

不同抗冻剂对牙鲆胚胎毒性研究以及玻璃化颗粒冷冻保存方法的应用

刘本伟^{1,2}, 陈松林², 田永胜², 孔晓瑜¹, 王春花²

(1. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:以牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)不同发育期胚胎为实验材料,研究了7种渗透性和5种非渗透性抗冻剂对牙鲆尾芽期和心跳期胚胎的毒性,同时对玻璃化液在不同胚胎发育期的毒性作用,以及玻璃化颗粒冷冻过程中,冷冻颗粒降温和解冻的时间进行了研究。结果表明,单一渗透性抗冻剂对牙鲆胚胎的毒性随着抗冻剂浓度的升高、平衡时间的延长而提高,其毒性由大到小依次为乙二醇(EG)、酒精(EtOH)、甘油(Gly)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)、甲醇(MeOH)、1,2-丙二醇(PG)。非渗透性抗冻剂中聚乙烯吡咯酮(PVP)对牙鲆尾芽期胚胎的毒性最强,其次是蔗糖和D果糖,葡聚糖和葡萄糖毒性最弱。在总体积分数一定的情况下,PG、MeOH与DMSO体积比为9:6:5的混合抗冻剂对牙鲆尾芽期胚胎毒性最低;各发育期胚胎经过玻璃化液平衡后,尾芽期以前胚胎的成活率随胚胎发育期逐渐升高,心跳期以后逐渐降低,尾芽期和心跳期成活率最高。含胚胎的玻璃化颗粒冷冻降温时间最短为15.09 s,解冻时间最短为6.22 s;而不含胚胎的玻璃化颗粒冷冻降温和解冻时间分别为(13.83±1.86) s和(7.20±0.90) s。将PG、MeOH与DMSO按体积比9:6:5配成总体积分数为35%的混合溶液,再添加5%的蔗糖配制成玻璃化液,采用此玻璃化颗粒冷冻方法对173粒牙鲆尾芽期至心跳期胚胎进行超低温冷冻保存,解冻后共获得4粒成活胚胎。[中国水产科学,2007,14(5):733-742]

关键词:牙鲆(*paralichthys olivaceus*);胚胎;抗冻剂;玻璃化;颗粒冷冻保存法

中图分类号:S91

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)05-0733-10

玻璃化冷冻保存胚胎技术在牛^[1]和小鼠^[2-3]等哺乳动物上已获得成功,而鱼类由于胚胎体积大、卵黄多、对低温极其敏感,冷冻解冻后不易成活,使得胚胎冷冻保存技术一直成为困扰低温研究工作者的难题。一些学者认为,采用快速降温的玻璃化方法冷冻保存胚胎,比采用慢速降温的冷冻方法更有可能获得成功^[4-5]。玻璃化冷冻保存方法要求抗冻剂的浓度要高,而鱼类胚胎由于渗透能力低,冷冻前需要用抗冻剂处理较长的时间,从而增加了抗冻剂对胚胎的毒性损伤,造成胚胎大量死亡。为了降低胚胎在平衡过程中的死亡率,增加冷冻胚胎解冻后复活率,寻找毒性相对较低的玻璃化液是关键问题之一。

目前采用的大多数抗冻剂对生物都有一定的毒性,毒性作用与抗冻剂及生物种类有关^[6],因此在设计玻璃化液时对抗冻剂的毒性做基础性研究显得尤为重要。一些学者对此开展了一系列的研究工作,例如,低浓度抗冻剂对斑马鱼(*Brachydanio rerio*)^[7]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[8]等鱼类胚胎孵化的影响;不同抗冻剂对斑马鱼^[9-10]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)^[11-12]、鲑(*Salmo salar* L.)^[13]胚胎的渗透性等;在抗冻剂对牙鲆胚胎毒性的研究方面,Zhang等^[14]探讨了1,2-丙二醇(PG)、甲醇(MeOH)、二甲基亚砜(DMSO)、甘油(Gly)、乙二醇(EG)等5种渗透性抗冻剂的毒性作用,及其在低温下对胚胎的保护作用,但有关抗冻剂的不同平衡时间对胚胎的影响相关的报道较少。

此外,在玻璃化液种类和浓度一定的情况下加快冷冻解冻速率可提高玻璃化液在冷冻和解冻时的玻璃化率^[15]。目前鱼类胚胎冷冻所采用的玻璃化方法多为麦管冷冻法,由于该方法中玻璃化液与外界环境有麦管相隔,不能直接进行热交换,限制了降温和解冻时温度变化的速率。解冻时复温速率低就会增加麦管的反玻璃化率,因此在解冻时多采用比胚胎孵化水温高的水浴温度解冻,这样解冻时间控制不准就会增加胚胎在解冻时冻伤和烫伤的可能,

此外,在玻璃化液种类和浓度一定的情况下加快冷冻解冻速率可提高玻璃化液在冷冻和解冻时的玻璃化率^[15]。目前鱼类胚胎冷冻所采用的玻璃化方法多为麦管冷冻法,由于该方法中玻璃化液与外界环境有麦管相隔,不能直接进行热交换,限制了降温和解冻时温度变化的速率。解冻时复温速率低就会增加麦管的反玻璃化率,因此在解冻时多采用比胚胎孵化水温高的水浴温度解冻,这样解冻时间控制不准就会增加胚胎在解冻时冻伤和烫伤的可能,

收稿日期:2006-12-28; 修订日期:2007-04-19.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570259);国家863计划项目(2003AA603510).

作者简介:刘本伟(1981-),男,硕士研究生,从事鱼类低温生物学研究.

通讯作者:陈松林(1960-), Tel:0532-85844606; E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

从而降低了解冻胚胎的复活率。为了使胚胎能够在孵化水温达到较高解冻速率,探索一种能够增加解冻速率的玻璃化冷冻方法显得尤为重要。

本研究以牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)不同时期的胚胎为材料,对不同渗透性抗冻剂在不同平衡时间下的毒性、非渗透性抗冻剂毒性、几种毒性相对较低的渗透性抗冻剂的混合比例、玻璃化液对不同发育期胚胎的毒性进行了更加深入的研究。在此基础上,进行了玻璃化颗粒冷冻保存方法的研究,以期鱼类胚胎冷冻保存及损伤机理的研究提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 胚胎来源

实验所用牙鲆胚胎由山东省海阳市黄海水产有限公司提供。牙鲆亲鱼饲养于25 m³水泥池中,平均光照时间每天10 h左右,流水养殖,水温14~16℃。自然受精牙鲆胚胎收集后于14℃恒温培养箱中培养,取发育至所需阶段的胚胎(细胞期、囊胚期、原肠中期、胚孔封闭期、肌节期、尾芽期、心跳期、出膜前期、出膜期)进行实验。

1.2 抗冻剂种类及所需化学试剂

采用以NaCl、KCl、CaCl₂·2H₂O、MgCl₂·6H₂O、NaHCO₃配制而成的BS₂^[16]为基础液。与渗透性抗冻剂1,2-丙二醇(PG)、甲醇(MeOH)、甘油(Gly)、乙二醇(EG)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)、酒精(EtOH)、非渗透性抗冻剂聚乙二醇咯酮(PVP)、蔗糖(Sucrose)、葡萄糖(Glucose)、葡聚糖(Dex)、D果糖(D-fructose)配成不同浓度的抗冻液(液体试剂V/V,固体试剂m/V)进行毒性实验及冷冻保存研究。

1.3 单一渗透性抗冻剂对牙鲆胚胎的影响

以BS₂为基础液,将PG、EG、MeOH、EtOH、Gly、DMF和DMSO等7种渗透性抗冻剂配制成分总体积分数为20%(V/V)的抗冻液。取50~100粒牙鲆尾芽期和心跳期胚胎置于不同培养皿中,分别加入1 mL所配溶液在室温(12~13℃)下处理胚胎10 min、20 min、30 min和40 min,然后加入海水培养,12 h后统计各种抗冻剂处理后胚胎的成活率(成活胚胎数/总胚胎数)。将BS₂处理同期胚胎作为对照。

以BS₂为基础液,将PG与MeOH分别配制成分质量分数为20%、23%、25%、27%、30%、33%、35%、37%、40%的抗冻液。取50~100粒牙鲆尾芽

期胚胎于不同培养皿中,分别加入1 mL以上所配溶液(1.2)在室温下平衡30 min,取出加入海水培养,12 h后统计胚胎的成活率。将BS₂处理同期胚胎作为对照。

1.4 非渗透性抗冻剂对牙鲆胚胎的影响

以BS₂为基础液配成总体积分数为30%的PM抗冻液(其中PG与MeOH体积比为3:2),分别加入0 g/L、10 g/L、25 g/L、50 g/L、75 g/L、100 g/L的PVP、D果糖、蔗糖、葡萄糖和葡聚糖,室温下处理牙鲆尾芽期胚胎30 min后不洗脱直接加入海水培养,12 h后统计胚胎成活率。将BS₂处理同期胚胎作为对照。

1.5 渗透性抗冻剂混合比例对牙鲆胚胎的影响

将PG与MeOH按体积比3:2比例配成混合抗冻液,以BS₂为基础液,将此PM混合液与DMSO按体积比1:0.4:1.3:1.2:1.1:1.1:1.2配成总体积分数为30%各种混合抗冻剂,室温下分别处理牙鲆尾芽期胚胎40 min、50 min后取出加入海水培养,12 h后统计胚胎的成活率。将BS₂处理同期胚胎作为对照。

1.6 玻璃化液对不同时期牙鲆胚胎的影响

按1.5筛选到的毒性最低的PM与DMSO混合比例(体积比3:1)配制成总体积分数为25%和30%的混合抗冻液,在室温下分别处理牙鲆细胞期、囊胚期、原肠中期、胚孔封闭期、3~4对肌节期、13~15对肌节期、尾芽期、心跳期、出膜前期、出膜期胚胎,50 min后取出加入海水培养至孵化出膜,统计胚胎的孵化率(出膜胚胎数/成活胚胎数),孵化仔鱼的畸形率(畸形鱼苗数/出膜鱼苗数)。将BS₂处理后的同期胚胎作为对照。

1.7 玻璃化颗粒冷冻过程中冷冻颗粒降温、解冻时间的测定

按1.5筛选到的PM与DMSO混合比例(体积比3:1)配置总体积分数为35%的混合抗冻液,添加5%的非渗透性抗冻剂蔗糖配成玻璃化液,在13℃条件下以5步法(分别采用1/4、1/3、1/2、2/3的玻璃化液及玻璃化原液平衡胚胎,每步平衡时间相同)对牙鲆13~14对肌节胚平衡30 min、40 min、50 min。吸取25 μL玻璃化液连同1粒平衡后的胚胎直接滴入液氮冷冻并开始计时,至冷冻颗粒沉入液氮底不再发出声音停止计时,此时间定为冷冻颗粒降温时间。冷冻颗粒在液氮中冷冻1 h后取出,直接放入16℃海水中解冻,将冷冻颗粒放入海水至完全解冻时间定为冷冻颗粒解冻时间。同时以同样

方法测定无胚胎情况下冷冻颗粒降温和解冻时间。

1.8 胚胎玻璃化颗粒冷冻保存

按1.5筛选到的PM与DMSO混合比例(体积比3:1)配置总体积分数为35%的混合抗冻液,添加5%的非渗透性抗冻剂蔗糖配成玻璃化液。室温条件下平衡牙鲆尾芽期至心跳期胚胎:分步平衡是先在1/4浓度的玻璃化液中平衡90 min,再于1/2浓度的玻璃化液中平衡10 min,最后放入玻璃化液中立即开始冷冻,10 min后停止冷冻,冷冻胚胎中包括最后一步平衡时间为1 min至20 min的胚胎;一步平衡时,将胚胎直接加入玻璃化液中平衡5 min,然后开始冷冻,直至胚胎在玻璃化液中平衡20 min时停止冷冻。

采用颗粒冷冻法冷冻胚胎:吸取25 μL 玻璃化液连同1~2粒胚胎直接滴入液氮中,使其形成玻璃化冷冻颗粒。胚胎冷冻至少2 h后从液氮中取出放入16 $^{\circ}\text{C}$ 的过滤海水中解冻,解冻胚胎在过滤海水中室温下培养30 min后,将成活胚胎转入14 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养至孵化,仔鱼投喂小球藻及轮虫于14 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养。

1.9 数据处理

实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示。

利用数据统计分析软件SPSS进行单因素方差分析(one-way ANOVA),同一系列不同数据组间利用最小显著极差法进行多重比较,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 单一渗透性抗冻剂对牙鲆胚胎的毒性影响

7种渗透性单一渗透性抗冻剂对牙鲆胚胎的毒性影响如图1所示。在抗冻剂体积分数为20%时,经PG和MeOH平衡不同时间后胚胎的成活率与对照无显著差异。20%的EG、EtOH和Gly处理后,随着平衡时间的延长胚胎的成活率显著下降,EG平衡的胚胎成活率下降最为迅速,当平衡时间为30 min时胚胎的成活率降至 $(0.27 \pm 0.46)\%$ 。由此可见,在实验的几种渗透性抗冻剂中20%的EG对牙鲆尾芽期胚胎的毒性最大。20%的PG、MeOH、DMSO、EG、DMF、EtOH和Gly处理40 min后尾芽期胚胎的成活率分别为: $(90.00 \pm 1.57)\%$ 、 $(84.40 \pm 10.55)\%$ 、 $(46.77 \pm 6.90)\%$ 、 $(56.87 \pm 7.11)\%$ 、 $(11.80 \pm 8.14)\%$ 、 $(5.23 \pm 2.90)\%$,由此推断,20%的各种抗冻剂对牙鲆尾芽期胚胎的毒性由大到小依次为EG、EtOH、Gly、DMF、DMSO、MeOH、PG。

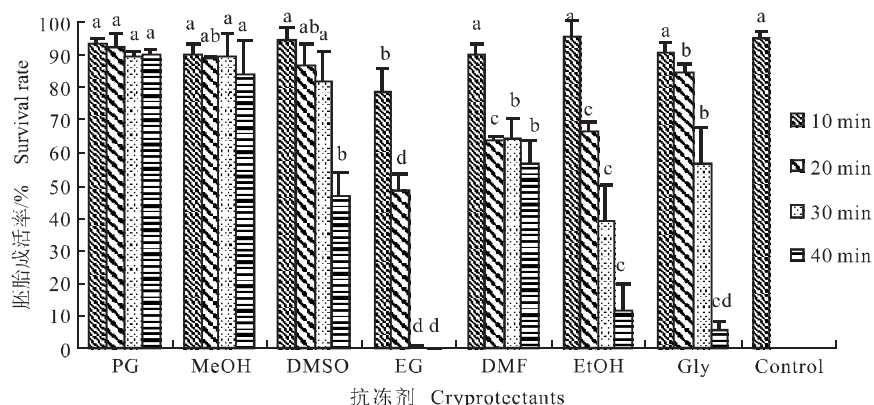


图1 牙鲆尾芽期胚胎在20%的不同单一抗冻剂中的成活率($n=3$)

注:字母不同表示组间有显著差异($P < 0.05$)。

Fig.1 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage treated with different permeable cryoprotectants in 20% (V/V) concentration ($n=3$)

Note: Different letters donate significant differences between groups.

图2显示了7种渗透性抗冻剂对牙鲆心跳期胚胎毒性作用。在20%的各种抗冻剂中PG和DMF对牙鲆心跳期胚胎的毒性较低,EG和EtOH的毒性最高;随着平衡时间的延长,经20%的MeOH平衡

的胚胎成活率下降也较为显著;20%的PG、MeOH、DMSO、EG、DMF、EtOH和Gly处理40 min后心跳期胚胎的成活率分别为 $(97.23 \pm 4.79)\%$ 、 $(59.63 \pm 6.81)\%$ 、 $(13.60 \pm 4.73)\%$ 、0、 $(96.00 \pm 2.62)\%$ 、0、

(1.63 ± 2.83)%, 由此推断 20% 的各种抗冻剂对牙
鲆心跳期胚胎的毒性由大到小依次为 EG、EtOH、

Gly、DMSO、MeOH、DMF、PG。

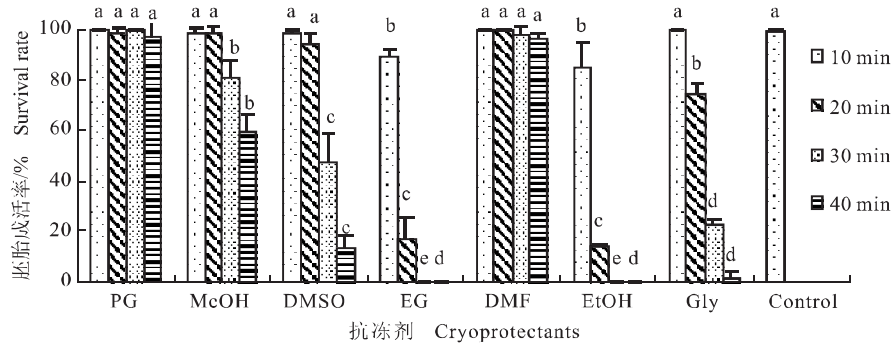


图2 牙鲆心跳期胚胎在 20% 的不同单一抗冻剂中平衡不同时间的成活率 ($n=3$)

注: 字母不同表示组间有显著差异 ($P<0.05$)。

Fig.2 Survival rate of flounder embryos at heart beating stage treated with different permeable cryoprotectants in 20% (V/V) concentration ($n=3$)

Note: Different letters donate significant differences between groups.

经不同浓度 MeOH 和 PG 平衡 30 min 后的牙
鲆尾芽期胚胎的成活率均随着抗冻剂浓度的增大而
降低, 且 MeOH 平衡的胚胎成活率降低较快, 当抗
冻剂体积分数达到 40% 时, MeOH 平衡的胚胎全部
死亡, PG 平衡的胚胎成活率也降低至 ($0.43 \pm$

0.75)%; PG 平衡后胚胎的成活率高于相同浓度的
甲醇平衡后胚胎的成活率; PG 和 MeOH 平衡后的
胚胎成活率与对照有显著性降低时的体积分数为
35%、23%, 该浓度下平衡后的胚胎成活率与其他浓
度存在着显著差异 ($P<0.05$), 见图 3。

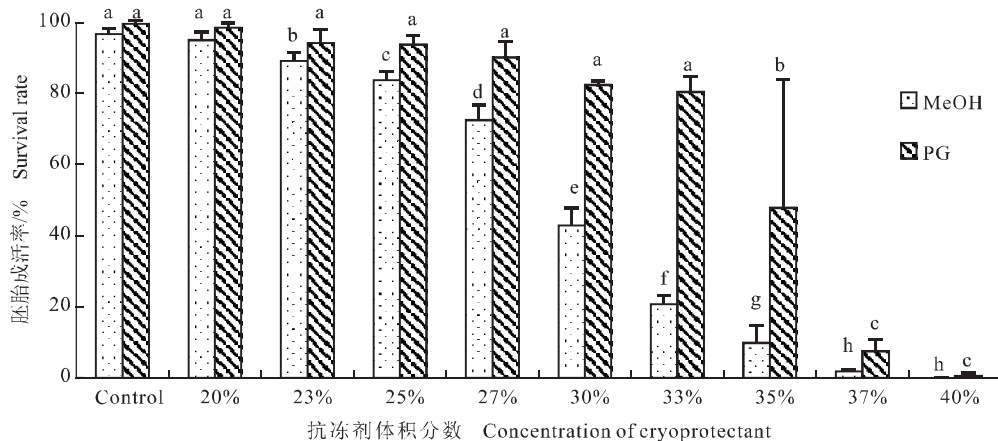


图3 牙鲆尾芽期胚胎在不同浓度 MeOH 和 PG 中平衡 30 min 的成活率 ($n=3$)

注: 字母不同表示组间有显著差异 ($P<0.05$)。

Fig.3 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage treated with MeOH and PG in different concentrations for 30 min ($n=3$)

Note: Different letters donate significant differences between groups.

2.2 非渗透性抗冻剂对牙鲆胚胎的毒性影响

非渗透性抗冻剂中不同浓度的葡萄糖对牙鲆尾
芽期胚胎的成活率没有显著影响 ($P<0.05$), PVP

对牙鲆尾芽期胚胎的成活率影响最大, 当质量浓度
达到 50 g/L 时, 胚胎成活率迅速降低至 ($69.80 \pm$
 16.91)%, 当质量浓度增加至 100 g/L 时胚胎成活

率降至 $(22.40 \pm 3.90)\%$ (图 4); 在这几种非渗透性抗冻剂中 PVP 对牙鲆尾芽期胚胎的毒性最强, 其次

是蔗糖和 D 果糖, 葡聚糖和葡萄糖毒性最弱。

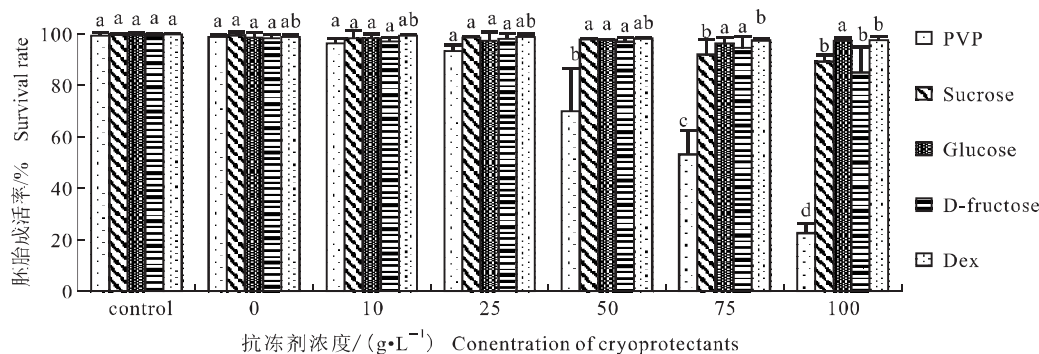


图 4 牙鲆尾芽期胚胎在不同浓度非渗透性抗冻剂中平衡 30 min 的成活率 ($n=3$)

注: 字母不同表示组间有显著差异 ($P<0.05$)。

Fig. 4 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage treated with different non-permeable cryoprotectants in different concentrations for 30 min ($n=3$)

Note: Different letters donate significant differences between groups.

2.3 3 种渗透性抗冻剂混合比例对牙鲆胚胎的影响

在总浓度一定的情况下, 3 种混合抗冻剂中各种抗冻剂的比例不同对胚胎的毒性大小不同 (图 5)。以 PG 与 MeOH 按体积比 3:2 配制成 PM 液, 以 BS2 为基础液, PM 和 DMSO 按不同体积比混合成总体积分数为 30% 的混合抗冻液 (PMD)。平衡

牙鲆尾芽期胚胎 40 min 和 50 min 时, 各比例之间存在显著性差异 ($P<0.05$), 当 PM 与 DMSO 体积比为 3:1 时, 胚胎的成活率显著高于其他比例下胚胎的成活率 ($P<0.05$), 在总积分分数一定的情况下, PM 与 DMSO 体积比为 3:1 时, 混合抗冻剂对牙鲆尾芽期胚胎的毒性最小。

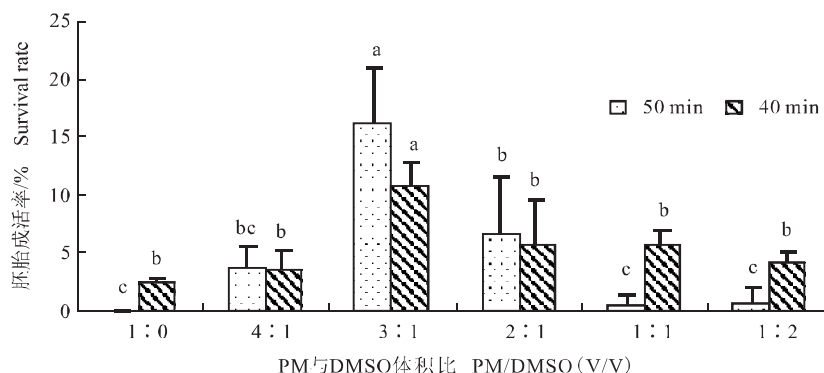


图 5 牙鲆尾芽期胚胎在不同比例混合抗冻液中平衡不同时间的成活率 ($n=3$)

注: 字母不同表示组间有显著差异 ($P<0.05$)。

Fig. 5 Survival rate of flounder embryos at tail-bud stage treated with cryoprotectants combined with PM ($V_{PG}: V_{MeOH} = 3:2$) and DMSO ($n=3$)

Note: Different letters donate significant differences between groups.

2.4 玻璃化液对不同时期牙鲆胚胎的影响

在不同发育时期, 牙鲆胚胎对玻璃化液的耐受

能力不同 (图 6)。随着牙鲆胚胎的发育, 25% PMD (PG 与 MeOH 体积比 3:2 混合液, 再与 DMSO 按体

积比 3:1 混合)平衡 50 min 后的胚胎,心跳期以前各时期孵化率逐渐升高,但没有显著性差异 ($P > 0.05$),心跳期以后胚胎孵化率迅速降低,且与其他时期差异显著 ($P < 0.05$),尾芽期和心跳期胚胎孵化率最高,分别为 $(96.03 \pm 1.11)\%$ 和 $(93.20 \pm 7.34)\%$; 30% PMD 平衡 50 min 后的各时期胚胎孵化率均低于 25% PMD, 胚胎孵化率变化趋势与 25% PMD 平衡时胚胎孵化率变化相似,心跳期胚

胎孵化率最高,为 $(97.90 \pm 0.50)\%$ 。经过 25% PMD 和 30% PMD 平衡 50 min 的胚胎孵化仔鱼的畸形率均有随着胚胎发育时期的推后而逐渐升高的趋势,且心跳期以后各期胚胎之间的差异性显著 ($P < 0.05$),25% PMD 和 30% PMD 平衡后的出膜期胚胎孵化的仔鱼几乎全部畸形,畸形率分别为 100% 和 $(99.60 \pm 0.80)\%$ (图 7)。

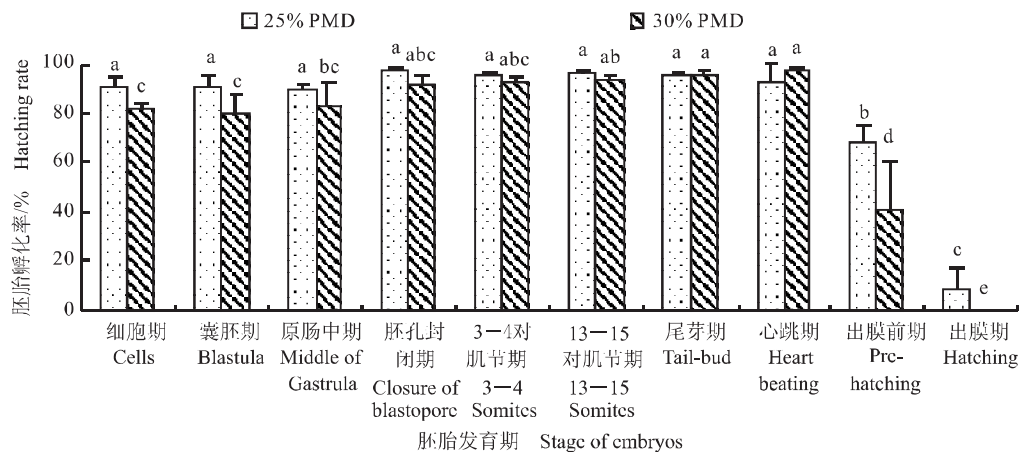


图 6 不同发育期牙鲆胚胎在 25% 和 30% 的 PMD 中平衡 50 min 的孵化率 ($n=4$)

注: 字母不同表示组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Survival rate of flounder embryos at different stages treated with 25% or 30% PMD ($V_{PG}: V_{MeOH} = 3:2$, $V_{PM}: V_{DMSO} = 3:1$) for 50 min ($n=4$)

Note: Different letters donate significant differences between groups.

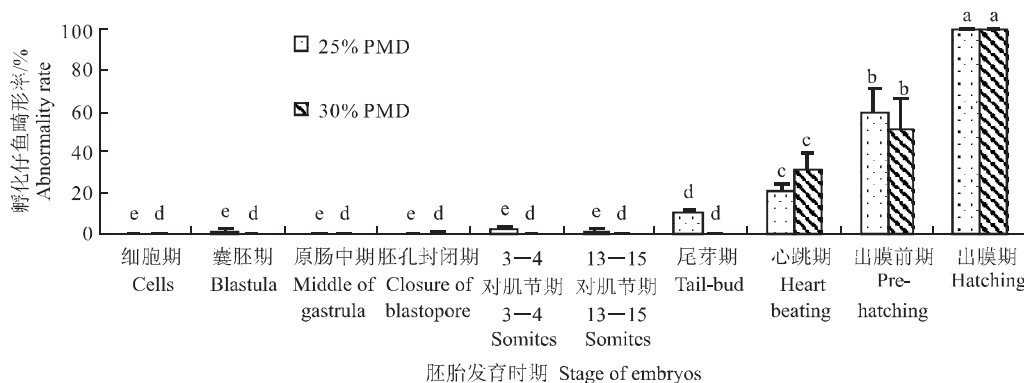


图 7 不同发育期牙鲆胚胎在 25% 和 30% 的 PMD 中平衡 50 min 后孵化仔鱼的畸形率 ($n=4$)

注: 字母不同表示组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 7 Abnormality rate of flounder fry hatched from embryos treated with 25% or 30% PMD ($V_{PG}: V_{MeOH} = 3:2$, $V_{PM}: V_{DMSO} = 3:1$) for 50 min ($n=4$)

Note: Different letters donate significant differences between groups.

2.5 玻璃化颗粒冷冻过程中降温、解冻时间的测定

在有胚胎的情况下,随着冷冻前平衡时间延长,冷冻颗粒降温时间有缩短的趋势(图8),冻前平衡30 min组冷冻时降温时间最长,为 (16.79 ± 1.61) s,冷冻颗粒从 13°C 降至 -196°C 平均降温速率为 $746.87^{\circ}\text{C}/\text{min}$,平衡50 min的胚胎降温时间最短,为 (15.09 ± 1.35) s,平均降温速率为 $831.01^{\circ}\text{C}/\text{min}$,各平衡时间组之间解冻时间没有明显差别,解冻时间依次为 (6.22 ± 0.72) s、 (6.38 ± 0.88) s、 (6.31 ± 0.22) s,冷冻颗粒从 -196°C 升温至 16°C 升温速率最大为 $2\,045.02^{\circ}\text{C}/\text{min}$;无胚胎情况下冷冻颗粒降温时间均比有胚胎时短,解冻时间均比有胚胎时长,且差异显著($P < 0.05$),无胚胎时冷冻颗粒降温和解冻时间分别为 (13.83 ± 1.86) s、 (7.20 ± 0.90) s,降温 and 升温速率分别为 $906.72^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 $1\,766.67^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

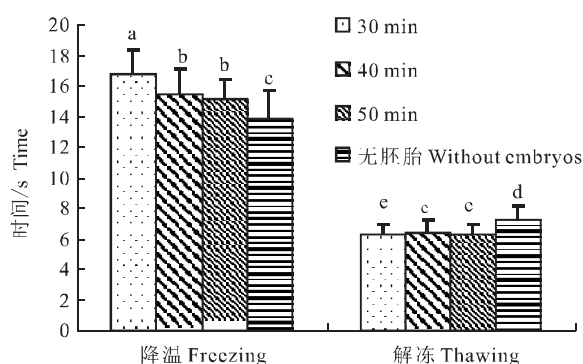


图8 玻璃化颗粒冷冻过程中有胚胎和无胚胎下冷冻颗粒降温和解冻时间 ($n=24$)

注:字母不同表示组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig.8 Freezing and thawing time of droplets with and without embryos during vitrified droplets cryopreservation ($n=24$)

Note: Different letters donate significant differences between groups.

2.6 胚胎玻璃化颗粒冷冻保存

以分步法平衡后,从33粒冷冻胚胎中获得1粒心跳期成活胚胎(图版1),成活率为3.03%,解冻10 h后孵化出正常仔鱼。以一步法平衡后,共获得3粒成活胚胎,其中尾芽期胚胎68粒复活2粒,成活率为2.94%;心跳期胚胎72粒复活1粒,成活率1.39%,3粒胚胎均孵化出正常仔鱼。4尾仔鱼孵化后均正常投喂管理,但期间仔鱼均未开口摄食,最后全部死亡,

存活最短时间为11 d,最长时间为15 d。

3 讨论

本实验通过对各种单一抗冻剂和混合抗冻剂的毒性进行研究,发现7种渗透性抗冻剂对牙鲆尾芽期胚胎的毒性由大到小依次为EG、EtOH、Gly、DMF、DMSO、MeOH、PG,当抗冻剂PG、MeOH和DMSO以体积比9:6:5混合时混合抗冻剂对牙鲆尾芽期胚胎的毒性最弱,牙鲆尾芽期和心跳期胚胎对玻璃化液的耐受能力最强,经玻璃化液平衡后成活率最高且孵化仔鱼的畸形率相对较低,是比较适宜超低温冷冻的胚胎时期。

不同种类、不同浓度的抗冻剂对不同的生物材料的毒性不同^[6]。Cabrita^[18]等研究了大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)胚胎对渗透性抗冻剂DMSO、MeOH和EG以及非渗透性抗冻剂PVP、蔗糖和X-1000的耐受能力,发现在3种渗透性抗冻剂浓度相同的情况下,大菱鲆尾芽期胚胎对DMSO的耐受能力高于MeOH和EG,非渗透性抗冻剂中只有20%的蔗糖使尾芽期胚胎的孵化显著下降。Dinnyés等^[19]发现用DMSO和Gly对原肠中期鲤胚胎处理5 min后,没有明显的毒性作用,在处理1 h以后,MeOH对桑椹胚和原肠中期的胚胎毒性最低。本实验在室温下利用不同渗透性抗冻剂,对牙鲆尾芽期胚胎平衡处理的结果显示,在体积分数为20%时,PG和MeOH对尾芽期胚胎的毒性最低,且在这两种抗冻剂中尾芽期胚胎较心跳期胚胎能够耐受更长时间的平衡,这与田永胜等^[16]对不同时期牙鲆胚胎对玻璃化液耐受能力的研究相似。EG和Gly对尾芽期胚胎毒性最高,在EG中平衡30 min后胚胎的成活率即降为 $(0.27 \pm 0.46)\%$ 。非渗透性抗冻剂中只有PVP随着浓度提高使牙鲆尾芽期胚胎的成活率迅速降低,实验中各种浓度葡萄糖对尾芽期胚胎的成活率没有显著影响。

不同时期的胚胎对抗冻剂的耐受能力也不同。田永胜等对鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[20]、大菱鲆^[17]胚胎超低温冷冻保存的研究发现:鲈神经胚对玻璃化液的耐受能力最弱,心跳期最强,而大菱鲆的肌节胚和尾芽胚对玻璃化液的适应能力最强。柳凌等^[21]在研究DMSO对泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)胚胎脱水量及存活率的影响时发现DMSO处理后的泥鳅胚胎尾芽期成活率高于心跳期。

Zhang^[22]在对斑马鱼胚胎进行冷冻保存中发现,斑马鱼胚胎进行超低温冷冻保存的最佳发育期应为心跳期。本实验中不同时期牙鲆胚胎在玻璃化液中的存活率随着胚胎发育期不同,尾芽期以前逐步升高,心跳期以后逐步降低,尾芽期与心跳期存活率最高,心跳期略高于尾芽期,但差异不显著,该结果与田永胜等^[20]在鲈鱼上和 Zhang^[22]在斑马鱼上的研究结果相类似。此外柳凌等^[21]在对泥鳅胚胎脱水量的研究中发现,在 DMSO 平衡时间不超过 2h 的情况下,同样处理的心跳期胚胎的脱水量要高于尾芽期,说明尾芽后期至心跳期胚胎可能是比较适宜超低温冷冻保存的牙鲆胚胎时期。

在胚胎及卵母细胞冷冻保存上采用的玻璃化方法较多。在家畜卵母细胞的冷冻保存上有细管法、开放式拉长塑料细管法、电子显微镜铜网法、微滴法、坚硬表面玻璃化法和冷环玻璃化法等方法^[23];鱼类胚胎的玻璃化冷冻保存多采用细管法,也有的采用塑料离心管方法,并在牙鲆^[24]、鲈鱼^[20]、泥鳅^[25]等鱼类上获得了解冻后复活胚胎。但不论采用细管法还是采用塑料离心管法,容器内玻璃化液与外界都不能直接接触,从而有可能降低冷冻和解冻过程中管内外的热交换速率,但未见对有容器和无容器时热交换速率的对比研究。田永胜^[26]在研究玻璃化麦管解冻时的温度变化时发现,在 35~45℃ 水浴解冻时麦管温度从 -196℃ 上升至 13℃ 的解冻速率在 1 500~2 000℃/min,本研究首次将颗粒冷冻方法应用于牙鲆胚胎的玻璃化冷冻保存,实验中在有胚胎情况下冷冻颗粒在 16℃ 海水中解冻即可获得 2045.02℃/min 的解冻速率,解冻速率明显高于麦管^[26]解冻速率。由此可见,由于颗粒冷冻法使玻璃化液在冷冻和解冻时都能直接与外界接触,能够提高冷冻颗粒的降温 and 复温速率,并有可能提高玻璃化液的玻璃化率,使较低浓度的玻璃化液在冷冻和解冻过程中即能够形成玻璃化,降低了冷冻过程中使用的玻璃化液的浓度,从而减小了冷冻前平衡过程中玻璃化液对胚胎的平衡损伤;由于解冻速率加快,使冷冻颗粒在常温海水中即可短时间恢复温度,避免了在高温解冻时解冻时间控制不准对胚胎造成的损伤。本实验采用颗粒冷冻方法对牙鲆胚胎进行了超低温冷冻保存,并在 3 次冷冻实验中从 173 粒冷冻胚胎中获得 4 粒复活胚胎。4 粒胚胎均孵化出鱼苗,最长存活 15 天,表明玻璃化颗粒冷冻方法在牙鲆胚胎的超低温冷冻保存中也是一条可以利用的途径。

参考文献:

- [1] Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, et al. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts[J]. Anim Reprod Sci, 1997, 48: 27-36.
- [2] Men H S, Chen J C, Ji W Z, et al. Cryopreservation of kunming mouse oocytes using slow cooling, ultrarapid cooling and vitrification protocols[J]. Theriogenology, 1997, 47: 1 423-1 431.
- [3] Rall W F, Fahy G M. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196℃ by vitrification[J]. Nature, 1985, 313: 573-575.
- [4] Liu X H, Zhang T, Rawson D M. Feasibility of vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) embryos using methanol[J]. Cryoletters, 1998, 19: 309-318.
- [5] Wusteman M, Robinson M, Pegg D. Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution[J]. Cryobiology, 2004, 48: 179-189.
- [6] Fahy G M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology[J]. Cryobiology, 1986, 23: 1-13.
- [7] Zhang T, Rawson D M, Morris G J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. Aquat Living Res, 1993, 6: 145-153.
- [8] Ahammad M M, Bhattacharyya D, Jana B B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures [J]. Cryobiology, 2002, 44: 114-121.
- [9] Harvey B, Kelley R N, Ashwood-Smith M J. Permeability of intact and dechorionated zebrafish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide [J]. Cryobiology, 1983, 20: 432-439.
- [10] Zhang T, Rawson D M. Permeability of the vitelline membrane of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to methanol and 1, 2-propylene glycol[J]. Cryoletters, 1996, 17: 273-280.
- [11] Cabrita E, Chereguini O, Luna M, et al. Effect of different treatments on the chorion permeability to Me₂SO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture, 2003, 221: 593-604.
- [12] Cabrita E, Robles V, Chereguini O, et al. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol [J]. Theriogenology, 2003, 60: 463-473.
- [13] Harvey B, Ashwood-Smith M J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes [J]. Cryobiology, 1982, 19: 29-40.
- [14] Zhang Y Z, Zhang S C, Liu X Z, et al. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos[J]. Theriogenology, 2005, 63: 763-773.
- [15] 周国燕, 华泽钊, 匡延平. 麦管玻璃化技术的热特性研究 [J]. 低温工程, 2003, 2: 15-19.
- [16] 田永胜, 陈松林, 严安生. 牙鲆胚胎玻璃化冷冻技术研究 [J]. 高技术通讯, 2005, 15 (3): 105-110.
- [17] 田永胜, 陈松林, 于过才, 等. 大菱鲆胚胎的玻璃化冷冻保存 [J]. 水产学报, 2005, 29 (2): 275-280.

- [18] Cabrita E, Robles V, Chereguini O, et al. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Cryobiology*, 2003, 47: 204 – 213.
- [19] Dinnyés A, Urbányi B, Baranyai B, et al. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different development stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress [J]. *Theriogenology*, 1998, 50: 1 – 13.
- [20] 田永胜, 陈松林, 严安生, 等. 鲈鱼胚胎的玻璃化冷冻保存 [J]. *动物学报*, 2003, 49 (6): 843 – 850.
- [21] 柳凌, 刘宪亨, 章龙珍, 等. DMSO 对泥鳅胚胎脱水量及存活率的影响 [J]. *中国水产科学*, 1998, 5 (4): 27 – 32.
- [22] Zhang T. Cryopreservation of prehatch embryos of zebra fish [J]. *Aquat Living Res Vivantes Aquat*, 1993, 6: 145 – 153.
- [23] 李雪松, 桑润滋. 家畜卵母细胞冷冻保存研究进展 [J]. *河北畜牧兽医*, 2005, 21 (4): 16 – 17.
- [24] Chen S L, Tian Y S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification [J]. *Theriogenology*, 2005, 63: 1 207 – 1 219.
- [25] 章龙珍, 鲁大椿, 柳凌, 等. 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究 [J]. *水产学报*, 2002, 26 (3): 213 – 218.
- [26] 田永胜. 三种海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2004. 1 – 141.

Toxicity of different cryoprotectants to Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos and application of vitrified droplets method

LIU Ben-wei^{1,2}, CHEN Song-lin², TIAN Yong-sheng², KONG Xiao-yu¹, WANG Chun-hua²

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China)

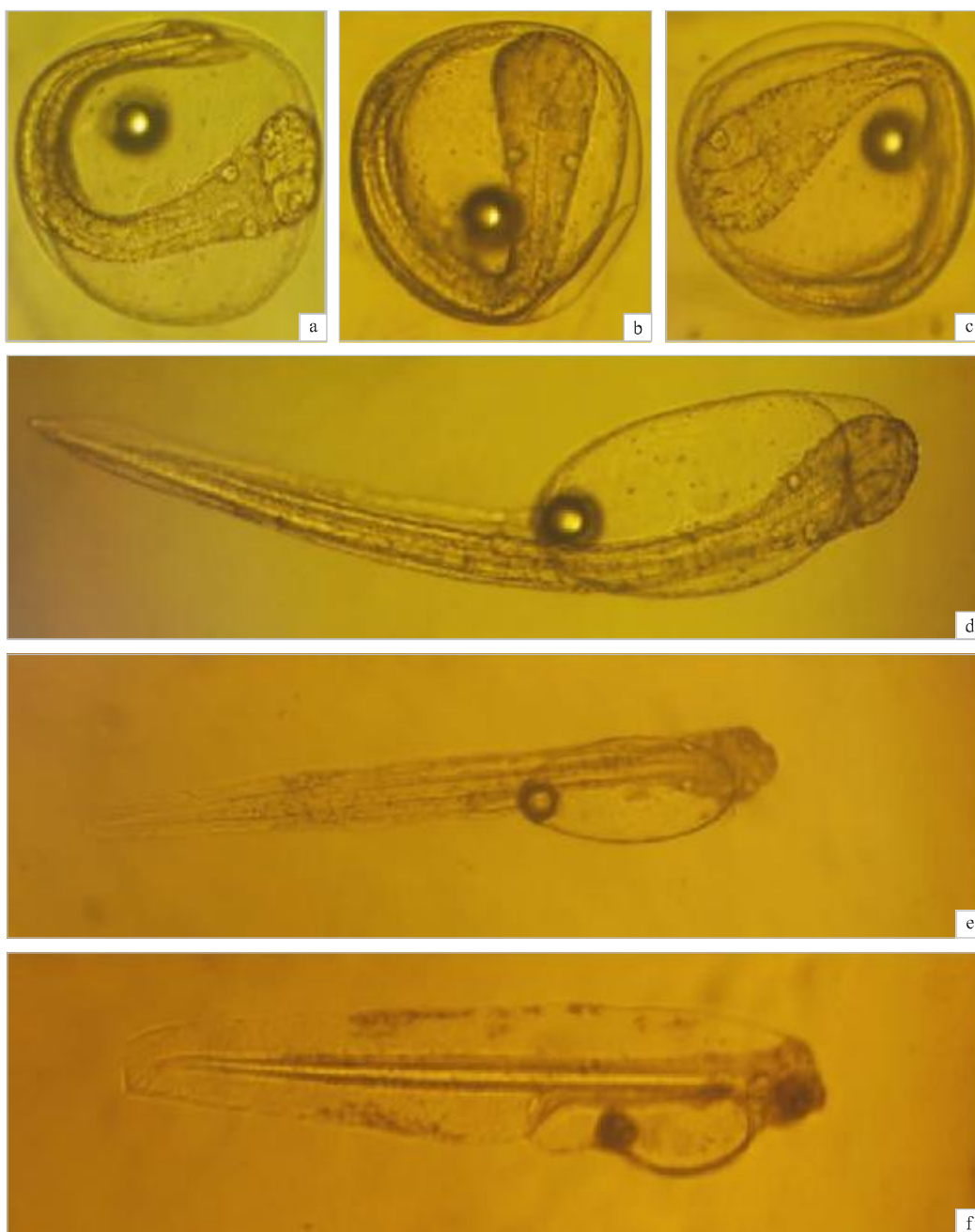
Abstract: The objectives of this study were to analyze the toxicity of seven permeable and five non-permeable cryoprotectants on flounder embryos and to find a suitable method for cryopreservation of flounder embryos. The proportion of permeable cryoprotectants in vitrification, the toxicity of vitrification on embryos at different stages and the equilibrated effect on embryos of every step in five step method were also studied. The results showed that the toxicity of different cryoprotectants on flounder increased with concentration and exposure time. The toxicity of permeable cryoprotectants was: EG > EtOH > Gly > DMF > DMSO > MeOH > PG. In the five non-permeable cryoprotectants, the toxicity of PVP on flounder embryos is the highest, and the toxicity of glucose and dextran is the lowest. When the volume proportion of PG and MeOH is 3:2 and PM:DMSO is 3:1, the toxicity of combined cryoprotectant on flounder embryos is the lowest. The survival rate of the embryos at tail-bud stage and heart beating stage is higher than other stages after exposure in the selected vitrification solution. The freezing and thawing time of vitrified droplets were tested. And the shortest freezing and thawing time of the droplets with embryos were 15.09 s and 6.22 s, respectively. The flounder embryos from tail-bud stage to heart beating stage were cryopreserved using selected vitrification solution and vitrified droplets method, and 4 survival embryos were obtained. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 733 – 742]

Key words: Japanese flounder; embryo; cryoprotectant; vitrification; droplets method

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

刘本伟等: 不同抗冻剂对牙鲆胚胎毒性研究以及玻璃化颗粒冷冻保存方法的应用

LIU Ben-wei et al: Toxicity of different cryoprotectants to Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos and application of vitrified droplets method



图版 I

a: 正常牙鲆心跳期胚胎, $\times 60$; b: 解冻后复活心跳期胚胎, $\times 60$; c: 复活胚胎解冻后培养 30 min, $\times 60$; d: 复活胚胎孵化第 1 天仔鱼, $\times 60$; e: 复活胚胎孵化第 2 天仔鱼, $\times 40$; f: 复活胚胎孵化第 3 天仔鱼, $\times 40$.

Plate I

a: Normal flounder embryo at heart beating stage, $\times 60$; b: The resurgent embryo at heart-beating stage after thawed, $\times 60$; c: The resurgent embryo cultured for 30 min after thawed, $\times 60$; d: The first day larval after hatching from resurgent embryo, $\times 60$; e: The second day larval after hatching from resurgent embryo, $\times 40$; f: The third day larval after hatching from resurgent embryo, $\times 40$.