

## 不同冻融处理对猪精子顶体膜蛋白表达的影响

曹立朋<sup>1</sup>, 孙培亮<sup>1</sup>, 安松文<sup>2</sup>, 金 一<sup>1\*</sup>

(1 延边大学农学院, 延吉 133002; 2 延吉市畜牧局, 延吉 133002)

**摘 要:** 为探究不同冷冻解冻方法对猪精子损伤的影响, 采用 2 种常用的冷冻解冻方法处理猪精子, 分别对其顶体膜蛋白进行分离, 进行 SDS-PAGE 电泳和总灰度值的检测和分析。结果表明, 采用一次稀释法进行猪精液的冷冻保存较二次稀释法解冻后精子活率高, 精子顶体膜蛋白组分中除 125 ku 和 90 ku 处蛋白表达水平低于二次稀释法外, 120 ku、48 ku、36 ku 均高于二次稀释法。可见, 猪精子在受到更深层次(二次稀释法对精子冷冻解冻损伤大)的冷冻损伤时, 伴随着顶体膜蛋白 125 ku 和 90 ku 表达水平的升高以及 120、48 及 36 ku 表达水平的降低。

**关键词:** 一次稀释法; 二次稀释法; 猪精子; 顶体膜蛋白; 表达

中图分类号: S814.8; S828.34

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)01-0020-04

### Effects of different freezing-thawing treatments on expression of acrosomal membrane proteins in boar sperm

CAO Lipeng<sup>1</sup>, SUN Peiliang<sup>1</sup>, AN Songwen<sup>2</sup>, JIN Yi<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002; 2. Yanji Animal Husbandry Bureau, Yanji 133002)

**Abstract:** To explore the effects of different frozen-thawed methods on boar sperms, two ways of freeze and thaw the porcine sperms were used. Isolating the sperm acrosomal membrane protein, detecting total proteins by SDS-PAGE electrophoresis, and analyzing the total gray value were conducted. The result showed that the boar sperm viability of freezing and thawing with one-time dilution method was higher than that with two-time dilution method. Compared to one-time dilution method, protein expressions of 125 ku and 90 ku were less than those with two-time dilution method in the components of pig sperm acrosomal membrane proteins, but the protein expressions of 120 ku, 48 ku and 36 ku were higher than those with two-time dilution. In conclusion, there were certain relationships between the boar sperm damage and the expression of acrosomal membrane proteins of 125 ku, 120 ku, 90 ku, 48 ku and 36 ku in the frozen-thawed process of boar sperm.

**Key words:** one-time dilution; two-time dilution; boar sperm; acrosome membrane protein; expression

对于猪精子冻融处理方法, 实验室常用一次稀释法和二次稀释法, 这 2 种经典的冻融精子方法各有优缺点, 一般研究者根据实验室条件的差异, 选择适合的方法进行实验, 虽然没有明确的标准指出哪种方法更好, 但是从分子水平研究两种方法的差异却非常有意义, 这对探究冻融精子的损伤机制可以提供一定的参考。

和其他动物相比, 猪精液中胆固醇与磷脂的比例较低, 并且胆固醇的含量在细胞膜内外差之间具有不对称性<sup>[1]</sup>, 导致猪精子对温度变化敏感且易受

损伤, 使精液冷冻生产和推广应用受到很大限制。为了加快家畜的遗传改良以及优良遗传品质的提高, 并降低各种传播性疾病的发生频率, 大力发展和使用冷冻解冻精液用于人工授精具有非常重要的意义。在精液的冷冻解冻应用中, 牛精液的实际生产应用效果较为明显、应用范围相对广泛, 这充分证明了冷冻解冻精液对于哺乳动物繁育具有十分重要的研究价值和前景。但是, 对于猪精子来说, 在经过冷冻解冻时会受到非常严重的损伤。这是因为磷脂以及胆固醇在精子的细胞膜中含量百分比明显

收稿日期: 2013-06-26

基金项目: 吉教科合字(2013)第 14 号资助。

作者简介: 曹立朋, 硕士研究生。E-mail: lipeng0810@163.com

\* 通信作者: 金 一, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: yijin@ybu.edu.cn

小于其他的哺乳动物<sup>[2]</sup>。

猪精液的冷冻技术是指利用干冰(-79℃)、液氮(-196℃)等作为冷却剂,将精液经过处理后,保存在超低温的液氮状态下,以达到长期保存精液的目的<sup>[3]</sup>。但是在冷冻过程中,由于猪精子对冷休克特别敏感,导致解冻后精子复苏率偏低,异常精子比较多,受胎率显著降低<sup>[4]</sup>。目前在生产实践当中还没有研究出较成熟的猪精子冷冻处理技术。

使精子迅速越过危险温区是精液冷冻解冻时提高精子冻后存活率和品质的关键。为避免低温对精子造成的损伤,精子解冻时也必须快速越过-5~-25℃这一危险温区,这与冷冻过程是一致的。关于解冻程序以及解冻温度,不同学者<sup>[5-7]</sup>所持观点也不尽相同。有科学家推测,解冻温度与动物品种及精子膜对冷冻-解冻温度骤变的敏感性有关<sup>[8]</sup>。进入21世纪,哺乳动物生殖技术飞速发展,但是冷冻处理的猪精子仍面临解冻后活力差、受胎率低、产仔数少,死胎等诸多问题<sup>[9]</sup>,除了在猪精子的冷冻技术上不断研究新的或者改良的冷冻解冻液配方以及冷冻操作方法以外,优化冷冻精子的解冻处理研究也是提高精子受精能力的重要突破口。

本试验通过2种常用的冷冻解冻方法处理猪精子<sup>[10]</sup>,分离和分析顶体膜蛋白组分,从分子层面对2种冻融方法进行分析比较,试图找到产生活率差异的原因,对探究猪精子冻融损伤及损伤保护的研究有一定作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

试验猪精液均采自延吉市韩吉牧业有限公司的健康成年长白公猪。用保温杯密封避光,在2 h内带回实验室<sup>[11]</sup>,运输过程中将其温度保持在24℃±2℃。用于试验的精液必须符合以下条件:①颜色为乳白色;②活率>70%;③顶体完整性>75%。

### 1.2 试验药品

预染蛋白质 Marker(Page Ruler Prestained Protein Ladder SM0671)购于北京华夏远洋生物科技有限公司。D-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>、NaCl、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、EDTA、柠檬酸二钠、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、BSA、MgCl<sub>2</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、Tris等均采购自Sigma公司。

### 1.3 主要药品的配制

①PBS: NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.56 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, 青霉素 6.00 mg, 链霉素 5.00 mg, 超纯水定容至 1000 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜消毒, 4℃封存待用。

②0.01 mol·L<sup>-1</sup>PBS 溶液: NaCl 0.8 g; KCl 0.20 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.144 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 g; 加入去离子水, 定容至 100 mL, 用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 调节 pH 至 7.4。

③一次稀释法稀释液成分: 冷冻稀释液基础液: D-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 3 g, 乳糖 4 g, 超纯水定容至 100 mL。冷冻稀释液: 取冷冻稀释液基础液 78 mL, 煮沸后加 22 mL 新鲜卵黄, 青霉素和链霉素各 10 IU, 甘油 5 mL。现用现配。

④二次稀释法稀释液成分: 冷冻稀释液 I 成分: D-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 1.5 g, 乳糖 3 g, 甘氨酸 0.8 g, 卵黄 24 g, 超纯水定容至 100 mL。冷冻稀释液 II 成分: 取 48 mL 的 I 液, 加入甘油作为冷冻保护剂, 使甘油最终积分为 2%, 即为冷冻稀释液 II 液。I、II 液需现用现配。

⑤膜蛋白提取液: Tris 1.21 g; NP-40 0.5 mL; NaCl 0.7 g; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.087 g; EDTA-Na<sub>2</sub> 0.0288 g; PMSF 0.5 mL, 加入去离子水, 定容至 100 mL。

## 1.4 方法

**1.4.1 精液的常规检测** 室温下静置 2 h, 使精液缓慢降温到室温(20~23℃)。用显微镜于 37℃下进行常规品质检查。选择无异味、色泽乳白色、精子形态正常、活率在 0.7 以上、密度为“密”精液供试。每头份精液量, 浓稠部分约为 80~150 mL 左右。

**1.4.2 精子活率测定** 吸取 100 μL 精液样, 滴于预热的 37℃的血细胞计数板上, 盖上盖玻片, 在 400×的光学显微镜下计数并计算活率。25 格×16 格的血球计数板计算公式: 精子数/mL=80 小格内精子个数/80×400×10000×稀释倍数; 成活精子数/mL=80 小格内成活精子个数/80×400×10000×稀释倍数。精子活率=成活精子数/mL/精子数/mL。

**1.4.3 洗精** 将取回的猪精液与 PBS 进行 1:5 的比例进行稀释, 1500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 反复 3 次, 留沉淀待用。

**1.4.4 精子冷冻处理的一次稀释法** 洗精后的精子和冷冻稀释液按照 1:2~5 比例稀释混匀后用 0.25 mL 的塑料细管进行分装并封口, 用纱布包裹 10~12 层, 先置于 4℃冰箱中预冷平衡 3~4 h, 再放入液氮液面上方 5~10 cm 处 10 min, 最后将样品完全放入液氮中长期保存。

**1.4.5 一次稀释法解冻处理** 从液氮中取出经过一次稀释法冷冻处理的猪精子, 放入 58℃的水浴锅中 8 s, 迅速取出。

**1.4.6 精子冷冻处理的二次稀释法** 先将 I 液按

1:1 的比例缓慢倒入装有洗精后精子的试管中并封口, 进行等温稀释 (32~35℃) 后, 再用 12~15 层纱布包裹试管, 连同 II 液一起放入 4℃ 冰箱中平衡 2 h, 然后加入与第一次稀释后精液总量相等的 II 液, 使精液最终稀释比例为 1:3, 继续平衡 1~2 h 后用移液枪轻轻吹打精液, 使其充分混匀后用 0.25 mL 的塑料细管进行分装并封口, 用纱布包裹 12~15 层, 放入液氮液面上方 2 cm 处 10 min, 最后将样品完全放入液氮中长期保存。

**1.4.7 二次稀释法解冻处理** 从液氮中取出经过二次稀释法冷冻处理的猪精子, 放入 40~45℃ 的水浴锅中 8~10 s, 迅速取出。

**1.4.8 精子顶体膜蛋白分离** 取鲜精用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗涤离心, 2500 r·min<sup>-1</sup>, 3 次, 每次 10 min, 弃上清液。再用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 洗涤离心; 2500 r·min<sup>-1</sup>, 3 次, 每次 10 min, 弃上清液, 用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 溶解沉淀, 然后加入膜蛋白提取液进行冰上裂解, 1.5 h 后取出, 15000 g 离心 20 min, 冰上吸取上清液于透析袋中, 用磁力搅拌器搅拌, 去离子水透析 2 h, 其间换水 1 次。0.01 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 透析 24 h, 中间换透析液数次。将透析后的膜蛋白溶液分装, -80℃ 保存备用。沉淀用不含有 NP-40 的膜蛋白提取液洗涤, -20℃ 保存。

**1.4.9 蛋白浓度测定 (紫外分光光度法)** 用紫外分光光度法测裂解提取的蛋白浓度, 使最终上样浓度一致 (蛋白终浓度调节为 (4.1050 ± 0.0576) μg·μL<sup>-1</sup>)。

**1.4.10 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳** 用紫外分光光度计测定各样品浓度, 将各处理组蛋白浓度调至相同。本试验蛋白上样量为 45 μL, 电泳条件为浓缩胶 (5%) 40 mA, 分离胶 (15%) 80 mA, 电泳 3~4 h 左右。电泳完毕后分胶, 放入考马斯亮蓝染色液中, 进行染色脱色。

## 1.5 实验数据统计分析

本试验使用 Adobe PhotoshopCS5 软件对 Western blot 条带总灰度进行检测和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种冷冻解冻处理猪精子的密度和活率结果

两种冷冻解冻方法处理后的猪精液, 用血细胞计数板在 20×20 倍视野下观察精子状态并计数, 数据为重复 3 次以上试验的平均值。发现 2 种处理对猪精子活率有不同程度的影响 (表 1), 在精子密度相近的情况下, 采用一次稀释法冷冻解冻猪精子比二次稀释法精子冷冻解冻猪精子的活率高。

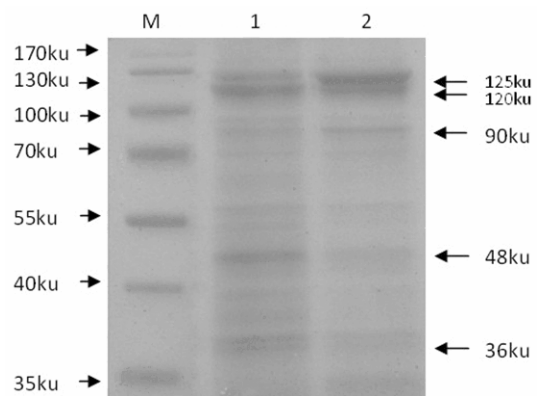
表 1 不同处理猪精子密度、活率测定结果

Table 1 The density and viability of pig sperm with different treatments

项目 Item	处理精子 Treatment of sperm	
	一次稀释法 One-time dilution	二次稀释法 Two-time dilution
密度/×10 <sup>8</sup> mL <sup>-1</sup> Density	0.80	0.80
活率/% Viability	32	21

### 2.2 两种冷冻解冻处理猪精子顶体膜蛋白组分 SDS-PAGE 电泳分离结果

对 2 种冷冻解冻方法处理后的猪精顶体膜蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 结果如图 1, 在相对分子质量为 125 ku、120 ku、90 ku 和 36 ku 处蛋白条带表达水平所不同。



M: Marker; 1:一次稀释法处理精子; 2:二次稀释法处理精子

M. Marker; 1. One-time dilution of sperm treatment; 2. Two-time dilution of sperm treatment

图 1 不同处理猪精子顶体膜蛋白 SDS-PAGE 电泳结果  
Figure 1 SDS-PAGE result of pig sperm acrosome membrane proteins

表 2 125、120、90、48 及 36 ku 条带总灰度值

Table 2 Total gray values of 125, 120, 90, 48 and 36 ku

条带灰度值/ku Gray value of band	一次稀释法 One-time dilution	二次稀释法 Two-time dilution
125	3286792	4003971
120	3949669	3341957
90	1505612	1593903
48	3476023	2324393
36	3020107	2091861

### 2.3 两种冷冻解冻处理猪精子顶体膜蛋白组分 SDS-PAGE 电泳条带总灰度值结果

对 2 种冷冻解冻方法处理后的猪精子顶体膜蛋白组分中 5 个表达水平明显不同的分子量蛋白进行总灰度检测 (表 2、图 2), 结果显示, 一次稀释法

除 125 ku 和 90 ku 处蛋白表达水平低于相应二次稀释法外, 120 ku、48 ku 和 36 ku 均高于二次稀释法。

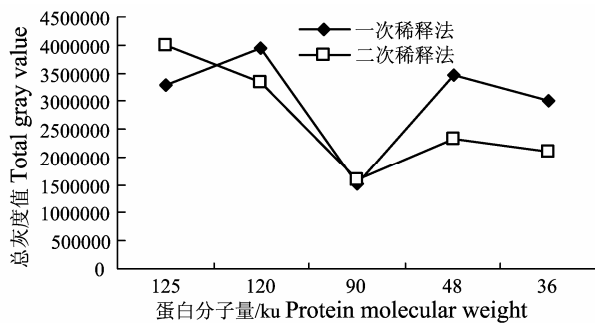


图 2 SDS-PAGE 电泳条带总灰度值折线图

Figure 2 Gray value of SDS-PAGE electrophoretic bands

### 3 讨论

对于猪冻精稀释液成分的使用很不统一, 但其中使用较多的仍是糖类。有研究表明, 在猪冻精稀释液中添加 2%~4% 的葡萄糖效果较好, 浓度过高会对精子顶体有损害作用。Paulenz 等<sup>[8]</sup>研究发现添加乳糖的效果比蔗糖和果糖好。本研究表明, 3% 的葡萄糖和 4% 的乳糖混合使用配制的一次稀释法稀释液对于冷冻保存猪精子效果较好, 猪精液解冻后活率达 0.32, 而二次稀释法只有 0.21。目前, 国内外抗冻剂多采用甘油、DMSO (二甲基亚砷)、乙二醇、丙二醇等几种保护剂。龙翔等<sup>[9]</sup>研究报道, 由于家畜品种及细胞组织结构不同, 所要求的抗冻剂有着明显的差异。本研究经过长时间的前期试验, 表明采用甘油作为猪冻精的保护剂时精子冻后活率最高, 效果最好。由此可见, 在猪冷冻精液的制作中, 选择甘油作为冷冻保护剂较为适宜。目前各种家畜精液冷冻稀释液一般都含有甘油, 但添加甘油的浓度仍然不是十分清楚<sup>[12-14]</sup>。本试验研究表明: 5% 甘油浓度的一次稀释液较 0%、1%、2% 及 4% 甘油浓度解冻后猪精子活率高; 2% 甘油浓度的二次稀释液较 0%、1%、2% 及 4% 甘油浓度解冻后猪精子活率高。一次稀释法明显较二次稀释法解冻后猪精子活率高, 说明其保存猪精液效果更好。本试验中一次稀释法的甘油浓度的研究结果与周佳勃等<sup>[10]</sup>的研究结果不同, 这可能说明在猪精液冷冻过程中, 甘油对精子具有重要的保护作用, 但是由于猪的品种及猪的个体差异等原因, 使甘油的适宜浓度也有所差异。

精子在发生、成熟以及不同状态下, 其顶体膜蛋白表达伴随着精卵识别、结合、融合等过程。由

于精子膜蛋白对精子穿过透明带、精卵识别、附着、精卵质膜结合和融合作用等有着重要意义, 所以把以上试验中较理想的冻融猪精子方法(一次稀释法)作为基础, 与二次稀释法冻融处理的猪精子顶体膜蛋白进行比较, 这对研究猪精子在冷冻解冻过程中的损伤可以提供一定的参考。通过本试验发现, 2 种冻融处理对猪精子顶体膜蛋白表达具有不同的影响, 不同冻融处理对猪精子的损伤伴随着顶体膜蛋白中相对分子质量为 125、120、90、48 及 36 ku 5 种蛋白表达发生变化, 一次稀释法除 125 ku 和 90 ku 处蛋白表达水平低于相应二次稀释法外, 120、48 和 36 ku 均高于二次稀释法。

### 参考文献:

- [1] Morrell J M, Wallgren M. Colloid centrifugation of boar semen[J]. *Reprod Domest Anim*, 2011, 46(2):18-22.
- [2] 高飞, 岳奎忠, 杨增明. 猪精液液态保存的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2004, 40(6): 46-49.
- [3] Yi Y J, Im G S, Park C S. Lactose-egg yolk diluter supplemented with N-acetyl-D-glucosamine affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm [J]. *Anim Reprod Sci*, 2002, 74 (3/4): 187-194.
- [4] 卜书海, 孙志杰, 李青旺, 等. 不同解冻方法对奶牛冻精活力的影[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2002, 30(5): 40-43.
- [5] Johnson L, Weitze K, Fisèr P, et al. Storage of boar semen[J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 62: 143-172.
- [6] 潘红梅, 麻常胜, 刘文, 等. 不同精液解冻液和解冻速率对猪颗粒冻精品质的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2010, 42(9): 49-52.
- [7] Watson P F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity [J]. *Peprod Dom Anim*, 1996, 31: 135-140.
- [8] Paulenz H, Taugbol O. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen[J]. *Reprod Dom Anim*, 1999, 34(5): 431-435.
- [9] 龙翔, 邵秀林. 不同冷冻保护剂在猪精液冷冻中的作用分析[J]. *畜禽业*, 1999(9): 19-22.
- [10] 周佳勃, 岳奎忠, 孙兴参, 等. 猪精液冷冻技术的研究 [J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(5): 295-299.
- [11] 张树山, 李青旺, 胡建宏, 等. 红景天多糖对猪精子冷冻保护效果的研究[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(3): 519-525.
- [12] 吕晓艳, 孙德林, 王楚端. 不同稀释液的精液保存时间及其相关性分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2005, 41(9): 50-52.
- [13] 孙德林, 吕晓艳, 王楚端. 不同配方稀释粉对公猪鲜精保存的效果分析[J]. *动物科学与动物医学*, 2004, 21(12): 43-45.
- [14] 张筱峰. 猪精液超低温冷冻保存的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.