

三种淡水鱼类胚胎低温保存及其 降温和复温速率的研究

张克俭 楼允东 张饮江 吴 萍
(上海水产大学渔业学院, 200090)

摘 要 用自行研配的低温保存液对泥鳅等三种鱼的心脏跳动期胚胎进行低温保存试验。试验中分别采用慢速、分段慢速及分段快速三种降温程序,保存后的胚胎又分别在 4、25 和 40℃ 的水浴中复温。从存活率和孵化率看,分段快速降温程序较好,分段慢速降温次之,慢速降温最差;而复温方式以 40℃ 方式最佳,25℃ 次之,4℃ 最差。其中又以分段快速降温和 40℃ 复温的效果最好。用此法经 -196℃ 保存的胚胎有高达 70%~80% 的存活率。慢速降温后再以慢速复温方式保存胚胎的效果最差,即使降温到 0℃,胚胎的存活率也仅 10%~15%,且无一孵化出膜。此外,还对低温保存的泥鳅胚胎作了电镜观察,结果表明:分段快速降温及 40℃ 复温保存的胚胎,其细胞内的细胞核和线粒体等细胞器的超微结构仅受到极其轻微的冰晶损伤,而慢速降温及 40℃ 复温的胚胎,其细胞器的超微结构受到严重的冰晶损伤。

关键词 泥鳅, 银鲫, 草鱼, 胚胎, 低温保存

低温保存鱼类精子、卵子和胚胎,建立种质冷冻库,以期在细胞水平上保存种质资源,对我国的水产养殖、遗传育种、低温生物学,以及名贵、优良、珍稀和濒危鱼类种质资源的保存具有重要的理论意义和应用价值。迄今,国内外学者对鱼类精子的低温保存做了大量研究,并取得了较好的结果[张轩杰 1987,陈松林和刘宪亭 1991]。在鱼类卵子和胚胎的低温保存方面也做了很多研究,但尚未取得突破性的进展[张新生等 1987,陈松林和刘宪亭 1991a、b,章龙珍等 1994]。

1 材料与方 法

1.1 胚胎类型和低温保存液的配制

试验以泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、银鲫(*Carassius auratus gibelio*)、草鱼(*Tenopharyngodon idella*)等三种鱼的心脏跳动期的胚胎为材料。胚胎低温保存液由抗冻剂和稀释液组合而成。稀释液为自行研配的代号为“MW-4”的混合液,抗冻剂以二甲亚砜为主,辅以少量甲醇和甘油。配方以 MW-4 作为稀释液,配制成含 2.5 M 二甲亚砜、0.2 M 甲醇和 0.01 M 甘油的保存液。

1.2 胚胎低温保存前的预处理

低温保存前,胚胎经低浓度到高浓度的系列保存液预处理后进行正式低温保存。预处理时,系列保存液的温度为 4℃,其成分与上述保存液相同,唯其中二甲亚砜的浓度从 0.5 M 起

始,每级递增 0.5 M,直至 2.5 M。胚胎从低浓度向高浓度保存液逐级过渡进行适应性预处理,每级处理 10 min。经预处理的胚胎最后装入直径为 3.2 及 7mm、管长均为 80mm 的一端封口的两根薄壁塑料管中,每管分别放入 10 个胚胎并加满保存液,然后将另一端管口封住,放在冰水中待用。

1.3 胚胎低温保存的降温程序

胚胎低温保存中分别采用了慢速、分段慢速和分段快速三种降温程序。慢速降温程序:胚胎以 0.3 °C/min 的速率降温至 -40 °C,然后以 0.5 °C/min 的速率降温至 -196 °C。其间,当降温至 -18.5°C 时进行植冰,降至 -196°C。分段慢速降温程序:胚胎分三个阶段降温至 -196 °C。第一阶段以 0.2 °C/min 的降温速率下降至 -20 °C;第二阶段以 2 °C/min 的速率降温至 -60 °C;第三阶段以 5 °C/min 的速率降温至 -196°C。分段快速降温程序:胚胎也分三个阶段进行降温保存。第一阶段以 2 °C/min 的速率降至 -20 °C;第二阶段以 10 °C/min 的速率降至 -60 °C;第三阶段则以 20 °C/min 的速率降至 -196 °C。

以上降温程序由微机控制降温仪(上海理工大学低温生物工程研究室研制)进行微机控制。在上述三种程序中,胚胎从 0 ~ -100°C 的降温过程中,每下降 10°C 均平衡保温 10 min。在各降温程序中胚胎分别在 0、-20、-40、-60、-80、-100 及 -196°C 等 7 个温度点保存 1 h 后取出复温、培养和观察。

1.4 低温保存后胚胎的复温解冻方式及复温后的处理

低温保存后的胚胎分别在 4、25 及 40 °C 水浴环境下复温解冻,其后的胚胎先用低温保存前的系列预处理保存液,从高浓度到低浓度作逆向浸泡,每级 10 min,逐渐去除胚胎中所含的各种抗冻剂成分,然后放入 MW-4 稀释液中培养 30 min,再逐渐加入去氯自来水,最后以去氯自来水培养。复温处理后的胚胎均经显微镜镜检,观察胚胎的心脏是否跳动,并计数和算出胚胎的存活率。经镜检心脏仍在跳动的胚胎继续培养,最后以是否出膜孵出鱼苗计算孵化率。计算出各温度点保存胚胎的存活率和孵化率。

1.5 泥鳅的正常和低温保存胚胎的电镜观察

未经低温保存的胚胎和经低温保存并复温处理后的胚胎先以 2.5% 戊二醛预固定,然后,分别按常规的扫描电镜和透射电镜样品制备方法制样、切片、观察并照相。

2 结果

2.1 泥鳅等三种鱼胚胎低温保存后的效果

2.1.1 慢速降温程序下胚胎低温保存的效果

泥鳅等三种鱼的胚胎在慢速降温程序下降至不同的温度点并保存 1 h,以三种不同的温度环境复温解冻后,其存活率和孵化率列于表 1。

从表 1 可以看出,在慢速降温程序下,以 4°C 复温的效果最差,25°C 复温的效果次之,40°C 复温的效果较好。以 4°C 复温解冻后,-20°C 以下各温度点保存的三种鱼胚胎的存活率和孵化率均为 0。用 25°C 复温解冻,三种鱼胚胎的存活率和孵化率有所提高。如在 -80°C 保存的

泥鳅胚胎有8%存活,银鲫6%存活,但均未孵化出膜,草鱼的胚胎仍无一存活。经40℃复温解冻后胚胎的存活率和孵化率有较大提高。在-100℃以上保存的泥鳅和银鲫胚胎有近80%以上的存活率,草鱼胚胎的存活率稍低,在-60、-80和-100℃保存后约有50%的存活率。三种鱼的胚胎经-60℃保存后约有6%~10%的孵化率,-80及-100℃保存胚胎尽管有较高的存活率,但经培养后均无一孵化出苗。在-196℃保存的胚胎存活率已降低到10%以下。在相同的降温和复温程序下,泥鳅和银鲫胚胎的保存效果好于草鱼胚胎。

表1 三种淡水鱼类胚胎慢速降温的低温保存结果

Table 1 The results of cryopreservation of three freshwater fishes' embryos using slow rate to lower temperature (%)

保存温度 ℃	泥鳅复温方式						银鲫复温方式						草鱼复温方式					
	4℃		25℃		40℃		4℃		25℃		40℃		4℃		25℃		40℃	
	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率
0	6	0	72	64	100	100	10	2	60	52	100	100	6	0	70	58	96	90
-20	0	0	44	16	100	28	0	0	48	20	100	34	0	0	40	22	98	22
-40	0	0	28	12	100	22	0	0	20	10	94	22	0	0	28	8	82	24
-60	0	0	18	0	100	6	0	0	14	2	90	10	0	0	0	0	54	8
-80	0	0	8	0	90	0	0	0	6	0	90	0	0	0	0	0	60	0
-100	0	0	0	0	76	0	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0	50	0
-196	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0

注:1.每组试验各进行5次,每组胚胎数各为10个。存活率和孵化率取5次的平均值。2.存活是指经低温保存的胚胎复温后可观察到心脏跳动者,以百分数计即为存活率;存活胚胎经继续培养后,可以孵出鱼苗,以百分数计则为孵化率

2.1.2 分段慢速降温程序下胚胎低温保存的效果

由表1和表2可以看出,用慢速降温程序进行胚胎低温保存和用分段慢速降温程序低温保存胚胎的效果有一定差异,后者稍好于前者。同样采用40℃复温方式的情况下,慢速降温在-100和-196℃保存温度点上三种鱼胚胎的存活率比分段慢速降温稍低,用分段慢速降温在-40和-60℃保存温度点上的孵化率也有提高。

表2 三种淡水鱼类胚胎分段慢速降温的低温保存结果

Table 2 The results of cryopreservation of three freshwater fishes' embryos using phased slow rate to lower temperature (%)

保存温度 ℃	泥鳅复温方式						银鲫复温方式						草鱼复温方式					
	4℃		25℃		40℃		4℃		25℃		40℃		4℃		25℃		40℃	
	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率
0	5	0	70	65	100	100	10	0	70	60	100	100	10	0	80	65	100	100
-20	0	0	40	20	100	25	0	0	50	20	100	50	0	0	50	20	90	25
-40	0	0	25	10	100	25	0	0	25	15	100	20	0	0	35	20	90	5
-60	0	0	15	0	100	10	0	0	20	0	90	5	0	0	10	0	85	0
-80	0	0	10	0	90	0	0	0	15	0	90	0	0	0	0	0	85	0
-100	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0	70	0	0	0	0	0	70	0
-196	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0

注:每组试验各进行2次,每组胚胎数各10个,其余同表1

2.1.3 分段快速降温程序下低温保存胚胎的效果

在分段快速降温的程序下,泥鳅等三种鱼胚胎低温保存后,经40℃环境复温解冻取得了较好的结果(表3)。

表 3 三种淡水鱼类胚胎分段快速降温的低温保存结果

Table 3 The results of cryopreservation of three freshwater fishes' embryos using phased quicked rate to lower temperature

(%)

保存温度 ℃	泥鳅复温方式						银鲫复温方式						草鱼复温方式					
	4℃		25℃		40℃		4℃		25℃		40℃		4℃		25℃		40℃	
	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率	存活率	孵化率
0	15	0	100	85	100	100	10	0	100	90	100	100	15	0	100	80	100	100
-20	0	0	50	20	100	65	0	0	50	15	95	65	0	0	55	20	100	60
-40	0	0	20	10	100	55	0	0	30	10	100	50	0	0	40	20	90	45
-60	0	0	20	5	100	25	0	0	25	0	95	30	0	0	20	0	80	20
-80	0	0	15	0	95	25	0	0	10	0	85	20	0	0	0	0	80	10
-100	0	0	0	0	90	10	0	0	0	0	85	15	0	0	0	0	75	10
-196	0	0	0	0	80	5	0	0	0	0	80	0	0	0	0	0	70	0

注:同表 2

表 3 结果表明,泥鳅等三种鱼的胚胎经 -196°C 低温保存,在 40°C 环境下复温后均有高达 70%~80% 的胚胎可以存活。这些胚胎复温解冻后进行解剖镜观察,发现胚体透明正常,头、躯体、尾部完好无损,心脏跳动也属正常,却较微弱。经继续培养观察,发现大多数胚体的心脏跳动越来越慢,变得相当微弱,胚体从尾部开始渐渐浑浊,不久尾部有组织突出,头部也膨胀变大,最后整个胚体呈乳白色而死亡。在泥鳅存活的 16 个胚胎中,有 1 个胚胎终于坚持到出膜成鱼苗,但银鲫和草鱼存活的胚胎却无一孵化出苗。将表 1、2 和 3 进行比较可以看出,不管用何种降温程序进行胚胎的低温保存,对胚胎存活率和孵化率影响较大的仍是复温解冻的方式。用分段快速降温程序进行胚胎低温保存后,再以 40°C 水温的快速复温解冻方式进行复温,取得了较好的结果,在 -40°C 以下各温度点保存的三种鱼胚胎的孵化率都有明显的提高。

2.2 低温保存后的泥鳅胚胎超微结构的变化

2.2.1 扫描电镜的观察结果

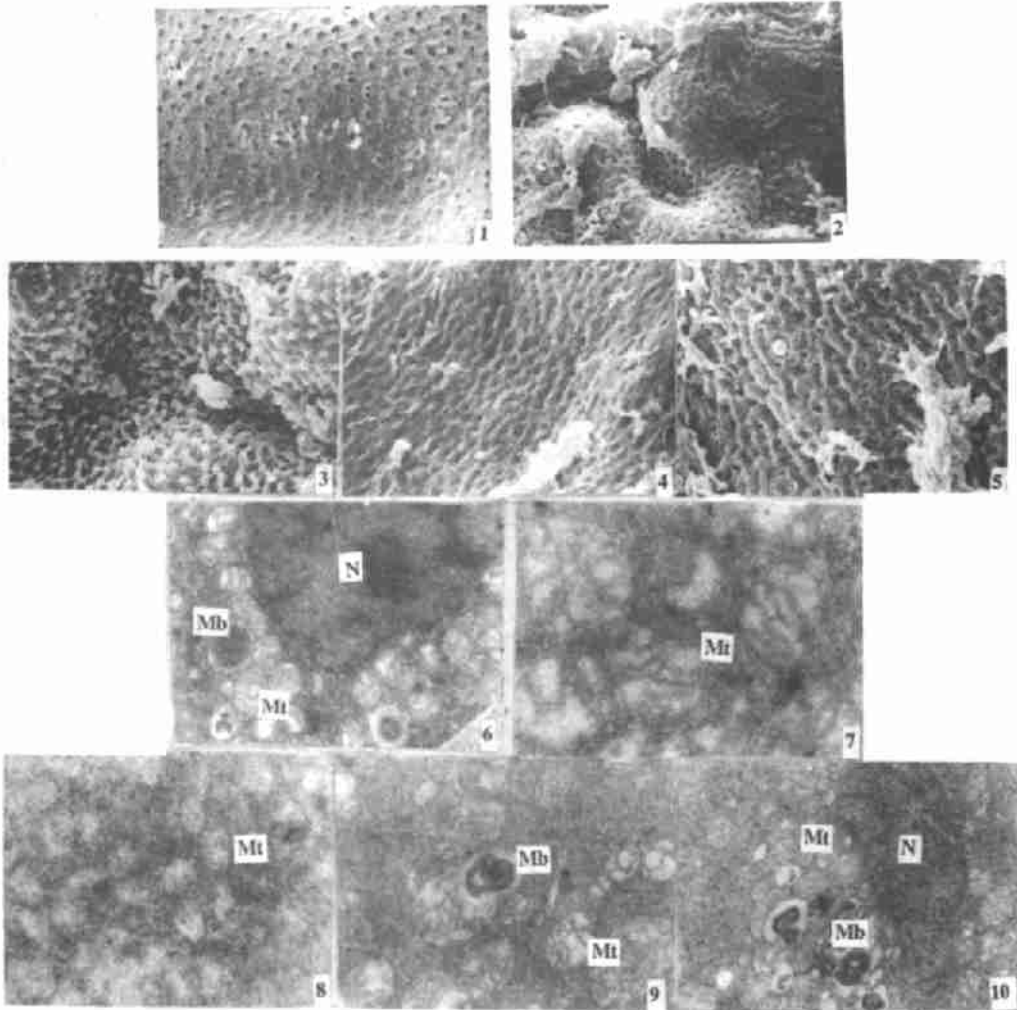
图版-1 为正常对照组的胚胎扫描图像。图像显示胚胎表面卵膜上的卵膜孔呈规则排列,孔洞大小均匀,卵膜表面平整。图版-2 和 3 是采用慢速降温程序在 -60°C 和 -196°C 低温保存的胚胎图像。从图版-2 可以看出,经 -60°C 保存后的胚胎卵膜表面呈起伏不平状,卵膜表面多处断裂,卵膜孔由于冷冻损伤而大小不一。胚胎经 -196°C 保存后,胚体收缩严重,冷冻损伤更为严重,卵膜表面断裂情况更为明显,在卵膜断裂的下方露出呈蜂窝状的卵黄颗粒,卵膜上的卵膜孔大小不一,由于受到冰晶的严重损伤,卵膜孔四周呈现凹凸不平状(图版-3)。

泥鳅胚胎用分段快速降温程序,分别在 -60°C 和 -196°C 下低温保存后的扫描图像表明:不管是在 -60°C ,还是 -196°C 下保存的胚胎,其卵膜表面仍较平整和完好,卵膜孔大小几乎无变化,排列较整齐。显然这些胚胎没有受到较大的冷冻损伤(图版-4,5)。但是图版-4 或图版-5 与图版-1 相比,经分段快速降温程序低温保存过的胚胎卵膜表面没有正常胚胎平整,略呈起伏状。

2.2.2 透射电镜观察的结果

在进行透射电镜术的研究中,同样做了对照组的超薄切片(图版-6)。从图版-6 可以清晰地看到胚胎细胞内的细胞核和线粒体等多种细胞器的超微结构,如细胞核的双层膜结构、核膜孔、核仁、染色质,以及线粒体的双层膜结构和其内部的线粒体嵴等。

在慢速降温程序下于 -60 和 -196°C 低温保存过的胚胎,由于冰晶造成的严重损伤,其细胞内部的超微结构受到很大的破坏。在 -60°C 保存的胚胎,其细胞内部核膜的两层膜结构与线粒体的双层膜结构已很难辨认,线粒体内部的嵴也仅存一些痕迹(图版-7)。经 -196°C 保存



图版 Plate

1. 对照组正常胚胎扫描电镜照片,示卵膜孔排列整齐; $\times 2\,000$ 。2. 慢速降温至 -60°C 保存的胚胎扫描电镜照片,示卵膜表面凹凸不平,卵膜断裂,卵膜孔大小不一; $\times 2\,000$ 。3. 慢速降温保存于 -196°C 的胚胎扫描电镜照片,示胚胎卵膜断裂,卵黄颗粒外露; $\times 2\,000$ 。4. 分段快速降温至 -60°C 保存的胚胎扫描电镜照片,示卵膜表面基本未受到损伤; $\times 2\,000$ 。5. 分段快速降温至 -196°C 保存的胚胎扫描电镜照片,示卵膜表面基本完好,未受到较大的损伤; $\times 2\,500$ 。6. 正常胚胎透射电镜照片,示核的双层膜和线粒体嵴完好无损; $\times 25\,000$ 。7. 慢速降温至 -60°C 保存的胚胎透射电镜照片,示胚胎细胞内的线粒体和内质网等超微结构受到冰晶严重损伤,线粒体的双层膜及嵴等结构已无法观察到; $\times 40\,000$ 。8. 慢速降温至 -196°C 保存的胚胎透射电镜照片,示胚胎细胞内线粒体受到冰晶严重损伤,仅可观察到线粒体轮廓,其嵴及双层膜已完全被破坏; $\times 28\,000$ 。9. 分段快速降温至 -60°C 保存的胚胎透射电镜照片,示细胞内的线粒体等结构保存较完好,未受到严重破坏; $\times 30\,000$ 。10. 分段快速降温至 -196°C 保存的胚胎透射电镜照片,示胚胎细胞内的细胞核、线粒体和微体等结构保存得较完好。 $\times 20\,000$ 。N:细胞核;Mt:线粒体;Mb:微体;Er:内质网

后, 胚胎细胞内部受到冰晶更为严重的损伤和破坏, 解冻后细胞内线粒体、微体、内质网等各种细胞器和胞核的超微结构已不复存在, 仅观察到线粒体、微体残留下的轮廓(图版-8)。

采用分段快速降温程序, 经 -60 和 -196°C 低温保存的胚胎, 细胞内各种细胞器的超微结构所受到的冷冻损伤很小, 因而被较好且较完整的保存下来(图版-9 和 10)。从图版-9 和 10 中可以清晰地观察到线粒体的双层膜结构、线粒体内部的嵴, 以及内质网的膜和微体等细胞器的超微结构。线粒体内部的嵴排列仍较规则, 微体内部呈环形排列的结构也规则无变化。但与图版-6 相比, 这些超微结构的清晰度稍差。

3 讨论

从对泥鳅等三种鱼的心跳期胚胎进行的低温保存试验结果可以看出, 采用的降温速率不同, 对鱼类低温保存的效果有一定影响。把各温度点保存的胚胎存活率和孵化率加以比较, 则分段快速降温优于分段慢速降温或慢速降温, 分段慢速降温略好于慢速降温的效果。表 1 ~ 表 3 的比较表明, 泥鳅等三种鱼的胚胎经三种不同降温程序经 -196°C 的超低温保存后, 同样以 40°C 水浴快速方式复温, 采用快速降温的胚胎的存活率高达 $70\% \sim 80\%$, 明显高于用慢速降温或分段慢速降温的胚胎的存活率。在一次试验中, 经 -196°C 保存后, 16 个存活的泥鳅胚胎经培育有 1 个胚胎最终孵化出能游动的鱼苗。同时, 对泥鳅胚胎采用慢速降温和分段快速降温程序进行低温保存后所做的电镜技术观察也显示, 慢速降温的胚胎其卵膜和胚胎内部细胞的超微结构在低温保存中, 由于冰晶的损伤造成严重的破坏, 而经分段快速降温保存的胚胎, 其表面卵膜结构及胚胎内细胞的线粒体、微体和内质网等各种细胞器的超微结构保存相当完好, 仅受到极轻微的损伤。正如刘金刚等[1993]指出的, 线粒体对低温极为敏感, 在剧烈的低温刺激后, 冻存措施不尽合宜, 线粒体会呈现膨胀直至破损, 内容物流出, 嵴排列紊乱断裂。因此, 笔者认为在鱼类胚胎进行低温保存时以采用快速降温程序为好。章龙珍等[1994]的研究结果也表明了同样的观点。

关于低温保存后细胞的复温速度问题。低温保存后的鱼类胚胎的复温方式目前主要采用慢速复温 ($2 \sim 8^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 及快速复温 ($40 \sim 250^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 两种。本文采用相同降温程序进行低温保存的泥鳅等三种鱼的胚胎, 经 40°C 水浴快速复温解冻后, 胚胎的存活率和孵化率明显高于采用 25°C 水浴的慢速复温的胚胎。如果采用 4°C 水浴的很慢的复温速度解冻, 则胚胎的存活率和孵化率更低。如表 1、2 和 3 所示, 不管采用何种降温程序, 在 -20°C 以下各温度点保存的胚胎以 4°C 水浴的慢速复温, 胚胎的存活率均为 0。在一定的低温范围内, 随着复温速度的提高, 胚胎的存活率和孵化率也相应有所提高。在胚胎的低温保存中, 影响胚胎存活率和孵化率的主要因素之一是冰晶对胚胎的损伤, 这种损伤在降温和复温过程中均有可能发生。为防止复温过程中胚内冰晶的再生, 采用较快的复温速率进行复温有较明显的效果。Mackenzie [1970] 和 Bank [1973] 在对酵母细胞进行快速冷却及复温再结晶的研究中指出, 在快速冷却中形成胞内冰本身对细胞并非致命的损伤, 但若在复温过程中复温速率过慢, 使细胞内发生再结晶的变化, 则对细胞是致命的损伤。在胚胎经低温保存后复温的方式研究中, 也有不同的看法, 如 Raymond 等 [1981] 在哺乳动物胚胎冷冻保存中发现, 慢速解冻优于快速解冻。张新生等 [1987] 在鲤胚胎冷冻保存研究中指出, $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的慢速复温效果优于 $148^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的快速复温。应当看到, 影响鱼类胚胎低温保存效果的因子很多, 不同研究者所用的抗冻剂的种类、浓度、搭配和稀释液的成分等都有一定的差异, 因此, 存在不同的观点在所难免。在鱼类胚胎的低温保

存研究尚未取得重大突破前,还有很多工作有待进一步研究。

参 考 文 献

- 刘金刚等.1998.低温医学.人民卫生出版社.64.
- 张轩杰.1987.鱼类精液超低温冷冻保存研究进展.水产学报,11(3):259~267.
- 张新生,华泽钊,赵林等.1987.鲤鱼胚胎冷却至-196℃的试验.上海机械学院学报,9(2):83~90.
- 陈松林,刘宪亭.1991a.鱼类精液超低温保存的基本原理、研究现状应用前景.淡水渔业,21(5):43~46.
- 陈松林,刘宪亭.1991b.鱼卵和胚胎冷冻保存研究和进展.淡水渔业,21(1):44~46.
- 杨景山,范宪周.1986.深低温生物学技术.实验技术与管理,3(1):3~6.
- 章龙珍,刘宪亭,鲁大椿等.1994.鱼类胚胎低温冷冻保存降温速率研究.淡水渔业,24(2):3~5.
- Bank H.1973. Visualization of freezing damage, II. Structural Alternation during Warming. Cryobiology, 10:157~170.
- Mackenzie A P.1970. Death of frozen yeast in the course of slow warming in the frozen cill, ed. by wlostenholme, G. E. W., churchill, london, 89~96.
- Raymond V R, et al.1981. Survival of frozen-thawed fetal rat pancreases as a function of the permeation of dimethyl sulfoxide and glycerol, warming rate, and fetal age. Cryobiology, 18:17~31.

STUDIES ON CRYOPRESERVATION OF THREE FISHES' EMBRYOS

ZHANG Ke-Jian, LOU Yun-Dong, ZHANG Yin-Jiang, WU Ping

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT The studies on cryopreservation of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) and grass carp (*Tenopharyngodon idella*) embryos using cryoprotectant compounded by ourselves were reported in this paper. A part of cryopreserved embryos were observed by transmission electron microscope. Three procedures of lowering the temperature, including slow rate, phased slow rate and phased quick rate, were employed during the process of cryopreservation. Three ways, including slow rate, middle rate and quick rate, were used to recover the room temperature. The results showed that the survival percentage and hatching percentage of the embryos using phased quick rate to lower temperature and quick rate to recover temperature were higher than the others. The survival percentage of the embryos in the temperature lowered to -196℃ using phased quick rate and recover the room temperature using quick rate was more than 80%. Observed by transmission electron microscope, it showed that the fine structure of the cell organs such as mitochondria of the embryo cells in the lowered temperature using phased quick rate and recover the room temperature using quick rate was damaged lightly by the ice crystal, while the embryo cells cryopreserved by the two other ways were damaged seriously.

KEYWORDS *Misgurnus anguillicaudatus*, *Carassius auratus gibelio*, *Tenopharyngodon idella*, Embryos, Cryopreservation