

研究简报

鱼类囊胚细胞和卵的电融合

易泳兰 刘沛霖 刘汉勤 陈宏溪

(中国科学院水生生物研究所、武汉)

ELECTRIC FUSION BETWEEN BLASTULA CELLS AND UNFERTILIZED EGGS IN FISH

Yi Yonglan Liu Peilin Liu Hanqin and Chen Hongxi

(Institute of Hydrobiology, Academia sinica, Wuhan)

关键词 鱼类, 囊胚细胞, 卵, 电融合

Key words Embryonic cells, eggs, fish, electric fusion

细胞核移植是研究细胞分化、核质关系等有效手段, 已取得了较好的成绩^[1-3]。但由于细胞核移植是一种显微操作技术, 技术难度较大, 尚难普及与推广。我们在进行鱼类细胞电融合初步成功的基础上, 开展了鱼类囊胚细胞和未受精卵的电融合研究, 探讨电脉冲可逆击穿能否将外源细胞核引入卵内? 以及外源细胞核能否促进未受精卵分裂、发育成正常的个体?

材料与方法

(一) 供体细胞与受体卵 实验用材料鱼为大鳞副泥鳅 *Paramisgurnus dabryanus*, 鳗尾泥鳅 *Misgurnus anguillicaudatus*、鲤 *Cyprinus carpio* 和红鲫 *Carassius auratus, red variety*。均按常规方法人工催产获得受精卵、待发育至囊胚期即以囊胚细胞作为供体细胞。然后采集未受精的成熟卵作为受体卵(以下简称受体卵)。

(二) 电融合装置与融合小槽及电场液与前文相同^[4]。

(三) 融合条件 在12—24℃室温下, 采用75—100 V/cm, 0.6 兆赫交流电, 脉冲电强为400—500 V/cm。受体卵和供体细胞的平均比例

为1:390—1:500, 细胞和卵在交流电场作用下2—3分钟, 然后电脉冲冲击2—3次, 时间常数20—50μs。

(四) 操作程序

1. 供体细胞的制备 取数十个囊胚期胚胎, 在赫氏液内用两把尖锐的钟表镊子切下囊胚。随即将囊胚转入盛有2毫升赫氏液(含EDTA、缺Ca、Mg)的刻度离心管内, 用吸管轻轻吹打, 使囊胚细胞加速分散成单个细胞。以每分钟3000转的速度, 离心3分钟, 去上清液后, 再加入2毫升电场液, 重复离心, 去上清液, 最后加入少量电场液, 备用。

2. 受体卵的采制 将成熟鱼卵挤入水中, 用0.25%胰蛋白酶(赫氏液作溶剂)水解卵膜, 约数十秒后(视水温而定), 倾去酶液, 水洗1—2次, 将裸卵迅速转入赫氏液内, 备用。

3. 实验组合 共3个组合即大鳞副泥鳅细胞与同种卵的融合; 大鳞副泥鳅(♀)×鳗尾泥鳅

1) 易泳兰等, 鱼类细胞核的移植及其应用(待发表)。

1987年11月11日收到。

(♂) 杂交细胞与母本卵的融合以及鲤的细胞与红鲫卵的融合。另外,以不加供体细胞和不作任何电场处理的大鱗副泥鰌受体卵作为空白对照^[1,2]。

4. 结果检查 各组受体卵的胚胎发育按囊胚期、原肠期、早晚胚体期和鱼苗各个发育阶段,分别进行观察与统计。并按形态特征鉴别融合鱼(表1)。

结 果 与 讨 论

(一) 空白对照组

一批不加供体细胞,也不进行电融合的2230个卵,有9个卵发育至囊胚期,占总卵数的0.4%;另一批不加供体细胞,但在同样实验条件下进行电场处理的1548个卵,出现不规则的分裂,无一个卵发育到囊胚期(表1)。两者均难以继续分裂下去,数小时后全部崩解。由此表明,实验组供体细胞与受体卵融合胚胎数统计,应从囊胚期作为统计的基数。同时,也间接证实,未受精的成熟卵子,在电场的刺激下,卵质出现一些假分裂或不规则的分裂,无论如何不能正常地分裂与发育至囊胚期,更不能孤雌发育成为一尾正常的

鱼苗。

(二) 大鱗副泥鰌囊胚细胞和大鱗副泥鰌受体卵的融合

受体卵总数296个,发育至囊胚期有33个,占受体卵的11.1%(表1)。其中有4个在囊胚期就停止发育,12个发育到原肠期,在还未形成胚体的早期胚胎停止发育的有6个和出现肌节或心跳期的晚胚5个,两项共11个,最后发育到鱼苗期有6尾。后三项分别占囊胚期胚胎的36.4%,33.3%和18.2%。6尾鱼苗发育成正常个体有4尾,其形态酷似同种的特征(图1)。

(三) 大鱗副泥鰌(♀)×鳗尾泥鰌(♂)杂交囊胚细胞与大鱗副泥鰌卵的融合

受体卵总数为1107个,发育至囊胚期的有36个,占受体卵总数的3.2%;其中在囊胚期停止发育的16个,原肠期停止发育的10个,胚体期的4个,只有6个发育到鱼苗。它们分别占囊胚期胚胎的44.4%,27.8%、11.1%和16.7%,6条鱼苗发育成正常的5条,它们的外部形态,基本近似于杂交卵发育的个体,即其体形有的兼具双亲的特征,如体长、体高方面;而尾柄略长,皮褶棱不很发达,接近于父本(图2,3)。

表1 电融合后受体卵胚胎发育的比较

Tab. 1 Comparison of embryonic development of recipient eggs after electric fusion treatment

组 别 group	受体卵 Total n. of recipient eggs	囊胚期 Total n. of blastula stage	囊 胚 期 停止发育 Arrested in blastula stage	原 肠 期 停止发育 Arrested in gastula stage	胚 体 期 (早、晚 胚) 停止发育 Arrested in early, or late embryonic stage	鱼 苗 Fry
供体细胞 donor cells	受体卵 recipient eggs					
大鱗副泥鰌→ 大鱗副泥鰌	296	11.1%* 33 100%	4 12.1%**	12 36.4%	11(早胚6个,晚胚5个) 33.3%	6 18.2%
大鱗副泥鰌(♀)×鳗尾 泥鰌(♂)→大鱗副 泥鰌	1107	3.2% 36 100%	16 44.4%	10 27.8%	4(晚胚) 11.1%	6 16.7%
鲤→红鲫	662	17.1% 113 100%	71 62.8%	18 15.9%	20(早胚18个,晚胚2个) 17.7%	4 3.5%
空 白 对 照 Blank control	2230	0.4% 9				
对 照 control	1548	0				

* 数字上面的百分数是囊胚期胚胎占受体卵总数的百分比。

** 数字下面的百分数是各发育阶段胚胎占囊胚期胚胎的百分比。

注: 大鱗副泥鰌;杂种;鲤鱼;红鲫;“→”cell nuclei shocked in recipient eggs by using electric pulses.

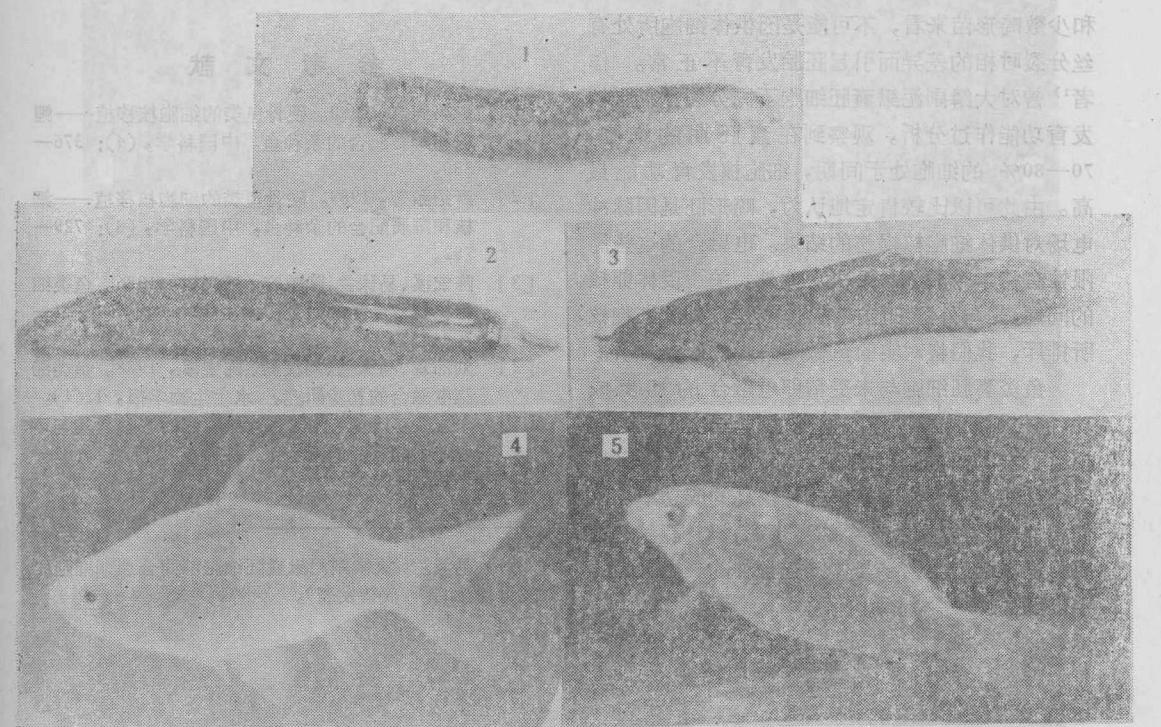


图 1—5 电融合鱼和对照鱼

Fig. 1—5 Electric fusion fish and Control fish

1. 大鱗副泥鰍同種卵和細胞的電融合魚；2. 大鱗副泥鰍（♀）×鰻尾泥鰍（♂）雜種魚；3. 雜種細胞和母本卵的電融合魚；4. 紅鯽；5. 鯉細胞和紅鯽卵的電融合魚。

1. Electric fusion fish from *P. dabryanus* blastula cells fused with recipient eggs of the same species; 2. Hybrid fish (*P. dabryanus* (♀) × *Misgurnus anguillicaudatus* (♂)); 3. Electric fusion fish from hybrid blastula cells (*P. dabryanus* (♀) × *Misgurnus anguillicaudatus* (♂)) fused with *P. dabryanus* recipient eggs; 4. Red goldfish (*Carassius auratus*, red variety); 5. Electric fusion fish from common Carp blastula cells fused with red goldfish recipient eggs.

(四) 鯉囊胚細胞與紅鯽卵的融合

共處理 662 個卵，發育到囊胚期有 113 個，占受體卵總數的 17.1%。其中，在囊胚期停止發育的有 70 個，達到原腸期 18 個，早期和晚期胚胎分別為 18 個和 3 個，仅有 4 個發育到魚苗。它們分別占囊胚數的 61.9%、15.9%、18.6% 和 3.5%。鯉囊胚細胞與紅鯽受體卵融合後產生的電融合魚各具二對觸須（圖 4,5），其形態純屬供體細胞核親本種鯉的特徵，同受體卵無須的紅鯽明顯的不同。

從實驗結果可以看出，我們自行設計的電融合裝置和融合條件，同樣適用於魚類胚胎細胞和未受精卵的電融合；在脈衝電場作用下，供體細胞核可以並入受體卵並能促使未受精成熟卵分裂，

發育成正常的個體。從初步鑑定的結果來看，由供體核參與發育成魚苗是確實無疑的，但是發育到囊胚期的融合卵的百分比低至 3.2%，最高也只占 17.1%，而且最後發育成魚苗的百分數更低，只占囊胚期胚胎數的 3.5—18.2%；約占受體卵總數的 0.8%。很可能是由於供體細胞和受體卵的融合是藉助脈衝的擊穿作用而實現的，而脈衝是具方向性的，在電融合槽的不同部位，受到脈衝的作用不同，即有的可以融合，有的不能融合，而出現不分裂或假分裂。同時電融合和細胞核移植相比，對供體細胞和受體卵質量的要求大體相同，只有當供體細胞核不受電脈衝損傷，又能與受體卵同步發育才能順利地通過胚胎發育的各階段，最後生成正常的魚苗。從出現大量的畸形胚

和少数畸形苗来看，不可能是供体细胞所处有丝分裂时相的差异而引起胚胎发育不正常。作者¹⁾曾对大鱗副泥鰌囊胚细胞不同分裂期细胞核发育功能作过分析，观察到在囊胚期的细胞，70—80% 的细胞处于间期，细胞核发育功能最高。由此可以比较肯定地认为，畸形胚是因脉冲电场对供体细胞核损伤的结果。电融合的这些局限性有待于今后继续解决。此外，关于受体卵核的问题，是与外源细胞核结合，或是被外源细胞核所排斥，我们将对实验鱼做进一步的研究分析。

鱼类囊胚细胞与未受精卵电融合的初步成功，简化了细胞核移植的操作过程，一次可以处理相当于一次核移植卵数的 2—3 倍。人们可以期望，电融合有可能比核移植有较高的成功率。我们相信，随着电融合技术的逐步完善与提高，它将成为鱼类细胞生物学与体细胞育种的一个有力的手段。

参 考 文 献

- [1] 童第周等, 1980. 硬骨鱼类的细胞核移植——鲤核和鲫质配合的杂种鱼。中国科学, (4): 376—380。
- [2] 严绍颐等, 1984. 硬骨鱼类的细胞核移植——鲤核和鲤质配合的杂种鱼。中国科学, (8): 729—782。
- [3] 陈宏溪、易泳兰、陈敏容、杨兴棋, 1986。鱼类细胞核发育潜能的研究。水生生物学报, (1): 1—7。
- [4] 刘沛霖、易泳兰、刘汉勤、陈宏溪, 1988。鱼类细胞电融合的初步研究。水生生物学报, 12(1)。
- [5] 朱志荣, 1962。泥鳅、黄鳝、青鳉的繁殖及其与环境关系的初步研究。水生生物学集刊, (1): 1—14。

1) 易泳兰, 大鱗副泥鰌囊胚细胞不同分裂期细胞核发育功能的研究(待发表)。