

種雞精液品質檢測與冷凍精液製作技術

一、技術名稱：雞精液品質檢測與冷凍精液製作技術

二、聯絡人：林德育/育種組 06-5911211 轉 312

劉振發/生理組 06-5911211 轉 235

三、操作的基本設備與用具：

(一)種雞精液品質檢測技術

- 1.位相差顯微鏡(須有 10×, 40×及 100×接物鏡)
- 2.玻璃小瓶(20 mm×50 mm)
- 3.載玻片(Acid-and alcohol-washed) 75 mm×25 mm
- 4.蓋玻片(Acid-and alcohol-washed) 37.5 mm×22 mm
- 5.顯微鏡 yellow-green 濾光片
- 6.玻璃攪棒
- 7.微量吸管 (0.02 及 1.0 ml)
- 8.微量滴管 (0.02 及 1.0 ml)

(二)種雞冷凍精液製備技術

- 1.液態氮桶
- 2.冰盆
- 3.冷凍小瓶(2 ml)
- 4.網底濾杯
- 5.微量吸管 (0.02 及 1.0 ml)
- 6.金屬鑷子
- 7.抗凍液
- 8.微量吸管 (0.02 及 1.0 ml)
- 9.微量滴管 (0.02 及 1.0 ml)

(三)種雞冷凍精液解凍技術

- 1.冰盆
- 2.玻璃小瓶(20 mm×50 mm)
- 3.螢光染劑(SYBR-14 與 PI)
- 4.螢光顯微鏡(須有 10×, 40×及 100×接物鏡)
- 5.位相差顯微鏡(須有 10×, 40×及 100×接物鏡)
- 6.載玻片(Acid-and alcohol-washed) 75 mm×25 mm
- 7.蓋玻片(Acid-and alcohol-washed) 37.5 mm×22 mm
- 8.微量吸管 (0.02 及 1.0 ml)

四、檢測流程耗材與記錄表格

(一)種雞精液品質檢測技術(資料來源：精液檢查 人工生殖技術/林慶雄與劉瑞珍)

1.利用顯微鏡檢查精子活力及泳動速率

(1)取清潔消毒之載玻片，加溫至 37.8°C，取一滴混合完全之原精液(精液輕緩轉動 2~3 次，但勿強力振盪)於玻片上，必要時可蓋上蓋玻片，立即以顯

微鏡低倍數觀查精子活動，並略估活精子百分率以及活動力。精子活動力等級判定為 0~5 級評估法如下：

- 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 % 的精子有活力，且泳動緩慢不前進。
- 0 級：無活力可辨別。

(2) 為能精確判定精子活力之等級，稀釋過的精液也可用以上方法來評分，但具黏性的稀釋液可能會仰制精子漩渦運動的形成，此時，應以精子前進運動速度及活力作為判定之依據。

(3) 有些研究者使用活精子所佔的 %，如 80%、70%、或 60% 的方法判定精蟲活力，亦不失為一良好的之方法。任何判定精子活力之方法，其檢查步驟及結果均應有詳細的說明。

2. 精子數計算

(1) 紅血球計數法：應用紅血球計數盤來計算，計算最少 4~5 大格 (64~84 個小方格) 內之精子數，其步驟如下：

A. 採得之原精液倒轉 2~3 次使混合均勻 (勿強力振盪)，吸 0.05ml 到標準紅血球稀釋管中，滴一個小氣泡於管內，並將管之末端拭淨 (氣泡可防止稀釋液滴入稀釋管前，精液因毛細作用而移動)。

B. 將稀釋液注入標準紅血球稀釋管中至標記 1.01mm 處一般可用 0.8 至 1 % 之 NaCl 溶液作為稀釋液 (通常家禽精子以 0.8 至 0.9%，而家畜精子以 0.9 至 1%)。將稀釋管以手握振盪使混合完全，將最上之 4~5 滴混合液去掉 (使管內之精液稀釋完全)，在紅血球數盤上放置一蓋玻片，將稀釋過精液滴入蓋玻片下方。

C. 開始計算精子數前應將計數盤靜置數分鐘，於室溫中完成精子數計算。紅血球計數盤計算之方格數依據精液之濃度及玻片上精蟲分佈之情況而定。計算小方格總數 80 格 (1/20x1/20mm)，所得之精子數乘以 10,000 為 ml 之精子數目。若使用已稀釋之精液而非原精液，算得之精蟲數須乘以稀釋倍數，才能求得正確之精子數。

(2) 光電比色法：此法為計算精子數迅速而實用之方法。其原理是以光透過標準稀釋精液多少為依據。此比色計必須標準化，該標準化是先由血球計計算法決定已知精子濃度後，予以換算應用。

(3) 視覺判定：由不透明度快速判定精子濃度，其方法是製作不同濃度之不透明標準液。氯化鋇及硫化鈉可調製硫化鋇溶液。分為 5 個不同濃度，0.06、0.09、0.12、0.15、0.18 % 即可應用。精液 1：枸鹽酸鈉稀釋液 10，稀釋後，與不同濃度標準液比較後，可快速了解精子濃度。

(4) 紅血球數自動測定儀：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。

3. 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

4. 死、活精子之染色

此法乃利用死、活精子吸收染色劑之差異性為依據。此試驗中，玻片上死亡之精子會吸收染色劑而呈藍色，活精子不吸收染色劑而無色。

(1) 染色劑之配製法如下：

- A 染色劑 — 2 % 水溶性 eosin 溶於 0.125M 之磷酸緩沖液中 (pH7.3)
磷酸緩沖劑：80.4 ml M/8 之 Na_2HPO_4
19.6 ml M/8 之 KH_2PO_4

- B 染色劑 — 1 份 Opal blur 加 1 份 0.125M 的磷酸緩沖液

A、B 染色劑等量混合，加熱過濾後備用。

(2) 染色之方法：

- A. 滴 1~2 滴染色劑於乾淨載玻片上，再滴入精液混合，上蓋另一片玻片，去除多餘之染色劑，並用布拭淨玻片邊緣，再將 2 玻片分開，置於加熱盤 (65°C) 上使乾燥。
- B. 玻片乾燥後，以顯微鏡之高倍 ($\times 1000$) 來計數。通常計算精子 333 隻，逢機取樣，若部分精子僅核有染色，判定為死精子。

活精子數可以公式 = 活精子數 $\times 3/10$ = 活精蟲數 %。

5. 種公雞精子畸型及存活率檢查

(1) 染色液之製備

A. 染色液配方一：

- Sodium glutamate. H_2O 麩酸鈉 1.92g
- Fructose or glucose 果糖或葡萄糖 0.6g
- Sodium acetate (anhydrous) 無水醋酸鈉 0.51g
- Magnesium acetate. $4\text{H}_2\text{O}$ 醋酸鎂 0.08g
- Potassium citrate. H_2O 檸檬酸鉀 0.128g

溶於水中並泡成 100 ml (以蒸餾水)，每 10ml 溶液內加入 0.16g eosin (水溶性) 及 0.6g nigrosin (水溶性)

B. 染色液配方二：

- Sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{2H}_2\text{O}$) 檸檬酸鈉 3.6 g

溶於蒸餾水中並泡成 100 ml，每 10 ml 溶液內加入 0.16 g eosin 及 0.6 g nigrosin

(2) 鏡檢器材

位相差顯微鏡 (須有 10 \times ，40 \times 及 100 \times 接物鏡)

20 mm×50 mm 玻璃管
載玻片(Acid-and alcohol-washed) 75 mm×25 mm
蓋玻片(Acid-and alcohol-washed) 37.5 mm×22 mm
顯微鏡 yellow-green 濾光片
玻璃攪棒
定量吸管 (0.02 及 1.0 ml)
微量滴管 (0.02 及 1.0 ml)

(3)鏡檢步驟

- A.在 5°C 冰水中放置一小試管，並加入 0.5 ml 染色液。
- B.在染色液中加入 0.02 ml 的精液並混合均勻(或是以 1 滴精液與 15 染色液的比例混合)。
- C.2 分鐘後搖動試管，並取出一滴置於載玻片上。
- D.在玻片作塗抹片，不易太厚或太薄以免影響觀察。
- E.以冷風吹風機迅速吹乾塗抹片。
- F.等完全乾燥後以 mounting fluid 滴在蓋玻片上，並覆在載玻片之塗抹片之上。
- G.以油鏡(100×)觀察，計算 300 隻精子的形狀及存活，以判定畸型率及存活率。



圖. 家禽精子生死鑑別，粉紅色(箭頭所指)者為死亡精，透明者為正常精子。

(二)種雞冷凍精液製備技術(資料來源：台灣土雞精子的急速冷凍研究 畜產研究/劉振發)

1.種雞冷凍精液製備

利用 Dimethylacetamide(DMA)調配成精液急速冷凍的抗凍液，將公雞的混合精液再加入等量的抗凍液，就置於冰塊間於 0°C 平衡 10 分鐘後，立即以微量滴管將含有抗凍劑的精液以小滴(約 20-25ul)的形態滴入液態氮中製成粒狀精液，並將 12~15 粒的冷凍精液裝入冷凍小瓶保存於液態氮中。抗凍液是以市售速保精溶液(豬精液稀釋用 500 毫升瓶裝，內含 33g Dextrose monohydrate、1.85mg Sodium citrate dihydrate、1.85g EDTA、0.8g Sodium bicarbonate、250mg Ampicillin sodium 和 250mg Dihydrostreptomycin sulfate)來溶入 12% DMA。

2.冷凍精液的解凍與精子存活率的檢測

粒狀冷凍精液的解凍步驟是先將 0.4ml 的速保精溶液裝入玻璃小瓶，置於 60°C 恆溫水槽中 1~2 分鐘後取出，再將冷凍小瓶內的粒狀精液(12~15 粒)迅速倒入玻璃小瓶混合，隨即將解凍後的精液置於冰塊間，解凍精子的存活是以 SYBR-14 和 PI 螢光染劑進行檢測，結果解凍精子的存活率約為 50%。

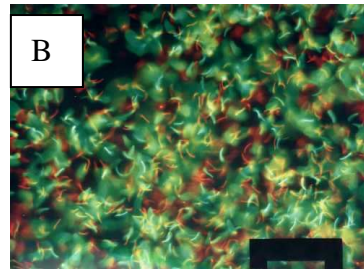
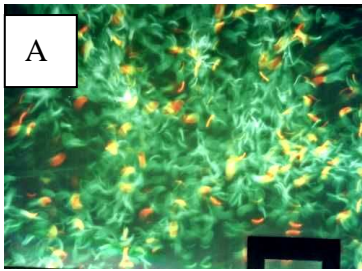


圖.利用 SYBR-14 及 PI 螢光染劑進行精液存活率檢測；綠色螢光為活的精子，黃色螢光為垂死的精子，紅色螢光為死的精子。A 為冷凍前的精液，B 為冷凍解凍的精液。鏡檢倍數是 400 和度量孔徑是 50 μm 。

(三)記錄表格

種雞精液品質檢測記錄表

種雞場 名稱	品種/ 品系	羽號	出生 日期	採精 日期	精液 量	精液 顏色	精子 活力	精子濃度 (億/毫升)	總精子 數(億)

五、已研習本技術的畜牧場名冊(包括精液進口公司)