

不同属泥鳅受精卵的激光融合及鱼类嵌合体

张闻迪 赵 白 王 秋 杨宝杰 邹建华

(青岛海洋大学, 青岛)

激光诱导细胞融合是细胞工程中的新方法, 无毒性和融合点的可选性是该方法的突出优点。Schierenberg(1984)曾在线虫卵裂期用激光微束融合分裂球以研究细胞的节律性^[1]。Wiegand(1987)报道了激光诱导离体的哺乳类动物细胞融合和植物原生质体融合的结果^[2]。我们在激光诱导同种泥鳅受精卵融合获得初步成功的基础上^[3], 又进一步对同种的和不同属的泥鳅受精卵的融合进行了实验研究, 以了解不同属受精卵细胞融合的可能性、融合后胚胎的发育能力以及不同属间不亲和性的表现, 为进一步研究亲缘关系更远的鱼类细胞融合提供参考。

材料与 方法

(一) 实验用鱼

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*, Sauvage)和鳃尾泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*, Cantor), 它们属于同一鳅科不同属, 均取自江苏金鸡湖养殖场。两种鱼卵都呈圆球状, 卵径分别为 0.60—0.65mm 和 0.72—0.84mm。卵色略有不同, 分别为黄褐色和淡黄色, 在显微镜下观察, 前者偏暗偏深, 可以与后者区分。

(二) 催青、人工授精、去卵膜、激光辐照等设备与操作

参照前报^[4]。

(三) 融合用激光能量

能量偏高或偏低都会严重影响细胞融合率。使用的能量以恰好能击穿两细胞接触处的质膜, 使两细胞内含物互相融合为最佳。我们在实验中发现, 此能量大约可有 10% 的偏差而不致明显影响细胞的融合与发育。对于泥鳅卵融合, 我们取激光能量为 800 μ J 最合适。

实 验 结 果

为了便于比较, 实验共分两组: 大鳞副泥鳅受精卵的同种卵融合及大鳞副泥鳅受精卵与鳃尾泥鳅受精卵融合。

(一) 大鳞副泥鳅受精卵的同种卵融合

同种泥鳅受精卵融合及其后的胚胎发育类型与前报相同^[4]。本次实验的统计结果见表 1。激光辐照同种卵 71 对, 融合 47 对, 融合率为 66%; 15 例发育至幼鱼, 占 19%; 其中 5 例融合时两胚盘相距较远, 发育成两体相连幼鱼, 10 例为两胚盘相距近, 发育成一体幼鱼。融合幼鱼的发育有的正常, 有的不正常。3 天后有 12 例成活, 但第 4 天仅有 3 例成活。这 3 例幼鱼形态各异: 发育为大个一体鱼的 1 例; 双头、一心脏, 一脊椎的 1 例; 双头双体共尾鱼 1 例。鳃丝、色素都已出现。8 天后吻须萌出。这三例皆发育至仔鱼期, 卵黄囊消失。其中, 大个一体鱼可自由摄食, 自由游动, 但行动迟缓。13 天时双、单脊椎鱼停止发育, 其余两例也于 21 天后死亡(图版 I-A)。

(二) 大鳞副泥鳅与鳃尾泥鳅受精卵融合

1. 融合过程: 这两种卵均为端黄卵, 激光照射后两卵的胚盘都逐渐举起, 并各自进行正常卵裂, 约 3h(20 $^{\circ}$ C)后两卵融合为哑铃状, 卵间的质膜已明显消失, 通过电视监视, 观察到卵细胞接触处逐渐变粗, 约 2h 后变为一个大球形胚(图版 I), 同时还可见到卵细胞内含物的流动。共辐照 179 对卵, 融合 96 对, 占辐照卵的 53%。

本文于 1990 年 7 月 22 日收到。

本研究由国家自然科学基金资助。

表 1 融合后胚胎发育的统计

组别	各发育阶段的胚胎数							存活记录	
	共计	融合	囊胚	原肠	幼鱼	3天	4天		
同种融合	71	47 (66%)	45	37	15	12	3	13天	21天
								1	2
不同属融合	179	96 (53%)	78	24	14	5	2	7天	14天
								1	1

2. 融合卵发育情况: 融合卵大都能存活发育, 其发育的阶段统计结果见表 1。96例融合卵中发育至囊胚期的78例, 到达原肠期的24例。最后发育至幼鱼的14例, 可见肌肉抽动, 幼体抖动, 占辐照卵的9%。融合幼鱼的形态类型与同种卵融合类似, 可分为两类。一类为胚盘相距较远, 各自卵裂的, 最后有6例发育至幼鱼, 其中5例第3天死亡, 仅存的1例为两幼鱼共有一个卵黄, 其中之一停止发育, 另一存活并可见明显的心脏跳动, 第4天也停止发育。另一类为胚盘相距较近, 发育为一个囊胚直至幼鱼的有8例; 其中6例在第3、4天死亡; 2例发育至仔鱼期, 卵黄囊消失, 可见到色素、鳃丝、吻须、尾部血液循环等, 也见到如鳃丝不对称、尾部弯曲及血液循环在黑色素出现之后才迟迟出现等不正常现象。该2例仔鱼分别活至第7天和第14天(图版 I-B)。

3. 融合卵发育特点

(1) 发育速度: 不同属融合卵的发展速度在细胞分裂期各融合卵相当整齐一致, 也与非融合的正常大鳞副泥鳅卵及鳗尾泥鳅卵(以下简称大鳞卵、鳗尾卵)相同。但进入囊胚期, 尤其原肠期后各融合卵逐渐表现出明显差别, 并与大鳞卵、鳗尾卵不同。总的来说, 从原肠期以后融合卵的发育一般都较大鳞卵、鳗尾卵迟缓。融合卵完成原肠的时间一般均迟于鳗尾卵(在21—23℃时鳗尾卵完成原肠的时间比大鳞卵晚4h)。融合卵达到“孵化期”也晚。这里要特别提出的是, 在比较融合卵与非融合卵的发育速度时, 当融合卵发育至肌肉效应期, 胚体中段出现肌肉收缩而抽动, 这时因为卵外并无卵膜存在, 胚体即可伸展开来, 从而达到孵化期。但从发育阶段来看, 它实际上是对应于正常卵发育的肌肉效应期。所以在比较发育速度时应将融合卵(已去膜)的孵化

期与正常卵(未去膜)的肌肉效应期比较。此说也适用于一般的去膜卵。

(2) 卵黄吸收: 实验观察到, 融合卵多数是在卵黄接触处开始融合的。融合过程中当卵变为一个大球形或椭圆形时, 卵黄已成为均匀透明的一体。但发育至肌节期形成胚体以后, 有的融合胚体的卵黄出现不均匀现象: 在整个卵黄范围内, 颜色有些部分较深, 有些部分较浅, 其间没有明显界限。此后有的卵仍可继续发育, 卵黄囊均匀地被吸收, 未观察到深色、浅色卵黄在吸收上的差别, 最后卵黄可完全被吸收; 但也有不少融合卵在卵黄出现不均匀后胚体逐渐解体。还有1例, 卵黄不均匀一直保持到幼鱼发育至黑色素出现之后, 此时有一大块透明卵黄很完整地离开胚体游离出来(图版 I-C), 幼鱼仍存活, 仍可见心脏跳动, 不久, 幼鱼停止发育, 游离出来的透明卵黄解体。

讨 论

实验结果表明, 不同尾泥鳅受精卵利用激光诱导可以融合。在受精卵融合过程(图版 I)及融合卵发育全过程中并没有出现任何细胞物质游离或解体, 并且由融合仔鱼与对照仔鱼外部形态、大小的对比(图版 I-C)可以清楚地看出, 大鳞副泥鳅和鳗尾泥鳅受精卵确实是融合了, 并且顺利通过了胚胎发育的各阶段直至生成仔鱼。这是激光诱导细胞融合方法又一成功例证。

实验观察到, 原肠期以后, 两胚盘相距较远时形成两个原肠的融合胚, 在两个原肠下包相遇后易出现解体死亡。这是受精卵融合特有的一种发育障碍, 仅在两胚盘相距较远, 各自发育的情况下出现。两个胚盘的两个组织中心分别组织各自的发育, 一旦两个原肠接触而两个组织中心的相对位置又不合适, 两个胚胎发育相互矛盾、相

互诱导, 引起混乱, 以至难以调整而使胚胎发育受阻。实验中两胚盘的相对位置是随机的, 但晚胚中只观察到“两头一脊椎”或“两头两脊椎一尾”等形态的胚体, 从未观察到头尾相连或其他更怪异的形态, 这说明两个原肠胚相互矛盾、相互调整, 但调整能力有限, 在某些相对取位的情况下就无法调整。实验中还观察到胚体后期出现卵黄不均匀、吸收不均匀、卵黄游离、进而胚体死亡。这可能与肠管对异属卵黄吸收能力有关, 是受精卵融合特有的另一发育障碍。

观察由一个大囊胚发育为大个一体融合鱼的融合发育过程, 可以看出: 两个受精卵在其各自胚盘上逐渐卵裂、扩展, 边缘处细胞相遇后合为一

个大胚盘。这个由两个不同属胚盘组合而成的大胚盘又逐步发育为大囊胚、大原肠直至一个大的融合个体鱼。根据嵌合体的定义“由两个或两个以上不同遗传组成的胚胎发育成的个体, 这种个体的组织器官是由基因型不同的细胞群组成, 称之为嵌合体”^[1]。本实验所得的大个一体鱼是由两个不同属泥鳅胚胎共同组合发育而成, 因此它很可能是一种嵌合体。但目前所获得的融合仔鱼还太小, 无法从形态特征上进行判断, 也缺少细胞学和生物化学方面的实验分析。尽管如此, 我们认为, 激光细胞融合很可能是一种极有前途的制造鱼类嵌合体的方法, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Schierenbeng, E.: *Dev. Biol.*, 101:240—245, 1984.
 [2] Wiegand, R. et al., *J. Cell Sci.*, 88:145—149, 1987.
 [3] 张闻迪等: 山东海洋学院学报, 17(3):60, 1987.
 [4] 张闻迪等: 生物工程学报, 4(4):298—303, 1988.
 [5] 陆德裕: 细胞生物学, 4(1): 7—13, 1982.

Laser-induced Fusion of Fertilized Eggs of Different Genera Loach and the Fish Chimera by Fusion

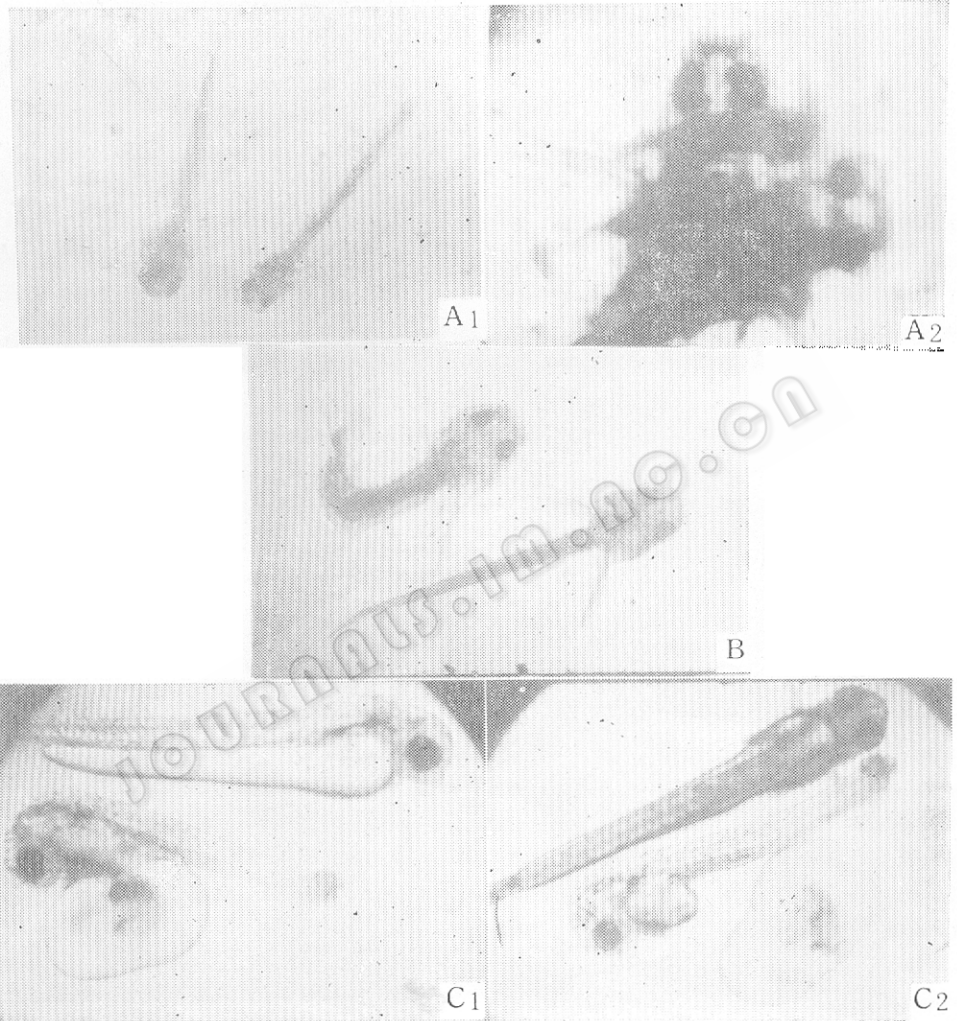
Zhang Wendi Zhao Bai Wang Qiu Yang Baojie Zou Jianhua
 (Ocean University of Qingdao, Qingdao)

This papers reports the experimental results of laser-induced fusion of fertilized eggs of different genera loach and presents a method to produce fish chimera by fusion of fertilized eggs.

The fusion of eggs of different genera loach and the embryonic development of fused eggs have been compared with the fused eggs of same species loach. There is an indication that two kinds of special developmental blocks exist on the development of fused fertilized eggs. In order to obtain high survival rate a proposal has been suggested.

Key words

Laser; cell fusion; egg; fish; chimera



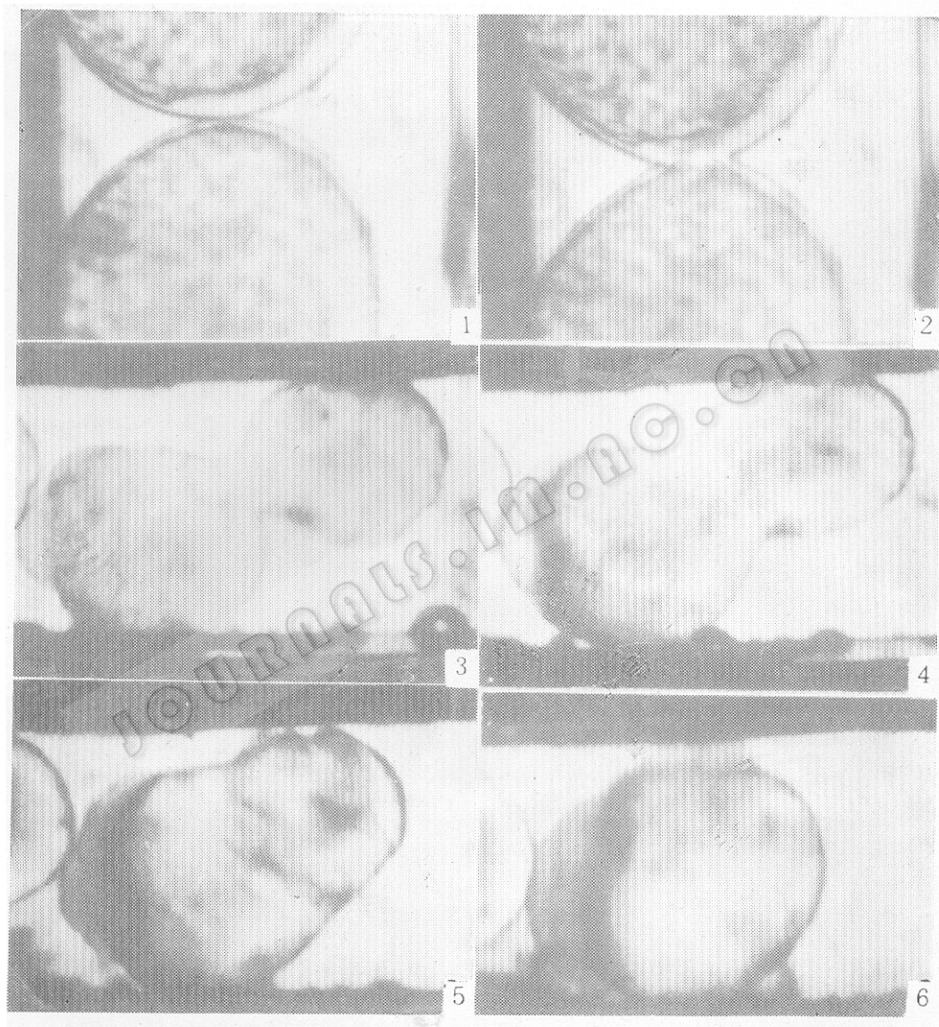
A. 同种卵融合发育的仔鱼、

1. 大个一体鱼(左); 对照(右), ($\times 4$) 2. 双头鱼($\times 40$)

B. 不同属卵融合发育的仔鱼(对照, 下), ($\times 4$)

C. 一块卵黄由卵黄囊分离出来($\times 20$)

1. 分离前 2. 分离后



融合过程的录相照片、

1. 辐射前 2. 辐射后(×40)

3—6: 由哑铃状(3)发育至球状(6), 约需2h(×20)