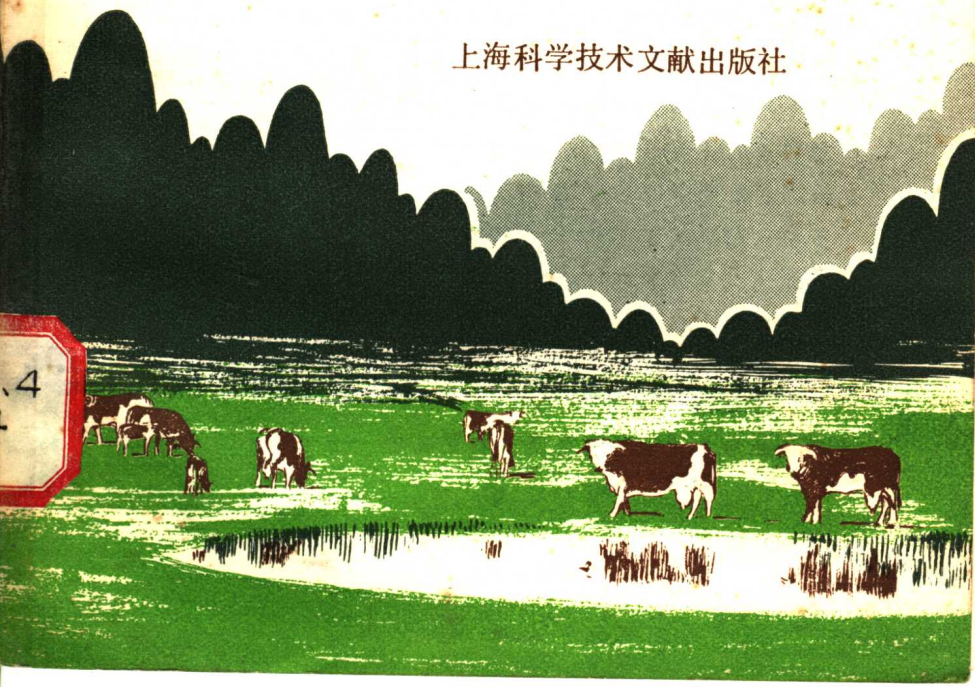


国外养牛 新技术

GUOWAI
YANGNIU
XINJISHU

上海科学技术文献出版社



438702

内 容 提 要

本译丛主要介绍 1978~1979 年国外有关乳牛人工授精、卵移和奶牛饲养管理等新技术,可供畜牧兽医专业人员和农业院校参考。

国 外 养 牛 新 技 术

上海畜牧兽医学会编

*

上海科学技术文献出版社出版
(上海高安路六弄一号)

新华书店上海发行所发行
浙江洛舍印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 8.5 字数 206,000

1981 年 4 月第 1 版 1982 年 7 月第 2 次印刷

印数: 4351—8550

书号: 16192·14 定价: 1.05 元

《科技新书目》181-139

目 录

牛精子的冷冻和冻干	1
精液添加物和包装方式对牛冷冻精子受精力的影响	16
圆柱法分离精子的综述	65
从采精到应用影响精子活力的因素	74
在冷冻过程中保护牛精液的卵黄成分	87
前列腺素 $F_{2\alpha}$ 对公牛精子质量和数量的影响	98
公牛的群养	108
公牛最大精液量的采精技术	123
测定前进活精子百分比的长时间曝光暗视野显微镜摄影 技术	129
人工授精的季节与繁殖力	134
配种时间对奶牛群受胎率的影响	137
牛同期发情的一般原理和基本技术	146
卵子移植	170
挤奶装置的安装	185
英国全国农业中心奶牛场	199
奶牛高效饲喂和管理	206
牛白血病及其诊断	218
牛的白血病和人工授精	232
加拿大奶牛繁育、饲养管理技术综述	240
奶牛乳房炎	261
冷冻牛胚胎从新西兰运至澳大利亚成功	270

牛精子的冷冻和冻干

E. F. Graham E. V. Larson B. G. Crabo

导 言

如果精子含有的水份超过 50%，在细心控制的化学环境条件和冷却速度下，则精子能成功地冰冻并能恢复成活。在冰冻时细胞实际是干燥的，因细胞中的水份已结晶为固体状态，这就抑止了细胞的正常功能。低温则减缓了细胞中的化学反应，所以在很低的温度，例如在 -196°C 时，细胞的生命处于暂停状态。如得当地解冻后，则可恢复正常活力。

在冻干过程中，当样品的温度保持在冰点以下时，结冰的水份即被除去。冻干是目前保存食品、药品及微生物的常用方法。

Polge 等 1949 年曾报道冻干鸟类的精子。他们取得的最好结果是将 1 毫升精液混合在 1 毫升含有 30% 甘油的 Ringers 溶液中，并在 -79°C 下冻成一薄层。在冻干中除去了 85~90% 的水份，当立即将冻干的精子恢复其水份时，观察到有 50% 的活力。但经过两小时的室温储藏，冻干的精子就不能复活。但没有对精液做过受精力试验。在所用的试品中是否全部均匀地干燥过，是不清楚的，所以也可能所观察到的能动的精子是来自未干燥部分。

Sherman (1954 年) 曾冻干以甘油处理过的人的精子，结果什么也没有发现。他认为：在干燥过程中增加了甘油浓度后，约有 35% 精子不能活动。他并观察到：如去掉水份过多，细胞则

死去。

Leidl(1956 年)曾使用卵黄柠檬酸盐和 10% 的甘油作为冷冻牛精子的缓冲剂,但每当除去试样中水份超过 95% 时则不能发现活动的细胞。他曾试图在平衡后和在冻干前除去甘油,但未获成功。他发现当除去水份时,甘油浓度增大,认为很可能甘油浓度的增大对精子起了毒害作用。

Bialy 和 Smith(1957 年)试图冻干牛的精子。精子先经过冷冻,使用含有 7.5% 甘油的卵黄柠檬酸盐作为缓冲剂,然后冻干至各种脱水程度。在脱水 40% 情况下,活力为 11.5%,这与经过冷冻而未经干燥处理的对照试样情况大致相同。水份去掉愈多则活力愈低,在脱水 75% 时,活力则降低至 4.1%。而当脱水 95% 时,则只留存几个活动的精子。这种试验是在冻干的试样在经过干燥处理后立即使其复原的情况下进行的,并未进行冻干试样的储藏试验。

Sherman(1957 年)试图将冷冻在卵黄和 7% 甘油缓冲液中的公牛精子进行冻干,但全部没有存活。他提出精子死亡的原因是与干燥的方式或速度、试样中的高浓度甘油和盐类以及细胞复水的方式或速度有关。

Yushchenko(1957 年)报道了在冻干牛、绵羊和兔子的精子方面已取得成功。他在含有 7.5~20% 甘油的培养基中使精子保持平衡,然后将精子转移至氟利昂庚烷(Freon Heptane)混合剂中以去除甘油。干燥是在氟利昂庚烷培养基中完成的。经过干燥的牛精子试样以高于冰点的温度储藏了 18~20 个月,最后复水时,发现有些活的细胞。精子以高于冰点的温度储存超过新鲜未经冰冻细胞的生命时间,在文献中是仅有的例子。关于牛精子受精力试验的报道还没有见到,但有 12 窝正常发育的小兔是由冻干的兔子精子产生的。遗憾的是,从 Yushchenko 那

里没有得到更多成功的报道，想重复他这一技术的其他研究人员也没有成功。

Meryman(1960 年)报道了成功地冻干了牛的精子，其做法是先将精液冷冻而不用甘油作为低温保护剂。精液置于真空室冻至看上去已干燥为止，湿度约 8%，于是将试样立即复水，显示出良好的活力。经过 24 小时储藏后，只有一丝活动的迹象，但这一迹象确实持续了六天之久。在受精力试验中，用这种精液曾使一头母牛怀孕。但其他想重复此试验的人均告失败。1963 年 Meryman 和 Kafig 报道他们也未能重复他们以前的工作。

Anderson 和 Merilan(1960 年)报道过关于牛精子的冻干情况。他们使各种精液加以冷冻，包括未经稀释的精液，在卵黄-柠檬酸盐-甘油、脱脂牛奶-甘油、卵黄-脱脂牛奶-甘油以及柠檬酸钾-甘油中稀释过的精液。他们试图用各种方法将试样中的水份去掉，包括中等真空脱水，高真空脱水，固-液脱水，液-气取代脱水以及固-液-气取代脱水。他们也曾试用过类似 Yushchenko 所用的方法，即细胞用甘油初步处理后再将甘油除去。但这些试验都没有成功。他们将失败原因归结于冻干试样中所遗留的甘油浓度太高。

Nei 和 Nagase(1961 年)报道过牛精子的冻干。他们所用的方法和 Meryman 的相似，结果是除一单独例子外其它均未成功。他们说，将试样中的水份去掉 75% 则没有能够成活的。他们大部分的试样是在卵黄柠檬酸盐中培养的，没有甘油。

Saacke 和 Almquist(1961 年)报道了他们用 Leidl, Yushchenko 和 Meryman 所用的方法进行了牛精子冻干试验，但都没有成功。在用了甘油后干燥的精子出现蜡质遗留物，此种物质不易复水。即使用 Yushchenko 的去掉甘油的方法也不

见效。电子显微照相研究显示,冻干破坏了精子的细胞膜。

最后关于冻干牛精子的研究报道来自 Singh 和 Roy(1967年)。他们研究了精液稀释液(卵黄柠檬酸盐或牛奶加或不加7%的甘油)和在试样冻干前的温度($+5^{\circ}\text{C}$, -20°C , 或 -40°C)之间的关系。取得最好效果的是使用没有掺入甘油的卵黄柠檬酸盐,试样在冻干前的温度为 $+5^{\circ}\text{C}$ 。冻干试样的最后含水量是用肉眼观察估计的。其最佳结果是“完全干燥”,而能动的精子为20.1%。对于储存和受精能力未进行试验。

综上所述,对于精子冻干的失败有下列原因:

1. 遗留下来的高浓度甘油对干燥和复水是有破坏作用的,而且可能对细胞有毒害作用;
2. 在甘油中浓度高的盐类,在冻干及储存过程中对细胞也可能有毒害作用;
3. 干燥及复水的方式;
4. 在干燥了的细胞和在干燥过程中所使用的培养基之间可能产生的相互作用。

表1仅说明在试验冻干精子方面的有限成就。

Nagase 等(1964年)首先报道了一种成功地冻干牛精子而不使用甘油的方法,尽管其受胎率是低的(56%)。用相同技术, Gibson 和 Graham(1969年)将颗粒在分子量较高的蔗糖和卵黄中冰冻,记录了不同公牛的精液抵抗冷冻的不同能力。在18头不同的公牛中间其恢复率达12~90%。受精力和不用甘油冷冻精子的恢复百分比之间的相关是高的(0.674),而受精力和在含有甘油的缓冲剂冷冻后活力之间的相关是不重要的。

Graham 等1972年曾报道冷冻牛精子的成功方法是用一种特制的缓冲剂(TEST):三羟甲基氨基乙烷磺酸缓冲剂N-tris(hydroxymethyl) methyl-2-amino ethane sulfonic acid, 325

表 1 精子冻干所进行的试验和所取得的结果

试 验 人 员	品 种	稀 释 液	甘油(%)	复活状况	受 精 力	备 注
Polge et al., (1949)	家禽	Binger's 溶剂	20~30	几个细胞	无	由于甘油浓度太高而失败
Sherman (1954)	人	精清 (Seminal Plasma)	10	无	无	高浓度的甘油有毒害作用
Leidl (1956)	牛	卵黄-柠檬酸盐	10	无	无	在干燥物质中甘油浓度过高
Bialy & Smith (1957)	牛	卵黄-柠檬酸盐	7.5	无	无	
Sherman (1957)	牛	卵黄-甘油	10	无	无	盐份高,甘油浓度高,脱水及复水的方式或速度有错误
Yushchenko (1957)	牛、羊 和兔子	氟利昂庚烷 (Freon-Heptane)	0	良好	小兔 12 窝	改变精液稀释液为不含甘油之培养基似有帮助
Meryman & Kafig (1959)	牛	卵黄-柠檬酸盐	0	良好		未使用甘油
Meryman (1959)	牛	卵黄-柠檬酸盐	0	良好	牛 1 只	
Anderson & Merilan (1960)	牛	卵黄-柠檬酸盐牛奶, 卵黄磷酸盐	8	无	无	在干燥过程中增加甘油浓度
Saacke & Almqvist (1961)	牛	卵黄-柠檬酸盐氟利 昂庚烷	用和不用	无	无	形态受损
Meryman & Kafig (1963)	牛	卵黄-柠檬酸盐	0	无	无	形态受损
Sherman (1963)	人	精清	10	无	无	在干燥过程中增加了甘油浓度
Singh & Roy (1967)	牛	卵黄-柠檬酸盐或牛奶	0 或 7	良好	无	没有甘油的卵黄-柠檬酸盐效果最佳

(毫渗压)用加有 20% 卵黄但没有甘油或其它综合类型的物质: 三羟甲基氨基甲烷缓冲剂 tris(hydroxymethyl)amino methand 325(毫渗压)滴定至 pH 7.2。如 Graham 等(1971 年)和 Graham 及 Crabo(1972 年)所报道, 其它种类家畜的精子亦曾经在在没有甘油或其它综合类型的物质的情况下冷冻成功。

步 骤

精液处理

采精——用假阴道采精使精液进入到 35°C 的盛器中, 保温到 15~30 分钟以后稀释时为止。

稀释——为研究目的, 稀释至每毫升精子数为 30×10^6 。为冻干目的, 则应稀释至每毫升有 250×10^6 个精子。

缓冲剂配方——基本缓冲剂是如前所述的缓冲剂(TEST)。

冷冻方法

所有试样的冷冻都是用颗粒方法, 如 Nagase 和 Niwa(1964 年)和 Nagase, Graham 与 Niwa(1964 年)所说的相同。

颗粒冻干的准备工作

最初的试验证明颗粒太大不能有效的进行冻干。因此颗粒在液氮中用研钵以杵捣碎。捣碎后的颗粒用筛子筛过, 去掉能穿过一般窗纱的小粒。使成为平均直径为 1~2 毫米的不规则的冷冻精液。

器具

为这次试验而设计制造的冻干器皿是采用 Mackenzie(1966 年)所报道的一种。干燥室包括试样室和冷凝室。两室之间由短管连接, 在短管中央有真空阀使两室相互隔绝。两室周围各有一可控制温度的外围装置, 同时各有单独的压力表。在试

样室的真空密封壁内可以使用可做记录的微量天平及热电偶 (thermocouple)。这一设备的排空是使用带有液氮冷却蒸气收集器的机械真空泵以及分子筛吸收泵。它能记录试样干燥温度及干燥速率,并可测定试样最后湿度以证实是否普遍干燥。

每次成功的试验可使约 700 毫克捣碎的精粒的残留水份干燥至一定数值。每次试验可从数天至数星期不等,这要看试样所需的温度和所需干燥的程度而定。干燥所用的温度为 $-50 \sim -70^{\circ}\text{C}$, 在此温度范围内精粒可储存几个星期而不致变质。在冻干完毕后将试样置于密封及抽过气的小瓶中。以此种方式得到的试样要经常贮存在水温度下,通常在一小时内就可使其复水。

为了保证干燥均匀,必须使试样与其环境达到平衡。然后含水量决定于试样的温度和冷凝器的温度。在试样和冷凝器之间温度差较大时可使干燥进程变快同时也使最后的产品较干燥些。试样的温度低则干燥也较慢。试验的目的是要研究试样及冷凝器的温度处于低于 -50°C 时精子的冻干。

含水量

试样的干燥程度决定于封闭在冻干器皿中可做记录的微量天平上所得的重量。水份的总量可认为是在 20°C 真空情况下能够被排除的水份。使用这种方法可以决定每克试样含有 882 毫克可排除的水份及 118 毫克不能干燥的固体。这里指的含水量是以仍留在试样中的 882 毫克可排除的水份的百分比来表示的。

恢复水份

干燥的试样是用缓冲剂-卵黄缓冲剂及蒸馏水的混合剂来恢复其水份的。把相当于原试样体积五倍的一份缓冲剂 (TEST) -卵黄缓冲剂和相当于从试样中排除的水份数量的蒸馏水混合

起来。在使用皮下注射器将恢复水份所用的液体注入前, 先将装有试样的冷的真空小瓶在 37°C 的浴槽中浸十秒钟。试样品于数秒钟之内即可溶解。

评价方法

活力——活动精子的百分比是既在开始时估计, 也在冷冻或冻干之后估计。活力是用带有闭路电视的显微镜下估计的。将试样置于显微镜下作好记录。用三次记录的平均数作为活力百分比。

谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)的分析是以 Graham 和 Pace (1967 年)所说的技术为基础的。每 10^9 个精子所放出的 GOT 作为细胞受到压力损伤的测量。在试样的细胞外介质中 GOT 的标准, 要在冷冻前、冷冻后及溶解后、冻干后以及由于重复冷冻和溶解受到最大损伤后都加以测定。

精子顶体——精子顶体的正常状态是用相差显微镜检查来确定, 如 Crabo 和 Graham(1972 年)的方法。

结 果

不用甘油的冷冻

表 2 表明了以上所说的对牛、猪、绵羊和山羊的精液在缓冲剂中冷冻的比较。虽然这种缓冲剂或两性离子 (zwitter ionic) 的缓冲剂相似, 证明对几种品种的效果是令人满意的, 但真正的冷冻保护物质好象是在卵黄中的那种物质 (见表 3)。Pace(1971 年)报道说, 在卵黄中的这种冷冻保护物质是糖-脂蛋白 (glyco-lipoprotein) 成份。因此, 其它的含有卵黄的缓冲剂在控制的条件下, 即使不比它效果更好, 至少可以相提并论。

表 2 经各种处理后精子活力百分比和精液中细胞外谷-草-转氨酶

品 种	活动精子 (%)		GOT(I. U./10 ⁹ 精子)							
			冻 前		解 冻 后 ⁽¹⁾		冻		前	
	不用甘油	用甘油	不用甘油	用甘油	不用甘油	用甘油	不用甘油	用甘油	不用甘油	最大 ⁽³⁾
牛	60.2 ⁽⁴⁾	61.0 N. S.	36.5	51.5**	129.9	169.2**	220.1	209.0 N. S.	不用甘油	289.7
猪	57.3	59.1 N. S.	31.7	40.6*	261.6	357.4*	353.3	413.4**	不用甘油	578.8
绵 羊	61.3	63.3 N. S.	40.9	52.1**	139.2	142.6 N. S.	237.0	195.7**	不用甘油	317.4
山 羊	60.8	61.7 N. S.	50.0	52.7 N. S.	131.4	152.6 N. S.	246.4	226.7**	不用甘油	469.3

* 在 $P=0.05$ 时显著

** 在 $P=0.01$ 时显著

(1) 所有精液是以颗粒的形状在干冰上冷冻的

(2) 样品是用密度梯度方法取得的 (Brown 等人, 1971 年)

(3) 样品是置于液氮中的, 随后解冻 (三次)

(4) 取得的平均数的试验数 牛=30, 猪=12, 绵羊=12, 山羊=6

表 3 冷冻在 TesNakz PO₄F 缓冲剂中牛精子的(A)卵黄和甘油对解冻后活力的作用
(B)放出的谷-草-转氨酶(GOT)

(A) 解冻后平均 ^(a) 活力(%)		
甘 油 (%)	卵 黄 (%)	
	0	20
0	1 ^(b)	24 ^(c)
4	3 ^(b)	40 ^(d)

(a) 每一数值是六只牛的平均数; 标准误差为 ± 2.50

(b) (c) (d) 在 $P=0.05$ 时无显著差异的平均数的共同标号

(B) 解冻后放出的 GOT 平均数 ^(a) (I. U./10 ⁹ 精子)		
甘 油 (%)	卵 黄 (%)	
	0	20
0	371 ^(c)	249 ^(b)
4	354 ^(c)	227 ^(b)

通过种种处理冷冻前和受到最大损伤时放出的 GOT 平均数分别为 218 和 406 (I. U./10⁹ 精子) 标准误差为 ± 9.01

(a) 每一数值为六头牛的平均数

(b) (c) 在 $P=0.05$ 时无显著差异的平均数的共同标号

表 4 表明冷冻的比较, 使用的缓冲剂, 一种是用卵黄, 一种不用卵黄, 以上两种情况又分别使用或不使用几种常用的冷冻保护剂, 结果亦表明有卵黄成份的重要性。

冻干

两种冻干试验的结果示于图 1 中。上面的一条曲线是将试样和冷凝器都保持在 -50°C 超过三个星期时间的结果。最后含水量是 2.5% 而细胞能功率低于 0.05%。下面一条曲线表

表 4 稀精液中的卵黄对牛精液的活动精子百分比和细胞外 GOT 的作用

	活 精 子 (%)			GOT(I.U./10 ⁶ 精子)					
	冷 冻 前		解 冻 后	冷 冻 后		解 冻 前		解 冻 后 ¹	
	不用卵黄	用卵黄		不用卵黄	用卵黄	不用卵黄	用卵黄	不用卵黄	用卵黄
	最大 限度 ²								
对照	6.7ab	55.0a	1.7 N. S.	370.4b	192.2b	470.5b	235.7b	678.8 N. S.	414.4b
1, 3-丁二醇 (Butanediol)	4.3b	55.0a	1.0	374.3b	187.7b	536.0b	264.5b	703.6	432.6b
二甲亚砜 (Dimethyl Sulfoxide)	12.3a	55.0a	1.3	367.8b	164.3b	465.9b	295.4b	630.8	392.3b
乙二醇 (Ethylene glycol)	11.7a	56.7a	1.3	368.1b	156.8b	503.1b	242.1b	678.2	419.5b
甘油 (Glycerol)	15.0a	53.3a	1.3	411.8b	161.5b	481.2b	240.7b	675.4	399.7b
1, 5-戊二醇 (Pentanediol)	8.0ab	53.3a	0.3	432.6b	178.7b	585.6b	315.0ab	719.6	427.0b
1, 7-庚二醇 (Heptanediol)	0.0b	5.7b	0.0	761.7a	255.7a	764.2a	431.2a	793.1	634.1a
平 均	8.3	47.7	1.0	441.0	185.3*	543.8	289.2*	697.8	445.7*

a, b, c 在同一垂直线中未跟随同一字母的平均数差异显著 ($P=0.05$)

* 差异显著 ($P=0.05$)

1. 样品是用密度梯度方法取得的 (Brown 等人, 1971 年)

2. 样品是经浸在液氮中和解冻 (三次) 取得的

明的结果是将试样保持在 -70°C , 冷凝器保持在 -75°C , 时间

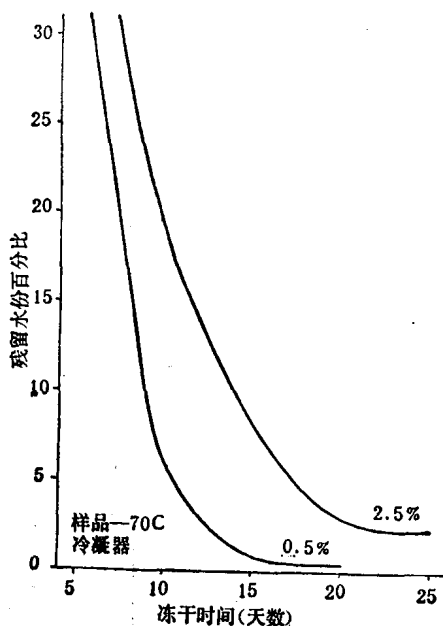


图1 牛精子在 -50°C 和 -70°C ,
干燥度和冻干时间对比

约为三个星期, 最后的含水量为0.5%, 结果细胞完全没有能动的。这两条曲线表明了试验中要达到平衡的实际界限。把在干燥中试样的温度降低到 -70°C 以下, 时间太长是不实用的; 把试样的温度提高至 -50°C 以上, 时间久了会造成明显的变质。

由于这些平衡条件都没有能在复水后导致活动精子有较大的数字, 所以要进一步研究以制止在超过

平衡值时的湿度标准的冻干过程。图2表明活动精子的百分比和用这种方法达到的试样干燥程度之间的大致关系。活动精子的数字在试样的干燥程度未低于30%时是不会受到强烈的影响的。含水量低于3%时, 就没有活的精子。在30~3%范围内, 随着含水量的降低, 能活动的精子也相应减少了。在含水量是15~7%的情况下, 精子顶体似乎还是可以的。但含水量为3%时, 则由于存在大量碎片之故, 精子顶体就看不出来了。对冻干试样中酶的分析, 结果是没有说服力的, 但的确出现了

GOT 和乳酸脱氢酶水平低于在含水量为 30~3% 时所受到最大损害时的水平。

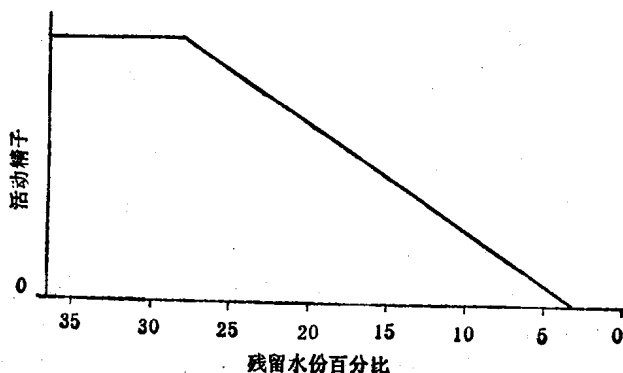


图 2 干燥度和活动精子数字对比

对冻干精子的受精力曾进行过一次试验。牛的精子是象上述那样准备的, 在试样温度为 -51°C 、冷凝器温度为 -54°C 下冻干了五天。经过冻干的试样, 其活力为 25%, 仅略低于在 -50°C 贮存五天未经干燥过的对照试样。经镜检显示了 35% 的正常精子顶体。该试样是每毫升含 2×10^8 个精子。

一头发情的母牛先在 1973 年 1 月 16 日下午 1 时 30 分使用了约 1.5 毫升的试样进行配种, 又在 1973 年 1 月 17 日上午 8 时 30 分使用同样数量的试样进行复配。结果该母牛在 1973 年 10 月产下一头正常小牛。

目前正在进行的工作是改进所用的器皿, 使其有可能同时对 35 个试样进行冻干。为了通过使用一些具有统计意义数字的试样来取得足够的数据, 如活力的读数、精子顶体的研究、对酶的分析、受精率的试验以及贮存的试验, 故扩大干燥的容量是必要的。

结 论

过去在冻干精液方面失败的可能原因是在试样中使用了甘油作为抗冻剂。缓冲方法现已发展到成功地冷冻精液而不需使用甘油。

冻干用的器皿的结构是要能做到仔细地控制试样和冷凝器的温度并在干燥过程中不断称测其重量。在没有甘油的缓冲剂(TEST)-卵黄、缓冲剂中准备的牛的精液,在干冰上经过颗粒冷冻然后打碎成小颗粒状以备冻干之用。干燥的试样是用相当其本身体积五倍的缓冲剂(TEST)-卵黄缓冲剂使其恢复水份,缓冲剂(TEST)-卵黄缓冲剂中要含有足够的水份以恢复其原有的渗透压。含水量为 0.5~2.5% 是可以从试样中得到的,这时试样已达到了稳定的干燥状态,但干燥到此程度没有细胞可以复活。在达到稳定状态之前,可用以阻止干燥的进程来使含水量达到 2.5% 以上。活力的测定数字、精子顶体的研究、酶的分析和一次成功的受精力试验表明牛精液在水份为 3~30% 的范围中显示了不明显但有用的复原。试样干燥到最后含水量大于 30% 时,则似乎无异于冷冻精子。

问题及回答

问: 在关于残留含水量方面, 是否在精子细胞里有一定数量的水份永远不能被干燥吗? 是否有方法确定这一点?

答: 是有方法的。但还没有使用。我们主要是研究残留水份。所研究的试样在加热完全干燥时约为 11% 的干物质。其余的就是残留水份。所以我们要想办法去掉约 89% 的水份。现