

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

不同品種牡蠣卵與胚體低溫保存程序之比較研究(II)

A Comparative Studies on the Cryopreservation Protocols for Eggs and Embryos from Different Species of Oysters (II)

計畫編號：NSC 87-2313-B-002-103-

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：林達德 國立臺灣大學農業機械工程學系

電子郵件信箱：m456@ccms.ntu.edu.tw

一、中文摘要

本計畫以不同品種之牡蠣胚體與卵為對象，建立實用化之低溫保存程序並探討影響保存程序的因子。本年度為三年計畫之第二年，分別進行了國內與國外牡蠣胚體與卵的低溫保存程序比較研究，同時建立所試驗之牡蠣胚體與卵之低溫凍結特性基本資料。由荷蘭、法國、美國與加拿大進口之巨牡蠣胚體經低溫保存後，目前已可以穩定得到75%以上之存活率，影響低溫保存的主要因子在於牡蠣卵與精子的品質。本研究中亦測試了甘油、乙二醇、丙二醇與DMSO等不同種類冷凍保護劑與冷凍速率對於冷凍後存活率之影響。在相同冷凍條件下，甘油的使用顯示較佳的冷凍保存效果。

關鍵字：低溫保存、牡蠣、胚體與卵

Abstract

Different species of oyster were selected to establish practical cryopreservation protocols for their embryos and eggs. The time span of this project is planned for three years. The specific research objectives for this second-year project was to compare cryopreservation protocols, and to determine the intracellular ice formation (IIF) characteristics of selected oyster eggs or

embryos. Oysters imported from Netherland, France, U.S.A. and Canada were used in the experiments. The survival rate was significantly increased to 70~80% this year. The major factor affecting the survival rate was found to be the quality of oyster eggs and embryos. Effects of using different types of cryoprotectants and cooling rates were also tested. Under the same freezing condition, the use of glycerol as cryoprotectant appeared to be more effective than other selected cryoprotectants.

Keywords: Cryopreservation, Oyster, Embryo and egg

二、緣由與目的

低溫生物學(Cryobiology)為探討生物系統於低溫狀態下之反應與變化的基礎科學[5]，由於此領域與農學、醫學與食品工業等方面無論在學理與應用上，均有密切之關係。最顯著的應用研究如鼠胚、牛胚與豬胚等哺乳類胚體的保存[2,3,11]，以及最近的果蠅胚體低溫保存[9]等。

魚貝類胚體或精子之低溫保存在水產養殖上具有實質之義意，從建立基因庫的觀點而言，低溫保存可以使瀕臨絕種之魚貝類得以妥善保護，亦有利相關於魚貝類遺傳工程之研究；從養殖生產的觀點而

言，則建立低溫保存程序有助於魚貝類之品種改良、繁殖調節與養殖管理[6]。有關魚貝類之低溫保存研究在精子保存方面已有許多成功的例子[1,7,8]，在貝類胚體或卵之低溫保存方面則有關之低溫保存研究較少，但近來亦有初步成功之報告[4,10]。牡蠣為我國重要的養殖貝類，主要的養殖品種為巨牡蠣(*Crassostrea gigas*)，為因應未來牡蠣養殖產業的發展，積極進行養殖技術的改進是必要的工作。由於法國在牡蠣的養殖技術與研究工作均有相當之水準，透過國際合作的方式將可以加強養殖技術的交流，同時對於我國養殖牡蠣的品種改良將可以提供良好的管道。本計畫的主要目標為建立實用的牡蠣低溫保存程序並進行不同品種間低溫保存程序的比較分析，同時配合臺灣省水產試驗所養殖系趙乃賢博士之「歐美亞品種之三倍體牡蠣比較研究」計畫與臺灣省水產試驗所東港分所鄭金華博士之「中法牡蠣之雜交育種實驗」計畫，建立試驗研究之相互支援。有關牡蠣胚體的低溫保存研究，我國已有相當良好的基礎，至目前為止，巨牡蠣胚體以傳統兩段式低溫保存程序存放於液態氮解凍後之存活率為 $73 \pm 9\%$ 。因此本計畫期望在目前已有之研究成果上，藉由國際合作取得不同品種之牡蠣，進行不同品種牡蠣胚體與卵的低溫保存比較實驗，同時繼續進行低溫保存程序最佳化之研究以提昇存活率。本年度計畫為三年計畫之第二年。

三、研究設備與方法

(一)實驗材料：

在本年度計畫中，由於繁殖季節的關係，我們除對台產牡蠣為巨牡蠣進行低溫

保存實驗外，亦進口國外牡蠣進行實驗。台產牡蠣購於臺北市環南市場、果菜市場、西寧市場攤販以及瑋升貿易有限公司，購得當日自產地運送到達之新鮮巨牡蠣後帶回實驗室進行實驗。進口之巨牡蠣分別來自荷蘭、法國、美國與加拿大，其運送過程均以冷藏空運來台，落地後即進行實驗或分別以 4°C 冷藏及養殖池低溫飼養兩種方式保存。

(二)人工取精取卵及受精：

採活體解剖的方式取得牡蠣配子。因限於篇幅，詳細之實驗方法請參見第一年度之報告。

(三)兩段式冷凍保存實驗：

授精後之牡蠣胚胎，在 $27\sim 28^{\circ}\text{C}$ 恆溫箱中培養十小時，成長至轉動擔輪子胚為材料，在小燒杯中拌勻，於試管中離心去上清液後，控制組加入海水，放進小燒杯內在恆溫箱中培養；試驗使用之冷凍保護劑分別為 2M 的 DMSO (Dimethyl sulfoxide)、2M Glycerol、2M 1,2-Propandiol (PG)、2M Ethylene Glycol (EG)等，添加冷凍保護劑的時間在室溫下包括離心時間共維持 20 分鐘，胚體或卵置於 0.25ml 之麥管封口後，再放入 KRYO 10 冷凍儀內，依事先設定好之程式做降溫的工作。首先由 20°C 以每分鐘 -1°C 的速率降至 -12°C ，用尖端浸泡在液態氮中的鑷子輕夾一下麥管植冰(Seeding)後，停留 5 分鐘；再從 -12°C 以冷凍機預設各種速率降至 -35°C ，於 -35°C 停留 5 分鐘後，投入液態氮中完成冷凍。解凍過程是以 28°C 水浴解凍。解凍後洗去保護劑，加入海水，此程序在室溫維持 5 分鐘(包括離心)，放進小燒杯在 28°C 恆溫

箱中培養 2 小時後計數存活率。

四、結果與討論

本年度克服了去年度計畫中有關國外胚體培養存活率偏低之問題，因此在低溫保存後胚體存活率的提升上有很顯著的改善，冷凍速率與保護劑種類的實驗比較也因此有了完整的實驗資料。

(一) 胚體培養的改善：

由於第一年度之低溫保存後存活率偏低，本年度計畫初期針對胚體培養程序的改善進行實驗，使培養至擔輪子期胚體的比率得以到達 90% 以上。圖 1 為人工授精後於 27 進行培養實驗的結果，由圖中可知臺產牡蠣於該溫度下之培養時間應至少為 10 小時，進口之加拿大牡蠣培養時間則需要更為延長。牡蠣卵與精子之品質影響人工授精結果甚巨，於牡蠣活體運送過程之溫度、時間及繁殖季節均對人工授精成功與否有決定性之影響。

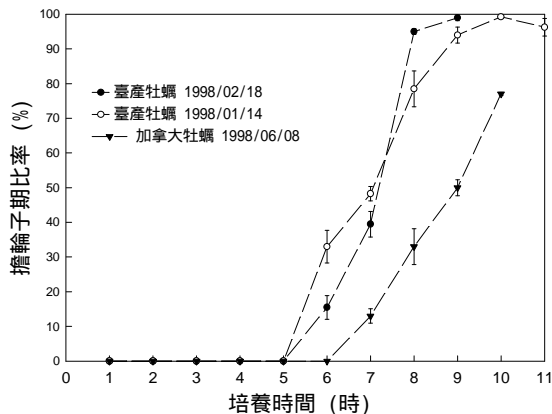


圖 1 臺產與加拿大進口牡蠣卵人工授精後於 27 下進行培養，於不同時間發育至擔輪子胚體之比率

(二) 低溫保存實驗：

由於培養方法的改善，開始進行低溫保存實驗的擔輪子胚體可以達 90% 以上，因此冷凍後之胚體存活率較第一年度計畫

大幅提升。圖 2 所示為以荷蘭進口牡蠣為例說明各低溫保存階段之存活率，該實驗所使用之冷凍保護劑為 2M DMSO，冷凍速率為 $-1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 。相較於控制組，在冷凍保護劑之添加階段、植冰階段均無顯著之存活率降低，主要影響存活率的過程為等速率降溫過程，以此實驗而言，約有 25% 之存活率下降，而此過程也是影響整個低溫保存程序存活率的關鍵。

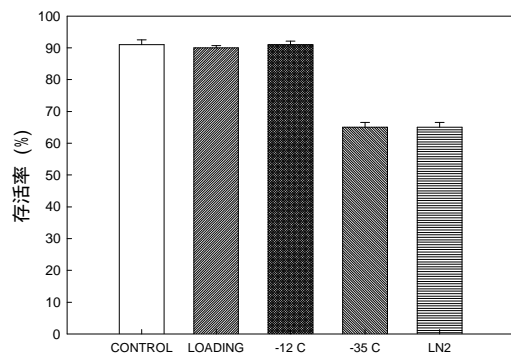


圖 2 進口荷蘭牡蠣於兩階段式低溫保存程序中各階段之存活率

(三) 冷凍速率與冷凍保護劑的影響：

冷凍速率為影響存活率之主要因子，以荷蘭進口牡蠣為例，圖 3 所示為使用 DMSO 或甘油在三種冷凍速率下的存活率比較。使用甘油或 DMSO，最佳之冷凍速率均為 $-1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ，此實驗結果與前一年度計畫中以臺產牡蠣進行實驗所得之最佳冷凍速率為 $-4 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 有所不同。

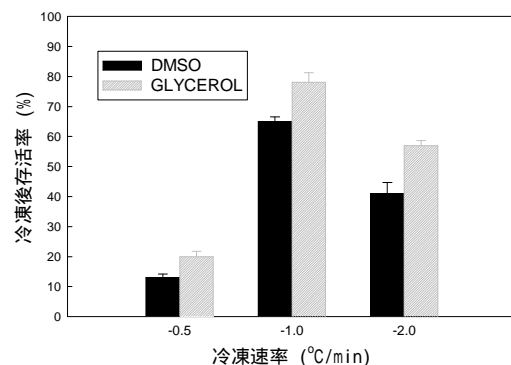


圖 3 進口荷蘭牡蠣於不同冷凍速率下使用 DMSO 或甘油為冷凍保護劑之存活率比較

圖 4 所示為以荷蘭進口牡蠣胚體為例進行使用不同冷凍保護劑所得之冷凍後存活率，實驗之冷凍速率為-1 /min。由圖可知使用四種選定之冷凍保護劑均可以達到 45% 以上之存活率，四種冷凍保護劑中則以甘油所得之結果最佳，達 78±3%。

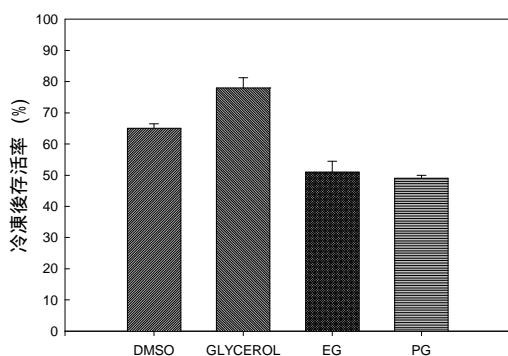


圖 4 進口荷蘭牡蠣胚體使用不同冷凍保護劑之存活率比較

(四)不同品系牡蠣胚體之比較：

實驗之進口牡蠣均為不同品系之巨牡蠣(*Crassostrea gigas*)，圖 5 所示為三種不同品系牡蠣胚體以甘油或 DMSO 進行低溫保存後存活率之比較。

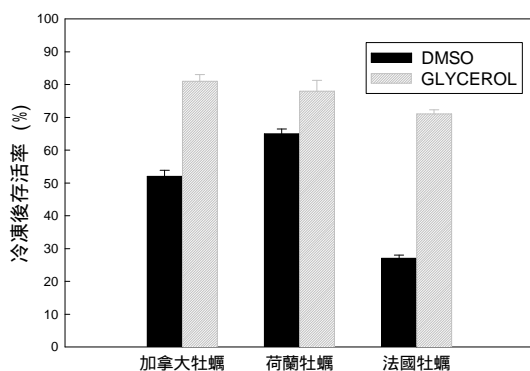


圖 5 三種不同品系牡蠣胚體以甘油或 DMSO 進行低溫保存後存活率之比較

五、計畫成果自評

本年度計畫中具體地改善了牡蠣胚體培養的程序，同時對於不同品系之進口

牡蠣進行各項比較實驗。對由國外進口之牡蠣胚體所適用之低溫保存程序中之冷凍保護劑種類與冷凍速率等條件，均有建立完整的資料。目前使用 2M 甘油為冷凍保護劑，以-1 /min 之冷凍速率進行低溫保存，可穩定得到 75% 以上之存活率，顯示所發展的低溫保存程序已具有實用性。另外，本年度四月間亦赴法國與法方之國家海洋研究院(IFREMER)進行學術交流，訪問期間法方對於本研究之成果甚表肯定。

六、參考文獻

- [1] Chao, N.H., Chao, W.C., Liu, K.C. and Liao, I.C. 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Biol.* 30:107-118.
- [2] Hayashi, S., Kobayashi, K., Mizuno, J. Saitoh K. and Hirano, S. 1989. Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Record* 125:43-44.
- [3] Leibo, S.P. 1977. Preservation of mammalian cells and embryos by freezing. In: *Cryoimmunology*. 311-334, INSERM, Paris.
- [4] Lin, T.T., Tung, H.T. and Chao, N.H. 1993. Cryopreservation of oyster embryos with conventional freezing procedure and vitrification. *Cryobiology* 30:Abstract.
- [5] Mazur, P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* 168:939-949.
- [6] Mounib, M.S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 53:13-18.
- [7] Naidenko, T. 1997. Cryopreservation of *Crassostrea gigas* oocytes, embryos and larvae using antioxidant echinochrome A and antifreeze protein AFP1. *Cryo-Letters* 18:375-382.
- [8] Scott, A.P. and Baynes, S.M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17:707-739.
- [9] Steponkus, P.L., Myers, S.P., Lynch, D.V., Gardner, L., Bronshteyn, V., Leibo, S.P., Rall, W.F., Pitt, R.E., Lin, T.T. and MacIntyre, R.J. 1990. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, Vol. 345, No. 6271:170-172.
- [10] Toledo, J.D., Kurokura, H. and Kasahara, S., 1989. Preliminary studies on the Cryopreservation of the blue mussel embryos. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55(9):1661.

[11] Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P.
1972. Survival of mouse embryos frozen to -196
and -296 . Science 178:411-414.