

校正的 BO 液培养法对牛精子体外 获能的影响*

阎志春 张天佑 梁裕利
(畜牧系)

王祖昆
(广东省农科院畜牧研究所)

摘要 本试验校正了利用肝素和咖啡因使牛精子体外获能的传统的 BO 液配方及培养方法, 利用去透明带仓鼠卵的穿透试验和顶体的台盼兰——姬姆萨双重染色技术检查了该方法对获能的影响, 发现校正的 BO 液培养法缩短了预培养时间, 增强了获能效果。

关键词 牛精子; 获能; 去透明带仓鼠卵的穿透试验; 台盼兰——姬姆萨顶体染色法

近两年来, 牛体外受精技术 (BLVF) 获得了很大的进展^[1]。为了促使牛精子的体外获能 (capacitation), 许多研究者曾试用了多种培养液, 如 MEM 液^[2]、mKRB 液^[3]、HIS 液^[4]、BO 液^[5]和 Tyrode's 液^[6]等等; 最近, 又通过向培养液中添加不同量的肝素^[6]、咖啡因^[7]、离子载体 A23187^[8]及磷脂类^[9]等, 以期增加获能和顶体反应的效果。随着对精子获能和顶体反应机理认识的不断深入, Tyrode's 液培养法获得了很大的改进^[10], 但使用同样广泛的 BO 液法却未见有改进的报道。

异种精子在体外穿透去透明带仓鼠卵的试验最先是被用来检查人类精子的受精能力^[11], 但近年来由于体外受精技术的需要, 这种方法被用于代替牛卵母细胞的体外受精, 检查牛精子的体外获能效果和改进培养方法^[12, 13]。

目前使用的 BO 液牛精子获能培养方法^[7, 14]需要较长的预培养时间。本研究根据精子体外获能研究的最新进展, 试图校正 BO 液的原配方及培养方法, 以期提高牛精子体外获能的效率。

1 材料方法

1.1 精液来源

所用精液取自饲养于深圳市光明华侨畜牧场种公牛站的一头由美国引进的青年公牛。精液分两种, 一种是以每周射精 2 次的频率采得的精液 (L 组); 另一种则来自以每周 4 次射精的频率采得的精液 (H 组)。两种精液都取一次正常的射精, 鲜精活力都是 0.75, 制成颗粒冻精后 0.5 h 的解冻后活力都是 0.35。

1.2 培养液的配制

对照组的 BO 液采用最近 Park 等报道的方法^[14], 但 BSA 的浓度改为 5 mg/ml 与本文

• 本文是张天佑教授主持的国家自然科学基金资助项目“公牛高频率采精及其生理机理的研究”的一部分。

1991-01-16 收稿

校正的 mBO 液中浓度相同，以利比较。F—mBO 表示受精时组成的培养液。

表 1 用于精子获能及卵子受精的培养液

成分	单位	BO	mBO	F—mBO
NaCl	mmol/L	112.0	110.0	111.0
KCl	mmol/L	4.02	6.02	5.02
CaCl ₂ · 2H ₂ O	mmol/L	2.25	1.75	2.0
MgCl ₂ · 6H ₂ O	mmol/L	0.52	1.02	0.77
NaHCO ₃	mmol/L	37.0	31.0	34.0
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	mmol/L	0.83	0.83	0.83
Pyruvate (sodium salt) ^a	mmol/L	1.25	8.2	4.725
Glucose	mmol/L	13.9	0	6.95
Hepes ^b	mmol/L	0	6.0	3.0
Penicillin	iu/100ml	10000	10000	10000
Streptomycin	mg/100ml	5	5	5
1%Phenol red	ml/100ml	0.02	0.02	0.02

BB 液：BO+5 mg/ml BSA^c. BBH 液：BO+5 mg/ml+10 μg/ml Heperin^d

BBC 液：BO+5 mg/ml BSA+10mmol/L Caffeine^e

mBBCH 液：mBO+5mg/ml BSA+10mol/L Caffeine+20 μg/ml Heperin, pH=8.0.

- a. Pyruvic acid Sodium Salt: CH-9470 Buchs, Fluka Chemie AG.
- b. Hepes: Art 10 110, MERCK.
- c. Albumin, Bovine; Essential Fatty Acid-free, SIGMA Chemical Company, U. S. A.
- d. Heperin Sodium Salt: From Bovine, 154 u/mg, SIGMA Chemical Company U. S. A.
- e. Caffeine-Sodium Benzoate: 50; 50 (w/w) mixture, SIGMA Chemical Company, U. S. A.

1.3 去透明带仓鼠卵的获得

金黄地鼠 (Goldern hamster, Mesocritus auratus) 购自广东省农科院兽医研究所，为10~15周龄，体重100~150 g 的成年雌鼠，于发情第1 d 的上午8:00腹腔注射 PMSG^f60 iu，59~60 h 后腹腔注射 hCG^g60 iu，其后 14~16 h 取出仓鼠输卵管。在 BB 液中切开输卵管膨大部，将被卵丘细胞包围的卵子移入含 0.04%透明质酸酶^h 的 BB 液中，用移液器抽洗数次，去掉卵丘细胞；将去卵丘的卵子用 BB 液洗两次后，移入含 0.02%牛胰蛋白酶ⁱ 的 BO 液中约 1 min 以去掉透明带。将去透明带的卵子迅速移入 BB 液中洗 3 次。最后将去透明带的卵子移

- f. PMSG: 兽用血清性促性腺激素，批号891，长春生物制品研究所。
- g. hCG: 人绒毛膜促性腺激素，批号880416，宁波市激素制品厂。
- h. Hyaluronidase from Bovine testes: Type I-S, SIGMA, Chemical Company, U. S. A.
- i. Trypsin from bovine pancreas, 4u/mg, control 23049, Serua Feinbiochemica Heidelberg, New York.

入灭菌石醋油覆盖下的 50 μ l BB 液(试验组)或 BBC 液(对照组)中。

1.4 精子的获能处理

取 L, H 组精液各两粒, 39℃ 下用 0.8 ml BO 液解冻 20 S, 在已预热至 37℃ 的玻片上评定活力。1 500 r/min 下离心 10 min, 再用 0.8 ml BO 液重新悬浮, 然后在同样条件下再离心两次。最后用 BBH 液(对照组)悬浮, 放入 39℃, 有 5% CO₂, 95% 空气的 CO₂ 培养箱中培养 5~5.5 h 或用 mBBCH 液(试验组)培养 1 h。取培养过的精液上层 0.66 ml, 评定活力, 用血球计数板计数。用 BBH(对照组)或 mBBCH 液(试验组)将精子浓度调至 5×10^6 个/ml。

将获能处理后的精液 50 μ l 与含去透明带仓鼠卵的 50 μ l BB 液或 BBC 液混合, 分别组成 100 μ l F-mBBCH 或 F-BBCH 受精液滴。受精 4~4.5 h。

1.5 穿透结果的检查

受精结束后取出卵子在 BB 液中洗 3 次, 移入中性福尔马林(nutral formalin)固定液中固定过夜。第 2 天上午将卵子取出, 用 1% 乙酰间苯二酚蓝¹(Aceto-lacmoid)染色 5 min, 在 400× 或 1000× 相差显微镜下检查。在卵内发现精子膨大的头部(旁边必须有尾部存在)或雄原核时判为被穿透。

1.6 精子顶体的双重染色

在给仓鼠卵授精的同时, 向一不含卵子的受精液滴中加入 100 μ l 1% 台盼蓝染色液, 39℃ 在培养箱中培养 15 min。基本采用楠·比吕志(1989)的方法^[15], 对精子进行处理和分类。只是用 3.5% 的戊二醛缓冲固定液代替原方法中使用的二甲砷酸盐固定液。

对试验数据, 两个百分率之间的比较用 Pearson's χ^2 检验, 两个平均数之间的比较用 t-检验以测定其差异的显著性。

2 结果分析

2.1 mBO 法对预培养后精子活力及穿透去透明带仓鼠卵成绩的影响

由表 2 可见, 预培养后 mBO 法较之原 BO 法显著地保持了精子的活力。原 BO 法经过 5~5.5 h 的长时间培养, 活力有极大的下降, 甚至难以在一个视野中见到直线或 S 型前进运动的精子。mBO 法中虽然使用了咖啡因, 能促使精子的“过活”^[16], 但基础液中降低了 Ca²⁺ 的浓度至只有 1.75 mmol/L, 所以咖啡因促使精子“过活”的作用可能会受到限制; 另一方面 mBO 培养将培养时间降至只有 1 h, 对精子活力的保持也有作用。

去透明带仓鼠卵的穿透结果中, 平均每卵附精数极显著地增加说明获能和顶体反应精子的比例在 mBO 培养法中得到提高, 因为受精后仓鼠卵经过多次冲洗, 只有发生过顶体反应的精子才能牢实地附着在卵子上。仓鼠卵的穿透率可能与卵子的质量有关, 在本试验中小批量卵的试验尤为如此^[17], 但用 mBO 法所得的穿透率结果在两组对照中仍然极显著地高于 BO 法的值。穿透试验中最重要的指标应是雄原核率, 它不仅包含了穿透率及穿透卵中精子平均数两项指标, 而且表示了入卵精子在卵内发育到原核期的能力。用 mBO 法获能后, 雄原核率在 L 组极显著地高于 BO 法的值, 但在 H 组却差异不显著, 这可能是 mBO 对高频率采精得到的精子的获能效果不尽理想。

1. Lacmoid; pH=4.0~6.0, product no. 20056, BDH Chemical Ltd Poole, England.

表 2 mBO 法预培养后精子活力变化的差异及精子穿透去透明带仓鼠卵成绩的变化

	L 组		H 组	
	BO 法	mBO 法	BO 法	mBO 法
解冻后活力	0.35	0.35	0.35	0.35
预培养后活力	0.06**	0.22**	0.08**	0.25**
穿透率(%)	65.0(13/20)**	85.0(17/20)**	55.0(11/20)**	75.0(9/12)**
雄原核率(%)	35.0(7/20)**	70(14/20)**	40(8/20)	50(6/12)
平均每卵附精数	1.10±0.83**	5.27±4.3**	1.35±0.99**	5.17±4.52**

*差异显著, P<0.05; **差异极显著, P<0.01

2.2 获能预培养后精子顶体双重染色的结果

利用 mBO 法和 BO 法对精子进行预培养, 共做 3 批顶体染色试验, 结果如表 3 示。结果表明, mBO 法在两组试验中都极显著地提高了顶体反应的活精子比例, 这与仓鼠卵穿透试验的结果较为一致; 原 BO 法使未发生顶体反应的活精子比例增高, 但活精子的总数却与与 mBO 法差别不太, 这可能是由于染色时是利用上浮法 (swin-up) 吸取了活精子测定的原因。可以发现, mBO 法使得有顶体反应的总精子数增加了。

表 3 mBO 法对精子获能预培养后顶体双重染色结果的影响

	L 组		H 组	
	BO 法	mBO 法	BO 法	mBO 法
无顶体反应的活精子 (%)	28.4*	19.3*	32.4**	12.6**
有顶体反应的活精子 (%)	20.1**	48.6**	15.0**	41.2**
无顶体反应的死精子 (%)	30.9**	11.1**	26.7	20.1
有顶体反应的死精子 (%)	11.4*	21.0*	25.9	26.1

*差异显著, P<0.05 **差异极显著, P<0.01。

3 讨论

据 Parrish(1985)的试验^[18], 葡萄糖与肝素间存在拮抗作用, 因此本试验校正的 mBO 培养法中去掉了葡萄糖成分, 增加了小分子的丙酮酸钠的含量, 以期供给精子营养; 低浓度或不含 Ca²⁺的培养液, 被认为是可以抑制顶体反应而不影响其获能, 而一旦增加 Ca²⁺浓度时又可诱发顶体反应的发生, 并且已有试验证明高 PH 值和高浓度的 K⁺对去钙的培养液是有益的^[19,20], 所以 mBO 法中降低了 Ca²⁺浓度, 用 Hepes 作缓冲剂提高了 PH 值, 同时增加了 K⁺浓度, 试图以此在组成受精液后再将已获能的精子诱发顶体反应, 防止顶体酶的过早溢出。mBO 法还利用了肝素与咖啡因的协同作用^[17], 这两种成分被认为都对精子吸收 Ca²⁺至细胞内有作用^[16,16]。

本试验是用仓鼠卵穿透试验来检查获能效果的, 据认为受精前精子的活力对精子穿透卵黄膜和透明带是重要的^[21,22], 所以 mBO 法缩短了受精前精子的预培养时间, 使活力不至下降太快, 尽管 Parrish 等 (1988) 认为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的肝素浓度下, 牛精子要经过 4 h 的预培养才能获能较好^[10], 但 mBO 法将肝素浓度增加到 20 $\mu\text{g/ml}$, 获能结果是满意的。

咖啡因易使精子“过活”, 原 BO 法中在受精时才将精液与咖啡因相遇^[14], 较为合理。据报道, BSA 的高浓度可能对精子的获能也有作用^[23], 所以本研究中将原 BO 液法 20 mg/ml 的 BSA 调至 5 mg/ml 可能使其获能效果受到部分影响。另外, 肝素有可能掩盖透明带上精子受体而阻止发生顶体反应^[23], 所以用 mBO 法做牛卵母细胞的体外受精时, 在对卵子授精前将精液离心以除去培养液中的肝素是有益的, 许多研究者的试验注意到了这一点^[6,1]。

致谢 承蒙罗承浩副教授审阅此文, 特表感谢。

参 考 文 献

- 1 阎志春. 牛体外受精技术的研究进展. 国外畜牧学——草食家畜, 1989(5): 37~39
- 2 Hensleigh H C and Hunter A. G. In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. J Dairy Sci, 1985, 68: 1456~1562
- 3 Iritani A, et al. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemical defined medium. J Reprod Fert, 1984, 70: 487~492
- 4 Sirard M A, Lambert R D. Birth of calves after in vitro fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. Vet Rec, 1986, 119: 167
- 5 Brackett B G, et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. Boil Reprod, 1982, 27: 147~158
- 6 Lu K H, et al. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. Vet Rec, 1987, 121: 259~260
- 7 Niwa K and Ohgata O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology, 1988, 30 (4): 733~741
- 8 Byrd W, Wolf D P. Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. Biol. Reprod. 1986, 34: 859~869
- 9 Graham J K and Foote R H. In vitro fertilization of zona-free hamster ova by heparin-treated bovine sperm: A fertility assay. Bio Reprod, 1984, 30 (Suppl. 1): 112
- 10 Parrish J J, et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod, 1988, 38: 1171~1180
- 11 Rogers B J, et al. Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free hamster ova. Fertil Steril, 1979, 32 (6): 664~670
- 12 Bousquet D. and Brackett B G. Penetration of zona-free hamster eggs as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. Theriogenology, 1982, 17(2): 199~213
- 13 Brackett B G, et al. Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertilizing ability of the bull and stallion. Gamete Res, 1982, 5: 217~227
- 14 Park C K, et al. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. J Reprod Fert, 1989, 86: 577~583
- 15 楠・比呂志, 阪上守人, 原山・洋. トソバンブルー・キムザ染色によるヤギ先体反応精子の判別. 日畜会報, 1988, 59(3): 235~240

- 16 Aitken R G and Elton R A. Application of Poisson distribution theory to the zona-free hamster oocytes penetration test to assess sperm function of men with asthenozoospermia. *J Reprod Fert*, 1986, 77: 67~74
- 17 Wright S J, Longo F J. Sperm nuclear enlargement in fertilized hamster eggs is related to meiotic maturation of the maternal chromatin. *J Exp Zool*, 1988, 247: 155~165
- 18 Parrish J J, et al. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Therogenology*, 1985, 24: 537~549
- 19 Samper J C, et al. In vitro capacitation of stallion spermatozoa in calcium-free Tyrode's medium and penetration of zona-free hamster eggs. *Therigenology*, 1989, 31 (4): 875~883
- 20 Rodan E R S, Fleming A D. Is a Ca^{++} -ATPase involved in Ca^{++} regulation during capacitation and acrosome reaction of guinea-pig spermatozoa. *J Reprod Fert*, 1985, 85: 297~308
- 21 Gould J E, et al. What function functions of the sperm cell are measured by in vitro fertilization of zona-free hamster eggs. *Fertil Steril*. 1983, 40: 344~352
- 22 Dyonne B P J, et al. Importance of sperm motility after capacitation in interpreting the hamster ovum sperm Penetration assay. *Fertil Steril*, 1987, 47 (3): 456~459
- 23 Meizel S, Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *The American Journal of anatomy*, 1985, 174: 285~302

EFFECT OF A MODIFIED BO MEDIUM ON IN VITRO CAPACITATION OF BOVINE SPERMATOZOA

Yan Zhichun Zhang Tianyou Liang Yuli

(Department of Animal Science)

Wang Zukun

(The Animal Husbandry Research Institute, Guangdong)

Abstract The traditional BO medium and method using caffeine and heparin for the in vitro capacitation of bovine spermatozoa was modified in this study. Zona-free hamster eggs penetration test (HEPT) and Trypan blue-Giemsa stain technique were employed to examine the effect of mBO medium on capacitation and it was found that the new method shortened preincubation time as well as improved capacitation effect.

Key words Bovine spermatozoa; Capacitation; Zona-free hamster eggs penetration test (HEPT); Trypan blue-Giemsa stain