

平衡时间、冷冻方法及解冻程序对马精液冷冻效果的影响

毋状元^① 郑新宝^{①#} 霍飞^① 董红^① 罗永明^① 于维浩^②
徐文慧^② 陈静波^{①*}

① 新疆畜牧科学院畜牧研究所 乌鲁木齐 830011; ② 昭苏县畜牧兽医局 伊犁昭苏 835600

摘要: 精液平衡、冷冻及解冻是冻精制作过程中三个必不可少的环节,对精液冷冻效果起着决定性作用。在马 (*Equus caballus*) 精子冷冻中针对这三个过程的研究较少,为进一步优化马精液冷冻方法,提高精液冻后质量,本研究比较不同平衡时间、冷冻方法及解冻程序对冻融后精子运动参数、质膜完整性及线粒体膜电势的影响。平衡 120 min、180 min 和 240 min 组冻融后精液活力及质膜完整性明显高于平衡 0 min、45 min、90 min 及 8 h 平衡组;距离液氮面 2 cm 和 4 cm 高度熏蒸冷冻获得了与程序冷冻仪冷冻法相似的冷冻效果;采用高温瞬时解冻法 (75°C 7 s 和 46°C 20 s) 比常规方法 (37°C 30 s) 获得了更高的冻后精液活力 ($P < 0.05$)。综合上述结果,在马精液冷冻过程中综合采用 120 ~ 240 min 平衡,距离液氮面 2 ~ 4 cm 熏蒸法和高温瞬时解冻法 (75°C 7s 和 46°C 20 s) 可获得更好的精液冷冻效果。

关键词: 马; 精液冷冻; 精液平衡; 熏蒸法; 解冻

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2016) 06-1092-09

The Effect of Equilibrium Time and Freezing-thawing Method on Equine (*Equus caballus*) Sperm Cryopreservation

WU Zhuang-Yuan^① ZHENG Xin-Bao^{①#} HUO Fei^① DONG Hong^① LUO Yong-Ming^①
YU Wei-Hao^② XU Wen-Hui^② CHEN Jing-Bo^{①*}

① Institute of Animal Science, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830011; ② Zhaosu County Animal Husbandry and Veterinary Section, Zhaosu, Yili 835600, China

Abstract: Equilibrium, freezing and thawing are three essential steps which play a critical role in semen freezing process. In order to optimize Horse (*Equus caballus*) sperm freezing methods, we investigated the impact of the equilibrium, freezing and thawing manipulations on sperm motility, membrane integrity and

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31360550);

* 通讯作者, E-mail: chenjb126@126.com;

第一作者介绍 毋状元, 男, 博士研究生; 研究方向: 动物繁殖技术; E-mail: 408995810@qq.com;

同等贡献第一作者 郑新宝, 男, 副研究员; 研究方向: 动物繁殖技术; E-mail: 113276002@qq.com.

收稿日期: 2016-03-23, 修回日期: 2016-05-30 DOI: 10.13859/j.cjz.201606017

mitochondrial membrane potential after freeze-thawing. Semen was collected from 4 adult stallions, diluted in INRA82 + 5% clarified egg yolk + 3.5% combined cryoprotectant and then frozen. In experiment 1, we compared the effect of equilibration for 0, 45, 90, 120, 180, 240 min and 8 h on equine sperm cryopreservation; in experiment 2, we aimed to find a suitable height of liquid nitrogen steam for freezing; in experiment 3, we assessed the effect of different thawing procedures on post-thaw semen quality. Statistical analysis was conducted with ANOVA SPSS 13. Differences between means of parameters were subjected to an analysis of variance using the Tukey's test, with $P < 0.05$ considered significant. The results showed that the equilibrium time of 120, 180 and 240 min resulted in significantly higher sperm motility and membrane integrity than the equilibrium for 0, 45, 90 min and 8 h group after thawing (Fig. 2); liquid nitrogen steam frozen at 2 cm and 4 cm from liquid nitrogen surface obtained similar results with program freezing method (Fig. 3); high temperature rapid thawing method (75°C 7 s and 46°C 20 s) gained a higher post-thaw motility than the conventional thawing method (37°C 30 s) (Fig. 4). In summary, we believe that combination of equilibrium for 120 - 240 min, liquid nitrogen steam frozen at 2 cm and 4 cm from liquid nitrogen surface and high-temperature rapid thawing method (75°C 7 s and 46°C 20 s) can get better effect in horse sperm freezing process.

Key words: Horse (*Equus caballus*); Sperm freezing; Semen equilibrium; Liquid nitrogen steam frozen; Thawed

精液冷冻技术是濒危野生动物保种繁育、家畜遗传改良及人类辅助生殖的关键技术之一, 尽管该项技术从发展之初到现在已经有 70 多年历史, 但仅在有限的物种应用得比较成功。马 (*Equus caballus*) 作为一种重要的家畜, 精液冷冻技术尚不成熟, 精液冻融后活力差且个体间冷冻效果不稳定, 无法满足应用需求。精液平衡、冷冻及解冻是精液冷冻过程中三个必不可少的环节, 对精液冷冻效果的好坏起着决定性作用。

平衡时间对动物精液冷冻效果不仅物种间差异大, 而且即使同一物种结论也不尽相同。有报道显示藏獒 (*Canis lupus familiaris*) (辛国省等 2008)、猪 (*Sus scrofa*) (姜兴刚等 2008)、家兔 (*Oryctolagus cuniculus*) (田秀娥等 2013) 精液冷冻适宜平衡时间分别为 15 ~ 20 min、60 min、90 min, 关于牛 (*Bos taurus*) 精液冷冻最适平衡时间的报道差异较大, 从 3 h (乔建民等 1989) 到 4 ~ 5 h (李晓东等 1996), 再到 7.5 h (刘玉等 2009) 不等。关于马精液冷冻的最适平衡时间尚无定论, 已报道的推荐平衡时

间从 20 min 至 5 h 不等。为进一步确定马精液冷冻适宜的平衡时间, 我们比较了平衡 0、45、90、120、180、240 min 及 8 h 对马精液冷冻效果的影响。

适宜的解冻程序能使精液快速越过危险温区, 防止解冻过程中重结晶对精子造成损伤。目前应用的细管精液解冻方法有低温 (5°C)、常温 (15°C)、体温 (35 ~ 40°C) 及高温解冻法 (70 ~ 75°C), 解冻时间从 7 ~ 120 s 不等。究竟哪一种方法更优尚无明确结论, 不同国家和地区在选择上往往存在较大差异 (Qiao et al. 2014)。对于马精液细管冻精通常采用 37°C 30 s 解冻法 (Alipour et al. 2013), 也有研究者提出采用 75°C 7 s (Cochran et al. 1984) 或 46°C 20 s (Mckinnon et al. 2011) 能获得更好的效果, 但后两种方法一直以来并未被广泛采纳。为了进一步确定马精液冷冻的最适解冻程序, 我们比较了 37°C 30 s、75°C 7 s 和 46°C 20 s 三种解冻程序对精子质量的影响。

降温速率是否合适是精液冷冻成败的关键, 目前精液冷冻方法主要有液氮熏蒸法和程

序降温冷冻法。对绝大多数实验室和冻精尚未产业化应用的物种,液氮熏蒸法仍然是精液冷冻的主要手段。采用熏蒸法,降温速率由细管距离液氮面的高度决定。为了筛选最适合的马精液熏蒸冷冻方法,我们以程序冷冻法作为对照,比较距离液氮面不同高度对马精液冷冻效果的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选择4匹6~12岁成年英纯血种公马(鲜精平均活力见表1)作为实验动物,按《种公马饲养管理标准》(DBN654000/T216-2015)要求方法饲养。采精时间为2014年9~11月,每匹公马每周采精2次,每匹公马共采精9次。

精子冷冻液构成: INRA82(葡萄糖5g,乳糖300mg,棉籽糖300mg,HEPES925mg,柠檬酸钠60mg,柠檬酸钾82mg,双蒸水100ml,超高温脱脂奶100ml;所用试剂均购自simga公司,超高温脱脂奶为实验室自制,95℃加热10min,10000g离心30min,去除脂肪)(Vidament 2005)加5%卵黄(体积百分含量)和3.5%混合抗冻剂(1/3甘油加2/3甲基甲酰胺)。

1.2 实验方法

1.2.1 精液采集、离心、平衡、冷冻及解冻 用活体母马做台马,清洁消毒好母马后躯,用马专用假阴道(中国农业大学马研究中心生产)进行精液采集。将采集到的精液过滤后,用37℃预热的INRA82稀释液按1:1比例稀释,

向管底添加0.5ml精液离心垫(法国卡苏公司),1000g离心20min,弃上清及管底离心垫,每匹公马取相同量的精子做混池,添加冷冻液调整精子浓度至 2×10^9 个/ml,装入0.5ml细管。

实验1:将装好管的0.5ml细管精液各取20支,在5℃平衡0、45、90、120、180、240min及8h后,置于液氮面上4cm处熏蒸冷冻10min后投入液氮保存。液氮储存24h后,37℃30s解冻,评价精液质量。

实验2:将装好管的0.5ml细管精液在5℃下平衡180min,分别用液氮熏蒸法和程序冷冻法(对照组)冷冻。熏蒸法分3组,熏蒸高度距离液氮面分别为2、4和6cm,熏蒸10min后将投入液氮保存;程序冷冻仪设定冷冻程序为从4~-110℃,降温速率为40℃/min,从-110~-140℃,降温速率为20℃/min,程序执行完成后投入液氮保存。液氮储存24h后,37℃30s解冻,评价精液质量。

实验3:按实验2熏蒸法(5℃平衡180min,距离液氮面高度4cm处)冷冻后,液氮储存24h后,比较37℃30s、75℃7s和46℃20s三种解冻方法解冻后精液活力。

1.2.2 精液质量评价 用计算机辅助精液分析仪(CEROS II,法国卡苏公司)检测精子运动参数。取5μl解冻后精液滴加于Leja玻片(法国卡苏公司)检测腔室中(腔室深度及高度固定为20μl),置于配备有37℃恒温载物台的计算机精液辅助分析仪下,进行精液质量评价。主要观测4个参数,运动精子比例(total

表1 公马鲜精平均活力

Table 1 Motility parameters of fresh semen

公马 Stallion	年龄 Age	运动精子(%) Total motility	前向运动精子(%) Progressive motility	平均路径速度(μm/s) Average path velocity	快速运动精子(%) Rapid motility
A (n = 13)	6	87.00 ± 3.72	46.23 ± 6.42	109.55 ± 10.51	75.54 ± 5.40
B (n = 10)	8	89.20 ± 4.35	45.60 ± 5.57	98.96 ± 8.05	73.52 ± 8.69
C (n = 12)	9	86.92 ± 4.96	45.92 ± 4.66	91.42 ± 6.98	69.00 ± 4.43
D (n = 11)	12	87.09 ± 7.24	46.18 ± 6.31	94.79 ± 8.63	74.27 ± 4.37

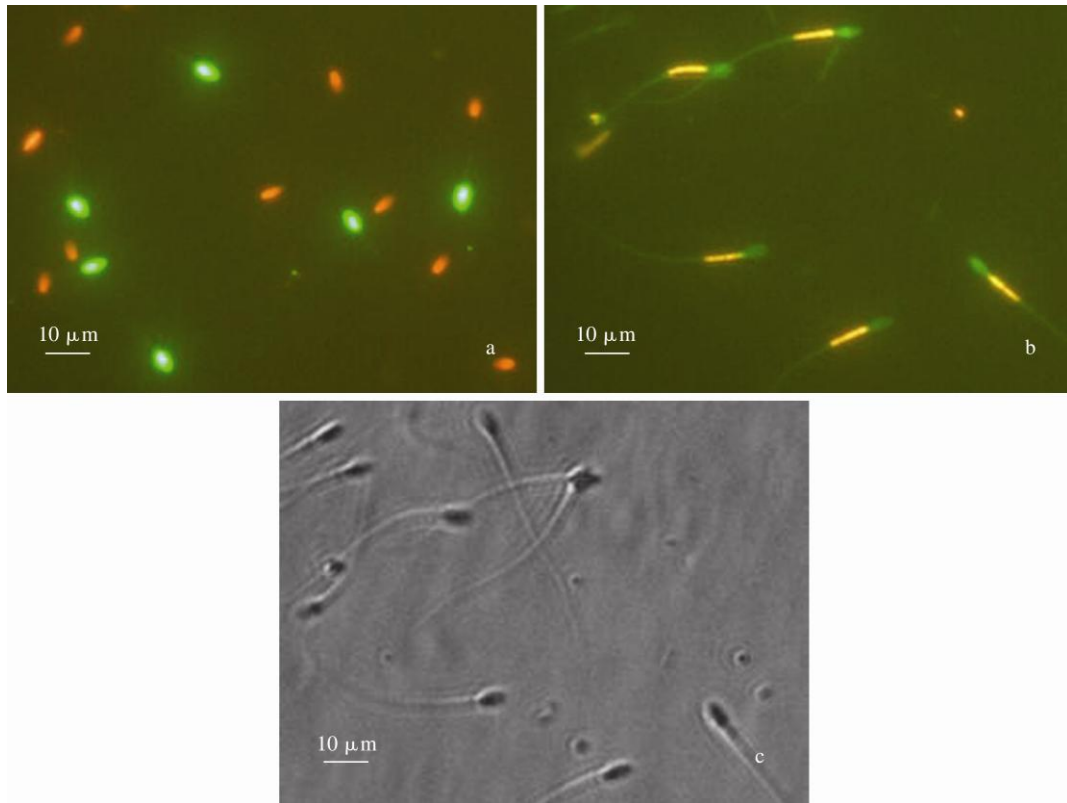


图1 STRA-14/PI 和JC-1荧光染色后40倍显微镜下马精子

Fig. 1 Representative patterns of equine sperm observed using SYBR-14/PI and JC-1 staining ($\times 40$)

a. STRA-14 和 PI 双荧光精子染色结果, 图中被染上绿色荧光的为质膜完整精子, 染上红色荧光的精子质膜破损; b. JC-1 荧光染料精子染色结果, 图中精子线粒体区域被染上橙黄色的精子线粒体功能完整, 未被染色精子线粒体功能受损; c. 图 b 同一视野可见光下观察结果。

a. The result of equine sperm stained by SYBR-14 and PI, the spermatozoa stained green are viable and the red stained cells are nonviable; b. The result of equine sperm stained by JC-1, stained spermatozoa with high membrane potential, non-stained spermatozoa with low membrane potential; c. View of b under phase contrast microscopy.

motility, TM; 精子运动速率大于 $20 \mu\text{m/s}$ 被认为是活精子); 前向运动精子比例 (progressive motility, PM; 直线率大于 75%, 运动速率大于 $50 \mu\text{m/s}$); 平均路径速度 (average path velocity, VAP; 精子每秒钟运动轨迹的长度); 快速运动精子比例 [rapid motility, RAP; 运动速度大于平均路径速度 (VAP) 的精子占总精子的比例]。

精子质膜完整性 (viability) 用 SYBR14/PI 荧光染色试剂盒进行检测 (Invitrogen, L-7011), 荧光染色效果见图 1a, 质膜完整的精子荧光显

微镜下发绿色荧光, 质膜破损精子被染成红色。具体方法为: 精液解冻后用 PBS 1:1 稀释后, 650 g 离心 7 min, 弃上清, 添加 1 ml HEPES 缓冲液 [10 mmol/L HEPES (Sigma 公司), 150 mmol/L NaCl, 10% BSA, pH 7.4], 添加 $5 \mu\text{l}$ SYBR 14 (0.02 mmol/L), 36°C 孵育 10 min, 然后再添加 $5 \mu\text{l}$ 2.4 mmol/L 碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 36°C 孵育 8 min, 孵育完成后 650 g 离心 7 min, 弃上清, 添加 1 ml PBS 稀释, 滴片置于荧光显微镜 (OLYMPUS, ONIX992-IX71) 下观测。每个实验组解冻 3 支

细管，每支细管取 3 个观察视野，每个样本计数精子个数不少于 500 个。

用 JC-1 (Invitrogen, M34152) 荧光染料染色检测精子线粒体膜电势 (mitochondrial membrane potential)，染色效果见图 1b，线粒体功能正常的精子膜电势高，被染成橙黄色，线粒体功能异常的精子膜电势低，不能被 JC-1 荧光染料染色，同一视野可见光下观察结果见图 1c。精液解冻后用 PBS 1:1 稀释后，650 g 离心 7 min，离心完成后弃上清，添加 1 ml PBS 洗涤 1 次。添加 10 μl JC-1 (200 μmol/L) 至 1 ml 稀释后精液样品中，36℃ 孵育 10 min，滴片观察，每个视野在荧光下对染色精子进行计数，然后转换至可见光下计数总精子数。每个实验组解冻 3 支细管，每支细管取 3 个观察视野，每个样本计数精子个数不少于 500 个。

1.3 统计学分析

每组实验重复 3 次，检测获得的运动精子比例 (TM)、前向运动精子比例 (PM)、快速运动精子比例 (RAP)、平均路径速度 (VAP)、质膜完整性及线粒体膜电势数据均用 SPSS 13.0 软件单因素方差分析 (one-way ANOVA)

中的 Tukey's 检验比较平均值差异性， $P < 0.05$ 认为差异水平显著。

2 结果

2.1 不同平衡时间对精液冷冻效果的影响

不同平衡时间对精子冻融后运动精子比例 (TM)、前向运动精子比例 (PM)、快速运动精子比例 (RAP)、平均路径速度 (VAP) 及质膜完整性的影响见图 2。不平衡或过夜平衡 (约 8 h) 精子冻融后运动精子比例 (TM)、快速运动精子比例 (RAP) 及质膜完整性均显著低于平衡 45、90、120、180、240 min 组 ($P < 0.05$)。平衡 120、180 和 240 min 三组精子冻融后运动精子比例 (TM)、前向运动精子比例 (PM)、快速运动精子比例 (RAP) 及质膜完整性显著高于其他各组 ($P < 0.05$)，这三组中平衡 180 min 后精子冻融后前向运动精子比例 (PM) 和平均路径速度 (VAP) 显著高于其他两组 ($P < 0.05$)，而平衡 120 min 组精子冻融后质膜完整性显著高于平衡 180 min 和 240 min 组 ($P < 0.05$)。显示该条件下，马精液冷冻最适平衡时间为 120 ~ 240 min。

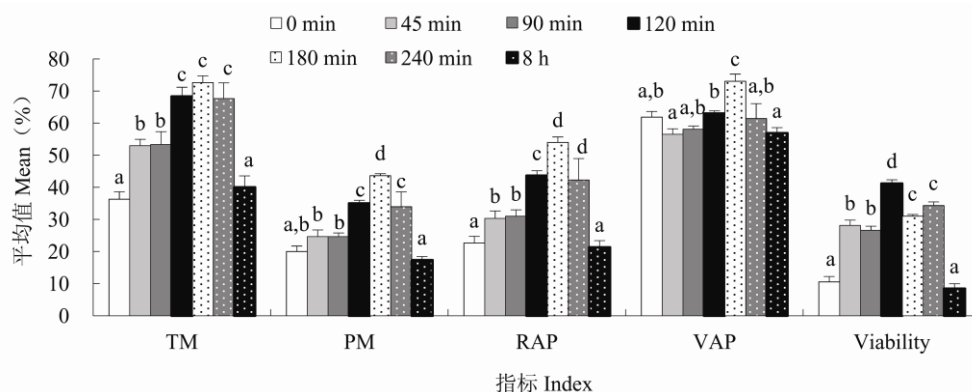


图 2 不同平衡时间对精液冷冻效果的影响

Fig. 2 The effect of equilibrium time on post-thaw sperm quality

TM. 运动精子比例; PM. 前向运动精子比例; RAP. 快速运动精子比例; VAP. 平均路径速度; Viability. 精子质膜完整性。同一检测指标上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), $a < b < c < d$ 。

TM. Total motility; PM. Progressive motility; RAP. Rapid motility; VAP. average path velocity; Viability. Plasma membrane integrity. Different superscripts indicated significant difference in one index ($P < 0.05$), $a < b < c < d$ 。

2.2 不同熏蒸高度对马精液冷冻效果的影响

采用距液氮面不同高度熏蒸冷冻精液, 解冻后精液运动精子比例 (TM)、前向运动精子比例 (PM)、快速运动精子比例 (RAP)、平均路径速度 (VAP)、质膜完整性及高线粒体膜电势率见图 3。液氮熏蒸高度为 6 cm 组冻融后, 精液运动精子比例 (TM)、质膜完整性及线粒体膜电势均显著低于熏蒸高度 2 cm 和 4 cm 及对照组 (程序冷冻仪组) ($P < 0.05$)。熏蒸高度 2 cm 和 4 cm 及对照组 (程序冷冻仪组) 冻融后精液运动精子比例 (TM) 及质膜完整性差异不显著, 但熏蒸高度 2 cm 和 4 cm 组线粒体膜电势显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 不同解冻程序对冻融后精液质量的影响

采用 37°C 30 s、75°C 7 s 和 46°C 20 s 三种解冻程序解冻后精液运动精子比例 (TM)、前向运动精子比例 (PM)、快速运动精子比例 (RAP)、平均路径速度 (VAP)、质膜完整性及线粒体膜电势见图 4。采用 46°C 20 s 程序解冻后精液运动精子比例 (TM)、快速运动精子比例 (RAP) 及线粒体膜电势显著高于采用 37°C 30 s 程序解冻组 ($P < 0.05$)。采用 37°C 30 s 和 75°C 7 s 程序解冻后精液运动精子比例 (TM)

和线粒体膜电势差异不显著, 但快速运动精子比例 (RAP) 后者显著高于前者 ($P < 0.05$)。采用三种解冻程序解冻后精液前向运动精子比例 (PM)、质膜完整性及平均路径速度 (VAP) 均无显著差异。

3 讨论

3.1 平衡时间对精液冷冻效果的影响

关于平衡对精液冷冻效果的影响机理还不是很清楚, 通常认为精液平衡的主要目的是让精子细胞与冷冻液间实现充分的物质交换, 尤其是让冷冻液中的抗冻剂 (如甘油) 充分扩散进入精子, 置换精子细胞内部的自由水 (Amann 1993, Graham 1996)。基于这一点, 理论上平衡时间的长短主要受稀释液中抗冻剂浓度和分子进出精子细胞的速率影响。对于同一浓度的某一种抗冻剂, 其渗透进入精子细胞达到平衡的时间主要受抗冻剂透过精子膜的速率决定。但 Tracey (1999) 的实验结果表明, 马精子对包括甘油、二甲基亚砷 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 及丙二醇在内的常规抗冻剂通透率都很高, 抗冻剂在较短的时间即可在精子细胞内外达到平衡, 因而他认为精液平衡的主要作用

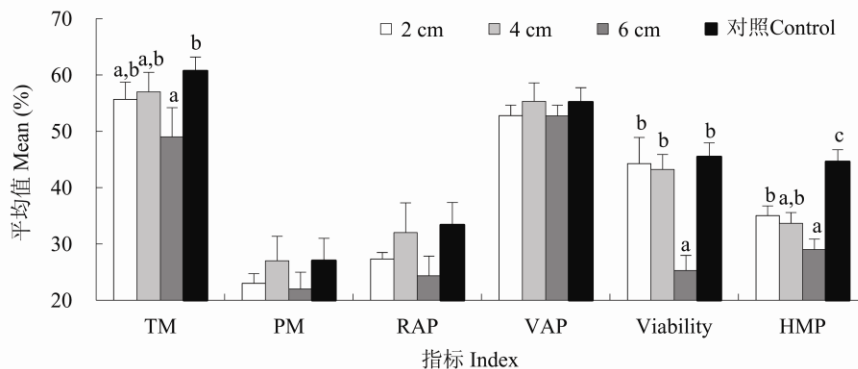


图 3 液氮熏蒸高度对精液冷冻效果的影响

Fig. 3 The effect of liquid nitrogen steam frozen on post-thaw sperm quality

TM. 运动精子比例; PM. 前向运动精子比例; RAP. 快速运动精子比例; VAP. 平均路径速度; Viability. 精子质膜完整性; HMP. 高膜电势精子。同一检测指标上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), $a < b < c$ 。

TM. Total motility; PM. Progressive motility; RAP. Rapid motility; VAP. average path velocity; Viability. Plasma membrane integrity; HMP. High mitochondrial membrane potential. Different superscripts indicated significant difference in one index ($P < 0.05$), $a < b < c$.

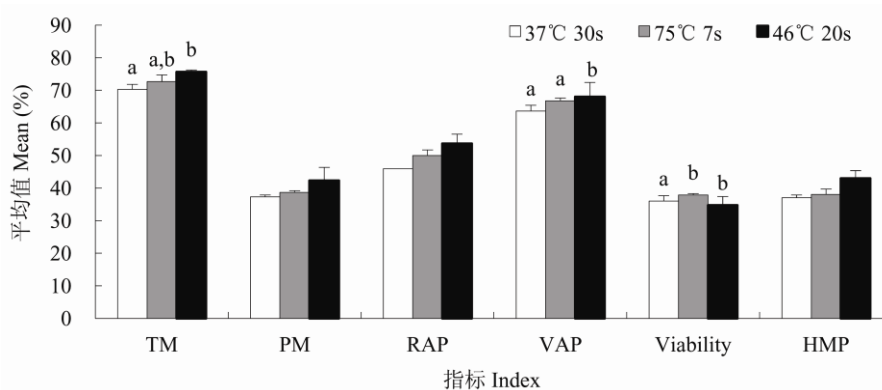


图 4 三种解冻程序对冻融后精子质量的影响

Fig. 4 The effect of different thawing methods on post-thaw sperm quality

TM. 运动精子比例; PM. 前向运动精子比例; RAP. 快速运动精子比例; VAP. 平均路径速度; Viability. 精子质膜完整性; HMP. 高膜电势精子。同一检测指标上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), $a < b$ 。

TM. Total motility; PM. Progressive motility; RAP. Rapid motility; VAP. average path velocity; Viability. Plasma membrane integrity; HMP. High mitochondrial membrane potential. Different superscripts indicated significant difference in one index ($P < 0.05$), $a < b$.

是让精子膜达到更加稳定的状态。本实验中不平衡直接进行冷冻效果较差,表明抗冻剂需要一定的时间渗透进入精子才能起到抗冻保护作用;平衡 45 min 和 90 min 获得了相似的冷冻效果,间接提示平衡 45 min 时抗冻剂已经充分渗透;平衡 120 ~ 240 min 获得了最好的冷冻效果,暗示平衡的作用可能除了让抗冻剂充分渗透外还起到了稳定精子膜的作用;过夜平衡导致非常差的冷冻效果,可能归因于抗冻剂的化学毒害作用 (Fahy et al. 1990)。另外平衡时间的长短还可能受稀释液成分影响,如法国 IMV 生产的 INRAFREZE 商品稀释液的推荐平衡时间为 75 min,巴西生产 Botucio 冷冻稀释液的推荐平衡时间为 20 min,德国 minitube 公司生产的商业马冷冻稀释液 Gent 的推荐平衡时间则为 2.5 ~ 5.0 h,我们所采用的 INRA82 基础液成分与 Gent 液更接近,因此最适平衡时间也基本一致。

3.2 冷冻方法对精液冷冻效果的影响

在世界范围内,规模化的牛冻精生产中心基本已经配备了自动化的精液程序冷冻仪,但对绝大多数实验室和冻精尚未产业化应用的物种,采用液氮熏蒸法仍然是精液冷冻的主要手

段。对于马而言,精液冷冻技术仍处于探索提高和小规模应用阶段,因此建立成本低廉、效果稳定的液氮熏蒸冷冻方法,对于马冷冻精液实验研究和大规模生产有重要意义。Morris 等 (2007) 的研究表明,当降温速率在 4 ~ 50°C/min 之间时,精液活力没有明显差异,高于或低于这一温度区间,精液活率将显著降低。根据 Prathalingam 等 (2006) 绘制液氮熏蒸法降温曲线图可知,位于液氮面上 2.5 cm 处 0.25 ml 细管中温度随时间呈非线性变化,熏蒸第 1 分钟降温相对较慢,约为 30°C/min;第 2 分钟的降温速率达到了 65°C/min,第 3 分钟的降温速率约为 15°C/min。精液冷冻过程中的危险温区为 -5 ~ -50°C (Penitente-Filho et al. 2014),因此在确保精子细胞内不形成冰晶的前提下,越快速通过这一危险温区对精子冷冻越有利,本实验中采用 2 cm 和 4 cm 的熏蒸高度获得了比 6 cm 更好的结果支持这一理论。但与程序冷冻仪相比,熏蒸法跨越这一危险区域时的降温速率显然要慢于程序冷冻仪,这或许可以解释本实验中程序冷冻仪冻后精子线粒体膜电势显著高于熏蒸法。

3.3 解冻程序对精液冷冻效果的影响

精液解冻和冷冻是两个正好相反的过程, 研究人员普遍认为这两个过程对精子具有同等重要性 (Watson 1995, Soderquist et al. 1997), 但在科学研究和生产实践中常常忽视解冻过程的重要性。在我国通常采用的冻精解冻方法是 35 ~ 39°C 30 s, 但有一些报道认为用高温瞬时解冻可以获得更好的效果, Soderquist 等 (1997) 研究显示绵羊 (*Ovis aries*) 冻精采用 50°C 9 s 和 70°C 5 s 方法解冻效果优于 35°C 12 s; Cochran 等 (1984) 研究认为, 采用 75°C 7 s 解冻马冻精效果优于 37°C 30 s 的解冻程序; Penitente-Filho 等 (2014) 报道 60°C 7 s 解冻山羊 (*Capra aegagrus*) 精液后质膜完整性显著高于 38°C 60 s; 最近 Athurupana 等 (2015) 用不含甘油的冷冻液冷冻猪精液, 采用 70°C 8 s 解冻后精液的活力、质膜完整性、顶体完整性及体外授精能力均显著高于常规解冻方法。我们的实验结果表明, 采用 75°C 7 s 和 46°C 20 s 两种高温快速解冻法均取得比常规 37°C 30 s 更优的解冻效果。高温瞬时解冻能有效提高冻后精液质量的原因被普遍认为是快速升温防止了解冻过程中重结晶对精液的伤害 (Morris et al. 2012)。

参 考 文 献

- Alipour H, Sharbatoghli M, Yazdi P E, et al. 2013. Pregnancy in the caspian miniature horse using frozen semen cryopreserved with the EquiPRO CryoGuard freeze medium and customized freezing protocols. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(4): 266-271.
- Amann R P. 1993. *Physiology and endocrinology* // McKinnon A O, Voss J L. *Equine Reproduction*. Malvern, PA: Lea & Fibiger, 677-678.
- Athurupana R, Ioki S, Funahashi H, et al. 2015. Rapid thawing and stabilizing procedure improve post-thaw survival and *in vitro* penetrability of boar spermatozoa cryopreserved with a glycerol-free trehalose-based extender. *Theriogenology*, 84(6): 940-947.
- Cochran J D, Amann R P, Froman D P, et al. 1984. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw Motility of equine sperm. *Theriogenology*, 22(1): 125-138.
- Fahy G M, Lilley T H, Linsdell H, et al. 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, 27(3): 247-268.
- Graham J K. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12: 131-147.
- McKinnon A O, Squires E L, Vaala W E, et al. 2011. *Equine Reproduction*. 2nd ed. American: Wiley-Blackwell, 2975.
- Morris G J, Acton E, Murray B J, et al. 2012. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*, 64(2): 71-80.
- Morris G J, Faszler K, Green J E, et al. 2007. Rapidly cooled horse spermatozoa: Loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*, 68(5): 804-812.
- Penitente-Filho J M, Oliveira F A, Jimenez C R, et al. 2014. Association of vitamin E with rapid thawing on goat semen. *The Scientific World Journal*, 2014(1): 964172-964172.
- Prathalingam N S, Holt W V, Revell S G, et al. 2006. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*, 66(8): 1894-1900.
- Qiao L, Tong Q, Fu Q, et al. 2014. Main content area effect of different thawing methods on post-thaw motility of cow semen in cryopreservation straws. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2014(4): 185-187.
- Soderquist L, Madrid B N, Rodriguez M H, et al. 1997. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, 48(7): 1115-1125.
- Tracey C. 1999. Evaluation of CPAs for use in the cryopreservation of stallion spermatozoa. Canada: A Thesis Presented to the Faculty of Graduate Studies of the University of Guelph.
- Vidament M. 2005. French field results (1985 - 2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 89(4): 115-136.
- Watson P F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*,

- 7(4): 871–891.
- 姜兴刚, 赵桂英, 和绍禹, 等. 2008. 冷冻前离心方法、平衡时间、甘油浓度对猪精子冷冻保存的影响. 畜禽生产, 2008(6): 42–43.
- 李晓东, 阿淑艳, 王希平, 等. 1996. 平衡时间对牛冷冻精液活力影响. 黑龙江动物繁殖, 4(1): 18–19.
- 刘玉, 张晓霞, 张海涛, 等. 2009. 延长平衡时间和提高冷冻保护剂的比例对牛冷冻精液冻后活力的影响. 青岛: 第六届全国低温生物医学及器械学术大会, 122–124.
- 乔建民, 苏满营. 1989. 晋南牛细管冷冻精液平衡时间与活力关系试验. 黄牛杂志, 1989(3): 42–43.
- 田秀娥, 蔺晓舟. 2013. 不同平衡时间对獭兔精液冷冻保存效果的影响. 中国畜牧兽医文摘, 34(2): 44–47.
- 辛国省, 张勇, 赵兴绪, 等. 2008. pH值和含甘油稀释液平衡时间对藏獭精液冷冻保存活率的影响. 中国畜牧杂志, 44(7): 15–17.