

· 研究简报 ·

大菱鲆胚胎玻璃化方法研究

田永胜^{1,2}, 陈松林², 严安生¹

(1. 华中农业大学, 湖北 武汉 430070; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 用大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 神经期胚对6种抗冻剂的毒性进行检测, 发现其毒性排列为: 1,2-丙二醇 (PG) < 甲醇 (MeOH) < 甘油 (Gly) < 二甲基甲酰胺 (DMF) < 乙二醇 (EG) < 二甲亚砜 (DMSO)。以 DMF 为主因子配制和筛选出11种玻璃化程度较好的玻璃化液, 并用大菱鲆肌节期胚对其中5种玻璃化程度最好的玻璃化液进行检测, 结果显示, A4 (DMSO 20% + DMF 25%)、A7 (DMSO 25% + DMF 20%) 较适合于大菱鲆胚胎的平衡处理, 利用 A4 和 A7 平衡处理神经期胚、肌节期胚、心跳期胚、出膜前期胚, 结果显示大菱鲆神经期和肌节胚对玻璃化液的适应能力较强。实验测试出不同时期胚胎在两种玻璃化液中的成活率, 为大菱鲆各期胚胎在玻璃化液中的平衡处理提供了依据。利用大菱鲆肌节胚对不同的平衡步骤进行了筛选, 发现五步法的平衡效果较好。

关键词: 大菱鲆; 玻璃化; 胚胎

中图分类号: Q959.486 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)02-0166-04

由于生态环境的破坏及人类活动的影响, 使部分海水鱼类种质资源和遗传多样性趋于减少, 因此有必要对海水鱼类品种资源的保护和物种的保存方法进行重点研究。配子和胚胎冷冻保存是长期保存水产动物种质资源的有效途径^[1], 而胚胎玻璃化冷冻技术则是冷冻保存鱼类胚胎的一个很有潜力的技术手段。

玻璃化冷冻保存在哺乳动物如: 昆明小鼠^[2]、牛^[3]、山羊^[4]、马^[5]的卵母细胞或囊胚的冷冻保存上获得了成功。但在鱼类胚胎玻璃化研究方面, 仅对泥鳅胚胎进行了冷冻实验^[6], 有关海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存还未见报道。

本研究以大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 胚胎为材料, 对6种抗冻剂毒性、玻璃化液、不同时期胚胎对玻璃化液的适应性、平衡步骤进行了筛选, 力求能够筛选出浓度较低、玻璃化程度较稳定、毒性较低、玻璃化液, 以及适合的胚胎时期及合理的玻璃化平衡步骤, 从而为海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存技术探索一条有效途径。

1 材料和方法

1.1 玻璃化液的配制和筛选

利用二甲基甲酰胺 (DMF)、DMSO、甘油 (Gly) 和甲醇 (MeOH) 4种抗冻剂, 按照 15%、20%、25% 和 30% (V/V) 4个浓度梯度, 以 DMF 为主因子与其他3种抗冻剂组合, 利用 D15^[7] 为基础液, 配制成34种质量分数在 40%~55% 的冷冻

保护剂, 注入麦管, 投入液氮中冷冻 10~20 min, 提至液氮蒸气中平衡 1 min 左右, 迅速移入 40℃ 水浴中摇动解冻。同时观察麦管中冷冻保护剂的玻璃化程度和解冻时是否有反玻璃化现象, 统计玻璃化形成情况, 选择玻璃化率最高的作为实验用玻璃化液。

1.2 不同抗冻剂毒性实验

在室温 (15℃) 下, 分别利用 30% (V/V) DMSO、DMF、Gly、1,2-丙二醇 (PG)、乙二醇 (EG)、MeOH 处理大菱鲆神经胚一定时间, 然后用 1 mol/L 的蔗糖洗脱 10 min, 再用 12℃ 过滤海水培养 2 h 以上, 统计胚胎成活率。根据成活时间和成活率评价不同抗冻剂的毒性。

1.3 大菱鲆胚胎对玻璃化液适应性实验

1) 室温下将大菱鲆肌节胚分别在 A4、A7、B7、C9、C11 五种玻璃化液中五步法平衡处理 40 min, 用 1 mol/L 蔗糖液洗脱 10 min, 12~15℃ 过滤海水培养 10 h, 统计成活率。

2) 分别将大菱鲆神经期、肌节期、心跳期、出膜前期胚胎在 A4 和 A7 中平衡 40 min, 然后用 1 mol/L 蔗糖液洗脱 10 min, 12~15℃ 过滤海水培养 10 h, 统计成活率。

1.4 玻璃化液中平衡步骤的选择

在室温下利用大菱鲆肌节胚, 分别在 A4 液中采用一步法、三步法、五步法平衡处理 40 min, 后用 1 mol/L 蔗糖液洗脱 10 min, 再用 12℃ 过滤海水培养, 统计成活率和孵化率。

收稿日期: 2003-05-12; 修订日期: 2003-07-21。

基金项目: 国家“863”高新技术研究与发展项目 (2001AA621100); 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室开放课题 (2002-03)。

作者简介: 田永胜 (1964-), 男, 高级工程师, 博士研究生, 从事鱼类生态生理及低温生物学研究。

通讯作者: 陈松林。Tel: 0532-5844606。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

一步法:将胚胎一次置于终浓度的 A4 玻璃化液平衡;

三步法:将胚胎依次置于浓度为 1/4 倍、1/2 倍、1 倍 A4 玻璃化液中平衡;

五步法:将胚胎依次置于浓度为 1/4、1/3、1/2、2/3、1 倍的 A4 玻璃化液平衡。

1.5 数据处理

测定数据应用单向方差分析中的最小显著极差法(LSR法),进行多重比较,比较结果用字母标记法(a,b,c,d…),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 结果

2.1 玻璃化液的配制与筛选

由表1可见,根据实验中玻璃化出现次数,其中 A4、A5、A7、A9、A12、B6、B7、B9、B10、C9 和 C11 几种溶液冷冻和解冻时较易形成玻璃化,以 A4、A7、B7、C9 和 C11 五种溶液玻璃化程度最好。其他配方或在冷冻时形成玻璃化,但在解冻时反玻璃化,或在冷冻和解冻时玻璃化都不稳定。

2.2 不同种类抗冻剂的毒性效果

表2可见,大菱鲆神经胚在不同种类抗冻剂中平衡 70 min,只有 PG 和 MeOH 中的胚胎存活,成活率分别为 65.1% 和 19.2%,其他抗冻剂中的胚胎全部死亡,可见 PG 的毒性最低,其次为 MeOH。抗冻剂 DMSO、DMF、Gly、EG 中的处理时间至 30 min,经培养大菱鲆神经胚的成活率分别为 10%、

66.5%、80.0% 和 18.3%,胚胎在抗冻剂中耐受时间长、成活率高,说明抗冻剂的毒性小,反之毒性大。因此将以上 6 种抗冻剂的毒性由低到高排列为:PG < MeOH < Gly < DMF < EG < DMSO。

表1 玻璃化液(VS)配制和选择结果($n=3-5$)

Table 1 Selecion results of vitrification solutions(VS) ($n=3-5$)

VS 代号 VS No.	成分 Components	冷冻 Cryopreserve	解冻 Thaw
A4★	DMSO 20% + DMF 25%	5+	4+,1-
A5☆	DMSO 20% + DMF 30%	3+,1-	4+
A7★	DMSO 25% + DMF 20%	5+	5+
A9☆	DMSO 25% + DMF 30%	3+,1-	4+
A12☆	DMSO 30% + DMF 25%	2+,1-	3+
B6☆	Gly 25% + DMF 25%	5+	2+,3-
B7★	Gly 25% + DMF 30%	5+	4+,1-
B9☆	Gly 30% + DMF 20%	4+,1-	3+,2-
B10☆	Gly 30% + DMF 25%	3+,1-	3+,1-
C9★	MeOH 25% + DMF 30%	4+	4+
C11★	MeOH 30% + DMF 20%	5+	3+,2-

注:“+”为玻璃化,“-”为不玻璃化或反玻璃化;☆:冷冻和解冻时玻璃化程度较高,★:冷冻和解冻时玻璃化程度最高

Note: “+” represents vitrification; “-” represents nonvitrification or transvitrification; ☆: higher vitrification degree during cryopreserving and thawing; ★: the highest vitrification degree during cryopreserving and thawing

表2 大菱鲆肌节胚在不同种类抗冻剂中的成活率($n=3$)

Table 2 Survival rate of turbot somite embryos in different cryoprotectants ($n=3$)

% , $\bar{X} \pm SD$

项目 Item	抗冻剂 Cryoprotectants					
	DMSO	DMF	Gly	EG	PG	MeOH
总样本数/ind Specimen number	46	39	48	44	39	63
平衡 70 min Equilibrate 70 min	0.0	0.0	0.0	0.0	65.1 ± 34.6	19.2 ± 17.8
平衡 30 min Equilibrate 30 min	10.0 ± 17.32	66.5 ± 22.65	80.0 ± 20.05	18.3 ± 1.82	*	*

注: * PG 和 MeOH 的毒性在平衡 70 min 时已表现得清楚,无需在 30 min 进行重复实验。

Note: * The replicate experiments were not needed for 30 min equilibrating because the toxicity of PG and MeOH exhibited very clear when equilibrating for 70 min.

2.3 大菱鲆不同时期胚胎对玻璃化液的适应性

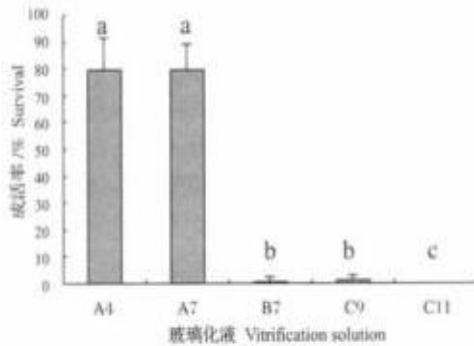
由图1可见,大菱鲆肌节期胚胎在 A4 和 A7 中平衡 40 min 存活率较高,分别为 79.3% 和 79.7%; B7 和 C9 中成活率很低,分别为 0.9% 和 1.2%, C11 中为 0。A4 和 A7 与 B7、C9、C11 相比有显著性差异($p < 0.05$)。说明 A4、A7 较适合于大菱鲆胚胎的平衡处理。

由图2可见,大菱鲆肌节胚在 A4 和 A7 中成活率最高分别为 79.3% 和 79.7%,神经胚中次之,分别为 63.4% 和 48.6%,心跳期胚为 44.0% 和 7.2%,出膜前期胚为 14.4% 和 2.1%;在 A4 液中肌节期和神经期胚胎成活率与心跳期

和出膜前期有显著性差异($p < 0.05$)。在 A7 中肌节期胚胎成活率与其他时期胚胎都有显著性差异($p < 0.05$)。说明大菱鲆肌节期和神经期胚胎较适合于在玻璃化液中处理。

2.4 不同平衡步骤对大菱鲆胚胎成活率的影响

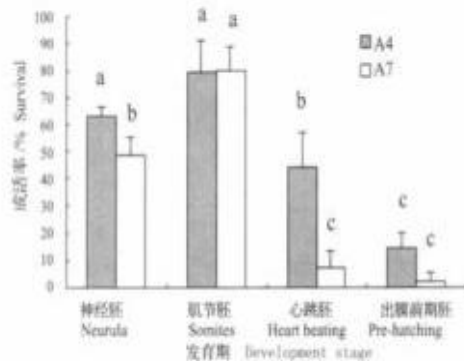
由图3可见,大菱鲆肌节胚采用五步法平衡成活率为 91.2%,三步法为 76.5%,一步法为 9.27%;互相之间都有显著性差异($p < 0.05$);相应的孵化率分别为 78.8%、66.5%、16.67%,一步法与三步、五步法有显著性差异($p < 0.05$)。可见五步法最适于胚胎的平衡。



A4: DMSO 20% + DMF 25%; A7: DMSO 25% + DMF 20%; B7: Gly 25% + DMF 30%; C9: MeOH 25% + DMF 30%; C11: MeOH 30% + DMF 20%

图1 大菱鲆肌节胚在不同玻璃化液中的成活率 ($n=3$, 平衡 40 min)

Fig.1 Survival rate of turbot somite embryos in different vitrification solutions ($n=3$, Equilibrated for 40 min)



A4: DMSO 20% + DMF 25%; A7: DMSO 25% + DMF 20%

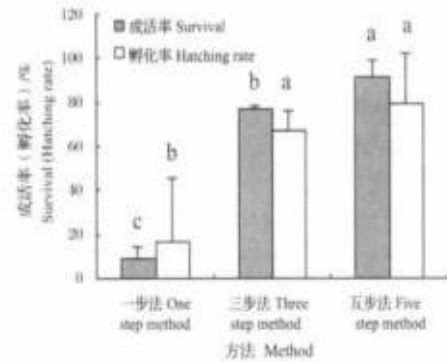
图2 大菱鲆不同时期胚胎在玻璃化液 A4 和 A7 中的成活率 ($n=3$, 平衡 40 min)

Fig.2 Survival rate of various turbot embryos in A4 and A7 ($n=3$, Equilibrated for 40 min)

3 讨论

鱼类胚胎玻璃化冷冻保存是一个有机的完整过程,其中主要包括玻璃化液筛选、胚胎时期筛选、平衡方法筛选、冷冻和解冻方式、洗脱方法的筛选等几个主要的技术环节。

目前常用的冷冻保护剂主要可分为3类:低分子量可渗透保护剂、低分子量不可渗透保护剂和大分子量不可渗透保护剂^[8]。低分子量高渗透的保护剂都具有很强的毒性,单独使用时毒性高于混合使用;本实验通过对 DMSO、DMF、Gly、EG、PG 和 MeOH 的毒性测试,发现 PG 毒性最低,为其在玻璃化液的配制中提供了一定的依据。



A: 一步法; B: 三步法; C: 五步法

A, One-step method; B, Three-step method; C, Five-step method

图3 大菱鲆肌节胚在不同平衡方法下的成活率 ($n=3$)

Fig.3 Survival rates of turbot somite embryos in different equilibration methods ($n=3$)

在胚胎玻璃化冷冻保存中,为了避免在冷冻和解冻过程中形成冰晶损伤,不同实验者使用了不同的抗冻剂配方,Rall和 Fahy^[9]首次提出一种玻璃化液 VSI (25% DMSO + 15.5% 乙酰胺 + 10% PG + 6% 聚乙二醇),实现了小鼠胚胎的冷冻保存。Kasai 等^[10-11]用 EG、聚蔗糖、蔗糖配制成了 EFS40,冷冻保存了小鼠桑椹胚。在鱼类方面仅章龙珍等^[12]对淡水鱼类胚胎的玻璃化液进行了筛选。本实验利用毒性适中的 DMF 与其它3种抗冻剂配制筛选出5种玻璃化液,进行了海水鱼类大菱鲆胚胎适应性筛选实验。

在对斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)^[13] 胚胎冷冻保存研究中显示,进行超低温冷冻保存的最佳时期为心跳期,金鱼 (*Carrasius auratus*) 心跳期胚胎对抗冻剂的耐受能力较强^[14]。本实验将大菱鲆神经胚、肌节胚、心跳胚、出膜前期胚分别在 A4、A7 液中平衡处理,显示出肌节胚和神经胚较其它时期胚胎对玻璃化的耐受能力强。说明不同的鱼类胚胎对玻璃化液有不同的适应性,而且不同抗冻剂的毒性也不同。

在哺乳动物胚胎玻璃化过程中,不同实验者对胚胎在玻璃化液中的平衡采取了不同的步骤,Rall^[15]认为,在4℃下二步法添加抗冻剂可以防止化学毒性和限制抗冻剂的过度渗透。在小鼠扩张囊胚的玻璃化冷冻中采用二步法^[16],在牛囊胚冷冻中采用三步添加方法^[17]。本实验在处理大菱鲆肌节胚时,分别采用一步、三步、五步添加玻璃化液至终浓度(45%) A4,不经冷冻,直接洗脱进入海水培养,其五步法的成活率明显高于三步法,三步法高于一步法,说明大菱鲆胚胎在玻璃化液中采用五步法平衡有利于提高成活率。

参考文献:

- [1] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 161-168.
- [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] Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, et al. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro - derived bovine blastocysts[J]. *Animal Reproduction Science*, 1997, 48: 27 - 36.
- [4] Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, et al. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2 - to 4 - cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid - surface vitrification (SSV) methods[J]. *Theriogenology*, 2003, 59: 1 839 - 1 850.
- [5] Oberstein N O, Donovan M K, Brummer J E, et al. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods[J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 607 - 613.
- [6] 章龙珍, 鲁大椿, 柳 凌, 等. 玻璃化液对泥鳅胚胎成活率的影响[J]. *淡水渔业*, 2001, 31(5): 43 - 44.
- [7] 陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液超低温冷冻保存的研究[J]. *动物学报*, 1992, 38: 413 - 424.
- [8] 史洪才. 家畜胚胎冷冻保存的研究进展[J]. *草食家畜*, 1999, 1: 31 - 34.
- [9] Rall W F, Fahy G M. Ice - free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification[J]. *Nature*, 1985, 313: 573 - 575.
- [10] Kasai M, Komi J H, Takakamo A, et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability[J]. *J Reprod Fertil*, 1990, 89: 91 - 97.
- [11] Zhu S E, Kasai M, Otsu H, et al. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol - based solution[J]. *J Reprod Fertil*, 1993, 98: 139 - 145.
- [12] 章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 玻璃化液对鲢鱼胚胎成活率的影响[J]. *淡水渔业*, 1996, 25(5): 7 - 10.
- [13] Zhang T. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebra fish[J]. *Aquat Living Resour*, 1993, 6: 145 - 153.
- [14] 柳 凌, 刘宪亭, 章龙珍, 等. 鱼类、水生生物配子及胚胎低温冷冻保存研究进展[J]. *淡水渔业*, 1997, 27(3): 13 - 17.
- [15] Rall W F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification[J]. *Cryobiology*, 1987, 24: 387 - 402.
- [16] 朱士恩, 曹申明, 张忠诚. 液氮气熏蒸法玻璃化冷冻小鼠扩张囊胚的研究[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(2): 163 - 167.
- [17] Le Gal F, Massip A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure[J]. *Cryobiology*, 1999, 38: 290 - 300.

Study on vitrification method of turbot, *Scophthalmus maximus*, embryos

TIAN Yong-sheng^{1,2}, CHEN Song-lin², YAN An-sheng¹

(1. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Yeallow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The toxicity of six different cryoprotectants on turbot *Scophthalmus maximus* neurula was examined. The results showed that the toxicity of the six cryoprotectants sequenced as follows: PG < MeOH < Gly < DMF < EG < DMSO. Eleven better vitrifiable solutions mainly composed of DMF were compared, of which 5 kinds were tested using turbot somite embryos. The results showed that A4 (DMSO20% + DMF25%) and A7 (DMSO25% + DMF20%) were two vitrification solutions suitable for equilibrating treatment of turbot embryos. Neurula, somite embryos, heart-beating embryos and pre-hatching embryos were treated with A4 and A7 and the experiment results indicted that neurula and somite embryos are more resistant to vitrification solution. The survival rate of turbot embryos at different stages in A4 and A7 was also determined, which could offer evidence for determining the treatment time of different stage embryos in vitrification solutions. The effect of different equilibration procedures on turbot embryos was examined and the five - step equilibration method was found to be most effective.

Key words: vitrification; turbot; *Scophthalmus maximus*; embryos

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

* This study is supported by the State 863 High Technology R & D Project of China (No. 2001A621100) and a programme on sustainable utilization of marine resources for key laboratory, the Ministry of Agriculture (No. 2002 - 03).