

夏良萍,陈梦婷,陈悦萍,等. 黄颡鱼精子超低温冷冻保存技术[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):196-198.

# 黄颡鱼精子超低温冷冻保存技术

夏良萍, 陈梦婷, 陈悦萍, 徐丹丹, 采克俊

(湖州师范学院求真学院生命科学系,浙江湖州 313000)

**摘要:**以解冻后的精子活力为指标,研究了不同稀释液、不同抗冻剂、平衡时间、液氮熏蒸高度、稀释液 pH 值和不同糖类对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)精子超低温冷冻保存的影响。结果显示,最佳防冻液为 10% 甲醇与 CCSE2 组合,最佳平衡时间为 30 min,最佳熏蒸高度为 7 cm,稀释液 pH 值为 6.0 和 7.0 时较合适,添加麦芽糖的冻精活力较好。

**关键词:**黄颡鱼;精子;超低温冷冻保存;活力

**中图分类号:** S965.199.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0196-03

鱼类种质资源是水产养殖生产、优良品种培育及水产养殖业可持续发展的物质基础,也是水生生态系统的重要组成部分。种质资源超低温保存是保存物种的有效途径<sup>[1]</sup>。由于鱼卵和胚胎体积大、膜通透性差、卵黄含量高、对冷却敏感,目前还难以冷冻<sup>[1-3]</sup>。鱼类精子细胞个体小,水和抗冻剂容易通透,冷冻保存较易成功<sup>[2]</sup>。鱼类精子超低温冷冻保存对鱼类种质资源保存起重要作用。黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是一种小型底层经济鱼类,人工繁殖已在各地开展。在黄颡鱼人工繁殖中,存在雌雄鱼成熟不同步、雄鱼精液难以被挤出等问题,规模化繁殖效率依然不高。开展黄颡鱼精子超低温冷冻保存技术研究具有重要的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于 2012 年 5—9 月进行。鱼来自浙江湖州鱼类批发市场,选择健康状况良好、体表无伤、无病且性成熟的鱼作为试验材料。

### 1.2 药品与试剂

抗冻剂:二甲亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)、甘油(glycerol,Gly)、乙二醇(ethylene glycol,EG)、丙二醇(propylene glycol,PG)、乙二醇甲醚(methoxyethanol,MG)、甲醇(methanol,MeOH),购自 Amresco 公司,其他药品均为国产分析纯。

### 1.3 稀释液配制

(1)D-17<sup>[2]</sup>:用电子天平称取 NaCl 0.9 g、KCl 0.05 g、葡萄糖 1.5 g 溶于 100 mL 纯水。(2)HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)<sup>[4]</sup>:用电子天平称取 NaCl 7.896 g、KCl 0.396 g、

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.195 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.072 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.054 g、NaHCO<sub>3</sub> 0.345 g、葡萄糖 0.99 g 溶于 1000 mL 纯水。(3)CCSE2<sup>[5]</sup>:用电子天平称取 NaCl 0.342 7 g、蔗糖 3.431 4 g 溶于 100 mL 纯水。以上 3 种稀释液用容量瓶定容后,分装到 Eppendorf 管中,冻存在冰箱中待用。

### 1.4 方法

1.4.1 精液采集 选取性成熟的雄性亲鱼,剖腹取精巢,将精巢剪碎,添加试验所用的稀释液稀释,用干燥的过滤漏斗将所需的精液过滤,立即放在 4℃ 冰箱内,防止精子活力下降。

1.4.2 精子活力的检测 在载玻片上滴 10 μL 纯水,取 5 μL 鲜精于纯水中,立即用显微镜观察活力,快速运动的精子记录为活精子。精子活力 = 运动精子数/全部的精子数 × 100%。鲜精活力在 90% 以上的精液用于试验。

1.4.3 不同抗冻剂浓度及稀释液对精子冷冻保存的影响 选取 6 种抗冻剂,添加浓度为 5% 和 10%,稀释液为 HBSS、CCSE2、D-17,精液与防冻液稀释比为 1:20,混合液分装至麦管中,每只麦管装 100 μL,在 4℃ 冰箱内平衡 30 min,平衡结束后在液氮上方 7 cm 处熏蒸 10 min。熏蒸结束后倒入液氮中保存。解冻时在 37℃ 水浴中解冻 6 s。用纯水激活后,在显微镜下检测冻精活力。利用上述筛选出的最佳抗冻剂甲醇,稀释液 CCSE2,进行甲醇浓度(5%~20%)精细筛选。

1.4.4 不同平衡时间对精子冷冻保存的影响 4℃ 平衡时间设定为 0、15、30、45、60 min,防冻液为 10% 甲醇/CCSE2。

1.4.5 液氮熏蒸高度对精子冷冻保存的影响 稀释液选用 CCSE2,抗冻剂选用 10% 甲醇和 10% 乙二醇甲醚。熏蒸高度分别为 3、5、7、9、11、13 cm。熏蒸结束后倒入液氮中保存,保存 5 min 后在 37℃ 水浴中解冻,解冻时间为 6 s。用纯水激活后,在显微镜下检测冻精活力。

1.4.6 糖类对黄颡鱼精子冷冻保存的影响 选取的抗冻剂为 10% 甲醇,稀释液为用 5 种糖类配制而成的 0.1 mol/L 和 0.2 mol/L 的 CCSE2,5 种糖类为葡萄糖、果糖、海藻糖、蔗糖、麦芽糖。

### 1.5 数据处理

结果用“平均值 ± 标准差”表示;数据分析使用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析。图表使用 Origin 7.5 绘制。

收稿日期:2013-03-16

基金项目:浙江省科技创新团队项目(编号:2012R10026-01、05);浙江省公益性技术应用研究计划(编号:2011C37078);浙江省自然科学基金(编号:Y3090561、Y3110432);浙江省钱江人才计划(编号:2012R10076)。

作者简介:夏良萍(1991—),女,浙江湖州人,本科生,从事鱼类精子冷冻研究。E-mail:578833055@qq.com。

通信作者:采克俊,博士,副教授,研究方向为水产生物技术。E-mail:caikejun@hutc.zj.cn。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同抗冻剂与稀释液对黄颡鱼精子冷冻保存的影响

3 种稀释液、6 种抗冻剂的 2 种浓度,配制的 36 种不同防冻液对黄颡鱼精子冷冻保存的影响,结果如表 1 所示,当抗冻剂为甲醇时,冻精活力普遍较强。当甲醇为 10% 时,冻精的活力达到最高;当 CCSE2 作为稀释液时,冻精活力较好。10% 甲醇 - CCSE2 组合时,冻精活力达到最强。利用该最佳组合,进一步比较了 7 种甲醇不同浓度对黄颡鱼精子冷冻的影响,结果如图 1 所示,当甲醇浓度在 5% ~ 7.5% 时,冻精活力较差;当甲醇浓度在 10% ~ 12.5% 时,冻精活力最高;之后随着甲醇浓度升高,冻精活力下降。

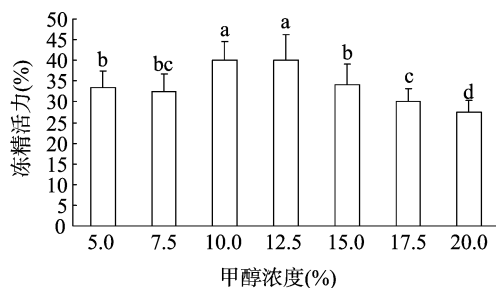
表 1 抗冻剂与稀释液组合对黄颡鱼冻精活力的影响

防冻剂种类	防冻剂浓度 (%)	稀释液	精子活力 (%)
甲醇	5	D-17	21.43 ± 5.56hijk
		HBSS	27.15 ± 4.88defgh
		CCSE2	36.43 ± 2.44b
	10	D-17	26.43 ± 3.78defghi
		HBSS	31.43 ± 3.78bcd
		CCSE2	42.86 ± 2.67a
甘油	5	D-17	1.00 ± 0.00o
		HBSS	2.14 ± 1.95o
		CCSE2	15.71 ± 5.35klmn
	10	D-17	1.57 ± 1.51o
		HBSS	2.71 ± 2.14o
		CCSE2	12.86 ± 2.67mn
DMSO	5	D-17	15.00 ± 7.07klmn
		HBSS	26.43 ± 3.78defghi
		CCSE2	27.86 ± 6.36defg
	10	D-17	16.43 ± 7.48klmn
		HBSS	28.57 ± 3.78def
		CCSE2	31.43 ± 6.27bcd
乙二醇	5	D-17	13.57 ± 6.27lmn
		HBSS	17.86 ± 4.88jklmn
		CCSE2	20.71 ± 9.76hijkl
	10	D-17	20.00 ± 4.08ijklm
		HBSS	22.14 ± 4.88fghi
		CCSE2	29.29 ± 6.07cde
丙二醇	5	D-17	12.14 ± 8.09n
		HBSS	16.43 ± 5.56klmn
		CCSE2	17.14 ± 7.56jklmn
	10	D-17	17.86 ± 8.59jklmn
		HBSS	22.14 ± 5.67ghij
		CCSE2	23.57 ± 8.02efghij
乙二醇甲醚	5	D-17	15.71 ± 4.50klmn
		HBSS	15.71 ± 6.07klmn
		CCSE2	29.29 ± 6.73cde
	10	D-17	15.71 ± 5.35klmn
		HBSS	15.71 ± 7.87klmn
		CCSE2	35.71 ± 6.73bc

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 平衡时间对黄颡鱼精子冷冻保存的影响

4 ℃ 不同平衡时间对黄颡鱼解冻后精子活力的影响,结



图中不同的字母表示显著性差异 ( $P < 0.05$ )。图2至图5同。

图1 不同浓度甲醇对黄颡鱼精子冻精活力的影响

果如图 2 所示,随着平衡时间的增加,冻精活力增强,当平衡时间为 30 min 时,冻精活力达到最大,46.67%;当平衡时间 45、60 min 时,冻精活力反而变差。

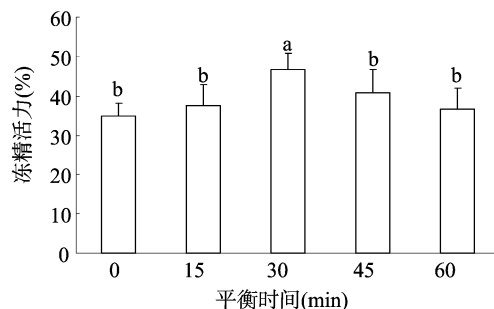


图2 平衡时间对黄颡鱼冻精活力的影响

### 2.3 熏蒸高度对黄颡鱼精子冷冻保存的影响

熏蒸高度对黄颡鱼精子冷冻保存的影响,结果如图 3 所示,10% 甲醇的冻精活力比 10% 乙二醇甲醚强;当熏蒸高度是 7 cm 时,2 种抗冻剂的冻精活力都达到最强,分别为 44.17% 和 36.67%。

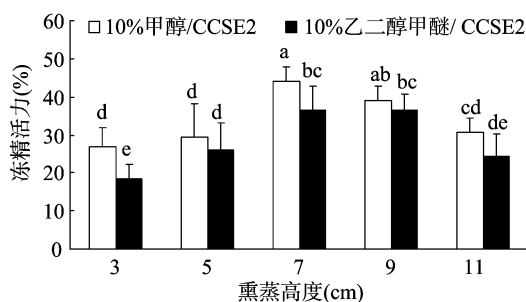


图3 熏蒸高度对黄颡鱼冻精活力的影响

### 2.4 稀释液 pH 值对黄颡鱼精子冷冻保存的影响

稀释液 pH 值对黄颡鱼精子冷冻保存的影响,结果如图 4 所示,在 pH 值为 5.0 时,冻精活力最弱,为 23%;而在 pH 值为 6.0 和 7.0 时,冻精活力较强,分别为 45%、47%;当 pH 值为 8.0 时,冻精活力下降。

### 2.5 糖类对黄颡鱼精子冷冻保存的影响

比较不同糖类对黄颡鱼精子冷冻保存的影响,结果如图 5 所示,添加麦芽糖的冻精活力较好,尤其是在 0.1 mol/L 浓度的情况下,冻精活力最高。

## 3 讨论

黄颡鱼体积较小,精巢呈分枝状,精液量较少,不易挤出,规模化苗种生产多采用解剖精巢取精的方式进行人工授精,使

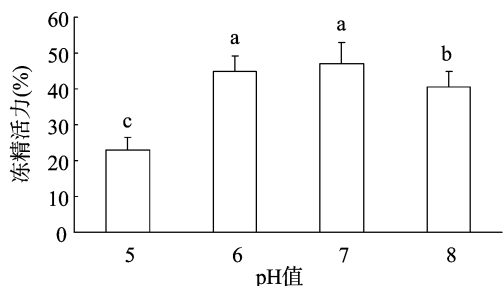


图4 稀释液CCSE2不同pH值对黄颡鱼冻精活力的影响

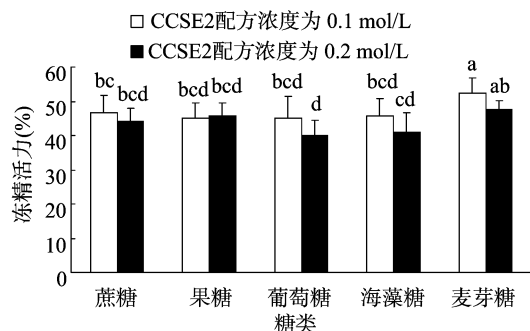


图5 糖类对黄颡鱼冻精活力的影响

生产过程中雄鱼亲本浪费较为严重,精子不能充分利用,规模化繁殖效率依然不高,开展精子超低温冷冻保存研究可促进黄颡鱼人工授精技术提高。相关黄颡鱼超低温冷冻保存技术研究报道很少<sup>[6]</sup>。

精子在冷冻前必须先稀释于防冻液中。防冻液主要由稀释液和渗透性抗冻剂组成。筛选防冻液是鱼类精子冷冻保存中的重要步骤,也是研究最多的领域,稀释液的适合与否直接影响到保存结果。相关报道鱼类精子冷冻的稀释液已经多达几十种<sup>[7]</sup>。本研究选择了最常用的3种稀释液D-17<sup>[2]</sup>、HBSS<sup>[4]</sup>、CCSE2<sup>[5]</sup>。这3种稀释液成分简单,都由无机盐和糖类组成,但渗透压不同。D-17的渗透压为397 mOsm/kg,属于高渗透压<sup>[2]</sup>;HBSS渗透压为320 mOsm/kg,属于等渗<sup>[4]</sup>;而CCSE2报道的渗透压为325 mOsm/kg<sup>[5]</sup>,笔者实验室检测实为260 mOsm/kg,略微低渗。高渗的D-17成功冷冻保存了鲤鱼等多种淡水鱼类精子。近年来,接近等渗的HBSS已经成功保存了孔雀鱼、黑玛丽<sup>[4]</sup>、绿色剑尾鱼<sup>[8]</sup>等多种鱼类精子,有广泛的适用性。淡水鱼精液稀释液多为等渗或略微高渗<sup>[7]</sup>。本研究发现对于黄颡鱼精子冷冻,略微低渗的CCSE2效果最佳,表明黄颡鱼精巢环境的渗透压可能比其他鱼类低,需要进一步研究验证。

由于不同种类的鱼精子的生理特性具有很大差异,确定最适的抗冻剂种类和浓度非常重要<sup>[9]</sup>。对于不同物种,有不同适宜的渗透性抗冻剂。DMSO因其高渗透性和易与精子膜上磷脂层发生相互作用而被广泛应用于多种鱼类精子冷冻<sup>[7]</sup>。本研究结果10%甲醇对黄颡鱼冷冻效果最佳,与Pan等的报道结果<sup>[6]</sup>一致。乙二醇甲醚的效果仅次于甲醇。

冷冻前,为了让渗透性抗冻剂渗入精子起到保护作用,一

般在4℃平衡一段时间。低温有利于减小抗冻剂对精子的毒性,也有利于精子对冷冻环境的适应,一般鱼类精子的平衡时间控制在10~60 min<sup>[2,7]</sup>。本研究最佳平衡时间都为30 min。说明适当的平衡对鱼类精子冷冻非常重要。

慢速熏蒸慢速降温,有利于鱼类精子对低温的适应,能够在冻结前充分脱水,是目前鱼类精子冷冻的主要降温方式。如果降温速率太慢,精子就会长时间处于高渗溶液中,导致细胞收缩,出现溶质损伤。筛选最佳的降温速率对提高冷冻保存效果至关重要。本研究中在液氮面上7 cm高度处熏蒸降温,冻精活力最高。表明液氮熏蒸慢速降温是鱼类精子冷冻的有效方法。

关于糖类对精子冷冻的报道较多,特别是海藻糖对精子有保护作用。本研究在稀释液CCSE2配方的基础上,研究5种糖类对黄颡鱼精子冷冻保存的影响,结果麦芽糖的冻精活力较好,而海藻糖并没有发现有保护作用。这可能是糖类对精子冷冻的保护作用有物种差异。稀释液CCSE2的pH值对黄颡鱼精子冷冻保存的影响,pH值为6.0和7.0时,冻精活力最好。

通过精液冷冻保存技术,建立相应的鱼类种质资源库,将这些物种的基因资源完全保存下来,为鱼类种质资源的保护开辟了新的途径。黄颡鱼精子冷冻保存的研究为其种质资源保护和开发利用打下了基础。

#### 参考文献:

- [1] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 161-168.
- [2] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 21-44.
- [3] Robles V, Cabrita E, Herréiz M P. Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species[J]. Zebrafish, 2009, 6(3): 281-293.
- [4] Huang C, Sun C, Su X, et al. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies—a generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae[J]. Cryobiology, 2009, 59(3): 351-356.
- [5] Irawan H, Vuthiphanchai V, Nimrat S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm[J]. Animal Reproduction Science, 2010, 122(3/4): 236-243.
- [6] Pan J L, Ding S Y, Ge J C. Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm[J]. Aquaculture, 2008, 279(1/2/3/4): 173-176.
- [7] 采克俊, 曹 访, 叶金云. 鱼类精子低温冷冻保存研究进展[J]. 湖州师范学院学报, 2012, 34(2): 26-30.
- [8] Huang C J, Dong Q X, Walter R B, et al. Initial studies on sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*[J]. Theriogenology, 2004, 62(1/2): 179-194.
- [9] 王晓爱, 杨君兴, 陈小勇, 等. 软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存[J]. 动物学研究, 2012, 33(3): 283-289.