

- 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

胚胎的。

相比之下,玻璃化低温保存,由于采用浓度很高的抗冻液使细胞脱水,从而在细胞内和细胞外抗冻液中都不会有冰晶形成,这就允许快速冷却。对于对寒冷极为敏感的果蝇胚胎而言,采用这种方案可减少低温损伤,有利于胚胎的低温保存。事实上,目前成功的做法都选用了玻璃化低温保存这条途径。

二、果蝇胚胎的渗透化处理方法

渗透化处理(permeabilization)的目的是使大量的胚胎(10^3 — 10^5 个)有效地去除蜡质层,同时还要保证胚胎的其他部分尽可能不受或少受影响,以便胚胎能正常地发育和孵化。判断渗透化处理效果的两个标准^[2]是:1)胚胎在高渗溶液中质壁分离(plasmolyze)的能力,通常用可渗透百分数表示;2)处理后胚胎的存活率,即孵化率。

目前,胚胎的渗透化处理方法主要有两种,一种是美国 Steponkus 研究组的“二步法”^[2],另一种是美国 Mazur 研究组的“优化法”^[7,8]。从渗透化处理的去壳、去水膜和溶蜡三大步骤看,这两种方法大同小异。

Lynch 等^[2]选用俄勒冈 R 系 P 2 果蝇的 12—13 h 胚胎,用 2.6% 的次氯酸钠处理 2 min,并用大量的蒸馏水清洗,其目的是去除壳外层(dechoriation)。然后将这些胚胎(0.15—0.2 ml)转移到尼龙滤网上,用异丙醇连续冲洗 20 s,以除去附于胚胎蜡质层表面的水分。再用 n-己烷连续冲洗 30 s 即可溶掉蜡质层,将残留于网上的液体吸干,并立刻用注射器洒射任氏液(Ringer's solution)于胚胎上。处理过的胚胎转移到细胞培养液(含 0.1% 牛血清白蛋白以防胚胎结块)中培养 15 min 即可^[2]。

在初期的实验中,Lynch 等在用次氯酸钠去壳后直接加有机溶剂(n-辛烷, n-己烷),但效果不佳。原因是去壳后的卵表面有一层水膜,而水与有机溶剂互不相溶,从而影响了有机溶剂溶解蜡质层的效果。为此,Lynch 等在渗透

化程序中引入了用异丙醇冲洗这一步,异丙醇本身不会使卵渗透化,短时间的接触也不影响存活率,但它可去除卵表面的水分,增加水分与有机溶剂之间的混溶性,使得有机溶剂能有效地溶解蜡质层。

用这种方法,Lynch 等获得 80—95% 的渗透百分数和 75—90% 的孵化率,并且在 5 周内的试验结果平均值分别为 89.6% 和 81.5%。

表 1 异丙醇-己烷二步法处理后卵的渗透百分数和存活率^[2]

处理程序	渗透百分数	存活率
未处理	0 %	98% (182/196)
去外壳	0 %	83% (110/118)
渗透化	86% (95/111)	82% (231/283)

注:1)渗透百分数指在 1 mol/L 蔗糖溶液中的皱缩百分数,存活率指孵化百分数。

2)未处理的和仅去壳的胚胎不表现皱缩情况。

Mazur 等的优化程序^[7,8]是,将胚胎用两张滤网夹成“三明治”,用 2.6% 次氯酸钠脱膜,然后用 200 ml 水彻底清洗,残留水分也是用异丙醇去除的,而异丙醇是通过在空气中干燥 2 min 挥发去除的(Mazur 等认为该步骤是关键性的)。溶蜡是通过将胚胎置于 n-庚烷和 0.3% 或 0.4% 的 1-丁醇的混合物中处理 90 s 或 110 s 而实现的(时间及浓度都被认为是很关键的)。最后迅速分开滤网,将胚胎置于 D 20 培养液中洗涤(残留烷烃被证实会挥发掉),并转入 23—24℃ 有盖培养盘与潮湿环境中孵化。

胚胎在有机溶剂中的处理时间也是极为重要的,延长处理时间可提高渗透百分数,但却会使存活率下降。例如,将处理时间从 30 s 降到 20 s,渗透百分数从 91% 降到 71%,而存活率提高了 10%。

渗透化处理的一个主要目的是让抗冻剂能进出胚胎。实验表明,上述“二步法”处理后的胚胎,在 20℃ 时,与 DMSO 达到平衡的时间小于 20 min,与乙二醇和丙二醇的平衡时间约为 35 min。相比之下,与甘油达到平衡的时间

就长得多了,大于9 h。

三、抗冻处理程序

Mazur 等的做法^[8]是,将果蝇胚胎(通常附在一种滤网上)从培养液 D 20 中取出,用滤纸吸干所带水分,随即放入 2 mol/L 乙二醇中,胚胎朝上。由于胚胎通常漂浮,所以还要向胚胎上面滴加 2 mol/L 乙二醇,每次 0.1—0.2 ml,重复几次。在 2 mol/L 乙二醇中保持 30 min,温度为 23—24℃。

此后,从乙二醇中取出胚胎,吸干液体,再放入预冷至 0℃ 的 8.5 mol/L 乙二醇中(通常含 10% PVP,有时也含 6% 或 12% 的牛血清白蛋白,这种溶液被称为胚胎玻璃化溶液),同时将 0.1—0.2 ml 的 8.5 mol/L 相同溶液滴于胚胎上,并重复几次。保持 5 min。实测样品温度为 5℃。

在每次将胚胎从一种溶液转入另一种溶液时都要吸干其所带液体,这样做的目的是防止所带液体影响另一种溶液的浓度。

四、降温与复温程序

为了提高冷却速率,在实验前几分钟,采用给 -196℃ 液氮减压降温的办法,将液氮降温至液固并存的状态。这种液固混合物称为泥氮(N₂-slush)。

将附有胚胎的滤网从胚胎玻璃化溶液中取出,吸干所带液体,并迅速放入刚制备好的 -205℃ 泥氮中;保持 20—60 s 后,将滤网迅速移入 24℃ 的 0.75 mol/L 蔗糖溶液中(用 D 20 配制),10 s 后转移到含 1—2 ml 相同液的培养皿中,保持 2 min^[8]。

在 -20—-150℃ 温度范围内, Mazur 等测得投入泥氮中的冷却速率为 110000 ± 13000℃/min (N = 14),投入液氮中的冷却速率为 55000 ± 6000℃/min (N = 7);从液氮中到 D 20 蔗糖溶液中的复温速率为 120000 ± 15000℃/min (N = 7)。

五、结果与讨论

1. 抗冻处理方法与效果

受 Rall 和 Fahy^[9] 的启示, Steponkus、Mazur 两个小组也分两步实现胚胎的抗冻处理:首先在室温下让胚胎与 2 mol/L 乙二醇达到平衡;再将获得初步抗冻的胚胎放入 8.5 mol/L 乙二醇中做短期抗冻。

表 2 给出了胚胎在初步抗冻后的存活情况。由表可见,在室温下处理 30 min 足可使由于抗冻液浓度而引起皱缩的胚胎恢复到正常的体积(可简称为体积恢复);另外降温到 0℃ 虽可降低抗冻液毒害,但却使渗透速度大为下降,表现为体积恢复所需时间成倍增加,最终结果与室温组相当,所以初步抗冻中的降温是不必要的。

表 2 渗透化后的 12 h 胚胎在乙二醇中处理后的存活情况^[8]

乙二醇浓度 (mol/L)	温度 (°C)	处理时间 (min)	90% 胚胎体积恢复所需时间 (min)	孵化率 (%)	
				绝对值	标准化值
2.0	23	30	16	70 ± 3	84 ± 3
2.5	23	30	24	68 ± 8	77 ± 5
3.0	23	30	26	59 ± 4	68 ± 8
3.5	23	30	25	48 ± 8	54 ± 7
2.0	0	60	59	74 ± 6	85 ± 2
2.5	0	60	59	80 ± 2	92 ± 8
3.0	0	110	106	52 ± 4	60 ± 1
3.5	0	110	106	52 ± 1	60 ± 4

注:标准化孵化率以未渗透对照组的孵化存活率为标准。

抗冻的第二步是用高浓度的抗冻液(玻璃化液)处理胚胎,使胚胎内浓度大为提高,以防冷却和复温时的冰晶形成。然而,要使胚胎内外渗透平衡,即使在室温下也需一个多小时,这显然是极其有害的。所以,在实验中人们根据 Rall 和 Fahy^[9] 的做法,将初步抗冻好的胚胎放入预冷的高浓度乙二醇中做短时间的抗冻,胚胎中的水分会大量渗出,从而提高了胚胎内的浓度。

表 3 给出了在 2 mol/L 乙二醇中处理过的 12 h 胚胎在高浓度乙二醇中的存活情况。由表可见,浓度越高,存活率越低;7 min 的处理效果

表3 初步抗冻过的12h胚胎在5℃高浓度乙二醇中处理后的存活情况^[8]

乙二醇浓度 (mol/L)	处理时间 (min)	绝对孵化率 (%)	标准化孵化率 (%)
5.0	5	69±9	78±10
6.5	3	48±3	64±3
	5	59±4	73±4
	7	38±8	50±9
8.5	3	49±5	61±5
	5	47±3	59±3
	7	33±8	42±9
8.5+10%PVP	5	46±3	54±3
9.0	5	34±7	41±8
9.5	5	40±4	42±5

注: 标准化孵化率以未抗冻的并且未渗透化的对照组孵化率为标准。

不如3min或5min; 尽管5mol/L和6.5mol/L乙二醇的毒害比8.5mol/L小, 但冷却至-200℃用时前者抗冻过的胚胎无一存活, 所以在8.5mol/L乙二醇中处理5min的做法应用较多。

2. -205℃低温冷却后的存活情况

表4给出了不同玻璃化低温保存方式时的存活情况。显然, 1) 用6.5mol/L乙二醇抗冻的胚胎无一孵化; 2) 单纯用8.5mol/L乙二醇抗冻, 并且冷却/复温方法不当(直接影响冷却/复温速率), 效果也很差; 3) 用8.5mol/L乙二醇和PVP或BSA的混合液抗冻, 效果明显, 并可获得高达54±2%的发育率和12±1%的孵化率。4) 用液氮有时也可取得好的效果。

表4 不同玻璃化低温保存方式下的12h胚胎存活情况^[9]

乙二醇浓度 (mol/L)	聚合物浓度	冷却	复温	孵化率 (%)	发育率 (%)	N
6.5	—	铜块	铜片	0±0	17±8	9
		异戊烷	铜片	0±0	1±1	3
		液氮	铜片	0	0	1
8.5	—	铜块	铜片	5±3	22±8	10
		异戊烷	铜片	0.7±0.3	21±4	3
		液氮	D 20/蔗糖	9±2	36±5	14
8.5	20% PVP	液氮	D 20/蔗糖	10±4	53±5	2
	10% PVP	液氮	D 20/蔗糖	10±2	44±12	2
	5% PVP	液氮	D 20/蔗糖	0	23	1
	20% PVP	液氮	D 20/蔗糖	8±2	43±5	8
	10% PVP	液氮	D 20/蔗糖	12±1	54±2	52
	5% PVP	液氮	D 20/蔗糖	12±4	48±8	2
	12% BSA	液氮	D 20/蔗糖	4±3	24±5	2
	6% BSA	液氮	D 20/蔗糖	6±3	38±4	2
	12% BSA	液氮	D 20/蔗糖	13±0.3	49±5	3
	6% BSA	液氮	D 20/蔗糖	5±2	33±8	3

注: 这里“发育”包括能孵化的和发育到能显示充有空气的气管但不能孵化的。

表5 冷却/复温速率对冷却至-200℃的12h胚胎存活率的影响^[8]

方式	冷却速率(℃/min)	复温速率(℃/min)	发育率 (%)	孵化率 (%)	N
RCRW	110000	120000	46±6	10±3	9
RCSW	110000	49	0	0	6
SCRW	74	120000	39±6	6±3	8
SCSW	74	49	0.5±0.5	0.0	6

注: 1) RCRW——快速冷却/快速复温; RCSW——快速冷却/慢速复温; SCRW——慢速冷却/快速复温; SCSW——慢速冷却/慢速复温;

2) 本表“发育率”含义与表4相同。

3. 冷却/复温速率对存活率的影响

表5给出了冷却/复温速率对胚胎存活率的影响情况。由表可见,胚胎的玻璃化低温保存要求极快的冷却/复温速率,并且复温速率的影响更为明显,因为它直接关系到是否会出现反玻璃化的不良结果。

下图显示了复温速率对发育率和孵化率的影响。由图可见,复温速率的提高对胚胎存活有十分显著的影响。

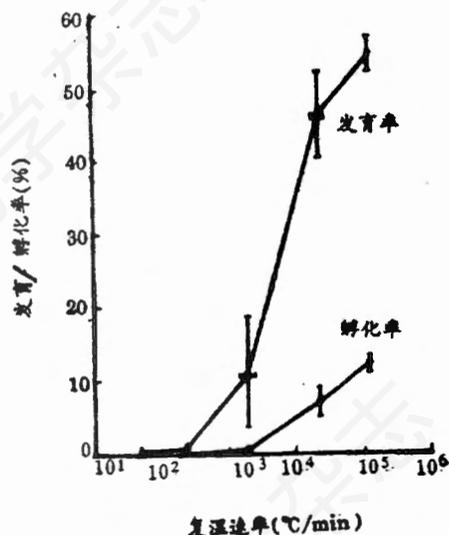


图 复温速率对发育/孵化率的影响

(2 mol/L/8.5 mol/L 乙二醇 + 10% PVP 两步抗冻, 氮中冷却)

4. PVP 和 BSA 的作用

尽管像 PVP 和 BSA 这样的大分子物质不容易渗入胚胎,尤其是在 5 °C 溶液中只持续 5 min 的情况下就更不容易,但是它们对胚胎低温保存的影响是明显的(表4)。Mazur 等认为^[8],它们保护胚胎的途径可能有二;其一是它们可能降低胚胎外玻璃态的刚性,从而降低了应力;其二是它们提高了玻璃化液的渗透压,引起胚胎大量脱水,从而提高了胚胎内的浓度,使胚胎的玻璃化程度更高。

5. 胚胎发育阶段对低温保存的影响

在渗透化处理 和冷却/复温速率 这两个重要因素之外,研究人员还发现了对果蝇胚胎低

温保存有重要意义的第三个因素,即胚胎的发育阶段。

Mazur 等证实^[7],果蝇胚胎发育阶段超过 14 h 之后,烷烃/醇类物质的渗透化处理效果开始变差,所以他们在实验中选用 12 h 胚胎。但是在研究中,他们却发现,14—15 h 阶段的胚胎在经历极快速冷却/复温之后,存活率明显高于 12 h 胚胎。他们认为原因可能是^[8],1) 由于乙二醇可能更有效地渗透到各部位,使发育后期的胚胎中反玻璃化情况得到缓解;2) 发育后期的胚胎可能对少量的胚胎内冰晶具有较强的抵抗力。14—15 h 胚胎经历 -205 °C 低温而保持较高的孵化率之机理仍在探索之中。

六、结束语

最近,Steponkus 等人已使经过低温保存的 12—15 h 阶段果蝇胚胎孵化率提高到 49—55%,并且能使 11% 的孵化幼仔发育成成年果蝇^[10];Mazur 等人也报道,他们使 60—70% 的俄勒冈 R 果蝇存活,并且获得平均值为 40% 的孵化幼仔发育成具有繁殖能力的成年果蝇的好成绩^[11]。

12—15 h 阶段的果蝇胚胎是一个含有约 50000 个细胞,并且高度组织化和器官化的复杂生物体,它是低温保存中遇到的最为复杂的有生命生物材料之一。但是,经过近几年的不懈努力,科学家们已经取得可喜的成绩,并探索出了能够成功地低温保存果蝇胚胎的方法,剩下的问题是如何进一步提高低温保存存活率和成年果蝇培养率。

摘 要

果蝇胚胎的低温保存是近几年国际上很热门的研究课题,它对遗传等学科的研究具有重要意义,但是由于其外壳很好的防水性和自身较差的耐寒性,使得果蝇胚胎的低温保存难度较高。本文报道了目前比较有影响的 Steponkus 和 Mazur 这两个研究小组的研究进展,并较为详细地介绍了他们的研究方法、结果以及对果

蝇胚胎的低温保存有重要影响的因素。

参 考 文 献

- [1] 华泽钊, 生物材料的低温保存, 1987, 科学, 39, 35—41.
- [2] Lynch, D. V. et al., 1989, *Cryobiology*, 26: 445—452.
- [3] Steponkus, P. L. et al., 1990, *Nature*, 345: 170—172.
- [4] Myers, S. P. et al., 1988, *Cryobiology*, 25: 544—545.
- [5] Lin, T. T. et al., 1989, *Cryobiology*, 26, 453—471.
- [6] Leibo, S. P. et al., 1988, *Cryobiology*, 25: 545—546.
- [7] Mazur, P. et al., 1992, *Cryobiology*, 29: 210—239.
- [8] Mazur, P. et al., 1993, *Cryobiology*, 30: 45—73.
- [9] Rall, W. F. et al., 1985, *Nature*, 313: 573—575.
- [10] Steponkus, P. et al., 1992, *Cryobiology*, 29: 763.
- [11] Mazur, P. et al., 1992, *Science*, 258: 1932—1935.

第三届细胞核的结构、功能与进化会议在昆明召开

中国细胞生物学学会染色体专业委员会与云南省细胞生物学学会联合召开的第三届细胞核的结构、功能与进化学术讨论会于1993年11月22—23日在昆明举行。会议共收到论文139篇, 内容包括进化细胞生物学、进化分子生物学、动植物的核型进化、细胞周期的基因调控、细胞生物学技术、肿瘤细胞生物学、量子生物学等各个方面。与会者50人, 分别来自北京、上海、长春、广州及昆明。

会上李靖炎首先就1990年以来国际上在组蛋白起源问题上的重大突破作了分析。接着张尚宏教授(中山大学)作了关于核DNA重复序列的起源问题的报告。两个报告引起了与会者极大的兴趣。

在动植物的核型进化研究上, 梁汉兴、顾志健(昆明植物所)、王蕊芳(昆明动物所)等同志的报告显示了我国细胞学家的深厚功底。汪旭(云南师大)利用抗着丝粒蛋白抗血清区分来自染色体断片与来自滞后染色体的微核, 在细胞遗传学技术上是很有价值的。刘爱华、刘瑞清(昆明动物所)分别介绍了以当前最先进的技术建立珍稀动物淋巴细胞株和从被污染的细胞株中清除支原体的成功经验。邓启铜(中山大学)介绍了他建立异附加系的新方法。博士研究生吴传芬(北师大)介绍了关于对着丝粒蛋白的起源问题所作的系统研究。这些都得到了与会者的重视。

本届会议一个突出的方面是昆明动物所的进化细胞生物学实验室对目前所知的最原始生物——源真核生物(archezoa)贾第虫细胞核所作的一系列研究。戴嘉陵等在国际上首次指出贾第虫的核中已经有了核骨架, 虽则还没有核纤层。这意味着核骨架是细胞核内最古老和最重要的结构成分之一, 其起源看来可追溯到真核细胞的原核祖先那里, 而核纤层的发生则显然是真核细胞进化形成以后的事。博士生吴刚等对贾第虫组蛋白所作的检查在国际上首次发现源真核生物已经有了五种组蛋白, 这意味着也需要把4种核小体组蛋白从其同祖先分子的分化追溯到真核细胞的原核祖先那里去。其与产甲烷杆菌体内的组蛋白系统相关蛋白(histone-related protein) HMt已经有所分化(1992)正相吻合。有关贾第虫的着丝粒蛋白的检查在国际上首次表明, 源真核生物已经具有保守性极强的几种着丝粒蛋白, 而且这几种蛋白在几种原细菌和真细菌体内就已经有了端倪(吴传芬等)。

这次会议另一项突出的报道是博士研究生文建凡(昆明动物所)等在改进了组蛋白的抽提方法, 彻底排除了蛋白水解酶起作用的可能性以后, 发现两种涡鞭毛虫(甲藻)——尖尾藻和一种动物共生甲藻实际上都具有多种染色质碱性蛋白, 而不是只有一、两种。这不仅纠正了过去的有关报道, 而且意味着国际上过去的许多有关报道可能都需要重新进行核查。

(中国科学院昆明动物所 李靖炎)