

# 應用豬卵體外受精技術評估公豬精液保存效果

陳銘正 陳逸仲 陳立峰 陳維泰 劉淑屏 方瓊郁 林佳靜

國立宜蘭技術學院畜產系

## 摘要

本試驗之目的，在應用豬卵母細胞之體外成熟與體外受精技術，比較公豬精液稀釋保存之效果，期能在短時間內鑑定稀釋精液之受精能力變化。本試驗係以手握法採取公豬新鮮精液，經添加 Modena 稀釋液後，保存於 15°C 恆溫冰箱中八日。試驗期間測定原精液及稀釋精液之 pH 值，並分別檢查其活力及頭巾完整性，最後進行體外受精，評估精子之受精率，俾與精液保存期間精液品質變化情形相互比較。

試驗結果顯示，稀釋精液在 0 至 8 日之保存期間，pH 值維持在 6.96 至 7.13 之間，而原精液在同一期間之 pH 值則由 7.32 降至 5.97。原精液與稀釋精液於保存二日後，稀釋精液內精子活動率顯著高於原精液者；稀釋精液被保存至第六日時，精子仍保有 60% 以上之活動率，原精液組則於第四日急遽降至 37.5%。原精液保存四日後，精子具不完整頭巾之百分率則由 2.55% 提高至 48%，第六日以後則高達 90% 以上；稀釋精液組則在保存四日內頭巾不完整百分率仍維持在 8.8% 水平內，惟第六日後才被提高至 22.5%。應用前述不同保存期間之稀釋精液，在體外完成獲能作用後進行體外受精試驗，結果證明公豬新鮮精液添加 Modena 稀釋液後保存 2 日者可維持 78.43% 之高受精率，惟當保存期延長至 4-5 日或 6-7 日時，則受精率分別降低至 44.3% 與 9.9%。

**關鍵詞：**公豬、精液保存、體外受精

# The Use of *In Vitro* Fertilization of Pig Oocytes to Assess Fertilizing Ability of Stored Boar Semen

Ming-Cheng Chen I-Chung Chen Li-Fong Chen Wei-Tay Chen

Su-Ping Liu Chiung-Yu Fang Chai-Ching Lin

Department of Animal Science

National Ilan Institute of Technology

## Abstract

The purpose of this study was to use *in vitro* fertilization (IVF) techniques for assessing the fertilizing ability of boar sperm that was stored for 8 days. Semen was collected by gloved-hand method, diluted with Modena extender and stored in a refrigerated incubator at 15 °C. Stored semen was evaluated for pH value, sperm motility, acrosome integrity and subsequently used for *in vitro* fertilization. Results showed that pH value of diluted semen was stable and maintained from 6.96 to 7.13 during storage, however that of undiluted semen was significantly decreased from 7.32 to 5.97. The semen preserved in extender obtained higher motility than undiluted semen after 2 days storage. The sperm motility of diluted semen was still over 60% at day 6, but that was decreased to 37.5% at day 4 in undiluted semen. The percentage of abnormal acrosome spermatozoa was still under 8.8% in diluted semen stored within 4 days, but that was increased to 22.5% at day 6. Meanwhile, the abnormal acrosome rate of spermatozoa was increased to 48% at day 4 and over 90% after 6 days storage in undiluted semen. Further results from IVF assay revealed that boar sperm that had been previously stored for 2 days in Modena extender fertilized 78.43% of porcine oocytes. However, the increase of storage time to 4-5 days and 6-7 days would result in a much decrease of fertilization rate to 44.3% and 9.9%, respectively.

**Key Words** : Boar 、 Semen preservation 、 *In vitro* fertilization

## 一、前言

以往種豬場或人工授精站均以精液 pH 值、精子活動百分率及頭巾完整性等精液性狀，做為評定公豬精液性能之指標。然而，能夠產生良好精液品質之公豬，經與母豬配種後，未必能獲得良好之受精率，故僅藉由檢查精液品質，不足以鑑定公豬之受精能力。應用田間試驗檢測公豬稀釋精液之保存期限，往往需使用較多數目之母豬進行人工授精，由母豬之懷孕率與分娩率亦可據以判斷公豬稀釋精液之保存期限。但試驗所需時間長(母豬平均懷孕期 114 日)，且試驗期間易受各種外在因素之影響，如氣候、疾病、飼養管理缺失等，致使試驗結果分歧。Yanagimachi[1]將倉鼠卵母細胞去除透明帶後，可於體外(*in vitro*)與天竺鼠之精子完成受精作用。之後，此種技術更被應用於檢查人類、牛及豬等動物精子的受精能力[2, 3, 4]。惟去除卵母細胞之透明帶，須以化學藥劑處理，此舉容易造成卵母細胞孤雌致活，且因種別特異性，使受精能力的評估有所誤差。

欲得到精子正確之受精能力，唯有進行外科手術，將精子直接注入發情適期之母豬生殖道內，並檢查其受精率[5]，但此法太過繁複，於應用上殊為不便，是以迄今並無一套簡便的方法，用以測驗公豬精子的受精能力。自鄭[6]於英國劍橋開創世界首例的試管豬後，應用豬卵母細胞體外成熟及體外受精技術，可於實驗室中提供一致的環境，使豬卵母細胞之受精結果有其一致性。此等檢驗技術自豬卵母細胞體外培養開始，至固定檢查精子之受精率為止，可於一週內完成。本試驗之目的，即在應用豬卵母細胞體外成熟及體外受精技術，比較公豬精液稀釋保存之效果，俾在短期內鑑定稀釋精液保存期間精子受精能力之變化。

## 二、材料與方法

### 一、精液之來源

本試驗使用之公豬，為來自國立宜蘭技術學院畜產系牧場，業經應用體外受精技術證明具有生育能力者，包括純種杜洛克及包含藍瑞斯、約克夏與杜洛克三品種之雜交公豬各 1 隻，其年齡約在 2 至 3 歲之間。每次採精均以手握法採其全部精液於燒杯中。

### 二、卵巢之來源

供測試精子受精能力之卵母細胞，係取自於屠宰場之雌性肉豬卵巢。自宜蘭縣家畜肉品拍賣市場屠宰場取得之卵巢，置於 37°C 之磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer solution, PBS)[6]中，三十分鐘內攜回實驗室。

### 三、精液稀釋保存及精液性狀測定

將剛採集之新鮮精液，利用血球計數法計算精子濃度，靜置三十分鐘後，取部分精液用 Modena 稀釋液 (SGI, USA) 調整精子濃度至  $2 \times 10^8$  精子/ml，置於 100 ml 之人工授精瓶內，為稀釋精液組；另取 100 ml 未稀釋之原精液置於人

工授精瓶中，為原精液組。將兩組精液置於 15°C 恆溫箱中保存，依 0、2、4、6 及 8 日之間距，分別取各組精液做下列精液性狀之測定：

#### (一)、精液 pH 值之測定

以 pH meter(F-23, HORIBA, Japan)測定之。

#### (二)、精子活力之判斷

取適量精液滴於載玻片上，以蓋玻片覆蓋，用加溫板加熱至 37°C，觀察並估計具有活動能力之精子百分比。

#### (三)、精子頭巾完整性之判定

取 100  $\mu$  l 精液，加入等量含 2% 戊二醛之固定液[7]予以固定，混合後取一小滴製成玻片，置於位相差顯微鏡下，以 400x 倍率觀察頭巾完整與否。每個樣品各計算 333 隻精子，記錄其頭巾為完整與不完整者之百分率。精子在頭巾尖端具有一粗黑線條者，表示該精子具有完整之頭巾。

#### 四、卵母細胞之體外成熟

自屠宰場取得之肉豬卵巢，置於 PBS 培養液中洗滌，挑選直徑 2~3 mm 濾泡，將其刺破，使卵母細胞流出，在解剖顯微鏡下，找出優良等級之卵丘-卵母細胞複合體，以顯微吸管吸起，置於另一新鮮 PBS 液中備用。豬卵母細胞體外成熟之方法，依陳等[8]所述為之，將前述卵丘卵母細胞複合體置於 2 ml 含 FSH 2.5  $\mu$  g/ml、LH 5 i u/ml、LTH 20 ng/ml、雌素二醇 0.5  $\mu$  g/ml 與 20% 源自發情穩定當天之母豬血清之 M199 成熟培養液(GIBCO BRL, USA)，並覆蓋一層礦物油後，置於 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中，以 39°C 條件下培養 44~48 小時，俾完成卵母細胞之體外成熟培養。

#### 五、卵母細胞之體外受精

##### 1、精子體外獲能

將保存之公豬稀釋精液與含 0.1% 牛血清白蛋白之 BSA 生理鹽水(0.9% NaCl)，以 1:1 的比例混合後，於 20°C、600rpm 轉速離心三分鐘(HERMLE, Germany)，取其一半量含精子之上層液，加等量之 BSA 生理鹽水，混合後以 2200 rpm 離心三分鐘，去除上清液，再加入 10 ml 之 BSA 生理鹽水，重複上述步驟一次，俾進一步洗去精漿中精子之去獲能因子。當最後一次離心結束，去掉上層液後，加入 pH7.8 之獲能培養液[6]，將精子重新懸浮後，置於 37°C 恆溫箱中，以 95% 之相對濕度與含 5%CO<sub>2</sub> 及 95% 空氣之條件下培養四小時，以完成獲能作用。

##### 2、體外受精

從已經完成成熟培養之卵母細胞中，選取發育良好者，在 PBS 液中，以玻璃吸管吸上吸下，將卵外圍之卵丘細胞洗掉。將收集之卵母細胞，依照陳等[8]所述之方法，置於 1900  $\mu$  l pH7.4 之受精培養液中，然後加上 100  $\mu$  l 濃度為  $2 \times 10^7$  精子/ml 業經完成獲能作用的精子，使得最終受精濃度為  $10^6$  精子/ml，於 39°C、5%CO<sub>2</sub> 培養箱中受精 6~8 小時。

#### 六、體外受精結果判斷

受精培養後，將卵取出，應用 Cheng[9]所述之法，將卵固定於載玻片上，以酒精-冰醋酸(純酒精：冰醋酸=3：1)浸泡四十八小時加予固定。再以 1% Lacmoid 染色劑(溶於 45%之冰醋酸)染色，並置於位相差顯微鏡下檢查其受精情形。卵母細胞僅當其卵黃膜內可被發現具有鑽入且已經膨脹之精子頭部，與殘留之精子尾部者，始被判定已被成功受精(圖 1)；若同一卵母細胞內，同時含有兩隻或兩隻以上之鑽入精子者，則判定為多精入卵。

#### 七、統計分析

本試驗中，針對精子活力、頭巾完整性與精液 pH 值進行差異比較時，均係採用駢對 t 測驗(paired t test)；又針對所獲得之受精率、多精入卵率等數據，均分別應用卡方測定(chi-square test)予以進行統計分析[10]。

圖 1. 豬之成熟卵母細胞(A)與受精卵(B)經染色後之顯微照相圖。

Fig.1. The micrographs of pig matured egg (A) and fertilized egg (B) stained with aceto-lacmoid.

### 三、結果與討論

本試驗之目的在於測定保存第 0、2、4、6、8 日原精液和稀釋精液中精子性狀之變化，包括精子頭巾完整性、活動率以及 pH 值，並以第 0、2、4-5、6-7 日稀釋精液之精子與成熟卵母細胞進行體外受精(*in vitro* fertilization)，進而判定精子的受精能力。精液保存日數對精子頭巾完整性之影響如圖 2 所示。原精液被保存 8 日結果顯示具有完整頭巾之精子百分率在第 0 日與第 2 日分別為 97.4%與 91.2%，差異不顯著；唯第 4 日以後，精子具完整頭巾之百分率則顯著下降至 52.1%( $P < 0.05$ )。而保存於 Modena 稀釋液之精子具完整頭巾之百

分率，第 2 日至第 4 日與第 0 日之差異並不顯著，分別為 92.3%、91.3%與 96.6%；到第 6 日時，具完整頭巾之百分率則顯著下降至 43.7%( $P < 0.05$ )。

液保存日數對精子活力之影響如圖 3 所示。隨著保存日數增加，原精液之精子活動率有顯著下降，第 2 日精子活動率為 55.0%，顯著低於第 0 日之 97.5%( $P < 0.05$ )；保存到第 6 日，精子活動率僅剩 10.0%；第 8 日時已完全無具有活動力之精子，精子凝集現象嚴重。添加 Modena 稀釋液保存之試驗中，發現精子活動率雖逐漸下降，但下降速率不如原精液劇烈，第 0、2、4、6、8 日之活動率分別為 92.5%、80.0%、70.0%、60.0%及 36.7%；雖然第 6 日精子活動率顯著低於第 0 日者，唯精子仍維持有 60.0%之活動率，保存至第 8 日精子活動率則顯著地降至 36.7%，已不適合施行人工授精。

圖 2. 公豬精液保存期間精子頭巾完整性之變化。\*: 差異顯著( $P < 0.05$ )。

Fig. 2. The changes of acrosomal intactness in boar sperm during 8 days preservation.

\*: Significant difference ( $P < 0.05$ ).

圖 3. 公豬精液保存期間精子活動率之變化。\*: 差異顯著( $P < 0.05$ )。

Fig. 3. The changes of motility in boar sperm during 8 days preservation.

\*: Significant difference ( $P < 0.05$ ).

精液保存期間 pH 值之變化如圖 4 所示。隨著保存日數之增加，精液 pH 呈現顯著下降，第 2 日之 pH 為 6.92，已顯著低於第 0 日之 7.32( $P < 0.05$ )；至第 8 日更降至 5.97，非常不利於精子存活。於稀釋精液中，其 pH 值隨保存天數增加

而逐漸上升，雖然上升幅度不大，唯第 8 日之 pH7.13 仍顯著高於第 0 日之 6.96(P<0.05)。

在保存精子之受精試驗中，受精的精子來自保存於 Modena 稀釋液中第 0、2、4-5、6-7 日之稀釋精液者。其體外受精結果如表 1 所示。保存第 0、2 與 4-5 日之精子分別有 54.7%、80.4%、45.4% 之受精率，唯第 6-7 日者則降至 9.9%，顯著較保存 4-5 日者為低(P<0.05)。大多數受精卵，均屬多精入卵，每一受精卵含有之精子穿入數，第 0、2 與 4-5 日分別為 4.3、4.6 與 5.7，而保存至第 6-7 日者，平均每一個卵穿入之精子數則顯著下降至 1.7 (P<0.05)。

圖 4. 公豬精液保存期間 pH 之變化。\*: 差異顯著(P<0.05)。

Fig. 4. The changes of pH value in boar semen during 8 days preservation.

\*: Significant difference (P<0.05).

表 1. 公豬稀釋精液保存期間對豬精子受精能力之影響

Table 1. The effect of preservation days on the fertilizing capacity of boar spermatozoa preserved in

Modena extender

Semen age (Days)	No. of mature oocytes	No. (%)of fertilized oocytes	No. (%)of Fertilized eggs Polyspermic	No. of penetrated sperm per egg
0	139	76(54.7) <sup>a</sup>	52(68.4) <sup>a</sup>	4.3±3.5 <sup>a</sup>
2	51	41(80.4) <sup>a</sup>	25(61.0) <sup>a</sup>	4.6±4.2 <sup>a</sup>
4-5	97	44(45.4) <sup>ab</sup>	39(88.6) <sup>a</sup>	5.7±4.4 <sup>a</sup>
6-7	71	7(9.9) <sup>b</sup>	1(14.3) <sup>b</sup>	1.7±1.9 <sup>b</sup>

a, b: 同一列中數據無相同字母者，表示差異顯著(P<0.05)。

Data within the same column without the same superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

綜上所述，在測定精液之 pH、精子活動率與頭巾完整行性試驗中，添加 Modena 稀釋液之精液，所有性狀均顯著地較原精液為佳。唯當精液保存超過 6 日時上述精液性狀有明顯變差的趨勢，此可能係造成精子保存至第 6-7 日之體外受精受精率降低，且受精卵平均精子入卵數較少之原因。由體外受精試驗結果顯示，精液要有高的受精率，必須保持良好之精液性狀，而以 Modena 稀釋液保存後，仍可維持良好之精液性狀達四日之久。不同保存液對公豬精液有不同之保存效果，對精液性狀之表現亦有差別[11]。本試驗係採用已商業化之 Modena 稀釋液，當精子在 Modena 稀釋液中保存到第 4 日時，對精子性狀和受精力尚無不良影響，當保存到第 6 日時，精子性狀顯著變差，而影響精子體外受精之受精率，顯然此時精子死亡數增加，且存活精子之運動能力已顯著下降，無法穿透卵母細胞外圍之透明帶，完成受精作用。

對公豬精液品質之評估，一般採用精液濃度、精子活力與精子頭巾完整性等性狀為依據[12, 13]，但 Smith *et al.* [14] 研究指出，精液性狀與精子真正受精能力未必完全吻合；Cheng[13] 比較各種不同稀釋液對公豬精液保存效果，係將保存精液以人工授精方式注入一批發情同期化女豬之生殖道中，並於授精三日後犧牲女豬，由被沖洗出來之豬卵中，受精卵之比例及平均每個卵透明帶周圍之精子數可以正確評估保存精子之受精能力。豬之體外成熟與體外受精技術已被試驗成功[6, 15]，陳等[8] 應用此等技術，以體外成熟之卵母細胞，可以鑑定公豬精子經由電穿孔處理後之受精能力；本試驗更證明，體外成熟卵母細胞亦可被應用於精子保存試驗，判定保存精子之受精能力，不再需要大規模地對同期發情母豬進行人工授精，可以降低田間試驗所耗費之時間、金錢與人力。

## 謝 誌

本研究承國科會 NSC87-2313-B-197-005 號計畫補助經費，特此致謝。

## 參考文獻

1. Yanagimachi, R. (1972), "Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs *in vitro*", J. Reprod. Fert., Vol. 27, pp. 477-480.
2. Hall, J. L. (1981), "Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova", Fertil. Steril., Vol. 35, pp. 457-463.
3. Imai, H., K. Niwa and A. Icitani (1977), "Penetration *in vitro* of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa", J. Reprod. Fert., Vol. 51, pp. 495-497.
4. Bousquet, D. and B. G. Brackett (1982), "Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertility ability of bull sperm after frozen storage", Theriogenology, Vol. 17, pp. 199-213.
5. Polge, C., S. Salamon and I. Wilmut (1970), "Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination", Vet. Rec., Vol. 87, pp. 424-428.
6. 鄭登貴(1985)，「試管豬—豬卵體外受精之研究」，畜產研究，第十八卷，第一期，第 99-142 頁。

7. Pursel, V. G. and L. A. Johnson (1974), "Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation", *Theriogenology*, Vol. 1, pp. 63-68.
8. 陳銘正、馬春祥、鄭登貴(1995)，「電穿孔處理對豬精子受精能力之影響」，中畜會誌，第二十四卷，第四期，第 435-447 頁。
9. Cheng, W. T. K. (1985), "*In vitro* fertilization of farm animal oocytes", Ph. D. Thesis, University of Cambridge.
10. Steel, R. G. D. and J. H. Torrie (1984), "Principles and procedures of statistics", Mc-Graw-Hill Book Co., Inc., New York, U.S.A.
11. 陳運雄(1987)，「不同稀釋液對豬精液性狀之影響」，嘉義農專畜牧獸醫學報，第十九卷，第一期，第 9-17 頁。
12. 池雙慶、吳明哲、蘇祐明、蔡經源(1980)，「公豬稀釋精液在保存效果與檢定公豬繁殖性能之研究」，中畜會誌，第九卷，第二期，第 133-143 頁。
13. Cheng, W. T. K. (1988), "Preservation of boar semen at 15°C", *J. Chinese Soc. Vet. Sci.*, Vol. 14, pp. 339-350.
14. Smith, K. D., L. J. Rodriguez - Rigau and E. Steinberger (1977), "Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples", *Fertil. Steril.*, Vol. 28, pp. 1314-1319.
15. Mattioli, M., M. L. Bacci, G. Galeati and E. Seren (1989), "Development competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*", *Theriogenology*, Vol. 46, pp. 503-513.

88 年 2 月 2 日 收稿

88 年 3 月 25 日 接受