

卤虫脱壳卵的液氮冷冻保存研究

刘向宇 陆仁后

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

作者以甘油、DMSO、葡萄糖和蔗糖为冷冻保护剂对卤虫脱壳卵进行了液氮冷冻保存研究。各保护剂对短期吸水发育的胚胎有一定的冷冻保护作用,在本实验条件范围内,高浓度保护剂较低浓度保护剂好,双重保护剂(甘油+DMSO、葡萄糖+蔗糖)冷冻保护作用较单一保护剂效果好。饱和 NaCl 溶液对各发育时期的胚胎均有较好的冷冻保护作用,但对后期胚胎的冷冻保护作用较弱。作者认为胚胎内冰晶的形成是卤虫脱壳卵冷冻致死的主要原因。冷冻保护剂对卤虫脱壳卵的冷冻保护作用可能与它们的脱水作用有关。

关键词 卤虫脱壳卵, 冷冻保存, 冷冻保护剂

动物的卵和胚胎的冷冻保存对于种质资源的保护、杂交育种等研究工作具有重大意义,1972年,Whitting等^[1]首先在小鼠的胚胎冷冻保存中获得突破,迄今哺乳类动物的胚胎冷冻保存已不是个难题。鱼类中虽也进行了一些尝试,但基本还没有成功。无脊椎动物的卵和胚胎的冷冻保存研究不多,成功的例子更少,1990年 Toledo等^[2]报道,将轮虫螺旋臂尾(*Brachionus plicatilis*)胚胎保存于液氮中30d,解冻后获得了60%左右的存活率。甲壳类动物的卵子和胚胎的冷冻保存目前尚未见报道。

卤虫是存在于沿海地区盐田及内陆高盐湖泊中的一种甲壳类动物,是鱼虾、特别是鱼虾苗的优质饵料。在外界生活条件恶化时,卤虫可以产生休眠卵,由于这种卵具有厚实的卵壳的保护,抗耐力很强,易于保存,可以随时方便地取材。脱壳后的卤虫休眠卵失去了其特殊的保护层,结构与鱼卵及蟹卵有许多相似之处,对其冷冻保存的研究可以为鱼类和其它甲壳类的卵及胚胎冷冻保存技术的研究提供有价值的参考资料,有可能成为一种冷冻生物学的实验模型动物。鉴于以上原因,作者对脱壳的卤虫休眠卵的液氮保存进行了研究,并对其冷冻保存机制和冷冻损伤机制进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 卤虫(*Artemia* sp.)休眠卵为美国 Ocean Star International Inc. 产品,罐装;海水为人工半海水(NaCl 14g/L, MgCl₂ 13.5g/L, MgSO₄ 2.5g/L, CaCl₂ 0.90g/L, KCl 0.65g/L);各种冷冻保存液均由海水配制,且预先放置在4℃冰箱

中。液氮罐型号为 YDS-10。

1.2 脱壳卵的液氮保存 脱壳参考 Sorgeloos 等^[3]的方法,将卤虫休眠卵放入 28℃ 的自来水中吸水 1h 后,加入等体积的次氯酸钠溶液(最终浓度为 2.6%左右),混合 30min 脱去卵壳,自来水冲洗 5min,获得脱壳卵。分别以葡萄糖、蔗糖、DMSO、甘油、葡萄糖+蔗糖和甘油+DMSO 溶液为冷冻保存液(表 1、2),取脱壳卵数百颗放入小指管中,加 1.5ml 保存液,在 4℃ 下分别平衡 10、30、60 和 90min,转入液氮蒸气平衡 3-4min,进入液氮保存 24h,然后 30℃ 水浴解冻,每组取 100 颗卵 28℃ 海水孵化,48h 后计数出膜无节幼体,计算孵化率。实验重复 4 次,计算平均值,进行 t-检验。

表 1 不同保护剂(单种)、浓度、平衡时间,卤虫脱壳卵液氮保存 24h 后的孵化率

Tab.1 Post-thaw hatching rate of *Artemia* decapsulated cysts after stored in liquid nitrogen for 24 hours with various single-type cryoprotectants, concentrations and balance periods

保护剂 (cryoprotectant)	平衡时间(balance time)			
	10min	30min	60min	90min
孵化率(hatching rate)				
葡萄糖(0.5mol/L)	56.3±4.4 ^a	49.3±5.4 ^a	17.5±2.1 ^{abc}	31.5±3.4 ^{abc}
葡萄糖(1.0mol/L)	64.8±4.3 ^a	55.5±2.4 ^a	37.5±3.5 ^{abc}	49.5±1.7 ^{abc}
葡萄糖(1.5mol/L)	61.8±2.5 ^a	57.8±2.9 ^a	59.3±2.6 ^a	58.8±3.0 ^a
葡萄糖(2.0mol/L)	64.3±2.9 ^a	59.5±3.9 ^a	61.3±2.5 ^a	64.3±3.9 ^a
蔗糖(0.5mol/L)	59.8±6.9 ^a	36.5±5.0 ^a	40.8±2.8 ^{abc}	39.8±3.6 ^{ac}
蔗糖(1.0mol/L)	50.5±1.7 ^a	53.0±2.6 ^a	50.8±5.1 ^a	57.3±2.6 ^{ac}
蔗糖(1.5mol/L)	53.5±7.9 ^a	49.8±5.6 ^a	51.0±5.9 ^a	40.0±1.4 ^{ac}
蔗糖(2.0mol/L)	58.8±5.4 ^a	49.5±5.8 ^a	52.3±4.7 ^a	67.5±5.3 ^a
DMSO(5%)	4.3±1.0	10.0±2.2 ^b	12.5±1.3 ^{ac}	11.8±1.0 ^{ac}
DMSO(10%)	4.3±2.1	12.3±1.0 ^b	29.3±3.3 ^{abc}	21.5±3.5 ^{ac}
DMSO(20%)	13.0±1.8	23.0±3.2 ^{ab}	33.8±5.7 ^{abc}	31.0±3.6 ^{ac}
DMSO(30%)	14.3±3.3	48.8±3.3 ^{ab}	61.4±2.2 ^{ac}	64.8±4.4 ^{ac}
甘油(5%)	17.0±2.7	19.8±4.8	16.3±5.9 ^a	6.8±1.0 ^a
甘油(10%)	15.5±5.8	21.0±2.5 ^a	17.5±5.5 ^a	26.8±1.3 ^{abc}
甘油(20%)	14.0±6.4	33.8±5.9 ^{ab}	62.0±8.7 ^{abc}	35.9±10.2 ^{abc}
甘油(30%)	20.0±7.5	44.0±4.3 ^{ab}	51.2±4.7 ^{ac}	46.5±5.5 ^{ac}
海水	23.8±8.2	13.3±1.9	5.3±1.7 ^{bc}	0 ^{bc}

a 与海水对照相比显著 ($|t| > t_3$ 0.05) b 与前一组数据相比显著 ($|t| > t_3$ 0.05)
c 与平衡 10min 的数据相比显著 ($|t| > t_3$ 0.05)
a Significantly different from sea water control group ($|t| > t_3$ 0.05)
b Significantly different from the preceding group ($|t| > t_3$ 0.05)
c Significantly different from the group balancing for 10 min ($|t| > t_3$ 0.05)

表 2 不同保护剂(双重)、浓度、平衡时间、卤虫脱壳卵液氮保存 24h 后的孵化率

Tab.2 Post-thaw hatching rate of *Artemia* sp. decapsulated cysts after stored in liquid nitrogen for 24 hours with various dual cryoprotectants, concentrations and balance periods

保护剂 (cryoprotectant)	平衡时间(balance time)			
	10min	30min	60min	90min
孵化率(hatching rate)				
(蔗糖+葡萄糖)				
0.5mol / L+0.25mol / L	69.5 ± 2.7	61.0 ± 5.9	63.8 ± 2.5	61.3 ± 2.4
0.5mol / L+0.5mol / L	69.8 ± 3.9	66.3 ± 7.5	57.3 ± 9.7	62.8 ± 4.4
0.5mol / L+0.75mol / L	73.0 ± 2.9	66.5 ± 6.6	64.0 ± 2.9	60.8 ± 1.7
0.5mol / L+1.0mol / L	82.0 ± 3.8	68.3 ± 3.3	64.8 ± 6.9	70.5 ± 2.5
1.0mol / L+0.25mol / L	61.3 ± 1.7	68.0 ± 6.1	67.0 ± 4.8	62.3 ± 2.5
1.0mol / L+0.5mol / L	61.8 ± 2.5	66.3 ± 3.5	62.3 ± 5.9	65.8 ± 3.9
1.0mol / L+0.75mol / L	63.0 ± 1.4	69.0 ± 2.6	69.8 ± 3.5	68.8 ± 2.1
1.0mol / L+1.0mol / L	65.3 ± 2.1	72.0 ± 2.16	65.3 ± 3.9	71.0 ± 1.8
(甘油+DMSO)				
10%+2.5%	64.8 ± 3.6	53.8 ± 9.2	57.0 ± 4.1	34.8 ± 3.1 ^a
10%+5%	63.8 ± 1.5	58.0 ± 4.1	52.5 ± 11.0	61.8 ± 1.5
10%+10%	73.0 ± 3.6	70.5 ± 1.9	66.5 ± 6.5	71.3 ± 0.5
10%+20%	73.0 ± 1.8	72.5 ± 2.5	74.0 ± 2.5	81.3 ± 3.6
20%+2.5%	66.3 ± 4.1	65.5 ± 2.7	73.8 ± 2.8 ^a	78.5 ± 2.4 ^a
20%+5%	73.8 ± 2.2	70.5 ± 1.3	65.8 ± 7.1	71.3 ± 5.4
20%+10%	67.8 ± 5.1	68.5 ± 7.1	68.0 ± 2.2	70.3 ± 1.7
20%+20%	62.0 ± 3.2	73.3 ± 2.1 ^a	75.3 ± 3.0 ^a	76.3 ± 1.5 ^a
海水	23.8 ± 8.2	13.3 ± 1.9	5.3 ± 1.7	0

a 与平衡 10min 的相比显著 (|t|>t₃ 0.05)
a Significantly different from the group balancing for 10 min (|t|>t₃ 0.05)

1.3 饱和 NaCl 溶液和甘油+DMSO 溶液对各发育时期胚胎的冷冻保存 取在 28℃ 海水中发育不同时期(0、1、2、3、4、5、6、7、8 和 12h)的脱壳卵数百颗放入小指管中,分别加 1.5ml 饱和 NaCl 溶液(自来水配制)和甘油+DMSO 溶液(20%+10%, 10%+20%),加饱和 NaCl 溶液的在 4℃ 下平衡 24h,加甘油+DMSO 溶液的在 4℃ 下平衡 90min,然后转入液氮蒸气平衡 3—4min,进入液氮保存 24h,孵化率计算同上。

1.4 冷冻保存时间对孵化率的影响 分别以 2.0mol 葡萄糖、2.0mol 蔗糖、20%甘油+10%DMSO 和 10%甘油+20%DMSO 为冷冻保存液。取脱壳卵数百颗放于指管中,加 1.5ml 保存液,4℃ 平衡 90min,液氮蒸气平衡 3—4min 后,进入液氮分别保存 1、5、13 和 25d。孵化率计算同脱壳卵的液氮保存。

1.5 保存后卤虫染色体数检查 分别以 20%甘油、20%DMSO 和饱和 NaCl 溶液为冷

冻保存液, 取脱壳卵数百颗放于指管中, 加 1.5ml 冷冻保存液, 4℃ 平衡 90min, 液氮蒸气平衡 3—4min 后, 进入液氮保存 1d, 30℃ 水浴解冻, 28℃ 孵化。

染色体制备参考张闰生等^[4]的方法, 取刚孵化出的无节幼体, 在含 3—5ppm 秋水仙素的 28℃ 海水下处理 5—6h, 刺死, 蒸馏水低渗 30min, 甲醇、冰醋酸 (3 : 1) 固定 30min, 取单个幼体置于载玻片上, 针头敲散, 干后, Giemsa 染色, 镜检、摄影, 染色体计数。用符号检验法和秩和检验法 (95% 置信度) 检验各实验组与对照组染色体数的差异。

1.6 石蜡切片观察卤虫休眠卵休眠时期 取刚脱壳的卤虫休眠卵 Bouin 液固定, 常规石蜡制片, 切片厚度 7μm。

1.7 石蜡切片和扫描电镜观察冷冻对在 28℃ 下发育 4h 的卤虫脱壳卵的影响 脱壳卵在 28℃ 下发育 4h 后, (1) 直接用 2.5% 戊二醛 (0.1mol / L PBS, pH = 7.2) 和 Bouin 液固定; (2) 取脱壳卵数百颗放入指管中, 加 1.5ml 海水, 液氮蒸气平衡 3—4min, 进入液氮保存 24h, 30℃ 水浴解冻, 戊二醛和 Bouin 液固定; (3) 取脱壳卵数百颗放入指管中, 加入 1.5ml 饱和 NaCl 溶液, 4℃ 保存 24h 后, 液氮蒸气平衡 3—4min, 进入液氮保存 24h, 30℃ 水浴解冻, 分别以戊二醛和 Bouin 液固定。其中 Bouin 液固定的, 24h 后换 70% 酒精, 按常规石蜡制片; 戊二醛固定的, 制片时经 PBS 冲洗, 1% OsO₄ 固定 30min, 临界点干燥, 真空喷金镀膜, 最后用 AMRAY-1830 扫描电镜观察和摄影。

2 结果与分析

2.1 脱壳卵的液氮保存 从表 1 可以看出, 对照随着海水平衡时间的加大, 孵化率下降, 表明卤虫脱壳卵吸水后对冷冻损伤敏感; 葡萄糖、蔗糖、DMSO 和甘油均显示出一定的冷冻保护作用, 高浓度的保护剂较低浓度保护剂冷冻保护作用强; 在高浓度下, 非渗透性保护剂, 葡萄糖 (1.0mol / L, 2.0mol / L) 和蔗糖 (2.0mol / L) 冷冻保护作用与平衡时间无关; 而渗透性保护剂 DMSO 和甘油平衡 60min 和 90min 的冷冻保护效果较 10min 和 30min 好 (有个别例外, 可能是由于实验误差引起的) (表 1)。

从表 2 中可以看出, 蔗糖+葡萄糖的双重保护剂作用较单种保护剂冷冻保护作用强, 保护作用与平衡时间无关。甘油+DMSO 溶液双重保护剂的作用也较单种保护剂强, 但某些浓度组合与平衡时间有关, 10% 甘油+2.5% DMSO 平衡 90min 的孵化率较平衡时间短的低 ($|t| > t_{30.05}$), 20% 甘油+2.5% DMSO、20% 甘油+20% DMSO 平衡时间长的孵化率比平衡时间短的高 ($|t| > t_{30.05}$) (表 2)。

在解剖镜下观察可以看到脱壳卵在海水中平衡 90min 后, 卵子吸水饱满, 而用 DMSO、甘油、蔗糖和葡萄糖溶液平衡后的卵子均有一定的脱水收缩, 卵子瘪凹。

2.2 饱和 NaCl 溶液和甘油+DMSO 溶液对胚胎各发育时期的冷冻保存 随着吸水发育时间的加长, 海水对照的孵化率下降 (发育 2h 后冷冻全部致死)。甘油+DMSO 溶液的冷冻保护作用也减弱 (发育 3h 后, 分别以 20% 甘油+10% DMSO 和 10% 甘油+20% DMSO 为保护剂, 孵化率只有 15.3% 和 43.0%, 发育 4h 以后, 甘油+DMSO 已没有冷冻保护作用)。而以饱和 NaCl 溶液为保护剂的对脱壳卵的各发育时期都有一定的保护作用, 但对后期的胚胎保护作用减弱, 在 28℃ 下发育 12h 后, 饱和 NaCl 溶液保护的脱壳卵孵化率只有 24.5% (表 3)。

表 3 卤虫脱壳卵在 28℃ 下发育不同时间后,以饱和 NaCl 溶液和甘油+DMSO 为保护剂,
液氮保存 24h 后孵化率

Tab.3 Post-thaw hatching rate of decapsulated *Artemia* sp. cysts of various developmental stages at 28℃ after stored in liquid nitrogen for 24 hours with saturated NaCl solution, glycerol+DMSO as cryoprotectants

发育时间 (developing time)	保护剂(cryoprotectant)			
	海水	饱和盐水	(甘油+DMSO)	(甘油+MSO)
			20%+10%	10%+20%
孵化率(hatching rate)				
0h	22.0±2.9	69.0±4.6	67.8±5.1	73.0±1.8
1h	5.3±1.7	63.8±11.1	46.3±2.8	47.5±3.1
2h	0	50.3±6.5		
3h	0	34.8±3.1	15.3±6.3	43.0±2.2
4h	0	40.5±7.1	0	0
5h	0	37.8±2.2		
6h	0	39.5±7.8		
7h	0	38.3±4.3		
8h	0	34.8±4.0		
12h	0	24.5±3.3		

在解剖镜观察发现脱壳卵经饱和 NaCl 溶液平衡 90min 后,卵子收缩、瘪凹,其瘪凹程度较 DMSO、甘油、葡萄糖和蔗糖溶液平衡的脱壳卵严重。

2.3 冷冻保存时间对孵化率的影响 从表 4 中可以看出 2.0mol/L 葡萄糖溶液为保护剂的效果最差,在液氮中保存 5d 后孵化率显著下降(|t|>t₃ 0.05),保存 25d 后孵化率仅为 16.0%。以 2.0mol/L 蔗糖溶液、20%甘油+10%DMSO 和 10%甘油+20%DMSO 溶液为保护剂保存 25d 后孵化率有显著下降(|t|>t₃ 0.05),但孵化率仍分别有 48.3%、51.1%和 63.0%(表 4)。

表 4 卤虫脱壳卵经液氮保存不同时间后的孵化率

Tab.4 Post-thaw hatching rate of *Aremia* sp. decapsulated cysts after various storage periods in liquid nitrogen

保护剂 (cryoprotectant)	保存时间(storage Period)			
	1d	5d	13d	25d
	孵化时间(hatching rate)			
2.0ml/L 葡萄糖	64.3±3.9	50.5±7.8 ^a	27.0±3.2 ^a	16.0±1.9 ^{ab}
2.0mol/L 蔗糖	67.5±5.3	73.8±3.3	72.8±2.5	48.3±5.6 ^a
(甘油+DMSO)				
20%+10%	70.3±1.7	80.8±6.0	77.0±4.2	51.1±7.1 ^a
10%+20%	81.3±3.6	80.3±4.5	84.3±1.0	63.0±1.4 ^a

a 与前一组数据相比显著(|t|>t₃ 0.05) b 与同浓度保存 5d 的相比显著(|t|>t₃ 0.05)
a Significantly different from the preceding group (|t|>t₃ 0.05)
b Significantly different from the group preserved for 5 days (|t|>t₃ 0.05)

表 5 液氮保存 24 小时的卤虫脱壳卵及其对照卵孵出的无节幼体染色体数

Tab.5 Chromosome number of nauplii hatched from decapsulated *Artemia* sp. cysts after stored in LN for 24 hours and from control

染色体数(chromosome number)	21	26	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
a 卤虫个数	4							1	3					1	1	4	30	1
百分比%	8.9							2.2	6.7					2.2	2.2	8.9	66.7	2.2
(nauplii percentage)																		
b 卤虫个数	3	2		1	1	1	1	2	1	1	1	3	2	2	2	25		
百分比%	6.8	4.5		2.3	2.3	2.3	4.5	2.3	2.3	2.3	6.8	4.5	4.5	4.5	4.5	56.8		
(nauplii percentage)																		
c 卤虫个数	2	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	27	
百分比%	4.4	2.2	2.2	2.2	6.7	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	6.7	2.2	2.2	2.2	2.2	60.0	
(nauplii percentage)																		
d 卤虫个数	4	2				3	1	3	1	1	1	1	2	2	2	2	25	
百分比%	8.9	4.4				6.7	2.2	6.7	2.2	2.2	2.2	2.2	4.4	4.4	4.4	4.4	55.6	
(nauplii percentage)																		

a 未冷冻对照, b 20%甘油为保护剂冷冻, c 20%DMSO 为保护剂冷冻, d 饱和盐水为保护剂冷冻
a Unfrozen control, b Cryopreserved in 20% glycerol solution, c Cryopreserved in 20% DMSO solution, d Cryopreserved in saturated NaCl solution

2.4 冷冻对染色体数的影响 卤虫未冷冻对照组的大多数个体(66.7%)染色体数为二倍体($2n=42$) (图版 I:1), 也有少数(8.9%)为单倍体($n=21$) (图版 I:2), 未冷冻对照组中还出现了一些非整倍体的染色体数, 可能是群体中天然的非整倍体, 也可能是实验技术造成的, 还有待进一步的实验证实(表 5)。

以甘油、DMSO 和饱和 NaCl 溶液为冷冻保存液, 各实验组中染色体数大多为 $2n$, 单倍体的很少。用符号检验法和秩和检验法(95%置信度)检验, 各实验组与对照组之间无显著差异, 因此可以认为各种倍性的卤虫胚胎对冷冻的敏感性是一致的。

2.5 石蜡切片观察卤虫休眠卵休眠期 切片发现刚脱壳的卤虫卵中有一扁圆型的空腔, 偏于一端, 在卵黄中散布着许多子细胞核(图版 I:6), 因此作者所指的卤虫休眠“卵”实际上是已经是发育至囊胚前期的胚胎。

2.6 石蜡切片和扫描电镜观察冷冻对在 28°C 下发育 4h 的卤虫脱壳卵的影响 未冷冻对照卵膜表面可看到清晰的、充分展开的网状结构(图版 I:3), 内部有一空腔(图版 I:7)。液氮保存 24h 后该网状结构完全被破坏, 卵膜表面皱折、甚至破裂, 内部物质外泄(图版 I:5), 但内部没有看到破坏(图版 I:8); 饱和 NaCl 溶液处理, 再放入液氮保存的脱壳卵, 卵膜表面网状结构仍然存在, 但稍有收缩(图版 I:4), 切片发现其内部的腔收缩(图版 I:9), 但内部未发现明显损伤。

3 讨论

3.1 目前, 在液氮中冷冻保存成功的卵子和胚胎个体都较小, 直径在 $100\mu\text{m}$ 左右, 卤虫脱壳卵直径为 $250\mu\text{m}$ 左右, 是目前在液氮中保存成功的, 体积最大的个体。卤虫脱壳卵具多层卵膜, 富含卵黄, 与鱼卵和高等甲壳类动物卵相似, 其冷冻保存的成功对鱼卵和高等甲壳类动物等多黄卵的冻存可以提供有价值的参考资料。

3.2 一般认为, 冷冻对细胞造成的损伤有两种^[5]: (1)降温速度过快, 细胞内水分来不及外排, 形成细胞内冰晶, 细胞受机械损伤; (2)降温速度过慢, 细胞内水分外排, 在细胞内形成长期高渗条件, 对细胞造成生理损伤。但对卵子和胚胎等复杂细胞的冷冻损伤机制了解甚少, 1982 年, Harvey 等^[6]发现冷冻损伤鱼类受精卵的最外层卵膜。Toledo 等^[2]和 Renard^[7]分别研究了轮虫和牡蛎胚胎的冷冻保存, 发现冷冻对卵黄颗粒有一定的影响。

卤虫脱壳卵是一种较特殊的材料, 能抵抗极度脱水, 高渗对它几乎不能造成损伤, 因此冷冻致死主要是机械损伤造成的。从作者的实验结果分析, 卤虫脱壳卵内的水分在冷冻保存中是一个关键因子。脱壳卵吸水后, 对冷冻损伤敏感。扫描电镜观察发现, 在 28°C 下吸水发育 4h 的卤虫脱壳卵液氮保存后, 卵膜表面遭受了严重损伤, 甚至破裂, 造成膜内物质的外泄。而饱和 NaCl 溶液处理再进行液氮保存的卤虫脱壳卵, 胚胎内的水分含量大大减少, 卵膜没有遭受破坏, 并且胚胎大多能存活。因此, 由于膜内水分的存在而导致膜内冰晶的形成是造成卤虫卵膜破裂和胚胎死亡的主要原因, 减少卤虫脱壳卵内水分是冷冻保存成功的关键。

3.3 1990 年, Toledo 等^[2]冷冻保存蟠旋臂尾轮虫胚胎, 发现 DMSO 对胚胎有脱水作用; 1991 年, Renard^[7]用蔗糖冷冻保存大西洋巨大巨蛎(*Crassostrea gigas*)胚胎, 也推测其保护机制与脱水有关。本实验卤虫脱壳卵的冷冻保存中发现, 甘油、DMSO、蔗糖和葡萄糖

溶液平衡后, 卤虫脱壳卵均有一定的收缩现象, 它们的冷冻保护机制可能与其脱水作用有关。

饱和 NaCl 溶液前人未用作冷冻保护剂, 作者首次发现其具有冷冻保护作用, 它能有效地脱去卤虫脱壳卵中的水分, 其冷冻保存效果较保护剂(甘油、DMSO、蔗糖和葡萄糖)更佳。

3.4 合适的发育时期对胚胎冷冻保存是一个重要因子。海胆和紫贻贝的晚期胚胎对冷冻有较高的忍受能力^[8,9]; 螺旋臂尾轮虫胚胎在对称期对冷冻抗性最强^[2]。

在作者的实验中, 发现刚脱壳的卤虫卵处于囊胚前期, 对冷冻具有一定的抗性, 不加保护剂在 28℃ 下发育 2h 后, 液氮保存全都死亡, 发育 4h 后, 甘油+DMSO 对其已没有冷冻保护作用, 饱和 NaCl 溶液虽然对卤虫的不同发育时期的胚胎均有一定的冷冻保护作用, 但对后期胚胎保护作用减弱。因此, 卤虫的后期胚胎对冷冻是较敏感的, 可能是由于后期各种器官已经形成, 冷冻更易造成损伤的原因。

参 考 文 献

- [1] Whittingham D G, Lyon M F, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196℃ and -296℃. *Science*, 1972, **178**: 411—414.
- [2] Toledo J D, Kurokura H. Cryopreservation of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* embryos. *Aquaculture*, 1990, **91**: 385—294.
- [3] Sorgeloos P, Bossuyt E, Lavina E, et al. Decapsulation of Artemia cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture*, 1977, **12**: 311—355.
- [4] 张闰生、刘凤歧、赵晓霞等. 卤虫染色体倍性组成的研究. *动物学报*, 1990, **36**(4): 412—419.
- [5] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Amer. J. Physiol.* 1984, **143**: C125—C142.
- [6] Harvey B, Ashwood-Smith M J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. *Cryobiology*, 1982, **19**: 29—40.
- [7] Renard P. Cooling and freezing tolerances in embryos of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects. *Aquaculture*, 1991, **92**: 43—57.
- [8] Asahina E, Takahashi T. Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of sea urchin. *Cryobiology*, 1978, **15**: 122—127.
- [9] Toledo J D, Kurokura H, Kasahara S. Preliminary studies on the cryopreservation of the blue mussel embryos. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1989, **55**(9): 1661.

CRYOPRESERVATION OF DECAPSULATED *ARTEMIA* SP. EMBRYOS

Liu Xiangyu and Lu Renhou

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 420072)

Abstract

The decapsulated *Artemia* sp. embryos at their blastula stage were successfully cryopreserved in liquid nitrogen with various concentrations of glycerol, DMSO, glucose and sucrose as single cryoprotectants. Higher cryoprotectant concentrations were better than the lowers. Dual cryoprotectants (glycerol+DMSO, glucose+sucrose) had stronger cryoprotection than single-type cryoprotection. Saturated NaCl solution showed a powerful cryoprotection for various developmental stages of *Artemia* sp. embryos, although a weaker cryoprotection was observed for later stage. Intraembryonic ice crystal formation was the main reason causing the death of the embryos. The cryoprotection of various cryoprotectants is possibly related to their dehydration effect.

Key words Decapsulated *Artemia* sp. embryo cryopreservation, cryoprotectant

图 版 说 明

1 卤虫染色体 $2n=42(1000\times)$; 2 卤虫染色体 $1n=21(1000\times)$; 3 扫描电镜示卤虫脱壳卵在 28°C 下发育 4h 的胚胎表面结构($1000\times$); 4 扫描电镜示卤虫脱壳卵在 28°C 下发育 4h, 4°C 饱和 NaCl 溶液平衡 24h 后, 液氮保存 24h 的胚胎表面结构, 有皱折($1000\times$); 5 扫描电镜示卤虫脱壳卵在 28°C 下发育 4h 后, 海水中液氮保存 24h 的胚胎表面结构, 有的地方破裂, 胚胎内物质外泄($1000\times$); 6 刚脱壳的卤虫脱壳卵胚胎切片($800\times$); 7 在 28°C 发育 4h 后的卤虫脱壳卵切片($800\times$); 8 在 28°C 发育 4h 后, 在海水中液氮保存 24h 的卤虫脱壳卵切片($800\times$); 9 在 28°C 发育 4h 后, 在 4°C 饱和 NaCl 溶液中平衡 24h, 液氮保存 24h 的卤虫脱壳卵切片($800\times$)

1. Chromosome of *Artemia* sp. $2n=42$; 2. Chromosome of *Artemia* sp. $1n=21$; 3. Scanning electron micrograph of decapsulated *Artemia* embryo which developed for 4 hours at 28°C ; 4. Scanning electron micrograph of decapsulated *Artemia* sp. embryo which developed for 4 hours at 28°C , then was stored at liquid nitrogen for 24 hours after stored in 4°C saturated NaCl solution for 24 hours; 5. Scanning electron micrograph of decapsulated *Artemia* sp. embryo which developed for 4 hours at 28°C , then was stored at liquid nitrogen for 24 hours; 6. Paraffin section of decapsulated *Artemia* sp. embryo; 7. Paraffin section of decapsulated *Artemia* sp. embryo which developed for 4 hour at 28°C ; 8. Paraffin section of decapsulated *Artemia* sp. embryo which developed for 4 hour at 28°C , then was stored at liquid nitrogen for 24 hour; 9. Paraffin section of decapsulated *Artemia* sp. embryo which developed for 4 hour at 28°C , then was stored at liquid nitrogen for 24 hour after stored at 4°C saturated NaCl solution for 24 hours