

# 不同冷源对民猪精液冷冻保存效果的研究

王文涛, 马红, 何鑫淼, 刘娣\*

(黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 本试验用干冰和液氮作为冻源对民猪精液冷冻效果进行研究, 包括对精子活率及顶体完整率的影响。结果表明:以干冰为冻源进行民猪精液冷冻, 解冻后, 精子活率为43.5%、顶体完整率为52.2%; 以液氮为冻源进行民猪精液冷冻, 解冻后, 精子活率为41.8%、顶体完整率为51.5%, 两者差异不显著。

**关键词:** 民猪; 冷冻精液

## CryoProtective effects of different freezing system on frozen semen in the Min Pig

Wang Wentao, Ma Hong, He Xinmiao, Liu Di\*

(1. Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences Harbin 150086)

**Abstract:** In this experiment, study on the cryoProtective effects of dry ice and liquid nitrogen on frozen-thawed semen in the Min Pig, including sPerm motility and acrosome integrity. The result showed that the sPerm motility is 43.5% and the sPerm acrosome integrity is 52.2% by dry ice; the sPerm motility is 41.8% and the sPerm acrosome integrity is 51.5% by liquid nitrogen. There have no significant differences between the dry ice and liquid nitrogen.

**Keyword:** Min Pig; frozen semen

目前, 猪人工授精技术已经广泛应用于畜牧业生产, 所用精液多为鲜精, 用鲜精配种存在成本高, 浪费严重和易交叉感染等问题, 这使人们的视线逐渐转移到冷冻精液上。猪精子本身对冷应激特别敏感, 在冷冻过程中极易损伤, 从而造成母猪的受胎率低、窝产仔数少, 严重制约着猪冷冻精液的应用。因此, 深入系

\***基金项目:** 国家生猪产业技术体系(CARS-36); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(2012RFQYN025)

**作者简介:** 王文涛(1981-), 男, 黑龙江省农业科学院, 硕士研究生, 动物遗传育种与繁殖

**通讯作者:** 刘娣(1963-), 吉林省四平市人, 女, 博士生导师, 教授, 研究方向: 分子生物学。

Tel:0451-87502330;E-mail:wangwentao\_1981@163.com

系统地研究猪精液冷冻机理和生产的关键技术,探讨影响猪冻精活率及受精能力的因素,进一步提高受胎率和产仔数,已成为国内外养猪生产中急待解决的问题<sup>[1]</sup>。

民猪作为我国优良的地方猪种,其高繁殖力、高肉质品质为消费者所广泛关注,民猪冷冻精液技术的研究,将极大提高民猪种猪利用率、保存率,对民猪保种工作的开展和民猪产业的发展有着重要的意义。本文以液氮和干冰作为民猪精液冷冻过程中的冻源,对其活率及顶体完整率等指标进行研究,为探索选择适合民猪精液冷冻的冻源提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

民猪种公猪选自黑龙江省农业科学院畜牧研究所民猪养殖繁育基地。

#### 1.1.2 试剂

试剂均为国产分析纯试剂、液氮、干冰。

精液稀释液(冷冻基础液):碳酸氢钠0.1 g,葡萄糖2.75 g,EDTA 0.29 g,柠檬酸三钠0.69 g,Tris 0.56 g,加水至100 mL混合均匀。

冷冻保护液 I 液:将11%的乳糖液与新鲜蛋黄以4:1的比例混合,搅拌均匀,冷却至17 ℃备用。

解冻液(BTS):柠檬酸钠0.6 g,葡萄糖3.7 g,EDTA-Na<sub>2</sub> 125 mg,碳酸氢钠125 mg,氯化钾75 mg,加水至100 mL混合均匀,使用时另添加10%新鲜蛋黄混合搅拌均匀。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 民猪精液的采集

民猪精液采集采用手握法采精,需注意的是民猪被毛浓密,采精过程中被毛、皮屑对精液的污染较为严重,在采精前应对公猪进行刷拭,剪毛,防治精液污染<sup>[2]</sup>。精液采集后,以精液稀释液与原精1:1比例混合,镜检精子活力,选取活力70%

以上的精子进行冷冻操作。

### 1.2.2 民猪精液的冷冻

镜检合格精液放置于17℃下平衡1小时后分装于10 mL离心管中，放置于控温至17℃的离心机中800 r/min离心10分钟，去除上清，镜检密度达到 $10^9$ ，备用；在合格精液中，以1:1比例添加冷冻保护液 I 液，4℃平衡1小时，镜检，将活力大于70%的精液装入0.25mL冷冻细管，PVA封口粉封口<sup>[3]</sup>，备用，采用不同冻源进行冷冻。

干冰冷冻方法：利用干冰为冷源进行精液冷冻。将装有精液的冷冻细管置于干冰平面，约5min后将冷冻细管放入纱布袋，最后投入到液氮中进行冷冻保存。

液氮冷冻方法：利用液氮为冷源进行精液冷冻。将装有精液的冷冻细管悬于距液氮面5 cm 处，液氮熏蒸5 min，最后放入纱布袋投入到液氮中进行冷冻保存。

### 1.2.3 民猪精液的解冻

采用湿解法解冻，以 BTS 液为解冻液。42℃水浴，解冻后 1000g，5min 重复离心两次，用 DPBS 重新悬浮，镜检。

### 1.2.4 民猪精液的品质检测

#### 1.2.4.1 活率

将解冻后精液以DPBS20倍稀释后，37℃下静置20min，混匀，在显微镜400倍下，取20  $\mu$ l于37℃恒温加热台上，用血球计数板法计算精子活率。

精子活率 = (直线运动精子/精子总数)  $\times$ 100%

#### 1.2.4.2 顶体完整率

采用考马斯亮蓝G250进行解冻精液顶体完整率检测，顶体完整的精子可以被染色为蓝色，顶体破损的精子不能被染色。

精子顶体完整率 = (顶体完整精子/精子总数)  $\times$ 100%

## 2 结果与分析

采用干冰冷冻方法和液氮冷冻方法对民猪精液进行冷冻保存，解冻后，采用

干冰冷冻方法解冻后活率为43.5%、顶体完整率为52.2%；采用液氮冷冻方法解冻后活率为41.8%、顶体完整率为51.5%，结果见表1。

表1 不同冷源冷冻精液活率及顶体完整率

冷源	次数	活率 (%)	顶体完整率 (%)
液氮	4	41.8±6.6 <sup>a</sup>	51.5±3.8 <sup>a</sup>
干冰	4	43.5%±5.7 <sup>a</sup>	52.2±4.0 <sup>a</sup>

注：不同小写英文字母表示同列数据差异显著 ( $P < 0.05$ )。

解冻后，采用干冰冷冻方法冷冻的民猪精液活率、顶体完整率皆高于采用液氮冷冻方法的民猪精液，但差异不显著。

### 3 讨论

猪精液冷冻技术多采用干冰、液氮等作为冻源，将精液特殊处理后冷冻，然后投入超低温液氮中，使精子细胞的代谢完全停止，达到长期保存的目的<sup>[4]</sup>，精子的损伤程度最终由降温速率和冷冻的最终温度来决定<sup>[5]</sup>。本研究分别采用干冰冷冻方法和液氮冷冻方法对民猪精液进行冷冻研究，就实验结果来看，在解冻后民猪精液活率、顶体完整率方面，采用干冰作为冻源效果优于液氮，但两者差异并不显著，原因可能是由于液氮的蒸发速度较快，使冷冻过程中温度变化幅度较大造成精子的损伤程度高于干冰作为冻源的精子，具体原因仍需进一步实验来验证。

参考文献 (略)