

大熊猫精液超低温冷冻的比较

黄炎^① 李德生^① 杜军^① 王鹏彦^① 张和民^① JoGayle Howard^② Rebecca Spindler^②

(^①卧龙自然保护区大熊猫研究中心 四川汶川 623006; ^②美国国家动物园,华盛顿特区)

摘要:对卧龙自然保护区大熊猫研究中心的9只雄性大熊猫电刺激采精,比较研究了稀释液中甘油含量、精液离心、不同稀释液和冷冻方法对大熊猫精液超低温冷冻保存后的活力、运动状态和顶体的影响。稀释液中甘油的含量为4%~5%较好,冻精解冻后的活力和顶体的正常率能保持鲜精的一半。离心和未离心的精液经超低温冷冻,解冻后的活力和运动状态都较接近。TEST和SFS两种稀释液的效果没有明显的差异。细管的冷冻过程较颗粒方便、快捷,时间容易控制,是一种较好的超低温冷冻精液的方法。

关键词:大熊猫;超低温冷冻;精液离心;细管

中图分类号:Q492 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)02-25-05

Study for Freezing Semen of Giant Pandas

HUANG Yan^① LI De-Sheng^① DU Jun^① WANG Peng-Yan^① ZHANG He-Min^①

JoGayle Howard^② Rebecca Spindler^②

(^①Wolong Nature Reserve Wenchuan 623006, China; ^②National Zoological Park, Washington DC, USA)

Abstract: Nine males at the Research and Conservation Center for Giant Panda in Wolong Nature Reserve were used for this study. Semen was collected by electroejaculation. Influence of glycerol contents, sperm washing, cryodiluents, freezing methods on sperm motility, status and acrosome were studied. Cryodiluent with 4% ~ 5% glycerol was effective for freezing giant panda sperm. Washing sperm (to remove seminal fluid) might improve post-thaw motility and forward progressive status. SFS and TEST cryodiluent showed same effectiveness in freezing giant panda semen. To freeze in straws was easier and faster than to freeze in pellets.

Key words: Giant Panda; Freezing semen; Cryodiluent, Washing sperm; Straws

大熊猫是我国特有的濒危珍稀动物,由于野外种群数量的大量减少,人们正试图通过圈养途径来挽救大熊猫。但圈养大熊猫的雄兽只有10%能进行自然交配,不能进行自然交配的雌兽只能人工授精,而人工授精的成功率与冻精的质量有重要联系^[1-6]。卧龙自然保护区大熊猫研究中心现圈养大熊猫42只,从1990年到2000年共产大熊猫32胎,49仔,存活36仔。为提高冻精的质量,增强其活力、活率、运动状

态和顶体的正常率,以进一步提高大熊猫人工授精的成功率,1999年3月~2000年6月,对9只雄性大熊猫进行了电刺激人工采精,并研究了稀释液中甘油的不同含量、精液离心、不同稀释液和冷冻方法对大熊猫精子质量的影响。现

第一作者简介 黄炎,男,35岁,学士,高级工程师;研究方向:大熊猫的繁殖生理;

收稿日期:1999-07-12,修回日期:2000-11-30

将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

林楠(298):1984年生于白水江,体重94 kg,健康,因攻击雌兽而没有放对,是人工授精的主要供精者。睾丸发育好,质地正常,睾丸体积为 186.39cm^3 。采精电压2~6 V,射精电压5.5~6 V。采精量2.7 ml,精液密度 1496×10^6 个/ml,活力85%,活率89%,运动状态3.0, pH 7.9。

希梦(399):1993年9月19日生于卧龙繁殖场,体重117 kg,健康,睾丸发育好,质地正常,睾丸体积为 229.9cm^3 。采精电压2~8 V,射精电压7 V。采精量2.25 ml,精液密度 142×10^6 个/ml,活力50%,活率83%,运动状态2.5, pH 7.9。

健健(400):1993年9月19日生于成都动物园,体重84 kg,体质较差,睾丸发育较差,质地较软,睾丸体积 99.8cm^3 。采精电压2~8 V,射精电压7~8 V。采精量0.22 ml。精子密度 4×10^6 个/ml,活力0%,活率20%, pH 6.8。

大地(394):1992年9月22日生于卧龙繁殖场,体重116.6 kg,健康。睾丸体积 333cm^3 。采精电压3~9 V,射精电压8~9 V。采精量6.2 ml,精液密度 581×10^6 个/ml,活力70%,活率75%,运动状态3.0, pH 7.9。

乐乐(305):1983年生于宝兴,体重105 kg,患皮肤癌已3年,睾丸发育好,质地正常,睾丸体积 629.9cm^3 。采精电压4~8 V,射精电压5~8 V。采精量4.47 ml,精液密度 664×10^6 个/ml,活力90%,活率90%,运动状态2.5, pH 7.9。

盼盼(308):1985年生于宝兴,体重130.5 kg,健康,能进行自然交配。睾丸体积 455.2cm^3 。采精电压4~6 V,射精电压5~6 V。采精量2.85 ml,精液密度 2311×10^6 个/ml,活力80%,活率85%,运动状态3.5, pH 8.0。

壮壮(357):1989年生于南坪,体重94.1 kg,健康,睾丸体积 307.2cm^3 ,采精电压4~8

V,射精电压8 V。采精量3.81 ml,精液密度 1089×10^6 个/ml,活力75%,活率82%,运动状态2.5, pH 8.2。

迪迪(413):1994年10月5日生于卧龙繁殖场,体重110.5 kg,健康。睾丸体积 295.8cm^3 ,采精电压4~8 V,射精电压4~8 V。采精量4.1 ml,精液密度 531×10^6 个/ml,活力95%,活率95%,运动状态3.0, pH 8.2。

新星(329):1987年生于宝兴,体重121 kg,健康,能进行自然交配。睾丸体积 419.1cm^3 ,采精电压3~7 V,射精电压4~7 V。采精量8.87 ml,精液密度 731×10^6 个/ml,活力70%,活率87%,运动状态2.5, pH 8.1。

1.2 精液采集 大熊猫用氯胺酮6~8 mg/kg,辅以龙朋0.3~0.5 mg/kg进行麻醉保定。电极棒直径2.6 cm,长30 cm,3个长条电极长6.5 cm,高0.3 cm,呈45°,90°和135°排列。刺激电压从2~3 V开始,根据大熊猫的反应,即后肢收缩的程度,缓慢增加,每次刺激时间2秒,刺激的间隔时间为3秒,持续刺激直至采出精液,连续刺激不能超过30次,如果第一次没有采到精液或采量太少,隔5分钟后再连续刺激一次。

1.3 精液分析方法 把采集的精液放入37℃的水浴箱中,测量精液的体积,用显微镜对精液的质量和形态学进行分析、评估。精子质量用精子的活力(motility)、活率(percent live)、运动状态(status)、pH值、顶体的正常率(normal apical ridge)和精子形态学(morphology)来进行评价。

活力(%):取少量精液于保温37℃的载玻片上,计数100个,凡是活动的精子记为有活力的精子,以%计算。

活率:滴一滴精液于保温37℃的载玻片上,在旁边滴上同样体积的Pap染液,用一载玻片将其混合后涂片(不能来回涂),待片干后在显微镜下计数,白色精子为活精子,粉红色是死精子。

运动状态:评价精子的运动状态,用1~5表示,1是转圈;2是曲线运动;3是直线运动,但运动状态慢;4是较快的直线运动;5为很快

的直线运动。

pH 值: 取少量精液滴在 pH 试纸上。

顶体正常率: 用 POPE 染液染色, 吸取 1 μ l 精液 + 9 μ l POPE 染液, 染色 90 秒, 涂片。片干后用 100 倍油镜观测。A. 正常顶体 (normal apical ridge) 是深紫色; B. 受损的顶体 (damaged apical ridge) 也是深紫色, 但顶部表面凹凸不平, 成锯齿状; C. 顶体丢失 (missing apical ridge), 顶部是白色; D. 顶体蓬松 (loose acrosome cap) 顶部是白色, 顶部表面凹凸不平, 顶体损伤最严重。

精子形态学: 把 2 μ l 精液加入 200 μ l 0.3% 甘油醛中固定, 取少量于载玻片上用油镜观察。

1.4 精液冷冻

1.4.1 细管冷冻 将精液用 TEST (# 9971、# 9972, Irvine Scientific, 2511 Daimler Street, Santa Ana, CA 92705-5588) 和 SFS (12% 蔗糖 75.3 ml, 甘油 4.7 ml, 卵黄 20 ml, 双抗各 500 ~ 1 000 IU/ml) 做 1:3 稀释, 在 4℃ 冰箱中平衡 3 小时, 冷冻前, 把精液吸入细塑料管中, 每管 0.25 ml (两端留 10 mm 以便密封), 装好后用酒精灯把钳子烧热, 夹细管的两端使之封闭 (或使用密封机进行密封)。然后把细管放在平衡好的试管架上层 (离液氮 7.5 cm) 1 分钟, 再放在试管架下层 (离液氮 2.5 cm) 1 分钟, 此后置入液氮中, 浸 2 分钟后装入纸筒中, 放进液氮罐长期保存。

1.4.2 颗粒冷冻 将精液用 TEST 和 SFS 做

1:3 稀释, 在 4℃ 冰箱中平衡 3 小时, 先把冻精板 (聚四氟乙烯板) 放入装有液氮的金属槽中平衡 10 分钟, 然后把冻精板提升到距液氮面 2 cm 处, 用电子温度计测量冻精板的温度, 当温度降到 -80 ~ -85℃ 时, 用微量吸管快速地把平衡好的精液以 40 ~ 100 μ l/粒滴在冻精板上, 2 分钟后把冻精板快速侵入液氮中, 用平衡好的镊子把精粒装入玻璃小瓶中, 放进液氮罐长期保存。

1.5 精液解冻

1.5.1 解冻细管 把 0.25 ml 的细管放入 37℃ 水浴 45 秒, 擦干细管上的水, 剪开细管密封的一端, 用吸管把精液吹入 1.25 ml 的恒温在 37℃ 的 Hams 稀释液中。

1.5.2 解冻颗粒 把装有 0.5 ml TCM199 解冻液的小试管放入 40℃ 水浴平衡 10 分钟, 取一粒冻精迅速放入, 一分钟后移入 37℃ 水浴备用。

2 结果

2.1 不同甘油含量对精子超低温冷冻保存的对比 甘油作为抗冻剂, 不同的含量会影响抗冻效果, 表 1 显示了 3 种甘油含量对大熊猫精液超低温冷冻保存后质量的影响。稀释液中甘油的含量为 4% ~ 5% 较好, 冻精解冻后的活力和顶体的正常率能保持鲜精的一半, 运动状态变化不大。

表 1 甘油含量对精子超低温冷冻保存后质量的影响

甘油含量 (%)	活力 (%)				运动状态				顶体正常率 (%)			
	林楠	希梦	林楠 (鲜精)	希梦 (鲜精)	林楠	希梦	林楠 (鲜精)	希梦 (鲜精)	林楠	希梦	林楠 (鲜精)	希梦 (鲜精)
4	42.5	20	85	50	3.0	3.0	3.0	2.5	54	66	96	93
5	40	20			3.0	2.5			54	60		
6	30	25			3.0	3.0			28	60		

2.2 精液离心的比较研究 将精液 0.25 ml 加入 0.75 ml TEST 稀释液中, 取 1/2 离心 8 分钟 (300 r/min), 离心后去除上清液, 再加入与上清液相同体积的稀释液, 用同样方法进行超低温冷冻保存。解冻后用精子的活力、运动状态和顶体的正常率三项指标进行评价 (表 2)。

离心后的精液经超低温冷冻, 活力、运动状态和顶体正常率与未离心的精液都较接近, 说明离心除去精浆后对大熊猫精子的活力、运动状态和顶体正常率没有明显的影响。

2.3 两种精子稀释液的比较 分别取新鲜精液 0.25 ml 于 0.75 ml TEST 和 SFS 稀释液中, 用

颗粒法进行超低温冷冻,冷冻后马上用 TCM199 解冻进行对比分析(表 3,4)。

表 2 精液离心后的比较

熊猫	活力(%)		运动状态		顶体正常率(%)	
	离心后	未离心	离心后	未离心	离心后	未离心
林楠	47.5	42.5	3.5	3.0	50	57
希梦	25	22.5	3.0	2.5	60	60
乐乐	75	80	3.5	3.0	83	88
盼盼	75	70	3.5	3.0	78	85
壮壮	55	50	3.5	3.0	92	88
迪迪	55	80	3.0	2.5	88	92
大地	65	70	3.0	3.5	91	

表 3 在两种稀释液中精子的活力(%)和运动状态的比较

时间 (min)	林楠				希梦			
	TEST		SFS		TEST		SFS	
	活力	运动状态	活力	运动状态	活力	运动状态	活力	运动状态
0	45	3.0	40	3.0	15	2.5	10	2.5
30	45	3.0	45	3.0	20	2.5	20	3.0
60	40	3.0	45	3.0	20	3.0	20	3.0
90	45	3.0	45	3.0	20	3.0	20	2.5

表 4 在两种稀释液中精子顶体正常率(%)的比较

	林楠		希梦	
	TEST	SFS	TEST	SFS
正常顶体	60	62	52	38
顶体损伤	14	24	26	6
顶体缺失	12	10	18	44
顶体蓬松	14	4	4	12

TEST 和 SFS 两种稀释液的效果比较接近,没有明显的差异。大熊猫精液解冻时的活力和

运动状态至解冻后在 37℃ 的水浴中 30、60 和 90 分钟后基本保持稳定。

2.4 不同超低温冷冻保存方法的比较 取鲜精 0.25 ml 加入 0.75 ml TEST 稀释液中,分别用颗粒与细管两种方法进行超低温冷冻,冷冻后马上用 TCM199 解冻液解冻,比较解冻后精液的活力、运动状态和顶体的正常率(表 5)。

表 5 显示用颗粒和细管两种方法冷冻精液的活力和运动状态都很接近,只有顶体的正常率有些差异,细管的效果较颗粒好。

表 5 不同超低温冷冻精子保存方法的比较

熊猫	活力(%)			运动状态			顶体正常率(%)		
	鲜精	颗粒	细管	鲜精	颗粒	细管	鲜精	颗粒	细管
林楠	85	40	40	3.0	3.0	3.0	96	44	46
希梦	50	20	25	2.5	2.5	2.5	93	56	68
乐乐	90	90	80	3.0	3.0	3.0	95	87	89
壮壮	75	50	50	2.5	2.5	2.5	98	91	89
大地	70	70	70	3.0	3.0	3.0	91	80	79
盼盼	80	70	70	3.5	2.5	3.0	99	85	88
迪迪	95	70	80	3.0	3.0	2.5	98	89	87
新星	70	65	65	2.5	2.5	2.5	99	89	93
平均	76.9	59.4	59.4	2.9	2.8	2.8	96.1	78.1	79.9
方差	14.1	21.8	21.1	0.4	0.3	0.3	2.9	18	15.8

2.5 精液低温保存 取大熊猫新鲜精液 0.25 ml 加入 0.75 ml 的稀释液中,保存于 4℃ 冰箱中,间隔 4、8、24、48 小时每次取少量精液检测精子活率、活力和运动状态,评价精液质量(表 6)。

表 6 精液低温保存实验

时间 (h)	林 楠			希 梦		
	活率 (%)	活力 (%)	运动 状态	活率 (%)	活力 (%)	运动 状态
4	84	78	3	82	39	3
8	86	85	3	80	40	3
24	84	63	3	80	61	2
48	80	48	1	80	28	1

大熊猫的精液在 4℃ 低温保存 3 天,其活力、活率和运动状态都保持在较高的水平,完全符合人工授精所需标准。

3 讨 论

迪迪、希梦和健健都是在 5.5 岁时采集的精液,但由于体质和发育的差异,精液质量也不同,迪迪的体质好,精子的质量亦好,可用于人工授精,而希梦和健健的精子活力低、畸形率

高,不符合人工授精所需标准。

大熊猫精液离心去精浆后,再稀释并进行超低温冷冻,解冻后的活力和运动状态都与未离心的精液比较接近。用离心的精液对大熊猫进行人工授精的效果如何,还需进一步探讨。

细管和颗粒两种不同的冷冻方法效果差不多。细管的冷冻过程较颗粒方便、快捷,时间容易控制,因为精液被密封保存,不易丢失和受到污染。

参 考 文 献

- [1] 刘维新,叶掬群,李成忠等. 大熊猫人工授精繁殖技术. 中国动物园年刊,1979. 2:20~24.
- [2] 王雄清. 卧龙自然保护区动植物资源及保护. 成都:四川科学技术出版社,1992. 48~49.
- [3] 汤纯香,邱贤猛,王雄清. 卧龙自然保护区动植物资源及保护. 成都:四川科学技术出版社,1992. 33~37.
- [4] 叶志勇,何光昕,张安居等. 大熊猫人工配种方法的研究. 四川大学学报,1991,28:50~53.
- [5] 刘晨光,冯文和,张安居等. 大熊猫精子发生及年龄、季节变化. 四川大学学报,1997,34:11~16.
- [6] 冯文和,王鹏彦,王春蓉等. 大熊猫精液品质的研究. 四川大学学报,1991,28:93~101.