

曹 访,郭良勇,殷雨洋,等.湖羊精液稀释液及冷冻保护剂的筛选[J].江苏农业科学,2019,47(23):201-203.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.048

湖羊精液稀释液及冷冻保护剂的筛选

曹 访¹,郭良勇²,殷雨洋²,蒋永清³,李玉峰²,王卫星²

(1.湖州师范学院生命科学学院,浙江湖州 313000; 2.湖州市农业科学研究院湖羊研究所,浙江湖州 313000;
3.浙江省农业科学院畜牧兽医研究所,浙江杭州 310021)

摘要:试验旨在研究不同稀释液对湖羊精液的 4 ℃ 保存效果,同时探讨不同种类及浓度的冷冻保护剂对湖羊精液冷冻保存效果的影响。选择 6 种常见的绵羊精液稀释液配方,检测湖羊精液稀释后精子活力变化,分析精子存活时间及生存指数;另选取 6 种常见的精子冷冻保护剂,分 3 组浓度(5%、10%、15%)添加,检测细管冻精解冻后的精子活率。结果表明,6 种稀释液对湖羊精液的 4 ℃ 保存效果存在显著差异,其中 F 稀释液保存效果最佳。冷冻保护剂的种类和添加比例对湖羊精液的冷冻保存效果都存在影响,稀释液中添加 5% 的丙三醇对湖羊精液的冷冻保存效果最佳。

关键词:湖羊;精液;精子活力;稀释液;冷冻保护剂;筛选

中图分类号: S826.3⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)23-0201-03

湖羊是我国南方地区特有的国家级畜禽资源保护绵羊品种,主要分布于江浙沪一带的太湖流域,具有独特的波浪形羔皮、多羔、生长速度快等诸多优良性能。目前,在绵羊品种改良、选育过程中,人工授精技术因为种公羊利用率高、母羊便于集中管理、可加快选育进程等优点,在繁殖领域逐渐受到推崇。相关配套技术诸如优秀稀释液的开发及冷冻保护剂的研究,也因为可进一步发挥种公羊的利用潜能、实现遗传资源保护等原因而受到研究人员的关注。韩天龙等研究表明,4 ℃ 条件下好的稀释液可使羊精子在较长的时间内保持 60% 以上的活率^[1]。满都拉发现,在合理稀释倍数下采用优秀稀释液稀释输精不影响羊的受精率^[2]。朱志伟等则证实了冷冻精液用于保存动物资源的可行性,研究证明添加抗冷冻保护剂丙三醇可使冻精解冻后保持较好的活力^[3]。

近年来,绵羊精液的稀释及冷冻保存技术得到了长足的发展,如精液稀释液的开发以及冷冻保存技术的研究^[4],但单独针对太湖地区湖羊的研究与应用较少,并且绵羊精液的低温稀释保存效果及抗冷冻保存技术尚存在进一步改善的空间。本研究拟采用不同稀释液配方对湖羊精液开展稀释,对精液稀释保存效果进行比较,以筛选出适合湖羊精液的最佳稀释液。同时,在此稀释液基础上,研究不同冷冻保护剂及添加浓度对湖羊精液冷冻保存效果的影响,以筛选出适合湖羊精液冷冻保存的最佳冷冻保护剂,从而进一步挖掘优秀湖羊种公羊的利用潜能,并为当地的湖羊供种及保种工作提供参考。

收稿日期:2018-09-05

基金项目:浙江省农业重大技术协同推广计划(编号:2019XTTGSG02);浙江省湖州市农业新品种选育及产业化开发专项主动设计项目(编号:2015ZD2014);浙江省农业科学院地方科技合作项目(编号:181022)。

作者简介:曹 访(1980—),男,江苏丰县人,硕士,高级实验师,研究方向为动物遗传育种。E-mail:hzyzucf@hotmail.com。

通信作者:郭良勇,硕士,畜牧师,研究方向为动物遗传育种。E-mail:1728893756@qq.com。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本试验选用长兴昌达羊业有限公司所提供的 3 只优秀种公羊,年龄为 2~3 岁,试验选用种公羊膘情为中上等,体质健壮,按常规进行饲养管理。

1.2 配方

1.2.1 稀释液配方 试验选择了 6 种稀释液配方,标记为配方 A、B、C、D、E 和 F,详见表 1。按试验需要和稀释液配方中的比例称取表 1 中各物质,溶于蒸馏水中,用滤纸过滤,于 110 ℃ 高压 10 min,取出静置至室温备用。取新鲜洁净鸡蛋,小心敲除外壳,去掉蛋清,把包有完整卵黄膜的卵黄放在洁净平皿内,用无菌的去针头注射器刺破卵黄膜,缓慢抽取卵黄,加入到上述溶液中。将配制好的稀释液置于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2 冷冻保护液配方 选择 4 ℃ 条件下保存效果最好的稀释液作为基础液,选择 6 种常见的冷冻保护剂,按照试验要求添加到基础液中,溶解后制成冷冻保护液,置于 4 ℃ 冰箱中备用。冷冻保护剂添加比例见表 2。

1.3 精液处理

1.3.1 精液稀释保存 采集湖羊精液,经活力检测及品质鉴定后,等量分装于灭菌的试验管内,在 35 ℃ 等温条件下按照稀释程序要求,加入预温的 6 种稀释液,分 2 次等比例稀释至 4 倍,细管灌装后,用纱布包裹细管并装入离心管,将离心管置于盛 35 ℃ 温水的大烧杯内,然后将烧杯迅速置于 4 ℃ 冰箱,缓缓降温至 4 ℃ 保存。每隔 24 h 镜检精子活率,镜检时操作温度控制在 35 ℃ 左右。

1.3.2 精液冷冻保存 采集湖羊精液,在 35 ℃ 恒温条件下,按照试验要求采用添加冷冻保护剂的稀释液将精液分 2 次等比例稀释至 4 倍体积,然后将稀释好的精液放入 4 ℃ 冰箱缓缓降温,1.5 h 后在 4 ℃ 条件下分装至冻存管并平衡 2 h,然后按照冻存程序将精液冻存。按照试验安排,依照解冻程序将细管冻精解冻,检测精子活率。

表 1 羊精液稀释液配方(100 mL)

稀释液	葡萄糖(g)	果糖(g)	氯化钠(g)	柠檬酸钠(g)	三羟甲基氨基甲烷(g)	柠檬酸(g)	卵黄(mL)
A	3.0	—	—	3.0	—	—	20
B	—	—	0.9	—	—	—	20
C	3.0	—	—	1.4	—	—	20
D	0.8	—	—	2.8	—	—	20
E	—	0.5	—	2.4	—	—	20
F	—	0.5	—	—	3.63	1.99	20

表 2 冷冻保护剂

水平	冷冻保护剂添加比例(%)					
	乙二醇甲醚(EGME)	乙二醇(EG)	丙三醇(GI)	1,2-丙二醇(MPD)	甲醇(MeOH)	二甲基亚砜(DMSO)
1	5	5	5	5	5	5
2	10	10	10	10	10	10
3	15	15	15	15	15	15

1.4 流式细胞仪检测精子活率

解冻后的精子,按照说明用 Live/Dead sperm viability Kit (L-7011)(Sigma)试剂盒进行染色,然后用流式细胞仪进行检测(BD FACSCanto II)。

1.5 效果判定

精子活率为直线运动的精子数占视野中总精子数的百分比;精子存活时间为 99% 的精子死亡的存活时间;精子有效存活时间是指精子活率不低于 0.5 的保存时间;精子生存指数是指相邻 2 次精子活率的平均数与间隔时间乘积的总和。

2 结果与分析

2.1 稀释液对湖羊精液 4 ℃ 稀释保存效果的影响

2.1.1 6 种稀释液对精子活率的影响 由图 1 可知,在 4 ℃ 保存条件下,6 种稀释液中的湖羊精子活率随时间增加而逐渐降低,保存效果存在明显差异。A、B、C、D 4 种稀释液保存效果较差,A 稀释液中精子活率在 1 d 后显著下降;B、C、D 稀释液中精子活率在 3 d 后显著下降;E、F 稀释液中的精子保存效果比较理想,2 种稀释液中精子活率在 6 d 内都能保持在 0.6 以上;6 d 后, E 稀释液中的精子活率降低速度要显著快于

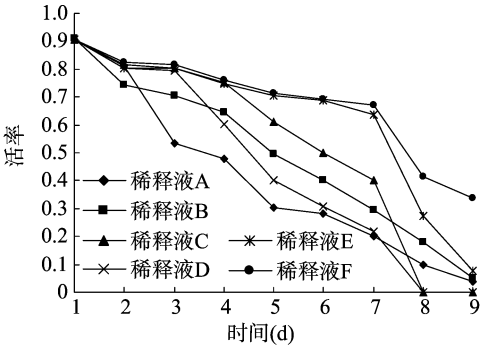


图1 不同稀释液中精子活率变化(4 ℃)

F,而 F 整体保存效果要好于 E。2.1.2 不同稀释液中羊精子的存活时间及存活指数 由表 3 可知,在 4 ℃ 保存条件下,6 种稀释液中的精子总存活时间、有效存活时间和生存指数存在差异,F 稀释液中精子的总存活时间和有效存活时间显著或极显著高于其他 5 种稀释液 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且生存指数也极显著高于其稀释液 ($P<0.01$),F 稀释液对精子 4 ℃ 保存效果最好。

表 3 不同稀释液中精子的存活时间及生存指数(4 ℃)

稀释液	A	B	C	D	E	F
总存活时间(h)	199.00 ± 1.15cAB	201.67 ± 1.20cdAB	153.67 ± 1.86bA	145.67 ± 1.20aA	207.33 ± 2.33dAB	243.67 ± 4.41eB
有效存活时间(h)	62.12 ± 4.41aA	95.35 ± 1.04cC	120.34 ± 1.69dD	84.31 ± 0.17bB	153.02 ± 0.62eE	159.90 ± 0.98fE
生存指数	2.66 ± 0.07aA	3.85 ± 0.06bB	4.96 ± 0.08cC	2.89 ± 0.07aA	5.90 ± 0.14dD	7.04 ± 0.08eE

注:同列数据不同小写、大写字母分别表示差异显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)。下表同。

2.2 冷冻保护剂对湖羊精液冷冻保存效果的影响

2.2.1 不同种类及添加比例冷冻保护剂对湖羊冷冻精液精子活率的影响 由表 4 可知,将细管冻精解冻后,通过镜检初步检测解冻后 0 h 精子活率,结果表明不同冷冻保护剂对精子的冷冻保存效果存在差异,以乙二醇及丙三醇的冷冻保存效果最佳,湖羊冻精解冻活率保持在 0.5 左右,且不同浓度的冷冻保护剂对精子的冷冻保存效果也不同,甲醇、二甲基亚砜、乙二醇乙醚的添加浓度以 10% 为最佳,乙二醇、丙三醇、1,2-丙二醇以 5% 为最佳。

2.2.2 流式细胞仪活率检测 通过常规活率检测,发现 5% 乙二醇和 5% 丙三醇对精子的冷冻保存效果较好。由图 2 可知,通过流式细胞仪对 5% 乙二醇和 5% 丙三醇的冷冻保存效果做进一步验证,发现精子解冻活率要略高于 5% 乙二醇,这与前期的镜检结果基本一致。所以丙三醇为本试验的最佳冷冻保护剂,5% 为最佳添加浓度。

3 讨论

本研究对比了 6 种稀释液对湖羊精子的 4 ℃ 保存效果,

表 4 不同种类及添加比例冷冻保护剂对冷冻精液精子活率的影响

冷冻保护剂	不同添加比例冷冻保护剂冻精解冻活率		
	5%	10%	15%
乙二醇甲醚	0.103 ± 0.007dC	0.427 ± 0.004aA	0.000
乙二醇	0.490 ± 0.008bA	0.220 ± 0.008dD	0.045 ± 0.005bB
丙三醇	0.507 ± 0.013aA	0.272 ± 0.009bB	0.078 ± 0.007aA
1,2-丙二醇	0.403 ± 0.010cB	0.233 ± 0.004dD	0.053 ± 0.008aA
甲醇	0.036 7 ± 0.004eD	0.407 0 ± 0.007aA	0.000 0bB
二甲基亚砷	0.122 ± 0.004dC	0.333 ± 0.006cC	0.000

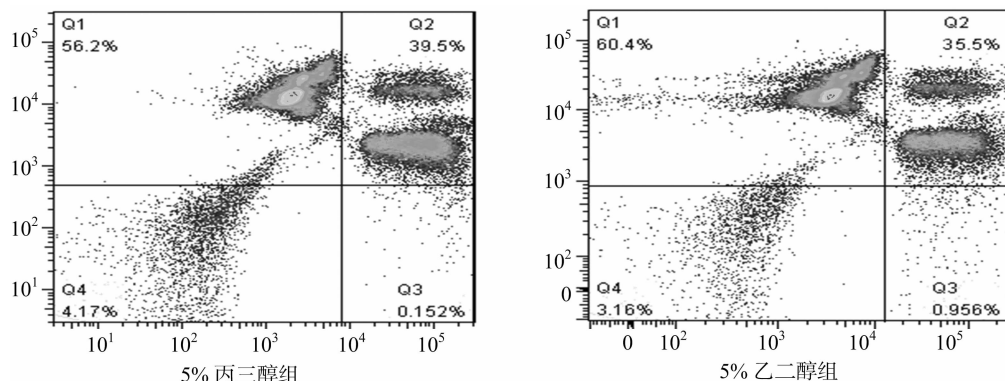


图 2 流式细胞仪检测湖羊精子活率

结果发现,F 稀释液的保存效果最佳,在 6 d 仍可保持 60% 以上的精子存活率,说明 F 稀释液为湖羊精子提供了较好的营养及缓冲。迟庆德等曾利用优秀稀释液对绵羊精液进行稀释输精,取得非常理想的情期受胎率^[5-7],本项目组在后续的研究中也将会开展输精试验,并进一步优化稀释液配方,为湖羊的鲜精保存及异地输精提供保障。

本研究对比了 6 种渗透性抗冷冻保护剂对湖羊精子的冷冻保护效果,结果发现乙二醇和丙三醇的保护效果较好,且丙三醇更佳,这与刘玉峰等的研究结果^[8]基本一致。相关研究发现,丙三醇低温冷冻保护性能,可能与丙三醇能浓缩或结合细胞内水,并具有阻碍冰晶核形成和增长的性能及抑菌作用有关;而乙二醇的低温冷冻保护性能则可能是由于乙二醇分子量小,渗入或渗出细胞的速率与水分子差异不大,对精细胞的渗透压影响较小^[9]。同时,本研究还对 6 种冷冻保护剂的 3 种添加浓度进行了比较,结果发现,不同冷冻保护剂的最佳添加浓度不一致,如乙二醇甲醚、甲醇的添加浓度以 10% 为最佳,而丙三醇、乙二醇的添加比例以 5% 最佳,这可能是由于不同冷冻保护剂对精子的活力和受精力普遍存在毒害作用,如甘油能引起精子顶体的异常,而乙二醇则可以引起尾部畸形^[10],冷冻保护剂添加比例过高或过低对精子的毒害作用更显著。

另外,本研究采用常规镜检和流式细胞仪检测 2 种方法,对 5% 丙三醇和 5% 乙二醇的冷冻保存效果进行检测,结果发现,2 种方法检测出的冻精解冻活率存在差异。这可能与常规镜检存在误差有关,部分尾部畸形或顶体损伤的精子通过常规检测无法判断,计数时被统计为正常精子,而流式细胞仪是通过染色后精子的荧光情况进行筛选,相比较而言数据结果更为可靠。

4 结论

本研究在比较了 6 种常用精液稀释液的基础上,筛选出更适合湖羊精液稀释的 F 稀释液(果糖、Tris 和柠檬酸组合);并以 F 稀释液为基础,比较了 6 种冷冻保护剂的 3 种浓度对湖羊精子冻存的影响,结果发现,以 5% 的丙三醇作为冷冻保护剂的效果最佳,冻精活率达到了 39.5%,可用于生产实践,为后续冻精在湖羊生产中的推广应用打下了基础。

参考文献:

- [1] 韩天龙,李清泉,毛 冉,等. 羊精液稀释保存液的筛选[J]. 畜牧与兽医,2015,47(9):45-47.
- [2] 满都拉. 精液稀释倍数对精子活力及母羊受胎率的影响[J]. 当代畜牧,2014(8):65-66.
- [3] 朱志伟,俞颂东,金水仙,等. 冷冻精液和冷冻胚胎保存湖羊种质资源的应用研究[J]. 浙江畜牧兽医,2001(3):4-5.
- [4] 郭 鹏,苏 锐,张春燕,等. 浅谈家畜精液的稀释与稀释液的配制[J]. 科技情报开发与经济,2010,20(8):154-156,167.
- [5] 迟庆德. 肉羊精液多倍稀释配种的效果观察[J]. 黑龙江动物繁殖,2009,17(3):24-25.
- [6] 朱冬冬,许光明,甘叶青,等. 湖羊精液多倍稀释受胎效果观察[J]. 上海畜牧兽医通讯,2011(6):21.
- [7] 刘雅青,涂友仁,凌辉宗,等. 绵羊精液高倍稀释受胎效果的研究[J]. 畜牧与饲料科学,2010,31(6):27-29.
- [8] 刘玉峰,李 武,兰 翠. 乙二醇对绵羊冻精效果的研究[J]. 中国草食动物,2002,22(6):9-11.
- [9] 赵晓娥,王光亚,马保华. 布尔山羊细管冷冻精液研制初报[J]. 西北农业大学学报,1999,27(1):19-23.
- [10] 李青旺,江中良,王立强,等. 猪精液冷冻保存的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(4):63-66.