

《种猪常温精液》新国标解读

(GB 23238-2021)

刘望宏,13971208448

华中农业大学，全国畜标委猪业工作组



农业农村部种猪质量监督检验测试中心（武汉）

2022-6-15

目录 CONTENTS

显微镜介绍

2

1

新旧标准对比

检测技术介绍

3

- 剂量
- 前向运动精子数
- 精子活力
- 精子畸形率

第一节

新旧标准比对



1 新旧标准比对

01

旧标准

无效

ICS 65.020.30
B 43



中华人民共和国国家标准

GB 23238—2009

种猪常温精液

Boar fresh semen



农业农村部种猪质量监督检验测试中心（武汉）

02

新标准

现行有效

ICS 65.020.30
CCS B 43



中华人民共和国国家标准

GB 23238—2021
代替 GB 23238—2009

种猪常温精液

Boar liquid semen

2021-04-30 发布

2022-05-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

2022-6-15

1 新旧标准比对

1 范围

本文件规定了种猪常温精液的质量技术要求、抽样、试验方法、检验规则、标签和随行文件、包装、贮存、运输和保质期、不合格产品处置。

本文件适用于商品化的种猪常温精液产品。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

种猪 boar 更改

体型外貌和性能质量符合本品种标准要求且具有种用价值的公猪。

注：来源于具有《种畜禽生产经营许可证》和《动物防疫合格证》的种猪场或公猪站，或有资质的种猪性能测定站。

3.5

前向运动精子数 number of progressively motile sperm **更改**

每剂量精液中呈前向运动精子的总数。

3.7

混合精液 pooled semen **新增**

同一品种两头及以上种猪的精液混合物。

3.8

批次 batch **新增**

同一生产线、同一时间,使用同一份或混合精液稀释分装生产的一批常温精液产品。

3.9

保质期 shelf life **新增**

自产品生产之时起,在满足种猪常温精液产品规定的保存和运输条件下,其产品符合质量要求的最长期限。

检验项目减少2项：

检测项目	旧标准GB23238-2009	新标准GB23238-2021
外观	乳白色、无杂质，包装封口严密	无
剂量	量筒法	称量法
精子活力	人工目测评分	仪器法
前向运动精子数（每剂量中直线前进运动精子数）	血球板计数法	仪器法
精子畸形率	姬姆萨染色法（染色时长1.5h）	姬姆萨染色法 （染色时长15~30min） 伊红苯胺黑快速染色法
有效期	≥72h	无

旧标准产品 质量要求

4 要求

4.1 原精液

4.1.1 来源

来源于具有种用价值,体型外貌和生产性能符合种用要求,三代系谱资料齐全,体质健康的种猪。

4.1.2 外观

乳白色,无脓性分泌物,无皮毛等异物。

4.1.3 采精量

≥ 100 mL。

4.1.4 精子密度

≥ 1 亿/mL。

4.1.5 精子活力

$\geq 70\%$ 。

4.1.6 精子畸形率

$\leq 20\%$ 。

4.2 常温精液产品

4.2.1 外观

乳白色,无杂质,包装封口严密。

4.2.2 剂量

地方品种 40 mL~50 mL,其他 80 mL~100 mL。

4.2.3 精子活力

$\geq 60\%$ 。

4.2.4 每剂量中直线前进运动精子数

地方品种 ≥ 10 亿,其他 ≥ 25 亿。

4.2.5 精子畸形率

$\leq 20\%$ 。

4.2.6 有效期

≥ 72 h。

新标准产品 质量要求

项目	受体为引入品种、培育品种		受体为地方品种
	常规输精	深部输精	
剂量/mL	≥ 80.0	≥ 60.0	≥ 40.0
精子活力/%	≥ 60.0	≥ 60.0	≥ 60.0
前向运动精子数/ (10^8 个/剂)	≥ 18.0	≥ 12.0	≥ 10.0
精子畸形率/%	≤ 20.0	≤ 20.0	≤ 20.0

9.4 保质期

生产企业应给出常温精液产品的保质期,保质期应不少于 72 h。



主要发达国家猪常温精液部分技术指标

国家	稀释液种类	输精量(ml)	总精子数(亿)
巴西	KIEV、BTS	80-100	25-35
加拿大	BLI、BTS、Modena	70	25-30
丹麦	KIEV	85	20
法国	BTS	100	30
荷兰	BTS	80-100	30-40
挪威	BTS	100	20
西班牙	MR-A	100	23-60
瑞典	KIEV	100	30
英国	BTS、Reading、SCK-7、ZORPVA	75	10-30
德国	BTS、KIEV	80-100	18-20 (活精子)
美国	KIEV、BTS、Modena	75	22.5-27.5 (活精子)
芬兰	KIEV、MR-A	100	20-50

抽样的问题？

5 抽样

5.1 抽样方法

5.1.1 出厂检验

以每批次生产份数为基数,随机抽取样品,抽取份数取整数且不少于基数的 10%。

5.1.2 型式检验

以每批次生产份数为基数,随机抽取样品,抽取份数取整数且不少于基数的 15%。

5.2 抽样时间

产品分装后 2 h 至保质期截止前 24 h。

关于检验规则：

7 检验规则

7.1 检验类别

7.1.1 出厂检验

出厂检验项目为第 4 章规定的产品剂量、精子活力和前向运动精子数。

7.1.2 型式检验

型式检验项目为第 4 章规定的全部项目。产品正常生产时，至少每半年进行一次型式检验，若有下列情况之一时，应进行型式检验：

- a) 生产工艺及设备有重大变更时；
- b) 所用生产原料有重大变化时；
- c) 种猪发生疾病或统一注射疫苗时；
- d) 停产 3 个月以上恢复生产时；
- e) 出厂检测结果与上次型式检测结果有较大差异时；
- f) 监督管理部门提出要求时。

合格 判定规则：

7.2 判定规则

7.2.1 样品判定规则

7.2.1.1 所检项目全部符合本文件规定时，则判定该样品合格。

7.2.1.2 检测结果中有任何项目不符合本文件规定时，则判定该样品不合格。若该样品在其保质期内可进行复检，复检结果全部符合本文件规定时，则判定该样品合格，复检结果有任何项目不符合本文件规定时，则判定该样品不合格；若该样品已不在其保质期内，则不得复检。

7.2.1.3 各项目检测结果的极限数值判定按 GB/T 8170 中修约值比较法执行。

7.2.2 每批次产品的判定规则

每个批次的产品中所有抽检样品合格，则判定该批次的产品合格；其中有任一抽检样品不合格，则判定该批次的产品不合格。

何为随性文件？

8.2 随行文件 简称两证一档

随行文件至少应包括种畜禽生产经营许可证和动物防疫合格证的复印件,以及种猪系谱档案(混合精液除外)等复印件。

9 包装、贮存、运输和保质期

9.1 包装

产品包装应为对精子无毒副作用的一次性塑料制品,可选用袋装、瓶装或管装,容量应大于第4章中规定的对应产品最低剂量的110%。封口严密。

9.2 贮存

种猪常温精液应置于恒温箱中避光保存,恒温箱内温度应控制在 $16^{\circ}\text{C}\sim 18^{\circ}\text{C}$ 。保质期内每间隔8 h~12 h应摇匀1次。

9.3 运输

种猪常温精液应置于 $16^{\circ}\text{C}\sim 18^{\circ}\text{C}$ 避光密封的容器中运输,运输过程避免强烈震动和碰撞。

9.4 保质期

生产企业应给出常温精液产品的保质期,保质期应不少于72 h。

10 不合格产品处置

不应出售和使用检验不合格的产品。不合格产品应按有关规定进行无害化处理。

第二节

显微镜介绍



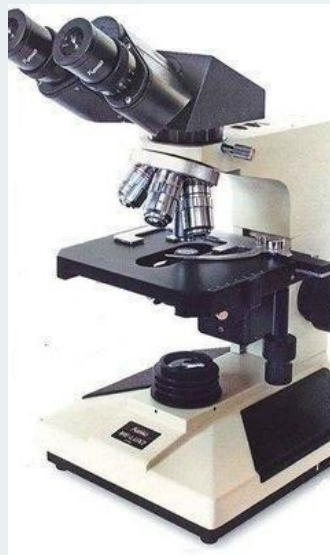
2显微镜介绍

按物镜的安
装位置分类：

A.正置显微镜

B.倒置显微镜

切片观察

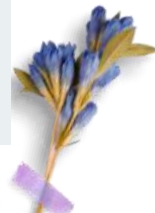


A

培养皿细胞
观察



B



活细胞和未染色生
物标本观察



A

鉴定物质细微结
构



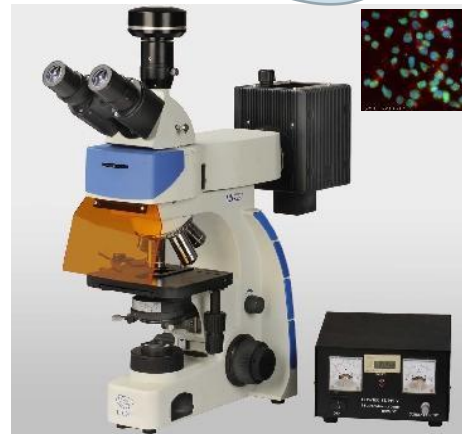
B

观察未染色的透
明样品



C

观察荧光染色样
品



D

按聚光或光
源分类：

A.相差显微镜

B.偏光显微镜

C.暗视野显微镜

D.荧光显微镜

E.普通显微镜

E

普通光学显微镜基本构造



2显微镜介绍

按结构与用途分类：普通光学显微镜、万能研究显微镜、体式显微镜、万能数码显微镜、电子显微镜。



体式显微镜：两
条光路观察样品，
凸显立体感



扫描电子显微镜：固体
样品表面进行高分辨形貌
观察



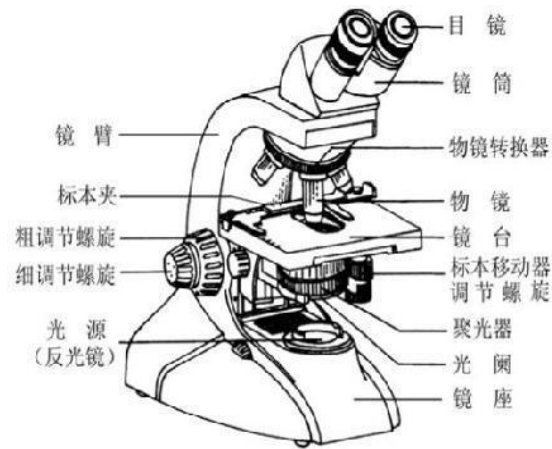


图 4-1B 光学显微镜的构造

2显微镜介绍

注意事项



先低
后高

倍数调节



先粗
再微

旋钮调节



防潮 防尘
防腐 防热

维护保养



(武汉)

2-6-15

第三节

检测技术



3.1 剂量



定义：每份种猪常温精液的体积。

- 受体为引进或培育猪种，常规输精 $\geq 80\text{mL/剂}$ ；深部输精 $\geq 60\text{mL/剂}$ ；合格。
- 受体为地方猪种 $\geq 40\text{mL/剂}$ ，合格。



3.1 剂量

A.1.2 试验步骤

接通电子台秤电源，开机，检查电子台秤的运行情况。在 18℃~25℃ 室温条件下，将电子台秤清零后，从恒温箱中取出待检产品，置于台秤称量盘上，记录显示值为 W_1 。使用与受检产品同一批次、未使用的空包装，或全部项目检测完毕，倒出内容物清洗并干燥的空包装，置于电子台秤称量盘上，记录显示值为 W_2 。

A.1.3 试验数据处理

剂量按式 (A.1) 计算：

$$W = W_1 - W_2 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

W —— 样品剂量值，按 1 g = 1 mL 进行换算，单位为毫升 (mL)；

W_1 —— 样品与包装的称量值，单位为克 (g)；

W_2 —— 空包装的称量值，单位为克 (g)。

计算结果保留至小数点后 1 位，按 GB/T 8170 的规定进行修约。

称量法与容量法的比较优势（4个优势）

- ①种猪常温精液密度为 **1.0038 ± 0.0025 g/mL**与水的密度1.000 g/mL (4℃) 接近，一份80 mL的种猪常温精液与纯水的质量差为 0.3076 ± 0.0440 g，误差小于0.5mL水的质量。本实验与文献报道的称量法是将精液密度假定为**1 g/mL**的研究结果一致（Auger et al.1995）。人的原精液密度为 **$1.043—1.102$ g/mL**。（Huggins et al., 1942; Brazil et al., 2004a; Copper et al., 2007）。
- ②使用容量法时其残留在原容器的精液量约为 **0.5930 ± 0.0894 mL**，大于在同等体积情况下的质量误差。有文献报道，残留在原容器的精液量约0.3-0.9 mL（Brazil et al; 2004a; Iwamoto et al., 2006; Copper et al., 2007）。

- ③容量法在操作过程中对精子损伤较大，可能对后续检测结果产生影响。
- ④从生产的角度看，修订后，只要生产的产品灌装剂量 ≥ 80 mL即可满足标准要求，低于79.7mL则有不合格的风险。



称量法与容量法剂量比较		
方法	称量法	容量法
	精液剂量/g	精液剂量/mL
样本量N (份)	36	36
剂量值	83.7764 ± 1.8429	83.1833 ± 1.8959

3.2精子活力

定义：精液中前向运动精子活动的程度。当精液温度在 37 °C 左右时，以精液中前向运动精子数占总精子数的百分比表示。

A

- 仪器设备及耗材：
显微镜（相差显微镜）

B

恒温载物台：
37 °C ± 1 °C

C

恒温箱：
17 °C ± 1 °C 移液器：
量程 ≤ 20 μL

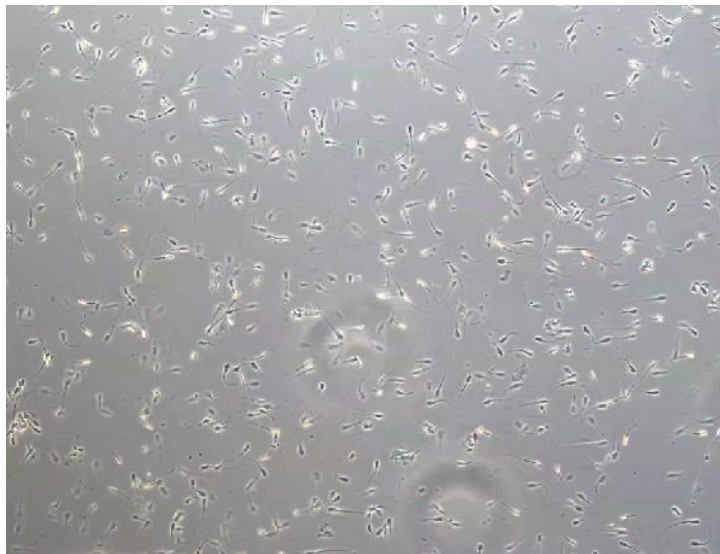
D

专用定容玻片：腔
室高度 20 μm ± 2
μm

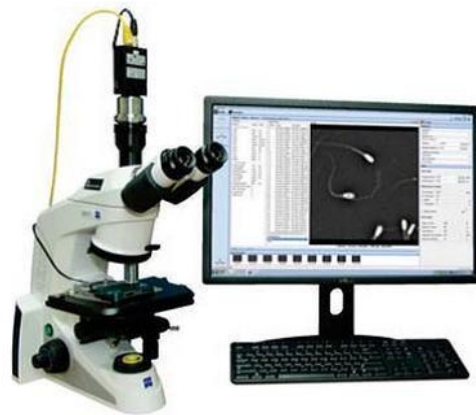
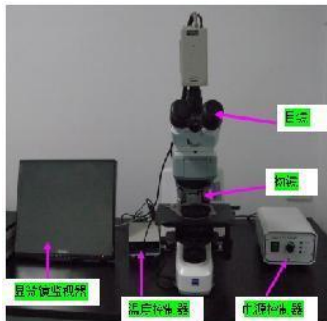
旧标准活力

结果计算与评判：

三个视野的活力平均值为结果；精子活力大于60%为合格，小于60%为不合格。



相差显微镜：全自动精子质量分析软件



CEROS II 计算机辅助精液分析系统

3. 2精子活力

A. 2. 1 仪器设备与耗材

A. 2. 1. 1 精子质量分析仪：由相差显微镜、显示器和专用分析软件等组成。相差显微镜至少应配有 10 倍、20 倍的物镜镜头。专用分析软件的主要技术参数应为 $VCL \geq 5 \mu\text{m/s}$ 、 $VSL \geq 5 \mu\text{m/s}$ 、 $STR = VSL/VAP \geq 25\%$ 。精子质量分析仪可读取并显示多个视野的平均值。

注 1：VCL 为精子曲线运动速度。

注 2：VSL 为精子直线运动速度。

注 3：VAP 为精子平均运动速度。

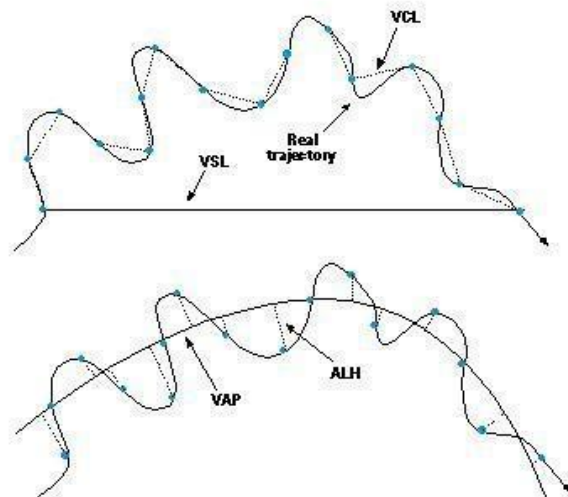
注 4：STR 为精子直线运动速度与平均运动速度的比值。

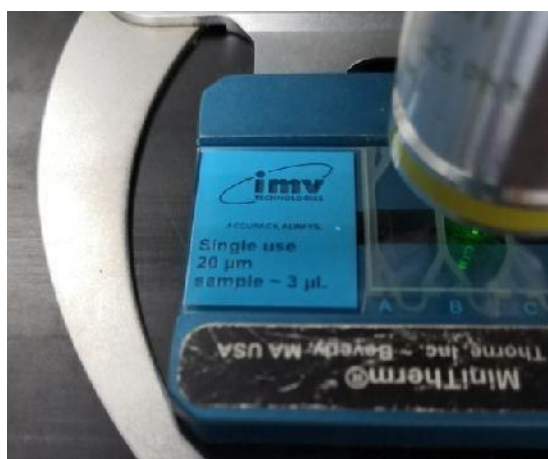
A. 2. 1. 2 恒温载物台： $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

A. 2. 1. 3 恒温箱： $17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

A. 2. 1. 4 移液器：量程 $\leq 20\text{ }\mu\text{L}$ 。

A. 2. 1. 5 专用定容玻片：腔室高度 $20\text{ }\mu\text{m} \pm 2\text{ }\mu\text{m}$ 。

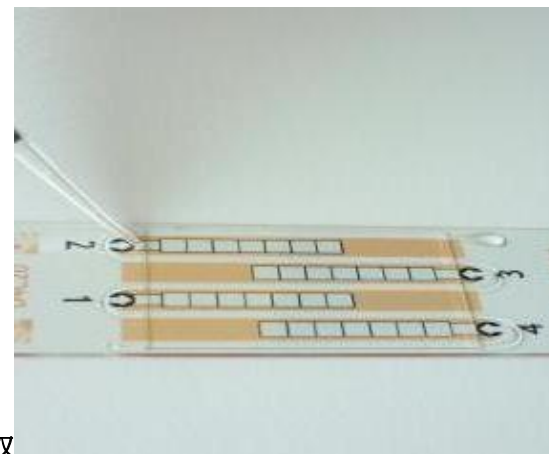




专用定容玻片



Leja精子检测专用玻片



定容玻片检验报告（舱室高度为： $20\mu\text{m} \pm 2\mu\text{m}$ ）

Certificate of analysis

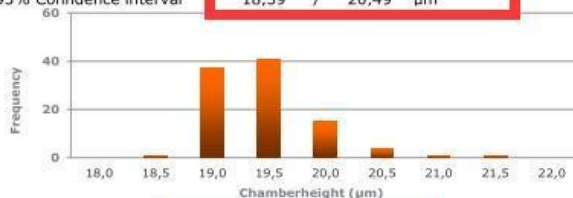
Product Specifications

Product name	20 μm 4-Chamber Slide
Product code	IMV 20-01-04-B/02
Production date range	16-04-2015 - 17-04-2015 dd-mm-yyyy
Lot number	161554

Quality Test

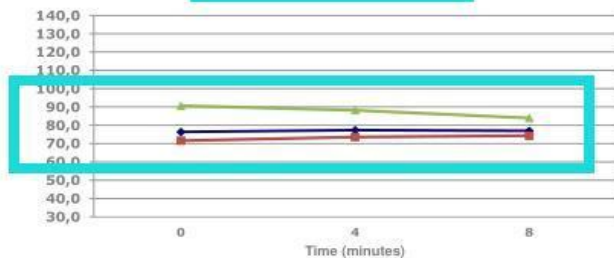
Chamber Height

Number of samples	100	chambers
Average	19,44	μm
Minimum / Maximum height	18,67 / 21,42	μm
Standard Deviation	0,54	μm
95% Confidence interval	18,39 / 20,49	μm



Quality Test

Chamber Toxicity



IMV授权

— % Motility

— % Prog. Mot.

— VAP ($\mu\text{m}/\text{second}$)



农业农村部种猪质量监督检验测试中心（武汉）

精子大小

精子分为头、颈、尾三个组成部分，一般长度为 $50-60\mu\text{m}$ ，不同动物的精子大小形状有所区别，猪精子头部呈扁的卵圆形，头部长度一般为 $8-9\mu\text{m}$ ，宽度约 $2\mu\text{m}$ ，厚度约 $1-1.5\mu\text{m}$ ，长宽厚的比值一般为：8:4:1

舱室玻片的检测报告显示：舱室高度平均值为 19.44 ± 0.54 ($18.67 \sim 21.42$) μm

舱室玻片的检测报告显示：舱室玻片不影响精子的安全性，对精子活力没有影响

2022-6-15

操作步骤—准备仪器

- a) 开启精子质量分析仪预热至少 5 min，安装恒温载物台（带有恒温载物台的一体化仪器不需要此步骤），开启恒温载物台电源开关，设置温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；
- b) 检查物镜是否转换到相差显微镜头，必要时应按照说明书进行物镜校准并转换光圈模式，以达到最佳备用状态；调节显微镜光源至适宜的亮度，将低倍物镜正对载物台的通光孔，调节物镜与恒温载物台之间的最佳距离，观察视野明亮程度，通过调节聚光器，直至视野光线最佳；
- c) 将专用定容玻片置于恒温载物台上预热，预热时间应大于 1 min；

操作步骤一取样要求

- d) 从恒温箱中取出待检样品，在 18 °C~25 °C 室温条件下轻摇 2 min~3 min;
- e) 保持精液瓶与视线水平，使其倾斜约 45°，将移液器的吸头伸入液面下 15 mm~20 mm 处，避开凝结絮状物，吸取 3 μL~5 μL 样品，滴于专用定容玻片进样口处，让其自行流入腔室，待检（样点 1）；用同样方法吸取 3 μL~5 μL 样品，滴于专用定容玻片另一腔室的进样口处，待检（样点 2）；
- f) 点样后预热 1 min~3 min，在 200 倍条件下，按照操作要求在 3 min 内完成样点 1 和样点 2 的检测。
- g) 每个样点至少读取 3 个视野的数据，记录每个样点的平均值。

取样的注意事项：

- 摇匀方式与时间：摇匀2min~3min
- 取样方法：倾斜约45°
- 液面深度约15mm~20mm
- 取样数量：3 μ L~5 μ L
- 预热时间：预热1min~3min

为什么要摇匀？

- 精液放置一段时间，精子容易聚集、缠绕，摇匀样品是精液品质检测前非常重要的步骤。由于缠绕聚集的方式多样，如右图。所以探讨样品摇匀时间是非常有必要的。

Fig. 2.3 Schematic diagram of different extents of sperm agglutination

Degree of agglutination			
Parts involved	1. Isolated (<10 sperm/ agglutinate, many free sperm)	2. Moderate (10–50 sperm/ agglutinate, free sperm)	3. Large (aggluti- nates >50 sperm, some sperm still free)
			4. Gross (all sperm agglu- tinated, and agglutinates interconnec- ted)

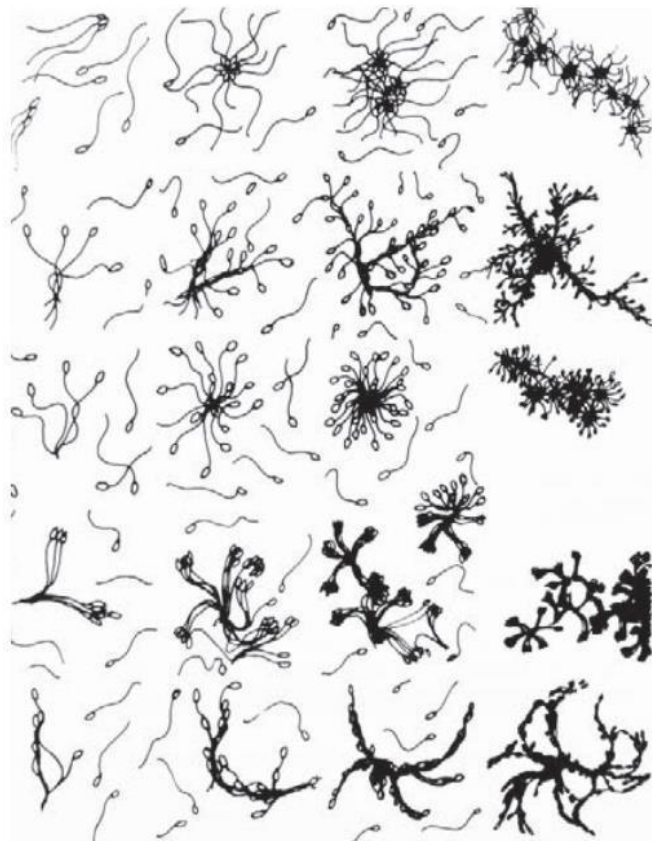
A. Head-to-head

B. Tail-to-tail (heads are seen to be free and move clear of agglutinates)

C. Tail-tip-to-tail-tip

D. Mixed (clear head-to-head and tail-to-tail agglutinations)

E. Tangle (heads and tails enmeshed. Heads are not clear of agglutinates as they are in tail-to-tail agglutination)



Reproduced from Rose et al. (1976) by permission of Wiley-Blackwell.

精子缠绕方式

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen .
FIFTH EDITION . P20



不同摇匀时间对比（预热1min检测结果）

摇匀时间	1min	3min	5min
活率（%）	95.7±2.0	93.4±1.6	94.3±1.7
密度（百万/mL）	76.4±5.6 ^a	76.3±6.0 ^a	58.2±5.7 ^b
活力（%）	78.6±2.0 ^a	71.2±1.9 ^b	82.1±1.9 ^a

注：表中字母上标不相同代表差异显著（P<0.05）

- 小结：检测结果表明，检测活力指标摇匀时间1-5min均可，密度检测在5分钟出现较大误差，1-3min则较为理想。

取样液面深度比较（预热1min，倾斜45°，10 μ L）

取样液面深度	1mm	8mm	15mm	22mm
活率，%	92.2 $\pm$ 2.0	94.2 $\pm$ 1.8	96.5 $\pm$ 1.3	95.8 $\pm$ 1.3
密度，百万/毫升	47.0 $\pm$ 5.5 ^c	59.3 $\pm$ 5.7 ^b	78.6 $\pm$ 5.6 ^a	72.4 $\pm$ 3.5 ^a
活力，%	74.8 $\pm$ 1.8 ^b	81.6 $\pm$ 2.2 ^a	85.4 $\pm$ 2.2 ^a	54.4 $\pm$ 2.2 ^c

注：表中字母上标不同代表差异显著（ $P < 0.05$ ）。

小结：检测结果表明，取样液面高度1.5cm最佳。

预热时间比较（摇匀1min，倾斜45°，10 μ L，液面深度1.5cm）

预热时间	1min	3min	5min	7min	9min	10min	11min
活率	93.6 $\pm$ 5.8 ^a	93.8 $\pm$ 5.2 ^a	93.0 $\pm$ 6.5 ^a	92.1 $\pm$ 4.7 ^a	89.7 $\pm$ 5.3 ^a	45.3 $\pm$ 7.4 ^b	8.1 $\pm$ 3.2 ^c
密度 百万/毫升	64.1 $\pm$ 3.8 ^a	52.0 $\pm$ 4.7 ^b	45.3 $\pm$ 4.6 ^b	46.4 $\pm$ 3.4 ^b	42.2 $\pm$ 5.3 ^b	40.7 $\pm$ 6.6 ^{bc}	36.0 $\pm$ 7.8 ^c
活力	82.6 $\pm$ 5.5 ^a	74.0 $\pm$ 7.3 ^a	60.3 $\pm$ 6.8 ^b	51.4 $\pm$ 5.7 ^b	45.0 $\pm$ 6.4 ^c	18.5 $\pm$ 7.1 ^d	0.4 $\pm$ 0.9 ^e

注：表中字母上标不相同代表差异显著（ $P < 0.05$ ）。快速前进活力：精子活力分为a, b, c, d，四个等级，其中c, d是指原地打转前进和原地转圈运动的活力，a, b指快速前进与慢速前进精子的活力。本表格中快速前进活力指活力为a等级的快速前进的精子。

小结：根据结果来看，在取样量10 μ L的条件下，预热1min以后是精子活力最佳观测时间, 3min后显著下降。

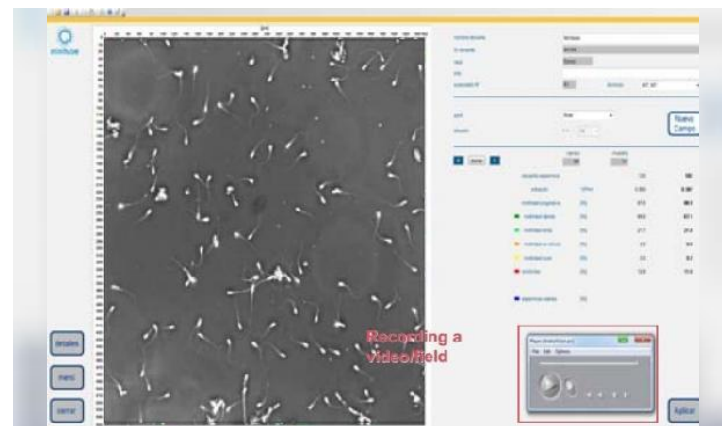
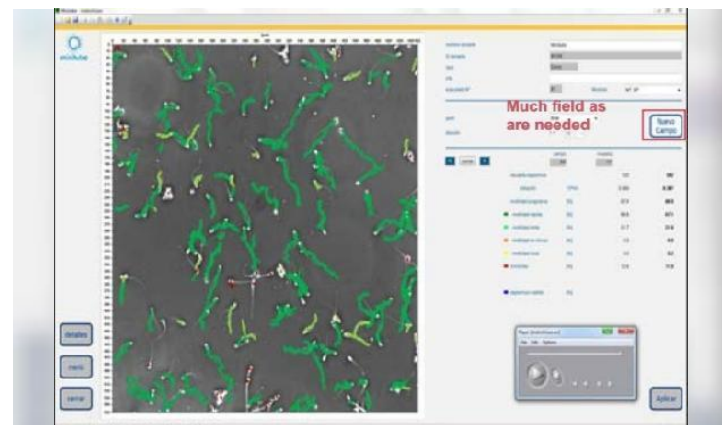
活力结果计算与评判:

- 一个平行样三个及三个以上视野的活力平均值为结果；2个平行样的平均值为样品结果，两个样点计算结果相对偏差大于5%，则应重检。

$$M = \frac{M_1 + M_2}{2}$$

- 式中：M——精子活力，%；
- M1——仪器给出的样品平行样样点 1 检测活力的平均值，%；
- M2——仪器给出的样品平行样样点 2 检测活力的平均值，%；
- 结果判断：精子活力≥60%为合格，<60%为不合格。

Motility	Statistics	Note
Field 4	Field 5	Field 6
Field 1	Field 2	Field 3
Field 7		
☒ Save images for this field		
Cells: 198	(Totals) 1536	(Std Dev) Export to AVI
Concentration: 0.7975	0.8822	(0.239)
Motility: 93.4 %	95.83	(2.727)
Progressive motility: 81.8 %	81.18	(5.678)
Local motility: 11.6 %	14.6	(4.596)
Immotile: 6.57 %	4.17	(2.727)
5.2		
Field Info	Progressive Info	Cell Detail
Hyperactive:	4.04 %	(4.17)
Linear:	5.56 %	(7.68)
Non-linear:	45.5 %	(40.6)
Curvilinear:	10.6 %	(13.2)



3.3前向运动精子数

定义：每剂量精液中呈前向运动精子的总数。

检测方法：同精子活力检测方法，活力检测完毕后直接在仪器软件界面读取精子密度值。

每剂量中精子总数： $S=D_i \times W$

式中：S ——每剂量中精子总数，单位为亿个（ 10^8 个）；

D_i ——仪器显示的精子密度值，单位为亿个/毫升（ 10^8 个/mL）；

W ——样品剂量的实测值，单位为毫升（mL）；

D_i 和S应保留至小数点后 3 位 。

前向运动精子数： $C=S \times M$

式中：C ——前向运动精子数，单位为亿个（ 10^8 个）；

M ——精子活力检测值，单位为百分比（%）。

仪器检测精子密度校正(血球计数板法)

• 1) 仪器设备与耗材

- a)显微镜：物镜为10倍、40倍。
- b)电子天平：感量为0.01 g。
- c)计数器。
- d)移液器：量程1 000 μL 和200 μL 。
- e)容量瓶：100 mL。
- f)血球计数板。
- g)盖玻片。
- h)离心管：1.5 mL或2 mL。

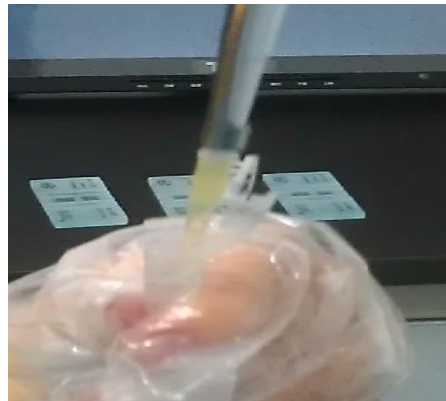
2) 试剂

- a) 水：GB/T 6682，三级水。
- b)3.0 %氯化钠溶液：称取3.0 g氯化钠，用水溶解并定容至100 mL。

仪器检测精子密度校正(血球计数板法)

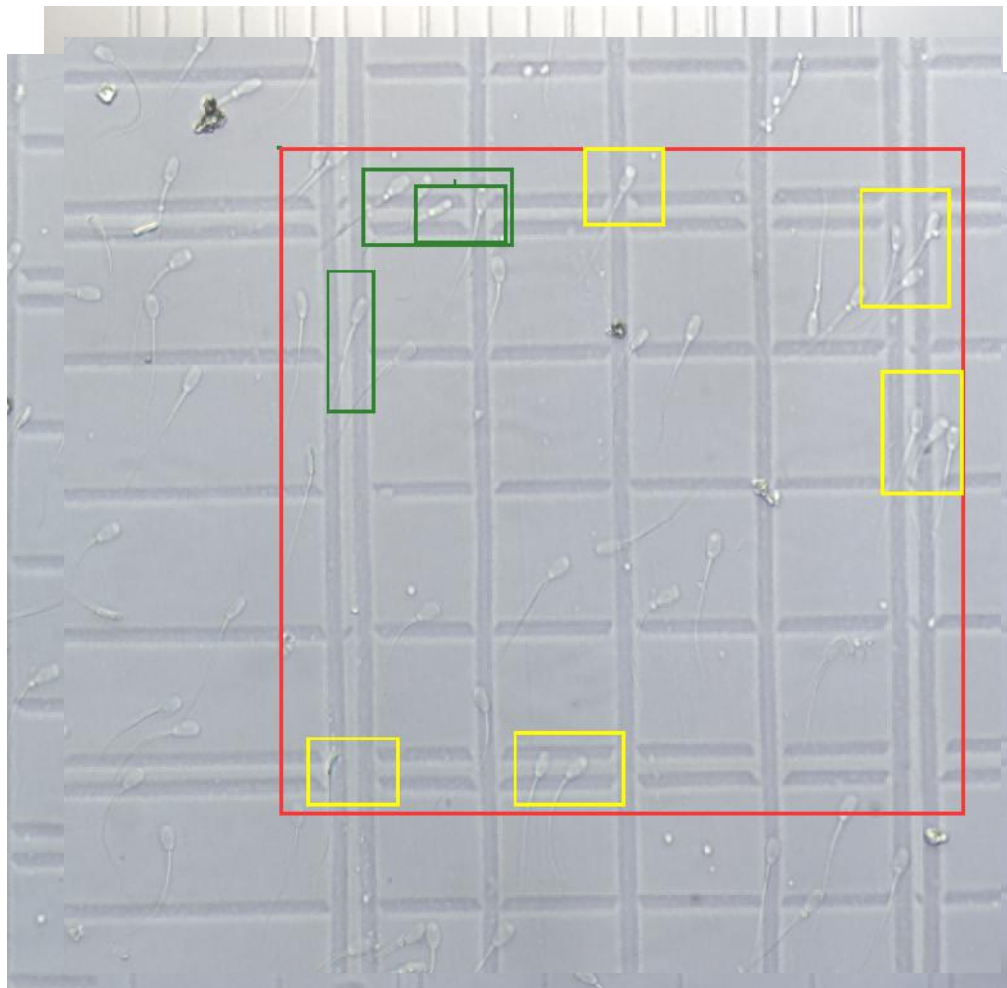
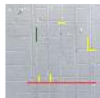
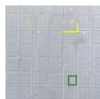
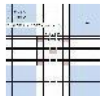
操作步骤

- 准备样品：摇匀，取50微升样品于EP管中，加入0.95ml、3.0%氯化钠溶液后混合均匀待用（**20倍稀释**）；
- 点样：用移液枪取混合好的样品于血球计数板盖玻片的边缘，让样品自行流入并均匀充满整个计数室；



仪器检测精子密度校正(血球计数板法)

- 观察：常用400倍进行观察；
- 计数：观察每个中方格内所有的精子数，计数原则是一个中方格内“记上不计下，计左不计右”；每个血球计数板共观察5个中方格，分别为左上角、左下角、右上角、右下角及计数板中间共五个，计数为5个中方格内所有精子数的总和。



仪器检测精子密度校正(血球计数板法)

仪器检测精子密度校正(血球计数板法)

$$S = T_i \times 5 \times 20 \times 10^4 \times 10^{-8}$$

式中：

- S —— 精子密度，单位为亿个/毫升（ 10^8 个/mL）；
- T_i —— 两个计数室中 5 个中方格总精子数的平均值，单位为个；
- 5 —— 5 个中方格精子数转换成 25 个中方格的倍数；
- 20 —— 精液稀释倍数；
- 10^4 —— 体积单位换算（ 10 （ 1mm^3 内的精子数） $\times 1000$ （每毫升精液的精子数））；
- 10^{-8} —— 密度单位换算。

仪器检测精子密度校正(血球计数板法)

注意事项

- 检测使用的血球计数板应提前在显微镜下镜检，如方格模糊不清应弃用。
- 取样之前要轻轻摇匀。点样应均匀地充满整个计数室，不能有气泡或厚度过大。
- 两个计数室中 5 个中方格总精子数 (T_i) 之间的绝对差值应不大于 5 个，否则，提示样本不均匀，应再次混匀，重新取样检测。

仪器检测精子密度校正(血球计数板法)

注意事项

- 若每个计数室内的精子数过多，应将稀释倍数放大再行检测；反之则将稀释倍数缩小再行检测。一般以每个中方格内的精子数控制在10~20个为宜。对于异常检测结果（精子数过少或过多，或两室精子数严重不均衡），则应立即复检。
- 每份样品检测 2 次，2 次检测结果之间的相对偏差应小于 5 %，否则应重检，用 2 次检测结果的平均值表示该样品的检测结果。
- 同一份样品至少应由两人进行精子密度的检测，两人检测结果之间的相对偏差应小于 5%，否则应重检。

仪器法检测

对血球计数法中的同一样品，按仪器法的步骤检测精子密度，至少 2 次。仪器检测结果之间的相对偏差应小于 5 %，否则应重检。当检测结果满足本条要求时，取其平均值作为仪器法的最终检测结果。

比对校正

将血球计数法和仪器法的最终检测结果进行比对，若两者之间的相对偏差小于 5%，则精子质量分析仪完成校正。否则应按照精子质量分析仪的参数设置程序，调整精子密度检测的相关参数，并重复血球计数板法的步骤，直至血球计数法和仪器法检测结果之间的相对偏差小于 5 %。



3.4 畸形率

方法1：姬姆萨染色法（仲裁法）

- 原理

精子畸形率采用姬姆萨染色法进行检测。实验用姬姆萨染液对精子进行染色，以便清楚的观察精子的形态，再通过显微镜在高倍下分区观察总精子数和畸形精子数，通过换算得出精子的畸形率。



3.4畸形率

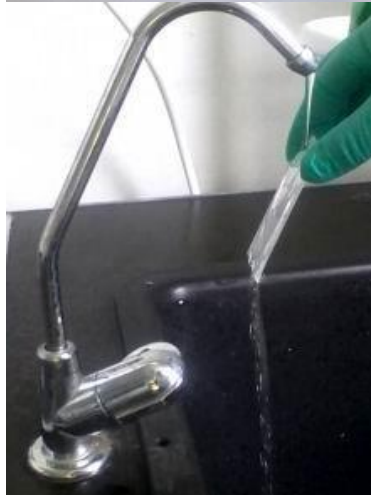


●操作步骤

抹片：用移液枪吸取 10 μL 样品滴于载玻片一端，用另一边缘光滑的载玻片与有样品的载玻片**呈约35°夹角**，先浸润与样品接触的边缘向另一侧**缓慢推动**，将样品均匀地涂抹在载玻片上，自然风干（约 5 min），每样品制作 2 个抹片。

3.4 畸形率

染色：将风干后的抹片浸没于放有姬姆萨染液的染缸中，
染色 15 min ~ 30 min 后用水缓缓清洗染液，直至玻片上无明显染液后，晾干制成染片。



3.4 畸形率

表 A.1 精子形态判定

精子形态判定	精子形态
正常精子	头部呈椭圆形，中部和尾部自然延伸。
畸形精子	头部：大头、小头、梨形头、圆头、双头等； 尾部：原生质滴、断尾、卷尾、双尾、异常弯曲等。

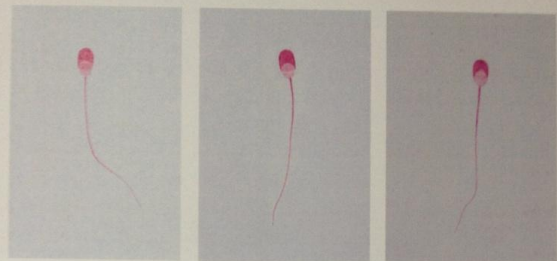
镜检：将染片置于 **400 倍** 下观察，观察顺序为从左到右，从上到下。根据观察到的精子形态，按表 A.1 要求判定正常精子和畸形精子，且一边观察，一边用计数器计数，累计观察 **约 200 个精子**，分别记录精子总数和畸形精子总数，拍照保存该样品的图片。

$$A_i = \frac{A}{A_0} \times 100$$

- **A_i** —— 畸形率，%；
- **A₀** —— 观察精子总数，单位为个；
- **A** —— 观察畸形精子总数，单位为个。

3.4 畸形率

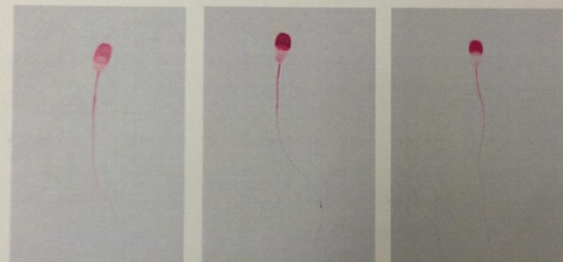
正常精子



长白

长白

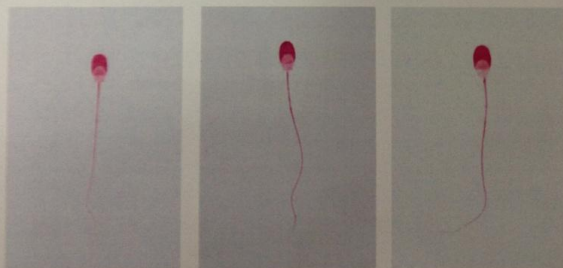
长白



大约克

大约克

大约克

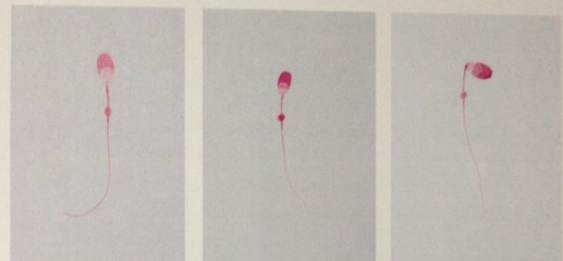


杜洛克

杜洛克

杜洛克

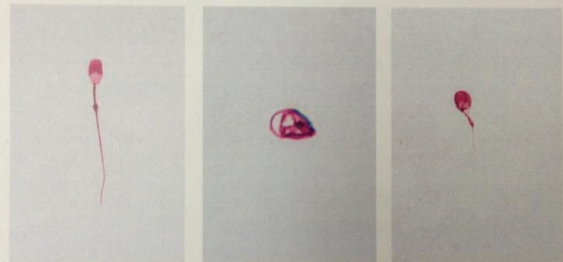
其他类畸形精子



原生质滴、头尾呈偏轴状态

原生质滴

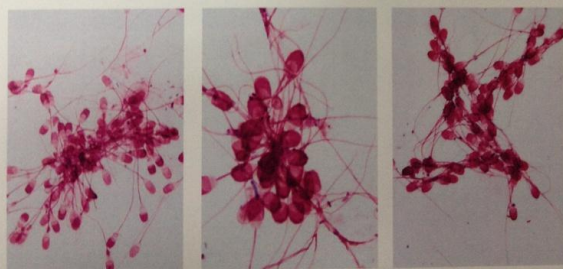
原生质滴、颈折弯、顶体皱折



原生质滴、顶体膨胀

发育不全精子

发育不全精子



精子尾-尾凝集

精子头-尾凝集

精子头-头凝集

•3.4 畸形率

头部畸形



大头-左



大头



大头



小圆头



头形不正



双畸形头



小头



尖头



梨形头
纤维裸露



头形不正



头形不正



双头

3.4 畸形率

头部畸形



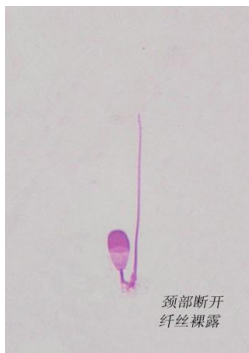
3. 4畸形率

尾部畸形

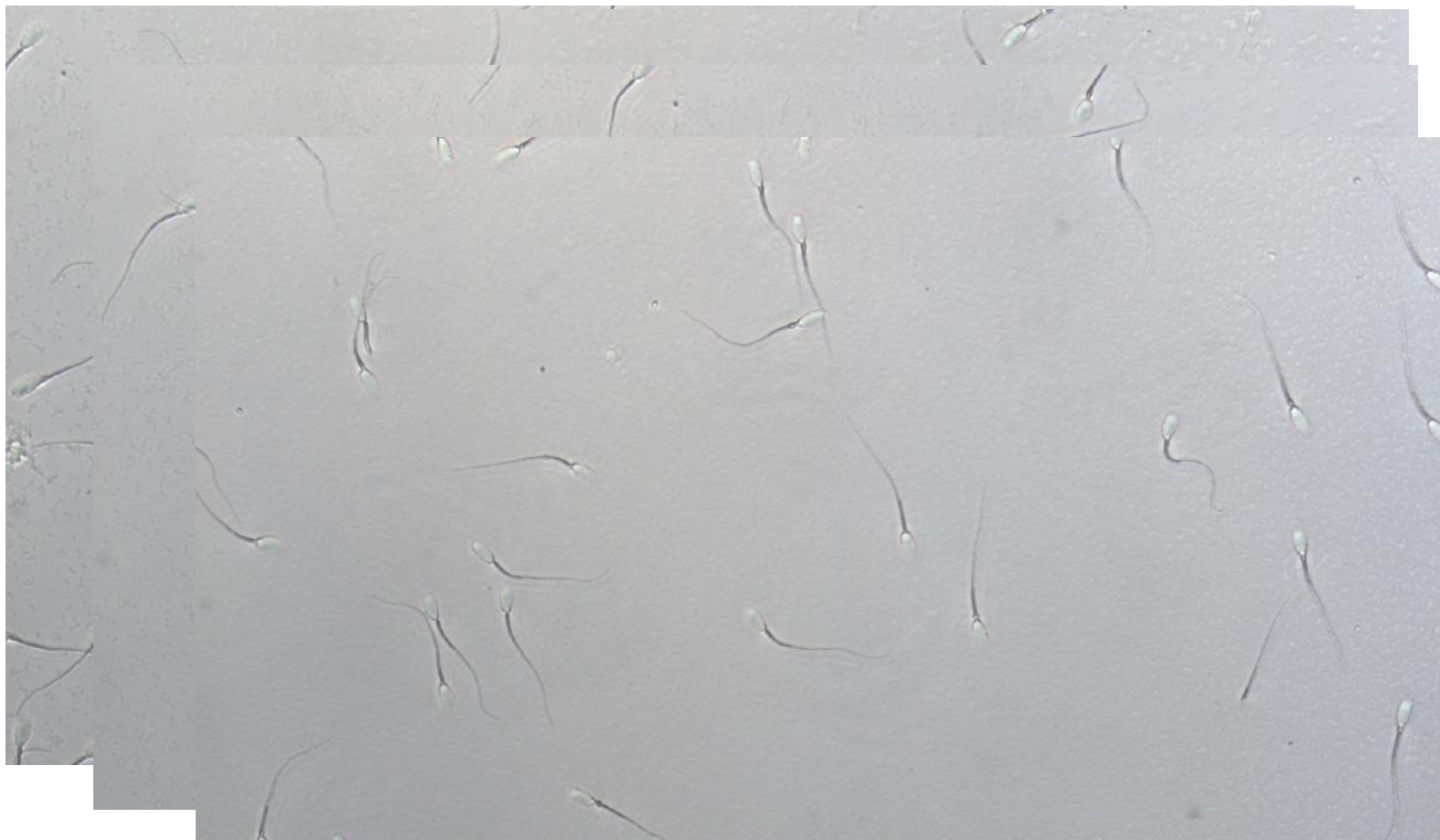


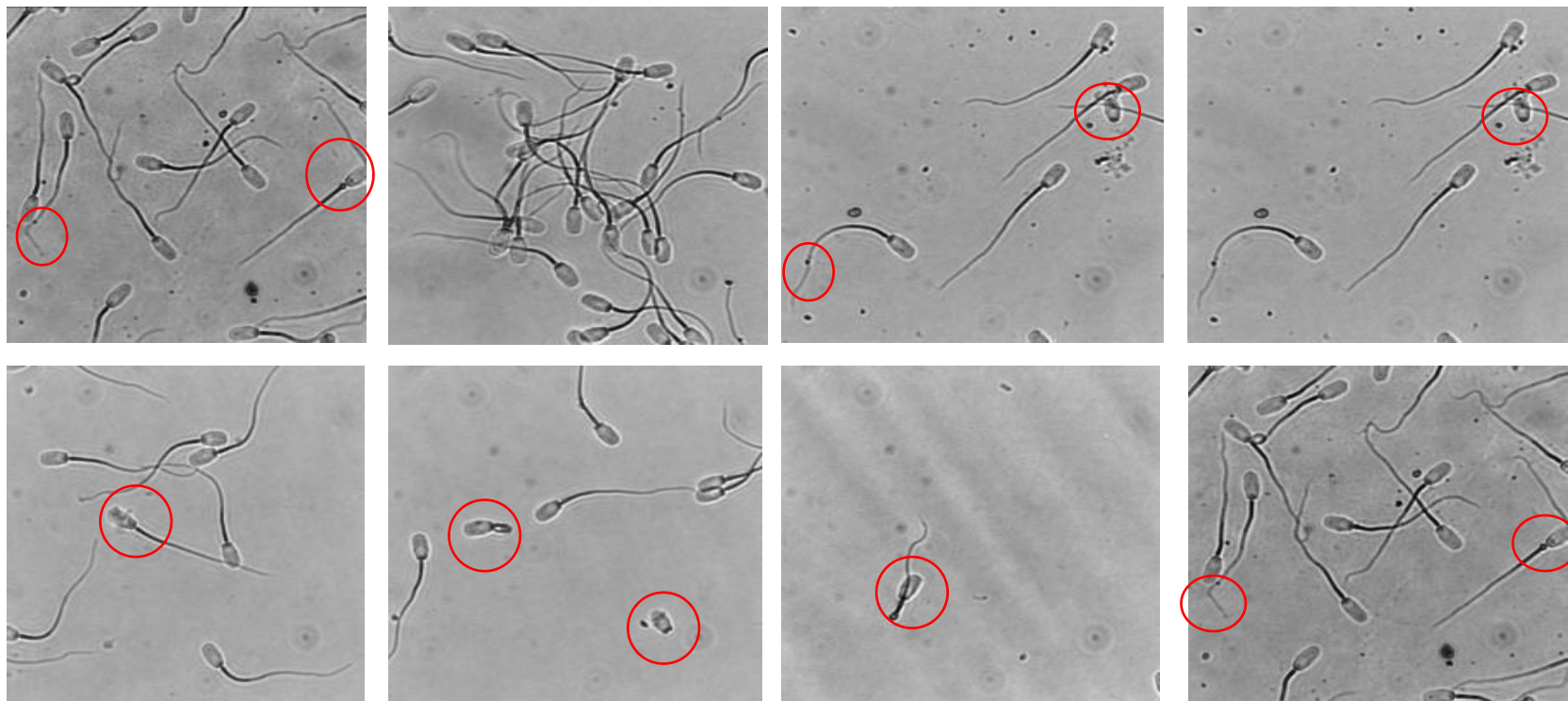
3.4 畸形率

尾部畸形

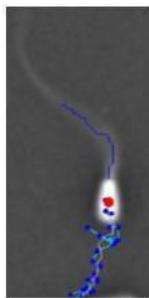
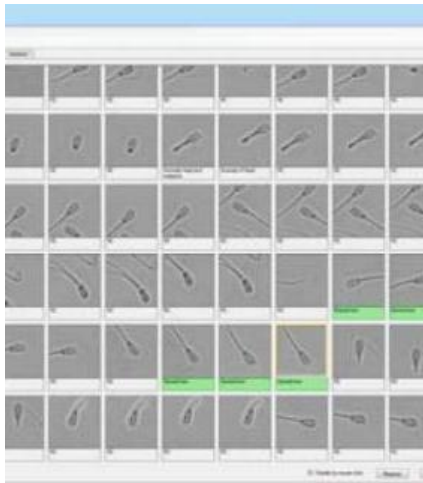


3.4 畸形率



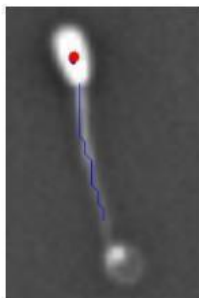


全自动精子质量分析仪畸形率分析结果 (CASA)



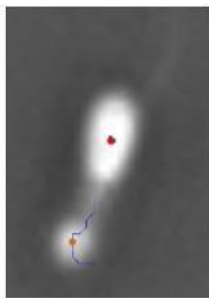
Bent tail

弯尾



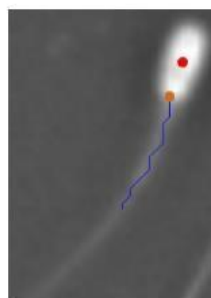
Coiled tail

卷尾



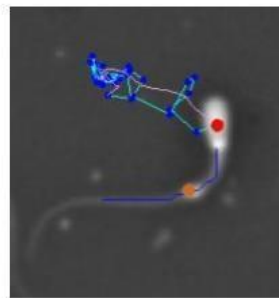
Distal Midpiece Reflex

DMR



Proximal droplet

近端原生质滴



Distal droplet

远端原生质滴

3.4 畸形率

注意事项：

- 抹片必须均匀，角度要掌握好，抹片晾干后才能进行染色；
- 在显微镜下观察畸形精子时，应先在低倍下找视野范围，然后再转到高倍下观察畸形精子的形态并记录；
- 用水冲洗染液的时候一定不能直接对着有精子的地方直接冲，应该冲载玻片边缘用水缓缓的冲去染液。

方法2：伊红苯胺黑快速染色法



- 作为活体细胞染色法的一种，可以在深色背景下使形态正常的精子不着色，胞浆透明，而**死精子和无完整膜结构的精子呈现红色**，可有效区分死亡精子，并能进一步分析精子结构。
- 有研究报道用4种伊红-苯胺黑活体染色法评价精子形态，结果表明，有3种方法能保持良好的精子自然形态，均可作为评定精子形态的使用方法。



抹片：

- 吸取 30 μL 样品和 10 μL 伊红苯胺黑染色液，放入离心管中，轻摇混匀，制成精液、伊红苯胺黑染色液的**混合液**，放置**约 30 s ~ 60 s**；
- 用移液器吸取 **10 μL** 精液、伊红苯胺黑染色液的混合液，滴于载玻片一端，用另一边缘光滑的载玻片与有样品的载玻片呈约 35° 夹角，先浸润与样品接触的边缘向另一侧缓慢推动，将样品均匀地涂抹在载玻片上，自然风干（约 5 min），制作 2 个抹片；

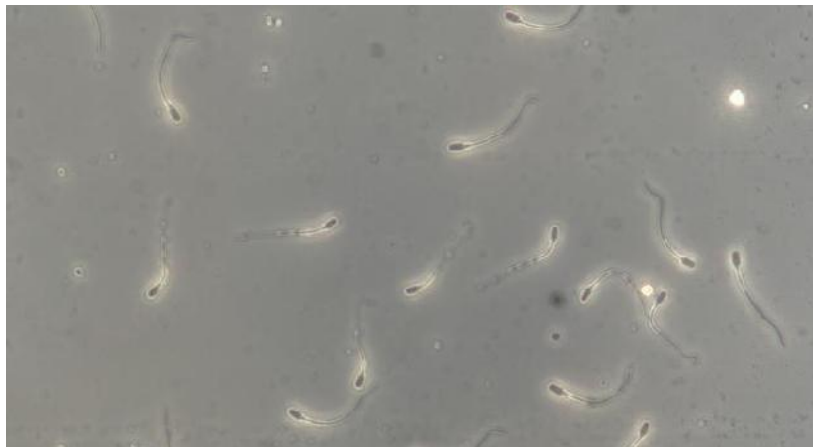
镜检与数据处理：

- 方法同姬姆萨染色法。

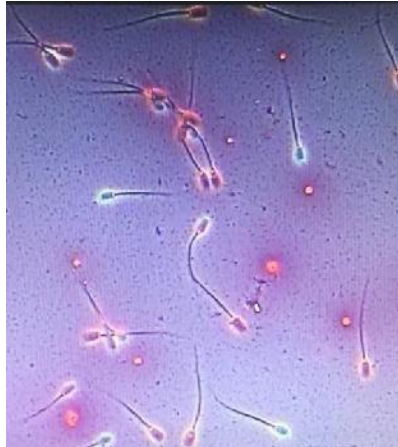
五种快速染色方法优缺点比较

序号	染色法	优点	缺点或不足	效果评价
1	姬姆萨染色法 (30min/样)	易清洗，背景干扰少。	偶尔颗粒物较多。	精子染色效果一般
2	伊红苯胺黑染色法 (1min/样)	活体混合染色，快捷，方便，还呈现双色，可识别活死精子，染色后，精子尾部直。	取样量少，不确定度大。	精子染色效果最佳
3	纯伊红染色法 (30s/样)	抹片前直接混合染色，快捷，方便	背景色比较重，伊红颗粒比较多，不易观察精子	染色效果不佳
4	考马斯亮蓝染色法 (30s/样)	对蛋白上色效果好，头部颜色比较明显。	背景颗粒物比较多，难清洗，通常要配合专业脱色液使用，操作步骤复杂。	精子染色效果一般
5	迪夫快速染色法 (30min/样)	背景干净。	不漂洗背景色重，漂洗则浅，但着色不明显，价格贵，每次染色消耗大量染液，适合大批量染色，重复使用效果不佳。	精子染色效果一般

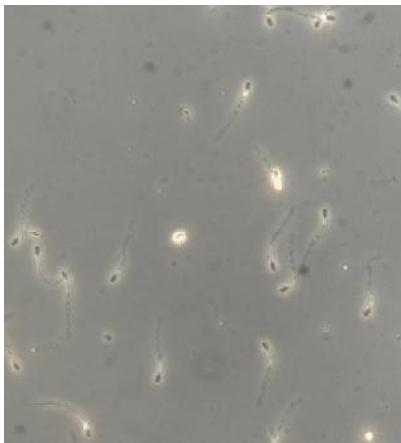
五种快速染色 方法效果图



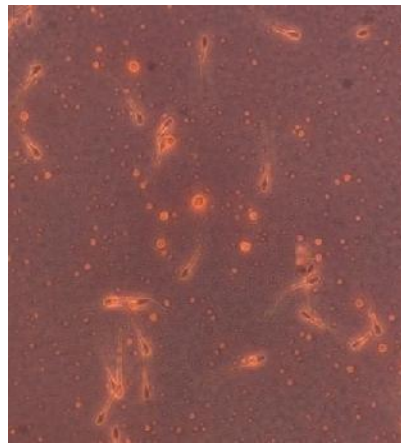
1. 姬姆萨染液：精液（1:1）



4. 伊红苯胺黑：精液（1:3）



2. 考马斯亮蓝：精液（1:1）



3. 伊红染液：精液（1:1）



5. 迪夫快速染色法：精液（1:3）

结论：伊红苯胺黑活体染色法，呈现双色，可识别活死精子，精子尾部直，精子形态的观察效果最佳，作为精子畸形率快速方法是可行的。

6种染色方法检测时长统计

单位: min

序号	染色方法	取样抹片时长 T_1	风干时长 T_2	固定时长 T_3	染色时长 T_4	晾干时长 T_5	显微镜观察时 T_6	单样检测总时长 $T_{总1}$	批量检测总时长 $T_{总2}$	批量检测时单个样品平均检测时长, $\bar{T}$
1	姬姆萨直接染色法	2	10	0	0.5	0	5	17.5	150	7.5
2	姬姆萨常规染色法	2	10	0	15	10	5	42	175	8.75
3	考马斯亮蓝染色法	2	10	0	0.5	0	5	17.5	150	7.5
4	伊红染色法	2	10	0	0.5	0	5	17.5	150	7.5
5	伊红苯胺黑染色法	2	10	0	1	0	5	18	160	8.0
6	迪夫快速染色法	2	10	11	1	20	5	49	182	9.1





感谢您的关注！

