

# 中国对虾精子超低温保存的研究\*

柯亚夫 蔡健儿

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**提要** 于1991年11月—1993年5月对中国对虾纳精囊中精子进行超低温保存研究。结果表明,以自然海水或人工海水作基础液添加10%DMSO(V/V)及5%—10%的甘油配制成抗冻稀释液,稀释中国对虾精子进行超低温保存最有效,存活率在60%以上;保存94—138d,解冻后作人工授精,受精率最高达59%;稀释液中 $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ 为超低温保存所必需,但 $Ca^{2+}$ 浓度过高则不利于精子的保存。光镜及电镜观察表明,冷冻对中国对虾精子的损伤主要表现为“棘突”的折断,严重时顶体脱落仅剩精核;冻伤的精子不发生正常顶体反应,不形成顶体丝。

**关键词** 中国对虾 精子 超低温保存 人工授精

甲壳动物精子低温保存的研究仅有罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的精荚(Chow, 1982; Chow et al., 1985)、单肢虾(*Sicyonia ingentis*)(Anchordoguy et al., 1988)和螃蟹(*Scylla serrata*)(Subramonian et al., 1989)精子。蔡健儿<sup>1)</sup>、王清印<sup>2)</sup>分别对中国对虾精子研究,但受精率低。作者借助活体染色法,以精子的存活率和受精率为指标,结合精子顶体反应的诱导及人工授精对中国对虾精子进行超低温保存的系统研究,以期认识中国对虾精子的成熟发育、人工诱导雌核发育的研究和新品种的培育提供科学依据。

## 1 材料与与方法

低温保存实验用虾为中国对虾(*Penaeus chinensis*):一部分为养殖虾,采自山东省日照市水产研究所及石臼代家村育苗场;一部分为海捕虾,采自本所水族楼。实验于1991年11月—1992年5月和1992年11月—1993年5月间进行。将中国对虾暂养于实验室内玻璃钢桶中。人工授精所需未受精卵的产卵虾,分别于1992年3—5月采自山东省昌邑县渤海盐场育苗场和1993年4月采自山东省日照市石臼代家村育苗场。

### 1.1 精子活细胞的鉴别与检测

**1.1.1 台盼蓝排除法**(杨景山, 1990) 取一滴2%的台盼蓝,用人工海水配制(artificial sea water, ASW)(Gesteira et al., 1988)和一滴精子悬液于载玻片上,混合后盖片,于30℃孵育3min,以Carl Zeiss 600倍显微镜观察,活的精子不着色,死的精子细胞顶体部或核体部呈蓝色,以此计算成活率,每次统计200个精子。

\* 国家“八五”重点科技项目, C01920308。柯亚夫,男,出生于1963年2月,硕士,助理研究员。

收稿日期:1993年10月14日,接受日期:1995年5月13日。

1) 蔡健儿等,1990,中国对虾人工诱导雌核发育实验总结,中国科学院海洋研究所。

2) 王清印等,1990,对虾良种选育技术研究报告,中国水产科学研究院黄海水产研究所。

**1.1.2 曙红 B 染色法**(许华等, 1988) 分别吸取 5% 的曙红 B、2% 的甲苯胺蓝(用 ASW 配制)和精子悬液各 5—10 $\mu$ l 滴在载玻片上, 先用针头使曙红 B 与精液混合, 于 30 $^{\circ}$ C 孵育 5min, 然后与 2% 的甲苯胺蓝混合。显微镜下观察, 死精子头部或整个细胞被染成深红色; 活者透明不着色, 以此统计成活率。

## 1.2 纳精囊中精子超低温(-196 $^{\circ}$ C)保存

释出纳精囊中精子, 用煮沸过滤的天然海水(nature sea water, NSW, 盐度为 34.5)、人工海水(ASW)、去钾人工海水(-K<sup>+</sup>ASW, 在人工海水组成中去掉 KCl 的成分, 以同质量的 NaCl 代替, 保持盐度、pH 值不变, 下同)、去镁人工海水(-Mg<sup>2+</sup>ASW)、去钙人工海水(-Ca<sup>2+</sup>ASW)和 2 倍钙离子人工海水(2 $\times$ Ca<sup>2+</sup>ASW, 将人工海水中 CaCl<sub>2</sub> 的成分加倍)作基础液, 稀释精子, 加入不同浓度、不同组成的系列抗冻剂, 装入 1—2ml 的塑料管中, 每样体积在 0.5ml 左右。平衡后按二段冷冻法(陈章波等, 1989), 先在液氮蒸气中预冷, 然后浸入液氮, 在液氮容器中保存, 于 35—40 $^{\circ}$ C 水浴中解冻。

## 1.3 人工授精

未授精卵取自正在产卵雌虾体腔中的游离卵, 以不加精子的卵子和已自然产生的卵子为对照, 干法授精, 室温或 20 $^{\circ}$ C 温箱中孵化。当细胞分裂为 4-细胞时计数授精率, 每次计数 200 粒卵子以上; 不足 200 粒, 按实际卵数求出授精率。取出授精卵孵化, 孵出的无节幼体数占授精卵数的百分比即为孵化率。

## 1.4 超低温保存

纳精囊中的精子, 在人工授精前分别进行不去抗冻剂和去抗冻剂处理。不去抗冻剂的解冻后直接释出精子进行人工授精; 去抗冻剂的, 用基础液(ASW 或 NSW)分级稀释, 1:1 混合, 每次 2—5min, 两次以上; 或者用 0.5mol/L 的蔗糖, 或 10% 及 5% 葡萄糖(用 ASW 配制)梯度稀释, 最后用基础液稀释, 稀释时样品与稀释液比为 1:1, 每次 2—5min, 3 次以上。

## 1.5 光镜及电镜观察

在光镜下观察中国对虾精子染色统计存活率的同时, 统计精子的形态完整率, 核体完整率, 观察精子的顶体反应、凝集反应、胞吐及细胞质突起等现象, 并及时予以拍照。

电镜观察材料首先用 2.5% 戊二醛固定(ASW 为缓冲液)。透射电镜观察: 戊二醛固定后, Aga 预包埋; 1% OsO<sub>4</sub> 再次固定, 酒精系列脱水, Epon 812 包埋, 瑞典 Lkbova 切片, 铀染, 日立 H-500 透射电镜观察照相。扫描电镜(SEM)观察: 精子用戊二醛固定后, 滴在盖玻片上, 酒精系列脱水, 醋酸异戊酯置换, 临界点干燥, IB-3 型离子镀膜机喷金, 然后在 KYKY-1000B 型扫描电镜上观察照相。

## 2 结果

### 2.1 纳精囊中精子的超低温(-196 $^{\circ}$ C)保存结果

精子必需经过稀释才能进行超低温保存。实验表明, 剪取整个纳精囊加入抗冻剂, 经超低温保存解冻后, 其中的精子会被冻坏。用人工海水、天然海水作为基础液稀释的精子其存活率均接近 60%。如果稀释液中缺少 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> 中的任何一种, 精子超低温保存的存活率都下降; Ca<sup>2+</sup> 浓度超过 0.7 mol/L 也不利于精子的超低温保存,

见图 1。

本研究结果表明，用甘油(Glycerol.G)或二甲基亚砷(DMSO)单独作抗冻剂配制的精子稀释液，用以保存中国对虾精子，存活率不高，即使增加 DMSD 的浓度可以提高精子成活率，但也难以超过 40%。低浓度甘油对精子的保存效果不佳，增加浓度会提高精子存活率，但浓度超过 10%(V/V)，其存活率反而会下降。在精子稀释液中，同时加入甘油和 DMSO，能大大提高其存活率。用含有 10%DMSO 和 5%—10% 甘油的稀释液保存精子，存活率可达 60% 以上(见表 1)。在精子悬液中添加抗冻剂时，一次性加入与分批加入没有差别。

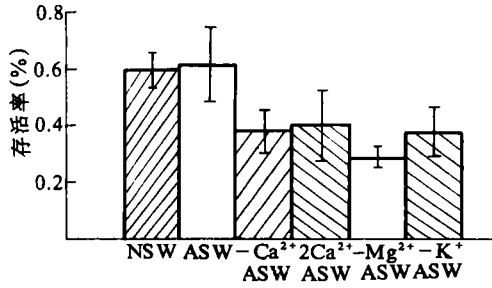


图 1 稀释液中缺少Ca<sup>2+</sup>， Mg<sup>2+</sup>， K<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 浓度过高对精子成活率影响结果

Fig.1 The freezing survival rate of *Penaeus chinensis* spermatozoa which no Ca<sup>2+</sup>， Mg<sup>2+</sup>， K<sup>+</sup> or double Ca<sup>2+</sup> in cryodiluent  
注：抗冻剂为 10%G+10%D (V/V)，平衡 20min，第一次预冷 30min，第二次预冷 5min，解冻温度在 35—36℃，保存 24h 以上。

表 1 不同组成的抗冻剂对中国对虾纳精囊中精子超冷存活率的影响

Tab.1 Effect of various antifreezing agents on survival rate of cryopreservation

*Penaeus chinensis* spermatozoa

分组	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DMSO (%) (V/V)	10	10	10	10	10	10	10	7.5	5	2.5	0
G (%) (V/V)	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	10	10	10	10
存活率 (%)	34.2 ±3.4	47.3 ±4.3	67.0 ±15.9	72.0 ±13.6	65.0 ±3.9	14.4 ±7.8	13.7 ±3.7	39.0 ±13.6	33.8 ±8.0	23.5 ±4.0	20.2 ±8.4

注：精子稀释液为 ASW，平衡 20min，第一次预冷 30min，第二次预冷 5min，冷冻体积为 0.5ml，35℃ 解冻保存 30min 以上。

用液氮容器保存中国对虾精子时，如果将含抗冻剂的精子悬液直接放入液氮中，解冻后精子不能存活。加入抗冻剂后需在低温下(0—4℃)平衡 20—30min，经液氮蒸气两段预冷结冰后投入液氮中。第一次预冷时，样品离液氮面较远，时间稍长；第二次预冷时，样品接近液氮面，时间较短。两段预冷正交实验结果及方差分析，见表 2。极差(R)顺序，第 2 次预冷时间(0.296)大于第一次预冷时间(0.194)。平衡时间相对较宽，20—30min 都能较好保存精子。精子在液氮中保存的时间长短并不影响其存活率。超低温保存 94—138d 的精子，在解冻后，作人工授精时，最高授精率达 59.0%，主要结果见表 3。

在 20—40℃ 水浴中解冻精子，存活率都较高，在 60% 以上；其中以 35—40℃ 为最好，而且安全，方便。如果采取慢速解冻法，先使样品离开液氮，在液氮蒸气中放置一定时间再提出解冻，并不能提高存活率，处理不当，反而会冻伤精子。

表 2 两段预冷正交实验结果及方差分析

Tab.2 The orthogonal tests result and variance analysis of two-stepfreezing

分组	因 素		
	第一次预冷 (min)	第二次预冷 (min)	相对存活率 (%)
1	20	5	62.9
2	20	10	46.6
3	20	15	28.9
4	30	5	80.2
5	30	10	56.6
6	30	15	47.5
7	40	5	54.6
8	40	10	39.0
9	40	15	32.5
$K_1$	1.384	1.977	
$K_2$	1.843	1.422	$S_T=0.2034$
$K_3$	1.261	1.089	$S_E=0.0065$
$R$	0.194	0.296	$F_{0.01}(2,4)=18.000$
$S$	0.063	0.134	$F_{0.05}(2,4)=6.940$
$F$	38.600	82.600	

注: 精子稀释液: ASW, 抗冻剂组成为 10%D+10%G (V/V), 冷冻体积为 0.4ml, 解冻温度 35℃, 平衡 20min, 保存 30min 以上。K 为水平和; R 为极差; S 为平方和;  $S_T$  为总平方和;  $S_b$  为误差平方和; F 为统计量。

表 3 超低温保存中国对虾精子人工授精主要结果

Tab.3 The result of artificial fertilization with the spermatozoa of *Penaeus chinensis* in cryopreservation

分 组	精子来源	精子稀释液	DMSO (%) (V/V)	G (%) (V/V)	保存天数	是 (+) 否 (-) 去抗冻剂	授精率 (%)	孵化率 (%)
1	纳精囊	ASW	10	10.0	97	-	47.5	65.5
2	纳精囊	NSW	10	10.0	94	-	17.5	75.0
3	纳精囊	NSW	10	5.0	137	+	28.1	35.7
4	纳精囊	NSW	10	10.0	138	-	52.5	30.5
5	纳精囊	NSW	10	7.5	138	-	59.0	33.3

不同体积的样品进行超低温保存时, 需要采取不同的降温方法。如果精子稀释液、抗冻剂组成、平衡时间及降温速率一定, 随着体积的增大, 解冻后精子存活率会降低, 见图 2a。其他条件不变, 随着一次样品体积增大, 减慢降温速率, 精子相对存活率也在 60% 以上, 见图 2b。精子的浓度过大不利于超低温保存, 会使得精子保存后存活率波动很大, 以  $(1-2) \times 10^7$  个/ml 为宜。

实验表明, 中国对虾精子解冻后去抗冻剂时易发生顶体反应, 以去抗冻剂的精子作

人工授精的结果不如不去抗冻剂的精子。本实验从 1991 年 11 月—1993 年 4 月共保存 4 批 60 个样品, 解冻 41 个样品, 精子相对存活率在 60%—70%, 用其中 29 个样品作人工授精, 13 个样品能授精, 授精的样品占 44.8%, 孵化率略低于自然产卵的孵化率。

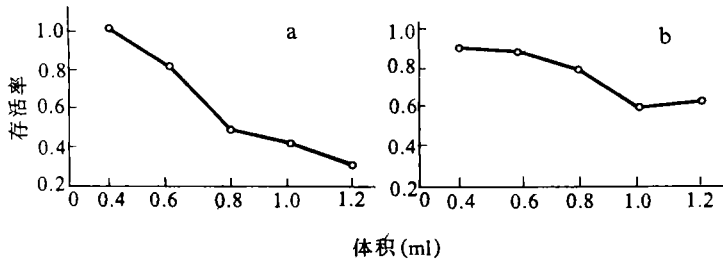


图 2 精子超低温(-196℃)保存后存活率与不同冷冻体积的关系

Fig. 2 Relation between cryopreservation survival rate of the spermatozoa of *Penaeus chinensis* and various freezing volume

精子稀释液 ASW, 抗冻剂 7.5%G+10% (V/V), 平衡 20min.

a. 第一次预冷 30min, 第二次预冷 5min, 保存 30min 以上, 35℃ 水浴解冻;

b. 第一次预冷 40min, 第二次预冷 10min, 保存 30min 以上, 逐渐接近液氮面, 35℃ 解冻。

## 2.2 光镜和电镜观察结果

超低温保存时, 如果操作不当极易造成精子损伤, 轻度损伤使“棘突”折断(图版 I :3), 严重损伤时会使精子从顶体脱落(图版 I :2), 或者核体破裂(图版 I :5)。未受损伤的精子外形光滑完整(图版 I :1), 解冻后能正常发生顶体反应。正常的精子发生顶体反应最后会形成顶体丝<sup>1)</sup>, 解冻后的精子如果正常也会形成顶体丝。但遭到损伤的精子往往不能正常形成顶体丝, 即使形成也难以授精成功。

## 3 讨论与结论

### 3.1 精子的超低温保存方法及损伤机制

**3.1.1 稀释液** 精子超低温保存的稀释液分基础液和抗冻剂两个部分。稀释液中缺少  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  会降低精子超低温保存后的存活率, 由此推测, 在降温 and 复温过程中, 精子不是被动地被冷冻, 而是随着降温和复温导致环境渗透压的变化, 不断调节水分进出细胞膜以适应这种变化, 为此细胞不会过分脱水而损伤。在自我调节过程中,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  为精子所必需。

抗冻剂常用的有 DMSO 和甘油, 甘油渗透力弱, 能降低原生质冰点到  $-35^{\circ}C$  左右。但与甘油相比, DMSO 渗透力强, 亲水性好, 能与电解质螯合从而降低细胞内电解质的浓度, 进而使细胞内保持水分, 使原生质冰点降低到  $-45^{\circ}C$  (McGann, 1978), 故优于甘油。Anchordoguy 等(1988)保存单肢虾精子时, 认为 5% 的 DMSO 有效。Chow 等(1985)用 10% 的甘油作抗冻剂, 保存罗氏沼虾精荚, 解冻后能授精。本研究表明, 液氮容器保存中国对虾精子, 以 10% 的 DMSO 加上 5%—10% 的甘油效果最佳(见表 1)。

1) 柯亚夫等, 1993, 中国对虾精子顶体反应的研究。

**3.1.2 保存方法** 目前保存精子的方法有两种,即“程控仪冷冻法”和“人工冷冻法”(朱伟杰等,1991)。朱伟杰等(1991)以人的精子对这两种方法进行了比较研究,发现两种方法无显著差异。本研究采用人工冷冻法,授精率可达59%。

**3.1.3 平衡** 精子悬液中加入抗冻剂后一般需要平衡,但Anchordoguy等(1988)保存单肢虾精子时,不经平衡也有效。在中国对虾精子超低温保存时,不经平衡,效果不好。在0—4℃平衡20—30min很有必要,精子也不会发生顶体反应。

**3.1.4 解冻与授精** 解冻,是将冷冻态的精子升温融解从而使精子复苏的过程,一般在室温或恒温水浴中解冻(Chow et al., 1985)。本研究表明,在20—40℃的水浴中解冻效果都较好,以35—40℃为最佳。先去抗冻剂的精子后作人工授精时,授精率最高仅为47.5%,而不去抗冻剂的作人工授精,授精率最高达59%(见表3)。之所以如此,是因为精子经冷冻、解冻后易发生顶体反应而失活。

**3.1.5 损伤机制** 低温损伤主要来自降温和复温过程,表现为“冰晶损伤”和“溶质损伤”两种情况。快速降温时,细胞内水分因没有及时移出胞外,因而在细胞内外都形成冰晶。温度低于-60℃以下,水分子停止运动呈玻璃态,这种冰本身对细胞来说并非致命(陈章波,1989; Mazur, 1970),但复温时产生的重结晶对细胞却是致死损伤。慢速冷冻时,细胞外先结冰,胞内水分外渗,细胞皱缩,表现为“溶质损伤”;本研究为慢速冷冻,即为这种损伤。另外, Fahy(1986)认为精子的损伤还应包括抗冻剂的毒性。本研究表明,中国对虾精子低温保存时很难达到100%存活,改变抗冻剂的浓度并不能提高冷冻的存活率,抗冻剂的毒性也是存在的。

### 3.2 精子的成熟发育

中国对虾在秋季交尾,次年春天才产卵授精,精子在雌虾纳精囊中保持时间长达半年,而秋季纳精囊中的精子是否已达到了成熟,精子的成熟是否一定要通过雌虾而“获能”,目前尚没有统一的认识。由于(1)中国对虾交尾后不久到1月份之前,释出纳精囊中的精子入海水或人工海水中时,会发生胞吐及细胞质突起现象<sup>1)</sup>,且伴有凝集现象的出现(图版I:6),但产卵前后雌虾纳精囊中精子则没有这种现象。(2)取不同时期纳精囊中的精子诱导顶体反应,可见随着时间的推移,精子顶体反应率略有升高<sup>1)</sup>,这也说明,精子在纳精囊中有一个缓慢成熟的过程。(3)经过超低温保存的精子具备了授精能力,这与降温复温过程的激活有关。由于纳精囊中精子直到产卵前顶体反应率都不会升得太高,说明纳精囊中精子并非完全成熟。为此本文作者认为,在自然状况下,纳精囊中的精子并非是真正获能的精子,精子的获能也并非发生在交尾过程中;也许是在产卵的瞬间,卵膜及卵膜分泌物的刺激,“精浆”中抑制精子活性的物质稀释,溶氧的迅速升高等促使精子“获能”,并马上发生顶体反应而授精。

## 参 考 文 献

- 许华等,1988,生物化学与生物物理学进展,15(6):248.  
朱伟杰等,1991,暨南大学学报,12(1):103—107.  
陈章波等,1989,中国水产(台湾),443:7—19.

1) 柯亚夫等,1993,中国对虾精子顶体反应的研究。

- 杨景山, 1985, 生理科学进展, **16** (4): 296 — 301.
- Anchordoguy, T. J. et al., 1988, *Cryobiology*, **25**: 238 — 243.
- Chow, S., 1982, *Bull. Jap. Soci. Sci. Fish.*, **48** (12): 1 693 — 1 695.
- Chow, S. et al., 1985, *Biol. Bull.*, **168**: 471 — 475.
- Fahy, G. M., 1986, *Cryobiology*, **23**: 1 — 13.
- Gesteira, T. C. V. et al., 1988, *J. Crus. Biol.*, **8** (3): 317 — 321.
- Mazur, P., 1970, *Science*, **168**: 939 — 949.
- McGann, H., 1978, *Cryobiology*, **15**: 362 — 364.
- Subramonian, T. et al., 1989, Fifth Int. Cong. Inve. Rep., Abstracts, 57 pp.

## CRYOPRESERVATION OF SPERMATOOZOA FROM THE MARINE SHRIMP *PENAEUS CHINENSIS*

Ke Yafu, Cai Nan'er

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

**Abstract** Cryopreservation (  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  ) of spermatozoa from the marine shrimp *Peneus chinensis* was studied from 1991 to 1993. In cryopreservation of spermatozoa from thelycum, it is best that artificial or natural seawater is diluted with 10% DMSO and 5% — 10% Glycerol. Successful artificial insemination was observed after thawing of spermatozoa preserved in liquid nitrogen (  $\text{LN}_2$  ) for 94 — 138 days. The highest fertility rate of the spermatozoa from thelycum is 59%.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  are necessary for cryopreservation of chinese shrimp spermatozoa.

Observation with optical microscope, scanning electron microscope ( SEM ) and transmission electron microscope ( TEM ) showed several types of cryopreservation freezing injury such as snapping of “ spike ”, acrosome breaking off, breaking at the nuclear body. The freezing injuries prevent acrosome filament formation.

**Key words** *Penaeus chinensis* Spermatozoa Cryopreservation Artificial insemination