

- tor Research, 1992, 4: 321—335.
- [18] Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, et al., 1988, *Mol. Cell Biol.*, 8: 4162—4168.
- [19] Gentry LE, Webb NR, Lim GJ, et al., 1987, *Mol. Cell Biol.*, 7: 3418—3427.
- [20] Wakafeld LM, Smith DM, Broz S, et al., 1989, *Growth Factor*, 1: 203—218.
- [21] Lioubin N, Madisen L, Roth RA, et al., 1991, *Endocrinology*, 128: 2291—2296.
- [22] Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, et al., 1991, *EMBO J.*, 10: 1091—1101.
- [23] Olofsson A, Miyazono K, Kanzaki T, et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 19482—19488.
- [24] Gray AM, Mason AJ, 1990, *Science*, 247: 1328—1330.
- [25] Sha X, Yang L, Gentry LE, 1990, *J Cell Biol.*, 110: 1361—1367.
- [26] Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, et al., 1990, *J. Cell Biol.*, 110: 1361—1367.
- [27] Purcho AF, Cooper JA, Brunner AM, et al., 1988, *J Biol. Chem.*, 263: 14211—14215.
- [28] Wakefield LM., Smith DM, Flanders KC, et al., 1988, *J Biol. Chem.*, 263: 7646—7654.
- [29] Pircher R, Jullien J, Lawrence DA, 1986, *Biochem Biophys Res Commcen*, 136: 30—37.
- [30] Jennings JC, Mohan, S, 1990, *Endocrinology*, 126: 1014—1021.
- [31] Flaumenhaft R, Abe M, Sato Y, et al., 1993, *J Cell Biol.*, 120: 995—1002.
- [32] Kazaki T, Olofsson A, Moren A, et al., 1990, *Cell*, 61: 1051—1061.
- [33] O'Connor-McCourt M and Wakefield LM, 1987, *J Biol Chem.*, 262: 14090—14099.
- [34] James K., 1990, *Immun, Today*, 11: 163—166.
- [35] La Marre J, Wollenberg GK, Gonias SL, et al., 1991, *Lab Invest.*, 65: 3—14.
- [36] Lamarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, et al., 1991, *J Clin Invest.*, 87: 39—414.
- [37] Sun Daopin, Kand A, Piez, Yasushi Ogawa, et al., 1992, *Science*, 257: 369—373.
- [38] Michael P, Schlunegger and Markus G, Grutter, 1992, *Nature*, 358: 430—434.
- [39] Su Wan Qian, James K. Burmester, June R. Merwin, et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 6290—6294.
- [40] Sela Cheifetz and Joan Massague, 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 20767—20772.
- [41] Xiao-Fam Wang, Herbert Y. Lin, Elinor Ng-Eaton, et al., 1991, *Cell*, 67: 797—805.
- [42] A Sharon J. Archer, Ad Bax, Auita B. Robert. et al., 1993, *Biochemstony*, 32: 1152—1163.
- [43] Archer, S. J., A. Bax, A. B. Roberts et al., 1993, *Biochemistry*, 32: 1164—1171.

1

## 植物组织和细胞的玻璃化冻存研究

严庆丰\* 黄纯农

(杭州大学生物科学与技术系 杭州 310012)

利用液氮超低温(-196℃)冻存是进行植物组织和细胞长期、稳定保存的有效方法。它不仅在日常育种中可以克服各种珍稀、濒危植物资源自然繁衍的困难,而且能在现代生物技术研究中保存各种培养细胞和优良中间实验材料,从而为实验细胞库的建立创造条件。

自从1973年Nag和Street<sup>[1]</sup>首次成功地

超低温保存了胡萝卜悬浮细胞以来,已对100多种植物材料进行过超低温保存的尝试,并且发展了快速冷冻法、缓慢降温法、分步降温法、干燥冷冻法等多种降温冷冻的方法<sup>[2-4]</sup>。然而目前还没有找到一种能适合所有植物材料

\* 现为浙江大学生物医学工程研究所博士生,杭州 310027。

表1 植物组织和细胞玻璃化冻存报道一览表

作物名称	冷冻材料	结果	文献
右刁柏	培养细胞	65%存活, 再生植株	9
	体细胞胚	50%存活, 再生植株	
	胚性愈伤组织	69%存活, 再生植株	10
	多生芽簇	85%—95%存活, 再生植株	11
脐橙	珠心悬浮培养物	80%—96%存活, 再生植株	12—14
薄荷	茎尖	31%—75%存活, 苗形成	15
	悬浮细胞	部分细胞恢复生长	8
黑麦	叶肉原生质体	51%存活	16
康乃馨	茎尖	55—100%活, 成苗或少量愈伤组织	17、18
白苜蓿	顶端分生组织	80%存活, 再生植株	19
苹果	茎尖	80%苗形成	20
	梨	茎尖	
甘薯	茎尖	64%活, 苗形成或少量愈伤组织	21

的, 效果和重演性都好的方法。就目前最常用的分步降温法来说, 它操作繁琐, 且需要昂贵的程序降温仪等设备, 因此难以在生物工程领域普遍推广应用。

最近发展的超低温保存的新方法——玻璃化法可以克服这些困难<sup>[6]</sup>。生物材料经高浓度玻璃化保护剂处理后, 快速投入液氮保存, 使保护剂和细胞内水分来不及形成冰, 或冰晶没有充分的时间生长, 从而进入一种人工的完全玻璃化状态。在“玻璃态”时, 水分子没有发生重排, 不产生结构和体积的变化, 因而不会由于机械损伤或溶液效应, 造成组织和细胞伤害, 保证化冻后细胞仍有活力。

Luyet 等早在本世纪 30 年代就指出这种玻璃化状态在超低温保存中的利用价值<sup>[6]</sup>, 然而直到 1985 年 Rall 等<sup>[7]</sup>才第一次运用玻璃化法保存小鼠胚胎取得成功。1989 年 Langis 等<sup>[8]</sup>和 Uragami 等<sup>[9]</sup>相继证实了玻璃化法冻存植物材料同样是可行的, 迄今已有 10 几种植物组织和细胞作过玻璃化冻存的尝试(表 1)。由于玻

璃化法具有简单、快速等优点, 生物材料的玻璃化冻存已成为低温生物学领域发展最快的生长点之一。

### 一、玻璃化冻存的理论基础

Luyet 认为<sup>[6]</sup>, 液体的固化有两种方式, 一种是形成坚锐的冰晶, 另一种是进入无定形的玻璃化状态。从理论上讲, 只要获得足够快的降温速度, 任何液体都可以进入“玻璃态”。例如, 要能使纯水玻璃化, 降温速度需高达每秒  $10^{10}^{\circ}\text{C}$ , 而实际上这是难以实现的。然而, 通过添加高浓度的冷冻保护剂, 可以显著地降低形成玻璃化所要求的降温速率。从理想保护剂的相界图(图 1)中可以看出, 随着溶液浓度的提高, 溶液的冰点( $T_m$ )降低, 水分子流动性下降, 而玻璃化形成温度( $T_g$ )升高, 导致形成玻璃化所要求的总的过冷程度下降<sup>[22]</sup>。事实上, 水溶液可以在冰点以下保持不结冰, 即过冷, 我们把溶液所能达到的最低过冷温度称为均一晶核温度( $T_h$ ), 然而处于  $T_m$  和  $T_h$  间的

过冷状态(图中以  $x$  表示)是不稳定的,因时间的延长或温度进一步降低,随时可能形成冰晶。由于已玻璃化的溶液几乎都含有冰核,随着缓慢升温,在自然热转化的同时,晶核融化,重新结冰而形成大晶体,即发生去玻璃化过程,此温度为去玻璃化温度( $T_d$ )。

对于一种理想的保护剂,根据其引起的玻璃化状态差异,按溶液浓度划分为4个范围<sup>[5]</sup>(见图)。在浓度较低的范围I,由于均一晶核和非均一晶核不可避免,真正玻璃化状态不会出现。在浓度稍高的范围II,  $T_h$  曲线的拐点处(图中A点)是可能发生玻璃化的最低浓度,然而它是一种非常不稳定的玻璃态,随着温度的升高,不可避免地发生结冰或去玻璃化。因此,这一浓度范围的保护剂用于组织和细胞的玻璃化冻存是不合适的。

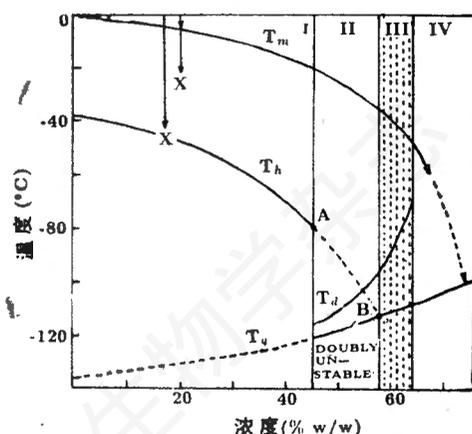


图1 理想保护剂的相界图<sup>[5]</sup>

在  $T_h$  等于、甚至低于  $T_g$  的范围III, 稍慢降温, 尽管会有非均一晶核出现, 但不会有冰晶形成, 溶液可直接进入  $T_g$ , 成为玻璃态。因此,  $T_g$  和  $T_h$  的交点(图中B点), 可能是玻璃化冻存组织和细胞所需的最低保护剂浓度。这一浓度范围不会产生冰晶, 但降温过程中形成的大量非均一晶核, 升温时会去玻璃化, 导致重结晶。由非均一晶核形成冰晶需要几分钟时间, 如果复温速度足够快, 就可以防止晶核生长, 避免去玻璃化。

最后, 在范围IV, 即使缓慢升温, 也不会出现去玻璃化过程, 不会产生任何晶核, 整个系统是稳定的。虽然从理论上讲, 范围IV的保护剂浓度对组织和细胞超低温保存是很理想的。但是因为它浓度太高, 对细胞毒害大, 所以在实际应用中, 主要还是选用范围III的保护剂浓度。

## 二、玻璃化保护剂的筛选原则

和传统冷冻保存方法不同, 玻璃化法没有繁琐的降温过程, 而把生物材料直接投入液氮中保存, 因此玻璃化保护剂的正确筛选和处理, 已成为玻璃化冻存的关键。一种理想玻璃化保护剂, 其最适浓度范围应该满足两个条件: 一是尽量缩短  $T_m$  和  $T_g$  间的温度差, 二是不存在均一晶核界线。

玻璃化保护剂的种类会显著地影响冰的结晶类型。当添加高浓度的粘性物质时, 倾向于形成对细胞没有伤害的球状结晶。某些象PVP(聚乙烯吡咯烷酮,  $MW > 30000$ )这样的高分子量的聚合物, 其高浓度的水溶液在任何温度和任何降温速率的条件下, 都不会形成晶体而保持无定形状态。溶液的玻璃化不只取决于溶质分子的大小、类型、浓度, 还与其分子构象紧密相关, 实验表明, 当温度降到大大低于熔点(冰点)时, 各种同分异构体的行为差异极大。例如, 1,2-丙二醇和1,3-丙二醇形成玻璃化所要求的浓度分别为44%和57%(W/W), 而浓度同为20%(W/W)时, 它们的均一晶核温度前者为 $-68^\circ\text{C}$ , 后者为 $-60^\circ\text{C}$ 。

Fahy等人的研究发现, 典型的玻璃化溶液分子中, 若有甲基簇的存在, 将会大大提高它的抗结冰能力<sup>[23]</sup>。例如, 乙二醇、1,2-丙二醇、2,3-丁二醇形成玻璃化所需的浓度分别是53%、44%和34%(W/W)。同样在简单酰胺类溶液中, 甲酰胺不能形成玻璃化, 乙酰胺只有在很高浓度时才玻璃化, 而N-甲基乙酰胺的抗结冰能力大大高于前二者, 这很可能是在疏水的甲基簇周围有相应的水分子排列的结

果。玻璃化法冻存组织和细胞,所使用的保护剂浓度高,毒害大,目前还没有仅用一种保护剂就取得成功的例子。然而,使用复合保护剂,各组分的保护作用得到综合协调的发展,产生累加效应,彼此减小甚至消除单一成分的毒害作用。如二甲基亚砜(DMSO)可增加细胞对静水压力的耐受,乙酰胺的存在可以降低DMSO的毒性。添加复合保护剂比单一保护剂更容易进入玻璃化状态,从而取得较好的保护效果。

### 三、玻璃化冻存的几个关键因素

#### 1. 保护剂的添加方法,处理时间和温度,以及化冻洗涤条件

从理论上说,玻璃化状态没有冰晶产生,不存在对组织和细胞的机械损伤和溶液效应。脐橙珠心细胞经PVS 2处理,未经液氮冷冻,细胞存活率为63%;经PVS 2处理和玻璃化冻存后仍有61%的细胞存活<sup>[12]</sup>。证实玻璃化本身对细胞的损伤很小,而保护剂添加和转移过程对细胞的影响很大。这在石刁柏体细胞胚和培养细胞的玻璃化冻存中也有类似情况<sup>[9]</sup>。因此正确的保护剂处理必须保证细胞充分脱水,同时防止化学毒害和渗透压力造成细胞伤害。

Towill采用逐级平衡法<sup>[13]</sup>,缓慢添加保护剂,以降低渗透压力,减轻对细胞的伤害,然而由于它程序复杂,耗时较多,不太被人们采纳。有人设计一种两步处理法,即先用60% PVS 2、25℃处理5分钟,再转移到100% PVS 2中,0℃处理3分钟,冻存后有80%细胞存活,并再生植株<sup>[12]</sup>。这很可能是因为在25℃,甘油,乙二醇等是渗透性化合物,使细胞脱水;转移到0℃,成为非渗透性化合物,诱导细胞收缩,防止细胞在保护剂扩散过程中膨胀,如此造成的细胞低温脱水与传统的缓慢降温法,或分步降温法冷冻前期所发生的脱水过程非常一致。在我们的实验中,玻璃化冻存大麦和水稻的胚性悬浮细胞,以25%浓度的玻璃化保护剂前过渡30分钟,再以100%浓度的保护

剂0℃处理5分钟,取得了较好的冻存效果(待发表)。一种更简单的方法,即采用25℃或0℃一步处理,玻璃化法冻存植物组织和细胞也有成功的实例,如康乃馨茎尖<sup>[17,18]</sup>,脐橙细胞<sup>[13]</sup>,石刁柏胚性愈伤组织<sup>[10]</sup>和多生芽簇<sup>[11]</sup>,白苜蓿顶端分生组织<sup>[19]</sup>,苹果和梨的茎尖<sup>[20]</sup>等。至于到底采用何种保护剂添加方法可能还需考虑材料的种类或生理状态。

Takahashi等研究发现<sup>[25]</sup>,同种玻璃化保护剂分别在0℃和23℃对生物材料处理相同的时间,结果两者的细胞存活率相差近20个百分点。另一方面,对于不同的组织和细胞,所要求的保护剂处理时间和温度也不同,例如:脐橙珠心悬浮培养物是25℃、3分钟<sup>[14]</sup>;梨茎尖是25℃、90分钟<sup>[20]</sup>;黑麦原生质体是2℃、1分钟<sup>[16]</sup>;石刁柏多生芽簇是0℃、120分钟<sup>[11]</sup>。其总的趋势是,保护剂处理温度高(室温),时间要求短;而低温(0℃)下,时间需延长,以保证充分脱水。悬浮培养物和原生质体要求时间短,而茎尖等外植体可承受较长的处理时间。有人认为,保护剂的处理时间要根据材料的体积大小而相应变化,有关两者对应关系尚需进一步研究。

处于玻璃化状态的细胞质常有微小冰核存在,随着温度升高,因热容改变而去玻璃化。有实验表明,已玻璃化的细胞在-70℃停留2分钟,对细胞存活率影响不大,而-70℃停留60分钟,或-50℃停留10分钟,对细胞的伤害常常是致命的。因此,如何快速通过冰晶生长区(-60℃--40℃),对于保持细胞活性是重要的<sup>[12]</sup>。目前一般采用40℃水浴化冻,或流水化冻,甚至有人提出微波化冻的方法,这对于大块的器官或组织而言,是一种有益的尝试。

不同于传统的超低温保存,在玻璃化冻存中,由于保护剂的浓度很高,化冻后的洗涤被认为是重要的,最常用的是在含1.2 mol/l蔗糖的培养基中,25℃洗涤10分钟<sup>[11,12,14,21]</sup>,也有人用含1.5 mol/L,甚至2.0 mol/L山梨

醇的培养液洗涤<sup>[16,17]</sup>。

## 2. 材料的生理状态

即便都能很好地控制上述因素,玻璃化冻存石刁柏的存活率也并不高(培养细胞65%,体细胞胚50%)<sup>[9]</sup>,研究发现,培养细胞的不同生长时期取材,细胞存活率在20%—65%之间变化。因此,欲提高冷冻存活率,选择合适细胞生理状态(主要是液泡化程度)是必要的。

冻存组织和细胞的预培养是改善其生理状态的有效方法。在预培养的培养基中补充了甘露醇、山梨醇、脯氨酸等有渗透活性的添加剂,对提高细胞的耐冻力有明显的促进作用<sup>[24]</sup>。据文献报道,蔗糖、山梨醇等物质造成的高渗可以促进内源ABA的合成<sup>[26]</sup>。在我们实验中,水稻、大麦悬浮细胞经0.5 mol/L山梨醇预培养1天,其胞内自由水含量明显减少,显微和超微结构观察表明,预培养后的细胞中液泡数目减少,大液泡被小液泡所取代(待发表)。白苜蓿顶端分生组织经1.2 mol/L山梨醇4℃预培养2天可以大大提高其玻璃化冻存后的存活率<sup>[19]</sup>。

## 3. 活性检测和恢复培养

经液氮超低温保存的植物组织和细胞,测定其冻后存活率是必要的。目前最常用的方法是TTC法(氯化三苯四氮唑还原法)<sup>[28]</sup>测定脱氢酶活性,将处理样品的光吸收与对照组相比较,计算其百分率来表示冻后的相对存活率。也可用FDA(荧光素双醋酸酯)法<sup>[27,28]</sup>,通过荧光显微术检测细胞活性。然而无论是TTC法,还是FDA法,其检测的都只是细胞内某种酶的活性,而真正细胞的活性,除了各种酶的综合作用外,还需保持细胞结构的完整性。我们会经常碰到这样的情况,冻存的组织和细胞,经TTC法或FDA法测出的相对存活率很高,但接种到恢复培养基上,根本不能恢复生长,说明细胞的内膜系统或其它结构已遭受不可逆的致命的损伤。

因此,要判断一种超低温保存方法是否真

正有效,其最直接,最有力的证据是观察其冻后恢复生长的比率,只有能够获得稳定的,相对较高恢复生长率的冻存方法才是真正有实际价值的。只有在这个前提下,为比较各种因素对冻存效果的影响,通过TTC法、FDA法等快速检测其相对存活率才有意义。

## 四、玻璃化冻存的优点

有作者把玻璃化法和两步法的冻存效果进行了比较,如Niino等冻存梨茎尖时上述两种方法的存活率分别是 $83 \pm 3\%$ 和 $80 \pm 5\%$ <sup>[29]</sup>,Yamada等在白苜蓿顶端分生组织中的结果是 $83 \pm 14\%$ 和 $86 \pm 8\%$ <sup>[19]</sup>,可见两者无明显差异。甚至有作者报道,有些材料只能用玻璃化法才能存活,如石刁柏多生芽簇<sup>[11]</sup>、甘薯茎尖<sup>[14]</sup>等。

Haskins等认为<sup>[30]</sup>,以传统超低温方法冻存的梨分生组织,其存活细胞须经历去分化、扩增、再分化和植株再生的过程,而非原始的分生组织直接长成植株,这在薄荷、马铃薯等材料中也有相似报道,只是它们是由次生胚胎或不定芽发生途径再生植株的。这种重新去分化和再分化大大增加了突变的机会,不利于遗传资源的保存。而采用玻璃化法,似乎有利于克服上述不足之处,例如玻璃化冻存的石刁柏体细胞胚<sup>[9]</sup>,白苜蓿分生组织<sup>[19]</sup>、苹果和梨的茎尖<sup>[20]</sup>,薄荷茎尖<sup>[16]</sup>等都能直接再生植株,这对于种质资源的保存有着重要意义。

## 五、结束语

综上所述,利用玻璃化法保存植物组织和细胞是有效的,它不仅简单、快速,在保存器官和组织结构完整等方面更有其独到之处。目前已保存成功的植物,既有茎尖、分生组织、体细胞胚,又有胚性愈伤组织、悬浮细胞、甚至原生质体,显示广泛的材料适应性。但是,目前已玻璃化冻存的植物以园艺作物为主,而对重要的禾谷类作物和经济作物的玻璃化冻存研究很少<sup>[16,21]</sup>,而且玻璃化冻存的材料多为

茎尖、分生组织等外植体,而对组织和细胞培养物研究很少<sup>[8,10,16]</sup>。因此,在植物组织和细胞的玻璃化冻存研究中,应该扩大试验材料的范围,对冻存过程中细胞的生理状态和超微形态进行深入的研究,特别是从分子水平来分析玻璃化冻存的机理,建立一套普遍有效,操作简便的植物组织和细胞保存方法,使玻璃化超低温保存在生物工程的研究和应用中发挥更大作用。

### 参 考 文 献

- [1] Nag. K. K. & Street. H. E., 1973, *Nature*, 245: 270.
- [2] Kartha. K. k., 1987, *Plant Tissue and Cell Culture*, Alan R. Liss, Inc., pp 447—458.
- [3] Nitzsche, W., 1980, *Z. Pflanzen Physiol.*, 100: 269—271.
- [4] Withers, L. A., 1979, *Plant Physiology*, 63: 460—467.
- [5] Fahy. G. M., et al., 1984, *Cryobiology*, 21: 407—426.
- [6] Luyet. B. J., 1937, *Biodynamica*, 1: 1—14.
- [7] Rall. W. F. & Fahy. G. M. 1985, *Nature*, 31: 573—575.
- [8] Langis. R., et al., 1989, *Cryo-Letters*, 10: 421—428.
- [9] Uragami. A., et al., 1989, *Plant Cell Reports*, 8: 418—421.
- [10] Uragami. A., et al., 1991, *Cryobiology*, 28(6): 550.
- [11] Kohmura. H., et al., 1992, *Plant Cell Reports*, 11: 433—437.
- [12] Sakai. A., et al., 1990, *Plant Cell Reports*, 9: 30—33.
- [13] Sakai. A.; et al., 1991, *J. Plant Physiology*, 137: 465—470.
- [14] Sakai, A., et al., 1991, *Plant Science*, 74: 243—248.
- [15] Towill. L. E., 1990, *Plant Cell Reports*, 9: 178—180.
- [16] Langis. R. & Steponkus. P. L., 1990, *Plant Physiology*, 92: 666—671.
- [17] Langis. R. et al., 1990, *Cryobiology*, 27: 657—658.
- [18] Peter. L., et al., 1991, *Cryobiology*, 28: 539.
- [19] Yamada. T., et al., 1991, *Plant Science*, 78: 81—87.
- [20] Niino. T., et al., 1992, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 28: 261—266.
- [21] Towill. L. E., et al., 1992, *Plant Cell Reports*, 11: 175—178.
- [22] MacFarlane. D. R., 1986, *Cryobiology*, 23: 230—241.
- [23] Fahy. G. M., et al., 1987, *Cryobiology*, 24: 196—213.
- [24] Goldner. E. M., et al., 1991, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 24: 19—24.
- [25] Takahashi. T. et al., 1986, *Cryobiology*, 23: 103—115.
- [26] Towill. L. E., et al., 1975, *Can. J. Bot.*, 53: 1093—1102.
- [27] Huang. C. N. et al., 1986, *Protoplasma*, 135: 80—87.
- [28] 黄纯农, 1988, *细胞生物学杂志*, 10(3): 133—135.
- [29] Niino. T., et al., 1991, *Plant Tissue Culture Letters*, 8(3): 185—189.
- [30] Haskins. R. H., et al., 1980, *Can. J. Bot.*, 58: 835—840.

### 会 议 通 知

经细胞培养和细胞工程专业委员会、细胞免疫专业委员会及癌细胞生物学专业委员会共同研究, 决定于1994年11月7—12日在山东泰山医学院联合召开三个专业委员会的学术讨论会。

如您参加会议和提供论文摘要(300—500字), 可来信(寄上海岳阳路320号上海细胞生物学研究所季永镛同志收)。回信截止日期为九月中旬, 会议具体事项见正式通知。

中国细胞生物学学会细胞培养和细胞工程专业委员会  
中国细胞生物学学会细胞免疫专业委员会  
中国细胞生物学学会癌细胞分化专业委员会