

陈春娜, 黄颖颖, 陈先均, 等. 分光光度法测定达氏鲟精子密度标准的研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 184–186.

分光光度法测定达氏鲟精子密度标准的研究

陈春娜^{1,2}, 黄颖颖¹, 陈先均¹, 龙治海¹, 杜 军^{1,2}

(1. 四川省农业科学院水产研究所, 四川宜宾 644000; 2. 四川省生物资源保护与可持续利用实验室, 四川成都 611731)

摘要:通过比较分光光度计 3 种波长(380、530、780 nm)下吸光度(D)与精子密度(C)的关系, 研究建立测定达氏鲟精子密度的方法, 以加快精子计数程序的标准化。结果表明, 在 3 种不同波长下, 随着精子密度增加, 精子的吸光度也不断增大; 通过对精子密度与吸光度的关系进行回归分析, 发现精子密度与吸光度呈良好的对数关系, 380 nm 为最适检测波长, 其回归方程为 $D_{380\text{ nm}} = -7.212 + 0.513\ln C (r^2 = 0.975)$ 。

关键词:达氏鲟; 精子; 密度; 分光光度法

中图分类号: S965.215.12⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1002–1302(2014)01–0184–03

精子密度是评价精子质量的一个重要指标, 不仅可以用来判断精液品质的优劣, 还直接关系到人工授精中精子用量的有效精子数。在受精过程中, 精子浓度过低会降低受精率, 过高会造成受精卵后期发育脱膜畸变。通过测定精子密度, 可以在人工授精中建立最佳精卵比例, 避免多精入卵^[1–2]。同时, 精子密度也是反应鱼类繁殖潜力的重要指标, 是优化个体遗传潜力的主要考虑因素。此外, 精子密度能显著影响精子冷冻保存效果, 正确测定精子密度有助于将精子稀释至冷冻保存所需浓度范围^[3], 有利于精子冷冻保存。

测定精子密度最常见的方法有目测法、血球计数法和库尔特颗粒计数法^[4]。目测法虽然简单, 但十分不精确, 计数法虽然精确, 但费时、费力, 在处理大量样品时很难做到快速及时。用分光光度计测定精子密度, 具有操作方法简便、快速及结果准确等特点, 在很多领域上都有应用, 尤其是在家畜精子密度研究中应用较多^[5–8]。有关测定水产动物精子密度的研究较少。国外应用分光光度法已建立了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、白鲈虎鱼 (*Leucoparion petersi*)、金鲈 (*Perca flavescens*)、银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*)、硬头鲈 (*Salmo gairdneri*)、*Oncorhynchus mykiss*、塞巴各湖鲈 (*Salmo salar m. sebago* Girard)、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*)、西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*)、小体鲟 (*Acipenser ruthenus*)、牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、*Crassostrea virginica* 和紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 等水产动物精液密度和光密度的相关关系^[9–17], 国内利用该方法建立了俄罗斯鲟 (*Acipenser gueldenstaedtii*)、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 精子密度的标准曲线^[4, 18]。

达氏鲟 (*Acipenser dabryanus* Dumeril) 英文名 Dabry's sturgeon、Yangtze sturgeon, 别称长江鲟和沙腊子, 是我国特有的淡水定居性鲟科鲟属鱼类^[19], 分布于长江上游和金沙江下游, 为国家一级重点保护动物、国际自然保护联盟 (IUCN) 极危级

(CR) 物种、国际濒危动植物贸易公约 (CITES) 附录 II 保护物种、长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区的主要保护对象之一, 具有很高的学术价值和生态价值。目前, 国内外尚未见利用分光光度法测定达氏鲟精子密度的相关报道。本研究探讨了不同波长和密度下吸光度与精子密度之间的关系, 旨在建立分光光度法测定达氏鲟精子密度的标准化方法, 以便于快速检测精子密度。

1 材料与方法

1.1 材料

性成熟雄性达氏鲟亲鱼为四川省农业科学院水产研究所养殖, 2012 年 4 月经注射催产, 采取腹部挤压法收集精液, 确保精液不含尿液等杂质。收集得到的精液保存在干燥的离心管中, 于 4 ℃ 下保存。

1.2 方法

以 0.65% NaCl 为稀释液, 将鲜精液分别稀释成 10 份浓度梯度不同的样品, 利用紫外可见分光光度计 (岛津 UVmini–1240) 分别在波长 380、530、780 nm 处测吸光度, 每一样品在同一波长下测定 3 次, 取平均值作为该样品的吸光度 (D), 以 0.65% NaCl 溶液做空白, 用血球计数板分别计数每个浓度梯度的样品浓度 (C)。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 及 SPSS 统计软件进行分析处理, 并进行回归差异检验和比较。

2 结果与分析

由图 1 可见, 在 3 种不同波长下, 随着精子密度增加, 精子的吸光度也不断增大; 当精子密度小于 1×10^6 个/mL 时, 吸光度变化不大, 因此确定 1×10^6 个/mL 为检测下限。通过对精子密度与吸光度关系的回归分析发现, 精子密度与吸光度呈良好的对数关系, 其回归方程为 $D = a + b\ln C$, 将对数函数进行线性变换: $Y = a + bX$, 其中 $Y = D$, $X = \ln C$ 。3 种波长下精子密度与吸光度的相关系数都较高, 其回归方程分别为 $D_{380\text{ nm}} = -7.212 + 0.513\ln C (r^2 = 0.975)$; $D_{530\text{ nm}} = -6.969 + 0.492\ln C (r^2 = 0.968)$; $D_{780\text{ nm}} = -6.504 + 0.454\ln C (r^2 = 0.953)$ 。

收稿日期: 2013–05–23

基金项目: 四川省财政基因工程青年基金 (编号: 2012QNJJ–016)。

作者简介: 陈春娜 (1981–), 女, 四川自贡人, 硕士, 助理研究员, 从事水产名特优繁育和鱼类生理生化研究。E-mail: hc_1981_2001@sina.com。

波长为 380 nm 时,达氏鲟精子密度与吸光度回归方程的判定系数 $r^2=0.975$,高于波长 530 nm 和 780 nm 时回归方程的判定系数,这表明 380 nm 为最适检测波长。对回归方程回

归系数和常数项的显著性检验结果表明,精子密度对数与吸光度间存在着显著的正线性关系。

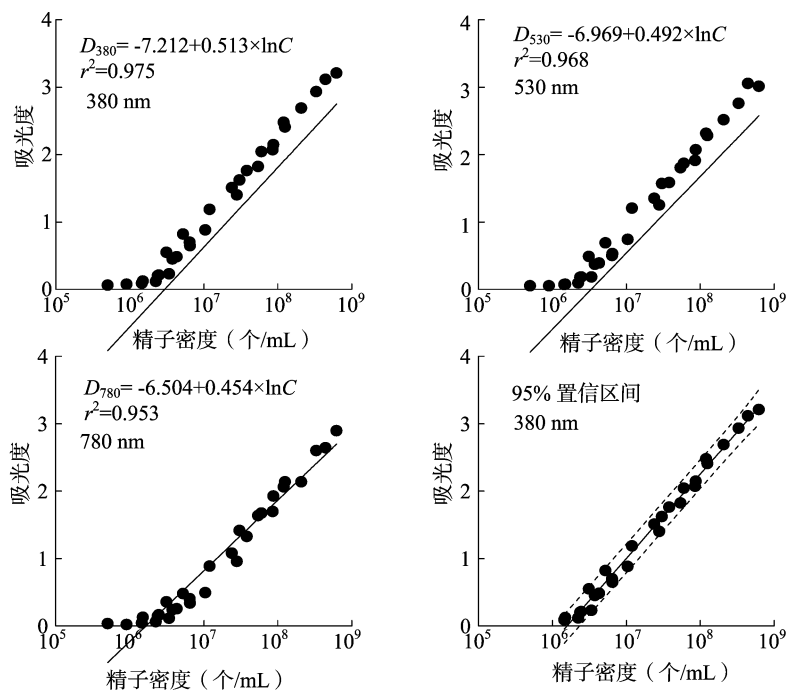


图1 380、530、780 nm 波长时达氏鲟精子密度与吸光度标准曲线

3 小结与讨论

3.1 不同回归模型及不同波长下精子密度与吸光度的回归关系

研究发现,精子密度与吸光度随着种类的不同而呈现不同的函数关系:猪呈三次函数回归关系、牛呈二项式回归关系、羊呈线形回归关系、太平洋牡蛎呈对数回归关系、紫贻贝呈线形回归关系、俄罗斯鲟呈对数回归关系^[4,6-8,15,17]。本研究达氏鲟精子密度与吸光度的分布趋势以指数函数曲线拟合时相关性最为显著,通过变换能将指数函数转换为线性函数,利用该曲线方程能通过吸光度快速准确地推算精子密度。

测定时选择合适的波长尤为重要。精液由多种成分组成,在任一波长下的吸光度是全部组分之和,通常吸光度在最适波长时有 1 个比较宽的波峰,得到的回归方程相关系数也比较高^[20],已报道测定精子浓度的波长范围大多选用 375 ~ 630 nm^[21],如太平洋牡蛎最适波长为 581 nm、紫贻贝为 320 nm、大菱鲆为 420 nm、俄罗斯鲟为 530 nm、三疣梭子蟹和中华绒螯蟹为 520 nm^[4,13,15,17-18,21]。本研究采用了 3 种可见光波长 380、530、780 nm,发现在 380 nm 波长下得到的回归方程相关系数较高,380 nm 为最佳检测波长。

3.2 影响分光光度计测定精子密度精确度的因素

分光光度法测定精子密度可以广泛应用于水产动物精子质量评估、人工繁殖、精子冷冻保存和遗传育种等方面,但是在使用分光光度计检测精子密度的过程中,会受到一些因素的影响。

在测定时,需要将精液稀释成不同浓度的精子悬液,研究发现,当加入不同浓度的稀释液时,精子会呈现出不同的运动

水平,运动水平的快慢会直接影响精子悬液形成的时间,从而会影响到吸光度的读数^[22],因此在选择稀释液浓度时,应尽可能选择抑制精子运动的最低浓度。精液稀释的比例是影响光度计测定精子密度精确度的另一因素^[21],由于受光度计示值范围因素的影响,精液浓度过高会超出检测仪器的最大量程,浓度过低会使吸光度变化不大,浓度过高或过低均会造成较大的测定误差,因此应根据光度计的示值范围确定稀释倍数。由于受稀释方式、量器精度等因素的影响,用于稀释的精液量也会造成不同程度的测量误差,从而影响分析结果的准确性,因此,用于稀释的精液体积一定要精确^[9]。另外,在测量开始时,精子由于重力作用,可能在样品中分布不均,因此,在测定浓度和吸光度之前,精子悬液是否充分摇匀也会影响读数。在收集精液的过程中还要注意防止尿液等物质污染精液,这些污染物也会影响精确度。

因此,为使分光光度计测定精子密度更精确,在精液样本的准备阶段和测量过程中都应严格按照标准程序进行。

3.3 测定精子密度在达氏鲟研究中的重要性

达氏鲟是一类较大型的鱼类,性成熟年龄长,种群中存在着“生殖间期”的现象,即当年产卵的亲鱼第 2 年可能不会产卵。如何利用好当年性成熟的个体,在人工繁殖中提高卵的受精率与孵化率,精子用量及精卵比例在人工授精过程中就显得十分重要。精子浓度过低受精率会偏低,过高则部分受精卵会出现脱膜畸变^[2]。因为同一尾鲟鱼不同时间段采集到的精液浓度不一致^[4],在自然产卵季节,在实际生产中不能以精液体积作为精液用量的依据,对于采集到的精液,可以运用分光光度计法对其质量进行评估,快速、准确测定达氏鲟精子密度,确定最适精卵比例,为人工授精精子用量提供

参考。

目前,达氏鲟的人工繁殖亲本仍取自自然繁殖种群。因环境因子等破坏,达氏鲟自然繁殖群体数量已处于濒危状态,且雌雄性比严重失调,雄性比例显著下降。为保护好达氏鲟的种质资源,开展精液的冷冻保存技术在达氏鲟研究中显得十分必要,而精子密度则是影响精子冷冻保存的关键因素之一。在水生动物精子的短期保存中,有研究发现,精子密度越高,活力保持越长,这是因为精子存活期间消耗的氧是固定的,浓度高的精液会降低体系溶解氧,有利于保存精子的能量物质^[23-25]。在水生动物精子超低温冷冻保存研究中发现,由于缺乏统一的精子浓度标准,即使是在相同的试验条件下,同一物种中成功冷冻保存的方案也很难重复^[3]。因此,可以利用分光光度计快速、精确测定精液浓度,为今后达氏鲟精子超低温冷冻保存中精液用量提供统一的量化范围,为该种群资源保护起到指导性作用。

参考文献:

- [1] Gruffydd L D, Beaumont A R. Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* (Mollusca, Lamellibranchia) [J]. Helgol Wiss Meeresunters, 1970(20):486-497.
- [2] 高绪生,刘永峰,刘永襄,等. 精子密度对皱纹盘鲍卵的受精率及受精卵畸形率的影响[J]. 海洋湖沼通报,1990,3(03):71-75.
- [3] Dong Q, Huang C, Tiersch T R. Control of sperm concentration is necessary for standardization of sperm cryopreservation in aquatic species; evidence from sperm agglutination in oysters [J]. Cryobiology, 2007,54(1):87-98.
- [4] 张涛,章龙珍,庄平,等. 分光光度法测定俄罗斯鲟精子密度标准的研究[J]. 海洋渔业,2009,31(1):87-91.
- [5] 李孝娟,郭光成,岳鹏飞,等. 721 型分光光度计测定猪精子密度操作指南[J]. 黑龙江动物繁殖,2008,16(3):24.
- [6] 张亮,郭宗义,潘红梅,等. 分光光度法快速测算公猪精子密度的研究[J]. 广东农业科学,2012,39(5):103-105,108.
- [7] 吴宓. 应用 7230 型分光光度计测定公牛精子密度[J]. 黄牛杂志,1994,67(02):39-41.
- [8] 肉孜汗,热合曼,热孜亚. 应用 721 型分光光度计测定公羊精液密度的试验[J]. 新疆畜牧业,2002(4):20-21.
- [9] Ciereszko A, Dabrowski K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique [J]. Aquaculture, 1993,109(3-4):367-373.
- [10] Bouck G R, Jacobson J. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1976,105(4):534-535.
- [11] Piironen J. Variation in the properties of milt from the finnish land-

locked salmon (*Salmo salar* m. *sebago* Girard) during a spawning season [J]. Aquaculture, 1985, 48(3/4):337-350.

- [12] Ji X S, Chen S L, Tian Y S, et al. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production - scale fertilization [J]. Aquaculture, 2004, 241:517-528.
- [13] Suquet M, Omnes M H, Normant Y, et al. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture, 1992, 101(1-2):177-185.
- [14] Sarosikek B, Ciereszko A, Rzmieniecki A, et al. The influence of semen cryopreservation on the release of some enzymes from siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and starlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa [J]. Archives of Polish Fisheries, 2004, 12(1):13-21.
- [15] Dong Q, Eudeline B, Huang C, et al. Standardization of photometric measurement of sperm concentration from diploid and tetraploid *Pacific oysters*, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. Aquaculture Research, 2005, 36(1):86-93.
- [16] Gaffney P M, Bernat C M, Allen J K. Gametic incompatibility in wild and cultured populations of eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin) [J]. Aquaculture, 1993, 115(3-4):273-284.
- [17] Rio - portilla M A, Beaumont R A. Sperm concentration in the mussel *Mytilus edulis* L.: a spectrophotometric measurement protocol [J]. Aquaculture International, 2008, 16(6):573-580.
- [18] 管卫兵,杨牧川,王成辉. 分光光度法测定两种蟹类精子密度的研究[J]. 水产学杂志, 2012, 25(1):35-37, 57.
- [19] 丁瑞华. 四川鱼类志 [M]. 成都:四川科学技术出版社, 1994.
- [20] Harris D A. Spectrophotometry & spectrofluorimetry: a practical approach [M]. New York: Oxford University Press, 1987:49-63.
- [21] Foote R H, Arriola J, Wall R J. Principles and procedures for photometric measurement of sperm cell concentration [C]//Proceedings of the Seventh Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. Columbia, MD, USA, 1978:55-61.
- [22] Dong Q, Eudeline B, Allen S K, et al. Factors affecting sperm motility of tetraploid Pacific oysters [J]. Journal of Shellfish Research, 2002, 21:719-723.
- [23] Paniagua - Chavez C G, Buchanan J T, Tiersch T R. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm [J]. Journal of Shellfish Research, 1998, 17(1):231-237.
- [24] Chia F S, Bickell L R, et al. Spermatogenesis and sperm function [M]//Adiyodi K G, Adiyodi R G, Echinodermata. Reproductive biology of invertebrates; Volume II. New York: John Wiley and Sons Ltd, 1983:545-620.
- [25] 蔡明夷,柯才焕,王桂忠,等. 九孔鲍精子短期保存技术研究 [J]. 海洋科学, 2008, 32(1):1-5.

更正:《江苏农业科学》2013 年第 41 卷第 11 期 151-153 页所刊论文《一种 NSCT 域改进阈值函数的杂草图像去噪方法》,第二作者刘强的单位更正为:2. 中铁十六局集团北京工程有限公司,北京 100018。特此更正,并向作者致歉。

《江苏农业科学》编辑部