

卵丘細胞之存否與不同抗凍液組成對豬卵母細胞玻璃化冷凍效果的影響⁽¹⁾

劉振發⁽²⁾ 李俊德⁽³⁾ 李秀美⁽²⁾ 吳明哲⁽⁴⁾ 陳立人⁽²⁾

收件日期：90 年 10 月 12 日；接受日期：91 年 9 月 12 日

摘 要

豬卵母細胞的冷凍保存有利於種源保存與供應其他胚顯微操縱研究之需。本研究之目的，係探討卵母細胞的去除與否和比例相異的冷凍保護劑對於不同成熟階段的豬卵母細胞以玻璃化法冷凍之影響。供試的卵丘-卵母細胞複合體（Cumulus-oocyte-complex, COC）係採集自屠宰場女豬卵巢的濾泡。玻璃化冷凍保存的保護劑為：以含 18%胎牛血清的杜比克式改良式磷酸緩衝溶液（modified Dulbecco's phosphate buffered solution, mDPBS）調製成 40%丙二醇（Ethylene Glycol）和 18% Ficoll 70 的溶液，再將此二溶液以不同的體積比例調製成爲 A（3:2）與 B（1:1）二種抗凍液。供試的卵丘-卵母細胞複合體經不同時間（0、24 與 48 小時）的體外成熟培養後，逢機分爲去除與不去除卵丘細胞二群，分別各以二種抗凍液之一浸漬 10 分鐘後，裝填入 0.25 ml 麥管，直接投入液態氮中進行急速冷凍。解凍係在 60°C 溫水中行之。待內容物液化後以含蔗糖之 mDPBS 逐步將冷凍液置換出來。解凍卵母細胞的存活，則以螢光染劑 SYBR-14 和 Prodidium iodide 染色判定。結果顯示，具有完整卵丘細胞包被的卵母細胞以 A 抗凍液進行冷凍時，在體外培養 0、24 與 48 小時各個成熟階段，其冷凍解凍後之存活率分別爲 100.0%、96.0%與 0；當以 B 抗凍液進行冷凍時，則其各個成熟階段卵母細胞的解凍後存活率分別爲 57.6%、69.0%與 6.67%。而裸露的卵母細胞以 A 抗凍液進行冷凍時，在體外培養 0、24 與 48 小時各個成熟階段，其冷凍解凍後之存活率分別爲與 100%、34.5%與 0；當以 B 抗凍液進行急速冷凍時，則其各個不同的成熟階段卵母細胞的解凍後存活率分別是 29.0%、34.5%、和 0。

關鍵詞：豬、卵母細胞、玻璃化冷凍保存。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1132 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

- (3) 高雄縣政府農業局。
- (4) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

緒 言

豬卵體外成熟技術的肇始 (Motlik and Fulka, 1974) 與豬卵體外受精技術的突破 (Cheng, 1985), 以及這二種技術的結合, 導致可由豬卵體外成熟、體外受精、體外培養與胚移置後, 產下正常仔豬的結果 (Mattioli *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1993)。此等豬胚體外生產系統技術的發展, 有利於豬卵巢等屠宰廢棄物的資源再利用, 同時也可以大量提供試驗豬胚的需求。

豬卵母細胞的品質隨屠宰到卵子收集時間的延長而低下 (駱及吳, 1996), 而影響後續之發育並降低利用效率。為因應豬卵母細胞這種生物學的特性, 以及利用屠宰場的廢棄卵巢提供生殖科技與顯微操縱等研究所需的大量豬卵母細胞來源, 發展豬卵母細胞的冷凍保存技術實有必要 (Nagashima *et al.*, 1992, 1994; Ledda *et al.*, 2001)。

哺乳動物生殖細胞的冷凍研究起始於精子的冷凍保存 (Polge *et al.*, 1949), 50 年來的進展已使得這項技術廣泛地使用在家畜尤其是乳牛的產業上, 對於優良遺傳物質的傳播與提升育種改良的速率已有卓越的貢獻。另一方面, 在家畜胚的冷凍保存中, 亦以乳牛胚冷凍技術的發展最為成熟, 不論是傳統的緩慢降溫冷凍法抑或玻璃化快速降溫冷凍法, 均已經到達商業化應用的層面 (Niemann, 1991; Vajta, 2000)。

哺乳動物卵母細胞的冷凍保存研究的起步比精子與胚者均為較晚, 且其成功率亦較低 (Niemann, 1991; Vajta, 2000), 雖然其這項技術的發展有助於提供研究所需的大量卵源, 在動物保種與挽救瀕臨絕種動物方面亦具有實際上的效用, 但迄今為止尚未被視為一種已經發展成熟的技術 (Ledda *et al.*, 2001)。究其原因, 可能與哺乳動物卵母細胞為大型的單一細胞, 故其細胞膜、染色體與紡錘絲等胞器, 對於冷凍過程中水份脫出所產生的滲透壓改變與冰晶形成等可能產生的低溫傷害, 比細胞較多且小型的胚更為敏感所致 (Martino *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996; Vajta, 2000)。相較其他哺乳類物種, 豬之精子、卵母細胞與胚對於低溫的耐受性尤低。當降溫到 15°C 時, 豬精子便逐漸失去活力與授精能力 (Pursel *et al.*, 1973); 而豬之卵母細胞同樣的低溫下則完全失去存活與發育的能力 (Didion *et al.*, 1990; Nagashima *et al.*, 1992, 1994; Dobrinsky, 1997)。自 1980 年代起已有豬胚冷凍成功的報告, 包括以傳統的緩慢降溫冷凍法冷凍擴張囊胚 (郭, 1993; Kameyama *et al.*, 1990; Nagashima *et al.*, 1992)、孵化囊胚 (郭, 1993; Oguri, 1990; Nagashima *et al.*, 1992; Kasiwazaki *et al.*, 1991ab; Fujino *et al.*, 1993), 以玻璃化快速降溫冷凍法冷凍豬擴張囊胚或孵化囊胚 (Dobrinsky and Johnson, 1994)。然而, 迄今為止尚未有成功地從冷凍解凍的豬卵母細胞獲致仔豬的報告 (Dobrinsky, 2001)。

為提高豬卵母細胞在冷凍過程中對於滲透壓驟變的耐受能力, 前報已有應用抗凍蛋白的添加以提高慢速冷凍豬卵的存活率 (陳等, 1995), 和以添加 Ficoll 70 於玻璃化冷凍保護液急速冷凍豬卵 (Wu and Lee, 1996) 的初步結果。而已知額外添加卵丘細胞於去除卵丘細胞的裸露卵母細胞進行共培養, 並無法對於裸露卵母細胞的成熟或發育有所助益, 顯示維持卵母細胞與卵丘細胞之間的連繫, 對於卵母細胞後續之成熟發育有重要之影響 (Hashimoto *et al.*, 1998)。Fuku *et al.* 亦認為, 卵母細胞對於低溫的敏感性, 可能與卵丘細胞的正常連繫受到干擾或破壞有關 (Fuku *et al.*, 1995)。本研究將探討卵丘細胞的去除與否和抗凍液中冷凍保護劑含 Ficoll 70 比例的組成差異, 對於不同成熟階段豬卵母細胞冷凍保存之影響。

材料與方法

I. 豬卵母細胞之收集: 自屠宰場採集女豬屠體卵巢, 以收集具有完整卵丘細胞包被之卵丘 — 卵母

細胞複合體〔Cumulus-oocyte-complex, COC〕，再以吳及李(1998)的方法進行體外成熟培養，於培養後不同時間(0、24、與48小時)，逢機分為去除與不去除卵丘細胞二群供試。

II. 豬卵母細胞之冷凍：

- (i) 抗凍液之製備：玻璃化冷凍保存的保護劑係以含18%胎牛血清的mDPBS調製成40% Ethylene Glycol 和18% Ficoll 70 的溶液，再將此二溶液以不同的體積比例調製成爲A(3:2)與B(1:1)二種抗凍液。
- (ii) 玻璃化冷凍操作：豬卵丘—卵母細胞複合體在體外成熟培養開始後不同時間(0、24與48小時)，或利用毛細玻璃拉製的微管吹吸以去除卵丘細胞，或不經去除卵丘細胞，分別各以上述二種抗凍液之一浸漬10分鐘後，裝填入0.25 ml 麥管，直接投入液態氮中進行急速冷凍，並在液態氮中保存二周以上。
- (iii) 豬卵母細胞解凍操作：解凍係先將取出自液態氮的麥管浸入於60℃溫水中行之。待內容物液化後，將內容物擠出於含1/3體積0.2 M 蔗糖與2/3體積抗凍液的溶液中平衡五分鐘，再逐步移置於含2/3體積0.2 M 蔗糖和1/3體積抗凍液的溶液、含0.2 M 蔗糖和18%胎牛血清的mDPBS、含0.1 M 蔗糖和18%胎牛血清的mDPBS中和含18%胎牛血清的mDPBS各停留五分，以便將抗凍液置換出來。
- (iv) 冷凍解凍後豬卵母細胞存活之判定：冷凍解凍後具卵丘細胞包被與去除卵丘細胞之豬卵母細胞存活之判定，係仿駱及吳(1996)以螢光染劑SYBR-14和Prodidium iodide (PI)行之。具有完整細胞膜的存活豬卵，將僅與螢光染劑SYBR-14結合，在螢光顯微鏡下呈現綠色螢光。而細胞膜受損死亡者，將由於PI的滲入，使其在螢光顯微鏡下呈現紅色螢光。
- (v) 不同處理之豬卵母細胞存活百分率之比較係以塔方分析(chi-square test)進行之。

結果與討論

卵丘細胞的去除與否和抗凍液中冷凍保護劑比例的差異，對於不同成熟階段豬卵母細胞冷凍保存之影響如表1所示。具有完整卵丘細胞包被的豬卵母細胞以A抗凍液進行冷凍時，在體外培養0、24與48小時各個成熟階段，其冷凍解凍後之存活率分別爲100.0%、96.0%與0%；當以B抗凍液進行冷凍時，則其各個成熟階段卵母細胞的解凍後存活率分別爲57.6%、69.0%與6.67%。而裸露的卵母細胞以A抗凍液進行冷凍時，在體外培養0、24與48小時各個成熟階段，其冷凍解凍後之存活率分別爲與100.0%、34.5%與0%；以B抗凍液進行急速冷凍時，則其各個不同的成熟階段卵母細胞的解凍後存活率是29.0%、34.5%和0%。

卵母細胞對於低溫的低耐受性爲其冷凍保存操作上最大的障礙(Martino *et al.*, 1996; Vajta, 2000; Ledda *et al.*, 2001)。低溫對於卵母細胞的影響包括細胞膜的安定性(Keleshova *et al.*, 1999; Zeron *et al.*, 1997, 2000)、細胞微細管(microtubule)細胞骨骼(cytoskeleton)和紡錘體的穩定度(Fuku *et al.*, 1995; Leibo *et al.*, 1996)、與透明帶的通透性和完整性(陳等, 1995; Vincent *et al.*, 1990)、卵母細胞內脂質小滴的安定性(Nagashima *et al.*, 1992, 1994; Isachenko *et al.*, 2001)、以及染色體組的正常與完整性(Shaw *et al.*, 1998; Ledda *et al.*, 2001)。在以傳統的緩慢降溫方式冷凍法中，提高卵細胞膜安定性以降低其對於低溫的敏感性的方式有添加凍蛋白質(陳等, 1995; Arav *et al.*, 1993)、醣類(Keleshova *et al.*, 1999)或抗氧化劑(Zeron *et al.*, 1997)、或甚至以電融合法將含有安定細胞膜的特殊成份利用微脂粒送進卵細胞膜以改變其安定性(Zeron *et al.*, 2000)。然而，對於以傳統緩慢降溫方式冷凍法中，卵母細胞所必須面對的15到-5℃這一個冰晶形成而造成冷凍傷害最大危害的溫度區帶而言，添加醣類或抗氧化劑的方式所能提供的防護效果實甚爲有限(Shaw *et al.*, 1997; Keleshova

et al., 1999; Dobrinsky, 2001)。另以微脂粒電融合改變細胞膜特性的方式，不但操作繁複而且也難以排除因而誘起卵母細胞孤雌化致活的可能性。

表 1. 玻璃化冷凍解凍後豬卵母細胞的存活率

Table 1. Survival of porcine oocytes after thawing from vitrification

| Cryoprotective solution | Time of in vitro maturation (hrs) | Cumulus Intact(+)/denuded(-) | No. of oocytes tested | No. (%) of oocytes survival after thawing |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------|---|
| A | 0 | + | 30 | 30 (100.0) ^a |
| | | - | 30 | 30 (100.0) ^a |
| | 24 | + | 25 | 24 (96.0) ^a |
| | | - | 29 | 10 (34.5) ^{bc} |
| | 48 | + | 40 | 0 (0) ^c |
| | | - | 35 | 0 (0) ^c |
| B | 0 | + | 33 | 19 (57.6) ^b |
| | | - | 31 | 9 (29.0) ^{bc} |
| | 24 | + | 29 | 20 (69.0) ^b |
| | | - | 29 | 10 (34.5) ^{bc} |
| | 48 | + | 30 | 2 (6.67) ^c |
| | | - | 29 | 0 (0) ^c |

^{a, b, c} The percentages within the same column without the same letter differ significantly ($P < 0.05$).

豬卵母細胞對於低溫的耐受性比其他哺乳動物者為低 (Didion *et al.*, 1990; Nagashima *et al.*, 1992, 1994; Dobrinsky, 1997)。Didion *et al.* (1990) 以 1.5 M 的甘油做為冷凍保護劑，將生殖泡階段 (germinal vesicle stage) 具有完整卵丘包被的豬卵母細胞降溫到 15°C 並保持 10 分鐘後回溫，發現所有豬卵母細胞均無法存活。並且，當利用相同的冷凍保護劑將具有完整卵丘包被的生殖泡階段豬卵母細胞以傳統緩慢降溫方式冷凍解凍後，雖然包被於卵母細胞上的卵丘細胞仍具有正常的存活率，但是所有的卵母細胞則均已死亡。前報中以添加第三型抗凍蛋白於 1.5 M 甘油的冷凍保護劑並以傳統緩慢降溫方式冷凍時，雖然可以提高已排出第一極體的豬成熟豬卵母細胞之耐凍能力約達 29.5% (78.95% v.s. 60.97%)；然此操作對於未排出第一極體的豬卵母細胞則無保護效果 (陳等, 1995)。Didion *et al.* (1990) 與陳等 (1995) 的結果顯示，當以傳統緩慢降溫方式進行冷凍保存時，不同成熟階段的豬卵母細胞之耐受程度有所差異，對已成熟豬卵母細胞較為有效。

相較於傳統緩慢降溫的冷凍方式，玻璃化法急速冷凍表面上雖然只有在冷凍解凍的過程中避免冰晶的形成之優勢，然而其急速降溫使卵與胚快速地通過 15°C 到 -5°C 這個危害最大的溫度區帶 (Dobrinsky, 1996; Martino *et al.*, 1996; Isachenko *et al.*, 1998; Zeron *et al.*, 1999)，可俾益於提高包括細胞內脂質小滴、含脂質的生物膜與細胞骨骼等細胞構造的安定性。而且，大分子物質如 Ficoll 或 polyvinylpyrrolidone (PVP) 的添加，可提高玻璃化物質形成的溫度 (Shaw *et al.*, 1998)，並可緩衝滲透壓的劇變，以提高卵或胚在冷凍解凍操作中的存活率 (McWilliams *et al.*, 1995)。利用添加 7% PVP 於 8.0 M 丙二醇 (ethylene glycol)，中並以玻璃化法急速冷凍處理所保存的豬胚，經解凍後移置到受胚母豬，已有成功產仔的報告 (Kobayashi *et al.*, 1998)。Wu and Lee (1996) 於生殖泡階段豬卵母細胞含丙二醇的冷凍保護劑中，添加 4.5%、6.0% 或 7.5% 的 Ficoll 70，經玻璃化急速冷凍解凍後，其存活率分別為 82%、81% 與 97%，顯示 Ficoll 70 的添加有利於經玻璃化法急速冷凍與解凍後的存活率，且具有劑量效應的趨勢。本研究結果以 Wu and Lee (1996) 所使用的冷凍保護劑中成效最佳的配方 (即本研究中含有 7.5% Ficoll 70 之 A 抗凍液) 與含有 9.0% 的 Ficoll 70 之 B 抗凍液做

為冷凍保護劑，進一步比較提高提高 Ficoll 70 的含量對於體外成熟過程各階段的豬卵母細胞進行玻璃化冷凍的影響。實驗結果顯示，提高抗凍液中 Ficoll 70 的含量從 7.2% 到 9.0% 對於體外成熟過程各階段的豬卵母細胞玻璃化冷凍解凍後的存活率不但沒有助益，反而均有負面的效果（表 1）。造成這種結果的原因，可能是 B 抗凍液中 Ficoll 70 的含量雖然提高到 9.0%，但相對地丙二醇濃度降為 20%，造成其在急速降溫時玻璃化形成的速度不如丙二醇濃度為 24% 的 A 抗凍液快之故。Shaw *et al.* (1997) 亦指出影響抗凍液玻璃化形成速度的主要因素為配方中丙二醇的濃度，增加 Ficoll 的添加濃度對於抗凍液玻璃化形成速度並沒有絕定性的影響。

雖然不去除卵丘細胞包被的豬卵母細胞在生殖泡階段與經體外成熟培養 24 小時後，於含有 24% 丙二醇與 7.5% Ficoll 70 之 A 抗凍液保護下，可以耐過玻璃化法冷凍的操作，在解凍後有 96% 以上的存活率。但經過體外培養 48 小時後已達成熟階段的豬卵母細胞，在相同的處理下解凍後則完全無法存活。顯示此種玻璃化冷凍保護劑對於豬卵母細胞冷凍保存的保護能力有隨著成熟程度的增進而漸減的趨勢。這種現象可能為此冷凍保護液對於卵丘-卵母細胞複合體的構造當中，連繫卵丘與卵母細胞之間的 gap junction 在不同的成熟階段對於低溫的耐受性之影響力的差異有關。Suzuki *et al.* (2000) 指出，連繫豬卵丘-卵母細胞複合體的卵丘細胞突出物 (cumulus cell projections) 主要係由微管系 (microfilaments) 所組成，而此種微管系於生殖泡與 metaphase-I (體外成熟培養第 0 到 24 小時) 階段的數量最多，而在體外成熟培養至 metaphase-II (體外成熟培養第 36 到 44 小時) 則急速減少。這種因為體外成熟的程度而出現的卵丘與卵母細胞之連繫的成份改變，也會造成卵母細胞本身細胞膜的變化，因而改變其對於玻璃化冷凍操作的耐受力。

去除卵丘未經培養的豬卵母細胞，在 A 抗凍液的保護下可以耐過玻璃化冷凍，解凍後全數存活。但是經體外成熟培養 24 後去除卵丘，在以相同的處理予以冷凍解凍後，其存活率則降低到 34.5%。進一步於體外成熟培養到 48 小時，經去除已擴散的卵丘後再以相同的方式予以玻璃化冷凍，解凍後的豬卵母細胞則無一存活。這種現象除卻前述之組成卵丘與卵母細胞之連繫的成份改變，與其所造成卵母細胞本身細胞膜的變化等原因之外，亦不排除去除卵丘細胞的操作對於卵母細胞細胞膜結構的改變，而使得去除卵丘而裸露的豬卵母細胞對於玻璃化冷凍的耐受力更形低下。

不同成熟階段的哺乳動物卵母細胞對於低溫與冷凍操作有不同的耐受能力 (Leibo *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1998)。前報中顯示於 1.5 M 甘油抗凍劑中添加抗凍蛋白，可以提高豬已成熟卵母細胞以緩慢降溫法冷凍解凍後之存活率，但對於未成熟之卵母細胞則無保護效果 (陳等, 1995)。本研究的結果亦顯示豬生殖泡與 metaphase-I 階段未去除卵丘的卵母細胞在含有 24% 丙二醇與 7% Ficoll 的抗凍液中，可以耐過玻璃化急速冷凍而存活，而已達 metaphase-II 的豬卵母細胞，則無法耐過相同的操作。此等結果可能暗示豬卵母細胞在不同的體外成熟階段，由於細胞內胞器、細胞骨骼及細胞膜特性的改變，是故對於緩慢降溫法與玻璃化急速降溫法等不同的冷凍方式有不同的適應性。相類似的論點亦見於其他哺乳動物卵母細胞的冷凍研究報告與綜論 (Fuku *et al.*, 1995; Zeron *et al.*, 1999; Vajta, 2000; Dobrinsky, 2001)。

雖然在其他的哺乳類物種，包括小鼠、大鼠、倉鼠、牛、山羊、綿羊與人類等的卵母細胞均有成功冷凍的結果 (Didion *et al.*, 1990; Vajta, 2000; Ledda *et al.*, 2001)。然而，相較於其他家畜，有關豬卵母細胞冷凍保存的研究文獻並不多，且亦迄今尚無成功冷凍豬卵母細胞解凍後經授精並獲致仔豬的報告 (Dobrinsky, 2001)。有鑑於種源保存與其他如豬胚複殖與基因轉殖等生殖科技的試驗研究對於豬卵的大量需求，進一步深究開發可以穩定操作豬卵母細胞冷凍保存的方式，實有其必要性。

參考文獻

- 吳明哲、李秀美。1998。豬胚的體外生產。畜產研究 31：53~61。
- 郭有海。1993。豬胚冷凍及其移置之研究。中華農學會報新 163：82~91。
- 陳立人、黃文瑛、駱亞欣、吳明哲。1995。第三型抗凍蛋白對極體形成前後豬卵之冷凍保存效果。畜產研究 28：169~179。
- 駱亞欣、吳明哲。1996。豬卵丘細胞包被完整性與其細胞存活之關係。中畜會誌 25（增刊）：131。
- Arav, A., B. Rubinsky, G. Fletcher and E. Serend. 1993. Cryogenic protection of oocyte with antifreeze proteins. *Mol.Reprod. Dev.* 36：488~493.
- Cheng, W. T. K. 1985. In vitro fertilization of farm animal oocytes. PhD thesis. Council for National Academic Awards, England.
- Didion, B. A., D. Pomp, M. J. Martin, G. E. Homanics and C. L. Markert. 1990. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.* 68：2803~2810.
- Dobrinsky, J. R. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45：17~26.
- Dobrinsky, J. R. 1997. Cryopreservation of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 52：301~312.
- Dobrinsky, J. R. 2001. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. *Theriogenology* 56：1333~1344.
- Dobrinsky, J. R. and L. A. Johnsin. 1994. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification - a study of in vitro development. *Theriogenology* 42：25~35.
- Fujino, Y., Y. Ujisato, K. Endo, T. Tomizuka, T. Kojima and N. Oguri. 1993. Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos. *Cryobiology* 30：299~305.
- Fuku, E., L. Xia and B. R. Downey. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 32：39~156.
- Hashimoto, S., K. Saeki, Y. Nagao, N. Minami, M. Yamada and K. Utsumi. 1998. Effects of cumulus cell density in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 50：334~335.
- Isachenko, V., C. Soler, E. Isachenko, F. Perez-Sanchez and V. Grishchinko. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36：250~253.
- Isachenko, V., E. Isachenko, H. W. Michelmann, J. L. Alabart, I. Vazquez, N. Bezugly and F. Nawroth. 2001. Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes. *Anat Histol Embryol* 30：333~338.
- Kameyama, K., T. Takedomi, K. Miyamoto and T. Onihara. 1990. Effect of lecithin on cryopreservation of porcine embryos. *Proceeding of 78th Annual Conference of the Japanese Society of Animal Reproduction*. Niigata, Japan. P.22.
- Kashiwazaki, N., S. Ohtani, K. Miyamoto and S. Ogawa. 1991a. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *Vet. Rec.* 16：256~257.
- Kashiwazaki, N., S. Ohtani, H. Nagashima, H. Yamakawa, W. T. K. Cheng, A. C. Lin, R. C. S. Ma and S. Ogawa. 1991b. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *Theriogenology* 35：211.
- Keleshova, L.L., J. M. Shaw, D.R. MacFarlane and A. O. Trounson. 1999. Sugar exert a major influence

- on the Vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 38 : 119~130.
- Kobayashi, S., M. Takei, M. Kano, M. Tomita and S. P. Leibo. 1998. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology* 36 : 20~31.
- Ledda, S., G. Leoni, L. Bogliolo and S. Naitana. 2001. Oocyte cryopreservation and ovarian banking. *Theriogenology* 55 : 1359~1371.
- Leibo, S. P., A. Martino, S. Kobaiashi and J. E. Pollard. 1996. Stage development sensitivity of oocytes and embryos at low temperature. *Anim. Reprod. Sci.* 42 : 45~53.
- Martino, A., J. W. Pollard and S. P. Leibo. 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45 : 503~512.
- Mattioli, M., G. Bacci and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 31 : 1201~1207.
- McWilliams, R. B, W. E. Gibbons, and S P. Leibo. 1995. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to monosaccharides and disaccharides. *Human Reprod.* 10 : 1163~1171.
- Motlik, J. and J. Fulka. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 36 : 235~237.
- Nagashima, H., H. Yamakaya and H. Niemann. 1992. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stage. *Theriogenology* 37 : 839~850.
- Nagashima, H., N. Kashiwazaki, R. Ashman, C. Grupen, R. F. Seamark and M. Nottle. 1994. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 41 : 113~118.
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research need. *Theriogenology* 35 : 109~124.
- Oguri, N. 1990. Recent progress in porcine embryo transfer and cryopreservation. *Jpn. J. Swine Sci.* 27 : 80~86.
- Polge, C., A. U. Smith and A. S. Parkers. 1949. Revival of spermatozoa and dehydration at low temperatures. *Nature* 164 : 666.
- Pursel, V. G., L. A. Johnson and L. L. Schulman. 1973. Fertilizing capacity of boar semen stored at 15°C. *J. Anim. Sci.* 37 : 532~535.
- Shaw, J M., L. L. Kuleshova, D. R. MacFarlane and A. O. Trounson. 1997. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology* 35 : 219~229.
- Shaw, J M., A. Oranratnachar and A. O. Trounson. 1998. Fundamental cryopreservation of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53 : 59~72.
- Suzuki, H., B. S. Jeong and X. Z. Yang. 2000. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 63 : 723~729.
- Suzuki, T., A. Boediono, M. Takagi, S. Saha and C. Sumantri. 1996. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method in vitro. *Cryobiology* 33(5) : 515~524.
- Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod Sci.* 60-61 : 357~364.
- Vincent, C., S. J. Pickering and M. H. Johnson. 1990. The hardening effect of DMSO on mouse zona pellucida requires of an oocyte and is associated with reduction in the number of cortical granules present. *J. Reprod. Fertil.* 89 : 153~159.

- Wu, M. C. and H. L. Lee. 1996. Vitrification of porcine oocytes. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.* 25(1):35~51.
- Yoshida, M., Y. Mizoguchi, K. Ishigaki, T. Kojima and T. Nagai. 1993. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 39 : 1303~1311.
- Zeron, Y., A. Arav and J. H. Crowe. 1997. The effect of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in the lipid phase transition in immature bovine oocytes. *Theriogenology* 47 : 362.
- Zeron, Y., M. Pearl, A. Borochoy and A. Arav. 1999. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* 38 : 35~42.
- Zeron, Y., M. Tomczal, J. H. Crowe and A. Arav. 2000. Electrofusion of bovine oocytes with different liposomes change the membrane thermobehaviour and reduces chilling sensitivity. *Theriogenology* 53 : 267.

Cumulus Removal and Different Cryoprotectants Effects on Porcine Oocytes Vitrification ⁽¹⁾

Jenn-Fa Liou ⁽²⁾, Jing-Der Li ⁽³⁾, Hsiu-Mei Lee ⁽²⁾,
Ming-Che Wu ⁽⁴⁾ and Lih-Ren Chen ⁽²⁾

Received : Oct. 12, 2001 ; Accepted : Sep. 12, 2002

Abstract

Cryopreservation of porcine oocytes would benefit the preservation of germplasm as well as the supply of experimental materials in embryological studies. The objective of this study was to investigate the influences of cumulus cells and different cryoprotectants on porcine oocyte vitrification. Porcine carcass ovaries obtained from a slaughterhouse were used to collect cumulus-oocyte-complexes (COCs). Two different cryoprotective solutions were prepared from 40% ethylene glycol and 18% Ficoll 70 in mPBS containing 18% fetal bovine serum. Solution A was composed with three parts 40% ethylene glycol and two parts 18% Ficoll 70. Solution B was a mixture of 40% ethylene glycol and 18% Ficoll 70 at the same volume. COCs at different time of in vitro maturation were randomly designated into cumulus-intact and cumulus-free groups. Oocytes were then subjected to vitrification in solutions A and B. Oocyte survival rates in the two groups were determined by SYRB-14 and prodidium iodide staining. The results showed that cumulus-intact oocytes at 0, 24, and 48 hours of in vitro maturation survived after vitrification were 100.0%, 96.0% and 0.0% in solution A, and 57.6%, 69.0%, and 6.67% in solution B, respectively. The survival rates for the cumulus-free oocytes at 0, 24, and 48 hours of in vitro maturation were 100.0%, 34.5%, and 0.0% in solution A, and 29.0%, 34.5% and 0.0% in solution B.

Key words: Pigs, Oocytes, Vitrification.

(1) Contribution number 1132 from Taiwan Livestock Research Institute, council of Agriculture.

(2) Division of Physiology, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, ROC.

(3) Agricultural Department of Kaohsiung County Government, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

(4) Hsinchu Branch Institute, COA-TLRI, Hsinchu, Taiwan, ROC.