

赵万乐,李艳玲,朱松波,等. 稀释液中添加 *L*-半胱氨酸对鸡精液室温保存的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):131-133.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.037

稀释液中添加 *L*-半胱氨酸对鸡精液室温保存的影响

赵万乐¹, 李艳玲¹, 朱松波¹, 陈二平¹, 张兆旺²

(1. 郑州市农林科学研究所, 河南郑州 450005; 2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃兰州 730070)

摘要:利用安卡红种公鸡新鲜精液,在 A、B 等 2 种稀释液稀释后分别添加不同浓度的 *L*-半胱氨酸,测定精子活率和精子畸形率,比较不同浓度的半胱氨酸对鸡精液在常温保存下的效果。结果表明,在常温下保存,在 A 稀释液中添加 1.0 mmol/L *L*-半胱氨酸的鸡精液的各项指标值均比不添加和添加 5.0 mmol/L *L*-半胱氨酸的好($P < 0.05$),且保存效果较为理想。在 B 稀释液中添加 1.0、5.0 mmol/L *L*-半胱氨酸的精子有效存活时间极显著高于对照组($P < 0.01$);随着 *L*-半胱氨酸添加量的增多,生存指数值变大,且以添加 5.0 mmol/L *L*-半胱氨酸最高,但与添加 1.0 mmol/L *L*-半胱氨酸间差异不显著($P > 0.05$)。但是,2 种稀释液中是否添加 *L*-半胱氨酸对精子畸形率影响不大($P > 0.05$)。

关键词:稀释液;鸡;精液;*L*-半胱氨酸;室温保存;精子活率;畸形率

中图分类号: S831.3+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0131-03

精液保存会随着时间的推移而使精子活力以及受精能力降低^[1],即使是使用一些比较好的稀释液。精子在呼吸代谢过程中能产生活性氧簇(ROS),携带有氧自由基,造成过氧化损伤,这是受精能力下降的重要原因之一。因此,在精液稀释液中添加抵抗自由基的成分是很有必要的^[2]。近些年,过氧化作用对精子的不良影响得到研究者的普遍重视,但是由于物种和抗氧化剂作用机理的不同,抗氧化剂在精液保存中的添加量和作用效果报道不尽相同。本试验根据鸡精液的氧化原理和 *L*-半胱氨酸的作用机理,在稀释液中添加不同浓度的 *L*-半胱氨酸,观察精液在常温下的保存效果,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验动物

收稿日期:2015-12-25

作者简介:赵万乐(1987—),男,山西晋城人,硕士,研究实习员,主要从事动物繁殖技术方面的研究。E-mail:503587578@qq.com。

菌株的拮抗菌,经鉴定为链霉菌。通过抑菌试验发现,LFJK-11 菌株发酵液抑菌效果强,可以运用其发酵液来防治水产病原物。本试验对 LFJK-11 菌株的生长特征、生理生化特征及其菌丝和基质特征进行研究,并对其进行 16S rDNA 测序比对并构建生物树,最终确定该菌株为链霉菌属菌株,所得结果与常规生理生化鉴定结果一致。

本试验属首次对 LFJK-11 菌株生长特征进行研究,且其发酵产物对于嗜水气单胞菌 HCLF-2 菌株拮抗作用显著,是一种较好的拮抗菌,对水产动物病原菌有较强的抑制活性,起抗病能力。此研究对于探寻水产动物及人类肠道病原物的生物防治以及水产业的发展有着十分重要的作用。

参考文献:

[1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌综述[J]. 水产学报,1992,16(3):

选用 15 羽健康、繁殖性能好的安卡红种公鸡,供采精用。供试验鸡的饲料配方见表 1。

表 1 供试鸡饲料配方

原料	配比(%)	营养浓度	含量
玉米	60.0	代谢能(MJ/kg)	12.3
豆粕	21.0	粗蛋白(g/kg)	116.8
麦麸	2.0	钙(g/kg)	10
胡麻渣	6.5	总磷(g/kg)	6.5
石粒子	8.0	有效磷(g/kg)	4.2
CaHPO ₄	2.0	可消化赖氨酸(g/kg)	5.8
NaCl	0.3	可消化蛋氨酸(g/kg)	3.1
预混料	1.0		

注:1 t 预混料的成分含量为:维生素 A 10.0 kg、维生素 D 8.0 kg、维生素 E 2.0 kg、维生素 K 0.6 kg、CuSO₄·5H₂O 4.8 kg、FeSO₄·7H₂O 35.0 kg、MnSO₄·H₂O 34.8 kg、CoCl₂ 3.6 kg、Na₂SO₄ 150.0 kg、蛋氨酸 150.0 kg、赖氨酸 50.0 kg、氯化胆碱 150.0 kg、植酸酶 10.0 kg、稻壳粉 479.2 kg、牧乐维他 20.0 kg。

282-286.

[2] 陈怀青. 气单胞菌研究进展[J]. 鱼类病害研究,1997,19(3): 18-33.

[3] Hanninen M L. Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources[J]. Journal of Applied Bacteriology,1994,76:455-462

[4] 陈爱平. 2005 年中国水产养殖病害监测报告(一)[J]. 科学养鱼,2006(8):48-49.

[5] 朱丽梅,侯建文,罗凤霞,等. 百合灰霉病的诊断及其病原物的分离纯化[J]. 金陵科技学院学报,2009,25(3):59-63.

[6] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:370-398.

[7] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京:高等教育出版社,2007:149-152.

1.2 试验方法

1.2.1 稀释液配方 根据试验目的配制 2 种基础稀释液 A、B(表 2)各 250 mL,然后各取 3 份,均为 30 mL,编号为 A₀、A₁、A₂、B₀、B₁、B₂,以 A₀、B₀ 为空白对照组,然后在控制 A、B

稀释液渗透压和 pH 值基本不变的基础上分别向其中添加不同浓度的 L-半胱氨酸,制成 A₁、A₂、B₁、B₂ 等 4 种稀释液,其中 A₁、B₁ 中 1.0 mmol/L L-半胱氨酸添加量为 3.6 mg、A₂、B₂ 中 5.0 mmol/L L-半胱氨酸添加量为 18.2 mg。

表 2 基础稀释液配方

基础稀 释液 类型	配方										渗透压 (mOsm/kg)	pH 值	
	果糖 (g)	葡萄糖 (g)	柠檬酸钠 (g)	柠檬酸钾 (g)	谷氨酸钠 (g)	乙酸钠 (g)	磷酸二 氢钾(g)	氯化镁 (g)	EDTA - Na ₂ (g)	Tris (g)			蒸馏水 (mL)
A	0.998 4			0.119 6	1.984 0	0.600 4		0.067 6			100	338	6.94
B		1.004	0.499 2		0.898 8		0.500 4	0.070 0	0.300 8	0.602 4	100	296	7.49

1.2.2 精液采集 用腹背部联合按摩法采集公鸡精液,将取得的鸡精液用纱布过滤,注意在采集过程中减少粪便、血液、尿酸盐等的污染。然后将集精瓶用毛巾包好迅速带回实验室,运送过程中,且尽量避免振荡。

1.2.3 精液的稀释和保存 分别用稀释液 A₀、A₁、A₂、B₀、B₁、B₂ 在室温下将鸡精液按照体积比 1∶3 进行稀释,稀释后迅速检查精子活率,然后置于室温(试验进行期间最高室温 27℃,最低室温 24.5℃)下进行保存。测定精子生存指数和总存活时间,即每隔 4 h 观察 1 次活率,直到精子的活率为 0 时终止,每个处理重复 4 次。精子生存指数为相邻 2 次精子活率平均数与间隔时间乘积的总和,总存活时间为从观察开始至精子活率为 0 时的累计时间和。此外,本试验结合生产实际情况测定有效生存指数和有效存活时间,即指精子的活率为 0.6 时的生存指数和精液保存时间。

1.2.4 精子畸形率 精子畸形率是通过用龙胆紫染液染色后的精液抹片在显微镜 1 000 倍油镜下观察 300 个精子中畸形精子所占的比例。分 2 次观察,第 1 次为在刚稀释完后即行抹片观察,第 2 次为等精子全部死亡时。

1.3 数据处理

利用 Excel 2007 对原始数据作初步整理,然后采用 SPSS 17.0 生物统计软件包进行统计学分析,差异显著标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 生存指数和总存活时间

试验结果(表 3)表明,在添加相同浓度 L-半胱氨酸的情况下,用 B 稀释液保存鸡精液的精子总存活时间和生存指数均显著高于 A 稀释液($P < 0.05$)。就某一个稀释液而言,在 A 中添加 1.0 mmol/L L-半胱氨酸时,生存指数均显著高于不添加和添加 5.0 mmol/L L-半胱氨酸等 2 个试验组($P < 0.05$),但总存活时间以添加 5.0 mmol/L L-半胱氨酸最长,且显著长于对照组和添加 1.0 mmol/L L-半胱氨酸试验组($P < 0.05$)。而在 B 液中添加 1.0、5.0 mmol/L L-半胱氨酸的生存指数显著高于未添加组,且以添加 5.0 mmol/L L-半胱氨酸的效果最好($P < 0.05$),总存活时间表现出与 A 稀释液相同的趋势。

表 3 不同浓度半胱氨酸和稀释液精子生存指数、总存活时间比较结果

L-半胱氨酸浓度 (mmol/L)	生存指数		总存活时间(h)	
	A	B	A	B
0	9.75 ± 0.65aA	15.46 ± 0.38aB	20 ± 1.73aA	43.0 ± 1.73aB
1.0	10.83 ± 0.33bA	16.60 ± 0.23bB	22 ± 1.73aA	45.0 ± 1.73aB
5.0	9.72 ± 0.48aA	17.17 ± 0.69bB	23 ± 0.00bA	48.5 ± 0.87bB

注:不同大写、小写字母表示相同指标同行、同列差异显著($P < 0.05$);相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。下表同。

2.2 有效生存指数和有效存活时间

试验结果(表 4)表明,添加相同浓度半胱氨酸的情况下,用 B 稀释液保存鸡精液的精子有效存活时间和有效生存指数均显著高于 A 稀释液($P < 0.05$)。在 A 稀释液中添加 1.0、5.0 mmol/L 半胱氨酸时,有效生存指数均显著高于对照组($P < 0.05$),但 2 组间无显著差异($P > 0.05$);有效显存活时间以添加 1.0 mmol/L 最长,且显著的高于其他 2 组($P < 0.05$)。而在 B 稀释液中无论是否添加 L-半胱氨酸,其有效生存指数差异不显著($P > 0.05$),但对于有效存活时间来说,添加 1.0、5.0 mmol/L 均显著高于未添加组($P < 0.05$)。

2.3 保存前后 2 个时期精子畸形率

本试验将巨型精子、短头精子、双头或双尾精子、顶体膨胀或脱离、精子头部残缺或尾部分离等各种精子异常类型均视为畸形,试验结果(表 5)表明,添加相同浓度 L-半胱氨酸的情况下,第 1 次观察用 B 稀释液保存的鸡精液时,其精子畸形率显著低于 A 稀释液($P < 0.05$),而第 2 次两者之间差

表 4 不同浓度半胱氨酸和稀释液精子有效生存指数、有效存活时间比较结果

L-半胱氨酸浓度 (mmol/L)	有效生存指数		有效存活时间(h)	
	A	B	A	B
0	4.16 ± 0.06aA	7.66 ± 0.35aB	7.5 ± 0.75aA	9.0 ± 0.0aB
1.0	5.41 ± 0.11bA	7.79 ± 0.25aB	9.5 ± 0.50bA	14.5 ± 1.0bB
5.0	5.22 ± 0.18bA	7.46 ± 0.15aB	7.0 ± 0.00aA	14.0 ± 1.5bB

异不显著($P > 0.05$)。同一种稀释液而言,2 种稀释液在不添加 L-半胱氨酸和添加 1 mmol/L L-半胱氨酸时精子畸形率差异均不显著($P > 0.05$),第 1 次观察时 A、B 等 2 种稀释液在不添加 L-半胱氨酸和添加 1 mmol/L L-半胱氨酸时精子畸形率显著低于添加 5 mmol/L L-半胱氨酸时的精子畸形率($P < 0.05$);第 2 次观察时,A 稀释液精子畸形率差异均不显著($P > 0.05$),B 稀释液在不添加 L-半胱氨酸和添加 1 mmol/L L-半胱氨酸时精子畸形率显著低于添加 5 mmol/L

表 5 不同浓度半胱氨酸和稀释液的精子畸形率

<i>L</i> -半胱氨酸浓度 (mmol/L)	第 1 次观察的精子畸形率(%)		第 2 次观察的精子畸形率(%)	
	A	B	A	B
0	64.33aA	51.00aB	92.33aA	91.33aA
1.0	69.00aA	48.33aB	93.33aA	92.00aA
5.0	72.33bA	54.33bB	94.67aA	95.00bA

L-半胱氨酸精子畸形率($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

从表 3、表 4 可看出,总的趋势是添加组的保存效果好于未添加组,且添加量或稀释液不同,试验结果也不同。在 A 稀释液中,生存指数以添加 1.0 mmol/L 时最高,2 个试验组间的有效生存指数无显著差异,但显著高于对照组。说明在精液保存前期(精子活率将至 60% 以前)*L*-半胱氨酸浓度对精子机能影响不大,后期会有较大影响,在 B 稀释液中也表现出类似结果。造成这一结果的具体原因还不清楚,须进一步研究。精子的存活时间和稀释液的氧化还原指数相关,精子在氧化还原指数为 0,即在高度无氧的保护液中保存时间最长;在纯氧环境中,精子几乎不能生存,抗游离氧自由基能力很弱。另外,生物氧化、辐射、污染物侵害、细胞内酶促反应等过程中释放的自由基对生物分子,尤其是对脂质和核酸有很大的损伤作用,但保护性酶和抗氧化剂可防止自由基的损害作用^[3]。所以,在稀释液中添加含巯基抗氧化剂的一个主要目的就是能够及时清除精子代谢和外界因素产生的自由基,以达到对精子的保护作用。*L*-半胱氨酸是一种含有巯基的小分子量氨基酸,是细胞间谷胱甘肽(GSH)的前体,极易渗入细胞膜,增强细胞内和细胞外 GSH 的生物合成,进而清除了自由基而保护了膜内的脂类和蛋白质。精子在常温保存过程中会进行缓慢的呼吸代谢活动而产生活性氧族,所携带的氧自由基氧化性很强,能氧化精子质膜的不饱和脂肪酸,干扰精子的代谢,造成过氧化损伤,这就是精子受精能力下降的重要原因^[4]。Ravie 等报道,鸡和火鸡精子中含有多不饱和脂肪酰基^[5],而且鸡和火鸡精子的体外保存都起过氧化反应、精子脂质过氧化反应,对精子具有中毒效应^[6-7]。Fujihara 等试验发现,脂质过氧化反应会降低精子活率^[8]。从对火鸡精子的研究来看,精子中的抗氧化性没有足够高,因此不能够抑制精子脂质过氧化反应,这可以解释本试验中添加 *L*-半胱氨酸后精液的保存效果明显好于不添组。

本试验虽未得出对于 A、B 等 2 种稀释液添加 *L*-半胱氨酸的准确量,但随着 *L*-半胱氨酸浓度的增加,保存效果开始变得不明显,但在不同的稀释液中这种变化不同,具体来说,在 A 稀释液中添加 5 mmol/L *L*-半胱氨酸时,除总存活时间外其他 3 个指标均有所下降;B 稀释液在同等情况下虽有所上升,但不明显,说明抗氧化剂的添加量只有在合适的浓度下才能发挥效果。Blesbois 等试验证明,维生素 C 浓度低时才具有抗氧化作用,而高浓度的维生素 C 具有促氧化作用^[9]。孙琪证明,在向稀释液中添加 2、4 mmol/L 半胱氨酸均能提高猪精子各项指标,更可以维持 8 d 60% 以上的活率,其中 2 mmol/L 半胱氨酸效果更显著,添加 8 mmol/L 半胱氨酸效果则较为不明显^[10]。覃永长等证明,在 250 mL 基础稀释液

中添加 0.1 g(在本试验中相当于 3.3 mmol/L) *L*-半胱氨酸保存猪精液 8 d 时,精子活率还保持在 50% 以上^[11]。李大吉等在冷冻稀释液中添加 1 mmol/L *N*-乙酰半胱氨酸 + 0.1 mg/mL *L*-半胱氨酸(在本试验中相当于 1.0 mmol/L),解冻后猪精子的平均路径速度、平均侧摆幅度和平均鞭打频率最高,运动的线速度最低,但对膜脂质过氧化反应没有影响,但 0.1 mg/mL *L*-半胱氨酸处理组可以明显降低丙二醛(MDA)含量^[12]。虽然有很多试验已经证明 *L*-半胱氨酸可以有效地保护精子,降低精子畸形率,但在本试验中可以看出,是否添加 *L*-半胱氨酸对精子畸形率似乎并没有多大的改变,这可能是由试验条件造成的,精液来源于不同物种以及稀释液溶质。

本试验通过测定鸡精液保存过程中精子的生存指数及有效存活时间可知,在 A 稀释液中添加 1.0 mmol/L *L*-半胱氨酸效果较好,但添加 5.0 mmol/L *L*-半胱氨酸时保存效果会有所下降;在 B 稀释液中添加 1.0 mmol/L *L*-半胱氨酸与添加 5.0 mmol/L *L*-半胱氨酸的保存效果差异不显著,但均高于空白对照组,这种差异可能是由稀释液的不同造成的。综上可知,在本试验中影响精子体外存活时间和有效存活时间的因素不是某一个因素造成的,B 稀释液比 A 稀释液好,可能是由于 B 稀释液中某些成分和 *L*-半胱氨酸共同作用才表现出对鸡精液的体外保存效果,可能是增加了抗氧化剂的作用,但具体机制还须要进一步分析。在进行鸡精液体外常温保存时,添加 *L*-半胱氨酸可以明显延长保存时间,但不同浓度保存效果不相同。

参考文献:

- [1] Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trends [J]. *Animal Reproduction Science*, 2000, 60/61 (3): 349 - 355.
- [2] 高飞,岳奎忠,杨增明. 猪精液液态保存的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2004, 40 (6): 46 - 49.
- [3] Rodriguez - Martinez H, Saravia F, Wallgren M, et al. Boar spermatozoa in the oviduct [J]. *Theriogenology*, 2005, 63 (2): 514 - 535.
- [4] 张长兴,陈理盾. 影响猪精液保存时间的因素[J]. *河南畜牧兽医*, 2001, 28 (8): 15 - 16.
- [5] Ravie O, Lake P E. The phospholipids ~ bound fatty acids of fowl and turkey spermatozoa [J]. *Anim Reprod Sci*, 1984, 9 (2): 189 - 192.
- [6] Fujihara N, Koga O. Prevention of the production of lipid peroxide in rooster spermatozoa [J]. *Anim Reprod Sci*, 1984, 7 (4): 385 - 390.
- [7] Cecil H C, Bakst M R. In vitro lipid peroxidation of Turkey spermatozoa [J]. *Poultry Sci*, 1993, 72 (7): 1370 - 1378.
- [8] Fujihara N, Howarth Jr B. Lipid peroxidation in lowi spermatozoa [J]. *Poultry Sci*, 1978, 57 (6): 1766 - 1768.
- [9] Blesbois E, Grasseau I, Blum J C. Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4°C [J]. *Theriogenology* 1993, 39 (3): 771 - 779.
- [10] 孙琪. 不同抗氧化剂对猪精液常温保存的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [11] 覃永长, 张家庆, 朱旋, 等. 不同类型半胱氨酸对猪精液保存的影响[J]. *养猪*, 2010 (2): 20 - 22.
- [12] 李大吉, 魏世宝, 金一, 等. *N*-乙酰半胱氨酸和 *L*-半胱氨酸对冻融后猪精液品质的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2009, 41 (9): 42 - 44.