

马氏珠母贝精子低温保存主要影响因素的研究

余祥勇, 王梅芳, 陈钢荣, 刘雅靖, 张春芳

(湛江海洋大学 珍珠研究所, 广东 湛江 524025)

摘要: 采用二甲基亚砷(DMSO)和甘油作为抗冻剂,以海水或体液等为基础液,配制体积分数为6%、8%、10%和12%的抗冻保护液.将马氏珠母贝精液和抗冻保护液以1:2、1:5、1:10和1:20(体积比)混合后,置4℃中平衡30和60 min,再于-18℃中冷冻4、24和72 h,解冻后观察精子的活动状态和受精率.结果表明,抗冻剂种类、体积分数以及精液与保护液的比例对精子的活动状态有很大的影响;4℃的平衡时间对精子的存活率影响不显著,但对受精率却有明显的影响.在-18℃时,精液和抗冻保护液体积比1:20, DMSO体积分数为10%和12%的两组保存效果较好.精子存活率随着保存时间的增长而降低,但基础液的类型对精子受精率没有明显影响.

关键词: 马氏珠母贝; 精子; 低温保存; 影响因子

中图分类号: S968.31

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0096-04

Studies on main factors influencing cryopreservation of spermatozoa of *Pinctada martensii*

YU Xiang-yong, WANG Mei-fang, CHEN Gang-rong, LIU Ya-jing, ZHANG Chun-fang

(Pearl Research Institute, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol was used as antifreezers for preserving the sperm of *Pinctada martensii* at lower temperature, and boiled seawater, body fluid of *Pinctada martensii*, mixture of body fluid and seawater were selected as basic solution to dilute the antifreezer at volume fractions of 6%, 8%, 10% and 12%, respectively. After mixed with diluent at the ratio of 1:2, 1:5, 1:10 or 1:20, sperms of *Pinctada martensii* were frozen at 4℃ for 30 or 60 min, then at -18℃ for 4, 24 or 72 h. When the sperms were thawed at room temperature, their activity and fertilizing capability of the sperms were checked. The results revealed that different antifreezers, their volume fractions as well as the ratios of sperms versus protection had significant effects on the activity, fertilizing capability of spermatozoa. The duration of balancing at 4℃ had no marked effect on survival rate of sperms but altered inseminating rate of sperms obviously. Two groups, in which the volume fractions of DMSO were 10% and 12%, respectively, achieved better results after diluted sperms were preserved at -18℃ with the proportion of sperms and diluent antifreezer at volume ratio 1:20. Observations showed that sperm survival rate decreased when the preservation time prolonged, but the change of sperm inseminating rate in different basic solutions was not significant.

Key words: *Pinctada martensii*; sperm; cryopreservation; influencing factors

自1949年英国的 Polge 等成功地利用甘油冷冻保存动物精子以来,乙二醇(EG)、丙二醇、二甲基亚砷(DMSO)等相继被发现有很好的防精子冻伤效果^[1].动物精子在0~4℃低温保存最多只有几十天的时间,而置于-196℃的液氮中,保存数月甚至年后解冻,其受精能力仍能恢复^[2].目前贝类种质低温

保存研究则刚刚起步,国内在贝类精液冷冻保存方面所做的工作较少^[3-5].马氏珠母贝是我国海水珍珠生产最主要的物种,其良种选育工作已取得一些进展^[6-7].本文就马氏珍珠贝精液低温冷冻保存的基础液、2种常用抗冻剂(二甲基亚砷和甘油)的合适浓度及对精子活动和受精的影响、精子与抗冻保护

液适宜比例等进行摸索, 考虑到海水养殖场大多偏远而不便使用液氮, 故在普通冰箱所能达到的 4 和 -18 °C 2 个温度下, 对精子冷冻保存影响因素开展研究, 以期日后超低温保存的工作提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

马氏珠母贝取自湛江海洋大学流沙珍珠基地, 在实验室暂养备用。剖开后收集外套液置于 4 °C 保存备用, 并选择成熟饱满的雄贝, 从性腺吸取精液用于试验。

1.2 基础液和不同体积分数抗冻剂的配制

所用基础液 3 种: a、海水; b、外套液; c、外套液与海水 1:1 (体积比) 的混合液。抗冻剂为二甲亚砜 (DMSO) 和甘油, 用 3 种基础液分别配制体积分数为 6%、8%、10% 和 12% 的 DMSO 及甘油抗冻保护液, 置 4 °C 预冷备用。

1.3 不同稀释倍数的精液样品制备

从雄贝性腺取少量精子经氨海水刺激后镜检, 选择精子活力好的精液与抗冻保护液按 1:2、1:5、1:10、和 1:20 (体积比) 稀释, 作为试验组样品; 对照组中, 精液用不含抗冻剂的海水按 1:20 (体积比) 稀释。稀释样品摇匀后, 分别分装于 1.5 mL 的塑料冻存管中, 1 mL/管。

1.4 抗冻剂的毒性与保护效应估测

将试验组和对照组 (未加抗冻剂) 样品分 2 组 (每组平行重复 3 次), 第 I 组于 4 °C 中分别放置 4、24、72 h, 第 II 组于 4 °C 中分别平衡 30、60 min, 再置于 -18 °C 中分别冷冻 4、24、72 h。

1.5 解冻及解冻后精子活力的检测

经过 -18 °C 冷冻, 取出后马上在 35 °C 水浴中解冻, 取少许精液, 滴加氨海水激活, 依据精子的活动情况估计精子存活率 (观察 3~5 个视野取平均值)。有精子存活的组别用常规方法受精, 观察胚胎发育, 在 2 h 后计算受精率。

2 结果与分析

2.1 抗冻剂种类及精液稀释倍数对保存效果的影响

样品经 4 °C 平衡 30 min (或 60 min)、-18 °C 冻存 4 h (或 24 h)、解冻后, 镜检发现, 不同的抗冻剂、不同的稀释倍数对精子的保存效果有明显差异, 结果见表 1。

试验结果表明, 在平衡时间、冻存及解冻方式相同的条件下, 甘油和 DMSO 的效果有所不同: 以甘油为抗冻剂的所有组别, 均出现絮状凝结, 显微观察,

絮状物为不活动的精子集聚而成; 以 DMSO 为抗冻剂, 1:2 和 1:5 稀释组也有絮状凝结的现象, 而 1:10 和 1:20 稀释的组别基本正常, 1:20 时精子活力更好。这说明甘油对马氏贝精子冻存有不良影响, 而 DMSO 抗冻保护作用较好, 但在精液太浓 (稀释倍数小) 时, 其作用也不明显。

表 1 2 种抗冻剂及精液稀释比例对保存效果的影响¹⁾

Tab. 1 The effect of two antifreezers and dilution ratios of sperm on cryopreservation

精液:保护液 sperm:diluent (V:V)	φ(DMSO)/%				φ(甘油 glycerol)/%			
	6	8	10	12	6	8	10	12
1:2	×	×	×	×	×	×	×	×
1:5	×	×	×	×	×	×	×	×
1:10	×	√	√	√	×	×	×	×
1:20	√	√	√	√	×	×	×	×

1) × 有絮状物形成, 无存活的精子; √ 无絮状物, 有存活的精子; 保护液均用 3 种基础液配制, 其结果一致

2.2 不同体积分数 DMSO 抗冻保护液对保存效果的影响

精液样品加入不同体积分数的 DMSO 抗冻液, 在 4 °C 平衡 30 min, -18 °C 冻存 4 h, 解冻后进行观察, 结果 (表 2) 表明 DMSO 体积分数低于 10% 时, 对精子的保护作用较弱。

表 2 不同体积分数 DMSO 抗冻保护液的保存效果¹⁾

Tab. 2 The effect of various dilution ratios of DMSO antifreezer on cryopreservation

检测项目 inspect subjects	φ(DMSO)/%			
	6	8	10	12
肉眼观察 with naked eye	√	√	√	√
镜检 under microscope	×	×	√	√
存活率 survival rate/%	< 5	< 10	80	80

1) × 表示有絮状物; √ 表示无絮状物。精液:抗冻保护液 (体积比)=1:20

2.3 4 °C 平衡时间对精子保存效果的影响及 DMSO 的毒性

经过 4 °C 平衡后镜检发现, 当精液:抗冻液 (体积比) 为 1:20 时, 不论 DMSO 的体积分数是多少, 30 和 60 min 的平衡时间对精子的存活率没有明显的影响 (均为 95% 以上); 两试验组间的精子活动能力也并无明显差别, 而与对照组相比略有下降。

经过 -18 °C 冷冻 4 h 后, 均有 80% 的精子存活, 但在 4 °C 平衡了 60 min 的组别, 精卵混合后 2 h 观察的受精率却极低 (图 1)。这说明 4 °C 平衡时间的长短 (30 和 60 min) 对 -18 °C 冻存精子的受精能力有明显影响。4 °C 冷冻 4 h 后, DMSO 的添加与否, 精子存

活率无明显差异;而4℃冷冻24 h后,精子存活率有差异(表3)。

表3 4℃精子在不同体积分数的DMSO中保存不同时间的存活率¹⁾

Tab. 3 At 4℃ the survival rates of sperms after different durations of cryopreservation in various ratios of DMSO %

t(保存 preserve)/h	φ(DMSO)/%				对照(天然海水) control(seawater)
	6	8	10	12	
4	99	99	95	95	100
24	90	85	85	85	99
72	20	20	25	20	55

1) 精液:保存液(体积比)=1:20;不同体积分数的DMSO用天然海水配制

结果表明,在4℃下平衡30 min~24 h,精子的存活率都只有轻微下降,但样品在4℃下平衡60 min后,受精率已显著下降,说明精子受精能力随着平衡时间延长而受到DMSO损害明显加大。

2.4 2种温度下冷冻的保护与损伤效应

在4与-18℃冷冻温度下,精子的存活率随冷冻时间的延长而降低(表4)。

表4 2种冷冻温度下精子存活率的比较¹⁾

Tab. 4 Survival rates of sperms at two different cryopreservation temperatures

t(冷冻 frozen)/h	试验组存活率/%		对照组存活率/%
	survival rate of tested groups		survival rate of controls
	4℃	-18℃	-18℃
4	95	80	10
24	85	70	0
72	20	<5	0

1) 精液:保存液(体积比)=1:20;4℃平衡30 min;DMSO的体积分数为10%

在-18℃下,与对照组比较,反映出抗冻剂对精子有明显的保护作用,4~24 h的精子存活率在70%以上,而对照组冷冻24 h,已没有存活的精子;但对照组冷冻4 h时,尚有10%的存活率,可能此时精子原生质水分还没全部结冰,还有少量受损害较小的精子具有活动能力。

比较试验组在4与-18℃下的结果,可以看出,在4~72 h冷冻时,-18℃比4℃对精子存活率影响要大得多,可能在-18℃下,即使加抗冻剂,还是有部分精子原生质(如质膜外层)水分结冰,从而对精子造成损害。

2.5 不同DMSO体积分数及平衡时间对受精率的影响

精液:保护液按1:20(体积比)稀释后,放置在4

℃下分别平衡30、60 min,再移入-18℃中冷冻4 h,35℃解冻,镜检后发现,体积分数为10%和12%的DMSO保护液中,各组精子存活率都在80%以上;在4℃的平衡时间为30 min的样本受精率都在25%左右;若平衡60 min,各组的受精率均降到1%左右,即样品在4℃下平衡30 min的效果均优于平衡60 min;在4℃平衡30 min时,DMSO体积分数12%比10%的抗冻效果好(图1)。

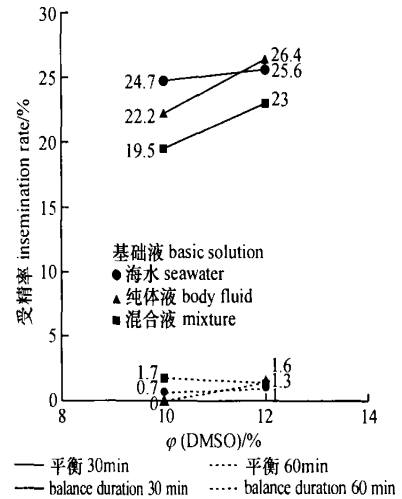


图1 不同DMSO体积分数及平衡时间对受精率的影响

Fig. 1 Effects of different basic solutions volume fraction of DMSO and balance duration on insemination rate

综合上述结果,并考虑保护液的配制简单、毒性小等因素,选择海水为基础液配制体积分数为10%~12%的DMSO,在4℃下平衡30 min再冷冻,可收到较好的低温保存效果。

3 讨论

3.1 基础溶液和抗冻剂对保存效果的影响

在配制抗冻保护液的基础溶液中,通常认为添加磷脂、糖类、蛋白质和维生素等物质会增强精子的抗冻能力.本试验选用外套液作为基础溶液组分,主要考虑到它是珍珠贝的分泌物,除了已经知道的营养和抗菌作用外,推测也和性腺内体液一样不会对精子有激活作用.通常认为海水与体液的pH值、渗透压和溶解氧等差异会使进入海水的精子激活^[8],但据喻达辉等^[9]的研究,精子在pH8.0的自然海水中不能被激活;笔者的多次试验也支持这个结果:珍珠贝的精子与海水接触后0.5 h内均观察不到精子的活动.在用外套液和海水混合液(1:1)作为基础溶液时,复活后的受精率和发育情况更好些,出现这样的差别,可能是外套液中的一些营养成分也有增加精子抗冻能力的作用.由于本试验只是精子超低温冷冻前期工作,外套液适宜的采集方式和使用配

还需进一步摸索。

在马氏珠母贝精液中加入含甘油或 DMSO 的抗冻液后, 镜检发现精子运动能力均下降。有研究表明甘油可造成哺乳类精子损伤^[10], 而 DMSO 渗透力强、亲水性好, 能使原生质保持水分并降低其冰点, 保护效果优于甘油^[11]。在本试验中, 添加 DMSO 的组别在 4 °C 冷冻 24 h 后, 还有 85% 精子存活, 表明在较短的时间里, DMSO 对精子的损害不严重; 但在 4 °C 冷冻 72 h 后, 只有约 20% 的存活率, 而对照组有超过 50% 的存活率, 则表明 DMSO 的毒害作用随着接触时间的延长而明显增大。DMSO 对精子有毒性但又有较好防冻效果的双重特性, 需要 DMSO 有一个适宜使用浓度, 既能起到良好的抗冻作用, 又不会导致精子损伤。杨爱国等^[3]发现浓度 8% ~ 10% 的 DMSO 对扇贝的精子保护最好。笔者的试验也表明, 体积分数 10% ~ 12% 的 DMSO 可对马氏珠母贝的精子有较好的抗冻保护作用。

3.2 降温平衡和精子保存温度

精液和抗冻剂混合后在低温 (0 ~ 10 °C) 中平衡的目的是使抗冻剂充分渗透。笔者发现平衡 60 min 的组别的受精率明显比 30 min 的低。本试验表明, 精子稀释后在 4 °C 平衡时间太长会产生较大的危害。对比 4 °C 平衡 30 和 60 min 结果, 发现虽然解冻后的精子存活率无明显区别, 但受精率对比表明, 平衡时间的延长损害了精子的受精能力, 这也说明活动着的精子并不一定就具有受精功能。

本试验采用了 4 和 -18 °C 2 种温度, 一方面这是偏远养殖场取样和前期处理中用普通冰箱就可以达到的温度, 另一方面 -18 °C 也是添加抗冻剂前后, 精子内外水分结冰与不结冰的温度。笔者希望通过比较 2 种温度下, 加入抗冻剂前后的精子活动和受精状况, 来确定超低温冷冻前的适宜平衡程序。根据李贺等^[5]的研究, DMSO 在 4 °C 以上对精子会产生较大的毒害作用, 当温度下降到 2.5 °C 时它对精子的

毒害会大大的降低。而 -18 °C 保存 72 h 存活率虽然比没有加抗冻剂的对照组高许多, 但并不比 4 °C 下保持的效果好, 推测 -18 °C 可能会减低 DMSO 毒性, 但这个温度对精子也有不利影响。

综合试验的结果, 笔者认为, 对于马氏珠母贝的精子保存而言, 十几个小时的保存, 应不加抗冻剂直接在 4 °C 放置, 而几天以至更长时间的保存, 应将精子用含有 DMSO 的保护液稀释后, 在 4 °C 下平衡不超过 30 min, 然后转入液氮冻存。

参考文献:

- [1] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998. 3-6, 30-33; 43-45.
- [2] 陈章波, 张建华, 雷淑芬, 等. 配子的冷冻原理及其在水产界的应用[J]. 中国水产, 1989, 44(3): 7-17.
- [3] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 624-628.
- [4] 李纯, 李军, 薛钦昭. 栉孔扇贝精子的超低温保存研究[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(1): 57-61.
- [5] 李贺, 王品虹, 贺桂珍, 等. 太平洋牡蛎精液的超低温保存[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2): 207-211.
- [6] 林岳光, 姜卫国. 三倍体和二倍体合浦珠母贝育珠比较的初步研究[J]. 热带海洋, 1993, 12(3): 90-94.
- [7] 王爱民, 阎冰, 叶力, 等. 马氏珠母贝不同地理种群内自繁和种群间杂交子一代主要性状的比较[J]. 水产学报, 2003, 27(3): 200-206.
- [8] 楼允东. 组织胚胎学[M]. 北京: 农业出版社, 1996. 295-298.
- [9] 喻达辉, 陈竞春, 苏天凤, 等. 合浦珠母贝精子的实验生物学初步研究[J]. 热带海洋, 1998, 17(1): 83-86.
- [10] 李新红, 顾孝连, 华修国, 等. 甘油浓度对蓝狐精子低温冷冻保存的影响及冻融前后精子的超微结构[J]. 动物学研究, 2003, 24(6): 421-428.
- [11] 柯亚夫, 蔡难儿. 中国对虾精子超低温保存的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(2): 187-192.

【责任编辑 柴焯】

(上接第 95 页)

- [5] 邱永敏, 刘金章, 程方, 等. 个体户猪场圆环病毒 II 型血清学调查[J]. 河南畜牧兽医, 2003, 24(6): 26-27.
- [6] 梁红虎, 罗满林, 刘镇明, 等. 检测猪圆环病毒 2 型的一种 PCR 方法[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2003, 24(3): 91-92.
- [7] TISCHER I, MIELDS W, WOLFF D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus[J]. Arch Virol, 1986, 91: 271-276.
- [8] 仇化吉, 童光志. 猪病研究新进展[J]. 畜禽业, 2002

(10): 6-8.

- [9] LIU Q, WILLSON P, ATTOH-POKU S, et al. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 fusion protein[J]. Protein Expr Purif, 2001, 21(1): 115-120.
- [10] BLANCHARD P, MAHÉ D, CARIOLET R, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins[J]. Vaccine, 2003, (21): 4 565-4 575.

【责任编辑 柴焯】