

伊红、台盼蓝检测河蟹精子存活率的比较

马强 丁银娣 曲迪 李嘉尧 孙菊香 王群*

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要: 对台盼蓝和伊红染色法检测河蟹(*Eriocheir sinensis*)精子存活率的方法进行了评价研究。结果表明,两种染色法死、活精子分别呈现出明显不同的染色特征:活精子无色透明,顶体中央凸起呈圆锥状,光镜下辐射臂及细胞边界清晰;死亡精子顶体着色,且中央有一染色较深的圆斑,核杯染色不明显,细胞体积变大,边界模糊。通过不同染色时间和不同染料浓度的比较发现,两种染色法最适染液浓度分别是0.25%的伊红和0.5%的台盼蓝,染色时间均以15 min为佳。在此基础上,将新鲜精子和60℃水浴处理致死精子以不同的体积比混合,配成含致死精子比例为10%~90%的9个梯度样品,用伊红和台盼蓝分别测定各样品精子死亡率,并进行相关性分析。结果发现,各样品实测精子死亡率均略高于样品的理论死亡率,同时两种染色法实测值与样品理论值呈显著正相关($P < 0.05$),两种染色法之间亦呈显著正相关($P < 0.05$)。上述结果表明,伊红和台盼蓝可用于河蟹精子的活体染色,且两种染色法在对河蟹精子染色中具有一定的稳定性和可比性。

关键词: 河蟹(中华绒螯蟹)精子存活率;台盼蓝;伊红

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)04-65-05

Evaluation of Sperm Viability Rate of *Eriocheir sinensis* Stained by Eosin and Trypan Blue

MA Qiang DING Yin-Di QU Di LI Jia-Yao SUN Ju-Xiang WANG Qun*

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

Abstract Sperm quality evaluation is an important part in male reproductive biology. In spite of numerous studies on mammalian and fish, there are few related reports on crustacean, even no reports on Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*). Eosin staining and trypan blue staining are two common methods for detecting cellular viability rate and both are used for evaluation of sperm quality. In this paper, sperm viability rate of *E. sinensis* was investigated with eosin staining and trypan blue staining. The results showed that there were significant differences of staining characters between dead and live spermatozoas: the live ones were transparent, while the dead ones were stained easily by either dye. We found that 0.25% eosin solution and 0.5% trypan blue solution stained the most effectively, and the optimum reaction time was 15 min. We also showed that there was positive correlation between practical and theoretical values when either of the two dyes was used ($P < 0.05$) and there was also positive correlation between these two staining methods ($P < 0.05$). These results suggested that both eosin staining and trypan blue staining were suitable for evaluation of sperm viability rate of Chinese Mitten Crab.

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30300265, 30271012);

* 通讯作者, E-mail: qwang@bio.ecnu.edu.cn;

第一作者介绍 马强,男,硕士,研究方向:水生生物生殖营养学, E-mail: mq81_cn@163.com。现工作单位:崇明东滩鸟类国家级自然保护区。

收稿日期:2006-09-11, 修回日期:2007-04-16

Key words : *Eriocheir sinensis* ; Sperm viability rate ; Trypan-blue ; Eosin

鉴于河蟹(中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis*)在我国水产养殖业中的重要地位以及近年来日益严重的种质下降、资源混杂等现象,河蟹种质资源保护、种质复壮以及与此密切相关的生殖生物学研究越来越受到人们的重视。甲壳动物生殖生物学的研究普遍存在雄性严重滞后于雌性的现象,其原因除了与雌体在生殖中的特殊作用(如抱卵、为胚胎发育提供营养等)外,很大程度上与虾蟹类缺乏有效的精子质量评价体系有关。目前,哺乳动物精子质量评价的研究较深入且技术相对成熟^[1-3],而甲壳动物却鲜见报道^[4,5],且均直接借鉴哺乳动物的相关技术和方法,未针对甲壳动物自身的特点就方法的适用性进行探讨。为此,本文就伊红、台盼蓝对河蟹精子活体染色效果、适用性以及精子质量评价中应用的可靠性进行了研究,确定了这两种染色剂检测河蟹精子存活率的最适浓度和最佳染色时间,为今后河蟹精子质量的深入研究以及河蟹精子质量评价体系的逐步建立提供重要参考。

1 材料与方 法

1.1 游离精子的获得 实验用蟹于 2004 年 8 月购自上海市长风集贸市场,均为健康活泼的未交配成熟雄性个体。活体解剖后迅速取出输精管,刺破贮精囊获得精英,将所获精英用浓度为 0.125% 的胰蛋白酶 (Trypsin 1:250 购自上海华美生物工程公司)于 37℃ 孵育 10 min,小牛血清终止反应,400 r/min 离心 10 min,取上清,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,所获沉淀用无钙离子人工海水 (Ca^{2+} -FASW)^[6]洗涤 3 次,最后加 5 ml Ca^{2+} -FASW,振荡混匀^[7]获得实验用游离精子。血细胞计数板计算精子密度,使用前调节精子密度至约 2×10^6 个/ml。

精子致死处理:参照 Gliozzi^[8]及管卫兵^[9]的方法,将新鲜精子于 60℃ 水浴处理 15 min 致死。

1.2 精子染色特征的判断以及精子死亡率的

计数方法 用无钙离子人工海水 (Ca^{2+} -FASW)分别配制成 2% 的台盼蓝、伊红贮存液,使用时根据需要稀释至所需浓度。

参照 Jeyalectumie^[5]及柯亚夫^[10]等方法,采用倍比稀释法对伊红设置了 4 个染液浓度,由于 1% 及 0.125% 的台盼蓝染色时死、活精子难以分辨,故台盼蓝仅设 2 个浓度。

精子染色特征的判断:取新鲜精子和致死精子,分别用台盼蓝 (0.5%) 和伊红 (1%) 室温染色 15 min,显微镜观察并拍照,分别确定死精子和活精子各自的染色特征。

精子死亡率的统计:染色完成后,吸取一定量的样品制成临时封片,根据已确定的死精子的染色特征,光镜 400 倍下随机检测 300 个精子中的死亡精子个数,统计样本死亡率。

1.3 不同染料浓度和染色时间下精子死亡率的比较 取新鲜精子用不同浓度的伊红 (1%、0.5%、0.25%、0.125%) 台盼蓝 (0.5%、0.25%) 于室温染色,每一染液浓度又分设 5、15 和 30 min 3 个不同的染色时间。染色完成后,统计各样本精子死亡率。

1.4 两种染色法相关性比较 测定新鲜精子和 60℃ 水浴处理致死精子的密度,调节至两者密度相似。将两者以不同的体积比混合,配成含有致死精子百分率分别为 10% ~ 90% 的 9 个梯度样品,作为该样品的理论死亡率。鉴于新鲜精子的存活率不可能达到 100%,故所配样品的实际精子死亡率略高于理论死亡率。根据实验 1.3 结果,选择最适的伊红和台盼蓝染色浓度及时间,分别测定各样品实际精子死亡率,并进行相关性分析。

实验数据用“平均数 ± 标准差”表示,采用 Deuncan 单因素方差分析法比较 2 种活体染色法的死亡率, Pearson 相关性分析法比较 2 种染色法相关系数。应用 SPSS 11.0 软件 *t*-检验方法进行数据处理。

2 结 果

2.1 精子染色特征 用伊红和台盼蓝分别染

色后,死、活精子的染色特征差异明显。伊红染色后,活精子在光镜下细胞界限清晰可辨,细胞表面吸附有大量的染料颗粒,呈现一粉红色的环状结构,辐射臂放射状排列于细胞表面;核杯呈极薄的环状结构包裹顶体,无色透明,具有较强的折光性;顶体球形,中央凸起呈圆锥状结构为头帽。死亡精子的细胞体积明显大于活精子,且细胞边界模糊,细胞表面未见染料颗粒附

着,辐射臂完全消失;核杯呈较厚的环状结构包裹顶体,折光性弱,而核杯的增厚是导致整个细胞体积明显增大的主要因素;顶体亦呈球形,与活精子顶体相比体积没有明显变化,但整个顶体被伊红明显着色,且头帽中央有一深红色圆斑(图 1:a)。台盼蓝染色结果基本与伊红相似(图 1:b)。

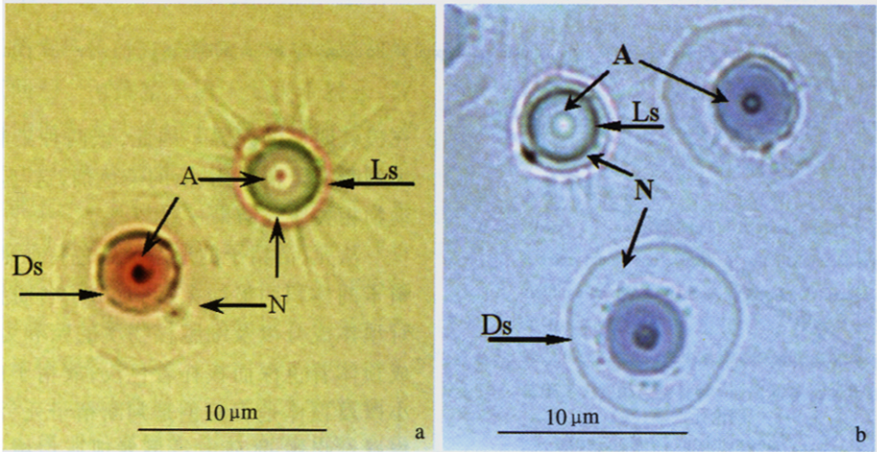


图 1 伊红(a)和台盼蓝(b)染色后的死、活精子染色特征

Fig.1 Sperms of *Eriocheir sinensis* stained by eosin (a) or trypan blue (b)

N:核 nucleolus; A:顶体 acrosome; Ds:死精子 dead sperm; Ls:活精子 live sperm.

2.2 不同染色法精子死亡率的比较 两种染料不同终浓度及染色时间的精子死亡率结果见表 1。不同染液浓度下精子死亡率均随着染色时间的延长而增加,至 30 min 时增幅明显,其中伊红的增幅尤甚。

伊红实验组同一染色浓度下,30 min 实验组的精子死亡率显著高于 5 min 时的对应浓度组($P < 0.05$),但与 15 min 对应浓度组比较发现,仅 1.0%和 0.50%组之间存在显著差异($P < 0.05$);而 5 min 和 15 min 各对应组之间均无显著差异($P > 0.05$)。同一染色时间下,1%伊红实验组的精子死亡率均明显高于其他各实验组($P < 0.05$),而 0.25%、0.125%伊红组之间差异不显著($P > 0.05$);0.5%伊红组在 5 min 的死亡率与其他各组均无显著差异($P > 0.05$),15 min 时则显著高于 0.125%伊红组($P <$

0.05),30 min 时与 1%伊红组之间无显著差异($P > 0.05$),但显著高于其他各组($P < 0.05$)。

台盼蓝实验组的结果与伊红明显不同,其在不同浓度和不同染色时间的情况下,各组间精子死亡率均无显著差异($P > 0.05$)。此外,在同一染色时间下,与 0.25%和 0.125%的伊红组之间亦无显著差异。

2.3 不同染色方法相关性比较 根据上述结果,将含有不同比例死亡精子的样本分别用伊红(终浓度 0.25%)和台盼蓝(终浓度 0.5%)染色 15 min,结果见图 2。两种染色方法测得的精子死亡率均高于理论值,虽然略有波动,但都随着样品中死亡精子比例的增加而升高。Pearson 法相关性检验结果表明,台盼蓝法和伊红法测得的精子死亡率分别与理论值显著正相关($R = 0.99, P < 0.05$; $R = 0.99, P < 0.05$),而两种

表 1 两种染液在不同染色条件下精子死亡率的比较

Table 1 Comparison of sperm death rate evaluated by two staining methods under different conditions

时间 Time (min)	死亡率 Death rate (%)					
	伊红 Eosin				台盼蓝 Trypan blue	
	1%	0.50%	0.25%	0.125%	0.5%	0.25%
5	6.17 ± 2.29 ^{AA}	5.58 ± 2.35 ^{AB}	3.91 ± 0.99 ^{AB}	4.17 ± 1.53 ^{AB}	4.17 ± 1.80 ^{AB}	4.00 ± 1.76 ^{AB}
15	6.83 ± 2.62 ^{AA}	5.83 ± 1.80 ^{AB}	4.58 ± 1.16 ^{ABC}	4.33 ± 0.07 ^{AB}	4.43 ± 0.94 ^{AC}	4.08 ± 1.44 ^{AC}
30	11.17 ± 3.07 ^{BA}	10.92 ± 2.44 ^{BA}	5.16 ± 1.40 ^{BB}	5.33 ± 1.30 ^{BB}	4.92 ± 1.16 ^{AB}	4.92 ± 1.05 ^{AB}

小写字母表示同一浓度下染色时间间的差异显著性,大写字母表示同一时间下染色浓度间的差异显著性(Duncan 多重比较, $P < 0.05$)

Small letter means significant difference in the same column and capital letter means significant difference in the same row (Duncan multiple comparison, $P < 0.05$).

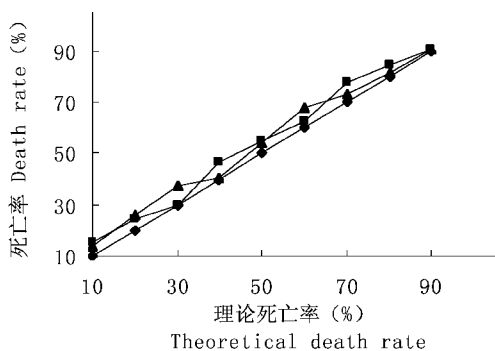


图 2 两种染液检测不同比例死、活精子混合样本的死亡率及相关性比较

Fig. 2 Death rate of sperms with different mixture ratios of fresh and dead samples

■ 0.5% 台盼蓝; ▲ 0.25% 伊红; ◆ 理论值。
 ■ trypan-blue staining; ▲ eosin staining;
 ◆ theoretical proportions of dead cell.

染色法之间亦显著相关($R = 0.98$, $P < 0.05$)。

3 讨论

精子质膜是精子最外层的细胞结构,对于细胞内、外环境起着生理屏障的作用^[11],膜完整性是精子维持正常生理功能的基础和基本条件。因此,精子膜的完整性常作为评价精子质量的最基本指标,而活体染色剂是目前判断精子质膜完整性最简便的方法之一,台盼蓝和伊红则是其中最常用的精子活体染色剂^[12,13]。

3.1 检测河蟹精子存活率的适用性 经过台盼蓝和伊红染色后,活精子未着色,而死精子则在相应部位着色,且死、活精子在染色特征上存

在极其明显的差异。因此,该两种染料可以作为判断河蟹精子死、活的染色剂,这与其他甲壳动物相关研究结果一致^[5,9,10]。

从死、活精子的形态及染色特征来看,死亡精子的体积明显增大,同时由于台盼蓝和伊红对顶体成分以及细胞核物质的亲和力不同,造成顶体着色深而核杯着色浅,故精子的体积大小以及顶体是否着色是判断精子死、活的主要指标。此外,本研究结果发现死亡精子的辐射臂全部消失,这可能与精子致死的方法有关,精子辐射臂极其纤细,加热可能导致辐射臂蛋白质的变性消失,故死亡精子辐射臂的消失可能由人为因素造成。

3.2 最适检测浓度和相关性分析 通过不同染色剂浓度、不同染色时间的比较研究发现,染色剂浓度和染色时间对精子死亡率的检测结果影响较大,染色剂的浓度越高、染色时间越长,所测得精子死亡率值越高,而过低的染料浓度和过短的染色时间会使精子染色不充分,从而造成死、活精子判断上的困难,甚至无法分辨。染色剂浓度过高、染色时间过长所造成的死亡率上升,与染料自身的毒性相关。此外,差异性分析结果表明,伊红和台盼蓝的最适染色浓度分别为 0.25% 和 0.5%,其染色时间均以 15 min 为佳。

相关性比较的结果发现,各样品精子死亡率的实测值均高于配制样品时的理论值,这与新鲜精子本身存在一定的死亡率有关。而相关性分析发现,用 0.5% 的台盼蓝和 0.25% 的伊

红染色 15 min 后 ,9 个不同死亡率精子样品的实测值与样品的理论值之间显著正相关 ,同时两种染料所测结果之间亦显著正相关 ,说明在上述浓度和染色时间条件下 ,伊红和台盼蓝均能比较真实地反映精子的实际存活率 ,其结果具有稳定性和可比性 ,完全可以用于河蟹精子存活率的检测。

4 展 望

精子质量评价研究是雄性生殖生物学研究中的热点问题。河蟹精子属于无鞭毛精子 ,故很多运动性指标无法适用于该蟹精子质量的评价 ,而精子存活率的评价仅仅是精子质量评价的基础性指标 ,探索和寻找适合河蟹精子质量评价的非运动性指标是目前该类精子质量评价的关键 ,对建立科学的无鞭毛精子质量评价体系 ,推动河蟹乃至其他甲壳动物雄性生殖生物学的研究具有重要意义。

近年来 ,非运动性指标已在哺乳动物精子质量评价中得到了很好的应用 ,如应用络合异硫氰酸荧光素的豌豆凝集素 (FITC-PSA) 进行精子顶体荧光标记 ,对精子顶体反应进行评价 ,分析精子染色质结构 ,利用荧光分光光度计^[8]和流式细胞仪^[14]评价精子的质量等 ,而且一些新的荧光分析方法已在昆虫中成功运用^[15,16]。这些方法在甲壳动物中的应用仍属空白 ,有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Gravance C G ,Gamer D L ,Miller M G , *et al.* Fluorescent probes and flowcytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicol* 2001 **15** (1) 5 ~ 10.
- [2] Huo L J ,Yang Z M. Effects of platelet activating factor on capacitation and acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2000 **56** (3) 436 ~ 440.
- [3] Gadella B M , Miller N G , Colenbrander B , *et al.* Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane :elimination of labeling artifacts. *Mol Reprod Dev* , 1999 **53** (1) :108 ~ 125.
- [4] Bhavanishankar S , Subraminiam T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forskal). *J Exp Zool* ,1997 **277** 326 ~ 333.
- [5] Jeyalectumie C , Subramoniam T. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *Biol Bull* ,1989 **177** 247 ~ 253.
- [6] Leung-Trujillo J R ,Lawrence A L. Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus seriferus* under laboratory conditions. *Aquaculture* ,1987 **65** 363 ~ 370.
- [7] 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 (2) 82 ~ 87.
- [8] Gliozzi T M ,Luzi F ,Cerolini S. Assessment of sperm viability in boar ,rabbit and rooster :a modification of the fluorometric ethidium bromide exclusion procedure. *Theriogenology* ,2003 , **60** 635 ~ 645.
- [9] 管卫兵 ,王桂忠 ,李少菁等 .锯缘青蟹精子低温冷藏及精子活力的染色法评价 .台湾海峡 ,2002 **21**(4) :457 ~ 462.
- [10] 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.
- [11] 朱伟杰 ,刘学高 .冷冻保存对人类精子膜完整性的影响 .中国病理生理杂志 ,1997 **13**(6) 624 ~ 628.
- [12] 黄宇烽 .实用精液细胞学彩色图谱 .南京 :东南大学出版社 ,1994 25.
- [13] 马远方 .现代男性病 .北京 :北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社 ,1996 309.
- [14] Johannisson A , Peña F J , Wallgren M , *et al.* Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay :a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 2003 **60** 677 ~ 689.
- [15] Hunter F M , Birkhead T R. Sperm viability and sperm competition in insects. *Current Biology* 2002 **12** :121 ~ 123.
- [16] Bernasconi G , Hellriegel B , Heyland A , *et al.* Sperm survival in the female reproductive tract in the fly *Scathophaga stercoraria* (L.). *J Insect Physiol* 2002 **48** :197 ~ 203.