

## 三重染色揭開精子之秘

三重染色精子之過程，提供資訊評估人工授精(AI)站新進公豬應以何種稀釋液來保存。

準確的精液分析為 AI 站必備要素，然而最佳測試方式為人工授精後母豬之受胎率，但此法緩不濟急。為了事先確認此公豬精液是否為高品質並且能使用在 AI 上，必須精確分析精液樣品。近年來，科技發展使 AI 實驗室，能利用精子生理構造及受胎率，來得到更詳細可靠之精液資訊評估。

精子為高度分化具特異性之細胞，並具有多樣機能特性，精子之結構上及計畫性的獨特分化，只為穿入卵並且使其受精。精子可由選拔、儲藏、保存、運送及受胎率來評估。

有能力使卵子受精之精子，在經選拔及儲藏之後，須至少維持四個特性；(1)代謝：用來產生能量、(2)前進運動能力、(3)精子須有完整之頭帽，頭帽部內含必需酵素：玻尿酸水解酶、前頭帽部酶、頭帽部酶及脂質酶、(4)精子細胞膜上之蛋白質，對精子在陰道內之存活，及附著於卵之細胞膜相當重要。

AI 實驗室使用位相差顯微鏡及電腦影像分析，評估精子之前進運動，而精液則以比色計測量精子數目。顯微鏡高倍放大精子形態或結構，有助於顯現精子外形及其結構是否完整(尾部、中片部及最重要含 DNA 之頭部)，AI 實驗室經由分析程序，確認精子具有完整的膜(包括細胞膜、頭帽部及粒線體)與功能性胞器，此精子才算存活。獨特三重染色技術(Treble stains)的建立，即針對濃稠的公豬精液進行檢驗。

三重染色技術使用 3 種不同螢光染劑，來評估精子 3 種獨特構造(細胞膜、頭帽部膜及中片部之粒線體)。細胞膜為一種選擇性滲透之障壁，其包覆整個精子並調節物質進出細胞。利用螢光試劑 Propidium Iodide(PI)，鍵結細胞 DNA 且染上亮紅色，PI 無法滲透完好的細胞膜，因此 PI 只能進入已損傷(即可滲透)之細胞膜，並將之染成亮紅色，此被染色之精子即被認定死精。

頭帽為膜狀構造，內含用來鑽入卵子外層而達到受精之複合式以及半乳糖，使用 Peanut Agglutinin Lectin(PNA)為頭帽染色，由於 PNA 無螢光特性但其在三重染色中可與藻紅質結合，此 PNA 一旦與頭帽外露之半乳糖結合則會顯現出螢光黃色。

公豬精子之中片部可說是精子之發電廠，提供尾部鞭毛運動之所需能量。中片部主要由粒線體構成，而粒線體為製造能量的胞器，具活力或完整之粒線體，可被螢光染劑 Rhodamine 123(R123)染成螢光綠，且依染色程度顯示胞器活動與否。

利用這些螢光染劑得知，哪些精子具完整頭帽與有活力之粒線體，進而測得精子存活率。同時，使用流式精子細胞儀，測量精子染色後之反應。

流式精子細胞儀為一種光學檢測系統，同樣也可使用在精子性別研究上。原理是使單一精子進入單一通道，經雷射光束照射，依螢光物質發光與否，判別精子裡之染劑，此儀器一秒可精確測量一萬個精子。

現在，應用本技術可有效且廣泛的評估 AI 站或其他繁殖場之新進公豬。同樣地，此技術也可測定不同稀釋液的保存能力。瞭解精子基本構造損害之方法，可找出可能最好之稀釋液來保存精液。

(莊雅伶摘譯/蔣榮章審 Pig International, 33 (5):11-14, May 2003)