

猪精液冷冻保存 技术应用进展

张德福 研究员

上海市农业科学院畜牧兽医研究所
上海种猪工程研究中心

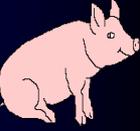


提 纲

一、猪精液冷冻保存技术意义

二、研究进展及应用现状

三、展望



一、猪精液冷冻保存技术意义

1

优秀种公猪精液的应用不再受时空限制；

猪种质资源保护有效途径

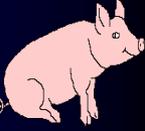
获得更大遗传进展

取代活体公猪的引进

降低育种成本

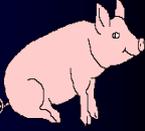
2

提高猪场的生物安全性。

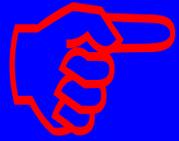
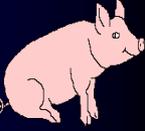


猪精液冷冻基本流程





二、研究进展及应用现状



研究与应用进展

1949年Polge等发现甘油(丙三醇)对牛精子具有抗冻保护作用;

1956年, Polge等最早进行猪精液冷冻并进行人工授精;

1957年Hess等首次获得冷冻精液的人工授精仔猪;

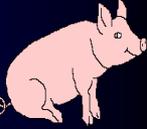
1975年, 1975年, Pursel和westendorf分别建立了颗粒和细管冷冻猪精液的方法;

冷冻精液(颗粒或细管剂型)采用常规输精方法受胎率和产仔数远低于常温保存精液, 而手术法深部位输精复杂且对母猪有不良影响。

截止2000年, 人工授精母猪中采用冷冻精液比例不到1%。

目前, 猪精液冷冻保存技术日趋成熟, 猪冷冻精液已步入商业化生产——加拿大加裕公司(GENESUS)。

2007--2011年



times PM/AM/PM and AM/PM/AM, respectively. Of 2696 recorded services, 2122 (78.7%) of the females farrowed. The mean (\pm SD) total number piglets born were 12.5 (\pm 3.9). A progressive improvement of fertility over time was observed mainly due to adaptive procedures associated with an introduced technology. In summary, acceptable fertility is possible with frozen semen and has merit for application as a reproductive management tool.

Animal Reproduction Science 137 (2013) 189–196



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anireprosci



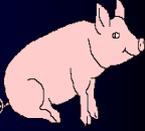
Field fertility of frozen boar semen: A retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period

B.A. Didion^{a,*}, G.D. Braun^b, M.V. Duggan^c

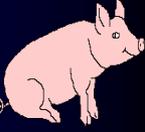
^a Minitube of America, Verona, WI, United States

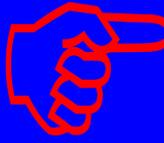
^b HyLife Ltd., La Broquerie, MB, Canada

^c Fast Genetics, Saskatoon, SK, Canada



- 目前加裕公司冻精受胎分娩率达到85%，这几乎与新鲜精液无差异。而平均窝总产仔数在14头左右，几乎等于新鲜精液的使用结果



 **国内**猪精液冷冻技术始于上世纪50年代初。
1977年成立了全国猪冻精协作组。

1975~1978年，全国范围累计利用冷冻精液人工授精母猪达6079头，情期受胎率为42.1~61.3%；

1986年全国冷冻精液累计配种母猪6万余头，然而，受胎率（第一情期受胎率达70%以上）和产仔数不尽人意。

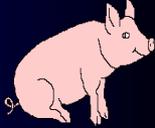
近几年：国内科研院所在冷冻保存液的研发方面做了大量工作。

个别公司猪精液冷冻获得突破，受胎率和平均产仔数，达到了猪冷冻精液商业生产应用要求。



👉 关于采精方法





每头公猪采精需要时间 (min)

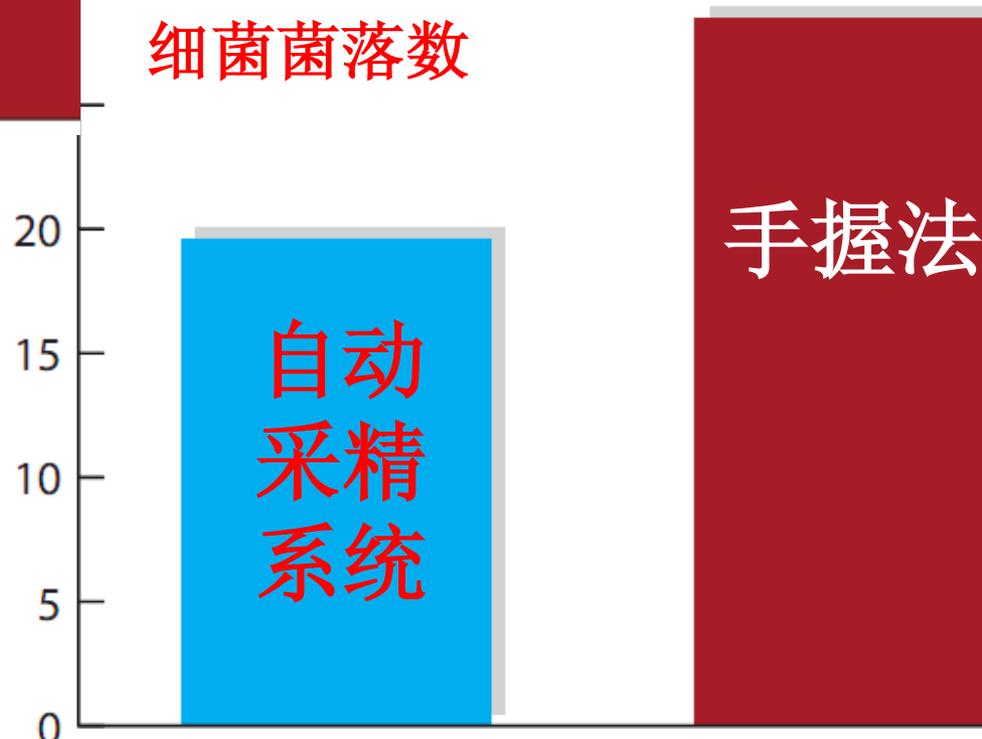


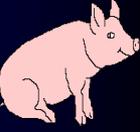
*提高劳动效率；并提高了采精员操作安全性。

*采集过程隔绝了与外界空气的接触，降低了对精液的污染。

精液中细菌数量是影响冷冻精液品质的决定性因素之一。

细菌菌落数





关于输精方法



常规输精法（子宫颈）

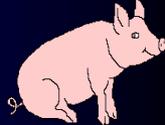


深部位输精法
（子宫内、子宫角）



	子宫角输精 冷冻解冻精子	子宫颈输精 冷冻解冻精子
授精头数	49	33
情期不返情数 (%)	42/49 (85.71)	27/33(81.82)
28 天妊娠数 (%)	39/49 (79.59)	26/33 (78.79)
产仔母猪数(%)	38/49 (77.55)	25/33 (75.76)
产仔数(mean ± SEM)	354(9.31 ± 0.41)	240(9.6 ± 0.53)

深部位输精方法显著提高母猪繁殖效率，且大大降低了输精量 (1×10^9 VS $5-6 \times 10^9$)



关于剂型

颗粒法

操作简便，易污染且不便标记

扁平袋

(FlatPack container)

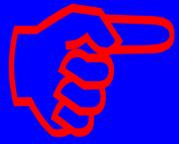
一定程度上满足母猪人工授精输精量大的特点，但体积大造成冷冻效果差。

5 mL大管

0.5 mL大管



冷冻效果好、适合商业化生产；深部位输精技术和高浓度的冷冻精液可实现较好的受胎率和产仔数。



关于冷冻保存液

冷冻保存液主要由起能量（单糖类）、缓冲、防止精子冷冻休克（卵黄等）、抗菌等作用的成份组成。

家禽卵黄存在生物安全性问题，已研发出**取代卵黄的植物源成份**，如大豆卵磷脂；

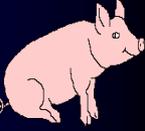
从一些**耐低温植物中提取糖复合物**作为非渗透性冷冻保护剂，如红景天多糖、海藻糖等；

抗生素存在耐药性问题，提取或生物工程合成**抗菌肽取代抗生素**已成研发趋势；

甘油对精子有一定毒害作用，筛选低毒渗透性保护剂，或一些糖类、氨基酸部分代替或结合使用。如海藻糖、谷氨酸盐和脯氨酸等。

氧化损伤对精子的生理功能产生重要影响。研究高效、无负作用的抗氧化剂是冷冻保存液研发的重要内容。可用于精液保存的**抗氧化剂**有谷胱甘肽、超氧化物歧化酶和过氧化物酶、褪黑素或维生素E及其类似物等。

国外已有多个商业化的冷冻稀释粉，使用方便简单。



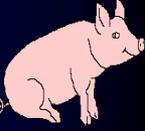
关于母猪发情鉴定

观察、试情等

使用冷冻精液需要输精2次；
成本高、耗费劳力。



兽用B超可以通过直接观察到母猪卵泡发育情况，结合观察法大幅度提高人工授精效率。可实现母猪单次输精。从而降低冷冻精液成本和节省人力。



关于精液的精准降温

采用冰箱降温平衡

通过调整细管与液氮面距离控制冷冻速率

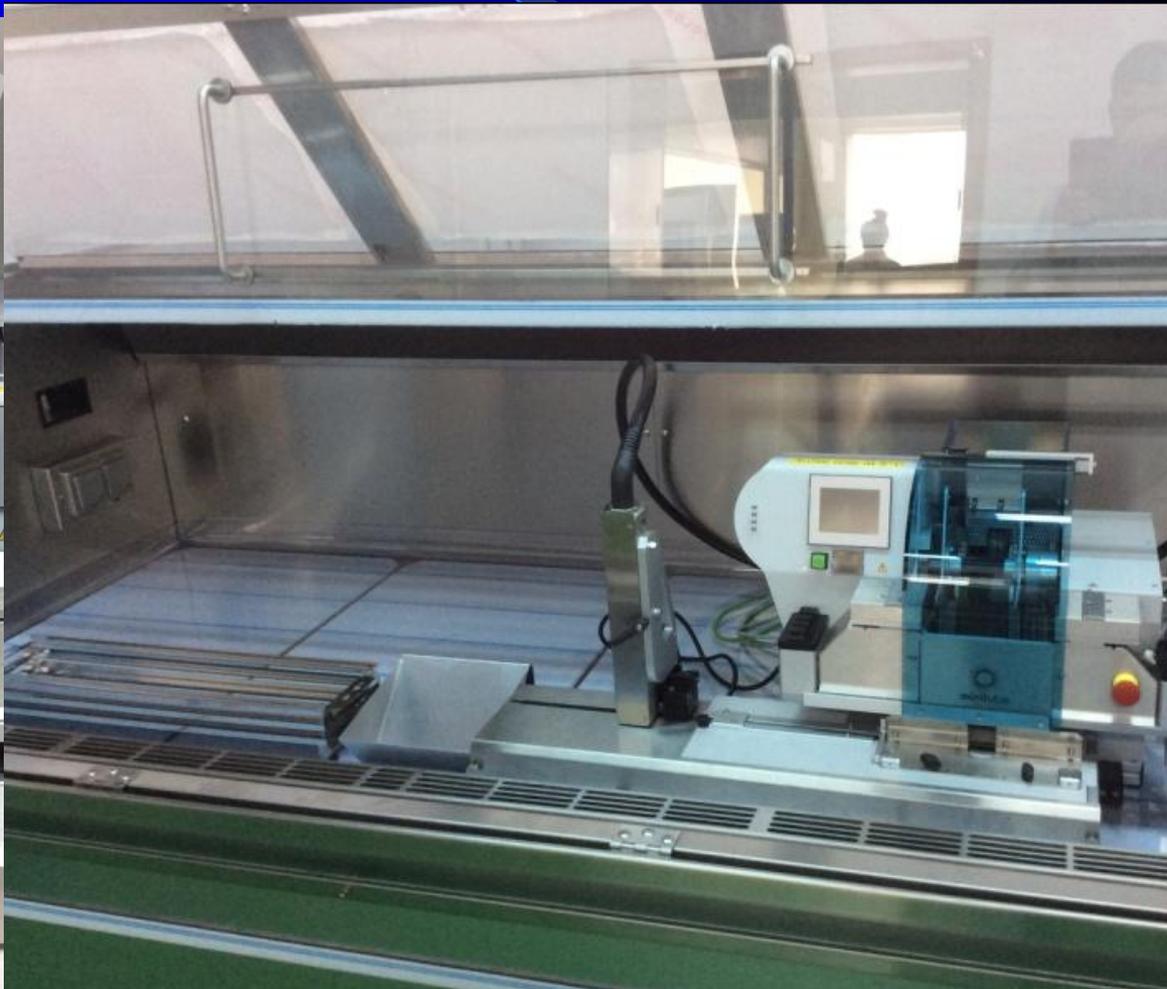


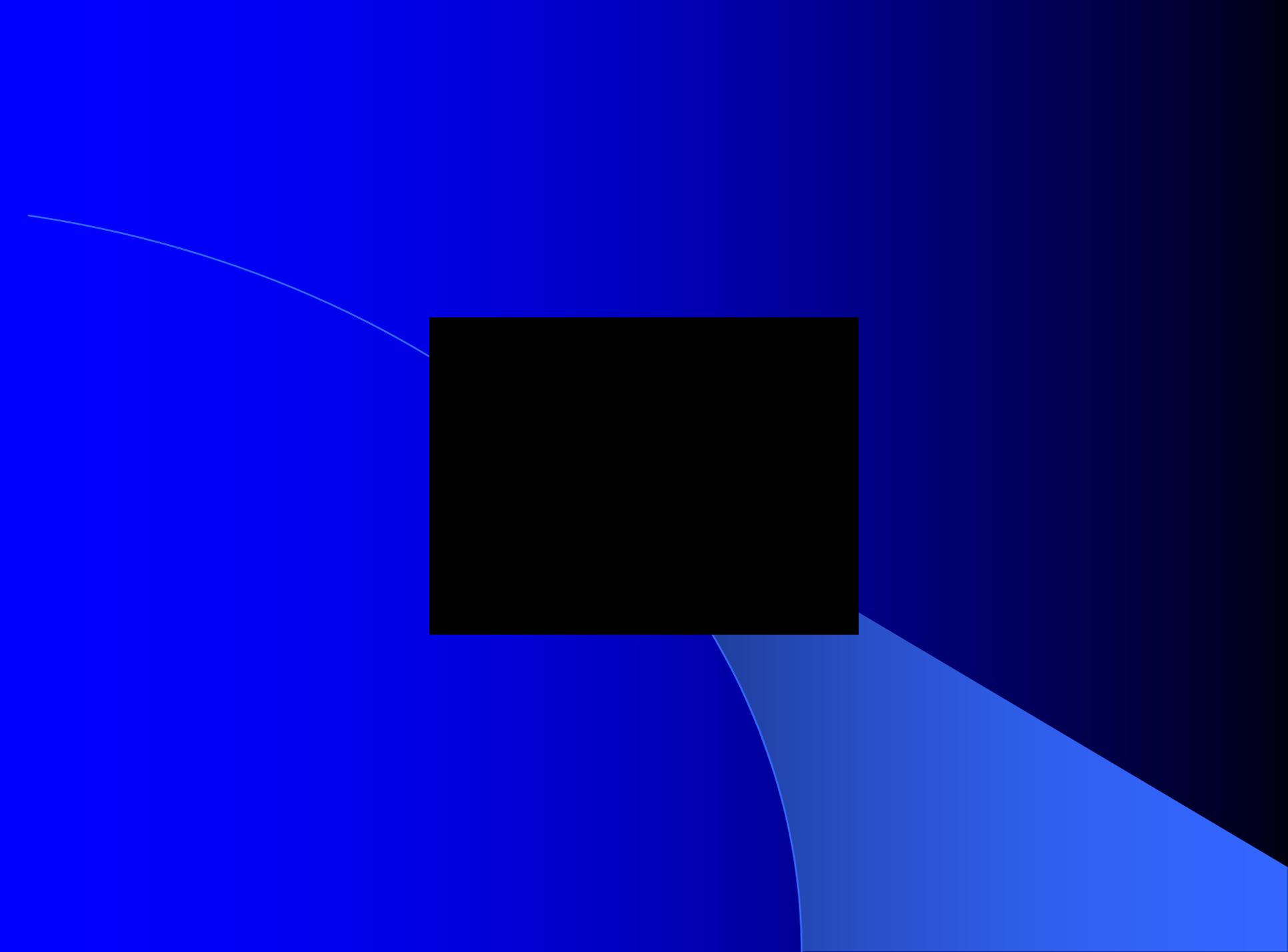
低温操作柜



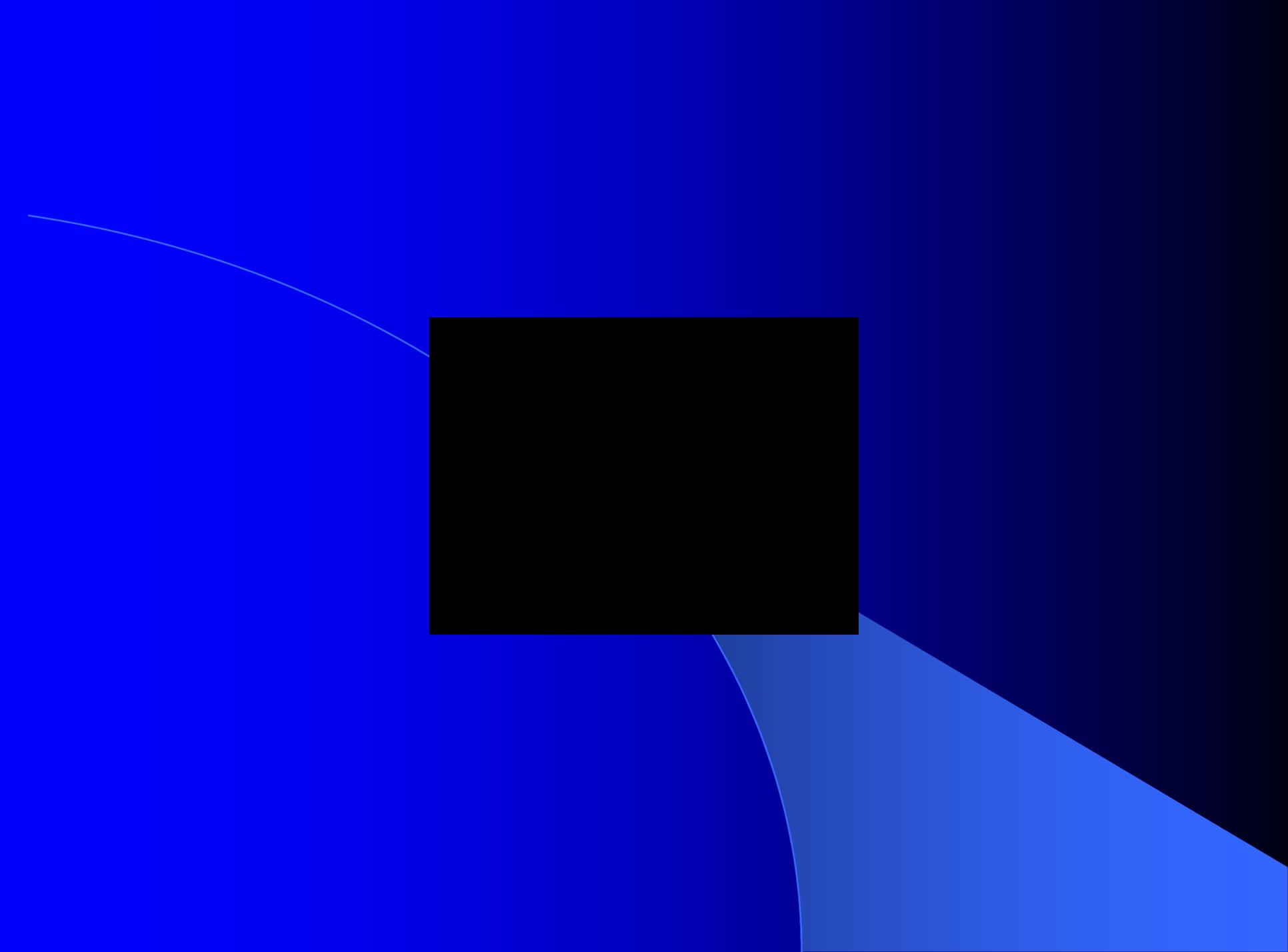
精子冷冻仪

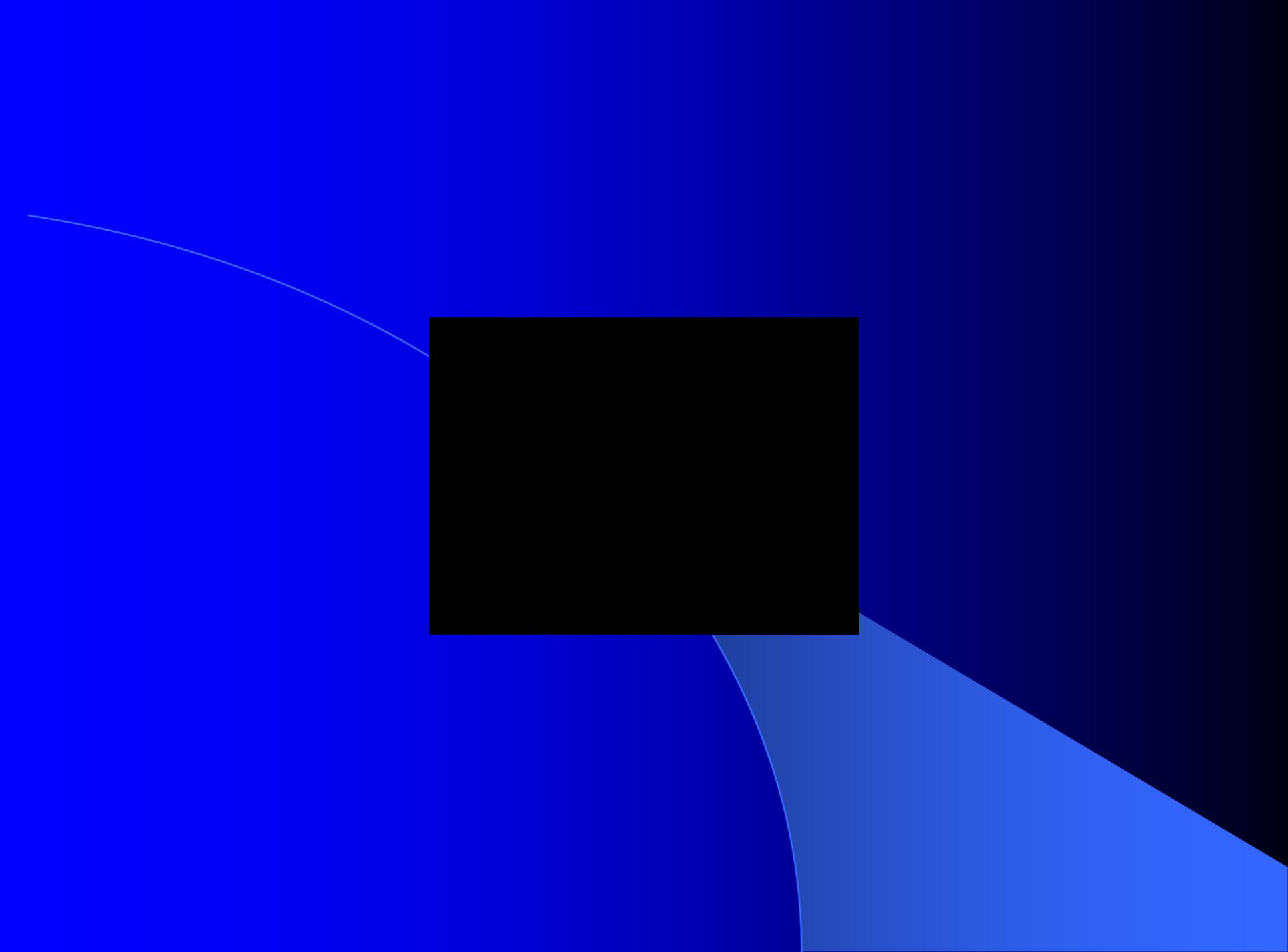
程序化冷冻仪的应用

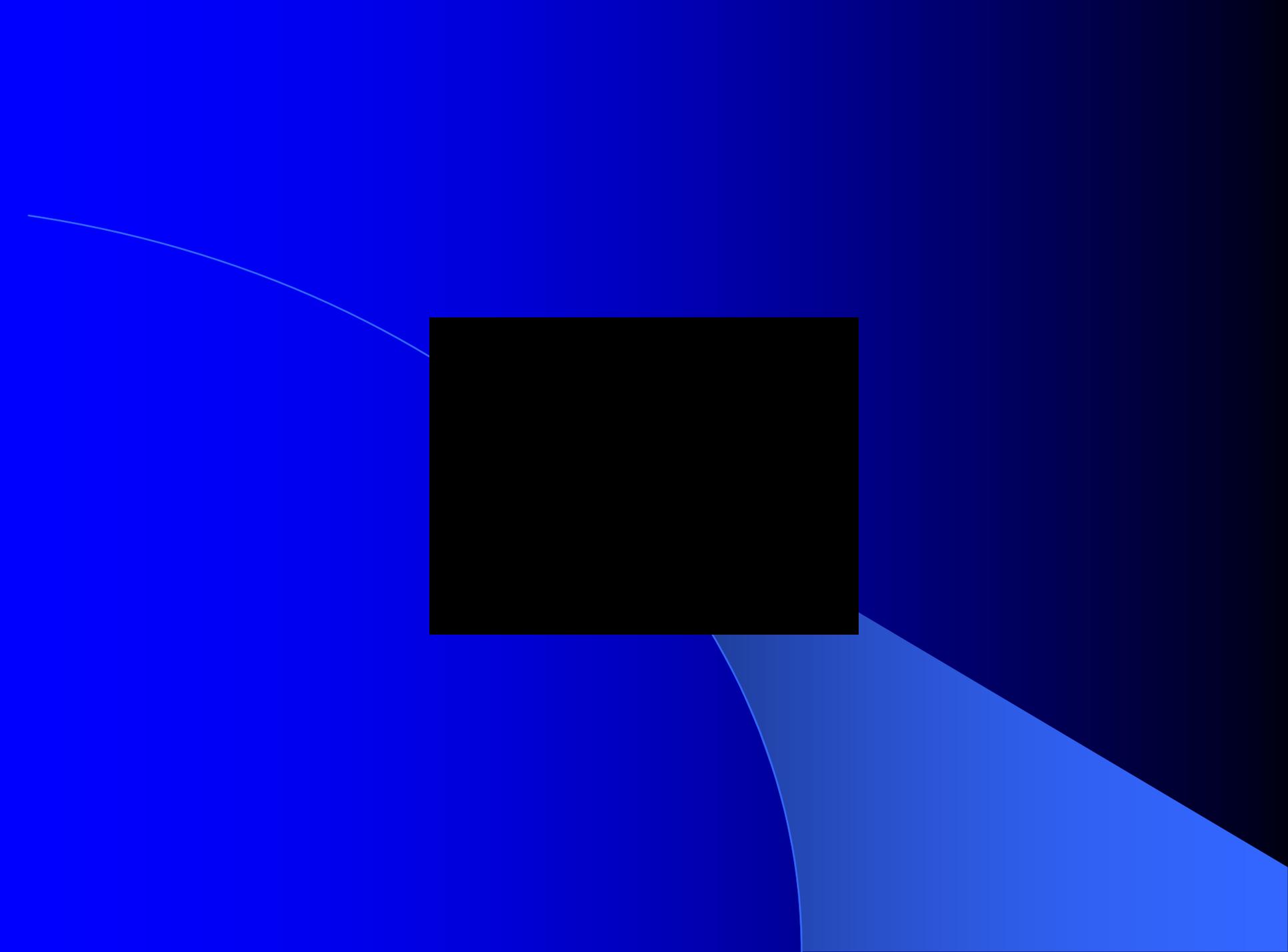


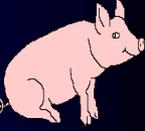












**专用冷冻仪、灌装、
标记等仪器的应用**

冷冻保存液的研发及商业化生产

精准的发情鉴定技术

深部位输精技术

已具备冷冻精液的商业化生产条件；

使用冷冻精液的母猪平均受胎率和产仔数已接近或相当于液态保存精液。

革命性地推动养猪业发展



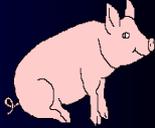
我们实验室的部分工作介绍

主要是利用低温保存技术（通过建立精子库、胚胎库、体细胞库、[、](#)[、](#)；在此过程中，我们队猪精液冷冻保存进行近30年的工作。。。

优良猪种种质资源的长期保存（上海地区地方猪种、长三角部分地方猪种、培育品种）

其他家畜。。。

应用超低温冷冻技术建立上海地区 猪种种质资源基因库





地方猪种种质资源保护的迫切、重要性

- 近20年多来由于各地城市化、工业化的迅速扩展（经济发达地区尤为突出），使许多地方猪种数量急剧下降；
- 有些品种甚至绝种或已濒临绝种。

畜禽遗传资源保护和利用“十三五”规划发布 (2016年11月9日)

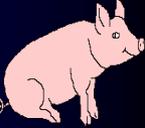
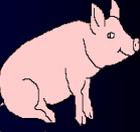


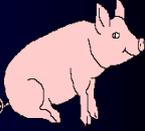
表5 我国地方畜禽遗传资源濒危品种列表

畜种	濒危	濒临灭绝	灭绝	小计
猪	淮猪(山猪、灶猪、皖北猪)、马身猪、大蒲莲猪、河套大耳猪、汉江黑猪、两广小花猪(墩头猪)、粤东黑猪、隆林猪、德保猪、明光小耳猪、兰屿小耳猪、华中两头乌猪(赣西两头乌猪)、湘西黑猪、仙居花猪、官庄花猪、闽北花猪、莆田猪、岷县花猪、赣中南花猪、玉江猪、滨湖黑猪、确山黑猪、安庆六白猪、湖川山地猪(罗盘山猪)	岔路黑猪、碧湖猪、兰溪花猪、 <u>浦东白猪</u> 、 <u>沙乌头猪</u>	横泾猪、虹桥猪、潘郎猪、雅阳猪、北港猪、福州黑猪、平潭黑猪、河西猪	37
家禽	金阳丝毛鸡、边鸡、浦东鸡、萧山鸡、中山沙栏鸡、四川麻鸭、云南麻鸭、雁鹅、百子鹅、阳江鹅、永康灰鹅	彭县黄鸡	烟台糝糠鸡、陕北鸡、中山麻鸭	15
牛	太行牛、复州牛、徐州牛、温岭高峰牛、樟木牛、阿勒泰白头牛、海仔水牛、大额牛(独龙牛)	舟山牛、蒙山牛	上海水牛、荡脚牛	12
羊	兰州大尾羊、汉中绵羊、岷县黑裘皮羊、承德无角山羊、马关无角山羊		临沧长毛山羊	6
其他	鄂伦春马、晋江马、宁强马	敖鲁古雅驯鹿、新疆黑蜂		6



地方猪种种质资源保护的迫切、重要性

- 地方猪种资源是一个国家的**战略资源**，优良地方猪种种质资源是我们今后开展**猪育种工作的基本素材**。
- 上海地方猪种主要有嘉定的梅山猪、金山的枫泾猪、崇明的沙乌头猪和浦东的浦东白猪。
- **长三角地区部分地方猪种**、 、
- 在全球性抢夺生物资源和保护生物多样性的今天，如何采取切实可行的技术措施，尽可能多地保存、利用好这些优良的地方猪种资源，显得尤为迫切。



相关技术的突破

- 地方猪种的保种方式主要分活体原位保种（动态保种）和静态保种（遗传物质保存）。静态保种的主要方法有配子或胚胎的超低温保存、DNA保存和体细胞冷冻保存等。
- 近年来随着现代生物技术的不断发展，尤其是猪精子冷冻保存技术、胚胎玻璃化冷冻技术和体细胞克隆技术的发展和完善，使静态保种（部分）代替活体保种成为了可能和现实。



中华人民共和国科学技术部

The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China



[\[放大字体\]](#) [\[缩小字体\]](#) [\[打印\]](#) [\[发送\]](#) [\[我要纠错\]](#) [\[关闭窗口\]](#)

www.most.gov.cn

[科技部门户](#) > [专题专栏](#) > [加强自主创新](#) > [创新追踪](#) > [创新成果](#) > [国内创新成果](#)

我国科学家突破“玻璃化冷冻”技术

科技部门户网站 www.most.gov.cn

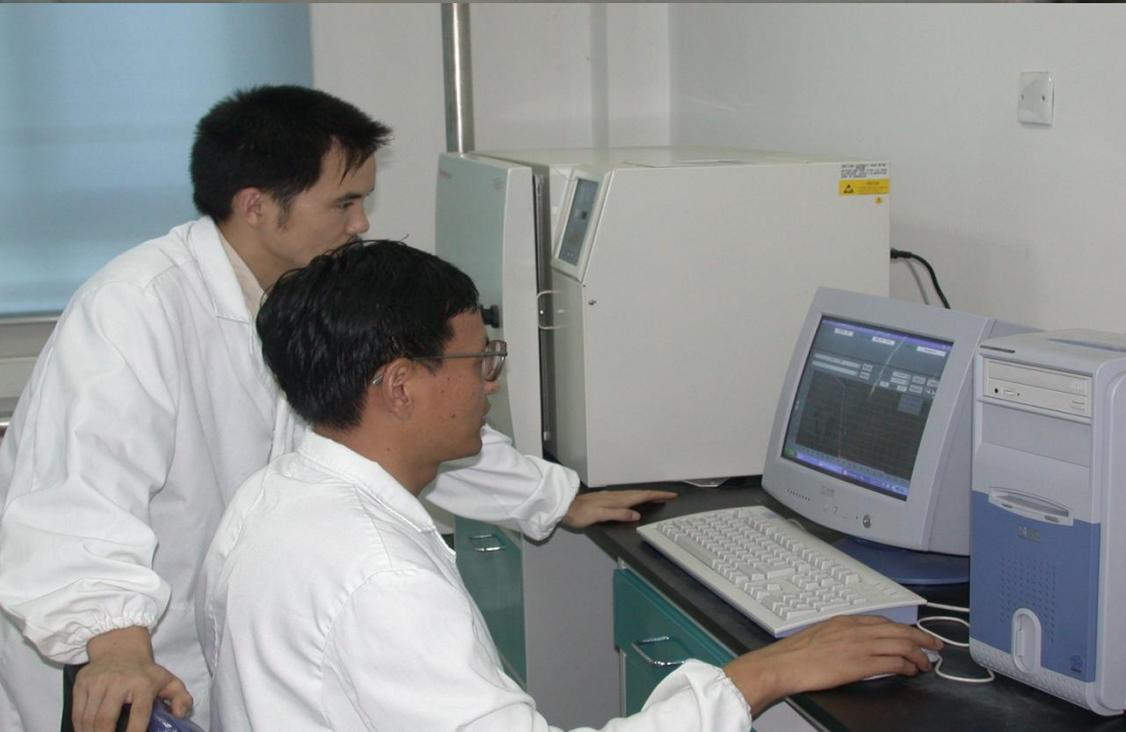
2005年09月27日

来源：科技部

上海市农业科学院畜牧科学家23日宣布，他们已经成功掌握在零下196摄氏度的超低温中保存猪胚胎的技术。通过这种技术保存的28个胚胎复苏之后移植入母猪体内，产下10头小猪，成活8头。这是中国科学家在难度较高的猪胚胎超低温保存研究上的首次突破，为建立中国特有猪种胚胎库奠定了技术基础。

据主持此项研究的张德福研究员介绍，虽然牛等家畜的胚胎冷冻技术已经实用化，但猪胚胎由于脂肪含量高，内在结构有特殊性，相对而言对低温的耐受性较差，给冷冻保存造成很大困难。而目前最常用的以养殖为主的活体保存方法，在维持专门保种群体方面成本过于高昂，难以克服活畜保种中疾病、自然灾害等因素带来的各种困难。

据了解，此次保存技术上的突破关键是利用“玻璃化冷冻技术”达到瞬间急剧降温的效果。科学家解





精子库样品资料模板

基本信息							
公猪耳号:	6171	品种:	上海白猪(上系)	体重(KG):	250	年龄:	4
父亲耳号:				母亲耳号:			
照片:							

精子采集及冷冻保存								
次数 1:	日期:	2016/4/20	颜色:	正常	气味:	无	体积:	220
	原精密度:	1.5×10^8	PH:	--	活力:	0.8	活率:	85%
	顶体完整率:	--	畸形率:	<2%	运输稀释液:	Homoney	冷冻方法:	熏蒸
	冷冻剂型:	0.5ml	冻精密度:	3×10^9	冷冻高度:	5cm	冷冻数量:	60
次数 2:	日期:	2016/4/28	颜色:	正常	气味:	无	体积:	200
	原精密度:	1.5×10^8	PH:	--	活力:	0.85	活率:	90%
	顶体完整率:	--	畸形率:	<2%	运输稀释液:	Homoney	冷冻方法:	熏蒸
	冷冻剂型:	0.5ml	冻精密度:	3×10^9	冷冻高度:	5cm	冷冻数量:	60
保存地点:	基因中心种质库			入库时间:	2016/10/19			
入库位置:	1-5-24; 1-5-24		说明:	如 1-5-1, 即第 1 罐第 5 库位的第 1 提桶				

抽样检查						
次数 1	抽检日期:	2016/4/28	解冻条件:	52℃/35s	解冻液:	BTS
	冻后活力:	0.4	冻后活率:	49%	畸形率:	--
	顶体完整率:	--	质膜完整率:	--	检查人员:	张树山
次数 2	抽检日期:	2016/4/29	解冻条件:	52℃/35s	解冻液:	BTS
	冻后活力:	0.4	冻后活率:	51%	畸形率:	--
	顶体完整率:	--	质膜完整率:	--	检查人员:	张树山

配种统计					
所配母猪妊娠率:		窝均产仔数:		窝均活仔数:	
窝均断奶数:		断奶均重:		育成率:	
				平均初生重:	
				窝均出栏数:	

其他 (后代生长发育等, 约 500 字总结)

基本信息

品种:	上海白猪 (上系)	耳号:	9067	雌雄:	雌性	体重 (kg):	260
胎次:	4	配种公猪:	4393	父亲耳号:		母亲耳号:	
照片							
初配日期:	2016/6/22	二配日期:	2016/6/23	胚胎回收时间:	2016/6/29		
胚胎回收液体:	TCM199+2%FBS	胚胎数量:	8	胚胎回收方法:	屠宰冲胚		
桑椹胚数:	0	囊胚数:	8	退化胚数:	0	其他数量:	0

冷冻及储存

冷冻方法:	CRYOTOP	数量:	1	冷冻液配方:	EDS30	
冷冻日期:	2016/6/29	操作人员:	戴建军			
保存地点:	基因中心种质库		入库时间:	2016/10/19		
入库位置:	1-5-27	说明:	如 1-5-1, 即第 1 罐第 5 库位的第 1 提桶			

抽样检查

首检日期:	--	存活率:	--	培养液:	--	24h 囊胚腔恢复率:	--
二检日期:	--	存活率:	--	培养液:	--	24h 囊胚腔恢复率:	--
.....							

猪繁殖与生长发育情况

胎次	初配日期:	配种日期:	配种公猪:	产仔数:	产活仔数:	均初生重:
胎次 1	断奶日期:	断奶窝重:	育成数:	出栏数:	仔猪平均乳头数:	
					
胎次 2	初配日期:	配种日期:	配种公猪:	产仔数:	产活仔数:	均初生重:
	断奶日期:	断奶窝重:	育成数:	出栏数:	仔猪平均乳头数:	
胎次 3	初配日期:	配种日期:	配种公猪:	产仔数:	产活仔数:	均初生重:
	断奶日期:	断奶窝重:	育成数:	出栏数:	仔猪平均乳头数:	

.....

其他 (生长、发育和杂交利用效果等, 500 字总结)

胚胎库样品资料模板



公猪细胞库样品资料模板

基本信息

品种:	上海白猪(上系)	耳号:	6171	雌雄:	雄性	体重(kg):	250
年龄:	4	父亲耳号:		母亲耳号:			
照片							

培养方法

组织来源:	耳组织	建系方法:	组织块培养法
建系日期:	2016/4/28	细胞长出日期:	2016/5/5
首次传代(F1)日期:	2016/5/10	第二次传代(F2)日期:	2016/5/14
第三次传代(F3)日期:	-	支原体检测结果:	阴性
细菌检测结果:	阴性		

细胞生长情况备注(100字以内) 细胞长出日期正常,但长出细胞的组织块较少,后期细胞生长较快。

冷冻及储存

冷冻日期:	2016/5/18	冷冻时代数:	F2	细胞密度:	3.1×10^6 个/ml
冷冻体积:	1ml	冷冻数量:	4		
保存地点:	基因中心种质库		入库时间:	2016/10/19	
入库位置:	1-5-26(盒4)	说明:	如 1-5-1, 即第 1 罐第 5 库位的第 1 提桶		

抽样检查

首检日期:	2016/9/24	存活率:	75	传代日期:	2016/9/28	再传日期:	-
二检日期:		存活率:		传代日期:		再传日期:	
.....							

公猪精液指标

次数 1	检查日期:	2016/4/25	颜色:	正常	气味:	无	体积:	220	PH:		活力:	0.8
	顶体完整率:	-	畸形率:	<2%	细菌数:		检查人员:	张树山				
胎次 2	检查日期:	2016/4/28	颜色:	正常	气味:	无	体积:	200	PH:		活力:	0.85
	顶体完整率:	-	畸形率:	<2%	细菌数:		检查人员:	张树山				
.....												

配种统计

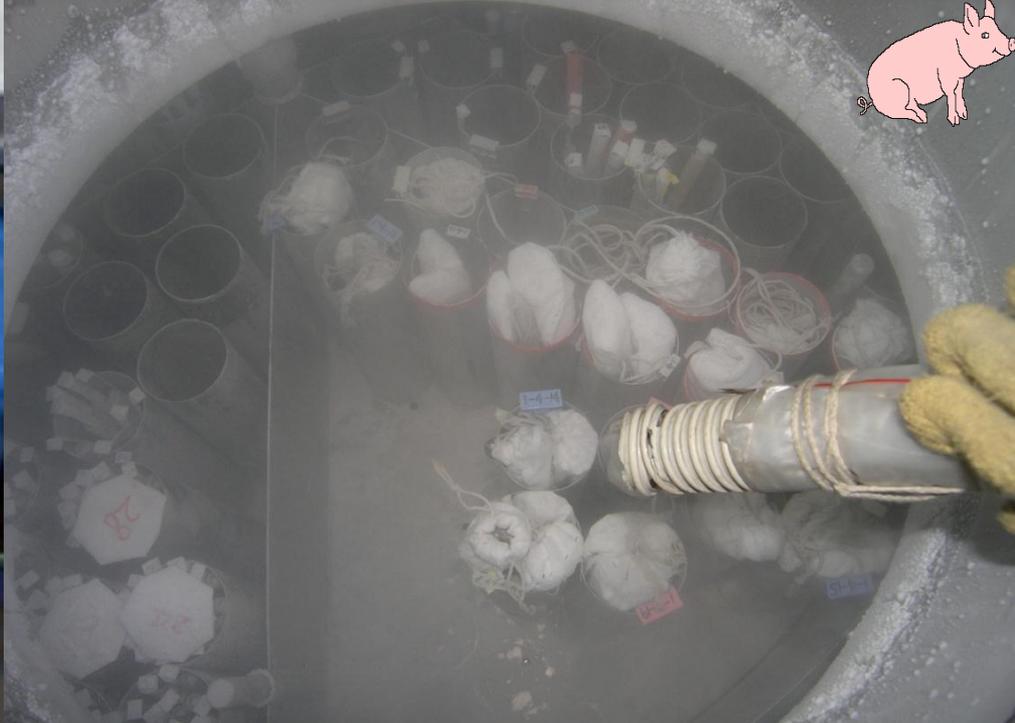
所配母猪妊娠率:		窝均产仔数:		窝均活仔数:		平均初生重:	
窝均断奶数:		断奶均重:		育成率:		窝均出栏数:	

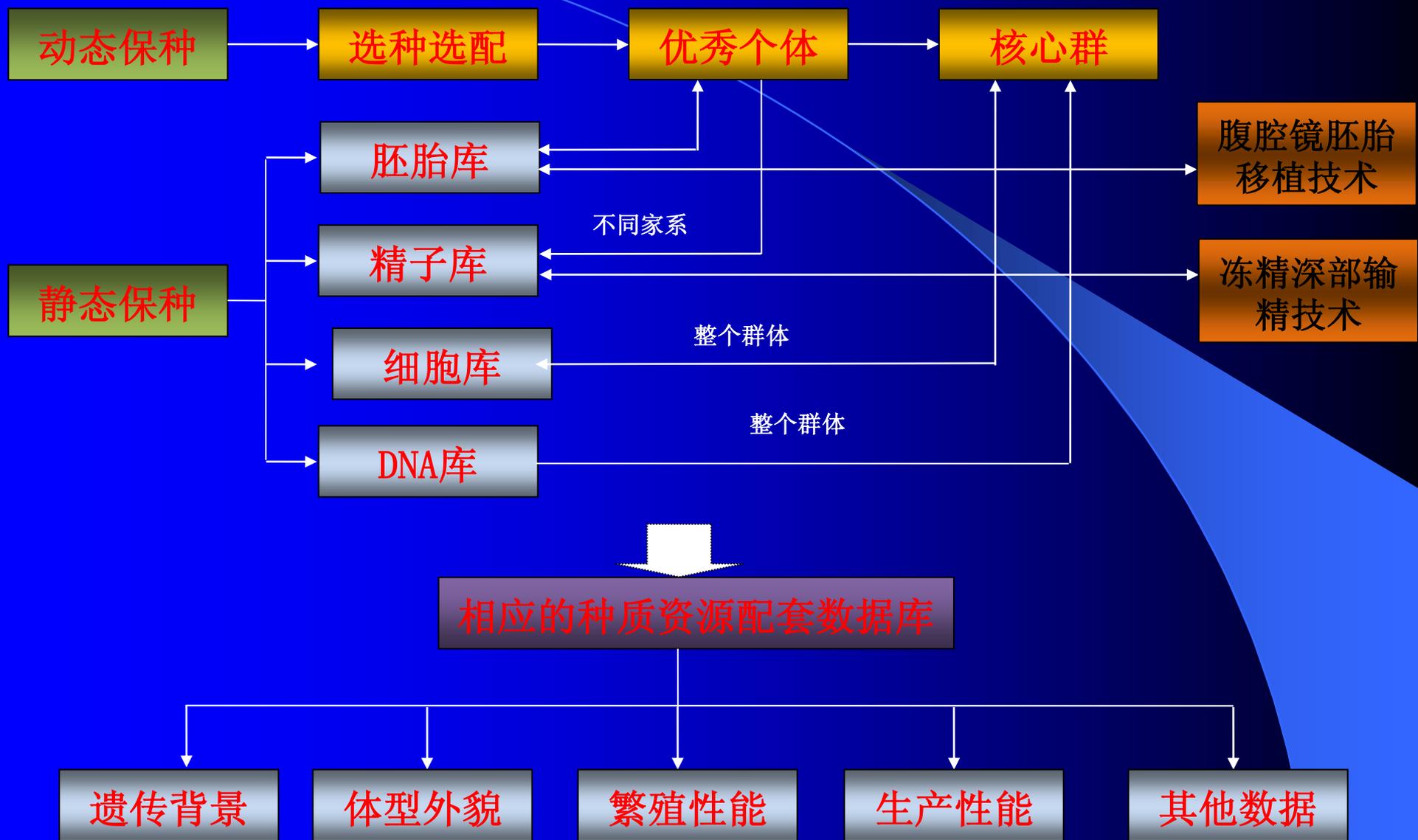
其他(后代生长发育等,约 500 字总结)



DNA文库档案中个体信息参照细胞库。下图是对上海白猪（上系）58份样品进行了DNA提取后的部分结果。

日期	样本	样本量	类型	Abs260	Abs280	260/280	浓度 (ng/ul)
2016. 5. 30.	5888	1	dsDNA	0. 406	0. 271	1. 5	20. 3
	8642	1	dsDNA	0. 487	0. 309	1. 58	24. 3
	1158	1	dsDNA	0. 462	0. 294	1. 57	23. 1
	9914	1	dsDNA	1. 603	0. 916	1. 75	80. 2
	9766	1	dsDNA	0. 349	0. 204	1. 71	17. 5
	8352	1	dsDNA	0. 568	0. 336	1. 69	28. 4
	9274	1	dsDNA	0. 504	0. 317	1. 59	25. 2
	9770	1	dsDNA	1. 033	0. 832	1. 24	51. 6
	1714	1	dsDNA	0. 696	0. 411	1. 69	34. 8
	8160	1	dsDNA	0. 616	0. 381	1. 62	30. 8
	5. 31	4724	1	dsDNA	0. 37	0. 217	1. 71
5304		1	dsDNA	0. 681	0. 39	1. 74	34
9678		1	dsDNA	0. 354	0. 229	1. 55	17. 7
6146		1	dsDNA	0. 494	0. 294	1. 68	24. 7
9768		1	dsDNA	0. 695	0. 418	1. 66	34. 7
1172		1	dsDNA	0. 439	0. 273	1. 61	22
1710		1	dsDNA	0. 496	0. 307	1. 62	24. 8
6144		1	dsDNA	0. 572	0. 358	1. 6	28. 6
9764		1	dsDNA	0. 533	0. 356	1. 5	26. 6
8518		1	dsDNA	0. 535	0. 367	1. 46	26. 8
6. 1.	1964	1	dsDNA	0. 557	0. 361	1. 54	27. 8
	1136	1	dsDNA	0. 502	0. 276	1. 82	25. 1
	4854	1	dsDNA	0. 223	0. 12	1. 86	11. 2
	5810	1	dsDNA	0. 461	0. 289	1. 6	23. 1







上海市科学技术奖 证书

为表彰上海市科技进步奖获得者，特颁发此证书。

项目名称：猪种种质资源长期保存技术

获奖者：张德福

奖励等级：二等奖



上海市人民政府

2008年12月01日

证书号：20084155-2-R01



上海市科学技术奖 证书

为表彰上海市科技进步奖获得者，特颁发此

项目名称：猪体细胞克隆技术的建立和优化及
生产性能观察测定

获奖者：张德福

奖励等级：二等奖



上海市人民政府

2011年11月23日

证书号：20114051-2-R01

猪精液冷冻----部分资助项目

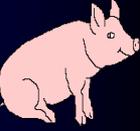
猪种质资源长期保存技术研究（上海市科技兴农重点攻关项目（2003第14-1号））；

猪生殖细胞及胚胎冷冻保存技术的优化和应用（上海市科技兴农重点推广项目，2007第3-7号）；

太湖猪各类群种质资源的收集与保存（上海市科委，123919N1700）；

猪精液、胚胎冷冻技术在地方猪种保种中的应用（上海市科委，103919N1800）；

克隆和冷冻保存技术在上海白猪保种、育种中的应用（上海市科委，133919N1700）；



合作单位

上海市农业生物基因库

上海第二医科大学发育生物学研究中心

上海祥欣畜禽有限公司

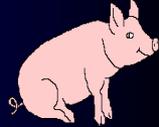
上海市嘉定区梅山猪育种中心

上食五丰上海猪场

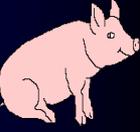
上海警备区富民农场

上海市金山、崇明、浦东新区种畜场

。 。 。 。 。 。 。



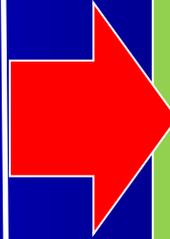
三、展望



**无动物源成分、无抗
冷冻保存液的研发**

**性控技术与猪精液冷冻
的结合**

**依据猪精子特性对其
冷冻工艺的优化**



**革命性地推动
猪育种业及
养猪业实现
跨越式发展**



Thank you!