

# 繁殖生物技術在養豬產業之應用

杜清富

台灣動物科技研究所 研究員兼組長

## 一、前言

育種目的在於選出好的種源，再利用所選出優良種源繁殖具經濟效益之後裔，因此應用遺傳理論及統計方法進行選拔好的種畜禽，再應用繁殖技術擴大數量。此外，好的種畜禽受其自然壽命限制，因此亦需配合保種技術，可延續該種源之應用年限。在養豬產業，遺傳評估已由傳統體表型選拔增加基因型選拔；在繁殖及保種技術改善，人工授精 (AI) 及精液冷凍保存技術算是從自然配種最大突破或轉變的繁殖技術，且截至目前仍為最實用及效益之繁殖技術。本文重點將檢視在養豬產業有關繁殖技術，自此 AI 及精液冷凍保存以後，研究人員努力提升之研發，簡要回顧諸如豬卵體外成熟/受精及體外培養、胚冷凍保存、胚移置、X/Y 精子分離、顯微操作、體細胞保存及複製技術等發展。

## 二、豬卵體外成熟/受精及體外培養

豬卵體外成熟/受精需視為一體，取自屠宰場卵巢，回收其約 5 mm 濾泡內之卵母細胞，添加濾泡激素(FSH)及排卵素(LH)，配合濾泡抑或胎牛血清等，於 38.5°C 培養箱內進行 40~44 小時體外培養，去除大部分顆粒性細胞/保留卵丘細胞再與獲能之精子進行體外受精。此領域在我國鄭登貴教授突破

體外受精瓶頸之後蓬勃發展。目前已完全建立牛卵體外成熟/受精相關技術，可例行生產體外成熟/受精胚，並達商業化規模。豬卵由於其細胞質內具非常多之脂肪球滴，此生物特性與牛及山羊卵不同，脂肪球滴可能為豬卵能量應用特別之處，不過可能也造成豬卵未能充分達到細胞質成熟，在體外受精時無法限制過多精子進入，造成多精入卵現象，正常受精過程只允許一隻精子進入卵內，過多精子進入造成受精卵無法正常發育。目前在改善豬卵培養系統研究，以組合配方培養液為基礎，評估豬卵使用牛白蛋白或胎牛血清作為能量利用、添加維生素 E 改善脂肪球滴所引起之自由基傷害、能量代謝後 CO<sub>2</sub> 之清除等，截至目前豬卵未能充分成熟造成多精入卵仍為最大瓶頸。不過，此技術之應用如不考慮卵之遺傳背景，以增加體外成熟豬卵回收數量，仍可具產業價值。豬胚體外培養因在 4-細胞期開始啟動胚內原基因之表現，因不易啟動，造成體外培養至囊胚期時，其存活率及細胞數目均不如移置體內發育者，而限制其發展。

### 三、胚冷凍保存及胚移置

前述豬卵細胞質中富含脂肪球滴之生物特性，此亦限制豬胚冷凍發展，在冷凍過程此脂肪球滴易造成卵細胞骨架損傷，解凍後培養發育至囊胚階段時其細胞數目較少，且細胞核 DNA 損傷亦較嚴重，因此在技術發展，一直集中思考如何去除(或摘除)豬胚內脂肪球滴，如將早期胚(如剛受精之原核胚)離心並配合顯微操作，在顯微鏡下吸除脂肪球滴，經冷凍之豬胚移置後可生

下活仔豬，我國養豬研究所郭有海先生早期研究雖未使用此方法處理冷凍豬胚，亦成功生下一頭死產仔豬，惟脂肪球滴仍為豬胚冷凍成功與否及效率好壞之瓶頸。近 10 年來，以玻璃化法搭配微滴(千分之一毫升)或固態界面之極快速(每分鐘可降 20,000°C)冷凍技術開發，已突破脂肪球滴之限制，亦即不必移除或離心處理脂肪球滴，且不必使用穩定細胞骨架之藥物處理，不論取自活體受精的豬胚或體外成熟/受精的豬胚，在冷凍解凍及胚移置之後，均可成功出生存活且健康之仔豬。新近(2009 年)日本位在筑波的農業生物科學研究所 Kikuchi 教授團隊，以固態界面配合快速降溫之玻璃化法成功生下 17 頭經體外成熟/受精、冷凍保存及胚移置等處理之仔豬，其平均體重亦達 1.4 公斤。

基本上豬胚冷凍技術已達成熟可商業化利用之階段，惟其後續仍須搭配胚移置技術，如冷凍者為原核至桑椹胚期的豬胚，則需配合外科手術將解凍豬胚移置至同期化受胎豬之輸卵管內，至於囊胚或已孵化之豬胚可移置在子宮角上端，此部分可結合深部受精技術，將胚移置至子宮角近輸卵管之適當位置，如可克服此瓶頸，未來冷凍豬胚移置，可類似牛胚移置，由畜主自行操作，在場內自備液態氮桶，購買優良種豬胚回場存放及自行進行解凍及胚移置，將降低種豬橫向轉移時疾病傳播風險。

#### 四、X/Y 精子分離

長久以來學者一直努力希望找出簡易分離 X/Y 精子技術，諸如依據 X/Y

精子在游動速度、密度、表面電荷或 H-Y 抗原差別進行分離，不過均無理想結果。近代基因體及蛋白質體學蓬勃發展，學者嘗試依其原理發展出新分離技術，如應用精子 X/Y 染色體長度差異，以及家畜禽 X/Y 精子 DNA 量具 3.0~4.2% 些微差距，利用此等差距再配合螢光染劑(Hoechst 33342)染色、紫外光激發，以及流式細胞儀之高壓力噴射之細胞分離技術，每小時可分離 35 萬隻精子，可有效正確分離 X/Y 精子。此一進展在牛 X/Y 精子分離，由於牛的 AI 較簡易、所需授精精子數不需太高、受孕率高、分離後精子之冷凍保存及解凍後受精力高等因素，在 1998 年英國已有農企業公司進行商業化推廣。

事實上最早進行 X/Y 精子分離的家畜禽是豬，為美國農部 Johnson 博士團隊進行，豬隻 X/Y 精子 DNA 量差 3.6%，不過在精子分離時仍有諸多瓶頸待克服，諸如進行分離時需使用螢光染劑、紫外光、流動壓力、稀釋液 pH 值變化、分離後精子數減少、需再離心濃縮及冷凍保存及解凍等處理之變化，造成精子活力降低、細胞膜及粒腺體(提供能量)與頭部內 DNA 損傷等現象，結果使分離所得之 X/Y 精子受精力極低。使用 X/Y 精子不論進行體外受精(配合胚移置豬胚)或子宮深部 AI，均可出生出活仔豬，惟至產業化時其效率仍就待改善，尤其增加可用精子數、降低精子之細胞膜及 DNA 損傷，以及配合改善冷凍保存及深部授精技術。

此外，類似早期尋求 X/Y 精子表面可能有 H-Y 抗原差別，進行分離及

發展 H-Y 抗體之作法，新近美國農部 Johnson 博士團隊(2006 年)利用蛋白質體學技術，使用已經 X/Y 分離之精子，進行二維電泳蛋白質點分析比較，試圖找出 X/Y 精子細胞膜上差異之蛋白質，不過仍未能成功，僅再次確認 X/Y 精子外觀或細胞膜蛋白質等之相同性。

## 五、顯微注射

顯微注射技術普遍用在家畜基因轉殖，非直接改善豬隻繁殖性能之技術，惟在精子數目稀少(寡精)或無活動力時，可於顯微鏡下應用此技術，直接抓取精子將其注入卵細胞質內，此技術稱為卵細胞質內授精(intracytoplasma sperm insemination, ICSI)技術，此技術在人類婦產科進行男性不孕症之治療甚為普遍。在養豬產業應用，如種公豬為極特殊或珍貴且精液性狀不佳甚至無性慾者，不論取自射出或副睪之精子可先冷凍保存，再由具此技術之專業人員進行 ICSI，所產生之豬胚再進行胚移置即可，惟此法所生之後裔如為公豬，難保可恢復其性慾或精液品質。

在間接應用顯微注射，可引進外源基因至豬隻基因體內，在育種應用可引進全新性狀是可行作法，惟過去 25 年來的發展，大家普遍對基因改造生物(GMO)存有疑慮，再加上基因轉殖後仍需配合後續遺傳評估及選育，經由傳統遺傳育種方式穩定性能之後，方可培育出有用之品系，至今以加拿大學者所培育之植酸酶基因轉殖環保豬最為成熟，以近 20 年時間培育，證實具有降低有機磷之排放之特性，但目前仍需通過法規審核及消費者接受，方可

進入養豬產業。我國發展豬乳鐵蛋白質基因轉殖豬，雖然亦具提高仔豬育成率之初步結果，惟在諸多因素考量之下，目前僅進行基因轉殖豬精液冷凍保存，未能持續發展。未來在因應極端氣候變化下，尤其在高溫逆境中，豬隻食慾及繁殖性能勢必受到衝擊，此一情境，勢必很難由現有豬種中選育出具經濟價值之耐熱豬種，但是否可藉由基因轉殖技術而有所突破，值得吾人思維。

## 六、體細胞保存及複製技術

一般而言，整個體細胞復育流程可分為體細胞保種、體細胞核轉置及親緣鑑定。欲保種之種豬，可取其耳刻組織，置於碎冰中快遞寄送到保種之實驗室，經由無菌操作，將組織建立成初代培養之細胞，所建立之細胞可簡易置於含 10% DMSO 之胎牛血清冷凍保護液中，置於-80℃冰箱過夜，再移至液態氮中冷凍保存，此保種方法不僅簡易，且不限於種公豬，對具優良繁殖性能之母豬亦可行。在體細胞核轉置(SCNT)方面，取體內或體外成熟卵母細胞，藉由顯微操作技術進行卵母細胞核去除，再將供核細胞直接注射至細胞質中，可得重組豬胚；目前發展中之徒手法(hand made)在一般解剖顯微鏡(10~20 倍)下，以徒手持刀片將豬卵對半截切，再取無極體(無卵細胞核)兩半對夾一顆體細胞進行融合，取得重組豬胚；再將此等重組豬胚移置受胚母豬輸卵管或子宮角上端內，待母豬完成懷孕，進行 SPF 剖產或自然分娩複製豬隻。在親緣鑑定方面，將體細胞與複製分身之基因體 DNA，進行單核苷

酸多態型與微衛星標記之基因型分析，即可確定其親緣之正確性。

此SCNT技術在豬隻遺傳育種之應用，可應用於放大具較高遺傳經濟價值之種畜群，尤其在頂級種公豬因年老或疾病因素需淘汰，可藉由體細胞冷凍保存及SCNT，將該豬隻之生命繼續延續，並延伸其產值。優良種豬遺傳性狀保存，一般認為以冷凍精液為最方便及經濟之方式，但配合體細胞複製技術改進，體細胞之冷凍保存相較於精液冷凍，更為簡便且同時保存完整的基因體DNA（兩套染色體），而不似冷凍精液只保存配子，僅具半套DNA之遺傳特性。以遺傳資源多樣性考量，對不同遺傳潛力之豬隻亦可進行體細胞保種，待有需求之時再重新藉由複製技術將豬隻復育。

目前由於技術成熟，複製豬隻外觀並無缺陷，甚至繁殖性能、發身日齡、懷孕期、窩仔數、育成率等繁殖性狀與平均日增重及屠體性狀，與一般豬隻並無差異，顯示此技術對高育種潛力之豬隻具有其應用價值。此外，複製豬和其子代所生產之食品，與其他人工繁技術或自然配種方式生產者並無差異，在食品衛生安全方面，美國FDA認為，並不需特別訂定檢驗之規範，甚至不需特別標示即可上市出售。目前歐盟食品安全管理局亦同意美國FDA之結論，讓歐盟國家體細胞複製家畜及其後裔可進入食物鏈，歐盟種豬協會亦贊同歐盟食品安全管理局之此一決定。

## 七、討論

以養豬產業而言，豬隻性能非常複雜，從體型、身體骨骼之結構、腳部

結構、背脂厚度、腰眼面積、日增重、飼料效率、繁殖性能及泌乳能力等等項目龐雜。因此，育種目標常因個別國家、地域、商業及個人之偏好，而有非常多之品種與品系形成，造成育種者之偏愛可能有復古之現象，此與乳牛之育種完全不同，因此種源之保存與基因多樣性甚為重要。動科所精液銀行目前仍冷凍保存超過 20 年之優良種豬精液，極具有育種價值，惟此等精液銀行中之精子屬於具半套遺傳物質之基因庫，其價值僅為體細胞保存之一半，此外精液冷凍保存之技術不容易，非一般實驗室可進行；反之，體細胞之保存為一項簡易之技術，一般會無菌操作之實驗室即可進行，雖然須經較困難體細胞複製技術將體細胞復育還原成豬隻，惟復育豬隻具有全套之遺傳基因，具無限之產業價值。此外，一頭檢定第一名之種公豬，其售價昂貴，就算以 AI 中心運作方式販售新鮮精液，其種源之傳遞速度與範圍仍有所限制，因此由複製技術提供多頭復育種公豬，可更快速散佈其性能至其肉豬群後裔。再者，現有豬隻保種之概念因生物特性，均侷限在公畜之精液，若以體細胞觀之，可輕易突破性別之限制，亦即優良種母豬亦可進行之體細胞種源保存。除 SCNT 複製技術之外，豬胚冷凍保存在玻璃化法技術之突破，其冷凍胚之遺傳親源關係容易確定，進入種豬登錄體系較無爭議，未來如可簡化子宮深部胚移置技術，可方便由現場人員直接操作。此外，地球暖化，所造成極端環境溫度變化，是否可藉由生物技術作為有所突破，應值得深思。以產業考量，只要有用、可讓養豬業蒸蒸日上之技術，均值得發展與應用，

我國在自然資源非常有限之條件下，更應由技術提昇有突破性發展。

AMBA