

羊建平,武彩红,赵旭庭,等. 冷冻保存对猪精子 DNA 完整性及形态结构的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):151-153.

# 冷冻保存对猪精子 DNA 完整性及形态结构的影响

羊建平<sup>1,2</sup>, 武彩红<sup>2</sup>, 赵旭庭<sup>2</sup>, 周春宝<sup>2</sup>, 姚静<sup>3</sup>, 张斌<sup>2</sup>, 郑筱峰<sup>2</sup>

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300;

3. 江苏炸无锡市农业委员会, 江苏无锡 214023)

**摘要:**采集姜曲海猪精液, 对其进行超低温冷冻保存, 解冻后分别通过显微镜、扫描电镜和吖啶橙染色观察其形态、超微结构和 DNA 完整性, 探讨冷冻保存对猪精子 DNA 完整性及形态结构的影响, 同时探讨海藻糖和乳糖对冷冻精子的保护作用。结果表明, 冷冻后精子形态正常率(海藻糖组和乳糖组分别为 74.7%、67.6%)及 DNA 完整率(海藻糖组和乳糖组分别为 66.4%和 63.2%)均显著低于新鲜精子(95.5%和 94.7%), 且冷冻组间也存在显著差异( $P < 0.05$ ); 冷冻造成精子结构不同程度的损伤, 主要表现为精子头颈部发生部分或全部断裂, 颈部肿胀, 顶体结构损伤。

**关键词:**猪精子; 冷冻保存; DNA; 形态结构

**中图分类号:** S828.3<sup>+</sup>4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0151-02

精子的长期保存在畜牧业、低温生物学种质资源保存及动物基因研究等方面具有重要的意义; 但冷冻保存猪精液应用于人工授精的比例尚不足 1%, 仍存在冷冻-解冻后活力差、受胎率低、产仔数少等诸多问题<sup>[1-2]</sup>。许多学者致力于猪冷冻精液的研究, 但关于精子冷冻后 DNA 损伤及超微结构研究较为缺乏。因此, 本试验探索冷冻保存对猪精子 DNA 完整性及超微结构的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 精液采集

4 只成年、健康、性欲旺盛的姜曲海种公猪由国家级姜曲海种猪场提供。利用手握法采集精液, 立即置于保温桶中, 1 h 内带回实验室。将精液用专用滤纸过滤至 37 °C 预热烧杯中, 然后按照 1 : 1.5 与稀释液(德国米尼图 MII 稀释剂)进行稀释。

### 1.2 稀释液和冷冻液的配置

1.2.1 冷冻基础液的配置 分别称取葡萄糖 1.1 g, Tris 2.42 g, 柠檬酸钠 1.48 g, 青霉素 0.06 g 和链霉素 0.1 g, 溶解于双蒸水中, 定容至 100 mL。

1.2.2 冷冻液的配置 冷冻 I 液: 海藻糖组(冷冻 1 组), 在稀释液的基础上添加 375 mmol/L 海藻糖、0.1% 十二烷基磺酸钠(SDS)、0.05% 维生素 C 和 20% 卵黄; 乳糖组(冷冻 2 组), 在稀释液的基础上添加 375 mmol/L 乳糖、0.1% 十二烷基磺酸钠(SDS)、0.05% 维生素 C 和 20% 卵黄。冷冻 II 液: 在冷冻 I 液的基础上添加甘油, 使其终浓度为 3%。

1.2.3 吖啶橙染色液的配置 吖啶橙溶液: 吖啶橙 0.1 g 溶解于 100 mL 蒸馏水中; 枸橼酸溶液: 枸橼酸 1.91 g 溶解于

100 mL 蒸馏水中; 磷酸氢二钠溶液:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  10.74 g 于 100 mL 蒸馏水中。临用时, 分别取吖啶橙染色液 10 mL、枸橼酸溶液 40 mL、磷酸氢二钠溶液 7.5 mL 混合, 即为吖啶橙染色液。

### 1.3 精液冷冻-解冻方法

将 1 : 1.5 稀释后的精液置于 17 °C 过夜, 17 °C 离心(800 g, 12 min), 弃上清, 然后加入冷冻 I 液于 4 °C 平衡 1.5 h; 再加入等体积 4 °C 预冷的冷冻 II 液, 使精液最终稀释比为 1 : 2, 然后再于 4 °C 平衡、分装于 0.25 mL 细管中, 不超过 45 min, 距液氮面 3 cm 熏蒸 10 min, 然后投入液氮保存 7 d。

解冻时, 将细管从液氮中迅速取出, 直接投入 37 °C 水浴中并迅速摇晃。将解冻后的精液收集于 10 mL 试管内, 然后用 9 倍体积的 PBS 液清洗精子。

### 1.4 精子正常形态率的检测

于相差显微镜下直接观察活精子的正常形态率, 至少计数 200 个精子。将巨型精子, 短小精子, 双头或双尾精子, 顶体膨胀或脱落精子, 精子头部残缺或与尾部分离、尾部变曲精子等, 均视为畸形精子。

### 1.5 精子 DNA 完整性的检测

将精液用 PBS 洗 3 次, 弃上清, 调整精子浓度为  $2 \times 10^4$  个/mL, 涂片, 自然晾干, 无水乙醇-冰醋酸(3 : 1)固定 5 min, 然后置入盛有新鲜配制的吖啶橙染色液的染色缸中染色 10 min。蒸馏水清洗, 晾干后, 石蜡油封片, 于荧光显微镜观察、计数<sup>[3]</sup>。DNA 双链完整的精子呈现绿色, 表明有受精能力; DNA 双链损伤的精子呈现红色或黄色, 表明无受精能力, 计数 300 个精子。

### 1.6 扫描电镜样本制备

新鲜和试验 1 组冷冻-解冻精子样本于 2.5% 戊二醛中 4 °C 固定 6 h, 再经 PBS 清洗 3 次, 1 次 30 min; 随后, 将精子包埋于 4% 琼脂中, 再于 1% 锇酸( $\text{OsO}_4$ )中固定 1.5 h, 然后再经 PBS 清洗 3 次<sup>[4]</sup>; 之后, 乙醇逐级脱水, 乙酸异戊脂置换; 临界点干燥仪干燥, IB-5 离子溅射仪喷金, 扫描电子显微镜(SEM)观察、拍照。

收稿日期: 2013-05-20

项目基金: 江苏省自然科学基金(编号: BK2008589); 江苏省“青蓝工程”项目[编号: 苏教师 2010(27)号]; 江苏省无锡市农业产学研合作项目。

作者简介: 羊建平(1965—), 男, 江苏泰兴人, 硕士, 副教授, 主要从事动物医学教学及科研工作。E-mail: jstzyip@yahoo.com.cn。

### 1.7 数据处理

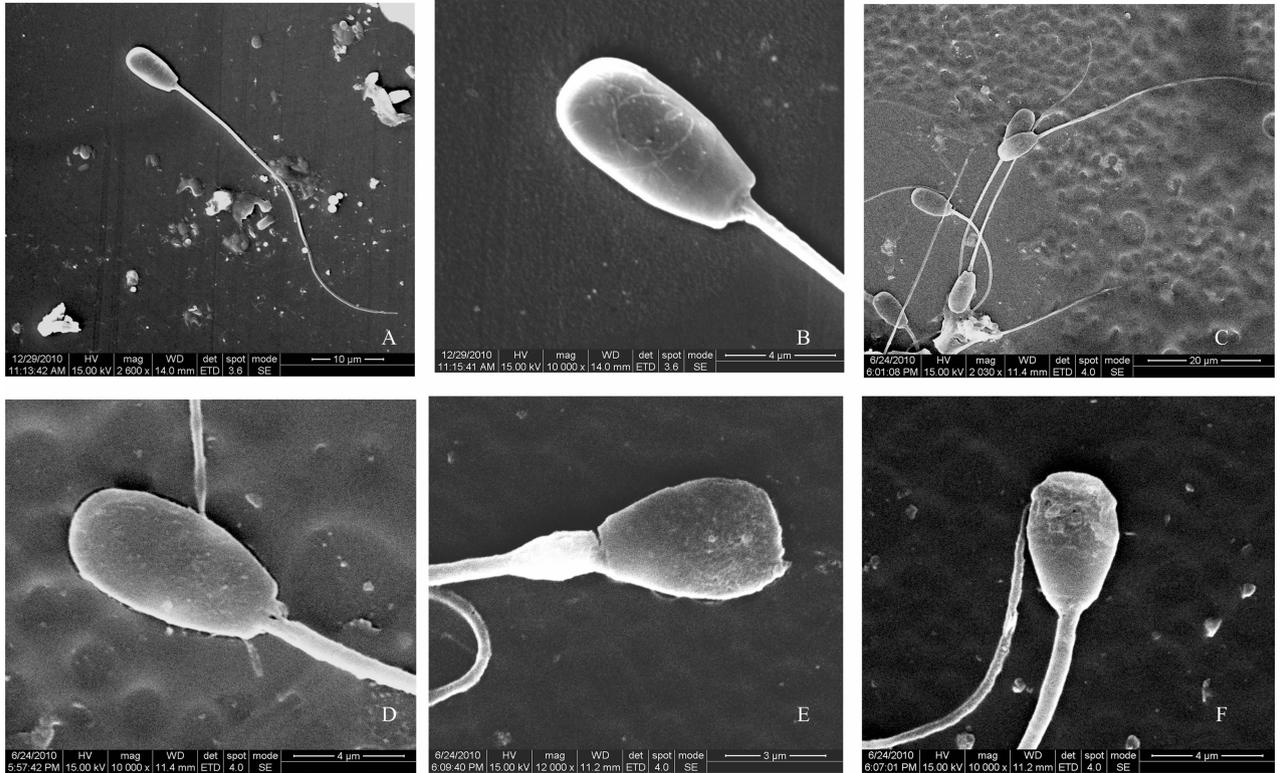
所获试验数据采用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 冷冻对猪精子超微结构的影响

在扫描电镜下,猪新鲜精子(图1-A、B)头、颈、尾结构

完整;头部由细胞核和顶体组成;顶体结构完整,边界清晰,边缘整齐,局部无隆起,表面无空洞;尾部完整。冷冻-解冻后,猪精子头部和颈部发生全部或部分断裂(图1-C、D、E),颈部肿胀(图1-E);顶体结构损伤(图1-E)或消失仅见核结构(图1-F)。



A、B—新鲜精子; C、D、E、F—冷冻-解冻后精子  
图1 扫描电镜下,冷冻保存前后猪精子的超微结构

### 2.2 冷冻对猪精子形态正常率及 DNA 完整性的影响

由表1可见,冷冻1组、冷冻2组及新鲜对照组间精子形态正常率和DNA完整率均存在显著差异( $P < 0.05$ ),且冷冻1组和冷冻2组精子的形态正常率和DNA完整率又显著低于新鲜精子( $P < 0.05$ )。冷冻1组的形态正常率及DNA完整率又显著高于冷冻2组( $P < 0.05$ )。

表1 冷冻对猪精子形态正常率及DNA完整性的影响

处理	形态正常率 (%)	DNA 完整率 (%)
海藻糖组(冷冻1组)	74.7 ± 1.75b	66.4 ± 1.68b
乳糖组(冷冻2组)	67.6 ± 1.52c	63.2 ± 1.84c
新鲜精液(对照组)	95.5 ± 1.55a	94.7 ± 1.70a

注:同一列后不同小写字母表示差异达0.05显著水平。

## 3 讨论

精子的受精能力与精子的形态结构密切相关<sup>[5]</sup>。顶体位于精子头部前端,其内含有多与受精相关的酶。精卵融合前精子必须发生顶体反应,顶体酶才能发挥作用<sup>[6]</sup>。可见,完整的顶体结构是正常顶体反应的基础。精子细胞作为遗传物质的主要传递者,其DNA完整程度直接关系到精子质量及其后代的生长发育<sup>[7]</sup>。本研究发现,冷冻后猪精子形态

结构及DNA完整率均显著低于新鲜精子。在扫描电镜下,冷冻精子头颈结合处断裂、颈部肿胀、顶体结构损伤或消失。许多研究表明,冷冻损伤是低温冷冻任何哺乳动物精子所难以避免的。冷冻损伤主要与细胞内外冰晶形成所致的机械性损伤及渗透压改变所致的化学性损伤<sup>[8-9]</sup>、细胞膜功能紊乱<sup>[10]</sup>和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶障碍<sup>[11]</sup>等因素有关。

本研究也发现,添加海藻糖组的冷冻精子形态完整率和DNA完整率均比添加乳糖组的高,表明海藻糖对猪精子冷冻保存具有较好的保护作用,这与张树山等的研究结果<sup>[12]</sup>一致。海藻糖是一种非常稳定的非还原性双糖,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,具有稳定细胞膜和蛋白质结构的特性<sup>[13]</sup>。冷冻过程中,精子核蛋白对DNA双链的保护作用被削弱,造成精子线粒体与核基因组的DNA损伤,DNA双链变性为单链DNA,该损伤可能是造成胚胎发育不良和流产的主要原因。李刚琴等的研究结果表明,精子DNA易受活性氧的攻击,造成氧化损伤,进而引起形态结构发生改变而发生不育<sup>[7]</sup>。但有资料表明,人精子冷冻保存并不影响完整的精子核DNA链,仅可能加重冷冻前已损伤精子核DNA链的损伤程度<sup>[14-15]</sup>,这可能和人精子冷冻保存方法成熟有关,但也说明猪精子冷冻保存方法仍需继续探索。

邵春荣,黄广明,李 健. 微生态制剂克洛生对断奶仔猪生产性能的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):153-154.

# 微生态制剂克洛生对断奶仔猪生产性能的影响

邵春荣<sup>1</sup>,黄广明<sup>2</sup>,李 健<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院六合动物科学基地,江苏南京 211501; 2. 建明工业(珠海)有限公司,广东珠海 519040)

**摘要:**在饮水中添加 100 g/t 克洛生(试验 2 组)的断奶仔猪末重比对照高 8.00% ( $P < 0.05$ ),比饲料中添加抗生素(试验 1 组)高 2.84% ( $P > 0.05$ )。试验 2 组日增重比对照高 23.81% ( $P < 0.05$ ),比试验 1 组高 7.22% ( $P > 0.05$ ),说明克洛生对断奶仔猪的增重效果优于抗生素。3 组的料重比分别为 2.21 : 1、1.90 : 1、1.80 : 1,以饮水中添加克洛生组最优,说明克洛生能明显降低料重比。此外,试验 2 组的腹泻率最低,为 1.88%,对照组和添加抗生素组分别为 3.75% 和 4.38%,说明克洛生还能有效降低断奶仔猪的腹泻率。

**关键词:**微生态制剂;抗生素;断奶仔猪;生产性能;腹泻率

**中图分类号:** S828.5;S816.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0153-02

可溶性粉剂克洛生™是一种微生态饲料添加剂,所含有的活性成分是从健康动物肠道中分离出来的枯草芽胞杆菌 PB6 菌株。该菌株已获得美国专利,在产品中以孢子形式存在,抗逆性强,各种有机酸和多种抗生素等成分不会对 PB6 菌株产生抑制。PB6 菌株通过分泌脂性肽等活性成分对产气荚膜梭菌、致病性大肠杆菌等有害菌具有强大的杀灭作用。另外,PB6 孢子能在动物肠道中复活且繁殖速度快,可迅速在肠道中抢占定植位点,营造厌氧环境并抑制有害菌和促进有益菌生长,从而起到维护肠道健康和提高动物生产性能的功。与抗生素相比较,微生态制剂在抑制肠道有害菌繁殖的同时能够完全避免因长期使用抗生素而引起的耐药性问

题<sup>[1-3]</sup>。本研究旨在探讨饮水中添加微生态制剂克洛生对断奶仔猪生长性能、腹泻改善效果的影响,了解克洛生在断奶仔猪保育阶段的使用效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

本试验按照“胎次一致、体重相近、公母各半”的原则选择 28 日龄杜长大三元杂交断奶仔猪 48 头,随机分成 3 组,分别为空白对照组、试验 1 组和试验 2 组,每组设 16 个重复,每个重复 1 头猪,共 16 头。每个处理分别饲喂对应日粮和饮水。

### 1.2 试验设计

对照组采用内江正大商品颗粒饲料,正常饮水;试验 1 组在商品颗粒饲料配方中添加 70% 阿莫西林、98% 环丙沙星 250,300 g/t 的专用颗粒饲料(厂家定制),正常饮水;试验 2

收稿日期:2013-05-28

作者简介:邵春荣(1964—),男,副研究员,主要从事饲料营养研究。

Tel:(025)57686203;E-mail:njscr@163.com。

## 参考文献:

- [1]张树山,李青旺,胡建宏,等. 红景天多糖对猪精子冷冻保护效果的研究[J]. 农业生物技术学报,2010,18(3):519-525.
- [2]Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell J M, et al. Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm[J]. Theriogenology,2008,69(9):1083-1094.
- [3]孙静波,姜 宏,何瑞冰. 精子 DNA 完整性与精液参数的相关性研究[J]. 中国男科学杂志,2010,24(4):26-29.
- [4]彭 影,刘雨生,童先宏,等. 扫描电镜下畸形精子增多症患者的精子形态观察[J]. 中国男科学杂志,2007,21(2):37-42,45.
- [5]Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation[J]. Micron,2006,37(7):597-612.
- [6]O'Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa[J]. Biochimica et Biophysica Acta,2004,1674(2):215-221.
- [7]李刚琴,何 映. 精子线粒体 DNA 损伤与男性不育[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,18(4):4-5.
- [8]Agca Y, Mullen S, Liu J, et al. Osmotic tolerance and membrane permeability characteristics of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa[J]. Cryobiology,2005,51(1):1-14.
- [9]Agca Y, Critser J K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction[J]. Seminars in Reproductive Medicine,2002,20(1):15-23.
- [10]Pegg D E. The history and principles of cryopreservation[J]. Seminars in Reproductive Medicine,2002,20(1):5-13.
- [11]Martin G, Sabido O, Durand P, et al. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm[J]. Biology of Reproduction,2004,71(1):28-37.
- [12]张树山,李青旺,李 刚,等. 海藻糖、蔗糖和乳糖对猪精液冷冻保护效果的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(6):41-45,51.
- [13]García de Castro A, Tunnacliffe A. Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells[J]. FEBS Letters,2000,487(2):199-202.
- [14]宋 博,郑履康,邓丽霞,等. 冰冻对精子 DNA 的影响[J]. 中华男科学,2002,8(4):253-254.
- [15]肖清明,徐 红,何宗明,等. 精液冷冻对不育患者精子核 DNA 链完整性影响的研究[J]. 山东医药,2005,45(19):10-11.