

# 电刺激采集大额牛精液及其超低温冷冻的初步研究\*

## SUCCESSFUL ELECTROEJACULATION AND SEMEN CRYOPRESERVATION OF *BOS FRONTALIS*

关键词：大额牛；电刺激采精；精液；冷冻保存

Key words: *Bos frontalis*; Electroejaculation; Semen; Cryopreservation

中图分类号：Q492 文献标识码：A 文章编号：1000-1050 (2000) 03-0239-03

大额牛 (*Bos frontalis*) 又名独龙牛，俗称野牛，是一种半野生半家养，为数不多的珍稀濒危牛种，仅分布于云南怒江州的独龙江一带。它有着典型的肉用体型，耐粗饲，抗逆性强，肉质细腻，是一种有待于进一步开发和极有应用前景的珍稀品种<sup>[1]</sup>，由于大额牛的发现比较晚<sup>[2]</sup>，除了对大额牛的细胞核型、起源和进化、遗传多样性、肉质特性的研究外<sup>[3-6]</sup>，目前，对大额牛缺少更多的研究。本文首次对大额牛进行电刺激采集精液和大额牛精液超低温冷冻方法研究，为保护和利用大额牛这一濒危物种资源提供一种技术方法。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

2头5~6岁大额牛，1995年底购自云南省福贡县，在中国科学院昆明动物研究所内自行饲养。采精期间送往云南省冻精站单独圈养，饲养及管理与云南省冻精站种公牛完全相同。电刺激采集器用SPE EJACULATOP (美国)；精液冷冻设备和冷细管均为IMV. L'Aigle (法国)产品；其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 方法

将大额牛保定于采精台上，剪去尿道口的毛，用0.01%高锰酸钾溶液洗净腹部，擦干，用水清洗肛门，将电极(牛直肠型)着水后缓缓插入直肠内。为了免除牛的紧张，在直肠内停2~3 min，再打开电源，用连续刺激方式进行采精：起始电压为0 V，每增加10 V为一个阶段，每阶段从小到大，反复刺激0.5~1 min，逐步增加到60 V，同时还进行睾丸的按摩。若未能采集到精液，停止刺激和按摩睾丸，休息3~5 min，再进行下一轮的刺激。见精液排出，则立即断电，收集精液。

采集到的精液，在37~40℃下观察活力，检测密度，记录收集的精液量，然后进行冷冻。冷冻方法按云南省家畜冻精站牛精液冷冻方法(即一步法冷冻)进行。精液冷冻保存液配方：Tris 2.5 g，柠檬酸 1.5 g，果糖 1.0 g，甘油 6 ml，青霉素 5万单位，链霉素 2.5万单位，卵黄 20 ml，纯水 74 ml。冷冻步骤：用精液冷冻保存液将精液稀释成 $2.0 \times 10^7$ /ml的精子浓度，在4℃冰箱中平衡2~3 h，机器分装于0.25 ml的细管(straw)内，将装好精液的细管置于液氮液面5 cm(约-130℃)处，平衡5 min，然后直接快速放入-196℃液氮中冷冻保存；从每一批冻存的细管精液中随机取出3管，在37~38℃水浴中解冻复苏，在37~40℃观察其活力，活力在0.3以上者进行保存。

### 2 结果与讨论

对2头大额牛，用电刺激采精17次，成功14次，成功率为82%；平均每次采精量为2.67(0.5~6) ml，精子平均密度为 $8.32(2.12 \sim 25.22) \times 10^8$ /ml，新鲜精液活力平均为0.6(0.3~0.65)。

\* 基金项目：云南省重点基金资助项目(96C0062)

作者简介：和协超(1963-)，男，实验师。

收稿日期：1999-05-04；修回日期：1999-08-05

精液冷冻 12 批, 冷冻—解冻后复苏活力在 0.3 以上的 9 批, 冷冻成功率为 75% (详见表 1)。

人工采精是人类为了研究、利用和保护动物而一直探索的课题。本室曾在母牛的繁殖季节 (早春晚秋) 用大额牛母牛作为台牛, 进行人工阴道采精<sup>[7]</sup>。最近我们在缺乏大额牛母牛的情况下, 先后以西门塔尔、荷斯坦、大额牛的公牛, 去势后公牛, 荷斯坦母牛甚至用发情的荷斯坦奶母牛作为台牛, 对大额牛进行诱情训练调教和人工采精, 但都没有成功, 大额牛几乎没有什么性行为反应。对大额牛实施假阴道采精的结果显示, 大额牛有较大的种间差异性, 没有同一品种性成熟的大额牛母牛作为台牛采精或调教训练, 就难以采集到精液。这一结果同时提示大额牛在自然状态下能否和黄牛进行交配, 以及大额牛的公牛是否也存在生殖季节有待进一步研究和证实。

表 1 电刺激采集大额牛精液及其冷冻结果

Table 1 Results of electroejaculation and semen cryopreservation of *Bos frontalis*

采精次数 Stimulation times	成功率 Success rate	精液量 (ml) Semen volume	密度 (108/ml) Concentration	活力 Sperm motility	解冻后活力 Post-thaw motility
17	82 (14/17)	2.67±0.44 (0.6~6.0)	8.32±2.18 (2.12~25.22)	0.6±0.03 (0.3~0.65)	0.34±0.03 (0.25~0.4)

注 Note: 平均值±标准误 Mean±SE

本文首次在非麻醉状态下使用电刺激采集大额牛精液, 获得成功。用电刺激采集大额牛精液, 刺激电压 20 V 左右就会使阴茎勃起, 但不会马上射精, 当刺激电压加到 30~40 V 时就会流出一滴滴精清 (有时带有少量精子), 此时尚不收集, 这是排精的先兆, 但要密切注意, 准备收集精液。电刺激后排精不像假阴道采精那样快, 牛分 2 个阶段射精<sup>[8]</sup>, 要多收集一段时间, 当精液排出时就立即断电, 不可继续刺激。在采精过程中我们发现, 大额牛对电刺激十分敏感。电压升至 20 V 时就有刺激反应, 60 V 电压时反应强烈, 后肢强直, 站立困难, 电压不能超过 70 V。若 1 次排精少于 0.5 ml 时, 休息 5~1 min 后, 可再进行第 2 次采精。

精液的超低温冷冻保存技术对动物的遗传育种、品种改良、疾病控制和濒危物种的保护有着十分重要的意义<sup>[9,10]</sup>。冷冻精液通过人工授精技术, 或通过 IVF、IVM-IVF、单精子注射等方法既可进行种间杂交, 又可进行生殖生物学的研究。大额牛精液冷冻—复苏的结果表明, 用荷斯坦奶牛精液的冷冻保护液和冷冻方法超低温冷冻保存大额牛的精液, 其精子冷冻—复苏的活力与荷斯坦奶牛或西门塔尔、短角牛等肉牛的基本一致。同样, 使用电刺激采集的大额牛精液, 经冷冻—复苏后, 其活力与用人工假阴道采集的精液的冷冻—复苏活力基本一致<sup>[7]</sup>; 本研究结果表明使用电刺激采集大额牛的精液及超低温冷冻保存其精液是可行的。

至 1993 年, 贡山县大额牛的存栏数只有 396 头, 近年虽然在大额牛的保护方面取得了一定的成绩, 但由于群体小, 大额牛的近交等因素造成的遗传多样性的匮乏, 将会导致该群体子代的遗传质量下降, 这一优良的种质资源仍然受到严重的威胁<sup>[5]</sup>。大额牛电刺激采精及其精液超低温冷冻保存的成功为进一步研究、保护和利用这一优良品种, 以及其他濒危物种的保护提供了技术方法上的参考。

## 参考文献:

- [1] 施立明. 中国的生物多样性现状及其保护 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 100-105.
- [2] 曾养志, 单祥年, 陈宜峰, 罗丽华, 曹筱梅. 我国大额牛的描述及其染色体的研究 [J]. 自然杂志, 1979, 2 (11): 62-663.
- [3] 单祥年, 陈宜峰, 曾养志, 罗丽华, 曹筱梅. 大额牛核型分析 [J]. 遗传, 1979, 2 (5): 25-27.
- [4] 兰宏, 熊习昆, 林世英, 刘爱华, 施立明. 中国牛品种 mtDNA 多样性及 Y 染色体的比较研究 [J]. 遗传学报, 1993, 20 (5): 249-250.

(上接第 240 页)

- [5] 聂龙, 施立明, 和向东, 赵玉龙, 木文刚, 张建良. 独龙牛遗传多样性及其种群遗传结构的等位酶分析 [J]. 遗传学报, 1995, 22 (3): 185-191.
- [6] 葛长荣. 大额牛肉质特性研究 [J]. 中国农业科学, 1996, 29 (4): 75-78.
- [7] 文端成, 季唯智, 杨上川, 门宏升, 施立明. 大额牛精液的低温冷冻保存—蔗糖、乳糖和葡萄糖的低温冷冻保护效果比较 [A]. 中国动物学研究 [C]. 北京: 中国林业出版社, 1999. 917-922.
- [8] 潘庆杰. 野生动物人工采精的方法 [J]. 野生动物, 1998, 19 (1): 31-32.
- [9] Gould K G, Styperek R P. Improved methods for freeze preservation of chimpanzee sperm [J]. *American Journal of Primatology*, 1989, 18: 275-284.
- [10] Colter G H. Bovine spermatozoa in vitro: A review of storage, fertility estimation and manipulation [J]. *Theriogenology*, 1992, 38: 197-207.

和协超 沈放 季维智 (中国科学院昆明动物研究所, 昆明, 650223)

HE Xiechao SHEN Fang JI Weizhi

(*Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, 650223*)

赵家才 刘国章 (云南省家畜冻精改良站)

ZHAO Jiakai LIU Guozhang

(*Yunnan Provincial Animal Artificial Insemination Station*)

杨国荣 和占星 (云南省肉牛和牧草研究中心)

YANG Guorong HE Zhanxing

(*Yunnan Provincial Beef Cattle and Pasture Research Center*)