

# 種豬精子體能檢測技術

推廣場所：

行政院農業委員會畜產試驗所 遺傳育種組

台南市新化區牧場路 112 號

電話：06-5911211 轉 231

傳真：06-5911784

聯絡人：吳明哲組長、郭廷雍、邢湘琳、林秀蓮

## 一、操作的基本設備與用具

- (一) 精子流式細胞儀(體能分析儀) ( Sperm Flow Cytometer , *IMV Technology Co.*)
- (二) 精蟲計數儀(*Spermacue* )
- (三) 精子稀釋液( *Easy Buffer, IMV Technology Co.* )
- (四) 精子活率檢測分析套組( *LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Invitrogen* )
- (五) 精子頭帽及膜完整性檢測分析套組( *PNA-FITC, Sigma*)
- (七) 精子粒線體膜電位分析套組( *Guava Mitochondrial Depolarization Kit, Millipore*)
- (八) 精子細胞內游離鈣水平分析套組( *Fluo-4 NW Calcium Assay Kit, Invitrogen* )
- (九) 精子染色體結構分析套組( *Sperm Chromosome Structure Assay with Acridine orange, Invitrogen* )
- (十) 精子細胞內氧化作用分析套組( *Oxidation Assay with H<sub>2</sub>DCFDA , Invitrogen* )
- (十一) 精液細菌含量分析套組( *Bacteria Counting Kit, Invitrogen* )

## 二、檢測流程

精子流式細胞儀為是計算並檢測顯微粒子的技術，例如細胞被懸浮在流動液體中，經過電子檢測儀器而被檢測。它可以在每秒內同時對上千個粒子進行物理和(或)化學的多參數分析。本機分析對象可包括豬、牛、羊、水鹿、雞、鴨、鵝等家畜禽類別，每一物種依精液來源分為新鮮精液、稀釋精液、冷凍後解凍精液等三大類進行精子體能之分析外，亦可作為目前種畜禽產精能力評估、精子稀釋液及冷凍保護劑等開發之應用。

## 1. 精液樣品分析類別及分析方式

精液類別	新鮮精液	稀釋精液
收集、保存與運送方式	種豬於精液採集後，先將精液混均勻，並倒取原精液 20ml 至採精瓶內，用力旋緊前應將瓶內多餘空氣擠出，並於採精瓶上註明牧場名稱及豬隻編號，放置入保溫箱內，帶回實驗室分析，全程為 15°C 保溫。	豬精液之保存必需維持在 15~16°C，且降溫之速度應以緩慢為佳，運送時應避免日光直射、振動和溫度之急劇變化，另外豬精液之運輸應以密封之容器包裝，避免暴露於空氣中。
精液送檢方式	檢定站生長性能檢定合格公豬或自留公豬之低溫送檢精液量 3~5 毫升寄送畜產試驗所 遺傳育種組種原中心 (低溫宅配方式)	
分析項目	分析該樣品精液中 5,000 隻精子體能分佈圖型，作為該頭公豬精子之內在體能參數指標，包括活精子數、精子頭帽及精子膜完整性、精子粒線體膜電位完整性(受損程度)與精子凋亡比例、精子細胞內游離鈣含量的檢測、精核 DNA 染色質結構完整性、精子細胞內自由基、以及細菌污染精子等參數。	
分析結果	送檢結果之檢測資料查詢將只提供種畜禽場之負責人，資料查詢需辦理申請，申請後，以帳號密碼進行上網資料查詢。	

\* 目前以有完成登錄之種豬為主。

\* 送樣前請填妥畜牧場送樣資料表(參考三、紀錄表格部分)與精液樣品包裝後一同寄送畜產試驗所遺傳育種組種源中心。

## 2. 測量精液濃度

以精蟲計數儀測量新鮮精液濃度，分別記錄後，將原液進行上機前調整精液濃度。

## 3. 上機前進行精液濃度調整

在豬、牛、雞分別為  $3.5 \times 10^7$  spz/ml、 $5.7 \times 10^7$  spz/ml、 $3.5 \times 10^7$  spz/ml

A. 從儲精瓶中吸取約 0.2 毫升之精液原液至 96 孔盤(Plate)

B. 將 Plate 中之精液依比例以 Easy Buffer 稀釋至約  $35 \times 10^6$  spz/ml

## 4. 精子活率檢測分析

A. Sybr14 working solution：取 1 $\mu$ l 之 Sybr14 + 49 $\mu$ l 之 Easy Buffer 混合

B. mix solution：取 1 $\mu$ l 之 Sybr14 working solution + 1 $\mu$ l 之 PI + 48 $\mu$ l 之 Easy Buffer 混合。

C. 取 3 $\mu$ l 之稀釋精液 + 147 $\mu$ l Easy Buffer + 50 $\mu$ l mix solution 混合後於 37°C 避光培養 10 分鐘後上機分析。

D. 分析結果：豬新鮮精液活率須 $>70\%$ 或冷凍精液解凍後活率需 $>50\%$ 為合格。

5. 頭帽及精子膜完整性分析

A. stain mix：取  $1\mu\text{l}$  之 PI +  $0.5\mu\text{l}$  之 PNA-FITC +  $48.5\mu\text{l}$  之 Easy Buffer 混合。

B. 取  $4\mu\text{l}$  之稀釋精液 +  $146\mu\text{l}$  Easy Buffer +  $50\mu\text{l}$  之 stain of mix 混合後於  $37^\circ\text{C}$  避光培養 10 分鐘後上機分析。

C. 分析結果：豬新鮮精液活精且頂體膜完整之細胞百分比須 $>60\%$ 或解凍後精液活精且頂體膜完整之細胞百分比需 $>40\%$ 為合格。

6. 線粒體膜電位與凋亡程度分析

A. mix solution：取  $2\mu\text{l}$  之 JC-1 +  $48\mu\text{l}$  之 Easy Buffer 混合

B. 取  $3\mu\text{l}$  之稀釋精液 +  $147\mu\text{l}$  Easy Buffer +  $50\mu\text{l}$  mix solution 混合後於  $37^\circ\text{C}$  避光培養 30 分鐘後上機分析。

C. 分析結果：在豬新鮮精液中處於去極化狀態的精子細胞百分比需 $<30\%$ 或解凍後精液處於去極化狀態的精子細胞百分比需 $<50\%$ 為合格。

7. 精子細胞內游離鈣水平檢測分析

A. 2X dye：取 5ml 之 Assay Buffer +  $100\mu\text{l}$  之 initial of probenecid(B)加入 Fluo-4 NW 中，並混合一到兩分鐘。

B. 取  $2\mu\text{l}$  之稀釋精液 +  $98\mu\text{l}$  之 Assay Buffer +  $100\mu\text{l}$  之 2X dye 混合後於  $37^\circ\text{C}$  避光培養 30 分鐘，然後於室溫避光培養 30 分鐘後上機分析。

C. 分析結果：目前該參數尚待進一步試驗研究，以取得最佳參數值。

8. 精子 DNA 染色體結構檢測分析

A. AO staining solution：取  $10\mu\text{l}$  之 AO solution +  $9.99\text{ml}$  之 staining solution。

B. 取  $5\mu\text{l}$  之稀釋精液加入  $200\mu\text{l}$  之 TNE Buffer。

C. 將加入稀釋精液之 TNE Buffer 加入  $0.4\text{ml}$  之 acid detergent solution。

D. 等待 30 秒後，加入  $1.2\text{ml}$  之 AO staining solution。

E. 室溫培養 3 分鐘後上機分析。

F. 分析結果：百分比愈高愈好，表示精子內 DNA 呈現為雙股無斷裂之狀態。

9. 精子細胞內氧化作用分析

A. Control： $20\mu\text{l}$  之精液加入  $980\mu\text{l}$  之  $\text{H}_2\text{O}_2$  2%後於室溫靜置 10 分鐘，接著以

500G 離心 5 分鐘，離心後吸去上層澄清液，將離心管底部之 pellet 加入 1000 $\mu$ l 之 Easy Buffer。

- B. Sample-sample：20 $\mu$ l 之精液加入 980 $\mu$ l 之 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% 後於室溫靜置 10 分鐘，接著以 500G 離心 5 分鐘，離心後吸去澄清液，將離心管底部之 pellet 加入 1000 $\mu$ l 之 Easy Buffer。
- C. Tested sample：將 20 $\mu$ l 之精液加入 980 $\mu$ l 之 Easy Buffer。
- D. 將 Sample-sample 及 Tested sample 加入 5 $\mu$ l 之 H<sub>2</sub>DCFDA，然後將 Control、Sample-sample 及 Tested sample 於 37 $^{\circ}$ C 避光培養 5 分鐘，接著以 500G 離心 5 分鐘，離心後吸去澄清液，將離心管底部之 pellet 加入 400 $\mu$ l 之 Easy Buffer，並吸取 200 $\mu$ l 之樣品上機分析。
- E. 分析結果：目前該參數尚待進一步試驗研究，以取得最佳參數值。

#### 10. 細菌及細胞濃度檢測分析

- A. Control：以 0.2 $\mu$ m 之 filter 過濾精液以取得 1ml 之精漿。
- B. Tested sample：以 1.2 $\mu$ m 之 filter 過濾精液以取得 1ml 之精漿。
- C. 將樣品及 Control 加入 1 $\mu$ l 之 Syto BC stain for bacteria 於室溫靜置 5 分鐘。
- D. 將樣品及 Control 加入經過充分混合之 beads 後稍微混合後上機分析。
- E. 分析結果：數值表示分析之精液其每 mL 具有百萬個細菌。

#### 11. 分析結果可產生五種數據報告：

- A. 列印質量報告（一天進行一次分析）
- B. 列印日報告（一天之內所有分析）
- C. 列印單個報告（選擇一階段內一種動物的分析）
- D. 列印比較報告（選擇一階段內所有物種的所有分析）
- E. 列印整體報告（數據庫清單）



Assays	Results	Std dev	Unit
Live spz with intact acrosome	82.53	0.00	%
Live spz	81.06	0.00	%
Depolarized mitochondria spz	2.74	0.00	%
High calcium level spz	94.46	0.00	%
Calcium mean level	418.07	0.00	UA
Bacteria counting	0.16	0.00	Mbact/ml



Assays	AnimalID	Data	Std dev	Unit
Bacteria counting	20110036	81.08	0.00	Mbact/ml
	negative	7.25	0.00	Mbact/ml
Calcium mean level	20110035	342.51	0.00	UA
	20110036	369.55	0.00	UA
	20110037	388.46	0.00	UA
	20110038	400.82	0.00	UA
	20110039	459.40	0.00	UA
Depolarized mitochondria spz	20110040	396.10	0.00	UA
	20110041	364.47	0.00	UA
	20110035	20.74	0.00	%
	20110036	16.76	0.00	%
	20110037	20.76	0.00	%
High calcium level spz	20110038	25.36	0.00	%
	20110039	33.48	0.00	%
	20110040	33.28	0.00	%
	20110041	35.08	0.00	%
	20110035	68.83	0.00	%
Live spz	20110036	53.54	0.00	%
	20110037	58.39	0.00	%
	20110038	61.36	0.00	%
	20110039	31.23	0.00	%
	20110040	33.42	0.00	%
Live spz with intact acrosome	20110041	57.64	0.00	%
	20110035	96.72	0.00	%
	20110036	77.34	0.00	%
	20110037	93.73	0.00	%
	20110038	93.99	0.00	%

### 三、記錄表格 (參考用)

畜牧場精液樣品 送樣資料表							
牧場名稱	品種及耳號	採精日期 及時間	送樣日期 及時間	送樣人員	精液種類	稀釋液 廠牌	稀釋比例
					<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI		
					<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI		
					<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI		
					<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI		
					<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI		
					<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI		

備註：

0

遺傳育種組 家畜禽精液 收樣紀錄簿									
收樣日期	收樣時間	送樣人員	樣品來源	牧場名稱	品種及耳號	精液種類	收樣人員	儲存位置與溫度	分析代號
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			
						<input type="checkbox"/> 新鮮 <input type="checkbox"/> 冷凍 <input type="checkbox"/> AI			

樣品來源 種豬基金會代號 A，新化檢定站 B，竹南檢定站 C，自留公豬 D，彰化場 E，竹南 AI 站 F，其他-請寫入來源

遺傳育種組 種公豬精液 檢查紀錄表

日期	欄位	採集員	公豬耳號	顏色				精液量 (ml)	活 力	濃度 (億/ml)	畸形精 子(%)	未成熟 (%)	正常率 %	備 註
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							
				<input type="checkbox"/> 乳白	<input type="checkbox"/> 褐色	<input type="checkbox"/> 琥珀色	<input type="checkbox"/> _____							

檢查員：\_\_\_\_\_

種公豬採精記錄表

品種	耳號	出生日期	登錄號	名號	畜主	緊迫型		多產型		肉質型		
						<input type="checkbox"/> AA	<input type="checkbox"/> MM	<input type="checkbox"/> dd	<input type="checkbox"/> aa	<input type="checkbox"/> HH		
						<input type="checkbox"/> AB	<input type="checkbox"/> MN	<input type="checkbox"/> Dd	<input type="checkbox"/> Aa	<input type="checkbox"/> Hh		
						<input type="checkbox"/> BB	<input type="checkbox"/> NN	<input type="checkbox"/> DD	<input type="checkbox"/> AA	<input type="checkbox"/> hh		
採精日期		年 月 日 時 分										
公 豬 精 液 性 狀	精液量(c. c.) <input type="checkbox"/> 50 <input type="checkbox"/> 100 <input type="checkbox"/> 150 <input type="checkbox"/> 200 <input type="checkbox"/> 250 <input type="checkbox"/> 300 <input type="checkbox"/> 350 <input type="checkbox"/> 400 <input type="checkbox"/> 450 <input type="checkbox"/> 500											
	顏色 <input type="checkbox"/> 乳白(正常) <input type="checkbox"/> 微黃(含尿) <input type="checkbox"/> 琥珀(含血) <input type="checkbox"/> 淺白 <input type="checkbox"/> 水樣											
	活力(例：“70++”為活力是++的精蟲有70%) <input type="checkbox"/> 死精 <input type="checkbox"/> 70+以下(受精能力差) <input type="checkbox"/> 70+(活力弱) <input type="checkbox"/> 70++(活力中) <input type="checkbox"/> 70+++ (活力強) <input type="checkbox"/> 75+++ <input type="checkbox"/> 80+(活力弱) <input type="checkbox"/> 80++(活力中) <input type="checkbox"/> 80+++ (活力強) <input type="checkbox"/> 85+++ <input type="checkbox"/> 90+(活力弱) <input type="checkbox"/> 90++(活力中) <input type="checkbox"/> 90+++ (活力強) <input type="checkbox"/> 95+++											
	精子數等級 <input type="checkbox"/> +(稀薄) <input type="checkbox"/> ++(正常) <input type="checkbox"/> +++ (濃厚) <input type="checkbox"/> 無精子											
	精子濃度 _____ ×10 <sup>8</sup> /cc 正常精子 _____ % , 頸部原生質 _____ % , 中片部原生質 _____ % , 其他畸型 _____ %											
陰莖 外觀	正常	<input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 粗硬 (如屬正常者,可再選是否粗硬)										
	異常	<input type="checkbox"/> 軟鞭 <input type="checkbox"/> 無螺旋 <input type="checkbox"/> 倒勾 (可複選)										
鞭長度	<input type="checkbox"/> 一掌寬(10公分) <input type="checkbox"/> 二掌寬(20公分) <input type="checkbox"/> 二掌半寬(25公分)											
	<input type="checkbox"/> 三掌寬(30公分) <input type="checkbox"/> 三掌半寬(35公分) <input type="checkbox"/> 四掌寬(40公分) (單選)											
性慾駕乘意願	<input type="checkbox"/> 高 <input type="checkbox"/> 中 <input type="checkbox"/> 低 <input type="checkbox"/> 無 (單選)											
駕乘後肢強度	<input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 稍弱 <input type="checkbox"/> 蹲坐 (單選)											
乳頭數	左 右											
其他備註												

遺傳育種組 精液樣品登錄與上機分析 記錄表

分析時間： 年 月 日 時 分

本組代碼 流水號	採樣/ 送樣日 期 及時間	精液 型態	物 種	耳 號	精液 濃度	稀釋 倍數	混合 比例	鏡 檢	Liv/De (%)	Liv/Acr (%)	Mito-p (%)	Ca <sup>2+</sup> (UA)	SCSA (%)	Oxid (%)	Bacteria (百萬/ml)	分析員 簽名
									始:	始:	始:	37°C:	始:	始:	始:	
									末:	末:	末:	RT:	末:	末:	末:	

物種代號--紅羽土雞 rr, 黑羽土雞 br, 烏骨雞 ur, 杜洛克 D, 約克夏 Y, 藍瑞斯 L, 黑豬 F, 盤客夏 B, 漢普夏 H, 荷蘭公牛 b, 水鹿 Bu 其他物種-請文字註明填入

四、感謝已參與並協助完成精子體能分析之畜牧場名冊

種豬	福昌畜牧場	豪耀畜牧場
	暉煌畜牧場	王文曲畜牧場
	高昌畜牧場	福冠畜牧場
	合一畜牧場	馮亮欽畜牧場
	順安畜牧場	山霖畜牧場
	水波畜牧場	大豪興畜牧場
	祝興畜牧場	願景金來畜牧場
	仙佳畜牧場	藝涌畜牧場
	金山畜牧場	

種雞	豐輝畜牧場
	台禽畜牧場
	凱馨畜牧場