

布尔山羊细管冷冻精液研制初报

赵晓娥 王光亚 马保华

(西北农业大学动物科学与动物医学学院,陕西杨凌 712100)

摘 要 首次在国内建立了布尔山羊的细管精液冷冻程序。试验证明,选用 30 g/L 的葡萄糖、13 g/L 的柠檬酸钠和 1 g/L 的乙二胺四乙酸钠 (EDTA) 作基础稀释液,乙二醇作保护剂,精液冻前经 100 mL/L 卵黄处理,离心除去精清。精液稀释并经冻前处理后装入 0.5 mL 细管,在 4℃ 下平衡 1.5 h,再以 1℃/min 的速率降温至 -80℃ 以下 (3~5 min) 投入液氮,可获得良好的冷冻效果。用乙二醇作保护剂的冷冻精液,解冻后在 12~15℃ 的常温下放置 24 h,其活力仍可满足输精的要求。

关键词 布尔山羊,细管,精液冷冻

分类号 S827.913.6, S814.6

国外早在 70 年代初期就研制了山羊的细管冷冻精液,其精子的冻后存活率达到 70%~75%^[1]。但在国内,目前山羊的冷冻精液均为颗粒精液。颗粒冷冻精液剂量不准确,操作过程中易污染,含菌量高,操作麻烦,受胎率低。细管冷冻精液的冷冻速率高,计量准确,不易造成解冻过程中的二次污染,因而输精后的受胎率较高,目前奶牛的冷冻精液几乎全部为细管精液。为此,笔者借鉴胚胎冷冻的成功经验^[2],进行了山羊细管冷冻精液的研制工作。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验动物 选用蓝田县蓝桥乡布尔山羊繁育站的 117 号布尔山羊种公羊,2 周岁,体重 120 kg,健壮。配种季节舍饲,每日补饲含 80 g/kg 的磷酸缩脲和微量元素的配合精料 1.4 kg,粗饲料自由采食,主要为新鲜树叶、青干草、黄豆叶子等。

材 料 冷冻细管为国产 0.5 mL 硬塑料管,冷冻细管架用不锈钢材料自制,低温温度计 (美国 RPE 冷冻仪配件),血细胞计数板,各种稀释液均采用国产试剂配制。

1.2 方 法

精液的采集和品质评定 常规假阴道采精,精液采出后,眼观评定精液的颜色、浑浊度;稀释后镜检并按生产标准目测判断其密度和活力。其外观、密度及活力正常者用于冷冻试验。

精子计数 精液冻前和解冻后均采样,每份精液均做 3 次计数,取其平均值。按原精液做 200 倍稀释,滴入血细胞计数板,立即在 400 倍显微镜下观察计数不运动的精子数,

收稿日期 1998-03-26

课题来源 陕西省科委“九五”攻关项目,97K06-G2

作者简介 赵晓娥,女,1968 年生,助教

即获得每毫升所含的死精子数;然后将计数板放置于 50℃下 10 min,杀死精子,再次计数,即获得每毫升所含的精子总数。总精子数减死精子数即为存活精子数。活精子数与总精子数之比即代表精液的精子活力;解冻后的活力与冻前活力之比,为精子的存活率。用此数据做标准,衡量精液质量和冷冻效果,并对目测结果进行校正。

稀释液及保护液的配制及筛选 5种基础稀释液的成分见表 1,基础稀释液加入 100 mL/L卵黄即为I 液;加入保护剂(乙二醇)为II 液。精液用基础稀释液进行稀释,镜检目测稀释后的活力;并用含 100 mL/L乙二醇的II 液,进行细管冷冻,以筛选出适于布尔山羊精液冷冻的稀释液。稀释液选出之后,再用其中一种和含乙二醇 80, 100, 120和 144 mL/I的II 液进行冷冻试验,进一步筛选出适宜的保护剂浓度。

表 1 5种稀释液的成分

编号	葡萄糖 / (g° L ⁻¹)	柠檬酸钠 / (g° L ⁻¹)	果糖 / (g° L ⁻¹)	EDTA / (g° L ⁻¹)	加入 PBS/mL	加二蒸水后容积 / mL
1	50	3	—	1	—	1000
2	—	30	—	—	—	1000
3	—	30	10	—	—	1000
4	—	—	—	—	1000	—
5	30	13	—	1	—	1000

注:卡那霉素含量为 166.7 nmol/s; EDT A为乙二胺四乙酸钠; PBS为磷酸盐缓冲液,其中无 Ca²⁺, Mg²⁺。

精液冻前处理 精液采出后,自然降温至与室温相同的温度,用I 液对倍稀释,离心 3次,除去精清。沉淀物按原精液量计算,用不含卵黄的基础稀释液作 1∶ 5或 1∶ 10稀释后,再加入等量II 液,混合均匀后即可装入细管。在测试降温数据时,需另做一对照管。细管密封后,放入冷冻架中并用棉布包裹,在普通冰箱中(4℃)平衡 1.5 h。

冷冻过程 从冰箱中取出冷冻架,尽快把温度计的感温探头插入对照管,将冷冻架慢慢放入液氮罐,20 s后快速放至冷冻架底部距液氮面 2~ 3 cm,再经 10 s后驱动液氮 20 s促使蒸发,提高冷冻速率,以快速通过危险温区,然后停止驱动。从开始冷冻起,每 30 s记录一次温度,为分析冷冻速率提供数据。温度下降到 - 80℃以下时,即可将细管投入液氮保存。

解冻 细管精液从液氮中取出后,在空气中停留 10 s,投入 42℃的温水中解冻 20 s,检查解冻后活力。并将部分解冻细管精液放在常温下,每隔 6~ 8 h 检查,在显微镜下目测其活力,以了解其在常温下的存活时间。

2 结果与分析

2.1 精液质量

采精量受采精人员的影响较大,熟练的操作者每次采精量为 1.2~ 2.4 mL,不熟练或有不良习惯者每次采精量仅为 0.5~ 0.8 mL。精液外观呈浓稠的乳白色,不透明,无异常气味,pH 6.8。从集精杯外观察,可见似云雾状翻腾滚动。镜下目测及计数活力均稳定在 0.9,密度为 19.5亿~ 23.5亿个/mL。

2.2 不同稀释液的冷冻效果

精液用不同的稀释液稀释,经I 液处理,离心除去精清,再分别用基础液和含 10

mL/L乙二醇的II 液稀释后装管冷冻。观察对精液活力的影响。

精液用 1号稀释液稀释后,其活力立即降至 0. 52,所以未用于冷冻。其余 4种稀释液,虽然在稀释后立即检查,其活力差别不明显,分别为 0. 78, 0. 80, 0. 76和 0. 80。但冻后活力有明显的差别,分别为 0. 23, 0. 27, 0. 19和 0. 38。

2.3 不同体积分数保护液的冷冻效果

选用 3号稀释液,用含乙二醇体积分数分别为 80, 100, 120和 144 mL/L的II 液进行冷冻试验。解冻后在镜下测定精液活力,分别为 0. 2, 0. 3, 0. 25和 0. 15。其结果表明,II 液中乙二醇含量以 100 mL/L为适宜的体积分数。即冷冻精液中乙二醇含量在 50 mL/L时其保护作用最好。

2.4 冷冻结果

按预试验结果,采用最佳组合,用 5号稀释液和含 100 mL/L乙二醇的II 液,进行布尔山羊细管冷冻精液的冷冻试验。共计冷冻 5批 178支,每支精液量为 0. 4 mL。冻前对精液进行计数,冻后随机抽样解冻计数,作统计分析。结果见表 2。

表 2 布尔山羊精液冷冻结果

批次	数量/支	冻前活力	冷冻速率 / ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$)	解冻后活力	存活率 /%
1	43	0. 67	27. 6	0. 36	53. 7
2	40	0. 80	11. 1	0. 37	45. 9
3	37	0. 78	21. 1	0. 38	49. 3
4	16	0. 70	31. 3	0. 37	52. 3
5	42	0. 79	18. 3	0. 40	50. 4

注: 经差异显著性检验,批间差异不显著 ($P> 0. 05$)。

从表 2可见,试验冷冻的布尔山羊精液活力达到生产要求。随后按冷冻试验的程序,不作降温速度监测,于冷冻架放入液氮罐口内 5 min后,将细管投入液氮保存。每一批次随意抽检 2支解冻,在镜下目测活力,并将检测后细管内的剩余精液放在室温 ($12\sim 15^{\circ}\text{C}$) 下,定期检查活力。共计冷冻 4批,172支。其结果细管末段活力为 0. 34~ 0. 45,中段 0. 4~ 0. 5,首段(棉塞端)为 0. 5。在室温下放置 12 h,活力为 0. 34~ 0. 5; 24 h为 0. 30~ 0. 45。

3 讨 论

3.1 稀释液对精液活力的影响

稀释液成分中对精液活力影响较大的是葡萄糖和柠檬酸钠含量,后者与稀释液的 pH 相关。精液用 1号稀释液稀释后,活力立即显著下降。这与倪志斌等^[3]在海门山羊上的结果相反。据有关资料^[4]介绍,稀释液中糖类以葡萄糖的效果最好,但不能接近等渗浓度,该液的葡萄糖为等渗,其柠檬酸钠的含量又过低,pH为 6. 4。经改进后的 5号稀释液,葡萄糖含量为 30 mL/L,柠檬酸钠为 13 mL/L,其 pH为 6. 8,无论是冻前或冻后均获得良好效果。2,3号稀释液不含葡萄糖,柠檬酸钠为 30 mg/L,pH为 7. 0,4号稀释液为无钙和镁的磷酸盐缓冲液,pH为 7. 2,精液在这 3种稀释液中,最初运动非常活跃,但经短时间后,活力迅速降低,这可能是由于 pH值较高,刺激精子运动,能量消耗加速所致。

山羊精液中含有一种能引起精子凝结的酶,是精液中抑制精子抗冻能力的主要成分。

企图用降低精液稀释倍数提高有效精子数的方法,显著地降低了冷冻精液解冻后的活力^[1]。本试验用含卵黄的稀释液对精液进行处理后离心分离精清,然后用不含卵黄的稀释液和保护液进行冷冻获得良好的效果。卵黄有防止温度下降对精子的损害作用,精子与卵黄接触后,细胞表面形成一种疏水态蛋白膜,防止细胞与介质之间的渗透。这种脂蛋白膜在精子细胞与卵黄接触后 3~5 min 即可形成,甚至经反复离心冲洗,也会牢固地结合在细胞膜上。所以精液经卵黄处理后,在冻前和降温过程没有必要再用卵黄稀释液^[5]。

3.2 保护剂对精液冷冻效果的影响

山羊颗粒冷冻精液采用甘油作保护剂,解冻后要进行二次稀释。王光亚等^[2]在山羊胚胎冷冻的研究中证明,乙二醇对安哥拉山羊胚胎的保护作用优于甘油。甘油在常温下对精子有毒害作用。甘油的分子较大,渗入或渗出细胞的速度较水分子慢,在实体显微镜下观察,胚胎进入甘油保护剂后,由于水分子很快渗出细胞,胚胎明显收缩。经过一段时间后随着甘油分子的渗入,胚胎才逐渐恢复到接近原来状态。胚胎解冻后必须逐步脱除保护剂后才能移植,否则会由于渗透效应造成胚胎细胞膨胀破裂。乙二醇分子较小,渗入或渗出细胞的速率与水分子差异不大,所以渗透压反应也较小。用乙二醇冷冻胚胎,解冻后不一定要脱除保护剂,可直接移植。笔者选用乙二醇作为精液冷冻的保护剂,并对其适宜体积分数进行了研究,试验证明布尔山羊冷冻精液中乙二醇以 50 mL/L 为宜。精液解冻后在常温下放置 24 h,其活力仍能满足输精要求,说明乙二醇在常温(12~15℃)下对精子无毒害作用。

3.3 冷冻速率对冻后活力的影响

Polge^[6]对精液冷冻的研究发现,引起细胞损害的温区主要在 -15~-30℃, -30℃ 以下精子的损失甚微。Jansen^[7]进一步研究了 -15~-56℃ 时冷冻速率与细管冷冻精液的生物参数,得出冷冻速率对存活精子百分率的回归方程图形,该图形呈抛物线,其存活率峰值在 56℃/min,理想范围为 10~60℃/min。根据这些研究结果,在冷冻过程中,本研究先将冷冻架放入液氮罐口预冷 20 s,然后在液氮中放入一个小金属棒,以加快液氮蒸发,提高冷冻速率。约 10 s,当听不到液氮的沸腾声时,轻轻摇动液氮罐,以促进液氮蒸发,提高降温速率。通过温度检测,降温速率为 11.1~31.3℃/s 时,2~3 min 细管内的温度可下降到 -30℃ 以下。降温速率在 Jansen's 回归方程的理想范围,批间差异不显著($P>0.05$)。

参 考 文 献

- 1 Corteel J M. 山羊精子经冲洗深冻后的受精能力. 家畜繁殖科学技术进展, 北京: 科学出版社, 1980. 371~ 373
- 2 王光亚, 马保华, 赵晓娥. 安哥拉山羊胚胎冷冻试验. 西北农业学报, 1996, 5(4): 36~ 40
- 3 倪志斌, 陈永一, 邱保安. 山羊精液高倍稀释输精效果的研究与应用. 中国养羊, 1993(12): 20~ 24
- 4 曾培坚, 王立铭. 稀释液渗透压对绵羊精液冷冻的影响. 中国畜牧杂志, 1992, 28(4): 17~ 19
- 5 Ostashko F I, Pavlenko M P. 冷冻精液新方法. 见: 中国畜牧兽医学学会译编. 家畜繁殖科学技术进展. 北京: 科学出版社, 1980. 328~ 330
- 6 Parkinson T J, Whitfield C H. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. Theriogenology, 1987, 27: 781~ 797
- 7 Jansen H B. The Influence of cooling rates practised in the Netherlands on the survival of bovine spermatozoa. pack-

aged in 0.25 mL French straws. In 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Volume3-Brief Communications. Dublin Belfield University college, 1988. 258

A Study of Straw Frozen Sperm in Boer Goats

Zhao Xiao'e Wang Guangya Ma Baohua

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest
Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract The freezing of Boer Goat semen in straw was studied and the first freezing procedure in China established. The basic solution contained 30 g/L glucose, 13 g/L sodium citrate and 1 g/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Sperm was treated with a basic solution containing 100 mL/L egg yolk and centrifuged for removing sperm serum before freezing, and was loaded into 0.5 mL straw placed in a 4°C condition for 1.5 h. The cooling rate was about 11–30°C/min from 4°C to –80°C, and then liquid nitrogen was plunged in. The post-thaw sperm viability was 0.3 to 0.5 in 12 to 15°C condition for 12 to 24 h and its viability could still be used in insemination.

Key words Boer Goat, straw, sperm freezing

· 简 讯 ·

《西北农业大学学报》入选俄罗斯《文摘杂志》(PK)

据中国高校自然科学学报对外联络委员会年度工作报告(1998)报道,《西北农业大学学报》入选世界六大检索期刊之一——俄罗斯《文摘杂志》(PK)。本次入选的高校学报共35家,其中农口学报有《西北农业大学报》《河南农业大学学报》《华中农业大学学报》《湖南农业大学学报》和《浙江农业大学学报》5家,陕西省高校学报除我校外,还有《西安医科大学学报(英文版)》《西安交通大学学报(英文版)》《西安医科大学学报(自然科学版)》《西北大学学报(自然科学版)》等4家。

(温晓平 供稿)