

徐婷婷,刘运镇,纪康,等. 冷冻前预处理对新西兰兔精液超低温保存品质的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):243-244.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.083

# 冷冻前预处理对新西兰兔精液超低温保存品质的影响

徐婷婷<sup>1</sup>, 刘运镇<sup>1</sup>, 纪康<sup>2</sup>, 赵莎莎<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2. 江苏省金坛市动物卫生监督所,江苏金坛 213200)

**摘要:**以新西兰兔精液为研究对象,对新鲜精液采用不同的静置时间、离心速度、离心时间及精清留量进行处理,经过超低温保存后,通过测定精子活率、顶体完整性、质膜完整性来选择兔精液冷冻保存最近佳预处理方案。结果表明,精液离心前静置 60~90 min 再以 1 000 r/min 的速度离心,其冻后活率及复苏率明显优于其他静置时间;离心 10 min 时的效果优于其他离心时间;采用 1 000 r/min 的速度离心时,相同离心时间均较其他离心速率冷冻-解冻后精液活率、复苏率、精子质膜完整性和顶体完整性高;离心后,精清留量和精液的体积比为 1:1 的冻后活率、复苏率、精子质膜完整性和顶体完整性优于精液与精清的体积比为 0:1、2:1。

**关键词:**兔;精液保存;活率;顶体;完整性;质膜;精清留量

**中图分类号:**S829.13<sup>+</sup>4

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2014)12-0243-02

精液超低温冷冻保存,对动物种质资源保护有重要作用。精液冷冻保存在牛、猪上都有比较成熟的技术方案,在生产实践上应用较广泛。但迄今为止,关于兔精液的冷冻保存研究相对较少,尚未形成完整的技术方案和技术突破。由于夏季气温较高,兔的受孕率不论是自然受孕还是人工授精都比春秋季大幅降低,给养兔业带来了较大的影响,因此研究兔精液超低温保存、形成完整的技术准则成为当前最迫切的研究任务。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 仪器设备 电子天平、荧光倒置显微镜、电热恒温水浴锅、电热恒温干燥箱、CO<sub>2</sub> 培养箱、离心机、液氮生物容器、冰箱、蒸汽灭菌器、双人单面净化工作台、超声波清洗仪、加热板、0.25 mL 细管等。

1.1.2 试剂 NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、无水葡萄糖、二水柠檬酸钠、青霉素钾、硫酸链霉素、柠檬酸、甘氨酸、甘油、牛血清白蛋白、Tris。

1.1.3 试验动物 江苏盐城正山兔业有限公司的 1~2 岁优质新西兰种公兔,体质健康,无繁殖疾病。试验兔单笼饲养,饲养温度 24℃ 左右,湿度 50% 左右,每天光照 12 h,定量喂食全价配合饲料,自由饮水。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 溶液的配制

PBS 液(磷酸盐缓冲液)的配制:NaCl 0.8 g, KCl 0.02 g, CaCl<sub>2</sub> 0.013 2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.289 8 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.012 1 g, 加双蒸水至 100 mL, pH 值调至 7.2,

0.22 μm 滤膜过滤,4℃ 保存备用。

BTS 液(常温保存液)的配制:葡萄糖 3.7 g, 二水柠檬酸三钠 0.6 g, 乙二胺四乙酸二钠 0.125 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.125 g, KCl 0.007 5 g, 青霉素钠 0.06 g, 硫酸链霉素 0.1 g, 加双蒸水至 100 mL, pH 值调至 7.2, 0.22 μm 滤膜过滤,4℃ 保存备用。

冷冻稀释液的配制:葡萄糖 1.59 g, 柠檬酸 1.96 g, Tris 3.52 g, 青霉素钠 0.06 g, 硫酸链霉素 0.1 g, 甘油 4%, 卵黄 20%, 加双蒸水至 100 mL, pH 值调至 6.21, 0.22 μm 滤膜过滤,4℃ 保存备用。

解冻液的配制:葡萄糖 5.0 g, 柠檬酸钠 0.5 g, 10% 安钠咖 5 mL, 青霉素 8 万 IU, 硫酸链霉素 10 万 IU, 加双蒸水至 100 mL, 0.22 μm 滤膜过滤,4℃ 保存备用。

PI 染色溶液的配制:PI 0.05 g 溶解于 20 mL PBS 液中,4℃ 保存备用。

DABCO 防荧光淬灭剂的配制:甘油/PBS(9:1)10 mL、DABCO 0.024 6 g, 1 mL 分装,4℃ 保存备用。

1.2.2 精液采集 在采精器中注入温水并装上预热至 35~37℃ 的集精管,将发情成年母兔放入公兔笼内,诱导公兔爬跨母兔,将阴茎导入母兔阴门处的采精器内,公兔射精后侧倒时迅速将采精器竖立拿出兔笼,弃去夹层中的温水,使精液全部流入集精管中。于 37℃ 下进行精液常规质量检查,选择无异味、乳白色、精子形态正常、活率在 0.7 以上、密度适中的精液用于试验。精子活率的检测方法:20 μL 精液充入 37℃ 预热的血细胞计数板上,显微镜下观察向前运动精子所占的比值即为精子活率。

#### 1.2.3 精液的预处理

1.2.3.1 离心前静置时间 将采集的合格精液保存在 37℃ 的保温瓶中,分别静置 15、30、60、90 min。

1.2.3.2 离心速率 分别以 500、1 000、1 500、2 000 r/min 的速度分别离心 5、10、15 min。

1.2.3.3 精清留存量 将离心后的精液分别按照精清与精子的体积比为 0:1、1:1 和 1:2 的量留取,然后用等温稀释液进行稀释。

收稿日期:2014-08-21

基金项目:江苏省“333 高层次人才培养工程”项目(编号:苏农办人[2013]3 号);江苏省无锡市农业产学研合作项目。

作者简介:徐婷婷(1979—),女,江苏泰州人,硕士,实验师,从事预防兽医研究和教学工作。E-mail:t\_h\_l@163.com。

1.2.3.4 稀释与平衡 将符合要求并且经过预处理的精液按 1∶2 的体积比与等温的稀释液混合,摇匀,放入 5℃冰箱中平衡 2 h。

1.2.3.5 冷冻精液的制备与解冻 采用 0.25 mL 细管法进行冷冻,将装有精液的细管置于充分预冷广口冷冻容器内的管架上,距离液氮面 3 cm,熏蒸 10 min,然后投入液氮罐提桶内保存。解冻时,将细管取出后直接投入 37℃温水中解冻 45 s,用等温解冻液按体积比为 1∶10 稀释,37℃水浴 10 min。

1.2.3.6 精液品质检测指标及方法 (1)精子活率。取 10 μL 精液 PI 荧光染色法进行判断(死精子 PI 染色后呈阳性,活精子 PI 染色后呈阴性),置于载玻片上,盖上盖玻片,在 400×显微镜下评定精子活率。每次至少检查 200 个精子。计算公式:活率=未着色精子数/总精子数。(2)质膜完整率。将解冻后的精液用果糖-柠檬酸钠低渗液(0.675 g 果糖、0.367 g 二水柠檬酸钠溶于 50 mL 双蒸水中)稀释,调整精子密度为 100 万~200 万 spz/mL,37℃孵育 30 min,取 20 μL 精子悬液于血细胞计数板上,400×倒置显微镜观察,每次至少计数 200 个精子,计算弯尾精子的比率,计算公式:质膜完整率=弯尾精子数/总精子数×100%。(3)精子顶体完整率。采用姬姆萨染色法测定,计算公式:精子顶体完整率=顶体完整精子数/总精子数×100%。

1.3 数据统计

所有处理均至少重复 5 次,每次计数精子数不少于 200 个。采用 *t* 检验和方差分析法对试验数据进行统计分析,*P*<0.05 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 稀释前静置时间对猪冻精活率及复苏率的影响

由表 1 可知,精液离心前静置 60、90 min,再以 1 000 r/min 的速度离心 10 min,其冻后活率及复苏率明显优于静置 30、120 min 的冻后活率和复苏率(*P*<0.05),其中静置 90 min 的效果最好;静置 60、90 min 的精子质膜完整率和顶体完整率差异不显著(*P*>0.05),显著好于 30、120 min (*P*<0.05)。

表 1 离心前静置时间对精液冻后活率及复苏率的影响

静置时间 (min)	原精活率	冻后活率	复苏率 (%)	质膜完 整率(%)	顶体完 整率(%)
30	0.7	0.31±0.02b	44.29b	42.82b	67.83b
60	0.7	0.35±0.02a	50.00a	53.47a	73.24a
90	0.7	0.38±0.04a	54.29a	53.26a	74.38a
120	0.7	0.27±0.02b	38.57b	48.82b	65.17b

注:同列数据后不同字母表示差异显著(*P*<0.05)。下同。

2.2 离心速度及离心时间对冻后活率及复苏率的影响

对采集的兔新鲜精液静置 60 min 后,以 500、1 000、1 500、2 000 r/min 的速度分别离心 5、10、15 min,解冻后精子的各项指标见表 2。由表 2 可知,在不同转速下离心时,离心时间对冻后精子活率、复苏率、精子质膜完整性和顶体完整性的影响差异显著(*P*<0.05),离心 10 min 时的效果优于其他离心时间。在离心相同时间下,采用 1 000 r/min 的速度离心时的冷冻-解冻后精液活率、复苏率、精子质膜完整性和顶体完整性均显著高于其他离心速率(*P*<0.05)。可见,离心时

间和离心速度对精液的冻后活率影响较大,通常以 1 000 r/min 的速度离心 10 min 较好,且与其他情况相比差异显著(*P*<0.05)。

表 2 离心速度和离心时间对精液冻后活率及复苏率的影响

离心速率 (r/min)	离心时间 (min)	原精 活率	冻后活率	复苏率 (%)	质膜完整 率(%)	顶体完 整率(%)
500	5	0.7	0.24±0.01b	34.29b	43.26b	68.54b
	10	0.7	0.27±0.01a	38.57a	48.17a	71.26a
	15	0.7	0.25±0.02b	35.71b	42.03b	65.79b
1 000	5	0.7	0.31±0.02b	44.29b	45.01b	70.38b
	10	0.7	0.38±0.04a	54.29a	53.26a	74.38a
	15	0.7	0.28±0.02b	40.00b	47.24b	68.47b
1 500	5	0.7	0.29±0.01b	41.43b	44.75b	67.83b
	10	0.7	0.32±0.02a	45.71a	50.23a	72.14a
	15	0.7	0.28±0.02b	40.00b	46.21b	66.30b
2 000	5	0.7	0.22±0.01b	31.42b	42.08b	64.81b
	10	0.7	0.27±0.02a	38.57a	45.34a	67.26a
	15	0.7	0.23±0.01b	32.86b	39.65c	63.14b

2.3 精清留量对精液冻后活率及复苏率的影响

由表 3 可知,当精液与精清的体积比为 1∶1 时,冻后活率、复苏率、精子质膜完整性和顶体完整性显著优于精液与精清的体积比为 1∶0 和 2∶1 时效果(*P*<0.05)。

表 3 不同精清留量对精液冻后活率的影响

<i>V</i> <sub>精液</sub> : <i>V</i> <sub>精清</sub>	原精 活率	活率	复苏率 (%)	质膜完 整率(%)	顶体完 整率(%)
1∶0	0.7	0.33±0.02b	47.14	49.87b	71.82b
1∶1	0.7	0.38±0.04a	54.29a	53.26a	74.38a
2∶1	0.7	0.35±0.01a	50.00	50.63b	71.65b

3 结论与讨论

试验结果表明,在稀释前将精液静置 60~90 min 可有效使精子和精清接触,精子获得了对冷休克及冷冻损伤更强的抵抗力,静置时间太长可引起精清变质,从而对精子质量产生影响。同时,精子不运动也容易形成假死状态,静置时间过短,精子不能和精清充分接触,对冷休克和冷损失的抵抗能力较差。

以 1 000 r/min 的离心速度离心 10 min,解冻后活率、复苏率、质膜完整率和顶体完整率分别达到 0.38、54.29%、53.26%、74.38%。不离心或者离心速率太小、时间太短,精液体积过大稀释效果不佳,而如果离心速度过快、时间过长则会使精子在离心管底部凝结,从而导致形态异常,活率下降。

参考文献:

[1] 赵廷军,张维祥,潘雨来. 人工授精技术在家兔生产中的应用[J]. 中国养兔,2007(2):18-20.  
[2] 张旭刚,赵永聚,李周权. 双荧光探针检测冷冻对精子质膜完整性的影响[J]. 中华男科学杂志,2007,13(5):403-406.  
[3] 刘晓妮,李志军,项斌伟,等. 动物精液品质评定方法的研究进展[J]. 中国草食动物,2011,31(2):50-54.  
[4] 刘伟,崔成都,王海军,等. 中国白兔精液冷冻保存的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2008(2):98-99.  
[5] 李孝娟. 三种渗透性抗冻剂和稀释基础液配合对兔精液冷冻保存效果的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2000.