

动物繁殖学实验

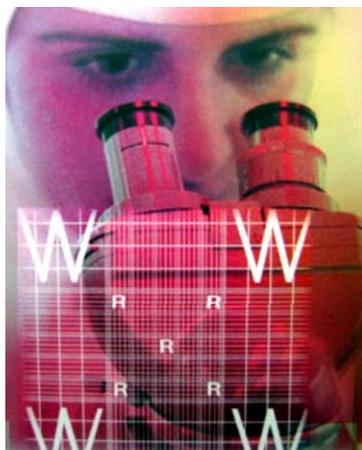
主讲教师：张明

实验一：精子密度测量技术比较

一、实验目的

精子密度的精确测量是衡量公畜繁殖性能和进行精液稀释的科学依据。

1. 掌握血球计数板计数法测量精子密度的操作过程；
2. 了解分光光度测定方法精子密度的原理；
3. 了解Coulter (库尔特) 精子计数的原理；
4. 比较血球计数板计数法与光密度测定法测量精子密度的准确性。



二、实验原理

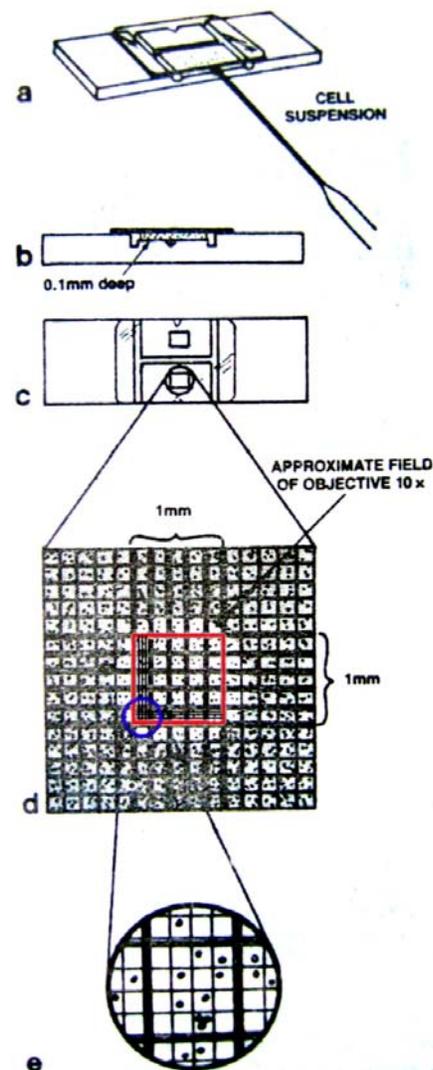
1. 血球计数板计数法测量精子密度的原理

采用抽样统计的原理。一般直接数 $0.02 \sim 0.1 \text{mm}^3$ 体积液体中的精子数，然后根据精液的稀释倍数和体积单位转换关系计算精液中精子密度。

2. 误差的主要来源：

(1) 采样准确性：精子凝集、精子沉淀、精液稀释倍数太大均可引起采样误差；

(2) 计数准确性：数精子时视野中的精子数，不同液层中的精子计数的准确性，抽样面积区的准确性。



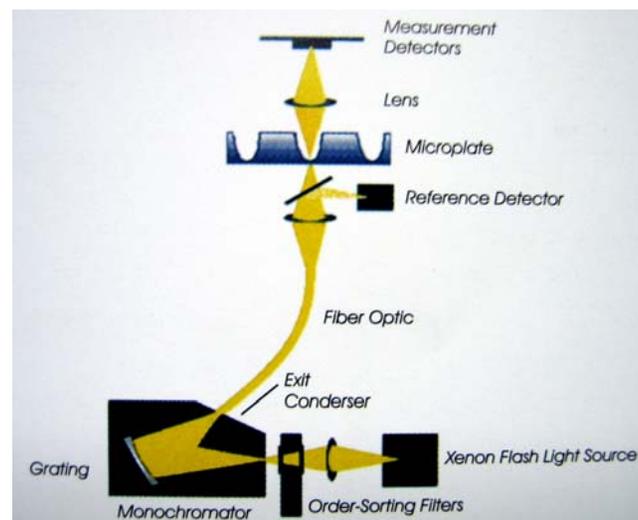
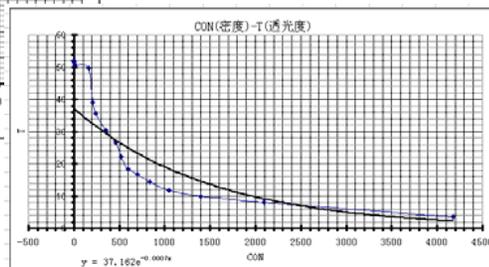
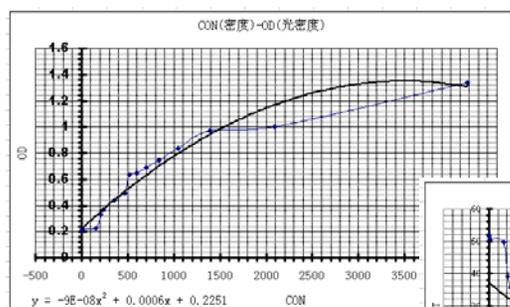
二、实验原理

2. 分光光度测定精子密度的原理

光通过精液（带有精子的液体）时，一部分光必吸收，吸收的光密(OD)或透过的光强度(T)与精液中精子的密度呈一定的函数关系*。即： $C=F(OD)$ 或 $C=G(T)$ 。

*根据郎伯-比尔定律： $OD=K_{\lambda}Cd$ (其中 K_{λ} 表示一定波长光的吸光系数， C 表示浓度， d 表示光通过的距离)。

分光光度测定精子密度时，一般先绘制标准曲线，即建立 $C=F(OD)$ 或 $C=G(T)$ 的函数关系。

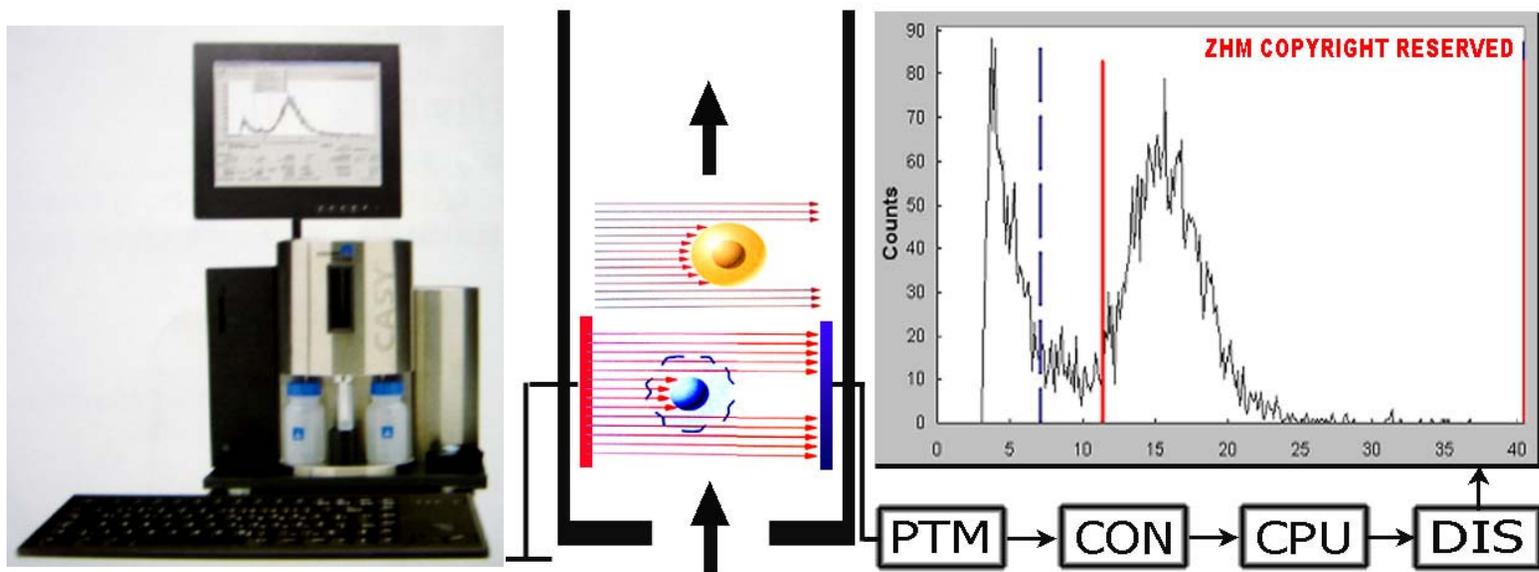


二、实验原理

3. Coulter (库尔特) 精子计数原理

当微粒通过两端有电势差的微孔时，其两端的电势会发生改变，且电势的改变程度与微粒的大小有关。每当一个微粒通过时，

一个电势波动产生，从而实现计数功能。Coulter可以实现计数自动、高速的计数，但必须人工确定计数微粒大小的阈值。



三、实验器材

- 1、材料：猪精液（5个不同密度梯度）。分别表示为样品 ρ_1 、 ρ_2 、 ρ_3 、 ρ_4 和 ρ_5 ，一个未知样品X。（每个同学承担一个样品的计数）
- 2、器械：显微镜(JAPAN, Olympus CH-2)，血球计数板，加厚盖玻片，计数器，加样枪(200 μ l，带枪头)，96孔平底板，全波长光阅读器(USA, Thermol Variskan)，全自动细胞计数器(German, CASY DT)。
- 3、试剂：3% NaCl溶液，CASY-buffer，CASY-cleanning。
- 4、其他：坐标纸，铅笔(自备)。

- * 注意计数板的清洗;
- * 正确的使用加样枪;
- * 计数器的调零和计数。



四、实验步骤

(一) 标准曲线的绘制

- 1、将五个样品（ ρ_1 、 ρ_2 、 ρ_3 、 ρ_4 和 ρ_5 ）用血球计数法测定密度，每个样品至少测定3次；然后测定五个样品（ ρ_1 、 ρ_2 、 ρ_3 、 ρ_4 和 ρ_5 ）的光密度。

样品编号		ρ_1			ρ_2			ρ_3			ρ_4			ρ_5		
计数板 $\rho_H(10^6/ml)$	次数	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	平均数															
光密度																

- 2、绘制密度—OD的曲线，作为标准曲线。并在Excel软件中计算其回归关系。

附：回归关系的计算

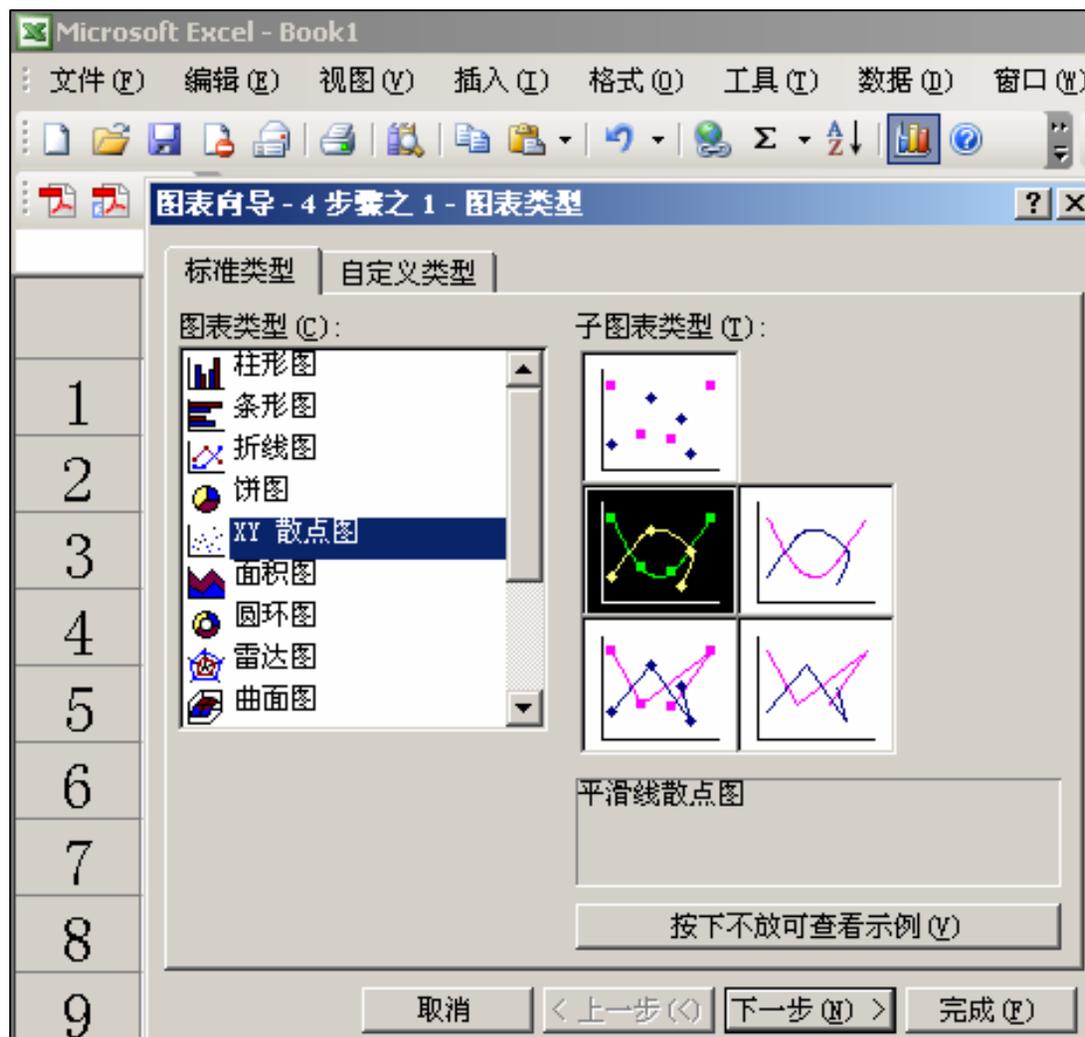
标准曲线回归关系计算



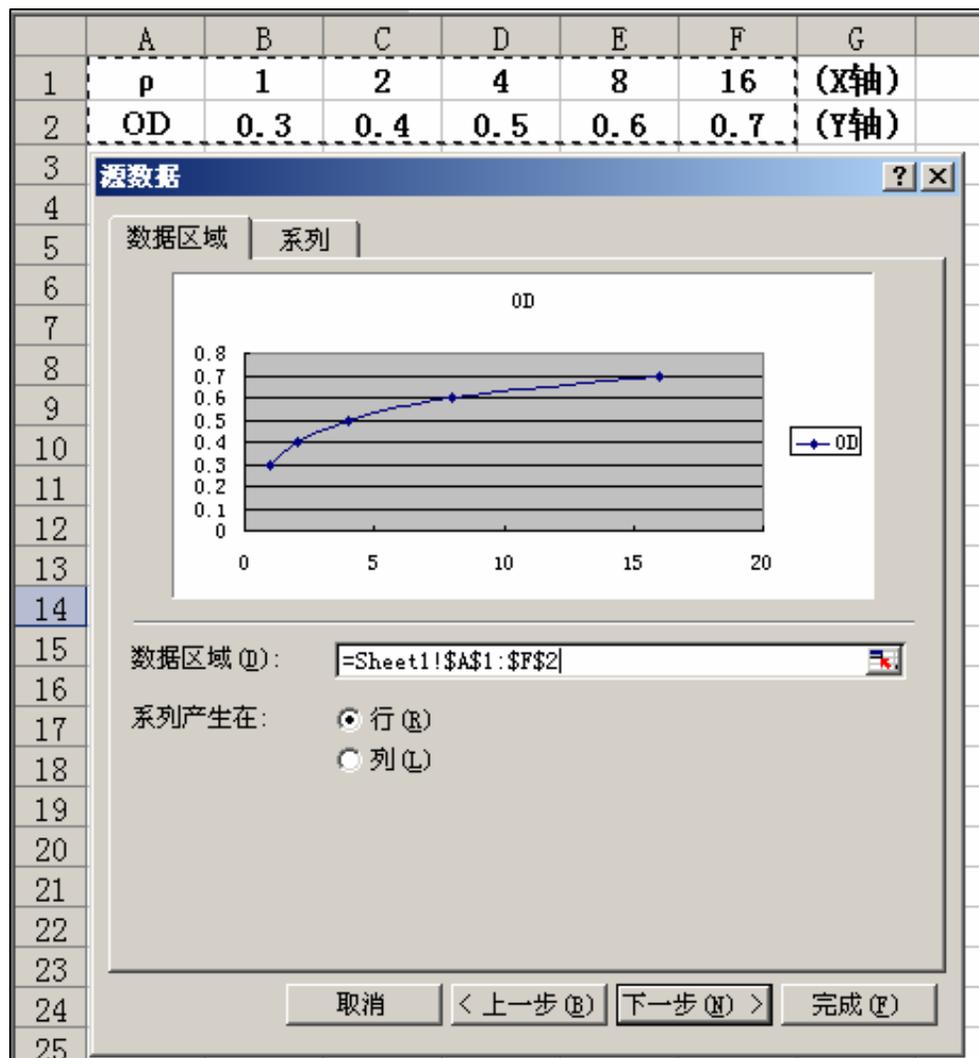
The screenshot shows the Microsoft Excel interface with a data table. The table has 8 columns (A-G) and 3 rows. The first row contains headers A through G. The second row contains values for ρ (1, 2, 4, 8, 16) and is labeled '(X轴)'. The third row contains values for OD (0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7) and is labeled '(Y轴)'. The Excel window title is 'Microsoft Excel - Book1' and the active cell is J11.

	A	B	C	D	E	F	G
1	ρ	1	2	4	8	16	(X轴)
2	OD	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	(Y轴)

标准曲线回归关系计算



标准曲线回归关系计算



标准曲线回归关系计算

文件(F) 编辑(E) 视图(V) 插入(I) 格式(O) 工具(T) 数据(D) 窗口(W) 帮助(H)

宋体

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	p	1	2	4	8	16	(X轴)	
2	OD	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	(Y轴)	

图表向导 - 4 步骤之 3 - 图表选项

标题 坐标轴 网格线 图例 数据标志

图表标题 (T):
OD

数值 (X) 轴 (A):
10E6

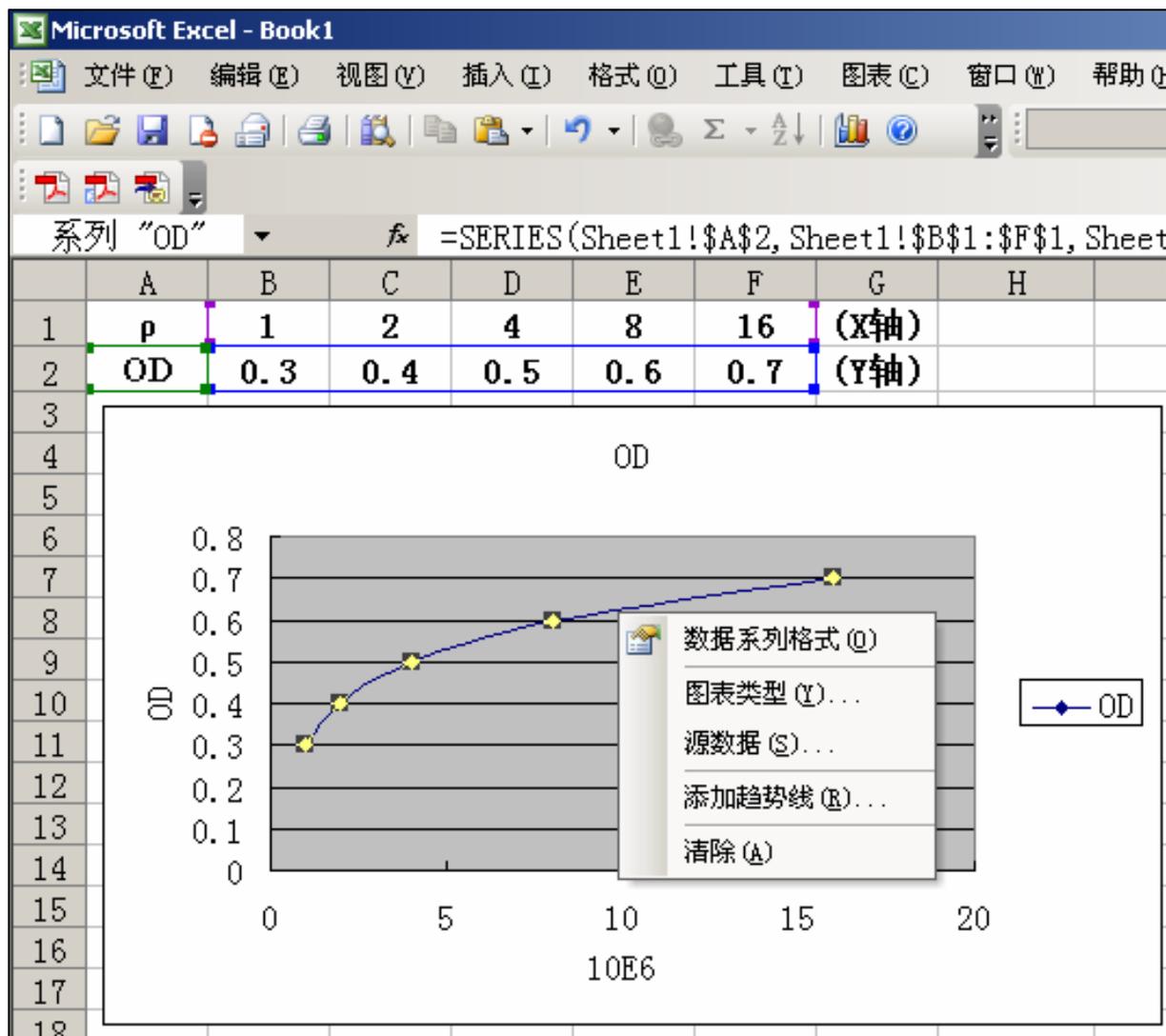
数值 (Y) 轴 (V):
OD

次分类 (X) 轴 (X):

次数值 (Y) 轴 (Y):

取消 < 上一步(B) 下一步(N) > 完成(F)

标准曲线回归关系计算



标准曲线回归关系计算

Microsoft Excel - Book1

文件(F) 编辑(E) 视图(V) 插入(I) 格式(O) 工具(T) 图表(C) 窗口(W) 帮助(H) Adobe PDF(P) 键入需要帮

系列 "OD" $=SERIES(Sheet1!\$A\$2, Sheet1!\$B\$1:\$F\$1, Sheet1!\$B\$2:\$F\$2, 1)$

	A	B	C	D	E	F	G
1	p	1	2	4	8	16	(X轴)
2	OD	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	(Y轴)

OD

添加趋势线

类型 选项

趋势预测/回归分析类型

线性(L) 对数(O) 多项式(P) 阶数(O): 2

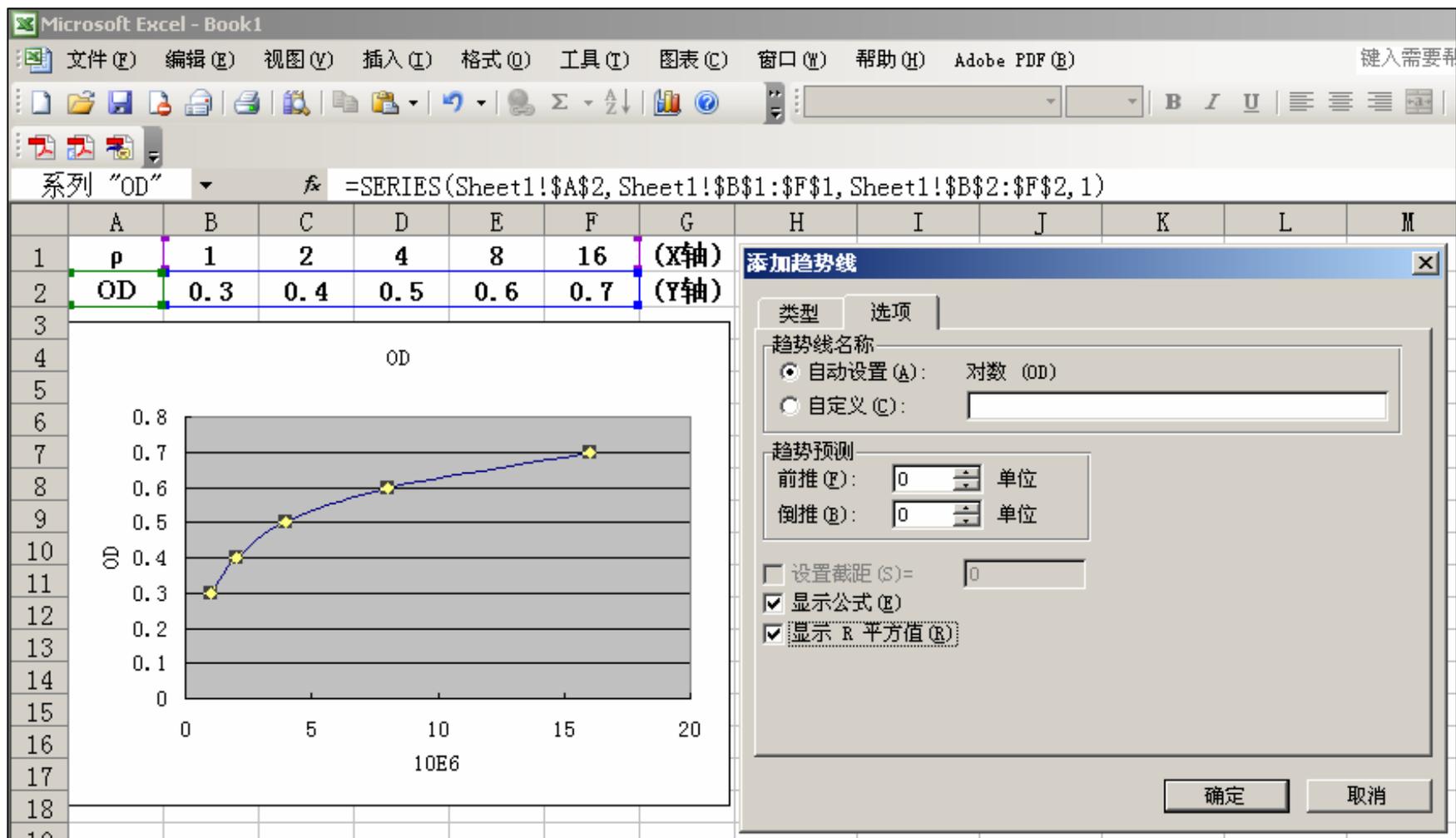
乘幂(W) 指数(X) 移动平均(M) 周期(E): 2

选择数据系列(S):

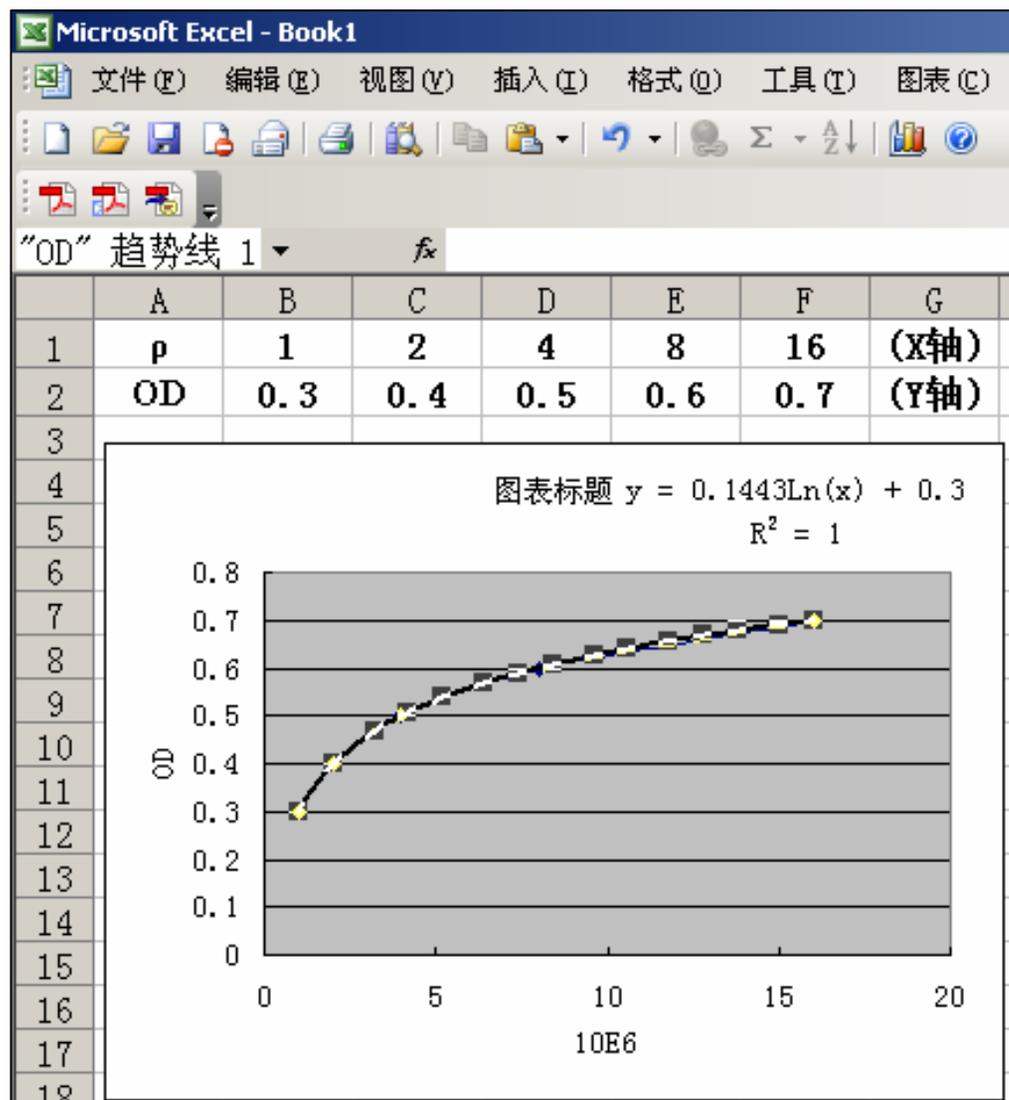
OD

确定 取消

标准曲线回归关系计算



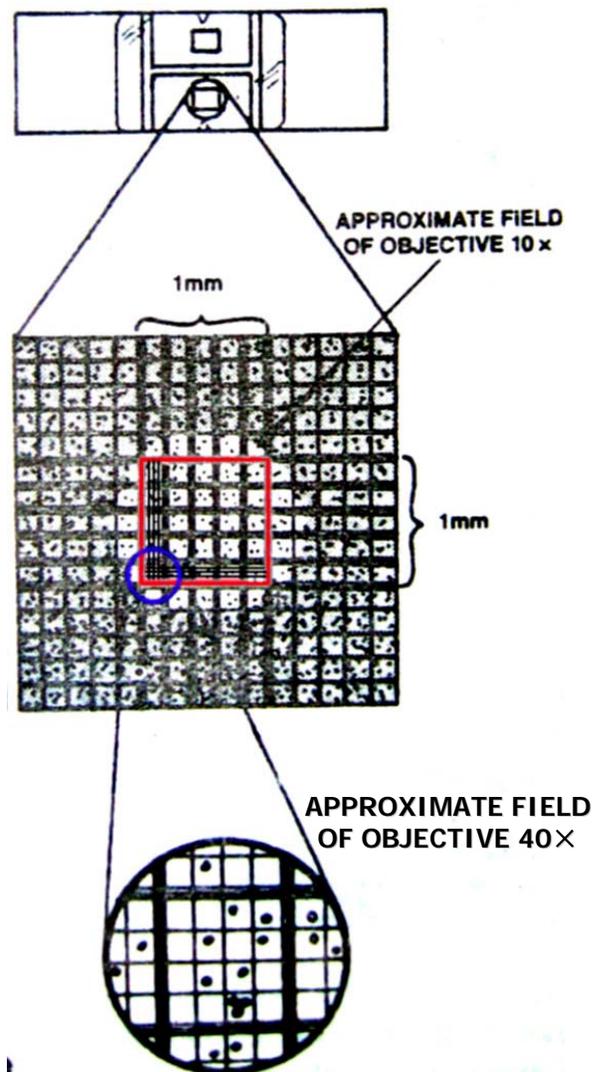
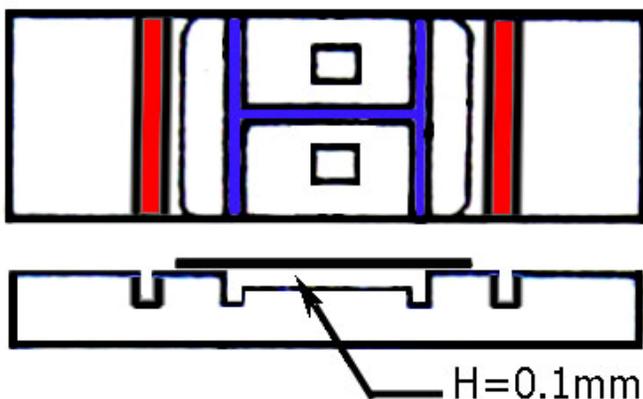
标准曲线回归关系计算



四、实验步骤

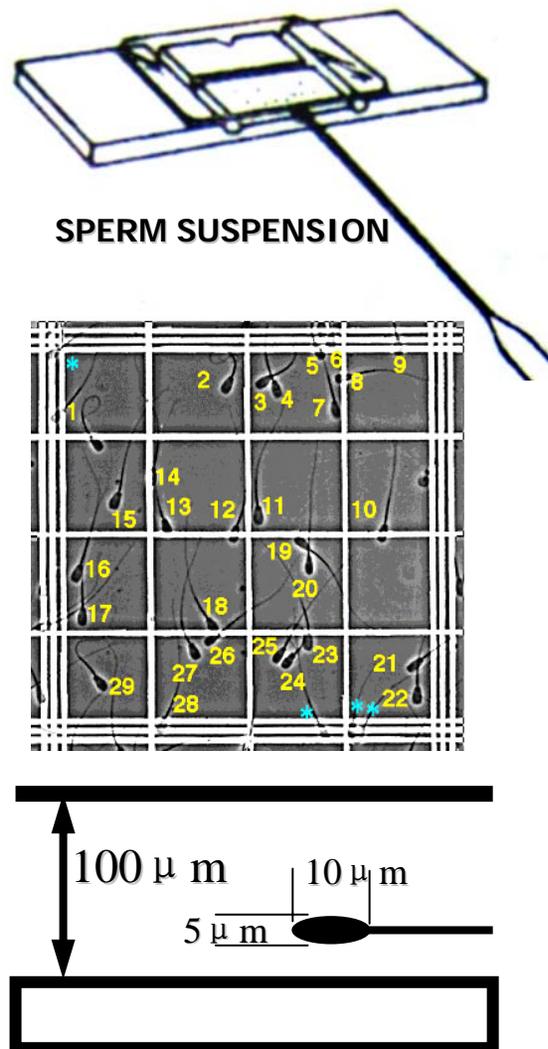
(二) 血球计数板计数(O)

- 1、用蒸馏水清洗计数板计数室，将水晾干；
- 2、将计数板放到显微镜载物台上，再盖上加厚盖玻片在计数室上；
- 3、在 $10\times$ 物镜下观察计数室刻线结构，然后转到 $40\times$ 下，找到计数的方格；



四、实验步骤

- 4、将精液样本震荡后取 $20\mu\text{l}$ 从盖玻片与计数室接触的缝隙处加入计数室；
- 5、在 $40\times$ 下对5个中方格的精子进行计数。计数时统一选择精子上的一个点作为计数点。计数时对于压线精子，采用“数上不数下，数左不数右”的原则；
- 6、在一个中方格视野中，应调节显微镜微调，使不同液层中的精子被观察到。至到数完5个中方格，将每个中方格的精子个数分别记录。
- 7、重复以上过程，每个组完成5个样品和X样品的计数，每个样品计数3次。



四、实验步骤

(四) 全自动细胞计数器计数(C)

- 1、该实验以组为单位进行。
- 2、取1支CASY样品管，将样品震荡后，取5 μ l的X样品管，然后加入5ml CASY-Buffer稀释。
- 3、调试好CASY-DT,其中计数微粒大小的阈值设定为(教师演示):
Left cursor: 10 μ m; Right cursor: 25 μ m。
- 4、调用CASY中的精子计数程序，测定CASY-Buffer，测定两次。

五、实验作业

每个同学完成的作业

1、计数板计数结果请填入下表（每个组员的实验结果）

样品	计数板计数																													
	第一次计数								第二次计数								第三次计数								不同次数之间					
	1	2	3	4	5	M ₁	S ₁	C _{V1}	个数	1	2	3	4	5	M ₂	S ₂	C _{V2}	个数	1	2	3	4	5	M ₃	S ₃	C _{V3}	个数	M	S	C

M_{1,2,3}-五个方格精子个数平均值
 S-五个方格精子个数的方差
 CV-五个方格精子个数的变异系数
 密度-精子密度 (10⁶/ml)

2、测量5个样品（ ρ_1 、 ρ_2 、 ρ_3 、 ρ_4 和 ρ_5 ）的OD值

（一个组统一测定后，交给学习委员，然后每个同学自己到学习委员处抄写）

	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	ρ_5	X样品
平均OD						

3、思考题：为什么要通过精子计数板计数获得的每个样品的平均密度来查出OD值，而不能用每个样品两次测量的密度查出的OD值的和除以2得到。

即： $\frac{CON_1+CON_2}{2} = CON$ ， 但 $\frac{OD_1+OD_2}{2} \neq$ 平均密度查出的OD

- 4、利用回归关系和X样品OD值，计算X样品的密度，然后与CASY-DT，和计数板计数密度比较，分析三种计数方法的准确程度。
- 5、讨论自己血球计数法计数中的主要误差来源。

每个组完成的作业（组长组织，组员协作完成）

1、填入三种精子计数方法的原始结果

	计数板计数 ($10^6/\text{ml}$)				分光光度法计数(OD)		
	1	2	3	$M_C \pm SD$	1	2	M_{OD}
P1							
P2							
P3							
P4							
P5							

2、绘制密度—OD值曲线，并计算其回归关系。将结果给组员。

实验二：精子活力测量及不同理化因素对 精子活力、存活时间的影响

一、实验目的

精子活力(motility)是指直线运动精子的比例，是测定精子活动能力的定性方法；精子活率(vitality)是指精子总数中活精子所占比例，是测定活精子和死精子的定量方法。

精子的活力可以反映出精子的受精能力，是精子质量最直观的表现。影响精子质量的理化因素很多，如温度、pH值、消毒剂、震动等。通过对精子活力和存活时间的测量可以评估理化因素对精子质量的影响程度。

- 1、掌握观察法测定精子活力的操作过程；
- 2、了解CASA、SQA分析精子运动的原理；
- 3、了解影响精子质量的理化因素。

二、实验原理

精子活力测定的方法目前主要有3种：显微镜观察法、计算机辅助精液分析(CASA)、精液质量分析仪(SQA)分析，其中显微镜观察法最简便，但带有一定的主观性。

1、显微镜观察法

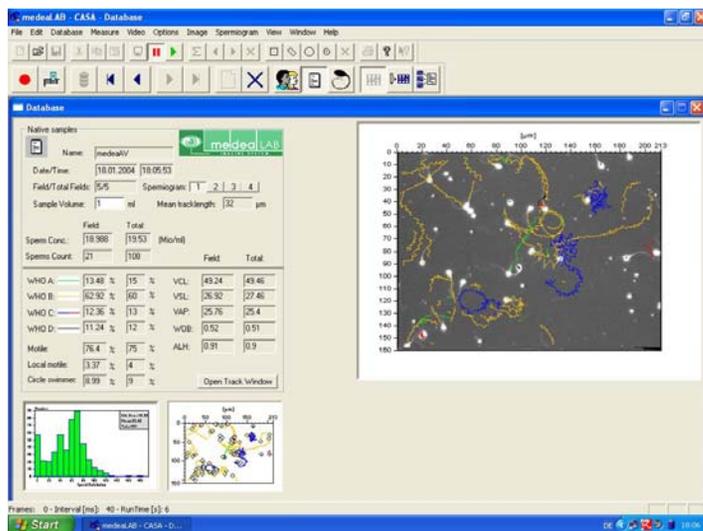
将原精液温度维持在 37°C ，在显微镜下放大100或400倍，目测视野中直线前进运动的精子占总精子的比率。精子活力采用0~1表示。



二、实验原理

2、计算机辅助精液分析(CASA)

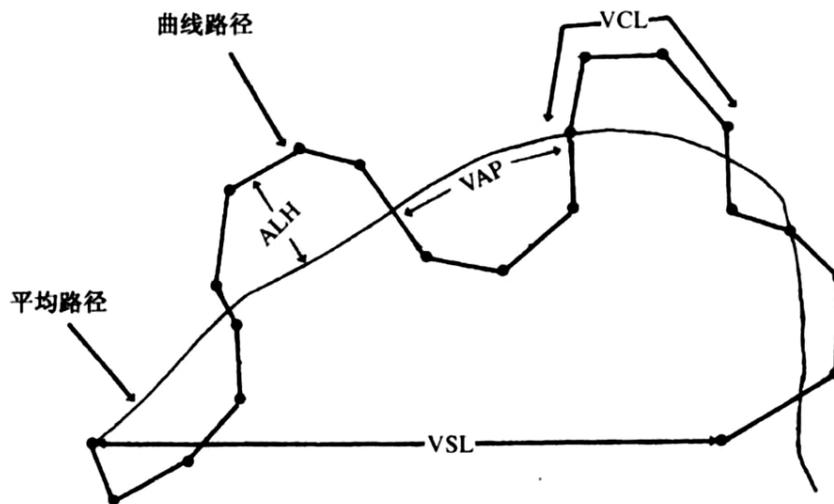
CASA的工作原理：精子形态的显微运动图像通过CCD摄像头采集后，经视频图像采集卡输入到计算机中，然后应用分析软件，对精子大小、形态、运动状态等进行动态分析处理。CASA可以客观准确地量化分析精子运动轨迹，获得精子运动的多项参数。



二、实验原理

CASA系统可测定的指标:

- ①VCL-曲线速度($\mu\text{ m/s}$)
 - ②VSL-直线速度($\mu\text{ m/s}$)
 - ③VAP-平均路径速度($\mu\text{ m/s}$)
 - ④ALH-精子头侧摆幅度($\mu\text{ m}$)
 - ⑤LIN-直线性, VSL/VCL
 - ⑥WOB-摆动性, VAP/VCL
 - ⑦STR-前向性, VSL/VAP
 - ⑧BCF-鞭打频率 (次数/s)
 - ⑨MAD-平均移动角度(度)
- WHO制定



CASA系统测定时易非精子颗粒物质的干扰。此外不同厂家不同类型的CASA系统参数设置的差异使彼此的检测结果不能直接比较。

二、实验原理

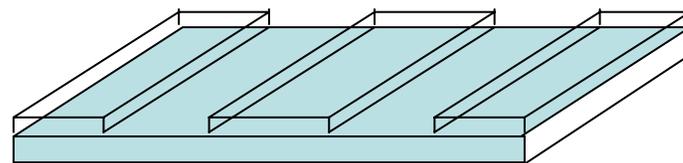
3、精液质量分析仪(SQA)分析原理

利用光电原理，让光束通过具有一定厚度的微量体积的精液标本，将精子活动强弱和精子密度高低以光信号形式接收并处理，将其转换成电脉冲数字信号，经计算机处理后，以SMI值的高低对精子质量进行综合评价。此外，还可以给出功能精子浓度、总精子浓度、精子活动度及正常形态精子百分率等精液分析参数。



三、实验器材

- 1、材料：猪精液（在37℃恒温降内）
- 2、器材：显微镜、热台、震荡器、 MC-100 板(实验室自制)、 盖玻片（每个MC-100 板需要2块）、微量加样枪、12孔板、记时器(自备)。
- 3、药品：蒸馏水、3%和0.9% NaCl溶液、0.1M HCl和0.1 M NaOH、0.1%洗涤剂。



MC-100 板

四、实验步骤

(一) 显微镜观察法测定精子活力和活率

- 1、将精液放在37℃恒温箱内。
- 2、首先将显微镜调好，然后将MC-100板、盖玻片清洗干净，烤干后，在恒温箱内预热到37℃左右。
- 3、取精液一滴(40 μ l)，滴加在预热的MC-100板测量室上，盖上盖玻片镜检，用低倍(10×)镜观察观察精子的运动状态，评定精子的活力和活率。
- 3、精子活力的评定方法：采用“十级一分制”。即在显微镜下，计算呈直线前进运动的精子所占的比例。直线前进运动的精子为100%，则评为1分；90%的评分为0.9分；80%的评为0.8分；依次类推。
- 4、精子活率的评定方法：采用百分率评定。在显微镜下，计算运动精子占总精子数的百分率，

四、实验步骤

(二) 精子生存时间的测定方法

- 1、将MC-100板、盖玻片清洗干净，烘干后，在恒温箱内预热到37℃左右。
- 2、取精液一滴(40 μ l)，于预热的MC-100板上，盖上盖玻片镜检，测量精子活率。
- 3、如果精子的初始活率在0.5以上，每间隔10分钟观察一次精子运动情况；如果精子的初始活率在0.5以下，每间隔5分钟观察一次精子的活动情况。直到所有精子停止运动，记录下精子全部死亡经历的时间。

精子的存活时间=间隔次数×间隔时间-间隔时间的一半。

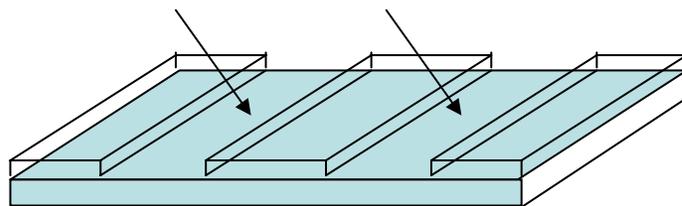
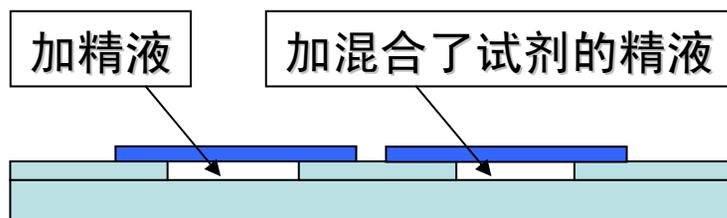
- * 以精子能否运动作为精子死活的标志，所以精子所在的环境温度应该在37~38℃左右。对照组的精子存活时间长，可以不测完。

四、实验步骤

实验前，小组成员进行分工：3个同学分别测定物理因素（低渗、等渗和高渗），3个同学分别测定化学因素（酸、碱和洗涤剂）。

（三）理化因素对精子的影响

- 1、每块MC-100板上有两个精液盛装室。一个加精液（对照组），另一个加添加了试剂精液（实验组）



四、实验步骤

2、对照组：取40 μ l 预热精液加入MC-100 板上一个测量室，盖上盖玻片；

3、实验组：在12孔板中按下表混合测试精液样品（混合前精液和试剂预热）。然后立即取40 μ l 混合样品加入MC-100 板上另一个测量室。盖上盖

玻片 ^{物理} 。化 因 素		精液	试剂	混合后样品体积	测试人
化学因素	0.1M NaOH	400 μ l	50 μ l	450 μ l	A
	0.1M HCl	400 μ l	50 μ l	450 μ l	B
	0.1% 洗涤剂	400 μ l	50 μ l	450 μ l	C
物理因素	高渗(3%NaCl)	200 μ l	100 μ l	300 μ l	D
	等渗 (0.9%NaCl)	150 μ l	150 μ l	300 μ l	E
	低渗(蒸馏水)	200 μ l	100 μ l	300 μ l	F

四、实验步骤

4、立即在显微镜下按照前面讲述的“显微镜观察法测定精子活力和活率，精子生存时间的测定方法”进行活力、活率和存活时间的测定。每个同学完成下表。

项目	活力	活率			精子存活时间 (分钟)
	10秒 (初始活力)	1分钟	10分钟	30分钟	
测试时间					
对照组					
___组					

四、实验步骤

（四）注意事项

- 1、精液、试剂随时保存在37℃恒温箱中，等温混合；
- 2、MC-100板临用前最好预热；
- 3、由于显微镜载物台没有保温装置，所以活力评定操作过程要快，尽量在10秒内完成；
- 4、精液与试剂的混合不能在玻片上；
- 5、精液与试剂混合后，应立即加到MC-100板测量室，盖上盖玻片后马上测量活力和活率（在10秒内）。

五、实验作业

1、_____对精子活率和存活时间的影响

项目	活力 10秒（初始活力）	活率			精子存活时间 （分钟）
		1分钟	10分钟	30分钟	
测试时间					
对照组					
_____组					

2、分析化学物质作用不同时间和不同浓度对精子的影响。

*** 可以对实验结果进行F检验**

附：实验四：兔胚胎移植准备（激素注射）

超排方法1：PMSG+hCG

时间	第0d	第3d(72h)	第7d(168h)
操作	肌肉注射 PMSG 50IU/只	肌肉注射 hCG 50 IU/ 只，同时配种	胚胎进入子宫

超排方法2：FSH+hCG

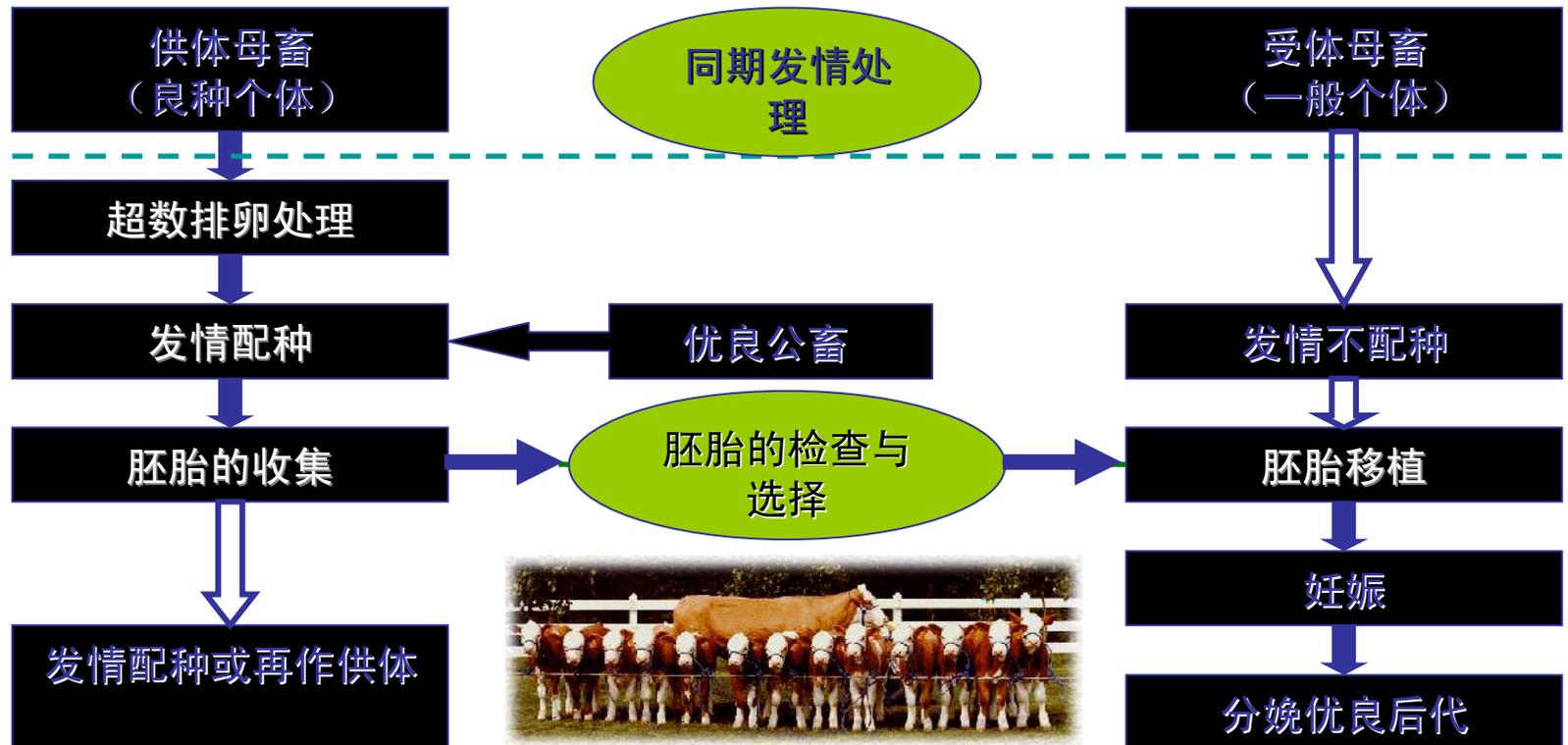
时间	第0d	第1d		第2d		第3d		第7d
	6:00pm	8:00am	6:00pm	8:00am	6:00pm	8:00am	6:00pm	9:00am
操作	肌注FSH 20 IU	肌注FSH 15 IU	配种，肌注 hCG50 IU	胚胎进 入子宫				

在胚胎移植操作前一周，首先将供体用PMSG（hCG）处理，处理后72小时，将公母兔合笼，给供体配种，同时用hCG处理供体。

实验三：兔胚胎移植技术

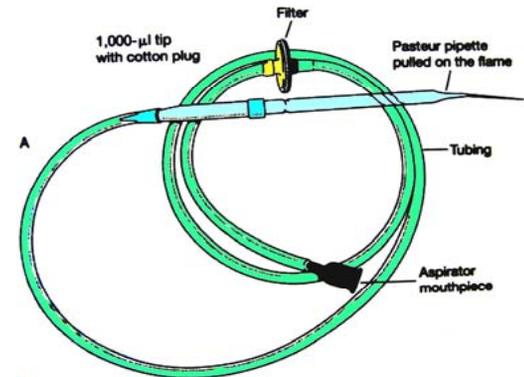
一、实验目的

通过家兔的胚胎移植认识胚胎移植的技术环节;掌握手术法采卵以及胚胎质量检查等技术操作。



二、实验器材

- 1、**手术器械**：手术剪1把、眼科镊1把、止血钳4把、手术刀1把、刀片1枚、注射器1ml、5ml、20ml个1个、大中小号针头各1颗、缝针大小各1枚、缝线、镊子1把、检卵杯（带滤膜）1个、表面皿3个。
- 2、**其他器械**：输卵管伞部回收管1根、检卵管（针）1根、解剖显微镜。
- 3、**药品试剂**：生理盐水50ml、速眠灵、青霉素80 IU、消毒药物（碘酒、75%酒精）
- 4、**激素**：PMSG (或FSH)、hCG
- 5、**其他**：手术服、保定架、保定绳4根。



三、实验原理

(一) 兔繁殖生理

1、母兔的生殖生理：家兔的初情期一般3-4月龄。家兔的发情没有明显的季节性。家兔发情周期的变化范围很大，一般8-15天，发情期约3天。母兔属诱发排卵，自发形成黄体的动物。家兔的妊娠期约30-31天(30-35天)。

2、胚胎移植是将一头良种母畜配种后的早期胚胎取出，或者由体外受精及其他方式获得的胚胎，移植到另一头同种的生理状态相同的母畜体内，使之继续发育成为新个体，所以又称之为人工受胎或借腹怀胎。提供胚胎的母畜称为供体(donor)，接受胚胎的母畜称为受体(recipient)。

四、实验步骤

(一) 供体和受体的准备：供体的超级排卵和受体的同期发情

1、选择年青、健康、经产的母兔，供、受体按1：3组群；选择性欲旺盛的公兔（按公：母=1：2）。将上述母兔分笼观察15天，确定未孕和发情正常。

2、供、受体的激素处理(PMSG法或FSH法)

时间	0d	3d(72h)	5.5-7d(132-168)
操作	肌肉注射PMSG 50IU	配种，可同时肌肉注射hCG 50IU	胚胎进入子宫

时间	第0d	第1d		第2d		第3d		第7d
	6:00pm	8:00am	6:00pm	8:00am	6:00pm	8:00am	6:00pm	9:00am
操作	肌注FSH 20 IU	肌注FSH 15 IU	配种，肌注 hCG50 IU	胚胎进 入子宫				

供受体同时进行PMSG处理，处理后72小时，供体配种（将公母兔合笼），然后用hCG处理供、受体。根据需要得到的胚胎发育阶段，在相应部位通过手术法胚胎。

(二) 手术采集胚胎

1、估计兔的重量

2、根据重量进行麻醉：用1ml注射器（最小号的针头）肌注速眠新，0.02-0.04ml/kg(速眠新溶液0.2-0.4ml/Kg)；或用20ml注射器（中号注射器）耳缘静脉注射，40%酒精生理盐水：6-8ml/kg。

麻醉时要缓慢，半量给药后，一边注射一边检查麻醉状态。手术过程中，根据兔子状态可能进行补药麻醉。

3、手术部位：根据情况可开两个口或开一个口。

(1) 两个开口：最后肋骨后一指和腰横突外2指处，开口长度3cm；

(2) 开一个口：腹后部正中部，开口长度5cm。

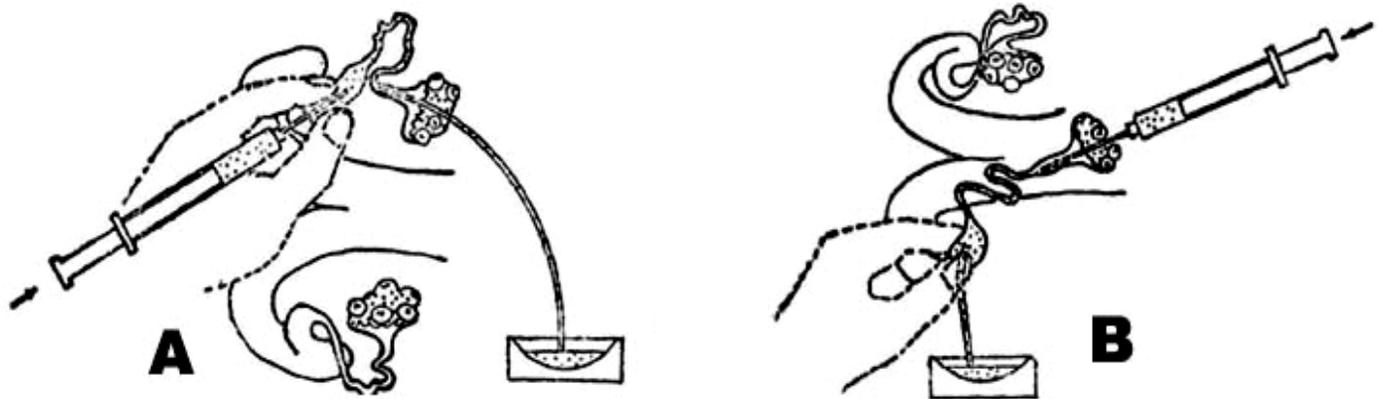
4、术部剪毛，消毒，剃毛，再次消毒。按外科手术程序打开腹腔，暴露子宫、输卵管和卵巢。数左右卵巢上的排卵点。

(三) 胚胎采集

1、从输卵管回收胚胎：

找到输卵管伞部和子宫结合部，用5ml注射器（中号针头），吸取37℃的生理盐水3.5-5ml，从宫结合部冲入，伞部回收（用吸管回收）；或从伞部冲入（用回收管插入输卵管伞部），宫管结合部回收（大号针头插针回收）。冲卵液用培养皿承接。

找伞部、宫管结合部一定要小心；插管要小心；防止回收管滑脱；冲卵过程中用力适度，尽量保持冲卵液温度（37℃）。

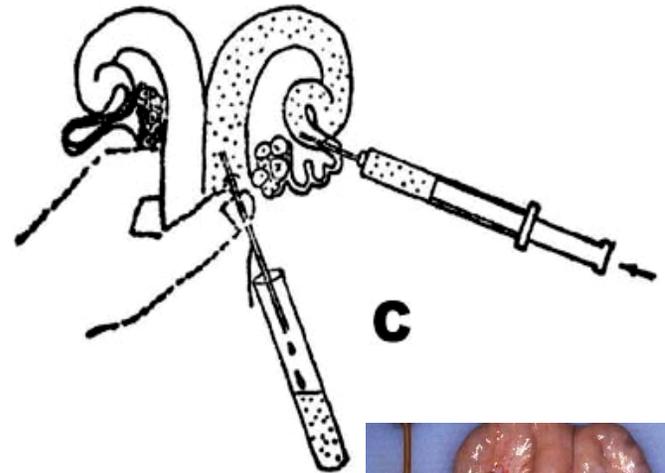


2、从子宫回收胚胎：

从子宫内回收时，先将一侧子宫颈口和宫管结合部结扎，然后在子宫体上两端分别进液和回收。进液用20ml注射器（大号针头），输液管回收。单侧子宫冲卵液的用量在10—20ml左右。

3、冲卵液用回收

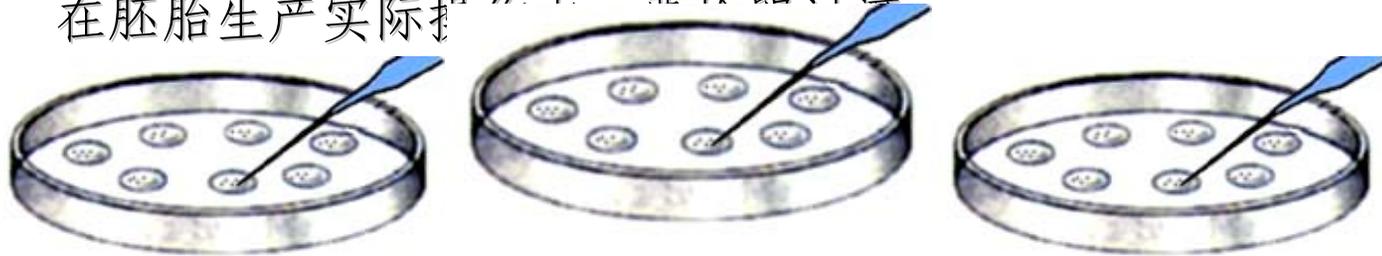
将冲卵液回收入检卵杯，滤出多余液体。然后将剩余液体转入表皿，静置沉降15min。最后在解剖显微镜下检胚。



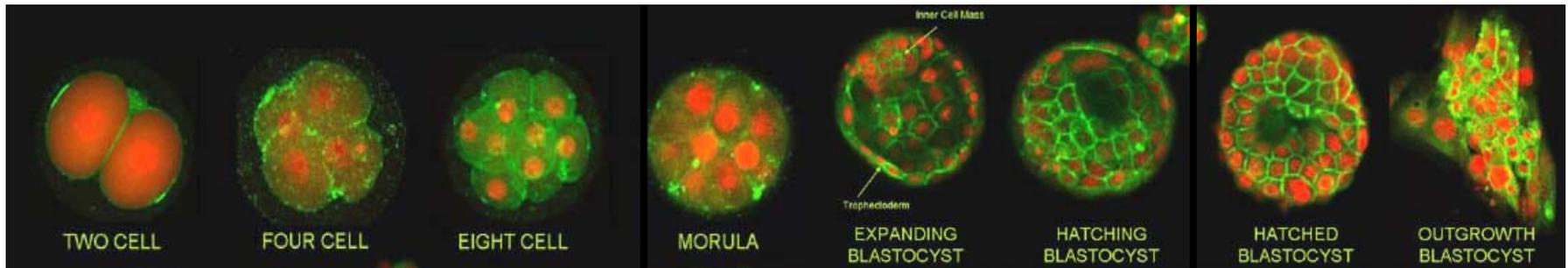
(四) 胚胎检查

将回收的胚胎在室温下（25℃）静置10min，然后在解剖显微镜下寻找胚胎（低倍下），然后放大检查胚胎发育阶段和质量。

在胚胎生产实际操作中，需进行三次过滴。



连续过滴三次



胚胎质量分级:

- (1) I级: 胚胎发育阶段与胚龄一致, 胚胎形态完整, 轮廓清晰, 呈球形, 分裂球大小均匀, 结构紧凑, 色调和透明度适中, 无游离的细胞和液泡或很少, 变性细胞比例 $<10\%$ 。
- (2) II级: 胚胎发育阶段与胚龄基本一致, 轮廓清晰, 分裂球大小基本一致, 色调和透明度及细胞密度良好, 可见到一些游离的细胞和液泡, 变性细胞占 $10\sim 30\%$ 。
- (3) III级: 胚胎发育阶段与胚龄不太一致, 轮廓不清晰, 色调变暗, 结构较松散, 游离的细胞或液泡较多, 变性细胞达 $30\sim 50\%$ (图14-4)。
- (4) 不可用胚: 有碎片的卵、细胞无组织结构, 变性细胞占胚胎大部分, 约 75% 。

(五) 胚胎移植

1、装胚：采用手术法移植时。首先同样采用外科手术的方法，暴露受体母兔的输卵管和子宫。将胚胎装入移卵针。装针方法，装好后最好在解剖显微镜下检查。

2、移植入输卵管中：找到输卵管的伞部、漏斗部，小心的插入移卵管，深度为2-3cm，用手固定移卵管后，将移卵管内胚胎推出，然后将移卵管在解剖显微镜下镜检。

防制推出胚胎时液体过多，形成胚胎随液体倒流出或从子宫结合部进入子宫。



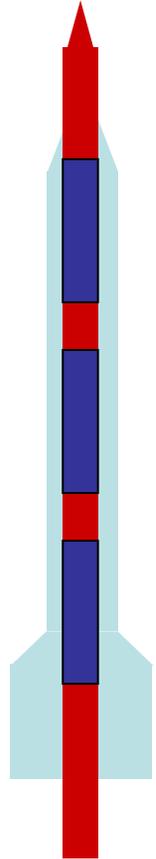
三、实验步骤

3、移植入子宫：从子宫收集的胚胎，移植回子宫。

（一般为桑椹胚及其以后发育阶段的胚胎）移植时，在子宫上三分一范围处（靠近宫管结合部的地方），用大号针头引导检查针进入宫膜后，将胚胎导入子宫膜内。最后镜检，确定移卵针内的胚胎是否移入子宫腔内。

（六）用外科手术的方法将供体的腹膜进行分层缝合（小针细线连续缝合腹膜和肌肉；大针和粗线结节缝合皮肤），并在伤口部用抗生素处理或肌肉注射青霉素。

（七）实验后受体的饲养管理：防治术部感染，加强饲养管理。



四、对实验结果进行统计分析

获得胚胎总数	左侧			右侧		
	卵巢排卵点	子宫	输卵管	卵巢排卵点	子宫	输卵管
胚胎质量	1级:	2级:	3级:	1级:	2级:	3级:
胚胎发育阶段	细胞胚:	桑葚胚:	囊胚:	细胞胚:	桑葚胚:	囊胚: