

種鹿精液品質檢測技術

推廣場所：

行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場
屏東縣內埔鄉老埤村通安路 372 號

電話：(08)7792617

傳真：(08)7791852

聯絡人：王治華場長、康獻仁主任、林信宏

一、操作的基本設備與用具

- (一) 電激採精器
- (二) 血球計數板
- (三) 載玻片(Acid-and alcohol-washed) 75 mm×25 mm
- (四) 蓋玻片(Acid-and alcohol-washed) 37.5 mm×22 mm
- (五) 微量吸管
- (七) 顯微鏡
- (八) 玻片恆溫板
- (九) 恆溫水浴槽

二、檢測流程

公台灣水鹿以鹿隻專用固定架保定後，利用 2%安耐寧與舒泰 50，以 1:1 比例混合之麻醉劑靜脈注射，其後並視鹿隻個體之麻醉程度，酌量增加施打劑量，直至鹿隻達到鎮靜保定為止。麻醉保定後，以電激採精器採取公鹿之精液樣品；其過程乃先將動物腹部及包皮外部之毛髮剔除後，以生理食鹽水(0.9%)清洗包皮內側，並清除直腸末端之糞便，再以塗抹潤滑劑之直腸探棒，以電極面朝向腹側方置入直腸中。待精液自包皮流出後，以 50 mL 之離心管收集精液樣本，供新鮮精液性狀之分析使用。

(一) 精液量：自各公鹿所採集之原精液，均利用微量吸管進行精液量之定量工作。

(二) 精子濃度：各公鹿之精液樣本均以3%氯化鈉(NaCl)之溶液稀釋200倍，使混合均勻，吸取稀釋後之精液流入蓋玻片(22×22×1 mm)，和血球計數板間之空間而充滿計數室，以200至400倍顯微鏡鏡檢，計算計數板上方格區(每方格有16個小格)的精子數，計算4個角落及中央共5個方格區的精子數，5個方格

區內的精子數乘以 10^7 即每ml原精液所含有的精子數。

(三) 精子活力等級：各公鹿之精液樣品於採集5 min內，置於光學顯微鏡下，以六級(0~5)計分法判斷其活力。

5 級	精子活力極好，80%以上的精子活力良好。精子之漩渦運動快速而明顯。
4 級	精子活力很好，70~80%的精子活力良好。精子之漩渦運動很快，但較5級稍差。
3 級	精子活力好，50~75%的精子活力好。但由顯微鏡視野所見之漩渦運動緩慢。
2 級	活力平常，約20~50 %的精子有活力。沒有漩渦運動形成。
1 級	活力差，低於30%的精蟲有活力，且泳動緩慢不前進。
0 級	無活力可辨別。

(四) pH值：以pH meter直接測量所採集精液之pH值。

(五) 形態異常精子之分析：利用苯胺黑-伊紅(nigrosin-eosin; NE)染色後，隨即使用顯微鏡予以評估。異常形態精子可分為三種：1. 第一型形態異常：包括頭部與頭帽異常者。2. 第二型形態異常：中片部含有原生質滴者。3. 第三型形態異常：尾部具缺陷者。

(六) 精子存活率之檢測：利用苯胺黑-伊紅(nigrosin-eosin; NE) 染色法評估之，即將5 μ L原精液與10 μ L NE染色劑混合後做成抹片，並置於37 $^{\circ}$ C 30秒使抹片儘速乾燥，再置於螢光顯微鏡下評估至少5個視野內之精子；其中呈現紅色或粉紅色者表示死亡之精子。

(七) 精子頭帽完整性之檢測：取100-200 μ L之精液樣本（取樣量依精子濃度而定），先置入離心管中，再加入與精液等溫之PBS溶液至1 mL之最終量，經混勻後離心5，且移除上清液，並重複上述步驟3次；第3次離心後，抽出上清液時，使下層剩餘0.1-0.2 mL，再以1:1 (V:V) 比例加入多聚甲醛 (paraformaldehyde; PA) 與戊二醛 (glutraldehyde; GA) 之混合固定液。其後，經混勻，再置於4 $^{\circ}$ C 冷藏12-24 h，以進行其固定作用。固定後之精子樣本續加入PBS使最終容積為1 mL，再離心完畢後，抽除900 μ L之上清液，並加入100 μ L之FITC-PNA染色劑，混勻後避光放置於37 $^{\circ}$ C 恆溫箱中進行15 min之染色。染色後之精子樣本，利用PBS清洗後遺留200 μ L之精液，續加入 100 μ L PBS、100 μ L 甘油及10 μ L propidium iodide (PI)，其後取10 μ L之精液樣品於壓片後置於螢光顯微鏡下，評估至少5個視野內之精子頭帽完整性；其中頭帽呈現綠色螢光者表頭帽破損之

精子。

三、記錄表格

雄鹿精液性狀檢查							
耳號							
品種							
年齡							
鹿角							
採精日期							
時間							
稀釋倍數							
精液量							
外觀顏色							
精子活力等級							
精子濃度							
精液 PH							
麻醉劑量	Rom						
	Zol						
不正常精子數							
不正常精子率							
活精子數							
死精子數							
存活率							
備註							

四、已研習本技術的畜牧場名冊

1	進穎畜牧場
2	野山畜牧場
3	大榮畜牧場
4	永康輝畜牧場
5	振福畜牧場

6	和平畜牧場
7	姚七畜牧場
8	蓬山畜牧場
9	大山母畜牧場
10	沐文畜牧場
11	旺旺畜牧場