

9309

台灣櫻花鉤吻鮭族群種內基因多樣性之研究(三)

研究主持人：郭金泉
雪霸國家公園管理處

台灣櫻花鉤吻鮭族群種內基因
多樣性之研究（三）

Studies on the intraspecific gene diversity of
Formosan landlocked salmon （Ⅲ）

內政部營建署雪霸國家公園管理處
委託研究報告

093-301020500G-009

台灣櫻花鉤吻鮭族群種內基因
多樣性之研究（三）

Studies on the intraspecific gene diversity of
Formosan landlocked salmon （Ⅲ）

受委託者： 國立澎湖技術學院

研究主持人： 郭金泉

研究助理： 邱如玉

內政部營建署雪霸國家公園管理處

委託研究報告

中華民國九十三年十二月

目次

表次	III
圖次	V
中文摘要	VII
英文摘要	IX
第一章 緒論	1
第一節 研究緣起與背景	1
第二節 保護魚類遺傳資源	2
第二章 材料和方法	5
第一節 實驗用魚和生殖隆起的分離	5
第二節 生殖隆起-細胞懸浮液之備製	6
第三節 凍結保存實驗	7
第四節 存活率評估	9
第三章 結果與討論	10
第一節 結果	10
第二節 討論	11
第四章 結論與建議	19
謝言	20
參考書目	21

表次

表 1	將生殖隆起置於 Bicell 中，再放入 -80°C 冷凍櫃中的過渡時間所代表的過渡溫度。	28
表 2	不同情況下，虹鱒原始生殖細胞凍結-解凍後之存活率。	28

圖次

圖 1	-80°C 冷凍櫃之降溫曲線。	29
圖 2	完整的 GR 的和分散的 PGC 其凍結-解凍後存活率的比較。	29
圖 3	不同的平衡時間其凍結-解凍後存活率的比較。	30
圖 4	不同的凍結方法其凍結-解凍後存活率的比較。	30
圖 5	不同的過渡溫度與時間，其凍結-解凍後存活率的比較。	31
圖 6	虹鱒凍結-解凍後之原始生殖細胞在不同時間下的圖片。	32
圖 7	台灣櫻花鉤吻鮭的生殖隆起切除之步驟。	33
圖 8	台灣櫻花鉤吻鮭之原始生殖細胞在不同時間下的圖片。	34

中文摘要

關鍵詞：幹細胞、凍結、魚、保全、代理孕母、種魚

一、研究緣起

凍結保存魚類原始生殖細胞 (primordial germ cells; PGCs) 開啟由種原關係相近的物種提供配子，復活欲保存個體和物種的嶄新大門。本研究的主要目的是進一步評估不同的凍結因子對凍結-解凍後原始生殖細胞存活率的影響，並最佳化凍結保存虹鱒原始生殖細胞的技術。更進一步將此技術應用於凍結保存台灣陸封型鮭魚（櫻花鉤吻鮭）的 PGCs。

二、研究方法及過程

由剛孵化的轉基因胚中切除完整的生殖隆起 (genital ridge; GR, 即含有 PGCs 的胚生殖腺)，再放入凍結培養基中凍結保存。凍結保護是由加入 10% (V/V) 之 (乙二醇; EG) 來提供。將樣品緩慢凍結至 -80°C 後再置於液態氮 (liquid nitrogen; LN_2 ; -196°C) 中長期保存。解凍後 PGCs 的存活率是以它們散發出的綠色螢光的強度和不為臺盼藍 (trypan blue) 染上色的能力來決定，再以顯微鏡和照相機紀錄作更詳細的形態確認和評估。

三、重要發現

透過統計分析的結果顯示完整 GR 的凍結耐受力優於以酵素分散的 PGCs。使用未控制的冷卻速率將樣品直接置於 -80°C ，解凍後只有很少量的 PGCs 可以存活 ($8.1 \pm 6.9\%$)。有控制冷卻速率 ($-1^{\circ}\text{C}/$

台灣櫻花鉤吻鮭族群種內基因多樣性之研究

min) 的方法較有效。簡易二段式的凍結保存方法證明是適合虹鱒 GR 的凍結保存。以 10% 濃度的乙二醇 (EG) 為抗凍劑，每分鐘以 1°C 的冷卻速率降溫至 -80°C 後，再置於液態氮的凍結方法獲得最好的存活率 (64.1±11.3%)。開發凍結保存虹鱒原始生殖細胞的技術，使得建立魚類-PGC 銀行變得可行，此技術不但可用以保存 (preserve) 瀕危魚種的遺傳資源，更可保全 (conserve) 野生魚群遺傳基因的多樣性。

英文摘要

The cryopreservation of fish primordial germ cells (PGCs) provides a novel way of regenerating a stock using PGCs from the closely related species. A reliable technique for the cryopreservation of rainbow trout PGCs has been established. The purpose of this paper was to examine the effects of various freezing factors on post-thaw viability. The whole genital ridge (GR), the embryonic gonad containing PGCs, was excised from hatching transgenic embryos and left to cryopreserve in a cryomedium. Cryoprotection was provided by addition of 10% (V/V) ethylene glycol. Samples were slowly ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) frozen to -80°C before being plunged into liquid nitrogen. The survival rates of post-thaw PGCs were determined by their green fluorescent intensity and ability to exclude trypan blue dye. Morphological evaluation was using microscopy. Statistical evaluation suggest that freezing tolerance of whole GR is better than that of dissociated PGCs. Very low ($8.1\pm 6.9\%$) viable PGCs were recovered using uncontrolled cooling protocols directly plunged into -80°C freezer. The controlled cooling rate is more effective. A simple two-step cryopreservation protocols proved to be suitable for rainbow trout GR. The best survival rate of rainbow trout GR ($64.1\pm 11.3\%$) was observed using a cooling rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -80°C and then plunged into liquid nitrogen with the addition of EG at 10% concentration. This technique

台灣櫻花鉤吻鮭族群種內基因多樣性之研究

could make it possible to establish a fish-*PGC* bank, which would be useful not only to preserve genetic resources of endangered fish species but also to conserve the genetic diversity of wild fish populations.

Keywords : stem cell, freezing, fish, surrogate broodstock, conservation

第一章 緒 論

第一節 研究緣起與背景

最近，環境污染、外來種的入侵、氣候變遷、過漁……等諸因素，已造成許多本土水產生物的大量瀕危與絕種，且有多數的魚種已名列在「國際自然資源保育聯盟」(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources; IUCN)的紅皮書(Red List)中。因此，有許多保育和復活魚種的嶄新方法孕運而生。配子(精子和卵子)和胚的凍結保存是發展動物易地(*ex situ*)保育遺傳基因多樣性的重要工具(Thorgaard and Cloud, 1993)。在動物飼養方面，凍結保存配子和胚最主要的好處是「低溫銀行」(cryobanks)的建立，它可儲存和散布有效的遺傳資源並架起時間和空間的橋樑，使保存配子可超越時空幫助繁衍生物(Palasz and Mapletoft, 1996)。Cryobank 也是幫助保育瀕危物種的一種利器(Schiewe et al., 1995)。在魚類，凍結保存是保育瀕危物種基因庫(gene-banking)一個有效的方法；它在水產養殖和海洋牧場經營上也有實際的優點，諸如經濟性的維持商業上重要的養殖品種；在疾病突然爆發，自然災害，或意外像漏油時之族群保護；穩定供應種苗生產的配子；使孵化場間配子／或結合子的運送更容易；和提供有效地選擇性育種以改進遺傳基因。所以，發展野生或商業性重要魚種基因型凍結保存的適當技術是有必要的。

第二節 保護魚類遺傳資源

在許多硬骨魚類已成功地將其精液凍結保存 (Gwo, 1999, 2000ab)。凍結保存精子和雄核生殖 (androgenesis) 結合提供了只用精子當作核基因組物質以復活個體的方法 (Leung and Jamieson, 1991; Araki et al., 1995; Nagoya et al., 1996)。Bercsényi 等人 (1998) 已成功地以一物種遺傳物質不活化的卵和另一物種正常精子去達到種間雄核發生 (鯉科魚)。Gamma (γ) 射線-照射鯉魚的卵和金魚凍結保存的精子授精及雄核發育單被體可以熱-刺激 (heat shock) 去還原二倍體和製造活的子代。Babiak 等人 (2002) 也以凍結保存的精子製造出雄核發育虹鱒之活的二倍體。然而；此技術無法克服失去卵的粒線體 DNA，即母系遺傳物質 (細胞質因子) 的遺憾。

即使培養的魚-細胞 (cultured fish-cells) 已成功地凍結保存且所衍生 (凍結後) 的存活率也很高 (約 90%)，但也幾乎不可能由這些凍結保存的培養細胞的核去繁衍個體，因為這些細胞已經失去了分化細胞的發育能力，即：全能性 (totipotency) 或多功能性 (pluripotency) (Calvi and Maise, 1998)。因為魚類初期胚的分割球細胞仍保有未來發育的全能性，所以凍結保存分割球細胞應是維持核基因組和粒線體 DNA 二者遺傳基因多樣性的一個有效方法，它可在解凍之後移植入接受者 (recipient; 寄主) 的囊胚中。

而藉由凍結保存分割球細胞去製造生殖品系嵌合體 (germ line chimera)，透過雌性嵌合體與雄性嵌合體或該物種凍結保存的精液授精，去復活魚種應是一個有效的方法 (Takeuchi, 2001)。在斑馬魚 (*Brachydanio rerio*; Harvey 1983)，虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*; Nilsson and Cloud, 1993; Calvi and Maise, 1998)，狗鮭 (chum salmon; *O. keta*; Kusuda et al., 2002)，青沙鯪 (whiting; *Sillago*

japonica; Strüssmann et al., 1999) , 牙漢魚 (pejerrey; *Odontesthes bonariensis*; Strüssmann et al., 1999) 和青鱗魚 (*Oryzias latipes*; Strüssmann et al., 1999) , 鯉魚 (*Cyprinus carpio*; Calvi and Maisse, 1999) , 金魚 (*Carassius auratus*; Kusuda et al., 2004) 已成功地凍結保存分割球細胞。Kusuda 等人 (2004) 移植凍結保存金魚的分割球細胞至雌核生殖三倍體鯉魚 (crucian; *C. a. longsdorffii*) 之胚下中空球體，證實凍結-解凍後存活的分割球細胞保有它們的全能性，且可以分化成體細胞和生殖細胞品系。所以，當有必要時我們可以結合以上二種技術來保育瀕危或絕種魚。此方法更優於雄核生殖或核移植 (Wakamatsu et al., 2001) , 即用來自代理孕母胚含有粒線體基因組之去核卵。然而，此技術既尚未廣泛地應用在其他魚種，也還沒有任何實際的應用。

而完整魚胚成功之凍結保存至今尚未完成 (Gwo, 2000b) 。即使凍結保存魚卵和胚似乎是保存母系基因組的有效方法，但此法至今尚未成功因為大量的卵黃，厚的卵膜和結構複雜的胚體 (如 YSL: yolk syncytial layer 和卵黃/細胞質膜) 抑制了抗凍劑的均勻滲入和凍結過程中的均勻冷卻 (Chao and Liao, 2001) , 況且魚胚在原腸初期之前對凍傷 (chilling injury) 是有高敏感性的 (Hagedorn et al., 1997) 。Harvey 等人 (1983) 和 Hagedorn 等人 (1996) 已測定此複雜成分的生物系統中穿入抗凍劑且顯示穿透障礙的存在。

而凍結保存原始生殖細胞 (primordial germ cells; PGCs) 是保存魚類遺傳資源的嶄新替代方法 (Kobayashi et al., 2003, 2004; Takeuchi et al., 2004) 。結合 PGC 的凍結保存和異種移植 (xenotransplantation) 是保育瀕危物種的有效策略 (Takeuchi et al., 2004) 。虹鱒原始生殖細胞凍結保存的第一篇報告是 Kobayashi 等人於 2003 年發表的兩頁簡短報告。此研究延續其報告將凍結保存

台灣櫻花鉤吻鮭族群種內基因多樣性之研究

中常見之凍結條件最佳化，目的就是要增進和提高虹鱒原始生殖細胞凍結解凍後的活存率，邁出實現此策略的第一步。

而虹鱒 (*O. mykiss*) 與台灣櫻花鉤吻鮭 (*O. masou formosanus*) 是關係非常相近的物種 (同屬不同種)，且又因為台灣櫻花鉤吻鮭的實驗樣品數量非常有限，故希望由虹鱒所建立之純熟技術可直接應用在台灣櫻花鉤吻鮭原始生殖細胞的保存上。

本研究的內容：

- 1、比較凍結完整的 GR 或分散的 PGC 其凍結-解凍後的存活率。
- 2、比較不同的平衡時間其凍結-解凍後的存活率。
- 3、比較不同的凍結方法其凍結-解凍後的存活率。
- 4、比較不同的過渡溫度與時間其凍結-解凍後的存活率。

第二章 材料與方法

第一節 實驗用魚和生殖隆起的分離

實驗用的魚胚是採自飼養在日本東京海洋大學大泉實驗站 (Yamanashi, Japan) 10°C 泉水中的轉基因虹鱒品系。其PGCs已用 *vasa*-基因調節序列啟動之GFP基因將之可視化 (Takeuchi et al., 2002)。收集授精後 30 及 40 天 (30, 40dpf) 的虹鱒胚置於虹鱒等張食鹽溶液 (isotonic salt solution) 的培養皿中。於配備有GFP過濾座 (DM505, Olympus) 的解剖顯微鏡 (SZX9, Olympus, Tokyo, Japan) 下以鑷子 (INOX No.5, A. Dumont & Fils, Switzerland) 手工去除卵膜，加入 0.05% 之 2-phenoxyethanol (2-苯氧乙醇； $C_6H_5OCH_2CH_2OH$) 將胚麻醉除去卵黃，再以剪刀 (NAPOX stainless MB-41) 去頭、去尾，剖開腹腔，將黏在背部的生殖隆起取出，並確認GR內綠色螢光細胞的存在。所有的操作皆在 10°C 溫度以下進行。

第二節 生殖隆起-細胞懸浮液之備製

5

將存在於含5%胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS; 50 μ l) 之含鈣-磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS (+); phosphate buffered saline; 450 μ l) 中之GR收集至0.6ml之微量試管 (microtube), 以低溫 (4 $^{\circ}$ C) 離心 (1000rpm 5 分鐘), 移除上清液後進行酵素分散處理或凍結實驗。因為生殖隆起的胚組織含有PGCs和體細胞, 故將GR培養在含0.5%胰蛋白酶 (trypsin; Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ) 之200 μ l分散培養基 (含有5%FBS及1mM Ca²⁺之PBS; pH8.2) 2小時20 $^{\circ}$ C。將所產生的細胞懸浮液以低溫離心 (條件同上), 移除上清液後進行凍結實驗或存活率的判定。

第三節 凍結保存實驗

一、凍結實驗

Kobayashi等人(2003)比較四種抗凍劑：二甲亞砜(dimethyl sulfoxide; DMSO)，甘油(glycerol; Gly)，丙二醇(1,2-propanediol; PROH)和乙二醇(ethylene glycol ; EG)，其中EG所得之凍結-解凍後存活率最高。也測定不同濃度的EG(1.2M, 1.5M, 1.8M, 2.1M, 2.4M)，其中1.8M(10%; V/V)的濃度所得之凍結-解凍後存活率最高。根據此，我們使用1.8M的EG來進行我們的凍結實驗。由轉基因虹鱒胚所取得之GR和分散後的PGCs，經低溫離心(條件同上)移除上清液後，懸浮在以基礎培養基配製的凍結培養基(cryomedium)中，置於冰上平衡15分鐘。調整懸浮液以獲得最後濃度為50GRs/ml或600~1200PGCs/ml。為了方便實驗的進行及減少PGCs不必要的流失，我們以微量試管進行凍結保存實驗。將裝有樣品之微量試管以石臘(paraffin)封口後，迅速置入Bicell凍結容器(Nihon Freezer Co., Ltd)中，隨後立刻放入-80°C的冷凍櫃，以每分鐘降1°C的降溫速度(cooling rate)去冷卻樣品。我們初步實驗的結果發現：完整的GR較分散的PGCs具有較高的凍結耐受力。故完整的GR組織被用來進行以下的實驗。

二、凍結速率和平衡時間的影響

生殖隆起和10%的EG平衡1, 15和30分鐘後，以石臘封口後迅速移入Bicell凍結容器，隨後此容器立即置入-80°C之冷凍櫃。部分樣品則沒有置入Bicell凍結容器而直接放在-80°C冷凍櫃中凍結。-80°C冷凍櫃之降溫曲線如圖1。90分鐘後將Bicell中之微量試管取出置於液態氮中，隔夜儲存至使用為止。

三、過渡溫度 (Transition temperature) 和時間的影響

根據上述實驗最佳結果，我們把生殖隆起和10%EG平衡15分鐘後置入 -80°C 的冷凍櫃中30，60，90，120和150分鐘後（其所代表之過渡溫度如表1所示）再投入液態氮。隔夜儲存後解凍並測定存活率。

四、解凍

將微量試管浸泡在 10°C 的水浴中，直到冰晶融化（大約1分鐘）為止。將樣品的體積稀釋3倍，加入 $400\mu\text{l}$ 之PBS（+）使溶液趨近於等張。此GR懸浮液經低溫離心（條件同上）移除上清液後，再以5%胰蛋白酶處理，將PGCs分散出來，以測定其存活率。

第四節 存活率的評估

PGCs的最初數目是在凍結或酵素處理之前，計算分離的生殖隆起中PGCs的數目而來。分散的PGCs其存活率分別以修飾的臺盼藍（trypan blue）染色除去法（Kusuda et al., 2002）、綠色螢光的強度和在顛倒螢光顯微鏡（CK40, Olympus）下以它們延伸的偽足主動運動的能力（Kobayashi et al., 2003）來評估和重複確認。將胰蛋白酶分散之細胞懸浮液經低溫離心（條件同上）後，移除上清液，調整體積為50 μ l，加入10 μ l之0.4%臺盼藍混合。隨後移入96-well plate中，經低溫離心（條件同上）後，在顛倒顯微鏡下觀察，並計算存活的細胞數目。

計算存活率的公式如下：存活率（%）=（存活的PGC數目／最初PGC數目） \times 100。每一個樣品的最初數目至少要計算到100個細胞以上，且至少重覆3次實驗。所有數據皆以平均值 \pm 標準偏差（SE）表示。統計分析是以One-way ANOVA之Duncan's Multiple Range Test（Steel and Torei, 1980）來比較每個處理的存活率及顯著差異。以 $p < 0.05$ 的值決定有統計上顯著差異的水準。

第三章 結果與討論

第一節 結果

凍結保存完整的生殖隆起其解凍後PGCs的存活率 ($64.1 \pm 11.3\%$) 明顯地優於凍結保存分散的PGCs所得的結果 ($19.0 \pm 8.5\%$) (表2和圖2)。凍結保存分散的PGCs會顯著降低解凍後的存活率。不同的胚齡 (30及40dpf) 其凍結-解凍後之存活率並沒有差異 (數據未顯示)。樣品在抗凍劑中延長平衡時間從1到15和30分鐘, 並沒有明顯地改進存活率 (圖3)。沒有控制冷卻速率而直接將樣品置於 -80°C 冷凍櫃中, 只有少量的細胞可在解凍後復活 ($8.1 \pm 6.9\%$) (表2)。每分鐘降 1°C 有控制的冷卻速率是較有效的 (圖4)。

簡易二階段式的凍結保存程序被證明是較適合虹鱒GR的。曝露在 LN_2 中可存活的PGCs只有應用二階段式的凍結方法才可獲得。生殖隆起在置於液態氮之前必須緩慢冷卻 (每分鐘降 1°C) 以確保任何的存活機會。增加在過渡溫度 (-80°C) 放置的時間至150分鐘, 並不會增加凍結-解凍後的存活率 (圖5)。最高的存活率是發生在將GR儲在 -80°C 的溫度90分鐘, 勝於30、60、120和150分鐘。即表示較適合GR的過渡溫度為 -80°C , 而非 -30°C 或 -60°C 。

凍結-解凍後的PGCs, 在高倍 (400倍) 顯微鏡下可觀察到延伸的偽足主動運動的能力 (圖6), 代表這些PGCs在凍結-解凍後仍具有活性。

第二節 討論

虹鱒原始生殖細胞凍結保存的第一篇報告是Kobayashi等人(2003)之兩頁簡短報告。本研究則是延續此論文將凍結保存中常見之凍結條件最佳化。即使，在這個領域的報告有限，但與其他凍結保存所發表的資料整合後，可歸納出一些有關未來凍結保存魚類原始生殖細胞的方法。

一、虹鱒胚的年齡對凍結-解凍後原始生殖細胞存活率的影響

Takeuchi 等人(2003)指出：在水溫10°C時，授精後第35和40天(孵化期)的代理孕母(recipient)胚有能力可引導供給者(donor)PGCs至它們的生殖隆起，但授精後第45天的代理孕母則沒此能力。供給者PGCs的年紀也會影響形成群體的比率：和取自授精後第45天胚的PGCs相比，取自授精後第35和40天胚之生殖隆起的PGCs，在代理孕母的生殖隆起形成群體的能力較強。在老鼠PGCs體外的遷移實驗(emigration assay)也顯示：只有當PGCs分離自它們的遷移期間，才會表現運動的行為(Wylie and Heasman, 1993)。PGCs可以感覺和反應來自生殖隆起之誘引分子，表示分離自生殖隆起之PGCs仍保有它們移動的能力。然而，隨著生殖腺的發育，此能力會逐漸消失(Takeuchi et al., 2003)。所以，Takeuchi 等人(2003)下：「代理孕母腹膜腔條件的適當與否，與供給者PGCs自身的移動能力，是供給者PGCs能否在代理孕母生殖腺形成群體的必要因子」的結論。

Takeuchi 等人(2003)推測：授精後第35天前之虹鱒魚胚很難切除其生殖隆起，因為生殖隆起尚未發育完全。這些胚也不適合當作代理孕母，因為它們的腹膜腔太小，移植針無法插入。所以其研究建立的移植程序是不適用於授精後第35天前之虹鱒胚。然而，在此研究中，我們比較30dpf和40dpf之虹鱒胚其GR於凍結-解凍後PGCs的存活

率。結果發現二者並無顯著差異（未發表之觀察）。況且移植30dpf 胚凍結-解凍後的PGCs已被證實是有效的（Kobayashi et al., 未發表的數據）。亦即凍結-解凍後30dpf的供給者PGCs有能力在代理孕母胚之GR形成群體，繼而增殖及分化成具有功能的配子。故30dpf和40dpf之虹鱒胚皆可進行凍結保存的實驗。

二、凍結完整的生殖隆起和分散的（dissociated）原始生殖細胞

即使，把GR經酵素分散成細胞懸浮液的PGCs控制組仍有很高的存活率（ $93.0 \pm 2.5\%$ ），但會失去一些細胞（7%），大概是在分散過程中造成這些細胞的死亡。因為虹鱒PGCs對高溫是敏感的， 10°C 左右較恰當（Kobayashi et al., 未發表的數據）。在此研究中，生殖隆起是以 20°C 分散的（Takeuchi et al., 2002）。在此溫度下，胰蛋白酶是不完全活化的，其活化溫度為 28°C 左右（Worthington Biochemical Corporation公司的說明書）。且為了製備GR-細胞懸浮液，至少要培養2小時，並施以反覆的物理（機械性）吸量動作，使GR的細胞（包括PGCs和體細胞）均勻分離及分散。此相當長的程序也許會傷害一些PGCs。所以，若使用在低溫下有高度活性的酵素應可以提高PGCs的存活率（Kobayashi et al., 2004）。Emiliani等人（2000）提出老鼠囊胚經長期之體外培養會降低它的凍結耐受力，而使胚的存活率降低。在此研究中，完整GR凍結-解凍後PGCs的存活率遠高於酵素處理過的PGCs。這結果顯示，經長時間酵素處理後的PGCs對凍結保存的耐受性會明顯降低。

Calvi和Maisse（1998）提出隨著細胞分裂所造成分割球細胞數目的增加，會使細胞體積變小，每個細胞的有效表面積（surface to volume ratio）增加，進而提升細胞膜的通透性。故凍結愈進階時期的分割球細胞，可增加凍結-解凍後細胞的存活率。但在此研究中却

得到相反的結果，也許是我們設定的凍結條件較適合GR，而凍結PGCs的最佳條件，還需要進一步的調查。

另一個造成酵素處理後的PGCs凍結-解凍後存活率低的可能原因是：在移除上清液的過程中，我們無法在解剖顯微鏡下看見PGCs，所以它們很有可能會隨著移除的過程而流失。所以，到目前為止，凍結保存完整的GR是凍結保存虹鱒PGCs最好的方法。

三、抗凍劑的種類、濃度和平衡時間

完整的GR以1.8M (10%) 之EG凍結保存，在四個測試的抗凍劑中表現出最高的存活率，和控制組比較為1:0.69 (控制組:EG組)。所以，EG是凍結虹鱒PGCs最好的抗凍劑。二甲亞砜 (dimethyl sulfoxide; DMSO)，甘油 (glycerol; Gly)，丙二醇 (1,2-propanediol; PROH) 和乙二醇 (ethylene glycol; EG)，都是凍結較常使用 (Gwo, 2000ab) 且具滲透性的抗凍劑。一種適合的抗凍劑的加入可以減少細胞因為冰晶形成所造成的傷害，且通常會明顯地增加細胞的存活率。以抗凍劑作培養基是斑馬魚分割球細胞成功凍結保存之必需 (Harvey, 1983)，且大大地增加虹鱒 (Calvi and Maisse, 1998)、鯉魚 (Calvi and Maisse, 1999) 和狗鮭 (Kusuda et al., 2002) 分割球細胞凍結-解凍後之存活率。

EG已廣泛用在哺乳動物胚之凍結保存，不管是緩慢凍結法或玻璃化法，如老鼠、大鼠、兔、羊和牛，因為它的分子量低 (62.07)、滲透性高和毒性低 (Emiliani et al., 2000)。最近，EG被用於人的卵母細胞之玻璃化，就如用在人的精子的凍結保存一樣 (Chi et al., 2002)。Chi等人 (2002) 證明EG用在人胚緩慢-凍結之可行性。且因為EG的毒性低和滲透性高對隨後的胚胎發育及妊娠，沒有證據顯示會有不良的影響。但EG對虹鱒PGCs移植後發育的影響，則需進一步實驗加以探討。

一般來說，細胞的死亡是由「細胞膜和核膜蛋白質因為脫水和鹽類濃度增加」而變性退化 (degeneration)；和在抗凍劑處理期間的過度脫水與凍結／解凍程序中造成細胞本身的物理性破壞 (Leung, 1991)。GR以PROH，DMSO和Gly凍結保存的存活率極低，甚至沒有存活的PGCs，暗示此三種抗凍劑對虹鱒PGCs有較高的毒性。這也暗示了此三種抗凍劑，可能它們的脫水效應和對PGCs的毒性，都不適合凍結保存虹鱒的PGCs。事實上，Calvi和Maisse (1998)並沒有觀察到凍結-解凍後分割球細胞存活率明顯降低的情形，因為他們採取漸進式加入抗凍劑和漸進式稀釋抗凍劑的方法。所以，快速加入和移除抗凍劑但不致使細胞體積變化太大，也是未來值得考慮的。

抗凍劑暴露的時間（即平衡時間）的不同會影響解凍後的存活率。凍結程序中，平衡時間不能太短（為了使水分子的替代物質進入細胞），也不能太長（為了避免毒性的影響）。所以，抗凍劑的平衡時間和濃度都是需要控制的重要因子。在PGCs的凍結培養基中，抗凍劑的濃度變化從1.2到2.4M，而結果顯示濃度1.8M（10%；V/V）的EG是最適合的抗凍劑。而凍結前的平衡時間由1到90分鐘，是在室溫之下進行。狗鮭分割球細胞的平衡時間為30分鐘（10°C）（Kusuda et al., 2002）。虹鱒分割球細胞的平衡時間為大於25分鐘（10°C）（Calvi and Maisse, 1998）。在此研究中，為了降低高溫對PGCs的傷害凍結前平衡的執行是在冰上（0°C）。1，15和30分鐘的平衡時間對凍結-解凍後PGCs存活率的影響沒有顯著差異。暗示於0°C 30分鐘以內的平衡時間皆適合凍結保存虹鱒的PGCs。

以凍結保存分割球細胞之抗凍劑而言，最適合虹鱒和鯉魚的是PROH (Calvi and Maisse, 1998, 1999)；最適合溫水魚類和狗鮭的是DMSO (Strüssmann, 1999; Kusuda et al., 2002)。綜合以上可知，凍結保存最適合的條件會因物種有很大的差異 (Strüssmann, 1999; Gwo, 2000ab)。而且，不同物種間有不同的遺傳物質，會強烈影響胚對凍結的耐受力，即胚的細胞質與抗凍劑之間的交互作用

(Emiliani et al., 2000)。所以，我們必須考慮到每種抗凍劑對特定細胞形態的毒性。不同的物種和不同的細胞其最好的抗凍劑，濃度和它的平衡時間仍需以實驗為依據來決定 (trial-and-error)。

四、凍結方法

凍結方法是凍結保存決定性的關鍵。一般最常用的方法是直接凍結法和二階段式的緩慢-凍結法。虹鱒完整的GR和分散的PGCs都不能承受用10%抗凍劑以未控制的降溫速率 ($-45^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 圖1) 而直接凍結至 -80°C 的方法。直接凍結就是將細胞置於液態氮中，已知會快速形成冰晶對細胞的傷害。所謂二階段式的方法是冷卻細胞至零下某一溫度，而後將細胞置於液態氮中儲存 (Gwo, 2000ab)。

造成凍結-解凍程序中，細胞傷害的主要原因是滲透壓的衝擊，細胞內冰晶的形成和抗凍劑的毒性。而在緩慢-凍結程序中，因使用低濃度的抗凍劑，所以滲透壓的衝擊和抗凍劑的毒性對細胞傷害的影響不如細胞內冰晶的形成嚴重。玻璃化方法的發展可避免緩慢凍結的障礙。即使，在玻璃化中使用高濃度的抗凍劑可明顯克服細胞內冰晶的形成，但長時間暴露於高濃度的抗凍劑會增加抗凍劑的毒性。最近，快速玻璃化技術的發展是要去縮短暴露在抗凍劑的時間，但會增加滲透壓的衝擊。所以，在玻璃化法中，滲透壓的傷害是失去活性的主要原因。即使，這二種方法各有優點，但最近的研究在胚的緩慢-凍結程序上有較好的成效。且因為高濃度的抗凍劑所造成的滲透壓衝擊，玻璃化比起緩慢凍結，對人胚隨後的發育傷害較大 (Chi et al., 2002)。

綜合以上原因及此研究中的觀察發現，一個二階段式緩慢-凍結的方法為：在置於液態氮之前，控制冷卻速率由 $+4^{\circ}\text{C}$ 到中間過渡之零下溫度 (-80°C) 證明是適合虹鱒GR的。Calvi和Maisse (1998) 指出虹鱒的分割球細胞在置於液態氮之前，要緩慢冷卻至 -80°C 。而

Kusuda等人(2002)指出狗鮭的分割球細胞在置於液態氮之前，要緩慢冷卻至 -30°C 。Strüssmann等人(1999)亦指出緩慢冷卻至零下某一溫度，是溫水魚類(青沙鯪、牙漢魚和青鱒魚)分割球細胞凍結保存之必需。而過渡溫度 -30°C 和 -60°C 會明顯降低PGCs凍結-解凍後的存活率。且在最適合的過渡溫度(-80°C)之下，延長過渡時間至120及150分鐘會明顯降低PGCs凍結-解凍後的存活率。因為細胞的保存在 -80°C 以上會呈現不安定狀態，可能是仍有部分溶液未完全凍結的緣故(Mazur, 1970)。且生物活性要在 -130°C 才能有效被抑制，在 -130°C 以下才能長期保存而不變質(Mazur, 1984)。

五、偽足的活性

Trinkaus(1973)描述底鱒科(*Fundulus*)魚類體內(*in vivo*)偽足的活性：「此分離細胞如此的行為改變是由於細胞表面可變形性的增加，即短暫半球形的突出和縮回而造成大小和形狀的改變」。因為這樣的伸縮過程會起皺而使得它們可能形成額外的膜，這是細胞延伸(spreading)和變形(deformability)的必需(Erickson and Trinkaus, 1976)。所以，偽足的活性(膜的變形)是凍結-解凍程序中可忍受收縮和膨脹的重要角色(Calvi and Maisse, 1998)。而且偽足的活性亦是影響PGCs未來移植實驗成功與否的關鍵(Takeuchi et al., 2003)。

六、凍結(冷卻)速率與解凍速率

在此研究中，證明使用Bicell凍結容器(每分鐘降 1°C)來凍結虹鱒的GR是適合的。魚類分割球細胞之凍結保存亦多為緩慢之冷卻速率，條件為每分鐘降 1°C (Harvey, 1983; Nilsson and Cloud, 1993; Calvi and Maisse, 1998, 1999; Strüssmann, 1999; Kusuda, 2002)。

而Calvi和Maisse (1998) 使用更緩慢的冷卻速率 (每分鐘降 0.3°C) 可以增加凍結-解凍後分割球細胞的存活率。故若將冷卻速率降低可否增加虹鱒PGCs的存活率，則需進一步實驗加以證明。

一般的解凍速率應以快速為宜，以減少再結晶的程度。解凍方式可以水浴法或室溫下直接解凍，但不可使細胞過熱。魚類分割球細胞常見之解凍方法為較快速的水浴法 (Strüssmann, 1999; Kusuda, 2002) 和較緩慢的方法 (置於冰上) (Calvi and Maisse, 1998)。本研究採用較快速的水浴法 (10°C)，而較緩慢或其他的解凍方式是否可以增加虹鱒PGCs的存活率，則需再釐清。

七、植冰 (Ice seeding)

植冰是凍結老鼠、羊和兔子胚所必需，於 -10°C 以下的溫度植冰會引發膜的破壞和隨後釋放的潛熱，造成胚之脫水引起胎兒的傷害 (Kusuda et al., 2002)。Calvi and Maisse (1998) 凍結魚類分割球細胞的植冰是在 -6.6°C 。Kusuda等人 (2002) 在 -15°C 植冰顯示較低的存活率，指出魚類分割球細胞的植冰應和哺乳動物胚相同，在高於 -10°C 的溫度植冰。至於，植冰可否增加虹鱒PGCs的存活率，則有待研究證實。

八、其他因子

滲透性抗凍劑和非滲透性抗凍劑混合，如DMSO+海藻糖可大幅提升對精子的保護作用。而在此研究中，PGC凍結保存的基礎培養基中有加入葡萄糖 (glucose) 和牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA)，二者都是屬於大分子的非滲透性抗凍劑，PGC是否會因為滲透性抗凍劑和非滲透性抗凍劑的相互作用，而保有凍結-解凍後之高存活率。或者，若以海藻糖 (trehalose) 或蔗糖 (sucrose) 取代葡萄

台灣櫻花鉤吻鮭族群種內基因多樣性之研究

糖 (glucose) 可否得到較好的結果，則需進一步實驗加以釐清。

第四章 結論與建議

我們建議用以下的方法，來凍結保存虹鱒之原始生殖細胞：（1）以30和40dpf胚之GR為材料，（2）以1.8M（約10%）之EG為抗凍劑，（3）凍結完整之生殖隆起，而非分散之原始生殖細胞，（4）平衡時間在30分鐘以內，（5）以每分鐘降溫1°C，從4°C冷卻至-80°C，最後（6）保存在液態氮中。

在此研究中，我們建立了凍結保存虹鱒PGCs解凍後有高存活率的技術，根據我們的初步實驗發現此開發於凍結保存虹鱒原始生殖細胞的技術也可以應用於凍結保存台灣陸封型鮭魚（櫻花鉤吻鮭）的PGCs（圖7,8）。此技術的確立使得建立「魚類-PGC銀行」的夢想變得可能，它不只可用於保存瀕危物種的遺傳資源，更可保全野生魚群遺傳基因的多樣性（Kobayashi et al., 2003）。而凍結保存台灣陸封型鮭魚（櫻花鉤吻鮭）的PGCs應該會是易地（*ex situ*）保育此物種一個極重要和有價值的方法！

謝 言

我們感謝內政部營建署雪霸國家公園在經濟上和材料上的鼎力支持，尤其是林永發處長、廖林彥君等不記其數的雪霸國家公園同仁之幫忙。我們也感謝日本國東京海洋大學吉崎悟朗副教授，小林輝正博士班研究生的友情教導，及大泉實驗站同仁的悉心照料。東京吳輔佑夫婦的借宿也在此一併致謝，沒有他們的協助，此研究無法順利完成。

參考書目

- 邱如玉、廖林彥、郭金泉、2003。育種及保育瀕危魚類的新技術--細胞媒介基因轉殖。養魚世界月刊。第九期、35-38 頁。
- 邱如玉、廖林彥、林永發、郭金泉編譯、2004。移植分割球細胞以製造「生殖品系嵌合體」虹鱒。中國水產。第 614 期、49-52 頁。
- 邱如玉、廖林彥、林永發、郭金泉編譯、2004。鮭科魚類之基因轉殖。中國水產。第 615 期、43-52 頁。
- 邱如玉、廖林彥、郭金泉、林永發、2004。原始生殖細胞：魚類生物工程的嶄新工具。2004 年魚類學年會暨學術研討會論文集。第 36 頁。
- 邱如玉、廖林彥、林永發、郭金泉編譯、2005。原始生殖細胞：魚類生物工程的嶄新工具。科學發展月刊。印刷中。
- 高玉瑄、1993。牡蠣胚及豐年蝦無節幼蟲凍結保存之初步研究。國立海洋大學水產養殖學系碩士論文。1-55 頁。
- 陳銓汶、2000。水產無脊椎動物牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 與九孔 (*Haliotis diversicolor*) 精液之凍結保存。國立海洋大學水產養殖學系碩士論文。1-60 頁。
- 賀曉明、1996。凍結保存斑節蝦 (*Penaeus japonicus*) 胚、無節幼蟲及眼幼蟲之初步研究。國立海洋大學水產養殖學系碩士論文。1-56 頁。
- 趙乃賢、梁溫欣、蔡惠萍、廖一久、1994。魚類精液低溫與冷凍保存研究之現況與展望。生物技術在水產養殖上應用研討會論文集。94-117 頁。
- Araki K, Shinma H, Nagoya H, Nakayama I, Onozato H. 1995. Androgenetic diploids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

- produced by fused sperm. *Can J Fish Aquat Sci* 52: 892-896.
- Babiak I, Dobosz S, Goryczko K, Kuzminski H, Brzuzan P, Ciesielski S. 2002. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factor. *Theriogenology* 57:1229-1249.
- Bercsényi M, Magyary I, Urbányi B, Orbán L, Horváth L. 1998. Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. *Genome* 41:573-579.
- Calvi SL, Maisse G. 1998. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres : influence of embryos stage on postthaw survival rate. *Cryobiology* 36:255-262.
- Calvi SL, Maisse G. 1999. Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio*) blastomeres. *Aquat Living Resour* 12:71-74.
- Chao NH, Liao IC. 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. In: Lee CS, Donaldson EM, editors. *Reproductive biotechnology in finfish aquaculture*. Amsterdam: Elsevier Science. p 161-189.
- Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, Joo JY, Chang SS, Chung KS. 2002. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Hum Reprod* 17:2146-2151.
- Chiu JY, Gwo JC, Kobayashi T, Yoshizaki G. 2004. The proposed conservation of Taiwan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) plan using cell transplantation technique. The nineteenth joint annual conference of biomesical sciences. p 204.
- Chiu JY, Kobayashi T, Yoshizaki G, Gwo JC. 2004. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

- primordial germ cells. Aquaculture Europe 2004: Biotechnologies for quality. p 231-232.
- Emiliani S, Bergh MVD, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. 2000. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Hum Reprod 15:905-910.
- Erickson CA, Trinkaus JP. 1976. Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading. Exp Cell Res 99: 375-384.
- Gwo JC, Ohta H, Okuzawa K, Wu HC, Lin PW. 1999. Cryopreservation of fish sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). Theriogenology 51: 569-582.
- Gwo JC. 2000a. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch TR, Mazik PM, editors. Advances in World Aquaculture. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. Vol 7 p 138-160.
- Gwo, JC. 2000b. Cryopreservation of eggs and embryos from aquatic organisms. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch TR, Mazik PM, editors. Advances in World Aquaculture. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. Vol 7 p 211-229.
- Hagedorn M, Hsu E, Pilatus U, Wildt DE, Rail W, Blackbund SJ. 1996. Magnetic resonance microscopy reveals a permeability barrier for cryoprotectants in dechorionated zebrafish embryos. Cryobiology 33,667.
- Hagedorn M, Hsu E, Kleinhans FW, Wildt DE. 1997. New approaches for studying the permeability of fish embryos: Toward

- successful cryopreservation. *Cryobiology* 34:335-347.
- Harvey B. 1983. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to -196°C . *Cryobiology* 20:440-447.
- Kobayashi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2003. Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiol Biochem* 23:479-480.
- Kobayashi T, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Takeuchi T. 2004. Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Mol Reprod Dev* 67:91-100.
- Kusuda S, Teranishi T, Koide N. 2002. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. *Cryobiology* 45:60-67.
- Kusuda S, Teranishi T, Koide N, Nagai T, Arai K, Yamaha E. 2004. Pluripotency of cryopreserved blastomeres of the goldfish. *J Exp Zool* 301:131-138.
- Leung LK. 1991. Principles of biological cryopreservation. In: Jamieson BG, editor. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge. p 231-244.
- Leung LK, Jamieson BG. 1991. Live preservation of fish gamete 23
In: Jamieson BG, editor. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge. p 245-269.
- Mazur P. 1970. The freezing of biological systems. *Cryobiology* 168:939-949.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and

- implications. *Am J Physiol* 247:125-142.
- Nagoya H, Okamoto H, Nakayama I, Araki K, Onozato H. 1996. Production of androgenetic diploids in amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*). *Fish Sci* 62:380-383.
- Nilsson E, Cloud JG. 1993. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres. *Aquat Living Resour* 6: 77-80.
- Palasz AT, Mapletoft RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnol Adv* 14:127-149.
- Schiewe MC, Hollifield VM, Kasbohm LA, Schmidt PM. 1995. Embryo importation and cryobanking strategies for laboratory animals and wildlife species. *Theriogenology* 43:97-104.
- Strüssmann CA, Nakatsugawa H, Takashima F, Hasobe M, Suzuki T, Takai R. 1999. Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. *Cryobiology* 39: 252-261.
- Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2001. Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol Reprod Develop* 59:380-389.
- Takeuchi Y, Yoshizaki G, Kobayashi T, Takeuchi T. 2002. Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter. *Biol Reprod* 67:1087-1092.
- Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2003. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol Reprod* 69:1142-1149.

- Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2004. Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430: 629-630.
- Thorgaard GH, Cloud J.G. 1993. Reconstitution of genetic strains of salmonids using biotechnical approaches, In: Thorgaard, G.H. and J.G. Cloud editors. *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*. Plenum Press, New York. p 189-196.
- Trinkaas J P. 1973. Surface activity and locomotion of *Fundulus* deep cells during blastula and gastrula stages. *Dev Biol* 30: 68-103.
- Wakamatsu Y, Ju B, Pristyaznhyuk I, Niwa K, Ladygina T, Kinoshita M, Araki K, Ozato K. 2001. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1071-1076.
- Wylie CC, Heasman J. 1993. Migration, proliferation and potency of primordial germ cells. *Semin Dev Biol* 4:161-170.
- Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H, Takeuchi T. 2000a. Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol Reprod Dev* 55: 364-371.
- Yoshizaki G, Takeuchi Y, Sakatani S, Takeuchi T. 2000b. Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout *vasa*-like gene promoter. *Int J Dev Biol* 44:323-326.
- Yoshizaki G, Takeuchi Y, Kobayashi T, Ihara S, Takeuchi T. 2002. Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. *Fish Physiol Biochem* 26:3-12.

Yoshizaki G, Takeuchi Y, Kobayashi T, Takeuchi T. 2003.
Primordial germ cell: a novel tool for fish bioengineering.
Fish Physiol Biochem 28:453-457.

表 1. 將生殖隆起置於 Bicell 中，再放入 -80°C 冷凍櫃中的過渡時間所代表的過渡溫度。

過渡時間 (mins)	30	60	90	120	150
過渡溫度 ($^{\circ}\text{C}$)	-30	-60	-80	-80	-80

表 2. 不同情況下，虹鱒原始生殖細胞凍結-解凍後之存活率。

Groups	Average survival rate (%)	STDEV
Control	93.0	2.5
Cryo-intact GR (Bicell-90mins)	64.1	11.3
Cryo-dissociated PGCs (Bicell-90mins)	19.0	8.5
Cryo-intact GR (Freezer-90mins)	8.1	6.9
Cryo-intact GR (Bicell-30mins)	12.0	8.1
Cryo-intact GR (Bicell-60mins)	37.7	26.3
Cryo-intact GR (Bicell-120mins)	22.9	11.5
Cryo-intact GR (Bicell-150mins)	13.9	4.0

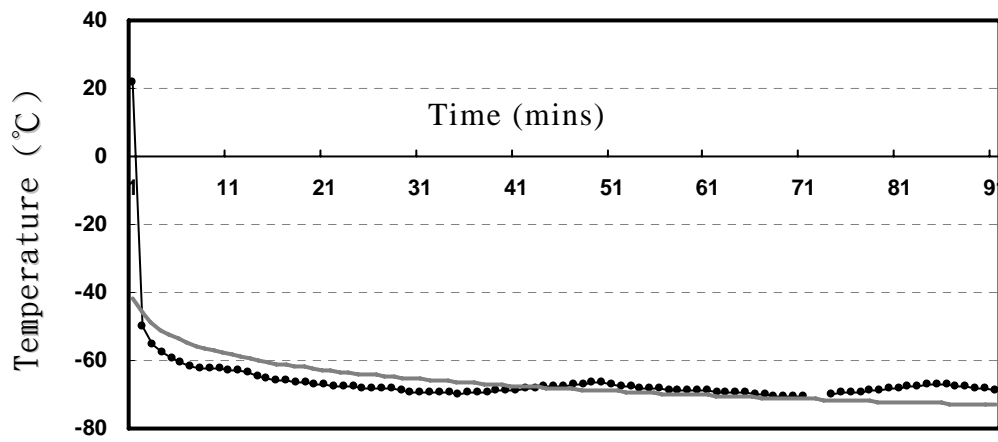


圖 1. -80°C 冷凍櫃之降溫曲線。

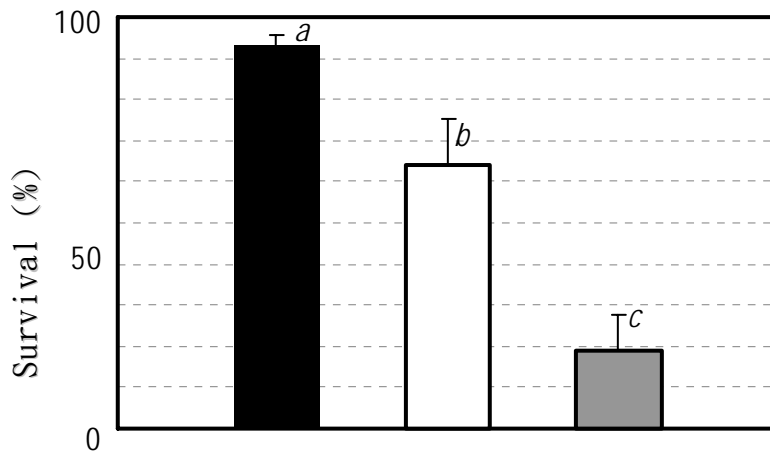


圖 2. 完整的 GR 的和分散的 PGC 其凍結-解凍後存活率的比較。黑色代表控制組，白色代表凍結保存完整的 GR，灰色代表凍結保存分散的 PGC。

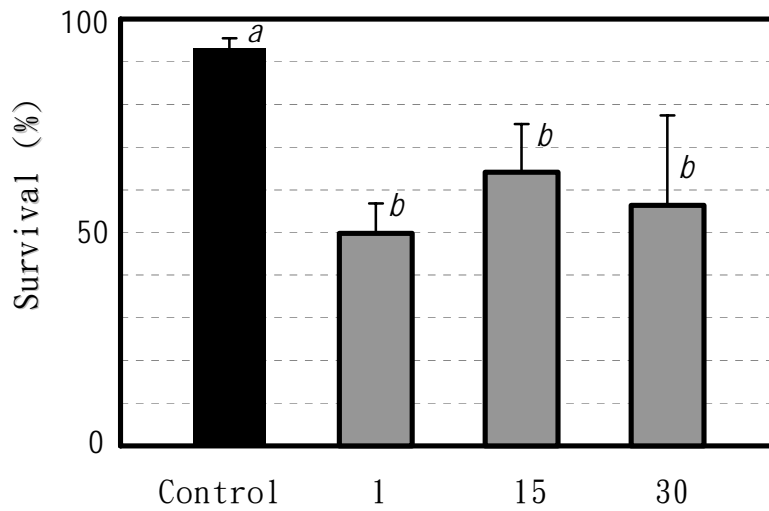


圖 3. 不同的平衡時間其凍結-解凍後存活率的比較。橫軸數字的單位為分鐘。延長平衡時間從 1 到 15 和 30 分鐘，三者的存活率並沒有顯著地差異。

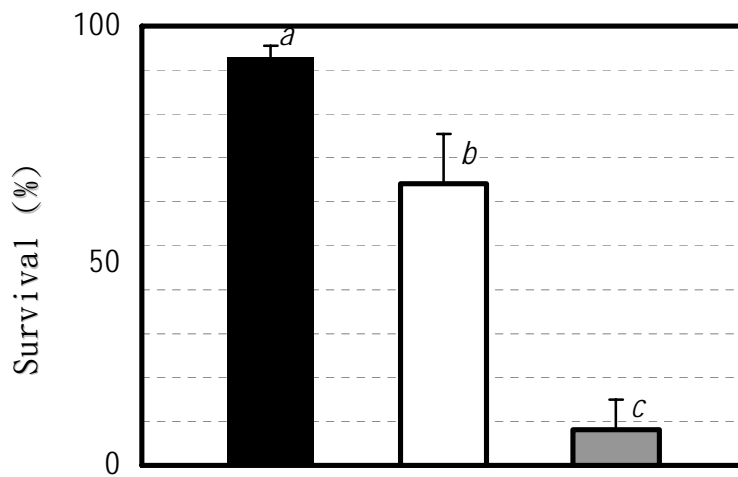


圖 4. 不同的凍結方法其凍結-解凍後存活率的比較。黑色代表控制組，白色代表有控制冷卻速率之 Bicell，灰色代表沒有控制冷卻速率之 freezer。

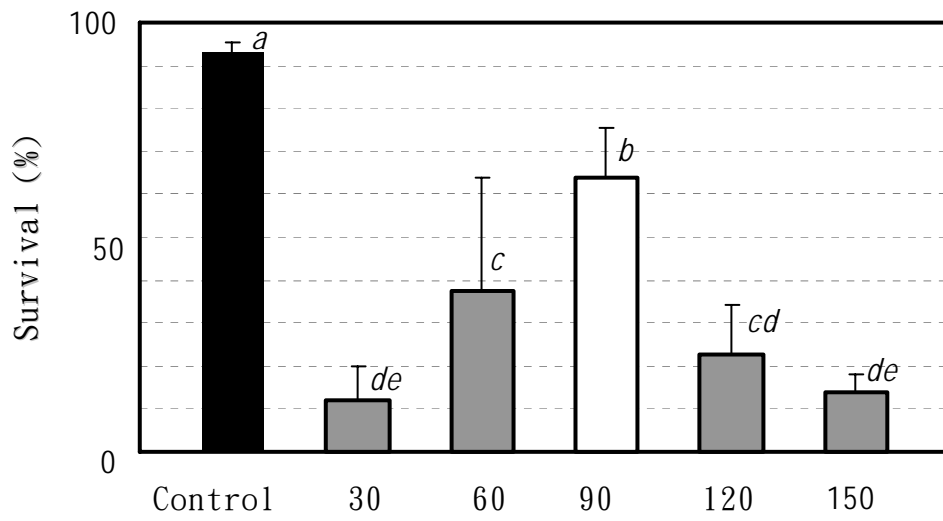


圖 5. 不同的過渡溫度與時間，其凍結-解凍後存活率的比較。橫軸數字的單位為分鐘。白色代表在 Bicell 中放置 90 分鐘，其過渡溫度為 -80°C ，擁有最高的存活率。

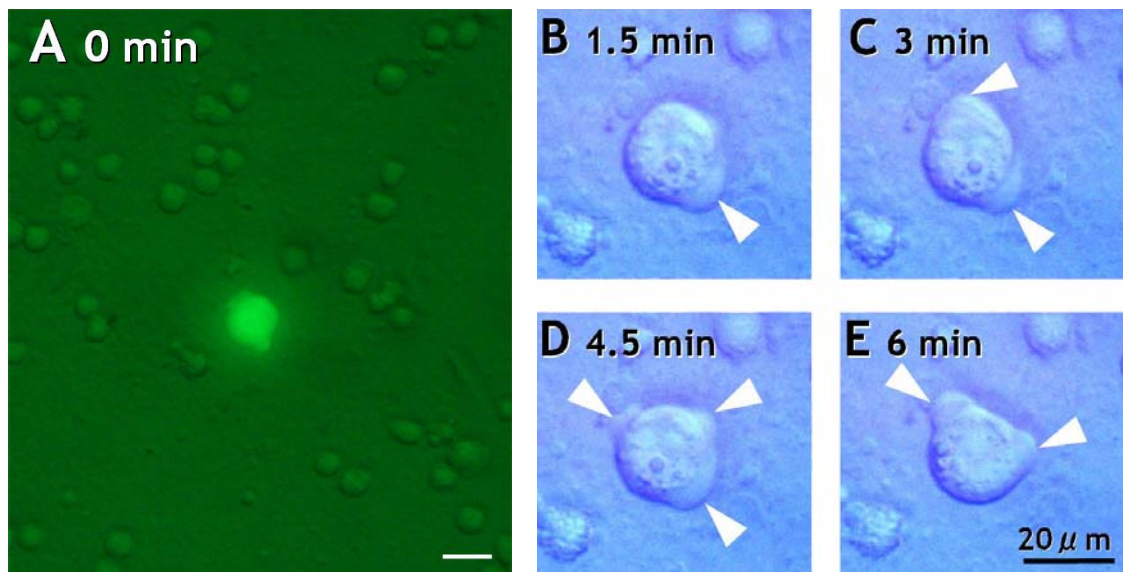


圖 6. 虹鱒凍結-解凍後之原始生殖細胞在不同時間下的圖片。圖 A 是在倒立式螢光顯微鏡下所觀察到生殖隆起的細胞懸浮液。原始生殖細胞帶有強烈的綠色螢光。圖 B-E 是倒立式顯微鏡下圖 A 原始生殖細胞之放大圖。顯示原始生殖細胞以它延伸的偽足（箭頭所示）主動運動的能力。比例尺代表 $20\mu\text{m}$ 。

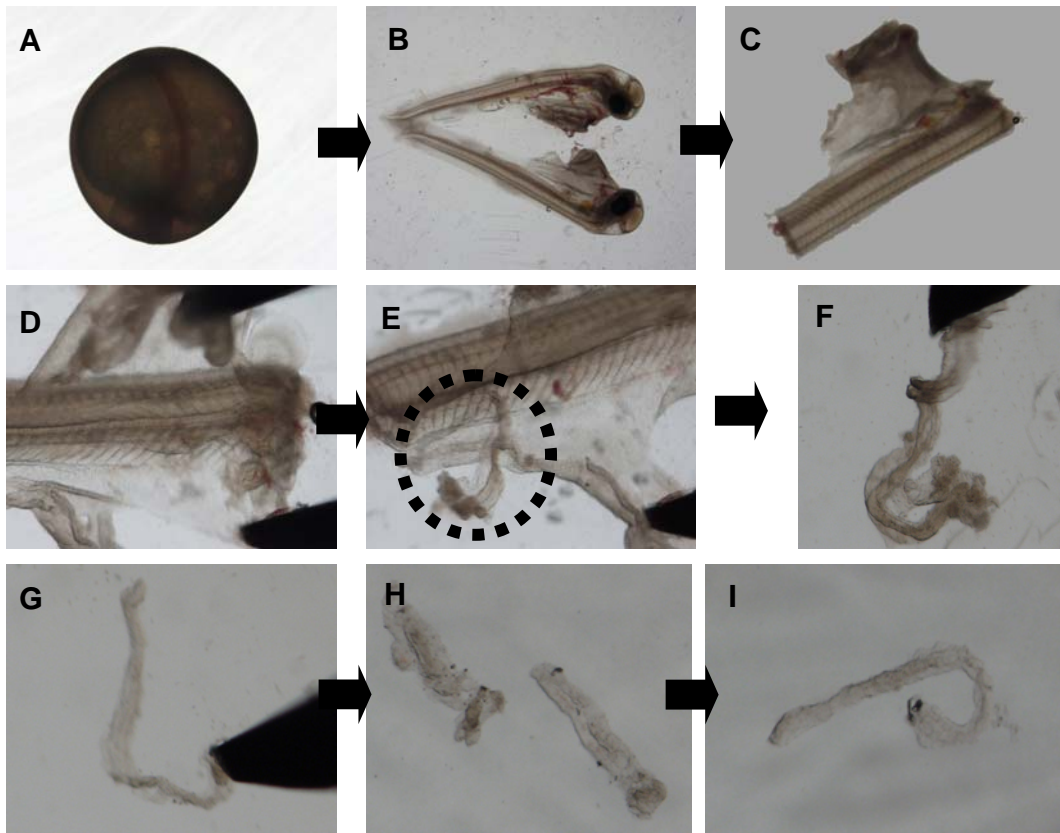


圖 7. 台灣櫻花鉤吻鮭之生殖隆起切除的步驟。A 為水溫 10°C 之下，大約授精後 36 天的胚（約 5mm 左右）。B 為除去卵膜後，經麻醉再除去卵黃的胚（約 0.8-1.3mm 左右）。C 為去頭、去尾後，腹腔背部黏有生殖隆起的軀幹部。D 為 C 圖腹腔之撐開圖。E 圖中圓形虛線所示為取自黏在腹腔背部中央之生殖隆起和中腎管。F 為含有中腎管之生殖隆起。G、H、I 為除去中腎管後之生殖隆起。

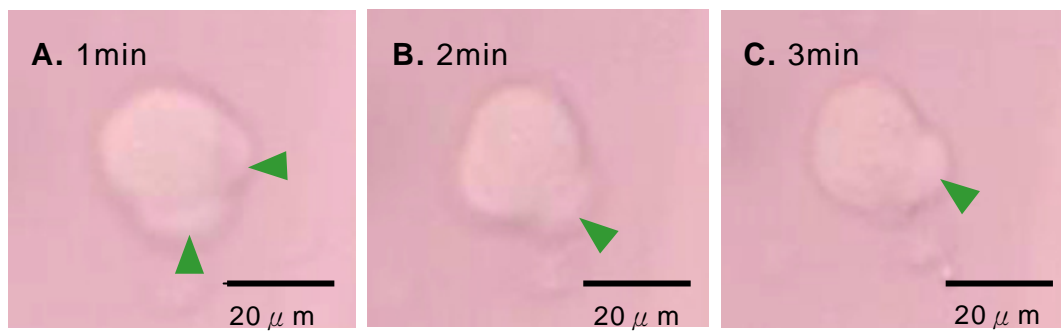


圖 8. 台灣櫻花鉤吻鮭之原始生殖細胞在不同時間下的圖片。在一般光學顯微鏡下所觀察到生殖隆起的細胞懸浮液，顯示原始生殖細胞以它延伸的偽足(箭頭所示)主動運動的能力。比例尺代表 $20\mu\text{m}$ 。