

文章编号: 1000- 0615(2002)03- 0213- 06

泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究

章龙珍^{1,2}, 鲁大椿¹, 柳 凌¹, 郭 峰¹, 张洁明¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 荆州 434000; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘要: 泥鳅胚胎(胚孔封闭期)用 10# 玻璃化液作为低温保护剂, 经低温(-196℃)冷冻保存 17h 后, 38℃ 水浴解冻, 解冻后的胚胎获得了成活。在稀释液 B1、B2、B3 中分别有 26.7%、15.0%、3.0% 成活的胚胎。解冻后的胚孔封闭期胚胎经过 50h 的培养, 胚胎从胚孔封闭期发育至尾鳍出现期。

关键词: 泥鳅胚胎; 超低温冷冻保存; 抗冻剂; 玻璃化液

中图分类号: S917 文献标识码: A

Cryopreservation of loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, embryos by vitrification

ZHANG Long-zhen^{1,2}, LU Da-chun¹, LIU Ling¹, GUO Feng¹, ZHANG Jie-ming¹

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Jingzhou 434000, China;

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Shanghai 200090, China)

Abstract: Use of a vitrified solution (composition 10) as a cryoprotectant for the cryopreservation of loach embryos is studied in this paper. Using this vitrified solution, embryos were preserved at a temperature of -196℃ for 17 hours. Afterward, the preserved embryos were thawed using thawing solution in warm water (38℃), and revival embryos were successfully obtained. During thawing, we compared 3 kinds of thawing solution compositions (B1, B2 and B3), and the survival rates of the preserved embryos after thawing in B1, B2 and B3 thawing solutions were 26.7%, 15.0% and 3.0% respectively. After thawing, it took 50 hours for the development of revival embryos from the interval of blastopore closure to the interval of caudal fin appearance.

Key words: loach embryos; cryopreservation; cryoprotectant; vitrified solution

鱼类胚胎超低温冷冻保存到目前为止尚未起得突破性进展, 主要原因是胚胎体积大, 含有大量的卵黄和水份, 其次是对抗冻剂敏感, 耐受力低, 草鱼胚胎经 20% 二甲亚砜、12% 乙二醇、20% 甲醇平衡 90min 后胚胎全部死亡^[1]。近几年来也起得一些进展, 泥鳅胚胎心脏跳动期经(-196℃)保存后 16 个胚胎中有 1 个获得了成活^[2], 这是至 1989 年保存鲤胚胎成活至今第 2 例经(-196℃)冷冻保存后获得成活的胚胎^[3]。后因实验结果不能复现, 鱼类胚胎超低温冷冻保存仍难于获得真正成功。

按照常规的方法, 采用低浓度的抗冻剂对鱼类胚胎进行超低温冷冻保存, 难以实现鱼类胚胎的冷

收稿日期: 2001-08-24

资助项目: 国家“九五”攻关项目子专题(96-008-01-03-03)

作者简介: 章龙珍(1954-), 女, 湖北谷城人, 副研究员, 主要从事鱼类生殖生理、低温生物学的研究。现工作单位: 东海水产研究所。

Tel: 021-65684690, E-mail: longzhen2885@hotmail.com

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

冻保存。玻璃化液作为抗冻保护剂在保存哺乳动物胚胎、甲壳类卤虫胚胎已获得了成功^[4,5],但对鱼类胚胎的冷冻保存未见报道。

玻璃化冷冻方法具有操作简单,快速的优点,利用玻璃化液冷冻保存胚胎,不会导致细胞内形成冰晶。由于保存液的玻璃化,减少了在冷冻保存过程中低温形成冰晶对细胞的损伤,使胚胎获得成活^[5]。但形成玻璃化的高浓度抗冻保护剂对胚胎会产生“毒性”和“高渗”损伤作用^[6],实验证实适合保存哺乳动物胚胎的玻璃化液不适合保存鱼类胚胎,所以保存鱼类胚胎首先必须筛选出“低毒”、无“高渗”损伤作用的玻璃化液。作者利用自行配制筛选出的四种玻璃化液经对不同发育时期泥鳅胚胎的实验,筛选出最适合泥鳅胚胎保存的玻璃化液,冷冻前胚胎经玻璃化液处理后,采用快速降温保存方法,解冻后的胚胎在稀释液中培育,胚胎获得了成活。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

泥鳅胚胎:从集贸市场上购回的泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*),经人工催产,授精孵化后选取发育正常的胚孔封期、肌肉效应期、胚体转动期3个时期的胚胎和出膜1d的鱼苗做实验。在0~4℃下筛选玻璃化液,实验重复3次,每个样品的胚胎数最多为50粒,最少为30粒,取3次的平均值。低温冷冻实验,冷冻前平衡时间的确定进行了两次实验,每个样品的胚胎数最多为30粒,最少7粒。稀释液的筛选共进行了4次实验,样品胚胎数最多20粒,最少15粒。

玻璃化液:玻璃化液的配制按参考文献[7]。实验用的4种玻璃化液,它们的组成和浓度分别为2[#](20%乙二醇+15%1,2丙二醇);5[#](10%二甲基亚砷(DMSO)+25%1,2丙二醇);7[#](20%二甲基亚砷+20%甲醇);10[#](15%甲醇+20%1,2丙二醇)。

稀释液:选用经过实验筛选出来的代号为B稀释液。

1.2 方法

首先配制2[#]、5[#]、7[#]、10[#]玻璃化液,将配制好的玻璃化液放入0~4℃培养箱中预冷。挑选发育正常的胚胎,用滤纸吸干水后,放入预冷的各玻璃化液中,分别平衡不同的时间。将平衡好的胚胎一部分在室温下培养,一部分装入0.5mL的塑料离心管中,在-20℃平衡10min后快速进入液氮(-196℃)保存。

快速解冻,将胚胎快速升温至-20℃平衡10min后,38℃水浴解冻。取配制好的稀释液20mL于培养皿中,把解冻后的胚胎用滤纸吸干后放入其中,待10min后滴加1mL自来水,以后每隔10min加1次,共加5次。

显微镜下观察记录胚胎发育情况。

2 结果

2.1 玻璃化液的确定

冷冻前,用2[#]、5[#]、7[#]、10[#]玻璃化液保存的3个时期的泥鳅胚胎,胚胎在几种玻璃化液中存活时间最长的是10[#]玻璃化液。在30min以内,胚孔封闭期的胚胎除5[#]玻璃化液对胚胎造成全部死亡外,其余的成活率均在58%以上,时间延长至50min,7[#]、10[#]还有50%~60%的成活率;肌肉效应期的胚胎,当时间延长到50min时,2[#]保存胚胎全部死亡,而10[#]保存的胚胎70min时有85%以上的成活率,我们将10[#]保存胚胎的时间延长至110min时仍有75%以上的成活率;胚体转动期当时间延长到50min时,2[#]、5[#]、7[#]保存的胚胎全部死亡,10[#]保存的胚胎70min时还有80%以上的成活率;用上述4种玻璃化液保存出膜1天的苗,时间延长至50min时,2[#]、7[#]、10[#]保存的苗全部死亡,5[#]保存的70min

时还有 90% 以上的成活率,见表 1。从中可以明显地看到不同的玻璃化液对不同发育时期的保存效果不一样,5[#] 保存鱼苗,10[#] 保存胚胎的成活率最高,存活时间最长。

表 1 冷冻前泥鳅胚胎在不同玻璃化液中平衡后的存活率

Tab.1 Survival rate of loach embryos treated in different vitrified solutions before cryopreservation

玻璃化液 vitrified solutions	冷冻前不同平衡时间胚胎的成活率(%) survival rate of embryos at different treatment time before cryopreservation											
	胚孔封闭期(min) closure of blastopore			肌肉效应期(min) muscular contraction			胚体转动期(min) embryo writhe			出膜后 1 天(min) one day after hatching		
	30	50	70	30	50	70	30	50	70	30	50	70
2 [#] 乙二醇+ 1,2 丙二醇(20% + 15%) glycol + 1.2 propanediol	58	0	0	85	0	0	58	0	0	93	0	0
5 [#] DMSO + 1,2 丙二醇(10% + 25%) DMSO + 1.2 propanediol	0	0	0	90	19	0	78	0	0	92	92	92
7 [#] DMSO+ 甲醇(20% + 20%) DMSO + methanol	82	62	ND*	82	60	0	80	0	0	82	0	0
10 [#] 甲醇+ 1,2 丙二醇(15% + 20%) methanol + 1.2 propanediol	60	50	ND	95	92	85	92	85	80	79	0	0

* ND 表示无数据; ND means No data.

2.2 冷冻前平衡时间的确定

用 10[#] 玻璃化液做超低温冷冻保存泥鳅胚孔封闭期和胚体转动期两个时期的胚胎,冷冻前在 0~4℃ 分别平衡 30、50min(表 2)。

表 2 10[#] 玻璃化液超低温(-196℃)冷冻保存泥鳅胚胎的结果

Tab.2 Results of cryopreservation (-196℃) of loach embryos using 10[#] crystal solution

平衡时间(min) treatment time	发育期 developmental intervals					
	胚孔封闭期 closure of blastopore			胚体转动期 embryo writhe		
	透明卵(ind) transparent eggs	发白卵(ind) white eggs	透明卵的百分率(%)* % of transparent eggs	透明卵(ind) transparent eggs	发白卵(ind) white eggs	透明卵的百分率(%)* % of transparent eggs
30	20	2	90.9	19	1	95.0
	29	1	96.7	6	2	75.0
50	19	2	90.5	5	2	71.4
	4	11	26.7*	3	5	37.5

* 胚胎经培养发育至尾鳍出现的百分率; * percent when embryos developed to the interval of caudal fin appearance.

从表 2 中可以看到,冷冻前平衡 30 min 的胚孔封闭期胚胎经-196℃ 冷冻解冻后,有 90% 以上的胚胎透明。胚体转动期的胚胎有 75.0%~95.0% 的透明,冷冻前平衡 50min 胚孔封闭期胚胎有 90% 的胚胎透明,有 26.7% 的胚胎发育到尾鳍出现,显微镜下清楚观察到 18~19 对体节(图版 1-9)。胚体转动期有 37.5%~71.4% 的胚胎透明。该试验结果可以复现。胚体转动期,解冻 24h 后观察到心脏跳动。解冻后整个胚胎透明,形态正常,加稀释液后胚胎卵膜仍有粘性。

2.3 降温方式的确定

玻璃化液保存不适合采用慢速降温,因 4 种玻璃化液的冰点分别在-22~-39℃ 之间^[7],采用慢速降温速率就不会形成玻璃化液,并且胚胎在玻璃化液中时间和处在低温下的时间过长,对胚胎成活有影响。所以采用分段降温和快速降温两种方式进行保存。

分段降温程序:

初温 10~15℃ $\xrightarrow{2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$ 0℃ 平衡 10min $\xrightarrow{0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$ -20℃ 平衡 10min $\xrightarrow{\text{直接投入}}$ 液氮

快速降温程序:

初温 10~15℃ $\xrightarrow{\text{直接投入}}$ -20℃ 平衡 10min $\xrightarrow{\text{直接投入}}$ 液氮

解冻方式:

-196℃ $\xrightarrow{\text{快速}}$ -20℃ 平衡 10min \longrightarrow 38℃ 水浴解冻

按照分段降温,解冻后的胚胎没有成活,而按照快速降温的,解冻后胚胎获得了成活。表3为解冻后的胚胎在不同稀释液中的培养结果。

表3 解冻后泥鳅胚胎在室温下的培养结果

Tab. 3 Results of the loach embryo nurtured in the room temperature after thawing

稀释液 diluent	胚孔封闭期 closure of blastopore					胚体转动期 embryo writhe				
	卵数 egg number	透明卵 transparent eggs	发白卵 white eggs	成活数 survival number	成活率(%) survival rate	卵数 egg number	透明卵 transparent eggs	发白卵 white eggs	成活数 survival number	成活率(%) survival rate
B1	15	6	5	4	26.7	17	6	5	6	35.3
B2	20	5	12	3	15.0	20	3	14	3	15.0
B3	20	3	16	1	3.0	15	1	13	1	6.7
B4	20	0	20	0	0	15	0	15	0	0
B5	20	0	20	0	0	15	0	15	0	0

2.4 解冻后胚胎发育

解冻后胚胎发育见图版 1-9。

3 讨论

选用泥鳅胚胎作为低温保存对象,是因为泥鳅卵子在淡水鱼类中比其它的卵子要小,卵径在0.8~1.0mm之间,泥鳅的繁殖期长,容易获取材料,但比起哺乳动物的胚胎0.2mm大许多。泥鳅的胚胎含有大量的卵黄和水份,在保存过程中,卵黄的脱水与原生质脱水速度不一样^[6]。所以选用胚孔封闭期胚胎进行保存,在冷冻前脱水过程中可以使原生质与卵黄脱水达到一致,避免卵黄过度脱水造成解冻后卵黄破裂,使胚胎得以成活。

哺乳动物小鼠胚胎在玻璃化液EFS溶液中的时间最长20min,成活率为20%,在EF中15min全部死亡^[4]。我们筛选出的10[#]和5[#]玻璃化液,在70min时还有80%~85.9%的成活率,这满足了因胚胎大、含水份高,需要长时间脱除水份而不受到“毒性”和“高渗”损伤的要求,胚胎在50min内基本脱除水份而成活没有受到影响。

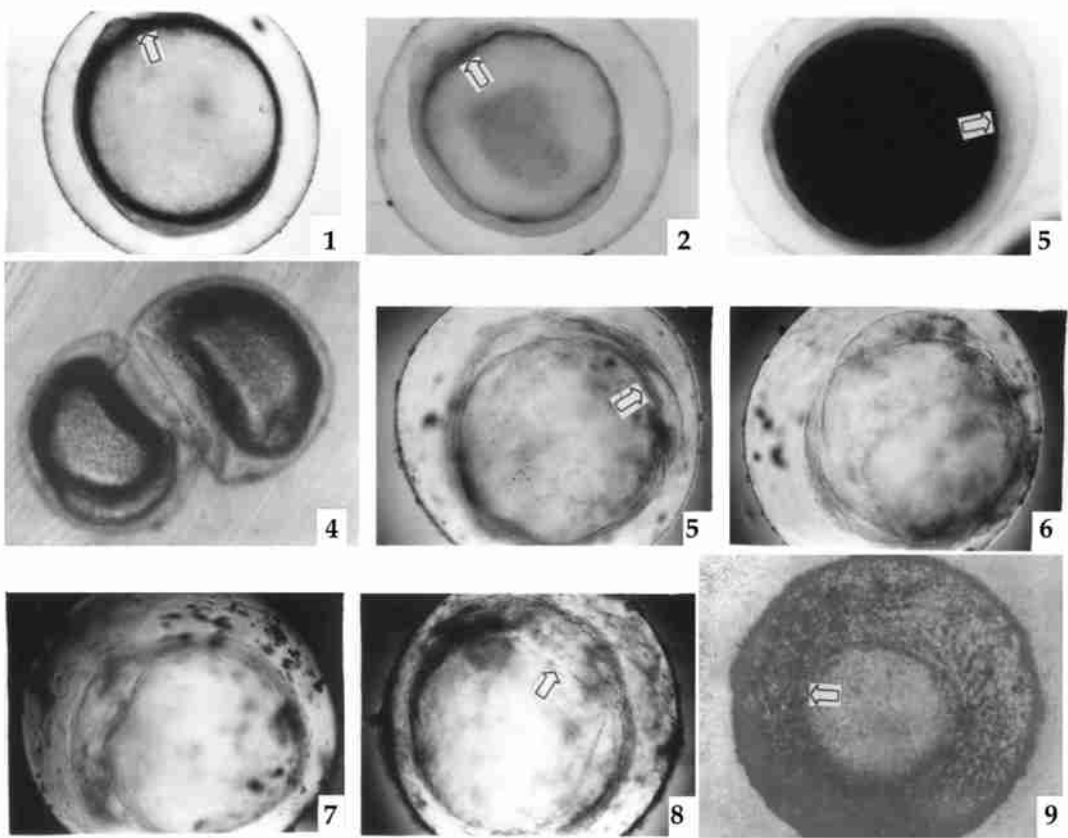
在分段降温过程中,从初温进入液氮,已用时60min,加上冷冻前平衡时间已超出胚胎在玻璃化液中成活的时间,胚胎的过度脱水,产生渗透压损伤,同时胚胎在-10℃~-20℃低温时间有30min,虽然没有结冰,对胚胎成活仍有一定的影响。采用快速降温避免了这些缺点,使胚胎在刚好脱除水份后能快速地进入到液氮中保存,避免在危险温区形成冰晶对胚体造成损伤。这也是胚胎能够成活的关键。

解冻后的胚胎从早期胚孔封闭期发育到尾鳍出现,证明胚胎经超低温冷冻保存后,已完全获得成活,但胚胎最后没有出苗,我们认为不是冷冻保存的原因,是稀释液和解冻后的管理原因造成的。因为稀释液中有蔗糖成分,蔗糖是一些细菌和霉菌的培养基,所以当胚胎在室温下经过2天多(50h)发育到尾鳍出现时,卵膜上长了许多象絮状的东西包裹着卵,胚胎最后可能因为缺氧而死亡。这在今后的研究中应该加以改进。解冻后胚胎的发育速度比正常的慢了许多,正常胚孔封闭期胚胎在水温19~22℃发育至尾鳍出现一般只需8~9h,而经冷冻过的胚胎却需要50h,我们认为可能有3个原因造成:1.解冻后的胚胎有一个复苏的过程,不可能解冻后就开始发育;2.解冻后的胚胎在稀释液中自身渗透压的调节有一个过程;3.培养冷冻胚胎稀释液的渗透压偏高,影响胚胎的快速发育。这需进一步的研究证实。

采用10[#]玻璃化液保存和快速降温等方法,解决了冰晶形成和“高渗”损伤等关键问题,鱼类胚胎超低温冷冻保存后获得成活胚胎,并且可重复实现,这在超低温冷冻保存鱼类胚胎尚属首次。

参考文献:

- [1] Zhang L Z, Liu X T, Lu D C, et al. Effects of several factors on the survival rate of fish embryo before cryopreservation[J]. Freshwater Fisheries, 1992, 22(10): 20- 24. [章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 鱼类胚胎冷冻保存前几个因子对其成活率影响的研究[J]. 淡水渔业, 1992, 22(1): 20- 24.]
- [2] Zhang K J, Lou Y D, Zhang Y J, et al. Studies on cryopreservation of three fishes' embryos [J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(4): 366- 372 [张克俭, 楼允东, 张饮江, 等. 三种淡水鱼类胚胎低温保存及其降温和复温速率的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 366- 372.]
- [3] Zhang X S, Hua Z Z, Zhao L. A study on the cryopreservation of common carp embryos [J]. Cryo Letters, 1989, 10: 271- 278.
- [4] Kasai M. Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification [J]. Frontiers in Endocrinology, 1994, 4, 481- 487.
- [5] Zhang L Z, Liu X T, Zhang J M, et al. Cryopreservation of embryo and nauplii of *Artemia* spp. [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1997, 4(4): 68- 72. [章龙珍, 刘宪亭, 张洁明, 等. 卤虫胚胎和无节幼体超低温冷冻保存的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(4): 68- 72.]
- [6] Zhang L Z, Liu X T, Lu D C, et al. Permeability and toxicity of vitrified cryoprotectants on embryos of oriental weather fish (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Freshwater Fisheries, 1998, 28(6): 21- 23. [章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 玻璃化液对泥鳅胚胎的渗透及毒性作用[J]. 淡水渔业, 1998, 28(6): 21- 23.]
- [7] Zhang L Z, Liu X T, Lu D C, et al. Effects of vitrification on the survival of silver carp embryo [J]. Freshwater Fisheries, 1996, 26(5): 7- 10. [章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 玻璃化液对鲢鱼胚胎成活率的影响[J]. 淡水渔业, 1996, 25(5): 7- 10.]



图版说明 Explanation of Plate

1. 对照组胚孔封闭期胚胎, 箭头示胚孔封闭处; 2. 冷冻前的胚孔封闭期胚胎, 箭头示胚孔封闭处; 3. 刚解冻的胚孔封闭期胚胎, 箭头示胚孔封闭处; 4. 在稀释液中的胚胎; 5. 稀释液中培养 24h 后的胚胎, 箭头所示眼泡出现; 6. 稀释液中培养 35 小时的胚胎; 7. 稀释液中培养 36h 后的胚胎, 箭头所示眼泡长大, 眼晶体出现; 8. 稀释液中培养 46h 胚胎, 箭头示肌节; 9. 稀释液中培养 50h 胚胎, 箭头示尾鳍出现。

1. control embryo that was in the developmental interval of blastopore closure, arrow shows the site of blastopore closure; 2. pre-frozen embryo that was in the developmental interval of blastopore closure, arrow shows the site of blastopore closure; 3. newly thawed embryo that was in the developmental interval of blastopore closure, arrow shows the site of blastopore closure; 4. embryo that was in diluent; 5. embryo cultured in diluent for 24 h, arrow shows that ocular vesicle appeared; 6. embryo cultured in diluent for 35 h; 7. embryo cultured in diluent for 36 h, arrow shows that ocular vesicle grew bigger and lens crystalline appeared; 8. embryo cultured in diluent for 46 h, arrow shows myomere; 9. embryo cultured in diluent for 50 h, arrow shows that caudal fin appeared.