

真鲷精子的超低温保存研究*

李 纯 李 军 薛钦昭

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 对真鲷精子超低温保存技术进行了初步探讨,在液氮中保存真鲷 (*Pagrosomus major*) 精子时发生冷冻伤害的温域为 $-30 \sim -60\text{ }^{\circ}\text{C}$,适宜的降温速率为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$;使用抗冻剂 DMSO 的适宜浓度为 20%;采用低盐度或高 pH 值的溶液激活冻精的效果不如自然海水。真鲷冻精的复苏率和存活率最高可达到 50.73% 和 62.5%;以 $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 20% DMSO 处理真鲷精子,保存在液氮中 46 d 后冻精复苏率和存活率为 50.63% 和 61.02%。

关键词 真鲷,精子,超低温保存

冷冻保存种质细胞是一种能有效地保存物种多样性和遗传多样性的技术。超低温保存技术对开展种质(基因)交流,选择育种工作有重要意义。利用超低温保存技术可以没有地域限制和季节限制地进行育种工作,同时也可以利用杂交、自交和返交等育种手段培育新品种。海洋动物种质细胞的超低温保存技术起步较晚,开始于鲑鳟鱼类精子细胞的保存。由于海洋动物繁殖是在水生环境,与陆地动物的生存环境有着很大的差别,因此超低温保存技术对保存海洋动物种质细胞还处于试验研究阶段,并没有广泛应用生产^[1-2]。我国海鱼精子低温保存研究目前尚未见报道,本研究针对真鲷 (*Pagrosomus major*) 精子超低温保存进行了初步探讨,为建立真鲷精子库,提供技术支持。

1 材料和方法:

实验用的真鲷精子来源于薛家岛黄家养殖场的育苗用亲鱼。在 1999 年 5 月间选取性腺发育成熟的真鲷雄鱼,每次实验所用的精液均取自同一尾鱼。从水中捞出后用纱布将鱼体表面的水分吸干,挤压腹部收集排出的精液,但要注意防止尿液混入其中。取一点精

液在海水中稀释进行镜检,活力在 90% 以上时,进行实验。抗冻液配方及降温程序分别参见表 1 和图 1。

因为性腺发育成熟的雄鱼比较少,所以将收集到的浓精液经过 0.75% NaCl 溶液稀释 50 倍后再进行实验。将稀释后精液与抗冻液按 1:3 混合装入冷冻管中,样品最终体积为 0.4 ml。在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中平衡 2 min,用生物降温仪按不同降温程序对真鲷精子进行超低温保存。样品保存 2 h 以上,取出在 $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻后在消毒海水(盐度 31~32)中激活,稀释比例为 1:5,然后在 500 倍显微镜下观察记数。精子复苏比例以运动精子占全部精子的百分数表示。同时采用 0.5% 伊红 Y 溶液对精子进行染色,观察、记数结构完整精子占精子总数的百分比。

2 结果与讨论

2.1 真鲷精子在不同条件下的超低温保存效果

不同的抗冻液 A₁~A₄ 及 D₁ 与真鲷精子混合后,分别按照降温程序 P₂, P₃ 和 P₄ 进行超低温保存。对精子复苏比例、存活率的影响结果见图 2。

在 A₄ 抗冻液和降温速率为 P₄ 时,冻精解冻后的复苏比例和存活率达到最高,分别为 50.73% 和 62.5%。在同一种抗冻液条件下以 P₄ 降温程序冷冻处理精子效果最佳;对同一种降温程序,抗冻液 A₄ 效果较好。此外,相同条件下由 DMSO 和甘油混合组成的抗冻液对精子的超低温保护作用与单独用 DMSO

表 1 超低温保存真鲷精子的各种抗冻液配方

Tab.1 Various of the anti-freezing agents *Pagrosomus major*

抗冻液	DMSO(%)	甘油(%)	蔗糖(%)
A ₁	5	/	5
A ₂	10	/	5
A ₃	15	/	5
A ₄	20	/	5
D ₁	5	5	5

* 国家自然科学基金资助项目 39770583 号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4392 号。

收稿日期:2001-07-25;修回日期:2001-08-28

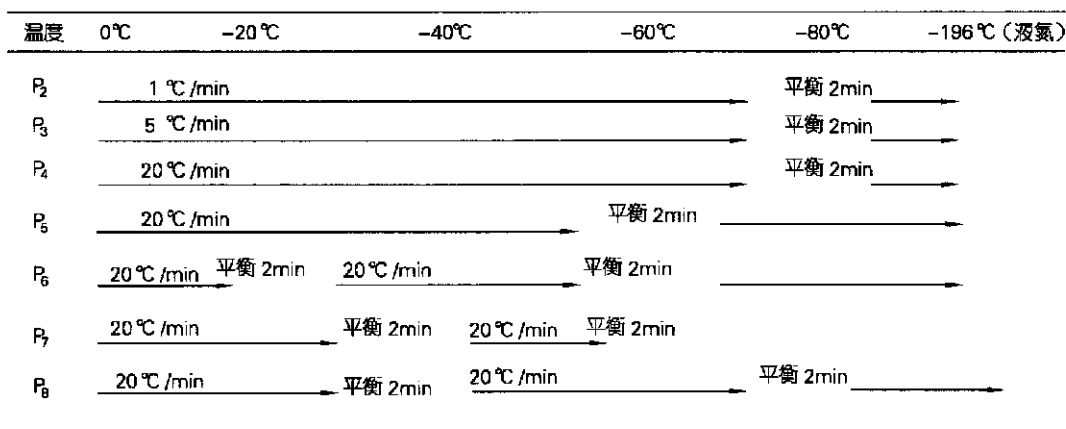


图1 不同降温程序

Fig.1 Freezing procedure for cryopreservation of *Pagrus major*

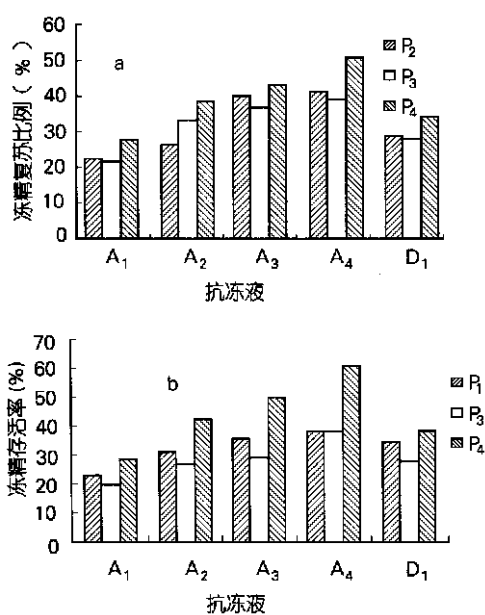


图2 降温速度和抗冻剂对真鲷冻精复苏比例 (a) 和存活率 (b) 的影响

Fig.2 Effect of freezing rate and cryoprotectants on sperm motility (a) and survival rate (b) of *P. major*

的保存效果相似。

2.2 不同降温方法对真鲷精子保存效果的影响

精子与 A₄ 抗冻液混合后分别以 P₄, P₅, P₆, P₇, P₈ 方法降温。解冻后发现以 P₄ 降温程序处理的精子其复苏比例、存活率高达 45.95% 和 48.21%。以 P₇、P₈ 程序降温的两组由于在 -40℃ 停滞了一段时间, 它

们的保存效果最差, 其复苏比例和存活率分别只有: 20.18%, 18.88%; 19.6%, 18.97% (图 3)。真鲷精子发生冷冻伤害的温域是在 -20℃ ~ -60℃, 但造成严重伤害是发生在 -40℃ 左右。在显微镜下观察真鲷精子采用 P₇ 和 P₈ 方法保存的精子有大部分的头部分裂, 尾部断裂。Lahnsteiner 等 1996 年低温保存鲑鱼和哲罗鱼的精子时, 受到冷冻伤害的细胞基本上也都表现为: 头部膨胀或者是中段、尾部破损, 甚至精子结构完全消失只剩下部分鞭毛或染色体。

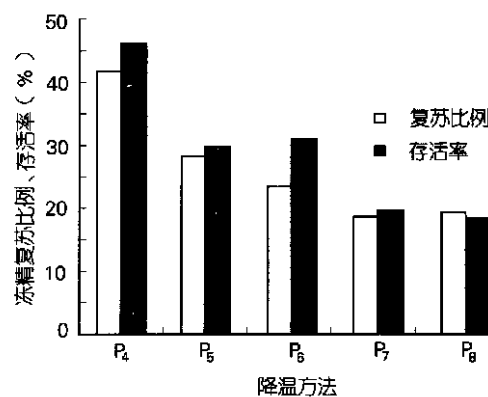


图3 分阶段降温对真鲷冻精复苏比例和存活率的影响

Fig.3 Effect of stepwise freezing on sperm motility and survival rate of *P. major*

2.3 不同溶液激活真鲷冻精对其复苏比例和存活率的影响

超低温保存的精子解冻后为了最大限度恢复其

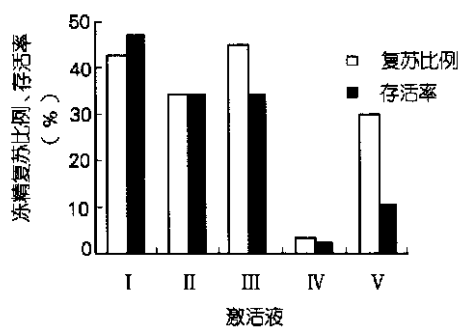


图 4 不同激活液对真鲷冻精复苏比例和存活率的影响
Fig.4 Effect of reactivation solutions on sperm motility and survival rate of *P. mpr*

复苏比例,常采用一定盐度、pH 值及含某些离子的溶液来激活解冻后精子。本实验用 I 消毒海水(盐度 32)、II 1/2 消毒海水(盐度 16)、III 0.12 mol/L NaHCO_3 + 消毒海水、IV 0.1% 氨水 + 消毒海水和 V 0.025% 氨水 + 消毒海水等 5 种溶液来激活真鲷冻精。结果(图 3)发现使用激活液 I 和 III 对冻精复苏比例较好分别达到 43.01% 和 45.05%;激活液 I 使冻精存活率高达 47.42%。含有氨水的激活液 IV、V 使冻精存活率比较低,只有 1.68% 和 9.9%。对真鲷冻精激活实验中主要考虑到溶液渗透压和酸碱度可能是导致冻精复苏效果好坏的关键因素。结果证明:盐度为 32 的自然海水和 pH 值为 8.58 的 0.12 mol/L NaHCO_3 溶液对冻精的激活是适宜的。由于抗冻剂的作用,以及冷冻解冻处理,精子本身渗透压大为升高,对渗透压非常敏感,渗透压过高或过低会使精子细胞脱水或吸水膨胀,导致细胞

的膜系统破坏。激活液 pH 值的不恰当,会引起细胞蛋白质变性,同样导致死亡。

2.4 超低温保存时间对真鲷精子复苏比例和存活率的影响

真鲷精子与抗冻液 A₄ 混合,按照 P₄ 降温程序进行超低温保存。精子在液氮中保存 2 h 后就解冻的冻精复苏率和存活率分别为 50.73% 和 62.5%。保存 46

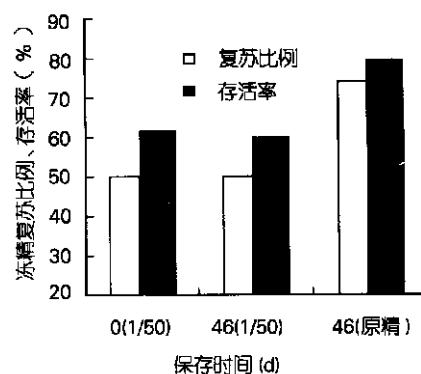


图 5 不同保存时间对真鲷冻精复苏比例和存活率的影响
Fig.5 Effect of storage time on sperm motility and survival rate of *P. mpr*

d 后解冻激活,统计冻精的复苏率和存活率分别为 50.63% 和 61.02%,说明超低温保存真鲷精子的时间长短对精子复苏率和存活率没有影响(图 5)。

参考文献

- 1 李 纯 李 军 薛钦昭. 海洋科学, 2000, 24(4): 12 ~ 15
- 2 Chao N. H. and liao I. C. . *Aquaculture*, 2000, 197: 161 ~ 189

CRYOPRESERVATION OF SPERMATOZA OF RED SEA BREAM

LI Chun LI Jun XUE Qinzhao

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences Qingdao, 266071)

Received: Jul. 25, 2001

Key Words: *Pagrus mpr*, Spermatoza, Cryopreservation

Abstract

For sperm of *Pagrus mpr*, the freezing damage occurred at - 20 °C to - 60 °C. The nature seawater is a kind suitable activator solution. The optimal motility and survival rate of 50.73% and 62.5% were obtained in cryopreservation of the spermatozoa of *P. mpr* using a cryoprotectants dilution (DMSO 20% + sucrose 5%) and freezing rate 20 °C/min. The motility and survival rate of sperm is 50.63% and 61.02% respectively after storing 66 days in LN₂.

(本文编辑:刘珊珊)