

海藻糖对猪精子冷冻真空干燥保存效果的影响

孟祥黔^{1,2,3}, 顾晓龙^{1,2,3}, 吴彩凤^{2,3}, 戴建军^{2,3}, 张廷宇^{2,3}, 谢一妮^{1,2,3}, 吴志强^{1,2,3},
刘亮^{2,3}, 马恒东¹, 张德福^{2,3}

- 1 四川农业大学生命科学与理学院, 雅安 625014
- 2 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106
- 3 上海农业遗传育种重点实验室 动物遗传工程研究室, 上海 201106

摘要: 猪精子经冷冻干燥后, 在光学显微镜和电子显微镜下观察其超微结构, 并借助辅助生殖技术将其注入猪卵母细胞后, 进一步观察受精卵的发育情况。结果表明: 海藻糖组雄原核形成率 (68.52%)、卵裂率 (59.17%) 和囊胚率 (19.16%) 优于 EDTA 组 (64.59%、56.26% 和 15.62%) 和对照组 (35.36%、52.33% 和 8.60%) ($P < 0.05$); 海藻糖组的冷冻真空干燥猪精子分别在 4℃ 下保存 60、120、180 d, 雄原核形成率、卵裂率和囊胚率均无显著差异 ($P > 0.05$); 海藻糖组的冷冻真空干燥猪精子复水化后孵育 1 h 和 2 h, 卵裂率、卵裂率和囊胚率均差异显著 ($P < 0.05$); 海藻糖处理组与 EDTA 处理组中的冷冻真空干燥猪精子分别在 4℃ 和 -20℃ 下保存后各处理组间精子形态差异不显著 ($P > 0.05$); 海藻糖组中 B 级冷冻真空干燥精子百分数显著多于 EDTA 处理组 ($P < 0.05$)。超微结构分析表明, 冷冻真空干燥猪精子的损伤主要表现在顶体和颈部的肿胀与缺损、尾部断裂。

关键词: 猪精子, 冷冻真空干燥, 单精子注射

Effect of trehalose on the freeze-dried boar spermatozoa

Xiangqian Meng^{1,2,3}, Xiaolong Gu^{1,2,3}, Caifeng Wu^{2,3}, Jianjun Dai^{2,3}, Tingyu Zhang^{2,3},
Yini Xie^{1,2,3}, Zhiqiang Wu^{1,2,3}, Liang Liu^{2,3}, Hengdong Ma¹, and Defu Zhang^{2,3}

- 1 Animal Science & Technology College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China
- 2 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China
- 3 Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

Abstract: After freeze-drying, the ultrastructure of boar sperms was observed by optical and electron microscopy. The in vitro development ability of the sperm was also examined with intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The rate of male pronuclear formation was (68.52%), for cleavage (59.17%) and for blastocyst formation (19.16%) of the trehalose group (0.2 mol/L), significantly higher than those of the 50 mmol/L EDTA group (64.59%, 56.26% and 15.62%) and the control group (35.36%, 52.33%)

Received: January 11, 2010; **Accepted:** May 21, 2010

Supported by: Shanghai Agricultural Genetics and Breeding Laboratory (No. Shagb2008-03), Youth Science and Technology Development Fund of Shanghai Academy of Agricultural Science (No. 2009(15)), Shanghai Agriculture Committee (No. 2007-3-7), Transgenic Major Projects of New Varieties (Nos. 2009ZX08006-014B, 2008ZX08006-005), Shanghai Municipal Science and Technology Committee (No. 103919N1800).

Corresponding author: Defu Zhang. Tel: +86-21-52235475; E-mail: zhangdefu10@yahoo.com.cn

Hengdong Ma. E-mail: mahengdong007@163.com

上海市农业遗传育种重点实验室开放课题 (No. Shagb2008-03), 上海市农科院青年科技发展基金 (No. 2009(15)), 上海市科技兴农推广项目 (No. 2007-3-7), 转基因生物新品种培育重大专项 (Nos. 2009ZX08006-014B, 2008ZX08006-005), 上海市科委科技成果转化项目 (No. 103919N1800) 资助。

and 8.60%) ($P < 0.05$). After storage for 60, 120 and 180 d at 4°C, no significant difference in the in vitro development was observed ($P > 0.05$). The male pronuclear, cleavage and blastocyst formation after ICSI with freeze-dried spermatozoa incubated for 1 h was superior than those incubated for 2 h ($P < 0.05$). No significant differences in the structures after stored at 4°C or -20°C ($P > 0.05$) were observed between the trehalose group and EDTA group. The percent of B grade freeze-dried boar spermatozoa in the trehalose group was higher than that of the EDTA group ($P < 0.05$). Based on the ultrastructure observation, main cryogenic damage in freeze-dried boar spermatozoa was swelling, damage or rupture in the sperm acrosome, neck and tail.

Keywords: boar spermatozoa, freeze-drying, intracytoplasmic sperm injection

早在 1949 年 Polge 等^[1]首次发现甘油对精子具有冷冻保护作用,同时也进行了精子冷冻真空干燥的试验。以往的研究表明,冷冻真空干燥的精子在复水化后完全丧失运动能力,不能在自然条件下授精,不具备深入研究的意义。由于冷冻真空干燥保存后的精子具有完整的雄性遗传物质,并随着胞内单精子注射技术 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 的不断发展和完善,使这种方法保存的精子能够成功获得后代。目前已经成功应用 ICSI 技术使冷冻真空干燥精子获得发育正常的胚胎,且已相继在小鼠^[2]、大鼠^[3]和兔^[4]等实验动物上获得正常后代。在大家畜 (尤其是猪) 上,冷冻真空干燥精子鲜有报道,仅见 Nakai 等技术获得发育良好的胚胎,但移植后流产^[5]。

冷冻真空干燥的精子可在 4°C 条件下长期保存,无需很多冷藏设备,更容易保存和运输。然而,目前猪精子冷冻真空干燥技术尚处于探索阶段,国际上至今还没有一个被认可的冷冻真空干燥和复水化程序。本研究试图在前人研究基础上,对猪冷冻真空干燥技术进行改进,并借助 ICSI 技术和扫描电镜,探讨海藻糖与 EDTA 在冷冻真空干燥过程中对猪精子的保护效果,以期为提高猪精子乃至哺乳动物精子冷冻真空干燥保存技术提供一些理论和实践基础。

1 材料与方法

本试验中,药品除特殊说明外均购自 Sigma 公司。

1.1 猪精液预处理

猪精液采自上海白猪原种猪场 2~3 岁、健康、性欲旺盛的上海白猪 3 头,手握法采集精液,收集精液中段浓厚部分,经 4 层纱布过滤,除去胶状物。

用 HARMONY 稀释液在等温条件下作 1:1 稀释,保存于保温瓶中,2 h 内运回实验室。取 50 mL 猪精液常温下 600×g 离心 10 min,弃上清加入等体积 Modena 液 (23.5 mmol/L sodium citrate、11.9 mmol/L Bicarbonate、6.3 mmol/L EDTA-2Na、46.7 mmol/L Tris、15.1 mmol/L citric acid、152.6 mmol/L glucose、0.3 mg/mL gentamycin),放入 17°C 恒温冰箱中使精子上浮。30 min 后,吸取上层 10 mL 悬浮液移入离心管中,常温下 600×g 离心 10 min,弃上清后底部沉淀的精子用于以下实验。向含有精子沉淀的离心管中加入 3 mL 冻干保护剂 (50 mmol/L NaCl+10 mmol/L Tris-HCl+0.2 mol/L Trehalose, pH 8.0, 渗透压为 268 mOsm/kg; 50 mmol/L NaCl+10 mmol/L Tris-HCl+50 mmol/L EDTA, pH 8.0, 渗透压为 268 mOsm/kg),保护剂的添加并混匀分为 3 步,每步添加 1 mL 冻干保护剂,添加间隔为 2 min,以便达到渗透压平衡,精子密度为 3×10^8 /mL,最后按照 100 μL/瓶分装到安培瓶中。

1.2 猪精子冷冻干燥及复水化

猪精子冷冻真空干燥:分装后的安培瓶放入冷冻真空干燥仪中,使精子在-40°C 下冷冻 8 h,随后进行冷冻真空干燥,具体参数如下:步骤 I:-40°C~-20°C,压强为 7.0 Pa,冷冻速率为 0.03°C/min,且在-20°C 停留 1 h;步骤 II:-20°C~4°C,压强不变,冷冻速率为 2°C/min,4°C 停留 1 h。设定之后对猪精子进行冷冻干燥。最后对安培瓶进行火焰封口,并保存于 4°C 冰箱中,见图 1A。

冷冻真空干燥猪精子的复水化:水化前对安培瓶进行断口,立即添加 100 μL 的去离子水,充分混匀。

1.3 顶体染色及分级观察

考马斯染色制片:1) 取 1 mL 生理盐水于 1.5 mL

离心管中,加入 200 μL 精液,立即常温下离心,9 168 $\times\text{g}$,15 s(从离心机开始转动时计时);2) 弃上清,加入 1 mL 3.7%的多聚甲醛,固定 0.5 h,再离心,9 168 $\times\text{g}$,15 s(从离心机开始转动时计时);3) 弃上清,加入 1 mL PBS,再离心,9 168 $\times\text{g}$,15 s(从离心机开始转动时计时);4) 弃上清,加入 50~100 μL PBS,取 10 μL 精液于载玻片一头,用一边缘整齐的玻片呈 35 度角将精液样品均匀拖布于载玻片上,制成精液涂片,自然风干;5) 将考马斯亮蓝染液滴于涂片上,染色 20 min,用去离子水轻轻冲洗,晾干备检。

按照精子形态、精子膜、顶体和尾部的完整与否,将精子分为 4 种类型:A.顶体完整(精子头部外形正常,细胞膜和顶体完整着色均匀,顶脊、赤道段清晰)与尾部完整型;B.顶体膨胀(顶体着色均匀,但头部边缘不整齐呈畸形,核前细胞膜不明显或部分缺损)与尾部完整或出现部分断裂;C.顶体破损(顶体着色不均匀,顶体脱离细胞核,形成缺口或陷凹)、顶体脱落(赤道段以前的细胞膜缺损,顶体已全部脱离细胞核),尾部完整或出现部分断裂;D.只剩精子头部。

1.4 冷冻干燥猪精子超微结构观察

扫描电镜:冷冻干燥猪精子经 PBS 洗 2~4 次后,于 2.5% glutaraldehyde 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 6 h,再经 PBS 清洗 3 次,每次 30 min;再于 1% osmium 中固定 1.5 h,然后再经 PBS 清洗 3 次,每次 30 min;之后,用乙醇逐级(30%、50%、70%、90%、100%、100%)脱水,每级 20 min;样品脱水后,用乙酸异戊脂置换;置换后的样品直接移到样品台上,再放入临界点干燥仪干燥,粘台,IB-5 离子溅射仪喷金,置于扫描电子显微镜(PHILIPS2505)下观察、拍照。

1.5 冷冻真空干燥猪精子的显微注射

卵母细胞的准备:自上海市长宁区复兴屠宰场采集猪卵巢,根据本实验室建立的方法进行卵母细胞的成熟培养^[6],挑选有第一极体排除的卵母细胞进行显微注射。

猪冻干精子的准备:复水化后的精子常温下

600 $\times\text{g}$ 离心 2 min,弃上清后加入 500 μL 的 Pig-FM(90 mmol/L 氯化钠,12 mmol/L 氯化钾,25 mmol/L 碳酸氢钠,8 mmol/L 氯化钙,0.5 mmol/L 磷酸二氢钠,0.5 mmol/L 硫酸镁,2 mmol/L 丙酮酸钠,10 mmol/L 乳酸,2 mmol/L 咖啡因,5 mg/mL 牛血清白蛋白和 10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸),并在 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育备用^[7]。

显微注射:将 2 μL 孵育后的冷冻真空干燥猪精子吹入含有 4% PVP 的 N-23 中,再将卵母细胞吹入 N-23 滴中,一次 25 枚左右。最后,持卵针吸住卵母细胞,并调整极体的位置,使其保持在“12 点或 6 点”方向,再横向将注射针中的精子注入卵母细胞中^[7],见图 1 B。

卵母细胞激活和培养:注射后先放入 N-23 中在培养箱培养 20 min,使卵母细胞复原。随后采取电激活(1 000 V/cm)30 s,转入化学激活剂(CHX)中激活,4 h 后转入 N-23 中进行培养观察卵裂率和囊胚率。

原核检查:ICSI 胚胎培养 15 h 后,利用 Hoechst33342 进行荧光染色,以判断精子头部染色体的变化状态。仍为致密染色体的视为雄原核没有形成,精子头部染色体去致密化、膨胀或扩张则视为原核正在形成或已经形成,见图 1 F。

1.6 统计分析

使用 SPSS 统计软件进行分析, $P<0.05$ 时即视为差异显著。

2 结果

2.1 添加不同保护剂的冻干精子对 ICSI 后胚胎发育的影响

以添加 0.2 mol/L 海藻糖和 50 mmol/L EDTA 的冷冻真空干燥猪精子,研究 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 7 d 并观察单精注射后胚胎的发育情况。冷冻真空干燥猪精子水化后孵育时间均 1 h,注射入卵后观察雄原核、卵裂率和囊胚率。由表 1 可知:海藻糖处理组中雄原核形成率(68.52%)显著高于 EDTA 处理组(64.59%)和对照组(未添加保护剂)(35.36%),后者之间差异显著($P<0.05$);添加 0.2 mol/L 海藻糖

的冷冻干燥猪精子在 ICSI 后的卵裂率 (59.17%) 和囊胚率 (19.16%) 较添加 50 mmol/L EDTA 的卵裂率 (56.26%) 和囊胚率 (15.62%) 差异显著, 二者较未添加组 (52.33% 和 8.60%) 均差异显著 ($P < 0.05$)。图 1C、1D、1E 分别为海藻糖处理组, EDTA 处理组和对照组中冷冻真空干燥猪精子 ICSI 后培养 7 d 所获取的囊胚。

表 1 添加海藻糖对 ICSI 后胚胎发育的影响

Table 1 Effect of trehalose on embryonic development

Disposal	No. of oocytes successfully injected	With male pronucleus (%)	Cleavage rate (%)	Blastocyst rate (%)
Trehalose	135	68.52±1.88 ^a	59.17±1.51 ^a	19.16±1.48 ^a
EDTA	115	64.59±1.15 ^b	56.26±1.03 ^b	15.62±1.48 ^b
Control	104	35.36±1.97 ^c	52.33±1.08 ^b	8.60±1.89 ^c

Values with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$); Values with same superscripts in the same column differ no significantly ($P > 0.05$). The experiment was repeated five times. The same as below.

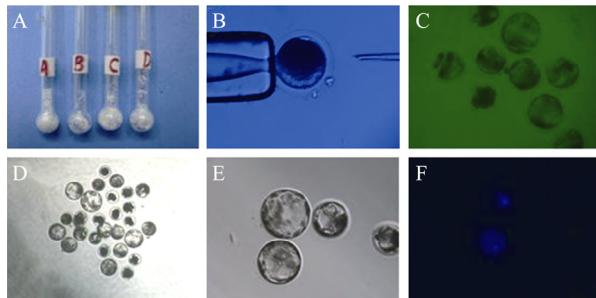


图 1 冻干猪精子及其单精子注射后体外发育

Fig. 1 Freeze-dried boar spermatozoa and the *in vitro* development after ICSI. (A) Freeze-dried boar spermatozoa. (B) ICSI process. (C) Blastula formed from trehalose group. (D) Blastula formed from EDTA group. (E) Blastula formed from control group. (F) Male and female pronucleus.

2.2 冷冻真空干燥猪精子的保存时间对胚胎发育的影响

以 0.2 mol/L 海藻糖作为保护剂的冷冻干燥猪精子, 研究在 4℃ 下分别保存 60、120 和 180 d, 水化后孵育时间均为 1 h, 随后进行 ICSI, 观察雄原核、卵裂率和囊胚率。由表 2 可知: 保存在 4℃ 下 60、120 和 180 d 的冷冻干燥猪精子通过 ICSI 注射后, 雄原核形成率 (69.32%、68.61%、68.14%), 卵裂率 (53.65%、52.60% 和 51.71%) 和囊胚率 (17.82%、17.43% 和 17.15%) 均无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 2 冷冻干燥猪精子不同保存时间对胚胎发育的影响

Table 2 Effect of different storage time of freeze-dried sperm on embryonic development

Time for freeze-drying (month)	No. of oocytes successfully injected	With male pronucleus (%)	Cleavage rate (%)	Blastocyst rate (%)
2	148	69.32±2.35	53.65±1.84	17.82±1.77
4	134	68.61±1.69	53.40±1.42	17.43±2.05
6	137	68.14±2.02	52.91±1.59	17.15±2.36

2.3 冷冻干燥猪精子水化后孵育时间对培养发育的影响

保存在 4℃ 下, 以 0.2 mol/L 海藻糖为保护剂的冷冻干燥猪精子复水化后孵育时间分别为 1 h 和 2 h, 注射入卵后, 对比水化后孵育时间长短对胚胎发育的影响。由表 3 可知: 冷冻干燥猪精子水化后孵育 1 h 和 2 h 后, 雄原核形成率, 卵裂率和囊胚率均差异显著 ($P < 0.05$), 且囊胚率上, 孵育 1 h (17.98%) 的冻干精子优于孵育 2 h (12.67%) 组 ($P < 0.05$)。

表 3 冷冻干燥猪精子水化孵育时间对培养发育的影响

Table 3 Effects of different hydration time for freeze-dried sperm on embryonic development

Hydration time (h)	No. of oocytes successfully injected	With male pronucleus (%)	Cleavage rate (%)	Blastocyst rate (%)
1	136	68.22±2.17 ^a	59.17±2.01 ^a	17.98±1.53 ^a
2	135	66.80±1.21 ^b	53.67±2.36 ^b	12.67±2.47 ^b

2.4 保存温度对冷冻干燥猪精子形态的影响

本试验海藻糖处理组 (0.2 mol/L 海藻糖) 和 EDTA 处理组 (50 mmol/L EDTA) 中的猪冻干猪精子保存在 4℃ 和 -20℃ 下, 180 d 后水化, 对冻干精子整体形态分为 A、B、C、D 四个等级进行染色观察, 结果见表 4, 海藻糖处理组与 EDTA 处理组中的冻干精子分别在 4℃ 和 -20℃ 下保存后各处理组间差异不显著 ($P > 0.05$); 海藻糖处理组中 B 级冻干精子百分数显著多于 EDTA 处理组 ($P < 0.05$)。

表 4 保存温度对冷冻干燥猪精子的影响

Table 4 Effect of storage temperature for freeze-dried boar sperm

Storage temperature (°C)	No. of sperm	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
Trehalose: 4	210	11.42±1.72	78.24±1.80 ^a	7.10±1.41	3.23±1.17
-20	154	10.89±1.65	78.81±1.04 ^a	7.87±2.27	2.42±1.58
EDTA: 4	183	9.46±3.32	74.75±2.14 ^b	10.24±2.16	5.53±1.66
-20	165	9.10±1.25	74.40±1.51 ^b	10.29±2.72	6.20±1.39

2.5 扫描电镜观察冷冻干燥猪精子

通过扫描电镜对冷冻真空干燥保存猪精子进行超微结构观察。由图可知,冷冻真空干燥时添加 0.2 mmol/L 海藻糖作为猪精子保护剂,对精子外部形态具有较好的保护效果。精子在冷冻真空干燥后仍具有较完整的形态,如顶体和尾部(图 2A),冷冻干燥猪精子头部的顶体和赤道清晰可见(图 2B)。冷冻干燥时添加 50 mmol/L EDTA 作为猪精子保护剂,猪精子外部形态较为完整,样品处理时精子尾部尚存少许杂质(图 2C),顶体清晰可见(图 2D),而尾部与头部后环(RING)之间出现断痕(图 2D,箭头处),并未完全断裂。未添加保护剂的冷冻干燥猪精子在干燥过程中出现不同程度的损伤,如顶体的丢失(图 2E),精子头部后环(RING)与尾部中段相连处出现断裂损伤,尾部并未完全脱落和精子尾部完全脱落(图 2F,箭头处)。

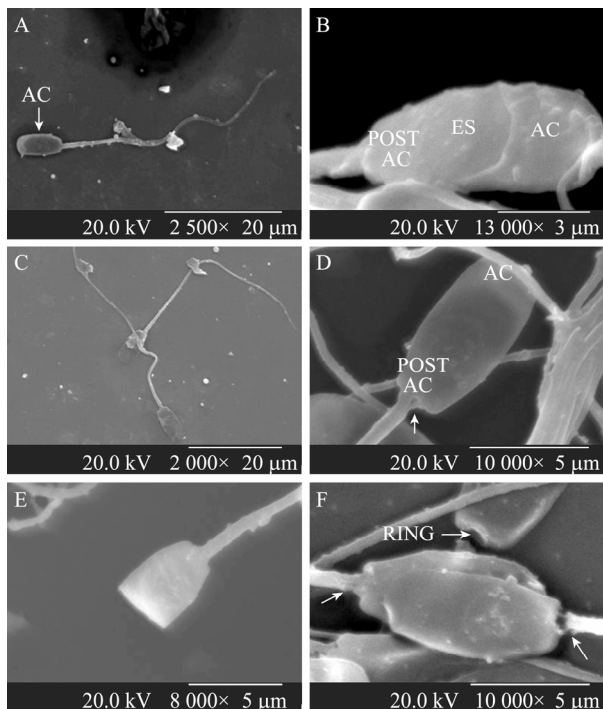


图 2 冻干猪精子的超微结构

Fig. 2 ultrastructure of freeze-dried boar sperm. (A) Acrosome (AC) of freeze-dried spermatozoa of trehalose group (arrow). (B) Acrosome (AC) and equatorial segment (ES) of freeze-dried spermatozoa of trehalose group. (C) Freeze-dried spermatozoa of EDTA group. (D) Acrosome (AC) of freeze-dried spermatozoa of EDTA group. Basal cords and posterior ring aren't seen as well as the beginning of the middle piece with circumferential strings of particles around the plasma membrane (arrow). (E) Acrosome loss of freeze-dried spermatozoa of control group. (F) Posterior ring is clearly seen. Freeze-dried spermatozoa tail of control group damage or loss (arrow).

3 讨论

在冷冻真空干燥过程中水分子桥的失去、蛋白构象的改变会引起精子的损伤。精子在冷冻真空干燥的恶劣条件下会产生应变蛋白,这种蛋白能避免干燥所带来的损伤影响,人们也在寻找能够替代这种蛋白的物质。精子膜在干燥状态下,其完整性会被破坏,影响对离子的传输能力,降低膜上脂质的熔点,造成相变从而导致损伤。在冷冻真空干燥过程中精子经历了低温(-40℃)和干燥,这必将受到来自这两方面的损伤,特别是形态发生变化,如:精子质膜的破损,尾部损伤甚至脱落,细胞器(线粒体)暴露在与胞内不一样的环境中等等,冷冻真空干燥猪精子的电镜图可以清晰看到上述损伤。这些可能都是减低显微注射后受精率低下的原因^[8-9]。在保护精子质膜方面,Aisen 等^[10]认为海藻糖效果较好,Bayarad 等^[11]在小鼠和 Aboagla 等^[12]在山羊精液冷冻保存研究中也得到相同的结论,本试验所得的结果完全与上述一致。

目前关于冷冻真空干燥猪精子所添加的保护剂都是基于生化角度来选择保护剂的成分。 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 与核酸内切酶作用,增大长期保存后精子染色体异常的比例,而添加保护剂则可以与之结合,防止与核酸内切酶作用。目前冷冻真空干燥精子所使用的保护剂多为 EDTA 或 EGTA 的 Tris-HCl 缓冲液^[3-4,8,13-17]。而本试验结果显示海藻糖更有利于保护猪冷冻真空干燥精子。

Jennings 等^[18]认为冻干保护剂在蛋白分子周围形成环境,提供水分子,避免因为蛋白分子中水分子桥的失去和蛋白构象的改变而引起细胞损伤。其中糖在蛋白质稳定性保持中具有重要作用,能大幅提高细胞中酶的稳定性。当环境恶劣时,海藻糖呈现出优于其他糖类的优点。在许多生物中,海藻糖的自动生成经常是与一些应变蛋白同时出现的^[19-21]。这些蛋白处于精子膜上,能参与保护精子免受冷冻真空干燥损伤的影响,作用类似与海藻糖。该机理可能与海藻糖有利于许多生物材料的稳定性有关^[22-23]。关于海藻糖保护细胞的分子机理,不同学者提出不同学说,但众多研究表明^[24-25],海藻糖的保护机制

与其晶体结构、溶液的物理构象和化学特性密切相关。当干燥过程中水分被去除时,海藻糖和脂质之间的氢键能避免脂质分子改变构象,这就是所谓的“水替代假说”^[26]。与其他糖类相比,海藻糖更有利于保存膜在干燥状态下的完整性和对离子的传输能力^[27],降低膜上脂质的熔点,防止膜相变造成的损伤^[26,28],具有很高的玻璃化温度,是细胞悬浮液容易达到玻璃化^[29]。

Kaneko 等^[13]还发现精子冻干保护剂的 pH 8.0~8.2 时效果较好。精子核内的一些酶,如核酸内切酶在酸性条件下较稳定,高 pH 值的环境下这些酶的活性被抑制,这对保护染色体的完整是有益的。故本试验中添加的保护剂的 pH 值均为 8.0。

冷冻真空干燥精子的目标是在 4℃ 下长期保存。2003 年,Monika 等^[30]利用保存了 1.5 年的小鼠冷冻真空干燥精子成功获得后代。本研究保存 180 d 的冷冻真空干燥猪精子 ICSI 后虽能获得囊胚,但并未进行胚胎移植,因此还有待于进一步的研究。

Kwon 等^[16]注入冷冻真空干燥猪精子头部和整个精子并进行发育对比,发现前者形成雄原核率要优于后者,笔者只注入整体的精子在雄原核形成率上低于上述冻干 4 h、9 h、16 h 且保存在 4℃ 或 25℃ 的冷冻真空干燥猪精子,但获得囊胚率上要高于上述试验。Nakai 等对冷冻真空干燥猪精子进行了水化后孵育时间 (0~60 min、60~120 min、20~180 min) 之间的对较,发现 0~60 min 水化后孵育时间的冷冻真空干燥精子单精注射后囊胚率为 23.1%, 120~180 min 的为 22.6%,二者之间差异不显著^[5]。本试验中针对水化后孵育时间 (1 h 和 2 h) 做了研究,所得结果与上述不一致。

综上所述,海藻糖对猪冷冻真空干燥的精子具有较好的保护作用,但仍需对冻干工艺等进一步优化和完善。

致谢: 感谢上海市农业科学院生态环境保护研究所 在冷冻真空干燥,上海同济大学在扫描电镜观察中的帮助!

REFERENCES

[1] Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa

after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, 1949, **164**(10): 666-676.

[2] Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(7): 639-641.

[3] Hirabayashi M, Megumi K, Junya I, et al. Viable offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote*, 2005, **13**(1): 79-85.

[4] Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod*, 2004, **70**(6): 1776-1781.

[5] Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, et al. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability *in vitro* and *in vivo* after intracytoplasmic sperm head injection. *Zygote*, 2007, **15**(1): 15-24.

[6] Zhang DF, Liu D, Tang LL, et al. A modified enucleation method of porcine oocytes. *Chin J Veter Sci*, 2006, **26**(5): 574-577.

张德福, 刘东, 汤琳琳, 等. 猪卵母细胞去核方法的改进. *中国兽医学报*, 2006, **26**(5): 574-577.

[7] Yong HY, Pyo BS, Hong JY, et al. A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3-4 μm diameter injection pipette. *Human Reprod*, 2003, **18**(11): 2390-2396.

[8] Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, et al. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(24): 13501-13506.

[9] Tateno H, Kimura Y, Yanagimachi R. Sonication perse is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biol Reprod*, 2000, **63**: 341-343.

[10] Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concent rations. *Theriogenology*, 2002, **57**(7): 1801-1808.

[11] Bayarad TS, Esther EN, Kathleen AT. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 1998, **37**(1): 46-58.

[12] Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod*, 2003, **69**(4): 1245-1250.

[13] Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and development talability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, 2003, **68**(1): 136-139.

- [14] Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, *et al.* Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod*, 2003, **69**(6): 2100–2108.
- [15] Kusakabe H, Kamiguchi Y. Chromosomal integrity of freeze-dried mouse spermatozoa after ^{137}Cs γ -ray irradiation. *Mutat Res*, 2004, **556**(1/2): 163–168.
- [16] Kwon IK, Park KE, Niwa K. Activation, pronuclear formation, and development *in vitro* of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod*, 2004, **71**(5): 1430–1436.
- [17] Kusakabe H, Kamiguchi Y. Ability to activate oocytes and chromosome integrity of mouse spermatozoa preserved in EGTA Tris-HCl buffered solution supplemented with antioxidants. *Theriogenology*, 2004, **62**(5): 897–905.
- [18] Jennings TA. Lyophilization: introduction and basic principles: US, 1574910817. 1999-08-31.
- [19] Elliott B, Haltiwanger RS, Fitcher B. Synergy between trehalose and Hsp104 for thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1996, **144**(3): 923–933.
- [20] Devirgilio C, Hottiger T, Dominguez J, *et al.* The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast I. genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem*, 1994, **219**(1/2): 179–186.
- [21] Reinders A, Romano I, Wiemken A, *et al.* The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance. *J Bacteriol*, 1999, **181**(15): 4665–4668.
- [22] Xie GF, Timasheff SN. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys Chem*, 1997, **64**(1/3): 25–43.
- [23] Timasheff SN. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem*, 1998, **51**: 355–432.
- [24] Crow JH. Virification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipid. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1280**: 187–196.
- [25] Li AM, Zhang YZ, Xu H. Research and application of trehalose. *J Hanzhong Teach Coll: Natl Sci*, 2003, **21**(2): 89–94.
李爱民, 张银志, 徐晖. 海藻糖的研究与应用. 汉中师范学院学报: 自然科学, 2003, **21**(2): 89–94.
- [26] Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, *et al.* The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 1998, **60**: 73–103.
- [27] Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, *et al.* Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars. *Biochem J*, 1987, **242**(1): 1–10.
- [28] Hays LM, Crowe JH, Wolkers W, *et al.* Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transitions. *Cryobiology*, 2001, **42**(2): 88–102.
- [29] Chen TN, Fowler A, Toner M. Literature review: supplemented phase diagram of the trehalose water binary mixture. *Cryobiology*, 2000, **40**(3): 277–282.
- [30] Monika AW, Takehito K, Hirokazu K, *et al.* Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod*, 2003, **69**(6): 2100–2108.