

星斑川鲷胚胎的玻璃化冷冻保存

李振通^{1,3}, 田永胜^{1,2*}, 唐江^{1,3}, 成美玲^{1,4}, 孙宗哲⁵

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 青岛 266273; 3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 4. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023; 5. 蓬莱市宗哲水产养殖公司, 蓬莱 265617)

摘要: 为研究星斑川鲷胚胎玻璃化冷冻保存, 首先, 于室温条件下采用玻璃化液五步平衡法处理星斑川鲷的尾芽期胚胎 30 min, 比较分析分别含有葡萄糖、果糖、蔗糖和海藻糖的 4 种不同玻璃化液(PMG3G、PMG3F、PMG3S、PMG3T) 的毒性, 发现含有海藻糖的玻璃化液(PMG3T) 对尾芽期胚胎的毒性最小, 胚胎的成活率与孵化率相对较高, 分别为 75.00%±5.43%和 50.00%±4.53% ($P<0.05$)。其次, 分析玻璃化液 PMG3T 对星斑川鲷囊胚期至出膜前期 7 个时期的胚胎的毒性, 发现尾芽期胚胎和心跳期胚胎经处理后成活率较高, 分别为 69.33%±6.43%和 72.67%±3.94% ($P<0.05$), 但心跳期胚胎的孵化率较高, 为 65.33%±3.91% ($P<0.05$), 尾芽期胚胎次之, 说明心跳期胚胎对 PMG3T 的耐受能力相对于尾芽期胚胎更好, 更适宜进行胚胎的玻璃化冷冻保存实验。最后, 采用玻璃化液 PMG3T 对心跳期胚胎进行 -196℃ 冷冻实验, 发现所处理的 60 粒胚胎中有 7 粒成活, 可漂浮水面, 继续培养后可见进一步发育, 但未孵化出膜。另外, 将 100 mL 未受精卵(未经玻璃化液处理)置于 -20℃, 分别在冷冻 5~70 min 时取出 10 mL 复温并进行授精, 结果显示, 冷冻 5 min 的卵的受精率为 89.83%±6.51% ($P>0.05$), 随着冷冻时间的延长, 受精率越来越低, 冷冻 70 min 时受精率为 3.71%±1.27%, 畸形率越来越高, 在冷冻 70 min 时达到 100%。本研究筛选出比较适宜的玻璃化液、低温耐受性较高的胚胎发育时期, 为星斑川鲷胚胎低温冷冻保存技术的建立和种质的长期保存和应用提供了实验数据。

关键词: 星斑川鲷; 胚胎; 玻璃化; 冷冻保存

中图分类号: S984.1; Q492.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2020)03-0373-07

Cryopreservation of Starry flounder embryos by vitrification

LI Zhentong^{1,3}, TIAN Yongsheng^{1,2}, TANG Jiang^{1,3}, CHENG Meiling^{1,4}, SUN Zongzhe⁵

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266273; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 5. Penglai Zongzhe Aquaculture Company, Penglai 265617)

Abstract: In this study, the vitrification cryopreservation of Starry flounder (*Platichthys stellatus*) embryos was studied. Firstly, the tail bud stage embryos was treated 30 min with vitrification solution by five-step equilibrium method at indoor temperature, The toxicity of 4 different vitrification solution (PMG3G, PMG3F, PMG3S, PMG3T) containing glucose, fructose, sucrose and trehalose were compared and analyzed. It was found that trehalose-containing vitrification solution (PMG3T) had the least toxicity to the tail bud stage embryos, and the embryo survival rate and hatching rate were relatively high, 75.00%±5.43% and 50.00%±4.53%, respectively ($P<0.05$). Secondly, the toxicity of PMG3T to seven stage embryos from blastula stage to pre-hatching stage was analyzed, the result reveals that the survival rate of treated tail bud stage embryos and heartbeat stage embryos were higher, 69.33%±6.43% and 72.67%±3.94% ($P<0.05$), however, the hatching rate of heartbeat stage embryos was relatively

收稿日期: 2019-08-30

基金项目: 山东省良种工程(2019LZGC020, 2016LZGC009), 山东省重点研发计划(2019GHY112063), 烟台市重点研发计划(2016JH021), 烟台市高端人才引进“双百计划”项目和黄海水产研究所基本科研业务费(20603022019002, 20603022018019)共同资助。

作者简介: 李振通, 硕士研究生。E-mail: gienetom@163.com

* 通信作者: 田永胜, 博士, 研究员。E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

higher, $65.33\% \pm 12.48\%$ ($P < 0.05$), followed by tail bud embryos, which suggests that heartbeat stage embryos was of higher endurance capacity to PMG3T than tail bud stage embryos, and the heartbeat stage embryos was unfit for cryopreservation experiment. Finally, the heartbeat embryos treated with PMG3T were used to perform a -196°C freezing experiment, it was found that 7 of the 60 embryos survived and floated on the water. After further cultivation, further development was observed, but no embryos hatched in the end. In addition, 100 mL ovum were placed in -20°C and taken out 10 mL ovum when refrigerating for 5 to 70 minutes, rewarm and inseminate, the results show that fertilization rate of ovum frozen for 5 min was $89.83\% \pm 6.51\%$, and with the extension of the freezing time, the fertilization rate was getting lower and lower, and the deformity rate was getting higher and higher, the fertilization rate and deformity rate of ovum after freezing for 70 min were $3.71\% \pm 1.27\%$ and 100%. In this study, We have selected suitable vitrification solution and embryonic development stages with high tolerance to low temperatures, which providing a experimental data for the establishment of ultra-low temperature (-196°C) cryopreservation technology of Starry flounder embryos and the long-term preservation and application of germplasm resources.

Key words: Starry flounder; embryos; vitrification; cryopreservation

我国幅员辽阔,蕴藏着丰富的生物种质资源,而且数量巨大,其中有鱼类3 000多种^[1]。丰富的水生生物种质资源为水产养殖业的快速发展奠定了坚实的基础,减缓了自然环境为人类提供食物来源的压力。然而,近年来,由于渔业资源的无序捕捞利用以及人工养殖过程中因不合理操作造成的种质退化问题,使得水产养殖优良种质资源的保护成为水产养殖业中迫切解决的问题^[2]。

胚胎的冷冻保存可以将鱼类的全部遗传信息保存起来,是一种保护种质资源的有效途径,其中,玻璃化冷冻保存是近年来发展起来的一种高效快速的动物胚胎冷冻保存技术,是将经过高浓度玻璃化液平衡处理的种质细胞和胚胎借助一定的载体快速投入液氮(-196°C)中保存的一种种质保存方法。含较高浓度抗冻剂的溶液在快速降温过程中,由液态转化为类似于玻璃状的非晶体状态,避免了细胞内冰晶形成所造成的机械损伤^[3]。玻璃化冷冻保存具有简单、易操作、不需要昂贵的仪器等优点,因此在动物胚胎特别是哺乳动物牛^[4]、羊^[5]、鼠^[6]等胚胎的冷冻保存上获得较大成功。然而,由于鱼类卵径大、具有双层膜结构、含有较大卵黄以及膜通透性差等特点^[2],限制了水分与抗冻保护剂在膜内外的渗透,使得鱼类胚胎的低温冷冻保存研究进程缓慢,只在不多的鱼类中实现了完整胚胎的冷冻保存成活,如泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[7]、文昌鱼(*Branchiostoma japonicum*)^[8]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[9]、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)^[10]、七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)^[11]和云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)^[12]等鱼类胚胎冷冻保存获得了成活胚胎和鱼苗。

星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)又称星突江鲷,隶属鲷形目(*Pleuronectiformes*)、鲷科

(*Pleuronectidae*)、鲷亚科(*Pleuronectinae*)、川鲷属(*Platichthys*),英文名为Starry flounder,俗称珍珠鲷、沼鲷和黄金鲷等^[13],在我国主要分布在图门江和绥芬河河口区沿海区域以及黄海北部海域,对水温、盐度的变化具有较强的忍耐力,是一种经济价值很高的寒温性大型鲷类,它的自然种群资源量在我国分布很稀少,另外由于无序利用,自然资源已濒临枯竭。于2006年突破了星斑川鲷工厂化育苗技术^[14],由于没有严格的生产规划以及优良品种的保护,在星斑川鲷养殖生产中出现因近亲繁殖造成的种质衰退等问题。近年来,国内外研究者主要对星斑川鲷胚胎发育^[15]、染色体核型^[16]和雌核发育^[17]等进行了研究,在胚胎冷冻保存方面还鲜有研究报道,本研究对适宜于星斑川鲷胚胎冷冻保存的玻璃化液、胚胎时期,以及低温处理胚胎的受精力等方面进行研究,以期为星斑川鲷胚胎冷冻保存技术的建立及种质的长期保存提供实验数据。

1 材料与方 法

1.1 亲鱼与胚胎来源

实验所用星斑川鲷是由山东省蓬莱市宗哲水产养殖公司提供。挑选健康、体形正常的星斑川鲷作亲鱼,通过条件控制,促进其性腺成熟。亲鱼培育水温为 $6\sim 8^\circ\text{C}$,pH值 $7.8\sim 8.6$,盐度为 $29\sim 32$,溶解氧 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上。待性腺发育接近成熟时注射促黄体素释放激素类似物(LHRH-A2) $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 催熟,48 h后进行星斑川鲷人工挤卵,干法授精,然后加海水静置20 min,然后对受精卵进行冲洗,再静置数分钟,将上浮的质量较好的受精卵布于孵化池中培养,孵化水温为 $11\sim 14^\circ\text{C}$,盐度为 $29\sim 32$,溶解氧 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上,光照控制在 $1\ 000\text{ lx}$ 以下,每天换水2次,每次2/3,严格控制水温与水质,每

隔一定的时间取少许胚胎进行观察, 取发育至囊胚期、原肠中期、胚孔封闭期、12~18 对肌节期、尾芽期、心跳期和出膜前期胚胎进行实验。

1.2 试验试剂

试验采用以 NaCl (24.72 g·L⁻¹)、KCl (0.865 g·L⁻¹)、CaCl₂·2H₂O (1.46 g·L⁻¹)、MgCl₂·6H₂O (4.86 g·L⁻¹)、NaHCO₃ (0.19 g·L⁻¹) 配制而成的 BS2^[10] 为基础液; 本实验所选用的渗透性抗冻剂为甲醇 (MeOH)、甘油 (Gly)、1,2-丙二醇 (PG), 非渗透性抗冻剂蔗糖 (Sucrose)、果糖 (D-Fructose)、D-葡萄糖 (D-glucose) 和海藻糖 (Trehalose)。利用 BS2 为溶剂配制 0.125 mol·L⁻¹ 蔗糖溶液。

1.3 适宜玻璃化液的筛选

糖类的性质不同, 其对胚胎的保护与损伤作用均不同。为研究葡萄糖、果糖、蔗糖和海藻糖对胚胎的影响, 利用 BS2 基础液和以上渗透和非渗透性抗冻剂配合不同的糖类, 配制浓度为 40% 的 PMG3S、PMG3T、PMG3G 和 PMG3F 四种玻璃化

液 (表 1), 室温下采用玻璃化液五步法^[11]处理星斑川鲷的尾芽期胚胎 30 min (表 2)。每组平衡处理星斑川鲷胚胎 40 粒, 不经冷冻直接用浓度为 0.125 mol·L⁻¹ 的蔗糖溶液洗脱 10 min, 然后用吸管吸出胚胎置于 14℃ 无菌海水恒温培养箱中培养, 6 h 后统计胚胎的成活率, 继续培养, 每隔 3 h 换一次水, 观察统计孵化率。星斑川鲷同期胚胎作对照, 相同环境下培养 (n=3)。

1.4 适宜胚胎发育时期的筛选

利用筛选出的玻璃化液采用五步法分别处理星斑川鲷囊胚期胚胎、原肠中期胚胎、胚孔封闭期胚胎、12~18 对肌节期胚胎、尾芽期胚胎、心跳期胚胎和出膜前期胚胎 30 min, 每组实验处理胚胎 50 粒, 然后用蔗糖溶液洗脱 10 min, 最后再加入无菌海水于 14℃ 恒温培养箱中培养, 每隔 3 h 换水一次, 6 h 后统计胚胎的成活率, 继续培养统计孵化率。使用相同时期末处理胚胎作对照 (n=3)。

表 1 4 种玻璃化液配方

Table 1 Formulation of 4 kinds of vitrification solution

玻璃化液 Vitrification solution	1,2-丙二醇/% 1,2-Propylene glycol	甲醇/% Methanol	甘油/% Glycerin	糖类/% Sugar				BS2/%
				D-葡萄糖 D-Glucose	蔗糖 Surcose	果糖 D-Fructose	海藻糖 Trehalose	
PMG3G				5				
PMG3S	15.75	10.5	8.75		5			60
PMG3F						5		
PMG3T							5	

表 2 玻璃化液五步法平衡处理胚胎方法

Table 2 Five-step equilibrium method before the cryopreservation of embryos

玻璃化液的稀释倍数 The dilution ratio of vitrification solution	平衡时间/min Balance time
1/4 倍	6
1/3 倍	6
1/2 倍	6
2/3 倍	6
1 倍	6

1.5 利用玻璃化法对星斑川鲷胚胎超低温冷冻保存

利用筛选出来的玻璃化液借助五步法平衡处理筛选出的胚胎时期的胚胎 30 min, 然后将胚胎和玻璃化液一起吸进 6 个麦管, 每个麦管吸入 10 粒, 酒精灯加热封口, 将麦管快速投入到液氮中。超低温冷冻保存 6 h 后再取出, 用 37℃ 水浴对其解冻直到玻璃化去除, 然后用蔗糖溶液洗脱 10 min, 再加新鲜过滤海水于 14℃ 的恒温箱中培养, 每隔 2 h 进行换水, 统计成活率。

1.6 星斑川鲷卵子的低温冷冻和授精效果

为验证卵子对低温的耐受能力, 选取刚挤出的 200 mL 优质卵子, 分成两份各 100 mL, 一份直接置于 -20℃ 的冰箱中, 分别在冷冻 5 min、10 min、15 min、20 min、30 min、50 min 和 70 min 后取出 10 mL 适量卵子, 先于 14℃ 水中复温, 然后对其授精, 添加少量新鲜过滤海水, 静置 5 min, 加适量新鲜过滤海水, 静置 10 min, 取上浮卵于 14℃ 恒温箱中培育, 6 h 后取胚胎进行观察, 统计受精率、畸形率; 一份直接授精作为对照 (n=3)。

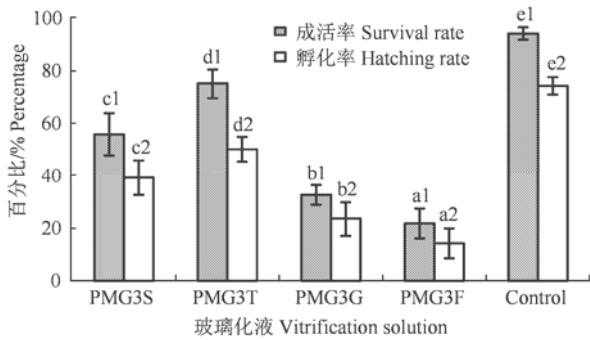
1.7 数据处理

用 SPSS 软件对所得实验数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 在几个不同数据组之间, 对其采用最小显著极差法进行多重比较, 并用 Excel 软件做这几组数据的条形图, 并在图上标记字母来表示各组之间的差异性, 各组之间所标记的不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 玻璃化液筛选实验

经 PMG3S、PMG3T、PMG3G 和 PMG3F 四种玻璃化液处理的星斑川鲮尾芽期胚胎，培养 6 h 后的成活率分别为 55.83%±8.12%、75.00%±5.43%、32.50%±3.81% 和 21.67%±5.64% (图 1)，经 PMG3T 处理的尾芽期胚胎的成活率最高 ($P<0.05$)，PMG3F 处理的最低，对照组为 94.00%±2.47%。孵化率分别为 39.17%±6.71%、50.00%±4.53%、23.33%±6.32% 和 14.23%±5.76%，经 PMG3T 混合抗冻剂处理的星斑川鲮的尾芽期胚胎孵化率最高，与其他实验结果差异显著 ($P<0.05$)。经 PMG3F 处理的孵化率最低，对照组的孵化率为 74.17%±3.21% (图 1)。由此可以得出，在这四种混合抗冻剂中，PMG3T 混合抗冻剂的毒性最低，对胚胎的保护效果较好，适宜用于胚胎冷冻保存实验。经玻璃化液处理前后尾芽期胚胎与孵化出膜胚胎如图所示 (图 2)。



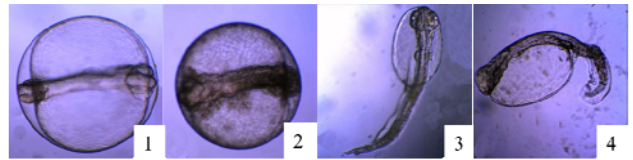
不同系列字母(n₁,n₂)均表示差异显著($P<0.05$)，下同
Different series of letters(n₁,n₂) indicate significantly different ($P<0.05$), the same below

图 1 4种混合抗冻剂对星斑川鲮尾芽期胚胎成活率与孵化率的影响(n=3)

Figure 1 The effect of different four kinds of cryoprotectants on Survival rate and hatched rate of Starry flounder embryos at tail bud stage

2.2 适宜胚胎发育时期的筛选

星斑川鲮囊胚期胚胎、原肠中期胚胎、胚孔封闭期、12-18 对肌节期胚胎、尾芽期胚胎、心跳期胚胎和出膜前期胚胎经玻璃化液 PMG3T 处理，培养 6 h 后的成活率分别为 7.33%±2.01%、0、4.67%±2.14%、8.00%±2.5%、69.33%±4.63%、72.67%±3.94% 和 31.33%±3.66% (图 3)。星斑川鲮的尾芽期胚胎、心跳期胚胎对抗冻剂的承受能力较强，优于其它胚胎时期 ($P<0.05$)。原肠中期胚胎对玻璃化液耐受能力最差。从原肠中期到心跳期，对抗冻剂的耐受能力逐渐增强，心跳期之后，逐渐减弱。对照组胚胎成活率为 85.33%±5.82%。



1.未处理的尾芽期胚胎; 2.经玻璃化液处理后尾芽期胚胎; 3.经玻璃化液处理后胚胎孵化出苗(正常); 4.经玻璃化液处理后胚胎孵化出苗(畸形)

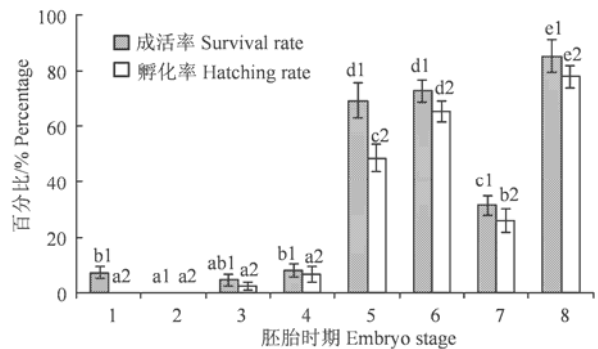
1. Untreated tail bud embryos; 2. Treated bud embryos with vitrification solution; 3. Hatched normal fish after embryos treated with vitrification solution; 4. Hatched abnormal fish after embryos treated with vitrification solution

图 2 利用玻璃化液(PMG3T)处理前后尾芽期胚胎与孵化出膜鱼苗

Figure 2 Before and after processing tail bud embryos and fish

继续培养统计孵化率，分别为 0、0、2.32%±1.52%、6.67%±2.74%、48.67%±4.86%、65.33%±3.91% 和 26.00%±4.21%，星斑川鲮心跳期胚胎的孵化率最高，与其它胚胎时期孵化率差异显著 ($P<0.05$)，对照组孵化率为 78.00%±3.95% (图 3)。

虽然经抗冻剂处理后，尾芽期胚胎、心跳期胚胎成活率都比较高，差异不显著 ($P>0.05$)，但由于心跳期胚胎经抗冻剂处理后的孵化率较尾芽期高，因此，选择心跳期胚胎进行星斑川鲮胚胎冷冻保存实验。



1.囊胚期; 2.原肠中期; 3.胚孔封闭期; 4.12-18 对肌节期; 5.尾芽期; 6.心跳期; 7.出膜前期; 8.对照组

1. Blastula stage; 2. Midgastrula; 3. Blastopore close stage; 4. Twelve-eighteen pairs muscle knob stage; 5 Tail bud stage; 6. Heartbeat stage; 7. Pre-hatching stage; 8. Control

图 3 星斑川鲮不同时期胚胎经玻璃化液 PMG3T 五步法处理后的成活率与孵化率(n=3)

Figure 3 The survival rate and hatching rate of different Starry flounder embryo stage treated with PMG3T by five steps method

2.3 玻璃化冷冻保存实验结果

60 粒胚胎中有 7 粒浮于液面，具有生长迹象，其它皆下沉，显为乳白色。上浮胚胎在光学显微镜下观察发现多数胚胎卵膜有不同程度的损伤，而且

胚体有弥散现象, 胚体发育 1 h 后, 胚体各部均呈“肥大”状态, 胚胎心包清晰, 胚体和卵黄透明, 胚体上黑色素点分布清晰, 在 14℃ 恒温箱中继续培养 24 h, 但均未孵出仔鱼。上浮较完整胚胎如图 4。

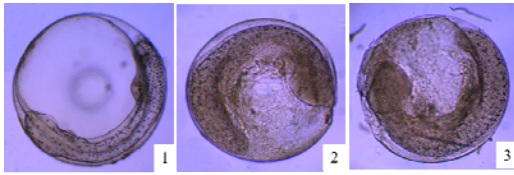


图 4 未处理心跳期胚胎(1)与利用 PMG3T 处理, 冷冻保存并解冻后上浮胚胎(2,3)

Figure 4 Unrated heartbeat stage embryos(1) and after treatment with PMG3T, thawed up-floating embryos after cryopreservation(2,3)

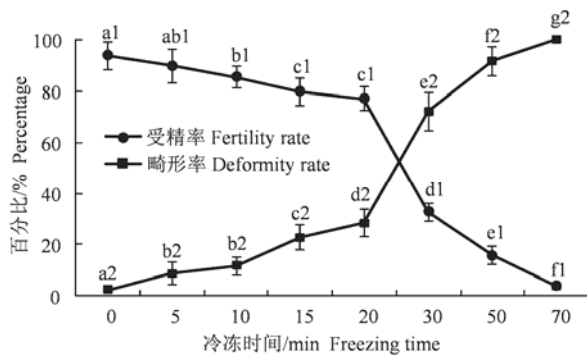


图 5 不同的冷冻时间对卵子受精率与受精卵畸形率的影响(n=3)

Figure 5 The effect of ovum fertilization rate and the fertilized egg deformity rate by different freezing time



1. 未受精的卵; 2. 畸形细胞期胚胎; 3. 正常 16 细胞胚胎; 4. 发育畸形胚胎; 5. 发育的畸形鱼; 6. 发育正常鱼
1. Unfertilized egg; 2. Abnormal cellular embryos; 3. Normal cellular embryos; 4. Abnormal embryos; 5. Deformity fish; 6. Normal fish

图 6 冷冻后卵子的受精与胚胎发育

Figure 6 The fertilisation and embryos development of the egg after freezing

2.4 低温冷冻卵子的受精效果

卵子经冷冻处理 5 min、10 min、15 min、20 min、30 min、50 min 和 70 min, 其受精率分别为 89.83%±6.51%、85.33%±4.15%、79.67%±5.56%、77.00%±

4.57%、32.67%±3.50%、15.73%±3.45%和 3.71%±1.27%, 对照组为 93.73%±5.52% (图 5)。结果显示, 随着冷冻时间的延长, 卵的受精能力越来越低, 冷冻 5 与 10 min 的相对较高, 两者差异不显著, 但与其它结果差异显著 ($P<0.05$), 冷冻 70 min 的最低。随着冷冻时间的延长, 受精卵不能正常分裂与发育, 发育畸形率也逐渐提高, 分别为 8.77%±4.54%、11.75%±3.50%、22.67%±4.82%、28.33%±5.51%、72.00%±7.38%、91.67%±5.68%和 100% (图 5)。冷冻 5、10 min 的卵受精后的畸形率较低, 两者之间差异不显著, 但与其他结果差异显著 ($P<0.05$)。70 min 的已全部畸形, 不能正常发育, 对照组为 2.33%±0.88%。受精卵与未受精卵 (图 6)。

3 讨论与结论

3.1 玻璃化液的筛选

在进行胚胎的冷冻保存中, 玻璃化液中的渗透性抗冻剂可以渗透进入胚胎内代替水分, 在快速降温时提高细胞质粘稠度, 使细胞液冰点降低, 达到在低温下保护细胞的作用, 因此, 玻璃化液的筛选对胚胎冷冻保存的成功有着重要意义。在鲈鱼胚胎的玻璃化冷冻保存中应用了玻璃化液 VSD2^[10], 在大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 胚胎的玻璃化冷冻保存中应用了玻璃化液 PMP1^[18], 在老鼠 (*Mus musculus*) 胚胎的冷冻中利用了玻璃化液 EFS40^[19], 在羊 (*Caprinae*) 胚胎冷冻中利用 PBS 液配制含有 25%甘油和 25%乙二醇的玻璃化液^[20]。本实验利用基础液 BS2 配制含有渗透性抗冻剂与非渗透性抗冻剂成分的玻璃化液进行玻璃化冷冻保存, 研究了 4 种非渗透性保护剂糖类对胚胎的保护作用, 发现含有海藻糖的玻璃化液处理胚胎的效果较好, 优于其他 3 种糖类。海藻糖具有很好的玻璃化特性, 经海藻糖处理后, 溶液玻璃化温度接近 -30℃, 远优于传统渗透性保护剂的玻璃化温度 (-65℃)^[21]。研究海藻糖的抗低温机制中发现, 经 0.5 mol·L⁻¹海藻糖与二甲基亚砜处理的皮肤与二甲基亚砜-丙二醇组的相比, 皮肤的基底膜完整、密度正常, 连续性好, 半桥粒结构清晰可见, 分布均匀与新鲜组相似。这 4 种糖类中的羟基能结合蛋白质分子表面部分, 达到保护蛋白质的作用, 与蔗糖、果糖和葡萄糖相比, 海藻糖的分子较小, 易于以分子形式填充到蛋白质分子的空隙中, 限制蛋白质分子结构发生变化, 避免膜蛋白变性失活, 加入海藻糖的保护液不仅提高了冷冻细胞的发育能力、解冻后复活能力, 而且提高了细胞的可移植潜力^[22]。另外, 海藻糖能稳定细

胞膜的分子结构,减少细胞膜因其它因子改变而产生的损伤,而且海藻糖能够抑制 Bax 基因的表达,抑制细胞凋亡信号发生,从而达到保护细胞作用^[23]。

虽然抗冻剂可以降低细胞内冰晶形成,减少快速冷冻过程中造成的细胞损伤,但是高浓度抗冻剂的毒性也会造成细胞生理与渗透损伤。研究发现甘油、二甲亚砜、乙二醇和甲醇对草鱼胚胎都有毒性,毒性从大到小为甲醇、甘油、乙二醇和二甲基亚砜,且抗冻剂浓度越高、平衡处理时间越长,毒性越大^[24]。在大菱鲆胚胎冷冻保存中对 6 种渗透性抗冻剂的毒性进行了比较,发现毒性从小到大排序为 1, 2-丙二醇、甲醇、甘油、二甲基甲酰胺、乙二醇和二甲基亚砜^[18]。在牙鲆胚胎对抗冻剂毒性耐受性研究中,发现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,混合抗冻剂能够通过对抗冻剂的综合作用减免单一抗冻剂的毒性,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^[25]。因此,适宜的抗冻剂种类、玻璃化液组成和玻璃化液各组分的比例的筛选对鱼类胚胎冷冻保存成功发挥着极其重要的作用。在进行星斑川鲷胚胎冷冻保存中选用的 PG、MeOH 与 DMSO 体积比为 9:6:5,取得较佳结果。

3.2 胚胎发育时期的筛选

胚胎的不同发育时期对玻璃化液以及低温的适应能力不同,每一种类生物适应玻璃化液并耐低温冷冻保存的最佳胚胎发育时期也不同。鱼类不同于哺乳动物,哺乳动物多是使用早期阶段的胚胎进行冷冻保存,如使用牛囊胚期胚胎^[4]、羊桑葚期胚胎或囊胚期胚胎^[5]、小鼠二细胞期胚胎^[6]进行胚胎的冷冻保存。而进行鱼类胚胎冷冻保存时,各时期胚胎均有采用。在研究斑马鱼(*Barchydanio rerio* var)不同发育时期胚胎对冷冻的耐受性时,发现早期发育阶段胚胎对冷冻最脆弱,心跳期胚胎对低温的耐受力最强^[26]。鲑鱼神经胚耐受力最低,心跳胚耐受力最强,出膜前期胚次之^[10]。文昌鱼原肠中期胚胎较其它时期对抗冻液的耐受力更强^[8]。云纹石斑鱼的尾芽期胚胎相较于其它时期对玻璃化液的耐受力更高^[27]。牙鲆尾芽期胚胎较其他时期耐受力强^[28]。大菱鲆肌节胚对玻璃化液的耐受力较强,在 40 min 以内,具有比其它发育时期更高的成活率,尾芽期胚次之,出膜前期胚最低^[18]。星斑川鲷胚胎在水温 13~14℃发育历经 100 h^[17],不同发育时期的胚胎对玻璃化液以及低温的耐受能力不同。从星斑川鲷胚胎经 PMG3T 处理后的成活率与

孵化率得出,尾芽期胚胎以前对玻璃化液的适应能力较差,尾芽期胚胎之后适应能力较强,但心跳期胚胎适应能力最强,适合进行低温冷冻保存。不同种类胚胎的细胞结构不同,对抗冻剂以及低温的耐受能力不同,因此,适宜胚胎发育时期的选择对于胚胎冷冻保存的成功至关重要。

3.3 星斑川鲷胚胎的超低温冷冻保存

自 1950 年英国学者 Blaxter 首次成功冷冻保存大西洋鲱 (*Clupea harengus*) 精巢以来,各国学者对鱼类配子与胚胎的冷冻保存进行了大量的实验研究,并取得很大进展。对大菱鲆胚胎进行冷冻保存实验,获得了 1 粒复活的胚胎并孵化出膜^[18]。对鲈鱼心跳期胚胎进行冷冻保存,解冻后获得 2 粒成活胚胎并孵化出膜^[10],在对牙鲆胚胎的玻璃化冷冻保存研究中,获得了 5 粒成活胚胎,其中有 4 粒孵化出膜^[9]。对鲤 (*Cyprinus carpio*) 胚胎进行冷冻保存研究,复温解冻后 16 个胚胎中有 4 个复活,其中有 3 粒胚胎孵出鱼苗^[29]。在众多的海水鱼胚胎冷冻保存中,仅有云纹石斑鱼胚胎冷冻保存较为成功,分别孵化出 44 和 212 尾仔鱼^[12, 27],最长存活 16 d。而哺乳动物的胚胎冷冻成活率较高,牦牛的胚胎经冷冻处理后成活率达 73.3%^[4],羊的囊胚期胚胎冷冻后孵化率可达 65.8%。经观察解冻的星斑川鲷胚胎,发现大多数胚胎比较完整,膜损伤较小,猜测胚胎受冰晶损伤的可能性很小,未孵化出膜的主要原因是溶液损伤效应。

和哺乳动物相比,水生生物胚胎的冷冻保存还未完全突破,冷冻胚胎成活率低,且实验结果不能重复,鱼类胚胎冷冻保存成功率低的原因主要在于鱼卵自身的结构,鱼卵径比哺乳动物的卵径大的多,一般为 1~6 mm^[2],而且鱼卵具有双层膜结构,膜通透性较差,另外鱼卵内含有大量的卵黄,鱼卵内的水分不易脱出,抗冻保护剂不易渗透入胚胎内,限制了水分与抗冻保护剂在膜内外的渗透,易形成冰晶对鱼卵造成损伤^[30]。通过移除少量卵黄可增加耐冷冻的能力,将经冷冻保存的移除少量卵黄的原始生殖细胞移入囊胚泡中,有 7 粒胚胎成活,提高了生殖细胞冷冻细胞复活的可能性^[31]。通过新技术如微流控制方法,减免在添加玻璃化液与洗脱玻璃化液步骤中玻璃化液对卵的渗透压力损伤,提高冷冻成活率^[32]。利用封闭的北里玻璃化液 (Closed-Kitasato Vitrification System) 系统控制胚胎对玻璃化液的吸收量,从而达到最佳的保护作用^[33]。随着冷冻保存技术的发展与具体操作的完善,对星斑川鲷胚胎的冷冻保存研究有一定的启发作用。

3.4 卵子的低温耐受性

未受精卵暴露于低温环境中, 由于卵自身没有抵抗低温的保护机制, 长时间的冷冻处理, 会影响卵的质量、卵的受精能力以及受精卵的畸形率。研究了星斑川鲷卵子对低温的耐受能力, 随着冷冻处理时间的延长, 卵的受精能力越来越低, 经过低温冷冻处理, 虽然看似能够受精, 但是低温冷冻处理对卵的影响不仅只是影响其受精能力, 而且会影响受精卵的生长发育情况。经过低温冷冻处理, 随着冷冻时间的延长, 胚胎的畸形率逐渐升高, 70 min 时已经全部畸形, 说明在 -20°C 的低温下, 冷冻 70 min 为星斑川鲷卵子的极限时间, 为完善对星斑川鲷胚胎生物学的认识提供了科学依据。

本研究首次报道了星斑川鲷胚胎的冷冻保存研究, 对具有较好保护作用的 PMG3T 玻璃化液、对低温以及玻璃化液具有较高耐受性的心跳期胚胎进行了筛选, 利用玻璃化法对星斑川鲷胚胎进行了冷冻保存实验, 60 粒心跳期胚胎经过复温解冻后, 有 7 粒上浮成活胚胎, 但在后续培养中未孵化出膜。虽然经冷冻保存的胚胎没有孵化出鱼苗, 但初步了解了星斑川鲷卵子与胚胎的生物学特性, 以及筛选了较为适宜的玻璃化液与胚胎时期, 为星斑川鲷胚胎冷冻保存成功奠定了基础。

参考文献:

- [1] 方嘉禾. 中国生物种质资源保护现状与行动建议[J]. 中国农业科技导报, 2001, 3(1): 77-80.
- [2] 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.
- [3] RALL W F, FAHY G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification[J]. Nature, 1985, 313(6003): 573-575.
- [4] PAUL A K, LIANG Y Y, SRIRATTANA K, et al. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container[J]. Anim Sci J, 2018, 89(2): 307-315.
- [5] BHAT M H, SHARMA V, KHAN F A, et al. Open pulled straw vitrification and slow freezing of sheep IVF embryos using different cryoprotectants[J]. Reprod Fertil Dev, 2015, 27(8): 1175.
- [6] MOCHIDA K, HASEGAWA A, TAGUMA K, et al. Cryopreservation of mouse embryos by ethylene glycol-based vitrification[J]. JoVE, 2011(57):e3155.
- [7] 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.
- [8] 孙毅, 张秋金, 王义权. 文昌鱼胚胎的程序化冷冻保存[J]. 动物学报, 2007, 53(3): 524-530.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 姜静. 几种海水鱼类种质超低温冷冻保存研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- [12] TIAN Y S, ZHANG J J, LI Z T, et al. Effect of vitrification solutions on survival rate of cryopreserved *Epinephelus moara* embryos[J]. Theriogenology, 2018, 113: 183-191.
- [13] 李思忠, 王惠民. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲷形目[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [14] 郑春波, 姜启平. 星斑川鲷工厂化养殖技术[J]. 水产养殖, 2007, 28(2): 34-35.
- [15] 王波, 刘振华, 孙丕喜, 等. 星斑川鲷胚胎发育的形态观察[J]. 海洋学报, 2008, 30(2): 130-136.
- [16] 徐冬冬, 尤锋, 王波, 等. 星斑川鲷染色体核型分析[J]. 海洋科学进展, 2008, 26(3): 377-380.
- [17] 段会敏, 田永胜, 李文龙, 等. 星斑川鲷雌核发育二倍体、单倍体与普通二倍体及杂交胚胎发育的比较[J]. 中国水产科学, 2017, 24(3): 477-487.
- [18] 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.
- [19] 朱士恩, 曾申明, 张忠诚. 小鼠胚胎玻璃化冷冻保存及保存时间对其体内发育率的影响[J]. 中国畜牧杂志, 1998, 34(6): 12-14.
- [20] BARIL G, TRALDI A L, COGNIE Y, et al. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos[J]. Theriogenology, 2001, 56(2): 299-305.
- [21] 贾晓明, 马彩虹, 于瑜, 等. 海藻糖对低温储存皮肤 β 1 integrin 及活力的影响[J]. 军医进修学院学报, 2008, 29(3): 206-208.
- [22] SASNOOR L M, KALE V P, LIMAYE L S. Prevention of apoptosis as a possible mechanism behind improved cryoprotection of hematopoietic cells by catalase and trehalose[J]. Transplantation, 2005, 80(9): 1251-1260.
- [23] 齐战, 王勇杰, 王善政, 等. 海藻糖在气管低温保存中的保护机制[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(1): 17-21.
- [24] 章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 鱼类胚胎冷冻保存前几个因子对其成活率影响的研究[J]. 淡水渔业, 1992, 22(1): 20-24.
- [25] 刘本伟, 陈松林, 田永胜, 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[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 733-742.
- [26] ZHANG T T, RAWSON D M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos[J]. Cryobiology, 1995, 32(3): 239-246.
- [27] ZHANG J J, TIAN Y S, LI Z T, et al. Optimization of vitrification factors for embryo cryopreservation of kelp grouper (*Epinephelus moara*)[J]. Theriogenology, 2020, 142: 390-399.
- [28] 赵燕, 陈松林, 孔晓瑜, 等. 几种因素对牙鲆胚胎玻璃化冷冻保存的影响[J]. 动物学报, 2005, 51(2): 320-326.
- [29] 张新生, 华泽钊, 赵林, 等. 鲤鱼胚胎冷却至 -196°C 的试验[J]. 上海机械学院学报, 1987, 9(2): 83-90.
- [30] MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications[J]. Am J Physiol-Cell Physiol, 1984, 247(3): C125-C142.
- [31] HIGAKI S, KAWAKAMI Y, ETO Y, et al. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions[J]. Cryobiology, 2013, 67(3): 374-382.
- [32] GUO Y Y, YANG Y, YI X Y, et al. Microfluidic method reduces osmotic stress injury to oocytes during cryoprotectant addition and removal processes in porcine oocytes[J]. Cryobiology, 2019, 90: 63-70.
- [33] MOMOZAWA K, MATSUZAWA A, TOKUNAGA Y, et al. A new vitrification device that absorbs excess vitrification solution adaptable to a closed system for the cryopreservation of mouse embryos[J]. Cryobiology, 2019, 88: 9-14.