

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.02.019

## 黄鳝精液 -80℃超低温冷冻保存试验

闫秀明<sup>1</sup>, 张林达<sup>2</sup>, 张小雪<sup>1\*</sup>

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵阳 550025;

2. 毕节地区畜牧兽医研究所, 贵州毕节 551700)

**摘要:**采用 -80℃超低温冷冻方法对黄鳝精液冷冻保存技术进行了研究。获得如下结果:黄鳝精子在冻存前不需低温平衡过程;10% DMSO 作为抗冻保护剂效果最好,以 200 μL 离心管为冻存容器,保存 168 h,精子相对活力可达 79%;以细管为冻存容器,精子相对活力可达 88%。此结果为黄鳝精子冷冻保存库的建立提供了实验依据。

**关键词:**黄鳝; 精子; 超低温冷冻保存

中图分类号: Q959.4; Q954.43 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2011)02-0207-05

### A Study on -80℃ Cryopreservation Techniques of *Monopterus albus* Spermatozoa

YAN Xiu-ming<sup>1</sup>, ZHANG Lin-da<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-xue<sup>1\*</sup>

(1. Guizhou Key Laboratory of Animal Genetics Breeding and Reproduction, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Bijie Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Bijie, Guizhou Province 551700, China)

**Abstract:** In this paper, the -80℃ cryopreservation techniques of *Monopterus albus* spermatozoa were studied. The following results were obtained: Before -80℃ cryopreservation, a lower-temperature equilibrium process was not needed; if 10% DMSO was used as an anti-freezing protective agent, the sperm relative activity was higher than that of others; if 10% DMSO was used as an anti-freezing protective agent and 200 μL centrifuge tubes used as freezing containers, the sperm relative activity increased to 79% when preserved 168 h; Moreover, when thin tubes were used as containers, the sperm relative activity was 88%, when preserved the same period of time. The results of the study would be an experimental basis for the establishment of a *Monopterus albus* sperm cryopreservation library.

**Key words:** *Monopterus albus*; sperm; cryopreservation

黄鳝 *Monopterus albus* 隶属于硬骨鱼纲 Osteichthyes 合鳃目 Synbranchiformes 合鳃科 Synbranchidae 黄鳝属 *Monopterus*。其肉质鲜嫩,营养丰富,经济价值高,深受国内外市场青睐。然而,到目前为止,黄鳝养殖产业化仍未真正形成,其主要原因是黄鳝苗种规模繁殖技术还没有取得实质性突破。在当前黄鳝苗的人工繁殖过程中,由于雄鳝数量急剧减少以及雌雄亲鳝性成熟时间不同步等多方面因素的影响,使得大量繁殖较为困难。鱼类精液冷冻保存技术可以克服鱼类人工繁殖中雄性少、雌雄亲鱼成熟不同步等问题,国内外学者对各种鱼类精液的冷冻保存进行了大量研究(鲁大椿等,1989,1997;陈松林等,1992;江世贵等,2000,2006;Hisashi, 2000;Kebby, 2003;Cosson *et al.*, 2005;James & Satterfield, 2005;Tsvetkova *et al.*, 2005),但是关于黄鳝精液保

存研究的报道却不多,且仅限于低温条件下的临时性储存(苟兴能,2006)。为此,本研究进行 -80℃超低温冰箱的黄鳝精液冷冻保存试验,以期获得一种简便易行、持续时间较长的黄鳝精液保存方法,为进一步开展黄鳝种苗的规模繁殖、黄鳝种质资源保护和品种改良等奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 精子采集

性成熟雄性黄鳝于 2009 年 4~8 月购自贵州省贵阳市花溪区徐家冲农贸市场,受试黄鳝共 286 条,平均体长 52.84 cm ± 6.32 cm,平均体重 215.35 g ± 35.74 g。取成熟度好的个体,解剖后取性腺(性腺平均长度 15.12 cm ± 3.65 cm),挤压精巢取精液,平均精液量为 176.53 μL ± 42.21 μL。在显微镜下,采

收稿日期:2010-05-17 接受日期:2010-07-11

基金项目:贵州省自然科学基金项目[黔科合 J 字(2008)2130]; 贵州大学引进人才科研项目[贵大人基合字(2007)003]

作者简介:闫秀明(1984~),男,硕士研究生, E-mail: yxm2tjj@126.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangxx508@163.com

用医用血球计数板计数,然后用 Hanks' 液稀释剂将精液稀释,使精子浓度达  $5 \times 10^5$  个/mL 后进行冷冻保存试验。

## 1.2 稀释液的配制

表 1 稀释液成分  
Table 1 Diluent composition

溶液 Solution	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	葡萄糖 Glucose	三蒸水 Triple-distilled water
A	0.06 g	0.06 g	0.2 g	8 g	—	—	1 g	750 mL
B	—	—	—	—	0.14 g	—	—	100 mL
C	—	—	—	—	—	0.35 g	—	100 mL

注:“—”表示不含此成分

## 1.3 不同平衡方法及冷冻保存方法的筛选

### 1.3.1 不同平衡方法的筛选

解剖黄鳝,取出黄鳝精巢,挤压精巢,采集鲜精。按 1 份鲜精与 5 份水的比例混合激活,利用医用血球计数板在光学显微镜下目测活力。测定活力后,分别取 3 份 20  $\mu$ L 鲜精,分装于 3 个 200  $\mu$ L 离心管中,每管中分别加入 60  $\mu$ L 稀释液与二甲亚砜(DMSO)配制成的混合液。使 3 个 200  $\mu$ L 离心管中的 DMSO 最终浓度均为 10%,分别用 4 $^{\circ}$ C 平衡 30 min、-20 $^{\circ}$ C 平衡 15 min,只在 4 $^{\circ}$ C 平衡 30 min,无需平衡 3 种不同方法平衡后,置于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冷冻冰箱中冻存 24 h,然后取出并迅速浸入 55 $^{\circ}$ C 水浴中解冻 10~15 s 至半融状态,然后进行精子活力测定。

将 B 液缓缓地注入 A 液中,得到混合液。再将 C 液倒入混合液中混匀,容量瓶定容至 1 L,转入试剂瓶中,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

### 1.3.2 200 $\mu$ L 离心管冻存法

取 1 条雄性黄鳝,采用 1.1 的方法采集精子并进行精子活性检测,选择精子活力(有活性精子占总精子的比例)达到 95% 以上的个体进行试验。取 1 条精子活力达 95% 以上的黄鳝,按每管 20  $\mu$ L 精液的标准,分装于 6 个 200  $\mu$ L 离心管中。每管再分别加入 60  $\mu$ L 稀释液与 DMSO 或甘油的混合液,使冷冻保护剂的最终浓度分别达到 5%、10%、15% DMSO 和 5%、10%、15% 甘油,混匀,无需平衡,直接置于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中冷冻保存。

### 1.3.3 细管冻存法

用 1.3.2 中的试验方法,分别配置最终抗冻保护剂浓度为 5%、10%、15% DMSO 和 5%、10%、15% 甘油的精子混合液,混匀。用细管(直径 0.3 mm,长 15 cm)分别吸取 DMSO 精子混合液和甘油精子混合液,每个细管吸收量为 40  $\mu$ L 左右,细管两端灼烧封口,无需平衡,直接置 -80 $^{\circ}$ C

参照陈松林等(1992)所使用的鱼类精子稀释液配方,配制黄鳝精子冷冻保存稀释液。稀释液成分见表 1。

超低温冷冻冰箱保存。

## 1.4 精子复苏与活力检测

分别于冻存 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 和 168 h 后取出不同冻存条件下的精子,将冷冻管迅速浸入 55 $^{\circ}$ C 水浴中解冻 10~15 s 至半融状态后,进行精子活力检测。

按照运动状态可将精子的运动形式分为:快速直线运动、慢速直线运动、摆动运动和无运动。快速直线运动和慢速直线运动的精子判定为具有活力。

精子活力检测采用光学显微镜镜检方法:取 20  $\mu$ L 鲜精或解冻精子溶液,与蒸馏水按 1:9 体积比例混匀,吸管取 1 滴稀释后的精液,滴在 16 格  $\times$  25 格的血球计数板上,盖上盖玻片,置于光学显微镜下观察精子活力,计数 3 次取平均值获得精子密度。

血球计数板精子密度计算公式:

$$\text{精子密度(个/mL)} = 100 \text{ 小格内精子个数} / 100 \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

由于实验过程中使用了不同个体的黄鳝进行试验,为了便于比较不同黄鳝个体间的精子活力,在此实验中引入“复苏后精子相对活力”这一概念。

$$\text{复苏后精子相对活力} = (\text{精子复苏后活力} / \text{鲜精活力}) \times 100\%$$

鲜精活力:鲜精激活后,光学显微镜下通过血球计数板计数得到的鲜精中有活性精子密度占总精子密度的百分比。

精子复苏后活力:冻精复苏后,光学显微镜下通过血球计数板计数得到的复苏后的冻精中有活性精子密度占总精子密度的百分比。

## 1.5 数据分析处理

所有数据均用 SPSS V17.0 软件分析,计算平均值与标准差( $\bar{x} \pm s$ ),采用 *t* 检验。

## 2 实验结果

### 2.1 黄鳝精子生物学特性

通过常规检测,测得实际用于实验的 200 条黄鳝的平均产精量为  $159.91 \mu\text{L} \pm 32.41 \mu\text{L}$ ,最高产精量达  $267 \mu\text{L}$ ;鲜精平均精子密度为  $(7.70 \pm 0.83) \times 10^6$  个/mL,最高为  $9.45 \times 10^6$  个/mL;鲜精平均精子活力为  $90.15\% \pm 1.98\%$ ,最高达  $95.67\%$ 。

### 2.2 平衡方法筛选

表 2 表明,平衡方法 3(即无须平衡,直接置  $-80^\circ\text{C}$  超低温冰箱中冻存)效果最好。

表 2 不同平衡方法对精液冷冻保存的影响  
Table 2 The effects on the preservation of semen with different balanced approaches

平衡方法 Balanced methods	鲜精活力 Vitality of fresh semem (%)	复苏后活力 Vitality of recovery (%)
方法 1	$87.73 \pm 0.964$	$57.76 \pm 1.097$
方法 2	$87.73 \pm 0.964$	$65.49 \pm 0.986$
方法 3	$87.73 \pm 0.964$	$72.08 \pm 0.891$

### 2.3 不同抗冻保护剂对精子活力的影响

黄鳝精子分别添加 5%、10%、15% DMSO 和 5%、10%、15% 甘油抗冻保护剂后,用  $200 \mu\text{L}$  离心管  $-80^\circ\text{C}$  超低温冷冻保存 24 h、48 h、72 h、96 h 后取出,解冻复苏后进行精子活力检测,计算相对活力并进行比较,结果见图 1。

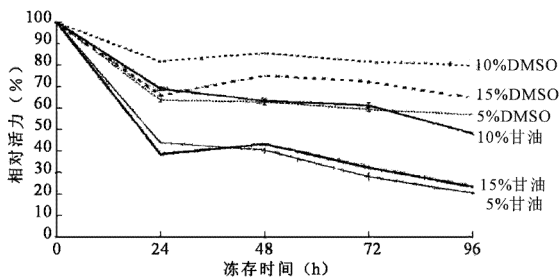


图 1 不同种类和不同浓度抗冻保护剂对黄鳝精子活力的影响  
Fig. 1 The impacts of different types, concentrations and different anti-freezing protection agents on sperm motility of *Monopterus albus*

由图 1 可知,  $200 \mu\text{L}$  离心管-超低温冷冻冰箱冻存方法,随着时间推移,甘油组精子复苏后活力明显低于 DMSO 组,表明 DMSO 对黄鳝精子的抗冻保护效果优于甘油。而 DMSO 组中,10% DMSO 抗冻保护剂抗冻效果最好。通过筛选后,选择 10% DMSO 实验组做后续冻存实验,结果见图 2。

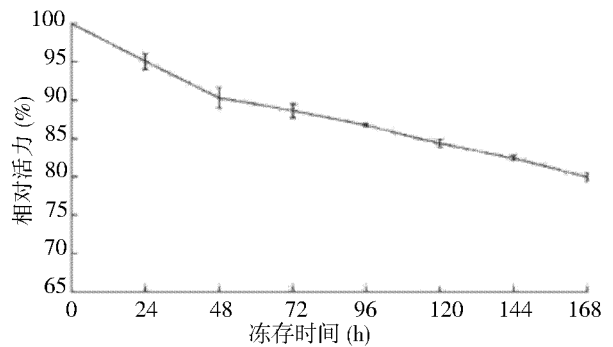


图 2 10% DMSO 超低温冻存 24 ~ 168 h 后精子活力变化  
Fig. 2 The change in sperm motility after 24 ~ 168 h ultra-low temperature freezing with 10% DMSO as cryoprotectant

图 1 显示,在不同抗冻保护剂条件下,冻存 96 h 内精子复苏后活力均呈不同程度的下降,然而 10% DMSO 条件下,精子活力最高。图 2 表明,10% DMSO 抗冻保护剂  $-80^\circ\text{C}$  冻存 168 h 后,精子的相对活力仍保持在 79%。

对冷冻保护剂和冷冻时间两个因素对黄鳝精子活力影响的差异显著性进行统计分析表明,冷冻保护剂和时间为  $P < 0.01$ ,在  $\alpha = 0.01$  水平上拒绝无效假设,可认为不同种类及浓度的冷冻剂对黄鳝精子的保护作用之间差异显著;不同冷冻保存时间对黄鳝精子的保护作用之间差异显著。因此,黄鳝精子的冷冻保存存活率不仅与冷冻保护剂种类及浓度显著相关,而且也与保存时间显著相关(表 3)。

### 2.4 冻存容器对精子活力的影响

细管(直径 0.3 mm)作为冻存容器、分别用 8%、10% 和 12% DMSO 进行  $-80^\circ\text{C}$  超低温冷冻保存试验,结果见图 3。显示以 10% DMSO 为抗冻保护剂,在细管-超低温冷冻冰箱方法冻存效果最好。经过 168 h 后,精子复苏后相对活力仍然能达 88% 以上。

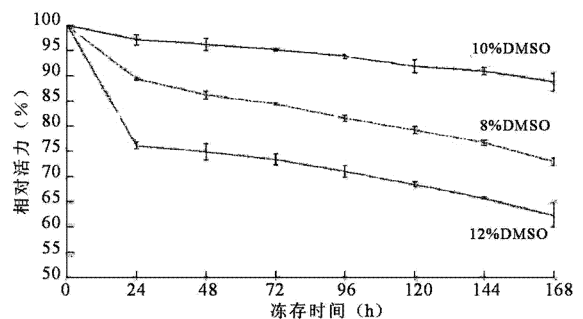


图 3 细管及不同浓度 DMSO  $-80^\circ\text{C}$  超低温冻存 24 ~ 168 h 后精子活力变化  
Fig. 3 The change in sperm motility after 24 ~ 168 h of  $-80^\circ\text{C}$  ultra-low temperature freezing with thin tube and different concentrations of DMSO as cryoprotectant

表 3 200  $\mu\text{L}$  离心管条件下  $-80^\circ\text{C}$  超低温冷冻保存精子活力二因素方差分析  
Table 3 Two factors analysis of variance of the sperm viability with 200  $\mu\text{L}$  centrifuge tube and  $-80^\circ\text{C}$  ultra-low temperature freezing

差异源 Different sources	平方和 Squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	概率 P Probability P
时间 A Time A	0.5682	5	0.1136	71.744 **	0.000 **
抗冻保护剂 B Frost protection agent B	0.0496	3	0.0165	10.445 **	0.000 **
误差 Error	0.0238	15	0.0016		
总计 Total	0.6416	23			

\*  $\alpha = 0.05$ ; \*\*  $\alpha = 0.01$

200  $\mu\text{L}$  离心管法和细管法  $-80^\circ\text{C}$  超低温冷冻保存(10% DMSO 作为抗冻保护剂)之间保存效果的差异见图 4。

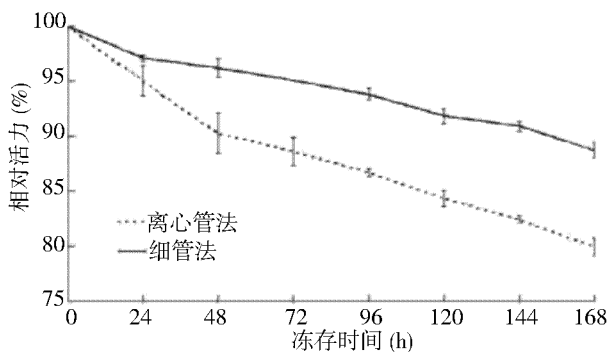


图 4 10% DMSO 条件下不同冻存容器  $-80^\circ\text{C}$  超低温保存 24 ~ 168 h 后精子活力变化

Fig. 4 The change in sperm motility after 24 ~ 168 h of  $-80^\circ\text{C}$  ultra-low temperature freezing with 10% DMSO as cryoprotectant and different freezing containers

综合分析上述结果可知:以 10% DMSO 为抗冻保护剂,并用细管-超低温冻存方法进行黄鳝精子冻存可以达到较佳的冻存效果。

### 3 讨论

#### 3.1 降温平衡对冻存活力的影响

鱼类精液稀释后是否需要在低温环境中降温平衡,目前尚无定论。冷冻保存的早期研究中,大都采用平衡一段时间的做法。Ott (1971) 在研究了虹鳟 *Salmo gairdneri* 等鱼的精液冷冻保存后认为, DMSO 是一种渗透力很强的抗冻剂,在稀释后不需要进行任何平衡处理。本实验结果表明,在黄鳝超低温冰箱冻存过程中,用 DMSO 作抗冻保护剂也不需要平衡处理,进行平衡处理反而会影响冻存效果。推测可能与黄鳝精液本身的生理生化特性有关;另外,实验操作时平均环境气温在  $20^\circ\text{C}$  左右可能也与黄鳝精液无需平衡有关。但未见更高实验操作温度时需要低温平衡的报道,因此此假设需进一步实验证明。

#### 3.2 不同容器对冻存效果的影响

鱼类精子冻存过程中,选用不同的容器也会影

响冻存效果。精液容器的选择标准是透热性好、降温速度快、管壁均匀、耐低温。本实验分别用 200  $\mu\text{L}$  离心管和细管(直径 0.3 mm)两种容器进行对比试验,结果表明:管壁更薄、降温速度更快的细管冻存效果明显优于 200  $\mu\text{L}$  离心管。但在实际生产实践中,由于细管操作繁琐,从而影响其在生产中的应用范围。在对冻存时间要求不是很长时,可以考虑选用 200  $\mu\text{L}$  离心管。

#### 3.3 不同抗冻保护剂对冻存效果的影响

常用的精子冻存抗冻保护剂有 DMSO、甘油、甲醇等。由于甲醇对鱼类精子伤害较大,在实验设计阶段就已将其排除(刘本伟等,2007)。DMSO 对鱼类精子的抗冻保护效果最好,但不同鱼类的最适浓度不尽相同(章龙珍等,2004)。本研究结果显示:10% DMSO 对黄鳝精子的抗冻保护作用最好。这一结果与其它鱼类精子的抗冻保护剂及适用浓度(DMSO:8% ~ 10%)基本相同。

#### 3.4 冻存时间的影响

常温( $25^\circ\text{C}$ )条件下,黄鳝精子只能维持十几分钟至几十分钟的活力(苟兴能,2006);在低温( $0 \sim 4^\circ\text{C}$ )保存状态下,保存 10 h 精子活力可达 75%。本实验在以细管为容器的条件下,黄鳝精液在  $-80^\circ\text{C}$  超低温冷冻条件下保存 168 h,其相对活力仍可达 88%。目前,黄鳝精子冻存后活力需达到何种标准才可用于生产实践并无明确标准。但是,以细管为容器,  $-80^\circ\text{C}$  超低温冷冻保存法冻存 168 h 后,黄鳝精子相对活力仍能达到 88%,这一结论可能对黄鳝的人工繁殖有一定的帮助。

#### 3.5 超低温冷冻冰箱冻存技术

鱼类精液的保存技术包括常温、低温( $0 \sim 4^\circ\text{C}$ )及超低温冷冻保存技术(苟兴能,2008)。超低温冷冻保存技术包括超低温冷冻冰箱冻存技术及液氮冻存技术等。液氮冻存法是目前公认的较佳的动物精子冷冻保存方法,但其冻存成本高,且必须经常添加液氮,操作繁琐。与液氮冻存技术相比,  $-80^\circ\text{C}$  超低温

温冷冻冰箱冻存技术具有操作简便、成本低等优点；与常温和低温(0~4℃)保存技术相比,具有保存效果好、保存时间相对较长等优点。因此,-80℃超低温冷冻冰箱冻存技术在黄鳝的规模繁殖研究和生产实践中具有较好的应用前景。有关用 10% DMSO 为抗冻保护剂、-80℃超低温冷冻保存更长时间是否还能保持较高的精子活力,还有待深入研究。

#### 4 参考文献

- 陈松林,刘宪亭,鲁大椿,等. 1992. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究[J]. 动物学报, 38(4): 413~424.
- 苟兴能. 2006. 黄鳝精子活力及黄鳝受精卵孵化的研究[J]. 水利渔业, 26(4): 3~4, 32.
- 苟兴能. 2008. 黄鳝精子保存液的初步研究[J]. 科学养鱼, (11): 40~41.
- 江世贵,区又君,李加儿,等. 2006. 鲷科鱼类精子超低温保存技术[J]. 水产科技, (3): 22~25.
- 江世贵,苏天凤,喻达辉,等. 2000. 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, 24(2): 119~122.
- 刘本伟,陈松林,田永胜,等. 2007. 不同抗冻剂对牙鲆胚胎毒性研究以及玻璃化颗粒冷冻保存方法的应用[J]. 中国水产科学, 14(5): 733~742.
- 鲁大椿,傅朝君,刘宪亭,等. 1989. 我国主要淡水养殖鱼类精液的生物学特性[J]. 淡水渔业, 19(2): 34~37.
- 鲁大椿,刘宪亭,章龙珍. 1997. 鱼类精液冷冻保存技术操作规程[J]. 淡水渔业, 27(4): 13~17.
- 章龙珍,刘宪亭,陈松林,等. 2004. 二甲亚砜对几种淡水鱼精子渗透压及成活率影响的研究[J]. 水生生物学报, 18(4): 297~302.
- Cosson MP, Billard R, Gatti JL, *et al.* 2005. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy[J]. Aquac, 46: 71~75.
- Hisashi K. 2000. Cryopreservation of rainbow trout Sperm[J]. Bull Soci Sci Fish, 46: 1493~1495.
- James R, Satterfield J. 2005. Factor influencing storage potential of preserved walleye semen[J]. The Progressive Fish-Cultuist, 57: 175~181.
- Kebby JH. 2003. Cryogenic preservation of sperm from striped bass[J]. Trans Amer Fish Soci, 112: 86~94.
- Ott AG. 1971. Fertilization of steelhead trout eggs with cryo-preserved sperm[J]. Fish, 28: 1915~1918.
- Tsvetkova LI, Pronina ND, Kochetov A, *et al.* 2005. On certain factors affecting sperm cryopreservation of carp, *Cyprinus carpio*[J]. Ichthyo, 35(9): 305~314.