(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 117296830 B
(45)授权公告日 2024.08.06

(21)申请号 202311244747.7
(22)申请日 2023.09.25
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117296830 A
(43)申请公布日 2023.12.29
(73)专利权人 仲恺农业工程学院
地址 510225 广东省广州市海珠区纺织路东沙街24号
专利权人 广东猪仙子繁育科技有限公司
(72)发明人 杨明 刘直泓 刘峻荣 欧稳
(74)专利代理机构 佛山市禾才知识产权代理有限公司 44379
专利代理师 朱培祺
(51)Int.Cl.
A01N 1/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 101856016 A,2010.10.13
CN 106417259 A,2017.02.22

审查员 王克双

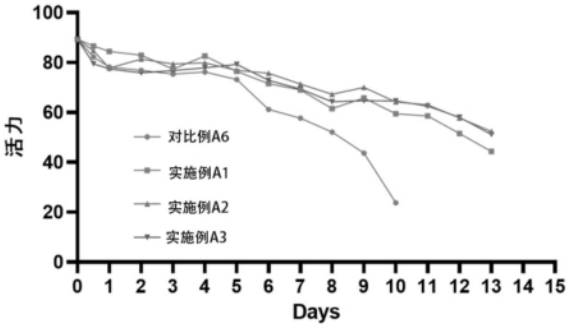
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种公猪精液的稀释液及其制备方法和用途

(57)摘要

一种公猪精液的稀释液及其制备方法和用途,稀释液,按质量份数,由以下组分组成:葡萄糖、的果糖、乳糖、海藻糖、碳酸氢钠、柠檬酸钠、Tris、EDTA-2Na、氯化钾和抗生素组合物;抗生素组合物为青霉素和链霉素的组合,或为庆大霉素,或为恩诺沙星。制备方法,用于制备上述的一种公猪精液的稀释液。其最优可以使精子在17℃的温度下活力达到0.6以上维持11天,及畸形率小于18%并最优维持至11天,并且该抗生素所需的成本最低为约0.3元每升,实现了精液稀释剂所选择的组分、含量、及组分之间的配伍最优,解决了精子活力、畸形率、保存时间及成本综合性能不能同时兼备的问题。



CN 117296830 B

1.一种公猪精液的稀释液,其特征在于,按质量份数,由以下组分组成:25-35份的葡萄糖、15-25份的果糖、3-7份的乳糖、1-2份的海藻糖、1-2份的碳酸氢钠、5-7份的柠檬酸钠、5-7份的Tris、2-3份的EDTA-2Na、0.1-1份的氯化钾和抗生素组合物;

所述抗生素组合物为0.1-0.5份的青霉素和0.2-0.7份的链霉素的组合,或为0.05-0.15份的庆大霉素,或为0.05-0.15份的恩诺沙星;

所述稀释液的制备方法,包括以下步骤:

(1)按照配方剂量称取公猪精液的稀释液的组分,将称量好的试剂加入灭菌完毕的容器中;

(2)量取1L的超纯水倒进步骤(1)的容器中,用搅拌至组分充分溶解;

(3)加入柠檬酸将稀释液pH值调至6.4～6.5之间;

(4)等待完全溶解后倒入干净的容器中,密封后放入4℃冰箱保存。

2.一种稀释液在制备抗菌成本低的公猪精液稀释液中的用途,其特征在于,所述稀释液为权利要求1所述的一种公猪精液的稀释液。

3.一种稀释液在制备保存效果高的公猪精液稀释液中的用途,其特征在于,所述稀释液为权利要求1所述的一种公猪精液的稀释液。

一种公猪精液的稀释液及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及畜牧繁殖技术领域,尤其涉及一种公猪精液的稀释液及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 猪的人工授精技术是通过对公猪进行精液质量的检测、稀释、温度控制等技术步骤,然后人工将精液注入发情期母猪的生殖道,从而实现受孕的目的。人工授精是一种高效的生物技术,可以提高母猪的产量,提高种猪的利用效率,而精液稀释是最重要的环节之一。精液稀释液的制备主要是为了补充精子体外活动时所需要的能量,调节精液在体外恒温下的pH值,维持精液的渗透压恒定,为精子在体外恒温下的存活提供基本环境。将精液稀释液和猪的精液按照一定的比例进行混合稀释后,成为标准的商品精液用于人工授精配种;

[0003] 目前养殖场投入生产的稀释粉大部分为国外进口品牌的稀释粉,原因是自配的稀释粉和国产稀释粉在保存效果和授精效果上都与进口稀释粉有很大的差距,所以大部分公猪站生产精液时,优先选择价格昂贵但精液保存效果好的进口稀释粉进行精液生产,从而保证长途运输到达目的地后精子能保持较好的活力,增加母猪配种的授精质量,获得更好的收益。稀释粉成本是在整个人工授精成本中占有的比例是很大的,因此,研发出经济高效的国产公猪精液稀释粉可以降低公猪站的运营成本,推动我国猪人工授精行业的快速发展,这是有重要意义的。目前精液稀释剂的配方需要进一步优化,例如精液稀释剂所选择的组分、含量、及组分之间的配伍对公猪精液稀释液的精子活力、畸形率、保存时间及成本的影响。如何制备一种综合性能高的稀释液是当前的研究重点,精液稀释剂的研发和优化可以有效地改善精液的品质,抑制细菌在精液中的生长繁殖,延长精液保存的时间,推动了人工授精技术的应用推广。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提出一种公猪精液的稀释液,其将青霉素和链霉素的组合、庆大霉素或恩诺沙星添加至由葡萄糖、果糖、乳糖、海藻糖、碳酸氢钠、柠檬酸钠、Tris、EDTA-2Na和氯化钾组成的稀释液中。

[0005] 本发明还提出一种公猪精液的稀释液的制备方法,其用于制备上述的稀释液。

[0006] 本发明还提出一种稀释液在制备抗菌成本低的公猪精液稀释液中的用途。

[0007] 本发明还提出一种稀释液在制备保存效果高的公猪精液稀释液中的用途。

[0008] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 一种公猪精液的稀释液,按质量份数,由以下组分组成:25-35份的葡萄糖、15-25份的果糖、3-7份的乳糖、1-2份的海藻糖、1-2份的碳酸氢钠、5-7份的柠檬酸钠、5-7份的Tris、2-3份的EDTA-2Na、0.1-1份的氯化钾和抗生素组合物;

[0010] 所述抗生素组合物为0.1-0.5份的青霉素和0.2-0.7份的链霉素的组合,或为

0.05-0.15份的庆大霉素,或为0.05-0.15份的恩诺沙星。

[0011] 一种公猪精液的稀释液的制备方法,用于制备上述的一种公猪精液的稀释液,其包括以下步骤:

[0012] (1)按照配方剂量称取公猪精液的稀释液的组分,将称量好的试剂加入灭菌完毕的容器中;

[0013] (2)量取1L的超纯水倒进步骤(1)的容器中,用搅拌至组分充分溶解;

[0014] (3)加入柠檬酸将稀释液pH值调至6.4~6.5之间;

[0015] (4)等待完全溶解后倒入干净的容器中,密封后放入4℃冰箱保存。

[0016] 一种稀释液在制备抗菌成本低的公猪精液稀释液中的用途,所述稀释液为上述的一种公猪精液的稀释液。

[0017] 一种稀释液在制备保存效果高的公猪精液稀释液中的用途,所述稀释液为上述的一种公猪精液的稀释液。

[0018] 本发明提供的技术方案可以包括以下有益效果:

[0019] 本方案提供一种公猪精液的稀释液,其将青霉素和链霉素的组合、庆大霉素或恩诺沙星添加至由葡萄糖、果糖、乳糖、海藻糖、碳酸氢钠、柠檬酸钠、Tris、EDTA-2Na和氯化钾组成的稀释液中,其最优可以使精子在17℃的温度下活力达到0.6以上维持11天,及畸形率小于18%并最优维持至11天,并且该抗生素所需的成本最低为约0.3元每升,实现了精液稀释剂所选择的组分、含量、及组分之间的配伍最优,解决了精子活力、畸形率、保存时间及成本综合性能不能同时兼备的问题。

附图说明

[0020] 图1是不同抗生素稀释液配方的精子活力对比图;

[0021] 图2是不同抗生素精液稀释液的精子畸形率对比图;

[0022] 图3是各抗生素配方抗菌成本对比图;

[0023] 图4是5种精液稀释液对比例对常温保存公猪精子活力的影响的示意图;

[0024] 图5是5种精液稀释液对比例对常温保存公猪精子畸形率的影响示意图;

[0025] 图6是5种精液稀释液对比例对常温保存公猪精子直线运动的影响示意图。

具体实施方式

[0026] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0027] 下面结合附图通过具体实施方式来进一步说明本方案的技术方案。

[0028] 一种公猪精液的稀释液,按质量份数,由以下组分组成:25-35份的葡萄糖、15-25份的果糖、3-7份的乳糖、1-2份的海藻糖、1-2份的碳酸氢钠、5-7份的柠檬酸钠、5-7份的Tris、2-3份的EDTA-2Na、0.1-1份的氯化钾和抗生素组合物;

[0029] 所述抗生素组合物为0.1-0.5份的青霉素和0.2-0.7份的链霉素的组合,或为0.05-0.15份的庆大霉素,或为0.05-0.15份的恩诺沙星。

[0030] 一种公猪精液的稀释液的制备方法,用于制备上述的一种公猪精液的稀释液,其包括以下步骤:

[0031] (1)按照配方剂量称取公猪精液的稀释液的组分,将称量好的试剂加入灭菌完毕的容器中;

[0032] (2)量取1L的超纯水倒进步骤(1)的容器中,用搅拌至组分充分溶解;

[0033] (3)加入柠檬酸将稀释液pH值调至6.4~6.5之间;

[0034] (4)等待完全溶解后倒入干净的容器中,密封后放入4℃冰箱保存。

[0035] 一种稀释液在制备抗菌成本低的公猪精液稀释液中的用途,所述稀释液为上述的一种公猪精液的稀释液。

[0036] 一种稀释液在制备保存效果高的公猪精液稀释液中的用途,所述稀释液为上述的一种公猪精液的稀释液。

[0037] 本方案提供一种公猪精液的稀释液,其将青霉素和链霉素的组合、庆大霉素或恩诺沙星添加至由葡萄糖、果糖、乳糖、海藻糖、碳酸氢钠、柠檬酸钠、Tris、EDTA-2Na和氯化钾组成的稀释液中,其最优可以使精子在17℃的温度下活力达到0.6以上维持11天,及畸形率小于18%并最优维持至11天,并且该抗生素所需的成本最低为约0.3元每升,实现了精液稀释剂所选择的组分、含量、及组分之间的配伍最优,解决了精子活力、畸形率、保存时间及成本综合性能不能同时兼备的问题。

[0038] 1、实验准备

[0039] 1-1、试验试剂

[0040] 葡萄糖、果糖、海藻糖、乳糖、柠檬酸、柠檬酸钠、碳酸氢钠、乙二胺四乙酸(EDTA-2Na)、三羟甲基氨基烷(Tris)、氯化钾、牛磺酸、谷胱甘肽(还原性)、半胱氨酸、L-谷氨酰胺、维生素C、牛血清白蛋白(BSA)、β-环糊精、庆大霉素、青霉素、链霉素、复方新诺明、硫酸庆大霉素、恩诺沙星。

[0041] 1-2、实验仪器

[0042] 电子天平、5000μL规格移液枪、1000μL规格移液枪、10μL规格移液枪、5ml离心管、80ml输精瓶、Magapor精子检测系统、Magapor检测版、雷磁pH计PHSJ-3F型号、光学显微镜、恒温水浴锅。

[0043] 1-3、精液来源

[0044] 试验精液来自广东省某公猪站的杜洛克、大白、长白,分别各2头。

[0045] 1-4、采精前准备

[0046] 1-4-1、工具的准备

[0047] 制作好的采精杯、乳胶手套、一次性PE手套、剪刀、抽纸(无香味、不掉屑)、毛巾、装满生理盐水的洗瓶、水桶、清水、采精记录表、保温泡沫箱、电热水壶。

[0048] 1-4-2、集精杯准备

[0049] 集精杯要求事先预热、有过滤纸,且洁净无污染,采精前对采精栏进行卫生清洁;检查假母猪台是否稳当,认真擦拭假母猪台台面及后躯下部;根据公猪大小调整假母猪台高度;确保橡胶防滑垫放在假母猪台后方,以保证公猪爬跨假母猪台时,站立舒适。

[0050] 1-4-3、公猪准备

[0051] 打开采精栏门,设置通道;核对公猪栏号耳号;检查公猪健康状况,是否有跛脚或

者发烧;打开栏门,使用挡猪板在公猪后面驱赶,禁止站立在公猪前面,将公猪赶入采精栏。

[0052] 1-5精液采集

[0053] 收集公猪的精液;

[0054] 1-6检测指标,每天抽取各个配方稀释后的精液1ml于离心管,恒温水浴锅37℃回温15-30分钟,并检测精子活力、畸形率。连续检测13天。

[0055] 1-6-1、精子活力:本试验采用Magapor公司的精子检测系统对精液进行直线运动的精子进行检测统计。检测方法参照Magapor精子检测系统提供的试验操作步骤。先将试验用的精液进行重复上下颠倒5次的摇匀,之后用移液枪吸取各组试验精液1mL装进1.5mL离心管中,做好标记,再放入水浴锅中37℃加热15分钟。接着用移液枪吸取3.5μL离心管中的精液,将其打入Magapor检测板内,然后使用Magapor精子检测系统进行检测。

[0056] 1-6-2、精子畸形率:公猪精子畸形类型主要有以下几种,远端质滴,近端质滴和中端折尾。Magapor的CASA系统进行原精检测时会识别出畸形的精子,从而得出精子畸形率。每个样品要取3个不同视野进行活力分析,取5个不同视野进行畸形率分析。

[0057] 1-6-3、数据处理:使用GraphPad Prism8.0软件进行one-way ANOVA方差分析,并进行多重比较,以P＜0.05作为差异显著性的判断标准。

[0058] 2、对比例A:

[0059] 2-1、稀释液的配制

[0060] 用电子天平按照配方剂量称取各种组分,将称量好的试剂加入灭菌完毕的1L烧杯中,再量取1L的超纯水倒进烧杯中,用磁力搅拌器将其充分溶解,之后加入柠檬酸将稀释液pH值调至6.4～6.5之间。等待完全溶解后倒入干净的容器中,做好标记,密封后放入4℃冰箱保存。配方如表1所示;

[0061] 表1-对比例A1的稀释粉配方

[0062]

成分	对比例 A1	对比例 A2	对比例 A3	对比例 A4	对比例 A5
葡萄糖(g)	30	30	30	40	30
果糖(g)	20	-	-	-	20
乳糖(g)	5	-	-	-	5
海藻糖(g)	1.5	-	-	1.5	1.5
牛磺酸(g)	-	0.63	-	-	-
谷胱甘肽(g)	-	1.5	-	-	1.5
半胱氨酸(g)	-	0.25	-	-	-
L-谷氨酰胺(g)	-	-	0.6	-	-
维生素 C(mg)	-	-	10	-	-
BSA(g)	-	-	4	-	4
β-环糊精(g)	-	-	2	-	-
碳酸氢钠(g)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
柠檬酸钠(g)	6	6	6	6	6
Tris(g)	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
EDTA·2Na(g)	2.35	2.35	2.35	2.35	2.35
氯化钾(g)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
青霉素(万 IU)	100	100	100	-	-
链霉素(万 IU)	-	100	100	-	-

[0063]

庆大霉素(万 IU)	48	-	-	20	20
复方新诺明(万 IU)	-	-	-	2.5	2.5

[0064] 2-2、精液的稀释与保存

[0065] 在80mL精液瓶中加入5种配方稀释液各5ml并做好记号,放入36.5℃水浴锅中预热。将干净的精液袋套入干净的1L烧杯中,从气动传输装置中取出刚采的精液,此时精液温度一般为36.5℃左右。用5000μL规格移液枪取5mL精液分别加入标记好的精液瓶中,完成1:1稀释,待精液瓶中精液温度与稀释液温度同温时,将各个配方的稀释液缓缓倒进精液瓶,定容至80ml的刻度线。之后将稀释好的精液在室内缓慢降温,待降到室温后,将其转移到17℃冷库中,并用毛巾将其覆盖,每过12小时轻轻摇匀精液瓶一次,每天进行精液检测,记录精子指标。

[0066] 2-3、结果与分析

[0067] 2-3-1、不同配方稀释液对常温保存猪精子活力的影响

[0068] 由图4可知,用五种自配稀释液稀释的精液,精子活力在稀释前后虽有变化,但差异都不显著。在17℃保存条件下,在保存后的第三天活力能达到0.6以上的有对比例A1,对比例A3和对比例A4。对比例A2在保存第一天后活力已经低于0.5,保存效果显著低于对比例A1和对比例A4(P＜0.05),与对比例A3和对比例A5没有显著性差异(P＞0.05)。对比例A1和对比例A4则在保存第7天,精子活力在0.6以上。各配方稀释液在常温保存条件下的保存效果顺序为:对比例A2→对比例A3→对比例A5→对比例A1→对比例A4。

[0069] 2-3-2、不同配方稀释液对常温保存精子畸形率的影响

[0070] 图5是5种精液稀释液对常温保存公猪精子畸形率的影响。

[0071] 2-3-3、不同配方稀释液对精子直线运动的影响

[0072] 由图6可知,精液在稀释前后,各配方对精子直线运动的提升差异均不显著(P＞0.05)。在保存的第一天到第三天,对比例A3与对比例A4、对比例A5有显著差异(P＞0.05)。在保存的第五天到第八天,对比例A1和对比例A2有显著差异,对比例A3与对比例A2、对比例A4、对比例A5有显著差异.但经过14天分析,五种配方对精子直线运动的影响均无显著差异(P＞0.05)。结果表明,五种配方稀释液对精子的直线运动影响不大。

[0073] 2-4、讨论

[0074] 2-4-1、公猪精液稀释粉添加成分的作用

[0075] 环境和操作中有很多因素会对精液的保存效果有影响,影响精子的保存质量。如今猪精液冷冻保存技术尚未成熟,液态常温保存技术仍然是当下需要重视的技术。公猪精液经稀释液进行稀释,一方面可以增加猪精液的体积,提高精液使用次数,增加优秀公猪的精液利用率,节约成本;另一方面可以为精子提供营养物质,抗氧化物等成分,为精子提供合适的生存环境,有利于延长精子存活时间,减少长途运输中对精子的应激损伤,提高精子的受精能力。在猪精液保存时,稀释液成分、各成分的浓度以及成分之间的比例都对精液的保存效果有重要的影响。

[0076] 本次试验设计五种不同特点的配方。对比例A1是以葡萄糖、果糖、乳糖这些能量物质为主要成分。公猪精子可以利用精液中的糖类为自身活动提供能量,当精液中的能量物质消耗完时,精子便开始消耗自身储存在线粒体内的ATP,由于精子细胞内的ATP含量极少,24小时之内便会全部消耗完,导致精子的活率降低。猪常温保存稀释液中添加适量的能量物质,可以提高精子的活力,延长精子的保存时间。葡萄糖作为常用的一种稀释液营养成分,还可以调节稀释液的渗透压,防止高渗或低渗环境导致的精子损伤,但是糖的浓度不宜过高,否则会损害精子的顶体,造成受精效果低下。

[0077] 对比例A2主要是以谷胱甘肽、半胱氨酸等抗氧化剂以抵消精子呼吸代谢产生的ROS,还有添加少量的牛磺酸,其作用是提高精子的活率和抗氧化能力。但结果表明,对比例A2的保存效果最差,保存时间最低,畸形率变化最高,造成这种结果的原因有可能是两种或三种以上的抗氧化剂添加在一起,导致稀释液中还原作用太强,从而影响精子的正常代谢,破坏精子质膜,不利于精子的正常生存。应进一步研究不同精子保护剂和抗氧化剂之间的配伍效应,从而提高公猪精液常温保存的效果。

[0078] 对比例A3则是添加BSA,维生素C,L-谷氨酰胺,其配方主要特点是保护精子质膜,提高精子的完整性。其中,有研究表明,BSA具有稳定稀释液渗透压、保护精子细胞膜的作用。有研究表明,维生素C呈偏酸性,可使精子减少活动代谢,又起到有效防止精子磷脂发生

过氧化的作用。也有研究发现添加维生素C对猪精液常温和低温保存不但没有促进作用,反而维生素C浓度大于25μg/mL时,会对精子产生不利影响。也有研究发现,维生素C能增加精子保存的时间,其原理是能降低精子的质膜脆性和通透性,抑制精子的运动。也有研究表明,维生素C是一种抗氧化物质,可直接与ROS反应,从而降低ROS的含量,减少ROS对精子的不良影响,最终使精子的活力和受精能力有效提高,提升精子的结构完整性。因此,目前在稀释液中添加维生素C没有同一定论,有待于进一步深入研究。

[0079] 对比例A3还添加了少量的β-环糊精,β-环糊精具有一定的吸附作用,可以吸附精子代谢的有害产物,延长精子的存活时间,同时还具有保护精子质膜的作用,降低质膜被氧化作用所受到的损伤。

[0080] 对比例A4则是将青霉素、链霉素抗生素替换为效果更好的庆大霉素和复方新诺明。青霉素作为β内酰胺类抗生素,作用时间短,对革兰氏阳性菌有较好的抗菌效果,但是对大肠杆菌却没有良好的抗菌作用,链霉素也是对革兰氏阳性菌有抗菌效果,对大肠杆菌无效。有研究结果表明,复方新诺明是一种比青霉素抗菌谱更广,抑菌效果更显著的抗生素药物,而且还对不同来源肠杆菌属有较高的敏感性,最适添加量为2.0g/L。

[0081] 对比例A5是将以上4种配方的特点综合一起。但结果表明,保存精子的效果并不如对比例A1和对比例A4好。说明精液稀释粉成分还需要进一步研究配伍效应。

[0082] 2-4-2、关于稀释液pH的研究

[0083] 目前人们对于公猪精子体外保存的稀释液中的pH还没有统一定论,有研究认为,在体外保存的公猪精液最佳pH值为6.4,同样也有研究认为精液pH值在6.5～6.8之间的保存效果较好。因此,精子在偏弱酸的环境中会降低代谢率,提高保存效果。但也有研究认为精液体外保存pH值应在7.0左右的弱碱性的环境中保存效果较好,因为精子在保存过程中会通过糖酵解途径,代谢如乳酸的酸性代谢产物,而稀释液中的弱碱性物质能抵消酸性代谢产物,防止精液pH环境快速变成酸性环境,导致精子酸中毒,影响精子的正常功能,改变精子的结构,使精子的质膜和顶体受到损害。此外,原精液的pH为弱碱性,加入弱碱性的稀释液可能符合精子原本的生存环境,减小对精子的刺激。pH值在精液保存的过程中,呈现先下降后上升最后区域平稳的趋势,这可能是精子在稀释后一段时间内,精子未进入休眠状态,运动能力较强,新陈代谢较为旺盛,产生大量酸性代谢产物使精液的pH值下降,此时精液呈弱酸性,弱酸性环境下精子降低了代谢速率,稀释液中能量物质也减少,之后缓冲物质开始发挥作用,使精液pH值不再降低,最后精液pH值达到平衡。所以关于精子体外保存的环境是弱酸性还是弱碱性,哪一种环境保存效果好,以及挑选出合适的缓冲物质还需要进一步研究。

[0084] 2-5结论

[0085] 结果表明,综合精子指标分析,配方一的保存效果最好,配方一成分特点是除了添加葡萄糖、果糖、乳糖,还添加性质稳定的非还原性双糖海藻糖,其次是配方四,最差的是配方二。基于此对比例的研究,设计实施例A的配方。

[0086] 3、实施例A:

[0087] 用电子天平按照配方剂量称取各种组分,将称量好的试剂加入灭菌完毕的1L烧杯中,再量取1L的超纯水倒进烧杯中,用磁力搅拌器将其充分溶解,之后加入柠檬酸将稀释液pH值调至6.4～6.5之间。等待完全溶解后倒入干净的容器中,做好标记,密封后放入4℃冰

箱保存。配方如表2所示；

[0088] 表2-实施例A的稀释液配方

[0089]

成分	对比例 A6	实施例 A1	实施例 A2	实施例 A3
葡萄糖(g)	30	30	30	30
果糖(g)	20	20	20	20
乳糖(g)	5	5	5	5
海藻糖(g)	1.5	1.5	1.5	1.5
碳酸氢钠(g)	1.25	1.25	1.25	1.25
柠檬酸钠(g)	6	6	6	6
Tris(g)	6.5	6.5	6.5	6.5
EDTA·2Na(g)	2.35	2.35	2.35	2.35
氯化钾(g)	0.75	0.75	0.75	0.75
青霉素(g)	-	-	0.3	-
链霉素(g)	-	-	0.5	-
硫酸庆大霉素(g)	-	0.1	-	-
恩诺沙星(g)	-	-	-	0.1

[0090] 在80mL精液瓶中加入5种配方稀释液各5ml并做好记号，放入36.5℃水浴锅中预热。将干净的精液袋套入干净的1L烧杯中，从气动传输装置中取出刚采的精液，此时精液温度一般为36.5℃左右。用5000μL规格移液枪取5mL精液分别加入标记好的精液瓶中，完成1:1稀释，待精液瓶中精液温度与稀释液温度同温时，将各个配方的稀释液缓缓倒进精液瓶，定容至80ml的刻度线。之后将稀释好的精液在室内缓慢降温，待降到室温后，将其转移到17℃冷库中，并用毛巾将其覆盖，每过12小时轻轻摇匀精液瓶一次，每天进行精液检测，记录精子指标。

[0091] 3、结果

[0092] 3-1、不同稀释粉配方精液活力保存时效的比较：

[0093] 由图1可知，对比例A6活力达到0.6以上的保存天数达到6天，实施例A1保存到第10天，实施例A2和实施例A3则可以维持到第11天，精子活力在0.6以上。四个配方稀释液稀释的精液，精子活力在稀释前后有变化，但差异都不显著。在17℃保存条件下，所有配方在稀释精液后的第六天活力均能达到0.6以上。各配方稀释液在常温保存条件下的保存效果顺序为:实施例A2≈实施例A3>实施例A1>对比例A6。

[0094] 3-2、不同稀释粉配方精液畸形率的时效比较：

[0095] 随着保存时间的增加，四种配方稀释液对猪精子畸形率的时效影响如下:由图2可知，各个配方的精子畸形率都可以维持低于18％至少7天，而对比例A6，即对比例A5，在第8天开始畸形率超过20％，实施例A1在第13天时畸形率超过20％，实施例A3在第13天时畸形率超过18％，而实施例A2在第13天时，仍然畸形率低于18％。随着保存时间的增加，精子的畸形率有上升的趋势。7天以前，四种抗生素稀释液中的精子畸形率差异不显著。7天后，对比例A6开始极显著差于实施例A1、实施例A2和实施例A3(P＜0.01)。在第13天时，实施例A2和实施例A3要显著优于实施例A1(P＜0.05)。结果表明，在畸形率方面，不同配方稀释液保存效果由高到低分别为:实施例A2≈实施例A3＞实施例A1＞对比例A6。

[0096] 3-3、不同稀释粉配方成本的比较：

[0097] 由于所有配方基础稀释液相同,只有抗生素成分的不同,所以抗生素成分的成本差异代表着稀释粉配方的成本差异,经计算结果如表3所示:

[0098] 表3-各种抗生素配方的抗菌使用成本

[0099]

	抗生素价格	用量	成本
对比例A6	0	0	0
实施例A1	￥3,655.0	0.1g/L	0.74元/L
实施例A2	￥719.0+￥1,130.0	0.3g/L+0.5g/L	1.00元/L
实施例A3	￥1,481.0	0.1g/L	0.30元/L

[0100] 由此可见含有恩诺沙星的实施例A3是成本最低的一个,其抗生素成本大约为0.3元/L,而目前市面上最常用的实施例A1硫酸庆大霉素配方的抗菌成本约0.74元/L,比恩诺沙星配方的抗菌成本多出了接近60%,因此,恩诺沙星抗生素配方,是抗菌成本最低的一个稀释粉配方。

[0101] 3-4、讨论:

[0102] 3-4-1、抗生素对精液保存的作用

[0103] 首先通过4种不同配方的精液稀释液对精子的活力、精子畸形率的影响分析,可以看出:添加抗生素的精液稀释液配方确实可以延长精液保存的时间,其中硫酸庆大霉素精液稀释液配方对比对比例A5,活力大于0.6的保存天数延长了4天,而恩诺沙星精液稀释液配方和青链霉素精液稀释液配方对比对比例A5,活力大于0.6的保存时间延长至11天。

[0104] 其次,对比例A5的精子畸形率低于18%的保存天数达到7天,而添加了硫酸庆大霉素的组别对比对比例A5延长至12天。添加青链霉素的组别和恩诺沙星的组别则比对比例A5延长至13天。

[0105] 从对比例A5的结果可以看出:在精子活力骤降的同时,其畸形率,也会随即上升,主要的原因在第六天开始,精液中的细菌开始大量的繁殖,从而争夺了精液中的营养物质,同时,各种细菌繁殖代谢过程也对精液稳态进行了破坏,包括pH值、渗透压等,从而使得精子的代谢紊乱、精子的结构遭到破坏,所以在精子活力骤降的同时,畸形率也随后一天开始明显上升。而其他配方的活力和畸形率相对稳定的原因是抗生素对精液的杀菌或者抑菌的作用,精液保存的过程中,细菌一开始在稀释精液时就被消灭或者虽然有部分存活,但是其无法实现生长繁殖,被抑制在一定范围内,从而保存了维持精子所需要的营养物质以及环境稳态,使精子在被回温后得以迅速恢复活力并且保持相对稳定的精子结构。因而本实施例A的稀释液相对于对比例A1-A6,其可大幅度地降低了精子畸形率。从实验的结果中可以明显看出,恩诺沙星和青霉素、链霉素合剂对于精液稀释液的保存效果均较好。这与其抗菌的原理息息相关,恩诺沙星的抗菌作用机理是通过对DNA的脱氧核糖核酸(DNA)回旋酶的抑制,从而影响了DNA的复制,导致其死亡。因为细菌细胞属于原核细胞,DNA是裸露的,而畜禽细胞属于真核细胞,DNA是包被的,所以很容易地进入到菌体中,与DNA发生相接触,从而发生选择性的反应。

[0106] 青霉素的作用机制是通过抑制细菌的细胞壁粘肽的合成来实现。处于生长期的敏感细菌分裂是最活跃的,细胞壁正在进行生物合成,在青霉素的作用下,粘肽的合成会因为受到阻碍而无法形成细胞壁,最终在渗透压的作用下导致其裂解死亡。而处于非生长繁殖阶段的细菌,因为没有形成细胞壁的过程,所以青霉素对此时期细菌起不到抑制或杀灭作

用。与青霉素联合应用的链霉素的主要抗菌机理是抑制细菌的蛋白质合成,可使细菌细胞膜的通透性增强,从而使得胞内物质外渗导致细菌的死亡,而其中有一部分耐药菌则会因为稀释液中含有青霉素,在青霉素的作用下导致其死亡或者被抑制。所以青霉素和链霉素的联合使用可以达到抗菌作用增强的效果。

[0107] 另外,庆大霉素属于氨基糖苷家族,除大观霉素外,是目前已知的唯一导致蛋白质误译的核糖体抑制剂。它能抑制细菌核糖体的功能,导致细菌死亡。其与链霉素属于同一类抗生素,但是抗菌谱比链霉素更广。在此次实验中,比青链霉素配方的活力保持0.6以上的时间少了一天,畸形率维持小于18%的天数也同样少了一天。推测是由于青霉素和链霉素联合应用后的抗菌谱比庆大霉素的抗菌谱更大,所以对精液中更多的细菌有抑制、杀灭效果。

[0108] 从本实验中可以明显的看出,抗生素对细菌的杀灭或抑制效果对于精液的保存有较大的帮助,无论哪一种抗生素的精液稀释液配方,其保存效果都比上述对比例A的无添加抗生素精液稀释液要好,活力和畸形率都比无抗生素上述任何对比例A要更优秀。

[0109] 3-4-2、抗生素的成本分析

[0110] 从本次实验结果可以看出,在添加了抗生素的精液稀释液其成本都在0.3元每升到1元每升之间,这是基于少量生产的每升单价;而如果用于大批量生产上面,或许可以拿到更低廉的批发价格,但是,价格也不会偏差太大,毕竟抗生素的生产成本在那里,每一种抗生素的生产工艺的偏差,也导致其价格的不同,因此,本次实验的成本结果对于工厂大规模生产具有一定的参考意义。

[0111] 其中,恩诺沙星配方的抗菌成本比起其他两抗生素配方都要便宜,在市面上的稀释粉一般以50g/袋,每袋可以稀释成1L的稀释液,而1L稀释液只需要添加0.1g恩诺沙星,成本仅需要0.3元。相较于其他青链霉素1元成本,硫酸庆大霉素0.7元成本,具有非常大的成本优势,且精液保存效果与青链霉素相当,都可以保存11天。因此,恩诺沙星是大规模生产稀释粉的首选抗菌原料。

[0112] 3-4-3、结论

[0113] 在庆大霉素、青链霉素、恩诺沙星这几种抗生素精液稀释液配方中,恩诺沙星配方的精液稀释液对精子的保存效果最好,稀释后活力大于0.6可以维持11天,畸形率小于18%可以维持11天,抗菌成本仅需0.3元每升,是此次试验中的最优选择。

[0114] 以上结合具体实施例描述了本方案的技术原理。这些描述只是为了解释本方案的原理,而不能以任何方式解释为对本方案保护范围的限制。基于此处的解释,本领域的技术人员不需要付出创造性的劳动即可联想到本方案的其它具体实施方式,这些方式都将落入本方案的保护范围之内。

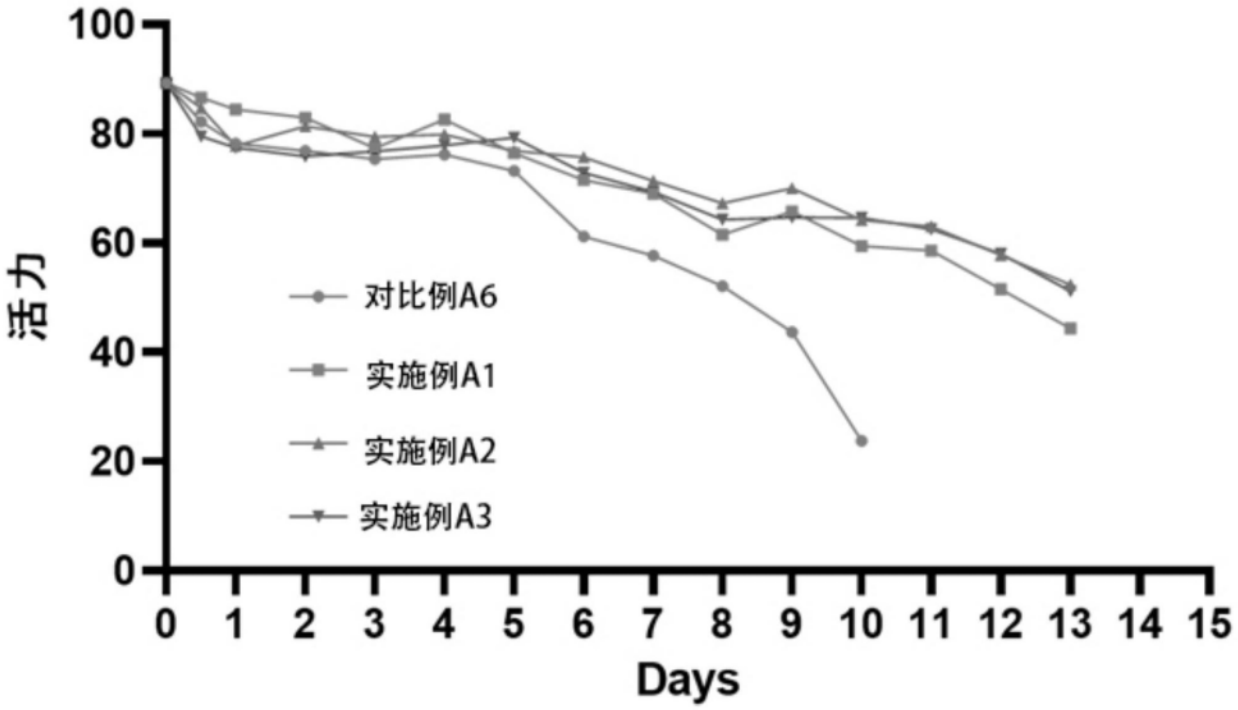

活力
100
80
60
40
20
0
对比例A6
实施例A1
实施例A2
实施例A3
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days

图1

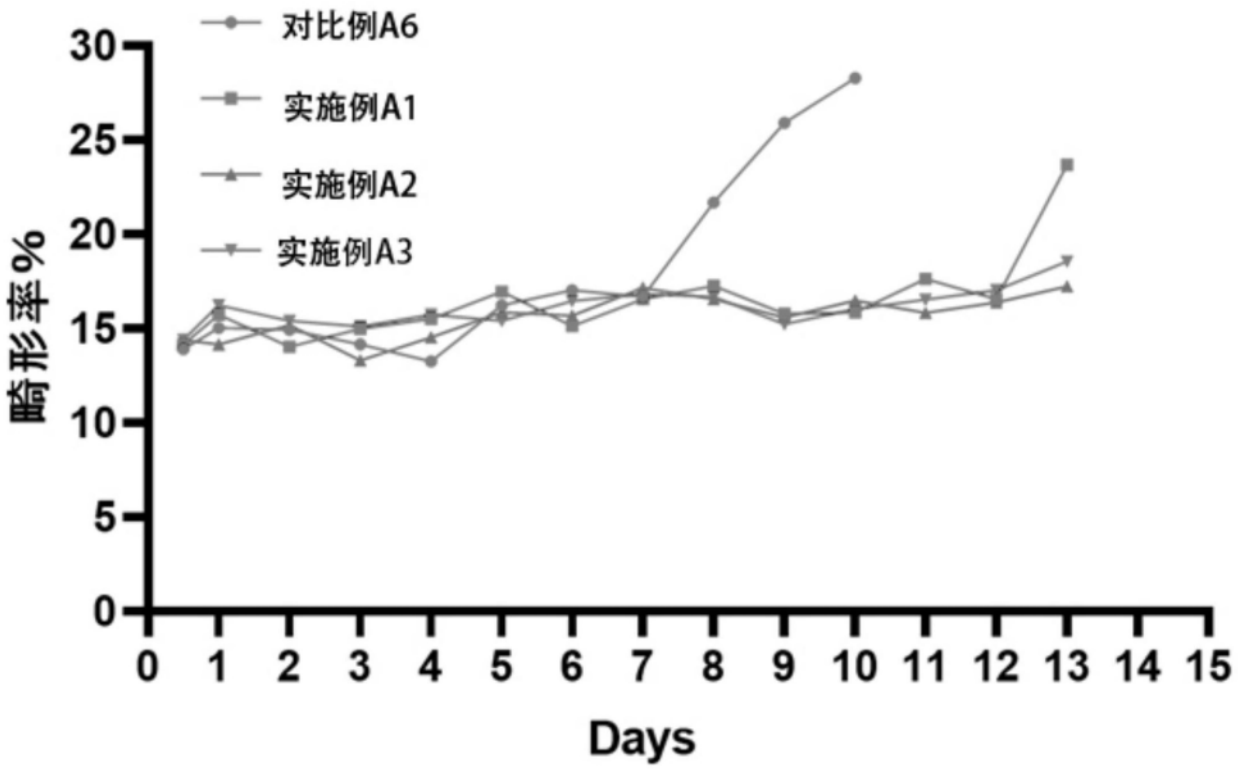

畸形率%
30
25
20
15
10
5
0
对比例A6
实施例A1
实施例A2
实施例A3
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Days

图2

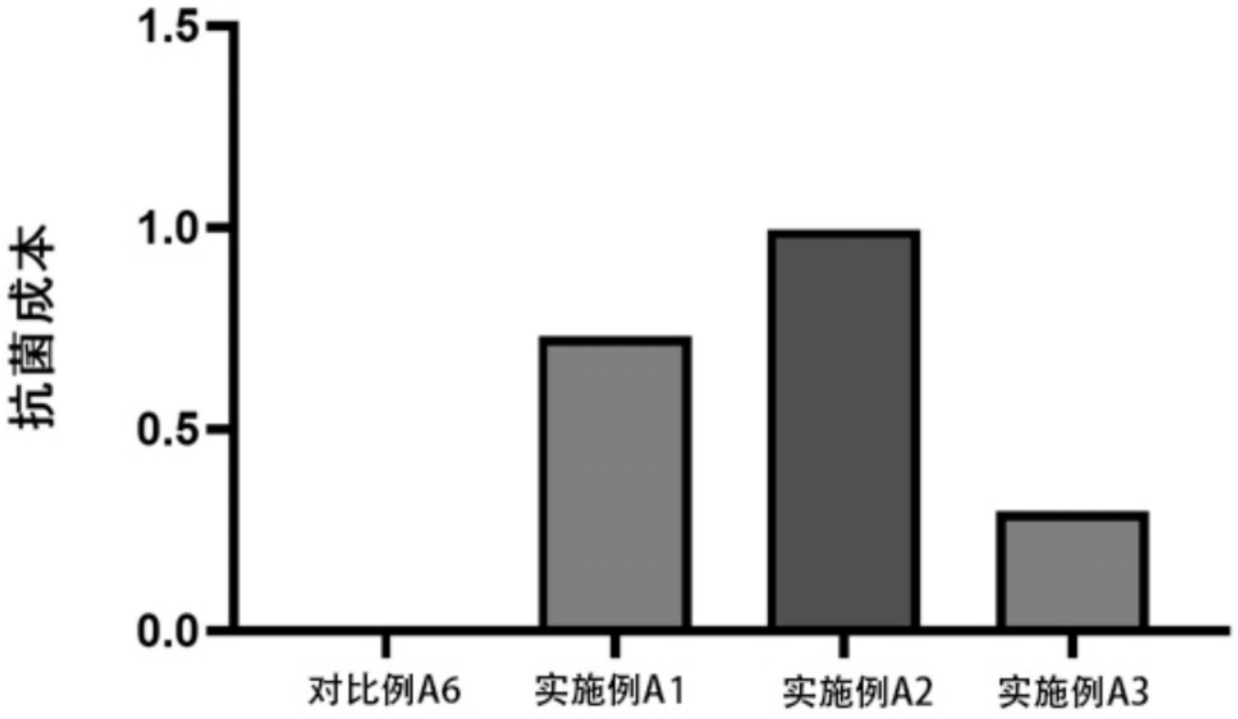

抗菌成本
1.5
1.0
0.5
0.0
对比例A6
实施例A1
实施例A2
实施例A3

图3

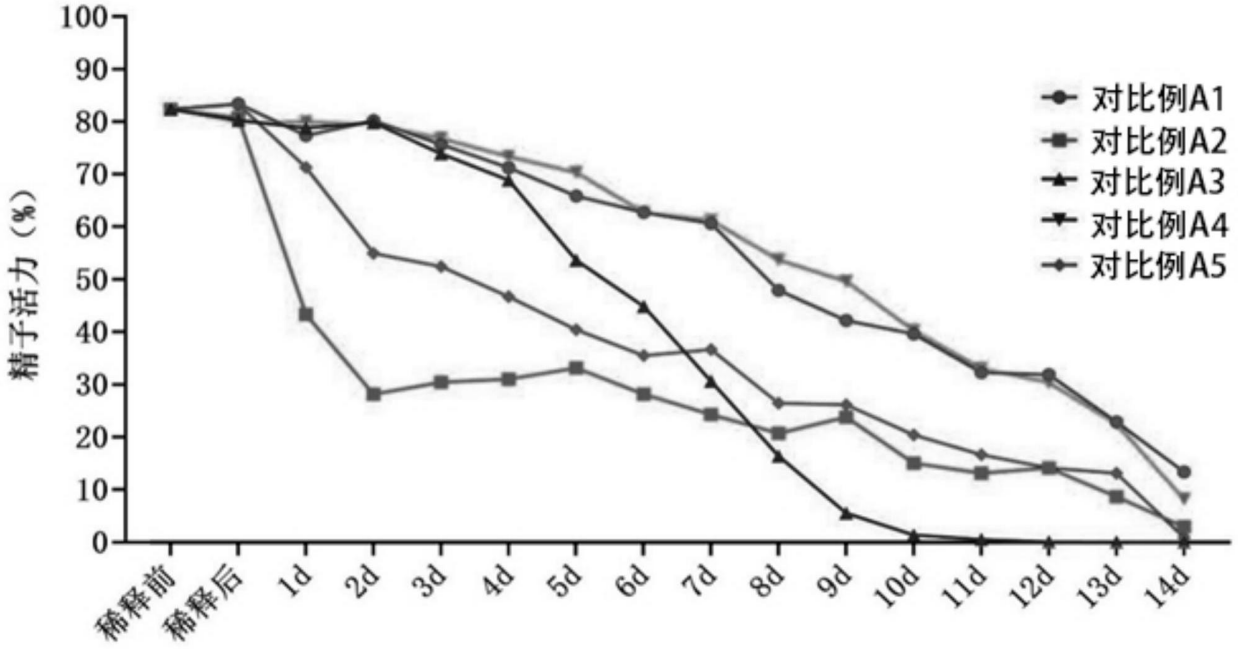

精子活力（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
稀释前
稀释后
1d
2d
3d
4d
5d
6d
7d
8d
9d
10d
11d
12d
13d
14d
对比例A1
对比例A2
对比例A3
对比例A4
对比例A5

图4

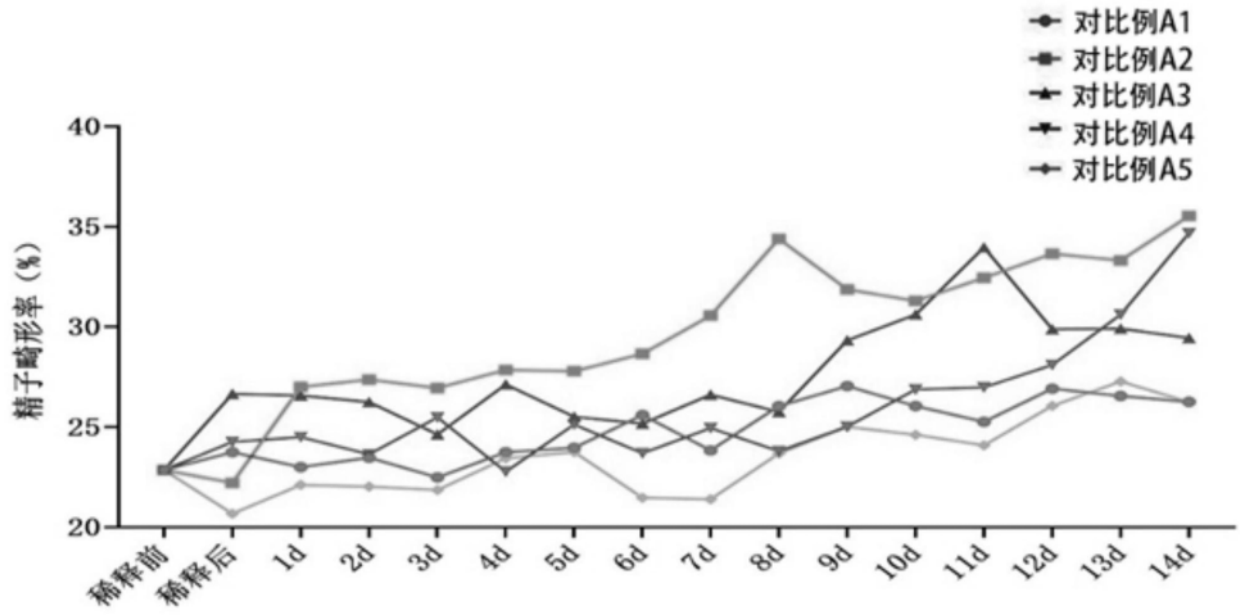

对比例A1
对比例A2
对比例A3
对比例A4
对比例A5
精子畸形率（%）
40
35
30
25
20
稀释前
稀释后
1d
2d
3d
4d
5d
6d
7d
8d
9d
10d
11d
12d
13d
14d

图5

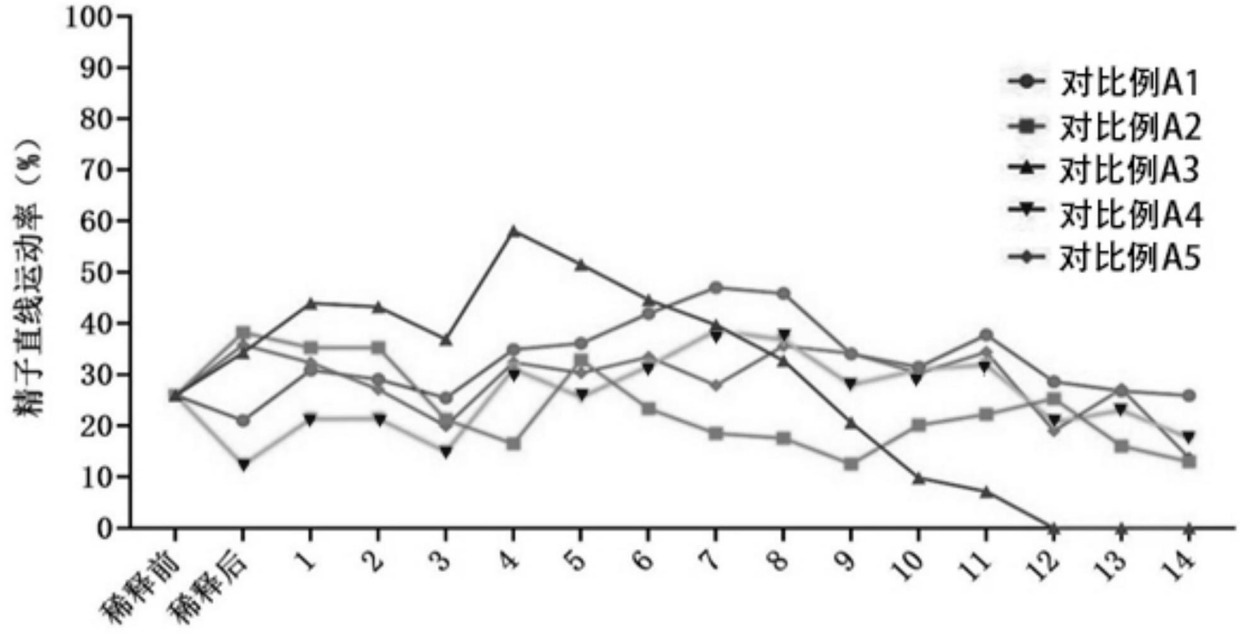

对比例A1
对比例A2
对比例A3
对比例A4
对比例A5
精子直线运动率（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
稀释前
稀释后
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

图6