

小尾寒羊精液冷冻温度曲线初步研究^{*}

胡建宏¹, 王立强², 李青旺²

(1 西北农林科技大学 干旱半干旱研究中心, 陕西 杨陵 712100; 2 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 在超低温温度计的监控下, 用氟板法进行了小尾寒羊冻精颗粒的制作。结果表明, 小尾寒羊精液冷冻的关键因素是冷冻温度和降温速度, 其冷冻温度曲线的始冻温度为 -124°C ~ -108°C , 热平衡温度和入氮温度为 -133°C , 熏蒸温度为 -108°C ~ -133°C ; 其降温温区分别为滴冻时间45 s, 熏蒸和热平衡共5 min, 其中熏蒸时间256 s, 热平衡时间44 s, 从而构成了完整的小尾寒羊精液冷冻温度曲线。

[关键词] 精液冷冻; 温度曲线; 液氮; 小尾寒羊

[中图分类号] S826.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)01-0085-04

绵羊精液冷冻保存技术研究主要是在20世纪50年代开始的, Emmens等^[1]于1950年将绵羊精液冷冻到 -79°C 获得了较高的存活率, 随后一些研究者将绵羊精液在大范围零下温度进行了冷冻和保存试验。我国从1974年开始进行了绵羊冷冻精液的研究^[2], 并取得了一些进展^[3], 有些地方还制订了绵羊精液冷冻保存的技术规程^[4]。但是, 在国内冷冻精液的生产工艺中, 大多数对冷冻温度要求不明确, 缺乏比较科学的冷冻温度曲线标准, 导致精子活力较低^[5]。在家畜精液冷冻技术中, 由冷冻温度和降温速度构成的冷冻温度曲线是影响精子冻后活力和受精率等生物参数的主要因素^[6], 绵羊精液能耐受 -79°C ~ -160°C 的温度变化^[7], 精液在降温过程中, 必须快速通过 0°C ~ -60°C 的危险温区^[5], 这些因素决定着冻精存活率的高低。

小尾寒羊是我国乃至世界著名的多胎、多产优良品种, 以其繁殖力高、产肉性能好、适应性强等特点而著称于世, 被誉为中国的“国宝”, 世界的“超级绵羊”, 在我国得到大面积推广。为了充分发挥小尾寒羊种公羊的生产潜力, 迅速扩大优良群体, 本研究采用冷冻精液这一先进的动物繁殖技术, 利用氟板法, 通过超低温温度计测定精液在冷冻容器冷冻面的温度变化来反映精液温度的变化, 找出适宜的冷冻温度和降温速度, 从而模拟出小尾寒羊精液冷冻的温度变化曲线, 为冻精生产的标准化和自动化提供一些参考数据。

1 材料与方法

1.1 器械

超低温温度计, 氟板, 5 L液氮罐, 冰箱, 显微镜, 电子天平, 假阴道, 高压消毒锅, 恒温箱等。

1.2 稀释液的配制

用电子天平准确称量各种试剂, 然后用双蒸水溶解, 经过滤和消毒后, 冷却至室温, 放入 5°C 冰箱内备用, 作为基础液。I液为基础液加卵黄后的稀释液, II液为加入冷冻保护剂的I液。

1.3 精液的采集

选取膘情中等, 体质健康, 性欲旺盛的种公羊, 利用假阴道按常规采精方法采集精液。精液采出后, 立即在 35°C ~ 38°C 下进行常规品质评定, 要求原精液的pH值为6.5~6.8, 畸形率5%以下, 密度达到“密”, 活力0.8, 无异常气味, 色泽为乳白色。

1.4 精液的稀释和平衡

1.4.1 第一次稀释和平衡 在精液常规检查完成后, 将符合要求的鲜精按1:1~1:2的比例立即用预热的稀释I液进行等温稀释, 然后用8~10层纱布包裹储精瓶, 降温后, 置于 2°C ~ 5°C 的冰箱中平衡1 h。

1.4.2 第二次稀释和平衡 将经过第一次稀释和平衡的精液在冰箱内按1:1的比例加入含冷冻保护剂的等温稀释II液后, 再放入 2°C ~ 5°C 的冰箱中继续平衡2~3 h。

^{*} [收稿日期] 2001-05-24

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(4130303)

[作者简介] 胡建宏(1969-), 男, 陕西白水人, 助理研究员, 在读硕士, 主要从事家畜繁殖研究。

1.5 冻精颗粒的制作

将超低温温度计的探头与氟板连接,并将氟板浸入液氮中预冷,以氟板不沸腾为准,然后将氟板上提,使其离液氮面1~2 cm,再盖上液氮罐的盖子,待温度恒定后打开盖子,用直滴管按每毫升10滴(每颗粒0.1 mL)的剂量滴冻。滴完后加盖熏蒸5 min,最后将氟板连同冻精一起浸入液氮中。

1.6 活力镜检及冻精保存

将制作好的冻精用维生素B₁₂在40~50℃温水中解冻后检查活力,对于活力在0.3级以上者,装入编号的纱布袋内,浸入液氮罐中保存。

1.7 试验数据的记录

从滴冻开始时测定温度,以后每5 s记录1次,直到冻精颗粒浸入液氮为止。试验结束后,对每批试验的数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 精液冷冻温度曲线的构成要素

2.1.1 始冻温度 根据试验记录的原始资料,将每批冻精活力在0.3级以上者的始冻温度进行统计分析,求其平均值,结果见图1。

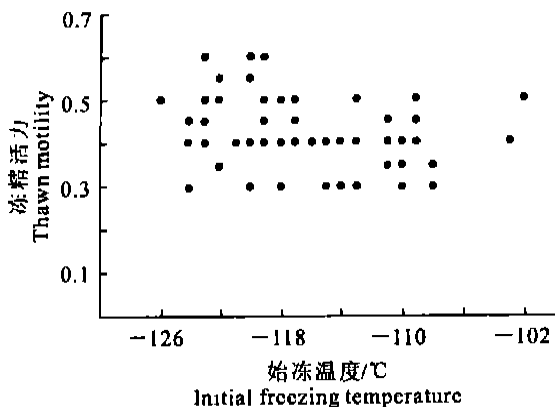


图1 始冻温度与冻精活力的关系

Fig 1 The relation between initial freezing temperature and thawed motility

从图1可以看出,小尾寒羊冷冻精液的始冻温度为-124~-108℃,也即从-124℃开始滴冻,当温度达-108℃时则完成滴冻。从图1还可以看出,始冻温度为一温度范围,因为随着时间的延长,氟板冷冻面的温度升高,因而始冻温度也相应升高,在该温度范围内,必须将冻精颗粒全部滴完。

2.1.2 热平衡温度与入氮温度 在制作冻精颗粒时,精液和氟板冷冻面存在120~180℃的极大温差^[5],二者接触后,精液温度迅速下降,冷冻面温度

上升,当完成滴冻加盖熏蒸时,两者温度又急剧下降,直到温差为零时,达到平衡状态,即称为热平衡温度。

通过对原始数据的统计分析,在本次试验研究中,冻精颗粒解冻后的活力分布大部分在0.4~0.5。在活力为0.3~0.4,0.4~0.5,0.5~0.6以及0.6级以上的热平衡温度分别为135,132,129,135℃;总体平均热平衡温度为-133℃,这与活力为0.4~0.5的热平衡温度十分接近,且比始冻温度低。冻精颗粒完成熏蒸后则投入到液氮中,由于该过程极短,瞬时即可完成,因此可以认为,热平衡温度与冻精颗粒的入氮温度(冻精颗粒浸入液氮前的温度)基本相同,即入氮温度也为-133℃。

2.1.3 熏蒸温度 冻精颗粒的熏蒸区为滴冻完成后开始加盖熏蒸至热平衡这一区段,其起始温度应为滴冻结束时的温度,因而本试验的熏蒸温度为-108~-133℃。

2.1.4 降温温区 降温温区指从精液滴冻开始到冻精颗粒浸入液氮所经历的时间,包括滴冻区、熏蒸区和热平衡区3个温区,它表示精液的降温速度。

滴冻区 滴冻时间与冻精活力的关系见表1。分析表1可知,活力为0.3~0.4,0.4~0.5,0.5~0.6时的滴冻时间分别为53,46,37 s,其基本趋势为滴冻时间越短活力亦越高。本次试验的平均滴冻时间为45 s,这与张一玲等^[8]报道的颗粒型冷冻精液要求在45~50 s滴冻100粒的滴冻速度相一致。一般情况下,在制作冻精颗粒时,必须在60 s以内完成滴冻,否则随着时间的延长而极易达到危险温区,降低冻精活力。

熏蒸区和热平衡区 在本次试验中,通过对冻精颗粒的颜色及活力的观测,以及综合有关报道研究^[4,9~10],确定最佳的熏蒸和热平衡时间为5 min。为了应用方便,将熏蒸时的温度下降区段称为熏蒸区,而将温度恒定的这一区段称为热平衡区。其熏蒸时间和热平衡时间见表1。

从表1得知,本试验的平均熏蒸时间为256 s,热平衡时间为44 s,在活力分布最广的0.4~0.5,其熏蒸时间与热平衡时间分别为250和50 s,二者十分接近。一般情况下,在制作冻精颗粒时,其熏蒸时间应为220~275 s,热平衡时间为25~80 s。

表 1 冻精活力与降温温区的关系

Table 1 The relationship between thaw n motility and cooling time																	s
处 理 Treatment	冻精活力 Thaw n motility																
	[Q 3, Q 4)				[Q 4, Q 5)				[Q 5, Q 6)				[Q 6, —)				
滴 冻 Initial freezing	50	50	65	60	55	55	40	50	55	40	45	30	30	35	60	40	
	50	40	60	50	45	60	55	35	35	55	20	20	60				
	55	35	75	50	45	45	35	60	55	30	35	40	45				
					60	25	25	45	45	35							
					40	50											
熏蒸 Freezing above liquid nitrogen	265	275	275	250	235	250	245	220		255	245	225	265	250	275		
	260	250	255	260	220	245	275	250		255	225	250	270	265			
	275	260	255	250	255	255	240	270		245	270	260	245				
					235	260	265	245		255							
					255	265	270	250									
热平衡 Thermal balance					255	240											
	35	25	25	50	65	50	55	80	80	45	55	75	35	50	25	35	
	40	50	45	40	55	25	50	45	45	45	75	50	30				
	25	40	45	50	60	30	65	40	35	55	30	40	55				
					55	45	35	30	50	45							
					45	60											

2 2 小尾寒羊精液冷冻温度曲线

颗粒型冷冻精液是将精液陆续逐滴滴在冷冻面板上,开始滴冻的精液始冻温度低,随着时间的延长始冻温度也不断升高。本研究采用氟板制作冻精颗粒,由于氟板有一定的厚度和重量,增加了热容量,绝热性能好,因而能较好地保持原有的始冻温度。小尾寒羊精液冷冻温度曲线见图 2。

Colas 等^[7]所报道的绵羊精液在液氮面上部温度 - 75~ - 125 ℃冷冻效果没有差别的范围之内,并与其结果一致;热平衡温度和入氮温度为- 133 ℃;熏蒸温度为- 108~ - 133 ℃。其滴冻时间为 45 s,熏蒸时间为 256 s,热平衡时间为 44 s。在制作冻精颗粒时,必须提高滴冻速度,缩短滴冻时间,使精液快速通过危险温区,提高冻精活力。

3 结论与讨论

从图 1 及表 1 可以看出,本次试验的小尾寒羊的冻精活力主要分布在 Q 4~ Q 5,有相当一部分也达到 Q 5 级以上,这说明本次试验是比较成功的,并初步得到了小尾寒羊的精液冷冻温度曲线。但是,家畜冷冻精液在牛方面发展很快,在羊方面尚处于试验研究阶段^[9],因为其受胎率较低。另外,本次试验的小尾寒羊精液冷冻温度曲线与有关研究差异较大^[10],而且与其他畜种的精液冷冻温度曲线也有较大差异^[5, 11],由于本试验是对小尾寒羊精液冷冻温度曲线的初步探讨,这一问题还有待今后进一步研究。

在本次试验中,由于受条件限制,只研究了精子的冻后活力。但据研究报道^[2],绵羊精子的耐冻性低于牛精子,虽然活力较高,而能保持生物学完整性的仅有 20%~ 30%,受损害的精子虽能运动,但不一定能进入卵子并受精,目前还没有搞清楚这种受损发生于冷冻区还是解冻区。因此,关于如何提高冻精的受胎率问题仍然是今后研究的关键。

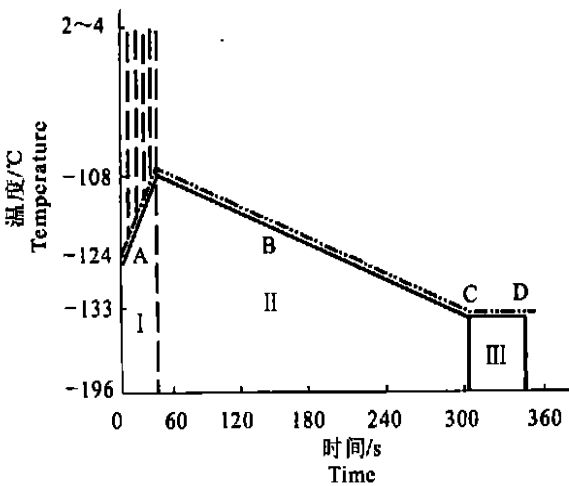


图 2 小尾寒羊精液冷冻温度曲线

A. 始冻温度; B. 熏蒸温度; C. 热平衡温度; D. 入氮温度;
I. 滴冻区; II. 熏蒸区; III. 热平衡区;
- - - - - 颗粒精液; — 冷冻面
Fig 2 The temperature curve in semen freezing of the small-tail sheep
A. Initial freezing temperature; B. Temperature in freezing above liquid nitrogen; C. Thermal balance temperature; D. Temperature at immersing into liquid nitrogen;
I. Initial freezing; II. Freezing above liquid nitrogen; III Thermal balance;
- - - - - Semen pellet; — Freezing surface

本次试验的始冻温度为- 124~ - 108 ℃, 在

[参考文献]

- [1] 郭年藩, 杨玉怀 绵羊精液冷冻保存技术研究综述(上) [J]. 国外畜牧科技, 1995, 22(3): 30- 34
- [2] 朱裕鼎, 张坚中, 陈元明, 等 提高绵羊冷冻精液质量和受胎率的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 1982, 13(1): 9- 16
- [3] 王立铭, 曾培坚, 冯克明 提高绵羊冷冻精液受胎率的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 1981, 12(4): 251- 257.
- [4] 徐大康, 李 炜 绵羊精液冷冻保存技术操作试行规程 [J]. 中国养羊, 1990, (4): 40- 44
- [5] 渊锡藩, 张一玲, 邢小军 影响精液质量的几个冷冻技术因素 [J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(3): 225- 230
- [6] 董 伟 第九届国际家畜繁殖会议论文(综述) [J]. 国外畜牧科技, 1981, (6): 38- 40
- [7] 郭年藩, 金东宝 绵羊精液冷冻保存技术研究综述(下) [J]. 国外畜牧科技, 1995, 22(4): 22- 27.
- [8] 张一玲, 渊锡藩, 邢小军 我国牛冷冻精液生产工艺温度曲线的现状分析研究 [J]. 黄牛杂志, 1994, 20(增刊): 34- 36
- [9] 李青旺, 武 浩 动物繁殖学 [M]. 西安: 西安地图出版社, 2000
- [10] 渊锡藩, 张一玲 动物繁殖学 [M]. 陕西杨陵: 天则出版社, 1993
- [11] 刘海军, 王立强, 渊锡藩 德国牧羊犬精液冷冻保存研究 [J]. 甘肃畜牧兽医, 1998, 28(2): 6- 8
- [12] 杨树源, 高锦发 绵羊冷冻精液受精率低的原因及改进方法(上) [J]. 国外畜牧科技, 1995, 22(5): 29- 32

Study on the temperature curve in semen freezing of the small-tail sheep

HU Jian-hong¹, WANG Li-qiang², LI Qing-wang²

(1 Research Center for Arid and Semiarid Areas; 2 College of Animal Sciences and Veterinary Medicine,
Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract Using the superlow temperature thermometer, frozen semen pellets of the small-tail sheep were produced by F plate. The results showed that the technological key factor in the processing procedures of sheep semen freezing was the establishment of temperature curve consisted of the freezing temperature and the cooling rate. The initial freezing temperature was -124°C to -108°C , and its required time was 45 s. The thermal balance temperature was -133°C , and its required time was 44 s. The temperature at immersing into liquid nitrogen was -133°C , and it almost required no time, the temperature in freezing above liquid nitrogen was -108°C to -133°C , and its required time was 256 s. All these constituted the temperature curve in semen freezing of the small-tail sheep.

Key words: semen freezing; temperature curve; liquid nitrogen; small-tail sheep