

馬精液冷冻保存及其受精效果

吉林农业大学兽医系产科及人工受精教研室

一九五〇年 Smith 及 Potge 两氏发现于精液中加入一定量的純甘油, 即使精液的温度降至 -79°C 的超低温时, 精子也能保持生存。一九五二年 Polge 及 Rowson 两氏进一步証明, 用保存在 -79°C 超低温达四周的精液进行輸精, 結果获得受胎。这些研究的結果, 給以后的精液冷冻保存的研究开辟了广濶的途徑。以后各国相繼对精液冷冻保存进行了研究, 使冷冻技术愈来愈趋于完善。到目前为止, 牛精液的冷冻保存, 达到了六个月, 最长达 1—2 年之久, 精液仍有受胎能力, 並且已被应用在牛的人工授精工作中。

一九五四年苏莫夫斯基氏研究了馬精液的冷冻保存, 根据它的研究結果, 精子的活力在冷冻一个月后, 保有冻前的 80%; 保存到四个月, 精子仅有冻前 50% 的活力。一九五五年 Poy 氏也对馬精液的冷冻进行了研究, 結果冻后的精子活力, 只佔最初的 60—70%。目前我們还没有蒐集到关于应用馬冷冻精液进行授精試驗的材料, 馬的精液冷冻保存还没有达到实际应用的地位。

为了提高优良种公馬的配种效率, 研究馬精液的冷冻长期保存法, 以使达到能够在实际中应用, 对于馬匹的繁殖和改良工作, 是有着重要意义的。一九五八年十月, 在农业部召开的精液保存問題的座談会之后, 我們在校党委及省农业厅的領導和支持下, 从該年十月二十五日起, 到一九五九年八月止, 先后分两阶段进行了馬精液冷冻保存及其授精試驗。在第一阶段, 我們經過多次試驗改进和确定了较为合适的精液冷冻技术; 在第二阶段, 又应用冷冻的馬精液, 对母馬进行了授精試驗, 取得了良好的成績。

一、精液冷冻保存技术

为了使精子在冻后能保有較高的活力, 我們首先对精液冷冻保存方法进行了多次的比較試驗。

我們采用了我校三匹种公馬的精液, 为冷冻保存的材料。种公馬是为武(阿尔登杂种)、为阿(阿尔登杂种)及为兴(三河种)。在一般的飼养条件下, 每隔 1—3 天采精一次。

我們是利用固体二氧化碳(干冰)进行精液冷冻的, 它是吉林化肥厂所生产的液体二氧化碳, 从鋼筒中放出后, 形成固体的二氧化碳。它的温度为 -79°C 。

馬精液的冷冻以苏联养馬研究所提出的馬精液稀釋液为試驗的基本方法。在此基础上, 我們对于精液的冷冻技术, 尤其是其中若干主要环节, 例如精液的稀釋液的卵黄量与甘油量、稀釋倍数、冻前精液稳定時間、冷冻方法和降温速度及解冻方法等, 进行了多次試驗, 初步改进並确定了较为合适的冷冻保存的方法。

(1) 精液的鑑定与稀釋: 采取公馬精液, 滤过后立即进行鏡檢, 鑑定精液的品質。用于冷冻保存的精液質量: 精液量須在 40 毫升以上, 每毫升含有一亿以上的精子, 精子活力为 0.6 以上, 方为合格。其次用葡萄糖卵黄甘油稀釋液, 按 1:2—4 进行稀釋。稀釋精液时, 必須在 18°C — 25°C 的室温下, 並且要保持稀釋液与精液的温度相等; 同时操作要細致, 避免冲击精子, 以防减低精子的活力。

精液稀釋按苏联原法其配方是无水葡萄糖 7.0, 蒸溜水 100.0; 新鮮卵黄 0.75, 純甘油 5.0。根据我們的試驗, 应用下列处方, 精子在冻前可保有較高的活力(見表 1 及表 2)

无水葡萄糖	7.0	蒸溜水	100.0
新鮮卵黄	1.6	純甘油	10.0

表1 稀釋液中甘油量与冻后精子活力的关系

稀釋液中的甘油量 (毫升)	5	8	10	12	14
冻后精子的活力 佔冻前活力的百分率	0.43 66.2%	0.48 74.6%	0.52 80.0%	0.52 80.0%	0.47 72.3%
备 注	1、稀釋液中卵黃量为0.75, 2、此表是三匹公馬九次試驗的平均值				

表2 稀釋液中卵黃量与冻后精子活力的关系

稀釋液中的卵黃量 (毫升)	0.75	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
冻后精子活力 佔冻前活力的百比率	0.54 76.5%	0.58 85.3%	0.59 86.8%	0.59 86.8%	0.62 91.2%	0.58 85.3%	0.54 76.5%
备 注	1. 稀釋液中甘油量为10.0, 2. 此表是5次試驗的平均值。						

(2) 精液的分装: 稀釋过的精液, 經再一次檢查, 認为精子活力无大变化时, 即通过連接在分液漏斗上的細长針头, 緩慢地将精液分注于 25 毫升的安瓶內, 每瓶注入 20 毫升以上。但要注意所有接触精液的用具, 不仅要保持无菌, 而且温度亦須与精液温度相等。

分注后, 立即用酒精噴灯火焰封閉安瓶口。封口的操作須敏捷迅速, 以免安瓶頸部以下部分温度增高, 影响精子的活力。

(3) 精液冻前的稳定: 为使精子能耐受 -79°C 的超低温, 在冻前将精液安瓶放在 0°C 环境下达一定時間, 是有着重要意义的。方法是将精液安瓶以三层紗布包好, 直接放于装有普通冰块的 0°C 广口暖瓶內, 或者置于 0°C 的水箱內, 使之自动降温。大約經 3 小时左右, 精液即可降至 0°C 。

稳定的時間按苏联原法为 6 小时, 但根据我們的測定, 以 12—16 小时为佳。精液在冻后活力較高些, 並且解冻后在 0°C 下的精子存活時間亦較长 (見表 3)

表3 冻前在 0°C 下的稳定時間对冻后精子的影响

稳 定 时 間	6	12	16	20	24
冻后精子活力 佔前后活力的百分率	0.48 80%	0.50 83.3%	0.50 83.3%	0.48 80%	0.42 70%
解冻后在 0°C 下存活時間	53—103	53—110	53—105	41—57	41—66
备 注	此表結果是三次試驗的平均值				

(4) 精液的冷冻与保存: 精液的冷冻須从 0°C 开始, 逐漸降至 -79°C , 則对精子的活力影响極小。冷冻方法有二; 一法是在容量 500—800 毫升的燒杯內注入 96° 的酒精, 插入一支低温度計。首先加少許固体二氧化碳 (干冰), 使酒精的温度降至 0°C 以后, 立即将精液安瓶从 0°C 的暖瓶或冰箱內取出, 放入燒杯內。以后, 即按一定速度添加干冰降温至 -79°C , 使精液冻结。冻结的精液安瓶即放入广口暖瓶內, 用碎干冰包埋之即可。另一方法是, 于暖瓶內装入酒精, 降温至 0°C 后, 即于其中冻结精液。此酒精温度达 -79°C 时, 即将精液安瓶保存該暖瓶內。

降温速度根据我們的比較試驗，認為按下列的速度进行冷冻，对精子活力影响較小（見表 4）。

0°C ~ -15°C	每分鐘降 0.7°C (三分鐘降 2°C)
-15°C ~ -40°C	// 2°C
-40°C ~ -79°C	// 3.4.5°C

表 4 降温速度对冻后精子活力的影响

精液冷冻方法 和降温速度	0 ~ -15°C -15 ~ -40°C 每分鐘降 1°C -40 ~ -79°C 3.4.5°C	0.7°C 每分鐘降 2°C 3.4.5°C	0.7°C 每分鐘降 1°C 3.4.5°C	0.5°C 每分鐘降 2°C 3.4.5°C
冻后精子活力 佔冻前活力百分率	0.57 85.6%	0.6 90.1%	0.57 85.6%	0.58 87.1%
备 注	此表結果是三次試驗的平均值。			

精液安瓿保存于广口暖瓶之后，为了始終保持瓶內溫度在 -79°C，每日須檢温一次。当发现溫度稍有升高时，应再添加干冰，否則即会显著地降低精子的活力。

(5) 精液的解冻：欲檢查或使用冷冻精液时，首先从暖瓶內取出精液安瓿，进行解冻。根据我們的試驗，冻结的精液安瓿，無論置于 20°C 室温下或浸入 18°C ~ 20°C 的水温中，进行解冻，精子的活力均不受影响。特別在水温中解冻时，只需 5 — 7 分鐘即可完全解冻，此法比較迅速（見表 5）。水温高于 38°C 时，对精子的活力及存活時間均稍有影响。

表 5 冻结精液解冻的溫度对冻后精子活力的影响

解 冻 溫 度	水温 5°C	水温 10°C	水温 15°C	水温 20°C	水温 38°C	室 温 18 ~ 20°C
解冻需要時間(分)	30-40	20-25	8-10	5-7	3-4	40-50
冻后精子活力	0.53	0.53	0.53	0.53	0.52	0.53
佔冻前活力的百分率	86.4%	86.4%	86.4%	86.4%	83.8%	86.4%
解冻后在 0°C 下的存活時間	100-150	100-150	100-150	100-150	52-100	105-150
备 注	1、此表結果是三次試驗平均值。 2、精液安瓿容 25 毫升精液。					

冷冻的精液解冻后，稍稍振盪安瓿，即打开瓿口，滴一滴于載物玻片上，盖上复盖片，准备鏡檢。解冻的精液的精子並不立即复苏，須在 38°C - 42°C 的溫度中，約經 5 — 7 分鐘左右，方能全部恢复其活动力。因此可采用显微镜恒温箱或用显微镜电气恒温装置进行加温。为使判定結果不致发生錯誤，一般做三次滴片檢查。精液經檢查合格后，即可用作輸精。

(6) 精液冷冻保存的成績：我們根据上述初步确定和改进的冷冻方法，对三匹种公馬的精液进行了多次的冷冻保存試驗，获得了良好成績（見表 6）。

表 6 三匹种公馬精液冷冻保存的成績

种公馬名	冷冻保存 期間(天)	精子冻前的 活力(平均)	解冻后精 子的活力	佔冻前活力 的百比率	解冻后在 0°C 下的存活時間	备 注
为 武	5~35	0.65	0.55~0.60	84.6~92.3%	130	此表是三次試驗的 結果
为 阿	5~35	0.7	0.6~0.65	85.7~92.9%	150	
为 兴	5~15	0.6	0.5	83.3%	80	

冷冻后的三匹公馬精子的活力，达到了冻前的80—90%以上，並且保存到35天时，精子的活力沒有明显的减低。解冻后在0°C下的精子存活時間达80—150小时。由此可以証明：我們初步所改进和确定的馬精液冷冻操作方法是适合的，用此种方法保存精液可以保有精子較高的活力，並在解冻后在0°C环境下精子的存活時間亦較长。

二、冷冻精液的受精效果

为了驗証冷冻精液的受精效果，我們于1959年4—7月期間，对來我校人工授精站的一部分发情母馬，应用冷冻精液进行了輸精。我們先后选择了卵泡发育到“φ4”的发情母馬八匹。所有母馬的輸精次数，在第一次輸精后48小时内排卵者，即不再輸精；超过48小时而未排卵者再輸第二次。八匹母馬中34号及56号虽判定需要进行第二次輸精，但因故未輸，故列为中途停配。所用的精液是保存到3—11天的冷冻精液，其活力均合乎輸精的要求，輸精量及稀釋后的濃度均按一般的輸精規定，只是稀釋倍数有4例为1:6倍，高于我們所确定的稀釋倍数。輸精試驗均在一個发情期內，並在輸精1个月后对輸精母馬应用阴道与直腸檢查及小动物試驗，先后进行了两次的妊娠鑑定。

經過輸精及妊娠鑑定的結果表明：八匹母馬中，除两匹为中途停配者外，其余六匹母馬仅在一個发情期內，已經确認為妊娠者共有三匹。授精試驗結果如表7：

表7 冷冻保存精液之授精試驗成績

輸精母馬号数	卵 胞 发 育 程 度	輸入冷冻精液的质量					輸精次数	妊娠鑑定	备 註
		輸精量(毫升)	稀釋倍数	每毫升精子数(万)	冻后精子活力	保存天数			
9	左“φ4”	20	1:6	2,500	0.5	6	2	—	1. 此項試驗結果为一个发情內輸精的成績； 2. 34及56号母馬中途停配。
11	左“φ4”	20	1:3	5,000	0.55	11	2	+	
12	左“φ4”“近”	20	1:3	5,000	0.5	10	1	+	
33	右“φ4”	20	1:6	2,500	0.55	3	1	—	
34	左“φ4”	20	1:6	2,500	0.5	4	1	—	
26	左“φ4”	20	1:6	2,500	0.5	6	1	+	
55	左“φ4”	20	1:3	5,000	0.4	10	1	—	
65	右“φ4”“近”	20	1:3	5,000	0.5	7	1	—	

三、討 論

1、我們原应用苏联养馬研究所提出的精液稀釋液配方，对三匹公馬精液进行冷冻保存时，結果不能令人滿意。因此，我們对精液稀釋液的甘油量与卵黃量、稀釋倍数、冻前稳定時間、冷冻方法与降温速度、解冻方法及一系列的冷冻保存操作方法进行了探討与試驗，初步改进和确定了較为合适的冷冻保存方法。但是我們所使用的公馬仅仅三匹，为了驗証这种冷冻保存方法的效果，有必要对更多数的公馬精液进行冷冻保存試驗。

2、根据文献的报导，公馬精液冷冻保存可达3—4个月之久，只是到冻后3—4个月时精子活力发现降低。我們由于某些条件所限，仅对公馬精液冷冻保存到35天，精子活力沒有明显减低，但在冻后能保存多長時間而仍保有受精能力，这是值得进一步研究的问题。

3、根据我們的試驗証明，冷冻精液是可以使母馬受胎的，而且受胎率也屬正常。但我們所做的授精試驗的例数較少些，故还不能确实地反应出冷冻精液的受胎效果的高低，有待于今后进一步对大批母馬进行授精試驗来証实。

4、精液冷冻保存是一种精液长期保存法，它的最大优越性是在于扩大优良种公馬的配种范围，發揮

种公馬配种率，因之对于馬匹的繁殖和改良是有着重要意义的。根据試驗結果，我們認為馬的冷冻精液可以应用在人工授精工作中；如果能在配种季节前采取精液，进行冷冻保存，到配种季节使用，則可提高优良种公馬配种效率50%以上或者更多一些。

四、結 論

1、我們反复地試驗和探討了精液冷冻保存技术，初步改进並确定了較為合适的精液的冷冻保存方法。

2、以我們初步确定的冷冻保存方法，对我校三匹种公馬精液进行了冷冻保存試驗，結果冻后的精子活力达到了冻前的80—90%以上，解冻后在0°C下的保存時間达到了80—150小时。

3、我們因受条件所限，冷冻精液的保存期間，最短为5天，最长到35天。保存到35天的精子活力，与保存到5天比較，沒有明显降低。

4、应用保存到3—11天的冷冻精液，給八匹发情母馬进行了輸精，除中途停配的两匹外，仅在一个发情期內，六匹母馬中已確認有三匹妊娠。（肖音整理）

五、主要参考文献

- 1、古巴列維奇著，兽医产科学及雌畜科学，1958. 1，382—384頁，黃宗鑾等譯。
- 2、西川义正著，家畜人工授精法，1956，530—559頁。
- 3、Г. Ильинская，在-70°C冰冻公馬精液时某些因素对其稳定性的影响，畜牧兽医譯报，1958，第一期，41—43頁。
- 4、X. Хабибуллин，冰冻状态中长期保藏公牛的精液，牲畜精液冷冻資料，黑龙江农业厅畜牧兽医处汇编1958. 8月，4—6頁。
- 5、公馬精液低温冷冻保存初步总结材料，黑龙江畜牧研究所。
- 6、Ю. В. Галкин 著，低温保存綿羊精液，中国畜牧兽医雜誌，1955，4期，168頁。
- 7、介紹一种低温（—79°C）长期貯藏精液方法，中国科学院畜牧研究所印发材料。
- 8、牲畜精液冷冻資料汇编，黑龙江省农业厅畜牧兽医汇编，1958. 8月。
- 9、Smith A. U., and Polge, (1950); Vet. Res., 62: 115.
10. Polge, C., and Powson, L. E. A. (1952); Rep. and int. Congr. Anim. Repro. 1952, 3: 90.