

生殖細胞低溫保存篇

◎黃牛精子

◎黃牛胚

◎水牛精子



◎山羊胚

◎山羊精子

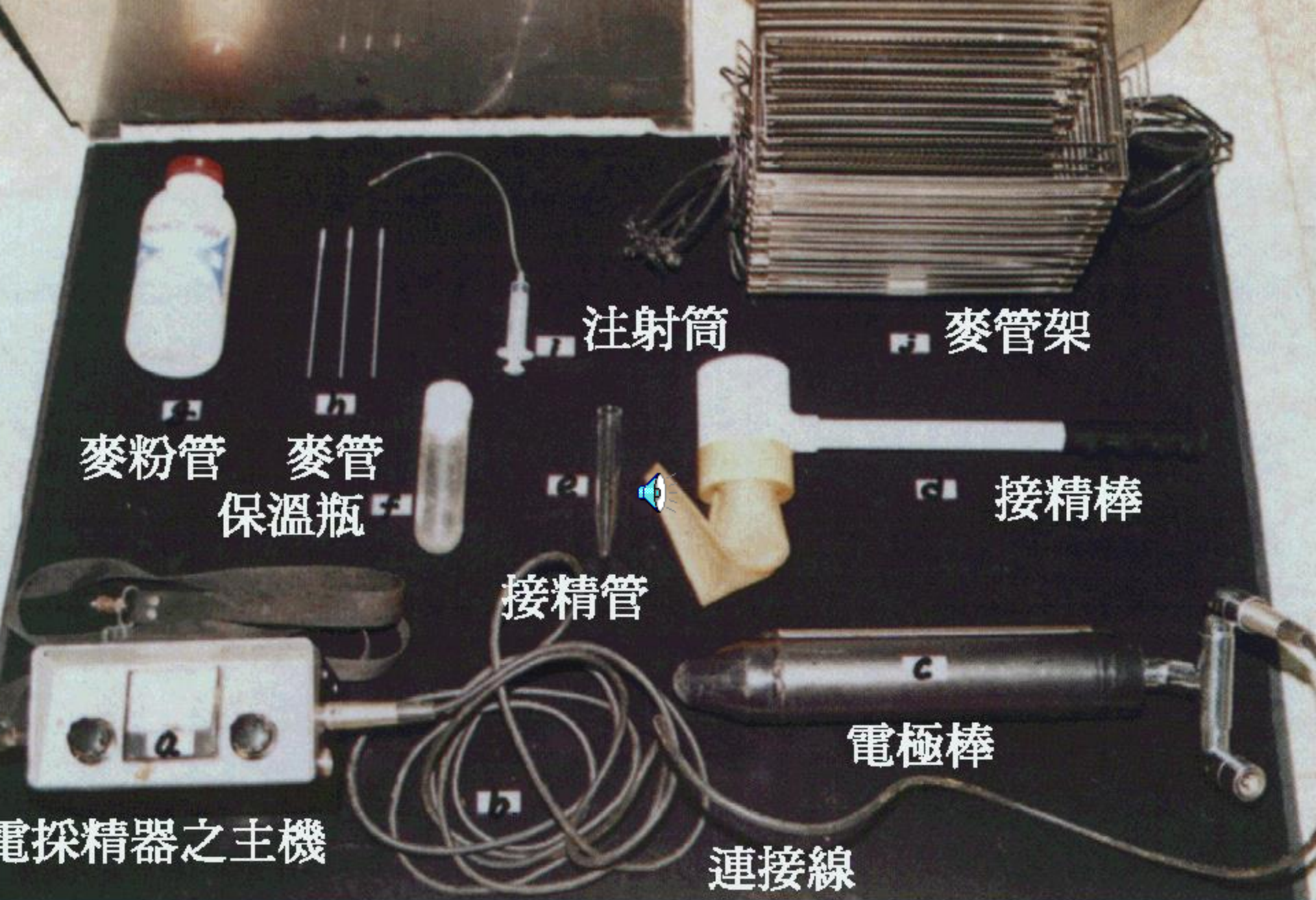
◎桃園豬胚

◎家禽精子

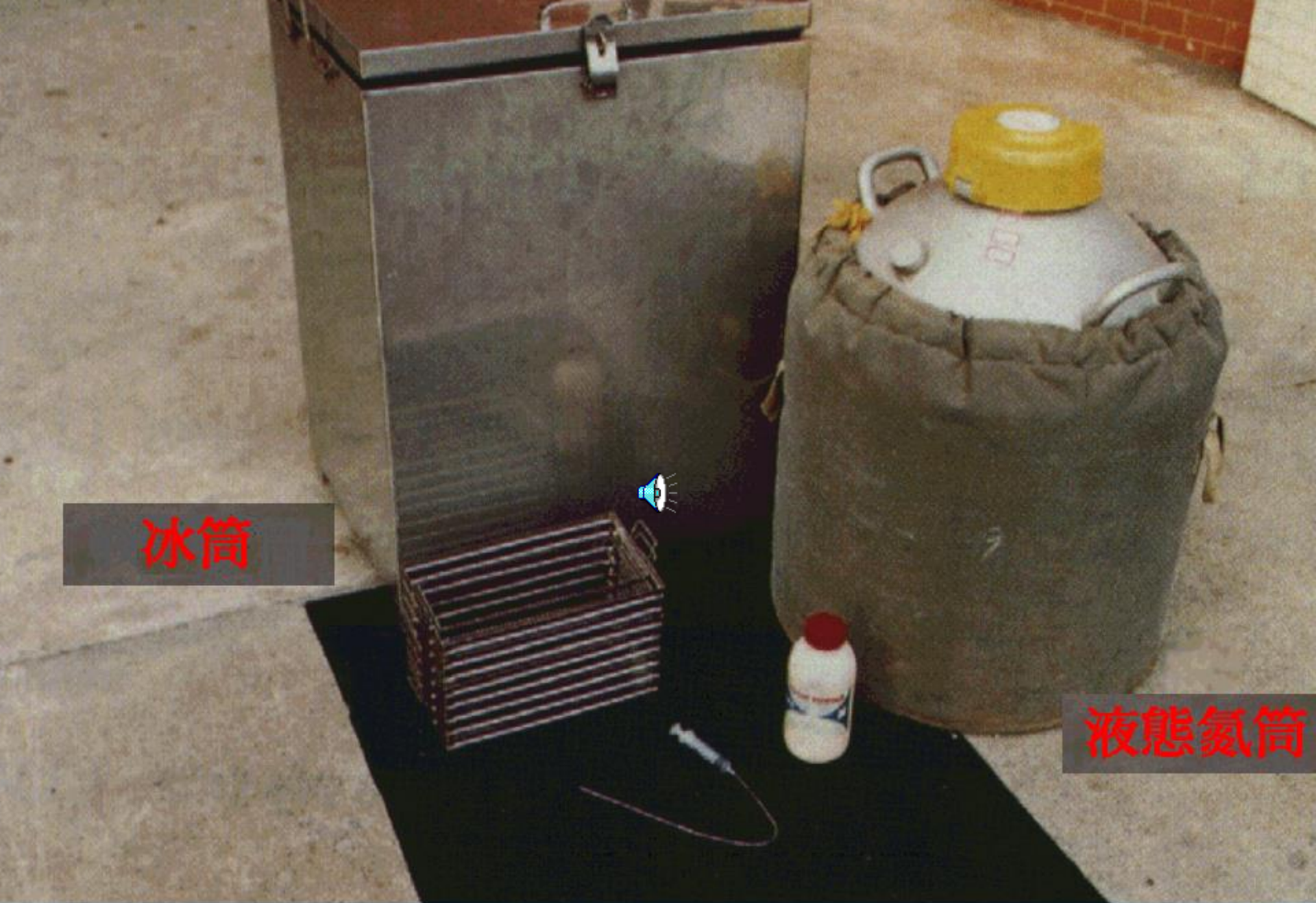


黃牛精子 (Sperm of Yellow Cattle)

公黃牛



精液採集及冷凍精液製作器具



冰筒

液態氮筒

精液採集及冷凍精液製作器具

黃牛冷凍精液製作方法

以假陰道或電氣採精器進行，

採精

採精前需清潔陰莖周圍穢物

精液添加抗生素

包括精液量、顏色、精子濃度、活力及畸形率等

鏡檢

檢查活力過程在 37°C 保溫器上進行

計算稀釋倍數

1. 以總稀釋量1/2之A液與原精液，緩慢進行，再於 4°C 平衡2小時以上

稀釋

2. A液平衡後，再與總稀釋量1/2之B液緩慢進行稀釋，再於 4°C 平衡約4小時左右

充填

利用注射筒連接麥管吸取約0.5ml精液，再以麥管封口粉末進行封口後放入冰水中，取出麥管並予拭乾

1. 將麥管平放於麥管架上

冷凍

3. 冷凍完成之麥管，存放於液態氮桶中，長期保存

2. 將麥管架逐漸放入液氮蒸氣中，緩慢進行冷凍，最後將麥管倒入液態氮中



電探精情形



水牛精子 (Sperm of Water Buffalo)

水牛採精



水牛精子 (Sperm of Water Buffalo)

水牛精子

水牛精液採集、冷凍、篩選與鏡檢



公水牛經過訓練後，可以隨時駕乘母水牛，以供採精之用。採取之精液量為 $2.6 \pm 1.5 \text{ ml}$ ，精子數目為 $2.1 \pm 0.9 \times 10^9$ 個/ml



水牛精液採集、冷凍、篩選與鏡檢：

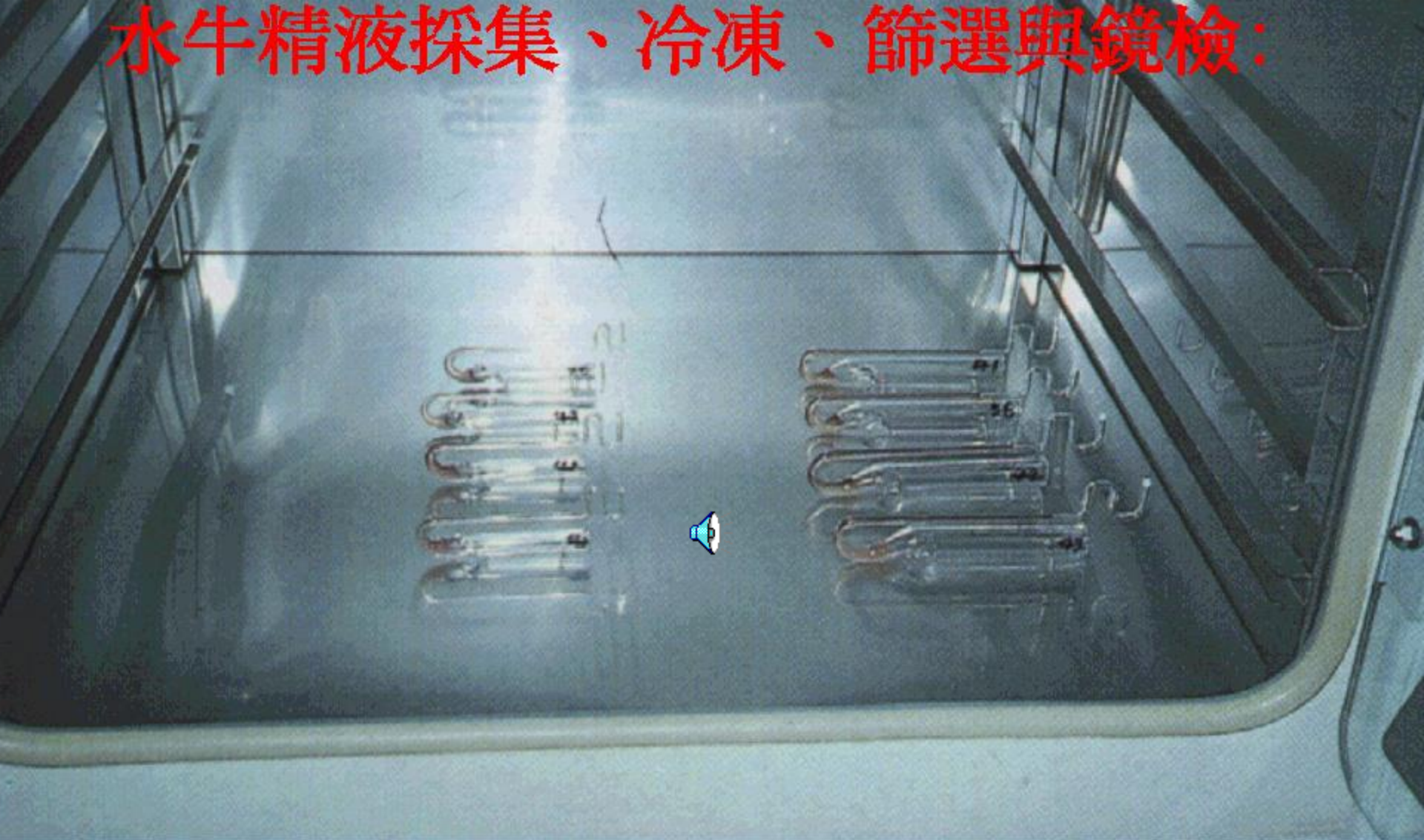
精液採取後經過處理，製成0.5ml包裝之冷凍精液可長期保存於零下196℃之液氮中，並能隨時解凍供母牛配種之用。

水牛精液採集、冷凍、篩選與鏡檢



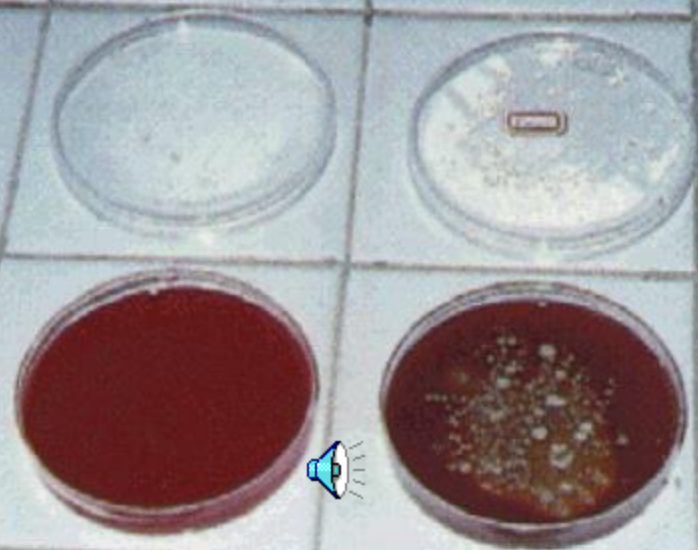
鑑定水牛冷凍精液之品質，可利用 8μ 口徑之 nucleopore 薄膜將精液置於 37°C 之水槽培養 3 小時，可計算出精子通過薄膜之百分率，其值應在 30% 以上時才屬優良級

水牛精液採集、冷凍、篩選與鏡檢：

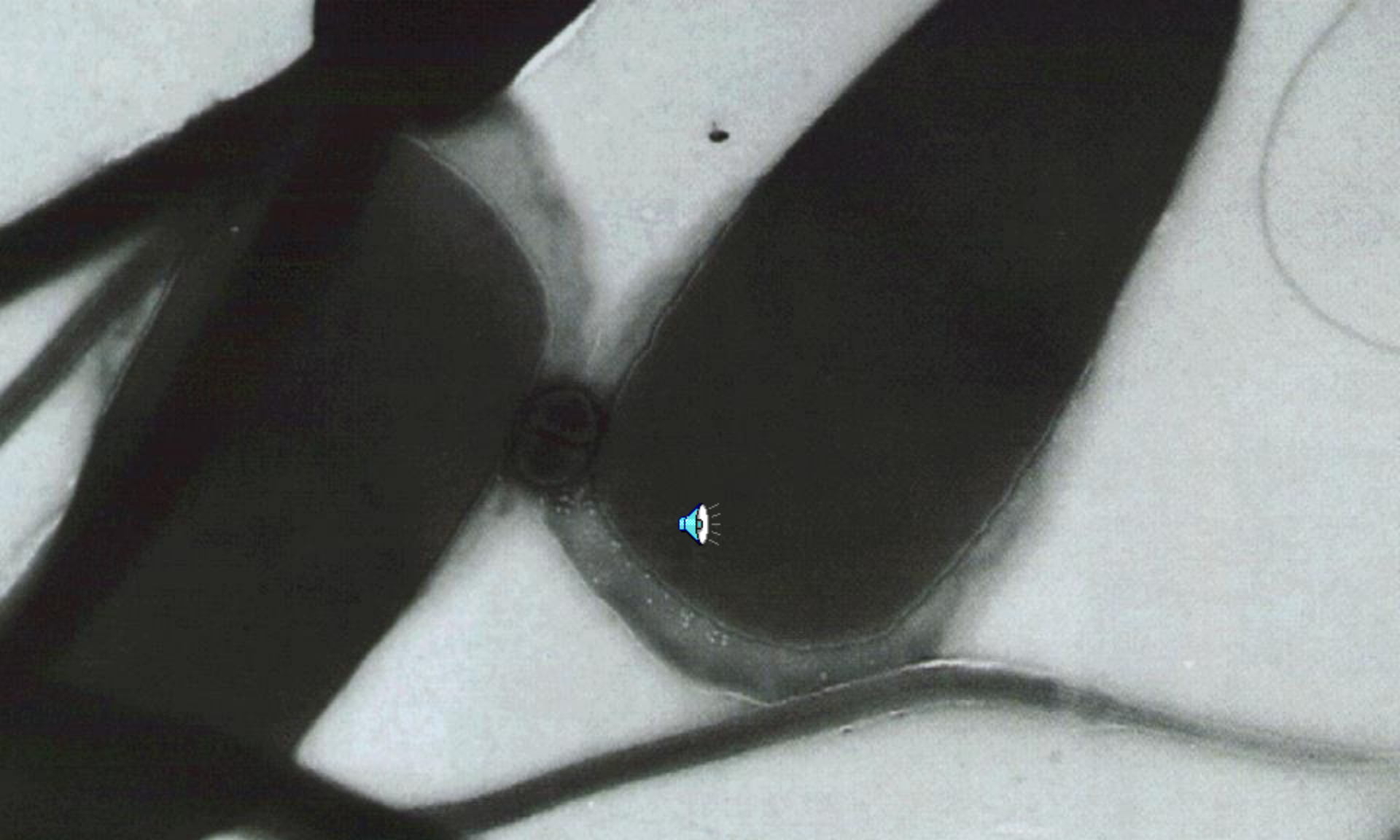


利用特製之U型玻管，以浮游精子法，進行分離無菌之水牛精液，將精液置於U型玻管後，內置TCM-199培養液，保存於37°C之二氧化碳培養箱2小時，浮游之精子即不帶菌

水牛精液採集、冷凍、篩選與鏡檢：

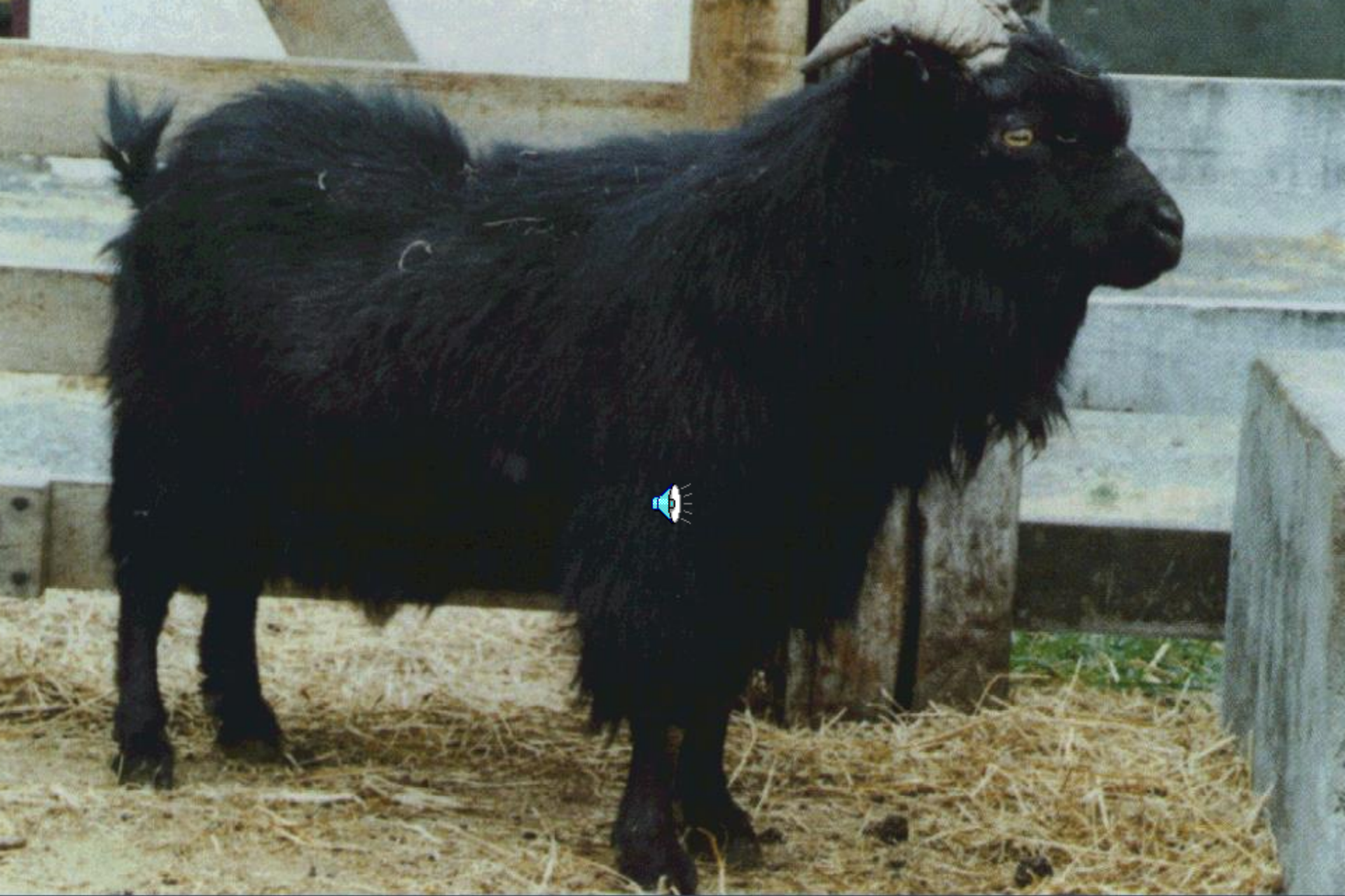


將浮游處理精液與未處理之原精液，接種於血液培養基內，培養48小時後，發現未處理精液之培養基內菌落叢生，而浮游處理精液之培養基內試驗組仍無菌繁殖



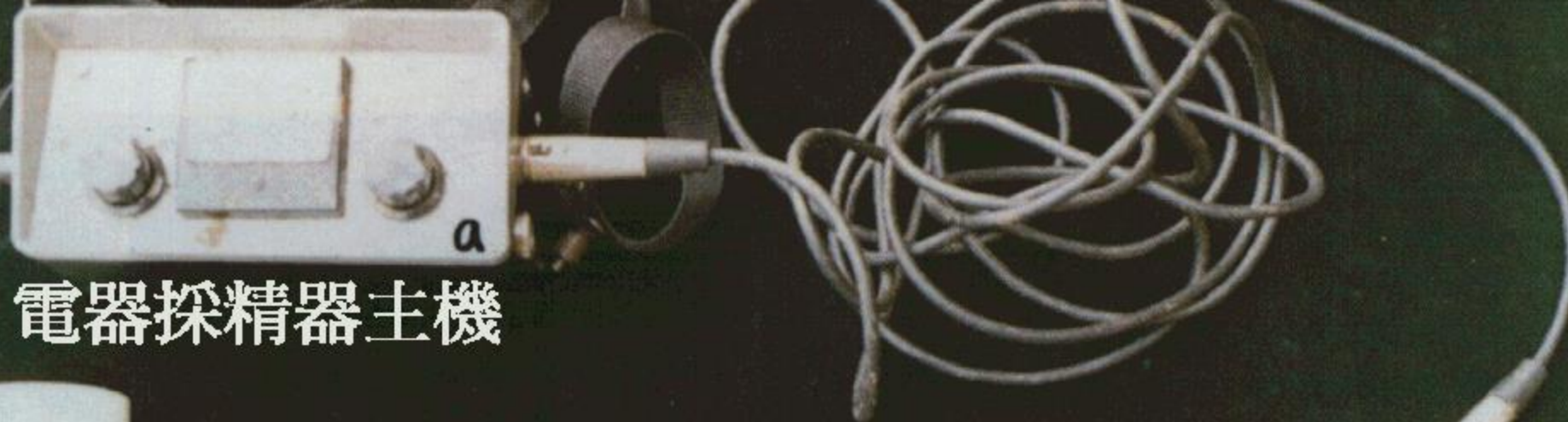
水牛精液採集、冷凍、篩選與鏡檢

將未處理之精液，在電子顯微鏡下檢查，均可發現細菌附著於精
子頭部及尾部等，而淨液處理過之精液均無發現細菌附著



山羊精子 (Sperm of Goat)

公山羊



電器採精器主機



精液接收器

精液接收用試管及
保溫試管



電極



潤滑劑

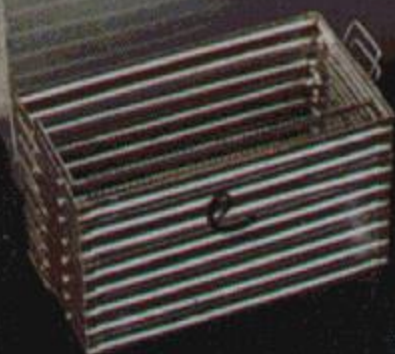
公羊採精用器具

精液麥管降
溫用保溫箱

a

精液貯存筒

b



麥管架



麥管封口用
粉末



注射筒連接麥管

公羊冷凍精液製作器具

公羊冷凍精液製作方法

以假陰道或電氣採精器進行，

採精

採精前需清潔陰莖周圍穢物

精液添加抗生素

包括精液量、顏色、精子濃度、活力及畸形率等

鏡檢

檢查活力過程在 37°C 保溫器上進行

計算稀釋倍數

1. 以總稀釋量1/2之A液與原精液，緩慢進行稀釋，再於 4°C 平衡2小時以上

稀釋

2. A液平衡後，再與總稀釋量1/2之B液緩慢進行稀釋，再於 4°C 平衡約4小時左右

充填

利用注射筒連接麥管吸取約0.5ml精液，再以麥管封口粉末進行封口後放入冰水中，取出麥管並予拭乾

1. 將麥管平放於麥管架上

冷凍

3. 冷凍完成之麥管，存放於液態氮桶中，長期保存

2. 將麥管架逐漸放入液氮蒸氣中，緩慢進行冷凍，最後將麥管倒入液態氮中



公羊以電氣採精之情形



精子之活力檢查



家禽精子 (Sperm of Poultry Breeds) 台灣土雞(公)



家禽精子 (Sperm of Poultry Breeds)

精子



十雞採精



菜鴨採精

家禽之冷凍精液製作

採精

精液檢查

稀釋分裝

精液與含甘油之冷凍保存稀釋液充分混合並分裝保存瓶中

預冷

將冷凍保存瓶置於冷凍架,在零下 196°C 液氮液面上預冷一小時以上

保存

移於貯存架上浸入零下 196°C 液態氮貯存桶中長期冷凍保存

家禽之冷凍精液製作

採精

精液檢查

稀釋分裝

精液與含甘油之冷凍保存稀釋液充分混合並分裝保存瓶中

預冷

將冷凍保存瓶置於冷凍架,在零下 196°C 液氮液面上預冷一小時以上

保存

移於貯存架上浸入零下 196°C 液態氮貯存桶中長期冷凍保存



品質液精檢鏡

稀釋分裝



冷凍架上預冷



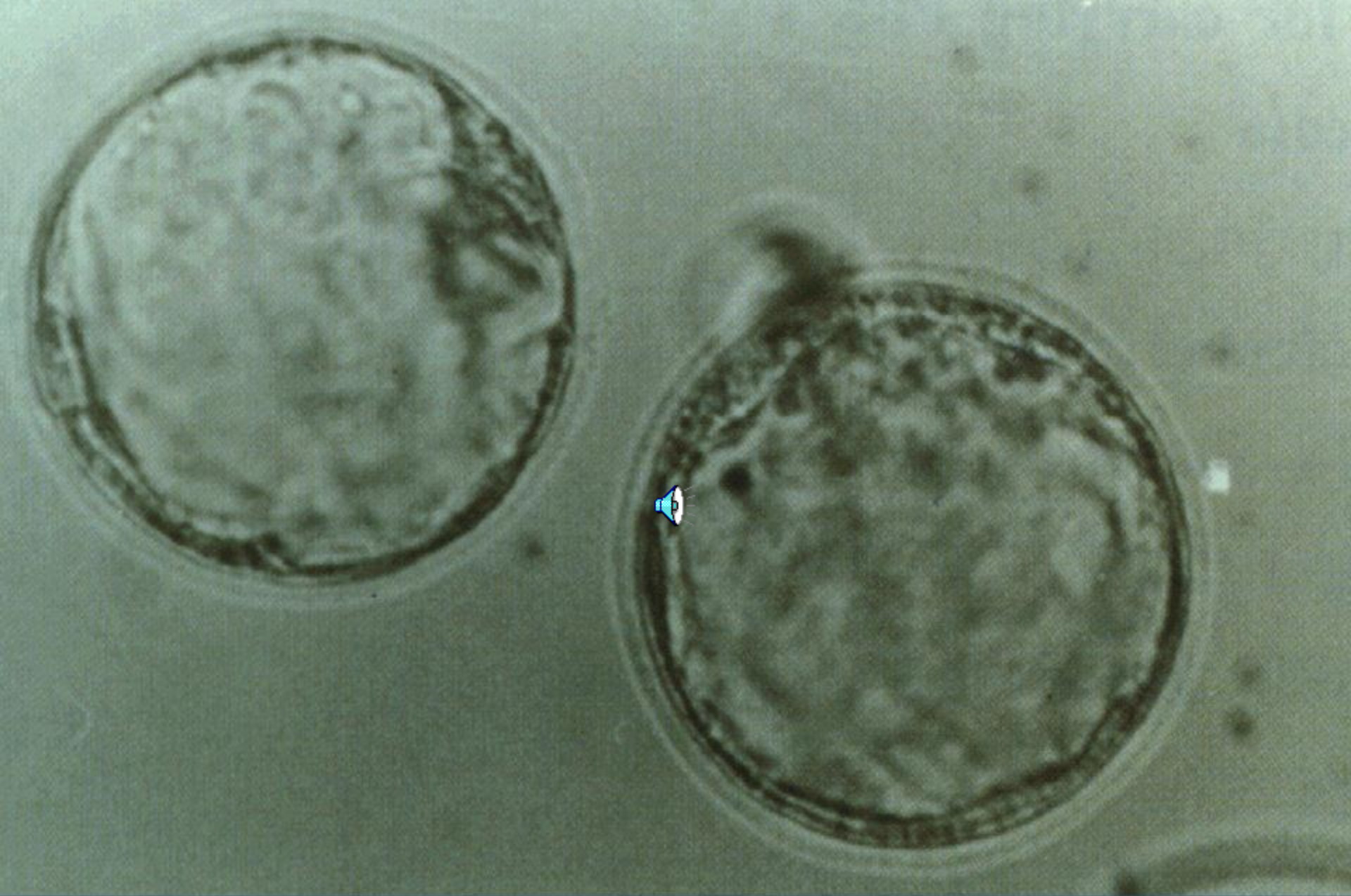
貯存架上長期冷凍保存





黃牛胚 (Embryo of Yellow Cattle)

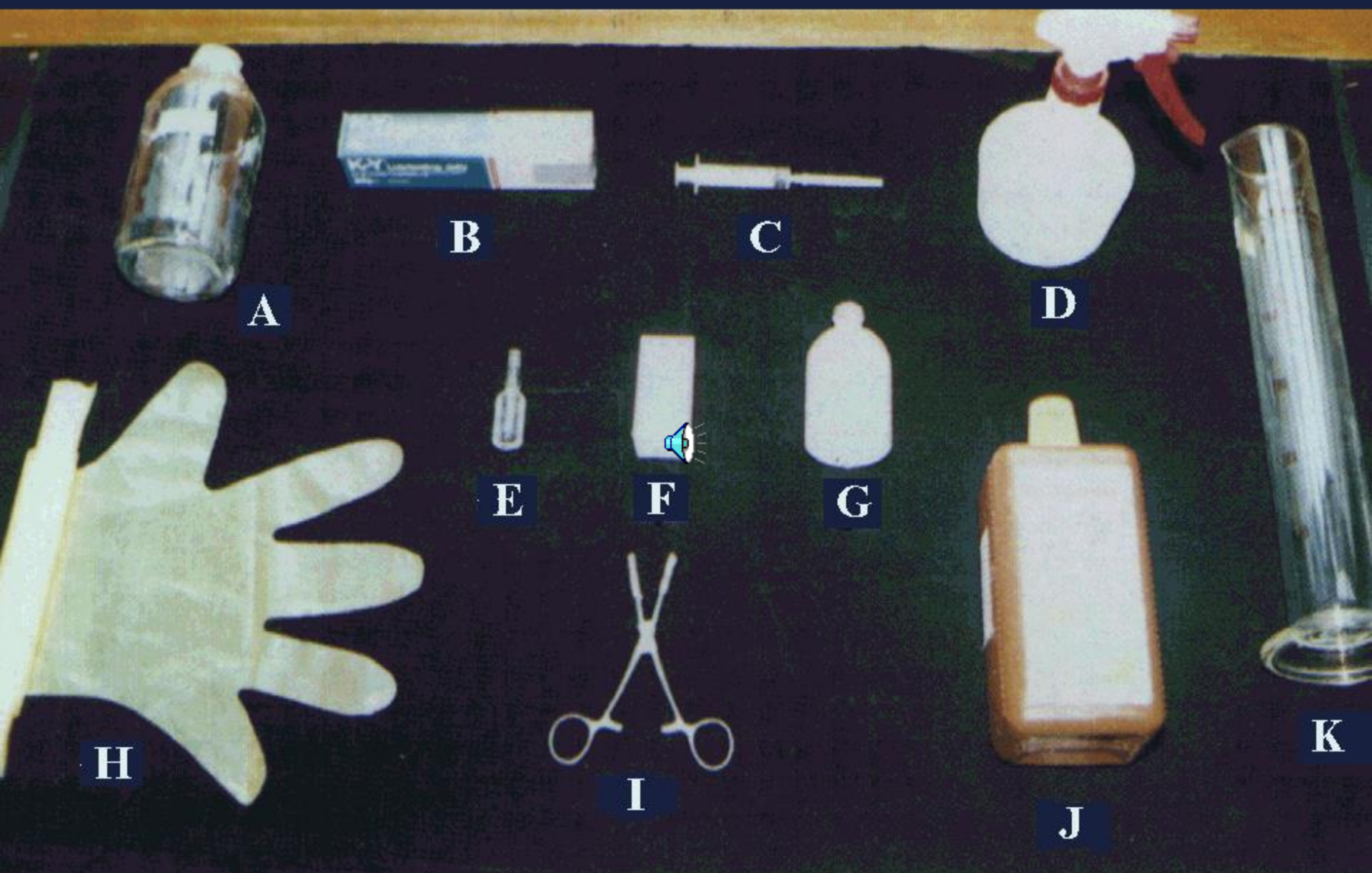
母黃牛



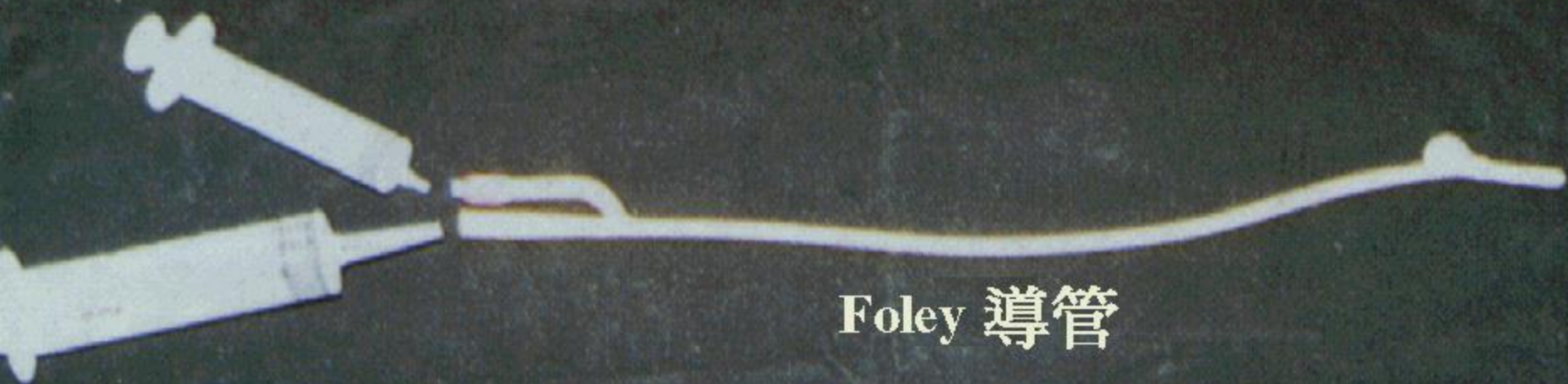
黃牛胚 (Embryo of Yellow Cattle)

胚

A:滴空瓶 B:潤滑劑 C:5ml 注射筒 D:70% 酒精 E:麻醉劑



: 前列腺素 G: 抗生素 H: 手套 I: 止血鉗 J: 碘液 K: 500ml 量筒



Foley 導管



注精棒

胚沖洗器具

50ml 注射筒

牛卵採集管

引導棒

胚沖洗器具

牛卵採集管(法製,I.M.V.)

20ml 注射筒

50ml 注射筒

收集瓶

沖洗器

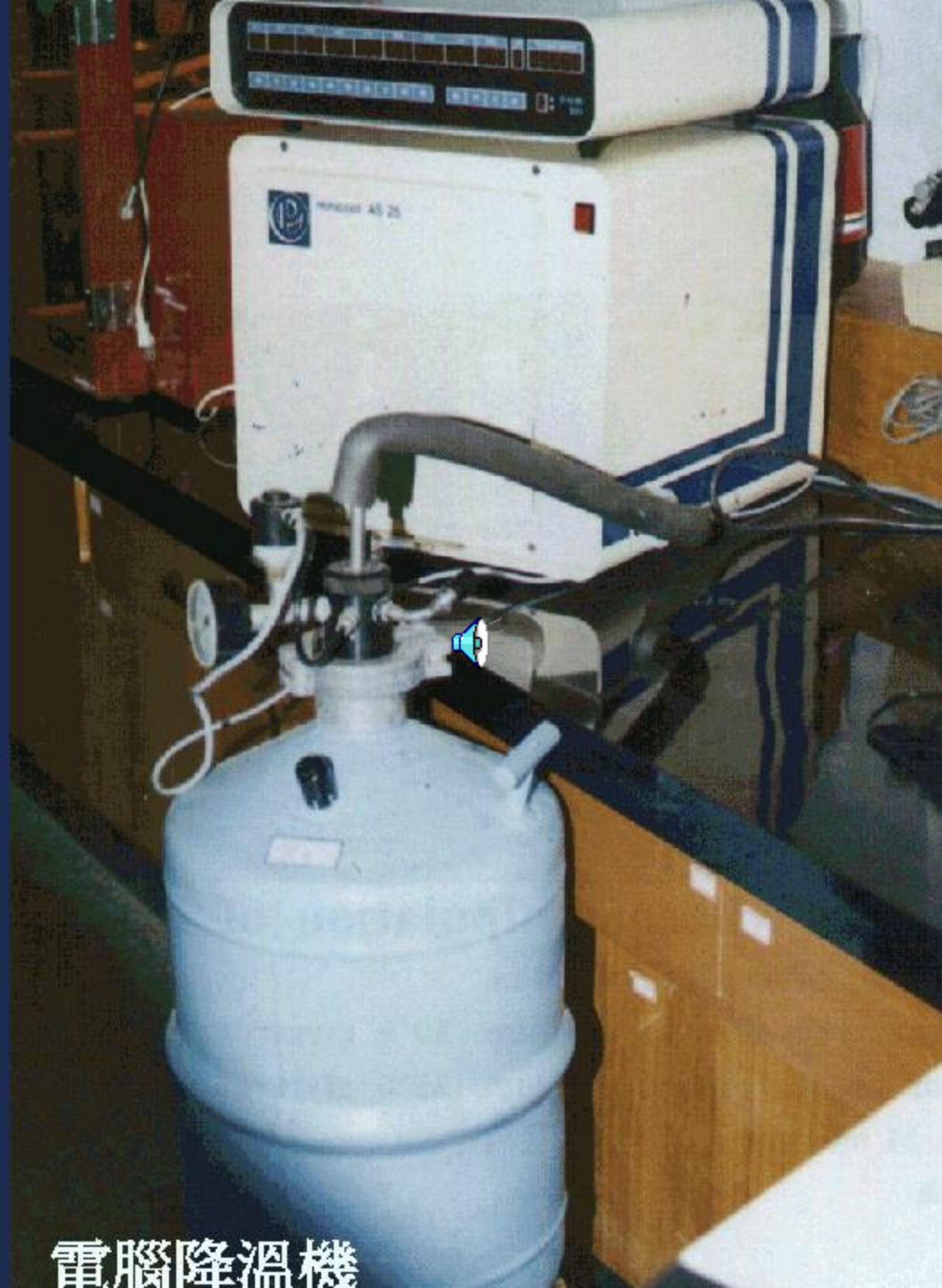
擴張器

胚沖洗器具





胚顯微操作器具



電腦降溫機

黃牛冷凍胚之製作方法





以 PBS 液行非外科手術法洗胚

days after
estrus

0-2



1
cell

1-3



2
cell

2-3



4
cell

3-5



8
cell

4-5



16
cell

5-6



morula

days after
estrus

5-7



tight
morula

7-8



early
blastocyst

7-9



blastocyst

8-10



expanded
blastocyst

9-11



hatching
blastocyst

Morphologically normal bovine em-

牛胚於不同階段之發育形態

洗胚之收集液

沉澱

鏡檢

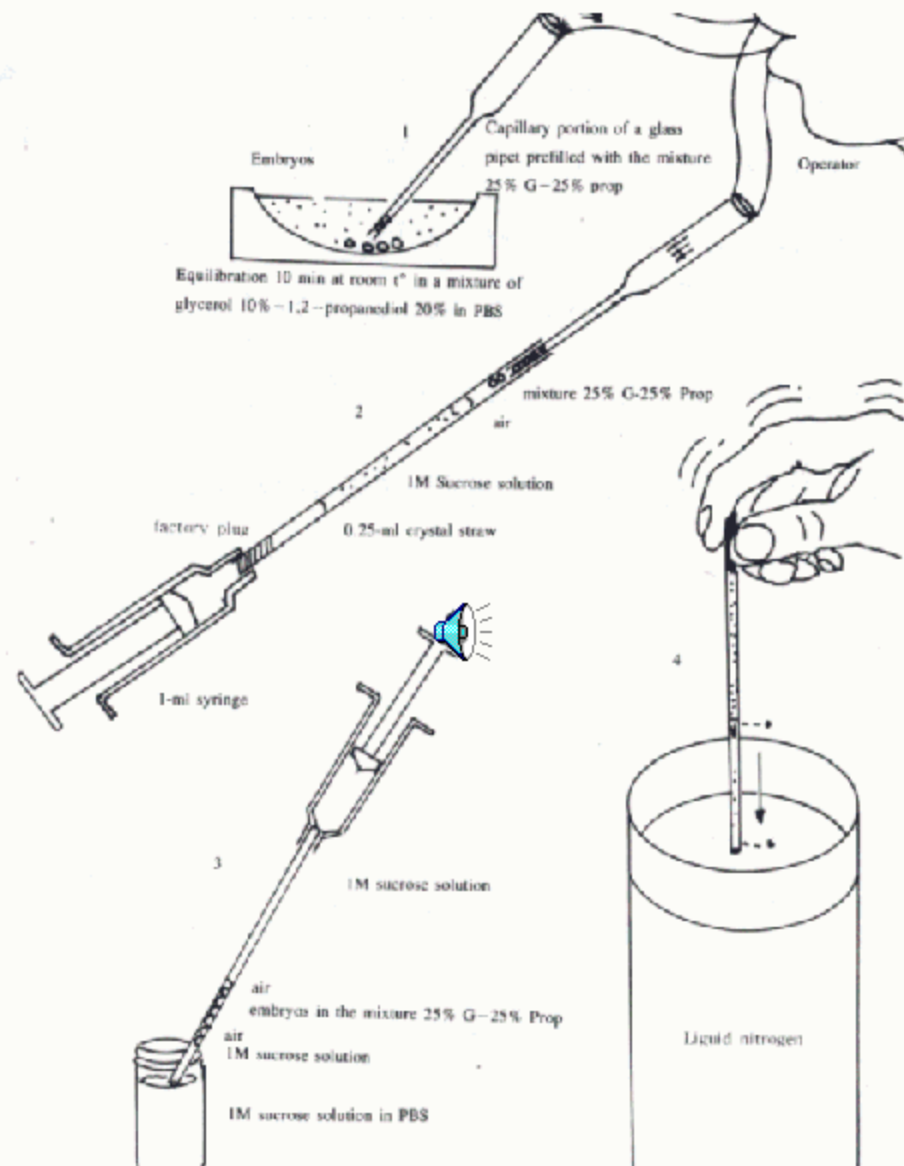
冷凍

靜置至少35分鐘，將上層液
濾去，取底層約50ml收集液
倒入 petri dish 以尋找胚並回
收之



挑出品質好的胚予以冷凍保
存。以 8-cell blastocyst 階段
受胎率較佳

黃牛冷凍胚之製作方法



玻璃化冷凍胚



山羊胚 (Embryo of Goat)

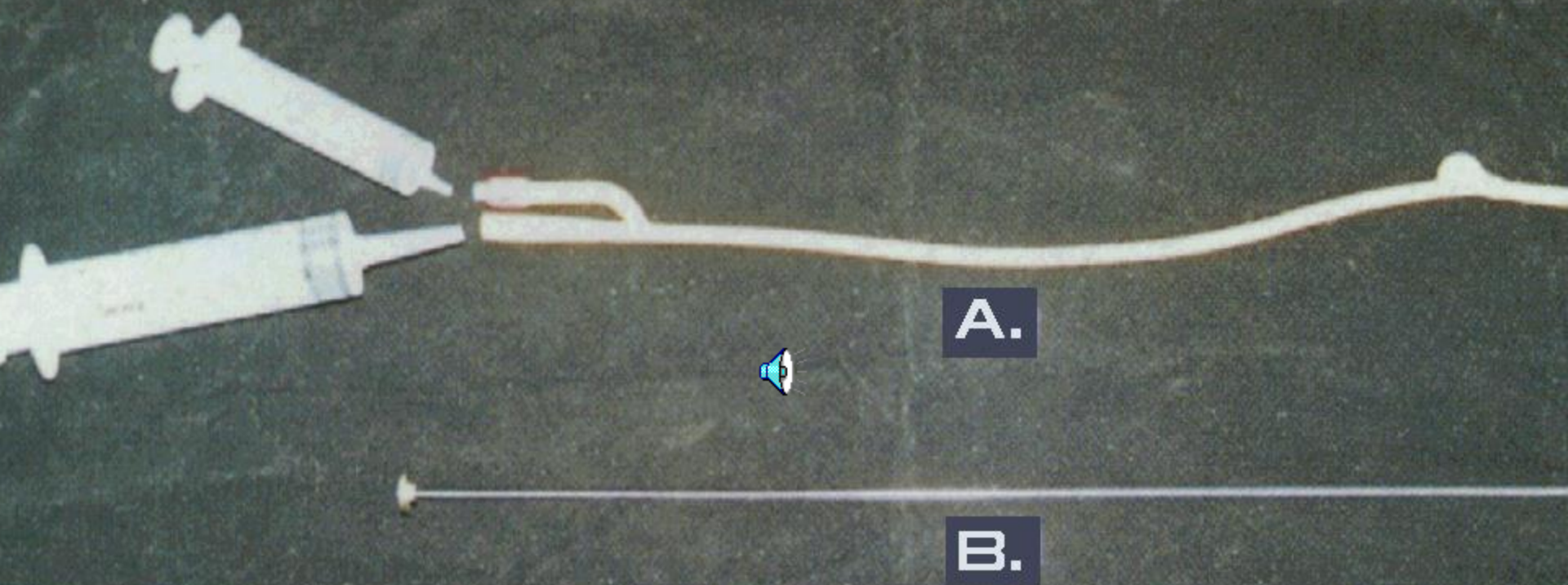
母山羊



山羊胚 (Embryo of Goat)

胚

羊胚採集用器具

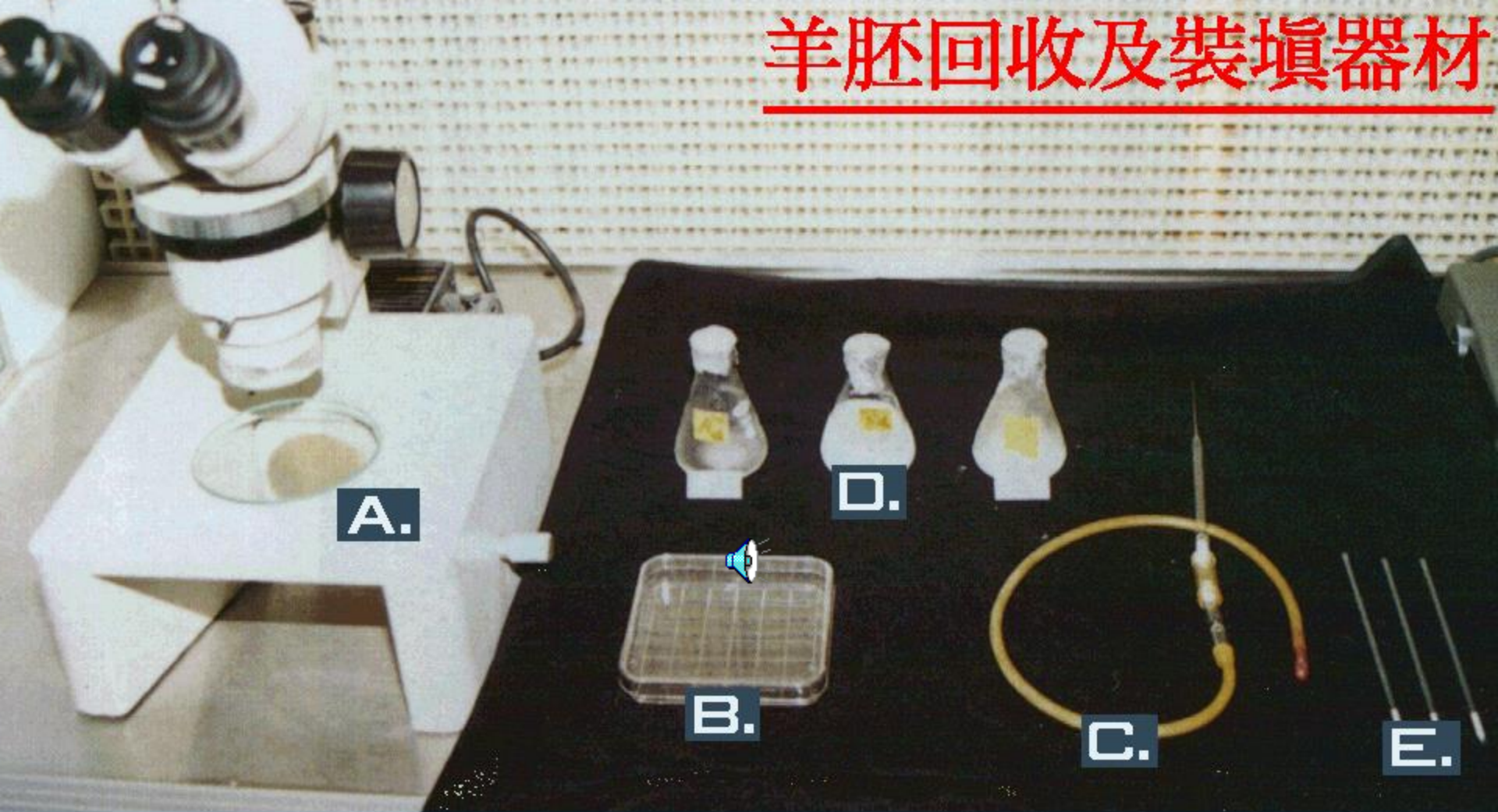


A. Foley 氏導管，含充氣管、氣球及沖洗液進出管。

B. 不銹鋼條，為支持 Foley 氏管，以便於涌入子宮中。



羊胚回收及裝填器材



- A. 立體顯微鏡：羊胚檢出及品質鑑定。
- B. 方格培養皿：盛裝沖洗液，便於胚之檢出。
- C. 吸管：將胚自培養皿中吸出集中。
- D. 防凍液：
- E. 裝填羊胚用之麥管(0.25ml)。



電腦控制冷凍降溫設備

- A 電腦程式設定主機: 設定不同降溫速率
- B 降溫箱: 內可置麥管, 並有自動Seeding裝置
- C 液態氮桶及氣壓表供應降溫之液氮氣

羊胚採集及冷凍方法

發情季節母羊動情週期

第 9-12 日

PMSG 1500 ru/ 頭
肌肉注射 48 小時

PGF2 α 肌肉注射
36-48 小時

HCG 1500 ru/ 頭 靜脈注射

母羊人工授精或自然交配

配種後 6-7 日

半外科手術沖洗胚

立體顯微鏡下回收胚

非發情季節母羊

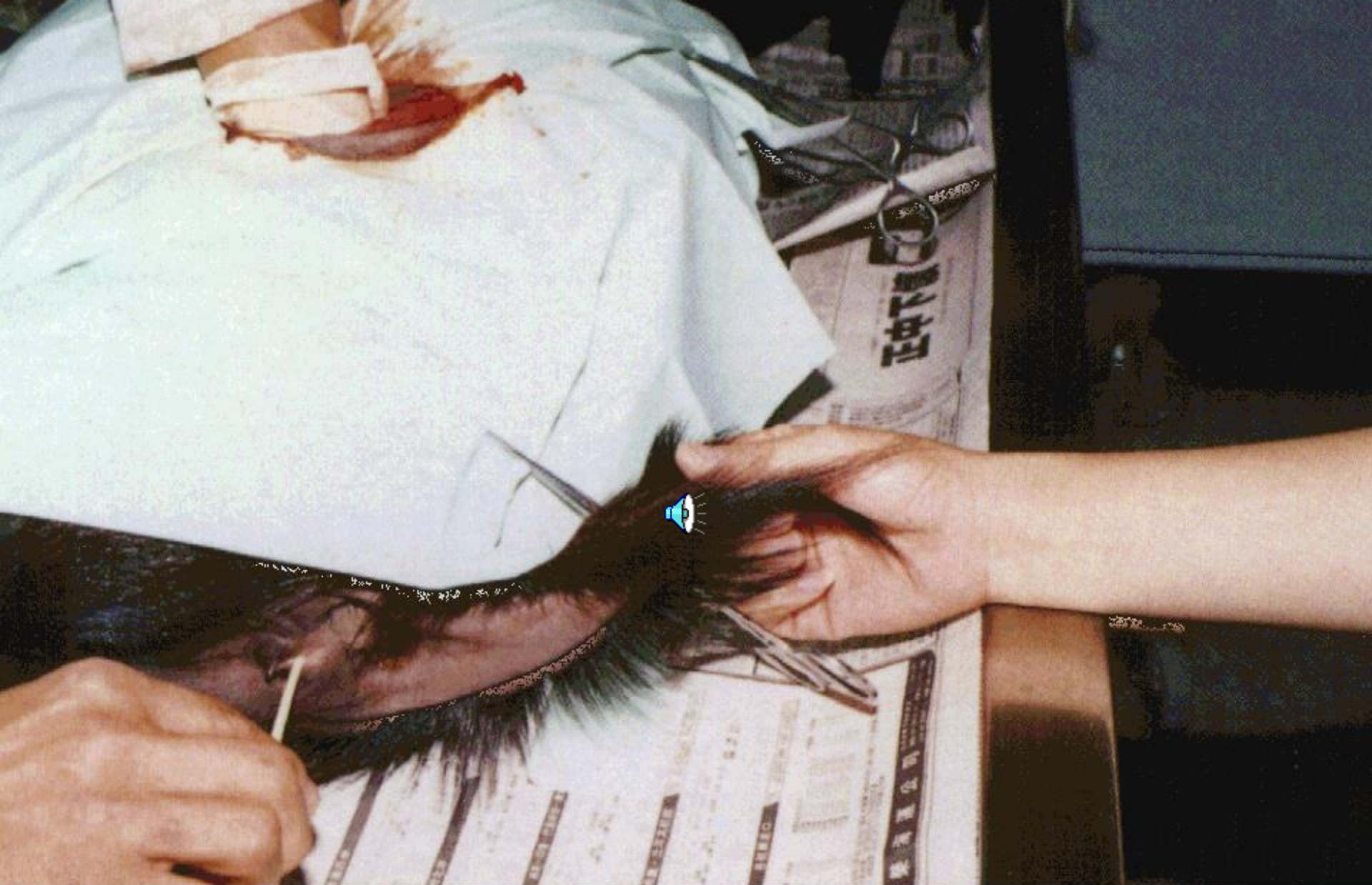
裝置陰道內助孕
素釋放器 CIDR
9-12 日

CIDR 取出前 2 日
PMSG 1500 ru/ 頭
肌肉注射

取出 CIDR 並注射 PGF2 α
取出 CIDR 後
24-36 小時
發情開始



母羊在麻醉之後，由左腹部手術切口之情形



由左手進入骨盤腔操縱子宮頸，右手則安置 Foley 氏
導管伸進入特定之子宮角。



將 Foley 導管之氣球吹脹。



以注射管注入油洗滌並回收之 左手同時可以操縱按摩子宮角。

羊胚採集及冷凍方法

(1) 溶液之配製

溶液 A: PBS+10% FCS (54ml PBS+6ml FCS=60ml)

溶液 B: PBS+10% glycerol (27ml 溶液 A+3ml glycerol=30ml)

溶液 C: PBS+5% glycerol (5ml 溶液 A+5ml 溶液 B=10ml)

(2) 步驟

1 胚以 A 液洗三次(室溫下)。

2 胚入 C 液 5 分鐘(室溫下)。

3 胚入 B 液 10-20 分鐘(室溫下)。

4 以 0.25-0.5ml 之麥管, 吸 B 液至 5cm 長, 吸空氣, 吸含胚之 B 液 4cm 長, 吸空氣, 吸 B 液, 最後封白粉。

5 電腦控制降溫:

20°C - 0°C 迅速冷卻

0°C - -7°C 1°C/min

-7°C Seeding 5 - 10 分鐘後再保持 10 分鐘

-7°C - -35°C 0.3°C - 0.6°C/min

-35°C - -196°C 達-35°C後直接投入液態氮

6 將製成之冷凍胚(麥管)移至液氮筒內儲存。



母豬與仔豬

保存細胞: 桃園豬胚 (Embryo of Taoyuan Pig)



豬囊胚

保存細胞: 桃園豬胚 (Embryo of Taoyuan Pig)

桃園豬孵化囊胚 (Hatched blastocyst)



以 16% FCS/PBS 洗淨



浸漬於 0.25M glycerol/PBS 中，10 分鐘



浸漬於 0.5M glycerol/PBS 中，10 分鐘



浸漬於 1.0M glycerol/PBS 中，10 分鐘



裝入 0.25ml 之麥管中



以每分鐘降 1°C 的速率降溫到 -6.8°C



植冰，維持 -6.8°C 達 10 分鐘



以每分鐘降 0.3°C 的速率降溫到 -35°C

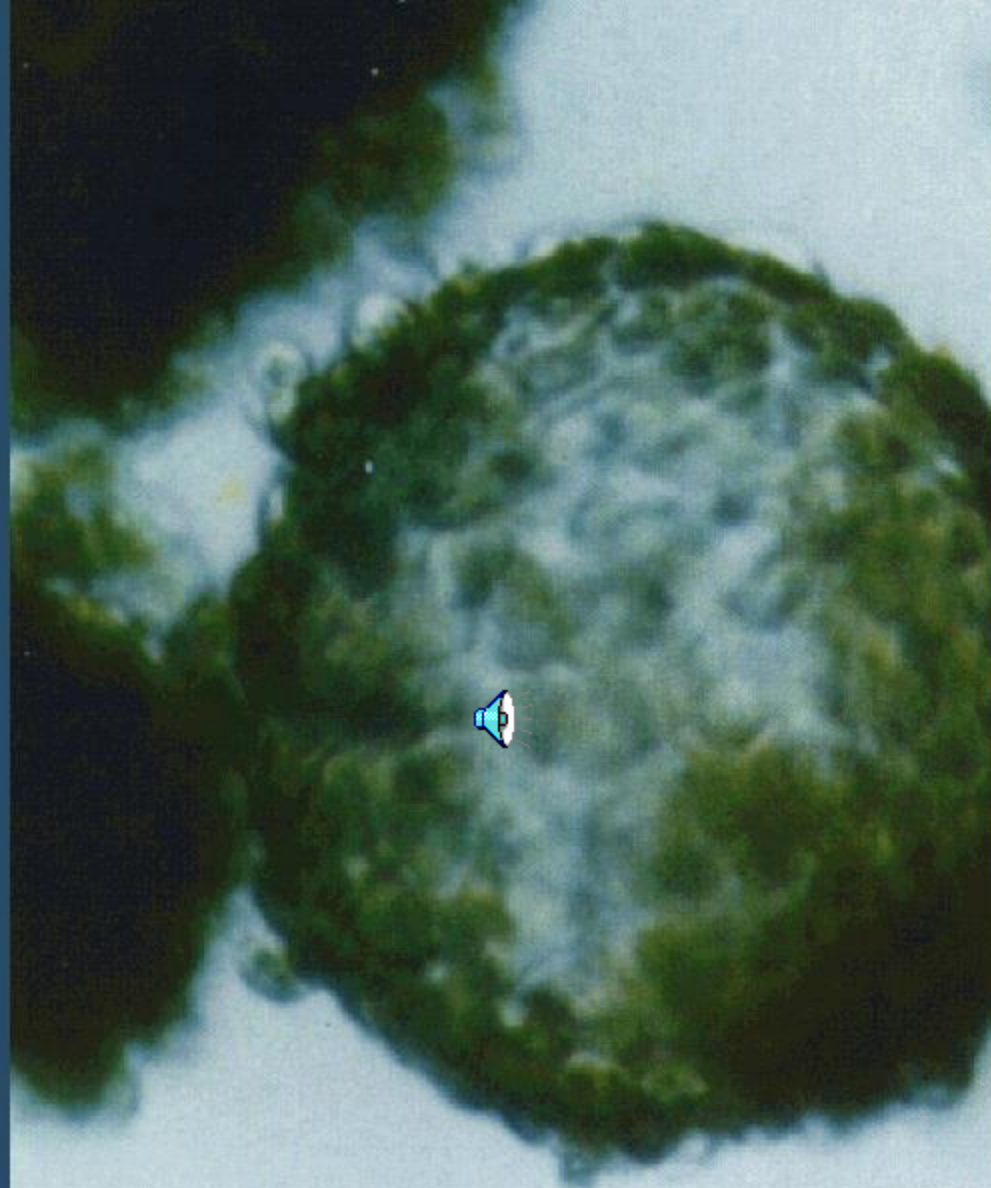


直接投入液氮中保存

桃園豬胚冷凍保存

解凍方式

- 1 將麥管自液氮中取出，直接投入 37°C 溫水中，待內容物融解後，將之擠出於錶玻璃上。
- 2 將胚尋出，移到 0.5M glycerol/PBS 保持 10 分鐘。
- 3 將胚移入 0.25M glycerol/PBS，保持 10 分鐘。
- 4 將 16% FCS/PBS 以逐滴加入的方式加入到含有胚的 0.25M glycerol/PBS 中。
- 5 將胚以 16% FCS/PBS 洗淨，即可做胚移置或培養觀察。



解凍後存活的豬囊胚