

牙鲆卵原细胞鉴定、分离及纯化的初步研究

孙朝徽 于清海 周勤 宋立民 姜秀凤 王青林 任建功 王玉芬* 任玉芹*

(中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 秦皇岛 066100)

摘要 为获得高比例和高数量的卵原细胞, 采用酶组合消化和Percoll梯度离心法开展了不同月龄牙鲆卵原细胞分离纯化的研究。通过光学观察及Vasa蛋白在生殖细胞的定位对卵原细胞进行了鉴定区分。结果表明, 所获卵巢单细胞悬液中, 6月龄每毫克卵巢组织获得的卵原细胞量为 $(9.86\pm 1.02)\times 10^4$ 个, 显著高于18月龄和30月龄($P<0.05$)。Percoll梯度离心后, 卵原细胞主要分布于L-15与20% Percoll梯度液间、20%~35% Percoll梯度液间, 其占比高达75%以上, 显著高于纯化前卵原细胞占比($P<0.05$); 且细胞存活率高达84%以上, 与纯化前细胞存活率无显著性差异($P>0.05$)。除18月龄外, 6月龄和30月龄每毫克卵巢组织获得的卵原细胞量纯化前后均无显著性差异($P>0.05$)。该文通过酶组合消化和Percoll梯度离心的方法对最适月龄——6月龄牙鲆卵原细胞进行分离纯化, 最终可获得高比例、高数量和高活性的卵原细胞, 为进一步开展牙鲆生殖细胞移植、基因修饰等研究提供了必备的细胞来源。

关键词 牙鲆; 卵原细胞; 鉴定; 分离; 纯化; *vasa*

Identification, Separation and Enrichment of Oogonia from Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Sun Zhaohui, Yu Qin Hai, Zhou Qin, Song Limin, Jiang Xiufeng, Wang Qinglin, Ren Jianguo, Wang Yufen*, Ren Yuqin*

(Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao, People's Republic of China, Qinghuangdao 066100, China)

Abstract In order to obtain high proportion and plenty of oogonia from Japanese flounder, the differences of isolation of oogonia from the fish of different months of age were compared and analysed by enzyme combination digestion and Percoll gradient centrifugation in this study. In addition, the oogonia were identified by optical observation and immunolocalization of Vasa protein in the germ cells. The results showed that $(9.86\pm 1.02)\times 10^4$ oogonia were obtained from 1 mg of 6-month-old ovaries, which were significantly higher than those of 18 months and 30 months ($P<0.05$). After Percoll gradient centrifugation, the oogonia were mainly distributed in L-15-20% Percoll gradient fluid and 20%-35% Percoll gradient fluid. The proportions of the oogonia of the two cell zones were more than 75%, which were significantly higher than those of the beginning ($P<0.05$). Moreover, the cell survival rates were more than 84%, roughly matched those of the pre-purified cells ($P>0.05$). There were no significantly differences between the number of oogonia before and after purification from 1 mg of 6- or 30-month-old ovaries except for 18-month-old ($P>0.05$). High proportion and abundant oogonia can be obtained from 6-month-

收稿日期: 2018-04-09 接受日期: 2018-06-07

中国水产科学研究院基本科研业务费(批准号: 2016PT06)、国家水产种质资源共享服务平台运行服务项目(批准号: 2018DKA30470)、现代农业产业技术体系专项经费(批准号: CARS-47)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0335-4260826, E-mail: wangyf-8000@163.com; Tel: 0335-4260822, E-mail: renyuqin123@sina.com

Received: April 9, 2018 Accepted: June 7, 2018

This work was supported by Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (Grant No.2016PT06), the National Infrastructure of Fishery Gremplasm Resoure (Grant No.2018DKA30470) and China Agriculture Research System (Grant No.CARS-47)

*Corresponding authors. Tel: +86-335-4260826, E-mail: wangyf-8000@163.com; Tel: +86-335-4260822, E-mail: renyuqin123@sina.com

网络出版时间: 2018-08-24 10:51:47 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180824.1051.008.html>

old ovary through enzyme combination digestion and Percoll gradient centrifugation, so as to provide the necessary source of cells for further develop germ cell transplantation, gene modification research.

Keywords *Paralichthys olivaceus*; oogonia; identification; separation; enrichment; vasa

在大多数物种中, 原始生殖细胞、精原细胞和卵原细胞是具有自我更新且产生功能性配子的干细胞^[1-4]。在具有大量产卵生殖策略的无脊椎动物和脊椎动物中, 卵原细胞是存在于雌性整个生命周期的卵巢中的祖细胞, 执行着干细胞的功能, 在动物的整个育龄期确保持续地产生卵母细胞, 最终形成卵子。相对于卵巢中各类型细胞, 卵原细胞数量较少, 并且随着生殖周期而发生变化^[5]。

近年来, 生殖细胞移植技术(germ cell transplantation, GCT)已在水产养殖和濒危物种保护方面得到广泛的应用^[6-10]。一般地, 多采用原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)^[11]、精原细胞(spermatogonial, SG)^[12]和卵原细胞(oogonia, OG)^[8,13-14]进行生殖细胞移植。其中, 斑马鱼和银汉鱼的卵原细胞移植后均产生了供体的后代^[13-14]。然而, 牙鲆的卵原细胞移植尚未见报道。而如何获得高比例和高数量的卵原细胞则是牙鲆卵原细胞移植成功最为关键的一个环节。另外, 卵原细胞是牙鲆雌鱼成体干细胞中唯一与下一代遗传背景密切相关的细胞, 其日益成为研究基因的学者关注的对象。因此, 需要可靠的方法来鉴定和分离纯化牙鲆卵原细胞。

在鱼类中, 由于缺乏卵原细胞特异标记, 所以需要较为可靠的方法来鉴别以便获取大量的卵原细胞来开展其他研究。目前, 鉴定鱼类的生殖细胞特异基因日益增多, 诸如*oct4*、*nanos*、*vasa*等^[14-19]。其中, *vasa*基因是DEAD-box家族成员, 用于编码ATP依赖的一种RNA解旋酶。在大部分物种中, 其仅在生殖细胞体系表达。所以, *vasa*作为特异标记被广泛地应用于原始生殖细胞和配子发育的研究。吴晓萌等^[20]于2013年完成了牙鲆*vasa*基因克隆及表达分析, 为本文通过Vasa蛋白在牙鲆生殖细胞定位鉴定和区分

卵原细胞提供了数据支撑。而生殖干细胞分离和纯化的方法主要有组合酶消化法结合免疫磁珠分选法^[21]、流式细胞分选法^[22-23]、差速贴壁法^[17,24-25]以及Percoll梯度离心法^[26-27]等。本文拟采用消化酶组合和Percoll梯度离心分离纯化牙鲆不同月龄卵原细胞, 并通过光学观察和Vasa蛋白在生殖细胞的定位鉴定区分卵原细胞以便比较牙鲆不同月龄卵原细胞的差异, 以期获得较高比例和高数量的卵原细胞, 为进一步开展牙鲆生殖细胞移植、基因修饰等研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

选取3组实验鱼, 即6月龄10尾、18月龄和30月龄牙鲆各4尾。测量全长、体质量后断脊柱放血, 待血流干后, 采集卵巢组织称重, 并用PBS(pH7.2)冲洗1遍后剪取0.5 cm³左右性腺组织, 用4%多聚甲醛固定, 保存备用。统计各月龄牙鲆生长情况(表1)。

1.2 卵原细胞分离方法

每组实验鱼做4个重复。每个重复称取300 mg卵巢组织放入含有1 mL PBS的凹面皿中, 剥离卵巢薄膜、剪碎组织。将剪碎的组织块转移至15 mL离心管中, 300 ×g离心5 min, 去除上清液, 加入3 mL酶消化工作液, 每隔半小时吹打1次。酶消化工作液包括: 0.25%胰蛋白酶(Worthington公司, LS004454)、0.055% DNA酶I(Sigma公司, 11284932001)、5%胎牛血清(Gibco公司, 16000-044), 溶剂为L-15培养基。25 °C下消化3 h后, 用孔径为100 μm、40 μm的细胞筛网依次过滤, 300 ×g离心5 min, 用L-15培养基清洗2次, 将细胞悬浮于1.5 mL L-15培养基(含有5%胎牛血清)中待用, 并用锥虫蓝染色, 计算活细胞数量。

表1 各月龄牙鲆生长情况

Table 1 The growth of Japanese flounder among different age in months

各月龄 Months of age	全长(cm) Total length (cm)	体质量(g) Body weight (g)	性腺指数 GSI
6	19.38±2.74	81.19±17.69	0.16±0.04
18	42.83±4.75	533.57±197.39	0.68±0.04
30	49.33±2.89	614.35±64.25	1.17±0.32

1.3 Percoll密度梯度离心纯化

每组实验鱼做3个重复。参考张晓丽等^[28]对新生小鼠精原干细胞的纯化方法, 首先按照1.5 mol/L NaCl:Percoll=1:9的比例将Percoll原液配制成生理渗透压, 再用生理盐水将已达到生理渗透压的Percoll液配制成20%、35%、50%浓度梯度各1.5 mL, 制备成Percoll梯度液。最终将待纯化的1.5 mL细胞悬液置于梯度最上层, 200 ×g离心30 min后, 将各级细胞带小心移出, 清洗2次, 浓缩至不同的容积, 吹打均匀, 取10 μL锥虫蓝染色, 计算活细胞量, 显微拍照。将余下的细胞样品用4%多聚甲醛溶液固定细胞24 h后, 用PBS清洗3次, 最终琼脂糖包埋备用。

1.4 组织学及免疫荧光分析

对琼脂糖包埋的细胞样品和性腺组织样进行常规脱水、石蜡包埋、连续切片, 切片厚度5 μm。对组织切片进行苏木素-伊红(H-E)染色, 中性树脂胶封片, 用3D Histech数字切片扫描分析系统(型号: Panoramic MIDI)进行扫描观察。

将牙鲈Vasa蛋白序列(GenBank序列号: XP_0199-57862.1) 1~204 aa作为抗原序列, 构建质粒, 表达纯化蛋白制备抗原用于免疫兔子, 最终制备出牙鲈Vasa兔多克隆抗体(杭州华安生物技术有限公司制备αVasa)。对组织和细胞的石蜡切片进行脱蜡复水, 抗原修复, 3%过氧化氢溶液室温孵育25 min, 阻断内源性过氧化物酶, BSA封闭, 加入一抗αVasa(1:500) 4 °C孵育过夜, 第2天洗涤甩干切片加入羊抗兔荧光二抗(1:300, 阳性红光), DAPI染液(谷歌生物, G1012, 1:500)复染细胞核, 最后脱水封片, 全组织切片和细胞切片扫描观察。

1.5 统计分析

根据卵原细胞形态学特征和Vasa蛋白在生殖细胞中的定位, 统计纯化前后卵原细胞量及卵原细胞占比。采用SPSS 22.0软件对不同月龄牙鲈分离获得的活细胞率、卵原细胞量、卵原细胞占比分别进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异; 对纯化前后卵原细胞量及卵原细胞占比进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

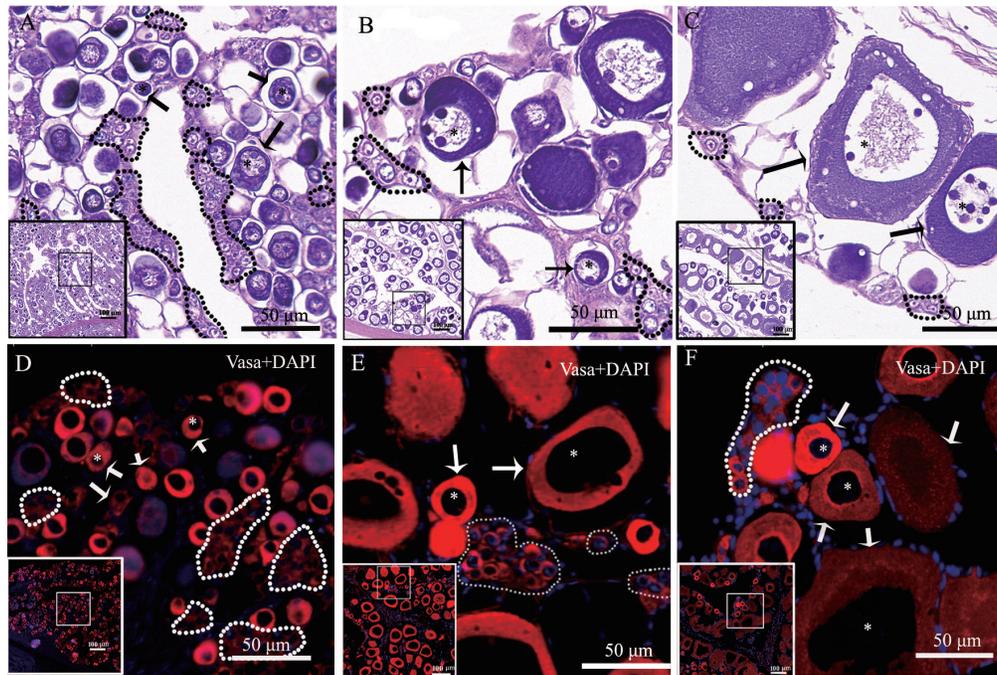
2.1 卵原细胞鉴定

原始生殖细胞(primitive germ cells, PGCs)细胞直径范围为10~12 μm, 细胞核直径范围为6~10 μm,

有1~2个致密核仁, 并且具有特征性的亚细胞结构——生殖质颗粒^[3]。而牙鲈卵原细胞与原始生殖细胞形态学上十分相似, 呈圆形或椭圆形, 核质比较高, 是牙鲈卵巢组织中最小的生殖细胞, 其一般位于卵巢上皮基底膜沿着产卵板成簇状分布, 每一簇约2~10个卵原细胞(图1)。vasa基因是DEAD-box家族成员之一, 是生殖系细胞特异基因。在牙鲈雌性卵巢中, 牙鲈vasa基因只在卵原细胞和卵母细胞的细胞质中表达, 不在其他体系细胞中表达(图1D~图1F)。故通过Vasa蛋白在细胞中的免疫定位, 将生殖细胞和其他体系细胞区别; 另外, 卵母细胞直径较卵原细胞直径大且有明显的胚泡特征, 很容易与卵原细胞区分开来(图1和图2)。较小的αVasa阳性生殖细胞中, 最小生殖细胞[直径范围为6.3~9.7 μm, 平均值为(8.4±0.8) μm; 细胞核直径范围为5.0~9.5 μm, 平均值为(7.3±1.1) μm]的细胞质非常少并带有较强的荧光信号(图2A), 被鉴定为卵原细胞; 较大一些的生殖细胞由于细胞质扩大, 归属为正在形成的卵母细胞(图2B); 而细胞直径范围为12~15 μm的I时相早期卵母细胞已有较为明显的胚泡结构(图2C)。所以, 根据生殖细胞形态大小和结构特征, 采用普通光学观察和Vasa蛋白在生殖细胞中的免疫荧光定位分析很容易鉴定区分出牙鲈卵原细胞。对6月龄、18月龄和30月龄的组织学观察和免疫荧光分析发现, 不同月龄的牙鲈卵巢中卵原细胞分布存在差异。其中, 6月龄牙鲈卵原细胞分布最多, 其主要以卵原细胞、I时相卵母细胞为主。

2.2 卵原细胞分离效果

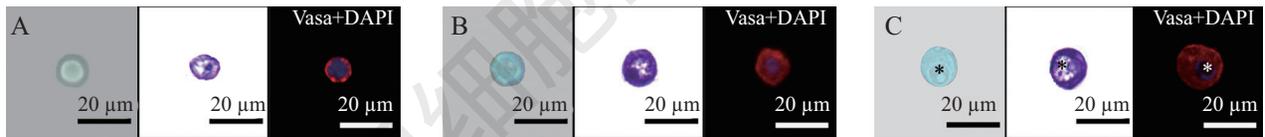
经过组合酶消化处理、过滤和清洗, 最终得到不同月龄牙鲈卵巢单细胞悬液。通过分析比较各月龄细胞存活率发现: 各月龄细胞存活率均高达92%以上, 且各月龄之间不存在显著性差异($P > 0.05$)。通过普通光学观察和Vasa蛋白在生殖细胞中的免疫荧光定位(图3), 统计分析各月龄细胞悬液中卵原细胞(表2)发现: 各月龄卵原细胞占比均低于54%, 且各月龄之间不存在显著性差异($P > 0.05$)。各月龄平均每毫克卵巢组织分离获得的卵原细胞量存在显著性差异($P < 0.05$); 其中, 6月龄卵原细胞量为(9.86±1.02)×10⁴个/mg, 显著高于18月龄和30月龄; 而18月龄与30月龄卵原细胞量无显著性差异($P > 0.05$)。各月龄之间的平均性腺指数存在显著性差异($P < 0.05$), 6月龄平均性腺指数为0.16±0.04, 显



A~C: 分别为6月龄、18月龄、30月龄的卵巢组织切片图; D~F: 分别为6月龄、18月龄、30月龄Vasa蛋白在卵巢中的免疫荧光定位。箭头表示初级卵母细胞; 星号表示卵母细胞胚泡; 虚线圈起来的区域为卵原细胞或卵原细胞簇。
A~C: the ovaries histology of 6-month-old fish, 18-month-old fish and 30-month-old fish separately; D~F: immunolocalization of Vasa protein in the ovaries of 6-month-old fish, 18-month-old fish and 30-month-old fish. Arrow: oocytes; asterisk: germinal vesicles; the area enclosed by the dotted line: oogonia or the cluster of oogonia.

图1 牙鲆卵巢组织切片及Vasa蛋白在卵巢的免疫荧光定位

Fig.1 Immunolocalization of Vasa protein and histology in the ovaries of Japanese flounder

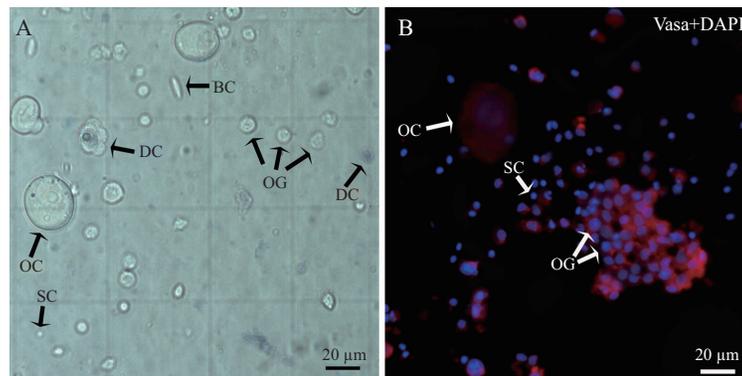


A~C: 卵原细胞、正在形成的卵母细胞、I时相早期卵母细胞特征观察; 星号表示胚泡。

A~C: observation of the characteristics of oogonia, forming oocytes and type I early oocytes separately; asterisk: germinal vesicles.

图2 各级较小雌性生殖细胞特征观察

Fig.2 Observation of the characteristics of female small germ cells



A: 细胞普通光学观察; B: Vasa蛋白在雌性生殖细胞中的免疫荧光定位。BC: 血细胞; DC: 死细胞; OC: 卵母细胞; OG: 卵原细胞; SC: 支持细胞。
A: the ordinary photology observation of cells; B: the immunolocalization of Vasa in the germ cells of females. BC: blood cells; DC: dead cells; OC: oocytes; OG: oogonia; SC: sertoli cell.

图3 细胞普通光学观察及Vasa蛋白在雌性生殖细胞中的免疫荧光定位

Fig.3 Ordinary photology observation and immunolocalization of Vasa protein in the germ cells of females

表2 不同月龄牙鲆卵原细胞分离效果

Table 2 The result of oogonia separation among different months of age

月龄 Months of age	细胞存活率(%) Cell survival rate (%)	卵原细胞量($\times 10^4$)/mg卵巢组织 Oogonia counts ($\times 10^4$)/mg ovarian tissue	卵原细胞占比(%) Oogonia proportion (%)	性腺指数 GSI
6	92.8 \pm 1.5 ^a	9.86 \pm 1.02 ^a	43.67 \pm 7.64 ^a	0.16 \pm 0.04 ^a
18	93.0 \pm 6.9 ^a	3.42 \pm 0.67 ^b	53.17 \pm 1.49 ^a	0.68 \pm 0.04 ^b
30	93.7 \pm 1.5 ^a	3.87 \pm 1.44 ^b	47.00 \pm 7.81 ^a	1.17 \pm 0.32 ^c

不同字母表示存在显著性差异($P < 0.05$), 相同字母表示无显著性差异($P > 0.05$); 下同。

Different lowercase letters indicate significant differences among the groups ($P < 0.05$), while the same letter indicates the absence of a significant difference ($P > 0.05$); the same below.

著低于其他两个月龄($P < 0.05$)。

2.3 卵原细胞纯化效果

通过Percoll密度梯度离心纯化后, 各月龄均获得4个细胞带, 从上向下依次为1、2、3、4四层, 将各层细胞带小心吸出, 清洗2次, 进行普通光学观察和细胞免疫荧光分析发现, 1、2细胞带主要为卵原细胞及少量的支持细胞和I时相早期卵母细胞(图4A、图4B和图4E、图4F)。3细胞带主要为卵母细胞(图4C和图4G), 4细胞带为血细胞及杂质(图4D和图4H)。通过对各月龄纯化前后细胞存活率分别进行比较发现, 各月龄纯化后细胞存活率较纯化前降低, 但与纯化前差异不显著($P > 0.05$)(表3)。通过对各月龄纯化前后卵原细胞占比分别进行比较发现, 各月龄的1、2细胞带卵原细胞占比均显著高于纯化前($P < 0.05$), 但1、2细胞带两者之间无显著性差异($P > 0.05$)(表3)。将1、2细胞带的细胞悬液混合后, 通过对各月龄纯化前后平均每毫克卵巢组织获得的卵原细胞量分别进行比较发现, 6月龄、30月龄纯化前后无显著性差异($P > 0.05$), 而18月龄纯化后显著低于纯化前($P < 0.05$)(表3)。

3 讨论

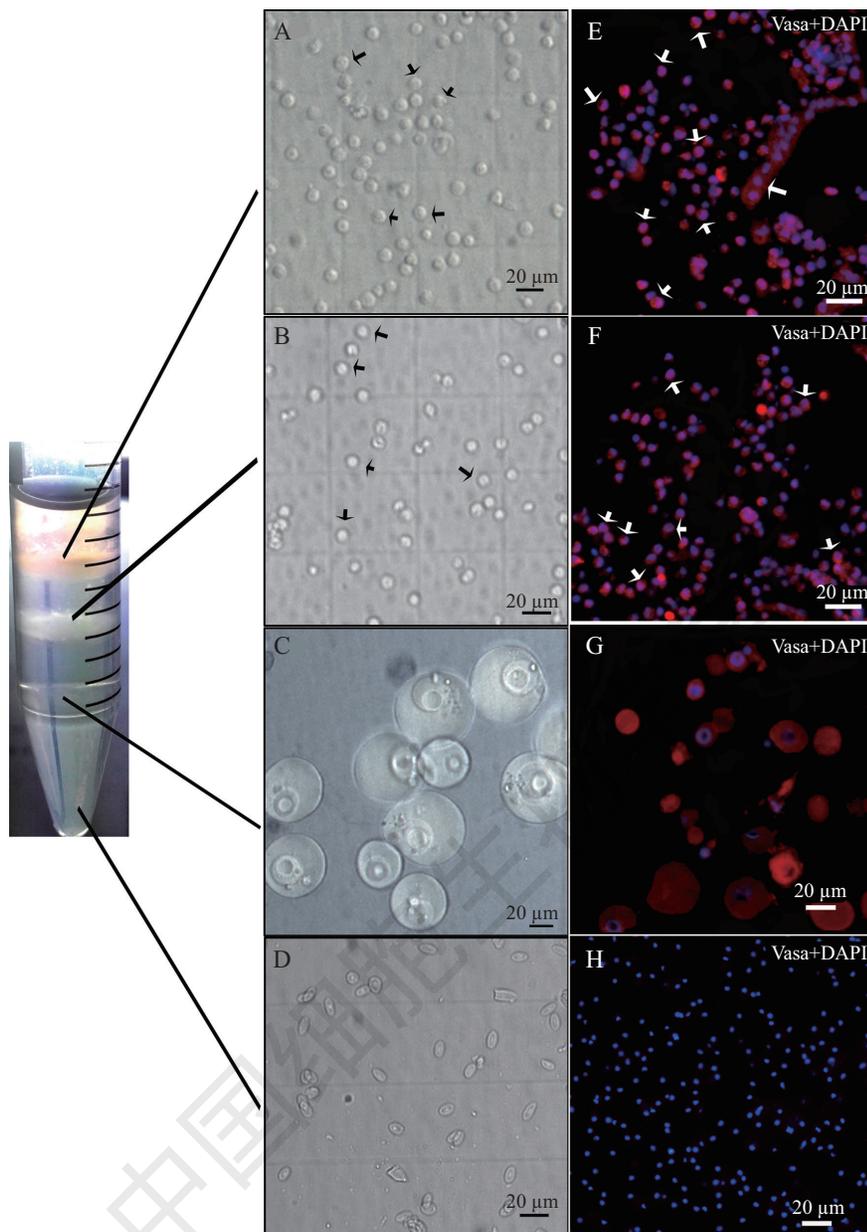
在具有大量产卵生殖策略的无脊椎动物和雌性脊椎动物中, 卵原细胞执行着干细胞的功能, 既要不断增殖维持自身的数量, 又要在动物的整个育龄期持续地分裂、分化确保卵子发生^[13]。鉴于卵原细胞的重要作用, 我们需探索一套高效的鉴定、分离和纯化牙鲆卵原细胞的方法, 这对于开展其生殖干细胞移植、基因功能等研究具有重要的意义。

目前, 鲆鲽鱼类生殖系细胞的特异基因有 $vasa$ 、 $oct4$ 、 $nanos$ 、 dnd 等。其中, 张全启团队^[20]已经于2013年完成了牙鲆 $vasa$ 基因克隆与表达分析。牙鲆

$vasa$ 基因仅在性腺生殖细胞中特异表达, 且在雌性生殖细胞(原始生殖细胞、卵原细胞和卵母细胞)中高表达。因此, 本文采用牙鲆 $Vasa$ 蛋白序列最终制备成 $Vasa$ 蛋白抗体, 通过免疫荧光的方法并结合普通光学观察能较为容易地鉴别出卵原细胞。

随着月龄的增加, 卵原细胞开始分化形成各级生殖细胞, 其绝对数目及所占的生殖细胞比例也将下降^[29]。所以, 选择合适的月龄制备牙鲆卵巢单细胞悬液尤为重要。以往文献中几乎没有详细地开展过针对不同月龄分离纯化生殖干细胞的差异方面研究^[24-25, 28-30], 仅Takeuchi等^[31]比较分析了不同月龄的鳊鱼精原干细胞分离纯化的差异。本文通过对不同月龄的组织学观察发现, 6月龄牙鲆卵巢发育处在I期向II期过渡阶段, 以卵原细胞和I时相卵母细胞为主, 卵母细胞卵径范围为12~41 μm (图1A和图1D); 18和30月龄牙鲆卵巢发育均处在II期, 18月龄牙鲆以II时相早期卵母细胞为主, 卵径范围为43~108 μm (图1B和图1E), 30月龄牙鲆以II时相中期卵母细胞为主, 卵径范围为84~200 μm (图1C和图1F)。所以, 理论上选择6月龄牙鲆制备牙鲆卵巢生殖细胞单细胞悬液可获得大量的卵原细胞, 优于18月龄和30月龄, 与本文最终得到的结果吻合。

分离获得高质量单细胞悬液另一个关键因素是酶消化。本文参照Takeuchi等^[31]酶消化法, 优化适合牙鲆的卵巢生殖细胞分离各项参数最终获得高质量的牙鲆卵巢生殖细胞单细胞悬液。比较分析不同月龄卵原细胞分离效果发现: 在制备单细胞悬液过程中, 细胞筛网滤掉了大部分卵径大于40 μm 的卵母细胞, 故导致三个月龄之间牙鲆卵原细胞占比无显著性差异; 然而, 6月龄平均每毫克卵巢组织获得的卵原细胞量远远大于18月龄和30月龄。由此, 可以进一步证明6月龄最为适合制备牙鲆卵巢生殖



A~D: 纯化后各层细胞带普通光学观察; E~G: Vasa蛋白在生殖细胞中的免疫荧光定位。箭头表示卵原细胞。

A~D: ordinary photology observation of each cell zone; E~G: immunolocalization of Vasa protein in germ cells. Arrows: oogonia.

图4 卵原细胞纯化结果

Fig.4 The results of the enrichment of oogonia

胞单细胞悬液。

目前, 生殖干细胞纯化的方法比较常用的有差异贴壁法、不连续Percoll密度梯度离心法等^[21-27]。本文采用的是不连续Percoll密度梯度离心法, 此方法方便、快捷, 不需要特定的实验仪器, 在常规实验室均可进行。本实验通过多次的预实验, 最终将Percoll密度设置成20%、35%、50%三个梯度。经过不连续Percoll密度梯度离心后, 卵原细胞主要集中在L-15~20%、20%~35%。而且经过多次不同月龄重

复实验, 细胞存活率纯化前后没显著性差异, 各月龄均获得了卵原细胞占比高达77%以上的单细胞悬液, 且纯化后6月龄和30月龄卵原细胞量与纯化前无显著性差异, 18月龄除外。18月龄纯化前后卵原细胞量出现差异的原因很可能因为在某次清洗细胞过程中丢失过多造成, 需要进一步的研究排除。通过本文的实验数据, 我们推出一套高效获取牙鲆卵原细胞的方法, 即以6月龄作为最适月龄, 通过组合酶消化和不连续percoll密度梯度离心来分离纯化牙鲆卵原细胞,

表3 各月龄细胞存活率、卵原细胞占比及卵原细胞量纯化前后比较

Table 3 Comparison of cell survival rates, oogonia proportion and oogonia counts before and after enrichment among different months of age

各月龄 Months of age	细胞悬液 Cell suspension	细胞存活率(%) Cell survival rate (%)	卵原细胞占比(%) Oogonia proportion (%)	卵原细胞量($\times 10^4$)/mg卵巢组织 Oogonia counts ($\times 10^4$)/mg ovarian tissue
6	Before enrichment	92.8 \pm 1.5 ^a	43.67 \pm 7.64 ^a	9.86 \pm 1.02 ^a
	1	91.0 \pm 3.3 ^a	77.67 \pm 3.79 ^b	7.74 \pm 1.02 ^a
	2	89.7 \pm 3.3 ^a	75.67 \pm 3.51 ^b	
18	Before enrichment	93.0 \pm 6.9 ^a	53.17 \pm 1.49 ^a	3.42 \pm 0.67 ^a
	1	91.4 \pm 2.8 ^a	86.97 \pm 6.88 ^b	1.91 \pm 0.53 ^b
	2	84.5 \pm 7.8 ^a	84.06 \pm 8.29 ^b	
30	Before enrichment	93.7 \pm 1.5 ^a	47.00 \pm 7.81 ^a	3.87 \pm 1.44 ^a
	1	91.9 \pm 3.1 ^a	82.00 \pm 3.00 ^b	2.29 \pm 0.70 ^a
	2	91.0 \pm 3.7 ^a	81.00 \pm 4.36 ^b	

并结合卵原细胞形态学特征和Vasa抗体在生殖细胞的定位,从而有效鉴别卵原细胞的阳性率。

参考文献 (References)

- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà, J. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *Gen Com Endocrinol* 2010; 165(3): 367-89.
- Schulz RW, de França LR, Lareyre JJ, Le Gac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, *et al.* Spermatogenesis in fish. *Gen Com Endocrinol* 2010; 165(3): 390.
- Xu HY, Li MY, Gui JF, Hong YH. Fish germ cells. *Sci China Life Sci* 2010; 53(4): 435-46.
- 赵雅贤, 周勤, 于清海, 夏连军, 任玉芹, 林听听. 鱼类生殖细胞移植技术的发展及应用前景. *中国水产科学* (Zhao Yaxian, Zhou Qin, Yu Qinghai, Xia Lianjun, Ren Yuqin, Lin Tingting. Development and application prospects of fish germ cell transplantation technology. *Journal of Fishery Sciences of China*) 2017; 24(2): 414-23.
- Harrington LH, Walker CW, Lesser MP. Stereological analysis of nutritive phagocytes and gametogenic cells during the annual reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Inverteb Biol* 2007; 126(2): 202-9.
- Yoshizaki G, Lee S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. *Stem Cell Res* 2018; 29: 103-10.
- Sato M, Morita T, Katayama N, Yoshizaki G. Production of genetically diversified fish seeds using spermatogonial transplantation. *Aquaculture* 2014; s 422-423: 218-24.
- Ye H, Li CJ, Yue HM, Du H, Yang XG, Yoshino T, *et al.* Establishment of intraperitoneal germ cell transplantation for critically endangered Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*. *Theriogenology* 2017; 94: 37-47.
- Seki S, Kusano K, Lee S, Iwasaki Y, Yagisawa M, Ishida M, *et al.* Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation. *Sci Rep* 2017; 7: 43185.
- Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 2007; 317(5844): 1517.
- Saito T, Gotokazeto R, Arai K, Yamaha E. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol Reprod* 2008; 78(1): 159-66.
- Nóbrega RH, Greebe CD, Van d KH, Bogerd J, de França LR, Schulz RW. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS One* 2010; 5(9): e12808.
- Wong TT, Saito T, Crodian J, Collodi P. Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae. *Biol Reprod* 2011; 84(6): 1190-7.
- Majhi SK, Hattori RS, Rahman SM, Strüssmann CA. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish. *PLoS One* 2014; 9(4): e95294.
- Majhi SK, Hattori RS, Rahman SM, Suzuki T, Strüssmann CA. Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult *Patagonian pejerrey* (*Odontesthes hatcheri*). *Theriogenology* 2009; 71(7): 1162-72.
- Aoki Y, Nakamura S, Ishikawa Y, Tanaka M. Expression and syntenic analyses of four nanos genes in medaka. *Zoolog Sci* 2009; 26(2): 112-8.
- Santos Nassif Lacerda SM, Costa GM, da Silva Mde A, Campos-Junior PH, Segatelli TM, Peixoto MT, *et al.* Phenotypic characterization and *in vitro*, propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 192: 95-106.
- Wang Z, Gao J, Song H, Wu X, Sun Y, Qi J, *et al.* Sexually dimorphic expression of vasa Isoforms in the Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*). *PLoS One* 2014; 9(3): e93380.
- Gao J, Wang X, Zhang Q. Evolutionary Conservation of pou5f3 genomic organization and its dynamic distribution during embryogenesis and in adult gonads in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Int J Mol Sci* 2017; 18(1): 231.
- Wu X, Wang Z, Jiang J, Gao J, Wang J, Zhou X, *et al.* Cloning, expression promoter analysis of vasa gene in Japanese flounder

- (*Paralichthys olivaceus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2014; 167(1): 41-50.
- 21 贺亚南, 陈晓丽, 任晓霞, 郝海生, 秦彤, 赵学明, 等. 免疫磁珠纯化小鼠精原干细胞的研究. *中国生物工程杂志*(He Yanan, Chen Xiaoli, Ren Xxiaoxia, Hao Haisheng, Qin Tong, Zhao Xueming, *et al.* Research on purification of mouse spermatogonial stem cells using magnetic microbeads. *China Biotechnology*) 2014; 34(7): 38-43.
- 22 Lassalle B, Ziyat A, Testart J, Finaz C, Lefèvre A. Flow cytometric method to isolate round spermatids from mouse testis. *Hum Reprod* 1999, 14(2): 388-94.
- 23 Ichida K, Kise K, Morita T, Yazawa R, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Flow-cytometric enrichment of Pacific bluefin tuna type A spermatogonia based on light-scattering properties. *Theriogenology* 2017; 101: 91-8.
- 24 孔群芳, 罗奋华, 萨初拉, 包佳婧, 刘代艳, 吴应积. 山羊精原干细胞的分离纯化及鉴定. *畜牧兽医学报*(Kong Qunfang, Luo Fenhua, Sa Chula, Bao Jiajing, Liu Daoyan, Wu Yingji. Enrichment and identification of spermatogonial stem cells from goat testis. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*) 2013; 44(10): 1554-60.
- 25 李玉华, 段斐, 周小羽, 李扬, 李润生. 小鼠精原细胞的分离纯化. *实验动物与比较医学*(Li Yuhua, Duan Fei, Zhou Xiaoyu, Li Yang, Li Runsheng. Isolation and purification of mouse spermatogonia. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*) 2015; 35(1): 42-5.
- 26 Yakovlev KV, Battulin NR, Serov OL, Odintsova NA. Isolation of oogonia from ovaries of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Cell Tissue Res* 2010; 342(3): 479-90.
- 27 Shang M, Su B, Perera DA, Alsaqufi A, Lipke EA, Cek S, *et al.* Testicular germ line cell identification, isolation, and transplantation in two North American catfish species. *Fish Physiol Biochem* 2018; 44(1): 717.
- 28 张晓丽, 高英茂, 赵舒武, 邴鲁军. 新生小鼠精原细胞分离和纯化的实验研究. *山东大学学报(医学版)*(Zhang Xiaoli, Gao Ying-mao, Zhao Shuwu, Bing Lujun. Experimental study on the separation and purification of spermatogonia in neonatal mouse. *Journal of Shandong University, Health Science*) 2005; 43(8): 674-7.
- 29 孙朝徽. 牙鲆*Paralichthys olivaceus*性腺分化与发育的组织学研究(硕士论文). 东北农业大学[Sun ZH. Histological studies on gonadal ontogenesis, differentiation and development in Flounder (*Paralichthys olivaceus*). Northeast Agricultural University] 2008, 34-40.
- 30 薛振华, 刘国世, 史建民, 王梁, 田秀芝, 王永彬, 等. 达兰猪精原干细胞的分离、纯化和初步鉴定. *中国农业大学学报*(Xue Zhenhua, Liu Guoshi, Shi Jianmin, Wang Liang, Tian Xiuzhi, Wang Yongbin, *et al.* Purification and preliminary identification of spermatogonial stem cells in porcine. *Journal of China Agricultural University*) 2008; 13(2): 1-6.
- 31 Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Miwa M, Yoshizaki G. Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe Croaker, *Nibea mitsukurii* (*Perciformes, Sciaenidae*). *Biol Reprod* 2009; 81(6): 1055-63.