

真鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的检测

魏平¹ 竺俊全¹ 闫家强¹ 朱艺峰¹ 杨万喜² 吴雄飞³

(1. 宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室, 宁波 315211; 2. 浙江大学生命科学院精子实验室, 杭州 310058;
3. 宁波市海洋与渔业研究院, 宁波 315012)

SPERM CRYOPRESERVATION AND THE DNA DAMAGE DETECTION IN *PAGROSOMUS MAJOR*

WEI Ping¹, ZHU Jun-Quan¹, YAN Jia-Qiang¹, ZHU Yi-Feng¹, YANG Wan-Xi² and WU Xiong-Fei³

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, the Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. The Sperm Laboratory, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3. Ningbo Academy of Oceanology and Fisheries, Ningbo 315012, China)

关键词: 真鲷; 精子; 超低温冻存; 活力; 受精率; DNA 损伤; 单细胞凝胶电泳

Key words: *Pagrosomus major*; Spermatozoa; Cryopreservation; Sperm motility; Fertilization rate; DNA damage; SCGE

中图分类号: Q959.483; Q492 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)05-1049-07

因名贵经济鱼类育种或种质资源保存的需要, 精子超低温冻存及冻精质量评价的研究已越来越引起研究者的重视。在海产鱼类中, 已见对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[1,2]、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)^[3,4]、大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)^[4]、中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis*)^[5]、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[6]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[7]、细须石首鱼(*Micropogonias undulatus*)^[8]等种类精子冷冻保存的研究报道。冻精及鲜精质量的优劣一般以精子的活力(激活率、运动时间及寿命)与受精率为评价指标, 而以精子核 DNA 损伤程度为精子质量评价依据的研究相对较少, 仅见黑鲷^[9]、虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)^[10]及狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[11]等鱼类中研究报道。在精子活力及受精率等常规指标检测的基础上, 进行精子核 DNA 损伤的检测, 有助于了解抗冻剂种类及浓度对精子核稳定性的影响, 为抗冻剂的优化选择提供细胞学依据。

真鲷(*Pagrosomus major*)是我国名贵的海产经济鱼类, 东南沿海重要的养殖种。开展真鲷精子的超低温冻存、建立优良种质的精子库, 不仅对种质资源保护具有重要意义, 而且在杂交育种中也具有应用价值。有关真鲷精

子超低温冻存的研究已见报道, 但冻存效果因研究者实施的冻存条件不同存在差异^[12-16]; 徐西长等^[17]用单细胞凝胶电泳法(Single-cell gel electrophoresis, SCGE)检测了以二甲基亚砜(DMSO)为抗冻剂的超低温冻存真鲷精子的 DNA 损伤, 但以乙二醇(EG)为抗冻剂的超低温冻存真鲷精子的 DNA 损伤研究未见报道。SCGE 法也称彗星试验, 是一种检测细胞 DNA 损伤的经典方法^[18], 其原理是细胞通过裂解、DNA 解链等过程, 电泳时损伤的 DNA 从核中溢出、朝阳极泳动, 产生一个尾状带即彗尾, 未损伤的 DNA 保持球形, 两者共同形成“彗星”, “彗星”的长度和经荧光染色后“彗星”的荧光强度与 DNA 损伤度相关, 由此可以检测单个细胞的 DNA 损伤^[9,19]。由于能在荧光显微镜下观察细胞 DNA 的损伤情况, 且具有快速、简便及灵敏的特点, 已被应用于猪冻精^[20]、牛冻精^[21]、家蚕冻精^[22]、河蟹冻精^[23]及鱼类冻精^[9-11]等 DNA 损伤的检测中。本研究以 Cortland 溶液为稀释液、DMSO 和 EG 为抗冻剂、0.5 mL 麦细管为冻存管, 两步降温法超低温冻存真鲷精子, 测定了冻精与鲜精的活力与受精率, 并用 SCGE 法检测了精子核 DNA 损伤, 旨在为真鲷精子超低温冻存技术改进及冻精质量的评价提供参考。

收稿日期: 2009-09-04; 修订日期: 2010-06-20

基金项目: 宁波市科学技术局项目(编号: 2006C100044, 2007A31004); 宁波大学人才工程项目(编号: BSL2009004); 宁波大学校级基金项目(编号: XK0715043); 教育部创新团队项目(编号: IRT0734)资助

作者简介: 魏平(1985—), 男, 湖南怀化人; 硕士研究生; 主要从事水产动物育种研究。E-mail: yincong250@163.com

通讯作者: 竺俊全(1964—), E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

试剂 Tris(三羟甲基氨基甲烷)、EDTA(乙二胺四乙酸)、 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (乙二胺四乙酸二钠)、LMA(低熔点琼脂糖)、Sodium lauroyl sarcosine(十二烷基肌氨酸钠)、EB(溴化乙锭)、DMSO(二甲基亚砜)、EG(乙二醇)及 Triton X-100 均购于 BBI, 其他试剂均为国产分析纯。

仪器 低温离心机(Thermo D-37520 Osterode, 德国)、BX51 荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、BG-Power600i 型电泳仪及 BG-SubMIDI 型水平电泳槽(北京百晶公司)、0.5 mL 麦细管(0.5 mL CASSOU straw, 法国 IMV 公司)。

1.2 材料

性成熟的真鲷亲鱼于 2009 年 4 月取自浙江省宁波市海洋与渔业研究院横码基地苗种场, 鱼体重 1.5—2.0 kg/尾, 雄鱼 10 尾、雌鱼 3 尾, 供采精、卵用。

1.3 方法

精液的采集与稀释 先将精液稀释液(Cortland 溶液: NaCl 7.25 g/L, KCl 0.38 g/L, CaCl_2 0.18 g/L, NaHCO_3 1.00 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.23 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.41 g/L, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 1.00 g/L, $\text{pH}=7.00$)与抗冻剂(DMSO 及 EG)按一定比例混合配制制成抗冻液, 置于冰箱(4°C)预冷, 然后进行采精。用洁净的毛巾擦干真鲷生殖孔周围体表, 轻压鱼腹使精液自然流出, 获得无尿污的精液于培养皿中, 置于冰浴上。将采得的精液与抗冻液按 1:3 比例混匀成精液-稀释液混合物, 于 4°C 下平衡 10—15 min。

冷冻与解冻 将平衡过的精液-稀释液混合物分装入体积为 0.5 mL 的麦细管中(每支装约 0.4 mL), 平放在离液氮面 3—5 cm 处平衡 5—8 min 后, 投入液氮中保存。每一抗冻剂浓度保存 6 支。解冻时将麦细管从液氮中快速取出, 于 40°C 水浴中摇动溶化。

鲜精与冻精的活力及受精率测定 按江世贵等^[5]的方法测定鲜精与冻存 3 d 后精子的活力(激活率、运动时间及寿命)。精子的激活率指精液与激活液(盐度 27 的过滤海水)混合后, 于显微镜下观察运动精子的数量占全部精子数量的百分比, 精子的运动时间指精子自激活开始至 90% 的精子原地颤动为止的时间, 精子的寿命指精子自激活开始至 90% 的精子停止运动所经历的时间。实验重复 3 次。

采用干法授精, 即将鲜精(约 5 μL)和冻精(约 20 μL)分别与卵(约 0.5 mL)混匀, 8—10 min 后加过滤海水洗卵 2 次, 受精卵置于 1000 mL 烧杯中(盛过滤海水 800 mL), 于室温($22\text{—}24^\circ\text{C}$)、微充气条件下孵育。胚胎发育到原肠胚中期时测定受精率。实验重复 3 次。

鲜精与冻精 DNA 损伤的 SCGE 检测 (1) SCGE 试验溶液配制 PBS: 0.2 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (81 mL) 与 0.2 mol/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (19 mL)混合液($\text{pH}=7.4$,

4°C 保存); 裂解液: 2.5 mol/L NaCl , 100 mmol/L EDTA, 10 g/L 十二烷基肌氨酸钠, 1% Triton X-100, 10% DMSO, $\text{pH}=10$; 电泳液: 0.3 mol/L NaOH , 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, $\text{pH}=13$ 。Tris-HCl: 0.4 mol/L Tris, HCl 溶液中和至 $\text{pH} 7.0$; EB: 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) SCGE 试验方法及步骤 将鲜精及冻存 3 d 后解冻的精液与 4°C PBS 溶液充分混合, 于离心机(2000 r/min) 4°C 下离心 2 次, 每次 10—15 min, 然后将精液稀释至约 1×10^6 个/mL。取稀释后精液 50 μL 与 1% 的液态低熔点琼脂糖凝胶 350 μL 混匀于 5 mL 离心管中, 待混合液凝固后加入预冷的裂解液于 4°C 下裂解 1 h, 再用 PBS 溶液洗涤 2 次, 弃掉 PBS 与裂解混合液, 70°C 水浴加热 3 min, 使含有精子的低熔点琼脂糖融化成液态, 吸取 95—100 μL 均匀平铺在预热的普通载玻片上, 加盖玻片于 4°C 下冷凝 15 min。待琼脂糖附着在载玻片上后, 轻轻剥掉盖玻片, 将载玻片浸入加有电泳液的电泳槽中静置 20 min, 使精子核 DNA 双链解旋, 然后在 12 V、100 mA 条件下电泳 25 min。电泳完毕, 轻轻取出载玻片, Tris-HCl 中和 3 次, 每次 5 min, 然后用 EB 染色 10 min, 于 Olympus 荧光显微镜(激发光波长 580 nm)、暗光下观察, 随机观察 100 个精子核, 并拍摄彗星图片。每组(同一抗冻剂浓度)做 4 个平行试验。

试验数据处理 (1) 采用 CometScore 1.5 软件分析彗星图片, 获得尾矩(Tail moment)及彗星拖尾中 DNA 的量占细胞总 DNA 的比例等参数, 尾矩=尾长(Tail length)×尾部 DNA 百分含量(DNA in Tail)。(2) 彗星率及损伤系数计算, 彗星率=(彗星细胞数目/总细胞数目)×100%; 损伤系数=[(0 级损伤的细胞个数×0)+(I 级损伤的细胞个数×1)+(II 级损伤的细胞个数×2)+(III 级损伤的细胞个数×3)+(IV 级损伤的细胞个数×4)]。(3) 采用 Photoshop 7.0 软件处理编辑彗星图片。

所有试验数据和组间单因素方差分析采用 SPSS 11.5 完成, 以 $P=0.05$ 为检验水准, 统计结果以平均值与标准误差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 真鲷冻精的活力及受精率

鲜精及超低温冻存 3 d 后的真鲷精子的活力(激活率、运动时间及寿命)与受精率测定结果(表 1)。D1—D5 组和 E2—E4 组冻精的活力及受精率与鲜精相比差异不显著($P>0.05$), 其他组冻精的活力及受精率与鲜精差异显著($P<0.05$), 其中 D2 及 E2 组冻精的活力与受精率接近鲜精水平。统计分析表明, 真鲷冻精的受精率与激活率呈线性正相关(图 1、图 2)。

2.2 真鲷鲜精及冻精的 DNA 损伤

鲜精和各冻精组的 SCGE 检测结果显示, 彗星尾矩

表 1 真鲷鲜精及冻精的活力及受精率($n=3, \bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Motility and fertilization rate of fresh sperm and frozen-thawed sperm ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	激活率 Activation rate (%)	运动时间 Moving time (min)	寿命 Life-span (min)	受精率 Fertilization rate (%)
鲜精	90.12±2.41 ^a	53.86±4.18 ^a	71.18±6.64 ^a	89.05±1.99 ^a
D1	83.74±4.64 ^a	49.97±2.58 ^a	64.64±2.59 ^a	82.10±0.96 ^a
D2	89.41±2.59 ^a	51.25±2.65 ^a	68.82±4.39 ^a	87.10±2.26 ^a
D3	85.67±4.09 ^a	47.07±4.69 ^a	62.29±4.56 ^a	85.42±4.36 ^a
D4	83.27±3.43 ^a	47.28±2.55 ^a	59.53±5.26 ^a	84.99±2.12 ^a
D5	80.29±6.79 ^a	45.14±3.07 ^a	59.16±8.05 ^a	79.94±4.30 ^a
D6	64.17±4.75 ^b	22.37±5.08 ^b	31.62±5.46 ^b	67.73±7.73 ^b
E1	79.32±8.16 ^b	34.76±4.38 ^b	48.36±4.89 ^b	71.36±2.86 ^b
E2	87.35±5.01 ^a	50.66±3.91 ^a	67.98±4.35 ^a	86.42±1.63 ^a
E3	81.43±3.00 ^a	48.14±5.04 ^a	62.45±3.91 ^a	82.96±1.23 ^a
E4	79.88±7.74 ^a	45.53±4.21 ^a	61.71±8.11 ^a	79.90±4.14 ^a
E5	63.89±4.79 ^b	26.36±6.36 ^b	34.71±8.88 ^b	65.05±2.53 ^b
E6	53.52±4.86 ^b	18.47±5.02 ^b	21.24±5.69 ^b	44.84±6.07 ^b

注: D1. 5% DMSO; D2. 10% DMSO; D3. 15% DMSO; D4. 20% DMSO; D5. 25% DMSO; D6. 30% DMSO; E1. 5% EG; E2. 10% EG; E3. 15% EG; E4. 20% EG; E5. 25% EG; E6. 30% EG; 表中同列数值后不同上标英文字母表示差异显著($P<0.05$); 下同
Note: Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$); the same below

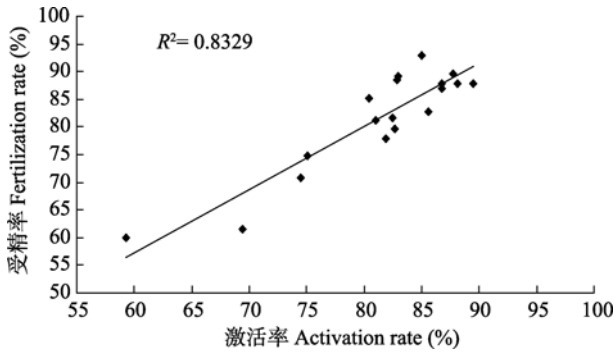


图 1 DMSO 为抗冻剂冷冻保存的真鲷精子受精率与激活率的相关性
Fig. 1 Correlation of fertilization rate and activation rate of frozen-thawed sperm by DMSO

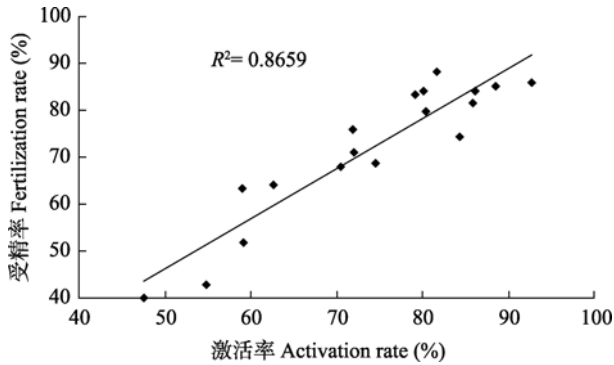


图 2 EG 为抗冻剂冷冻保存的真鲷精子受精率与激活率的相关性
Fig. 2 Correlation of fertilization rate and activation rate of frozen-thawed sperm by EG

随抗冻剂 DMSO 及 EG 浓度的升高而增大。其中 DMSO 浓度在 5%—25% 及 EG 浓度在 5%—20% 时, 冻精的彗星尾矩与鲜精相比差异不显著 ($P>0.05$); DMSO 浓度为 30%、EG 浓度为 25% 及 30% 时, 冻精的彗星尾矩与鲜精相比差异显著 ($P<0.05$) (图 3)。

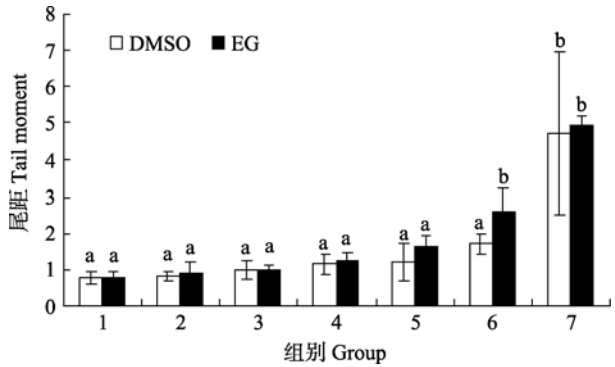


图 3 真鲷鲜精及冻精 SCGE 检测的彗星尾矩
Fig. 3 Tail moment of fresh sperm and frozen-thawed sperm by SCGE
1 组. 鲜精(对照组); 2 组. 5% DMSO 及 5% EG; 3 组. 10% DMSO 及 10% EG; 4 组. 15% DMSO 及 15% EG; 5 组. 20% DMSO 及 20% EG; 6 组. 25% DMSO 及 25% EG; 7 组. 30% DMSO 及 30% EG。同一系列中, 与对照组相比, 直柱上所标字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)
Group 1. fresh sperm; Group 2. 5% DMSO and 5% EG; Group 3. 10% DMSO and 10% EG; Group 4. 15% DMSO and 15% EG; Group 5. 20% DMSO and 20% EG; Group 6. 25% DMSO and 25% EG; Group 7. 30% DMSO and 30% EG. Compared with the control group, different letter in the columniation of the same series means that there were remarkable difference between them ($P<0.05$)

根据彗星拖尾中 DNA 的量占细胞总 DNA 的比例, 将真鲷鲜精及冻精核 DNA 损伤程度分为 5 级。0 级: <5% (DNA in Tail), 无损伤, 精子核完整、呈圆形(图 4a); I 级: 5%—20% (DNA in Tail), 轻度损伤, 精子核缩小, 可见少许彗尾(图 4b); II 级: 20%—40% (DNA in Tail), 中度损伤, 精子核进一步缩小, 彗尾明显延长(图 4c); III 级: 40%—95% (DNA in Tail), 重度损伤, 精子核明显缩小, 彗尾较长、荧光信号强(图 4d); IV 级: >95% (DNA in Tail), 完全损伤, 精子核模糊或消失, 彗尾长、荧光信号极强(图 4e)。

根据上述精子核 DNA 损伤程度分级方法, 通过

CometScore 1.5 软件对真鲷鲜精与冻精的 SCGE 彗星图片数据进行分析处理, 得出鲜精及冻精的彗星率及核 DNA 损伤情况(表 2)。由表 2 可知, 5%—25% DMSO 及 5%—20% EG 为抗冻剂的冻精的彗星率及 DNA 损伤情况与鲜精差异不显著($P>0.05$), 而 30% DMSO、25% EG 及 30% EG 为抗冻剂的冻精的彗星率和 DNA 损伤情况与鲜精差异显著($P<0.05$)。精子核 DNA 损伤主要为轻度和中度损伤, 重度损伤比率较低, 完全损伤仅存在于 25% 及 30% DMSO 与 20%、25% 及 30% EG 为抗冻剂的冻精中, 且比例低。

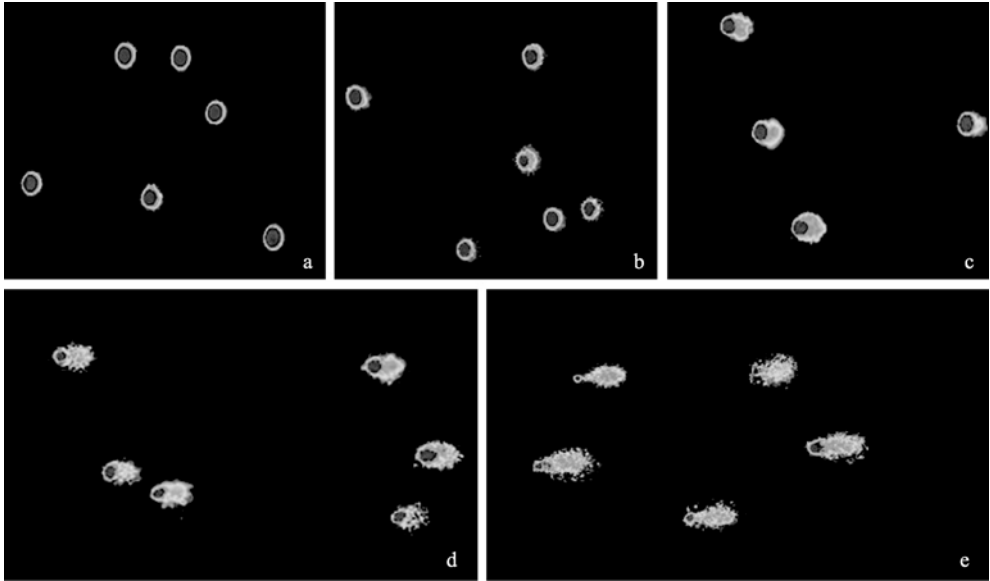


图 4 真鲷鲜精与冻精的 SCGE 彗星图

Fig. 4 Comet image of fresh and frozen-thawed sperm

a. 0 级损伤 Grade 0 damage $\times 400$; b. 1 级损伤 Grade I damage $\times 400$; c. 2 级损伤 Grade II damage $\times 400$; d. 3 级损伤 Grade III damage $\times 400$; e. 4 级损伤 Grade IV damage $\times 400$

表 2 真鲷鲜精及冻精 SCGE 检测的 DNA 损伤分级($n=400, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Classification of DNA damage detection of comet rate in fresh sperm and frozen-thawed sperm ($n=400, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	0 级 Grade 0 (%)	I 级 Grade I (%)	II 级 Grade II (%)	III 级 Grade III (%)	IV 级 Grade IV (%)	彗星率 Comet rate (%)	损伤系数 Damage coeffi- cient
鲜精	72.25 $\pm$ 2.22 ^a	16.25 $\pm$ 2.06 ^a	9.25 $\pm$ 1.50 ^a	2.25 $\pm$ 0.96 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	27.50 $\pm$ 2.22 ^a	41.50 $\pm$ 5.00 ^a
D1	69.00 $\pm$ 1.83 ^a	17.25 $\pm$ 3.60 ^a	10.50 $\pm$ 2.52 ^a	3.25 $\pm$ 0.96 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	31.00 $\pm$ 1.83 ^a	48.00 $\pm$ 4.83 ^a
D2	66.50 $\pm$ 7.55 ^a	19.50 $\pm$ 3.70 ^a	11.00 $\pm$ 4.69 ^a	3.00 $\pm$ 1.63 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	33.50 $\pm$ 7.55 ^a	50.50 $\pm$ 14.84 ^a
D3	64.75 $\pm$ 2.22 ^a	19.50 $\pm$ 2.89 ^a	11.75 $\pm$ 6.40 ^a	4.00 $\pm$ 1.83 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	35.25 $\pm$ 2.22 ^a	55.00 $\pm$ 5.66 ^a
D4	58.25 $\pm$ 3.50 ^a	20.00 $\pm$ 4.08 ^a	11.75 $\pm$ 4.03 ^a	5.00 $\pm$ 3.56 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	41.75 $\pm$ 3.50 ^a	59.00 $\pm$ 11.49 ^a
D5	57.75 $\pm$ 16.78 ^a	21.25 $\pm$ 3.40 ^a	16.50 $\pm$ 3.03 ^a	4.00 $\pm$ 1.83 ^a	0.50 $\pm$ 1.00 ^a	42.25 $\pm$ 16.78 ^a	68.25 $\pm$ 33.95 ^a
D6	22.25 $\pm$ 9.54 ^b	26.00 $\pm$ 2.71 ^b	41.75 $\pm$ 4.72 ^b	7.75 $\pm$ 1.71 ^b	2.00 $\pm$ 1.41 ^b	77.75 $\pm$ 9.54 ^b	140.75 $\pm$ 12.53 ^b
E1	65.75 $\pm$ 2.06 ^a	21.25 $\pm$ 8.38 ^a	10.00 $\pm$ 4.90 ^a	3.00 $\pm$ 3.46 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	34.25 $\pm$ 2.06 ^a	50.25 $\pm$ 11.67 ^a
E2	64.00 $\pm$ 1.41 ^a	20.00 $\pm$ 2.45 ^a	12.25 $\pm$ 2.36 ^a	3.75 $\pm$ 2.22 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	36.00 $\pm$ 1.41 ^a	55.75 $\pm$ 4.43 ^a
E3	62.75 $\pm$ 3.50 ^a	21.00 $\pm$ 3.83 ^a	11.50 $\pm$ 4.43 ^a	4.75 $\pm$ 2.06 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	37.25 $\pm$ 3.50 ^a	58.25 $\pm$ 5.74 ^a
E4	58.25 $\pm$ 2.75 ^a	21.00 $\pm$ 3.92 ^a	14.50 $\pm$ 2.65 ^a	5.50 $\pm$ 1.91 ^a	0.75 $\pm$ 0.50 ^a	41.75 $\pm$ 2.75 ^a	67.00 $\pm$ 7.79 ^a
E5	39.75 $\pm$ 6.29 ^b	25.25 $\pm$ 2.50 ^b	25.50 $\pm$ 5.92 ^b	7.25 $\pm$ 2.06 ^b	2.25 $\pm$ 1.50 ^b	60.25 $\pm$ 6.29 ^b	107.00 $\pm$ 13.34 ^b
E6	20.00 $\pm$ 12.78 ^b	26.25 $\pm$ 4.79 ^b	42.50 $\pm$ 4.04 ^b	8.50 $\pm$ 4.20 ^b	2.75 $\pm$ 1.26 ^b	80.00 $\pm$ 12.78 ^b	147.75 $\pm$ 11.30 ^b

对鲜精和冻精的 DNA 损伤系数与抗冻剂浓度的相关性进行统计分析, 结果表明, 损伤系数与抗冻剂浓度成正相关(图 5、图 6)。

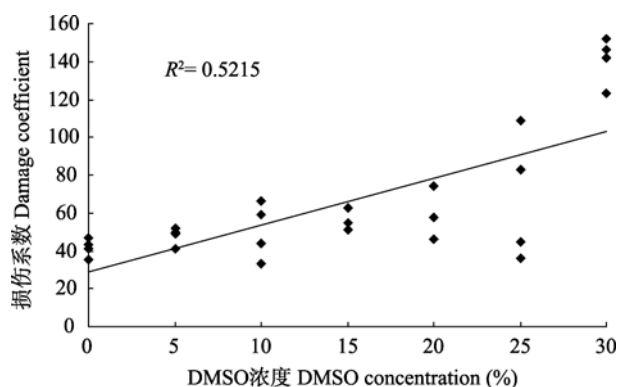


图 5 真鲷鲜精及冻精 SCGE 检测的 DNA 损伤系数与 DMSO 浓度的相关性

Fig. 5 Correlation of damage coefficient and DMSO concentration of fresh sperm and frozen-thawed sperm

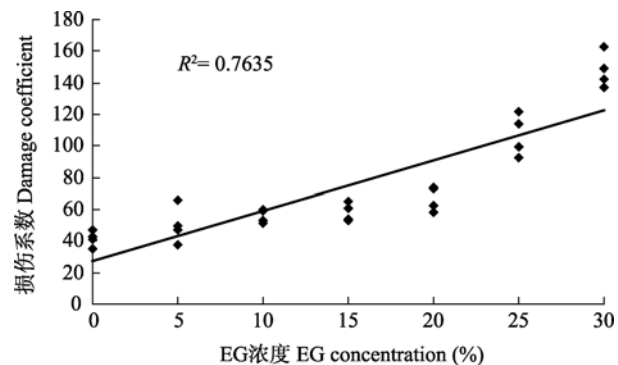


图 6 真鲷鲜精及冻精 SCGE 检测的 DNA 损伤系数与 EG 浓度的相关性

Fig. 6 Correlation of damage coefficient and EG concentration of fresh sperm and frozen-thawed sperm

3 讨 论

本研究发现, 以 Cortland 溶液为稀释液、5%—25% 的 DMSO 及 10%—20% 的 EG 为抗冻剂, 超低温冻存真鲷精子的效果较佳, 冻精核 DNA 损伤较轻; 而以 30% DMSO、5% EG、25% EG 及 30% EG 为抗冻剂超低温冻存真鲷精子的效果下降, 其中 30% DMSO、25% EG 及 30% EG 为抗冻剂的冻精核 DNA 损伤程度明显加重。

李纯^[16]以 0.75% NaCl 溶液为稀释液、20% DMSO 为抗冻剂, 用 0.5 mL 冷冻管及程序降温仪降温法超低温冻存真鲷精子, 液氮中保存 46d 后冻精复苏率达 50.63%; 刘清华^[12]以 Cortland 溶液为稀释液, 用 2 mL 冷冻管和程序降温仪降温法超低温冻存真鲷精子, 结果发现以 15%—20% DMSO、9% 及 12% EG 为抗冻剂, 20℃/min 的速率降温, 在液氮中保存精子 7d 后解冻, 精子活动率达

79.4%—88.6%、受精率达 89.6%—95.6%, 接近鲜精水平; 丁福红^[15]以 15% DMSO 为抗冻剂, 程序降温法、20℃/min 速率降温, 超低温冻存真鲷精子, 冻精复活率及受精率分别达 89.29% 及 96.8%。我们的试验发现, 以 Cortland 溶液为稀释液, 0.5 mL 麦细管为冻存管, 5%—25% DMSO 及 10%—20% EG 为抗冻剂, 两步降温法超低温冻存的真鲷精子, 3d 后解冻, 精子活力和受精率与鲜精无显著差异, 其中以 10% DMSO 为抗冻剂的冻精的激活率、运动时间、寿命及受精率分别达 $(89.41 \pm 2.59)\%$ 、 $(51.25 \pm 2.65)\text{min}$ 、 $(68.82 \pm 4.39)\text{min}$ 及 $(87.10 \pm 2.26)\%$, 以 10% EG 为抗冻剂的冻精的激活率、运动时间、寿命及受精率分别达 $(87.35 \pm 5.01)\%$ 、 $(50.66 \pm 3.91)\text{min}$ 、 $(67.98 \pm 4.35)\text{min}$ 及 $(86.42 \pm 1.63)\%$ 。可见, 因研究者实施的冻存条件不同, 真鲷精子的冻存效果存在差异。本试验的真鲷冻精的受精率与激活率呈正比, 冻精激活率与受精率的正相关性也见于大黄鱼^[1,2]、大西洋鳕(*Gadus morhua*)^[24]、黑鲷^[9]、虹鳟^[25]等鱼类中研究报道。需要说明的是, 本试验的两步降温法采用了自制的简易降温装置, 方便携带到远离实验室的野外鱼种场或养殖场使用, 克服了程序降温仪难以携带到野外操作的缺点。

DMSO 和 EG 为鱼类精子冻存的常用抗冻剂。Horton, et al.^[26]对虹鳟精子超低温冻存的研究发现, 10% DMSO 是一个高度有效的浓度, 能对精子起到良好的保护作用。大菱鲆^[7]、大梭鱼(*Esox masquinongy*)^[27]、点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)^[28]、马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)^[29]、黑鲷^[9]、狼鲈^[11]等鱼类的精子超低温冻存的研究表明, 10% DMSO 为抗冻剂冻存精子的效果较佳。10% EG 为抗冻剂冷冻保存黄鳍鲷(*Acanthopagrus latus*)^[30]、细须石首鱼^[8]等鱼类的精子的效果较好。本研究也表明, 10% DMSO 及 10% EG 对超低温冻存真鲷精子起到了良好的抗冻保护效果。

Zilli, et al.^[11]对超低温冻存的狼鲈精子的 DNA 损伤的 SCGE 检测发现, 以 10% DMSO 为抗冻剂冷冻狼鲈精子, 冻精与鲜精的 DNA 损伤状况无显著差异。Labbe, et al.^[10]研究了超低温冻存对虹鳟精子 DNA 稳定性的影响, 发现以 10% DMSO 为抗冻剂冷冻虹鳟精子, 冻精的 DNA 损伤与鲜精差异不显著, 冻精受精率达 93.5%。Martínez-Páramo, et al.^[31]以 7% DMSO+10% 卵黄为抗冻剂超低温冻存西班牙杜埃尔纳褐鲈(*Salmo trutta*), 冻精 DNA 损伤与鲜精无显著差异, 冻精激活率与鲜精相同, 达 77.6%。叶霆等^[9]对超低温冻存的黑鲷精子的 DNA 损伤的检测表明, DMSO 浓度为 5%—20% 时, 黑鲷冻精与鲜精的彗星率及损伤系数差异不显著; DMSO 浓度为 25% 及 30% 时, 冻精与鲜精的彗星率及损伤系数差异显著, 冻精的 DNA 损伤与抗冻剂 DMSO 浓度成正相关。本试验表明, 真鲷冻精 DNA 损伤程度随 DMSO 及 EG 的浓

度升高而增大, DMSO 浓度在 5%—25% 及 EG 浓度在 10%—20% 范围内, 真鲷冻精的彗星率及 DNA 损伤状况与鲜精接近, 而且冻精活力与鲜精相比无显著差异; DMSO 浓度高于 25% 及 EG 浓度高于 20% 时, 真鲷冻精的彗星率及 DNA 损伤比鲜精明显加重, 冻精的活力明显下降。因此, 为确保真鲷冻精 DNA 的稳定性及具有较高活力, 宜将抗冻剂 DMSO 及 EG 的浓度分别控制在 5%—25% 及 10%—20% 范围内。本试验所用的精液系来自同一批亲鱼, 而且各试验组精液均采用相同的降温与复温程序, 冻精组彗星率及损伤系数的差异主要是由抗冻剂 DMSO 及 EG 浓度不同引起的。我们认为, 较高浓度的抗冻剂 DMSO 及 EG 是造成冻精核 DNA 损伤的主要原因。

关于 SCGE 法检测鱼类精子核 DNA 损伤的实验条件, 因研究者研究的鱼种类不同而异。Zilli, *et al.*^[11] 采用 2 层铺胶法 SCGE 检测狼鲈冻精核 DNA 损伤, 采用的电泳液为 0.3 mol/L NaOH、1 mmol/L Na₂-EDTA (pH>12), 电泳的电压为 25 V, 电泳时间 10 min。Labbe, *et al.*^[10] 采用 3 层铺胶法 SCGE 检测虹鳟冻精核 DNA 损伤, 采用的电泳液为 280 mmol/L NaOH、1 mmol/L EDTA (pH>13), 电泳的电压为 20 V, 电流 300 mA, 电泳时间 24 min。叶霆等^[9] 采用单层铺胶法 SCGE 检测黑鲷冻精核 DNA 损伤, 采用的电泳液为 300 mmol/L CH₃COONa、100 mmol/L Tris (pH=10.0), 电泳的电压为 15 V、电流 130 mA, 电泳时间 60 min。徐西长等^[17] 采用单层铺胶法 SCGE 检测真鲷冻精核 DNA 损伤, 其电泳液及电泳时间与叶霆等^[9] 的相同, 但电压为 14 V、电流 110 mA。本试验采用单层铺胶法铺片, 电泳液为 0.3 mol/L NaOH、1 mmol/L Na₂-EDTA (pH=13), 在 12 V、100 mA 条件下电泳 25 min, 具有灵敏度高、彗星图谱清晰的优点。

参考文献:

- [1] Xiao Z Z, Chen X F, Ding F H, *et al.* An efficient methodology of sperm cryopreservation of large Yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Marine Science*, 2007, **31**(4): 1—4 [肖志忠, 陈雄芳, 丁福红, 等. 大黄鱼精液的高效超低温保存. 海洋科学, 2007, **31**(4): 1—4]
- [2] Lin D J, You Y L. Physiological characteristics and cryopreservation of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) sperms [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2002, **21**(4): 69—75 [林丹军, 尤永隆. 大黄鱼精子生理特性及其冷冻保存. 热带海洋学报, 2002, **21**(4): 69—75]
- [3] Li C, Li J, Xue Q Z. Cryopreservation of spermatozoa of Black Porgy [J]. *Marine Science*, 2001, **25**(11): 1—4 [李纯, 李军, 薛钦昭. 黑鲷精子的超低温保存研究. 海洋科学, 2001, **25**(11): 1—4]
- [4] Hong W S, Zhang Q Y, Zhou D C. Short-term cryopreservation of spermatozoa of *Sparus macrocephalus* and *Boleophthalmus pectinirostris* [J]. *Marine Sciences*, 1997, **7**: 6—8 [洪万树, 张其永, 周东晨. 黑鲷和大弹涂鱼精液短期冷冻保存. 海洋科学, 1997, **7**: 6—8]
- [5] Jiang S G, Su T F, Yu D H, *et al.* The biological characteristics of *Bostrichthys sinensis* spermatozoa and its cryopreservation [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, **24**(2): 119—122 [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. 水产学报, 2000, **24**(2): 119—122]
- [6] Hong W S, Zhang Q Y, Xu S F, *et al.* Physiological characteristics and cryopreservation of *Lateolabrax japonicus* sperms [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1996, **18**(2): 97—104 [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. 海洋学报, 1996, **18**(2): 97—104]
- [7] Chereguini O, Cal R M, Dreanno C, *et al.* Short-term storage cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm [J]. *Aquar Living Resour*, 1997, **10**: 251—255
- [8] Gwo J C, Strawn K, Longnecker M T, *et al.* Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa [J]. *Aquaculture*, 1991, **94**: 355—375
- [9] Ye T, Zhu J Q, Yang W X, *et al.* Cryopreservation of *Sparus macrocephalus* Spermatozoa and DNA Damage Detection of Frozen-thawed Sperm with SCGE [J]. *Zoological Research*, 2009, **30**(2): 151—157 [叶霆, 竺俊全, 杨万喜, 等. 黑鲷精子的超低温冻存及冻精 DNA 损伤的 SCGE 检测. 动物学研究, 2009, **30**(2): 151—157]
- [10] Labbe C, Martoriati A, Devaux A, *et al.* Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, **60**: 397—404
- [11] Zilli L, Schiavone R, Zonno V, *et al.* Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2003, **47**: 227—235
- [12] Liu Q H. Study on spermatozoa cryopreservation and cryo-damage in red seabream (*Pagrosomus major*) [D]. Thesis for Master of Science. Ocean University of China, Qingdao. 2005 [刘清华. 真鲷 (*Pagrosomus major*) 精液超低温保存及其低温损伤研究. 硕士毕业论文. 中国海洋大学, 青岛. 2005]
- [13] Qu Y J, Li J E, Jiang S G. Effects of preservation and activation on biological property of *Pagrosomus major* (Temminck et Schlegel) spermatozoa [J]. *Tropic Oceanology*, 1998, **17**(3): 65—74 [区又君, 李加儿, 江世贵. 保存和激活对真鲷精子生理特性的影响. 热带海洋, 1998, **17**(3): 65—74]
- [14] Hong W S, Zhang Q Y, Wu D X. Cryopreservation of red sea bream *Pagrosomus major* spermatozoa and testes [J]. *Journal of Xiamen University*, 1996, **35**(5): 790—794 [洪万树, 张其永, 吴鼎勋. 真鲷精液和精巢超低温冷冻保存. 厦门大学学报, 1996, **35**(5): 790—794]
- [15] Ding F H. Cryopreservation of red sea bream (*Pagrosomus*

- major)'s sperm and embryo [D]. Thesis for Master of Science, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao. 2004 [丁福红. 真鲷精子和胚胎冷冻保存研究. 硕士学位论文. 中国科学院海洋研究所, 青岛. 2004]
- [16] Li C, Li J, Xue Q Z. Cryopreservation of spermatozoa of red sea bream [J]. *Marine Sciences*, 2001, **25**(12): 6—8 [李纯, 李军, 薛钦昭. 真鲷精子的超低温保存研究. 海洋科学, 2001, **25**(12): 6—8]
- [17] Xu X C, Ding F H, Li J. Cryopreservation caused sperm and damage in red sea bream *Pagrosomus major* and its detection [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2005, **36**(3): 221—225 [徐西长, 丁福红, 李军. 单细胞凝胶电泳用于检测低温保存的真鲷(*Pagrosomus major*)精子 DNA 损伤. 海洋与湖沼, 2005, **36**(3): 221—225]
- [18] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, **123**(1): 291—298
- [19] Xue L Y, Li L, Nie S P. Studies on DNA damage of the blood cells in *Carassius auratus* induced by phenol and hydroquinone [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(2): 341—343 [薛良义, 李卢, 聂松平. 苯酚和对苯二酚对鲫鱼血细胞 DNA 损伤的研究. 水生生物学报, 2006, **30**(2): 341—343]
- [20] Jiang Z L, Li Q W, Li W Y, *et al.* Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay [J]. *Animal Reproduction Science*, 2007, **99**: 401—407
- [21] Słowińska M, Karol H, Ciereszko A. Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa [J]. *Cryobiology*, 2008, **56**: 100—102
- [22] Chen T F, Wu D Y. Detection of DNA damage of silkworm cryopreservation sperm using single cell gel electrophoresis [J]. *Canye Kexue*, 2005, **31**(3): 366—369 [陈田飞, 吴大洋. 单细胞凝胶电泳检测家蚕冷冻精子的 DNA 损伤. 蚕业科学, 2005, **31**(3): 366—369]
- [23] Chen D H, Li Y D, Jia L Z, *et al.* Cryopreservation of *eriocheir sinensis* sperms(in vitro) with different cryoprotective solutions and prefreezing time [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(4): 579—585 [陈东华, 李艳东, 贾林芝, 等. 冷冻保护剂及预冷时间对河蟹精子体外冷冻保存的影响. 水生生物学报, 2008, **32**(4): 579—585]
- [24] Mounib M S, Hwang P C, Idler D R. Cryogenic preservation of Atlantic cod *Gadus morhua* sperm [J]. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1968, **25**: 2623—2632
- [25] Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, *et al.* Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation [J]. *The Progressive Fish Culturist*, 1996, **58**: 149—159
- [26] Hoton H F, Ott A G. Cryopreservation of Fish spermatozoa and Ova [J]. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1976, **33**: 995—1000
- [27] Ciereszko A, Dabrowski K, Lin F, *et al.* Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved muskellunge spermatozoa [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1999, **128**: 542—548
- [28] Chao N H, Tsai H P, Liao I C. Short- and Long-term Cryopreservation of Sperm and Sperm Suspension of the Grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider) [J]. *Asian Fisheries Science*, 1992, **5**: 103—116
- [29] 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**: 569—582
- [30] Gwo J C. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa (Teleost, Perciformes, Sparidae) [J]. *Theriogenology*, 1994, **41**: 989—1004
- [31] Martínez-Páramo S, Pérez-Cerezales S, Gómez-Romano F, *et al.* Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential [J]. *Theriogenology*, 2009, **71**: 594—604