

研究简报

虹鳟卵母细胞体外成熟与授精的研究

石连玉¹ 尹洪滨¹ 毛崇林² 沈俊宝¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070; 2. 阜新市水产研究所, 阜新 213000)

STUDIES ON *IN VITRO* MATURATION AND FERTILIZATION
OF RAINBOW TROUT OOCYTES

SHI Lian Yu¹, YIN Hong-Bin¹, MAO Chong-Lin² and SHEN Jun Bao¹

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070;

2. Fuxin Fishery Research Institute, Fuxin 213000)

关键词: 虹鳟; 卵母细胞; 成熟; 授精; 体外

Key words: Rainbow trout; Oocyte; Maturation; Fertilization, *in vitro*

中图分类号: S965.122 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)01-0110-03

随着基因工程技术的发展,很多学者正致力于转基因鱼的研究。就实验材料而言,鱼类有体外受精、发育、怀卵量多、卵径大、便于显微操作等优点。然而鱼类受精卵的卵黄多、核很小,镜下难以分辨。特别是虹鳟卵膜厚而不透明,不可能将外源基因精确地注入到动物极内。因此转化率很低,只有通过大量地注射鱼卵来增加转化个体的数量。这不但要饲养大量实验鱼,而且为受体鱼的检测带来了很大的困难。一般来说通过体外培养成熟的卵母细胞膜薄而透明,核膨大明显可见。因此可以精确地将外源基因注入核区域内,从而可以大大地提高转化率。

鱼类卵母细胞体外培养技术也是研究鱼类卵母细胞成熟的调控机制、胚胎发育与分化等生殖机制的重要手段^[1]。然而卵母细胞的成熟要受到激素、生化物质和培养条件等多方面因素的影响。利用外源激素促使卵母细胞体外成熟,在哺乳类和两栖类有很多报道^[2,3]。而鱼类国外虽有些报道^[10,11],但在国内只有金鱼和红鲫有报道可以体外成熟授精。本实验旨在探讨不同的激素对虹鳟卵母细胞体外成熟、排卵与受精的影响。

1 材料与方法

1.1 实验鱼 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) 1.5kg 以上,3—4龄,成熟度IV期中,取自黑龙江水产研究所渤海冷水鱼试验站。

1.2 培养基 配方同 B. Jalabert^[10]

1.3 激素 17 α 羟孕酮(17 α -Hydroxyprogesterone, 17 α -HP), 17 β -雌二醇(17 β -Oestradiol, 17 β -E2), 孕酮(Pregesterone), 睾酮(Testosterone), 前列腺素(Prostaglandin)。

1.4 培养方法 实验鱼在无菌条件下取出卵巢,在平衡液内分成小块(每块最大不超过5个滤泡),分装入含有10ml培养基的50ml三角培养瓶内,加入不同浓度的各种激素并设空白对照,培养于含5% CO₂ 的培养箱内,培养温度为12.5℃。每组均设两个平行分别用于进行成熟率与排卵率的观察和人工授精及受精率的观察。

1.5 结果观察 成熟率和排卵率的观察方法:同红鲫^[1]。受精率的观察方法是在进行成熟率观察的同时用另一平行组的成熟卵母细胞进行人工授精,受精卵在小型水族箱内孵化,将水族箱放在恒温箱内,温度为12.5℃,并不断向孵化水中冲氧。10d后进行受精率检查,方法是将卵放入盛有受精率鉴别液(福尔马林 甘油 冰醋酸 蒸馏水=5:6:4:85)的培养皿中,经5min后,肉眼见到有白色线状胚体的卵为受精卵。根据受精卵的比例计算受精率。

2 结果

2.1 成熟率观察

通过5次10尾虹鳟鱼卵母细胞的体外培养,成熟率检

收稿日期:2002-09-20;修订日期:2003-01-30

基金项目:农业部重点科研项目(编号:渔10-02-05)资助

作者简介:石连玉(1960—),男,辽宁省西丰县人;研究员;主要从事鱼类遗传育种研究

通讯作者:尹洪滨

查统计结果由图 1 所示。对各实验组的成熟率与对照组进行 χ^2 检验, 结果 17β -E2 和前列腺素与对照组没有显著性差异。其他各组差异性显著。说明 17β -E2 和前列腺素对虹鳉卵母细胞的体外成熟没有明显的促进作用。而孕酮、睾酮和 17α -HP 的作用显著, 其中 17α -HP 的作用最为显著。从图 1 还可以看出培养时间由 24h 增加到 72h 孕酮、睾酮和 17α -HP 三组的成熟率都有明显的提高。

2.2 排卵率的观察

虹鳉鱼卵母细胞体外培养 24h、48h、72h, 17α -HP ($1\mu\text{g}/\text{mL}$)、前列腺素 ($2\mu\text{g}/\text{mL}$) 及 17α -HP 与前列腺素联合作用下对排卵率的影响见图 2。从图 2 中可以看出, 17α -HP 组的排卵率与对照没有差异。前列腺素和 17α -HP + 前列腺素组比对照组明显提高。培养时间从 24h 增加到 72h 各组的排卵率并未明显增加。当 17α -HP 和前列腺素的浓度由 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加到 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 时排卵率没有明显变化(图 3)。

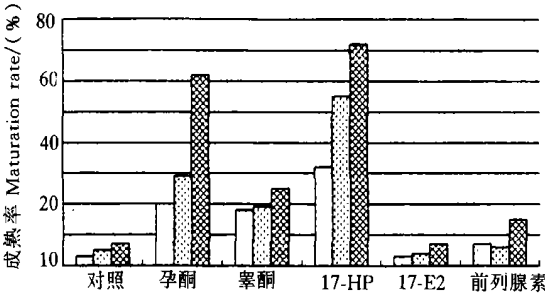


图 1 不同激素对虹鳉卵母细胞体外成熟率的影响

Fig. 1 Influence of different hormone on the maturation rate of rainbow trout oocyte *in vitro*
前列腺素浓度为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$, 其他为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$.
□ 2h ▨ 48h ▩ 72h

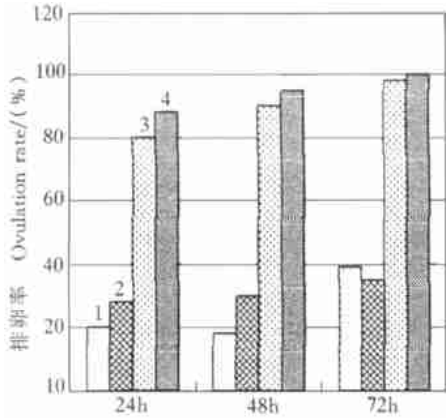


图 2 不同时间、不同激素($1\mu\text{g}/\text{mL}$)组合对虹鳉卵母细胞排卵率的影响

Fig. 2 Influence of different time, hormone($1\mu\text{g}/\text{mL}$) and combination on the ovulation rate of rainbow trout oocyte *in vitro*
1. 对照; 2 17α -HP; 3 17α -HP + 前列腺素; 4. 前列腺素

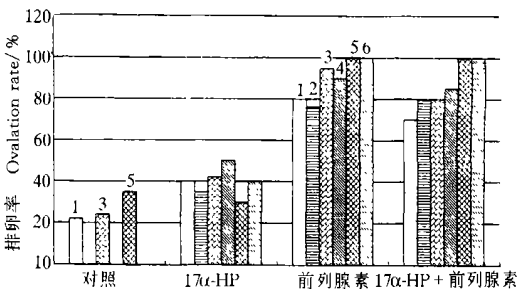


图 3 不同激素、浓度、时间对虹鳉卵母细胞排卵率的影响

Fig. 3 Influence of different hormone, concentration and time on the ovulation rate of rainbow trout oocyte *in vitro*
1. 对照($1\mu\text{g}/\text{mL}$); 2 24h($5\mu\text{g}/\text{mL}$); 3. 48h($1\mu\text{g}/\text{mL}$);
4. 48h($5\mu\text{g}/\text{mL}$); 5. 72h($1\mu\text{g}/\text{mL}$); 6. 72h($5\mu\text{g}/\text{mL}$)

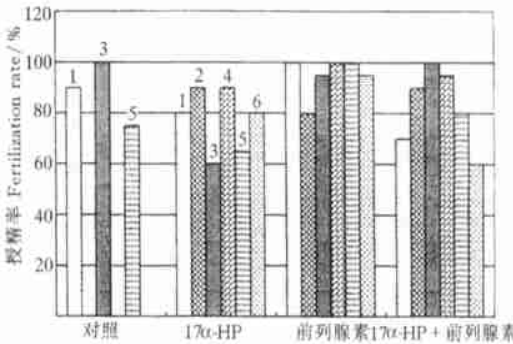


图 4 不同激素、浓度、时间对虹鳉卵母细胞受精率的影响

Fig. 4 Influence of different hormone, concentration and time on the fertilization rate of rainbow trout oocyte *in vitro*
1. 对照($1\mu\text{g}/\text{mL}$); 2 24h($5\mu\text{g}/\text{mL}$); 3. 48h($1\mu\text{g}/\text{mL}$);
4. 48h($5\mu\text{g}/\text{mL}$); 5. 72h($1\mu\text{g}/\text{mL}$); 6. 72h($5\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.3 受精率的检查

经过对成熟并排卵的卵母细胞进行人工授精, 结果各组的受精率都在 50% 以上, 各组包括对照组之间均没有明显差异(图 4)。说明受精率与培养时间、激素浓度及激素种类均没有明显的相关性。

无论从体内和体外的研究都表明硬骨鱼类的卵母细胞的成熟最终是在 17α - 20β -双羟孕酮(17α - 20β P) 的诱导下完成的^[1,5,9]。本试验使用 17α -HP 同样可以诱导虹鳉卵母细胞成熟。这是因为 17α -HP 在滤泡的颗粒细胞层中可以作为 17α - 20β P 的前身, 在 20β 羟类固醇脱氢酶的作用下转化成 17α - 20β P^[1,9]。这与红鲫的研究结果一致^[1]。在以孕酮作为诱导激素的情况下, 与 17α -HP 具有类似的结果。但效果不如 17α -HP 明显(图 1), 特别是在培养时间为 24h 的情况下。当培养时间增加到 72h, 成熟率明显增加, 已接近 17α -HP。这可能是因为孕酮促使卵母细胞成熟同样需要转化成为 17α - 20β P。而孕酮比 17α -HP 缺少一个羟基, 因此在转化成 17α - 20β P 的过程中路径要比 17α -HP 复杂, 所需时间要长。

睾酮在虹鳉卵母细胞的成熟过程中也起一定的作用,但没有 17α -HP和孕酮那么明显,这可能是因为睾酮在 17α - 20β -P的合成中只起到协同作用^[3]。

在整体和离体研究中发现^[5,6,7,8] 17β -E₂对卵母细胞的大生长期具有一定作用。 17β -E₂可以诱发肝细胞合成一种雌性特异蛋白,再转化成卵黄蛋白前体。卵黄蛋白前体再被结合到卵母细胞中,进一步转变成卵黄蛋白,在卵母细胞中形成卵黄颗粒沉积。而在卵母细胞的核成熟(极化)过程中的作用不大。本研究中所选用的卵母细胞为IV中期,这时已完成了卵黄积累。因此,这时 17β -E₂对卵母的促成熟作用不大,这与对大西洋鲑的研究结果一致。

在对红鲫的研究中发现^[1],前列腺素对卵母细胞的成熟没有影响,但可以促成熟卵母细胞排卵。当前列腺素与 17α -HP联合作用时即可以使卵母细胞成熟又可以促使其排卵。在本研究中得到了类似的结果图(1、2)。

一般来说卵母细胞对激素的浓度和作用时间是有一定的耐受限的,在对鲤和鲫鱼的研究中发现 17α -HP的浓度在 $1\mu\text{g/mL}$ 成熟率达最大值,浓度增加成熟率反而下降。增加培养时间,成熟率虽然可以增加但卵母细胞出现过熟老化现象。因此鲤鱼对 17α -HP的耐受浓度为 $1\mu\text{g/mL}$,培养时间为24h。而虹鳉的卵母细胞的培养时间由24h增加到72h成熟率明显提高,且没有过熟。在前列腺素的作用下,可以排卵,也可以受精。这可能是因为虹鳉的培养温度较低,激素活性较小,所以作用时间较长。另一个原因也可能是虹鳉的卵母细胞比鲤科鱼类大,细胞膜也比较厚,增加了作用时间。关于激素浓度从图3、4可以看出当 17α -HP和前列腺素由 $1\mu\text{g/mL}$ 增加到 $5\mu\text{g/mL}$ 时,排卵率和受精率均没有太大的影响。说明虹鳉对激素的浓度的耐受范围比鲤科鱼类广。

在人工授精实验中发现各组不同的激素,不同浓度、不同的培养时间受精率与对照组均没有大的区别。说明只要成熟排卵的卵母细胞就可以受精,而与培养条件无关。

参考文献:

- [1] Shi L Y, Studies on maturation and fertilization of red remora oocyte *in vitro* [J]. Journal of fishery sciences of china, 1995, 2(5): 36—39. [石连玉. 红鲫卵母细胞体外成熟和受精的研究. 中国水产科学, 1995, 2(5): 36—39]
- [2] Zheng R Z, Research on the external maturation and fertilization of the

oocyte of the Rabbit [J]. *Acta zoologica sinica*, 1992, 38(1): 64—71 [郑瑞珍. 兔卵母细胞体外成熟和体外受精的研究. 动物学报, 1992, 38(1): 64—71]

- [3] Ji W Z, External maturation, fertilization and cultivation of the morkey s oocyte [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1992, 18: 2090—2092. [季维智. 猕猴卵母细胞的体外成熟, 受精和培养. 科学通报, 1992, 18: 2090—2092]
- [4] Wang R X, Research to get the transgenic goldfish from the external matured oocyte [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1990, 18: 1422—1424. [王壬学. 从体外成熟卵母细胞获得转基因金鱼的研究. 科学通报 1990, 18: 1422—1424]
- [5] Zhao W X, Changes of the sex steroid content in Hypophthalmichthys molitrix during its spawning [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1988, 12(3): 212—216. [赵维信. 诱导鲢排卵时性类固醇激素含量的变化. 水生生物学报, 1988, 12(3): 212—216]
- [6] Zhao W X, Improvement of the measurement methods and the annual Changes of the estradiol content in *Megalobrama amblycephala* serum [J]. *Acta Hydrobiologica sinica*, 1987, 11(2): 97—104. [赵维信等. 团头鲂血清中雌二醇含量测定方法的改进和周年变化规律的研究. 水生生物学报, 1987, 11(2): 97—104]
- [7] Jiang R X, Variation of gonadotropin and 17β -estradiol by LHRH-*Ain Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1986, 10(2): 187—193. [姜仁良. 促黄体生成素释放激素类似物对团头鲂血清中促性腺激素和 17β 雌二醇含量变动的研究. 水产学报, 1986, 10(2): 187—193]
- [8] Zhao W X, Separating of ovarian follicle releasability steroids in Atlantic Salmon during its vitellogenic stages induced with gonadotropin [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1986, 10(4): 389—394. [赵维信. 促性腺激素诱发大西洋鲑卵黄发生期卵巢滤泡释放性类固醇激素的离体研究. 水产学报, 1986, 10(4): 389—394]
- [9] Wang Y Q, Fishery physiology [M]. Shanghai: Science technology Publisher of Shanghai, 1990, 229—255. [王义强. 鱼类生理学. 上海: 上海科学技术出版社, 1990, 229—255]
- [10] Jaiabert B, Fostier A. The modulatory effect *in vitro* of oestradiol 17β testosterone or cortisol on the output of 17α -hydroxy 20β -dihydroprogesterone by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ovarian follicles stimulated by the maturational gonadotropin s-GH [J]. *Reprod. Nutr. Develop.* 1984, 24(2): 127—136
- [11] Barry T P, ; procarione L S, lapp A F *et al.* Induced final oocyte maturation and spawning in walleye (*Stizostedion vitreum*) [C]. *Aquaculture* 1992, 92: 21—25