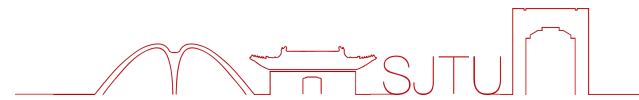




上海交通大学
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY



第二届博鳌高端猪业科技论坛

猪冷冻精液现状和未来

李 新 红
博士/教授

2020年11月11日

饮水思源 · 爱国荣校



1

一、猪精液冷冻技术

2

二、低温保护剂筛选

3

三、现状与技术瓶颈

4

四、未来发展与趋势

01

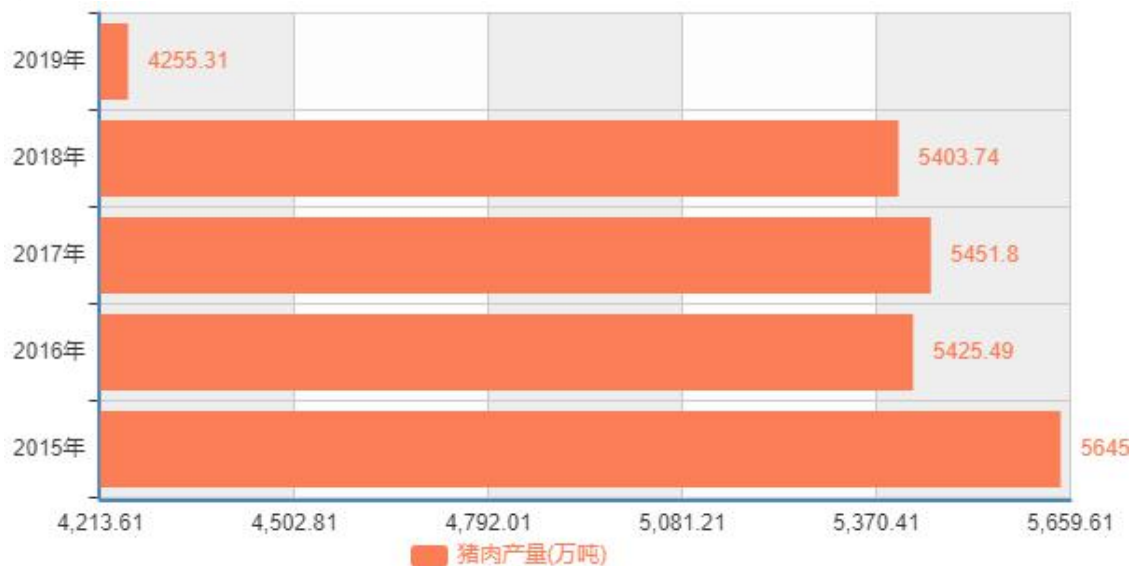
猪精液冷冻技术





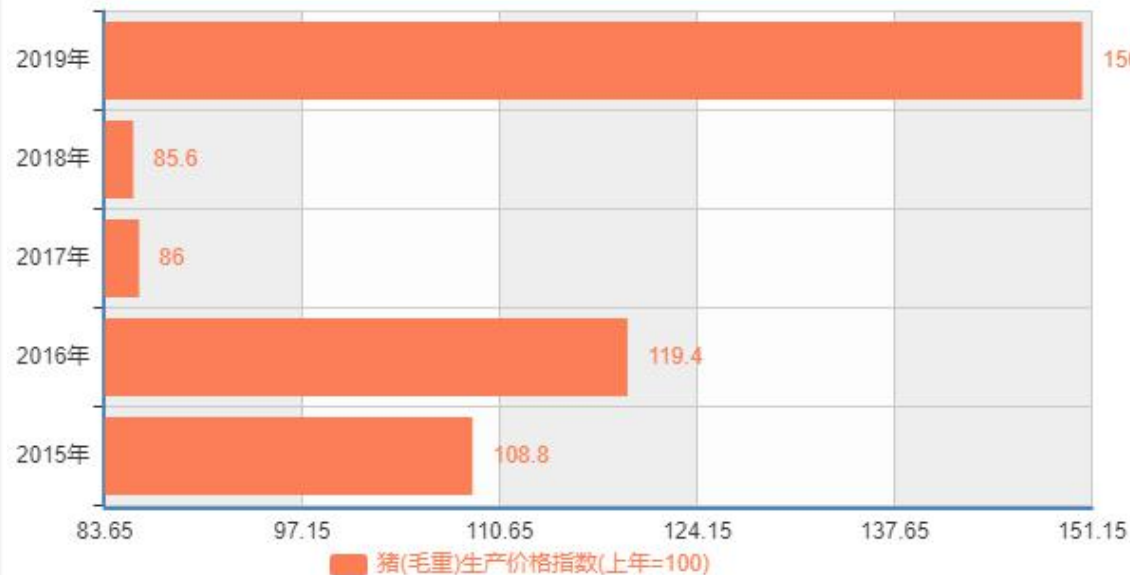
猪精液冷冻技术

近五年猪肉产量



受到“猪周期”和非洲猪瘟的影响，2018-2019年猪肉产量大幅下降。

近五年生猪（毛重生产价格指数）



猪肉产量的下降导致价格不断攀升，同时产生更多的养殖动力。

全国对猪肉呈现高品质和高数量需求！





公猪繁殖技术的应用及其优势

应用

公猪改良优选

人工授精技术

精液长效保存

优势

提高公猪精液利用率

雄性遗传物质的长期保存

克服时间地域差异适时配种

有助于提高妊娠效率和产仔数

减少精液污染便于控制疾病传播



猪精液长效保存技术

液态保存

概念：精液在**液体状态**下保存的技术，保存温度在**17°C或5°C**，有效保存时间可达10天以上；

现状：全球范围内**99%**人工授精使用液态精液，是目前主流保存方式；

优势：液态精液人工授精平均妊娠率为80%，产子数11；保存和运输**便捷**；

冷冻保存

概念：精子在**冰晶固态**形式下保存的技术，保存温度通常在0°C以下（-80°C或-198 °C），精子可**长久保存**；

现状：全球**使用范围较小**；猪精液冷冻保存技术仍有发展空间；

优势：可用于**保护遗传资源**；**延长优良精子的利用时间**；

猪精液冷冻保存技术具有发展潜力！



猪精液的生理特点

精液

组成：精子与精清

单次射精量：150-500毫升

精子数：40-50*10¹⁰ 个

颜色：乳白色或灰白色

渗透压：290至300 mOsm

pH值：7.4±0.2

精子

组成：头、颈和尾部，总长约60微米；

头部：由质膜、细胞核和顶体组成，包含遗传物质及精卵结合关键酶。

颈部：发挥连接头部和颈部的作用。

尾部：呈鞭毛状，包含大量线粒体，是精子的主要动力来源。

猪精液冷冻重点是保护精子的结构完整性！



猪精液冷冻过程中的生理变化

❶ 冷冻过程中，精子经历物理和化学环境的一系列剧烈变化，主要引起精子相变



细胞外

- 主要包含水分和保护液；
- 低温水会形成冰晶，改变渗透压，损伤精子膜；

细胞膜

- 主要成分脂质具备异质性，有不同的相变温度；
- 低温会产生凝胶和液态结构域，结构易损；

细胞内

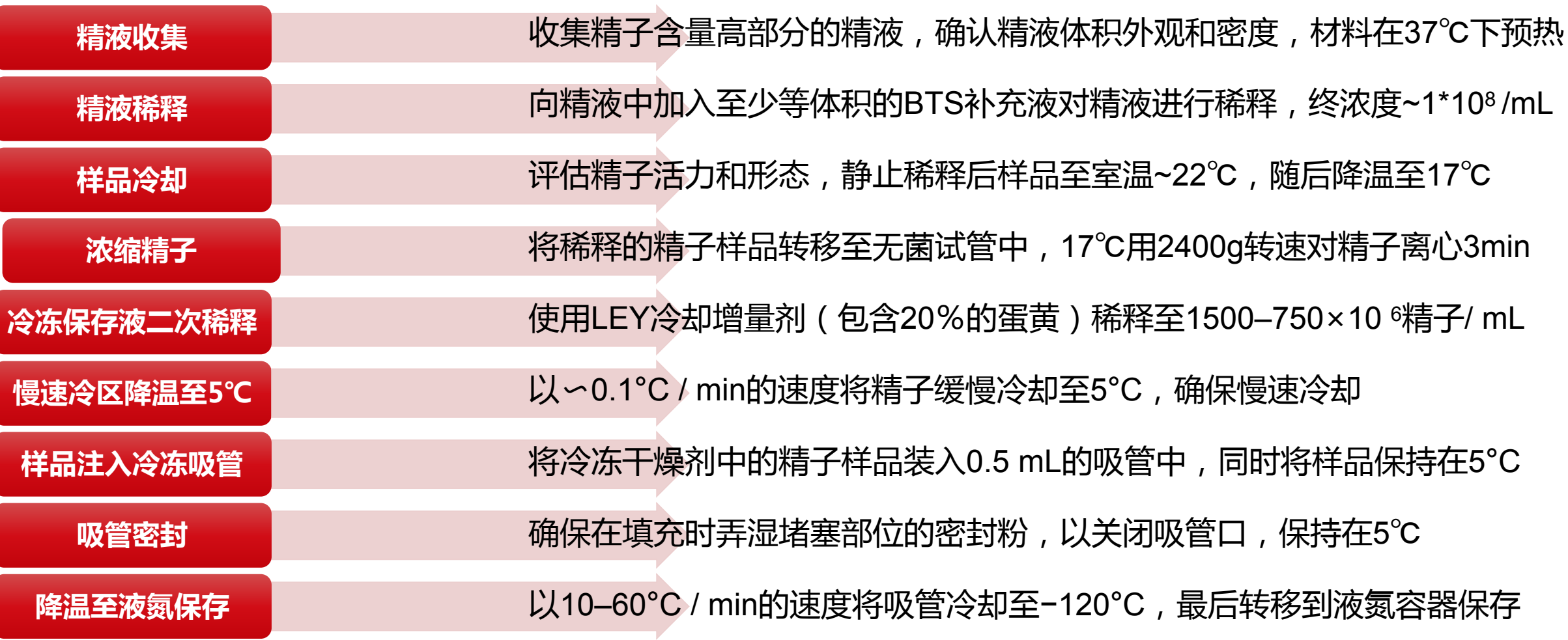
- 主要由水组成
- 低温引起胞内水结晶，释放结晶潜热，改变渗透性；

依据冷冻速度可分为：缓慢冷冻和快速冷冻(玻璃化冷冻)，缓慢冷冻为常用技术



猪精液冷冻技术

猪精液冷冻流程(缓慢冷冻)



此流程为国际通用方法，具体操作参考 *Methods in Molecular Biology* (2020版)

Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock: Bovine, Equine, and Porcine Sperm. Chapter 15





猪精液冷冻流程(缓慢冷冻)的注意事项

步骤	影响因素	注意事项	参考文献
冷冻前	精子收集	使用密度梯度清洗可以去除死精和功能丧失的精子（Androcoll- P试剂），提高冻前精子质量；	Kruse et al. (2011), Martínez- Alborcia et al.(2012), Martinez- Alborcia et al. (2013)
	平衡时间	低温保存之前，将公猪精子在15–17°C下保存10–24 小时（保持时间）会增加其低温耐受性；	Alkmin et al. (2014), Casas and Alhouse (2013), Yeste, Estrada, Rivera Del Álamo, et al. (2014)
冷冻过程	包装因素	在0.25mL-5mL的吸管中, 0.5mL的吸管包装对于精子质量保护的最明显；	Casas et al. (2009), Wongtawan et al. (2006), Yeste, Estrada, et al. (2013)
	冷冻速率	冻结步骤（即从5到 -150 °C）通常持续5到6分钟为宜；	Carvajal et al. (2004), Casas et al. (2009)
	防冻剂	渗透性(甘油)和不可渗透性(乳糖和蛋黄)保护液防止精子损伤；	Rodriguez - Martinez and Wallgren (2011), Zeng, Tang, et al. (2014)



猪精液解冻流程

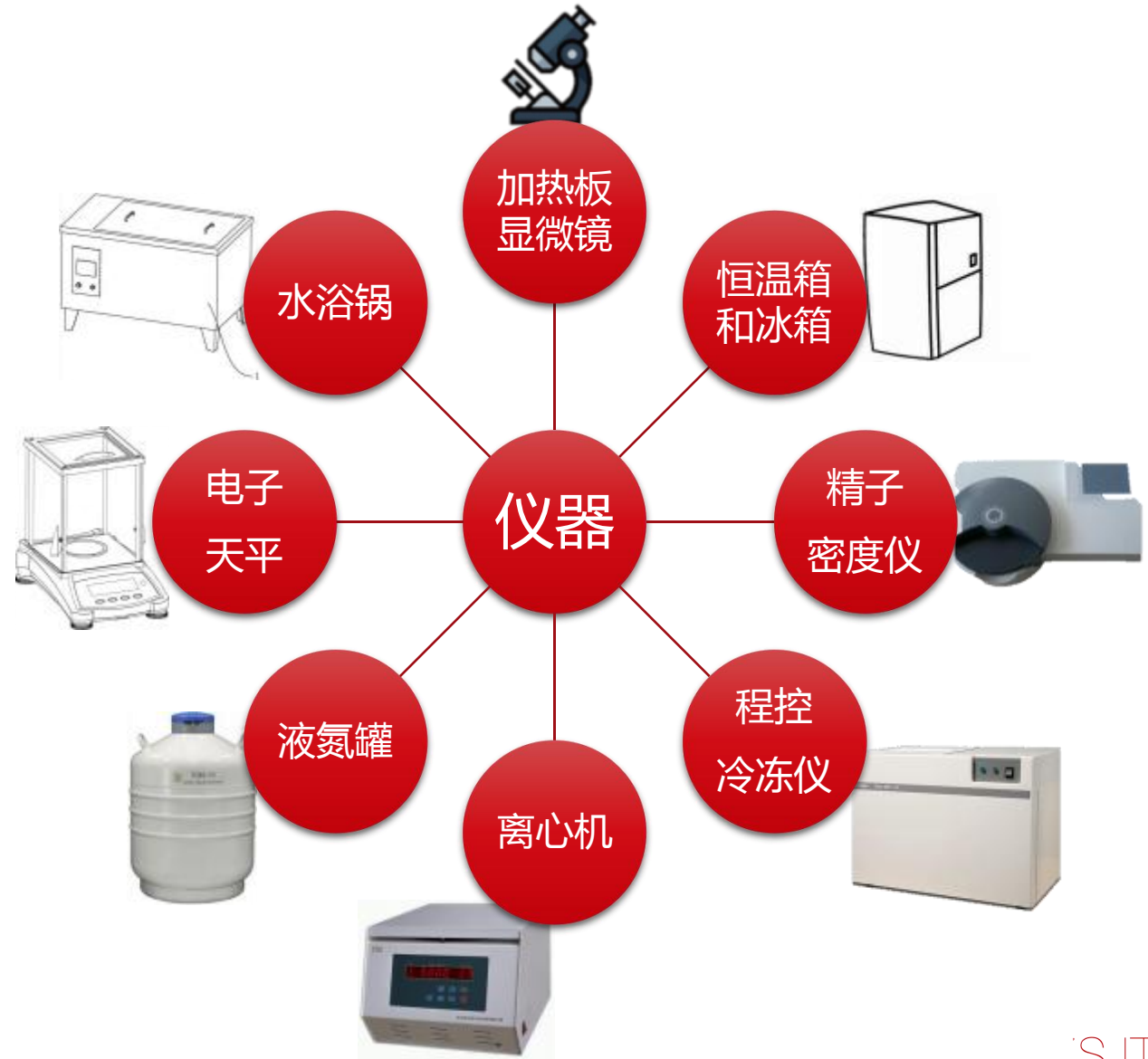
主要解冻过程：样品37℃温水中孵育30s；

注意事项: (可有效提高冷冻精子利用率)

1. 当在较短的时间内使用较高的培养温度时，融化会更快，解冻后的精子活力更高；
2. 解冻后必须稀释至合适的浓度，Beltsville解冻溶液（BTS）是使用最广泛的精子稀释剂；
3. 额外添加运动激活剂（如茶碱）和抗氧化剂（如半胱氨酸），可提高精子活力；
4. 解冻精子适量添加精清可改善顶体完整性，并增加怀孕率；
5. 提高授精过程中精子数量，如 3×10^9 /剂时母猪具有良好生殖性能；



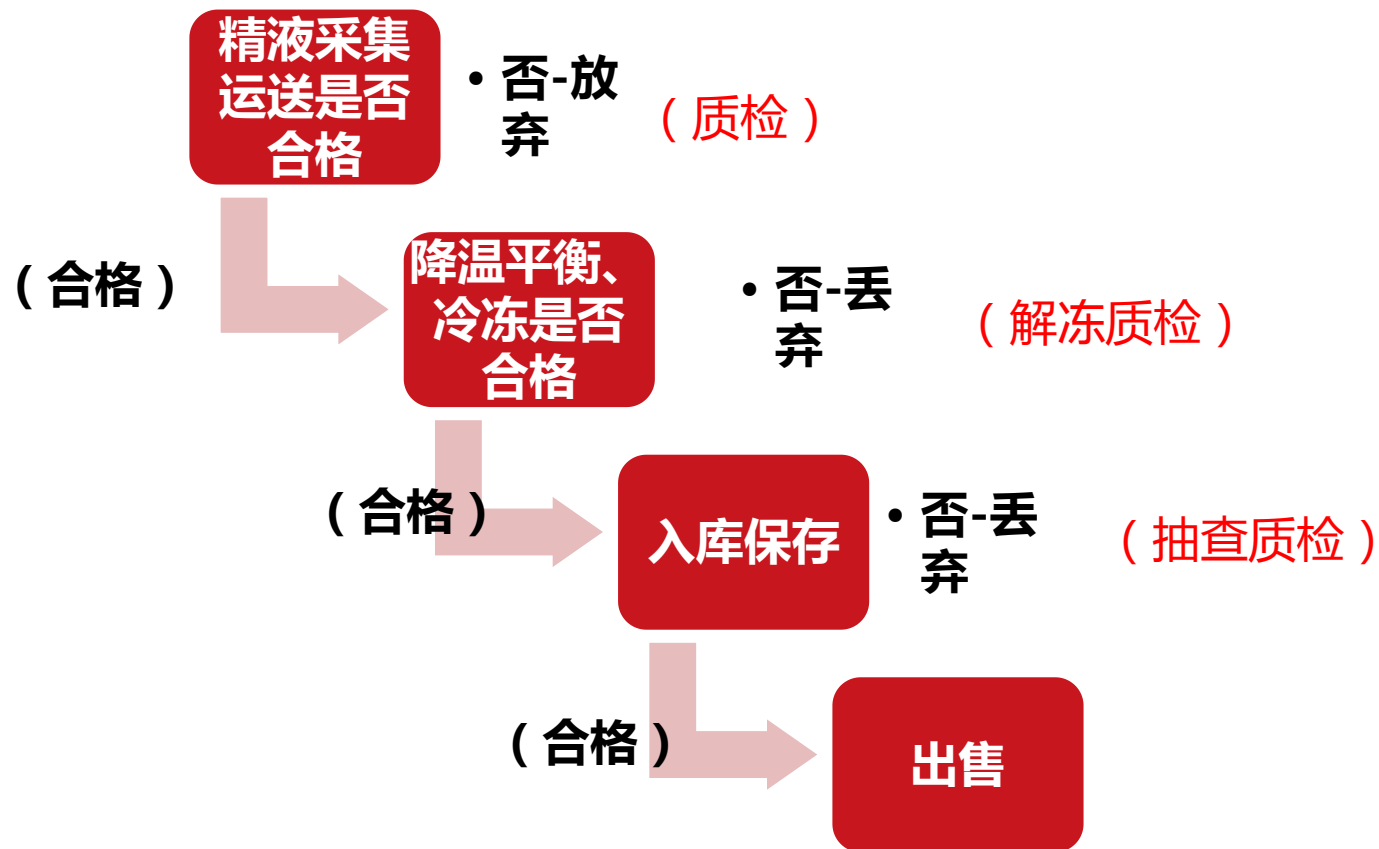
猪精液冷冻保存平台





猪冷冻精液生产保存流程

猪冷冻精液生产基本流程

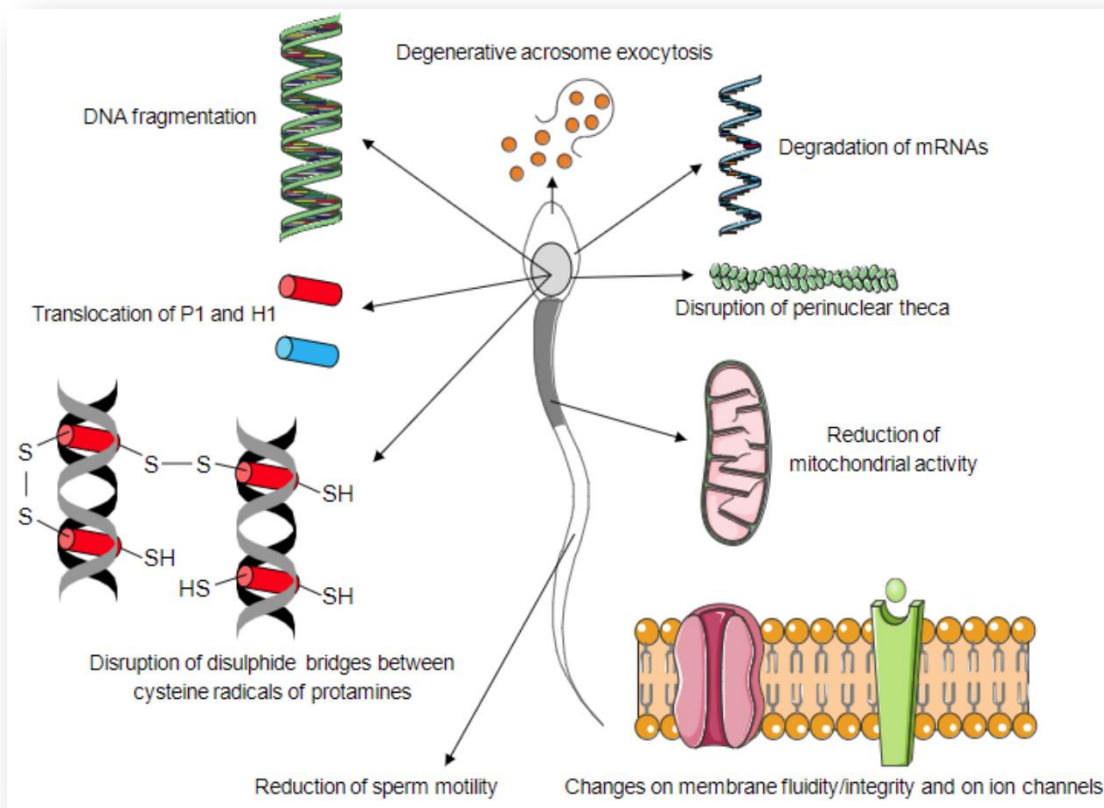


02

低温保护剂筛选



猪精液冷冻过程对精子的主要损伤



冷冻对猪精子的损伤 (Yeste , 2016)

- ① 顶体破损
- ① 质膜完整性降低
- ① DNA损伤
- ① 活性氧增多
- ① 线粒体活性减弱
- ① 钙离子流失
- ① 精子活力下降

① 损伤主要由低温引起胞内水分子相变成冰晶，导致精子损伤



低温保护剂筛选

低温保护剂的分类

针对冷冻损伤的表现，具有不同的保护策略





低温保护剂筛选

冷冻时添加的保护剂

渗透性防冻剂 主要包括甘油乙二醇等可以穿过细胞膜的物质。

甘油能有效地保留了解冻后的精子功能;



Baishya et al. , 2014

甘油可改善精子的活力和顶体膜完整性;



Silva et al. , 2015

2%–3%的甘油会降低细胞凋亡作用。



Zeng et al. , 2014



低温保护剂筛选

冷冻时添加的保护剂

❶ 非渗透性防冻剂 主要包括蛋白质、聚乙二醇、葡聚糖蛋黄等在胞外作用的物质。

乳糖和海藻糖
能有效提高精
子活力和授精
能力;



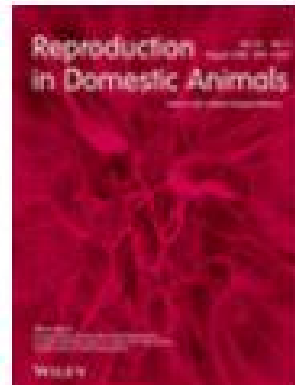
Malo et al. , 2010

20 % 蛋黄和
甘油同时使用
可显著改善精
子活力 ;



Hu et al. , 2010

OEP可保护质
膜,增强线粒体
功能和质膜完
整性 ;



Fraser, Jasiewicz, & Kordan , 2014

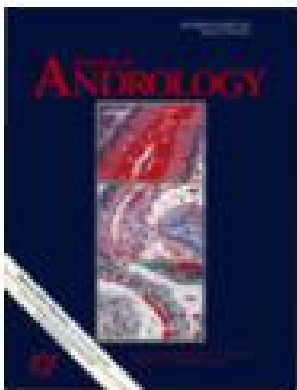


低温保护剂筛选

冷冻时添加的保护剂

抗氧化剂 主要包括抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、生育酚等

谷胱甘肽可以增强精子活力，保护膜和核的完整性；



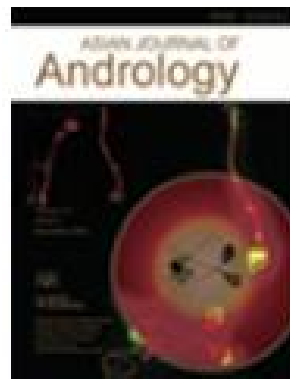
Malo et al. , 2010

抗坏血酸和谷胱甘肽结合使用会产生更好的保护效果；



Giaretta et al. , 2015

半胱氨酸,生育酚，丁基化羟基甲苯，Trolox被证实具有保护精子作用；



Chanapiwat, et al.2009 ; Roca et al.2004 ; Giaretta et al.,2015 ; Jeong et al.2009 ; Kaeoket et al. , 2010 ;



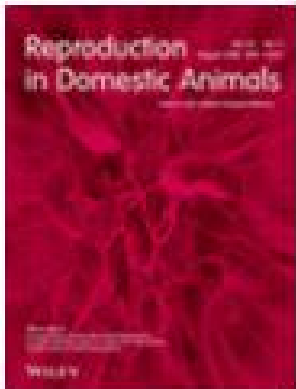


低温保护剂筛选

冷冻时添加的保护剂

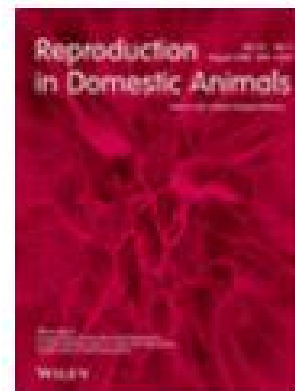
胆固醇类 主要包括胆固醇负载的环糊精 (CLC) 等

CLC可以在解冻后1小时提高冻融精子的膜完整性



Graham et al. , 2012

CLC补充解冻介质可增强质膜和冻融精子的顶体完整性



Tomás et al. , 2014



低温保护剂筛选

解冻时添加的稀释保护剂

精浆(具有争议)

精浆对精子活力和膜完整性具有积极作用, 提高生殖性能;



Okazaki et al. , 2012

有些学者证实精清对提高繁殖能力无明显作用 (Fernández-Gago et al , 2013)

催产素

催产素在人工授精前加入精液中, 可提高精子授精能力;



Okazaki et al. , 2014



低温保护剂筛选

解冻时添加的稀释保护剂

EDTA离子螯合剂

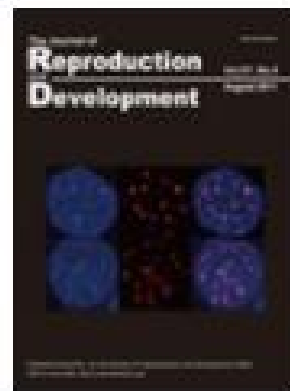
EDTA也能增加精子的活力和冷冻解冻精子的受精能力；



Okazaki et al. , 2012

咖啡因和钙离子

咖啡因和Ca可增加子宫内受精冷冻解冻精子母猪分娩率



Yamaguchi et al. , 2009

低温保护剂目前研究非常多，但选取时需要验证！





低温保护剂筛选

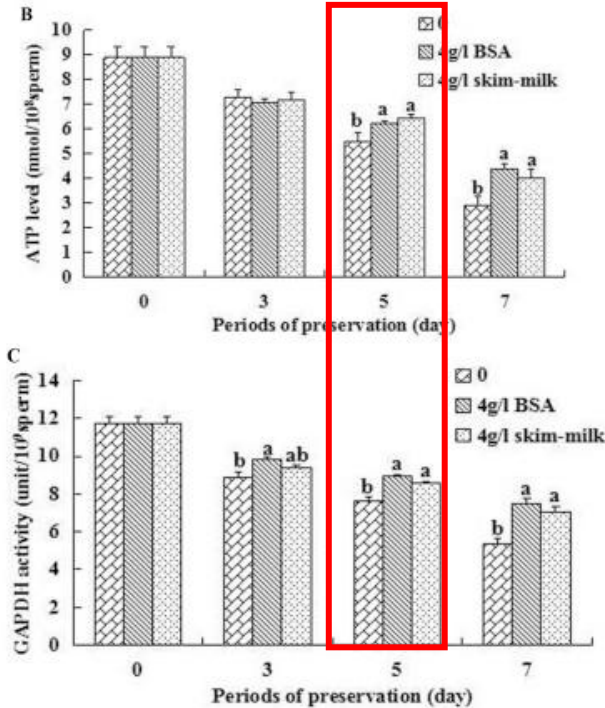
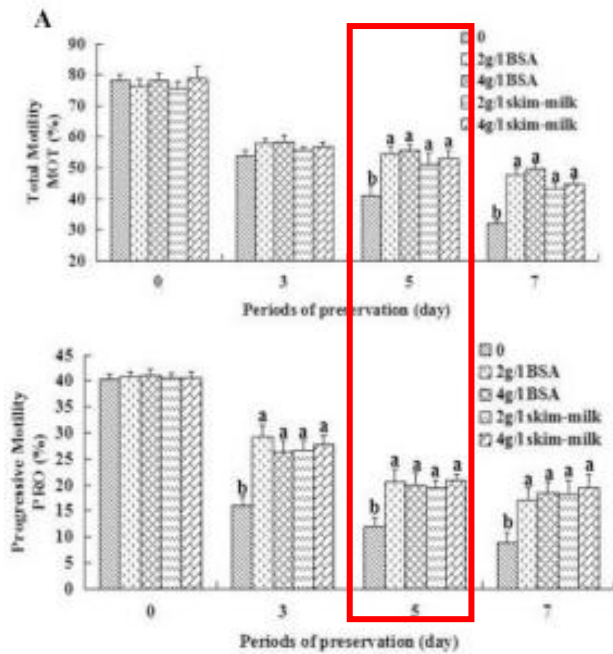
潜在的低温保护剂

本团队研究工作

BSA和脱脂奶粉

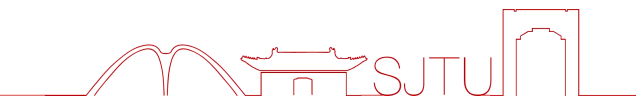
保护低温保存中精子活力

提高低温保存中精子能量生成



Xinhong Li et al. , 2017

蛋白类BSA和脱脂奶粉可能
作为潜在的防冻剂！



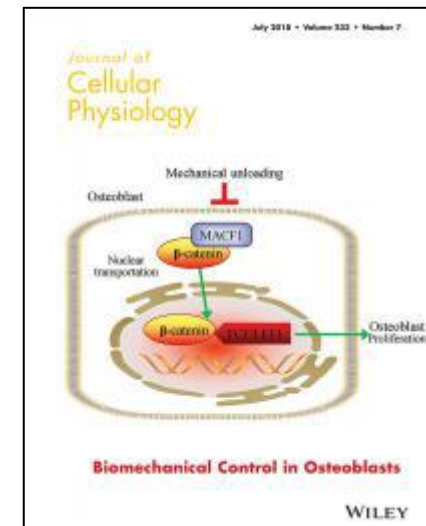
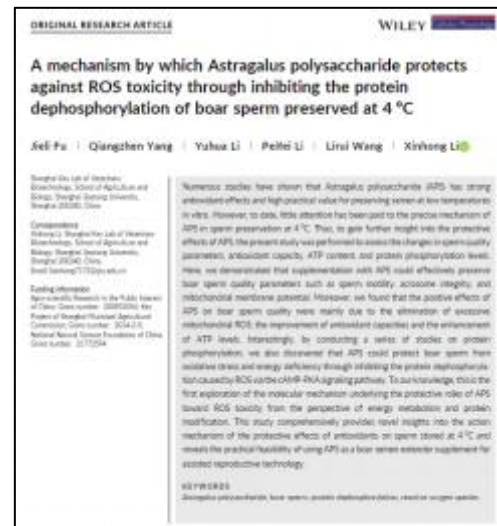
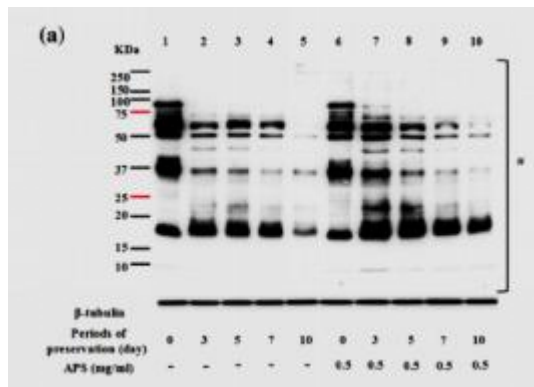
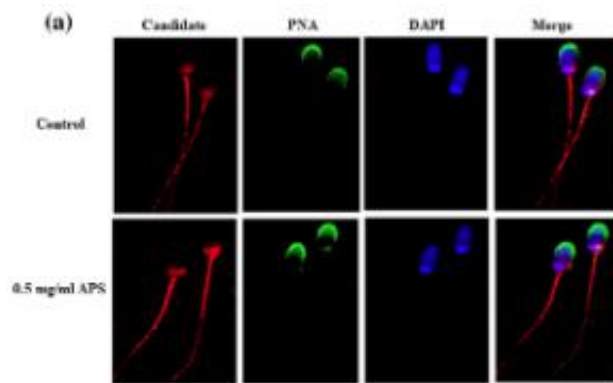


低温保护剂筛选

潜在的低温保护剂

本团队研究工作

黄芪多糖



Xinhong Li et al. , 2018 (IF:5.546)

Accepted directly without revision

黄芪多糖可能为冷冻过程的
精子提供保护！

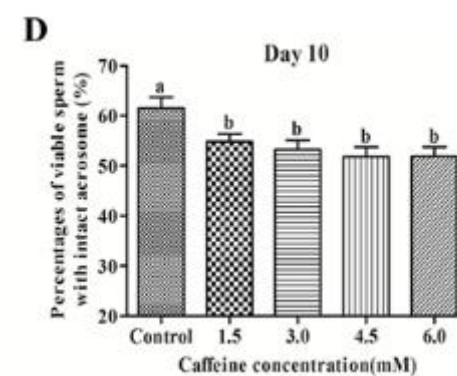
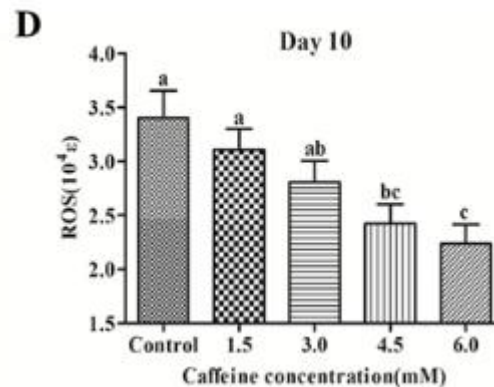
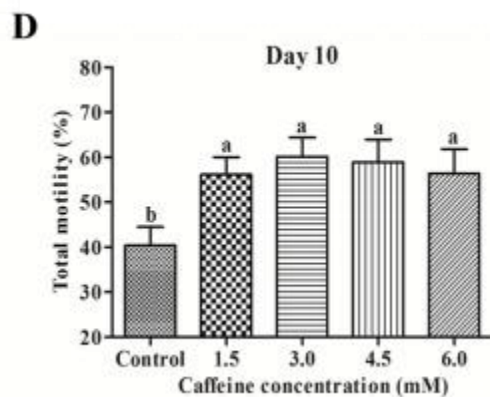
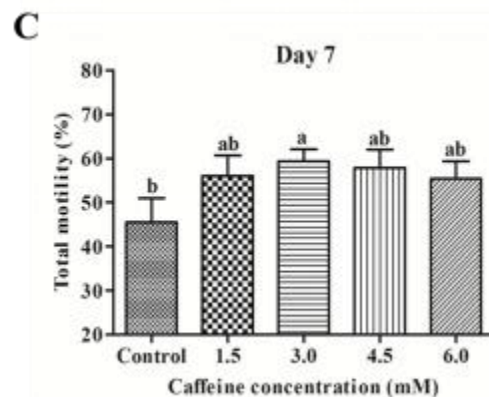
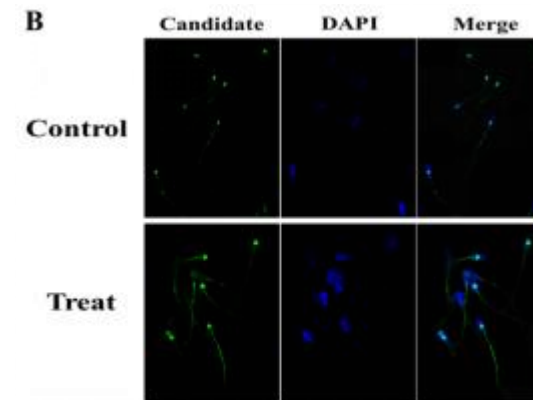
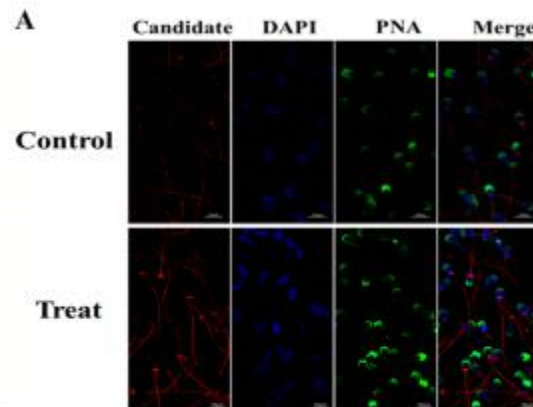
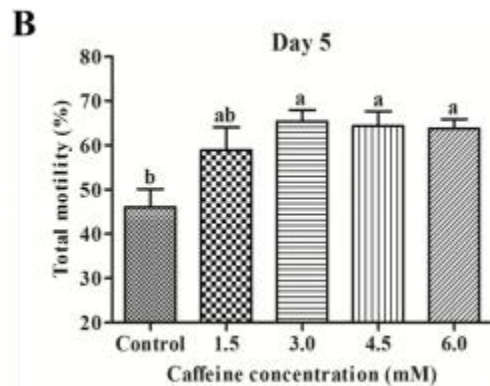
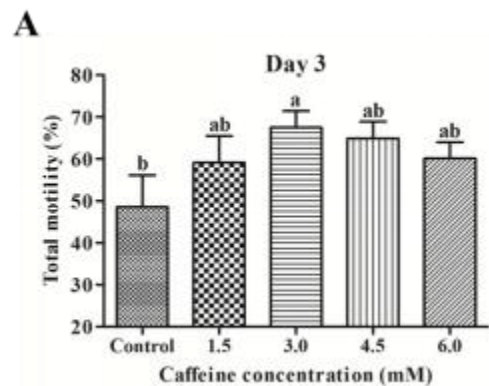
首次从蛋白磷酸化角度揭示黄芪多糖通过抗氧化功能保护精子活力！





低温保护剂筛选

本团队研究工作



咖啡因可能对冷冻保存的猪精子提供激活作用！



03

现状与技术瓶颈





1、猪精液冷冻保存技术现状：

优势：冷冻的精子可以与供体和受体的位置无关地使用，可以长期保存，甚至在公母死亡后也可以作为遗传储备。

在现代牲畜育种中，使用冷冻保存的精液进行人工授精优于使用冷冻保存的胚胎和卵母细胞。

现状：在养牛业中，授精几乎完全依赖于使用冷冻保存的精液。

在马种中，主要使用冷藏（ 5°C ）稀释的精液，但使用冷冻保存的精液的兴趣日益浓厚。

在猪种中，用稀释的精液进行授精，精液在 $16-20^{\circ}\text{C}$ 下储存和运输。

精液的冷冻保存可以有效保留生物的种质资源。

但猪冷冻精液生产因难度大、冻精-解冻后活率及受胎率低等诸多原因，导致猪冷冻技术研究仍未完全成熟。

完善猪冷冻精液制备技术，还有很多问题亟待解决。

Schulze, M., Kuster, C., Schäfer, J., Jung, M., & Grossfeld, R. 2018. *Animal Reproduction Science*, 190, 94–101.

Karageorgiou, M., Tsousis, G., Boscós, C., Tzika, E., Tassis, P., & Tsakmakidis, I. 2016. *Acta Veterinaria Brno*, 85, 023–031.

Yeste, M. (2017). State - of- the - art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, 14(1), 69–81.



2、猪精液冷冻保存技术瓶颈：

➤ 抗生素引起的细菌耐药问题

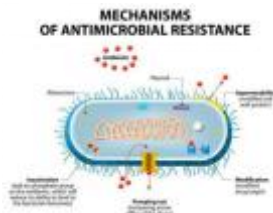
精液中细菌数量是影响冷冻精液品质的决定性因素之一



抗生素的使用会引起耐药菌株并在通过人工授精传播

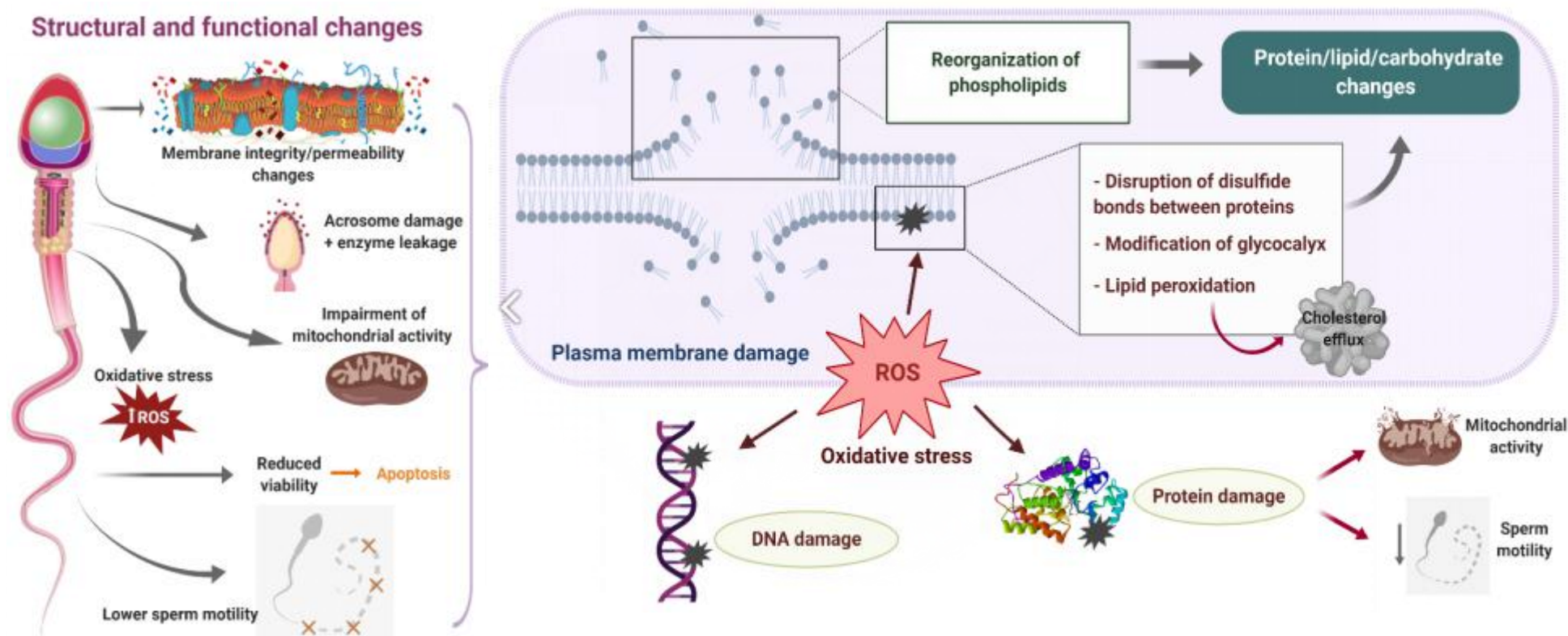


发展高效/新颖的非抗生素型抑菌策略，已是未来发展的大势所趋



2、猪精液冷冻保存技术瓶颈：

- 冷冻过程易诱导精子产生ROS的累积，对精子的生理功能产生重要影响。



04

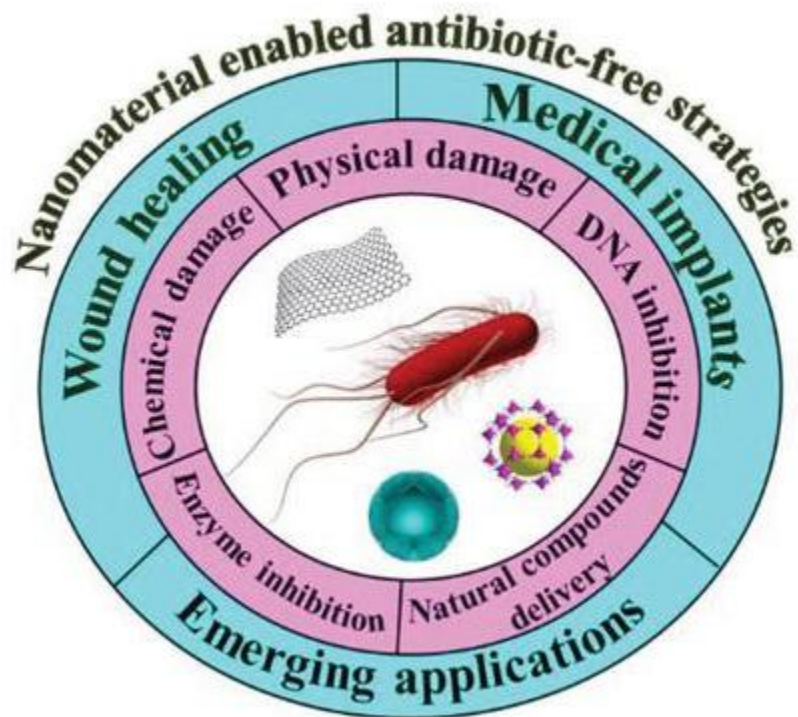
未来发展与趋势



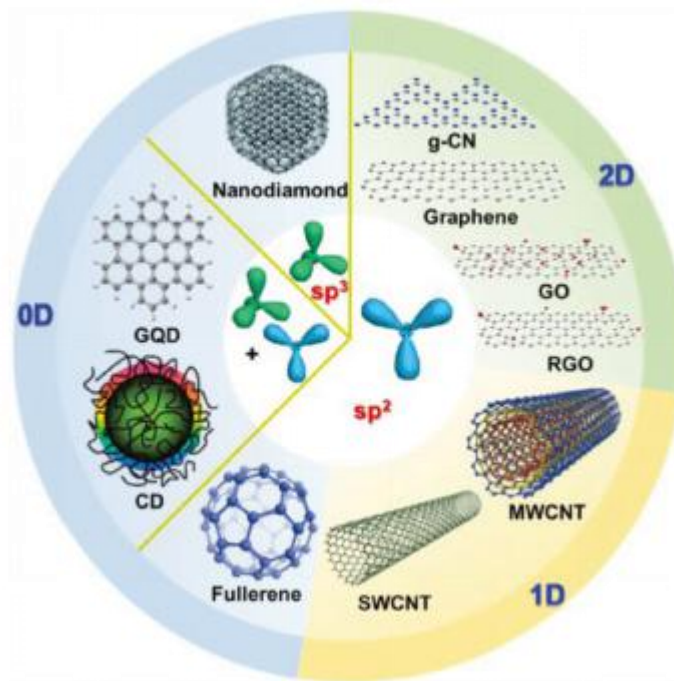


1、猪精液冷冻细菌微生物的防治：

➤ 发展高效/新颖的非抗生素型抑菌策略



纳米材料催生的非抗生素型抑菌策略



碳基抗菌纳米材料举例

纳米材料具备的特质：

- 1. 菌株选择性（葡萄球菌属/假单胞菌属等）
- 2. 蛋白酶稳定性
- 3. 热动力学稳定性等。

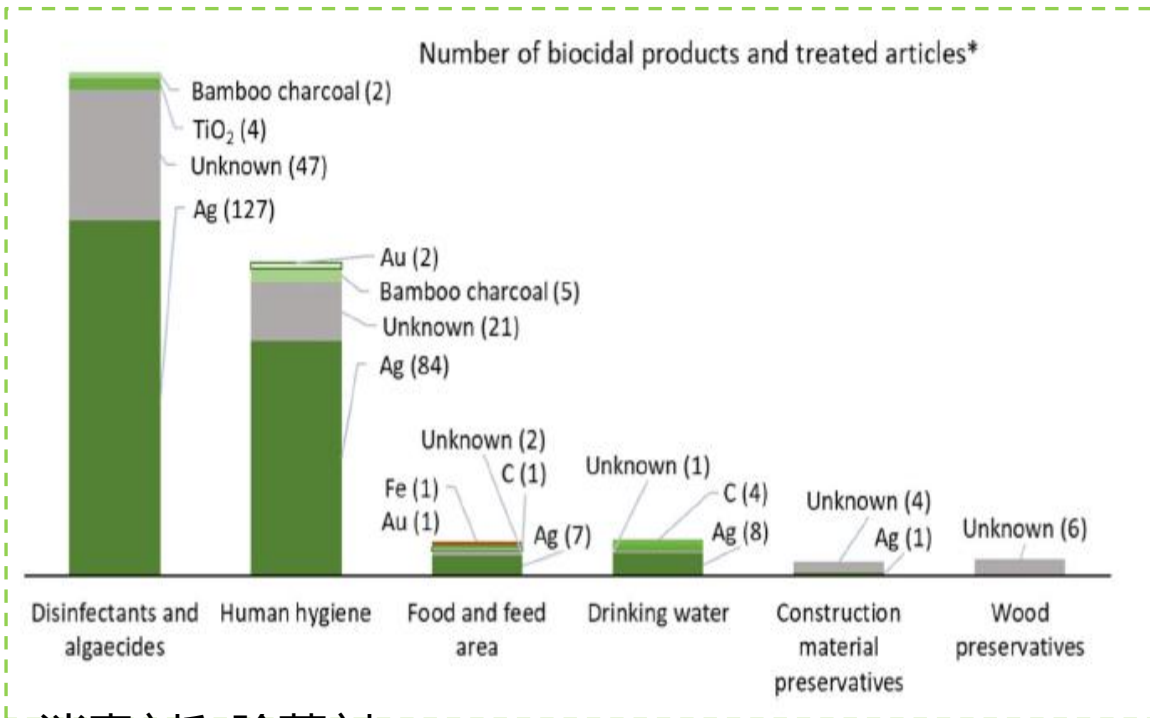




1、猪精液冷冻细菌微生物的防治：

➤ 发展高效/新颖的非抗生素型抑菌策略

抗菌纳米材料替代抗生素的可行性参照



消毒剂 and 除藻剂



nanomaterials



Article

Iron Oxide Nanoparticles as an Alternative to Antibiotics Additive on Extended Boar Semen

Ioannis A. Tsakmakidis ^{1,*}, Theodoros Samaras ², Sofia Anastasiadou ¹, Athina Basioura ¹, Aikaterini Ntemka ¹, Ilias Michos ¹, Konstantinos Simeonidis ², Isidoros Karagiannis ¹, Georgios Tsousis ¹, Mavroeidis Angelakeris ² and Constantin M. Boscos ¹

¹ School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54627 Thessaloniki, Greece; anastasiadousof@yahoo.gr (S.A.); basioura@vet.auth.gr (A.B.); demkaterina@hotmail.com (A.N.); imichos84@hotmail.com (I.M.); anisivet@yahoo.gr (I.K.); tsousis@vet.auth.gr (G.T.); pboscos@vet.auth.gr (C.M.B.)

² School of Physics, Faculty of Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece; theosama@auth.gr (T.S.); ksime@physics.auth.gr (K.S.); agelaker@auth.gr (M.A.)

* Correspondence: iat@vet.auth.gr; Tel.: +30-2310-994-467

Received: 20 July 2020; Accepted: 7 August 2020; Published: 10 August 2020



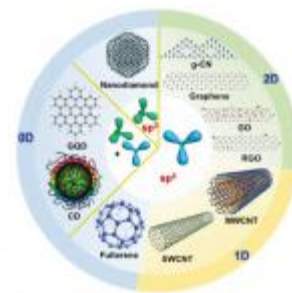
抗菌纳米材料在繁殖领域的应用存在很大空白！





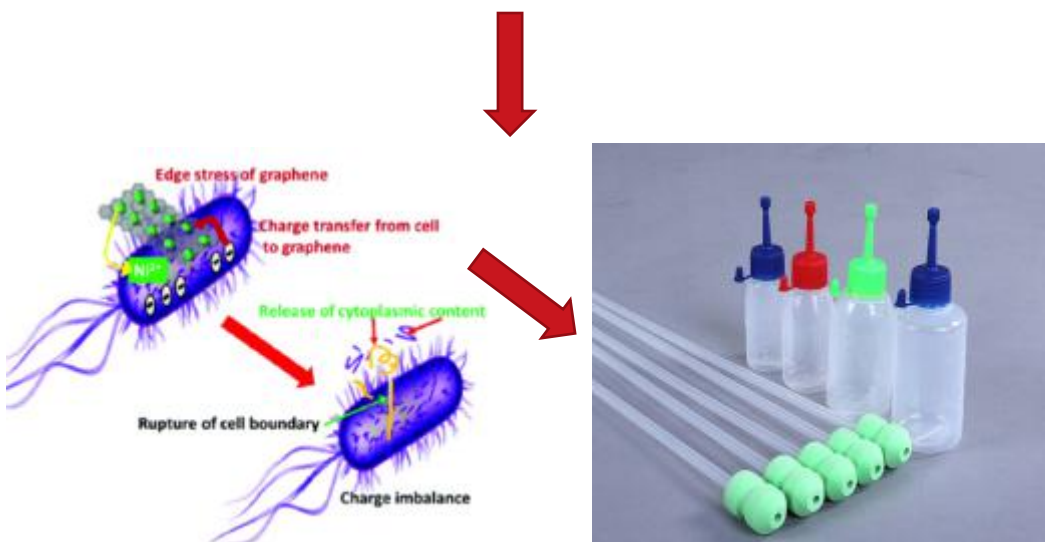
1、猪精液冷冻细菌微生物的防治：

➤ 发展高效/新颖的非抗生素型抑菌策略



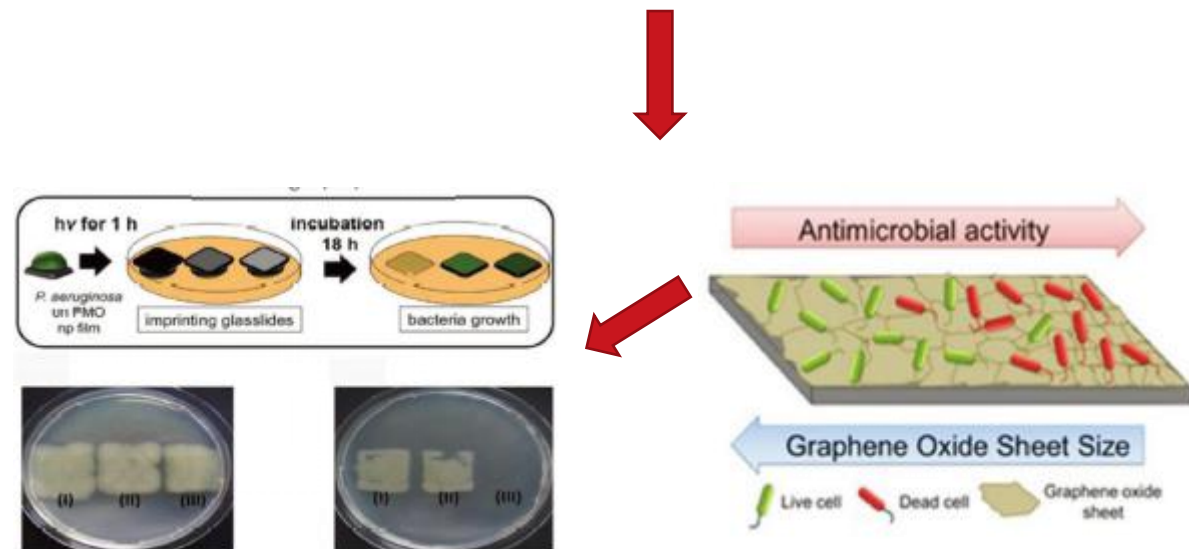
方案一

替代抗生素直接添加于精液中，用于精液保存
例如：金刚石粉，Au₂₅(MHA)₁₈



方案二

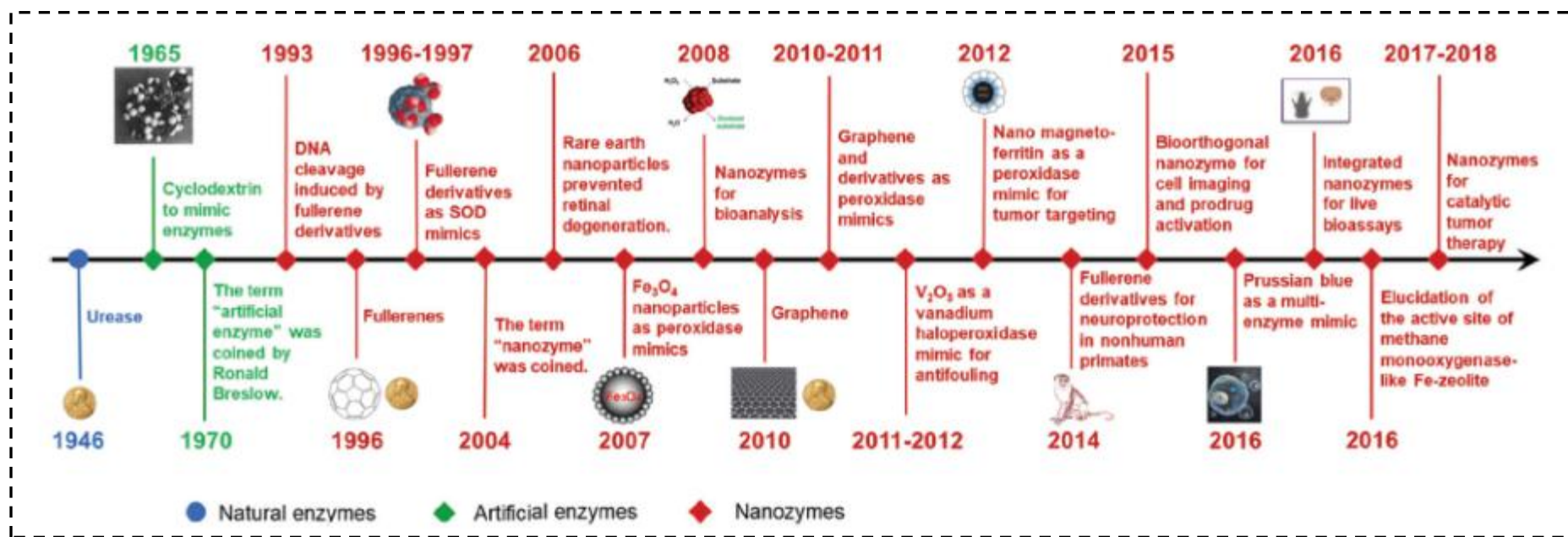
抗菌涂层或者抗菌器皿的开发：将抗菌材料应用于精液培养器皿的内表面





2、猪精液冷冻纳米材料的利用：

随着纳米科学的高速发展，一些无机纳米材料被发现具有类似酶的催化活性。这些纳米材料可以催化天然酶的底物反应，并且具有与天然酶相似的催化机制，因此被定义为**纳米酶 Nanozymes**。



生物酶和纳米酶的发展时间轴

自从2007年阎锡蕴院士团队首次报道纳米酶概念以来（Nature Nanotechnology, 2007）。迄今，全球已有29个国家的290多个实验室报道了**320余种**纳米酶，逐渐形成了**纳米酶新型交叉学科领域**。

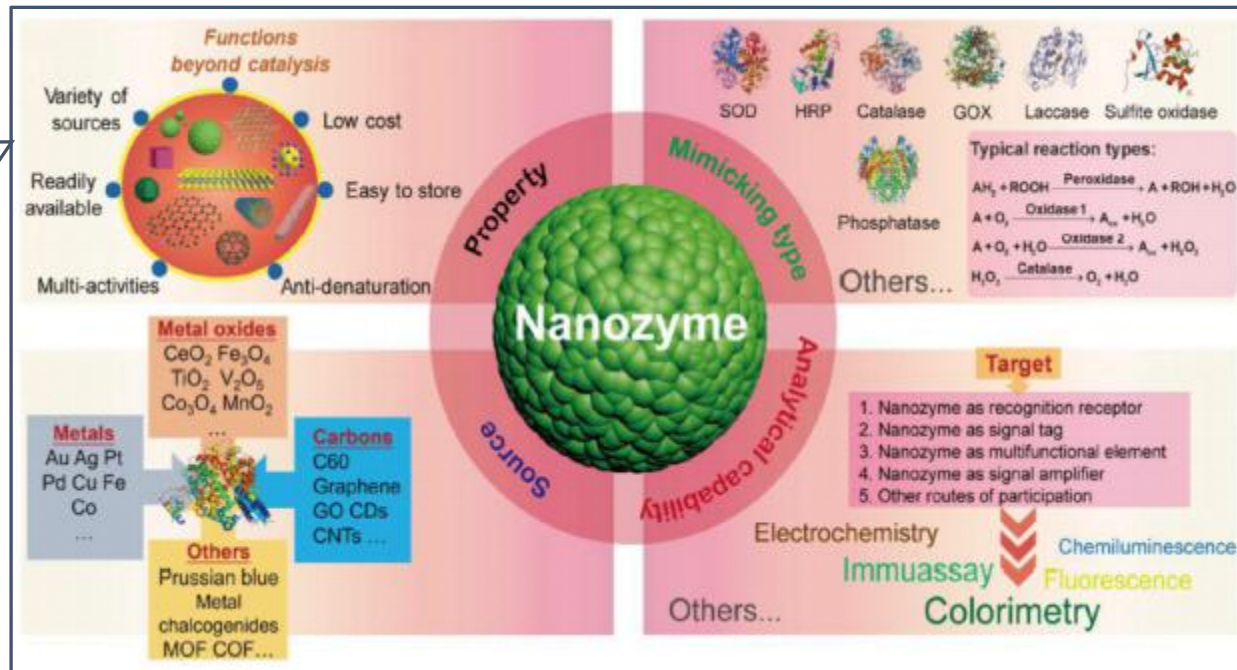




2、猪精液冷冻纳米材料的利用：

与传统生物酶相比较：

- 催化效率高
- 稳定性好
- 制备工艺简单
- 成本低、批量生产
- 易于储存



纳米酶的分类

纳米酶的应用

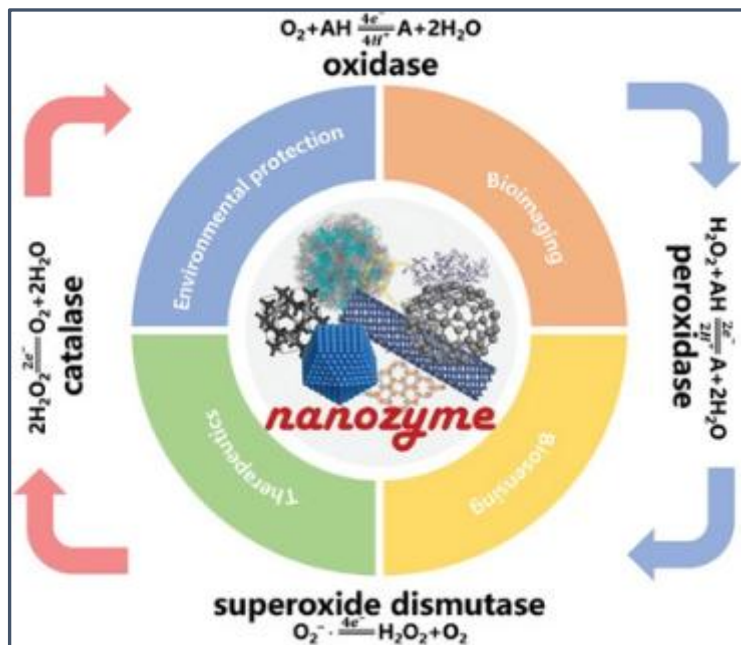


目前已被广泛应用到疾病诊断和治疗、传染病防控、环境监测和污水处理等多个领域。纳米酶是目前为数不多的由中国科学家发现、被国际同行认可，并迅速实现成果转化的**新型交叉学科领域**。

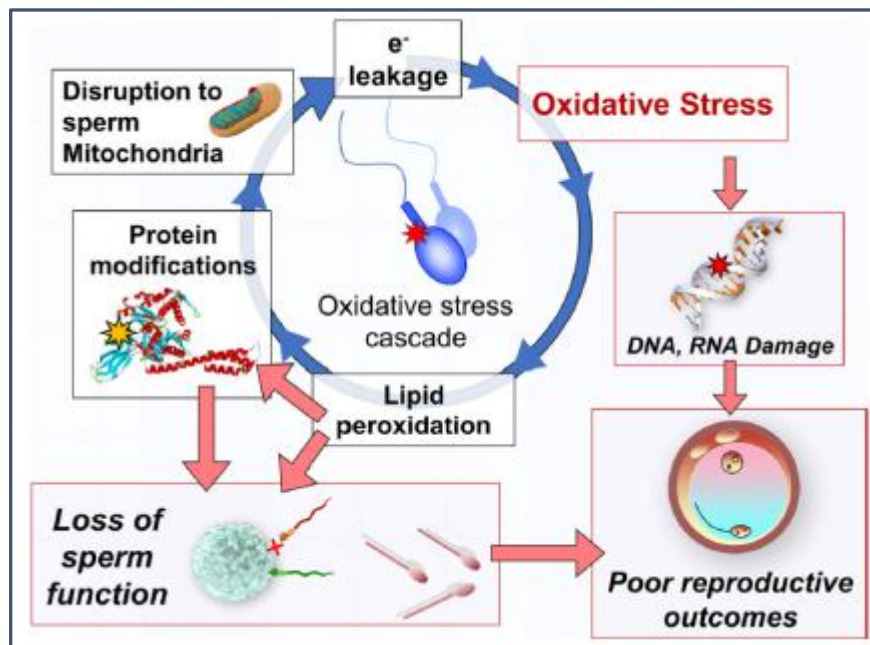


2、猪精液冷冻纳米材料的利用：

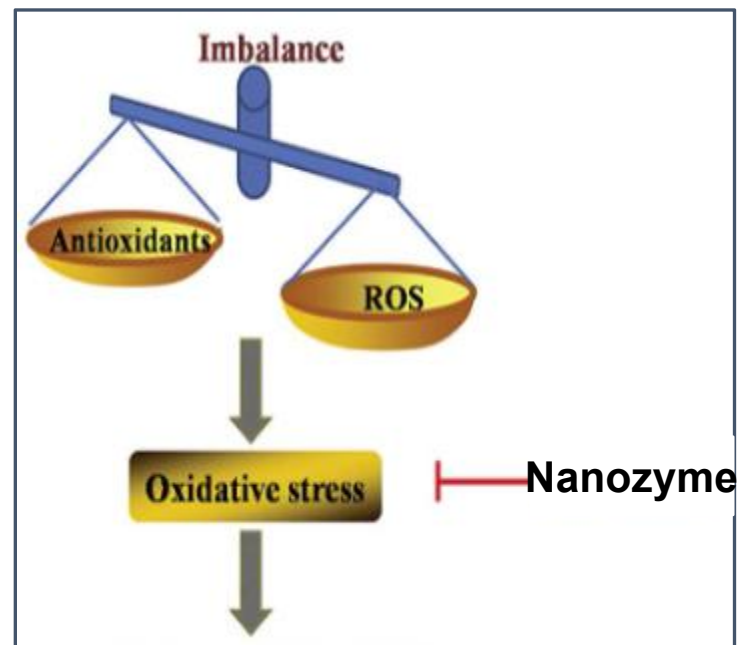
纳米酶的分类



精子冻融引起的氧化应激损伤



纳米酶的抗氧化作用



思考：能否将具有抗氧化活性的纳米材料应用于精液的保存？

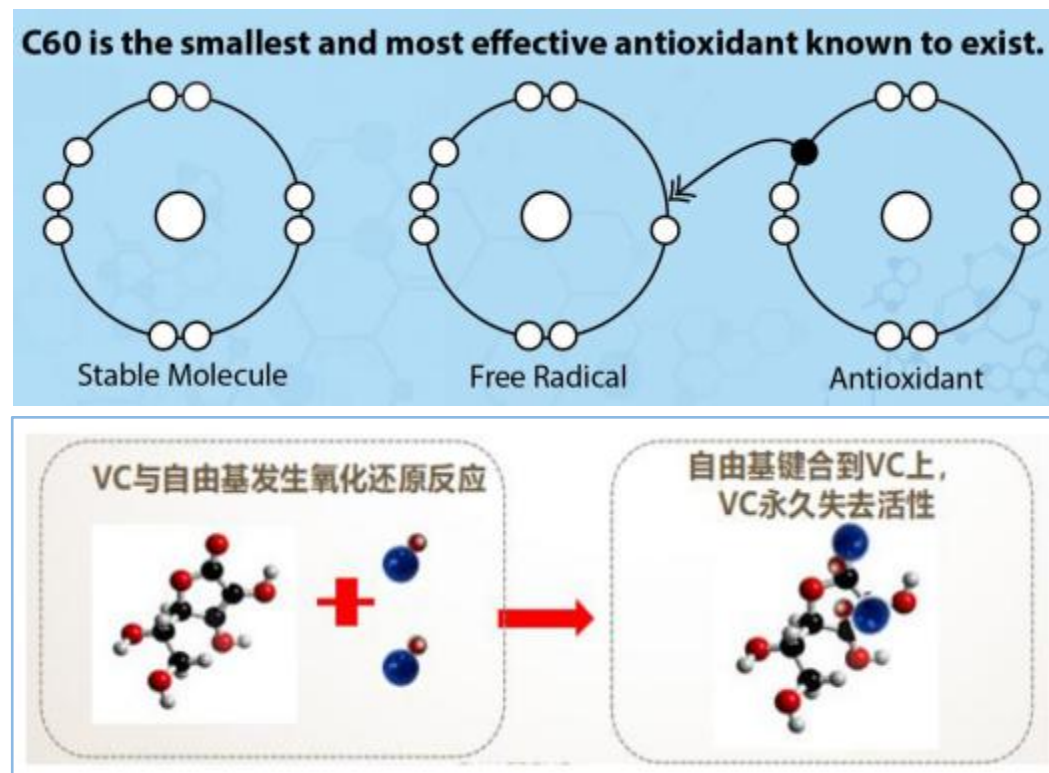


2、猪精液冷冻纳米材料的利用：

C60的抗氧化效率是Vc的172倍



C60的“足球状”结构



清除ROS的机理



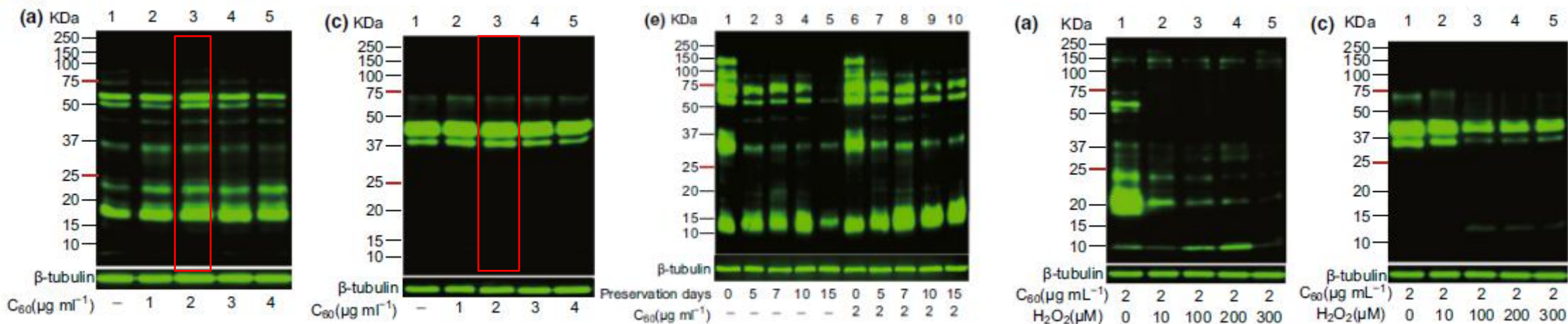
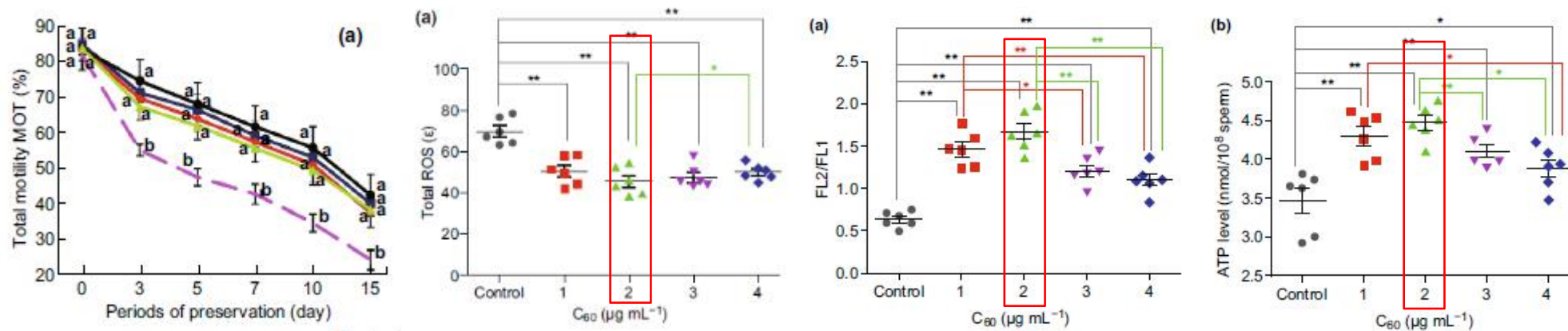
美国市场上的C60保健品





2、猪精液冷冻纳米材料的利用：

本团队研究工作

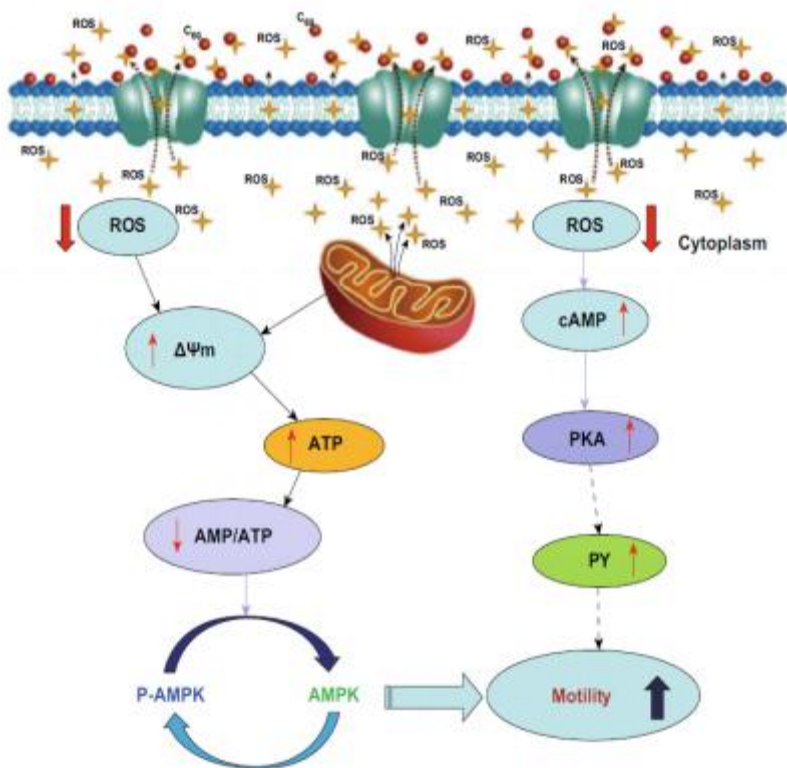




2、猪精液冷冻纳米材料的利用：

本团队研究工作

并邀稿Perspective文章



Nano-Micro Letters

ISSN 2311-6706
e-ISSN 2150-5551
CN 31-2103/TB

ARTICLE

<https://doi.org/10.1007/s40820-019-0334-5>



Cite as
Nano-Micro Lett.
(2019) 11:104

Received: 30 September 2019
Accepted: 29 October 2019
Published online: 27 November 2019
© The Author(s) 2019

C₆₀ Fullerenes Suppress Reactive Oxygen Species Toxicity Damage in Boar Sperm

Xinhong Li¹ ✉, Lirui Wang^{1,2}, Huan Liu¹, Jieli Fu¹, Linqing Zhen¹, Yuhua Li¹, Yaozhong Zhang³, Yafei Zhang⁴ ✉

✉ Xinhong Li, lixinhong7172@sjtu.edu.cn; Yafei Zhang, yfzhang@sjtu.edu.cn

- ¹ Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, People's Republic of China
- ² Institute of Nano Biomedicine and Engineering, Shanghai Engineering Research Centre for Intelligent Diagnosis and Treatment Instrument, Department of Instrument Science and Engineering, School of Electronic Information and Electrical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, People's Republic of China
- ³ Department of Electrical and Computer Engineering, Michigan State University, East Lansing, USA
- ⁴ Key Laboratory of Thin Film and Microfabrication (Ministry of Education), Department of Micro/Nano Electronics, School of Electronics, Information and Electrical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, People's Republic of China





未来发展与趋势

2、猪精液冷冻纳米材料的利用：

- 开发高效、无副作用的纳米酶用于精液保存

纳米材料用于精液保存的可行性参照

方案一

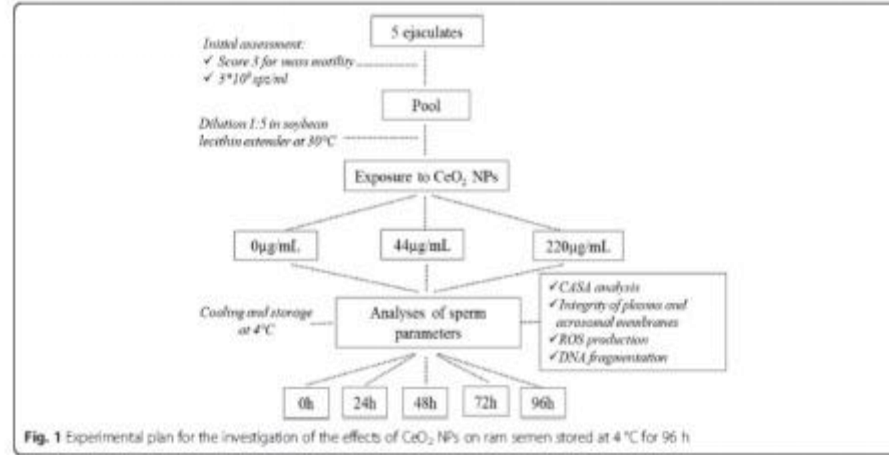
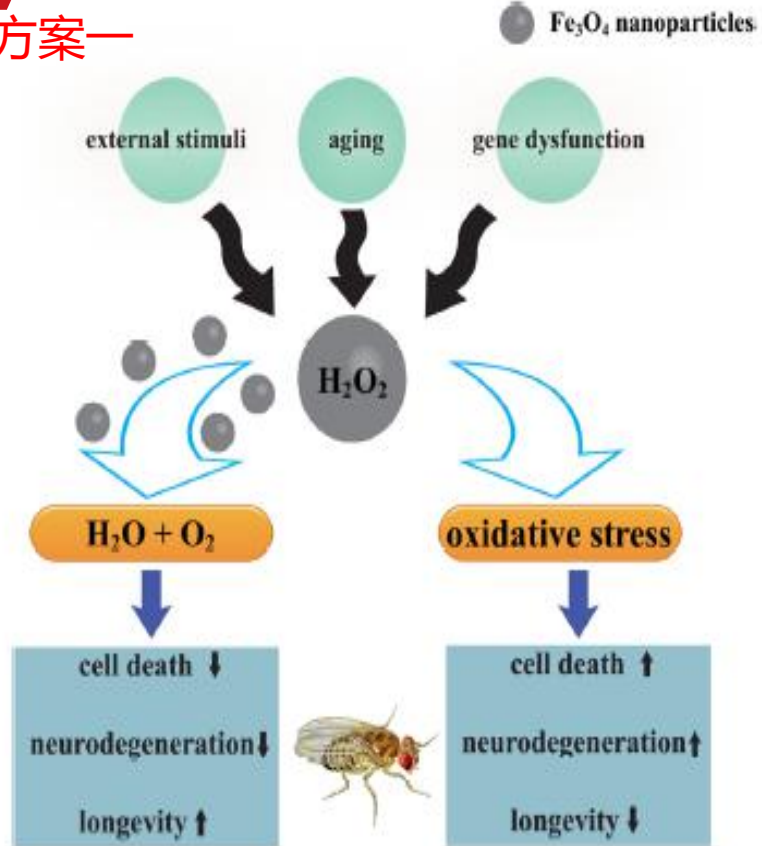
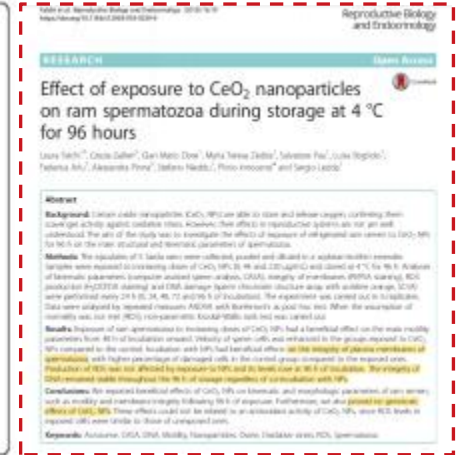
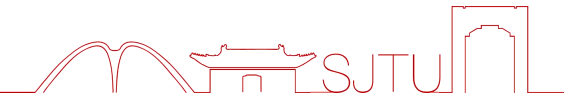
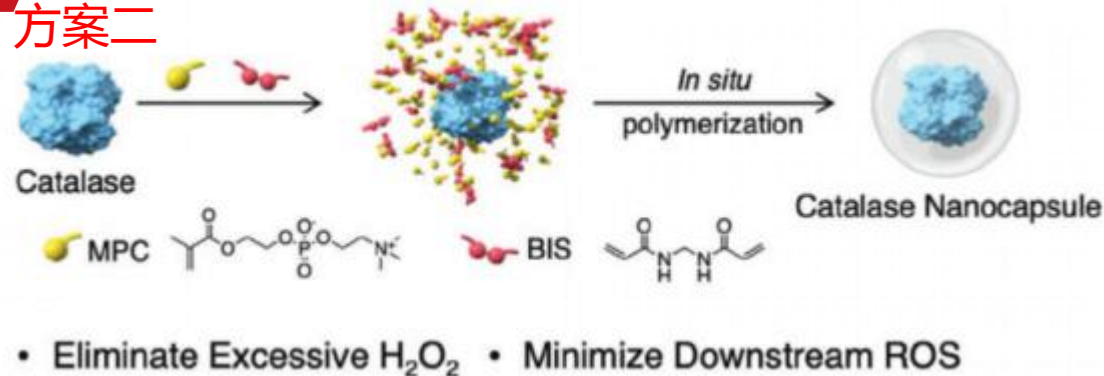


Fig. 1 Experimental plan for the investigation of the effects of CeO_2 NPs on ram semen stored at 4°C for 96 h



方案二

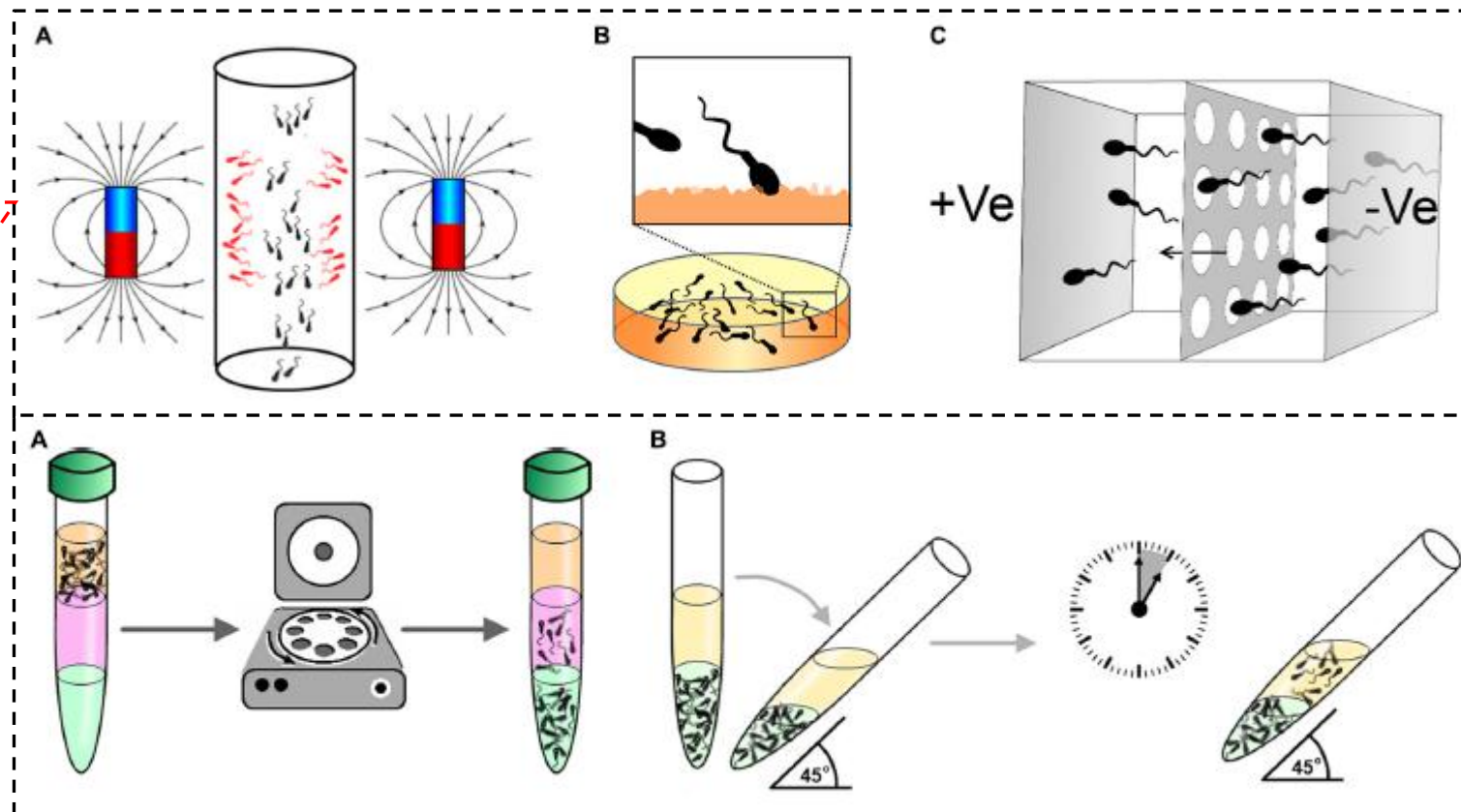




3、猪冷冻精液生产中的利用：

- 利用纳米技术解决繁殖领域的问题

利用纳米粒子筛选
活力强的精子,用于
人工授精





谢谢