

稀釋液中甘油與二甲基亞砜比例對玻璃化冷凍解凍後山羊精子品質之影響⁽¹⁾

康定傑⁽²⁾⁽⁴⁾ 陳裕信⁽³⁾ 曲鳳翔⁽³⁾ 林秀蓮⁽³⁾ 曾楷扉⁽²⁾

收件日期：108 年 11 月 19 日；接受日期：108 年 12 月 26 日

摘 要

本研究主要為利用甘油 (glycerol) 搭配二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 為冷凍保護劑成分，並以 0.25 mL 法式麥管 (French straw) 為載具進行麥管式山羊精液玻璃化冷凍，評估 glycerol (2、4、6%) 與 DMSO (0、3、6、9%) 於各組合中，何種比例之搭配最有利於麥管式玻璃化冷凍解凍後山羊精子之品質之維持。結果顯示 6% glycerol 與 6% DMSO 之組合在活力 ($41.08 \pm 2.13\%$)、存活率 ($55.48 \pm 2.49\%$)、頭帽完整性 ($35.89 \pm 3.02\%$) 及 DNA 完整性 ($71.65 \pm 1.73\%$) 表現均顯著高於其他組別。另外針對最佳組合性能者 (6% glycerol + 6% DMSO)，進一步評估添加 0.5 M 蔗糖 (sucrose) 後對玻璃化冷凍解凍後山羊精子品質是否有更佳之保護效果。結果顯示，添加 0.5 M sucrose 者，解凍後精子存活率 ($55.77 \pm 1.34\%$)、頭帽完整性 ($41.92 \pm 1.25\%$) 及粒線體潛能 ($51.90 \pm 2.19\%$) 之性能表現皆顯著優於未添加者 ($P < 0.05$)。綜合以上結果得知，山羊精液麥管式玻璃化冷凍稀釋液中添加 6% glycerol、6% DMSO 及 0.5 M sucrose 為冷凍保護劑時可獲得較佳之解凍後精子品質。

關鍵詞：山羊、法式麥管、精液玻璃化冷凍。

緒 言

繁殖技術之應用在 20 世紀中有突破性的進展，這些進展顛覆了以往大家對低溫生物科學上的認知。在 20 世紀初首先被開發的繁殖技術便是人工授精 (artificial insemination, AI)。AI 技術發展約 20 年後，Polge (1949) 發現了第一個冷凍保護劑 (glycerol)，並成功的應用 glycerol 將精子冷凍保存。在 1980 代初期，第一頭成功經由體外受精 (in vitro fertilization, IVF) 產製的小牛也順利出世 (Brackett *et al.*, 1980)。雖然在 19 世紀末已揭露造成細胞死亡及冷凍傷害之始作俑者為細胞內部所產生之冰晶 (Molisch, 1897)，然而嚴格來說，此理論直至 20 世紀初始被科學家們瞭解，從而由冷凍生物科學衍生而出繁殖相關冷凍技術。Luyet and Hodapp (1938) 為首次利用青蛙的精液進行玻璃化冷凍，並證實玻璃化冷凍方法可應用於動物精液之冷凍。而 Polge (1949) 重複驗證 Luyet and Hodapp (1938) 之結果，並從中發現 glycerol 可做為精子冷凍時的保護劑，從此開啟了慢速冷凍的研究範疇。時至今日，有兩種主要的冷凍技術被應用在配子冷凍上，一是慢速冷凍法 (slow cryopreservation)，另一則為玻璃化冷凍法 (vitrification)。在冷凍過程中使用之冷凍保護劑 (cryoprotectants) 均具有毒性。慢速冷凍通常使用較低濃度的冷凍保護劑，如此一來使得細胞受到的毒性傷害之威脅相對減低；另外冷凍保護劑的作用便是利用濃度梯度的原理，使細胞內部水分滲透出細胞外，如此一來細胞於冷凍過程中因溫度降至冰點以下而導致細胞內部殘餘水分形成冰晶的機會便下降，然而水分由細胞內移出的過程中，滲透壓的改變會對細胞膜造成緊迫，若冷凍保護劑濃度較低，則此一緊迫現象則較輕微 (Alex and Higgins, 2014)。玻璃化冷凍則是一個迅速的冷凍方法，因其降溫速率高達每分鐘 $100,000^{\circ}\text{C}$ 以上 (He *et al.*, 2008)，因此減少了低溫冷休克 (cold shock) 的發生，此一極高之降溫速率，使得於冷凍過程中，溫度下降得以快速跨過冰晶形成帶，減少了冰晶形成對細胞的傷害。但是玻璃化冷凍並非沒有缺點，其需要較高濃度的冷凍保護劑，因而細胞需要承受之毒性及滲透壓差之緊迫亦較高 (Kasai, 1996; Alex and Higgins, 2014)。此外，玻璃化冷凍的冷凍程序與慢速冷凍法相較，在成本及製作時間上簡單許多，另在許多物種卵母細胞及胚冷凍的結果表現亦優於慢速冷凍

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2627 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

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

(Campos *et al.*, 2016)。本試驗利用 0.25 mL 之法式麥管為載具，裝填精液後進行玻璃化冷凍，評估 DMSO (0 – 9%) 與 glycerol (2 – 6%) 搭配添加於精子玻璃化冷凍保護劑中對冷凍解凍後精子品質之影響。

材料與方法

I. 動物及精液收集

本試驗精液係採集自 3 頭年齡介於 2 – 3 歲之阿爾拜因公羊，採精頻率每週 2 次，每次間隔 2 天以上。

精液採集係使用人工假陰道 (artificial vagina) 法，採集前先予以組裝，於假陰道外殼之注水孔注入 45°C 溫水，使假陰道內襯間夾層呈現約 2/3 之飽滿度，其後再於氣孔吹入定量空氣以維持假陰道內腔適宜的壓力；採精時於假陰道內腔前 1/3 處之表面塗抹對精子無害之潤滑劑 (K-Y 軟膏) (Johnson and Johnson Medical, Limited Gargrave, Skipton, BD23 3RX. U. K.)。人工採精操作時，待公羊駕乘母羊的同時，將公羊陰莖導入假陰道內，直至完成射精動作；其後，並將假陰道之錐形漏斗向下甩動，使精液集中於集精管 (15 mL 離心管) 內而完成精液採集。

II. 精漿之去除

先各別配置重量百分比濃度 0.9% NaCl、1.15% KCl、0.61% CaCl₂、2.11% KH₂PO₄、3.82% MgSO₄ · 7H₂O、5.34% Glucose anhydrate 之溶液。精漿洗滌操作液之配製則依序加入 100 mL 0.9% NaCl、4 mL 1.15% KCl、3 mL 0.61% CaCl₂、0.4 mL 2.11% KH₂PO₄、1 mL 3.82% MgSO₄ · 7H₂O、4.5 mL 5.34% Glucose anhydrate 及 12 mL pH 為 7.4 之磷酸緩衝液 (phosphate buffer)，混勻後調整 pH 至 7.15 – 7.20 之間，並儲存於 4°C 備用。收集於 15 mL 離心管內之精液，除吸取部分精液進行新鮮精液之各項精子品質分析外，其餘之精液加入 3 倍量的精漿洗滌操作液，經輕柔混合後，以 700 × g，離心 10 min，去除上層液後重覆上述步驟乙次，最終留下約 1 mL 的精子混合液供後續之試驗使用。

III. 冷凍保護稀釋液配製

本研究中冷凍保護劑 DMSO 與 glycerol 之濃度依比例不同共分成 12 組 (DMSO : glycerol, v/v%) 最終濃度比值分別為 2 : 0、4 : 0、6 : 0、2 : 3、4 : 3、6 : 3、2 : 6、4 : 6、6 : 6、2 : 9、4 : 9、6 : 9)，配製方式皆以體積比體積為之 (v/v)；因此，glycerol/DMSO 之最終濃度 (%) 分別為 1/0、2/0、3/0、1/1.5、2/1.5、3/1.5、1/3、2/3、3/3、1/4.5、2/4.5、2/4.5%。各冷凍保護劑配方以含 4% 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 之 Tris-citric acid-glucose (4% LDL-TCG) 為基礎液，各冷凍保護劑之添加量則按照 glycerol (2 – 6%) 及 DMSO (0 – 9%) 各組所需之濃度比例配製；稀釋液皆加入 gentamicin 250 µg 及 penicillin 150 µg (表 1)。其後經 0.22 µm 之濾網 (Millipore, millex GP filter unit) 過濾後儲存於 4°C 備用。

表 1. 山羊精液玻璃化冷凍保護劑成分

Table 1. The cryoprotectant components of goat sperm vitrification dilution

Components	
LDL (g) (dry matter)	4
Tris (g)	2.42
Citric acid (g)	1.48
Glucose (g)	1.00
Glycerol (%)	2 – 6
DMSO (%)	0 – 9
Gentamicine (µg)	250
Penicillin (µg)	150
Distilled water (mL)	up to 100

IV. 精液之冷凍

收集之精液依照各試驗所需均分成數等分。每一組之冷凍保護稀釋液添加皆使用二階段方式添加，第一階段冷凍保護稀釋液為僅含 glycerol 者。採集之精液經洗滌精漿後依照各處理組需要之濃度加入第一階段稀釋液

(含 2 – 6% glycerol)，第一階段稀釋液之添加量依照每劑擁有 1×10^9 精子濃度進行添加量計算，添加第一階段稀釋液時，將添加量平分成三等份進行添加，每等份添加間隔時間為 10 min。添加完畢後靜置 120 min，續依照配方之不同分別加入等體積含有 DMSO (0 – 9%) 之第二階段稀釋液。第二階段稀釋液添加完畢並混勻後，立即裝填入 0.25 mL 之法式麥管。麥管裝填方法為先吸取約 80 μ L 不含任何冷凍保護劑之稀釋液 (4% LDL-TCG 基礎液)，製作氣泡後續吸取含有冷凍保護劑之精液混合液 50 μ L，製作氣泡後再吸取約 80 μ L 不含任何冷凍保護劑之稀釋液，最後以 PVA (Polyvinyl alcohol) 粉封口後移入距液態氮液面上 4 cm 處之平臺，維持 30 sec 後立即將麥管插入液態氮中進行玻璃化冷凍。而評估添加 0.5 M sucrose 之試驗時，0.5 M sucrose 添加於第一階段稀釋液中，其餘方法與不同比例 glycerol 及 DMSO 之試驗相同；因此 sucrose 的最終濃度為 0.25 M。

V. 精液之解凍

所有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性狀之評估。

VI. 精子性能分析

精子各項性能之分析皆使用流式細胞儀 (EASCYTE PLUS；法國 IMV 公司) 並搭配 EasySoft v5.4.1 beta2 軟體進行存活率 (viability)、精子頭帽完整性 (acrosome integrity)、粒線體潛能 (mitochondria potential) DNA 完整性 (DNA integrity) 分析，所有操作步驟皆依照操作手冊進行。

VII. 精子活力分析

新鮮精液先以 4% LDL-TCG 稀釋至 6.5×10^6 sperms/mL 之濃度後，吸取 10 μ L 之精液，滴於載玻片上，蓋上蓋玻片後利用電腦精子分析系統與 VideoTesT-ZooSperm 1.0 軟體，評估精子活力 (motility)，詳細操作依操作手冊進行。

VIII. 統計分析

本研究中各處理組別之精子活力、存活率、頭帽完整性、DNA 完整性及粒線體潛能之差異均以統計分析系統 (statistical analysis system, SAS, 2012) 以一般線性模式程序 (general linear models, GLM)，並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。

結果與討論

冷凍保存是長時間保存精子的最有效技術，但是冷凍保存過程中的低溫會對哺乳動物精子產生傷害，導致存活率、DNA 完整性及功能的完整性下降 (Martin *et al.*, 2004; Bucak *et al.*, 2013)。山羊精子因為擁有較低的膽固醇 / 磷脂質比例，導致其冷凍解凍敏感性較其他物種高 (Motamedi-Mojdehi *et al.*, 2013)。現今已有許多稀釋液及冷凍保護劑被開發應用於羊隻精液冷凍 (Soylu *et al.*, 2006)。本研究評估於精子冷凍稀釋液 (4% LDL-TCG) 中添加不同比例 glycerol (2 – 6%) 與 DMSO (0 – 9%) 之冷凍保護劑對山羊精液麥管式玻璃化冷凍解凍後精子品質之影響。冷凍之精液於解凍過程對精子活力、頭帽、細胞膜及 DNA 完整性皆會有不良之影響 (Abdelhakeam *et al.*, 1991)。試驗結果如表 2 所示，在無 DMSO (0%) 存在的狀況下，隨著 glycerol 濃度增加 (2%、4% 及 6%)，解凍後精子活力、存活率、頭帽完整性及粒線體潛能等性能皆會隨之有顯著的增加，其中在 glycerol 濃度為 6% 時之精子活力、存活率與所有處理組中之最佳表現組合 (6% glycerol + 6% DMSO) 相同，在粒線體潛能之表現上甚至顯著高於最佳搭配組，此一結果與 glycerol 用於山羊傳統冷凍精液製作時使用 7% 甘油對精子冷凍解凍保護效果之最佳結果相似 (Farshad *et al.*, 2009; Bezerra *et al.*, 2011)；當 DMSO 於 3% 及 6% 時，精子活力、存活率、頭帽完整性及粒線體潛能基本上均亦隨 glycerol 濃度增加而有較佳之表現。glycerol 及 DMSO 濃度同為 6% 時，除粒線體潛能顯著低於 6% glycerol + 0% DMSO 組外，其餘在精子活力、存活率、頭帽完整性及 DNA 完整性均顯著高於其他組合，為試驗中保護效果最佳之組合。然而當 DMSO 濃度提升至 9% 時，對精子活力、頭帽完整性、DNA 完整性及粒線體潛能之保護能力大幅下降，其中又以頭帽完整性之影響較大；而當 glycerol 濃度亦提升至 6% 之最高量時，在活力、存活率、頭帽完整性之表現均顯著低於其他之組合。綜合上述結果發現，在無 DMSO (0%) 存在下，glycerol 添加量達到 6% 時，進行玻璃化冷凍對於精子的冷凍解凍保護效果均很優異。glycerol 與 DMSO 皆為山羊精液冷凍常見之滲透性冷凍保護劑 (Ritar *et al.*, 1990a, b; Tuli and Holtz, 1994; Kundu *et al.*, 2000; Leboeuf *et al.*, 2000)，可以經由濃度梯度而擴散進入細胞中，其中 glycerol 分子量為 92.094 g/mole，而 DMSO 則為 78.130 g/mole，小分子量之物質可以更快之速度利用擴散原理進入精細胞中。Alex and Higgins (2014) 研究指出在 21°C 條件下，DMSO 之滲透速率為 6.4 μ m/min，而 glycerol

表 2. 稀釋液中添加不同比例之 glycerol 與 DMSO 對山羊精液管式玻璃化冷凍解凍後精子品質之影響

Table 2. The effects of different glycerol and dimethyl sulfoxide ratios in diluent on the goat sperm quality after tube-type vitrified-thawed

Glycerol (%)	DMSO (%)	Motility (%)	Viability (%)	Acrosome Integrity (%)	DNA Integrity (%)	Mitochondria potential (%)
2	0	31.04 ± 1.82 ^c	40.44 ± 0.68 ^f	18.28 ± 1.38 ^{bc}	68.21 ± 1.79 ^{bc}	29.62 ± 0.66 ^{cde}
4	0	36.58 ± 3.33 ^b	46.22 ± 3.21 ^{de}	21.34 ± 1.21 ^{bc}	68.36 ± 0.59 ^{bc}	34.30 ± 3.66 ^{bc}
6	0	40.62 ± 1.51 ^a	54.57 ± 0.91 ^{ab}	28.10 ± 2.20 ^b	69.40 ± 1.04 ^b	38.62 ± 0.97 ^a
2	3	31.93 ± 1.72 ^c	43.19 ± 1.90 ^{ef}	18.83 ± 1.03 ^{bc}	62.69 ± 1.68 ^{def}	28.24 ± 1.74 ^{de}
4	3	36.31 ± 2.45 ^b	42.38 ± 2.22 ^f	19.29 ± 1.23 ^{bc}	64.59 ± 1.94 ^d	33.97 ± 2.86 ^{ab}
6	3	39.17 ± 0.71 ^b	51.78 ± 2.00 ^{bc}	20.79 ± 0.69 ^{bc}	66.80 ± 0.93 ^c	35.96 ± 0.60 ^{ab}
2	6	36.94 ± 1.61 ^b	50.59 ± 1.56 ^c	21.44 ± 1.11 ^{bc}	62.07 ± 0.93 ^{ef}	32.73 ± 1.95 ^{bcd}
4	6	41.00 ± 1.14 ^a	50.73 ± 1.37 ^c	26.15 ± 0.53 ^a	69.19 ± 0.32 ^b	34.68 ± 4.38 ^{ab}
6	6	41.08 ± 2.13 ^a	55.48 ± 2.49 ^a	35.89 ± 3.02 ^a	71.65 ± 1.73 ^a	36.14 ± 0.83 ^b
2	9	29.62 ± 0.67 ^c	48.85 ± 1.98 ^{cd}	14.87 ± 2.32 ^c	64.26 ± 0.32 ^{de}	29.24 ± 0.58 ^{de}
4	9	25.17 ± 2.66 ^d	48.51 ± 0.88 ^{cd}	14.18 ± 1.60 ^c	61.92 ± 1.61 ^{ef}	24.63 ± 0.91 ^{ef}
6	9	21.74 ± 1.68 ^e	33.94 ± 0.71 ^g	12.40 ± 1.90 ^e	60.41 ± 0.72 ^f	24.59 ± 2.05 ^{ef}

Values are mean ± S.E.M., replicate = 10.

^{a, b, c, d, e, f, g} Values in the same column with different superscripts differ (P < 0.05).

表 3. 稀釋液中添加 0.5 M sucrose 對山羊精液管式玻璃化冷凍解凍後精子品質之影響

Table 3. The effects of diluent (6% glycerol + 6% DMSO) presence of 0.5 M sucrose on the goat sperm quality after tube-type vitrified-warmed

Treatment	0.5 M sucrose	Motility (%)	Viability (%)	Acrosome Integrity (%)	DNA Integrity (%)	Mitochondria potential (%)
6% glycerol +	-	40.33 ± 0.82 ^a	53.85 ± 1.42 ^b	35.63 ± 1.63 ^b	69.29 ± 0.98 ^a	37.13 ± 0.94 ^b
6% DMSO	+	47.90 ± 2.22 ^a	55.77 ± 1.34 ^a	41.92 ± 1.25 ^a	69.85 ± 0.88 ^a	51.90 ± 2.19 ^a

Values are mean ± S.E.M., replicate = 8.

^{a, b} Values in the same column with different superscripts differ (P < 0.05).

則僅有 1.0 $\mu\text{m}/\text{min}$ ，兩者有 6.4 倍之差異。一般正常情況下，水分子在 20 – 25°C 條件下的擴散速率是 0.195 – 1.150 $\mu\text{m}/\text{min}$ ，若是滲透速率過高則會導致精子細胞膜內外滲透壓差太大而受到損傷。在細胞或是配子冷凍試驗中，最常被使用的仍為 glycerol。然而這些冷凍保護劑添加之最終濃度 (v/v) 及平衡時間與溫度，需取決於其毒性以及對精子冷凍解凍後精液品質之效益而定。冷凍保護劑通常具有毒性，其中 DMSO 毒性高於 glycerol 甚多 (Kasai, 1996)。此外，如同本試驗，各種冷凍保護劑間可相互搭配使用，如 glycerol (6%) 與 DMSO (5.9%) 組合使用時較兩者單獨使用，在精子解凍後活力表現上有顯著增加之效果 (glycerol + DMSO, glycerol, DMSO; 45% vs. 33% vs. 15%) (Kundu *et al.*, 2001)。此一結果與試驗中 glycerol (6%) 搭配 DMSO (6%) 時會有最佳之精子保護效果之結果符合。然而當 DMSO 添加量達到 9% 時，精子各項性能表現均顯著下降，此結果可顯現出滲透壓及毒性對精子之雙重傷害效果明顯。另有報告指出，利用 DMSO 作為精子冷凍保護劑成分會導致細胞膜受損及膜表面蛋白質變性 (Jomha *et al.*, 2004)，此結論亦與實驗中添加 9% DMSO 時對於頭帽完整性之負面影響最大的結果相符。

以 6% glycerol + 6% DMSO 最佳搭配組進行一步試驗，評估添加 sucrose 對於精子在玻璃化冷凍解凍後之影響。結果顯示 (表 3) 添加 0.5 M sucrose 組，在活力、存活率、頭帽完整性及 DNA 完整性之表現均顯著優於未添加組。先前研究指出，自然形成之精液成分中即有醣類，此等醣類能提供精子進行運動時所需之能量來源，包括果糖 (fructose)、葡萄糖、乳糖 (lactose) 及其他醣類 (Evans and Maxwell, 1987)，然而醣類也有做為精液冷凍稀釋液中平衡滲透壓及冷凍保護劑之功能 (Corteel, 1974; Ritar and Salamon, 1982; Salamon and Ritar, 1982; Evans and Maxwell, 1987)。本試驗之精子稀釋液中有添加葡萄糖，此為山羊精子代謝過程中絕佳且必須的能量來源，可維持精子生理功能正常 (Fukuhara and Nishikawa, 1973; Corteel, 1974)。Fukuhara and Nishikawa (1973) 證實葡萄糖除可提供能量來源外，更有保護精子的作用。單醣與雙醣或多醣在稀釋液中扮演的角色不同；單醣如葡萄糖與果糖，其分子量很小，可經由主動運輸輕易穿過細胞膜進入細胞內，為細胞能量的來源；乳糖、蔗糖、棉子糖 (raffinose)、海藻 (trehalose) 或葡萄聚醣 (glucan) 等雙醣或多醣類，則無法穿過細胞膜，但可在細胞膜外形成一個高滲透壓環境，促進細胞脫水，降低冰晶形成並可穩定細胞膜上磷脂質之安定性，提升解凍後精子的存活率 (Molinia *et al.*, 1994; Aisen *et al.*, 2002)。一般的精液冷凍並不需要如此高濃度之多醣類添加，但在胚或卵母細胞冷凍時添加 0.5 – 0.8 M sucrose 對羊胚冷凍、豬胚冷凍 (Zhang *et al.*, 2009) 及鼠胚冷凍 (Melo *et al.*, 2010) 解凍後之保護效果顯著。本試驗結果顯示，在冷凍保護稀釋液中添加 0.5 M sucrose 對精子玻璃化冷凍解凍後精子品質維持有更佳之效果，顯示出高濃度醣類應用於精子玻璃化冷凍，亦可以有近似應用於卵母細胞及胚冷凍之優良效果。

綜合上述，利用 glycerol 及 DMSO 搭配並添加 sucrose 作為山羊精子玻璃化冷凍之冷凍保護稀釋液時，以 6% glycerol 搭配 6% DMSO 及 0.5 M sucrose 可得到較佳之玻璃化冷凍解凍後精子品質之保護效果。

參考文獻

- Abdelhakeam, A. A., E. F. Graham, I. A. Vazquez and K. M. Chaloner. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. *Cryobiology* 28: 43-49.
- Aisen, E., V. Medina and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
- Alex, M. and A. Z. Higgins. 2014. Membrane permeability of the human granulocyte to water, dimethyl sulfoxide, glycerol, propylene glycol and ethylene glycol. *Cryobiology* 68: 35-42.
- Bezerra, F. S., B. T. S. Castelo, H. M. Alves, I. R. S. Oliveira, G. L. Lima, G. C. X. Peixoto, A. C. S. D. Bezerra and A. R. Silva. 2011. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology* 63: 263-266.
- Brackett, B. G., J. F. Evans, W. J. Donawick, M. L. Boice and M. A. Cofone. 1980. In vitro penetration of cow oocytes by bull sperm. *Arch. Androl.* 5: 6-9.
- Bucak, M. U. N. Keskin, M. Taspinar, K. Cayan, N. Baspinar, M. C. Cenariu, A. Bilgili, C. Qzturk and A. N. Kursunlu. 2013. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology* 67: 34-39.
- Campaos, A. L. M., J. de S. Guedes, J. K. Rodrigues, W. A. P. Pace, R. R. Fontoura, J. P. J. Gaetano and R. M. Marinho. 2016. Comparison between Slow Freezing and Virtrification in Terms of Ovarian Tissue Viability in a Bovine Model. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 38: 333-339.
- Corteel, J. M. 1974. Viabilite des spermatozoids de bouc conserves et congeles avec ou sans leur plasma seminal: effect du glucose. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 14: 741-745.

- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths. Sydney.
- Farshad, A., B. Khalili and P. Fazeli. 2009. The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability of markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. *Pakistan J. Bio. Sci.* 12: 239-245.
- 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: 266-274.
- He, X., E. C. H. Park, A. Fowler, M. L. Tarmush and M. Toner. 2008. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz microcapillary: a study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology* 56: 223-232.
- Jomha, N. M., P. C. Anoop, K. Bagnall and L. E. McGann. 2004. Effects of increasing concentrations of dimethyl sulfoxide during cryopreservation of porcine articular cartilage. *Cell Presev. Tech.* 1: 111-120.
- Kasai, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 67-75.
- Kundu, C. N., K. Das and G. C. Majumder. 2001. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology* 41: 21-27.
- Kundu, C. N., J. Chakraborty, P. Dutta, D. Bhattacharyya, A. Ghosh and G. C. Majumder. 2000. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 40: 117-125.
- Lemboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- Luyet, B. J. and R. Hodapp. 1938. Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 39: 433-434.
- Martin, C., L. Aquilina, C. Gascuel-Oudou, J. Mole'nat, M. Faucheux and L. Ruiz. 2004. Seasonal and inter-annual variations of nitrate and chloride in streamwaters related to spatial and temporal patterns of groundwater concentrations in agricultural catchments. *Hydrological Proces.* 18: 1237-1254.
- Melo, M. S. L., C. S. Sena, F. J. N. Barreto, L. R. Bonjardim, Jr. G. S. Almeida, J. T. Lima, D. P. De Sousa and L. J. Quintans-Junior. 2010. Antinociceptive effect of citronellal in mice. *Pharm. Biol.* 48: 411-416.
- Molisch, H. 1897. *Untersuchungen uber das Erfrieren der Pflangen*. Fischer, Jena. 1-73.
- Molinia, F. C., G. Evans, P. I. Casares and W. M. C. Maxwell. 1994. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 113-122.
- Motamedi-Mojdehi, R., M. Roostaei-Ali Mehr and R. Rajabi-Toustani. 2013. Effect of different levels of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival of ram spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 49: 65-70.
- Polge, C., A.V. Smith and A. S. Parkes. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- Ritar, A. J., P. D. Ball and P. J. Omay. 1990a. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 2: 27-34.
- Ritar, A. J., P. D. Ball and P. J. Omay. 1990b. Artificial insemination of Cashmere goat: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod. Fertil. Dev.* 2: 377-384.
- 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: 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. Sic.* 35: 295-303.
- Soylu, S., H. Yigitbas, E. M. Soylu and S. Kurt. 2006. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1021-1030.
- Tuli, P. K. and W. Holtz. 1994. Effect of glycerolizing procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42: 547-555.
- Zhang, G. F., T. Liu, Q. Wang, L. Chen, J. D. Lei, J. Luo, G. H. Ma and Z. G. Su. 2009. Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: a new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. *Food Hydrocolloids* 23: 2001-2007.

The effects of different glycerol and dimethyl sulfoxide ratios in diluent on the goat sperm quality after tube-type vitrified-thawed ⁽¹⁾

Ting-Chieh Kang ⁽²⁾⁽⁴⁾ Yu-Hsin Chen ⁽³⁾ Fung-Hsiang Chu ⁽³⁾ Hsiu-Lien Lin ⁽³⁾ and Kai-Fei Tseng ⁽²⁾

Received: Nov. 19, 2019; Accepted: Dec. 26, 2019

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of using different glycerol (0, 2, 4 and 6%) / DMSO (0, 3, 6 and 9%) ratios in diluent on the quality of the goat sperm after tube-type (0.25 mL French straw) vitrification and thawing. Results showed that the motility ($41.08 \pm 2.13\%$), viability ($55.48 \pm 2.49\%$), acrosome integrity ($35.89 \pm 3.02\%$) and DNA integrity (71.65 ± 1.73) obtained by using 6% glycerol/6% DMSO were significantly ($p < 0.05$) higher than those of other ratios. Moreover, sucrose (0.5 M) was added to the optimal ratio (6% glycerol / 6% DMSO) to investigate whether the sperm quality could be further improved after vitrified ad thawing. It was found that addition of sucrose (0.5 M) had significantly ($p < 0.05$) increased viability ($55.77 \pm 1.34\%$), acrosome integrity ($41.92 \pm 1.25\%$) and mitochondrial potential ($51.90 \pm 2.19\%$). It can be concluded that the combination of 6% glycerol, 6% DMSO and 0.5 M sucrose in diluent as cryoprotectant components is able to maintain a better sperm quality in vitrified-thawed goat semen.

Key words: Goat, French straw, Sperm vitrification.

(1) Contribution No. 2627 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

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

(4) Corresponding author, E-mail: tckang@mail.tlri.gov.tw.