

文章编号:1000-0615(2007)06-0711-10

## 计算机辅助对几种鲟鱼冻精激活液的比较

柳凌<sup>1</sup>, OTOMAR Linhart<sup>2</sup>, 危起伟<sup>1</sup>, 郭峰<sup>1</sup>, 张洁明<sup>1</sup>, 刘鉴毅<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业部淡水鱼类种质资源与  
生物技术重点实验室, 湖北荆州 434000;

2. *Joint Laboratory of Genetics, Physiology and Reproduction of Fish, Institute of Animal Physiology  
and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, University of South Bohemia,  
Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, 38925 Vodnany, Czech Republic*)

**摘要:**首次在我国采用鱼类彩色精子图文分析系统(FSQAS-2000)对中华鲟、史氏鲟、西伯利亚鲟和匙吻鲟经超低温冷冻保存后的精子,在不同激活液条件下,平均曲线运动速度(VCL)、平均直线运动速度(VSL)、平均路径运动速度(VAP)、平均移动角度(MAD)、以及冷冻前后精子活率的变化等多项参数进行了统计学比较研究。研究分析了不同渗透压、pH以及含Mg<sup>2+</sup>的激活液对这些参数的影响。研究结果表明:几种鲟鱼激活液的渗透压均较低,其中西伯利亚鲟最低,为10 mOsm·kg<sup>-1</sup>;中华鲟和史氏鲟为20 mOsm·kg<sup>-1</sup>;匙吻鲟最高,为30 mOsm·kg<sup>-1</sup>。不同的渗透压对冷冻精子的VCL、VSL、VAP、以及精子活率均产生显著( $P \leq 0.05$ )或极显著( $P \leq 0.01$ )影响。激活液的pH除了对冷冻精子的上述参数产生影响外,最显著的是对精子的运动轨迹,即平均移动角度(MAD $^{\circ}$ ·s<sup>-1</sup>)产生影响( $P \leq 0.01$ )。pH越低,精子的MAD越小。几种鲟鱼的最适pH分别为西伯利亚鲟pH 7.5,中华鲟、史氏鲟和匙吻鲟pH 8.5。当4种鲟鱼的冷冻精子激活液中加入5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>时,冷冻精子的3种运动速度显著提高( $P \leq 0.01$ )。综合分析后认为:西伯利亚鲟的冷冻精子激活液应为10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl + 5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5;中华鲟和史氏鲟的冷冻精子激活液为20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl + 5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, pH 8.5;匙吻鲟的冷冻精子激活液为30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl + 5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, pH 8.5。用此激活液对冷冻前后4种鲟鱼精子活力的相关性进行线性回归分析发现,西伯利亚鲟的 $R^2 = 0.8296$  ( $P < 0.01$ );中华鲟的 $R^2 = 0.9860$  ( $P < 0.01$ );史氏鲟的 $R^2 = 0.9622$  ( $P < 0.01$ );匙吻鲟 $R^2 = 0.9477$  ( $P < 0.01$ )。说明冷冻前后4种鲟鱼精子的平均活率存在着极显著的线性正相关性。

**关键词:**鲟鱼;计算机辅助分析系统;超低温保存;精子活力

中图分类号:S 917

文献标识码:A

## Comparative study of activating mediums for the cryopreserved sperm of several sturgeons using CASA

LIU Ling<sup>1</sup>, OTOMAR Linhart<sup>2</sup>, WEI Qi-wei<sup>1</sup>, GUO Feng<sup>1</sup>, ZHANG Jie-ming<sup>1</sup>, LIU Jian-yi<sup>1</sup>

(1. *Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources and Biotechnology, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Jinzhou 434000, China;*

收稿日期:2006-11-15

资助项目:国家基础公益项目(2004DIB3J099)

作者简介:柳凌(1959-),男,湖南长沙人,研究员,主要从事鱼类生殖生理及发育生物学研究。Tel:0716-8126851, E-mail:Liul

@yfi.ac.cn

2. Joint Laboratory of Genetics, Physiology and Reproduction of Fish, Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, University of South Bohemia, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, 38925 Vodnany, Czech Republic)

**Abstract:** The digital analysis technique of sperm quality assessment in fish has provided reliable reference evidences for the effects and the damage mechanism of cryopreservation, genetics and breeding, etc. From the study using fish color sperm image analysis systems (FSQAS-2000) conducted on the cryopreserved sperm of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), Amur sturgeon (*A. schrenckii*), Siberian sturgeon (*A. baerii*) and paddlefish (*Polyodon spathula*) under different activating mediums, the most parameters, including the curvilinear velocity (VCL), the straight line velocity (VSL), the angular path velocity (VAP), angular displacement (MAD) and percentage of motile sperm, etc. were compared for the first time in China. The influences of activating mediums with different osmolality, pH and concentration of  $Mg^{2+}$  on the parameters were also analyzed in the study. Our results indicated that: First, the osmolality of activating medium for the sturgeons mentioned above was quite low, among them, the lowest for Siberian sturgeon ( $10 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), the highest for paddlefish ( $30 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), the middle for Chinese sturgeon and Amur sturgeon ( $20 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Second, it had a significant ( $P \leq 0.05$  or  $P \leq 0.01$ ) influence on VCL, VSL, VAP and percentage of motile sperm in cryopreserved samples. Third, pH of activating medium had the most significant difference on MAD ( $P \leq 0.01$ ) among the parameters, and it was lower and MAD was larger. Fourth, the most appropriate pH was 7.5 for Siberian sturgeon and 8.5 for Chinese sturgeon, Amur sturgeon and paddlefish. And last, the velocities (VCL, VSL, VAP) had significant increases ( $P \leq 0.01$ ), when  $MgCl_2$  ( $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was added into activating medium. In conclusion, the appropriate activating mediums for the cryopreserved sperm of Siberian sturgeon, Chinese sturgeon and Amur sturgeon, paddlefish were  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl +  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $MgCl_2$ , pH 7.5,  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl +  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $MgCl_2$ , pH 8.5,  $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl +  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $MgCl_2$ , pH 8.5, respectively. Using the mediums to activate sperm, there were highly positive linear correlations ( $P < 0.01$ ) in percentage of motile sperm between prefreeze and post-thaw sperm.  $R^2$  was 0.83, 0.99, 0.96, 0.95 for Siberian sturgeon, Chinese sturgeon, Amur sturgeon and paddlefish, respectively.

**Key words:** sturgeon; computer-aided sperm analysis (CASA); cryopreservation; sperm motility

在我国,鱼类精子活力检测一直未引起水产界的高度重视,其方法主要采用传统的估计法。即在显微镜同一视野下,依据观察者的经验,对激活后精子的运动状态、精子的活率以及快速运动时间等参数进行评价。这种方法人为的估计成分较大,精确性较差,缺乏可重复性,所获得的结果也无法进行统计学分析<sup>[1-2]</sup>。目前,国际上已逐渐开展对鱼类的计算机辅助精子活力检测 (computer-aided sperm analysis, CASA) 相关研究<sup>[3-5]</sup>。我国虽然也能见到少数几篇有关采用计算机辅助分析的方法对鱼类或其他水生生物的精活力分析的研究报道<sup>[6-9]</sup>,但分析的基础主要是采用医学软件和哺乳类精子的分析方法。由于鱼类精子和哺乳类精子在生物学特性上存在很大

差异<sup>[10]</sup>,因此,研究的结果有很大的局限性。

作者依据鱼类精子的生物学特性,参照医学对人类精子的检测方法,在世界卫生组织对精子检测标准的基础上<sup>[11]</sup>,与武汉千屏影像技术有限公司合作,开发了一款具有自主知识产权的鱼类精子彩色图文分析系统 (FSQAS-2000),并开展了利用该软件对多种鱼类精子进行活力检测的相关研究。本论文研究了4种鲟鱼精子经超低温冷冻保存后,冻精激活液的成分对精子活力的影响。其目的方面是为鱼类精子的超低温冷冻保存效果进行数字化评价,为以后的研究提供精确的、可重复的参考依据;另一方面,为我国鱼类精子活力数字化评价方法探索一条行之有效的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 精液采集

试验中所用精液取自西伯利亚鲟 (*Acipenser baeri*)、中华鲟 (*A. sinensis*)、匙吻鲟 (*Polyodon gladius*) 和史氏鲟 (*A. schrenckii*) 4 种鲟鱼 (表 1)。

表 1 4 种鲟鱼精液采集相关信息

Tab. 1 The information for collecting sperm of four sturgeons

种类 species	采集地 collecting site	采集时间(年-月) collecting time	亲本类型 source of fish	亲鱼数(尾) number of male fish	保存精液量(mL) quantity of sperm
中华鲟 <i>A. sinensis</i>	湖北宜昌 Yichang	2005-10	野生 wild	3	100
西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	湖北十堰 Shiyan	2006-04	养殖 farmed	4	30
史氏鲟 <i>A. schrenckii</i>	湖北十堰 Shiyan	2006-04	养殖 farmed	3	30
匙吻鲟 <i>P. spathula</i>	湖北荆州 Jinzhou	2006-05	养殖 farmed	5	50

### 1.2 冷冻保存

冷冻方法采用修正后的 Linhart 等<sup>[12]</sup> 和 Liu 等<sup>[13]</sup> 方法。鲜精与稀释液按 1:3 混匀。西伯利亚鲟的稀释液为 50 mmol·L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl + 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl; 中华鲟和史氏鲟的稀释液为 75 mmol·L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl + 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl; 匙吻鲟的稀释液为 100 mmol·L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl + 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> KCl。所有稀释液的 pH 均为 8。混合液置于 4 ℃ 冰箱平衡 30 min 后, 加入终浓度为 8% ~ 10% 的甲醇。混匀, 立即用 0.5 mL 麦管 (IMV, 法国) 分装, 放入预先设置起始温度为 0 ℃ 的程序降温仪 (kryo. 550-16, 英国) 中。降温程序为 0 ℃ 开始, 3 ℃·min<sup>-1</sup> 降至 -5 ℃; 5 ℃·min<sup>-1</sup> 降至 -15 ℃; 10 ℃·min<sup>-1</sup> 降至 -25 ℃; 20 ℃·min<sup>-1</sup> 降至 -80 ℃; 最后平衡 5 min。降温完成后, 直接将精液从程序降温仪中取出, 立即放入液氮 (-196 ℃) 中保存。保存 1 个月以上后, 取出解冻、激活、镜检。

### 1.3 解冻镜检

精液在液氮中保存 1 个月以上后, 取出, 在 38 ~ 40 ℃ 水浴中 8 s 即可解冻。解冻后的精液在 4 ℃ 冰箱存放, 待镜检。

在定量板上涂抹一层 1 mg·mL<sup>-1</sup> PBS, 加入 50 μL 待测激活液。然后加入 0.25 μL 冻精, 检测最终稀释比为 1:600。立即混匀, 在 10 × 10 倍显微镜 (Leica DM 2500 德国) 下镜检, 同时录像 (JVC TK-U890EG, 日本)。待测激活液按如下内容和顺序进行:

虽然精液来源不尽相同, 但均采用类固醇激素人工催情。待亲鱼发情后, 用于毛巾擦净亲鱼生殖孔周围, 挤压腹部, 收集无粪便和杂物的干净精液于塑料精液存放袋中, 充氧后密封 4 ℃ 存放。精液运回实验室后, 除用少量精液进行镜检外, 其余立即进行超低温冷冻保存。

**渗透压对冻精活力的影响** 分别用 5 mmol·L<sup>-1</sup> 10 mmol·L<sup>-1</sup> 20 mmol·L<sup>-1</sup> 和 30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液激活冻精, pH 均为 8。对照组用蒸馏水激活。

**pH 对冻精活力的影响** 用 Tris-HCl 调 pH (Delta320, 中国) 分别为 6.5、7.5、8.5 和 9.5 激活冻精。其中, 西伯利亚鲟为 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl; 中华鲟、史氏鲟为 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl; 匙吻鲟为 30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl。对照组用蒸馏水激活。

**Mg<sup>2+</sup> 对冻精活力的影响** 分别用 Tris-HCl + 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>、5 mmol·L<sup>-1</sup>、7.5 mmol·L<sup>-1</sup> 和 10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 激活冻精。其中, 西伯利亚鲟用 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5; 中华鲟、史氏鲟用 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.5; 匙吻鲟用 30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.5 激活对照组。

在上述试验中, 每解冻一支麦管可完成 1 种激活液的试验, 约 20 min 完成, 平行重复 3 次。所有试验的对照组均用蒸馏水作激活液。

### 1.4 计算机辅助检测冻精活力

精子激活后的录像采用鱼类彩色精子图文分析系统 (FSQAS-2000) (中国水产科学院长江水产研究所和武汉千屏影像技术有限公司联合研制) 进行分析。精子激活后每隔 30 s 进行一次序列图像采集, 直到激活后 3 min。每个序列图像为 3 s, 72 帧。系统检测参数设置为: 最小步距 25 像素; 当前阈值为 150; A 级精子最小直线速度 20 μm·s<sup>-1</sup>; B 级精子最小直线速度 5 μm·s<sup>-1</sup>; C

级精子最小直线速度  $1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ 。然后对每个序列图像分别进行检测和报告输出。

### 1.5 数据分析

系统所得数据采用 SPSS 进行分析。两组平均数间的比较用 Paired-Sample T Test, 多重比较采用 One-Way ANOVA。  $P < 0.05$  为显著差异,  $P < 0.01$  为极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 渗透压对冻精活力的影响

鱼类精子在低温保存时, 由于稀释液、抗冻剂、以及降温过程的影响, 其精子的渗透压将发生一定的改变。表 2 列出了不同渗透压的激活液对 4 种鲟鱼冻精活力参数的影响。

表 2 不同渗透压的激活液对几种鲟鱼冷冻精子活力参数的影响

Tab. 2 The post-thaw sperm motility of several sturgeons stimulated by activating medium with different osmolalities

种类 species	激活液 activating medium	60 s 时的冻精活力 (%) rate of moving sperm at the 60 second after stimulated				平均曲线 运动速度 ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) VCL	平均直线 运动速度 ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) VSL	平均路径 运动速度 ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) VAP	平均移动的角度 ( $^{\circ}\cdot\text{s}^{-1}$ ) MAD
		A 级	B 级	C 级	D 级				
西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	5 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	53.26	9.67	19.87	16.17	89.94 ± 13.74 <sup>b</sup>	43.89 ± 13.62 <sup>b</sup>	49.55 ± 14.35 <sup>b</sup>	42.40 ± 4.40 <sup>b</sup>
	10 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	65.87	19.94	11.02	3.18	112.96 ± 13.18 <sup>a</sup>	65.61 ± 20.61 <sup>a</sup>	62.60 ± 8.57 <sup>a</sup>	58.68 ± 6.39 <sup>a</sup>
	20 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	55.93	13.50	14.79	15.78	92.64 ± 12.66 <sup>b</sup>	48.74 ± 15.76 <sup>b</sup>	53.78 ± 9.97 <sup>b</sup>	43.31 ± 6.52 <sup>b</sup>
	30 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	46.18	25.63	18.34	9.85	79.96 ± 14.72 <sup>b</sup>	42.83 ± 14.34 <sup>b</sup>	45.15 ± 12.33 <sup>c</sup>	46.09 ± 7.23 <sup>b</sup>
	蒸馏水	41.32	11.36	26.92	20.40	62.23 ± 12.48 <sup>c</sup>	37.34 ± 13.25 <sup>c</sup>	42.42 ± 10.53 <sup>c</sup>	44.74 ± 8.63 <sup>b</sup>
中华鲟 <i>A. sinensis</i>	5 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	63.03	19.29	7.61	10.07	81.88 ± 9.26 <sup>b</sup>	23.27 ± 4.90 <sup>b</sup>	32.06 ± 6.78 <sup>b</sup>	39.86 ± 4.29
	10 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	63.42	18.23	5.97	12.33	84.14 ± 11.52 <sup>b</sup>	25.23 ± 4.13 <sup>b</sup>	34.23 ± 6.08 <sup>b</sup>	40.09 ± 5.26
	20 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	64.18	20.92	9.14	5.76	104.62 ± 14.37 <sup>a</sup>	29.37 ± 4.23 <sup>a</sup>	40.97 ± 6.85 <sup>a</sup>	42.96 ± 3.61
	30 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	57.26	15.57	17.64	9.53	72.18 ± 12.75 <sup>c</sup>	22.23 ± 4.87 <sup>c</sup>	30.02 ± 4.32 <sup>c</sup>	40.66 ± 5.20
	蒸馏水	55.25	13.69	14.38	16.68	74.22 ± 10.29 <sup>c</sup>	22.85 ± 3.16 <sup>c</sup>	31.71 ± 6.45 <sup>c</sup>	40.20 ± 5.32
史氏鲟 <i>A. schrenckii</i>	5 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	45.92	17.79	21.78	14.51	103.70 ± 13.45 <sup>c</sup>	49.19 ± 6.46 <sup>c</sup>	59.99 ± 5.13 <sup>c</sup>	51.85 ± 4.62 <sup>a</sup>
	10 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	48.95	21.40	21.73	7.90	118.74 ± 13.49 <sup>b</sup>	57.09 ± 6.23 <sup>b</sup>	71.87 ± 5.55 <sup>b</sup>	51.38 ± 3.64 <sup>a</sup>
	20 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	57.68	20.88	14.85	6.59	139.32 ± 12.10 <sup>a</sup>	68.99 ± 7.65 <sup>a</sup>	82.91 ± 5.90 <sup>a</sup>	59.19 ± 3.38 <sup>a</sup>
	30 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	46.54	18.69	20.06	14.71	115.10 ± 13.13 <sup>b</sup>	56.06 ± 6.29 <sup>b</sup>	68.64 ± 5.82 <sup>b</sup>	55.79 ± 4.61 <sup>b</sup>
	蒸馏水	44.37	16.51	22.71	16.41	100.16 ± 13.75 <sup>c</sup>	45.02 ± 6.72 <sup>c</sup>	56.66 ± 5.45 <sup>c</sup>	52.12 ± 4.98 <sup>a</sup>
匙吻鲟 <i>P. spathula</i>	5 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	50.31	15.72	19.69	14.23	61.86 ± 11.45 <sup>c</sup>	22.61 ± 5.81 <sup>b</sup>	27.05 ± 6.16 <sup>c</sup>	53.72 ± 7.14 <sup>a</sup>
	10 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	52.10	34.13	3.59	10.18	64.02 ± 10.17 <sup>c</sup>	21.75 ± 5.25 <sup>b</sup>	28.34 ± 7.13 <sup>c</sup>	54.68 ± 8.13 <sup>a</sup>
	20 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	61.85	16.10	8.47	13.56	94.00 ± 16.86 <sup>b</sup>	42.51 ± 10.50 <sup>a</sup>	52.34 ± 13.92 <sup>b</sup>	44.86 ± 9.09 <sup>b</sup>
	30 mmol·L <sup>-1</sup> Tris	66.17	17.29	3.76	12.78	130.44 ± 12.48 <sup>a</sup>	44.07 ± 7.33 <sup>a</sup>	69.47 ± 8.23 <sup>a</sup>	58.99 ± 4.32 <sup>a</sup>
	蒸馏水	50.96	13.79	16.51	8.74	62.30 ± 10.77 <sup>c</sup>	21.77 ± 5.00 <sup>b</sup>	27.99 ± 7.29 <sup>c</sup>	56.38 ± 5.20 <sup>a</sup>

注:表中同一栏内,右上角标有不同英文字母的数据,相邻字母间的比较(如:a与b;b与c的比较)具有显著差异( $P < 0.05$ ),间隔字母间的比较(如:a与c的比较)具有极显著差异( $P < 0.01$ )

Notes: The continuously different letters in the same line show significant difference ( $P < 0.05$ ), and the uncontinuously different letters show highly significant difference ( $P < 0.01$ )

西伯利亚鲟 所有实验组的精子平均曲线运动速度(VCL)、平均直线运动速度(VSL)和平均路径运动速度(VAP)均高于对照组。其中,10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 VCL、VSL 和 VAP 最高,与其他实验组和对照组比较存在显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ )差异。而 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的精子平均移动角度(MAD)最大( $P < 0.05$ ),说明该实验组的精子的运动轨迹更趋于直线。30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 VCL、VSL 和 VAP 在所有实验组中最低,但高于对照组,说明适当的提高西伯利亚鲟冻精激活液的渗透压可以提高精子的运动速度,但过高反而会降低精子的运动速度。60 s

时的冻精活力测定同样证明了这一点。10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 A 级精子所占比例最高,而 D 级最低。虽然 30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 B 级精子在所有实验组和对照组中最高,但 A + B 的值则低于 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组,而高于对照组。

中华鲟 所有实验组精子的 VCL、VSL 和 VAP 均高于对照组。其中,20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 VCL、VSL 和 VAP 最高,与其他实验组和对照组比较存在显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ )差异。MAD 与其他实验组和对照组比较略有升高,但无显著差异,说明在试验设计的渗透压变化范围内,渗透压的改变对中华鲟冻精的运动轨迹

无影响。30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的各项参数与对照组比较无显著差异。60 s 时的冻精活力测定仍然是 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 的 A 级最高, D 级最低。

**史氏鲟** 所有实验组精子的 VCL、VSL 和 VAP 均高于对照组。其中, 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 VCL、VSL 和 VAP 最高, 与其他实验组和对照组比较存在显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ) 差异。5 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 VCL、VSL 和 VAP 与对照组比较无显著差异。除 30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 MAD 与其他实验组和对照组比较存在显著差异 ( $P < 0.05$ ) 外, 其他实验组和对照组间均无显著差异。60 s 时的冻精活力测定仍然是 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 的 A 级最高, D 级最低。

**匙吻鲟** 30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 VCL、

VSL 和 VAP 在所有实验组和对照组中最高。而 5 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组和 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 VCL、VSL 和 VAP 与对照组比较无差异。30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组的 MAD 也最高, 虽然与 5 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组、10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 组和对照组无显著差异, 但与 20 mmol·L<sup>-1</sup> 组存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。60 s 时的冻精活力测定仍然是 30 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 的 A 级最高, D 级最低。

## 2.2 pH 对冻精活力的影响

不同种的鱼精子的 pH 不尽相同。精子在冷冻过程中, 由于稀释液和抗冻剂的影响, 其 pH 也可能发生一些改变。表 3 列出了不同 pH 的激活液对 4 种鲟鱼冻精活力参数的影响。

表 3 不同 pH 的激活液对几种鲟鱼冻精活力参数的影响

Tab. 3 The post-thaw sperm motility of several sturgeons stimulated by activating medium with different pH

种类 species	激活液 activating medium	60 s 时的冻精活力 (%) rate of moving sperm at the 60 second after stimulated				平均曲线 运动速度 ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	平均直线 运动速度 ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	平均路径 运动速度 ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )	平均移动的角度 ( $^{\circ}\cdot\text{s}^{-1}$ )
		A 级	B 级	C 级	D 级	VCL	VSL	VAP	MAD
西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	pH 6.5	60.38	17.42	11.34	10.86	99.96 ± 14.72 <sup>b</sup>	42.83 ± 14.34 <sup>b</sup>	45.15 ± 12.33 <sup>b</sup>	46.09 ± 7.28 <sup>b</sup>
	pH 7.5	67.17	20.63	8.32	3.88	112.96 ± 13.18 <sup>a</sup>	65.61 ± 20.61 <sup>a</sup>	62.60 ± 8.57 <sup>a</sup>	58.68 ± 6.39 <sup>a</sup>
	pH 8.5	62.93	17.54	9.79	9.74	92.64 ± 12.66 <sup>b</sup>	48.74 ± 15.76 <sup>b</sup>	53.78 ± 9.97 <sup>b</sup>	53.31 ± 6.52 <sup>b</sup>
	pH 9.5	58.22	19.67	9.87	12.24	89.94 ± 13.74 <sup>b</sup>	43.89 ± 13.62 <sup>b</sup>	49.55 ± 14.35 <sup>b</sup>	52.40 ± 4.40 <sup>b</sup>
	蒸馏水	41.32	11.36	26.92	20.40	62.28 ± 12.48 <sup>c</sup>	37.34 ± 13.25 <sup>c</sup>	42.42 ± 10.53 <sup>c</sup>	47.74 ± 8.63 <sup>b</sup>
中华鲟 <i>A. sinensis</i>	pH 6.5	63.03	19.29	7.61	10.07	99.48 ± 15.21 <sup>b</sup>	23.27 ± 4.90 <sup>c</sup>	32.06 ± 6.78 <sup>b</sup>	39.86 ± 4.29 <sup>c</sup>
	pH 7.5	63.42	18.28	5.97	12.33	102.14 ± 10.52 <sup>ab</sup>	25.28 ± 4.13 <sup>b</sup>	33.03 ± 6.08 <sup>b</sup>	43.91 ± 5.77 <sup>b</sup>
	pH 8.5	64.18	20.92	9.14	5.76	104.62 ± 14.37 <sup>a</sup>	29.37 ± 4.23 <sup>a</sup>	40.97 ± 6.85 <sup>a</sup>	58.96 ± 3.61 <sup>a</sup>
	pH 9.5	57.26	15.57	17.64	9.53	94.54 ± 5.75 <sup>b</sup>	28.03 ± 2.81 <sup>a</sup>	38.87 ± 4.32 <sup>a</sup>	58.27 ± 3.29 <sup>a</sup>
	蒸馏水	55.25	13.69	14.38	16.68	74.22 ± 10.29 <sup>c</sup>	22.85 ± 3.16 <sup>c</sup>	31.71 ± 6.45 <sup>b</sup>	40.20 ± 5.32 <sup>c</sup>
史氏鲟 <i>A. schrenckii</i>	pH 6.5	53.92	17.79	16.78	11.51	125.30 ± 14.45 <sup>ab</sup>	49.19 ± 6.46 <sup>c</sup>	73.56 ± 9.52 <sup>b</sup>	39.21 ± 4.62 <sup>c</sup>
	pH 7.5	55.90	21.40	4.73	7.79	132.78 ± 13.49 <sup>a</sup>	57.09 ± 6.23 <sup>b</sup>	82.37 ± 7.51 <sup>a</sup>	55.18 ± 6.34 <sup>b</sup>
	pH 8.5	57.68	20.88	14.85	6.59	139.32 ± 12.10 <sup>a</sup>	68.99 ± 7.65 <sup>a</sup>	82.91 ± 5.90 <sup>a</sup>	69.19 ± 3.38 <sup>a</sup>
	pH 9.5	46.54	18.69	20.06	14.71	120.86 ± 17.11 <sup>b</sup>	56.06 ± 6.29 <sup>b</sup>	77.64 ± 3.82 <sup>ab</sup>	60.76 ± 5.61 <sup>a</sup>
	蒸馏水	44.37	16.51	22.71	16.41	100.16 ± 13.75 <sup>c</sup>	45.02 ± 6.72 <sup>c</sup>	56.66 ± 5.45 <sup>c</sup>	52.12 ± 4.98 <sup>b</sup>
匙吻鲟 <i>P. spathula</i>	pH 6.5	61.37	15.72	10.69	12.22	120.04 ± 17.39 <sup>a</sup>	23.54 ± 6.46 <sup>b</sup>	31.17 ± 6.49 <sup>c</sup>	43.72 ± 9.11 <sup>c</sup>
	pH 7.5	65.00	14.13	8.52	12.35	119.68 ± 17.25 <sup>a</sup>	28.10 ± 5.25 <sup>b</sup>	65.42 ± 7.85 <sup>b</sup>	54.68 ± 10.13 <sup>b</sup>
	pH 8.5	66.17	17.29	3.76	12.78	130.44 ± 12.48 <sup>a</sup>	44.07 ± 7.33 <sup>a</sup>	69.47 ± 8.23 <sup>a</sup>	64.86 ± 9.09 <sup>a</sup>
	pH 9.5	61.85	16.10	8.47	13.56	104.74 ± 14.56 <sup>b</sup>	42.51 ± 10.50 <sup>a</sup>	68.00 ± 11.17 <sup>a</sup>	59.23 ± 4.17 <sup>a</sup>
	蒸馏水	50.96	13.79	16.51	18.74	62.30 ± 10.77 <sup>c</sup>	21.77 ± 5.00 <sup>b</sup>	27.99 ± 7.29 <sup>c</sup>	46.38 ± 5.20 <sup>c</sup>

注:表中同一栏内, 右上角标有不同英文字母的数据, 相邻字母间的比较(如: a 与 b; b 与 c 的比较)具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 间隔字母间的比较(如: a 与 c 的比较)具有极显著差异 ( $P < 0.01$ )

Notes: The continuously different letters in the same line show significant difference ( $P < 0.05$ ), and the uncontinuously different letters show highly significant difference ( $P < 0.01$ )

**西伯利亚鲟** 所有实验组精子的 VCL、VSL 和 VAP 均高于对照组。其中, pH 7.5 组的 VCL、VSL 和 VAP 最高, 与其他实验组和对照组比较存在显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ) 差

异。说明适当的 pH 激活液可显著提高精子的运动速度。而除了 pH 7.5 组的 MAD 显著高于其他实验组和对照组外 ( $P < 0.05$ ), 其他试验组与对照组比较, MAD 无显著差异。因此认为激活

液在该试验范围内的 pH 对精子的运动轨迹无显著影响。同时,60 s 时的冻精活力测定是 pH 7.5 组的 A 级最高,D 级最低。所以,pH 7.5 应该是西伯利亚鲟冻精激活液的最适 pH。

**中华鲟** 所有实验组精子的 VCL、VSL 和 VAP 均高于对照组。其中,pH 8.5 组的 VCL、VSL 和 VAP 最高,除了与 pH 9.5 组比较,VSL 和 VAP 无差异外,与其他实验组和对照组比较存在显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ )差异。但值得注意的是,pH 8.5 组的 MAD 与 pH 9.5 组的无差异,但与 pH 7.5 组和对照组存在显著差异

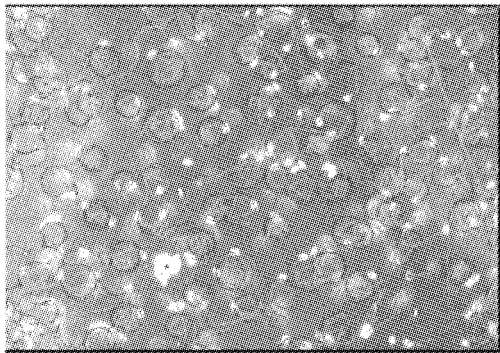


图1 中华鲟 pH 6.5 组冻精在激活 60 s 时的运动轨迹图

Fig. 1 The moving track of post-thaw sperm of *A. sinensis* in pH 6.5 test group at the time of activated 60 s

**史氏鲟** 所有实验组精子的 VCL、VSL 和 VAP 均高于对照组。其中,pH 8.5 组的 VCL、VSL 和 VAP 最高,与对照组比较有极显著差异( $P < 0.01$ )。而 pH 6.5 组的 MAD 最低,与 pH 8.5、pH 9.5 和对照组比较有极显著差异( $P < 0.01$ )。pH 6.5 组的精子运动轨迹也呈旋转运动状。60 s 时的冻精活力测定是 pH 8.5 组的 A 级最高,D 级最低。所以 pH 8.5 应该是史氏鲟冻精激活液的最适 pH。

**匙吻鲟** 所有实验组精子的 VCL、VSL 和 VAP 均高于对照组。其中,pH 8.5 组的 VCL、VSL 和 VAP 最高,与对照组比较 VCL 和 VAP 呈极显著差异( $P < 0.01$ ),VSL 呈显著差异( $P < 0.05$ )。而 pH 6.5 组和对照组的 MAD 最低,与 pH 8.5 和 pH 9.5 组比较有极显著差异( $P < 0.01$ ),与 pH 7.5 比较有显著差异( $P < 0.05$ )。pH 6.5 组的精子运动轨迹也呈旋转运动状。60 s 时的冻精活力测定是 pH 8.5 组的 A 级最高,D

( $P < 0.05$ ),而与 pH 6.5 组存在极显著差异( $P < 0.01$ )。图 1 为 pH 6.5 组在冻精被激活 60 s 时的运动轨迹图,图 2 为 pH 8.5 组在冻精被激活 60 s 时的运动轨迹图。从图中可看出,pH 6.5 组的精子几乎在原地旋转,而 pH 8.5 组的精子则呈较正常的运动状态。所以,MAD 值越小,说明精子的旋转程度越大。低 pH 的激活液会使精子做旋转运动,从而影响精子的迅速扩散。60 s 时的冻精活力测定是 pH 8.5 组的 A 级最高,D 级最低。所以 pH 8.5 应该是中华鲟冻精激活液的最适 pH。

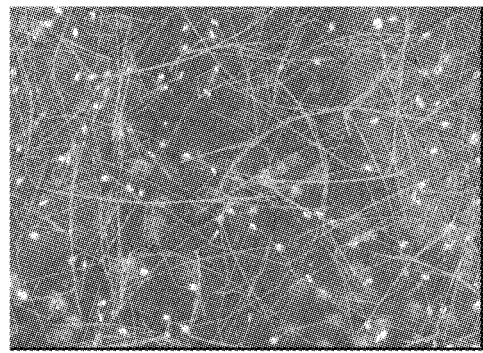


图2 中华鲟 pH 8.5 组冻精在激活 60 s 时的运动轨迹图

Fig. 2 The moving track of post-thaw sperm of *A. sinensis* in pH 8.5 test group at the time of activated 60 s

级最低。所以 pH 8.5 应该是匙吻鲟冻精激活液的最适 pH。

### 2.3 $Mg^{2+}$ 对冻精活力的影响

试验发现在 4 种鲟鱼冻精激活液中加入适当浓度的  $Mg^{2+}$ ,可显著增加冻精被激活后的运动速度。表 4 列出了不同浓度  $Mg^{2+}$  的激活液对 4 种鲟鱼冻精活力参数的影响。从表 4 可看出 4 种鲟鱼的冻精激活液中加入  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$  可显著提高冻精的 VCL、VSL 和 VAP。所有实验组与对照组比较均呈显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ )差异。但  $Mg^{2+}$  对精子的运动方式无影响。除中华鲟和匙吻鲟的  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$  组与其他实验组和对照组有显著差异( $P < 0.05$ )外,其他 2 种鲟鱼的实验组和对照组均无差异。而 4 种鲟鱼 60 s 时的冻精活力测定均是  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$  组的 A 级最高,D 级最低。所以,4 种鲟鱼的冻精激活液中加入  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$  应是较适宜的浓度。

表 4 不同浓度的  $MgCl_2$  激活液对几种鲟鱼冻精活力参数的影响  
 Tab.4 The post-thaw sperm motility of several sturgeons stimulated by activating medium with different concentration of  $MgCl_2$

种类 species	激活液 activating medium	60 s 时的冻精活力 (%) rate of moving sperm at the 60 second after stimulated				平均曲线 运动速度 ( $\mu m \cdot s^{-1}$ ) VCL	平均直线 运动速度 ( $\mu m \cdot s^{-1}$ ) VSL	平均路径 运动速度 ( $\mu m \cdot s^{-1}$ ) VAP	平均移动 的角度 ( $^{\circ} \cdot s^{-1}$ ) MAD
		A 级	B 级	C 级	D 级				
西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i>	2.5 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	60.38	20.63	11.34	7.65	118.86 ± 11.61 <sup>b</sup>	65.01 ± 14.55 <sup>b</sup>	64.97 ± 12.13 <sup>b</sup>	56.89 ± 7.08
	5.0 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	66.26	18.79	11.13	3.82	126.74 ± 10.42 <sup>a</sup>	74.03 ± 10.13 <sup>a</sup>	76.92 ± 9.40 <sup>a</sup>	57.38 ± 6.69
	7.5 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	62.98	17.54	9.79	9.74	121.32 ± 12.32 <sup>a</sup>	64.14 ± 15.12 <sup>b</sup>	62.63 ± 9.87 <sup>b</sup>	58.51 ± 6.53
	10 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	58.22	19.67	9.87	12.24	109.48 ± 13.79 <sup>b</sup>	60.93 ± 13.20 <sup>b</sup>	60.80 ± 14.05 <sup>b</sup>	59.44 ± 4.48
	10 mmol·L <sup>-1</sup> Tris pH 7.5	65.87	19.94	11.02	3.18	112.96 ± 13.18 <sup>b</sup>	65.61 ± 20.61 <sup>b</sup>	62.60 ± 8.57 <sup>b</sup>	58.68 ± 6.39
中华鲟 <i>A. sinensis</i>	2.5 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	63.03	19.29	7.61	10.07	108.48 ± 15.17 <sup>b</sup>	37.37 ± 6.05 <sup>a</sup>	41.06 ± 6.78 <sup>b</sup>	59.86 ± 4.29 <sup>b</sup>
	5.0 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	70.15	17.34	8.52	3.99	122.34 ± 18.33 <sup>a</sup>	38.40 ± 6.78 <sup>a</sup>	49.79 ± 6.62 <sup>a</sup>	67.55 ± 4.00 <sup>a</sup>
	7.5 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	63.42	18.28	5.97	12.33	102.14 ± 10.52 <sup>b</sup>	33.80 ± 7.18 <sup>ab</sup>	40.23 ± 6.18 <sup>b</sup>	58.27 ± 3.29 <sup>b</sup>
	10 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	57.26	15.57	17.64	9.53	94.54 ± 15.75 <sup>c</sup>	27.63 ± 6.87 <sup>b</sup>	36.48 ± 7.91 <sup>b</sup>	53.91 ± 5.77 <sup>b</sup>
	20 mmol·L <sup>-1</sup> Tris pH 8.5	64.18	20.92	9.14	5.76	104.62 ± 14.37 <sup>b</sup>	29.37 ± 4.23 <sup>b</sup>	40.97 ± 6.85 <sup>b</sup>	58.96 ± 3.61 <sup>b</sup>
史氏鲟 <i>A. schrenckii</i>	2.5 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	53.92	17.79	16.78	11.51	141.30 ± 14.49 <sup>b</sup>	69.86 ± 6.46 <sup>b</sup>	88.56 ± 6.52 <sup>ab</sup>	59.21 ± 4.62
	5.0 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	62.41	18.85	15.52	3.22	151.78 ± 15.23 <sup>a</sup>	77.61 ± 7.49 <sup>a</sup>	94.17 ± 6.90 <sup>a</sup>	68.61 ± 4.44
	7.5 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	59.90	19.43	14.70	7.77	142.78 ± 13.49 <sup>b</sup>	67.59 ± 6.23 <sup>b</sup>	85.37 ± 7.51 <sup>b</sup>	60.18 ± 6.34
	10 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	46.54	18.69	20.06	14.71	120.86 ± 17.11 <sup>c</sup>	56.06 ± 6.29 <sup>c</sup>	77.64 ± 6.82 <sup>c</sup>	60.76 ± 5.61
	20 mmol·L <sup>-1</sup> Tris pH 8.5	57.89	20.85	14.68	6.58	139.32 ± 12.10 <sup>b</sup>	68.99 ± 7.65 <sup>b</sup>	82.91 ± 5.90 <sup>b</sup>	69.19 ± 3.38
匙吻鲟 <i>P. spathula</i>	2.5 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	65.00	14.13	8.52	12.35	139.68 ± 17.25 <sup>ab</sup>	43.10 ± 5.25 <sup>b</sup>	69.92 ± 7.85 <sup>b</sup>	54.68 ± 10.13 <sup>b</sup>
	5.0 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	71.02	16.91	7.45	4.62	142.82 ± 17.58 <sup>a</sup>	53.73 ± 4.44 <sup>a</sup>	78.92 ± 6.72 <sup>a</sup>	63.39 ± 8.57 <sup>a</sup>
	7.5 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	61.37	15.72	10.69	12.22	120.04 ± 17.39 <sup>b</sup>	42.51 ± 10.50 <sup>b</sup>	76.17 ± 6.49 <sup>a</sup>	53.72 ± 9.11 <sup>b</sup>
	10 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	61.85	16.10	8.47	13.56	104.74 ± 14.56 <sup>c</sup>	23.54 ± 6.46 <sup>c</sup>	68.00 ± 11.17 <sup>b</sup>	55.23 ± 4.17 <sup>b</sup>
	30 mmol·L <sup>-1</sup> Tris pH 8.5	66.17	17.29	3.76	12.78	130.44 ± 12.48 <sup>b</sup>	44.07 ± 7.33 <sup>a</sup>	69.47 ± 8.23 <sup>a</sup>	64.86 ± 9.09 <sup>a</sup>

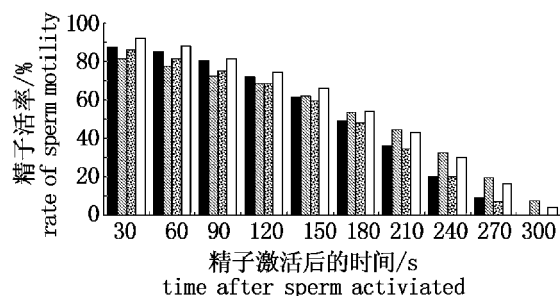
注:表中同一栏内,右上角标有不同英文字母的数据,相邻字母间的比较(如:a与b;b与c的比较)具有显著差异( $P < 0.05$ ),间隔字母间的比较(如:a与c的比较)具有极显著差异( $P < 0.01$ )

Notes: The continuously different letters in the same line show significant difference ( $P < 0.05$ ), and the uncontinuously different letters show highly significant difference ( $P < 0.01$ )

## 2.4 精子冷冻保存效果比较

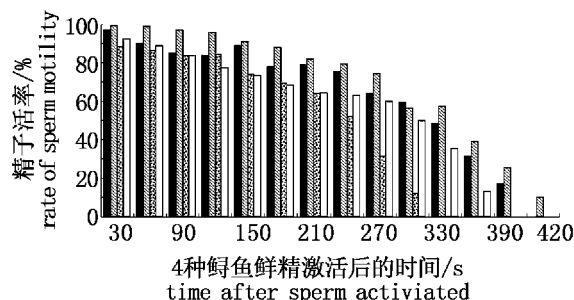
图 3 和图 4 分别为冷冻后和冷冻前 4 种鲟鱼精子在各检测时段的平均活率。从图中可看出冷冻前中华鲟的精子寿命最长,达到了 420 s 以上;其次是西伯利亚鲟为 390 s;史氏鲟的精子寿命为

360 s;匙吻鲟的精子寿命最短,为 300 s 左右。240 s 前,4 种鲟鱼的精子平均活率均在 60% 以上,但 240 s 以后,匙吻鲟精子的平均活率急速下降。其他 3 种鲟鱼精子在 330 s 后,平均活率才相继低于了 60%。



■ 西伯利亚鲟 *A. baerii* □ 中华鲟 *A. sinensis*  
 ▨ 匙吻鲟 *P. spathula* □ 史氏鲟 *A. schrenckii*

图 3 4 种鲟鱼冻精被激活后各时间段的精子活率  
 Fig.3 The rate of post-thaw sperm motility at the each time after activated



■ 西伯利亚鲟 *A. baerii* □ 中华鲟 *A. sinensis*  
 ▨ 匙吻鲟 *P. spathula* □ 史氏鲟 *A. schrenckii*

图 4 4 种鲟鱼鲜精被激活后各时间段的精子活率  
 Fig.4 The rate of fresh sperm motility at the each time after activated

冷冻后4种鲟鱼精子的平均寿命都不同程度的缩短了。中华鲟和史氏鲟为300 s,西伯利亚鲟和匙吻鲟为270 s。4种鲟鱼精子在180 s以后均低于了60%。

对4种鲟鱼冷冻前后精子的平均活率相关性作线性回归分析,结果显示西伯利亚鲟的 $R^2 = 0.8296 (P < 0.01)$ ;中华鲟的 $R^2 = 0.9860 (P < 0.01)$ ;匙吻鲟的 $R^2 = 0.9622 (P < 0.01)$ ;史氏鲟 $R^2 = 0.9477 (P < 0.01)$ 。说明冷冻前后4种鲟鱼精子的平均活率存在着极显著的线性正相关性。

### 3 讨论

#### 3.1 鱼类精子活力检测方法

计算机辅助精子活力分析系统(CASA)是在包括显微摄影、显微图像分析和荧光显微技术等多项技术和设备的基础上发展起来的新技术<sup>[15]</sup>。该系统利用硬件(显微镜、录像机、频闪仪、计算机等)和软件(Micro Image v 5.0、SQIAS-1000、以及FSQAS-2000等)对精子激活后的录像进行数字化处理和分析。此项技术最初是应用在男性生殖学研究中,以后随着技术的发展和完善逐渐被应用到其他哺乳类精子活力的检测中<sup>[16-19]</sup>。

鱼类精子的活力检测最初是1985年由Cosson等<sup>[20]</sup>对鲑鱼的研究开始的。当时是通过对鲑鱼精子激活后的录像,进行慢镜头回放,并在显示器上加入了预先设置好的定标网格,通过精子在各网格中的运动,用秒表记录时间,实现了半数字化鱼类精子活力检测。真正开始计算机辅助鱼类精子活力检测技术的研究是最近10年才开展起来的<sup>[14,21-26]</sup>。CASA技术的引入克服了传统鱼类精子活力检测无法克服的难题,如:精子在激活后快速运动的时间很短、精子的密度很高、以及鞭毛摆动的频率很快等<sup>[5]</sup>。使鱼类精子活力检测在一个更精确、重复性更强、数字化程度更高、并快速、简便的基础上进行。

FSQAS-2000是作者依据鱼类精子的生物学特性,参照医学对人类精子的检测方法,在世界卫生组织对精子检测标准的基础上,与武汉千屏影像技术有限公司合作,开发的一款具有自主知识产权的鱼类精子彩色图文分析系统。该系统对激活后的精子录像,按时间分段进行采集,每个时间段为3秒72帧图像。系统会依据每个精子在图像中像素点所在的位置进行自动编号,然后计算

机根据每个精子在每一帧图像中的像素点来分析该精子的运动状态。该系统与国外同类系统相比,省掉了频闪仪、时间打卡器等造价很高的硬件设备,而用精子的像素点移动原理和计算机本身的时间记录功能取代。因此,该系统比国外同类系统更简便、更经济,同时由于精子与像素点的关系是一一对应的关系,所以也更精确。

#### 3.2 精子活力的相关参数

无论是本论文所采用的FSQAS-2000,还是其他形式的CASA,均能对鱼类精子的运动状态提供20多项参数的分析结果。但在对美洲鲟(*Noturus flavipinnis*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)、鲑(*Oncorhynchus mykiss*)和湖鲟(*Acipenser fulvescens*)等的许多研究中发现,最重要的参数是精子的VCL(精子在其实际运动轨迹上的速度)和VSL(精子开始运动的位置与最后所处位置间的直线距离/所花的相应时间)<sup>[25,27-30]</sup>。我们对4种鲟鱼的研究也同样证明,不同的激活液可以使鲟鱼精子的VCL和VSL发生很大变化。

另一个与精子运动速度有关的参数是精子的VAP(精子沿其空间实际运动轨迹所做的平滑曲线的距离/所花的相应时间),一些学者认为它在鱼类精子分析中不重要,原因是鱼类精子总是在一个方向上做平滑的曲线运动。因此,认为鱼类的VAP和VCL是基本相同的<sup>[25,27-30]</sup>。但另一些学者则认为VAP和VCL同样重要。在研究棘鱼(*Acanthodii aculeatus*)和狼鱼(*Anarhl minor*)时发现,由于这些鱼的精子要在胶体渗透压很高的激活液中运动,激活液所产生的阻力迫使精子的运动轨迹呈飘逸状。因此,VAP和VCL产生了很大差异<sup>[31-32]</sup>。作者在对4种鲟鱼精子的研究中也发现VAP和VCL有很大差异。分析认为,鱼类精子的VAP和VCL是否有差异主要取决于精子的体积和形状、精子的运动速度、精子的运动方式以及精子在激活液中所受到的阻力。试验中的4种鲟鱼精子体积均比一般鱼类大20~50倍,形状呈梭形,速度比一般淡水鱼类精子快(鲤科鱼类平均曲线速度可达到 $100 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上<sup>[33]</sup>)。最主要的是4种鲟鱼精子的运动方式,精子在激活后,不仅沿自身长轴做旋转运动,而且还沿运动方向的轴做旋转运动。因此,精子在运动过程中所受的阻力很大,迫使精子做不规则的



飘逸运动。另一种可能是,试验主要是针对冷冻保存后的精子进行冻精激活试验。精子在冷冻过程中,其膜结构可能受到了损伤,从而改变了精子的正常运动状态。这种可能性是否存在尚有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 邓岳松,林浩然. 鱼类精子活力研究进展[J]. 生命科学,1999,3(4):271-278.
- [2] Billard R, Cosson J. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish[J]. J Exp Zool,1992,261:122-131.
- [3] Rurangwaa E, Kimeb D E, Olleviera F, et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish [J]. Aquaculture, 2004,234:1-28.
- [4] Boyer S P, Davis R O, Katz D F. Automated semen analysis current problems in obstetrics [J]. Gynecol Fertil, 1989,12:165-200.
- [5] Billard R, Cosson J, Crim L W, et al. Sperm physiology and quality [M]//Bromage N, Roberts R. Eds. Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell, Oxford, 1995:25-52.
- [6] 周定刚,温安祥,黄鳍精子活力检测和精子入卵早期过程观察[J]. 水产学报,2003,27(5):398-402.
- [7] 管卫兵,王桂忠,李少菁. 甲壳动物精子质量和活力评价[J]. 海洋通报,2003,22(2):83-88.
- [8] 苏德学,严安生,田永胜. 钠、钾、钙和葡萄糖对白斑狗鱼精子活力的影响[J]. 动物学杂志,2004,39(1):16-22.
- [9] 胡家会,张士瑾,张永忠,等. 青岛文昌鱼精子运动特征及计算机辅助分析[J]. 动物学报,2006,52(4):706-711.
- [10] Linhart O, Kudo. Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization [J]. J Fish Biol, 1997,51:573-582.
- [11] Medea AV Gmb H. Manual for medeaLAB CASA (Computer Aided Sperm Analysis) Version 5. 1 [M]. Am Weichselgarten 23 D-91058 Erlangen Germany, 1997:15-31.
- [12] Linhart O, Rodina M, Cosson J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos [J]. Cryobiology, 2000,41:241-250.
- [13] Liu L, Wei Q W, Guo F, et al. Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) sperm [J]. J Appl Ichthyol, 2006,22:55-59.
- [14] Gallis J L, Fedrigo E, Jatteau P, et al. Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility [M]//Williot P. Ed. *Acipenser*. Cemagref Publ, 1991,143-151.
- [15] Boyer S P, Davis R O, Katz D F. Automated semen analysis. current problems in obstetrics [J]. Gynecol Fertil, 1989,12:165-200.
- [16] Vantman D, Banks S M, Koukoulis G, et al. Assessment of sperm motion characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer assisted semen analyzer [J]. Fertil Steril, 1989,51:151-161.
- [17] Farrell P B, Presicce G A, Brockett C C, et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility [J]. Theriogenology, 1998,49:871-879.
- [18] Moore H D M, Akhondi M A. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat spermatozoa from proximal cauda have a greater fertilizing capacity *in vitro* than those from the distal cauda or vas deferens [J]. J Androl, 1996,17:50-60.
- [19] Hirano Y, Shibahara H, Obara H, et al. Relationships between sperm motility characteristics assessed by computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilisation rates *in vitro* [J]. J Assist Reprod Genet, 2001,18:213-218.
- [20] Cosson M P, Billard R, Gatti J L, et al. Rapid and qualitative assessment of trout sperm motility using stroboscopy [J]. Aquaculture, 1985,46:71-75.
- [21] Toth G P, Christ S A, McCarthy H W, et al. Computer-assisted motion analysis of semen from the common carp [J]. J Fish Biol, 1995,47:986-1003.
- [22] Toth G P, Ciereszko A, Christ S A, et al. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions [J]. Aquaculture, 1997,154:337-348.
- [23] Christ S A, Toth G P, McCarthy H W, et al. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA) [J]. J Fish Biol, 1996,48:1210-1222.
- [24] Kime D E, Ebrahimi M, Nysten K, et al. Use of

- computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to effects of heavy metals [J]. *Aquat Toxicol*, 1996, 36: 223 – 237.
- [25] Kime D E, van Look K J W, McAllister B G, *et al.* Computer assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, 130: 425 – 433.
- [26] Ravinder K, Nasaruddin K, Majumdar K C, *et al.* Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen [J]. *J Fish Biol*, 1997, 50: 1309 – 1328.
- [27] Ciereszko A, Toth G P, Christ S A, *et al.* Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa [J]. *Theriogenology*, 1996, 45: 665 – 672.
- [28] Rurangwa E, Volckaert F A M, Huyskens G, *et al.* Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilisation in African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 751 – 769.
- [29] Rurangwa E, Biegniowska A, Slominska E, *et al.* Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm; a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2002, 131: 335 – 344.
- [30] Jobling S, Coey S, Whitmore J G, *et al.* Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67: 515 – 524.
- [31] Kime D E, Tveiten H. Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolfish [J]. *J Fish Biol*, 2002, 61: 1549 – 1559.
- [32] Elofsson H, McAllister B G, Kime D E, *et al.* Long lasting sticklebacks sperm; is ovarian fluid a key to success in freshwater [J]. *J Fish Biol*, 2003, 63: 240 – 253.
- [33] Perchec G, Jeulin C, Ander K, *et al.* Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108: 747 – 753.