

卤虫胚胎和无节幼体超低温冷冻保存的研究^{*}

章龙珍 刘宪亭 张洁明 鲁大椿 郭峰 柳凌

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州市 434000)

摘 要 用玻璃化液作为低温保护剂, 对卤虫胚胎和无节幼体进行超低温冷冻保存实验。通过实验筛选出 5 种适宜卤虫胚胎保存的玻璃化液, 找出了影响胚胎成活的降温温层和升温温层, 使胚胎经 -196°C 保存后的成活率稳定在 90%。建立了较为完善的卤虫胚胎冷冻保存的程序。卤虫无节幼体经超低温冷冻保存后, 获得 3-5% 的成活率。

关键词 冷冻保存, 玻璃化液, 胚胎, 无节幼体, 卤虫

卤虫(*Artemia spp.*)是甲壳类动物, 生活在沿海地区的盐田和内陆高盐湖泊中。由于卤虫的卵子小, 且外层有一个很硬的鞘保护着, 所以风干后的卤虫休眠卵在 $3-4^{\circ}\text{C}$ 下可以长期保存。如果保存温度升高, 随着时间的延长, 卵子孵化率下降。卤虫幼体是鱼、虾、蟹苗的优质活饵料, 开展卤虫胚胎和无节幼体的超低温冷冻保存研究, 其主要目的是使该种质在超低温下不受时间和环境因素的影响得到真正的保存; 其次是探索超低温保存种质的一些冷冻损伤机理, 为其它经济水产甲壳动物冷冻基因库的建立和水生动物配子、胚胎低温保存提供参考依据。刘向宇等^[1,2]报道了卤虫无节幼体在低温冰箱 -30°C 保存 10 分钟后获得 86.4% 成活。在液氮用抗冻剂保存孵化 3h 的卤虫胚胎获得 43% 成活, 保存孵化 4h 的胚胎没有成活。卤虫胚胎超低温保存还没有形成完整的技术, 无节幼体超低温保存还没有获得成功。

用玻璃化液在液氮保存哺乳动物胚胎已经获得成功^[6,7], 但它保存水生动物胚胎的报道却很少^[3]。本文利用玻璃化液作为抗冻剂对卤虫胚胎和无节幼体超低温冷冻保存技术进行系统的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

卤虫休眠卵为美国 San Francisco Bay Brand, Inc. 进口产品, 室温下在 3% 的 NaCl 溶液

收稿日期: 1997-03-31。

^{*} 本研究为国家“八五”科技攻关子专题, 编号 85-15-01-02-03。

中孵化率达 85% 以上。

1.2 方法

1.2.1 不同的玻璃化液对冷冻前卤虫胚胎、无节幼体成活率的影响 将卤虫的休眠卵放入 3% 的 NaCl 溶液中, 于室温 26.9℃ 下吸水 6h 后, 滤去 NaCl 溶液, 放在 0—5℃ 培养箱预冷的各玻璃化液中, 继续平衡 0.5d、1.5d、5d、6d, 取出并滤去玻璃化液, 用 5% 的 NaCl 溶液冲洗 3—5 次后, 放入 5% 的 NaCl 溶液中孵化, 然后统计无节幼体数量。卤虫幼体为出膜 1d 的无节幼体, 在 0—5℃ 下各玻璃化液中平衡处理 1d、2d、5d、6d、10d 后取出, 用 5% 的 NaCl 的溶液冲洗 3—5 次, 放入 5% 的 NaCl 溶液中培养, 统计能游动的幼体数量。

1.2.2 冷冻前玻璃化液处理时间

对卤虫胚胎超低温冷冻保存效果的影响 将卤虫休眠卵放入 3% 的 NaCl 溶液中, 在 15℃ 培养箱中孵化 35h, 去 NaCl 溶液, 放入筛选出来的 3-e、5-e、6-b 玻璃化液和 15% DMSO 中, 同时作对照。在 0—5℃ 培养箱中分别平衡 0.5d、1.5d、3.5d、4.5d、13d、20d、26d, 将平衡过的胚胎装入小塑料管中, 用低温生物降温仪进行程控降温冷冻。

1.2.3 快速冷冻降温和解冻升温的温层对胚胎的影响 将卤虫卵在 15℃ 培养箱中经过 35h 的孵化, 待部分胚胎出现脱壳, 再将这些胚胎移入 0—5℃ 预冷的 3-e、5-e、6-b 玻璃化液中, 继续平衡 3.5d, 然后将样品快速降温至不同的温层, 平衡 10 分钟进入液氮冷冻保存。经液氮保存 3h 的胚胎以不同的升温方法进行解冻。解冻的胚胎用 5% 的 NaCl 冲洗 3—5 次后, 放入 5% 的 NaCl 溶液中, 再置于培养箱(15℃)中孵化, 计算出膜的无节幼体。

1.2.4 卤虫脱壳胚胎和无节幼体超低温保存

脱壳卵的制备 将卤虫休眠卵先用自来水浸泡 5h 后加入等量的次氯酸钠溶液脱壳, 脱壳时间 7 小时。将脱壳的卤虫卵用 5% 的 NaCl 溶液培养至脱膜前, 然后放入 3-e、4-b、6-b 玻璃化液中置于 -5℃ 分别平衡处理 10min、13h、24h、48h、72h, 将平衡过的胚胎作超低温冷冻保存; 卤虫无节幼体的保存, 选用刚出膜 1d 的无节幼体, 以 3-e、4-b、5-e、6-b 玻璃化液作为保存液, 在 -5℃ 平衡 66h, 然后作超低温冷冻保存。

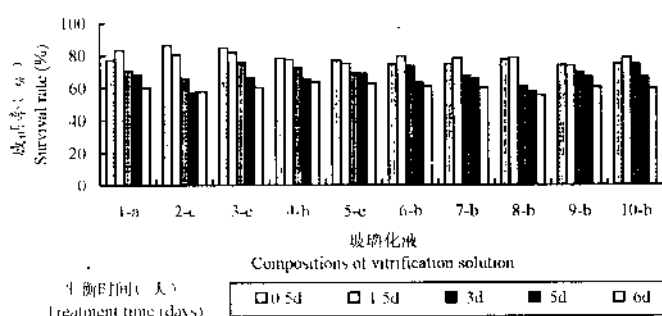


图 1 冷冻前玻璃化液对卤虫胚胎成活率的影响

Fig.1 Effects of vitrification solution on the survival rate of *Artemia* embryo before cryopreservation

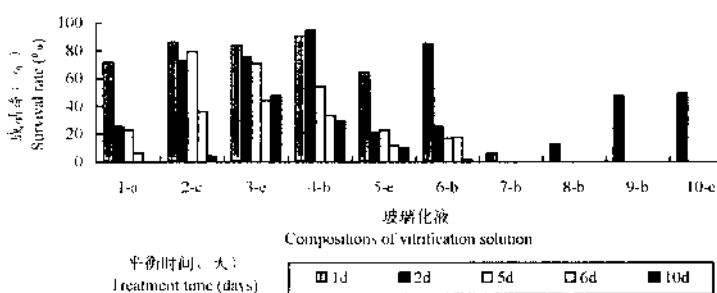


图 2 冷冻前玻璃化液对卤虫无节幼体成活率的影响

Fig.2 Effects of vitrification solution on the survival rate of *Artemia* nauplii before cryopreservation

2 结果

2.1 玻璃化液对卤虫胚胎、无节幼体冷冻前成活率的影响

10 组不同组合的玻璃化液对卤虫胚胎成活率的影响是随着处理时间的延长成活率逐渐降低,在平衡时间内这些玻璃化液对卤虫胚胎成活的影响没有显著的差异,见图 1。而 10 组不同组合的玻璃化液对卤虫无节幼体成活率的影响差异较大,特别是 7-b、8-b、9-b、10-c 玻璃化液对卤虫无节幼体成活率影响最大,经上述玻璃化液处理 2d 的无节幼体全部死亡。而 3-e、4-b 处理的无节幼体第 10d 还有 30-40% 成活,见图 2。

2.2 冷冻前玻璃化液处理时间对超低温冷冻保存卤虫胚胎的影响

卤虫胚胎在 3-e、5-e、6-b 玻璃化液中未经平衡处理的成活率最低,最高只达到 50%,在玻璃化液中随着平衡时间的延长,冷冻后成活率提高,平衡 1.5-4.5d,冷冻胚胎的成活率可达 90%。3-e、5-e、6-b 玻璃化液对卤虫胚胎在低温下有很好的保护作用,经低温平衡处理 26d,仍能获得 75-80% 的成活率。用 15% 的 DMSO 保存最高只获得 40% 的成活率,对照组成活率仅为 7%,见图 3。

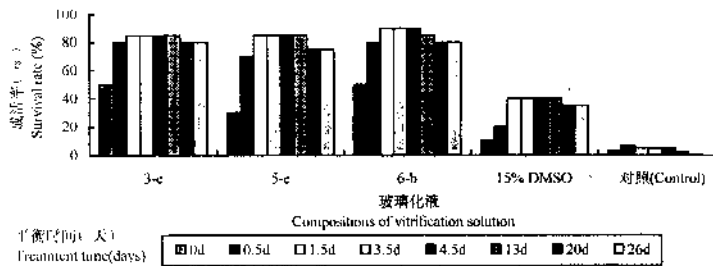


图 3 冷冻前平衡时间对卤虫胚胎超低温冷冻保存的效果

Fig.3 Effects of treatment time on the survival rate of *Artemia* embryo before cryopreservation

2.3 冷冻降温和解冻升温温层对卤虫胚胎成活的影响

用玻璃化液作抗冻剂保存卤虫胚胎,在快速冷冻降温过程中,当样品从 -20℃ 平衡 5min 后,快速降至 -120℃--196℃ 的各个温层,对胚胎的成活没有明显影响,都能获得 85-90% 的成活率。而当温度从 -20℃ 降至 -120℃ 以上温度时,随着降温温层的升高成活率下降,见图 4。解冻升温温层对卤虫胚胎成活率的影响,液氮中的冷冻胚胎从 -196℃ 升至 -120℃ 的各个温层,平衡 20min 后解冻对胚胎成活没有大的影响。解冻温度从 -120℃ 升至 -20℃ 以下温区时,解冻后胚胎成活率明显下降,升至 -20℃ 时解冻,仍能获得较高的成活率,见图 5。

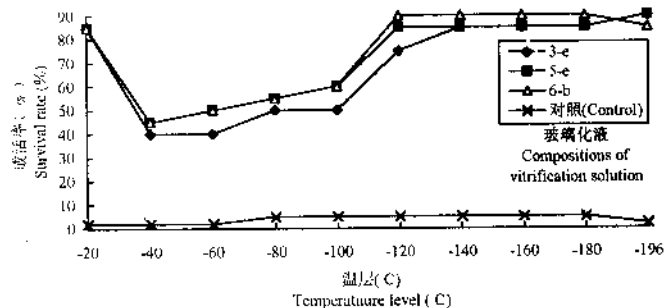


图 4 冷冻降温温层对卤虫胚胎冷冻保存的效果

Fig.4 Effects of temperature level during freezing on the survival rate of *Artemia* embryo

2.4 卤虫脱壳胚胎和无节幼体超低温冷冻保存结果

卤虫脱壳胚胎经冻前平衡 24h 后,冷冻保存成活率达到最高,其中 3-e 玻璃化液保存效果最好,最稳定,见图 6。用 4-b 玻璃化液保存卤虫无节幼体,解冻后有 2 个幼体微弱摆

动, 换 5% 的 NaCl 溶液后, 幼体破裂死亡。用 6-b、5-e 玻璃化液保存无节幼体, 解冻后分别获得了 3% - 5% 的成活率。用 6-b 玻璃化液在 -120°C 下保存 10min 的无节幼体, 解冻后获得 12% 的成活率。

3 讨论

3.1 玻璃化液对卤虫胚胎、无节幼体的影响

卤虫因为生活在沿海盐田和内陆的高盐湖泊中, 其自身的生理特性是耐高渗, 经饱和的 NaCl 溶液处理后仍能成活^[1]。从试验结果看, 卤虫的胚胎不但耐高渗, 而且耐抗冻剂, 低温下在玻璃化液中可较长时间保存。卤虫的无节幼体在 7-b、8-b、9-b、10-c 等玻璃化液中最高只能保存 1d, 第 2d 全部死亡。在这几种玻璃化液中都含有甲醇, 卤虫的幼体对甲醇是否敏感以及耐受程度, 有待进一步研究。

3.2 冷冻前玻璃化液的平衡处理时间对超低温保存效果的影响

如果按常规保存哺乳动物胚胎的方法, 对卤虫胚胎进行冻前短时间(10min)的平衡处理, 解冻后胚胎成活率很低。卤虫胚胎在玻璃化液中要经过 13h 以上的平衡时间, 才能使胚胎内部的水分充分脱除, 获得高成活率。由此可以认为, 影

响胚胎成活的主要原因是冻前平衡时间的掌握, 如果平衡时间短, 胚胎内部的水分还没有充分脱除, 在冷冻过程中就会形成胚内冰晶, 造成胚胎的死亡。

3.3 快速冷冻降温和解冻升温温层对卤虫胚胎成活率的影响

利用玻璃化液保存卤虫胚胎, 采用快速降温 and 升温的方法一步脱除抗冻剂可以避免慢慢降温的费时, 解冻时脱除抗冻剂的烦琐^[4], 使卤虫胚胎冷冻保存变得简单易行。从快速冷冻保存过程中, 冷冻时降温的温层和解冻时升温的温层对胚胎的成活有一定的影响, 其危险温区在 -20°C - -120°C 之间, 这与华泽钊等^[5]研究的结果(0°C - 60°C)有所不同。卤虫胚胎于 -20°C 平衡可获得高成活率, 因为用玻璃化液保存胚胎的冰点都低于 -22°C ^[3], 当降温时, 玻璃化液在 -20°C 没有结冰, 避免了胚胎外冰晶的损伤。解冻升温时, 越过了危险温区, 使胚胎能够成活。

3.4 卤虫脱壳胚胎和无节幼体的超低温冷冻保存

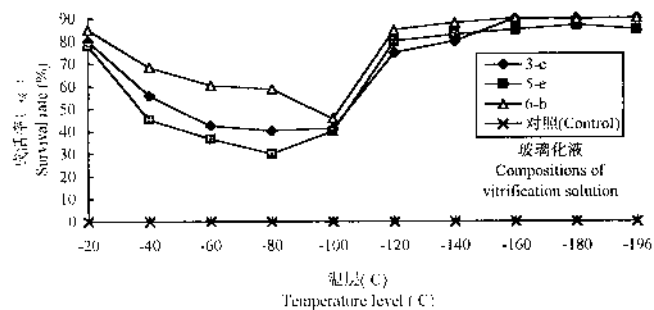


图 5 解冻升温温层对卤虫胚胎冷冻保存的效果

Fig.5 Effects of temperature level during thawing on the survival rate of *Artemia* embryo

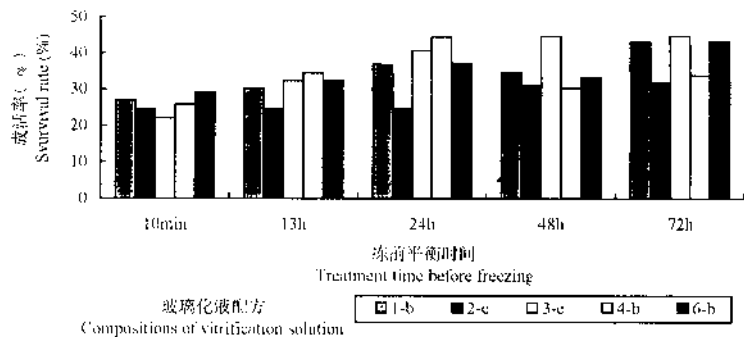


图 6 卤虫脱壳胚胎超低温保存的结果

Fig.6 Results of cryopreservation of decapsulated *Artemia* embryo

关于卤虫胚胎脱壳后成活率低的问题,一方面卤虫胚胎在次氯酸钠溶液中脱壳时间过长,次氯酸钠是碱性很强的溶液,pH 值在 12 以上,对胚胎造成一定的影响;另一方面卤虫胚胎的壳起到了一定的保护作用。在室温下,没有脱壳的卤虫胚胎的孵化率达 85-90%,而经脱壳后的孵化率仅 40.5%,超低温冷冻保存的脱壳胚胎解冻后可获得 40% 的成活率。实验证明用玻璃化液保存卤虫胚胎,冻前平衡 13h 以上,采用快速升、降温的方法越过危险温区,便可使卤虫胚胎超低温冷冻保存后获得成活率高而稳定的结果,建立了较为完善的卤虫胚胎超低温保存技术。卤虫无节幼体超低温冷冻保存成活率低,其原因为无节幼体是发育完整的个体,各种器官已形成,体积增大,体内含水量增加,致使冷冻保存前的处理更为复杂和困难,尤其是冻前脱除水分的时机难以掌握;另一方面,解冻后不恰当的稀释液培养也是影响成活率的关键因素。

参 考 文 献

- [1] 刘向宇等,1996。卤虫脱壳卵的液氮冷冻保存研究。水生生物学报,20(3):248-255。
- [2] 刘向宇等,1994。卤虫无节幼体和日本绒螯蟹合浦亚种溞状幼体的冷冻保存。水产学报,18(4):321-325。
- [3] 章龙珍等,1996。玻璃化液对鲢鱼胚胎成活的影响。淡水渔业,5:7-11。
- [4] 章龙珍等,1994。鱼类胚胎低温冷冻保存降温速率研究。淡水渔业,2:3-5。
- [5] 华泽钊,1987。生物材料的低温保存。科学,39(1):35-41。
- [6] Kasai M. 1994. Cryopreservation of Mammalian Embryos by Vitrification. *Frontiers in Endocrinology*. 4:481-487。
- [7] Massip A. 1989. Cryopreservation of Mammalian Embryos by Vitrification. *Animal Reproduction Science*, 19(1-2): 117-129。

CRYOPRESERVATION OF EMBRYO AND NAUPLII OF *ARTEMIA* SPP.

Zhang Longzhen Liu Xianting Zhang Jieming Lu Dachun Ge Feng Liu Ling

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

ABSTRACT Cryopreservation of the embryo and nauplii of *Artemia* spp. was experimented using vitrification solution as a cryopreservative agent. The experimental results are as follows: Firstly, five compositions of vitrification solution, which are suitable for the embryo and nauplii to be cryopreserved, had been selected (Composition No. 2-c, 3-e, 4-b, 5-e, 6-b). Then, the sensitive temperature ranges to the embryo and nauplii during freezing and thawing of the cryopreservation procedure were determined and the technical programs in cryopreservation for the embryo and nauplii were established. Finally, after thawing, the survival rate of the embryo cryopreserved in liquid nitrogen (-196°C) could be maintained at 90%; moreover, the survival rate of the nauplii cryopreserved in liquid nitrogen (-196°C) could also reach to 3-5%.

KEY WORDS Cryopreservation, Vitrification, Embryo, Nauplii, *Artemia*