

细胞内吞的研究进展

陈晓群 汤雪明

(上海第二医科大学细胞生物学实验室 200025)

细胞内吞(endocytosis)是细胞从周围环境中摄取各种物质的过程,是细胞生理代谢的一个极为重要的现象。几乎所有的真核细胞都通过内吞作用摄取细胞外基质中的大分子。70年代中期,Steinman等人发现了细胞膜系统再循环现象,Goldstein等人第一次较为完整地描述了由受体介导的低密度脂蛋白(Low density lipoprotein,简称LDL)内吞过程,这两项成果使细胞内吞成为细胞生物学研究领域中的一个热点,从80年代一直延续至今。研究发现,细胞内吞的大分子的种类是十分多样的,其中包括:激素和生长因子,载有营养或调节物质的转运蛋白,溶酶体酶、免疫球蛋白、毒素、病毒,甚至一些人工合成的大分子^[1]。大量的工作都围绕着这些大分子是如何被细胞识别、结合、内化、分选、加工处理而进行的。这些工作证实:细胞能有选择地从周围环境中摄入某些物质,并在一种极精细的调节下将不同的物质分别以不同的途径送到胞内不同的区域。

根据目前的观点,内吞分为三大类。第一类为受体介导内吞(receptor-mediated endocytosis),是细胞在网格蛋白(clathrin)参与下内吞结合在质膜受体上的大分子的过程。这是目前研究各种内吞形式的重点;第二类为吸附内吞(adsorptive endocytosis),是细胞内吞结合在质膜上的分子的过程。这个过程没有网格蛋白参与,但可能有质膜受体参与;第三类为液相内吞(fluid phase endocytosis),是一些和质膜没有亲和力的分子溶于细胞间基质而被质膜包裹“饮”入细胞的过程。液相内吞被认为是细胞代谢的一个基本过程。

一、细胞内吞的研究方法

研究细胞内吞的实验模型是多种多样的。

有的实验室主要以体内(in vivo)实验为主^[2,3]。随着细胞培养技术的普及,大多数实验室开始以培养细胞为研究对象。这些细胞有些是正常的原代培养或建株的细胞^[4],有些是肿瘤细胞,有些则是突变了缺陷型细胞^[5]。近些年来,有些实验室又建立了无细胞系统(cell-free system)来研究内吞过程中的某些机制^[6],如分离出胞内各种膜泡成分研究膜的融合机制。

研究内吞的方法有很多,随着越来越多的学者对内吞问题的重视,新的方法也不断地被引进和发明。总的来说,从研究手段上分,这些方法可分为三大类,即形态学方法、生物化学方法及分子生物学方法。

形态学观察是十分经典,同时又是十分有效的方法。利用电镜和光镜的示踪细胞化学技术,我们可以直观地看到配体和细胞膜上受体结合被吞入细胞及在细胞中移动的整个过程。根据内吞的不同方式,示踪剂也分为三大类,即受体介导内吞过程示踪剂,常用的如LDL分子,EGF分子等;吸附内吞过程示踪剂,如一些植物凝集素,阳离子铁蛋白;以及液相内吞示踪剂,如辣根过氧化物酶等。这些示踪剂常标记有电镜或光镜下可见的物质,如胶体金、铁蛋白、同位素、荧光物质等。示踪剂加入到细胞培养液或注入动物体内后,在不同的时间里处理细胞或动物,然后观察细胞,从而找出示踪剂的胞内途径,这是一般实验室常用的方法。

生化方法通常是通过分析膜泡成分研究内吞的过程。将细胞匀浆后通过梯度离心等不同方法,能够分离出和内吞有关的膜泡成分进行分析测定^[7]。一些生物化学家则致力于分析膜泡融合机制,并重建了无细胞的膜泡融合模型^[8]。

随着分子生物学技术的普遍应用,内吞的工作已深入到了分子水平。许多受体蛋白被纯

化, 基因被克隆。经基因突变而被改造的受体和一些膜蛋白的内吞行为, 成为许多研究者的兴趣所在^[9]。

内吞是一个从胞外到细胞膜最后到胞质中的连续过程, 出于对这个过程的一个或几个方面的兴趣, 各个实验室的工作重点不同, 因而对实验对象也有不同的处理。常用的方法有: 用不同的配体刺激细胞的内吞行为, 研究内吞动力学及各种途径; 用阻断剂阻碍某个内吞途径, 从而较清晰地研究感兴趣的内吞方式。如 Sandvig 和 Bo van Deurs 等一直从事无网格蛋白存在的内吞方式, 他们常用的胞质酸化、低渗排钾方法抑制受体介导内吞, 从而证明无网格蛋白存在的一条内吞途径的存在^[10,11]; 另外一些方法则用来阻断内吞过程中某阶段。如 Dunn 及 Hubbard 于 1980 年建立的低温处理方法, 阻断质膜上有被小泡的形成及胞质中内体和溶酶体的融合^[12]; Ward 等用 K^+ 缓冲液取代 Na^+ 缓冲液温育细胞, 阻断内体和溶酶体融合^[13]; Hart 等人用氯化铵抑制吞噬体和溶酶体融合, 并引起吞噬体和内吞途径中内体的融合, 形成一条新的途径^[14]等等。

二、细胞内吞的途径

前面已经介绍, 内吞可分为三大类。受体介导内吞和吸附内吞, 通常都是配体与细胞膜上的受体结合后入胞, 因而是一种有特异性的配体内吞; 液相内吞则是非特异性的。受体介导内吞和吸附内吞的主要区别在于: 第一, 一般而言在受体介导内吞中, 受体-配体复合物在质膜上做侧向移动, 移至有被小窝中积聚, 再形成内吞小泡, 网格蛋白参与了这个过程, 而吸附内吞中, 受体-配体复合物并不积聚, 也没有网格蛋白参与内吞过程; 第二, 有些研究表明, 质膜上分布的参与受体介导内吞的受体数目远少于吸附内吞受体^[15]; 另外, 有人观察到这两种内吞形式形成的内吞小泡在大小上也有差别, 前者形成的小泡直径略大于后者^[11]; 除

此之外, 这两种内吞方式是十分相似的。下面将重点讨论受体介导内吞的过程及不同功能的配体的内吞途径(见图)。

1. 质膜阶段

膜上的受体通常是一些和特异配体有高度亲和力的整合膜蛋白。受体和配体的识别和结合有各种不同的机制。 α_2 -巨球蛋白是一种四聚体糖蛋白, 存在于组织液中, 它能与多种蛋白酶结合, 发生构象上的变化, 这种变化能被间质细胞膜上受体识别, α_2 -巨球蛋白因此与受体结合, 而后吞入细胞^[1]。而分泌到细胞间质中的少量溶酶体酶, 则通过甘露糖-6-磷酸和质膜上的甘露糖-6-磷酸受体识别结合入胞。

根据受体对同一配体的亲和力不同, 人们把受体分为高亲和力和低亲和力受体两类。许多培养的纤维细胞上有 5×10^5 个受体, 其中高亲和力受体约 10—20000 个, 其余受体则亲和力较低^[1]。高亲和力受体占受体总数的比例不是一成不变的, 而是随着周围环境的变化而变化。有人研究发现在富含 EGF 的培液中细胞膜上高亲和力的 EGF 受体数目下降。对于这两类受体在膜表面数量比例的变化以及在内吞过程中的作用, 目前引起了较多兴趣。

质膜上受体的数量一般由其占用率调节的。一些受体, 如 EGF、LDL 受体, 其数量因配体的大量存在而下降, 若将细胞培养在配体缺乏的介质中, 几天后则膜上相应受体数目增加。当然也有例外, α_2 -巨球蛋白和转铁蛋白受体数目在各种培养条件下都维持相对稳定^[1]。此外, 受体在膜表面分布也不均匀。有些部位, 如微绒毛上, 受体就相对密集^[1,3]。受体能随着膜脂的流动迅速在质膜上游动, 因而在细胞表面的分布变化迅速。

各种途径的受体介导内吞都有一个共同的特征, 即受体都要移动到细胞膜的有被小窝区域, 在此处内陷成为有被小泡, 进入胞内。所谓有被小窝、小泡, 最早由 Roth、Porter 等人于 60 年代中期发现。他们通过电子显微镜观察到细胞膜胞质面某些区域被有一层绒毛状物质。

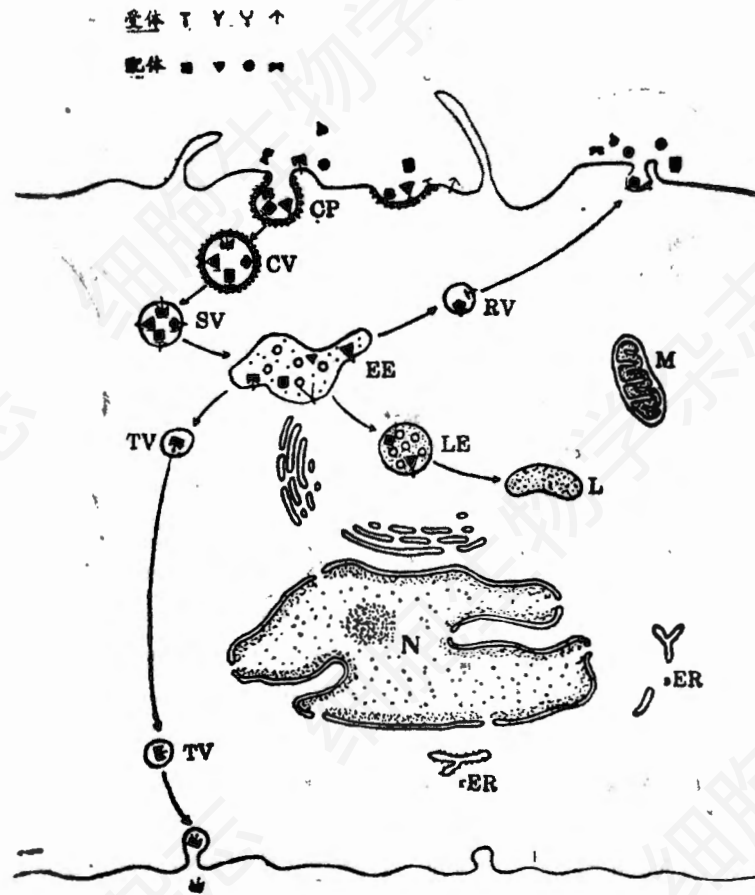


图 受体介导内容四种途径示意图

EE(early endosomes): 早期内体

LE(late endosomes): 晚期内体

L(lysosomes): 溶酶体

G(Golgi apparatus): 高尔基体

N(nucleus): 细胞核

M(mitochondria): 线粒体

sER(smooth endoplasmic reticulum): 光面内质网

rER(rough endoplasmic reticulum): 糙面内质网

CP(coated pits): 有被小窝

CV(coated vesicles): 有被小泡

SV(smooth vesicles): 光滑小泡

TV(transcytic vesicles): 跨膜小泡

RV(recycling vesicles): 再循环小泡

70年代中期, Anderson等人发现了这些区域和LDL分子内吞之间的关系^[9]。同一时期的Pearse等人发现了组成这些绒毛状物质的一种主要蛋白, 随后研究证明这种蛋白的作用在于它在质膜胞质区形成一个篮状框架, 使质膜下陷成小泡, 因而这种蛋白被命名为网格蛋白^[10]。之后, Pearse又报道了另一种主要的蛋白, 为一种中介分子, 既有和受体的蛋白胞质区作用的功能区, 又有和网格蛋白作用的功能

区, 称为adaptor^[17]。有被小窝、小泡的形成包括网格蛋白, adaptor及其它一些分子的征用和装配: 质膜上首先形成一个小窝, 随后质膜下陷产生小泡脱离质膜其余部分。有的受体不结合配体便能在小窝中集聚, 并被吞入, 如LDL受体, 而另一些受体则必须和配体结合后才移至小窝中被内吞, 如EGF受体^[10]。一般认为, 包括受体在内的膜蛋白的移动是被动地受膜脂流动影响的。为什么受体能集中在有被

小窝中呢?有些研究认为膜脂是不断地流向有被小窝区域,受体被动地被带到这个区域^[10]。而受体为何能集中在小窝处,目前还没有定论。有人认为许多受体蛋白的胞质区有和丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基相连的磷酸化基团,由蛋白激酶C调节的磷酸化可能就是受体聚集的一种调节机制^[9]。这种说法仍有争议。不论怎样,受体的集聚一定需要受体蛋白和网格蛋白等组成的“绒毛”状物质之间的某种相互作用,这一点是很清楚的。近来的研究表明受体蛋白胞质区酪氨酸残基的存在,可能对内吞信号的传入有重要的调节作用。一些本不内吞的膜蛋白,经突变后在胞质区出现酪氨酸残基,则引起了该蛋白在有被小窝中的集聚和内吞^[9]。

2. 胞内阶段

几乎所有受体介导内吞的过程在初期都是相同的,都于有被小窝处下陷,形成有被小泡进入细胞。此后网格蛋白迅速解聚,形成光滑小泡。光滑小泡相互溶合,或和早期内体融合。此后,内吞的不同受体和配体的命运开始有了不同。根据目前的观点,受体-配体复合物在胞内的移动主要有以下几种途径^[9]。

(1) 受体再循环,配体降解。

这是一条比较经典的途径,最早用于描述LDL分子的内吞,以后发现无唾液酸糖蛋白, α_2 -巨球蛋白,胰岛素和黄体化激素都采用这一途径。沿着这条途径,配体和受体在低pH值的早期内体中解离,配体继续被输送到溶酶体。受体则离开内体,返回质膜,重新结合新的配体,开始下一循环的内吞。显然,受体的再利用和大量、高速地运送配体入胞是相适应的。

(2) 受体、配体都再循环。

转铁蛋白是第一个被发现采用这条途径的。当转铁蛋白和受体复合物到达早期内体时,两者不发生解离,只是释放出所携带的铁离子。然后,脱铁的铁蛋白-受体复合物返回细胞表面。一旦回到中性的介质中,脱铁的转铁蛋白则和受体解离,受体又可以结合新的含铁的铁

蛋白分子。以后,有人报道了免疫系统的一些细胞通过这条途径加工抗原并提呈给效应细胞。

(3) 受体、配体都降解。

EGF是采用这条路线的典型例子。EGF-受体复合物到达早期内体后,虽然在酸性环境下,两者解离,但受体并不离开内体返回质膜,而是和EGF一起运送到溶酶体降解。这其中的机制还不清楚。

(4) 受体、配体穿胞转运。

这个途径是描述载有多聚免疫球蛋白A和免疫球蛋白M的受体穿过上皮细胞进入分泌液中的过程,如穿过乳腺上皮进入乳汁中。肝脏中新合成的受体分布于肝细胞窦状隙表面,结合IgA二聚体,复合物被吞入细胞。在随后的某个阶段,受体被蛋白酶水解,一部分受体联着Ig和膜脱离开,最后,载有IgA的小泡移到肝细胞的胆小管面,将Ig及与其相联的部分受体释放到胆汁中^[20]。

除了上述这几种主要途径外,有些研究还揭示一些受体进入高尔基体(虽然数目很少),然后重返质膜。如无唾液酸糖蛋白受体、转铁蛋白受体、甘露糖-6-磷酸受体等^[21]。此外,某些病毒被内吞后,还会出现在内质网中^[22]。

配体和受体所经的这几种途径给我们揭示了一个事实,即细胞中必然存在着一种分选受体和配体的机制。目前的观点认为,分选是在早期内体中发生的。

受体、配体一经内吞后,很快被传递给分布在细胞周缘的管、泡状的早期内体中。实验证明,不同的配体和受体能被传递到同一内体中^[23]。此后,参与再循环的受体、配体等与其它成分分离,通过不断出芽的方式形成小泡离开早期内体^[24]。生化分析也证明,早期内体阶段含有大量循环受体,而功能和早期内体显著不同的晚期内体中只含少量循环受体^[8]。在极性细胞中,一些内吞的蛋白分子正是在早期内体中和那些将被降解或循环的物质分开经跨细胞运输被送到相对的细胞表面^[20]。然而分选的

机制仍不清楚。生化分析证实,内体的膜上存在质子泵,使内体中形成酸性环境。当配体-受体复合物从中性的内吞小泡传递到早期内体时,受低 pH 值的影响,其构象发生了变化,复合物解离。因而早期内体常被称为 CURL 区(受体和配体非偶合区, *Compartment of Uncoupling of Receptors and Ligands*)。

经过早期内体的分选,那些将被降解的成分,则被继续送往晚期内体,最终到溶酶体中。这是一条十分清晰的途径,但在这个途径中的各个阶段仍存在不少有争议和含糊不清的方面。配体是如何从早期内体到晚期内体最终到溶酶体的细节到目前仍未完全阐明。当前,至少有两种模型描述这个过程^[25,26]。

(1) 小泡运输模型

这是 1975 年 Palade 为细胞分泌途径提出的一种模型,现在被用来解释细胞的内吞途径。它认为早期、晚期内体,以及溶酶体,都是原已存在的细胞器,它们之间通过运输小泡相互联系。运输小泡从一个区域出芽产生后,在胞内移动,将膜以及膜内的成分通过膜泡融合而传递给另一个区域。由此推论,早期、晚期内体及溶酶体应各含有一些固有的蛋白质成分。Hopkins 等人分离了质膜、有被小窝、内体和溶酶体分别加以分析,证明一些主要的蛋白成分在内吞的整个过程都存在,但内吞的每一阶段的确存在各自的专一性蛋白,并且溶酶体和内体的蛋白组成有很大的不同^[27]。Gruenberg 等人报道在破坏了微管的细胞中,内吞的配体滞留在早期内体和一种来源于早期内体但在结构上又有所不同的球状小泡中,以极慢的速度被降解^[8]。这些证据说明配体从早期到晚期内体的运输是间断的,不是一个连续的过程。

(2) 膜泡成熟模型

这个模型认为早期内体在胞内移动,不断接受来自质膜的小泡,与之融合,进行分选,将返回膜表面或跨胞的成分通过某种方式输送出去,剩下的膜和胞内成分接受来自高尔基体

的成分,成熟为晚期内体,最终形成溶酶体。许多工作都证明具有分选作用的早期内体能够不断地融合新形成的内吞小泡。分析加入配体不同时间分离出的内体,发现越早分离的早期内体,其与质膜溶合的活性越大。随着时间的推移,早期内体经过多次融合后,溶合活性逐渐降低^[28]。Dunn 等用两种标记通过脉冲标记及追踪证实配体(待降解的)存留在早期内体中,并且新的分选内体不断形成,补充那些成熟为晚期内体的部分^[25]。

另外一种内体成熟的模型是最近由 Hopkins 提出的^[29]。他利用激光共聚焦扫描显微镜检测了活细胞中配体-受体复合物的移动路线,提出内体是一个相互关联的管网结构,内吞的物质进入管网结构中后,又进入到一类似于多泡体的膨大物中,这个膨大部分以一种蠕动的方式向核周缘运动。有些工作指出,在一些细胞中观察较厚的电镜切片,早期内体确有许多分枝,形成局部的网状结构。这个结构似乎联系了膜边缘的泡状内体,但似乎和核周缘的晚期内体不相联。

晚期内体除了在形态上和早期内体不同,其生化性质及分布和早期内体也十分不同。它常常分布于核周缘。形状较大,成分更复杂。有人将它描述为多泡体,认为它是前溶酶体。晚期内体含有大量的溶酶体水解酶的受体和一种溶酶体膜蛋白 Ig P 120^[6]。这些证据提示,晚期内体似乎是新合成的溶酶体酶和底物(配体等)汇合的区域。酶的受体循环于 TGN(*Trans-Golgi Network*)和内体之间,不断地运送水解酶到晚期内体中。因此,传统的以酸性磷酸酶的细胞化学反应作为鉴别溶酶体的指标是不完全的。在很多细胞中都已证明晚期内体也是酸性磷酸酶阳性的。晚期内体和高尔基体除了存在上述的关系之外,一些内吞的膜蛋白,如无唾液酸糖蛋白受体,转铁蛋白受体等,也从晚期内体运往高尔基体,然后重返质膜表面。这个过程估计和这些蛋白的再糖基化有关。

晚期内体通过融合将它的成分传递给溶酶体。各种成分在溶酶体中降解。

细胞中不依赖网格蛋白的内吞过程很早就有发现,这包括前面提及的吸附内吞和液相内吞。吸附内吞形成的内吞小泡的直径一般比有被小泡的小。在细胞中内吞物移动的途径和受体介导内吞相同。

液相内吞被认为是细胞代谢的固有过程。和质膜没有亲和力的分子溶解于细胞外基质中,在细胞膜代谢过程中被质膜包裹随机地带入胞内。液相内吞泡的体积较大,它也将吞入的成分传递给早期内体^[23],以后的过程和受体介导内吞相似。

三、细胞功能和内吞途径的关系

几乎所有的细胞类型都显示出内吞及在溶酶体中降解大分子的能力,其原因在于某种内吞途径总是和细胞完成某些功能相关^[30]。例如配体降解、受体再循环的途径,是细胞摄取营养、调节成分、清除细胞间质中的病原体以及有机体发育过程中残余成分采取的主要方式。而配体、受体都进入降解的途径,使细胞能通过控制受体蛋白的合成,调节受体在细胞表面的数量,从而调节细胞的生理状况。在免疫系统的一些细胞中,抗原似乎也是通过内吞过程进行加工并提呈的。巨噬细胞和某些B淋巴细胞通过受体介导内吞摄入外源性抗原,传递到酸性内体中。抗原在内体中部分水解;细胞表面的MHC II类分子也不断内吞和再循环。这种过程提示水解的抗原片段可能在内体中和MHC II类分子结合成复合物,一起返回质膜,提呈给附近的T细胞抗原受体^[9]。另外,跨膜的途径也是许多细胞转运大分子的方式之一。细胞对某些营养成分的储存也是通过一定的内吞途径完成的,如卵黄的储存等。细胞功能与内吞途径的关系是非常有意义的研究方向,还存在许多问题等待我们去不断探索。

参 考 文 献

[1] Willingham M. C & Pastan I., 1984, *In-*

ternational Review of Cytology, 92: 51—92.

- [2] Balin B. J. & Broadwell R. D., 1987, *J. Histochemistry & Cytochemistry*, 35 (4): 489—498.
- [3] Hermo L. & Lalli M., 1988, *J. Andrology*, 9(1): 1—14.
- [4] Ghinea N. et al., 1992, *J. Cell Biology*, 118(6): 1347—1358.
- [5] Wang R. H. et al., 1990, *J. Biological Chemistry*, 265(33): 20179—20187.
- [6] Gruenberg J. & Howell K. E., 1989, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 5: 453—81.
- [7] Woodman P. G. & Warren G., 1991, *J. Cell Biology*, 112(6): 1133—1141.
- [8] Gruenberg J. et al., 1989, *J. Cell Biology*, 108: 1301—1316.
- [9] Goldstein J. L. et al., 1985, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1: 1—39.
- [10] Sandvig K. & Bo van Deurs, 1991, *Cell Biol. Intl. Rep.*, 15(1): 1—5.
- [11] Hansen S. H. et al., 1991, *J. Cell Biol.*, 113(4): 731—741.
- [12] Dunn W. A. et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255: 5971—8.
- [13] Ward D. M. et al., 1990, *J. Cell Biol.*, 110: 1013—1022.
- [14] Hard P. D. & Young M. R., 1991, *J. Exp. Med.*, 174(4): 881—9.
- [15] Gonatas N. K. et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 99: 1379—1390.
- [16] Pearse B. M. F., 1987, *EMBO J.*, 6: 2507—12.
- [17] Pearse B. M. F., 1988, *EMBO J.*, 7: 3331—6.
- [18] Dunn W. A. & Hubbard A. L., 1984, *J. Cell Biol.*, 98: 2148—59.
- [19] Bretscher M. S., 1984, *Science*, 224: 681—6.
- [20] Mostov T. E. & Simister N. E., 1985, *Cell*, 43: 389—90.
- [21] Farquhar M. G., 1985, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1: 447—488.
- [22] Kartenbeck J. et al., 1989, *J. Cell Biol.*, 102(6): 2721—9.
- [23] Ward D. M. et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264(14): 8164—70.
- [24] Dunn K. W. et al., 1989, *J. Cell Biol.*, 109: 3303—14.
- [25] Dunn K. W. & Maxfield F. R., 1992, *J. Cell Biol.*, 117(2): 301—310.
- [26] Helenius A. et al., 1983, *Trends Bio-*

- chem. Sci.*, 8: 245—50.
- [27] Beaumelle B. D. et al., 1990, *J. Cell Biol.*, 111(5): 1811—23.
- [28] Stoorvogel W. et al., 1991, *Cell*, 65: 417—27.
- [29] Hopkins C. R. et al., 1990, *Nature*, 346: 335—9.
- [30] Holtzman E., 1989, *Lysosomes*, Plenum Press, New York & London.

果蝇胚胎的低温保存

韩润虎 华泽钊 任禾盛

(上海机械学院低温生物工程研究室 200093)

果蝇是遗传学研究中有重要价值的生物材料。从1909年摩尔根开始以果蝇为材料进行实验遗传学研究以来,遗传研究用的果蝇一直是人工繁殖培养的,这样不仅耗费了大量人力物力,而且容易发生变异。生物体的低温保存是在极低温度(-196℃或更低)下使生物体生命状态暂时“中止”的技术,所以,果蝇胚胎的低温保存,对遗传学的研究具有极其重要的意义^[1]。

一、果蝇胚胎的结构特点及低温保存中的困难

果蝇胚胎(也可称为卵)的壳(卵壳,eggcase或chorion)和卵黄膜(vitelline membrane)是防止水分蒸发的极为有效的天然屏障。果蝇的卵壳分内外两层:外壳(exochorion)由松散的纤维构成;内壳(endochorion)是一种网状结构,它与壳内薄膜相联接,是卵的一个厚厚的支撑层。紧挨内壳的是卵黄膜,它是一层非晶状的颗粒层,在此膜外表面上附有一层蜡质物质。这个蜡质层被认为是阻碍水分和其它物质进出卵的主要障碍^[2]。

果蝇胚胎对零度和零下温度的寒冷极为敏感,并且随发育阶段的不同而呈现不同的抵抗力。例如,俄勒冈R系P2果蝇,6h以内的胚胎对0℃的寒冷就很敏感,在0℃环境下3h后的孵化率不足20%;但在随后的发育阶段,

其胚胎对寒冷的抵抗力就有所增强。例如,12—13h的胚胎在0℃下24h后,仍有90%的孵化率。即使如此,果蝇胚胎仍怕低于-10℃的寒冷,如在-20℃下保存30min,存活率降到11%^[3]。

此外,由于果蝇胚胎的外壳(内外壳和卵黄膜的通称)良好的密封性,使得常规的低温保存困难重重。常规的生物体的低温保存,无论平衡型和非平衡型,都要求抗冻剂渗入胚胎内部,并使一部分水分脱出,以避免冷冻中冰晶的形成及其带来的损伤。这就要求对果蝇胚胎进行处理,使之对水分和一些抗冻剂具有通透性(这个过程称为渗透化处理)。

常规的慢速冷却低温保存要求样品首先与抗冻液达到平衡,然后使溶液缓慢降温到一个中间温度(-30—40℃),通过细胞外溶液部分结冰而引起细胞再次脱水。如果此时胞内浆质浓度足够大,在样品进入液氮时,细胞内就不会形成冰晶。这就要求冷却速率很低(根据水的渗出速度而定),以减少胞内的过冷度和冰晶形成的可能性。对于果蝇胚胎而言,这种冷却速率要低于0.5℃/min^[4,5]。然而,以如此低的冷却速率冷却果蝇胚胎,等温度降到-20℃时就只有不足20%的存活率,到-35℃时已无一存活。其原因是在低于-10℃的寒冷环境中的时间太长,胚胎因无法抵抗寒冷而死亡^[6]。显然,采用传统的慢速冷却法是不可能成功地保存果蝇