

# 黑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** 对黑鲷精子的超低温保存技术进行了初步探讨,黑鲷(*Sparus macrocephalus*)精子经过超低温保存后复苏率、存活率最高可以达到 61.37%和 61.4%。保存黑鲷精子时发生冷冻伤害的温度范围是 -20 ~ -60 °C,适宜的降温速率为 20 °C/min;使用抗冻剂 DMSO 的适宜浓度为 20%;样品体积对保存效果有相关性;利用自然海水激活冻精效果好于低盐度或高 pH 值的溶液;使用 20% DMSO 和 20 °C/min 降温速率处理,在液氮中保存黑鲷精子 66 d 后解冻,其复苏率和存活率分别为 59.81%和 58.45%。

**关键词** 黑鲷,精子,超低温保存

海洋生物种质细胞的低温保存最初是从保存海水鱼类精子开始的,经过几十年的研究发展已经取得了很大的成就,某些种类不仅能够长期低温保存,而且有很高的成功率。目前,冷冻保存研究主要集中在有开发利用价值的经济种类<sup>[1,2]</sup>,如虹鳟等。在我国,有关海水鱼类精子超低温保存工作尚未见有报道,本文对我国重要的海水鱼类养殖品种——黑鲷精子的超低温保存进行了初步的探讨。

## 1 材料和方法

实验用的黑鲷(*Sparus macrocephalus*)精子来源于本所实验用亲鱼。在 1999 年 5 月间选取性腺发育成熟的黑鲷雄鱼。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并防止尿液混入其中。取一点精液在海水中用海水稀释进行镜检,活力在 90%以上时进行实验。各种抗冻液配方及降温程序分别参见表 1 和图 1。

**表 1 超低温保存黑鲷精子的各种抗冻液配方**  
Tab. 1 Various of the anti-freezing agents for cryopreservation of *S. macrocephalus*

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

每次实验所用精液均取自同一尾鱼,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(最大容积 4 ml),样品最终体积为 0.4 ml。在 0 °C 水浴中平衡 2 min,用生物降温仪按不同降温程序对黑鲷精子进行超低温保存。样品保存 2 h 以上,取出在 35 ± 1 °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。冻精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,以此作为精子的成活率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黑鲷精子在不同降温速度和抗冻液条件下的超低温保存效果

不同的抗冻液 A<sub>1</sub> ~ A<sub>4</sub> 及 D<sub>1</sub> 与黑鲷精子混合后,分别按照降温程序 P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> 和 P<sub>4</sub> 进行超低温保存。对精子复苏比例和存活率的影响结果见图 2。

在 A<sub>4</sub> 抗冻液和降温速率为 P<sub>4</sub> 时,冻精解冻后的复苏比例和存活率达到最高,分别为 61.37% 和 61.4%。在同一种抗冻液条件下以 P<sub>4</sub> 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 A<sub>4</sub> 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使用 DMSO 的效果相似。在不同降温速率和抗冻剂浓度下对黑鲷冻精复苏比例影响的方差分析结果证明,降温

\* 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

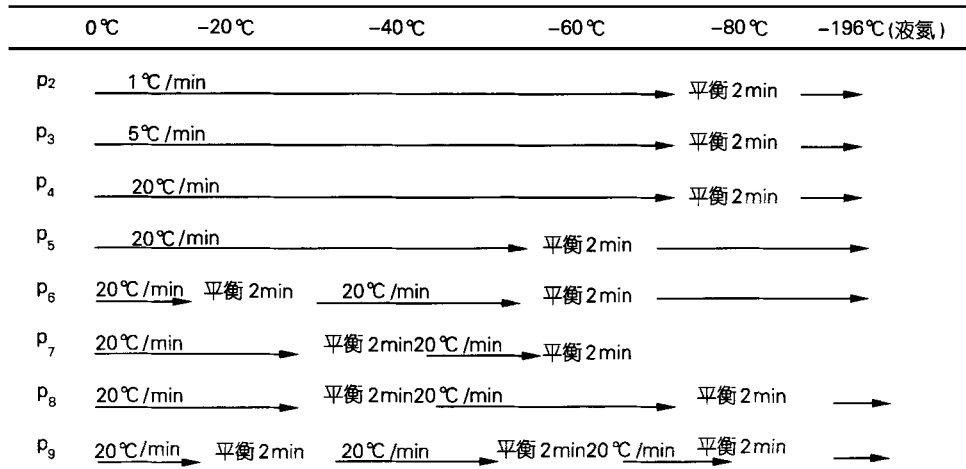


图 1 不同降温程序

Fig.1 Freezing procedure for cryopreservation of *Sparus microcephalus*

速率和抗冻剂浓度对冻精复苏比例影响是显著的 ( $P < 0.05$ )。

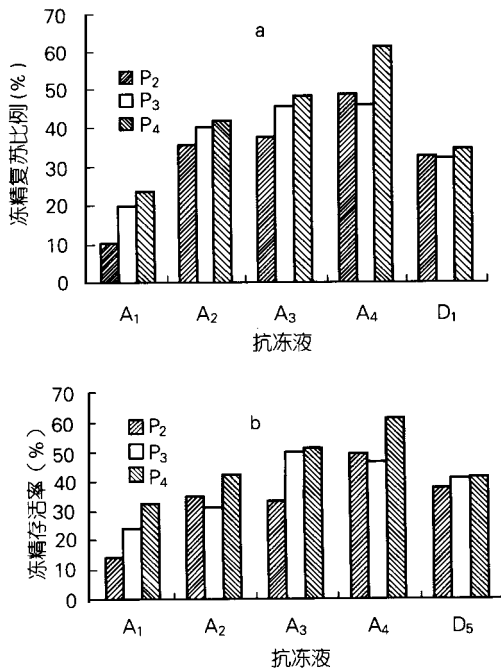


图 2 降温速度和抗冻剂对黑鲷冻精复苏比例 (a) 和存活率 (b) 的影响

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

## 2.2 样品体积对超低温保存黑鲷精子的影响

精子与 A<sub>4</sub> 抗冻液混合后按不同体积装入冷冻管中,按照 P<sub>4</sub> 降温程序进行超低温保存实验,结果发现保存效果与样品的体积有关.样品体积为 0.4 ml 或 1 ml 时冻精的复苏比例好于 0.2 ml.经过单因子方差分析,发现体积对冻精保存效果有影响,但不是非常显著 ( $0.01 < P < 0.05$ ).冻精存活率也是样品体积为 0.4 ml 或 1 ml 较好,体积为 0.2 ml 时最差,如图 3。

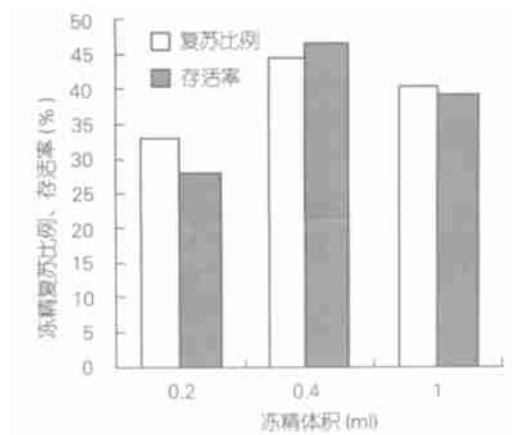


图 3 样品体积对黑鲷冻精复苏比例和存活率的影响

Fig.3 Effect of volume of samples on sperm motility and survival rate of *S. microcephalus*

### 2.3 不同降温方法对黑鲟精子保存效果的影响

精子与 A<sub>4</sub> 抗冻液混合后分别以 P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>8</sub>, P<sub>9</sub> 方法降温。解冻后发现以 P<sub>4</sub> 降温程序处理的精子其复苏比例、存活率高达 45.95% 和 48.21%，明显高于其他组。以 P<sub>6</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>8</sub>, P<sub>9</sub> 程序降温的两组由于在 -20℃ 或 -40℃ 停滞了一段时间，它们的保存效果很差，冻精的复苏比例和存活率分别为：12.62% 和 21.25%；9.85% 和 15.96%；15% 和 20%；10.5% 和 9.29% (图 4)。通过对冻精复苏比例结果的方差分析，发现在 -20℃ 或 -40℃ 停滞对保存效果影响非常显著 ( $P < 0.01$ )

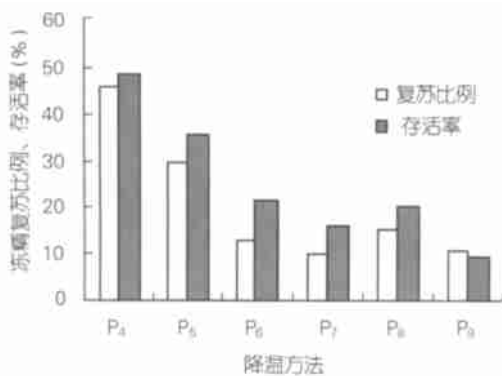


图 4 分阶段降温对黑鲟冻精复苏比例和存活率的影响  
Fig. 4 Effect of stepwise freezing on sperm motility and survival rate of *S. macrocephalus*

### 2.4 在不同溶液中激活黑鲟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<sub>3</sub><sup>+</sup> 消毒海水、IV 0.1% 氨水 + 消毒海水等 4 种溶液来激活黑鲟冻精。结果发现使用激活液 I、III 和 IV 对冻精复苏比例较好分别达到 45.95%、52.19% 和 45.34%；激活液 I、IV 使冻精存活率高达 48.21% 和 47.37% (图 5)。激活液 III 虽然使冻精有较高复苏比例，但存活率却较低，显微镜下观察也发现许多精子破裂甚至粘聚成团块状。

### 2.5 超低温保存时间对黑鲟精子复苏比例和存活率的影响

抗冻液 A<sub>4</sub> 与黑鲟精子混合后，按照 P<sub>4</sub> 降温程序进行超低温保存。精子在液氮中保存 66 d 后解冻激活，统计冻精的复苏率和存活率分别为 59.81% 和

58.45%，与保存 2 h 后就解冻的冻精复苏率和存活率 (61.37%、61.4%) 相比较没有显著差别，说明超低温保存黑鲟精子的时间长短对精子复苏率和存活率没有影响 (图 6)。

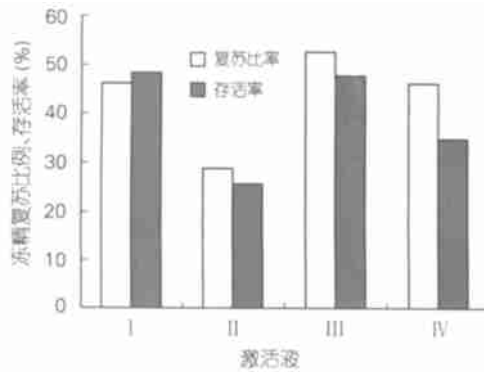


图 5 不同激活液对黑鲟冻精复苏比例和存活率的影响  
Fig. 5 Effect of reactivation solutions on sperm motility and survival rate of *S. macrocephalus*

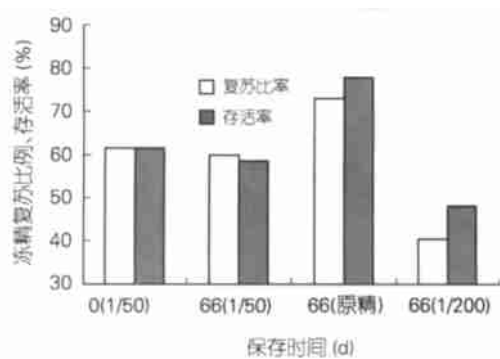


图 6 不同保存时间对黑鲟冻精复苏比例和存活率的影响  
Fig. 6 Effect of storage time on sperm motility and survival rate of *S. macrocephalus*

黑鲟精子冷冻保存后的复苏比例能够达到 50% 以上，这可能与鱼类精液排出体外后象陆生动物一样为高浓度的原精。虽然实验中经过 50 倍海水的稀释，但精液浓度还是非常高。Lubzens 等 1997 年用溶液稀释鲤鱼精子 5~50 倍对受精率没有影响。当稀释倍数在 500 倍以上时受精率明显降低。

### 参考文献

- 1 李纯, 李军, 薛钦昭. 海洋科学 2000, 24(4): 12~14
- 2 Chao N.H. and Liao I.C.. *Aquaculture*, 2001, 197: 161~189

# CRYOPRESERVATION OF SPERMATOZA OF BLACK PORGY

LI Chun LI Jun XUE Qirzhao

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

Received: Jul. 25, 2001

Key Words: *Sparus macrocephalus*, Spermatoza, Cryopreservation

## Abstract

In the present paper, attempting to develop simple, reliable and efficient methods for cryopreservation are reported. Cryopreservation of sperm cells of black porgy (*Sparus macrocephalus*) was investigated in liquid nitrogen. Motility and survival rate of 61.37% and 61.4% were obtained in cryopreservation of the spermatozoa of this species using a cryoprotectants dilution (DMSO 20% + sucrose 5%) and freezing rate 20 °C/min. The volume of samples can affect the result. The nature seawater is better than lower osmotic or high pH activator solution. The freezing damage occurred at -20 °C to -60 °C for *S. macrocephalus*. The motility and survival rate of sperm is 50.63% and 61.02% after storing 66 days in LN<sub>2</sub>.

(本文编辑:刘珊珊)