

# 稀釋液之 pH 值對阿爾拜因山羊冷藏 (4°C) 及冷凍 (-196°C) 精液品質之影響<sup>(1)</sup>

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

收件日期：102 年 2 月 21 日；接受日期：102 年 7 月 1 日

## 摘 要

本研究旨在探討含 4% 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的 Tris-citric acid-glucose (TCG) 稀釋液於不同之 pH 值條件下，對阿爾拜因山羊精液冷藏及冷凍精液解凍後品質之影響。試驗中評估之稀釋液 pH 值範圍介於 5.7 – 8.1。試驗結果顯示，在 4°C 冷藏儲存 72 h 後之精子活動能力、存活率及頭帽完整性，以 pH 值為 6.9 者均較其他組別者佳 ( $P < 0.05$ )；精液於 -196°C 冷凍試驗結果則顯示，冷凍精液解凍後，於 37°C 培養 6 h 之精子活動能力、存活率及頭帽完整性，亦以 pH 6.9 組顯著優於其他各組 ( $P < 0.05$ )。綜合結果說明，應用含 4% LDL 之 TCG 稀釋液作為阿爾拜因山羊精液之 4°C 冷藏及 -196°C 冷凍之稀釋液時，調整其 pH 值至 6.9 可得到較佳之精液品質。

關鍵詞：阿爾拜因山羊、低密度脂蛋白、pH 值、精液品質。

## 緒 言

山羊冷凍精液製作時，稀釋液之 pH 值若變動劇烈，將會導致精子死亡、受精能力及活力的喪失 (Mann, 1954)。研究發現，山羊精子代謝後之 pH 值變化範圍約在正負 0.3 個 pH 值之間 (Fukuhara and Nishikawa, 1973)，而動物於自然條件下，精漿所扮演之其中一項重要角色便是維持精子所處環境中 pH 值之恆定 (Mann, 1954)；然而在製作山羊冷凍精液時，稀釋液多以蛋黃為基質，而精漿中含有源自尿道球腺 (bulbourethral gland) 分泌的蛋黃凝集酵素 (egg yolk-coagulating enzyme, EYCE)，會將蛋黃中卵磷脂水解成為脂肪酸及具毒性之溶血卵磷脂 (lysolecithin) (Pellicer-Rubio *et al.*, 1997)。這些水解產物對精子具有毒性 (Aamdal *et al.*, 1965)。水解反應亦使精子細胞膜產生膜融合現象，進而引發頭帽反應 (Upreti *et al.*, 1999) 和染色質去緻密化反應 (Sawyer and Brown, 1995)，因此在製作冷凍精液時通常會將精漿予以移除，以避免上述之情形發生。有研究指出若稀釋液之 pH 值過低，將導致精子代謝活性及細胞呼吸作用之下降 (Latif *et al.*, 2005)；而當稀釋液 pH 值過高時，則將使精子提早發生頭帽反應及獲能作用，而致細胞衰竭死亡 (Oliphant *et al.*, 1977；Murphy and Yanagimachi, 1984；Nagae and Srivastara, 1986)，一般用於山羊精子之稀釋液多維持於 pH 6.0 – 8.0 之範圍 (Good *et al.*, 1966；Graham *et al.*, 1972)。常用之蛋黃與脫脂乳為基質之稀釋液，其 pH 值則落在 6.8 之譜 (Ritar and Salamon, 1982；Salamon and Ritar, 1982；Deka and Rao, 1987；Tuli and Holtz, 1992；Chauhan *et al.*, 1994)。Jaiswal and Majumder (1998) 發現若增加細胞外 pH 值則細胞內 pH 值隨之增加，此可使源自於山羊附睪不具活動能力之精子前進活動力增加，且會促使可誘發精子獲能作用之指標性酵素蛋白質激酶 A (protein kinase A) 的活化 (Visconti and Kopf, 1998)。由於上述相關研究得知，精漿移除後對精子所在環境之 pH 調節能力喪失，需完全由人工添加稀釋液中的緩衝系統所取代，因此，稀釋液中 pH 值之調整是否得宜，對山羊冷凍精液解凍後之精液品質影響甚巨。而低密度脂蛋白 (low density lipoprotein) 應

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1915 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 臺南市動物防疫保護處。

(4) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(5) 通訊作者，E-mail：pcshen@mail.npust.edu.tw。

用於牛 (Amirat-Briand *et al.*, 2004, 2010; Hu *et al.*, 2010, 2011)、山羊 (Eiman and Terada, 2004; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008) 及狗 (Varela Junior *et al.*, 2009) 等動物冷凍精液稀釋液中以評估其對冷凍解凍後精液品質影響之報告甚多，並證實 LDL 對冷凍精液解凍後精液品質有正面之影響。一般而言，射精量較多之動物其原精液 pH 值趨向中至微鹼性，如馬 (pH 7.2 – 7.8) 及豬 (pH 7.3 – 7.8) 等；射精量較少之動物則偏中至酸性，如牛 (pH 6.4 – 7.8) 及綿羊 (pH 5.9 – 7.3) (Garner and Hafez, 2000)；在台灣有關山羊精液的冷凍精液製作，其稀釋液在未調整 pH 值條件下亦可得不錯之解凍後精液品質 (楊等, 2003; 吳, 2007; 章等, 2008; 王等, 2009)。惟仍有報告認為冷凍山羊精液所使用稀釋液之 pH 值範圍應以 6.75 – 6.8 為佳 (Ritar and Salamon, 1982; Salamon and Ritar, 1982; Deka and Rao, 1987; Tuli and Holtz, 1992; Chauhan *et al.*, 1994)。然而，上述研究中所使用之稀釋液中，均非只單獨添加 LDL 者。有關 LDL 對動物冷凍精液解凍後具有正面效果之研究雖多，然於稀釋液中之最適 pH 值卻未多做著墨。因此，本研究以含 4% LDL 之 TCG 稀釋液為山羊冷凍精液之稀釋液，進一步探討稀釋液之 pH 值對山羊精液冷凍解凍後精液品質之影響，期能尋得較佳之 pH 值範圍。

## 材料與方法

### I. 公山羊精液採集及精漿去除

本試驗所需之公山羊精液係分別採集自 3 頭阿爾拜因品種性成熟公山羊，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。精液收集於 15 mL 離心管後加入 4 倍量 pH 值為 7.2 之精漿洗滌操作液，輕輕柔混勻後，以 275 × g，離心 10 min。去除上層液後再重覆上述步驟乙次，最終留下約 1 mL 的精子混合液供作後續之試驗所需。

### II. 精漿洗滌操作液配製

精漿洗滌操作液中各成份溶液需先配製成濃縮液，各成分溶液之濃縮液配製方法如表 1 所示；各成分溶液濃縮液配製完成後再依表 2 之比例混勻並調整 pH 值至 7.0 後始為精漿洗滌操作液。

表 1. 精漿洗滌操作液中各成份溶液濃縮液配方

Table 1. The composition stock of goat semen plasma eluent

Composition	0.9%	1.15%	0.61%	2.11%	3.82%	5.34%	phosphate
	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	glucose anhydrate	buffer
Weight (g)	0.9	1.15	0.61	2.11	3.82	5.34	–
Volume (mL)	100	100	100	100	100	100	–

表 2. 精漿洗滌操作液配方

Table 2. The composition of goat semen plasma eluent working solution

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

### III. 稀釋液配製

各試驗組之第一階段稀釋液以 2.42 g Tris、1.48 g citric acid、1.00 g glucose、250 μg gentamicine、150 μg penicillin 及 4% LDL 為主成分，各組分別以 1N NaOH 調整 pH 值為 5.7、6.0、6.3、6.6、6.9、7.2、7.5、7.8 及 8.1，最終以二次蒸餾之滅菌水定量到 100 mL。各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。

#### IV. 精液冷藏

新鮮採集之精液經去除精漿後分成數等份，分別移入 pH 值介於 5.7 – 8.1 (間隔為 0.3) 含有 4% LDL 之 Tris-Citric acid-Glucose (TCG) 第一階段稀釋液中，精子濃度調整為  $200 - 250 \times 10^6$  spermatozoa/mL。移入不同 pH 值之各處理組立即 (0 h) 測量其精子之活力 (motility)、存活率 (viability) 及頭帽完整性 (acrosome integrity)。測量完畢後將各處理組之精液移入 4°C 冷藏培養箱中避光培養 72 h，並分別於第 24 h、48 h 及 72 h 取樣回溫至 37°C 後進行精子活動能力、存活率及頭帽完整性之評估。

#### V. 精液冷凍

本試驗中所有精子之冷凍操作皆使用電腦程式化自動冷凍降溫儀 (Ice Cube 14S, Minitub, Germany) 進行。將上述已去除精漿之精液，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至  $400 - 500 \times 10^6$  spermatozoa/mL 之濃度並混合均勻後，移入暗房中，室溫靜置 30 min，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，使精液混合液中最終甘油濃度為 7%，而最終精子濃度為  $200 - 250 \times 10^6$  spermatozoa/mL。第二階段稀釋液添加完畢後靜置 10 min。並於 4°C 條件下將精液裝填入 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。其後依照設定好之降溫程序完成精液冷凍，最後將冷凍精液麥管投入液態氮中儲存，供後續冷凍精液解凍後精子品質之評估。

#### VI. 精液解凍

冷凍精液自液態氮桶取出後立即置入 37°C 水浴槽中 30 sec 解凍，解凍後精液立即評估精子活動能力、存活率及頭帽完整性 (0 h)，並持續於 37°C 培養箱中培養 6 h，並分別於第 3 h 及第 6 h 取出少量精液以評估精子活動能力、存活力及頭帽完整性。冷藏精液之回溫程序同冷凍精液。

#### VII. 精子活動能力評估

精子活動能力 (motility) 係利用電腦精子分析系統 (computer-assisted sperm analysis, CASA) 與 VideoTesi-ZooSperm 1.0 軟體進行評估。

#### VIII. 精子存活率及頭帽完整性評估

精子存活率之評估係利用精子死活套組 LIVE/DEAD sperm viability kit (Invitrogen, L7011) 及 EasyBuffer (EB, IMV ref.022162) 進行精子染色處理後再經由流式細胞儀 (EASCYTE PLUS, IMV, French) 並搭配 EasySoft v5.4.1 beta2 軟體進行分析。精子頭帽完整性之評估則利用 FITC-PNA 及 PI 染色後同樣使用流式細胞儀及 EasySoft v5.4.1 beta2 軟體進行分析。

#### IX. 統計分析

本研究中各處理組之精子活動能力參數差異性均以 statistical analysis system 9.2 (SAS 9.2) 進行一般線性模式分析 (general linear models, 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，所有處理組別間之差異性以  $P < 0.05$  表示。

## 結 果

於 4°C 冷藏條件下，精子之活動能力 (mobility) 表現如表 3 所示。於第 0 h 時，無論其 pH 值為何，處理組間均無顯著差異；冷藏 24 h 後 pH 8.1 ( $52.87 \pm 2.76$ ) 組則顯著低於其他處理組 ( $P < 0.05$ )；冷藏 48 h 後 pH 6.6 ( $80.67 \pm 2.40$ )、pH 6.9 ( $80.80 \pm 1.11$ ) 及 pH 7.2 ( $79.07 \pm 1.83$ ) 組間無顯著差異，但均顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )；經 72 h 培養後所測得之結果則顯示 pH 6.6 ( $76.07 \pm 2.12$ ) 及 pH 6.9 ( $78.30 \pm 2.71$ ) 兩組間無顯著差異，但均顯著優於其他處理組 ( $P < 0.05$ )。存活率如表 4 所示。於第 0 h 時各 pH 值處理組之間均無顯著差異；於冷藏 24 h 後 pH 5.7 ( $86.30 \pm 2.50$ )、pH 6.3 ( $85.10 \pm 1.35$ )、pH 6.6 ( $86.53 \pm 3.69$ )、pH 6.9 ( $88.60 \pm 1.21$ ) 及 pH 7.2 ( $87.33 \pm 1.30$ ) 組之間無顯著差異，但均顯著高於 pH 6.0 ( $81.70 \pm 3.42$ )、pH 7.5 ( $71.40 \pm 1.25$ )、pH 7.8 ( $81.87 \pm 1.70$ ) 及 pH 8.1 組 ( $61.70 \pm 1.76$ ) ( $P < 0.05$ )；而經 48 h 冷藏後之精子存活率表現在 pH 5.7 ( $82.13 \pm 0.85$ )、pH 6.6 ( $83.73 \pm 1.33$ )、pH 6.9 ( $83.30 \pm 1.75$ ) 及 pH 7.2 ( $81.57 \pm 1.45$ ) 組之間無顯著差異，

但均顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )；最終於 72 h 培養後測得之結果則顯示 pH 6.6 ( $82.03 \pm 1.45$ ) 與 pH 6.9 ( $81.60 \pm 0.82$ ) 組之間無顯著差異，唯均顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )。頭帽完整性如表 5 所示。於第 0 h 時 pH 5.7 ( $85.80 \pm 1.20$ )、pH 6.0 ( $86.80 \pm 1.15$ )、pH 6.3 ( $87.43 \pm 1.86$ )、pH 6.6 ( $84.47 \pm 3.92$ ) 及 pH 6.9 ( $84.10 \pm 1.71$ ) 組之間並無顯著差異存在，但均顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )；冷藏 24 h 後 pH 6.9 ( $77.00 \pm 1.40$ ) 組之頭帽完整性顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )；而精子頭帽完整性之表現經冷藏 48 h 及 72 h 後之結果均顯示 pH 6.6 ( $67.67 \pm 1.06$ ,  $55.00 \pm 2.10$ ) 及 pH 6.9 ( $67.97 \pm 1.15$ ,  $57.57 \pm 0.59$ ) 組之間無顯著差異，但均顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )。

以不同 pH 值稀釋液處理之山羊精子在 -196°C 冷凍條件下，解凍後於 37°C 進行培養 0、3 及 6 h 之活動能力表現如表 6 所示。於第 0 h 及第 3 h 時，pH 6.6 ( $66.00 \pm 3.06$ ,  $62.67 \pm 2.38$ ) 及 pH 6.9 ( $69.40 \pm 1.04$ ,  $69.40 \pm 1.04$ ) 組之間無顯著差異存在，但均顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )；解凍後經過 6 h 培養後之精子活動能力則以 pH 6.9 組最佳 ( $61.90 \pm 3.68$ )，並顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )。精子之存活率如表 7 所示，於後續培養第 0 h 及第 3 h 時，pH 6.6 ( $75.07 \pm 1.10$ ,  $73.47 \pm 2.38$ ) 及 pH 6.9 ( $75.30 \pm 1.67$ ,  $75.70 \pm 1.62$ ) 組之間無顯著差異存在，但均顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )；後續培養 6 h 後則以 pH 6.9 ( $70.77 \pm 1.16$ ) 組表現最佳，並顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )。精子頭帽完整性如表 8 所示，於第 0 h 時，pH 6.6 ( $65.10 \pm 1.05$ ) 及 pH 6.9 ( $65.67 \pm 1.46$ ) 兩組間無顯著差異，但均顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )；後續培養 3 h 及 6 h 之頭帽完整性則均以 pH 6.9 組 ( $64.00 \pm 1.15$ ,  $53.60 \pm 1.45$ ) 為最佳，並顯著高於其他處理組 ( $P < 0.05$ )。

綜觀阿爾拜因山羊精子以不同 pH 值之稀釋液處理後，於 4°C 冷藏保存 0、24、48 及 72 h 後之結果，以及經 -196°C 冷凍解凍後繼續培養 0、3 及 6 h 之活動能力、存活率與頭帽完整性評估之結果均顯示，以調整稀釋液之 pH 值為 6.9 時為最佳。

## 討 論

Hafez 於 2000 年指出由於山羊之射精量較少，其原精液之 pH 值屬中性偏酸，其 pH 值範圍在 5.9–7.3 之間，此一範圍之差異可能係不同地區之羊隻，其飼料原料、飲水與飼養環境所致。楊等 (2003) 曾報導台灣地區山羊之原始精液 pH 值為 6.6；因此在製作山羊冷凍精液時，多數之研究即以其稀釋液原始配製時之 pH 值為之 (黃等, 1997；楊等, 2003；章等, 2008；王等, 2009；Eiman and Terada, 2004；Varela Junior *et al.*, 2009)。惟仍有部份之研究指出在製作山羊冷凍精液時，將其稀釋液之 pH 值調整至 6.6–6.8 之間可得到較佳之結果 (Ritar and Salamon, 1982；Salamon and Ritar, 1982；Deka and Rao, 1987；Tuli and Holtz, 1992；Chauhan *et al.*, 1994；Ali Al Ahmad *et al.*, 2008)。由此可知，稀釋液之 pH 值有可能是影響山羊精液冷凍保存效果之重要關鍵。惟上述研究中之稀釋液皆使用雞蛋全蛋黃為其主要成份，並非單純以 LDL 為之；因此，本研究即以 4% (v/v) 之 LDL 取代雞蛋全蛋黃為 TCG 稀釋液主要成分，進一步評估稀釋液之值對山羊精液冷藏 (4°C) 及冷凍 (-196°C) 解凍後精液品質之影響。結果顯示 pH 值為 6.9 之處理組對山羊精液冷凍解凍後繼續培養 6 h 之各項精液品質數據均顯著優於其他 pH 值處理組 ( $P < 0.05$ )；此一現象亦發現於冷藏保存 72 h 後之各項精液品質數據中 ( $P < 0.05$ )。此與 Ali Al Ahmad *et al.* (2008) 研究指出，使用 LDL 作為冷凍保護劑，將其稀釋液之 pH 值調整至 6.8 之結果相呼應；亦類同於利用全蛋黃為山羊冷凍精液稀釋液主成分時，稀釋液之 pH 值範圍以 6.75–6.8 為最佳之結果 (Ritar and Salamon, 1982；Salamon and Ritar, 1982；Deka and Rao, 1987；Tuli and Holtz, 1992；Chauhan *et al.*, 1994)。綜此可知，進行山羊精液之冷藏與冷凍保存，使用 pH 值與原精液相近之稀釋液，似可得到較佳之回溫及解凍後之精液品質。此外與山羊相似亦屬具有較少射精量之牛而言，當製作公牛冷凍精液所使用之稀釋液 pH 值為 5.4 時，精液解凍後之活動能力 (32%) 將顯著低於利用稀釋液之 pH 值為 6.0 (45%)、6.5 (44%)、7.0 (42%) 所產製者；而人工授精後母畜之懷孕率則以 pH 6.5 之稀釋液所產製者最高 (Foote, 1970)。此正可說明，本研究所得利用含 4% LDL 其 pH 值調整為 6.9 之 TCG 稀釋液進行山羊精液冷凍具有最佳解凍後精液品質之緣由。另一方面，亦有研究指出若稀釋液之 pH 值過低，將導致精子代謝活性及細胞呼吸作用下降 (Latif *et al.*, 2005)；而當稀釋液 pH 值過高時，則將使精子之頭帽反應及獲能作用提早發生，而致細胞衰竭死亡 (Oliphant *et al.*, 1977；Murphy and Yanagimachi, 1984；Nagae and Srivastara, 1986)，這也部份說明何以本研究中利用較酸 (pH 5.7) 或較鹼 (pH 8.1) 之稀釋液所製作之山羊冷凍精液具有較低解凍後精液品質。

表 3. 稀釋液之 pH 值對阿爾拜因山羊精液於 4°C 冷藏不同時間後對精子活動能力之影響  
Table 3. The effects of extenders pH value on the sperm motility of Alpine goat sperm after 4°C storage for different periods

	pH 5.7	pH 6.0	pH 6.3	pH 6.6	pH 6.9	pH 7.2	pH 7.5	pH 7.8	pH 8.1
0 h	89.57 ± 0.78	89.73 ± 1.35	89.87 ± 2.01	89.47 ± 2.58	88.80 ± 0.36	88.90 ± 0.92	88.67 ± 2.57	88.47 ± 1.66	87.97 ± 1.79
24 h	80.80 ± 6.60 <sup>a</sup>	78.30 ± 0.46 <sup>a</sup>	81.63 ± 1.70 <sup>a</sup>	82.93 ± 5.88 <sup>a</sup>	83.93 ± 2.61 <sup>a</sup>	78.93 ± 8.80 <sup>a</sup>	71.80 ± 7.25 <sup>a</sup>	72.70 ± 4.98 <sup>a</sup>	52.87 ± 2.76 <sup>b</sup>
48 h	74.50 ± 0.44 <sup>bc</sup>	71.07 ± 3.71 <sup>cd</sup>	70.00 ± 2.00 <sup>cd</sup>	80.67 ± 2.40 <sup>a</sup>	80.80 ± 1.11 <sup>a</sup>	79.07 ± 1.83 <sup>ab</sup>	66.30 ± 3.68 <sup>d</sup>	61.13 ± 2.32 <sup>e</sup>	15.77 ± 4.74 <sup>f</sup>
72 h	55.90 ± 4.00 <sup>d</sup>	66.03 ± 3.27 <sup>bc</sup>	59.27 ± 0.74 <sup>d</sup>	76.07 ± 2.12 <sup>a</sup>	78.30 ± 2.71 <sup>a</sup>	69.40 ± 6.41 <sup>b</sup>	61.20 ± 2.91 <sup>cd</sup>	25.90 ± 4.20 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>

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

<sup>a, b, c, d, e, f</sup> Means in the same row with different superscript differ significantly (P < 0.05).

表 4. 稀釋液之 pH 值對阿爾拜因山羊精液於 4°C 冷藏不同時間後對精子存活率之影響  
Table 4. The effects of extenders pH value on the sperm viability of Alpine goat sperm after 4°C storage for different periods

	pH 5.7	pH 6.0	pH 6.3	pH 6.6	pH 6.9	pH 7.2	pH 7.5	pH 7.8	pH 8.1
0 h	93.10 ± 1.68	94.00 ± 1.37	95.13 ± 1.66	93.27 ± 1.31	92.50 ± 2.61	95.60 ± 0.56	93.67 ± 1.11	94.73 ± 2.01	94.27 ± 2.28
24 h	86.30 ± 2.50 <sup>a</sup>	81.70 ± 3.42 <sup>b</sup>	85.10 ± 1.35 <sup>ab</sup>	86.53 ± 3.69 <sup>a</sup>	88.60 ± 1.21 <sup>a</sup>	87.33 ± 1.30 <sup>a</sup>	81.23 ± 0.93 <sup>b</sup>	81.87 ± 1.70 <sup>b</sup>	61.70 ± 1.76 <sup>c</sup>
48 h	82.13 ± 0.85 <sup>ab</sup>	80.40 ± 0.79 <sup>bc</sup>	79.03 ± 1.11 <sup>c</sup>	83.73 ± 1.33 <sup>a</sup>	83.30 ± 1.75 <sup>a</sup>	81.57 ± 1.45 <sup>ab</sup>	71.40 ± 1.25 <sup>d</sup>	67.20 ± 1.30 <sup>e</sup>	31.93 ± 1.40 <sup>f</sup>
72 h	70.50 ± 0.87 <sup>d</sup>	71.60 ± 0.95 <sup>cd</sup>	74.37 ± 0.93 <sup>bc</sup>	82.03 ± 1.45 <sup>a</sup>	81.60 ± 0.82 <sup>a</sup>	75.43 ± 1.60 <sup>b</sup>	66.13 ± 4.78 <sup>e</sup>	52.00 ± 1.91 <sup>f</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>g</sup>

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

<sup>a, b, c, d, e, f, g</sup> Means in the same row with different superscript differ significantly (P < 0.05).

表 5. 稀釋液之 pH 值對阿爾拜因山羊精液於 4°C 冷藏不同時間後對精子頭帽完整性之影響  
Table 5. The effects of extenders pH value on the sperm acrosome integrity of Alpine goat sperm after 4°C storage for different periods

	pH 5.7	pH 6.0	pH 6.3	pH 6.6	pH 6.9	pH 7.2	pH 7.5	pH 7.8	pH 8.1
0 h	85.80 ± 1.20 <sup>ab</sup>	86.80 ± 1.15 <sup>ab</sup>	87.43 ± 1.86 <sup>a</sup>	84.47 ± 3.92 <sup>abc</sup>	84.10 ± 1.71 <sup>abc</sup>	82.13 ± 1.10 <sup>cd</sup>	83.70 ± 1.18 <sup>bc</sup>	79.77 ± 0.81 <sup>d</sup>	72.87 ± 2.44 <sup>e</sup>
24 h	69.60 ± 0.66 <sup>c</sup>	70.70 ± 0.44 <sup>bc</sup>	72.93 ± 2.32 <sup>b</sup>	73.27 ± 1.90 <sup>b</sup>	77.00 ± 1.40 <sup>a</sup>	73.33 ± 3.26 <sup>b</sup>	67.67 ± 1.51 <sup>c</sup>	60.33 ± 0.59 <sup>d</sup>	52.03 ± 1.42 <sup>e</sup>
48 h	51.60 ± 1.68 <sup>d</sup>	52.20 ± 1.11 <sup>d</sup>	60.30 ± 0.62 <sup>b</sup>	67.67 ± 1.06 <sup>a</sup>	67.97 ± 1.15 <sup>a</sup>	61.63 ± 1.27 <sup>b</sup>	58.20 ± 1.14 <sup>c</sup>	41.33 ± 0.85 <sup>e</sup>	32.07 ± 1.38 <sup>f</sup>
72 h	30.97 ± 0.96 <sup>cd</sup>	31.87 ± 0.99 <sup>c</sup>	48.90 ± 1.10 <sup>b</sup>	55.00 ± 2.10 <sup>a</sup>	57.57 ± 0.59 <sup>a</sup>	48.67 ± 1.60 <sup>b</sup>	28.97 ± 1.71 <sup>d</sup>	12.83 ± 2.50 <sup>e</sup>	4.97 ± 0.83 <sup>f</sup>

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

<sup>a, b, c, d, e, f</sup> Means in the same row with different superscript differ significantly ( $P < 0.05$ ).

表 6. 稀釋液之 pH 值對阿爾拜因山羊精液經 -196°C 冷凍解凍後精子活動能力之影響

Table 6. The effects of extenders pH value on the sperm motility of Alpine goat sperm after -196°C frozen-thawed

	pH 5.7	pH 6.0	pH 6.3	pH 6.6	pH 6.9	pH 7.2	pH 7.5	pH 7.8	pH 8.1
0 h	52.60 ± 2.55 <sup>d</sup>	62.00 ± 1.57 <sup>bc</sup>	63.50 ± 2.36 <sup>bc</sup>	66.00 ± 3.06 <sup>ab</sup>	69.40 ± 1.04 <sup>a</sup>	61.50 ± 1.35 <sup>c</sup>	53.03 ± 1.12 <sup>d</sup>	53.17 ± 2.82 <sup>d</sup>	47.77 ± 3.01 <sup>e</sup>
3 h	46.67 ± 1.96 <sup>c</sup>	52.50 ± 2.51 <sup>b</sup>	51.70 ± 1.11 <sup>b</sup>	62.67 ± 2.38 <sup>a</sup>	65.83 ± 1.62 <sup>a</sup>	52.97 ± 4.72 <sup>b</sup>	40.23 ± 2.18 <sup>d</sup>	41.10 ± 2.29 <sup>d</sup>	34.13 ± 1.00 <sup>e</sup>
6 h	39.97 ± 3.10 <sup>d</sup>	45.00 ± 3.16 <sup>c</sup>	46.30 ± 2.20 <sup>c</sup>	54.60 ± 1.99 <sup>b</sup>	61.90 ± 3.68 <sup>a</sup>	56.23 ± 1.31 <sup>b</sup>	42.67 ± 1.69 <sup>cd</sup>	38.60 ± 2.17 <sup>d</sup>	32.10 ± 1.20 <sup>e</sup>

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

<sup>a, b, c, d, e</sup> Means in the same row with different superscript differ significantly ( $P < 0.05$ ).

\* The frozen-thawed sperm was cultured at 37°C for 0, 3 and 6 h before analysis.

表 7. 稀釋液之 pH 值對阿爾拜因山羊精液經 -196°C 冷凍解凍後精子存活率之影響  
Table 7. The effects of extenders pH value on the sperm viability of Alpine goat sperm after -196°C frozen-thawed

	pH 5.7	pH 6.0	pH 6.3	pH 6.6	pH 6.9	pH 7.2	pH 7.5	pH 7.8	pH 8.1
0 h	59.33 ± 1.17 <sup>cd</sup>	66.77 ± 1.75 <sup>b</sup>	67.67 ± 1.16 <sup>b</sup>	75.07 ± 1.10 <sup>a</sup>	75.30 ± 1.67 <sup>a</sup>	62.93 ± 2.71 <sup>c</sup>	60.90 ± 2.01 <sup>cd</sup>	58.83 ± 3.01 <sup>de</sup>	56.93 ± 2.84 <sup>e</sup>
3 h	55.37 ± 1.29 <sup>ef</sup>	61.77 ± 2.51 <sup>c</sup>	64.97 ± 1.11 <sup>b</sup>	73.47 ± 2.38 <sup>a</sup>	75.70 ± 1.62 <sup>a</sup>	62.17 ± 4.72 <sup>c</sup>	58.40 ± 2.18 <sup>d</sup>	56.40 ± 2.29 <sup>de</sup>	53.80 ± 1.00 <sup>f</sup>
6 h	45.03 ± 2.81 <sup>d</sup>	51.80 ± 1.61 <sup>c</sup>	53.40 ± 1.60 <sup>c</sup>	60.67 ± 1.24 <sup>b</sup>	70.77 ± 1.16 <sup>a</sup>	60.57 ± 1.07 <sup>b</sup>	52.97 ± 1.85 <sup>e</sup>	53.83 ± 1.53 <sup>c</sup>	51.90 ± 1.21 <sup>d</sup>

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

<sup>a, b, c, d, e, f</sup> Means in the same row with different superscript differ significantly (P < 0.05).

\* The frozen-thawed sperm was cultured at 37°C for 0, 3 and 6 h before analysis.

表 8. 稀釋液之 pH 值對阿爾拜因山羊精液經 -196°C 冷凍解凍後精子頭帽完整性之影響  
Table 8. The effects of extenders pH value on the sperm acrosome integrity of Alpine goat sperm after -196°C frozen-thawed

	pH 5.7	pH 6.0	pH 6.3	pH 6.6	pH 6.9	pH 7.2	pH 7.5	pH 7.8	pH 8.1
0 h	47.50 ± 1.14 <sup>d</sup>	53.50 ± 1.55 <sup>c</sup>	57.83 ± 2.15 <sup>b</sup>	65.10 ± 1.05 <sup>a</sup>	65.67 ± 1.46 <sup>a</sup>	52.13 ± 1.96 <sup>c</sup>	40.80 ± 1.14 <sup>e</sup>	35.07 ± 1.05 <sup>f</sup>	22.93 ± 2.90 <sup>g</sup>
3 h	41.83 ± 1.32 <sup>e</sup>	48.43 ± 0.40 <sup>d</sup>	48.93 ± 0.67 <sup>d</sup>	60.77 ± 1.16 <sup>b</sup>	64.00 ± 1.15 <sup>a</sup>	52.13 ± 1.96 <sup>c</sup>	33.63 ± 1.27 <sup>f</sup>	24.10 ± 0.79 <sup>g</sup>	19.40 ± 0.79 <sup>h</sup>
6 h	34.43 ± 0.59 <sup>d</sup>	42.43 ± 2.06 <sup>c</sup>	44.63 ± 0.97 <sup>c</sup>	48.43 ± 1.36 <sup>b</sup>	53.60 ± 1.45 <sup>a</sup>	47.43 ± 1.36 <sup>b</sup>	25.33 ± 0.67 <sup>e</sup>	21.73 ± 2.05 <sup>f</sup>	13.63 ± 1.26 <sup>g</sup>

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

<sup>a, b, c, d, e, f, g</sup> Means in the same row with different superscript differ significantly (P < 0.05).

\* The frozen-thawed sperm was cultured at 37°C for 0, 3 and 6 h before analysis.

## 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動能力及存活率之影響。畜產研究 42(3)：275–282。
- 吳昇陽。2007。稀釋液成分及精漿去除對山羊精液冷藏和冷凍後精液品質及人工授精後生育能力之影響。碩士論文。屏東科技大學。屏東。
- 章嘉潔、吳昇陽、沈朋志。2008。山羊精液冷凍保存之研究。畜產研究 41(1)：27–34。
- 黃政齊、楊鎮榮、謝瑞春。1997。稀釋液與冷凍保護劑對臺灣山羊精液與胚冷凍保存效果之影響。畜產研究 30(4)：371–377。
- 楊鎮榮、吳錦賢、謝明江、黃政齊。2003。年齡與季節對阿爾拜因與奴比亞公羊精液品質之影響。畜產研究 36(1)：69–82。
- Aamdal, J., O. Lyngest and K. Fossum. 1965. Toxic effect of lysolecithin on sperm. *Nord. Vet. Med.* 17: 633–634.
- 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, S. Pineau, C. Thorin, S. Destrumelle, S. Desherces, M. Anton, M. Jouan, E. Shmitt and D. Tainturier. 2010. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results. *Anim. Reprod. Sci.* 122(3-4): 282–287.
- 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.
- Chauhan, M. S., R. Kapila, K. K. Gandhi and S. R. Anad. 1994. Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrologia* 26(1): 21–26.
- Deka, B. C. and A. R. Rao. 1987. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. *Indian Vet. J.* 64: 591–594.
- Eiman, M. E. A. and T. Terada. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62(6): 1160–1172.
- Foote, R. H. 1970. Influence of extender, extension rate, and glycerolating technique on fertility of frozen bull semen. *J. Dairy Sci.* 42(4): 807–811.
- Fukuhara, R. and Y. Nishikawa. 1973. Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility on goat spermatozoa. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 44(5): 266–274.
- Garner, D. L. and E. S. E. Hafez. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. Page 96–109. In: *Reproduction in Farm Animals*. eds. Hafez, E. S. E. and Hafez, B. Lippincott Williams & Willkins, South Carolina, USA.
- Good, N. E., G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa and R. M. M. Singh. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5(2): 467–477.
- Graham, E. F., B. G. Crabo and K. I. Brown. 1972. Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa I. *Bull. J. Dairy Sci.* 55(3): 372–378.
- Hafez, E. S. E. 2000. Anatomy of male reproduction. In: *Reproduction in Farm Animals*. eds. Hafez, E. S. E. and B. Bellin. Lippincott Williams & Willkins, South Carolina, USA, pp.365–375.
- Hu, J. H., Z. L. Jiang, Q. W. Li, S. S. Zhang, L. S. Zan, Y. K. Li and X. Li. 2011. The advantages of low-density lipoprotein in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* 62(1): 83–87.
- 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 effects of low-density lipoprotein in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 117(1–2): 11–17.
- Jaiswal, B. S. and Majumder, G. C. 1998. Biochemical parameters regulating forward motility initiation in vitro in goat immature epididymal spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.* 10(4): 299–307.
- Latif, L., A. Ijaz, M. Aleem and A. Mahmud. 2005. Effect of osmotic pressure and pH on the short-term storage

- and fertility of broiler breeder sperm. *J. Pakistan Vet.* 25(4): 179–182.
- Mann, T. 1954. On the presence and role of inositol and certain other substances in the seminal vesicle secretion of the boar. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 142(906): 21–32.
- Murphy, S. J. and R. Yanagimachi. 1984. The pH dependence of motility and acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res.* 10(1): 1–8.
- Nagae, T. and P. N. Srivastara. 1986. Induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa by calmodulin antagonist W-7. *Gamete Res.* 14(3): 197–208.
- Oliphant, G., C. L. Cabot and C. A. Singhas. 1977. Nature of the rabbit acrosome reaction-inducing activity of follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 50(2): 245–50.
- Pellicer-Rubio, M. T., T. Magallon and Y. Combarrous. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-Kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 57(5): 1023–1031.
- Ritar, A. J. and S. Salamon. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35(3): 305–312.
- Salamon, S. and A. J. Ritar. 1982. Deep freezing of Angora goat semen: effect of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 35(3): 295–303.
- Sawyer, D. E. and D. B. Brown. 1995. The use on an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reprod. Toxicol.* 9(4): 351–357.
- Tuli, P. K. and W. Holtz. 1992. The effect of zwitterions buffer on the freezability of Boer goat. *Theriogenology* 37(4): 947–951.
- Upreti, G. C., E. L. Hall, D. Koppens, J. E. Oliver and R. Vishwanath. 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 56(2): 107–121.
- Varela Junior, A. S., C. D. Corcini, R. R. Ulguim, M. V. F. Alvarenga, I. Bianchi, M. N. Correa, T. Lucia Jr. and J. C. Deschamps. 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim. Reprod. Sci.* 115(1–4): 323–327.
- Visconti, P. E. and G. S. Kopf. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59(1): 1–6.

# The effect of extender pH value on the quality of cooled (4°C) and frozen (-196°C) Alpine goat semen<sup>(1)</sup>

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

Received: Feb. 21, 2013; Accepted: Jul. 1, 2013

## Abstract

The objective of this study was to investigate the effects of pH between 5.7 - 8.1 (5.7, 6.0, 6.3, 6.6, 6.9, 7.2, 7.5, 7.8, 8.1) of Tris-citric acid-glucose (TCG) extender containing 4% low-density lipoprotein (LDL) on the quality of Alpine goat semen stored at 4°C or -196°C. The results showed that semen stored at 4°C for 72 h, the motility, viability and acrosome integrity of spermatozoa in extender with pH 6.9 was significantly better than those in extenders with other pH values ( $P < 0.05$ ). In the case of frozen (-196°C) semen after thawing and incubating at 37°C for 6 h, the motility, viability and acrosome integrity of spermatozoa in the extender of pH 6.9 were significantly ( $P < 0.05$ ) better than those of other treatments. In conclusion, the 4% LDL-contained TCG extender of pH 6.9 exhibits the better semen quality for Alpine goat semen irrespective of stored at either 4°C or -196°C.

Key words: Alpine goat, Low-density lipoprotein, pH, Semen quality.

---

(1) Contribution No.1915 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Tainan city animal healthy inspection and protection office, Tainan, 70045, Taiwan, R. O. C.

(4) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Neipu, Pingtung, 91201, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: pshen@mail.npust.edu.tw.