

泥鰍精液冷凍保存技術研發

趙乃賢¹、陳雨農²、林式修¹

¹水產試驗所水產養殖組、²台灣大學海洋研究所

泥鰍 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 英名 Pond loach，中文俗名為胡溜。喜棲息於河川、池塘等富有植物碎屑的淤泥表層，體長可達 20 cm。本實驗選擇這種台灣本土魚種，探討其精液保存技術，以達長期保存種原之目的，並為本土水產生物學建立良好平台。文中同時比較泥鰍與其他魚種之精液對不同抗凍劑和降溫流程的最佳組合方式。

種魚來自民間之繁養殖場，將雌雄魚區分後，分池飼育並投予人工浮性飼料，每日早晚各餵食 1 次。試驗於繁殖季節 (3–9 月) 進行，在採集精液的前 1 天，將公魚注射腦下腺催熟，並於隔天解剖，約八成可獲得成熟肥厚之精巢供實驗使用。精巢加上淡水魚生理食鹽水 (240 mOsm/kg) 後，使用研磨器混合研磨，過濾取得精液。該等精液經過顯微鏡一一鏡檢以後，擇優將 2–3 尾之精液混合備用。

冷凍精液用之抗凍劑分為基礎、初階及進階三大類 (圖 1)。基礎抗凍劑 (DMSO、Methanol 與 Glycerol) 為具滲透性之藥劑；初階抗凍劑 (Trehalose、Glucose 及 Sucrose) 為不具滲透性之醣類。試驗開始先添加基礎及初階抗凍劑，再依試驗結果擇優佐以進階抗凍劑 (TAPS、CAPS)，以探討每進一步處理是否有加強冷凍保存之效果。

基礎、初階及進階抗凍劑試驗結果

比較不同濃度之基礎抗凍劑 DMSO、Methanol、Glycerol 於常溫下及降溫至 -196°C 後對精子活力的影響。然後各添加醣類 0.06M Trehalose、Glucose 或 Sucrose 作成不同初階抗凍劑組合。降溫至 -196°C 後比較其對精子活力的影響。



圖 1 抗凍劑組合示意圖

基礎抗凍劑實驗結果如圖 2 所示。對照組係未添加任何抗凍劑的新鮮精液在室溫時之精子活力，但其降溫至 -196°C 後活力為 0。各試驗組結果如下，DMSO 組：15% 比 10% 及 5% 之精子活力為佳；Methanol 組：15% 冷凍之精液全無活力，10% 僅在初始時略有活力，5% 較為優異；Glycerol 組：5–15% 各濃度組結果均較其餘兩種基礎抗凍劑分組為

差。經三重複試驗結果，DMSO 組最好，且以 15% DMSO 為最佳。

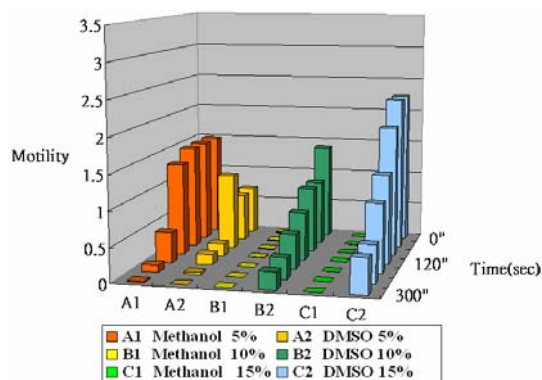


圖 2 基礎抗凍劑效果比較

初階抗凍劑試驗結果如圖 3 所示。15% DMSO + 0.06M Trehalose 組最佳，但其活力僅有 15% DMSO 組之八成左右。添加 Sucrose 組及 Glucose 組均比添加 Trehalose 組為差。

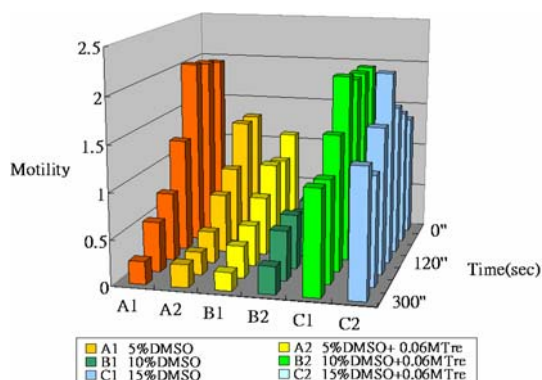


圖 3 初階抗凍劑效果比較

以初階抗凍劑之試驗結果，擇較優組進一步添加甲基三氫氧 (tris[Hydroxymethyl]methyl-aminopropane sulfonic acid; TAPS)、環己醯氨 (3-[Cyclohexylamino]-1-propane sulfonic acid; CAPS)，比較其對降溫至-196℃後精子活力的影響。結果如圖 4 所示，在既

加初階又加進階抗凍劑不同組中，均以添加 TAPS 者略比 CAPS 為佳。整體而言，添加進階抗凍劑實驗結果，以 15% DMSO + 0.06 M Sucrose + TAPS 組為佳，但仍比 15% DMSO 組差。

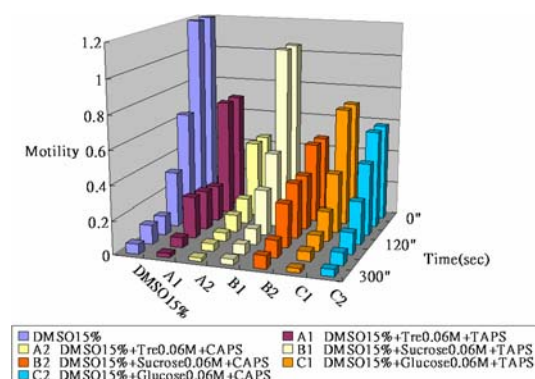


圖 4 進階抗凍劑效果比較

精液裝管與降溫程式設計

保存大量精液時，係以上述三項含基礎、初階或進階之抗凍劑前處理後，裝入不同標記之 PE 麥管，再配合使用可程式冷凍儀 (圖 5) 中，利用自行設計較適合淡水魚精液之降溫程式 FW1、FW2 或 FW3 (表 1)，進行大量裝有精液麥管之-196℃超低溫冷凍，以便長期保存精液。



圖 5 可程式冷凍儀

表 1 精液降溫程式 FW1、FW2 及 FW3

精液降溫程式		
FW1	FW2	FW3
Sperm + CPA	Sperm + CPA	Sperm + CPA
↓ 22°C	↓ 22°C	↓ 22°C
↓-5°C/min	↓-20°C/min	↓-20°C/min
4 °C	-35°C	-100°C
↓-10°C/min	↓-5°C/min	↓
-30°C	-120°C	LN2
↓-20°C/min	↓	
-140°C	LN2	
↓		
LN2		

結果與應用

欲大量超低溫冷凍保存泥鰱精液時，不必如其他已試驗過之淡水魚種精液添加進階抗凍劑方有助改善其活力，只須採用簡便之 15% DMSO 為抗凍劑及 FW3 降溫程式即可。表 2 列出本實驗室近來探討之 6 種魚類精液最佳降溫程式和抗凍劑組合之比較，以供種別性差異之參考。

本實驗小組於 2006 年繁殖季內，4 次使用佳質材料，共保存 150 份 0.25 ml 之冷凍精液於 -196°C 液態氮桶中。7—10 月間用於授精，得受精率 66.2—93.5%。總之，本實驗設計泥鰱精液添加不同濃度之基礎、初階及進階抗凍劑等各種組合，結果僅添加 15% DMSO 並以 FW3 降溫程式處理，已足以把握解凍後有 ≥ 5 min 之活存時間及平均 80% 以上受精率，是目前建議採用之最佳流程。

配合本實驗小組魚類染色體操作之經常性人工受精，使用預先儲存於液態氮中魚類精液其短程應用之優點為：

表 2 6 魚種精液降溫程式與抗凍劑最佳化比較

魚 種	最佳降溫程式	最佳抗凍劑組合	活存時間
泥鰱 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	FW3	15% DMSO	≥ 5 min
玫瑰鯛 <i>Puntius semifasciolatus</i>	FW1	15% DMSO + 0.06 M Trehalose	≈ 10 min
鰻魚 <i>Scaphesthes barbatulus</i>	FW1 or FW2	10% DMSO + 0.06 M Trehalose + TAPS	≈ 1 min
台灣馬口魚 <i>Candidia barbata</i>	FW1	15% DMSO + 0.06 M Trehalose + TAPS	≈ 1 min
圓吻鯛 <i>Distoechodon tumirostris</i>	FW1	15% DMSO + 0.06 M Trehalose + CAPS	≈ 1 min
台灣石鱚 <i>Acrossocheilus paradoxus</i>	FW2 or FW3	10% DMSO + 0.06 M Trehalose + CAPS	≈ 1 min

1. 由液態氮桶中取用冷凍精液、解凍至授精僅需數十秒，節省許多時間。
2. 一天取得多批次成熟卵，行人工受精時，不必犧牲多尾公魚，既節省人力又珍惜生命。
3. 一尾公魚之精巢，可製備 15 份以上確認優質之授精用精液。

藉既經濟且安全之液態氮作長期恆定超低溫的魚類精液保存，預計長期應用之方向為：

1. 提供繁養殖優良後代。
2. 避免流行疫病，造成物種之大量死亡或消失。
3. 結合分子生物技術，如保存帶有已轉殖基因之精子。
4. 因應今後日新月異生物科技整合應用。