

冷凍稀釋液中添加低密度脂蛋白對阿爾拜因山羊精液冷凍解凍後精子活力之影響⁽¹⁾

康定傑⁽²⁾ 沈朋志⁽³⁾ 邢湘琳⁽⁴⁾ 陳裕信⁽²⁾ 曲鳳翔⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁵⁾

收件日期：100 年 8 月 6 日；接受日期：100 年 12 月 15 日

摘要

本研究旨在探討稀釋液中低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 對阿爾拜因山羊 (Alpine) 精液冷凍解凍後精子活力之影響。試驗中首先由雞蛋蛋黃中萃取 LDL，結果顯示由雞蛋蛋黃中所萃取之 LDL，其回收率 (recovery rate) 可達 60.37%，而 LDL 中，水分 (moisture) 佔 57.17%，乾物質 (dry matter) 中粗脂肪 (crude fat) 佔 75.06%，蛋白質 (total protein) 則為 648.17 mg/kg。試驗中進一步評估稀釋液中 LDL 之濃度 (0–20% LDL) 對阿爾拜因山羊精液冷凍解凍後精子活力之影響，結果顯示稀釋液中添加 4% LDL 時，阿爾拜因山羊精液冷凍解凍後之精子活力 (motility) 顯著高於其他處理組及稀釋液中添加 20% 蛋黃之對照組 ($P < 0.05$)。綜此，阿爾拜因山羊精液稀釋液中添加 LDL 似可完全取代傳統稀釋液中使用之 20% 蛋黃，且添加量以 4% 為宜。

關鍵詞：阿爾拜因山羊、低密度脂蛋白、精液冷凍保存、精子活力。

緒言

精子冷凍保存技術之建立乃生殖科技的基礎，且伴隨著技術之普及化，精子冷凍保存之最大貢獻莫過於可應用於人工授精 (artificial insemination, AI) 與體外受精 (in vitro fertilization, IVF) (Medeiros *et al.*, 2002)。應用冷凍精液結合人工授精技術在動物育種及保種上之優勢，是可迅速提升優良種畜後裔之擴散速度與範圍、延續並保存優良種畜之遺傳基因、大幅降低因畜體移動而造成之疾病散佈問題；再者亦可使用於頻臨絕種動物之精子保存。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1720 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

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

目前山羊冷凍精液稀釋液多以全蛋黃 (egg yolk) 或脫脂乳 (skim milk) 為主，其中尤以全蛋黃之使用最為普遍。全蛋黃與甘油 (glycerol) 搭配應用於精子冷凍稀釋液時，蛋黃內之化合物於對抗精子冷凍過程中發生之冷休克扮演著非常重要的角色 (Philips, 1939; Bogart and Mayer, 1950)。然而蛋黃使用於稀釋液中對精液品質有四項不利之因子，包括 (1) 蛋黃是一種極佳的生物培養液，具有促進細菌或微生物生長的效果，因此易導致精液之污染發生；(2) 在取得蛋黃之打開蛋殼過程中容易汙染，且蛋黃與蛋白難以確實分離；(3) 蛋黃中含有某些顆粒物質，會阻止精子代謝轉換作用，並降低其活動力 (Kampschmidt *et al.*, 1953; Pace and Graham, 1974; Watson and Martin, 1975)；(4) 山羊精液中由尿道球腺所分泌之蛋黃凝集酵素 (egg yolk-coagulating enzyme, EYCE) 可將蛋黃中之卵磷脂 (lecithin) 水解出不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acid)，其中脫羧卵磷脂 (lysolecithin) 具有高毒性，而其他不飽和脂肪酸所產生之酸性環境亦對精子有害 (Corteel, 1992)。所幸，蛋黃中低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 之分離技術已建立，並發現其具有冷凍保護之效果 (Pace and Graham, 1974)。Foulkes (1977)、Polge *et al.* (1980) 和 Graham and Foot (1987) 更證實，LDL 可緊附於細胞膜，可穩定細胞膜的結構。因此牛冷凍精液製作時，利用含 LDL 之稀釋液能夠提供極佳的冷凍保護效果 (Foulkes, 1977; Moussa *et al.*, 2002; Amirat-Briand *et al.*, 2004)。綜合上述說明，LDL 確實具有應用於哺乳動物精液冷凍之利基。基於上述結果，本研究之目的乃在探討稀釋液中 LDL 濃度對阿爾拜因山羊精液冷凍解凍後精子活力之影響，期能改善阿爾拜因山羊精液冷凍解凍後之精子活力。

材料與方法

I. 雞蛋蛋黃中 LDL 萃取

本試驗中低密度脂蛋白之萃取方法係修正自 Moussa *et al.* (2002)、Hu *et al.* (2005) 及 Ali Al Ahmad *et al.* (2008) 等所述之步驟。將蛋黃液加入 2 倍量的等滲食鹽溶液 (0.17 M NaCl) 稀釋，並在 4℃ 的環境下攪拌 1 h。其後，蛋黃液以 4℃、10,000 × g，45 min 離心，取其上層液再以同條件離心一次。離心後收集之上層液加入 40% 硫酸銨 (Sigma, A-4418)，混合，在 4℃ 環境下充分攪拌 1–1.5 h，取上層液。將上層液倒入透析膜中 (MW=10,335) (Sigma, D-9527)，置放於已滅菌過的蒸餾水中，於 4℃ 環境下續以磁石攪拌進行透析。透析 24 h 後 (透析過程共換水 6 次)，將透析袋內液體倒出，以 4℃、10,000 × g，45 min 離心後，再次倒入透析袋內進行另外 24 h 之透析。完成共 48 h 透析後，可得清楚之分層，漂浮於上層濃稠流體即為 LDL。其後再以 4℃、10,000 × g，離心 45 min 後，小心收集浮於上層之 LDL，將所得之 LDL 儲存於 4℃ 冰箱備用。

II. 低密度脂蛋白成分之化學分析

(i) 乾物質含量分析

將 100 g 濕重之 LDL 樣品置於 104℃ 烘箱中烘乾 48 h，冷卻後秤重，計算乾物質含量 (表 4)。

(ii) 粗脂肪含量分析

將 1 g 濕重之 LDL 加入 1.8 mL 含 0.73% NaCl 之溶液混合均勻後，續加入 10 mL 之 hexane/isopropanol (3:2, v/v)，並於混勻後以 1,000 × g 離心 10 min。將上層液收集後，經真空乾燥後，稱重計算粗脂肪含量 (表 4)。

(iii) 蛋白質濃度分析

所收集之 LDL 於定量後利用 SDS-PAGE 檢測其蛋白質樣式 (profile)。本試驗係利用 Qubit Fluorometer (Invitrogen, Q32857) 及 Quant-iT Protein Assay 套組 (Invitrogen, Q33211) 分析蛋白質濃度 (表 4)。

III. 低密度脂蛋白之蛋白質組成分析

取蛋白質濃度已稀釋至 2 mg/mL 之樣品，先與樣品緩衝液以 (NuPAGE sample buffer (4x), NP0007) 4:1 的比例混合，混合後將之置入 95°C 水浴中 5 min，續以 5,000 × g，離心 5 min 後，取上層液備用。protein marker 添加量為 5 μL，樣品混合液之添加量為 20 μL。待所有樣品填裝至膠片之樣品槽後進行電泳（電壓：200 V，起始電流：100-115 mA，結束電流：60—70 mA，電泳時間：50 min）。電泳完成後先將電泳膠片完全置入染色液中 [5 mL 0.006% (w/v) comassie blue R250、40 mL 之純甲醇與 10 mL 10% (v/v) 冰醋酸混勻後，續以二次水定量到 100 mL]，進行 1 h 之染色。其後再將上述電泳膠片投入退染液 [20 mL 之純甲醇與 10 mL 10% (v/v) 冰醋酸混勻後，續以二次水定量到 100 mL] 中進行 1 h 退染，之後更換退染液，並持續進行退染 24 h，以完成退染工作。電泳結果顯現之 175、140、80、65、60 及 15 kDa 六個紋帶（圖 1）與 Muossa *et al.* (2002) 由雞蛋蛋黃中萃取所得之 LDL SDS-PAGE 紋帶結果相符合。是以，所得之 LDL 將備後續山羊精液冷凍時所需。

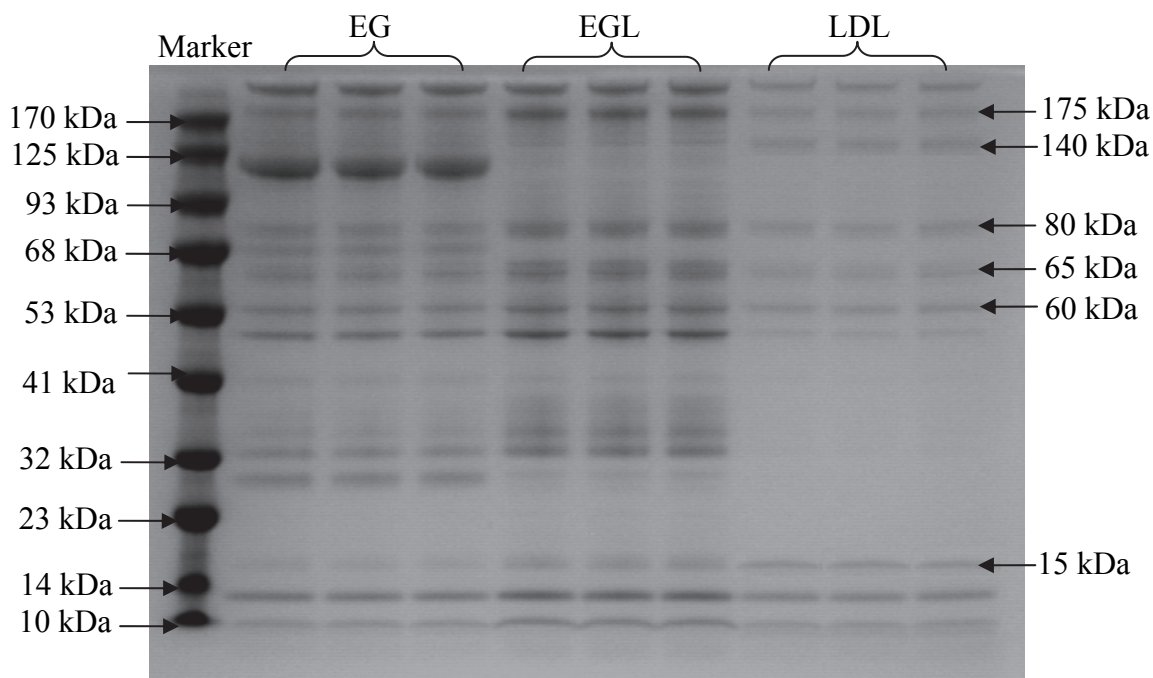


圖 1. 低密度脂蛋白之 SDS-PAGE 膠體電泳結果。EG：蛋黃；EGL：溶解於 0.17 M NaCl 之蛋黃混合液；LDL：透析後之低密度脂蛋白。

Fig. 1. The SDS-PAGE result of extracted LDL; EG: egg yolk; EGL: egg yolk solved in the 0.17 M NaCl Solution; LDL: low density lipoprotein.

IV. 公羊精液之採集及精液之處理方式

本試驗所需之公羊精液係分別採集自 3 頭不同個體之阿爾拜因品種性成熟山羊，精液收集時間介於 2010 年 10 月至 2011 年 3 月。精液採集係使用人工假陰道 (artificial vagina) 法進行。收集於 15 mL 離心管內之精液加入 4 倍量 pH 為 7.2 之精漿洗滌操作液，配方如表 1 所示，經輕柔混勻後，以 275 × g，離心 10 min。去除上層液後再重覆上述步驟一次，最終留下約 1 mL 的精子混合液供後續之試驗所需。

表 1. 精漿洗滌操作液配方

Table 1. The composition of goat semen plasma operate extender

Composition	0.9% NaCl	1.15% KCl	0.61% CaCl ₂	2.11% KH ₂ PO ₄	3.82% MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.34% glucose anhydrate	phosphate buffer (pH 7.4)
Volume (mL)	100	4	3	0.4	1	4.5	12

V. 稀釋液配製

對照組之第一階段稀釋液成分為 2.42 g Tris、1.48 g citric acid、1.00 g glucose、250 µg gentamicine、150 µg penicillin 及 20 mL 蛋黃，最終以二次蒸餾之滅菌水定量到 100 mL。試驗組之第一階段稀釋液則為 2.42 g Tris、1.48 g citric acid、1.00 g glucose、250 µg gentamicine、150 µg penicillin 及 1–20% (dry matter) 之 LDL，最終以二次蒸餾之滅菌水定量到 100 mL。對照組與試驗組之第二階段稀釋液成分除添加 14% 甘油外，餘皆同第一階段稀釋液。精子冷凍稀釋液配方如表 2 所示，滲透壓如表 3 所示。

表 2. 山羊精子冷凍稀釋液配方

Table 2. The composition of goat semen cryopreservation extenders

Component	Control	Treatment
Egg yolk (%)	20	-
LDL(g)(dry matter)	-	0-20
Tris (g)	2.42	2.42
Citric acid (g)	1.48	1.48
Glucose (g)	1.00	1.00
Gentamicine (µg)	250 µg	250 µg
Penicillin(µg)	150 µg	150 µg
Total	100 mL	100 mL

VI. 精液冷凍及解凍程序

供試精子之冷凍操作皆使用電腦程式化自動冷凍降溫儀 (computer control freezer 14S) 進行。去除精漿之公羊精液於室溫條件下，分別先依精子濃度添加適量之第一階段稀釋液，使成 $400-500 \times 10^6$ sperms/mL 之濃度，混勻後移入暗房中，室溫靜置 30 min 後再移入 4°C 冷房以 0.8°C/min 之降溫速率降至 4°C，並於 4°C 條件下平衡 1 h。其後再加入等量之 4°C 第二階段稀釋液 (添加量平分為 3 等分，每等分加入之間隔時間為 10 min)，使精液混合液中最終甘油濃度為 7%，而最終精子濃度 $200-250 \times 10^6$ sperms/mL。第二階段稀釋液添加完畢後靜置 10 min，並於 4°C 下將精液裝填入 0.5 mL 法式麥管 (French straw) 中，封口後置入電腦程式化自動冷凍降溫儀之麥管架，移入預先降溫至 4°C 之電腦程式化自動冷凍降溫儀中平衡 90 min。其後依序以 4°C 至 0°C (-15°C/min)，0°C 至 -110°C (-60°C/min)，-110°C 至 -180°C (-30°C/min) 等三階段之降溫程序完成精液冷凍，而本試驗之冷凍降溫過程中無設定植冰 (seeding) 程序。最終將麥管投入液態氮中儲存，以備後續冷凍精液解凍後精子活力之評估。所有不同試驗處理之冷凍精液自液態氮桶移出後，立即投入 37°C 水浴槽中 30 sec 解凍。解凍後再進行相關精子活力 (motility) 之評估。

表 3. 不含甘油之不同 LDL 濃度山羊精液冷凍稀釋液之滲透壓

Table 3. The osmotic pressure of different LDL concentration of goat semen cryopreservation extenders absence glycerol

Extenders	Osmotic pressure (mOsm/kg)
TCG	267
TCG contain 2.5% LDL	259
TCG contain 3% LDL	257
TCG contain 4% LDL	253
TCG contain 5% LDL	249
TCG contain 6% LDL	247
TCG contain 7% LDL	242
TCG contain 7.5% LDL	239
TCG contain 10% LDL	229
TCG contain 15% LDL	204
TCG contain 20% LDL	170
TCG containing 20% egg yolk (control)	265

VII. 精子活力評估

利用電腦精子分析系統 (computer-assisted sperm analysis, CASA) 與 VideoTesi-ZooSperm 1.0 軟體, 評估精子活力 (motility)、velocity average path (VAP): 平均移動路徑 ($\mu\text{m/s}$); velocity straight line (VSL): 直線移動速率 ($\mu\text{m/s}$); curvilinear velocity (VCL): 曲線移動速率 ($\mu\text{m/s}$); lateral head displacement (ALH): 精子頭部擺動振幅 (μm); beat cross frequency (BCF): 精子頭部擺動與平均路徑交叉的次數 (Hz); linearly (LIN): 直線前進之比率 (VSL/VCL, %); straightness (STR): 直線趨勢 (VSL/VAP, %) 等移動能力參數 (movement characteristics)。

VIII. 試驗設計

本研究分三試驗進行, 分別以不同間距添加, 而 LDL 添加之百分比皆以乾物質重計算之。第一次以每 5% 為間距 (0, 5, 10, 15 及 20% LDL); 第二次以 2.5% 為間距 (0, 2.5, 5, 7.5 及 10% LDL); 第三次則以 1.0% 為間距 (0, 3, 4, 5, 6 及 7% LDL) 進行試驗。取自 3 頭阿爾拜因公羊之供試精液分別測定射精量、顏色及 pH 值及活力 (活力值須大於 70%), 之後將 3 頭公羊之精液混合, 測定精子濃度後方用於試驗。試驗以含 20% 蛋黃之 Tris-citric acid-glucose (TCG) 稀釋液為對照組, 不論對照組或試驗組皆含有最終濃度為 7% 之甘油且所有試驗中稀釋液 pH 值皆調整至 6.6。試驗將比較各組稀釋液間之精液於冷凍解凍後對精子活力及移動能力之差異性。本研究所有試驗均為三重複。

IX. 統計分析

本研究中各處理組別之精子活力及移動能力之差異均以 statistical analysis system 9.2 (SAS 9.2) 進行一般線性模式分析 (general linear model, GLM)，再以鄧肯多變域分析法 (Duncan's multiple range test) 評估各處理間之差異性，所有處理組別間差異性以 $P < 0.05$ 表示。

結果

本研究由雞蛋蛋黃中萃取 LDL 之回收率可達 60.37%。而其成分之化學分析結果，水分為 57.07%，而含量為 42.83 的乾物質中，粗脂肪佔 75.06%，總蛋白質則為 648.17mg/kg (表 4)。萃取物之 SDS-PAGE 電泳結果顯現之 175、140、80、65、60 及 15 kDa 等六個紋帶 (圖 1) 之結果，與 Muossa *et al.* (2002) 由雞蛋蛋黃中萃取所得 LDL 之 SDS-PAGE 結果相符合，故判斷試驗中由雞蛋蛋黃中萃取所得之物質應為 LDL。

稀釋液中添加 LDL 之濃度對山羊精子冷凍解凍後活力之影響評估，則依照 LDL 濃度間距不同共分成 3 次 (5%、2.5%、1% 間距) 進行，結果如表 5 至表 7 所示。當以 5% LDL 為一區間 (表 5)，分別測試於稀釋液中添加濃度介於 5-20% 間之 LDL 濃度對山羊冷凍精液解凍後精子活力之影響，結果顯示解凍後精子之活力 (motility) 表現以添加 5% LDL (63.90%) 之處理組最佳，並顯著高於對照組 (20% egg yolk, 34.05%) 及 0%、10%、15% 及 20% LDL 之處理組 (35.15 - 57.26%) ($P < 0.05$)，其中又以未添加 LDL (0%) 之處理組最差 (20.25%)，並顯著低於其他處理組與對照組 ($P < 0.05$)。然而添加 10% LDL 之處理組 (57.26%) 之精子活力除顯著低於 5% LDL 組外 ($P < 0.05$)，均顯著高於其他處理組及對照組 ($P < 0.05$)，且當 LDL 添加量超過 10% 之後，精子之活力開始下降 [15% LDL 組 (37.97%)；20% LDL 組 (35.15%)] (表 5) 而 VAP 平均移動路徑 ($\mu\text{m/s}$)；VSL 直線移動速率 ($\mu\text{m/s}$)；VCL 曲線移動速率 ($\mu\text{m/s}$)；ALH 精子頭部擺動振幅 (μm)；BCF 精子頭部擺動與平均路徑交叉的次數 (Hz)；LIN 直線前進之比率 (VSL/VCL, %)；STR 直線趨勢 (VSL/VAP, %) 等移動力參數之結果顯示，對照組與 0、5、10、15% LDL 處理組間均無顯著差異存在 ($P < 0.05$)，但均顯著高於 20% LDL 組 ($P < 0.05$) (表 5)。

當以 2.5% LDL 為一區間，LDL 之測試濃度介於 2.5 - 10% 之間 (表 6) 之結果顯示，解凍後精子活力以添加 5% LDL 之處理組 (54.75%) 最佳，並顯著高於對照組與其他處理組 ($P < 0.05$)，而以添加 0% LDL 之處理組 (33.28%) 最差，並顯著低於其他處理組與對照組 ($P < 0.05$) (表 6)；且當 LDL 添加量超過 5% 之後，精子之活力開始下降，其中，7.5% LDL 組與 10% LDL 組之精子活力分別為 45.80% 與 44.20%，兩者間無差異，但顯著高於 20% egg yolk 之對照組 (33.28%) ($P < 0.05$) (表 6)。而 VAP、VSL、VCL、ALH 及 STR 等移動力參數之結果顯示，添加 2.5、5、7.5、10% LDL 之處理組及對照組間均無顯著差異存在，但均顯著高於 0% LDL 組 ($P < 0.05$) (表 6)。

當以 1% LDL 為一區間，LDL 之測試濃度介於 3 - 7% 之間 (表 7)，結果顯示，解凍後精子之活力以添加 4% LDL (72.65%) 之處理組最佳，並顯著高於對照組與其他處理組 ($P < 0.05$)，而以未添加 LDL 組 (0%) 最差 (21.55%)，並顯著低於其他處理組與對照組 ($P < 0.05$) (表 7)；而 VAP、VSL、VCL、BCF 及 STR 等移動力參數之結果顯示 3 - 7% LDL 組間無顯著差異存在，但均顯著高於無添加 LDL 組 (0%) ($P < 0.05$)；而對照組於存活率、VAP、VSL 及 VCL 之結果則顯示均顯著較 3% LDL、4% LDL、5% LDL、6% LDL 及 7% LDL 組差 ($P < 0.05$) (表 7)。

表 4. 雞蛋蛋黃低密度脂蛋白成分

Table 4. The composition of LDL from hen egg yolk

Recovery rate (%)	Moisture (%)	Dry matter (%)	Crude fat (%)	Total protein (mg/kg)
60.37 ± 7.02	57.17 ± 1.85	42.83 ± 1.85	75.06 ± 4.04	648.17 ± 65.56

表 5. 添加 0、5、10、15 及 20% LDL 對山羊精子冷凍解凍後活力及移動參數之影響

Table 5. Effect of extenders supplementation of 0, 5, 10, 15, and 20% LDL to extenders on the motility and movement characteristics of frozen-thawed Alpine goat spermatozoa

	Fresh	Control	0% LDL	5% LDL	10% LDL	15% LDL	20% LDL
Motility (%)	71.07 ± 3.12 ^a	34.05 ± 2.38 ^d	20.25 ± 2.18 ^e	63.90 ± 3.37 ^b	57.26 ± 3.56 ^c	37.97 ± 2.11 ^d	35.15 ± 2.38 ^d
VAP (μm/s)	36.65 ± 4.66 ^a	25.74 ± 6.27 ^a	22.19 ± 15.81 ^{ab}	27.59 ± 2.41 ^a	32.35 ± 2.72 ^a	25.12 ± 1.60 ^a	9.21 ± 9.32 ^b
VSL (μm/s)	29.46 ± 2.98 ^a	22.41 ± 5.04 ^a	19.84 ± 14.84 ^{ab}	24.34 ± 0.14 ^a	29.00 ± 4.05 ^a	22.85 ± 1.76 ^a	8.59 ± 8.56 ^b
VCL (μm/s)	68.25 ± 5.64 ^a	60.20 ± 4.31 ^a	68.82 ± 27.97 ^a	75.64 ± 5.01 ^a	78.93 ± 8.21 ^a	57.95 ± 1.17 ^a	30.16 ± 19.45 ^b
ALH (μm)	1.22 ± 0.14 ^a	0.94 ± 0.02 ^a	1.12 ± 0.45 ^a	1.27 ± 0.11 ^a	1.25 ± 0.12 ^a	0.92 ± 0.11 ^a	0.47 ± 0.33 ^b
BCF (Hz)	7.09 ± 0.36 ^{ab}	7.76 ± 0.63 ^a	6.73 ± 2.51 ^{ab}	8.27 ± 0.16 ^a	8.43 ± 0.09 ^a	8.70 ± 0.25 ^a	4.18 ± 3.28 ^b
STR (%)	81.87 ± 1.02 ^a	79.67 ± 6.07 ^a	62.37 ± 25.78 ^{ab}	85.03 ± 1.95 ^a	83.42 ± 1.73 ^a	87.91 ± 2.37 ^a	44.87 ± 36.11 ^b
LIN (%)	54.03 ± 4.29 ^a	37.50 ± 5.33 ^{ab}	24.97 ± 17.51 ^{bc}	38.96 ± 0.52 ^{ab}	41.45 ± 1.62 ^{ab}	40.31 ± 1.32 ^{ab}	18.19 ± 19.86 ^c

Values are mean ± S.E.M., replication=3.

Control: Tris-citric acid-glucose extender containing 20% egg yolk.

^{a, b, c, d, e} Values in the same row with different letters means significantly difference ($P < 0.05$).

表 6. 添加 0、2.5、5、7.5 及 10% LDL 對山羊精子冷凍解凍後活力及移動參數之影響

Table 6. Effect of extenders supplementation of 0, 2.5, 5, 7.5, and 10% LDL to extenders on the motility and movement characteristics of frozen-thawed Alpine goat spermatozoa

	Fresh	Control	0% LDL	2.5% LDL	5% LDL	7.5% LDL	10% LDL
Motility (%)	73.61 ± 2.91 ^a	33.28 ± 5.62 ^d	18.20 ± 0.61 ^e	32.57 ± 6.86 ^d	54.75 ± 2.07 ^b	45.80 ± 2.05 ^c	44.20 ± 3.39 ^c
VAP (μm/s)	28.20 ± 6.64 ^a	19.86 ± 3.96 ^b	12.15 ± 6.34 ^c	21.63 ± 4.36 ^{ab}	18.34 ± 3.50 ^b	19.15 ± 10.03 ^{bc}	17.08 ± 7.03 ^{bc}
VSL (μm/s)	20.34 ± 3.24 ^a	18.30 ± 4.01 ^{ab}	10.45 ± 6.29 ^c	19.28 ± 3.42 ^{ab}	16.53 ± 3.28 ^{ab}	17.17 ± 9.77 ^{abc}	15.66 ± 7.03 ^{bc}
VCL (μm/s)	62.77 ± 6.08 ^a	58.98 ± 11.60 ^{ab}	44.54 ± 10.81 ^c	60.04 ± 15.96 ^{ab}	56.02 ± 7.19 ^{ab}	55.24 ± 17.55 ^{bc}	52.47 ± 3.67 ^{abc}
ALH (μm)	1.01 ± 0.09 ^a	0.92 ± 0.15 ^{ab}	0.75 ± 0.18 ^c	0.98 ± 0.25 ^{ab}	0.90 ± 0.17 ^{ab}	0.92 ± 0.30 ^{bc}	0.83 ± 0.17 ^{bc}
BCF (Hz)	13.27 ± 6.71 ^a	9.00 ± 0.26 ^{ab}	8.88 ± 2.01 ^b	9.34 ± 1.44 ^{ab}	9.04 ± 0.63 ^{ab}	8.98 ± 1.20 ^{ab}	9.32 ± 1.44 ^{ab}
STR (%)	70.45 ± 5.44 ^{ab}	83.31 ± 2.46 ^a	66.67 ± 22.69 ^b	72.49 ± 10.37 ^{ab}	74.49 ± 7.55 ^{ab}	74.13 ± 12.20 ^{ab}	82.46 ± 14.75 ^{ab}
LIN (%)	34.32 ± 2.14 ^a	29.98 ± 3.20 ^{ab}	25.62 ± 13.76 ^b	26.86 ± 3.81 ^{ab}	27.15 ± 3.33 ^{ab}	27.44 ± 6.12 ^{ab}	30.22 ± 8.93 ^{ab}

Values are mean ± S.E.M., replication=3.

Control: Tris-citric acid-glucose extender containing 20% egg yolk.

a, b, c, d, e Values in the same row with different letters means significantly different ($P < 0.05$).

表 7. 添加 0、3、4、5、6 及 7% LDL 對山羊精子冷凍解凍後活力及移動參數之影響

Table 7. Effect of extenders supplementation of 0, 3, 4, 5, 6, and 7% LDL to extenders on the motility and movement characteristics of frozen-thawed Alpine goat spermatozoa

	Fresh	Control	0% LDL	3% LDL	4% LDL	5% LDL	6% LDL	7% LDL
Motility (%)	83.81 ± 3.08 ^a	56.61 ± 2.02 ^d	21.55 ± 3.37 ^f	44.26 ± 2.75 ^e	72.65 ± 2.40 ^b	67.23 ± 2.53 ^c	66.09 ± 1.95 ^c	67.21 ± 1.83 ^c
VAP (μm/s)	35.69 ± 4.18 ^a	27.74 ± 2.16 ^b	8.68 ± 2.66 ^c	30.04 ± 1.13 ^{ab}	35.27 ± 0.55 ^a	31.77 ± 0.88 ^{ab}	35.77 ± 2.11 ^a	30.29 ± 2.51 ^{ab}
VSL (μm/s)	30.55 ± 3.52 ^a	24.60 ± 2.26 ^b	7.26 ± 3.14 ^c	25.64 ± 2.10 ^{ab}	29.14 ± 0.93 ^{ab}	27.06 ± 1.12 ^{ab}	0.46 ± 3.51 ^a	26.17 ± 4.35 ^{ab}
VCL (μm/s)	54.91 ± 6.33 ^c	71.84 ± 2.42 ^{dc}	42.83 ± 8.02 ^f	77.74 ± 3.98 ^{bcd}	90.95 ± 4.59 ^a	85.65 ± 1.76 ^{abc}	88.11 ± 1.36 ^{ab}	75.25 ± 8.80 ^{ode}
ALH (μm)	1.06 ± 0.06 ^c	1.28 ± 0.01 ^b	0.76 ± 0.10 ^d	1.32 ± 0.07 ^{ab}	1.49 ± 0.09 ^a	1.44 ± 0.11 ^{ab}	1.44 ± 0.06 ^{ab}	1.26 ± 0.10 ^b
BCF (Hz)	7.00 ± 0.88 ^b	8.35 ± 0.10 ^a	5.56 ± 0.77 ^c	8.41 ± 0.10 ^a	8.42 ± 0.10 ^a	8.37 ± 0.10 ^a	8.52 ± 0.15 ^a	8.40 ± 0.04 ^a
STR (%)	77.36 ± 13.76 ^a	85.42 ± 1.38 ^a	55.73 ± 8.01 ^b	83.85 ± 3.53 ^a	82.47 ± 0.53 ^a	83.94 ± 0.44 ^a	84.70 ± 3.64 ^a	84.70 ± 2.34 ^a
LIN (%)	52.07 ± 8.32 ^a	36.28 ± 0.97 ^b	16.10 ± 5.02 ^c	37.05 ± 1.61 ^b	36.42 ± 0.93 ^b	36.14 ± 1.08 ^b	36.48 ± 0.50 ^b	38.85 ± 2.21 ^b

Values are mean ± S.E.M., replication=3.

Control: Tris-citric acid-glucose extender containing 20% egg yolk.

a, b, c, d, e, f Values in the same row with different letters means significantly different ($P < 0.05$).

討論

由試驗之綜合結果發現，於 TCG 稀釋液中添加 4% LDL 與傳統含有 20% 蛋黃之對照組相較於解凍後之精子活力 (72.65% vs. 56.61%) 與 VAP (35.27% vs. 27.74%)、VCL (90.95% vs. 71.84%) 及 ALH (1.49% vs. 1.28%) 等移動參數皆明顯較佳 ($P < 0.05$)。因此，山羊精液稀釋液中添加 LDL 似可以完全取代 20% 蛋黃之使用。本試驗之最佳結果為稀釋液中添加 4% LDL，此值雖看似低於 Ali Al Ahmad *et al.* (2008) 所得山羊冷凍精液 (Saenens 及 Alpines) 之最佳 LDL 添加量 8% 以及 Moussa *et al.* (2002) 與 Amirat-Briand *et al.* (2009) 提出牛 (Holstein bull) 冷凍精液中最適 LDL 添加量為 8% 之結果，但上述研究所使用之 LDL 百分比是以濕重計算之，而本試驗則以乾物質重為換算單位，因此若統一以乾物質作為基算標準，則以上述研究之 LDL 萃取物之乾物質約為 40% 計算，其 LDL 的實際濃度則為約為 3.2% [40% (乾物質百分比) × 8%]。一般而言，蛋黃之乾物質約佔 50%，又 LDL 佔蛋黃乾物質

之 67%，又 LDL 佔蛋黃乾物質之 67%，故含有 20% 蛋黃之對照組，估算其內之 LDL 約為 6-7% 之間。因此若比較 20% 蛋黃與 6% 及 7% LDL 之精液活力數值，則發現 20% 蛋黃組在精子活力 (56.61%) 上顯著低於本研究之稀釋液中添加 6% 或 7% LDL 組 ($P < 0.05$)。因此說明蛋黃中可能仍有物質不利於山羊精液之冷凍保存。在 Pace and Graham (1974) 之研究中即指出蛋黃成分中之水溶性物質 (water soluble fraction) 與顆粒 (granules)，均不利於精液冷凍解凍後之精子活力；相同之論點亦在綿羊精液冷凍解凍研究中被證實 (Watson and Martin, 1975)。Demianowicz and Strzezek (1996) 之研究則將蛋黃中之 LDL 與 HDL (high density lipoprotein) 分開。結果發現利用含 LDL 稀釋液之冷凍解凍後精液品質顯著優於使用含 HDL 者 (內含 granules)。此外，本研究所使用之 LDL 經硫酸銨移除蛋黃中之 β -livetina，而研究指出 β -livetina 之存在將導致精液品質之下降 (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008)，而蛋黃與 LDL 成分之差異係為本研究結果所得之適當 LDL 濃度較 20% egg yolk 具更佳精液保存效益之主要原因。此外，表 3 之結果顯示，當 LDL 添加量達 15-20% 時，其 VAP (9.21 $\mu\text{m/s}$ vs. 25.74 $\mu\text{m/s}$)、VSL (8.59 $\mu\text{m/s}$ vs. 22.41 $\mu\text{m/s}$)、VCL (30.16 $\mu\text{m/s}$ vs. 60.20 $\mu\text{m/s}$)、ALH (0.47 μm vs. 0.94 μm)、BCF (4.18 Hz vs. 7.76 Hz)、STR (44.87% vs. 79.67%) 及 LIN (18.19% vs. 37.50%) 均顯著低於含 20% 蛋黃之對照組 ($P < 0.05$)。此一結果可能與稀釋液滲透壓有關 (相關數據未顯現於本報告)，含 20% 蛋黃之對照組在未添加甘油前之滲透壓為 265 mOsm/kg (測定值)，而 15-20% LDL 於未添加甘油前之滲透壓已明顯降至 204 及 170 mOsm/kg (測定值)，相較於活體動物細胞正常滲透壓範圍 300 ± 30 mOsm/kg 來說，已經過低，而 Moussa *et al.* (2002) 研究中亦指出，過低的滲透壓會導致精子死亡。綜此，阿爾拜因山羊精液稀釋液中添加 LDL 似可完全取代傳統稀釋液中使用之 20% 蛋黃，且添加量以 4% 為宜。

參考文獻

- Ali Al Ahmad, M. Z., G. Chatagnon, L. Amirat-Briand, M. Moussa, D. Tainturier and M. Anton. 2008. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod. Domest. Anim.* 43(4): 429-436.
- Amirat-Briand, L., D. Benchairif, O. Vera-Munoz, H. Bel Hadj, S. Destrumelle, S. Desherces, E. Schmidt, M. Anton and D. Tainturier. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. *Theriogenology* 71(8): 1209-1214.
- Amirat-Briand, L., D. Tainturier, L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gerard, J. L. 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(5): 895-907.
- Bogart, R. and D. T. Mayer. 1950. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. *J. Anim. Sci.* 9(2): 143-52.
- Corteel, J. M. 1992. Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. In: *Proc. 5th Int. Conf. on Goats*, Vol. II, New Delhi, India, pp. 290-297.
- Demianowicz, W. and J. Strzezek. 1996. The effect of lipoproteins fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod. Dom. Anim.* 31(1): 279-280.
- Foulkes, J. A. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 49(2): 277-284.
- 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(1): 42-52.
- Hu, S., Y. Xie, P. Ramachandran, R. Loo, Y. Li and J. A. Loo. 2005. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics* 5(6): 1714-1728.
- Kampschmidt, R. F., D. T. Mayer and H. A. Herman. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 36(7): 733-742.
- Medeiros, C. M. O., F. Forell, A. T. D. Oliveirera and J. L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology* 57(1): 327-344.
- Moussa, M., V. Martinet, A. Trimeche, D. Tainturier and M. Anton. 2002. Low density lipoprotein extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57(6): 1695-1706.
- Pace, M. M. and E. F. Graham. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.* 39(6): 1144-1149.
- Phillips, P. H. 1939. The preservation of bull semen. *J. Biol. Chem.* 130 : 415.
- Polge, C. 1980. Freezing of spermatozoa. In *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*. (M. J. Ashwood-Smith and J. Farrant, Eds.), pp. 45-64. Pitman London.
- 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(2): 145-152.

Effects of low-density lipoprotein on frozen-thawed semen quality of Alpine goats

Ting-Chieh Kang⁽²⁾ Perng-Chih Shen⁽³⁾ Hsiang- Lin Hsing⁽⁴⁾
Yu-Hsin Chen⁽²⁾ Fung-Hsiang Chu⁽²⁾ and Lih-Ren Chen⁽²⁾⁽⁵⁾

Received: Aug. 6, 2011 ; Accepted: Dec. 15, 2011

Abstract

The objective of this study is to investigate the effects of concentration of low-density lipoprotein (LDL) on frozen-thawed semen motility in Alpine goats. The present study established a method for LDL extraction from hen's egg yolk. The recovery rate was 60.37%. In this study, various concentrations of LDL (between 0 and 20%, w/v) were added into freezing extenders for Alpine goat semen cryopreservation. The results showed that the motility (72.65%) of frozen-thawed Alpine goats semen cryopreserved in extender containing 4% LDL were significantly better than those of other treatment groups and the control group (containing 20% egg yolk) ($P < 0.05$). In conclusion, egg yolk commonly used as a cryoprotectant in Alpine goat semen cryopreservation extender could be substituted with LDL. In addition, the cryopreservation extender containing 4% LDL achieved the best cryopreservation effect for the Alpine goat semen.

Key words: Alpine goat, Low density lipoprotein, Semen cryopreservation, Sperm motility.

(1) Contribution No. 1720 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physical Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Department of Animal science, National Pintung University of Science and Technology, Neipu, Pintung, 912101, Taiwan, R. O. C.

(4) Breeding and Genetic Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, 71246, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw