



Кафедра инфекционных болезней,  
зоогигиены и ветсанэкспертизы

Б1.0.18 BIOTECHNIKA ВОСПРОИЗВОДСТВА С ОСНОВАМИ АКУШЕРСТВА

**СОВРЕМЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И  
КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ СПЕРМЫ БЫКА**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
к лабораторной работе

Направление подготовки  
36.03.02 Зоотехния

Профиль подготовки  
Кинология

Технология производства продуктов животноводства и пчеловодства

Квалификация выпускника - бакалавр

УДК 619:63. 60.2

ББК 48:46.0

Рекомендовано к изданию методической комиссии факультета биотехнологии и ветеринарной медицины

(протокол № 9 от «28» марта 2019 г.)

Составитель:

доктор ветеринарных наук, профессор Исмагилова Э.Р.

Ответственный за выпуск:

Заведующий кафедрой

инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы

доктор биологических наук, профессор Андреева А.В.

г. Уфа, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ

кафедра инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы

## ПОЯСНЕНИЕ К ТЕМЕ

Искусственное осеменение один из современных направлений биологической науки, который позволяет в короткий срок изучить производителя, получить от него огромное количество приплода и путем отбора и подбора усилить и закрепить полезные качества животных. В сельском хозяйстве при помощи искусственного осеменения и генной инженерии получают новые породы животных, отбирая ценные качества для получения, желаемого результата. Искусственное осеменение применимо при всех методах разведения и всех видах скрещивания сельскохозяйственных животных. Он представляет собой ряд технологических процессов и хозяйственных мероприятий, включающих отбор ценных производителей, сбалансированное кормление, оптимальный режим содержания и полового их использования, сбор, оценку и обработку спермы с целью сохранения и введения их в половые пути самки в период половой охоты.

В настоящее время технологические процессы быстро совершенствуются и получают дальнейшее свое развитие. Преимуществами новых технологических процессов являются применение оригинальных расфасовочных машин, автоматизация и механизация почти всех технологических процессов по уходу за быками, получению от них семени, оценке его, разбавлению, расфасовке, замораживанию, хранению и дальнейшему использованию. Недостатками отдельных технологических процессов являются сложные в регулировке и обслуживании оборудования и приборы, низкая производительность самой технологической установки.

Одну из современных лабораторий по замораживанию спермы быков представляет немецкая фирма Minitüb. Лаборатория обеспечена необходимым оборудованием, новейшими приборами, инструментами и материалами, которые позволяют в короткий срок собрать, обработать сперму и качественно ее сохранить. Каждый шаг протокола, фирмы Minitüb, сбора и подготовки бычьей спермы к замораживанию в соломках автоматизирован.

## ПРОТОКОЛ МИНІТЇВ ПО ЗАМОРАЖИВАНІЮ СПЕРМИ БЫКОВ

Протокол спеціально розроблений для підготовки быччєй сперми к замораживанию в соломках по 0,25 мл.

### До начала сбора спермы:

1. Включите все необходимые для работы приборы
2. Подготовьте необходимый объем разбавителя Андромед или Триладил согласно инструкции к соответствующему разбавителю
3. Поставьте подготовленный разбавитель в нагретую (33°C) водяную баню
4. Подготовьте необходимое количество стерильных форсунок наполнения и отсасывания согласно плану сбора спермы дня



Рис. 1. Водяная баня

5. Подготовьте необходимое количество макрокуветок для измерения концентрации спермы с помощью фотометра СДМ

6. Положите предметные и покровные стекла на столик нагрева для их нагревания

Контроль температуры:

предметный столик микроскопа с подогревом от  $+38,5^{\circ}\text{C}$  до  $+39^{\circ}\text{C}$ ;

предварительный подогрев предметных и покровных стекол;

водяная баня от  $+28^{\circ}\text{C}$  до  $+34^{\circ}\text{C}$ .

### **Шаг 1: Получение спермы**

- Стерилизация предварительно помытых вагин осуществляется в стерилизаторе вагин СТЕРИВАР
- Стерилизованные искусственные вагины нагреваются в специальном шкафу для нагрева вагин ( $+40^{\circ}\text{C}$ )



**Рис. 2. Стерилизатор вагин СТЕРИВАР**



**Рис. 3. Термостат для нагрева вагин (+40°C)**

- Соберите сперму предпочтительно на фантом – чучело,



**Рис. 4. Фантом чучело**

используя искусственную вагину и теплочехол (максимальная температура внутри вагины: +43°C)



**Рис. 5. Искусственная вагина и теплочехол**

- Передайте спермоприёмник с собранным эякулятом в лабораторию через окошко
- Свежесобранный эякулят в лаборатории держат в водяной бане.

**Минимальные требования, предъявляемые к эякуляту:**

Объем:> 2,0 мл

Концентрация:>  $0,6 \times 10^9$  /мл

Подвижность спермий с поступательным движением в нативной сперме: 70%

Подвижность спермий с поступательным движением, в сперме после оттаивания: > 50%

Морфология:

<20% - MAS

<10% - акросомальных отклонений

< 5% - аномалий головок.

## Шаг 2: Расчет объема эякулята

- Измерьте объем эякулята, используя для этого лабораторные весы.



Рис. 6. Лабораторные весы

### **Шаг 3: Определение мотильности (подвижности) эякулята**

- Определите подвижность спермиев с помощью микроскопа, или, в идеале, с помощью системы SpermVision™ CASA. Минимальные требования: 70% подвижных спермиев с поступательным движением.



**Рис. 7. Микроскоп системой SpermVision™ CASA.**

### **Шаг 4: Определение концентрации эякулята и необходимого объема разбавителя**

- Определите концентрацию эякулята, используя фотометр (SDM5)
- Рассчитайте необходимый объем разбавителя и количество соломок для расфасовки спермы, используя фотометр (SDM5).



**Рис. 8. Фотометр (SDM5)**

### **Шаг 5: Разбавление эякулята**

Прежде чем приступить к разбавлению, определите под микроскопом процент прямолинейно движущихся спермий (необходимый минимум составляет 70%).

Разбавьте эякулят предварительно подготовленным разбавителем в соотношении не менее чем 1:1 в течение 10 минут после взятия спермы, и после её исследования на качество и проведенных расчетов. На момент первого разбавления температура разбавителя и спермы должны быть одинаковы ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Второе и последующие разбавления можно производить при температуре окружающей среды, но в течение лишь нескольких минут. Разбавление на всех

этапах выполняется с помощью Smart Dispenser. После каждого этапа разбавления осторожно перемешивайте или вращайте эякулят.

Около 10 минут после разбавления следует провести выборочный (около 5%) контроль подвижности эякулята.



**Рис. 9. Smart Dispenser (для разбавления спермы на всех этапах)**

### **Шаг 6: Фасовка спермы в соломки и адаптация при температуре + 5°C**

**Вариант I.** Фасовка при температуре окружающей среды, до уравнивания.

Для наполнения и укупоривания соломок используют автоматическое фасовочно-укупорочное устройство МПП + Принтер Ляйбингер или МПП Кваттро + Принтер Ляйбингер, осуществляя при этом визуальный контроль процедуры во время ее выполнения.



**Рис. 10. Автоматическое фасовочно-укупорочное устройство МПП +  
Принтер Ляйбингер**



**Рис. 11. Автоматическое фасовочно-укупорочное устройство  
МПП Кваттро + Принтер Ляйбингер**

В начале каждого рабочего дня ставится стерильная форсунка отсасывания.

- Для каждого быка используется другая стерильная форсунка наполнения
- Шланги для форсунок наполнения и отсасывания одноразовые продукты и меняются для каждого быка
- Герметичность укупоренных соломок проверяется методом выборочного контроля, с использованием мандрена
- Наполненные и укупоренные соломки помещают на рампы, после чего подсчитывается количество произведенных соломок, без учета соломок, используемых для контроля качества партии продукции и других проверок.



**Рис. 12. Рампы**



**Рис. 13. Холодильный шкаф**

### **Шаг 7: Эквilibрация спермы (адаптация) при температуре + 5 °С**

**Вариант I.** Эквilibрация происходит в холодильнике (желательно с циркуляцией воздуха) или холодильном шкафу, что позволяет соломкам адаптироваться к температуре +5°C. Продолжительность адаптации составляет не менее 1,5 часов – обычно от 2 до 5 часов.

Рампы устанавливают в холодильник или холодильный шкаф горизонтально.



**Рис. 14. Рампы**



**Рис. 15. Холодильник**

**Вариант II. Упаковка при +5°C и одноэтапное разбавление**

- После окончательного разбавления эякулята при температуре, окружающей среды, далее в течение 30-45 минут происходит его охлаждение до +5°C
- Адаптация продолжается от 2 до 5 часов
- Соломки наполняются и укупориваются с использованием автоматического фасовочно-укупорочного устройства; при этом поддерживается температура +5°C.

**Вариант III. Упаковка при температуре +5°C и двухэтапное разбавление**

- При двухэтапном разбавлении для каждого этапа используются различные разбавители: используемый на первом этапе разбавитель не содержит глицерина, а используемый на втором - содержит. Это обеспечивает более

эффективное снижение температуры

- Сначала эякулят разбавляют не содержащим глицерина разбавителем и охлаждают до  $+5^{\circ}\text{C}$
- После того, как температура снизится до  $+5^{\circ}\text{C}$ , можно уже в любое время добавлять разбавитель, содержащий глицерин. Важно осуществлять мониторинг температуры
- Разбавитель с глицерином следует добавлять за 20 минут до замораживания спермы.

### **Шаг 8: Замораживание соломок со спермой**

- Соломки замораживают в горизонтальном положении на рампах в приборе для замораживания спермы МТ



**Рис. 16. Прибор для замораживания спермы МТ**

- Когда используются соломки 0,25 мл, продолжительность процесса замораживания составляет 8 минут, при начальных температурах от -110°C до -120°C. Когда используются соломки 0,5 мл, продолжительность процесса замораживания составляет 10 минут
- По окончании цикла замораживания соломки немедленно переносят в жидкий азот и хранят в LN2-контейнерах
- Необходимое количество соломок для целей контроля каждой партии произведенной продукции хранят отдельно
- После окончания замораживания морозильное устройство должно поработать без подачи жидкого азота с открытой крышкой до тех пор, пока весь лед и иней не растают. После этого следует досуха вытереть устройство хлопчатобумажным или бумажным полотенцем.



**Рис 17. Контейнер с жидким азотом**

### Шаг 9: Контроль партии продукции

- После замораживания, по 2 соломки из каждой партии собранной и обработанной спермы каждого быка размораживают и проводят оценку прямолинейной подвижности спермиев - либо субъективно, используя для этого систему SpermVision™ CASA
- Минимальное требование: >50% прямолинейно подвижных спермиев
- Проверенные партии ставятся на карантин на протяжении 28 дней
- После карантина спермадозы ставятся в спермабанк.

### Шаг 10: Размораживание спермы и подготовка спермадоз для контроля или искусственного осеменения

- Извлеките соломки из контейнера с жидким азотом и немедленно перенесите их в оттаиватель при +38° С (дефростер).



**Рис. 18. Оттаиватель для размораживания спермы при +38° С (дефростер)**

- Оттаивание спермы в соломках продолжается - 25-30 секунд



**Рис. 19. Бумажное полотенце**

- Высушите соломки, вытирая их чистым бумажным полотенцем
- Встряхните соломку таким образом, чтобы пузырек воздуха переместился в конец, укупоренный ультразвуком, после чего обрежьте этот конец, держа соломку данным концом вверх.

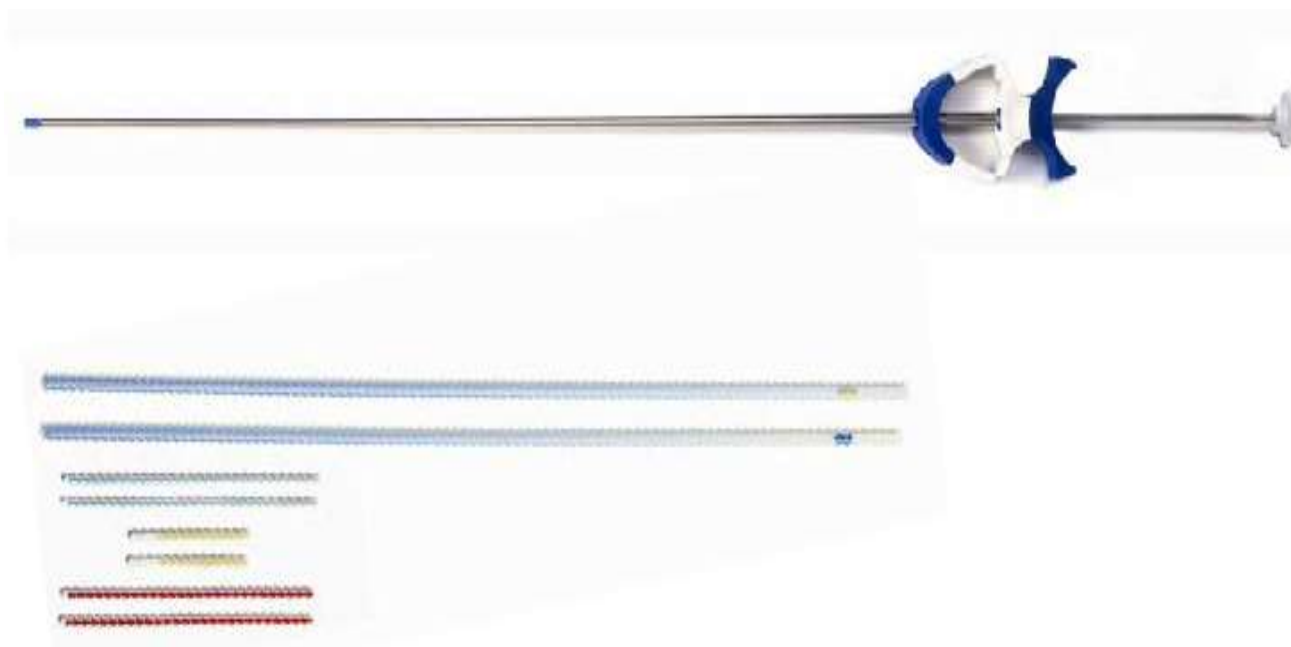
### **Шаг 11: Обычные процедуры оценки**

Регулярно проверяются следующие параметры произведенных спермадоз (выборочно около 5% эякулятов):

- Подвижность
- Общее количество спермиев
- Целостность мембраны
- Морфология
- Загрязненность

- Бактериальное загрязнение
- Резистентность

Осеменение проводится с помощью прибора осеменения, к примеру, Квиклок и универсального чехла осеменения.



**Рис. 20. Прибор осеменения Квиклок и универсальный чехол осеменения**

### Вопросы для самопроверки

1. Из каких этапов состоит технологический процесс замораживания бычьей спермы в соломках по 0,25 мл?
2. Какие работы необходимо провести до начала сбора спермы?
3. Каким способом собирают сперму у быка?
4. В чем осуществляется стерилизация предварительно помытых вагин?
5. Где и при какой температуре нагреваются стерилизованные искусственные вагины до начала сбора спермы?
6. Какие разбавители применяют для разбавления спермы быка?
7. Каким способом готовится необходимый объем разбавителя Андромед или Триладил?
8. После сбора спермы, куда передают спермоприёмник с собранным эякулятом и в чем ее держат?
10. Какие минимальные требования предъявляют к свежеполученному эякуляту?
11. Какими методами определяют подвижность спермиев?
12. Какой показатель определяют с помощью системы Sperm Vision™ CASA?
13. На каком приборе определяют концентрацию эякулята?
14. Какой прибор применяют для расчета необходимого объема разбавителя и количество соломок для расфасовки спермы?
15. Из скольких этапов состоит разбавление спермы?
16. Необходимо ли после каждого этапа разбавления вести контроль подвижности эякулята?
17. Какие устройства применяют для наполнения и укупоривания соломок?
18. Что такое эквilibрация и сколько вариантов она имеет?
19. При какой температуре и где проводится эквilibрация?
20. Как замораживают сперму быка?
21. Ведется ли контроль партии продукции спермадоз после замораживания и перед искусственным осеменением?

22. Как называется прибор для размораживания спермы?
23. При какой температуре размораживают сперму?
23. Регулярно ли и на какие параметры проверяются произведенные спермадозы?
24. Проверяют на качество спермы всю партию спермадоз или выборочно?
25. Какие приборы применяют для осеменения коров?
26. Для какой цели применяется сосуд Дьюара?

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Басовский Н.З. Крупномасштабная селекция в животноводстве / Н.З. Басовский, В.П. Буркат, В.И. Власов, В.П. Коваленко. – К., 1994. – 365 с.
2. Басовский Н.З. Селекция скота по воспроизводительной способности / Н.З. Басовский, Б.П. Звертяев. - М., 1975. - 220 с.
3. Жебровский Л.С. Генофонд сельскохозяйственных животных и его использование в селекции. - Л.: Колос, Ленингр. отд-ние, 1983. – 352 с.
4. Жилов В.Н. Племенная работа и искусственное осеменение в молочном скотоводстве. / В.Н. Жилов, В.А. Скворцов. – Архангельск, 1974. – 60 с.
5. Завертяев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / Б.П. Завертяев. – Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд-ние, 1989. – 229 с.
6. Завертяев Б.П. Селекция коров на плодовитость / Б.П. Завертяев. Л.: Колос, Ленингр. отд-ние, 1979. – 208 с.
7. Климов А.Ф. Анатомия домашних животных /А.Ф. Климов, А.И. Акаевский. Изд.7, Лань - С. Петербург – Москва - Краснодар, 2003. -1039 с.
8. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных / В.К. Милованов. – М.,1962. – 696 с.
9. Муромцев Г.С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев, Р.Г. Бутенко, Т.И. Тихоненко, М.И. Прокофьев. – М.: ВО Агропромиздат. – 384 с.
10. Никитин В.Я. Практикум по акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных / В.Я. Никитин, М.Г. Миролубов, В.П. Гончаров, В.В. Храмцов, О.Н. Преображенский - М.: Колос С, 2004. - 208 с.
11. Студенцов А.П. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения / В.С. Шипилов, В.Я. Никитин, М.Г. Миролубова, Л.Г. Субботина. О.Н. Преображенскиц, В.В.Храмцов. - М.: Колос, 2000. - 495 с.

## НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Triladyl®	(13500/0250)
Andromed®	(13503/0200)
Biladyl® A, B, AB	(13500/xxxx)
Стеклянные или пластиковые лабораторные стаканы	(15423/0500)
Не оставляющие волокон хлопка бумажные полотенца	(15230/9001)
Весы	(14295/0444)
Водяная баня	(14078/0001)
Фотометр SDM5	(12300/0005)
Кюветы для SMD5	(12301/0003)
NaCl, 0,9%, 1 л	(12301/4667)
Дозатор для NaCl	(12428/1815)
Фиксированная или регулируемая пипетка	(12425/9000)
Фазово-контрастный микроскоп	(12004/0331)
(Микро) предметные стекла	(15400/2400)
Покровные стекла	(15401/0990)
Микропипетки, одноразовые	(15403/0555)
Счетные камеры „Thoma neu“	(15150/4771)
Соломки 0,25 мл	(13407/xxxx)
CombiSystem	(13018/0002)
Морозильное устройство MT-Freezer	(16812/0000)
Штативы для соломок 0,25 мл	(15040/xxxx)
Загрузочный блок	(15041/xxxx)
Жидкий азот	
Алюминиевая канистра	(16965/6013)
Стаканы, различные размеры	(16xxx/xxxx)
Пинцеты	(17060/0025)

Криозащитные перчатки	(23830/0520)
MVE криогенный контейнер	(16520/2006)
Устройство для размораживания	(17043/3542)
Перчатки для осеменения, голубые	(17080/xxxx)
Набор для проведения искусственного осеменения	(17050/0050)
Дозатор Smart Dispenser	(13200/0700)
Насос для Smart Dispenser	(13200/0790)
Система SpermVision™ и аксессуары: просьба обращаться к контактному лицу Minitüb в регионе.	

**Фирма Minitüb рекомендует за дополнительной информацией обращаться к руководствам по эксплуатации представленного оборудования.**

### **Адрес фирмы Minitüb**

Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co.KG  
Hauptstr.41  
84184 Tiefenbach  
Germany  
Телефон: +49 (0) 8709 9229 0  
Факс: +49 (0) 8709 9229 39

Подписано в печать «    » \_\_\_\_\_ 2008

Формат бумаги 60\*84. Бумага типографская. Гарнитура «Таймс».

Усл. Печ. л. \_\_\_\_\_. Усл. Изд. л. \_\_\_\_\_ № \_\_\_\_\_ Тираж \_\_\_\_\_ экз. Заказ № \_\_\_\_\_

Издательство Башкирского государственного аграрного университета  
Адрес издательства и типографии 450001, г. Уфа, ул. 50 лет Октября, 34

