

采克俊,周志金,曹 访,等.长吻鲩精子超低温冷冻保存[J].江苏农业科学,2015,43(10):290-291.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.093

长吻鲩精子超低温冷冻保存

采克俊¹,周志金²,曹 访¹,朱俊杰¹,李景芬¹,叶金云¹

(1.湖州师范学院生命科学学院,浙江湖州 313000;2.浙江省湖州市水产技术推广站,浙江湖州 313000)

摘要:以精子活力为研究指标,比较二甲亚砷、甘油、甲醇、乙二醇、丙二醇、乙二醇甲醚 6 种不同抗冻剂、平衡时间、熏蒸高度对长吻鲩(*Leiocassis longirostris*)精子超低温冷冻保存的影响。防冻液组合为:10% 乙二醇甲醚/HBSS 条件下平衡 30 min,熏蒸高度为 11 cm 时,长吻鲩的冻精活力最高。

关键词:长吻鲩;精子;超低温冷冻保存;活力;平衡时间;熏蒸高度;乙二醇甲醚

中图分类号:S961.2⁺2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0290-02

鱼类种质资源是进行优良苗种培育、遗传改良和水产养殖业可持续发展的重要物种基础^[1],而由于环境恶化以及人类的过度捕捞等原因,导致鱼类种质资源匮乏。目前,超低温冷冻保存是保存物种的有效方式^[2]。由于鱼卵和胚胎体积大、卵膜通透性差、卵黄含量高、含水量多、冷冻保存不易,相比之下,鱼类精子的超低温冷冻保存更易成功^[1-3]。长吻鲩(*Leiocassis longirostris*)作为一种新近开发的淡水经济鱼类,具有重要的经济价值^[4],其精子冷冻保存未见文献报道,因此笔者进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用鱼均来自当地育苗场,选取健康状况良好、体表无伤、无病且性成熟的鱼类作为试验鱼。

1.2 试验药品与试剂

6 种抗冻剂二甲亚砷(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)购于 Amresco 公司,其他药品均为国产分析纯。

1.3 稀释液的配制

HBSS(汉克平衡盐溶液)的配制:用电子天平称取 7.896 g NaCl、0.396 g KCl、0.195 g MgSO₄·7H₂O、0.072 g Na₂HPO₄·12H₂O、0.054 g KH₂PO₄、0.345 g NaHCO₃、0.99 g 葡萄糖,溶于 1 000 mL 纯水中^[5]。

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,放在 Eppendorf 管中并立即置于 4 ℃ 冰箱内,防止精子活力下降。

1.4.2 精子质量活力的检测 精液外观质量检查:乳白色,无血污和粪便污染。在载玻片上滴 10 μL 纯水,取 5 μL 鲜精于纯水中,立即用显微镜观察其活力,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 85% 以上的精液才用于试验。

1.4.3 精子冷冻保存筛选

1.4.3.1 不同抗冻剂及其浓度对精子冷冻保存的影响 选取 6 种抗冻剂,添加浓度为 5%、10%,稀释液为 HBSS,精液与防冻液稀释比为 1:2,混合液分装至麦管中,每支麦管装 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 100 单位渗透压 HBSS 激活后,在显微镜下检测冻精活力。筛选结果显示,10% DMSO 和 10% 乙二醇甲醚的冷冻保存效果较佳。

1.4.3.2 不同平衡时间对精子冷冻保存的影响 4 ℃ 平衡时间设定为 5、15、30、45、60、75 min,选取的防冻液为 10% DMSO/HBSS 和 10% 乙二醇甲醚/HBSS。

1.4.3.3 液氮熏蒸高度对精子冷冻保存的影响 稀释液选用 HBSS,抗冻剂选用 10% HBSS 和 10% 乙二醇甲醚。熏蒸高度分别为 3、5、7、9、11 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 6 s;用 100 单位渗透压的 HBSS 激活,在显微镜下检测冻精活力。

1.4.3.4 数据处理 数据用“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(one-way, ANOVA),*P* < 0.05 表示差异显著;图表使用 Origin 7.5 绘制。

2 结果与分析

2.1 不同防冻剂及其浓度对长吻鲩精子冷冻保存的影响

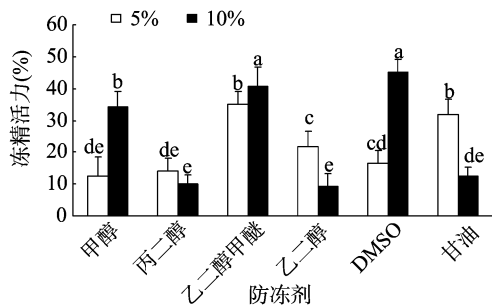
不同防冻剂及其浓度对长吻鲩精子冷冻保存的影响如图 1 所示。在熏蒸高度为 7 cm、平衡时间为 30 min 的条件下,当渗透性防冻剂浓度为 5% 时,乙二醇甲醚对长吻鲩精子的冷冻保存作用最佳,长吻鲩冻精活力达 35.00% ± 4.47%;当渗透性防冻剂浓度为 10% 时,作用效果最好的是 DMSO,精子活力达(45.00 ± 4.47)%。所以,筛选出来的最佳防冻液为

收稿日期:2014-09-25

基金项目:国家科技基础条件平台建设运行项目;浙江省科技创新团队项目(编号:2012R10026_01、2012R10026_05);浙江省钱江人才计划(编号:2012R10076);浙江省湖州市一般科研计划(编号:2012YN14)。

作者简介:采克俊(1975—),男,安徽来安人,博士,副教授,研究方向为淡水鱼繁育。E-mail:caikejun@hutc.zj.cn。

通信作者:叶金云,研究员,研究方向为水生生物学与水环境。E-mail:yjy@hutc.zj.cn。



不同的字母表示差异显著($P < 0.05$)。图2、图3同

图1 不同渗透性防冻剂对长吻鮠冻精活力的影响

10% DMSO + HBSS 和 10% 乙二醇甲醚 + HBSS。

2.2 不同防冻剂和熏蒸高度对长吻鮠精子冷冻保存的影响

不同防冻剂和熏蒸高度对长吻鮠精子冷冻保存的影响如图2所示。在防冻液组合为 10% DMSO + HBSS、熏蒸高度为 7 cm 时,长吻鮠的冻精活力最高,为 $(49.00 \pm 3.19)\%$;在防冻液组合为 10% 乙二醇甲醚 + HBSS、熏蒸高度为 11 cm 时,长吻鮠的冻精活力最高,为 $(52.00 \pm 4.32)\%$ 。

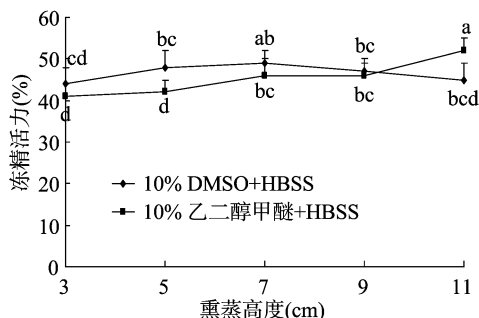


图2 熏蒸高度下对长吻鮠冻精活力的影响

2.3 不同防冻剂和平衡时间对长吻鮠精子冷冻保存的影响

不同防冻剂和平衡时间对长吻鮠精子冷冻保存的影响如图3所示。在防冻液组合为 10% DMSO + HBSS、熏蒸高度为 7 cm、平衡时间为 30 min 时,长吻鮠的冻精活力最高,为 $(40.00 \pm 3.16)\%$;在防冻剂组合为 10% 乙二醇甲醚 + HBSS、熏蒸高度为 11 cm、平衡时间 30 min 时,长吻鮠的冻精活力最高,为 $(43.00 \pm 5.16)\%$ 。

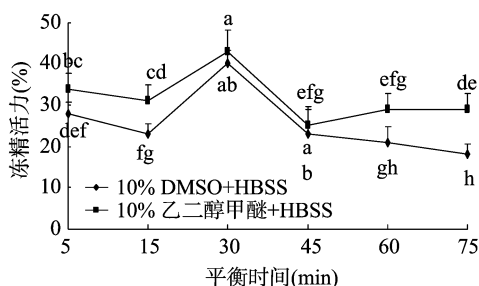


图3 平衡时间下对长吻鮠冻精活力的影响

3 结论与讨论

长吻鮠是一种名贵的淡水经济鱼^[6],主要分布于长江流域,而随着社会的需求日益增加和过度捕捞,导致其资源量迅速锐减^[6]。目前规模化苗种生产单位多采用解剖精巢取精的方式进行人工授精,但繁殖效率依然不高,开展精子超低温冷冻保存研究不仅可以极大地促进长吻鮠工授精研究,而且

对于鱼类资源保护和遗传改良具有重要意义。

超低温冷冻保存,能够使精子的运动完全停止,保证生命以静止的状态保存下来^[3,7-8],从而达到长期保存的目的。在冷冻之前,鱼类精子必须先保存于防冻液中,因此筛选防冻液是鱼类精子冷冻保存中的一个重要步骤,也是研究最多的一个领域。防冻液由稀释液和抗冻剂组成,报道的鱼类精子冷冻的稀释液已经多达几十种^[8],本研究以 HBSS 为稀释液,HBSS 渗透压为 300 mOsm/kg,属于等渗^[5]。在相关长吻鮠精子的人工授精报道中,精子保存液渗透压接近 380 mOsm/kg^[9],与本试验采用的 300 mOsm/kg 的 HBSS 相差较大。因此,还需要进一步研究稀释液的渗透压对长吻鮠精液冷冻保存的影响。

加入适当的抗冻剂,可以提高精子渗透压,降低冰点,有效减少精子冷冻保存过程中带来的冰晶损伤。由于抗冻剂本身对细胞有毒害作用,而不同种类的鱼类精子的生理特性具有很大差异。因此,确定最适的抗冻剂种类和浓度非常重要^[3,7-8]。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^[8],通常当其浓度达到 10% 时对鱼类精子的冷冻保存效果最佳,此外本研究还发现乙二醇甲醚的效果较好。

渗透性抗冻剂渗入精子需要一段时间,因此在冷冻之前,将精液置于 4℃ 下平衡一段时间对鱼类精子冷冻非常。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多控制在 10~60 min 之间^[2,8]。对于长吻鮠精子冷冻,最佳平衡时间都为 30 min。

慢速降温法有利于鱼类精子对低温的适应,能在冻结前充分脱水,减少冰晶形成,安全越过 -15~-60℃ 这段危险温度区;但是如果降温速率太慢,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,因此应筛选适宜的熏蒸高度对精子进行冷冻保存。结果表明,当熏蒸高度为 11 cm 且防冻液为 10% 乙二醇甲醚时,精子冷冻保存效果最佳。

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.
- [3] Robles V, Cabrita E, Paz H M. Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species[J]. Zebrafish, 2009, 6(3): 281-293.
- [4] 宋信华. 长吻鮠人工繁殖技术[J]. 渔业致富指南, 2002(3): 39-40.
- [5] Huang C J, Sun C L, Su X Y, et al. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies - a generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae[J]. Cryobiology, 2009, 59(3): 351-356.
- [6] 陈萍. 长吻鮠人工高产养殖技术[J]. 现代农业科技, 2009(22): 317, 319.
- [7] Cabrita E, Sarasquete C, Martinez - Paramo S, et al. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2010, 26(5): 623-635.
- [8] 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.
- [9] 万全, 沈保平, 孙文贤, 等. 长吻鮠精子保存液在人工授精中的应用试验[J]. 水产养殖, 2006, 27(3): 4-6.