

# 美洲黑石斑精子超低温保存研究

刘洪军<sup>1</sup>, 官曙光<sup>1</sup>, 刘清华<sup>2</sup>, 李 军<sup>2</sup>, 于道德<sup>1</sup>

(1. 山东省海水养殖研究所, 山东 青岛 266002; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 作者采用 2 mL 的冷存管和程序降温仪高效超低温保存美洲黑石斑(*Centropristis striata* L.)精子。分析比较了 4 种不同浓度抗冻剂 15%DMSO(二甲基亚砷)、15%EG(乙二醇)、15%PG(丙二醇)和 10% Meth(甲醇), 5 种降温速率(10, 15, 20, 25, 30 °C/min)和 5 种解冻温度(30, 35, 40, 45, 50 °C)对美洲黑石斑精子超低温保存效果的影响。实验结果表明, 采用 Hanks' 作为稀释液, 15% DMSO、15% EG、15% PG 作为抗冻剂, 30 °C/min 的降温速率对精液进行超低温保存 35 °C 水浴解冻, 冻精激活后获得理想的运动率(> 60%)。通过对抗冻剂、降温速率、解冻温度的筛选, 作者建立了美洲黑石斑精液高效超低温保存的方法, 并对冻精进行长期保存。美洲黑石斑精子超低温保存方法的建立对于海水鱼类精子库的建立以及种质资源的保存和生物多样性的保护具有重要意义。

**关键词:** 美洲黑石斑(*Centropristis striata* L.); 精子低温保存; 抗冻剂; 精子活力

中图分类号: Q331 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)01-0076-05

超低温冷冻保存是种质资源长期保存的一个重要方法。超低温保存的样品可进行长距离的运输, 实现远缘杂交、异源精子雌核发育诱导; 同时将精子超低温保存还可以提高精子的利用率, 减少雄性亲鱼培育数量, 降低成本; 通过建立精子库对精液进行长期保存对种质资源保护具有重要意义, 可以使濒临灭绝的物种的种质细胞得以长期的保存, 待需要时解冻来恢复其资源结构<sup>[1-5]</sup>。自从 1953 年 Blaxter 成功冷冻保存大西洋鲱鱼(*Clupea harengus*)精巢<sup>[6]</sup>以来, 鱼类种质细胞的低温保存迅速发展起来, 在过去的 50 多年中, 世界许多国家的科研工作者围绕超低温保存的降温方法、抗冻液的筛选、冷冻、解冻速率等方面开展了大量的研究工作, 并取得了巨大的进展, 现已有 200 多种鱼的精液被成功地超低温保存起来, 其中有 40 多种海水鱼的精液已进行了成功的超低温保存研究<sup>[7]</sup>。中国随着海水养殖业发展的迫切需要以及对海洋种质资源保护的认识, 海洋鱼类精液的超低温保存取得了巨大的进展, 对于一些具有较高的经济价值的鱼类的精液如真鲷(*Pagrus major*)<sup>[8-12]</sup>、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)<sup>[13]</sup>、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)<sup>[14]</sup>、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)<sup>[15]</sup>、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[16]</sup>、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)<sup>[17]</sup>进行了成功的超低温保存研究。

美洲黑石斑(*Centropristis striata* L.)属于鲈科(Serranidae), 石斑鱼亚科(Serraninae), 俗名有翡翠斑、珍珠斑等美誉, 属于目前国际上养殖的石斑鱼类之一, 中国于 2003 年成功引进<sup>[18]</sup>。黑石斑鱼属于雌雄同体, 首先发育为卵巢, 至第 3~5 年精巢开始发育产生精子。因此黑石斑鱼先雌后雄的繁育特性, 给人工繁育带来了困难。因此为了使得精子、卵子同步获得, 作者采用了超低温冷冻保存的方法首先将精子冻存, 然后等待卵子的成熟。目前虽然国外黑石斑精子已有报到<sup>[19]</sup>, 但是仅限于小体积 0.5 mL 麦管保存, 保存量远不能满足生产使用。

本研究中作者拟采用 2 mL 的冻存管、程序降温法、分析了 4 种抗冻剂、5 种降温速率和 5 种解冻温度对美洲黑石斑精子超低温保存的影响。采用程序降温法, 进行大容量冷冻保存, 建立一种黑石斑鱼精子实用型冷冻保存方法。建立美洲黑石斑精子超低温保存的方法可以减少雄性亲鱼的养殖量, 从而减少养殖成本, 同时对于石斑鱼其他种类精子超低温

收稿日期: 2011-09-21; 修回日期: 2011-12-06

基金项目: 农业部 948 项目(2011-Z39); 中国科学院海洋研究所知识创新工程领域前沿项目(Y02507101Q); 国家自然科学基金资助项目(41076100, 31072212)

作者简介: 刘洪军(1964-), 男, 山东博兴人, 研究员, 主要从事海洋生物学研究, 电话: 0532-82655169, E-mail: hongjunl@126.com; 于道德, 通信作者, E-mail: wensente@163.com

温保存方法的建立具有重要的指导作用。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 精子采集

材料采于 2011 年采集美洲黑石斑性成熟盛期(3 月中旬至 5 月下旬), 成熟的亲鱼养殖于烟台市百佳水产公司(龙口, 黄山馆养殖基地)。10 尾雌鱼和 20 尾雄鱼(3~4 kg, 6~7 龄)暂养于 20 m<sup>3</sup> 水池中, 循环海水。精子采集前雄鱼首先置于 0.003% 的丁香酚溶液中麻醉, 然后取出将鱼体用蒸馏水冲洗、擦干, 轻轻挤压腹部采集精液于玻璃器皿中, 采集过程中注意海水、血液、粪便的污染。收集的精子立即进行镜检, 活力较高的精子进行下面的试验。

### 1.2 抗冻剂的筛选

将精液与 Hanks'液(NaCl 8.01 g/L; KCl 0.40 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0.14 g/L; NaHCO<sub>3</sub> 0.35 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.06 g/L; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.10 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.10 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.06 g/L; Glucose 10.00 g/L; pH 6.80)稀释的不同种类不同浓度的抗冻剂: 二甲基亚砷 (DMSO)、乙二醇 (EG)、丙二醇 (PG)、甲醇(Meth) 以 1 : 3(v/v)的比例混合后, 将混合液吸入 2 mL 的冷存管中, 然后将冷存管转入 Kryo-360-1.7 程序降温仪, 0 平衡 2 min, 置于程序降温仪中, 平衡, 然后以 20 /min 的速度降至-180 并停留 2 min, 然后转入液氮保存。保存一定的时间然后解冻激活, 计算精子的运动率。实验中运动率的计算是采用精子激活后视野中运动的精子占有所有精子的百分比, 一个样品取 3 个视野, 一个视野精子数不低于 100 个。

### 1.3 降温速率的筛选

将精液与 Hanks'液稀释的 DMSO 以 1:3 的比例混合后, 0 平衡 2 min, 置于程序降温仪中平衡, 然后以 10、15、20、25、30 /min 的速度降至-180 并停留 2 min, 然后转入液氮保存。4 个月后以 35 水浴解冻计算运动率。每个实验均重复 3 次。

### 1.4 解冻温度的筛选

将精液与 Hanks'液稀释的 DMSO 以 1 : 3 的比例混合后, 置于程序降温仪中, 以不同的降温速率进行冷冻处理, 然后保存于液氮中, 4 个月后以 35 水浴解冻计算运动率。每个实验均重复 3 次。

### 1.5 解冻方法的筛选

将精液与 Hanks'液稀释的不同种类的抗冻剂以

1 : 3 的比例混合后, 置于程序降温仪中, 平衡 2 min, 然后以 20 /min 的速度降至-180 并停留 2 min, 最后快速转入液氮中进行超低温保存。保存 4 个月分别以 30、35、45、45、50 水浴解冻, 计算运动率。每个实验均重复 3 次。

### 1.6 冻精活力持续时间

将精液与 Hanks'液稀释的 15%DMSO、15%EG、15%PG 以 1 : 3 的比例混合后, 置于程序降温仪中, 以-30 /min 的降温速率进行冷冻处理, 然后保存于液氮中, 4 个月后以 35 水浴解冻计算运动率。每个实验均重复 3 次。

### 1.7 统计分析

用 SPSS 11.0 软件对数据进行统计分析。数据用平均值±SD 表示, 用一元方差分析(ANOVA)进行差异比较, 并运用 SNK(Student-Newman-Keuls'test)分析法进行显著性检验, 当  $P < 0.05$  认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 抗冻剂对冻精运动率的影响

抗冻剂对冻精运动率的影响如图 1 所示, 采用 15% DMSO、15% EG、15% PG 作为抗冻液保存的精子解冻后活力分别为(61.2±6.8)%、(56.6±9.1)%、(64.7±7.4)%, 虽然显著低于对照(新鲜精子)的运动率, 但它们之间的差异并不显著。相对而言 10% Meth 保存的冻精的运动率较差, 显著低于其他抗冻剂( $P < 0.05$ )。因此作者确定了 15% DMSO、15% EG、15% PG 都可作为美洲黑石斑精子冷冻保存的抗冻剂。

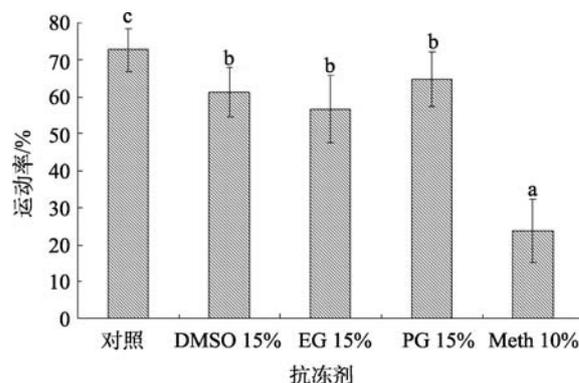


图 1 不同抗冻剂对冻精运动率的影响

Fig. 1 Effect of different cryoprotectant on post-thaw sperm motility

标有不同字母的柱状图表示数值之间差异显著( $P < 0.05$ ), 图 2, 图 3 同

columns without a common letter suggested datas significantly differed ( $P < 0.05$ ), consistent with Fig.2 and Fig.3

## 2.2 降温速率对冻精运动率的影响

降温速率对冻精运动率的影响如图 2 所示, 将 15% DMSO 保存的冻精, 以 10、15、20、25、30℃/min 的降温速率保存的冻精激活后其运动率并没有显著的差异( $P > 0.05$ ), 但相对于对照(新鲜精子)还是显著降低( $P < 0.05$ )。因此为了节省时间作者确定了 30℃/min 作为美洲黑石斑精子超低温冷冻保存的降温速率。

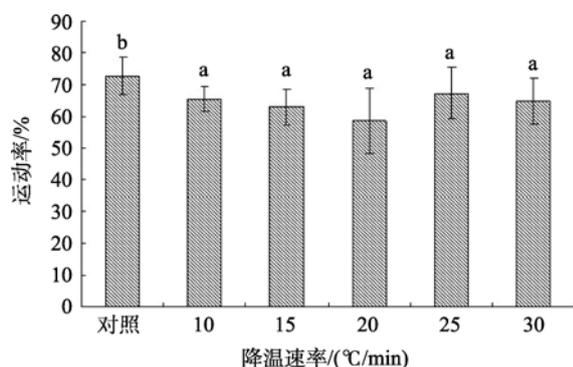


图 2 不同降温速率对冻精运动率的影响

Fig. 2 Effect of different cooling rate on post-thaw sperm motility

## 2.3 解冻温度对精子运动率的影响

将 15% DMSO 保存的冻精, 分别以 30、35、40、45、50 的水浴解冻, 水浴温度对精子的运动率的影响见图 3。结果显示 30、35、40、45、50 水浴解冻后的冻精的运动率间没有显著的差异( $P > 0.05$ ), 但相对于对照(新鲜精子)还是显著降低( $P < 0.05$ )。鉴于实验操作的方便性, 因此作者确定 35 作为美洲黑石斑冻精的解冻温度。

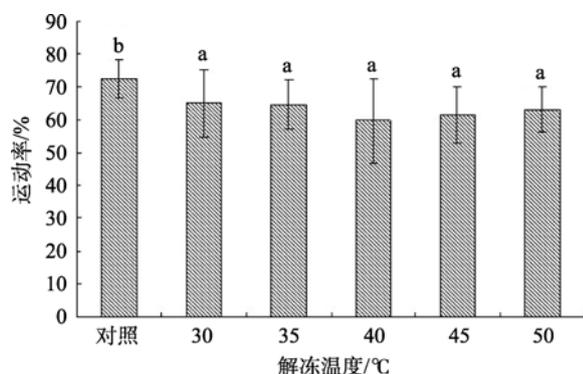


图 3 不同解冻温度对冻精运动率的影响

Fig. 3 Effect of different thaw temperature on post-thaw sperm motility

## 2.4 冻精激活后活力持续时间

15% DMSO、15% EG、15% PG 以 30 °/min 的降温速率保存的冻精, 35 °水浴解冻后, 海水激活后活力状况与激活时间的关系见图 4。冻精活力在 15 s 之内急速下降, 15 s 时冻精的运动率只有刚刚激活时的 1/3。冷冻精子活力持续的时间与鲜精比差异不显著( $P > 0.05$ ), 但是活力下降速度明显比鲜精快。

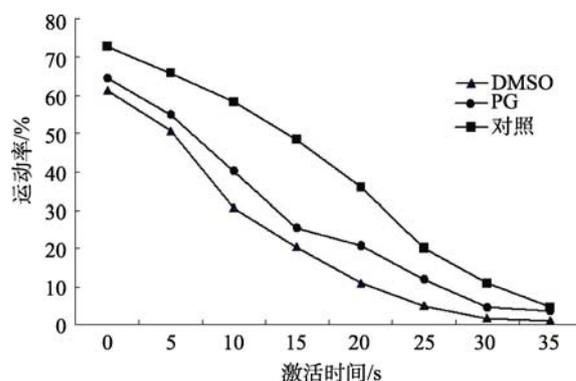


图 4 激活时间对冻精与冻精运动率的影响

Fig. 4 The effect of activation time on post-thaw sperm motility

## 3 讨论

适宜的抗冻剂是鱼类精子保存成功的关键因素, 不同的抗冻剂对不同种鱼的精液保护作用差异很大。因此建立精子冷冻保存方法的首要因素是筛选最适宜的抗冻剂的种类及浓度。参考课题组之前对真鲷、大菱鲆、大黄鱼等海水鱼类冷冻保存的方法以及黑石斑鱼精子的生理学特性, 作者确定了 15% DMSO、EG%、15% PG 以及 10% Meth 作为主要的几种抗冻剂进行筛选。在美洲黑石斑精子超低温保存中作者发现 15% DMSO、15% EG、15% PG 获得了较好的保护效果。在 DeGraaf<sup>[19]</sup>等报道 0.5 mL 的麦管冷冻的黑石斑鱼精子采用 10% DMSO 也获得了较好的保存效果。DMSO 由于其具有较好的渗透性是鱼类精子超低温保存应用最为广泛的一种抗冻剂, 5% ~ 20% DMSO 在许多海水鱼类精子的超低温保存种都取得了令人满意的效果, 例如, 金头鲷 (*Sparus aurata*)<sup>[20]</sup>、细须石首鱼 (*sciaena russelli*)<sup>[21]</sup> 和大菱鲆<sup>[15, 22]</sup>。在大黄鱼精子超低温保存中 10% DMSO 也表现出较好的保护效果。EG、PG 也是渗透性较好的抗冻剂在真鲷<sup>[8]</sup>精子超低温保存中也获得了较好的保存效果。但是对于大黄鱼精子 EG、PG

作为保护剂冷冻的精子其运动率一般。然而 PG、EG 在细须石首鱼<sup>[14, 21]</sup>、金头鲷<sup>[20]</sup>精子的超低温保存取得了理想的运动率和受精率。在真鲷精子超低温保存中 DMSO、EG、PG 也获得了较好的保存效果<sup>[8-12, 14]</sup>。但是 Meth 对美洲黑石斑的精子的保护效果较差, 同样在大黄鱼<sup>[14]</sup>、真鲷<sup>[8]</sup>精子超低温保存中也表现出较差的保存效果, 一些学者认为这是由于 Meth 过强的毒性和渗透性造成的, 这也是实验中 Meth 选择 10% 而不是 15% 的原因。因此抗冻剂种类以及浓度对精子的保护效果具有较强的鱼的种的特异性, 因此适宜抗冻剂及其浓度的选择是鱼类精子成功保存的关键环节。

降温速率和解冻温度对鱼类精子的超低温保存有重要作用。冷冻、解冻过程都会造成精子遭受结晶或者重结晶的损伤。但是对于美洲黑石斑精子, 10~30 /min 的降温速率、30~50 水浴解冻温度对冷冻解冻后的精子活动率没有明显的影响。解冻温度过低会导致解冻时间较长, 而解冻温度过高则影响操作的方便性, 因此在试验中作者选择了 35 水浴解冻。在大黄鱼精液超低温保存中作者发现 43 水浴解冻其运动率明显地高于 28 水浴解冻<sup>[14]</sup>, 然而在另一大黄鱼精液冷冻保存实验林丹军<sup>[23]</sup>等却发现室温解冻要优于 38~40 水浴解冻。有文献<sup>[24]</sup>报道解冻温度的选择应取决于降温速率, 以避免解冻过程中重结晶的形成。

作者首次采用程序降温法成功地超低温保存美洲黑石斑精液, 获得了较为理想的保存效果, 并将冷冻的精子长期保存于中国科学院海洋研究所海洋动物种质库。通过实验作者建立了美洲黑石斑精液高效、系统、完整超低温保存的方法, 此方法的建立对海水鱼类种质资源的保存和生物多样性的保护具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Gwo J C, Ohta H, Okuzawa K, et al. Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*)[J]. Theriogenology, 1999, 51(3): 569-582.
- [2] Van Der Walt L D, Van Der Bank F H, Steyn G J. The suitability of using cryopreservation of spermatozoa for the conservation of genetic diversity in African catfish (*Clarias gariepinus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology(Part A): Physiology, 1993, 106(2): 313-318.
- [3] Tiersch T R, Wayman W R, Skapura D P, et al. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch)[J]. Aquaculture Research, 2004, 35(3): 278-288.
- [4] Tiersch T R, Figiel C R, Wayman W R, et al. Cryopreservation of sperm of the Endangered Razorback Sucker[M]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 2000: 95-104.
- [5] Ohta H, Kawamura K, Unuma T, et al. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 58(3): 670-681.
- [6] Blaxter J H S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring[J]. Nature, 1953, 172: 1189-1190.
- [7] Gwo J C. Cryopreservation of sperm of some marine fishes[M]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 2000, 138-160.
- [8] Liu Q, Li J, Zhang S, et al. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2006, 37(3): 289-297.
- [9] Liu Q H, Li J, Xiao Z Z, et al. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*)[J]. Aquaculture, 2007, 263(1-4): 20-25.
- [10] Liu Q H, Li J, Zhang S C, et al. Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm[J]. Theriogenology, 2007, 67(6): 1168-1174.
- [11] Liu Q H, Chen Y K, Xiao Z Z, et al. Effect of storage time and cryoprotectant concentrations on the fertilization rate and hatching rate of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major* Temminck & Schlegel, 1843)[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(9): 89-95.
- [12] 李纯, 李军, 薛钦昭. 真鲷精子的超低温保存研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(12): 1-4.
- [13] 叶霆, 竺俊全, 杨万喜, 等. 黑鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的 SCGE 检测[J]. 动物学研究, 2009, 30(2): 151-157.
- [14] 肖志忠, 陈雄芳, 丁福红, 等. 大黄鱼精液的高效超低温保存[J]. 海洋科学, 2007, 31(4): 1-4.
- [15] Chen S L, Ji X S, Yu G C, et al. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization[J]. Aquaculture, 2004, 236(1-4): 547-556.

- [16] Chen S L, Tian Y S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification[J]. Theriogenology, 2005, 63(4): 1207-1219.
- [17] 洪万树, 张其永, 许胜发, 等. 花鲈精子生理特性及其精液超低温冷冻保存[J]. 海洋学报, 1996, 18: 97-104.
- [18] 雷霖霖, 卢继武. 美洲黑石斑鱼的品种优势和养殖前景[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 110-115.
- [19] DeGraaf J D, King W, Benton C, et al. Production and storage of sperm from the black sea bass *Centropristis striata* L[J]. Aquaculture Research, 2004, 35(15): 1457-1465.
- [20] Fabbrocini A, Lavadera S L, Rispoli S, et al. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurate*) spermatozoa[J]. Cryobiology, 2000, 40: 46-53.
- [21] Gwo J C, Strawn K, Longnecker M T, et al. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa[J]. Aquaculture, 1991, 94(4): 355-375.
- [22] Dreanno C, Suquet M, Quemener L, et al. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus Maximus*) spermatozoa[J]. Theriogenology, 1997, 48: 589-603.
- [23] 林丹军, 尤永隆. 大黄鱼精子生理特性及其冷冻保存[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 69-75.
- [24] Gwo J C. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa[J]. Theriogenology, 1993, 39: 1331-1324.

## An efficient methodology of sperm cryopreservation in *Centropristis striata*

LIU Hong-jun<sup>1</sup>, GUAN Shu-guang<sup>1</sup>, LIU Qing-hua<sup>2</sup>, LI Jun<sup>2</sup>, YU Dao-de<sup>1</sup>

(1. Mariculture Institute of Shandong Province, Qingdao 266002, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Sept., 21, 2011

**Key words:** *Centropristis striata*; cryopreservation; cryoprotectant; sperm motility

**Abstract:** In the present study, *Centropristis striata* sperm was efficiently cryopreserved using a programmable freezer. The motility of both fresh and post-thaw sperm was investigated in order to optimize the sperm cryopreservation protocols for *C. striata*. Four cryoprotectants (15% dimethyl sulfoxide, 15% ethylene glycol, 15% propylene glycol and 10% methanol), five cooling rates (10, 15, 20, 25 and 30 °C/min) as well as five thawing temperatures (30, 35, 40, 45 and 50 °C) were designed and tested in the sperm cryopreservation, and their effects on post-thaw sperm motility were studied. Optimal post-thaw motility (>60%) were achieved when using Hanks's supplemented with 15% DMSO, 15% PG and 15% EG with 30 °C/min cooling rate, and 35 °C water bath. An efficient cryopreservation method for *C. striata* sperm was established by analyzing the effect of cryoprotectants, cooling rates and thaw temperatures. This method is advantageous not only to establish laboratory experiment but also to preserve genetic resources for routine aquaculture hatchery operation.

(本文编辑: 谭雪静)