



種畜禽產品加值方法之研究

種畜精子分離篩選與選性繁殖生產系統

100年3月9日

■種畜禽產業研究團隊整體計畫架構魚骨圖：服務產業為主軸(2011年01月03日修訂)

FABRC (Food Animal Breeding Research Consortium)

總召集人：畜產試驗所 黃英豪所長

(註：劃底線之重點工作須農委會處局配合辦理)

99-102年 種畜禽產品加值方法之研究

- 生殖細胞供應體系研究
- 細胞凍存活用及凍精凍胚品管技術應用

優質動物人工繁殖體系

- 遺傳資源典藏方法開發
- 產品之基因驗證模式開發
- 動物基因條碼附加價值研發
- 品種DNA寄存

主力品種性能檢定及血統登錄

主力品種種畜禽場評鑑 及展示拍賣輔導

學者專家團隊

- 宋永義教授
- 李淵百教授
- 姜延年教授
- 張秀鑾教授
- 陳秋麟教授

台灣種畜禽產品外銷輔導推廣

- 台灣區種豬產業協會
- 中華民國養豬協會
- 中華民國乳業協會
- 中華民國酪農協會
- 中華民國養羊協會
- 中華民國養鹿協會
- 台灣養鹿協會
- 中華民國養雞協會
- 中華民國養鴨協會
- 中華民國養鵝協會

育成廠商團隊

- 台灣農畜產公司
- 台禽生技公司
- 凱馨實業公司
- 台鹿農產行
- 晶宇生技公司

97-101年 耐熱型種畜禽品種供應網

- 種豬產業主力品種繁殖供應體系建立
- 種牛產業主力品種繁殖供應體系建立
- 種羊產業主力品種繁殖供應體系建立
- 種鹿產業主力品種繁殖供應體系建立
- 種雞產業主力品種繁殖供應體系建立
- 種鴨產業主力品種繁殖供應體系建立
- 種鵝產業主力品種繁殖供應體系建立

品種產出 品質精進 品牌創新

| | | |
|----------|-------------|---------------|
| 行政院農業委員會 | 畜牧處、科技處、國際處 | 動植物防疫檢疫局 |
| 畜產試驗所 | 家畜衛生試驗所 | 動物科技研究所 中央畜產會 |

- 場內檢定新技術研發應用
- 品種品質鑑定技術應用
- 種用動物展示拍賣設備建置
- 性能檢測記錄自動化
- 種畜禽產業數位化服務
- 活畜禽裝箱海空運技術改進
- 種畜禽適應狀況追蹤資訊庫
- 種蛋長程運送兼續孵設備
- 運送通關紀錄網路化

種畜禽場名冊

總目標： 100家
100年目標： 85家
累計至2月止： 73家

99-102年 種畜禽性能檢定技術創新與遠程運送技術開發

- 亞太各國種畜禽育種繁殖體系
- 亞太各國種畜禽需求評估
- 亞太各國進口種畜禽防檢疫及衛生條件之調查及協商

- 建立種畜禽場自衛防疫網
- 種畜禽健康監測技術之開發與應用
- 種畜禽場健康諮詢及輔導
- 種畜禽動物保健資訊庫
- 無特定病原雞、番鴨及兔供應

97-101年 種畜禽產業的生物安全防護網



工作項目：1 性別控制胚生產系統建立

- 胚胎性別鑑定技術。
- 顯微操作取樣技術。
- 新鮮胚細胞樣品之採集、性別鑑定及胚移置整體流程之規劃與實施。
- 性別控制胚體外生產
- 選性胚移置後其準確性之評估。

(恆春分所) (新竹分所) (生理組)

山羊體內胚性別鑑定流程



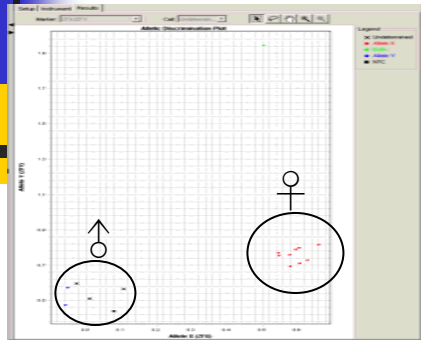
Surgical



Superovulation reaction



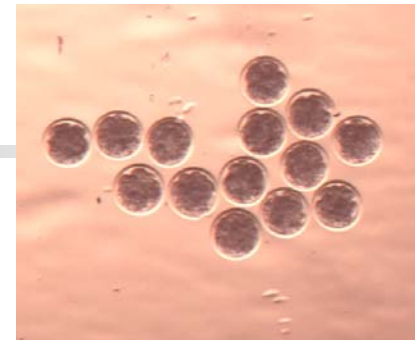
Flushing embryos



Real-time PCR



Micromanipulation



Morula stage



IVC to blastocyst



Recipient



Embryo transfer

性別控制仔羊生產



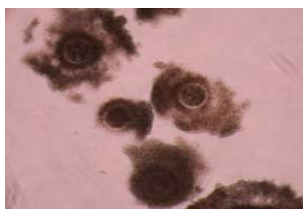
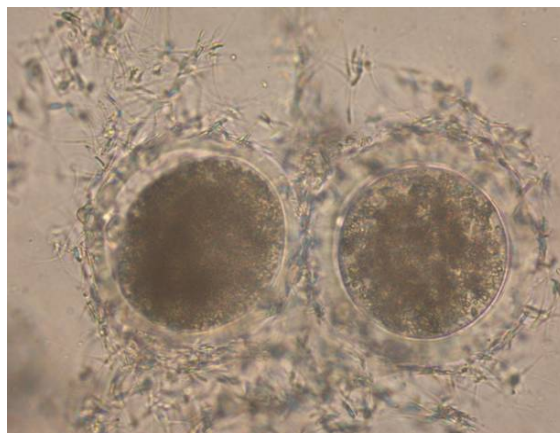
選性公胚所生產之公仔羊



選性母胚所生產之母仔羊

乳牛性別控制胚體外生產

體外卵母細胞收集 → 少量選性精液體外授精 → 選性胚體移置



■ 優點

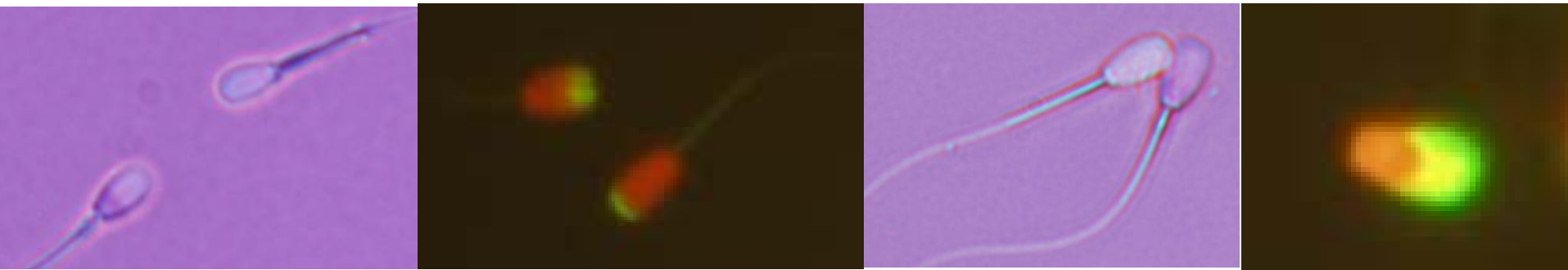
1. 成本低(平均5000個選性精子可讓1個卵授精)
2. 收集大量之卵母細胞，可經過嚴格篩選增加牛胚後續的發育能力

■ 缺點

1. 卵母細胞來源不明(無母系遺傳背景資料)
2. 卵母細胞體外成熟效果不如體內成熟

工作項目：2 水鹿X、Y精子分離條件 之評估及冷藏保存技術建立

- 1、麻醉保定暨公鹿電激採精技術。
- 2、精液性狀與型態分析。
- 3、精液冷藏保存技術。



台灣水鹿精液冷藏精液配方設計與製備流程

Semen collection



Sperm motility



Sperm viability

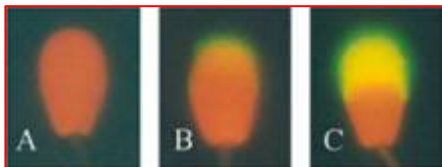
Semen evaluation

TCY

TY

CY

4 °C 12 h



Acrosome integrity

台灣公水鹿電激採精



表 2. 不同稀釋液種類對台灣水鹿精液冷藏 (4°C) 保存過程中精子活力、存活率和頭帽完整性之影響

| Items | 0hr | | | 12hr | | |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | TCY (1) | TY (2) | CY (3) | TCY | TY | CY |
| SMS ⁽⁴⁾ (0-5) | 5±0 ^a | 5±0 ^a | 5±0 ^a | 5±0 ^a | 5±0 ^a | 4±0 ^b |
| VIAB ⁽⁵⁾ (%) | 89.3±0.7 ^b | 92.1±0.9 ^a | 88.3±0.8 ^c | 86.8±0.5 ^d | 88.1±0.8 ^c | 84.2±1.0 ^e |
| NAR ⁽⁶⁾ (%) | 86.5±0.7 ^b | 88.5±0.3 ^a | 85.4±1.0 ^c | 82.3±0.6 ^d | 82.5±0.6 ^d | 77.3±0.7 ^e |

(1) Tris-citric-base medium; (2) TES-base medium; (3) Sodium citrate-base medium; (4) Sperm motility score;

(5) Sperm viability; (6) Acrosome integrity.

a, b, c, d, e Values without same superscripts in the same row are significantly different (P < 0.05).

精子的型態越扁平對性別分離越有利

Sambar deer

8.4

(red deer: 8.0)

6.0 (4.5)



37.8 (30.6)

X-Y difference 3.8

143.6

Dimensions and profiles of sperm heads and flow cytometric sorting indices for some domestic mammals and man^a

| Dimension | Bull | Boar | Ram | Rabbit | Cat | Dog | Horse | Man |
|----------------------------|------|------|------|--------|------|------|-------|------|
| Length (μm) | 9.1 | 9.0 | 8.1 | 7.7 | 7.7 | 7.0 | 6.5 | 4.6 |
| Head sagittal section | | | | | | | | |
| Width (μm) | 4.7 | 5.0 | 4.0 | 4.5 | 3.2 | 3.5 | 3.4 | 3.2 |
| Head profile | | | | | | | | |
| Area (μm^2) | 34.5 | 37.5 | 26.6 | 28.0 | 19.0 | 20.9 | 15.2 | 10.8 |
| X-Y difference (%) | 3.8 | 3.6 | 4.2 | 3.0 | 4.2 | 3.9 | 3.9 | 2.8 |
| Sorting index ^b | 131 | 115 | 112 | 84 | 80 | 82 | 59 | 31 |

^a Compiled from Mann [67] Mann and Lutwak-Mann [68], Johnson [7], Welch and Johnson [6], Garner [11], Garner and Seidel [13] and Seidel and Garner [14].

^b An approximation of the ability to flow cytometric sort sperm consisting of the head profile area (μm^2) \times X-Y Sperm DNA difference (%).

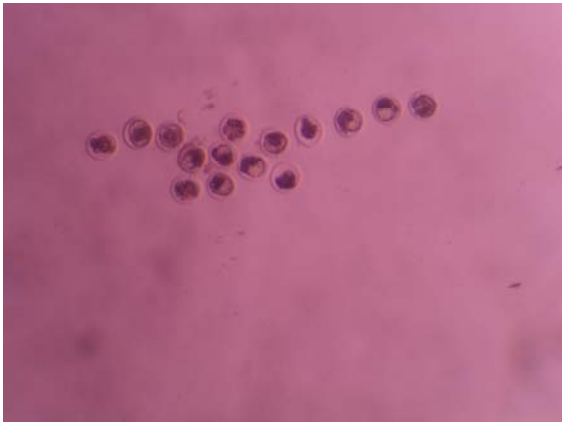


工作項目：3 乳牛選性精液人工授精

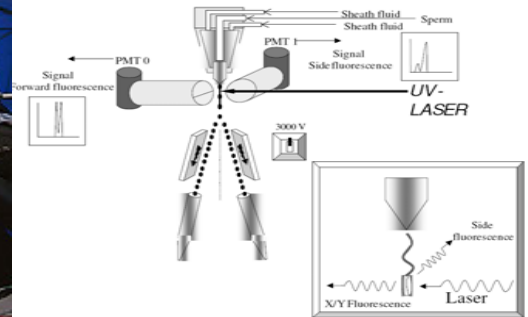
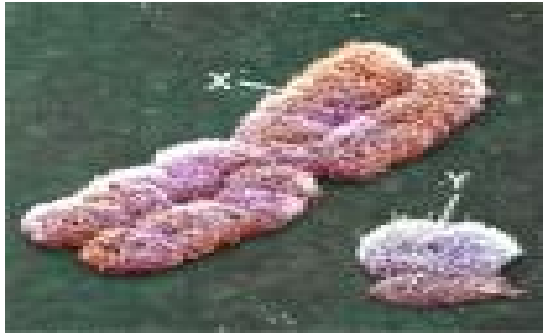
- 目前使用傳統與選性冷凍精液進行乳牛之人工授精與洗胚操作，
- 在傳統冷凍精液方面，完成3頭母牛之洗胚操作，得到35個胚，其中可移置胚有22個；
- 而選性冷凍精液方面，則完成2頭母牛之洗胚操作，得到6個胚，其中可移置胚有3個。
- 顯示進行乳牛之人工授精與洗胚操作，使用傳統冷凍精液會比使用選性冷凍精液得到較佳之成果。

(新竹分所)

乳牛選性體內胚生產過程



目前性別控制繁殖以精子之性別分離最具產業應用價值，此一方法可利用流式細胞儀(Flow cytometry)快速辨識精子中X或是Y染色體的差異量來大量生產單一性別精液，其鑑別速率已可達每秒40000隻精子，且正確率依分離速度條件可達90%以上，方便性及生產效率皆相當高。





工作項目：4 建立最佳化種畜精子冷藏保存與性別篩選染色操作模式

- 建立精子分離前處理稀釋液LDL由蛋黃中萃取之方法
- 精子分離前處理稀釋液之比較
- 建立精子活力分析標準
- 建立精子性別分離染色操作模式



精子分離前處理稀釋液之比較

- 配方一：含20%蛋黃之TCF稀釋液（100 mL）
Tris (hydroxymethyl) aminoethane 2.42 g Citric acid 1.48 g
Fructose 1.00 g Gentamicin 25 mg Penicillin-streptomycin 50000 IUEgg yolk 20% (v/v) Glycerol 6.4%
- 配方二：含8% LDL之TCF稀釋液（100 mL）
Tris (hydroxymethyl) aminoethane 2.42 g Citric acid 1.48 g
Fructose 1.00 g Gentamicin 25 mg Penicillin-streptomycin 50000 IU LDL 8% (w/v) Glycerol 6.4%



不同稀釋液之比較結果

| | (冷凍前) | 配方1 (解凍後) | 配方2 (解凍後) |
|-----------|-------|-----------|-----------|
| 活力 (1-5) | 5 | 4 | 5 |
| 存活率 (%) | 97.5 | 84.4 | 93.7 |
| 頭帽完整性 (%) | 89.95 | 73.22 | 76.28 |

利用蛋黃萃取純化之LDL做為保護劑有顯著之效果

是否去除精漿對採精後添加稀釋液LDL 冷藏保護效果之影響

| Items | 0hr | | 8hr | |
|-----------|------|------|------|------|
| | 去精漿 | 不去精漿 | 去精漿 | 不去精漿 |
| VIAB (%) | 80.3 | 93.1 | 72.6 | 88.1 |
| SMS (0-5) | 5±0 | 5±0 | 4±0 | 5±0 |



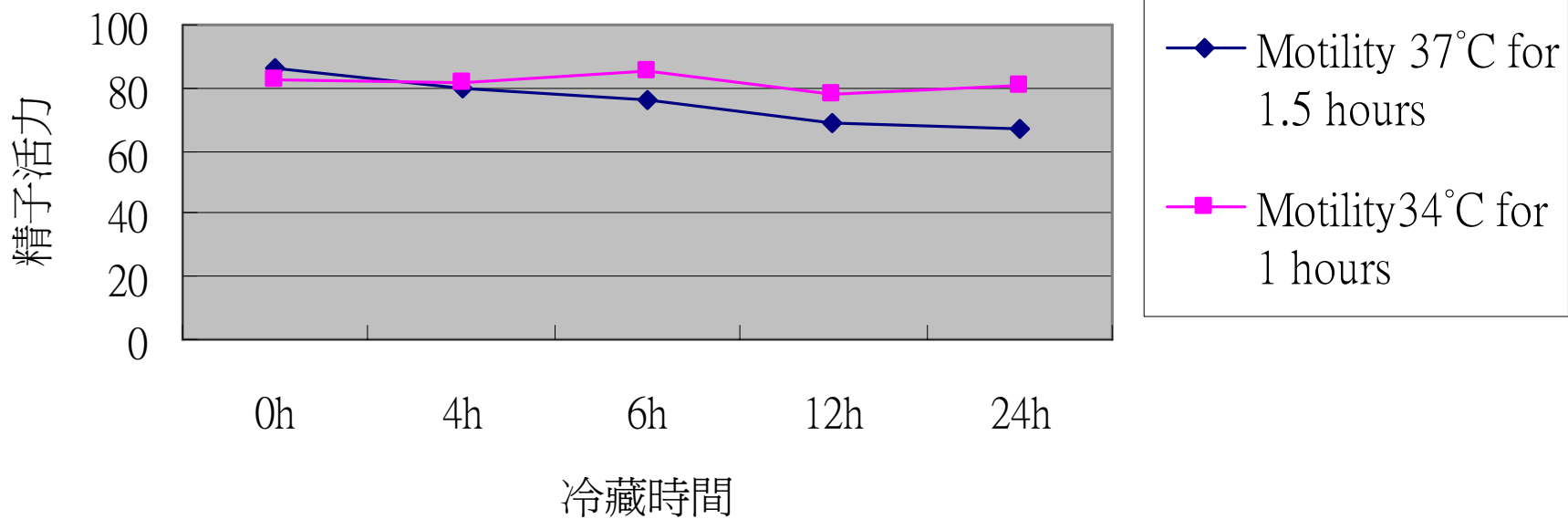
精子活力分析標準化

利用Makler counting chamber為平台，以VedioTesT Sperm 2.1軟體進行分析精子活力分析。分析參數如下：精子活力（sperm motility）：活動精子所佔之百分比來評估。

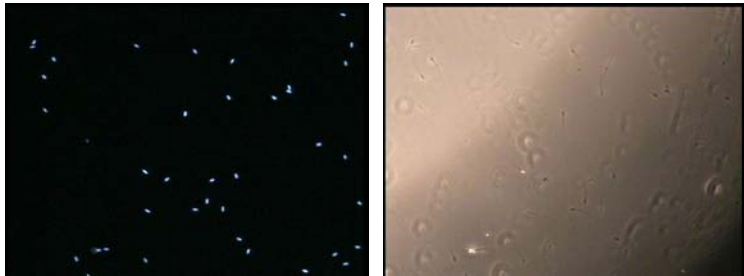
1. 直線運動速率（straight linear velocity, VSL, μ m/s）
2. 曲線運動速率（curvilinear velocity, VCL, μ m/s）
3. 頭部側向位移動幅度（amplitude of the lateral head displacement, ALH, μ m）
4. 線性指數（linearity index, LIN）： $LIN = (VSL/VCL) \times 100$
5. 平均移動速率（average path velocity, VAP, μ m/s）
6. 頭部位移頻率（frequency of head displacement, BCF, Hz）
7. 擺動係數（wobble coefficient, WOB）： $WOB = (VAP/VCL) \times 100$
8. 平均係數（mean coefficient）： $STR = (VSL/VAP) \times 100$

精子性別分離前的染色條件

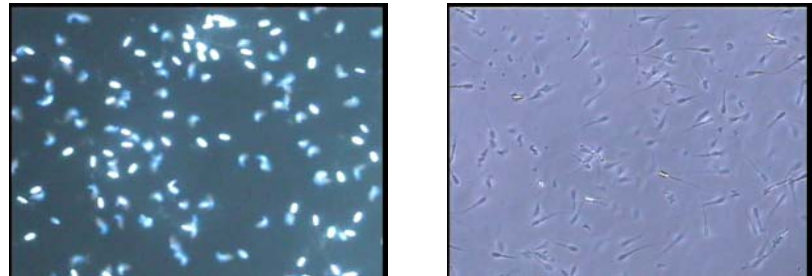
染色時間溫度對精子冷藏保存活力影響



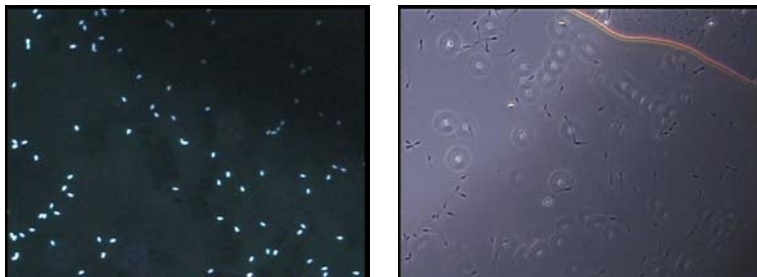
建立精子性別分離染色操作模式



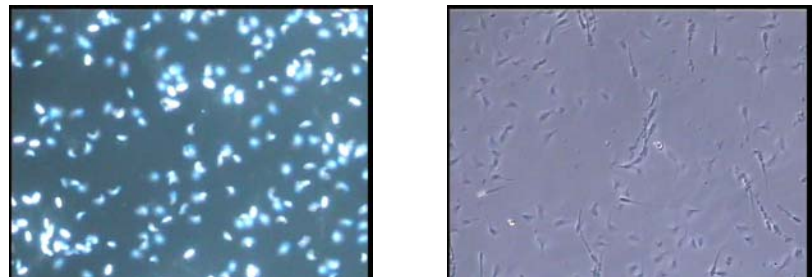
染色後6小時



染色後0小時



染色後12小時



染色後24小時

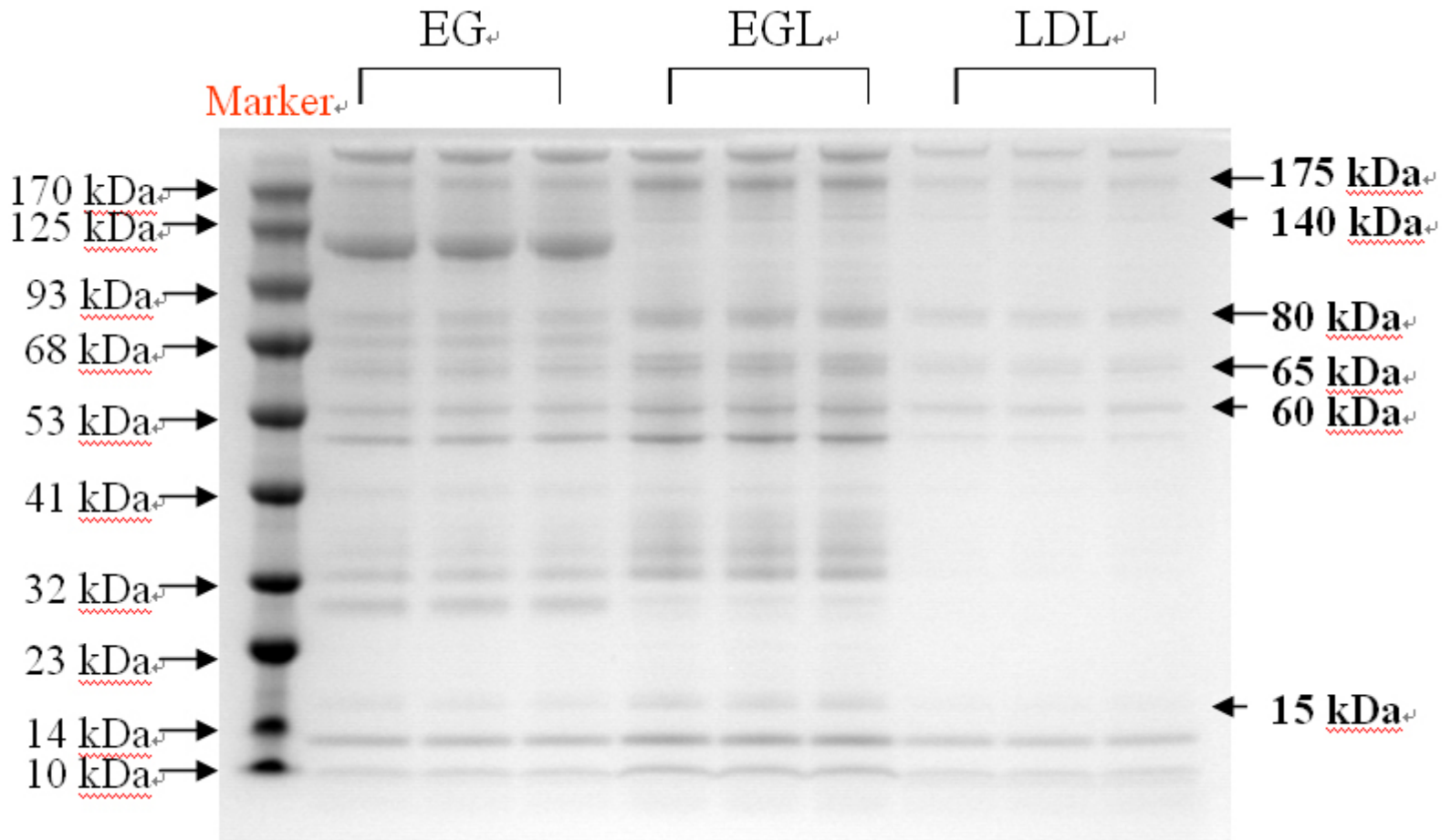
8.12 mM Hoechst 33342 solution and
incubated at 34 °C for 1 hours

LDL 萃取流程

- 本方法系參照Moussa *et al*, 2002; Hu *et al*, 2005; MZ *et al*, 2008等人發表文章中之方法略加修改而得。



SDS-PAGE膠體電泳分析



SDS-PAGE膠體電泳分析結果

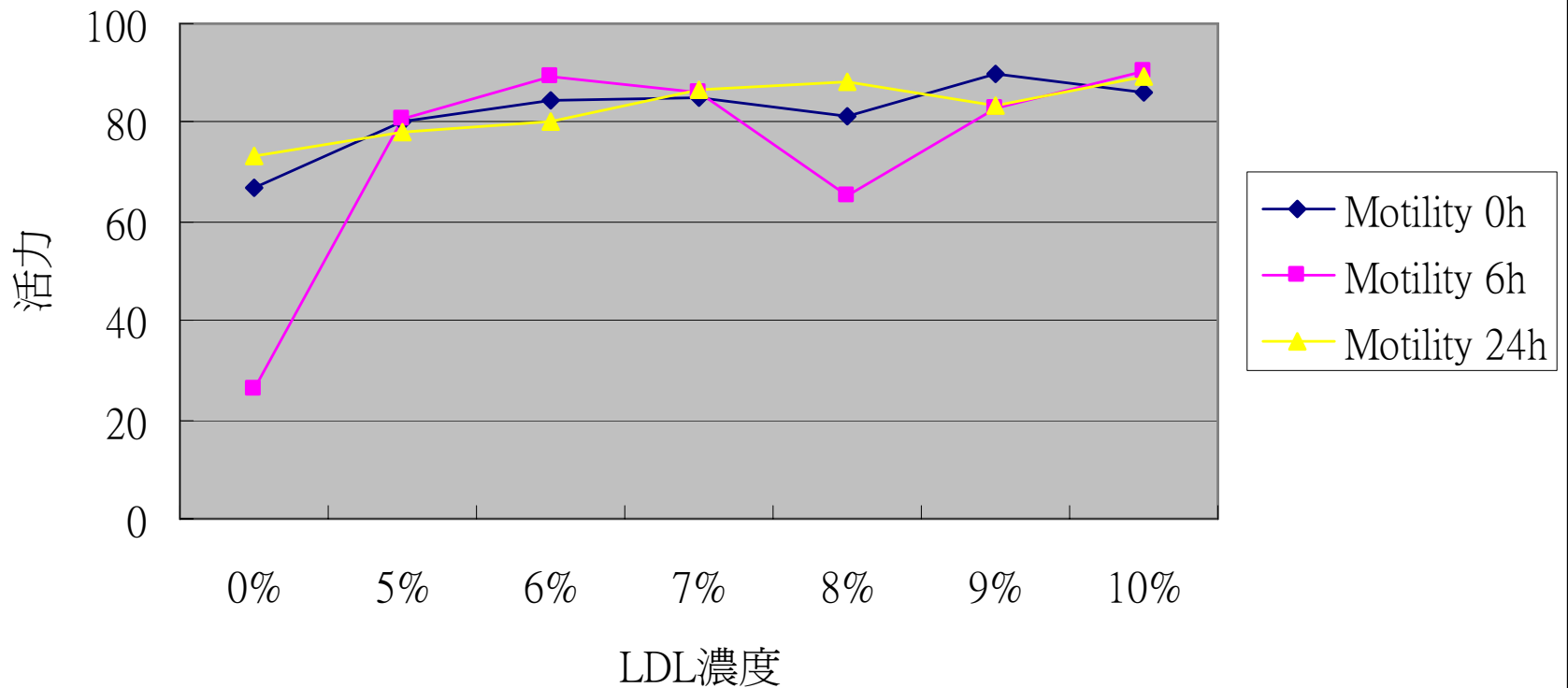
精子基本物理性狀分析

- 利用法國IMV（卡蘇）公司之精子分析儀（微細管流式細胞儀）配合CytoSoft v 5.4.1 beta 5之軟體分析精子存活率（Viability）、頭帽及胞膜完整性（Acrosome and sperm membrane integrity）、DNA完整性（Chromatin integrity）等參數。



精子性別分離前稀釋液LDL的適當濃度

LDL濃度冷藏時間對精子活力之影響





種畜精子冷藏保存與性別篩選染色操作模式

- 採精後以9% LDL TCG base稀釋液調整濃度為1億/ml 37 °C保存
- 分裝染色8.12 mM (H33342) 34 °C 1h
- 隔水降溫至4 °C避光條件下冷藏
- 每次取1 ml含1億隻精子進行性別篩選，可收集理想性別精子2000萬隻/小時

利用精子篩選儀器開發乳牛、山羊及水鹿X、Y 精子分離技術，及進行精液性別篩選



本年度採購 BECKMAN com MoFlo XDP' s 高速流式細胞分選
設備2兩台，於7月完成儀器裝設。

敬請指教

