

栉孔扇贝胚胎超低温液氮保存*

薛钦昭

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 选用两种低温保护剂配方, A: 10%甘油+4%葡萄糖; B: 15% DMSO(二甲亚砜)+4%葡萄糖+2%柠檬酸盐, 利用微机控制生物降温仪, 对栉孔扇贝胚胎进行液氮低温保存。以 1℃/min 由室温降温至 -20℃, 接着以 20℃/min 降温至 -80℃, 然后样品直接入液氮保存(-196℃), 1 周后, 经 45℃ 水浴解冻, 栉孔扇贝胚胎(发育 6d)的存活率达 65.1%(A 配方)和 56.5%(B 配方); 而采用 6℃/min 降温至 -20℃, 并以 20℃/min 降温至 -80℃, 直接入液氮, 胚胎解冻后的存活率分别为 39.0%(A 配方)和 27.9%(B 配方)。选用发育 24 h 的栉孔扇贝胚胎进行液氮保存实验, 解冻后, 胚胎基本死亡。

关键词 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*), 胚胎, 低温保存

海产贝类养殖是我国一重要产业, 对海产经济贝类种质进行低温保存, 对品种改良、种质交换及优良品种种质资源持续利用将奠定基础, 并可随时为分子生物学、遗传工程及发育生物学研究提供生物材料。

有关海洋无脊椎动物胚胎低温保存的研究开展甚少。Asahina 和 Takahashi^[1]以 1.0mol/L 甘油为抗冻剂对海胆胚胎进行了液氮保存, 取得了一定的胚胎存活率。Baust 和 Lawrence^[2]对对虾胚胎进行了低温保存的研究, 发现在 -20℃ 条件下, 保持 5min, 对虾无节幼体和蚤状幼体有 90% 的存活率, 但在 -196℃ 条件下, 存活率大幅度下降。Gallardo 等^[3]冷冻保存 2~8 细胞的贻贝 *Choromytilus chorus* 的胚胎, 没有成功。但有报道用 1.5mol/L 甘油在 -196℃ 冷冻保存贻贝胚胎, 胚胎解冻后, 具有一定的存活率^[4]。

本文选用不同的低温保护剂配方, 用生物降温仪控制降温条件, 对栉孔扇贝胚胎进行液氮保存研究, 以解决栉孔扇贝胚胎低温保存问

题。

1 材料和方法

1.1 胚胎的培养

亲体栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)来源于青岛当地养殖场。在诱导排卵前, 室内人工暂养 1 周, 主要喂以三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornutum* 和小新月菱形藻 *Nitzschia closterium*。用阴干并结合紫外线辐射海水升温法诱导栉孔扇贝排精排卵, 并人工授精, 用 3L 烧杯进行早期发育培养, 每天更换过滤海水, 前期主要投喂等鞭金藻 *Isochrysis galbana*, 后期结合三角褐指藻、幼虫密度控制在 10 个/ml 以内。

1.2 配方及冷冻条件

采用两种配方:

A: 10%甘油+4%葡萄糖

* EMBL 研究项目, 项目完成过程中, 得到了相建海教授的指导和支, 在此表示感谢。

收稿日期 1994 年 1 月 17 日

B: 15% DMSO + 4% 葡萄糖 + 2% 柠檬酸盐

→液氮

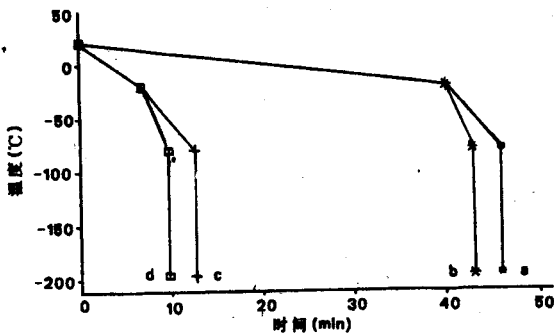


图 1 栉孔扇贝面盘幼虫低温冷冻曲线

Fig. 1 Freezing Curve in Cryopreservation of the Veliger (6d) of Chinese scallop, *Chlamys farreri*

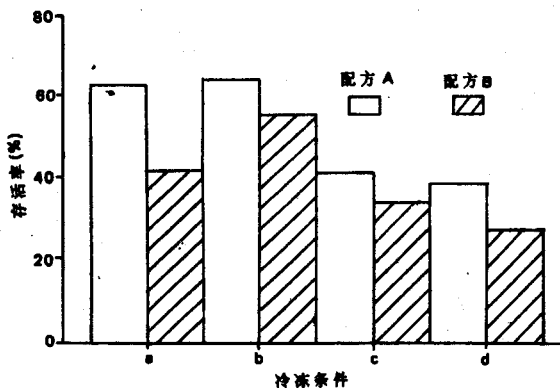


图 2 栉孔扇贝面盘幼虫(6d)液氮保存一周,解冻后的存活率(A,B 为保护剂配方)

Fig. 2 Veliger survival rate of Chinese scallop, *Chlamys farreri* after one week preservation in liquid nitrogen (A, B: protective recipes)

选用下列四种冷冻保存条件(见图 1)

- 室温 $\xrightarrow{1^\circ\text{C}/\text{min}}$ -20°C $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ -80°C $\rightarrow$ 液氮
- 室温 $\xrightarrow{1^\circ\text{C}/\text{min}}$ -20°C $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ -80°C $\rightarrow$ 液氮
- 室温 $\xrightarrow{6^\circ\text{C}/\text{min}}$ -20°C $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ -80°C $\rightarrow$ 液氮
- 室温 $\xrightarrow{6^\circ\text{C}/\text{min}}$ -20°C $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ -80°C

用 1.5ml 带盖离心管作容器,样品体积为 1ml,用生物降温仪控制降温条件,45℃水浴解冻,解剖镜下选取运动活跃、健壮的幼虫进行低温保存实验。解冻后,解剖镜下检查幼虫是否存活,并计数。

2 结果

对胚胎发育 6d 的栉孔扇贝面盘幼虫 (120 μm $\times$ 100 μm) 进行液氮保存实验,解冻后,面盘幼虫呈现一定的存活率(图 2)。同一冷冻条件下,以甘油为抗冻剂的配方 A 比以 DMSO 为抗冻剂的配方 B 有更好的低温保护效果,栉孔扇贝面盘幼虫解冻后, A 配方的存活率显著地高于 B 配方 ($P < 0.05$)。在 a~d 冷冻条件下, A 配方面盘幼虫解冻后的存活率比 B 配方平均高出 12.0%。

由室温至 -20°C , 冷冻条件 a, b 采用慢速 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 降温,而 c, d 采用快速 $6^\circ\text{C}/\text{min}$ 降温。栉孔扇贝面盘幼虫在 a, b 冷冻条件下,解冻后存活率显著地高于 c, d ($P < 0.05$)。选用 A 配方,在冷冻条件 a, b 情况下,栉孔扇贝面盘幼虫解冻后存活率为 63.0% 和 65.1%,而在冷冻条件 c, d 时,其面盘幼虫解冻后的存活率分别为 41.9% 和 39.0%。选用 B 配方,在冷冻条件 a, b 情况下,栉孔扇贝面盘幼虫存活率为 42.2% 和 56.5%,而在冷冻条件 c, d 下,解冻后,其面盘幼虫存活率为 34.4% 和 27.9%。

冷冻条件 a 和 b 及 c 和 d 间的不同是在 -20°C 至 -80°C 温度范围内,分别选用了 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 和 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 的降温速度。在同一配方中,冷冻条件 a, b 并没引起栉孔扇贝面盘幼虫解冻后存活率显著地差异 ($P > 0.05$),同样,在 c, d 冷冻条件下,栉孔扇贝面盘幼虫解冻后存活率无显著差异 ($P > 0.05$)。

选用发育 24h 的栉孔扇贝胚胎(担轮幼虫)进行液氮低温保存,解冻后担轮幼虫基本死亡。

3 讨论

加入适当的低温保护剂,以有效地降低在

低温冷冻过程中冰晶的形成对细胞的损伤,是生物低温保存成败的重要一环。本文发现以甘油为抗冻剂的配方(A)比以DMSO为抗冻剂的配方(B)有更好的低温保护效果,解冻后,栉孔扇贝面盘幼虫存活率高。而作者在对栉孔扇贝精子进行液氮保存的研究中,发现DMSO比甘油有更好的低温保护效果,且毒性小。可见,不同的细胞对低温保护剂有不同的要求。Gallardo等^[3]的研究表明,在低温保存贻贝胚胎中,甘油具有良好的低温保护作用。而Asahina和Takahashi^[1]选用1.0mol/L DMSO也成功地用液氮保存了海胆胚胎。

控制好初始阶段的降温速度是非常重要的。本文的结果表明,用慢速(1℃/min)降温至-20℃比用较快速度(6℃/min)降温有更好的效果,解冻后,面盘幼虫存活率高。Asahina^[1]的研究表明,初始降温阶段若采用过快降温速度,会引起细胞内冰晶形成,在慢速降温条件下,只出现细胞外结冰,而细胞内无冰晶形成,从而降低胞内冰晶的损伤作用。另一方面,采用慢速降温可使细胞逐渐地适应低温环境,并使保护剂充分地与细胞作用,达到低温保护效果。Steponkus^[5]研究表明,经低温适应的细胞比没有经低温适应的细胞具有更强的抗冷冻损伤能力。

在对栉孔扇贝面盘幼虫低温保存研究中,在-20℃~-80℃区间,采用快速降温(>10℃/min)以使细胞迅速渡过冰晶生成的危险温度区域,并进入玻璃化状态。本文采用10℃/

min和20℃/min降温速度,栉孔扇贝面盘幼虫解冻后存活率无显著差异,这表明在-20℃~-80℃区间,适宜的降温速度应在10℃/min以上。Renard^[4]对牡蛎*Crassostrea gigas*胚胎的低温保存研究中,发现降温至-20℃后,直接将样品投入液氮中,解冻后胚胎存活率与在-20℃(没投入液氮)的胚胎存活率无显著差异,这表明快速降温至超低温玻璃化这个过程,不会显著地降低细胞的存活率。可见控制好-20℃以上温度的降温条件显得更为重要,因这一阶段的降温条件对解冻后胚胎存活率影响较大。

不同发育阶段的栉孔扇贝胚胎,具有不同的抗冷冻损伤能力。选用发育24h的栉孔扇贝胚胎(担轮幼虫),在冷冻条件a~d时,解冻后,担轮幼虫基本死亡,而选用发育6d的面盘幼虫,解冻后,呈现较高的存活率。Renard^[4]选用2~4细胞的牡蛎胚胎进行低温保存,结果解冻后胚胎存活率极低,为1.6%。

参考文献

- [1] Asahina, E. and Takahashi, T., 1979. *Dev. Growth Differ.* 21(5):423-430.
- [2] Baust, J. G. and Lawrence, A. L., 1977. *Cryobiology* 14: 705.
- [3] Gallardo, C. S., et al., 1988. 25th Meeting of the Society for Cryobiology. Aachen 11-15 July 1988. Abstract 164.
- [4] Renard, P., 1991. *Aquaculture* 92: 43-57.
- [5] Steponkus, P. L., 1984. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 543-584.

CRYOPRESERVATION OF EMBRYOS OF SCALLOP, *Chlamys farreri*, IN LIQUID NITROGEN

Xue Qinzhaoh

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Received: Jan. 17, 1994

Key Words: *Chlamys farreri*, Embryo, Cryopreservation

Abstract

Two cryoprotective recipes, A: 10% glycerol + 4% glucose, B: 15% DMSO (dimethyl sulfoxide) + 4% glucose + 2% citrate, were used in cryopreservation of embryos of Chinese scallop, *Chlamys farreri*, by the aid of Programmed Cryobiological Controller. Using the freezing procedure, i. e. 1°C/min to -20°C, 20°C/min to -80°C, then plunging the samples into liquid nitrogen, the scallop embryos (6d, veliger) survival rate can reach as high as 65.1% (recipe A) and 56.5% (recipe B) after thawing in 45°C sea water bath. But the freezing procedure, 6°C/min to -20°C, -20°C/min to -80°C, then plunging the samples into liquid nitrogen, presented comparatively low embryo (6d) survival rate, i. e. 39.0% (recipe A) and 27.9% (recipe B). No embryo survived when cryopreserving the 24 h embryo (trochophore) in liquid nitrogen.