

猪精液 0.5 ml 细管快速冷冻和解冻方法的优化

杜立银^{1,2}, 曹少先¹, 刘铁铮¹

(¹江苏省农业科学院畜牧研究所, 南京 210014; ²内蒙古民族大学动物科学技术学院, 内蒙古通辽 028042)

摘要: 【目的】优化冷冻-解冻方法, 提高 0.5 ml 细管快速冷冻保存猪精液的质量。【方法】冷冻方法: 分别将细管水平置于液氮面上方 3、5、7、9 和 11 cm 处, 每一水平位置细管分别熏蒸 3、5、10、15 和 20 min 后投入液氮保存, 37℃ × 30 s 水浴解冻, 确定最优冷冻方法; 在选择最优冷冻方法的基础上, 分别采用 37℃ × 30s (对照组)、42℃ × 25 s、47℃ × 20 s、52℃ × 15 s、57℃ × 10 s 和 62℃ × 5 s 共 6 种方法水浴解冻, 确定最佳解冻方法。【结果】采用 3 cm × 10 min 冷冻方法, 解冻 0、8 h 精液中精子活率、质膜完整率和顶体完整率均最高。采用相对“高温短时”解冻, 精子活率、质膜完整率、顶体完整率和线粒体膜电位均较高, 同时丙二醛浓度降低; 57℃ × 10 s 和 62℃ × 5 s 解冻的精子各项指标无显著差异 ($P > 0.05$), 但前 4 项指标显著高于对照组 ($P < 0.05$), 丙二醛浓度显著降低 ($P < 0.05$)。【结论】优化猪精液 0.5 ml 细管快速冷冻的冷冻和解冻方法可以显著提高解冻质量, 采用 3 cm × 10 min 冷冻、57℃ × 10 s 或 62℃ × 5 s 解冻方法效果最佳。

关键词: 优化; 冷冻-解冻方法; 快速冷冻; 0.5 ml 细管; 猪精液

Optimization of Freezing and Thawing Protocol of Rapid Freezing Techniques of Boar Semen in 0.5 ml Straws

DU Li-yin^{1,2}, CAO Shao-xian¹, LIU Tie-zheng¹

(¹Institute of Animal Husbandry, Jingsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014; ²College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028042, Inner Mongolia)

Abstract: 【Objective】 This study was performed to optimize freezing and thawing protocol of rapid boar seminal cryopreservation in 0.5 ml straws. 【Method】 0.5 ml straws were placed at the height of 3, 5, 7, 9 and 11 cm above liquid nitrogen (LN) for 3, 5, 10, 15 and 20 min in polyethylene box, respectively. And the optimal freezing protocol was determined after straws were frozen in LN and thawed in water bath at 37℃ for 30 s. The optimal thawing protocol was determined from six basal protocols, including 37℃ for 30 s, 42℃ for 25 s, 47℃ for 20 s, 52℃ for 15 s, 57℃ for 10 s and 62℃ for 5 s. 【Result】 In twenty-five freezing protocol, both at post-thawed 0 h and 8 h, the percentages of TMS, PMI and NAR of spermatozoa were highest in semen frozen at 3 cm for 10 min. In six thawing protocols, the percentages of TMS, PMI, NAR and Mt-MP of spermatozoa were higher, and the concentration of MDA was lower in semen thawed at higher temperature. Moreover, compared with the control, the percentages of TMS, PMI, NAR and Mt-MP were increased ($P < 0.05$) and the concentration of MDA was decreased significantly ($P < 0.05$) in semen thawed at 57℃ for 10 s and 62℃ for 5 s, and there was no difference between thawed at 57℃ for 10s and 62℃ for 5s ($P > 0.05$). 【Conclusion】 For the rapid freeze-thawing method of this experiment, adopting optimized freezing and thawing protocol increased the quality of thawed semen, meanwhile, freezing 0.5 ml straws at 3 cm for 10 min and thawing at 57℃ for 10 s or 62℃ for 5 s were the optimal protocol.

Key words: optimization; freezing and thawing protocol; rapid freezing; 0.5 ml straw; boar semen

收稿日期: 2008-08-25; 接受日期: 2008-12-09

基金项目: 江苏省农业自主创新资金 (cx(08)104)、江苏省农业科学院博士后研究项目 (026016510602)、内蒙古民族大学博士基金 (BS020)

作者简介: 杜立银 (1972—), 男, 内蒙古通辽人, 副教授, 研究方向为动物遗传育种与种质资源保存。Tel: 13298094887; E-mail: dlyzz2000@yahoo.com.cn; 通信作者刘铁铮 (1946—), 男, 江苏南京人, 研究员, 研究方向为动物遗传育种。Tel: 025-84390352; E-mail: tzliu@263.net

0 引言

【研究意义】猪精液快速冷冻保存技术尚不完善, 冷冻和解冻是其中的两个关键步骤, 进一步优化冷冻和解冻方法对于提高猪冻精的质量十分必要。【前人研究进展】利用目前已知最优猪精液冷冻保存技术, 冷冻-解冻活力仍低于 50%, 规模化生产甚至很难超过 30%^[1], 而且一般以颗粒冻精、扁平塑料袋和 0.25 ml 细管的冷冻效果较好^[2]。程序化冷冻猪精液的结果表明, 0.5 ml 细管的最佳降温速度为 30℃·min⁻¹, 但不同报道的差异较大^[3-4]。【本研究切入点】猪精液的快速冷冻法具有操作简便、对设备要求低、利于推广应用等特点, 目前尚无 0.5 ml 细管的通用冷冻程序, 系统优化冷冻和解冻方法的研究报道也较少。【拟解决的关键问题】本试验采用聚乙烯保温箱液氮冷冻保存法, 以解冻后精子活率、质膜完整性、顶体完整性为评价指标优化冷冻方法, 结合丙二醛和线粒体膜活性指标优化解冻方法, 为提高猪精液 0.5 ml 细管快速冷冻的冷冻-解冻质量提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验设计

冷冻方法: 利用自制冷冻栅架(20 cm×12 cm×12 cm, PP 材料) 将 0.5 ml 细管分别水平置于聚乙烯保温箱(内径为 46 cm×35 cm×25 cm, 壁厚 2.5 cm) 内液氮面(液氮面距箱底 15 cm) 上方 3、5、7、9 和 11 cm 处, 每一水平高度的细管分别熏蒸 3、5、10、15 和 20 min 后投入液氮保存(共 25 个处理, 5 支细管/处理, 重复 5 批次)。通过评价 37℃×30 s 水溶解冻后 0、8 h 精子活率、质膜完整性和顶体完整性, 确定最优冷冻方法。

在最优冷冻方法基础上, 采用 37℃×30 s(对照组)^[5]、42℃×25 s、47℃×20 s、52℃×15 s、57℃×10 s 和 62℃×5 s 共 6 种水溶解冻方法, 通过评价解冻精液的精子活率、质膜完整性、顶体完整性和线粒体膜活性和 MDA 浓度, 确定最佳解冻方法。

1.2 精液采集

选用江苏省宜兴 TOPIG 国际(中国)种猪扩繁场中 2~3 岁、健康、性欲旺盛的 30 系公猪 3 头, 徒手把握法采集射出精液中段浓稠部分(活力≥0.9, 密度≥3.0×10⁸ 精子/ml), 混匀, 22℃静置 1 h, 备用。

1.3 主要试剂与仪器

OEP (orvus ES paste, NOVA Chemical sales 公

司)、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(碧云天生物技术研究所)、0.5 ml 细管及封口粉(沈阳富士平公司)、MDA 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所), 其它试剂为 A.R.级; 荧光显微镜(OLYMPUS-CX 41), 倒置相差显微镜(OLYMPUS-T041), 紫外分光光度仪(UV-757 型)。

1.4 冷冻保存基本过程

精液经 22℃静置 1 h 后, 用等温 BTS (Beltsville Thawing Solution)^[6] 稀释液按 1:1 (v/v) 稀释, 充分混匀, 1 h 内降温至 15℃, 15℃平衡 2 h; 1 600×g 离心 5 min, 弃掉上清, 用乳糖-卵黄冷冻稀释液(11% 乳糖液: 卵黄=4:1, v/v) 充分重悬, 1 h 内降到 5℃, 5℃平衡 2 h; 加入含甘油-乳糖-卵黄冷冻保护液, 使精液终浓度达 1.5×10⁹~2.0×10⁹ 精子/ml, 甘油终浓度为 3%, 装入 0.5 ml 细管冷冻保存。

1.5 测定指标与方法

活率 (Total motile sperm, TMS, %): 等温 BTS 适度稀释解冻精液, 37℃温育, 显微镜(400×) 观察计数运动精子占计数总精子数百分率。

质膜完整率 (plasma membrane integrity, PMI, %): 采用精子低渗肿胀试验^[7], 显微镜(400×) 下观察计数尾部呈“g”型肿胀精子的百分率。

顶体完整率 (normal acrosomal ridge, NAR, %): 取适度稀释的解冻精液 50 μl, 加至 1 ml 生理盐水中, 2 400×g 离心 1 min, 弃掉上清; 用 1 ml 3.7% 多聚甲醛 / PBS 充分悬浮, 室温固定 30 min; 离心, 弃掉上清; 1 ml PBS 悬浮, 离心, 弃掉上清; 适量 PBS 悬浮, 涂片, 空气干燥; 0.22% 考马斯亮蓝 G-250 (含 50% 甲醇和 10% 冰乙酸的水溶液) 染色 5 min; ddH₂O 冲洗载玻片表面染色液, 空气干燥; 树胶封片, 镜检计数(顶体完整精子的顶体呈蓝色, 边缘光滑)。

线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, Mt-MP, %): 按 JC-1 试剂盒说明操作, 在荧光显微镜观察计数尾部呈橘红色荧光精子百分率(呈绿色荧光则表示膜电位极低或丧失)。

丙二醛 (malondialdehyde, MDA): 采用硫代巴比妥酸法测定 (BTS 等体积稀释解冻精液, 1 500×g 离心 10 min, 吸取上清, 然后按试剂盒说明操作)。

1.6 数据统计

试验数据应用 SPSS13.0 统计软件 ANOVA 进行方差分析, DUNCAN 法进行多重比较检验差异显著性 ($P<0.05$), 数据为 5 次重复平均值 (Mean ± SEM)。

2 结果与分析

2.1 不同冷冻方法对精液质量的影响

解冻 0、8 h 后各项精液指标见表 1 和表 2。

由表 1 可见, 随熏蒸时间的延长, 在同一熏蒸高度的解冻 0 h 精液中, 11、9 cm 处熏蒸的精子 TMS、PMI 与 NAR 百分率均呈渐增趋势, 7 cm 处熏蒸的精子 TMS 和 NAR 则以 15 min 为拐点先升后降, 同时 PMI 亦未显著升高 ($P>0.05$), 5、3 cm 处熏蒸的精子 TMS、PMI 和 NAR 均以熏蒸 10 min 为拐点先升后

降, 且在 3 cm 处熏蒸 10 min、15 min 后, 前者的精子 TMS、NAR 显著高于后者 ($P<0.05$); 在熏蒸时间相同时, TMS、PMI 和 NAR 均随熏蒸高度的降低呈渐增趋势 (3 cm \times 20 min 除外), 3 cm 处熏蒸 10 min 的 TMS、PMI 和 NAR 均最高, 并且 NAR 显著高于熏蒸 5 min、15 min ($P<0.05$)。由表 2 可见, 冷冻-解冻精液保存 8 h 后, 精子 TMS、PMI 和 NAR 变化规律与解冻 0 h 相似。表明快速冷冻时 0.5 ml 细管的熏蒸高度、时间与猪精液的解冻质量密切相关, 采用 3 cm \times 10 min 冷冻法不仅解冻效果最佳, 而且精子结

表 1 不同冷冻方法的冷冻猪精液解冻 0 h 后 TMS, PMI 和 NAR

Table 1 TMS, PMI and NAR of boar semen treated with different freezing protocols at 0 h post-thawing (Mean \pm SEM)

项目 Items	熏蒸高度 Freezing height (cm)	熏蒸时间 Freezing time (min)				
		3	5	10	15	20
活率 Total motile spermatozoa (TMS, %)	11	14.25 \pm 0.23eC	14.96 \pm 0.39eBC	15.54 \pm 0.22eB	17.29 \pm 0.30dA	18.00 \pm 0.11adA
	9	15.77 \pm 0.22dD	16.22 \pm 0.67dD	17.85 \pm 0.23dC	18.93 \pm 0.23cB	20.27 \pm 0.12cA
	7	18.65 \pm 0.12cC	21.00 \pm 0.38cB	23.19 \pm 0.09cA	23.20 \pm 0.33bA	23.00 \pm 0.41bA
	5	23.66 \pm 0.45bD	26.44 \pm 0.34bBC	27.51 \pm 0.45bA	26.72 \pm 0.08aAB	25.76 \pm 0.21aC
	3	26.13 \pm 0.13aC	28.54 \pm 1.00aA	28.85 \pm 0.31aA	27.69 \pm 0.09aB	24.91 \pm 0.24aD
质膜完整性 Plasma membrane integrity (PMI, %)	11	4.73 \pm 0.20cC	4.88 \pm 0.07cC	5.08 \pm 0.21cBC	6.05 \pm 0.38cAB	6.44 \pm 0.14bA
	9	5.16 \pm 0.33cB	5.51 \pm 0.28cB	5.93 \pm 0.34cAB	6.47 \pm 0.23cA	6.88 \pm 0.23bA
	7	6.52 \pm 0.18bB	6.78 \pm 0.34bAB	7.43 \pm 0.23bAB	7.52 \pm 0.15bA	7.70 \pm 0.29abA
	5	8.18 \pm 0.23aA	8.66 \pm 0.40aA	8.89 \pm 0.22caA	8.72 \pm 0.34aA	8.30 \pm 0.17aA
	3	8.61 \pm 0.34aBC	9.37 \pm 0.35aAB	9.68 \pm 0.63aA	9.22 \pm 0.27aA	8.17 \pm 0.12aC
顶体完整性 Normal acrosomal ridge (NAR, %)	11	9.64 \pm 0.18eC	16.38 \pm 0.30eB	19.92 \pm 0.24eA	20.34 \pm 0.41dA	20.48 \pm 0.33dA
	9	13.20 \pm 0.30dD	20.74 \pm 0.14dC	22.90 \pm 0.22dB	26.20 \pm 0.25cA	26.73 \pm 0.36cA
	7	20.83 \pm 0.17cD	26.72 \pm 0.33cC	29.97 \pm 0.25cA	31.16 \pm 0.23bA	28.21 \pm 0.34bB
	5	27.48 \pm 0.33bD	31.38 \pm 0.25bC	34.82 \pm 0.29bA	33.48 \pm 0.30aB	31.32 \pm 0.30aC
	3	31.58 \pm 0.13aC	34.54 \pm 0.22aB	36.24 \pm 0.32aA	34.86 \pm 0.44aB	31.10 \pm 0.36aC

小写英文字母表示同列数据差异显著 ($P<0.05$), 大写英文字母表示同行数据差异显著 ($P<0.05$)。下同

Values with different small letter superscripts means significant difference ($P<0.05$) in the same column, while different capital superscripts means significant difference in the same line ($P<0.05$). The same as below

构和功能的潜在性损伤也较低。

2.2 不同解冻方法对精液质量的影响

结果见表 3。由表 3 可见, 精子 TMS、PMI、NAR 和 Mt-MP 百分率随解冻温度的提高逐渐升高, MDA 浓度则依次降低。与对照组 (37 $^{\circ}$ C \times 30 s) 相比, 42 $^{\circ}$ C \times 25 s 解冻后 TMS、PMI、NAR 显著升高 ($P<0.05$), 但 Mt-MP 升高与 MDA 降低均不显著 ($P>0.05$); 47 $^{\circ}$ C \times 20 s 解冻后, TMS、PMI 和 NAR 显著高于 42 $^{\circ}$ C \times 25 s ($P<0.05$), 但 Mt-MP 与 MDA 浓度仍无显著变化 ($P>0.05$); 52 $^{\circ}$ C \times 15 s 解冻后, PMI

和 NAR 显著高于 47 $^{\circ}$ C \times 20 s ($P<0.05$), 但 TMS、Mt-MP 及 MDA 变化不显著 ($P>0.05$); 57 $^{\circ}$ C \times 10 s 解冻后, PMI、NAR 和 Mt-MP 显著高于 52 $^{\circ}$ C \times 15 s ($P<0.05$), 但 TMS 和 MDA 变化不显著 ($P>0.05$); 62 $^{\circ}$ C \times 5 s 解冻后, 上述指标与 57 $^{\circ}$ C \times 10 s 均无差异 ($P>0.05$); 且 57 $^{\circ}$ C \times 10 s 和 62 $^{\circ}$ C \times 5 s 后精子 TMS、PMI、NAR 和 Mt-MP 百分率均显著高于对照组 ($P<0.05$), 同时 MDA 浓度显著降低 ($P<0.05$)。表明采用 57 $^{\circ}$ C \times 10 s 或 62 $^{\circ}$ C \times 5 s 方法的解冻效果较好。

表 2 不同冷冻方法处理的猪冷冻精液解冻 8 h 后精子 TMS, PMI 和 NAR

Table 2 TMS, PMI and NAR of boar semen treated with different freezing protocols at 8 h post-thawing (Mean \pm SEM)

项目 Items	熏蒸高度 Freezing height (cm)	熏蒸时间 Freezing time (min)				
		3	5	10	15	20
活率 Total motile spermatozoa(TMS, %)	11	11.67 \pm 0.98eD	12.80 \pm 0.89eC	14.45 \pm 0.98eB	15.67 \pm 0.17dA	15.26 \pm 0.29dAB
	9	13.00 \pm 1.11dD	14.34 \pm 0.12dC	16.01 \pm 0.09dB	17.45 \pm 0.11cA	16.85 \pm 0.10cAB
	7	16.76 \pm 0.22cD	18.63 \pm 0.10cC	21.65 \pm 0.20cA	21.52 \pm 0.32bB	20.98 \pm 0.13bB
	5	19.36 \pm 0.23bC	22.00 \pm 0.14bB	24.17 \pm 0.25bA	24.00 \pm 0.42aA	22.19 \pm 0.10aB
	3	21.79 \pm 0.22aC	25.12 \pm 0.15aB	27.33 \pm 0.24aA	24.75 \pm 0.30aB	21.52 \pm 0.20abC
质膜完整性 Plasma membrane integrity (PMI, %)	11	3.76 \pm 0.11cB	4.25 \pm 0.23cAB	4.74 \pm 0.40cA	4.78 \pm 0.32dA	4.40 \pm 0.34cAB
	9	4.40 \pm 0.18cC	4.79 \pm 0.09cBC	5.37 \pm 0.12cAB	5.82 \pm 0.25cA	6.27 \pm 0.21bA
	7	5.77 \pm 0.23bC	6.22 \pm 0.34bBC	6.65 \pm 0.25bABC	7.01 \pm 0.33bAB	7.23 \pm 0.30abA
	5	7.00 \pm 0.16aB	7.74 \pm 0.25aAB	8.45 \pm 0.14aA	8.30 \pm 0.09aA	7.68 \pm 0.30aAB
	3	7.49 \pm 0.10aBC	8.23 \pm 0.33aAB	9.10 \pm 0.22aA	8.66 \pm 0.22aA	7.22 \pm 0.41abC
顶体完整性 Normal acrosomal ridge (NAR, %)	11	6.92 \pm 0.20eC	10.98 \pm 0.18eB	14.30 \pm 0.32eA	14.38 \pm 0.30dA	14.88 \pm 0.22dA
	9	10.62 \pm 0.19dD	15.56 \pm 0.26dC	17.72 \pm 0.22dB	21.28 \pm 0.22cA	21.84 \pm 0.35cA
	7	16.80 \pm 0.13cE	20.66 \pm 0.34cD	24.64 \pm 0.23cB	26.00 \pm 0.22bA	22.92 \pm 0.36cC
	5	21.53 \pm 0.34bC	24.90 \pm 0.22bB	29.89 \pm 0.18bA	30.30 \pm 0.33aA	25.25 \pm 0.11aB
	3	24.96 \pm 0.33aD	29.00 \pm 0.24aC	32.55 \pm 0.14aA	31.34 \pm 0.71aB	23.89 \pm 0.25bE

表 3 不同解冻方法的解冻效果

Table 3 Results of different thawing protocols on frozen boar semen (Mean \pm SEM)

解冻方法 Thawing protocol	活率 Total motile spermatozoa (TMS, %)	质膜完整性 Plasma membrane integrity (PMI, %)	顶体完整性 Normal acrosomal ridge (NAR, %)	线粒体膜电位 Mitochondrial membrane potential (Mt-MP, %)	丙二醛 Malondialdehyde (MDA, nmol·L ⁻¹)
37°C×30s	41.35 \pm 0.22a	11.24 \pm 0.32a	43.84 \pm 0.08a	37.40 \pm 0.26a	2.25 \pm 0.25a
42°C×25s	42.93 \pm 0.30b	11.93 \pm 0.20ab	45.53 \pm 0.19b	37.48 \pm 0.15ab	2.23 \pm 0.10a
47°C×20s	44.73 \pm 0.40c	12.39 \pm 0.31bc	47.48 \pm 0.40c	38.12 \pm 0.41ab	2.13 \pm 0.08a
52°C×15s	45.07 \pm 0.14cd	13.07 \pm 0.30c	49.28 \pm 0.11d	39.00 \pm 0.23bc	2.06 \pm 0.15ab
57°C×10s	45.94 \pm 0.20de	13.72 \pm 0.37cd	51.53 \pm 0.23e	40.56 \pm 0.08d	1.86 \pm 0.03bc
62°C×5s	46.59 \pm 0.24e	14.26 \pm 0.34d	51.56 \pm 0.32e	40.75 \pm 0.19d	1.65 \pm 0.11c

3 讨论

3.1 冷冻方法

在正常情况下,猪射出精液中大约 50% 精子能够耐受冷冻和解冻过程^[8],冷冻和解冻过程中各种物理和化学应激均可导致精子活率及受精力的降低^[9]。目前程序化冷冻(慢速冷冻)的猪精液,其解冻效果优于聚乙烯保温箱液氮冷冻(快速冷冻)^[10],并且 0.25 ml 细管、扁平袋保存的冻精活力、顶体完整率及穿卵率等也显著高于 0.5 ml 或 5 ml 细管^[2,11]。因此,优化高浓度(1.5 \times 10⁹ 个精子/ml) 0.5 ml 细管猪精液的快速冷冻和解冻方法,对于完善猪精液冷冻保存技术、

促进猪精液冷冻在生产中的应用十分必要。

降温速率及其精确性显著影响冷冻-解冻猪精液质量。在本试验,快速冷冻的猪精液解冻 0、8 h 后,采用 3 cm \times 10 min 方法效果最好,TMS、PMI 和 NAR 百分率均高于或显著高于其它方法。冷冻过程中能否避免降温速率诱发细胞“溶解液效应”和细胞内植冰是衡量冷冻方法优劣的关键。程序化冷冻 0.5 ml 细管猪精液的理想降温速率为 30°C·min⁻¹,降温速度相对较慢会加剧精子的冷冻损伤,增加精子质膜的损伤率^[12],但也有人认为降温速度为 40°C·min⁻¹的冷冻-解冻猪精液的 TMS 和 PMI 较高^[3,13]。本试验选择测定液氮面上方 3、5 和 7 cm 处的降温速率分别为 55、40

和 $31^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 而以 $55^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 为宜, 但 TMS、PMI 和 NAR 百分率仍低于程序化冷冻^[14-15], 这除了与程序冷冻的“精细化”密切相关外, 乳糖-卵黄冷冻液中未添加 OEP 也是重要原因之一。目前大量研究^[16-18]证实, OEP 在精液冷冻过程中可以显著保护精子, 提高猪精液的冷冻-解冻效果。

3.2 解冻方法

精子 TMS、PMI 和 NAR 是评价精子功能状态和结构的重要指标, 与活性氧 (ROS) 诱发的精子质膜过氧化损伤程度密切相关。研究^[19-20]发现, 冷冻-解冻均可增加精液的 ROS 浓度, 使精子质膜过氧化加剧, 质膜过氧化产物-MDA 浓度升高。本试验采用相对“高温短时”解冻不仅提高了 TMS、PMI 和 NAR 百分率, 同时降低了 MDA 浓度, 特别是 $57^{\circ}\text{C}\times 10\text{ s}$ 和 $62^{\circ}\text{C}\times 5\text{ s}$ 解冻的效果显著优于对照组, 二者之间无差异。目前, 探讨 0.5 ml 细管猪冷冻精液解冻方法的报道较少, 结果也不尽相同。一般认为^[4], 快速解冻有利于保持精子活力, 0.5 ml 细管适宜解冻速率约为 $120^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 但大多数试验采用 $37^{\circ}\text{C}\times 30\text{ s}$ 解冻方法。Sellés 等^[5]发现, 与 $37^{\circ}\text{C}\times 30\text{ s}$ 相比, 采用 $50^{\circ}\text{C}\times 12\text{ s}$ 解冻的猪精液精子体外穿卵率、原核形成率和受胎率较高。同样, 在 $50^{\circ}\text{C}\times 40\text{ s}$ 解冻的 5 ml 细管猪精液中, 精子染色体完整率高于 $42^{\circ}\text{C}\times 40\text{ s}$ ^[21]。说明尽管不同试验的评价指标和结果有所差异, 但与本试验结果相近。

精子运动依赖于线粒体所提供的 ATP, Mt-MP 高表明线粒体提供精子运动 ATP 的能力强, 从而提高精子活力及其受精能力。目前, JC-1 是精子 Mt-MP 检测较理想的荧光探针之一, Mt-MP 升高, 精子尾部呈橘红色荧光, Mt-MP 降低则渐呈绿色荧光。此法不但灵敏快速, 其染色阳性率与精子活力高度正相关^[22-24]。本试验采用 $57^{\circ}\text{C}\times 10\text{ s}$ 或 $62^{\circ}\text{C}\times 5\text{ s}$ 解冻后, 精子尾部呈橘红色的百分率显著高于 $37^{\circ}\text{C}\times 30\text{ s}$ 。表明“高温短时”解冻有利于抑制精子质膜的氧化损伤、提高精子 TMS、PMI、NAR 和 Mt-MP 百分率。

4 结论

4.1 通过优化快速冷冻方法, 显著提高了 0.5 ml 细管冷冻保存猪精液的解冻质量, 本试验范围内采用 $3\text{ cm}\times 10\text{ min}$ 冷冻的效果最佳;

4.2 优化解冻方法可显著提高 0.5 ml 细管冷冻保存猪精液的解冻效果, 本试验范围内 $57^{\circ}\text{C}\times 10\text{ s}$ 或 $62^{\circ}\text{C}\times 5\text{ s}$ 解冻方法较好。

References

- [1] Zeng W X, Terada T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, 2001, 22(1): 111-118.
- [2] Córdova A, Pérez J F, Lleó B, García A C, Martín R S. *In vitro* fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Reproduction in Domestic Animals*, 2001, 36(3-4): 199-202.
- [3] Thurston L M, Holt W V, Watson P F. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology*, 2003, 60(1): 101-113.
- [4] Medrano A, Watson P F, Holt W V. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*, 2002, 123: 315-322.
- [5] Sellés E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S. Analysis of *in vitro* fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 2003, 38(1): 66-72.
- [6] Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, 2001, 121: 395-401.
- [7] Van der Ven H H, Jeyendran R S, Alhasani S, Perez-Pelaez M, Diedrich K, Zaneveld L J D. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and *in vitro* fertilization. *Journal of Andrology*, 1986, 7(3): 190-196.
- [8] Hernandez M, Roca J, Calvete J J, Sanz L, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez J A, Va Zquez J M, Martínez E. Cryosurvival and *in vitro* fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *Journal of Andrology*, 2007, 28: 690-697.
- [9] Gadea J, García-Vazquez F, Matás C, Gardón J, Cánovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *Journal of Andrology*, 2005, 26: 396-404.
- [10] Hammadeh M E, Szarvasy D, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W. Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow(programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2001, 18: 364-370.
- [11] Eriksson B M, Rodriguez-Martinez H. Deep-freezing of boar semen in plastic film 'cochettes'. *Journal of Veterinary Medicine, Series A*, 2000, 47(2): 89-97.
- [12] Guthrie H D, Welch G R. Effects of hypothermic liquid storage and

- cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 2005, 17: 467-477.
- [13] Kumar S, Millar J D, Watson P F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 2003, 46: 246-253.
- [14] Cremades T, Roca J, Rodriguez-Martinez H, Abaigar T, Vazquez J M, Martinez E A. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, 2005, 26: 610-618.
- [15] Fernando S, Margareta W, Szabolcs N, Anders J. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, 2005, 63: 1320-1333.
- [16] Pettitt M J, Buhr M M. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation. *Journal of Andrology*, 1998, 19: 736-738.
- [17] Guthrie H D, Welch G R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, 2006, 84: 2089-2100.
- [18] Roca J, Gil M A, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez J M, Martinez E A. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology*, 2004, 25: 397-405.
- [19] Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, María Vázquez J, Martínez E A, Roca J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *Journal of Andrology*, 2004, 25: 389-396.
- [20] Bailey J L, Bilodeau J F, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 2000, 21: 1-3.
- [21] Córdova-Izquierdo A, Oliva J H, Lleó B, García-Artiga C, Corcuera B D, Pérez-Gutiérrez J F. Effect of different thawing temperatures on the viability, *in vitro* fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 ml straws. *Animal Reproduction Science*, 2006, 92(1): 145-154.
- [22] Garner D L, Thomas C A. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 1999, 53: 222-229.
- [23] Gravance C G, Garner D L, Miller M G, Berger T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reproductive Toxicology*, 2001, 15: 5-10.
- [24] Pena F J, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 2003, 78: 85-98.

(责任编辑 高 雨, 林鉴非)