

文章编号: 1000-0615(2008)05-765-07

三疣梭子蟹精子活力的评价方法

朱冬发, 周 帅

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用染色法和钙离子载体 A23187 诱导精子顶体反应法, 对三疣梭子蟹精子的活力进行评价研究。结果表明, 采用台盼蓝染色无法清晰辨别死、活精子。采用曙红 B 染色, 精子分别呈现不同的染色特征: 活精子无色, 细胞边界清晰可辨, 在光学显微镜下观察可见顶体中央突起的圆锥状结构和辐射臂; 死精子细胞边界有稍许模糊, 核杯和顶体均着色。最适的曙红 B 浓度和染色时间分别为 2% 和 2 min。钙离子载体 A23187 诱导精子顶体反应的结果显示: 在诱导时间和 A23187 浓度分别为 50 min 和 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 校正顶体反应率达到 $(92.73 \pm 2.43)\%$ 。对这两种活力检测方法的比较分析显示, 曙红 B 染色法和钙离子载体 A23187 诱导精子顶体反应法的活力检测值与样品理论值呈显著正相关 ($P < 0.01$), 他们二者之间亦呈显著正相关 ($P < 0.01$), 说明这两种方法均可用于精子活力检测, 其结果具有可比性。

关键词: 三疣梭子蟹; 精子; 活力评价

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 是我国重要的大型海产经济蟹类, 其成熟精子形态、精子发生的超微结构和精子顶体反应过程中的结构变化等已有较深入的研究^[1-2], 但三疣梭子蟹精子活力评价的研究国内外迄今未见报道。

十足目甲壳动物精子无鞭毛, 不运动, 常规运动性指标不能用于其精子活力的评价。但进行精子低温保藏、超低温冻存、人工受精、雌核发育、精子介导转基因和雄性亲本生殖营养强化等方面的研究工作均需要对精子的活力进行评价。目前, 甲壳动物中已采用的精子活力评价方法有形态观察法^[3]、渗透压法^[4]、诱导顶体反应法^[3-5]、酶活力法^[6]、受精能力法^[7]、传统生物染色法^[8-11]和特异性荧光染色法^[12-13]等, 这些方法各有不同的适用范围和评价效果。为了建立起在生产上既具简便性又具准确性的三疣梭子蟹精子活力评价方法, 我们同时利用传统的生物染色法(台盼蓝染色法和曙红 B 染色法)和二价钙离子载体 A23187

人工诱导精子顶体反应法对三疣梭子蟹精子进行了活力评价的研究。

1 材料与方 法

1.1 精子样品制备

实验用三疣梭子蟹购自宁波市水产大世界。每次解剖雌蟹三只(每只 300 g 左右), 从 6 个纳精囊中取出白色精子团, 在无钙人工海水 (calcium-free artificial sea water, Ca^{++} FASW)^[14] 中研磨使精子释放出来, 分级离心获得白色精子沉淀。用 Ca^{++} FASW 将精子沉淀制备成密度约 $10^6 \text{ ind} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的精子悬浮液备用。

1.2 精子形态观察

取 1 滴精子悬浮液于干净载玻片上, Olympus BH-2 显微镜 400 倍下进行观察、拍照。

1.3 精子活力评价

台盼兰、曙红 B 染色法 取用 3.5% 戊二醛杀死的精子悬浮液、4℃ 下放置两周的精子悬

收稿日期: 2007-10-17

资助项目: 国家自然科学基金项目(40576068); 浙江省自然科学基金项目(Y305339); 浙江省科技计划项目(2008C22048)

作者简介: 朱冬发(1968-), 男, 江西临川人, 教授, 博士, 主要从事甲壳动物发育生物学研究。Tel: 0574-87600165; E-mail: zhudongfa@nbu.edu.cn

浮液及新鲜精子悬浮液各一滴滴于载玻片上,分别取 0.25%、1%、2%、4% 的曙红 B 染色液或台盼蓝染色液(用 Ca^{++} FASW 配制)各一滴与精子混合,用牙签轻轻混匀、染色。染色时间设置为 2 min、5 min 和 10 min 三档。Olympus BH-2 显微镜 400 倍下随机镜检约 200 个精子,比较、分析后确定最佳染色方案。

顶体反应诱导法 钙离子载体 A23187 (Sigma 公司)先用二甲亚砜溶解,再用过滤海水(sea water, SW)稀释成 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作母液。置冰箱(4 °C)保存备用。将备用的精子悬浮液在 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,弃上清液,用等量 SW 再制成精子悬浮液。

对 A23187 浓度与顶体反应诱导时间做双因素分析,以确定最佳的精子顶体反应诱导方案。A23187 浓度取 10、20、30、40 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 五个梯度;诱导时间取 10、20、30、40、50、60 和 120 min 七个梯度。诱导结束后精子悬浮液样品用戊二醛固定,每一试样随机镜检约 200 个精子,平行三组,计算精子顶体反应率。考虑到诱导过程中,SW 空白对照组中也有一定比率的精子会发生顶体反应,故采用校正公式:

校正诱导率(%) = (A23187 诱导顶体反应率 - 对照组顶体反应率) / (100% - 对照组顶体反应率) × 100。

1.4 精子活力评价实测值与理论值的相关性分析

实验设计 将新鲜精子悬浮液 2 mL 用 3.5% 戊二醛杀死,在 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,弃上清液,加入等量 SW 将沉淀制备成死亡精子悬浮液备用;将新鲜精子悬浮液 2 mL 在 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,弃上清液,加入等量 SW 将沉淀制备成活精子悬浮液备用。

将上述死、活两种精子悬浮液按比例配成活精子百分比分别为 0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 等 11 个梯度的样本,作为样本活精子百分率的理论值。

利用上述实验取得的最佳染色和顶体反应诱导方案检验这些样本精子的成活率。所得结果与理论值做相关性分析,并对两种评价方法的实验值也做相关性分析。

数据处理 在顶体反应诱导法实验值与理论值比较的实验中,精子在 Ca^{++} FASW 和 SW 中会有不同程度的顶体反应率,为此我们使用了

修正理论值和修正诱导率。

修正理论值 = 理论值 - $(n - 1) \times 10\% \times$ 非 A23187 诱导顶体反应率;

修正诱导率 = 实际百分率 + 诱导损失率 - 非 A23187 诱导顶体反应率;

非 A23187 诱导顶体反应率 = $(11 - n) \times 10\% \times 8.15\% + (n - 1) \times 10\% \times 15.62\%$;

诱导损失率 = $n \times 10\% \times (1 - 95.82\%)$ 。

式中: n 为实验组序号 1~11; $(n - 1) \times 10\%$ 为各实验组活精子所占比例;8.15% 为全活精子在对照组 Ca^{++} FASW 内的顶体反应率平均值;15.62% 为全活精子在对照组 SW 中的顶体反应率平均值;95.82% 为全活精子被 A23187 诱导的顶体反应率。

在顶体反应诱导法与染色法实测值比较的实验中,由于精子在 Ca^{++} FASW 中发生的顶体反应会对诱导实验有干扰,而染色法不存在这种情况,故采用了顶体反应诱导率修正值。

顶体反应诱导率修正值 = (顶体反应诱导率 - 8.15%) / (100% - 8.15%),式中的 8.15% 为精子在 Ca^{++} FASW 内的顶体反应率。

由于百分率用作统计不符合正态分布,故文中所涉及到的百分率统计比较实际上经过反正弦函数变化。实验数据使用 SPSS 软件进行方差分析和回归分析。

2 结果

2.1 精子形态

光镜下未发生顶体反应的精子呈球形,向四周伸出芒刺状辐射臂 5~10 根。正面观,精子主体呈两个同心圆状,内圆为顶体部分,外圆为核杯部分(图 1-a、b)。

2.2 染色法检测精子活力

台盼蓝染色法在不同染色液浓度和染色时间下均不能很好地区别死、活精子,不适合对三疣梭子蟹精子进行活力检测。

当曙红 B 染色液浓度为 2%,染色时间为 2 min 时,染色效果最理想,背景适宜,精子各部分结构清晰可辨。

采用曙红 B 染色液,活精子不着色(图 1-a);4 °C 下放置两周致死的精子(图 1-b)和戊二醛杀死的精子(图 1-f),其核杯部分被染成红色,顶体部分更是被染成深红色。死精子形态与活精子相

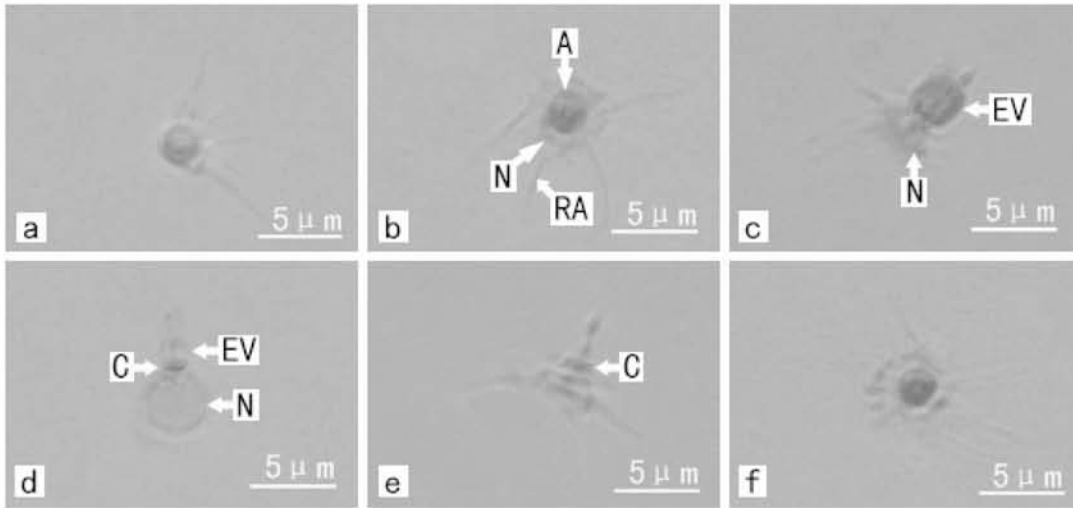


图1 曙红 B 染色的三疣梭子蟹精子

a. 活精子;b. 死精子;c. 已发生顶体反应的死精子;d. e. 已发生顶体反应的活精子;f. 戊二醛杀死的精子
A: 顶体;C: 颈部;EV: 外翻顶体囊;N: 核;RA: 辐射臂

Fig. 1 Sperms of *Portunus trituberculatus* stained by eosin B

a. Live sperm;b. Dead sperm;c. Dead acrosome-reacted sperm;d. e. Live acrosome-reacted sperm;f. Sperm killed by glutaraldehyde
A: acrosome;C: collar;EV: everted vesicle;N: nucleus;RA: radial arm

仿,只是着色后部分精子细胞边界有稍许模糊。

发生顶体反应的死精子核杯部分被染成红色,外翻顶体囊部分更被染成深红色(图 1-c);发生顶体反应的活精子仅颈部被染成红色,核杯部分不着色或稍具浅红色(图 1-d, e)。

2.3 顶体反应诱导法检测精子活力

SW 空白对照组的精子顶体反应率见表 1。

表 1 对照组精子顶体反应率(均值 ± 标准差)
Tab. 1 Rate of acrosome reaction(mean ± SD) of *Portunus trituberculatus* in control

反应时间(min) time of reaction	顶体反应率(%) rate of acrosome reaction
10	17.08 ± 0.79
20	22.49 ± 1.47
30	22.41 ± 0.81
40	26.94 ± 2.25
50	32.37 ± 1.72
60	33.33 ± 1.15
120	34.98 ± 1.63

依据对照组顶体反应率计算各处理组校正顶体反应诱导率(表 2)。当 A23187 浓度和反应时间分别为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 50 min 时,校正顶体反

应诱导率可达 $(92.73 \pm 2.43)\%$ 。双因素分析结果显示,反应时间不同造成的校正反应率差异极显著($P < 0.01$), A23187 浓度不同造成的校正反应率差异也极显著($P < 0.01$),交互效应同样极显著($P < 0.01$)(表 2)。

2.4 精子活力评价实测值与理论值的相关性分析

顶体反应诱导法实测值与理论值相关性分析
顶体反应诱导法修正实测值与修正理论值呈显著相关性($R = 0.976, P < 0.01$)(图 2),表明顶体反应诱导法对判断三疣梭子蟹精子活力有很好的效用。

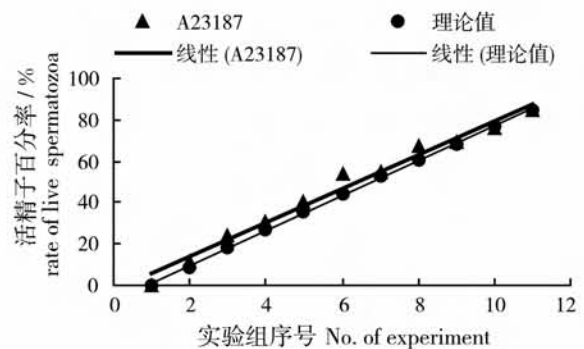


图2 顶体反应校正值与理论值的对照

Fig. 2 Comparison of acrosome reaction rate and theoretical rate

表 2 三疣梭子蟹精子顶体反应双因素实验结果

Tab. 2 Two-way analysis of variance results of acrosome reaction of *Portunus trituberculatus*

处理组 No. of treatment	时间(min) time of reaction	浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) concentration of A23187	顶体反应率(%) percentage of acrosome reaction
1	10	10	8.65 ± 0.80
2	10	20	13.20 ± 0.70
3	10	30	33.07 ± 1.05
4	10	40	47.62 ± 2.90
5	10	50	49.51 ± 0.83
6	20	10	17.15 ± 1.19
7	20	20	27.53 ± 0.81
8	20	30	51.60 ± 0.81
9	20	40	62.43 ± 1.64
10	20	50	66.68 ± 2.03
11	30	10	21.25 ± 1.37
12	30	20	36.74 ± 1.30
13	30	30	64.63 ± 1.26
14	30	40	74.35 ± 1.02
15	30	50	79.16 ± 2.76
16	40	10	20.94 ± 0.99
17	40	20	51.91 ± 1.45
18	40	30	82.61 ± 2.54
19	40	40	82.24 ± 1.38
20	40	50	84.60 ± 1.63
21	50	10	21.54 ± 2.48
22	50	20	55.61 ± 1.84
23	50	30	92.73 ± 2.43
24	50	40	93.34 ± 2.52
25	50	50	92.62 ± 1.87
26	60	10	21.38 ± 2.17
27	60	20	54.62 ± 1.03
28	60	30	90.79 ± 0.53
29	60	40	88.37 ± 2.24
30	60	50	92.20 ± 3.09
31	120	10	23.64 ± 3.59
32	120	20	50.97 ± 1.53
33	120	30	91.71 ± 1.30
34	120	40	88.54 ± 1.63
35	120	50	92.81 ± 1.77

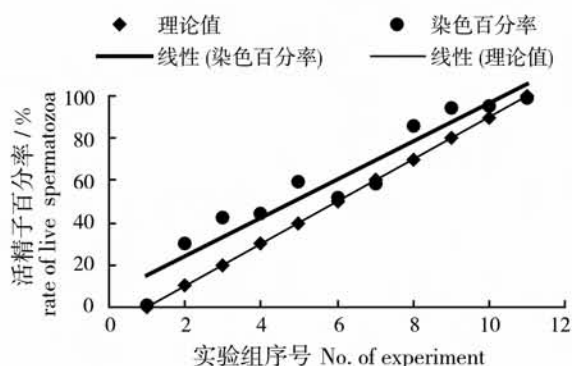


图 3 伊红染色百分率与理论值对照

Fig. 3 Comparison of eosin B staining rate and theoretical rate

染色法实测值与理论值相关性分析 曙红 B 染色法实测值除了第 1、6、7、11 组外,其他组均显著高于理论值(配对样本 T 检验 $P < 0.01$)(双尾)(图 3)。相关性分析结果显示曙红 B 染色法实测值与理论值显著相关($R = 0.920, P < 0.01$),这表明曙红 B 染色法虽然高估了精子的成活率,但仍然是一种简单、实用的判别精子活力的方法。

顶体反应诱导法与染色法实测值相关性分析 曙红 B 染色法实测值除第 1、6、7 组外,其他组均极显著高于顶体反应诱导法实测值(配对样本 T 检验 $P < 0.01$)(双尾)。两种方法实测值呈显著相关性($R = 0.922, P < 0.01$),表明曙红 B 染色法

虽然要比顶体反应诱导法高估活精子的百分率,但这两种精子活力评价的方法之间仍具有可比性(图 4)。

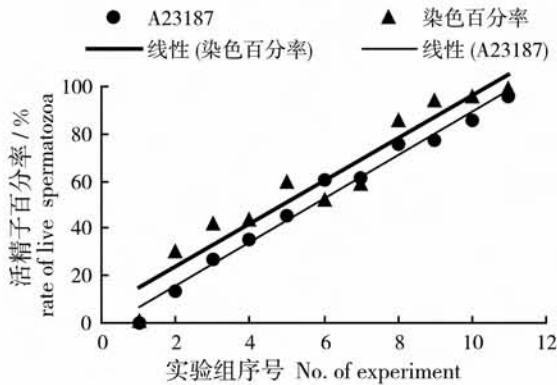


图 4 染色百分率与诱导顶体反应率对照

Fig. 4 Comparison of eosin B staining rate and acrosome reaction rate

3 讨论

十足目甲壳动物精子冷冻保存困难的一个重要原因是缺乏可靠的精子活力评价方法^[15]。虾、蟹类精子无鞭毛,不运动,因此只有能发生顶体反应的精子才有可能完成入卵、受精过程。顶体反应诱导法无疑是一种科学、准确的十足目甲壳动物精子活力评价方法。常用的十足目甲壳动物精子顶体反应诱导物是卵水^[2,3,5,16]和钙离子载体 A23187^[2,4,17],但有研究表明卵水诱导精子顶体反应效果不稳定^[3]。钙离子载体 A23187 能高效、稳定地诱导精子顶体反应可能归功于两点:(1)帮助打开细胞膜上的离子通道;(2)促进 Ca^{2+} 进入精子细胞^[4]。王艺磊等曾采用正交试验法优化了诱导锯缘青蟹精子顶体反应的条件^[17]。我们通过双因素分析发现,当 A23187 浓度和反应时间分别为 $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 50 min 时,校正顶体反应诱导率可达 92.73%,说明 A23187 同样可高效诱导三疣梭子蟹精子的顶体反应。

近年来,传统生物染色法较多地被应用于十足目甲壳动物精子活力的评价^[3,8-11],常用的有台盼蓝染色法、曙红 B 染色法和亚丁醇染色法等。传统生物染色法评判精子活力是基于活精子具有完整的细胞膜,能排斥染料而不被着色;死精子由于细胞膜损伤,通透性改变,染料可以大量进入而不被外吐,故被着色。Bhavanishankar 等^[4]

在研究锯缘青蟹精子冻存时发现台盼蓝和曙红 B-苯胺黑染色法评价精子活力的结果不理想,从而放弃使用传统生物染色法。Wang 等^[3]认为传统生物染色法对精子的理化状况提供的信息有限,可能高估活精子的比例。管卫兵等^[9]认为传统生物染色法可以作为低温冷冻保存的锯缘青蟹精子活力评价的一种有效方法,但台盼蓝染色法不适用于评价甘油作冷冻剂低温保存的精子的活力。马强等^[8]最近认为台盼蓝染色法和曙红 B 染色法均完全可用于河蟹精子存活率的检测。我们利用台盼蓝和曙红 B 作为染色剂对三疣梭子蟹精子进行活力判断时,发现台盼蓝染色法不能很好地区别死、活精子,不适合对三疣梭子蟹精子进行活力检测;曙红 B 染色法则能有效地区别死、活精子,不管精子是否发生顶体反应。尽管曙红 B 染色法实测值高于理论值和顶体反应诱导法实测值,但相关性分析结果显示曙红 B 染色法实测值与理论值和顶体反应诱导法实测值均显著相关,这表明曙红 B 染色法仍不失为一种简单、价廉而生产上实用的判别三疣梭子蟹精子活力的方法。

目前采用的甲壳动物精子活力评价方法虽然在一定程度上能够反映精子的活力状况,但大多主观性相对较强,效果还不太稳定。最终的精子活力评价,应采用受精率或孵化率来评判。可由于十足目甲壳动物很难获取到未受精的成熟卵,其人工受精操作较难开展,因此建立和完善包括顶体反应在内的十足目甲壳动物精子活力评价的非运动性指标体系十分必要和迫切。非运动性指标还包括精子质膜完整性、精子获能状况、精子酶活力和精子染色质结构等。哺乳动物研究中已有许多采用非运动性指标对精子活力进行评价的报道,有些方法在昆虫中也已得到了成功的应用^[18-19]。在甲壳动物方面,Magda 等^[12]发现碘化丙锭(PI)-流式细胞术评价凡纳滨对虾精子活力的结果与传统生物染色法分析的结果具有较好的相关性;孙菊香等^[13]最近认为 PI-流式细胞术在检测河蟹精子活力方面较传统生物染色法更具灵敏性和可靠性;十足目甲壳动物精子活力评价体系的完善必将为虾、蟹类种质库的建立、种质的选育和遗传改良等的研究提供很大的帮助。

参考文献:

[1] 李太武. 三疣梭子蟹精子的发生及超微结构研究

- [J]. 动物学报, 1995, 41(1): 41-47.
- [2] 朱冬发, 王春琳, 余红卫, 等. 三疣梭子蟹精子顶体反应过程中的形态和结构变化[J]. 动物学报, 2004, 50(5): 800-807.
- [3] Wang Q Y, Misamore M J, Jiang C Q, *et al.* Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality [J]. J World Aquac Soc, 1995, 26: 261-271.
- [4] Bhavanishankar S, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. J Exp Zool, 1997, 277: 326-336.
- [5] Anchordoguy T J, Crogwe J H, Griffin F J, *et al.* Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis* [J]. Cryobiology, 1988, 25: 238-243.
- [6] 冯北元, 徐慕禹, 朱谨钊, 等. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)精子 ATP 酶活力与生殖关系的探讨[J]. 海洋科学, 1995, 2: 33-36.
- [7] 孔杰, 麦明, 王清印, 等. 中国对虾精子和卵子受精能力的初步研究[J]. 海洋科学, 1995, 2: 3-5.
- [8] 马强, 丁银娣, 曲迪, 等. 台盼蓝检测河蟹精子存活率的比较[J]. 动物学杂志, 2007, 42(4): 65-69.
- [9] 管卫兵, 王桂忠, 李少菁, 等. 锯缘青蟹精子低温冷藏及精子活力的染色法评价[J]. 台湾海峡, 2002, 21(4): 457-463.
- [10] 柯亚夫, 蔡难儿. 中国对虾精子超低温保存的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(2): 187-193.
- [11] Jeyalectumie C, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata* [J]. Biol Bull, 1989, 177: 247-253.
- [12] Magda L, Clarissa G, Marcela S. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Cryobiology, 2004, 48: 349-356.
- [13] 孙菊香, 范丽君, 贾林芝, 等. 伊红-PI 染色法检测中华绒螯蟹活精子率[J]. 水产学报, 2007, 31(增刊): 69-73.
- [14] Leung-Trujillo J R, Lawrence A L. Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions [J]. Aquaculture, 1987, 65: 363-370.
- [15] Gwo J C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review [J]. Aquac Res, 2000, 31(3): 259-271.
- [16] 堵南山, 赖伟, 薛鲁征. 中华绒螯蟹精子顶体反应的研究[J]. 动物学报, 1987, 33(1): 8-13.
- [17] 王艺磊, 张子平, 谢芳靖, 等. 锯缘青蟹精子顶体反应的研究[J]. 动物学报, 2001, 47(3): 310-316.
- [18] Bernasconi G, Hellriegel B, Heyland A, *et al.* Sperm survival in the female reproductive tract in the fly *Scathophaga stercoraria* (L.) [J]. J Insect Physiol, 2002, 48: 197-203.
- [19] Hunter F M, Birkhead T R. Sperm viability and sperm competition in insects [J]. Current Biology, 2002, 12: 121-123.

Viability assessment of spermatozoa in the swimming crab *Portunus trituberculatus*

ZHU Dong-fa, ZHOU Shuai

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education,
Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The viability assessment of spermatozoa in the swimming crab *Portunus trituberculatus* was carried out by means of the traditional biostaining techniques of trypan blue and eosin B and the method of artificial induction of acrosome reaction. With the trypan blue staining, we could not differentiate clearly between the dead and live spermatozoa. But we could distinguish clearly the difference of the dead and live spermatozoa with the eosin B staining. The morphological and structural characters of spermatozoa dyed by eosin B were studied in detail with light microscopy. The sperm has a top-like shape, and consists of an acrosome, nuclear cup and 5 – 10 radial arms which extend from the nucleus. The live spermatozoa were colorless, while the acrosome and nuclear cup of dead spermatozoa were stained easily by eosin B, and the boundaries of dead spermatozoa were not clear. The best concentration of eosin B and staining time were 2‰ and 2 min respectively. The acrosome reaction of spermatozoa were induced artificially by treatment with divalent cation ionophore A23187. And $(92.73 \pm 2.43)\%$ of the emendatory rate of acrosome reaction was achieved when sperms isolated from the seminal receptacles of the female crab were exposed to $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ionophore A23187 for 50 min. There were significant positive correlation among the practical value of eosin B staining, the practical value of artificial induction of acrosome reaction and the theoretical value ($P < 0.01$). It is concluded that both the method of eosin B staining and the method of artificial induction of acrosome reaction by ionophore A23187 were suitable for the viability assessment of spermatozoa in *P. trituberculatus*, and the results of these two methods were comparable.

Key words: *Portunus trituberculatus*; spermatozoa; viability assessment