

斑马鱼卵母细胞的体外成熟及成熟卵的受精发育

李书鸿 毛钟荣 韩文 孙志远 闫维 陈惠萍 严绍颐

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

采用体外培养的方法, 研究斑马鱼卵母细胞的成熟过程。Ⅳ时相初级卵母细胞在 $0.5\mu\text{g/ml}$ 17α -羟基孕酮的EM-199培养液中, 80%氧气, 25°C 的体外培养条件下, 在40min内, 胚泡(GV)逐渐由卵母细胞中央至动物极边缘1/2处移动到动物极边缘, 进入Ⅴ时相卵母细胞。30min后胚泡破裂(GVBD), 胚泡破裂率为59%。此种卵母细胞继续培养2h才完全成熟。成熟卵不能从滤泡膜中自然排出。冷开水中剥离其外边的滤泡膜后加入具有受精能力的精子, 即使成熟卵受精, 受精膜举起, 胚盘在动物极形成。其后受精卵的分裂、发育等与自然成熟受精卵相同。以发育至囊胚为受精标准, 这种体外成熟卵受精率为78%。这是斑马鱼卵母细胞体外培养成熟的首例报道。鱼类卵母细胞体外成熟技术的建立, 为外源基因卵母细胞胚泡内转移奠定了基础。

关键词 卵母细胞成熟; 体外; 斑马鱼

在转基因鱼的研究方面, 由于受精卵雌、雄原核及合子核难以观察到, 以往的做法都是将外源基因直接注射到受精卵的细胞质中。这种方法整合率低, 而且易出现嵌合体。将外源基因先注射到卵母细胞的细胞核(胚泡)内, 再使卵母细胞体外成熟和受精, 从而开辟鱼类基因转移新途径。这种方法具有明显的优点^[1,2]。国外进行卵母细胞体外成熟研究的实验室不少^[3-5], 本实验室从1989年初开始卵母细胞体外成熟方面的工作, 当年就获得了体外成熟和受精发育的金鱼^[6]。1991年又开展了泥鳅和斑马鱼卵母细胞体外成熟的研究。中国科学院海洋所在金鱼卵母细胞体外成熟方面也取得成功^[7]。本文报道斑马鱼卵母细胞的体外成熟及成熟卵的受精发育。

材料和方法

(一)实验鱼

性成熟的斑马鱼 (*Brachydanio rer-*

io, 鲤形目, 鲤科)由北京购得, 鱼龄7—12个月。雌鱼体重500mg, 体长5cm; 雄鱼体重300mg, 体长5cm。雌、雄分养在室内玻璃缸(68×40×35cm)中, 自然光照, 控制水温 23°C 。每日早晚投喂食物, 及时清理多余食物和粪渣。

(二)卵母细胞体外成熟

早上9点选腹大雌鱼剖腹, 取出卵巢(直径0.7cm)置EM-199培养液中。用尖镊分离出单个卵母细胞。此种卵母细胞外被滤泡膜。选出滤泡膜完整的卵母细胞, 每50—70个置一个培养皿(直径60mm)中, 每个培养皿中含培养液20ml, 其中激素种类和含量根据需要可有一定的变化(激素先溶于无水乙醇内, 乙醇在培养液内最终浓度不超过0.1%)。然后置80%氧气, 无二氧化碳的培养箱中, 25°C 培养。定期检查卵母细胞成熟情况, 记录胚泡破裂时间和胚泡破裂率。对照组的卵母细胞

本文于1992年11月22日收到。

本文属于国家“七.五”攻关及自然科学基金资助课题组成部分。

处理与实验组相同, 但培养液内不含激素。

(三) 成熟卵的受精

卵母细胞在发生GVBD后每隔30min, 取数粒卵子, 置EM-199培养液内, 用两把尖镊小心剥去滤泡膜, 并移入冷开水中, 取精子加到卵子旁使二者混合, 此时作为受精开始时间。1min后将卵取出放在Holtfreter培养液(每升蒸馏水中含0.35g NaCl, 0.05gKCl, 0.1g CaCl₂, 0.2g NaHCO₃)中, 于25℃继续培养。定期观察受精卵的发育并作照相记录。以发育到囊胚为受精标志, 统计受精率。

(四) 组织学样品的制备

受精后至第一次卵裂前, 每隔5min取受精卵用Bouin氏液固定24h, 按常规方法做石蜡切片, H.E染色, 观察雌、雄原核接合及纺锤体形成情况。

表 1 17 α -羟基孕酮(17 α -P)所诱导的斑马鱼卵母细胞的体外成熟

Table 1 Zebrafish oocyte maturation induced by 17 α -hydroxyprogesterone(17 α -P)

Treatment	No. of experiment							
	1	2	3	4	5	6	7	8
17 α -P(0.5 μ g/ml)	67.9 ^a (106) ^b	41.4(116)	72.5(138)	48.6(148)	44.5(119)	60.5(251)	58.8(34)	70(80)
EM-199(control)	0(23)	0(16)	0(20)	0(18)	3.3(30)	0(20)	8.0(25)	0(23)

a. GVBD%; b. Number of oocytes examined

卵黄颗粒的聚集, 动物极可以辨认(图版 I-5)。但在不含激素的EM-199培养液中的对照组, 卵母细胞一直不能继续其成熟过程, 也不发生GVBD(表1, 图版 I-5)。

(二) 成熟卵的受精

在体外培养的Ⅳ时相初级卵母细胞, GVBD后1h并未完全成熟, 此时在剥去滤泡膜进行人工授精时, 卵子不能受精。其中大约有20%的卵子在接触水后发生皮质反应, 但受精膜不能完全举起, 卵子不分裂。GVBD后2h, 卵子才完全成熟,

结 果

(一) 卵母细胞的体外成熟

成熟期的雌性斑马鱼的卵巢充满了充分长大的Ⅳ时相的初级卵母细胞, 直径为0.63mm(图版 I-1)。两个卵巢共有卵母细胞100粒以上。此种卵母细胞的胚泡(核)偏位, 它位于卵母细胞中央至动物极1/2处, 用透明液(甲醇:冰醋酸=3:1)检查, 胚泡(GV)清晰可见(图版 I-2)。这种鱼在25℃与雄鱼共养时通常24h后产卵, 产卵几十粒。在我们的体外培养系统中, Ⅳ期卵母细胞的胚泡继续其边移过程, 平均40min后到达动物极边缘(图版 I-3), 胚泡直径60 μ m, 这时卵母细胞开始变为透明状。胚泡到达动物极边缘约3min后破裂(GVBD)(图版 I-4)。以后的几小时内, 卵母细胞的主要形态变化是

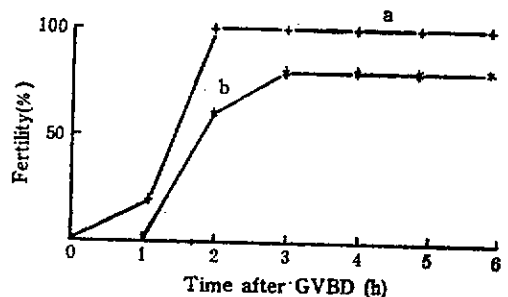


图 1 受精率与Ⅳ时相卵母细胞培养时间(从GVBD开始)的关系

Fig.1 Relationship between fertility and the time after GVBD

a. Cortical reaction; b. Fertility



图 2 斑马鱼体外成熟卵的受精和发育

Fig.2 The fertilization and development of zebrafish eggs matured *in vitro*

- a. An oocyte having finished its final maturation, arrow shows the animal pole
- b. A fertilized egg matured in vitro. Shows the fully-elevated chorion.
- c. A 2-cell stage embryo developed from in vitro matured egg in zebrafish
- d. Paraffin section, indicates the tight contact of the male and female pronuclei. 20min. after fertilization.
- e. Paraffin section, indicates the first metaphase spindle. Arrow shows the chromosome in metaphase.

f, g. Two adult zebrafish developed from in vitro matured egg (f, male; g, female)

剥去滤泡膜在冷开水中受精, 100%的卵子有皮质反应, 其中60%的卵子可以发育为囊胚。GVBD后3h, 100%的卵子有皮质反应, 78%的卵子可发育为囊胚(图1)。

受精后, 受精膜快速举起, 在10min内达到最大(直径1.0mm), 胚盘在动物

极形成, 卵子直径0.60mm(图2-a, b)。卵子的受精能力在其完全成熟后可在培养液内保持3h(图1), 其后受精能力将下降, 部分卵子将变质。体外成熟的受精卵, 在25℃下, 受精后20min雌、雄原核紧密接合, 30min到达第一次卵裂中期(图2-d,

表 2 不同激素对斑马鱼Ⅳ时相初级卵母细胞胚泡破裂的影响

Table 2 Effects of different steroids on GVBD of zebrafish oocytes

Hormones	17α-P	17α,20β-DP	DOC	Cort	Control
Number.of oocytes with GVBD	333 ^a (198) ^b	382(225)	335(192)	382(122)	221(1)
GVBD%	59	59.4	57.3	31.9	0

a. Number of oocytes examined b. Number of oocytes with GVBD

e)40min完成第一次卵裂,4h发育到囊胚,96h孵化出膜(图2-c,f,g),与其他作者所描述的斑马鱼胚胎发育相同^[8]。

(三)几种激素对Ⅳ时相初级卵母细胞体外成熟的作用

我们比较了17α-羟基孕酮,17α,20β-二羟基孕酮,脱氧皮质酮,可的松等4种激素诱导斑马鱼卵母细胞发生GVBD的效果,结果如表2所示,不同激素对胚泡破裂的效果不同。如图2所示,在17α-P处理组中,浓度在0.1—2μg/ml之间时,GVBD%变化不大。

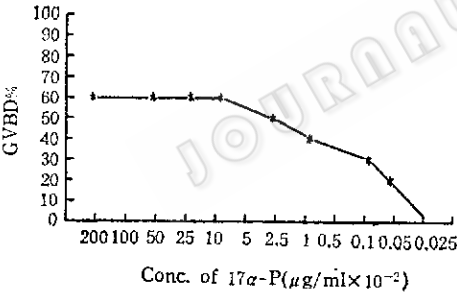


图 3 不同17α-羟基孕酮浓度对斑马鱼Ⅳ时相初级卵母细胞GVBD的影响
Fig.3 Effects of different concentrations of 17α-P on GVBD of zebrafish oocytes

讨 论

金鱼^[9];amago salmo^[10]和 med-aka^[11]是几个比较特殊的例子。它们的Ⅳ时相初级卵母细胞在体外适当激素处理时,胚泡破裂率可以达到100%。在其他进行过体外成熟研究的近30种鱼中胚泡破

裂率均不能达到100%。在本实验中,不同激素诱导斑马鱼卵母细胞成熟的效果不同,胚泡破裂率在31.9%到59.4%之间,同样胚泡破裂率不能达到100%,说明斑马鱼同一个卵巢内的卵母细胞之间存在着一定差异,使得它们在同样培养条件下,所表现的成熟情况不同,有的发生了胚泡破裂,有些则没有。这种卵母细胞之间的差异,一部分可能与剥离时,有些卵母细胞受到损伤有关。因为当将卵巢取出后,稍加分离,而不分离成单个卵母细胞进行培养时,胚泡破裂率有一定提高,在70%左右。与斑马鱼情况形成明显对比的是在金鱼繁殖季节,采用同样的分离为单个卵母细胞的方法培养金鱼的Ⅳ时相初级卵母细胞,胚泡破裂率接近100%。这种斑马鱼与金鱼的差别,除因为斑马鱼卵母细胞易受损伤外,似乎还与它们的生殖习性有关。斑马鱼在营养条件、温度(25℃)适宜的情况下,一条性成熟的雌鱼产卵周期很短,一般在5天以内,有时仅为1天(24h)^[12,13];而金鱼则不同,即使条件适宜其产卵,在产出一批卵后也必须经过较长时间恢复(至少2个月)。斑马鱼在其自然产卵后马上解剖,观察其卵巢,发现卵巢中仍有许多Ⅳ时相初级卵母细胞,这种卵母细胞在体外激素处理时,仍按一定比例发生GVBD。与此相反,金鱼产卵时,产卵量大,产卵后,卵巢中几乎没有剩下充分长大的Ⅳ期卵母细胞。这里提示人们,在金鱼中,取出来的一批卵母细胞,它们预计在差不多相同的时间产卵,

即很同步。而在斑马鱼中,都是充分长大的一批卵母细胞,则可能在某种程度上早已决定哪些即将产卵,而另外的一些则在下一个产卵周期中成熟。但是,它们之间的差别难以从外形上看出,用透明液处理检查其胚泡位置,也难观察到区别,基本上都在卵母细胞中央与动物极边缘之间。

开始培养时,斑马鱼卵母细胞的胚泡在卵母细胞中央与动物极之间。在激素作用下,胚泡移到动物极边缘所需的时间为30min。在金鱼中,开始培养时,胚泡在卵母细胞中央,移到动物极边缘需5h^[6]。而同样情况下,在ayu, amago salmon及

rainbow trout^[13]中,胚泡由卵母细胞中央移到动物极边缘需十几小时,在marine flatfish^[14,15]中则为80h。从卵母细胞发生GVBD开始到完全成熟的时间,斑马鱼为2h,比金鱼(7h)短^[8,7],而与medaka^[8]相似。这说明,在不同鱼中,卵母细胞两次减数分裂所需时间是不同的。这种不同与其生活区域的关系还需进一步研究。但是,这种卵母细胞成熟的速度与它们胚胎发育的速度相一致。这说明物种之间的差别同样表现在卵母细胞成熟速度上。

参 考 文 献

- [1] Ozato, K. et al., *Cell Differ.*, 19:237—244, 1986.
- [2] Ozato, K. et al., *Zool. Sci.*, 6:445—457, 1989.
- [3] Iwamatsu, T., *Annot. Zool. Japon*, 40: 6—19, 1967.
- [4] Epler, P. and Bienzrz, K., In "International Symposium on Reproductive Physiology of Fish", Paimpont(France). 19 Sep., 1977. Insti. Appl. Acad. Agric., 30-059 Krakow, Poland 18(4), 991—995.
- [5] Iwamatsu, T. and Kotoh, T., *Annot. Zool. Japon*, 51:79—89, 1978.
- [6] 李书鸿、严绍颐, "863"生物高技术领域论文集, 1990.
- [7] Wang, R. et al., *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 9:88—93, 1991.
- [8] Hisaoka, K. K. and Battle, H. I., *J. Morph.*, 102:311—327, 1958.
- [9] Jalabert, B., *J. Fish Board Canada*, 33:974—988, 1976.
- [10] Nagahama, Y. et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 51:15—23, 1983.
- [11] Yamauch and Yamamota, *Annot. Zool. Japon*, 46:144—153, 1973.
- [12] Legault, R., *Copeia*, 4:328—330, 1974.
- [13] Eaton, R. C. and Farley, R. D., *Copeia*, 4:195—204, 1974.
- [14] Canario, A. V. W. and Scott, A. P., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 77:177—191, 1990a.
- [15] Canario, A. V. W. and Scott, A. P., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 77:161—176, 1990b.

***In Vitro* Oocyte Maturation in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*, and the Fertilization and Development of the Mature Egg**

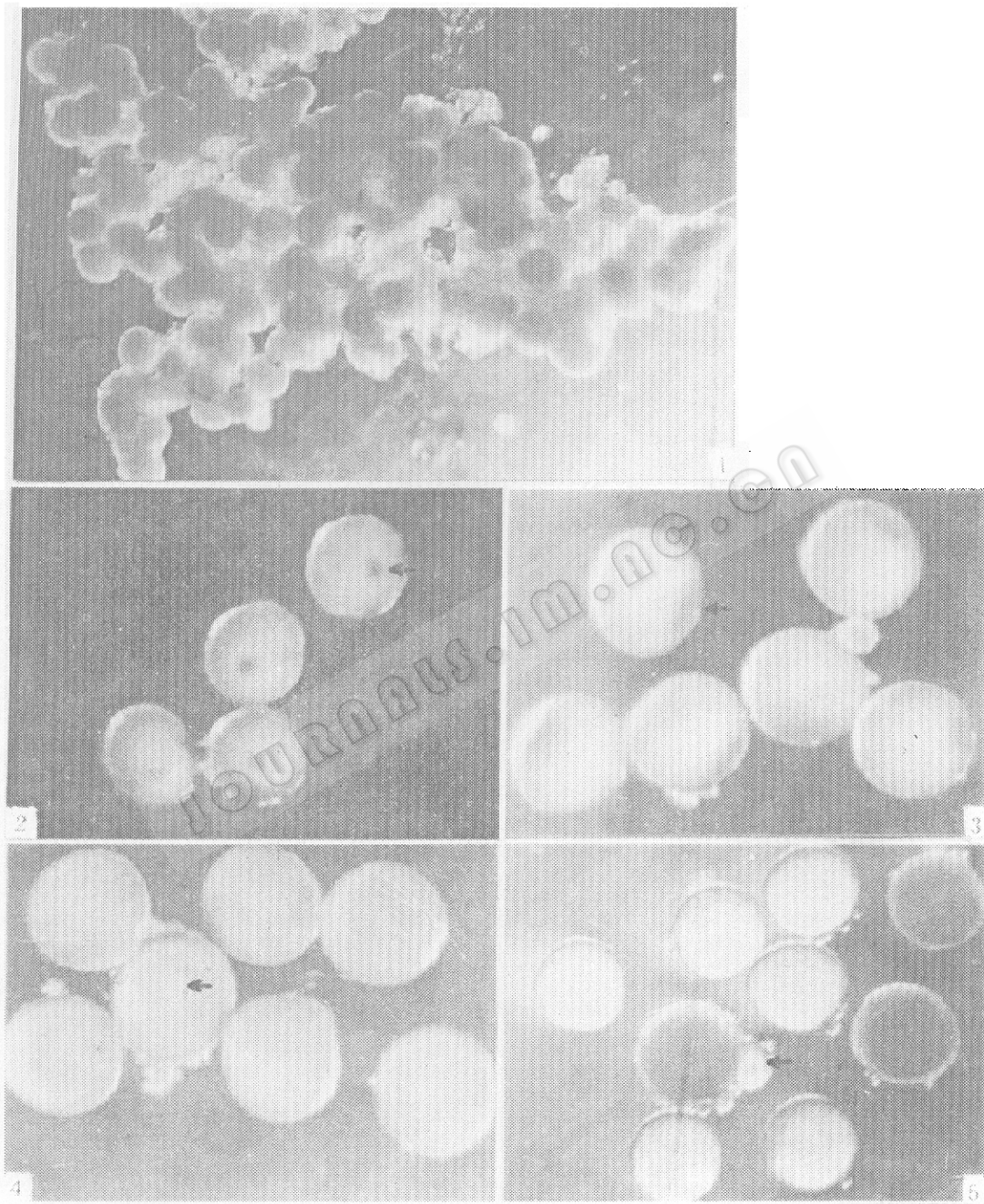
Li Shuhong Mao Zhongrong Han Wen Sun Zhiyuan

Yan Wei Chen Huiping Yan Shaoyi

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080)

The *in vitro* maturation process of zebrafish oocyte was investigated. When in medium EM-199 containing 0.5 μ g/ml of 17 α -hydroxyprogesterone, under the conditions of 80% O₂, 25 $^{\circ}$ C, the germinal vesicles of the oocytes in stage IV migrated from midway between the center and the periphery to the periphery in 40 minutes and the oocytes went into stage V. 30min. later, the oocytes underwent germinal vesicle breakdown (GVBD) with a GVBD% of 59%. Two hours were needed for such oocytes to complete their final maturation. The mature eggs can not come off from the follicle layer surrounding them naturally (ovulation). By removing the follicle and adding active sperms for insemination, we could make the mature eggs fertilized. The chorion elevated and blastoderm formed on the animal pole. The cleavage and development of the fertilized eggs followed are just the same as that of naturally matured fertilized eggs. Using the blastula as a successful fertilization of the *in vitro* matured egg, the fertilization rate is 78%. This is the first report on the successful oocyte final maturation *in vitro* in zebrafish. The establishment of oocyte *in vitro* maturation technique has made grounds for the further investigation of the transfer of foreign genes in the germinal vesicles of the oocytes.

Key words Oocyte maturation, *in vitro*, zebrafish.



1. Two ovaries from a sexually mature zebrafish, they are full of fully-grown oocytes.
2. Several oocytes in stage IV (in transparent solution), arrow shows the germinal vesicle (GV), it is in the midway between the center and the periphery of the oocyte.
3. Several oocytes in stage V (in transparent solution), arrow shows the GV.
4. Several oocytes underwent GVBD, the GVs can not be seen in transparent solution, arrow shows the place of GVBD.
5. 3 h after incubation, shows the live oocytes and the dead (arrow) oocytes. (in medium EM-199).