

猪人工授精-实验室关键技术

朱士恩

(中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

摘要: 猪的人工授精技术是育种方法中一项简单有效且最重要的生物技术之一。本文从以下几方面介绍猪人工授精工作中实验室的必备设备、采精操作、精液品质的检查、稀释、分装、保存、运输及输精配种操作技术及注意事项, 为畜牧业中推广猪的人工授精技术提供参考。

关键词: 猪; 采精; 人工授精; 精液

猪的人工授精技术始于20世纪30年代, 迄今为止其应用已有70多年的历史。我国猪人工授精技术也始于上世纪50年代, 但由于当时仪器设备相对落后, 只能由专门的人工授精员进行输精, 未能在养猪业中达到理想的推广程度。到了20世纪90年代以后, 由于技术、设备的更新, 该项技术得到迅速的普及。

人工授精不仅可以减少公猪的饲养头数, 加大公猪的选择强度, 充分发挥优秀公猪的遗传潜力, 同时, 通过人工授精还可以减少性传播疾病, 提高生产效率, 获得更高的经济效益。另外, 人工授精技术与繁殖控制技术相结合, 如同期发情和诱发分娩, 可使猪群管理更加方便, 有利于全进全出的现代化养猪生产体系的建立。保存精液技术的发展, 尤其是冷冻精液、低温保存精液及性控精液的发展, 进一步提高了人工授精技术在猪育种方面的作用。通过保存优良种公畜或濒危物种公畜的精液, 使公畜的使用不受其生理年限的限制, 实现遗传资源的保存; 可使种公猪跨群或跨地区使用更为方便、经济、安全, 便于引入外源群体的基因, 获得大量优良公畜的后代, 从而加快遗传进展的扩散速度; 通过控制公畜的使用建立一个均衡的群体结构, 提高遗传参数及育种值估计效率。为此, 猪人工授精技术是以培育种猪和生产商品猪为目的而采用的最简单、最有效的配种方法, 是实现科学养猪、养猪生产规模化、现代化的重要手段, 在养猪生产中很容易得到推广应用。

1. 猪人工授精实验室必备设备

1.1 显微镜

用于评定精子活率、密度、畸形率等。其放大倍数包括 10×10 、 10×40 和 10×100 倍, 应配备恒温加热板(预热载玻片、盖玻片等, 防止精子冷休克)。

1.2 精子密度测定仪

能比较准确地分析出原精密度, 确定稀释倍数, 畸形精子的比例。其优点是检测速度相当快, 1~2min 即可出结果, 从而减少了对原精的影响。

1.3电子台称

用于称量精液质量(1g相当于1ml)，以测量精液体积。

1.4数显恒温水浴锅

加热精液稀释液以及用于控制精液稀释液的温度。另外，还用于冷冻精液的解冻。

1.5数显恒温精液保存箱

温度波动范围在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，用于精液的保存。

1.6量筒或烧杯

1000 ml、2000 ml各两个，用于准备稀释液、稀释精液以及将精液分装到输精瓶。

1.7保温瓶

用于采精，能保温隔热。

1.8pH计或pH试纸

测量精液的pH值（也可用酸度计测量）。

1.9温度计

需温度计2支，分别用于测量精液和稀释液的温度，但要保证这2支温度计都必须是校正好的，至少是这两个温度计测量同一液体时表示的温度一致。这样才能保证精液和稀释液测量处于等温。

1.10其他

采精杯、消毒外科用纱布、输精瓶(100 ml)、微量可调移液器及吸头、精子计数器测、玻璃棒、一次性乳胶手套、一次性采精袋、蒸馏水(最好是双蒸水，要求所用蒸馏水最好为3天内制的新鲜蒸馏水，有条件的场可配备超纯水机，以保证所用水的质量)、纸巾、浴巾(保温用)、市售成品稀释粉或一些配制精液稀释液所用的药品等。

2.精液采集前的准备工作

2.1精液采集前实验室的准备工作

精子对温度、渗透压以及杂质的细小变化都很敏感，因此用于精液处理的所有设备都应清洁、消毒灭菌、干燥和保温。

2.2工作人员及实验室准备

工作人员穿上工作服，70%酒精擦净工作台，墙面、地面和室内空气保持无灰尘，室温保持在22~25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3精液稀释液的准备

在采精前的1h将精液稀释粉放入定量的双蒸水中，混匀，充分溶解，而后置于37℃恒温水浴锅中预热，1h后即可使用。也可提前自配精液稀释液，然后置于37℃恒温水浴锅中预热备用。

2.4采精器皿准备

将采精器皿、保温瓶、采精杯(消毒的过滤纸折叠成漏斗形，并用橡皮筋固定在杯口处，其目的是过滤将精液中的大部分胶状物，否则这些胶体会吸附液体和精子，会使直线运动的精子数目减少)均放在37℃恒温箱中预热。

2.5仪器准备

电子天平、恒温载物台、显微镜、精子计数器、100~500 μ l微量移液器及其配套吸头、签字笔、记录本、载玻片、盖玻片等。

2.6精液分装器件的准备

准备好精液分装器、精液瓶、纱布、记号笔等。

2.7种公猪的准备

剪去公猪包皮及其周围的长毛，将公猪体表脏物冲洗干净并擦干体表水渍。

3.猪的人工采精方法

猪的人工采精方法包括电刺激采精法、假阴道采精法和手握采精法。前两种方法现已很少使用，目前国内外主要采用手握法采精。

3.1手握采精法

一手带双层手套，另一手持37℃保温杯(内装1次性采精袋)用于收集精液，用温的生理盐水清洗其腹部和包皮，待公猪爬跨台猪并伸出阴茎，脱去外层手套，用手(大拇指与龟头相反方向)紧握伸出的公猪阴茎螺旋状龟头，顺其向前冲力将阴茎的“S”状弯曲拉直，握紧阴茎龟头防止其旋转。待公猪射精时用集精杯收集浓份精液于保温杯内的一次性采精袋内，最初射出的少量(5 ml左右)精清不接取。

公猪的射精反应对压力的敏感度大于对温度的敏感度，只要采精员掌握适当的压力，公猪经过训练都可以采出精液。也可借助发情母猪，或使用假台猪，但公猪采精前必须进行必要的训练，如在假台猪附近进行几次本交后，换上假台猪，并在上面涂抹上发情母猪的粘液或尿液等。现在发现涂抹其它公猪的分泌物如尿液、唾液等对采精公猪的刺激更大。

3.2采精频率

采精频率以单位时间内获得最多的有效精子数来决定，成年公猪每周采精不超过2次，

青年公猪每周1次。

4.精液的品质检查

采集精液后应及时送到实验室对精液进行处理和检查。精液品质检查的目的在于鉴定精液品质的优劣，以确定精液是否适用于输精及为精液的稀释提供参考，同时也是检查公猪饲养水平和生殖器官的机能状态，反映操作技术质量，检验精液稀释、保存和运输效果的方法。精液检查包括外观检查和显微镜检查。精液的外观检查十分重要，主要包括精液量、颜色、气味、酸碱度等指标。精液的显微镜检查包括精子活率、精子密度的测定及精子形态学检查。

4.1 精液的外观检查

4.1.1 颜色

正常的精液是乳白色或浅灰色，呈云雾状，精子密度越高，色泽愈浓，其透明度愈低。异常精液：如带有绿色或黄色是混有脓液或尿液；带有浅红色或红褐色是含有血液，表明精液中有炎症物，这样的精液应舍弃不用，并会同兽医寻找原因，及时治疗。

4.1.2 气味

正常猪精液略带腥味，如有异常气味（恶臭味，炎症的一种表现），应废弃不用。

4.1.3 pH 值

以 pH 计或 pH 试纸测量。正常精液的 pH 值为 7.0~7.8，呈中性或弱碱性。一般来说，精液 pH 值越低，精子密度越大。

4.1.4 采精量的测定

测量精液量主要用电子天平称量法。按 $1\text{g} = 1\text{ml}$ 计，精液量(g) = (精子的质量 + 集精杯的质量) - 集精杯子的质量。避免以量筒等转移精液盛放容器的方法测量精液的体积，减少精子的死亡。

猪的射精量因品种、年龄、使用频率不同有较大的差异，一般公猪的一次射精量为 200~500 ml。公猪射精过多或过少，应分析原因。采精次数过多，公猪生殖机能衰退，日常管理不当，采精技术不熟练均可能造成一次采精量过少；一次采精量过多则可能是由于混入过多的副性腺分泌物及尿液等。

4.2 精液的显微镜检查

4.2.1 精子活率检查

精子的活率是指精液在 37℃ 条件下呈直线运动的精子占全部精子总数的百分率，它与精子受精能力密切相关，是评定精液品质的重要指标。一般要求在每次采精后、精液稀释后、

输精前均应进行活率检查。精子活率的评定一般用目测估测法在显微镜下观察精子活率，按 0.1~1.0 的十级评分法进行评估。检查活率时要求载玻片和盖玻片都应 37℃ 预热，鲜精活率在 0.7 以上才可进行稀释配制。保存 24h 以上的精液使用前需检查活率，要求在 0.6 以上的精液才可以使用。

精子的活率检查须在 37℃ 条件下进行。如果检查温度低于 20℃，精子活动能力差，不能反映精子的真正活率；如果检查温度高于 40℃，精子非常活跃，能量代谢加强，很快死亡，容易造成错误判断。

4.2.2 精子密度检查

精子密度指每毫升精液中含有的精子数量，是确定精液稀释倍数、评定精液品质的一个重要指标，正常公猪的精子密度为 2~3 亿/ml，有的可高达 5 亿/ml。检测精子密度的方法主要有估测法、精子密度仪法、血细胞计数方法等。目前生产上主要以精子密度仪法为主。

4.2.2.1 估测法

在显微镜下观察精子的分布，精子与精子之间的距离少于一个精子长度为“密”，其距离相当于一个精子的长度为“中”，其距离大于一个精子的长度为“稀”。此种方法主观性强，误差大，只能进行粗略的估计。

4.2.2.2 精子密度仪法

该方法使用方便，检查所需时间短，重复性好，结果比较准确，是目前人工授精中测定精子密度最适用的方法。

4.2.2.3 血细胞计数方法

该方法最准确，但速度太慢，生产实践中主要用于校正精子密度仪的读数。

血细胞计数方法：①以微量加样器取具有代表性原精液 200μL，用 3%NaCl 稀释 10 倍；②在血细胞计数板上放一盖玻片，取 1 滴稀释液后精液置于计数板的槽中，靠虹吸将精液吸入计数室内；③在高倍镜下计数 5 个中方格内的精子总数，将该数乘以 50 万，即得原精液每毫升的精子数（即精液密度）。

4.2.3 精子畸形率检查

精子畸形率是指畸形精子占精子总数的百分率。其测定可用伊红或姬姆萨等染料染色后用普通显微镜观察，或者用相差显微镜直接观察活精子的畸形率。

4.2.3.1 精子畸形种类

种类包括头部畸形，即头部巨大、瘦小、细长、圆形、双头、顶体膨胀或脱落等；颈部畸形，即颈部膨大、纤细、屈折、不全、带有原生质滴、不鲜明、双颈等；尾部中段畸形，

即弯曲、螺旋形、回旋、短小、长大、双尾、折尾等。公猪利用过度，饲养管理不良，配种间隔过长，采精操作不当或者睾丸和附睾疾病等均可导致畸形精子的产生。

4.2.3.2 精子畸形率的显微镜检查方法

抹片，取一滴原精液作抹片(也可用稀释后精液)，自然干燥；福尔马林磷酸盐固定液固定 15~20min，Giemsa 染液染色 90min，水洗后并自然风干。在显微镜下放大 400~1000 倍检查，要求镜检计数 ≥ 300 个精子，记录观察到的畸形精子数和精子总数之比，即可得出畸形精子百分率。

在检查精液时如发现精子畸形率超过 15%，且某一种畸形占优势，就需注意公猪是否已出现潜在的危险，如果没有任何一种畸形精子占优势，即使总畸形率达 20%，对受胎率也不会受影响，但一般要求精子畸形率不超过 18%为宜。

4.3 填写精液品质检查登记表

精液品质检查后应做好详细记录，包括公猪品种、耳号、采精时间、采精量、精子活率、精子密度、畸形率等。

5. 精液稀释液配制、分装、保存与运输

5.1 稀释液配制

精液稀释液要求在使用前配制，这样稀释液才会有较稳定的pH值。稀释粉先加入少量双蒸水充分溶解，然后再定量加入，过滤后则贴好标签，注明品名、配制时间、配制人等，然后放入4℃冰箱保存，以备用。

5.1.1 精液稀释

精液稀释的目的是要使一头公猪的繁殖力比自然交配扩大很多倍，而且受胎率等繁殖指标不下降。稀释液根据保存时间的长短可分为短效、中效和长效稀释液。多数精液稀释液含有缓冲物质(柠檬酸钠等)和营养物质(糖类等)，缓冲液用于避免 pH 值的改变，精液中的营养物质可被精子吸收。稀释后精液中的精子会消耗稀释液中的养分并且产生废物，因此，精液存放时间越长，其受精力越低。所以精液稀释后应及时输精。

5.1.2 精液稀释要求

5.1.2.1 精液稀释时要求与精液直接接触的器材和容器，都必须经过严格消毒处理。使用前，用少量同温稀释液冲洗一遍。

5.1.2.2 未经品质检查或检查不合格(活率 < 0.7)的精液不能稀释。

5.1.2.3 精液采集后应尽快稀释，原精贮存时间不宜超过30min。

5.1.2.4 稀释时严禁太阳光直射精液，应于较暗处操作。

5.1.2.5 精液要求等温稀释。精液与稀释液的温度相差不能超过1℃，以精液温度为标准，来调节稀释液的温度。

5.1.2.6 稀释时，将稀释液沿杯(瓶)壁缓慢加入到精液中，然后轻轻摇动或用消毒玻璃棒沿一个方向缓慢搅拌，使其混合均匀。

5.1.2.7 高倍稀释时，应先进行低倍稀释(1:1~2)，稍待片刻后再将余下的稀释液沿壁缓慢加入，以防造成“稀释打击”。

5.1.2.8 稀释倍数的确定：精液稀释的比例应根据原精液的品质，输精量，配种母猪的头数，以及是否需要运输和贮存而定。一般以每个输精剂量含有效精子数40亿以上，输精量为80~100ml，来确定稀释倍数。例如：某头公猪一次采精量是200 ml，活率为0.8，密度为2亿/ml，要求每个输精剂量是含40亿个有效精子，输精量为100 ml，则总精子数为200 ml × 2亿/ml = 400亿，稀释份数为400亿 × 0.8 / 40亿 = 8份，加入稀释液的量为8 × 100 ml - 200 ml = 600 ml。

5.1.2.9 稀释后要求静置片刻再作精子活率检查。如果稀释前后精子活率无太大变化，即可进行分装与保存；如果活率下降过快，说明稀释液的配置或稀释操作有问题，不宜使用，并应查明原因加以改进。

5.2 精液分装

精液的分装有瓶装、管装和袋装。装精液用的瓶、管、袋均为对精子无毒害作用的塑料制品。瓶装精液在分装时简单方便，易于操作，不需购置专门的分装机。精液瓶为常用的精液包装物，瓶上一般有刻度，容量为80~100ml。将稀释后的精液以每80~100ml为单位分装至输精瓶中，并在瓶上标明公猪品种、耳号、生产日期、稀释液名称等。

5.3 精液保存

精液保存分为常温（17℃等）、低温（4℃等）和冷冻（-196℃）保存。在生产上，目前国内猪精液的保存主要是常温17℃保存。

精液常温保存的要求：

5.3.1 将分装完的精液置22~25℃的室温1~2h后，放入17℃恒温箱贮存，也可将精液瓶用几层纱布或干毛巾包好后直接放置于17℃冰箱中，让其温度缓慢下降，避免因温度下降过快，造成死精子数等增多。

5.3.2 保存过程中要求每12h将精液摇匀1次，防止精子沉淀而引起死亡，每次摇动时，动作要轻缓均匀，同时观察精液的色泽状态，并做好记录，发现异常及时处理。

5.3.3保存过程中要切实注意冰箱内温度的变化(通过温度计的显示),以免因意想不到的原因而造成电压不稳而导致温度升高或降低。

5.3.4尽量减少精液保存箱开关次数,以减少对精子的影响。

5.3.5使用前对保存的精液进行活率检查,活率低于0.6的精液应弃之不用。

5.3.6用短效稀释液稀释的精液可保存3天,中效稀释液可保存4~6天,用长效稀释液稀释的精液可保存7天以上。但无论何种稀释液保存精液,都应尽快用完,否则会影响使用效果。

5.4精液的运输

精液运输成败的关键在于保温和防震是否做得充分。运输过程中精液应置于保温较好的装置内,保持在16~18℃,并且要避免强烈的震动。

精液运输应注意的事项:

1. 精液在运输前必须经过严格的检查,活率低于0.7的精液严禁调出;
2. 包装瓶或包装袋中应尽量排出空气,以减少在运输过程中的震荡;
3. 在运输过程中,应严格避光;
4. 精液运输到达目的地后,检查精子活率,合格后方可接收;

6.输精

6.1 输精的时间

母猪在发情后阴部红肿,用手压背部,出现静立反射,为最佳输精时间。此时许多发情母猪都有爬跨其它母猪,或允许其它母猪爬跨的表现。也可利用公猪进行试情,母猪接收公猪爬跨,则表示发情。发情母猪出现静立反射后8~12h进行第一次输精,之后间隔8~12h进行第2次输精。

6.2 输精方法

目前的输精方法主要有:子宫颈输精法(intra-cervical insemination, intra-CAI),子宫内输精法(post-cervical insemination, post-CAI)和子宫角输精法(deep uterine insemination, DUI)。其中,子宫内输精法、子宫角输精法使用精液量少,适用于冷冻精液、性控精液等,但操作相对复杂,需特殊的输精管。目前,生产上主要应用子宫颈输精法,其操作简单,易掌握。

6.2.1 宫颈输精法

消毒清洁双手,戴上消毒手套,清洁母猪外阴、尾根及臀部周围,再用温水浸湿毛巾,

擦净外阴部；从密封袋中取出灭菌后的输精管，手不应接触输精管前 2/3 部分，在其前端涂上润滑液；将输精管 45 度角向上插入母猪生殖道内，当感觉有阻力时，缓慢逆时针旋转同时前后移动，直到感觉输精管前端被锁定（轻轻回拉不动），并且确认被子宫颈锁定；从精液贮存箱取出品质合格的精液，确认公猪品种、耳号；缓慢颠倒摇匀精液，去除瓶嘴，接到输精管上，轻轻压确保精液能够流出输精瓶；当输精瓶（管、袋）内精液排空后，放低输精瓶（管、袋）约 15 秒，观察精液是否回流到输精瓶，若有倒流，再将其输入。一个情期内实行两次输精(间隔 8~12 h)，可提高受胎率和产仔数。

6.2.2 填写输精记录

输精后应做好详细记录，包括公、母猪品种、耳号、输精时间、输精量、精子活率、输精次数、输精操作者等。