

家畜冷 冻精液

张坚中 徐铁铮

中国农业科技出版社



家畜冷冻精液

张坚中 徐铁铮 编著

内 容 提 要

本书的中心内容是介绍了家畜精液冷冻保存技术。主要包括家畜精液冷冻保存的发展历史和现状、冷冻机理、稀释液、精液冻前处理、冻精的剂型、冷冻方法、解冻方法及冻精的贮存。

此外,本书还涉及了精子、精液有关的基本理论,以及品质评定、输精等问题。

本书可供有关大专院校师生,特别是从事家畜繁殖及冷冻精液研究的技术人员阅读、参考。

家畜冷冻精液

张坚中 徐铁铮 编著

责任编辑 杜洪

封面设计 马钢

中国农业科技出版社出版(北京海淀区白石桥路30号)

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京巨山印刷厂印刷

开本: 787×1092毫米1/32 印张: 8.25 字数: 190千字

1988年12月第一版 1988年12月第一次印刷

印数: 1—14500册 定价: 2.80元

ISBN 7-80026-079-8/S·49

前 言

人们很久以来一直在设想如何能保存家畜的精液，经过不断地探索研究，才发展到今天所用的、效果较好的家畜精液冷冻保存的技术。

据说早在18世纪，已有人观察到可用雪来保存马的精液（据Spallanzani）。至19世纪末，已有记载人的精子可在 -17°C 保存（Devenport, 1897），在本世纪前半叶，有人报导人的精子在玻璃管内 -79°C 下可保存40天之久；也可在 -196°C 和 -269°C 超低温下保存。其后，有人提出一个理论，认为活细胞只要在冻前迅速脱水，冻时急速降温，使细胞内的水来不及形成冰晶（玻璃化），就不致损伤精子；在冷冻下精子代谢程度降低，这样就可以长期保存（Luyet及Gehemio, 1940）。以后，逐渐发展了抗冻保护剂，如加入10%甘油后可使蛙精子在 -4°C 至 -6°C 下不会受冷冻的影响（Rostand, 1946）。1950年，Smith和Polge在柠檬酸钠液中加入10%甘油，在 -79°C 下保存牛精子而首次获得成功，得到了第一头用冷冻精液生下的犊牛，为家畜繁殖和人工授精开辟了一个新纪元。在近30多年来，低温冷冻保存家畜精液的研究、应用，发展甚为迅速。

低温冷冻长期保存精液的主要目的有三：（1）可以不受地域限制。只要把良种公畜精液在超低温下保存，这样就可以运到任何一地为母畜输精，不需要再从远处引进活的种畜了；（2）可以不受种公畜生命的限制。在优良种公畜死

后，仍可用它生前保存下来的精液输精，产生后代。这样就可以把最优良的遗传物质（基因）长期保存下来，随时可以取用。目前许多国家，包括我国在内，都建立了精液库；

（3）可以最大限度地扩大优良种公畜的利用率。大规模的应用冷冻精液人工授精，可以更加迅速地提高畜群的生产力。据国外估计，一头种公畜，如能使它冷冻保存下的精液充分发挥潜力，就能配大数量的母畜：牛5万头，绵羊、山羊5千头，猪2千头，对家畜的改良起到很大作用。

我国自60年代以来，由于全国畜牧科技工作者的不断努力，在家畜冷冻精液的研究和应用方面都取得了很大进展。就近年来国外和国内所报导的较系统较全面的情况加以比较，即可看出：（1）在奶牛中，国外几乎全部用冻精输精，如美国930万头母牛100%用冻精，法国700万头母牛99%用冻精。我国奶牛数虽少，但大都采用冻精，城郊奶牛用冻精的接近100%。（2）在马中，国外试用冻精的国家虽不少，但匹数不多，最多的为南斯拉夫1482匹。我国1979年用冻精配母马的已达1977匹（情期受孕率达65%）。（3）在绵羊中，国外应用冻精的大多在试验阶段，用冻精最多的为澳大利亚（1500只）和民主德国（2000只）。而我国在1978年用冻精输精母羊已达5734只，据最近总结，1982年冻精输精母羊14617只（情期产羔母羊率46.2%，其中养羊条件较好的达52.2%）；1983年冻精输精母羊17485只（情期产羔母羊率49.9%），这样大数量和较好的效果（据本书著者张坚中未发表的资料），在国外尚未见报导。（4）在猪中，国外用冻精最多的国家是美国，9000头，占人授母猪（9万头）的10%。我国人授母猪虽甚多（1975年97万头），但用冻精输精的还不普及（1978年757头），仅广西应用较

多，自1975年以来，共计有13 249头，情期受胎率达75.7%（据1974年全国猪冻精会上不完全统计）。

公畜精液可在超低温下（一般在 -196°C 液氮中）长期保存。目前国外都建立了精液库。美国1979年生产的冷冻牛精液（按输精剂量计），在国内应用1 246万份，向国外输出183万份，并仍在不断增多，对普及和迅速提高家畜生产能力起到了很大作用。我国在家畜精液冷冻保存技术上有很大发展，在推广应用已取得一定效果，在许多地方还建立了牛精液库。因此，很有必要总结国内外有关家畜精液冷冻保存的技术方法，以便在生产应用中不断提高技术，扩大冻精应用规模，取得更高的效益，著者就是为此目的而编写本书的。

本书的中心内容在于详细介绍各种家畜（主要是马、牛、羊、猪）精液冷冻保存的技术方法，以及有关的理论；叙述了稀释液的配制，抗冻防护剂的种类、含量及效果。特别在稀释液的配制方面，著者用较多篇幅作了详细介绍。在技术方面，介绍了精液在冻前的处理，稀释倍数和方法，降温平衡，包装方法，冷冻和解冻程序等。

为了提高受胎率，本书中还介绍了评定精液品质的方法，输精的适宜时间、部位、输入精子数和输精次数等；并叙述了影响受胎率的若干因素，如畜种、个体、气候等等。

为了便于读者了解有关家畜生殖细胞的理论，本书在开始时为读者提供了若干基础知识。

本书在叙述精液冷冻保存时也涉及到了冷冻的机理，冷冻对细胞（细胞质与细胞膜）造成的损害，同时也介绍了各类抗冻保护剂的作用。

由于家畜精液冷冻保存的重要性，以及近年来国内外精

液冷冻保存技术的迅速发展，广大科研人员迫切需要有一本这方面的参考书，为此我很乐于应著者的要求，向广大读者推荐此书，并为本书写此〈前言〉。

郑丕留
一九八五年五月

目 录

前 言

第一章 精子和精液 (1)

第一节 精子的发生和精液生产 (1)

一、种细胞的分裂和变化 (1)

二、精子发生周期和精细管上皮周期 (3)

三、精子发生与精子数量和质量的关系 (4)

四、每日精子生产和产量 (5)

五、影响精子产量的若干因素 (7)

六、增加精子产量的途径 (10)

第二节 精子的形态和结构 (12)

第三节 家畜精液的化学成分和生理生化特性 (15)

一、精液的成分及其作用 (15)

二、精子的生理特性 (21)

三、影响精子在体外存活的主要因素 (25)

第二章 受精 (29)

第一节 配子在母畜生殖道的运行 (29)

一、精子在母畜生殖道的运行 (29)

二、卵子的运行 (30)

第二节 配子在受精前的准备 (32)

一、精子的获能 (32)

二、卵子在受精前的准备 (34)

第三节 受精过程的形态变化	(35)
一、顶体反应	(35)
二、精子穿过透明带	(36)
三、精、卵质膜的融合	(37)
四、卵子对精子穿入的反应	(37)
五、雌、雄原核形成	(39)
六、受精过程所需要的时间	(39)
第四节 促进受精的因素	(39)
一、精子和卵子的质量是促成受精的先决条件	(40)
二、良好的配种质量有助于配子的结合	(41)
三、配子的运行正常有利于顺利结合	(41)
四、数量的精子也是促成受精的必要因素	(41)
五、适当的受精时间是提高受精率的保证	(42)
第三章 精液冷冻的机理	(43)
第一节 概论	(43)
第一节 水在冰冻过程中的一些物理现象	(45)
一、过冷溶液及冰结晶	(45)
二、水形成冰晶的过程	(46)
三、水的玻璃态	(48)
第三节 冷冻对细胞造成的损伤	(49)
一、细胞内外的溶质浓度增高	(49)
二、细胞脱水	(50)
三、蛋白质变性	(50)

第四节 冷源	(164)
一、干冰	(164)
二、液氮	(167)
第五章 家畜精液品质的评定方法	(174)
第一节 肉眼检查法	(175)
一、外观	(175)
二、射精量	(175)
三、pH值	(176)
第二节 显微镜检查法	(177)
一、利用光学显微镜评定精液品质的方法	(177)
二、利用电子显微镜观察精子超微结构的方法	(196)
第三节 理化检查法	(198)
一、光电比色精子密度测定法	(198)
二、酶的测定	(201)
三、精子抗力试验	(206)
四、利用凝胶——交联葡聚糖过滤 评定精液质量的方法	(206)
第四节 冷冻精液的卫生及其检疫	(210)
第六章 输精	(215)
第一节 输精技术	(215)
一、发情鉴定	(215)
二、最适输精时间	(217)
三、输精方法	(220)
四、输精标准	(221)
第二节 影响冷冻精液受胎率的因素	(222)
一、精液的品质	(222)

二、母畜的体况和繁殖机能	(233)
三、输入精子数	(236)
四、输精时间和次数	(237)
五、输精方法	(241)
主要参考文献	

第一章 精子和精液

第一节 精子的发生和精液生产

精子是在睾丸的曲精细管内形成。曲精细管上皮的精原细胞经过一系列的分裂和增殖，最终形成精子的全过程称为精子发生。精子在附睾内成熟，并贮存到射精，这是一个非常复杂的过程。精子的发生和成熟过程直接影响到精子的数量和质量。

家畜在出生时，精细管还没有管腔，睾丸内只存在两类细胞，即性原细胞和未分化细胞。公畜达到一定年龄后，性原细胞才转变成精原细胞，精子的发生即以此为起点。未分化细胞则变成支持细胞，它虽不直接参加精子的发生，但对种细胞却起着营养和支持的作用，特别对精子形成有着密切关系。牛和羊，约在生后6月龄和4月龄，支持细胞停止分裂和增殖，保持数量的恒定；而精原细胞则一直不断地分裂增殖直到成年。公畜到了性成熟期，开始释放第一批精子。性成熟以后的一段时期内，不仅精子发生的日产量有所增加，而且睾丸也在生长。随后，家畜进入成年时期，睾丸停止生长，精子每日生产和精子的每日产量才趋于稳定。

一、种细胞的分裂和变化

从精原细胞开始到最后变成精子，须经过复杂的分裂和

形成过程。在此过程中，染色体数目减半。细胞核和细胞质也发生显著的变化。这一过程在牛、绵羊和马大体相似，可划分为两个时期，四个阶段。但在猪和其他动物可能有些差别。

第一个时期称为精母细胞发生期，此期可分为三个阶段。第一阶段，细胞生长、分裂和增殖，形成三类精原细胞：（1）A型精原细胞（简称A型细胞），细胞质较少，呈椭圆形，核中散布着微细的染色质颗粒；（2）中间型精原细胞，由A型细胞分裂而成，核内含有丰富的染色质；（3）B型精原细胞（简称B型细胞），由中间型细胞增殖而成，具有浓厚的染色质，核圆而小，核膜明显。在精原细胞分裂时，染色体容易区别，A型细胞的分裂前期染色体变长，而B型细胞的分裂前期染色体则缩短。染色体数目与体细胞相同。一个精原细胞经过四次分裂后，在反当动物和马各可获得16个初级精母细胞，猪可能分裂成24个。这个阶段持续约15—17天。

第二阶段：由初级精母细胞开始进行种细胞的减数分裂，它的细胞核与B型细胞很相似，容易被误认。染色体分散在核内，变成染色质纤丝，在分裂前期的开始称为前细线期。继后，进入分裂前期，按细胞学的传统再分成五期，即细线期、合线期、粗线期、双线期及缩线期。分裂前期经过的时间较长，接着就是分裂中期、后期到末期，终于由每个初级精母细胞分裂成两个次级精母细胞，其中的染色体减半成为单组，细胞较小，核呈圆形。这个阶段一般可达15—16天。

第三阶段：再由每个次级精母细胞分裂成两个精细胞。因此，每个初级精母细胞经过二次成熟分裂，最后形成四个精细胞。这个阶段一般不超过一天。

第二个时期称为精子形成期，即第四阶段。精细胞不再分裂，而在支持细胞的顶部经过变形过程形成精子，约要10—15天。这个时期精细胞在形态上发生急剧的变化，细胞核变成精子头的主要部分，细胞质包括核糖核酸，水分和糖原大部分消失，原呈圆形的细胞逐渐缩小，由其中的中心小体逐渐生成精子的尾部。由高尔基体变成精子的顶体，线粒体聚集在尾的前段周围。每个精子形成后，从支持细胞上解脱出来，进入睾丸的精细管腔内，在附睾达到成熟并贮存于附睾尾部。交配时，通过平滑肌的收缩，精子被送入雄性生殖道并排出体外。

二、精子发生周期和精细管上皮周期

家畜精子发生是从A型精原细胞开始，经过精母细胞发生期和精子形成期，最后形成精子，这个过程叫精子发生周期。在一个精子发生序列完成过程当中，精细管的同一部位若干个新的精子发生序列陆续出现，因此，在精细管的任何一横切面上都可以看到若干代生殖细胞的重叠。由于各代生殖细胞的发育是彼此密切关联着的，所以，精细管上皮就形成一定的细胞组合系列。某一精细管上皮的固定区域，两个相同的细胞组合系列出现之间所发生的一系列变化的时间过程，称为精细管上皮周期。就是说，一个精子发生周期当中就包含着若干个精细管上皮周期。在时间过程上表现为，一个精子发生周期所需要的时间相当于若干个精细管上皮周期所需要的时间。

精细管上皮周期，牛为13.5天，马为12.2天，羊为10.3天，猪为8.6天，水牛为8.6天。牛和羊的精子发生周期相当于4.68个精细管上皮周期。为便于计算，将精子发生周期定

为4.5个精细管上皮周期，因此公羊精子发生的时间大约为46天(10.3×4.5)。

由A型细胞最后变成精子的时间，各种动物并不相同，由于测定技术的影响，结果不十分准确。如牛约60天，马可能49天或刚超过50天，绵羊约49—50天，猪约44—45天，水牛大约为38天。

三、精子发生与精子数量和质量的关系

精子发生数量的效能在很大程度上取决于生殖细胞分裂的状况。精子的形成则在很大程度上制约着精子的质量。

精原细胞分裂情况决定了初级精母细胞产生的数量。各种家畜精原细胞有丝分裂的有效系数可用有丝分裂指数来表示（细线期/A₀精原细胞+A₁精原细胞）。各种家畜的有丝分裂指数是不同的，牛和羊，有丝分裂指数为16；猪为28；但是，当公牛发生异常时，有丝分裂指数可降到10；用长日照处理的公羊也减至10或更低。

在公羊的精子发生过程中，数量减少的主要危险期，可能是处于中间型的精原细胞。公羊的正常精子发生与非正常精子发生相比，在A型精原细胞阶段，两者数量的差异不大（ 5.1 ± 0.65 与 4.6 ± 0.5 ），而经过中间型精原细胞阶段到B型精原细胞阶段时，两者数量上的差异显然增大了（ 17 ± 1.6 和 12.8 ± 1.1 ）。在对牛的研究中，同样认为，中间型精原细胞最易受干扰。例如，一个A型精原细胞，理论可分裂为48个初级精母细胞，而实际上仅产生16个，这是由于从A₁型精原细胞分裂到B₁型精原细胞时发生退化性变化的结果。

决定精子数量的第二个关键时期是在精子发生周期中的减数分裂阶段，减数分裂效果用减数分裂指数表示。据测

定，公羊平均减数分裂指数为63。一定数量的初级精母细胞不能通过合线期阶段。例如，当公羊受长日照处理时，初级精母细胞产生固缩核。另外，常见的异常是由于缺少第二次成熟分裂，导致产生二倍体的性细胞。有人曾认为，用长日照处理公羊，从性原细胞到A₁型精原细胞、A₁型精原细胞到中间型精原细胞、中间型精原细胞到初级精母细胞粗线期、初级精母细胞到减数分裂后期，变性细胞的总数分别占10%、23%、36%和43%。由此可见，精子发生数量在精子发生的各个不同阶段都有程度不同的下降。在公羊和公猪，当阴囊的温度人为地增高至41℃，并持续3小时，粗线期的精母细胞很快地被破坏掉。

精子形成包括细胞核和细胞质的一系列复杂变化过程。这里需要着重指出，精子形成过程中，支持细胞实际上控制着生殖细胞与环境之间的交流。在研究人类男性避孕方面发现，支持细胞不仅供给各级生殖细胞养料，而且血流中的药物及毒素也只有通过支持细胞才能到达各级生精细胞。人们熟知，形态异常的精子影响受孕率。牛和羊的精子细胞在核变形伸长时，精子细胞核的基部收缩，易形成梨形精子，而梨形精子的形成与公牛繁殖低下相关联。一般认为，大约从次级精母细胞期开始，直到射精，精子的抗原性越来越强，这显然与发育中的性细胞内部的生物化学变化有关；另一方面也与精子由睾丸生成到精子被射出的过程中从周围体液中摄取可溶性的抗原有关。

四、每日精子生产和产量

每日精子生产 (DSP) 指睾丸内每日形成精子的总数。
每日精子产量 (DSO) 指每日实际可采集的精子数。家畜精