

保藏技术与冰冻保存*

深尾 伟晴 森川 弘道

对植物细胞在长期持续、反复进行的继代培养中会发生细胞遗传的与生理的变化,已了解得很多^[1]。为了供应稳定的细胞系,必须有良好的保存技术,而且作为基因资源的培养细胞或其原生质体的保存问题,随着利用植物细胞组织培养方法来进行物质生产和细胞育种的发展,这一课题今后的重要性将日益增加。

本节讨论植物培养细胞中目前认为最有效的液氮

(-196℃)冰冻保存技术,围绕作者所获结果予以叙述。有关这一技术的全面讨论,请参阅专著^[2,3]和综述^[4,5]。

1. 冰冻伤害的原因与解决

首先将细胞冰冻伤害的原因和解决的概况,归纳整理于下。图1为细胞冰冻过程中,细胞内外物理变化和细胞受到伤害的模式图。

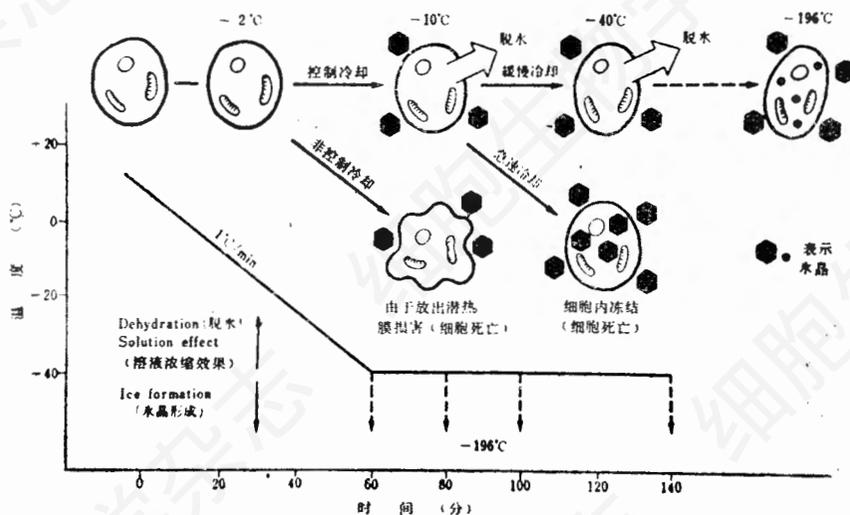


图1 细胞冰冻过程中细胞内外的物理变化的模式图

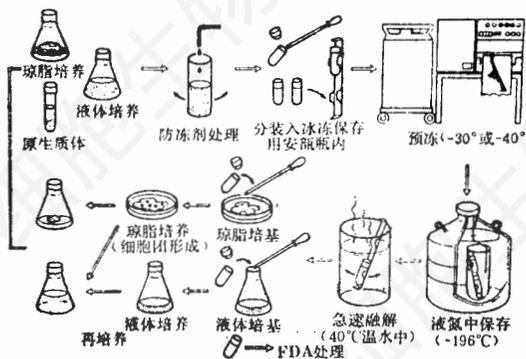


图2 冰冻保存、融解、再培养的操作

A. 放出潜热

冰冻过程中,细胞最初受到的伤害是在细胞周围

的水分处于冻结温度区域(-2--10℃)时产生的。即这种水分的过冷却导致急剧的结冰,①急剧的释放融解潜热,从而使细胞膜变性,膜被破坏^[6],以及②诱发细胞内冰晶形成(细胞内冻结),细胞死亡^[2-5](非控制冷却)。程序冷却器(program freezer)(参看第三节)由于是将液氮强制注入室内,在这一温度区域的任意点结冰(即打破过冷却),以及有可能抵消除去潜热,大致呈直线的冷却(控制冷却,见图4)。

B. 细胞外冻结与脱水

到-10℃时,在高浓度的防冻剂存在下,细胞外水分结冰已大致完成,通常细胞内尚未结冰。结果使

* 本文摘译自山田康之编著(1984年)“植物细胞培养マニエアル”第140—149页。講談社サイエンスイフイク。

细胞内外产生水的蒸汽压差, 在持续缓慢冷却($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)下, 可以维持这一蒸汽压差, 细胞内就不会结冰, 细胞内水分向细胞外排出^[2-5](由于细胞外冰冻而脱水)。此时, 如冷却速度加快($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上), 细胞内产生大型冰晶, 导致细胞死亡^[2-5]。但是, 在非常急速冷却情况下($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上), 在细胞内形成对细胞不造成伤害的微小冰晶, 细胞并不死亡^[3]。

C. 溶液的浓缩伤害与冰晶形成的伤害

最终保存温度在液氮的沸点(-196°C)时, 细胞内水分全部结晶化或固化。使细胞膜系由于冰晶形成所受的伤害最小, 彻底去除细胞内水分是件好事。但是, 因过度脱水而使 pH 发生变化, 盐类浓度大幅度上升, 则对细胞膜、酶有极大的影响。因此必须确定冰晶形成的伤害(ice damage)与溶质浓缩的伤害(solution effect)两者均最小的妥协点(双因子学说 two factoc theory)^[7-9], 即①冷却速度, ②预冻温度(液氮投入前的冷却温度, 图 1 为 -40°C)以及③预冻温度中的保存时间, 通过改变三者组合的变化来得到最适的冰冻条件。

D. 防冻剂的作用机制

植物细胞组织冰冻时, 通常用二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$)和葡萄糖等防冻剂(参照下述 3, 4 节)。这些防冻剂的效果是: ①因增大膜对水分的通透性, 促进细胞外冰冻造成的脱水效果(DMSO); ②细胞的溶质浓度增高(细胞内水分的冰点降低); 细胞内开始结冰的温度下降; ③保护酶、蛋白质等^[5]。最近作者等用 DMSO- D_6 , 以质子 NMR(核磁共振)分析法分析培养细胞冰冻过程中不冻水量的变化以及 DMSO- D_6 的效果(DMSO- D_6 也有预防冰冻的效果), 结果发现存在 DMSO- D_6 时, 细胞内不冻水量显著增加^[10]。

2. 冰冻保存装置(程序冷冻装置)

以作者等所用冰冻装置为例叙述于下(图 3)。这一装置是美国 Cryo-Med 公司制造, 由程序控制仪(图 3 a)、冷冻室(图 3 b)、加压液氮贮藏器(图 3 c)、液氮冷冻器(图 3 d)、记录仪(图 3 e)以及电源(图 3 f)构成。在冷冻室内首先将样品无菌的装入许多聚乙烯制的安瓿瓶中。冷冻室内设有一对温度传感器, 监视安瓿瓶内外温度。为此, 一个传感器插入安瓿瓶内, 另一个传感器放置在安瓿瓶外。从温度传感器的信号, 交互采点调查(样品温度间隔 10 秒, 室内温度间隔 2 秒), 记录在纸上。依据这一温度信号, 按程序自动控制液氮喷出量。按照预定的冷却速度将样品冷

却, 而且也可抵销冷却过程中因放出融解潜热而上升的温度, 从而可维持预定的冷却速度。但是由于样品(培养的植物细胞)的种类、浓度(细胞/液体的比率), 样品数量, 开始放出潜热温度和放出的热量等均有差别, 所以必须了解预先冷却样品的特性, 以便确定适宜的冷却程序。图 4 表示在这一装置中薰衣草培养细胞在冷却情况下温度变化的记录。根据上述的仪器结构, 样品在预定的冷却速度达到预冻温度下冷却后放入液氮冰冻器内并予以保存。



图 3 程序冷冻装置

a. 程序仪控制器 b. 冷冻室 c. 加压式液氮贮藏器 d. 液氮冷冻器 e. 记录图纸 f. 电源装置

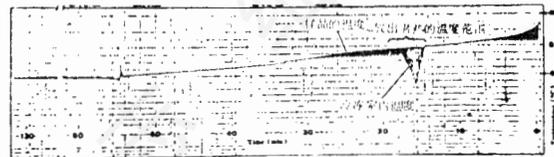


图 4 冷却曲线一例(冷却速度: $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 预备冰冻温度 -40°C 保持在 -40°C)

更简便的方法是将样品放入聚苯乙烯块中, 将聚苯乙烯块放入深冷冻器中进行预冻方法已有报道^[11]。根据这一方法大致能获得一定的缓慢冷却速度, 但不能避免上述的因放出潜热所造成的温度上升。

3. 培养细胞冰冻保存的操作

作者等以在实验中所用的生物素高产生的绿色薰衣草培养细胞以及小蘗碱高产生的日本黄连(Coptis japonica)培养细胞为例, 来说明冰冻保存操作的步骤(参考图 2)。

1) 薰衣草培养细胞[琼脂培养基(1)*¹, 在 25℃、光照 4000 Lux 下培养, 间隔两周继代], 日本黄连培养细胞[液体培养基(2)*², 在 25℃、黑暗下培养, 间隔 3 周继代]。使用继代培养后 4—7 天的细胞。

2) 配制浓度为最终浓度二倍的防冻剂溶液(10% DMSO + 20% 葡萄糖)。这一溶液用蒸馏水也可用液体培养基(1)*³ 配制(薰衣草细胞用), 或液体培养基(2)配制(日本黄连细胞用), 无菌过滤后用冰冷却。

3) 使用细胞时, 预先将培养基在冰上冷却 15 分钟以上。对于薰衣草细胞加入与其体积(通常 10 ml)等量的冰冷的液体培养基(1)制备成悬液, 在此细胞悬液中(日本黄连细胞系用液体培养细胞原液), 将第 2) 项的防冻剂在冰冻冷却及无菌条件下用蠕动泵按一定速度(通常 15—20 ml/hr)加入, 使最终浓度为 5% DMSO + 10% 葡萄糖。在添加时经常振动搅拌细胞悬液。

4) 添加防冻剂后, 细胞悬液分装入冰冻保存用的聚丙烯制的安瓿瓶内, 每一瓶加入 0.5 ml 细胞和 1 ml 的液体, 然后放于冰上静置 1 小时以上。

5) 将安瓿瓶装入铝制安瓿瓶架上, 移入程序冷冻器的冷冻室, 用 1℃/min 冷却速度, 在 -30℃ 乃至 -40℃ 下预冻, 再在预冻温度下保持 0—85 分钟后, 将安瓿瓶直接放入液氮冰冻器, 一般保存 3—5 天。

6) 保存后, 取出安瓿瓶在约 40℃ 温水中轻轻振荡, 急速融解, 直到安瓿瓶内完全无结晶片时(放入温水中约 3 分钟后), 从温水中取出。

7) 取出一部分融解的细胞, 滴入 1/10 量的 0.1% FDA*⁴[¹²] (融解在丙酮内), 约 3—5 分钟后, 用荧光显微镜观察[¹³]。

FDA 具有原生质膜透过性, 不发荧光, 在细胞内由于酯酶作用脱酯化而游离出荧光素。荧光素在紫外线激发下产生荧光。此外, 由于这一色素本身的原生质膜透过性低, 所以活细胞可根据其荧光素的荧光而加以识别(图 5), 因此, 存活率是以活细胞数[暗视野下发荧光的细胞数/总细胞数(在亮视野下的细胞数) × 100(%)] 来表示。

以 FDA 法发荧光的细胞, 必然不限于形成细胞团的细胞, 由于 FDA 法存活率与细胞团形成率之间的平行关系已被指出[¹⁴], 检索冰冻保存条件就很方便。

8) 融解后, 将安瓿瓶内的细胞 0.5 ml (其中含有 3×10^3 — 7×10^3 个细胞小团) 在含 0.6% 琼脂*⁵ (直径

60 mm 的培养皿中加入 10 ml 培养基) 上铺平板, 进行培养(薰衣草细胞在 25℃、4000 Lux 光照, 日本黄连细胞在 25℃、黑暗下培养), 调查细胞团形成率。细胞团形成率是 ① 细胞团数/细胞小团块数 × 100(%) , 或 ② 有细胞团形成的培养皿数/置平板的培养皿总数 × 100(%) 表示。

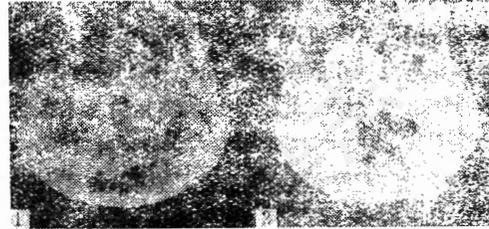


图 5 1. 冰冻保存(液氮中 3 天), 融解后再增殖的愈伤组织(薰衣草) 2. 冰冻保存(液氮中 3 天), 融解后再增殖的愈伤组织及再生的小植株(薰衣草)

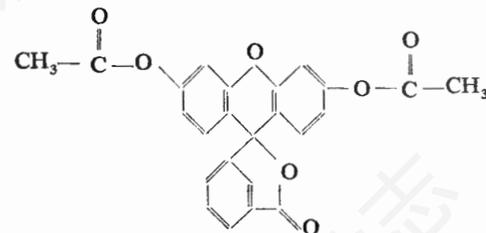
根据以上 1) — 8) 项操作, 日本黄连细胞在预冻温度为 -30℃, 维持 20—40 分钟, 然后冰冻保存的情况下, FDA 法的存活率为 30%, 约 40 天形成细胞团, 细胞团形成率按(8) — ② 计算为 13.8%。薰衣草细胞在预冻温度 -40℃, 维持时间 0 分钟后冰冻保存情况下, FDA 法存活率为 8.5%, 约两周形成团, 细胞团形成率按[(8) — ①] 计算为 4.8% (日本黄连细胞冰冻保存后, 在含活性炭 0.5% (W/V) 或小牛血清 10% (V/V) 液体培养基(2) 中培养, 则细胞活跃的再增殖)。形成的细胞团移入新鲜培养基。冰冻保存后,

*¹ 琼脂培养基(1): LS 培养基[¹⁴] 中添加 3% 蔗糖、1% 琼脂、 10^{-5} mol/L 吲哚丁酸(IBA)、 10^{-6} mol/L 苄基氨基嘌呤(BA)。

*² 液体培养基(2): LS 培养基中添加 3% 葡萄糖、 10^{-5} mol/L NAA、 10^{-6} mol/L BA。

*³ 液体培养基(1): 从琼脂培养基(1) 中除去琼脂。

*⁴ FDA 系荧光素二乙酯(fluorescein diacetate)



*⁵ 薰衣草用: 液体培养基(1) 中添加 0.6% 琼脂。日本黄连用: 液体培养基(2) 中添加 0.6% 琼脂。

分析再增殖的细胞的生物的和生理的机能。结果是薰衣草细胞保持了生物素的生产能力、叶绿体分化能力或再生小植株的能力^[14,15](图6)。日本黄连细胞保持了小蘗碱产生的能力^[16]。

4. 原生质体的冰冻保存操作

本节以日本黄连细胞产生的原生质体为例予以说明(参考图2)。

1) 按常规精细分离出日本黄连的原生质体。

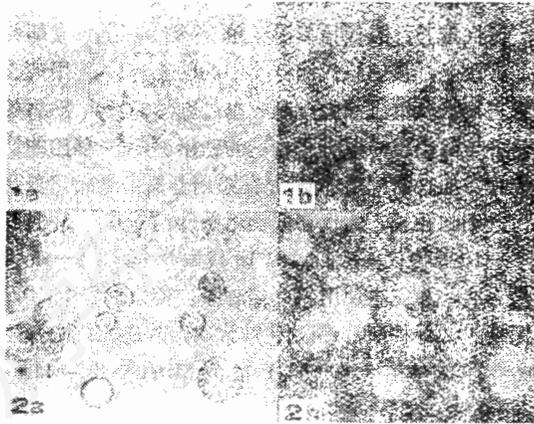


图6 用FDA方法观察细胞的存活

液氮中保存3天,融解的薰衣草细胞,日本黄连原生质体用FDA处理,在亮视野与暗视野下,用显微镜观察。 $\times 200$

1. 薰衣草细胞 a. 亮视野 b. 暗视野
2. 日本黄连原生质体 a. 亮视野 b. 暗视野

2) 用冰冷的 8×10^5 个/ml原生质体悬液(0.6mol/L 梨醇+2.5 mmol/L (CaCl_2)2 ml加入2 ml冰冷的二倍浓度防冻剂(10% DMSO+20%葡萄糖、蒸馏水或液体培养基(2)融解),按前述第3节3)项缓缓倾入(2 ml/min),使最终浓度为5% DMSO+10%葡萄糖。

3) 防冻剂加入后,原生质体悬液(4 ml)分装入1 ml的聚丙烯制安瓿瓶内(约 4×10^5 个原生质体/ml/安瓿瓶),再于冰上静置1小时以上。

4) 将安瓿瓶按前述第3节5)项同样操作,1°C/min的冷却速度,于-30°C预冻,在此温度下保持0—20分钟,直到液氮接入冷冻器,一般保存3—5天。

5) 保存后,取出安瓿瓶,按前述第3节6)项方法操作,急速融解。

6) 取出一部分融解的原生质体,按前述第3节7)项FDA法统计原生质体的存活率(图5(2))。

7) 剩余的融解原生质体,以每1 ml原生质加入

9 ml液体培养基*1后,取1 ml在0.6%琼脂培养基*2(直径30 mm的塑料培养皿加入1 ml培养基)上铺平板(约 4×10^4 个原生质体/皿)于25°C、黑暗下培养。

(周荣仁译 周郑校)

参 考 文 献

- [1] J. G. Torrey, 1976, *Physiol. Plant.*, 20, 265.
- [2] 酒井昭, 吉田静夫, 1983, 植物と低温, 东京大学出版社。
- [3] 酒井昭, 1982, 植物的耐冻性と寒冷适应, 学会出版センター。
- [4] 菅原康刚, 1983, 细胞工学, Vol. 1. No. 3.
- [5] L. A. Withers, 1980, *Adv. Biochem. Engineer.*, 18, 101.
- [6] A. W. Rowe, 1967, Proc. Intern. Conference on Low Temperature Science, Sapporo, Japan 1966 (ed. E. Asahina), vol. II, p. 21.
- [7] P. Mazur, S. P. Leibo and E. H. Y. Chu, 1972 *Exp. Cell Res.*, 71, 345.
- [8] P. Mazur, 1977, *Cryobiology*, 14, 251.
- [9] H. T. Meryman, R. J. Williams and M. ST. J. Douglas, 1977, *Cryobiology*, 14, 287.
- [10] A. Tanak, K. Sonomoto and S. Fukui, 1983, Abstr. 7th International Enzyme Engineering Conference, White Haven USA, p. 107.
- [11] A. D. Maddox, F. Gonsalves and R. Shields, 1982, *Plant Science Letters*, 28, 157.
- [12] G. G. Cuilbault and D. N. Kramer, 1964, *Anal. Chem.*, 36, 409.
- [13] J. M. Widholm, 1972, *Stain Technology*, 47 (No. 4), 189.
- [14] 山田康之, 森川弘道, 深尾伟晴, 太田江津子, 1983, 日本农芸化学会大会讲演要旨集, P. 541.
- [15] K. Watanabe, M. Mitsuda and Y. Yamada, 1983, *Plant Cell Physiol.*, 24, 119.
- [16] 深尾伟晴, 太田江津子, 森川弘道, 山田康之, 永嶋伸也, 铃木荣一郎 1983, 第8回植物组织培养ツンポシウム讲演要旨集 P 32.

*1 液体培养基(2)加入0.6 mol/L 山梨醇。

*2 液体培养基(2)加入水解酪蛋白0.025%, 柳乳10%。