

種畜禽加值產品查驗體系研討會

雞精液與種蛋供應網

台灣土雞冷凍精液製作、繁殖力評估及應用

國立中興大學動物科學系
黃三元

105.05.26
行政院農業委員會畜產試驗所



大綱

- 一、前言
- 二、影響雞隻冷凍精液之因素
- 三、冷凍保存對精子與其繁殖力之影響
- 四、台灣土雞冷凍精液製作
- 五、台灣土雞冷凍精液繁殖力評估
- 六、台灣土雞冷凍精液之應用及未來



一、前言

➤ 精液冷凍保存之目的

- ◆ 保持生物基因庫的多樣性
- ◆ 保種
- ◆ 引種



➤ 最早冷凍禽類精液：Shaffner et al. (1941)

- ◆ 抗凍劑fructose
- ◆ 混合精液直接滴到-76°C乾冰與酒精的固態混合物上
- ◆ 解凍後只得到活力低弱精子，
- ◆ 人工授精後胚胎只發育到10-15小時便停止生長 (Shaffner, 1942)

➤ Polge et al. (1949; 1951) 進行雞精液冷凍，有較多小雞孵出。



目的

1. 影響雞隻冷凍精液因素
2. 台灣土雞冷凍精液製作
3. 台灣土雞冷凍精液繁殖力評估及應用



表 1、雞精液之化學組成及物理性狀

Constituent or property	Whole semen	Spermatozoon	Seminal plasma
Water content (%)	-	59.9	96.4
Specific gravity	-	1.1722	1.011
Calcium (meq/liter)	2.46	0.72	2.55
Magnesium (meq/liter)	5.8	17.09	5.11
Sodium (meq/liter)	152.99	53.58	158.76
Potassium (meq/liter)	15.6	61.38	12.93
Copper (meg/liter)	-	-	10.0
Zinc (meq/liter)	-	-	1.275 (0.06-0.52)
Chloride (meq/liter)	41.6	37.2	37.2
Uric acid (mg/100ml)	40.5 (10.1-88.2)	-	-
Urea (mg/100ml)	9.1 (1.8-22.5)	-	-
Protein (mg/100ml)	1.8-2.8	-	-

(李, 1978)



二、影響雞隻冷凍精液之因素

- 精液組成分及精子物理構造
 - ➔ 配出適合精子維持受精力的稀釋液
- 短時間常溫及低溫保存精子遭受的傷害及改變
 - ➔ 發展精子的冷凍保存技術

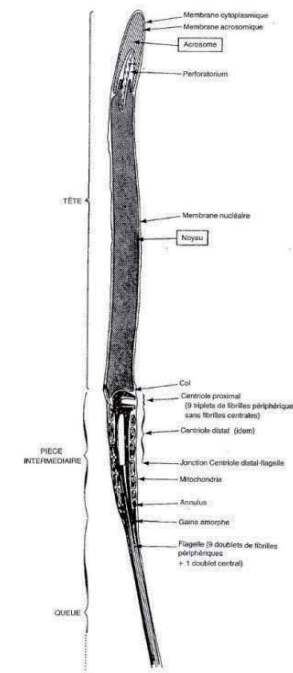


圖 1、雞精子頭部顯微結構

(Sauveur, 1988)



➤ 影響雞隻精液冷凍因素

- ◆ 稀釋液成分
- ◆ 冷凍降溫速率
- ◆ 抗凍劑
- ◆ 冷凍精液包裝



9



表2、雞冷凍稀釋液配方

	Sexton and Fewlass (1978)	Chalah et al. (1999)	Schramm et al. (1982)	Lake (1968)	Mocé (2010)
Sodium Glutamate	8.67	19.20	28.50	19.20	19.20
Fructose	5.00	8.00		8.00	8.00
Glucose			5.00		
Inositol			2.50		
Potassium phosphate dibasic 3H ₂ O	12.70				
Potassium acetate		5.00	5.00	5.00	5.00
Potassium citrate	0.64				
Potassium sulfate		0.32			
Potassium monophosphate	0.65				
Sodium acetate 3H ₂ O	4.30				
Magnesium chloride 6H ₂ O	0.34				
TES	1.98				
Magnesium acetate			0.70	0.70	
Polyvinylpyrrolione		3.00		3.00	3.00
Protamine sulfate salt					0.32

Unit: gram, dissolve in 1 liter water.



11



➤ 冷凍稀釋液之成分

- ◆ glutamate：精漿主要成分(李, 1978)。
- ◆ 化學離子：精液中固有組成分。
- ◆ pH值：7.0-7.4。
- ◆ 滲透壓：約 330-340 mOsm (Mocé et al., 2010; Chalah et al., 1999)。
- ◆ 醣類(sucrose、trehalose或fructose)：保護冷凍解凍後精子之存活。
- ◆ 胺基酸(AAs)：保護精子細胞膜結構。



10



➤ 抗凍劑之演進與效果

- ◆ 滲入細胞內減少冰晶的形成
- ◆ 改變並使細胞膜脂質與蛋白質重新排列
- ◆ 使細胞膜流動性增加並較具親水性
- ◆ 保護增加冷凍後精子的存活率

(Holt, 2000)



12



I. 甘油 (Glycerol)

- ✓ Polge (1951)首次發現在雞精液加入15-20%的甘油，可以使精子冰凍於-79°C，於40°C解凍後並不會傷害精子活力。
- ✓ 但甘油會
 - 影響細胞質內的組成
 - 改變細胞膜的通透性
 - 改變脂雙層結構穩定性
 - 使部分共價蛋白質附著於精子表面
 - 會影響受精作用
 - 在人工授精前必須離心去除(Hammerstedt and Graham. 1992)
 - Seigneurin and Blesbois (1995) 使用甘油製備冷凍精液可獲得平均76%的受精率。



13



II. 二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)

- ✓ DMSO與新鮮精液混合後進行授精，並不會影響精子代謝與受精表現，所以在授精前不需去除(Sexton, 1975)。
- ✓ DMSO會破壞精漿內蛋白質的化學成分(Harris and Sweeney, 1971)。
- ✓ Lake (1986)認為DMSO對冷凍傷害之保護不如甘油有效。
- ✓ Mitchell and Buckland (1976)使用DMSO搭配0.5 ml麥管製備冷凍精液後進行人工受精，其結果不盡理想。



14



III. N,N-二甲基乙酰胺 (Dimethylacetamide, DMA)

- ✓ Lake and Ravie (1984)開始使用DMA作為甘油以外之另一種抗凍劑選擇。
- ✓ 其於雞精子冷凍保護效果優於甘油(Bacon et al., 1986; Chala et al., 1996; Blesbois et al., 2007)。
- ✓ DMA在人工授精前不移除亦不會使正常精子受到傷害。
- ✓ 在Tselutin et al. (1999)使用DMA製備冷凍精液可獲得85-93%的受精率。



15



➤ 冷凍包裝方式

雞精液冷凍包裝方式主要分成

- ◆ 麥管法(straw)：主要分成0.25ml與0.5ml兩種，以階段式降溫後置於液態氮中儲存；
- ◆ 顆粒(pellet)：將待凍精液直接以微量滴管滴入液態氮中，再收集至冷凍小管(vial)中儲存。

(Blesbois et al., 2008; Chalah et al., 1999; Mocé et al., 2010)。



16



- ◆ Tajima et al. (1990)以DMSO、DMA與甘油三種抗凍劑以麥管包裝製備冷凍精液，結果以甘油為抗凍劑的三週總受精率表現優於DMSO與DMA為抗凍劑者(表3)。
- ◆ Tselutin et al. (1999)比較甘油與DMA搭配麥管與顆粒包裝製備冷凍精液，結果顯示甘油搭配麥管包裝有較佳表現，而DMA搭配顆粒製備較麥管者具較高的受精率(84.7±5.3% vs. 26.7±4.5%)。



17



表3、甘油、二甲基亞砷或N,N-二甲基乙酰胺對Minnesota Dominant Marker種雞受精率的影響

Treatment	week	Total eggs (n)	Fertile eggs (n)	Fertility (%)
Unfrozen, control	1	34	29	85
	2	45	41	91
	3	45	44	98
X				92 ^a
Frozen, glycerol	1	33	20	61
	2	38	17	45
	3	43	13	30
X				44 ^b
Frozen, DMSO	1	48	11	23
	2	47	4	9
	3	50	4	8
X				13 ^c
Frozen, DMA	1	38	10	26
	2	39	2	5
	3	43	1	2
X				11 ^c



^{a-c} Means within a column with no common superscript are different ($P < 0.05$).

(Tajima et al., 1990)

18



三、冷凍保存對精子與其繁殖力之影響

➤ 精子冷凍會改變結構

- ◆ 抗凍劑造成精子處於高滲環境，使部分精子頭部與中片部產生膨脹現象 (swelling) (Marquez and Ogasawara, 1977)。
- ◆ 冷凍解凍過程仍會有部分冰晶形成破壞細胞。
- ◆ 以甘油作抗凍劑時，其濃度若 $> 0.1M$ 將干擾受精 (Hammerstedt and Graham, 1992)
- ◆ 解凍後需將甘油去除，但多次離心過程將造成精子形態受損，例如：折尾、折頸等形態異常精子將增加(圖3)。



19



20



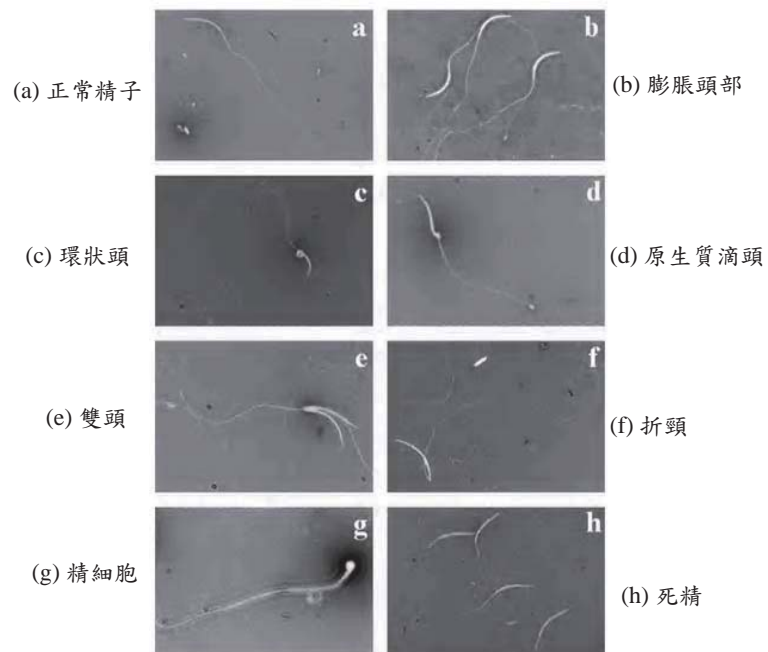


圖 3、精子形態分類 (Lukaszewicz et al., 2008)

21

➤ 精液性狀

- ◆ Long et al. (2006)指出精子在經過冷凍解凍處理後，精子ATP總含量顯著下降($P < 0.05$) (表4)，顯示冷凍解凍後精子無法產生足夠的能量供給維持活力，當進入輸卵管時，仍無法游至隱窩(sperm storage tubules)，冷凍後精子可到達隱窩數量較新鮮精子銳減。
- ◆ 四種純種商業雜品系精液經冷凍解凍處理後之ATP、膜完整性、受精率和孵化率在品系間有所差異(表5)。

23

➤ 細胞膜結構

- ◆ 冷凍過程快速的改變溫度與滲透壓會使細胞膜脂雙層結構產生翻轉，使原本在內膜(inner leaflet)的物質暴露到外膜(outer leaflet)，例如在哺乳類與禽類精子中依phospholipid phosphatidylserine由內對外暴露增加量，也可作為評估精子品質之參數(Glander and Schaller, 1999; Purdy et al., 2009)。
- ◆ 嵌在精子細胞膜上的膽固醇會因冷凍解凍處理過程而流失，進而影響細胞膜的流動性與抗凍能力(Blesbois et al., 2005)。

22

表4、新鮮與冷凍解凍後雞精子腺核苷三磷酸濃度之比較

Male	Fresh sperm	Frozen/thawed sperm
1	5163.2 ± 0.34 ^a	65.04 ± 0.02 ^b
2	3644.20 ± 0.53 ^a	58.97 ± 0.06 ^b
3	2141.50 ± 0.45 ^a	64.21 ± 0.03 ^b
4	3321.70 ± 0.3 ^a	67.03 ± 0.03 ^b
5	2958.12 ± 0.67 ^a	59.61 ± 0.04 ^b
6	2772.34 ± 0.55 ^a	50.26 ± 0.03 ^b
7	1643.71 ± 0.32 ^a	50.49 ± 0.05 ^b
8	1434.16 ± 0.67 ^a	48.05 ± 0.02 ^b
9	2734.49 ± 0.23 ^a	52.07 ± 0.04 ^b
10	3600.65 ± 0.44 ^a	59.01 ± 0.03 ^b
11	1842.32 ± 0.62 ^a	63.29 ± 0.07 ^b
12	3194.77 ± 0.14 ^a	60.07 ± 0.05 ^b

^{a-b} 同一列平均值無相同上標字母者有顯著差異($P < 0.05$)。

(Long, 2006)

24

表 5、四種商業品系雞隻精液冷凍解凍後之繁殖力評估

Line	ATP concentration (pmol/10 ⁹ sperm)	Membrane-intact sperm (%)	Fertile egg (%)	Hatched chicks (%)
1	106.8 ± 0.83	44.3 ± 0.34	18.6 ± 1.6	98 ± 1.0
2	62.4 ± 0.97	40.7 ± 0.51	14.3 ± 5.2	96 ± 1.2
3	118.8 ± 0.62	55.2 ± 0.23	20.2 ± 3.4	100
4	124 ± 0.43	53.6 ± 0.25	28.3 ± 4.5	100

^a n = 10 male per line

(Long, 2006)



25



➤ 細胞膜對環境滲透壓耐受度

- ◆ 不同禽類精子對於滲透壓忍受度極度不同，雞與火雞精子在環境滲透壓超過500 mOsm時其存活率顯著下降。
- ◆ Blanco et al. (2000)發現四種猛禽類(Gold eagle, Peregrine falcon, Bonelli's eagle, Imperial eagle)對於高滲透壓(3000 mOsm)具高度耐受性，但品種間對於低滲透壓(50 mOsm)耐受性具有差異。



27



- ◆ 雞精子經過DMA和甘油兩種抗凍劑冷凍解凍處理後，誘導產生頭帽反應(acrosome reaction)的精子比率顯著下降，顯示精子經過冷凍解凍處理後，會降低產生頭帽反應的能力(Mocé et al., 2010)。



26



➤ 細胞膜醣類

- ◆ 精子細胞膜表面具20-60nm的緊密碳水化合物層(Bearer and Friend, 1990)，由細胞膜上的醣蛋白或脂蛋白組成，這些寡糖在精子運輸及成熟的過程中會被修飾，為最早與雌性生殖道環境接觸的部分；
- ◆ 此等寡糖末端大多都會接上唾液酸(sialic acid)，先前的研究證明火雞與雞精子表面佈滿了唾液酸，且唾液酸包覆於精子表面可增加其抗原性(antigenicity)，Steele and Wishart (1996)移除精子表面唾液酸後發現精子活力及存活率並無影響，但會限制精子進入隱窩的能力。



28



- ◆ 精子表面唾液酸對精子繁殖力具重要影響(Froman and Thursam, 1994)。
- ◆ Peláez et al. (2011)利用三種抗凍劑(DMSO、DMA及 glycerol)冷凍處理精子，結果精子表面唾液酸顯著流失而暴露出醣基，造成此結果之原因除了冷凍處理過程外，推測與抗凍劑毒性也有相關(Froman and Thursam, 1994)。
- ◆ 隨著使用抗凍劑的毒性增加，暴露的醣基越多，且流失的唾液酸會使精子無法到達隱窩，影響受精表現。



29



➤ 細胞膜流動性

- ◆ 細胞膜的流動性取決於膽固醇與磷脂質組成比例，且會因磷脂質所含的飽和脂肪酸與不飽和脂肪酸量的多寡而有所不同。
- ◆ 若環境溫度超過相變溫度，則膽固醇會使膜的流動性下降；若環境溫度低於相變溫度，則膽固醇會舒緩因低溫引起細胞膜磷脂質分子流動性下降。
- ◆ Blesbois et al. (2005) 發現冷凍後雞、火雞及珠雞精子細胞膜流動性下降，且脂質組成比率與膽固醇/磷脂質百分比(膜流動性)在冷凍處理後火雞與珠雞精子有顯著改變，冷凍解凍處理可能使精子細胞膽固醇流失，使精子細胞膜保護能力下降。



30



- ◆ Blesbois et al. (2008)發現雞精子冷凍保存後，其存活百分率(percentage of viable, PVN)與受精率(percentage of fertility, FERT)具高度正相關，同一隻公雞以精液新鮮時的細胞膜流動性(membrane fluidity, FLUID)可預測冷凍精液受精率表現之64%，當同時考量FLUID與PVN可得78%之預測率，FLUID、PVN與活力(percentage of motility, PMOT)三者一起考量則可以解釋85%的繁殖力。



31



- 劉等(2003)首先成功建立台灣土雞精子的冷凍保存技術
 - ◆ 以豬精液稀釋液速保精溶液溶入12% DMA作為抗凍液製作粒狀冷凍精液。
 - ◆ 將粒狀冷凍精液以60°C快速解凍後進行連續三天人工授精。
 - ◆ 在熱季平均七天的受精率與受精蛋孵化率分別為50%與95%；涼季之受精率與受精蛋孵化率分別為90%與96%。
 - ◆ 以粒狀冷凍精液進行台灣土雞種原保存是可行的，但建議於涼季進行繁衍會有較佳的受精率。



32



四、台灣土雞冷凍精液製作

1. 試驗雞隻：

- ◆ 36週齡L2品系台灣土雞
- ◆ 40週齡L2品系台灣土雞與選拔採食殘差品系之雜交公雞



33

2. 冷凍精液製備與冷凍保存(Tselutin et al., 1999)

- ◆ 以Lake (1968)、Schramm et al. (1982)及Mocé et al. (2010)所發表之冷凍稀釋液配方(表2)稀釋精液製備冷凍精液。
- ◆ 精液冷凍流程如下：
 - (1). 新鮮混合精液先與冷凍稀釋液混合，於5°C下平衡20分鐘。
 - (2). 加入DMA抗凍劑使其最終濃度為6%。
 - (3). 將混合精液於0°C下平衡1分鐘。
 - (4). 以微量滴管將含有抗凍劑的精液以小滴(每滴約45~60µl)型態滴入液態氮中製成粒狀冷凍精液
 - (5) 收集顆粒狀冷凍精液馬上裝於冷凍小管保存於-196°C之液態氮中。

34

3. 冷凍精液解凍：

- (1). 稀釋液裝入10ml玻璃量杯，置於60°C恆溫水槽1~2分鐘後取出，迅速倒入冷凍精液顆粒混合。
- (2). 解凍後精液吸取至1.5ml離心管置於冰塊間，進行精液性狀評估或攜至現場進行人工受精。

35

4. 冷凍精液品質與繁殖力評估：

- ◆ 精液性狀
 - 精子活力
 - 精子存活率 (Chalah et al., 1999)
 - 精子濃度
 - 不正常形態精子比率(斷頭、折頸、折尾、中片部鬆散、頭帽剝離、未成熟精子、頭部膨脹及具有原生質滴)

36

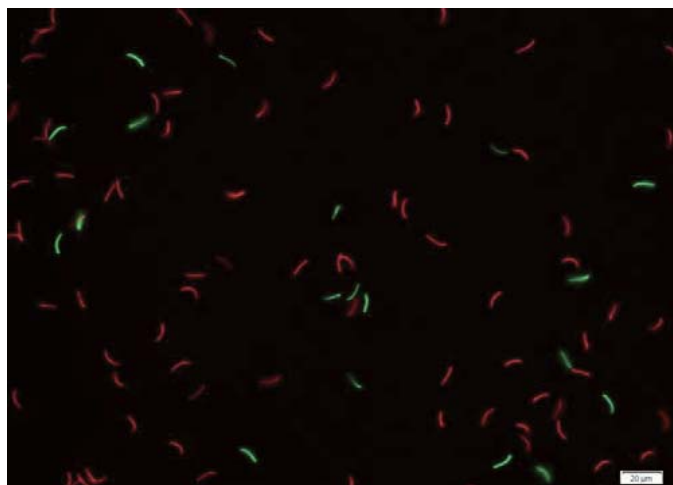


圖 4、以SYBR-14/PI螢光染色判定精子存活率。
紅色為死精，綠色為存活精子。

(陳, 2012)

37



◆ 繁殖力

- 人工授精後之受精率與孵化率進行評估。
- 以每隻母雞授精約 3×10^8 個精子連續進行兩天，在授精後第二天開始收蛋5天，於入孵後第7日照蛋記錄受精率，並記錄孵化率。



38



五、台灣土雞冷凍精液繁殖力評估

表 6、選拔採食殘差品系與L2品系台灣土雞雜交公雞之新鮮精液與不同冷凍稀釋液製備冷凍精液解凍後精子活力、存活率、受精率與孵化率比較

性狀	冷凍稀釋液 [#]			
	Fresh	Schramm	Lake	Mocé
精子活力 (%)	86.0±1.0 ^a	30.0±8.9 ^c	67.0±2.0 ^b	55.0±6.3 ^b
精子存活率 (%)	83.7±3.0 ^a	34.0±5.0 ^b	44.6±4.3 ^b	34.3±2.5 ^b
受精率 (%)	100 ^a	58.0±12.6 ^b	63.1±8.1 ^b	66.0±9.5 ^b
孵化率 (%)	80.6 ±10.0	56.9 ± 13.4	56.9±7.9	65.1±9.9

[#]以表2列出Mocé et al. (2010)、Schramm et al. (1982)及Lake (1968)所發表之冷凍稀釋液配方製備。

^{a-c} 同一列平均值無相同上標字母者有顯著差異($P < 0.05$)。

(陳, 2012)

39



40



表 7、L2品系台灣土雞公雞的新鮮精液與不同冷凍稀釋液製備冷凍精液解凍後精子活力、存活率、形態異常率、受精率與孵化率之比較

性狀	冷凍稀釋液 [#]			
	Fresh	Schramm	Lake	Mocé
精子活力 (%)	68.5±6.8 ^a	34.0±11.7 ^b	42.0±5.8 ^b	54.0±5.1 ^a
精子存活率 (%)	89.5±1.7 ^a	16.6±5.2 ^b	17.4±0.9 ^b	23.7± 2.7 ^b
形態異常率 (%)	24.8±6.0	15.1±2.1	18.5±2.3	21.3±5.4
受精率 (%)	89.0±4.2 ^a	12.8±5.5 ^b	35.5±9.0 ^b	35.5±18.7 ^b
孵化率 (%)	72.9±9.1 ^a	12.8±5.5 ^b	29.2±8.9 ^b	35.5±18.7 ^b

[#]以表2列出Mocé et al. (2010)、Schramm et al. (1982)及Lake (1968)所發表之冷凍稀釋液配方製備。

^{a-c} 同一列平均值無相同上標字母者有顯著差異($P<0.05$)。

(陳, 2012)

41

本研究結果顯示

- 選拔採食殘差品系與L2品系台灣土雞雜交公雞與L2品系台灣土雞公雞精子，經冷凍解凍處理後活力、存活率、受精率顯著下降，且雜交公雞優於純種L2。
- 冷凍解凍操作過程可能使精子形態受損、冷凍冰晶形成、冷凍稀釋液內含有抗凍劑使精子處於高滲透壓環境造成物理性傷害。

42

六、台灣土雞冷凍精液之應用及未來

- 台灣土雞冷凍精液之應用
 - ◆ 保存台灣土雞種原與基因庫
 - ◆ 供季節間精液調配使用

43

➤ 台灣土雞冷凍精液之未來

- ◆ 不同稀釋液對於台灣兩種土雞冷凍保存結果皆效果不彰，冷凍解凍保存過程尚需修正。
- ◆ 膽固醇作為多種家畜精子冷凍添加物時可增加冷凍後活力表現及細胞膜完整性(Mocé et al., 2010)，故可嘗試應用於雞隻稀釋液中，以期減少冷凍傷害並保護胞器(例如粒線體)，維持精子正常功能。

44

- ◆ 探討精子生理相關之生物路徑分子(例如醣解作用、檸檬酸循環、電子傳遞鏈及精子鞭毛運動相關的蛋白質分子)在冷凍解凍後表現量之改變，以作為改善台灣土雞冷凍精液繁殖力之參考。



45



致 謝

- 台灣區雜糧發展基金會
- 教育部



46



敬請指教！



47

