

分光光度法快速测算公猪精子密度的方法研究¹

张亮¹, 郭宗义¹, 潘红梅¹, 孙甚林², 崔先利²

(1.重庆市畜牧科学院养猪研究所 重庆 402460; 2.重庆南方金山谷农牧有限公司, 400039)

摘要: 为了建立分光光度法测定猪精子密度的标准方法, 比较了不同波长(450 nm、550 nm、650nm)下吸光度(A)、透射比(T)与精子密度(C)的关系。吸光度的检测上限随波长的增加而上升, 分别为 2.016 亿/mL (450 nm)、2.24 亿/mL (550 nm) 和 2.35 亿/mL (650 nm), 但重复测定的稳定性下降。透射比的观测值随着稀释倍数的增加重复测定的稳定性降低, 当稀释倍数大于 10 (450 nm)、6 (550 nm)、4 (650 nm) 倍时重复测定的观察值之间开始出现差异。实验结果表明, 450 nm 为最适检测波长, 猪精子密度与吸光度、透射比分别呈三次函数和幂函数回归关系, 其回归方程分别为 $C_{450}=0.48A^3-0.76A^2+0.67A-0.066$ ($R=0.951$) 和 $C_{450}=1.657T^{-1.068}$ ($R=0.94$)。

关键词: 猪, 精子密度, 分光光度法

Rapid Estimation on the sperm concentration in boar semen by spectrophotometric method

Zhang liang¹, Guo zong yi¹, Pan hong mei¹, Sun shen lin², Cui xian li²

(1.Swine research institute, Chong qing Academy of animal science, chong qing, 402460;

2. chong qing southern golden valley company, chong qing, 400039)

Abstract: To provide the necessary standardization for procedures of sperm concentration estimation, a spectrophotometric method has been established to determine the sperm concentration of boar seme. Wavelengths of 450, 550, and 650 nm have been compared, and 450 nm was found to be the most sensitive and reliable. A logarithmic relationship between sperm concentration(C)and optical absorbance (A)or spectrophotometric transmittance(T)was observed for sperm concentration, The regression equation for the standard curve at 450 nm was $C_{450}=0.48A^3-0.76A^2+0.67A-0.066$ ($R=0.951$)and $T_{450}=1.657C^{-1.068}$ ($R=0.844$).

Keyword: swine, sperm concentration, spectrophotometric method

近几年随着猪场养殖规模的逐步扩大, 猪人工授精技术已广泛应用于实际生产。在人工授精技术的许多环节都日益完善的今天, 如何更加准确快速的测定精子密度, 仍是一个值得探讨的问题。目前常用的精子密度测定方法有血球计数法^[1]、流式细胞仪法^[2]和分光光度法^[3]等, 并已开发出专用的精子密度测定仪^[4, 5], 其中被广泛采用的血球计数法在处理大批量样品时显得繁琐和低效, 而分光光度法具有操作简单、仪器价格低等优点, 利用建立的精子密度与吸光度标准曲线能够快速、精确测定精子密度, 目前已在生产和科研上得到一定应用。

笔者试图利用不同浓度精液的透光性存在差异的特点, 通过探明精子密度与分光光度计读数之间是否存在显著的相关关系, 建立分光光度计读数与精子密度的回归曲线方程, 为快速确定猪精子密度提供一种简便方法。本文研究了不同波长时测定的透射比、吸光度与精子密度之间的关系, 旨在建立分光光度法测定猪精子密度的标准化方法, 为猪人工授精技术的发展与推广提供参考。

1 材料方法

1.1 材料

实验用 7 头性成熟美系杜洛克种公猪, 由重庆市畜牧科学院养猪研究所种猪场提供。实验公猪每周采精 2~3 次, 实验人员用徒手采精法收集公猪精液, 经过四层滤纸过滤后, 确保精液不含尿液等杂质, 收集得到的精液保存在干燥的聚乙烯塑料袋中, 置于保温杯中, 30 min 内送回实验室。实验期间共收集 20 份精液用于光密度检测。

收稿日期: 2011-3-22

资助项目: 重庆市畜牧科学院基本科研业务费重庆市科委专项资金项目 10608

作者简介: 张亮 (1982-), 男, 助理研究员, 主要从事动物繁殖技术方面的研究。Tel: 02346790212, Email: zhang_liang1982@163.com

试验仪器试剂有显微镜、721 分光光度计、采精杯、电子天平、过滤纸、载玻片、盖玻片、血细胞计数板、一次性食品保鲜袋、温度计、生理盐水。

1.2 方法

以 0.9%NaCl 生理盐水为稀释液，将鲜精分别稀释 1.25、2、2.5、4、5、6、8、10、12.5、20、25、50、100、125、200 倍，利用 721 型可见分光光度计分别在 450 nm、550 nm 和 650 nm 波长下测定吸光度(A)和透射比(T)，以 0.9%NaCl 生理盐水溶液做空白，用标准血球计数法测定稀释前精子密度 (C)。每份精液样品均以重复测定三次的平均值(变异系数在 10%以下)为该样品精液的精子密度的测定值。

1.3 数据分析

试验数据采用 EXCEL 及统计软件 SPSS 进行分析处理，并进行回归方程拟合和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 精子密度与吸光度、透射比的关系

研究表明，吸光度检测精子密度的上限随检测波长的增加呈上升的趋势，但重复测定的稳定性下降。当精子密度大于 2.016 亿/mL (450 nm)、2.24 亿/mL (550 nm) 和 2.35 亿/mL (650 nm) 时，检测仪器将无法读取读数，所以不难看出吸光度只能够反映密度在 2.35 亿/ml 以内的精子在透光特性上的差异 (图 2)。而透射比在描述精子透光特性时并未出现检测上限的问题，能对所有不同的精子密度反映出对应的观测值。但随着精液稀释倍数的增加，重复测定的稳定性降低，当稀释倍数大于 10 (450 nm)、6 (550 nm)、4 (650 nm) 倍时重复测定的观察值之间开始出现差异。

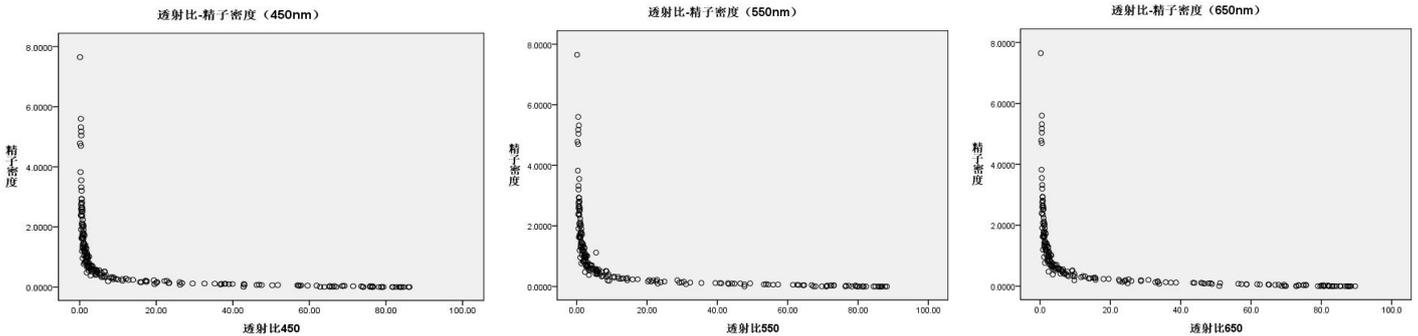


图 1 透射比与精子密度的关系图

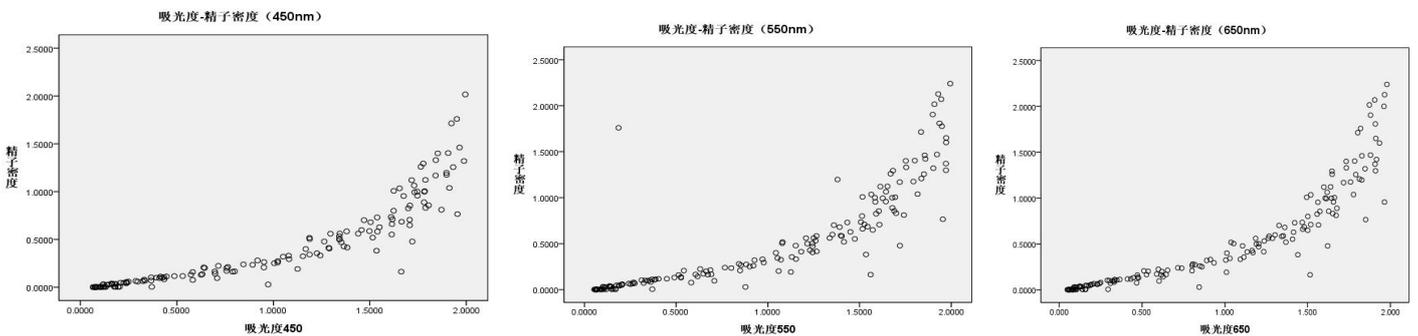


图 2 吸光度与精子密度的关系图

2.2 测量波长对精子密度与透射比的回归方程的影响

采用线性函数、对数函数、幂函数、二次函数、三次函数 5 种方程对精子密度与吸光度、透射比的关系进行回归分析，相关性最紧密的作为选取型式。结果表明，三次函数对吸光度拟合最好，而对透射比拟合最好的是幂函数。在三个不同波长下精子密度与吸光度、透射比的回归方程分别为：

$$C_{450}=0.48A^3-0.76A^2+0.67A-0.066 \quad (R=0.951)$$

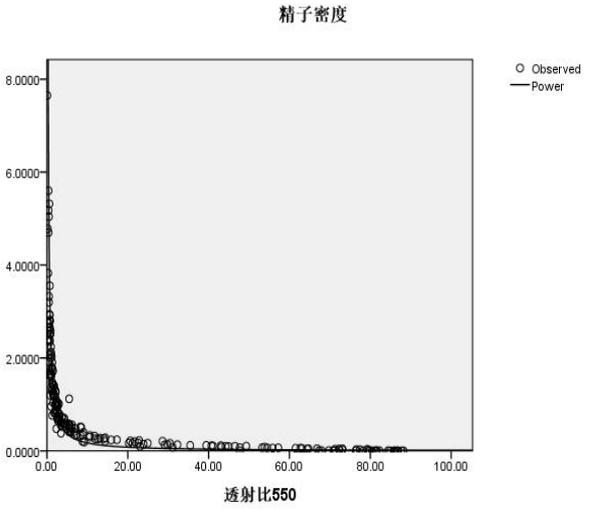
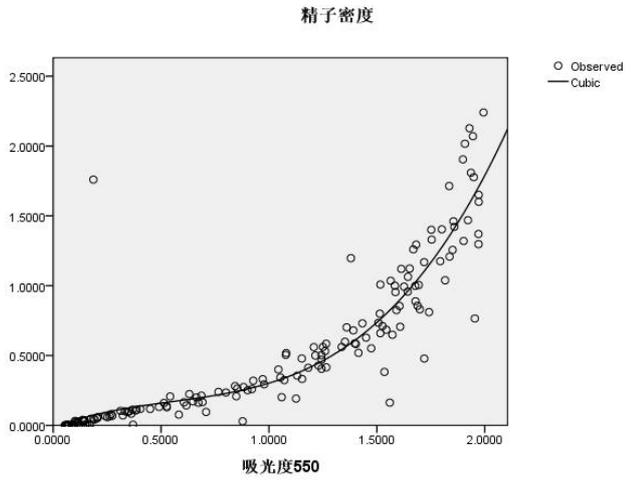
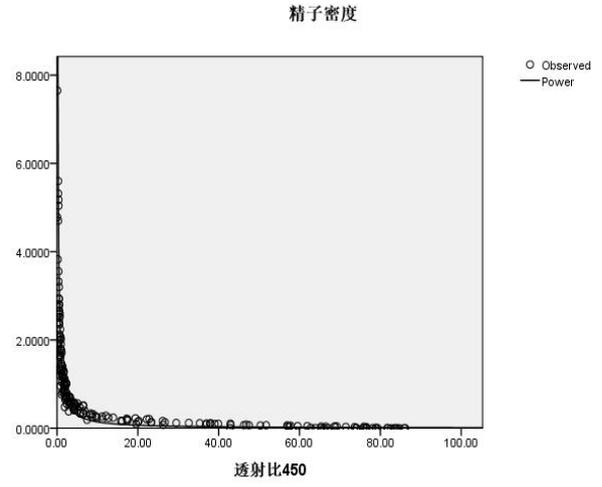
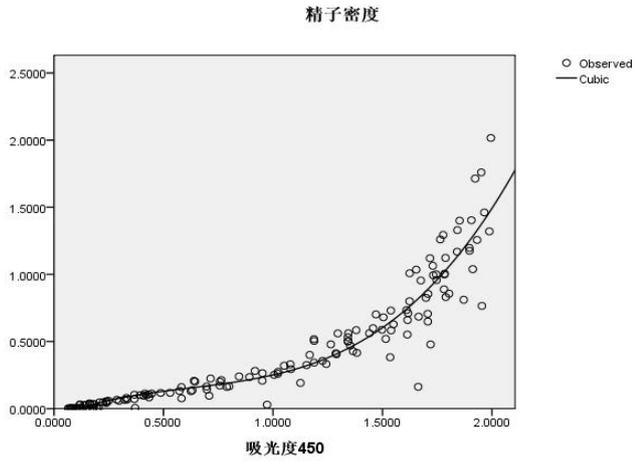
$$C_{450}=1.657T^{-1.068} \quad (R=0.94)$$

$$C_{550}=0.434A^3-0.719A^2+0.604A-0.018 \quad (R=0.92)$$

$$C_{550}=2.119T^{-1.112} \quad (R=0.912)$$

$$C_{650}=0.486A^3-0.858A^2+0.746A-0.058 \quad (R=0.956)$$

$$C_{650}=2.449T^{-1.125} \quad (R=0.910)$$



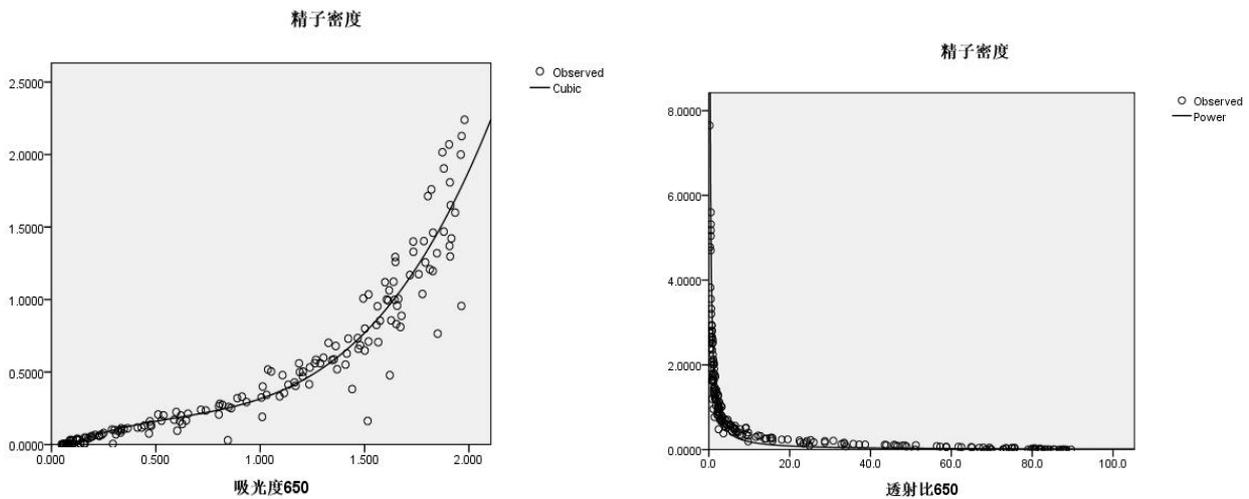


图 3 精子密度与吸光度、透射比的回归关系图

2.3 密度对照表

表 1 光密度与精子密度对照表

透射比	精子密度 (亿/ml)	透射比	精子密度(亿/ml)	吸光度	精子密度(亿/ml)
0.1	7.650	1.1	1.461	1.995	2.016
0.3	5.206±0.46	1.2	1.324±0.25	1.937	1.737±0.03
0.4	3.477±1.23	1.3	1.186±0.02	1.908	1.421±0.03
0.5	2.663±0.51	1.4	1.169	1.824	1.325±0.01
0.6	2.289±0.39	1.6	0.995±0.133	1.742	1.025±0.02
0.7	2.096±0.44	1.7	0.888	1.734	0.976±0.02
0.8	1.671±0.44	2.0	0.839±0.02	1.589	0.716±0.01
0.9	1.619±0.24	2.2	0.755±0.06	1.625	0.671±0.02
1.0	1.564±0.30				

3 结论与讨论

3.1 结论

对以上回归方程回归系数和常数项的显著性检验结果也表明，精子密度对数与吸光度、透射比间存在显著的正线性关系。450 nm 下猪精子密度与透射比回归方程的相关系数 (R=0.94) 高于 550 nm (R=0.912) 和 650 nm (R=0.910)，吸光度与精子密度虽然在 650 nm 下回归方程的相关系数 (R=0.956) 高于 450 nm (R=0.951) 和 550 nm (R=0.956)，但在 650 nm 下对吸光度测定的重复性较差，所以认为 450 nm 是检测吸光度与透射比较好的波长。

3.2 精子密度检测在猪人工授精技术中的重要性

在猪人工授精实践中，精子密度的检测关系到精液稀释比例大小，而这对精液产品质量有着至关重要的影响。目前，人工授精站对猪精子密度的测定均采用目测估计的方法，该方法虽然快速但存在主观性较大，精确度较差的缺点。进口的精子质量分析系统虽然能够较准确的对精液密度进行检测，但往往价格较昂贵，不能在生产中普遍应用。血球计数板计数的方法是目前多数人认为检测精子密度比较准确的方法，也在当前的生产中广泛应用。尽管该方法有成本低，测量准确的优点，但在处理大批量样品时这种方法显得繁琐和低效，所以我们试图建立 721 分光光度计透射比与

精子密度的回归曲线方程，通过测定精子的透射比来迅速估算精子密度的方法。

3.3 不同回归模型及不同波长对精子密度与吸光度的回归关系影响

在以前的许多报道中，研究者往往利用吸光度与精子密度建立函数关系，并且不同种类生物的精子密度与吸光度呈不同函数关系，太平洋牡蛎精子密度与吸光度呈对数回归关系^[6]，紫贻贝^[7]与俄罗斯鳎^[8]则呈线形回归关系，牛的精子密度与吸光度间呈二项式回归关系^[9]。在1994年吴买生^[10]的研究中采用蒸馏水对比溶液在445 nm波长下，测定47份精液的密度和透射比，得出了猪精子密度与透射比间呈幂函数回归关系。

分光光度计的工作原理是溶液中的物质在光的照射激发下，产生了对光吸收的效应，而物质对光的吸收是具有选择性的，各种不同的物质都具有其各自的吸收光谱，因此当某单色光通过溶液时，其能量就会被吸收而减弱，光能量减弱的程度和物质的浓度有一定的比例关系。一般的溶液由于其溶质往往是一种物质的，所以光度值与该物质的浓度有直接的相关关系。而精液的成分并不是单一的，在任一波长下测得的光度值是全部组份吸光值的总和，由于精液组分的多样性，往往光度值在最适波长时有一个比较宽的吸收光谱，所以测定时选择合适的波长对观测值的准确性至关重要^[8]。已报道的测定精子浓度的波长范围大多选用445~580 nm^[10-13]，但并没有数据直接证明该波长是测定猪精液密度的最适波长。所以本研究对不同波长下透射比与精子密度关系进行研究，结果表明波长为450 nm时猪精液稀释到10倍时仍然可以保持较好的重复性，且回归方程的决定系数也最高。所以在实践中可以利用该研究结果，将原精液稀释1~10倍，测得吸光度和透射比后，利用回归方程估算出稀释后的精液密度，再乘以稀释倍数，即可得出原精液的密度。为了使该方法可以更好地应用在生产中，我们也将光度值与精子密度的对应情况列出（表1），以供大家参考。当然由于本实验存在样本数不足的问题（n=20），希望在今后的试验中考虑品种的因素扩大样本量，使得实验结果能够更好地指导生产。

3.4 分光光度法测定精子密度的应用前景

精子密度作为一项衡量精液质量的重要指标，准确快速的测定方法对提高猪人工授精技术的效率有着重要的意义。通过分光光度计测定精液的光度值来估计精子密度的方法始于上个世纪七八年代^[14]，之所以没有被广泛的应用与当时的技术条件不成熟有关。但随着一次性滤纸、输精管等工业产品在人工授精技术中的广泛应用，也使我们重新看到了分光光度法应用的可能，该方法快速、准确、易操作等特点适合检测大批量样品的精子密度，有很大的实用和推广价值。

参考文献

- [1]Hansen, C., et al., *Validation of the FACSCount AF system for determination of sperm concentration in boar semen*. *Reproduction in Domestic Animals*, 2002. **37**(6): p. 330-334.
- [2]Evenson, D., et al., *Rapid Determination on Sperm Cell Concentration in Bovine Semen by Flow Cytometry*. *Journal of dairy science*, 1993. **76**(1): p. 86-94.
- [3]Zrim ek, P., et al., *Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality*. *international journal of andrology*, 2004. **27**(1): p. 57-62.
- [4]Bijttebier, J., P. Vyt, and A. Van Soom, *Effectiveness of sperm quality analyzer version Pig (SQA-Vp) for porcine semen in comparison with other methods for semen analysis*. 2008.
- [5]Kuster, C., *Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: Why they can be different*. *Theriogenology*, 2005. **64**(3): p. 614-617.
- [6]Dong, Q., et al., *Standardization of photometric measurement of sperm concentration from diploid and tetraploid Pacific oysters, Crassostrea gigas (Thunberg)*. *Aquaculture Research*, 2005. **36**(1): p. 86-93.
- [7]del Rio-Portilla, M.A. and A.R. Beaumont, *Sperm concentration in the mussel Mytilus edulis L.: a spectrophotometric measurement protocol*. *Aquaculture International*, 2008. **16**(6): p. 573-580.

- [8]张涛,张龙珍,庄平. 分光光度法测定俄罗斯鲟精子密度标准的研究. 海洋渔业, 2009. **31**(1): p. 87-91.
- [9]吴宓. 应用 7230 型分光光度计测定公牛精子密度. 黄牛杂志, 1994. **20**(2): p. 39-41.
- [10]吴买生. 利用分光光度计快速测定公猪精子密度. 宁畜牧兽医, 1991. **4**(2): p. 13-14.
- [11]黄卫红. 利用分光光度计检测水牛精子密度. 广西畜牧兽医, 2002. **18**(6): p. 7-8.
- [12]李孝娟,郭光成,岳鹏飞. 721 型分光光度计测定猪精子密度操作指南. 黑龙江动物繁殖, 2008. **16**(3): p. 24.
- [13]周明,马晓艳. 牛精液精子密度简易测定方法的探讨. 四川畜禽, 1995(004): p. 25-26.
- [14]Majumder, G. and C. Chakrabarti, *A simple spectrophotometric method of assay of forward motility of goat spermatozoa*. Reproduction, 1984. **70**(1): p. 235.