

牙鲆胚胎程序化冷冻保存研究

王春花^{1,2} 陈松林^{1*} 田永胜¹ 刘本伟¹ 邓 寒¹

(¹ 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所,青岛 266071)

(² 上海水产大学,200090)

摘要 以牙鲆胚胎为材料,对胚胎程序化冷冻保存的主要环节进行了探讨,以优化牙鲆胚胎的程序化超低温冷冻保存法。单一抗冻剂的毒性试验表明甲醇(Methanol)、1,2-丙二醇(PG)的毒性低于其他抗冻剂的毒性。混合抗冻剂的毒性试验表明,20%~25%PM抗冻剂的毒性很低,经其平衡处理的胚胎,冷冻至-30℃,成活率可达80%以上。植冰前采用2℃/min的降温速率,从植冰后到入液氮前温度采用8℃/min的降温速率效果较好。入液氮前温度的筛选实验表明,入液氮前的温度以-45℃较好。利用20%PM和22%PMP,采取优化的降温程序冷冻保存尾芽期的牙鲆胚胎,分别获得5枚和7枚复活胚胎,并全部孵化出膜。

关键词 牙鲆 胚胎 程序化 冷冻保存

中图分类号 Q65 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2007)03-0057-07

Study on the cryopreservation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by a programmed freezing method

WANG Chun-hua^{1,2} CHEN Song-lin^{1*} TIAN Yong-sheng¹
LIU Ben-wei¹ DONG Han¹

(¹ Key Laboratory Sustainable Utilization of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT Study was carried out on cryopreservation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos, aiming at optimizing the programmed freezing method. Through toxicity tests of cryoprotectant in Japanese flounder embryos, methanol (MeOH) and propylene glycol (PG) were found to be lower than other cryoprotectants in toxicity to embryos. Furthermore, the mixed cryoprotectants, viz. 20%~25%PM (PG+MeOH), was even weaker in toxicity, compared to single cryoprotectant. In the cooling process, it was better to adopt 2℃/min as the velocity of descending temperature before icing, and then using 8℃/min. until exposing to liquid nitrogen, with reaching -45℃ being preferable. By using the optimized descending temperature process, 5 embryos survived in 26 flounder embryos at tail-bud stage undergoing cryopreservation with 20%PM solution, and 7 survived in 45 with 22%PMP solution.

国家 863 高技术研究与发 展项目(2001AA621100)和 国家自然 科学基金 项目(30570259) 共同资助

*通讯作者。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn, Tel:(0532)85844606

收稿日期:2006-01-13;接受日期:2006-04-12

作者简介:王春花(1979-),女,硕士研究生,主要从事海洋生物学和低温生物学研究。

KEY WORDS *Paralichthys olivaceus* Embryos A programmed freezing method
Cryopreservation

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 隶属于鲽形目 (Paleuronectiformes)、鲆科 (Bothidae)、牙鲆亚科 (Paralichthyinae)、牙鲆属 (*Paralichthys*) ,牙鲆主要分布于我国以及朝鲜、日本、俄罗斯远东沿岸海区,是我国重要的海水养殖鱼类。近年来,由于过度捕捞和近亲繁殖,其种群数量在逐渐减少,优良性状在逐渐退化。因此对牙鲆野生种或优良品种进行长期保存,以保护鱼类种质资源已变得越来越重要。而鱼类配子和胚胎的冷冻保存对鱼类生物多样性、种质资源保护、遗传育种和水产养殖具有重要的意义和应用价值。

程序化冷冻保存法是采用较低浓度的抗冻保护液,利用程序降温仪,按照预先设计的降温程序将种质细胞所处的环境降至一定温度,然后将其投入液氮中长期保存,等需要时再以一定的复温程序使细胞复活(李广武 1998)。目前,程序化冷冻保存法在畜牧业生产中已作为一种常规的胚胎冷冻保存方法而被广泛应用,但在鱼类胚胎保存方面,由于鱼类胚胎体积大、含水量多、卵膜通透性差、卵黄含量高,给鱼类胚胎冷冻保存带来很大的困难,使其研究进展不大。迄今为止,用程序化方法对鱼类胚胎进行超低温冷冻(-196℃)成功的报道不多,主要包括:Zhang等(1989)用程序降温法将鲤鱼胚胎在-196℃冷冻保存,解冻后16枚中4枚胚胎复活,其中3枚孵化出膜;张克俭等(1997)将泥鳅心跳期胚冷冻到-196℃,在16枚中有1枚胚胎复活并孵化出膜;于过才等(2004)用程序冷冻保存法,在72枚鲈鱼胚胎中获得3枚复活胚胎。以上研究虽获得复活胚胎,但胚胎复活率比较低、成活时间短。而有关牙鲆胚胎程序化冷冻保存的研究,目前国内外均未见报道。本文以牙鲆胚胎为材料,对鱼类胚胎程序化冷冻保存进行了深入细致的研究,以建立牙鲆胚胎程序化冷冻保存技术,为牙鲆种质资源保存提供技术手段。

1 实验材料与方法

1.1 牙鲆胚胎

牙鲆胚胎采用的是自然受精卵,待受精卵发育到所需发育阶段,取出胚胎进行实验。

1.2 实验试剂

利用常见的两类冷冻保护剂,包括渗透性冷冻保护剂:甲醇(Methanol)、1,2-丙二醇(PG)、甘油(Gly)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砷(DMSO);非渗透性冷冻保护剂:聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、蔗糖(Sucrose)。基础液用NaCl(0.422 mol/L)、KCl(0.011 mol/L)、CaCl₂·2H₂O(0.013 mol/L)、MgCl₂(0.024 mol/L)、NaHCO₃(2.26 mol/L)配制而成。洗脱液是用基础液配制而成的0.125 mol/L蔗糖溶液。

1.3 单一抗冻剂的毒性实验

用基础液配制15% Methanol、15% PG、15% Gly、15% DMF、15% DMSO,用这些抗冻剂在室温下处理胚胎30~60 min,后用洗脱液除去抗冻剂,培养,计算胚胎成活率。对照采用基础液。

1.4 混合抗冻剂的毒性实验

用基础液配制20% PM(20% PG+20% Methanol)、20% FP(20% DMF+20% PG)、20% FM(20% DMF+20% Methanol)、20% SP(20% DMSO+20% PG)、20% SM(20% DMSO+20% Methanol),用这些抗冻剂在室温下处理胚胎50~120 min,后用洗脱液除去抗冻剂,培养,计算胚胎成活率。对照采用基础液。

配制10%、15%、20%、25%、30%、35% PM,用这些抗冻剂在室温下平衡胚胎,当有约50%胚胎上浮时,将上浮胚胎装入麦管,以-10.0℃/min的速度降至-30℃并保存10 min,38℃水浴解冻,洗脱,培养;计算成活率。

1.5 降温速率的筛选实验

1.5.1 室温-植冰前

用 20 % PM 处理胚胎并装入麦管后,从室温开始分别以 - 1.0 /min、- 2.0 /min、- 3.0 /min、- 4.0 /min、- 5.0 /min 降到 - 12 ,在此平衡 5 min,然后 38 水浴解冻,洗脱,培养;计算成活率。

1.5.2 植冰后-入液氮前

用 20 % PM 处理胚胎并装入麦管后,从室温开始以 - 2 /min 的速度降到 - 12 ,植冰,平衡 5 min,再分别以 - 2 /min、- 3 /min、- 4 /min、- 5 /min、- 6 /min、- 7 /min、- 8 /min、- 9 /min、- 10 /min 的降温速度降至 - 30 ,平衡 10 min,38 水浴解冻,洗脱,培养;计算成活率。

1.6 入液氮前温度的筛选实验

用 20 % PM 平衡处理胚胎并装入麦管,从室温以 - 2 /min 的速度降到 - 12 ,植冰,平衡 5 min,继续以 - 8 /min 的速度分别降到 - 30 、- 35 、- 40 、- 45 、- 50 、- 55 、- 60 ,平衡 10min,38 水浴解冻,洗脱,培养;计算成活率。(实验 1.3~1.6 每个实验都重复 5 次。)

1.7 超低温冷冻实验

从胚孔封闭期到出膜前期的胚胎反复进行冷冻保存实验,用 20 % PM 和 20 % PVP(20 % PM + 2 % PVP)平衡胚胎,装入麦管,以 - 2 /min 的速度降到 - 12 ,植冰,平衡 5 min,继续以 - 8 /min 的速度分别降到 - 45 ,平衡 2 min,快速投入液氮中,保存 1~24 h,解冻,洗脱,培养。

1.8 数据分析

用单因素方差分析重复实验的数据差异;用 Duncan's 法进行多重比较 (Subset for alpha = 0.05),比较结果用字母标记法在图中标记,在同一系列中字母相同表示差异不显著 (P>0.05),字母不同表示差异显著 (P<0.05)。

2 实验结果

2.1 单一抗冻剂的毒性

如图 1 所示,甲醇 (Methanol) 和 1,2-丙二醇 (PG) 的毒性相对其他 3 种抗冻剂的毒性小,经其处理 30 min 的胚胎成活率分别为 92.67 % 和 90.91 %;甘油 (Gly) 和二甲基甲酰胺 (DMF) 对胚胎的毒性很大,在处理 60 min 时胚胎成活率分别为 4.56 % 和 4.76 %;除 1,2-丙二醇外,随着时间的增加胚胎的成活率明显降低。

2.2 混合抗冻剂的毒性

2.2.1 两种抗冻剂组合的毒性

如图 2 所示,PM 为 1,2-丙二醇和甲醇组合、FP 为二甲基甲酰胺和 1,2-丙二醇组合、FM 为二甲基甲酰胺和甲醇组合、SP 为二甲亚砷和 1,2-丙二醇组合、SM 为二甲亚砷和甲醇组合。

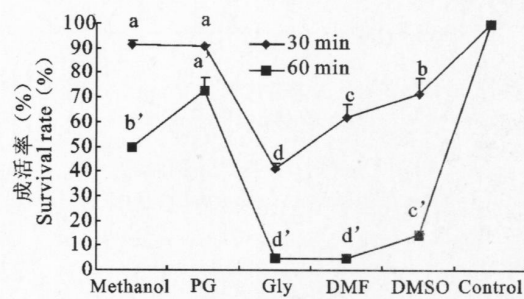


图1 牙鲆尾芽期胚经15%不同抗冻剂平衡处理后的成活率
Fig.1 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage treated with different cryoprotectants solutions in 20% (v/v) for 30 and 60 min

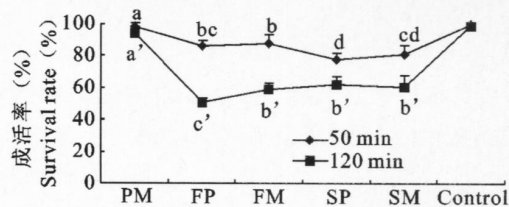


图2 牙鲆尾芽期胚胎经20%不同混合抗冻剂平衡处理后的成活率
Fig.2 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage treated with different mixed cryoprotectants solutions in 20% (v/v) for 50 and 120 min

实验结果表明,抗冻剂组合的毒性明显低于单一抗冻剂的毒性,处理 50 min 后的胚胎成活率在 78 % 以上;其中 PM 组合呈现显著优势,胚胎经其处理 120 min 后,成活率为 94.03 %,因此引出了最佳 PM 浓度的筛选实验。

2.2.2 最佳 PM 浓度的筛选

由图 3 可见,20 % 和 25 % 的 PM 冷冻效果较好,胚胎成活率在 80 % 以上;随 PM 浓度增加(10 % ~ 35 %),胚胎成活率呈现先升后降的趋势,说明用程序降温法冷冻胚胎所用抗冻剂浓度不需要很高。

2.3 降温速率

2.3.1 室温-植冰前的降温速率

结果表明,从室温到植冰前采用 2 /min 的降温速率,胚胎成活率较高(94.13 %);采用 1 /min、3 /min、4 /min、5 /min 的降温速率,胚胎成活率为 70 % ~ 85 % (图 4)。

2.3.2 植冰后-入液氮前的降温速率

结果表明,采用 8 /min 的降温速率,胚胎成活率为 92 %,冷冻效果较好;采用 <5 /min 的降温速率,胚胎成活率 < 35 %,说明植冰后采用慢速降温是不可取的(图 5)。

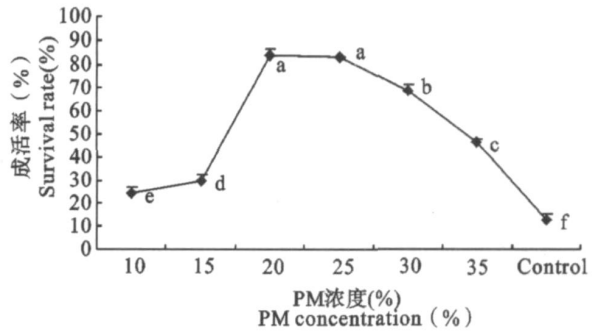


图 3 牙鲆尾芽期胚胎经不同浓度的 PM 抗冻剂中平衡处理并降至 - 30 成活率

Fig.3 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage forzen to - 30 with PM solution treatment in different concentration

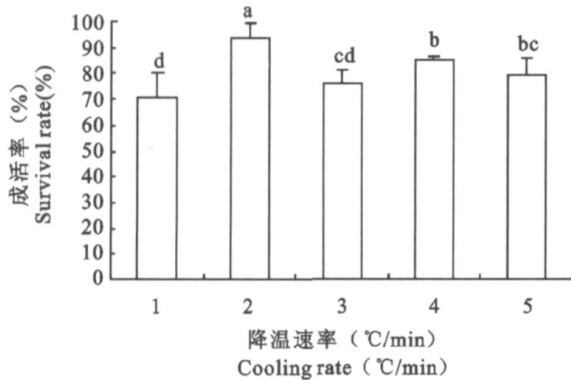


图 4 牙鲆尾芽期胚胎经不同降温速率降至 -12 °C,解冻后的成活率

Fig.4 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage frozen to -12 °C with different descending temperature velocity

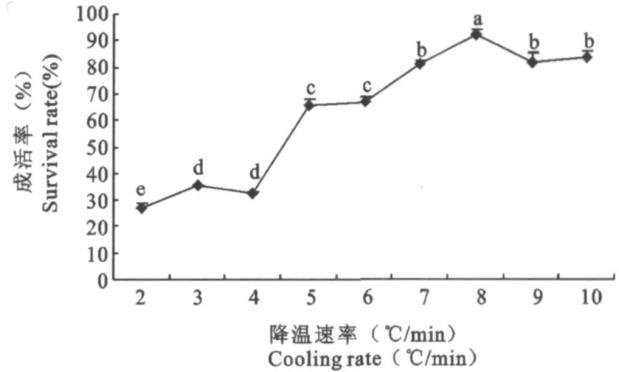


图 5 胚胎植冰后采用不同的降温速率降至 -30 °C,解冻后的成活率

Fig.5 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage frozen to -30 °C with different descending temperature velocity after icing

2.4 入液氮前温度

结果表明,在入液氮前温度 - 45 时,胚胎成活率为 82.86 % ~ 85.91 %,差异不显著;入液氮前温度 - 45 时,成活率呈现明显的下降趋势,差异显著;此结果说明,用 20 % PM 处理的胚胎危险期出现在 - 45 的某一温度区域内,建议入液氮前温度在 - 45 左右(图 6)。

2.5 超低温冷冻

经过反复实验,复活的胚胎时期都是尾芽期,验证了尾芽期是对冷耐受力较强的时期;其中 22 % PMP 中含有 2 % PVP,验证了非渗透性抗冻剂对胚胎的冷冻保护作用(田永胜等 2003,于过才等 2004)。复活胚

胎孵化出膜后,从出膜第4天的仔鱼开始投喂小球藻,这些仔鱼发育相对迟缓,并且生命力比较脆弱。牙鲆胚胎的超低温冷冻保存实验结果如表1所示,复活胚胎和仔鱼照片如图版所示。

3 讨论

(1) 抗冻剂对细胞的毒性作用主要发生在冷冻前和解冻后的处理阶段,其毒性与种类和平衡时间等因素有关。Newton等(1996)测定了几种渗透性抗冻剂对对虾胚胎的毒性,发现对于无节幼体和桑椹胚来说,EG和Methanol毒性最低。Urbanyi等(1997)在研究抗冻剂对鲤鱼桑椹胚和心跳期胚胎的毒性时,发现Methanol毒性最低。Zhang等(1996)研究发现,抗冻剂对斑马鱼胚胎的毒性由小到大的顺序为:PG < Methanol, DMSO, 2,3-丁二醇,乙酰胺 < EG < Gly。作者测定了5种渗透性抗冻剂对牙鲆尾芽期胚胎的毒性,处理30 min的结果为:Methanol < PG < DMSO < DMF < Gly,处理60 min的结果为DMF > Gly > DMSO > Methanol > PG。由此可见,不同抗冻剂对胚胎的毒性作用是不同的,并且抗冻剂的毒性随处理时间的增长而增加,另外还可以看出Methanol是一种很好的渗透性抗冻保护剂。

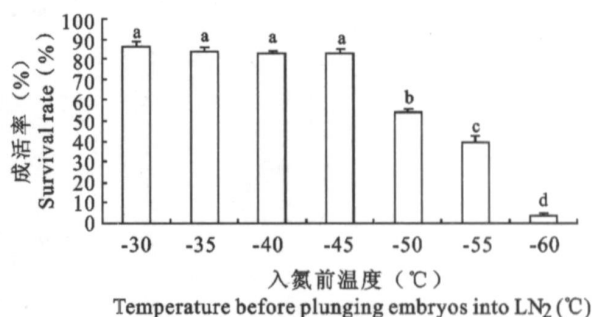


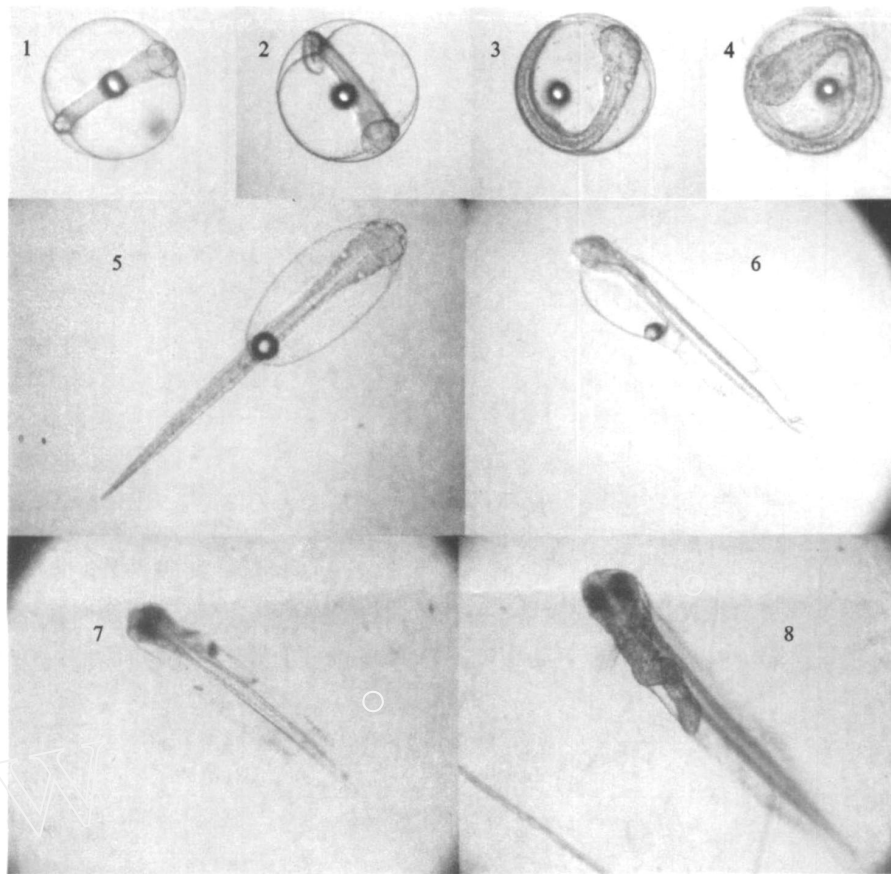
图6 经冷冻至不同入液氮前温度的尾芽期胚成活率
Fig. 6 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage frozen to different temperatures (-30 ~ -60 °C) before being exposed to LN₂

表1 牙鲆胚胎超低温冷冻保存结果

Table 1 Cryopreservation results of *P. olivaceus* embryos

抗冻液 Cryoprotectants	胚胎时期 Embryos stage	麦管数 Number of straws	胚胎总数 Number of embryos	保存时间 Storage time in LN ₂ /h	畸形数 Number of abnormal embryos	成活数 Number of survival embryos	成活时间 Survival time (d)
20 % PM	尾芽期 (Tail-bud)	5	26	17	0	5	2~7
22 % PMP	尾芽期 (Tail-bud)	9	45	17	1	7	2~17

(2) 用程序化冷冻保存法进行胚胎冷冻,降温速率是非常重要的影响因子。Stoss等(1983)采用0.3~0.35 /min的降温速率,在-20 °C冷冻保存虹鳟和大马哈鱼受精卵,解冻后获6.4%的复活率。张克俭等(1997)研究了不同降温速率对冷冻保存泥鳅胚胎的影响,表明分段快速降温优于分段慢速降温,并获得在液氮中保存的复活胚胎并孵出仔鱼。章龙珍等(1994)对鲢鱼(*Hypophthalmichthys*)、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yih)和青鳉(*Oryzias latipes*)胚胎,在低温下采用慢速降温速率0.2~0.5 /min降至-40 °C以上温度,胚胎获得了20%以上的成活率;以2 /min降温到-40 °C,再以10 /min降至-196 °C,胚胎获得了90%以上的复活率。Hagedorn等(2004)在研究斑马鱼胚胎冰晶形成温度的实验中表明慢速降温不是一个好方法。作者采用牙鲆尾芽期胚胎进行速率筛选实验,结果表明,植冰以后,采用较慢的降温速率(2~4 /min)将胚胎降温至-30 °C并维持10 min,胚胎成活率仅有20%~35%,而用-8 /min将胚胎降温至-30 °C并维持10 min,胚胎成活率为92%,可见在植冰后采用较快速度降温的效果明显优于慢速降温,其原因之一是植冰后继续采取慢速降温会增加抗冻液对胚胎的溶质损伤。



1. 冷冻成活尾芽期胚 $\times 40$, 2. 发育到尾芽中期胚 $\times 40$, 3. 发育至胚体转动期胚 $\times 40$, 4. 发育至出膜前期胚 $\times 40$, 5. 出膜第1天的仔鱼 $\times 60$, 6. 第2天的仔鱼 $\times 40$, 7. 第5天的仔鱼 $\times 40$, 8. 第15天的仔鱼 $\times 40$

1. Survival cryopreserved tail-bud embryo $\times 40$, 2. Tail-bud embryo at the later stage $\times 40$, 3. Embryo at the movement stage $\times 40$, 4. Embryo at pre-hatching stage $\times 40$, 5. 1d larvae after hatching $\times 60$, 6. 2d larvae after hatching $\times 40$, 7. 5d larvae after hatching $\times 40$, 8. 15d larvae after hatching $\times 40$

图版 复活的胚胎和仔鱼

Plate Survival cryopreserved flounder embryos after thawing with hatched fry

(3) 胚胎冷冻保存是一项系统工作,一个处理环节操作不慎,都会导致整个实验的失败。目前比较成熟的冷冻保存法有程序化冷冻保存法和玻璃化冷冻保存法。另有许多学者尝试了去除卵膜(Cabrita *et al.* 2003)、吸取卵黄(Liu *et al.* 1999)、显微注射抗冻剂(Janik *et al.* 2000)和核磁共振显微术(Hagedorn 1998)等方法,但都没有获得明显效果,技术也不够成熟。

在鱼类胚胎冷冻保存方面,被研究的鱼类主要有虹鳟(*Salmo gairdneri* Richardson)、河鳟(*Salmo trutta* Linnaeus)、银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)、马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)、溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis* Mitchell)、鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yih)、青鳉(*Oryzias latipes*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、南亚野鲮(*Labeo rohita*)、喀拉鲃(*Catla catla*)、印鲮(*Cirrhina mrigala*)、牙鲮(*Paralichthys olivaceus*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)等。在不同鱼类胚胎的冷冻方法上,不同的作者采用了不同的冷冻保存方法。作者对牙鲮胚胎的程序化冷冻保存法进行了比较系统的研究,获得了复活胚胎,并孵化出膜。同时在实验过程中做了一些程序化冷冻保存法与玻璃化冷冻保存法的对比。由于玻璃化冷冻保存法不需要昂贵的冷冻降温设备、操作简易方便,被广大学者所青睐(Chen *et al.* 2005)。但是如果出现反玻璃化,那么麦管中的胚胎就会全部破碎,无一幸免,而且玻璃化冷冻保存法的稳定性较差;程序化冷冻保存法采用较低浓度的抗冻剂,对胚胎造成的毒性损伤较小,并且对胚胎

的完整性具有极强的保护作用,作者另有实验证明,用程序化冷冻保存法保存的胚胎其完整率可高达90%以上。因此,将程序化冷冻与玻璃化冷冻保存法结合起来使用,将会提高冷冻胚胎的完整性和复活率,提高实验的重复性和稳定性。

致谢:本研究部分实验在山东海阳863高技术基地进行,感谢刘寿堂总经理、李学文副总经理在实验材料供给上的帮助。

参 考 文 献

- 于过才,陈松林,孔晓瑜,田永胜,季相山. 2004. 鲈鱼胚胎程序化冷冻保存的研究. 海洋水产研究, 25(1):1~8
- 田永胜,陈松林,严安生,季相山,于过才. 2003. 鲈鱼胚胎玻璃化冷冻保存研究. 动物学报, 49(6):843~850
- 张克俭,楼允东,张饮江. 1997. 3种淡水鱼类胚胎低温保存及其降温和复温速率的研究. 水产学报, 21(4):366~372
- 李广武. 1998. 低温生物学. 湖南:科学技术出版社
- 陈松林. 2002. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展和前景展望. 水产学报, 26(2):161~168
- 章龙珍,刘宪亭,鲁大椿,陈松林,方萍,郭峰. 1994. 鱼类胚胎低温冷冻保存降温速率研究. 淡水渔业, 24:3~5
- Cabrera, E., Chereguini, O., Luna, M. et al. 2003. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture, 221:593~604
- Chen, S. L., and Tian, Y. S. 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. Theriogenology, 63:1 207~1 219
- Hagedorn, M., Kleinhans, F. W., Artemow, D. et al. 1998. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. Biol. Reprod, 59:1 240~1 250
- Hagedorn, M., Peterson, A., Mazur, P. et al. 2004. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. Cryobiology, 49:161~189
- Janik, M., Kleinhans, F. W., and Hagedorn, M. 2000. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). Cryobiology, 41:25~34
- Liu, X. H., Zhang, T., and Rawson, D. M. 1999. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish embryos. Cryobiology, 39:236~242
- Newton, S. S., and Subramoniam, T. 1996. Cryoprotectant toxicity in penaeid prawn embryos. Cryobiology, 33:172~177
- Stoss, J., and Edward, M. D. 1983. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmo Gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 31:51~65
- Terrence, R. T., and Patricia, M. M. 2000. Cryopreservation in Aquatic Species. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society
- Urbányi, B., and Magyary, I. 1997. Toxicity of Methanol, DMSO and Glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different developmental stages. Theriogenology, 1:408
- Zhang, T., and Rawson, D. M. 1996. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo. Cryobiology, 33(1):1~13
- Zhang, X. S., Zhao, L., Hua, T. C. et al. 1989. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. Cryo Letters, 10:271~278