DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2008.40579

冷冻保护剂及预冷时间对河蟹精子体外冷冻保存的影响

陈东华　李艳东　贾林芝　厉小波　王立人　曲　迪　王　群
(华东师范大学生命科学学院, 上海　200062)

摘要:本文以甘油、二甲亚砜 (DMSO)为冷冻保护剂,采用两步降温法,以精子存活率和 DNA损伤程度为检验其冷冻效果的评价指标,研究了冷冻保护剂和预冷时间对河蟹 *Eriocheir sinensis*精子冷冻保存效果的影响。胰蛋白酶消化法获得河蟹游离精子,液氮冷冻保存 8h以上,精子保存密度为 10^7个 /mL,伊红染色法检测精子存活率,单细胞凝胶电泳 (SCGE)检测精子 DNA损伤。实验共设置 10个组,分别为不同浓度的单一冷冻保护剂 (每种保护剂的体积百分比分别为 5%、10%、12.5%、15%)和两种保护剂组合 (两种保护剂在同一实验组中的体积百分比含量均为 5%、10%)。结果显示,12.5%甘油的保存效果最佳,精子存活率达到 62.60 %。在此基础上,以 10%甘油作为冷冻保护剂,设置 5、10、20、30、40min 5个时间梯度,研究了预冷时间对精子冷冻保存效果的影响。结果显示预冷时间的长短对精子冷冻保存效果的影响显著,当预冷时间低于 20min时,精子大量死亡,且精子 DNA严重损伤;当预冷时间超过 30min时,精子存活率明显提高,精子 DNA损伤明显减弱。

关键词:中华绒螯蟹;河蟹;精子;冷冻保存;冷冻保护剂;二甲亚砜;甘油;单细胞凝胶电泳
中图分类号: Q172　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3207(2008)04-0579-07

精子的冷冻保存是遗传育种和种质资源保护的有效保障,但冷冻过程及冷冻保护剂均会对精子产生不同程度的损伤,其中包括精子 DNA损伤。而作为遗传物质的载体,精子 DNA的完整性是子代正常发育的必要保障。因此,冷冻保存过程中精子 DNA的损伤程度应该作为其保存效果的一个重要评价指标。单细胞凝胶电泳 (Single cell gel electrophoresis assay, SCGE)又称彗星试验 (Comet assay),是目前较有效的检测 DNA单链损伤的技术,因其灵敏度高、操作简便而受到亲睐[1—5]。中华绒螯蟹 (河蟹 *Eriocheir sinensis*)是我国重要的水产养殖品种,近年来有关该蟹雄性生殖生物学的研究已有少量报道[6],但该蟹精子冷冻保存方面的研究仍属空白。本文以甘油 (Glycerol)、二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)为冷冻保护剂,采用两步降温法,以精子存活率和 DNA损伤程度为检测其冷冻保存效果的评价指标,研究了冷冻保护剂和预冷时间对河蟹精子冷冻保存效果的影响,以期为将来深入开展甲壳动物精子冷冻保存的研究提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　取材　实验用二龄成熟雄蟹于 2006年 3月两次购自上海长风集贸市场,3%高锰酸钾浸泡消毒 20min,迅速解剖取出输精管,置于灭菌无钙离子人工海水 (Ca^{2+}-FASW) (NaCl 21.63g/L, KCl 1.12g/L, H_3BO_3 0.53g/L, NaOH 0.19g/L, $MgSO_4$ 4.93g/L,盐度 20, HCl调节 pH至 7.4)中,刺破输精管,挤出精荚,自然沉淀,弃上清,重复洗涤 3次,获得精荚,采用胰蛋白酶消化法[7]获得游离精子,置入灭菌的细胞冻存管 (2mL)中,调节精子密度至 (3—4) $\times10^8$个 /mL。

1.2　精子的冷冻保存及复苏

1.2.1　不同冷冻保护剂对精子冷冻保存的影响　以 DMSO和甘油作为冷冻保护剂,分别设置 10个不

收稿日期: 2007-01-23;**修订日期**: 2007-12-11
基金项目:国家自然科学基金项目 (30300265)资助
作者简介:陈东华 (1981—),女,汉族,山西太原人;硕士;现工作单位:上海生命科学研究院健康研究所。李艳东 (1979—),硕士,现工作单位:郑州市第一中学
通讯作者:王群 (1968—),男,教授; E-mail: qwang@bio.ecnu.edu.cn

同的保护剂浓度和保护剂组合,实验 1—4组分别含 DMSO (*V*/*V*) 5%、10%、12.5%、15%,实验 5—8组分别含甘油 (*V*/*V*) 5%、10%、12.5%、15%,实验 9组分别含 DMSO和甘油各 10% (*V*/*V*),实验 10组分别含 DMSO和甘油各 5% (*V*/*V*);此外,设置 3个对照组:对照 1组为新鲜精子,不经冷冻保存;对照 2组为未添加冷冻保护剂的新鲜精子,直接冷冻;对照 3组为未经胰蛋白酶处理的新鲜精荚,直接加入 10%甘油 (*V*/*V*)冷冻保存。

将精子样品置于细胞冻存管中,4℃下分别滴加冷冻保护剂至所需浓度,平衡 30min,检测各样品精子存活率 (平衡后存活率)。采用液氮两步降温法,第一次预冷 20min,样品离液氮表面 5cm,随后进行第二次预冷,样品接近液氮表面,时间为 5min,然后迅速放入 10L的液氮罐中冷冻保存 8h以上。冷冻复温后检测各样品的精子存活率 (冷冻后存活率)。同时,选取部分实验组,采用 SCGE法检测冷冻过程对精子 DNA的损伤。

1.2.2 第一次预冷时间对精子冷冻保存的影响 4℃下滴加甘油至 10% (*V*/*V*),平衡 30min后,将样品置于液氮表面 5cm处,分别以 5min、10min、20min、30min、40min 5个时间梯度进行第一次预冷,其余步骤与 1.2.1相同。

1.2.3 冷冻复温过程 取出冷冻样品迅速放入 55℃水浴中解冻 10—15s, Ca^{2+}-FASW洗涤 2次以去除保护剂,然后用 Ca^{2+}-FASW将样品稀释至 (3—4) ×10^7个 /mL, 4 ℃下备用待测。

1.3 检测方法

1.3.1 伊红染色法检测冷冻精子的存活率 伊红染色法检测精子存活率,染色终浓度为 0.5%,染色时间 10min,光镜下计算死亡精子数,并将所有发生形变和类似顶体反应的精子都作为死亡精子统计。每次随机计数 200个,分 4个随机计数点,每个点约计 50个[8],最后统计所有样品的精子存活率和精子密度。每实验组均设三个重复。

1.3.2 SCGE检测冷冻精子的 DNA损伤 按 Singh, *et al.* 方法[9]略加改进,具体方法如下:

用 Ca^{2+}-FASW配制 0.5%常温熔点琼脂糖 (NMA)溶液,加热熔化后,冷却至 45℃,取 100μL滴于洁净的载玻片上,立即盖上盖玻片,使琼脂糖均匀地敷在载玻片上,迅速置入 4℃ 10min。待琼脂糖冷却变硬,形成第一层胶,分别取 10μL各处理组精子悬液与 75μL 0.5%的低熔点琼脂糖 (LMA)溶液在 37℃下充分混匀,制成精子-低熔点琼脂糖悬液。取下第一层胶的盖玻片,迅速将该悬液滴于第一层琼脂糖表面,加盖玻片, 4℃ 10min使之硬化,形成第二层胶。随后,再次取下盖玻片,滴加 75μL 0.5% LMA,加盖玻片, 4℃ 10min冷却硬化,形成第三层胶。

取下盖玻片,将含有三层胶的玻片立即浸入预冷的裂解液 (2.5mol/L NaCl, 100mmol/L Na_2-EDTA, 10mmol/L Tris,调节 pH至 10后加入 1%肌氨酸钠,使用前加 1% TritonX-100和 10% DMSO), 4℃静置 1h,使细胞充分裂解并使 DNA松散。取出玻片,吸去表面液体,将上述处理过的玻片并列放置在水平电泳槽的阳极,加入预冷的电泳液 (1mmol/L Na_2-EDTA, 300mmol/L NaOH, pH > 13),液面高出玻片 2.5mm,静置 30min,以使 DNA充分解旋。之后, 4℃、25V、300mA电泳 20—30min。取出玻片并吸干水分,置于 0.4mol/L、pH 7.5的 Tris溶液中洗 3次,每次约 5min。随后分别加入 25μg/mL的 EB 50μL,盖上盖玻片,染色 15—20min。

汞灯激发波长为 580nm绿光,400倍荧光显微镜下观察、拍照获取彗星图像,用 CASP分析软件分析测量 DNA迁移的各种参数[10]:彗星拖尾长度 (L tail, Tail length inarbitrary units)、彗星尾部 DNA的相对含量 (Tail DNA, relative % of DNA in the comet tail)、尾动量 (TM, tail moment means integrated value of DNA density multiplied by the migration distance,即 L tail ×TailDNA)、Olive尾动量 (OTM, Olive tail moment means the product of the distance between the center of gravity of the head and the center of gravity of the tail and percent tail DNA即 TailDNA ×迁移 DNA中心密度)。

2 结 果

2.1 不同冷冻保护剂及浓度对河蟹精子冷冻保存效果的影响

不同冷冻保护剂对河蟹精子冷冻保存存活率的影响结果 (表 1)。

表 1　不同保护剂对冷冻保存河蟹精子存活率的影响(平均值 ±标准差)

Tab. 1　Viability rate of *Eriocheir sinensis* sperms preserved in the different cryoprotective solutions(mean ±S. E.)

组别 Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	对照 1 Control 1	对照 2 Control 2	对照 3 Control 3
二甲亚砜 DMSO (%)	5	10	12.5	15	0	0	0	0	10	5	0	0	—
甘油 Glycerol (%)	0	0	0	0	5	10	12.5	15	10	5	0	0	10
初始存活率 Undealt (%)	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83	95.59 ±1.83
平衡后存活率 Cryoprotected (%)	90.87 ±1.91^{b}	89.96 ±6.57^{b}	83.62 ±2.73^{c}	78.94 ±4.31^{d}	94.97 ±2.15^{a}	92.67 ±3.75^{a}	91.76 ±1.75^{b}	91.01 ±2.76^{b}	91.11 ±3.19^{b}	90.87 ±2.97^{b}	95.59 ±1.83^{a}	95.42 ±2.60^{a}	—
降幅 Descent extent (%)	4.94	5.89	12.52	17.42	0.93	3.05	4.01	4.79	4.69	4.94	0.00	0.18	—
冷冻后存活率 Cryopreserved (%)	53.10 ±4.9^{b}	47.64 ±5.66^{b}	31.53 ±2.52^{c}	3.50 ±0.78^{d}	37.32 ±4.66^{c}	46.71 ±5.67^{b}	62.60 ±2.47^{b}	43.70 ±5.12^{b}	15.00 ±1.57^{d}	6.78 ±0.58^{d}	95.52 ±1.53^{a}	4.07 ±0.73^{d}	80.14 ±3.40^{a}
总降幅 Total descent extent(%)	44.45	50.20	67.05	96.34	60.98	51.15	34.51	54.28	84.31	92.99	0.0	95.82	16.16

注:One-way ANOVA,LSD Duncan,多因子比较 ($p < 0.05$)

Note: One-way ANOVA, LSD Duncan multiple comparison ($p < 0.05$)

冷冻保护剂平衡后精子存活率的变化　从表 1 可见,在加入冷冻保护剂平衡 30min后,各组精子存活率即出现不同程度的下降。实验 5组 (5%甘油组)精子存活率的降幅最小,仅为 0.93%,而实验 4组 (15% DMSO 组)降幅最大,达到 17.42%。在单纯添加 DMSO的实验组中 (1—4组),随添加量的增加其精子存活率的降幅不断增大,从 4.94% (1组)上升至 17.42% (4组)。在单纯添加甘油的实验组 (5—8组)中,精子存活率的总体降幅相对较小,最大添加量的实验 8组降幅 (4.79%)虽最大,但仍低于 DMSO最低浓度组 (1组)。实验 9、10组为同时添加甘油和 DMSO的实验组,其降幅仅接近 DMSO浓度最低组 (1组)。对照 1组和对照 2组因未添加任何保护剂,故其精子存活率无变化。

冷冻后精子存活率的变化　对照 1组因未经冷冻保存,故精子存活率基本无变化,而经冷冻保存后复温的其他各组精子存活率均出现大幅下降。对照 2组因未添加任何冷冻保护剂直接冷冻,故其精子存活率仅为 4.0%,几乎完全死亡;对照 3组是以精荚的形式添加 10%甘油冷冻保存,其精子存活率达到 80.14%,高于所有其他实验组。在各实验组中,以实验 7组 (甘油,12.5%)降幅最小,为 34.51%;其次为实验 1组,降幅为 44.45%;实验 2、6、8组降幅较接近,分别为 50.2%、51.15%和 54.28%;而实验 4组和实验 10组的降幅超过 90%,表明绝大部分精子已经死亡。

从同一添加浓度、不同保护剂之间的比较发现,在 5%添加量的情况下,DMSO (1组)的精子存活率降幅小于甘油 (5组),而至 10%时两者相近 (2组和 6组),至 12.5%时甘油 (7组)的降幅明显小于 DMSO (3组),当达到 15%时 DMSO (4组)的降幅达到了 95.57%,而甘油 (8组)亦达到了 51.98%。从同一保护剂、不同添加浓度之间的比较发现,随着 DMSO添加量的增加,精子存活率的降幅呈现快速增高的趋势;甘油则表现出先下降后升高的趋势,其中实验 7组的降幅最小。此外,以等比例添加甘油和 DMSO的实验组 (实验 9、10组),其精子存活率均较低。

精子冷冻保存后的 DNA损伤检测　根据上述结果,选取对照 1组以及 10%甘油、10% DMSO、5%甘油 +5% DMSO、10%甘油 +10% DMSO各组,采用 SCGE方法检测其精子冷冻保存后的 DNA损伤程度 (表 2)。对照 1组 (未经冷冻)经电泳后,其 DNA

在电场中几乎不泳动,染色后呈圆形的荧光团,无拖尾现象(图 1.1),其余各实验组均出现不同程度的拖尾现象,其中 10%甘油组和 10%DMSO组的电泳图(图 1.2、1.3)。

从表征 DNA损伤程度的各项指标来看,对照 1组的 4项指标均显著低于其他各实验组。在所选取的 4个实验组中,10% DMSO实验组的拖尾长度达到 237.84,其损伤程度最大,而 10%甘油实验组各项指标均低于其他实验组,表明其对精子的保存效果相对较好。

表 2 河蟹精子冷冻保存后 DNA损伤的彗星分析(平均值 ±标准差)*

Tab.2 Comet assays of DNA damage of *Eriocheir sinensis* sperms after cryopreservation (mean ±S.E.)

组别 Group	L tail	Tail DNA	TM	OTM
对照 1 Control 1	21.35 ±11.33	4.03 ±2.51	0.64 ±0.25	1.48 ±0.31
10%甘油 10% Glycerol	130.23 ±48.68	8.41 ±4.39	3.75 ±2.07	3.89 ±1.99
10%二甲亚砜 10% DMSO	237.84 ±86.05	16.09 ±3.61	9.45 ±3.66	7.51 ±2.47
5%甘油 +5%二甲亚砜 5% Glycerol +5% DMSO	148.07 ±42.51	11.53 ±1.99	8.92 ±4.76	6.67 ±2.65
10%甘油 +10%二甲亚砜 10% Glycerol +10% DMSO	193.03 ±71.63	14.08 ±2.88	9.88 ±5.79	7.21 ±4.43

* 表中数据是以图片像素大小表示的 DNA损伤的彗尾相对长度或大小

* The data that denote the relative length or size of comet tail caused by DNA damage based on its picture pixels

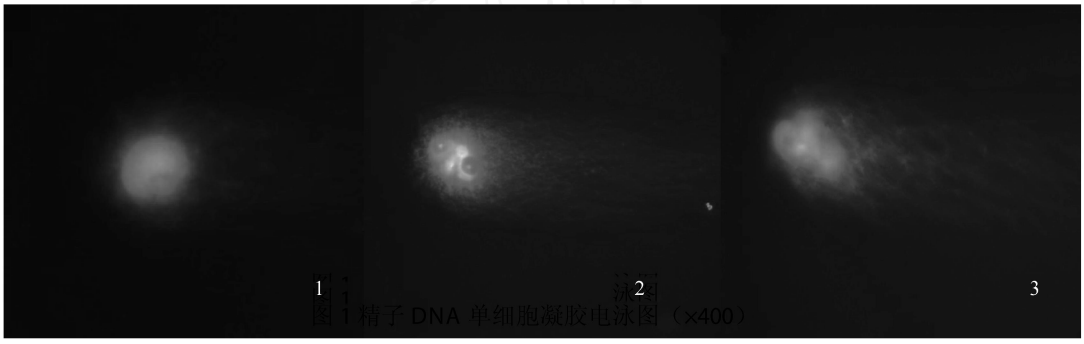

图 1 精子 DNA单细胞凝胶电泳图(×400)

Fig.1 Electrophoretic images of DNAs of *Eriocheir sinensis* sperms using SCGE (×400)

1. 对照; 2. 10%甘油冷冻保存效果; 3. 10%DMSO冷冻保存效果

1. Control group; 2. 10% Glycerol; 3. 10% DMSO

2.2 第一次预冷时间对河蟹精子冷冻保存效果的影响

不同预冷时间对河蟹精子冷冻后存活率的影响结果(表 3)。随着预冷时间的增加存活率呈现递增的趋势,其中以实验 1组存活率最低,仅为(5.90 ±2.47)%,实验 5组最高,达 49.38%,但与实验 4组差异不显著。

表 3 不同预冷时间对河蟹精子冷冻保存存活率的影响(平均值 ±标准差)

Tab.3 Viability rate of *Eriocheir sinensis* sperms preserved with different prefreezing time (mean ±S.E.)

组别 Group	1	2	3	4	5
预冷时间 Prefreezing time (min)	5	10	20	30	40
存活率 Viability rate (%)	5.90 ±0.47^{a}	33.09 ±3.83^{b}	44.17 ±2.20^{c}	48.73 ±1.56^{d}	49.38 ±0.54^{d}

注: One-way ANOVA, LSD Duncana多因子比较($p < 0.05$)

Note: One-way ANOVA, LSD Duncan multiple comparison ($p < 0.05$)

不同预冷时间对河蟹精子冷冻后 DNA 的损伤结果(表 4)。从拖尾长度来看,随着预冷时间的增加,其拖尾长度呈现下降趋势,其中实验 1组 L tail 值达到 87.36,显著高于其他各组;实验 2组和实验 3组相对较接近,分别为 42.91和 47.36,两者间无显著差异;而实验 4组和 5组分别为 16.93 和 17.18,两者间亦无显著差异,但显著低于其他各实验组。

表 4　不同预冷时间下冷冻保存河蟹精子 DNA彗星分析(平均值 ±标准差)*

Tab.4　Comet assays of DNA damage of *Eriocheir sinensis* sperms preserved with different prefreezing time (mean ±S.E)

组别 Group	L tail	Tail DNA	TM	OTM
1	87.36 ±10.49	7.97 ±0.99	3.31 ±0.46	1.83 ±0.24
2	42.91 ±4.76	6.96 ±0.76	1.28 ±0.13	1.89 ±0.19
3	47.36 ±3.49	5.97 ±0.69	1.31 ±0.26	1.83 ±0.14
4	16.93 ±2.25	5.97 ±0.48	0.18 ±0.02	0.79 ±0.08
5	17.18 ±1.63	4.73 ±0.35	1.11 ±0.18	1.58 ±0.19

* 表中数据是以图片像素大小表示的 DNA 损伤的彗尾相对长度或大小

* The data that denote the relative length or size of comet tail caused by DNA damage based on its picture pixels

3　讨　论

3.1　不同冷冻保护剂及浓度对河蟹精子冷冻保存效果的影响

冷冻保存必须添加合适的冷冻保护剂,以确保冷冻保存后细胞的活力,而正确选择冷冻保护剂的种类和浓度、适宜的冷冻保存方法,将直接影响冷冻保存的效果。目前最常用的冷冻保护剂主要有二甲亚砜(DMSO)、甲醇、乙二醇和甘油等[11]。

甘油和 DMSO 是许多水生无脊椎动物精子良好的冷冻保护剂[12,13]。Chow, *et al.* 以 10%的甘油成功地用于罗氏沼虾精荚的冷冻保存[13]。而柯亚夫等[14]则用含有 10 % DMSO 和 5% —10%甘油的稀释液冷冻保存中国对虾的精子,其存活率达到 60%,受精率达到 59%。然而,研究证实,冷冻保护剂本身对精子也有一定的损伤作用[15],过多的甘油可使精子膜起皱而引起精子死亡,而 DMSO 虽具渗透性强、易渗入细胞等特性,但对细胞的毒性作用十分显著[16]。本实验发现,在加入冷冻保护剂平衡 30min后,甘油和 DMSO 即已对精子造成一定的损伤,相同浓度下 DMSO 对精子的损伤作用明显高于甘油,且 DMSO 对精子的损伤程度随其浓度增加而加强。因此,DMSO 只适合低浓度下使用,这与 Anchordoguy, *et al.*[17]对锐脊单肢虾精子冷冻保存的研究结果相似。

从冷冻后的精子存活率来看,所有实验组中以 12.5%的甘油保护效果最佳,其冷冻后的存活率可达 62.6%,降幅仅为 34.51%,其次为 5%DMSO 实验组。而 Bhavanishankar, *et al.*[12]对锯缘青蟹精子的研究同样认为,甘油的冷冻保存效果明显优于 DMSO,并认为其精子对甘油的忍受能力高于 DMSO。

此外,已有的研究证实,不同保护剂按一定比例混合,其冷冻保护效果更占优势[16]。而本实验则发现,“5%甘油 +5%DMSO ”及“10%甘油 +10%DMSO ”实验组的精子存活率仅为(15.0 ±5.57)%和(6.7 ±5.8)%,明显低于某些浓度的单一保护剂(如 12.5%甘油),这可能与本实验所设计的浓度梯度过少,未找到较为合适的比例及浓度有关,因而有必要对两种保护剂的最佳组合进行更深入的研究。

3.2　不同预冷时间对河蟹精子冷冻保存效果的影响

Chow, *et al.*[8]在对罗氏沼虾精荚长期冷冻储存的研究中发现,精荚冷冻前需置于液氮表面进行 5—10min的预冷;Anchordoguy, *et al.*[17]亦发现,锐脊单肢虾精子在 -30℃中预冷后可获得理想的存活率;但 Bhavanishankar, *et al.* 却认为,锯缘青蟹精子分别在 -30℃和 -50℃中预冷后浸入液氮的存活率没有明显差异[12]。本实验证实,若精子在液氮表面预冷时间少于 20min,其冷冻损伤显著,若大于 40min其损伤明显降低,但与 30min之间差异不显著;而 SCGE的检测同样发现,预冷时间少于 30min,其 DNA损伤明显。因此,预冷时间对河蟹精子冷冻保存质量具有重要影响。

3.3　精荚壁在精子冷冻保护中的作用

精荚壁是包裹精子的一层非细胞结构,研究证实,甲壳动物的精荚壁具有防脱水、抗菌、营养等作

用[18—20],对精子起到了很好的保护作用。为此,部分学者尝试利用精荚直接进行精子的保存。Ishida, *et al*.[21]和 Ting, *et al*.[22]研究发现,巨螯虾属(*Homarus*)和长毛对虾(*P. penicillatus*)的精荚在保存289d后,精子的形态正常且能发生顶体反应,并将之用于人工授精,而用精子直接保存则出现精子退化和细菌的大量生长[21]。而 Jeyalectumie, *et al*.[23]亦发现,锯缘青蟹的精荚在 -79℃和 -196℃贮存30d后,其精荚中的精子仍能保持较好的活力。而本实验中作为对照的精荚冷冻保存结果发现,其保存后的精子存活率远高于其他各实验组,说明用精荚冷冻保存的效果要明显优于精子直接冷冻保存。因此,有必要进一步开展有关精荚冷冻保存的研究,以最大限度提高冷冻精子的存活率。

3.4 冷冻过程的 DNA 损伤

通常认为冷冻条件下 DNA 比较稳定,其完整性不易被破坏。Steele, *et al*.[24]对冰冻保存的人精液标本进行了 SCGE 分析,结果未显示冷冻对精子遗传物质的影响;但徐西长等[25]在对真鲷精子的低温冷冻保存研究中发现,用 30%DMSO 冷冻保存后,精子 DNA 损伤状况与鲜精差异明显。本实验发现,加入冷冻保护剂的精子与鲜精相比其 DNA 已出现不同程度的损伤,而冷冻后对河蟹精子 DNA 的损伤程度更大,其中 10%DMSO 保存的精子 DNA 损伤最为明显。因此,在评价甲壳动物精子冷冻保存效果时,不仅要关注其存活率,同时更应关注冷冻对精子 DNA 的损伤。

参考文献:

[1] Ostling O, Johanson K J. Microceletronphoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, **123**: 291—298

[2] Singh N P, Danner D B, Tice R R, *et al* A bundant alkali sensitive sites in DNA of human and mouse sperm [J]. *Exp Cell Res*, 1989, **184** (2): 461—470

[3] Zhang Y M, Wang Y Q, Yu R L, *et al* Effects of heavy metals Cd^{2+}, Pb^{2+} and Zn^{2+} on DNA damage of Loach Misgurnus anguillicandatus [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (4): 399—403 [张迎梅,王叶青,虞国六,等. 重金属 Cd^{2+}、Pb^{2+}和 Zn^{2+}对泥鳅 DNA 损伤的研究. 水生生物学报, 2006, **30** (4): 399—403]

[4] Xue L Y, Li L, Nie S P, *et al* Studies on DNA damage of the blood cells in Carassius auratus induced by Phenol and Hydroquinone [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (2): 241—243 [薛良义,李卢,聂松平,等. 苯酚和对苯二酚对鲫血细胞 DNA 损伤的研究. 水生生物学报, 2006, **30** (2): 241—243]

[5] Li X N, Han Y L, Deng R P, *et al* Effects of Tributyltin on DNA dmage of gill cell from *Saccostrea cucullata* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29** (3): 336—339 [李兴暖,韩雅莉,邓瑞鹏,等. 三丁基锡对牡蛎鳃细胞 DNA 损伤的研究. 水生生物学报, 2005, **29** (3): 336—339]

[6] Wang Q, Ma Q, Li K, *et al* Effects of Dietary Zinc on development of reproductive system of male Chinese Mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29** (4): 417—423 [王群,马强,李恺,等. 饲料中添加不同含量的微量元素锌对河蟹雄性生殖腺的影响. 水生生物学报, 2005, **29** (4): 417—423]

[7] Ma Q, Wang Q, Li K. Comparative study of trypsinase digestion and homogenization in acquiring gree sperms from *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of East China Normal University* (Natural Science), 2006, **3**: 113—118 [马强,王群,李恺,等. 酶消化法和匀浆法获得河蟹游离精子的比较研究. 华东师范大学学报(自然科学版), 2006, **3**: 113—118]

[8] Leung T J R, Lawrence A L. Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus serilferus* under laboratory conditions [J]. *Aquaculture*, 1987, **65**: 363—370

[9] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exptl Cell Res*, 1988, **175**: 184—191

[10] Konca K, Lankoff A, Banasik A, *et al* A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay [J]. *Mutat Res*, 2003, **534** (1—2): 15—20

[11] Mitsutoshi Y. Conservation of sperms: current status and new trends [J]. *Animal reproduction Science*, 2000, **60—61**: 349—355

[12] Bhavanishankar S, Subraminiam T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forskal) [J]. *J Exp Zool*, 1997, **277**: 326—333

[13] Chow S, Taki Y, Ogasawara Y. Cryopreservation of spermatophore of the freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Biol Bull*, 1985, **158**: 471—475

[14] Ke Y F, Cai N E. Cryopreservation of spermatozoa from the marine shrimp penaeus chinensis [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1996, **27** (2): 187—193 [柯亚夫,蔡难儿. 中国对虾精子超低温保存的研究. 海洋与湖沼, 1996, **27** (2): 187—193]

[15] Watson P F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen [J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, **60—61**: 481

[16] Hua Z Z, Ren H S. The Technique of Cryobiology and Crymedicine [M]. Beijing: Academic Press 1994, 149—175 [华泽钊,任禾盛. 低温生物医学技术. 北京:科学出版社. 1994, 149—175]

[17] Anchordoguy T J, Crowe J H, Griffin F J, *et al* Cryopreservation of sperm from the marine shimp, *Sicyonia ingentis* [J]. *Cryobiology*, 1988, **25**: 238—243

[18] Sasikala S L, Subramoniam T. On the occurrence of acid mueopolysaceharides in the spermatophores of two marine prawns, *Penaeus indicus* (Miline Edwards) and *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) (Crus-tacean: Macmra) [J]. *Exp Mar Bio Ecol*, 1987, **113**: 145—153

[19] Subramonian T. Spermatophores and Sperm Transfer in *Marine*

Crustacean, Advances in marine biology [J]. *Academic Press Limited*. 1993, **29**: 129—215

[20] Hinsch G W. Structure and chemical content of the spermatophores and seminal fluid of reptantian decapodss [A]. In: Bauer R T, Martin J W (Eds), Crustacean sexual biology [M]. New York: Columbia University Press. 1991, 290—307

[21] Ishida T, Talbot P, Kooda M C. Technique for the long-term storage of lobstr (Homarus) spermatophores [J]. *Gamete Res*, 1986, **14**: 183—195

[22] Ting Y Y, Lin M N, Tzeng B S, *et al*. Studies on the cryopreservation of spermmtophore and vas deferens of red-tail shrimp, Ptrtaeus penicil-latus [J]. *Bull Taiwan Fish Res Inst*, 1990, **49**: 189—195

[23] Jeyalectumie C. Subramoniam T. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab scylla serrata [J]. *Biol Bull*, 1989, **177**: 347—253

[24] Steele E K, Meclure N, Lewis S E. Comparison of the effects of the two method cryopreservation on testicular sperm DNA [J]. *Fertil Steril*, 2000, **74** (3): 450—453

[25] Xu X Z, Ding F H, Li J. Cryopreservation caused sperm DNA damage in red sea bream (*Pagrosamus major*) and its detection [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, **36**: 221—225 [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精子 DNA 损伤. 海洋与湖沼, 2005, **36**: 221—225]

CRYOPRESERVATION OF *ERIOCHEIR SINENSIS* SPERMS (IN VITRO) WITH DIFFERENT CRYOPROTECTIVE SOLUTIONS AND PREFREEZING TIME

CHEN Dong-Hua, LI Yan-Dong, JIA Lin-Zhi, LI Xiao-Bo, WANG Li-Ren, QU Di and WANG Qun

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062)

Abstract: As for genetic breeding and conservation of biotic germplasm resources, the cryopreservation of sperms serves as an effective protection. However, the process of cryopreservation and cryoprotective solutions both enable to cause damage of sperms to some extent, including DNA damage of sperms. Anyhow, serving as vectors of genetic information, the integrity of DNA is necessary for the normal development of offspring. Therefore, the extent of DNA damage caused during cryopreservation can be used as an important index to evaluate the cryopreservative effects. In this study, sperms of *Eriocheir sinensis* cryopreserved in glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) (*in vitro*) were detected for the cryopreservation effects with different cryoprotective solutions and prefreezing times. Viability rate and DNA damage of sperms were betaken as evaluation indices. Sperms of *Eriocheir sinensis* were acquired by trypsinase digestion and cryopreserved in the liquefied nitrogen for over 8 hours with sperm density at 10^7 sperm/mL. Meanwhile, viability rate of sperms was assessed by eosin stain and DNA damage was detected by single cell gel electrophoresis (SCGE). Ten experimental groups and three control groups were set. Those ten groups were four glycerol and DMSO scalar solutions (for each) (5%, 10%, 12.5%, 15%) and two composite solutions with equivalent glycerol and DMSO (5%, 10%). Results revealed that cryoprotective solution with 12.5% glycerol was optimum for cryopreservation of *Eriocheir sinensis* sperms (*in vitro*), where viability rate reached to 62.60%. Furthermore, cryoprotective solution with 10% glycerol was used to study its cryopreservation effects with different prefreezing times and five time gradients (5, 10, 20, 30 and 40 min) were set. It revealed that prefreezing time had a conspicuous influence on cryopreservation effects, i.e. sperms were thorough dead with overwhelming DNA damage after less than 20 min' prefreezing, however, viability rate of sperms ascend obviously with DNA damage decreasing distinctly when prefreezing time was over 30min.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Spermatozoa; Cryoprotective solution; Glycerol; DMSO; SCGE