

超低温冷冻保存卤虫胚胎的损伤机理*

章龙珍 刘宪亭 鲁大椿 柳 凌 郭 锋 张洁民 陈松林

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

摘 要 通过扫描电镜观察超低温冷冻保存的卤虫胚胎膜结构, 查明造成卤虫胚胎损伤的主要机理是: (1) 玻璃化液使胚胎膜受到损伤, 改变了膜的通透性, 玻璃化液进入胚胎内部造成胚胎死亡; (2) 在超低温冷冻保存过程中, 冷冻物理损伤造成胚胎膜的破裂, 导致胚胎死亡。

关键词 卤虫, 胚胎, 超低温冷冻, 玻璃化液, 损伤

卤虫(*Artemia* spp.) 脱壳卵超低温冷冻保存已经取得成功, 但孵化4 h的卤虫胚胎用抗冻剂冷冻保存没有获得成功^[1]。玻璃化液冷冻保存卤虫胚胎已经获得完全成功, 并且建立了一套较为完善的卤虫胚胎冷冻保存技术^[2]。在进行卤虫胚胎超低温冷冻保存时, 保存未脱壳胚胎的成活率比保存脱壳后胚胎的成活率高, 这证明壳对胚胎起到很好的保护作用。另一方面, 随着卤虫胚胎在玻璃化液中平衡时间的延长, 成活率有所下降, 特别是脱壳后的胚胎, 成活率更低。为了进一步弄清玻璃化液在冷冻保存过程中对卤虫胚胎的影响, 探索玻璃化液对冷冻卤虫胚胎的损伤机理, 本文对超低温冷冻保存的卤虫胚胎进行扫描电镜观察研究。

1 材料和方法

1.1 材料

卤虫休眠卵为美国旧金山湾卤虫卵公司(San Francisco Bay Brand, Inc.)的进口产品。室温下在3%的NaCl溶液中孵化率达85%以上。

1.2 方法

将卤虫休眠卵用自来水浸泡5 h, 加入等量的次氯酸钠溶液, 经过5 h后全部脱去壳。把去壳卤虫卵放入3% NaCl溶液中, 23℃下孵化24 h后(部分

已经成为幼虫), 随机取少量卤虫胚胎用2%的戊二醛固定作为对照, 其余的装入6-b玻璃化液中, 玻璃化液的配制和超低温冷冻方法按作者的方法^[2,3]进行。卤虫胚胎在0~5℃培养箱平衡5 d, 然后将玻璃化液中的圆形胚胎和内陷皱缩的胚胎分别挑选出来, 一部分用戊二醛固定和5% NaCl溶液孵化, 另一部分作超低温冷冻保存。冷冻后的卤虫胚胎用2%的戊二醛固定和用5% NaCl溶液孵化, 待出膜后计算出膜的幼体数。将2%的戊二醛固定后的卤虫胚胎用5% NaCl溶液冲洗3次, 1%锇酸固定, 临界点干燥, 真空喷金镀膜, 日立S-530扫描电镜观察、拍照。

2 结果

2.1 冷冻保存前、后卤虫胚胎膜结构的变化

正常的未经脱壳和玻璃化液处理的卤虫胚胎为圆形, 饱满、不透明, 直径约0.2 mm(图版I-1), 脱壳后在3% NaCl溶液中孵化24 h的卤虫胚胎亦为圆形, 透明、饱满(图版I-2)。胚胎膜表面为多边形隆起线联结而成的蜂窝状结构(图版I-3)。

冷冻前, 在玻璃化液中的圆形卤虫胚胎, 其胚胎膜的蜂窝状结构没有发生改变, 但膜上出现大小不等的孔洞(图版I-4, 5)。冷冻前的圆形胚胎, 经冷冻、解冻后仍为圆形, 形态上没有发生变化, 膜的结构上也没发生改变(图版I-6), 膜上同样有许多小孔洞(图版I-7)。

收稿日期: 1997-12-23

* 本文为“九五”国家重点科技攻关计划(96-008-01-03-03)子专题的研究内容

冷冻前内陷皱缩的卤虫胚胎,膜上没有小孔洞,内陷处多边形隆起线明显,而在没有内陷的地方,多边形的隆起线不明显(图版 I-8)。内陷皱缩的卤虫胚胎经冷冻、解冻后,仍为内陷(图版 I-9, 11),膜上没有小孔洞(图版 I-10)。

2.2 冷冻保存对卤虫胚胎膜的损伤

卤虫圆形胚胎经冷冻保存后,从膜的表面上没有观察到裂纹(图版 I-7),而内陷皱缩的卤虫胚胎经冷冻保存后,有极少数胚胎的膜上有裂纹(图版 I-12)。有的胚胎表面有块状组织脱落,显示出内部类似蜂窝状的结构(图版 I-13)。

2.3 玻璃化液对卤虫胚胎的脱水作用

正常的卤虫胚胎放入玻璃化液中后,胚胎开始脱水,由刚开始的圆形变成局部内陷,膜皱缩,随着平衡时间的延长,内陷渐趋严重(图版 I-8)。在玻璃化液中平衡处理 3 d 后,少量内陷的胚胎逐步变成圆形胚胎,随着平衡时间的延长,圆形胚胎增多。

2.4 冷冻前、后卤虫圆形和内陷皱缩胚胎的孵化率

冷冻前、后的圆形胚胎用 5% 的 NaCl 溶液孵化,孵化率都为 0。胚胎在 5% NaCl 溶液中全部破裂、融解,只有当 NaCl 的浓度达到 200% 或饱和浓度时才能避免破裂,但胚胎不能成活。

冷冻前、后的内陷皱缩胚胎,经 5% NaCl 溶液孵化后,可获得 80%~90% 的成活率。

3 讨论

3.1 玻璃化液对卤虫胚胎膜通透性的影响

卤虫胚胎在玻璃化液中,随着平衡时间的延长,圆形胚胎逐步增多,通过扫描电镜观察到这些冷冻前、后圆形胚胎膜上都有大小不等的小孔洞,而内陷皱缩的胚胎则没有。这些孔洞可能是玻璃化液对膜的损伤作用造成的。由于这些小孔洞的出现改变了膜结构的通透性,使膜失去对胚胎的保护作用,玻璃化液通过这些小孔洞进入胚胎内部,使胚胎变成圆形,同时对胚胎造成毒性和物理损伤。这些圆形胚胎用 5% NaCl 溶液孵化,胚胎全部破裂、融解,只有当 NaCl 的浓度提高到 200% 或饱和浓度时,圆形胚胎才不破裂。这进一步证明,玻璃化液进入到胚胎内部,使胚内的渗透压提高了许多。

3.2 超低温冷冻保存对卤虫胚胎膜的损伤

卤虫胚胎经玻璃化液脱水后,变得内陷、皱缩。

超低温冷冻保存过程可能对其中部分胚胎的胚胎膜有一定的损伤。经冷冻保存后的内陷皱缩胚胎有少量不能成活,扫描电镜观察发现有的胚胎膜上有被冻裂的裂纹,有的胚胎表面组织脱落。刘向宇等^[1]用甘油加二甲亚砜作为抗冻剂在液氮中保存卤虫脱壳卵,观察到冷冻后的卵膜结构完全被破坏,内部物质外泄。赵维信等^[2]在 -20℃ 保存鲤鱼胚胎,观察到冷冻对胚胎细胞表面嵴的损伤^[4]。我们观察到有裂纹的这部分胚胎内陷程度稍差,可能是胚胎在冻前平衡处理时有极少量水份没有完全脱除,致使胚胎在超低温冷冻保存时被冻裂。

3.3 玻璃化液对卤虫胚胎的冷冻保护作用

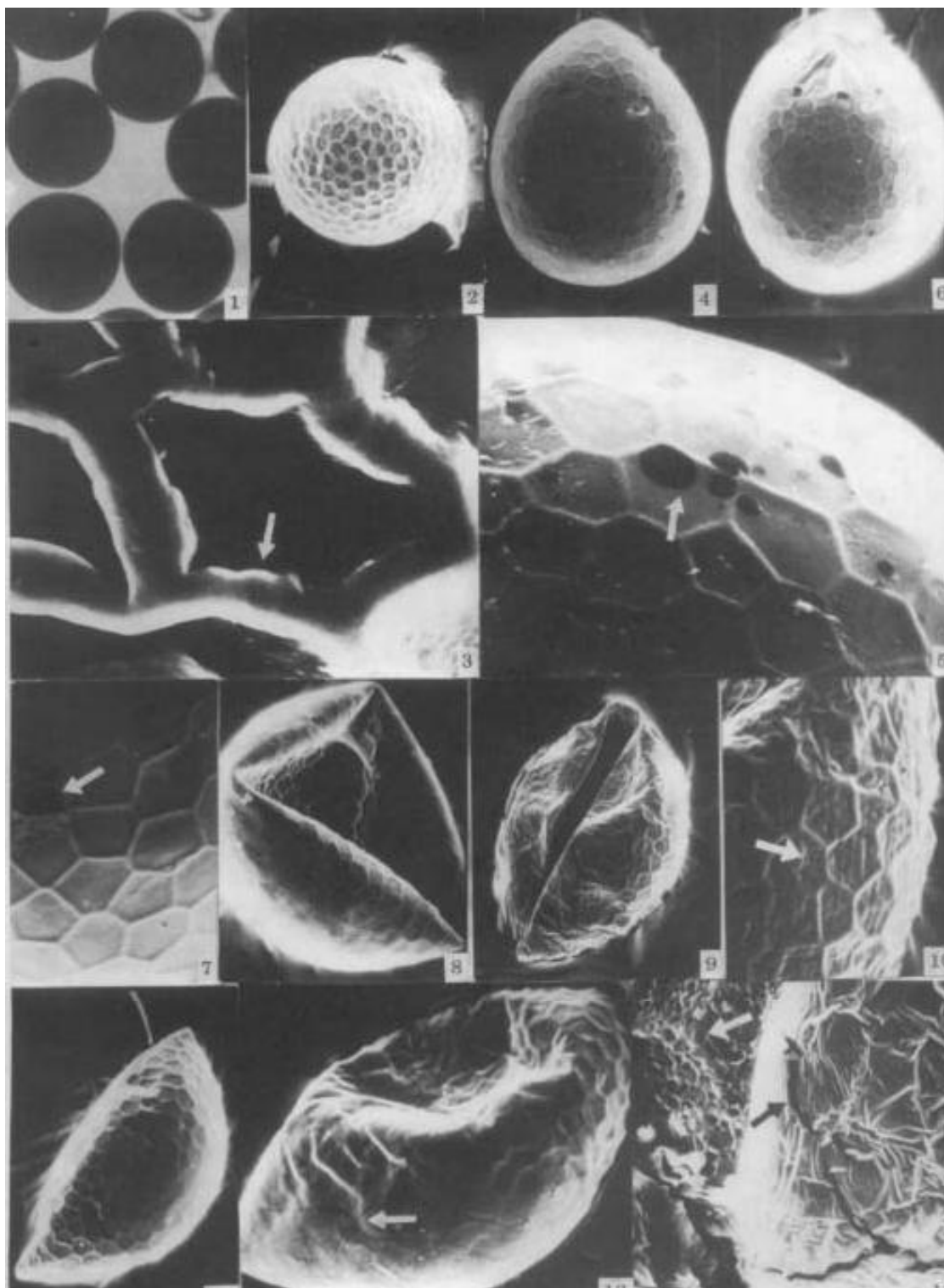
冷冻胚胎的成活关键在于能否完全脱除胚内水份,胚胎内极少的水份在冷冻过程中会形成胚内冰晶,对胚胎造成损伤,影响成活率。玻璃化液在一定的条件(13 h 以上)下,可以完全脱除胚胎内的水份,避免胚胎内形成冰晶,从图版 I-8, 9 可以看到胚胎脱水内陷的程度。从解冻内陷胚胎能够孵出幼体,而内陷程度差或圆形胚胎都不能孵出幼体,也说明了这一点。玻璃化液还能部分渗透到胚胎内部,起到降低胚内冰点的作用,使胚胎在快速冷冻保存过程中越过危险温区。用饱和的 NaCl 溶液也能脱除卤虫胚胎内的水份,但保存后的成活率不高,特别是发育几小时的胚胎,其成活率更低^[1]。

上述实验观察证明,卤虫胚胎耐抗冻剂,耐高渗,在玻璃化液中保存 3 d 对成活率没有影响。一旦玻璃化液对胚胎膜造成损伤,大量的玻璃化液进入胚胎内部时,胚胎不能成活。这就说明,胚胎在超低温冷冻保存时不可能形成胚胎内的玻璃化,因玻璃化液的大量进入对胚胎造成直接损伤。

致谢:江汉石油学院测试中心王淑敏副研究员协助电镜观察,在此致谢。

参 考 文 献

- 1 刘向宇,等. 卤虫脱壳卵的液氮冷冻保存研究. 水生生物学报, 1996, 20(3): 248~255
- 2 章龙珍,等. 卤虫胚胎和无节幼体超低温冷冻保存的研究. 中国水产科学, 1997, 4(4): 68~72
- 3 章龙珍,等. 玻璃化液对鲢鱼胚胎成活的影响. 淡水渔业, 1996, 5: 7~11
- 4 赵维信,等. 几种鲤科鱼类精子和胚胎冷冻损伤的扫描电镜研究. 淡水渔业, 1992, 5: 3~5



图版 I Plate I

- 1 正常的卤虫胚胎, $\times 90$ 。Normal *Artemia* embryo.
- 2 正常脱壳后的卤虫胚胎, $\times 270$ 。Normal shelled *Artemia* embryo.
- 3 卤虫胚胎的膜, $\times 2\ 700$ 。Membrane of *Artemia* embryo.
- 4 冷冻保存前圆形卤虫胚胎, $\times 270$ 。Round *Artemia* embryo before cryopreservation.
- 5 图版 I - 4 的放大, 箭头示胚胎膜上的小孔洞, $\times 1\ 350$ 。Magnification of Plate I - 4, arrow showing small holes on the membrane.
- 6 冷冻保存后圆形卤虫胚胎, $\times 270$ 。Round *Artemia* embryo after cryopreservation.
- 7 图版 I - 6 的放大, 箭头示膜上有小孔洞, $\times 900$ 。Magnification of Plate I - 6, arrow showing small holes on the membrane.
- 8 冷冻保存前皱陷卤虫胚胎, $\times 270$ 。Crapy *Artemia* embryo before cryopreservation.
- 9 冷冻保存后皱陷卤虫胚胎, $\times 270$ 。Crapy *Artemia* embryo after cryopreservation.
- 10 图版 I - 9 的放大, 胚胎膜上没有小孔洞, $\times 900$ 。Magnification of Plate I - 9, arrow showing no small holes on the membrane.
- 11 冷冻保存后皱陷卤虫胚胎膜上没有裂纹, $\times 450$ 。No flaws on membrane of crapy *Artemia* embryo after cryopreservation.
- 12 冷冻保存后皱陷的卤虫胚胎, 箭头示膜上裂纹, $\times 720$ 。Crapy *Artemia* embryo after cryopreservation, arrow showing flaw on membrane.
- 13 冷冻保存后的卤虫胚胎, 白色箭头示胚胎膜脱落; 黑色箭头示裂纹, $\times 900$ 。 *Artemia* embryo after cryopreservation, white arrow showing the membrane falling off; black arrow showing the flaw on the membrane.

Damage machanism of *Artemia* spp. embryos during cryopreservation

Zhang Longzhen Liu Xianting Lu Dachun Liu Ling Guo Feng Zhang Jiemin Chen Songlin

(Changjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000)

Abstract Using vitrification solution as a cryoprotective agent, the cryopreservation of *Artemia* spp. embryos was successfully carried out. By means of scanning electron microscopy (SEM), the ultrastructure of the embryophoric membrane was observed during cryopreservation. The vitrification solution can damage the embryophoric membrane and enhance the permeability, then penetrate into the embryos and result in their being poisoned and death. On the other hand, the embryophoric membrane of some embryos are physically ruptured by ice crystal during cryopreservation so that they can hardly survive.

Key words *Artemia* spp, embryo, cryopreservation, vitrification solution, damage