

显微注射抗冻剂对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 胚胎毒性及冷敏感性的影响

武鹏飞^{1,2}, 丁浩², 田永胜², 陈松林²

(¹中国海洋大学生命学院, 青岛山东 266000;

²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛山东 266071)

摘要:在鱼类胚胎冷冻保存中, 由于胚胎体积大、卵膜具多层结构, 并且通透性差, 传统的平衡法无法使抗冻剂足够、有效的进入胚胎内部起到保护作用。为弥补了普通平衡法的不足, 此研究利用显微注射技术, 将抗冻剂直接注射到鱼类胚胎卵黄囊内, 提高了抗冻剂对胚胎的保护程度。此研究以牙鲆胚胎为试验材料, 对显微注射抗冻剂种类、抗冻剂的注射剂量、注射浓度、以及抗冻剂注射后胚胎的冷敏感性影响进行了筛选。结果表明: 牙鲆胚胎较适宜的显微注射剂量为 750 μ l; 几种抗冻剂注射牙鲆胚胎后的毒性大小相对排列为 PVP>蔗糖, DMSO > MeOH > PG, 其中注射 PG 获得的胚胎成活率和孵化率最高, 注射 PVP 获得的胚胎成活率和孵化率最低, 而 PG 与 MeOH 组成混合抗冻剂 PM 毒性更低获得的胚胎成活率和孵化率更高。而任何一种抗冻剂均随着浓度的增加其毒性随之增加; 另外, 在冷敏感试验中, 显微注射 6 mol/L 的 PM 的胚胎胚胎, 应用程序化法处理, 以 2 $^{\circ}$ C/min 的速率由室温降至 -20 $^{\circ}$ C, 平衡 10 min 后解冻处理, 发现注射 PM 的胚胎低温处理后成活率为 (25.07 \pm 1.57)%, 而 6 mol/L 的 PM 五步平衡法同步处理的对照组胚胎成活率为 (20.88 \pm 2.84)%, 说明显微注射的胚胎冷敏感性一定降低。

关键词: 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)胚胎; 显微注射; 冷冻保存;

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

论文编号: 2009-0694

Study on Toxicity and Chilling Sensitivity of Flounder *Paralichthys Olivaceus* Embryos Microinjected Cryoprotectants

Wu Pengfei^{1,2}, Ding Hao², Tian Yongsheng², Chen Songlin²

(¹College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qindao Shandong 266000;

²Key laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao Shandong 266071)

Abstract: In cryopreservation of fishes embryos, due to the characteristics of fishes embryos, such as big physical volume, the bad permeability of vitelline membrane, etc, traditional techniques for the incorporation of cryoprotectants have failed to protect all embryo compartments. But the method microinjection could incorporate cryoprotectants into the yolk sac of fish's embryos and could offset the shortage of traditional methods to some extent and raise the protection degree of cryoprotectants to embryos. In the present study, several factors relating to cryopreservation of flounder *Paralichthys olivaceus* embryos by vitrification were studied: cryoprotectants, microinjection volumes of cryoprotectants, microinjection concentration of

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570259)资助。

第一作者简介: 武鹏飞, 男, 1983年出, 辽宁省抚顺市人, 硕士, 主要从事生态学和低温生物学研究。通信地址: 266000 山东省青岛市市南区南京路106号, 中国水产科学院黄海水产研究所, E-mail: wpf00_00_00@163.com。

通讯作者: 陈松林, 男, 1960年出生, 湖北武汉人, 教授, 研究员。主要从事鱼类功能基因组、分子标记和分子育种、胚胎冷冻保存、胚胎干细胞培养和基因打靶以及鱼类性别控制等领域的研究工作。通信地址: 266000 山东省青岛市市南区南京路106号, 中国水产科学院黄海水产研究所, Tel: 0532-85844606, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn。

收稿日期: 2009-04-02, **修回日期:** 2009-06-02。

cryoprotectants, and the cooling sensitivity of embryos after being microinjected. The results showed that 1, the becoming microinjection volume was 750pl. 2, the toxicity of five single-agent cryoprotectants sequenced as follows PVP>Sucrose, DMSO>MeOH>PG. Among these cryoprotectants, the embryos injected with PG got the highest survival rate and hatching rate, with PVP got the lowest, however, there was a mixture of PG and MeOH (PM), its toxicity was much lower than PG and the embryos injected with it got higher survival rate and hatching rate than with PG. The toxicity of cryoprotectans increased as the concentration of its increased. 3, the survival rate of embryos microinjected with 6mol/L PM was $(25.07 \pm 1.57)\%$ after being cooled in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes by programmed cooling method, whereas the survival rate of controls dealt with five steps balance method was $(20.88 \pm 2.84)\%$, which indicated that the chilling sensitivity of embryos microinjected decreased.

Key words: *Paralichthys olivaceus* embryos, Microinjection, Cryopreservation

0 引言

鱼类胚胎超低温冷冻保存,对鱼类生物多样性、种质资源保护、遗传育种和水产养殖具有重要的意义和应用价值。胚胎冷冻技术,如今已经在小鼠和多种哺乳动物胚胎上达到应用性水平。但在鱼类上,虽然研究者多次获得冷冻后的成活胚胎,并孵化出苗,但冷冻复活率低,结果不够稳定,仍未达到应用性水平。章龙珍^[1]等用泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)胚胎(胚孔封闭期)通过玻璃化法在液氮中冷冻保存17 h,解冻后的胚胎获得了成活,经过50 h的培养,胚胎发育至尾鳍出现期后死亡;Chen and Tian^[2]等对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)胚胎玻璃化胚胎冷冻保存进行了较为系统深入的研究,共获得8次冷冻后成活胚胎,共20枚,其中14枚发育成正常鱼苗;Ding等^[3]对真鲷(*Pagrosomus major*)胚胎进行了玻璃化冷冻的探索,筛选出了一组抗冻剂,能够在玻璃化冷冻后获得更多形态完整的胚胎,在此基础上,李军^[4]等对真鲷胚胎进行玻璃化冷冻,获得了7次冷冻成活胚胎,共25枚,其中最长的存活时间为13天;赵燕^[5]等获得4次冷冻后成活胚胎,共8粒,其中7粒孵化出健康的鱼苗;刘本伟^[6]等通过玻璃化颗粒的方法获得4粒成活胚胎等。虽然以上几位研究者获得了冷冻后存活胚胎,并孵化出鱼苗,不过,冷冻后成活率很低,且结果不够稳定。国外也有研究者对斑马鱼(*Brachydanio rerio*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)上进行了胚胎玻璃化冷冻保存的研究^[7],但均未获得成功。

目前,鱼类胚胎冷冻保存的方法主要为玻璃化和程序化冷冻保存,前者应用较为普遍。但两种方法均采用抗冻剂浸泡胚胎的平衡法使抗冻剂渗入胚胎内部,从而达到冷冻中保护胚胎的目的,如田永胜^[8]等的五步平衡法等。但由于鱼胚胎体积大、具有双层卵膜、卵膜通透性差、卵黄含量高等特点,普通平衡法并不能使抗冻剂足够有效的渗透到胚胎内部,不能使胚胎得

到足够的保护,而鱼类胚胎本身低温敏感性又较高,多种不利因素导致鱼胚胎冷冻保存的研究进展并不顺利。

胚胎内部的卵黄囊是鱼类胚胎冷敏感性的关键部位^[9]。卵黄囊内含有水分,冷冻过程中会产生冰晶,冷冻过程中会对胚胎造成损伤,而阻止冰晶产生损伤对胚胎冷冻保存成功是必要的。抗冻剂可以在冷冻过程中对胚胎起保护作用。但由于卵黄膜通透性差,卵黄膜成为了天然的屏障^[10],阻碍了抗冻剂进入卵黄。为克服卵黄膜渗透的屏障,使足够的抗冻剂进入胚胎内部,提高抗冻剂对胚胎的保护,在此研究中,应用了显微注射技术,将抗冻剂注射至胚胎卵黄内。显微注射法最初应用于基因工程,后来这项技术被用到去除部分斑马鱼卵黄来降低胚胎冷冻敏感性^[11-12]。Janik^[10]等率先将此方法应用到斑马鱼胚胎冷冻保存中,此后Beirão^[9]等将此法应用到对金头鲷(*Sparus aurata*)胚胎冷冻保存,并首次将注射抗冻剂对胚胎冷敏感性的影响进行了研究。Robles^[13]等则选用南极鱼类血液中存在抗冻蛋白作为抗冻剂,注射至大菱鲆胚胎内进行低温冷冻。

丁浩^[14]等应用显微注射技术对牙鲆胚胎的抗冻剂、注射的胚胎时期、注射胚胎的注射部位等进行了探索,但未对注射抗冻剂浓度变化对胚胎的影响以及抗冻剂注射后对胚胎低温耐受性的影响进行研究,除此之外,国内外尚未见其他试验者有这方面研究的报道。此试验应用显微注射技术,继续对牙鲆胚胎的冷冻保存进行深入探索,着重对几种单一抗冻剂和混合抗冻剂注射后的毒性以及注射后胚胎的冷敏感性变化进行研究,以为鱼类胚胎冷冻保存研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验时间和地点

此试验于2008年3月在山东省海阳市黄海水产有限公司进行。

1.2 试验材料

1.2.1 胚胎来源 试验所用牙鲆胚胎由山东省海阳市黄海水产有限公司提供。采用流水方法收集受精卵, 收集到的牙鲆胚胎装入2 L玻璃烧杯, 16 °C恒温培养箱中充气培养。取发育至尾芽期胚胎进行试验。

1.2.2 抗冻剂 试验采用人工海水BS2, 以NaCl、KCl、CaCl₂·2H₂O、MgCl₂·6H₂O、NaHCO₃配制^[15], 作为浸泡胚胎抗冻剂的基础液; 以Ringer solution(2.99g/L KCl, 6.49 g/L NaCl, 0.29 g/L CaCl₂, 0.202 g/L NaHCO₃)^[9], 作为显微注射抗冻剂的基础液。此试验所用抗冻剂有渗透性和非渗透性两类。渗透性抗冻剂为1,2-丙二醇(PG)、甲醇(MeOH)二甲亚砜(DMSO); 非渗透性抗冻剂蔗糖(Sucrose)、聚乙烯吡咯酮(PVP)。

1.3 试验方法

1.3.1 显微注射方法 显微注射仪为Eppendorf公司产品, 注射玻璃针用PC-10拉针仪(日本Narashige公司)自行拉制, 用游丝镊断针, 选择针尖锐利的作为注射用针。注射时, 将发育至尾芽期的胚胎吸至自制琼脂凹槽内, 加入少量灭菌海水, 使胚胎在凹槽内呈单排直线排列。注射过程中, 用自制拨卵针拨动胚胎, 使注射针能注射到胚胎适宜部位。整个注射过程在解剖显微镜下观察进行。

1.3.2 不同抗冻剂注射后对胚胎的影响 取尾芽期胚胎, 注射4 mol/L的DMSO、PG、MeOH、DMSO、PM(PG:MeOH=2:1,V/V), PVP和蔗糖浓度为4%, 以Ringer solution为基础液, 注射剂量为500 pl, 每批注射15~20粒胚胎, 将注射后的胚胎分别在6 mol/L浓度的PM抗冻剂中平衡10 min, 0.125 mol/L蔗糖洗脱10 min, 将胚胎取出放入人工配制的无菌海水, 16 °C恒温培养箱中培养, 12 h后统计胚胎的成活率(成活卵数/总卵数), 胚胎孵化后用新鲜过滤海水培养并统计孵化率(出膜鱼苗数/成活卵数), 显微注射相同剂量的Ringer solution至同期胚胎作为对照组。

1.3.3 显微注射不同剂量抗冻剂对胚胎的影响 取尾芽期胚胎, 注射6 mol/L的PM, 注射剂量分别为250、500、750、1000、1500 pl, 每个注射剂量注射15~20粒胚胎, 将注射后的胚胎在6 mol/L的PM中平衡10 min, 之后步骤同上。

1.3.4 显微注射不同浓度抗冻剂对胚胎的影响 取尾芽期胚胎, 以Ringer solution为基础液, 将PG、MeOH、DMSO三种渗透性抗冻剂, 每种分别配制成4、6、8 mol/L的溶液, PVP、蔗糖两种非渗透性抗冻剂配制成4%、6%、8%的溶液, 将配制好的几种抗冻剂, 注射750 pl至牙鲆胚胎卵黄囊内, 每种抗冻剂注射3个浓

度, 每批注射15~20粒。将注射后的胚胎在6 mol/L的PM溶液中平衡10 min(以BS2作为基础液), 之后步骤同上。

1.3.5 显微注射对胚胎低温耐受性的影响 取尾芽期胚胎, 以Ringer solution为基础液, 将渗透性抗冻剂DMSO、PG、MeOH、PM各配制成6 mol/L浓度的溶液, 非渗透性抗冻剂蔗糖配制为6%的溶液作为抗冻剂, 注射750 pl至胚胎卵黄囊内, 每批注射15~20粒, 注射后的胚胎在6 mol/L的PM中平衡10 min, 装入麦管, 每管装1~2个胚胎, 使用程序化降温仪以2 °C/min的速率从室温降至-20 °C, 平衡10 min之后步骤同上。五步平衡法处理同期胚胎, 以BS₂作为基础液, 配制6 mol/L的PM作为抗冻剂, 按照五步平衡法^[9]处理胚胎, 程序化降温仪2 °C/min的速率降至-20 °C, 平衡10 min后取出。

1.4 数据处理

试验数据利用数据统计分析软件SPSS进行单因素方差分析(one way ANOVA), 不同数据组间利用最小显著极差法HSD法进行多重比较, 并以字母标记法在图中标记, 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 结果与分析

2.1 不同抗冻剂注射后对胚胎的影响

通过试验结果, 可以看出4 mol/L、500 pl的几种抗冻剂对胚胎的影响。PG、MeOH、DMSO、PVP、蔗糖(PVP和蔗糖浓度为4%)这五种单一抗冻剂注射后, 各自获得了(55.95±3.3)%、(48.3±6.46)%、(40.44±3.35)%、(29.6±2.43)%、(32.4±2.6)%的成活率, 可以得出几种抗冻剂对于牙鲆尾芽期胚胎的相对毒性由大到小排列为PVP>蔗糖, DMSO>MeOH>PG, 两种毒性较低的抗冻剂PG与MeOH混合成PM获得了(62.47±5.46)%的成活率, 与MeOH、DMSO、PVP、蔗糖差异显著($P<0.05$)。在孵化率上, 注射PVP获得的最低, 并与其他几种抗冻剂获得的孵化率相比有显著差异($P<0.05$), 而PG、MeOH、DMSO、PVP、蔗糖之间, 以及与PM之间无显著差异($P>0.05$)。(见图1)

2.2 显微注射不同剂量抗冻剂对胚胎成活的影响

通过试验, 得到了对牙鲆胚胎显微注射250 pl、500 pl、750 pl、1000 pl、1500 pl的6 mol/L的PM抗冻剂的胚胎成活率, 分别为(77.67±8.34)%、(60.22±5.29)%、(49.21±2.97)%、(23.63±2.63)%、(8.88±3.37)%; 孵化率为(83.55±6.14)%、(72.1±5.15)%、(68.9±1.90)%、(53.33±5.77)%、(16.67±28.87)%。在所得结果中, 250 pl的胚胎成活率和孵化率最高, 最低

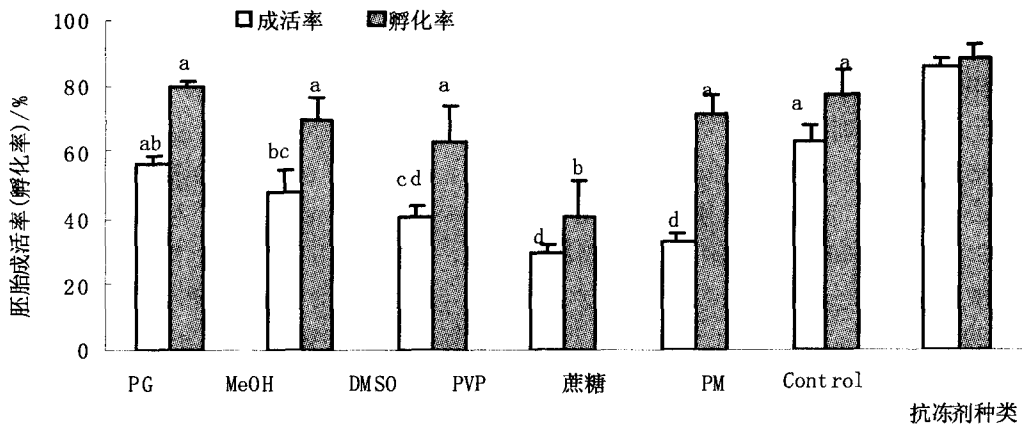


图1 牙鲆尾芽期胚胎注射 500 μ l、4 mol/L 的不同抗冻剂后的成活率和孵化率(n=3)

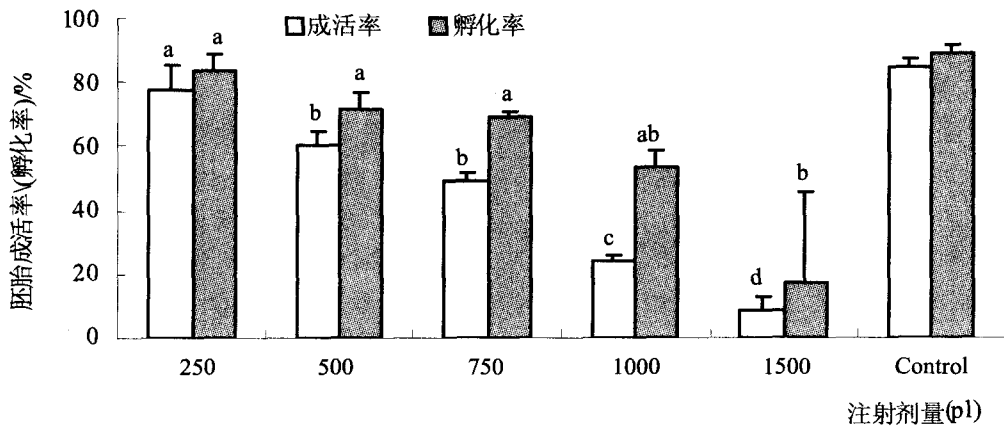


图2 注射不同剂量抗冻剂(PM)后牙鲆胚胎成活率(n=3)

是 1500 μ l。可以看出,随着注射剂量的增加,胚胎的成活率和孵化率随之降低。但是,注射剂量增加至 1000 μ l 时,所得到成活率为(23.63 \pm 2.63)%,与 750 μ l 所得到的成活率(49.21 \pm 2.97)%差异显著($P < 0.05$),综合考虑抗冻剂对胚胎的保护以及胚胎成活率的因素,选择 750 μ l 作为牙鲆尾芽期胚胎较适宜的显微注射剂量。(见图 2)

2.3 显微注射不同浓度抗冻剂对胚胎成活的影响

通过试验,可以得出,在注射剂量为 750 μ l 时,注射不同浓度、不同种类的抗冻剂,所得到的胚胎成活率和孵化率有所不同。在 DMSO、PG、MeOH、PVP、蔗糖五种单一抗冻剂中,注射剂量为 750 μ l、浓度为 4 mol/L 时,PG 成活率最高(48.24 \pm 6.47)%,PVP 的成活率最低(25.54 \pm 6.13)%,孵化率 PG 最高(69.54 \pm 5.7)%,PVP 最低(41.67 \pm 17.56)%;注射浓度为 6 mol/L 时,注射 PG 的胚胎的成活率最高(44.99 \pm 4.36)%,PVP 的成活率最低(24.76 \pm 4.26)%,孵化率 PG 最高(63.06 \pm 3.37)%,PVP 最低(35 \pm 8.66)%;注射浓度为 8 mol/L 时,PG 的胚胎成活率仍最高(39.52 \pm 3.07)%,孵化率 PG 最高(56.61 \pm

0.91)%,PVP 最低(46.67 \pm 5.77)%。混合抗冻剂 PM 在 4 mol/L、6 mol/L、8 mol/L 三个注射浓度的所得到的成活率和孵化率均高于同浓度水平的单一抗冻剂,PM 在 4 mol/L、6 mol/L、8 mol/L 注射浓度分别获得了(52.75 \pm 4.52)%、(49.21 \pm 2.25)%、(39.52 \pm 2.51)%的成活率,(73.52 \pm 3.36)%、(68.9 \pm 1.92)%、(61.9 \pm 1.68)%的孵化率。可以看出,单一抗冻剂中,相同注射剂量和注射浓度下,PG 取得的成活率和孵化率最高,PVP 最低,混合抗冻剂 PM 在成活率和孵化率上优于单一抗冻剂;而在相同注射剂量不同浓度下,注射浓度增加,抗冻剂毒性增强,胚胎成活率和孵化率随之降低。(图 3、图 4)

2.4 注射后胚胎冷敏感性的影响

通过试验,可以得出,在 -20 $^{\circ}$ C 冷冻 10 min 后,经显微注射 PM 的胚胎取得了最高的成活率(25.07 \pm 1.57)%,注射蔗糖的成活率最低(13.77 \pm 2.84)%,而经过五步平衡法处理的对照组胚胎获得了(20.88 \pm 3.76)%的成活率。虽然冷冻后胚胎的成活率和孵化率照冷冻前有一定的降低,但通过与五步平衡法的对

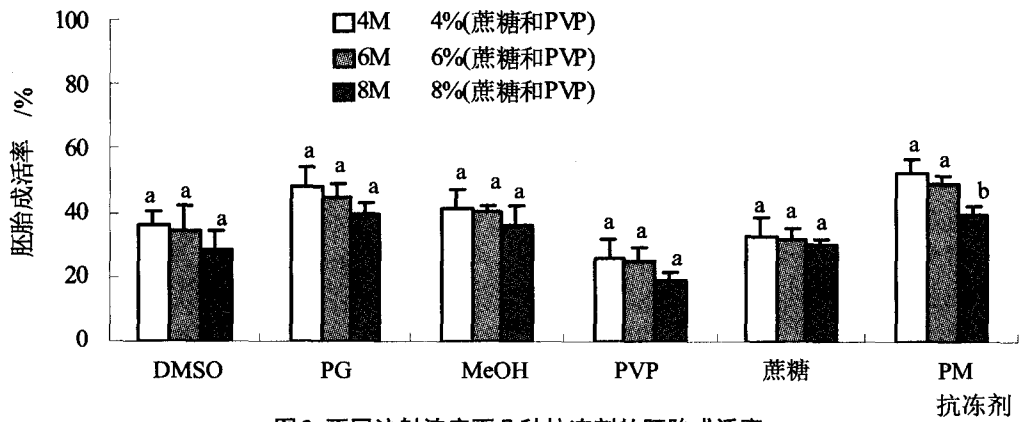


图3 不同注射浓度下几种抗冻剂的胚胎成活率

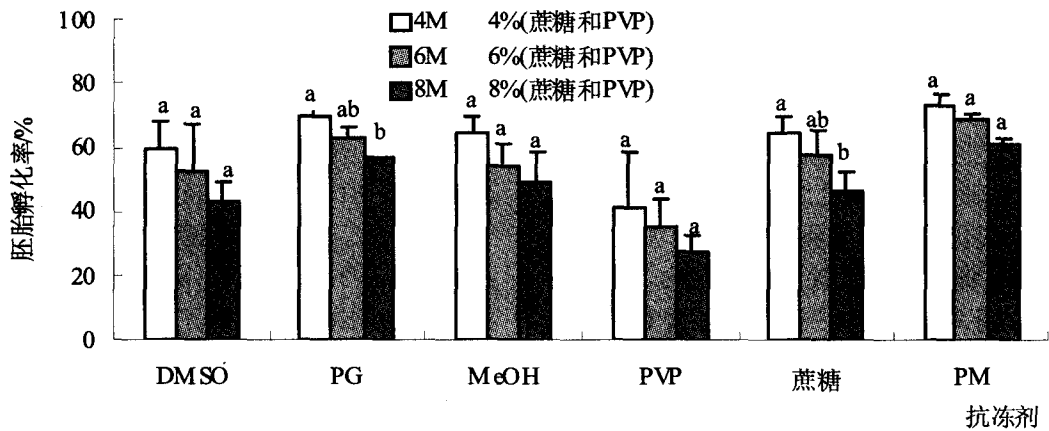


图4 不同注射浓度下几种抗冻剂的胚胎孵化率

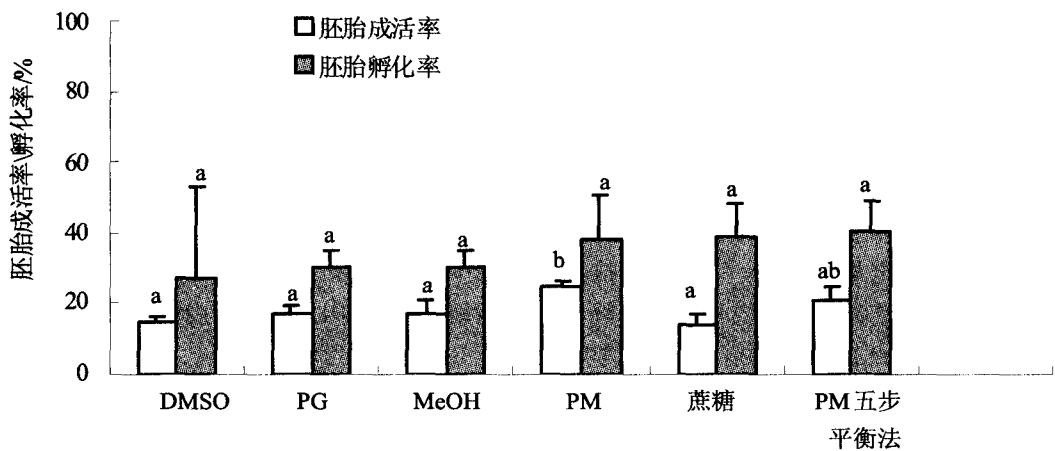


图5 注射不同抗冻剂的胚胎冷冻后的成活率和孵化率

比,注射PM的胚胎成活率有了相对的提高。另外,虽然注射蔗糖的胚胎成活率最低,但却取得了较高的孵化率(38.88±9.62)%,而注射DMSO的胚胎孵化率最低(27.78±25.46)%,说明蔗糖对显微注射后胚胎后期发育的毒性相对较低。(图5)

3 讨论

鱼类胚胎冷冻保存技术,是一项包括选择适宜发育时期的胚胎、适宜的抗冻剂、适宜的平衡方法、适宜

的解冻方法和洗脱方法等多步骤的系统性很强的试验过程。但由于鱼类胚胎自身的特点,如胚胎体积大、双层卵膜、卵黄体积大、胚胎内含水量大等不利因素,导致了整个试验过程更为复杂,需要更多试验条件的筛选。

鱼类胚胎卵膜具有多层结构,渗透率较低,导致抗冻剂很难渗入到胚胎内部^[14]。鱼类胚胎冷冻保存需要一个抗冻剂在胚胎各部分进行最佳分布,而传统方法

未能使抗冻剂进入胚胎的每个部分,保护胚胎,特别是卵黄囊,而卵黄囊也被认为胚胎冷敏感性的主要部位^[9]。但卵黄膜通透性差,卵黄膜成为了天然的屏障^[10],极大的影响了抗冻剂进入卵黄的过程^[16]以及卵黄囊内部水分的流出。卵黄内含有大量的高脂质物质导致了胚胎的高冷敏感性^[11]而卵黄内含有的水分,解冻时卵黄囊常常遭受重结晶的损伤^[7]。而显微注射技术则是一种合适的技术,可以使抗冻剂进入到胚胎内部,克服鱼类胚胎的天然屏障^[9-10,13],有极大的应用价值。

选取适宜的胚胎发育阶段,是冷冻保存成功的基础。在应用普通平衡法对牙鲆、大菱鲆胚胎冷冻保存试验中,尾芽期是比较适合的发育时期^[2,8]。而应用显微注射法进行胚胎冷冻保存的报道中,研究者基本选用了尾芽期胚胎作为试验材料^[9,13]。就于牙鲆胚胎而言,丁浩^[14]等选择了牙鲆心跳期胚胎作为显微注射的材料,并通过试验表明心跳期的胚胎较尾芽期有更好的表现。但此研究仍选择尾芽期的胚胎,因为显微注射要求刺穿卵膜,将抗冻剂直接注入卵黄内,而心跳期的卵膜要比尾芽期的卵膜更厚^[14],胚胎体积更大,注射过程更容易对胚体造成物理损伤,降低试验成功率。

对于五种单一抗冻剂PG、MeOH、DMSO、PVP、蔗糖来说,其中,PG和MeOH之间的毒性以及DMSO和蔗糖之间的毒性差异不明显($P>0.05$)。前三种时渗透性抗冻剂,它们的毒性大小排列与Chen and Tian^[2]等的普通平衡法处理结果相似,说明在显微注射法和普通平衡法中,抗冻剂对胚胎的毒性作用试验结果是一致的。而蔗糖和PVP两种非渗透性抗冻剂来看,应用蔗糖作为抗冻剂以往并不多见。对于PVP来说,虽然在玻璃化液PM中添加一定量的PVP,以此作为抗冻剂浸泡牙鲆胚胎在抗冻剂玻璃化的形成和毒性的降低方面有一定的好处^[17],但在本次试验注射PVP后,取得的胚胎成活率并不高,可能由于PVP具有较强的脱水能力所造成的。另外,PG与MeOH的混合液PM的效果,要优于几种单一抗冻剂,这也与Chen and Tian^[2]、赵燕^[5]的试验结果一致,证实混合抗冻剂对胚胎毒性要小于单一抗冻剂。

注射到卵黄囊的抗冻剂对胚胎的毒性比浸泡胚胎的毒性弱^[9],胚胎对于卵黄中高浓度抗冻剂的存在耐受程度高。对金头鲷胚胎注射DMSO试验中,卵黄囊中的抗冻剂最终浓度为6.1 mol/L时,胚胎的孵化率为60%左右,EG最终浓度为7.8 mol/L时,胚胎孵化率为40%左右,MeOH最终浓度为10 mol/L时,胚胎的孵化

率为48%左右^[9]。而在金头鲷普通平衡法试验中,胚胎浸泡在6 mol/L的DMSO中存活时间不超过10 min,在4 mol/L的DMSO中存活时间不过30 min;胚胎浸泡在4 mol/L的MeOH和EG,存活时间不超过30 min^[18]。对于牙鲆胚胎而言,由于试验中没有测出牙鲆胚胎卵黄囊体积,因此未能得到抗冻剂在黄囊中的最终浓度,未能像金头鲷一样做类似的比较。但应用普通平衡法,将牙鲆胚胎浸泡在4 mol/L的DMSO、MeOH、EG中45 min后牙鲆胚胎的成活率分别只有 $(2.50\pm 2.89)\%$ 、 $(38.75\pm 14.93)\%$ 和 $(1.25\pm 2.50)\%$ ^[19]。抗冻剂注射到卵黄后,胚胎对抗冻剂的耐受程度高,可能因为抗冻剂从卵黄囊到整个胚胎的扩散是极为有限的^[9]。Hagedorn^[20]认为抗冻剂一旦被注射到卵黄后,几乎不会渗出。Robles^[11]分析荧光标记的蛋白注射到大菱鲆卵黄囊后,发现没有同预期的一样,进入到胚胎细胞。Janik^[10]也观察到注射到斑马鱼卵黄囊的抗冻剂没有降低亚显微结构的损伤。抗冻剂注射到卵黄中后,扩散至整个卵黄,在此之后,胚体细胞缓慢的吸收卵黄内的小颗粒,这个过程避免了胚体细胞被立刻暴露与注射浓度相同的高浓度抗冻剂中^[10]。另外,Klyachko^[21]发现,存在于欧洲泥鳅(*Misgurnus fossilis*)胚胎发育早期的许多酶,呈现不均衡分布。而且酶常常是抗冻剂的毒性影响的目标^[22-25],胚体拥有几乎发育所必须的80%以上的酶,卵黄的高耐受性,也可能是由于在卵黄当中,酶活性更低的原因^[10]。

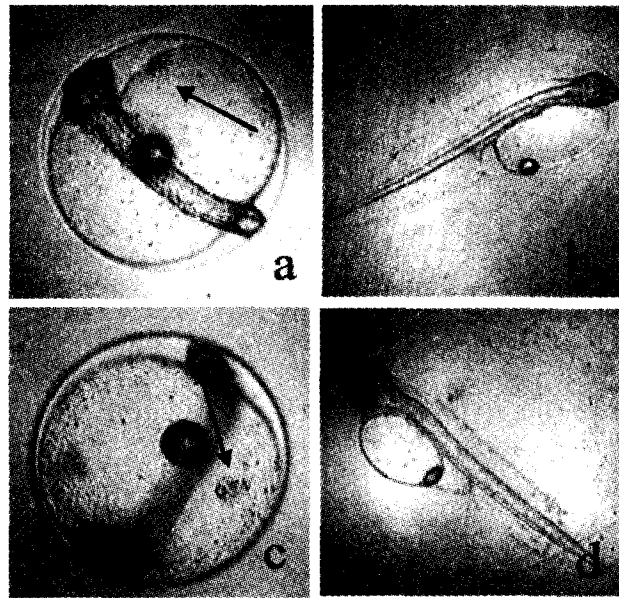
与其他几种鱼相比,牙鲆胚胎所能承受的显微注射剂量明显偏低。斑马鱼在试验中的注射剂量最高30 nl时,胚胎成活率最低为 $(14\pm 4)\%$ ^[10];金头鲷最大注射剂量为150 nl时,孵化率为40%左右^[9];大菱鲆也可承受20 nl注射剂量的抗冻蛋白^[13];而在丁浩^[14]等的试验中,注射1 nl的6 mol/L的PM抗冻剂,牙鲆胚胎成活率下降到10%左右,在此次研究中,注射剂量增加至1.5 nl时,胚胎成活率降为 $(8.88\pm 16.7)\%$,可见,牙鲆胚胎对于显微注射抗冻剂的注射剂量的耐受性较低,这可能是由于胚胎不同卵径和卵黄囊体积所造成的。牙鲆胚胎卵径较小,为0.8~1.0 mm,而斑马鱼、大菱鲆的卵径较大,分别可达到1~1.5 mm,0.9~1.1 mm;但金头鲷的卵径0.82~0.92 mm,比牙鲆小,但对显微注射剂量的耐受性要高,而这可能是由于不同鱼之间的耐受性差异造成的。

从冷敏感性试验结果来看,虽然注射蔗糖的胚胎成活率最低,但孵化率却很高,这可能由于蔗糖是非渗透性抗冻剂以及蔗糖本身的特点,对胚胎在低温时的保护较差,但可能对胚胎的孵化有着积极的作用。

Dinnyes^[26]等曾指出蔗糖在胚胎冷冻中有着很重要的作用。在冷冻保存过程中,糖对胚胎的损伤很小,这也与 Sakkas^[27]等和 Kuleshova^[28]等的观点一致,但这方面还需要进行更深入的研究,比如将抗冻剂加入一定量的蔗糖后再对胚胎进行注射。

另外,冷敏感性试验结果表明,经过注射PM的胚胎成活率较五步平衡法处理的胚胎冷敏感性有所降低。但是,显微注射法取得的胚胎成活率和孵化率并不足够理想。这可能有如下几点原因:第一、并没有找到更为适合的胚胎冷冻保存的抗冻剂;第二、显

微注射法是一个极为精细的试验操作过程,稍有不甚,就会对胚胎造成一定的机械损伤,而实际操作中,有些是不可避免的损伤从而导致胚胎的冷敏感性不降反而提高;第三,显微注射抗冻剂虽进入卵黄囊,但仍未对整个胚胎提供足够水平的保护,并且是否完全渗透到胚体各个部位,渗透效率、渗透时间等也是未知的。但笔者同 Janik、Beirão、Robles 等研究者,同样坚信,将显微注射方法进一步优化,并且与玻璃化法优化之后相互结合进行鱼类胚胎冷冻保存的方向可以通向成功的终点。



图版 1

a. 显微注射抗冻剂后牙鲆尾芽期胚胎(箭头所指处为针头刺穿后的痕迹), $\times 50$; b 显微注射抗冻剂后胚胎孵化的鱼苗, $\times 50$;
c“显微注射法”低温处理后的成活胚胎, $\times 50$; d “显微注射法”低温处理后的成活胚胎孵化的鱼苗;

参考文献

- [1] 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):213-217.
- [2] Chen S L, Tian Y S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification[J]. Theriogenology, 2005, 63 (4): 1207-1219.
- [3] Ding F H, Xiao Z Z, Li J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos [J]. Theriogenology, 2007, 68 (5):702-708.
- [4] 李军,徐西长,丁福红,等.真鲷胚胎玻璃化冷冻保存[M]//陈松林,鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术 北京:中国农业出版社,2007: 427-434.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Roles V, Cabrita E, Real M, et al. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays[J]. Cryobiology, 2003, 47 (1):30-39.
- [8] 田永胜,陈松林,严安生.大菱鲆胚胎玻璃化方法研究[J].中国水产科学,2004,11(2):166-169.
- [9] Beirão J, Robles V, Herráez M P. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryo[J]. Aquaculture, 2006, 261(3):897-903.
- [10] Janik M, Kleinhans F W, Hagedorn M. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos[J]. Cryobiology, 2000, 41(1):25-34.
- [11] Liu X H, Zhang T T, Rawson D M. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Cryobiology, 1999, 39(3):236-242.
- [12] Liu X H, Zhang T T, Rawson D M. Effect of chilling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. Theriogenology, 2001, 55 (8):1719-1731.
- [13] Robles V, Cabrita E, Anel L, et al. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos

- [J]. *Cryobiology*, 2006, 261(4):317-318.
- [14] 丁浩,田永胜,武鹏飞,等.利用显微注射技术对牙鲆胚胎冷冻保存[J].*中国水产科学*,2008,15(5):866-872.
- [15] 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.
- [16] Hagedorn M, Hsu E W, Pilatus U, et al. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartmental biological system[J].*Proc Natl Acad Sci USA*,1996,93:7454-7459.
- [17] 田永胜.三种重要海水鱼类胚胎玻璃化冷冻保存研究:[D].湖北:华中农业大学,2004:31-37.
- [18] Cabrita E, Robles V, Wallace J C, et al. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos[J]. *Aquaculture*, 2006,25(2-4):245-255.
- [19] 于过才.三种重要海水鱼类胚胎的程序化冷冻保存研究[D].青岛:中国海洋大学,2004:22-31
- [20] Hagedorn M, Kleinhans F W, Artemov D, et al. Characterization of a major permeability barrier in the Zebrafish embryos[J]. *Biol. Reprod.*1998, 59:1240-1250.
- [21] Klyachko O O, Vladimir P K, Sofa I, et al. Nonuniform distribution of enzymes in fish eggs[J]. *J. Exp. Zool*, 1982, 222: 137-148.
- [22] Adam M M, Rana K J, McAndrew B J. Effect of cryoprotectants on activity of selected enzymes in fish embryos [J]. *Cryobiology*, 1995, 32(1):92-104.
- [23] Arakawa T, Carpenter J F, Kita Y A, et al. The basis for toxicity of certain cryoprotectants:A hypothesis[J]. *Cryobiology*, 1990,27 (4): 401-415.
- [24] Baxter S J, Lathe G H. Biochemical effects on kidney of exposure to high concentrations of dimethyl sulfoxide. *Biochem.Pharmacol*, 1971, 20:1079-1091.
- [25] Fahy G M, Lilley T H, Linsdell H, et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms [J]. *Cryobiology*, 1990, 27(3): 247-268.
- [26] Dinnyés A, Urbány B, Baranyai B, et al. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different developmental stages and the protective effect of sucrose[J]. *Theriogenology*, 1997, 47(1):396.
- [27] Sakkas D, Urned F, Menezo Y, et al. Effects of glucose and fructose on fertilization ,cleavage and viability of mouse embryos *in vitro*[J]. *Biol Reprod*, 1993, 49:1288-1292.
- [28] Kuleshova L L, MacFarlane D R, Trounson A Q, et al. Sugars exert a major influence and have low toxicity to embryos and oocytes[J]. *Cryobiology*, 1999, 38(2):119-130.