

# 臺灣東部海域赤鯮精液冷凍保存技術之初步探討

蔡惠萍<sup>1</sup>、吳允暉<sup>2</sup>、何源興<sup>3</sup>、張錦宜<sup>4</sup>

<sup>1</sup>水產試驗所水產養殖組、<sup>2</sup>海洋漁業組、<sup>3</sup>東部海洋生物研究中心、<sup>4</sup>水產試驗所

## 前言

超低溫冷凍保存是利用超低溫度使細胞新陳代謝停止，生命活動處於靜止狀態，從而達到長期保存的目的。目前已成功保存 200 多種淡水魚類精液，為重要經濟魚類及某些珍貴稀少瀕危魚類基因資源的長期保存提供有效、可靠的方法，對魚類資源保存具有重要功能。由於養殖魚貝介類品種的多樣性，若要使水產養殖產業有效運用這項技術，則需依品種特性，建立各品種的配子冷凍保存之標準化程序與方法。

赤鯮 (*Doederleinia berycoides*) 又名紅臭魚、紅鱸、紅喉，分類上屬於發光鯛科 (Acropomatidae) 赤鯮屬，分布於西太平洋的朝鮮半島、日本以及中國東海、黃海及印度洋的溫帶水域。牠是肉食性魚，以甲殼類及軟體動物為食，常見於水深 100—600 m 處，最大體長可達 0.4 m。在商業上，赤鯮是重要的食用魚，一般利用延繩釣或底拖網捕獲，肉質細膩，極具經濟價值。

本研究旨在建立一套適合赤鯮精子冷凍保存的簡易方法，以期為種原保存、生產繁殖應用等提供相關之基礎重要技術。研發赤鯮的精液超低溫冷凍保存技術，未來可以協助繁殖業者建立重要經濟魚貝介類精液之長

期供需管道。而在進行人工繁殖時，所遭遇之雄魚精液欠缺，種魚成熟時段甚或季節不一致等問題，或執行異種雜交之要求皆可迎刃而解。同時可減少蓄養雄種魚之人力、空間與經費，是降低生產成本之良策。另針對保存和保護利用優良種原、遺傳育種等方面亦具有實質意義。

## 材料與方法

### 一、赤鯮精液的收集

自 2014 年 10 月起至 2015 年 10 月底止，自臺灣東部海域陸續以刺網及拖網捕獲成熟赤鯮雄魚共計 5 批，魚體平均全長  $25.02 \pm 2.21$  cm，平均體重  $209.50 \pm 38.58$  g，平均生殖腺指數 (GSI) 為  $1.74 \pm 0.90$ 。每次取得精液量約在 1—6 ml 之間，每隻平均取得量約 0.2—1.0 ml。

採集到的成熟雄魚儘速攜回實驗室，首先用清水清洗生殖孔及其附近的魚體表面，用吸水紙將生殖孔周圍的水分吸乾，以大拇指腹輕推腹部，俟精液流出後，以人工吸取的方式吸進收集管中，精液收集時不得有血液、鱗片、糞便及水滲入，收集完後置於 4°C 冰箱中保存待用。

以鏡檢進行精子活力檢測，在載玻片上



滴 10  $\mu\text{l}$  過濾海水，取 5  $\mu\text{l}$  新鮮精液於過濾海水中，立即用顯微鏡觀察活力，快速運動的精子記錄為活精子。精子活力 = 運動精子數/全部的精子數  $\times 100\%$ 。

另，採取赤鯪精液以德製 GONOTEC 冰點滲透壓計 OSMOMAT 030 測量新鮮赤鯪精液、海水魚生理食鹽水及 150 mM NaCl 之滲透壓，每次測量前滲透壓計需先用標準溶液檢定並校正。

## 二、赤鯪精液低溫保存

採集之新鮮精液分別用海水魚生理食鹽水 (NaCl 13.5 g, KCl 0.6 g,  $\text{CaCl}_2$  0.25 g,  $\text{MgCl}_2$  0.35 g,  $\text{NaHCO}_3$  0.2 g, 用蒸餾水配成 1 L) 及 150 mM NaCl 二種稀釋液，以 1 : 4 比例進行稀釋，再分別添加 5% 之二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, 簡稱 DMSO) 及 5% 甘油 (Glycerol) 之抗凍劑共 4 組，置於 4°C 冰箱中保存，每隔 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h、18 h、24 h 及 48 h 於各組採取 5  $\mu\text{l}$  精液，以過濾海水激活後觀察比較其精子存活狀態。

## 三、赤鯪精液冷凍保存

(一) 不同抗凍劑濃度及稀釋液對赤鯪精液冷凍保存的影響

選取 DMSO、Glycerol 及 Propylene Glycol (簡稱 PG) 等三種抗凍劑，添加濃度為 5%、10%、15% 及 20%，稀釋液為海水魚生理食鹽水、150 mM NaCl 及 Hank's Solution (NaCl 8 g, KCl 0.4 g,  $\text{CaCl}_2$  0.14 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.06 g, glucose 1 g and  $\text{NaHCO}_3$  0.35 g, 用蒸餾水配成 1 L) 等三種，精液與稀釋液比為 1 : 9，混

合液分裝至 500  $\mu\text{l}$  冷凍麥管 (straw) 中，每支麥管裝 400  $\mu\text{l}$ ，平衡時間 10 min，在保麗龍盒內倒入液態氮，並放入 PE 細片，使其距離液面 6 cm，然後將裝有精液之麥管放在細片上，蓋上盒蓋，將其溫度維持在 -90 - -100°C，利用液態氮蒸氣預冷 15 min，預冷結束後倒入液態氮中保存。解凍時，在 30°C 水浴中解凍 15 sec，用過濾海水激活後，在顯微鏡下檢測精子活力，利用上述條件篩選出最佳抗凍劑及稀釋液。

(二) 預冷高度對赤鯪精液冷凍保存的影響

抗凍劑選用 5%、10%、15% 及 20% 的 DMSO、Glycerol 及 Propylene Glycol。預冷高度分別為距離液態氮高度 3 cm 及 6 cm，預冷時間持續 15 min。預冷結束後倒入液態氮中保存。保存 12 h 後在 30°C 水浴中解凍，解凍時間為 15 sec，取 5  $\mu\text{l}$  用過濾海水激活後，在顯微鏡下檢測精子活力。

(三) 糖類對赤鯪精液冷凍保存的影響

選取的抗凍劑為 10% Glycerol，稀釋液為海水魚生理食鹽水、150 mM NaCl 及 Hank's Solution，精液與稀釋液比為 1 : 9，試驗組則添加海藻糖 (trehalose) (調配成最終濃度為 30 g/L) 進行冷凍保存，12 h 後解凍，用過濾海水激活，在顯微鏡下檢測精子活力。

## 結果與討論

### 一、赤鯪精液

臺灣東部赤鯪精液採集最佳時間為每年的 9—10 月。赤鯪新鮮精液、海水魚生理食鹽水及 150 mM NaCl 之滲透壓經測得依序分別為  $301.67 \pm 3.06$  mOsmol/kg、 $472.67 \pm 3.79$

mOsmol/kg 及  $279.00 \pm 2.00$  mOsmol/kg。所採得之精液以過濾海水激活後，其精子活力比率約 80% 之間，活力約可持續 5—6 分鐘後即急遽下降，至 12 分鐘後即完全不動。精子置於海水魚生理食鹽水及 150mM NaCl 中均為靜止不動。

## 二、赤鯪精液低溫保存

魚類精液短期保存的關鍵為抑制精子活力，否則其授精力很快就降低。精子在精漿內最穩定可不必稀釋，但對某些魚種之精液，稀釋是必要的。因為在擠精時其活力上升，短期保存所使用之低溫不足以抑制其活力，所以一般建議以稀釋液補充保存期間所需之能量。石斑精液加鹽類溶液及 10% DMSO 有助在 5—10°C 之短期保存 (Withler and Lim, 1982)。吳郭魚精液藉含有 glucose、glycine 及 sucrose 之稀釋液，而使保存期由 5 天延至 18 天 (Harvey and Kelley, 1984)。

本實驗，將赤鯪精液在 4°C 低溫保存，結果以新鮮精液 + 海水魚生理食鹽水 + 5% Glycerol 及新鮮精液 + 150 mM NaCl + 5% Glycerol 組之精子可以活存 24 小時以上，仍具有 60% 以上的活力，較不添加稀釋液之精液原液對照組及新鮮精液 + 海水魚生理食鹽水 + 5% DMSO 及新鮮精液 + 150 mM NaCl + 5% DMSO 組之精子在 4°C 可延長其保存效果。

## 三、赤鯪精液冷凍保存

(一) 不同抗凍劑濃度及稀釋液對赤鯪精液冷凍保存的影響

適宜的精子稀釋液可提高精子活存率和活力，進而提高受精率。前人研究顯示，以 0.5% 的葡萄糖或蜂蜜 (溶於生理食鹽水中)

可成功保存虱目魚 (Chao and Liao et al., 1987) 及黑鯛 (Chao et al., 1986) 精液。吳郭魚精液因具黏性，所以以牛奶、甲醇及生理食鹽水組成的稀釋液可作為其理想的冷凍介質，鯉魚精液稀釋液則添加尿素為佳。各魚種之精液稀釋比例 (精液：稀釋液) 如下：吳郭魚、黑鯛、烏魚為 1:1，鯉魚 1:3，虱目魚 1:4，石斑魚 1:20 (Chao et al., 1994)。本試驗針對赤鯪精液以海水魚生理食鹽水、150 mM NaCl 及 Hank's Solution 等三種稀釋液，以 1:9 比例混合，結果以 150 mM NaCl 配合 Glycerol 之效果最佳，解凍後仍具有較佳之精子活力。

適宜的抗凍劑是魚類精子保存成功的關鍵，不同的抗凍劑對不同種魚的精液保護作用差異很大。因此建立精子冷凍保存方法的首要因素是篩選出最合適的抗凍劑及添加濃度。抗凍劑具有提供不安定酵素冷凍保護、在非冷凍水溶液中穩定蛋白質的作用。許多化學物質都可作為抗凍劑，參考以往對石斑魚、真鯛、大黃魚等海水魚類冷凍保存的方法，本試驗採用 5—20% DMSO 及 Glycerol 作為主要的抗凍劑進行篩選。試驗結果，以 Glycerol 效果最佳，濃度則以 10% 優於 5% 及 15%，最差則為 20%。許多研究者指出，使用 3.3—15% (v/v) glycerol 或 DMSO 是冷凍精液的最佳抗凍劑，濃度過高 (20% 以上) 容易刺激 RNA 的合成。DMSO 由於具有較好的滲透性，是魚類精子冷凍保存應用最為廣泛的一種抗凍劑，5—20% DMSO 在許多海水魚類精子的冷凍保存都取得了令人滿意的效果。但在赤鯪精液冷凍保存應選擇以 Glycerol 為抗凍劑可獲得較好的保存效果。



## (二) 預冷高度對赤鯪精液冷凍保存的影響

冷凍速率在冷凍保存過程中具有重大的決定性。當冷凍速率太快，會形成細胞內冰晶，為防止細胞內冰晶形成，則必須調適冷凍速率。某些種類的魚類精液在某些抗凍劑中會形成一重要的零下溫度帶 (subzero temperature zone)，在這範圍內，細胞會增加溶質的濃度，因此，必須儘快地通過此一溫度帶。但是，也必須使其有足夠的時間讓細胞去除水分，以避免冰晶形成。

冷凍方式可用分段降溫方式進行，如烏魚、黑鯛、石斑魚以兩段降溫方式來操作，首先降溫至  $-100^{\circ}\text{C}$ ，再降至  $-196^{\circ}\text{C}$ ，本試驗即採此種兩段降溫方式進行。考量未來在繁殖場應用，可採簡便方式以保麗龍盒放入 PE 細片，使其距離液態氮之液面 3 cm，然後將裝有精液之冷凍麥管 (straw) 放在細片上，蓋上盒蓋，將其溫度維持在  $-90$ — $-100^{\circ}\text{C}$ ，此乃方便、有效且花費少的方法，本所以往已成功地運用在烏魚、黑鯛及石斑魚的精液冷凍保存上 (Chao, 1991)。

本次試驗通過控制精子樣品距離面的高度，來改變冷凍過程的降溫速率。發現經 3 cm 和 6 cm 兩個不同高度的處理，所得冷凍後精子的活力，以 10% 及 15% Glycerol 作為抗凍劑組，不論以 3 cm 和 6 cm 高度，預冷精子活力皆可達到 70—80%，若選擇其他抗凍劑則以 3 cm 高度預冷組優於 6 cm 組。

## (三) 糖類對赤鯪精液冷凍保存的影響

Gardiner (1978) 的研究表明，魚類精子能够利用外源性小分子糖類來補充自身能量的消耗，尤其是葡萄糖、半乳糖、果糖。故在本次試驗中，嘗試在抗凍劑中另外添加海

藻糖，結果顯示，不論是否添加 30 g/L 的海藻糖對赤鯪精液冷凍保存之影響並不明顯。

## 結論與展望

本研究顯示 8—10 月臺灣東部採得之赤鯪精液滲透壓為  $301.67 \pm 3.06$  mOsmol/kg，將精子置於海水魚生理食鹽水及 150 mM NaCl 中均為靜止不動。若以 1 : 4 比例混和海水魚生理食鹽水或 150 mM NaCl 後添加 5% Glycerol 可保存於  $4^{\circ}\text{C}$  低溫 24 h 後仍具有 60% 活力。另試驗建立赤鯪精液之超低溫冷凍保存程序，結果顯示，以赤鯪精液 1 : 9 比例添加 150 mM NaCl 稀釋液及 10% Glycerol 之抗凍劑，混合裝入 500  $\mu\text{l}$  之冷凍麥管平衡時間在 10 min 內，採兩段降溫方式，以保麗龍盒加入並放入 PE 細片，使其距面 3 cm，然後將裝有精液之麥管放在細片上，蓋上盒蓋，將其溫度維持在  $-90$ — $-100^{\circ}\text{C}$ ，持續 15 min 後投入液態氮中保存，解凍後精子仍具有 80% 的活力。

本試驗因至目前執行僅 1 年，且因赤鯪之生殖季節短，可採得之精液量少，有多項試驗因子無足夠精液可供試驗，且無法取得足夠之成熟卵子，故無法進行後續之授精相關試驗，期待可經由人工培育出優質且充足之成熟卵細胞得以實際進行後續之人工繁殖育苗試驗。另採集所得新鮮精子的品質良莠影響後續冷凍保存精子品質甚劇，目前精液多自漁船漁獲後攜回實驗室採集所得，若能人工養殖種魚麻醉後直接採集，應可獲得更佳之冷凍保存成效。