

海藻糖、蔗糖和乳糖对猪精液 冷冻保护效果的影响*

张树山¹, 李青旺^{1,2}, 李 刚¹, 陈晓宇¹, 胡建宏¹, 韩增胜¹, 王立强¹

(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 环境与工程学院 生物工程系, 河北 秦皇岛 066004)

[摘 要] 比较了在冷冻保存液中添加不同水平海藻糖、蔗糖和乳糖对猪精液冷冻保护的效果。结果表明, 添加3种双糖均能提高精液的冷冻保护效果, 其最佳添加水平均为0.035 g/mL, 在该添加水平下, 海藻糖组的精子活率、活力和精子质膜完整率分别为(46.34±0.52)%, (41.38±0.39)%和(43.51±1.78)%, 与蔗糖组差异均不显著($P>0.05$), 但均显著高于乳糖和对照组($P<0.05$); 海藻糖组的有线粒体活性精子百分率和精子顶体完整率分别为(44.56±1.16)%, (64.09±0.81)%, 显著高于蔗糖、乳糖和对照组($P<0.05$), 3种双糖均随添加水平升高精子的顶体完整率逐渐升高; 海藻糖组获能处理前后的精子获能率分别为(3.68±0.07)%和(41.82±0.56)%, 显著优于蔗糖、乳糖和对照组($P<0.05$)。说明海藻糖对猪精液冷冻保护的效果最好, 最佳添加水平为0.035 g/mL。

[关键词] 猪精液; 精液冷冻; 海藻糖; 蔗糖; 乳糖

[中图分类号] S828.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0041-05

自1956年Polge首次利用冷冻精液人工授精获得仔猪至今^[1], 猪精液冷冻技术虽然经过多年的发展, 但与奶牛冷冻精液的应用相比, 仍有很大差距。这主要是由于猪精子对低温打击非常敏感, 而且冷冻-解冻过程中精子功能极易受到损伤, 导致冷冻精液授精的受胎率和窝产仔数均较低; 另外, 冷冻精液采用的小剂量包装也难以达到人工授精要求。这些问题严重制约了猪冷冻精液在猪育种及其商品化生产中的应用^[2-3]。

冷冻保存液中的冷冻保护剂对精子的冷冻效果至关重要, 自从人们发现甘油对冷冻精子有保护作用后, 家畜精液冷冻技术得到迅速发展^[4]。甘油能够渗入到精子细胞内部, 浓缩或结合细胞内水分, 降低溶液中盐的浓度和冷冻保存液的渗透压。但是, 甘油在保护精子的同时对精子又有一定毒害作用, 可使部分精子解冻后失去受精能力。因此, 近年来猪精液冷冻保存液中非渗透性冷冻保护剂, 如海藻糖、蔗糖等引起了研究人员的高度关注。海藻糖作为非还原性双糖, 是天然双糖中最稳定的糖类, 对细胞无毒害作用。有研究^[5-8]认为, 海藻糖能够在生物活性细胞

脱水的情况下在细胞膜外形成一层保护膜, 从而在冷冻过程中保护细胞膜的完整性。Bayard等^[9], Dal-mata等^[10]和Woelders等^[11]分别研究了海藻糖对小鼠、兔子和牛冷冻精液保护效果的影响; Eman等^[12]和Eman等^[13]分别研究了海藻糖、蔗糖对山羊精子冷冻-解冻后细胞膜的影响; 牧人等^[14]研究了蔗糖对山羊冷冻-解冻后精子细胞膜功能的保护效果; Fernando等^[15]研究认为, 冷冻保存液添加乳糖对猪精子细胞膜有保护作用。

本研究在TCG冷冻保存液的基础上, 添加不同水平的海藻糖、蔗糖和乳糖3种双糖, 以解冻后精子活率、顶体完整率、精子获能率作为冷冻-解冻猪精子评定指标, 比较了不同双糖对猪精液冷冻效果的影响, 以期对精液非渗透性冷冻保护剂研究提供一些参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 精液采集 本试验所用精液采自河北省秦皇岛市抚宁县瘦肉型种猪场中猪龄1.5~2岁、体格

* [收稿日期] 2005-10-27

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2004K02-G11-03, 2005K02-G03-03); 西北农林科技大学科研专项(05ZR100)

[作者简介] 张树山(1976-), 男, 山西大同人, 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, 陕西西乡人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理与调控及生物技术研究。

E-mail: liqingwangysu@yahoo.com.cn

健壮、繁殖性能良好的 8 头约克夏种公猪。精液采集采用手握法,收集中段精子浓厚部分精液。精液采集后用专用滤纸除去胶状物,以商用稀释液 1:1 稀释后,显微镜初检活力在 0.7 以上的精液用保温瓶运回实验室。

1.1.2 试剂及仪器 主要药品: D-海藻糖, 异硫氰荧光素标记的花生凝集素(FITC-PNA)、碘化丙啶(PI)和 CTC 3 种染色剂均为 Sigma 公司产品; 蔗糖、乳糖均购自北京奥博公司; 甘油购自天津巨星盛源公司。

主要仪器设备: 程序冷冻仪为英国 BD TRON-ICS 公司生产; 超低温温度计为美国 Barnant 公司生产; 电子分析天平为沈阳龙腾公司生产; PHS-3C 型精密 pH 计为南京高倍德公司生产; OSMOMAT 030 型渗透压计为北京华粤公司生产; 倒置荧光显微镜和数码相机为日本尼康公司生产。

1.1.3 溶液及荧光染液 (1) TCG 冷冻基础液^[16]。准确称取葡萄糖 1.1 g, 柠檬酸 1.48 g, Tris 2.42 g, 加蒸馏水至 100 mL, 调 pH 值至 6.21, 渗透压 286 mOsm。

(2) BTS 液。准确称取葡萄糖 3.7 g, EDTA 10.125 g, 二水柠檬酸钠 0.6 g, NaHCO_3 0.125 g, KCl 0.007 5 g, 青霉素 0.06 g, 硫酸链霉素 0.1 g, 加蒸馏水至 100 mL, 调 pH 值至 7.25, 渗透压为 315 mOsm。

(3) PI(碘化丙啶)贮存液。取 0.004 g PI 溶于 2 mL PBS 中, 0.45 μm 滤膜过滤后, -20°C 避光贮存。

(4) 果糖-柠檬酸钠低渗液。果糖 0.675 6 g, 二水柠檬酸钠 0.367 6 g, 加蒸馏水至 50 mL, 渗透压为 150 mOsm。

(5) 罗丹明 123 贮存液。取 0.000 4 g 罗丹明 123 溶于 2 mL 二甲基亚砜(DMSO)中, 0.45 μm 滤膜过滤, 避光贮存。

(6) CTC 染液。取 Tris 0.024 2 g, NaCl 0.076 g, L-半胱氨酸 0.006 g, CTC 0.039 g, 溶于 10 mL 双蒸水中, 调 pH 值至 7.8, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 避光保存。

(7) 异硫氰荧光素标记的花生凝集素(FITC-PNA)染液。取 0.001 g FITC-PNA, 溶于 10 mL PBS 中, 用 0.45 μm 滤膜过滤后, 避光贮存。

1.2 试验设计

将海藻糖、蔗糖和乳糖分别配制成 375 mmol/L 的等渗溶液, 均以不同的添加水平加入

TCG 冷冻基础液中, 使海藻糖、蔗糖和乳糖的质量浓度分别为 0.035, 0.070, 0.105, 0.140 g/mL, 以 TCG 冷冻基础液为对照。用上述不同水平的 3 种双糖冷冻液对猪精液进行冷冻, 解冻后镜检评定精子活率和活力, 并结合 PI-罗丹明 123、FITC-PNA 和 CTC 3 种荧光染色法, 以及低渗肿胀检测(HOST)评定其冷冻效果。

1.3 精液预处理及冷冻

精液运抵实验室后, 用 50 mL 离心管等量分装, 离心($800 \times g$, 10 min)、弃上清, 加 BTS 液至原来体积, 15 层纱布包裹在 15 $^\circ\text{C}$ 恒温箱平衡 3 h, 将平衡处理过的精液用离心管分装, 离心($800 \times g$, 10 min), 弃上清, 加 I 液(TCG 冷冻基础液+ 体积分数 20% 卵黄), 置于 5 $^\circ\text{C}$ 冰箱中缓慢降温 2 h, 加 II 液(含体积分数 3% 甘油的 I 液), 5 $^\circ\text{C}$ 冰箱平衡 1 h, 装管(0.25 mL), 置于程序冷冻仪中以 1 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 从 5 $^\circ\text{C}$ 缓慢降至 -5°C , 迅速移至液氮上方 3 cm 熏蒸 15 min, 将细管投入液氮。

1.4 解冻后猪精子质量的评定

1.4.1 精子活力 取猪精液冷冻细管, 37 $^\circ\text{C}$, 30 s 水浴解冻后, 取 10 μL 精液于载玻片上, 加盖玻片, 在 400 $\times$ 倒置显微镜下主观评定精子活力(直线运动精子百分率)。

1.4.2 精子活率和有线粒体活性精子百分率 将解冻的精液用等温 BTS 液稀释, 调整精子密度为 $3 \times 10^6/\text{mL}$ 。先取等温的 100 μL HEPES/BSA^[16] 缓冲液置于预温的 1.5 mL 离心管中, 然后加入 10 μL PI 贮存液和 1 μL 罗丹明 123 贮存液, 避光孵育 10 min, 最后加入 50 μL 精液, 在 37 $^\circ\text{C}$ 、黑暗潮湿环境孵育 30 min。取 10 μL 精子悬液于载玻片上, 加盖玻片, 荧光显微镜(400 $\times$)下观察。死精子在波长 488 nm 紫外光激发下头部核区发红色荧光, 活精子和有活性线粒体的精子头部不发光, 而尾巴线粒体部分(中段)有亮绿色荧光。计算精子活率(活精子百分率)和有线粒体活性精子百分率。

1.4.3 精子质膜完整率 采用果糖-柠檬酸钠低渗液进行低渗肿胀检测(HOST)。将解冻的精液用低渗液稀释, 调整精子密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, 取 20 μL 精子悬液滴于血细胞计数板上, 400 $\times$ 显微镜下观察, 计算弯尾精子百分率, 每次计算至少 200 个精子。

1.4.4 精子顶体完整率 参考 Lamia 等^[17]的方法, 利用 FITC-PNA 染液染色后, 荧光显微镜观察精子顶体形态。将解冻后的精液铺在 PV P 液面上,

800 × g 离心 6 m in, 弃上清液; 将沉淀精子用 PBS 重悬, 调整精子密度为 1 × 10⁶/mL, 从中取 30 μL 涂片, 空气中自然干燥, 甲醇固定 10 m in 后, 再加入 30 μL FITC-PNA 染液, 37 ℃、黑暗潮湿环境下孵育 30 m in, 再用 PBS 溶液冲洗, 自然干燥后加少量增光剂(含体积分数 10% 的 PBS 液), 无色指甲油封片, 立即在荧光显微镜下观察。

1.4.5 精子获能率 将解冻后的精液用等温 BTS 液稀释, 调整密度为 1 × 10⁶/mL, 取 400 μL 精子悬液加到 1 mL 30 g/L PVP 溶液面上, 500 × g 离心 6 m in, 弃上清, 沉淀进行如下处理。(1) 获能处理前的染色。取 200 μL PBS 溶液重悬沉淀, 加入 200 μL CTC 染液, 混匀后避光孵育 30 s, 用 36 μL 体积分数 12.5% 戊二醛液混匀后固定, 取 10 μL 精子悬液, 加盖盖玻片, 用无色指甲油封片, 立即在 400 × 荧光显微镜下观察。(2) 获能处理后染色。用 200 μL TCM 液沉淀悬浮, 置培养箱中孵育 3 h 使其获能,

然后染色、固定并观察。每项每次计算至少 200 个精子, 计算精子获能率。

1.5 数据处理

用 SPSS 软件的 One-Way ANOVA 对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 3 种双糖对解冻后猪精子活率的影响

由表 1 可见, 不同双糖对解冻后猪精子活率有很大影响, 海藻糖、蔗糖和乳糖在冷冻保存液中的最佳添加水平均为 0.035 g/mL。在该添加水平下, 解冻后猪精子活率显著高于对照组 ($P < 0.05$); 随双糖添加水平的增加, 各添加组的精子活率急剧下降; 海藻糖和蔗糖的添加效果无明显差异, 解冻后精子活率最高分别达到 $(46.34 \pm 0.52)\%$ 和 $(43.58 \pm 0.49)\%$, 但均显著优于乳糖和 TCG 对照。

表 1 3 种双糖对冷冻-解冻后猪精子活率、活力和有线粒体活性精子百分率的影响 ($n = 21$)

Table 1 Viability, motility and the percentages of mitochondrial activity sperm after frozen-thawed with disaccharides ($n = 21$)

组别 Group	添加水平/ (g · mL ⁻¹) Concentration	精子活率/% Viability	精子活力/% Motility	有线粒体活性 精子百分率/% Mitochondrial activity
TCG 对照 Control	0	31.61 ± 0.97 a	31.26 ± 0.37 a	31.62 ± 1.17 a
海藻糖 Trehalose	0.035	46.34 ± 0.52 b	41.38 ± 0.39 b	44.56 ± 1.16 b
	0.070	32.40 ± 1.01 a	31.06 ± 0.52 a	31.49 ± 0.96 a
	0.105	21.63 ± 1.02 c	12.03 ± 0.04 c	21.08 ± 0.46 c
	0.140	18.96 ± 1.57 d	12.03 ± 0.04 c	16.97 ± 0.61 d
蔗糖 Sucrose	0.035	43.58 ± 0.49 b	41.29 ± 0.43 b	41.08 ± 0.53 e
	0.070	37.29 ± 1.12 e	32.03 ± 0.09 a	33.38 ± 1.21 a
	0.105	21.06 ± 0.38 cd	11.68 ± 0.26 c	20.61 ± 0.52 c
	0.140	17.97 ± 0.62 d	11.68 ± 0.26 c	17.05 ± 0.78 d
乳糖 Lactose	0.035	38.29 ± 0.37 e	32.33 ± 0.45 a	35.76 ± 0.61 a
	0.070	27.39 ± 0.52 f	26.89 ± 0.75 a	31.48 ± 0.46 a
	0.105	20.09 ± 0.47 cd	11.00 ± 0.00 c	19.81 ± 0.58 c
	0.140	18.67 ± 0.65 d	11.00 ± 0.00 c	14.07 ± 0.65 d

注: 表中同列数据后标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

Note: Values with different small letters within the same column differ significantly. Same in the following tables

2.2 3 种双糖对解冻后猪精子活力的影响

由表 1 可知, 3 种双糖的适宜添加水平为 0.035 g/mL, 在该添加水平下, 海藻糖、蔗糖处理组解冻后精子活力显著优于 TCG 对照和乳糖组 ($P < 0.05$), 海藻糖的添加效果略优于蔗糖, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。乳糖对解冻后精子活力的影响与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 表明乳糖与葡萄糖对猪精子的冷冻保护作用相似。

2.3 3 种双糖对解冻后有线粒体活性精子百分率的影响

由表 1 可知, 海藻糖、蔗糖和乳糖在冷冻保存液中的最佳添加水平均为 0.035 g/mL, 在该添加水平下, 有线粒体活性精子百分率分别为 $(44.56 \pm 1.16)\%$, $(41.08 \pm 0.53)\%$ 和 $(35.76 \pm 0.61)\%$, 海藻糖和蔗糖均显著高于对照及各自组内其他添加水平 ($P < 0.05$)。其中海藻糖效果最好, 解冻后有线粒

体活性精子百分率显著高于蔗糖、乳糖以及 TCG 对照 ($P < 0.05$)。

2.4.3 3 种双糖对解冻后猪精子质膜完整率的影响

由表 2 可以看出, 3 种双糖的最适添加水平均为 0.035 g/mL , 在该添加水平下冻后精子质膜完整

率显著高于其他添加水平 ($P < 0.05$), 其中海藻糖和蔗糖组的质膜完整率分别为 $(43.51 \pm 1.78)\%$ 和 $(43.37 \pm 0.72)\%$, 显著高于乳糖及对照组 ($P < 0.05$); 3 种双糖均随添加水平的增加, 精子质膜完整率急剧下降。

表 2 3 种双糖对冷冻-解冻后猪精子质膜完整率、顶体完整率和精子获能率的影响 ($n=21$)

Table 2 Effect of 3 disaccharides on the parameters of membrane integrity, acrosome integrity and capacitation of frozen-thawed sperm

组别 Group	添加水平/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration	质膜完整率/% Membrane integrity	顶体完整率/% Acrosome integrity	精子获能率/% Rate of capacitation sperm	
				获能处理前 Before capacitation	获能处理后 After capacitation
TCG 对照 Control	0	$31.40 \pm 1.13\text{ a}$	$38.85 \pm 0.72\text{ ac}$	$8.72 \pm 0.85\text{ a}$	$29.23 \pm 0.52\text{ a}$
海藻糖 Trehalose	0.035	$43.51 \pm 1.78\text{ b}$	$64.09 \pm 0.81\text{ b}$	$3.68 \pm 0.07\text{ b}$	$41.82 \pm 0.56\text{ b}$
	0.070	$27.43 \pm 3.59\text{ c}$	$65.38 \pm 1.16\text{ b}$	$4.41 \pm 0.16\text{ b}$	$28.95 \pm 0.66\text{ a}$
	0.105	$19.23 \pm 0.96\text{ d}$	$66.02 \pm 2.04\text{ b}$	$4.29 \pm 0.24\text{ b}$	$17.69 \pm 0.85\text{ c}$
	0.140	$14.92 \pm 0.51\text{ de}$	$67.49 \pm 1.62\text{ b}$	$5.17 \pm 0.62\text{ b}$	$15.67 \pm 0.09\text{ c}$
	0.035	$43.37 \pm 0.72\text{ b}$	$38.91 \pm 0.53\text{ ac}$	$7.61 \pm 0.83\text{ a}$	$38.99 \pm 0.57\text{ c}$
蔗糖 Sucrose	0.070	$33.29 \pm 0.62\text{ a}$	$39.27 \pm 0.67\text{ ac}$	$8.59 \pm 0.63\text{ a}$	$33.88 \pm 0.69\text{ d}$
	0.105	$19.31 \pm 0.74\text{ d}$	$40.63 \pm 0.52\text{ a}$	$10.65 \pm 0.57\text{ c}$	$17.35 \pm 0.73\text{ c}$
	0.140	$17.58 \pm 0.72\text{ d}$	$41.09 \pm 0.53\text{ a}$	$10.28 \pm 0.73\text{ c}$	$12.90 \pm 0.18\text{ e}$
	0.035	$35.07 \pm 0.91\text{ a}$	$36.24 \pm 0.51\text{ c}$	$7.39 \pm 0.61\text{ a}$	$34.71 \pm 0.42\text{ d}$
	0.070	$30.56 \pm 0.47\text{ c}$	$36.48 \pm 0.88\text{ c}$	$10.97 \pm 0.48\text{ c}$	$25.84 \pm 0.46\text{ a}$
乳糖 Lactose	0.105	$18.54 \pm 0.58\text{ d}$	$38.51 \pm 0.71\text{ ac}$	$11.56 \pm 0.71\text{ c}$	$16.83 \pm 0.91\text{ c}$
	0.140	$14.49 \pm 0.75\text{ e}$	$39.37 \pm 0.63\text{ ac}$	$12.29 \pm 0.74\text{ c}$	$14.79 \pm 0.73\text{ e}$

2.5 3 种双糖对解冻后精子顶体完整率的影响

由表 2 可知, 海藻糖能显著提高冻后精子的顶体完整率, 其中以 0.035 g/mL 添加水平的效果最好, 精子顶体完整率达 $(64.09 \pm 0.81)\%$, 显著高于蔗糖、乳糖各添加组及对照组 ($P < 0.05$); 随着添加水平的升高, 各组解冻后精子顶体完整率逐渐提高, 但各组内不同添加水平间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.6 3 种双糖对解冻后精子获能率的影响

由表 2 可知, 获能处理前, 与蔗糖和乳糖组相比, 海藻糖可显著降低冷冻-解冻过程中精子获能率 ($P < 0.05$); 获能处理后, 3 种双糖均可显著提高冻后精子获能率 ($P < 0.05$), 其最佳添加水平均为 0.035 g/mL , 在该添加水平下, 海藻糖、蔗糖和乳糖组的冻后精子获能率分别为 $(41.82 \pm 0.56)\%$, $(38.99 \pm 0.57)\%$ 和 $(34.71 \pm 0.42)\%$ 。

3 结论与讨论

本研究结果表明, 冷冻保存液中添加 0.035 g/mL 海藻糖和蔗糖可以明显提高解冻后猪精子的活率、活力, 效果优于乳糖及对照组。海藻糖能够在活性细胞严重脱水情况下在细胞膜外形成一层保护膜, 在一定程度上对精子起到较好的保护作用。本试验

中, 乳糖添加组的精液解冻效果较差, 这与国外相关研究结果不完全一致^[15, 17-18], 其原因还有待进一步研究。海藻糖可显著提高冻后精子的顶体完整率, 且随着添加水平的增加精子顶体完整率逐渐提高, 但冻后精子活率随着添加水平的升高而下降, 这与 Elman 等^[12]在山羊上的研究结果不完全一致。这可能是由于猪精子对高渗溶液的耐受性较山羊精子差, 渗透压升高导致猪精子迅速脱水死亡。

与乳糖、蔗糖相比, 海藻糖添加水平为 0.035 g/mL 时, 提高冻后精子顶体完整率和质膜完整率的效果最好, 且精子顶体完整率随添加量增加而升高, 表明海藻糖对精子细胞膜有一定的保护作用; 海藻糖能明显提高有线粒体活性精子百分率且显著降低冻后精子获能率, 与 Elman 等^[12]报道结果相一致。猪精子细胞对低温非常敏感, 加之冷冻保存液通常由大分子物质、糖类和渗透性冷冻保护剂组成, 溶液渗透压高, 对细胞产生不利影响。糖类与氨基酸、牛血清白蛋白相似, 通过稳定精子质膜而发挥保护作用, 糖类的羟基与精子膜磷脂的磷酸根结合置换周围的水分子, 从而防止冷冻时由冰晶造成的损伤^[15]。海藻糖是一种非常稳定的非还原性双糖, 与蔗糖、麦芽糖等具有相似的分子结构和生理作用, 对

生物体或生物大分子具有独特的非特异性保护作用,在冷冻过程中可以在细胞膜外产生一种玻璃状的防护层,从而提高细胞对高渗透的耐受性,使细胞继续保持活性。Garcia等^[19]研究表明,海藻糖作为一种水分子替代分子,在冷冻过程中可使细胞膜在固相-液相相互转变中免受损伤,在细胞内主要作为一种亲和性溶质来对抗细胞膜外的渗透压变化。海藻糖保护精子的机制与其晶体结构、溶液的物理构象和化学特性密切相关,在冷冻时,海藻糖可以强有力地束缚水分子,与膜脂质共同拥有结合水或者

本身起到代替膜结合水的功能,防止细胞因失水而造成养分损失和细胞损伤,具有稳定细胞膜和蛋白质结构的特性。Jelinkova等^[20]研究证明,海藻糖在哺乳动物精液冷冻保存中的作用类似其他双糖,尤其是蔗糖,但必须和渗透性冷冻保护剂结合使用才能有效保护精子。

随着对海藻糖等双糖精液冷冻保护机理的进一步研究,人类将完全有可能开发出一种由双糖类部分取代或完全替代渗透性冷冻保护剂的新型抗冻保护剂。

[参考文献]

- [1] Polge C. Artificial insemination in pig[J]. Vet Rec, 1956, 68: 62-76
- [2] Lisa M Thurston, William V Holt, Paul F Wastson. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison[J]. Theriogenology, 2003, 60: 101-113
- [3] Woelders H, Matthijs A, Zuidberg C A, et al. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws[J]. Theriogenology, 2005, 63: 383-395
- [4] Kumar, M illar, W aston. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines[J]. Cryobiology, 2003, 46: 246-253
- [5] 权国波, 马恩普. 海藻糖在哺乳动物细胞保存中的作用机制及应用现状[J]. 临床输血与检验, 2003, 5(1): 78-80
- [6] 聂凌鸿, 宁正祥. 海藻糖的生物保护作用[J]. 生命的化学, 2001, 21(3): 206-209
- [7] Alex, Hans. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002, 57: 1695-1706
- [8] 胥传来, 姚惠源. 海藻糖与脂质膜相互作用的研究[J]. 西安石油大学学报: 自然科学版, 2004, 19(6): 63-66
- [9] Bayarad, Esther, Kathleen. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation[J]. Cryobiology, 1998, 37: 46-58
- [10] Dalinata, Graham. Cryopreservation on rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose[J]. Theriogenology, 1997, 48: 831-841
- [11] Woelders, M atthijs, Engel. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing[J]. Cryobiology, 1997, 35: 93-105
- [12] Eiman, A boagla, Terada. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing[J]. Biology of Reproduction, 2003, 69: 1245-1250
- [13] Eiman, Takato. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa[J]. Theriogenology, 2004, 62: 809-818
- [14] 牧人, 张锁链, 王建国, 等. 蔗糖、牛血清白蛋白和锌离子对白绒毛山羊精液冷冻效果的影响[J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28(2): 120-125
- [15] Fernando, M argareta, Szabolcs, et al. Deep freezing of concentrated boar sperm for intra-uterine insemination: effects on sperm viability[J]. Theriogenology, 2005, 63: 1320-1333
- [16] Eriksson, Rodriguez M artinez. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat Packs and Maxi-straws[J]. Animal Reproduction Science, 2000, 63: 205-220
- [17] Lamia, Daniel, Laetitia. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender[J]. Theriogenology, 2004, 61: 895-907
- [18] Friedler S, Giudice L C, Lamb E J. Cryopreservation of embryos and ova[J]. Fertil Steril, 1988, 49: 743-764
- [19] Garcia De Castro A, Tunnacliffe A. Intracellular trehalose improves osmo-tolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells[J]. FEBS Letters, 2000, 487: 199-202
- [20] Jelinkova L, Selman H A, Arava A, et al. Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos[J]. Fertil Steril, 2002, 76(2): 412-414

(下转第 51 页)

Cloning and immunoprotection of PA recombinant protein of *Bacillus anthracis*

XIE Ying-guo^{1,2}, WU Xiu-fang^{1,2}, WU Su-qin², WANG Xi-liang², HE Wei-ming¹

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

2 Department of Immunology of Research Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Science,

State Key Laboratory of Pathogen and Biosafety, Beijing 100071, China)

Abstract: PA gene amplified was from *Bacillus anthracis* by PCR and then cloned into pET28a(+) vector. The recombinant plasmid pET28a(+)-PA was constructed and expressed and the immunogenicity and immunoprotection were studied. The results show that the length of PA gene is about 2 055 bp and relative molecular mass of the expressed protein is 83 ku; the rPA has good immunogenicity, and specificity of antibody could be detected after 10 d immunization, and the antibody levels rise markedly, 3rd to 12 800; the rPA protein stimulates the specificity of antibody binding to mouse IgG1-based; the rPA protein can promote the growth and multiplication of the mouse spleen cells *in vitro*. The rPA immunization group can significantly increase CD4⁺ mouse spleen cells and the immune responses tend to Th2-type response, showing that the rPA most mediate to humoral immunity. The rPA is fairly immune protective, the protection rate being 50%.

Key words: *Bacillus anthracis*; protective antigen; immunity; genetic engineering vaccine

(上接第 45 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)06-0041-EA

Effect of trehalose, sucrose and lactose on cryopreservation of boar sperm

ZHANG Shu-shan¹, LI Qing-wang^{1,2}, LI Gang¹, CHEN Xiao-yu¹,

HU Jian-hong¹, HAN Zeng-sheng¹, WANG Li-qiang¹

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

2 Department of Biological Engineering, College of Environment & Chemical Engineering, Yanshan University, Qinghuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: In this study, the effects of adding three disaccharides (trehalose, sucrose and lactose) in the cryopreservative solution were compared. The results were summarized as follows: The effect of boar semen cryopreservation was markedly improved with three disaccharides, and their optimum level was 0.035 g/mL; At the level of 0.035 g/mL, the viability, motility, the percentages of mitochondrial activity and membrane integrity of frozen-thawed sperm with trehalose were $(46.34 \pm 0.52)\%$, $(41.38 \pm 0.39)\%$, $(44.56 \pm 1.16)\%$ and $(43.51 \pm 1.78)\%$ respectively, and there was no significant difference between trehalose and sucrose ($P > 0.05$), and both of them were higher than that of lactose group and the control ($P < 0.05$); The percentage of intact acrosome of trehalose group was $(64.09 \pm 0.81)\%$, and higher than that of the sucrose, lactose group, and the control ($P < 0.05$), and increased with the increasing level of three disaccharides; The percentages of capacitating boar sperm before and after capacitation treatment were $(3.68 \pm 0.07)\%$ and $(41.82 \pm 0.56)\%$, and was better than that of lactose group and the control ($P < 0.05$). To sum up, the effect of improving the frozen-thawed sperm quality with trehalose was superior to sucrose, lactose and TCG control, and the optimum level was 0.035 g/mL.

Key words: boar semen; cryopreservation; trehalose; sucrose; lactose