

单细胞电泳技术检测低温保存猪精子的DNA损伤

李文焯, 李青旺^{2*}, 江忠良, 张树山

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100; 2. 燕山大学环境与化学工程学院生物工程系, 河北秦皇岛 066004)

摘要 应用单细胞凝胶电泳技术(SCGE), 对冷冻解冻后猪精子DNA的损伤情况进行研究。结果表明, 冷冻解冻会对猪精子DNA造成损伤, 其彗星率与鲜精相比差异显著($P < 0.05$); 各组冻精之间, 甘油添加量为2%~3%(v/v)时, 冷冻对猪精子DNA造成的损伤最低, 彗星率均低于其余各组($P < 0.05$)。

关键词 猪精子; 单细胞电泳; DNA损伤; 甘油

中图分类号 S814.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02581-02

Effect of Cryopreservation on the DNA Damage of Boar Sperm with Single Cell Gel Electrophoresis

LI Wenye et al (College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract Boar sperm cryopreservation is an important method for germplasm conservation. However, the method may cause the change of DNA structure and component. The change of DNA structure may damage the boar sperm quality and result in defects in its descendant. Therefore, how to keep the sperm intact and how to avoid the damage caused by cryopreservation become an important issue. Thus, the effect of cryopreservation on the DNA damage of boar sperm was studied and the method of single cell gel electrophoresis (SCGE) was a simple and valid method to examine the damage of the sperms. And the degree of the DNA damage was estimated with the comet tail pattern formed by the DNA nuclei movement in the electricity field. SCGE was used to study the DNA damage of cryopreservation boar sperm. The result indicated that cryopreservation can cause boar sperm DNA damage and compared with the fresh sperm it had remarkable difference ($P < 0.05$), the freezing caused lowest DNA damage than others when the glycerol with the concentration of 2% to 3% was supplied in experiment group ($P < 0.05$).

Key words Boar sperm; Single cell gel electrophoresis; DNA damage; Glycerol

精子是遗传物质的直接载体, 其DNA损伤情况将直接影响精子的质量及其下一代的生长发育。精子DNA的损伤情况是检测精子质量的一个重要依据。已有研究表明, 猪精液在冷冻解冻过程中, 会造成精子膜完整性破坏、顶体破坏、线粒体结构受损, 从而影响精子的生存能力和受精能力。但对于冷冻解冻过程是否对猪精子DNA造成损伤, 国内尚未见报道。单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis, SCGE) 又称彗星试验, 是一种在单细胞水平上检测真核细胞DNA损伤与修复的方法。由于其快速、简便和灵敏, 已广泛应用于检测淋巴细胞^[1]、人类精子细胞^[2]、鱼类冷冻精子DNA^[3-5]的损伤研究。该研究的目的是应用彗星试验研究冷冻解冻是否会影响猪精子DNA的完整性, 在分子水平上对精子进行检测, 以探讨SCGE技术在评估猪精液冷冻和人工受精中的意义, 对建立适宜的猪精液冷冻解冻程序以及优良种公猪种用价值的评定具有很强的指导意义和广泛的实用价值。

1 材料与方 法

1.1 精液采集 手握法采集猪精液, 将预温的(37℃)集精杯口用灭菌滤纸盖好, 收集精液时去除前段尿液, 收集浓厚段精液(一般为80~200 μl), 边采集边过滤。鲜精在1 h内运回实验室。

1.2 精液的冷冻解冻

1.2.1 精液预处理。采回的精液迅速镜检活力, 并取5~10 μl用血细胞计数板测定密度, 0.7以上的用于试验。精液在室温静置0.5 h后, 置预运转的离心机内离心(500 × g, 10 min), 弃去上清, 再加入等量等温的常温保存液重悬, 缓慢

降至室温。

1.2.2 精液稀释程序。用15 ml离心管依所采精液的密度每管取精液5~10 ml, 20 000 × g, 10 min离心, 弃上清, 然后用TCG+卵黄调整精子密度在 1.5×10^9 /ml, 用纱布包裹后置4℃冰箱中平衡1.5~3 h, 再用常温稀释液稀释平衡2~3 h。

1.2.3 精液冷冻程序。装管(0.25 ml细管), 首先放入程序冷冻仪以1℃/min的速度从5℃缓慢降至-5℃, 迅速取出置液氮上方3 cm处熏蒸20 min, 同时用超低温温度计测量温度, 最后将细管精液迅速投入液氮保存。

1.3 彗星试验 将细管冻精水浴解冻后迅速用PBS洗涤调整细胞密度至 2×10^5 /ml。样品用2% - 巯基乙醇在4℃下孵育1 h, 冲洗, 离心根据Fraser等^[6]介绍的方法稍作修改后分析精子DNA的损伤情况。

1.3.1 制片。剪取0.5 mm的医用胶布, 将载玻片围成长约2 cm的正方形框。先在该正方形框内铺上100 μl 0.75% (w/v)正常熔点的琼脂糖(NMA), 盖上盖玻片使胶定型, 在室温下静置5 min, 此为底层胶。待胶凝固后取下盖玻片, 将10 μl精子细胞悬液与75 μl 0.5%的低熔点琼脂糖(LMA)在37℃条件下轻轻吹打混匀, 立即铺在底层凝胶上, 盖上盖玻片待胶凝固后取下。

1.3.2 精子裂解。将铺好胶的盖玻片置于裂解液2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L EDTANa₂, 10 mmol/L的Tris, pH值为10, 1%十二烷基肌氨酸钠, 1% Triton X-100)在4℃条件下裂解2 h, RNA酶处理(2.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L的Tris, 0.05%十二烷基肌氨酸钠, pH值为7.4, 用前加20 μg/cm³ RNase A)4℃条件下作用4 h。最后将玻片移至含蛋白酶K 1 g/L的裂解液中37℃过夜处理。

1.3.3 电泳。玻片在含有300 mmol/L醋酸钠, 100 mmol/L Tris的弱碱性电泳液(pH值9.0)中平衡20 min, 在12 V、100 mA、室温条件下电泳1 h。电泳时带负电荷DNA片段将离开主核向阳极迁移, 形成一个像彗星样的拖尾, 尾的长短与

基金项目 河北省秦皇岛市科技局转基因动物生产基因工程药物研究项目(D08)。

作者简介 李文焯(1981-), 男, 陕西宝鸡人, 硕士研究生, 研究方向: 动物生殖生理调控和生物技术。* 通讯作者, 博士生导师, 教授, E-mail liqingwangysu@yahoo.com.cn。

收稿日期 2006-10-14

DNA 损伤的程度有关。

1.3.4 中和。从电泳液中取出凝胶载玻片,小心吸除残留的电泳液,立即用预冷的中和液(Tris-HCl, pH 值7.5)漂洗3次,每次10 min。4 避光进行。

1.3.5 染色和观察。取出凝胶载玻片,在胶面上滴加25 ng/L EB 50 μ l,盖上盖玻片,4 避光染色20 min。用倒置荧光显微镜 N KON 120 型 观察。

1.3.6 精子 DNA 的损伤分级。根据彗星尾部的 DNA 含量将 DNA 损伤程度分为 5 级。0 级(G_0): < 5%, 无损伤, 精子核完整; 1 级(G_1): 5% ~ 20%, 轻度损伤, 可见彗尾, 精子核基本完整; 2 级(G_2): 20% ~ 40%, 中度损伤, 可见明显的彗尾, 精子核缩小; 3 级(G_3): 40% ~ 95%, 重度损伤, 彗尾荧光信号强而密, 并见明显缩小的精子核; 4 级(G_4): > 95%, 完全损伤, 仅见荧光强而密的彗星, 精子核基本消失。

1.3.7 结果判定。精子 DNA 的损伤用精子头部中心处的荧

光强度与沿迁移方向的强度来表示细胞的总长和尾长,以尾长代表精子损伤的程度。每个样品重复 3 次,每次计数 100 个精细胞。

1.4 数据统计分析 应用统计软件 SPSS 11.0 进行方差分析。

2 结果与分析

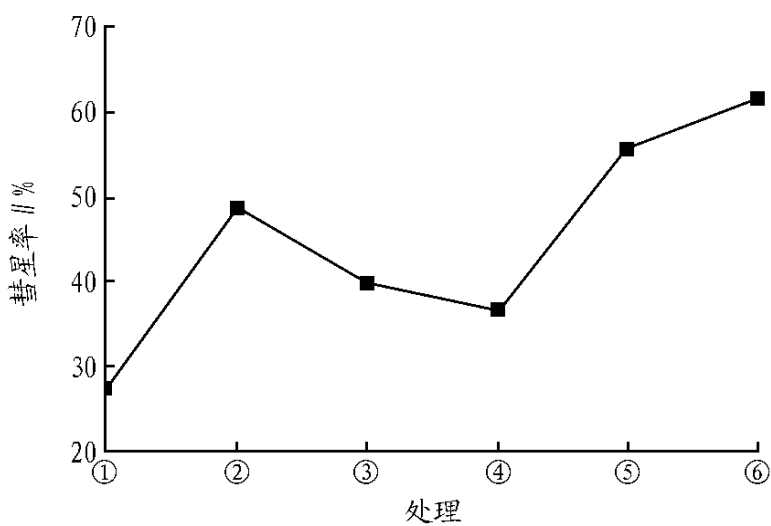
在猪精液冷冻过程中,分别添加 1%、2%、3%、4%、5% (v/v) 甘油作为冷冻保护剂并与新鲜猪精液作对照进行单细胞凝胶电泳试验,由表 1、图 1 可以看出,冻后猪精子的 DNA 损伤较新鲜猪精液明显升高,鲜精与添加甘油的冷冻精液各组其彗星率均差异显著 ($P < 0.05$)。而在添加甘油的冷冻精液各组中,处理间差异显著 ($P < 0.05$)。在冷冻精液的制作过程中,添加甘油可显著降低冻后精子 DNA 的损伤,最佳添加量为 2% ~ 3%。

受损的猪精子见图 2。

表 1 不同甘油添加量对猪精子 DNA 完整性的影响

处理	G_0	G_1	G_2	G_3	G_4	彗星率 %
鲜精	72.80 \pm 0.87 a	13.36 \pm 3.56 d	11.62 \pm 2.14 d	2.22 \pm 0.65 c	0.00 \pm 0.00 b	27.20 \pm 0.87 d
1% 甘油	51.94 \pm 1.37 c	27.34 \pm 1.62 b	15.83 \pm 1.67 c	5.55 \pm 0.38 a	0.00 \pm 0.00 b	48.72 \pm 0.91 b
2% 甘油	60.25 \pm 1.01 b	25.75 \pm 0.38 c	10.26 \pm 2.51 d	3.74 \pm 1.58 b	0.00 \pm 0.00 b	39.75 \pm 1.01 c
3% 甘油	63.43 \pm 1.04 b	23.08 \pm 0.32 c	10.83 \pm 0.92 d	2.66 \pm 1.34 c	0.00 \pm 0.00 b	36.57 \pm 1.04 c
4% 甘油	44.31 \pm 0.85 d	31.58 \pm 0.65 a	19.17 \pm 3.14 b	4.94 \pm 0.83 a	0.00 \pm 0.00 b	55.69 \pm 0.85 a
5% 甘油	38.54 \pm 0.02 d	30.60 \pm 2.31 a	23.58 \pm 1.79 a	5.37 \pm 0.65 a	1.91 \pm 0.21 a	61.46 \pm 0.02 a

注:表中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。



注: ①为鲜精; ②为1%甘油; ③为2%甘油; ④为3%甘油; ⑤为4%甘油; ⑥为5%甘油。

图 1 各处理组的彗星率

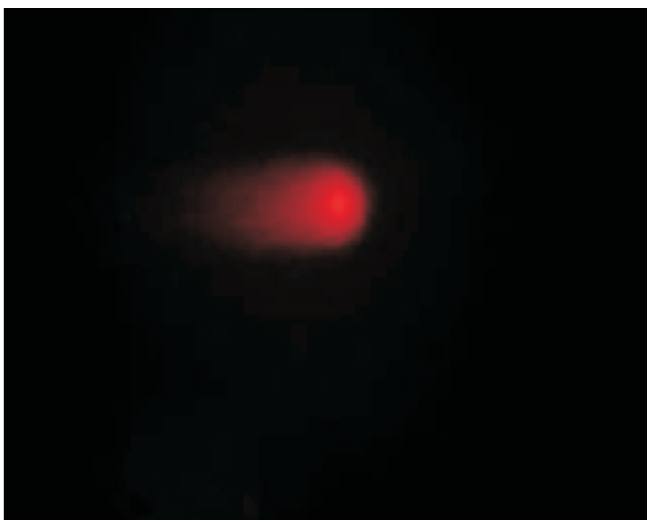


图 2 受损的猪精子

检测精子 DNA 损伤报道却较少。主要是由于精子 DNA 双螺旋与核蛋白构成了精子细胞的基本结构。核蛋白由 85% 的鱼精蛋白和 15% 的组蛋白组成。DNA 链与鱼精蛋白之间由牢固的二硫键连接,形成了细胞核的独特致密结构, DNA 很难从核蛋白中分离^[7]。该试验采用 2% - 巯基乙醇对精液进行预处理以破坏 DNA 链与鱼精蛋白之间的二硫键,从而加快了精子染色体的解聚,同时用 RNase-A 和蛋白酶 K 进行消化处理达到分离精子 DNA 的目的。

在精子发生过程中,从精原细胞一直到成熟的精子细胞,其染色体发生了很大的变化,精子发育为具有高度凝集的核并呈种属特异的形状。但是,在制作冷冻精液的过程中,由于精液的稀释、离心,冷冻保护剂的添加量等都可能使精子 DNA 受到损伤。Kryzosiak 等^[8]研究认为,牛精子在体外处理时精液的稀释及较长时间的孵育会破坏 DNA 的完整性;Hamnadeh 等^[9]研究报道,人的精子经过离心和冷冻解冻后也会使 DNA 的完整性发生改变。该试验研究发现,冷冻解冻的猪精 DNA 损伤较新鲜猪精液明显升高,鲜精与添加甘油的冷冻精液各组其彗星率均差异显著 ($P < 0.05$)。甘油作为一种渗透性冷冻保护剂,在冷冻过程中可渗入细胞内防止细胞内水分形成冰晶造成对细胞的机械性损伤。试验结果表明:添加甘油量为 2% ~ 3% 时,可显著降低冷冻对 DNA 的损伤。

关于精液体外处理后精子 DNA 损伤加剧的机理,Chatterjee 等^[10]认为,精子在各种外界因素的相互作用下,增加了死亡精子和受

3 讨论

单细胞凝胶电泳技术作为检测单个细胞 DNA 损伤的一种简便、灵敏的方法,在许多领域得到应用,但是应用该技术

(上接第2582页)

(ROS)。活性氧分子具有强烈的氧化特性,使细胞膜氧化损伤,同时也会作用于DNA,引起DNA链的断裂;Baarends等研究认为,精子在从精原细胞逐渐转化为精子的过程中,在后期丢失了大部分的细胞质,从而也就遗失了一部分保护精子细胞免遭氧化损伤的酶类,而这些酶有利于组蛋白向鱼精蛋白浓缩成染色质的交换作用,由于这些酶类的丢失阻碍了相应蛋白修复损伤DNA的通路。

参考文献

- [1] MALUF S W, ERDIMAN B. Follow up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronucleus analysis and single cell gel electrophoresis assay [J]. *Mutation Research*, 2000, 471: 21 - 27.
- [2] 徐德祥, 沈汉民, 王俊南. 单细胞电泳用于检测人精子DNA链断裂[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2000, 17(4): 281 - 284.
- [3] LABBLE C, MARTORIATI A, DEVAUX A, et al. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA integrity in developing plart in rainbow trout [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, 60: 397 - 404.

- [4] ZILII L, SEHAVONE R, ZONNO V, et al. Evolution of DNA damage in dcentrachus labrax sperm following cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2003, 47: 227 - 235.
- [5] 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鳊 (*pogonius major*) 精子DNA损伤[J]. *海洋与湖泊*, 2005, 36(3): 221 - 225.
- [6] FRANSER, STRZEZEK. Effects of Freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay [J]. *Reprod Dom Anim*, 2005, 40: 530 - 536.
- [7] WARD WS, COFFEY D S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells [J]. *Bd Reprod*, 1991, 44: 569 - 574.
- [8] KRZYZOSIAK J, EVENSON D, HTT C, et al. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2000, 12: 251 - 261.
- [9] HAMMADEH M E, ASKARI A S, GEORGT, et al. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men [J]. *Int J Androl*, 1999, 22: 155 - 162.
- [10] CHATTERJEE S, GAGNON C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing [J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 59: 451 - 458.