

猪精液冷冻保存的初步研究^{*}

李青旺, 江中良, 王立强, 胡建宏, 于永生, 夏凡

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 采用液氮熏蒸法制作猪冻精颗粒, 对稀释液及冷冻保护剂进行优化筛选。结果表明, 在5种稀释液中, 5号稀释液优于其他4种($P < 0.05$); 甘油的冷冻保护性能优于乙二醇和二甲基亚砜($P < 0.01$), 其适宜浓度为2 mL/L; 稀释液中添加安钠咖可有效延长精子的冻后存活时间($P < 0.01$)。猪精液冷冻效果的关键因素是冷冻温度、冷冻速度和解冻温度, 通过对不同温度情况的研究, 初步制定了猪精液冷冻温度曲线。

[关键词] 猪; 冷冻精液; 冷冻保护剂; 冷冻曲线; 精子活率

[中图分类号] S828.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)04-0063-04

猪是我国畜牧业生产的主要品种, 是肉类消费的主要来源之一, 约占总消费肉类的60%~80%。我国猪品种资源丰富, 冷冻优良种公猪精液对于充分发挥良种猪的遗传品质以及猪遗传资源的保护均具有极其重要的应用价值。猪冷冻精液技术研究始于1956年, Polge^[1]首次报道对猪精液进行冷冻成功, 并获得通过人工授精技术所产仔猪。但到目前为止, 与牛、羊相比, 由于猪冷冻精液生产难度大, 技术水平较低, 导致冻精活率低、受胎率低、产仔数较鲜精少等^[2]诸多原因, 使得猪冷冻精液一直难以在生产中大范围推广应用, 严重制约着我国地方猪种改良和肉品质量提高以及冷冻生物学的基础研究。因此, 本研究通过对猪精液冷冻保存技术的研究, 可为猪冷冻精液的基础研究提供理论依据, 同时在生产实践中对提高猪冻精活率以及繁殖率具有重要的指

导作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

西北农林科技大学种猪场12月龄、体质健康、性欲旺盛的大约克种公猪1头。

1.2 稀释液的筛选

1.2.1 稀释液的配制 用电子天平准确称量各种试剂, 经双蒸水溶解后, 盛入已编号的试剂瓶中配制成1~5号稀释液的基础液(表1), 然后进行过滤、灭菌, 冷却至室温, 放入2~5℃冰箱中备用。采样前, 取出基础液按比例加入卵黄配制成I液, 置于35℃水浴锅中预热。然后再向I液中加入不同浓度的冷冻保护剂即为II液(冷冻液), I、II液需现用现配。

表1 稀释I液的成分和剂量

Table 1 Compositions and dosage of diluent I

稀释液 Extender	葡萄糖/ (g·L ⁻¹) Glucose	乳糖/ (g·L ⁻¹) Lactose	蔗糖/ (g·L ⁻¹) Sucrose	EDTA/ (g·L ⁻¹)	Tris/ (g·L ⁻¹)	柠檬酸钠/ (g·L ⁻¹) Sodium-citrate	硫酸铵/ (g·L ⁻¹) Vitrinol ammonium	甘氨酸/ (g·L ⁻¹) Glycin	卵黄/ (mL·L ⁻¹) Egg yolk
1	-	-	84	4	6	3	2	-	50
2	-	-	75	-	5	5	-	5	200
3	-	60	-	-	-	5	-	0	-
4	40	-	12	-	-	-	-	-	100
5	15	30	-	-	-	-	-	8	240

1.2.2 稀释液辅助剂的添加 降温平衡前向稀释液中添加一定剂量的安钠咖(Caffeine and Natrium Benzoate, CNB)和Vc, 使其最终质量浓度分别为400和10 mg/L。

1.3 精液的采集

用手握法采精, 选择中段浓份精液经4层纱布过滤, 除去胶状物后, 用生物显微镜于37℃下进行常规品质检查。选择无异味、色泽乳白色、精子形态

^{*} [收稿日期] 2003-01-20

[基金项目] 98 留学回国启动基金(4130107)

[作者简介] 李青旺(1956-), 男, 陕西西乡人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理与调控技术研究。

正常、活率在 0.7 以上、密度为“密”的精液供试。

1.4 精液的预处理

将质量合格的精液保存在 32~35℃ 的保温壶中平衡 60~80 min, 使精子与精清充分接触, 然后经 800 r/min 离心 10 min, 弃掉精清。为防止长时间静置使猪精子进入假死状态, 在离心前应轻轻晃动贮精瓶数次, 以使精子恢复活力。

1.5 数据处理

数据处理用 t 检验和方差分析, 重复 5 次以上。

表 2 不同稀释液精子冻后活率

Table 2 Sperm motility after freezing in different diluents

稀释液 Diluent	次数 Times	原精活率 Sperm motility	冻前活率 Pre-freezing motility	冻后活率 After-freezing motility	复苏率/% Recovery rate
1	12	0.7	0.67 ± 0.03 a	0.11 ± 0.02 a	16.4 a
2	12	0.7	0.70 ± 0.04 a	0.10 ± 0.01 e	14.3 a
3	12	0.7	0.66 ± 0.01 a	0.14 ± 0.01 a	21.2 a
4	12	0.7	0.64 ± 0.04 a	0.43 ± 0.02 b	67.2 b
5	12	0.7	0.69 ± 0.02 a	0.51 ± 0.02 c	73.9 d

注: 表中每列所标字母不同者为差异显著 ($P < 0.05$), 下表同。

Note: Figures with different letters in the same column show significant difference ($P < 0.05$). The following tables are just the same.

2.2 不同冷冻保护剂及浓度对冻精活率的影响

本研究选取甘油、二甲基亚砷和乙二醇 3 种不同的冷冻保护剂, 设置了 5 种不同的浓度水平, 采用二因子重复试验, 研究不同冷冻保护剂及不同浓度对冻精活率的影响, 结果见表 3。

表 3 不同浓度下不同冷冻保护剂对精子冻后活率的影响

Table 3 Effect of the difference cryoprotectants with difference concentration on sperm motility after freezing

浓度/ (mL · L ⁻¹) Contents	甘油 Glycerol	二甲基亚砷 DM SO	乙二醇 Glycol
1	0.33 ± 0.06 a	0.30 ± 0.05 a	0.12 ± 0.03 d
2	0.53 ± 0.05 b	0.41 ± 0.04 c	0.16 ± 0.04 d
3	0.52 ± 0.02 b	0.40 ± 0.06 c	0.15 ± 0.05 d
4	0.50 ± 0.04 b	0.39 ± 0.03 c	0.12 ± 0.07 d
5	0.32 ± 0.05 a	0.25 ± 0.06 a	0.10 ± 0.05 d

表 3 表明, 冻精活率在 3 种冷冻保护剂间差异

表 4 不同稀释液添加剂对精子冻后活率及存活时间的影响

Table 4 Effect of the difference supplement in diluent on sperm motility and living time after freezing

添加剂 Supplement	即时活率 Instant survival rate	保存时间/h Storage time				总存活时间/h Total time	生存指数 Living index
		4	8	12	24		
对照 Control	0.50 ± 0.04 a	0.36 ± 0.04 a	0.20 ± 0.05 a	0.15 ± 0.03 a	少数 Little	60.42 ± 4.74 a	5.08 ± 0.87 a
安钠咖 CNB	0.58 ± 0.10 a	0.50 ± 0.08 b	0.40 ± 0.10 b	0.35 ± 0.06 b	0.30 ± 0.04	154.85 ± 8.23 b	16.42 ± 1.58 b
Vc	0.30 ± 0.06 b	0.15 ± 0.09 c	0.12 ± 0.03 c	0.06 ± 0.03 c	少数 Little	62.39 ± 7.93 c	2.35 ± 0.26 c

从表 4 可以看出, 在 2 种添加剂中, 添加安钠咖组的精子冻后活率和生存指数显著高于对照和 Vc 两组 ($P < 0.01$)。对即时活率与生存指数 2 项指标分析表明, 在猪冷冻精液中添加适量的安钠咖有利于提高精子冻后活率和总存活时间, 安钠咖是提高

2 结果与分析

2.1 不同稀释液对冻精活率的影响

不同配方稀释后, 精子的冻后活率见表 2。分析表明, 用 4 号和 5 号稀释液时精子冻后活率显著高于其他 3 种稀释液 ($P < 0.05$), 冻精复苏率也显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$), 而用 5 号稀释液精子冻后活率和复苏率明显优于 4 号 ($P < 0.05$), 因而 5 号稀释液为较佳稀释液, 其配方最优。

极显著 ($P < 0.01$), 且不同浓度水平间差异也十分明显 ($P < 0.05$), 这表明不同冷冻保护剂及不同浓度水平对猪精子冻后活率具有显著影响 (表 3)。对 3 种冷冻保护剂及其在不同浓度时精子冻后活率进行平均数多重比较表明, 以 2~4 mL/L 甘油作为冷冻保护剂时冷冻效果较佳, 冻后活率达 0.50~0.53, 以 2 mL/L 甘油为冷冻保护剂所制作冻精的冻后活率最高, 可达 0.58。

2.3 不同稀释液添加剂对精子冻后活率及存活时间的影响

本研究选取 2 种添加剂, 设 1 个对照组, 以 5 号稀释液为基础液, 甘油浓度为 2 mL/L, 观察不同添加剂在冻精颗粒解冻后于室温下保存不同时间的精子活率与生存指数, 结果见表 4。

猪冻精活率较为理想的添加剂。

2.4 猪精液冷冻保存的冷冻温度曲线

本研究采用氟板制作颗粒冷冻精液, 以其作为冷冻面, 由于氟板绝热性能较好, 因而能较好地保持原有的始冻温度。制作时, 利用 5 L 广口液氮罐, 冷

冻面与液氮面距离为 1~2 cm,待冷冻面充分预冷后用胶头滴管在氟板上连续等量滴冻,每滴剂量为 0.1 mL。参考胡建宏等^[3]小尾寒羊精液冷冻曲线的基本方法,其始冻温度为-135℃,滴冻温度保持在-110~-130℃,滴冻时间一般为 50 s,保持在 60 s 以内,加盖熏蒸 250 s 后,浸入液氮中贮存。猪精液冷冻温度曲线见图 1。

2.5 不同解冻方法对精子冻后活率的影响

采用干解法与湿解法分别解冻冻精颗粒,湿解

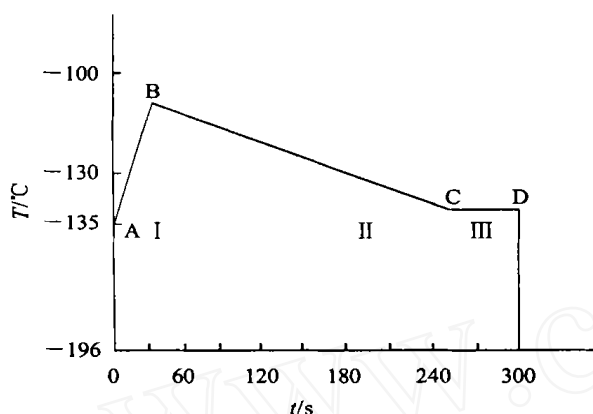


图1 猪精液冷冻温度曲线

A. 始冻温度; B. 熏蒸温度; C. 热平衡温度; D. 入氮温度
I (A-B). 滴冻区; II (B-C). 熏蒸区; III (C-D). 热平衡区

Fig. 1 The freezing curve of boar semen

A. Beginning freeze temperature; B. Suffocating temperature;
C. Balance temperature; D. Nitrogen entering temperature

I (A-B). Dropping freeze section; II (B-C). Suffocating section;
III (C-D). Balance section

3 结论与讨论

目前,冷冻精液稀释液的主要成分可分为稀释剂、营养剂、保护剂以及其他添加剂等 4 大种类。国内外研究者使用的稀释剂成分较多,添加量各异,但糖类是稀释剂的重要组成部分,它可直接被精子分解而产生能量,同时也是一种重要保护物质。本研究结果表明,在猪冻精稀释液中添加 20~40 g/kg 的葡萄糖效果较好,如果将低浓度的葡萄糖(20~30 g/kg)与乳糖(20~30 g/kg)混合使用效果最佳,精子冻后活率平均 0.53,优于黄全成等^[4]、徐章龙等^[5]的研究结果。但葡萄糖浓度不可过高,否则对精子顶体有损害作用^[6]。另外,有人报道^[5],乳糖作为稀释剂的效果比蔗糖和果糖好,这与本研究结果相同。

甘油是一种常用的冷冻保护剂,各种家畜冷冻精液一般都采用,但实际生产中的添加浓度很不一致,如牛冷冻稀释液的添加体积分数为 5%~7%,绵羊为 3.5%~5%^[7]。Fahy^[12]对不含或含有不同甘

油浓度的稀释液进行比较发现,以体积分数 2% 的甘油冷冻效果最好,体积分数 5% 最差,与本研究结论类似。另外,本研究还对比了甘油、二甲基亚砜(DMSO)、乙二醇、丙二醇等几种不同保护剂的冷冻效果,结果表明,甘油作为冷冻保护剂时猪精子的冻后活率明显优于 DMSO 和乙二醇。同时通过精子畸形率检查发现,以乙二醇作为冷冻保护剂,尾部畸形精子较多,顶体异常精子较少,说明乙二醇对精子的顶体有较好的保护作用,而以甘油作为冷冻保护剂时尾部畸形精子较少而顶体异常精子较多。因此,在猪冷冻精液中,甘油是较为适宜的冷冻保护剂,且对精子尾部有较好的保护作用,本研究结果与龙翔等^[8]、周佳勃等^[9]的研究结论一致。

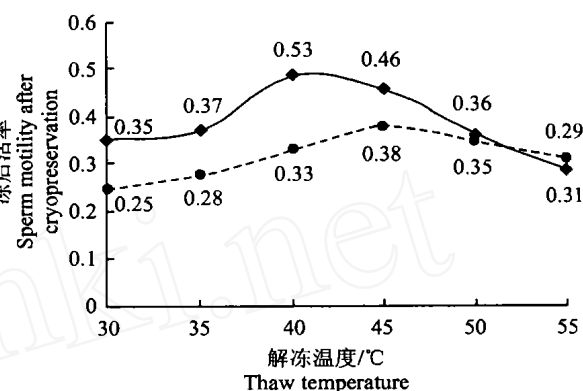


图2 不同解冻方法对精子冻后活率的影响

—◆—, 干解冻; --●--, 湿解冻

Fig. 2 Effect of different methods on sperm motility after thawing

—◆—, Dry thaw; --●--, Wet thaw

油浓度的稀释液进行比较发现,以体积分数 2% 的甘油冷冻效果最好,体积分数 5% 最差,与本研究结论类似。另外,本研究还对比了甘油、二甲基亚砜(DMSO)、乙二醇、丙二醇等几种不同保护剂的冷冻效果,结果表明,甘油作为冷冻保护剂时猪精子的冻后活率明显优于 DMSO 和乙二醇。同时通过精子畸形率检查发现,以乙二醇作为冷冻保护剂,尾部畸形精子较多,顶体异常精子较少,说明乙二醇对精子的顶体有较好的保护作用,而以甘油作为冷冻保护剂时尾部畸形精子较少而顶体异常精子较多。因此,在猪冷冻精液中,甘油是较为适宜的冷冻保护剂,且对精子尾部有较好的保护作用,本研究结果与龙翔等^[8]、周佳勃等^[9]的研究结论一致。

关于稀释液添加剂,常万存^[10]认为安息香酸钠的抑菌作用可以延长精子的存活时间。安钠咖是安息香酸钠与咖啡因合成的药物,咖啡因可能作用于细胞上特异的受体,激活和影响一些酶的活性,参与细胞的多种生理生化过程。本研究于稀释液降温平

衡前添加安钠咖,取得了相对理想的效果,精子冻后活率平均 0.53。但 Smith^[11] 研究认为,在降温平衡后添加安钠咖效果较好,精子解冻后活率为 0.52。因此,关于安钠咖适宜的添加量和如何添加仍有待于进一步研究。

本研究采用干解法与湿解法分别解冻冻精颗粒,结果表明,猪冻精干解法效果显著优于湿解法 ($P < 0.05$)。据徐章龙等^[5]、郭年潘^[12] 以及国外许多科学家研究表明^[13,14],对于猪冷冻精液颗粒的解冻,以干解法效果优于湿解法,且干解冻法操作简单,适于大批量颗粒冻精的解冻,这与本研究结论相同。

对于冷冻温度曲线,本研究的始冻温度为-135

,热平衡温度和入氮温度为-132,熏蒸温度为-108~-132,其滴冻时间为 50 s,熏蒸时间为 250 s,热平衡时间为 50 s 左右。从精子冻后活率可以看出,猪的冻精活率主要分布在 0.32~0.53,有相当一部分达到 0.5 以上,说明本研究取得了较为理想的结果。但是,本研究猪精液冷冻温度曲线与渊锡藩等^[15] 的研究差异较大,而且与其他畜种的精液冷冻温度曲线也有比较显著的差异^[16],但有一点是明确的,即冷冻精液制作过程中必须提高滴冻速度,缩短滴冻时间,以使精液快速通过危险温区,从而提高冻精解冻后活率。由于本研究是对猪精液冷冻温度曲线的初步探讨,有些问题仍有待于今后进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Polge C. Artificial insemination in pigs[J]. Vet Rec, 1956, 68: 62-76
- [2] Fahy GM. Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology[J]. Cryobiology, 1986, 23: 1-13
- [3] 胡建宏,王立强,李青旺. 小尾寒羊精液冷冻温度曲线初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(1): 85-88
- [4] 黄全成,刘丑生,康文彪,等. 猪冷冻精液新技术研究试验报告[J]. 甘肃畜牧兽医, 1993, 23(6): 4-6
- [5] 徐章龙,蒋伟华,蔡加乐,等. 猪精液冷冻技术研究[J]. 中国畜牧杂志, 1999, (4): 28-32
- [6] 李震钟,杨学时,冯健超,等. 家畜繁殖技术进展[M]. 重庆:科学技术文献出版社重庆分社, 1976
- [7] 李青旺,武浩. 动物繁殖学[M]. 西安:西安地图出版社, 2000
- [8] 龙翔,邵秀林. 冷冻保护剂在猪精液冷冻中的作用分析[J]. 畜禽业, 1999, (9): 19-22
- [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(5): 295-299
- [10] 常万存. 添加安钠咖和咖啡因对精子活力的影响[D]. 陕西杨陵:西北农业大学, 1994
- [11] Smith T T. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium[J]. Cryobiology, 1996, 33: 11-18
- [12] 郭年潘. 猪精液常温保存[J]. 国外畜牧科技, 1990, (6): 21-22
- [13] Soede N M. Oestrus expression and timing of ovulation in pigs[J]. British Pig Science, 1998, 39: 187-194
- [14] Golyshev N A. Improvement of technology of boar semen[J]. Animal Reproduction Science, 1997, 59: 49-53
- [15] 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
- [16] 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

Study on the technique of boar semen freezing

LI Qing-wang, JIANG Zhong-liang, WANG Li-qiang, HU Jian-hong, YU Yong-sheng, XIA Fan

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The diluents, the cryoprotectant concentration and freeze curve used to produce frozen boar semen pellets were studied. The results showed that the diluent 5 is the best one ($P < 0.05$) in five groups, and glycerol is better than glycol or DM SO as the cryoprotectant ($P < 0.01$). When the glycerol concentration is 2 percent, the sperm motility of frozen semen pellets is the best in all treatment groups. Supplying CNB (Caffeine and Sodium Benzoate) in the diluent can increase the thaw sperm survival time and motility effectively ($P < 0.01$). The freezing temperature, freezing rate and thaw temperature are the keys which influence the effect on boar freezing semen. The freezing curve of boar semen is established based on studying the different temperature.

Key words: boar; frozen semen; cryoprotectant; freeze curve; sperm motility