

● 研究报告 ●

摘要：
较冷冻保护
度对广东三

以及抗冷冻保护剂穿透膜运动的速率,并保持细胞内 ATP 含量的稳定。另外,冷冻过程可能有利于精子获能,同时对精子是一个存强除弱的筛选过程。但经过冷冻解冻过程后的精子,活力远不及新鲜精液。因此,在精液冷冻和解冻过程中,向稀释液中添加冷冻保护剂,以提高解冻后的精子活力是十分必要的。

咖啡因学名为 1,3,7—三甲基黄嘌呤(Xantine),又称咖啡碱,是存在于咖啡、茶叶中的一种生物碱,有兴奋中枢神经的作用,是一种精子活性物质。Barkay 等(1977)将咖啡因用于精液冷冻保存中,发现具有激发精子活力的作用。徐章龙(1980)、吴石坚(1981)将其应用于猪的精液冷冻,Anle(1984)将其应用于绵羊的精液冷冻,金穗华等(1990)将其应用于牛的精液冷冻保存中,均取得较为理想的效果。咖啡因作为体外精子促活剂的研究非常多。20 世纪 80 年代初期已有一些研究报道咖啡因可在体内促进多种动物以及人类精子的活力和运动速度,促进精子获能,而且延长精子的存活时间。应用连续多次曝光照相技术(JTK)与体外活体染色体技术相结合,对咖啡因在体外影响精子活力的作用做了较为宏观的研究,结果显示,咖啡因可以将不活动的精子激活转为活动状态,使活动精子比例明显增加,但对精子的活力并无影响。本试验旨在探讨不同浓度咖啡因对三黄鸡精液冷冻颗粒解冻后精子活力、畸形率和存活时间的影响,比较不同浓度咖啡因在鸡精液冷冻过程中的作用和效果,从而选择三黄鸡冷冻精液最适宜的咖啡因浓度。

1 材料与方法

111 试验材料

11111 种公鸡的选择:从湛江海洋大学家禽育种中心选择 300 日龄左右、健康无病、精液品质良好的三黄鸡种公鸡供采精用。

11112 药品、试剂以及仪器:咖啡因(广州化学试剂厂出品),丙三醇(分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司出品,批号:w990540),曲利本蓝(分析纯,广州化学试剂厂出品),无水乙醇(广州市新港化工有限公司出品),龙胆紫(上海标本模型厂出品,批号:900515),硫酸链霉素(华北制药股份有限公司出品,批号:001121),新鲜蛋黄(湛江海洋大学家禽育种中心收集的新鲜鸡蛋制作),葡萄糖(分析纯,广州化学试剂厂出品),XMT 系列智能数显控温仪(余姚市长江温度仪表厂出品)。

112 试验方法

11211 精液采集:采用背部按摩法采集精液。采集过程中要求精液无粪便、血液、饲料等污染,采集后用棉花和纱布包好,置于保温杯中,迅速带回实验室,参见徐日福等(1996)在《种鸡精液冷冻保护剂的确定》一文的方法。

11212 稀释液配制:在 517 % 的蔗糖溶液中加入新鲜卵黄液,配成含卵黄 20 % 的 I 液,其中每 1 mL I 液须加入链霉素 500 单位,摇匀。以 I 液为基础液,加上无水甘油,配成含有甘油 16 % 的 II 液。再以 I 液为基础液,加入咖啡因及 II 液,配成浓度为 16、12、10、8、6、4、2 mmol/L 的 II 液,II 液与 II 液放入 5 °C 的冰箱内预冷 1 h。

11213 精液冷冻前的准备:同源精液采集后,先取 1 mL,用相同温度的不含冷冻保护剂的 I 液进行 1:2 的第一步稀释后,用纱布包上 10 层,放在 5 °C 左右的冰箱中预冷 1 h 左右,再用相同温度含不同浓度咖啡因的 II 液进行 1:1 的第二步稀释,配成咖啡因浓度为 8、6、5、4、3、2、1 mmol/L 的 II 液,接着在 5 °C 左右的冰箱中平衡。

11214 精液冷冻:用泡沫塑料盒盛装液氮,在距离液氮面 1~2 cm 处架上铜丝网,待铜丝网充分冷却,温度降至 -100~-90 °C 时,开始滴冻。用吸管吸取一滴,滴于铜丝网上,

加盖,熏蒸 2 min,待颗粒发白有光泽时可将颗粒浸入液氮中。

11215 解冻:取 0.15 mL 51.7 %的葡萄糖溶液,放入小试管内,浸入 40 °C热水中经 2~3 min 后,用预冷的长柄镊子从贮精罐中快速取出一颗冻精投入小试管内,待溶化 1/3~1/2 时,取出试管,并快速不停地晃动,使冻精快速溶解,当精液全部溶化后,保存在 35 °C的环境中,进行精液评定。

11216 精子活力检查:按常规方法进行,参见韩毅冰等《透明质酸对猪精子活率、获能、顶体反应及体外受精穿透率的影响》一文的方法。

11217 畸形率检查:按常规方法进行。

11218 存活时间检查:在 35 °C的温度条件下保存精液,并在 25 °C室温观察精子的存活情况,采用平板压片法,将各组精液分别置于显微镜下进行观察,每隔 15 min 观察一次精子的活力,直到精子全部死亡,登记存活时间。

11219 数据处理:采用方差分析法分析处理数据,并进行显著性检验。

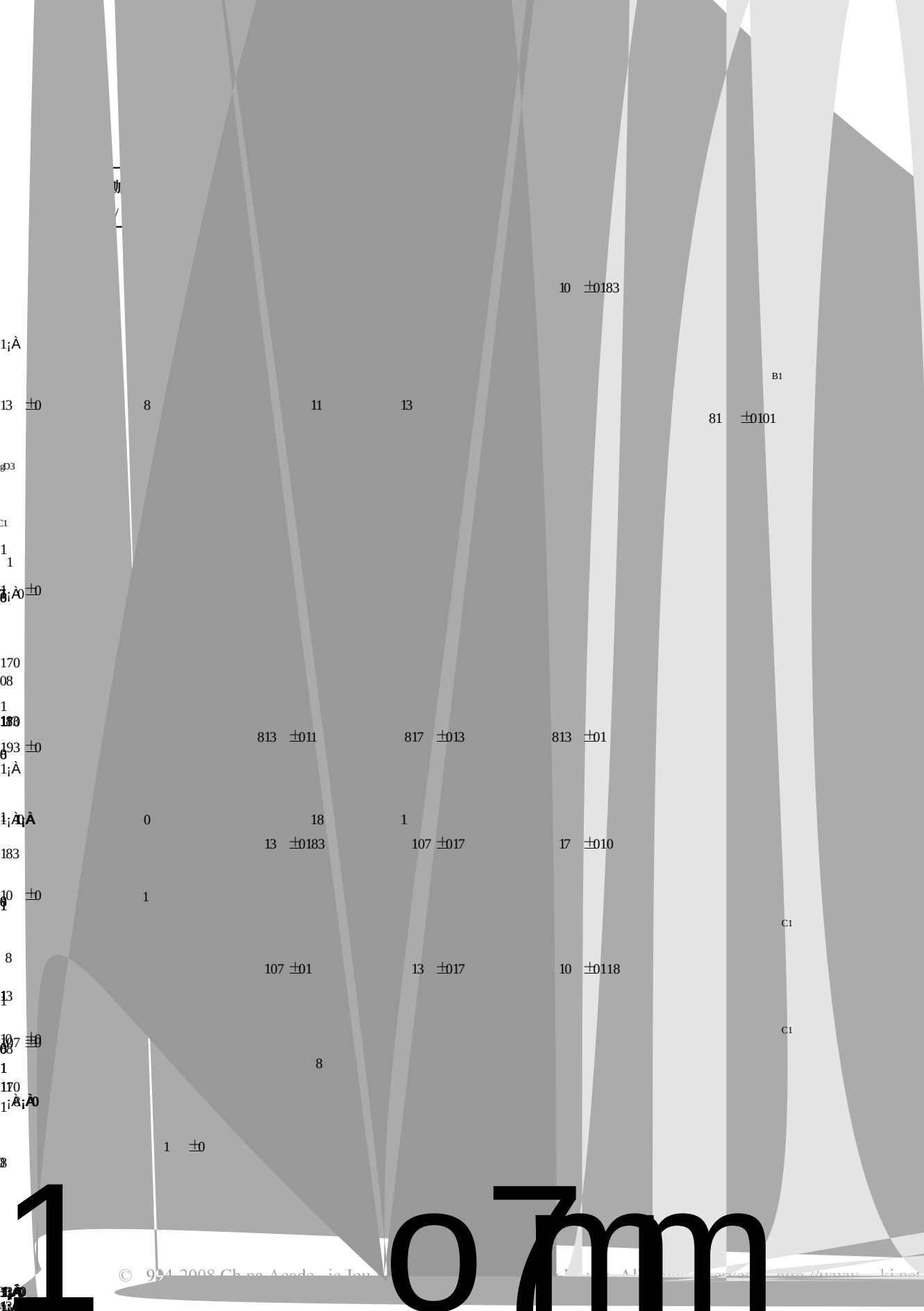
2 结果与分析

2.1 冷冻保护液中咖啡因浓度对精液冷冻解冻后精子活力的影响

冷冻液中咖啡因浓度对精液冷冻解冻后精子活力的影响如表 1 所示。

表 1 冷冻液中咖啡因浓度对精液冷冻解冻后精子活力的影响

咖啡因浓度 / mmol L ⁻¹	重 复			均 值
	I	II	III	
0	0.1356 ±0.008 5	0.1350 ±0.0042 4	0.1329 ±0.0014 1	



粒