

DOI:CNKI:61-1390/S.20110907.1057.014

网络出版时间:2011-09-07 10:57

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20110907.1057.014.html>

实时精子分离系统对猪精子冷冻品质的影响

杨 海^{1,2}, 李青旺¹, 胡建红¹, 张树山³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 衡阳师范学院 生命科学系, 湖南 衡阳 421008;

3 上海市农业科学院 畜牧兽医研究所, 上海 201106)

【摘 要】 **【目的】**探索实时精子分离系统对猪精子冷冻品质的影响。**【方法】**采用实时精子分离系统对精液进行分离优选,液氮冷冻法制作细管冻精,以未分离精液为对照,检测实时精子分离系统对猪精子冷冻品质的影响。**【结果】**分离优选精子解冻后,精子活率、顶体完整率、质膜完整率、正常染色质率均明显高于对照组($P < 0.01$);分离组精子的正常形态率也显著高于对照组,且未受冷冻—解冻过程的影响($P > 0.01$);分离过程对精子密度也未产生显著影响($P > 0.01$)。**【结论】**实时精子分离系统可以显著改善猪冷冻精液的品质。

【关键词】 实时精子分离系统;猪;精子;精液冷冻;精液品质

【中图分类号】 S828.3⁺4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)10-0053-05

Effect of real-time sperm separation system on the quality of boar sperm frozen

YANG Hai^{1,2}, LI Qing-wang¹, HU Jian-hong¹, ZHANG Shu-shan³

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

2 Department of Life Sciences, Hengyang Normal University, Hengyang, Hunan 421008, China;

3 Institute of Husbandry and Veterinary, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to explore the effect of real-time sperm separation system on the quality of boar semen frozen. **【Method】** Original semen was separated with real-time sperm separation system and tubule-froze with liquid nitrogen. The original semen was looked as control group, and the effect of real-time sperm separation system on the quality of boar semen frozen was detected. **【Result】** After the separated semen was thawed, the sperm motility, the rate of spermatozoa with intact acrosome, the rate of spermatozoa with normal plasma membrane, the rate of spermatozoa with normal chromatin of the separated group were higher than those of the control group ($P < 0.01$); For the rate of spermatozoa with normal morphology, the separated group was better than that of the control group ($P < 0.01$), but it was not affected by the freeze-thaw process ($P > 0.01$); The spermatozoa density was not significantly affected by the separation process ($P > 0.01$). **【Conclusion】** The real-time sperm separation system can significantly improve the quality of boar frozen semen.

Key words: real-time sperm separation system; boar; sperm; semen freezing; semen quality

猪精液冷冻技术在促进养猪业的产业化、规模化、工厂化以及实现优良种猪遗传资源共享方面具

* [收稿日期] 2011-04-11

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863)项目(2008AA101004)

[作者简介] 杨 海(1978—),男,湖南浏阳人,讲师,博士,主要从事动物生殖生理与调控研究。E-mail: yanghai530@yahoo.com.cn

[通信作者] 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研究。

E-mail: liqingwangysu@yahoo.com.cn

有重要的研究意义^[1-3]。长期以来,国内外猪冷冻精液领域的众多学者致力于精子选择^[4]、稀释液筛选^[5]、精液冷冻技术^[6]以及精子冷冻后结构变化^[7-8]的研究,并取得了阶段性的研究成果。然而,将所采集的猪精液稀释平衡后直接进行冷冻的方法,仍然存在解冻精液品质差、受精率低、窝产仔数少等缺陷,限制了猪冷冻精液在生产中的推广应用^[9-10]。获得高品质精液是精子冷冻的前提,实时精子分离系统(王氏管精子分离系统)具有优选精子的功能^[11],如能将其应用于精液的冷冻保存,将对解冻后的精液品质产生积极影响。目前,尚未见将实时精子分离系统用于精液冷冻保存的研究报道。本试验采用实时精子分离系统对猪精液进行分离优选,并用液氮冻存法冷冻精液,解冻并检查冻精的精子密度、活率、正常形态率等精液参数和顶体完整率、质膜完整率、正常染色质率等精子品质参数,探索实时精子分离系统对猪冷冻精液品质的影响,以期对猪精液的冷冻保存提供新的资料,并为猪冷冻精液大规模应用于生产实践提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器及设备 研究用到的主要仪器及设备有:实时精子分离系统(实验室自制)、全自动离心机(Heraeus,德国)、生物冷冻仪(Biotronics,英国)、荧光显微镜(IBE2000,日本)、高压灭菌锅(Hirayama,日本)、电子天平(Denver,美国)、超低温温度计(Ametek,美国)、全自动精子分析仪(M179583,中国)、液氮罐(东亚,中国)、0.25 mL细管(凯苏,法国)、恒温箱、氟板和注射器等。

1.1.2 主要试剂 主要试剂有D-葡萄糖、果糖、乳糖、Tris(Amresco进口分装)、柠檬酸钠、牛血清白蛋白(Sigma进口分装)、L-甘氨酸(北京鼎国生物中心)、柠檬酸(北京世纪星化工有限责任公司)、甘油(天津巨星盛源化学试剂有限公司),以及医用青霉素、链霉素等。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液配制 精子分离优选液采用mBWW(氯化钠5.95 g、氯化钾0.35 g、二水氯化钙0.25 g、磷酸二氢钾0.16 g、七水硫酸镁0.29 g、碳酸氢钠1.5 g、葡萄糖1.0 g、丙酮酸钠0.028 g、青霉素1.0 g、链霉素1.0 g、双蒸水1 000 mL)。精液冷冻过程中,精液的第1次稀释采用BTS^[12](葡萄糖37.0 g、柠檬酸钠6.0 g、EDTA 1.3 g、碳酸氢钠1.3 g、氯化

钾0.8 g、青霉素1.0 g、链霉素1.0 g、双蒸水1 000 mL),第2次稀释采用TCG^[13-14](在100 mL BTS常温保存液中添加Tris 2.42 g、柠檬酸钠1.48 g、葡萄糖1.1 g)。在配制稀释液时,先用电子天平准确称量各种试剂,双蒸水溶解,经过滤除菌后,冷却至室温,放于4℃冰箱保存备用。

1.2.2 精液采集 精液采自1.5~2岁、体格健壮、膘情中等、性欲旺盛的杜洛克公猪。手握法采集公猪中间浓厚段约150 mL精液。精液采出后,立即在35~38℃下进行品质评定,要求原精液为乳白色、无异常气味,精子密度 3.0×10^9 mL⁻¹以上,活力0.75以上。用4层以上纱布滤去胶体物后备用。

1.2.3 精液的分离优选 将装有mBWW分离优选液的分离管于37℃条件下预热10 min,从粗端缓缓加入等温等倍稀释精液0.5 mL,然后置于38.7℃、体积分数5%的CO₂细胞培养箱中孵育35 min,再用注射器从尖端回收分离优选后的猪精子。试验中以未分离精液为对照。

1.2.4 精液的稀释与平衡 (1)精液的第1次稀释与平衡。将品质评定合格的精液于500×g离心10 min以去除精清,常温保存液BTS按1:1体积比稀释,经12~15层纱布包裹后缓慢降至15℃,平衡3 h,调整降温速度约为0.1℃/min。

(2)精液的第2次稀释与平衡。选用TCG稀释液作为冷冻基础液,在TCG中添加体积分数20%的卵黄后,混合均匀,定为I液。

将经过第1次稀释、平衡的精液在17℃、800×g离心10 min,弃上清液,再按1:1~2的体积比用预热的I液进行等温稀释,然后用8~10层纱布包裹储精瓶,置于2~5℃冰箱中,以约0.08℃/min的降温速度从15℃降至5℃,平衡1.5~3 h。

(3)精液的第3次稀释与平衡。将经过第2次稀释、平衡的精液按2:1的体积比用等温II液(I液中添加体积分数3%的甘油)进行稀释,继续放入2~5℃冰箱中平衡2 h,然后进行液氮冷冻。

1.3 细管冻精的制作

在2~5℃的环境下,通过专用注射器将经过第3次稀释与平衡的精液吸入0.25 mL细管内,然后用封口机快速封管。将内装精液的细管迅速放入始冻温度为-120℃左右的冷冻槽中熏蒸15 min后,将细管冻精投入液氮中。

1.4 精液解冻

将制作好的细管冻精置于37℃的水浴锅中解冻30 s,用解冻液(95%的常温保存液+5%的I液)

按 1 : 10 体积比稀释后,在 37 ℃ 的温水中孵育 20 min,取 10 μL 精液用于精液参数及精子品质参数的检测与分析。

1.5 精液及精子品质参数的评定

随机抽取精液标本进行检测,每份标本计数 200 个精子。精子密度、精子活率、正常形态率采用全自动精子分析仪测定,顶体完整率、质膜完整率的测定参考 Huo 等^[8]的方法,正常染色质率用吖啶橙 (Acridine Orange,AO)染色法检测。

1.6 数据处理

用 SPSS 11.5 软件包对试验数据进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 实时精子分离系统对精液的纯化和优选效果

本试验中,运用实时精子分离系统分离得到的

精液清澈透明,精子与精子之间互不粘连。显微镜下检验精子活力发现,分离精子的活动能力较原精液有所增强,且几乎看不到死精子、体细胞、上皮细胞、白细胞、组织碎片和其他杂质,证明精液得到了纯化和优选。

2.2 分离及冷冻过程中精液参数的变化

分离及冷冻过程中的精液参数变化见表 1。表 1 表明,精子密度在分离及冷冻过程中差异不显著 ($P>0.01$);分离组冷冻前后的精子活率均优于对照组 ($P<0.01$),液氮冷冻后的精子活率显著下降 ($P<0.01$);分离组冷冻前后精子的正常形态率均优于对照组 ($P<0.01$),但液氮冷冻过程并未对精子正常形态率产生显著影响 ($P>0.01$)。由此可见,用实时精子分离系统对精子进行分离优选,可显著提高始冻精液的活率和正常形态率,从而有利于保证获得高品质的冷冻精液。

表 1 分离及冷冻过程中精液参数的变化

Table 1 Change of semen parameters in the process of separation and freezing

组别 Group	处理 Treatment	密度/($\times 10^9$ mL ⁻¹) Density	活率/% Motility	正常形态率/% Normal morphology rate
对照组 (n=21) Control group	冷冻前 Original	18.2 $\pm$ 1.3	70 $\pm$ 5	72.4 $\pm$ 13.6
	解冻后 Thawed	18.0 $\pm$ 1.2	40 $\pm$ 4 a	68.2 $\pm$ 12.0
分离组 (n=21) Separated group	冷冻前 Original	16.5 $\pm$ 1.5	87 $\pm$ 3 b	78.5 $\pm$ 10.5 b
	解冻后 Thawed	16.1 $\pm$ 1.3	50 $\pm$ 5 ab	74.0 $\pm$ 10.8 b

注:a 表示与冷冻前相比差异显著 ($P<0.01$);b 表示与对照组相比差异显著 ($P<0.01$)。下表同。

Note:a means composed with original group ($P<0.01$);b means composed with control group ($P<0.01$). The same below.

2.3 分离及冷冻过程中精子品质的检测

采用低渗膨胀法检测精子的质膜完整程度,结果如图 1 所示,在显微镜 (400 $\times$) 下,正常精子在低渗溶液中尾部膨胀弯曲,而质膜损伤的精子在低渗溶液中尾部不弯曲 (图 1)。采用吖啶橙染色法对精子的染色质状态进行检测,结果见图 2。由图 2 可

见,在荧光显微镜 (400 $\times$) 下,染色质正常的精子呈现绿色,而染色质异常的精子呈现红色;采用异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 染色法检测精子的顶体状态,结果见图 3。由图 3 可知,在荧光显微镜 (400 $\times$) 下,正常精子的顶体呈半椭圆形,表面光滑;顶体损伤的精子呈三角形,表面粗糙。

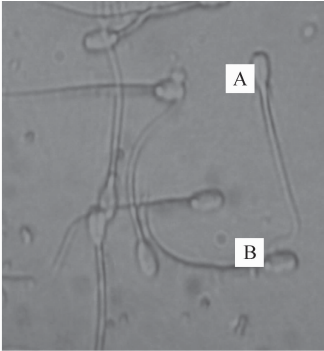


图 1 低渗溶液中的精子形态观察
A. 质膜损伤的精子;
B. 质膜完整的精子
Fig.1 Sperm in hypisotonic solution
A.Sperm with damaged plasma membrane;
B.Sperm with intact plasma membrane

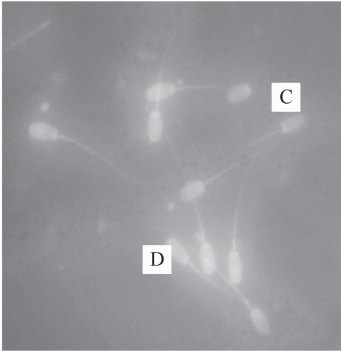


图 2 AO染色后的精子形态观察
C. 染色质正常的精子;
D. 染色质异常的精子
Fig.2 Sperm chromatin dyed by AO
C.Sperm with normal chromatin;
D.Sperm with abnormal chromatin

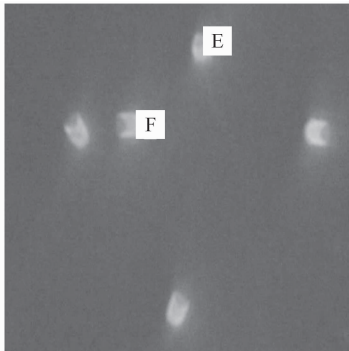


图 3 FITC染色后的精子顶体观察
E. 顶体损伤精子;
F. 顶体完整精子
Fig.3 Sperm acrosome dyed by FITC
E.Sperm with damaged acrosome;
F.Sperm with intact acrosome

2.4 分离及冷冻过程中精子品质参数的变化

分离及冷冻过程中的精子品质参数变化见表 2。由表 2 可知,分离及冷冻前后的精子顶体完整率、质膜完整率、正常染色质率均存在显著差异,且

分离组的各参数均优于对照组($P<0.01$);但是,经过液氮冷冻后,精子的顶体完整率、质膜完整率、正常染色质率均显著下降($P<0.01$)。

表 2 分离及冷冻过程中精子品质参数的变化

Table 2 Change of spermatozoa parameters in the process of separation and freezing					%
组别 Group	处理 Treatment	顶体完整率 Intact acrosome rate	质膜完整率 Normal plasma membrane	正常染色质率 Normal chromatin rate	
对照组($n=21$) Control group	冷冻前 Original	65.7±5.2	75.0±3.4	82.1±2.7	
	解冻后 Thawed	51.0±6.3 a	67.8±4.7 a	75.2±5.1 a	
分离组($n=21$) Separated group	冷冻前 Original	87.2±5.1 b	80.7±3.5 b	89.3±3.5 b	
	解冻后 Thawed	69.2±4.0 ab	73.5±5.2 ab	80.7±5.4 ab	

3 讨 论

实时精子分离系统综合了生物学、流体力学等学科原理,是平置、抗重力、长距离、多方向、多角度的精子竞争性浮游分离纯化系统^[11]。由于正常精子具有向上浮游的能力和特性,而精液中的体细胞、组织碎片、死精子、杂质无此能力,故可通过该分离系统将其分离开来。此外,正常、健康、成熟精子的浮游速度、方向、距离与不成熟精子、异常精子、弱精子明显不同,因此正常精子在实时精子分离系统中竞争性地浮游一段时间后,即可将死、弱、差、畸形精子和杂质予以淘汰,从而达到对精液进行纯化和优选的目的。本试验中的精液得以纯化和优选就是基于上述原理,这在刘培^[15]和徐岚等^[16]的试验中也有所体现。

精子的密度、活率、正常形态率是评价精液的重要指标,也是保证精子完成受精和受精卵继续发育的必要条件^[3]。本试验中,精子经过实时精子分离系统分离后,冻前活率达到 87%,较对照组提高 24.2%($P<0.01$),优于韦相才等^[17]的试验结果,与刘培^[15]和周汝滨等^[18]的试验结果接近;解冻后的精子活率达 50%,优于李青旺等^[14]的试验结果。分离组的精子正常形态率在冷冻前达到 78.5%,较对照组提高 8.4%($P<0.01$),说明实时精子分离系统能有效地淘汰畸形精子,从而保证精子的正常形态。精子密度在分离优选过程中变化不大($P>0.01$),这与韦相才等^[19]的研究结果一致。虽然分离优选过程中淘汰了一部分死、弱精子,而使单位容积内的精子密度降低,但由于精子向前运动的特性使之向回收点聚集,因此只要分离过程的时间适合,就会有足够多的精子汇集到回收点,从而使精子密度达到受精要求。由于精液来源、分离优选液、操作熟练程度、检验方法的不同,精子活率、正常形态率和精

子密度在不同的报道中也不尽一致^[15-17],但这些研究均证实了实时精子分离系统对精液品质的优化作用。

精子顶体完整率、质膜完整率、正常染色质率是提高动物受精率和保障受精卵正常发育的十分关键的精子品质评价参数^[10]。由于精子细胞膜与外界环境直接作用,且有一定的脆性,因此在精子操作环节容易受到破坏,从而影响精子的受精能力。实时精子分离系统为表面光滑的半封闭玻璃管,因而在优选过程中不会对精子造成任何损伤。本试验中,分离组的精子顶体完整率、质膜完整率、正常染色质率在冷冻前均达到 80%以上,较对照组分别提高了 32.7%, 7.6% 和 8.7% ($P<0.01$),与韦相才等^[17,19-20]的试验结果接近;解冻后,精子的顶体完整率、质膜完整率、正常染色质率分别达到 69.2%, 73.5% 和 80.7%,明显高于对照组($P<0.01$)。由此可见,精液冻后品质得以显著改善,其重要原因是实时精子分离系统对原精液进行了分离优选,有效地提高了猪精子的冻前品质。

在精液采集、离心、过滤、平衡、制作冷冻精液等操作环节中,精子随时可能会受到外界不良因素的破坏和影响,而使精液品质降低,这就为实时精子分离系统的应用提供了广阔的空间。本试验采用实时精子分离系统对猪的原精液进行了分离优选和冷冻研究,结果表明,分离精液的精液参数和精子品质参数在冷冻前后均有显著提高,这为实时精子分离系统在动物和人类精液冷冻保存中的应用提供了参考。

[参考文献]

[1] Tribout T, Caritez J C, Gruand J, et al. Estimation of genetic trends in French Large White pigs from 1977 to 1998 for growth and carcass traits using frozen semen [J]. Journal of Animal Science, 2010, 88(9): 2856-2867.

- [2] Singleton W L. State of the art in artificial insemination of pigs in the United States [J]. Theriogenology, 2001, 56: 1305-1310.
- [3] Rath D, Bathgate R, Rodríguez-Martínez H, et al. Recent advances in boar semen cryopreservation [J]. The Society for Reproduction and Fertility Supplement, 2009, 66: 51-66.
- [4] Parrilla I, Vazquez J M, Caballero I, et al. Optimal characteristics of spermatozoa for semen technologies in pigs [J]. The Society for Reproduction and Fertility Supplement, 2009, 66: 37-50.
- [5] Malo C, Gil L, Gonzalez N, et al. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender [J]. Cryobiology, 2010, 61(1): 17-21.
- [6] 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.
Zhou J B, Yue K Z, Sun X C, et al. Studies on boar semen freezing techniques [J]. Chinese Journal of Vet Science, 2002, 22(5): 295-299. (in Chinese)
- [7] Gliozzi T M, Luzzi F, Cerolini S. Assessment of sperm viability in boar, rabbit and rooster; A modification of the fluorometric ethidium bromide exclusion procedure [J]. Theriogenology, 2003, 60: 635-645.
- [8] Huo L J, Ma X H, Yang Z M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar sperm during long-term storage [J]. Theriogenology, 2002, 58: 1349-1360.
- [9] Juan M V, Emilio A M, Jordi R, et al. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: The value of deep intrauterine insemination [J]. Theriogenology, 2005, 63: 536-547.
- [10] Gadea J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility [J]. Theriogenology, 2005, 63: 431-444.
- [11] 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.
Lu R K, Peng S J. Real-time sperm separation system; Wang's tube system [J]. Journal of Andrology, 1994, 8(2): 123-125. (in Chinese)
- [12] Johnson L K, Weitze A F, Fiser P, et al. Storage of boar sperm [J]. Animal Reproduction Science, 2000, 62: 143-172.
- [13] Lamia A, Daniel T, Laetitia J, et al. 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.
- [14] 李青旺, 江中良, 王立强, 等. 猪精液冷冻保存的初步研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(4): 63-66.
Li Q W, Jiang Z L, Wang L Q, et al. Study on the technique of boar semen freezing [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2003, 31(4): 63-66. (in Chinese)
- [15] 刘 培. 王氏管临床应用体会 [J]. 新疆医科大学学报, 2001, 24(2): 173.
Liu P. Experience of clinical application of Wang's tube [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2001, 24(2): 173. (in Chinese)
- [16] 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.
Xu L, Lu R K, Chen L, et al. The experimental and clinical application of real-time sperm separation technology [J]. Journal of Reproductive Medicine, 2001, 10(1): 38-41. (in Chinese)
- [17] 韦相才, 田佩玲, 陈平乐. 王氏管精子优选法的应用及效果 [J]. 广东医学, 2000, 21(5): 375-376.
Wei X C, Tian P L, Chen P L. Effects analysis of Wang's tube sperm separating system in practice [J]. Guangdong Medical Journal, 2000, 21(5): 375-376. (in Chinese)
- [18] 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.
Zhou R B, Pan C R, Li Y Q, et al. Applying SHIS sperm-separating system to improve the quality of human sperm [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2001, 9(2): 98-102. (in Chinese)
- [19] 韦相才, 田佩玲, 陈平乐, 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.
Wei X C, Tian P L, Chen P L, et al. Comparison and evaluation of two different methods for sperm separation [J]. National Journal of Andrology, 2000, 6(4): 234-237. (in Chinese)
- [20] 韦相才, 李庆琨, 田佩玲, 等. 两种精子优选方法效果比较 [J]. 生殖医学杂志, 2004, 13(2): 83-86.
Wei X C, Li Q K, Tian P L, et al. A comparison of two different methods for sperm separation in artificial insemination with husband semen [J]. Journal of Reproductive Medicine, 2004, 13(2): 83-86. (in Chinese)