

文章编号: 1000-0615(2006)02-0170-05

马氏珠母贝精子的超低温保存

王梅芳, 余祥勇, 刘永, 毛勇, 于非非

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 通过比较不同 pH 值(5.5~9.5)、不同盐度的海水等作为基础液对马氏珠母贝精子保存的影响, 选择其中无激活精子作用又对其生理特性(活力, 寿命, 受精能力等)无影响者, 加入二甲亚砜抗冻剂配制成超低温保存的抗冻保护液, 精液与保护液按 1:10 和 1:20 的比例混合, 样品按 4 组不同的降温程序平衡后转入液氮冷冻, 比较其超低温冻存的效果。结果表明: 以海水(pH 7.5~8.0)为基础液, 配制 10% DMSO 作为抗冻保护液, 精液与保护液比例为 1:20, 在低温(0~4℃)中平衡约 30 min, 在距液氮面 15 cm、5 cm 处分别停留 5 min、10 min 后转入液氮(-196℃), 冻存精子效果良好。冷冻 24 h、48 h 及 5 个月后, 在 38~40℃下水浴解冻复苏后, 用终浓度 0.25‰的氨海水刺激, 精子存活率可超过 60%, 受精率可达 80%。

关键词: 马氏珠母贝; 精子; 超低温保存

中图分类号: S917 文献标识码: A

Study on cryopreservation of spermatozoa in *Pinctada martensii*

WANG Mei-fang, YU Xiang-yong, LIU Yong, MAO Yong, YU Fei-fei

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Comparing solutions of different pH (5.5-9.5) and different salinity to develop suitable basic solution for spermatozoa cryopreservation of pearl oyster *Pinctada martensii*, we chose the basic solution, which could inhibit the activation and had less influence on the physiological characteristics (such as activity, life span and fertilizing capability) of the spermatozoa, and adopted dimethyl sulfoxide (DMSO) as antifreeze to compound diluents for protecting the spermatozoa. After combination of natural seawater with DMSO (10%) and seminal fluid at the ratios of 1:10 and 1:20, the specimens were transferred into LN2 by 4 temperature-lowering processes. The conclusion showed that cryopreservation processes were effective in which the samples were pre-frozen in 0-8℃ within 30 minutes, swung at 15 cm above for 5 min and then at 5 cm above LN2 for 10min, transferred them into LN2 for prolonging period (24 h, 48 h and 5 months), and then thawed them with water at 35-40℃, the survival rate of spermatozoa could exceed 60% when activated with 0.25‰ ammonia seawater and the fertilization rate could reach 80%.

Key words: *Pinctada martensii*; spermatozoa; cryopreservation

配子的长期保存在繁殖生物学、遗传育种和种质资源保护等方面具有重要意义, 尤其是能为珍稀物种和重要经济种类基因资源的长期保存提供有效技术手段, 也可作为克服因繁殖期差异和地理隔离所导致群体或物种间杂交障碍的途径。

利用超低温(液氮)保存雄配子的研究在海洋动物中已取得一些进展, 但主要集中在鱼类^[1-3], 贝类方面在鲍鱼、牡蛎和扇贝等中^[4-9]有过相关报道。

马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)是重要的育珠贝, 已进行了 40 多年的养殖和育珠生产, 但一

收稿日期: 2005-07-26

资助项目: 国家海洋“863”项目(2002AA603022); 广东省科技计划项目(2003C20330)

作者简介: 王梅芳(1964-), 女, 甘肃秦安人, 副教授, 主要从事发育生物学及贝类遗传育种。Tel: 0759-2382184

通讯作者: 余祥勇, Tel: 0759-2382184, E-mail: yuxyong@tom.com

直没有开展系统的良种选育,其育珠的单产和质量明显下降。近年来,我国南方多家科研机构开展了其良种选育工作^[10,11],目前已得到具有某些优良性状的群体;保存这些良种个体的配子材料,对其遗传研究和生产推广都有重要意义。精液的冻存是保存种质的有效方法,而目前马氏珠母贝精液超低温冷冻保存技术的研究尚未见有关报道。我们在对其精子低温冷冻保存初步研究的基础上^[12],进一步就精子超低温冷冻过程中基础液及冷冻程序等开展研究,以期建立马氏珠母贝精液超低温冷冻保存的适宜方法。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验所用的马氏珠母贝取自广东海洋大学雷州流沙珍珠基地,实验室暂养,选择性腺成熟饱满的雄贝,用吸管直接从性腺吸取精液备用。

1.2 精子的检测

取少量精液于载玻片上,滴加适量的氨海水激活,光镜下观察。估测视野中活动精子的数量占全部精子数量的百分比(精子存活率或激活率);精子的活力状态可分为极活泼(++++)、活泼(+++)、活动(++)和颤动(+)4种。冻存精子解冻后用常规方法受精并观察早期胚胎发育,通过计算受精率来评价超低温冷冻的效果。其中受精率以开始卵裂的卵数占卵子总数的百分比表示。用于检测冷冻精子受精能力的卵取自刚解剖的成熟母贝。

1.3 基础液的筛选

4种基础液的配制与筛选 A:柠檬酸钠系:柠檬酸钠2.9g,甘氨酸2.0g,于蒸馏水溶解至100mL,pH7.3,参考秦鹏春^[13]法;B:KCl NaCl为1:4,取4%KCl25mL与100mL4%NaCl混合,pH6.2,参考江世贵等^[2]方法;C:0.8%NaCl,pH7.30(生理等渗液);D:天然海水,pH8.0。

用上述4种基础液分别对精液进行稀释(精液基础液为1:10),然后装入1.5mL冷冻管中,分两大组分别放置在室温和低温(4℃)下,2h后对精子进行镜检,记录加氨水后精子的存活率和活力情况,平行做3组,取平均值。

不同pH值海水的保存效果 将海水用乙酸和氢氧化钠调配pH值为5.5、7.0、7.5、8.0(天然海水)、8.5、9.0、9.5,然后如下操作:

iv组,将精液分别加入到不同pH值的海水中,观察精子是否活动并比较激活或抑制效果;㊟组,向iv组中未激活精子的5组海水(pH5.5~8.5)中再加入氨海水,记录精子的激活率,从中筛选出精子的激活率、活力均较好者作为基础液。

不同盐度海水的保存效果 将天然海水与蒸馏水按不同比例配成下列4组不同盐度的海水。A组:天然海水,盐度30;B组:海水:蒸馏水为1:1;C组:海水:蒸馏水为1:2;D组:海水:蒸馏水为1:3。

以上述海水作基础液,加精液后分别置室温和4℃下保存,保存不同时间(0~16h)后取样,按1.2方法镜检,记录精子的存活率,平行做3组,取平均值,比较不同盐度海水的保存和激活效果。

1.4 降温程序的筛选

参考余祥勇等^[12]实验结果,以海水配制的10%DMSO为抗冻保护液,精液:保护液按1:20体积比进行稀释(抗冻保护液在4℃冰箱中预冷,分3次滴加于精液中,每次间隔5min),经4℃平衡30min后,将样品分装于1.5mL的冷冻管中,按以下4种程序降温后再放入液氮中,A组:在距液氮面约15cm处平衡5min;B组:在距液氮面15cm、5cm处均平衡5min;C组:在距液氮面15cm、5cm处分别平衡5、10min;D组:不经液氮面平衡直接投入液氮。液氮中保存24h、48h后解冻,按1.2方法镜检,比较冻存效果。

1.5 解冻

以室温流水或37~40℃水浴解冻,融化后置室温,待用。按1.2方法对冷冻精液进行镜检。

1.6 精子激活的氨海水浓度和人工授精的精卵比例

精液样品经1.4中C组程序冻存24h、5个月,39℃水浴快速解冻,然后将冷冻管中的1mL冻精加海水至10mL稀释,分次加入浓度为5%的氨海水刺激,镜检激活效果。选成熟母贝,解剖取卵,洗卵后放入10mL海水中,备用。精卵用血球计数板计数。

设8组解冻精液的精卵数量比,分别为5:1、10:1、15:1、20:1、30:1、40:1、50:1、100:1,以新鲜精液为对照组,将精子在0.25%氨海水激活后,与卵液按比例混合进行人工授精试验,观察胚胎发育情况,并计算受精率。

2 结果与分析

2.1 基础液的选择

不同类型基础液的选择 4种 pH 值和成分不同的基础液(A、B、C、D)分别稀释马氏珠母贝精液后,置室温(23℃)和低温(4℃)下2h,镜检活动精子存活率和活力情况,观察结果见表1。

表1 4种基础液对精子存活率和活力的影响

Tab.1 The effects of 4 extenders on survival rates and vitality of spermatozoa

基础液 extenders	23℃		4℃	
	精子存活率(%) survival rates	活力 vitality	精子存活率(%) survival rates	活力 vitality
A	20	++	30	+++
B	85	++++	90	++++
C	5	+	5	+
D	90	++++	95	++++

从表1可以看出,低温的保活效果比常温稍好,而B组(NaCl+KCl)、D组(海水)的低温保存效果均好于其它溶液。

不同pH值海水溶液的选择 按照上述iv、⊕两组程序操作,在室温(20℃)条件下镜检在不同pH值的海水中的精子激活率(表2)。

表2 不同pH值的海水溶液中的精子激活率

Tab.2 The activating rate of spermatozoa in seawaters of different pH values %

组别 groups	pH							
	5.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	
iv	0	0	0	0	0	<5	<5	
⊕	70~80	70	>90	>90	>90	-	-	

iv组中,将精液直接加入到各pH值海水溶液后即时观察,精子在pH 5.5~8.5的海水中均未被激活,即短时间内,低pH海水(包括天然海水)不会直接激活精子;⊕组,向pH值低于8.5的5组中加入氨海水激活精子,观察pH 7.5~8.5海水中的激活效果较好;表明该pH范围对精子活力的影响较小,因而选择天然海水(pH 7.5~8.2)作基础液较合适。

不同盐度海水溶液的选择 以不同盐度的海水作为基础液,按精液:基础液为1:20稀释后,分别保存在室温和4℃下比较保活效果。在不同保存温度和时间内,不同盐度基础液中精子存活率见表3。

表3 不同盐度的海水溶液中的精子存活率

Tab.3 The survival rates of spermatozoa in seawaters of different salinities

保存温度(℃) temperature	保存时间(h) time	精子存活率(%) survival rates			
		A	B	C	D
28(室温)	0	60	40	40	40
	1	95	60	9	0
	2	98	83	27	1
	4	93	30	2	0
	6	63	33	6	3
	16	5	0	0	0
4	2	96	40	7	1
	4	96	43	6	2
	6	96	50	7	0
	16	5	0	0	0

从激活效果来看:1)A组(天然海水)好于其它组;2)在室温下,2h存活率最高,说明精子需在海水浸泡一段时间后,才被完全激活;3)4℃下,在6h内精子存活率一直较高,说明低温可减缓精子活力下降。考虑到自然繁殖状态及上述不同pH值、盐度等因素对精子活力的影响,可选择天然海水(pH 7.5~8.0)作基础液。

2.2 精液超低温冷冻程序

精液样品经4℃平衡30min后,再按1.4中4组不同的降温程序平衡后投入液氮冷冻,24h后38℃水浴解冻,镜检结果见表4。

表4 不同降温程序对超低温保存精子的影响

Tab.4 The effects of 4 different procedures on cryopreserved spermatozoa

降温程序 procedures	精子存活率(%) survival rates	活力 vitality	运动时间(min) motile duration
A	15~20	++	5
B	25~35	++	5
C	50~60	+++	7
D	<5	+	2

由表4知,不同的降温程序对精液的超低温保存有影响,C组(距液氮面15、5cm处分别平衡5、10min以上)的效果最好,D组(不经平衡直接投入液氮的)效果较差。精液超低温(-196℃)冻存48h、5个月的样品与24h的样品效果差别不大,说明-196℃中保存精子是安全的;观察还发现:经过冷冻程序的精子,复活后加氨海水,其运动时间可持续2~7min,这个时间与鲜精的实验结果(约10min)相比要短一些^[4]。

2.3 解冻

用室温自来水或37~40℃水浴解冻后,镜检结果表明,较快融化对精子复活有利,一般水温

在 38~40 °C、水浴 2 min 内解冻, 效果较好。

2.4 精子的激活和授精的精卵比例

解冻后加海水至 10 mL, 分次加入 5‰ 氨海水, 每次 0.1 mL。激活率及活力状况见表 5。

表 5 不同浓度氨海水对解冻精子的激活效果

氨水终浓度 (‰) ammonia in seawater	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
激活率 (%) activating rate	0	< 10	< 20	45	60	60
活力 vitality	-	+	++	+++	+++	+++

结果表明, 当氨海水终浓度达到 0.25‰ 时, 精子激活率达 60%, 该浓度大于通常情况下所需的氨激活浓度(约 0.09‰)。

精子在 0.25‰ 氨海水激活后, 按不同精卵比混合, 采用常规贝类人工授精方法操作, 观察胚胎发育情况, 实验组(解冻精液)与对照组(新鲜精液)在不同精卵比例下的受精率见图 1。

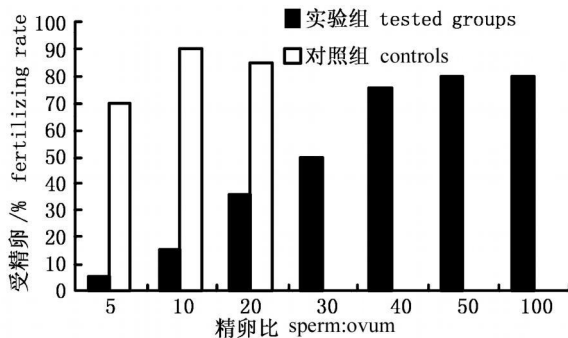


图 1 不同精卵数量比例混合后的受精率

Fig. 1 Fertilizing rate at different ratios of sperm to ovum

图 1 显示, 实验组中精卵比达(40~50):1 时与对照组 10:1 的受精率相当, 可能说明: 冷冻样品全部精子中, 可被激活的约 60%, 但其中只有 25% 左右具有受精能力, 而其他 75%, 虽能活动但因冷冻使受精能力受损或丧失。观察还发现, 冻精组与对照组发育进程无差异, 但同步性略差; 冷冻精子的受精率可达 80% 以上。

3 讨论

3.1 马氏珠母贝精子冷冻的基础液

基础液是否合适, 不仅影响冷冻保存的效果, 在复温后也会影响受精率, 孵化率以及胚胎发育

等。合适的基础液应对精子没有激活作用, 配制和使用应尽量简单。柠檬酸钠盐除用于哺乳类精液的冷冻, 也用于扇贝的胚胎保存^[15], 而 4% NaCl 或 4% 的 KCl: NaCl 为 1:4 基础液在海水鱼精液冷冻中采用, 把它们用于珠母贝精子的保存时, KCl 和 NaCl 混合作为基础液的效果较好, 根据喻达辉的实验结果, 1%~5% NaCl 或 KCl 对精子都不能直接激活, 而将 pH 调到 10.5 以上时, NaCl 或 KCl 有很好激活效果; 天然海水不会激活精子^[16], 海水是双壳类精子冷冻较适宜的基础液^[8,9], 本文用于马氏珠母贝的效果也不错; 这可能是由于双壳类受精的过程是在天然海水中进行, 海水对精子的生理活性没有不利影响; 但近岸海水的理化性质在不同水域、不同季节是不稳定的, 因此对于马氏珠母贝精子冷冻开展一些更严格的实验研究, 基础液还应以 pH 低于 8.2 的 KCl 和 NaCl 混合液或按配方严格调配海水更为适宜。

海水与双壳类精子原生质的 pH 值和渗透压存在差异, 因此调节海水的 pH 值和盐度与精子原生质相适应, 理应不会激活精子而具有较好的保存效果。精子原生质的 pH 值和渗透压通常比海水低, 因此, 我们考虑海水作为基础液, 主要是要降低 pH 值和盐度。在调低海水的 pH 值时选用了乙酸, 主要考虑它是有机二元酸, 因有一定缓冲作用而对冷冻保存有利。我们的结果表明, 减低 pH 值至 8.0 以下确实因不激活精子而对保存有利, 但降低盐度(如与生理等渗液接近的 0.8% NaCl)保存效果却极差; 而 4% NaCl 和 4% 的 KCl 的混合液相当于盐度高达 40, 却同盐度 30 的天然海水一样都有较好的保存效果, 这可能暗示珍珠贝作为变渗动物, 其精子已具有了某种适应受精的海水环境变化的机制, 长期生活、繁殖在高盐水域, 高渗的外部环境也不会对精子造成脱水或其他损害。

3.2 马氏珠母贝精液冻存和复活受精的精卵比例

太平洋牡蛎^[8]和扇贝^[9]精液超低温保存时, 均发现距离液氮面高度及预冷冻时间与保存精子的存活率有密切关系。本文马氏珠母贝精液的冷冻也能得到同样的结论, 不同高度及平衡时间预处理实际上是对降温速率的控制, 不同物种和实验系统需要摸索才能找到适宜的方式。不经平衡直接投入(D组)效果较差, 可能是这种快速冷冻

过程对精子造成较大的伤害。

精液的冷冻过程对精子造成伤害,主要是来自温度转换的过程中。冷冻或融化过程中在细胞内部形成的冰晶可导致细胞死亡^[17]。因此冷冻时要掌握各个阶段的冷冻平衡时间。一般来说,精子原生质浓度比介质高,冷冻过快则胞内水分来不及外渗就被冻结成冰,而冰晶的存在使精子结构损伤;冷冻过慢,胞外介质中的水先结冰,精子会因脱水而受到伤害。目前在贝类的精子冷冻的研究报道中,多数还是采取在液氮面一定距离停留一段时间的办法,其程序的稳定性还有待提高。随着研究的深入、低温技术的发展和贝类的性细胞低温保存研究受到更多的重视,借助计算机来控制降、复温过程,不久的将来会建立起各类生物配子低温冷冻可靠、以至标准化的技术程序。

复苏受精时适宜的精卵比例,对受精率有明显的影响,以前的研究未在这方面进行深入探讨^[18,19]。复苏后受精率目前是衡量冷冻技术成功和精液质量的主要标准。对于像哺乳类那样每次产1个或几个卵的生物而言,精子的数量几乎永远大大超过卵的数量,在正常状态下,是数以百万计中一个优秀者幸运与卵结合,因此,影响受精率的主要因素是卵的成熟状况。而产卵量较多生物的受精率则涉及到较多的因素,但通常状态下,精子的数量也会超过卵的数量,因此,“受精率”一词在多数情况下,是用来评价卵的质量以及它接受精子而激活生命的能力,但在很多情况下(如对冷冻精子)也用来评估精子的质量;然而冷冻后精子使卵受精(或“授”精给卵)的能力,评价起来则复杂许多。在此,受精过程与评价系统的稳定和标准化非常重要,要综合考虑多种因素,尽量减少一些可能的影响因子,如用以检测多份精子的卵应该来源于同一个雌贝,密度和数量(不应太多)也应该确定。

由于精液超低温冷冻后,丧失受精能力的精子占了相当比率(30%~50%),因此,受精时精子的量要比常规大许多,在研究与生产中会产生一些新的问题,如失活精子对卵受精的影响、早期胚胎是否在多余精子及精液物质等的存在下发育不正常等,这都需要更深入地研究。

本校水产学院海洋生物系2004届学生肖哲豪、钟国光,2005届学生齐巨龙、周钊洪参加了部分工作,特此致谢。

参考文献:

- [1] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 161-168.
- [2] 江世贵, 苏天凤, 喻达辉, 等. 中华乌塘鳢精子的生物学特性及其超低温保存[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 119-122.
- [3] 洪万树, 张其永, 许胜发, 等. 花鲈精子特性及其精液超低温冷冻保存[J]. 海洋学报(中文版), 1996, 18(2): 97-104.
- [4] Gwo J C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review[J]. Aquaculture Research, 2000, 31(3): 259-271.
- [5] Nascimento I A, Leite M B, Sampaio de Araujo M M, et al. Selection of cryoprotectants based on their toxic effects on oyster gametes and embryos[J]. Cryobiology, 2005, 51(1): 113-117.
- [6] Ieropoli S, Masullo P, Santo Mdo E, et al. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilisation viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Cryobiology, 2004, 49(3): 250-257.
- [7] Paniagua-Chavez C G, Buchanan J T, Tiersch T R, et al. Advances in the cryopreservation of gametes and larvae of the eastern oyster [J]. Journal of Shellfish Research, 2000, 19(1): 654.
- [8] 李, 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(自然科学版), 2002, 32(2): 207-211.
- [9] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 扇贝精液的超低温保存技术研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 624-628.
- [10] 王梅芳, 余祥勇, 刘永, 等. 马氏珠母贝杂交与自繁后代及企鹅珍珠贝间同工酶差异分析[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(6): 777-782.
- [11] 何毛贤, 姜卫国. 合浦珠母贝遗传育种研究进展[J]. 海洋湖沼通报, 2000, (1): 75-82.
- [12] 余祥勇, 王梅芳, 陈钢荣, 等. 马氏珠母贝精子低温保存主要影响因素的研究[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(3): 96-99.
- [13] 秦鹏春. 哺乳动物胚胎学[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001. 444-447.
- [14] 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.
- [15] 薛钦昭. 栉孔扇贝胚胎超低温液氮保存[J]. 海洋科学, 1994, (4): 44-47.
- [16] 喻达辉, 江世贵, 陈竞春, 等. 合浦珠母贝精子激活的离子选择性[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 101-103.
- [17] 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, 1995. 41-46.
- [18] 陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 鲢、鲤、团头鲂、草鱼精液冷冻保存的研究[J]. 动物学报, 1992, 38(4): 413-424.
- [19] 李纯, 李军, 薛钦昭. 海洋生物种质细胞低温保存与机理[J]. 海洋科学, 2000, 24(4): 12-15.