剂可改变胚胎冷冻时的物理化学环境, 减轻和防止降温和复温过程中冰晶对细胞的损伤。结合哺乳动物胚胎冷冻对冷冻保护剂的研究

来看, 冷冻保护剂可分为四类^[24], 即: (一) 低分子量可渗透性保护剂; (二) 低分子不可渗透物质; (三) 大分子保护剂; (四) 混合保护剂。

用作胚胎保护剂主要有甘油、乙二醇、DMSO、丙二醇、丙三醇、蔗糖、聚蔗糖等。但它们在对抗胚胎脱水保护的同时又会对胚胎产生毒性, 对不同的胚胎表现不同的保护效果, 在鱼类的胚胎冷冻保存中, 要根据不同的冷冻方法、鱼种、发育胚龄选择不同的保护剂。同时, 由于鱼类胚胎体积较大(直径 1~6mm), 而且具有 2 层膜, 抗冻剂进入其内速率很慢, 若想使抗冻剂充分进入胚胎内, 就必须在冷冻保存前, 将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, 这无疑会对胚胎造成伤害。Harvey 等在 1982 年的研究就表明, 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^[25]。Robertson 等^[26]比较了甘油、二甲亚砜和甲醇对似石首鱼胚胎的毒性作用, 表明尾芽期胚胎对甘油、二甲亚砜、甲醇这三种抗冻剂的最大耐受浓度分别为 1mol·L⁻¹、2mol·L⁻¹ 和 2mol·L⁻¹, 甘油的毒性作用大于二甲亚砜和甲醇。另外章龙珍等^[27]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, 且浓度越高、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%。此外, Zhang 和 Rawson^[20]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 3mol·L⁻¹、1,2-丙二醇和 5mol·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。

3.2 胚龄的影响

不同发育时期的鱼类胚胎对抗冻剂的敏感性以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*) 尾芽期胚胎比桑堪期胚胎更能经受冷冻保存(Robertson and Lwaene, 1988)^[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(章龙珍等, 1992)^[27]。Zhang 等(1995)^[29]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(1997)^[30]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。Routray (2002)^[31]在青鳉不同时期胚胎对抗冻剂 DMSO(0.6-2.5M)吸收的实验中发现, 对 DMSO 的吸收能力随发育阶段的延长而增强。但 Zhang 等(1993)在对去膜的斑马鱼胚胎水份和甲醇的通透性的研究中表明不同发育阶段水份的通透性保持相对稳定, 对甲醇的通透能力则随着胚胎发育的进行而下降。但未去膜的胚胎对甲醇的渗透性则随着胚胎发育的进行而增强, 由此说明壳膜对水份的渗透性变化不明显, 对抗冻剂的渗透能力可能随发育时间的延长而增强。余来宁等^[32]研究表明, 中华鲟原肠细胞冷冻存活率明显比囊胚细胞的高。可以看出,

选取适宜胚龄的胚胎进行冷冻保存，是成功地进行冷冻保存的重要一步。

3.3 卵膜的通透性

由于鱼类胚胎具有双层卵膜这一特殊性，且卵膜对水份和抗冻保护剂的通透性低，所以卵膜的通透性低就成了影响鱼胚胎冷冻保存成功的另一个重要限制因子，在胚胎冷冻保存中，胚胎往往尚未吸足抗冻剂，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。

Harvey (1983)^[33]斑马鱼胚胎研究表明抗冻剂在胚胎中的分布是不均匀的，胚盘细胞较卵黄易于渗透。对鲤鱼、青鳉、虹鳟卵黄周围部分的 DMSO 渗透性实验都表明这些部位的渗入抗冻剂浓度远低于可以发生抗冻剂保护作用的有效浓度 (Suzuki 等, 1995)^[34]。Zhang 等 (1996)^[20]通过胚胎体积的变化来观察抗冻剂的渗透情况，但只能反映卵黄周围区域有抗冻剂渗入，未能提供卵黄及胚盘细胞有抗冻剂渗入的证据。Hagedorn 等(1997)^[30]研究了斑马鱼胚胎中水分的分布及其通透性，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分含量是不相同的。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 (1998)^[35]也研究了斑马鱼胚胎对水分和甲醇的通透性。表明去膜的斑马鱼胚胎对水分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(1998)^[36]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分和 DMOS 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 DMOS 的通透率则要比胚盘低 3 个数量级，分别为 $5 \times 10^{-6} \text{cm/min}$ 和 $1.5 \times 10^{-3} \text{cm/min}$ 。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。

不过研究者也通过各种方法提高了卵膜的通透性，如 Catherine 等 (1994) 实验表明用氯处理胚体可以增强卵膜的渗透性。Hagedorn(2002)^[37]在实验中转入体内特定 mRNA，使水疏松性蛋白-3 (aquaporin-3) 在胚胎内表达，改造胚胎通透性,从而从本质解决抗冻剂不能进入卵黄的膜障碍问题。目前科研工作者将传统地低温生物技术与新的电流共振 (ESR) 和磁共振 (MR) 等新技术结合，测定胚胎内各部分的体积变化以及水分，抗冻剂的分布情况。相信通过学科间的融合，鱼类胚胎卵膜通透性低的这一限制因素会被克服。

3.4 解冻处理

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°C/min)和慢速解冻(2 — 8°C/min)2 种^[38]。Zhang 等(1989)^[39]在鲤鱼胚胎冷冻保存中发现慢速解冻(8°C/min)优于 148°C/min 的快速解冻。而 Harvey(1983)^[40]在斑马鱼胚胎冷冻保存中，则发现 43°C/min 和 2°C/min 的解冻速率，无明显差异。张克俭

等(1997)^[12]则发现冷冻泥鳅胚胎在 40℃水浴中解冻的效果明显优于在 25℃和 4℃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(1983)^[41]用 1mol/1DMOS 冷冻虹鳟受精卵,解冻时让其分别在 0.5 和 0.25mo/11DMSO 中各平衡 5min,然后进入水中孵化,获得不错的效果。张克俭等(1997)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。解冻后如何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子之一。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。

4 鱼类胚胎冷冻保存的展望

尽管人们对鱼类胚胎的冷冻保存研究的历史已有了二十多年,在研究中也偶尔有过超低温冷冻保存后解冻胚胎存活的例子(zhangetal, 1989; 张克俭等, 1997; 章龙珍等, 2002; 陈松林等, 2003; 李军等, 2003; 田永胜等, 2003),但是重复性效果不好,所以总体来说,目前在该领域尚未取得真正的突破。目前,人们在鱼类胚胎冷冻方面的研究大多集中在鱼类胚胎本身对降温及低温的反应特性、不同保护剂对鱼类胚胎的毒性和保护性、鱼类胚胎对水及保护剂的通透性、不同发育时期胚胎的低温耐受性、使用不同的降温方法和降温速率、试用不同的保护稀释液配方、冷冻前对鱼类胚胎的预处理、采用不同的解冻复温方法和解冻后处理等内容上。但有关鱼类胚胎冷冻保存后,组织结构和细胞超微结构的变化情况,目前尚未见有报道。

低温冷冻保存技术在鱼类养殖、遗传育种及种质资源保存中有着明显的优点,(一)通过建立胚胎冷冻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;(二)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,胚胎冷冻保存技术的完善对渔业发展和生态环境保护都很有意义。所以针对鱼类胚胎保存中的一些不利因素,在将来的胚胎冷冻研究中以下几个方面必将有所突破。

4.1 抗冻蛋白的应用

抗冻蛋白作为抗冻保护剂抗冻蛋白是存在于美洲大绵等耐冻鱼类体内的一种糖蛋白。Knight 等(1986)^[42]提出抗冻蛋白在耐寒生物体中的重要作用。Carpenter 和 Harsen^[43]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^[44]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%。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。由于化学抗冻剂(二甲亚砜等)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。

4.2 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。

4.3 鱼类胚胎干细胞在种质保存上的应用

目前，鉴于鱼类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。与鱼类囊胚细胞相类似，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。Calvi 和 Maisse^[45]将发育到 Ballar6A-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，在鱼类种质保存上也有重要应用价值^[46]。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。

4.4 遗传稳定性的研究

鱼类胚胎冷冻保存的主要目的是保存鱼类基因型，只有确保冷冻保存胚胎的基因结构没有发生变化，这项技术才可以在生物多样性保护得到有效应用。因此有关冷冻保存对鱼类基因结构的影响不容忽视。Vanper 等（1993）对非州鲶鱼的冷冻精子的基因变异情况的实验结果表明超低温保存没有造成改变。但 Oteme 等（1998）对鲶鱼冷冻精子的实验发现有冻精授精产生的第四代的基因型发生了变异。所以说明选择的稳定（指不会造成基因变异）的抗冻剂及生化处理方法应该引起高度重视。今后将运用分子生物学和生化遗传学技术对鱼类胚胎冷冻保存低温保存后的遗传结构进行分析评价。

附表：鱼类胚胎低温保存研究成果

种类	发育阶段	保存温度(°C)及时间	成活率 (%)	文献
银大马哈鱼	受精卵	-20	6.4	Stoss,1983
虹鳟	发眼期	-25	10~26	Erdshl,1986
鲤	尾芽期	-30(15min),-196(20min)	13.4,18.7	Zhang,1989
斑马鱼	心跳期	-25, -30	43.8	Zhang,1993
团头鲂	出膜前期	-40(16min)	14	章龙珍,1994
青鱼	心跳期	-30(15min)	12.5	章龙珍,1994
泥鳅	心跳期	-100(60min), -196(120min)	10	张克俭,1997
银鲫	心跳期	-100(60min)	15	张克俭,1997
草鱼	心跳期	-100(60min)	10	张克俭, 1997
虹鳟	胚盘	-196	88~95	Calvi, 1997

参考文献:

- [1] Polge C., SmithAU., Reviva lof spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature, 1949,164:666.
- [2] Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P .Survival of mouse embryos frozen to-196°C and -269°C[J].Science,1972,178:411-414.
- [3] Fridler S,Giudive L and E lamb, Cryopreservation of embryo and ova [J]. Fert Steril,1988, 49: 743 - 764. in vitrderived bovine embryos [J].Therigenology,1993,39(1):81-94.
- [4] Parks J E and N A Ruffing Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes[J]. Therigenology, 1992, 37(1): 59-73.

- [5] Leibo SP and N M Loskutoff. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos [J]. Theriogenology, 1993, 39(1): 81-94.
- [6] Leibo SP et al. High survival of zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. Cryoletters, 1993, 14: 133-144.
- [7] Blaxter THS. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature, 1953, 172: 1189-1190.
- [8] 赵燕, 牙鲆胚胎的玻璃化冷冻保存的研究[lunwen]. 中国海洋大学, 2005.
- [9] 李纯, 李军等, 海洋生物种质细胞低温保存与机理. 海洋科学, 2000, 24(4): 12-15.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Massip A, Van Der Zwalm P, Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos [J]. Theriogenology, 1987, 27(1): 69-79.
- [15] 陈松林, 刘宪亭. 鱼卵和胚胎冷冻保存研究进展 [J]. 淡水渔业, 1991(1): 44-46.
- [15] 章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 郭峰, 张洁明, 柳凌. 玻璃化液对鳊鱼胚胎成活率的影响, 淡水渔业, 1996, 26(5): 7-10.
- [16] 章龙珍, 鲁大椿, 柳凌, 郭峰, 张洁明. 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究 [J]. 水产学报, 2002, 26(3): 213-217.
- [17] 田永胜, 陈松林, 严安生, 季相山, 于过才. 鲈鱼胚胎的玻璃化冷冻保存. 动物学报, 2003, 49(6): 843-850.
- [18] Chen S.L. and Tian Y.S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification [J]. Theriogenology, 2005, 63: 1207-1219.
- [19] Chao N H, Chen Y R, Hsu H, et al. Pretreatment and cryopreservation of zebrafish embryos [J]. Cryobiology, 1997, 35(4): 340.
- [20] Zhang T, Rawson D M. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos [J]. Cryobiology, 1996, 33(1): 1-13.
- [21] 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.
- [22] 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 [J]. 动物学报, 2005, 51(2): 320-326.
- [23] 刘本伟. 玻璃化冷冻保存方法及冷冻损伤机理研究[lunwen] 中国海洋大学, 2007.
- [24] 包华琼, 李跃民, 哺乳动物胚胎冷冻的研究进展 [J]. 草食家畜, 2001, 4 (总 113 期): 1-5.
- [25] Harvey B, Ashwood S. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes.

Cryobiology,1982,19:201-205.

[26] 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.

[27] 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.

[28] Robertson S M, Lawrence A L. 1988, Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose and sea salt solutions to the embryos of red drum The Prog Fish-Culture 50:148-154.

[29] Zhang T, Rawson D M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish embryos[j]. 1995, Cryobiology 32(3):239-246.

[30] Hagedorn M., Hsu E., Kleinhans FW, Wildt DE. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. Cryobiology, 1997, 34:335 — 347.

[31] Routray P, Suzuki T, Strussmann C A, et al. 2002, Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzias latipes*. Theriogenology 58:1483-1496.

[32] 余来宁,危起伟,张繁荣,杨东,姚雁鸿,刘红艳. 中华鲟胚胎细胞的冷冻保存及其核移植[J] 水产学报,2007,31(4):431-436.

[33] Harvey, B., Kelley, R.N., and Ashwood-Smith, M.J. 1983b, permeability of intact and dechorinated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide Cryobiology 20:432-439.

[34] Suzuki T, Komada H, Takai R, et al. 1995, Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. Fish. Sci 61:193-197.

[35] Zhang T.T. and Rawson D.M.. Permeability of dechorinated one-cell and six-somite stage zebra fish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol (J) .Cryobiology, 1998, 37(1):13 — 21.

[36] Hagedorn M, Kleinhans WF, Artemov D, Characterization of a major permeability barrier in the zebra fish embryo[J]. *Biol Reprod*, 1998, 59:1240 — 1250.

[37] Hagedorn, M., Lance, S.L., Fonseca, D.M., et al. 2002, Altering Fish Embryos with Aquaporin-3: An Essential Step Toward Successful Cryopreservation. *Biology of Reproduction* 67:961-966.

[38] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J] 水产学报. 2002, 26(2):161-168.

[39] Zhang X S, Zhao L, Hua T C, et al. 1989 A study on the cryopreservation of common carp embryos. *Cryo Letters*, 10:271-278.

[40] Harvey, B. 1983 Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms and intact embryos of the zebra fish to minus 196 Celsius. *Cryobiology* 20:440-447.

[41] Stoss J, Donaldson E M. 1983, Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout and coho salmon *J Aquac* 31:51-61.

[42] Knight, C.A., Duman, J.G. 1986, Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology* 23:256-262.

- [43] 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.
- [44] Rubinsky B, Arav A, Devries A. Cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes[J]. Cryobiology,1992,29:69-79.
- [45] 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.
- [46] 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.