

酸诱导分离家兔 X、Y 精子研究

杨海^{1,2}, 李青旺^{1,2}, 胡建宏¹, 韩增胜^{1,2},
赵红卫², 陈晓宇^{1,2}, 吴淑云^{1,2}, 杨智清^{1,2}

(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, 河北 秦皇岛 066004)

[摘要] 利用 X 精子在酸性环境条件下的运动活性比 Y 精子强的原理, 通过酸诱导, 用王氏管分离法(实时精子分离技术)分离家兔 X、Y 精子, 同时利用体视显微镜评定所分离精子的活率, 并用唑吡因染色法进行鉴定。结果表明, 在稀释液 pH 为 5.5 时分离效果最好, 分离后目的精液精子活率平均达 $(91 \pm 1.4)\%$, 较分离前平均精子活率 $(82 \pm 1.3)\%$ 提高了 9.1%, 两者差异极显著 ($P < 0.01$); 分离后的精液中, X 精子的比例为 $(73.3 \pm 1.0)\%$, Y 精子的比例为 $(26.7 \pm 1.0)\%$, 与分离前精液中 X、Y 精子各占 50% 的比例差异均极显著 ($P < 0.01$), 表明酸诱导条件下的王氏管分离法是 X、Y 精子分离简单有效的方法。

[关键词] 酸诱导; X、Y 精子; 王氏管分离法; BWB 液; F 小体

[中图分类号] S829.13

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)03-0021-05

X 与 Y 精子分离是动物性别控制中最直接、最有效的方法, 多年来一直倍受各国研究者的重视。X、Y 精子分离的方法很多, 其中流式细胞仪分离 X、Y 精子是当今应用十分普遍的方法, 对 X、Y 精子的分离准确率高, 一般可以达到 95% 以上, 分离后的精液用于人工授精和卵母细胞体外培养的结果与原精液相比无显著差别^[1]。但流式细胞仪由于存在价格昂贵, 精子分离的过程比较复杂, 分离效率低, 技术要求高, 且染色过程中可能对精子造成一定损害等缺点^[2-4], 使其在大规模应用于当今畜牧业生产时并不现实。而 X、Y 精子分离的其他方法, 如浮游法、电泳法、凝胶过滤法、密度梯度法、免疫分离法等均存在分离效果不明显或可重复性差的缺点。因此迫切需要科研工作者探索出一种新的、可用于实际生产的 X、Y 精子分离方法, 以实现家畜性别的人为控制。

王氏管分离系统是美籍华人王福楠博士于 1986 年发明的专利技术, 它是将生物学、流体力学等学科相互结合而建立起来的一种精子分离系统^[3-4]。其基本原理是利用动物正常精子具有向前浮游的特性, 通过特定的竞争浮游, 将正常精子和精液中的体细胞、组织碎片、微生物、杂质和异常精子分

离开来。该技术能明显纯化和优化精子, 提高精液品质, 已经在临床上应用于人类辅助生殖, 为弱精少精症患者解决了生育问题。BWB 液 (Biggers, Whitten and Whitingham solution, BWB) 是精子操作常用的工作液, 主要用于精卵穿透试验, 具有无肝素等促使精子早衰的获能物质, 能够显著提高精子活动能力^[5-6]。同时, 由于 X、Y 精子在形态、大小、重量等方面的差异以及受 pH 影响后浮游速度的不同, 可通过调整分离液的酸碱度、粘稠度、分离管的长度和弯曲度等, 将 X、Y 精子人为进行分离。但是, 有关将王氏管分离系统和 BWB 液结合起来分离家畜精液 X、Y 精子的研究, 目前尚未见报道。为此, 本试验在改良 BWB 液配方、改变其 pH 的基础上, 利用王氏管分离技术探索最佳 X、Y 精子分离的 BWB 液 pH 值以及精子分离的基本程序, 以为家畜 X、Y 精子分离提供一定的理论依据及实践参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备 HVE-50 高压消毒柜, 日本 HIRAYAMA 公司生产; 全自动离心机, 德国 Heraeus 公司产品; IBE2000 荧光显微镜, 日本生产; 精密 pH

[收稿日期] 2005-07-27

[基金项目] 河北省秦皇岛科技局“转基因动物生产基因工程药物研究”项目 (D08)

[作者简介] 杨海 (1978—), 男, 湖南浏阳人, 在读硕士, 主要从事动物生殖生理与调控技术研究。

[通讯作者] 李青旺 (1956—), 男, 陕西米脂人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理与调控技术研究。

计,电子天平,分离管,注射器,恒温箱等。

1.1.2 药品与试剂 D-葡萄糖,Amresco 公司进口分装;丙酮酸钠,Sigma 公司进口分装;人血清白蛋白,Sigma 公司进口分装;L-精氨酸,北京鼎国生物中心提供;乳酸钠、青霉素、链霉素等。

1.1.3 精液样品 在燕山大学实验动物中心,利用假阴道法集成成年新西兰大耳兔精液,精液采出后经精子洗液洗涤,去除杂质,现场评定活率为 $(80.0 \pm 12.3)\%$,稀释并调整精子密度为 $2.0 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ (精液稀释液为 pH 值 6.8 的 BWV 液),备用。

1.2 方法

1.2.1 改良 BWV 液的配制 BWV 分离液的配方参考张秀成^[5]介绍的方法进行,并添加精氨酸使其终质量浓度为 5 mg/mL。溶液配制好后调节 pH 分别为 6.5,6.0,5.5,5.0,4.5,4.0 和 3.5,0.22 μm 滤膜过滤除菌,现配现用。

1.2.2 最适 pH 值的确定 将精液用分离液 1:1 (体积比)稀释后,每隔 5 min 观察不同 pH 条件下的精子活率,判定最适 pH。最适 pH 值的判定标准为:在 30 min 内精子活率维持在 $(50 \pm 5)\%$ 的时间较长,以利于 X 精子运动,收集最大量的 X 精子。

1.2.3 X、Y 精子的分离 将装有分离液的分离管

于 37 °C 条件下预热 5 min,从粗端缓缓加入等温稀释液 0.5 mL 后,置于 38.7 °C、体积分数 5% CO_2 的细胞培养箱中孵育 30 min,然后用注射器从尖端回收精子。

1.2.4 Y 精子的鉴定 Y 精子的鉴定利用 F 小体染色法。先将分离回收后的精液置于分离回收管内,3 500 r/min 离心 10 min,弃上清液。然后加入固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定 30 min,待干燥后,将玻片置于 0.5% 喹吖因染液中染色 25 min,接着用 pH 值为 6.5 的生理盐水轻轻漂洗玻片 2~3 次,直至无染色液痕迹为止。最后在 400× 荧光显微镜(激发滤片 BG12,屏障滤片 0-565)下进行观察。若精子头部中央出现荧光亮点者为 F 小体阳性,属 Y 精子;若精子头部无荧光亮点者为 F 小体阴性,属 X 精子。据此,显微镜下统计每份精液样品的总精子数和具有 F 小体阳性的精子数,计算 Y 精子的比例。

1.2.5 数据分析 试验数据用 Spss 11.5 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 值对精子活率的影响

精液稀释后不同时间、不同 pH 的精子活率见图 1。

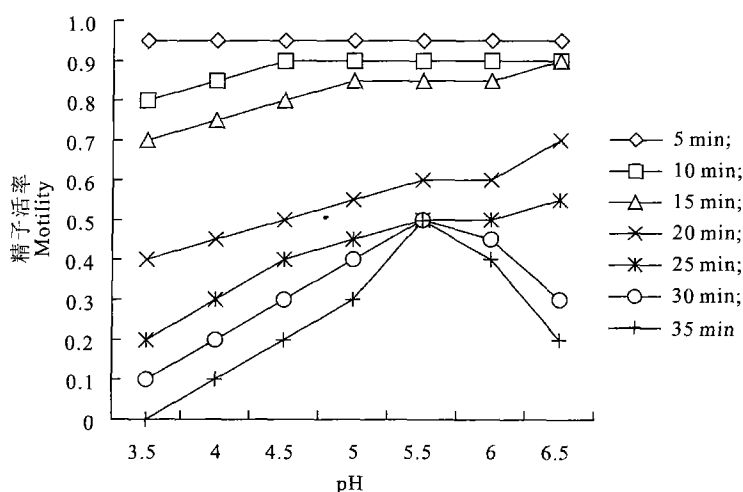


图1 精液稀释后不同时间、不同 pH 的精子活率曲线

Fig. 1 pH value-motility curve of sperm in different times after being diluted

由图 1 可知,在精液稀释后的不同时间段,不同 pH 分离液中精子活率的差异十分明显,且同一时间段中不同 pH 分离液中精子活率变化也较大。在精液稀释 5 min 内,pH 对精子活率没有影响;10 min 时精子活率发生变化的转折点的 pH 为 4.5,此

后在不同 pH 稀释液中精子活率没有变化;15 min 时精子活率发生变化的转折点的 pH 为 5.0,稀释液 pH 从 6.0 上升至 6.5 时,精子活率相应提高;20 min 时精子活率发生变化的转折点的 pH 为 5.5,此时精子活率为 $(60 \pm 5)\%$,随着溶液 pH 的增大,精

子活率有所提高;25 min 时精子活率变化的转折点的 pH 也为 5.5,此时精子活率为(50±5)%,随着溶液 pH 的增加,精子活率有所提高;30,35 min 时精子活率变化转折点的 pH 均为 5.5,此时精子活率为(50±5)%,当稀释液 pH 继续上升时精子活率迅速下降。由此可知,为获得数量多,且活率高的精子,保证分离后精子的质量,分离液的最适 pH 应为 5.5,如果酸度过强则精子活率维持在(50±5)%的时间只有 25 min 左右,而碱性过强时虽然精子活率为(50±5)%的时间也为 30 min,但随后急剧下降,精子回收量较少。表明精子最佳收集时间为精液稀释后 25 min,时间过长则回收精子质量下降,时间过

短则回收精子量较少,难于保障分离后精子的数量要求。

2.2 酸诱导对分离前后精子活率的影响

将 pH 为 5.5 的改良 BWB 液装入王氏管,然后进行 X、Y 精子的分离,将分离前后的精子置于体视显微镜下评定活率,结果见表 1。由表 1 可知,分离前精子活率平均为(82±1.3)%,分离后精子活率平均提高到(91±1.4)%,提高幅度达 9.1%,提高幅度十分明显,两者相比差异极显著($P<0.01$)。表明可以采用王氏管法,利用 pH 为 5.5 的改良 BWB 液分离精子。

表 1 酸诱导分离前后精子的活率
Table 1 Motility of original and separated sperm %

次数 Number	分离前 Preseparation	分离后 After separation	提高幅度 Increase range	次数 Number	分离前 Preseparation	分离后 After separation	提高幅度 Increase range
1	81±1.0	91±1.3	10.0	6	81±1.0	93±0.8	12.0
2	83±0.8	89±1.1	6.0	7	82±0.8	90±1.0	8.0
3	83±0.7	92±0.9	9.0	8	82±0.9	91±1.1	9.0
4	84±0.5	93±1.0	9.0	平均值 Average	82±1.3	91±1.4	9.1
5	80±0.9	90±1.2	10.0				

注: * * 表示与分离前的平均值相比差异极显著($P<0.01$)。
Note: * * Means significant difference at 0.01 level.

2.3 酸诱导分离后精液中 X、Y 精子的比例

通过王氏管法将精液用 pH 为 5.5 的改良 BWB 液分离后,再将回收的精子用喹吖因进行染色,然后在荧光显微镜下观察 Y 精子,计数 Y 精子的个数和精子总数,统计分析 X、Y 精子的比例,其结果见表 2。从表 2 可以看出,经过数次重复分离,分离后精液中 Y 精子比例最高为 28.0%,最低为

24.5%,平均为(26.7±1.0)%;而分离后精液中 X 精子的比例平均为(73.3±1.0)%,X、Y 精子的比例为 2.7 : 1,与自然状态下 X、Y 精子 1 : 1 的比例相比差异极显著($P<0.01$)。因此,通过王氏管法,利用酸诱导分离 X、Y 精子的效果比较理想,分离后精液中 X 精子所占比例和精子活率均较高。

表 2 酸诱导分离后精液中 X、Y 精子的比例
Table 2 Rate of separated X/Y spermatozoa in the separated semen after acid inducement

次数 Number	总精子数 Total sperm	Y 精子数 Y sperm	X 精子数 X sperm	Y 精子 阳性率/% Positive rate	次数 Number	总精子数 Total sperm	Y 精子数 Y sperm	X 精子数 X sperm	Y 精子 阳性率/% Positive rate
1	112	30	82	26.7	6	122	32	90	26.2
2	100	28	72	28.0	7	110	30	80	27.2
3	106	26	80	24.5	8	102	28	74	27.4
4	96	26	70	27.0	平均值 Average	106.4±4.0	28±1.0	78±3.0	26.7±1.0
5	104	28	76	26.9					

3 结论与讨论

3.1 王氏管法分离精子的效果

王氏管分离系统是平置的抗重力型长距离精子

竞争性浮游分离纯化系统。由于一般情况下精液中的非精子成份和运动能力差的精子根本无法浮游 5 cm 以上距离,很难到达收集端,故回收精液中精子活率比原精液明显提高,这是王氏管法可以纯化优

选精子的关键所在。韦相才等^[7]报道,王氏管分离法获得的精子在活率、顶体完整率、膜完整率等方面显著优于上游法和 Percoll 法,证实王氏管分离法能够显著提高精子活率,改善精液品质。本研究结果表明,分离回收后精液中精子活率较原精液提高 9.1%,与对照相比差异极显著($P < 0.01$),这与周汝滨等^[8]、徐岚等^[9]的研究结果一致。但是,分离后的精子最终是否可以应用于生产,分离后精子的体外受精、人工授精能力以及后代性别比例是否变化等仍需进一步研究。

3.2 不同 pH 值对精子运动能力的影响

精子是雄性动物的生殖细胞,同时又是活细胞,极易受到外界环境条件(如酸碱度)的影响。温键萍等^[10]研究表明,精子内存在 2 类酶,一类存在于精子的颈部和中段,与物质转运和能量代谢有关,如果受到抑制,精子的向前运动就会终止或减弱;另一类存在于顶体部位,与精子穿透卵子的能力有关,受到抑制后精子穿透卵子的能力会降低。当精液稀释液的 pH 值较低时,精子内部的 pH 值随之降低,使这 2 类酶处于抑制状态,精子向前运动的能力受到抑制。本研究结果表明,处于酸性环境条件时,Y 精子的运动受到抑制,而 X 精子的运动得到加强。在王氏分离管原精液端至回收端约 5 cm 处,30 min 后回收的精子中 X 精子比例高达 73.3%,这说明最先到达回收端的精子主要为 X 精子。陆仁康等^[2]研究表明,利用王氏管分离系统对动物精子进行分离的

准确率可以达到 84%。关于酸性环境对 X、Y 精子运动能力的影响在水生动物上尤其明显,黄睿等^[11]报道,在 pH 值为 8.0~9.0 时圆背角无齿蚌精子活率最高,寿命最长。阮国良等^[12]报道,泥鳅精子在 pH 为 7.6 时活力最强,最适宜受精。但是,关于 pH 改变精子活力的机理还不甚清楚,作者推测可能是因为酸性环境改变了 Y 精子内某些酶(如乳酸脱氢酶)的活性,使精子运动发生了变化。如果真是这样,则又说明 X、Y 精子酶不但种类不同,而且存在量的差别,这有待于今后进一步深入研究。

3.3 稀释液中加入精氨酸的作用

精氨酸为酸性氨基酸,水解后能够降低分离液的 pH 值,抑制 Y 精子的运动,从而促使更多的 X 精子直线向前运动,最先到达回收端。本研究在 BWB 稀释液中加入 5 mg/mL 精氨酸后,对抑制 Y 精子活率、扩大回收后精液中 X 精子比例具有较好的协助作用。吴伟等^[13]、谢献胜等^[14]等研究报道,奶牛人工授精前从子宫颈注入一定量的精氨酸,分别取得了 65.4% 和 73.77% 的母犊率;赵宗胜等^[15]将精氨酸配成精液稀释液用于绵羊的人工授精,也取得了 63.32% 的母羔率。可见,稀释液中添加精氨酸有利于 X 精子的运动,而抑制了 Y 精子的活动,与本研究结果一致,说明精氨酸在精子分离时对保证 X 精子优先浮游到达目的地具有良好的促进作用。

[参考文献]

- [1] 张明,卢克焕.用分离精子进行性别控制研究的现状[J].中国生物工程杂志,2003,23(7):57-61.
- [2] 陆仁康,彭守静.实时精子分离系统(王氏管系统)[J].男性学杂志,1994,8(2):123-125.
- [3] Wang F N. Real-time sperm separation system; a review of Wang tubes and related technology[J]. Arch Androl, 1995, 34: 13-32.
- [4] Wang F N, Chen C M, Merino G, et al. Wang tube system improve pregnancy in infertility treatment[J]. Mol Androl, 1991, 3: 387-395.
- [5] 张秀成.精子检测与分离[M].北京:北京科学技术出版社,1993:183-214.
- [6] Hafez E S E, Hafez B. Reproduction in Farm Animals[M]. 7th ed. New York: A Wolters Kluwer Company Press, 2000: 491-495.
- [7] 韦相才,田佩玲,陈乐平,等.精子分离两种方法的比较和评价[J].中华男科学,2000,6(4):234-237.
- [8] 周汝滨,潘超仁,李永全,等.用实时精子分离系统提高精子质量的研究[J].中国优生与遗传杂志,2001,9(2):98-102.
- [9] 徐岚,陆仁康,陈玲,等.实时精子分离技术(王氏管法)的实验和临床应用研究[J].生殖医学杂志,2001,10(1):38-41.
- [10] 温键萍,罗自强,徐若璞. HFMC 在体外抑制精子功能的机理初探[J]. 华西医科大学学报, 1989, 20(3): 274-276.
- [11] 黄睿,孙丽萍.不同 pH 值和阳离子对圆背角无齿蚌精子活力的影响[J]. 抚州师范高等专科学校学报, 2001, 20(3): 37-41.
- [12] 阮国良,冯家斌,杨代勤.渗透压、pH 值和温度对泥鳅精子活力及受精率的影响[J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(1): 22-25.
- [13] 吴伟,刘润铮,王光辉.限制 Y 精子活力对犊牛性别的影响[J]. 吉林农业大学学报, 1998, 20(1): 62-64.
- [14] 谢献胜,仲崇怀,蒋春茂.精氨酸对奶牛后代性别控制的实验[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(2): 19-20.
- [15] 赵宗胜,代江生,李大全.精氨酸对绵羊性别控制的试验报告[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1998(4): 10-11.

The separation of X and Y spermatozoa in the environment of acid inducement

YANG Hai^{1,2}, LI Qing-wang^{1,2}, HU Jian-hong¹, HAN Zeng-sheng^{1,2},
ZHAO Hong-wei², CHEN Xiao-yu^{1,2}, WU Shu-yun^{1,2}, YANG Zhi-qing^{1,2}

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Environment and Chemistry Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: Separating animal's X and Y spermatozoa is the most direct and efficient way to control animal's sex. Real-time separation technology was used in our study and its theory is that the X spermatozoa swims faster than Y spermatozoa in acidic solution, X spermatozoa are aim spermatozoa and the separation result (motility of separated sperm, rate of X spermatozoa) was identified with microscope and Quarine dyeing. In order to find the suitable pH value of separation solution, the original sperm was diluted with BWW solution in different pH values, finally, the pH 5.5 solution was found as separation solution. This study took pH 5.5 solution as separation solution and used real-time separation technology to separate the X and Y spermatozoa. The result showed that the motility of separated sperm reached $(91 \pm 1.4)\%$ and increased by 9.1% compared with the original, and significant differences existed between the separated sperm and the original ($P < 0.01$); the rate of X spermatozoa reached $(73.3 \pm 1.0)\%$, Y spermatozoa reached $(26.7 \pm 1.0)\%$, the difference was significant compared with the original. The real-time separation technology in the environment of acid inducement is a brief and effective technology in the separation of X and Y spermatozoa.

Key words: acid inducement; X、Y-spermatozoa; real-time separation; BWW solution; F-body

(上接第20页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)03-0016-EA

Cloning and analyzing of the secondary structure
of the 3' noncoding region of RHDV

LIU Guang-qing¹, ZHANG Yu-ying^{1,2}, YUN Tao¹, NI Zheng¹, ZHANG Miao-tao³,
LIANG Hua-li¹, HUA Jiong-gang¹, LI Shuang-mao¹, DU Qing-yun¹, SHENG Zu-tian¹

(1 Key laboratory of Virology & Biotechnology of Agriculture Ministry, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China;

2 Animal Veterinary Medicine College Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3 College of Animal Science and Technology, North west Sci-Tech University
of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: The authentic 3' end sequence of Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), including part of VP60, VP12, 3'NCR, and poly (A) tail, was amplified by 3'RACE, and the result showed 3'NCR was 59nt in length, and at least 27 As existed in the poly(A) tail. Compared with other reference strains, JX/CHA/97 strain share higher nucleotide acid identity with the reference strains (93.5%—100%). With the help of RNA structure soft ware, the secondary structure of RHDV was predicted and analysed. The result showed that there were two stem-loops (SL) in the region, which may be necessary for viral replication. Besides, it was found that the formation of SL1 was closely related to the presence of poly(A) tail, which implied that poly(A) tail may be related to the stability of the second structure of 3' NCR, and to the replication of viral genom.

Key words: rabbit hemorrhagic disease virus; 3' Non-coding region; poly(A); secondary structure; bioinformatics