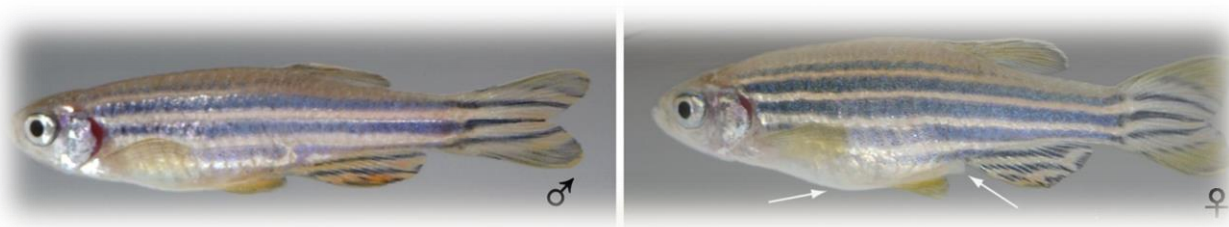


# 斑马鱼精子冻存

## 技术原理



国家斑马鱼资源中心

国家斑马鱼资源中心

( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )

2017.3.30



# 一、鱼类精子发生和形成简介

# 二、冷冻保存技术原理

国家斑马鱼资源中心  
( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )



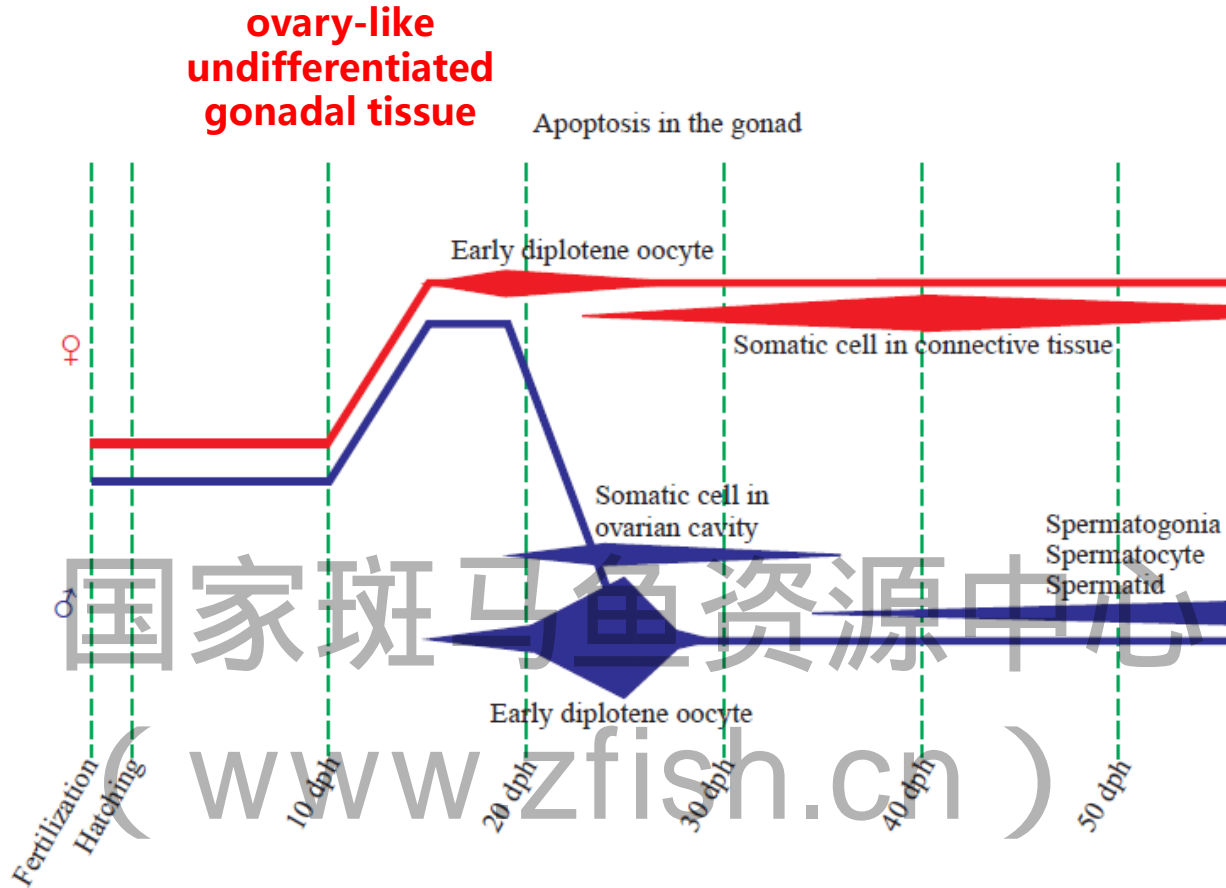
## 雌雄异体鱼类的性别决定

低等脊椎动物，性别决定机制多样

- **遗传决定型**：性染色体（X/Y），如青鳉
  - **环境决定型**：温度决定型居多，没有明确的性染色体，由遗传内因和环境因素共同影响决定，如斑马鱼
- 环境因素**：水温、pH、光照、养殖密度、溶氧、盐度、食物丰度、群体信号和环境内分泌干扰物等



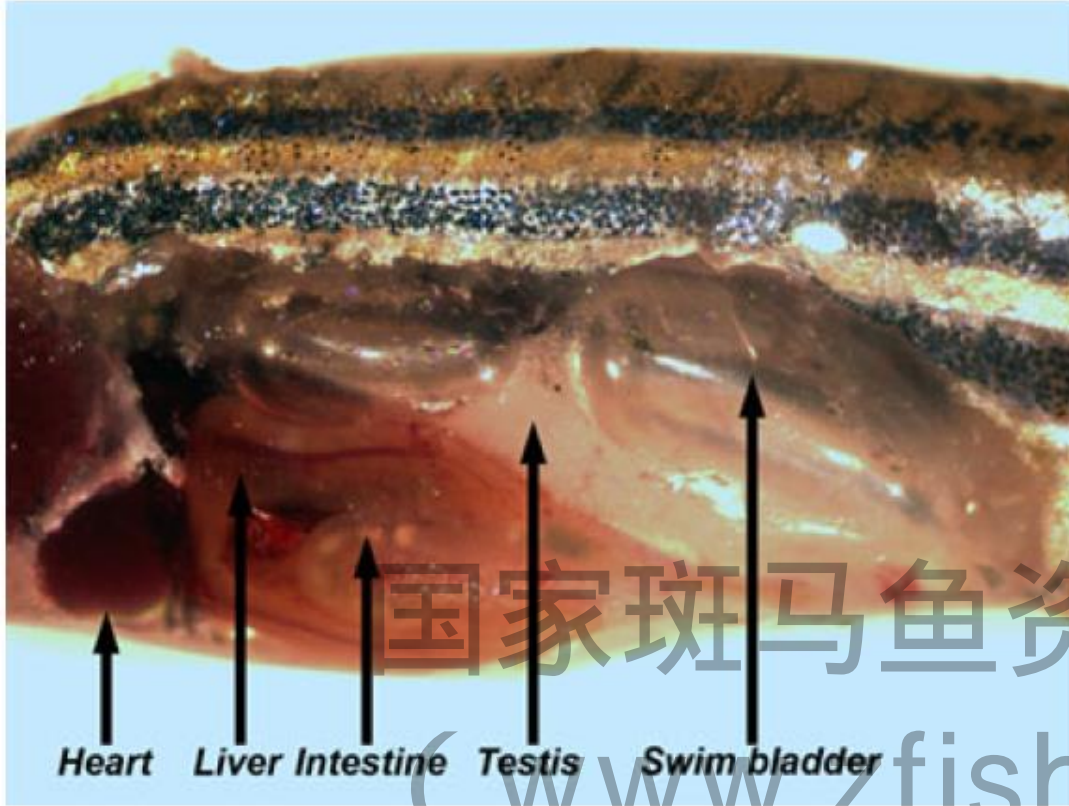
# 斑马鱼雄性生殖腺发育



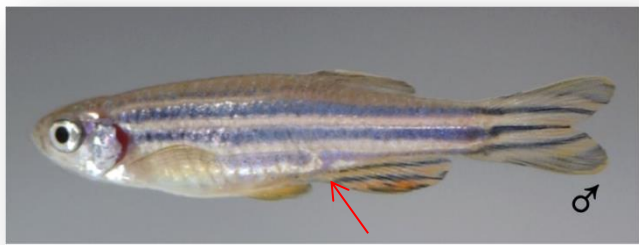
**斑马鱼中的雄性发育**（卵母细胞凋亡假说）：在一系列的內因和外因的共同影响下，调控性别决定基因的表达，指导雄性个体早期生殖腺中的卵母细胞凋亡，启动精原细胞胎的发育和增殖，形成成熟的雄性生殖腺。



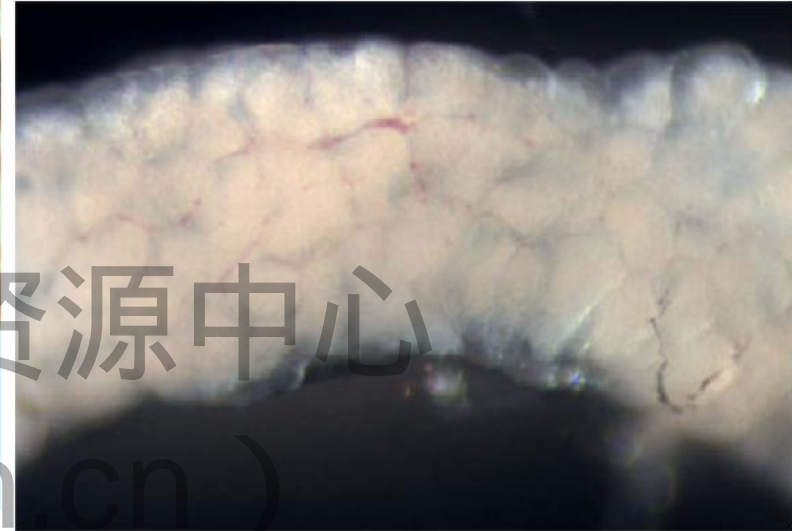
# 鱼类精巢的形态结构



J Vis Exp. 2010; (37): 1717.



➤ The testes are long, white, paired organs that are attached to the dorsal body wall.



- white roundish structures: seminiferous tubules, contain cysts with various stages of developing germ cells from spermatogoni to spermatids



# 鱼类精子发生和形成

- 鱼类精巢一般分为管状型和**叶状型**两种，大多数鱼类包括斑马鱼属于后者。
- 精巢由许多小叶组成，小叶中有多个包含精原细胞的生精小囊，精子成熟过程中，一个生精小囊中的所有生殖细胞基本上处于同一个发育阶段。
- 精子成熟后，生精小囊不断膨大直至破裂，释放精子到输精管中。

国家斑马鱼资源中心

( www.zfish.cn )

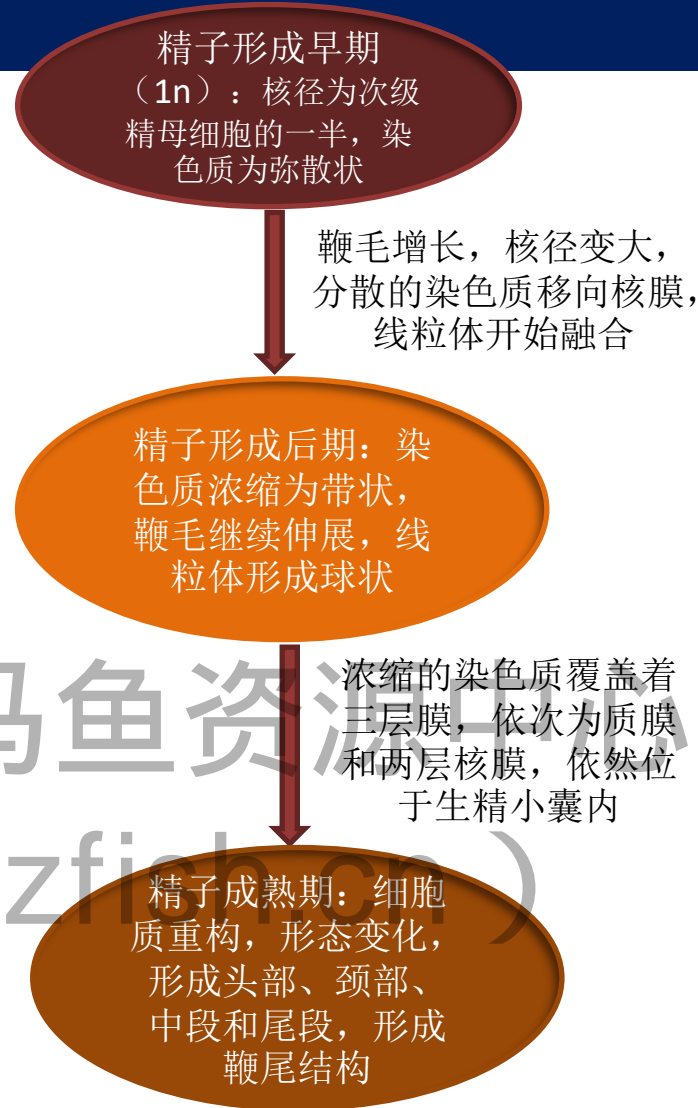
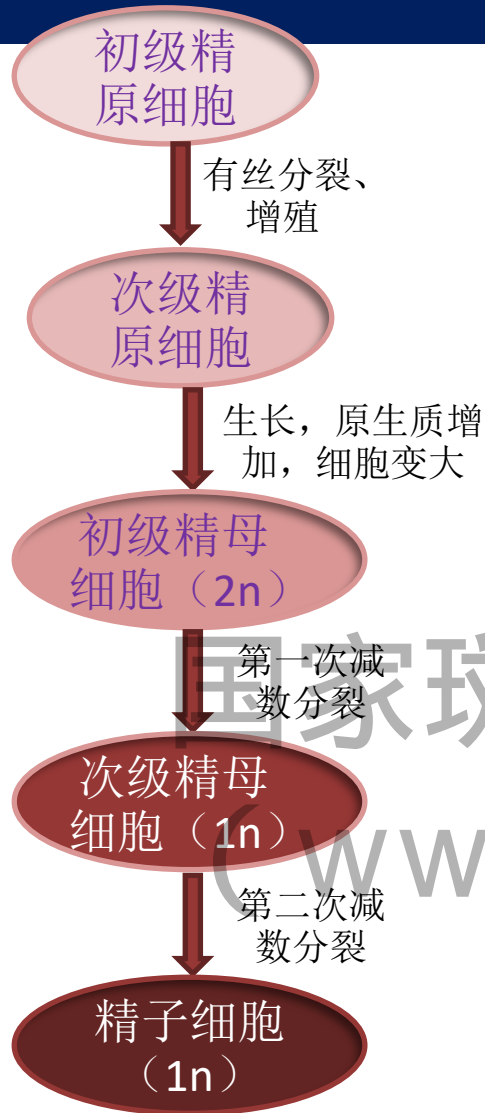


图示为剑尾鱼的生精小囊 ( SC ) 和输精管 ( VD )



# 鱼类精子发生

# 鱼类精子形成



通过挤压腹部可以将精子从输精管中挤出体外，大部分的精子均可通过这种方式收集到



# 一、鱼类精子发生和形成简介

# 二、冷冻保存技术原理

国家斑马鱼资源中心  
( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )





# 冷冻保存技术的原理

➤ **冷冻保存技术** (cryopreservation), 指将生物、生命组织、或细胞等有机物质 ( 生物材料的含水量一般在60-90% ) 和其他物质在摄氏**-196度**或以下的低温保存的一种技术。

水部分结冰  
酶部分失活  
生化活动较迟钝  
新陈代谢较低  
保存数小时到数天

自由水已结冰  
酶大部分失活  
生化活动近乎停止  
新陈代谢很低  
保存数月到半年

酶全部失活  
生化活动停止  
新陈代谢最低点  
进入休眠状态  
保存~10年



冰点到-40℃



-70℃ ~ -80℃

干冰、超低温冰箱



-196℃ 或以下



国家斑马鱼资源中心  
( www.zfish.cn )

# 配子冷冻保存技术的作用

- 可以将优质品系或濒临灭绝的品系长期保存起来，避免因长期养殖、近亲交配而造成的**种质退化**和**遗传变异**等现象。
- **节省养殖空间**，以及与之相应的人力物力资源。
- 通过配子的冷冻保存，可以为鱼类遗传育种和生物技术研究不间断地提供材料，大大方便了遗传发育研究。

国家斑马鱼资源中心



48 lines/RACK, ~26 RACKs



600 L/10K tubes/1,250



# 鱼类精子冷冻保存技术发展历史

研究简报

### 草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲤鱼冷冻精液授精试验

THE INSEMINATING EXPERIMENTS WITH THE FROZEN SEMENS OF GRASS, SILVER, BIG HEAD AND MUD CARP

王祖昆 邱繁彪  
(广东省农业科学院)

陈魁侯 顾阳晖  
(广东省水产研究所)

梁耀辉 黄  
(北海公社鱼苗场)

Wang Zukun and Qiu Linqian

(Animal Husbandry Institute, Academy of Agricultural Science of Guangdong Province)

Chen Kuaihou and Gu Yanghui

(Fisheries and Animal Husbandry Bureau of Shunde Xian)

Liang Yaohui and Huang

(Fish Fry Farm of Bei Hai Commune)

#### 摘要

本文介绍了草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲤鱼冷冻精液人工授精试验。对35尾雌鱼的部份精子进行了处理。各得鱼卵半吨至壹吨不等(按卵内细胞核体积)的卵。草鱼44.21% (71.79%)、鲢鱼32.58% (49.78%)、鳙鱼18.55% (46.24%)、鲤鱼21.05% (51.13%)。试验用的冷冻精液一般在冰层中保存40—60天,最长保存时间超过700天。试验表明,在冰层中保存一年至两年的冷冻精液,受精能力仍有受到显著影响。

鱼类精液冷冻技术是近几十年发展起来的新技术。当前,国外主要研究海水鱼类的冷冻精液<sup>[1]</sup>。淡水鱼类冷冻精液授精技术的研究报道不多。国内,1981年卢肇霖

### Sperm Storage and Cross-Fertilization of Spring and Autumn Spawning Herring

This preliminary communication gives the results of some experiments conducted at the Marine Laboratory, Aberdeen, in 1953, as part of a more extensive herring-rearing programme. They show that it is possible to cross-fertilize the two spawning 'types' of herring (*Clupea harengus*) found in the north-east Atlantic, one of which spawns in the spring, the other in the autumn.

To achieve this, a technique of long-term gamete storage is required. Polge, Smith and Parkes<sup>1</sup> first reported that fowl spermatozoa stored in dilute glycerol at -79°C. remained alive for as long as nine months; Polge and Rowson<sup>2</sup> found that bull spermatozoa remained fertile after storage for nine months under these conditions. Similar methods were therefore applied to the storage of herring gametes.

Ripe spermatozoa and eggs were obtained in March 1953 from spring-spawning herring caught in the Firth of Clyde. Two samples of each of the ovary and testes were removed by dissection and placed in sealed tubes containing a solution of 12.5 per cent glycerol in diluted sea water (one part

## Blaxter, 1953年, 海水鱼类

《Nature》, 1953, 172(4391):1189-1190

## 王祖昆, 1984年, 淡水鲤科

《水产学报》, 1984, 8(3):255-257



### Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol<sup>1</sup>

BRIAN HARVEY,<sup>2</sup> R. NORMAN KELLEY, AND M. J. ASHWOOD-SMITH  
Department of Biology, University of Victoria, P.O. Box 1700, Victoria, B.C., Canada V8W 2Y2  
Received January 21, 1982

HARVEY, B., R. N. KELLEY, AND M. J. ASHWOOD-SMITH. 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. Can. J. Zool. 60:1867-1870.

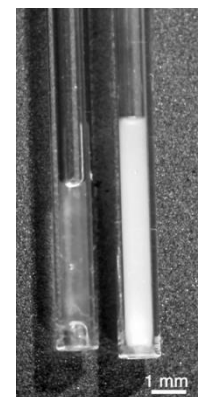
We describe a method for cryopreservation of milt from individual *Brachydanio rerio* using methanol and powdered milk as cryoprotectants. Motility was positively correlated with hatching, which averaged 51 ± 35.6% in a typical experiment. Variability in motility and hatching was not correlated with sperm volume or age of the fish, and is believed to be due to differences in sperm quality between individuals, as well as technical constraints imposed by the short duration of motility in thawed spermatozoa.

## Harvey Method

[Traduit par le journal]

## Harvey, 1982年, 斑马鱼

CAN. J. ZOOL. VOL. 60, 1982



## ➤ 超快速玻璃化冻存方法

利用多种高浓度的冷冻保护剂联合形成的玻璃化冷冻保护液保护悬浮细胞，直接投入液氮快速冻存的方法。

- 液体连续固化，形成非晶体的玻璃态，分子无序排列，保持未凝固前的状态。
- 理想冻存方法，应用于胚胎冷冻
- 极快速，无冰晶形成，免受低温损伤
- 途径：
  - 1) 增加溶液的浓度  
冷冻保护剂浓度高达40-60%
  - 2) 降温速率极大  
纯水滴玻璃化  $> 10^7$  K/S  
样品直接投液氮  $\sim 10^3$  K/S
- 冻存液配制较复杂，冷冻前和复苏后操作较繁琐。

## ➤ 慢速降温非玻璃化冻存方法

利用温级冰箱、干冰 ( $-79^{\circ}\text{C}$ )、程控降温仪以及液氮气相将样品降温至  $-80^{\circ}\text{C}$  左右，然后直接投入液氮进行冻存的方法。

- 溶液非连续固化，形成晶体，分子呈有序排列
- 有冰晶形成，冰晶形成的大小和数量主要受降温速率和冷冻保护剂的种类影响
- 应用于一般细胞和精子的冻存



# 慢速降温冻存技术/低温损伤

温度下降

样品预处理：细胞（精细胞）于含有抗冻剂的溶液中预处理

程控降温仪或其他方法慢速降温

细胞外溶液的水分结冰：溶质浓度升高

合适的降温速率

细胞脱水：胞内水分外渗，体积收缩，胞内溶质浓度和渗透压升高，冰点下降

降温至-60°C以下，所有自由水结冰，迅速投入-196°C结冰

样品于液氮中永久保存

➤ **冰晶损伤**：随着温度的下降，溶液中形成大量的冰晶，胞外冰晶容易导致细胞的机械损伤，胞内冰晶易导致细胞膜及细胞器的破坏，引起细胞死亡

水结晶过程

冰晶损伤  
常温未结冰

降温速率过快

危险温区  
(水强烈结晶)

自由水全部结冰

0°C  
(冰点)

-60°C

纯水冰点=0度，过冷温度后开始结晶

- ✓ 降温速率慢，形成的冰晶核少，冰晶生长速度快，形成数目少而体积大的冰晶；
- ✓ 降温速率快，形成的冰晶核多，生长受限，成数目多体积小的冰晶。



# 慢速降温冻存技术/低温损伤

样品预处理：细胞（精细胞）于含有抗冻剂的溶液中预处理

程控降温仪或其他方法慢速降温

细胞外溶液的水分结冰：溶质浓度升高

合适的降温速率

细胞脱水：胞内水分外渗，体积收缩，胞内溶质浓度和渗透压升高，冰点下降

降温至-60°C以下，所有自由水结冰，迅速投入-196°C结冰

样品于液氮中永久保存

- **溶质损伤**（渗透压损伤）：溶质浓度过高，细胞暴露时间过长易导致失活
  - 高渗导致蛋白质保护层水分丢失而失活
  - 细胞膜脂脱水，膜结构破坏

降温速率过慢

溶质损伤

温度下降

- **细胞膜**是半渗透性膜
- 内为水+有机物+可溶性盐+糖+蛋白+脂类等组成的细胞器
- 水和一些小分子物质可在细胞内外维持渗透压平衡。



# 慢速降温冻存技术/低温损伤

温度下降

样品预处理：细胞（精细胞）于含有抗冻剂的溶液中预处理

程控降温仪或其他方法慢速降温

细胞外溶液的水分结冰：溶质浓度升高

合适的降温速率

细胞脱水：胞内水分外渗，体积收缩，胞内溶质浓度和渗透压升高，冰点下降

降温至-60°C以下，所有自由水结冰，迅速投入-196°C结冰

样品于液氮中永久保存

毒性损伤

其他损伤

pH损伤  
辐射损伤等

冷休克损伤

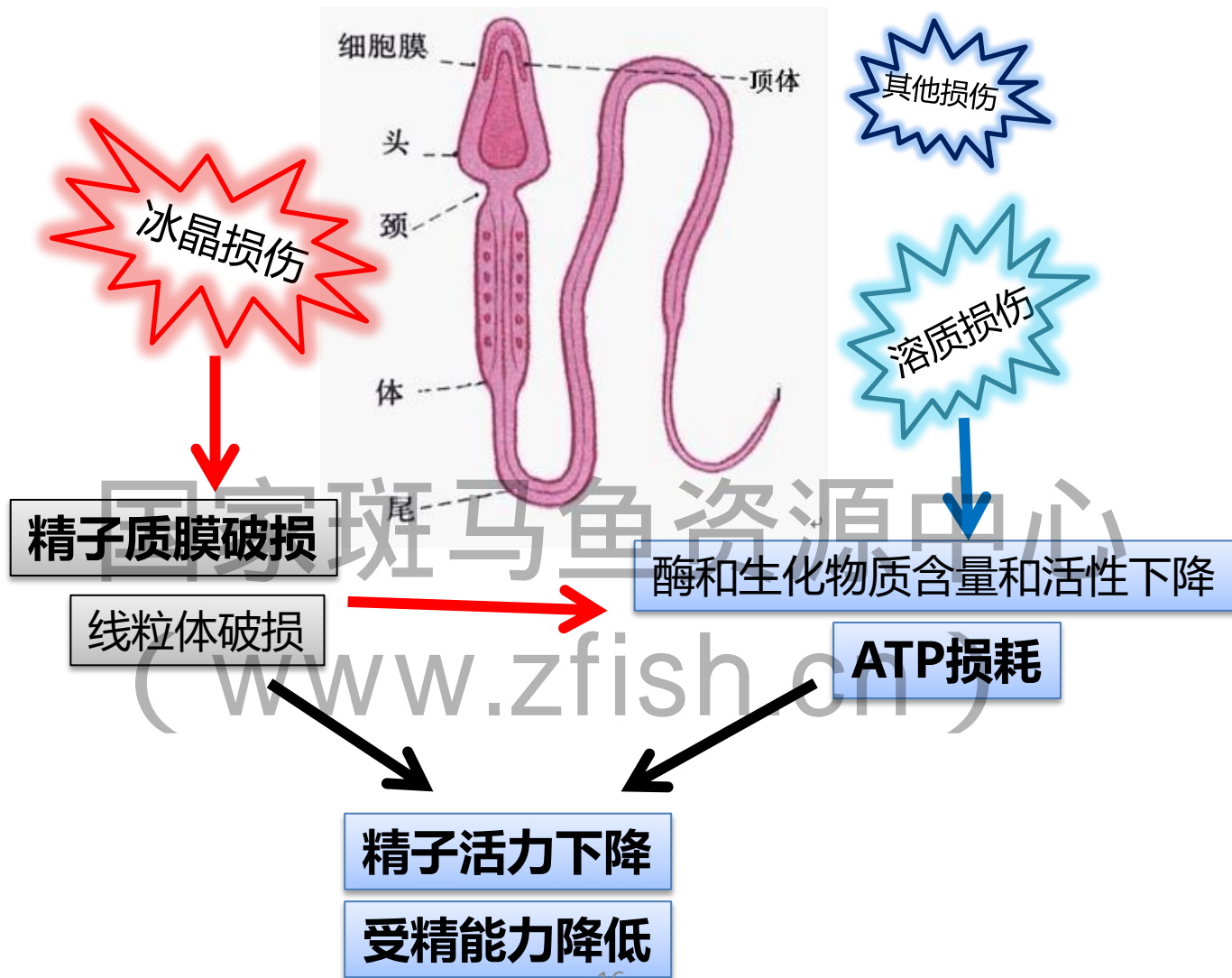
➤ **冷冻保护剂毒性损伤**：冷冻保护剂大多数是有细胞毒性的，长时间暴露会对细胞的结构或遗传物质产生损伤

➤ **冷休克损伤**：过冷状态对细胞造成的损伤。溶液从10°C降温至-16°C的过程中，当处于过冷状态时，冰晶自发形成，膜脂脱水从液相变为固相，膜渗透率改变，造成冷休克。主要受降温速率的影响。



# 低温保存/精子形态生理学变化

电镜  
流式细胞仪  
超微结构分析



紫外分光光度法





- **精子活力**：加入约10倍体积水激活精子后，统计有向前运动活力的精子数目占总细胞数目的比例。
- **精子受精率**：收集200-300枚左右的优质未受精卵，使用鲜精或冻存精液进行受精反应，3小时后统计受精卵占总胚胎的比例。
- **精子结构完整性**：电镜或流式细胞仪评估浆膜完整性、顶体/线粒体完整性
- **生化活性物质检测**：紫外分光光度法检测精子中的ATP水平、其他相关的酶和生化物质的含量和活性。



**精子活力**：加入约10倍体积水激活精子后，统计有向前运动活力的精子数目占总细胞数目的比例。

- 精子在精巢中处于无活力状态，多种鱼类精浆中含有高浓度 $\text{Na}^+$  和 $\text{K}^+$ 维持精巢内高渗状态。
- 影响因素：**渗透压、离子、温度、pH**等

( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )

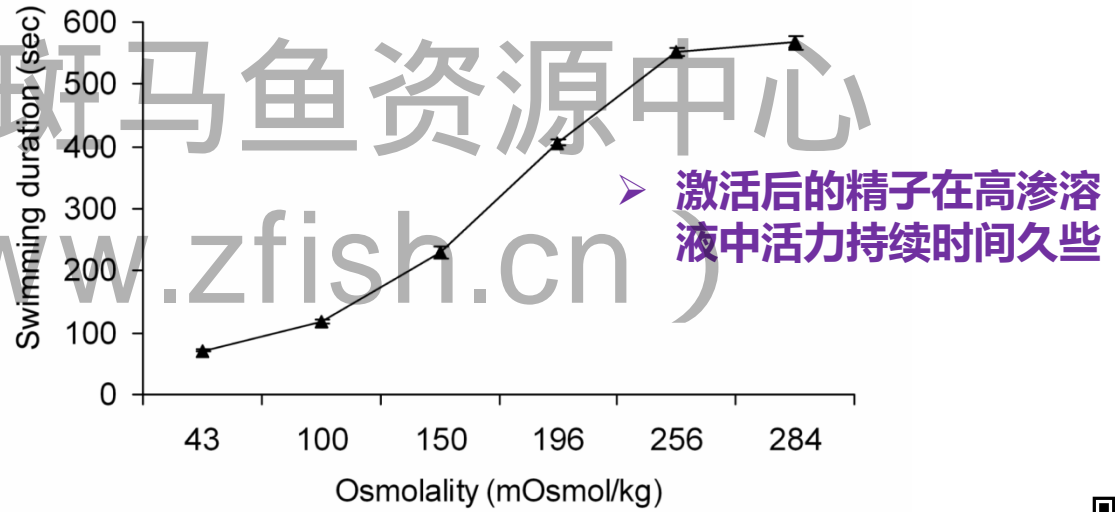
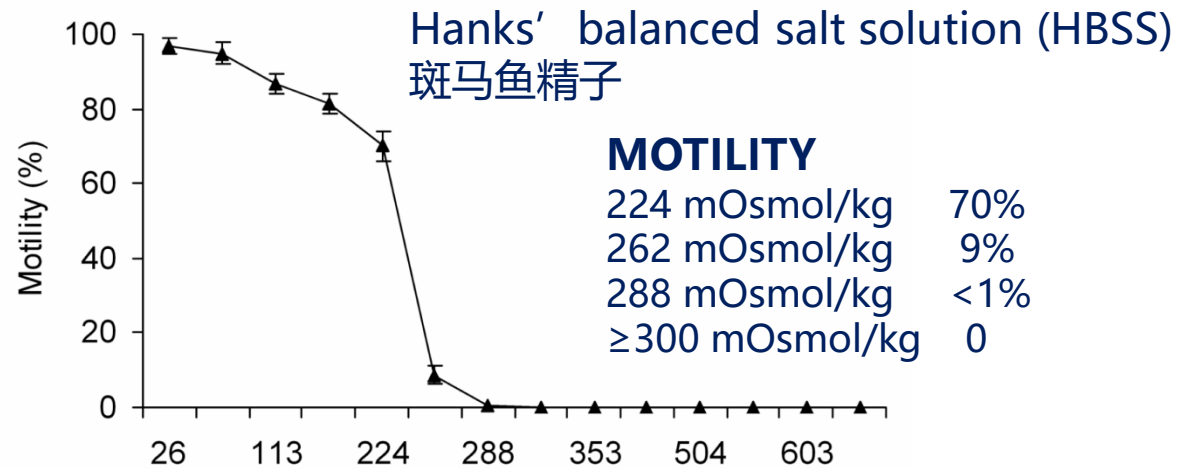


# 精子活力影响因素：渗透压

➤ **渗透压**：由于液体浓度不同，在半透膜上产生的压力差，和溶液浓度成正比，水的渗透压为0

➤ **渗透压**  $P=iCRT$   
C 摩尔浓度  
R 气体常数  
T 绝对温度

➤ **激活精子活力持续时间**  
双蒸水: <60 s  
纯水: <2-3 min.  
GRS buffer: ~1 h.  
Hank's buffer: 4°C, ~1 weeks

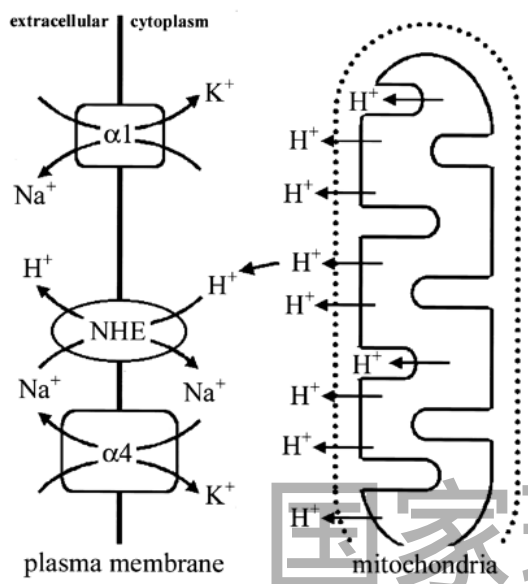


国家斑马鱼资源中心  
(www.zfish.cn)

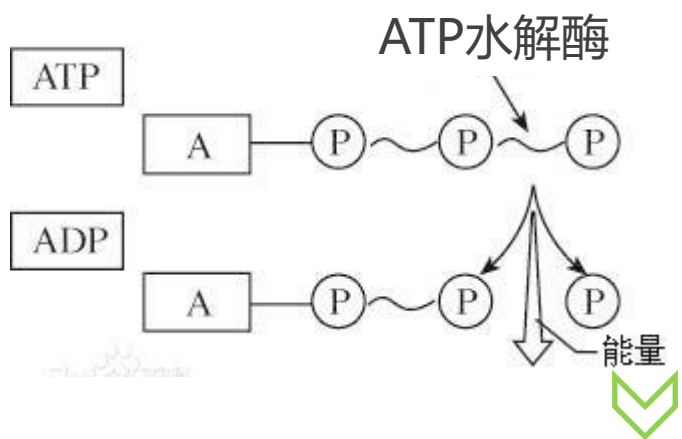


# 精子活力影响因素：离子类型及浓度

## ATP (三磷酸腺苷)生成



## ATP水解供能



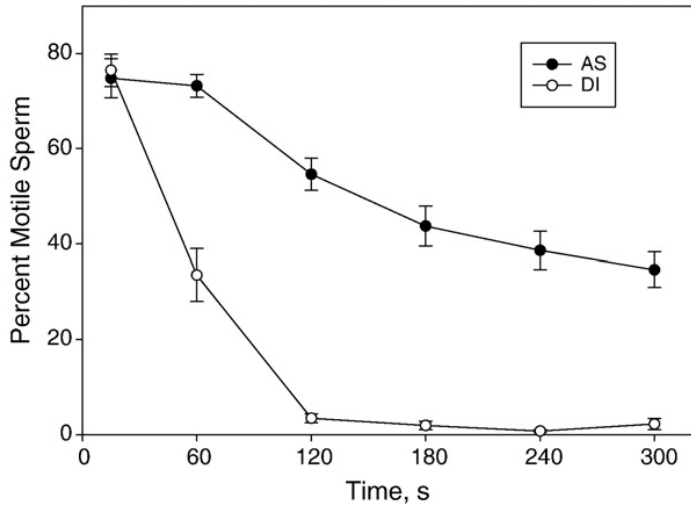
精子纤维收缩  
鞭毛运动  
保持精子活力

国家斑马鱼资源中心  
(www.zfish.cn)

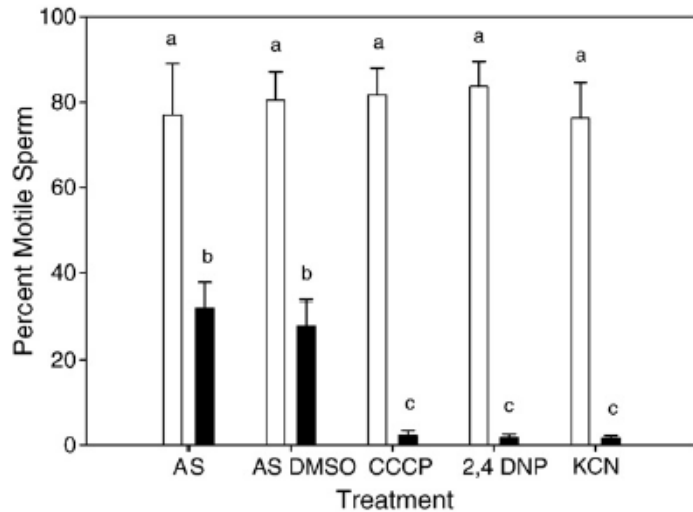
- 依赖于Na,K离子通道的ATP酶在合成ATP时大量释放H<sup>+</sup>，酸性环境有损精子活力
- Na,K离子通道不停地将胞外的K<sup>+</sup>与胞内的Na<sup>+</sup>交换，再通过Na, H离子通道将胞内大量的H<sup>+</sup>释放到胞外
- ATP的生成和水解作用为精子的活力持续供能



# ATP供能对斑马鱼精子活力的影响



AS精子激活盐溶液  
DI去离子水



Percent motile sperm at 15 s (white) and 300 s (black) post-activation

CCCP,DNP,KCN : 氧化磷酸化作用抑制剂  
氧化磷酸化作用(oxidative phosphorylation)是指在生物氧化中伴随着ATP生成的作用

国家斑马鱼资源中心  
(www.zfish.cn)

- 精子中的ATP水平对精子的初始激活至关重要
- 精子激活60-90s后，ATP生成能力决定精子活力持续时间



➤ **冷冻保护剂**：低毒、高效

➤ **适宜的降温速率**：冰晶形成与细胞脱水进程

➤ **合适的稀释缓冲液**：维持良好生理状态

➤ **复温速率**：防止二次低温损伤



# 冷冻保护剂 vs 低温损伤

## 渗透性冷冻保护剂

渗透性，小分子物质

丙二醇(PG)

甲醇 (MeOH)

二甲基乙酰胺 (DMA)

二甲亚砷(DMSO)

乙二醇(EG)

甘油(Glycerol)等

## 非渗透性冷冻保护剂

渗透性差，大分子物质

聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)

果糖

蔗糖

聚乙二醇

葡聚糖

白蛋白

羟乙基淀粉等

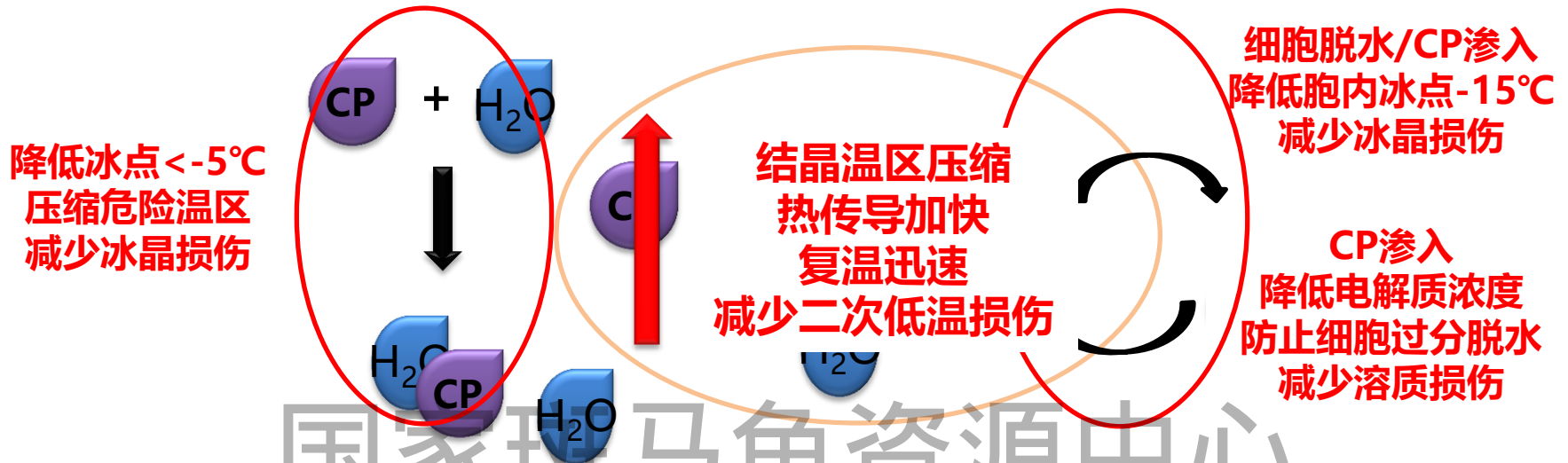
国家斑马鱼资源中心  
(www.zfish.cn)

- 果糖对冷冻精子的生存指数和存活时间方面优于蔗糖，葡萄糖最差。
- 非渗透性冷冻保护剂毒性较渗透性冷冻保护剂小，混合添加可以减少细胞毒性。



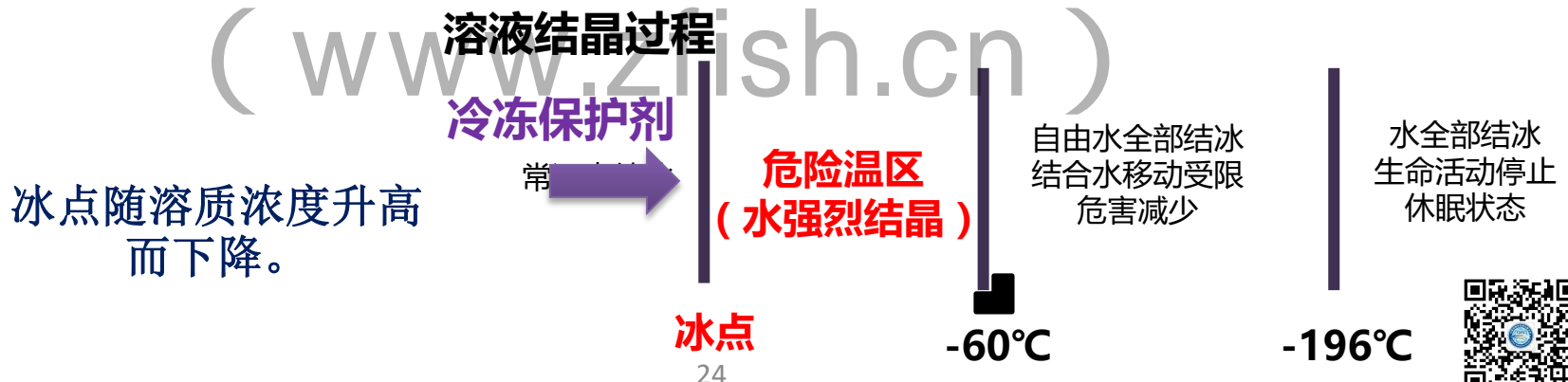
# 冷冻保护剂 vs 低温损伤

## 渗透平衡与结晶过程



国家斑马鱼资源中心

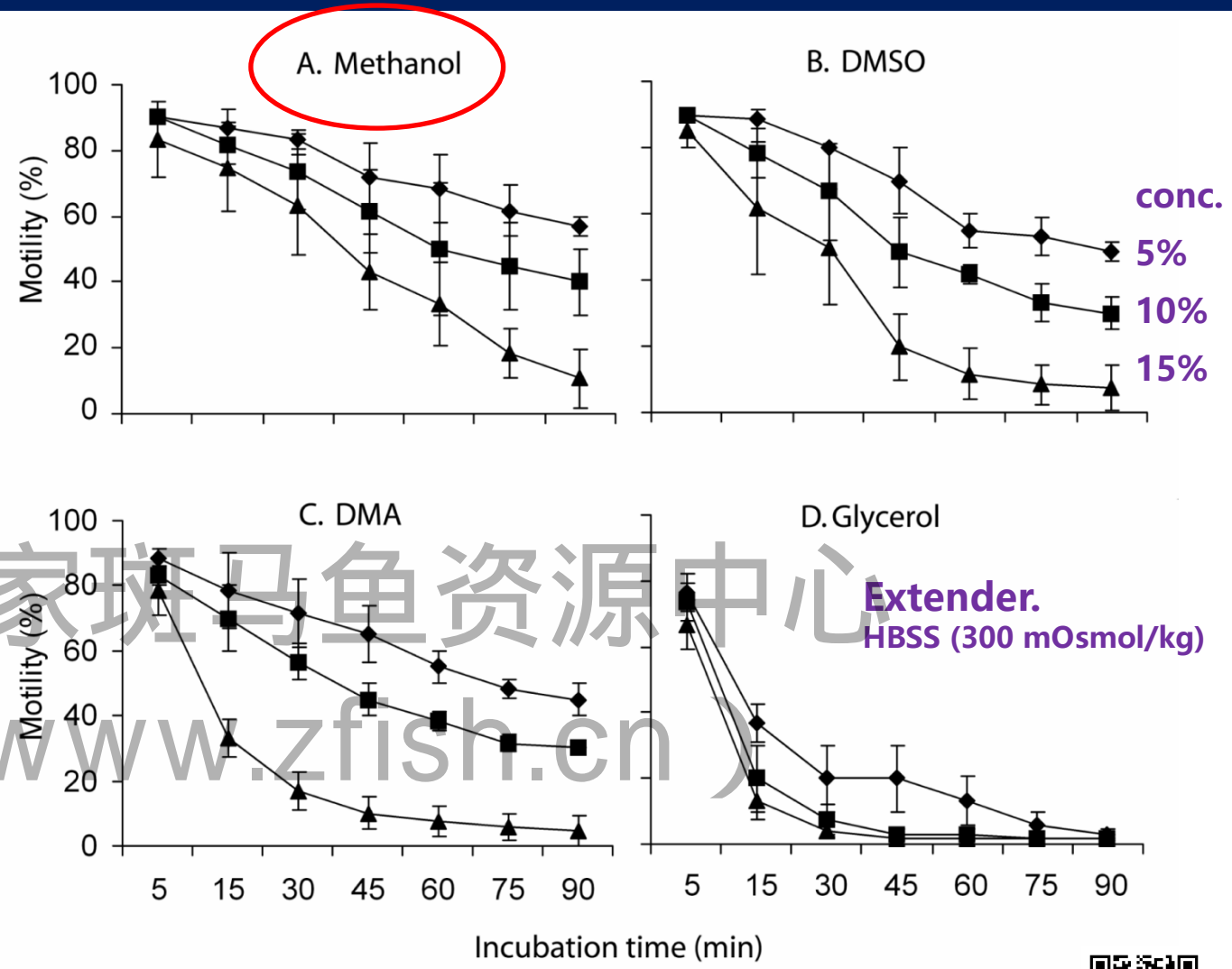
溶液结晶过程  
( www.zfish.cn )





# 冷冻保护剂对斑马鱼精子的毒性比较

- ✓ Methanol甲醇: Mr=32, 渗透性好, 细胞毒性, 可致DNA突变
- ✓ DMSO二甲基亚砜: 细胞冻存, Mr=78, 易致精子尾交联
- ✓ DMA二甲基乙酰胺: Mr=87, 渗透性好
- ✓ Glycerol甘油: 细菌冻存, Mr=92, 渗透性略差, 易致精子尾交联
- ✓ 脱脂奶粉常被用作细胞外冻存保护剂联合添加, 可以有效地缓解精子尾交联导致的精子活力低下问题



➤ **冷冻保护剂**：低毒、高效

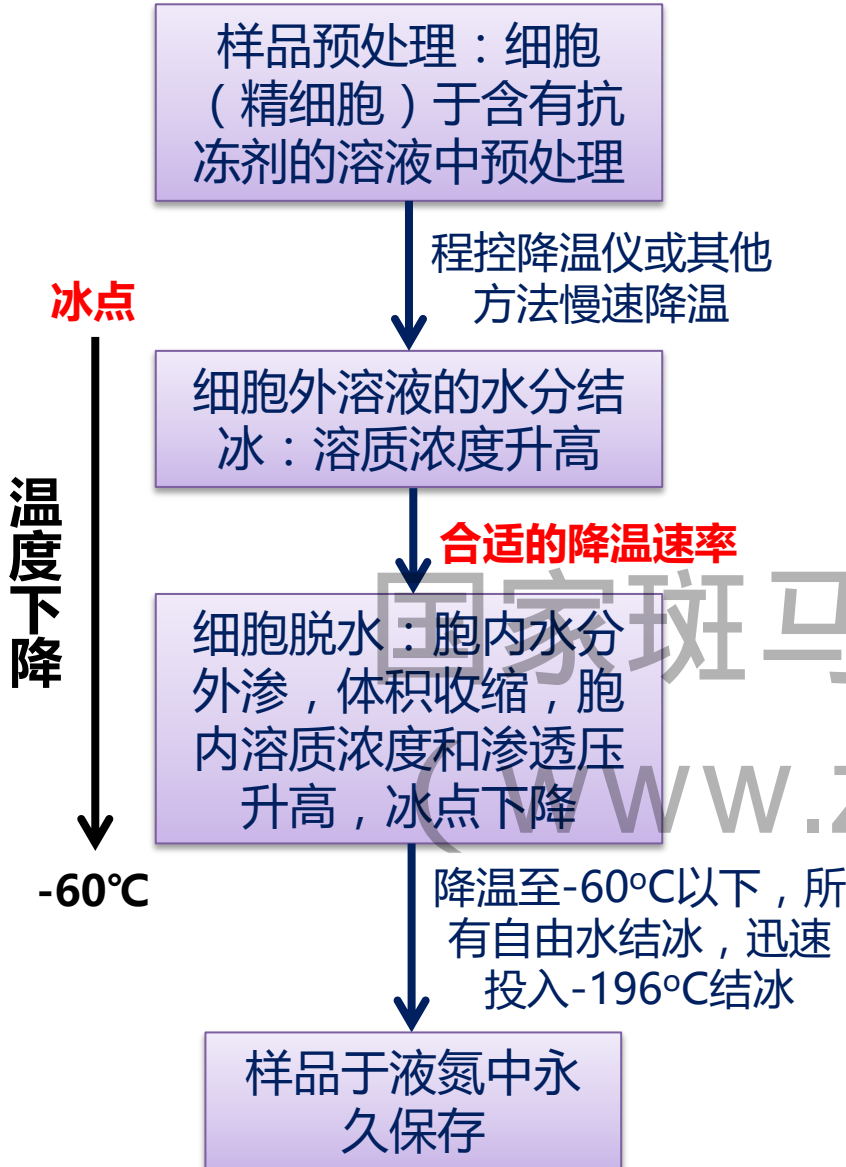
➤ **适宜的降温速率**：冰晶形成与细胞脱水进程

➤ **合适的稀释缓冲液**：维持良好生理状态

➤ **复温速率**：防止二次低温损伤



# 降温速率 vs 低温损伤



➤降温的过程是**传热**与**渗透**两个因素相互作用的过程，最佳降温速率是指这两个因素的最好配合。

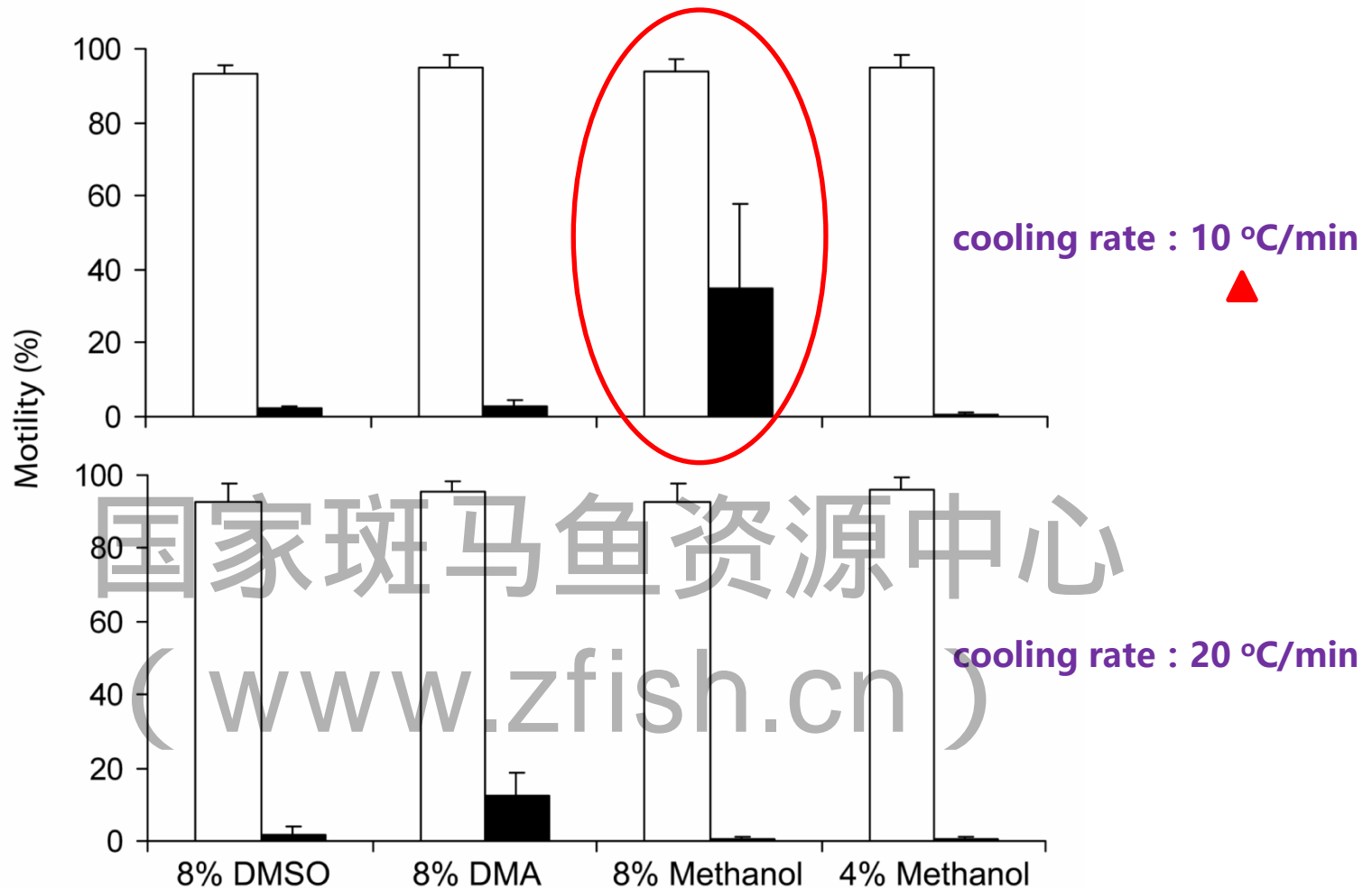
➤**降温速率过慢**，容易造成严重的溶质损伤，即细胞严重脱水，体积严重收缩，失去活性。

➤**降温速率过快**，容易造成严重的胞内冰晶损伤，即细胞内水分没有足够的时间外渗，随着温度的下降发生胞内结冰，形成较大冰晶，造成细胞膜及细胞器的破坏。

**最适降温速率**  
1.6°C ~ 1K °C/min  
细胞体积  
细胞膜渗透性  
冷冻的敏感性  
细胞水含量



# 斑马鱼精子冻存/降温速率



➤ **冷冻保护剂**：低毒、高效

➤ **适宜的降温速率**：冰晶形成与细胞脱水进程

➤ **合适的稀释缓冲液**：维持良好生理状态

➤ **复温速率**：防止二次低温损伤



# 稀释缓冲液/配制原则

**稀释缓冲液**是为了给细胞（精子）提供一个渗透压和pH适宜的环境，来延长其体外存活时间，维持良好生理状态以更好地抵抗低温损伤。

配制的主要原则如下：

- **溶液等渗性**：等渗或接近，防止精子激活，并保持正常结构
- 具有一定的**缓冲能力**和适宜的**pH值**
- 各成分**互不反应**，提供所需的营养和生活条件
- 对细胞无毒害作用，最好含有抗菌物质

国家斑马鱼资源中心  
(www.zfish.cn)

精子冻存常用的稀释缓冲液：**GRS/HBSS/FBS/balanced-tris-buffer**

### Ginsberg Fish Ringers

NaCl  
KCl  
CaCl<sub>2</sub>•2 H<sub>2</sub>O  
NaHCO<sub>3</sub>

### Hank' s balanced salt solution

NaCl, KCl  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>  
NaHCO<sub>3</sub>

### Balanced-tris-buffer

NaCl, KCl  
CaCl<sub>2</sub>  
MgSO<sub>4</sub>  
Tris



➤ **冷冻保护剂**：低毒、高效

➤ **适宜的降温速率**：冰晶形成与细胞脱水进程

➤ **合适的稀释缓冲液**：维持良好生理状态

➤ **复温速率**：防止二次低温损伤



**复温速率**是指在细胞复苏时温度升高的速度。复温速率选择不当也会降低冻存细胞存活率。一般来说，**复温速率越快越好**。

- **常规的做法**：在33°C ( **不超过42 °C** ) 水浴中，于1-2分钟内完成复苏。
- **复温损伤**：复温速率过慢，胞内外冰晶容易发生再结晶现象形成较大冰晶，高浓度的电解质也会导致溶质损伤，造成致命细胞伤害。复温时造成的细胞损伤非常快，往往在极短的时间内发生。

( www.zfish.cn )





**谢谢各位！**  
国家斑马鱼资源中心  
( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )

