

徐小波, 严敏, 欧正铨, 等. 6 种进口猪精液常温保存稀释粉的效果比较[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(9): 201–203.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.09.046

6 种进口猪精液常温保存稀释粉的效果比较

徐小波¹, 严敏², 欧正铨³, 任宪路³, 师蔚群¹

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014;

2. 江苏省沛县农业干部学校, 江苏沛县 221600; 3. 徐州惠牧种畜禽有限公司, 江苏沛县 221600)

摘要: 为了解进口猪精液常温保存稀释粉的实际应用效果, 选购市场上常见的 6 种进口稀释粉进行比较试验。结果表明: 随着常温保存时间的延长, 不同稀释粉组间, 活力下降速度存在差异, 其中 DILTEC 和 CXM 下降最快, PRIMXCELL 组下降最慢。精子有效存活时间差异很大, 由长到短的顺序为 PRIMXCELL > ACTIYE > XINZUAN > SpermPro > CXM > DILTEC; 总存活时间也是 PRIMXCELL 最长, 达到 384 h 以上; 保存 120 h 顶体完整率存在显著差异, 从高到低顺序为 PRIMXCELL > SpermPro > XINZUAN > ACTIYE > CXM > DILTEC。说明法国的 PRIMXCELL 稀释粉最好, 有效存活时间 242 h, 总存活时间 384 408 h, 保存 120 h 顶体完整率 79.6%。

关键词: 公猪精液; 稀释粉; 常温保存; 精子活力; 顶体完整率

中图分类号: S814.3; S828.3⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)09-0201-03

1956 年英国学者 Polge 成功地将猪人工授精技术从试验研究应用于养猪生产实践, 但直到 20 世纪 80 年代这项技术才真正在养猪生产中广泛应用^[1]。我国猪人工授精推广较晚, 且外种猪引进(造成发情鉴定不准确)等原因严重影响了本项技术的发展。一些养猪发达国家人工授精的普及率在 90% 以上^[2-3], 我国猪人工授精的比例在 40% 左右, 规模猪场的比例达 85%。虽然猪冷冻精液能实现猪精液的长期保存, 但其技术相对复杂、成本高且受胎率低, 所以 99% 以上采用常温保存精液来实施猪人工授精^[4]。猪精液的活力保存是人工授精的重要环节, 其中稀释粉的配制是保证精子质量

的关键因素之一。国外稀释粉研究较早, 保存效果相对较好, 目前常见的进口稀释粉有丹麦的亚卫、比利时的 CMX、美国的 VIM、西班牙 BIO、法国卡苏 BTS 等, 进口稀释粉种类多, 价格贵, 效果差别较大。为筛选出优秀的进口稀释粉, 本研究挑选出市售常见的 6 种进口稀释粉进行效果比较, 以期为人工授精的推广应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 稀释粉

选购市场上常见的 6 种进口稀释粉(法国 PRIMXCELL、荷兰 SpermPro、丹麦 ACTIYE、西班牙 DILTEC、比利时 CXM 和韩国 XINZUAN)进行比较试验。

1.2 公猪精液

试验用精液来源于徐州惠牧种畜禽有限公司 18 月龄的健康大约克种猪, 于 2017 年 5 月共 4 次采集同一头公猪精液(公猪号 HM15385), 手握法采精, 收集中段精子含量高的部分(丢弃射精开始与结束时精清含量高的部分)精液, 每次采

收稿日期: 2018-03-21

基金项目: 江苏省苏北科技专项(编号: SZ-XZ2017011)。

作者简介: 徐小波(1964—), 男, 江苏镇江人, 研究员, 研究方向为地方猪种资源保护与利用。E-mail: 119649103@qq.com。

通信作者: 师蔚群, 副研究员, 主要从事畜禽生态健康养殖技术研究。E-mail: 113847911@qq.com。

[14] Marani M, Tenev T, Hancock D, et al. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis[J]. Molecular and Cellular Biology, 2002, 22(11): 3577–3589.

[15] 毛德文, 陈月桥, 王丽, 等. Caspase-8 及 Caspase-3 与细胞凋亡[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(10): 148–150.

[16] 曾明, 丁媛媛, 王金萍, 等. 可舒胶囊对酒精性肝损伤小鼠肝组织 Caspase-3 与 Caspase-8 活性的影响[J]. 中国医药导报, 2013, 10(27): 22–24.

[17] Weldearegay Y B, Pich A, Schieck E, et al. Proteomic characterization of pleural effusion, a specific host niche of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle with contagious bovine pleuropneumonia (CBPP)[J]. Journal of Proteomics, 2016, 131: 93–103.

[18] Li B, Du L P, Sun B, et al. Transcription analysis of the porcine

alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e101968.

[19] Xu X, Zhang H, Song Y L, et al. Strain-dependent induction of neutrophil histamine production and cell death by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2012, 91(2): 275–284.

[20] Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T, et al. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2006, 72(1/2): 46–59.

[21] Bai Fangfang, Ni Bo, Liu Maojun, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 175(1): 58–67.

精结束 10 min 内用猪精子质量计算机检测系统检测原精密度与活力(表 1),平均分成 6 份,准备稀释。

表 1 原精密度与活力检查结果

采精批次	采精量 (mL)	精子密度 ($\times 10^8$ 个/mL)	精子活力 (%)
20170508	220	2.4 \pm 0.14	88.1 \pm 1.28
20170511	210	2.5 \pm 0.18	87.8 \pm 1.17
20170515	220	2.3 \pm 0.11	87.1 \pm 1.31
20170518	200	2.5 \pm 0.15	87.0 \pm 1.43

1.3 精液的稀释和保存

在精液稀释前 1 h,将 6 种不同的稀释粉按说明书分别用双蒸水配制成稀释液,置于 37 ℃ 恒温水浴中预热备用。采集的新鲜精液检查合格后 30 min 内完成稀释,根据精液密度确定稀释倍数(稀释终密度为 3.5 $\times 10^7$ 个/mL),保证 80~100 mL 稀释精液中含有效精子数 30 $\times 10^8$ 个左右。稀释前将稀释液的温度调至与精液温度之差小于 1 ℃,将稀释好的精液分装在 10 mL 青霉素瓶中做好 6 种不同标记并编号,用多层毛巾覆盖在室温中缓慢降温,3~4 h 后置于 17 ℃ 的恒温箱中保存。保存过程中每隔 12 h 轻轻翻动 1 次,防止精子在瓶底沉淀时间过长,影响活力保存。

1.4 精子活力检查

每隔 24 h,从 6 种稀释精液中各取出 1 瓶轻轻摇匀后置于 37 ℃ 水浴中预热 2 min,取中层精液 10 μ L 涂片,用猪精子质量计算机检测系统检测精子活力变化。

1.5 顶体完整率

于稀释后保存 120 h,使用南京建成精子快速染色试剂盒按程序对精子进行涂片染色,在 1 000 倍光学显微镜下观察统计顶体完整率(即顶体完整的精子所占总精子的比例)。

1.6 数据处理

精子活力及顶体完整率检测均采用多视野(3 个以上)平

均值,用“平均值 \pm 标准差”表示,用 SPSS 18.0 进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同猪精液稀释粉在稀释过程中对精子活力的影响

6 种稀释粉稀释后的精液,精子活力均有所下降(表 2),其中西班牙的 DILTEC 和比利时的 CXM 下降幅度较大($P<0.05$),其次是法国的 PRIMXCELL 和丹麦的 ACTIYE($P<0.05$),荷兰的 SpermPro 下降幅度较小($P<0.05$),韩国的 XINZUAN 下降最小($P<0.05$)。说明不同的稀释粉,在稀释过程中对精子的应激损伤程度有差异。

表 2 稀释前后精子活力变化

生产国家	稀释粉名称	精子活力(%)	
		稀释前	稀释后
法国	PRIMXCELL	87.5 \pm 1.32	84.4 \pm 1.15b
荷兰	SpermPro	87.5 \pm 1.32	85.5 \pm 1.12ab
丹麦	ACTIYE	87.5 \pm 1.32	84.3 \pm 1.31b
西班牙	DILTEC	87.5 \pm 1.32	82.5 \pm 1.22c
比利时	CXM	87.5 \pm 1.32	83.7 \pm 1.17bc
韩国	XINZUAN	87.5 \pm 1.32	86.6 \pm 1.18a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 不同猪精液稀释粉对精子常温保存过程中活力的影响

随着常温保存时间的延长,精子活力呈现逐步下降(表 3),但不同稀释粉组间,下降速度存在差异,其中 DILTEC 和 CXM 下降较快,PRIMXCELL 下降最慢,ACTIYE、SpermPro 和 XINZUAN 下降速度居中且总速度相近,但 ACTIYE 表现为前期(120 h 前)下降速度较快(3 组下降速度依次为每天 2.56、2.00 和 2.37 百分点),后期(120~360 h)下降速度较慢(3 组下降速度依次为每天 6.15、6.42、6.89 百分点)。

表 3 保存过程中精子活力变化

保存时间	精子活力(%)					
	PRIMXCELL	SpermPro	ACTIYE	DILTEC	CXM	XINZUAN
0 d(0 h)	84.4	85.5	84.3	82.5	83.7	86.6
1 d(24 h)	83.0	84.1	82.9	81.1	82.4	85.1
2 d(48 h)	81.4	82.5	81.3	79.4	80.8	83.5
3 d(72 h)	79.9	80.3	79.0	74.3	77.8	80.5
4 d(96 h)	78.3	78.0	75.8	70.5	71.1	77.9
5 d(120 h)	76.1	75.5	71.5	64.9	67.3	74.9
6 d(144 h)	72.6	68.8	67.7	62.8	63.5	70.3
7 d(168 h)	70.3	62.6	64.2	59.0	61.4	68.1
8 d(192 h)	65.9	58.0	61.4	54.6	57.9	60.7
9 d(216 h)	62.3	54.9	58.5	50.2	56.0	56.9
10 d(240 h)	60.3	50.7	55.8	46.0	54.0	54.8
11 d(264 h)	56.3	47.5	52.3	33.8	48.1	49.6
12 d(288 h)	50.1	44.6	48.2	23.5	40.1	44.3
13 d(312 h)	45.7	39.8	42.5	14.4	31.8	38.2
14 d(336 h)	38.3	32.1	34.0	0	17.2	31.5
15 d(360 h)	26.3	11.3	10.0	—	0	6.0
16 d(384 h)	15.0	0	0	—	—	0
17 d(408 h)	0	—	—	—	—	—

注:数据均为 3 个视野平均值,因数据较多,所以标准差未列出。

2.3 不同精液稀释粉对精子有效存活时间、总存活时间和顶体完整率的影响

6 种稀释粉组的有效存活时间(活力维持在 60% 以上的存活时间)在 162 ~ 242 h 差异很大,由长到短的顺序为 PRIMXCELL > ACTIYE > XINZUAN > SpermPro > CXM > DILTEC,PRIMXCELL 有效存活时间最长,DILTEC 最短;活力在 30% 时的存活时间在 273 ~ 353 h 之间,由长到短的顺序为 PRIMXCELL > ACTIYE > SpermPro > XINZUAN > CXM >

DILTEC,其中 ACTIYE、SpermPro 和 XINZUAN 很接近,都在 338 h 左右;总存活时间也是 PRIMXCELL 最长,达到 384 h 以上,DILTEC 最短,只有 312 h 以上。6 种稀释粉组保存 120 h 顶体完整率存在显著差异,其中 PRIMXCELL 最高(79.6%),显著高于 DILTEC 最低(69.8%),从高到低顺序为 PRIMXCELL > SpermPro > XINZUAN > ACTIYE > CXM > DILTEC(表 4)。

表 4 精子有效存活时间、总存活时间和顶体完整率比较

稀释粉名称	有效存活时间 (h)	30% 活力保存时间 (h)	总存活时间 (h)	120 h 顶体完整率 (%)
PRIMXCELL	242	353	384 ~ 408	79.6 ~ 2.1a
SpermPro	182	338	360 ~ 384	78.5 ~ 1.8a
ACTIYE	204	340	360 ~ 384	75.2 ~ 2.3ab
DILTEC	162	273	312 ~ 336	69.8 ~ 1.6c
CXM	178	315	336 ~ 360	72.2 ~ 1.5bc
XINZUAN	196	337	360 ~ 384	78.3 ~ 1.9a

注:有效存活时间和 30% 活力存活时间根据每次检查的活力结合下降速度折算;同列数据不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

3.1 猪精液稀释粉及其添加物的作用

猪原精不进行适当稀释,在室温下放置十几小时就会全部失去活力,常温保存稀释液提供猪精子存活并保持受精能力所需的能量物质及适宜的环境(pH 值和渗透压等),稀释液中不同的添加物具有不同的作用,葡萄糖提供能量维持渗透压,碳酸氢钠、Tris 和柠檬酸钠提供酸碱环境,EDTA 防止顶体反应,谷胱甘肽和褪黑激素保护质膜防止氧化损伤,海藻糖和蔗糖等对质膜和顶体结构有保护作用,BSA 作为蛋白保护剂则通过稳定精子结构等多途径保护精子,维生素 C 和氯丙噻能抑制或降低精子的运动,这些添加物的适量使用与合理配合才能最大限度地延长稀释精液在常温保存的时间^[5]。苏泽智等自制的稀释粉保存 5 d 的精子活力为 63%,顶体完整率 78.4%^[6],活力不同程度地低于本试验选的 6 种进口稀释粉,顶体完整率相当。尤如华等选用 6 种进口稀释粉与自配稀释粉进行比较,发现法国的 PRIMXCELL 活力保存时间最长,且自配与进口的在保存 7 d 活力差异不是很大,但之后活力差距迅速拉开^[7],由于其鲜精活力与本研究相比较低,所以保存相同时间的精子活力和总存活时间均低于本试验结果,但其比较与排序结果基本吻合。

3.2 精子活力、顶体完整率与受精能力

猪人工授精实践证明,猪一次正常输精量为 80 ~ 100 mL,必须含有 25×10^8 个左右的精子,才能得到较高的受胎率。同时对精子活力的要求必须在 60% 以上,否则受胎率也会受到严重影响,所以保持 60% 精子活力的存活时间才是有意义的存活时间,并确定为有效存活时间。另外,精子的顶体含有多种与受精有关的酶,在顶体穿过透明带和放射冠中发挥重要作用,只有顶体完整、有活力的精子才具备受精能力,所以有些形态正常的精子虽然有活力但不具备受精能力,那是由于其顶体结构异常所致,同样一些顶体形态正常,但精子尾部丢失等精子整体形态不正常的精子则没有活力,也不具备受精能力,因此在对精液受精能力进行判定时,在活力检

查的基础上结合顶体染色是很必要的^[8]。本研究选择在常温下保存 120 h 在活力检测后进行顶体染色检查,结果显示所有稀释粉组精子活力都在 64.9% 以上,顶体完整率都在 70% 以上,说明 6 种稀释液虽然保存精子活力的时间有差异,但保存 5 d 都不会影响正常的受精。

3.3 研制高效国产稀释粉很有必要

目前养殖场使用较多的为进口稀释粉,虽然进口稀释粉价格较贵,但国产稀释粉保存时间短、受精效果差,所以人们宁愿选择较贵的稀释粉来保证较好的保存与受精质量,从而能在生产中得到较好的回报。因此,对好的进口稀释粉的成分进行研究,在国内已有稀释剂中添加各种利于精子活力保存的成分,以期研制出价格低、保存时间长、受精能力强的稀释粉,打破国人迷信进口稀释粉的状况,推动我国猪人工授精行业的快速发展。

参考文献:

- [1] Johnson L A, Weitze K F, Fiser P, et al. Storage of boar semen[J]. Anim Reprod Sci, 2000, 62: 143 - 172.
- [2] Gerrits R J, Lunney J K, Johnson L A, et al. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations[J]. Theriogenology, 2005, 63: 283 - 99.
- [3] Feitsma H. Artificial insemination in pigs, research and developments in the Netherlands, a review[J]. Acta Scientiae Veterinariae, 2009, 37(Suppl 1): 61 - 71.
- [4] 刘国世, 王 剑, 薛振华, 等. 国外猪人工授精技术研究进展[J]. 猪业科学, 2007(7): 16 - 19.
- [5] 张宝珣, 戈 新, 五建华, 等. 猪常温精液保存的研究进展[J]. 猪业科学, 2009(8): 68 - 71.
- [6] 苏泽智, 李亚新, 魏海燕, 等. 稀释粉对猪精液常温保存效果的研究[J]. 家畜生态学报, 2015, 36(1): 59 - 62.
- [7] 尤如华, 高春国, 杨祖云, 等. 不同稀释粉对公猪精液稀释保存效果的试验研究[J]. 养猪, 2014(5): 47 - 48.
- [8] 王 锋. 动物繁殖学实验教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006: 44 - 47.