

猪精液冷冻与常温保存技术的研究

唐国梁¹ 史文清¹ 侯云鹏¹ 路永强³ 刘庆宇³ 朱士恩^{1,2}

(1. 中国农业大学 动物科学技术学院; 2. 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;
3. 北京市畜牧兽医总站, 北京 100029)

摘要 为研究冷冻保存和常温(17 ± 0.5)保存后猪精子活率、活力和顶体完整率,比较了猪精液冷冻稀释液中2种甘油含量细管法的快速冷冻效果,以及不同解冻温度对冷冻精液的影响,采用细胞计数法、FDA-PI双重染色法与Giemsa染色方法检测精子的活率、活力和顶体完整率。结果显示:3%(体积分数,下同)甘油冷冻解冻后精液的活率、活力(38.54%、52.24%)显著($P < 0.05$)高于2%甘油组(15.63%、28.22%),但3%甘油组顶体完整率(11.55%)显著($P < 0.05$)低于2%甘油组(21.71%)。38℃水浴解冻后的精子在39℃培养箱中4h内活率高于0.3,而50℃水浴解冻后1h后的活率低于0.3。精液稀释液Anderohep和BTS在常温(17 ± 0.5)保存新鲜猪精子的活率与顶体完整率上效果相似,保存3d内精子活率达0.6以上,保存6d内精子活率为0.3以上。结果表明,使用3%甘油冷冻保存及2种常温保存稀释液均可以较好地保存精子。

关键词 猪;精液;冷冻保存;常温保存

中图分类号 S828

文章编号 1007-4333(2006)04-0033-04

文献标识码 A

Cryopreservation and normal temperature preservation of porcine spermatozoa

Tang Guoliang¹, Shi Wenqing¹, Hou Yunpeng¹, Lu Yongqiang³, Liu Qingyu³, Zhu Shien^{1,2}

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. State Key Laboratory of Agrobiotechnology, Beijing 100094, China;

3. General Station of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Beijing, Beijing 100029, China)

Abstract The effect of cryopreservation and normal temperature preservation on porcine spermatozoa was investigated by comparing with the sperm motility, survival and acrosome-intact rates. The effects of thawing temperature after cryopreservation were also compared. The porcine liquid and frozen sperm were studied in order to improve the effect of preserved spermatozoa. The methods of cytometry, double staining of FDA-PI and Giemsa staining were used to test the motility, survival and acrosome-intact rates of preserved spermatozoa. The motility and survival rates of the group with 3% glycerin concentrations (38.54% and 52.24%, respectively) were significantly ($P < 0.05$) higher than that of the group with 2% glycerin concentrations (15.63% and 28.22%, respectively). However, acrosome-intact rate of the group with 2% glycerin concentrations (21.71%) was significantly ($P < 0.05$) higher than that of the group with 3% glycerin concentrations (11.55%). The result of different thawing temperatures indicated that the spermatozoa thawed in 38℃ water showed a better survival rate than those thawed in 50℃ water; the duration of preservation on above 30% survival rate were 4 and 1 h, respectively. In the experiment of normal temperature (17 ± 0.5) preservation, the effects in Anderohep and BTS dilution had no difference on the motility and acrosome-intact rates of spermatozoa. The motility of spermatozoa was above 60% in 3 days and the motility was not less than 30% until 6 days after preservation. Cryopreservation using 3% glycerin and the normal temperature preservation are feasible and can meet practical need.

收稿日期: 2006-01-06

基金项目: 北京市农委试验示范项目

作者简介: 唐国梁, 硕士研究生; 朱士恩, 教授, 通讯作者, 主要从事配子与胚胎生物技术研究, E-mail: zhushien@cau.edu.cn

Key words porcine; spermatozoa; cryopreservation; normal temperature preservation

冷冻精液应用于人工授精对快速提高家畜的遗传改良速度和遗传品质,减少疾病传播等具有十分重要的作用,牛冷冻精液在养牛业中的广泛使用及其良好的使用效果充分证明冷冻精液研究的重要性。猪精子细胞质膜中胆固醇与磷脂比率显著低于其他哺乳动物^[1],其精子更易受到冷冻的伤害。目前猪的冻精解冻后只有0.3左右的活率^[2],使用猪冷冻精液进行人工授精效果远不如鲜精授精及自然交配^[1]。在猪卵母细胞体外受精实验中需要猪精子的冷冻保存技术,这是因为1次冷冻保存的精液可以为多次实验提供稳定的精子来源,消除了精液来源差异造成的实验误差;而且猪体外受精程序中应用冻精比应用鲜精获能的效果更好^[3]。猪液态精液保存3d左右,活率保持在0.6以上^[4-5],可以满足人工授精要求,而且目前国内使用的猪精液常温保存稀释液需从国外购买。为此,笔者通过对猪精液超低温和常温2种保存技术进行研究,比较精液冷冻与常温保存后对精子活率、活力和顶体完整率的影响,旨在研究精液保存适宜方法,提高精液保存效果。

1 材料与方法

1.1 精液采集

选择3头繁殖历史清楚、平均年龄1.5岁的种公猪(长白),采用手握法采精,收集精子丰富部分,经4层灭菌纱布过滤去除胶体后,立即测量精液量,并检查精子活率和密度。

1.2 精液的稀释及冷冻

冷冻精液采用Wang等方法^[6]。原精液在室温25℃下静置平衡1~1.5h,并与Hulsenberg^[2]稀释液1:1等温稀释,100g离心3min以除去精清中的脂滴等大颗粒杂质,然后以1500g离心5min,弃去上清,用冷冻稀释液BF5^[2]将精子稀释调整至 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 个/mL。将稀释好的精液经1.5~2h缓慢降温至5℃后按1:1加入含不同体积分数甘油的BF5,使其最终甘油的体积分数分别为2%和3%,装入0.25mL细管,封口后液氮气熏蒸15min,然后投入液氮中冷冻保存。

1.3 精液的解冻

采用2种解冻方法:分别在38℃和50℃水浴中

解冻30和12s。解冻后与1mL DPBS等温混合,1500g离心5min除去上清,再加入1mL DPBS混合,重新悬浮精子。解冻后悬浮的精子放置于39℃培养箱中。

1.4 精液的常温保存

采集的精液在室温25℃下静置1~1.5h,采用Androhep^[7]和BTS^[8]2种稀释液,分别按1:1等温稀释,经过1h缓慢降温至 (17 ± 0.5) ℃,置于恒温箱中低温 (17 ± 0.5) ℃保存。每隔12h轻轻摇动1次储存精液的试管,并检测精子活率及顶体完整率。

1.5 精子活率检查

取250μL精液放1mL DPBS中,在37℃下孵育20min,然后,取20μL滴于37℃恒温台上的血细胞计数板上,在显微镜下观察,计算5个视野中直线运动的精子。

1.6 精子活力的染色

采用二乙酰荧光素(FDA)和碘代丙啶(PI)共同染色,在200μL含10μg/mL PI和20μg/mL FDA的染液中加入30μL的精液,39℃染色30min。荧光显微镜下观察,并使用DP70 CCD图像采集系统获得图像。图像中红色荧光标记的精子为死精子,绿色荧光标记的为活精子。

1.7 精子顶体完整率

用Giemsa染色,制作精子抹片,福尔马林液固定15min,Giemsa液染色90min,染色结束后水洗并风干,10×100倍油镜(Olympus BH2)观察精子,记录顶体完整率。

1.8 统计分析

采用Excel数据分析软件对实验数据进行方差检验。

2 结果

2.1 冻精稀释液中不同甘油含量对解冻后精子活率、活力及顶体完整率的影响

表1结果显示,BF5冷冻保护液中添加不同体积分数的甘油(2%和3%),采用38℃水浴解冻以3%甘油冷冻精液解冻后的活率、活力显著高于2%甘油组冷冻效果($P < 0.05$),而顶体完整率却显著低于2%甘油组($P < 0.05$)。

表 1 不同甘油含量冻精液解冻后精子活率、活力及顶体完整率

Table 1 Motility, survival and acrosome-intact rate of sperm cryopreserved with different glycerin concentrations

甘油质量分数/ %	活 率/ %	活 力/ %	顶体完整率/ %
2	15.67 ±2.52 A(1 152)	28.16 ±1.20 A(1 148)	22.55 ±8.91 a(1 064)
3	38.56 ±3.19 B(1 256)	52.05 ±4.03 B(980)	11.57 ±2.68 b(1 567)

注 同列内不同小写字母差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母差异极显著 ($P < 0.01$); 括号内为所观察的精子数目。下同。

2.2 不同温度解冻后精子活率、活力及顶体完整率
不同温度解冻结果表明, 50 水浴解冻的精子

活力显著高于 38 水浴解冻的 ($P < 0.05$), 但活率及顶体完整率无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 不同解冻方法解冻后精子的活率、活力及顶体完整率

Table 2 Motility, survival and acrosome-intact rate of sperms cryopreserved with different thawing methods

不同解冻方法	活 率/ %	活 力/ %	顶体完整率/ %
38 水浴 30 s	38.56 ±3.19 a(1 256)	52.0 ±4.03 a(980)	11.57 ±2.68 a(1 567)
50 水浴 12 s	39.10 ±2.18 a(1 208)	60.70 ±.60 b(875)	11.03 ±4.20 a(910)

注 冷冻精液稀释液为含 3% 甘油的 BF5, 下同。

2.3 不同温度解冻后精子在受精液中孵育 6 h 内活率变化

将不同温度水浴解冻精液在 mBO^[6] 受精液中孵育, 38 水浴解冻的精子在 4 h 内精子活率仍保持 0.3 以上, 而 50 水浴解冻的精子活率维持 0.3 以上不超过 2 h (表 3)。

表 3 解冻后精子孵育中活率的变化

Table 3 Motility change of the thawed sperms during incubation %

解冻后培养时间/ h	不同解冻方法	
	38 水浴解冻 30 s	50 水浴解冻 12 s
0	38.56 ±3.19 a (1 256)	39.10 ±2.18 a (1 208)
1	35.02 ±3.78 a (1 128)	32.58 ±5.02 a (800)
2	33.53 ±4.48 a (805)	22.26 ±4.57 b (906)
3	31.15 ±3.31 a (960)	19.74 ±0.22 c (972)
4	30.58 ±7.71 a (930)	14.52 ±0.30 c (948)
5	25.19 ±1.43 a (843)	10.80 ±1.42 c (942)
6	23.75 ±2.96 a (820)	9.54 ±1.94 c (996)

在 (17 ±0.5) 常温保存, 随时间延长精子活率及顶体完整率均逐渐下降, 2 种稀释液保存精子活率在 6 d 内无显著性差异 ($P > 0.05$), 且活率均保持在 0.3 以上 (图 1), 顶体完整率也无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

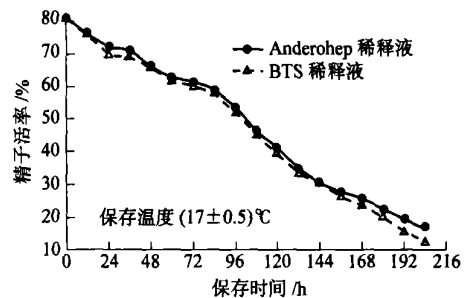


图 1 精液低温保存中精子活率的变化

Fig. 1 Motility rate of sperm preserved at low temperature (17 ±0.5)

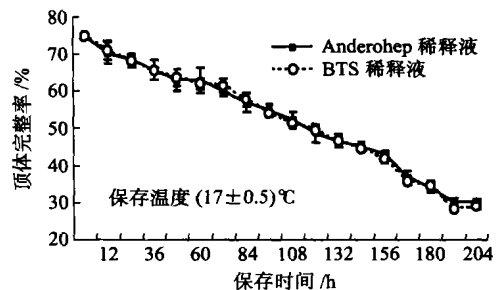


图 2 精液低温保存中精子顶体完整率的比例

Fig. 2 Acrosome-intact rate of sperms preserved at normal temperature (17 ±0.5)

2.4 精液低温保存的活率及顶体完整率变化

使用 Androhep 和 BTS 稀释液稀释后的精液

3 讨论

实验证明细管法冷冻的效果好于颗粒法^[279],而且体外受精实验方便取用,所以本实验也采取细管法冷冻。冷冻保存精液实验中使用的抗冻保护剂甘油是渗透性细胞冷冻保存剂,含3%甘油的冷冻精液解冻后精子活率与其他研究者的实验结果相似^[2],而含2%甘油的冷冻精液解冻后精子活率显著低于3%甘油组($P < 0.01$) (表1),这可能是由于2%的甘油对精子的抗冻保护能力不足。甘油的过量渗透对精子细胞膜有一定的影响,可导致精子的顶体完整率下降^[10]。本实验中3%甘油组的精子顶体完整率低于2%甘油组,且存在显著性差异($P < 0.05$) (表1)。精子一旦发生顶体反应,其存活时间就会变短,所以采用猪的冷冻精液进行人工授精实验时即使采取子宫深部输精受胎率及产仔率也往往低于鲜精或低温保存的精液^[1]。由于猪的冷冻精液解冻后精子活率不够理想,所以目前猪的精液冷冻保存还不能在生产上推广应用。在不同温度条件下解冻3%甘油组冷冻精液的实验结果显示,在50条件下解冻后的精子活力高于38的解冻效果(表2),但是由于高温解冻使精子活动加剧,能量消耗加快,所以其死亡速度也加快(表3),这一结果与其他研究结论相似^[11]。体外受精实验中使用的精液活率需要保持在0.3以上,保持时间为4~6h^[6];本实验中,3%甘油组冷冻精液,38水浴解冻后在受精液中孵育4h内活率高于0.3,可以满足体外受精的要求。

在17保存实验中,3d内精子活率可以保持在0.6以上,精液在采集之后静置使精子与精清充分接触,这能使精子增强对低温刺激的耐受性^[11],并且在配置低温保存稀释液时调整溶液pH为弱酸性以降低精子的代谢^[4],从而达到延长精子保存时间的目的。在低温保存的前3d中精子活率保持的比较稳定,呈缓慢下降趋势,且在6d内Anderohep和BTS稀释液保存的精子活率无显著性差异($P > 0.05$) (图1),BTS稀释结果也有类似的报道^[35]; (17±0.5)保存精液204h,顶体完整率始终缓慢下降(图2),此趋势与其他报道^[11]结果相一致。

综上所述,含有体积分数3%甘油的BF5冷冻

稀释液冷冻精液,38水浴解冻后的精子在受精液中孵育4h内活率仍高于0.3,基本上能满足体外受精的要求;而采用Anderohep和BTS精液稀释液在(17±0.5)条件下保存3d以上精子的活率达0.6以上,可以达到人工授精的要求。本实验结果可为猪精液冷冻与低温保存技术在生产中的应用提供参考,体内、外受精效果有待于进一步的实践证明。

参 考 文 献

- [1] 高飞,岳奎忠,杨增明.猪精液液态保存的研究进展[J].中国畜牧杂志,2004,40(6):46-49
- [2] Abeydeera L R, Day B N. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa[J]. Biol Reprod, 1997, 57:729-734
- [3] 陈大元.受精生物学[M].北京:科学出版社,2000:76-89
- [4] 吕晓艳,孙德林,王楚端.不同稀释液的精液保存时间及其相关性分析[J].中国畜牧杂志,2005,41(9):50-52
- [5] 孙德林,吕晓艳,王楚端.不同配方稀释粉对公猪鲜精保存的效果分析[J].动物科学与动物医学,2004,21(12):43-45
- [6] Wang W H, Okuda K, Niwa K. In vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen thawed ejaculated spermatozoa[J]. J Reprod Fertil, 1991, 93:491-499
- [7] Waberski D, Weitze K F, Rath D et al. Wirkung von bovinem Serumalbumin und Zwitterionenpuffer auf flüssigkonservierten Ebersamen[J]. Zuchthyg, 1989, 24:128-133
- [8] Pursel V G, Johnson L A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure[J]. J Anim Sci, 1975, 40:99-102
- [9] 周佳勃,岳奎忠,孙兴参,等.猪精液冷冻技术的研究[J].中国兽医学报,2002,22(3):295-298
- [10] Huo L J, Ma X H, Yang Z M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long term storage[J]. Theriogenology, 2002, 58(7):1349-1360
- [11] 钱云,师蔚群,钟声,等.猪冷冻附睾精子与体外成熟卵母细胞的体外受精[J].中国兽医学报,2001,21(6):624-626