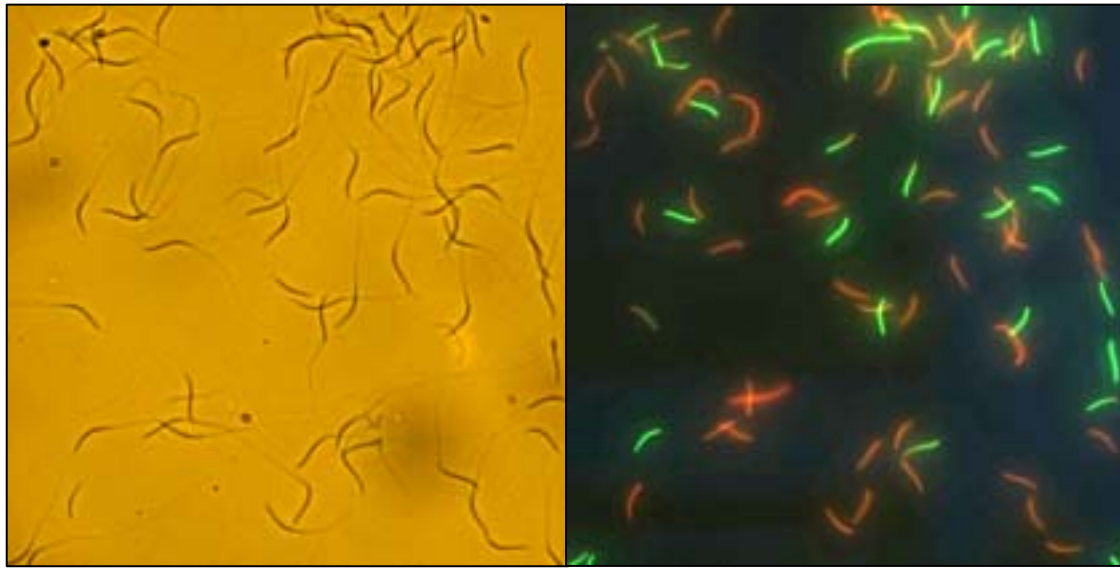


菜鴨與番鴨冷凍精液之試驗



畜試所宜蘭分所





試驗目的

- 調整季節的需要
- 增加優良公鴨的利用價值
- 確保與擴大遺傳育種的基因庫
- 其它





冷凍精液之製作

- 家畜禽人工生殖技術
台灣省畜產試驗所專輯第十三號
- Cryopreservation of gander semen
British Poultry Science (2001) 42:384-388



製作方法

1.採集精液, 觀察其活力與計算精子數目

精子活力判定

- 5 級:** 極好, **> 80%**活力良好, 漩渦運動快速明顯
- 4 級:** 很好, **70~80%** 活力良好, 漩渦運動很快, 但較**5級**差 ([活力影片](#))
- 3 級:** 好, **50~75%**活力好,漩渦運動緩慢 ([活力影片](#))
- 2 級:** 平常, **20~50%**有活力,沒有漩渦運動
- 1 級:** 差, **< 30%**有活力, 精子泳動緩慢不前進
- 0 級:** 無活力可辨別





2. 以**1:2 (semen: diluent)** 比例稀釋精液
 - **Modena**
 - **Safe Cell**
3. 分別加入 **4% DMSO** 和 **9% DMA (final)** 當抗凍劑, 放在冰上平衡**10** 分鐘
4. 注入**0.5ml**的麥管中, 以**sealing powder** 封住管口
5. 放在乾冰上約二小時, 移至液態氮中保存





6. 將麥管取出, 放入**45°C**約**1**分鐘, 使其解凍
7. 剪掉麥管兩端, 倒出精液, 觀察活力
8. 加入 **1:2 (semen: stain) Nigrosin-Eosin Live-Dead semen stain** 染色
9. 放在冰上 **2** 分鐘, 混勻取適量混合液在玻片作塗抹片
10. 以顯微鏡觀察其形狀與存活, 計算精子的存活率





實驗結果

精子解凍後的活力

1.Tsaiya 9%DMA in modena extender

2.Tsaiya 9%DMA in safe cell extender

3.Tsaiya 4%DMSO in modena extender

4.Tsaiya 4%DMSO in safe cell extender

Activity: 3 > 1 > or ~ 4 > 2





1. Muscovy 9%DMA in modena extender

2. Muscovy 9%DMA in safe cell extender

3. Muscovy 4%DMSO in modena extender

4. Muscovy 4%DMSO in safe cell extender

Activity: 3 > or ~ 4 > 1 > or ~ 2





Tsaiya semen – NE stain



dead sperm

Abnormal live sperm

Normal live sperm

630X





Muscovy semen – NE stain



Tsaiya frozen semen

Extender Cryo-protectants	Modena (% of live spermatozoa)	safe cell (% of live spermatozoa)
9% DMA	15.67	13.00
4%DMSO	20.33	15.67

Fresh semen activity 3~4, 72.33%



Muscovy frozen semen

Extender Cryo-protectants	Modena (% of live spermatozoa)	safe cell (% of live spermatozoa)
9% DMA	17.67	16.33
4%DMSO	32.33	29.33

Fresh semen activity 4~5, 84%





冷凍精液之人工授精

試驗動物: 褐色菜鴨

冷凍精液: 4%DMSO in modena extender

1. 將麥管取出, 放入45°C約1分鐘, 使其解凍, 剪掉麥管兩端, 倒出精液, 觀察活力

菜鴨冷凍精液活力

番鴨冷凍精液活力





2. 進行人工授精, 將母鴨生殖道翻出後, 以注精器注入冷凍精液
3. 注精後第二天開始撿蛋, 連續收集五天 (存放在 18°C)
4. 放入孵化機中孵化, 於第四日照蛋, 測其受精率

試驗結果: 人工授精後第二天菜鴨受精率為 4.9 %





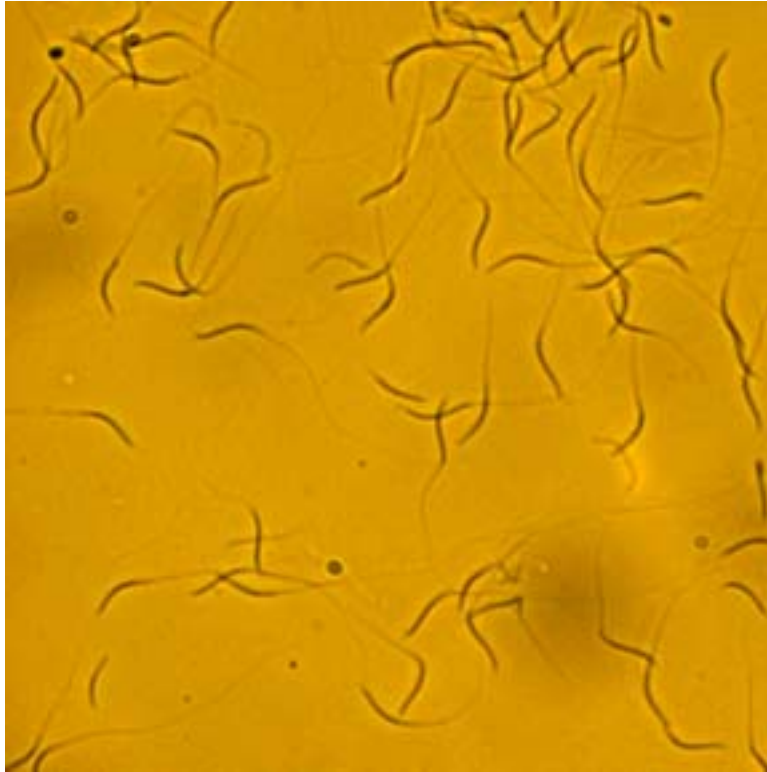
精子螢光染色試驗

LIVE / DEAD Sperm Viability Kit

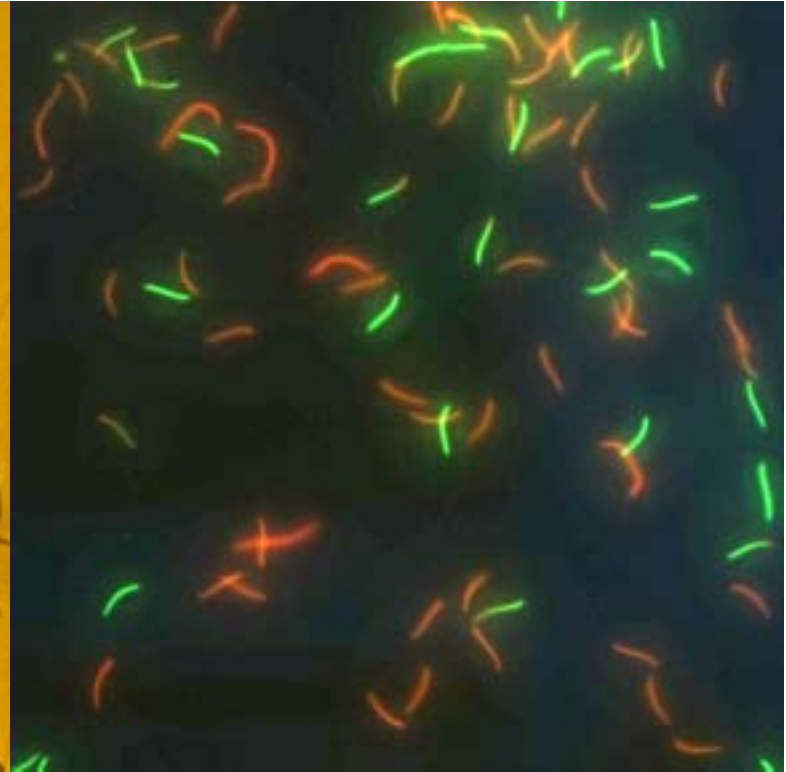
1. 取 5 μ l 精液加入 90 μ l 3% NaCl 和 5 μ l 稀釋 100 倍的 SYBR 14 , 混合均勻於 37 °C 作用 10 分鐘
2. 作用完後再加入 0.5 μ l propidium iodide (PI) , 室溫反應 5 分鐘
3. 將 5 μ l 混合物放在載玻片上, 蓋上蓋玻片, 於螢光顯微鏡下觀察並拍照



Muscovy sperm



Live/Dead stain



Green (SYBR 14) : live sperm

Red (PI) : dead sperm





討 論

- 精子存活率

- 冷凍精液製作方式

- 稀釋液、抗凍劑、冷凍與解凍方法

- 存活率之評估

- 螢光染色法增加準確度

- 受精率

- 冷凍精液

- 提高精子存活率、增加精液量

- 人工授精

- 縮短授精時間、連續人工授精三天

