

## 研究简报

## 银鲫卵母细胞体外诱导成熟的初步观察

THE PRELIMINARY OBSERVATION ON INDUCING CRUCIAN  
CARP, *CARASSIUS AURATUS GIBELIO*,  
OOCYTE MATURATION IN VITRO

丁军 蒋一珪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

Ding Jun and Jiang Yigui

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

关键词 银鲫, 卵母细胞, 成熟, 体外诱导

KEYWORDS *Carassius auratus gibelio*, crucian carp, oocyte, maturation,  
in vitro

体外诱导鱼类卵母细胞成熟技术是指在离体情况下,用诱导物质将处于IV时相的鱼类卵母细胞诱导发育至V时相的技术。此项研究在国外始于七十年代初期,已对十几种鱼作过研究,其中的绝大部分仅止于探索体外诱导鱼类卵母细胞胚泡破裂的最佳条件[Epler P., 1981; Epler, P., 1986; Goetz, F. W., 1983; Hirose, K., 1971; Hirohiko kagawa等, 1984; Jalabert, B., 1976; Saat, T. V., 1976],而对诱导胚泡破裂后卵母细胞的发育和离体卵母细胞内部结构变化的细胞学观察却少见报导。因此,体外诱导过程中卵母细胞能否正常发育仍缺乏充分的证据。为此,我们以雌核发育银鲫为实验材料,初步探讨了体外诱导银鲫IV时相卵母细胞成熟的技术,并重点对离体培养的银鲫卵母细胞的几个发育阶段进行了细胞学观察,为体外诱导银鲫卵母细胞成熟技术的可行性提供了基本证据。

## 一、材料与方 法

银鲫(*Carassius auratus gibelio*)取自本所关桥试验场。挑选卵巢发育较好的银鲫,解剖后取出卵巢,置于GBSS(7.3g NaCl, 0.18g KCl, 0.07g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.18g  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ , 0.35g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.95g HEPES, 1.0g 葡萄糖, 1000IU 青霉素, 0.1g 硫酸链霉素,溶于1000ml重蒸水中,以1N NaOH调pH7.5—7.8)[Hirohiko kagawa等, 1984]中洗去血污,以尖镊小心取小块卵巢组织,置于含5ml培养液的培养皿中,分散卵巢,使每个卵母细胞均可接触到培养液[每ml培养液加入约30粒卵,培养液为GBSS内含0.0001%的17 $\alpha$ -羟-20 $\beta$ -二氢孕酮(W/V),且体外诱导过程中所用器皿及工具均需灭菌],23°C培养箱中恒湿培养,定时取样, Bouin's液固定,石蜡连续切片, H. E. 染色。用光镜观察。

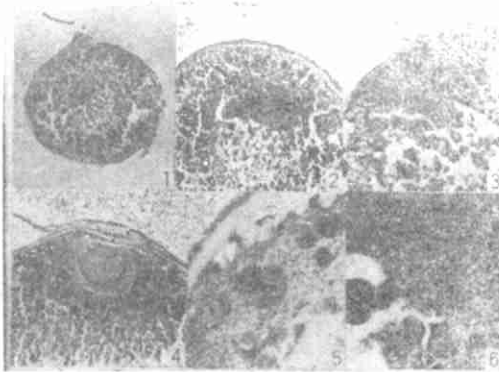
## 二、结果与讨论

### (一) 离体培养的银鲫卵母细胞成熟过程中的外观变化

银鲫 IV 时相卵母细胞外观呈青灰色或略偏黄色,不透明。离体放入培养液后,随培养时间的增加,银鲫卵母细胞外表逐渐转绿并开始透明。当胚泡破裂时,卵母细胞完全透明并转成绿色。在解剖镜下,其动物极清晰可辨。在胚泡破裂后的各发育阶段,银鲫卵母细胞外观上再未发生明显变化。

### (二) 离体培养的银鲫卵母细胞成熟过程中的细胞学变化

细胞学观察表明,离体培养成熟与在体内成熟的银鲫卵母细胞有着一致的发育进程和内、外部变化。①IV 时相卵母细胞。卵母细胞核(胚泡)位于卵母细胞中央,核膜上有许多凹凸,胚泡周边有大量分散的核仁,整个卵母细胞充塞着大量卵黄(图版-1)。②卵母细胞胚泡偏移。离体培养约 5 小时,卵母细胞内胚泡开始向受精孔方向偏移(图版-2)。③卵母细胞胚泡极位。离体培养约 10 小时,胚泡偏移至受精孔下方,由于核膜通透性的改变,胚泡体积膨大,核液开始外溢,在胚泡变化的同时,卵母细胞质也开始逐渐移向受精孔区域,形成原初动物极(图版-3)。④卵母细胞胚泡破裂。离体培养约 12 小时,大部分卵母细胞胚泡破裂,核、质混合,形成动物极。此时,染色质集中成一团,其外围仍有核膜残留(图版-4)。⑤卵母细胞第一次成熟分裂中期。离体培养约 20 小时,银鲫卵母细胞进入第一次成熟分裂中期,在这一发育时期,分别观察到了具有三极纺锤体(图版-5)和两极纺锤体(图版-6)结构的两类银鲫卵母细胞,这与体内成熟的银鲫卵母细胞的细胞学观察结果[丁军,蒋一珪,1991]是一致的。



图版 Plate

1. IV时相卵母细胞,  $\times 25$ ; 2. 卵母细胞胚泡偏移,  $\times 50$ ; 3. 卵母细胞胚泡极位,胚泡偏移至受精孔下方,  $\times 50$ ; 4. 卵母细胞胚泡破裂,  $\times 50$ ; 5. 具三极纺锤体结构的第一次成熟分裂中期卵母细胞,  $\times 800$ ; 6. 具两极纺锤体结构的第一次成熟分裂中期卵母细胞,  $\times 800$ 。

上述实验结果表明,在适当的外部诱导条件下,离体培养的银鲫卵母细胞在胚泡破裂后仍可继续被诱导发育,并且其发育行为在外观上和细胞学上的变化均与体内成熟的银鲫卵母细胞相一致,也就是说,离体培养的银鲫卵母细胞也具有正常的发育进程,可见,经过进一步的完善,在体外获得成熟的银鲫卵母细胞是可行的。

本研究由国家自然科学基金(3860590)资助。

## 参 考 文 献

- [1] 丁 军, 蒋一珪, 1991. 雌核发育银鲫和两性融合发育红鲤卵母细胞成熟的细胞学比较研究. 水生生物学报, 15(2):97—103.
- [2] Epler, P., 1981. Effect of steroid and gonadotropin hormones on the maturation of carp ovaries. Part III: Effect of steroid hormones on the carp oocyte maturation in vitro. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 28: 103—110.
- [3] —, 1986. Joint action of carp (*Cyprinus carpio*) pituitary hormone and human chorionic gonadotropin in carp oocyte maturation and ovulation: in vivo and in vitro studies. *Aquaculture*, 51: 133—142.
- [4] Goetz, F. W., 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In "Fish Physiology, Vol IX, Part B, pp. 117—161, (Hoar, W. S., Randall, D. J. and Donaldson, E. M. eds), Academia Press INC.
- [5] Hirose, K., 1971. Biological studies on ovulation in vitro of fish, I. Effects of pituitary and chorionic gonadotropin on ovulation in vitro of Medaka, *Oryzias latipes*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 37: 585—591.
- [6] Hirohiko Kagawa *et al.*, 1984. In vitro estradiol-17 $\beta$  and testosterone production by ovarian follicles of goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinology*, 54, 139—143.
- [7] Jalabert, B., 1976. In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmon gairdneri*), Northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish. Res. Board. Can.*, 33, 974—988.
- [9] Saat, T. V., 1985. Influence of unfavorable factors on in vivo and in vitro oocyte maturation and ovulation in *Carassius auratus gibelio*. (In Russian). *Ontogenez*, 16(5): 483—491.