

冷凍稀釋液中添加低密度脂蛋白對 臺灣黑山羊精液冷凍—解凍後品質之影響⁽¹⁾

王得吉⁽²⁾ 李平南⁽²⁾ 李宗育⁽²⁾ 陳冠安⁽²⁾ 黃政齊⁽²⁾⁽³⁾

收件日期：101 年 6 月 30 日；接受日期：102 年 3 月 1 日

摘 要

本試驗目的為探討利用含有不同濃度低密度脂蛋白 (Low density lipoprotein, LDL) 之冷凍稀釋液對臺灣黑山羊精液冷凍保存之影響。試驗於繁殖季節中進行，運用假陰道法進行 3 頭 2-4 歲齡之台灣黑山羊新鮮精液採集。每週採取 3 次。採集後之新鮮精液經鏡檢後混合並等量分為 5 管，經洗滌後分別利用 YTF (Egg yolk-Tris-Fructose)、TCG-Y (Tris-Citrate acid-Glucose-Egg yolk)、TCG-6% LDL、TCG-8% LDL 及 TCG-10% LDL 等 5 種稀釋液配方進行精液冷凍保存。試驗結果顯示，利用上述五種不同稀釋液配方進行山羊冷凍精液製作時，其解凍後對精子存活率雖無顯著差異，但經 1 至 5 小時培養後則產生顯著性差異，其中以含 10% 低密度脂蛋白稀釋液所製作之冷凍精液經解凍培養至 5 小時後精子存活率最高。在精子活力部分，於 37°C 培養 5 小時後，以含低密度脂蛋白組之精子存活率顯著 ($P < 0.05$) 優於 TCG-Y 組。試驗結果顯示，低密度脂蛋白添加於冷凍保護劑中有提昇精子冷凍保護之效果。

關鍵詞：臺灣黑山羊、精液冷凍、低密度脂蛋白。

緒 言

在生產家畜冷凍精液過程中，精子暴露在一連串潛在的傷害下。精子冷凍過程，諸如所使用的稀釋液、平衡培養時間乃至於冷凍程序等，皆可影響精子解凍後之存活率及受精之潛能。Johnson *et al.* (2000) 研究指出，精子冷凍—解凍造成之凍傷害，可藉由適當的降溫速率及冷凍保護稀釋液的設計而降至最低。此外，為了限制在精子冷凍—解凍過程中，因胞內冰晶形成和脫水而致之溶質濃度增加產生之有害影響 (Amann and Pickett, 1987)，冷凍保護劑諸如甘油等是必需被使用 (Garner, 1991)。在過去 60 年，蛋黃一直是被使用於不同物種冷凍精液生產過程中，冷凍保護稀釋液之主要成份。冷凍保護稀釋液中若與甘油配合使用，則蛋黃於冷凍過程中所致溫度休克之不利影響可避免，顯示甘油之保護功能，並且具有促進精子受精能力的作用 (Phillips, 1939; Bogart and Mayer, 1950; Wall and Foote, 1999; Manjunath *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2004; Lamia *et al.*, 2004)。然而，蛋黃使用有其缺點：一是衛生安全問題，因其似一生化培養基，極易發生污染及促進細菌孳生。二是技術上問題，因須打破雞蛋並去除蛋白、繫帶及卵黃膜而回收蛋黃液，因此難以於自動工業中被開發而商品化應用。最後則是蛋黃中富含顆粒性物質而阻礙精子之代謝交換或降低其活動能力 (Kampschmidt *et al.*, 1953; Pace and Graham, 1974; Watson and Martin, 1975)。因此，如何自蛋黃液中尋找具抗凍能力之分子以取代此複雜之蛋黃液為一重要課題 (Kampschmidt *et al.*, 1953; Pace and Graham, 1974)。許多研究嘗試利用配製已知成分之冷凍保護稀釋液，以尋找可能具有抗凍

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1882 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(3) 通訊作者，E-mail: jchuang@mail.tlri.gov.tw。

能力之分子。Pace 及 Graham (1974) 利用超高速離心方式純化蛋黃液，並觀察到低密度脂蛋白 (Low density lipoprotein, LDL) 具有抗凍能力。此一特性被發現後陸續在許多研究中被證實 (Watson and Martin, 1975; Quinn and Chow, 1980; Graham and Foote, 1987; Babiak *et al.*, 1999; Moussa *et al.*, 2002; Bergeron and Manjunath, 2006)，如當公牛精液在冷凍製作過程中添加 8% (w/v) 低密度脂蛋白，於冷凍—解凍後可得到最佳之效果 (Foulkes, 1977; Moussa *et al.*, 2002; Amirat *et al.*, 2004; Amirat *et al.*, 2005)。

本研究主要目的即是利用自雞蛋中所萃取之低密度脂蛋白，利用不同濃度低密度脂蛋白之稀釋液，進行山羊精液冷凍保存，並對解凍後精子存活率及活力之影響進行評估，以作為日後研究與產業推廣之參考。

材料與方法

I. 試驗動物與飼養管理

試驗於 2010 年 1–3 月間進行，運用假陰道法進行 3 頭 2–4 歲齡之台灣黑山羊新鮮精液採集。每週採取 3 次，每次間隔一天。採集之精液經稀釋 200 倍後於顯微鏡下評估，選取存活率在 80% 以上及活力為 4 以上者供試驗進行 (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008)。試驗羊隻圈飼於個別羊欄，欄舍內提供飲水、礦鹽及乾草任食，每日並補充肉羊精料 0.4 kg。

II. 精液之處理與冷凍精液製作流程

採集後之新鮮精液經鏡檢合格及濃度計數後等量分為 5 管，分別加入原精液量 5 倍量之洗滌液 (Corteel, 1980)，緩慢混合後，以 $210 \times g$ 進行離心 10 分鐘，移除上層澄清液體後，再加入 5 倍量之洗滌液，重複上述離心條件一次。其後分別加入 YTF (Egg yolk-Tris-Fructose)、TCG-Y (Tris-Citrate acid-Glucose-Egg yolk) (王等, 2009)、TCG-6% LDL、TCG-8% LDL 及 TCG-10% LDL 等 5 種第一階段冷凍稀釋液進行稀釋，使稀釋精液最終濃度達每毫升 5×10^8 個精子。將稀釋精液置入 4°C 冷房中平衡 2 小時後，等量加入含 7% 甘油之第二階段冷凍稀釋液進行稀釋，使稀釋精液最終濃度達每毫升 2.5×10^8 個精子，然後裝填至 0.5 毫升麥管中並予以封粉。最後將麥管排列於麥管架上後，以兩階段方式於液態氮液面上方進行短暫平衡 (16 cm 處，2 分鐘及 5 cm 處，3 分鐘)，最終將麥管迅速移入液態氮中，完成精液冷凍程序。將麥管裝入標示日期、耳號的鋁架上，儲存於液態氮桶中一星期以上。其中自雞蛋中萃取低密度脂蛋白之程序則是依據 Ali Al Ahmad *et al.* (2008) 所述之程序進行。

III. 試驗設計

比較經 YTF、TCG-Y、TCG-6% LDL、TCG-8% LDL 及 TCG-10% LDL 等 5 種不同冷凍稀釋液冷凍解凍後之精子，其分別培養於 37°C 0 小時及 5 小時後之存活率及活力。試驗結果為 4 重複處理所得平均。

IV. 解凍後精子效能評估

存活率評估是依照 Roca *et al.* (1996) 所述之 eosin-nigrosin 染色法進行染色，其方式為將精液以該染劑進行染色後，風乾並置於 400 倍顯微鏡下鏡檢，若染成紅色即代表為死精子。每一抹片隨機挑選 3 視野，每一視野計算至少 200 個精子，然後將活精子數除以總精子數即為精子之存活率。精子活力之等級評估亦是依照 Roca *et al.* (1996) 所述之方式進行，其方式為將精液置於 100 倍顯微鏡下觀察精液之泳動波，再依其等級判定標準進行判斷，其範圍為 0–5。

精子各項活動力指數是利用電腦輔助精子分析軟體 (computer-aided sperm analysis, CASA)，VIDEOTEST-SPERM 2.1 (VideoTest, Ltd., St.-Petersburg, Russia) 進行分析。不同冷凍稀釋液之冷凍精液解凍後，分別置於含 0.5 mL 原冷凍稀釋液之 1.5 mL 微量離心管中，分別培養於 37°C 水浴槽內，並於 0 小時及 5 小時各取 5 μL 進行至少取 3 視野之觀察。評估項目包含 VAP: average path velocity- $\mu\text{m/s}$ ，平均路徑速度；VSL: straight line velocity- $\mu\text{m/s}$ ，平均直線運動速度；VCL: curvilinear velocity- $\mu\text{m/s}$ ，平均曲線運動速度；ALH: amplitude of lateral head displacement- $\mu\text{m/s}$ ，精子平均側擺幅值；BCF: beat cross frequency -Hz，精子平均鞭打頻率；STR: sperm track straightness -%，運動的前向性；LIN: linearity index -%，運動的直線性。STR = $\text{VSL} / \text{VAP} \times 100$ ；LIN = $\text{VSL} / \text{VCL} \times 100$ 。

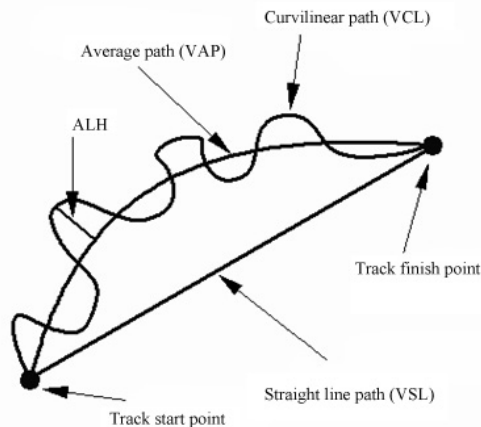


圖 1. 精子活動參數圖示。

Fig. 1. Sperm movement scheme.

VCL: curvilinear velocity; VAP: average path velocity; ALH: lateral head displacement; VSL: straight-line velocity.

精子頭帽膜完整性分析是依據 Aboagla and Terada (2003) 所述之方法 (SYBR-14 test) 進行分析，評定標準為在螢光顯微鏡觀察下，若頭帽呈現綠色螢光表示精子具有完整之頭帽膜，若呈現橘紅色則表示精子頭帽膜不完整；精子膜完整性則是依據 Osinowo *et al.* (1982) 所述之方法 (HOST test) 進行分析，評定標準為在顯微鏡下觀察，若尾部呈現捲曲表示精子具有完整細胞膜，若呈現非捲曲狀則表示精子細胞膜不完整。

V. 統計分析

試驗期間所收集之資料均以套裝統計分析系統 (statistical analysis system, SAS, 1998) 進行分析，而測定值以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示，並以鄧肯氏多變域測定法 (Duncan's Multiple Range Test) 比較山羊精液性狀之差異顯著性。

結果與討論

利用不同稀釋液配方進行山羊精液液態氮冷凍保存，其解凍後精子存活率如表 1 所示。冷凍精液於 37°C 解凍後立即鏡檢觀察 (0 小時)，於不同稀釋液配方間精子存活率並無顯著差異。但於 37°C 培養 2 小時後，以含低密度脂蛋白組之精子存活率具有優於 TCG-Y 組 (TCG-Y: 64.8 ± 10.0) 之趨勢；而於 37°C 持續培養至 5 小時後，以含 10% 低密度脂蛋白組之精子存活率 ($54.4 \pm 6.4\%$) 顯著 ($P < 0.05$) 優於其它四組。試驗結果顯示，利用 YTF、TCG-Y、TCG-6% LDL、TCG-8% LDL 及 TCG-10% LDL 等五種不同稀釋液配方進行山羊冷凍精液製作時，其解凍後對精子存活率上雖無顯著差異，但經 1 至 5 小時培養後則產生顯著性差異，其中以含 10% 低密度脂蛋白稀釋液所製作之冷凍精液經解凍培養至 5 小時後精子存活率最高。

冷凍稀釋液添加的目的主要是提供精子細胞能量之來源、保護精子細胞在降低溫度所造成的傷害及維持其暫時存活的適當環境。曾被使用過的山羊精液稀釋液之種類繁多 (Memon and Ott, 1981; Salamon and Maxwell, 1995)，然而在實用上仍以脫脂乳粉及蛋黃兩種稀釋液較為普遍 (Chemineau *et al.*, 1991)。於王等 (2009) 先前研究顯示，冷凍精液經解凍並回溫於 37°C 持續培養至 5 小時後，以 YTF 組之精子存活率顯著 ($P < 0.05$) 高於 SKM 及以 TCG 為基礎之稀釋液 (TCG-Y 及 TCG-Y-CLC)，與本試驗所得之結果相似。先前研究證實，蛋黃能夠有效的幫助精子於急速的降溫過程中對抗冷休克及提昇精子的受精能力 (Bogart and Mayer, 1950; Wall and Foote, 1999; Manjunath *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2004; Lamia *et al.*, 2004)。然而，蛋黃所具有對精子保護之功能主要成份為其中所含之低密度脂蛋白 (Watson and Martin, 1975; Quinn and Chow, 1980; Graham and Foote, 1987; Babiak *et al.*, 1999; Moussa *et al.*, 2002; Bergeron and

Manjunath, 2006)。低密度脂蛋白是約由 87% 的脂質及 12% 蛋白質所組成之直徑約 35 nm 的球型結構 (Anton *et al.*, 2003)。在冷凍—解凍過程中，低密度脂蛋白受到破壞致使磷脂質散佈至液體中，在精子膜表面形成保護膜 (Quinn and Chow, 1980; Cookson *et al.*, 1984)。Ali Al Ahmad *et al.* (2008) 於乳用山羊的研究中指出，添加低密度脂蛋白將顯著提昇精子冷凍—解凍後之存活率，與本試驗結果相似。

表 1. 不同稀釋液配方在解凍後經培養於 37℃，0 小時至 5 小時後對山羊精子存活率之影響

Table 1. Effects of different diluents on percentage of live sperm (%) in post-thaw goat semen incubated at 37℃ for 0 to 5 h (from 4 replicates)

Diluents	Time of post-thawing			
	0 h	2 h	4 h	5 h
TCG-Y (n=12)	77.7 ± 7.3	64.8 ± 10.0 ^b	33.0 ± 9.5 ^b	12.1 ± 2.1 ^c
YTF (n=12)	82.3 ± 3.8	79.9 ± 3.6 ^a	44.0 ± 9.1 ^{ab}	31.1 ± 7.7 ^b
TCG-6% LDL (n=12)	79.4 ± 7.2	76.5 ± 8.0 ^{ab}	56.8 ± 15.6 ^a	35.8 ± 7.4 ^b
TCG-8% LDL (n=12)	86.2 ± 5.1	76.1 ± 6.3 ^{ab}	57.5 ± 11.4 ^a	29.2 ± 9.4 ^b
TCG-10% LDL (n=12)	77.4 ± 4.0	71.8 ± 9.2 ^{ab}	63.7 ± 10.1 ^a	54.4 ± 6.4 ^a

^{a, b, c} Values without the same superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$)

利用不同稀釋液配方進行山羊精液液態氮冷凍保存，其解凍後精子活力如表 2 所示。冷凍精液於 37℃ 解凍後立即鏡檢觀察 (0 小時)，於不同稀釋液配方間精子活力並無顯著差異。但於 37℃ 培養 2 小時後，以含低密度脂蛋白組之精子活力顯著 ($P < 0.05$) 優於 TCG-Y 組 (3.5 ± 0.58)；而於 37℃ 持續培養至 5 小時後，仍以含低密度脂蛋白組之精子活力顯著 ($P < 0.05$) 優於 TCG-Y 組。試驗結果顯示，利用 YTF、TCG-Y、TCG-6% LDL、TCG-8% LDL 及 TCG-10% LDL 等五種不同稀釋液配方進行山羊冷凍精液製作時，其解凍後對精子活力上雖無顯著差異，但經 1 至 5 小時培養後則產生顯著性差異，其中以含低密度脂蛋白組之精子存活率顯著 ($P < 0.05$) 優於 TCG-Y 組。Bencharif *et al.* (2008) 於狗的研究顯示，添加 6% (w/v) 低密度脂蛋白及公牛精液在冷凍精液製作過程中添加 8% (w/v) 低密度脂蛋白，於冷凍—解凍後可得到最佳之效果 (Foulkes, 1977; Moussa *et al.*, 2002; Amirat *et al.*, 2004; Amirat *et al.*, 2005)，這些結果與本試驗有所差異，可能原因為不同物種間期精子細胞膜組成有所不同所致 (Hu *et al.*, 2010)。

表 2. 不同稀釋液配方在解凍後經培養於 37℃，0 小時至 5 小時後對山羊精子活力之影響

Table 2. Effects of different diluents on sperm motility in post-thaw goat semen incubated at 37℃ for 0 to 5 h (from 4 replicates)

Diluents	Time of post-thawing			
	0 h	2 h	4 h	5 h
TCG-Y (n=12)	4.50 ± 0.58	3.50 ± 0.58 ^b	2.00 ± 0.00 ^c	1.50 ± 0.58 ^b
YTF (n=12)	4.75 ± 0.50	4.25 ± 0.50 ^{ab}	2.50 ± 0.58 ^{bc}	2.25 ± 0.50 ^{ab}
TCG-6% LDL (n=12)	4.75 ± 0.50	4.75 ± 0.50 ^a	3.25 ± 0.96 ^{ab}	3.00 ± 0.25 ^a
TCG-8% LDL (n=12)	4.75 ± 0.50	4.75 ± 0.50 ^a	3.75 ± 0.50 ^a	3.00 ± 0.00 ^a
TCG-10% LDL (n=12)	5.00 ± 0.00	4.25 ± 0.50 ^a	3.75 ± 0.50 ^a	3.25 ± 0.50 ^a

^{a, b, c} Means with different superscripts within the same column are significantly different ($P < 0.05$)

利用精子分析儀進行精子移動特性分析之結果如表 3 所示。在 VSL 值部分，含 10% 低密度脂蛋白組者顯著 ($P < 0.05$) 高於 YTF 及含有 6% 與 8% 低密度脂蛋白組。VCL 值部分，含 10% 低密度脂蛋白

組者顯著 ($P < 0.05$) 高於其他處理組。ALH 和 BCF 值則以含低密度脂蛋白者相較於 TCG-Y 組分別呈現較高與較低之趨勢。STR 及 LIN 值則以 YTF 組顯著 ($P < 0.05$) 低於其他處理組別。電腦輔助精液分析基於動力學的基礎上，用來進行精液比較分析。事實上精子的動力參數與受精能力極具相關，在人類 (Giwerzman *et al.*, 2003)、乳牛 (Farrell *et al.*, 1998) 及綿羊 (Sanchez-Partida *et al.*, 1999) 等相關研究已獲證實。本研究綜合整體數值顯示，於稀釋液配方中添加低密度脂蛋白可增加山羊精液冷凍解凍後精子移動特性，且含 10% 低密度脂蛋白者於 VSL 及 VCL 數值顯著高於其他濃度添加者。

表 3. 不同稀釋液配方在解凍後利用精子分析儀進行山羊精子移動特性分析之影響

Table 3. Effects of different diluents on post-thaw goat sperm motion characteristics obtained using the sperm analyzer system (from 4 replicates)

	TCG-Y (n=12)	YTF (n=12)	Concentration (%) of yolk low density lipoproteins in TCG extender (n=12)		
			6%	8%	10%
VAP (μ m/s)	35.5 \pm 6.0	34.6 \pm 5.4	34.5 \pm 5.3	33.8 \pm 4.9	37.7 \pm 4.5
VSL (μ m/s)	33.1 \pm 5.5 ^{ab}	30.8 \pm 5.1 ^a	31.2 \pm 4.8 ^a	30.8 \pm 4.0 ^a	35.0 \pm 3.9 ^b
VCL (μ m/s)	59.4 \pm 9.8 ^a	62.9 \pm 9.1 ^a	59.6 \pm 8.2 ^a	59.4 \pm 10.1 ^a	67.0 \pm 7.1 ^b
ALH (μ m/s)	1.2 \pm 0.2 ^a	1.5 \pm 0.2 ^b	1.4 \pm 0.2 ^b	1.4 \pm 0.3 ^{ab}	1.4 \pm 0.2 ^b
BCF (Hz)	8.1 \pm 0.3 ^a	7.6 \pm 0.2 ^b	7.6 \pm 0.3 ^b	7.7 \pm 0.4 ^{bc}	7.8 \pm 0.3 ^c
STR (%)	93.4 \pm 3.2 ^a	89.4 \pm 2.8 ^b	91.0 \pm 4.0 ^a	91.6 \pm 4.4 ^a	93.5 \pm 2.1 ^{ac}
LIN (%)	57.3 \pm 4.8 ^a	49.6 \pm 2.8 ^b	53.8 \pm 6.5 ^a	53.4 \pm 5.6 ^a	56.2 \pm 4.9 ^{ac}

^{a, b, c} Means with different superscripts within the same line are significantly different ($P < 0.05$)

VAP: average path velocity- μ m/s; VSL: straight line velocity- μ m/s; VCL: curvilinear velocity- μ m/s; ALH: amplitude of lateral head displacement- μ m/s; BCF: beat cross frequency -Hz; STR: sperm track straightness -%; LIN: linearity index - %.

相關研究顯示，精子頭帽完整性與受精能力有著非常強烈之關聯性 (Saacke and White, 1972)，且精子若失去頭帽將喪失與卵母細胞結合並使其受精之能力。胞質膜為一高度動態的結構，不僅負擔細胞內物質交換且亦參與著受精過程 (Flesch and Gadella, 2000)。利用不同稀釋液配方進行山羊精液液態氮冷凍保存，其解凍後精子頭帽完整性與尾膜完整性結果如表 4 所示。不同稀釋液配方進行山羊冷凍精液製作後，無論於精子頭帽完整性與尾膜完整性於各組間均無顯著性差異。

表 4. 不同精液冷凍稀釋液配方在山羊精子解凍後頭帽完整性與尾膜完整性之評估

Table 4. Percentage preservation of acrosome integrity and flagella plasma membrane integrity in goat spermatozoa frozen-thawed using the different diluents (from 3 replicates)

Percentage (%) of spermatozoa with	TCG-Y (n=12)	YTF (n=12)	TCG-6% LDL (n=12)	TCG-8% LDL (n=12)	TCG-10% LDL (n=12)
Intact acrosome	67.5 \pm 5.8	71.9 \pm 6.8	68.7 \pm 9.7	69.8 \pm 3.5	72.0 \pm 6.8
Intact tail membrane	45.7 \pm 4.4	50.7 \pm 4.9	48.0 \pm 7.4	48.1 \pm 0.7	47.0 \pm 3.4

蛋黃在精液冷凍過程中為一般被使用添加於稀釋液之物質。然而，因其來自於動物，因此亦有著微生物或病毒污染的潛在危險性。Bousseau *et al.* (1998) 研究指出，雞蛋依其來源經常受到沙門氏菌或葡萄球菌之不同程度污染。在自然感染的蛋雞蛋黃中亦可分離到禽流感病毒 (Cappucci *et al.*, 1985)。這些微生物或病毒污染，將可對使用在人工授精的精液之受精能力造成影響。近年在綿羊的研究顯示，這些潛在的

生物性污染可利用經過滅菌處理的蛋黃粉取代新鮮蛋黃液而避免，但不免降低解凍後精子之性能，而限制了該技術的優勢 (Marco- Jimenez *et al.*, 2004)。利用低密度脂蛋白取代新鮮蛋黃液則有維持冷凍稀釋液冷凍保護效果之優點，這種簡單的分子未來可用人工合成之方式生產，且無任何生物性污染之可能性 (Amirat *et al.*, 2004)。即使現在，於衛生安全觀點看來，自雞蛋中萃取之低密度脂蛋白可大大降低細菌污染程度 (Amirat *et al.*, 2004)。然而，低密度脂蛋白其於精子冷凍—解凍過程中保護細胞免於傷害的確切機制仍未明。Manjunath *et al.* (2002) 及 Bergeron *et al.* (2004) 認為，源自蛋黃中低密度物質—脂蛋白複合物之成分與牛精漿蛋白質 BSP-A1/A2, BSP-A3 及 BSP-30-kDa (Bull seminal plasma proteins, BSP proteins) 產生交互作用，而致精子主要保護機轉之再現。Bergeron *et al.* (2004) 確認，減少牛精漿蛋白質結合到精子細胞而避免細胞膜脂質外流，將增加精子活動能力，而稀釋液中添加低密度脂蛋白之保護精子可能途徑：一為低密度物質—脂蛋白複合物之成分與牛精漿蛋白質產生交互作用，避免牛精漿蛋白質與精子結合而致之細胞膜脂質外流進而損害精子細胞的過程，其二為低密度物質—脂蛋白複合物之脂質可結合到精子細胞膜，而在低溫保存過程中維持其完整性。低密度物質—脂蛋白複合物對於牛精漿蛋白質具有極高的親合力，即便經過冷凍—解凍程序，此一過程仍可快速、專一且穩定進行。研究顯示，精液利用含有蛋黃液之稀釋液進行稀釋並經冷凍—解凍後，牛精漿蛋白質含量相較於新鮮精液可減少達 80% (Nauc and Manjunath, 2000)。此外，先前研究亦指出蛋黃中某些成分會消滅低密度脂蛋白之冷凍保護特性 (Pace and Graham, 1974; Watson and Martin, 1975)。Demianowicz and Strezek (1996) 之研究自蛋黃中分離出低密度脂蛋白和高密度脂蛋白後顯示，添加低密度脂蛋白較蛋黃液對公豬精液之冷凍保護為佳，然而若添加高密度脂蛋白將降低精子活動力致與蛋黃者無異，此可能肇因於一些顆粒性分子含於高密度脂蛋白分子中。因此一般咸認蛋黃中亦確存在某些成分影響精子之活動力 (Moussa *et al.*, 2002)。然低密度脂蛋白並非無限制添加，若添加超過 10% 以上則會降低精子冷凍保護效果 (Moussa *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2009)，此因可能有為低密度脂蛋白濃度增加亦會加速顆粒性物質或高密度脂蛋白聚集而致之結果 (Pace and Graham, 1974; Thérien *et al.*, 1999)。

先前試驗結果顯示，低密度脂蛋白添加於冷凍保護劑中將有提昇精子冷凍保護之效果。然而，在 Anchordoguy *et al.* (1988) 研究指出，某些有機體對於低溫會形成胺基酸累積的反應，當與傳統之冷凍保護劑結合，這些胺基酸在冷凍—解凍過程中對於避免細胞內結構損害上肩負重要角色。在精子冷凍領域上，胺基酸或其前驅物其冷凍保護效果已在綿羊 (Sanchez-Partida *et al.*, 1992)、種馬 (Koskinen *et al.*, 1989) 及人類 (Renard *et al.*, 1996) 等物種上有諸多研究。Trimeche *et al.* (1996) 研究指出，冷凍保護稀釋液中添加麩胺酸 (glutamine) 將對驢子冷凍—解凍精液具有正面影響效果。因此，未來於冷凍精液製作改善研究方面，或許亦可結合相關研究進行更深一步之探討。

參考文獻

- 王得吉、康定傑、林信宏、黃政齊。2009。不同稀釋液配方對台灣黑山羊精液冷藏或冷凍保存後精子活力及存活率之影響。畜產研究 40 (4)：213-222。
- Aboagla, E. M. and T. Terada. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. Biol. Reprod. 69: 1245-1250.
- Ali Al Ahmad, M. Z., G. Chatagnon, L. Amirat-Briand, M. Moussa, D. Tainturier, M. Anton and F. Fieni. 2008. Use of Glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. Reprod. Dom. Anim. 43: 429-436.
- Amann, R. and B. Pickett. 1987. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. Equine Vet. Sci. 7: 145-173.
- Amirat, L., D. Tainturier, L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gerard, J. Courtens and M. Anton. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. Theriogenology 61: 895-907.
- Amirat, L., M. Anton, D. Tainturier, G. Chatagnon, I. Battut and J. L. Courtens. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: biociphos, low density lipoprotein and triadyl, before, during and

- after freezing and thawing. *Reproduction* 129: 535-543.
- Anchordoguy, T., J. Carpenter, S. Looms and J. Crowe. 1988. Mechanisms of interaction of amino acids with phospholipids bilayers during freezing. *Biochem. Biophys. Acta* 946: 505-512.
- Anton, M., V. Martinet, M. Dalgallarrondo, V. Beaumal, E. David-Briand and H. Rabesona. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.* 83: 175-183.
- Babiak, I., J. Glogowski, M. J. Luczynski, M. Luczynski and W. Demianowicz. 1999. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology* 52: 473-479.
- Bencharif, D., L. Amirat, M. Anton, E. Schmitt, S. Desherces, G. Delhomme, M. L. Langlois, P. Barrie're, M. Larrat and D. Tainturier. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 70: 1478-1488.
- Bergeron, A., M. H. Crete, Y. Brindle and P. Manjunath. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.* 70: 708-717.
- Bergeron, A. and P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 1338-1344.
- Bogart, R. and D. Mayer. 1950. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoa viability. *J. Anim. Sci.* 9: 143.
- Bousseau, S., J. Brillard, B. Marguant-Le Guenne, B. Guerin, A. Camus and M. Lechat. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50: 699-706.
- Cappucci, D., D. Johnson, M. Brugh, T. Smith, C. Jackson, J. Pearson and D. Senne. 1985. Isolation of avian influenza virus (subtype H₅N₂) from chicken eggs during a natural outbreak. *Avian Dis.* 9: 1195-1200.
- Chemineau, P., Y. Cognie, Y. Guerin, P. Orgeur and J. C. Vallet. 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goat. FAO, UN, Rome, pp. 115-162.
- Cookson, A. D., A. N. Thomas and J. A. Foulkes. 1984. Immunochemical investigation of the interaction of egg yolk lipoproteins with bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 70: 599-604.
- Cortel, J. M. 1980. Effects of seminal plasma on the survival and fertility of spermatozoa kept *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.* 20: 1111-1123.
- Demianowicz, W. and J. Strezek. 1996. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod. Domest. Anim.* 31: 279-280.
- Farrell, P., G. Presicce, C. Brockett and R. Foote. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49: 871-879.
- Flesch, F. M. and B. M. Gadella. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta (BBA): Rev. Biomembr.* 1469: 197-235.
- Foulkes, J. 1977. The separation of lipoprotein from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 49: 277-284.
- Garner, D. 1991. Artificial insemination. In: Cupps, P. T. (ed.), *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, San Diego, pp. 251-278.
- Giwerzman, A., J. Richthoff, H. Hjollund, J. Bonde, K. Jepson, B. Frohm and M. Spano. 2003. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil. Steril.* 80: 1404-1412.
- Graham, J. K. and R. H. Foote. 1987. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24: 42-52.
- Hu, J. H., Q. W. Li, L. S. Zan, Z. L. Jiang, J. H. An, L. Q. Wang and Y. H. Jia. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 117: 11-17.

- Jiang, Z. L., Q. W. Li, J. H. Hu, W. Y. Li, H. W. Zhao and S. S. Zhang. 2007. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* 54: 301–304.
- Johnson, L. A., K. F. Weitze, P. Fiser and W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172.
- Kampschmidt, R., D. Mayer and H. Herman. 1953. Lipids and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 36: 733-742.
- Koskinen, E., M. Junnila, T. Katila and H. Soini. 1989. A preliminary study on the use of betaine as a cryoprotective agent in deep freezing of stallion semen. *J. Vet. Med.* 39: 110-114.
- Lamia, A., T. Daniel, J. Laëtitia, T. Chantal, G. Olivier, L. C. Jean and A. Marc. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl 1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61: 895-907.
- Manjunath, P., V. Nauc, A. Bergeron and M. Menard. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.* 67: 1250-1258.
- Marco-Jimenez, F., S. Puchades, E. Moce, M. Viudes-de-Castro, J. Vicente and M. Rodriguez. 2004. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. *Reprod. Domest. Anim.* 39: 438-441.
- Memon, M. A. and R. S. Ott. 1981. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *Rev. Anim. Prod.* 17: 19-26.
- Moussa, M., V. Martinet, A. Trimeche, D. Tainturier and M. Anton. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.
- Nauc, V. and P. Manjunath. 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol. Reprod.* 63: 1058-1066.
- Osinowo, O. A., J. O. Bale, E. O. Oyedipe and L. O. Eduvie. 1982. Motility and eosin uptake of formaldehyde-treated ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 65: 389-394.
- Pace, M. and E. Graham. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.* 39: 1144-1149.
- Phillips, P. 1939. The preservation of bull semen. *J. Biol. Chem.* 130: 415.
- Quinn, P. J. and P. Y. W. Chow. 1980. Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasmamembrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60: 403-407.
- Renard, P., G. Grizard, J. Griveau, B. Sion, D. Boucher and D. Le Lannou. 1996. Improvement of motility and fertilization potential of post-thaw human sperm using amino-acids. *Cryobiology* 33: 311-319.
- Roca, J., J. A. Carrizosa, I. Campas, A. Lafuente, J. M. Vazquez and E. Martinize. 1996. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Rumin. Res.* 25: 147-153.
- Saacke, R. G. and J. M. White. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: *Proceedings of the Fourth NAAB Technical Conference on Artificial Insemination in Reproduction*, Madison, WI, pp. 22-27.
- Sanchez-Partida, L., W. Maxwell, L. Paleg and B. Setchell. 1992. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 4: 113-118.
- Sanchez-Partida, L., D. Windsor, J. Eppleston, B. Setchell and W. Maxwell. 1999. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J. Androl.* 20: 280-288.
- Salamon, S. and W. M. C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249.
- SAS. 1998. SAS/STAT Users Guide Release 6.03 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Thérien, I., R. Moreau and P. Manjunath. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 61: 590-598.

- Trimeche, A., P. Renard, D. Le Lannou, P. Barriere and D. Tainturier. 1996. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology* 45: 1015-1027.
- Wall, R. J. and R. H. Foote. 1999. Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-Tris-glycerol extender. *J. Dairy Sci.* 82: 817-821.
- Watson, P. F. and C. A. Martin. 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 28: 145-152.

Effects of low density lipoprotein supplementation in diluents on the quality of frozen–thawed goat semen⁽¹⁾

De- Chi Wang⁽²⁾ Ping-Nan Lee⁽²⁾ Tsung-Yu Lee⁽²⁾ Kuan-Ann Chen⁽²⁾ and Jan- Chi Huang⁽²⁾⁽³⁾

Received: Jun. 30, 2012 ; Accepted: Mar. 1, 2013

Abstract

The aim of this study was to examine the effects of diluents containing different concentrations of low density lipoprotein, LDL, on the quality of frozen-thawed goat semen. Semen was collected twice weekly from three bucks of Taiwan Black Goat with 2 to 4 years of age via artificial vagina during the breeding season. Semen was pooled and subjected to various dilutions, including Egg yolk-Tris- Fructose (YTF), Tris-Citrate acid- Glucose-Egg yolk (TCG-Y), TCG-6% LDL, TCG-8% LDL and TCG-10% LDL after removal of seminal plasma by centrifugation. Diluted semen was frozen and stored in liquid nitrogen for at least 1 month before quality checking of the frozen-thawed semen. The quality of semen was evaluated after incubation at 37°C for 1-5 h post thawing. The percentage of live sperm in the semen diluted with 10% LDL was significantly ($p < 0.05$) higher than those of semen diluted with the rest concentrations of LDL. Addition of LDL in diluents significantly improved the motility of sperm in frozen-thawed semen ($p < 0.05$). These results indicated that LDL supplementation at an appropriate proportion in semen extender served as an optimal cryoprotectant for freezing of goat sperm.

Key word: Taiwan black goat, Semen frozen, Low density lipoprotein.

(1) Contribution No. 1882 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hengchun Branch Institute, COA-LRI, Hengchun, Pingtung 946, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: jchuang@mail.tlri.gov.tw