

CYTOBIOLOGY

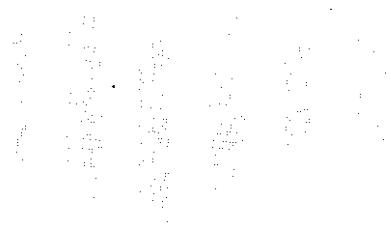
低温生物学

李广庆 郑晓良 殷元/主编
湖南科学技术出版社

CRYOBIOLOGY

低温生物学

李广武 郑从义 唐兵/主编
湖南科学技术出版社



内 容 简 介

低温生物学是生物学的一门新兴的分支学科,它是研究低温对生物体所产生的影响及其应用的科学。

本书共分五篇 13 章,从细胞学、遗传学、物理化学和低温工程技术等不同角度全面、系统地阐述了低温生物学基础理论,详细地介绍了各类不同生物材料低温保存的原理与方法,并简要介绍了生物技术发明专利申请与专利培养物的保藏。

本书既可作为科研院所、大专院校从事低温生物学研究及教学工作者的的重要参考书,也可作为从事各种生物材料低温保存实际工作者的重要工具书。

低 温 生 物 学

主 编:李广武 郑从义 唐 兵

责任编辑:刘奇琰

出版发行:湖南科学技术出版社

社 址:长沙市展览馆路 66 号

印 刷:湖南省新华印刷三厂

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址:长沙市韶山路 158 号

邮 编:410004

经 销:湖南省新华书店

出版日期:1998 年 8 月第 1 版第 1 次

开 本:850mm × 1168mm 1/32

印 张:11.25

插 页:4

字 数:286000

印 数:1—3100

书 号:ISBN 7—5357—2048—X/Q · 36

定 价:25.00 元

(版权所有·翻印必究)

前 言

低温生物学(cryobiology)是生物科学的一门新兴分支学科,它是研究低温对生物体所产生的影响及其应用的科学。其研究内容包括生物对寒冷环境耐性的机理;生物体冻伤及其防治;生物材料的低温保存和移植等诸多方面。目前,低温生物学在生物耐寒性的理论研究和生物材料冷冻保存的应用研究方面发展较快。低温生物学的研究和应用,不仅促进了生物学、医学等基础学科的发展,而且为农业、畜牧业、医药工业及食品工业等带来了巨大的效益。不仅如此,低温生物学研究广泛、深入地开展,对保护人类赖以生存的环境,挽救濒危的珍稀动、植物及微生物物种,保护生物多样性也将产生深远的影响。因此低温生物学已成为备受人们关注的一门新兴交叉学科。

70年代以来,我国临床低温医学发展较快,并相继出版了《低温医学》、《实用低温医学》、《低温生物医学技术》等专著。这些专著的问世,对推广、普及、提高低温医学和低温生物学起到了重要的促进作用。但我国目前全面、系统介绍低温生物学的书籍甚少。基于这一现状,本书力求全面、系统地从细胞学、遗传学、物理化学和低温工程技术等不同角度论述低温生物学的有关基础理论,并介绍各类不同生物材料低温保存的基本原理和技术方法。本书作者都长期从事低温生物学和生物材料低温保存方面的研究,所撰写的内容参阅了国内外最新资料,并结合了本人长期工作经验和研究成果。

本书由李广武、郑从义、唐兵主编。参加编写的有李广武(第1章)、郑从义(第2章、第8章、第9章、第10章、第12章、第13

章、附录)、唐兵(第5章、第6章、第7章)、万小春(第1章、第2章)、王林波(第10章)、王延枝(第2章)、华泽钊(第3章、第4章)、梁锋(第11章)。

本书既可作为科研院所、大专院校从事低温生物学研究及教学工作者的有益参考书,也可作为从事各种生物材料低温保存实际工作者的工具书。

湖南科学技术出版社对本书的出版给予了大力支持;我国在日本京都大学农学院留学的汪光熙博士和在美国芝加哥大学微生物学系留学的卫燕博士为本书提供了大量的文献资料;中国典型培养物保藏中心的全体同志给予多方面的支持;辛晓红同志为全书文稿输入计算机,陈宝联先生为本书绘制插图付出了辛勤的劳动,在此一并致以衷心的感谢。

全书从1996年元月组稿,历时1年半完成。虽然尽了最大努力,但由于低温生物学发展迅速,内容广阔,涉及多种学科,资料文献浩如烟海,限于编者水平有限,错误之处敬请广大读者和同仁批评指正。

李广武 郑从义

1997年7月于武汉大学

目 录

第 1 篇 低温生物学概论

第 1 章 绪 论

- § 1.1 低温生物学的定义及其研究范畴 (1)
- § 1.2 低温生物学研究简史 (3)
- § 1.3 低温生物学研究与生物多样性保护 (7)

第 2 章 低温生物学研究的细胞学及遗传学基础..... (11)

- § 2.1 植物冻害与抗寒性的细胞学基础 (11)
- § 2.2 微生物冷冻干燥保存的细胞学基础 (17)
- § 2.3 生物材料超低温冻存的细胞学基础 (30)
- § 2.4 低温免疫研究的细胞学基础 (33)
- § 2.5 生物材料低温保存与遗传稳定性的关系 (36)

第 3 章 低温生物学研究的物理化学基础..... (41)

- § 3.1 低温保存与低温损伤 (41)
- § 3.2 溶液的冻结特性与细胞的损伤 (47)
- § 3.3 低温保护剂和保存液 (57)
- § 3.4 三元溶液的相图及其在低温生物学中的应用 (59)
- § 3.5 玻璃化保存与溶液的玻璃化 (67)

第 4 章 低温生物学研究的低温工程技术基础..... (72)

§ 4.1	低温技术基础·····	(72)
§ 4.2	程序降温仪及其应用·····	(84)
§ 4.3	低温显微技术·····	(92)
§ 4.4	形成玻璃化的超快速冷却方法·····	(101)
§ 4.5	低温真空干燥技术·····	(105)

第2篇 微生物低温生物学

第5章	低温微生物·····	(112)
§ 5.1	低温微生物的基本概念·····	(112)
§ 5.2	低温微生物的分布特点及栖息环境·····	(114)
§ 5.3	低温微生物的种类·····	(123)
第6章	微生物菌种低温保存法概述·····	(127)
§ 6.1	微生物菌种保藏的基本原理和方法·····	(127)
§ 6.2	冷冻保存法·····	(130)
§ 6.3	冷冻干燥保存法·····	(133)
§ 6.4	菌种保存的质量控制及效果评估·····	(136)
第7章	各类微生物菌种的低温保存·····	(142)
§ 7.1	细菌的低温保存·····	(142)
§ 7.2	丝状真菌的低温保存·····	(152)
§ 7.3	酵母菌的低温保存·····	(154)
§ 7.4	藻类及原生动物的低温保存·····	(155)
§ 7.5	医学微生物菌种的低温保存·····	(158)

第3篇 动物材料的低温生物学

第8章	细胞培养物的低温冻存·····	(171)
§ 8.1	细胞培养物冻存及其质量控制概述·····	(171)
§ 8.2	细胞培养物冷冻保存的原理和方法·····	(176)
§ 8.3	细胞培养物冻存的实用方法·····	(180)
§ 8.4	细胞培养物冷冻保存质量控制范围与检测项目·····	(188)

第 9 章 细胞培养物冻存前后的特殊检测	(210)
§ 9.1 免疫荧光抗体染色方法	(210)
§ 9.2 同工酶电泳图谱分析法	(212)
§ 9.3 同工酶分析在种内细胞交叉污染检测中的应用	(219)
§ 9.4 染色体分析方法	(222)
§ 9.5 DNA 指纹图谱分析方法	(225)
§ 9.6 PCR 技术	(234)

第 10 章 动物胚胎的冻存	(238)
§ 10.1 动物精子的超低温冻存	(238)
§ 10.2 鼠胚的超低温冻存	(241)
§ 10.3 羊胚的超低温冻存	(245)
§ 10.4 水生动物胚的超低温冻存	(249)

第 4 篇 植物材料的低温生物学

第 11 章 种质资源低温保存的原理和主要形式	(251)
§ 11.1 种质资源低温保存	(251)
§ 11.2 种质资源低温保存的主要方式	(258)
§ 11.3 作物种质资源低温保存的程序和技术	(262)
§ 11.4 作物种质资源低温保存的发展趋势	(282)

第 12 章 植物离体材料冻存概述	(289)
§ 12.1 影响植物离体材料冻存效果的主要因素	(291)
§ 12.2 植物离体材料冻存实用方法	(295)
§ 12.3 植物材料冻存的质量控制方法	(300)

第 13 章 植物离体材料冻存实例	(306)
§ 13.1 植物细胞培养物的冻存	(306)
§ 13.2 植物分生组织、芽端的冻存	(311)
§ 13.3 植物花粉、胚的冻存	(315)
§ 13.4 植物离体材料的玻璃化冻存	(319)

附 录 专利培养物保藏	(325)
I . 生物技术发明与专利	(326)
II . 生物技术发明专利申请与培养物的保存	(329)
主要参考文献	(342)

第 1 篇 低温生物学概论

第 1 章 绪 论

§ 1.1 低温生物学的定义及其研究范畴

“cryobiology”由“cryo”和“biology”组成, cryo 是一个前缀词, 译为“低温”。它源于希腊语, 也有冷冻(frost)、寒冷(cold)之意。biology 译为“生物学”, 故全词直译为“低温生物学”。起初, “cryobiology”一词主要为美国人使用, 英国人一直以“low temperature biology”表达低温生物学的含义。随着时间的推移, 各国开始习惯于使用“cryobiology”一词, 在较新的文献中, 很少用“low temperature biology”。当然, 无论以哪种形式表达, 二者的意思是一样的, 均强调低温与生物学的关系。

尽管“低温”是一个经常被使用的词, 但就其定义而言, 可以说是非常含糊的。例如, 物理学上所指的低温, 是指接近于绝对零度的极低温度(-273°C); 而农业上所说的低温(冷害), 常常是指那些比常温稍低一点的温度而言; 微生物学上的低温冷休克(cold shock)温度通常为 $+4^{\circ}\text{C}$ 以下; 医学上常提到的体温过低(hypothermia)泛指低于人体温度(37°C)的体温; 食品保鲜学上的低温冷冻(chilling)意为食品的冻结温度(-20°C)以下。可见在日常

生活中,很难给低温一个确切的定义。那么,低温生物学要讨论的低温到底是一个怎样的温度范围呢?从“低”这方面来说,实验中可以实现的低温可达到绝对零度,即 -273°C ;而从“高”这方面讲,若以温度划线,似乎是一个难题。然而,从低温生物学研究性质、研究对象划线,上限温度可以放在 0°C 附近,或者是更高一些($5\sim 10^{\circ}\text{C}$)。这样的温度范围足以概括低温生物学的研究范畴。

在低温生物学中,还有一个对低温形式的语言表达问题,如低温、极低温、超低温所表达的温度范围差异很大,如果说极低温度是指接近绝对零度(-273°C),那么,超低温的概念则使人感到茫然。因此,习惯上,将液氮温度(-196°C)称为超低温;干冰温度(-70°C)称为极低温;低温则从 4°C 往下线推。急速冻结、缓慢冻结一类的词也常在低温生物学中被使用,严格地讲这也是不妥的,因为二者间并无一个冻结的温度和速度概念。Smith提出的语言表达方式(表1-1)比较好地解决了温度和速度间的关系,尽管有学者持不同意见,但仍有其参考价值。

表 1-1 Smith 提出冷却温度与速度的语言表达

温度范围	冻结时间	语言表达
$0\sim -190^{\circ}\text{C}$	2 秒以内	超速冻结(ultrarapid)
$0\sim -79^{\circ}\text{C}$	2 秒~5 分钟	快速冻结(rapid)
$0\sim -79^{\circ}\text{C}$	16 分钟以上	慢速冻结(slow)
-20°C 及其它	1 小时以上	极慢速冻结(very slow)

以上讨论的是低温的定义和语言表达等问题。鉴于低温生物学是以生物活体为研究对象,所以有必要对低温与生物活体机能间的关系进行讨论。在低温生物学研究中,如果以生物体的死活为基准,那么生物体间对低温的抗性(或耐受性)差异显著。一般认为,最高级的动物——人对低温的耐受性是最弱的,而最低级的生物体——微生物则是最强的。例如,在比 37°C 高或者低 $10\sim 20^{\circ}\text{C}$ 的情况下,人的生命就有危险。而多数细菌、病毒在近于绝对零度,即 -273°C 的最低限温度条件下,仍能生存。这可以说是两

个极端,几乎所有生物的生存温度均位于这两个极端之间。当然,有时同种生物体间对低温的抵抗力也存在差异。诸如单细胞微生物的低温抗性差异还与培养条件、生理状况、遗传特性有直接的关系。所以低温生物学的目的之一就是要比较、确定其温度差异,从而有效地保存它们。

综上所述,低温生物学可以定义为是研究低温条件下生命现象的科学。其研究内容涉及动物学、植物学、微生物学、医学、农学、林学、食品科学中的许多方面。它以物理学、化学、低温工程学为依托,以生物化学、生物物理学、细胞生物学、遗传学为基础,研究生物个体的低温生存环境、离体生物材料的低温保存、植物的冻害及耐寒性,探索低温损伤机理,发掘低温抗冻物质,实施冷冻医疗等,从而阐明低温条件下生命现象的特征及其本质。

§ 1.2 低温生物学研究简史

低温生物学产生的确切年代虽然不太清楚,但可引用 Dr. Luyet 在 Society for Cryobiology 的创立大会上的演讲内容,对低温生物学研究历史作简要介绍。

人类自原始时代就开始不断地与寒冷作斗争。例如,用火取暖、剥取动物皮裹身等等。但是,冰期过后,随着地球上气候的逐渐变暖,防范高温的问题又接踵而来,于是,人类又开始考虑利用寒冷。例如,在冬季,将冰准备好供夏季保存食品用。这些与生活密切相关的问题促进人类考虑利用低温,使人类的智慧得以发展。在悠久的人类历史中,能作为低温生物学的基础,针对寒冷对生物体影响的研究始于 18 世纪。在当时,多以植物为研究对象,具体的研究内容包括冻结的障碍作用、产生障碍的原因及冰侵入植物的机制的观察;对冻结抵抗力强的植物和抵抗力弱的植物的差异研究;耐冻性因子的探索;冻结障碍的防范以及使动植物耐冻的方法等等。

另一方面,关于寒冷对动物的影响的研究,首先被作为问题提

出的是昆虫和水生动物是怎样忍受冬季的寒冷以及水的冻结。另外,也弄清了线虫类的小动物即使在干燥状态下也能够长期生存,以及植物的种子等不仅能够忍受干燥,而且以脱水来增加对低温的抵抗性等事实。进入 19 世纪后,随着多种微生物的发现,知道了微生物也对冻结和干燥有很强的抵抗性,特别是芽孢的抵抗性非常强。

就温度而言,作为影响生物生存的外部因子,不仅有自然的气候条件,而且还能够人为地创造寒冷环境。制冰法、空冷冷冻机、空气液化机分别于 1834 年、1849 年、1895 年被研制成功。这些获取低温的方法和装置的开发及利用,使低温生物学的实验研究变得相对容易,促使该领域的研究得以快速发展。

进入本世纪后,随着应用范围的不断扩大,低温生物学得到了快速的发展,尤其是 30 年代以来的数十年的进步格外迅速。Luyet(美国)、Levitt(美国)以及 Greaves(英国)等的研究大体上就是在这个时代。第二次世界大战后,应用方面的发展引人注目,其被广泛地应用到制药及食品加工等领域就是其特征之一。另一方面,其在医疗领域的应用,例如低体温法、患部冻结法、移植用材料的保存法等外科领域广泛使用的方法都是近几十年的事,是低温生物学的新领域。

如果进一步将整个历史过程归纳一下,可以将其分成以下两大部分。

第一部分是关于生物在自然气候条件下对寒冷的感受性或抵抗性的观察。这也是与人的冻死及冻伤有关联的问题。简言之,即低温会给生命体带来什么影响?或者说,生命体是怎样忍受低温的?这些是自古以来就存在,但至今仍留有许多未知点的低温生物学的重大课题。

第二部分是这些自然现象为基础,在实际应用中发展起来的问题。在多数情况下,主要是针对生物体的保存,利用冷冻机或致冷剂来冷却以达到极低的温度。保存温度越低,生物体代谢机能越低下,就越能够抑制活性物质的作用,所以,液态氮常常被用

来保存实验材料(如生命体的细胞或组织)。但生物材料在冷冻和复原过程中常常会承受种种损伤。因此,为了尽可能地减少其损伤,保护物质的研究曾一度盛行,自 1949 年 Polge 等添加甘油低温保存动物精子获得成功以来,人们为低温保护物质的筛选、应用花费了许多精力。迄今 DMSO、PVP、乙二醇等低温保护剂广泛被应用。

应该说,低温生物学发展最快是近二十几年的事,进入 80 年代以来,由于热物理学、物理学、化学、工程学和生物学、医学等学科的渗透、交叉,低温工程理论及实用设计原理的不断更新及应用,低温生物学的研究快速发展,取得许多突破性的进展。诸如高精度程控降温仪、低温显微镜、微热电偶测温计的问世,使得研究生物材料冻存的降温速率、测定冰晶形成方式、诱导冰核形成等更为方便,人们可以在 $+30 \sim -180^{\circ}\text{C}$ 范围内任意调整变温,根据冻存材料的种类和状况,调节降温速率。现已证明,不同的单细胞个体,同一种细胞或组织,在相同的低温保护剂中,以不同的速率降温冻存、复温后,活性相差甚远。但人们通过借助高精度低温研究仪器,控制降温条件,可以取得明显的冻存效果。目前,各种生物材料单细胞长期冻存成为可能,并能对包括动物器官(胰腺、皮肤、角膜、眼球等)、植物组织(花粉、胚、叶片等)进行冻存。另外,玻璃化冻存技术已从研究向应用发展,各种玻璃化保护剂配比设计、保护剂种类的选择、浓度的调整、加入方法和去除方法都在不断完善,并趋于标准化。基础研究为实际应用奠定了基础,使得多种生物材料已能成功地玻璃化冻存。应该说,这一技术具有广阔的应用前景。

最近几年,抗冻蛋白的分离、纯化,抗冻基因的发现,使低温生物学的研究从个体、细胞水平进入分子水平。现已证明,抗冻蛋白不但能作为一种抗冻剂用于细胞或组织的低温冻存,还可采用基因重组、转移的分子生物学技术,将抗冻基因进行转移,从而选育抗冻动物(鱼类)、抗冻植物。虽然这些研究还处于起步或初步研究阶段,但发展很快,受到低温生物学家、遗传学家的高度重视。

例如,大西洋的大马哈鱼不具备抗冻能力,因此,不能在寒冷的北大西洋养殖。将抗冻蛋白基因导入大马哈鱼体内,并使其表达抗冻蛋白,从而增强抗寒能力,并能在北大西洋养殖。

低温免疫的研究取得突破性进展,冷冻免疫已不再是仅限于冷冻治疗肿瘤的观察。90年代以来,已发现器官冷冻后,对降低免疫排斥反应有明显的作用;人外周血单核细胞冷冻后,可增强分泌多种细胞因子的功能。这些发现具有重要价值,开辟了低温生物学研究的新领域。

另外,低温对生物体的损伤机理、生物体抗冻性方面的研究已进入亚细胞水平、分子水平。通过对多种生物材料的研究,很多假说得到实验的证实,如膜损伤学说、DNA修复机制、酶偶联形式等。这些研究不仅阐明了很多理论问题,也为低温医疗、冷冻保藏的普及提供了理论依据。

如前所述,低温生物学自形成体系以来,历史还很短,尽管如此,其应用范围日益扩大,至今这个边缘科学所研究的内容已涉及到很多方面,而且使人感觉到有许多基础性问题尚未阐明,而应用方面却先行了。例如,冻结及干燥所引起的细胞障碍的机制尽管还不清楚,但为防除障碍用的保护物质的利用却已积累了许多的经验。另外,同样是基础研究,但生物的个体水平和细胞水平之间以及细胞水平和构成细胞的蛋白质、脂类等的分子水平之间的研究,还存在着很大的鸿沟。因此,还需各个领域研究者通力合作,共同攻关。可以相信,蛋白变性的研究直接用来说明细胞损伤机制的日子会早日到来。

另一方面,应用领域在今后还有可能更大地扩展范围。例如,低温生物学现在已经在宇宙生物学方面发挥着重要作用;在医学领域,从移植用脏器的保存到生物体自身的冻结保存,都是学者们不断研究的重要课题。今天的梦想有很多会变成明天的现实,我们期待着低温生物学研究的飞跃发展。

§ 1.3 低温生物学研究与生物多样性保护

一、生物多样性保护的意义

生物资源是地球上生命存在的基础,其中也包括人类自身生存的基础。因此,保护生物资源就是保护人类赖以生存的基础。但是随着科学的进步、工农业的发展、人口的膨胀,人类正在不知不觉地破坏赖以生存的环境,生物多样性正在以前所未有的速度遭受破坏。最新的估计认为,在过去的 2 亿年中,平均每 100 万年有 90 万种脊椎动物灭绝。根据 Myers(1988)的粗略估计,大约每 27 年就有一种高等植物灭绝,这个速度还在不断加快。根据全球 2000 年预测报告,如果人类的消费水平和破坏状况按目前情况不变,预计到 2000 年,地球上全部物种的 15%~20% 将会消失。最近一个关于世界鸟类的综合评价总结说,在 9000 种世界鸟类中,有 1000 种(占 11%)不同程度地受到灭绝的威胁,而 1978 年才只有 290 种鸟类受到威胁。在我国,生物多样性也同样面临着严重问题,由于人口压力,需要更多的耕地及生活和生产资料,大面积森林遭受砍伐,草原开垦和过度放牧,致使我国十分丰富的生物多样性走向被破坏的境地。有人估计,我国目前至少有 3000 种植物处于濒危,有 3 万~15 万种生物受到严重威胁,如不采取有力保护措施,很快就要绝灭。世界各国对生物多样性保护十分关注,在 1980 年世界自然资源保护联盟(IUCN)、联合国环境署(VNEP)和世界野生生物基金会(WWF)联合提出的《世界自然保护策略》就指出要维护基本生态学过程和生命维持系统,保护基因多样性、物种和生态系统的永续利用,对生物多样性的三个方面已明确指出要加以保护。在 80 年代初,IUCN 进一步提出了“抢救植物就是拯救人类”的行动纲领,说明了生物多样性与人类生存的密切关系,所以生物多样性的保护,决不是一个小问题,而是关系到人类生存的大问题,否则将对子孙后代犯下无法弥补的错误。

二、生物多样性保护的内容

生物多样性是指地球上所有的生命资源,是 40 亿年来自然进化的结果,它包括几万甚至上千万的植物、动物、微生物以及它们所拥有的基因,以及由这些生物所构成的生态系统。因此,生物多样性包括三方面的内容,即生态系统多样性、物种多样性和遗传多样性。

(一) 生态系统多样性

生态系统是指在一定空间下,植物、动物、微生物及其所在地的环境因素,通过能量流动和物质循环而发生相互作用的综合体。我国地域辽阔,地处寒温带、温带、暖温带、亚热带和热带,从东南沿海到西北内陆,又有湿润、非湿润、非干旱和干旱不同的地区,加之我国地形复杂而增加了我国的复杂性。据初步统计,我国森林就有 16 个大类,约 185 类生态系统,还有 4 大类草原、7 大类荒漠以及高山植被等约 460 类生态系统。这样规模的生态系统的多样性是我国的一项宝贵财富。

(二) 物种多样性

物种是生命存在的基本形式,也是生态系统中生物群落组成的基本单元。因此群落的物种多样性是生态系统结构和功能的决定因素。可是直到如今,人们还不能精确估计全球物种的数量,不同的研究者估计数差距甚大。据估计,地球上所存在的生物约为 500 万~3000 万种之间,经科学家订名的种类只有 140 万种,其中昆虫约 75 万种,脊椎动物 4.1 万种,植物(主要为维管植物和苔藓植物)为 25 万种,真菌 10 万种,其他还有无脊椎动物、藻类及微生物等。我国也是物种极其丰富的国家之一,仅就动物而言,昆虫为 15 万种,无脊椎动物 3.5 万种,脊椎动物已知 5139 种(兽类 499 种,鸟类 1186 种,爬行类 380 种,两栖类 270 种,鱼类 2804 种)。我国动物种类数约占全世界动物种类的十分之一左右,说明我国是一个物种多样性极为丰富的国家。

(三) 遗传多样性

每一物种都是一个独特的基因库。可以说物种多样性中包括遗传多样性,但遗传多样性远远超过物种多样性的范围。种下可