

冷凍稀釋液中添加卵黃、低密度脂蛋白及卵黃漿 對豬冷凍精子解凍後品質之影響⁽¹⁾

吳昇陽⁽²⁾ 康定傑⁽³⁾ 章嘉潔⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：106 年 2 月 20 日；接受日期：106 年 9 月 12 日

摘 要

本試驗比較卵黃 (egg yolk, EY)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 及卵黃漿 (egg yolk plasma, EYP)，添加於冷凍稀釋液製作豬冷凍精液，對精液解凍後品質的影響。試驗選用性成熟且健康之公豬 5 頭採取新鮮精液進行冷凍保存，解凍後應用電腦輔助精液分析系統 (computer-assisted sperm motility analysis, CASA) 與 VideoT-sperm 2.1 軟體，進行精子總活力、精子前進式活力及精子活力速率參數分析，並利用 FITC-PNA 染色評估精子頭帽完整率項目之差異。結果顯示，使用 20% 卵黃漿冷凍稀釋液製作之冷凍精液於解凍後，體外培養至 4 及 6 h 的冷凍精液之精子總活力及精子快速前進式活力，均顯著高於 20% 卵黃冷凍稀釋液製作者 ($P < 0.05$)；而使用 9% 低密度脂蛋白冷凍稀釋液所製作之冷凍精液，其解凍後之精子總活力、精子快速前進式活力及頭帽完整率，均顯著較差於 20% 卵黃漿及 20% 卵黃冷凍稀釋液之冷凍精液 ($P < 0.05$)。本研究證實稀釋液添加 20% 卵黃漿或 20% 卵黃在冷凍過程中對豬精子具有一定的保護作用，且保護效果顯著優於 9% 低密度脂蛋白。

關鍵詞：豬、精子品質、冷凍保存。

緒 言

精液冷凍保存已廣泛被運用，因使用不受時空限制，且能提升優質種畜的利用及縮短世代間距 (Yeste *et al.*, 2008)，但豬冷凍精液的使用並不普遍。豬精液冷凍保存技術始於 1956 年，之後各國學者進行大量相關研究，取得部分進展，不過仍未解決解凍後精子存活率低、受胎率差以及產仔數少等最困難之問題 (Rath *et al.*, 2009; Rodriguez-Martinez and Wallgren, 2011; Estrada *et al.*, 2014)。精液冷凍保存時，需添加冷凍稀釋液，有助於降低精子因冷休克所造成精子存活，或保存後影響精液品質之問題；因此研製高效的豬精液冷凍稀釋液、或更為簡易之稀釋配方，已成為豬精液保存技術的研究重點。

卵黃 (EY) 已被廣泛使用作為精液冷凍保護劑，屬於非滲透性緩衝劑，使精子耐受滲透壓改變，而卵黃所提供保護作用推測是低密度脂蛋白 (Jiang *et al.*, 2007)。關於在冷凍稀釋液中添加 LDL 已在許多物種被廣泛研究，可抵抗冷休克，精子解凍後存活率顯著增加，且精子頭帽和質膜完整率也明顯提高 (Moussa *et al.*, 2002; Lamia *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006)。研究添加 9% LDL 於冷凍稀釋液中，顯著改善精子總活動及精子直線運動速率，另隨添加 LDL 的濃度增加為 6%、7%、8% 至 9%，質膜完整性也相對顯著改善 (Hu *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2012)。

近來研究使用卵黃漿 (EYP) 取代卵黃製作如馬 (Pillet *et al.*, 2011)、狗 (Corcini *et al.*, 2016) 及水牛 (Hussain Shah *et al.*, 2017) 冷凍精液，解凍後精液品質及受胎率顯著改善。EYP 產製是透過 EY 離心方式處理 (Anton *et al.*, 2003; Guilmineau *et al.*, 2005)，EYP 由 85% 的低密度脂蛋白和 15% 球形糖蛋白 (globular glycoprotein) (Anton, 2013; Strixner and Kulozik, 2013) 所組成，分析 EYP 與 EY 的生化成分如膽固醇、磷脂、脂肪酸及脂蛋白含量組成比例不同 (Strzezek

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2574 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所臺東種畜繁殖場。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

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

et al., 2006; Laca *et al.*, 2015)。EYP 同時富含許多生物活性物質，如免疫球蛋白 Y (IgY) 和磷脂 (Navidgha-semizad, 2014)，本試驗在冷凍稀釋液中分別添加 9% LDL 及 20% EYP，與常規豬冷凍精液稀釋液添加 20% EY 製作冷凍精液，進行解凍後精液品質差異探討，以期發展較佳的豬精液冷凍稀釋液。

材料與方法

I. 精液採集與處理

本試驗選用性成熟且生殖能力正常，平均年齡 1 歲之健壯公豬 5 頭，每週採集公豬精液一次。精液採集後立即進行常規檢查，並在 37°C 下靜置 30 分鐘後，再選取存活率 80% 以上與活力 75% 以上的精液進行冷凍保存。

II. 卵黃漿及低密度脂蛋白配製

EYP 分離方法依據 McBe and Cotterill (1979) 所述，將 EY 與無菌蒸餾水進行稀釋並攪拌，再以 10,000 × g、10°C 條件離心 45 分鐘，將上清液再次離心以完全去除顆粒，然後於 4°C 條件保存繼續使用。本試驗中 LDL 之萃取方法係修正自 Ali Al Ahmad *et al.* (2008) 及康等 (2012) 所述之步驟，將卵黃液加入 2 倍量的等滲食鹽溶液 (0.17 M NaCl) 稀釋，並在 4°C 的環境下攪拌 1 小時，其後卵黃液以 4°C、10,000 × g 離心 45 分鐘，取其上清液再以同條件離心一次，離心後收集上清液加入 40% 硫酸銨 (Sigma-Aldrich, A-4418)，混合攪拌 1 小時取上層液。將上清液倒入透析膜中 (MW = 10,335) (Sigma-Aldrich, D-9527)，放置於滅菌蒸餾水中，於 4°C 環境下以磁石攪拌進行透析，將上清液對蒸餾水透析至少 6 小時以除去硫酸銨。完成透析後，可得清楚之分層，漂浮於上層濃稠流體即為 LDL，再次離心 (10,000 × g，45 分鐘)，收集富含低密度脂蛋白的沉澱殘渣儲存於 4°C 備用。

III. 精液冷凍

採集之精液選取濃厚部分，經鏡檢精液品質後，使用 Beltsville thawing solution (BTS, 37.0 g/L glucose, 1.25 g/L EDTA, 6.0 g/L sodium citrate, 1.25 g/L sodium bicarbonate, and 0.75 g/L potassium chloride) (Johnson *et al.*, 2000) 進行精液稀釋。冷凍精液製作參考 Westendorf *et al.* (1975) 提供之方式，稀釋之精液冷卻至 15°C，於 800 × g 離心 10 分鐘，去除上清液後加入不同冷凍稀釋液，稀釋至精子密度為 1.5×10^9 cells /mL。冷凍稀釋液的組成及製備，取乳糖 11 g，加蒸餾水至 100 mL，分別以 20% EY、20% EYP 或 9% LDL 濃度加入冷凍稀釋液作為比較，於 4°C 下平衡 3 小時後，按 1:2 的比例加入冷凍稀釋液，並添加甘油使其最終濃度為 3% (v/v)，精子稀釋最終濃度為 1×10^9 cells /mL，冷卻完成後之精液裝填於 0.5 mL 之麥管 (Minitüb, Tiefenbach, Germany)，並以封口粉封住末端，然後將麥管移置於電腦程式控制儀 (Ice cube 14S, GmbH, Austria) 內，執行冷凍程式降溫；以下列冷卻條件進行凍存：自 5°C 至 -5°C，降溫速率以 -6°C/分鐘，自 -5°C 到 -80°C，以 40°C/min 速率降溫，於 -80°C 保持 30 秒，-80°C 至 -150°C，降溫速率 -60°C/分鐘，最後再將完成冷凍之麥管移入液氮桶內貯存 (Yeste *et al.*, 2014)。

IV. 冷凍精液之解凍過程

備妥解凍用 BTS 精液稀釋液 (25°C) 後，迅速自液氮桶內取出所需之冷凍精液，將麥管依 40°C、30 秒進行解凍。擦乾麥管表面之水分，先剪開麥管之一端，其次再剪開另一端，讓精液流至 2 mL 解凍用稀釋液，然後將精液置入於 37°C 培養箱培養，並依試驗設計之培養時間進行解凍後之精液性狀測試。

V. 精液性狀評估

取解凍後精液，以電腦輔助精子分析系統與 VideoTesT-Sperm 2.1 軟體 (Russia) 進行分析，分析校正係參考 Dziekoska *et al.* (2013) 之方法，評估項目包括精子活力 (motility)、前進式活力 (progressive motility, PM)、平均移動路徑 (velocity average path, VAP)、直線移動速率 (velocity straight line, VSL)、曲線移動速率 (curvilinear velocity, VCL)、精子頭部擺動振幅 (lateral head displacement, ALH)、精子頭部擺動與平均路徑交叉的次數 (beat cross frequency, BCF)、直線趨勢 (straightness, STR) 和直線前進之比率 (linearity, LIN) 等移動能力參數。

VI. 精子頭帽完整性評估

以免疫螢光染色技術評估精子頭帽完整性，其步驟係依據 Zeng 及 Terada (2001) 之方法稍作修正，即取精液樣品 30 μL 塗抹於載玻片上，經空氣乾燥後，以甲醇固定 10 分鐘，之後取 30 μL 含 (100 μg/mL) 螢光素異硫氰酸鹽結合花生凝集素 Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) (Sigma -Aldrich, St, Louis, MO, USA) 之 PBS 溶液，滴置於載玻片上，再移入 37°C 培養箱內靜置 30 分鐘後，再以 PBS 沖洗，經空氣乾燥後使用 5 μL 的 Antifade 溶液 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) 封片，以保持螢光效果。精子頭帽完整性

評估使用光學螢光顯微鏡 (DM 2500, Leica) (1000 ×, 油鏡), 以激發波長 480 nm、射出波長 530 nm 光源進行鏡檢, 隨機計數約 100 個細胞, 且每一樣品重覆計算數六次。在顯微鏡下觀察精子頭帽染色及形態, 其判讀方式如下: (1) 精子頭帽顯現完整密集明亮螢光表示頭帽完整; (2) 精子頭帽僅顯現部分螢光表示頭帽部分受損; (3) 精子頭帽未顯現螢光表示頭帽之細胞膜及外頭帽膜完全受損。

VII 統計分析

豬冷凍精液解凍後, 靜置於 37°C、6 小時, 並每間隔 2 小時評估其總活力、前進式活力、精子活力速率參數, 及解凍後立即評估精子頭帽完整率等項目之差異; 試驗資料均以平均數 ± 標準差表示, 並以變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA) 檢驗差異顯著性。

結果與討論

本試驗比較 EY、LDL 及 EYP 製作豬冷凍精液, 對解凍後精液品質的影響。三種不同冷凍稀釋液製作冷凍精液, 解凍後於每 2 小時進行精子總活力、精子快速前進式活力等測試; 試驗結果如表 1 所示, 20% EYP 組所製作豬冷凍精液解凍後, 4 至 6 小時的精子總活力及精子快速前進式活力顯著高 ($P < 0.05$) 於 20% EY 組與 9% LDL 組, 9% LDL 組的精子總活力、精子快速前進式活力於各分析時段均顯著 ($P < 0.05$) 低於 20% EY 組及 20% EYP 組。結果說明 9% LDL 添加於稀釋液, 精子活力及精子快速前進式活力之下降速度均較利用卵黃稀釋液組快。用 20% EYP 取代 20% EY 冷凍保存豬精液, 精子活力及精子快速前進式活力相對較佳, 因此能有效延長精子的存活時間。

表 1. 不同組豬冷凍精液解凍精子活力率與前進式活力率

Table 1. Effect of extender composition on the motility and progressive motility of boar frozen-thawed sperm

Extenders	Post thawed incubation time			
	30 min	2 h	4 h	6 h
----- Total sperm motility (%) -----				
EY	72.2 ± 5.2 ^a	61.9 ± 7.0 ^a	47.7 ± 5.6 ^a	36.8 ± 7.6 ^a
EYP	75.8 ± 5.2 ^a	65.0 ± 5.9 ^a	54.8 ± 4.8 ^b	46.7 ± 8.9 ^b
LDL	60.8 ± 6.6 ^b	38.5 ± 9.2 ^b	35.1 ± 5.9 ^c	24.1 ± 3.5 ^c
----- Progressive sperm motility (%) -----				
EY	59.2 ± 4.3 ^a	44.3 ± 4.7 ^a	29.7 ± 4.3 ^a	19.3 ± 4.4 ^a
EYP	61.4 ± 5.2 ^a	46.8 ± 3.5 ^a	34.4 ± 3.5 ^b	28.1 ± 6.6 ^b
LDL	47.4 ± 6.7 ^b	27.3 ± 7.3 ^b	21.5 ± 4.1 ^c	12.5 ± 2.4 ^c

^{a, b, c} Values with different superscripts in the same columns are significantly different ($P < 0.05$).

EY, 20% Egg yolk; EYP, 20% Egg yolk plasma; LDL, 9% low density lipoprotein.

精子活力評估可分為定量及定性分析, 定量分析指前進式活力即直線前進運動的精子數占全部精子總數的百分率, 而定性分析主要包括平均移動路徑、直線運動速率、曲線運動速率及精子頭部擺動振幅等指標, 運用電腦輔助精液自動分析儀分析。CASA 定性分析精子運動參數及可能相關的形態變化, 與公豬的繁殖能力評估在商業上廣泛應用 (Didion, 2008), 並與受胎率呈相關性 (Holt and Medrano, 1997)。在精子活力各項移動參數方面如表 2 所示, 豬精液解凍後體外培養 5 min 及 6 h, 9% LDL, 與 20% EY 及 20% EYP 兩組間的 VAP、VSL、VCL 及 ALH 均呈顯著低現象 ($P < 0.05$), 其他指數包括 BCF、STR、LIN 則於上述三組間均無顯著差異 ($P > 0.05$)。20% EY 與 20% EYP 兩組間的 VAP、VSL、VCL、BCF、STR 及 LIN 均無顯著差異 ($P > 0.05$), 說明豬精液冷凍稀釋液中 20% EYP 取代 20% EY, 對冷凍前後精子的各項運動參數沒有顯著影響。

精子頭帽完整性與透明帶和卵母細胞膜結合能力密切相關, 可用於預測受孕力 (Fazeli *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2012)。因此, 在進行冷凍精液品質評估時, 有必要檢測解凍後精子頭帽完整性以分辨品質之良窳。利用 9% LDL、20% EY 及 20% EYP 稀釋液冷凍之精液經解凍後, 以 FITC-PNA 免疫螢光染色分析精子頭帽完整性之分析結果如表 3 所示, 結果顯示解凍後 20% EY、20% EYP 及 9% LDL 三組冷凍精液之精子頭帽完整率分別為 53.3 ± 3.9、54.9 ± 4.7 及 42.6 ± 6.0%, 部分頭帽受損率分別為 28.7 ± 4.1、26.9 ± 3.8 及 32.0 ± 4.2%, 而頭帽完全受損率為 17.0 ± 3.4、17.2 ± 3.7 及 26.3 ± 2.5%; 這說明 9% LDL 組冷凍精子解凍後的頭帽完整率顯著 ($P < 0.05$) 低於 20% EY 組和 20% EYP 組。

表 2. 不同組豬冷凍精液解凍精子移動參數率

Table 2. Effect of extender composition on the motion characteristic of boar frozen-thawed sperm

	Extenders	5 min	6 h
VAP ($\mu\text{m/s}$)	EY	43.4 \pm 6.7 ^a	31.1 \pm 7.6 ^a
	EYP	48.5 \pm 12.2 ^a	32.6 \pm 7.5 ^a
	LDL	34.4 \pm 2.8 ^b	26.3 \pm 6.2 ^b
VSL ($\mu\text{m/s}$)	EY	21.1 \pm 3.3 ^a	15.3 \pm 3.8 ^a
	EYP	23.6 \pm 5.9 ^a	16.0 \pm 3.8 ^a
	LDL	16.4 \pm 2.0 ^b	12.9 \pm 3.1 ^b
VCL ($\mu\text{m/s}$)	EY	58.9 \pm 8.2 ^a	45.3 \pm 7.6 ^a
	EYP	66.3 \pm 21.6 ^a	48.4 \pm 17.7 ^a
	LDL	50.1 \pm 4.1 ^b	36.8 \pm 8.3 ^b
ALH ($\mu\text{m/s}$)	EY	2.1 \pm 0.3 ^a	1.6 \pm 0.3 ^a
	EYP	2.4 \pm 0.8 ^a	1.7 \pm 0.3 ^a
	LDL	1.7 \pm 0.2 ^b	1.4 \pm 0.3 ^b
BCF (Hz)	EY	8.5 \pm 0.2 ^a	8.2 \pm 0.1 ^a
	EYP	8.5 \pm 0.2 ^a	8.1 \pm 0.4 ^a
	LDL	8.5 \pm 0.1 ^a	8.3 \pm 0.2 ^a
STR (%)	EY	96.1 \pm 0.8 ^a	96.0 \pm 1.0 ^a
	EYP	96.6 \pm 1.3 ^a	95.9 \pm 0.5 ^a
	LDL	96.8 \pm 1.0 ^a	96.1 \pm 0.9 ^a
LIN (%)	EY	41.1 \pm 3.9 ^a	37.4 \pm 5.1 ^a
	EYP	44.9 \pm 10.2 ^a	37.6 \pm 2.5 ^a
	LDL	40.1 \pm 3.2 ^a	36.8 \pm 3.9 ^a

VAP, average path velocity; VSL, straight line (progressive) velocity; VCL, curvilinear velocity; ALH, lateral head displacement; BCF, cross-beat frequency; STR, straightness; LIN, linearity; CASA, computer-assisted sperm analysis; SEM, standard error of the mean.

EY, 20% Egg yolk; EYP, 20% Egg yolk plasma; LDL, 9% low density lipoprotein.

^{a, b} Values with different superscripts in the same columns are significantly different ($P < 0.05$).

表 3. 不同組豬冷凍精液解凍精子頭帽完整性率

Table 3. Effect of extender composition on the acrosome integrity of boar frozen-thawed sperm

Extenders	INA (%)	PDA (%)	LA (%)
EY	53.3 \pm 3.9 ^a	28.7 \pm 4.1 ^a	17.0 \pm 3.4 ^a
EYP	54.9 \pm 4.7 ^a	26.9 \pm 3.8 ^a	17.2 \pm 3.7 ^a
LDL	42.7 \pm 6.0 ^b	32.0 \pm 4.2 ^a	26.3 \pm 2.5 ^b

INA: Intact acrosome; PDA: Partially damaged acrosome; LA: Lost acrosome.

^{a, b} Values with different superscripts in the same columns are significantly different ($P < 0.05$).

EY, 20% Egg yolk; EYP, 20% Egg yolk plasma; LDL, 9% low density lipoprotein.

1939 年 Phillips 為首位用卵黃於低溫保存稀釋液 (Phillips, 1939), 卵黃於冷凍過程保護精確優化機制仍屬未明, 許多作者進行相關研究, 卵黃屬於非滲透性緩衝劑, 使精子抵抗滲透改變, 並保護質膜耐受冷休克 (Demaniowicz and Strzezek, 1996)。研究證實 LDL 是蛋黃中最主要保護精子之成分, LDL 佔全蛋黃之總固體約 2/3, 其存在於可溶性蛋黃漿部分 (Nys and Guyot, 2011), LDL 直徑約 17 至 60 nm 球型顆粒, 核心部分由甘油三酯組成, 外層被蛋白質和磷脂包覆 (Erçelebi and Ibanoglu, 2010)。精液冷凍解凍的過程中, LDL 的結構發生改變, 當脂質和蛋白質之間的相互作用遭到破壞, 部分磷脂游離進入溶液, 並附著於精子表面形成一層保護膜, 取代精細胞膜上的部分磷脂質, 進而保護免受損傷達到保護精子效果 (Bencharif *et al.*, 2008)。研究使用 6 至 10% LDL 添加於豬冷凍精液皆可改善豬

冷凍精液解凍品質 (Hu *et al.*, 2006)，冷凍稀釋液中添加 9% LDL 時顯著改善了精子總活力及精子直線運動速度，隨 LDL 添加濃度的增加，更增加質膜完整性 ($P < 0.05$) (Hu *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2012)，但本實驗採用 9% LDL 冷凍稀釋液，解凍效果並不佳，是否與使用禽類個體蛋黃中膽固醇、脂肪酸和磷酸組成成分不盡相同 (Li-Chan and Kim, 2008)，或稀釋分離方式與處理流程有關 (Freschi *et al.*, 2011)，進而影響 LDL 保護精子免受冷凍損傷的效果所造成差異仍需再研究。學者使用 20% LDL 取代蛋黃，用於 Collared peccary (Pecari tajacu) 一種外型似豬隻野生動物之精液冷凍保存，結果顯著改善質膜完整率及精子活力 (Souza *et al.*, 2015)，因此本研究所使用 9% LDL 濃度是否最適濃度亦應進一步探究。

蛋黃成分極其複雜，隨添加蛋黃濃度提升，有利於精子保存之物質濃度上升，同時不利於精子保存的成分也增加。已有文獻顯示蛋黃亦存在會抑制精子呼吸作用的成分 (Amirat *et al.*, 2004; Huopalahti *et al.*, 2007)；同時卵黃顆粒和碎片增加時，嚴重影響精子運動能力，由於現階段豬冷凍精液的品質仍不能滿足當前生產供應面的需求，因此，研發取代蛋黃之的冷凍稀釋液配方仍是今後豬精液冷凍研究的重點。蛋黃透過離心步驟將上層分為卵黃漿和下層為卵黃顆粒 (Guilmineau *et al.*, 2005; Huopalahti *et al.*, 2007)。卵黃顆粒組成為 70% 高密度脂蛋白和 16% 卵黃高磷蛋白 (phosvitin) (Laca *et al.*, 2010)；蛋黃漿則由 85% 低密度脂蛋白和 15% 球形醣蛋白 (globular glycoprotein) (Anton, 2013; Strixner and Kulozik, 2013) 所構成。卵黃成分中 HDL 一直被視為有害影響精子功能 (Demaniowicz and Strzezek, 1996)，而卵黃顆粒會干擾精子活力 (Akhter *et al.*, 2011)。目前純化 LDL 耗時，並且提取質量受限，未達廣泛商業應用，部分研究已使用卵黃漿取代卵黃 (Pillet *et al.*, 2011)，進行 16°C 及 5°C 低溫儲存豬新鮮精液，其人工授精的受胎率達 80% 至 90%，產仔數為 10.25 至 11.08，對豬精子質膜的結構和功能完整性具極佳保護效果 (Strzezek *et al.*, 2005; Dziekońska, 2013)，及且有助於精液冷凍保存改善 (Fraser and Strzezek, 2007)。學者探究卵黃漿保護機制主要與卵黃組成有關，卵黃富含豐富的磷脂、不飽和脂肪酸等脂類物質，減少冷凍解凍過程中會產生大量的過氧化物造成對精子質膜的損害，並強化精子質膜功能的完整性 (Bergeron and Manjunath, 2006; Chanapiwat *et al.*, 2012)，且於精液冷凍過程中卵黃的脂蛋白會與精子質膜結構交互作用，進而保護精子並提升活率及活力，甚至受精率 (Manjunath *et al.*, 2002; Buranaamnuay *et al.*, 2011)。

本研究將豬精液冷凍稀釋液中添加 20% EYP，解凍後精子總活力、精子快速前進式活力等顯著改善，20% EYP 作為冷凍保護劑時能取得一定的效果，尤其是添加量為 20% 時效果良好，後續在冷凍保護液中添加卵黃漿也將是今後豬精液冷凍保存技術很重要的研究方向。

誌 謝

本試驗承農委會科技計畫 (105 農科 -2.1.1- 畜 -L3) 經費補助，特此致謝，試驗期間並承育種組吳明哲組長商借儀器設備，臺東縣養豬戶曾堂益提供試驗材料，謹此一併致謝。

參考文獻

- 康定傑、沈朋志、邢湘琳、陳裕信、曲鳳翔、陳立人。2012。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。畜產研究 45：95-106。
- Akhter, S., M. S. Ansari, B. A. Rakha, S. M. H. Andrabi, M. Khalid and N. Ullah. 2011. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology* 76: 759-764.
- 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: 429-436.
- Amirat, 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: 895-907.
- Anton, M., V. Martinet, M. Dalgalarondo, V. Beaumal, E. David-Briand and H. Rabesona. 2003. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.* 83: 175-183.
- Anton, M. 2013. Egg yolk: structures, functionalities and processes. *J. Sci. Food Agri.* 93: 2871-2880.
- Bencharif, D., L. Amirat, M. Anton, E. Schmitt, S. Desherces, G. Delhomme, M. L. Langlois, P. Barrière, 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. and P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 1338-1344.
- Buranaamnuay, K., R. Grossfeld, C. Struckmann and D. Rath. 2011. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 127: 56-61.
- Chanapiwat, P., K. Kaeoket and P. Tummaruk. 2012. Improvement of the frozen boar semen quality by docosahexaenoic acid (DHA) and L-cysteine supplementation. *Afr. J. Biotechnol.* 1: 3697-3703.
- Corcini, C. D., K. L. Goularte, D. C. Bongalhardo, T. Lucia Jr, R. D. Jardim and A. S. Varela Junior. 2016. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. *Andrologia* 48: 114-115.
- Demaniowicz, W. and J. Strzezek. 1996. The effect of lipoprotein fraction from 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.
- Didion, B. A. 2008. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. *Theriogenology* 70: 1374-1376.
- Dziekońska, A., L. Fraser, A. Majewska, M. Lecewicz, L. Zasiadczyk and W. Kordan. 2013. Effect of commercial long-term extenders on metabolic activity and membrane integrity of boar spermatozoa stored at 17 degrees C. *Pol. J. Vet. Sci.* 16: 517-525.
- Erçelebi, E. A. and E. Ibanoglu. 2010. Effects of pectin and guar gum on creaming stability, microstructure and rheology of egg yolk plasma-stabilized emulsions. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 297-302.
- Estrada, E., J. E. Rodriguez-Gil, L. G. Rocha, S. Balasch, S. Bonet and M. Yeste. 2014. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology* 2: 88-99.
- Fazeli, A., W. J. Hage, F. P. Cheng, W. F. Voorhout, A. Marks, M. M. Bevers and B. Colenbrander. 1997. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida *in vitro*. *Biol. Reprod.* 56: 430-438.
- Fraser, L. and J. Strzezek. 2007. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology* 68: 248-257.
- Freschi, J., H. Razafindralambo, S. Danthine and C. Blecker. 2011. Effect of ageing on different egg yolk fractions on surface properties at the air-water interface. *Int. J. Food Sci. Tech.* 46: 1716-1723.
- Guilmineau, F., L Krause and U. Kulozik. 2005. Efficient analysis of egg yolk proteins and their thermal sensitivity using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis under reducing and no reducing conditions. *J. Agr. Food Chem.* 53: 9329-9336.
- Holt, W. V. and A. Medrano. 1997. Assessment of boar sperm functions in relation to freezing and storage. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52: 213-222.
- Hu, J. H., Q. W. Li, G. Li, X. Y. Chen, H. Yang, S. S. Zhang and L. Q. Wang. 2006. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19: 486-490.
- Huopalahti, R., R. Lopez-Fandino, M. Anton and R. Schade. 2007. *Bioactive egg compounds* (1st ed.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. German.
- Hussain Shah, S. A., S. M. Hassan Andrabi, H. Ahmed and I. Z. Qureshi. 2017. Chicken egg yolk plasma in tris-citric acid extender improves the quality and fertility of cryopreserved water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology* 89: 32-40.
- 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. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172.
- Kong, D. H., K. Shang, Y. Guo, J. Liu, H. Zhang and H. Wei. 2012. A study on optimizing the cryopreservation methods for bama miniature pig semen. *Exp. Anim.* 61: 533-542.
- Laca, A., M. C. Saenz, B. Paredes and M. Diaz. 2010. Rheological properties, stability and sensory evaluation of low-cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *J. Food Eng.* 97: 243-252.
- Laca, A., B. Paredes, M. Rendueles and M. Diaz. 2015. Egg yolk plasma: Separation, characteristics and future prospects. *LWT- Food Sci Technol* 62: 7-10.
- Lamia, A., T. Daniel, J. Lae titia, 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, a commercial egg yolk extender, *Theriogenology* 61: 895-907.
- Li-Chan, E. C. Y. and H. O. Kim. 2008. Structure and chemical composition of eggs. In Y. Mine (Ed.), *Egg bioscience and biotechnology*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. USA. pp. 1-96.
- Manjunath, P., N. Veronica, 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.
- McBee, L. and O. Cotterill. 1979. Ion exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk. *J. Food Sci.* 44: 656-660.
- Moussa, M., V. Marinet, 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.
- Navidghasemizad, S., F. Temelli and J. Wu. 2014. Physicochemical properties of left over egg yolk after livetins removal. *LWT-Food Sci. Technol.* 55: 170-175.
- Nys, Y. and N. Guyot. 2011. Egg formation and chemistry. In: Nys Y, Bain M, Immerseel, Van F, editors. *Improving the safety and egg quality of eggs and egg products*, vol. 1(6). Woodhead Publishing Limited, UK. pp. 83-132.
- Phillips, P. H. 1939. The preservation of bull semen. *J. Biol. Chem.* 130: 415.
- Pillet, E., G. Duchamp, F. Batellier, V. Beaumal, M. Anton, S. Desherces, E. Schmitt and M. Magistrini. 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 75: 105-114.
- Rath, D., R. Bathgate, H. Rodríguez-Martínez, J. Roca, J. Strzezek and D. Waberski. 2009. Recent advances in boar semen cryopreservation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 66: 51-66.
- Rodríguez-Martínez, H. and M. Wallgren. 2011. Advances in boar semen cryopreservation. *Vet. Med. Int.* Article ID 396181.
- Souza, A. L., G. L. Lima, G. C. Peixoto, T. de Souza Castelo, M. G. Oliveira, V. V. de Paula and A. R. Silva. 2015. Sperm characteristics following freezing in extenders supplemented with whole egg yolk and different concentrations of low-density lipoproteins in the collared peccary (*Pecari tajacu*). *Reprod. Biol.* 15: 223-228.
- Strixner, T. and U. Kulozik. 2013. Continuous centrifugal fractionation of egg yolk granules and plasma constituents influenced by process conditions and product characteristics. *J. Food Eng.* 117: 89-98.
- Strzezek, J., L. Lecewicz, A. Dziekońska and L. Fraser. 2005. A simple method of extraction of lipoprotein fractions from avian egg yolk protective effect on cooled boar semen. *Theriogenology* 63: 496-497.
- Strzezek, K. J., L. Fraser, A. Dziekońska and M. Lecewicz. 2006. Complexity of technology preservation of boar semen fundamental and applicative approaches. *Reprod. Domest. Anim.* 41: 311-377.
- Westendorf, P., L. Richter and H. Treu. 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten -Verfahren. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 82: 261-267.
- Yeste, M., M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. Garcia-Gil, E. Badia, J. Bassols, A. Pruneda, E. Bussalleu, I. Casas and S. Bonet. 2008. Boar spermatozoa and prostaglandin F2 α . Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F2 α to the short-term extender over cooling time. *Anim. Reprod. Sci.* 108: 180-195.
- Yeste, M., E. Estrada, E. Pinart, S. Bonet, J. Miro and J. E. Rodríguez-Gil. 2014. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology* 68: 251-261.
- Zhang, W., K. Yi, C. Chen, X. Hou and X. Zhou. 2012. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 132: 123-128.
- Zeng, W. X. and T. Terada. 2001. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology* 55: 615-627.

Effect of freezing extenders supplementation with whole egg yolk, low-density lipoproteins and egg yolk plasma on semen qualities of boar frozen-thawed sperm ⁽¹⁾

Sheng-Yang Wu ⁽²⁾ Ting-Chieh Kang ⁽³⁾ and Chia-Chieh Chang ⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: Feb. 20, 2017; Accepted: Sep. 12, 2017

Abstract

The aim of this study was to compare post-thawed sperm quality characteristics of the boars following freezing in extenders supplemented with whole egg yolk (EY), low-density lipoproteins (LDL) and egg yolk plasma (EYP). Semen was collected from five sexually matured and healthy boars, and then retained for sperm cryopreservation. The sperm quality of frozen-thawed semen was determined by computer-assisted image analysis system (CASA) and Semen Analyzer (VideoTesp-sperm 2.1). The characteristics of frozen-thawed semen characteristics including total motility, progressive motility, CASA motility and acrosome integrity (fluorescein isothiocyanate conjugated with peanut agglutinin) were evaluated. The results showed that the percentage of total motility and rapid progressive motility the of boar semen cryopreserved in extender containing 20% EYP after thawing for 4, 6 hrs were significantly better than 20% EY ($P < 0.05$). It showed that the percentage of total motility, rapid progressive motility and acrosome integrity of 9% LDL were significantly lower than those of 20% EY, 20% EYP ($P < 0.05$). Accordingly, extender containing 20% EY or 20% EYP could protect the boar spermatozoa during the cryopreservation, the effectiveness of protection sperm was significant higher than that of 9% LDL.

Key words: Boar, Sperm quality, Cryopreservation.

(1) Contribution No. 2574 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Taitung Animal Propagation Station, COA-LRI, Taitung 95444, Taiwan, R. O. C.

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

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