

猪精液常温保存稀释粉保存效果研究

苏泽智, 刘琦, 李亚新, 雷佳琦, 魏海燕, 王玉莹, 陈达罡, 杨公社, 胡建宏

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了开发猪精液常温保存新型稀释粉, 本研究通过检测精子活率、质膜完整性、顶体完整性以及 SOD 活性、 H_2O_2 和丙二醛 MDA 产生量等指标, 分析常温保存稀释粉对猪精液的保存效果。结果表明, 在常温保存条件下, 自配稀释粉保存猪精液 5d 时间内, 精子活率平均为 0.63, 精子顶体完整率和质膜完整率分别达到 78.4% 和 48.6%; SOD 活力、 H_2O_2 产生量和 MDA 产生量分别是 177.39 IU/mL、86.28 mmol/mL 和 9.36 nmol/mL, 达到国外同类产品水平, 可以在生产实践当中予以应用。

关键词: 常温保存; 猪精液; 稀释粉; 精液品质

Effects of Diluent on Quality of Boar Semen Stored at Normal Temperature

SU Zezhi, LIU Qi, LI Yaxin, LEI Jiaqi, WEI Haiyan, WANG Yuying, CHEN Dagang,

YANG Gongshe and HU Jianhong

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi

712100, China)

Abstract: In order to develop a new diluent of boar semen stored at normal temperature, sperm motility, acrosome integrity rate, plasma membrane integrity rate, superoxide dismutase (SOD) activity, yield of hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) were measured to assess the diluted semen quality after the preservation in this study. The results showed that under the condition of normal temperature preservation, in diluent preserved boar semen 5 d time, sperm motility was average of 0.63, acrosome integrity and plasma membrane integrity rate achieved 78.4% and 48.6%. SOD activity, yield of H_2O_2 and MDA were 177.39 IU/mL, 86.28

mmol/mL and 9.36 nmol/mL. The diluent reach the same level of foreign countries, it can be applied in the production practice.

Key words: Normal temperature preservation; Boar semen; Dilution powder; Semen quality

猪人工授精技术在集约化养猪场中的推广与应用,日益显示出在降低公猪饲养量和饲养成本、加快猪群品种改良、减少疾病传播等多方面的优势。与冷冻精液相比,常规液态保存精液人工授精后具有受胎率高、窝产仔数高、费用低、操作程序简单等优点^[1]。因此,常温保存更有利于提高良种公猪遗传资源的利用率。在常温保存时,猪精液稀释技术尤为关键,可以降低精子密度,为精子提供营养物质、缓冲物质,并维持适当的渗透压和 pH^[2]。为了探究一种保存效果可靠,成本低廉的自配稀释粉,本试验设计出一种新的配方,并用该配方对猪精液进行常温保存,分析精子活率、有效存活时间、顶体完整率、质膜完整率及 SOD 活力、H₂O₂ 产生量和 MDA 产生量等,以便对在生产中的应用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

杨陵区养猪服务站,按常规饲养方法饲养管理,20 月龄健康杜洛克、大约克和长白种公猪各 6 头。

1.1.2 主要仪器设备

电热恒温烘箱、电子天平、磁力搅拌仪、光学显微镜、pH 测定仪、17 °C 精液保存箱、高速离心机、恒温培养箱、酶标仪等。

1.1.3 稀释粉配方成分

稀释粉配方主要成分包括海藻糖、EDTA、柠檬酸钠、碳酸氢钠、N-乙酰半

胱氨酸、Tris、BSA、氨基乙酸、SOD、CAT 等。

1.1.4 稀释液的配制

按配方规定剂量准确称量每种药品于干燥灭菌的大烧杯中，加入 1 L 双蒸水，放置磁力搅拌仪上加热搅拌，待各成分充分溶解后，封口于室温下静止 30 min，使所有成分在溶液中均衡分布，电解质得到稳定。然后用 0.22 μm 进口滤器过滤溶液于干燥灭菌细口瓶中，加入配方规定剂量的抗生素后，封口待用。

1.2 试验方法

1.2.1 精液处理

处理方法参照朱永雄^[2]的试验步骤。

1.2.2 检测指标

(1)精子活率、精子有效保存时间、精子顶体完整率及精子质膜完整率 每 24 h 测定精子活率、有效存活时间、顶体和质膜完整性，检测方法参照朱永雄^[2]的试验步骤。

(2)SOD 活性、 H_2O_2 和 MDA 产生量 SOD 活性、 H_2O_2 和 MDA 产生量测定：使用 SOD 试剂盒、 H_2O_2 试剂盒和丙二醛试剂盒测定，检测方法根据试剂盒说明书进行。

1.3 数据处理

试验过程中，每个样本设置 3 个重复，使用单因素方差分析，结果用平均值 \pm 标准差表示，所有数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 猪精子活率、顶体完整性和质膜完整性

稀释保存不同时间后的猪精子活率、顶体完整性和质膜完整性见表 1。

表 1 稀释粉对猪精子活率、顶体完整性和质膜完整性的影响

保存时间/ d	精子活率	顶体完整性/ %	质膜完整性/ %
Conservation Time	sperm motility	acrosome integrity rate	plasma membrane integrity rate
原精	0.867±0.006 ^a	93.07±0.551 ^a	72.13±0.473 ^a
稀释后精液	0.843±0.012 ^a	91.83±0.153 ^b	67.80±0.700 ^b
1.0	0.807±0.015 ^b	89.07±0.896 ^c	64.23±0.115 ^c
2.0	0.783±0.015 ^b	86.03±0.306 ^d	60.27±0.100 ^d
3.0	0.747±0.012 ^c	83.63±0.451 ^e	57.50±0.379 ^e
4.0	0.703±0.015 ^d	80.03±0.493 ^f	55.37±0.100 ^f
5.0	0.630±0.020 ^e	78.40±0.265 ^g	48.60±0.569 ^g
有效保存时间/d		5.403±0.015	
Effective survival time/d			

注：同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)，相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。

由表 1 可知，精液保存的第 1、2d 精子活率由 0.807 下降至 0.783，差异不显著 ($p>0.05$)，但从第 3d 起，精子活率开始快速下降，这可能与稀释液体系中精子代谢产生的废弃物堆积增多有关。精子顶体完整性和质膜完整性显著下降 ($p<0.05$)，但达到了应用要求。

2.2 试验配方对常温保存猪精液 SOD 活性的影响

常温稀释保存后的猪精子 SOD 活性见图 1。

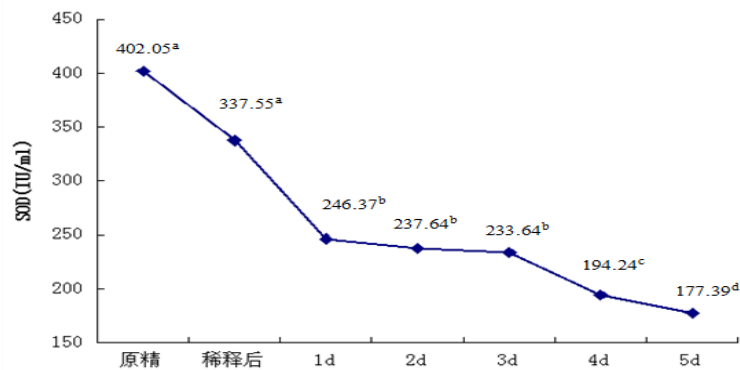


图 1 试验配方对常温保存猪精液 SOD 活性的影响

由图 1 可知，SOD 活性在稀释后由 402.05IU/ml 下降到 337.55IU/ml 显著降低 ($p<0.05$)，在保存的第 1、2、3 d 差异不显著 ($p>0.05$)，在保存的第 4、5 d 又显著下降 ($p<0.05$)。

2.3 试验配方对常温保存猪精液 H₂O₂ 产生量的影响

常温稀释保存后的猪精子 H₂O₂ 产生量见图 2。

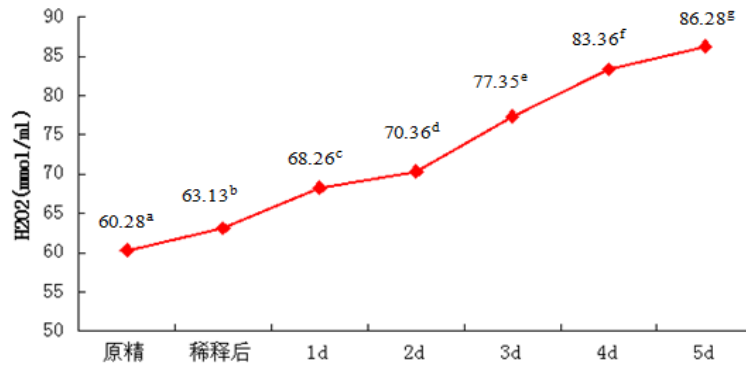


图 2 试验配方对常温保存猪精液 H₂O₂ 产生量的影响

由图 2 可知，精液 H₂O₂ 产生量在有效保存时间内每一天都比前一天显著增加 ($p<0.05$)。

2.4 试验配方对常温保存猪精液 MDA 产生量的影响

常温稀释保存后的猪精子 MDA 产生量见图 3。

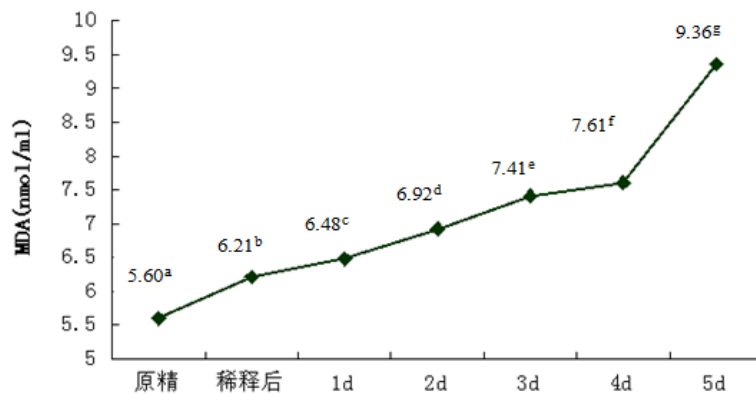


图 3 试验配方对常温保存猪精液 MDA 产生量的影响

由图 3 可知，猪精液 MDA 产生量在保存期间随着时间的延长显著增加

($p < 0.05$)。

3 讨论

3.1 猪精液常温保存稀释粉保存效果的影响因素

精液稀释粉一方面要用于扩大精液容积，一方面维持精子的受精能力。稀释粉中的葡萄糖和海藻糖不仅能为精子提供能量，还可以维持稀释液的渗透压。碳酸氢钠或柠檬酸钠常被用来调节稀释液 pH，但 Tris 缓冲能力更强^[4]。在本配方中，Tris 能够维持精液 pH 的稳定，EDTA 能够与稀释液中的金属离子尤其是 Ca^{2+} 结合，减少进入细胞内的 Ca^{2+} ，防止诱发精子获能和顶体反应的发生。正是由于各成分的科学选择和精确定量，使本配方保存精液的效果达到理想水平。

3.2 稀释粉保存猪精液效果的主要质量指标

目前常检测活率、顶体完整率、质膜完整率和抗氧化能力等与母猪受胎率和繁殖成绩相关的指标。本试验结果表明，该稀释粉中的海藻糖能通过稳定质膜而发挥保护精子的作用^[5]。洪洁赟等^[6]研究认为，EDTA、Tris 以及精浆中的一些成分都具有螯合特性，能够抑制金属离子在过氧化反应过程中所起的催化作用，以防止膜磷脂中的不饱和脂肪酸发生氧化反应以及保存过程中自发的精子顶体反应的发生。本试验较高的顶体和质膜完整性，证实了本配方中加入 EDTA、Tris 等螯合剂和缓冲物质，对延长精液保存时间具有显著效果。

3.3 猪精液常温保存稀释粉的抗氧化能力

精子存活时间与稀释液的氧化还原指数密切相关，即在高度无氧的稀释液中保存时间最长^[7]。通过试验结果分析，表明本配方稀释粉保存精子氧化损伤水平较低，其原因可能是含有适宜的 BSA、活性酶和 N-乙酰半胱氨酸等抗氧化物质。BSA 具有维持渗透压、缓冲 pH、充当载体还原酶的稳定剂以防止酶的分解和非特异性吸附等作用^[8]，其对延长猪精液保存时间有显著效果。SOD 和 CAT 的配伍使用，使稀释精液体系的抗氧化保护作用得到显著加强，SOD 可将精液中 O_2^- 转化成 H_2O_2 ，进一步被 CAT 还原为不造成氧化损伤的 H_2O 等产物。N-乙酰半胱

氨酸分子中的巯基与体内活性氧自由基有很强的结合能力^[9]，本试验对精子质膜完整性的测定表明，添加 N-乙酰半胱氨酸对猪精子的质膜有很大保护作用，其结果与徐德祥等^[10]的 N-乙酰半胱氨酸对外源性 H₂O₂ 和内源性 O²⁻引起的精子损伤有明显的保护作用基本一致。试验表明，本配方稀释粉中选择加入的蛋白保护剂、活性酶和抗氧化剂，都能够充分发挥作用，抑制精子质膜的过氧化损伤，产生了有效延长精液保存时间的效果。

4 结论

本稀释粉配方中为精子提供营养物质的葡萄糖和海藻糖，调节稀释液 pH 的柠檬酸、柠檬酸钠和碳酸氢钠，维持稀释精液稳定的缓冲物质有 EDTA 和 Tris，蛋白类保护剂 BSA，抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸，另外添加了适量 SOD、CAT 活性酶和抑制微生物繁殖的庆大霉素。在精液的保存过程中，影响精液常温保存效果的因素很多，其作用机理也非常复杂，虽然本配方稀释粉在常温保存猪精液效果方面已达到国外中效稀释粉水平，但对于开发有效保存时间更长的长效稀释粉，关于不同种类的稀释粉不同成分对精子的作用机理还需要后期进一步的研究。

参考文献（略）