

郭 苹,陈永霞,马 静,等. 时间和密度对公猪精子活力和运动参数的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):169-173.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.043

时间和密度对公猪精子活力和运动参数的影响

郭 苹^{1,2}, 陈永霞³, 马 静¹, 杨剑波¹, 邢 军¹, 吴井生¹

(1. 江苏农林职业技术学院,江苏句容 212400; 2. 江苏省句容市畜牧兽医总站,江苏句容 212400;

3. 江苏省句容市动物疫病预防控制中心,江苏句容 212400)

摘要:研究时间和密度对公猪精子活力和运动参数的影响,采用计算机辅助精子分析(CASA)系统在采精后 0、10、20、30、60 min 时检测精子运动参数,比较精子活力[用前向运动(PR)的精子百分率表示]、精子活动率[用前向运动和非前向运动(NP)的精子百分率表示]、精子运动速度等参数在不同时间节点不同密度下的变化情况。结果显示,精子活力和精子活动率整体上均表现为随时间延长而降低的趋势,在 20 min 时均极显著低于 0 min 时的检测水平,60 min 时两者的检测水平降幅分别达 29.91%、16.48%。在 1.0 亿个/mL 及以下(D₁)、1.0 亿~1.5 亿个/mL(D₂)、>1.5 亿~2.0 亿个/mL(D₃)、2.0 亿个/mL 以上(D₄)密度级别下,60 min 时精子活力和精子活动率检测结果降幅不一,D₁ 降幅最大,D₄ 最小;曲线速率(VCL)、直线速率(VSL)和平均轨道速率(VAP)等精子运动速度指标均呈现随时间而下降现象;线性(LIN)、直向(STR)和摆动(WOB)变化较平缓,上下波动幅度较小,交打频率(BCF)中,0 min 时检测水平最高,为(6.059±0.197) Hz,之后呈现明显下降趋势,至 60 min 时下降 1.201 Hz,降幅为 19.82%,差异极显著($P<0.01$),0 min 时与 20 和 30 min 时比较,差异显著($P<0.01$)。结果表明,密度大的精液缓冲能力强,精子活力和运动参数降幅小,密度小的精液缓冲能力弱,精子活力和运动参数降幅大;精液品质检查和精液稀释等工作最好在采精后 10 min 内完成。

关键词:时间;密度;运动参数;计算机辅助精子分析(CASA);精子;公猪

中图分类号:S828.9⁺5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0169-04

精液品质检查是评价公猪种用价值最基本也是最重要的检查方法,检查结果能直接或间接反映公猪的生殖机能状况、利用年限、饲养管理水平、母猪受胎率等情况,因此精液品质检查是猪人工授精技术过程中的一个重要环节,也是保证母猪受胎率的一个重要技术手段,能直接影响到后代的数量、质量和猪场的经济效益^[1]。

猪的精液品质检查指标主要包括精液量、密度、活力、pH 值等,采用的方法主要是肉眼估测、人工计数等,存在检测时间长、准确性不高、检测指标少等问题^[2]。人类的精液品质检查发展迅速,技术成熟,方法可行,设备先进。本试验参照《人类精液检查与处理实验室手册》(第五版)^[3],将精子活动力分为前向运动(PR)、非前向运动(NP)和不活动(IM)3 个类别,精子活力一般用前向运动的精子百分率表示,精子活动率则用前向运动和非前向运动的精子(PR+NP)百分率来表示。

本试验采用计算机辅助精子分析(CASA)系统进行检测,检测精子运动参数,分析采精后不同时间节点以及不同密度对精子活力、精子活动率、精子运动速度等指标的影响,以

期为精液品质检查时间节点和精液稀释时间间隔等研究提供理论依据,同时也为后续的精液处理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用种公猪均来自江苏农林职业技术学院种猪场,其中:长白猪(L)3 头、大白猪(Y)3 头、杜洛克猪(D)4 头、巴克夏猪(B)2 头、梅山猪(M)6 头,均为成年种公猪(28~38 月龄)。每头种公猪每周采精 2 次,固定采精时间和采精员。试验时间为 2016 年 11 月至 2017 年 7 月,试验地点为江苏农林职业技术学院种猪场实验室。

1.2 精液采集和指标测定

公猪精液的采集用手握法进行;在采精过程中,弃去前后段精清,收集中段富含精子部分,用 4 层灭菌纱布过滤精液,采完精后,立即吸取 10 μ L 精液,放入 2 μ L 观察池(标准计数板,8 个观察池。每个观察池 22 μ L,池高 20 μ m),置于负相差显微镜下观察和检测。

采用西班牙 CASA 系统进行精液质量分析。测定的主要指标:精子活力指标有 PR、NP;精子运动速度指标有曲线速率(VCL)、直线速率(VSL)和平均轨道速率(VAP);精子运动方式指标有线性(LIN)、直向(STR)、摆动(WOB)、头侧摆振幅(ALH)、交打频率(BCF)。检测时,要求精子总数不低于 500 个。

1.3 分组方式和数据统计

1.3.1 分组方式 时间分组按照精液采集后 0、10、20、30、60 min 进行,采集的精液放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中,一直放到检测

收稿日期:2017-08-25

基金项目:江苏省农业三新工程(编号: SXGC[2014]274);农业部 and 江苏省农委畜禽资源保护项目(编号: C3201007、JS-C-23);江苏农林职业技术学院院级项目(编号: 2017kj08)。

作者简介:郭 苹(1979—),女,江苏镇江人,硕士,兽医师,从事动物遗传育种与繁殖工作和研究。E-mail: 3709438@qq.com。

通信作者:吴井生,博士,副教授,从事猪育种与繁殖研究。E-mail: 17190607@qq.com。

完毕;密度按照 1.0 亿个/mL 及以下、1.0 亿~1.5 亿个/mL、1.5 亿~2.0 亿个/mL、2.0 亿个/mL 以上进行分组,分别记作 D₁、D₂、D₃、D₄ 组。

1.3.2 数据统计 采用 SPSS 19.0 软件中 GLM 程序对各项数据进行方差分析,差异显著或极显著时采用 *LSD* 法进行多重比较,结果表示为边际均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 时间和密度对精子活力和活动率的影响

在不同时间下,精子平均活力变化情况见表 1。前向运

动精子比例和精子活动率在采精后即检测时最高,分别为(50.29±2.22)%、(92.29±2.49)%,随后,精子活力下降。10 min 后,精子活力和精子活动率分别为(44.70±2.17)%、(86.87±2.43)%,与采精时相比差异不显著(*P*>0.05)。20 min 后,与 0 min 时差异达到极显著水平(*P*<0.01)。与 0 min 相比,60 min 时的精子活力、活动率降幅分别为 29.91%、16.48%。非前向运动精子比例在 0~60 min 之间变化不明显,差异不显著(*P*>0.05)。在 0~60 min 之间,PR 和 PR+NP 的变化呈现下降趋势,NP 变化趋于平稳,变化幅度不大。

表 1 不同时间下精子平均活力和活动率检测结果

测定指标	精液采集后不同时间的活力和活动率(%)				
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
PR	50.29±2.22Aa	44.70±2.17ABab	40.32±2.22BCbc	39.78±2.17BCc	35.25±2.17Cc
NP	42.00±1.46Aa	42.16±1.43Aa	41.96±1.46Aa	39.69±1.43Aa	41.84±1.43Aa
PR+NP	92.29±2.49Aa	86.87±2.43ABab	82.28±2.49BCbc	76.89±2.43Cc	77.08±2.43Cc

注:同行数据后标有不同大写字母、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。下表(除表 8)同。

在比较不同时间下精子平均活力变化情况的基础上,分析了不同原精密度下 PR 和 PR+NP 比例变化趋势。由表 2 可知,在不同原精密度下,PR 比例随时间变化大体上均表现为下降趋势,60 min 时与采精时相比,D₁ 组下降幅度最大,为 23.15 百分点,D₄ 组下降幅度最小,为 4.34 百分点;D₁ 组中,

采精后 0 min 与 10 min 时精子活力相比,差异不显著(*P*>0.05),但与 20、30、60 min 时相比,差异显著或极显著(*P*<0.05 或 *P*<0.01);D₄ 组中,采精后 0 min 时的 PR 比例在所有密度组别中最高,为(56.68±3.36)%,60 min 后的比例为(52.34±3.36)%。

表 2 不同原精密度下 PR 比例变化结果

密度组别	精液采集后不同时间的 PR 比例(%)				
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
D ₁	50.93±4.80Aa	41.88±4.80ABab	36.85±4.80ABCbc	32.12±4.80BCbc	27.78±4.80Cc
D ₂	49.18±4.77Aa	45.75±4.77Aa	39.19±4.77Aa	36.25±4.77Aa	40.05±4.77Aa
D ₃	48.58±3.35Aa	42.70±3.10Aab	39.11±3.35ABabc	37.48±3.10ABbc	31.91±3.10Bc
D ₄	56.68±3.36Aa	55.47±3.36Aa	56.40±3.36Aa	52.40±3.36Aa	52.34±3.36Aa

由表 3 可知,精子的活动率在不同密度组别中大体上均随时间表现为下降趋势,其中,D₁ 组别的下降幅度最大,D₄

组别下降幅度最小,D₂ 和 D₄ 组别中,各时间点精子总的活力检测结果差异不显著(*P*>0.05)。

表 3 不同原精密度下 PR+NP 比例变化结果

密度组别	精液采集不同后时间的 PR+NP 比例(%)				
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
D ₁	88.79±5.12Aa	85.54±5.12ABab	76.01±5.12ACac	65.94±5.12BCbc	65.66±5.12Cc
D ₂	91.55±5.00Aa	85.60±5.00Aa	83.91±5.00Aa	77.43±5.00Aa	85.24±5.00Aa
D ₃	93.85±4.32Aa	84.89±4.00ABab	80.52±4.32ACc	79.23±4.00ACc	72.77±4.00BCc
D ₄	99.90±1.04Aa	99.73±1.04Aa	99.81±1.04Aa	97.62±1.04Aa	98.70±1.04Aa

2.2 时间和密度对精子运动速度的影响

由表 4 可知,VCL、VSL、VAP 等精子运动速度指标均随时间呈现下降现象。在 VCL 方面,采精 0 min 时最大,为(50.52±1.73) μm/s,10 min 后降至(45.65±1.68) μm/s,但两者间差异不显著(*P*>0.05),之后继续下降,20 min 后降至(43.93±1.73) μm/s,与采精 0 min 时差异达到极显著水平(*P*<0.01),60 min 后降至(38.85±1.68) μm/s,降幅达

23.10%。在 VSL 方面,采精 0 min 时最大,为(16.46±0.60) μm/s,与 10 min 时相比差异不显著(*P*>0.05),与采精 20 min 时相比,差异显著(*P*<0.05),与 30、60 min 时相比,差异极显著(*P*<0.01)。在 VAP 方面,采精 0 min 时最大,为(27.80±0.95) μm/s,10 min 后降至(25.74±0.92) μm/s,差异不显著(*P*>0.05),与 20、30 min 时相比,差异显著(*P*<0.05),与 60 min 时相比,差异极显著(*P*<0.01)。

表 4 不同时间下精子运动速度检测结果

测量指标	精液采集后不同时间的运动速度(μm/s)				
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
VCL	50.52±1.73Aa	45.65±1.68ABab	43.93±1.73BCbc	41.89±1.68BCbc	38.85±1.68Cc
VSL	16.46±0.60Aa	14.93±0.58ABab	14.31±0.60ABCbc	14.27±0.58BCbc	13.15±0.58Cc
VAP	27.80±0.95Aa	25.74±0.92ABab	24.65±0.95ABbc	24.27±0.92ABbc	22.51±0.92Bc

根据不同时间下精子运动速度和显著性检验结果分析了不同精子密度下 VCL、VSL、VAP 的时间变化规律,具体结果见表 5、表 6、表 7。

由表 5 可知,就 VCL 而言,总的趋势是,无论在哪种密度

下,VCL 随着时间的延长而降低,只是降低幅度不同而已;D₂ 组在各时间节点的平均 VCL 差异不显著($P>0.05$);D₄ 组在 60 min 时的平均 VCL 高于其他密度级别不同时间节点的

水平。

表 5 不同原精密度不同时间精子 VCL 检测结果

密度组别	精液采集后不同时间的 VCL(μm/s)				
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
D ₁	42.30 ± 1.99Aa	39.02 ± 1.99Aab	34.83 ± 1.99ABbc	35.41 ± 1.99ABbc	31.12 ± 1.99Bc
D ₂	46.48 ± 3.93Aa	47.06 ± 3.93Aa	44.39 ± 3.93Aa	38.82 ± 3.93Aa	42.69 ± 3.93Aa
D ₃	50.13 ± 2.64Aa	44.02 ± 2.35ABab	43.28 ± 2.64ABabc	40.53 ± 2.35ABbc	36.60 ± 2.35Bc
D ₄	84.83 ± 7.78Aa	64.52 ± 7.78Aab	69.33 ± 7.78Aab	71.39 ± 7.78Aa	56.01 ± 7.78Ab

由表 6 可知,就 VSL 而言,也呈现随时间增加而降低的现象,D₄ 密度级别平均 VSL 普遍高于其他密度级别同一时间节点的

水平;D₂ 组各时间节点的 VSL 差异不显著($P>0.05$);D₁ 组中,采精后 0 min 时检测的平均 VSL 水平高于

60 min 时的水平,两者间差异达到极显著水平($P<0.01$);D₃ 组中,0 min 时的水平显著高于 60 min 时的水平($P<0.05$),但两者与其他各时间节点的差异均不显著($P>0.05$)。

表 6 不同原精密度不同时间节点下精子 VSL 检测结果

密度组别	精液采集后不同时间的 VSL(μm/s)				
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
D ₁	17.28 ± 1.22Aa	14.39 ± 1.22ABab	13.78 ± 1.22ABab	14.25 ± 1.22ABab	12.18 ± 1.22Bb
D ₂	15.23 ± 1.29Aa	15.37 ± 1.29Aa	14.19 ± 1.29Aa	13.44 ± 1.29Aa	14.17 ± 1.29Aa
D ₃	14.91 ± 0.87Aa	14.21 ± 0.80Aab	13.41 ± 0.87Aab	13.20 ± 0.80Aab	12.01 ± 0.80Ab
D ₄	22.03 ± 1.70Aa	17.40 ± 1.70Aab	18.78 ± 1.70Aab	19.70 ± 1.70Aab	16.46 ± 1.70Ab

由表 7 可知,就 VAP 而言,D₁ 组中,0 min 时的平均 VAP 水平极显著高于 60 min 时的水平($P<0.01$);D₂ 组中,各时间节点间差异不显著($P>0.05$);D₃ 组中,0 min 时的水平显著高于 60 min 时的水平($P<0.05$),但两者与其他时间节点

水平间差异不显著($P>0.05$);D₄ 组中,0 min 时的水平最高,为(43.39 ± 3.70) μm/s,显著高于 60 min 时的(31.07 ± 3.70) μm/s($P<0.05$)。

表 7 不同原精密度不同时间节点下精子 VAP 检测结果

密度组别	精液采集后不同时间的 VAP(μm/s)				
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
D ₁	25.02 ± 1.50Aa	22.42 ± 1.50ABab	20.53 ± 1.50ABb	21.74 ± 1.50ABab	18.71 ± 1.50Bb
D ₂	25.65 ± 2.09Aa	26.50 ± 2.09Aa	24.87 ± 2.09Aa	22.67 ± 2.09Aa	24.30 ± 2.09Aa
D ₃	26.98 ± 1.46Aa	25.29 ± 1.35Aab	24.26 ± 1.46Aab	23.47 ± 1.35Aab	21.44 ± 1.35Ab
D ₄	43.39 ± 3.70Aa	33.92 ± 3.70Aab	36.38 ± 3.70Aab	37.72 ± 3.70Aab	31.07 ± 3.70Ab

2.3 时间和密度对精子运动方式的影响

由表 8 可知,在 LIN、STR、WOB、ALH 和 BCF 中,LIN、STR 和 WOB 变化较平缓,上下波动幅度较小;ALH 在各时间节点都表现出下降的趋势,但不明显,0 ~ 60 min 间下降 0.184 μm,降幅为 6.73%,差异不显著($P>0.05$);在 BCF

中,0 min 时检测水平最高,为(6.059 ± 0.197) Hz,之后呈现明显下降趋势,至 60 min 时下降了 1.201 Hz,降幅为 19.82%,差异极显著($P<0.01$),0 min 时与 20、30 min 时比较,差异极显著($P<0.01$)。

表 8 不同时间下精子其他运动参数检测结果

时间(min)	LIN(%)	STR(%)	WOB(%)	ALH(μm)	BCF(Hz)
0	32.80 ± 1.04Aa	58.62 ± 0.91Aa	55.00 ± 0.98Aa	2.734 ± 0.067Aa	6.059 ± 0.197Aa
10	32.71 ± 1.01Aa	57.73 ± 0.89Aa	56.08 ± 0.96Aa	2.720 ± 0.066Aa	5.532 ± 0.193ABb
20	32.60 ± 1.04Aa	57.73 ± 0.91Aa	55.75 ± 0.98Aa	2.731 ± 0.067Aa	5.293 ± 0.197BCb
30	33.18 ± 1.01Aa	57.26 ± 0.89Aa	56.69 ± 0.96Aa	2.670 ± 0.066Aa	5.033 ± 0.193BCbc
60	33.80 ± 1.01Aa	58.25 ± 0.89Aa	57.37 ± 0.96Aa	2.550 ± 0.066Aa	4.858 ± 0.193Cc

注:同列数据后不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。

由表 9 可知,在不同原精密度不同时间节点下精子 BCF 检测结果总体呈现下降趋势,D₂ 和 D₄ 组中各时间节点水平间差异不显著($P>0.05$),采精后 60 min 时与采精时相比降幅分别为 9.53%、13.38%,D₁ 和 D₃ 组的下降幅度分别为 28.72%、20.89%,与 0 min 间的差异均达到极显著水平($P<$

0.01)。

3 讨论

本试验采用 CASA 系统检测猪精子运动参数,该系统在人类精液检测中已被广泛使用,相对于常规精液分析而言,具

表 9 不同原精密度不同时间节点下精子 BCF 检测结果

密度组别	精液采集后不同时间的 BCF 检测结果(Hz)				
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
D ₁	7.229 ± 0.468Aa	6.201 ± 0.468ABab	5.565 ± 0.468ABb	4.896 ± 0.468Bb	5.153 ± 0.468Bb
D ₂	5.739 ± 0.378Aa	5.589 ± 0.378Aa	5.515 ± 0.378Aa	5.151 ± 0.378Aa	5.192 ± 0.378Aa
D ₃	5.309 ± 0.241Aa	5.019 ± 0.223ABa	4.781 ± 0.241ABCab	4.774 ± 0.223ABCab	4.200 ± 0.223BCb
D ₄	5.949 ± 0.296Aa	5.133 ± 0.296Aa	5.497 ± 0.296Aa	5.862 ± 0.296Aa	5.153 ± 0.296Aa

有客观性强、准确性高、重复性好等优点,适合用于临床精液标本的检测^[4-5],一般 30 s 内就能完成 1 个样本的检测。

精液标本从采集到分析的时间间隔是影响精液检测结果准确性的重要因素,也是检测前质量控制的重要环节^[6]。在人类精液检测上,为确保检验结果的准确性,提供更有价值的参考数据给临床,让各实验室之间的检验结果更具可比性,精液标本从采集到分析的时间间隔应严格控制^[7-9],推荐的时间间隔为 30 min。根据 GB/T 25172—2010《猪常温精液生产与保存技术规范》中的规定,精液采集后应尽快稀释,放置时间不超过 15 min。

关于检测时间对精液品质影响的报道,张将等研究认为,精子浓度和圆细胞浓度在精液液化后 15、30、45、60、90、120 min 较稳定,精子活力及活动率在 30 min 内也较稳定,30 min 后精子活力显著下降,45 min 后精子活动力也显著下降,精子活力及精子活动率均与检测时间呈负相关^[6];邵永等研究表明,30、60、90 min 检测的精子活力及活动率均分别显著低于 20 min 时检测的活力及活动率^[10];潘锋等研究显示,15、30、60 min 内精子活力及活动率显著下降^[11];蒲江波等研究认为,人类精子最佳检测时间为完全液化后的 1 h,随着时间的延长,精子的 PR 和 PR + NP 均明显下降,下降的主要原因是精子能源供给不足^[12],精子活力下降不是呈直线式而是波浪式^[12-14]。陈碧等研究了取精后至冷冻前的间隔时间对精子冷冻复苏效果的影响,结果表明精液取出 15、30 min 后进行冻存的精子复苏率显著高于 60 min 的^[15]。

本研究结果显示,精子活力和精子活动率大体上均表现为随时间延长而降低的趋势,在 20 min 时均极显著低于 0 min 的检测水平,60 min 时两者的检测水平降幅分别达 29.91%、16.48%。在不同密度级别下,60 min 后精子活力检测结果降幅不一,D₁ 组中达 45.45%,D₄ 组中仅为 7.66%,60 min 后精子活动率检测结果降幅亦不一,D₁ 组中达 26.05%,D₄ 组中为 1.20%。结果表明,密度大的精液缓冲能力强,精子活力降幅小,密度小的精液缓冲能力弱,精子活力降幅大。

VCL、VSL 和 VAP 是以精子头部为参照物,测定其单位时间内精子头部移动距离或相对位移,可以反映精子的运动能力,LIN、STR、WOB、ALH、BCF 等指标可以用来反映精子运动方式,所以认为精液在体外放置时间延长不仅降低精子的运动能力,又可以影响其运动方式^[10]。

邵永等研究了精液留取后不同时间对精子运动参数的影响,结果显示,BCF 在 30 min 时显著高于 20 min 时,90 min 时 VCL 显著低于 20、30 min 时,30、60、90 min 时的 STR 与 20 min 时相比显著降低,90 min 时的 VAP、VSL 分别显著低于 20 min 时的^[10]。

本研究中,VCL、VSL 和 VAP 等精子运动速度指标整体

均呈现随精液离体时间延长而下降现象;在 VCL 方面,精液采集时(0 min)的 VCL 水平极显著高于 20、30、60 min 时,在 VSL 方面,0 min 的 VSL 水平显著高于 20 min 时,极显著高于精液采集后 30、60 min 时,在 VAP 方面,0 min 时的 VAP 水平显著高于 20、30 min 时,极显著高于 60 min 时。在 LIN、STR、WOB、ALH 和 BCF 中,LIN、STR 和 WOB 变化较平缓,上下波动幅度较小,在 ALH 中,各时间节点表现出下降的趋势,但不明显,差异不显著($P>0.05$),在 BCF 中,0 min 时检测水平最高,为(6.059 ± 0.197) Hz,之后呈现明显下降趋势,至 60 min 时下降 1.201 Hz,降幅为 19.82%,差异极显著($P<0.01$),0 min 时与 20、30 min 时比较,差异极显著($P<0.01$)。

随着时间的延长,精子细胞脱水,pH 值发生改变,渗透压的变化及温度的变化均会造成精子活力、活动率、运动参数等降低,尤其是精浆果糖浓度的降低、丝氨酸蛋白酶活性的改变以及精子 DNA 的损伤等可能因素的影响,是造成精子活力、活动率和运动参数改变的重要因素^[13-15]。

4 结论

本试验中,精子活力(PR)、精子活动率(PR + NP)、VCL、VSL 和 VAP 等精子运动速度指标均表现为随时间延长而降低的趋势,密度大的精液缓冲能力强,精子活力和运动参数降幅小,密度小的精液缓冲能力弱,精子活力和运动参数降幅大,精液品质检查和精液稀释等工作最好在采精后 10 min 内完成。

参考文献:

[1] 梅军四,江中良,袁勤科,等. 不同品种的种公猪精液品质差异的研究[J]. 畜牧与兽医,2016,48(9):86-89.
[2] 胡庭溪,朱化彬,杜卫华. 计算机辅助精子分析系统的研究进展[J]. 中国畜牧杂志,2014,50(21):73-77.
[3] 世界卫生组织. 人类精液检查与处理实验室手册[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2011.
[4] Lu J C,Huang Y F,Lü N Q. Computer-aided sperm analysis: past, present and future[J]. Andrologia,2014,46(4):329-338.
[5] Amann R P,Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments [J]. Theriogenology,2014,81(1):5-17.
[6] 张 将,巫戌美,王 东. 正常液化精液标本不同时间检测对精液参数的影响[J]. 解剖学研究,2017,39(2):93-96.
[7] 陈振文. 精液分析标准化和精液质量评估[J]. 中国计划生育学杂志,2006(10):634-637.
[8] 黄宇烽,陆金春. 精子质量参数分析的标准化与质量控制的研究进展[J]. 中华男科学杂志,2007,13(11):963-968.
[9] Zhu Q X,Gao E S,Pathak N,et al. Single or double semen samples: the dilemma in epidemiological studies on semen quality[J]. Human Reproduction,2016,31(3):511-517.

吴 双,朱善元,郭长明,等. 肠炎型犬细小病毒的分离鉴定及病毒滴度测定[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):173-175.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.044

肠炎型犬细小病毒的分离鉴定及病毒滴度测定

吴 双,朱善元,郭长明,秦 枫,左伟勇,王永娟,洪伟鸣,王安平

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室,江苏泰州 225300)

摘要:为获得肠炎型犬细小病毒分离株,采集犬细小病毒胶体金初检阳性的3份粪便,采用同步接毒法分别接种猫肾细胞(F81)和犬肾细胞(MDCK)进行分离培养,F81盲传至第2代出现细胞病变,MDCK盲传至第3代出现细胞病变,2种细胞均仅从病料3中分离出1株病毒。采用PCR方法鉴定该分离株为犬细小病毒并命名为CPV3。根据VP2基因核苷酸序列绘制的系统进化树及其推导氨基酸序列的分析,确定CPV3属于CPV-2a亚型。测定CPV3在MDCK中72 h时的组织细胞半数感染量(TCID₅₀),第5代次(CPV-M-5)和第10代次(CPV-M-10)的TCID₅₀数值分别为 $10^{-4.83}/0.1$ mL和 $10^{-5.50}/0.1$ mL,这为后续测定重组犬干扰素活性试验提供了材料。

关键词:犬细小病毒;细胞病变;CPV-2a亚型;组织细胞半数感染量

中图分类号:S852.65

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2018)23-0173-03

犬细小病毒(CPV)感染是以呕吐和腹泻并伴有胃肠道出血等为主要病征的急性传染性疾病,加拿大、美国和澳大利亚同年报道从患肠炎的病犬粪便中分离到CPV,该病很快在全世界范围内传播。各年龄段犬均可发病,以6月龄以下幼犬发病和死亡较多^[1]。作为细小病毒中最易变异的病毒^[2],1980年报道,1978—2000年从最初的CPV-2型演变出现了CPV-2a,与CPV-2相比潜伏期更短、肠炎症状更严重、粪便中病毒含量低;1984年报道了CPV-2b,2000年报道了CPV-2c,2010年在国内首次被鉴定,致病性更强,3种抗原变异株。近10年来,世界各地出现了New CPV-2a、New CPV-2b和New CPV-2c优势抗原变异株,其中New CPV-2a/b主要在中国、韩国和日本等亚洲国家流行。New CPV-2a/b与CPV-2a/b区别在于VP2蛋白上297位氨基酸发生了突变,改变了与宿主细胞受体的亲和力^[3-4]。CPV-2的变

异主要是通过VP2基因定向漂移产生新抗原变异株^[5],只是在VP2蛋白上5~8个关键氨基酸位点发生了变化,但却导致抗原性、致病性和宿主谱发生改变^[6]。CPV-2是一种无囊膜、单股负链的易变异DNA病毒,基因组约为5 200个核苷酸,编码的结构蛋白包括VP1和VP2,其中VP2是病毒结构蛋白,含有CPV的主要抗原决定簇,约占病毒衣壳蛋白90%的比重。VP2蛋白在决定病毒的宿主范围、结合及进入细胞过程中均起到了重要作用^[7-8]。由于CPV-2的复制和组装须要借助宿主细胞中的多种DNA复制酶,因此只能在分裂间期细胞中复制,所以采用同步接毒法来分离病毒^[9]。本试验采用同步接毒法利用F81和MDCK细胞分离到1株CPV,该病毒属于CPV-2a亚型,为了满足后续测定重组犬干扰素活性试验的需要,测定了该分离株的病毒滴度。

1 材料与方法

1.1 疑似犬细小病毒病病料的采集

江苏省泰州某宠物医院收治了3例疑似犬细小病毒病的病犬,病犬均出现典型的腹泻症状、呕吐、消瘦、鼻镜干燥等临床症状,采集病犬的新鲜粪便,先按照韩国安捷公司生产的CPV胶体金快速诊断试纸说明书进行检测,后采集检测为阳性犬的新鲜粪便,将其置于含3%胎牛血清、10%双抗的RPMI-1640,于-80℃下备用。

1.2 细胞、常用试剂

F81和MDCK购自武汉博士德生物工程有限公司;胎牛

收稿日期:2017-08-11

基金项目:江苏省青蓝工程项目(编号:00000216047);江苏省六大人才高峰项目(编号:NY-009);江苏省兽用生物制药高技术重点实验室开放课题(编号:JSKL开放402);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(16)1055]。

作者简介:吴 双(1983—),女,江苏徐州人,博士,副教授,主要从事动物传染病防控和兽用基因工程疫苗研究。E-mail:jswushuang@sina.cn。

联系作者:王安平,博士,副教授,主要从事兽用生物制药研究。E-mail:wap4017@163.com。

[10]邵 永,戈一峰,赵晓峰,等. 精液留取后不同时间分析对精子运动参数的影响[J]. 中华男科学杂志,2010,16(7):631-634.

[11]潘 锋,徐志鹏,石 亮,等. 精液常规参数初检合格后不同时间点再分析结果及其与精子DNA损伤的关系[J]. 中华男科学杂志,2013,19(1):63-67.

[12]蒲江波,高 建,唐雪莲. 少、弱、畸形精子症患者体外精子的PR、PR+NP以及顶体酶活性在不同时间段的下降速率比较[J]. 中华男科学杂志,2015,21(8):733-736.

[13]Sharma R, Hogg J, Bromham D R. Is spermatozoan acrosin a predictor of fertilization and embryo quality in the human? [J]. Fertility and Sterility, 1993, 60(5):881-887.

[14]马金霞,钱立新,蒋田华,等. 正常供精者精液检测时间与精子活力的关系研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2003(1):43.

[15]陈 碧,张 维,马天仲,等. 取精后至冷冻前的间隔时间对精子冷冻复苏效果的影响[J]. 中国医学创新,2016,13(11):1-4.