

利用显微注射技术冷冻保存牙鲆胚胎

丁浩^{1,2}, 田永胜¹, 武鹏飞^{1,3}, 刘洋¹, 陈松林¹

(1. 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; 2. 上海海洋大学, 上海 200090; 3. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要: 在鱼类胚胎的冷冻保存中, 需要抗冻剂有效地渗入胚胎, 才能对胚胎起到保护作用。本研究采用显微注射技术将抗冻剂直接注射到牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 胚胎内, 以实现牙鲆胚胎的玻璃化低温冷冻保存。研究中, 首先对抗冻剂种类进行了选择, 将抗冻剂的毒性由大到小依次排列为: 乙二醇 (EG)、甘油 (Gly)、二甲基亚砜 (DMSO)、甲醇 (MeOH)、1,2 丙二醇 (PG)、PM21 (PG: MeOH=2:1); 对胚胎发育时期和注射剂量进行了筛选。实验结果显示, 注射 600 pL (1 pL=10⁻⁶ mL) 抗冻剂 PM21 后, 牙鲆的心跳期胚胎成活率显著高于尾芽期胚胎 ($P<0.05$), 成活率为 (64.04±2.05)%; 对卵黄囊、卵膜与卵黄膜间隙作为注射部位进行了选择, 发现采用卵黄囊内注射的胚胎成活率高于“五步平衡法”, 并显著高于通过卵黄膜间隙注射 ($P<0.05$), 其成活率为 (44.24±7.88)%。结果表明, 注射 600 pL 35% PM21 至牙鲆心跳期胚胎卵黄囊内, 平衡 10 min, 然后进行玻璃化冷冻保存, 取得了 68.2%~79.4% 透明胚胎, 能够对牙鲆胚胎提供很好的保护。说明显微注射方法可以成功地将抗冻剂注射入牙鲆胚胎, 并在牙鲆胚胎的冷冻及胚胎的完整性方面发挥有效的保护作用。[中国水产科学, 2008, 15(5): 866-872]

关键词: 牙鲆; 胚胎; 显微注射; 玻璃化; 冷冻保存

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-0866-07

超低温冷冻保存技术在牛和小鼠等哺乳动物胚胎冷冻保存上已获得成功。鱼类胚胎体积大, 相对表面积小, 这使抗冻剂的渗入和水的渗出速率相对降低^[1]; 卵膜的通透率低, 也限制了抗冻剂和水的渗透; 鱼类胚胎具有高度的冷冻敏感性, 容易造成胚胎冷冻损伤^[2]; 此外鱼类胚胎还具有胚盘和卵黄这样的多室系统, 它们对抗冻剂具有不同的渗透速率^[3-5]。以上种种因素使鱼类胚胎的冷冻保存极为困难。因此, 寻找新的方法来降低胚胎对冷冻的敏感性, 提高抗冻剂对胚胎的保护作用是非常重要的。

目前在鱼类胚胎冷冻保存上, 应用较多的方法是玻璃化冷冻法。陈松林等^[6]最早将玻璃化冷冻法引入鱼类胚胎冷冻保存研究, 之后玻璃化方法在鱼类胚胎冷冻保存上取得了一些成果^[1,7-10]。Chen 等^[10]对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 胚胎玻璃化冷冻保存进行了较系统、深入的研究, 建立了玻璃化冷冻保存技术, 多次获得冷冻复活的牙鲆胚胎, 并孵化出鱼苗。目前国内在进行玻璃化冷冻时, 其

中抗冻剂渗透这一环节, 都是通过将胚胎直接放在抗冻剂中平衡一段时间 (以下简称普通平衡法), 由于卵膜通透性差, 无法对抗冻剂渗入胚胎内部的量进行准确衡量。为了能够克服卵膜通透性差这一缺点和准确测量进入胚胎内部抗冻剂的量, 本实验采用显微注射法将抗冻剂注射至胚胎内 (以下简称显微注射法)。

显微注射法开始应用于基因工程, 随后此项技术被应用于去除部分斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 卵黄来降低胚胎冷冻敏感性^[11-12]。Janik 等^[13]率先将此方法应用到斑马鱼胚胎冷冻保存, 此后 Beirão 等^[14]在对金头鲷 (*Sparus aurata*) 胚胎冷冻保存中也用到显微注射法。Robles 等^[15]用此方法注射抗冻蛋白至大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 胚胎内进行低温冷冻。

本实验应用显微注射法将抗冻剂注射至牙鲆胚胎内, 对胚胎冷冻过程中一系列影响因素进行筛选, 以期鱼类胚胎冷冻保存及损伤机理的研究提

收稿日期: 2007-10-10; **修订日期:** 2008-01-11.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30570259); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2003AA603510); 农业科技成果转化资金项目 (2007GB2C600174)

作者简介: 丁浩 (1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学和低温生物学. E-mail: dhsxb@163.com

通讯作者: 陈松林. Tel: 0532-85844606; E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 胚胎

实验所用牙鲆胚胎由山东省海阳市黄海水产有限公司提供。通过控光控温,使牙鲆亲鱼自然产卵受精,采用流水集卵法收集受精卵,受精卵收集后于 14 °C 恒温培养箱中充气培养,每天早晚吸底 2 次除去死卵。取发育至所需阶段(尾芽期和心跳期)的胚胎进行实验。

1.2 试剂

实验采用以 NaCl、KCl、CaCl₂·2H₂O、MgCl₂·6H₂O、NaHCO₃ 配制而成的 BS₂^[16] 为基础液。实验所用渗透性抗冻剂 1,2-丙二醇(PG)、甲醇(MeOH)购自上海亨达精细化工有限公司;蔗糖(Sucrose)、二甲亚砜(DMSO)、甘油(Gly)购自上海生工生物工程有限公司;乙二醇(EG)购自中医药集团上海化学生物工程有限公司。

1.3 显微注射方法

显微注射仪为 Eppendorf 公司产品,注射玻璃针用 PC-10 拉针仪(日本 Narashige 公司)自行拉制,用游丝镊断针,务必达到针尖锐利。注射时,将发育至不同时期的牙鲆胚胎小心吸入到特制的琼脂凹槽内,使其在凹槽内呈单排直线排列,加入少量灭菌海水浸没胚胎。用自制柔软拨卵针拨动胚胎,使注射针能注射到胚胎不同部位。显微注射操作在解剖镜下进行。

1.4 不同抗冻剂对牙鲆尾芽期胚胎的影响

以 BS₂ 为基础液,将 PG、EG、MeOH、Gly、DMSO 和 PM21 (PG:MeOH=2:1, V/V) 6 种渗透性抗冻剂配制成体积百分比浓度为 35%(V/V) 的溶液。分别注射 400 pL (1 pL=10⁻⁶ mL) 35% PG、MeOH、EG、DMSO、Gly、PM21 至牙鲆尾芽期卵黄囊内,每批注射 10~15 粒。将注射后的胚胎分别在 35% PG、MeOH、EG、DMSO、Gly、PM21 溶液中平衡 10 min,用 0.125 mol/L 蔗糖溶液洗脱 10 min,然后加入无菌海水于 16 °C 恒温培养箱中培养,12 h 后统计各种抗冻剂处理后胚胎的成活率(成活卵数/总卵数),胚胎孵化后用新鲜过滤海水培养,再统计孵化率(出膜鱼苗数/成活卵数)。注射 BS₂ 处理同期胚胎的成活率和孵化率作为对照。

1.5 不同注射剂量对牙鲆心跳期胚胎成活率的影响

分别注射 35% PM21 200 pL、400 pL、600 pL、

800 pL、1 000 pL 至牙鲆心跳期胚胎。每批注射 10~15 粒,将注射过的胚胎在 35% PM21 中平衡 10 min,用 0.125 mol/L 蔗糖洗脱 10 min,然后加入无菌海水于 16 °C 恒温培养箱中培养,12 h 后统计胚胎的成活率,胚胎孵化后用新鲜过滤海水培养。注射 BS₂ 处理同期胚胎的成活率作为对照。

1.6 相同注射剂量对牙鲆不同发育时期胚胎成活率的影响

注射 600 pL 35% PM21 至牙鲆尾芽期、心跳期胚胎,每批注射 10~15 粒。将注射过的胚胎在 35% PM21 中平衡 10 min,用 0.125 mol/L 蔗糖洗脱 10 min,然后加入无菌海水于 16 °C 恒温培养箱中培养,12 h 后统计胚胎的成活率,胚胎孵化后用新鲜过滤海水培养。注射 BS₂ 处理同期胚胎的成活率作为对照。

1.7 不同注射部位对牙鲆心跳期胚胎成活率的影响

牙鲆卵由外及内主要有卵膜和卵黄膜包被,选择注射部位分为:卵膜与卵黄膜间隙和卵黄囊。实验中,将 600 pL 35% PM21 分别注射至卵膜与卵黄膜间隙、卵黄囊内,并与“五步平衡法”^[17](普通平衡法中的一种)作对比。每批注射 10~15 粒。将注射后的胚胎在 35% PM21 中平衡 10 min,然后以 2 °C/s 的速率降至 20 °C,平衡 5 min 后,用 0.125 mol/L 蔗糖溶液洗脱 10 min,迅速转入无菌海水中于 16 °C 恒温培养箱中培养,12 h 后统计处理后胚胎的成活率,胚胎孵化后用新鲜过滤海水培养。将注射 BS₂ 处理同期胚胎的成活率作为对照。

1.8 牙鲆心跳期胚胎显微注射抗冻剂后的玻璃化冷冻保存

注射 600 pL 35% PM21 至牙鲆心跳期胚胎卵黄囊内,每批注射 10~15 粒,将注射后的胚胎在 35% PM21 中平衡 10 min,然后装入麦管,每只麦管装 1~2 粒,快速投入液氮中,进行玻璃化冷冻保存。1 h 后于 37 °C 水浴解冻复温,并用 0.125 mol/L 蔗糖溶液洗脱 10 min,加入过滤海水,观察。

1.9 数据处理

利用数据统计分析软件 SPSS 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),结果以平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。不同数据组间利用最小显著极差法进行多重比较,并以字母标记法在图中标记具有统计学差异的各项,同一系列中字母相同表示差异不显著($P > 0.05$),字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同抗冻剂对牙鲆尾芽期胚胎成活率和孵化率的影响

在分别用 35% (V/V) 的 PG、MeOH、EG、DMSO、Gly 和 PM 21 6 种抗冻剂对牙鲆尾芽期胚胎进行显微注射后, 得到胚胎的成活率分别为 $(43.93 \pm 8.17)\%$ 、 $(40.21 \pm 3.47)\%$ 、 $(10.37 \pm 5.79)\%$ 、 $(29.35 \pm 1.06)\%$ 、 $(12.78 \pm 8.94)\%$ 、 $(65.46 \pm 3.79)\%$ 。结果表明, 在抗冻剂体积百分比浓度为 35% 时, 注射 PM21 后牙鲆胚胎的成活率和孵化率最高, 其中孵化率与对照无显著差异 ($P > 0.05$)。表明 35% 的 PM21 对牙鲆尾芽期胚胎的毒性较低; 注射 35% 的 PG、MeOH 和 DMSO 后, 胚胎的成活率较低, 与注射 PM21 后的成活率有显著差异 ($P < 0.05$)。毒性最大的是 EG, 注射后胚胎成活率最低, 为 $(10.37 \pm 5.78)\%$, 孵化率也最低, 为 $(16.67 \pm 16.67)\%$ 。35% 的各种抗冻剂注射后对牙鲆尾芽期胚胎的毒性从大到小依次为 EG、Gly、DMSO、MeOH、PG、PM21 (图 1)。

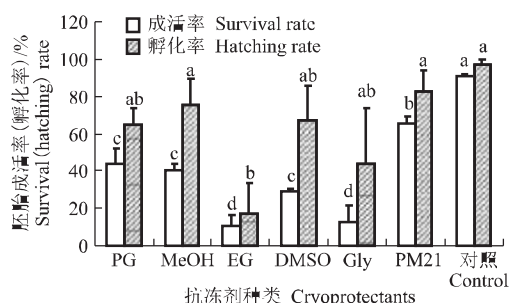


图 1 牙鲆尾芽期胚胎注射 400 pL 35% (V/V) 的不同抗冻剂后的成活率和孵化率 ($n=3$)

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.1 Survival and hatching rate of *Paralichthyo olivaceus* embryos at heart beating stage injected with 400 pL different 35% (V/V) cryoprotectants ($n=3$)

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.2 不同注射剂量PM21对牙鲆心跳期胚胎成活率的影响

注射不同剂量 35% PM21 至牙鲆心跳期胚胎后, 胚胎成活率随着注射量的增加而降低。当注射量增至 600 pL 时, 胚胎成活率为 $(64.04 \pm 2.05)\%$; 当注射量增至 800 pL 时, 胚胎成活率为 $(26.50 \pm 2.27)\%$, 与注射 600 pL 组比较显著下降 ($P < 0.05$),

说明 600 pL 是较为适宜的注射剂量 (图 2)。

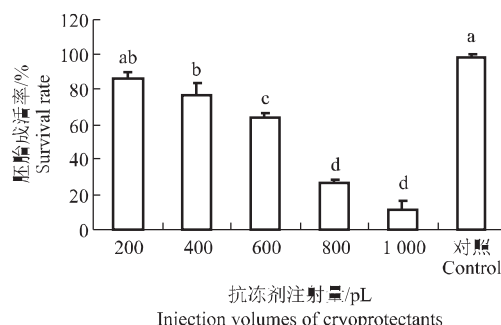


图 2 注射不同剂量抗冻剂后牙鲆心跳期胚胎成活率 ($n=3$)
不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.2 Survival rate of *Paralichthyo olivaceus* embryos at heart beating stage with different injection volumes of cryoprotectants ($n=3$)

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.3 相同PM21注射剂量对不同发育时期牙鲆胚胎成活率的影响

胚胎发育时期不同, 对抗冻剂 PM21 的耐受力也不同。实验发现, 在注射 600 pL 35% (V/V) PM21 后, 心跳期胚胎成活率为 $(64.04 \pm 2.05)\%$, 要显著高于尾芽期 $(45.38 \pm 2.91)\%$ ($P < 0.05$), 说明心跳期是比较适宜进行低温冷冻保存的胚胎时期 (图 3)。

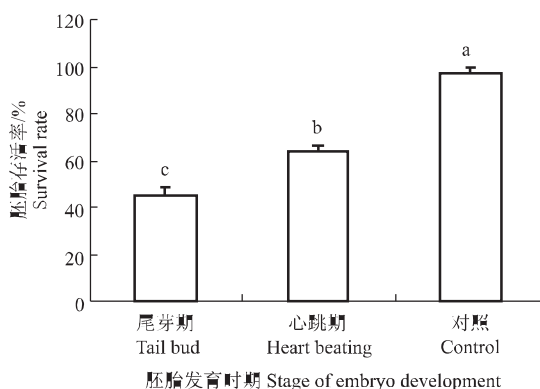


图 3 注射相同剂量 PM21 抗冻剂后不同发育时期牙鲆胚胎的成活率 ($n=3$)

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.3 Survival rate of *Paralichthyo olivaceus* embryos at different development stage with same injection volumes of cryoprotectants PM21 ($n=3$)

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.4 不同注射部位对牙鲆心跳期胚胎成活率的影响

利用心跳期胚胎对注射部位作了比较。将注射抗冻剂的胚胎平衡 10 min 后, 进行 20 °C 低温处理, 同时与“五步平衡法”对比。发现卵黄囊注射组的胚胎成活率最高, 为 $(44.24 \pm 7.88)\%$; “五步平衡法”次之, 为 $(37.26 \pm 2.02)\%$, 但两者无显著差异 ($P > 0.05$)。成活率最低的是膜间隙注射组的胚胎, 为 $(16.30 \pm 3.53)\%$, 与前 2 种方法相比有显著差异 ($P < 0.05$) (图 4)。说明注射抗冻剂至卵黄囊后, 胚胎的低温耐受性增强, 抗冻剂对胚胎起到的保护作用最好, 而注射至膜间隙后抗冻剂对胚胎起到的保护作用最差。

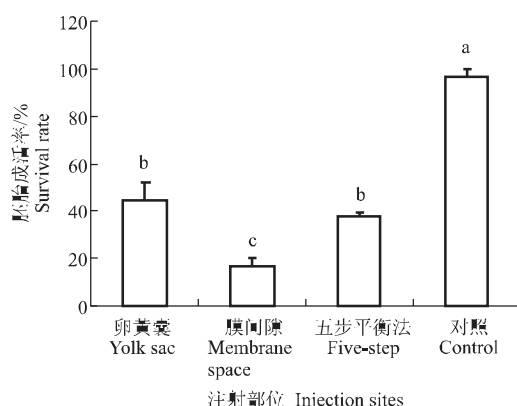


图 4 不同注射部位对冷冻后牙鲆胚胎成活率的影响 ($n=3$)
不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.4 Effect of different injection sites on survival rate of *Paralichthys olivaceus* embryos after cooling ($n=3$)
Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.5 牙鲆心跳期胚胎显微注射抗冻剂后玻璃化冷冻保存的效果

将冷冻保存的牙鲆心跳期胚胎解冻洗脱后, 胚胎上浮率达 92.64%~95.33%, 并取得了 68.2%~79.4% 的透明胚胎, 胚胎上浮至 0.5~1 h 后下沉, 变白, 未发现成活胚胎。但解冻后胚胎完整性良好, 整体外形完整率要优于“五步平衡法”。解剖镜下观察, 卵黄稍收缩, 卵黄膜基本完好, 卵黄无外流。胚体外形无损伤 (图版 I)。在冷冻过程中, 卵黄囊是极易损伤的部位, 卵黄囊的轻微损伤就能导致胚胎的死亡。

3 讨论

鱼类胚胎冷冻保存是一个系统过程, 其中包括胚胎发育时期的选择、玻璃化液的选择、平衡方法的选择、解冻方法和洗脱方法的选择等。这些技术环节任何一步做得不理想, 都会对胚胎造成致命损伤。显微注射方法因为要刺穿卵膜, 将抗冻剂直接注入卵黄内, 更容易对胚体造成物理损伤和抗冻剂毒性损伤, 故对每个技术环节的要求都很严格。

在此之前已有研究表明, 显微注射法是一种让抗冻剂进入胚胎的理想方法^[13,15]。本研究也证明了通过显微注射抗冻剂对牙鲆心跳期胚胎能够提供很好的保护, 如果注射方法恰当, 几乎对胚胎不产生物理伤害。但随着注射剂量的增加, 胚胎成活率也在下降。说明抗冻剂在对胚胎保护的同时也对胚胎产生毒性作用。同样, Robles 等^[15]报道在对大菱鲆尾芽期胚胎进行显微注射抗冻剂后, 胚胎成活率有轻微下降。但 Beirão 等^[14]对金头鲷尾芽期胚胎进行显微注射抗冻剂后, 则发现胚胎成活率和孵化率无显著降低, 这可能与注射剂量有关。本实验通过对注射剂量的梯度筛选, 得出 600 pL 为理想的注射剂量, 既能对胚胎提供足够保护, 又能减少对胚胎的毒性作用。

胚胎发育时期是对胚胎超低温冷冻保存的重要影响因子。在普通平衡法中, 对牙鲆、大菱鲆来说, 尾芽期胚胎比较适合进行冷冻保存^[10,18], Robles 等^[15]对大菱鲆胚胎进行显微注射抗冻蛋白, 选用的是尾芽期胚胎。Beirão 等^[14]对金头鲷胚胎进行显微注射抗冻剂, 也选用的是尾芽期胚胎。而对鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 来说, 心跳期胚胎比较适合进行冷冻保存^[8,19]。在本实验中, 对注射的胚胎时期进行筛选得出, 心跳期要显著优于尾芽期, 与“五步平衡法”得到结果不同。在注射时发现, 牙鲆心跳期胚胎卵膜要比尾芽期更难刺破, 由此推论, 心跳期胚胎卵膜比尾芽期卵膜要厚, 其渗透性也比尾芽期胚胎要差, 在“五步平衡法”中, 心跳期胚胎对抗冻剂的渗透性自然要比尾芽期低, 所以这也可能是尾芽期胚胎成活率高于心跳期胚胎的原因之一。在此实验中, 抗冻剂被直接注射至胚胎内部, 每个时期注射的剂量是相同的。由于对抗冻剂的耐受力较高, 所以心跳期胚胎成活率显著高于尾芽期, 这种差异的另一个原因也可能与种间差异有关^[20]。

Janik 等^[13]在对斑马鱼显微注射抗冻剂时发现尽管胚胎对 DMSO 和 PG 有很好的耐受性,但 PG 对胚胎的毒性要小于 DMSO, DMSO 不适合作为注射用抗冻剂。但 Beirão 等^[14]在对金头鲷胚胎进行显微注射抗冻剂时却发现 EG (5 mol/L)、MeOH (5 mol/L) 和 DMSO (5 mol/L) 对胚胎的毒性无显著差异。但在本实验中对尾芽期胚胎注射 35% (V/V) PG、MeOH、EG、DMSO、Gly、PM21 400 pL, 得出它们对胚胎的成活率和孵化率有显著影响,其中注射 PM21 后胚胎成活率和孵化率最高,分别为 $(65.46 \pm 3.79)\%$ 和 $(82.84 \pm 10.83)\%$,比单一注射 PG 和 MeOH 效果好。这与 Chen 等^[10]、赵燕等^[20]的实验结果一致,证实混合抗冻剂对胚胎的毒性要小于单一抗冻剂。

在胚胎冷冻保存中,抗冻剂要对胚胎起到保护作用,则必须能够快速渗透到胚体各个部位。由于在本实验操作中发现,被注射针头刺过的胚胎存活率极低,所以只选择卵膜与卵黄膜间隙和卵黄囊 2 个部位进行了注射,而略去胚体注射。结果表明,显微注射法在 20 °C 对牙鲆胚胎的保护优于“五步平衡法”,不过,注射至卵黄囊内的抗冻剂是否能完全渗透到胚体各个部位,尚待进一步研究。与此相类似,Robles 等^[15]在对大菱鲆胚胎注射抗冻蛋白后并未发现抗冻蛋白渗入胚胎细胞内。Janik 等^[13]在对斑马鱼胚胎进行显微注射抗冻剂后也未发现冷冻损伤有所减少。

与传统方法比较,显微注射法是逐粒对胚胎进行注射,略显繁琐。但本实验旨在探索如何降低牙鲆胚胎冷冻敏感性,对这一新方法进行了尝试,并取得初步效果。本实验中,尽管未获得冷冻成活胚胎,但是解冻后胚胎上浮率和透明胚胎率提高。通过这一现象,可以认为显微注射法在鱼类胚胎冷冻保存中是一个值得探索的方法。

参考文献:

- [1] 章龙珍,鲁大椿,柳凌,等. 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): 213-218.
- [2] Wallace R A, Selman K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians [J]. J Electron Microsc Technol, 1990, 16: 175-201.
- [3] Zhang T 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.
- [4] Hagedorn M, Kleinhans F W, Artemov D. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo [J]. Biol Reprod, 1998, 59: 1 240-1 250.
- [5] Cabrita E, Chereguini O, Luna M, et al. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture, 2003, 221: 593-604.
- [6] 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, 29 (1): 44-46.
- [7] 章龙珍,刘宪亭,鲁大椿,等. 玻璃化液对鲢鱼胚胎成活率的影响[J]. 淡水渔业, 1996, 26(5): 7-10.
- [8] 田永胜,陈松林,严安生,等. 鲈鱼胚胎的玻璃化冷冻保存[J]. 动物学报, 2003, 49(6): 843-850.
- [9] Roles V, Cabrita E, Real M, et al. Vitrification of turbot embryos preliminary assays [J]. Cryobiology, 2003, 47: 30-39.
- [10] Chen S L, Tian Y S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification[J]. Theriogenology, 2005, 63: 1 207-1 219.
- [11] Liu X H, Zhang T T, Rawson D M. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Cryobiology, 1999, 39: 236-242.
- [12] Liu X H, Zhang T T, Rawson D M. Effect of chilling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. Theriogenology, 2001, 55: 1 719-1 731.
- [13] Janik M, Kleinhans F W, Hagedorn M. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*) [J]. Cryobiology 2000, 41: 25-34.
- [14] Beirão J, Robles V, Herráez M P, et al. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryo[J]. Aquaculture, 2006, 261: 897-903.
- [15] Robles V, Cabrita E, Herráez M P. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFP III) in turbot embryos [J]. Cryobiology, 2004, 49: 317-318.
- [16] 田永胜,陈松林,严安生. 牙鲆胚胎玻璃化冷冻技术研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(3): 105-110.
- [17] 田永胜. 三种海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004: 1-141.
- [18] 田永胜,陈松林,严安生. 大菱鲆胚胎玻璃化方法研究[J]. 中国水产科学, 2004, 11 (2): 166 169.
- [19] 于过才,陈松林,孔晓瑜,等. 鲈鱼胚胎程序化冷冻保存的研

究[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(1): 1-7.

保存的影响[J]. 动物学报, 2005, 51(2): 320-326.

[20] 赵燕, 陈松林, 孔晓瑜, 等. 几种因素对牙鲆胚胎玻璃化冷冻

Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos using microinjection

DING Hao^{1,2}, TIAN Yong-sheng¹, WU Peng-fei^{1,3}, LIU Yang¹, CHEN Song-lin¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China; 3. Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Cryopreservation of fish embryos requires an optimal distribution of cryoprotectants inside all embryo compartments. Traditional techniques for the permeation of cryoprotectants have failed to protect all embryo compartments, especially the yolk sac which has been considered the principal point of embryo chilling sensitivity. In the present study, microinjection was used to make cryoprotectants penetrate into the yolk sac of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. Several factors relating to cryopreservation of flounder embryos with microinjection were investigated which were cryoprotectants, stages of embryo development, injection volumes of cryoprotectants and injection sites. The toxicity sequence of cryoprotectants were got from high to low as follows: Ethylene glycol (EG), Gly, DMSO, methanol (MeOH), 1, 3-propanediol (PG), PM21 (PG:MeOH=2:1). To test the effects of developmental stage of embryos and volumes of cryoprotectant injection, embryos at tail bud and heart beating stage were injected with different volumes of cryoprotectants. After microinjecting with 600 pL 35% PM21 to embryos, survival rate of embryos at heart beating stage is $(64.04 \pm 2.05)\%$, obviously higher than that of embryos at tail bud stage ($P < 0.05$). Through the choice of injection sites which are intermembranous space and yolk sac, the results indicate that the optimal injection site is yolk sac, with significant higher survival rate of $(44.24 \pm 7.88)\%$ compared with intermembranous space injection group ($P < 0.05$). The results show that this method can provide a sufficient protection for the embryos by injecting 600 pL 35% PM21 into the yolk sac of flounder embryos at heart beating stage before vitrifying. With this method 68.2% 79.4% transparent embryos were got. Although after thaw the embryos didn't survive because of limited time and embryo quality, it is still testified that microinjection allowed delivery of high concentrations of cryoprotectants into yolk sac without deleterious effects on the embryo intactness. This study explored a new possible way in fish embryos cryopreservation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 866-872]

Key words: *Paralichthys olivaceus*; embryos; microinjection; vitrification; cryopreservation

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

丁浩等：利用显微注射技术冷冻保存牙鲆胚胎

DING Hao et al: Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos using microinjection



图版 I

a. 注射抗冻剂后牙鲆心跳期胚胎（箭头所指处为针头刺穿后的痕迹），×50；b. “五步平衡法”解冻后心跳期胚胎，×50；c. 显微注射抗冻剂解冻后牙鲆心跳期胚胎，×50.

Plate I

a. Flounder embryo at heart beating stage microinjected with cryoprotectants (Arrows indicate the external damage produced by puncture), ×50; b. flounder embryos at heart beating stage through normal balance after thawing, ×50; c. flounder embryos at heart beating stage through cryoprotectants microinjection after thawing, ×50.

• 书讯 •

《中国海洋生物种类与分布》（增订版）

——海洋出版社出版

本书对 1994 年出版的《中国海洋生物种类与分布》及美国 2001 年出版的英文版进行了增订。本增订版 1999 年完成修订、2007 年再次补充，共记录中国海域的 22 561 个物种，隶属于 5 界，其中动物界 24 门，其他界 22 门。

这次增订仍根据 Margulis & Schwartz (1982) 五界分类；基本上按 1994 年版的体例，着重增补初版后 10 多年来新报道或初版遗漏的物种。为力求相对稳定，仅对分类阶元（界、门、纲、目、科、属）做小修订。

本书可供海洋生物研究、水产养殖、开发、管理的教学人员和研究人员使用；也可供海洋学、环境保护、水产品外贸和编译人员参考。

黄宗国主编，16 开精装本，1210 页。

国际标准书号：ISBN 978-7-5027-6905-5/Q.199；定价：280 元。

购买方式：

邮局汇款：

地址：北京市海淀区大慧寺路 8 号海洋出版社发行部；邮编：100081；联系人：邓昂

银行汇款：

户名：海洋出版社；开户行：工行首都体育馆支行；帐号：02000 53709 02490 7030

电话：010 62147016；传真：010 62114300；联系人：邓昂

