

一种新抗冻剂 DMF 在淡水鱼类精液 超低温保存上的应用*

姜仁良 赵维信 张饮江

(上海水产大学水产养殖系, 200090)

提 要 本文首次报导了一种新的抗冻剂——N-N-二甲基甲酰胺(Dimethyl Formamide, DMF)对淡水鱼类精液超低温冷冻保存具有明显效果, 冻精的受精效果优于二甲亚砜(DMSO)。团头鲂、鲤、草鱼、鲢、鳙使用 13%DMF 抗冻剂, 精液液氮保存 3-4 周, 受精率分别为 76%、54.03%、68.6%、37.9%和 40.60%, 而用 13%DMSO 作为抗冻剂时, 则分别为 69.1%、42.6%、67.6%、19.4%和 37.4%。结果表明 10-15%DMF 作为抗冻剂, 含 0.5%NaCl 的稀释液稀释精液, 精液与稀释液按 1:4 比例混合冷冻; 2%NaCl 作为激活剂, 以 10 倍体积激活剂稀释解冻精液进行授精为宜。

关键词 鱼类精液, 超低温保存, N-N-二甲基甲酰胺(DMF)

随着鱼类人工繁殖、苗种生产和遗传、育种研究工作的进展, 鱼类精液超低温冷冻保存技术, 引起了人们的极大兴趣和重视, 迄今已在鱼类中广泛开展了这项工作。国外在本世纪五十年代就开展了该项研究工作, 起步较早, 至今已取得了一定的成就^[10-13]。

我国从七十年代才起步研究, 但近年来发展较迅速。我国不少学者对鱼类精液超低温冷冻保存技术作了大量试验工作^[1-9]。在家禽精液冷冻保存中, 采用的抗冻剂主要有甘油和二甲亚砜两种, 但甘油对淡水鱼精液的冷冻保存, 抗冻效果不佳, 而 DMSO 是目前使用最广泛的鱼类精液冷冻抗冻剂^[11]。现参照前人的试验经验, 试图寻找一种新的鱼类精液冷冻保存抗冻剂, 从而提高冻精的受精率, 完善鱼类精液超低温冷冻保存技术, 为鱼类人工繁殖, 遗传育种和“基因库”及“精子库”的建立提供一种更合适的抗冻剂。

1 材料与方法

1.1 精液的来源

冬季收集成熟雌、雄鲤饲养在暖房池内, 以便提早进行人工催情产卵。挤取精液以超低温冷冻贮存, 至鲤自然产卵季节时, 再取自然成熟的雄鲤精液样品进行试验, 就可以延长试验季节。部分鲤精液取自上海青浦县水产收购站上市的野生鲤。草鱼、鲢、鳙、团头鲂的精液, 分别从上海青浦县水产养殖场及江苏省昆山水产养殖场人工繁殖季节收集的。挤取精液时, 先用干毛巾擦干雄鱼腹部, 后轻轻挤压腹部, 同时用干燥消毒注射器吸取干净乳白色精液, 并镜检精子呈涡动状态才选用。精液暂存 4℃ 冰箱中备用。

1.2 精子活力标准

精液置于载玻片上, 滴加蒸馏水后镜检精子运动状态。一般分为三级: (1)精子涡动状态——不能看清楚精子形态及运动轨迹。(2)穿梭运动——仍不能看清精子形态, 稍能看清精子运动轨迹。(3)慢速运动——能看清精子形态和运动轨迹。只有涡动和穿梭运动状态的精子才具有受精能力; 慢速运动的精子基本上已不具有受精能力。

1.3 抗冻剂 DMF 和稀释液渗透压测定

采用上海医科大学制造的 FM-3A 型冰点渗透压计。

1.4 稀释液、平衡、降温与复温

稀释液配方为葡萄糖 4.8 克、氯化钾 0.06 克、柠檬酸钠 2 克、氯化钠 0.5 克、蒸馏水 100ml。抗冻剂采用 DMSO 和 DMF 二种, 浓度为 10-15%, 然后再与一定量的精液混合(稀释液与精液按 4:1 混匀)。置 4℃ 冰箱内平衡 20 分钟后, 精子呈涡动状, 才能作为冷冻材料。降温和复温均采用分步法进行。

1.5 人工授精

预备好按常规催产所获得的成熟卵子, 置于培养皿内。每个培养皿放卵 200 粒左右, 加 0.5ml 解冻精液, 进行干法授精。激活剂按一定比例量与解冻精液混合均匀, 再倒入培养皿中轻轻拌匀受精。干法受精后, 再加清水冲洗数次, 清除抗冻剂及污物, 在室温下孵化, 每日换水数次。胚胎发育至原肠中期计算受精率(鲤胚胎发育至发眼期时计算), 待出膜孵出鱼苗, 按常规计算孵化率。

2 结果

2.1 家鱼与野生鲤精液质量的差别

鲤精液质量对冷冻效果的试验, 发现在室内水族箱饲养二周以上的鲤、饲养在池塘里的鲤以及繁殖季节从水产收购站收集野生鲤的精液, 经冷冻后精子的成活率和活力程度有明显的差异(表 1)。

表 1 不同环境条件下雄鲤精液冷冻结果的差别

Table 1 The cryopreservative difference of common carp sperm for different environmental condition

环境条件	水族箱		池塘				野生	
	DMSO	DMF	DMSO		DMF		DMSO	DMF
浓度(%)	10	10	10	13	10	13	13	13
精子平均成活率(%)	42	45	60	55	71	76	80	80
解冻后精子最高成活率(%)	60	60	70	70	90	90	90	90
精子活动状态	穿梭	穿梭	涡动	穿梭	穿梭	涡动	涡动	涡动

在水族箱饲养的鲤, 精液量少质差, 精子涡动仅为 20 秒左右, 解冻后精子平均成活率为 42-45%; 池塘饲养的鲤, 精子涡动时间为 30 秒左右, 精子平均成活率则为 55-76%; 野生鲤, 精子涡动时间长达 50-75 秒, 精子平均成活率高达 80% 以上。因此鲤精液超低温

冷冻保存尽量取野生雄鲤精液, 精子质量好, 寿命长, 有较高的受精率。

2.2 13%DMF 稀释液的渗透压及激活剂

含不同浓度 NaCl 的稀释液(0.05%, 0.1%, 0.5%和 1.0%NaCl)与 13%DMF 和精液混合后, 渗透压分别上升为 1060, 1185, 1380 和 1460 毫渗透压(mOsm)。四种混合液渗透压上升的平均幅度为 778.8mOsm(表 2)。

表 2 含 13%DMF 稀释液的鲤精液渗透压

Table 2 The osmotic pressure of common carp sperm with 13% DMF in extender

稀释液中 NaCl 含量 (%)	稀释液 (mOsm)	精液+13%DMF 稀释液 (mOsm)	平均上升幅度 (mOsm)
0.05	320	1060	740
0.10	390	1185	795
0.50	560	1380	820
1.00	700	1460	760

精液稀释后置 4℃平衡 20 分钟, 效果为最佳, 能被 0.6%NaCl(206mOsm)—4%NaCl(1360mOsm)溶液激活(表 3)。其中以含 0.5%NaCl 的稀释液处理精液, 用 2%NaCl 作为激活剂时, 精子涡动的时间最长为 16 秒。

表 3 含不同浓度 NaCl 的稀释液中精子被激活的状态

Table 3 The actived effects of spermatozoa in extender with different NaCl concentrations

激活剂浓度 (NaCl, %)	精子涡动的时间(S)			
	稀释液中 NaCl 含量(%)			
	0.05	0.10	0.50	1.00
0.6	5	4	4	1
1.0	5	3	8	3
2.0	5	4	16	8
3.0	4	3	14	4
4.0	不被激活	不被激活	12	6
4.1	-	-	不被激活	不被激活

2.3 不同浓度的 DMSO 与 DMF 对精液冷冻效果的试验

DMF 对团头鲂精子的抗冻效果与 DMSO 相差不大, 10—15%DMF 对鲤精的抗冻效果优于 DMSO(表 4)。

2.4 鲤、团头鲂、草鱼、鲢和鳙冻精受精试验

采用 13%DMF 作为抗冻剂, 这五种鱼的冻精受精率都高于 13%DMSO 抗冻剂组; 鲤、团头鲂的孵化率也高, 孵出鱼苗经 7 天培育, 成活率达 90%(表 5)。

表 4 不同浓度的抗冻剂对鲤、团头鲂精子成活率的影响

Table 4 The survival rates of spermatozoa of common carp and blunt snout bream for the cryoprotectant of different concentrations

鱼 类	鲤						团头鲂					
	DMSO			DMF			DMSO			DMF		
抗冻剂												
浓度(%)	10	13	15	10	13	15	10	13	15	10	13	15
解冻后精子最高成活率(%)	80	70	70	90	90	90	90	90	80	90	90	90
解冻后精子平均成活率(%)	51	50	43	55	57	60	75	76	70	73.5	76	75
精子活动状态	穿梭	穿梭	穿梭	涡动	涡动	涡动	涡动	穿梭	穿梭	涡动	涡动	涡动

表 5 团头鲂、鲤、草鱼、鲢、鳙冻精授精试验结果

Table 5 The results of fertilizing test of cryopreservative sperm in carps

鱼类	团头鲂						鲤鱼		草鱼		鲢鱼		鳙鱼	
	DMSO			DMF			DMSO	DMF	DMSO	DMF	DMSO	DMF	DMSO	DMF
抗冻剂														
浓度(%)	10	13	15	10	13	15	13	13	13	13	13	13	13	13
受精率(%)	13.9	69.1	11.3	17.0	76.0	14.2	42.6	54.1	67.6	68.6	19.4	37.9	37.4	40.6
孵化率(%)	78.3	74.5	66.7	73.7	81.3	79.4	48.2	53.4	-	-	-	-	-	-

3 讨论

3.1 一种新的鱼类精液抗冻剂

从 1987 年我们选择了一种新抗冻剂 DMF, 这是一种无色液体, 分子量 73.8, 常用来作为组织或细胞培养的保护液。DMF 分子具有极性, 能溶解多种难溶的有机物和高聚物, 并能以任何比例与水混溶, 渗透能力强, 扩散速度快, 能与电介质整合从而降低细胞内电介质的浓度, 具有细胞内保水作用, 降低原生质冰点等优点。15%DMF 的凝固点为 -7°C , 而 15%DMSO 则为 -5°C 。因此, DMF 对低温的缓冲作用稍胜于 DMSO。当精液与含有 0.5%NaCl 的稀释液和 13%DMF 混合后, 混合液的渗透压为 1380mOsm; 用 2-4%NaCl 溶液作激活剂时, 其渗透压为 684-1369mOsm。由于混合液的渗透压相对 2-4%NaCl 溶液是高渗溶液, 因此精子为能被较低渗的 2-4%NaCl 溶液激活, 当采用 4.1%NaCl 溶液, 渗透压为 1500 mOsm 时, 精子则不能被激活(表 3)。可以认为 DMF 抗冻剂与 DMSO 相似, 也是通过渗入细胞内, 提高精子渗透压, 使其冰点下降, 能起到抗冻保护作用, 使精子免受低温冲击致死。

试验结果表明, 鲤、团头鲂精液使用 DMF 作为抗冻剂, 解冻后的精子与鲜精一样, 呈全涡动状态, 持续时间长。当精液解冻后未加水时, 与使用 DMSO 时一样, 精子保持静止状态, 但加水激活后, 用 DMF 抗冻剂的精液, 要静止片刻约 10-20 秒, 才开始被激活涡动, 而使用 DMSO 抗冻剂的精液加水后立刻开始涡动。这可能是由于 DMF 作为抗冻剂

时, 精液加水后, 引起的渗透平衡比较缓慢, 导致精子涡动持续时间也就较长一些; 而用 DMSO 作为抗冻剂时, 精液加水后引起渗透平衡较快, 解冻后精子即刻活动, 相对地其涡动时间则短一些, 使精子能量瞬间即被消耗尽。这可能也是 DMF 作为抗冻剂的精子受精率较高的原因。现我们推荐鲤、团头鲂可使用 10-15%DMF 作为抗冻剂。稀释液中 NaCl 浓度 0.5% 为宜, 以 2%NaCl 作为解冻精子的激活剂。至于草鱼、鲢和鳙用 DMF 作为抗冻剂稍能显示出优越性, 因试验次数少, 未针对不同种类, 选择适当的 DMF 浓度以及最佳降、复温程序, 来求得解冻后精子的最高成活率, 这有待于今后进一步研究。

3.2 家养鲤和野生鲤精液质量出现明显的差异性

一般情况下, 野生鲤的精液质量比室内水族箱和池塘内饲养的鲤为佳。野生鲤的精液量多, 质好, 鲜精液精子涡动时间长, 持续涡动时间竟达到 50-70 秒; 精液经过平衡解冻, 精子被激活后, 一般出现涡动状态, 持续时间仍很长, 达 30-40 秒, 精子成活率达 90%。而家养于水族箱饲养的鲤, 其鲜精液精子涡动时间仅在 20-30 秒, 解冻精液被激活精子平均成活率一般为 25-76%。为此, 说明野生鲤精子有较高活力, 相应受精率也会提高。因此, 我们认为在建立精子库或育种挑选亲鱼时, 应该考虑到取野生鲤精液为宜, 其后代体质较为健壮。渔民们普遍有这样经验, 取野生雄鲤为父本, 另取池塘饲养的雌鲤为母本, 繁衍后代, 生长快, 一般当年就可达 0.5 公斤以上商品规格。有条件的渔场可因地制宜地普遍采用此法, 大大缩短鲤养殖周期, 使当年鲤直接培育成食用鱼, 这在生产上是有明显的社会效益和经济效益。

3.3 解冻精液的稀释

人工授精时, 当精卵混合时, 如果加少量一定浓度的 NaCl 溶液激活, 精液往往容易凝成胶状物, 导致精子丧失活力, 受精率极低, 甚至不能受精。若在解冻精液中加入一定比例的 NaCl 溶液, 胶状物就很少出现, 甚至不发生胶体丝状物。因此, 在授精时, 精液与一定比例浓度的 NaCl 溶液先混合, 然后再与卵混合均匀, 就不见胶体丝状物出现, 保证正常受精。经多次试验, 解冻精液用 NaCl 溶液以 1:10 稀释, 使每粒卵子占有 2.5 万尾精子量接触已能保证受精的顺利进行。

3.4 受精率高低的分析

在本试验中, 除了团头鲂解冻精液受精率和孵化率较高外, 鲤鱼及家鱼受精率都不甚理想, 这是因为在降温、复温程序中未能安全越过 $-40^{\circ}\text{C} \sim -60^{\circ}\text{C}$ 的冰晶形成区, 从而导致解冻精子死亡, 即使有成活精子, 其活力也不高, 寿命缩短, 不呈现涡动和穿梭运动。据实验观察, 无涡动和快速穿梭运动的精子不具有受精能力。其次是解冻精子由于冷冻而引起形态结构上的变异, 精子酶活性的破坏, 大量复苏精子被胶质所包埋, 精子活力被抑制, 显然这些精子是没有受精能力的。另外各种鱼类的精液对稀释液浓度的要求不甚相同, 精液理化特性也不一致。当通过添加一定的抗冻剂, 防止细胞在降温过程中的严重脱水和低温打击, 避免细胞内冰晶的形成, 并采用适当的降温速度, 使精子安全越过冰晶形成区, 进入玻璃化状态。此时精子就不会出现原生质的严重脱水, 细胞结构完整, 精子解冻后即可恢复运动能力。但这种玻璃化状态是不稳定的, 温度回升到 -60°C 以上时, 会发生再结晶现象。因此, 寻找各种鱼类精液超低温冷冻保存最佳最稳妥的操作程序是至关重要的。超低温冷冻保存鱼类精液, 冻精受精率达到或接近常精受精的水平也是完全可能的。近年来, 家养鱼类的提纯复壮, 引进新品种, 扩大养殖品种, 种质资源的保存, 鱼类精子库的建立, 已提到水产养殖

业的日程上,从“种”的角度来加以考虑。所以非常迫切要求精液超低温冷冻保存技术得以完善和应用到生产上。为此,再深入一步开展这项工作的研究,制订一套规范化的冷冻保存技术,这将会进一步推动我国水产养殖事业的向前发展。

水产养殖系 1987-90 届学生赵德福、雷庆铎、陈景楠、刘立新、彭林林、吴宜东、赵吉伟、周恂等参加了该项试验,在此深表感谢。

参 考 文 献

- [1] 王祖昆等, 1984. 我国南方几种养殖鱼类精液的冷冻保存研究. 水产学报, 8(3): 255-256.
- [2] 1985. 我国南方主要养殖鱼类精子特性研究. 淡水渔业, (1): 18-21
- [3] 王洪 潘英涛, 1982. 家鱼冻精技术的研究. 水产科技情报, (6): 14-17.
- [4] 吴景贵, 1959. 鲤鱼精子的寿命观察报告. 动物学杂志, (10): 462-465
- [5] 宗毫侣等, 1983. 鱼精低温冷冻贮存, 受精与孵化的实验研究. 淡水渔业, (5): 5-7
- [6] 陈松林等, 1987. 抗冻剂二甲亚砜对家鱼精子生理特性影响的初步研究. 淡水渔业, (5): 17-20.
- [7] 梁荣计, 1979. 液氮保存鱼类精液试验报告. 广西水产科技, (1): 18-20.
- [8] 张轩杰, 1987. 鱼类精液超低温冷冻保存研究进展. 水产学报, 9(3): 259-267.
- [9] 潘英涛, 1981. 鱼类冻精结构变异的电镜研究. 淡水渔业, (1): 4-6.
- [10] Kurokura, H. *et al.*, 1984. Cryopreservation of the carp sperm. *Aquaculture*, 37(3): 267-273.
- [11] Mounib, M. S., 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 53: 13-18.
- [12] Stein, H. *et al.*, 1978. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18(4): 1073-1076.
- [13] Stoss, J. *et al.*, 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effects of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*, 32(3/4): 321-330.

APPLICATION OF A NEW CRYOPROTECTANT ON CRYOPRESERVATION OF FRESHWATER FISH SPERM

Jiang Ren-liang Zhao Wei-xin and Zhang Yin-jiang

(Department of Aquaculture, SFU, 200090)

ABSTRACT In this paper, a new kind of cryoprotectant-Dimethyl formamide (DMF) is being reported that it has a significant effect on cryopreservation for freshwater fish sperm. The fertilizing rates of thawed sperm in blunt snout bream, common carp, grass carp, silver carp and bighead carp are 76%, 54.03%, 68.6%, 37.9% and 40.6%, respectively. Using 10-15% DMF as cryoprotectant and 0.5% NaCl in extender were available. 2% NaCl as active solution and 10 times volume of active solution to dilute thawed sperm during fertilization were necessary.

KEYWORDS fish sperm, cryopreservation, DMF (N-N-dimethyl formamide)

We thank our school-fellows: Zhao De-fu, Lei Qing-duo, Chen Jing-nan, Liu Li-xin, Peng Lin-lin, Wu Yi-dong, Zhao Ji-wei and Zhou Xun for their technical assistances.