



稀释液中添加 VB₁₂ 在湖羊精液保存中的应用

石少英¹, 杨树猛¹, 张志杰², 蔺成友¹, 杨秀兰¹, 闫宝生^{3*}

(1. 甘南州畜牧工作站, 甘肃合作 747000; 2. 临潭县卓洛乡畜牧兽医站, 甘肃临潭 747500;
3. 北京中农安得生态科技有限公司, 北京 100102)

摘要: 羊精液保存时, 稀释液中添加一定量的维生素 B₁₂ (VB₁₂), 对提高精液品质具有重要作用, 可维持精子顶体完整率, 延长精子体外存活时间和提高精子存活率和活力。本研究旨在探究稀释液中添加不同浓度 VB₁₂ 对湖羊精液保存效果的影响。试验选取 10 只湖羊, 采用假阴道法采集精液, 添加不同浓度的 VB₁₂ 稀释液 (0、0.025、0.05 和 0.075 mg/mL), 在 4 °C 条件下冷藏保存。研究表明: 在保存初期第 1、2 天, 各 VB₁₂ 添加组精子畸形率与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。0.05 mg/mL VB₁₂ 组第 2~5 天精子存活率和活力显著高于其他浓度组 ($P < 0.05$), 第 4、5 天精子畸形率显著高于其他组 ($P < 0.05$), 所有添加 VB₁₂ 组第 5 天的精子畸形率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。综上所述, 稀释液中添加适量的 VB₁₂ 可以有效提高湖羊精液保存效果, 延长精子的存活率和活力保持时间, 并在一定程度上降低精子畸形率, 为优化湖羊精液保存技术, 提高人工授精成功率提供了依据。

关键词: 稀释液; VB₁₂; 精子存活率; 精子活力; 精子畸形率

[中图分类号] S814.4 [文献标志码] A [文章编号] 1004-6704(2025)-03-0085-05

Application of Adding VB₁₂ to Diluent for the Preservation of Hu Sheep Semen

SHI Shaoying¹, YANG Shumeng¹, ZHANG Zhijie², LIN Chengyou¹, YANG Xiulan¹, YAN Baosheng^{3*}

(1. Gannan Prefecture Livestock Workstation, Hezuo, Gansu 747000, China; 2. Zhuoluo Township Livestock and Veterinary Station, Lintan, Gansu 747500, China; 3. Beijing Zhongnong Ande Ecological Technology Co., Ltd, Beijing 100102, China)

Abstract: When storing sheep semen, adding a certain amount of vitamin B₁₂ (VB₁₂) to the diluent is important in improving semen quality, maintaining sperm acrosome integrity, prolonging sperm in vitro survival time, and increasing sperm survival rate and motility. This study investigates the effect of different concentrations of VB₁₂ added to diluent on the preservation of Hu sheep semen. Ten Hu sheep were selected for the experiment, and semen was collected using the pseudo-vaginal method. Different concentrations of VB₁₂ diluent (0, 0.025, 0.05 and 0.075 mg/mL) were added and stored at 4 °C. The research results showed that on the first and second day of storage, there was a significant difference in sperm abnormality rate between the VB₁₂-added groups and the control group ($P < 0.05$). The 0.05 mg/mL VB₁₂ group had significantly higher sperm survival rates

[收稿日期] 2024-12-20
[基金项目] 甘南州重点领域科技计划项目(2022JY2NC003);
甘南州重大专项计划项目(2023ZZ1NC004)
[第一作者] 石少英(1977-), 女, 高级畜牧师, 主要从事畜牧养殖基础研究及技术推广工作。E-mail: 810663712@qq.com
[共同第一作者] 杨树猛(1976-), 男, 高级畜牧师, 主要从事畜牧养殖基础研究及技术推广工作。E-mail: 513584479@qq.com
*[通信作者] 闫宝生, E-mail: 18109410225@163.com

and activity from day 2 to day 5 compared to other concentration groups other concentration groups ($P < 0.05$), and the sperm abnormality rate on days 4 and 5 was significantly higher than in other groups ($P < 0.05$). The sperm abnormality rate of all VB₁₂ addition groups on day 5 was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). In summary, adding an appropriate amount of VB₁₂ to the diluent can effectively improve the preservation effect of Hu sheep semen, prolong the survival rate and motility retention

time of sperm, and to some extent reduce the sperm abnormality rate. This provides a basis for optimizing Hu sheep semen preservation technology and improving the success rate of artificial insemination.

Key words: diluent; VB₁₂; sperm survival rate; sperm motility; sperm abnormality rate

近年来,随着人工授精技术在家畜繁殖领域的逐步推广,依托稀释液的精液液态低温保存技术也逐渐受到研究者的关注。液态低温保存是通过降低温度使精子代谢减弱,从而延长精子存活时间,当温度回升后,能够恢复正常代谢机能而不丧失受精能力。稀释液配方是液态低温保存的关键环节之一,良好的稀释液包含营养物质、抗氧化剂、酶和激素等各种成分,不仅可以扩大有效精液容积,还可以为精子代谢提供所需的能量物质,提高精子活力、精子存活率和延长精子寿命^[1-4]。

针对维生素的添加效果在精液稀释保存方面的研究,日益受到研究者的关注^[5-6]。精液稀释液中添加一定量的维生素 B₁₂ (VB₁₂),有助于维持精子顶体完整率,提高精子活力、精子存活率和降低精子畸形率和延长精子体外存活时间,从而提高精液品质、受精率^[7]。鉴于此,本试验通过对比在稀释液中添加不同浓度 VB₁₂ 对湖羊精液保存效果的影响,总结出 VB₁₂ 稀释液的最佳保存稀释比例,优化 VB₁₂ 的添加量,探索其对湖羊体外生存状态的影响,以期优化精液保存技术应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物

选择健康、繁殖性能正常的湖羊 10 只,年龄在 2~3 岁之间。羊只由甘肃省铭鑫羊业养殖有限责任公司(临潭县农盛养殖农民专业合作社)提供。

1.2 试剂与仪器

试剂:注射用 VB₁₂ (山东威智百科药业 1 mL:0.25 mg 注射剂)、乳糖(莱阳化工实验厂)、葡萄糖(烟台市双双化工)、柠檬酸钠(上海建信化工)、青霉素(哈药集团)、硫酸链霉素(四川鼎尖动物药业)、卵黄、蒸馏水、姬姆萨染色液(BASO 贝索)、凡士林。

试验仪器:显微镜(重庆奥特光学仪器)、冰箱、电热恒温水浴锅(科伟)、高压蒸汽灭菌锅、电炉、锅、电子天平、锥形瓶、离心管、移液枪(Eppendorf)、移液枪头、玻璃棒、温度计、吸管、载玻片(帆船牌)、盖玻片、过滤纸、绳子、纱布、剪刀。

1.3 稀释液的配制

使用调平后的电子天平精确称量无水葡萄糖 3

g、乳糖 3.8 g、柠檬酸钠 1.3 g,充分溶于 100 mL 蒸馏水,过滤两次,然后在高温炉中蒸煮 30 min,温度降至 30 ℃左右时,加入卵黄 15 mL、青霉素和链霉素各 10 万 IU,配制成基础稀释液(表 1)。将不同浓度(0、0.025、0.05 和 0.075 mg/mL)VB₁₂ 加入分装到离心管的基础稀释液中,然后将样品密封放入冰箱冷藏室备用,电热恒温水浴锅温度设定到 37 ℃,于采精前 1 h 预热^[8]。

表 1 稀释液的成分与剂量

Table 1 Composition and dosage of diluent

	成分		
	乳糖	无水葡萄糖	柠檬酸钠
含量/g	3.8	3	1.3

1.4 精液采集与处理

采用假阴道法采集公羊精液,将采集到精液的集精杯置于 39 ℃ 恒温水浴锅内,现场进行了颜色、气味等方面的常规检查,随后带回实验室开展精液质量检查,精液色泽为乳白,气味有轻微腥味,呈现云雾状,精子存活率达到 80% 以上,密度大于等于 30 亿/mL,经化验合格后即可使用。将合格的精液和配置好的基础稀释液 37 ℃ 等温后按照 1:8 的比例进行混合,分管后再加入不同浓度的 VB₁₂,用封口膜封口后包上多层脱脂纱布,放入冰箱冷藏室。保存时每隔 12 h 轻微摇晃,每隔 24 h 检测并记录一次精子的活力、存活率、畸形率和顶体完整率。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 精子存活率检测 精子存活率指精液中活精子占检测总精子的比率。将同批稀释的湖羊精液部分置于 37 ℃ 下完成回温,在载玻片上滴入 10 μL 的精液,盖上玻片,在 400× 光学显微镜下观察,每个观察范围内,至少要统计 200 个精子,最后对精子存活率取平均值评定^[9-10]。计算公式:

$$\text{存活率}/\% = \text{运动精子}/\text{检测精子总数} \times 100$$

1.5.2 精子活力检测 精子活力指精液中呈直线运动的精子占活精子数的比率。将同批稀释的湖羊精液部分置于 37 ℃ 下完成回温,在载玻片上滴入 10 μL 的精液,盖上玻片,在 400× 光学显微镜观察,以判断精子在精液中的运动是否具有前进的能力。精子运动方式包括直线运动、回旋运动以及摆动,每个视野至少统计 200 个精子。评出精子活力,最后对精子活力取平均值评定^[11-12]。计算公式:

$$\text{活力}/\% = \text{直线运动精子数}/\text{检测运动精子总数} \times 100$$

1.5.3 精子畸形率检测 将同批稀释的湖羊精液

部分置于 37 ℃ 下完成回温,用移液枪吸取 10 μL 精液滴在载玻片上,再用另一载玻片推成薄而均匀的抹片,用酒精灯固定,然后用姬姆萨染色 10 min,再用蒸馏水冲洗,晾干。在 400× 光学显微镜下从不同视野中观察精子形态,并观察畸形精子数,精子的异常种类有单头双尾、双尾单头,尾折断、无头或无尾、顶体损坏等。精子大小不一,利用 400× 光学显微镜放大后对精子形态进行不同视角的观察,并对精子的异常精量进行推算。对至少 400 个精子进行统计,计算出精子畸形率^[13]。计算公式:

畸形率/%=畸形精子数/400×100

1.5.4 精子顶体完整率检测 将同批稀释的湖羊精液部分置于 37 ℃ 下完成回温,将 10 μL 的精液滴在载玻片上,再用另一载玻片推成薄的均匀抹片,再用酒精灯固定,用姬姆萨染液染色 10 min,再用蒸馏水冲洗,晾干。在 400× 光学显微镜下从不同视角观察精子的形态,其中每个制片观察不少于 200 个精子。顶体分型共有四个型,分别是Ⅰ型,顶体完整,着色均匀;Ⅱ型,顶体微幅膨胀;Ⅲ型,顶体受损,颜色较浅,边缘残缺;Ⅳ型,顶体全部脱落,露出精子核。Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型号均为顶体不完整精子。计算公式:

顶体完整率/%=(200-顶体不完整精子数)/

200×100

2 结果与分析

2.1 VB₁₂ 对精子存活率的影响

随着时间的延长,精子存活率逐渐减弱可以通过显微镜直接观察到。由表 2 可知,0.05 mg VB₁₂ 组与其他组相比,下降速度较慢,第 2 天时,0.025 和 0.05 mg/mL VB₁₂ 组和对照组的精子存活率显著高于 0.075 mg/mL 组($P<0.05$);保存 3 d 和 5 d 的 0.05 和 0.075 mg/mL VB₁₂ 组的精子存活率显著优于其他两组($P<0.05$);在 VB₁₂ 添加量为 0.025 和 0.05 mg/mL 组中,经 4 d 保存后的精子存活率明显高于其他两组。

2.2 VB₁₂ 对精子活力的影响

由表 3 可知,精子活力是随着时间增长而逐渐降低的。0.05 mg/mL VB₁₂ 组与其他浓度组相比下降趋势缓慢,而保存 1 d 的 0.025 和 0.05 mg/mL VB₁₂ 组的精子活力均显著高于其他两组($P<0.05$);0.05 mg/mL VB₁₂ 组保存 2、3、4、5 d 的精子活力显著高于其他三组($P<0.05$)^[14]。

2.3 VB₁₂ 对精子畸形率的影响

从表 4 可以看出,保存 1 d 的 0.025、0.05 和 0.075 mg/mL VB₁₂ 组精子畸形率高于对照组($P>0.05$);

表 2 不同浓度 VB₁₂ 对低温保存湖羊精子存活率的影响

Table 2 Effects of different concentrations of VB ₁₂ on sperm survival rate of Hu sheep under low temperature preservation					
保存时间 /d	样本量 /只	VB ₁₂ 浓度/(mg/mL)			
		0	0.025	0.05	0.075
1	10	74.5±1.80a	74.0±2.00a	75.0±3.28a	71.5±1.80a
2	10	71.5±2.18a	73.0±1.80a	76.0±1.80a	60.5±5.22b
3	10	48.0±1.32c	48.0±1.00c	53.5±1.00b	58.0±1.80a
4	10	16.0±1.32b	24.0±1.32a	24.0±0.50a	18.0±1.32b
5	10	16.0±2.18c	17.0±0.87c	27.0±2.18a	22.0±1.50b

注:同行数据后不同小写字母表示异显著($P<0.05$),下同。

表 3 不同浓度 VB₁₂ 对低温保存湖羊精子活力的影响

Table 3 Effects of different concentrations of VB ₁₂ on sperm motility of Hu sheep under low temperature preservation					
保存时间 /d	样本量 /只	VB ₁₂ 浓度/(mg/mL)			
		0	0.025	0.05	0.075
1	10	59.7±6.11b	64.8±3.81ab	71.3±6.25a	56.8±5.13b
2	10	58.0±3.12b	61.0±1.00b	76.5±1.32a	48.0±2.18c
3	10	46.0±0.87c	46.0±0.50c	52.0±2.18a	49.0±1.80b
4	10	10.5±0.50b	12.2±0.76b	14.5±1.32a	8.0±1.50c
5	10	7.0±0.87c	10.0±1.32b	12.7±1.89a	7.2±1.32b

表 4 不同浓度 VB₁₂ 对低温保存湖羊精子畸形率的影响

Table 4 Effects of different concentrations of VB₁₂ on sperm malformation rate of Hu sheep under low temperature preservation

保存时间 /d	样本量 /只	VB ₁₂ 浓度/(mg/mL)			
		0	0.025	0.05	0.075
1	10	9.10±1.00b	10.0±1.10ab	10.2±1.00a	10.5±1.13b
2	10	10.3±1.10c	10.2±1.20b	10.1±0.90a	10.9±1.18c
3	10	10.7±0.80c	10.9±1.10c	10.2±0.60b	11.2±1.13a
4	10	11.0±1.00b	11.3±1.20ab	11.0±0.81a	11.9±1.00c
5	10	11.1±0.72c	11.5±0.30b	11.3±0.60a	11.9±1.10b

保存 2 d 的 0.025 和 0.05 mg/mL VB₁₂ 组精子畸形率均显著低于 0.075 mg/mL 组和对照组($P<0.05$)；保存 3 和 4 d 的 0.05 mg/mL VB₁₂ 组精子畸形率显著低于 0.025 和 0.075 mg/mL 组和对照组($P<0.05$)；保存 5 d 的 0.025、0.05 和 0.075 mg/mL VB₁₂ 组精子畸形率均显著高于对照组($P<0.05$)^[15]。

3 讨 论

家畜精液低温保存中添加不同浓度 VB₁₂ 的应用,国内外报道相对较少。用 VB₁₂ 稀释小尾寒羊精液,然后在 5~10 ℃下保存,发现 VB₁₂ 能显著提高精子的有效存活时间(精子活力>0.6)和最长存活时间(90%精子死亡时间),特别是以 1:3 比例稀释时,可以分别达到 22 h 和 49 h,而不含 VB₁₂ 的稀释液有效存活时间和最长存活时间仅为 7 h 和 17 h^[16]。但也有研究表明,与柠檬酸钠稀释液相比,VB₁₂ 注射液用作波尔山羊精液低温(4~5 ℃)保存的精子存活时间相对较短,精子有效存活时间(活力降至 0.3 前的保存时间)和最长存活时间(99%精子死亡前的保存时间)平均为 33 h 和 64 h,而含柠檬酸钠的稀释液可分别达到 59 h 和 102 h。

在鲜精和精液室温保存中的应用,在 37 ℃的条件下,向波尔山羊精液稀释液中加入 VB₁₂,结果精子有效存活时间和最长存活时间分别达到 20 h 和 25 h,存活时间显著延长^[17]。值得注意的是,精液常温保存时,如果环境温度长时间保持相对过高,容易造成保存液中细菌的迅速繁殖,pH 发生变化,使精子能量严重丧失而加速精子的死亡。

本研究的结果表明,VB₁₂ 作为一种营养添加剂,在稀释液中的适量添加能够显著提高湖羊精液

的保存效果。VB₁₂ 作为动物体内重要的辅酶,可能通过参与精子代谢过程,提高精子对冷藏环境的适应性,从而延长其存活率和活力保持时间。此外,VB₁₂ 还可能具有抗氧化作用,能够减少精子在保存过程中的氧化损伤,进而降低精子畸形率。随着保存时间的延长,所有添加 VB₁₂ 组的精子畸形率最终均高于对照组。这可能与 VB₁₂ 的添加量、保存条件以及精子自身的老化过程有关^[18]。因此,在未来的研究中,需要进一步优化 VB₁₂ 的添加量、探索更适宜的保存条件,并深入研究 VB₁₂ 对精子保存效果的具体作用机制,以期为优化精液保存技术和提高人工授精成功率提供更加全面的科学依据。

此外,本研究仅针对湖羊精液进行了探索,不同品种的羊只可能存在差异。因此,将 VB₁₂ 添加到稀释液中保存精液的方法是否适用于其他品种的羊只,以及是否会对其他繁殖性能产生影响,仍有待进一步研究和验证。

4 结 论

本研究通过对比不同浓度 VB₁₂ 稀释液对湖羊精液保存品质的影响,发现添加 0.05 mg/mL VB₁₂ 的稀释液能显著提高湖羊精液在冷藏条件下的保存质量。具体而言,该浓度下的 VB₁₂ 能够延长精子存活率和活力保持时间,特别是在保存 2~5 d 内,相较于未添加 VB₁₂ 的对照组和其他浓度组,0.05 mg/mL VB₁₂ 组精子存活率和活力均表现出显著差异($P<0.05$)。此外,虽然添加 VB₁₂ 在保存初期对精子畸形率无显著影响,但随着保存时间的延长,0.05 mg/mL VB₁₂ 组在保存 3~4 d 时精子畸形率显著低于其他组($P<0.05$)。然而,值得注意的是,

保存 5 d 时,所有添加 VB₁₂ 组的精子畸形率均高于对照组,这可能与长时间保存导致的精子自然老化有关。

参考文献:

[1] NEILA-MONTERO M, RIESCO M F, MONTES-GARRIDO R, et al. An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility [J]. Theriogenology, 2022, 191: 179-191.

[2] PAULENZ H, SÖDERQUIST L, PÉREZ-PÉ R, et al. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram Semen[J]. Theriogenology, 2002, 57(2): 823-836.

[3] ACHARYA M, BURKE J M, SMYTH E, et al. Effect of Semen extender and storage temperature on ram sperm motility over time[J]. Journal of Animal Science, 2016, 94(S1): 53.

[4] 张宝珣, 戈新, 王建华, 等. 猪常温精液保存的研究进展[J]. 猪业科学, 2009, 26(8): 68-71.

[5] AZAWI O I, HUSSEIN E K. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the Semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C [J]. Veterinary Research Forum, 2013, 4(3): 157-160.

[6] AKHTER S, ZUBAIR M, MAHMOOD M, et al. Effects of vitamins C and E in tris citric acid glucose extender on chilled Semen quality of Kail ram during different storage times[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 18 123.

[7] 姚桂东, 陶勇, 章孝荣. 维生素 B₁₂、E 和 C 在家畜精液保存中的应用[J]. 动物医学进展, 2006, 27(3): 36-39.

YAO G D, TAO Y, ZHANG X R. The application of vitamin B₁₂, E and C in the preservation of livestock Semen[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(3): 36-39.

[8] 蔡吉光, 孙淑琴, 王立阁, 等. 稀释液中添加不同浓度的维生素 B₁₂ 对牛细管冷冻精液精子形态的影响[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2004, 6(2): 10-11.

CAI J G, SUN SH Q, WANG L G, et al. The effect of adding vitamin B₁₂ in sperm diluter on quality of bull's straw frozen sperm[J]. Journal of Liaoning Agricul-

tural Vocation-Technical College, 2004, 6(2): 10-11.

[9] 郭良勇, 殷雨洋, 周俊波, 等. 稀释液中添加维生素 C 对湖羊精液低温保存效果的影响[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(8): 18-23.

GUO L Y, YIN Y Y, ZHOU J B, et al. Effect of vitamin C addition to the diluent on fresh Semen quality of Hu sheep[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(8): 18-23.

[10] GIBBONS A E, FERNANDEZ J, BRUNO-GALARAGA M M, et al. Technical recommendations for artificial insemination in sheep[J]. Animal Reproduction, 2019, 16(4): 803-809.

[11] 张柳明, 孙晓梅, 康言, 等. 稀释倍数对湖羊精液低温保存效果的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(4): 181-185.

ZHANG L M, SUN X M, KANG Y, et al. Chinese Journal of Animal Science, 2023, 59(4): 181-185.

[12] 陈亚明, 赵有璋. 绵羊精液品质模糊综合评定方法及应用[J]. 甘肃农业大学学报, 2002, 37(4): 410-415.

CHEN Y M, ZHAO Y ZH. Fuzzy assessment and its application of ram Semen[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2002, 37(4): 410-415.

[13] 丁家桐, 师蔚群, 徐巧琴. 维生素 B₁₂ 解冻牛冷冻精液效果探析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1999(1): 7-9.

[14] 李润生, 郭玉香. 维生素 B₁₂ 注射液可作黄改颗粒精液解冻液[J]. 黄牛杂志, 1989, 15(2): 82.

[15] 李跃民, 张学明. 维生素 B₁₂ 注射液解冻奶牛冻精颗粒效果探讨[J]. 中国奶牛, 1991(4): 35-36.

[16] 张培松, 周玉香, 徐振鑫. 不同比例维生素 B₁₂ 稀释液对小尾寒羊精子存活时间的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003(8): 28-29.

[17] 周占琴, 武和平, 陈小强. 布尔山羊精液保存技术研究 I 稀释液和解冻液的筛选[J]. 西北农业学报, 1998, 7(2): 15-19.

ZHOU ZH Q, WU H P, CHEN X Q. The storage methods of Boer goat Semen I optimization to diluents and thawing solutions[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 1998, 7(2): 15-19.

[18] 李玉凡, 李茂林. 维生素 B₁₂ 注射液解冻牛的冻精试验[J]. 当代畜牧, 1996(5): 13.