

龍膽石斑精液冷凍保存方法之初探

王威鈞、陳昱昕、邱家豪、鄭金華、陳紫嫻

水產試驗所東港生技研究中心

前言

臺灣目前主要養殖的石斑魚種類有三種，分別為青斑 (*Epinephelus coioides*)、龍膽石斑 (*E. lanceolatus*) 和老虎斑 (*E. fuscoguttatus*)。除了上述三種外，近年來也出現新雜交品系－珍珠龍膽。珍珠龍膽係以龍膽石斑之精液和老虎斑之卵雜交而成，兼具龍膽石斑生長快速及老虎斑抗病性佳的優點 (周，2009)，因而成為未來石斑養殖之主力。欲生產珍珠龍膽必須先取得龍膽石斑精液，但由於其體型龐大，成熟雄魚可達上百公斤，收取精液時需要較多人手幫忙，增加取精上的困難度。收取後之精液需馬上運用或暫時冰存，但冰存後之精子活力會隨著時間而降低，最長只能冰存一個禮拜，精子的活力便會趨近於零，故急需建立一個有效的保存方法。

將新鮮精液冷凍保存已行之有年，多種石斑魚包括瑪拉巴石斑 (*E. malabaricus*) (Chao et al., 1992)、雲紋石斑 (*E. moara*) (Miyaki et al., 2005) 和七帶石斑 (*E. septemfasciatus*) (Koh et al., 2010) 等之精液保存已被確立，但至目前為止，此冷凍技術仍然還未應用至龍膽石斑上，故本研究的主要目的即在建立龍膽石斑精液冷凍保存方法。

材料與方法

一、材料來源

胎牛血清 (FBS) 購自 Gibco；High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 購自 ABI；FastStart Universal Probe Master (ROX) 購自 Roche；0.5 ml 的麥管 (straw) 購自 IMV technologies；5 ml 的麥管購自 Continental Plastic；2 ml 的冷凍管購自 NALGENE。

二、精液之收集

將本中心飼養之龍膽石斑置於擔架上，以起重機吊起，利用晶片機掃描分辨公母，將雄性龍膽石斑麻醉後，以 75% 酒精消毒並擦拭去除海水，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內，收集完後先置於冰上保存。

三、樣品 RNA 之萃取及反轉錄反應

以 RNA Extraction Kit 抽取樣品之 RNA。將樣品置於 1.5 ml 的離心管中，加入 500 L 的 RNA 萃取溶液，利用研磨棒將樣品磨碎，置於室溫下平衡 5 分鐘，加入 100 L 氯仿 (chroloform)，震盪使其混合均勻，置於室溫下平衡 3 分鐘，以 12,000 g 離心 15 分鐘。取上清液約 200 L 加入新的 1.5 ml 離心管中，並加入 200 L 的異丙醇 (isopropanol)，震盪使其混合均勻，以 12,000

g 離心 10 分鐘後，去除上清液。加入 75% 的酒精 500 L 沖洗沉澱物，以 12,000 g 離心 5 分鐘後，去除上清液，真空抽乾。加入適量 DEPC 水回溶沉澱物，以分光光度計測定萃取 RNA 之總量。利用 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 進行反轉錄反應，取 1 g 的萃取 RNA 和預先配置好的 2X RT Master Mix (2 L 的 10X RT buffer、0.8 L 的 25X dNTP Mix (100 mM)、2 L 的 10X RT Random Primers、1 L 的 MultiScribe Reverse Transcriptase、1 L 的 RNase Inhibitor 和 3.2 L 的 Nuclease-free H₂O) 以 1:1 的比例混合均勻，以下列步驟進行反轉錄反應：25°C、10 min；37°C、120 min；85°C、5 min，完成後即為 cDNA。

四、龍膽石斑精液 NNV 病毒之檢驗

利用本所同仁蕭義勇博士以 Redspotted grouper nervous necrosis virus segment RNA2 (FJ789784) 為模板設計之引子對和探針進行 PCR 反應，序列如下：NNV-QF2: 5'-CCT-TCG-ACG-CGC-TTC-AAG-CA-3'；NNV-QR3: 5'-CAG-AGG-AGC-GTG-CGG-GTG-T-3'；NNV Q-PCR probe: FAM-5'-TGC-AGT-CGT-TGC-CAA-A-3'-TAMRA。在 PCR 管中加入 12.5 L 的 FastStart Universal Probe Master (ROX)、1 L 的 NNV-QF2 (6 M)、1 L 的 NNV-QR3 (6 M)、1 L 的 NNV Q-PCR probe (3 M)、6 L 的 dd H₂O 和 10 ng 的樣品 cDNA，混合均勻後，置入 StepOne Real-Time PCR 機器中，反應條件為：95°C、10 min；50 個循環的 (95°C、15 sec；60°C、1 min)，完成後以 StepOne Software v2.1 軟體進行分析。

五、精液冷凍步驟

本冷凍步驟參考 Koh et al. (2010) 之方法，收集經檢驗確定無 NNV 感染之精液，將 2 L 的精液和 18 L 的滅菌海水混合均勻，在顯微鏡 (10X 目鏡、4X 物鏡) 下觀察其活力，活動的精子比例高於 90% 的精液才進行後續的冷凍步驟。以市售的胎牛血清 FBS 作為稀釋液以 1:9 的比例和精液混合，將精液稀釋 10 倍，加入抗凍劑 (DMSO) 至最終濃度 5%，分裝至 0.5 ml 的麥管、2 ml 的冷凍管或 5 ml 的麥管，置於冰上平衡 10 分鐘。在保麗龍盒中加入約七分滿的液態氮，將冷凍管置於漂浮在液態氮上之保麗龍板，蓋上保麗龍盒的蓋子，冷卻 15 分鐘。將冷凍管裝至鐵架上，最後置入液態氮桶中保存。

六、精液解凍步驟

將冷凍之精液從液態氮桶中取出，以預熱好之 40°C 的水浴槽中快速解凍至溶解，溶解後以擦手紙擦拭冷凍管表面，去除表面上之水分，取出 2 L 的精液和 18 L 的滅菌海水混合均勻，觀察加入海水後，精子在顯微鏡下 (10X 目鏡、4X 物鏡) 移動之情形並記錄。

結果與討論

以 0.5 ml、2 ml 及 5 ml 三種不同體積的冷凍管進行精液之冷凍，並觀察其活力的差別。圖 1 為不同體積冷凍管精液活力之比較。用 0.5 ml 的麥管進行精液冷凍，冷凍前之新鮮精液活力為 90%，冷凍後隔天取出觀察，其活力為 70%；56 天後，降至 50%，84 天後，活力只剩 30%。以 2 ml 的冷凍管進行精液冷凍，冷凍前新鮮精液活力為 90%，冷

凍後隔天取出觀察，其活力為 70%，第 84 天取出觀察，其活力仍保有 70%。以 5 ml 的麥管進行精液冷凍，冷凍前新鮮精液活力亦為 90%，冷凍後隔天取出觀察，其活力只剩 20%，冷凍 84 天後，活力仍維持在 20%。由上述結果可知，以 2 ml 冷凍管進行精液冷凍的效果最好且穩定，目前 2 ml 冷凍管進行精液冷凍已保存 8 個月，定期取出觀察活力，冷凍精液的活力仍保有 70%，證明利用 2 ml 冷凍管保存龍膽石斑精液之方法很穩定。

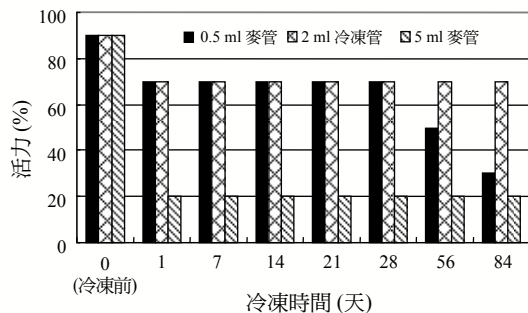


圖 1 不同體積冷凍管進行龍膽石斑精液冷凍比較

接著比較以冷凍精液或新鮮精液和虎斑卵進行雜交之效果，分別觀察二分裂時間、二分裂比例、四分裂時間和四分裂比例。圖 2 為二分裂時間和四分裂時間之比較，圖 3 為二分裂比例和四分裂比例之比較。以冷凍精液進行雜交，受精卵的二分裂時間平均為 45.3 ± 7.6 分鐘，二分裂比例為 $62.7 \pm 4.6\%$ ，四分裂時間為 59.0 ± 9.2 分鐘，四分裂比例為 $62.3 \pm 4.0\%$ 。以新鮮精液進行雜交，受精卵的二分裂時間平均為 46.7 ± 8.1 分鐘，二分裂比例為 $61.7 \pm 2.9\%$ ，四分裂時間為 60.0 ± 8.7 分鐘，四分裂比例為 $61.0 \pm 1.7\%$ 。由上述結果可知，以冷凍精液或新鮮精液進行雜交之效果並無顯著性差異。

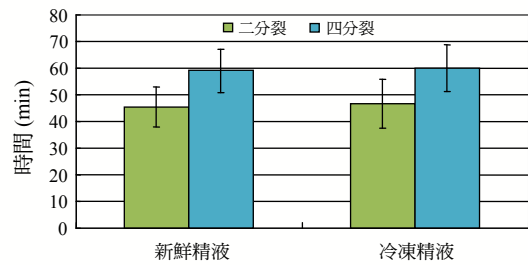


圖 2 新鮮精液與冷凍精液受精卵分裂時間之比較

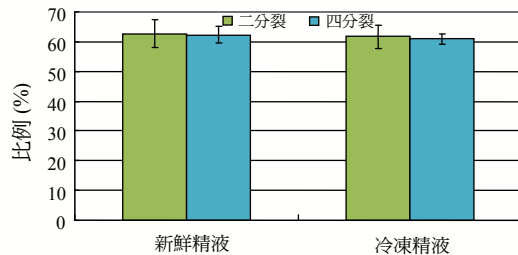


圖 3 新鮮精液與冷凍精液受精卵分裂比例之比較

神經壞死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 因會破壞宿主之神經系統而得名，其感染途徑包括水平及垂直感染兩種，其中又以垂直感染較難阻斷，主要係因為種魚之免疫系統完善，較能抵抗 NNV 病毒，因此外表上看起來好像未受感染，但實際上卻已帶原，所產出之精液或卵也會帶有 NNV 病毒，導致幼苗培育時，因為病毒感染而出現大量死亡現象，且幼苗因太小無法接受疫苗的注射，故唯一的方法只能從防止垂直感染著手。

在本實驗中，發現以 2 ml 冷凍管進行龍膽石斑精液的冷凍效果最穩定，且證實利用冷凍精液和新鮮精液進行雜交的效果無顯著差異，顯示 Koh et al. (2010) 的方法確實能適用於龍膽精液之冷凍，但是否為最適合且效果最好之冷凍方法仍有待探討。未來將針對抗凍劑種類、抗凍劑濃度、平衡時間及解凍溫度和時間等因素作進一步研究，以期建立一個最適合龍膽石斑精液冷凍保存方法。