



College of Animal Science and Technology

动物科学技术学院

猪人工授精技术与操作安全

中国农业大学动物科技学院
朱士恩

- **Tel: 010-62731979**
- **Fax : 010-62731767**
- **E-mail: zhushien@cau.edu.cn**
- **日 期 : 2011-05-11**

汇报提纲

猪精液的特性及精子结构

实验室精子质量检测方法

精子指标与受精能力的关系

精液体外保存及操作安全

人工授精新方法及操作安全

猪精液的特性及精子结构



猪精液的特性



猪精子结构



猪精液的特性

射精量

200~500 ml

密度

2~3 亿/ml

颜色

乳白色或浅灰色，呈云雾状

气味

略带腥味

pH值

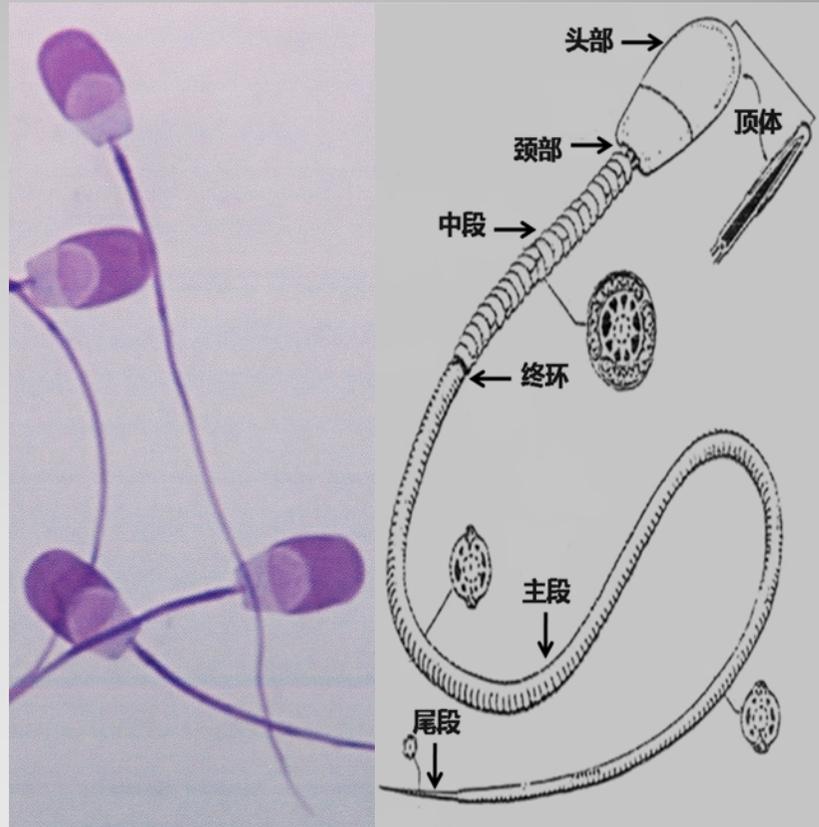
7.0~7.8

猪精子结构

头部

颈部

尾部



猪的精子分头部、颈部和尾部三个主要部分，长度为50~60 μm ，表面有质膜覆盖，是含有遗传物质并有活动能力的雄配子。

头部

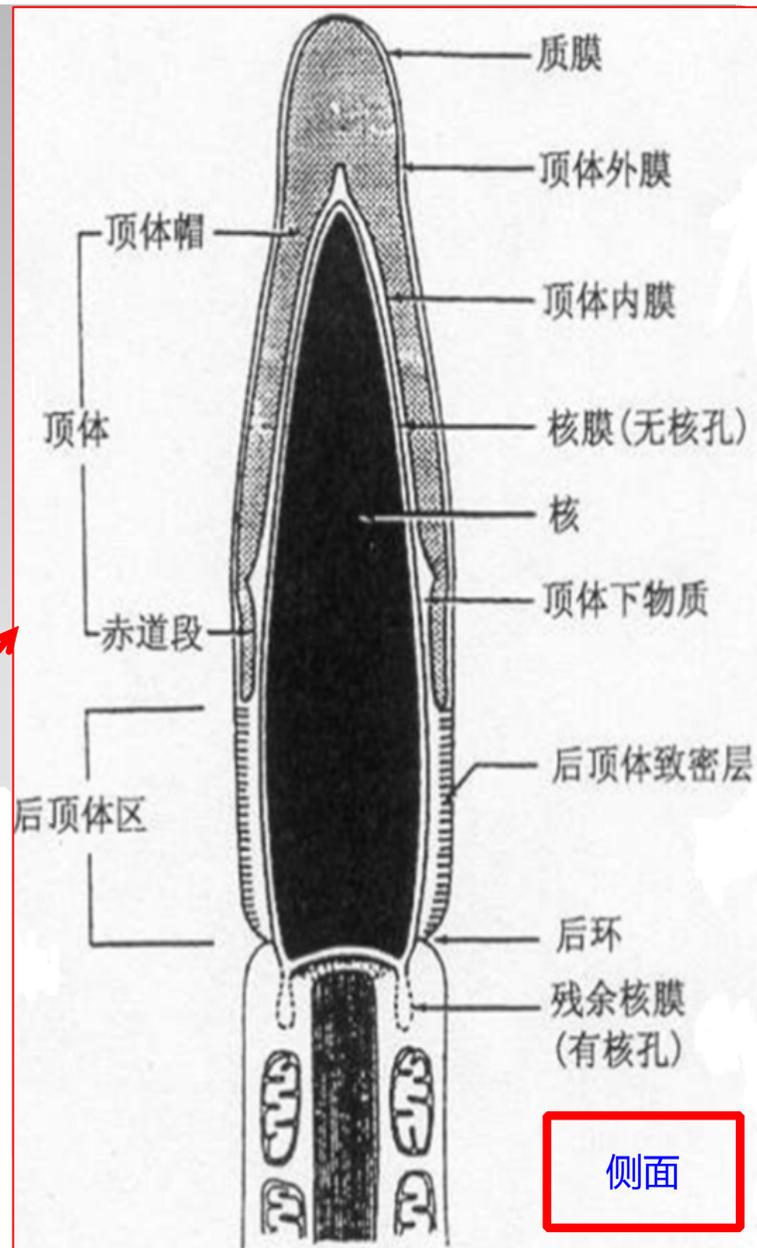
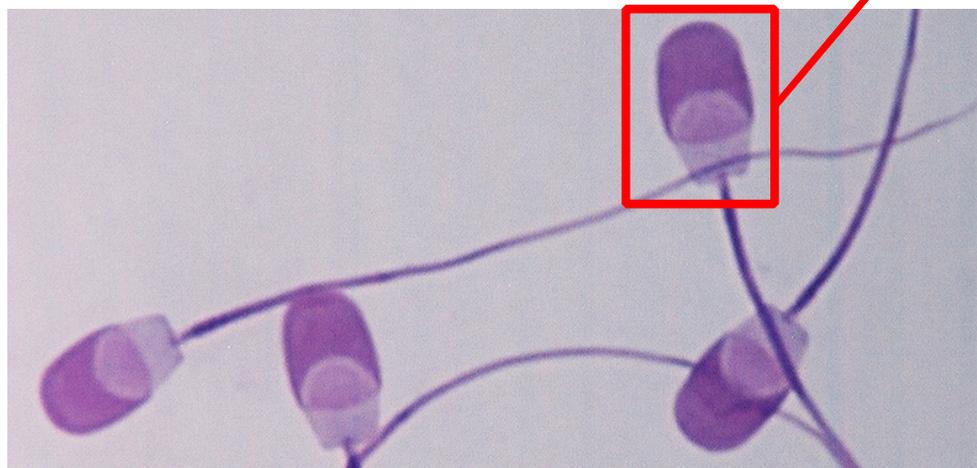
大小: 猪精子头部长**8.5 μm** ;

形状: 为扁卵圆形, 长: 宽: 厚=**8:4:1**;

质膜: 精子头部最外层的膜;

细胞核: 内含遗传物质**DNA**;

顶体: 在质膜下为帽状双层结构的顶体, 顶体内含多种与受精有关的酶。

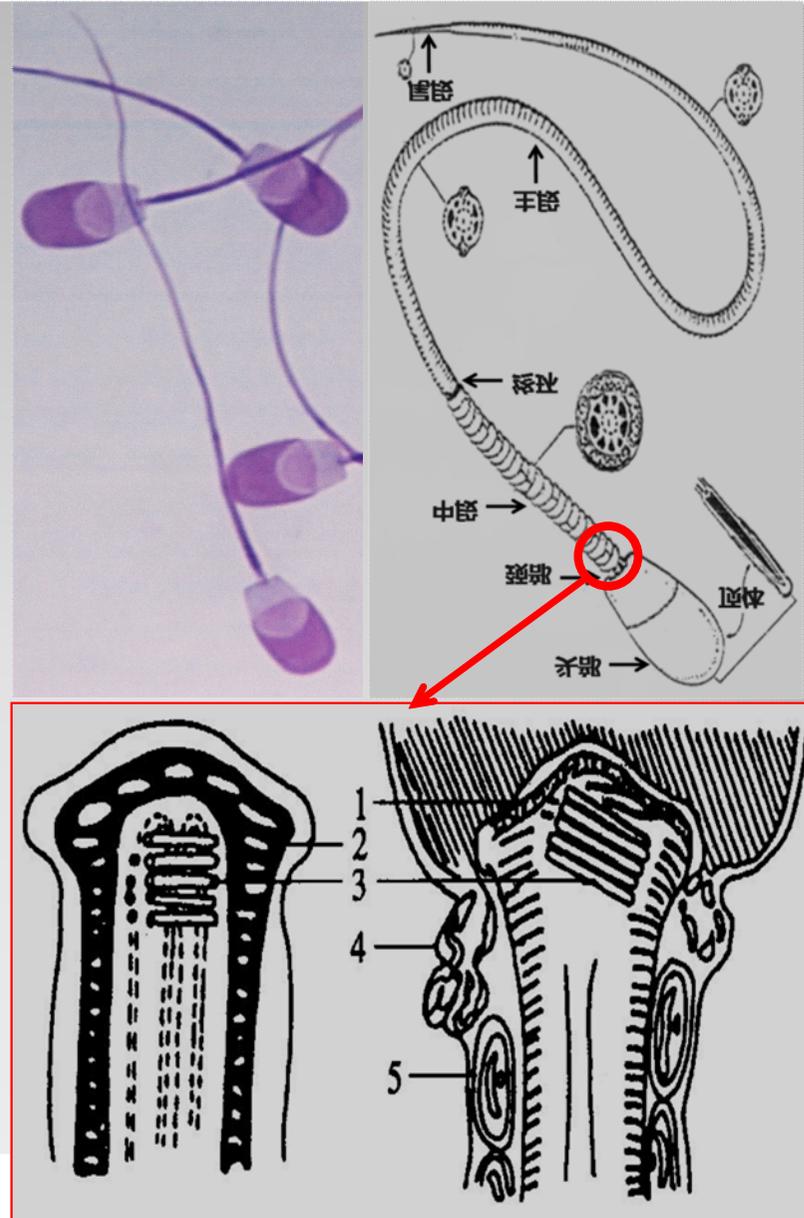


颈 部

位 置：猪精子的颈部位于头的基部，是头和尾的连接部；

作 用：精子尾部的纤丝在该部与头相连接。

- 1.小头
- 2.植入板
- 3.中心粒
- 4.核膜瘤
- 5.中段起始部

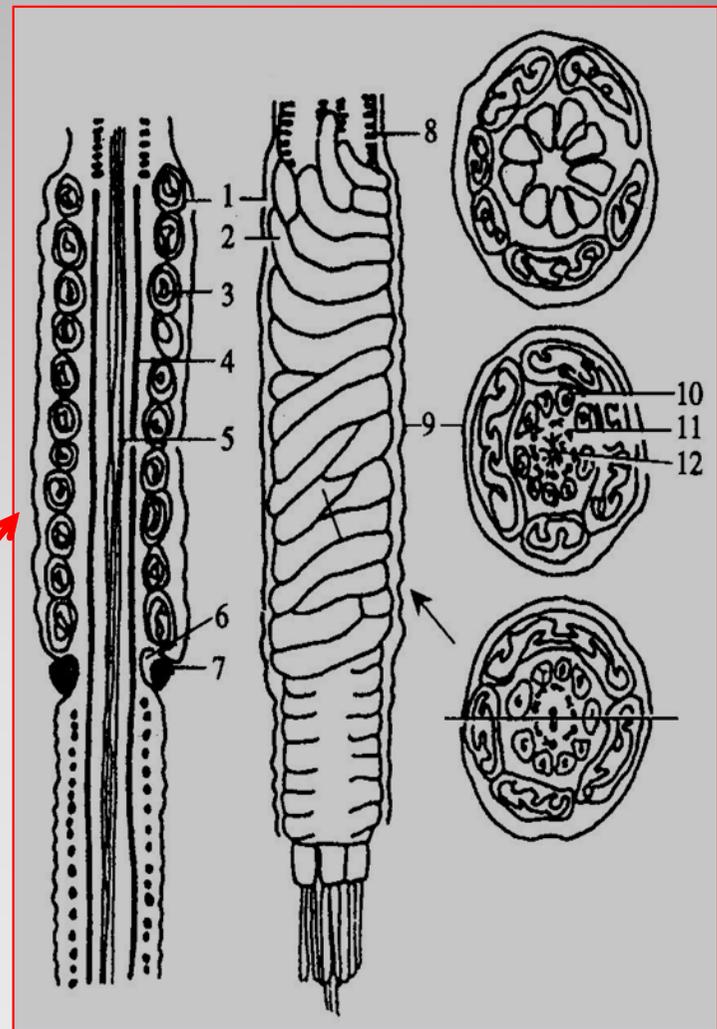
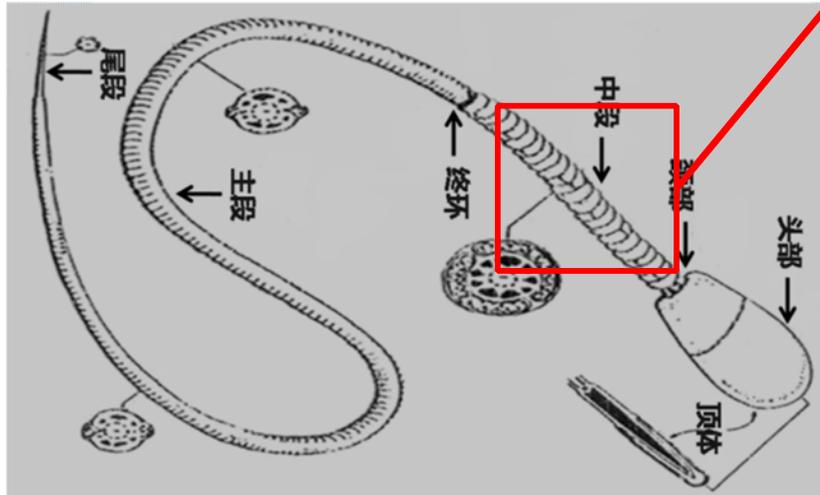


尾部

作用：为精子最长的部分，是精子代谢和运动器官；

组成：根据其结构的不同又分为中段（约 $10\mu\text{m}$ ）、主段（约 $30\mu\text{m}$ ）和末段（约 $2\sim 5\mu\text{m}$ ）；

中段：由颈部延伸而来，内有**线粒体**，是精子分解营养物质，产生能量的主要部分。



- | | | |
|---------|---------|-----------|
| 1.质膜 | 2.线粒螺旋体 | 3.线粒螺旋体横切 |
| 4.外周纤丝 | 5.中心纤丝 | 6.终环后窝 |
| 7.终环 | 8.植入板 | 9.质膜 |
| 10.外圈纤丝 | 11.内圈纤丝 | 12.中心纤丝 |

畸形精子和分类

头部畸形

种类：窄头、头基部狭窄、梨形头、圆头、巨头、小头、头基部过宽和发育不全等。

形成位置：精子在睾丸内精子发生过程中受不良环境影响引起的。

中段畸形

种类：包括中段肿胀，纤丝裸露和中段呈螺旋状扭曲等。

形成位置：中段畸形多数是在睾丸或附睾发生。

尾部畸形

种类：尾部各种形式的卷曲、头尾分离、双尾、带有原生质滴的不成熟精子。

形成位置：精子通过附睾、尿生殖道和体外处理过程中出现的。

A. 正常精子的头形

• 1—3

B. 异常精子的头形

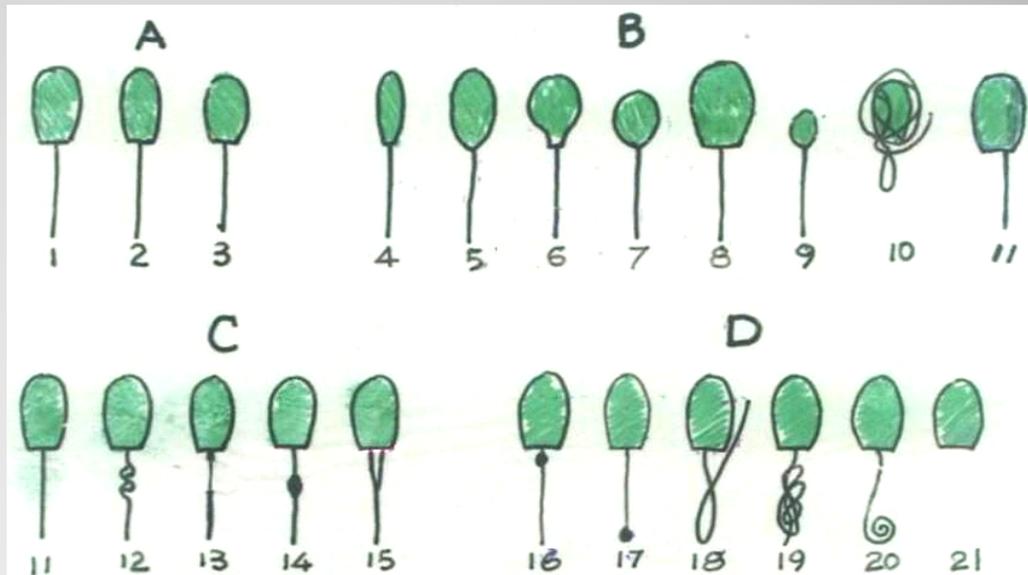
• 4. 窄头 5. 头基部狭窄 6. 梨形头 7. 圆形头
• 8. 巨头 9. 小头 10. 发育不全 11. 偏轴

C. 中段的形态

• 11. 正常的中段 12. 螺旋状中段 13. 中段鞘膜脱落
• 14. 假原生质滴 15. 双中段

D. 尾部的形态

• 16. 近端原生质滴 17. 远端原生质滴 18. 单卷尾
• 19. 尾多重卷曲 20. 环形卷曲 21. 无尾的头



精液检测

- ◆ 宏观指标：颜色、气味、pH、体积、密度、活力、活率等；
- ◆ 微观指标：质膜完整性、线粒体、顶体和获能状态等。

精子质量检测方法

1 颜色、气味、pH、采精量检测

2 精子运动能力检测

3 精子密度检测

4 精子畸形率检测

5 精子质膜完整性检测

6 线粒体功能检测

7 获能和顶体检测

8 染色质完整性检测

9 透明带结合检测

10 体外受精检测

颜色、气味、pH、采精量检测

颜色

正常

乳白色或浅灰色
呈云雾状

异常

绿色、黄色
浅红色、红褐色

气味

正常

略带腥味

异常

恶臭等异常气味

pH 值

正常精液pH值
为 7.0~7.8

pH值越低
精子密度越大

采精量

电子天平称量法
按1g = 1 ml计

射精量
为200~500 ml



精子运动能力检测

(一)

目测估测法
检测活率

(二)

计算机辅助分析
(CASA)检测

显微镜检测



目测估测法检测活率

目测估测法

按0.1~1.0的十级评分法进行评估



玻片升温至37℃

取精液10μl制片

于37℃恒温台上

相差显微镜下

400倍观察精子

活率要求

鲜精活率 > 0.7才可进行稀释配制

保存精液活率 > 0.6才可以使用

计算机辅助 (CASA) 检测精子运动能力

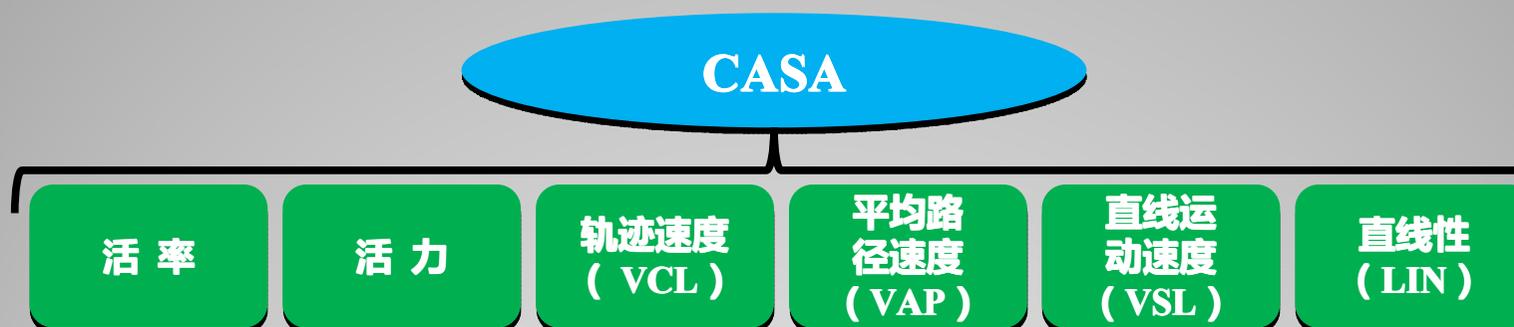


Table 2 解冻后质膜完整率和活力参数(from Eriksson,2002)

Breed	Boars (n)	Ejaculates (n)	PMI (%) ¹	Motile (%) ²	Linearly motile (%)	VSL (μ m/s) ³	VAP (μ m/s) ⁴	VCL (μ m/s) ⁵	LHD (μ m/s) ⁶
L	18	66	60±8.3	53±4.5	60±11.8	84± 11.2	96 ± 12.7	136 ± 17.1	3.1± 0.52
Y	20	66	60±8.4	52±6.0	66±12.7	85± 11.5	95± 12.5	131 ± 17.2	2.9 ± 0.63
H	9	23	60±5.4	49±4.6	69±12.9	84 ± 10.4	94 ± 10.5	123 ± 19.0	2.5± 0.71

H, 汉普夏;L, 长白猪;Y, 约克夏.

¹精子质膜完整率; ² 眼观评估; ³直线运动速度; ⁴平均路径速度; ⁵轨迹速度; ⁶精子侧摆幅度



计算机辅助分析仪

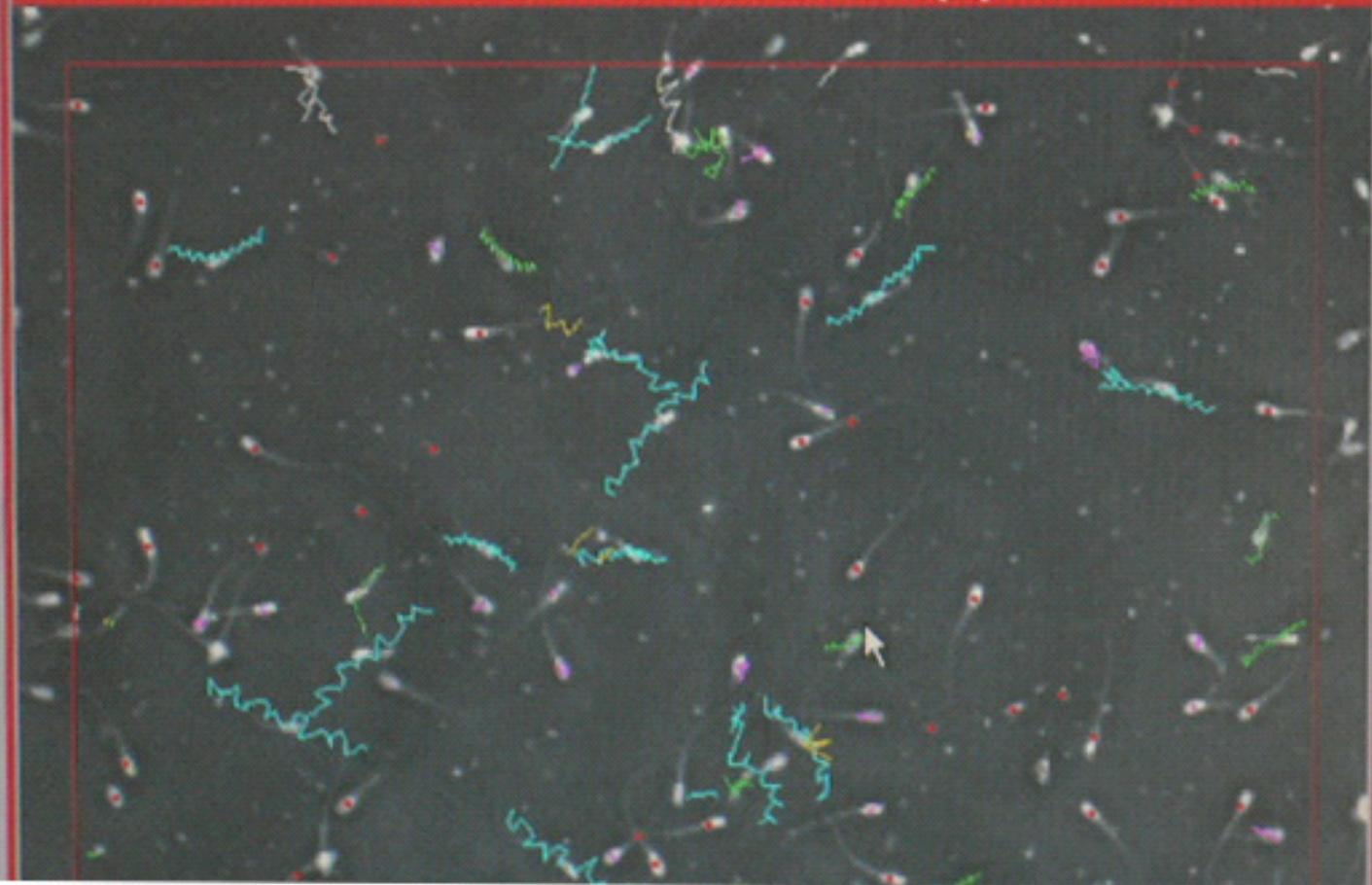
1200001 (No. hs)

11/04/2008 11:58:45

ADMIN

Print

FILE: C:\IMAGE\BULLV61200001.01C [16]



- Progressive
- Motile
- Slow
- Static
- Border
- Late Entry
- Late Track

- Results
1
- Play Back
16
- QC Plots
1
- Bar Charts
1
- Custom Reports
1

COUNT SUMMARY

Category	Cells Counted	Sample (M)	Concentration (M/ml)	Percent
Total	98	27.67	131.78	100
Motile	29	8.19	39.00	30
Progressive	15	4.24	20.17	15

ANIMAL RESULTS

Parameter	Value	Units
Total Sperm/Dose	29.44	M
Dilute Ejaculate to	0.22	ml
Total Doses	0	
Progressive Sperm/Dose	11.73	M
Dilute Ejaculate to	0.08	ml
Progressive Doses	0	

精子密度检测

估测法

主观性强，误差大

<一个精子为“密”

=一个精子为“中”

>一个精子为“稀”

精子密度仪法和CASA法

方便、时间短、重复性好

原精液200 μ L

3%NaCl稀释10倍

计数板上放盖玻片

滴上1滴稀释精液

计数5个中方格精子

将该数乘以50万

血细胞计数法

最准确，但速度慢

猪精子密度一般为2~3亿/ml
生产上主要以精子密度仪法检测

精子畸形率检测



畸形率检查方法



相差显微镜直接观察

伊红或姬姆萨等染色后普通显微镜观察



染色后显微镜观查



取中层精液抹片

固定液固定20min

Giemsa染色90min

水洗并风干

置1000倍油镜下

观察精子 > 300个



畸形率要求



要求：**一般要求不超过18%为宜**

影响：畸形率过高会减少精液的受精能力

改善：增加精液的用量可以提高其受精效果

精子质膜完整性检测

1

精子质膜作用及分布

2

精子质膜染料分类

3

精子不同区域质膜的检测

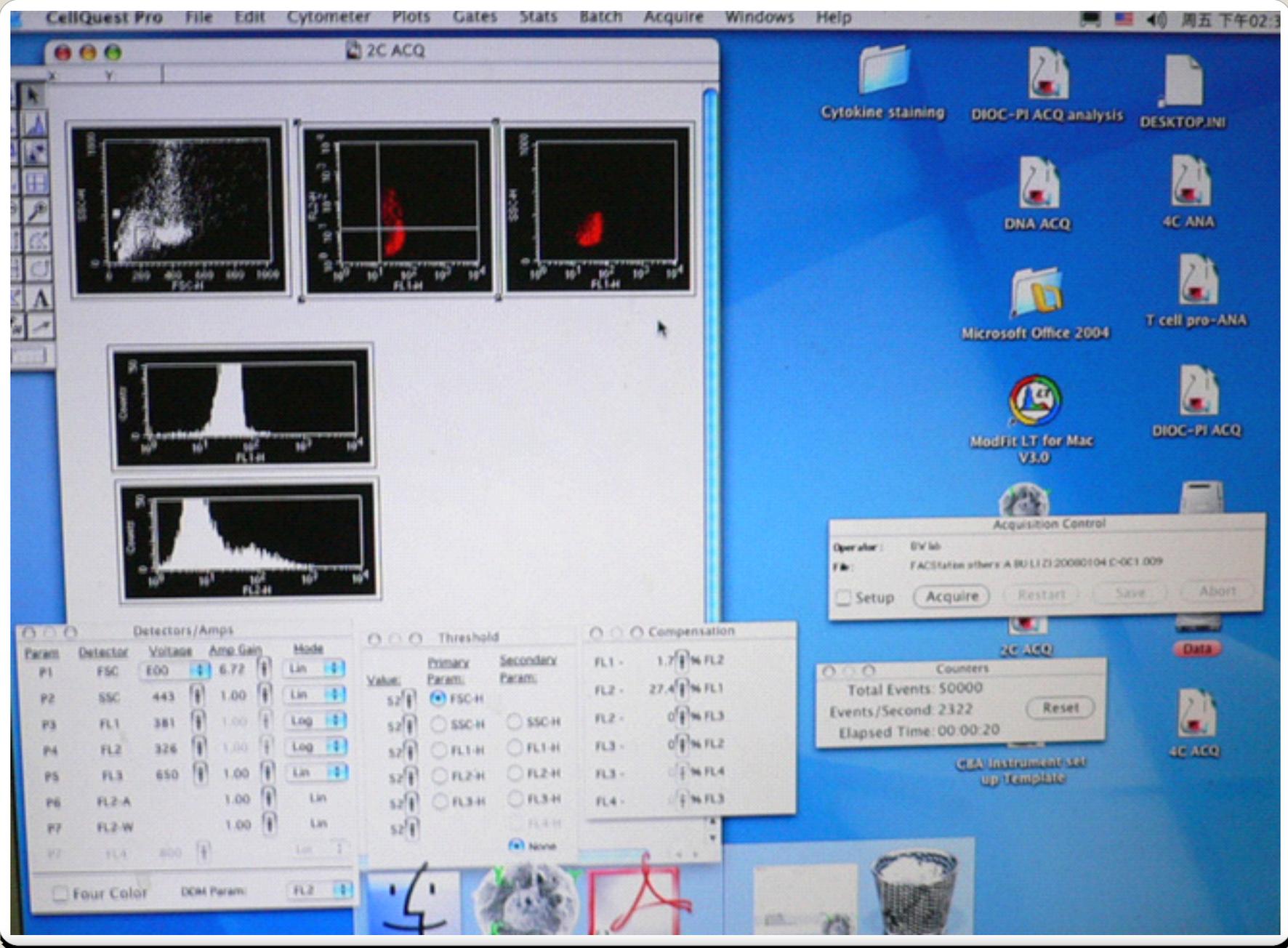
4

精子质膜的主要检测方法



流式细胞仪





精子质膜作用及分布

精子质膜

分布

覆盖于顶体外膜区上的质膜

覆盖于精子头部非顶体区的质膜

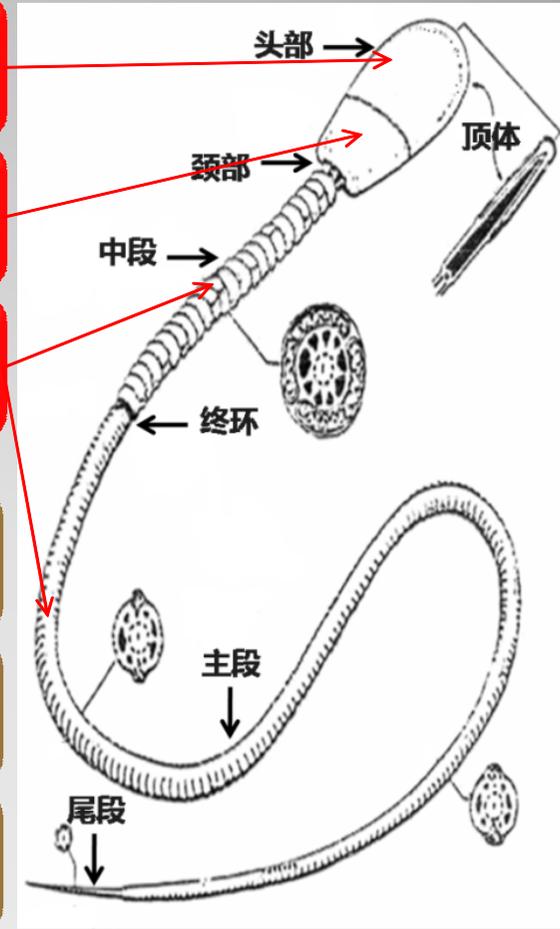
覆盖于尾部的中段和主段部分的质膜

作用

维持完整的细胞内环境

受精过程中起到信号识别与传导作用

转运物质功能



精子质膜染料分类

非荧光染料

荧光染料

伊红—苯胺黑染色

伊红—苯胺蓝染色

苔盼兰—吉姆萨染色

死精子特异性荧光染料

活精子特异性荧光染料

● 碘化丙锭 (PI)

● Hoechst33258

● 溴化乙锭 (EB)

● SYBR-14

● 烟酸己可碱33342

● 羧基荧光素双醋酸盐 (CFDA)

染色原理：此种染料不能进入质膜完整功能的精子内部，只能进入质膜受损的精子，并与DNA结合发出荧光。

染色原理：活精子特异的荧光染料是膜通透性的染料，只能进入细胞膜完整的精子。

精子不同区域质膜的检测

覆盖于顶体外膜区上的质膜

通常与顶体外膜完整性的检测联合起来进行

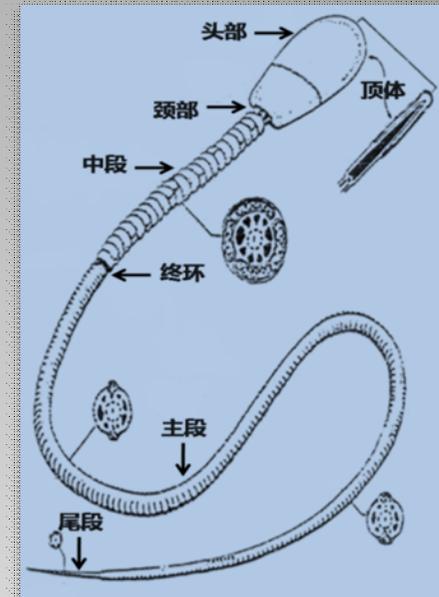
覆盖于精子头部非顶体区的质膜

荧光染料，如碘化丙锭（PI）、溴化乙锭（EB）、DAPI、Hoechst 33258等

非荧光染料，如伊红—苯胺黑、伊红—苯胺蓝等

覆盖于尾部的质膜

精子的低渗肿胀实验（HOST）检测



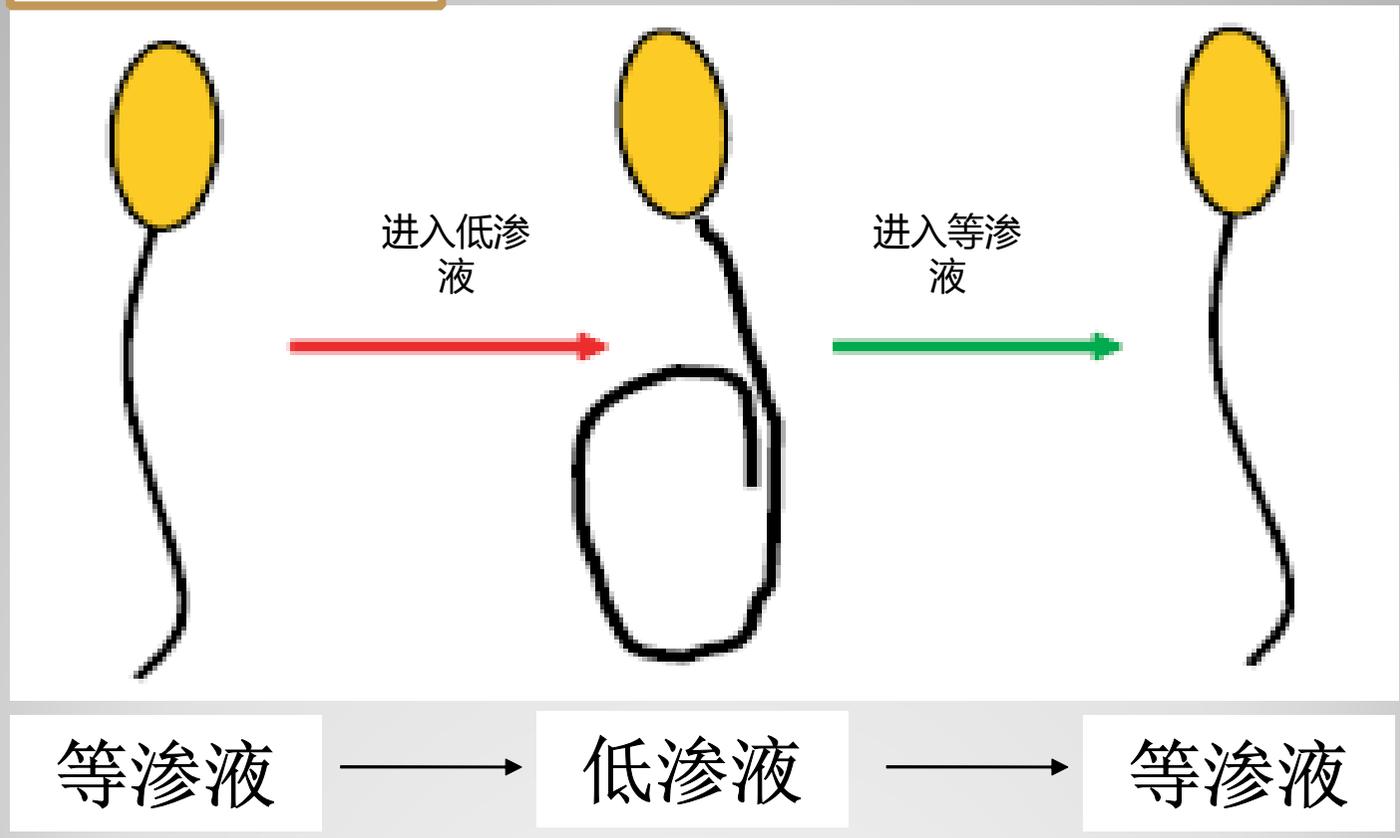
原理：

低渗溶液中，有生物活性的精子质膜会使水分子进入质膜中，水的内流使精子尾部的质膜膨胀并且尾部会发生弯曲。

若精子质膜损伤或失去生物活性，水能够自由通过质膜，在胞质内不会积聚液体，从而不会出现肿胀和尾部弯曲。

精子低渗肿胀检测 (HOST)

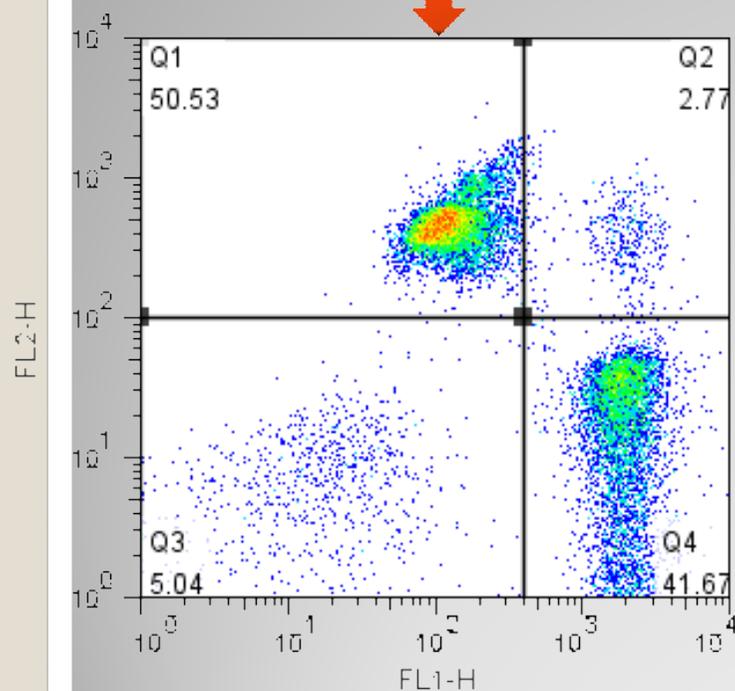
膜完整精子的变化



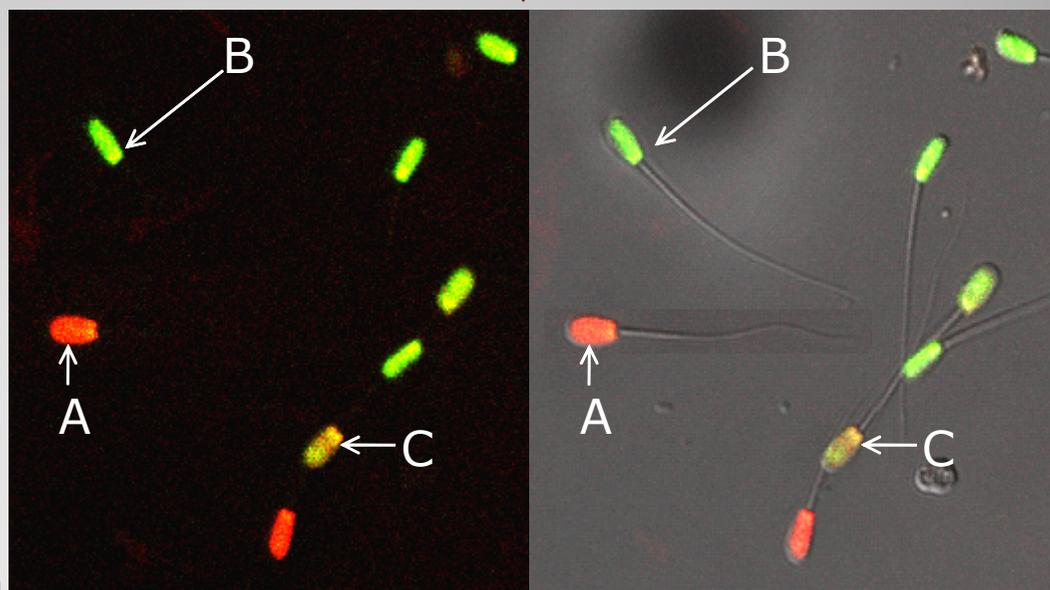
精子质膜检测新方法

SYBR-14和PI的联合染色

流式细胞仪检测



显微镜进行检测



- Q1: PI染色的死精子; ← A: PI染色的死精子, 为红色;
- Q4: SYBR-14染色活精子; ← B: SYBR-14染色活精子, 为绿色, 膜功能完整;
- Q2: SYBR-14/PI染色, 正在死亡的精子; ← C: SYBR-14 / PI染色, 正在死亡的精子。
- Q3: 杂质颗粒, 无颜色。

线粒体功能检测

1

检测线粒体的染料分类

2

精子线粒体检测方法



检测线粒体的染料分类

染料名称

R123

(Rhodamine123)

MITO

(MitoTracker Green FM)

JC-1

(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-
tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide)

染色特性

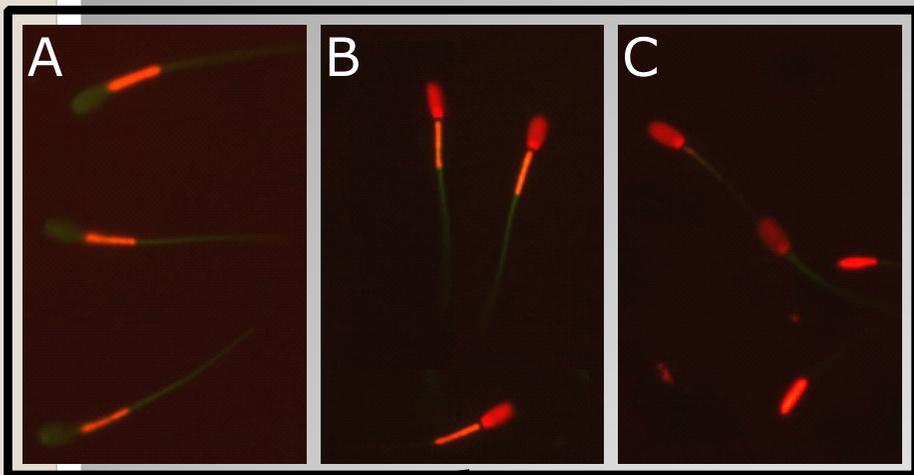
1. 渗透并沉积在正常线粒体上，**发绿色荧光**；
2. 若线粒体损坏则不发荧光。

1. 当积聚在线粒体内时会**发绿色荧光**。

1. 线粒体膜电位低时，**发绿色荧光**；
2. 膜电位高时发**橙色荧光**。

精子线粒体检测新方法

PI与JC-1联合染色



流式细胞仪检测:

D: 多边形内的精子, 为高能线粒体精子
多边形外的精子, 为低能线粒体;

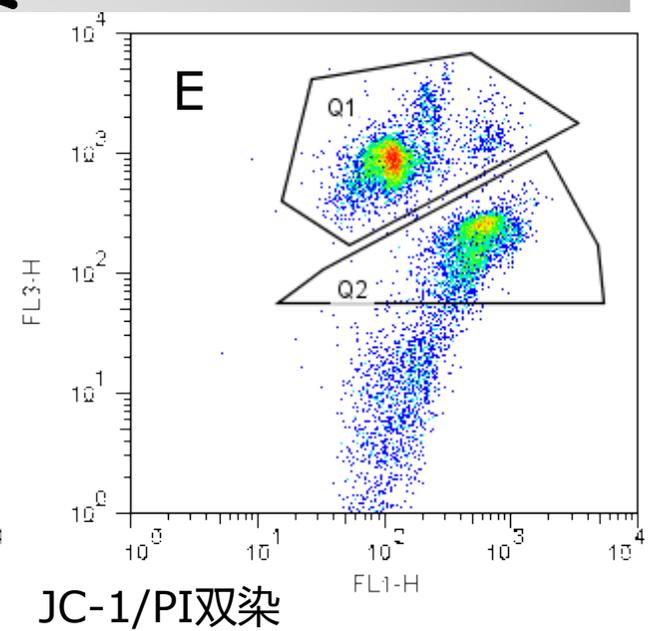
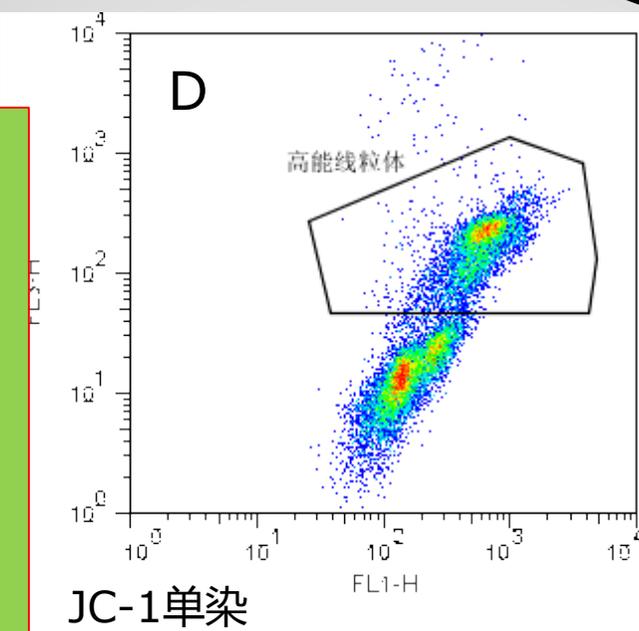
E-Q1: 死精子;
E-Q2: 活精子高能线粒体;
Q1Q2以外: 为活精子低能线粒体;

荧光显微镜检测:

A: 活精子高能线粒体
头无色或微绿, 尾橙色;

B: 死精子高能线粒体
头红色, 尾橙色;

C: 死精子低能线粒体
头红色, 尾微绿或无色。



获能和顶体检测

一 获能检测

精子膜的获能状态改变很容易引起顶体反应的提前发生，以及精子受精能力的丧失

二 顶体检测

1. 顶体反应是精子成功穿入卵母细胞所必需的过程。
2. 顶体内富含多种蛋白水解酶（顶体酶），在精子穿过卵子放射冠、透明带等受精过程中发挥主要作用。



获能检测

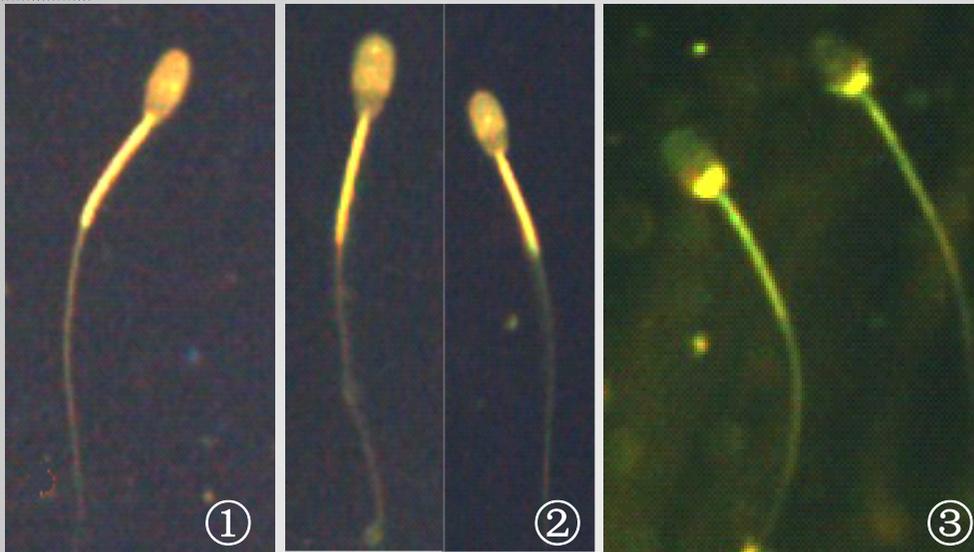
采用金
霉素
(CTC)

CTC 进入精子可以结合游离的钙离子，形成CTC-Ca²⁺ 复合物，在荧光显微镜下激发出黄绿色荧光

① **F型**，整个精子头部有均一荧光，为未获能，顶体完整的精子；

② **B型**，精子头前部为均一荧光，在靠近颈部部分无荧光或非常弱，为顶体完整且获能的精子；

③ **AR型**，整个精子头部无荧光，为顶体不完整的精子，即发生了顶体反应的精子。



顶体检测



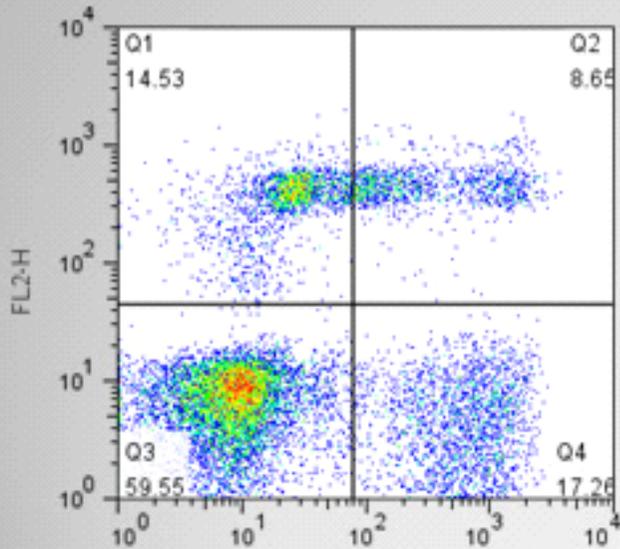
现在用的最多的是异硫氰酸荧光素（FITC）与花生凝集素（PNA）结合使用效果好。



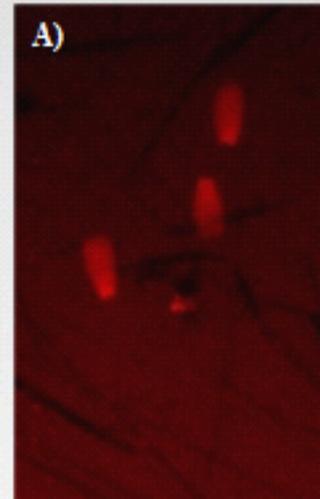
精子顶体主要是应用PI 和FITC-PNA 联合标记，用荧光显微镜或流式细胞仪进行检测。

●流式细胞仪检测精子的活力和顶体状态

●荧光显微镜下观察精子的活力和顶体状态



Q1: PI 标记为未发生顶体反应死精子;
Q2: PI/FITC-PNA 标记的顶体反应死精子;
Q3: 无颜色, 未发生顶体反应活精子;
Q4: FITC-PNA标记发生顶体反应活精子。



A)PI标记死精子的细胞核呈现红色荧光;
B)发生顶体反应或顶体膜破损的精子被FITC-PNA 标记, 呈现绿色顶体。

体外受精检测

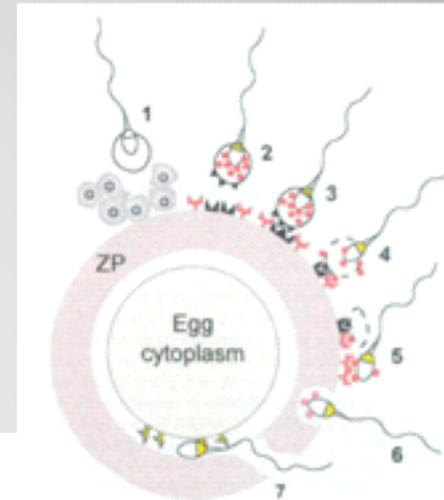
卵母细胞体外受精(IVF)技术已经很成熟，可以利用IVF技术来检测精子的受精能力。

优点

- ◆ 更能够接近体内的受精过程
- ◆ 更好的检测精子的真实质量

缺点

- ◆ 部分动物体外受精技术并不成熟
- ◆ 费时费力
- ◆ 实验条件复杂
- ◆ 成本过高



膜的完整性与受精能力之间具有**显著但可变**的相关性

$r = 0.05$ (Alm et al.,2001) ; $r = 0.39\sim 0.57$ (Januskauskas , 2001)

活力与受精能力之间具有**可变**的相关性。

$r = 0.15\sim 0.83$

(Kjaestad et al.,1993;
Januskauskas et al.,2003)

顶体与受精能力之间具有**显著但可变**的相关性

$r = 0.60\sim 0.84$

(Withfield and Parkinson
1995; Januskauskas et
al.,2000)

体外受精 (IVF) 与受精能力之间具有**显著**的相关性 $r = 0.35\sim 0.59$

(Zhang et al., 1997; Schneider et al.,1999)

精子与透明带的结合能力与受精能力之间具有**显著**的相关性

$r = 0.50$

(Zhang et al.,1998)

实验室评估精子质量与受精能力的关系

猪精液的保存处理

注意事项

精液稀释

精液保存

冷冻解冻

精液运输

精液稀释注意事项

- 器具须消毒，使用前，用少量稀释液冲洗一遍
- 品质检查不合格(活率 < 0.7)的精液不能稀释
- 精液采集后尽快稀释，原精贮存时间不宜超过30min
- 稀释时严禁太阳光直射精液,应于较暗处操作
- 精液要求等温稀释,以精液为标
- 稀释液沿杯壁加入到精液中,沿
- 高倍稀释时先进行低倍稀释,以
- 稀释倍数: 根据精液的品质,输精量
- **以每个输精剂量40亿/80 ~100ml来确定稀释倍数**
- 稀释后要求静置片刻再作精子活率检查

采精量200 ml, 活率0.8, 密度2亿/ ml,
每个输精剂量含40亿/100 ml。
总精子数=200 ml × 2亿/ ml =400亿
稀释份数=400亿 × 0.8/40亿=8份
需稀释液=8 × 100 ml -200 ml =600 ml



精液保存注意事项

保存温度

常温（17℃等）

低温（4℃等）

冷冻（-196℃）

生产上：常温17℃

精液需缓慢降温，室温1~2h或纱布包裹

每12h将精液摇匀1次，要轻缓均匀

注意冰箱内温度的变化防止温度升高或降低

减少保存箱开关次数，以减少对精子的影响

使用前检查活率，**活率 < 0.6精液应弃之**

用稀释液保存的精液，应尽快用完

保存要求



精液的冷冻及解冻方法

(Westendorf et al. 设计, Bwanga et al 改进)

稀释流程

精液采集并进行质检

用BTS稀释, 降温 (15°C, 3 h)

离心 (800×g, 10 min), 弃除上清

用LEY稀释, 降温 (5°C, 2 h)

5°C条件下, 用含甘油的LEY稀释

分装于5ml扁平袋 (细管) 或0.5 ml细管

冷冻流程

置于冷冻支架并移入程序冷冻仪 (5°C)

3 °C/min, 5 °C → -5°C, 保持 1 min 结晶

50 °C/min, -5°C → -140°C, 液氮储存

解冻流程

5ml扁平袋: 50 °C, 13 s

5ml 细管: 50 °C, 40 s

0.5ml 细管: 50 °C, 12 s 或 37 °C, 20s

精液运输应注意的事项

精液运输关键

保温、防震、避光

运输注意事项

运输前应检查活率，低于0.7的精液严禁调出

包装瓶（袋）应排尽空气，以减少运输震荡

运输过程中，放入保温箱中保温（16~18℃）

运输过程中，应严格避光

到达目的地，检查精子活率，合格方可接收



人工授精方法



子宫颈输精法

intra-cervical insemination, intra-CAI



子宫内输精法

cervical insemination, post-CAI

post-



子宫角输精法

deep uterine insemination, DUI

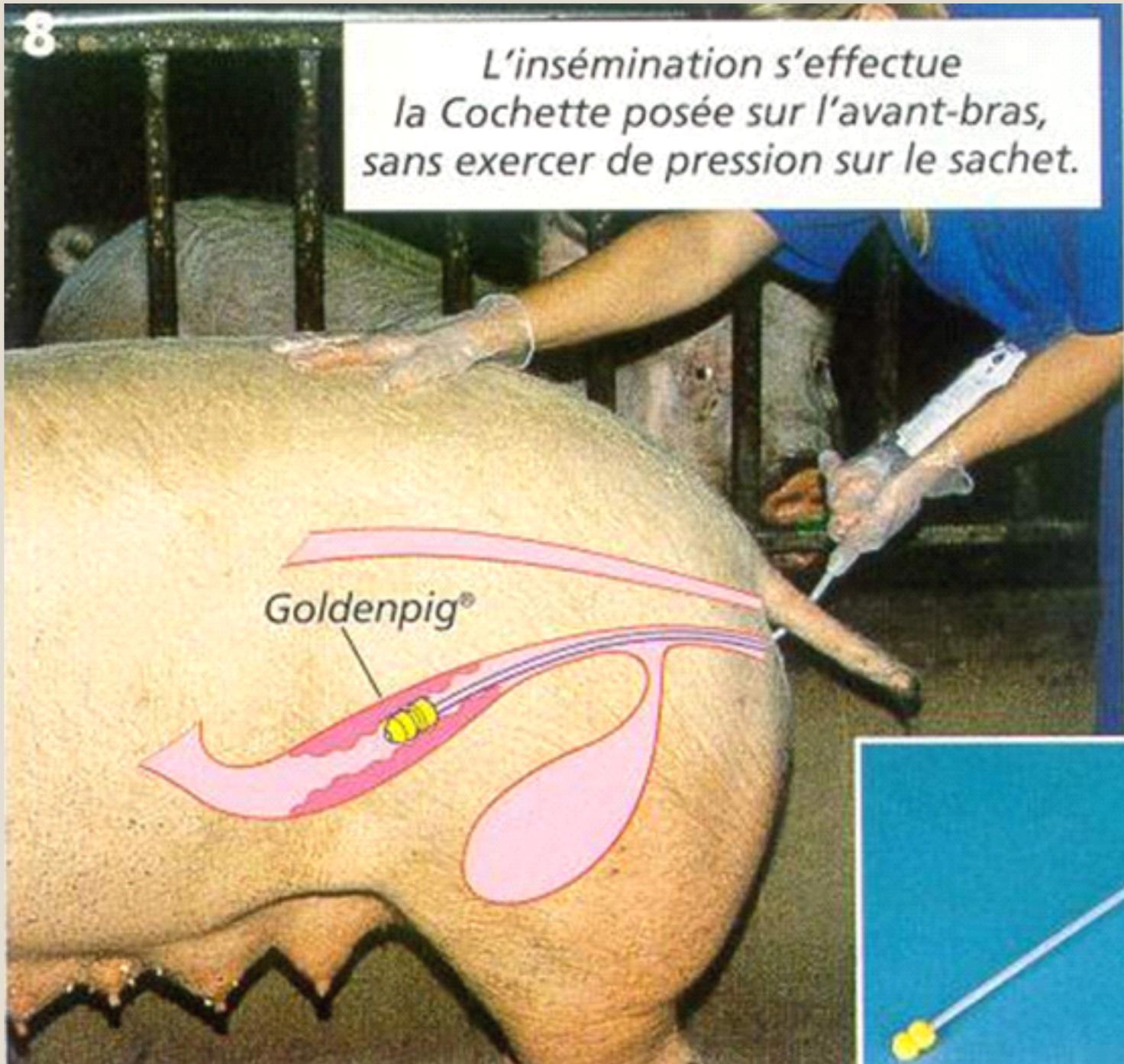


传统人工授精技术(intra-CAI)

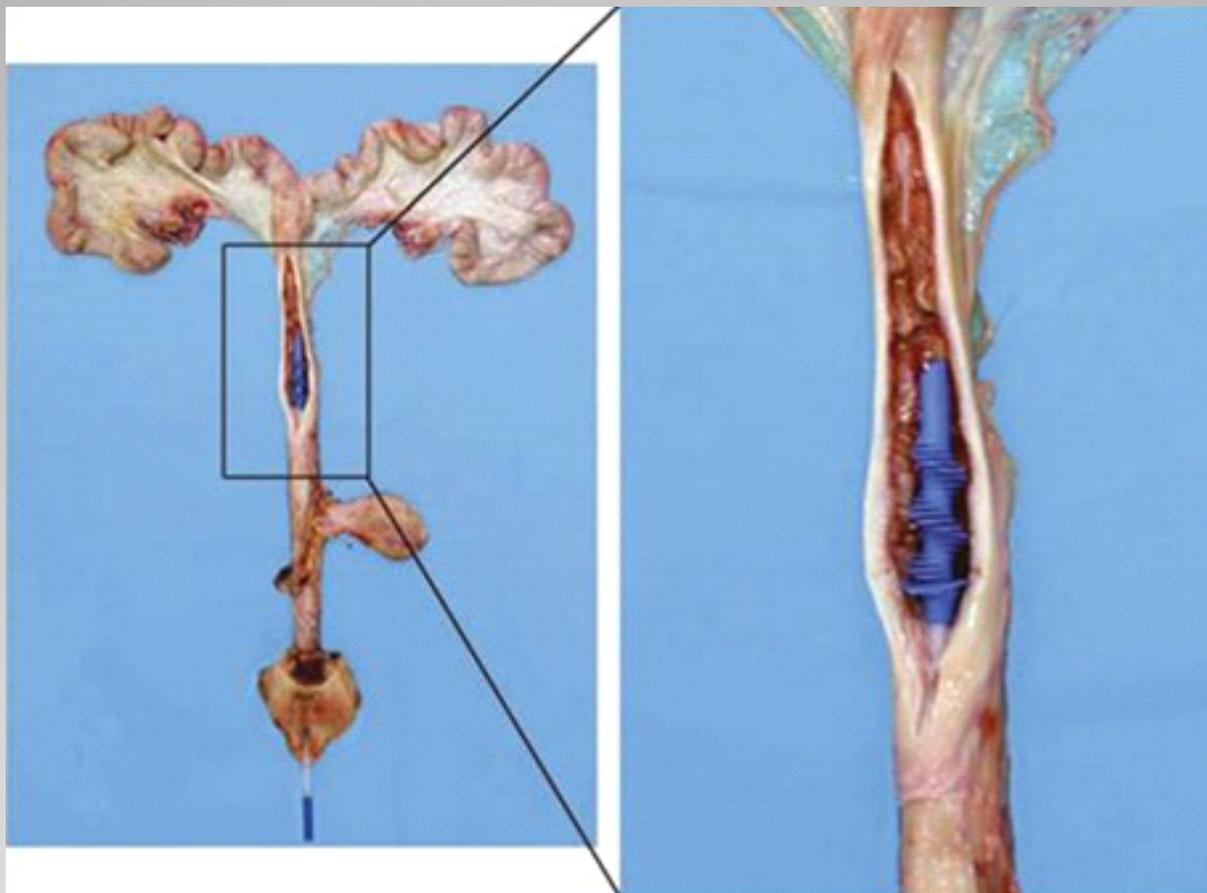


8

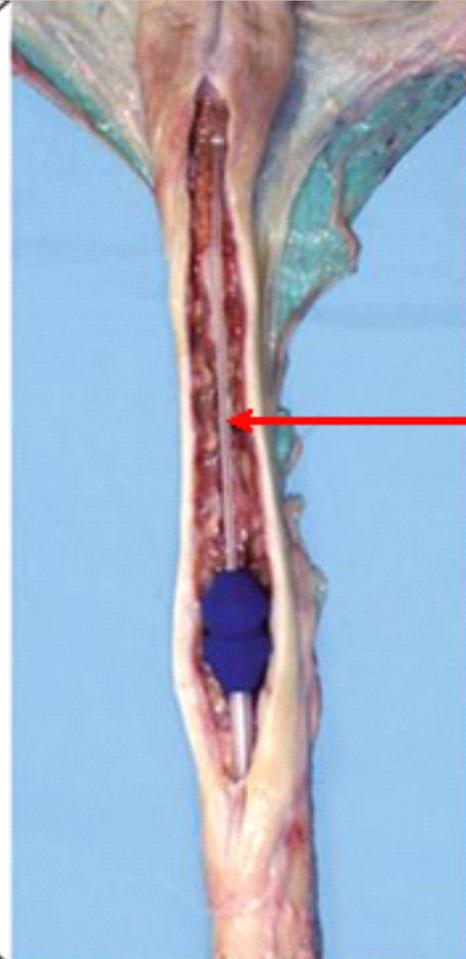
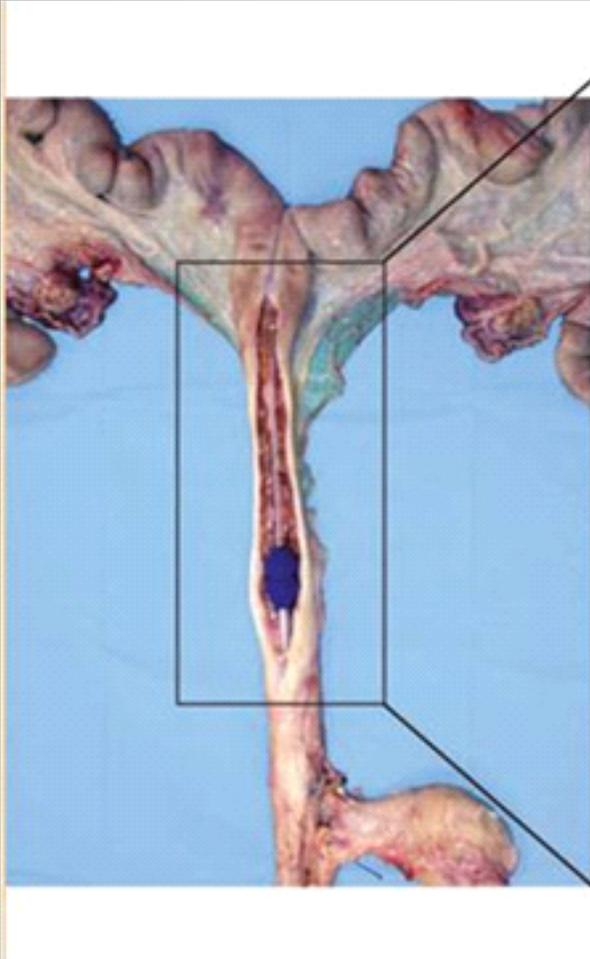
*L'insémination s'effectue
la Cochette posée sur l'avant-bras,
sans exercer de pression sur le sachet.*



子宫颈输精法(intra-CAI)

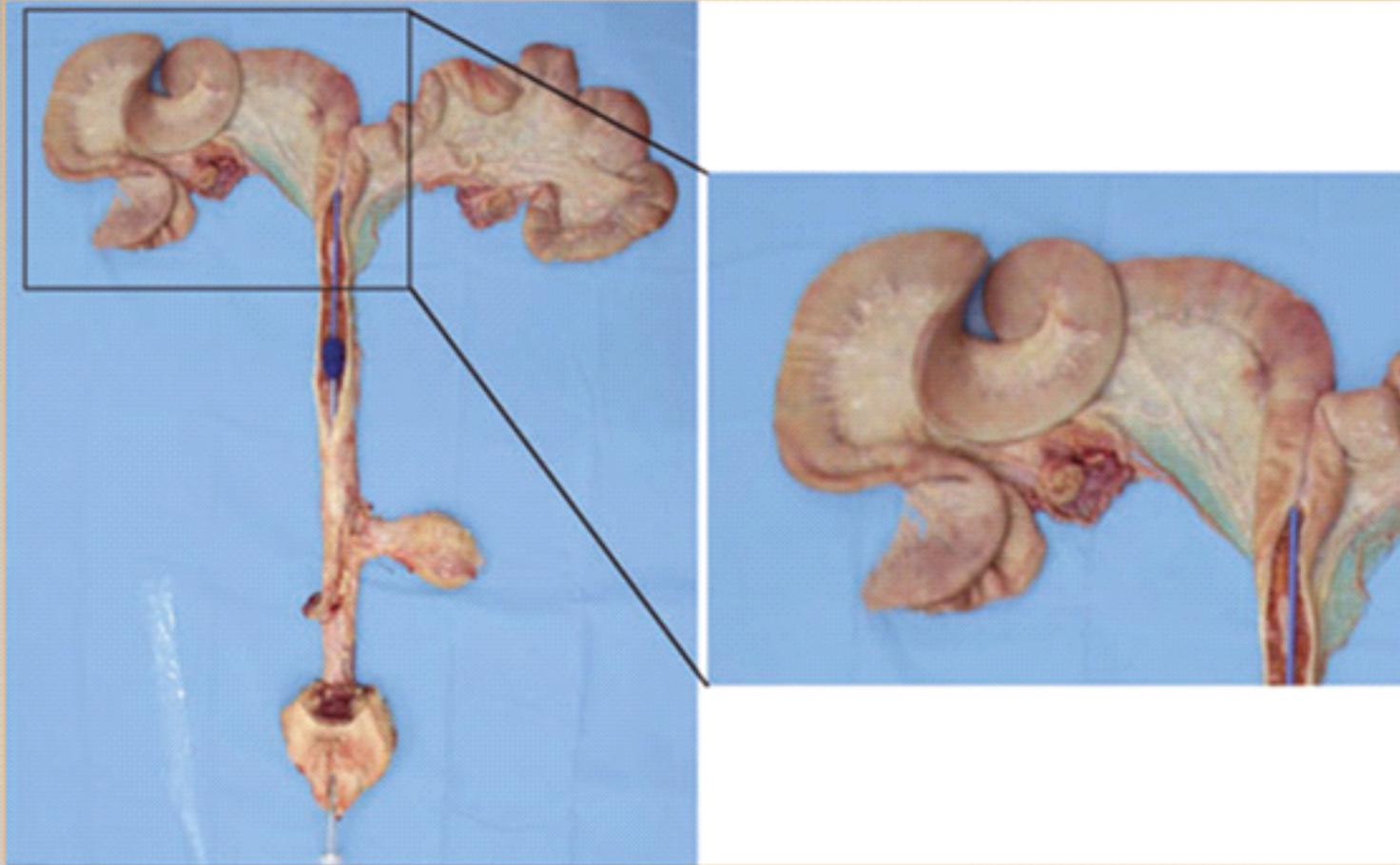


子宫内输精法(post-CAI)



软管

子宫角输精法(DUI)



子宫内与子宫颈输精的生产数据比较

冷藏精子

作者	输精方法	输精数量	分娩率 (%)	产仔数 (头/窝)	备注
Watson and Behan (2002)	子宫颈输精	3000×10^6	91.3	12.5	差异不显著
	子宫内输精	1000×10^6	88.7	12.1	
Hungary and Croatia	子宫颈输精	3000×10^6	88.1	12.3	产仔数差异显著
	子宫内输精	1000×10^6 (10亿)	87.8	10.2	

子宫角与子宫颈输精的生产数据比较

液态精子

作者	输精方法	输精数量	分娩率 (%)	产仔数 (头/窝)	备注
Va' zquez et al. (2001)	子宫颈输精	3000×10^6	87.3	10.4	差异不显著
	子宫角输精	150×10^6	83.3	9.2	
Day et al. (2003)	子宫颈输精	3000×10^6	90.0	12.9	差异不显著
	子宫角输精	150×10^6 (1.5亿)	83.0	10.5	

子宫角与子宫颈输精的生产数据比较

**Table 1. 对断奶发情母猪 (激素诱导排卵) 授精一次的不返情率、妊娠率、分娩率、产仔数 ;
(from Roca et al. 2003)**

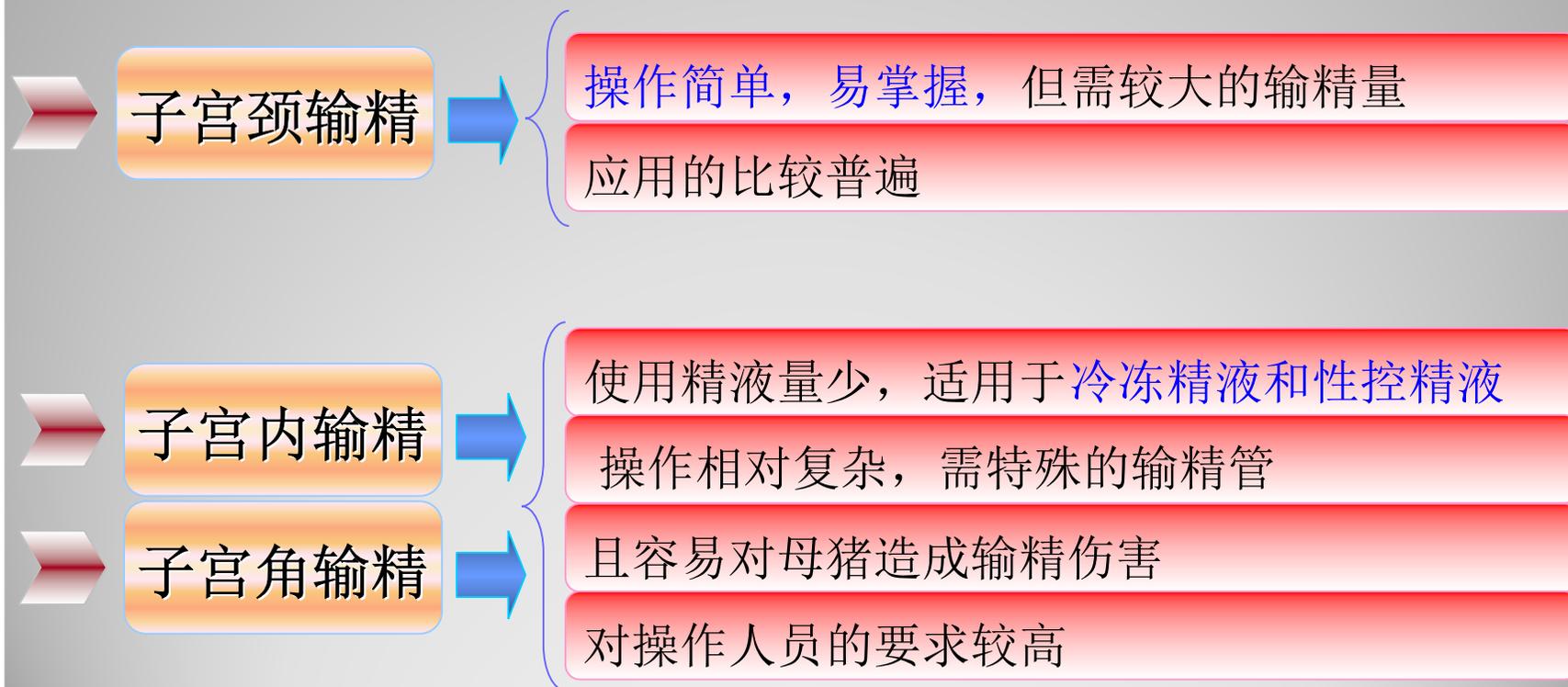
	子宫角输精		子宫颈输精
	冷冻解冻精子	新鲜精子	冷冻解冻精子
授精头数	49	29	33
情期不返情数 (%)	42/49 (85.71)	24/29 (82.76)	27/33(81.82)
28 天妊娠数 (%)	39/49 (79.59)	24/29 (82.76)	26/33 (78.79)
产仔母猪数(%)	38/49 (77.55)	24/29 (82.76)	25/33 (75.76)
产仔数(mean ± SEM)	354(9.31 ± 0.41)	239(9.96 ± 0.32)	240(9.6 ± 0.53)

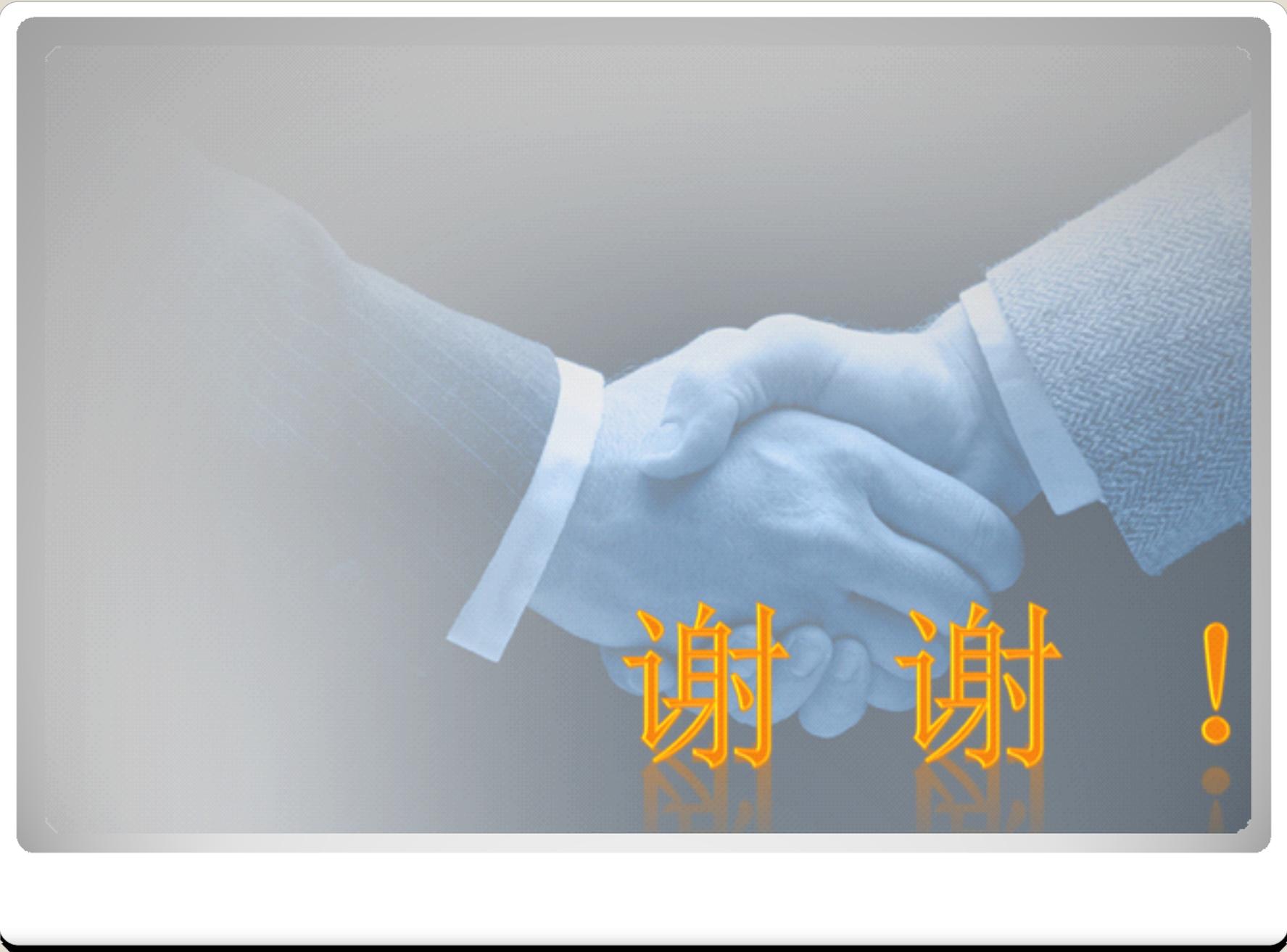
子宫内输精法的输精量: 鲜精 (150×10^6), 冻精(1000×10^6); 传统输精法的输精量: 冻精(6000×10^6);

结论:

- 不同精液及不同授精方法在各项生产指标上差异不显著
- 采用DUI法与intra-CAI比较, 将输精量从 $5-6 \times 10^9$ 降到 1×10^9 不会改变繁殖性能

三种输精方法的特点





谢谢！