

流式细胞仪用于牛精液分选的技术要点

何 旭

河北省畜牧良种工作站, 石家庄 050061

摘要 流式细胞仪应用于性控冻精生产是目前奶牛生产繁育性别控制技术的有效方法。本文阐述了流式细胞仪分离精子的工作原理及应用效果, 并对流式细胞仪分离精子存在的问题进行了分析, 提出了奶牛 X 精子和 Y 精子分离技术的展望。

关键词 流式细胞分选技术; 奶牛; 性控冻精

流式细胞分选技术是借鉴荧光标记、激光、计算机分析技术, 对单细胞定量分析的一种新技术, 其具有极高的细胞检测速度与统计精确性, 广泛应用于医学临床实践的细胞生物学、血液学、免疫学、遗传及临床检验学等各个领域。利用其技术特性, 在奶牛性控冻精的生产上也得到了广泛应用, 从而进一步提高奶牛生产性能和育种进程。

收稿日期: 2016-01-22

何 旭, 男, 1977 年生, 畜牧师。

2 结果与分析

1) 产仔舍圈舍南面墙半透明进口尼龙布自动卷帘和北面墙双层玻璃窗户的安装, 以及屋顶独特的建筑材料和科学的设计, 使得整个圈舍冬季室内自然温度可达 10~18℃, 夏季室内自然温度在 18~24℃之间, 有通风采光、隔热保温、冬暖夏凉、环保坚固的良好效果。

2) 产床部分是产仔舍的核心工程, 能为初生仔猪提供 30℃左右的小气候和小环境; 栅栏、定位栏能保护仔猪, 防止被母猪压死, 便于对母猪和仔猪的管理; 水泥钢筋漏缝地板提供良好的卫生条件, 防止活物积存和细菌的繁殖, 减少仔猪疫病。

3) 采用氧氟焊接方式可以使产床限位栏焊接处不生锈、坚固, 使用寿命长。产床水泥钢筋漏缝地板和保温箱四周及底部的水泥钢筋板制作成形打磨平整后, 通过 100℃以上高温、熏蒸 8 h 以上才安装使用。熏蒸后的水泥钢筋漏缝地板和水泥钢筋板不开裂、不易老化、使用寿命长达 30 年以上; 新式产床比

1 性染色体 DNA 质量差异

哺乳动物每一个体的 X 精子和 Y 精子, 其 DNA 含量都是恒定的, 通常 X 染色体较 Y 染色体大, X 精子的 DNA 含量较 Y 精子多 3.0%~4.5%, 例如牛 X 精子的 DNA 含量较 Y 精子多 3.8%。利用哺乳动物精子携带 X 染色体和 Y 染色体的 DNA 含

传统的铸铁床或钢丝床平整光滑、价廉、不伤蹄、不伤猪, 具有经久耐用、卫生干燥、方便清扫等特点。实践证明, 母猪、仔猪生活在这样的环境很舒服。

3 结 论

仔猪出生时大脑皮层发育不健全, 通过神经系统调节体温的能力差, 对环境的温度要求较高。当环境温度低到一定范围时, 仔猪则会冻僵、冻死。所以, 必须做好仔猪的保温工作。仔猪自动温控系统的安装, 与传统常规保温灯相比, 节能约 2/3, 且不易损坏; 温度可自动调控, 可调高温为 80℃, 可根据仔猪不同的生长阶段所需不同环境温度而进行温度调节。该场一般第 1 天调到 36~40℃, 以后每天降 1℃, 一直降到 28℃为适, 这样的温度调节, 为哺乳仔猪生存提供一个健康生长发育的良好环境。该养殖场仔猪断奶成活率达到 98%。

自动输料系统的设置, 不但降低劳动强度、节约劳动成本、减少喂程时间, 而且喂量准确, 还可根据不同个体的饲料需求, 进行个别自动控制喂量。

量存在差异这一特性,为流式细胞仪进行 X、Y 精子的分离奠定了理论基础。

2 荧光染料 Hoechst33342 与精子细胞定量结合特性

在精子分离的前期处理时应用的染色剂 Hoechst33342 是一种相对安全的只对活细胞中 DNA 染色的荧光染料,它能穿透活细胞的脂质膜,以非嵌入方式特异性与 DNA 结合。其特性在于渗透入精子细胞后,对精子细胞的活力、受精的胚胎及后代个体发育不会造成显著影响。

3 精子细胞分选的技术及原理

取定量活力在 70%以上,精子密度为(9~14) × 10⁸ 个/mL 原精液,用 HEPES 缓冲液稀释至 2 × 10⁸ 个/mL,加入定量的 Hoechst33342 荧光染料,经 34℃ 的水浴处理后,置于分离仪上样仓。当经荧光染色标记的精子细胞被高压压入细微进样管经流动室时被具有导电特性的鞘液包裹,形成单个细胞的微小液滴,并被排成单列,液滴以一定速度从流动室 70 μm 喷嘴喷出,并逐个与激光束交截。被染色的精子细胞被激发出蓝色激发光,由于 X 精子 DNA 含量较 Y 精子多,比 Y 精子结合更多的荧光染料,因此经激光束激发释放出强弱不同的荧光信号,信号经流式细胞仪自带的计算机系统扩增放大并且定位分析后做出判断,分辨出 X 精子、Y 精子或是模糊难以分辨精子,同时在计算机上设定程序,根据分辨结果给每个包裹单个 X 精子或 Y 精子的液滴附予正电荷或负电荷。在微小液滴通过流动室中部的超高频压电晶体偏转板时,充电振动,在高压电场的作用下偏转,分路落入各自的收集容器中,没有充电的模糊精子液滴落入中间的废液容器,从

而实现细胞的分离。目前,先进的流式细胞仪分选速度理论上可达 20 000 个细胞/s 以上,其分选纯度能达到 90%以上,一次分离的最大合理量约为 10⁸ 个细胞。如果分选的精液样本量大时,为避免细胞活性降低,可采取分段式收集。

4 流式细胞仪分选过程中对精子产生损伤的几个因素

在分离精子的过程中,对精液的高度稀释、荧光染色、分离过程中的激光照射、高压机械损伤以及分离后的离心作用等诸多操作都不同程度地影响精子的生理机能;尤其对精子细胞最外层的细胞膜造成损伤,直接影响精子活力,顶体完整率、线粒体活性和获能状况,并使得分选的精子存活时间和受精能力下降。

5 性控冻精用于奶牛生产前景展望

近年来,流式细胞分离仪用于分选奶牛精液的技术趋于成熟,分选精子细胞的效率也大幅提高,其用于生产实践中显示出了较大的优势,但目前这项技术的应用还存在许多问题。首先,生产成本较高,流式细胞仪价格昂贵,专利技术使用及后期维护费用也较高,增加了生产成本;其次,虽然分选精子的速度较早期有了明显提高,但还远不能满足现在生产所需;再次,研究表明性控冻精的受精能力明显低于常规冻精的受精能力,通过试验证实,母牛使用性控冻精(每只细管精子数 2 × 10⁶ 个)的受孕率为常规冻精(每只细管精子数 20 × 10⁶ 个)受孕率的 60%~80%,单位细管的精子数量和精子在分离过程中受到的损伤是产生这一现象的主要原因,因此,设法减少精子在分离过程中的损伤和进一步提高分选效率,是今后性控精液分离技术发展的重点方向。

羊常用的多汁饲料

羊常用的多汁饲料有胡萝卜、甘薯、马铃薯、甜菜、甘蓝、萝卜、西葫芦、南瓜及青贮饲料等。这类饲料松软多汁,含有丰富的维生素和糖类,粗纤维少,适口性好,容易消化,能促进泌乳,增进健康,是羊越冬期间不可缺少的饲料。饲喂时,应洗净,切成小块或片状、丝状,块大容易造成食道梗塞。染有黑斑病的甘薯和发芽的马铃薯不能喂羊,否则容易发生黑斑病中毒或龙葵中毒。

来源:安徽日报农村版