

甘油、乙二醇对山羊精子形态结构的影响

黄亚娟¹ 刘文娟² 邸俊龙³

1. 陕西省泾阳县泾干镇动物防疫站, 陕西泾阳 713700;
2. 陕西省榆林市靖边县镇靖乡畜牧兽医工作站, 陕西靖边 718500;
2. 西安市阎良区关山镇畜牧兽医站, 西安 710089

摘要 根据布尔山羊冷冻精液质量监测结果, 目前国内山羊冷冻精液解冻后的活力达 30% 以上。情期受孕率达 60% 左右, 辽宁原种场在此基础上于 2004 年开始对辽宁绒山羊细管冷冻精液的稀释液、精液处理, 冷冻工艺解冻方法及受孕率结果等作了比较系统的研究, 取得了较好的结果。本试验通过对最佳基础液的筛选, 最佳保护剂种类及含量的筛选, 分别用含甘油、乙二醇的最佳冷冻稀释液对山羊的精液进行处理, 根据冷冻和解冻的结果, 对精子活率、畸形率, 顶体完整率进行研究。

关键词 甘油; 乙二醇; 情期受孕率; 精子活率

1 材料与方法

1.1 试验材料

体格健壮、健康无传染病且性欲旺盛的种公羊, 精液要求呈现乳白色成略带黄色云雾状明显, pH 在 6.8 ± 0.2 范围内, 目测活率在 0.7 以上, 种公羊均身体健康, 精神状态良好。

供选择的稀释液配方如下:

I 基础液: 葡萄糖 8 g、双蒸水 100 mL, 灭菌。(1) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.35 mL 甘油; (2) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.5 mL 甘油。

II 基础液: 葡萄糖 3 g、柠檬酸钠 3 g、双蒸水 100 mL, 灭菌。(1) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.35 mL 甘油; (2) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.5 mL 甘油。

III 基础液: 三羟甲基氨基甲烷 4.34 g、葡萄糖 0.70 g、蔗糖 1.60 g、柠檬酸钠 1.972 g、双蒸水 100 mL, 灭菌。(1) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.35 mL 甘油; (2) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.5 mL

甘油。

IV 基础液: 乳糖 4.6 g、葡萄糖 3.1 g、柠檬酸钠 1.5 g、双蒸水 100 mL, 灭菌。(1) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.35 mL 甘油; (2) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.35 mL 乙二醇; (3) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.47 mL 甘油; (4) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.47 mL 乙二醇。

V 基础液: 乳糖 5 g、葡萄糖 3 g、柠檬酸钠 1.5 g、双蒸水 100 mL, 灭菌。(1) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.35 mL 甘油; (2) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.5 mL 甘油。

VI 基础液: 乳糖 6 g、柠檬酸钠 1.5 g、双蒸水 100 mL, 灭菌。(1) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.35 mL 甘油; (2) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.5 mL 甘油。

VII 基础液: 乳糖 3.8 g、葡萄糖 2.6 g、柠檬酸钠 1.3 g、双蒸水 100 mL, 灭菌。(1) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.35 mL 甘油; (2) 处理: 8.0 mL 基础液 + 2.0 mL 卵黄 + 0.5 mL 甘油。

VIII 基础液: 葡萄糖 1.15 g、柠檬糖 2.6 g、柠檬酸

1.0 g、二羟甲基氨基甲烷 1.84 g、双蒸水 100 mL,灭菌。(1)处理:8.0 mL 基础液+2.0 mL 卵黄+0.35 mL 甘油;(2)处理:8.0 mL 基础液+2.0 mL 卵黄+0.5 mL 甘油。

V III 基础液:葡萄糖 0.96 g、柠檬酸钠 1.36 g、二羟甲基氨基甲烷 2.42 g、双蒸水 100 mL,灭菌。(1)处理:基础液 8.0 mL+2.0 mL 卵黄+0.35 mL 甘油;(2)处理:基础液 8.0 mL+2.0 mL 卵黄+0.5 mL 甘油。

以上每种基础液消毒灭菌后放凉,再按每毫升各加青霉素、链霉素 1 250 IU 混匀即可保存。

1.2 试验设计

选用合格新鲜精液,按以上 20 个稀释液分别进行处理,每个处理 6 个重复,根据冷冻解冻后的活率选出最佳稀释液的基础液,将选出的基础液按表 1 浓度添加保护剂,配成稀释液,用此稀释液再进行冷冻处理,每个处理重复 6 次,再以解冻后精子的活率、畸形率,顶体完整率,得出分析结果(表 2)。

表 1 保护剂的添加量

甘油/mL	0.30	0.35	0.40	0.47	0.50
乙二醇/mL	0.30	0.35	0.40	0.47	0.50

表 2 基础液的筛选结果

处理组	I(1)	I(2)	II(1)	II(2)	III(1)	III(2)	IV(1)	IV(2)	IV(3)	IV(4)
活率平均数(x)	0.15	0.13	0.26	0.25	0.20	0.21	0.33	0.35	0.40	0.41
处理组	V(1)	V(2)	VI(1)	VI(2)	VII(1)	VII(2)	VIII(1)	VIII(2)	VIII(1)	VIII(2)
活率平均数(x)	0.20	0.25	0.18	0.20	0.33	0.35	0.20	0.23	0.19	0.20

2)IV 基础液中添加不同浓度甘油对精子成活率的影响结果(n=6)。由活率为依据进行选择,添加 4.7%的甘油的效果明显好于其他浓度,经显著性检验,添加 4.7%的甘油组与总体样本比较,差异显著(P<0.05),故可以选择甘油的浓度为 0.47(表 3)。

3)不同浓度乙二醇对冷冻后精子成活率的影响(n=6)。由活率选择结果可以看出,添加 4.7%的乙二醇的效果明显强于其他浓度,经显著性检验,添加 4.7%的乙二醇处理组与总体样本比较,差异显著(P<0.05)(表 4)。

4)用 A(含 4.7%甘油)、B(含 4.7%乙二醇)、C(新鲜精液)3 个处理组对精子畸形率的影响(n=6)。甘油处理组的畸形率显著高于对照组和乙二醇处理组(P<0.01);乙二醇的处理组的畸形率显著高于对照组(P<0.01)(表 5)。

1.3 试验过程

1)将所需用品严格消毒后,将镜检合格的新鲜精液按 1:3 体积比稀释后,装管置于 0~4 °C 环境中平衡 2 h。

2)平衡后,将细管精液置于液氮中冷冻 5~10 min。

3)解冻镜检:将冷冻后的精液置于 38 °C 水浴中解冻后,制切片,观察活率。

4)标记分装,保存,对统计数据进行分析,选出最佳基础液。

5)用最佳基础液按表 1 配成稀释液,重复以上操作分别选出甘油、乙二醇的最佳稀释液 A、B。

6)用 A、B 2 个稀释液作冷冻精液处理,制作抹片,进行活率、畸形率,顶体完整率的观察。

7)对结果进行统计分析,得出结论。

2 结果

1)基础液的筛选结果(n=6)。由表 2 观测得,IV 基础液优于其他基础液,统计分析,IV 基础液平均数与整个样本平均数相比较差异极显著(P<0.01),可知 IV 为最佳基础液。

表 3 不同浓度甘油对精子成活率的影响结果

浓度	0.30	0.35	0.40	0.47	0.50
平均活率(x)	0.20	0.23	0.35	0.40	0.30

表 4 不同浓度乙二醇对精子成活率的影响结果

浓度	0.30	0.35	0.40	0.47	0.50
平均活率(x)	0.22	0.23	0.30	0.42	0.35

表 5 不同处理组对精子畸形率的影响结果

处理组	畸形率/%					
A	18.0	19.5	21.0	20.0	17.0	18.0
B	15.0	15.0	16.5	18.0	16.0	15.5
C	13.0	12.0	10.0	12.0	13.0	12.0

表 6 不同处理组对精子顶体完整率的影响结果

处理组	顶体完整率/%					
A	78.0	78.0	79.5	81.0	82.5	83.0
B	80.5	82.0	84.0	83.5	82.0	81.0
C	87.5	88.0	89.5	89.5	92.0	90.0

5)A、B、C 3 个处理组对精子顶体完整率的影响($n=6$)。甘油处理组的精子顶体完整率显著低于添加乙二醇的处理组($P < 0.05$)、极显著低于对照组($P < 0.01$)、添加乙二醇的处理组极显著低于对照组($P < 0.01$)(表 6)。

3 讨 论

冷冻精液人工授精技术应用到生产中以来,只是在牛的生产上应用比较多。由于冷冻精液的活率、畸形率、顶体异常率等各方面因素的影响,使得受胎率于自然交配相比较低,从而使此技术在山羊生产上未得到大面积推广。因此保护剂添加的种类和浓度,是目前研究的一个热点。精子在冷冻过程中,水分子重新按几何图形排列形成冰晶,冰晶可以使精子膜内的浓度和渗透压增高,水由精子内向外渗透,造成精子细胞脱水,发生不可逆的化学毒害而死亡。同时,精子水分形成冰晶,其体积增大且形状不规则,由于冰晶的扩展和移动,造成精子膜和细胞内部结构的机械损伤,引起精子死亡,所以,在冷冻过程中要尽量避开形成冰晶最多的温度范围($-15 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$),在冷冻过程中就要以最快的速度降温通过发生冰晶化的温度范围,形成玻璃化。快速降温时应添加一定量的甘油、乙二醇、二甲亚砜等抗冻保护物质,以增加精子的抗冻能力,防止发生冰晶化。

保护剂中,甘油具有较强的吸水性,抑制水分子形成冰晶,使水处于过冷状态,降低水形成冰晶的温度,缩小危险温度区。研究表明,甘油浓度过高对精子有毒害作用,可能造成其顶体和颈部损伤,尾巴弯曲及某些酶类破坏,降低其受精能力。乙二醇具有较强的亲水性能,能有效保护精子免受冰晶伤害,而且其浓度过高对于精子的毒害作用远小于甘油。

本试验研究发现,在低浓度的保护剂作用下($0.30 \sim 0.35 \text{ mL}$ 范围内 / 10 mL 冷冻稀释液中),甘油的保护作用与乙二醇的保护作用相比,差异不显著,也就是二者并没有本质的区别,保护剂体积增加到 0.35 mL 以上时,乙二醇的保护作用明显强于甘油,当保护剂体积达到 0.5 mL 时,二者的保护作用都呈于下降趋势,在这个过程中,精子的形态结构也发生了一系列的变化,本试验设置了 2 个处理组和 1 个对照组,即用所选择的最佳基础液,分别加入最适浓度的甘油和乙二醇后,制作抹片,在油

镜下统计出了各自的畸形率、顶体完整率,再以新鲜精液制成抹片作为对照组来进行生物统计学分析,结果发现,无论是甘油,还是乙二醇处理组,都与对照组差异显著,也就是说,在添加保护剂的过程中,精子的活率、畸形率、顶体完整率都不可避免地受到了很大的影响,甘油与乙二醇的处理组相比,甘油处理组的效果无论从活率、畸形率还是顶体完整率上分析,都不如乙二醇处理组好。

另外,在这个实验的整个研究过程中,还存在一些不可知因素的影响,还存在一些尚未解决的问题,如在研究过程中,基础液、稀释液的原始配方都选取的一些实际生产中常用的一些配方,这些配方添加保护剂的浓度都是从 3% 开始,5% 结束,那么 3% 以下的添加浓度,按照理论知识,甘油应明显强于乙二醇 5% 以上的添加浓度,乙二醇应明显强于甘油,但试验研究的添加浓度具有局限性,因而出现了一些不一致的地方,有待于进一步的探讨。就整个冷冻过程中,气温、光线、冷冻时间的微小差异,都有可能导致结果出现微小的偏差。在解冻过程中,水温的高低、解冻时间的长短以及解冻技术的熟练程度,也都会对结果产生一定影响。本试验在基础液中添加的营养剂为蛋黄,根据实际生产上的经验,添加等量鲜奶的效果优于蛋黄,以上是整个试验中存在的一些问题。

4 结 论

本试验结果表明,稀释液中添加 4.7% 的甘油和乙二醇时,对精子形态结构以及活率都有显著的影响,在选定的最佳稀释液中,甘油的保护作用不及乙二醇,添加甘油对精子的活率、畸形率、顶体完整率的损害程度要强于乙二醇。在实际的生产中,建议尽可能用乙二醇作为保护剂。

参 考 文 献

- [1] 张忠诚.家畜繁殖学[M].北京:中国农业出版社,2004.
- [2] 中国农业大学出版社主编.家畜繁殖学[M].北京:中国农业出版社,1980.
- [3] 张世伟,宋先忱,朱延旭,等.辽宁绒山羊细管冷冻精液研究[J].中国畜牧杂志,2006(3):23-25.
- [4] 董时富.生物统计学[M].北京:科学教育出版社,2000.
- [5] 明道绪.生物统计附实验设计[M].北京:中国农业出版社,2004.
- [6] 张一玲.家畜繁殖学实验实习指导[M].北京:农业出版社,1991.