

黄姑鱼精子的超低温冻存及细胞结构损伤的检测

金春华, 闫家强, 竺俊全*

(宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:以 HBSS 溶液为稀释液, DMSO 为抗冻剂, 0.25 mL 麦细管为冻存管, 两步降温法超低温冻存黄姑鱼精子, 并用单细胞凝胶电泳 (SCGE) 技术检测了冻精的 DNA 损伤, 荧光双染色流式细胞仪技术 (FCM) 检测了冻精的细胞膜性结构损伤。结果表明, DMSO 质量分数在 5%~20% 时, 冻精的活力与鲜精相比无显著差异; 其中 DMSO 质量分数在 10% 时, 冻精的激活率、运动时间及寿命分别为 $85.25\% \pm 3.95\%$ 、 (3.23 ± 0.27) min 及 (3.83 ± 0.33) min。DMSO 质量分数在 25%、30% 时, 冻精的活力显著下降。SCGE 检测显示, DMSO 质量分数在 5%~15% 时, 冻精的 DNA 损伤与鲜精相比差异不显著, DMSO 质量分数为 20%、25%、30% 时, 冻精的 DNA 损伤明显加重, 冻精的 DNA 损伤与抗冻剂 DMSO 的质量分数成正相关。FCM 检测显示, DMSO 质量分数在 5%~20% 时, 冻精中线粒体及细胞膜结构保持完整性的精子比例与鲜精相比无显著差异, DMSO 质量分数在 25%、30% 时, 冻精中的线粒体及细胞膜结构保持完整性的精子比例明显下降。分析认为, 较高质量分数的 DMSO 是引起冻精活力下降, DNA、线粒体及细胞膜结构损伤加重的主要原因。

关键词:黄姑鱼; 精子; 超低温冻存; 单细胞凝胶电泳; 荧光双染色流式细胞术

中图分类号: Q 959.48; S 917

文献标志码: A

因经济鱼类种质保存、遗传育种及苗种生产的需要, 精子超低温冻存及冻精质量检测的研究引起广泛重视。目前, 经济鱼类精子的超低温冻存及质量检测的研究已见在黑鲷 (*Sparus macrocephalus*)^[1]、真鲷 (*Pagrosomus major*)^[2-3]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[4]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[5]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[6]、褐鲟 (*Salmo trutta*)^[7]、七带石斑鱼 (*Epinephelus septemfasciatus*)^[8] 及条纹狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[9] 等种类中研究报道。精子超低温冻存前后的质量检测常用显微镜活力 (激活率、运动时间及寿命) 观察法^[10] 及受精率测定法^[1-2]; 精子活力的显微观察因操作人员的不同存在判定上的主观差异; 受精率测定需要一定数量的优质成熟卵, 采卵时需对亲鱼的性成熟度进行人工调控, 而且人工受精及孵化技术要求较高, 有时受产卵季节的限制而难以实

现。因此, 在精子活力及受精率等常规指标检测的基础上, 需要用更加简便、有效的方法检测冷冻精子质量。由于冷冻保存会导致精子细胞结构损伤, 影响其生理功能及受精能力。所以, 对冷冻精子细胞结构损伤程度的检测十分必要。精子细胞结构损伤主要包括核 DNA 损伤^[1-2, 6-7] 及细胞膜性结构损伤^[3, 11-12] 等。其中, 核 DNA 损伤检测常用单细胞凝胶电泳 (SCGE) 法, 具有快速、简便及灵敏的特点, 已被应用于鱼类精子^[1-2, 6-7, 9] DNA 损伤检测中; 细胞膜性结构损伤检测常用荧光双染色流式细胞术 (FCM), 具有高通量、准确和简便的特点, 已被应用于哺乳动物精子^[11-12] 及鱼类精子^[3, 13-14] 等的质量检测中。对超低温冻存精子的核 DNA 及细胞膜性结构损伤进行检测, 有助于探讨冷冻损伤机理、了解抗冻剂种类及浓度对精子超低温冻存效果的影响, 为抗冻剂的优选提供细胞学依据。

收稿日期: 2011-01-13 修回日期: 2011-04-14

资助项目: 浙江省重大科技专项重点社会发展项目 (2009C03017-4); 宁波市科学技术局项目 (2006C100044, 2007A31004); 宁波大学人才工程项目 (BSL2009004); 教育部创新团队项目 (IRTO734)

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

黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 属鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科 (Sciaenidae)、黄姑鱼属,自然分布于我国沿海海域,是海洋渔业的主要捕捞对象,因其色泽金黄、肉嫩味美而深受人们喜爱。近年来,由于环境污染及捕捞过度等原因,导致种质资源的衰退。因此,黄姑鱼种质保存、育种及养殖开发受到重视^[15-18]。开展黄姑鱼精子的超低温冻存,建立优良种质的精子库,是种质保存的有效途径之一,且在育种生产上具有应用价值。目前,黄姑鱼精子的超低温冻存及冻精质量检测的研究未见报道。本研究以 HBSS 溶液为稀释液, DMSO (二甲基亚砜) 为抗冻剂, 0.25 mL 麦细管为冻存管, 用简易降温装置、两步降温法超低温冻存黄姑鱼精子, 并用 SCGE 法检测了冻精核 DNA 损伤, FCM 技术检测了冻精细胞膜性结构损伤, 旨在为黄姑鱼精子超低温冻存技术的确立及冻精质量的评价提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

性成熟黄姑鱼雄鱼于 2010 年 3 月取自浙江象山港湾水产苗种有限公司育苗场, 每尾体质量为 500 ~ 600 g, 共 8 尾, 经绒毛膜促性腺激素及促黄体素释放激素类似物 (HCG + LRH-A) 催产, 约 30 h 后采精。

1.2 方 法

精液的采集与稀释 先将 HBSS 溶液 (NaCl 8.0 g/L, KCl 0.4 g/L, CaCl₂ · 2H₂O 0.16 g/L, NaHCO₃ 0.35 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, Na₂HPO₄ · 7H₂O 0.12 g/L, KH₂PO₄ 0.06 g/L, C₆H₁₂O₆ 1.00 g/L) 与 DMSO 按一定比例混合配制成抗冻液, 置于 4 °C 冰箱中预冷。采精时用洁净的毛巾擦干黄姑鱼生殖孔周围体表, 轻压鱼腹使精液自然流出, 获得无尿污的精液于培养皿中, 置于冰块上。将采得的精液与抗冻液按 1:3 比例混匀成精液—抗冻液混合物, 于 4 °C 下平衡 5 ~ 8 min。

冷冻与解冻 将精液—抗冻液混合物分装入 0.25 mL 麦细管中 (每管盛约 0.2 mL), 然后在简易降温装置中将麦细管平放在液氮面 3 ~ 4 cm 处停留 3 ~ 5 min 后投入液氮中保存, 每一抗冻剂浓度保存 6 ~ 8 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。

鲜精及冻精的活力测定 按江世贵等^[10]的方法测定鲜精与冻存 10 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。

1.3 鲜精及冻精 DNA 损伤的 SCGE 检测

试验溶液配制 PBS: 0.2 mol/L 的 Na₂HPO₄ · 12H₂O (81 mL) 与 0.2 mol/L 的 NaH₂PO₄ · 2H₂O (19 mL) 混合液 (pH = 7.4, 4 °C 保存); 裂解液: 2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 10 g/L 十二烷基硫酸钠, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH = 10.0; 电泳液: 0.3 mol/L NaOH, 1 mmol/L Na₂-EDTA, pH = 13.0。Tris-HCl: 0.4 mol/L Tris, HCl 溶液中中和至 pH 7.0; EB: 20 μg/mL。

试验方法及步骤 将鲜精及冻存 10 d 后解冻的精液与 PBS 溶液充分混合, 于 4 °C 下离心 (3 000 r/min) 2 次, 每次 10 ~ 15 min, 然后将精液稀释至约 1 × 10⁶/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 1.5 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 均铺在预热后的载玻片上, 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, 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、110 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 BX-51 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。同一抗冻剂浓度做 3 个平行试验。

试验结果分析 (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)]。

1.4 鲜精及冻精膜性结构损伤的 FCM 检测

取鲜精及冻存 10 d 后的冻精各 20 μL, 加入 20 μL 10 μg/mL 的罗丹明 123, 4 °C 下避光染色 30 min, 2 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 加 3~4 mL HBSS 液稀释精子至约 10⁶/mL, 4 °C 下避光孵育 30~45 min, 然后取 1 mL 液体加入 10 μg/mL 的碘化丙锭 40 μL, 暗处染色 10 min 后上 FACS Calibur 型流式细胞仪, 在 5 mW 激发光(氩离子激光器)、波长为 488 nm 下检测, 用 Cell Quest 软件分析试验结果。

1.5 试验数据的统计学处理

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。

2 结果

2.1 黄姑鱼鲜精及冻精的活力

超低温冻存黄姑鱼精子 10 d 后解冻, 活力测定结果见表 1。D1~D4 组冻精的活力与鲜精相比差异不显著 ($P>0.05$), D5、D6 组冻精的活力与鲜精差异显著 ($P<0.05$)。

表 1 黄姑鱼鲜精及冻精的活力
Tab. 1 Vitality of fresh sperm and frozen-thawed sperm of *N. albiflora*

组别 groups	激活率/% activation rate	运动时间/min moving time	寿命/min life-span
D0	88.00 ± 2.94	3.73 ± 0.44	4.48 ± 0.65
D1	79.25 ± 3.86	3.04 ± 0.10	3.81 ± 0.25
D2	85.25 ± 3.95	3.23 ± 0.27	3.83 ± 0.33
D3	80.75 ± 2.99	3.11 ± 0.28	3.84 ± 0.36
D4	79.75 ± 4.03	3.05 ± 0.22	3.87 ± 0.12
D5	43.25 ± 6.18*	1.39 ± 0.41*	2.08 ± 0.59*
D6	25.25 ± 6.29*	0.81 ± 0.26*	1.23 ± 0.39*

注: D0. 鲜精; D1. 5% DMSO; D2. 10% DMSO; D3. 15% DMSO; D4. 20% DMSO; D5. 25% DMSO; D6. 30% DMSO; 表中同列数值后 * 表示与对照相比差异显著 ($P<0.05$)。

Notes: D0. fresh sperm; D1. 5% DMSO; D2. 10% DMSO; D3. 15% DMSO; D4. 20% DMSO; D5. 25% DMSO; D6. 30% DMSO; Means in the same column with * are significantly different ($P<0.05$).

2.2 黄姑鱼鲜精及冻精的 DNA 损伤

SCGE 检测结果显示, 各冻精组的彗星尾矩

随抗冻剂 DMSO 质量分数的升高而增大。其中 DMSO 质量分数在 5%~20% 时, 冻精的彗星尾矩与鲜精相比差异不显著 ($P>0.05$); DMSO 质量分数为 25%、30% 时, 冻精的彗星尾矩与鲜精相比差异显著 ($P<0.05$) (图 1)。

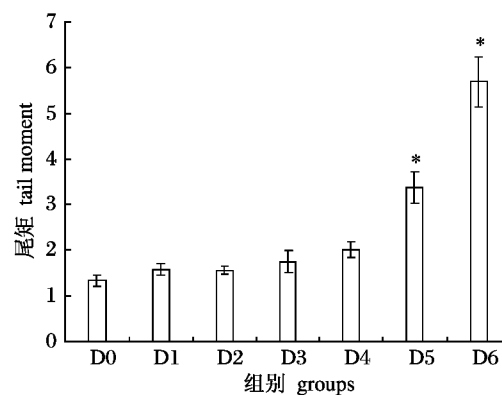


图 1 黄姑鱼鲜精及冻精 SCGE 检测的彗星尾矩

D0. 鲜精; D1. 5% DMSO; D2. 10% DMSO; D3. 15% DMSO; D4. 20% DMSO; D5. 25% DMSO; D6. 30% DMSO; 表中同列数值后 * 表示与对照相比差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 1 Tail moment of fresh sperm and frozen-thawed sperm of *N. albiflora*

D0. fresh sperm; D1. 5% DMSO; D2. 10% DMSO; D3. 15% DMSO; D4. 20% DMSO; D5. 25% DMSO; D6. 30% DMSO; Means in the same column with * are significantly different ($P<0.05$).

根据彗星拖尾中 DNA 的量占细胞总 DNA 的比例, 将鲜精及冻精核 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; I 级, 5%~20% (DNA in tail), 轻度损伤, 精子核缩小, 可见少许彗尾; 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; III 级, 40~95% (DNA in tail), 重度损伤, 精子核明显缩小, 彗尾较长; IV 级, >95%, 完全损伤, 精子核模糊或消失, 彗尾长 (图 2)。

根据上述精子核 DNA 损伤程度分级方法, 通过 CometScore 1.5 软件对黄姑鱼鲜精与冻精的 SCGE 彗星图片数据进行分析处理, 得出鲜精及冻精核 DNA 损伤情况 (表 2)。由表 2 可知, 抗冻剂 DMSO 浓度为 5%~15% 时, 冻精的 DNA 损伤与鲜精相比差异不显著 ($P>0.05$); DMSO 质量分数为 20%、25%、30% 时, 冻精的 DNA 损伤比鲜精明显加重。冻精的 DNA 损伤主要为轻度和中度损伤, 重度损伤比率低。

对黄姑鱼鲜精及冻精的 DNA 损伤系数与抗 DMSO 的质量分数成正相关(图 3)。冻剂浓度的相关性分析表明,损伤系数与抗冻剂

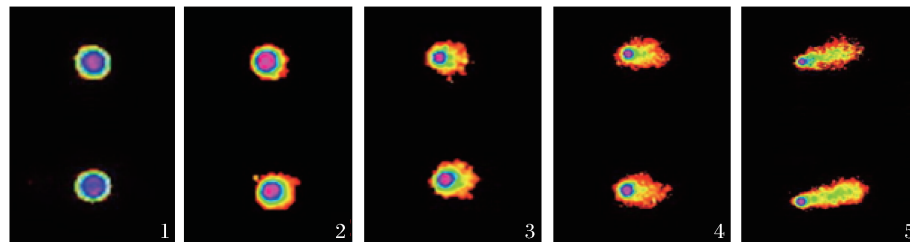


图 2 黄姑鱼鲜精与冻精的 SCGE 彗星图

1. 0 级损伤; 2. I 级损伤; 3. II 级损伤; 4. III 级损伤; 5. IV 级损伤。

Fig. 2 Comet image of fresh and frozen-thawed sperm of *N. albiflora*

1. Grade 0 damage; 2. Grade I damage; 3. Grade II damage; 4. Grade III damage; 4. Grade IV damage.

表 2 黄姑鱼鲜精及冻精 SCGE 检测的 DNA 损伤分级

Tab. 2 Classification of DNA damage detection of comet rate in fresh sperm and frozen-thawed sperm of *N. albiflora*

组别 groups	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 coefficient
D0	63.33 ± 2.52	20.67 ± 1.16	13.33 ± 1.53	4.67 ± 0.58	0.00 ± 0.00	36.67 ± 2.52	58.00 ± 2.65
D1	59.00 ± 3.61	22.67 ± 2.31	13.33 ± 2.31	5.00 ± 1.00	0.00 ± 0.00	41.00 ± 3.61	64.33 ± 5.86
D2	59.67 ± 3.51	21.33 ± 2.52	12.67 ± 1.15	6.33 ± 0.58	0.00 ± 0.00	39.75 ± 3.10	62.33 ± 3.21
D3	57.33 ± 3.06	23.33 ± 2.31	13.33 ± 2.31	5.33 ± 2.31	0.33 ± 0.58	42.67 ± 3.06	71.33 ± 8.46
D4	53.67 ± 2.52	22.67 ± 1.15	16.00 ± 1.00	7.00 ± 1.00*	0.67 ± 0.58	46.33 ± 2.52*	78.33 ± 4.04*
D5	45.67 ± 4.04*	28.00 ± 3.00*	15.33 ± 2.08	9.00 ± 2.64*	3.33 ± 1.53*	54.33 ± 4.04*	99.00 ± 7.55*
D6	34.33 ± 3.51*	33.67 ± 1.53*	20.33 ± 0.58*	9.67 ± 4.04*	4.00 ± 3.46*	65.67 ± 3.51*	119.33 ± 25.32*

注: D0. 鲜精; D1. 5% DMSO; D2. 10% DMSO; D3. 15% DMSO; D4. 20% DMSO; D5. 25% DMSO; D6. 30% DMSO; 表中同列数值后 * 表示与对照相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: D0. fresh sperm; D1. 5% DMSO; D2. 10% DMSO; D3. 15% DMSO; D4. 20% DMSO; D5. 25% DMSO; D6. 30% DMSO; Means in the same column with * are significantly different ($P < 0.05$).

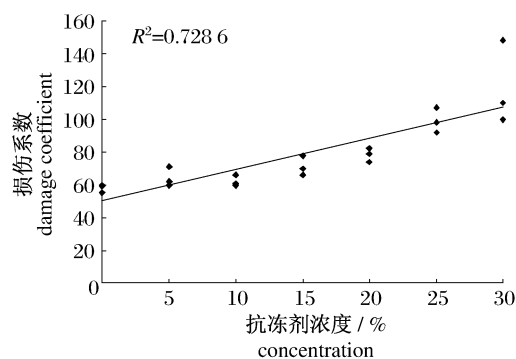


图 3 黄姑鱼鲜精及冻精 SCGE 检测的 DNA 损伤系数与 DMSO 质量分数的相关性

Fig. 3 Correlation of damage coefficient and DMSO concentration between fresh sperm and frozen-thawed sperm of *N. albiflora*

2.3 黄姑鱼鲜精及冻精的线粒体及细胞膜结构损伤

鲜精及冻精的 FCM 检测结果显示(图 4、表 3),精子的分布分 4 个区, region 1 精子被碘化丙锭着色,但未被罗丹明着色,表明精子细胞膜结构及线粒体均受损伤; region 2 精子未被碘化丙锭及罗丹明着色,表明精子细胞膜结构未受损伤,但线粒体受损伤; region 3 精子被碘化丙锭及罗丹明着色,表明精子细胞膜结构受损,但线粒体结构及功能正常; region 4 精子未被碘化丙锭着色,但被罗丹明着色,表明精子细胞膜及线粒体结构完整、功能正常。统计分析表明, D1 ~ D4 组冻精中线粒体及细胞膜均保持完整性的精子比例与鲜精相比无显著差异,其它组与鲜精相比差异显著。

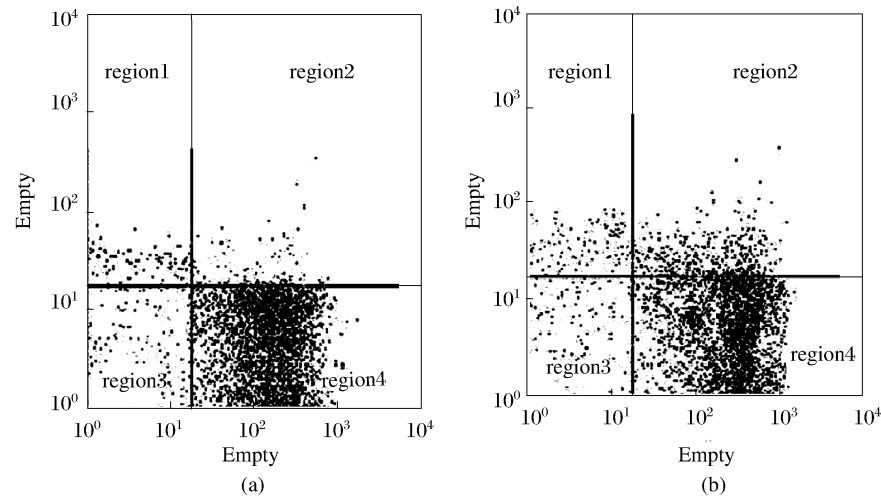


图4 黄姑鱼鲜精及冻精的 FCM 检测图

(a) 鲜精; (b) 10% DMSO 冻精。region 1. 线粒体功能异常, 细胞膜结构受损。region 2. 线粒体功能异常, 细胞膜结构正常。region 3. 线粒体功能正常, 细胞膜结构受损。region 4. 线粒体及细胞膜结构均正常。

Fig. 4 Flow-cytometric dot-plots of fresh sperm and cryopreserved sperm of *N. albiflora*

(a) fresh sperm; (b) 10% DMSO frozen-thawed sperm. region 1. sperm with a damaged plasma membrane, but normal mitochondrial function. region 2. sperm with an intact plasma membrane but lacking mitochondrial function. region 3. sperm with a damaged plasma membrane but normal mitochondrial function. region 4. sperm with an intact plasma membrane and functional mitochondria.

表3 黄姑鱼鲜精及冻精的 FCM 检测结果分析
Tab. 3 The flow-cytometric result of fresh and frozen-thawed sperm of *N. albiflora*

组别 groups	区间1 region1	区间2 region2	区间3 region3	区间4 region4
D0	4.34 ± 0.97	1.87 ± 0.75	3.21 ± 1.84	90.58 ± 1.96
D1	5.66 ± 1.40	5.87 ± 1.48*	3.79 ± 0.78	84.68 ± 3.30
D2	4.74 ± 0.87	6.14 ± 2.85*	3.47 ± 0.22	85.75 ± 4.41
D3	5.36 ± 0.42	5.33 ± 1.11*	4.37 ± 0.48	84.94 ± 2.16
D4	6.65 ± 1.64	5.83 ± 3.82*	4.20 ± 0.74	83.32 ± 3.62
D5	13.84 ± 2.14*	12.14 ± 3.22*	12.02 ± 1.62*	62.00 ± 3.27*
D6	16.95 ± 2.96*	18.57 ± 3.62*	12.86 ± 4.55*	51.62 ± 3.83*

注: D0. 鲜精; D1. 5% DMSO; D2. 10% DMSO; D3. 15% DMSO; D4. 20% DMSO; D5. 25% DMSO; D6. 30% DMSO; 表中同列数值后 * 表示与对照相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: D0. fresh sperm; D1. 5% DMSO; D2. 10% DMSO; D3. 15% DMSO; D4. 20% DMSO; D5. 25% DMSO; D6. 30% DMSO; Means in the same column with * are significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论

研究表明, 以 HBSS 溶液为稀释液, 5%、10% 及 15% 的 DMSO 为抗冻剂, 超低温冻存黄姑鱼精子的效果较佳, 冻精核 DNA 损伤较轻, 冻精中线粒体与细胞膜结构正常的精子比例较高; 而以 25% 及 30% DMSO 为抗冻剂超低温冻存黄姑鱼精子的效果较差, 冻精核 DNA 损伤程度明显加

重, 冻精中线粒体与细胞膜结构正常的精子比例显著下降。

DMSO 是鱼类精子超低温冻存的常用抗冻剂, 适宜的质量分数一般为 5% ~ 20%。ZHAANG 等^[4] 试验发现, 以人工海水为稀释液、12% DMSO 为抗冻剂, 超低温冻存牙鲆精子的效果较好, 冻精激活率达 60.5% ± 3.6%。CHEN 等^[5] 以 TS-2 溶液为稀释液, 以 6%、10% 及 14% DMSO 为抗冻剂、程序降温法超低温冻存大菱鲆精子, 冻精解冻后的激活率分别为 50.0% ± 5.0%、78.3% ± 7.6% 及 76.6% ± 5.8%。叶霆等^[1] 以 Cortland 溶液为稀释液、5% ~ 20% DMSO 为抗冻剂, 两步降温法超低温冻存黑鲷精子, 冻精解冻后激活率 ≥ 86.49% ± 1.69%, 其中 DMSO 质量分数为 10% 时, 冻精激活率达 92.91% ± 1.25%。魏平等^[2] 研究发现, 以 Cortland 溶液为稀释液、5% ~ 20% DMSO 为抗冻剂超低温冻存真鲷精子, 冻精激活率 ≥ 83.27% ± 3.43%, 其中 DMSO 浓度为 10% 时, 冻精激活率达 89.41% ± 2.59%。LIU 等^[3] 试验发现, 以 Cortland 溶液为稀释液、15% DMSO 为抗冻剂, 程序降温法超低温冻存真鲷精子, 冻精激活率达 81.0% ± 5.4%。KOH 等^[8] 以 FBS 溶液为稀释液、5% DMSO 为抗冻剂, 两步降温法超低温冻存七带石斑鱼精子, 冻精激活率达 77.6% ± 8.5%。本试验以

HBSS 溶液为稀释液、5%~20% 浓度的 DMSO 为抗冻剂,超低温冻存黄姑鱼精子取得了与鲜精激活率相近的效果。可见,DMSO 质量分数在 5%~20% 范围内适合一些海水鱼类精子超低温冻存。然而,抗冻剂 DMSO 的最适质量分数因鱼种类及采用的冻存条件不同有所差异。

精子核 DNA 损伤状况是衡量冻精质量的细胞学依据之一。PÉREZ-CEREZALES 等^[6]以 7% DMSO 加 5%~20% LDL(低密度脂蛋白)为抗冻剂,0.5 mL 麦细管为冻存管,两步降温法超低温冻存虹鳟精子,SCGE 检测发现冻精 DNA 损伤与鲜精相比差异显著。MARTÍNEZ-PÁRAMO 等^[7]以 7% DMSO 加 10% 卵黄为抗冻剂,0.5 mL 麦管为冻存管,两步降温法超低温冻存褐鳟精子,SCGE 检测发现冻精与鲜精的 DNA 损伤程度差异显著。ZILLI 等^[9]研究发现,以 10% DMSO 为抗冻剂,0.25 mL 麦管为冻存管,两步降温法超低温冻存条纹狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)精子,冻精 DNA 损伤与鲜精相比无显著差异。叶霆等^[1]以 Cortland 溶液为稀释液、5%~30% DMSO 为抗冻剂,两步降温法超低温冻存黑鲷精子,SCGE 检测发现 DMSO 质量分数为 5%~20% 时,冻精与鲜精的 DNA 损伤无显著差异,DMSO 质量分数为 25%~30% 时,冻精的 DNA 损伤与鲜精相比差异显著,冻精 DNA 损伤与抗冻剂 DMSO 质量分数成正相关。本试验发现,DMSO 质量分数为 5%~15% 时,黄姑鱼冻精的 DNA 损伤和鲜精相比无显著差异;DMSO 质量分数为 20%、25%、30% 时,冻精的 DNA 损伤和鲜精相比差异显著,冻精 DNA 损伤与抗冻剂 DMSO 的质量分数呈正相关。类似的结果也见于真鲷中研究报道^[2,19]。由于精子为单倍体细胞,其染色质结构与体细胞不同,由鱼精蛋白与 DNA 形成超螺旋四聚体,染色质高度凝聚,细胞内液体成分极少,超低温冻存对精子的机械性损伤远小于体细胞,只要使用合适的抗冻液及采用适当的降温或复温程序,就能有效保护精子核 DNA 免受或少受损伤^[20]。

线粒体及细胞膜结构损伤状况也是衡量冻精质量的重要细胞学依据。OGIER de BAULNY B 等^[13]以 Rh123 及 PI 作为荧光探针、双染色流式细胞术检测了不同抗冻剂浓度下虹鳟冷冻精子的线粒体及细胞膜结构的完整性,发现以 10% DMSO 为抗冻剂时冻精中线粒体及细胞膜结构

完整的精子比例较高。HE^[14]以 2.5% DMSO、5% DMSO 及 10% DMSO 为抗冻剂超低温冻存黑鲈(*Morone saxatilis*)精子,冻精的荧光双染色流式细胞术检测结果发现,DMSO 为 5% 时冻精中线粒体及细胞膜结构完整的精子比例较高,DMSO 为 2.5% 及 10% 时冻精中线粒体及细胞膜结构完整的精子比例显著下降。LIU 等^[3]也用荧光双染色流式细胞术检测了以 15% DMSO 为抗冻剂超低温冻存的真鲷精子的膜性结构损伤,发现冻精中线粒体及细胞膜结构正常的精子比例与鲜精相近,达 74.8%。本试验发现,以 5%~20% DMSO 为抗冻剂超低温冻存黄姑鱼精子,冻精中线粒体及细胞膜结构保持完整性的精子比例达 80% 以上,与鲜精相近,当抗冻剂质量分数达 25%、30% 时,冻精中线粒体及细胞膜结构保持完整性的精子比例显著下降。

一般认为,精子冷冻损伤主要包括冷休克损伤、冰晶损伤或机械损伤、渗透压损伤及抗冻剂毒性损伤等方面^[21]。本研究采用的抗冻液(稀释液 HBSS + 抗冻剂 DMSO)对黄姑鱼精子冷冻与解冻过程具有保护作用,但冻融精子随抗冻剂 DMSO 质量分数的不同发生了不同程度的细胞结构损伤。细胞膜结构的损伤会导致膜蛋白丢失或蛋白构象改变,细胞内物质渗漏、pH 变化、生理活动紊乱,影响细胞内外离子交换及精卵识别与受精^[22-24]。线粒体是精子运动的动力源,本研究的黄姑鱼冻精中部分精子线粒体受损伤,其生理功能下降甚至丧失,这部分精子活力必然降低甚至失活。

本研究用的精液采自同一批鱼,且各试验组均采用相同的降温与复温程序,冻精组 DNA、线粒体与细胞膜结构损伤的差异主要是由抗冻剂 DMSO 质量分数不同引起的,较高质量分数的 DMSO 可能是冻精损伤加重的主要原因。为降低黄姑鱼冻精细胞结构损伤,确保冻精质量,宜将抗冻剂 DMSO 质量分数控制在 5%~15%。

参考文献:

- [1] 叶霆,竺俊全,杨万喜,等. 黑鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的 SCGE 检测[J]. 动物学研究, 2009,30(2):151-157.
- [2] 魏平,竺俊全,闫家强,等. 真鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的检测[J]. 水生生物学报,2010,34(5):1049-1055.

- [3] LIU Q H, LI J, ZHANG S C, *et al.* Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm [J]. *Theriogenology*, 2007, 67:1168–1174.
- [4] ZHANG Y Z, ZHANG S C, LIU X Z, *et al.* Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology [J]. *Theriogenology*, 2003, 60:989–996.
- [5] CHEN S L, JI X S, YU G C, *et al.* Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization [J]. *Aquaculture*, 2004, 236:547–556.
- [6] PÉREZ-CEREZALES S, MARTÍNEZ-PÁRAMOB S, BEIRÃO J, *et al.* Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant [J]. *Theriogenology*, 2010, 74:282–289.
- [7] MARTÍNEZ-PÁRAMOB 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.
- [8] KOH I C C, YOKOI K, TSUJI M, *et al.* Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* [J]. *Cryobiology*, 2010, 61:263–267.
- [9] ZILLI L, SCHIAVONE R, ZONNO V, *et al.* Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2003, 47:227–235.
- [10] 江世贵, 李加儿, 区又君, 等. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系 [J]. *生态学报*, 2000, 20(3):468–473.
- [11] GUTHRIE H D, WELCH G R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm [J]. *Theriogenology*, 2005, 63:396–410.
- [12] CELEGHINI E C C, ARRUDA R P, ANDRADE A F C, *et al.* Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin [J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 14:119–131.
- [13] OGIER de BAULNY B, LE VENN Y, KERBOEUF D, *et al.* Flow cytometric evaluation of mitochondrial function and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa [J]. *Cryobiology*, 1997, 34:141–149.
- [14] HE S Y, WOODS L C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm [J]. *Cryobiology*, 2004, 48:254–262.
- [15] 蔡明夷, 刘贤德, 武祥伟, 等. 大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的诱导和微卫星分析 [J]. *水产学报*, 2010, 34(11):1629–1635.
- [16] 刘颖, 蔡明夷, 刘贤德, 等. 大黄鱼♀与黄姑鱼♂杂交F1家系初孵仔鱼的全氟分析 [J]. *水产学报*, 2010, 34(6):671–678.
- [17] 雷霖霖, 陈超, 徐延康, 等. 黄姑鱼工厂化育苗技术研究 [J]. *海洋科学*, 1992, 11(6):5–10.
- [18] 蔡厚才, 林岩璇, 陈传再. 南麂海区黄姑鱼网箱养殖技术研究 [J]. *浙江海洋学院学报*, 2000, 20(1):66–69.
- [19] 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 [J]. *海洋与湖沼*, 2005, 36(3):221–225.
- [20] 宋博, 郑履康, 邓丽霞, 等. 冰冻对精子 DNA 的影响 [J]. *中华男科学*, 2002(4):253–254.
- [21] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007:23–28.
- [22] FUIKAWA S, MIURA K. Plasma membrane ultrastructural changes caused by mechanical stress in the formation extracellular ice as a primary cause of slow freezing injury in fruit-bodies of basidiomycetes [J]. *Cryobiology*, 1986, 23:371–382.
- [23] 章龙珍, 刘鹏, 庄平, 等. 超低温冷冻对西伯利亚鲟精子形态结构损伤的观察 [J]. *水产学报*, 2008, 32(4):558–565.
- [24] 章龙珍, 江琪, 庄平, 等. 超低温冷冻对俄罗斯鲟精子抗氧化酶活性的影响 [J]. *大连水产学院学报*, 2009, 24(6):504–508.

Sperm cryopreservation and the cytoarchitecture damage detection in *Nibea albiflora*

JIN Chun-hua, YAN Jia-qiang, ZHU Jun-quan *

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

Abstract: In this study, DMSO was used as cryoprotectants, and HBSS solution was used as extender. Two-step cooling for cryopreservation of *Nibea albiflora* spermatozoa in 0.25 mL straws. DNA damage, mitochondria and membrane damage of *N. albiflora* sperm in response to the cryopreservation process by SCGE and FCM were also investigated. The results demonstrated that there were no significant differences between fresh sperm and frozen-thawed sperm which was diluted with 5% – 20% DMSO in vitality. The activation rate, moving time and life-span of frozen-thawed sperm were $85.25\% \pm 3.95\%$, (3.23 ± 0.27) min and (3.83 ± 0.33) min when 10% DMSO was used as cryoprotectant. However, a significant drop in sperm vitality was observed when DMSO concentration was increased to 25% and 30%. The SCGE showed that there were no significant differences between fresh sperm and frozen-thawed sperm which was diluted with 5% – 15% DMSO in DNA fragments, but DNA fragments differed significantly with fresh sperm when DMSO concentration rose to 20%, 25%, 30%. In fact, there was a positive correlation between comet rate of frozen-thawed sperm and concentration of DMSO in protocol. Also, we found that the integrity of mitochondria and membrane of frozen-thawed sperm obtained high proportion when using 5% – 20% DMSO as cryoprotectant, and there were no significant differences between fresh sperm and frozen-thawed sperm. But, the mitochondrial and membrane integrity had a significant drop when using 25% and 30% DMSO as cryoprotectants. So we concluded that toxicity of cryoprotectant was the main factor of DNA damage, mitochondrial membrane damage in frozen-thawed sperm.

Key words: *Nibea albiflora*; spermatozoa; cryopreservation; SCGE; FCM

Corresponding author: ZHU Jun-quan. E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn