

分类号：
学 号：

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



甘油、DMA 及大豆卵磷脂对绵羊精液冷冻及低温 保存效果的影响

学 位 申 请 人	郝冠英
指 导 教 师	万鹏程 研究员 韩吉龙 副教授
申 请 学 位 类 别	专业硕士
专 业 名 称	农业
研 究 领 域	畜牧
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2022年05月

**Effects of glycerin, DMA and soy lecithin on freezing and
cryopreservation of semen in sheep**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Agriculture

By

HaoGuanying

(Animal reproductive physiology and reproduction)

Dissertation Supervisor: Prof. Pengcheng Wan

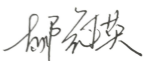
Associate Professor. Jilong Han

May, 2022

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明


本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其它个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 


时间： 2020 年 10 月 22 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 

时间： 2022 年 10 月 22 日

导师签名： 

时间： 2022 年 10 月 22 日

本研究经费资助

褪黑素对绵羊 IVF 胚胎质量和冷冻效率的影响机制

项目编号：MYSKLF202002

国家绒毛用羊产业技术体系

项目编号：CARS-39-07

兵团中青年科技创新领军人才计划

项目编号：2018CB025

省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室重大项目

项目编号：2021ZD03

摘要

【目的】为了提高优良种公羊利用效率，促进养羊产业良种化进程和养殖经济效益，也为了提高冷冻或低温保存精液的授精能力，本研究分析比较了不同的精液保护剂对精液冷冻保存、低温保存效果的影响，筛选出绵羊适宜应用的较佳精液冷冻、低温保存稀释液。

【方法】（1）探讨甘油、二甲基乙酰胺（Dimethylacetamide, DMA）以及甘油+DMA 联合应用对绵羊精液冷冻保存的效果，不同配比稀释液对精液冷冻-解冻后分析精子活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率、DNA 完整率等检测指标的影响，确定冷冻稀释液的最佳浓度。（2）冷冻保存试验组用作低温保存试验组，分析精子活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率、DNA 完整率等检测指标的影响，确定低温稀释液的最佳浓度，得出甘油与 DMA 联合应用最佳浓度。（3）探讨甘油与 DMA 联合应用最佳浓度与不同浓度大豆卵磷脂（Soy Lecithin, SL）对绵羊精液低温保存的效果，通过分析不同配比稀释液对精液低温保存后精子活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率、DNA 完整率和 ATP 水平等指标，探讨其对绵羊精液低温保护作用的影响。数据采用 IBM SPSS 20 进行单因素方差分析。

【结果】（1）在精液冷冻-解冻过程中，Tris 稀释液中添加 2.5 %甘油+2.5 % DMA 组复温后的精子活力（ $50.70 \pm 4.23\%$ ）、活率（ $64.03 \pm 1.98\%$ ）、直线速率（ $20.02 \pm 1.78 \text{ um/s}$ ）、曲线速率（ $64.70 \pm 5.47 \text{ um/s}$ ）、顶体完整率（ $46.96 \pm 2.05\%$ ）、DNA 完整率（ $48.69 \pm 5.72\%$ ）与 3 %甘油+2 %DMA 差异不显著（ $P > 0.05$ ）；但显著高于其它组（ $P < 0.05$ ）。（2）精液低温保存过程中，分别以 4 h、12 h、24 h、36 h、48 h 为时间节点进行精子活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整、DNA 完整率以及 ATP 水平的测定，Tris 稀释液中添加 2.5 %甘油+2.5 % DMA 低温保存效果最佳。（3）以试验二为基础，Tris 稀释液中添加 2.5 %甘油+2.5 % DMA+0.5% SL 在所有时间段内均可达到输精活率（30%）的最低标准。

【结论】综上，（1）在绵羊精液冷冻基础稀释液中添加 2.5 %甘油+2.5 % DMA 的效果显著高于其他组。（2）在 4 h 到 48 h 时，在绵羊精液低温基础稀释液中添加 2.5 %甘油+2.5 % DMA+0.5 % SL，精子低温保存效果最佳，可有效提高精子活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率、DNA 完整率和 ATP 水平。

关键词：绵羊；精液；甘油；二甲基乙酰胺；大豆卵磷脂

Abstract

【Objective】 In order to improve the utilization efficiency of high-quality rams, promote the process of improved breeding in the sheep industry and the economic benefits of breeding, and also to improve the insemination ability of frozen or cryopreserved semen, this study analyzed and compared the effects of different semen protectants on semen cryopreservation and cryopreservation. The best semen freezing and cryopreservation dilutions suitable for sheep were screened out.

【Methods】 (1) To investigate the effects of glycerol, Dimethylacetamide (DMA) and the combined application of glycerol + DMA on the cryopreservation of sheep semen, and the effects of different ratios of diluent on sperm viability, viability, linear rate, curvilinear rate, acrosome integrity rate, DNA integrity rate and other assays after freezing and thawing of semen, and to determine the optimal diluent for freezing concentration. (2) The cryopreservation test group was used as a cryopreservation test group to analyse the effects of sperm viability, viability, linear rate, curve rate, acrosome integrity rate, DNA integrity rate and other assay indicators, to determine the optimal concentration of cryodilution solution and to arrive at the optimal concentration for the combined application of glycerol and DMA. (3) To investigate the effect of the optimal concentration of glycerol and DMA in combination with different concentrations of soy lecithin (SL) on the cryopreservation of sheep semen, and to explore the effect of different ratios of diluent on sperm viability, viability, linear rate, curvilinear rate, acrosome integrity, DNA integrity and ATP level of sheep semen after cryopreservation. The data were collected using IBM SPSS 20 as a single test. The data were analysed by one-way ANOVA using IBM SPSS 20.

【Result】 (1) During the semen freezing-thawing process, the sperm viability (50.70 ± 4.23 %), viability (64.03 ± 1.98 %), linear rate (20.02 ± 1.78 $\mu\text{m/s}$), curve rate (64.70 ± 5.47 $\mu\text{m/s}$), acrosome integrity rate (46.96 ± 2.05 %) and DNA integrity rate (48.69 ± 5.72 %) of the Tris dilution with 2.5 % glycerol + 2.5 % DMA group after rewarming were not significantly different from those of the other groups. 46.96 ± 2.05 %, DNA integrity rate (48.69 ± 5.72 %) were not significantly different from 3 % glycerol + 2 % DMA ($P > 0.05$); however, they were significantly higher than the other groups ($P < 0.05$). (2) During the cryopreservation of semen, sperm viability, viability, linear rate, curvilinear rate, acrosome integrity, DNA integrity and ATP level were measured at 4 h, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h. The addition of 2.5 % glycerol + 2.5 % DMA to Tris dilution solution was the most effective for cryopreservation. (3) On the basis of test 2, the addition of 2.5 % glycerol + 2.5 % DMA + 0.5 % SL in Tris diluent achieved the minimum standard for spermatozoa viability (30 %) for all time periods for transfusion.

【Conclusion】 In summary, (1) the addition of 2.5 % glycerol + 2.5 % DMA to the sheep semen cryobase dilution was significantly more effective than the other groups. (2) The addition of 2.5 % glycerol

+ 2.5 % DMA + 0.5 % SL to the sheep semen cryobase dilution at 4 h to 48 h was the most effective for sperm cryopreservation, effectively increasing sperm viability, viability, linear rate, curve rate, acrosome integrity, DNA integrity and ATP levels.

Key words: sheep; semen; glycerin; dimethylacetamide; soybean lecithin

目录

摘要	I
Abstract	II
目录	IV
英汉缩略语名词对照表	VII
第 1 章 绵羊精液冷冻及低温保存研究进展	1
1.1 前言	1
1.2 精液保存原理及方法	1
1.2.1 精液冷冻保存原理及方法	2
1.2.2 精液低温保存原理及方法	3
1.3 精液保存研究进展	3
1.3.1 精液冷冻保存研究进展	3
1.3.2 精液低温保存研究进展	4
1.4 影响精液冷冻保存及低温保存效果的因素	4
1.4.1 缓冲物质	4
1.4.2 非电解质	5
1.4.3 抗冻剂	5
1.4.4 甘油	6
1.4.5 二甲基乙酰胺	7
1.4.6 卵黄	7
1.4.7 大豆卵磷脂	8
1.4.8 脱脂乳	8
1.4.9 抗氧化物质	8
1.5 绵羊精液品质检查方法	9
1.5.1 精子活力与活率检测	9
1.5.2 精子直线速率与曲线速率检测	9
1.5.3 精子密度检测	10
1.5.4 精子畸形率检测	10
1.5.5 精子质膜完整性检测	11
1.5.6 精子顶体完整性检测	11
1.5.7 精子 ATP 水平检测	11
1.5.8 精子 DNA 完整性的检测	12

1.5.9 精子线粒体功能	12
1.6 问题与展望	13
1.7 研究内容	14
1.8 技术路线	14
第2章 不同抗冻保护剂对绵羊精液冷冻保存效果的影响	15
2.1 前言	15
2.2 试验材料	15
2.2.1 样品采集	15
2.2.2 药品和器械	16
2.3 试验方法	16
2.3.1 精液稀释、收集及冷冻前准备工作	17
2.3.2 精液冷冻与解冻	17
2.3.3 精液质量检测	18
2.3.4 精子顶体完整率检测	18
2.3.5 精子 DNA 完整率检测	18
2.3.6 数据统计分析方法	18
2.4 结果与分析	18
2.4.1 不同浓度甘油对绵羊冻精质量的影响	18
2.4.2 不同浓度二甲基乙酰胺对绵羊冻精质量的影响	19
2.4.3 甘油与 DMA 联合应用对绵羊冻精质量的影响的结果	19
2.5 讨论	21
2.5.1 不同浓度甘油对绵羊冻精质量的影响	21
2.5.2 不同浓度 DMA 对绵羊冻精质量的影响	22
2.5.3 甘油与 DMA 联合应用对绵羊冻精质量的影响的结果	22
2.6 结论	24
第3章 甘油与 DMA 对绵羊精液低温保存效果的影响	25
3.1 前言	25
3.2 试验材料	25
3.2.1 样品采集	25
3.2.2 药品和器械	25
3.3 试验方法	26
3.3.1 精液采集	26
3.3.2 精液低温保存	26
3.3.3 精液质量检测	26

3.3.4 精子顶体完整率检测	26
3.3.5 精子 DNA 完整率检测	26
3.3.6 精子 ATP 水平测定	26
3.3.7 数据统计分析方法	27
3.4 结果与分析	27
3.4.1 甘油和 DMA 联合应用对绵羊低温保存质量的影响	27
3.5 讨论	30
3.6 结论	31
第 4 章 大豆卵磷脂对绵羊精液低温保存效果的影响	32
4.1 前言	32
4.2 试验材料	33
4.2.1 样品采集	33
4.2.2 药品和器械	33
4.3 试验方法	33
4.3.1 精液采集	34
4.3.2 精液低温保存	34
4.3.3 精液质量检测	34
4.3.4 精子顶体完整率检测	34
4.3.5 精子 DNA 完整率检测	34
4.3.6 精子 ATP 水平检测	34
4.3.7 数据统计分析方法	35
4.4 结果与分析	35
4.4.1 不同浓度大豆卵磷脂对精子低温保存效果的影响	35
4.5 讨论	39
4.6 结论	40
第 5 章 全文结论	41
参考文献	42
致谢	50
作者简介	51
石河子大学硕士研究生论文导师评阅表	52

英汉缩略语名词对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
AA	Acetamide	乙酰胺
ATP	Adenosine Triphosphate	三磷酸腺苷
CA	Carnosic Acid	鼠尾草酸
DMA	Dimethylacetamide	二甲基乙酰胺
DMSO	Dimethylsulphoxide	二甲基亚砷
EY	Egg Yolk	卵黄
EG	Ethylene Glycerol	乙二醇
GA	Gallic Acid	没食子酸
GLY	Glycerin	甘油
MeOH	Methyl Alcohol	甲醛
NAC	N-Acetyl-L-Cystein	N-乙酰半胱氨酸
PROH	Propylene Glycerol	1, 2-丙二醇
RLU	Relative Light Unit	相对光单位
SL	Soy Lecithin	大豆卵磷脂

第1章 绵羊精液冷冻及低温保存研究进展

1.1 前言

养羊业是新疆畜牧业的重要组成部分，在国民经济发展中占有举足轻重的地位。随着养殖技术发展和人们对优质肉食产品需求的提高，现代养羊业逐渐从以往传统放牧养殖向规模化、集约化养殖方向发展，在此过程中优良品种发挥着重要的作用。如何最大限度发挥优良种公羊的利用率和繁殖潜力，提高养羊业生产和养殖经济效益，是当前迫切需要解决的突出问题。通过对精液进行冷冻得以长期保存，不仅将优良基因代代相传及长途运输，还可不受时间及地域限制，在母羊最佳繁殖时间进行输精，提高母羊繁殖效率。通过自然交配改良遗传基因是非常缓慢的过程，而人工授精可以提高养羊场中优良种公畜的利用效率和品种改良的速度，也减少了自然交配潜在的疫病传染的概率^[1]。精液的冷冻保存及低温保存是人工授精关键技术环节，精液稀释液减少精子在冷冻保存及低温保存过程中的超低温或低温伤害，能够保护精子平稳度过危险温度区域，为精子提供生存必须的营养物质。优化精液稀释液是精液冷冻保存技术的重要部分。

近年来，为了提高优良种公畜精液冷冻保存的效果，通过不断优化精液稀释液、改进冷冻保存方法等，提高了精液冷冻保存及低温保存的效率^[2]。将 Tris、柠檬酸、果糖、卵黄和甘油等作为精液稀释液成分，使绵羊精子在冷冻状态下能够成功储存数年，在低温（4℃）状态下保存数小时甚至数天之久，之后用于人工授精也能有较高的受胎率^[3]。

综上所述，在畜牧生产中，优化精液稀释液优化为扩大优良种公畜基因、提高品种优良的速度及实现优良种用资源的商业化利用等提供了技术保障^[3]；也为建立种质资源长期保存奠定基础；同时对具有遗传价值的种质资源和濒临灭绝的品种生殖细胞冷冻保存及人类辅助生殖技术的发展都具有十分重要的意义^[4]。

1.2 精液保存原理及方法

精液保存方法分为液态保存与冷冻保存。精液冷冻保存方法包括颗粒法和细管冷冻法。精液液态保存保存时间较短，其方式分为精液常温保存（15℃-25℃）及精液低温（0℃-5℃）保存。

1.2.1 精液冷冻保存原理及方法

精子冷冻保存的原理是精子冷冻在液氮（196℃）中会停止细胞代谢，处于假死状态进行长期保存。精子冷冻过程中会造成包括稀释、培养、冷却、冷冻和解冻等带来的不同程度的超微结构、生化和功能损伤，导致精子活力、膜完整性和受精能力下降^[5]。

精子中 90% 都是水，因此精子冷冻保存过程中发生的损伤是由于精子暴露于温度变化（热应力）会导致细胞内和周围环境中的水形成冰晶^[6]造成细胞物理损伤，冰晶越大，损伤越大^[7]。为防止精子中形成水分结晶，通常在精子冷冻过程中要在冷冻稀释液中添加保护性抗冻剂，在精液冷冻稀释液中添加抗冻保护物质，保障精子在特定的凝结速率下形成玻璃化，在这种状态下，精子细胞结构正常，解冻后精子可以重新复苏。

物理性损伤是指精子中的水分形成冰晶，导致精子内部受到不可逆的损伤，引起精子死亡。主要是冰晶的直接损害，以及随着越来越多的冰晶形成，溶质浓度增加而造成的二次损害^[8]。吴海荣^[9]等研究表明，精子经过冷冻-解冻的程序后，发现大部分精子的生理、生化结构以及功能被破坏，活力和受孕率下降，受到以上损伤的精子或许有活力但是能否受精是未知数。秦春鹏^[4]等研究表示，精子冻融后，由于细胞膜膨胀而部分破裂，并被顶端的细胞外膜囊括。Tasseron F^[10]等认为在冻融过程中，造成绵羊精子顶端的空泡化和肿胀。

化学损伤是指在精液冷冻过程中，精子由于温度过低造成冷冻损伤。常用的有甘油、二甲基乙酰胺和二甲基亚砷等，对防止冰晶的产生起着重要作用^[5]。但是抗冻剂浓度也会影响精子的活力。其中，甘油是一种常用的抗冻保护剂，但甘油具有一定的毒性，浓度过高会对精子造成不可逆转的化学中毒，导致精子死亡。因此，筛选出毒性低、保护性强的新型抗冻保护剂并筛选适宜的添加浓度是确保冷冻精液广泛应用的基础^[7]。

因此，开展精液冷冻保护剂研究，减少低温下冰晶的形成，保护精子免受损害，减少冷冻产生玻璃态或玻璃质状态，避免防冻剂引起的渗透和毒性损害成为研究的关键问题。

精液冷冻方法主要包括：颗粒法和细管冷冻法。冷冻精液最早采用的是颗粒冷冻法^[11]。精液颗粒冷冻法具有操作简便、无需昂贵的设备、易于推行等优点，但是有着不易被标记、容易被细菌污染、测量不标准等缺点。随着技术的进展和配套仪器的研发，颗粒冷冻法已逐渐被细管法取代。细管冷冻法具有冷冻速度快、冷冻效果好、精液温度均匀、精液不易淆杂、判定简单、内容标准化、卫生条件好等优点。

细管冷冻法要注意装有精液的细管在放入仪器前的平衡时间及液氮量情况。在放入细管前，液氮倒入冷冻仪运行后平衡 90 min 使仪器温度降至 5℃ 后将细管放入仪器，70 min 后温度降至 -120℃，精液冷冻完毕取出，放入液氮。冷冻-解冻后活力达到 40% 以上^[12]。

1.2.2 精液低温保存原理及方法

精液低温保存原理是指精液在低温状态下（0 °C-5 °C）使精子进入休眠状态，保持数小时甚至数天，一般适用于公羊与所配母羊距离比较近，运输快捷方便的一种精液保存方法^[13]。

相对于精液冷冻技术，精液低温保存在温度上对精液的损害会更小，在 0-5 °C 的低温环境下，对精子细胞的超微结构不会因过低温度造成不可逆转的损伤，保持较低活动能力，减缓代谢过程从而存活时间延长^[14-15]。

1.3 精液保存研究进展

精液保存技术是提高种公畜利用率及扩大繁殖规模的必要手段。精液保存分为冷冻保存和液态保存，冷冻保存可以使精液进行数月甚至数年的长期保存，低温保存可以使精液达到数小时及数天的保存。不论哪种保存方法，都是用以扩大精液量、提高繁殖效率，为经济发展做出贡献。

1.3.1 精液冷冻保存研究进展

在二十世纪六七十年代精液冷冻保存技术在家畜上开始得到广泛应用，但普遍冷冻保存效率较低^[16]。牛精液冷冻保存始于 1951 年，在牛精液冷冻保存中，冷冻-解冻后精子活力逐渐降低了 50%，精子质膜的膨胀率也在 40% 左右^[16]。1957 年开始进行对猪与牛的精液冷冻保存研究，在猪精液冷冻-解冻后精子活力下降约 60%^[17]，多达 50% 的精子在解冻后质膜流动性受损^[18]。动物精液在冷冻-解冻后效果最差的是马，解冻后精子活力约为 30%-70% 且质膜遭到了破坏^[19]。

羊精液冷冻保存技术已是一项研究多年且基本成熟的技术，其技术能够大幅度提升优良种公羊的繁殖效率，促进杂交改良的效率。绵羊精液冷冻保存始于 1937 年^[20]。研究表明绵羊精液冷冻后通过通过人工授精后母羊的受胎率 37.9%-57.4%^[10]。到 70 年代后，关于绵羊精液冷冻-解冻后受胎率有所提高的报道越来越多，受胎率达到 47.9%-66.2%^[21]；90 年代以后，绵羊精液冷冻保存技术趋于成熟，受胎率达到 60% 左右^[10]。王立强在 2003 年进行小尾寒羊精液的冷冻-解冻后精子成活率可达 48%^[22]。郭富强等^[23]用冷冻-解冻后的山羊精液对 635 只母羊进行人工输精，受胎率达 44.9%。2019 年，李宇^[24]对山羊精液稀释液中添加 3.0 mg/mL 淫羊藿多糖对精液冷冻质量效果提升最好。2021 年，Yáñez Ortiz Iván 等^[25]研究表明，与牛和猪的冷冻精液相比，绵羊精液解冻后精子活力较低（30%-40%）。

近年来,随着养羊生产模式由传统放牧逐渐向舍饲、半舍饲及规模化、集约化养殖方向发展,生产模式的变化加速了对优良品种的迫切需求,传统的繁殖生产模式已经不适用于现代生产模式。同时伴随着人工授精技术发展与普及,精液冷冻与低温保存技术结合定时输精,可最大限度挖掘优良种公羊的繁殖潜能,促进养羊场品种改良步伐和养殖效益的提高^[26]。但在绵羊精液冷冻保存的各个阶段(公羊检查、精液收集、稀释、冷冻及解冻后的精子评估)都没有标准的方法,造成了研究方法之间的差异^[27]。

1.3.2 精液低温保存研究进展

精液低温保存是介于精液冷冻保存与常温保存之间。精液在低温条件下能减缓精子能量的消耗和活动损失,有效维持了精子的超微结构^[14]。低温保存技术已经应用于各种临床研究、冷冻手术、生态学、植物生理学和食品保藏^[15]。

Fernandez 等^[28]研究结果表明,在撤栓 46 h 后进行人工授精时,绵羊精液在 5 °C 的低温状态下保存 24 h 与在 15 °C 的常温状态下保存 6 h,母羊的受胎率无明显差异(52.0 % vs 56.7 %, $P < 0.05$)。Abadjieva 等^[29]研究表明,在分别添加天然抗氧化剂与三葡萄糖甘油蛋黄保护剂时,5 °C 保存 48 h 公羊精液的质膜完整性和形态无明显差异,并且研究还表明 5 °C 保存 48 h 公羊精液与 37 °C 保存 6 h 公羊精液的活力与形态无明显差异,在人工授精时仍可达到较为理想的效果。赵建清等^[30]研究表明,0 °C 保存绵羊精液,在第 10 天时活率在 50 % 以上,并且对顶体完整率没有显著影响,在体内或体外授精时可达较好的受精率 72.4 %。

1.4 影响精液冷冻保存及低温保存效果的因素

影响精液冷冻保存及低温保存效果的因素有很多,包括冷冻技术的差异、稀释液的种类以及动物个体的差异等^[26]。以下重点介绍在精液稀释液中添加缓冲物质、非电解质、抗冻剂、蛋白营养物质及抗氧化剂对精液冷冻保存和低温保存的影响。精液稀释液需要具备以下功能:提供精子体外存活的所需能量、抵抗低温打击、缓冲 PH 变化、抑制细菌滋生、平衡渗透压与电解质、扩大精液量等。

1.4.1 缓冲物质

精液在进行冷冻的过程中,会造成精液的渗透压、PH 值等改变从而对精子的活力造成影响。因此,在精液冷冻稀释液中添加适当的缓冲物质是维持精液渗透压、PH 值恒定,从而保持精子活力的有效技术手段。

金美林^[2]等发现, 精液稀释液的渗透压 340-358m Osm/L 时, 精子各项指标最佳。研究发现, 精液稀释基液的 PH 值为 6.6-6.8 时, 精子的运动能力最强, 能量流体最旺盛, 能量消耗快, 冷冻效果最佳, 平衡解冻后精子活力较高^[37]。刘福元等^[31]实验证明萨福克羊精液在低温保存时, 为追求更好的效果, 需要其稀释液的 PH 值接近与绵羊精液的 PH 值以提高受胎率。

Johnson^[32]等研究表明, 为防止精子过快的丧失运动能力, 在稀释液中加入 KCL, 目的是减缓钾离子消耗时间。在精液保存过程中, 对精液产生危害的现象还有顶体反应, 是由于钙离子跨细胞膜流入细胞内会启动精子获能^[32]。

近年来, 精液稀释液中常用 Tris 作为保护缓冲液, 冷冻效果较好^[32]。

1.4.2 非电解质

在自然条件下精液中强电解质(镁离子、钙离子)保持较高浓度, 会抑制精子活力。电解质过高, 会加快精子的新陈代谢、运动能力变强, 缩短精子的生存时间。为延长精子的存活时间, 需降低精子的电解质强度, 所以稀释液要添加非电解质或药物电解质以实现精液的长期保存^[33]。

常见的糖类及磷酸盐多是非电解质物质。在稀释液中加入一定量的非电解质, 例如适量的果糖、葡萄糖、蔗糖等能加强精子的活力^[34]。除此之外在稀释液中加入适量的氨基乙酸也可降低副性腺分泌物的电离程度^[34]。

1.4.3 抗冻剂

家畜精液稀释液中添加的常用的抗冻保护剂可以分为渗透性保护剂和非渗透性保护剂。

渗透性保护剂: 由于分子质量相对较小, 容易透过细胞膜到达细胞内部。其中主要包括二甲基亚砷(dimethylsulphoxide, DMSO)、甘油(glycerin, Gly)、1, 2-丙二醇(propylene glycerol, PROH)、乙二醇(ethylene glycol, EG)、甲醛(methyl alcohol, MeOH)和乙酰胺(acetamide, AA)等(表 1-1)^[6]。**非渗透性保护剂:** 非渗透性防冻保护剂, 不能自由通过细胞膜。它们主要包括蔗糖、海藻酸、聚蔗糖、葡聚糖、聚乙烯二醇、聚乙烯吡咯烷酮、牛血清蛋白、胎牛血清、抗冻蛋白和胎球蛋白。(表 1-1)^[7]。

各种渗透保护剂的保护机制基本相似, 但胚胎、卵母细胞和精子对冷冻保护剂的渗透性、毒性以及敏感性有差异, 影响其冷冻的效果。Kasai 等^[35]通过对小鼠桑椹期胚胎的研究表明, EG、Gly、DMSO、PG、AA 的冷冻毒性依次递减。

精液冷冻时, 如不使用抗冻物质缓解, 精液迅速从液态变成固态, 会导致大量冰晶形成, 导致精子死亡。精液稀释液中的抗冻剂主要是甘油、二甲基亚砷等^[36]。甘油渗入

细胞与细胞内的水分结合，阻断冰晶的形成。但甘油因为自身的粘度会阻挠精子从阴道到子宫，同时甘油对精子有毒，在冷冻后增加了精子畸形率^[38]。目前 DMA 已被证明可以代替甘油作为精子冷冻保存^[38-39]。

表 1-1 常用渗透性和非渗透性抗冻保护剂

抗冻保护剂	英文名称	分子式	相对分子量
乙酰胺	Acetamide	CH ₃ CONH ₂	59.07
乙二醇	Ethylene glycol	C ₂ H ₄ (OH) ₂	62.07
丙二醇	Propylene glycol	C ₃ H ₈ O ₂	76.10
二甲基亚砷	Dimethylsulphoxide	(CH ₃) ₂ SO	78.14
甘油	Glycerin	C ₃ H ₅ (OH) ₃	92.10
蔗糖	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30
海藻糖	Trehalose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30
聚蔗糖	Ficoll	-	70000
葡蔗糖	Dextran	-	70000
聚乙二醇	Polyethylene glycol	-	-
聚乙烯吡咯烷酮	Polyvinylpyrrolidone	-	-
牛血清蛋白	Bovine serum albumin	-	-
胎牛血清	Fetal calf serum	-	-

1.4.4 甘油

1779 年，瑞典科学家 Carl W. Scheele^[39]发现一种新的透明的糖浆状液体加热橄榄油和密陀僧(铅的氧化物, PbO)，被命名为甘油。Polge、Smith 和 Parker(1949)发现甘油了对精子有低温保护性能，从而开创了精液冷冻保存的历史^[40]。上世纪中旬人们开始对绵羊的精子冷冻保存技术进行研究，Emmens 等^[16]在 1950 年将羊的精液在-79 °C 下冷冻时首次取得良好的存活率。

甘油是目前在动物精液冷冻保存中应用最广泛抗冻保护剂之一，但也有研究证明其高渗透性可能会在解冻后对精子造成损害，在 3 %-7 %甘油浓度时精液在冷冻-解冻后存活效果最佳^[41]。武浩等^[39]研究表明，甘油作为一种小分子渗透性保护剂，可以进入精子的内部，改变细胞内的溶解浓度，通过降低细胞内溶液的冰点，可保护精子。不仅如此，甘油的存在降低了电解质浓度，从而对精子具有更好的保护作用^[10]。然而，由于精子保护过程中细胞内渗透压的变化，细胞膜处于低渗透环境中，导致细胞膜膨胀和破裂，产生渗透毒作用，导致精子丧失受精能力^[39]。

王强等^[42]将甘油作为抗冷保护剂，在低温保存 120 h 时活力为 44.6%。孙时军^[43]研究表明，在含有脱脂乳的牛精液稀释液中添加 10 %-13 %甘油，低温保存下 14 天仍具有较高的受精率。在猪精液稀释液中添加 1 %甘油，低温保存第 7 天时活率将近 60 %。

1.4.5 二甲基乙酰胺

酰胺作为一种渗透性抗冻保护剂，具有分子量低、膜通透性高、解冻后对细胞通透性影响小、损伤小的特点^[44]。与甘油相比，酰胺类具有含氮管能团（NH-C=O）和甲基（CH₃），具有高度亲水性和高度亲脂性，可以顺利穿透精子细胞膜，从而减少细胞内冰晶的形成，从而比甘油具有更好的冷冻保存效果^[30]。二甲基乙酰胺（DMA）替代甘油国内相关报道^[45-46]。

Gungor 等^[47]研究表明，稀释液中添加 4 %二甲基乙酰胺，对猪精液冷冻保存效果较好。在我国，甘油已被酰胺类化合物所代替进行精液冷冻保存研究，牛精液的冷冻保存中酰胺类化合物效果优于甘油^[47]。

Gabriel 等^[41]研究发现 DMA 可以完整地替代甘油，并且当二者联合使用时，可以降低甘氨酸浓度，但解冻后精子存活率降低。Bianchi 等^[20]在研究报告中说明甘油和二甲基乙酰胺具有不同的生化特性，都可以在冷冻保存期间保护精子细胞。Bittencourt 等^[48]研究表明稀释液中的高浓度 6 %DMA 在解冻后对绵羊精子细胞的活力造成有害影响。与甘油相比，在马的精液冷冻保护剂中使用酰胺作为抗冻保护物质，通常会增强解冻后精子的运动性和保持膜完整性^[49]。

1.4.6 卵黄

为进一步提高动物精液低温和冷冻保存的效果，将卵黄作为精液的外源营养物质来源和抗冻保护剂。卵黄具有取材方便、价格低廉的特点，并有较好冷冻保存效果。卵黄作为一种大分子非渗透性缓冲液，无法渗进精子细胞且新鲜卵黄在使用时还会造成稀释液微生物污染，但卵黄可以提高稀释液中各类培养基的活性。当稀释液中添加卵黄时，精子可大幅度避免冷冻带来的损伤^[17]。Gillan^[50]最先研究发现精子稀释液中添加卵黄可以降低精子超低温保存带来的机械性损伤。Bergeron 等表明^[49]卵黄或牛奶和甘油是液态或冷冻状态公牛精子的培养基中不可缺少的化合物。在过去的 60 年中，精液稀释精液中的冷冻保护介质不断地被改进，但是该介质的基本成分保持不变。Hosseini 等^[44]发现在精液冷冻保存过程中，由于冷休克和渗透会降低解冻后精子的活力和膜完整性降低。刘亮等^[51]研究表明，不同家禽的卵黄在稀释液中均有冷冻保护的效果。

卵黄对精子的维护作用主要取决于磷脂，尤其是卵磷脂。卵磷脂具有亲水基团，以减少精液冷冻过程中精子中的水分子玻璃化对精子造成的机械损伤。研究表明，卵黄对

精子具有保护作用是由于其某些成分与精子质膜结合^[40,49]。大豆中不饱和脂肪酸的含量远高于卵黄，不饱和脂肪酸在生物膜保护中起着重要作用，被认为是动物来源成分的卵黄的替代品^[52]。因此，研制无动物源性蛋白精液稀释液对动物本身的健康、动物产品的生物安全有非常重要的意义，可选择大豆卵磷脂作为卵黄替代物^[53]。

1.4.7 大豆卵磷脂

为进一步提高家畜精液冷冻保存的效率，提高精液冷冻保存稀释液配制后的保存时间，近年来国内外有学者采用大豆卵磷脂（Soy Lecithin, SL）粉剂代替卵黄，并研究证明对绵羊精液冷冻保存效果的具有积极的影响^[49]。

国外报道显示，在绵羊精液稀释液中加入 1 % 的大豆卵磷脂，冷冻解冻的效果比稀释液中加入 15 % 的卵黄，具有更高的精子活力和发育能力^[54]。Ramanathan^[55]研究发现，在羊精液的稀释液中加入 11 % 的大豆卵磷脂比加入卵黄的低温保存效果更好。羊精液冷冻保存稀释液冷冻保存中添加大豆卵磷脂的效果优于添加卵磷脂^[56]。Salmani 等^[56]证明大豆卵磷脂冷冻山羊精液后具有与卵黄相同的保护作用。Wagtendonk 等^[57]研究表明，添加卵磷脂的稀释液冷冻-解冻精液，人工输精后提高妊娠率、产犊率。

近年来，国内也有学者利用大豆卵磷脂添加到家畜精液稀释液中的报道。王杰^[1]研究发现稀释液中添加 1.25 % 大豆卵磷脂的冷冻保存效果优于添加 1.25 % 以上大豆卵磷脂。胡传水^[58]研究发现在稀释液中添加大豆卵磷脂精子的存活率高于稀释液中添加卵黄的存活率。

1.4.8 脱脂乳

在家畜精液冷冻稀释液中，脱脂乳是精液的营养物质，可以增强精子的运动能力，改善精子质量^[59]。在精液冷冻保护剂中添加脱脂乳，可以缩短精液冷冻前的平衡时间^[60]。Namula 等^[61]在公猪精液稀释液中添加 7.5 g/L 脱脂乳可以提高长期保存后的精子活力。Yasuyuki 等^[59]研究表明，使用基于脱脂乳的稀释液可以缩短犬精子冷冻保存所需的初始平衡时间。Lorenzo 等^[62]说明，脱脂乳与载胆固醇联合应用可以提高马精液的冷冻能力和母驴的繁殖力。Suherni 等^[63]通过脱脂乳与 L-精氨酸结合，保持山羊精液在冷藏条件下保存 5 天后活力活率依然符合输精要求。

1.4.9 抗氧化物质

抗氧化物质可以减少精子在有氧及可见光环境下的氧化作用，保证精子冷冻后活力和质膜完整率^[64]。根据报道，鼠^[9]、猪^[65]、山羊^[66]、奶山羊^[67]等使用抗氧化剂取得较好的低温保存精子效果。精液冷冻过程中，精子可能会在氧化应激的环境中被暴露，因为

精子抗氧化系统较弱,不能减轻过量活性氧带来的影响,从而导致精子生育率低。精液冷冻保护剂中添加 2 mM 没食子酸(Gallic Acid, GA)影响精子运动性,而添加 0.05 mM 鼠尾草酸(Carnosic Acid, CA)影响精子线粒体功能^[37]。精液冷冻保护剂中添加 2 mg/mL-5 mg/mL 竹叶黄酮, 6 mg/mL 异抗坏血酸钠, 0.2 mg/mL 的丁基羟基茴香醚时对猪精液抗氧化效果较好^[52]。在山羊精液冷冻保存中, 稀释液中添加 0.6 mg/mL 的 N-乙酰半胱氨酸可以显著提高精子活率和质膜完整率, 提升冷冻-解冻后精液品质, 改善精子冷冻保存效果^[66], 在奶绵羊精液中添加 0-80 μm 浓度范围内的白藜芦醇会提升精液抗氧化能力^[67]。

1.5 绵羊精液品质检查方法

在开展绵羊人工授精操作过程中, 精液品质往往影响人工授精后母羊的受胎率, 因此检查精液品质是必不可少的操作步骤。绵羊精液品质的检查主要是分辨精液质量的好坏, 留下符合要求的精液进行人工输精, 淘汰质量欠佳的精液, 以确保母羊的受胎率。同时, 检验雄性动物的繁殖管理水平和生殖功能状态, 反映技术操作的质量, 是稀释、储存、输送精液的基础^[68]。

1.5.1 精子活力与活率检测

精子活力(Total motility, TM)指直线运动的精子数占总精子数的比例。精子活率(Sperm Motility, SM)指活精子数占总精子数的百分比。精子存活率与精子生育能力密切相关, 是精子质量的首要指标^[56]。一般采用目测法和光学显微镜法。采用目测法, 应用方便且直观, 但是此方法主观性太强, 无法客观判断精子真实的活率。使用光学显微镜(400 \times)同时在 37.8 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下对精子活率进行至少三次评估, 并且在进行评估时要确保每个载玻片上的精子数不少于 200 个^[69]。

计算公式: 活力(%) = 直线运动精子数/检测总精子数 \times 100%。

活率(%) = 活精子数/检测总精子数 \times 100%。

1.5.2 精子直线速率与曲线速率检测

精子运动和形态测定的评估通常利用计算机辅助精子分析(computer-assisted semen analysis system, CASA)进行, 其提供了更客观的评估, 该系统通过评估利用相差显微镜、摄像机获得并在计算机屏幕上观看的连续图像序列来评估特定时间的精子运动轨迹。通过使用 CASA 系统, 记录了总的和渐进的精子活动值, 每个精子在单位时间内的运动速度曲线速率(VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$), 直线速率(VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$)^[70]。

直线速率 (Straight Line Velocity,VSL) 与曲线速率(Curvilinear Velocity,VCL)指标是描述精子速度的单个变量,评价精子运动性能,受精能力与其成正比,与繁殖性能密切相关。直线速率:精子头部直线运动的距离。曲线速率:精子头部实际运动的距离^[71]。精子直线速率与曲线速率的测定可通过 CASA 进行^[72]。评估时载玻片上得到精子个数不少于 200 个。

1.5.3 精子密度检测

精子密度 (Sperm Concentration,SC) 指每毫升精液中精子数目。精液稀释率与精子密度、注射量和有用精子数直接相关,是评价精液质量的重要指标之一^[73],可以直接决定种公羊的种质价值。精子密度检测方法分别为:使用计算机辅助精液分析系统(CASA)与血球计数板法^[74]。CASA 是利用最新的计算机技术和先进的成像系统来分析精液质量。血细胞比容法通过设置具有计数范围和特定厚度的计数室来指定收集样本的体积,对指定范围内的精子进行计数,即精子密度^[73]。

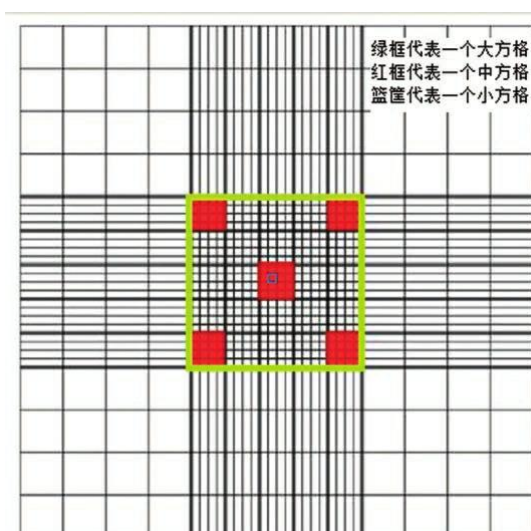


图 1-1 血球计数板计数室示意图^[74]

Fig. 1-1 Blood cell count plate count room schematic

1.5.4 精子畸形率检测

精子畸形是指精子异常的一种形式^[74]。精子畸形率可以间接反映睾丸生精功能障碍,也必然影响精子活力与受精能力。检测时,每个样本中精子数不少于 200 个进行形态异常检查。在形态学分类中发现的缺陷包括异常头部、顶体缺陷、中段缺陷、近端和远端胞质液滴、卷曲尾部和弯曲尾部^[73]。若是精子畸形率过高,则意味精液质量差。畸形率过高会直接影响受孕率,甚至引起遗传性疾病。正常精子中出现畸形精子的比例低于 20%,对生育率的影响并不大^[75]。

1.5.5 精子质膜完整性检测

精子质膜维持精子的稳定性和完整性，在受精过程中起着关键作用^[24]。在冷冻过程中对精子质膜的损害会导致生育能力和精子活力的丧失。检测精子质膜完整性可以间接评定精子的存活状态^[38]。

精子质膜的评价方法包括 HOST 法、伊红/黑色素 (EN) 和台盼蓝 (TB) 活染色法、碘化丙啶 (PI) 联合羧荧光素二乙酸酯 (CFDA) 或 SYBR-14 (SYBR) 荧光活染色法和低渗肿胀试验 (精子) ^[76-77]。

1.5.6 精子顶体完整性检测

精子顶体完整率检测是判断精子质量好坏的重要标准。顶体是位于精子顶端的泡状结构，是由高尔基体发育而来，其富含大量的与受精有关的水解酶类，如顶体素、透明质酸酶、放射冠穿透酶等。其中顶体素直接参与精子顶体反应的发生，与精子穿透卵母细胞的卵丘、放射冠和透明带密切相关^[78]。若顶体遭到破坏或顶体提前反应，导致精卵结合失败，影响受精率。

常用检测方法是吉姆萨染色法。这种方法的优点是染色后可以在普通显微镜下直接观察，简单易学。另外，免疫荧光法也是普遍使用的方法之一。这种方法主要使用 FITC (Fluorescein isothiocyanate)、花生凝集素和其它外源性植物凝集素的组合来检测。目前细胞测定法作为新的精子质量分析工具，正逐渐成为最常用的方法。这个方法的优点是高再现性、短时间和高速效率，但价格昂贵^[79]。

1.5.7 精子 ATP 水平检测

三磷酸腺苷 (ATP) 是所有生物体生存和繁殖所需的细胞合成的能量来源，被比喻为普遍的“货币”。从 1929 年 Lohmann^[80] 自从发现并从糖酵解肌肉中分离出 ATP 以来，ATP 在活细胞的新陈代谢和为各种生化反应提供能量方面起着关键作用，通过 ATP 水平的变化，可以评估各种药物和生物活性物质的细胞修复、抑制和增殖作用。测量生物体内的 ATP 水平及其动态变化是生物检测的一个重要指标^[80]。细胞功能的变化会影响 ATP 水平的改变。当 ATP 水平下降时，细胞一般处于凋亡、坏死或一些毒性状态下；当 ATP 水平上升时，可能是高葡萄糖刺激某些细胞导致细胞内 ATP 水平的波动。当线粒体功能受损或下降时，会反应出 ATP 水平下降，在细胞凋亡时，ATP 水平的下降通常和线粒体膜电位下降同时发生^[80]。

目前，国内外检测 ATP 的方法可分为三类：色谱法、电泳法和光学分析法。色谱法包括纸质色谱法、薄层色谱法、离子交换色谱法和高效液相色谱法。而电泳法包括纸质

电泳法、醋酸纤维膜电泳法、凝胶电泳法和毛细管电泳法。光学分析方法主要是生物发光技术，具有省时省力，无损检测，数据精准等优点，因此在实验室中更受青睐。而高效液相色谱（HPLC）方法是目前应用最广泛的，HPLC 具有强大的分辨能力，克服了传统分析的局限性，具有分析速度快、灵敏度高、准确性好特点，在医学分析中有着广泛的应用。HPLC 技术在国外已被广泛用于动物体内 ATP 及其化合物的测定。国内和国际上通过 HPLC 对动物体内 ATP 及其相关水解物进行分析，同时也可以分析食品中 ATP 的含量^[80]。

光学分析法具有省时省力，无损检测，数据精准等优点，因此在实验室中广泛应用。

1.5.8 精子 DNA 完整性的检测

研究表明，精子在冷冻过程中，精子 DNA 链被破坏，染色质结构异常，影响精子的活力和受精能力。因此可通过检测精子 DNA 的完整性或染色质损伤情况来判定精液质量及活性^[81]。

使用荧光原位杂交技术（FISH）检查精子 DNA 完整性。FISH 是一个新型的原位杂交方式，通过探针先与介体分子杂交，随后利用免疫化学过程和荧光体融合，从而显示细胞核或染色体中对应的 DNA 序列，杂交培育后，信息就被通过免疫化学过程表现在细胞核或染色体中的对应 DNA 序列上。最大的好处是可进行核间杂交，减少了在细胞培养中得到中间阶段的需要，适合于没有能力在人体外表进行分化的细菌，如成熟的人类精子。

目前，针对精子 DNA 完整性检测出现了 TUNEL 细胞凋亡检测，该方法是采用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-FITC（100T）来检测，其检测原理是：精子细胞在冷冻解冻过程中发生的染色质或 DNA 损伤，从而产生与 DNA 断点数目相同的 3'-OH 末端，通过利用末端脱氧核糖核酸转移酶可以将地高辛标记的 dUTP 标记至 3'-OH 末端，DIG-dUTP 结合在 DNA 断点部位，在与试剂盒中生物标记的抗地高辛抗体反应后，结合链霉亲和素-荧光素 FITC（SABC-FITC）。然后利用 FITC 在 490-495 nm 光波可被激化，而在 520-530 nm 发生荧光，呈黄绿色，从而可以在显微镜下观察到着色的凋亡细胞。相较于 FISH 测定，TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒具有使用更便捷、检测效率高且操作简单的特点，因此成为精子 DNA 完整性检测的理想检测方法。

1.5.9 精子线粒体功能

精子的活力与线粒体的活化密切相关。氧化代谢产生的场所是线粒体。ATP 存在于线粒体中，为精子尾部提供能量，是精子运动所必需的。线粒体功能状态是评价精子质量的重要指标。

1990年 Gambier 等^[82]采取罗丹明 123 荧光和 DNA 特异性荧光色素 PI, 检测精子的线粒体膜电位的变化。罗丹明 123 是一种荧光阳离子染料, 通常用作线粒体探针渗入细胞内, 根据线粒体膜电位在线粒体部位聚集, 经紫外光激发后发出绿色荧光, 常与 PI 结合使用^[82]。2010年, 罗丹明 123 依然作为人^[83]与山羊^[84]的细胞线粒体检测。目前常使用 JC-1 为荧光探针, 用于大规模检测线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential), 检测细胞、组织或纯化的线粒体中的线粒体膜电位。在高线粒体膜电位下, JC-1 在线粒体基质中聚集, 形成聚合物, 可产生红色荧光; 在低线粒体膜电位下, JC-1 不能在线粒体基质中聚集, 此时可产生绿色荧光。通过荧光颜色的变化来检测线粒体膜电位的变化, 红色和绿色荧光的相对比例通常被用来衡量线粒体去极化的比例。

1.6 问题与展望

绵羊精液冷冻保存技术发展面临的问题主要是: 使用精液冷冻保存技术普及程度与精液冷冻保存的效率较低。一方面, 精液在冷冻-解冻过后精子活力通常会大幅降低, 从而使到达母羊受精部位的有效精子数量减少, 导致受精率低于鲜精, 另一方面, 人工授精大部分依然采用鲜精输精, 对绵羊冷冻精液的需求不够紧迫, 在一定程度上阻碍了绵羊冷冻精液的推广应用, 制约着优秀绵羊品种的改良和育种进度。

近年来, 精液冷冻保存技术对于提高优良种公畜繁殖效率, 降低养殖生产成本具有重要意义, 也是种质资源保存的有效技术手段之一。并且由于活体动物运输导致的流行病频发, 使得远距离引进种群变得更加困难, 而采用冷冻精液配合人工授精技术则能有效解决此类问题。但目前利用冷冻精液开展人工授精的母畜受精率较新鲜精液要低。因此, 改善冷冻精液的保存方法和质量是关键^[70]。低温生物学技术已经广泛应用于动物种质资源的保存, 精子的冷冻保存比胚胎的冷冻保存更容易、更快、更便宜。随着对种质资源保存的需求不断增加和具有遗传变异的动物的发展, 精子冷冻的价值和用途将变得越来越普遍。

通过精液冷冻保存再进行人工授精, 控制各种接触性传染病的发生, 保障动物健康, 提高动物安全水平^[76]; 在精液经过稀释后, 利用人工授精技术, 每只公羊的精液匹配多只母羊, 提升了公畜繁殖效率, 也克服了由于体型差异过大而不容易交配的问题。人工授精技术加快成年雄性精子的遗传过程和繁殖速度^[6]。精液冷冻可以使精液得到长期保存, 从而使具有优良基因的动物得以更好的繁衍和传承以及可以用于建立遗传基因资源库保存具有遗传价值的种质资源和稀有羊种。

因此, 通过探究不同抗冻剂对精子冷冻和低温效果的影响, 为进一步深入研究绵羊精液冷冻保存及低温保存技术提供理论依据。

1.7 研究内容

(1) 在绵羊精液冷冻保护剂中分别添加不同浓度的甘油、DMA 及甘油和 DMA 联合应用, 通过测定精子的活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率及 DNA 完整率等技术指标, 探究对不同浓度抗冻保护剂对精液冷冻的影响。

(2) 在绵羊精液低温保护剂中添加不同浓度的甘油和 DMA 联合应用, 通过测定精子的活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率、DNA 完整率及 ATP 水平等技术指标, 筛选出最佳浓度的保护剂。

(3) 在绵羊精液低温保护剂中添加不同浓度的大豆卵磷脂代替卵黄, 通过测定精子的活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率、DNA 完整率及 ATP 水平等技术指标, 筛选出能够代替卵黄的大豆卵磷脂浓度。

1.8 技术路线

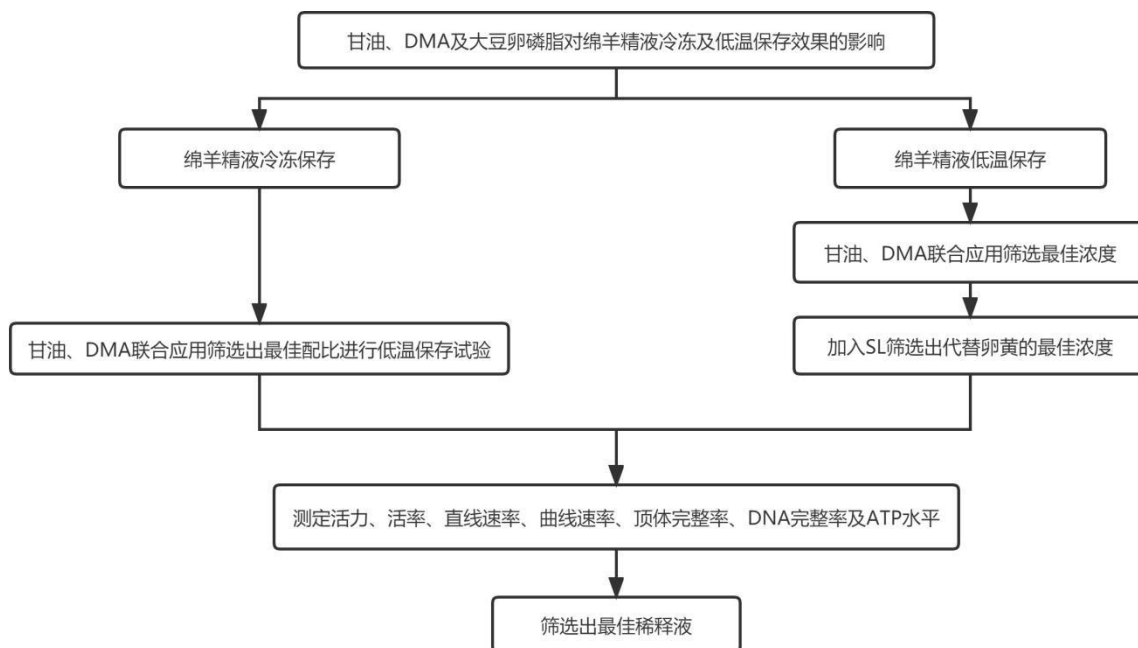


图 1-2 技术路线图

Fig. 1-2 Technology roadmap

第 2 章 不同抗冻保护剂对绵羊精液冷冻保存效果的影响

2.1 前言

精液冷冻保存依然是一种保存优良基因可选的方法,为保证长期保存来自最佳供体的精子,须在精液中添加稀释液进行保存。而在精液稀释液中,为保护精子免受或避免超低温环境的损害,在稀释液中添加抗冻物质,以此对精子起到保护作用。精液冷冻保存技术在畜牧生产上对提高优良种公畜利用率、优良遗传资源的保存利用、配子低温生物保存技术的研究、人类辅助生殖技术的发展都具有十分重要的意义^[3]。

家畜精液冷冻保存技术可以使优良种公畜的精液得以长期保存,改良种质。然而,由于家畜精液对外界条件的敏感性和不稳定性,这在一定程度上限制了家畜精液冷冻保存技术的发展。为了提高家畜精液在冷冻-解冻后的活力和配种母羊受胎率,要在冻精稀释液中添加冷冻保护剂、抗氧化剂、蛋白及无机盐等营养成分,改善精液冷冻保存方法^[85-86]。目前精液质量检测常采用计算机辅助精子分析仪(CASA)检测精子活力、活率、直线速率、曲线速率、运动轨迹等^[45]。

精液在冷冻过程中容易因低温形成冰晶,对精子细胞超微结构造成损伤^[87],并且冷冻保存过程中精子面临的挑战不是抵抗液氮温度下储存期的能力,而是跨越 0 °C--60 °C 的中温区。精子还必须经历两次这样的温度,第一次是在冷却期间,然后是解冻期间^[88]。因此普遍通过在稀释液中添加抗冻保护剂降低精子的低温损伤。在精液稀释液中采用甘油与 DMA 作为精子的抗冻保护剂,与甘油相比 DMA 渗透性更大、毒性更小。DMA 可以更好的渗入细胞内部进行保护作用。本研究旨在绵羊精液冷冻保护剂中分别添加甘油、DMA 以及甘油和 DMA 联合应用测定解冻后精子的活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率及 DNA 完整率等技术指标,探究不同浓度抗冻保护剂对精液冷冻保存效果的影响。

2.2 试验材料

2.2.1 样品采集

试验地点在新疆农垦科学院种羊场。2021 年 8 月底到 2022 年 1 月中下旬为试验时间。中国美利奴羊(新疆军垦型)公羊 12 只,平均年龄 3 岁,体格健壮,膘情较好,无生殖道疾病,生殖、营养、健康等方面状况良好且个体之间无明显差异,其体型外貌

和生产性能均符合种用标准。采用假阴道法采精，将采出的精液移入 1.5 mL 的离心管中，放入 37 °C 水浴。进行常规检测时，首先观察颜色为乳白色或浅黄色，密度在 1×10^9 /mL 以上，射精量在 0.5-1 mL，可用于后续检测。计算机辅助精子分析系统（CASA）检测精子活力及运动参数，其活力在 0.8 以上可以用于后续试验。

2.2.2 药品和器械

表 2-1 药品与器械

药品和器械	购买公司或货号
丙二醇	Solarbio 公司
二甲基乙酰胺	Solarbio 公司
Tris	Solarbio 公司
青链霉素	Solarbio 公司
吉姆萨染液	Solarbio 公司
柠檬酸	Wako 公司
葡萄糖	Wako 公司
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-FITC (100T)	碧云天公司
增强型 ATP 检测试剂盒	碧云天公司
迈朗精子分析仪	SJ-TMDI608
迈朗一次性精子计数板	ML-CASA 20
酶标仪	赛默飞公司
水浴锅	上海恒科宇公司 HWS24
精子冷冻仪	Cryologic, CL-5500

2.3 试验方法

表 2-2 绵羊精液冷冻稀释基础液

药品及溶液	剂量
Tris	1.817 g
葡萄糖	0.25 g
柠檬酸	0.995 g
卵黄	7.5 mL
双抗（庆大霉素和青霉素）	100000 单位
水	47.5 mL

注：稀释液在 PH6.7 左右符合绵羊精液生存需求。

表 2-3 不同浓度甘油组

组别	甘油浓度
G0	0 %
G2	2 %
G5	5 %
G8	8 %

注：G 代表甘油

表 2-4 不同浓度 DMA 组

组别	DMA 浓度
D0	0 %
D2	2 %
D3	3 %
D4	4 %
D5	5 %

注：D 代表 DMA

表 2-5 DMA 与甘油联合应用浓度

组别	浓度
G5	5 %甘油
G4D1	4 %甘油+1 % DMA
G3D2	3 %甘油+2 % DMA
G2.5D2.5	2.5 %甘油+2.5 % DMA
G2D3	2 %甘油+3 % DMA

注：将配制好的稀释液用 0.22 μm 滤器过滤混匀，放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

2.3.1 精液稀释、收集及冷冻前准备工作

精液采用假阴道法采集，将采好的精液放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温台上，检测鲜精精液品质，经常规检测，镜检活力在 0.8 以上、质量合格的精子与稀释液按 1:2 的稀释比例进行稀释，分组存放。

2.3.2 精液冷冻与解冻

精液冷冻：精液分装→4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱平衡 70 min→冷冻仪程序温度为 5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放入细管运行→90 min 到 -120 $^{\circ}\text{C}$ 后冷冻完毕→取出精液→投入液氮罐保存。

精液解冻：液氮中取出冻精→快速放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻 30 s→精液稀释液体积比 1:10 稀释→稀释后的精液放于 100 \times 显微镜下进行观察测量精子密度活力。

2.3.3 精液质量检测

解冻后精液平衡 10 min，轻轻混匀，取 10 μ L 解冻后精子于精子分析仪专用载玻片上，利用精子分析仪辅助分析系统（CASA）检测解冻后精子活力（TM）、活率（SM）、直线速率检测（VSL）以及曲线速率（VCL）。

2.3.4 精子顶体完整率检测

采用吉姆萨染色法^[24]：吉姆萨染液（Jimsa）按说明书进行 1:10 稀释，常温保存。取 10 μ L 解冻精液于载玻片涂片，等待 10-15 min 自然风干。甲醛固定 15 min，风干后冲洗干净，晾干后吉姆萨染色液染色 2 h，清水冲洗，风干后于油镜下随机观察 3 个视野（ $n \geq 200$ ），重复 3 次，统计顶体完整染成紫红色精子数和总精子数比例平均值。

2.3.5 精子 DNA 完整率检测

使用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-FITC(100T;生产厂家碧云天,产品编号 C2006):将玻片放入多聚赖氨酸 30 min;配置 0.01 mol/L TBS,调 PH 值为 7.5;涂片(与染色方法一致),晾干,用 4%多聚甲醛固定 30-60 min;后用 PBS 洗 2 min 重复 2 次,用纯水洗 2 min 重复 2 次;配置标记缓冲液,滴在玻片上 20 μ L,放入湿盒 37 $^{\circ}$ C 2 h;用 0.01 mol/L TBS 洗 2 min 重复 3 次;加封闭液 50 μ L,室温湿盒 30 min;用 0.01 mol/L TBS 洗 2 min 重复 3 次;玻片上加 50 μ L SABC 稀释液,放入湿盒 37 $^{\circ}$ C 30 min;用 0.01 mol/L TBS 洗 5 min 重复 4 次;DAPI 染色 5 min,纯水洗 2 min 重复 2 次;最后抗荧光封片剂封片,在 400 \times 荧光显微镜,波长 520 nm 下随机选取四个视野($n \geq 200$)观察,精子呈现黄绿色荧光为死精子,重复三次,统计各组百分率。

2.3.6 数据统计分析方法

采用 SPSS 20 进行单因素方差分析,并利用 LSD 对数据进行多重比较。数据结果表示为平均值 \pm 标准差。

2.4 结果与分析

2.4.1 不同浓度甘油对绵羊冻精质量的影响

如表 2-6 所示, G5 组精子活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率、DNA 完整率显著高于其它组,显著高于对照组($P < 0.05$)。

表 2-6 不同浓度甘油对绵羊冻精质量的影响

组别	活力/% (TM,%)	活率/% (SM,%)	直线速率 (VSL,um/s)	曲线速率 (VCL,um/s)	顶体完整率 (%)	DNA 完整率 (%)
G0	3.51±0.43 ^d	6.72±1.20 ^d	21.77±0.56 ^b	50.17±7.77 ^a	3.74±0.57 ^d	2.79±0.31 ^d
G2	14.64±4.25 ^b	21.10±5.51 ^b	21.10±5.52 ^b	19.51±1.68 ^b	18.41±1.78 ^b	15.15±1.20 ^b
G5	37.19±5.43 ^a	50.88±3.12 ^a	30.32±1.78 ^a	49.05±9.48 ^a	35.90±2.50 ^a	36.52±2.85 ^a
G8	8.57±2.49 ^c	14.63±3.99 ^c	7.98±2.34 ^c	15.94±1.79 ^c	7.96±2.73 ^c	8.91±0.82 ^c

注：同列数据上标任一相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)，不同上标小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.4.2 不同浓度二甲基乙酰胺对绵羊冻精质量的影响

如表 2-7 所示，D3 组精子活力、活率、直线速率、曲线速率、顶体完整率、DNA 完整率显著高于其它组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 2-7 不同浓度二甲基乙酰胺对绵羊冻精质量的影响

组别	活力/% (TM,%)	活率/% (SM,%)	直线速率 (VSL,um/s)	曲线速率 (VCL,um/s)	顶体完整率 (%)	DNA 完整 率 (%)
D0	3.51±0.43 ^d	6.72±1.20 ^d	21.77±0.56 ^a	50.17±7.77 ^a	3.74±0.57 ^d	2.79±0.31 ^d
D2	19.49±1.60 ^b	27.39±2.24 ^b	13.99±1.29 ^b	30.79±4.19 ^c	19.99±0.32 ^b	19.26±0.75 ^b
D3	21.73±1.99 ^a	32.91±1.88 ^a	20.60±1.21 ^a	47.42±2.66 ^a	26.26±2.00 ^a	21.92±1.20 ^a
D4	18.19±1.94 ^b	25.62±1.73 ^b	14.76±1.74 ^b	36.93±3.075 ^b	19.51±0.69 ^b	18.72±1.01 ^b
D5	12.95±2.20 ^c	22.44±2.36 ^c	9.40±2.30 ^c	18.32±1.58 ^d	9.15±1.46 ^c	12.92±1.23 ^c

注：同列数据上标任一相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)，不同上标小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.4.3 甘油与 DMA 联合应用对绵羊冻精质量的影响的结果

如表 2-8 所示，联合应用组中 G3D2 组与 G2.5D2.5 组精子活力、曲线速率、顶体完整率及 DNA 完整率差异不显著但显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，G2.5D2.5 组与 G4D1 组曲线速率差异不显著但显著高于其它试验组 ($P<0.05$)；所有指标显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 2-8 甘油与 DMA 联合应用对绵羊冻精质量的影响

组别	活力/% (TM,%)	活率/% (SM,%)	直线速率 (VSL,um/s)	曲线速率 (VCL,um/s)	顶体完整率 (%)	DNA 完整率 (%)
G5	47.19±2.44 ^b	62.88±3.11 ^a	27.24±2.42 ^a	54.05±9.48 ^b	44.47±1.59 ^b	46.52±2.84 ^b
G4D1	40.09±2.78 ^c	52.96±1.60 ^b	14.60±1.53 ^d	66.62±4.45 ^a	36.45±0.96 ^c	38.44±1.89 ^c
G3D2	52.93±3.86 ^a	65.01±2.04 ^a	22.22±0.78 ^b	58.71±0.46 ^b	50.43±3.78 ^a	49.77±1.38 ^a
G2.5D2.5	50.70±4.23 ^a	64.03±1.98 ^a	20.02±1.78 ^b	64.70±5.47 ^a	46.96±2.05 ^a	48.96±5.72 ^a
G2D3	34.66±4.88 ^d	42.58±2.96 ^c	17.03±3.73 ^c	49.94±1.19 ^c	31.22±0.98 ^d	30.92±2.69 ^d

注：同列数据上标任一相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)，不同上标小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

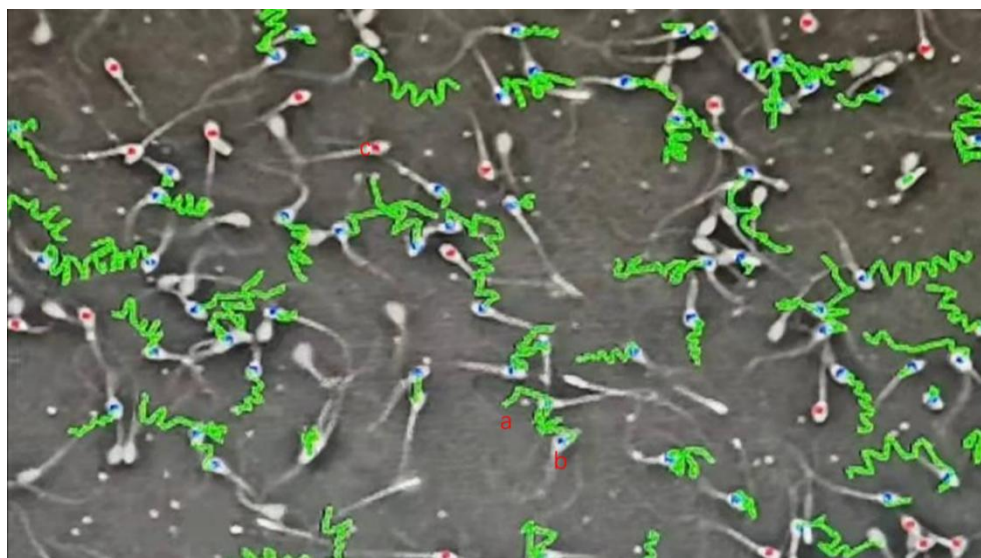


图 2-1 迈朗精液分析仪精液质量检测示意图 (20×)

Fig.2-1 Schematic diagram of semen quality detection of Milang semen analyzer (20×)

绿色线条：活精子活动路径；红色标记：死亡精子；蓝色标记：存活精子



图 2-2 精子吉姆萨染色 (100×)

Fig.2-2 Sperm Jimsa staining (100×)

A: 精子顶体破裂, B: 精子顶体轻微膨胀, C: 顶体膨胀, D: 顶体脱落, E: 顶体完整

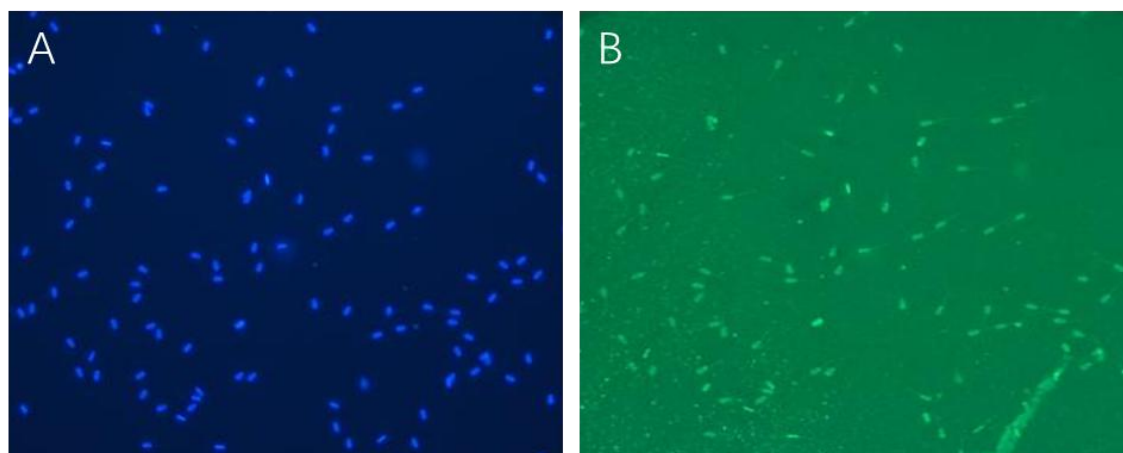


图 2-3 精子 DNA 完整率 (40×)

Fig. 2-3 Sperm DNA integrity rate (40×)

A: 蓝色标记活精子, B: 绿色标记死亡精子

2.5 讨论

2.5.1 不同浓度甘油对绵羊冻精质量的影响

在稀释液中,甘油是最常见的抗冻保护剂。刘晋津^[89]在研究中表明,在猪精液中抗冻保护剂中甘油浓度为 4% 时,冷冻-解冻后活力最佳。宋国欣^[90]在研究中表明,在绒山

羊精液抗冻保护剂中,当海藻糖与甘油协同应用时,添加1-2%甘油,DNA完整率显著高于不添加甘油组。本试验研究结果表明,绵羊精液冷冻保护剂中添加5%甘油效果最佳,宋国欣^[90]在绒山羊精液冷冻研究报告中显示,添加1-2%甘油精子解冻效果最好。与宋国欣研究结果有差异,分析其原因,一是可能由于基础液不同所导致结果不一致,二是可能由于动物品种不同导致差异。Pankaj等^[91]研究表明在公羊精液冷冻保护剂中添加5%甘油效果优于添加7%甘油。在本试验组中,绵羊精液冷冻保护剂中添加5%甘油效果优于添加8%甘油,与Pankaj研究结果基本一致。

2.5.2 不同浓度DMA对绵羊冻精质量的影响

据国内外研究报道,猪^[85]、牛^[47]、山羊^[74]、绵羊^[60]添加二甲基乙酰胺(DMA)冷冻精液取得了较好的冷冻保护效果。乙酰胺类抗冻保护剂在所有渗透性和非渗透性抗冻保护剂中,相对分子质量最小、冷冻毒性最低^[26]。研究山羊精液冷冻发现添加5%DMA时可以减少ROS的形成和活性,改善精子的功能^[59]。Bittencourt等^[48]研究显示在公羊精液冷冻保护剂中添加5%DMA或5%甘油的冷冻效果无明显差异。Santiani^[92]等发现对于秘鲁帕索马精液,添加3%-5%DMA时冷冻保护效果最佳。张伟^[85]研究表明,添加4%DMA对猪精液冷冻保存的精子活力、顶体完整率等效果最佳。在猫的研究当中,酰胺类可以很好的作为精液抗冻保护剂^[93]。郭玉堂等^[94]研究表明,1%DMA替代甘油进行公猪精液冷冻,解冻后效果更佳。本试验研究结果表明,绵羊精液冷冻保护剂中添加5%DMA或5%甘油的冷冻效果有明显差异,与Bittencourt研究结果有差异,分析其原因,一是可能由于基础液不同所导致结果不一致;二是可能由于羊种类以及不同属动物精液内含物不一致导致差异;三可能是由于DMA渗透性过大,抗冻保护成分大多流入精子内部,致使精子外部没有得到充分的保护,结晶过多导致死亡。

2.5.3 甘油与DMA联合应用对绵羊冻精质量的影响的结果

Menezes等^[38]研究表明,在绵羊精液冷冻保护剂中添加3%甘油+3%DMA或4%甘油+2%DMA时冷冻保护效果较好。在本试验中,在绵羊精液保护剂中添加3%甘油+2%DMA与2.5%甘油+2.5%DMA效果相当均好于其它联合添加组($P<0.05$),与Menezes等^[38]研究结果接近。但是,根据表3所示,2.5%甘油与2.5%DMA与3%甘油+2%DMA效果相比差异不显著($P>0.05$)。与Menezes相得结果几乎一致,由此可以推断,(1)在甘油与DMA联合应用时,效果比甘油、DMA单独使用时效果更好。

(2)在甘油与DMA联合应用时,甘油的含量不能低于2.5%,及在甘油含量为3%左右时,冷冻和解冻后的效果最好。其结论目前猜测是,当甘油含量过低时,不能在精子外部形成很好的保护膜而过多的甘油会导致精子获得更多的毒性。而甘油与DMA联合

使用时,利用其渗透性大小的特性,可以同时保护精子的内外部,使精子减少一部分冷冻损伤。

Anand^[95]的研究表明,冷冻-解冻后精子活力及运动性能测定指数越高,其人工授精的受胎率越高。因此,可以通过测定冷冻-解冻精子活力与运动性能初步断定精子品质。精子不同于一般的体细胞,是一种高度分化的单倍体雄性生殖细胞,具有独特的形态结构和生殖细胞特性^[96]。顶体是呈帽状形态的囊状结构,覆盖在细胞核的前部,精子顶体完整性是判断精子是否有受精能力的重要指标,然而,精子顶体极易因所处环境的变化而发生异常,精子颈部受损将会直接影响精子的运动,导致精液品质降低。根据Barthelemy^[97]研究顶体解体和顶体外膜的部分去除以及顶体内容物的减少是归因于精子处于冷冻状态下。这些缺陷可能归因于细胞外液冷冻过程中冰晶的形成,冰晶的形成导致顶体下区域的扩张。或者,渗透变化可引起脂质膜结构的损伤,导致水通道蛋白中的张力变化和质膜中的离子泄漏,并导致形态学变化^[98]。姜珊^[99]研究表明,精子顶体经吉姆萨染色后可分为5种类型:顶体完整、顶体轻微膨胀、顶体膨胀、顶体部分脱落和顶体全部脱落。徐振军^[100]在研究中表明,冷冻保存对绵羊精子DNA链的完整性没有显著影响。

本试验中添加3%甘油+2% DMA的DNA完整率与单独添加甘油相比差异显著,添加3%甘油+2% DMA的顶体完整率与单独添加甘油相比差异不显著,目前,甘油与DMA相互作用机制尚未明确,但可以通过现有的研究及结果进行推测。本试验结果显示,甘油与DMA联合作用会显著提高精子活力、膜完整性等相关指标,其作用结果显著优于单独添加甘油。在甘油与DMA联合应用时,甘油含量为2%左右时冷冻和解冻后的效果最好。对此进行分析,主要可能因为当仅存在甘油时,精子只能依赖甘油来抵御冷冻损伤,当甘油含量过低时不能在精子外部形成很好的保护膜,而过多的甘油会使精子产生更大的毒性,较高浓度的甘油更容易发挥保护作用,提高精子活力;而当存在DMA时,甘油与DMA共同抵御冷冻损伤,所需甘油浓度下降,高浓度甘油反而会损伤精子质膜,降低精子活力。

虽然在精液冷冻保存上取得了重要成果,但是在冷冻过程中依旧不可避免的造成损伤。造成细胞冷冻受损的重要原因可能是:(1)冷冻速率太慢时,保存的细胞暴露于高浓度抗冻保护剂中,极易受到溶液PH和溶质脱水的影响而遭受伤害或死亡(称溶液效应);(2)冷冻速率过快时,细胞内液体易出现结冰现象,对细胞造成物理或化学损伤^[101]。本试验中发现在基础液中添加3%甘油+2% DMA与2.5%甘油+2.5% DMA对精液在冷冻和解冻效果差异不显著。

2.6 结论

在绵羊精液冷冻保护剂中甘油与 DMA 联合应用添加浓度为 2.5%甘油+2.5% DMA 时更适合作为绵羊精液抗冻保护剂。

第3章 甘油与DMA对绵羊精液低温保存效果的影响

3.1 前言

精液低温保存是指，精液在采集后经过镜检筛选，与配制好的低温稀释液进行充分混合均匀，放入4℃环境中，利用低温降低精子代谢，减少营养消耗与代谢产物，抑制微生物生长。为确保精子能在低温环境中存活更久，在稀释液中添加营养物质、抗冻保护剂等，在精液恢复到37℃时使其拥有较好的受精能力。

绵羊精液进行4℃低温保存，是一种对于冷冻精液而言相对简单且保存效果相对较好的一种精液保存方式。在绵羊进行优化品种及品质的过程中，采用精液低温保存技术，可以延长精液的存活时间，改良培育进程。由此可见，精液4℃低温保存是辅助生殖技术中最重要的程序之一。低温精液保护剂的存在，进一步促进了辅助生殖生物技术的发展，提高了人工授精的受精率。甘油已被用作大多数动物物种精子的选择性低温保护剂，但是甘油对某些物种来说是避孕药，而其它低温保护剂，如酰胺，也已被证明是冷冻这些物种精液的良好选择^[37]。Fahy^[102]在1990年说明甘油的毒性作用，甘油毒性可能导致蛋白质变性、肌动蛋白相互作用的改变和无蛋白膜水泡的诱导。

除了甘油之外，已经研究了许多渗透低温保护剂来保存精液，如醇类（乙二醇、甘油等）和酰胺。建议理想的冷冻保护剂必须具有低分子量、高水溶性和低毒性。因为与甘油相比，大多数酰胺具有较低的分子量，所以这些冷冻保护剂可以引起较少的渗透损害。酰胺已被证明是在冷冻及低温环境下可以成为这些物种精液的良好替代冷冻保护剂^[45]。二甲基乙酰胺（DMA）与甘油相比，分子量与毒性小、粘度更低，更有利于对精子的保护。越来越多的学者开始将甘油替换成DMA，在牛^[52]、奶绵羊^[78]、猪^[3]、猫^[93]等动物身上均有所体现。

3.2 试验材料

3.2.1 样品采集

同第二章 2.2.1。

3.2.2 药品和器械

同第二章 2.2.2。

3.3 试验方法

绵羊精液低温稀释基础液：同第二章 2.3 表 2-2。

试验分组：同第二章 2.3 表 2-3、2-4、2-5。

3.3.1 精液采集

精液采用假阴道法采集，经常规检测，镜检活率在 80 %以上，质量合格方可用于后续试验。采集好精液的 30 min 内送到实验室，按试验组分组，每组按照精液：冷冻稀释液体积比 1:2 的进行稀释。

3.3.2 精液低温保存

将采集好的精液，采用稀释液进行 1:20 的浓度进行稀释，放入 4 °C 冰箱保存。分别截取 4 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h 时点段作为检测指标。目前精液质量的检测方法包括：采用 CASA 检测其活力、活率、直线速率、曲线速率、运动轨迹等^[15]。

3.3.3 精液质量检测

复温后精液孵育 10 min，轻轻混匀，抽取 10 μ L 精液滴在 37 °C 迈朗精子计数板中，置于 37 °C 恒温载物台上，在 100 \times 光学显微镜下随机选取 5 个视野，使用迈朗精液分析仪测定精子活力（TM）、活率（SM）、直线速率检测（VSL）以及曲线速率（VCL）。

3.3.4 精子顶体完整率检测

同第 2 章 2.3.4。

3.3.5 精子 DNA 完整率检测

同第 2 章 2.3.5。

3.3.6 精子 ATP 水平测定

使用增强型 ATP 检测试剂盒：离心沉淀细胞（4 °C 12000 g 5 min）→弃上清→加入 200 μ L 裂解液裂解细胞→再次离心（4 °C 12000 g 5 min）→取上清→用于后期测定。

标准曲线的测定：将 ATP 标准溶液用 ATP 裂解液稀释成 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 和 10 μ M 浓度梯度，制作标准曲线。

ATP 检测工作液的配置：按照每个样品或标准品按照 100 uL 配置 ATP 检测工作液 → 把待用试剂在冰浴上融解 → 取适量的 ATP 检测试剂，按照 1: 4 的比例稀释成 ATP 检测试剂。

ATP 浓度的测定：加 100 uL ATP 检测工作液到检测孔或检测管内 → 室温放置 3-5 min → 在检测孔或检测管内加上 20 uL 样品或标准品 → 用化学发光仪(luminometer) 或液闪仪测定 RLU 值。

本试剂盒在加入 10-100 uL 标准品时，在 0.1 μ M-10 μ M 的浓度范围内线性公式为： $y=0.00002-05x-0.1537$ ， $R^2=0.998$ 。

3.3.7 数据统计分析方法

采用 IBM SPSS 20 进行数据分析，采用单因素方差分析，并利用 LSD 对数据进行多重比较。数据结果表达为平均值 ± 标准差。

3.4 结果与分析

3.4.1 甘油和 DMA 联合应用对绵羊低温保存质量的影响

根据表 3-1 可知，在 4 h 时 G3D2 组与 G2.5D2.5 组差异不显著 ($P>0.05$)，但高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；在 12 h 时 G3D2 组显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；在 24 h-48 h 时 G2.5D2.5 组显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 3-1 不同浓度的甘油与 DMA 联合应用对精子低温保存活力的影响

组别	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h
G0D0	34.37±3.15 ^c	21.47±1.24 ^d	7.98±1.14 ^e	3.23±1.45 ^e	00.00±0.00 ^e
G4D1	58.83±4.09 ^b	43.24±2.15 ^c	37.09±1.86 ^b	33.95±1.25 ^b	29.85±0.67 ^c
G3D2	65.45±2.00 ^a	53.81±1.70 ^a	32.20±1.23 ^c	32.00±0.94 ^c	31.46±1.24 ^b
G2.5D2.5	67.54±2.31 ^a	51.57±0.44 ^b	44.90±1.60 ^a	45.40±0.62 ^a	40.98±1.78 ^a
G2D3	55.88±3.56 ^b	45.15±0.78 ^c	24.25±1.12 ^d	22.36±1.41 ^d	19.49±0.76 ^d

注：同列数据上标任一相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)，不同上标小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

根据表 3-2 可知，在 4 h 时，G3D2 组与 G2.5D2.5 组活率差异不显著 ($P>0.05$) 但显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；从 12 h-36 h 时，G2.5D2.5 组显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)，在 48 h 时，G4D1 组与 G2.5D2.5 组活率差异不显著 ($P>0.05$) 但显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高

于对照组 ($P<0.05$)。

表 3-2 不同浓度的甘油与 DMA 联合应用对精子低温保存活率的影响

组别	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h
G0D0	34.37±3.15 ^d	21.47±1.24 ^d	7.98±1.14 ^e	3.23±1.45 ^e	00.00±0.00 ^d
G4D1	75.15±1.97 ^b	54.34±1.38 ^c	70.35±0.82 ^b	66.11±1.09 ^b	62.03±1.54 ^a
G3D2	82.22±0.97 ^a	66.92±1.93 ^b	54.39±0.70 ^c	52.51±0.71 ^c	47.10±1.73 ^b
G2.5D2.5	81.63±1.13 ^a	78.54±4.30 ^a	74.32±1.42 ^a	71.82±1.41 ^a	63.03±2.63 ^a
G2D3	72.51±0.83 ^c	53.15±2.78 ^c	32.16±1.67 ^d	30.62±0.64 ^d	23.95±0.20 ^c

注：同上。

根据表 3-3 可知，在 4 h 时，G4D1 组、G3D2 组及 G2.5D2.5 组精子直线速率差异不显著 ($P>0.05$)，但显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；在 12 h-24 h 时，G3D2 组、G2.5D2.5 组及 G2D3 组精子直线速率差异不显著 ($P>0.05$)，显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；在 36 h 时，G3D2 组精子直线速率显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；在 48 h 时，G3D2 组与 G2.5D2.5 组精子直线速率差异不显著 ($P>0.05$)，但显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 3-3 不同浓度的甘油与 DMA 联合应用对精子低温保存直线速率的影响

组别	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h
G0D0	24.38±2.42 ^c	14.90±1.33 ^c	12.35±1.08 ^c	5.45±1.39 ^d	00.00±0.00 ^c
G4D1	37.79±1.76 ^a	24.51±1.31 ^b	22.91±1.13 ^b	19.14±1.05 ^c	12.74±1.81 ^c
G3D2	34.33±0.62 ^a	29.07±1.77 ^a	26.30±2.40 ^a	21.32±2.36 ^b	17.85±1.35 ^a
G2.5D2.5	36.97±1.61 ^a	29.46±0.76 ^a	27.78±1.86 ^a	19.28±0.99 ^c	16.08±0.89 ^a
G2D3	32.82±1.11 ^b	29.08±1.66 ^a	26.35±0.65 ^a	18.69±1.44 ^d	12.13±1.42 ^c

注：同上。

根据表 3-4 可知，在 4 h-12 h，G3D2 组与 G2.5D2.5 组差异不显著 ($P>0.05$)，显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；在 24 h 时，G3D2 组、G2.5D2.5 组及 G2D3 差异不显著 ($P>0.05$)，显著高于 G4D1 组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；在 36 h 时，G2.5D2.5 组与 G2D3 组差异不显著 ($P>0.05$)，显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；在 48 h 时，G3D2 组、G2.5D2.5 组及 G2D3 组差异不显著 ($P>0.05$)，显著高于 G4D1 组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 3-4 不同浓度的甘油与 DMA 联合应用对精子低温保存曲线速率的影响

组别	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h
G0D0	43.40±2.77 ^d	41.19±1.92 ^d	39.67±1.29 ^c	30.00±0.85 ^d	00.00±0.00 ^c
G4D1	66.37±0.62 ^c	58.05±1.92 ^c	54.35±1.23 ^b	38.47±2.93 ^b	23.89±1.95 ^b
G3D2	69.37±1.22 ^a	65.86±1.44 ^a	63.98±2.44 ^a	31.20±2.25 ^c	27.17±1.46 ^a
G2.5D2.5	70.12±1.40 ^a	66.19±0.89 ^a	61.82±2.82 ^a	44.81±2.46 ^a	27.67±2.07 ^a
G2D3	69.99±4.65 ^b	62.83±1.60 ^b	58.97±1.37 ^a	41.64±1.67 ^a	27.53±0.87 ^a

注：同上。

根据表 3-5 可知，4 h 时，G3D2 组与 G2.5D2.5 组差异不显著 ($P>0.05$)，显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；24 h-48 h 时，G2.5D2.5 组显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 3-5 不同浓度甘油与 DMA 联合应用对精子低温保存顶体完整率的影响

组别	4 h	24 h	48 h
G0D0	22.40±3.89 ^d	2.60±1.07 ^c	00.00±0.00 ^c
G4D1	58.27±2.58 ^b	35.00±1.45 ^b	24.50±1.10 ^c
G3D2	66.10±2.96 ^a	29.02±2.12 ^c	28.76±2.04 ^b
G2.5D2.5	67.56±1.10 ^a	41.18±2.20 ^a	33.66±1.90 ^a
G2D3	55.14±2.08 ^c	25.29±1.32 ^d	16.96±1.29 ^d

注：同上。

根据表 3-6 可知，4 h 时，G3D2 组与 G2.5D2.5 组显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)；24 h-48 h 时，G2.5D2.5 组显著高于其它试验组 ($P<0.05$)，显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 3-6 不同浓度甘油与 DMA 联合应用对精子低温保存 DNA 完整率的影响

组别	4 h	24 h	48 h
G0D0	20.24±1.63 ^c	2.26±0.91 ^c	0.00±0.00 ^c
G4D1	57.79±2.13 ^b	31.77±2.22 ^b	20.61±1.86 ^c
G3D2	62.34±2.02 ^a	26.72±1.28 ^c	24.55±1.12 ^b
G2.5D2.5	65.91±2.38 ^a	40.74±0.89 ^a	29.40±1.77 ^a
G2D3	54.37±2.42 ^b	21.67±1.54 ^d	12.78±1.34 ^d

注：同上。

根据表 3-7 可知, 在 4 h-48 h 所有时间段中, G2.5D2.5 组显著高于其它试验组 ($P<0.05$), 显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 3-7 不同浓度甘油与 DMA 联合应用对精子低温保存 ATP 水平 (单位 mm) 的影响

组别	4 h	24 h	48 h
G0D0	13.90±2.47 ^e	0.79±0.61 ^e	00.00±0.00 ^e
G4D1	105.46±6.36 ^b	43.54±0.59 ^b	34.56±0.74 ^b
G3D2	96.86±1.27 ^c	38.41±0.94 ^c	10.75±1.72 ^c
G2.5D2.5	126.46±4.33 ^a	57.87±2.06 ^a	51.27±1.92 ^a
G2D3	60.31±1.043 ^d	5.99±0.84 ^d	1.93±0.33 ^d

注: 同上。

3.5 讨论

在动物精液低温保存过程中, 为避免精子在长时间低温环境带来的精子细胞损伤, 通常会在低温稀释液中添加抗冷保护剂, 而甘油作为最常用的抗冻保护剂, 有文献报道, 在犬精液中单独添加 4 %-6 %时效果最佳^[103], 猪精液中单独添加 2 %-3 %时效果最佳^[104]。因此本试验稀释液中添加不同浓度甘油与 DMA 联合应用进行绵羊精液低温保存效果的比较。

在精液低温保存 (4 °C) 中, 精子会通过消耗自身能量及稀释液中的营养物质维持自身代谢。郝爱玲等^[105]研究发现, 4 %甘油低温保存 (4 °C) 牛精液效果最佳。杨文瑾^[106]研究中表明, 5 %甘油低温保存牛精液, 畸形率显著高于海藻糖组 ($P<0.05$)。2 %甘油常温保存 (16 °C) 湖羊精液 48 h-120 h 时, 精液品质提高, 保存 144 h-168 h 时, 含 2 %和 4 %甘油组精液品质提高^[107]。在绵羊精液稀释液中添加 10 %甘油低温保存到第 5 天时, 精子的顶体完整率以及质膜完整性均达到 50 %以上^[42]。低温保存 (4 °C) 猪精液, 猪精液稀释液中添加 1 %甘油或 1 %DMA, 低温保存效果差异不显著 ($P>0.05$)^[43]。

本试验研究结果有差异, 分析其原因, 一是由于稀释液基础配方差异所导致, 稀释液添加成分以及剂量的不同会直接导致对精子各个方面的影响, 二是由于羊的品种、自身品质以及生活环境的差异, 由于羊品种的不同, 精子质量就会有所差别; 即使同一品种的羊由于个体差异, 所产出的精子也会有差别; 由于生活环境以及饲养方式、配料的不同, 也会影响羊的精液质量。

在本试验中, 甘油与 DMA 低温保存 (4 °C) 中, 所有检测指标均在 4 h 时最高, 其原因可能是: (1) 保存时间较短, 甘油与 DMA 渗入较少, 精子内部所承受的毒害较小; (2) 由于短时间内, 精子消耗能量较少因此与其它时间段相比, 剩余能量高;

(3) 精子代谢产物量与保存时间成正比, 精子保存时间越短其产生的代谢产物量越少, 阻碍精子运动的可能性就越小; (4) 精子在 4 °C 保存在短时间内, 超微结构没有遭到破坏或者只是遭受轻微损害, 对精子的各项检测指标影响较小。孙时军等^[108]研究表明, 将猪精液进行低温保存 (4 °C), 将甘油和二甲基乙酰胺单独使用作为保护剂, 浓度为 1 %, 两者比较差异不显著 ($P>0.05$)。

3.6 结论

在绵羊精液低温保护剂中, 添加 2.5 %甘油+2.5 % DMA 时, 低温保存效果最佳。

第4章 大豆卵磷脂对绵羊精液低温保存效果的影响

4.1 前言

为了延长精液在体外的存活时间,并维持精液的蛋白能量需求,通常要在精液稀释液中添加动物源性蛋白,如卵黄(Egg yolk, EY)、脱脂牛奶补充剂或其他蛋白营养物质等。研究表明,在精液稀释液中添加EY具有保护精子在冷冻保存过程中免受损伤的功效,并有助于解冻后精子的活力和受精能力。通常,精子细胞膜的成分尤其是胆固醇和磷脂的含量,以及各种冷冻保护剂和补充剂与细胞膜成分的相互作用,对精子低温存活率具有一定的影响。EY可以稳定细胞膜,取代冷冻保存过程中损失的磷脂,防止胆固醇和磷脂的流出^[107]。EY提供的保护作用被认为是由于低密度脂蛋白(LDLs)和磷脂,但是直接分子调控机制尚不清楚^[109]。EY中的卵磷脂作为保护精子的重要物质之一,而大豆卵磷脂(Soybean Lecithin, SL)的卵磷脂含量是EY的10倍,因此可以起到更好的保护效果。

近年来,根据国内外研究报道显示,SL是EY的有效替代物,包括人类在内的许多物种的精液冷冻中,例如种马、山羊、家猫和狗。SL浓度在稀释液中体积1%时具有最佳的精液冷冻效果,更高的SL浓度有毒性作用^[108]。奶牛精液稀释液中添加EY或SL冷冻的精液受精率差异不显著^[109]。

基于动物蛋白培养基的不稳定性,促使研究寻找同样有效的植物源性蛋白或化学成分明确的替代品。不同批次的EY成分可能有所不同,可能受到母鸡的饮食和健康状况的影响,而植物蛋白可以得到更好的控制。更重要的是,EY存在细菌或病毒的风险,EY的污染可能会影响精子受精能力,动物蛋白的样本含有内毒素来源运输可能导致疾病传播^[110]。

SL为植物源性蛋白,卵黄为动物源性蛋白。植物源性蛋白的最大优势是:(1)取材方便,变数更小。动物源性蛋白由于母鸡的个体差异会导致卵黄质量的不稳定,从而影响试验结果。而植物源性蛋白具有取材方便,随用随取,更易保存等优点。(2)加热不易变性且卫生质量更有保障。卵黄加热会导致蛋白质变性,从而丧失功能,大豆卵磷脂可与稀释液一起加热进行消毒且不会变性。但是目前卵黄依然是最热门的稀释液营养物质的首选,在本试验中,将研究大豆卵磷脂作为稀释液中的营养物质进行精液4℃低温保存效果研究。

4.2 试验材料

4.2.1 样品采集

同第二章 2.2.1。

4.2.2 药品和器械

表 4-1 药品与器械

药品和器械	购买公司或货号
大豆卵磷脂	Solarbio 公司
Tris	Solarbio 公司
青链霉素	Solarbio 公司
吉姆萨染液	Solarbio 公司
柠檬酸	Wako 公司
葡萄糖	Wako 公司
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-FITC (100T)	碧云天公司
增强型 ATP 检测试剂盒	碧云天公司
迈朗精子分析仪	SJ-TMDI608
迈朗一次性精子计数板	ML-CASA 20
酶标仪	赛默飞公司
水浴锅	上海恒科宇公司 HWS24

表 4-2 绵羊精液低温稀释基础液

药品及溶液	剂量
Tris	1.817 g
葡萄糖	0.25 g
柠檬酸	0.995 g
双抗 (庆大霉素和青霉素)	100000 单位
甘油	1.25mL
DMA	1.25mL
水	47.5 mL

4.3 试验方法

表 4-3 不同浓度大豆卵磷脂组

组别	浓度
0 SL	0 %
0.25 SL	0.25 %
0.5 SL	0.5 %
0.75 SL	0.75 %
1 SL	1 %

4.3.1 精液采集

精液采用假阴道法采集，经常规检测，镜检活率在 80 % 以上，质量合格方可用于后续试验。采集好精液的 30 min 内送到实验室，按试验组分组，每组按照精液：冷冻稀释液体积比 1:2 的进行稀释。

4.3.2 精液低温保存

将采集好的精液，采用稀释液进行 1:20 的浓度进行稀释，放入 4 °C 冰箱保存。分别截取 4 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h 时点段作为检测指标。目前精液质量的检测方法包括：采用 CASA 检测其活力、活率、直线速率、曲线速率、运动轨迹等^[15]。

4.3.3 精液质量检测

复温后精液孵育 10 min，轻轻混匀，抽取 10 μ L 精液滴在 37 °C 迈朗精子计数板中，置于 37 °C 恒温载物台上，在 100 \times 光学显微镜下随机选取 5 个视野，使用迈朗精液分析仪测定精子活力 (TM)、活率 (SM)、直线速率检测 (VSL) 以及曲线速率 (VCL)。

4.3.4 精子顶体完整率检测

同第 2 章 2.4.4。

4.3.5 精子 DNA 完整率检测

同第 2 章 2.4.5。

4.3.6 精子 ATP 水平检测

同第 3 章 3.4.6。

4.3.7 数据统计分析方法

采用 IBM SPSS 20 进行数据分析, 采用单因素方差分析, 并利用 LSD 对数据进行多重比较。数据结果表达为平均值±标准差。

4.4 结果与分析

4.4.1 不同浓度大豆卵磷脂对精子低温保存效果的影响

根据表 4-4 所示, 在 4 h-12 h 时, 0.25 SL 的活力显著高于其它试验组 ($P<0.05$), 显著高于对照组 ($P<0.05$); 在 24 h 时, 0.5 SL 与 0.25 SL 的活力显著不显著 ($P>0.05$), 但显著高于其它试验组 ($P<0.05$), 显著高于对照组 ($P<0.05$); 在 36 h-48 h 时, 0.5 SL 的活力显著高于其它试验组 ($P<0.05$), 显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 4-4 不同浓度大豆卵磷脂对精子低温保存活力的影响

组别	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h
0 SL	23.86±1.21 ^c	14.26±1.13 ^c	3.43±1.35 ^d	0.74±0.43 ^d	0.00±0.00 ^e
0.25 SL	67.05±2.23 ^a	62.30±1.96 ^a	50.21±2.53 ^a	33.76±1.22 ^b	19.40±0.89 ^b
0.5 SL	62.39±2.26 ^b	59.53±1.06 ^b	50.34±2.16 ^a	47.27±0.77 ^a	25.10±1.81 ^a
0.75 SL	55.34±3.33 ^c	47.47±1.78 ^c	34.53±2.19 ^b	12.79±1.61 ^c	9.84±1.40 ^c
1 SL	45.15±1.34 ^d	39.86±0.52 ^d	25.29±0.88 ^c	28.45±0.77 ^a	7.30±0.74 ^d

注: 同上。

根据表 4-5 所示, 在 4 h-12 h 时, 0.25 SL 的活率显著高于其它试验组 ($P<0.05$), 显著高于对照组 ($P<0.05$); 在 24 h-48 h 时, 0.5 SL 的活率显著高于其它试验组 ($P<0.05$), 显著高于对照组 ($P<0.05$)。

表 4-5 不同浓度大豆卵磷脂对精子低温保存活率的影响

组别	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h
0 SL	34.37±3.15 ^c	21.47±1.24 ^c	7.98±1.14 ^c	3.23±1.45 ^c	00.00±0.00 ^e
0.25 SL	81.15±1.51 ^a	79.79±1.48 ^a	63.29±1.55 ^b	58.85±0.21 ^b	26.56±0.85 ^b
0.5 SL	77.22±2.72 ^b	75.44±2.63 ^b	68.24±1.68 ^a	61.33±1.09 ^a	31.32±0.67 ^a
0.75 SL	69.91±4.99 ^c	66.27±2.49 ^c	58.13±0.84 ^c	24.04±1.60 ^c	20.81±0.39 ^c
1 SL	61.97±1.81 ^d	50.32±1.69 ^d	23.54±1.03 ^d	19.41±0.72 ^d	17.83±0.86 ^d

注: 同上。

根据表 4-6 所示, 在 4 h 时, 0.5 SL 与 0.25 SL 的直线速率显著高于其它试验组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 12 h-36 h 时, 0.5 SL 的直线速率显著高于其它试验组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在 48 h 时, 0.5 SL 与 0.25 SL 的直线速率显著不显著 ($P > 0.05$), 但显著高于其它试验组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 4-6 不同浓度大豆卵磷脂对精子低温保存直线速率的影响

组别	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h
0 SL	24.38±2.42 ^b	12.90±1.33 ^d	14.35±1.08 ^d	5.45±1.39 ^d	00.00±0.00 ^c
0.25 SL	38.40±1.68 ^a	19.88±0.92 ^b	19.23±0.91 ^b	17.54±1.12 ^b	19.01±1.15 ^a
0.5 SL	40.47±1.51 ^a	25.75±1.13 ^a	24.36±1.23 ^a	22.06±1.70 ^a	19.02±1.38 ^a
0.75 SL	24.71±1.01 ^b	16.97±1.07 ^c	15.86±0.46 ^d	14.10±0.90 ^c	12.03±0.55 ^b
1 SL	22.00±1.43 ^c	17.04±1.51 ^c	16.65±0.39 ^c	15.43±0.56 ^c	13.39±1.05 ^b

注: 同上。

根据表 4-7 所示, 在 4 h-48 h 所有时间段中, 0.5 SL 的曲线速率显著高于其它试验组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 4-7 不同浓度大豆卵磷脂对精子低温保存曲线速率的影响

组别	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h
0SL	43.40±2.77 ^c	41.19±1.92 ^b	36.67±1.29 ^c	30.00±0.85 ^d	00.00±0.00 ^c
0.25SL	86.34±1.16 ^b	43.31±1.78 ^b	38.16±1.87 ^b	34.47±0.58 ^b	30.14±1.17 ^b
0.5SL	93.85±2.93 ^a	46.82±1.19 ^a	40.46±0.69 ^a	36.23±0.89 ^a	32.16±1.17 ^a
0.75SL	59.97±3.14 ^c	41.17±1.63 ^b	37.05±1.58 ^b	34.54±0.94 ^b	30.42±0.82 ^b
1SL	49.95±1.90 ^d	37.47±0.57 ^c	35.58±2.05 ^c	33.47±1.42 ^c	29.52±1.16 ^b

注: 同上。

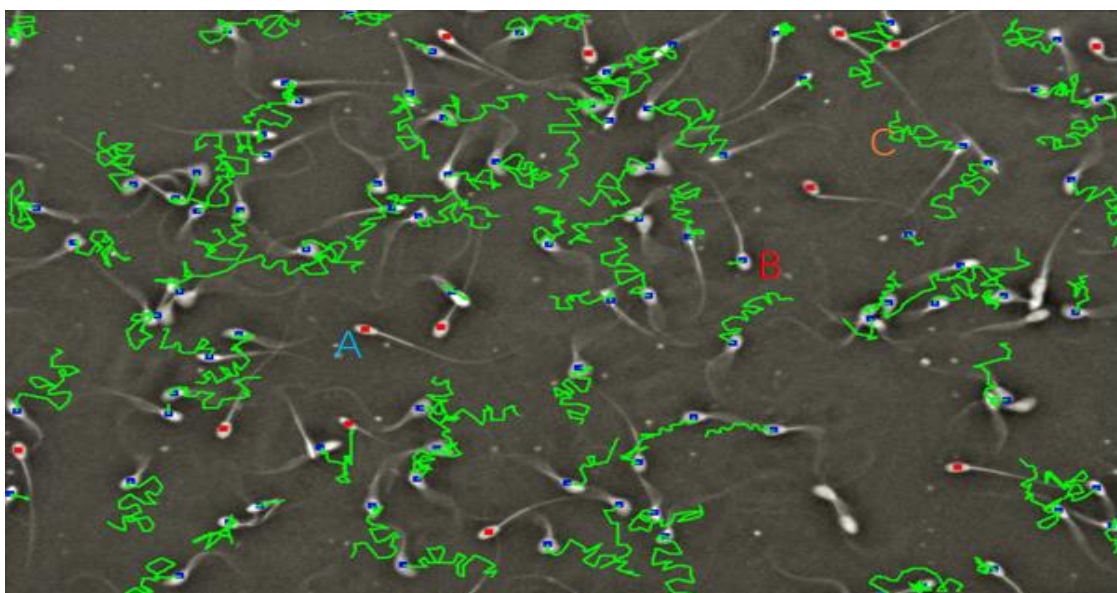


图 4-1 迈朗精液分析仪精液质量检测示意图 (20×)

Fig4-1. Schematic diagram of semen quality detection of Milang semen analyzer (20×)

绿色线条：活精子活动路径；红色标记：死亡精子；蓝色标记：存活精子

根据表 4-7 所示，在 4 h 时，0.25 SL 的顶体完整率显著高于其它试验组 ($P < 0.05$)，显著高于对照组 ($P < 0.05$)；在 24 h-48 h 时，0.5 SL 的顶体完整率与其它试验组相比差异显著 ($P < 0.05$)，显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 4-7 不同浓度大豆卵磷脂对精子低温保存顶体完整率的影响

组别	4 h	24 h	48 h
0SL	22.40±3.89 ^e	2.60±1.07 ^e	00.00±0.00 ^d
0.25SL	65.36±1.79 ^a	24.21±1.93 ^b	20.00±1.09 ^b
0.5SL	61.93±1.26 ^b	28.62±1.31 ^a	23.89±1.31 ^a
0.75SL	54.60±1.45 ^c	16.79±0.48 ^c	8.77±2.11 ^c
1SL	45.26±1.42 ^d	12.12±1.70 ^d	6.65±1.68 ^c

注：同上。

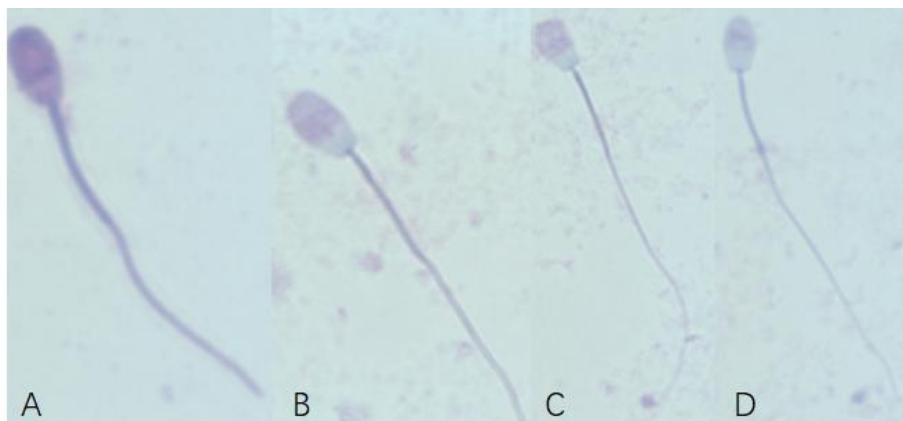


图 4-2 精子吉姆萨染色 (100×)

Fig 4-2. Sperm Jimsa staining (100×)

A. 顶体完整 B. 轻微膨胀 C. 顶体破裂 D. 顶体脱落

根据表 4-8 所示, 在 4 h 时, 0.25 SL 的 DNA 完整率显著高于其它试验组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在 24 h-48 h 时, 0.5 SL 的 DNA 完整率显著高于其它试验组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 4-8 不同浓度大豆卵磷脂对精子低温保存 DNA 完整率的影响

组别	4 h	24 h	48 h
0 SL	20.24±1.63 ^e	2.26±0.91 ^e	00.00±0.00 ^e
0.25 SL	66.72±1.30 ^a	23.68±1.54 ^b	17.81±3.07 ^b
0.5 SL	61.86±1.64 ^b	28.10±2.41 ^a	24.62±2.45 ^a
0.75 SL	55.17±1.66 ^c	16.43±1.07 ^c	10.35±0.66 ^c
1 SL	44.86±1.71 ^d	11.85±1.23 ^d	7.19±1.04 ^d

注: 同上。

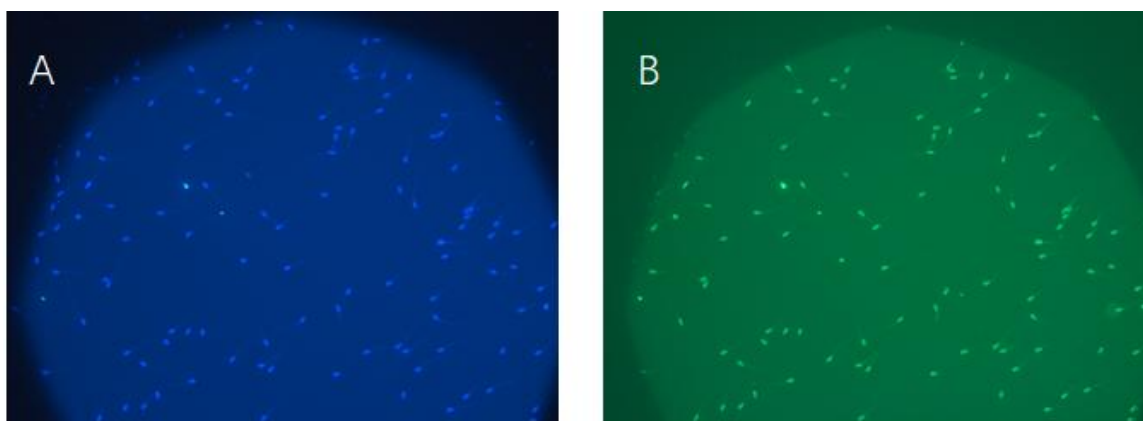


图 4-3 精子 DNA 完整率 (40×)

Fig4-3. Sperm DNA integrity rate (40×)

A: 蓝色标记活精子, B: 绿色标记死亡精子

根据表 4-9 所示, 在 4 h 与 48 h 时, 0.25 SL 的 ATP 水平显著高于其它试验组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在 24 h 时, 0.25 SL 与 0.5 SL 的 ATP 水平显著高于其它试验组 ($P < 0.05$), 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 4-9 不同浓度大豆卵磷脂对精子低温保存 ATP 水平的影响 (单位 mm)

组别	4 h	24 h	48 h
0 SL	13.90±2.47 ^d	0.79±0.61 ^d	00.00±0.00 ^e
0.25 SL	173.99±3.89 ^a	95.55±6.84 ^a	58.76±2.28 ^a
0.5 SL	127.89±9.65 ^b	93.14±1.25 ^a	54.13±5.10 ^b
0.75 SL	116.06±4.59 ^c	74.26±4.56 ^b	48.24±4.30 ^c
1 SL	112.99±1.18 ^c	48.83±2.35 ^c	43.35±2.83 ^d

注: 同上。

4.5 讨论

通过王杰^[1]的研究, 在稀释液中添加 0.5 %大豆卵磷脂在第 18 天时, 精子活率显著优于 1 %与 1.25 %组 ($P < 0.05$)。本试验研究结果与王杰有相似性, 在本试验中, 添加 0.5 % SL 稀释液在直线速率、曲线速率等指标中数据最佳。Layek S^[110]表明, 在黑犀牛和印度犀牛精液进行低温保存中, EY 和 2 % SL 的存活率最高, 其次是 1 % SL, EY、1 % SL 和 2 % SL 的顶体完整性相似 ($P > 0.05$)。孟娜娜^[111]在文章中阐述, 采用 0.375 %大豆卵磷脂的稀释液效果最佳。赵建清^[112]的研究表明, 在稀释液中添加 1.25 %大豆卵磷脂能够对绵羊精液进行长时间有效保存 9 天。本试验研究结果与前人有异, 在预试验中, 稀释液中大豆卵磷脂含量超过 1.25 % (包含 1.25 %) 时, 会产生大量的黏连导致精子死亡。可能是由于稀释液基础液的配比不同以及大豆卵磷脂厂家以及生产批次不同。根据刘鑫^[113]的研究表明, 在稀释液中添加 0.6 g/L 的大豆卵磷脂能显著提高猪精液在低温保存状态下 (4 °C) 的效果。李彦林^[114]马鹿精液在常温保存稀释液中, 添加 0.2 %大豆卵磷脂时对精子效果最好, 优于其它组 ($P < 0.05$)。段洪云^[115]等解释说, 在马精液冷冻保存中, 20 %的大豆卵磷脂可以替代卵黄作为马精液冷冻保护剂。

本试验结果表明, 精液低温保存 4 h 时效果最好, 随着时间的增加精液检测的各项指标数据均呈下降趋势。其原因可能是: 首先精子保存随着时间的增加, 代谢产物增多污染稀释液影响精液品质, 使稀释液营养物质随着代谢物的增加而减少。根据综合判断, 稀释液中添加 0.5 % SL 效果最佳。分析其原因: 一、大豆卵磷脂含量过高不利于精子存

活,可能由于大豆卵磷脂的粘稠特性导致精子死亡。而大豆卵磷脂含量过低,又会致使稀释液中蛋白含量不足,无法为精子提供足够的营养需求及保护作用。二、精液稀释液中添加大豆卵磷脂,大豆卵磷脂的亲水基团与精子内部水分子结合,在精子表面形成一层保护膜,降低低温对精子膜的损伤,提高质膜稳定性。大豆卵磷脂的凝固点低于缩醛磷脂,可渗透进精子细胞内,取代缩醛磷脂,故大豆卵磷脂在低温冷冻保存过程中可提高精子的抗冷能力,提高精子存活率。另一方面,在精液冷冻保存过程中,大豆卵磷脂所结合的不饱和脂肪酸可作为能量物质及活性物质,提高精子活力^[116]。

根据前人多年来的试验研究得出大豆卵磷脂对精液保存有提升效果,但是所得出的添加浓度量都不一致。分析其原因可能是:一、大豆卵磷脂生产厂家及批次不同;二、稀释液配比成分及剂量不同;三、物种及羊的品种不一致。以上分析的其中之一个原因也会导致结果差异。

4.6 结论

在本研究中,稀释液中在添加 2.5 %甘油+2.5 % DMA+0.5 % SL 对绵羊精液低温保存效果最好。

第5章 全文结论

本试验在绵羊精液冷冻稀释液中添加不同浓度的甘油与 DMA 及联合应用 SL, 通过测定精子在冷冻-解冻后或低温保存后的相关指标, 得出以下结论:

1. 本试验研究表明, 在绵羊精液冷冻保存中, 添加 3%甘油+2% DMA 与 2.5%甘油+2.5% DMA 效果最优。

2. 在绵羊精液低温保存试验中, 添加 2.5%甘油+2.5% DMA+0.5% SL 最优。依据输精标准可维持 48 h。

参考文献

- [1] 王杰. 大豆卵磷脂粉剂稀释液对绵羊精液低温保存效果的影响[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2019.
- [2] 金美林, 蔡元. 绵羊精液冷冻保存技术的研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医, 2017, 47(03): 61-62.
- [3] Weissenberg R., Menashe Y. Inception and five-year run of a semen cryobank clinical and Behavioral aspects[J]. Cell & Tissue Banking, 2001, 2(4): 235-239.
- [4] 秦鹏春, 石惠芝. 猪精子冷冻损伤的研究[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 1997(01): 27-28.
- [5] Saha A., Asaduzzaman M., Bari FY., et al. Cryopreservation Techniques for Ram Sperm[J]. Veterinary Medicine International, 2022, 20-22.
- [6] Morris, G.J., Acton, E., Murray, B.J., et al., Freezing injury: The special case of the sperm cell[J]. Cryobiology, 2012, 64, 71-80.
- [7] 候云鹏, 周光斌, 傅祥伟. 动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用第二版[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [8] Anel L., de Paz P., Alvarez M., et al. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen[J]. Theriogenology, 2003, 60: 1293-1308.
- [9] 吴海荣, 阿布力孜·吾斯曼. 绵羊精液冷冻保存研究进展[J]. 中国草食动物, 2012, 32(01): 63-66.
- [10] Tasseron F., Amir D., Schindler H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution cooling and freezing[J]. Reprod Fertil, 1977, 51: 461-462.
- [11] 蔡缪荧, 程国虎, 张昊. 山羊精液颗粒冷冻方法的研究[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015(06): 5-6.
- [12] 周煜. 0.25 mL 细管冷冻保存姜曲海猪精液方法的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [13] 路婷婷. 三种中草药多糖对绵羊精液 4°C 保存效果的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
- [14] 李方舟, 李宇, 张利坤, 等. 葡萄籽原花青素对山羊精液低温保存效果的影响[J]. 家畜生态学报, 2020, 41(07): 59-63.
- [15] Douglas L., Archer. Freezing: an underutilized food safety technology?[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90(2): 8-11.
- [16] Khalil WA., El-Hairy MA., Zeidan AEB., et al. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights[J]. Int J Vet Sci Med, 2018, 6: S49-S56.

- [17] Roca J., Hernández M., Carvajal G., et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival[J]. *J Anim Sci*, 2006, 84: 2692-2699.
- [18] Martinez AMJ., Morrell JM., Parrilla, I., et al. Improvement of boar sperm cryosurvival by using singlelayer colloid centrifugation prior freezing[J]. *Theriogenology*, 2012, 78, 1117-1125.
- [19] Catalan, J., Llavanera, M., Bonilla-Correal, S., et al. Irradiating frozen-thawed stallion sperm with redlight increases their resilience to withstand post-thaw incubation at 38 °C[J]. *Theriogenology*, 2020, 157, 85-95.
- [20] 阿布力克木·提力瓦尔迪. 不同保存方法对多浪羊精液品质及受胎效果的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
- [21] Barbas JP., Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells[J]. *Cell Tissue Bank*, 2009, 10: 49-62.
- [22] 王立强, 陈辉, 马健. 小尾寒羊精液冷冻技术研究[J]. *畜牧兽医杂志*, 2004(01): 11-13.
- [23] 郭富强, 张燕军, 王瑞军, 等. 山羊精液冷冻保存研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2020, 41(06): 79-84.
- [24] 李宇. 淫羊藿多糖对山羊精液冷冻保存效果的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019.
- [25] YáñezOrtiz I., Catalán J., RodríguezGil JE., et.al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep[J]. *Animal reproduction science*, 2021(prepublish).
- [26] 苟想珍, 何茂昌, 王珂, 等. 同期发情技术在萨福克肉羊冻精杂交改良中的应用研究[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2015, 31(08): 68.
- [27] Rajan Robin, Matsumura Kazuaki. Development and Application of Cryoprotectants[J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2018, 1081-1083.
- [28] Fernandez AD., Preve MO., Villegas N. Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility[J]. *Theriogenology*, 2003, 60(1): 21-26.
- [29] Abadjieva D., Yotov S., Mladenova V., et al. Positive effect of natural antioxidant oregonin from *Alnus incana* bark on ram semen quality stored at 5°C for 48 h[J]. *Res Vet Sci*, 2020, 131: 153-158.
- [30] Zhao JQ., Xiao GL., Zhu WL., et al. Ram semen preserved at 0 degrees C with soybean lecithin Tris-based extender substituted for egg yolk[J]. *Anim Biosci*, 2021, 34(2): 192-197.
- [31] 刘福元, 陈玲香, 杨永林, 等. 萨福克羊精液低温液态保存效果的研究[J]. *安徽农业科学*, 2008(25): 10887-10889.
- [32] Dziuk PJ. Dilution and Storage of Boar Semen[J]. *Journal of Animal Science*, 1958, 17(3)1-3.

- [33] Zahra M., Abbas F. Ginger and echinacea extracts improve the quality and fertility potential of 7 frozen-thawed ram epididymal spermatozoa[J]. *Cryobiology*, 2020, 92-94.
- [34] 杨立明. 人工授精中影响家畜精子在体外存活的各种因素[J]. *现代畜牧科技*, 2017(01):42.
- [35] Kasai M., Nishimori M., Zhu SE., et al. Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures[J]. *Biol Reprod*, 1992, 47: 1134-1139.
- [36] Liu W-X., Luo M-J., Huang P., et al. Comparative study between slow freezing and vitrification of mouse embryos using different cryoprotectants[J]. *Reprod Domest Anim*, 2009, 44: 788-791.
- [37] Yamada C., Caetano Heloísa VA, Simões R., et al. Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide[J]. *Anim Reprod Sci*, 2007, 99: 384-388.
- [38] Gungor S., Inanc Muhammed E, Ozturk C., et al. Gallic and carnosic acids improve quality of frozen-thawed ram spermatozoa[J]. *Andrologia*, 2019, 51(10)27-29.
- [39] 武浩, 王立强, 华松, 等. 无角陶赛特羊冻精制作技术[J]. *中国畜牧杂志*, 2002(06): 29-31.
- [40] Forouzanfar M., Sharafi M., Hosseini SM., et al. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen[J]. *Theriogenology*, 2010, 73(4), 480-487.
- [41] de Menezes GFO., Bittencourt RF., Cardoso Fernando de L., et al. Dimethylacetamide alone or in combination with glycerol can be used for cryopreservation of ovine semen[J]. *Animal reproduction*, 2021, 17(4)32-35.
- [42] 王强. 绵羊精子稀释液最佳配方及稀释比例与保存温度的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [43] 孙时军, 朱华鸿, 陈晓峰, 等. 低温保护剂对 4°C 保存猪精液活率的影响[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2012(04): 28-29.
- [44] Sztein JM., Takeo T., Nakagata N., History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation[J]. *Cryobiology*, 2018, 82: 57-63.
- [45] Alvarenga MA., Papa FO., Landim-Alvarenga FC., et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review[J]. *Anim Reprod Sci*, 2005, 89(1-4): 105-113.
- [46] Watson PF. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa[J]. *Vet Rec*, 1975, 97: 12-15.
- [47] 贾永宏, 朱庆超, 杨海涛, 等. 牛精液冷冻保护剂研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2014, 35(01): 5-8.
- [48] Bittencourt RF., Oba E., Biscarde CEA., et al. Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation[J]. *Cryobiology*, 2018, 85: 1-6.

- [49] Bergeron A., Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk[J]. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73: 1338-1344.
- [50] Gillan L., Evans G., Maxwell WM. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2004, 16(4): 447-454.
- [51] 刘亮, 孟祥黔, 吴彩凤, 等. 鸡蛋黄和鹌鹑蛋黄在崇明白山羊精液冷冻保存中效果比较[J]. *上海农业学报*, 2011, 27(2): 45-48.
- [52] Pace MM., Graham EF., Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing[J]. *J Anim Sci*, 1974, 39: 1144-1149.
- [53] 雒亚璇. 牛细管型冷冻精液品质评价及生产环节微生物污染分析[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2011.
- [54] 曹宗顺, 卢凤琦. 磷脂的提取与精制[J]. *中国医药工业杂志*, 1995(01): 42-45.
- [55] Ramanathan K., Vanmathy K., Ahmed T., et al. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C[J]. *Small Ruminant Research*, 2011, 99, 208-213.
- [56] Salmani H., Towhidi A., Zhandi M., et al. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen[J]. *Cryobiology*, 2014, 68: 276-280.
- [57] van Wagendonk-de Leeuw AM., Haring RM., Kaal-Lansbergen LM., et al. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract[J]. *Theriogenology*, 2000, 54: 57-67.
- [58] 胡传水, 朱银莉, 许春荣, 等. 大豆卵磷脂取代卵黄对猪精液低温保存的影响[J]. *广西农学报*, 2013, 28(1): 36-38.
- [59] Fu Jieli., Li Yuhua., Wang Lirui., et al. Bovine serum albumin and skim-milk improve boar sperm motility by enhancing energy metabolism and protein modifications during liquid storage at 17 °C[J]. *Theriogenology*, 2017, 102: 87-97.
- [60] Abe Yasuyuki., Asano T., Wakasa I. et al. Cryopreservation of canine spermatozoa using a skim milk-based extender and a short equilibration time[J]. *Reprod Domest Anim*, 2020, 55: 1548-1553.
- [61] Namula Zhao., Kodama R., Tanihara F., et al. Effects of skim-milk supplementation on the quality and penetrating ability of boar semen after long-term preservation at 15°C [J]. *Acta Vet Hung*, 2014, 62: 106-116.
- [62] Segabinazzi Lorenzo GTM., Scheeren Veronica FC., Freitas Dell'Aqua Camila P., et al. Cholesterol-loaded cyclodextrin addition to skim milk-based extender enhances donkey semen cooling and fertility in horse mares[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2021, 105: 102-112.

- [63] Susilowati S., Triana IN., Wurlina W., et al. Addition of L-arginine in skim milk extender maintains goat spermatozoa quality in chilled temperature for five days[J]. *Vet World*, 2019, 12: 1784-1789.
- [64] 慕勇,胡建宏. 山羊精液低温保存技术研究进展[C]. 中国畜牧兽医学会家禽生态学会学术研讨会论文集.[出版者不详], 2014:135-138.
- [65] 杨威. 三种抗氧化剂对猪精子冷冻保存效果的影响[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [66] 张宇. NAC、SLS 和 SDS 三种抗氧化剂对山羊精液冷冻保存效果的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2021.
- [67] 窦英杰. 奶绵羊精液冷冻稀释液优化研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2021.
- [68] 张嘉保, 田见晖主编. 动物繁殖理论与生物技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [69] Martine-Pastor F., Tizado EJ., Garde JJ., et al. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis[J]. *Theriogenology*, 2011, 75: 783-795.
- [70] Holt William V, Cummins James M, Soler Carles. Computer-assisted sperm analysis and reproductive science; a gift for understanding gamete biology from multidisciplinary perspectives[J]. *Reproduction, fertility, and development*, 2018, 30(6).
- [71] 张星. 黄芪多糖对奶山羊精液冷冻保存效果的影响[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2021.
- [72] Hirano Y., Shibahara H., Obara H., et al. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2001, 18: 213-218.
- [73] Buranaamnuay K., Grossfeld R., Struckmann C., Rath D. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm[J]. *Anim Reprod Sci*, 2011, 127, 56-61.
- [74] 张小香, 张士海, 朱宽峰. 精液质量分析系统与血球计数板法测定精子密度方法误差来源分析[J]. *中国畜牧业*, 2020(14): 87.
- [75] 夏敏杰, 芦洁, 黄超等. dl-扁桃酸对精子质膜及顶体的完整性和线粒体膜电位的影响[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(05): 554-559.
- [76] Arav A., Yavin S., Zeron Y. et al. New trends in gamete's cryopreservation[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187: 77-81.
- [77] Tsai Y L., Liu J., Garcia JE., et al. Establishment of an optimal hypo-osmotic swelling test by examining single spermatozoa in four different hypo-osmotic solutions[J]. *Hum Reprod*, 1997, 12: 1111-1113.
- [78] 王俊琴. 奶绵羊精液冷冻程序的探索与研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.

- [79] Gadea J., García-Vazquez F., Matás C., et al. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function[J]. *J Androl*, 2005, 26: 396-404.
- [80] 林小峰, 吴玉萍, 陈学军, 等. ATP 检测方法研究进展[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(36): 33-38.
- [81] Brito LFC., Barth AD., Bilodeau GS., et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate[J]. *Theriogenology*, 2003, 60: 1539-1551.
- [82] Gambier RM., Mulcahy DL., Confocal laser scanning microscopy of mitochondria within microspore tetrads of plants using rhodamine 123 as a fluorescent vital stain[J]. *Biotech Histochem*, 1994, 69: 311-316.
- [83] Jouan E., Le VM., Denizot C., et al. The mitochondrial fluorescent dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCTs) 1 and 2[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2014, 28: 65-77.
- [84] Seifi-Jamadi A., Ahmad E., Ansari M., et al. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen[J]. *Cryobiology*, 2017, 75: 15-20.
- [85] 张伟. 二甲基乙酰胺、海藻糖与低密度脂蛋白对猪精液冷冻保存效果的研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2012.
- [86] 范文华. 大豆卵磷脂和原花青素在山羊精液冷冻中的应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- [87] 施力光, 荀文娟, 岳文斌, 等. 山羊精子发生不同阶段的显微与超微结构观察[J]. *激光生物学报*, 2010, 19(04): 488-494.
- [88] Grötter L., Cattaneo L., Marini PE., et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization[J]. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 2019, 54(4): 12-15.
- [89] 刘晋津, 刘群, 吴腾, 等. 甘油浓度、去甲肾上腺素对猪精液冷冻保存的研究[J]. *猪业科学*, 2016, 33(03): 112-113.
- [90] 宋国欣, 张家新, 王瑞军, 等. 海藻糖和甘油相互协同提高绒山羊精液冷冻保存品质[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(01): 114-119.
- [91] Jha PK., Alam MGS., Mansur AAL., et al. Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques[J]. *Cryobiology*, 2019, 89: 35-41.
- [92] Santiani A., Evangelista-Vargas S., Vargas S., et al. Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol[J]. *Andrologia*, 2017, 49: 34-36.

- [93] Madrigal VM., Bittencourt RF., de Lisboa Ribeiro FA., et al. Can amides be alternative cryoprotectors for the preservation of feline semen[J]. *Cryobiology*, 2020, 97: 138-143.
- [94] 郭堂玉, 凌泽继, 韦明宇, 等. 不同冷冻保护液和解冻温度对猪精液冷冻效果的影响[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(07): 1000-1004.
- [95] Anand M., Yadav S., Assessment of motion and kinematic characteristics of frozen-thawed Sirohi goat semen using computer-assisted semen analysis[J]. *Vet World*, 2016, 9: 203-206.
- [96] 张利坤. 二甲双胍对同羊精液冷冻保存效果的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2020.
- [97] Barthelemy, C., Royere, D., Hammah, S., et al. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation[J]. *Syst. Biol. Reprod, Med* 1990; 25: 29-40.
- [98] Sa-Ardrit M., Saikhun, J., Thongtip, N., et al. Ultrastructural alterations of frozenthawed asian elephant (*elephas maximus*) spermatozoa[J]. *Int. J. Androl*, 2006; 29: 346-352.
- [99] 姜珊. 冷冻处理对牛、绵羊、山羊精子形态及受精能力的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.
- [100] 徐振军, 刘冰, 王佳朋, 等. 冷冻保存对绵羊精子 DNA 链完整性的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010(23): 59-61.
- [101] Mazur P., Leibo SP., Chu EH., A two factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells[J]. *Exp Cell Res*, 1972, 71: 345-355.
- [102] Fahy GM., Lilley TH., Linsdell H., et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms[J]. *Cryobiology*, 1990, 27: 247-268.
- [103] 曹授俊, 关文怡, 齐军喆. 低温保存犬精液稀释液的研究进展[J]. *山东畜牧兽医*, 2010, 31(07): 93-94.
- [104] 李新红, 李步社. 猪精液体外低温保存技术新进展[J]. *猪业科学*, 2017, 34(10): 110-112.
- [105] 郝爱玲, 阿淑艳, 郑伟, 等. 不同甘油浓度对牛鲜精低温保存的影响[J]. *中国奶牛*, 2007(10): 33-34.
- [106] 杨文瑾. 甘油和海藻糖对低温保存精液品质的影响[J]. *中国奶牛*, 2011(20): 25-27.
- [107] 张柳明, 马金亮, 冯云奎, 等. 甘油在湖羊精液常温保存中作用效果研究[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2020, 41(05): 69-74.
- [108] Wojtusik J., Stoops MA., Roth TL., Comparison of soy lecithin, coconut water, and coconut milk as substitutes for egg-yolk in semen cryodiluent for black rhinoceros (*Diceros bicornis*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*)[J]. *Theriogenology*, 2018, 121: 72-77.

- [109] Graham JK., Foote RH., Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing[J]. *Cryobiology*, 1987, 24: 42-52.
- [110] Layek SS., Mohanty TK., Kumaresan A., et al. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders[J]. *Anim Reprod Sci*, 2016, 172: 1-9.
- [111] 孟娜娜, 孙树春, 王寒阳, 等. 绵羊精液 4°C 液态保存的稀释液配方优化研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2015, 51(05): 34-38.
- [112] 赵建清, 王杰, 李娜, 等. 大豆卵磷脂替代卵黄的稀释液低温保存绵羊精液效果[J]. *塔里木大学学报*, 2018, 30(04): 15-19.
- [113] 刘鑫, 崔茂盛, 刘朝阳, 等. 大豆卵磷脂对猪精液 4 °C 保存质量的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(22): 68-69.
- [114] 李彦林, 库尔班·吐拉克, 金大智, 等. 不同保护剂对马鹿精液常温和低温保存效果的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(12): 144-149.
- [115] 段洪云, 张翔, 孙玉玲, 等. 大豆卵磷脂对马精液冷冻保存的效果研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(08): 150-154.
- [116] Badens E., Magnan C., Charbit G., Microparticles of soy lecithin formed by supercritical processes[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72: 194-204.

致谢

回想硕士两载路途，感叹时间太短，所学知识太少，对学校敬业的老师们、和蔼的导师和友好的师哥师姐及同门有太多的不舍，在这里我度过了人生中最美好的两年时光。在论文即将完成之际，特此感谢我的母亲、石河子大学的老师及新疆农垦科学院科研工作者们，我的进步离不开大家的鼎力相助。

首先要感谢我的导师万鹏程研究员，在研究生的两年里，我见识到了万老师的为人处事及学术能力，让我明白了，优秀的人不是只有一方面的优秀，更是具有从内到外的个人魅力。在生活中万老师关爱学生及下属、疼惜家人；在工作中认真严谨，雷厉风行；在学术上追求极致，实事求是。我的论文及试验皆是由万老师一手指导。

其次感谢新疆农垦科学院的杨永林老师，倪建宏老师，杨华老师，郭延华老师，对我试验的帮助。感谢中国农业大学傅祥伟老师对我论文的帮助。感谢中国农业科学院北京畜牧兽医研究所赵学明老师对我文章的帮助。

感谢石河子大学的老师们和新疆农垦科学院的王晶晶师姐、刘昱成师姐、刘宏涛师哥、白佳琛师哥、张振良师哥、郝哨鹏、王龙飞、李厚儒师弟及羊场的工作人员等对我的试验工作的大力支持。因为大家的帮助我的试验才能如此的顺利，我的科研生活才能如此有趣。

感谢赵卓同学，在与其相处中教会我与人相处最重要的是包容与理解。

最后要感谢我的母亲孙晓莉女士，是她在我泄气懈怠时给予我鼓励，叫我振作向前。她以身作则，永远勇敢的、积极乐观的面对生活中的各种困难，在绝望的境地也能打拼出自己的一番天地。

乘风破浪会有时，直挂云帆济沧海。在即将毕业之际，我诚挚祝愿以上的所有人能心愿得所，好人终有好报。与大家的情谊是我此生不可复制的成就。

作者简介

个人信息

姓名：郝冠英

性别：女

出生年月：1995.11

民族：汉

籍贯：黑龙江省伊春市

发表文章：《不同抗冻保护剂对绵羊精液冷冻保存效果的影响》

工作经历：

- 1.负责羊场的饲喂工作 包括各个阶段发育饲料的营养搭配卫生工作包括环境卫生、牲畜的疫苗接种等相关工作。
- 2.负责配种、精液采集等相关工作 包括适龄生产动物的分配，调教以及在生产生育期间专门营养饲料的搭配；以及相关的运输工作；根据不同品种牲畜的身体结构采取相应的采精措施。
- 3.负责实验室中的精液检查、精液冷冻等所有工作 包括精液的各项检查，稀释液的整体优化，精液冷冻—解冻后成活率的提高。
- 4.参与冲胚以及人工授精工作。

石河子大学硕士研究生论文
导师评阅表


研究生姓名	郝冠英	学制	两年
专业	农业硕士	研究方向	畜牧

学术评语：

该论文以绵羊精液为研究对象，开展对精液稀释液的研究。通过添加不同抗冻保护剂对绵羊精液进行冷冻及低温保存效果的提升。从而提高人工授精的受精率。

该论文研究目的明确，设计思路新颖，实施方案科学、具体，采用的技术路线适用先进，研究的工作量达到了专业硕士学位的要求，说明作者已经在本学科领域已经有了扎实的理论基础，能通过科学知识及参考文献去解决在生产实践问题，具有较强的科研工作能力。论文写作总体思路清晰，文理通顺，结构合理，数据可靠，结果可信。

综上所述，该生理论知识扎实，对课题方面的知识深入掌握，熟悉本工作的国内外研究动态，能利用所学知识解决工作中遇到的问题，具有较强的科研工作能力和较强的实践动手能力。同意参加论文答辩。

指导教师签字： 

2022年10月22日

