

## 種羊精液品質檢測技術

推廣場所：

行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所

屏東縣恆春鎮墾丁里牧場路1號

電話：(08)8861341

傳真：(08)8861345

聯絡人：黃政齊分所長、王得吉副研究員

### 一、操作的基本設備與用具

- (一) 羊用人工假陰道
- (二) 血球計數板
- (三) 光電比色計
- (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) 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

### 二、操作步驟

#### (一) 外觀

新鮮精液為均勻且不透明之外觀，此表示精子濃度甚高。若呈透明狀則所含精子數量稀少。採集之新鮮精液需毋受毛髮、穢物或任何異物等之污染。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。新鮮精液外觀顏色依不同物種而異，公羊精液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，利用收集管壁上之刻度直接讀取精液量。每頭成年公羊每次平均射精量為 1.0-1.5 毫升左右。但在不同品種、個體或同一個體不同次採集間而有所差異。

### (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  $5\ \mu\text{l}$  (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  $5\text{-}7\ \mu\text{l}$ ) 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  $5\ \mu\text{l}$  (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。

### (四) 精子泳動波

1. 新鮮精液採集後，取原精液  $5\ \mu\text{l}$  置於載玻片上，於  $37\text{-}38^\circ\text{C}$  下，以 80 倍顯微鏡觀察。
2. 依泳動波評分表，由 0-5 分區分為 6 個等級。

評分等級	泳動波情形
5	快速的泳動波，有漩渦
4	快速的泳動波，但沒有漩渦
3	普通的泳動波，波幅很低
2	非常緩慢的泳動波
1	僅局部有波動
0	完全靜止

#### (五) 活精子百分比 (存活率)

- 1.取原精液 5  $\mu$ 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  $\mu$ 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) 個別精子活動力

- 1.取原精液 5  $\mu$ 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  $\mu$ 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.依個別精子活動力評分表，由 0-5 分區分為 6 個等級。

評分等級	精子活動力情形
5	精子完全呈直線快速的移動
4	快速移動，但有些成直線或圓圈式移動
3	精子曲線移動，沒有顫抖移動的情形
2	緩慢移動，顫抖及混亂性移動，部分精子移動快速
1	精子無移動或非常緩慢，顫抖或僅尾部抖動
0	精子完全無移動

#### (七) 死精子及畸型精子評估

##### 1.染色劑配製：

成分	重量或容量
eosin	1 公克
nigrosin	2 公克
Tri-Na-citrate. 5.5 H <sub>2</sub> O	3.57 公克
二次蒸餾水	100 毫升

配置完成後，靜置 24 小時，過濾，測定 pH 值並以枸橼酸調整 pH 為 6.7-6.8，保存在 4°C。

- 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  $\mu$ 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。

#### (八) 精子耐熱性測試

- 1.公羊精子先以稀釋液稀釋至  $100-200 \times 10^6$  濃度，取 1ml 置入 1.5ml 微量離心管中，蓋緊上蓋。
- 2.置入 37-38°C 恆溫水浴槽中。
- 3.分別測定放入前、放入後每隔 1 小時直至 6 小時之精子存活率與活動力。

#### (九) 精子尾膜完整性（低滲膨脹試驗）評估

##### 1. 低滲透壓溶液配製

成分		重量或容量
Tri-sodium-citrate	0.735	公克
Fructose	1.351	公克
二次蒸餾水	定量至 100	毫升

- 2.取原精液  $50 \mu\text{l}$  (0.05 ml) 加入 1 ml 低滲透壓溶液中，混勻。
- 3.置入 37-38°C 恆溫水浴槽中 60 分鐘。
- 4.取出  $5 \mu\text{l}$  稀釋精液置於載玻片上並覆上蓋玻片
- 5.判讀：精子在顯微鏡下若呈現膨脹且捲曲之尾部，即表示該精子尾膜是完整的。

#### (十) 頭帽完整性評估（FITC-PNA 法）

- 1.於載玻片滴上 1 滴約  $15-20 \mu\text{l}$  稀釋精液。
- 2.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。
- 3.乾燥。
- 4.將玻片以絕對甲醇固定 15 分鐘，乾燥。
- 5.將含 FITC-PNA ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) 之 PBS 溶液均勻滴在抹片上，置於飽和濕氣的空間中，室溫靜置 10 分鐘。
- 6.緩慢用清水洗去抹片上未結合之 FITC-PNA 分子溶液。
- 7.於螢光顯微鏡下進行觀察與判讀。若精子頭帽有完整的綠色螢光表示頭帽完整，反之則為不完整之頭帽。

#### (十一) 應用

- 1.冷凍精液製作
- 2.人工授精
- 3.單一精子顯微注射
- 4.山羊卵母細胞體外授精



四、已研習本技術的畜牧場名冊(包括精液進口公司)

場名	研習項目
嘉南羊乳運銷合作社（新聯興牧場、喬安牧場、蘇正健乳羊場、賴明松乳羊場、建泉乳羊場、靚園乳羊場）	外觀、精液量、精子濃度、精子泳動波、存活率、個別精子活動力
禾光牧場	外觀、精液量、精子濃度、精子泳動波、存活率、個別精子活動力
歲那實業(精液進口公司)	外觀、精液量、精子濃度、精子泳動波、存活率、個別精子活動力
黃東陽肉羊場	外觀、精液量、精子濃度、精子泳動波、存活率、個別精子活動力