

種畜禽精子體能檢測技術研討會

一、技術名稱：乳牛精液品質檢測及冷凍精液製作技術

推廣場所：

行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所

苗栗縣西湖鄉五湖村埤頭面 207-5 號

電話：(037)911693

傳真：(037)911700

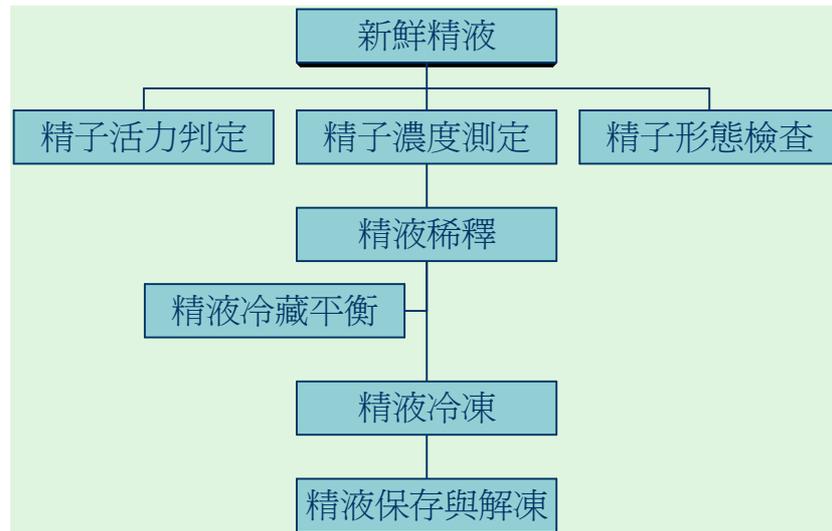
二、聯絡人：張莉犁分所長、李國華副研究員兼系主任

三、操作的基本設備與用具：

- (一) 乳牛用人工假陰道及集精杯
- (二) 血球計數板
- (三) 光電比色計或血球自動測定儀
- (四) 蓋玻片(Acid-and alcohol-washed) 37.5 mm×22 mm
- (五) 顯微鏡 yellow-green 濾光片
- (六) 定量分注器 (0.02 及 1.0 ml)
- (七) 立體顯微鏡 (須有 10×, 40×及 100×接物鏡)
- (八) 載玻片(Acid-and alcohol-washed) 75 mm×25 mm
- (九) 玻片恆溫板
- (十) 螢光顯微鏡 (須有 20× 及 40×接物鏡)
- (十一) 恆溫水浴槽
- (十二) 冰箱
- (十三) 液態氮桶
- (十四) 低溫操作櫃
- (十五) 梯度降溫桶與溫度感測器
- (十六) 滲透壓儀
- (十七) 滅菌釜
- (十八) 高溫乾燥滅菌箱
- (十九) 精液麥管印字機及封口機

四、檢測流程耗材與記錄表格

(一) 乳牛精液冷凍的製作流程：



(二) 乳牛精液品質檢測步驟

種公牛精液採集後應立刻放於維持 35°C 之水浴中，並儘快進行精液檢查：

(一) 外觀

採集之新鮮精液為均勻且不透明之外觀，不能遭受到毛髮、穢物或任何異物（水、血或尿）等之污染。新鮮精液外觀若呈現含有厚塊之凝結現象，則表示已受感（污）染。新鮮精液外觀顏色為灰白色至黃色，實際顏色依不同個體或同一個體不同次採集間而有所差異。

(二) 精液量

新鮮精液採集後，利用集精杯之管壁上之刻度直接讀取精液量。每頭成年公牛每次平均射精量為 5-10 毫升左右。但會依不同個體或不同次採精次數及間距等因素而有所差異。

(三) 精子濃度

1. 血球計數板法

(1) 血球計數板拭淨，蓋上蓋玻片，適度壓緊。

(2) 取原精液 5 μ l (0.005 ml) 加入 1 ml 之 3% 生理食鹽水中，混勻。

- (3)取 2.之稀釋精液(約 5-7 μ l)自血球計數板側邊凹槽緩慢注入與蓋玻片間之空隙，並使其佈滿，但勿使精液溢出蓋玻片外。靜置數分鐘。
- (4)將血球計數板置於顯微鏡下，調整焦距至可清楚看見方格(含有 25 中格，每中格又細分為 16 小格)。
- (5)手持計數器計算其中五個中格(位於四角及正中之中格)。
- (6)依下列公式計算每毫升之精子濃度：

$$5 \text{ 格總數} \times 5 \times 200 \text{ (稀釋倍數)} \times 10^4 \text{ (常數)}$$
- (7)每次採精後應取樣稀釋及計數 2 次，平均之。

2.光電比色計法

- (1)利用 20-50 個連續稀釋之已知濃度精液，採用 550 nm 波長進行吸光值之測定。
- (2)利用所得之吸光值製作標準曲線，其 X 軸與 Y 軸間之相關(r 值)需於 0.9 以上，且曲線斜度接近 1 方可使用。
- (3)取原精液 5 μ l (0.005 ml) 加入 1 ml 之 3%生理食鹽水中，混勻。
- (4)取 3.之稀釋精液入專用石英管內，置入分光光度計樣品槽中進行吸光值之測定。
- (5)依所得之吸光值讀值，直接於標準曲線對應出相對濃度。

3. 血球自動測定儀

利用紅血球數自動檢測功能進行新鮮精液數值(濃度)之測定。此法目前為最快速，準確性最高之方法，在製造冷凍精液之場所，相當實用，唯儀器價錢較貴。

(四) 精子漩渦運動

- 1.新鮮精液採集後，取原精液 5 μ l 置於載玻片上，於 37-38°C 下，以 80 倍顯微鏡觀察。
- 2.依精子漩渦運動評分表，由 1-5 分區分為 5 個等級。

精子漩渦運動	精子直線運動之比例	精子活力判定
1.快速且明顯	80%以上	特優
2.很快但較不明顯	70-80%	優良
3.緩慢	50-70%	佳
4.無精子漩渦運動	30-50%	不良
5.泳動緩慢不前進	30%以下	劣等

(五) 活精子百分比 (存活率)

1. 取原精液 $5\ \mu\text{l}$ (0.005 ml) 加入 1 ml 37-38°C 預溫之 0.9% 生理食鹽水中，混勻。
2. 取 1. 之稀釋精液 $5\ \mu\text{l}$ 置於載玻片上並覆上蓋玻片，於 37-38°C 下，以 200 倍顯微鏡觀察。
3. 每一樣品需連續觀察 5 個以上不同視野估算活精子百分比，作成平均數後即代表之。

(六) 精子型態之判定：

由精子的外觀來判定好壞，其方法如下：

1. 滴 2~3 滴生理鹽水於乾淨之載玻片上，再滴一滴精液使混合，上蓋另一玻片而均勻分散，置空氣中乾燥。
2. 以 Rose-Bengal 染色，乾燥 5~10 分鐘，再以蒸餾水洗去染色過度部份，然後乾燥，計算精子數。一般計算 333 隻精子，逢機取樣，以顯微鏡較高倍數 ($\times 1000$) 來進行，計算所得之異常精子數 $\times 3/10$ ，即為異常精子所佔 %。Rose Bengal 染色劑配製：3 gm 粉狀 Rose Bengal、99 ml 蒸餾水、1 ml 40 % 之福馬林。

(七) 死活精子之染色

1. 染色劑：2 % eosin and 1 dose Opal blue
螢光染劑(SYBR14,PI)
2. 取清潔之載玻片置於 30°C 保溫板上乾燥。
3. 於載玻片滴上 $30\ \mu\text{l}$ 染色液。
4. 加入 1 滴稀釋精液入染色液中並混合 10 秒鐘。
5. 靜置 50 秒。
6. 用另一載玻片或蓋玻片進行抹片製作，抹片需儘量平均與薄層。
7. 乾燥。
8. 判讀：染色後之精子，在顯微鏡下若呈現粉紅色或紅色，即表示該精子在染色前是活的，若為無色即為死的。至於畸型的精子則可依外觀形態加以區別。

- 2 % eosin and 1 dose Opal blue 死精子呈藍色。
- 螢光染劑(SYBR14,PI)死精子呈紅色，活精子呈綠色。

(八) 應用

1. 冷凍精液製作
2. 人工授精

五、記錄表格

表 1. 種公牛新鮮精液性狀紀錄表

牛號	採精日期	精液量 (ml)	精液顏色	精子活力	精子存活率(%)	精子濃度	稀釋倍數	製作支數	備註

六、已研習本技術的畜牧場名冊

場名	研習項目
常青牧場、四方牧場	精子外觀、存活率、個別精子活動力