畜牧兽医杂志，2024，43(5)：32-36
Journal of Animal Science and Veterinary Medicine

DOI：10.7606/j.issn.1004-6704.2024.05.006 http://xmsyzz.ijournals.cn

赵 霞，爱伦高娃，张春华，等. 不同稀释保护液对羊精子在4 ℃低温保存条件下品质影响的探索研究[J]. 畜牧兽医杂志，2024，43(5)：32-36.

ZHAO Xia，Ailungaowa，ZHANG Chunhua，et al. Effect of different dilution media on the quality of sheep semen during low-temperature preservation at 4 ℃[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine，2024，43(5)：32-36.

不同稀释保护液对羊精子在4 ℃低温保存条件下品质影响的探索研究

赵 霞[1]，爱伦高娃[2]，张春华[1]，羿 静[1]，贾致远[1]，赛 音[1]，道 楞[3*]

（1.内蒙古自治区农牧业科学院，内蒙古呼和浩特 010031；2.内蒙古自治区医科大学附属医院，内蒙古呼和浩特 010017；3.内蒙古自治区农牧业技术推广中心，内蒙古呼和浩特 010010）

摘 要：本研究旨在评估不同稀释保护液（含蛋黄、大豆卵磷脂、甘油等成分）在4 ℃条件下保存6 d对种公羊精子参数的影响，从而为种公羊鲜精低温延时保存技术提供科学依据，并提高优质种公羊的利用率。实验通过混合精液样本以消除个体差异，并将混合后的精液均分为三份，分别添加至三种不同的稀释保护液（Tris基础液＋大豆卵磷脂、Tris基础液＋蛋黄、牛奶＋果糖）中进行等温稀释，使最终精子浓度达到40×10^6个/mL。随后，将稀释后的精子分装至0.25 mL麦管中，并使用聚乙烯醇进行密封，储存于4 ℃恒温冰箱中。在储存后的0、72、120和144 h，采用计算机辅助精子分析系统（CASA）测定精子活力参数，并利用伊红染色技术评估精子顶体完整性和异常率。实验结果显示，在初始状态下，各组精子活力相近且未检出异常率；然而，随着储存时间的延长，精子活力逐渐降低，异常率逐渐上升。特别是在储存144 h后，牛奶＋果糖组的精子活力最低，异常率最高；相比之下，Tris基础液＋大豆卵磷脂组在短期内对精子活力的保持效果更佳，且精子异常率相对较低。因此，本研究表明，在4 ℃低温保存种公羊精子时，选择合适的稀释保护液对于维持精子活力和降低异常率至关重要，其中Tris基础液＋大豆卵磷脂稀释保护液表现出较好的应用潜力。

关键词：种公羊；低温保存；稀释保护液；精子活力；精子异常率；Tris基础液；大豆卵磷脂

［中图分类号］ S814 ［文献标志码］ A ［文章编号］ 1004-6704(2024)-05-0032-05

Effect of Different Dilution Media on the Quality of Sheep Semen during Low-Temperature Preservation at 4 ℃

ZHAO Xia[1]，Ailungaowa[2]，ZHANG Chunhua[1]，YI Jing[1]，JIA Zhiyuan[1]，SAI Yin[1]，DAO Leng[3*]

（1. *Inner Mongolia Agricultural and Animal Husbandry Sciences Academy，Hohhot，Inner Mongolia* 010031，*China*；2. *Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University，Hohhot，Inner Mongolia* 010017，*China*；3. *Inner Mongolia Autonomous Region Agricultural and Animal Husbandry Technology Promotion Center，Hohhot，Inner Mongolia* 010010，*China*）

Abstract：This study aimed to evaluate the effects of different dilution media（containing egg yolk，soy lecithin，glycerol，etc.）on semen parameters of breeding rams after 6-day storage at 4 ℃. The objective was to provide scientific evidence for the low-temperature delayed preservation of fresh semen from breeding rams and improve the utilization rate of high-quality breeding rams. Semen samples were mixed to eliminate individual differences，and the mixed semen was evenly divided into three portions and diluted with three different dilution media（Tris base solution＋soy lecithin，Tris base solution＋egg yolk，milk＋fructose）at an isothermal condition

［收稿日期］ 2024-06-18
［基金项目］ 内蒙古农牧业创新基金项目（2023CXJJM04）；内蒙古自治区科技计划项目（2021GG0067）；农牧业科技转化资金项目（2024TG13-3）
［第一作者］ 赵 霞（1968-），女，研究员，主要从事家畜繁殖技术研究与推广工作。E-mail：zxgege@163.com
*［通信作者］ 道 楞，E-mail：tnaq@sina.cn

to achieve a final sperm concentration of 40×10^6/mL. Subsequently, the diluted semen was dispensed into 0.25 mL straws, sealed with polyvinyl alcohol, and stored in a constant-temperature refrigerator at 4 ℃. At 0, 72, 120 and 144 h after storage, sperm motility parameters were determined using a computer-assisted sperm analysis system (CASA), and sperm acrosome integrity and abnormality rates were assessed using eosin staining. The results showed that sperm motility was similar in all groups at the initial state, and no abnormalities were detected. However, with the extension of storage time, sperm motility gradually decreased, and the abnormality rate gradually increased. Particularly after 144 h of storage, the milk+fructose group exhibited the lowest sperm motility and the highest abnormality rate. In contrast, the Tris base solution+soy lecithin group showed better maintenance of sperm motility in the short term, with a relatively low sperm abnormality rate. Therefore, this study indicates that selecting the appropriate dilution media is crucial for maintaining sperm motility and reducing the abnormality rate during low-temperature preservation of semen from breeding rams at 4 ℃. Among them, the Tris base solution+soy lecithin dilution media demonstrated good application potential.

Key words: breeding ram; low-temperature preservation; dilution media; sperm motility; sperm abnormality rate; Tris base solution; soy lecithin

公羊精液的有效储存受稀释保护液、冷冻工艺以及保存温度等多重因素的共同影响。在当前集约化养殖肉羊的趋势下，为提升人工授精技术在养羊业中的效率与应用范围，进一步优化羊精液稀释液配方、完善冷冻工艺以及低温保存技术显得尤为迫切。传统的非冷冻低温保存精液在不损害生育能力的前提下，其储存时间十分有限，这在很大程度上限制了绵羊和山羊精子的利用效率。因此，提高公羊精液在低温条件下的受精能力一直是研究者们关注的焦点。尽管经过不断的探索和改进，精液保存技术已取得了一定进展，但即便是经过冷冻或低温保存的精子，其受精能力仍明显低于新鲜精子。有研究表明，稀释后的公羊精液在冷冻保存前，在适宜的低温条件下可以保持较长时间的活力。然而，这些稀释液中常用的动物来源添加剂（如蛋黄或牛奶）带来了卫生风险、质量标准的不统一以及潜在的类固醇激素问题，这些因素均可能影响精子的受精能力。特别是蛋黄作为动物产品，其成分多变、标准化困难以及潜在的污染风险（如沙门氏菌污染）等问题[1-2]，使得开发替代品的需求日益迫切。

本研究通过评价和比较不同添加物（包括牛奶、Tris、大豆卵磷脂、甘油等）作为稀释保护液对公羊精液在 4 ℃低温保存 6 d 的品质影响，旨在为羊精液非冷冻低温保存技术的推广应用提供科学依据。我们期望通过这一研究，能够开发出更为安全、有效且易于标准化的稀释保护液配方，以推动人工授精技术在养羊业中的进一步发展与应用，为养羊业的可持续发展贡献力量。

1　试验材料

1.1　动物与精液采集

本研究选用了在同一饲养管理条件下饲养的 6 只 3～4 岁的优秀奶山羊种公羊作为试验动物。在实验前 40 d 开始，每只公羊的日粮中均添加了胡萝卜和鸡蛋，并确保其能够自由取水和舔食盐砖。为保持公羊的体质和精液质量，我们安排了每天早晚两次定时定量的运动，每次运动距离为 2～3 km。精液的采集采用了人工阴道射精技术，收集每只公羊的精液样本经混合后使用，以最大程度地消除个体差异对试验结果的影响。

1.2　试验试剂

本研究中使用的试剂包括 Tris（三羟甲基氨基甲烷）、果糖、柠檬酸、甘油、大豆卵磷脂（SL）等，均购自 Sigma-Aldrich（美国）。此外，还使用了伊红、青霉素和链霉素等试剂，均来自国内可靠供应商。

1.3　试验设备与器械

实验过程中使用的主要设备与器械包括：电子天平（日本）、生物相差显微镜（尼康）、全自动精子分析仪（美国 HamiltonThome lvos ll）、0.25 mL 麦管（法国）、封口粉（日本）等。此外，还使用了血细胞计数器、超声波细胞粉碎仪、pH 测试仪、恒温板、恒温水浴锅、细管架、冰箱、剪刀以及自制的泡沫冷冻箱等国内设备。

2　试验方法

2.1　稀释液的配制

2.1.1　Tris 基础稀释液化学配方　Tris 基础稀释液的配制过程如下：首先，使用万分之一的分析天平精确称量所需的化学药品，包括 Tris、果糖和柠檬酸。将这些药品放入 100 mL 的烧杯中，并加入约 50 mL 的双蒸水。随后，使用玻璃棒进行充分搅拌，待药品完全溶解后，将溶液定容至 100 mL。之后，将稀释液倒入三角瓶中，并使用封口膜密封，然后进行高压灭菌处理。待稀释液冷却后，分别加入青霉素和链霉素，以调节其 pH 值为 6.8，从而得到基础稀释液（表 1）。

表1 Tris基础稀释液配方

Table 1 Formulation of Tris base diluent

	基础液成分				
	双蒸水/mL	Tris/g	果糖/g	柠檬酸/g	pH
剂量	100	2.71	1.00	1.42	6.8

表2 不同添加剂的Tris稀释保护液

Table 2 Tris dilution protection solution with different additives

配方	SL/%	蛋黄/%	脱脂奶粉/g	果糖/g	甘油/%	pH值
Ⅰ	—	18		—	5	6.8
Ⅱ	1	—		—	5	6.8
Ⅲ		—	10	0.5	—	6.8

2.1.2 稀释液的配制 为了制备具有不同成分的稀释保护液，我们在Tris基础稀释液的基础上分别添加了大豆卵磷脂和蛋黄(表2)。

2.2 精液处理

2.2.1 精液采集与初步评估 使用人工阴道技术采集精液后，立即将精液转入等温试管中，确保精子活力不受影响。随后，将精液试管放入37 ℃恒温水浴锅中，静置10～15 min，使精液达到稳定状态。在此期间，对每个精液样本至少观察评估400个精子，关注其颜色、活力、活率、密度以及射精量等关键指标。选择射精量在0.5～2 mL范围内，精子浓度介于$1.5\sim2\times10^9$精子/mL之间，进行性运动精子百分比大于85%，且异常精子百分比小于10%的精子样本进行汇总，为后续实验备用。

2.2.2 精液的稀释与保存 为了消除个体差异，将初步评估合格的精液样本进行混合，并均匀分成三份。随后，使用Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ号三种不同的Tris稀释保护液，按照1∶1(体积比)的比例对混合后的精液样本进行等温稀释。稀释过程中保持操作温度恒定，以确保精子不受温度变化的影响。稀释完成后，将稀释液放置在37 ℃恒温水浴锅中平衡10 min，使精子适应新的环境。接下来，使用血细胞计数法检测稀释后的精子浓度，确保每个样本中的精子浓度达到最终要求的40×10^6个/mL。完成浓度调整后，将精子分装入0.25 mL的麦管中，并使用聚乙烯醇进行密封，以防止精子在保存过程中受到污染或干燥。最后，将所有封装好的精液样品用纯棉毛巾或纱布包裹，小心放入4 ℃恒温冰箱中进行保存。在保存过程中，定期检查精液样本的状态，确保精子活力保持稳定，为后续的实验和应用提供可靠的精子资源。

2.2.3 细管精液品质评定 从4 ℃恒温冰箱中取出低温保存的细管精液后，立即将其置于37 ℃水浴锅中，保持20～30 s以恢复精子活力。随后，按常规方法检测精子的活力与活率，以评估其在低温保存后的状态。为了进一步观察精子的微观结构，采用涂片、固定和染色方法进行品质检测。通过相差显微镜观察精子顶体的完整性，以了解其在保存过程中是否发生损伤。

①常规检测：在低温保存后的0、72、120和144 h的时间点，对精子的进行性运动进行检测。每次检测时，取适量精液样本滴在预热至37 ℃的两个24 mm×24 mm的盖玻片上。在尼康相差显微镜下，由两名经验丰富的技术人员分别对每个精液样本的5个不同显微镜视野区域的精子运动性进行评估。最终，将两次评估的平均值作为该样本的运动评分，以全面反映其精子活力状况。

②染色检测：采用伊红染色技术来测定精子顶体完整性的百分比。每张载玻片至少检测200个精子细胞，以准确计算顶体受损的精子百分比。具体操作步骤为：将一小滴精液与伊红染色液混合后，滴在干净的载玻片上，并迅速用另一张载玻片涂抹均匀，制作成涂片。在空气中干燥10 s后，置于显微镜下观察(放大400倍)，统计200个精子的染色情况。根据Mortimer(1994)的标准，将未被染色的精子视为活精子，而呈现粉红色或红色外染色的精子则归为死亡或受损精子。需要注意的是，若精子仅轻微粉红色或红色外染色仅限于精子颈部区域，仍归类为活精子。通过这种方法，我们可以准确评估精子在保存过程中的顶体完整性及活力变化。

2.3 数据分析

采用多因素方差分析对实验数据进行处理，设定$P<0.05$为差异显著的阈值。

3　实验结果

3.1　不同稀释保护液对 4 ℃低温保存精子活力的影响

精子在 4 ℃条件下低温保存后的第 0、72、120 和 144 h 我们检测了不同稀释保护液中精子活力百分比；在 4 ℃条件下添加蛋黄、大豆卵磷脂 Tris 稀释液和牛奶的精子活力见表 3。

表 3　不同稀释保护液对 4 ℃保存精子活力的影响

Table 3　Effects of different diluting protective fluids on sperm motility at 4 ℃

保存时间/h	精子活力/%		
	Tris 基础液＋大豆卵磷脂	Tris 基础液＋蛋黄	牛奶＋果糖
0	92.25±0.66a	86.42±1.37a	85.58±1.36a
72	87.67±1.28a	74.42±1.37b	66.92±1.29c
120	64.75±2.45b	54.00±1.85c	47.67±2.02d
144	58.17±1.07c	37.5±0.40d	30.0±0.4e

注：同行同列数据不同字母表示差异显著（$P<0.05$），相同字母表示差异不显著（$P>0.05$）。

我们研究了不同稀释保护液对 4 ℃保存条件下精子活力的影响。实验结果显示，在初始时间（0 h）时，Tris 基础液＋大豆卵磷脂组的精子活力最高，达到 92.25±0.66%，与 Tris 基础液＋蛋黄组和牛奶＋果糖组无显著差异（$P>0.05$），说明三种稀释保护液在初始状态下对精子活力的保护效果相近。随着保存时间的延长，各组精子活力均出现下降趋势。在保存 72 h 后，虽然精子活力均有所降低，但 Tris 基础液＋大豆卵磷脂组的精子活力依然保持在 87.67±1.28%，显著高于 Tris 基础液＋蛋黄组和牛奶＋果糖组（$P<0.05$）。这表明在保存初期，Tris 基础液＋大豆卵磷脂对精子活力的保护效果更为优越。随着保存时间进一步延长至 120 和 144 h，精子活力的下降趋势更为明显。然而，Tris 基础液＋大豆卵磷脂组的精子活力仍然相对较高，且与其他两组相比差异显著（$P<0.05$）。相比之下，Tris 基础液＋蛋黄组和牛奶＋果糖组的精子活力则呈现出更为显著的下降趋势，且两者之间的差异也逐渐增大。

实验结果表明，在 4 ℃保存条件下，不同稀释保护液对精子活力的保护效果存在显著差异。其中，Tris 基础液＋大豆卵磷脂组在保存期间能够较好地维持精子活力，表现出较好的保护效果。而 Tris 基础液＋蛋黄组和牛奶＋果糖组的保护效果则相对较差，精子活力下降较快。因此，在选择稀释保护液时，可以考虑使用 Tris 基础液＋大豆卵磷脂以提高精子在保存期间的活力。

3.2　不同稀释液对 4 ℃低温保存精子形态的影响

精子在 4 ℃条件下低温保存后的第 0、72、120 和 144 h 我们检测了不同稀释保护液中精子异常率结果见表 4。

表 4　不同稀释液 4 ℃低温保存精子不同时间段异常精子参数/%

Table 4　Parameters of abnormal sperm in different periods of cryopreservation with different diluents at 4 ℃

保存时间/h	精子异常率		
	Tris＋大豆卵磷脂	Tris＋蛋黄	牛奶＋果糖
0	未检出	未检出	未检出
72	4.2±1.0a	4.7±0.6a	7.7±1.5b
120	9.3±1.5b	9.3±0.6b	13.3±2.1c
144	15.1±1.6c	23.7±1.5d	34.7±1.5e

注：同行同列数据不同字母表示差异显著（$P<0.05$），相同字母表示差异不显著（$P>0.05$）。数据为异常精子率的平均值±标准误。

表 4 显示，随着保存时间推移每组精液异常率逐渐上升的趋势；144 h 后三组精子异常率之间均有显著差异；牛奶＋果糖组精子异常率显著低于其他两组。

从表 4 可以看出，在 4 ℃低温保存条件下，随着保存时间的延长，不同稀释液对精子异常率的影响呈现出显著差异。在初始时间点（0 h），由于精子未经保存处理，各组精子异常率均未检出，说明起始时精子的形态结构正常，未受到外界因素的影响。然而，随着保存时间的推移，精子异常率逐渐上升。在保存 72 h 后，虽然三组精子异常率均有所上升，但 Tris＋大豆卵磷脂组和 Tris＋蛋黄组的异常率相对较低，且两者之间没有显著差异。相比之下，牛奶＋果糖组的精子异常率已经显示出较高的水平，与其他两组存在显著差异。到了保存 120 和 144 h 的时间点，精子异常率的上升趋势更加明显。尤其是保存 144 h 后，各组之间的精子异常率差异达到最大。Tris＋大豆卵磷脂组的精子异常率虽然也有所上升，但相比其他两组仍然保持相对较低的水平。而 Tris＋蛋黄组的精子异常率则进一步上升，与 Tris＋大豆卵磷脂组之间的差异变得显著[3-4]。牛奶＋果糖组的精子异常率最高，与其他两组之间存在极

显著的差异。这些结果表明,在4 ℃低温保存条件下,不同稀释液对精子异常率的影响显著。其中,Tris+大豆卵磷脂组在保护精子形态方面表现出较好的效果,能够在较长时间内维持较低的精子异常率[5-6]。而牛奶+果糖组作为稀释液的效果较差,尤其是在保存时间较长的情况下,精子异常率明显上升。Tris+蛋黄组的效果介于两者之间。

4 讨 论

本研究对比了TRIS-EY、TRIS-SL及牛奶果糖三种稀释液在山羊精液储存过程中对精子活力的影响,结果表明稀释液的配方和黏度显著影响精子储存效果。与TRIS-EY和牛奶果糖相比,添加了大豆卵磷脂(SL)的TRIS-SL稀释液显著提高了精子的最终质量和活力,这一发现与先前的研究结果相吻合。大豆卵磷脂(SL)作为一种植物源性的添加剂,通过保护精子质膜、减轻胆固醇和磷脂的外流,显著减轻了精子在低温保存过程中的损伤[7-8]。与基于蛋黄的稀释液相比,大豆卵磷脂不仅提供了相似的保护效果,还避免了微生物污染的风险,并可能因其在环保和可持续性方面的优势而受到青睐[9]。

大豆卵磷脂在不同动物精液中的最适浓度仍需进一步探索。先前的研究表明,大豆卵磷脂的浓度可能会影响其保护效果。因此,未来的研究应针对不同物种和精液特性,确定最佳的大豆卵磷脂浓度[10-11],以最大化其在精液保存中的应用潜力。

此外,虽然甘油在冷冻保存中具有一定的保护作用,但其在4 ℃冷藏条件下的作用机制和最佳使用比例仍需进一步研究。相比之下,乙二醇作为一种低温保护剂,在公羊精液保存中显示出更好的应用前景。本研究未提供相关数据,但基于文献综述的假设。然而,其在实际应用中的效果仍需通过更多的研究来验证。

在选择稀释液时,还应考虑其对精子质膜和染色质结构的影响。牛奶和蛋黄等动物源性添加剂可能对这些结构产生不利影响,从而影响精子的受精能力。因此,选择环保、无污染的添加剂,如大豆卵磷脂,对于确保精子储存质量至关重要。

综上所述,通过选择合适的稀释液配方,我们可以显著提高精子在液体储存过程中的质量和稳定性。未来的研究应继续探索和优化精液储存技术,以更好地保护遗传资源,提高人工授精的成功率。同时,应关注大豆卵磷脂等环保型添加剂在精液保存中的应用潜力,以推动该领域的可持续发展。

精液冷冻保存对于保护遗传资源、维持动物遗传多样性以及提高人工辅助生育的成功率至关重要。然而,冷冻过程中精子质量的下降和受精能力减弱是限制其应用的主要问题。尽管已有研究致力于提高液体储存精液的品质,但在山羊等动物中效果有限。

本研究发现:TRIS-EY、TRIS-SL和牛奶果糖三种稀释液中的精子活力均随时间降低,其中TRIS-EY的高黏度可能限制了精子运动。与Tris稀释液和牛奶果糖相比,含1%大豆卵磷脂(SL)的Tris稀释液在长时间储存后保持了较高的精子质量和活力。这可能与SL对精子质膜的保护作用有关。牛奶果糖作为稀释剂会导致精子异常数增加,这可能与其对精子染色质结构的不利影响有关。

对未来研究的建议:探索和优化稀释液配方,以提高液体储存精液的品质和受精能力。进一步研究甘油和乙二醇等化学物质在低温保存精子中的最佳使用比例和作用机制。进行动物试验以验证含有大豆卵磷脂的低温保存液对羊精液体外和体内受精能力的影响。

5 结 论

大豆卵磷脂作为低温保存添加剂,在替代动物来源的添加剂(如蛋黄)方面表现出良好的效果,且不会对精子质量产生不良影响。这为优化精液保存条件、提高人工授精成功率提供了新的思路,并可能降低生产成本、提高环保性和可持续性。然而,在实际应用前仍需进行更多研究和验证。

参考文献:

[1] El-SISY G A,El-NATTAT W S,El-SHESHTAWY R I,et al. Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability[J]. Asian Pacific Journal of Reproduction,2016,5(6):514-518.

[2] BOUSSEAU S,BRILLARD J P,MARQUANT-LE GUIENNE B,et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine Semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents[J]. Theriogenology,1998,50(5):699-706.

[3] SUN L W,FAN W H,WU C F,et al. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat Semen cryopreservation[J]. Cryobiology,2020,92:146-150.

(下转第39页)