

ZEBRADÁNIÓ (*Danio rerio*) SPERMAMÉLYHŰTÉSÉNEK KIDOLGOZÁSA

Kollár Tímea, Bernáth Gergely, Csenki Zsolt, Kovács Róbert,
Kása Eszter, Urbányi Béla, Horváth Ákos

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet,
Halgazdálkodási Tanszék, Gödöllő

Bevezetés

Munkánk során a napjainkban igen elterjedt laboratóriumi modellállat, a zebradánió (*Danio rerio*) spermájának mélyhűtésével foglalkoztunk. Korábban többen próbálkoztak e faj spermájának mélyhűtésével, viszont ezek a módszerek nem egységesek, továbbá - a kis testméret és a minimális mennyiségű ivartermék miatt - a spermát az egyedek heréinek sebészi úton történő eltávolításával nyerték (Yang et al. 2007). E fajnak több mint 4500 mutáns vonala van, ezek között pedig több olyan is létezik, melynek egyedszáma minimális; ezen vonalak megőrzése kiemelkedő jelentőséggel bír. Ebből kifolyólag munkánk során egy olyan spermamélyhűtési eljárás kidolgozását tűztük ki célul, mely az állatok elpusztítása nélkül, az ivartermék lefejtésével megvalósítható.



Anyag és módszer

Kísérleteink során a fellelhető szakirodalmi adatok és módszerek alapján dolgoztuk. A különböző egyedektől – üvegkapilláris segítségével – lefejt spermát egy Eppendorf-csőbe, poolozva gyűjtöttük össze.



1. ábra: Az ivartermék kinyerése.

A mélyhűtést automata mélyhűtő berendezéssel végeztük el. A mélyhűtés során négy hígítót teszteltünk: Hanks-féle sóoldat (Jing et al. 2009), pontyféle immobilizáló oldat (200 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0; Saad&Billard 1987), módosított Kurokura-oldat (3,6 g NaCl, 10 g KCl, 0,29134 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,17066 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g NaHCO_3 1000 ml desztillált vízben; Kurokura et al. 1984), és „pér hígító” (200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris). Ezenkívül -2,5 és -56°C/perc közötti hűtési sebességekkel, valamint különböző hígítási arányokkal (1:4, 1:9, 1:19, 1:99) kísérleteztünk. Védőanyagként minden esetben 8% metanolt alkalmaztunk. Felolvasztás után számítógépes spermavizsgáló rendszerrel ellenőriztük a spermiumok motilitását, mely gyors és objektív meghatározást tesz lehetővé. Az aktiváláshoz desztillált vizet használtunk, melybe 1% BSA-t kevertünk, amely meggátolja a sejtek letapadását a tárgylemezre a motilitásvizsgálat során.

Eredmények

A legmagasabb felolvasztás utáni motilitást (24%) pér hígító, 7,5°C/perc hűtési sebesség, és a sperma 1:9 arányú hígításával értük el. Hanks-féle sóoldat és „pér hígító” keverékének használatával is sikerült igen jó motilitási eredményeket elérnünk (12%), viszont önmagában a Hanks-féle sóoldat alkalmazása ennél alacsonyabb motilitást (7%) eredményezett. A módosított Kurokura-oldat esetében 3%-os, viszont a pontyféle immobilizáló oldat esetében nem tapasztaltunk motilitást. A 7,5°C/perces hűtési sebességen kívül 10°C/percnél (5%) és 15°C/percnél (3%) tapasztaltunk motilitást; a 2,5°C/perc, 5°C/perc, 20°C/perc, és 56°C/perces hűtési sebességek mellett nem találtunk mozgó sejteket. Ezen kívül kétlépcsős hűtési görbét is teszteltünk, szintén eredménytelenül. A sperma 1:4 arányú (3%), 1:19 arányú (9%), valamint 1:99 arányú (0%) hígításával lényegesen gyengébb motilitást értünk el az 1:9-es hígításhoz képest.



2. ábra: A Halgazdálkodási Tanszéken található automata mélyhűtő berendezés.

Összegzés

A legjobb motilitást eredményező 7,5°C/perc hűtési sebességgel, 1:9 arányú hígítással, valamint „pér hígító” alkalmazásával megkezdjük termékenyítési kísérleteinket, melyek sikeresnek mondhatóak, viszont még további finomítások szükségesek az eredmények reprodukálhatósága érdekében.



3. ábra: A Halgazdálkodási Tanszéken található számítógépes spermavizsgáló rendszer.

Köszönetnyilvánítás

A munka a KMR-12-1-2012-0436 és KMR-12-1-2012-0221 pályázat, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma, 8526-5/2014/TUDPOL iktatószámú szerződés támogatásával valósult meg.

Hivatkozások

Jing, R., Huang, C., Bai, C., Tanguay, R., Dong, Q., 2009. Optimization of activation, collection, dilution and storage methods for zebrafish sperm. *Aquaculture*, 290: 165-171.
Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., Iwahashi, M., 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37: 267-273.
Saad, A., Billard, R., 1987. Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 65: 67-77.
Yang, H., Carmichael, C., Varga, Z.M., Tiersch, T.R., 2007. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology*, 68: 128-136.

