

牛羊精子体外获能技术

佟桂芝 韩永胜 宋 斌

黑龙江省畜牧研究所,黑龙江齐齐哈尔 161005

摘要 精子体外获能是模仿体内获能的环境条件,经过一系列的生理、生化过程使成熟卵母细胞受精。精子获能过程中发生了一系列的过氧化过程,产生了过量的氧自由基是导致体外受精率低下的原因之一。本文主要介绍了体外受精用精子的筛选及抗氧化方法、影响体外获能的因素等。

关键词 牛羊;精子;获能技术;抗氧化剂

经过多年的研究,精子体外获能已取得了很大进展。体外受精的体内、外环境的显著差异,导致体外卵子与精子的抗氧化能力显著低于体内环境。由于抗氧化能力的不足,导致过量的氧自由基(ROS)对细胞结构和功能产生毒害作用,从而表现出受精率低下及异常受精现象。

1 体外受精用精子的筛选及抗氧化方法

精子体外受精时可以见到足够数量的精子围绕卵子,但是很多却不能受精。这些变化的机理及对精子及卵子受精能力的影响还有待研究。影响体外受精效果的因素有很多:受精液的成分、培养的气相、温度、氧气浓度、渗透压、过氧化物的清除、受精滴体积等。对体外受精不利因素包括氧化应激和培养液成分。精子获能必须先要对精液进行筛选,去除精清、死精等,为体外获能创造类似体内的获能环境。

1)上浮筛选精子法。将精液加入获能液底部,然后静置在培养箱 30~60 min。目的是活力高的精子会上游到上层,吸出上层液后进行离心筛选,获得高活力精子。在此操作过程中要避免室内的操作温度过低或过高,尽量避免日光、室内灭菌过程中紫外线消毒后及操作工作台内臭氧的排出,避免精子在抗氧化过程产生过量的氧自由基。

2)Percoll 密度梯度离心法。Percoll 分离筛选精子的原理是根据形态正常、有活力的精子密度高于异常死精子及精清,利用平衡离心作用,将正常的活精子离心到高密度区,而异常的死精子及精清等杂质则停留在低密度区或界面分层处。筛选精子用密度梯度为 90%和 45%,此法可以获得更多优质精子。

3)离心筛选法。通过直接离心即可制备用于体外受精的精子。牛一般采用 2 次离心法,而羊精液一般采用 1 次离心筛选法加上浮筛选法。

2 精子体外获能的试剂

凡是能去除精子质膜蛋白,导致质膜稳定性下降、通透性增加,使 Ca^{2+} 内流的刺激方法均可使精子获能,肝素与咖啡因联合使用或两者单独使用是目前采用的精子获能方法。无论哪种方法都要注意在获能液中添加抗氧化剂,如褪黑素、 β -巯基乙醇、半胱氨酸等,来清除体外受精过程中产生的过氧化物。

3 抗氧化剂种类

氧自由基(ROS)产生与消除的平衡是体外受精的重要影响因素。精子与卵子体外受精时会受到氧化应激,而体外精子及卵子的抗氧化能力弱,细胞结构易受到破坏。ROS 会引起线粒体功能紊乱,

收稿日期:2017-04-01

基金项目:现代农业肉牛牦牛产业技术专项(NYCYTX-38);齐齐哈尔农业攻关项目(NYGG-201524);齐齐哈尔市农业攻关项目(NYGG-201408);黑龙江省财政厅项目(201608)

佟桂芝,女,1967年生,研究员,研究方向:反刍动物饲养及繁殖。