

## 甘油保存液的加入方法对冷冻公牛 精液的活率及受胎率的影响

内蒙古农牧科学院畜牧兽医研究所

林同壖 藥成祥 刘雅清

低温(-79°C以下)冷冻保存公牛精液时甘油是保存液中不可缺少的成分。当稀释后的精液被逐渐冷却到冰点并继续下降到-79°C以下,由于温度下降所引起的物理化学变化之所以没有把精子全部杀死是因甘油在其中发生了重要的保护作用。甘油的这种保护功能虽于1949年就被发现<sup>[1]</sup>,但在那个时期用冷冻的公牛精液给母牛输精却不能获得满意的受胎效果。直到1952年以后,由于改变了精液的冻前处理程序,才提高了冷冻精液的受精能力<sup>[2,3]</sup>。这一处理程序的要点是:新采出的精液在温度尚未降到室温前先用不含甘油的保存液做初步稀释,经3至5小时逐渐冷却到5°C,然后再用含有甘油的保存液作1比1稀释,并在5°C下放置一夜然后冷冻。此后,在生产实践中大都沿用这种方法<sup>[4,5,6]</sup>。在过去数年中虽然也有某些研究者做了一些试验,认为在室温下或在较高的温度下加甘油保存液并不一定会降低精液的受胎率<sup>[5,7,8]</sup>,但迄今为止尚未被普遍承认和采用。相反的另有一些研究者除了强调应先降温再加甘油保存液而外,还认为缓慢的分次加入比一次加入效果好。例如把应加入的甘油保存液等分为三分,每隔10分钟加入一分<sup>[9]</sup>;或等分为五分,每隔6—12分钟加入一分<sup>[10]</sup>。有人发现在室温下加甘油保存液常常会引起精子尾巴卷曲,因而不能做正常的前进运动<sup>[11,12]</sup>。但是,先降温后再加甘油保存液必须将一切接触精液的器皿及保存液预先冷却,并在同一温度下进行稀释、分装和封口等一系列处理工作。这都需要有较复杂的设备条件和小型冷库,同时操作起来也相当不方便。本试验的目的是为了进一步研究在室温下加甘油保存液的效果并探索改进途径,以便在不降低精液受精能力的前提下尽可能简化冷冻精液的操作技术。

### 试验方法及材料

1. 精液来源:公牛精液采自本所饲养的两头三河公牛及一头西门答公牛。在一般情况下每星期采精一或二次,每次用假阴道自每头公牛连续采取两个精液样品,间隔时间约为半小时左右。公牛的原精液品质见表1。

2. 保存液配方:本研究所用精液保存液共有4组,计6种配方,其组成见表2。

3. 精液的冻前处理:

试验一:选择两组常用的保存液(I号和II号常用于苏联及东欧国家<sup>[13]</sup>;III号及IV号常用于英美等国<sup>[14]</sup>)比较含有甘油部分的加入方法对精液解冻后活率评分的影响。每

表 1 公牛的精液品质

公牛别	射精量(毫升)			密度(亿/毫升)			活率(%)		
	检查次数	平均	范围	检查次数	平均	范围	检查次数	平均	范围
紅白花三河	19	5.07	1.0—7.8	17	13.6	7.3—20.5	19	69.2	60—80
黑白花三河	22	4.65	3.0—6.2	20	10.1	4.6—19.2	22	75.4	65—85
西門答尔	10	4.47	3.5—5.5	10	12.6	10.5—14.0	10	73.0	65—80

表 2 試驗中所用各种保存液的組成\*

保存液编号	I	II	III	IV	V	VI
蒸 馏 水 (毫 升)	100.00	100.00	80.00	66.00	100.00	100.00
檸 檬 酸 鈉 (克)	1.40	1.40	2.58	2.58	2.10	2.00
葡 萄 糖 (克)	3.00	3.00	—	—	4.50	4.00
氨 基 乙 酸 (克)	—	—	—	—	—	0.60
卵 黄 (毫 升)	20.00	—	20.00	20.00	20.00	20.00
甘 油 (毫 升)	—	16.00	—	14.00	10.00	10.00

\* 注: ①所用檸檬酸鈉皆含有五个分子结晶水; ②每毫升保存液中还加有青霉素鉀盐 500—1,000 单位。

个精液样品采出后等分为二分, 分别用 I 号及 III 号两种保存液在等温条件下做 1 比 4 至 1 比 9 倍稀释。稀释后的精液再各等分为三分: 一分于半小时后用相配对的 II 号或 IV 号保存液在室温下 1 比 1 再次稀释, 然后逐渐冷却至 0°C; 一分于半小时后将等量的 II 号或 IV 号保存液等分为三分, 每隔 15 分钟加入一分, 然后逐渐冷却至 0°C; 另一分则按通常的方法先逐渐降温至 0°C 平衡三小时, 再加入等量预冷至 0°C 的甘油保存液做为对照组。经过两次稀释后的精液在 0°C 下平衡 20 或 15 小时然后冷冻。

試驗二: 在試驗一中我們也发现不降温而加甘油保存液会有部分精子尾巴卷曲。这种现象有人认为是由于渗透压力降低所致, 并提出将甘油保存液中檸檬酸鈉及葡萄糖的浓度增加 50% (見第 V 号配方) 可在室温下一次完成稀释处理<sup>[16]</sup>。試驗二即为验证这一处理方法的效果。精液采出后等分为二, 一分用 V 号保存液在室温下 1 比 9 稀释 (一次加入), 然后逐渐冷却至 0°C 平衡约 20 小时冷冻; 另一分用 I 号及 III 号保存液按試驗一中对照组的方法处理。

試驗三: 由于試驗二所获结果还不能使人满意, 我們改变了保存液配方和稀释程序, 試驗組先用 I 号保存液在室温下稀释 1 至 3 倍, 半小时后再用第 V 号保存液在室温下 1 比 4 第二次稀释, 逐渐冷却到 0°C 平衡 20 小时然后冷冻。对照组精液的处理方法与前两个試驗中的对照组相同。

4. 分装及封口: 在容量为 2 毫升的玻璃安瓿中充注 1.5 毫升稀释精液, 随即用火熔封。已降温至 0°C 的稀释精液在分装和封口时器皿皆浸泡冰水中以防温度回升。

5. 冷冻: 将已封口的精液安瓿放置在特制的安瓿架上, 并浸入预冷至 0°C 的酒精浴盆中。开动搅拌机使盆内酒精迴轉流动, 此时开始添加干冰使酒精温度按以下速度逐渐下降: 由 0°C 降至 -10°C 每分钟下降 0.5°—1°C; 由 -10°C 降至 -15°C 每分钟下降 1°—2°C; 由 -15°C 降至 -30°C 每分钟下降 3°—4°C; 达到 -30°C 后加入大量干冰使温度迅速降到

-70°C以下。

6. 保存：将冷冻的精液安瓿装在编有号码的纱布口袋内迅速移入盛有干冰的广口保温瓶中，并用干冰酒精混合物层层埋好。纱布口袋也需事先浸埋在干冰酒精中冷却到-70°C以下。在保存期间每日需往广口保温瓶内添加干冰使温度不致升高。供输精试验所用的精液至少已在干冰中保存过2—3个月，并经不同交通工具的长途运输。

7. 解冻：精液安瓿由干冰酒精中取出后迅速放入38°—40°C温水中浸泡，并不停的轻轻摇动，待瓶内精液刚刚融化成液体时立即取出擦干瓶外水渍。每批精液冷冻后24小时皆取出足够数量的安瓿解冻，以供试验室内做活率检查之用。解冻后当时不检查的安瓿则存放于0°—4°C的条件下继续保存。供输精试验用的冷冻精液则于临输精前才进行解冻，距输精时间不超过半小时。

8. 活率检查：用压张法在38°C的温度以显微镜检查，评定具有正常前进运动能力的精子百分率。

9. 输精：1964年6至7月分在内蒙古锡林郭勒种畜场的两个分场的三河牛群中进行了部分冷冻精液的输精试验。所用精液仅限于采自三河公牛者，包括两种冻前处理方法，甲组系用第I号及II号保存液稀释者，按通常的程序处理，即降温后再加甘油保存液；乙组用I号及VI号保存液稀释，两次稀释皆在室温下进行（即试验三中的对照组和试验组）。每日早晚在挤奶时间内发现母牛已“打稳栏”（群内其他母牛和犏牛爬跨时稳立不动）即给以输精，12小时后再输一次，一个情期共输精两次。输精方法采用通过直肠握子宫颈法，用玻璃输精器插入子宫颈约2—3公分，每次输入解冻后的精液1.0—1.5毫升。

10. 妊娠诊断：配种后50—90天不再发情的母牛皆受到直肠检查，根据子宫和卵巢情况做妊娠与否的最后判定。

## 試驗結果

試驗一所用9个精液样品平均原活率为71.7%，冷冻前及解冻后活率评定结果见表3。由表3可见用两组保存液稀释所获结果极为相近，在室温下加甘油保存液无论临冷冻前还是解冻当时活率皆较低，解冻后活率下降也较快，其中一次加入者又比分三次加入者为差。活率评分较低的原因主要在于其中有一部分精子的尾巴发生卷曲，呈倒退迴旋运动。

表3 甘油保存液加入时的温度及方法对精液活率的影响（9次平均）

保存液种类	含甘油部分加入时的温度 及方法	前进运动精子百分率			
		第二次稀释后	平衡后临冷 冻前	解冻当时	解冻后在0°C— 4°C保存24小时
I 号 和	0°C一次加入	70.6	67.2	35.0	28.3
	室温下一次加入	63.3	56.1	24.4	14.4
II 号	室温下分三次加入	66.1	59.4	27.7	20.6
III 号 和	0°C一次加入	70.6	67.2	34.4	27.8
	室温下一次加入	64.4	57.2	25.0	16.1
IV 号	室温下分三次加入	66.6	61.7	27.7	18.9

試驗二用了12个精液样品，原活率平均为74.5%，用含有7.7%甘油的V号保存液

在室温下1比9只进行一次稀释对精液的活率仍有一定程度的不良影响，它与对照组的活率差距虽然不如在试验一中那样大，但冷冻效果也是不能令人满意的。两组精液冷冻前后平均活率变动情况见图1，解冻后在0°—4°C继续保存的总存活时间平均分别为164小时和216小时。

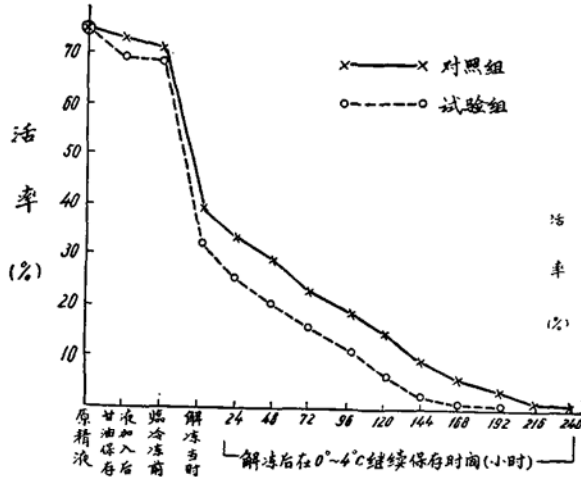


图 1

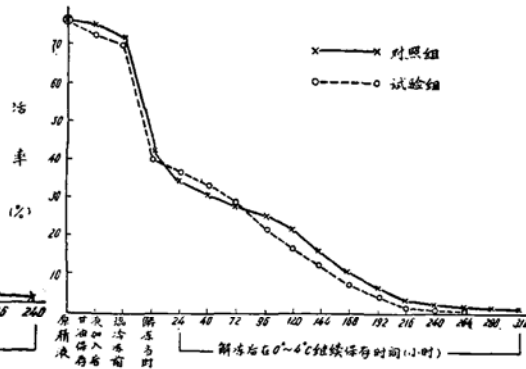


图 2 试验三中精液活率变动情况 (12次平均)

在试验三中试验组精液先用I号保存液初步稀释后约半小时，再用Ⅱ号保存液(也含甘油7.7%)1比4第二次稀释。甘油保存液加入后的当时活率虽比对照组下降较大，但经过平衡后在临冷冻之前活率基本上是相接近的(分别为71.3%和71.7%)。冷冻至-79°C经24小时后解冻，试验组活率虽也比对照组略低(分别为40.4%和42.1%)，但解冻后在0°—4°C继续保存的前三天活率下降的幅度比对照组为小，活率评分反而略高于对照组(见图2)。这批试验中12个精液样品的原活率平均为75.8%，精液解冻后在0°—4°C下继续保存的总存活时间平均分别为226小时和250小时。

根据输精试验结果(见表4)看来：用第Ⅱ号保存液在室温下完成全部稀释处理并未降低冷冻精液的受精能力。用这种稀释方法冷冻的公牛精液给60头母牛输精，情期受胎率达到58.3%；而用既往通用的保存液和稀释方法冷冻的公牛精液给另外80头母牛输

表 4 冷冻精液输精试验结果

	1 分 场		2 分 场		共 計	
	甲 组	乙 组	甲 组	乙 组	甲 组	乙 组
输精母牛数	43	39	37	21	80	60
50天无发情数	26	25	17	11	43	36
50天无发情率(%)	60.5	64.1	45.9	52.4	53.8	60.0
直肠检查确孕数	26	25	14	10	40	35
情期受胎率(%)	60.5	64.1	37.8	47.6	50.0	58.3

注：甲组、乙组的冻前处理方法分别相当于试验三中的对照组和试验组。1965年产犊期间我们重点到1分场做了调查，分娩母牛数与孕娠检查结果是相符的。

精, 情期受胎率为 50%。因此改变保存液配方后在室温下完成全部冷冻前的处理工作是有希望成功的。这种方法将大大简化操作条件, 因而也能节约许多人力物力。

## 摘 要

为简化低温冷冻精液的操作技术而进行了一系列的试验, 重点研究了甘油保存液的加入方法对公牛精液冷冻效果的影响。在初步的室内试验中看到, 用既往通用的甘油保存液在室温下进行稀释, 对精液冷冻前后的活率皆有不良影响, 有部分精子尾部发生卷曲不能正常前进运动。以后在第三个试验中增加了甘油保存液中溶质的浓度和成分, 情况得到改善。解冻后活率与对照组极为接近, 输精试验结果表明受胎率比对照组还略高。改进的保存液由下列成分组成: 蒸馏水 100 毫升, 柠檬酸钠( $5\text{H}_2\text{O}$ ) 2 克, 葡萄糖 4 克, 氨基乙酸 0.6 克, 卵黄 20 毫升和甘油 10 毫升。前三种溶质的总浓度约为等渗浓度的 150%, 甘油占总容积的 7.7%。每百毫升保存液中还加有青霉素钾盐 5—10 万单位。新采出的公牛精液先用等渗的柠檬酸钠-葡萄糖-卵黄液 1 至 3 倍稀释, 经半小时在室温下再用上述改进的甘油保存液 1 比 4 第二次稀释。逐渐降温至  $0^\circ\text{C}$  并在此温度下平衡 20 小时然后冷冻至  $-79^\circ\text{C}$ 。用这种方法冷冻的公牛精液经过 2—3 个月的保存后给 60 头母牛输精, 情期受胎率达到 58.3%, 而用通常的甘油保存液和稀释方法(降温至  $0^\circ\text{C}$  再加甘油保存液)冷冻的公牛精液输精母牛 80 头, 情期受胎率为 50%。在室温下加甘油保存液可大大简化操作技术, 而本试验的结果表明这种方法是有可能成功的。

## 参 考 文 献

- [1] Polge, C., Smith, A. U. & A. S. Parkes (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (Lond.)*, 164: 666.
- [2] Polge, C. & L. E. A. Rowson (1952) Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at  $-79^\circ\text{C}$ . *Nature (Lond.)*, 169: 626.
- [3] Polge, C. & L. E. A. Rowson (1952) Results with bull semen stored at  $-79^\circ\text{C}$ . *Vet. Rec.*, 64: 85.
- [4] Henderson, J. A. & J. W. Macpherson (1956) The use of frozen semen in routine insemination of cattle. *Pap. 3rd Int. Congr. Animal Reprod. 1956, Sect. 3: 15.*
- [5] Stewart, D. L. (1961) 对冷冻精液受胎率的观察, 第四届国际家畜繁殖会议论文选译, 农业出版社, 1962, 283 页。
- [6] Хабибуллин, X. (1957) Сохранение и перевозка семени быков при низких температурах. *Молочн. и Мясн. Живот.* 1957, 5: 39.
- [7] Blackshaw, A. W. (1960) The effects of pH, tonicity and the temperature of glycerolization on the revival of ram and bull spermatozoa after freezing to  $-79^\circ\text{C}$ . *Aust. Vet. J.*, 36: 376.
- [8] Graham, E. F., Vogt, D. W. & G. R. Fisher (1958) Effect of method of glycerol addition on the fertility of frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 41: 1553.
- [9] Miller, W. J. & N. L. VanDemark (1954) The influence of glycerol level, various temperature aspects, and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at sub-zero temperature. *J. Dairy Sci.*, 37: 45.
- [10] O'Dell, W. T. & J. O. Almquist (1954) Techniques for freezing bull spermatozoa in heated milk and preliminary breeding results. *J. Dairy Sci.*, 37: 652.
- [11] Stover, J. & H. J. Cembrowicz (1961) 在脱脂奶-卵黄缓冲液中加入甘油稀释牛精液对受胎率的影响. 第四届国际家畜繁殖会议论文选译, 农业出版社, 1962, 251 页。
- [12] Платов, Е. М. (1960) Осмотическое действие глицерина на живчиков быка. *Вест. Сель. Науки.* 1960, 11: 59.

- [13] Хабибуллин, Х. (1958) Длительное хранение семени быка в замороженном состоянии при  $-78^{\circ}\text{C}$ . Молочн. и Мясн. Скот., 1958, 2: 43.
- [14] Saroff, J. & J. P. Mixner (1955) The relationship of egg yolk and glycerol content of diluters and glycerol equilibration time to survival of bull spermatozoa after low temperature freezing. J. Dairy Sci., 38: 292.
- [15] Платов, Е. М. (1961) Усовершенствованный метод замораживания семен быка. Вест. Сель. Науки., 1961, 11: 127.

## THE EFFECT OF DILUTING METHODS OF GLYCEROL EXTENDER ON THE MOTILITY AND FERTILITY OF FROZEN BULL SEMEN

Lin, T. Y., Loan, C. S. and Liu, Y. C.

*(Research Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Inner Mongolian Academy of Agricultural Sciences)*

### Summary

In order to simplify the freezing technics, a series of experiments were conducted to determine the effect of diluting methods of glycerol extender on the motility and fertility of frozen bull semen. The preliminary experiments in laboratory showed, that diluting with common glycerol extender at room temperature had a detrimental effect on the semen motility, a part of spermatozoa rolled up their tails and could not swim normally. Results were improved by increasing the concentration of the solutes of glycerol extender on the 3rd experiment, the motility after thawing approached that of the control, and it was found in a field trial that the conception rates were somewhat higher than the control. The modified glycerol extender was composed of 2.0 g. of sodium citrate ( $5\text{H}_2\text{O}$ ), 4.0 g. of glucose, 0.6 g. of glycine, 20 ml. of egg yolk and 10 ml. of glycerol per 100 ml. distilled water. Fresh bull semen were first diluted with isotonic citrate-glucose-egg yolk extender, half an hour later the modified glycerol extender mentioned above was added at room temperature in 1:4, the diluted semen was gradually cooled to  $0^{\circ}\text{C}$ , and equilibrated under that temperature for 20 hours, then frozen to  $-79^{\circ}\text{C}$ . The bull semen thus preserved for 2-3 months were used in field trials, after 1st insemination the conception rate of 60 cows were 58.3%, as compared with 50.0% for 80 cows inseminated with frozen semen diluted at  $0^{\circ}\text{C}$  with common glycerol extender before freezing. Adding glycerol extender at room temperature will greatly simplify the freezing technics, and these experiments suggested that the method is promising.