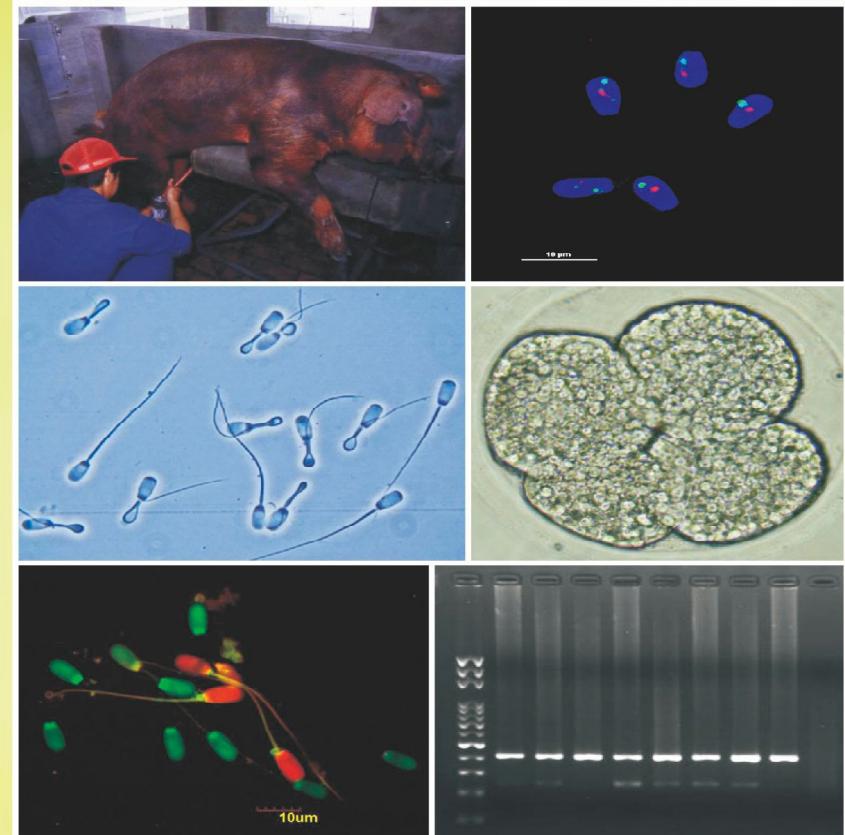


豬的人工授精與選性繁殖



陳銘正、陳奕竹、張設巖

國立宜蘭大學農業推廣委員會印行
行政院農業委員會經費補助
中華民國一百零一年十月出版

ISBN :
978-986-03-4034-1

GPN : 1010102251
定價：新台幣150元



978-986-03-4034-1

豬的人工授精與選性繁殖

目 錄

	頁 次
壹、緒言.....	1
貳、豬的人工授精.....	3
一、公豬精液的稀釋與保存.....	3
二、稀釋精液的品質.....	7
三、應用流式細胞儀檢測精液品質.....	14
四、人工授精的方法.....	21
參、豬的選性繁殖.....	23
一、選性繁殖的方法.....	23
二、選性繁殖的專利趨勢.....	31
三、豬選性繁殖的發展現況.....	33
四、實驗室發展的技術.....	36
五、繼續開發 XY 精子分離的新方法.....	43
肆、誌謝.....	45
伍、參考文獻.....	46

壹、緒言

近年來台灣豬群生產效率低落，母豬平均年上市頭數僅為 14 頭，除了離乳仔豬的死亡率高外，繁殖效率低落也是主要因素。為了提高豬的繁殖效率，減少疾病傳播，養豬先進國家的業者以人工授精 (artificial insemination, AI) 方式取代自然配種。

人工授精的實施，可以增加優良公豬的使用，因而改進豬群的性能；因為減少公豬飼養數量，可以降低購買與飼養的成本；經常檢查精液品質，可以減少飼養不育的公豬，提高母豬的受胎率；減少公豬與母豬直接接觸的機會，避免疾病交叉感染的風險，達到疾病控制的目的。因此在豬人工授精產業中公豬位居重要的角色，其性能檢定、遺傳登錄、精液品質與生物安全等，皆需通過驗證，才能生產良好的稀釋精液。自 2002 年起，農委會委託中央畜產會針對國內 32 家人工授精站進行評鑑，主要項目為：人工授精站的公豬頭數、產精效率及推廣效率等，以建立優良種公豬精液供應體系，並對公豬性能加予要求，應經過品種協會登錄，且必要時進行特殊基因的遺傳型檢測。然而，目前台灣豬人工授精的普及率仍較歐美國家低，因此，期望藉由推廣的方式，提供農民建立良好的公豬精液採集、檢查與稀釋保存等方法，進一步提升豬人工授精的普及率。

台灣肉品市場仍以肉豬最為大宗，根據農委會 100 年 11 月底的調查，目前台灣肉豬在養頭數為 554 萬頭，種公豬有 25,541 頭，種母豬有 604,654 頭及種女豬 93,052 頭，其中種豬平均價格約是肉豬五倍以上，經濟價值很高。而台灣肉豬生產體系主要以藍瑞斯 (Landrace)、約克夏 (Yorkshire) 及杜洛克 (Duroc) 三品

種豬，雜交出 LYD 三品種雜交肉豬。配種方法是以藍瑞斯母豬與約克夏公豬配種後，產生 LY 雜交豬，並選留 LY 母豬再與杜洛克公豬配種，產生 LYD 三品種雜交豬，即為目前市面常見的肉豬。由此可知，在生產過程中，養豬業者必須選留特定性別的種豬進行配種，例如 LY 母豬與杜洛克公豬，因此若生產出非預期性別的豬隻，除了將種豬作為肉豬使用外，也需針對雄性仔豬進行去勢手術，造成養豬業者經濟上的損失。

依據孟德爾遺傳理論，理論上的性比率應該為 1:1，然而實際上卻非如此，不同飼養條件、飼養環境與母體生理狀態皆有可能會影響後代性比率，雖然可以藉由不同的飼養管理方法，生產特定性別的後代，但仍然無法達到養豬業者期望的經濟效益。近年來，隨著分子生物學與分子遺傳學蓬勃發展，養豬業者期望藉由生物技術的方法提升選性繁殖的效率。

貳、豬的人工授精

一、公豬精液的稀釋與保存

自 1975 年起，開始使用液態保存的公豬精液，到目前母豬的人工授精已有 99% 使用液態公豬稀釋精液，此等精液被保存在 15-20°C 冰箱中 1 至 5 日，但有 85% 的稀釋精液在採精當日或保存第 2 日就使用完畢。公豬精液被稀釋後，可以不同濃度保存，搭配不同的授精方法。然而，公豬稀釋精液在保存期間，由於公豬精子細胞質膜的膽固醇與磷脂質的比例較低，且膽固醇分佈不均，使精子對低溫的耐受力較差，若是對稀釋精液降溫太快，或低於 15°C，則會造成存活精子的損失，稱為冷休克 (cold shock)，因此液態保存的精液適當溫度為 16-18°C。當新鮮精液進行稀釋時，要避免溫度的劇烈變化，才能避免精子受到損傷。

當公豬精液被採集後，為增加可使用的劑量，須進行稀釋的步驟，除了增加授精劑量外，仍可以維持精子的功能性，並且有良好的生育力，因此稀釋液的成分尤其重要。在新鮮精液中，精漿會提供精子在雌性生殖道運輸時所需的營養，但當新鮮精液射出後，精子的代謝活動僅能維持一段較短的時間，為了減少精子的代謝活動，需將精液適當稀釋並保存於低溫，以延長精子的壽命。



圖1. 精液採集



圖2. 稀釋精液

(一) 稀釋液成分

精漿中的物質還不足以讓精子於體外保存時利用，因此為了使精子在保存期間仍能維持良好的狀態，稀釋液成分扮演著重要的角色。表 1 為目前市售豬精液稀釋液的組成分，其功能分述如下：

精子代謝主要以糖解作用為主，不斷消耗能量而衰竭，因此在稀釋液中以添加糖類作為能量的來源，例如：葡萄糖、果糖等，可以維持精子代謝的所需。除此的外，稀釋液的滲透壓及 pH 值的平衡亦相當重要，一般公豬新鮮精液的 pH 值約為 7.4 ± 0.2 ，然而當精子進行糖解作用時，會使細胞內 pH 值下降，雖然可以減緩精子的活動而延長保存期限，但仍須防止精子的酸中毒。為了在精液保存期間讓精子維持適當的 pH 值，稀釋液中會添加一些緩衝物質，如碳酸氫鈉（sodium bicarbonate）、檸檬酸鈉（sodium citrate）或其他較強的緩衝物質，如 Tris 或 Hepes 等。

在精液保存期間，若 pH 值上升，容易誘導精子進行頭巾反應；當精液保存的軟管中存留過多空氣，會使 pH 值上升，而使具有活動力的精子逐漸減少。稀釋液中可以添加 HCO_3^- 來緩衝 pH 值，但過量 HCO_3^- 添加，會導致精子細胞膜結構改變，使細胞膜結構不穩定，鈣離子容易進入細胞內，誘導精子發生獲能作用，不利精子的保存。因此，稀釋液中會添加金屬螯合劑，常見者為二乙胺四乙酸（ethylene-diamine-tetra-acetic acid, EDTA）或乙二醇四乙酸（ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA），主要螯合細胞外的鈣離子，降低精子誘發獲能作用與頭巾反應。除此之外，稀釋液中降低鉀離子濃度，能維持精子膜上鈉鉀幫浦的功能

，避免胞內鉀離子流失，維持精子的活動力。

由於精子頭部的細胞質膜由多元不飽和脂肪酸組成，使精子對溫度及氧化較為敏感，又精漿中抗氧化物質含量較少，因此為防止精子的冷休克 (cold shock) 及氧化傷害，稀釋液中常添加牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、半胱胺酸 (Cystine) 或穀胱甘肽 (Glutathione)，可以有效維持精子細胞質膜的完整性。精液源自於體內，因此射出前，細胞應在無菌狀態，但是常常在採集過程中汙染到細菌。又體外保存精液的環境有益於細菌滋生，造成精子活力的降低與精子的凝集，因此在稀釋液中常添加硫酸慶大黴素 (Gentamycin sulfate)、硫酸新黴素 (Neomycin sulfate) 等抗生素來抑制細菌生長，延長精液保存期限。

表 1. 市售豬精液稀釋液的組成分

	IVT	Kiev	BTS	Reading	Modena	Androhep
葡萄糖	3.0	60.0	37.0	11.5	25.0	26.0
檸檬酸鈉	24.3	3.7	6.0	11.65	6.9	8.0
EDTA	-	3.7	1.25	2.35	2.25	2.4
重碳酸鈉	2.4	1.2	1.25	1.75	1.0	1.2
氯化鉀	0.4	-	0.75	-	-	-
乙醯半胱胺酸	0.05	-	-	-	-	-
HEPES	-	-	-	-	-	9.0
牛血清白蛋白	-	-	-	-	3.0	2.5
TRIS	-	-	-	5.5	5.65	-
檸檬酸	-	-	-	4.1	2.0	-
半胱胺酸	-	-	-	0.7	0.05	-
海藻糖	-	-	-	1.0	-	-
PVA	-	-	-	1.0	-	-
滲透壓	290	380	330	300	282	309
pH	-	7.2	7.2	-	6.9	6.8

(源自Gadca, 2003)

(二) 稀釋液種類

一般公豬精液的稀釋液依照保存期限可分為短效型與長效型兩種，前者的稀釋精液保存期為 1-3 日，而長效型者可保存 4 日以上。近年來常見的短效型稀釋液有：長生精 (Semengra)、速保精 (Sperm-up)、BTS、Kiev、Illinos Variable Temperature (IVT) 與 Merck III 等；長效型稀釋液有：威兒精、Acromax、Androhep®、Modena、MR-A®、Mulberry III、Reading 與 Safe-Cell。不管是長效型或短效型，所有公豬的稀釋精液應保存於 16-18°C 的恆溫冰箱，並在使用期限內授精完畢。

(三) 稀釋方法

目前有 2 種方式可以用來稀釋公豬精液，第一種為一步驟稀釋法，直接將等溫的稀釋液與精液進行混合，直接稀釋到授精濃度；另一種為兩步驟稀釋法，稀釋液先回溫到與精液相同溫度，進行 1:1 稀釋，對母豬授精前再稀釋到最終授精濃度；大多人工授精站採用第一種方法進行稀釋保存。

二、稀釋精液的品質

(一) 精液的物理性狀

1. 採集新鮮精液後，立即量取原精液的體積，一般公豬射精量約為 150-250 ml，每頭公豬個體間會有差異，故應比對同一頭公豬近期內採集的精液量，評估是否異常。
2. 以肉眼觀察原精液的顏色，正常濃度的精液應呈現乳白色。當精子濃度偏高時，顏色呈現乳黃色，濃度偏低時顏色呈現淺灰白色。若精液呈現淡紅色、琥珀色或其他色澤，表示精液中可能含有血液、尿液或組織細胞流入。
3. 嗅聞原精液應有淡淡腥味，若是被尿液污染則會帶有阿摩尼亞味。
4. 原精液的顏色和氣味不對者須丟棄，不宜使用，並做成記錄，持續追蹤該公豬在採精後的物理性狀。

(二) 精子濃度檢查

目前常用於計算精子濃度的方法有：血球計數板（圖3）、光電比色計（圖4）與血球自動測定儀。豬場多用光電比色計測定濃度，此方法雖然方便快速，但為求準確，仍需定期校正儀器。



圖3. 血球計數板



圖4. 分光光度計

甲、血球計數板估算濃度

1. 將血球計數板與搭配使用的蓋玻片洗淨，以拭鏡紙擦拭乾淨即可使用。
2. 以定量吸管吸取 0.01 ml 稀釋精液或原精液，加入 0.99 ml 的 4% 氯化鈉 (NaCl) 溶液，充分混合。
3. 吸取 0.1 ml 在步驟 2 已混勻的稀釋精液，將精液注入血球計數板的溝槽內，稀釋精液會自動被吸入血球計數板與蓋玻片間。
4. 在光學顯微鏡下，使用觀察倍率 100 倍，可看視野下有 25 個大方格，每個方格內都有 16 個小格，選擇 4 個角落和中間的大方格，共 5 個大方格進行計數，計數原則為：以精子頭部為主，壓在上方和右方格線的精子列入計算，而壓在下方和左方格線的精子不列入計算。

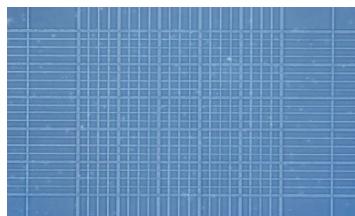


圖4. 顯微鏡視野下的畫面

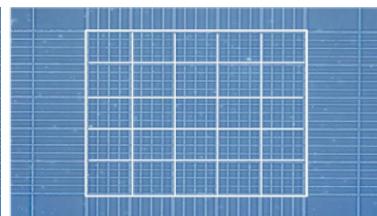


圖5. 在25格內計數精子濃度

5. 計算精子濃度為：

N：5個大方格內的總精子數

大方格體積：

$$\begin{aligned} \text{長}(1 \text{ mm}) \times \text{寬}(1 \text{ mm}) \times \text{高}(0.1 \text{ mm}) &= 0.1 \text{ mm}^3 \\ &= 0.1 \times 0.001 \text{ ml} \\ &= 1 \times 10^{-4} \text{ ml} \end{aligned}$$

稀釋倍數：0.01 ml原精液/(0.01 ml+ 0.99 ml) = 1/100

故精子濃度為： $5N \times 10^4 \times 10^2 = 5N \times 10^6$ 精子/ml

5. 將血球計數板上方與下方的精子濃度平均，所得即為該原精液
的精子濃度。

乙、光電比色計計算濃度

光電比色計型式與品牌甚多，只要所測定出的線性關係好（
線性關係係數 R^2 在 0.95 以上），均可作為測定精子濃度的工具。
須注意的是，應定期用血球計數板測得的精子數做為標準，進
行校正。

(三) 精子活力

當精子進入雌性生殖道時，精子能否到達受精位置並穿透卵母細胞，是成功受精的關鍵因素，因此精子活力可做為生育力的參考指標。目前檢查精子活力的方法有二，分別應用顯微鏡檢查與應用電腦輔助精液分析系統（computer assisted semen analyzer, CASA）檢查精子活力。



圖6. 位相差顯微鏡

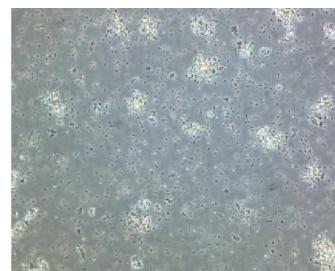


圖7. 顯微鏡視野下的精子活力

甲、應用顯微鏡觀測精子活力

稀釋精液的活力是以平均 100 隻精子中有多少隻精子有向前活動的百分比。因此檢測步驟如下：

1. 先將載玻片於 37°C 加熱。
2. 將稀釋精液輕輕混勻後，用定量吸管取 8 ul 精液滴在載玻片上，蓋上蓋玻片，放置在加熱板上 30 秒。
3. 在位相差顯微鏡下，以 100 至 200 倍的視野下至少觀察 5 個視野，即 4 個角落與中間，平均各視野下的精子活動力，作為此樣品的活力。
4. 依據郭與劉（2004）所述，活力讀值有兩種，一種是百分率法，從 95% 至 0%，以每 5% 為一個判定的單位。另一種是分級法，從 0 至 5 級，如表 2 所示。

表 2. 精子活力分級法的定義

分級	百分率	定義
5	>80%	非常好（精子均在動，無凝集的精子團塊）
4	75-80%	好或非常好（大部分為移動的精子與少量的精子團塊）
3	50-75%	好（有凝集的精子的團塊）
2	20-50%	普通（只有一半的精子在動）
1	<30%	差（精子指在原處搖動，但沒有位移的運動）
0	0%	死精或無精

(郭與劉, 2004)

乙、電腦輔助精液分析系統

為了避免顯微鏡檢查造成人為判斷的誤差，可以利用 CASA 進行分析精子活力，並同時收集多樣參數進行分析較為客觀，但因儀器昂貴，操作較為複雜，尚未被養豬現場所利用，多侷限於實驗室操作。

(四) 精子形態

精子形態雖與公豬生育力相關性不高，仍可作為評估精液品質的參考。檢查步驟如下：

1. 將稀釋精液與 10% 福馬林緩衝液以體積比 10：1 混合。
2. 取 1 ul 的混合精液滴在載玻片上，蓋上蓋玻片，並在蓋玻片四角上輕壓，使混合精液能平均擴散。
3. 在位相差顯微鏡下，以 400 至 1000 倍的視野進行檢查。

4. 形態判別項目為：

- (1) 成熟率：精子的頭部與中節位置不具有原生質滴皆為成熟精子。
- (2) 正常形態率：精子具有正常形態的百分比。精子的異常形態包括頭部或尾部的畸形，例如：精子頭部過大或過小、頭尾分離、尾部捲曲或折疊等。
- (3) 頭巾完整率：頭部前端呈現完整半月型者，表示精子頭巾是完整的。

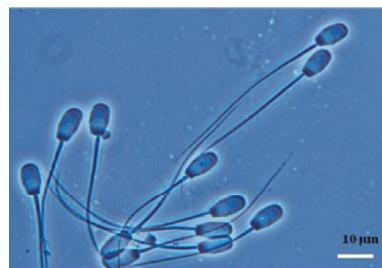


圖8. 正常形態且成熟的精子



圖9. 尾部異常與不成熟的精子

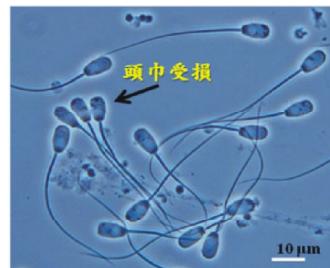


圖10. 頭巾受損的精子

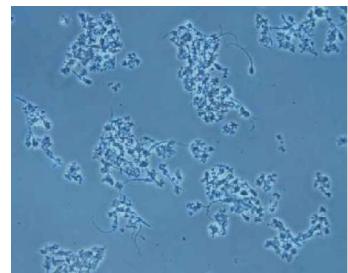


圖11. 精子凝集



圖12. 精子稀少

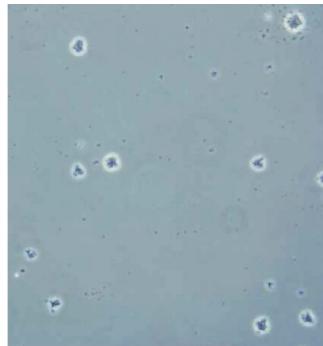


圖13. 無精子

5. 檢查精子形態的各種項目，分別計數至少 200 隻，即可以計算
精子成熟率、正常形態率與頭巾完整率。

三、應用流式細胞儀檢測精液品質

流式細胞儀（flow cytometry）乃在流體狀態下檢測細胞形態的技術，主要由三大系統組成，分別為：

1. 流體學系統（fluidics）：能使細胞顆粒散布於液體中，使細胞能夠逐顆通過雷射光束，產生光學訊號後進行分析。
2. 光學系統（optics）：能讓帶有螢光物質的細胞，經由雷射激發後，產生波長不同的螢光訊號，並通過的光學鏡片及偵測器。
3. 電子系統（electronics）：將螢光訊號轉變成電子訊號，並以電腦進行記錄與分析。

相對於顯微鏡技術，流式細胞儀可以較客觀、準確及快速的分析精液樣品。

流式細胞儀最早被應用於分析精子的 DNA 含量，後續便廣泛應用在精子存活率（viability）、頭巾完整性（acrosomal integrity）、粒線體功能性（mitochondrial function）、獲能狀態（capacitation status）、膜流動性（membrane fluidity）與 DNA 狀態（DNA status）等。流式細胞儀能快速、準確、客觀且大量地分析精液樣品，可以結合多項參數評估精液的生育力，因此可能與精液的生育力有較高的相關性。

（一）精子存活率

自 1980 年代起，最早應用於檢測精子存活率的螢光染劑為 FDA (fluorescein diacetate)，接著發展出較 FDA 穩穩定的螢光染劑，如：CAM (calcein acetomethyl ester) 、CFDA (6-carboxyfluorescein diacetate) 或 CMFDA (6-carboxymethyl-

fluorescein diacetate)；這些螢光染劑染色區別死活精子的原理為，當染劑經由細胞膜進入精子後，存活精子細胞內含有脂酶(esterases)，可將染劑轉變為不能滲透膜的螢光物質，並保留在細胞質內。近年來則利用可滲透活細胞膜的核酸染劑 SyBr-14，藉由細胞膜上的離子通道進入細胞質，而發出綠色螢光，所檢測的結果變異小且較具有一致性。死亡的精子會伴隨著細胞膜的損壞，因此一些不能滲透膜的核酸染劑也能進入細胞內，例如應用 PI (propidium iodide) 及 EthD-1 (ethidium homodimer-1) 進行染色，同時搭配存活精子的染劑，可以獲得更為準確的結果。目前廣泛以 SyBr-14 與 PI 搭配，對精液進行染色，並以流式細胞儀分析後，可以由第 4 象限得知精子的存活率(圖14)。以螢光顯微鏡觀察可知，存活精子會被 SyBr-14 染上，呈現綠色螢光；死亡精子會被 PI 染上，呈現紅色螢光(圖15與16)。

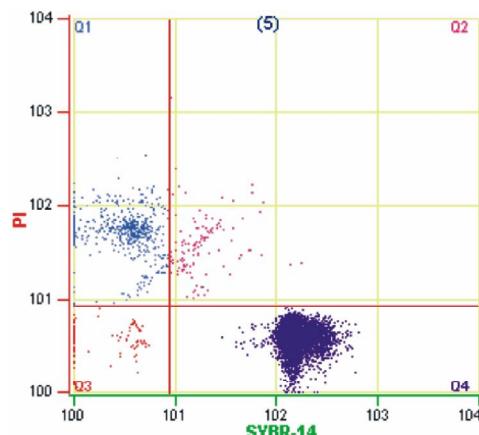


圖14. 流式細胞儀檢測精子存活率的點圖

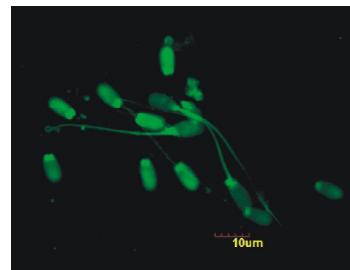


圖15. 存活的精子被 SyBr-14 染上綠色

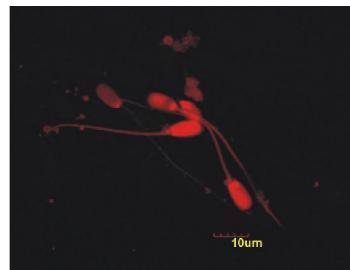


圖16. 死亡的精子被 PI 染上紅色

(二) 精子膜完整性

應用帶有 FITC (flourescein isothiocyanate) 融光標定的凝集素 (lectin) 對精子進行染色，是常用於檢測精子頭巾完整性的方法。當精子頭巾有損壞時，FITC-PSA (*Pisum sativum* agglutinin) 或 FITC-PNA (*Arachis hypogaea* agglutinin) 會與頭巾上的糖蛋白 (glycoprotein) 結合，呈現綠色螢光，其中以 FITC-PNA 較具專一性。近年來亦成功使用 PNA 結合帶有橘色螢光的 PE (phycoerythrin) 或 TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate)，搭配 SyBr-14 與 PI 同時進行染色，可以獲得更好的檢測結果。利用 PNA488 與 PI 進行染色並以流式細胞儀分析後，可以由第3象限得知精子膜完整性 (圖17)。以螢光顯微鏡觀察頭巾完整的精子，PNA488 無法與內膜糖蛋白結合，故不會有螢光被激發；頭巾破損者會與 PNA488 結合，頭巾呈現綠色螢光 (圖18與19)。

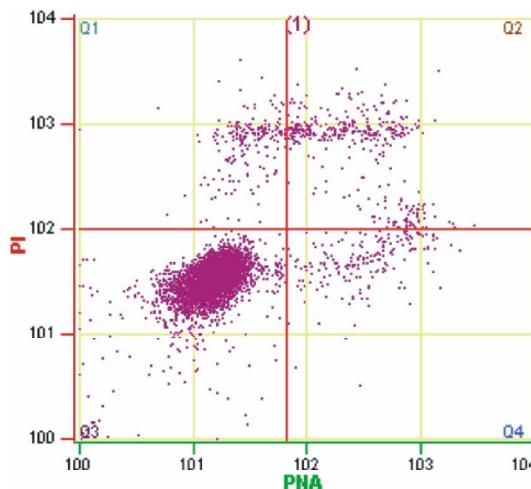


圖17. 流式細胞儀檢測精子膜完整性的點圖

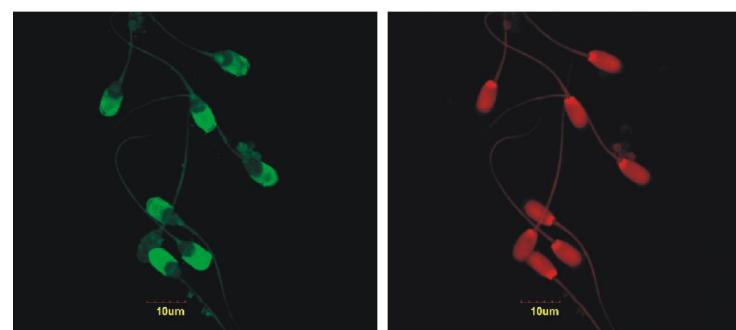


圖18. 頭巾破損的精子被 PNA488染上綠色

圖19. 死亡的精子被 PI染上紅色

(三) 精子粒線體功能性

粒線體位於精子的中節位置，提供細胞能量，使精子具有泳動能力，因此粒線體活性可作為精子活力的指標。粒線體藉由產生能量給予其他胞器，當電子傳遞進行時會產生膜內外的電位差，因此可以被親脂性陽離子螢光染劑染色。當精子粒線體具有活性時，R123 (Rhodamine 123) 及 MITO (MitoTrackerTM) 能累積於粒線體中，並呈現綠色螢光。近年來利用 JC-1 進行染色，對粒線體膜電位差更為敏感，甚至可以區分電位差的強弱 (Garner et al., 1997)。當粒線體具有高膜電位時，在粒線體中的 JC-1 會增加，並轉變為 J 聚體 (J-aggregates) 呈現橙色螢光；反之，膜電位較低時，則會以單體 (monomer) 存在，呈現綠色螢光。利用 R123 與 PI 進行染色並以流式細胞儀分析後，可以由第 4 象限得知具有粒線體功能的存活精子 (圖20)。以螢光顯微鏡觀察，粒線體功能完整精子的中節會被 R123 染上而發出綠色螢光，反之則表示精子粒線體已無功能 (圖21與22)。

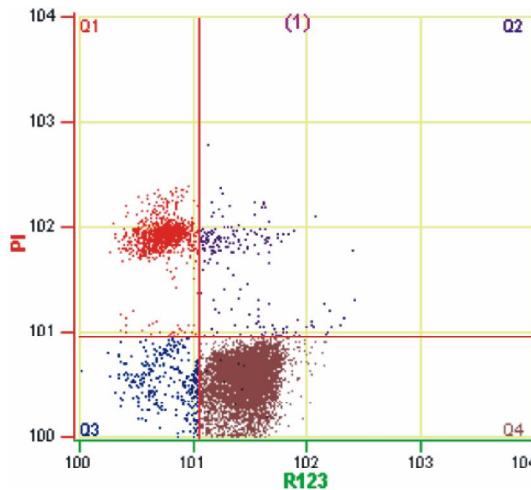


圖20. 流式細胞儀檢測精子粒線體功能性的點圖

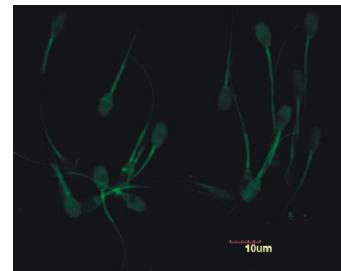


圖21. 具有粒線體功能的精子經R123染色，在中節上可見綠色螢光

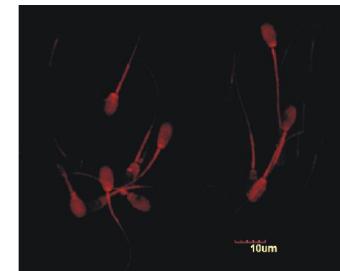


圖22. 死亡的精子被PI染上紅色

(四) 精子的染色質結構分析

正常精子的 DNA 結構能抵禦變性作用（denaturation），不正常精子的 DNA 較容易變性；因此，可利用精子染色質結構分析（sperm chromatin structure assay, SCSA）檢測精子 DNA 結構

的完整性。首先利用酸性溶液處理精子，不正常精子的DNA會變性，再以AO (acridine orange) 進行染色，當精子DNA結構完整時，AO染劑會鑲嵌於兩股中間，並呈現綠色螢光(圖24)，於530 nm處有吸光值；若精子DNA不正常，AO染劑會堆疊於單股DNA的磷酸根上，呈現紅色螢光(圖25)，於640 nm處有吸光值。精子被AO染色後，經流式細胞儀檢測可以得到DNA片段化指數(DNA fragmentation index, DFI)，即每隻精子的紅色螢光占全部螢光的比率，做為精子染色質結構是否完整的參考指標(圖23)。

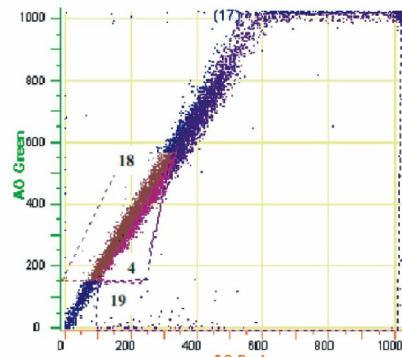


圖23. 流式細胞儀檢測精子粒線體功能性的點圖

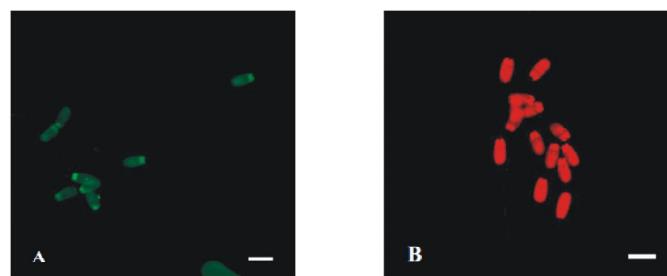


圖24. DNA完整的精子呈現綠螢光

圖25. DNA破損的精子呈現紅螢光

四、豬人工授精的方式

豬的人工授精為插入式授精，利用導管將稀釋精液注入母豬體內，依不同注精位置而有三種方法，分別為：子宮頸授精（intra-cervical insemination, CAI）、子宮內授精（intra-uterine insemination, IUI）及子宮深部授精(deep uterine insemination, DUI)。子宮頸授精係使用螺旋型授精器，前端螺旋設計便於母豬子宮頸固定，將較多的精液量注入母豬子宮頸後段位置(圖26)，一次授精量約 80 毫升，內含 50-60 億隻精子，其中約有 30-40% 的精子，在授精後 1 小時內自母豬生殖道流出。由於子宮頸授精的位置距離輸卵管較遠，精子到達受精位置前，須通過重重阻礙，最終通過輸卵管峽部到達受精位置者僅剩約 1000 隻精子。因此，為了減少精子的損失與精液的浪費，又開發了將精液注入生殖道更深部位的方法，使精子可以更接近精卵結合的位置。

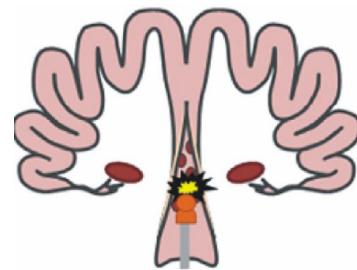


圖26. 子宮頸授精位置(圖片源自於 Mozo-Martin et al., 2012)

目前歐美國家常採用子宮內授精法 (圖27)，所使用的授精器較長，直接通過母豬子宮頸的層層皺摺，到達子宮體，可以減少約 20% 精液逆流，總精子數只要 10 億隻精子即可維持與子宮

頸授精法相同的分娩率，但是可能會減少窩仔數；尤其當總精子數降低至 5 億隻精子時，分娩率與窩仔數皆顯著下降。子宮內授精會因為精子老化或授精時間不正確，容易導致繁殖效率的下降，因此建議總精子數至少提升到 15 億隻精子較為適當。

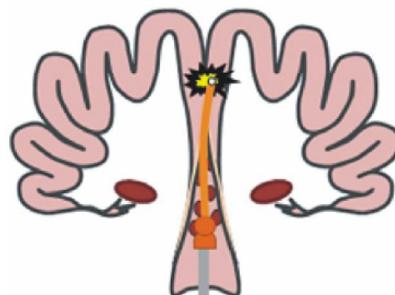


圖27. 子宮內授精位置(圖片源自於 Mozo-Martin et al., 2012)

子宮深部授精法係精液注入母豬體內的宮管接合處(圖28)，僅需注入 1.5-6 億隻精子，就可以獲得良好的受精率，此授精技術須準確插入子宮內，人員需經專業訓練，才可以減少母豬的精液授精量，防止精液逆流。子宮內授精的配種方式尚未在國內盛行，乃因需要專業訓練及合適的器材，仍然具有發展空間。



圖28. 子宮深部授精位置(圖片源自於 Mozo-Martin et al., 2012)

參、豬的選性繁殖

一、選性繁殖的方法

選性繁殖可以針對三方面著手，包含早期胚的性別篩選、調整受精條件與 XY 精子分選，茲分述如下：

(一) 早期胚的性別篩選

取受精分裂後早期胚的部份胚葉細胞 (blastomere) 進行胚性別鑑定，確定胚的性別後，再將已知性別的胚進行胚移植 (embryo transfer, ET)，就可以獲得特定性別的後代。但由於胚性別篩選需要使用顯微操作技術，吸取單一胚葉細胞，而且需結合豬胚移植技術，除了操作困難外，設備也較昂貴，因此至今無法廣泛應用於養豬產業上。胚的性別鑑定方法包含：

1. 核型鑑定

哺乳動物細胞皆有多對體染色體與 1 對性染色體，雄性動物的性染色體為 XY，而雌性動物性染色體為 XX，因此可以取部份的胚葉細胞，利用秋水仙素使細胞停留於有絲分裂中期，藉由低張溶液使細胞核破裂，使染色體釋出，再進行固定染色，以螢光顯微鏡觀察染色體的型態為 XX 或 XY 來判定胚的性別 (圖 29)。

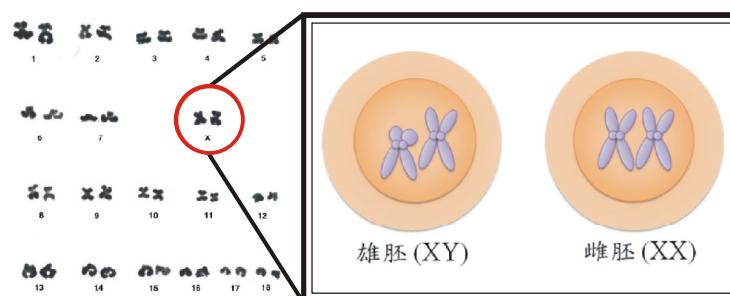


圖29. 染色體核型鑑定示意圖

(圖片源自 Jaroslaw et al., 2003)

2. H-Y 表面抗原測定

將胚的部分胚葉細胞與 H-Y 抗體共培養後，再加入帶有螢光標幟的第二抗體，最後利用螢光顯微鏡觀察，呈現螢光者判定為雄胚，相反地則為雌胚（圖 30）。

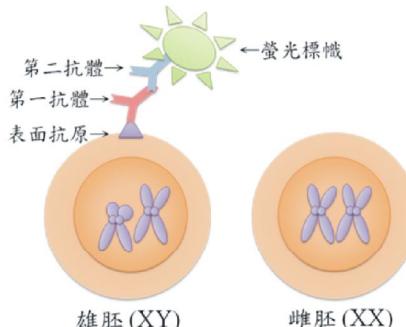


圖30.H-Y表面抗原測定示意圖

3. X 染色體酵素表現測定

雌性動物的性染色體為 XX，相較於雄性動物 XY 多了一個 X 染色體，因此理論上雌性動物 X 染色體基因的表現較雄性高出一倍，因此檢測 X 染色體上的 G6PD 酵素量的多寡，即可用於判定雄胚或雌胚（圖 31）。但雌性動物的 XX 染色體在胚胎發育過程中，其中一條 X 染色體最終會失去活性，形成緻密的巴氏體，因此此方法僅能應用於鑑定早期胚的性別。

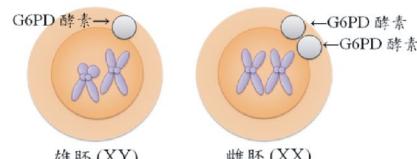


圖31.X染色體酵素表現測定示意圖

4. 聚合酶鏈鎖反應

聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 為一種可以在體外短時間內增幅特定 DNA 片段的方法，具有簡單、快速與準確等優點，目前已經廣泛應用於分子生物學的研究中。在胚性別鑑定中，將部份的胚葉細胞，以低張溶液瓦解細胞，使 DNA 釋出，再以 X 與 Y 染色體的特異性引子進行聚合酶鏈鎖反應，增幅 X 或 Y 染色體的特異性 DNA 片段，經由電泳膠片分析，呈現兩條亮帶者為雄性(XY)，相反地呈現一條亮帶者為雌性(XX)，藉此判定胚的性別（圖 32）。

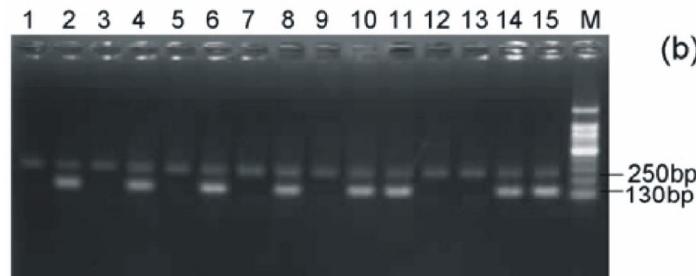


圖32. 應用 SRY 與 G3PDH 基因檢測牛胚的性別(圖片源自 Fu et al., 2007)

5. 融光原位雜交

取早期胚的部份胚葉細胞進行固定，與帶有不同螢光標幟的 X 與 Y 特異性 DNA 探針雜交後，再以核酸染劑 (DAPI) 進行染色，以螢光顯微鏡觀察，呈現藍色螢光為細胞核，在細胞核中呈現兩種不同螢光者為雄胚，具有染色體 XY；相反地僅呈現一種螢光者為雌胚，染色體為 XX，藉此判定胚的性別（圖 33）。

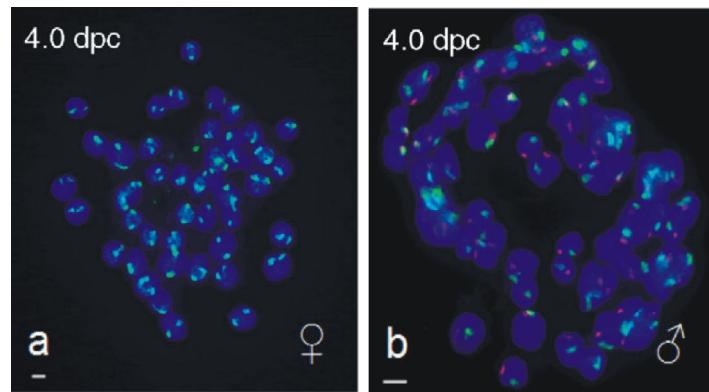


圖33. 應用螢光原位雜交檢測鼠胚的性別(圖片源自 Whyte et al., 2007)

(二) 調整受精條件

在精子與卵母細胞受精過程中，我們可以藉由改變受精的環境，而影響 X 或 Y 精子受精的比率，因此影響後代的性比率，但由於母體內環境難以控制，而且母畜發情同期化管理也較為困難，因此也難以應用於產業上。目前主要發展方向為調整人工授精的時間，利用 X 精子存活時間較長，且 Y 精子泳動及獲能速率較快的特性，於發情到排卵期的不同時間進行人工授精，可能可以生產較多特定性別的動物，例如 Martinez et al. (2004) 指出發情前期（發情後 8-18 小時）進行人工授精，由於 Y 精子會優先死亡，而利於 X 精子受精，有較高的雌胚比率（73.05%），相反地於發情後期（發情後 30 小時）進行人工授精，此時卵母細胞從濾泡中釋出，Y 精子因為泳動速率與獲能速率較快，較易於 Y 精子受精，而可產生較多的雄胚，但由於飼養者不容易得知母畜確切的發情時間與排卵時間，母畜發情同期化較為困難，且重複性不高，因此也很少應用於畜產業界。

(三) XY 精子分離

利用 X 與 Y 精子的差異性，將精液中 X 精子與 Y 精子先進行分離後，再以分離的精液進行人工授精，可以獲得特定性別的家畜。本方法提供家畜生產者飼養管理上的彈性，是比較有效率的選性繁殖方法。XY 精子分離的方法包含：

1. 白蛋白管柱分離法

X 與 Y 精子對不同濃度的白蛋白有不同的穿透能力，因此可以藉由不同濃度的白蛋白管柱對 X 與 Y 精子進行分離。Ericsson et al. (1973) 指出若精子先通過 7.5% 血清白蛋白後，再通過 17.5% 血清白蛋白，可以得到較多的 X 精子；若要分離較多的 Y 精子，則是先通過 10% 血清白蛋白，再通過 12.5% 與 20% 血清白蛋白（圖 34）。此方法分離後的精子可以直接進行人工授精，且分離的精子有 70% 的正確率，但 Brandriff et al. (1986) 指出，利用白蛋白管柱分離法分離精子，僅能分選出 43-48% 的 Y 精子。

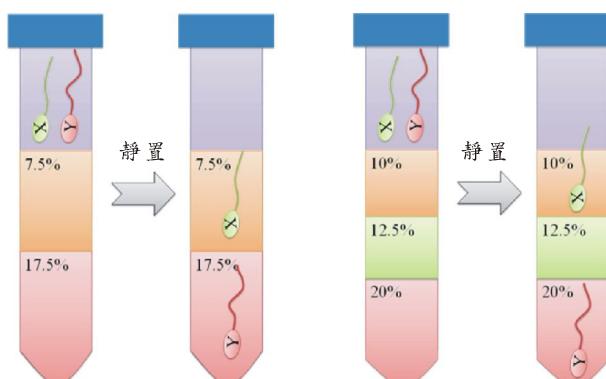


圖34. 白蛋白管柱分離法示意圖

2. 密度梯度離心法

此方法利用 XY 精子的質量與泳動速率不同的特性，搭配連續或非連續密度梯度的 Percoll 溶液，進行離心後將 XY 精子分離，X 精子由於質量較重且泳動速率慢，因此離心後下層精液（高密度）可以獲得較高比例的 X 精子；相反地，Y 精子質量較輕且泳動速率快，因而可以於上層（低密度）獲得較高比例的 Y 精子（圖 35）。雖然 Iizuka et al. (1987) 曾利用 Percoll 密度梯度離心法，分選出 94% 的 X 精子，但礙於 Percoll 含有內毒素，對於精子具有毒性，可能影響受精卵與胚的發育，因此不能廣泛應用。

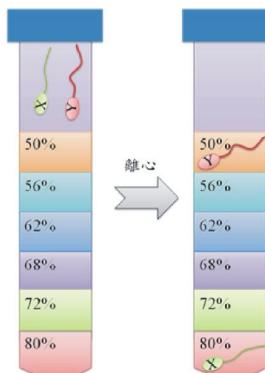


圖35. 密度梯度離心法示意圖

3. 免疫分離法

科學家們認為 Y 精子表面上應該存在與 X 精子不同的抗原，稱為 H-Y 抗原，若能得到 H-Y 抗原的特異性抗體，即可以透過親合性管柱層析或逆向層析法將 XY 精子分離（圖 36）。但

Hendriksen et al. (1993) 試圖利用七種不同的 H-Y 抗原的抗體進行分離，試驗結果顯示，七種 H-Y 抗體僅能辨認精子總數的 20-50%，對 Y 精子的專一性不高，因此科學家認為 H-Y 抗體並非只辨認 H-Y 抗原，也有可能辨認 X 精子。

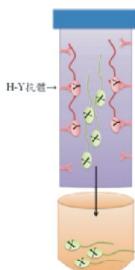


圖36. 免疫分離法示意圖

4. 上游法

此方法先將精液進行離心，將精子置於底層，利用 Y 精子泳動速率優於 X 精子的特性，Y 精子會優先到達上層溶液中，因此透過靜置一段時間後，收集上層液體可以得到較高比率的 Y 精子（圖 37）。然而 Rheingantz et al. (2006) 指出，以上層精液進行體外受精，僅能得到接近 60 % 的雄胚，效果並不顯著。

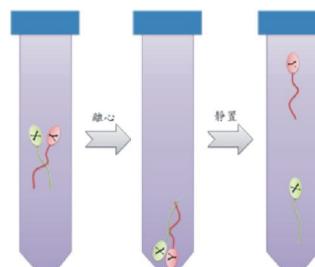


圖37. 上游法示意圖

5. 流式細胞儀 XY 精子分選法

X 與 Y 精子於 DNA 含量上存在著差異，因此利用核酸染劑 H33342 對精子進行染色後，進行流式細胞儀分析精子的 DNA 含量，可以將 X 與 Y 精子區分為兩族群，最後藉由流式細胞儀賦予 X 與 Y 精子不同的帶電荷後，利用正負極板使精液落於不同收集管中，可有效將 XY 精子分離（圖 38），為目前分選效率最高的 XY 精子分選方法（90% 以上），且流式細胞儀 XY 精子分選為目前唯一成功應用於乳牛產業的 XY 精子分選技術，但流式細胞儀分選精子的速度慢，無法在短時間內分選足夠一次豬人工授精的精子數，因此尚無法應用於養豬產業。

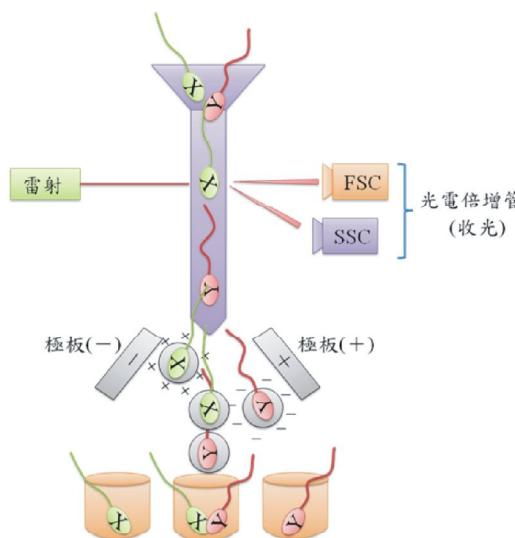


圖38. 流式細胞儀 XY 精子分選法示意圖

二、選性繁殖的專利趨勢

為了解目前選性繁殖的發展現況，我們曾經使用專利地圖進行分析，經查詢美國核准專利資料庫（USPTO issued）、美國申請專利資料庫（USPTO appl.）、世界專利資料庫（WIPO PCT）、台灣專利資料庫（TIPO）、日本專利資料庫（JPO-PAJ）、大陸專利資料庫（SIPO）等六個專利資料庫，總共查得 180 篇專利文獻，構築「選性繁殖的專利地圖分析」。

（一）選性繁殖的技術分布圖

自 1969 至 2010 年，各種選性繁殖技術的總專利數依序為 XY 精子分選（80%）、調整受精條件（16%）與胚性別篩選（4%），結果顯示 XY 精子分選為目前選性繁殖技術的主要開發方向（圖 39）。

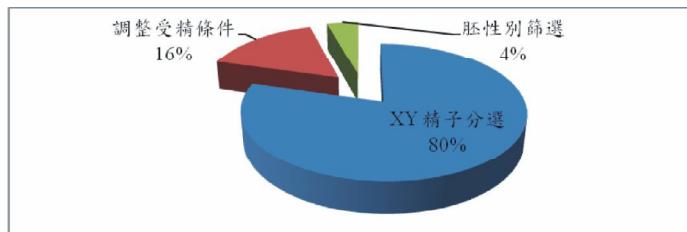


圖39. 1969 至 2010 年選性繁殖的技術分布圖

（二）2005 至 2010 年 XY 精子分選的技術比例圖

分析 2005 至 2010 年期間 XY 精子分選的發展現況，發現流式細胞儀為專利數最多的技術（53.57%）、其次為免疫分離法（

19.64%) 與上游法 (16.07%)，顯示近六年之間，以流式細胞儀、免疫分離法與上游法三者為 XY 精子分選技術的主要開發方向 (圖 40)。

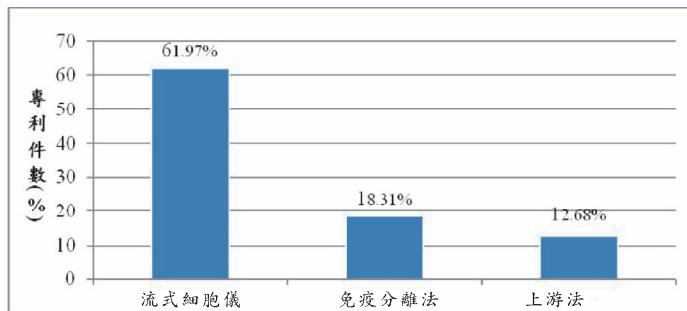


圖40. 2005至2010年XY精子分選的技術比例圖

(三) 2005 至 2010 年 XY 精子分選的趨勢圖

分析 2005 至 2010 年期間三種主要 XY 精子分選技術的發展趨勢，發現這六年流式細胞儀為選性繁殖的主流技術，但免疫分離法的專利件數在 2010 年快速增加，而上游法則於 2009 年後有下降的趨勢 (圖 41)。

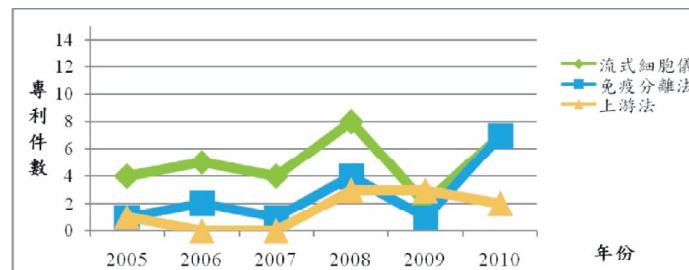


圖41. 2005至2010年XY精子分選的趨勢圖

三、豬選性繁殖的發展現況

(一) 流式細胞儀在養豬產業應用的侷限性

對母豬進行人工授精每次需要 30-50 億隻的精子，且需要進行兩次授精才能得到良好的懷孕率，但目前流式細胞儀分選速率最快者為每小時 1.5 億隻的精子，而且僅能得到每小時 3 千萬的性別分選精子 (Sharpe and Evans, 2009)，因此需要 100 小時才能得到足量的精子進行一次人工授精，但經過長時間的收集，多數精子均已失去活性，尤有甚者，經由流式細胞儀分選後的精子，由於精漿被稀釋或去除，精子處於過度活化的狀態，因此精子無法進行液態保存，必須盡快受精；若冷凍保存又會降低母豬的懷孕率、分娩率與產仔數。再者，具有分選精子功能的流式細胞儀需要台幣 2 千萬以上，如此昂貴的儀器設備，應用於養豬產業上是否有助於提升經濟效益，必須審慎評估。

(二) 生殖技術與人工授精技術的改良與應用

目前仍然只有流式細胞儀對 XY 精子有最好的分選效率，且正確率能達到 90% 以上，但由於分選速率較慢，難以得到足量的精子進行人工授精，因此為了克服分選速率的問題，除了改善儀器加速分選效率外，發展人工授精與生殖技術，降低授精的總精子數亦是可行的方向。流式細胞儀分選精子後，最有可能搭配的生殖科技為子宮內授精 (intrauterine insemination) (圖 42) 與體外受精 (in vitro fertilization) 後胚移植 (embryo transfer) (圖 43)，這兩種方法曾被嘗試應用於選性精子的授精。Martinez et al. (2001) 對母豬進行子宮內授精，僅需 5 千萬隻精子即可以

獲得良好懷孕率 (92.3%) 及產仔數 (10.02 ± 0.25)。另外 Bathgate et al. (2007) 利用體外受精後胚移植的方式，只需 2 百萬隻精子即可完成體外受精，胚移植後母豬的懷孕率可達 71.4%。此等試驗結果證實，流式細胞儀分選公豬精子，搭配子宮內授精或體外受精後胚移植可能可以應用於養豬產業，但仍然需考慮流式細胞儀價格昂貴，並克服豬胚移植技術的困難。考慮整體的經濟效益，流式細胞儀技術應用於豬選性繁殖的商業化仍然不成熟，還需要更進步的生殖技術支援。

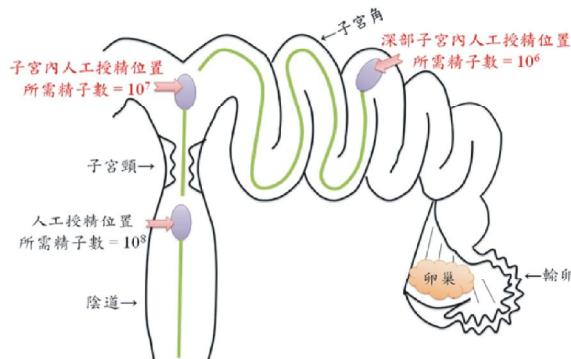


圖42. 深部子宮內人工授精示意圖

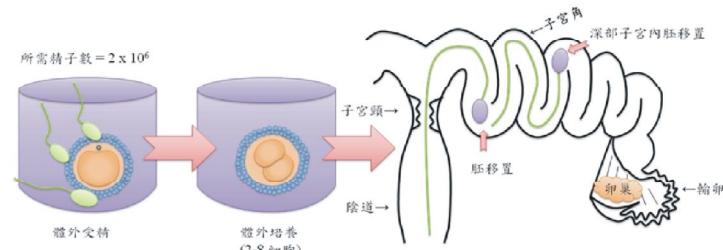


圖43. 體外受精與胚移植示意圖

(三) X 與 Y 精子表面特異性抗原的應用

家畜選性繁殖發展至今，X 與 Y 精子表面是否有特異性的抗原，仍然無確切的答案，但仍然有科學家相信 X 與 Y 精子表面可能有特異性抗原存在，因此他們認為利用 XY 精子表面特異性抗原進行免疫分離法是具有可行性的。

早期曾發現 H-Y 抗原可以應用於分離 X 與 Y 精子，但 Hendriksen et al. (1993) 指出 H-Y 抗原也存在於 X 精子表面，因而使免疫分離法停滯不前。近年來隨著流式細胞儀的發展與 XY 精子分選效率不斷改進，提供足量的 X 與 Y 精子進行表面特異性表面抗原分析，有些研究也找到 X 或 Y 精子表面的特殊標記，並藉由單株抗體 (Monoclonal antibodies) 的生產製備，搭配親合性管柱 (Affinity chromatography) 或逆向層析 (Reversed-phase chromatography) 將 X 與 Y 精子分離 (世界專利 3 件，美國申請專利 4 件，美國核准專利 10 件)，或是於抗體上攜帶藥物殺死 X 或 Y 精子 (美國申請專利 6 件)，來達到選性繁殖的目的。然而 Sang et al. (2010) 用一系列免疫方法與敏感度較高的銀染法 (silver staining) 尋找 XY 精子表面特異性抗原，得到 30 kDa 的特異性蛋白，但此特異性蛋白的抗體僅能辨認未分選精子 (29.2%)、X 分選精子 (19.7%) 與 Y 分選精子 (3.9%)，顯然目前免疫分離法分選效率仍有待改進，但仍為具有發展潛力的選性繁殖方法。未來的研究應著重於提升特異性抗體辨認精子的百分比，提升免疫分離法的分選效率，以及評估免疫分離法搭配親合性管柱或逆向層析對精子的活動力、形態、頭巾等精液品質性狀是否有影響，以確保人工授精後有良好的懷孕率與產仔數。

四、實驗室發展的技術

台灣生產肉豬主要是 LYD 三品種雜交而來，主要是取 LY 母豬多產的特性，因此種豬場希望繁殖 LY 時，能獲得較高比率的雌性後代，用來生產 LYD 肉豬。肉豬生產者也希望生產的肉豬皆為雌性，除了免除小豬的去勢手術外，也可獲得較高的售價。目前肉豬的生產系統幾乎已採用人工授精進行配種，偶而發現某一公豬可以生產較多的雌性後代，或稀釋精液在某種稀釋與保存狀態也會影響配種後的性比率，但均未能經由科學性驗證找出有效的選性繁殖技術。雖然藉由流式細胞儀 (flow cytometry) 的分選可獲得高純度的 X 或 Y 精子，然而分選後精子的存活能力差，受精率顯著降低，且分選速率最快僅達到每小時 1.5 億隻精子，可勉強用於乳牛之人工授精，但無法應用於母豬的配種，因為母豬每次人工授精所需的精子數目需達 30~50 億隻精子。因此仍需尋找其他方法對豬進行選性繁殖，此等方法除了需要分離足夠進行人工授精的精子數目外，尚且不能損及精子的活力與形態，更不影響分選精子的生育能力。

本研究室近兩年在農委會經費補助下，已成功建立檢測公豬精液中 X、Y 精子比例的技術，可以評估精子分選方法的有效性與準確性，另外為了能準確評估人工授精後，產生後代仔豬的性比率，也建立了早期豬胚性別鑑定技術，茲分述如下：

(一) XY 精子鑑定技術

1. 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR)

(1) 聚合酶鏈鎖反應與 DNA 裂解曲線

本方法參考郭妍希 (2009) 碩士論文。使用 iQTM SYBR Green Supermix 套組 (Bio-Rad, U.S.A) 進行 Real-time PCR，配方如下：

公豬組織或精子的基因組 DNA	6 ul
iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad)	12.5 ul
正向引子 (forward primer)	1 ul
反向引子 (Reverse primer)	1 ul
補二次蒸餾水至總體積	25 ul

將上述混合溶液置入即時定量聚合酶鏈鎖反應器 (QIAGEN Rotor Gene-Q)，並設定反應條件為 95°C 5 分鐘、40 複製循環 (95°C 10 秒 → 55°C 45 秒)，反應完成後隨即進行 DNA 裂解曲線 (Melting Curve) 分析，確認是否為單一高峰，以確保產物為單一片段 (圖 44 與 45)。

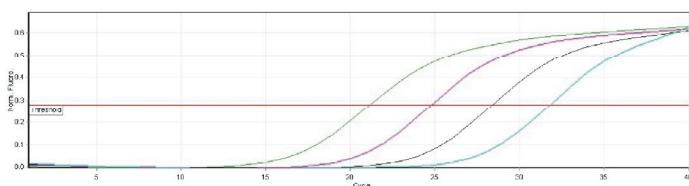


圖44. 即時定量聚合酶鏈鎖反應的增幅曲線

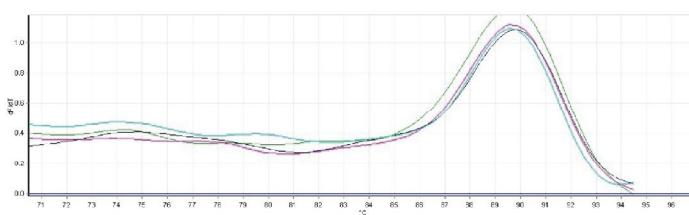


圖45. 即時定量聚合酶鏈鎖反應裂解曲線

(2)建立標準曲線與 X 精子比率計算

首先分別取 60 ng、6 ng、600 pg 與 60 pg 的公豬基因組 DNA

建立標準曲線(圖 46)，分別代表 10000、1000、100 與 10 基因組套數，接著將公豬組織基因組 DNA (internal control) 與 精子基因組 DNA 進行即時定量聚合酶鏈鎖反應，最後將 Ct 值 帶入公式，可得知精液中帶有的 SMCX 與 SMCY 基因組套數， 並藉由 Parati and Aleandri (2006) 的計算公式 ($X\text{ ratio} = n / (1+n)$, $n = X/Y$)，推算精液中 X 精子的比率，最後再以公豬組織 基因組 DNA 的結果進行校正，以修正因不同批次即時定量聚合 酶鏈鎖反應產生的偏差。

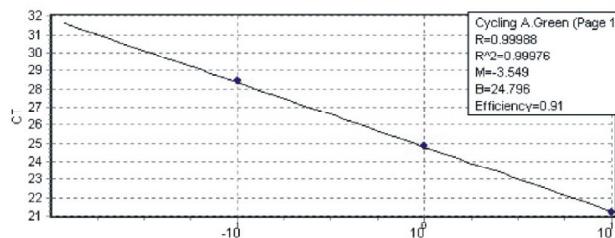


圖46. 基因組 DNA 系列稀釋的標準線性圖

2. 融光原位雜交

(1)DNA 融光探針製備

利用 nick translation 方法製備帶有 FITC 綠色螢光的 1 號染色 體與帶有 Spectrum Orange 的 Y 號染色體螢光標定探針。

(2)精子固定與玻片製作

將 1 ml 稀釋精液 (3×10^7 精子/ml) 置入離心管內，以 1500 rpm 離心 10 分鐘，小心地去除上層液，加入等體積的 PBS 進行 三次洗滌，並使沉積團塊 (pellet) 均勻懸浮，最後以 1500 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，加入 1 ml 的酒精-冰醋酸固定液 (酒精：冰醋酸 = 3:1)，均勻混合後，取出一部分精子懸浮液均勻

灑佈於玻片上，自然風乾。風乾後的玻片被置於 2X SSC buffer 5 分鐘，去除固定液，隨即置於 37°C 1M Tris-HCl buffer (含 DTT) 中 10-15 分鐘，使精子頭部膨脹，之後分別被置於 2X SSC buffer 與 PBS 中各 5 分鐘，再浸置於 70%，96% 與 100% 酒精中各 1 分鐘進行脫水，靜置自然風乾。風乾玻片先置於 PBS 浸泡 5 分鐘及 1% Paraformadehyde 浸泡 5 分鐘後置於 PBS 浸泡 5 分鐘，再分別浸置於 70%，85% 與 100% 酒精中各 1 分鐘，置於室溫下自然風乾。風乾後玻片轉置入 76°C 的 Denature buffer 中 5 分鐘，取出後分別浸置於 70%，96% 與 100% 冰酒精中各 1 分鐘，取出風乾保存。

(3) 螢光原位雜交與顯微鏡觀察

螢光標定核酸探針與固定上精子的玻片於雜交反應前皆以 75°C 進行 DNA 的裂解，之後取 3 ul 含有雙色螢光標定核酸探針 (1 ng/ul) 滴於載玻片，隨即覆上蓋玻片，置於 37°C 下進行雜交反應。經隔夜作用後，完成雜交的玻片置於 76°C 的 wash buffer I 中 5 分鐘，沖洗未鍵結的 DNA 探針，再轉置於 wash buffer II 中 30 秒後，在室溫下風乾。之後，取 10 ul DAPI 與 3 ul Antifode 滴於載玻片，並覆上蓋玻片。置於螢光位相差顯微鏡 (BX 50, Olympus, Japan)，分別以 WU、WB 及 WG 濾鏡組於 1000 倍下觀察螢光訊號，螢光訊號呈現一個綠點者為 X 精子，呈現一個綠點與一個紅點者為 Y 精子 (圖 47)。

(4) X 與 Y 精子比率計數

利用螢光位相差顯微鏡 (BX 50, Olympus, Japan)，分別以 1000 倍的 WU、WB 及 WG 濾鏡組於多個不同視野下進行拍攝，隨後進行 200 隻精子計數，評估精液中 X 與 Y 精子比率。

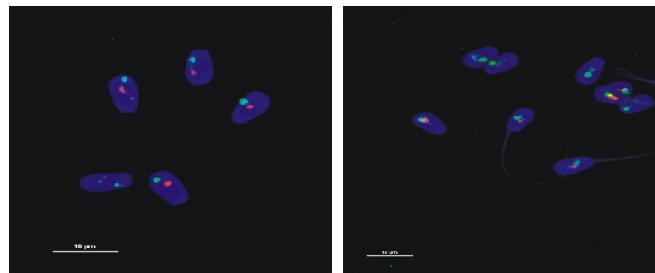


圖 47. 精子的螢光原位雜交。僅具有單一綠色訊號者為X精子，具有綠色與紅色訊號者為Y精子。

(二) 早期胚性別鑑定技術

1. 體外生產豬胚

自宜蘭縣肉品市場取得屠宰後的雌豬卵巢，立即放入於含 penicillin G 及 streptomycin 的生理食鹽水中，保持在 39°C 下帶回實驗室，隨後於 39°C 磷酸緩衝液中 (Dulbecco's phosphate buffer saline, D-PBS) 刺破濾泡，取得卵丘-卵母細胞複合體 (Cumulus-oocyte complex, COCs)，並將其置入 NCSU-23 培養液中，以 37°C、5% CO₂ 培養 44-48 小時，使卵母細胞成熟。成熟後的卵母細胞與精子共培養 6-8 小時進行體外受精，再置入體外胚培養液 (NCSU-23 + 0.4 % BSA) 進行體外培養 72-96 小時，取得體外生產豬胚 (圖 48)。

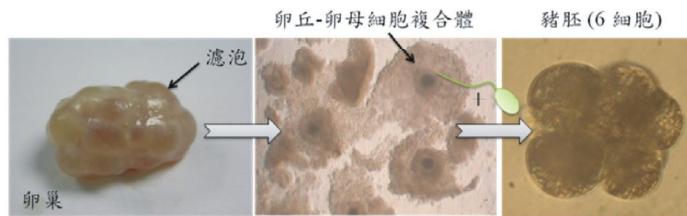


圖 48. 體外生產豬胚流程示意圖。左圖為豬的卵巢；中圖為卵丘卵母細胞複合；右圖為體外生產的豬胚(6細胞)。

2. 豬胚染色與收集

在解剖顯微鏡下吸取發育成 2-8 細胞的豬胚，以 Hecht 33342 染色 10 分鐘，隨後置入含 0.5% Pronase 的 PBS 使透明帶 (Zona pellucida) 軟化，再以倒立顯微鏡 (IX 71, Olympus, Japan) 觀察豬胚的胚葉細胞數及細胞核數 (圖 49)，最後以巴氏吸管吸取豬胚，置入含 8 ul 無菌水的 PCR 反應管中，保存於 -20°C 冰箱。

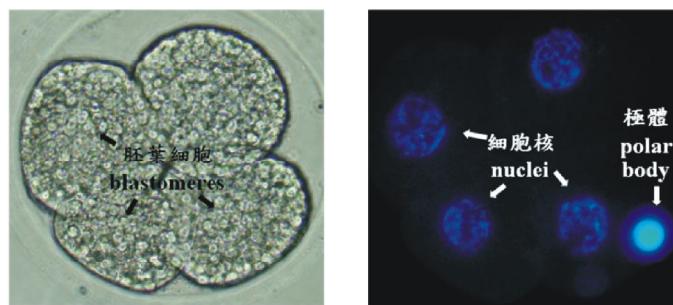


圖 49. 以倒立顯微鏡觀察豬胚的胚葉細胞數(左圖)及細胞核數(右圖)

3. 巢式聚合酶鏈鎖反應

本方法參照楊雅琳 (2009) 碩士論文進行胚性別檢測。將先前含有豬胚的 PCR 反應管中，加入第一組正向引子 (forward primer-1) 及第一組反向引子 (reverse primer-1)、反應緩衝液 (reaction buffer)、dNTP 與耐熱聚合酵素 (Super-Therm DNA polymerase, NO. JMR-801/420)，並以無菌水調整成 50 ul，隨後將反應管置於聚合酶鏈鎖反應器上，反應條件為 94°C 5 分鐘、35 個循環 (94°C 30 秒 → 57°C 30 秒 → 72°C 30 秒)。PCR 結束後，

取 2 ul 的 PCR 產物加入第二組正向引子 (forward primer-2) 及第一組反向引子 (reverse primer-2)、反應緩衝液、dNTP 與耐熱聚合酵素，再以相同的 PCR 反應條件進行 DNA 擴增，隨後取 5 ul 的 PCR 產物，進行電泳分析，觀察電泳膠片上 411 bp 與 231bp 位置，有兩條亮帶者為 XY，相反地，僅有一條亮帶者為 XX (圖 50)。

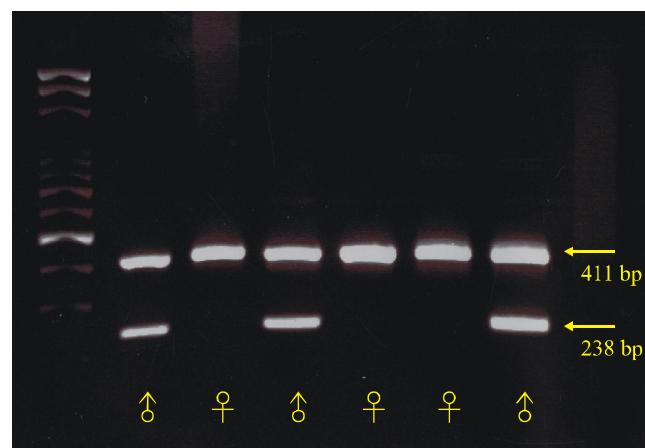


圖 50. 以巢式聚合酶鏈鎖反應檢測體外生產豬胚的性別。僅具有單一亮帶者 (411 bp) 為雌胚；具有兩亮帶者 (411 bp 與 238 bp) 為雄胚。

五、繼續開發 XY 精子分離的新方法

X 與 Y 精子的間存在許多差異，例如 X 精子存活時間較長、體型較大、泳動速率與獲能速率較慢，Y 精子存活時間較短、體型較小、泳動速率與獲能速率較快（圖 51），因此目前有許多應用 X 與 Y 精子差異性開發的 XY 精子分離方法，如白蛋白管柱分離法（Brandriff et al., 1986；Ueda and Yanagimachi, 1987）、密度梯度離心法與上游法（Rheingantz et al., 2006），但上述 XY 精子分選方法皆無良好的結果，唯有利用 DNA 含量差異進行分選的流式細胞儀有較好的分選效率（90%以上）。雖然流式細胞儀有較好的分選效率，但其分選速率較慢與價格昂貴，而使流式細胞儀無法普遍應用於養豬產業，因此應用 X 與 Y 精子的差異性，開發符合經濟效益的 XY 精子分選方法，來替代流式細胞儀分選 XY 精子為目前研究主要目標。

X v.s Y 精子

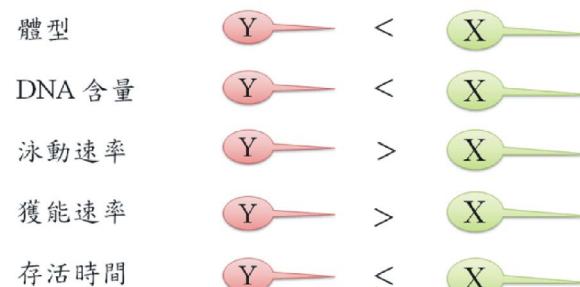


圖 51. X 與 Y 精子物理特性差異比較圖

未來本實驗室將應用上述技術，繼續發展對豬更有效的選性繁殖技術，包括對公豬精液酸鹼的處理、離心、靜置、保存、稀釋條件等改變，期望可以建立理想的豬生產系統。

肆、誌謝

感謝行政院農委會”開發畜禽生長與繁殖性能改進整合性科技與管理技術”計畫（99 AS-5.3.1-ST-aJ；100 AS-5.3.1-ST-a7；101 AS-6.1.2-ST-a1）經費補助。

伍、參考文獻

- 楊雅琳。2009。體外生產豬胚之性別鑑定。國立宜蘭大學生物技術研究所碩士論文。
- 郭妍希。2009。建立即時定量PCR與螢光原位雜交法評估不同pH稀釋保存液對X、Y精子比率之影響。國立宜蘭大學生物技術研究所碩士論文。
- 郭有海。2003。公豬精液品質控管技術。財團法人台灣動物科技研究所。
- 郭有海、劉世華。2004。豬隻人工授精站標準作業書手冊。財團法人台灣動物科技研究所。
- 陳銘正，2003。豬隻人工授精站作業標準。國立宜蘭大學農業推廣季刊。
- 陳銘正，2010。台灣地區豬人工授精站概況。國立宜蘭大學農業推廣季刊。
- Bathgate, R., K. M. Morton, B. M. Eriksson, D. Rath, B. Seig, W. M. C. Maxwell, and G. Evansa. 2007. Non-surgical deep intra-uterine transfer of in vitro produced porcine embryos Derived from sex-sorted frozen - thawed boar sperm. Anim. Reprod. Sci. 99: 82 – 92.
- Brandriff, B. F., L. A. Gordon, S. Haendel, S. Singer, D. H. Moore, and B. L. Gledhill. 1986. Sex chromosome ratios determined by karyotypic analysis in albumin-isolated human sperm. Fertil. Steril. 46: 678-685.

- Didion, B. A., K. M. Kasperson, R. L. Wixon, and D. P. Evenson. 2009. Boar fertility and sperm chromatin structure status: a retrospective report. *J. Androl.* 30: 655-660.
- Ericsson, R., C. Langevin, and M. Nishino. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 246: 421-424.
- Foxcroft, G. R., M. K. Dyck, A. Ruiz-Sanchez, S. Novak, and W. T. Dixon. 2008. Identifying useable semen. *Theriogenology* 70: 1324-1336.
- Fu, Q., M. Zhang, W. S. Qin, Y. Q. Lu, H. Y. Zheng, B. Meng, S. S. Lu, and K. H. Lu. 2007. Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR. *Theriogenology* 68: 1211-1218.
- Gadea, J. 2003. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span. J. Agric. Res.* 1: 17-27.
- Garner, D. L., C. A. Thomas, H. W. Joerg, J. M. DeJarnette, and C. E. Marshall. 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57: 1401-1406.
- Gillan, L., G. Evans, and W. M. Maxwell. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63: 445-457.
- Hendriksen, P., M. Tieman, T. Van Der Lende, and L. Johnson 1993. Binding of anti-HY monoclonal antibodies to separated X and Y chromosome bearing porcine and bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 189-196.

- Huo, L. J., X. H. Ma, and Z. M. Yang. 2002. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome Intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 58: 1349-1360.
- Iizuka, R., S. Kaneko, R. Aoki, and T. Kobayashi. 1987. Sexing of human sperm by discontinuous Percoll density gradient and its clinical application. *Hum. Reprod.* 2: 573-575.
- Iwata, H., H. Shiono, Y. Kon, K. Matsubara, K. Kimura, T. Kuwayama, and Y. Monji. 2008. Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 105: 234-244.
- Jaroslaw, S., W. Maria, and S. Marek. 2003. Chromosome abnormalities in secondary pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 60: 571 - 581.
- Johnson, L. A., K. F. Weitze, P. Fiser, and W. M. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172.
- Kasai, T., K. Ogawa, K. Mizuno, S. Nagai, Y. Uchida, S. Ohta, M. Fujie, K. Suzuki, S. Hirata, and K. Hoshi. 2002. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J. Androl.* 4: 97-103
- Lopez Rodriguez, A., T. Rijsselaere, P. Vyt, A. Van Soom, and D. Maes. 2011. Effect of Dilution Temperature on Boar Semen Quality. *Reprod. Domest. Anim.* Doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01938.x.

- Martinez, E. A., J. M. Vazquez, J. Roca, X. Lucas, M. A. Gill, I. Parrilla, J. L. Vazquez, and B. N. Day. 2001. Successful non-Surgical deep intrauterine insemination with small numbers of Spermatozoa in sows. *Reproduction* 122: 289 – 296.
- Martinez, F., M. Kaabi, F. Martinez-Pastor, M. Alvarez, E. Anel, J. Boixo, P. de Paz, and L. Anel. 2004. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility In cattle : a field study. *Theriogenology* 62: 1264-1270.
- Martinez-Pastor, F., M. Mata-Campuzano, M. Alvarez-Rodriguez, M. Alvarez, L. Anel, and P. de Paz. 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod. Domest. Anim.* 45 Suppl 2: 67-78.
- Mozo-Martin, R., L. Gil, C. F. Gomez-Rincon, Y. Dahmani, M. Garcia-Tomas, J. L. Ubeda, and J. Grandia. 2012. Use of a novel double uterine deposition artificial insemination technique using low concentrations of sperm in pigs. *Vet. J.* 193: 251-256.
- Rheingantz, M., L. Pegoraro, O. Dellagostin, A. Pimentel, M. Bernardi, and J. Deschamps. 2006. The sex ratio of in vitro produced bovine embryos is affected by the method of sperm preparation. *Anim. Reprod. Sci.* 3: 423-430.
- Roca, J., I. Parrilla, H. Rodriguez-Martinez, M. A. Gil, C. Cuello, J. M. Vazquez, and E. A. Martinez. 2011. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod. Domest. Anim.* 46 Suppl 2: 79-83.

- Roca, J., J. M. Vazquez, M. A. Gil, C. Cuello, I. Parrilla, and E. A. Martinez. 2006. Challenges in pig artificial insemination. *Reprod. Domest. Anim.* 41 Suppl 2: 43-53.
- Rozeboom, K. J., D. L. Reicks, and M. E. Wilson. 2004. The Reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *J. Anim. Sci.* 82: 2164-2168.
- Sang, L., W. C. Yang, L. Han, A. X. Liang, G. H. Hua, J. J. Xiong, L. J. Huo, and Yang, L. G. 2011. An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm. *J. Dairy Sci.* 94: 2060 – 2070.
- Sattar, A., M. Rubessa, S. Di Francesco, V. Longobardi, R. Di Palo, L. Zicarelli, G. Campanile, and B. Gasparrini. 2011. The influence of gamete co-incubation length on the in vitro fertility and sex ratio of bovine bulls with different penetration speed. *Reprod. Domest. Anim.* 46: 1090-1097.
- Sharpe, J. C., And K. M. Evans. 2009. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 71: 4-10.
- Steverink, D. W. B., N. M. Soede, E. G. Bouwman, and B. Kemp. 1998. Semen backflow after insemination and its effect on fertilisation Results in sows. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 109-119.
- Ueda, K., and R. Yanagimachi. 1987. Sperm chromosome analysis as a new system to test human X- and Y-sperm separation. *Gamete Res.* 17: 221-228.

Waberski, D., H. Henning, and A. M. Petrunkina. 2011. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reprod. Domest. Anim.* 46 Suppl 2: 45-48.

Whyte, J. J., R. M. Roberts, and C. S. Rosenfeld. 2007. Fluorescent in situ hybridization for sex chromosome determination before and After fertilization in mice. *Theriogenology* 67: 1022 – 1031.

國家圖書館出版品預行編目(CIP)資料

豬的人工授精與選性繁殖 / 陳銘正, 陳奕竹, 張
謾作, -- 初版. -- 宜蘭市 : 宜蘭大學農推
會, 民101.10
面 ; 公分. -- (農業推廣手冊 ; 17)
ISBN 986-03-4034-1(平裝)

1. 養豬 2. 生殖技術 3. 生育力

437.343

101021161

農業推廣手冊17

書名：豬的人工授精與選性繁殖
發行人：邱奕志
總編輯：林世斌
作者：陳銘正 陳奕竹 張謾作
出版機關：國立宜蘭大學農業推廣委員會
地址：宜蘭市神農路1段1號
電話：03-9357400#7613
出版日期：101年10月（初版）

定價：新台幣150元整
展售處：
國家書店松江門市(台北市松江路209號1樓)
五南文化廣場網路書店(<http://www.wunanbooks.com.tw/wunanbooks/>)

ISBN：978-986-03-4034-1
GPN : 1010102251

版權所有 翻印必究