

小球藻的玻璃化超低温保存法

蔡小宁* 陈舒泛 陈俊 刘少华

南京晓庄学院生命科学系, 南京 210017

Cryopreservation of *Chlorella vulgaris* by Vitrification

CAI Xiao-Ning*, CHEN Shu-Fan, CHEN Jun, LIU Shao-Hua

Department of Life Science, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing 210017

摘要 先用含 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油和 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的预处理液处理20 min, 然后用含30%蔗糖+15%乙二醇+10%二甲基亚砷+BBMG培养液的玻璃化液处理, 在 0°C 下预冻60 min后, 将小球藻投入液氮。此法存活率较高, 可达到60.14%, 小球藻种质保存效果较好。通过试验初步建立了小球藻玻璃化法超低温保存的技术程序。

关键词 小球藻; 超低温保存; 玻璃化法

10年来, 随着超低温保存技术的建立和发展, 有多种植物的细胞、组织和器官实现了超低温冰冻保存^[1]。玻璃化保存法是近年来发展起来的一种保存方法, 与其他超低温保存方法相比, 具有设备简单、程序简化和冻存效果好等优点, 在植物上已经取得很大进展^[2,3]。目前, 藻类种质的超低温保存技术已受到广泛的重视。迄今为止, 绝大多数藻类是采用两步冰冻法保存^[4-7], 采用玻璃化法超低温保存藻类的报道很少^[8]。本文探讨玻璃化法超低温保存小球藻种质的技术。

材料与方 法

1 实验用小球藻的准备

小球藻(*Chlorella vulgaris*)接种前, 所用的液体培养基和容器于 $1.2 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 压力下蒸汽灭菌20 min。从保存藻种的平板上挑取小球藻, 培养于装有5 mL BBMG液体培养基(参照 Bold's basal 培养基配方^[9], 其中含 $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸钠、 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨)的试管中。弱光下(根据我们的试验, 在异养培养条件下光照强度对小球藻生长无影响)培养5~7 d, 再将试管种接入50 mL BBMG液体培养基, 于弱光下培养至对数期, 此为最初的液体种子。培养小球藻时, 接入2%的液体种子于50 mL培养液中, 放在摇床上于 25°C 弱光下培养, 摇床转速为 $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4~5 d即可得到实验用的小球藻。

2 预处理液的加入

在室温下分别取2 mL藻液置于若干离心管中

离心(转速 $500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 下同), 弃去上清液, 小球藻沉降于离心管底部, 然后分别加入预先配制的不同浓度的预处理液(表1), 混匀, 于室温下处理20 min后再离心。

3 玻璃化液处理

玻璃化液配方为30%蔗糖+15%乙二醇+不同浓度二甲基亚砷+BBMG培养液, 加入前先放在 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 下预冷, 在无菌条件下取代预处理液, 悬浮后移入冻存管, 于 0°C 下预冻不同时间后放入液氮中。

4 化冻和玻璃化保护剂的去除

将在液氮中保存半年后的冻存管取出, 立刻放入 40°C 恒温水浴中迅速摇动, 直到最后一个冰晶消失后移入室温中。化冻后的小球藻在无菌条件下先在 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖溶液中室温平衡5 min, 然后再在 $1.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液中平衡5 min, 最后转入BBMG液体培养基中培养。培养条件为 27°C 、弱光、摇床速度 $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 培养4 d。

5 存活率的测定

参照Canavate及Lubian的方法^[10], 将经过处理的小球藻样品和对照小球藻样品再培养4 d后, 用722型光栅分光光度计于波长540 nm处测藻液的吸光度。根据预先确定的藻细胞密度($y\times 10^8$

收稿 2003-10-23 修定 2004-06-04

资助 南京晓庄学院重点项目基金(0309001)。

* E-mail: biocai@jlonline.com, Tel: 025-86569270

个·L⁻¹)和吸光度(x)的直线回归方程: $y=3.456x-0.389$ ($r=0.9961$), 可以推算出上述冰冻样品和对照样品在再培养4 d后的藻细胞密度, 两者的百分比值即为超低温保存的存活率^[6]。

实验重复3次, 每处理设置3个平行样品, 取平均值。

结果与讨论

1 预处理液中甘油和蔗糖的浓度及组合对小球藻存活率的影响

在超低温保存中通常对植物材料进行预处理, 预处理过程中通过蔗糖提高胞质浓度, 增加抗冻力和抗脱水力, 促进降温过程中玻璃化的形

成^[11]。甘油也是一种常用的冰冻保护剂。我们比较了预处理液中甘油和蔗糖的浓度及组合对玻璃化法超低温保存小球藻存活率的影响, 结果(表1)表明, 在所试浓度范围内, 如果预处理液中不添加甘油和蔗糖, 而仅仅作玻璃化液处理的存活率最低, 为29.11%; 预处理液中单加甘油或蔗糖的存活率大幅度提高; 预处理液中甘油和蔗糖都添加时, 小球藻的存活率则随着甘油浓度的增加而逐渐下降。这表明, 玻璃化液处理前, 先用含有蔗糖和甘油的预处理液预处理, 可大大提高玻璃化法超低温保存的小球藻存活率。以0.5 mol·L⁻¹甘油和0.4 mol·L⁻¹蔗糖的组合中, 存活率最高, 达到60.14%。

表1 预处理液中甘油和蔗糖的浓度及组合对存活率的影响

甘油/mol·L ⁻¹	蔗糖/mol·L ⁻¹	藻细胞浓度/×10 ⁸ 个·mL ⁻¹	存活率/%
对照 (未经任何处理)		4.690	100.00
0.5	0.4	2.820	60.14
1.0	0.4	2.731	58.22
1.5	0.4	2.677	57.07
2.0	0.4	2.649	56.49
2.5	0.4	2.397	51.10
3.0	0.4	2.090	44.56
0.5	0	2.628	56.04
0	0.4	2.171	46.30
0	0	1.365	29.11

玻璃化液配方为: 30% 蔗糖 +15% 乙二醇 +10% 二甲基亚砷 +BBMG 培养液, 预冻时间为60 min。

2 玻璃化液中不同浓度二甲基亚砷对小球藻存活率的影响

将待保存的小球藻经含0.5 mol·L⁻¹甘油和0.4 mol·L⁻¹蔗糖的预处理液处理后, 再以含不同浓度二甲基亚砷的玻璃化保护剂处理60 min, 结果表明, 10% 二甲基亚砷处理的小球藻存活率最高(表2)。

3 预冻时间对小球藻存活率的影响

在藻类冰冻保存中, 常用的预冻时间为0~60 min, 已有报道表明预冻时间对藻的存活率影响极大^[4,5]。我们用30% 蔗糖 +15% 乙二醇 +10% 二甲基亚砷 +BBMG 培养液的玻璃化溶液处理小球藻后, 于0℃下分别预冻不同时间, 结果表明, 无论预处理与否, 小球藻的存活率都以预冻时间为60 min时最高(表3)。

表2 玻璃化液中不同浓度二甲基亚砷对小球藻存活率的影响

二甲基亚砷浓度/%	藻细胞浓度/×10 ⁸ 个·mL ⁻¹	存活率/%
对照 (未经任何处理)	4.690	100.00
7.5	1.829	38.99
10.0	2.268	48.35
15.0	2.820	60.14

综上所述, 小球藻种质的玻璃化超低温保存较理想的技术程序为: 先用含0.5 mol·L⁻¹的甘油和0.4 mol·L⁻¹的蔗糖溶液预处理20 min左右, 然后加入含有30% 蔗糖 +15% 乙二醇 +10% 二甲基亚砷 +BBMG 培养液的玻璃化保护剂, 放入0℃冰中预冻60 min左右, 再投入液氮中保存; 保存半年(或以上)后, 将冻存管取出, 立刻放入40℃恒

表3 预冻时间对小球藻存活率的影响

处理时间/min	存活率/%	
	未预处理	预处理
0	0	3.57
15	0.34	10.07
30	5.46	42.81
60	28.65	66.32

温水浴中迅速摇动,直到最后一个冰晶消失后移入室温中;化冻后的小球藻在无菌的条件下转入 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖溶液中室温平衡5 min,然后再转入 $1.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液中平衡5 min。此时,小球藻可转入BBMG培养液中再培养,培养条件 27°C ,摇床速度 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,培养4 d,即可获得活化的小球藻。

参考文献

- 肖洁凝,黄学林. 茎尖和芽的超低温保存. 生物工程进展, 1999, 19(5):46~51
- 王子成,邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植物再生. 园艺学报, 2001, 28(4):301~306
- 王君晖,黄纯农. 玻璃化法——园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径——文献综述. 园艺学报, 1994, 21(3):277~282
- 王起华,张恩栋,李大鹏等. 盐生杜氏藻和青岛大扁藻的超低温保存. 植物学报, 2000, 42(4):399~402
- 王起华,张恩栋,王冰等. 两种海洋饵料硅藻的超低温保存. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 1999, 22(4):310~314
- 王起华,石若夫,程爱华. 三种饵料金藻超低温保存的研究. 中国水产科学, 1999, 6(2):89~92
- 王起华,张恩栋,周春影. 藻类种质超低温保存研究概况. 植物学通报, 2002, 19(1):21~29
- Day JG. Cryo-conservation of microalgae and cyanobacteria. Cryo-Letters, 1998, 1(supp):7~14
- Bischoff H, Bold HC. Phycological studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. Austin: Univ Texas Publ, 1963. No. 6318
- Canavate JP, Lubian LM. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. Aquaculture, 1995, 136: 277~290
- 王君晖,边红武,黄纯农. 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展. 植物学通报, 1999, 16(5):582~586