

# 不同浓度咖啡因对三黄鸡精液冷冻效果的影响

安立龙,黄志毅,冯嘉颖,黄莉丽

(湛江海洋大学 农学院动物科学系,广东 湛江,524088)

**摘要:** 试验以湛江海洋大学家禽育种中心的三黄鸡为试验材料,利用液氮制做颗粒冷冻精液,比较冷冻保护液中不同浓度添加物如咖啡因、甘油、二甲基亚砜以及平衡时间、解冻液种类及解冻液温度对广东三黄鸡冷冻精液解冻后精子活力、畸形率和存活时间的影响。结果表明,咖啡因添加量为4~5 mmol/L时,鸡精液冷冻解冻效果最佳,精子活力最高,为0.41~0.48,畸形率最低,为7.2%~7.4%,精子体外存活时间最长,为164~109 min ( $P < 0.01$ )。

**关键词:** 鸡精液;咖啡因浓度;精子活力;畸形率;存活时间

中国图书分类号: S 831.8<sup>+</sup>9 文献标识码: A 文章编号: 1006-799X(2005)02-0002-05

三黄鸡是我国著名的地方优质肉鸡品种,因为其母鸡黄羽、黄嘴(喙)、黄趾而得名,广泛分布于广东、广西、海南等地,三黄鸡肉质细嫩而实,肉味甘鲜醇厚,骨骼细软,腹下有一层皮下脂肪,油而不腻,食之爽口,深受消费者喜爱。对三黄鸡进行选育,并积极开发利用三黄鸡资源,对于满足市场需求,促进农村经济发展具有重要作用。发展规模化三黄鸡养殖技术,则是实现三黄鸡产业化的基本要求。在规模化生产过程中,种用母鸡实行笼养,必然要应用鸡的人工授精技术提高肉鸡繁殖效率。鸡的精液冷冻技术是鸡人工授精技术大规模应用的基础。利用鸡的精液

冷冻技术以及人工授精技术,可以充分提高优秀三黄种公鸡的利用率,降低种公鸡饲养数量,提高公鸡育种值,大大加快后裔测定的速度和测定的准确性。

鸡冷冻精液技术始于1941年,当时用高浓度的果糖作为稀释液冷冻精液,由于精子内部水分形成冰晶,造成精子死亡。1949年,Polge发现甘油具有冷冻保护作用,彻底改变了原有的精液保存程序,提高了精子冷冻保存成活率。之后,Lake报道了一种改进用甘油作为保护剂的低温保存精液技术,将精液保存于液氮中,获得了较高的受精率。我国开展家禽冷冻精液的研究起步较晚,1979年四川农学院牧医系繁殖科研组用鸡的冷冻精液腹膜内受精,率先在我国获得发育正常的雏鸡;1981年四川农学院牧医系繁殖研究室王林全等使用子宫内授精和深阴道授精,使鸡冷冻精液的平均受精率达到28%左右。

在精液冷冻过程中必须控制冰晶的形成

收稿日期:2003-10-05

基金项目:湛江海洋大学青年科研教师基金资助。广东省教育厅基金资助,湛江海洋大学大学生科技创新基金资助。

作者简介:安立龙(1966—),副教授,博士,湛江海洋大学大学生科技创新指导教师。

以及抗冷冻保护剂穿透膜运动的速率,并保持细胞内 ATP 含量的稳定。另外,冷冻过程可能有利于精子获能,同时对精子是一个存强除弱的筛选过程。但经过冷冻解冻过程后的精子,活力远不及新鲜精液。因此,在精液冷冻和解冻过程中,向稀释液中添加冷冻保护剂,以提高解冻后的精子活力是十分必要的。

咖啡因学名为 1,3,7—三甲基黄嘌呤(Xantine),又称咖啡碱,是存在于咖啡、茶叶中的一种生物碱,有兴奋中枢神经的作用,是一种精子活性物质。Barkay 等(1977)将咖啡因用于精液冷冻保存中,发现具有激发精子活力的作用。徐章龙(1980)、吴石坚(1981)将其应用于猪的精液冷冻,Anle(1984)将其应用于绵羊的精液冷冻,金穗华等(1990)将其应用于牛的精液冷冻保存中,均取得较为理想的效果。咖啡因作为体外精子促活剂的研究非常多。20 世纪 80 年代初期已有一些研究报道咖啡因可在体内促进多种动物以及人类精子的活力和运动速度,促进精子获能,而且延长精子的存活时间。应用连续多次曝光照相技术(JTK)与体外活体染色体技术相结合,对咖啡因在体外影响精子活力的作用做了较为宏观的研究,结果显示,咖啡因可以将不活动的精子激活转为活动状态,使活动精子比例明显增加,但对精子的活力并无影响。本试验旨在探讨不同浓度咖啡因对三黄鸡精液冷冻颗粒解冻后精子活力、畸形率和存活时间的影响,比较不同浓度咖啡因在鸡精液冷冻过程中的作用和效果,从而选择三黄鸡冷冻精液最适宜的咖啡因浓度。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 种公鸡的选择:从湛江海洋大学家禽育种中心选择 300 日龄左右、健康无病、精液品质良好的三黄鸡种公鸡供采精用。

1.1.2 药品、试剂以及仪器:咖啡因(广州化学试剂厂出品),丙三醇(分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司出品,批号:w990540),曲利本蓝(分析纯,广州化学试剂厂出品),无水乙醇(广州市新港化工有限公司出品),龙胆紫(上海标本模型厂出品,批号:900515),硫酸链霉素(华北制药股份有限公司出品,批号:001121),新鲜蛋黄(湛江海洋大学家禽育种中心收集的新鲜鸡蛋制作),葡萄糖(分析纯,广州化学试剂厂出品),XMT 系列智能数显控温仪(余姚市长江温度仪表厂出品)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 精液采集:采用背部按摩法采集精液。采集过程中要求精液无粪便、血液、饲料等污染,采集后用棉花和纱布包好,置于保温杯中,迅速带回实验室,参见徐日福等(1996)在《种鸡精液冷冻保护剂的确定》一文的方法。

1.2.2 稀释液配制:在 5.7% 的蔗糖溶液中加入新鲜卵黄液,配成含卵黄 20% 的液,其中每 1 mL 液须加入链霉素 500 单位,摇匀。以液为基础液,加上无水甘油,配成含有甘油 16% 的液。再以液为基础液,加入咖啡因及液,配成浓度为 16、12、10、8、6、4、2 mmol/L 的液,液与液放入 5 的冰箱内预冷 1 h。

1.2.3 精液冷冻前的准备:同源精液采集后,先取 1 mL,用相同温度的不含冷冻保护剂的 I 液进行 1 2 的第一步稀释后,用纱布包上 10 层,放在 5 左右的冰箱中预冷 1 h 左右,再用相同温度含不同浓度咖啡因的液进行 1 1 的第二步稀释,配成咖啡因浓度为 8、6、5、4、3、2、1 mmol/L 的液,接着在 5 左右的冰箱中平衡。

1.2.4 精液冷冻:用泡沫塑料盒盛装液氮,在距离液氮面 1~2 cm 处架上铜丝网,待铜丝网充分冷却,温度降至 -100~-90 时,开始滴冻。用吸管吸取一滴,滴于铜丝网上,

加盖,熏蒸 2 min,待颗粒发白有光泽时可将颗粒浸入液氮中。

1.2.5 解冻:取 0.5 mL 5.7% 的葡萄糖溶液,放入小试管内,浸入 40℃ 热水中经 2~3 min 后,用预冷的长柄镊子从贮精罐中快速取出一颗冻精投入小试管内,待溶化 1/3~1/2 时,取出试管,并快速不停地晃动,使冻精快速溶解,当精液全部溶化后,保存在 35℃ 的环境中,进行精液评定。

1.2.6 精子活力检查:按常规方法进行,参见韩毅冰等《透明质酸对猪精子活率、获能、顶体反应及体外受精穿透率的影响》一文的方法。

1.2.7 畸形率检查:按常规方法进行。

1.2.8 存活时间检查:在 35℃ 的温度条件下保存精液,并在 25℃ 室温观察精子的存活情况,采用平板压片法,将各组精液分别置于显微镜下进行观察,每隔 15 min 观察一次精子的活力,直到精子全部死亡,登记存活时间。

1.2.9 数据处理:采用方差分析法分析处理数据,并进行显著性检验。

## 2 结果与分析

2.1 冷冻保护液中咖啡因浓度对精液冷冻解冻后精子活力的影响

冷冻液中咖啡因浓度对精液冷冻解冻后精子活力的影响如表 1 所示。

表 1 冷冻液中咖啡因浓度对精液冷冻解冻后精子活力的影响

咖啡因浓度 / mmol L <sup>-1</sup>	重 复			均 值
0	0.356 ±0.008 5	0.350 ±0.042 4	0.329 ±0.014 1	0.345 ±0.014 2 <sup>cd</sup>
1	0.228 ±0.002 8	0.213 ±0.018 4	0.200 ±0.028 3	0.214 ±0.014 0 <sup>cd</sup>
2	0.256 ±0.014 1	0.248 ±0.017 0	0.263 ±0.024 0	0.256 ±0.007 5 <sup>cb</sup>
3	0.283 ±0.024 0	0.278 ±0.002 8	0.289 ±0.079 2	0.283 ±0.005 5 <sup>bb</sup>
4	0.440 ±0.056 6	0.456 ±0.028 3	0.427 ±0.008 5	0.441 ±0.014 5 <sup>aa</sup>
5	0.497 ±0.012 7	0.453 ±0.004 2	0.500 ±0.084 5	0.483 ±0.026 3 <sup>aa</sup>
6	0.297 ±0.018 4	0.293 ±0.014 1	0.257 ±0.042 4	0.282 ±0.022 0 <sup>bb</sup>
8	0.183 ±0.024 0	0.157 ±0.018 4	0.190 ±0.028 3	0.177 ±0.017 4 <sup>ee</sup>

注:数值肩注字母相同的各组间差异不显著( $P>0.05$ ),小写字母不同的各组间差异显著( $P<0.05$ ),大写字母不同的各组间差异极显著( $P<0.01$ ),下同。

结果表明,冷冻液中咖啡因浓度为 4 mmol/L 和 5 mmol/L 两组冷冻精液解冻后精子活力显著高于其它组( $P<0.01$ ),其中 5 mmol/L 一组的精子活力最高,为 0.483,比不加咖啡因的一组(0.345)高 0.138,比加咖啡因的各组中精子活力最低的一组(0.177)高 0.306,但与 4 mmol/L 一组(0.441)之间的差异不显著( $P>0.05$ )。说明当精液加入浓度为 4~5 mmol/L 的咖啡因时,冷冻效果最佳。

2.2 冷冻液咖啡因浓度对冷冻解冻后精子畸形率的影响

冷冻液咖啡因浓度对冷冻解冻后精子畸形率的影响如表 2 所示。

结果表明,冷冻液中咖啡因浓度为 4 mmol/L 和 5 mmol/L 两组冷冻精液解冻后精子畸形率显著低于其它组( $P<0.01$ ),其中 5 mmol/L 一组的精子畸形率最低,为 7.20%,比不加咖啡因的一组(9.29%)低 2.09 个百分点,比加咖啡因的各组中精子畸形率最高的一组(12.22%)低 5.02 个百分点,但与 4 mmol/L 一组(7.42%)之间的差异不显著( $P>0.05$ ),说明当精液加入浓度 4~5 mmol/L 的咖啡因时,畸形率最低。

2.3 冷冻保护液咖啡因浓度对冷冻解冻后精子存活时间的影响

冷冻液咖啡因浓度对冷冻解冻后精子存活时间的影响如表 3 所示。

表 2 不同浓度咖啡因处理精液冷冻解冻后的精子畸形率(%)

咖啡因浓度 / mmol L <sup>-1</sup>	重 复			均 值
0	9.33 ±0.042	9.40 ±0.057	9.13 ±0.184	9.29 ±0.140 <sup>IA</sup>
1	9.27 ±0.212	9.00 ±0.113	8.93 ±0.113	9.07 ±0.180 <sup>EA</sup>
2	8.60 ±0.085	8.67 ±0.170	8.80 ±0.283	8.69 ±0.101 <sup>DB</sup>
3	8.33 ±0.311	8.47 ±0.453	8.13 ±0.099	8.31 ±0.171 <sup>AB</sup>
4	7.33 ±0.283	7.07 ±0.297	7.87 ±0.099	7.42 ±0.408 <sup>CC</sup>
5	7.07 ±0.269	7.33 ±0.297	7.20 ±0.184	7.20 ±0.130 <sup>CC</sup>
6	8.07 ±0.212	8.20 ±0.283	8.93 ±0.269	8.40 ±0.464 <sup>EB</sup>
8	11.80 ±0.311	12.53 ±0.453	12.33 ±0.283	12.22 ±0.377 <sup>BD</sup>

表 3 不同浓度咖啡因处理精液冷冻解冻后的精子存活时间(min)

咖啡因浓度 / mmol L <sup>-1</sup>	重 复			均 值
0	86.3 ±1.84	85.0 ±4.24	86.7 ±0.42	86.3 ±0.89 <sup>BA</sup>
1	81.0 ±0.85	78.3 ±0.92	78.0 ±1.41	79.1 ±1.65 <sup>DD</sup>
2	80.7 ±0.99	87.7 ±0.99	83.3 ±0.42	83.9 ±3.53 <sup>AA</sup>
3	87.3 ±0.99	88.0 ±0.99	86.3 ±0.85	87.2 ±0.85 <sup>BA</sup>
4	108.7 ±1.70	106.7 ±1.13	96.0 ±1.70	103.8 ±6.83 <sup>CC</sup>
5	106.3 ±1.41	115.3 ±1.13	104.3 ±2.12	108.6 ±5.86 <sup>CC</sup>
6	86.7 ±2.12	85.3 ±1.70	83.7 ±1.41	86.4 ±1.50 <sup>BA</sup>
8	65.7 ±1.13	74.0 ±1.70	63.7 ±2.12	67.8 ±5.46 <sup>DB</sup>

经方差分析表明,咖啡因浓度为 4 mmol/L 和 5 mmol/L 两组冷冻精液解冻后精子存活时间显著高于其它组 ( $P < 0.01$ ), 其中 5 mmol/L 一组的精子存活时间最长, 为 108.6 min, 比不加咖啡因的一组 (86.3 min) 长 22.3 min, 比加咖啡因的各组中精子存活时间最短的一组 (67.8 min) 长 40.8 min, 但与 4 mmol/L 一组 (103.8 min) 之间的差异不显著 ( $P > 0.05$ )。说明当精液加入浓度为 4 ~ 5 mmol/L 的咖啡因时, 精子的存活时间最长。

### 3 讨论

#### 3.1 咖啡因对精液冷冻保护作用机理

试验结果表明,在精液稀释液中添加咖啡因,可以提高精液冷冻效果。其主要原因是,咖啡因不仅对机体中枢神经产生兴奋作用,而且对精细胞具有类似的影响,能刺激和激发精子,使不运动的精子产生活力并向前运动,增强精子耐冻性,能显著提高精子的抗

冷冻效果。更重要是,咖啡因作为环状核苷酸二脂酶的一种抑制剂,通过抑制该酶分解而使细胞内累积充分的环状磷酸腺苷(cAMP),使 cAMP 浓度增加,而 cAMP 能在 ATP 酶活性低的情况下维持精子活力。冷冻精液颗粒解冻后,其活力不及新鲜精液,但加入一定浓度的咖啡因会在较短时间内增强其活力。

#### 3.2 咖啡因浓度与精液冷冻效果的关系

试验结果表明,用浓度为 4 ~ 5 mmol/L 的咖啡因处理后的精液,能显著提高精子解冻后的活力,降低其畸形率,并延长其存活时间,增强精子的耐冻性。当咖啡因浓度较低或平衡时间过短时,它对精子的兴奋作用有限,可能降低精子的解冻活力,且只能在短时间内维持对精子的作用;而咖啡因浓度过大或平衡时间过长,对精子的刺激作用虽较强,

# 籽粒苋饲喂肉鸡试验初报

刘志林

(青海畜牧兽医职业技术学院,青海 湟源 812100)

**摘要:**通过对育肥肉鸡进行籽粒苋牧草的饲喂试验,结果表明,肉鸡适口性好、增重快,日增重高于对照组 15.22% ( $P < 0.01$ ),差异显著,经济效益明显。

**关键词:**籽粒苋;育肥肉鸡;试验

中国图书分类号:S 831.5 文献标识码:A 文章编号:1006-799X(2005)02-0006-02

随着退耕还林(草)工作的进一步加大和“西繁东育”工程的实施,饲草需求量也会越来越大。青海省东部农业区种植大量的籽粒苋优良牧草,进行牛羊育肥已取得很好的效果,用优良牧草饲喂家禽的工作尚未开展。因此为了进一步研究籽粒苋对肉鸡的育肥效果,进行了试验初探,现将结果报告如下。

## 1 材料选择和试验方法

### 1.1 供试鸡的选择

供试鸡系正大公司引进的 20 日龄艾维茵肉用型雏鸡。选择临床健康、体重基本一致的雏鸡 80 只,随机分为 4 个组,每组 20 只。

### 1.2 试验期饲养管理

供试鸡饲养环境一致,室内地面平养,专人饲喂。基础日粮配方为碎米 4.5%、玉米粉 50%、小麦粉 20%、豆饼 13.1%、鱼粉但会使精细胞兴奋过度导致衰老,降低了对 12%、食盐 0.4%,日喂 4 次,自由饮水。试验前及试验期内断喙及编号,按程序进行 MD、ND、IBD、IB 等疫病的接种免疫,并注重球虫

收稿日期:2004-10-28

冷打击的抵抗力,加剧咖啡因对精子的毒害作用,而且还会增加精子冷冻之前生命物质的代谢消耗,影响精子冷冻解冻后的存活率和受精能力,因而制冻效果差。特别是高浓度(大于 60 mmol/L)的咖啡因则会抑制精子运动,这符合咖啡因作用的内在规律。

### 3.3 滴冻温度与精子品质的关系

在进行滴冻时,铜丝网距液氮面的距离应严格控制在 1~2 cm,其原因在于冷冻时的降温速度上。如果铜丝网距离液氮面的距离合适(降温速度适当),精子内部的水有足够的时间向外渗出,使细胞内外的化学势达到平衡,并且细胞内形成冰晶小,数量亦少,冰

晶对精子造成的损伤小,有利于精子的生存。如果距离过低(降温速度过快),细胞中水没有充分的时间渗出。未渗出的水形成较大较大的冰晶,冰晶对细胞形成较大的伤害,不利于精细胞的生存。因此,铜丝网与液氮面的高低(降温速度的快慢)是使冷冻精液质量产生较大差异的因素。

## 4 小结

咖啡因添加量为 4~5 mol/L 时,能提高鸡精液冷冻解冻效果,且效果最佳,精子活力最高,为 0.44~0.48,畸形率最低,为 7.2%~7.4%,精子体外存活时间最长,为 104~109 min,显著优于其他组( $P < 0.01$ )。