

三疣梭子蟹精子保存研究

周 帅^{1,2}, 朱冬发¹, 王春琳¹, 薛良义¹

(1. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 杭州二中树兰实验学校, 浙江 杭州 311100)

摘要: 于 2004 年 5 月到 2004 年 7 月对三疣梭子蟹精子进行了常温、低温和超低温保存研究。利用离子载体 A23187 人工诱导顶体反应以判断精子活力。常温 and 低温保存实验的结果显示, 4 ℃ 下无钙人工海水(calcium-free artificial sea water, Ca²⁺ FASW)保存 236 h 的精子有 25% 以上的成活率。在 4 ℃, 25 ℃ 两种温度与 Ca²⁺ FASW、天然海水(natural sea water, NSW)两种基础液构成的 4 种组合中, 最优组为 4 ℃、Ca²⁺ FASW, 最差组为 25 ℃、NSW。将精子浓度与 Ca²⁺ FASW 对照组及诱导组比较, 结果显示, 25 ℃ 和 4 ℃ 下, 精子浓度与对照组顶体反应率相关性不显著 ($P=0.068>0.05$, $P=0.265>0.05$), 与诱导组顶体反应率极显著相关 ($P<0.01$)。以二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)和甘油(Glycerol, G)作为抗冻剂进行超低温冷冻实验, 72 h 后解冻, 包括对照组在内的所有组均有 98% 以上的精子不经诱导就发生顶体反应。

关键词: 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*); 精子; 保存

中图分类号: Q959 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)07-0037-06

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)俗称白蟹, 是中国重要的大型海产经济蟹类, 对其精子的超微结构^[1]、顶体反应^[2], 前人已进行过较详细的研究, 但其精子保存的研究国内外迄今未见报道。

种质优选、雌核发育以及物种保护等研究都要涉及到精液保存。精液的长期保存, 可以保证基因长时间的稳定性, 打破时间和空间的限制, 保证精子能够不间断地供应, 也不需要较高的饲养亲本的花费, 大大提高了选择育种的可行性。迄今对十足目甲壳动物精子保存的研究并不多, 而且几乎全部是针对超低温保存的^[3-7], 常、低温保存的研究仅有锯缘青蟹^[8]一例。因此, 对三疣梭子蟹精子进行常温、低温及超低温保存的研究是很有必要的。

由于在生产上人们需要的不仅仅是活的精子, 更重要的是能够作为亲本与卵子结合的精子, 而发生顶体反应正是精卵结合的前提, 所以我们选用了诱导顶体反应法作为精子活力评价方法, 以客观地表示精子活力的情况。

1 材料和方法

1.1 精子处理

三疣梭子蟹于 2004 年 7~12 月购自宁波水产大

世界。每次解剖雌蟹 3 只(每只 300 g 左右), 从 6 个纳精囊中取出其中的白色精子团, 在无钙人工海水(calcium-free artificial seawater)Ca²⁺FASW 中轻轻搅拌使分散的精子释放出来, 研磨后在 1 000 r/min 下离心 10 min, 弃上清液, 用 Ca²⁺FASW 或 NSW(天然海水, natural sea water)将白色精子沉淀稀释到大约 10⁶ 个细胞/mL 备用。

1.2 诱导顶体反应法评价精子活力

离子载体 A23187 (Sigma 公司)先溶于 100% DMSO 再用 NSW 稀释成 200 mg/L 的工作母液, 置冰箱(4 ℃)保存备用。

将 A23187 工作液按终浓度 50 mg/L 加入精子悬液中, 反应 50 min 后用终体积分数 3.5% 戊二醛固定,

收稿日期: 2005-05-26; 修回日期: 2007-04-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40576068); 浙江省自然科学基金资助项目(Y305339)

作者简介: 周帅(1978-), 男, 山东青岛人, 硕士, 从事甲壳动物细胞生物学研究, E-mail: dranpig@yahoo.com.cn.; 朱冬发(1968-), 通讯作者, 副教授, 电话: 0574-87600165, E-mail: zhudongfa@nbu.edu.cn

以 Olympus BH-2 400 倍显微镜观察,并随机计数大约 200 个精子,平行 3 组。以发生顶体反应的精子占总计数精子的百分比作为顶体反应率。

1.3 低温及常温精子保存

1.3.1 以 NSW 作为基础液

将精子样 (NSW 为基础液) 分别置于 4 (低温) 和 25 (常温) 下保存,在 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 40, 52 和 72 h 取样,加入 A23187 诱导顶体反应,对照组不加 A23187。

1.3.2 以 Ca²⁺ FASW 作为基础液

将精子样 (Ca²⁺ FASW 为基础液) 分别置于 4 和 25 下保存,在 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 68, 80, 92, 116 和 236 h 取样,1 000 r/min 下离心 10 min,取白色精子沉淀,用 NSW 稀释至提取量,加入 A23187 诱导顶体反应,对照组用 Ca²⁺ FASW 稀释,不加 A23187。同时用血球计数板记录精子浓度,平行 3 组。

1.4 抗冷剂和超低温精子保存^[7]

预先用 Ca²⁺ FASW 配制抗冻剂 DMSO 和 G,设置 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 和 30% 共 5 个浓度梯度。将 0.15 mL 精子悬液和等体积的抗冻剂混合,使抗冻剂的终体积分数为 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5% 和 15%,平行 3 组。对照组 A 为不加抗冻剂的精子悬液,对照组 B 为不加抗冻剂含精子团的完整纳精囊。将样品转入 0.5 mL 离心管中,在生理温度 (23) 下平衡 10 min,镜检抗冻剂诱发的顶体反应率。制备的精子悬液体积为 300 μL/管,把样品放在液氮蒸气中慢慢下降 (10 min 以内),最后直接投入液氮中。保存 72 h 后,在室温下解冻。在解冻后的样品中加入 0.2 mL 的 Ca²⁺ FASW,然后在 1 000 r/min 下离心 10 min,再将精子沉淀在 0.3 mL 的 NSW 中重悬浮,加入 A23187 诱导顶体反应,对照组用 Ca²⁺ FASW 重悬浮,不加 A23187。

1.5 数据处理

文中所涉及到的百分率数据在统计过程中经过反正弦函数变化。实验数据使用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 精子低温及常温保存结果

2.1.1 以 NSW 作为基础液

以 NSW 为基础液保存精子,当保存温度为 4

时,对照组顶体反应率组内总体差异极显著 ($P < 0.01$),但其中保存 4 ~ 40 h 差异不显著 ($P = 0.153 > 0.05$);保存 8 ~ 52 h 差异不显著 ($P = 0.204 > 0.05$)。整个实验过程中 (72 h 内),诱导组反应率始终在 93.57% 以上,组内总体差异不显著 ($P = 0.307 > 0.05$) (图 1)。

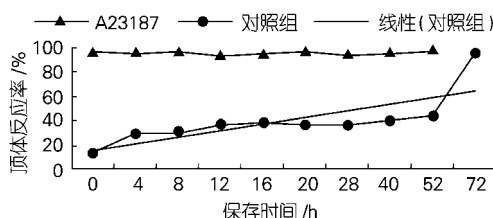


图 1 4 NSW 保存精子的成活率

Fig.1 Survival rate of spermatozoa extended by NSW at 4

当保存温度为 25 时,对照组顶体反应率组内总体差异极显著 ($P < 0.01$),其中保存 4 ~ 12 h 差异不显著 ($P = 0.503 > 0.05$)。诱导组反应率始终在 94% 以上,组内总体差异不显著 ($P = 0.341 > 0.01$) (图 2)。

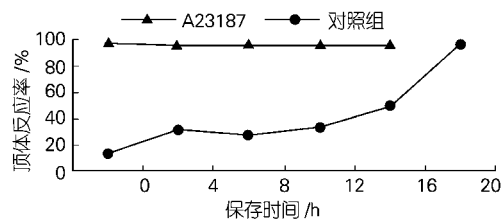


图 2 25 NSW 保存精子的成活率

Fig.2 Survival rate of preserved spermatozoa extended by NSW at 25

2.1.2 以 Ca²⁺ FASW 作为基础液

以 Ca²⁺ FASW 作为基础液保存精子,当保存温度为 4 时,对照组顶体反应率不超过 11%,组内总体差异极显著 ($P < 0.01$),除最后 1 组外,其它组差异不显著 ($P = 0.672 > 0.05$) (图 3)。诱导组组内差异极显著 ($P < 0.01$),其中保存 8 ~ 48 h 差异不显著 ($P = 0.054 > 0.05$);保存 16 ~ 68 h 差异不显著 ($P = 0.055 > 0.05$);保存 92 ~ 236 h 差异不显著 ($P = 0.099 > 0.05$)。

保存温度为 25 时,对照组顶体反应率不超过 35%,但变化幅度很大。组内总体差异极显著 ($P < 0.01$),但其中保存 16 h 与 24 h 差异不显著 ($P = 0.084 > 0.05$)。诱导组组内差异极显著 ($P < 0.01$),

其中保存 0 ~ 16 h 差异不显著 ($P=0.405>0.05$); 保存 16 ~ 32 h 差异不显著 ($P=0.056>0.05$) (图 4)。

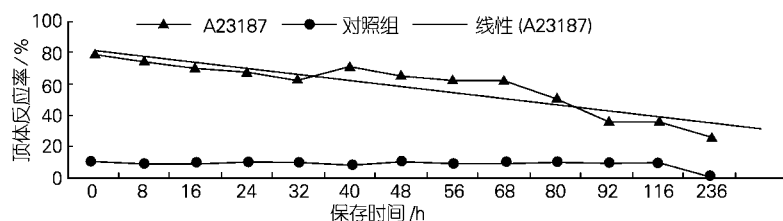


图 3 4 Ca^{2+} FASW 保存精子成活率

Fig.3 Survival rate of preserved spermatozoa extended by Ca^{2+} FASW at 4

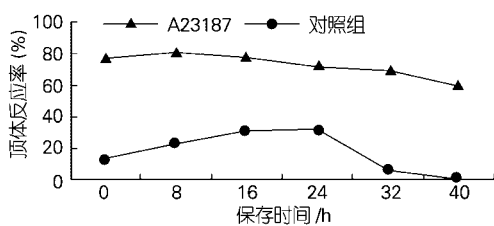


图 4 25 Ca^{2+} FASW 保存精子成活率

Fig.4 Survival rate of preserved spermatozoa extended by Ca^{2+} FASW at 25

方法做一个大致的排列:在两种温度与两种基础液的 4 种组合中,最优选择是 4、 Ca^{2+} FASW,其余依次为 4、NSW,25、 Ca^{2+} FASW 和 25、NSW。

2.1.3 精子浓度与诱导顶体反应率的关系

三疣梭子蟹精子保存在 Ca^{2+} FASW 中,4 下,236 h 精子浓度下降约 2.57 倍。组内总体差异显著 ($P=0.02<0.05$),但保存 0 ~ 32 h 差异不显著 ($P=0.087>0.05$);在保存过程中,从第 8 h 开始到第 236 h 精子浓度没有明显的下降 ($P=0.142>0.05$) (图 5)。保存温度 25 时,40 h 内精子浓度下降约 77.8 倍,组内差异极显著 ($P<0.01$) (图 6)。精子浓度与

我们按照保存时间及保存的稳定性将上述保存

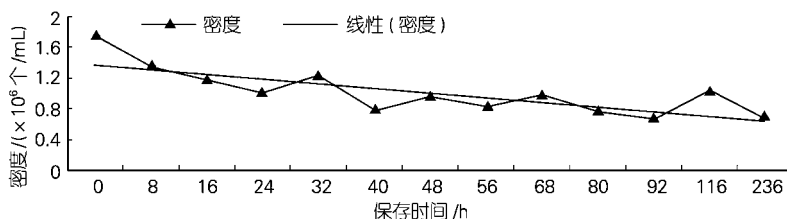


图 5 Ca^{2+} FASW 保存精子浓度

Fig.5 Concentration of spermatozoa extended by Ca^{2+} FASW at 4

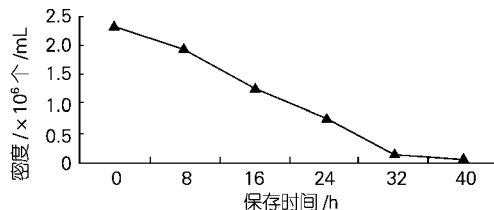


图 6 25 Ca^{2+} FASW 保存精子浓度

Fig.6 Concentration of spermatozoa extended by Ca^{2+} FASW at 25

对照组及诱导组比较的结果显示:25 下浓度与对照组顶体反应率的相关性并不显著 ($R=0.194$, $P=0.068>0.05$);与诱导组顶体反应率极显著相关 ($R=0.556$, $P<0.01$)。4 下浓度与对照组顶体反应率相关性不显著 ($R=0.033$, $P=0.265>0.05$);与诱导组顶体反应率极显著相关 ($R=0.242$, $P=0.001<0.01$)。结果说明:精子浓度的下降不会导致对照组精子顶体反应率的下降,但与诱导组顶体反应率的下降有很大的关系。

2.2 精子超低温保存结果

与对照组相比, DMSO 本身诱发的顶体反应率变化并不大(表 1)。包括对照组在内的各组精子解冻后不经诱导便有 98% 以上的顶体反应率(表 2)。说明超低温保存三疣梭子蟹精子在实际工作中可能还需要一些新的技术支持。

表 1 DMSO 诱发的精子顶体反应率

Tab.1 Rate of acrosome reaction induced by toxicity of DMSO

处理	DMSO 体积分数 (%)	顶体反应率 (%)
对照组	0	28.86
1	2.5	26.44
2	5.0	28.37
3	10.0	28.71
4	12.5	24.00
5	15.0	27.52

表 2 超低温冷冻保存精子顶体反应率

Tab.2 Rate of acrosome reaction of cryopreserved spermatozoa

处理	G 体积分数 (%)	DMSO 体积分数 (%)	顶体反应率 (%)
对照组 A ¹⁾	0	0	99.83
对照组 B ²⁾	0	0	100.00
1	0	2.5	99.03
2	0	5.0	100.00
3	0	7.5	100.00
4	0	10.0	100.00
5	0	12.5	99.52
6	0	15.0	98.33
7	2.5	0	98.51
8	5.0	0	99.50
9	7.5	0	98.50
10	10.0	0	99.00
11	12.5	0	99.02
12	15.0	0	99.00

注: 1) 对照组 A 为保存在 Ca²⁺ FASW 中的精子悬液未加任何抗冻剂投入液氮中; 2) 对照组 B 为将纳精囊连同里边包裹的精子团一同投入液氮

3 讨论

3.1 精子在不同温度、基础液中的活力

在以 NSW 为基础液的常、低温保存实验中, 对

照组精子最后均达到 90% 以上的顶体反应率, 而整个实验过程中, 诱导组精子顶体反应率始终在 90% 以上, 并没有任何活力下降的迹象; 以 Ca²⁺ FASW 为基础液, 将精子保存在 4 h 以内, 诱导组顶体反应率 80 h 以内保持在 49% 以上, 而到第 236 h, 保持在 25% 以上。以 Ca²⁺ FASW 为基础液, 保存温度为 25 ℃, 精子浓度在 40 h 内下降约两个数量级, 近 80 倍, 光镜下很难按原浓度观察, 须经浓缩处理。诱导组顶体反应率全程均在 59% 以上。实验结果说明三疣梭子蟹精子活力很强, 常温及低温保存不易失去顶体反应活性, 但同时我们可以看出, 以 NSW 为基础液时, 保存结果均为对照组中 90% 以上的精子发生顶体反应, 这种顶体反应的暴发导致其不能再作为生产上人工受精的材料; 保存在 25 ℃、Ca²⁺ FASW 中的精子失去作用的主要原因是浓度的骤减, 这使该条件保存的精子在生产上变得无意义。

3.2 抗冻剂及其毒性

果糖、脯氨酸、海藻糖及乙烯甘油等均可作为甲壳动物精子保存的抗冻剂, 最常用的是 DMSO 和 G^[3-7]。Bhavanishankar 等^[7]研究发现, 锯缘青蟹精子对 G 比对 DMSO 和乙烯甘油(EG)有更高的忍受能力, 这可能是由于 G 系蟹类脂肪代谢的中间产物^[5]。有时冷冻剂的联合使用可以产生更好的结果, 例如: 单独使用海藻糖对青蟹精子的保护作用不是很好, 但和 DMSO 联合使用时, 精子存活率大大提高^[5]。

一般认为, 抗冻剂毒性会降低精子的成活率, 导致精子顶体反应不能全部发生^[6-7]。但管卫兵等^[8]利用体积分数为 5% 的 DMSO 对青蟹精子进行 4 h 低温保存, 其结果优于对照组。

本研究对三疣梭子蟹精子的超低温保存结果显示, 在平衡阶段, DMSO 的存在诱发的精子顶体反应与对照组并无很大差异, 这与管卫兵等^[8]的实验结果很相似。

3.3 外界因素对精子的刺激

3.3.1 机械力

摩擦挤压等机械力会诱发三疣梭子蟹精子的顶体反应, 一般顶体反应率在 5% ~ 30% (随机抽样计数)。这不同于锯缘青蟹^[9]而与中华绒螯蟹^[10]类似, 设想在自然条件下, 精子接触卵膜可能会触发反应。

3.3.2 酶

酶消化法是十足目甲壳动物精子的获取方法之一。用链霉蛋白酶处理过的精子变得敏感, 发生完全

顶体反应的百分率升高^[7,9]。Griffin 和 Clark^[11]猜想,蛋白酶可能结合到与膜相连的物质上,在 *Sicyonia ingentis* 中促使离子浓度变化,并伴随顶体丝伸长。

3.3.3 Ca²⁺

一般认为,在有 Ca²⁺的溶液中,例如 NSW,精子会发生不同程度的顶体反应。利用 NSW 作为基础液保存三疣梭子蟹精子,4 h 内精子顶体反应率会提高 1 倍左右,之后维持上升趋势,但相对较缓,实验最终以精子不经诱导而全部发生顶体反应结束。与之相比,基础液用 Ca²⁺FASW 保存精子的时间更长,在 Ca²⁺FASW 中,对照组顶体反应率相对较为稳定,实验的结果是诱导组顶体反应率下降(4 组)或精子浓度下降(25 组),与 NSW 并不一致。

不同月份中华绒螯蟹精子被 NSW 诱导的顶体反应率差异很大,但始终比不含 Ca²⁺的 NaCl 诱导率高。12 月份采集的精子顶体反应率 1 h 内从 20% 左右上升到 40% 左右^[10],与我们的结果相似。Griffin 和 Clark^[1990] 亦证明溶液中的 Ca²⁺同人工海水中的精子发生顶体反应有关^[11]。

3.3.4 温度

三疣梭子蟹精子对温度是敏感的。基础液相同时,精子在 4 要比 25 更稳定,保存时间更长。

温度对三疣梭子蟹精子的强烈刺激主要表现在两种极限温度:高温与超低温。根据我们实验室的其他工作(待发),发现在 70~80 的高温下,2 min 就可以刺激精子进入顶体反应第二阶段,呈葫芦状,但只能停留在这一阶段,5 min 内全部死亡,锯缘青蟹^[8]在高温刺激下虽然同样死亡,但并没有发生顶体反应。三疣梭子蟹精子对超低温(-196)的敏感表现在,无论将含精子的纳精囊直接投入液氮,或是将经过 DMSO 和 G 保护的精子投入液氮都将刺激其发生顶体反应,反应率在 98% 以上。中国对虾精子^[6]冷冻保存后最适条件下成活率可达到 72% 左右,而锯缘青蟹的精子^[7]冷冻保存后,A23187 诱导

组反应率与对照组差别不是很大。比较以上结果,我们发现,三疣梭子蟹的精子相比其它两种甲壳动物,对超低温的刺激似乎更敏感。

参考文献:

- [1] 李太武. 三疣梭子蟹精子的发生及超微结构研究[J]. 动物学报, 1995, **41** (1): 41-47.
- [2] 朱冬发,王春琳,余红卫,等. 三疣梭子蟹精子顶体反应过程中的形态和结构变化[J]. 动物学报, 2004, **50** (5): 800-807.
- [3] Chow S, Taki Y, Ogasawara Y. Cryopreservation of spermatophore of the freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. **Biol Bull**, 1985, 158: 471-475.
- [4] Anghodoguy T J, Crogwe J H, Griffin F J, et al. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*[J]. **Cryobiology**, 1988, 25: 238-243.
- [5] Jeyalectumie C, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*[J]. **Biol Bull**, 1989, 177: 347-253.
- [6] 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): 187-193.
- [7] Bhavanishankar S, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. **Exp Zool**, 1997, 277: 326-336.
- [8] 管卫兵,王桂忠,李少菁,等. 锯缘青蟹精子低温冷藏及精子活力的染色法评价[J]. 台湾海峡, 2002, **21** (4): 457-463.
- [9] 王艺磊,张子平,谢芳靖,等. 锯缘青蟹精子顶体反应的研究[J]. 动物学报, 2001, **47** (3): 310-316.
- [10] 堵南山,赖伟,薛鲁征. 中华绒螯蟹精子顶体反应的研究[J]. 动物学报, 1987, **33** (1): 8-13.
- [11] Griffin F J, Clark Jr W H. Induction of acrosome filament formation in the sperm of *Sicyonia ingentis*[J]. **Exp Zool**, 1990, 254: 296-304.

Preservation of spermatozoa of blue crab *Portunus trituberculatus*

ZHOU Shuai^{1,2}, ZHU Dong-fa¹, WANG Chun-lin¹, XUE Liang-yi¹

(College of Life Science and Biotechnology ,Ningbo University ,Ningbo 315211 ,China ;2. Shulan Experment School of Hangzhou No.2 High School,Hangzhou 311100,China)

Received: May., 26,2005

Key words: *Portunus trituberculatus* ; spermatozoa ; preservation

Abstract: Normal(25 ℃),low temperature(4 ℃) preservation and cryopreservation(-196 ℃) of spermatozoa of blue crab *Portunus trituberculatus* were studied during May 2004 to July 2004. The viability assay of spermatozoa was carried out by means of the induction acrosome reaction method. The results of normal low temperature preservation showed that over 25% of acrosome reaction rate was achieved by treating the spermatozoa with ionophore A23187 when the sample was extended by calcium-free artificial sea water(Ca²⁺ FASW) at 4 ℃ for 236 hours. The best preservation choice was to adopt the group of 4 ℃, Ca²⁺FASW in the four group of 4 ℃ Ca²⁺ FASW, 25 ℃ Ca²⁺ FASW, 4 ℃ natural sea water(NSW) , 25 ℃ NSW and the worst one was to adopt the group of 25 ℃ NSW. Rates of acrosome reaction and concentration of sperm in Ca²⁺ FASW at 25 ℃,4 ℃ were compared and analyzed. It was concluded that there were not significant correlation between the rates of acrosome reaction in control and concentration of sperm,but there were very significant positive correlation between the rates of acrosome reaction induced artificially by treatment with ionophore A23187 and concentration of sperm($P<0.01$).After 72 hours,the cryopreserved spermatozoa sample extended by the DMSO or glycerol had over 98% rate of acrosome reaction including the control without any induction.

(本文编辑 : 刘珊珊)