

冷冻精液在猪生产中的应用及存在的问题

中国农业大学
朱士恩

2017-04-11

Tel: 010-62731979

mail: zhushien@cau.edu.cn

汇报提纲

一、猪冷冻精液的研究意义

二、精液品质检查

三、国内外猪精液冷冻技术发展概况

四、存在的问题与分析

五、市场前景展望

一、猪冷冻精液的研究意义

1. 充分挖掘优秀种公猪的遗传资源；
2. 利于国际、国内交流，使配种不受时间和空间的限制；
3. 加速品种改良，提高优良品种覆盖率；
4. 降低引种及饲养管理成本；
5. 降低传染病的危险，为生物安全提供保障；
6. 建立基因库，保护濒危品种。

二、精液品质检查与评定

- (一) 猪精液品质评定的内容及标准**
- (二) 普通显微镜检查**
- (三) 计算机辅助分析仪和流式细胞仪检查**

(一) 猪精液品质评定的内容及标准

1、国标 (GB/T25172-2010) 评定的内容及标准

精子活力： 在37℃下呈直线前进运动的精子占总精子数的百分比。

精子密度： 单位体积精液中精子数，单位为 10^8 个/mL。

精子畸形率： 畸形精子占总精子数的百分率。

采精频率：成年公猪每周采精2~3次

青年公猪采精每周1~2次

精液稀释后每头份剂量：为80~100mL

总精子数： 30×10^8 个~ 35×10^8 个

精子活力：70%以上

原精液细菌菌落数： $\leq 4 \times 10^3$ /mL

精子畸形率： $\leq 18\%$

2、国标 (GB/T25172-2010) 对原精液品质评估

颜色

乳白色，均匀一致

异常

绿色、黄色
浅红色、红褐色

气味

略带腥味，无异味

异常

恶臭等异常气味

pH 值

正常精液pH值
初: 7.0~7.8 ; 浓密:弱酸性

异常

pH值越低
精子密度越大

采精量

≥100 mL

异常

电子天平称量法
按1g = 1 mL计

(二) 显微镜检查

计数法

按0.1~1.0的十级评分法进行评估



玻片升温至37℃

取精液10μl制片

于37℃恒温台上

相差显微镜下

400倍观察精子

活率要求

鲜精活率 > 0.7 可用

冷冻精液活率 > 0.4

(三) 计算机辅助分析仪和流式细胞仪

1、计算机辅助(CASA)检测精子运动能力

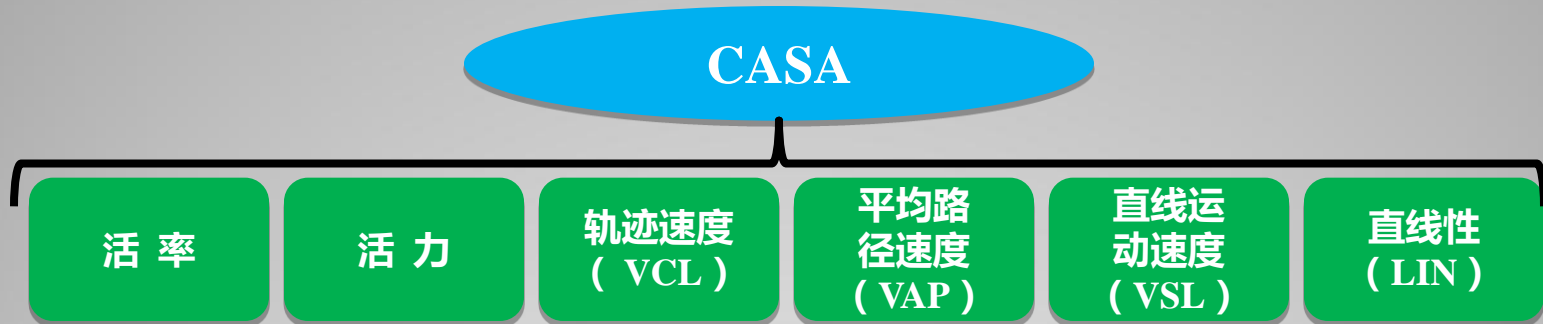
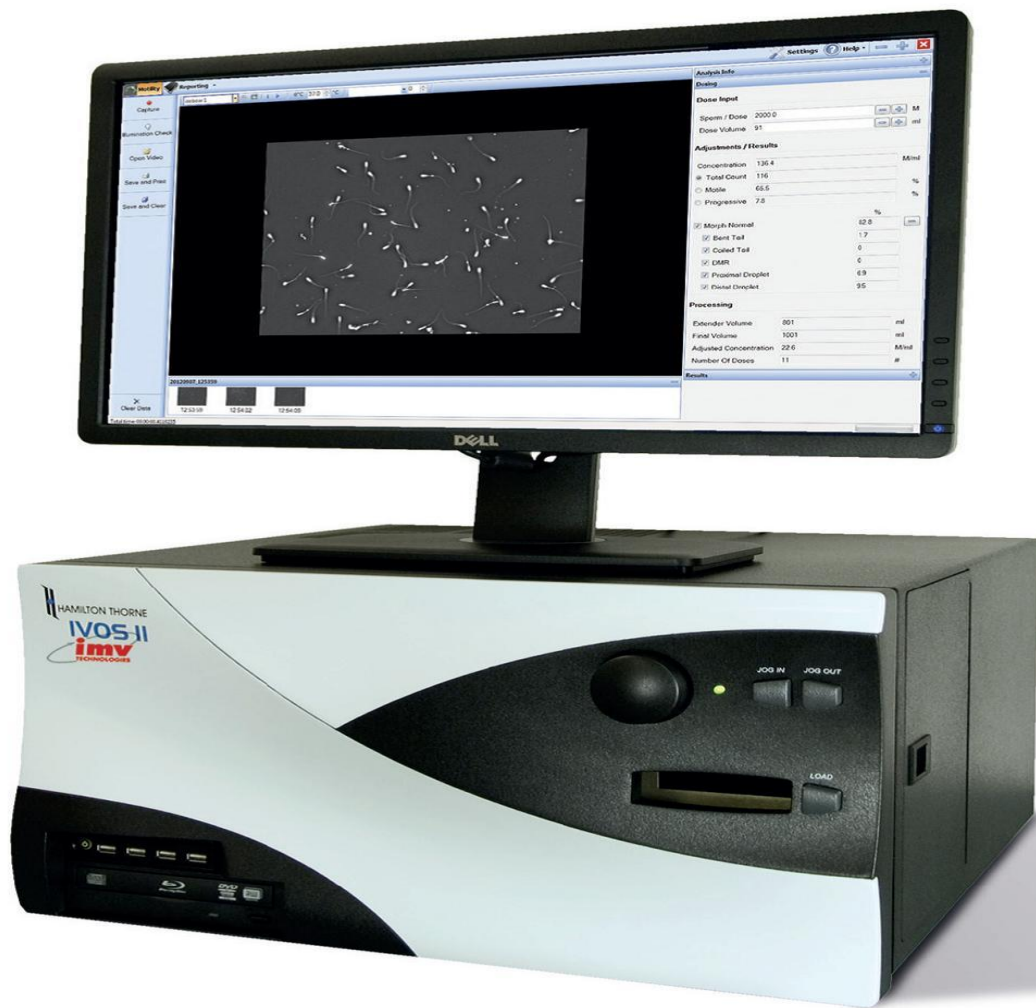


Table : 解冻后质膜完整率和活力参数 (from Eriksson, 2002)

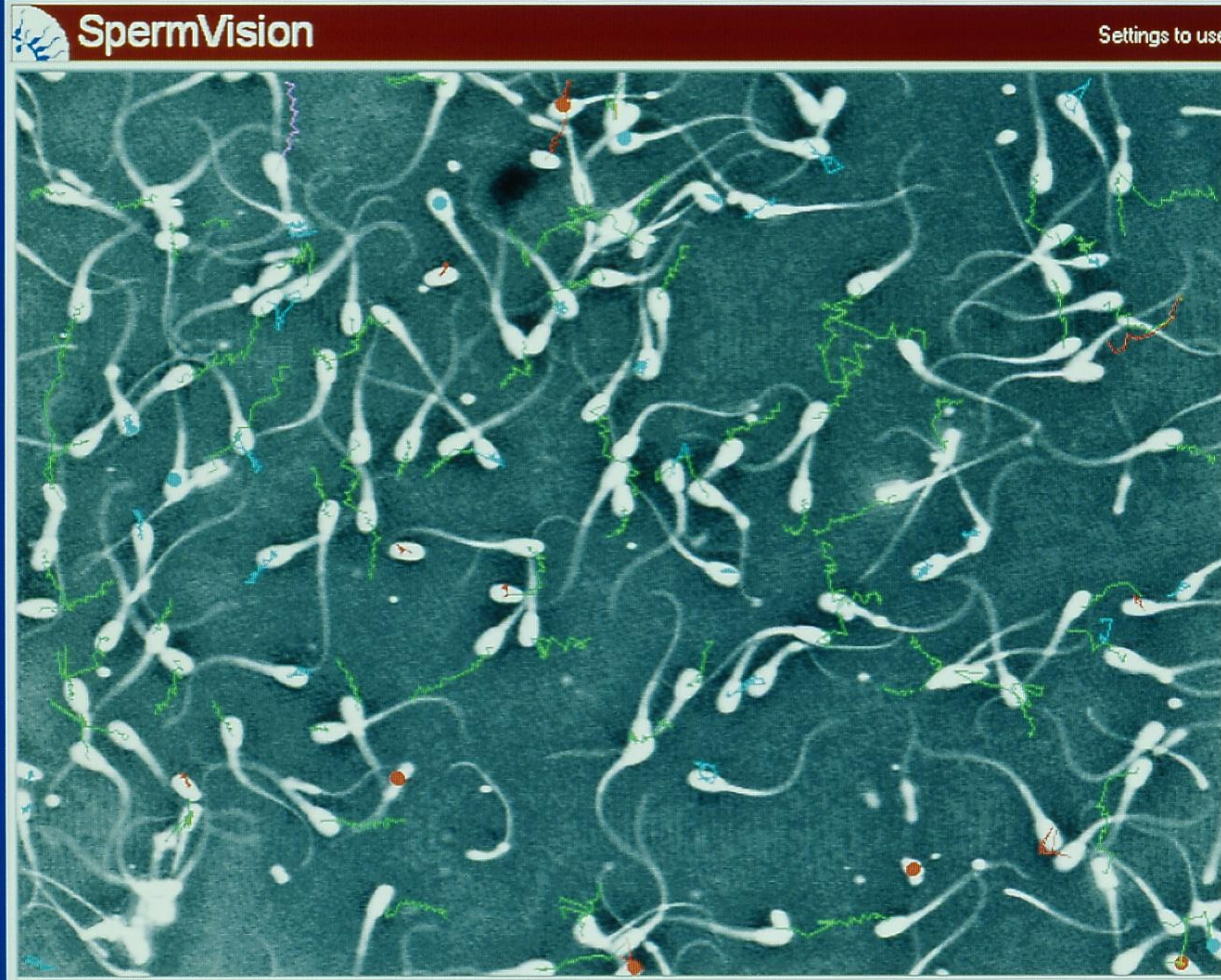
| Breed | Boars (n) | Ejaculates (n) | PMI (%) ¹ | Motile (%) ² | Linearly motile (%) | VSL (μm/s) ³ | VAP (μm/s) ⁴ | VCL (μm/s) ⁵ | LHD (μm/s) ⁶ |
|-------|-----------|----------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| L | 18 | 66 | 60±8.3 | 53±4.5 | 60±11.8 | 84± 11.2 | 96 ± 12.7 | 136 ± 17.1 | 3.1± 0.52 |
| Y | 20 | 66 | 60±8.4 | 52±6.0 | 66±12.7 | 85± 11.5 | 95± 12.5 | 131 ± 17.2 | 2.9 ± 0.63 |
| H | 9 | 23 | 60±5.4 | 49±4.6 | 69±12.9 | 84 ± 10.4 | 94 ± 10.5 | 123 ± 19.0 | 2.5± 0.71 |

H, 汉普夏; L, 长白猪; Y, 约克夏.

¹精子质膜完整率; ²眼观评估; ³直线运动速度; ⁴平均路径速度; ⁵轨迹速度; ⁶精子侧摆幅度



IVOS II 计算机辅助精子分析仪



Settings to use: boar

Close

Analysis Information

Total Cells: 132 Motility: 87.1 %

Concentration: 0.000 Progressive Motility: 63.6 %

Averages for Progressively Motile Cells

| | | | |
|------------|------------|-----------|------------|
| DCL: 34.82 | VCL: 82.00 | LIN: 0.45 | BCF: 37.53 |
| DAP: 20.96 | VAP: 49.24 | STR: 0.76 | ALH: 2.49 |
| DSL: 15.86 | VSL: 37.19 | WOB: 0.60 | AOC: 20.02 |

Field 1

Cells: 132 Motility: 87.1 %

Concentration: 0.000 Progressive Motility: 63.6 %

Averages for Progressively Motile Cells

| | | | |
|------------|------------|-----------|------------|
| DCL: 34.82 | VCL: 82.00 | LIN: 0.45 | BCF: 37.53 |
| DAP: 20.96 | VAP: 49.24 | STR: 0.76 | ALH: 2.49 |
| DSL: 15.86 | VSL: 37.19 | WOB: 0.60 | AOC: 20.02 |

Cell Detail Clear Field New Field

Cell: 8 Motility

Non-motile Local Progressive

DCL: 34.90 VCL: 83.70 LIN: 0.71 BCF: 34.74

DAP: 27.10 VAP: 65.00 STR: 0.91 ALH: 1.50

DSL: 24.70 VSL: 59.20 WOB: 0.78 AOC: 25.68

| | DSL | DAP | DCL | VCL | VAP | VSL | LIN |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 6 | 2.06 | 21.60 | 36.80 | 76.10 | 44.80 | 4.27 | 0.06 |
| 7 | 18.00 | 22.50 | 33.50 | 71.70 | 48.20 | 38.50 | 0.54 |
| 8 | 24.70 | 27.10 | 34.90 | 83.70 | 65.00 | 59.20 | 0.71 |
| 9 | 22.00 | 23.70 | 31.80 | 65.80 | 49.00 | 45.50 | 0.69 |

Frame 30 of 30

Speed Magnification

Display curved line Display average path

Analyze Load Images

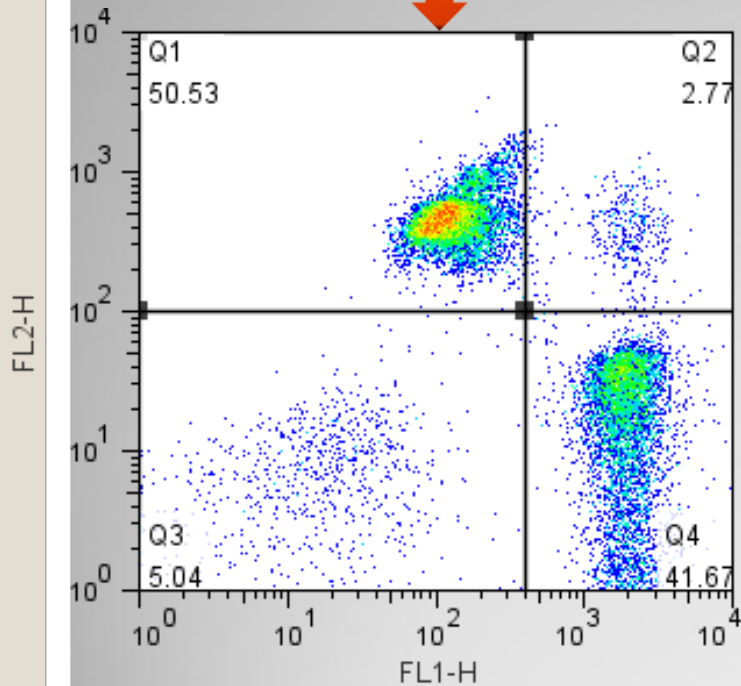
2、流式细胞仪



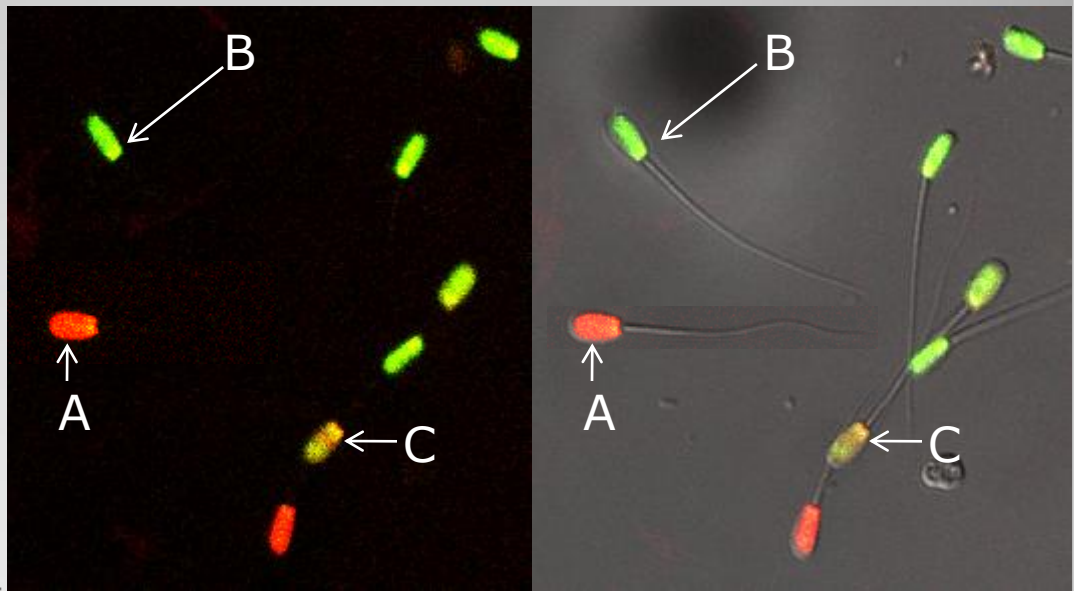
精子质膜检测新方法

SYBR-14和PI的联合染色

流式细胞仪检测



显微镜进行检测



➤Q1: PI染色的死精子;

➤Q4: SYBR-14染色活精子;

➤Q2: SYBR-14/PI染色, 正在死亡的精子;

➤Q3: 杂质颗粒, 无颜色。

➤A: PI染色的死精子, 为红色;

➤B: SYBR-14染色活精子, 为绿色, 膜功能完整;

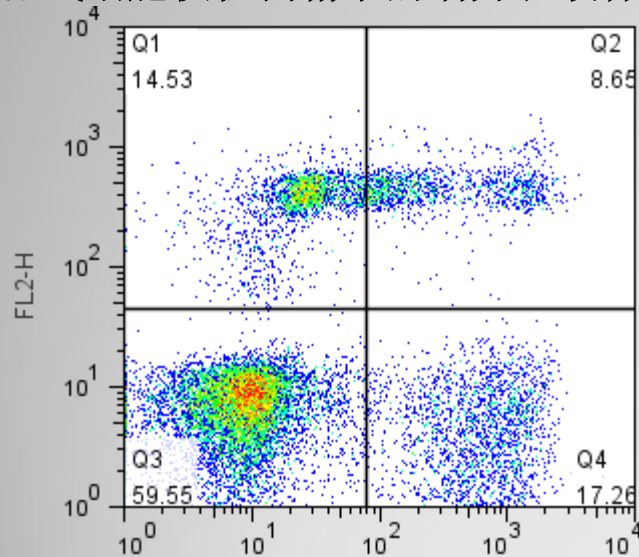
➤C: SYBR-14 / PI染色, 正在死亡的精子为橙色。

顶体检测

现在用的最多的是异硫氰酸荧光素（FITC）与花生凝集素（PNA）结合使用效果好。

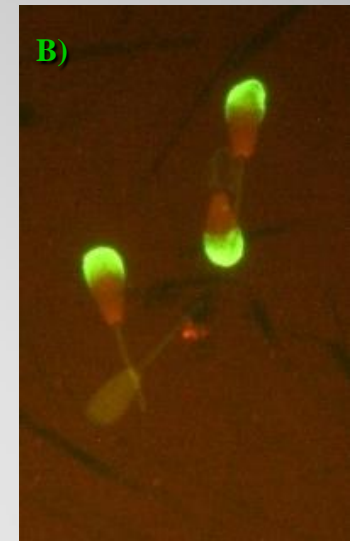
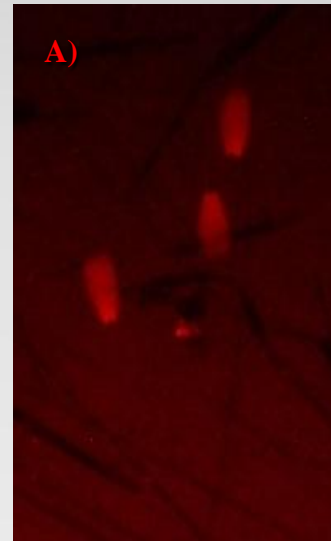
精子顶体主要是应用PI 和FITC-PNA 联合标记，用荧光显微镜或流式细胞仪进行检测。

● 流式细胞仪检测精子的活力和顶体状态



Q1: PI 标记为未发生顶体反应死精子;
Q2: PI/FITC-PNA 标记的顶体反应死精子;
Q3: 无颜色, 未发生顶体反应活精子;
Q4: FITC-PNA标记发生顶体反应活精子。

● 荧光显微镜下观察精子的活力和顶体状态



A)PI标记死精子的细胞核呈现红色荧光;
B)发生顶体反应或顶体膜破损的精子被FITC-PNA 标记, 呈现绿色顶体。

三、国内外猪精液冷冻技术发展概况

全球猪冻精研究实验室

- 猪鲜精配种使用率 $\geq 99.5\%$
- 猪冻精配种使用率 $\leq 0.5\%$
- 有30多家猪冻精实验室分布于：美国、英国、意大利、西班牙、法国、德国、瑞典、丹麦、比利时、中国等。

目前国内猪冷冻精液研究单位和研究者

- 吉林省农业科学院 李兆华研究院
- 上海农科院 张德福研究员
- 甘肃农业大学 张兆旺教授
- 南京农业大学 芮荣教授
- 西北农林科技大学 李青旺教授
- 四川农业大学 马恒东教授
- 东北农业大学 刘娣教授
- 广东温氏集团
- 卡苏公司
- 百钧达科技发展（北京）有限公司等

渗透性和非渗透性冷冻保护剂种类

1. 渗透性抗冻保护剂

甘油(Glycerol)、乙二醇(EG)、二甲基亚砷(DMSO)、丙二醇(PROH)、二甲基甲酰胺(DMF)、乙酰胺(AA)等。

2. 非渗透性抗冻保护剂

蔗糖、海藻糖、岩藻糖、聚蔗糖、葡聚糖、聚己二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、血清白蛋白、犊牛血清等。

抗冻保护剂保护原理

1. 渗透性冷冻保护剂

由于细胞外液渗透压较高，在精子脱水的同时，渗透性抗冻保护剂被置换到细胞内部，并与水分子结合，在平衡与降温过程中，可降低细胞内电解质浓度，从而保护细胞器免受高浓度电解质的损伤。同时避免细胞内水分子结晶导致的损伤。

2. 非渗透性冷冻保护剂

其不能进入细胞内，能够提高细胞外渗透压，在冷冻过程中使细胞内的水分向细胞外渗出，达到脱水的目的，以减少细胞内有序冰晶的形成，从而保护细胞免受损伤。

冷冻载体

1. 颗粒：约0.1mL

2. 细管：0.25、0.5mL、1mL小型细管
5mL大型细管

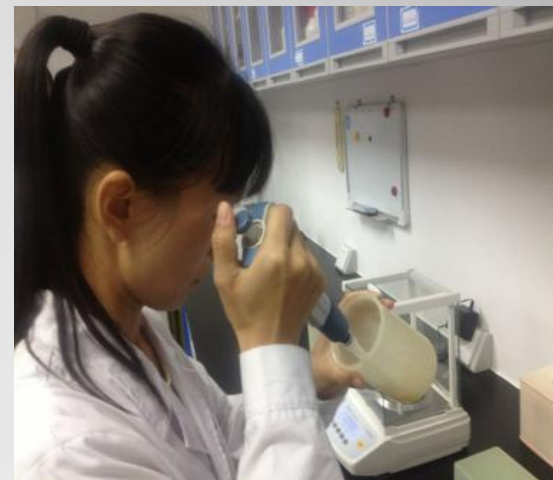
3. 5mL扁平塑料袋

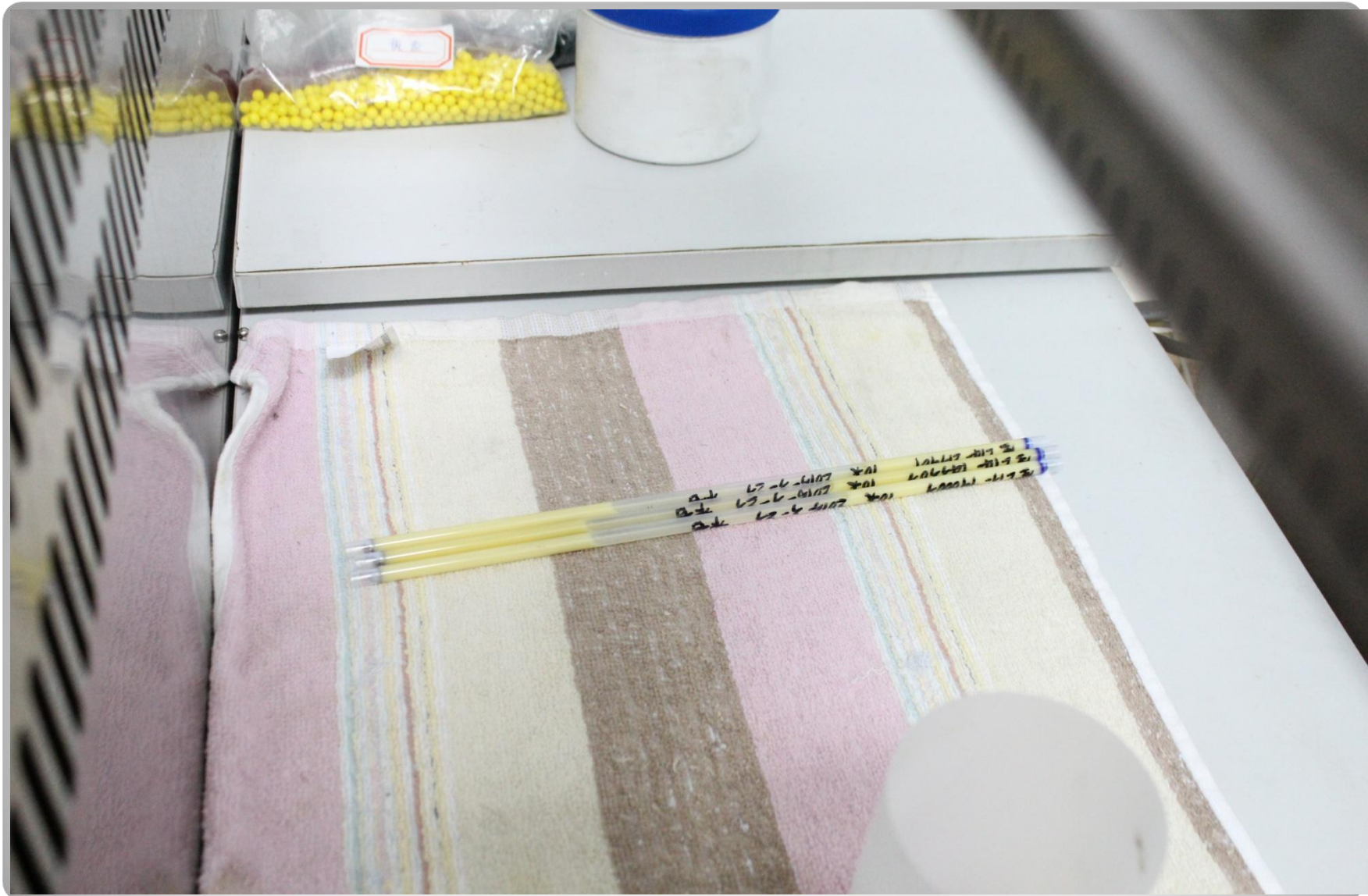
(一) 温室集团猪精液冷冻保存



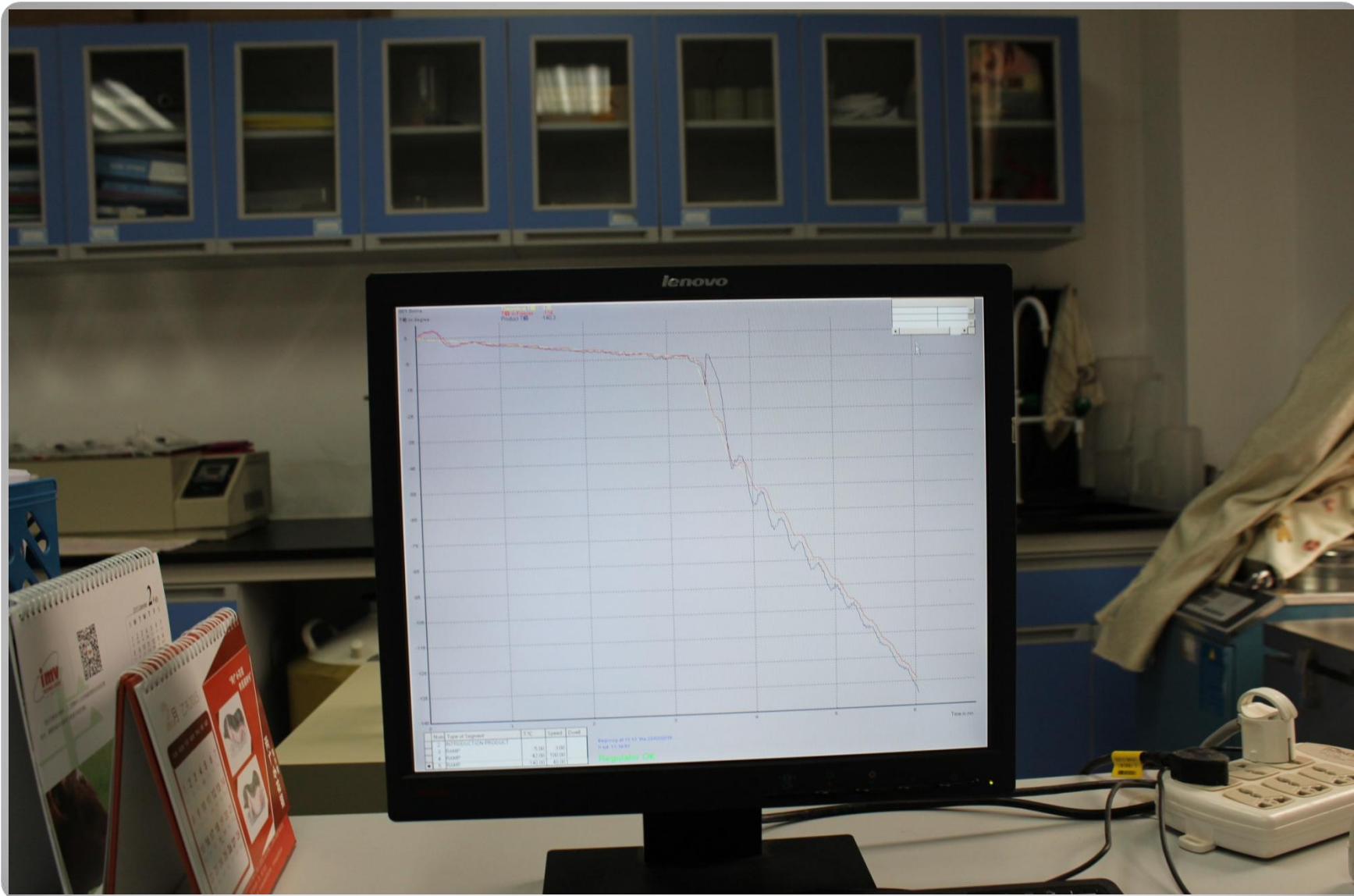
冷冻程序:

1. 采用卵黄稀释液稀释, 放入4℃冰柜平衡1~2h, 使精子最终密度达到12.5亿/mL, ;

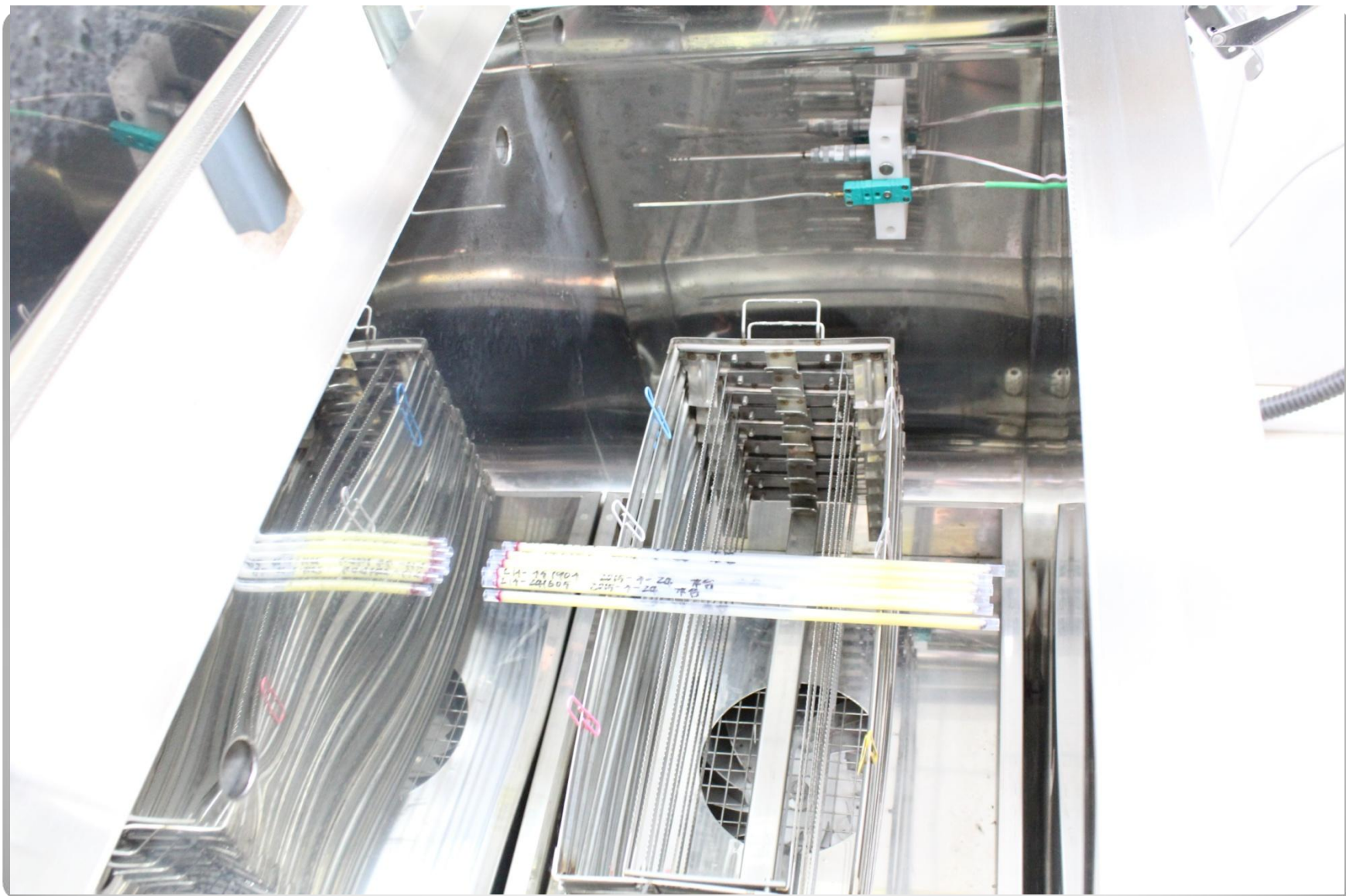




2. 装入5mL冷冻管，低温（5℃）平衡2h。



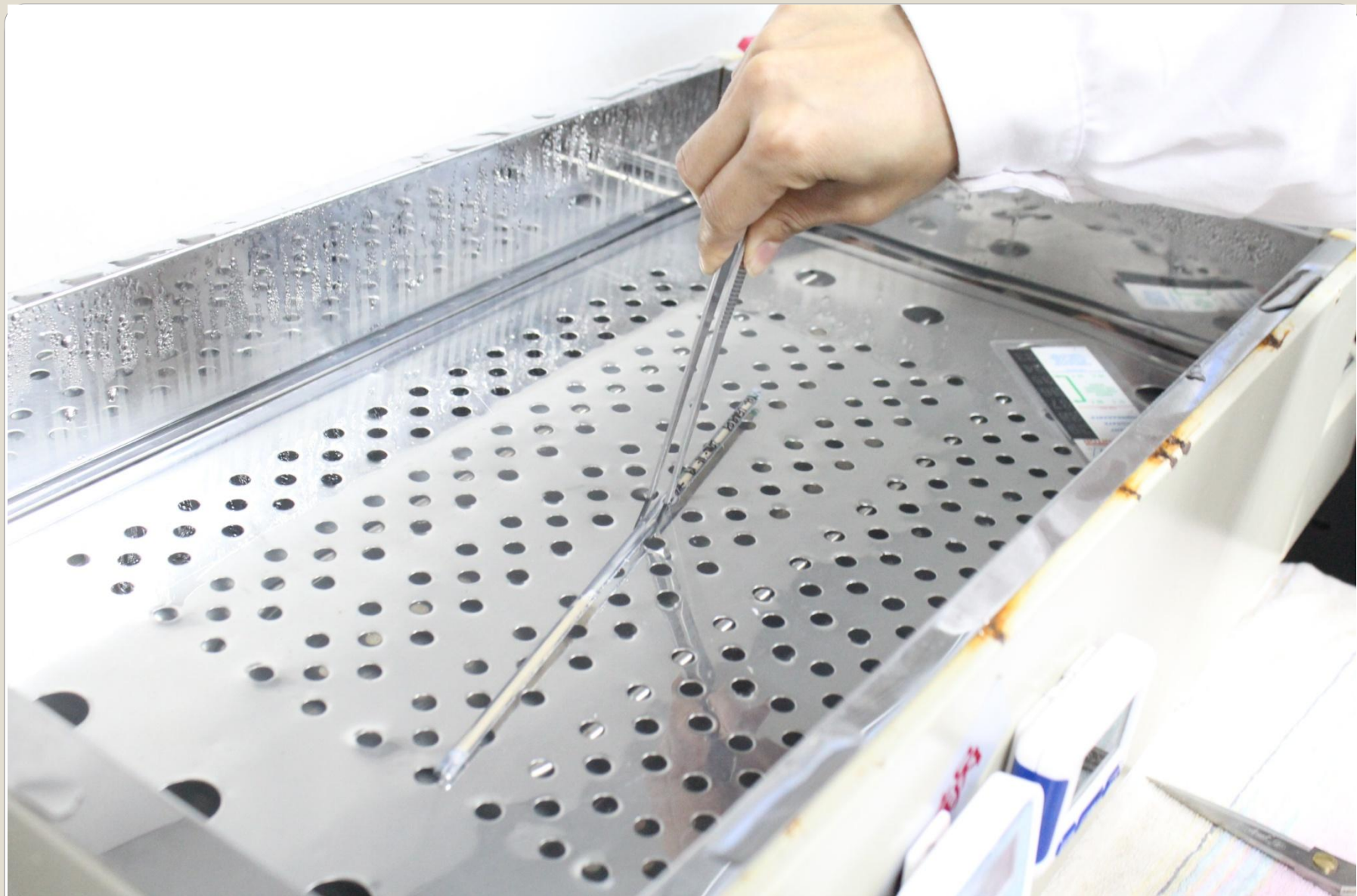
3. 计算机软件设计降温程序



4. 细管置于冷冻架上降温，7min完成。



5. 细管在液氮中冷冻保存



6. 在50°C水浴中解冻30s

冷冻精液输精效果比较

目前，猪精液冷冻主要是颗粒法、5 mL细管法及5 mL扁平袋（Flat-Pack）法，其中5 mL细管法及5 mL扁平袋（Flat-Pack）法保存效果要优于颗粒法。

采用子宫颈输精法，对自然发情母猪进行2次人工授精（50亿~60亿/次），结果显示：

| 方法 | 产仔率(%) | 平均窝产仔数(头) | 研究者 |
|-------------|--------|-----------|------------------------|
| 5 mL扁平袋法 | 72.2 | 10.7 | (Eriksson et al.,2002) |
| 5 mL细管法 | 62.6 | 9.0 | (Hofmo et al.,2000) |
| 颗粒法 | 40.0 | 6.4 | (Didion et al.,1996) |
| 5 mL细管法(深部) | 77.0 | 9.0-10.5 | (广东温氏集团,2014) |

广东温氏集团冻精及输精效果 (2016)

表-1 精液冷冻效果

| 冻精剂型 (mL) | 每剂冻精所含精子数 (亿) | 解冻后平均活力 (%) |
|----------------|--------------------|------------------|
| 5 | 50 | 56 |

表-2 冻精输精方式

| 母猪品种 | 母猪胎次 | 输精/头 | 输精方式 | 输精剂量/亿/次 | 输精次数/次 | 每次输精间隔/h | 解冻至输精的间隔/min |
|-------------|------|------|------|-------------|--------|----------|--------------|
| YY/LL/DR/RR | 2-7 | 211 | 深部 | 25 (1/2管) | 2 | 8-15 | 10-60 |

表-3 冻精输精受胎及分娩

| 输精头数 | 配种受胎率/% | 分娩率/% | 窝均产仔/头 |
|------|---------|-------|--------|
| 211 | 84.83 | 77.72 | 11.29 |

（二）百钧达科技发展（北京）有限公司

近年来在猪冷冻精液保存技术研发取得突破性进展。

采用**0.5mL细管**冷冻解冻后活力测定，使用单层精子活动空间的专用精子计数板，在显微镜下检测，**活力**达到80%以上。在38℃条件下可存活5~6h。近一年的**冻精输精结果**统计，发情正常母猪的**情期受胎率**达88.5%，**平均窝产仔数**11.2头。与鲜精输精效果无显著性差异。

百钧达冷冻精液输精新进展 (2017)

| 单 位 | 冻精配种/ 头 | 返情与空怀 /头 | 妊娠/头 | 妊娠率/ % | 均窝产仔数 /头 | 均窝产活仔 数/头 |
|----------------|------------|-------------|------|-----------|-------------|--------------|
| 北京养猪育 种中心 | 19 | 1 | 18 | 94.74 | | |
| 广东温氏新 兴种猪 | 50 | 4 | 46 | 92.00 | | |
| 威宁正大花 庙猪场 | 20 | 1 | 19 | 95.00 | 11.47 | 10.65 |
| 上饶市正邦 牛皮山猪场 | 65 | 4 | 61 | 93.39 | | |
| 对照组 | 62 | 1 | 61 | 98.39 | | |
| 襄阳正大武 马岗种猪场 | 20 | 2 | 18 | 90.00 | 12.12 | 10.59 |

(三) Peng Wang , 2012

精液用等体积的BTS稀释，3h降温到15℃，经800 g 离心10 min，弃上清。

在15℃用BTS稀释，1.5~2.5 h降温至5℃，再将精子终浓度调整为 1.0×10^9 ，甘油终浓度为3%。

0.25mL细管分装、封闭，5℃平衡1h。再用冷冻仪以1℃/min 降温至-5℃，置于液氮上方4cm处熏蒸15min，然后投进液氮。

解冻：在37℃水浴中45s。

结果：活率：43.2 %

顶体完整率：52.75%

质膜完整率：48.13%

(四) San-Yuan Huang - 台湾, 2009

鲜精在25°C室温平衡1h，经稀释后15°C下平衡4h，然后800g离心10min，弃上清。

用含80%乳糖和20%蛋黄溶液，重新悬浮。将装精液的离心管置于水中，2.5h降温至5°C。再次用含7%甘油的蛋黄-乳酸溶液稀释至精子密度为 1×10^9 /mL，装入6mL细管中，将细管在液氮上方3cm处熏蒸20min后，投入液氮保存。

解冻：

50°C水浴中45s，室温下用稀释液将精液1：9稀释，然后在37°C培养箱中培养10min。

活力：56%

(五) 国外冻精研究进展

1. 法国 IMV (卡苏) 公司, 2014

鲜精: 活力 $\geq 85\%$, 畸形率 $\leq 15\%$;

用 0.5mL 卡苏细管冻精, 42°C 水浴锅加热 20s, 将解冻后精液加入 34°C 的稀释液中, 计 7 支冻精/深部输精, 冻精输精最低标准为 **活力** $> 40\%$, 使用冻精输精, 建议 **输精 3 次**, 结果如下:

卡苏公司采用冻精深部输精的猪场实验数据

| 实验批次 | 总精子数 | 受胎率% | 生产指标 |
|-----------|---------------------|-----------|------------|
| 5×0.5mL | 3.8×10 ⁹ | 100 (22) | 11.4 (0.7) |
| 10×0.25mL | 3.8×10 ⁹ | 90.9 (22) | 11.8 (0.7) |
| 5×0.25mL | 1.9×10 ⁹ | 86.4 (22) | 11.1 (0.8) |

2. 韩国: Yong-Seung Lee , 2015

添加11%乳糖和20mL蛋黄稀释至80mL , 使精子密度达 $5 \times 10^8 / \text{mL}$, 然后离心 ($400 \times g, 10 \text{ min}, 22^\circ\text{C}$) , 3h降温至 5°C 。用含1.5% Orvus Es Paste和9% 甘油的乳糖-蛋黄液2 : 1进行稀释。然后用0.5mL细管分装 , 10min降温至 -120°C 。

解冻 : 50°C 水浴10 s。

结果 : **活率** : $76.9 \pm 1.01\%$

IVF后卵裂率 : $80.2 \pm 4.3\%$

囊胚发育率 : $28.3 \pm 3.8\%$

3. 泰国：P Chanapiwat, 2015

精液用ModenaTM1：1稀释后装入50mL离心管中，15°C下静置120min，800g离心10min。用乳糖-蛋黄液稀释至精子浓度为 $1.5 \times 10^9/\text{mL}$ ，5°C下静置90min；再用上液将精子浓度稀释为 $1 \times 10^9/\text{mL}$ ，用0.5mL细管分装。将细管置于液氮上方3cm处，20min后投入液氮。

解冻：50°C水浴12s，后用4倍体积ModenaTM液在37°C下稀释，备用。

| 结果： | 杜洛克 | 大白猪 | 长白猪 |
|---------------|-------------|--------------|--------------|
| 活率： | 50.0 ± 8.2% | 49.0 ± 6.5% | 48.0 ± 10.4% |
| 活力： | 40.0 ± 6.4% | 42.2 ± 5.4% | 36.7 ± 7.9% |
| 顶体完整率： | 52.2 ± 9.6% | 60.3 ± 11.8% | 51.6 ± 15.4% |

4. 瑞典：F.Saravia，2010

精液与乳糖-蛋黄液混合后在1.5h降到5°C，再与蛋黄、Equex STM和甘油（终浓度为3%）混合，精子的终浓度为 $1.0 \times 10^9/\text{mL}$ 。

然后在5°C下分装到扁平塑料袋中，精子终浓度为 $0.5 \times 10^9/\text{mL}$ 。然后放在程序冷冻仪中，以3°C/min速率从5°C降到-5°C，植冰后以50°C/min的速率从-5°C降到-140°C，投入液氮。

解冻：将扁平塑料袋置于35°C水浴中20s。

结果：

活力：69%

顶体完整率：70.6%

质膜完整率：56.1%

5. 瑞典- Eriksson , 2002

采用5mL平管冷冻猪精液，解冻后输精获得了较为理想的效果。

结果：

活力：49% ~ 53%

质膜完整率：60%

产仔率达：73%(308/421)

平均窝产仔数：10.7头

6. B.A美国 : . Didion , 2013

精液稀释后，放置于17°C生物培养箱中，然后以800g离心20min，弃上清。

添加冷冻稀释剂至精子浓度为 2.0×10^9 /mL，经2h降温到5°C，加等体积的冷冻稀释剂，用0.5mL细管分装。置于程序冷冻仪中从1°C/min降到-7°C，-7°C保存5min，再以29.6°C/min降至-130°C，在-130°C保存20min。然后投入液氮。

输精：输精量至少 2.0×10^9 个/mL，宫颈内输精。

结果：

妊娠率：78.7%

产仔率：81.1%

窝产仔数：12.5

7. 德国：K. Buranaamnuay，2011

精液稀释后于15°C下放置2h，于50mL离心管 800g 离心10min，用乳糖-蛋黄液稀释至 1.2×10^9 /mL，经90min 降温至5°C时，用乳糖-蛋黄液稀释至 0.8×10^9 /mL。

采用0.25mL细管分装后，于程序冷冻仪以-3°C/min速率从5°C降温至-7°C植冰，再以-50°C/min 速率从-7°C降温至-120°C，然后以-10°C/min速率降温至-140°C，投入液氮。

解冻：38°C 水浴30s，用38°C 的5倍体积的Androhep plus TM稀释，备用。

结果：

活率：32.4 ± 1.2%

活力：19.1 ± 1.1%

质膜/顶体完整率：54.9 ± 0.8%

8. 西班牙：E. de Mercado , 2008

精液在50mL离心管中降温至17°C。用FE-1稀释至精子浓度为 1.5×10^9 /mL，90min降温至5°C，用FE-2将精子稀释至终浓度为 1×10^9 /mL。采用0.5mL细管分装后进行冷冻：从5~-5°C，6°C/min；-5~-80°C，40°C/min；在-80°C静置30s，以70°C/min 降温至-150°C，然后投入液氮。

解冻：在37°C循环水中20s，移入37°C 2倍体积的BTS液中150min。

结果：

活率：50.2%

顶体完整率：51.3%

质膜完整率：49.5%

9. 西班牙：Jorge D. Juarez，2011

精液用FE液稀释至 1.5×10^9 /mL，以不同速率降温至 5°C 。再用FE-Glycerol-Orvus（甘油终浓度9%）液稀释至 1.0×10^9 /mL，用0.5mL细管分装。

采用程序冷冻仪以 $6^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率降温至 -5°C ，然后 $40^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率降温至 -80°C ，再以 $70^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率降温到 -150°C ，投入液氮保存。

解冻：在 37°C 水浴中20s。

结果：

活力： $66.7 \pm 2.3\%$

四、存在的问题与分析

1. 种公猪站发展不规范，种公猪良莠不齐，冷冻精液无标准可循；
2. 猪的精子脂肪含量相对较高，冷冻前脱水较困难，冷冻后精子内部产生结晶、膨胀而致损伤；
3. 冷冻液的配制和渗透性抗冻保护剂的选择单调，除了甘油外，乙二醇和DMSO等化学毒性小、渗透性强、玻璃化形成较好抗冻剂有待开发；
4. 选择海藻糖、棉子糖、阿拉伯半乳聚糖、聚蔗糖、葡聚糖等大分子非渗透性抗冻保护剂，提高胞外渗透压和抗损伤作用；
5. 优质遗传资源的保存技术研发投入力度不够。

五、市场前景展望

- 1. 建立优秀“遗传资源银行” - “精子库”；**
- 2. 降低活体保种成本和风险；**
- 3. 解除鲜精输精在时间和空间上的限制；**
- 4. 加速优良品种覆盖率和品种改良效率；**
- 5. 占领市场先机，具有广阔的经济效益和社会效益；**
- 6. 得冻精者得天下。**



谢谢!