炭疽芽孢杆菌 PA 蛋白的表达及免疫保护效果研究*

谢应国[1,2], 吴秀芳[1,2], 武素琴[2], 王希良[2], 何维明[1]

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;
2 军事医学科学院微生物流行病研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

[摘 要] 扩增了炭疽芽孢杆菌 *PA* 基因, 构建了原核表达质粒 pET-28a-PA, 并对其进行了诱导表达, 对表达产物免疫原性和免疫保护效果进行了研究。结果表明, *PA* 基因的长度约为 2 205 bp, PA 蛋白的相对分子质量为 83 ku; rPA 蛋白具有良好的免疫原性, 初免后 10 d 即可检测到特异性抗体, 第 3 次免疫后抗体水平明显升高, 可达 1∶12 800; rPA 蛋白刺激小鼠产生的特异性抗体亚型以 IgG1 为主; rPA 蛋白在体外对小鼠脾脏细胞有促进生长和增殖作用。rPA 免疫组小鼠脾脏中 CD_4^+ 细胞显著增加, 免疫应答趋向 Th2 型反应, 说明 rPA 介导的免疫反应以体液免疫为主。rPA 具有一定的免疫保护作用, 保护率达到 50%。

[关键词] 炭疽芽孢杆菌; 保护性抗原; 免疫; 基因工程疫苗

[中图分类号] S852.61+.6 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)06-0046-06

炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)是引起动物和人类炭疽病的病原菌, 由于可引起皮肤等组织发生黑炭状坏死, 故称为"炭疽"。炭疽病主要发生于草食动物, 亦可传染人, 其分布几乎遍及全世界, 农民、牧民、皮毛加工与动物屠宰工人及畜牧兽医工作者均容易受到感染。炭疽芽孢杆菌对人类及畜牧业危害很大, 具有致病力强、感染后潜伏期短、病情急和病死率高等特点。炭疽芽孢杆菌的外毒素由保护性抗原(Protective antigen, PA)、致死因子(Lethal factor, LF)和水肿因子(Edema factor, EF)3 种多肽组成[1]。LF 和 EF 是外毒素的毒性成分, 必须首先与 PA 结合才能发挥毒性作用; 单独的 PA 蛋白无毒, 但能诱发机体的保护性免疫反应, 是美国 FDA 批准的人用炭疽疫苗(Anthrax vaccine adsorbed, AVA)[2]。目前, AVA 的生产仍沿用传统工艺, 即从炭疽减毒株的培养物中吸附 PA, 但这种方法获得的 PA 含有微量的其他炭疽芽孢杆菌成分, 可能会导致AVA 在使用中出现一些副作用[2]。此外, AVA 疫苗生产时需要较高的生物安全设施, 使其生产成本增加。2003 年炭疽芽孢杆菌的全基因组序列向全世界发布[3], 这意味着炭疽芽孢杆菌研究进入了一个新的发展阶段, 各国都在研发重组 PA (rPA)的基因工程疫苗。本试验用基因工程方法将炭疽芽孢杆菌 *PA* 基因克隆到原核表达载体 pET28a(+)中, 构建重组表达质粒 pET-28a-PA, 获得了重组 PA 蛋白, 并对其免疫原性进行了研究, 为我国新一代炭疽芽孢杆菌疫苗的研制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、载体及主要试剂 炭疽芽孢杆菌 A16R, Vollum 株由军事医学科学院微生物流行病研究所菌种库提供; 菌株 *E. coli* DH5α, BL21(DE3)和载体质粒 pET28a(+)由军事医学科学院微生物流行病研究所免疫室提供; Pyrobest DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶 *Bam*HⅠ, *Sac*Ⅰ以及 T_4 DNA 连接酶均购自大连宝生物公司; DNA 快速回收试剂盒、羊抗兔酶标二抗购自博大泰克公司; pGEM-T 载体为 Promega 公司产品; 荧光标记的 CD_3, CD_4 和 CD_8 分子购自美国 EB 公司。

1.1.2 引物的设计与合成 根据 GenBank 中收录的炭疽芽孢杆菌 pXO1 质粒的 *PA* 基因序列(登录号为 AF306781)设计 1 对引物。上游引物: CGC GGA TCC ATG GAA GTT AAA CAG GAG

* [收稿日期] 2005-09-23
[基金项目] 国家"973"计划项目(2002CB513208)
[作者简介] 谢应国(1981-), 男, 四川内江人, 在读硕士, 主要从事炭疽芽孢杆菌分子生物学与免疫研究。
[通讯作者] 何维明(1944-), 男, 陕西临潼人, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物疫病防制研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

AAC CGG; 下游引物: CGA GCT CTT ATC CTA TCT CAT AGC CTT TTT TA GAA。上下游引物分别设有 *Bam* H Ⅰ和 *Sac* Ⅰ酶切位点, 引物由上海博亚生物公司合成。

1.2　*PA* 基因的 PCR 扩增

将炭疽芽孢杆菌 A16R 株于水浴中煮沸 10 min, 离心, 取上清即为炭疽芽孢杆菌 pXO1 质粒的 DNA, 用其为模板进行 *PA* 基因的 PCR 扩增。PCR 反应总体积 25 μL, 其中 DNA 模板 2 μL, 上下游引物各 1 μL, dNTPs(2 mmol/L) 2 μL, 聚合酶 0.25 μL, 无菌水 16.25 μL。扩增反应程序为: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 45 s, 54 ℃复性 1 min, 72 ℃延伸 3 min, 循环 35 次; 最后 72 ℃延伸 10 min。产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3　重组表达载体的构建

切下含 *PA* 基因的凝胶, 用 DNA 快速回收试剂盒回收 *PA* 基因, 用 pGEM-T Vector System Ⅰ将 *PA* 基因和 pGEM-T 载体于 16 ℃连接过夜。连接产物转化感受态菌株 *E. coli* DH5α($CaCl_2$ 法制备), 涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养平皿中, 37 ℃培养过夜, 挑取转化菌单菌落进行菌液 PCR 鉴定, 提取 PCR 结果呈阳性的细菌质粒, 用 *Bam* H Ⅰ和 *Sac* Ⅰ双酶切鉴定后送上海博亚生物公司进行测序, 分析插入片段位置是否正确。应用 T_4 DNA 连接酶将测序正确的 PA 片段连接到 pET28a(+) 载体上(16 ℃连接过夜), 构建 pET-28a-PA 重组表达载体。

1.4　rPA 的诱导表达与纯化

1.4.1　rPA 的诱导表达　将构建的 pET-28a-PA 重组表达载体转入 BL21(DE3) 表达宿主菌中, 挑取单个菌落接种于 3 mL 含 100 μg/mL 卡那青霉素的 LB 培养液中, 37 ℃、250 r/min 培养过夜。取 30 μL 新鲜菌液, 接种于另一 3 mL 液体培养基中, 37 ℃、250 r/min 培养至 OD_{600} = 0.6 时, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 ℃、250 r/min 继续培养 5 h, 取样进行 10 g/L SDS-PAGE 蛋白电泳检测。

1.4.2　rPA 的纯化　选用 Amersham 公司 HiTrap chelating 5 mL ×1 预装柱, 用 AKTA FPLC 蛋白纯化分析仪进行镍柱亲和纯化。将预装柱吸附 Ni^{2+}, 先以 Binding Buffer 过柱平衡, 上样后分别用 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000 mmol/L 咪唑溶液洗脱, 收集洗脱液。

1.5　表达产物的 Western blot 鉴定

对纯化的 PA 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。切 2 张 Whatman 3 mm 滤纸和 1 张硝酸纤维素滤膜, 将其浸泡于转移电泳液中, 15～30 min 后取出, 将胶和滤膜夹在两张滤纸之间(胶对阴极), 在 0.65 mA/cm^2 电转 1.5 h。转移结束后, 取出滤膜用封闭液(50 g/L 脱脂奶粉)室温封闭 1 h。PBST 洗膜 3 次(10 min/次), 再按 1∶1 000 加入一抗(重组 PA 蛋白免疫小鼠血清), 37 ℃反应 2 h, PBST 洗膜 3 次(10 min/次), 去除未结合的一抗, 加入 1∶10 000 稀释的 HRP 标记的二抗, 37 ℃反应 2 h, PBST 洗膜 3 次(10 min/次), 去除未结合的二抗, 将硝酸纤维素膜用 10 mL Western blot 显色液显色, 约 15～20 min 后终止反应。

1.6　rPA 免疫保护效果检测

1.6.1　免疫接种　选用 6～8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠(由军事医学科学院动物中心提供) 10 只, 分为 rPA 免疫组和 PBS 对照组, 每组 5 只。rPA 免疫组皮下多点注射以 $Al(OH)_3$ 为佐剂的 rPA 疫苗, 每次 50 μg/只, 于免疫后的第 14 和 28 天分别加强免疫一次。以 PBS 代替 rPA 用同样的方法处理 PBS 对照组。

1.6.2　血清抗体效价的检测　于每次免疫后第 10 天断尾采血分离血清, 采用间接 ELISA 法。以甲醛灭活的炭疽芽孢杆菌包被酶标板。4 ℃过夜, 向每孔加含 20 g/L 牛血清白蛋白的 PBS 100 μL, 37 ℃封闭 2 h, PBST 洗 3 次, 以 1∶50 倍稀释血清, 37 ℃孵育 1 h, PBST 洗 3 次; 向其中加入 HRP 标记的二抗 IgG, 37 ℃孵育 30 min, PBST 洗 3 次, 然后每孔加显色液 100 μL, 37 ℃显色 10 min, 每孔加入 4 mol/L H_2SO_4 50 μL 终止反应。用酶标仪于 450 nm 波长处测 *A* 值。结果判定标准为 *A*(实验孔)/*A*(阴性对照) ≥2.1 时为阳性。同时设空白、阴性对照。

1.6.3　抗体亚型分类　采用间接 ELISA 法。以甲醛灭活的炭疽芽孢杆菌包被酶标板。4 ℃过夜, 向每孔加含 20 g/L 牛血清白蛋白的 PBS 100 μL, 37 ℃封闭 2 h, PBST 洗 3 次, 以 1∶50 倍稀释血清, 37 ℃孵育 1 h, PBST 洗 3 次; 向其中加入酶标二抗 IgG1 或 IgG2a, 37 ℃孵育 30 min, PBST 洗 3 次, 每孔加显色液 100 μL, 37 ℃显色 10 min, 然后每孔加入 4 mol/L H_2SO_4 50 μL 终止反应。用酶标仪于 450 nm 波长处测 *A* 值。结果判定标准同 1.6.2。

1.6.4　T 淋巴细胞亚群分类　采集小鼠的脾脏, 置于含 50 mL/L FCS 的 RPMI-1640 培养液中, 0.154

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

mm 不锈钢网研磨过滤后, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清。沉淀加 5 mL 完全培养基悬浮细胞, 重复 1 次。调细胞数为 10^5/mL。在脾脏细胞中加入 CD_3^+、CD_4^+ 和 CD_8^+ 荧光抗体, 4 ℃避光孵育 40 min, 用含 20 mL/L FCS 的 PBS 洗 2 次, 10 g/L 多聚甲醛固定, 用流式细胞仪测定 T 细胞亚群, Cellquest 软件分析。

1.6.5 淋巴细胞增殖试验 将 2×10^5/mL 的脾脏淋巴细胞悬液按每孔 200 μL 加入 96 孔培养板中, 同一样品刺激组和未刺激组各设 3 个复孔, 刺激组每孔加 20 μg 刀豆蛋白 A (ConA) 后置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵箱中孵育 72 h; 取出培养液板, 向其中加入 MTT 染色液 20 μL/孔, 37 ℃孵育 6 h, 用酶标仪于 570 nm 处测吸光度(A 值)。以 A (刺激组)/A (未刺激组) 表示各组的刺激指数。

1.6.6 免疫小鼠的攻毒保护试验 在预试验基础上进行攻毒保护试验。将 12 只 BALB/c 小鼠分为 2 组, 每组 6 只进行免疫, 免疫方法和剂量同 1.6.1。于末次免疫 10 d 后以 Volum 株芽孢 (Reed's Muench 法计算得到 LD_{50} 为 750 个菌) 腹腔注射小鼠进行攻毒。攻毒剂量为 10 LD_{50}, 攻毒后密切观察试验小鼠的活动、摄食及精神状态, 14 d 时计算小鼠的死亡数和存活率。

1.7 统计学分析方法

用 SPSS 12.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{X}\pm S$ 表示, 各组间差异用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 *PA* 基因的 PCR 扩增与测序

由图 1 可知, 在约 2 205 bp 处扩增出一条特异性条带, 其长度与预期结果相一致。DNA 测序结果显示, *PA* 基因序列和 GeneBank 收录的序列完全相同。

2.2 pET-28a-PA 重组表达质粒的双酶切鉴定

pET-28a-PA 表达质粒的 *Bam*HⅠ, *Sac*Ⅰ 双酶切鉴定结果见图 2。由图 2 可知, 酶切的两条片段大小分别为 5 369 bp 和 2 025 bp, 与预期结果一致, 说明连接成功。

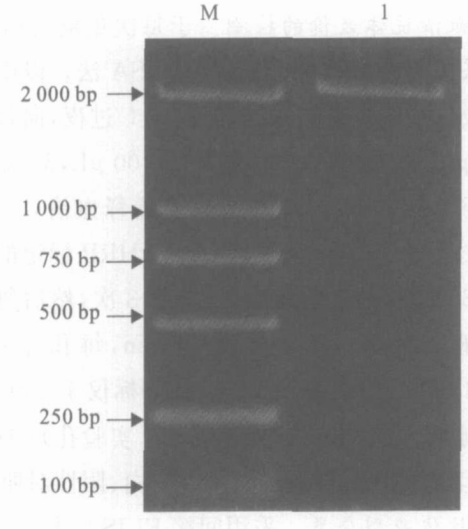

图 1 炭疽芽孢杆菌 *PA* 基因 PCR 扩增产物电泳结果

M. DNA marker; 1. PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification of *PA* gene from *Bacillus anthracis*

M. DL2000 DNA marker; 1. PCR product of *PA*

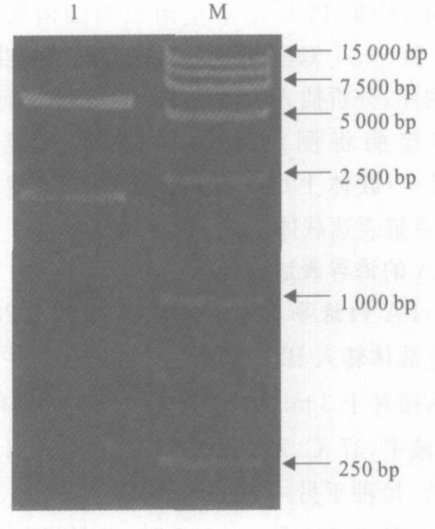

图 2 pET-28a-PA 重组表达质粒的双酶切鉴定结果

1. 重组质粒 pET-28a-PA 双酶切结果; M. DNA marker;

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid

1. Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pET-28a-PA; M. DL15000 DNA marker

2.3 rPA 的表达

阳性克隆菌株经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳鉴定, 结果见图 3。由图 3 可知, 诱导表达的 rPA 包涵体与未诱导的 pET-28a-PA 相比, 在 83 ku 附近出现的额外条带, 为 rPA 表达的蛋白。

2.4 rPA 的 Western blot 鉴定

表达的 rPA 蛋白经 Western blot 检测, 结果见图 4。由图 4 可知, rPA 能被免疫小鼠的血清识别, 说明 rPA 蛋白具有良好的免疫原性。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

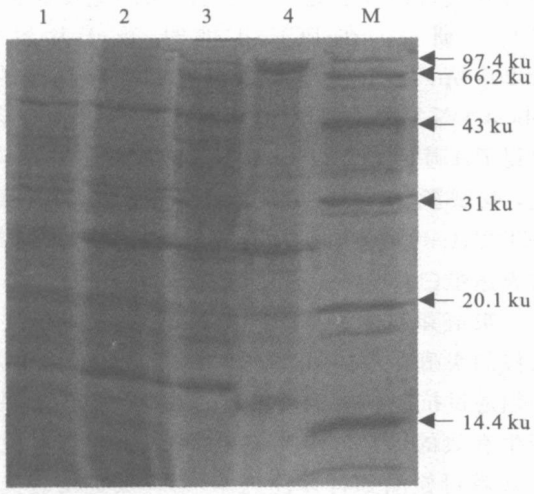

图 3　rPA 蛋白的 SDS-PAGE 分析结果

1. 空菌诱导; 2. 未诱导 pET-28a-PA; 3. 诱导表达的 rPA 上清; 4. 诱导表达的 rPA 包涵体; M. Marker

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of expressed protein of PA

1. Induced BL21(DE3); 2. Non-induced engineering bacteria pET-28a-PA; 3. Induced engineering bacteria supernatant pET-28a-PA; 4. Inclusion bodies of BL21(DE3) cells expressing PA; M. marker

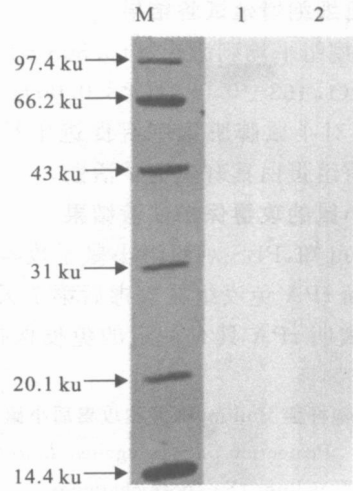

图 4　rPA 的 Western blot 鉴定结果

M. Marker; 1. 诱导表达的 rPA; 2. 未加诱导剂的阴性对照

Fig. 4　Identification of rPA with Western blot

M. Marker; 1. Recombinant PA protein induced expression; 2. Recombinant PA protein of non induced expression

2.5　抗 rPA 抗体水平检测

间接 ELISA 法检测抗体水平的结果显示, 初免后 10 d 即可检测到特异性抗体, 第 3 次免疫后抗体水平明显升高, 可达 1∶12 800。由此可见, rPA 具有较好的免疫原性。

2.6　抗 rPA 抗体亚型的测定

由图 5 可知, rPA 免疫组小鼠的 IgG1 水平高于 IgG2a 水平, 可见 rPA 刺激机体产生的特异性抗体是以 IgG1 为主。表明 rPA 主要是激发体液免疫。

2.7　T 淋巴细胞亚群分类结果

由表 1 可知, rPA 免疫组的 CD_4^+/CD_8^+ 极显著高于 PBS 对照组($P < 0.01$)。表明 rPA 免疫组小鼠脾脏中 CD_4^+ 细胞显著增加, 免疫应答趋向 Th2 型反应, 说明 rPA 介导的免疫反应以体液免疫为主。

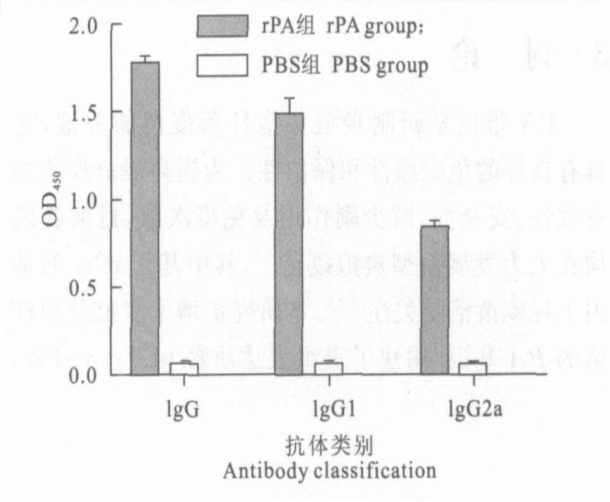

图 5　小鼠血清中总 IgG 及其亚型水平

Fig. 5　Total immunoglobuling level and subtype level in serum of immunized mice

表 1　小鼠脾脏中淋巴细胞 CD_4^+ 和 CD_8^+ 的比例

Table 1　Change of CD_4^+ and CD_8^+ on T lymphocyte of mice immunized with PBS, rPA

组别 Group	淋巴细胞比例/% Percentage of lymphocyte		CD_4^+/CD_8^+
	CD_4^+	CD_8^+	
rPA 组 rPA group	79.52±1.72	17.49±2.05	4.54**
PBS 对照组 PBS control group	62.83±0.37	33.53±1.26	1.87

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.8 T 淋巴细胞增殖试验结果

rPA 免疫组平均刺激指数(3.803±1.042)显著高于对照组(1.163±0.057)($P<0.05$)。表明 rPA 蛋白在体外对小鼠脾脏细胞有促进生长和增殖作用,说明该重组蛋白具有生物学活性。

2.9 免疫小鼠的攻毒保护试验结果

由表 2 可知,PBS 对照组小鼠于攻毒后第 3 天全部死亡,而 rPA 免疫组在攻毒后第 7 天还有 3 只小鼠存活,表明 rPA 具有一定的免疫保护作用,保护率达到 50%。

表 2 炭疽芽孢杆菌 Vollum 株芽孢攻毒后小鼠的存活情况

Table 2 Protection of mice against *B. anthracis* vollum (S) spore challenge

攻毒后时间/d Time of after challenge	小鼠存活数 Number of survived	
	rPA 组 rPA group	PBS 对照组 PBS control group
1	6	6
2	6	6
3	5	0
4	4	0
5	3	0
6	3	0
7	3	0

3 讨 论

PA 蛋白是研制炭疽芽孢杆菌疫苗的关键,它具有良好的免疫原性和保护性。为提高炭疽疫苗的有效性、安全性,减少副作用及免疫次数,目前各国均在大力发展新型炭疽疫苗[4],其中基于 rPA 的基因工程疫苗倍受关注[5-6]。本研究扩增了炭疽芽孢杆菌的 *PA* 基因,构建了重组表达质粒 pET-28a-PA,并对其进行诱导表达,对表达产物的免疫保护效果进行了研究。在 PCR 扩增时,由于片段较长(2 205 bp),本试验选择了具有高度保真性的 Pyrobest DNA 聚合酶,通过不断优化 PCR 反应条件,使得 *PA* 基因 PCR 产物没有发生突变。在载体选择上,本试验选用了 pET28a(+)原核表达载体,pET28a(+)载体具有操作简单、成本低、产量高,同时表达蛋白具有较好的稳定性等优点。

炭疽芽孢杆菌是细胞外感染的病原体,要清除入侵的炭疽芽孢杆菌,体液免疫起主导作用。因此,必须通过抗原刺激使机体产生较高的抗体水平才能产生有效的保护。本研究中,rPA 蛋白初次免疫后 10 d 就可检测到特异性抗体,第 3 次免疫后抗体水平明显升高(rPA 组抗体效价可达 1∶12 800);rPA 免疫组小鼠的 IgG1 水平明显高于 IgG2a 水平,主要是激发体液免疫;另外,T 淋巴细胞是重要的免疫调节细胞,可发挥正负两方面的调节作用。CD_4 和 CD_8 分子是 T 淋巴细胞重要的表面标志[7-8]。本研究结果显示,CD_4^+ T 淋巴细胞数量显著升高,CD_4^+/CD_8^+ 比值极显著增加,免疫应答趋向 Th2 型反应,说明 rPA 蛋白免疫小鼠后主要介导体液免疫反应。rPA 蛋白在体外对小鼠脾脏细胞有促进生长和增殖作用,表明 rPA 蛋白具有生物学活性。

rPA 疫苗的保护率为 50%,这与 Donald 等[4]的研究结果是相符的。要提高 rPA 疫苗的免疫保护效果,改变免疫剂量、免疫方式和佐剂的选择都需要进一步研究。本研究中的 rPA 疫苗对预防炭疽芽孢杆菌感染有一定的免疫保护作用,为研究具有更好保护效果的炭疽芽孢杆菌疫苗奠定了基础。

[参考文献]

[1] Duesbery N S. Anthrax toxins[J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55(12): 1599.

[2] Julia Y W, Michael H R. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus and toxin[J]. Medical Immunology, 2005, 4: 4-8.

[3] Ariel N, Zvi A, Makarova K S, et al. Genome-based bioinformatic selection of chromosomal anthracis putative vaccine candidates coupled with proteomic identification of surface-associated antigens[J]. Infection and Immunity, 2003, 8: 4563-4579.

[4] Donald J, Chabot, Angelo S, et al. Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection[J]. Vaccine, 2004, 23(6): 43-47.

[5] Baillie L. The development of new vaccines against *Bacillus anthracis*[J]. J Appl Microbiol, 2001, 91(4): 609-613.

[6] Leppla S H. Development of an improved vaccine for anthrax[J]. J Clin Invest, 2002, 110(2): 141-144.

[7] Stenger S, Modlin R L. Cytolytic T cell responses to intracellular pathogens[J]. Current Opinion in Immunology, 1998, 10: 471-477.

[8] Tascon R E, Stavropulos E, Lukacs K V, et al. Protection against mycobacterum tuberculosis infection by CD_8^+ T cells requires the production of gamma interferon[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(2): 830-834.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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

XIE Ying-guo[1,2], **WU Xiu-fang**[1,2], **WU Su-qin**[2], **WANG Xi-liang**[2], **HE Wei-ming**[1]

(1 *College of Animal Science and Techonology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2 *Depament of Immunology of Reseach Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Science, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, 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 2 205 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 1∶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 CD_4^+ 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 lactoseon on cryopreservation of boar sperm

ZHANG Shu-shan[1], **LI Qing-wang**[1,2], **LI Gang**[1], **CHEN Xiao-yu**[1], **HU Jian-hong**[1], **HAN Zeng-sheng**[1], **WANG Li-qiang**[1]

(1 *College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2 *Department of Biological Engineering, Collage 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±0.52)%, (41.38±0.39)%, (44.56±1.16)% and (43.51±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±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±0.07)% and (41.82±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

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net