

# 家畜繁殖学实验指导

主编：张贵学

东 北 农 业 大 学

2014年1月

# 家畜繁殖学实验指导

课程名称：家畜繁殖学

课程编号：05610053z

适用专业：动物科学、生物技术、动物医学及水产养殖等

实验学时：36-54学时

编写人员：张贵学 田亚光 黄 贺 郑 鹏

## 前 言

家畜繁殖学实验指导是根据目前国内外科学的发展和对畜牧人才的需要进行编写，其目的是使学生在校期间掌握家畜繁殖学的实验操作技能，加深对理论课的理解，做到理论和实践相结合，同时为其他专业基础课和专业课的学习奠定基础，也为学生毕业走向工作岗位迅速适应生产需要提供保障，为学生进一步深造提供了专业生物技术平台。

本实验指导共由 20 个实验组成，每一个实验都是对家畜繁殖生理理论的巩固，也是对繁殖技术的加强。既包括部分传统的实验，又增添了一部分高新技术实验内容。如：人工授精和胚胎移植部分属于传统的实验，但一部分内容做了补充和更新。增加了体外受精实验，干细胞制备等，扩大了学生的视野，提高了其高新技术的操作能力，进一步增加了家畜繁殖学实验的份量。

本实验指导适用于农业院校畜牧专业及农业职业教育本、专科生使用。实验指导在编写的过程中参阅了国内有关的教材和实验指导，查阅了国内外大量参考文献，也广泛征求了相关专业人员的意见，并得到他们的大力支持。

该指导教材在编写过程中，尽量将传统实验与现代实验有机地组合在一起，尽量与各学校家畜繁殖学所授课理论内容相一致，因此在编写过程中难免会出现这样或那样的一些不足，希望在教材的使用过程中，各位同仁给予指正。

2014年1月8日

## 目 录

实验一	实验器材的洗涤与消毒	1
实验二	公畜生殖系统组成及解剖构造的观察	4
实验三	母畜生殖系统组成及解剖构造的观察	9
实验四	公畜睪丸及母畜卵巢组织学观察	13
实验五	孕马血清促性腺激素的生物学测定	20
实验六	兔超数排卵	22
实验七	卵子和胚胎形态的观察及评定	24
实验八	人工授精器材的认识及假阴道的安装	27
实验九	采精	30
实验十	精液品质的检查	34
实验十一	精子顶体完整率的测定	38
实验十二	精子蛋白酶的测定	41
实验十三	人工输精	43
实验十四	精液稀释液的配制及其 pH 值测定	46
实验十五	精液的冷冻保存	51
实验十六	阴道涂片检查	54
实验十七	牛体外受精 (IVF)	56
实验十八	耳缘成纤维细胞培养	60
实验十九	小鼠胚胎干细胞培养	62
实验二十	牛雄性生殖干细胞培养	64

# 实验一 实验器材的洗涤与消毒

## 实验特点

实验类型：综合型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：3-4 人

## 实验目的要求

实验器材的清洗和消毒是实验的良好开端和实验是否成功的关键，直接影响实验结果，特别是一些高新生物技术对无菌条件要求特别严格。因此，要求同学们要认识到该实验的重要性，耐心细致，特别是无菌实验中一些器材的清洗与消毒。通过实验使同学们掌握器材清洗和消毒方法：超声波清洗、煮沸消毒、蒸气消毒、干热消毒、紫外线光消毒、酒精消毒和新吉尔灭浸泡消毒等。

## 实验原理

通过煮沸消毒、蒸气消毒、干热消毒、紫外线光消毒、酒精消毒和新吉尔灭浸泡消毒等将细菌和其他微生物杀死。

## 实验仪器设备

试管、烧杯、三角烧瓶、锥形瓶、吸量管、滴定管、量杯、量筒、人工授精器材等。

## 实验内容步骤

### 1、常规实验器材的清洗

#### (1) 一般玻璃仪器

如试管、烧杯、三角烧瓶、锥形瓶等，先用自来水洗刷至无污物，再选用大小合适的毛刷沾取洗涤剂或浸入肥皂水内，将器皿内外(特别是内壁)细心刷洗，再用自来水冲洗干净后，用蒸馏水冲洗2-3次(凡清洗干净的玻璃器皿，容器壁上不应带水珠，否则未洗干净，应按上述方法重新洗涤)，烘干后放清洁处备用。

#### (2) 量器

如吸量管、滴定管、量杯、量筒等，使用后应立即浸泡在清水中，勿使物质干涸，实验完毕后用流水冲洗，以除去附着的试剂、蛋白质等物质。晾干后浸泡在铬酸洗液中。

玻璃器材浸泡在铬酸液中一般需12小时，若急用至少浸泡4-6 小时，从铬酸液取出后用自来水流水冲洗2小时，然后用蒸馏水冲洗2-4遍，待器皿壁不挂水珠，透明即可烘干备用。

### （3）金属器械的清洗

用去污剂洗去手术金属器械上污剂，蒸馏水清洗。

## 2、器材的消毒

人工授精器材要严格消毒，防止细菌和微生物污染了精液。消毒不严会影响精液的质量，也会造成母畜生殖道感染。实验用器材主要使用物理学消毒法(煮沸、蒸气、干热、紫外线等)，部分器材可使用化学消毒(如酒精)。

### （1）煮沸消毒，适用于一切器皿及生理盐水，稀释液。

人工授精器材的消毒应以煮沸消毒为主。80℃10分钟，炭疽菌、结核菌、微生物均可杀死。100℃1分钟，炭疽菌芽胞可被杀死。在实践中，可用100℃15分钟煮沸消毒。在消毒过程中，消毒水应浸没消毒器皿，而生理盐水及稀释液以隔水(水浴)消毒为宜。

一切橡胶、玻璃、金属器材和稀释液均可煮沸消毒(脱脂棉、纱布、滤纸除外)。若煮沸水中加入1-2%的碳酸氢钠，可以增加消毒效果防止金属器材生锈。橡胶器材若煮沸消毒，应在水沸腾后立即取出，否则橡胶容易变性。

### （2）蒸气消毒，适用于一切器皿及稀释液。

在密闭情况下，100℃1分钟可以达到消毒目的。如果灭菌器不严密混入空气，消毒则需要10分钟。空气混入1/3消毒则需30分钟。在实践中，除用高压灭菌器外，自制的蒸气消毒锅，一般都应在水开后，消毒30分钟。

### （3）干热消毒，适用于玻璃器材和金属器械。

使用电热干燥箱灭菌，温度达到160℃，经过30-60分钟方能达到消毒目的。这种消毒效果比湿热消毒(煮沸、蒸气法)差。链球菌70-75℃1小时、大肠杆菌60℃13分钟、结核菌100℃1小时可被杀死。

另一种干热消毒法就是烧灼，操作中使用的白金耳，以及阴道开张器等金属器材均可用无烟火焰(酒精灯)烧灼消毒。

### （4）紫外线光消毒，适用于橡胶、塑料、玻璃器材。

### （5）橡胶、塑料等器材可用新吉尔灭浸泡消毒。

### （6）酒精消毒，适用橡胶、玻璃、金属等器材，一般用70%的酒精消毒。

## 注意事项

实验中要接触到强酸试剂，要避免被酸灼伤。清洗干净的仪器表面光滑无污物，没有水滴附着。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，写明实验过程及各种仪器的清洗方法。

## 实验二 公畜生殖系统组成及解剖构造的观察

### 实验特点

实验类型：验证型实验  
计划学时：2 学时

实验类别：专业基础课  
每组人数：5 人

### 实验目的要求

要求学生总体上掌握雄性牛、羊、猪和马生殖系统的组成、器官位置、形态和解剖构造。了解各种公畜睾丸的区别、精索组成，以及输精管的形状及起始部位。比较各种公畜副性腺的形态、位置、大小及排出口的部位。通过实验加深理论的认识，进一步将生殖器官的结构与功能联系起来，为学习公畜的生殖生理和繁殖技术奠定基础。

### 实验原理

家畜的一切生殖活动及提高畜牧业生产的繁殖技术均是在生殖系统的基础上进行的，所以，了解公畜牛、羊、猪和马生殖系统的组成及解剖构造是掌握繁殖学原理和繁殖技术的基础，同时对不同种家畜的生殖系统组成区别有一定了解。

### 实验材料

雄性牛、羊、猪和马生殖器官浸制标本、模型和幻灯片，在条件允许的情况下可进行畜体解剖观察。

### 实验内容步骤

公畜生殖系统组成：由性腺（睾丸）、附睾、输精管、尿生殖道和外生殖器（阴茎）构成，同时公畜有母畜所不具备的副性腺（精囊腺、前列腺和尿道球腺）。

1、睾丸（图2-1）是成对器官，呈长卵圆形，两个睾丸分居于阴囊的两个腔内。左侧睾丸通常大于右侧。睾丸大小、空间位置因品种、年龄的不同而有很大的差别。猪和绵羊的睾丸相对体重较大，牛和马较小。马睾丸的长轴与地面平行，附睾位于睾丸的上缘外侧，头端在前，尾端在后；牛、羊睾丸的长轴方向与地面垂直，附睾位于后缘，头端在上，尾端在下；猪睾丸的方向介于马牛之间附睾位于睾丸的前上缘，头端在前下方，尾端在后下方。

2、精索呈锐三角形，其下端接于睾丸的附着边和附睾上，其上端进入腹股沟管，精



索是包有睾丸血管、淋巴管、神经、提睾内肌以及输精管的浆膜褶，呈扁圆锥形，其基部附着于睾丸和附睾，入腹股沟管向腹腔行走，上端达鞘膜管内口。精索的睾丸动脉长而盘曲，伴行静脉细而密，形成精索的蔓丛，它们构成精索的大部分，具有延缓血流和降低血液温度的作用。

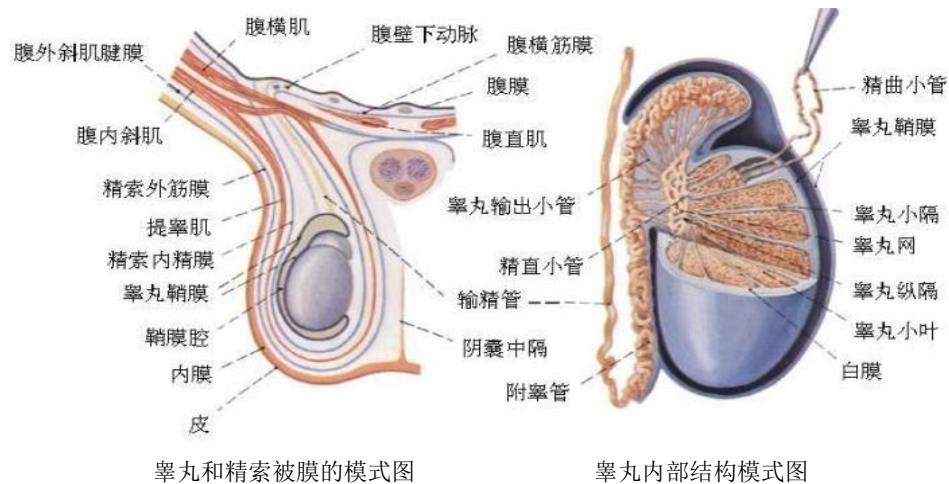


图2-1 睾丸囊内的解剖学构造

3、输精管由附睾管过渡而来，经过腹股沟管进入腹腔，以后即与精索内的其他部分分开单独向后上方进入盆腔，至膀胱背面，两侧输精管都进入尿生殖皱壁内，在此处输精管变粗，形成输精管壶腹，马（尤其驴）的比较发达，猪的几乎看不出来，牛、羊的输精管壶腹介于马和猪之间。实质为腺体组成，有分泌物排出。

4、副性腺由精囊腺、前列腺、尿道球腺组成。

精囊腺成对位于壶腹的右侧面或膀胱颈的表面，马的精囊腺呈长梨形，反刍类和猪的腺组织很结实，这也是猪最大的副性腺，猪的射精量大与此很有关系。但在肉食动物和骆驼并无此腺。腺体分叶状成对，而是在正中部相连，后端变狭窄，其中有排泄管，与输精管共同开口于尿道。

前列腺在精囊腺后方及尿道的背面，由腺体部和扩散部两部分构成。牛和猪的腺体部很小。绵羊没有这部分，扩散部则发达，几乎环绕着尿道。但马和犬的扩散部较小，腺体部成对裸露。而以十多条排泄管开口于精阜。

尿道球腺是位于骨盆部尿道后端的一对圆形腺体，它和前列腺都是有分叶的管状腺，腺体组织也同样地结实，富有平滑肌纤维，有助于分泌物的迅速排出。

猪的尿道球腺特别发达，其他家畜的腺体均掩覆在尿道肌下面，但犬没有此腺。其分泌液有粘性，由两条排泄管开口于尿道内。

5、阴茎主要由勃起组织及尿生殖道阴茎部组成，自坐骨弓沿中线先向下，再向前延伸，达于脐部。在阴茎的起点即阴茎根形成一对阴茎脚，固定在耻骨弓的两侧，由此向前伸长，达于腹下，开口于包皮。不同家畜阴茎的形状一般呈粗细不等的长圆锥形，主要差异在龟头部的形状，在反刍类和猪的阴茎体还形成S状弯曲，在勃起时呈伸直状态。

马的阴茎呈两侧稍扁的圆柱形，牛、羊的阴茎较细，在阴囊之后折成一S形弯曲，猪的阴茎也细，在阴囊之前形成S状弯曲。阴茎体由背侧的两个阴茎海绵体及腹侧的尿道海绵体构成。阴茎头为阴茎前端的膨大部，亦称龟头，主要由龟头海绵体构成。龟头的外形因畜种不同而迥异。

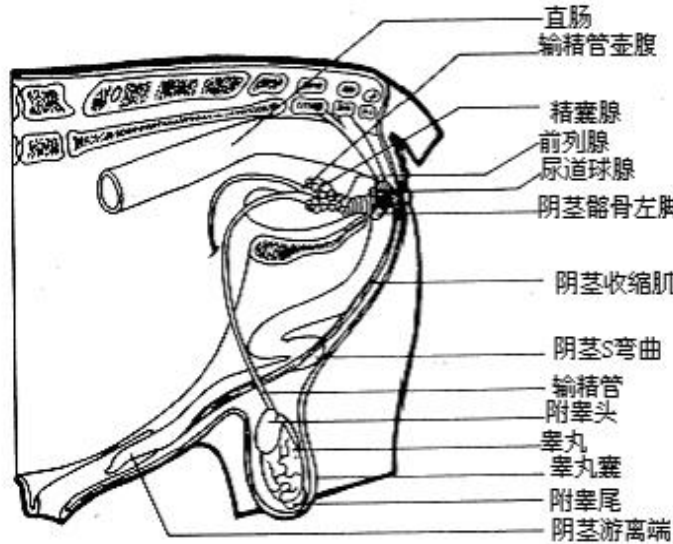


图2-2 牛生殖系统

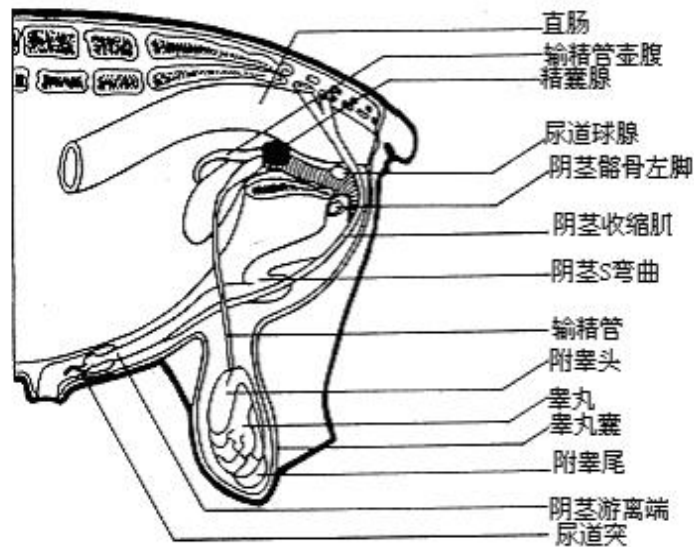


图2-3 羊生殖系统

牛的龟头较尖，且沿纵轴略呈扭转形，在顶端左侧形成一沟，尿道外口位于此处；马的龟头钝而圆，外周形成龟头冠，末端偏腹侧有凹的龟头窝，窝内有一2.5cm的尿道突；猪的龟头呈螺旋状，上有一浅的螺旋沟；羊的龟头呈帽状隆突，尿道前端突出于龟头前方；绵羊的长3-4cm，呈扭曲状细长突起，山羊的较短直；猫的龟头上有许多指向远侧部

的角质突起，狗和猫的龟头内有阴茎骨。

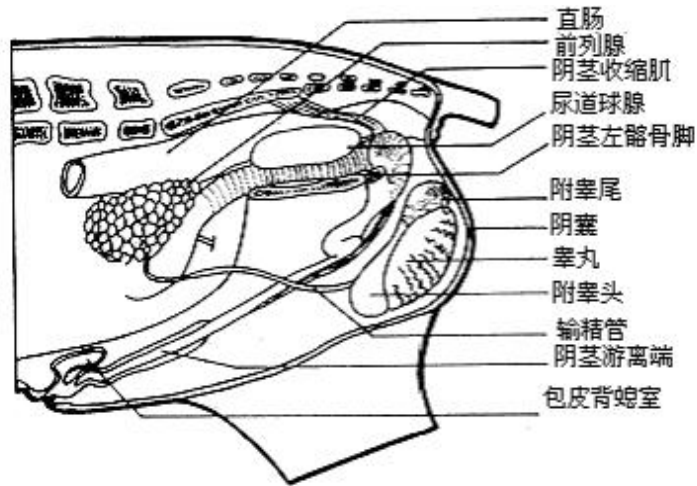


图2-4 猪生殖系统

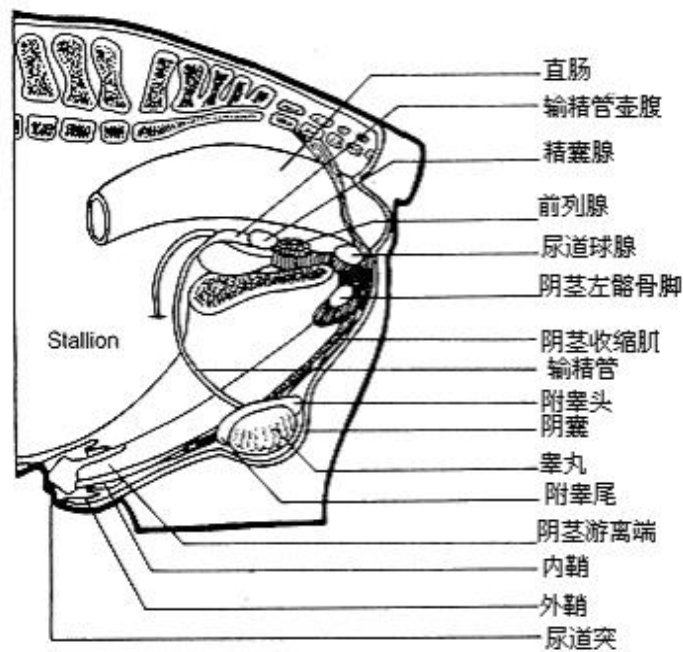


图2-5 马生殖系统

6、包皮是由皮肤凹陷而发育成的阴茎套。在不勃起时，阴茎头位于包皮腔内。牛包皮较长，包皮口围有一丛长而硬的包皮毛。包皮腔长35-40cm。

马的包皮形成内外二鞘，有伸缩性，阴茎勃起时，内外二鞘被拉展而紧贴于阴茎的表面；猪的包皮腔很长，背侧壁有一圆孔通入包皮憩室，室内常常聚集带有异味的浓稠液体。包皮的粘膜形成许多皱褶，并含有许多弯曲的管状腺，分泌油脂性的分泌物，这种分泌物与脱落的上皮细胞及细菌混合后形成带有异味的包皮垢。

## 注意事项

注意雄性牛、羊、猪和马生殖系统的组成、器官位置、形态和解剖构造的细微差别。掌握雄性牛、羊、猪和马生殖系统的组成、器官位置、形态和解剖构造。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，描述雄性牛、羊、猪和马生殖系统的组成、器官位置、形态和解剖构造。

## 实验三 母畜生殖系统组成及解剖构造的观察

### 实验特点

实验类型：验证型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：5 人

### 实验目的要求

要求学生总体上掌握雌性牛、羊、猪和马生殖系统的组成、器官形态和解剖构造及相互之间关系。了解各种母畜卵巢的区别、输卵管组成，以及子宫的形状特点。

通过实验加深理论课的认识，进一步将生殖器官的结构与功能联系起来，为学习母畜的生殖生理和繁殖技术奠定基础。

### 实验原理

家畜的一切生殖活动及提高畜牧业生产的繁殖技术均是在生殖系统的基础上进行的，所以，了解母畜牛、羊、猪和马生殖系统的系统组成及解剖构造是掌握繁殖学原理和繁殖技术的基础，同时对不同种家畜的生殖系统组成作出比较。

### 实验仪器设备

母畜生殖器官浸制标本、模型及幻灯片。

### 实验内容步骤

母畜生殖系统由性腺（卵巢）、生殖道（输卵管、子宫、阴道）和外生殖器官（尿生殖前庭、阴唇、阴蒂）构成（图3-1）。

#### 1、卵巢

由于动物的种类、品种及年龄不同，卵巢形态各异，就是同一个体亦随着发情周期各个阶段的相互交替以及生理机能的变化而在形态和大小方面有所不同，其形状主要决定于卵泡和黄体的大小变化，卵巢在腹腔里的位置并非一生固定。

牛的卵巢位置在两侧子宫尖端侧下方。青年母牛的卵巢都在骨盆腔内、耻骨前缘之后；经产母牛的卵巢在耻骨前缘下方。

羊的卵巢形状及位置基本与牛的相同，但比牛的卵巢形状圆而体积小。

猪的卵巢有较发达的卵巢囊（由卵巢系膜及输卵管系膜构成），卵巢和输卵管伞有时包在卵巢囊内，其形状随母猪性成熟的程度而有不同。幼小母猪卵巢的形状很像肾脏，在接近性成熟时，由于卵巢上有许多的小卵泡，因此形状很像桑椹，体积增大。达到性成熟时，卵巢上有许多卵泡及红体或黄体，很像一堆葡萄。

马的卵巢形状略似肾形，体积如鸽蛋大。附着边向上是卵巢系膜附着处，又称为卵巢门。自由边内陷形成排卵凹，朝向内侧的输卵管伞。卵巢由系膜吊在后腰区下的两旁，左卵巢位于第4-5腰椎左侧横突末端下方，即左侧髋关节的下内侧，右卵巢是在3、4腰椎横突之下，靠近腹腔顶位置较高且偏前，距中线较近。

犬的卵巢呈卵圆形，像菜豆，长约2cm，横切面直径约为1.5cm。卵巢系于由腹膜皱褶形成并包裹着神经、血管的卵巢系膜上。卵巢的形状决定于其上存在的卵泡及黄体。卵巢及其系膜的长度受着年龄，胎次的影响。两侧卵巢分别包被在脂肪覆盖着的卵巢囊中，发情期中的成熟卵泡直径可达0.6cm。

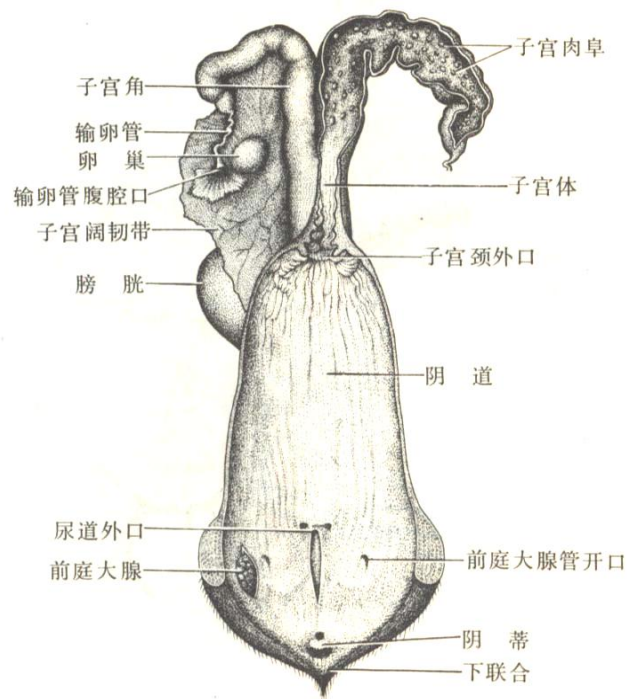


图3-1 母畜生殖系统

## 2、输卵管

输卵管位于子宫阔韧带外侧缘形成的输卵管系膜内，输卵管向腹腔开口的部分形成漏斗，其游离端的边缘不整齐，形如伞状，所以称之为伞。漏斗以下是管径较大的膨大部叫壶腹，约占管长的1/3，是受精场所。管的后段渐狭细，形成峡部，占输卵管全长的

2/3。

输卵管以马的最为弯曲，黄牛和水牛的输卵管全长各8.2-12.4cm和12.7-27.5cm，有12-16个浅弯曲。母马的输卵管和子宫角有明显的分界，形成输卵管子宫口。但其他家畜的峡部逐渐扩大而向子宫角移行，在反刍类和家兔更是如此，好似子宫角逐渐缩小其口径的延长部，因此也有称输卵管为子宫管。

### 3、子宫

子宫是有腔的肌质器官，胎儿在此发育成长。子宫分为子宫角、子宫体和子宫颈三部分。

牛的子宫位于腹腔内，以子宫阔韧带附着于盆腔前部的侧壁上。子宫的背侧邻直肠，腹侧为膀胱，并与瘤胃背囊和肠管等相接触。在妊娠时则根据妊娠期的不同，子宫的位置有显著的变化。子宫角左、右各一，全长35-40cm，被覆浆膜，仅在背侧面有一浅沟为界，此部常称为伪体；前部游离，呈弯曲的羊角状，先向下，继而向外向后，再翻转向上，并逐渐变细，末端形成乙状曲，与输卵管相移行，两子宫角后端相合，移行为子宫体。子宫体呈圆筒状，背、腹侧略压扁，子宫体长3-4cm。子宫颈是子宫体向后的延续部分，长6-10cm，后接阴道。子宫颈壁厚，其中央有一狭窄的管道，称子宫颈管，子宫颈粘膜苍白，形成4个环形褶，有的呈螺旋形或镰形，突入子宫颈管；褶上的粘膜又集拢成许多纵褶。管的前端开口于子宫体，称子宫颈管内口；后端开口于阴道，称子宫颈管外口。子宫颈后部突入阴道，形成子宫颈阴道部。羊的子宫与牛的相似。

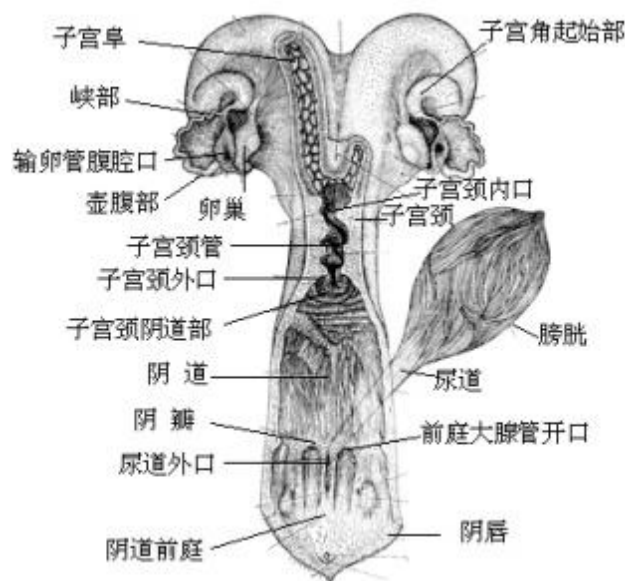


图3-2 母牛生殖器官（背面）

猪子宫也分为子宫角、子宫体和子宫颈。小母猪的子宫角细而弯曲，色泽鲜红。阉割时注意与管径较粗、管壁较薄、色泽深暗的小肠加以区别。大母猪子宫角长达150-200cm，壁厚而硬，色较白，与小肠容易区分。子宫体较短，而子宫颈长，约为子

宫体长度的3倍。子宫颈的肌层发达，粘膜形成半状隆起，称子宫枕，有14-20个交错相嵌，使子宫颈管呈螺旋状。子宫颈与阴道无明显分界，不形成子宫颈阴道部。

#### 4、阴道和外阴部

阴道是富有弹性的肌质膜管，其后端以阴道瓣(退化的处女膜)和阴道前庭分界，而习惯上该前庭部常当作阴道的一部分。阴道瓣在幼畜已成为胚胎期的遗迹，只有异常发育的是例外。母猪阴道成为子宫颈的延续部，在前端并不在子宫颈外口周围形成穹窿。前庭的前下方有尿道外口，有一对大前庭腺在其侧后方，它与雄性的尿道球腺的结构相似，发情时分泌大量的粘稠的液体。前庭开口处以大小阴唇保护，大阴唇在外面，下端联合处内方有阴蒂，相当于阴茎的退化组织，较为敏感。在发情期阴唇粘膜充血，而且肿胀松弛，有利于交配。

### 注意事项

注意雌性牛、羊、猪和马生殖系统的组成、器官位置、形态和解剖构造的细微差别。

### 实验报告要求

认真完成实验报告，描述雌性牛、羊、猪和马生殖系统的组成、器官位置、形态和解剖构造。



## 实验四 公畜睾丸及母畜卵巢组织学观察

### 实验特点

实验类型：验证型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：1 人

### 实验目的要求

通过睾丸和卵巢光镜切片的组织学观察，了解睾丸、卵巢的组织学构造，进而掌握精子的发生和卵子的形成过程。重点掌握曲细精管的组织结构，支持细胞的形态结构和功能，各种生精细胞的形态特征和排列规律。同时，了解直细精管、睾丸网的结构和睾丸的间质细胞的形态与功能。

### 实验原理

睾丸、卵巢组织经固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、染色、切片、封片等，在显微镜下观察，能够观察到各种生精细胞和卵细胞的形态特点，进而推断精子的发生和卵子的形成过程。

### 实验仪器设备

家畜睾丸和卵巢标本、组织学切片和光学显微镜。

### 实验内容步骤

1、睾丸切片观察（图4-1、4-2）：

（1）被膜 外层是较薄的固有鞘膜，内层为结缔组织白膜。

（2）睾丸小叶 每个睾丸小叶内曾以为有几条精细管，实则其中只有一条或由其派生而。

（3）曲精细管 曲精小管的管壁由外向内，是由同心圆状排列的结缔组织纤维，基膜和复层的生殖上皮构成，上皮主要有两种细胞，即生精细胞与支持细胞，支持细胞是细长形的细胞，位于生精细胞之间，辐射状排列在基膜上，支持细胞顶端形状不规则，突入管腔中，和临近的支持细胞互相组成网状。在支持细胞胞质中可见到附着很多精子。生精细胞是直接形成精子的细胞，数量比较多，成群地分布在支持细胞之间。

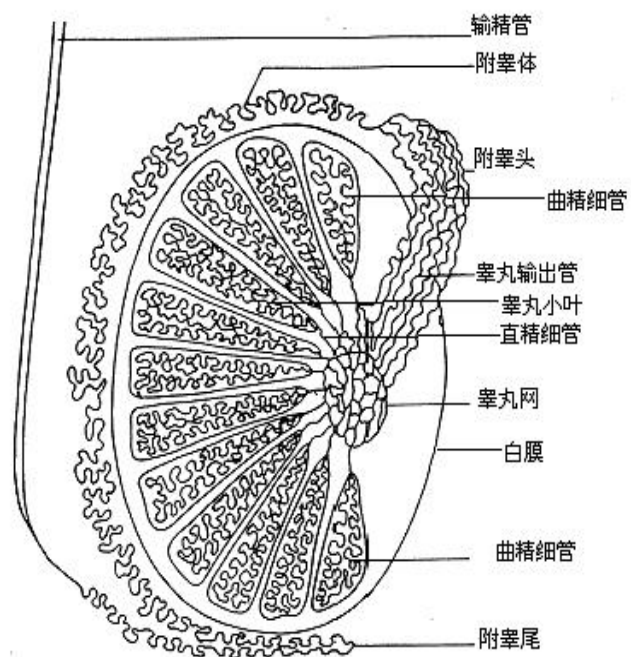


图4-1 公畜睾丸组织学结构图

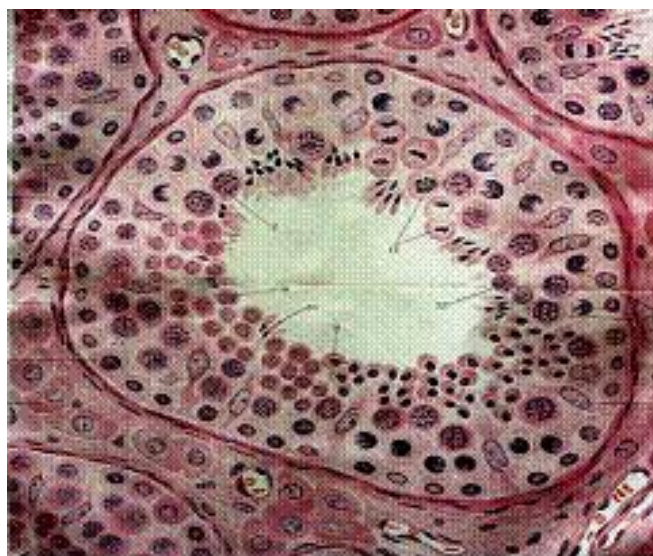


图4-2 精细管组织学结构图

#### ①精原细胞

是睾丸中最幼稚的生精细胞，位于精细管上皮的最外层，直径约为 $12\mu\text{m}$ ，细胞核为圆形或卵圆形，有1-2个核仁。般可分为三个类型，即A型精原细胞、中间型精原细胞和B型精原细胞。

**A型精原细胞** A型精原细胞特点为细胞质少，呈椭圆形，细胞较大，长轴与基底膜平行。

中间型精原细胞 细胞大而圆，附于基底膜，核圆形，染色体呈颗粒状，核染色浅、有一两个核仁、紧帖核膜，胞质中无糖元。

B型精原细胞 细胞较小，与基底膜接触较少，核圆形、核仁不规则。

## ②精母细胞

初级精母细胞 位于精原细胞上面，排列成几层，也常显有分裂现象，细胞呈圆形，体积较大。核亦呈球。富有染色体，着色较深，不过其染色体因处于不同的活动期而呈细线状或精线状。在最初阶段与精原细胞不易区分，随着细胞向管腔移动而离开基膜，同时胞浆不断增多，胞体变大，具有显著的胞核。

次级精母细胞 位于初级精母细胞的内侧，体积较小，细胞也呈圆形，核球形，染色质细粒状，最大特点是不见核仁，由于它很快就分裂，所以在同一位置上若有它存在则无精子细胞存在。

## ③精子细胞

细胞大都靠近曲精细管的管腔；也常排列数层，并且多密聚在足细胞远端的周围，细胞体积更小，胞核小，着色略深，胞浆少。

## ④精子

附着在足细胞上，呈蝌蚪状。头部染色很深，常深入足细胞顶部的胞浆中。精子发育成熟后，脱离曲精细管的管壁，游离在管腔中。

## 2、卵巢组织学观察

卵巢表面覆盖一层单层扁平或立方的表面上皮，称生殖上皮。生殖上皮下为薄层致密结缔组织构成的白膜。卵巢的外周部分称皮质，中央为髓质。皮质较厚，含有不同发育阶段的卵泡以及黄体 and 退变的闭锁卵泡等，卵泡间的结缔组织富有网状纤维和梭形基质细胞。髓质由疏松结缔组织构成，与皮质无明显分界，含有许多血管和淋巴管等。近卵巢门处有少量平滑肌束及门细胞（图4-3）。

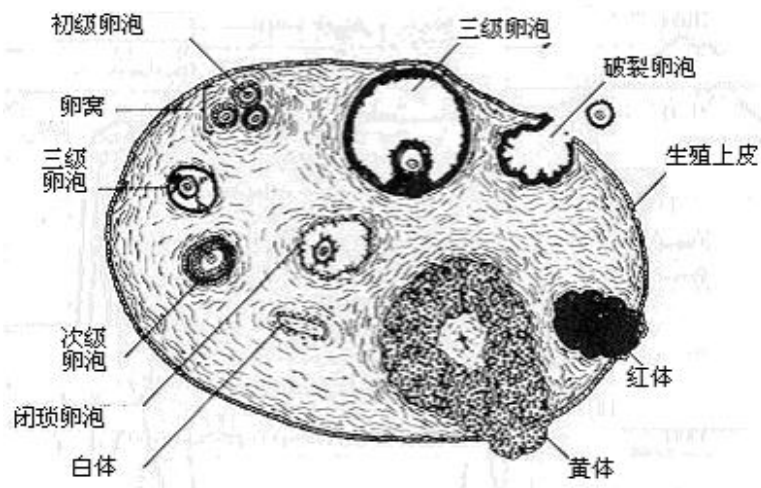


图4-3 卵巢的组织学结构图

### ①原始卵泡

原始卵泡位于皮质浅部，体积小，数量多。卵泡中央有一个初级卵母细胞，周围为单层扁平的卵泡细胞。卵泡细胞具有支持和营养卵母细胞的作用，卵泡细胞与卵母细胞之间有许多缝隙连接。



图4-4 原始和初级卵泡的组织学结构图

### ②初级卵泡

初级卵母细胞体积较大，卵泡细胞由单层扁平变为立方形或柱状。在初级卵泡早期，卵母细胞和卵泡细胞之间出现一层含糖蛋白的嗜酸性膜，称为透明带。

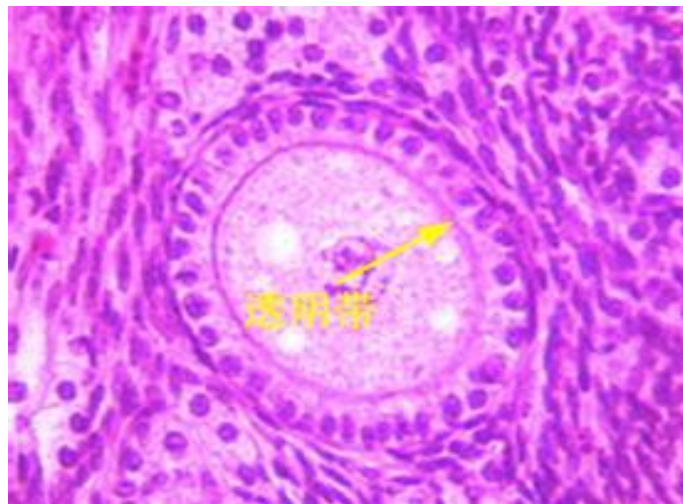


图4-5 初级卵泡的组织学结构图

### ③次级卵泡



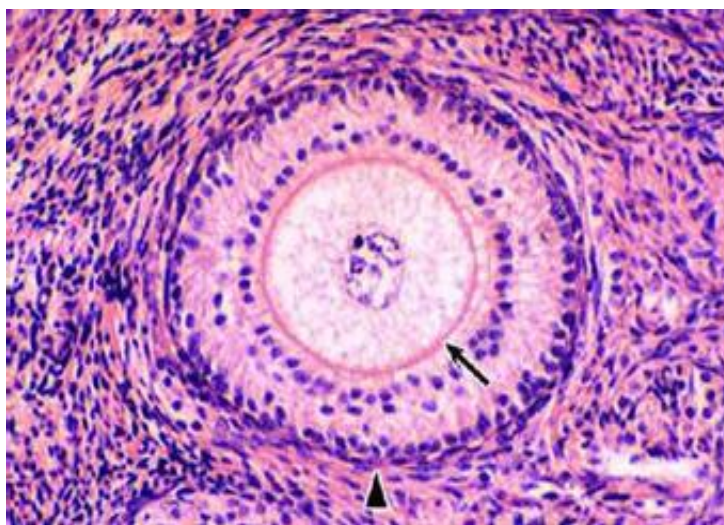


图4-6 次级卵泡的组织学结构图

随着细胞增殖成多层，在排列紧密的卵泡细胞间开始出现考尔-爱克斯诺小体，其数量随卵泡的生长而增多。小体为圆形囊泡，腔面是一层基膜，周围紧密排列的卵泡细胞，腔内含有卵泡细胞分泌的物质，参与卵泡液的形成卵泡体积更大。

#### ④生长卵泡

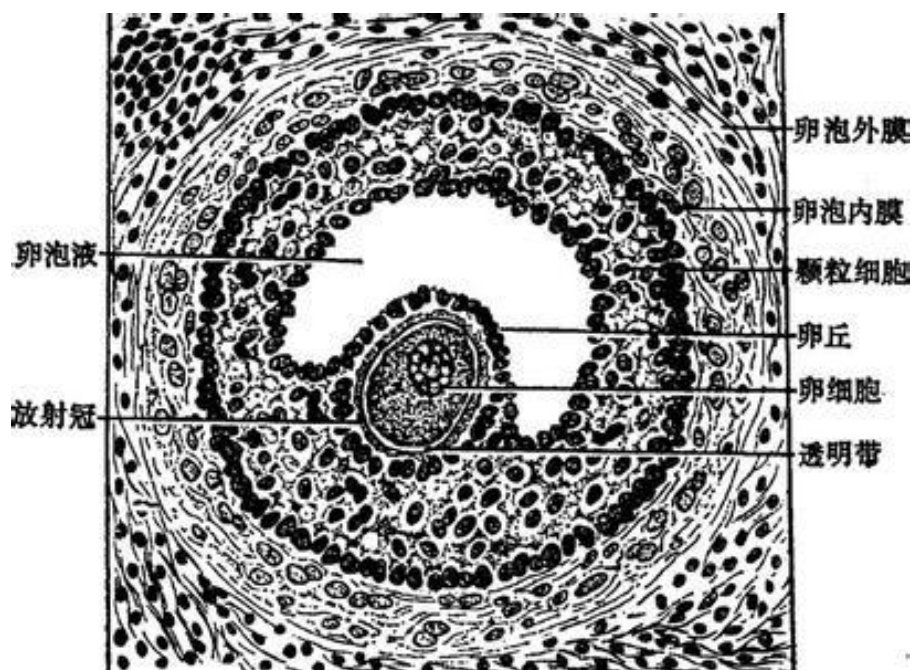


图4-7 生长卵泡组织学结构图

卵泡细胞间出现一些不规则的腔隙，并逐渐合并成一个半月形的腔，称为卵泡腔，腔内充满卵泡液。卵泡液是由卵泡细胞分泌和卵泡膜血管渗出液组成。随着卵泡液的增

多及卵泡腔扩大，卵母细胞居于卵泡的一侧，并与其周围的颗粒细胞一起突向卵泡腔，形成卵丘。此时初级卵母细胞直径可达 $100\sim 150/\mu\text{m}$ 。紧贴透明带的一层柱状卵泡细胞呈放射状排列，称放射冠。分布在卵泡腔周边的卵泡细胞较小，构成卵泡壁，称为颗粒层。在卵泡生长过程中，卵泡膜分化为内、外两层。内膜层含有较多的多边形或梭形的膜细胞及丰富的毛细血管，膜细胞具有分泌类固醇激素的结构特征。外膜层主要由成纤维细胞构成。

#### ⑤成熟卵泡

成熟卵泡是卵泡发育的最后阶段。卵泡体积很大，直径可达 $20\text{mm}$ ，并向卵巢表面突出（图4-8）。成熟卵泡的卵泡腔很大，颗粒层甚薄，颗粒细胞也不再增殖。

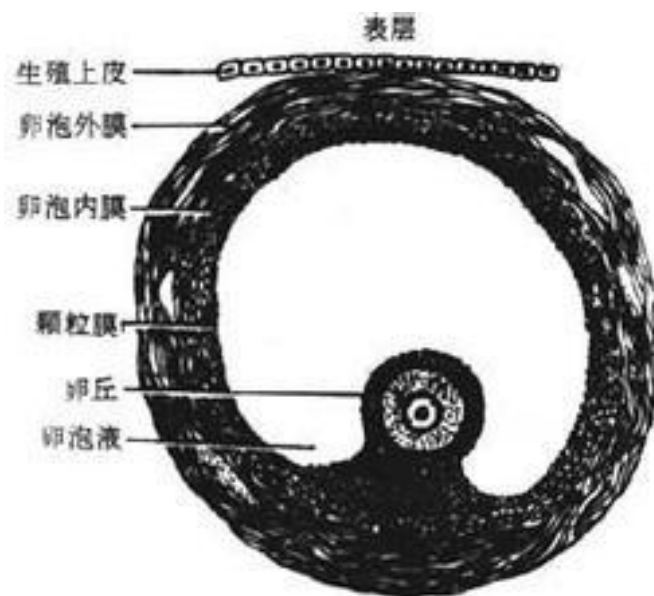


图4-8 成熟卵泡组织学结构图

#### ⑥黄体

成熟卵泡排卵后，残留在卵巢内的卵泡壁塌陷，卵泡膜内的血管和结缔组织伸入颗粒层。颗粒细胞分化为粒黄体细胞，膜细胞分化为膜黄体细胞。粒黄体细胞较大，呈多角形，染色较浅，数量多；膜黄体细胞较小，圆形或多角形，染色较深，数量少，分布于黄体的周边部。

#### ⑦闭锁卵泡

卵巢的大部分卵泡发育的各阶段逐渐退化，退化的卵泡称为闭锁卵泡。原始卵泡退化时，卵泡细胞首先出现核固缩，细胞形态不规则。卵泡细胞变小且分散，两种细胞随后均自溶消失。初级卵泡和早期次级卵泡的退化与原始卵泡相似，但退化的卵泡内可见残留的透明带，卵泡腔内常见中性粒细胞和巨噬细胞。晚期次级卵泡的闭锁变化较特殊，卵泡塌陷，卵泡膜的血管和结缔组织伸入颗粒层及卵丘，膜细胞一度增大，形成多边形上皮样细胞，胞质中充满脂滴，形似黄体细胞，并被结缔组织和血管分隔成分散的细胞

团索，称为间质腺。

#### ⑧门细胞

位于卵巢门近系膜处，则一些较大的上皮样细胞，细胞结构与睾丸间质细胞类似，胞质内富含胆固醇和脂色素等。妊娠期和绝经期的门细胞较明显，有分泌雄激素的功能。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，描述睾丸和卵巢光镜切片的组织学结构及曲细精管的组织结构、支持细胞的形态结构及各种生精细胞的形态特征和排列规律。

## 实验五 孕马血清促性腺激素的生物学测定

### 实验特点

实验类型：设计型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：4 学时

每组人数：4-5 人

### 实验目的要求

生物学测定法是根据一些动物的靶器官和靶组织对激素反应程度来测定激素含量的方法，是最早应用于激素测定的经典方法，能够直接反应激素的生物活性，也称作激素的生物学效价，其它的测定方法往往以此种方法加以验证。要求学生通过孕马血清促性腺激素的活性测定，掌握激素的生物学测定方法。

### 实验原理

PMSG的生物学测定法是以即将达到性成熟或摘除垂体的小鼠或大鼠，注射含有待测激素样品后，观察其子宫或卵巢增重及卵泡发育等变化。凡是引起确定的生理变化的最低有效剂量，即相当于一个效价单位（如小鼠单位或大鼠单位）。

母马在妊娠的40天，PMSG开始出现，增长至70天达到顶峰，持续到120天，每升血液中可达7万国际单位以上，然后开始下降，大约在170天时降到几乎测不出的程度。PMSG能促进动物卵巢机能，进而引起子宫增生和生长的变化。以性未成熟的小白鼠子宫增大程度为测定活性的根据，来测定该激素引起小白鼠子宫阳性反应的最低浓度，来进行计算预测定的PMSG样品的活性。即为能引起未成熟的小白鼠子宫增大一倍PMSG的量称之一小白鼠单位。

### 实验动物和器材

- 1、20-21日龄体重10-12g性未成熟的雌性健康小白鼠25只（每一实验教学组）。
- 2、含PMSG血清样品或稀释的PMSG和生理盐水。
- 3、5ml注射器5只，5号小针头5只，试管架1个，1ml、2ml、5ml、10ml吸量管各一支，吸耳球一个，10ml试管5支，20ml试管二支，剪子，镊子。



## 实验内容步骤

1、将 25 只小白鼠随机分为 5 组，每组 5 只，其中 4 组为实验组，另一组做为对照组。

2、取灭菌后的试管 4 支，分别加入生理盐水 11、2、4、6ml，吸取 1ml 样品血清或 PMSG 稀释液加入到第一支试管(11ml)中，充分混匀。再取此试管的稀释血清在其他三支试管中各加入 2ml，混匀后其血清浓度分别为 1/12、1/24、1/36 和 1/48。

3、用 4 种浓度的稀释血清各注射小白鼠 5 只，每只小白鼠腹皮下注射 0.2ml。要求注射部位准确，不得外漏，各组小鼠不得混串。

4、另外 5 只小白鼠按相同剂量注射生理盐水，作为对照组。

5、注射后按常规饲养，待 72 小时后剖检，并与对照组相比较观察子宫增大情况，每组若有 3 只或 3 只以上的小白鼠子宫呈阳性反应(增大一倍以上)，则认为该组浓度为阳性组。

6、将最低的有效浓度血清分母乘以 5，所得的数值即为每毫升血清样品中含有促性腺激素的小白鼠单位。

## 实验结果

1、所有实验组均为阳性

2、所有实验组均为阳性

第一种情况说明稀释倍数低了，第二种情况稀释倍数高了。

表5-1 剖检后小白鼠子宫变化记录

1/12 浓度		1/24 浓度		1/36 浓度		1/48 浓度	
阳性（只）	阴性（只）	阳性（只）	阴性（只）	阳性（只）	阴性（只）	阳性（只）	阴性（只）

## 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和所测得的实验结果并加以分析。

## 实验六 兔超数排卵

### 实验特点

实验类型：综合型实验

计划学时：6 学时

实验类别：专业基础课

每组人数：3-4 人

### 实验目的要求

通过实验使同学们掌握超数排卵的原理、方法和实验步骤，了解PMSG和hCG的生物学作用、卵巢反应、排卵点、卵泡发育和胚胎发育状况。

### 实验原理

PMSG和hCG均可促进卵泡的发育和排卵，因此可以使卵巢比正常状态下排出更多的卵子。

### 实验仪器设备

- 1、实验动物选择品种相同、月龄和体重相似的健康成年未妊母兔25只。
- 2、药品：FSH、PMSG、hCG、2%盐酸普鲁卡因注射液、静松灵、冲卵液(PBS)、消毒药品。
- 3、器械：1ml、5ml注射器、5号针头、手术刀、直尖手术剪、剪毛剪、止血钳、创巾、纱布块、直径0.4-0.5cm的4cm长塑料细管或玻璃管、平皿、缝合针、缝合线、实体显微镜。

### 实验内容步骤

- 1、将25只实验兔随机分为5组，按每公斤体重肌注不同的PMSG 0IU、30IU、40IU、50IU和60IU。
- 2、发情配种，与第一次注射间隔48-56小时，用公兔交配或耳静脉注射hCG90IU/kg。
- 3、配种后48-52小时手术冲卵。
- 4、手术采卵
  - ①实验兔肌肉注射20mg静松灵，进行全身麻醉。
  - ②将实验兔背位固定在兔用手术台上。

- ③术部剪毛，腆酒棉球常规消毒，然后用70%酒精消毒。2%盐酸普鲁卡因浸润性麻醉。
- ④手术刀在腹部正中线切口，依次为皮肤层、肌肉和腹膜。
- ⑤切开腹壁后，延两侧找到卵巢。观察排卵点(火山口)、黄体及未成熟卵泡，作好详细记录。
- ⑥从伞部联接输卵管，并固定，用5ml注射器于宫管接合部上行式冲卵。
- ⑦回收冲卵液，在实体显微镜下检卵。
- 5、冲卵后创口缝合
- 采用三层缝合法，腹膜为连续缝合，肌肉为断续缝合，皮肤为结节缝合，每缝合一层撒入适量抗菌药物。

## 实验结果：

将卵数及其发育阶段填入表格内。

表6-1 卵巢发育状况

项目	未成熟卵泡	黄体数	充血卵泡数	排卵数
左卵巢				
右卵巢				

表6-2 卵子回收状况

项目	未受精卵	2-8细胞	8-16细胞	桑椹胚
左卵巢				
右卵巢				

表6-3 兔排卵和卵的发育与时间的关系

排卵	2细胞	4细胞	8细胞	16细胞	进入子宫	胚胎形成
交配后	排卵后	排卵后	排卵后	排卵后	排卵后	排卵后
10-11小时	1天	1-15天	15-2天	2天	254天	3-4天

## 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和所观察的实验结果并加以分析。

## 实验七 卵子和胚胎形态的观察及评定

### 实验特点

实验类型：验证型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：3-4 人

### 实验目的要求

学习和掌握检卵过程，了解各发育阶段卵子形态和结构和检查与评定卵子品质的技能。

### 实验原理

卵子和胚胎的形态结构与其发育的阶段相适应，正常卵子和胚胎是圆形，卵裂球均匀一致。

### 实验仪器设备

不同发育阶段的胚胎、卵细胞展片、拨卵针、幻灯片、实体显微镜、检卵杯、平皿、吸卵管等。

### 实验内容步骤

- 1、学习在实体显微镜下，如何检卵并进行分类。
- 2、放大实体显微镜倍数观察卵子形态，绘图标出各部分名称，并认定其发育阶段。
- 3、通过图片观察与了解卵的发育阶段及质量并进行判定。
- 4、通过幻灯片观察与判断卵子的发育阶段，并评定质量及作好记录。
- 5、卵子和胚胎形态和结构见下图。

### 注意事项

- 1、检卵前首先要熟悉实体显微镜的结构及操作原理，做到熟练使用。
- 2、正确调节实体显微镜的焦距，使焦距对准集卵皿的内底部。盛冲卵液的集卵皿有三个面：①冲卵液的液面；②集卵皿的内底面；③集卵皿的外底面。
- 3、最好用凹形皿检卵，将含有冲卵液的凹形皿用手向心旋动，使卵子沉入低部中心，易于检查。

4、检卵顺序应由低倍到高倍，从底部10-20倍发现后再转换高倍镜进一步确认是否卵子。

5、卵子的比重比冲卵液大，因此应在冲卵液底部找卵。

6、卵子是球体，在镜下呈圆形，其外层是透明带，它在冲卵液内的折光性比输卵管冲取物中不规则状态的上皮碎片折光性强。

6、看到疑似卵子，可试用拔卵针拨动，由于冲卵液的存在，在拔卵针尚未触及时，卵子即已移动，这是区别卵子与上皮碎片及其他球状物的方法之一。

7、在集卵皿的冲卵液内所检出的卵子数量，与卵巢上排卵点的数量应大致相等，卵子数往往只能少于或接近排卵数。

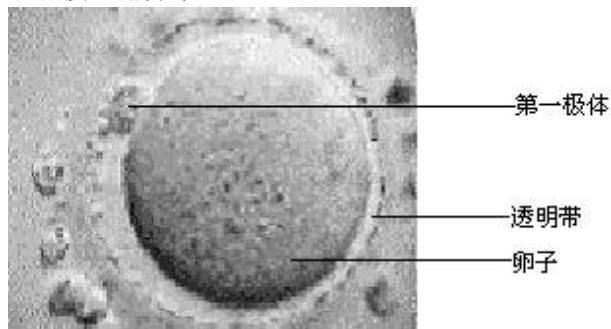


图7-1 无精卵子

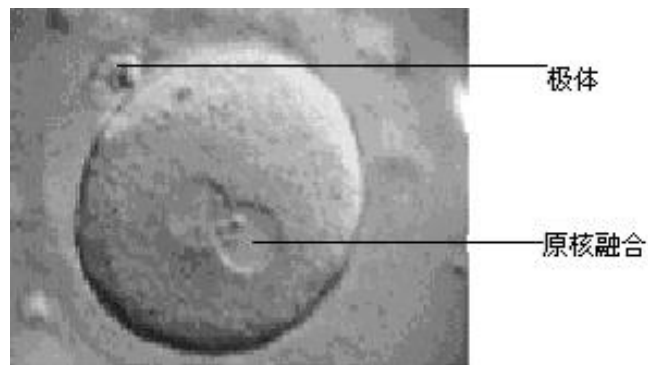


图7-2 原核融合时期的受精卵

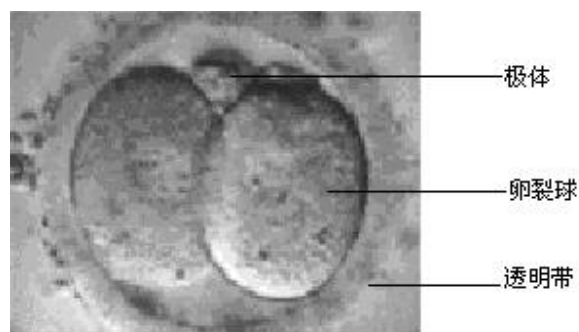


图7-3 两细胞卵裂球

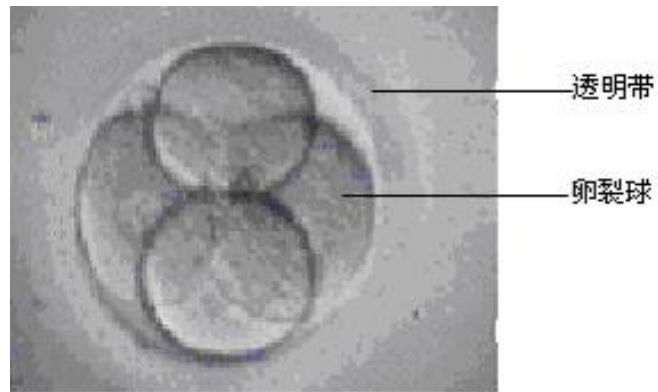


图7-4四细胞卵裂球

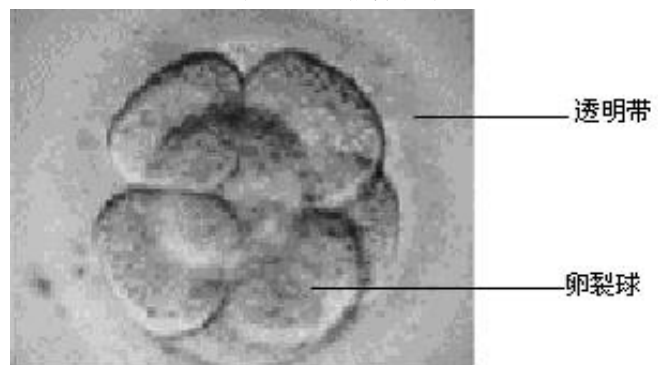


图7-5 八细胞卵裂球

## 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和所观察的卵子形态和结构，各发育阶段特点。

## 实验八 人工授精器材的认识及假阴道的安装

### 实验特点

实验类型：综合型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：3 人

### 实验目的要求

使学生熟悉家畜人工授精所用的各种器械，了解其用途、构造、原理和使用方法。

### 实验原理

人工授精器材的结构是根据家畜生殖系统的结构研制而成，其生理指标有家畜生殖系统的生物学特性决定。假阴道根据不同家畜外生殖器官对温度、压力和滑润度的敏感性不同，通过水温、气压和滑润剂进行相应调整已达到采精的目的。

### 实验仪器设备

电刺激采精器，牛、猪、羊、马和兔的假阴道外壳、内胎、集精杯及其保护套、橡皮圈活塞阀、长柄钳子、玻璃棒、温度计、漏斗、镊子、毛巾、脸盆、瓷量杯、天平、酒精灯、灭菌凡士林、油、95%与75%酒精棉球、滑石粉等。

### 实验内容步骤

指导教师讲述家畜人工授精器材各部件的名称和用途，并做假阴道安装示范，学生观察并每人安装一种或两种家畜的假阴道。

#### 1、各种家畜的采精器材及输精器材

##### (1)猪、马、牛和羊等人工授精器材

假阴道：它由外壳、内胎、集精杯三个主要部件组成，其形状是一直筒，但大小有别。

外壳：由硬橡胶或电木制成的，中央有注水孔，其上附有气卡开关。

内胎：是优质胶皮长筒，柔润坚韧，富有弹性。兔假阴道内胎是人用避孕套。

集精杯：双层玻璃杯，牛有美式假阴道的集精杯是带有刻度的大试管。

牛、羊输精器一般为长颈的玻璃注射器，现已广泛应用金属制成的凯苏枪。

牛、羊若用阴道开张法输精时，还须借助开室器，各种家畜金属开腔器形状相似，大小不一。

#### (2)马的人工授精器材

马的假阴道主要部件与牛、羊的相同，其形状呈圆筒形，分筒头、筒颈、筒体三部分。

外壳：是镀铬轻铁制成的，筒体中部有柄，侧方有注水孔，并附胶塞。

内胎：优质胶皮长筒。

集精杯：短圆柱状黑色橡皮杯。

马的输精器材是一长约70cm，一端尖细的优质橡皮导管，另一端连接20ml注射器。

#### (3)猪的人工授精器材

猪的采精现广为手握法采精。

猪的输精器是由注射器和较硬的胶导管组成。

### 2、采精前假阴道的准备

(1)安装内胎及消毒：将内胎放入外壳中，使露出两端的内胎长短相等，并翻转在外壳上，用胶圈固定。用 65%或70%酒精，按先集精瓶端，后阴茎入口的顺序擦拭。待酒精挥发后方可采精。采精前，必须用生理盐水或精液稀释液冲洗，以防内胎粘附精子。内胎除用酒精消毒外，还可用紫外线光消毒。最后装上胶漏斗及集精管。

(2)注水：将假阴道直立，水面达到中心注水孔即可。采精时内胎温度要求40-42℃。

(3)涂润滑剂：润滑剂多用灭菌的白凡士林，在早春或冬季可用2:1的自凡士林与液体石蜡的混合剂。涂抹深度约为假阴道全长的1/2。

(4)调节压力：从活塞注入空气，使假阴道入口呈现膨胀的放射状三条缝时才算适度，采精前，可在假阴道入口处复盖一块有Y形切口的泡沫塑料，以防污物被阴茎带入假阴道。采精后，内胎用毛刷蘸苏达水和肥皂液刷洗，再用清水冲洗，而后再用7%酒精浸泡半天(或用紫外线灯灭菌)。

在人工授精站，每次采精头数多，准备好的假阴道放入保温箱中，随用随取较为方便。

## 注意事项

注意不同家畜采精器械的区别。



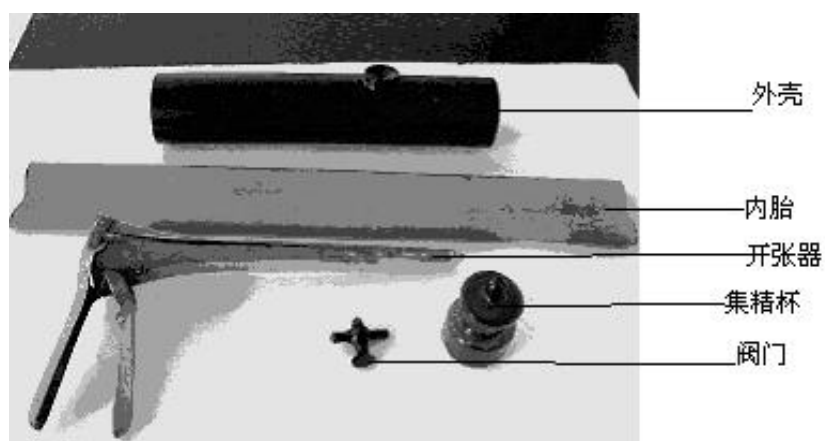


图8-1 采精器械

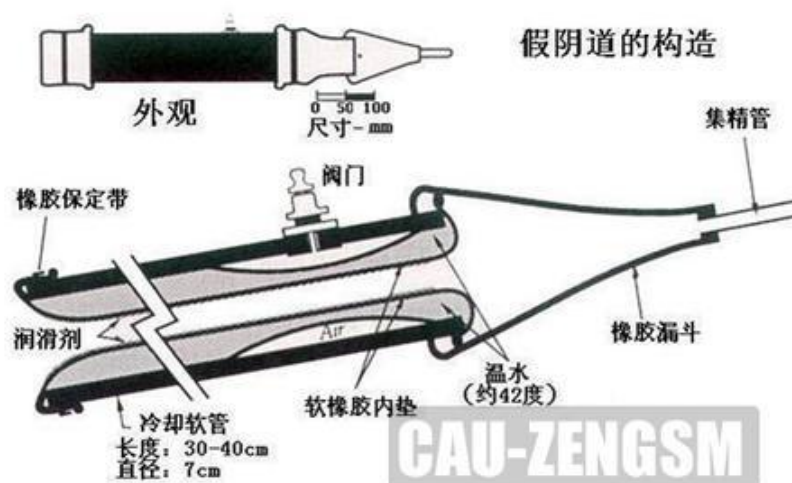
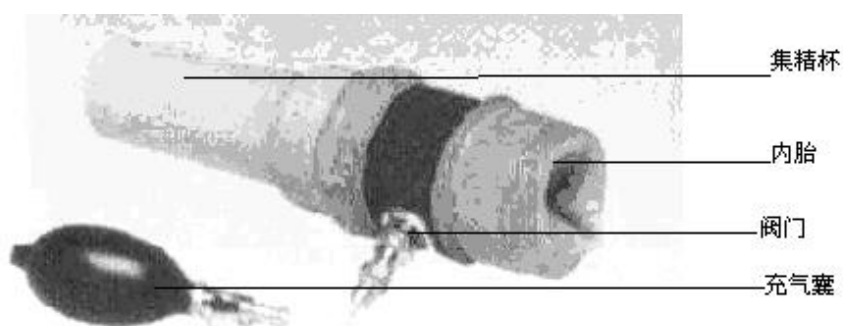


图8-2 假阴道

## 实验九 采 精

### 实验特点

实验类型：综合型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：3-4 人

### 实验目的要求

要求同学们了解采精程序及操作要领，初步掌握各种家畜采精方法。

### 实验原理

通过模拟生殖道内环境（温度、压力和滑润度）的方法，使公畜排精。

### 实验仪器设备

公畜、台畜、采精台、假阴道、集精杯、手套、酒精棉球、生理盐水、灭菌纱布、保温瓶、温度计、贮精瓶等。

### 实验内容步骤

做好采精前的准备工作，然后现场技术员或教师示范，而后由同学操作。

#### 1、公猪的采精

##### (1)手采精

①采精员一只手戴上消毒过的手术胶手套，另一手持集精杯。

②饲养员或助手将公猪赶至采精场地，待公猪爬跨台猪后，立即用清水(或0.1%高锰酸钾溶液)将公猪阴茎包皮洗净，然后带手套的手握成空拳，拳心向下，另一只手按摩包皮以促使阴茎伸出，并排清包皮液。

③公猪阴茎伸出后，让其自行插入拳内，待公猪阴茎在空拳中转动一些时间，同时用手由松到紧带弹性节奏地握住螺旋状阴茎头不让转动。

④待阴茎充分勃起向前伸时，顺势牵起向前，不要强牵。拳握阴茎松紧度以不使阴茎滑脱为准。握得太紧副性腺分泌物多，而精子较少。

⑤公猪俯射不动表示开始射精，即用集精瓶收集精液(瓶温保持30℃)。

⑥在采精时，集精瓶要复盖2-3层灭菌纱布。气温较低时，采精员的手应事先温热，

而后再拳握阴茎。公猪射精时可分为几个阶段，可以将最初射出的稀薄精液舍去，仅收集浓厚的精液。

#### (2)假阴道采精

①采用专用的短型猪假阴道，也可用牛假阴道截制，长度18-20cm，内径8cm。

②内胎以65-70%酒精消毒(胶漏斗及集精瓶应预先消毒)。

③注水，充气，使内壁温度达40℃。另有一胶漏斗，连接假阴道与集精瓶之间。

④采精时，假阴道涂抹适量润滑剂，筒头覆以塑料泡沫垫，中央有丫型切口以使阴茎通过。

⑤采精时，当阴茎插入假阴道后，采精员可于漏斗部握住阴茎尖端螺旋部，进行按摩刺激。

采精频度，可连采3天，休息1天，在南方有的猪场集中采8-9天休息3天，可根据情况而定，不能雷同。

#### (3)整理与洗涤假阴道

①打开活塞，放出空气和部分热水，以便使精液完全流入集精杯。

②回到室内，取下集精杯，进行精液品质检查。

③外壳用温水或稀薄苏达水擦拭。

④内胎先除去附着的凡士林层，再用苏达水或热碱水充分洗涤，最后清水冲洗，内胎悬挂在阴凉处，以备下次再用。

⑤集精杯彻底清洗后，消毒烘干备用。

### 2、鸡的采精：

#### (1)双人按摩采精法

①公鸡必须与母鸡隔离饲养2-3天，大多数公鸡经3-5次短期按摩训练便能顺利地采出精液。

②采精前用剪毛剪子剪去公鸡泄殖腔周围的羽毛，然后用生理盐水纱布块将泄殖腔周围碎羽毛刷掉，以免妨碍采精与污染精液。

③采精时，助手握住公鸡大腿基部，松紧要适当。鸡头向后，尾部朝向采精员，采精员左手于尾根处挡住尾羽，拇指和食指放在泄殖腔两旁的附近，以在适当时机挤出精液。

④采精时术者先用右手中指和食指夹着采精杯，并使杯口向下握于手心内，以避免按摩时公鸡排粪便污染，然后术者以左手自背鞍部向尾部方向抚摸数次，以减低公鸡惊恐，并引起性感。

⑤术者左手顺势将尾羽翻向背侧，并将拇指和食指跨捏在泄殖腔两上侧，此时术者右手拇指和食指应立即插在腹两侧的柔软部，施以迅速而敏捷的颤抖向上按摩，此时公鸡性感强烈，交接器勃起。此时用右手以拇指食指和中指捏住交接器并做适当的挤压精液便可顺利排出。

⑥当公鸡排精时，术者应停止按摩，并立即将右手夹着的采精杯杯口向上，承接精

液。

#### (2)单人按摩采精

①设置一张高约70cm，长约40cm，宽约50cm的采精台。

②用简易活动保定带，将公鸡保定在台子上。

③公鸡呈半蹲式，尾部稍微抬起。术者即可按背腹式按摩手势进行采精。

#### 3、兔的采精

公兔采精以假阴道效果最好。假阴道构造原理与牛羊相同，可用内径3.5-4cm，长8cm的硬胶皮水管或竹管做外壳，上面挖一注水孔。用外科胶指套或人用避孕套做内胎(应预先检查对精子有无伤害作用)。

采精可用母兔诱引，采精员左手握兔耳固定母兔，右手握假阴道，并将其藏在母兔腹下两后腿之间，当公兔爬跨母兔时，将假阴道套在公兔的阴茎上，公兔即可射精。

公兔射精后，常常摔倒且伴有尖叫声。经过训练的公兔，可用假母兔采精，采精员有时戴一兔皮手套，以代替母兔。

#### 4、公牛假阴道采精

(1)选择体格大小适中的健康母牛为台牛(亦可用性情温顺的不发情母牛)，将台牛牵到保定栏内，固定头部，尾部拉向左侧固定。

(2)采精前，用温热肥皂水洗涤母牛的外阴部和腹部，再用清水冲洗。对公牛亦应清洗腹部和包皮内部，以减少细菌对精液的污染。其清洗方法：在包皮内放块纱布，用力大的自来水冲洗，然后用生理盐水冲洗，洗净后擦干。

(3)采精时，为了防尘和防滑，可在台牛后方放一橡皮垫，公牛爬跨即安全又卫生。

(4)采精时，当公牛牵来时，要进行适当控制，待其性兴奋达到高潮时，阴茎频频伸出再令其爬跨。

(5)公牛临近台牛，采精员取下覆盖假阴道的纱布，并在公牛爬跨时，以左手准确托住包皮(切勿触摸阴茎)，将阴茎导入假阴道，假阴道与阴茎方向一致，约呈35度角，当公牛阴茎插入假阴道同时后躯向前强烈地耸跳时，即将射精。

(6)射精后，将假阴道集精杯端向下倾斜，同时摇着公牛跳下动作顺势自然地取下假阴道，并重新盖上纱布。

(7)打开活塞，放出空气和部分热水，使精液完全流入集精杯，取下精液杯，进行精液品质检查。

#### 5、羊采精

假阴道采精时，保证内腔温度为39-42℃，并在内腔前部1/2-1/3处涂上已消毒好的润滑剂(凡士林或石蜡油等)，以保持润滑。

用假台羊或发情母羊作台羊较为理想，现在多用发情母羊作台羊，采精前将母羊固定采精架内，用温热肥皂水洗涤母羊的外阴部和腹部，再用清水冲洗待公羊爬跨。将公羊牵至母羊处，采精员立于台羊右臀侧，右手持假阴道与地面保持35-45°，当公羊爬跨台羊时，用左手轻托阴茎包皮迅速将阴茎导入假阴道内，当公羊向前冲动，表示射精完

毕，将集精杯一端放下待公羊滑下时，取下假阴道，先放气，后将集精杯取下，检查精液。

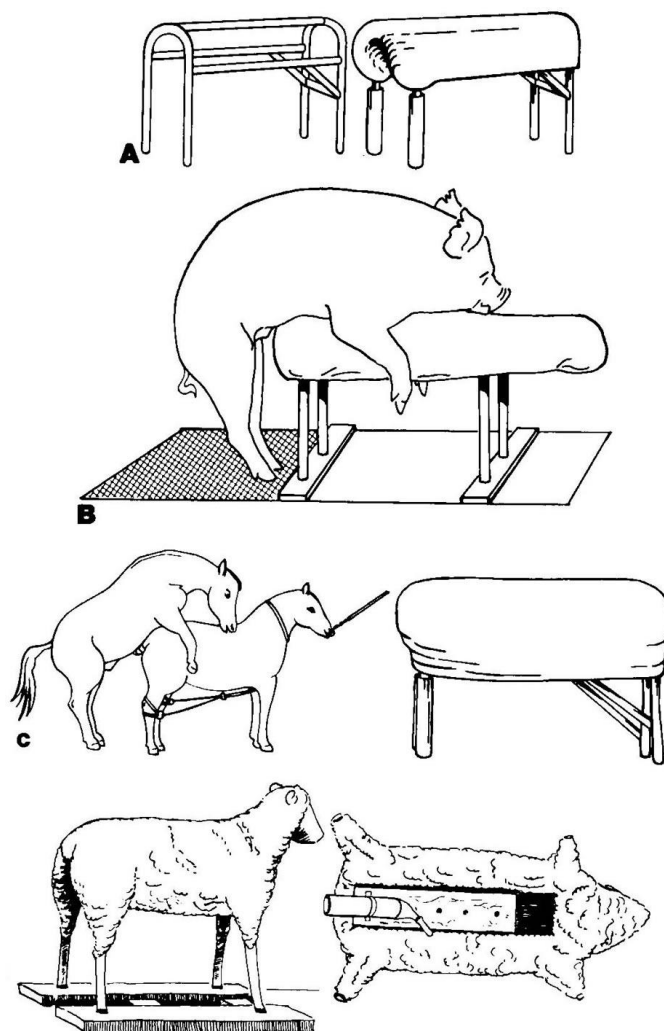


图 9-1 假台畜

## 实验十 精液品质的检查

### 实验特点

实验类型：综合型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：1 人

### 实验目的要求

采集的精液必须进行精液品质检查，其目的在于鉴定精液品质的优劣，选优去劣加以利用，以便确定配种负担能力；同时也反映出公畜饲养管理的状况及生殖机能的状态；评价技术操作的水平；检验精液稀释、保存和运输效果。

了解精液品质检查的主要内容和项目，掌握评定精液品质的能力。在老师的指导下，要求学生自己动手完成实验。

### 实验原理

精液的品质可通过外观评定、显微评定和生化方法检测出。检查精液的项目，一般可分为常规检查项目和定期检查项目两大类。常规检查项目有：射精量、颜色、气味、pH 值、精子活率、精子活力、精子密度等。定期检查项目有：精子计数、精子形态、精子存活时间及精子指数、精子死活率、精子微生物污染、精子代谢等。

精液的指标与受精力呈一定相关，如：精子活率、密度、形态、存活时间、pH 值、精液细菌菌落数和精子代谢能力等，而且它们之间也存在高度相关性。

### 实验仪器设备

显微镜及保温箱、载玻片及盖玻片、精液样本、小吸管、记数器、5%伊红水溶液、10%苯胺黑水溶液。

### 实验内容步骤

1、表观检查，精液采出后，立即进行直观检查。

(1)射精量：牛3-10ml，猪150-500ml，羊0.5-2ml，马30-200ml，鸡的射精量：肉用型公鸡的射精量平均为0.3-0.4ml，蛋用型公鸡的射精量平均为0.2-0.3ml，公兔的射精量为0.4-6ml。

(2)色泽：牛、羊的精液为乳白色，马、猪精液量大而呈乳白或灰白色。粉红色则混有血液，琥珀色则混有尿液。

(3)气味：无味或略带腥味。良好的牛、羊精液可观察到呈云雾状翻腾。按以下符号记入表内，云雾状显著者以“+++”表示；有云雾状以“++”表示，云雾不明显以“+”表示。

## 2、精子密度评定

### (1)估测法

材料：显微镜及保温箱，载玻片及盖玻片，精液样本，小吸管，计数器，5%伊红水溶液，10%苯胺黑水溶液。

方法：

①密度：将显微镜保温箱调节至37-38℃。取一小滴精液于清洁载玻片上，加上盖片，使精液分散成均匀一薄层，但不得有气泡。也不能使精液外流，或溢在盖玻片上，置于400-600倍显微镜下，按下列等级评定其密度。

密：在整个视野中精子密度很大。彼此之间很少有空隙，看不清楚各精子运动情况。此属为“密”，每毫升约含精子数在10亿以上。

中：精子之间空隙明显，精子彼此之间的距离约有一个精子的长度。有些精子活动情况可以清楚地看到，这种精液的密度评为“中”每毫升含精子数约在2-10亿之间。

稀：精子分散，精子彼此之间的距离超过一个精子的长度。这种情况每毫升精液中含精子数约在2亿以下。

### ②血球计算板测定精子密度

材料：显微镜、血球吸管、血球计算板、计数器、纱布、95%酒精、蒸馏水、3%NaCl溶液、精液样本。

方法：测定1ml精液内的精子数目。

用红血球吸管准确吸取牛羊精液至刻度0.5处，用纱布擦去管端附着的精液，然后将此精液吸至膨大部。吸入3%NaCl溶液至刻度101处，充分摇动，混合均匀，弃去管内最初几滴。将盖片推在计算室上，滴入一滴稀释的精液(待其自行进入计算室内)，滴加精液时防止过多或过少，亦不使计算室产生气泡，将计算板置于显微镜下，放大400-600倍计算。计算室是底面边长为1cm，高0.1cm，其体积为0.1cm<sup>3</sup>。有25个大方格，每个大方格内有16个小方格，故整个计算室有400个小方格，计算精子数，只需数出5个大方格的精子数，而后推算1ml内的精子数，计算时只数格内的精子或精子头压在格上线或左线的精子数，而下线和右线的精子不计入在内，如简化计算可将5个大方格内的精子数乘以10<sup>7</sup>即为公牛、公羊的精子密度，如用白血球吸管计算公马、公猪的精子密度，则将5大格精子数乘以10<sup>6</sup>即可。

血球吸管的洗涤：弃掉管内的残留精液，以蒸馏水冲洗2-3次，以酒精冲洗2-3次，再以乙醚冲洗，然后用打气球打入空气，直至乙醚完全挥发为止，检查精液管是否清洁干燥，可根据管内有无水珠和膨大内部小球有无粘附现象而定。

表10-1精液稀释倍数

精液	吸管种类	吸取时所达到的刻度		稀释倍数
		精液	3%NaCl	
公牛	红血球吸管	0.5	101	200
公羊		1	101	100
公猪	白血球吸管	0.5	11	20
公马		1	11	10

### 3、精子活力测定

若用保温装置即将显微镜保温箱或保温调节台调节至37-38℃。在室温18-25℃下，取一滴精液于载玻片上加上盖玻片，置显微镜下检查精子运动状况，并估算前进运动精子占整个视野内精子的百分数。如全部精子呈直线前进运动为1.0级，而其中90%的精子呈直线前进运动，则评为0.9级，依此类推。

十级制评定适用于各种家畜。牛、羊精子密度大可稀释后评定。公鸡的精液稀释液用0.75%的生理盐水稀释后，再评定。

精子活率 = 直线前进的精子数 / 总精子数

### 4、死活精子百分率的测定

(1)伊红法：取精液和0.5%伊红溶液各一滴置于清洁载玻片一端，迅速混合均匀，制成抹片。在400-600倍镜下观察，活精子透明不着色，于不同视野中随机查数着色和不着色的精子共500个，即可算出着色精子的百分率。

(2)伊红-苯胺黑法：取1滴精液置于载玻片一端，再滴加1滴5%伊红（水溶液）溶液，迅速混匀后，再加两滴1%苯胺黑（或苯胺兰）再迅速混匀，随即制作抹片，自然干燥后，于显微镜下观察。

死活精子率一般只作原精液保存精液的检查。要求抹片操作时的温度以35-37℃为宜。制片要快，混合要匀，又不能影响镜子的活率。观察抹片应在24h内进行，才能使评定结果准确。镜检时，精子头部呈透明无色的，死精子由于染液渗入细胞质，精子染为粉红色。精子死亡时间越长，它的着色越深。数500个精子，分别数出死、活精子各占的百分数。

### 5、精子畸形率的测定

动物精液中出现形态不正常的精子，称为畸形精子。精子畸形率指精液畸形精子占精子总数的百分率。畸形精子有各种各样，按其精子形态结构一般可分为三类：头部畸形，如缺损、巨大、瘦小、膨胀、细、圆形、梨型、双头轮廓不清等；颈部畸形，如粗大、纤细、曲折、断裂、双颈等；尾部畸形如粗大、纤细、短尾、长尾、双尾、无尾、弯曲、曲折、回旋等；有的精子带有原生质滴的是发育未成熟精子标志，但也列入畸形精子之列。在正常精液内，一般精子头部和颈部出现畸形较少，而其尾部畸形最为多见。此外在精液中还可看到一些不是精子的有形成分。如白细胞、红细胞、脱落的原生质滴、退化的精子细胞团块、多核巨形细胞等，这些成分可反应睾丸和排出管道的某些机能障



碍。

精液抹片的制备：

以毛吸管取精液一滴于洁净载玻片B之一端，另一载玻片A以30°角自B片另一端拖向该滴精液，待其边缘与精液充分接触后，向相反方向推去，如此即成为均匀的精液抹片，抹片不宜太厚，牛、羊精液可预先在载玻片上滴加生理盐水稀释。

抹片自然干燥后，以0.5%的龙胆紫酒精溶液，染色3分钟。

以流水缓缓冲去染料，待干燥后即可镜检。畸形精子过多，影响受精率，公牛畸形精子一般不应超过18%，公羊不应超过14%，公猪不应超过15%，公马不应超过15-30%。

畸形率计算：

将抹片置显微镜下(400-600X)检查500个精子，计算其中畸形精子所占百分数。

## 注意事项

注意精液在检查时，温度不要过低，防止精子遭到低温打击。

## 结果计算

活精子的百分数 = 活精子数/500（即死活精子总数）

1ml 精子数目 = 80 个小方格精子数 × 400 × 稀释倍数 × 10 × 1000/80

精子畸形率 = 畸形精子数/计算的精子总数（正常+畸形）

## 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和实验结果并分析。

# 实验十一 精子顶体完整率的测定

## 实验特点

实验类型：综合型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：1 人

## 实验目的要求

要求学生掌握精子顶体完整率测定的原理和方法。

## 实验原理

精子顶体异常率指精液中顶体异常的精子数占精子总数的百分率。精子顶体能释放蛋白质分解酶，所以在受精的过程中起着重要的作用，顶体的完整与否和受胎率有着密切的关系。精子经固定和姬姆萨染色后，顶体是否正常在 1000 倍光镜下均能观察到。顶体异常，一般表现为顶体膨胀、缺损、部分脱落、全部脱落等情况，其发生原因，可能与精子生成过程和副性腺分泌物性状不良有关，尤其是离体精子遭受低温打击和冷冻伤害等因素所造成的。因此精子顶体异常率时评定液态或冷冻精液品质检查的重要指标之一，各种家畜正常精液中精子顶体异常率。如果顶体异常率显著增加，例如牛超过 14% 以上，猪超过 4.3% 以上，就会直接影响受胎率。

## 实验材料设备

1、器材:载玻片、三角烧杯、玻璃漏斗、细玻璃棒、滴管、100ml容量瓶、25ml量筒、5ml、10ml刻度细管、生物显微镜(带油镜)、计数器、扭力天平、镊子、平皿、玻璃研皿、洗染架。

2、药品:姬姆萨染料、甘油(A.R)、碳酸镁(A.R)、甲醇(G.R)、 $\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (A.R)、 $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (A.R)、氯化钠(A.R)、二甲苯、香柏油、蒸馏水、中性树脂等。

## 实验步骤

### 1、载玻片的清洗

载玻片用时必须清洁，否则会影响涂片染色效果。

### 2、涂片

冷冻精液解冻后，用细滴管吸一滴精液，滴在载玻片的一端，用薄盖片推片，要求推得薄，而且均匀。

### 3、风干

4、自然风干，5分钟左右。

### 5、固定

风干后的涂片，平放在染色架上，用滴管吸固定液用固定液（24h前配好6.8%重铬酸钾液，临用时以8份6.8%重铬酸钾液和2份福尔马林液混合），使固定液由载玻片的一端，缓缓流动，直至铺满整个载玻片，静止15分钟。

### 6、水洗

静止15分钟后，用镊子夹住片子的一端将固定液弃去（残液倒入废液缸），在蒸馏水中冲洗3次凉干。

### 7、染片

每张片子需用2ml染液（染液的配制：姬姆萨原液20%，缓冲液30%，蒸馏水50%）。用滴管吸取染液，滴在涂片上，使整个染片铺满染液，染色90分钟。（该染液现用现配，配好即用）。

### 8、洗片

90分钟后，将涂片上的染液倒入残液缸内，用镊子夹住染片，用装有蒸馏水的洗瓶，缓缓冲洗，直至流水不变兰色，凉干待检，然后树脂封装制成标本。

### 9、镜检

置于高倍显微镜下（1000倍以上）或相差显微镜下观察。观察200个以上精子中顶体异常数，计算出精子顶体异常率。

## 实验结果

在油镜下数一百个精子，计算正常的或变态的精子占精子的百分数。

正常顶体：整个精子外形正常，轮廓清晰，顶体形态正常，各层膜清晰可见。

疏松顶体：精子外形正常，轮廓清晰，顶体形态正常，但电子密度下降，属正常精子

顶体半脱：顶体开始脱落，但顶体内膜的某些部分仍和核膜连接着。

顶体微胀：精子顶外形基本正常，顶体轻度膨胀，顶体层疏松，但尚均匀，电子密度下降。

顶体膨胀：顶体严重膨胀，表面凹凸不平，膜和顶体层都相当疏松。

顶体全脱：顶体全部脱落，只剩下光秃的头部，核膜（有时有顶体内膜）一般清晰可见。

## 注意事项

凡已稀释过的精液（含有卵黄、甘油的），必须将样品在含有 2%甲醛的柠檬酸盐中固定，涂片后在 37℃下干燥，才能有利染色着色和观察清晰。此外要求冷冻精液解冻后，应以 37℃中孵育 3h 为准，进行制片观测。各种家畜正常精液中精子顶体异常率，如果顶体异常率显著增加，牛超过 14%以上，猪超过 4.3%以上，就会直接影响受胎率。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和实验结果并分析。

## 实验十二 精子蛋白酶的测定

### 实验特点

实验类型：设计型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：3-4 人

### 实验目的要求

要求学生掌握精子蛋白酶的测定方法。

### 实验原理

精子含有代谢活动所需的各种酶，精子顶体除含有透明质酸酶外，还有顶体素，它是一种与膜蛋白酶相似的酶，能消化卵子的透明带，还有穿入放射冠的酶，能消化卵子周围放射冠细胞(颗粒细胞)之间的凝固物，这些酶和受精密切相关。这些酶类能够消化明胶蛋白，间接地反映酶的存在和活性强弱。

### 实验仪器设备

新鲜精液、明胶蛋白、保温箱、载玻片、盖玻片、100ml 烧杯、滴管、显微镜。

### 实验内容步骤

- 1、5%明胶蛋白，放入100ml烧杯中，融化均匀。
- 2、用镊子夹紧载片的一端，垂直插入5%明胶蛋白的烧杯中，停留一秒钟后迅速提起，然后仍垂直放置，待明胶蛋白自然干燥后待用。
- 3、取新鲜精液一小滴，滴在涂有 5%明胶蛋白干后的载玻片上，用盖片进行涂片，将此片在 37℃保温箱中放置 24 小时后观察其结果。若精子含有顶体蛋白酶，则在每一精子周围出现空圈。

### 注意事项

注意温度变化，防止精子遭受低温打击而死亡。

## 实验结果

精子所含顶体蛋白酶越多则所形成的空圈直径越大，反之则越小，根据圆圈直径大小可判定精子顶体蛋白酶的活性强弱。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和实验结果并分析。

## 实验十三 人工输精

### 实验特点

实验类型：综合型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：3-4 人

### 实验目的要求

了解输精过程，初步掌握各种家畜的输精方法。

### 实验原理

人工输精是将一定量的合格精液，适时而准确地输入到发情母畜的生殖道内适当部位，以达到妊娠为目的操作技术。这是家畜人工授精的最后一个环节，有时保证获得较高的受胎率的关键。在输精操作技术中应严格遵守家畜人工授精技术规程，增强无菌观念，积极采取各种措施，提高家畜人工授精的受胎率。

### 实验仪器设备

输精器械：阴道开张器、酒精灯、电筒、润滑剂（液体石蜡）、95%酒精、75%酒精、棉球、纱布、精液、稀释液。

### 实验内容步骤

#### 1、母牛的输精

##### (1)直肠把握子宫颈输精法：

术者着胶皮围裙，胶靴，左手戴长臂乳胶或塑料薄膜手套，母牛只需拴系头部，一般不用再加保定。术者左臂用水或肥皂沾湿，伸入母牛直肠，排出宿粪，并以手臂压按外阴部，迫使阴门开张。右手持输精器由阴门插入，先向上斜插，避开尿道口，而后再平插直至子宫颈口。以左手四指隔直肠壁把持子宫颈（约8cm，有软骨性感触），将输精管前端深入到接近颈管内口处（此时插入深度大约6-7cm）即可，随着注出精液后，抽出输精枪。

##### (2)阴道开张法输精：

阴道开张器的温度应为25-30℃，涂抹少量的液体石蜡，然后右手用阴道开张器将阴道打开，利用光线找到子宫颈口，将事先吸有精液的输精器的尖端插入子宫颈口内 1-2cm

深处，徐徐注入精液。如遇母牛的子宫颈不正或畸形时，则须特别操作，不得强行输精。母牛的输精量一般为1ml。输精后，为防止母牛横背而使精液倒流。可捏其背脊，稍停片刻，缓步将牛牵回牛舍。

## 2、母猪的输精

(1)母猪的外阴部及输精器具消毒。

(2)将输精管慢慢插入阴道内，直达子宫颈口处，由于子宫颈折壁阻碍，此时可将输精管左右捻转向前移动，稍加用力即可插入子宫颈口，插入深度为30-35cm，将输精器里的精液徐徐注入，随即精液流入子宫。

在输精时，若母猪不安定，可以滴数滴精液于母猪鼻端。如果输精管前端紧贴子宫颈粘膜，精液就会倒流或注入困难。遇到这种情况，应将输精管左右活动或稍微改变一下位置，即能顺利输精，输精完毕，缓缓抽出输精管，并用手掌拍击母猪的背部，以防精液倒流。

## 3、鸡的输精

精液可稀释1:3-4倍，最大可稀释10倍。每周输精一次，原精液剂量为0.025-0.03ml(约含精子0.5-1亿)即可获得高受精率。输精时间应在每天产完蛋的下午4点以后进行。

输精时由两人操作，一人用左手握住母鸡大腿基部将其保定，右手拇指和其余四指分别放在泄殖腔口下面，施以压力，使阴道口由泄殖腔内左侧翻出。另一个用1ml注射器吸取精液，插入阴道3cm，将精液慢慢注入，此时握鸡者配合精液注入慢慢松手，以免精液溢出。

如为笼养种母鸡输精时，则一人用左手伸入笼内抓住母鸡双腿，托至笼门口，右手拇指与其手指跨在泄殖腔柔软部分上，施巧力压向腹部，同时握两腿的左手，一面向后微拉，一面用中指和食指在胸骨处稍加压力，泄殖腔立即翻出阴道口，另一人立即输精。

输精器除常规的注射器外，还可使用无毒塑料输精管，每输一只母鸡应换一个塑料管。输精母鸡需在产蛋期间，每周重复输精一次，可保证高的受精率。

## 4. 兔的输精

兔的输精一般采用阴道深部直接输精法，输精器由1-2ml注射器，前端连接长10cm，直径2-3mm良质的胶管，也可用人的导尿管。

输精时由1人保定母兔，保定者将母兔仰卧轻夹在两膝间，两手分别握一后肢，并使分开，待母兔安静之后，输精者将输精器的导管，缓缓插入阴道深部约7-8cm，相当于子宫颈部位，然后缓缓注入精液，使其流入两个子宫颈口中。

母兔的输精量为0.25-1ml(稀释精液)为宜。每次输入精子数通常为1亿左右。

## 注意事项

在实验中要注意无菌操作。在输精枪插入时要注意方向的变化，防止伤及子宫。



## 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和实验结果并分析。

## 实验十四 精液稀释液的配制及其 pH 值测定

### 实验特点

实验类型：综合型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：3-4 人

### 实验目的要求

学会精液稀释液的一般配制方法和各种稀释剂的作用，掌握配制过程中消毒基本概念，了解 pH 值测定的操作方法。

### 实验原理

稀释液的种类，依据稀释液的用途和性质，可将其分为以下四类：

现用稀释液：适用采集的鲜精液经稀释后立即输精。此类稀释液常以等渗糖类或奶类，也可用生理盐水。

常温保存稀释液：适用于室内短期常温保存，具有 pH 值较低的特点，也有用含明胶的稀释液。

低温保存稀释液：适用于精液低温保存，其成分较复杂，除含有糖类、卵黄外，还有甘油或甲基亚砷等抗冻害物质。

精液稀释是往精液中加入适宜精子体外存活，并保持精子能力的一定量稀释保护液。只有经过稀释的精液，才适于保存、运输及输精等。精液稀释的目的，在于扩大精液的容量，延长精子的存活时间，增强受精能力，增加受配母畜头数，充分提高优良种公畜配种效率。

pH 值高低对精液品质有一定的影响，pH 值偏低的精液品质好，pH 值偏高的精液其精子生活力、受精力及保存效果等明显降低。因此测定稀释液的 pH 值，对精液保存有很重要的作用。

### 实验仪器设备

药品：葡萄糖、蔗糖、柠檬酸钠、抗菌素(青、链霉素)、双蒸水、鸡蛋、甘油等。

玻璃器材及其他用品：100ml 量筒、100ml 三角烧瓶、玻璃漏斗、1ml 注射器、10ml 注射器、滤纸、天平、消毒锅、酒精棉球、pH 酸度计。

## 实验内容步骤

精液稀释液的种类很多，但选择何种稀释液配方，应根据动物的种类、不同个体、保存方法、应用效果以及配方成分是否容易得到而定。一般现用现配。

### 1、各种成分的准备

蒸馏水：应现用现制或应用灭菌蒸馏水，最好采用灭菌的双蒸水。若无蒸馏水，也可用离子交换水或冷却沸水代替。

化学药品：所用糖类和盐类等物质，一般应采用化学分析纯的药品，配制时称量要准确。

奶类：奶类（包括全奶和脱脂奶、纯奶粉或脱脂奶等）必须是新鲜的，不含其它物质如糖、果汁、微量元素或其他添加剂等。将一定量的鲜奶或充分的奶粉溶液，经过滤后，再置于 92-95℃ 的水中进行 10min 灭菌，取出降温去奶皮后备用。

卵黄：取卵黄方法，是用最新鲜的鸡蛋，先将外壳洗净擦干，再用 75% 酒精消毒外壳，待酒精挥发后，轻轻破壳，尽量除去蛋清，再用灭菌注射器刺破卵黄，或者将卵黄倾倒入灭菌的滤纸或玻璃平皿内，以灭菌镊子挑破卵黄膜，轻轻倾出卵黄入灭菌量杯内，但注意不可混入蛋清和卵黄膜。

抗生素：常用抗生素为青霉素钾盐和双氢链霉素。抗生素必须在灭菌稀释液冷却后方可加入，氨苯磺胺也是一种常用的抗菌物质，将其溶于少量蒸馏水中（用量要计入总量），单独加热至 80℃，待完全溶解后加入稀释液内。一般用量为每毫升稀释液内加入青霉素 500-1000IU、链霉素 500-1000mg，氨苯磺胺的用量占稀释液的 0.3%。

### 2、具体配制方法

(1) 配制稀释液，把所用的器材按要求清洗好，且灭菌备用。

(2) 按配方准确地称量好药品，放入烧杯中，量出 100ml 双蒸水加入烧杯中，充分搅拌使其全部溶解。

(3) 用滤纸过滤到三角烧瓶中，封口，水浴消毒 30 分钟。

(4) 消毒后凉至室温，以备加卵黄与抗菌素。

(5) 新鲜鸡蛋清洗好，蛋皮用酒精棉球擦拭消毒，破壳取出卵黄，要求卵黄要完整，刺破卵黄膜，按配方所需量准确吸出卵黄加入冷却后的溶液中。

(6) 加抗菌素，每 100ml 稀释液中，应加青霉素，链霉素各 5-10 万单位。

(7) 稀释保护液要现用现配，亦可配后放入 4-5℃ 冰箱中备用，但不应超过一周。

### 3、测定 pH 值：PH 计的使用

(1) 轻轻安装电极，使玻璃电极略高于甘汞电极，以防损坏。玻璃电极膜浸入液体以淹没球部 1/2 为度。

(2) 接上电源，打开开关，指示灯亮后，预热 5 分钟。

(3) 调节温度补偿器与测定液或室温温度相同。

- (4) 将电极浸入盛有已知pH值的缓冲液中，注意试液杯应尽量靠近甘汞电极一边。
- (5) 根据预测的范围调节最终需要栏。
- (6) 旋转“零”点调节器，指针在需要处。
- (7) 按下读数开关，指针偏动，调节“定位调节器”的指针，使指针恰在缓冲液的已知pH值处重复校正至读数不变为止。
- (8) 用蒸馏水洗涤电极，用滤纸吸干。
- (9) 换上待测溶液，轻轻转动，使电极与溶液接触均匀。
- (10) 按下读数开关，指针所指的数值为待测的pH值。重复几次直至都不变为准。
- (11) 将电极清洗干净，蒸馏水冲洗后浸于蒸馏水中(甘汞电极把皮套套上，不泡水)，待用。
- (12) 关闭电源。

精子一般在pH约7.0时最为活泼，而且存活最大，在高于或低于最适pH时，活力会相当快地降低，因此配制后的稀释液pH值应接近精液的pH值。

目前，有不同型号的pH测定仪，其测定方法也不一样，希望同学们具体掌握。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和实验结果并分析。

## 附：家畜稀释液配方

种公牛稀释液配方(冷冻液配方)：

① 8% 葡萄糖溶液	75ml
卵黄	20ml
甘油	5ml
青霉素	1000 IU/ml
链霉素	1000 $\mu$ g /ml
② 12%蔗糖溶液	75ml
卵黄	20ml
甘油	5ml

抗菌素同上。

解冻液配方：

① 柠檬酸钠	29g
双蒸水	100ml
② 柠檬酸钠	1.4g
葡萄糖	10g

双蒸水 100ml

公猪精液稀释液配方：

①鲜精稀释液的配制

蔗糖 5.0g

奶粉 45g

双蒸水 100ml

②冷冻精液稀释液的配制

8% 葡萄糖溶液 77ml

卵黄 20ml

甘油 3ml

青链霉素 500-1000IU/ml

解冻液的配制

葡萄糖 5g

蒸馏水(双蒸水) 100 ml

绵羊精液稀释液的配制：

①鲜精稀释液的配制

葡萄糖 3g

柠檬酸钠 1.4g

卵黄 20ml

双蒸水 100ml

加抗菌素同牛的配制。

②冷冻精液稀释液的配制

I { 葡萄糖 3.0g  
柠檬酸钠 3.0g  
双蒸水 100ml

II { 取 I 液 80ml  
加卵黄 20ml

取 II 液 44ml

加甘油 6ml

加抗菌素 500-1000IU/ml

公兔精液稀释液的配制：

7% 葡萄糖溶液，1%氯化钠溶液，11%蔗糖溶液，10%奶粉等，配制好后灭菌，按例加抗菌素。

精液稀释液一般以1:3-5倍稀释。保存温度为0-5℃。

公鸡精液稀释液配方：

1%氯化钠溶液，5.7%葡萄糖溶液，卵黄-葡萄糖液，每100ml含新鲜卵黄1.5ml，葡萄

糖溶液425g。配制后灭菌，加抗菌素。

表14-1各种家畜精液的pH值

家畜种类	PH值
马	7.0-7.8
牛	6.5-7.5
羊	6.2-6.8
猪	6.8-7.2

## 实验十五 精液的冷冻保存

### 实验特点

实验类型：综合型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：2 学时

每组人数：3-4 人

### 实验目的要求

精子具有受温度变化直接影响本身活力和代谢能力的生物学特性。利用这一特性，将精液特殊处理后，保存在超低温下，此时精子代谢活动完全受到抑制，停止能量消耗，处于生命静止状态，长期保存下来。一旦升温，精子又能复苏并维持其原来的受精能力。要求同学们了解精液冷冻保存的技术操作过程和精液冷冻保存原理，初步学会冷冻保存方法。

### 实验原理

冰晶化是水在降温过程中的一定温度下，水分子重新按几何图形排列形成冰晶。冰晶可造成精细胞（精子）内外的溶质浓度和渗透压增高，引起细胞内脱水、原生质变干、酸碱度失去平衡、细胞膜和顶体以及整个组织和结构破坏等致死性伤害，最后导致精子发生不可逆的变化而死亡。一般精液内含 85-95% 的水分，精子内也含有少量的水分，这些水分在降温过程中在 -0.6—-60℃ 温度区内缓慢降温能形成冰晶。降温速率越慢，所形成的冰晶越大，其中特别以 -15—-25℃ 时冰晶形成最多。在冷冻精液过程中只有避开这个有害温度区，才能得以长期保存。

快速升降温度的办法，难以达到完全玻璃化冻结条件。为此，在制作冷冻精液的稀释液内，要加入一定量的甘油等抗冻害物质。甘油具有极强的亲水性，可限制水分子形成冰晶而处于过冷状态，降低水形成冰晶的温度，即缩小精子的有害温度的上限。此外，甘油容易渗透入精子内，可降低渗透压改变的不良影响，并起到营养作用等，增强精子的抗冻害能力和无冻害生存环境。精液在冷冻过程中不可避免地要形成冰晶，精子能否生存的关键在于冰晶的大小，冰晶越大对精液伤害越大，反之冰晶越小，伤害越小甚至无损伤。因此，只要避免大冰晶形成，并使精子稳定在微晶的状态下，一旦升温精子又能复苏并维持其原来的受精能力。

## 实验材料和仪器

精液、2.9%的柠檬酸钠溶液、50-100ml 烧杯、滴管、10ml 试管、低温温度计、20-80 目沙网、漏勺、灭菌纱布袋、液 N 罐、液 N、载玻片、盖片、显微镜、保温箱。

## 实验内容步骤

### 1、配制稀释液注意事项

配制稀释液所用的一切量具及物品，事先均应彻底清洗、严格消毒。精液稀释液必须新鲜，为此应现用现配。如有条件，可将灭菌的稀释液置入冰箱内保存数日。但卵黄、抗生素、奶类等成分应在临用时加入。

精液的适宜稀释倍数与家畜种类及稀释液种类有密切关系。确定精液的适宜稀释倍数应取决于：家畜精液的质量、输精的要求、稀释液种类及其对精子存活时间的检测结果等。家畜精液的一般稀释倍数，见下表。

表 15-1 家畜精液的稀释倍数

畜种	稀释倍数	输精量 (ml)	有效精子数 (亿)
乳牛、肉牛	540	0.2-1	0.1-0.5
水牛	5-20	0.2-1	0.1-0.5
马	2-3	15-30	2.5-5
驴	2-3	15-20	2-5
绵羊	2-4	0.05-0.2	0.3-0.5
猪	2-4	20-50	20-50

精液稀释应在采精后尽快进行，不经稀释的精液不利于精子存活。特别是精液处理室温度较低时（20℃以下），精子受低温打击，已出现冷休克，一般最好在 0.5h 内稀释。稀释前，必须调整稀释液的温度与精液温度一致。一般是将精液和稀释液处于同一温度（30℃左右）条件下，待预热后进行稀释。

稀释方法是按确定的稀释倍数，将一定量的稀释液沿瓶壁或沿插入的灭菌玻璃棒，缓慢倾入精液瓶内，轻轻搅匀，勿剧烈震荡。若稀释倍数大，应先低倍后高倍，分几次进行稀释。以防精子环境突然改变，造成稀释打击。

2、降温平衡 稀释后的精液，采用逐渐降温法，在4-8小时内，使稀释的温度降到4-5℃，然后置 4-5℃的冰箱内平衡2-4小时。平衡后的精子活力不低于0.6。

3、精液容器与液氮面的距离应保持1-1.5cm，初冻温度-80--120℃为宜。

4、把平衡后的精液从冰箱中取出，轻轻地摇动容器，使上下层精子均匀，用滴管吸取精液在沙网上滴注，每毫升滴注10粒，约2-3分钟颗粒冻结(为缩短时间，可两人同时操作)，随即收集冻精颗粒装入注有标记的纱布袋中，然后快速移入冷冻精液贮存罐中贮存。滴冻时，为了防止温度回升，应时刻注意调整纱网与液氮面的距离。



#### 5、解冻

解冻液是再次稀释冷冻精液的稀释液，常用的解冻液是2.9%的柠檬酸钠溶液和生理盐水，解冻液应事先配制好并灭菌保存在-5℃的冰箱中，在此环境中可贮存3、4天或一周，若在室温中，应现用现配。

解冻时，取1ml解冻液放入消毒的试管中，并置于40℃的温水中，解冻液的温度须达到39-40℃，取0.1ml剂量的颗粒精液一粒，立即投入试管中，摇动10秒钟，进行制片，置38℃显微镜保温箱中，镜检，活力达0.3以上者即可用于授精，并长期贮存备用。

### 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和实验结果并分析。

## 实验十六 阴道涂片检查

### 实验特点

实验类型：设计型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：4 学时

每组人数：1 人

### 实验目的要求

初步掌握小鼠阴道涂片操作方法，学会通过观察涂片的细胞学形态，推测卵巢机能和发情周期性的变化。

### 实验原理

小白鼠为多周期发情动物。雌性小白鼠在性成熟后，通常进行周期性排卵，卵巢中卵泡发育的各阶段与阴道上皮的周期变化紧密相关，即卵巢激素的变化导致阴道上皮细胞的典型变化。在啮齿类动物随性周期的不同阶段，阴道粘膜细胞形态发生比较典型的变化，因此，根据粘膜细胞发生的变化和细胞组合可判断啮齿类动物性周期的状态和卵巢的功能性变化。

### 实验仪器设备

性成熟雌性小白鼠若干只、脱脂棉、载玻片、甲醛、姬姆萨染液、生理盐水、染色缸、火柴杆、显微镜。

### 实验内容步骤

- (1) 用左手拇指和食指固定小白鼠的颈部，将小鼠倒放在手掌上，用小拇指固定其尾巴，然后用缠有脱脂棉的火柴杆，先用生理盐水润湿，再插入小鼠阴道中。
  - (2) 在载玻片中央滴一滴生理盐水，然后将取出的阴道分泌物均匀的涂在载玻片上。
  - (3) 涂片自然干燥后，用甲醇固定2-3分钟。
  - (4) 用姬姆萨染液(双蒸水与原液1:1)经过5-6分钟染色，然后用水轻轻冲洗，水洗后自然干燥，待检。
  - (5) 在显微镜下观察阴道涂片的组织学变化，并绘图。
- 小白鼠性周期4-5天，发情持续时间大约9-12小时或20小时，排卵是在发情开始后

2-3小时。

要求，对其中一小白鼠每隔1天做一次阴道涂片观察，共做3-4次，并绘图。推测卵巢发育阶段及其周期时间。

## 附：小鼠发情周期阴道细胞变化

### 1、发情前期

阴道涂片中有核上皮细胞占优势，它们有的是单个的，有的呈片状，并有少量白细胞。

### 2、发情期

涂片中有很多无核的角化鳞状细胞，细胞大而偏平，边缘不整齐，视野中看不到或很少白细胞与上皮细胞。（此时小鼠接受交配，卵巢上滤泡生长迅速，持续9-15小时）。

### 3、发情后期

阴道腔内角化上皮细胞减少，出现许多白细胞及有核上皮细胞（此时卵巢出现黄体与小滤泡。此时小鼠不接受交配，持续10-14小时）。

### 4、间情期

小鼠阴道粘膜薄，白细胞粘膜内游离出来，使阴道涂片中几乎全是白细胞。（卵巢上黄体开始功能性退化，此时持续 60-70 小时）。

## 注意事项

操作活动要轻柔，以免小鼠应激太强，影响实验结果。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，写出实验过程和实验结果并分析。

## 实验十七 牛体外受精 (IVF)

### 实验特点

实验类型：综合型实验

实验类别：专业基础课

计划学时：6 学时

每组人数：5 人

### 实验目的要求

通过实验使学生掌握卵巢收集、采卵、检卵、卵子体外成熟、精子获能、体外受精和胚胎培养的全部操作过程，加深体外受精理论的认识和理解。要求学生全面掌握室内无菌操作的规程，作到不污染，能够在老师的指导下独立操作。

### 实验原理

IVF 是体外受精 (in vitro fertilization) 的英文缩写，精卵结合谓之受精，模拟体内情况在培养皿中进行的受精过程叫体外受精。刚排出的卵子或体外受精的卵子处于 M<sub>I</sub> 期的卵子，在培养液中可以培养成熟，使之处于输卵管内卵子受精前的状态。排出的精子必须经过体外获能培养具备受精能力，获能的精子和体外成熟的卵子可在受精液中体外完成受精过程，形成受精卵。受精卵在胚胎培养液中进一步卵裂发育，形成可移植胚胎。

### 实验仪器设备

无菌室、离心机、CO<sub>2</sub>培养箱、酸度计、蒸馏仪、纯水仪、灭菌干燥箱、超净工作台、解剖显微镜、相差显微镜、电子天平、微量移液器、冰箱、冰柜。

### 实验内容步骤

牛体外胚胎生产由以下步骤组成：体外受精所需试液的制备、卵母细胞获得、卵母细胞成熟、精子获能、卵母细胞受精、体外胚胎培养。

#### 1、体外受精所需试液的制备

##### (1)卵母细胞清洗液前体 (TLH) (mg/L)

TLH(mg/L) : NaCl:6660 , KCl:240 , NaHCO<sub>3</sub>:168 , NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> :40.8 , \*CaCl<sub>2</sub> •2H<sub>2</sub> O:300, \*MgCl<sub>2</sub> •6 H<sub>2</sub> O:100, HEPES:2400, phenol red:10, Na lactate

(60% syrup): 1426 $\mu$ L。

上述化学药品溶于蒸馏水中，再加入  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :300 和  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶解。然后用 1.0N 的 NaOH 将 pH 值调整到 7.4，负压通过 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤到无菌锥形瓶中，分装在无菌瓶中，-20℃ 冷冻保存。需要时解冻，可在 4℃ 下保存 2 周。使用时加入 10% 的犊牛血清白蛋白 (FCS)，22mg/ml 的丙酮酸和 50 $\mu$ l/L 的青霉素。

#### (2) 受精液前体的制备 TL STOCK (mg/1L)

TL STOCK(mg/1L):NaCl:6660, KCl:235,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :300,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :100,  $\text{NaHCO}_3$ :2104,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :41, phenol red:10, Na lactate(60%):1426 $\mu$ L。(密度=1.31g/mL)

上述化学药品溶于蒸馏水中，再加入  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :300 和  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶解于锥形瓶中至 1000ml，分装在无菌瓶中，4℃ 下保存使用 2 周。

#### (3) 精子洗脱液前体的制备 TALP (mg/1L)

TALP (mg/1L):NaCl:5820, KCl:230,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :290,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :310,  $\text{NaHPO}_4$ :35, HEPES:2380,  $\text{NaHCO}_3$ :2090, phenol red:10, Na lactate(60% syrup):3081 $\mu$ L。

上述化学药品溶于蒸馏水中，再加入  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :300 和  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶解。然后用 1.0N 的 NaOH 将 pH 值调整到 7.4，负压通过 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤到无菌锥形瓶中，分装在无菌瓶中，-20℃ 冷冻保存。需要时解冻，可在 4℃ 下保存 2 周。

#### (4) 卵母细胞成熟液前体制备 TCM-199 Earle's

TCM-199 Earle's: Milli-Q water:900ml, TCM-199 Earle's:1 包(9.9g)。

上述化学药品溶于蒸馏水的锥形瓶中加  $\text{NaHCO}_3$ :2.2g/L 搅动至溶解，至 1000ml，负压通过 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤到无菌锥形瓶中，分装在无菌瓶中，可在 4℃ 下保存 2 周，不要冷冻保存。

#### (5) 硫酸庆大霉素

制备 50mg/ml 的硫酸庆大霉素于生理盐水中，铝纸包装避光，4℃ 下保存 1 个月。

#### (6) 丙酮酸盐或丙酮酸盐

制备 2.2g/ml 的丙酮酸盐或丙酮酸盐于生理盐水中，分装，-20℃ 下保存，使用前融化，用后，不再冷冻保存。

#### (7) 肝素

制备 1mg/ml 的肝素于生理盐水中，30 $\mu$ m 分装，铝纸包装-20℃ 冷冻保存，用前解冻。

#### (8) 雌二醇

制备 1mg/ml 雌二醇于 95%乙醇中，铝纸包装-20℃ 冷冻保存，用前解冻。

#### (9) FSH 和 LH 的准备

制剂	量	浓度
FSH	0.25mg	100 $\mu$ g/ml
BSA	12.5mg	0.5%
$\text{H}_2\text{O}$	2.5ml	

LH	2mg	10mg	1mg/ml
BSA	10mg	50mg	0.5%
H <sub>2</sub> O	2ml	10ml	

50μL 分装，冻干，-20℃冷冻保存。

#### (10)制备 1% (W/V) 丙酮酸-地衣红液

将 1g 地衣红溶于 40 ml 丙酮酸中，加入 60 ml 的蒸馏水，使用前用 whatman#1 滤膜过滤。

#### (11)卵子成熟前卵子冲洗液

总量 20ml

TLH(#3):18ml, 犊牛血清:2ml, 丙酮酸(#13):0.2ml, 庆大霉素(#11):20μL, 通过 0.22μm 滤膜过滤，保存在 30℃的水浴锅中。

#### (12)卵子成熟液

总量 10ml

TCM-199 Earle'(#6):9ml, FCS:1ml, 丙酮酸(#13):100μL, \*FSH(#17):5μg, LH(#17):50μg, 庆大霉素(#11):10μL。LH、FSH 最后加，通过 0.22μm 滤膜过滤，然后用 1μL/ml 的雌二醇在 60\*15mm 的石化皿中制备 12-15 个 50μL 的培养滴，上覆盖 9ml 的矿物油，放在 CO<sub>2</sub> 培养箱中平衡两个小时。

#### (13)受精前卵子冲洗液

总量 10ml

TLH(#3):10ml, 犊牛血清 30mg, 丙酮酸(#13):100μL, 庆大霉素(#11):10μL。

#### (14)受精液

总量 10ml

TL STOCK(#4):10ml, 犊牛血清:60mg, 丙酮酸(#13):100μL, 庆大霉素(#11):10μL, 肝素(#14):20μL。通过 0.22μm 滤膜过滤，在 60\*15mm 的石化皿中加入 12-15 个 18μL 的受精液、9ml 石化油，再在每滴中加入 30μL 受精液，放在 CO<sub>2</sub> 培养箱中平衡两个小时。

#### (15)精子清洗液

总量 10ml

TALP 液(#5):10ml, BSA 犊牛血清:60mg, 丙酮酸:1.1mg, 庆大霉素(#11):10μL。

### 2、卵母细胞的获得

#### (1)屠宰场卵巢

由屠宰场获取优良母牛的卵巢，保存在 30℃左右、0.9%的生理盐水（100000IU/L 的青霉素、100mg/L 链霉素和 250μl/L 的两性霉素 B）保温瓶中，同时选择排卵后 2-3 天的输卵管，一起运回实验室，由屠宰到卵巢进入实验室的时间不超过 4 小时。用装有 18G 针头的注射器由卵巢上 2-5mm 直径的卵泡中吸取卵母细胞和卵泡液，置于锥形试管。

#### (2)活体取卵母细胞

将 B 超主机连接一个阴道穿刺探头，穿刺针管路连接真空泵和一个收集管。操作用直肠把握的方式将探头插入阴道穹隆部，在直肠内的手将卵巢拿起，紧贴在探头所在的部位，在 B 超的屏幕上看见卵泡后，引导穿刺进针，吸取卵泡液及卵母细胞。

### (3)卵母细胞选择

选择卵丘细胞完整，形态良好的卵母细胞在卵子成熟培养液中进行成熟培养。培养条件是 39℃，5%CO<sub>2</sub>，卵母细胞在培养皿液滴内培养约 18-24h。

### 3、体外受精

将成熟卵子放入受精滴中，加入精子（体外获能液中获能处理，在体外受精过程中，要使精子获能并保持精子和卵母细胞的活力，精液一般要经离心清洗处理）。

### 4、体外培养

卵子在加有输卵管细胞的培养液中培养 7-8d 。

### 5、胚胎发育检查

将胚胎用乙醇:冰醋酸（3:1）固定 24 小时后，1%的 Lacmoid 染色，相差显微镜下观察。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，记录细胞的生长状态，分析实验结果。

## 实验十八 耳缘成纤维细胞培养

### 实验特点

实验类型：综合性实验

实验类别：专业基础课

计划学时：6 学时

每组人数：5 人

### 实验目的要求

通过实验使学生初步掌握哺乳动物细胞的原代培养与传代培养的基本操作过程，为进一步从事细胞生物学的相关实验打下基础。

### 实验原理

成纤维细胞(fibroblast)是结缔组织中最常见的细胞，由胚胎时期的间充质细胞(mesenchymal cell)分化而来。不同类型的结缔组织含成纤维细胞的数量不同。通常，疏松结缔组织中成纤维细胞的数量比同样体积的致密结缔组织中所含成纤维细胞的数量要少，分离培养成纤维细胞多以真皮等致密结缔组织为取材部位。

### 实验材料和仪器

DMEM、胰蛋白酶、PBS、L-谷氨酰胺、胎牛血清；超净工作台、CO<sub>2</sub>培养箱、倒置显微镜、台式离心机、细胞培养板。

### 实验内容步骤

#### （一）耳缘成纤维细胞原代培养

##### 1. 取材

取剃毛后的耳缘组织（1cm<sup>2</sup>），置于盛放 PBS（加双倍双抗）15ml 或者 50ml 的离心管中。

##### 2. 材料处理

（1）耳缘组织带回实验室后，用加有双抗的 PBS 冲洗后置于 3.5cm 培养皿中，用手术刀去除皮毛和骨。

（2）在盛有 PBS 的平皿中，用镊子将耳缘组织上残余的毛拔掉，反复清洗，直至 PBS 中无任何杂质为止。



(3) 将耳缘组织放入一小皿中，尽量将其剪碎，呈糊状，加入少量培养液。

### 3. 细胞培养

(1) 收集组织块转移至 15ml 离心管中，离心 1000rpm，3min。

(2) 弃去上清，以培养基重悬组织块，转移至 T-25 培养瓶中，尽量将组织块均匀分布，同时小心吸去组织块周围的培养基。

(3) 倒置培养瓶，37℃培养 6-12 h，然后翻转，加入 1.5ml 培养基。

(4) 隔日换液，约 4 日可见组织块周围有细胞爬出。

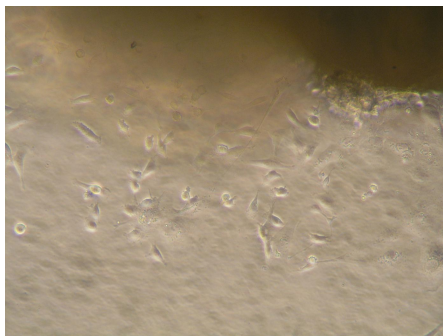


图 18-1 猪耳缘成纤维细胞原代培养 4 天

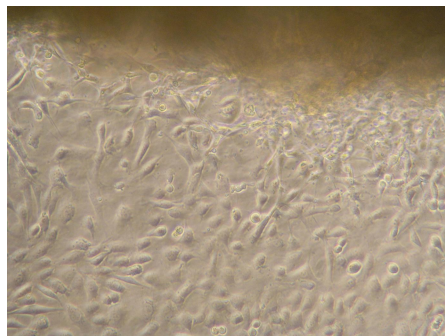


图 18-2 猪耳缘成纤维细胞原代培养 7 天

### (二) 猪耳缘成纤维细胞的传代

#### 1. 准备工作

37℃预热培养液、PBS、0.25% Trypsin-EDTA，打开超净台的紫外灯，准备离心管、培养瓶。培养液：DMEM +15%FBS+1% NEAA+1% L-Glutamine+1% 双抗。

#### 2. 传代

(1) 待细胞达到 90%以上汇合度时可以进行传代培养，吸出原瓶中的培养液，用 3 ml PBS 清洗一遍，每瓶加入 2 ml 0.25%Trypsin-EDTA，37℃条件下孵育 1.5 min，镜下观察瓶中细胞 90% 以上漂浮后用新鲜培养液终止消化，轻轻敲打皿底，将少数未完全消化下来的细胞吹打下来。

(2) 将细胞悬液移入 15 ml 离心管中，1000 rpm/min 离心 3 min，弃去上清液，用新鲜培养液重新悬浮沉淀，按照 1: 3 的传代比例接种到新的培养瓶中。

## 注意事项

耳缘组织处理时要反复清洗，尽量保持无菌操作，防止原代细胞的污染。翻转培养瓶的时间，要根据组织的消化程度、残留的培养液的多少决定，要保证组织块在加入新培养液时不脱落。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，记录细胞的生长状态，分析实验结果。

## 实验十九 小鼠胚胎干细胞培养

### 实验特点

实验类型：综合性实验

实验类别：专业基础课

计划学时：12 学时

每组人数：5 人

### 实验目的要求

掌握小鼠胚胎干细胞的制备过程，了解细胞制备过程中所需要的仪器和设备及各种试剂的作用。

### 实验原理

胚胎性干细胞通常是指源自囊胚内细胞团的 ES 细胞，但通常人们将从畸胎瘤中分离筛选到的多能 EC 细胞和从早期胎儿原始生殖细胞中分离出来的 EG 细胞也归为胚胎性干细胞。

将桑椹胚或囊胚放在饲养层上让其自然孵出透明带，贴附于饲养层，待 ICM 细胞扩大增殖时挑出，分离消化成小的细胞团块，移到新饲养层上培养。在抑制分化培养液中培养时，细胞呈克隆生长，紧密地聚集在一起，圆形或卵圆形的细胞呈单层或多层紧密堆积而形成岛状或巢状的集落。胚胎干细胞增殖迅速，每 18-24h 增殖一次。其不同于其他细胞的两个特征是：一是具有多能性，能够被诱导生成机体各种类型的细胞；二是可在体外不断扩增，并能连续无限的保持未分化状态。

### 实验仪器和材料

超净工作台、CO<sub>2</sub> 培养箱、倒置显微镜、台式离心机、细胞培养板；DMEM、胰蛋白酶、PBS、L-谷氨酰胺、胎牛血清、8-12 周龄小鼠、LIF。

培养液：DMEM +15%FBS+1% NEAA+1% L-Glutamine+1% 双抗。

干细胞培养液：DMEM +15%FBS+1% NEAA+1% L-Glutamine+1% 双抗+1000 IU/ml LIF。

### 实验内容步骤

#### （一）ICM 的分离、消化、传代培养

##### 1. 胚胎培养

取怀孕 3.5 天母鼠，处死后在无菌条件取出子宫置于无菌培养皿内。用 1ml 无菌注

射器吸入冲胚液，从子宫角端进针，将冲胚液快速推入子宫腔。每侧子宫注入冲胚液 1ml，胚胎将随冲胚液流出。在体视镜下检出胚胎（图 19-1）。

用 6 孔培养板制备饲养层，每孔加 2 ml 胚胎培养液，放入 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱培养 24 h，然后将得到的胚胎用胚胎培养液洗 2-3 遍后，每孔放 10 枚胚胎，立即放入培养箱中，并根据营养消耗定期更换培养液。

## 2. ICM 的分离

将桑椹胚或囊胚体外培养 4-5 天后，选择生长集中，隆起明显，形态仍未表现分化迹象的 ICM 集落进行初次传代（图 19-2）。

用玻璃针剥离 ICM 表面及周围滋养层细胞层，再将 ICM 挑出，移入 PBS 微滴中清洗 3 次，然后移入消化液微滴中孵育 1-5 min，用玻璃针将 ICM 离散成小细胞团块，然后移入新制备的带有饲养层的干细胞培养液的 6 孔培养板中，37°C，5%CO<sub>2</sub>，饱和湿度培养箱中培养。逐日观察，根据营养消耗情况进行半量更换培养液。

## （二）ES 传代培养

根据新集落出现及生长情况，挑取生长良好，而又未分化的 ES 细胞集落进行传代（图 19-3）。用 PBS 洗涤一次，加入消化液，以能覆盖细胞为宜，消化 30s 后弃消化液，用手指轻弹培养板底部，让残余消化液继续作用（或用玻璃针离散小细胞团块，加速消化）。在倒置显微镜下观察，见细胞与细胞分开、细胞团松散飘起时即加入培养液终止消化。移入离心管中轻轻吹打并进行离心，1000 转/min，离心 5 min。重新悬浮细胞，转移入新的带有饲养层的 6 孔培养板中，37 °C，5% CO<sub>2</sub>，饱和湿度培养。逐日观察，根据营养消耗情况进行半量更换培养液。

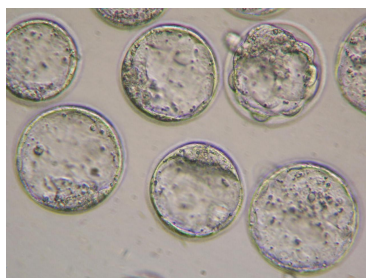


图19-1 3.5天的胚胎

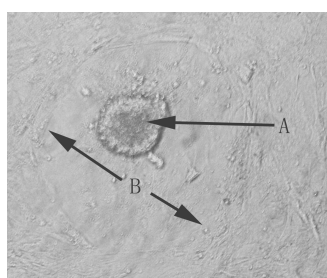


图19-2 体外培养4-5天的ICM

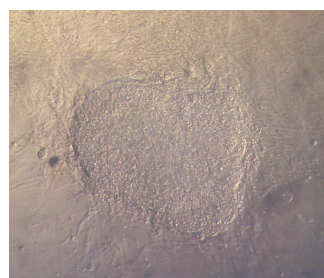


图19-3 ES细胞集落

## 注意事项

ICM 分离的时间是关键，要在 ICM 没有分化之前进行分离培养。分离 ICM 时，要分离成小的细胞团块，不能分离成单个细胞，否则会出现大量的分化。

## 实验报告要求

认真完成实验报告，记录细胞的生长状态，分析实验结果。

## 实验二十 牛雄性生殖干细胞培养

### 实验特点

实验类型：综合性实验

实验类别：专业基础课

计划学时：12 学时

每组人数：5 人

### 实验目的要求

掌握牛雄性生殖干细胞的制备过程，通过培养雄性生殖干细胞，进一步了解精子发生的机制。

### 实验原理

无尾两栖类的 PGC（primordial germ cells）来自内胚层，鸟类和哺乳类的则来自上胚层。一般在原肠胚之后或胚胎发育后期，它们以变性运动的方式自主地迁移到肠背系膜。通过肠背系膜进入位于中肾内侧和肠背系膜之间的、由脏壁中胚层形成的生殖嵴中。PGC 在迁移过程中，它们不断分裂增殖。如果 PGC 在迁移过程中最终没有到达生殖嵴，则可分化为最终到达的那个胚层的细胞，或者退化消失。

生殖嵴向体腔中不断突起，其背部产生一腔，即初级生殖腔。它被来自生肾组织未分化的间叶细胞或由体腔上皮向内迁移的细胞所充满，这些细胞积聚形成许多细胞团，又彼此相互连成许多细胞索，这就是网索（reticords）或原始性索（primitive sex cord），此即髓部。周围的上皮细胞和未分化的间叶细胞构成皮层。在此期间，有间充质基质侵入，把生殖嵴的皮层和髓部分开。PGC 进入生殖嵴的皮层后，由皮层和髓部共同组成胚胎的原始生殖嵴。在生殖嵴皮层中有三类细胞，一类是来自脏壁中胚层的体腔上皮，一类是生肾组织进入的间叶细胞，一类是较这些中胚层细胞大，呈圆形，内有一个呈圆形的核，细胞质内有较多的卵黄颗粒，这就是原生殖细胞。将来由原生殖细胞形成生殖细胞（精子和卵子），而来自生肾组织或体腔上皮的细胞则形成生殖腺内的体细胞，雄性为支持细胞和间质细胞，雌性为卵泡细胞。

睾丸中的 PGCs 转化为性原细胞（gonocyte）。在不同种属的哺乳动物中，这一转变发生的时间是不同的。小鼠约在出生前 2-3 天时开始出现性原细胞，它们位于曲细精管的中央。小鼠出生后的最初几天，性原细胞分裂增殖，并向曲细精管周围迁移。约在出生后 3 天时，大部分的性原细胞已经到达曲细精管的基膜。在这里，性原细胞转变为精原干细胞。精原干细胞分裂增殖，保持睾丸中的干细胞库，一部分精原干细胞开始分化过程。性成熟后，精原干细胞一方面自我更新以维持干细胞的数量，另一方面分化产生

各级精原细胞，最终产生成熟的精子。

## 实验仪器和材料

超净工作台、CO<sub>2</sub>培养箱、倒置显微镜、台式离心机、细胞培养板；DMEM、胰蛋白酶、PBS、L-谷氨酰胺、胎牛血清、新生牛睾丸、GDNF。

培养液：DMEM +15%FBS+1% NEAA+1% L-Glutamine+1% 双抗。

干细胞培养液：DMEM +2%FBS+1% NEAA+1% L-Glutamine+1% 双抗+100 ng/ml GDNF。

## 实验内容步骤

### （一）睾丸生精上皮细胞悬液的制备

将收集的睾丸置于 PBS 中洗涤后用眼科镊子将睾丸实质组织分成大小一致的小块，移入盛有 PBS 的玻璃皿中拨散，再移入另一个盛有 PBS 的玻璃皿中清洗，重复清洗 3 次，尽量去除血细胞和间质细胞。将获得曲精细管移入离心管中，加入 10 倍体积的胶原酶消化液，室温消化 3-5 min，期间轻轻吹打 2-3 次，至曲精细管彼此分散开为止，加入 5-10 ml 的 PBS，轻轻吹匀后 600 r/min 离心 2-3 min，弃上清液，重复上述消化 5-10 min，然后 1000 r/min 离心 5 min，弃上清液，加入 10 倍体积的胰酶消化液，室温消化 3-5 min，期间轻轻吹打 2-3 次，待悬液中看不到微小的曲精细管片段时，加入等量的基础培养液终止消化，1000 r/min 离心 5 min，弃上清液，用 PBS 重新悬浮细胞，100  $\mu$ m 和 74  $\mu$ m 筛网分别过滤，将过滤后的细胞悬液以 1000 r/min 离心 5 min 去除上清液，将细胞沉淀重新以基础培养液悬起。

### （二）雄性生殖干细胞的分离纯化

#### 1. 差速贴壁分选

睾丸组织经过第一次胶原酶的消化和低速离心洗涤，已基本除去了睾丸间质细胞，所获得的睾丸组织样品主要是曲精细管；再经过消化、过滤和离心洗涤后，既除去了未消化完全的组织块，也进一步除去了睾丸间质细胞和细胞碎片，所获睾丸细胞悬液中主要有生精细胞和支持细胞两种细胞。根据睾丸细胞混合培养时支持细胞贴壁快的特性，采用反复贴壁的方法除去其中的支持细胞，分选出生精细胞。分选和富集过程的主要步骤如下：

第一步：将生精上皮细胞悬液调整密度为  $1-5 \times 10^6$  个/mL 接种到培养瓶中培养 2h 至 4 h，时间取决于细胞贴壁状况，以支持细胞已大部分贴壁，而生精细胞只是松散地贴附在支持细胞层上为较好。第二步：用吸管轻轻吹打，悬起尚未紧密贴壁的生精细胞和部分支持细胞，转移到新的培养瓶中，培养过夜，直到残存的睾丸体细胞完全贴壁并开始培养瓶底铺展生长。第三步：吸管吹打悬起生精细胞，细胞悬液经 1000 转/min 离心 5

min，弃上清，用培养液重悬细胞。

## 2. Percoll 密度梯度分选

按 PBS：Percoll=1：9 的比例把湿热灭菌后的 Percoll 原液配制成 90%的 Percoll 溶液。用无钙、镁离子 PBS，按表 1 所列方案配制 Percoll 各梯度溶液。

表 20-1 Percoll 密度梯度的浓度、组成及密度

Percoll (%)	各梯度液体积(mL)	90%percoll (mL)	PBS (mL)	各梯度密度(1000 g/L)
20	10	2	8	1.031
30	10	3	7	1.043
40	10	4	6	1.056
50	10	5	5	1.067
60	10	6	4	1.077

将获得的生精上皮细胞细胞悬液用 1000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，用 1 mL DMEM/F-12 重新悬浮沉淀。取一个 15 mL 离心管，将配制好的 1.5 mL 不同密度的 Percoll 溶液按密度从大到小的顺序依次缓慢地沿管壁加到离心管中，形成一个 Percoll 密度梯度液，在其上缓慢加入准备好的 1 mL 细胞悬液，2000 g 离心机离心 20 min，收集各层细胞（图 20-1），并用 4 mL 细胞基础培养液重悬，离心洗涤细胞。

### （三）雄性生殖干细胞的培养

用 2%血清的培养液悬浮细胞，调整细胞密度为  $1-5 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 进行共培养。细胞形成集落（图 20-2）后进行传代培养。

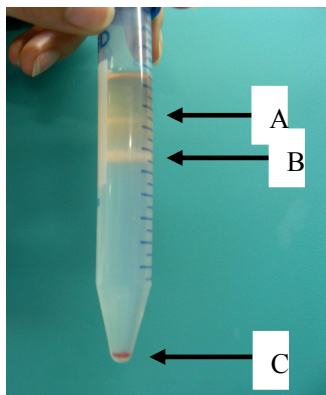


图 20-1 不连续密度梯度分选

（A）形成的第一条带，主要是细胞碎片和死细胞，（B）形成的第二条带，主要是生殖干细胞和支持细胞，（C）底部的血细胞和碎屑。

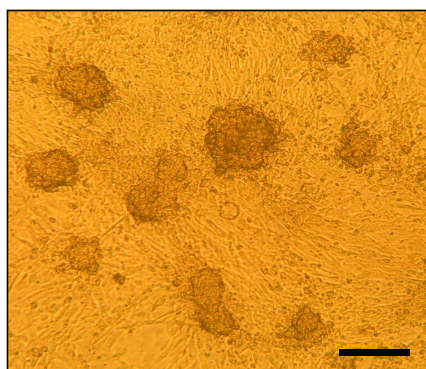


图 20-2 生殖干细胞集落, bar=200 $\mu$ m

## 注意事项

雄性生殖干细胞的分离纯化并不能达到 100% 的完全分离, 只能尽量分离, 然后采用共培养的方法。传代时将集落播种到饲养层上进行培养。

## 实验报告要求

认真完成实验报告, 记录细胞的生长状态, 分析实验结果。