

## 種鴨精液品質檢測技術

推廣場所：

行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所

宜蘭縣五結鄉季新村季水路28-1號

電話：(03)9503107

傳真：(03)9501950

聯絡人：黃振芳分所長、魏良原副研究員

### 一、操作的基本設備與用具

- (一) 精液採集：漏斗狀採精杯（直徑6cm 長18cm）、生理食鹽水、精液收集管。
- (二) 血球計數板。
- (三) 蓋玻片(Acid-and alcohol-washed) 37.5 mm×22 mm。
- (四) 載玻片(Acid-and alcohol-washed) 75 mm×25 mm。
- (五) 光學顯微鏡（接目鏡10×；接物鏡10×、20×、40×及100×）。
- (六) 螢光顯微鏡（接物鏡10×、20×、40×及63×）。
- (七) 濾光片：藍色（白光背景使用）、綠色（對比強烈背景）、空白。
- (八) 定量分注器（0.02 及 1.0 mL）。
- (九) 玻片恆溫板。
- (十) 恆溫水浴槽。

### 二、操作步驟

#### (一) 精液外觀

新鮮採集的鴨隻精液可由外觀初步判定鴨隻精子濃度，精液為均勻且不透明之乳白色外觀，此表示精子濃度甚高。若呈微透明狀則表示精子濃度較低。採集之新鮮精液不可遭羽毛、排泄物、飼料或任何異物等之污染。且盡速進行品質檢查。

#### (二) 精液量

新鮮精液採集後，可利用精液收集管壁上之刻度直接讀取精液量。鴨隻每次平均射精量在菜鴨、北京鴨及番鴨分別約為0.3、0.5及1.2mL左右。惟不同個體或同一個體不同次採集間亦有所差異。

#### (三) 精子濃度：血球計數板法

將原精液以3% NaCl 稀釋200 倍，溫和攪拌2分鐘，使混合均勻，吸取稀釋200 倍之精液流入蓋玻片（22×22×1 mm），和血球計數板（improved Neubauer haemocytometer）間之空間而充滿計數室，於水氣飽和的密閉盒中靜置10~15 分鐘以上，以200×-400× 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，方格內精子數小於10，計算全部方格；方格內精子數介於10~40 間，計算10 個方格；方格內精子數大於40，則計算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 精液所含精子數。

#### （四）精子泳動性評分

具凹槽之載玻片置於37.5°C的恆溫板上預熱，原精液溫和搖動使其混合均勻，以玻棒沾取新鮮精液一小滴於蓋玻片上，沾有精液之蓋玻片面朝下，反蓋於載玻片之凹槽上，以低倍（10×10）鏡檢精液波動情形。評分依0~5 分計，評分標準如下表。

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）精子活動力

每樣品至少二重複，以生理食鹽水（預溫至37°C）稀釋原精液200 倍後，將血球計數板置於37°C的加溫板上，如計算精液濃度之方法，在血球計數板上計算5 個方格內不泳動的精子數（A），再將原精液以3% NaCl 稀釋後，計算精液濃度所得的值为（B），則  $(B-A) / B \times 100\%$  即為精子活動力。

#### （六）精子存活比率

##### 1. 活體染色法

原精液以 eosin-nigrosin 活體染劑進行染色，製成抹片2片，快速風乾並存放於乾燥皿中待測，以避免受潮，於顯微鏡下以400 倍觀察，每一抹片計算500 隻精子，精子頭部染成紅色者即代表死精子。本法依據具完整細胞膜的精子無法被 eosin-Y 染色，僅細胞膜有損傷的精子可被染色之原理，因此，精子被染色後呈現紅色者即代表死精子，而 nigrosin 則用來當作染色的背景，提高未被染色，而呈現白色的活精子之辨識度。

##### 2. 活體螢光染色法

- (1) 試劑： LIVE / DEAD Sperm Viability 試劑組。
- (2) SYBR-14配製：SYBR-14 (1mM)以DMSO稀釋10倍。
- (3)取100 $\mu$ L精液添加稀釋後的SYBR-14(100 $\mu$ M)0.5 $\mu$ L，混合均勻後於37 $^{\circ}$ C維持10min。
- (4)添加SYBR-14後的精液加入PI (Propidium iodide) 0.5 $\mu$ L，混合均勻後，避免光線照射下於室溫維持5min。
- (5)加入 1/4 倍總體積的 37%福馬林以固定精子。
- (6)取處理後的精液 10 $\mu$ L 以螢光顯微鏡於 488 nm 波長條件下進行解凍後的精子存活率的檢測，呈綠光者是活的，呈黃光者是垂死的，而細胞膜有破損的細胞會呈紅光者是死的。

### 三、記錄表格

鴨新鮮精液性狀紀錄表

品種	籠號	採精日期	精液外觀	精液量 (mL)	精子濃度 (/mL)	精子活力 (0-5)	精子存活 率 (%)	備註

### 四、已研習本技術的畜牧場名冊(包括精液進口公司)