

平衡时间对鸡精液冷冻效果影响的研究

安立龙 许英梅 蔡小燕 曾东莹 曾睿 杜炳旺
(湛江海洋大学动物科学系,广东省湛江市湖光岩东 524088)

摘要:以湛江海洋大学家禽育种中心的三黄鸡为试验材料,利用液氮制做颗粒冷冻精液,研究平衡时间对鸡冷冻精液解冻后的精子活力、畸形率和存活时间的影响。结果表明:平衡时间为10~30分钟时,鸡精液冷冻效果最佳,精子活力最高,为 $0.38\pm 0.04\sim 0.42\pm 0.04$,畸形率最低,为 $7.5\pm 0.2\sim 7.8\pm 0.4\%$,精子体外存活时间最长,为 $88\pm 2\sim 91\pm 3$ 分钟,显著优于其它组($P<0.01$)。

关键词:鸡精液;平衡时间;精子活力;畸形率;存活时间

Research on the Influence of Glycerol Equilibration Time on the Quality of Frozen Cock Sperm

An lilong Xu yingMei Cai Xiaoyan Zeng Dongying Zeng Rui
(Department of Animal Science, Agriculture College,

Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, Guangdong province, P. R china 524088)

Abstract: The object of this research was to select the best equilibration time of Glycerol diluent with freezing cock sperm. We froze the cock sperm of three yellow strain with Liquid nitrogen and compared with the spermatozoa motility, abnormal rate and survival time for different equilibration time of Glycerol diluent. The results are as follow: The best equilibration time of Glycerol diluent is 10 to 30 min. For this equilibration time, the experiments got the highest spermatozoa motility (0.38 ± 0.04 to 0.42 ± 0.04), the lowest abnormal rate (7.5 ± 0.2 to $7.8\pm 0.4\%$) and the longest survival time (88 ± 2 to 91 ± 3 min). These dates showed the significant difference among the overall dates ($P<0.01$).

Key Words: Equilibration time, Fowl sperm, Spermatozoa motility, Abnormal rate, Survival time

随着养鸡业的发展,种用母鸡实行笼养,鸡的人工授精技术受到重视。鸡的精液冷冻技术是人工授精技术大规模应用的基础。利用鸡的精液冷冻技术以及人工授精技术,可以充分地提高优秀公鸡的利用率,降低公鸡饲养数量,提高公鸡育种值,大大加快后裔测定的速度和测定的准确性。因此,利用精液冷冻技术,可以加快家禽育种进度,提高工作的效率。

鸡冷冻精液技术研究始于1941年,当时用高浓度果糖溶液作为稀释液,在冷冻过程中,由于精子的内部水分形成冰晶,造成精子死亡。1949年,Plöge发现甘油具有抗冷冻作用,彻底改变了精液保存原有的程序,提高了精子冷冻保存的成活率。Lake报道了一种用甘油保护液低温保存精液的技术,将精液保存于液氮中,获得了较高受精率。我国开展家禽冷冻精液的研究较晚,1979年四川农学院牧医系繁殖科研组用鸡的冷冻精液腹膜内受精,获得了发育正常的雏鸡;1981年四川农学院王林全等使用子宫内授精和深阴道授精,使鸡的冷冻精液的平均受精率达到28%左右。在精液冷冻过程中必须控制冰晶的形成以及抗冻保护剂穿透膜运动的速率,并保持细胞内ATP含量的稳定。因此,在精液冷冻和解冻过程中,向稀释液中添加冷冻保护剂是十分必要的。在精液冷冻过程中,冷冻保护剂甘油的添加剂量与冷冻精液平衡时间对于冷冻鸡精液的品质具

有重要的影响。甘油浓度太小或平衡时间过短都可能减弱甘油对精子的抗冷冻保护作用,甘油浓度过大或平衡时间过长,不仅加剧甘油对精子的毒害作用,而且还会增加精子冷冻之前生命物质的消耗,影响精子冷冻解冻后的存活率和受精能力。本试验对经不同平衡时间处理的精液进行冷冻,观察解冻后精子活力、畸形率和存活时间,筛选鸡冷冻精液最适宜的甘油平衡时间。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 鸡的选择 从湛江海洋大学家禽育种中心选择 300 日龄左右、健康无病、精液品质好的三黄鸡种公鸡供采精用。

1.1.2 药品、试剂以及仪器 丙三醇(分析纯)(中国医药集团上海化学试剂公司生产,批号:w990540);蔗糖(广州化学试剂厂生产,批号:840805-1);无水乙醇(广州市新港化工有限公司出品);龙胆紫(上海标本模型厂出品,批号:900515);青霉素钠(80 万单位)(哈药集团制药总厂出品,批号:AG1110113);XMT 系列智能数显控温仪(余姚市长江温度仪表厂出品)。

1.2 实验方法

1.2.1 精液采集 采用背部按摩法采集公鸡精液。采集过程中要求精液无粪便、血液、饲料等污染。采集后用棉花和纱布包好,置于保温杯中,迅速带回实验室,待处理。

1.2.2 稀释精液 在 8 ml 5.7% 的蔗糖溶液中加入 2 ml 卵黄液,配成 10 ml 的 I 液,摇匀,然后取出 8.6 ml I 液,加上 1.4 ml 的无水甘油,配成含有甘油 14% 的 II 液,然后将 II 液放入 5℃ 的冰箱内预冷,直到预冷完毕后便加入精液中。

1.2.3 精液冷冻前的准备 取 1ml 的精液,用相同温度的不含冷冻保护剂的 I 液进行 1:2 的第一步稀释后,然后用纱布包上 10 层,放在 5℃ 左右的冰箱中预冷 1 小时左右,再用相同温度的含甘油的 II 液进行 1:1 的稀释,接着在 5℃ 的冰箱中进行平衡。

1.2.4 精液冷冻 用泡沫塑料盒盛装液氮,在距离液氮面 1~2cm 处架上铜丝网,待铜丝网充分冷却后,开始滴冻。滴冻后加盖,熏蒸 2 分钟,然后将颗粒浸入液氮中。

1.2.5 解冻 取 0.5ml 5.7% 的葡萄糖溶液,放入小试管内,浸入 40℃ 热水中经 2~3 分钟后,投入精液颗粒,待溶化 1/2~1/3 时,取出试管,当精液全部溶化后,进行精液评定。

1.2.6 精子活力检查 以全部精子呈直线运动,定为 1.0,80% 的精子直线运动其活力定为 0.8,50% 的精子成直线运动定为 0.5,依此类推。

1.2.7 畸形率检查 采用龙胆紫酒精溶液染色法,检测精子畸形率。

1.2.8 数据处理 采用方差分析法分析处理数据,并进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同平衡时间对冷冻精液解冻后精子活力的影响

用含甘油稀释后的精液经 0、10、15、30、90、120、150、180 和 210 分钟后,进行滴冻,观察解冻后的精子活力,重复 3 次。结果见表 1。

经方差分析表明,平衡时间为 10、15 和 30 分钟的三组冷冻精液解冻后精子活力显著高于其它组($P < 0.01$),其中 15 分钟的一组的精子活力最高,但与 10 分钟和 30 分钟这两组之间差异不显著($P > 0.05$)。说明当精液稀释降温后,平衡 10~30 分钟的冷冻效果最佳。

2.2 不同平衡时间对冷冻精液解冻后精子畸形率的影响

将各组解冻后的精液分别抹片,使用龙胆紫酒精溶液染色法进行染色,然后进行畸形率的检查,重复 3

次。结果见表 2。

经方差分析表明,平衡时间为 10、15、30 分钟的各组冷冻精液解冻后精子的畸形率分别显著低于其它组 ($P < 0.01$),但这三组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。说明当精液稀释降温后,平衡 10—30 分钟的畸形率最低。

表 1 不同平衡时间后精液冷冻解冻后的精子活力

平衡时间 (分钟)	重 复			均 值
	I	II	III	
0	0.22±0.03	0.23±0.03	0.20±0.05	0.22±0.04 ^{cdBCD}
10	0.38±0.03	0.38±0.06	0.38±0.03	0.38±0.04 ^{aA}
15	0.41±0.03	0.43±0.03	0.40±0.05	0.42±0.04 ^{aA}
30	0.37±0.03	0.38±0.06	0.38±0.03	0.38±0.04 ^{aA}
60	0.30±0.05	0.23±0.03	0.27±0.08	0.27±0.06 ^{bb}
90	0.32±0.03	0.2±0.03	0.2±0.03	0.25±0.06 ^{cbBC}
120	0.23±0.06	0.28±0.03	0.30±0.05	0.27±0.05 ^{bb}
150	0.27±0.03	0.20±0.05	0.25±0.03	0.25±0.05 ^{cbBC}
180	0.18±0.03	0.22±0.03	0.20±0.05	0.20±0.04 ^{dCD}
210	0.18±0.03	0.20±0.05	0.18±0.03	0.19±0.03 ^{dD}

注:数值肩注字母相同的各组间差异不显著 ($P > 0.05$),小写字母不同的各组间差异显著 ($P < 0.05$),大写字母不同的各组间差异极显著 ($P < 0.01$),下表同。

表 2 经不同平衡时间处理精液冷冻解冻后的畸形率(%)

平衡时间 (分钟)	重 复			均 值
	I	II	III	
0	10.0±0.3	10.2±0.2	9.9±0.3	10.0±0.3 ^{cC}
10	7.3±0.3	7.5±0.3	7.±0.1	7.5±0.2 ^{dD}
15	7.3±0.4	7.9±0.1	7.6±0.2	7.6±0.3 ^{dD}
30	7.7±0.4	8.0±0.4	7.7±0.3	7.8±0.4 ^{dD}
60	10.3±0.3	10.1±0.3	9.8±0.2	10.1±0.3 ^{cC}
90	11.0±0.1	10.7±0.3	10.1±0.2	10.6±0.5 ^{bb}
120	11.1±0.3	11.0±0.3	10.5±0.4	10.9±0.4 ^{bb}
150	12.0±0.2	11.8±0.2	11.6±0.3	11.8±0.3 ^{aA}
180	11.8±0.2	12.3±0.3	12.0±0.2	12.0±0.3 ^{aA}
210	11.7±0.3	12.1±0.1	12.5±0.3	12.1±0.4 ^{aA}

2.3. 不同平衡时间对冷冻解冻后的精子存活时间的影响

将各组解冻后的精液先后置于室温下(20℃左右),每隔 10 分钟 观察 1 次精子活力,直到精子全部死亡为止,从而测定各组冷冻解冻后精子的存活时间,重复 3 次。观察结果见表 3

经方差分析表明,平衡时间为 10、15、30 分钟的各组冷冻精液解冻后的存活时间分别显著长于其它组 ($P < 0.01$),而在 10、15、30 分钟各组间,15 分钟和 10 分钟以及 10 分钟和 30 分钟差异不显著 ($P > 0.05$)。说明当精液稀释降温后,平衡 10~30 分钟后精子的存活时间最长。

表 3 经不同平衡时间处理的精液冷冻解冻后的存活时间(分钟)

平衡时间 (分钟)	重 复			均 值
	I	II	III	
0	76±2	81±3	78±3	78±3 ^{cBC}
10	88±2	90±2	92±2	90±2 ^{abA}
15	88±2	93±2	91±1	91±3 ^{aA}
30	87±2	88±2	88±2	88±2 ^{bA}
60	78±3	81±2	80±3	79±3 ^{cB}
90	77±2	82±5	77±2	79±4 ^{cBC}
120	72±3	77±2	77±3	75±3 ^{dCD}
150	74±1	76±2	72±2	74±2 ^{deD}
180	73±2	77±3	71±1	74±3 ^{deD}
210	70±3	74±2	72±2	72±2 ^{eD}

3 讨 论

3.1 甘油的冷冻保护作用机理

实验结果表明,在精液稀释液中添加甘油,可以提高精液冷冻效果。其主要原因是:①甘油冲淡了溶液中溶质的浓度,在冷冻前,加入含甘油的冷冻稀释液,甘油进入精子细胞内,代替细胞一部分游离水,使游离水连同无机盐被排出,降低了细胞内容质的浓度,从而在冷冻时可阻止在-15℃以下引起的精子细胞蛋白质变性。②由于甘油作用,减少了形成冰晶时渗入细胞内盐类的数量,或是使盐类渗入细胞现象发生在更低的温度范围内。③甘油可以保护精子细胞内的谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)免受冻害而逸出,解冻后精子保留的GOT量高时,精子的活率也就高。④甘油进入细胞内,使二者的蒸气压相近,降低了稀释后精液的冰点,使精液处于适冷状态,因而在-15℃以下开始结冰,减缓细胞的皱缩程度和脱水速度。⑤由于甘油很容易通过细胞膜,从而扩散和渗入到精子细胞内,被分解成果糖,为精子代谢提供能量。

3.2 平衡时间与精液冷冻效果的关系

实验结果表明:平衡时间少于10分钟时,解冻后的精液品质较差。这是由于精液的平衡时间过短,甘油没有足够的时间进入细胞内,从而起不到防冻剂的作用。因此,精液冷冻过程中平衡时间不宜过短。实验结果表明:当平衡时间大于30分钟时,解冻后精液的品质也比较差,主要原因有以下两点:①从理化特性来看,甘油属于脂溶性溶剂,可透过细胞膜进入到细胞内,取代细胞内一部分游离水,使精子体内Mg²⁺和K⁺的含量减少,从而影响到细胞内外电解质的平衡。冷冻平衡时间越长,甘油迫使精子内Mg²⁺和K⁺流失量越大,对精子的危害越大。②甘油对精子细胞膜有干扰作用,当冷冻平衡时间过长,甘油对细胞膜的干扰作用就越大—从而使精子体内的酶逸出到精液中,导致精子代谢紊乱,致使精子死亡,精液品质下降。本实验结果表明,鸡精液平衡时间显著小于牛等哺乳类动物精液平衡时间。例如:牛精液最佳的甘油平衡时间为4~5小时。其原因在于,牛等哺乳类动物的精子比鸡的精子要大(牛的精子体积为30~80μm³,鸡的精子体积平均为9.2μm³),从而致使甘油渗透入牛的精子比鸡的精子时间要长。因此牛精液的甘油平衡时间要比较长。

3.3 滴冻温度与精子品质的关系

在进行滴冻时,铜丝网距液氮面的距离应严格控制在1~2cm。其原因在于冷冻时的降温速度上。如果铜丝网距液氮面的距离合适,精子内部的水有足够的时间向外渗出,使细胞内外的化学势达到平衡,并且细胞内形成冰晶小,数量亦少,冰晶对精子造成的损伤小,有利于精子的生存。如果距离过低,细胞的水没有充分的时间渗出。未渗出的水形成较多较大的冰晶,冰晶对细胞造成较大的伤害,不利于精细胞的生存。如果距离过高,虽然化学势达到平衡,但会形成较大的冰结晶,不利于精子生存。因此,铜丝网与液氮面的高低是冷冻精液质量产生较大差异的因素。

参考文献(略)