

鱼类精子超低温冷冻保存技术的创新与挑战

冯绣云, 董俊, 徐潇, 孟庆磊, 安丽, 王超, 朱永安*

山东省淡水渔业研究院, 山东 济南

收稿日期: 2024年11月12日; 录用日期: 2024年12月11日; 发布日期: 2024年12月19日

摘要

鱼类精子超低温冷冻保存对种质资源保护意义重大, 但面临诸多技术挑战。本研究旨在探索优化鱼类精子超低温冷冻保存技术, 以提高保存效果。明确了超低温冷冻保存原理, 分析了影响因素, 包括抗冻剂和稀释液的选择、冷却与解冻速率等。对比了新型抗冻蛋白样液与传统样液的优劣。研究结论表明, 鱼类精子超低温冷冻保存技术为鱼类种质资源保护提供了重要手段, 但仍需不断优化。未来可从保存液配方、冷冻和解冻技术、细胞损伤机制及新技术应用等方面深入研究。

关键词

鱼类精子, 超低温冷冻保存, 抗冻稀释液, 冷却速率, 解冻方法

Innovation and Challenges in Ultra-Low Temperature Cryopreservation Technology for Fish Sperm

Xiuyun Feng, Jun Dong, Xiao Xu, Qinglei Meng, Li An, Chao Wang, Yong'an Zhu*

Shandong Freshwater Fisheries Research Institute, Jinan Shandong

Received: Nov. 12th, 2024; accepted: Dec. 11th, 2024; published: Dec. 19th, 2024

Abstract

Ultra-low temperature cryopreservation of fish sperm is of great significance for germplasm resources protection, but it also faces many technical challenges. The purpose of this research is to explore and optimize the ultra-low temperature cryopreservation technology of fish sperm so as to improve the preservation effect. The principle of ultra-low temperature cryopreservation was clarified, and the influencing factors were analyzed, including the selection of antifreeze agents and

*通讯作者。

文章引用: 冯绣云, 董俊, 徐潇, 孟庆磊, 安丽, 王超, 朱永安. 鱼类精子超低温冷冻保存技术的创新与挑战[J]. 农业科学, 2024, 14(12): 1414-1418. DOI: 10.12677/hjas.2024.1412178

diluents, the cooling and thawing rates, etc. The advantages and disadvantages of the new antifreeze—protein-like solution and the traditional like solution were compared. The research conclusion shows that the ultra-low temperature cryopreservation technology of fish sperm provides an important means for fish germplasm resources protection, but it still needs to be continuously optimized. In the future, in-depth research can be carried out from the aspects of preservation solution formulation, freezing and thawing technologies, cell-damage mechanisms and the application of new technologies.

Keywords

Fish Sperm, Ultra-Low Temperature Cryopreservation, Antifreeze Diluent, Cooling Rate, Thawing Method

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

全球渔业资源的逐渐减少,保护和利用鱼类资源成为当务之急。鱼类精子超低温冷冻保存技术是保护鱼类种质资源的一项有效的生物技术。通过超低温冷冻保存,可以延长精子的保存时间,解决鱼类雌、雄配子发育不同步及地理隔离的问题,避免因鱼类栖息环境污染、过渡捕捞及外来物种入侵而造成的鱼类资源衰退等问题,同时也能防止工厂化养殖中因长期近亲交配导致的鱼类种质资源退化及变异现象,增加养殖亲鱼的遗传变异性,也有助于濒危物种的资源保护[1]。

然而,鱼类精子超低温冷冻保存面临着诸多技术挑战。首先,不同种类的鱼类对保存条件的要求有所不同,需要根据具体情况进行调整。抗冻稀释液的选择和冷冻速率的优化是关键问题。研究表明,添加一定浓度的甘油、蔗糖等物质可以显著提高鱼精子的冷冻效果,而冷冻速率过快或过慢都会对细胞结构造成损害。此外,超低温冷冻过程中会导致 DNA 完整性改变[2],线粒体损伤和代谢缺陷[3]、精子活力和速度降低[4],质膜解体[5]以及蛋白质渗漏[6],如兰州鲇精子超低温冷冻实验中,损伤主要表现为细胞膜损伤,细胞质膜与染色质膜发生破损、折皱、囊泡化或整体脱落,细胞核膜与质膜空隙加大,细胞核变形,核质疏散,线粒体结构弥散,线粒体内容物外流,从而降低鱼类精子的存活能力和受精能力[7]。

综上所述,鱼类精子超低温冷冻保存技术虽然具有重要意义,但仍需要进一步研究和完善,以克服技术挑战,提高保存效果。

2. 超低温冷冻保存原理

精子排出体外后,存活时间极短,这是由于外界温度较高,精子代谢速度加快,并且在体外受精的鱼类,精子被排放到缺少代谢底物的水环境中,完全依靠细胞内贮存的营养物质[8],因此,只有将精子放置在低温甚至超低温环境下保存才能有效的延长其存活时间[9]。在超低温环境下,精子的代谢会明显减缓甚至停滞。这是因为温度的降低极大地抑制了细胞内的生化反应和代谢过程。当温度降低时,酶的活性受到极大抑制,生化反应速度减慢。当温度降到一定程度,如 -196°C ,在超低温环境下,细胞内参与能量代谢的酶活性几乎为零,不能发生催化反应,精子无法进行正常的能量转换和消耗,从而进入一种类似“假死”的状态。此外,超低温还能减少细胞内的分子运动,降低细胞内水分的流动性,进一步减缓代谢过程[10]。

超低温冷冻保存的细胞生物学原理主要基于以下几点。首先,将样本中的水分冷冻成固态,降低温度可以减缓或阻止细胞内的生化反应和代谢过程,从而达到有效保存生物样本的目的。在超低温下,细胞内的水分凝固成冰晶,减少了细胞内的分子运动和生化反应,有利于细胞结构的保持。然而,冰晶的形成也可能对细胞结构造成损害,精子中含有大量的水分,在降温 and 复温的过程中极易受到冰晶和高浓度溶质损伤[11]。因此需要通过添加抗冻剂等手段来控制冰晶的大小和形态。

鱼类精子超低温冷冻保存步骤:1) 精液采集:一般通过人工挤压雄鱼腹部等方法获取精液。要注意避免血液、尿液、粪便等污染物混入精液。2) 稀释液配制。3) 精液与稀释液混合:按照一定比例将精液和稀释液缓慢混合,动作要轻,防止精子受到机械损伤。4) 降温平衡:把混合后的精液放在低温环境下平衡一段时间。5) 冷冻:常用的冷冻方法是精液装入麦管或冻存管等容器后,放入液氮蒸汽中预冻数分钟,然后再投入液氮(-196℃)中进行长期保存。

3. 影响因素分析

鱼类精子超低温冷冻保存受到多种因素的影响,下面结合资料对这些因素进行探讨。

3.1. 抗冻稀释液的重要性

稀释液的选择在鱼类精子超低温冷冻保存中起着至关重要的作用。不同的稀释液对冷冻效果有着显著的影响。例如,一般的样液选择为主要成分为生理盐水、营养液,模拟液等。除此之外,加入一些抗冻保护剂有助于维持冰晶的大小、均匀,从而减少冷冻损伤。

3.1.1. 抗冻剂

超低温保存中容易受到冰冻损伤,抗冻剂的存在可以保护精子受到致命损伤,延长精子的寿命,目前常用的抗冻剂为渗透性抗冻剂,如二甲基亚砷(DMSO)、甲醇(MeOH)、丙二醇(PG)、乙二醇(EG)、甘油(Gly)、二甲基甲酰胺等。如黄鳍棘鲷[1]、中国花鲈[10]等选择乙二醇作为抗冻剂,精子活力最高,圆口铜鱼[11]精子以10%甲醇作为抗冻剂时精子活力最高,10%二甲基亚砷为抗冻剂对乌克兰鱈[12]和兰州鲌[7]精子有很好的保护效果,15% PG 作为抗冻保护剂时条纹锯鲈[13]精子运动率最高。

3.1.2. 稀释液

稀释液可以为精子提供适宜的存活环境、营养,同时还可以降低抗冻剂对精子的毒性。常用的稀释液有 Hank's 盐溶液(HBSS)和 D-15,其次是鱼用任氏液,条纹锯鲈[13]精的精子以 HBSS 为稀释液解冻时精子冻存效果较佳,乌克兰鱈[12]采用 Hank's 作为稀释液,解冻后精子活力最高,黄鳍棘鲷[1]以 MPRS 溶液、圆口铜鱼[11]用 D1 稀释液解冻后精子活力最高。

3.2. 冷却与解冻速率

冷却和解冻速率对精子生存率有着重要影响。过快的冷冻速率会导致细胞内水分凝固过快,形成较大的冰晶,从而会对细胞结构造成损害;而过慢的冷冻速率则容易导致细胞内水分结冰不完全,同样会损害细胞结构。一般来说,冷却速率通常使用 10℃/min。当温度下降到-40℃时,继续降温在-1℃/min 的速率下,最终将温度降至-196℃的液氮中进行保存,能够较好的保存精子的活性。目前,较常用的方法是二步降温法(第一步是将鱼类精液在 4℃平衡,一般将所取精液放到冰箱冷藏一段时间,第二步根据鱼的种类不同,将冻存管在液氮面上方 1~10 cm 处放置 2~10 min,然后再在液氮面上放置一段时间或者直接投入液氮中)例如黄鳍棘鲷[1]先在 4℃平衡 30 min,液氮面上 5 cm 放置 5 min,最后投入液氮保存 2 h,中国花鲈[10]精子距液氮面 7.5 cm 处降温 10 min,都获得了很好的保存效果,其次是程序降温法和三步降温法。

解冻速率与冷冻速率相似，对精子的解冻后生存率产生重要影响。目前常用的方法是水浴复苏，一般使用 30°C~40°C 水浴迅速解冻。例如条纹锯鲷[13] 37°C 水浴解冻，兰州鲑[7] 40°C 水浴解冻都能取得好的复苏效果。

4. 抗冻稀释的优化

4.1. 精浆蛋白

精浆中存在多种物质，其中精浆蛋白可以在超低温冷冻保存精子时使其免于冰晶损伤。在一些鱼类中，精浆蛋白已被证明能在冷冻保存过程中维持成熟精子的活力，包括使精子保持静止状态、为精子代谢提供充足的营养水平、控制和调节最终成熟过程，以及保护精子免受蛋白水解或氧化攻击造成的损伤[14]。

4.2. 抗冻蛋白

抗冻蛋白具有抵抗低温的能力。它们通过降低冰点、改变冰晶形成、防止再结晶以及在低温下与质膜相互作用来保护细胞[15]。

从南极鱼科及北部鳕鱼体内发现的抗冻蛋白，目前已分为五类，分别为抗冻糖蛋白(AFGPs)、I型抗冻蛋白(AFP I)、II型抗冻蛋白(AFP II)、III型抗冻蛋白(AFP III)和IV型抗冻蛋白(AFP IV)[16]。它们在特定的冰晶表面上结合，从热力学角度不利于冰的生长。其在冷冻冷藏食品运输过程中得到广泛应用，抗冻蛋白可结合在冰晶的表面，让冰晶不会扩大，能有效抑制冰晶形成，提高冷冻冷藏品的质量。对于鱼类精子冷冻保存而言，这种抗冻蛋白能够显著提高精子的存活率。与传统抗冻稀释液相比，含抗冻蛋白的抗冻稀释液能在更短的时间内通过最大冰晶生成区，减少细胞膜所受到的压力差，从而降低细胞被破坏的风险。抗冻蛋白，特别是 AFP III，已被证明可通过在鲑鱼精子冷冻保存过程中维持膜磷脂成分及其脂肪酸组分的饱和度/不饱和度，来提高解冻后的精子质量并有助于稳定质膜组织[17]。添加 AFP III 可减少冻融过程中精子蛋白质图谱的变化。此外，将 AFP I 和 AFP III 添加到冷冻保存介质中已被证明可显著提高小体鲑精子膜的完整性，但对精子活力、速度和受精能力并无改善[18]。

5. 结论

保存液是超低温冷冻鱼精子的关键环节之一。目前虽然已经取得了一定的成果，但仍有很大的改进空间。未来的研究可以继续深入探讨保存液的配方和添加成分。例如，进一步研究不同种类的抗冻蛋白及其最佳组合，以更好地控制冰晶生长，提高精子的存活率[19]。同时，可以探索新型的渗透保护剂和抗氧化剂，减少冷冻过程中的氧化损伤。此外，针对不同种类的鱼类，开展个性化的保存液配方研究，以满足各种鱼类的特殊需求。

冷冻和解冻速率的优化仍然是未来研究的重点之一。目前虽然已经确定了不同鱼类的大致冷冻和解冻速率范围，但对于具体的鱼类品种，还需要更加精确的调整。未来的研究可以结合先进的技术手段，如计算机模拟和实时监测，对冷冻和解冻过程进行更深入的分析 and 优化。例如，通过计算机模拟不同冷冻和解冻速率下细胞内的冰晶形成和温度分布情况，为确定最佳冷冻和解冻速率提供理论依据。同时，可以开发新型的冷冻和解冻设备，提高冷冻和解冻过程的稳定性和可控性。

总之，未来的研究可以从保存液配方、冷冻和解冻技术、细胞损伤机制和新技术应用等方面入手，不断优化鱼类精子超低温冷冻保存技术，为鱼类种质资源的保护和利用提供更可靠的方法。

基金项目

山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2021CXGC010806); 山东省鱼类产业技术体系淡水鱼养殖岗位(SDAIT-12-09); 山东省重点研发计划(农业良种工程)项目(2021LZGC029)。

参考文献

- [1] 贾濮元, 郭华阳, 朱克诚, 等. 黄鳍棘鲷精子冷冻保存方法探究[J]. 南方水产科学, 2021, 17(6): 58-65.
- [2] Gwo, J. and Arnold, C.R. (1992) Cryopreservation of Atlantic Croaker Spermatozoa: Evaluation of Morphological Changes. *Journal of Experimental Zoology*, **264**, 444-453. <https://doi.org/10.1002/jez.1402640410>
- [3] He, S. and Woods III, L.C. (2004) Effects of Dimethyl Sulfoxide and Glycine on Cryopreservation Induced Damage of Plasma Membranes and Mitochondria to Striped Bass (*Morone Saxatilis*) Sperm. *Cryobiology*, **48**, 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.01.009>
- [4] Linhart, O., Rodina, M. and Cosson, J. (2000) Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus Carpio*: Sperm Motility and Hatching Success of Embryos. *Cryobiology*, **41**, 241-250. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2284>
- [5] Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and Patzner, R. (1996) Changes in Morphology, Physiology, Metabolism, and Fertilization Capacity of Rainbow Trout Semen Following Cryopreservation. *The Progressive Fish-Culturist*, **58**, 149-159. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1996\)058<0149:cimpma>2.3.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1996)058<0149:cimpma>2.3.co;2)
- [6] Dietrich, M.A., Arnold, G.J., Fröhlich, T., Otte, K.A., Dietrich, G.J. and Ciereszko, A. (2015) Proteomic Analysis of Extracellular Medium of Cryopreserved Carp (*Cyprinus Carpio* L.) Semen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, **15**, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2015.05.003>
- [7] 邢露梅, 肖伟, 李兰兰, 等. 兰州鲂精液超低温冷冻保存技术研究及细胞损伤检测[J]. 水生生物学报, 2021, 45(3): 547-556.
- [8] 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.
- [9] 周洲, 孔杰, 赵凤, 等. 鱼类精子超低温冷冻保存技术研究进展[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(3): 89-92.
- [10] 史应学, 程顺, 竺俊全, 等. 中国花鲈精子的超低温冷冻保存及酶活性检测[J]. 水生生物学报, 2015, 39(6): 1241-1247.
- [11] 刘光霞, 吴兴兵, 何勇凤, 等. 圆口铜鱼精子超低温冷冻保存[J]. 中国水产科学, 2020, 27(1): 44-52.
- [12] 马林, 李楠, 郝爽, 等. 乌克兰鳞鲤精子超低温冷冻保存方法研究[J]. 水产科学, 2019, 38(4): 473-478.
- [13] 韩龙江, 刘清华, 官曙光, 等. 条纹锯(鲑)精液超低温冷冻保存研究[J]. 水产学报, 2014, 38(10): 1714-1721.
- [14] Ciereszko, A., Dabrowski, K., Kucharczyk, D., Dobosz, S., Goryczko, K. and Glogowski, J. (1999) The Presence of Uric Acid, an Antioxidantive Substance, in Fish Seminal Plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, **21**, 313-315. <https://doi.org/10.1023/a:1007886121663>
- [15] Ciereszko, A., Dietrich, M.A. and Nynca, J. (2017) Fish Semen Proteomics—New Opportunities in Fish Reproductive Research. *Aquaculture*, **472**, 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.005>
- [16] 沈蕾, 章海敏, 胡军祥. 新技术在鱼类胚胎冷冻保存中的应用[J]. 浙江农业科学, 2013(6): 734-736.
- [17] Figueroa, E., Valdebenito, I., Zepeda, A.B., Figueroa, C.A., Dumorné, K., Castillo, R.L., *et al.* (2015) Effects of Cryopreservation on Mitochondria of Fish Spermatozoa. *Reviews in Aquaculture*, **9**, 76-87. <https://doi.org/10.1111/raq.12105>
- [18] Figueroa, E., Farias, J.G., Lee-Estevez, M., Valdebenito, I., Risopatrón, J., Magnotti, C., *et al.* (2018) Sperm Cryopreservation with Supplementation of A-Tocopherol and Ascorbic Acid in Freezing Media Increase Sperm Function and Fertility Rate in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Aquaculture*, **493**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.046>
- [19] Xin, M., Niksirat, H., Shaliutina-Kolešová, A., Siddique, M.A.M., Sterba, J., Boryshpolets, S., *et al.* (2019) Molecular and Subcellular Cryoinjury of Fish Spermatozoa and Approaches to Improve Cryopreservation. *Reviews in Aquaculture*, **12**, 909-924. <https://doi.org/10.1111/raq.12355>