

二細胞期與八細胞期高繁殖力豬胚外科採集 時間之探討⁽¹⁾

顏念慈^{(2) (5)} 劉振發⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾ 鄭連春⁽³⁾

林傳宗⁽²⁾ 張秀鑾⁽⁴⁾ 吳明哲⁽²⁾

收件日期：96年4月2日；接受日期：97年2月13日

摘要

本試驗旨在探討獲得二細胞期與八細胞期豬胚之適當外科採集時間。應用七月齡以上之藍瑞斯女豬 (*Sus scrofa*) 經律期媒 (Regumate) 連續餵飼 14 天後，隔天肌肉注射 2000 IU 孕馬血清激性腺素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)，間隔 72~78 小時再注射 1500 IU 人類絨毛膜激性腺素 (human chorionic gonadotropin, hCG)。所有誘發發情之女豬於 hCG 注射後 24 及 30 小時，以人工授精方法進行複次配種；並隨機分別在第一次配種後 48~50 小時、66~68 小時、78~80 小時、89~91 小時、95~97 小時進行外科手術取胚，以探討獲得二細胞期與八細胞期豬胚之適當時間。結果所得之二細胞期與八細胞期豬胚比率分別在 48~50 小時者 (n=12) 為 49.3 及 0%、在 66~68 小時者 (n=3) 為 10.4 及 1.3%、在 78~80 小時者 (n=4) 為 1.4 及 14.8%、在 89~91 小時者 (n=3) 為 3.7 及 9.3%、在 95~97 小時者 (n=3) 為 0 及 22.6%。此結果顯示二細胞期豬胚外科採集時間在第一次配種後 48~50 小時較佳，而八細胞期豬胚外科採集時間不易準確掌握，值得再深入探討。

關鍵詞：豬胚期、外科採集時間、高繁殖力。

緒言

繁殖效率為家畜生產效率的重要指標之一，經由改善雌畜豬胚的存活力與建立早期豬胚發育之基因表現藍圖，將有助於畜群提升繁殖效率進而增加生產效率；繁殖性能的提升將可降低仔豬的生產成本，增加豬肉產品的競爭力。由於台灣以往豬隻選拔策略，過度注重生長性能而忽略繁殖性

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1418號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所。

(3) 苗栗縣政府。

(4) 國立屏東科技大學。

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

能，導致近年來豬隻繁殖效能下降與繁殖力低下是國內種豬產業最大的問題；提高臺灣豬隻的繁殖效能將是面對 WTO 有利的競爭條件。提高繁殖效率的首要策略之一為提昇豬胚的存活率與建立早期豬胚發育之基因表現藍圖。豬胚發育成功與否主要取決於胚著床前的時期，亦即母源性及胚源性的轉換 (maternal-to-embryonic transition) 時期，約於豬胚 4 個細胞期至 8 個細胞期，亦即於母源性基因 (maternal genes) 表現停止，而胚源性基因 (embryonic genes) 開始表現的階段。利用哺乳動物早期胚胎進行體外培養 (*in vitro culture*)，常於特定發育階段產生“培養阻障 (culture block)”而造成胚胎死亡。不同物種發生阻障時間不同，例如小鼠發生於 2 個細胞期 (Schutz, 1993)，牛與羊發生於 8~16 細胞期，而人與豬則主要發生在 4 細胞期，因此又稱為“four cell block” (Zuccotti, *et al.*, 2002)。理論上若能研究造成早期胚發育障礙的機轉，即能提高豬的繁殖效能。因此，在此階段表現的基因可決定豬胚未來的分化成長與存活率。建立早期豬胚發育之基因表現藍圖 (cDNA expression profile)，有助於研究或瞭解影響豬隻繁殖效能的基因，並提供研究大型哺乳動物早期胚胎發育及生殖的重要模式。由於生物微晶片技術的研發與自受精卵中純化微量 RNA 後，經特定 RNA 聚合酶放大訊號製成螢光探針技術的結合，使得利用微量的胚 RNA 同時檢測上萬個表現序列標示 (express sequence tag, EST)，進而將建立早期胚胎之基因表現藍圖變為可行。本研究計畫目標係在提供高繁殖力種豬之早期豬胚，促使早期胚 EST 與胚發育之基因表現藍圖得以建立，配合繁殖效率表現差異的 DNA 序列比較，期望藉此發展早期鑑定豬隻繁殖效率之技術，以提昇國內豬隻繁殖力，並提供研究大型哺乳動物早期胚胎發育及生殖的重要模式。雌豬的生殖道在解剖上和生理上和其他的家畜有所不同，母豬以生長比例而言，其子宮角較長且彎曲，子宮頸襪非常緊密，不易進入或通過。故自 1960 年代以來，豬胚的採集與移置，一直都需採外科手術 (Day, 1979; Polge, 1982; 林等, 1989)。女豬在有穩定駕乘徵候反應後 39~40 小時或在 hCG 注射後 40~42 小時 (Hunter, 1990; Dziuk and Baker, 1962; Polge, 1978) 開始排卵，在 hCG 注射後 46 小時完成排卵 (Hunter, 1972)，Laurincik *et al.* (1994) 報告指出在 hCG 注射後 40、44、與 48 小時分別有 62%、35%、及 13% 成熟濾泡尚未排出卵，排出的卵中亦分別有 55%、30%、與 8% 的卵未受精；女豬在自然發情與自然配種下，豬胚在配種後 1 天為單細胞期(胚所在位置：輸卵管)，配種後 2 天為二細胞期(輸卵管)，配種後 3 天為四細胞期(輸卵管)，配種後 4 天為 16~32 細胞細胞期 (輸卵管到子宮角)，配種後 5 天為桑椹胚至囊胚 (子宮角) (Hunter, 1980; 陳及吳, 1991)。豬為多胎動物，其各卵子排卵時間之間距大，因此進行二細胞期與八細胞胚收集時，有必要探討最佳取胚手術時間，以獲得正確細胞數的豬胚供定序之用。

材料與方法

I. 藍瑞斯種豬來源與處理

首先依據中央畜產會提供之歷年來藍瑞斯豬種之登錄資料 (包括系譜與產仔數) 進行遺傳評估，進行動物模式 BLUP 預測值排名，其次選取 BLUP 預測值在前 20 名內，且其同胎窩仔數皆在 12 頭 (含) 以上之藍瑞斯種豬作為高繁殖力種豬，最後自民間優良種豬場採購上述藍瑞斯種豬或其後裔共種公豬 2 頭及種女豬 12 頭作為供試豬隻。試驗期間餵飼種豬粒狀飼料 (粗蛋白質：14.6%；可消化能：3149 kcal/kg)。進行二細胞期與八細胞期兩階段早期豬胚之採樣，種豬經超級排卵，配種，胚之沖洗及回收，若以每個成熟卵母細胞含 0.4~0.6 ng 的總 RNA 計算，建立一個 cDNA 基因庫必須用掉 25~500 ng 總 RNA，故每個不同發育階段的豬胚須採足 100 個以上，若以每隻女豬經超級排卵刺激平均可產 20~30 個卵估算，每次需逢機選取體重相近之 3 頭以上高產女豬進行試驗。

II. 豬採集胚處理方式，其步驟如下：

- (i) 七月齡以上供試之女豬每頭每天餵以 20 mg 的律期媒 (Regumate) (Hoechst Roussel Vet, France) 連續 14 天 (圖1- A)。
- (ii) 停餵律期媒隔日上午10:00，供試女豬每頭肌肉注射 2000 IU PMSG；並於 72-78 小時後每頭再肌肉注射 1500 IU hCG 做超級排卵處理。
- (iii) 女豬於 hCG 注射後翌日上午八時三十分~九時與下午三時三十分~四時，以人工授精方法進行複次配種，分別在第一次配種後 48~50 小時(n=12)、66~68 小時(n=3)、78~80 小時 (n=4)、89~91 小時 (n=3)、95~97 小時 (n=3) 進行外科手術取胚，以尋找獲得二細胞期與八細胞期豬胚之適當時間。
- (iv) 女豬外科胚採集的方法如陳與吳 (1991) 所示，術前 24 小時予以禁食，維持麻醉狀態下供胚豬的肚臍後方腹中線切開手掌寬切口後，暴露子宮角、輸卵管和卵巢，於輸卵管內裝入一玻璃導管後，即以鈍端針頭經由輸卵管戳灌入沖洗液，迅即以食指和中指夾擠按摩輸卵管，使沖洗液經由玻璃管流出而回收胚於量筒內，縫合前紀錄下左右卵巢上黃體數 (圖1-B及C)。豬隻自麻醉、消毒、採胚及皮膚縫合可於三十分鐘內完成。
- (v) 豬卵與胚以含 1% FCS (fetal calf serum) 的PBS從輸卵管中沖集出來後，在倒立顯微鏡下找出並鑑別胚期與是否正常。

III. 豬胚之鏡檢

豬卵與胚採集後經鏡檢判定其胚期 (圖1-D)，並比照菅原等 (1986) 所敘者區分為未受精卵、

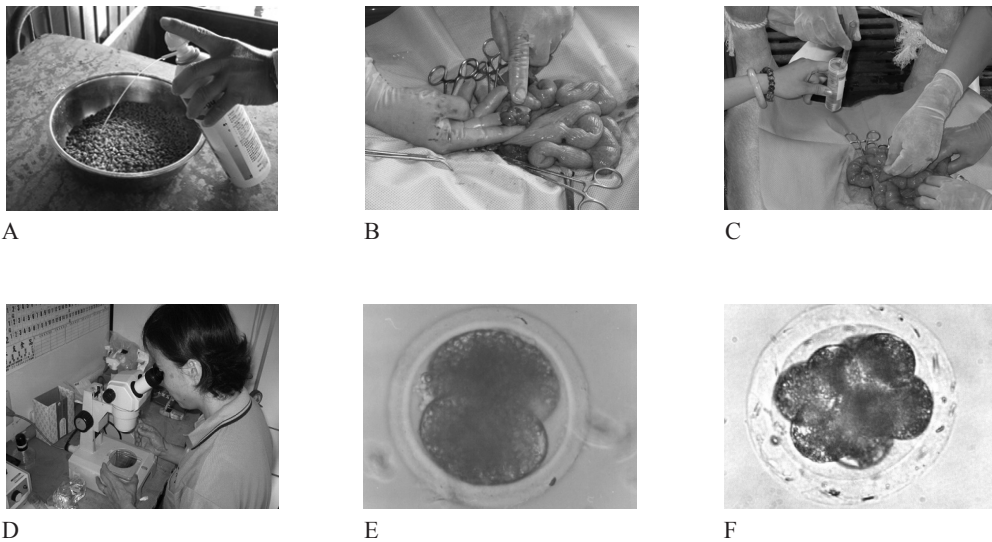


圖 1. 豬胚外科採集之流程。

- | | | |
|---------------------|------------|------------|
| (A) 女豬每日餵以20 mg的律期媒 | (B) 黃體計數 | (C) 沖集豬胚 |
| (D) 鏡檢胚 | (E) 二細胞期豬胚 | (F) 八細胞期豬胚 |

Fig. 1. Surgical collection and recovery of porcine embryos.

- | | |
|---|--------------------------------------|
| (A) Gilt fed with 20 mg per day of Regumate | (B) Counting number of corpora lutea |
| (C) Embryos flushing | (D) Embryo grading |
| (E) Two-cell stage embryo | (F) Eight-cell stage embryo |

單細胞胚、二細胞胚（圖1- E）、四細胞胚、八細胞胚（圖1-F）、十六細胞胚及桑椹胚。受精直後之受精卵（單細胞胚）正常型態特徵：透明帶外之卵丘細胞已脫落消失。透明帶上可見有附著精子穿突融解之不規則痕跡。透明帶與卵細胞間的空隙（卵黃囊間隙，perivitelline space）可見有二個色調較淺而亮的極體（第一及第二極體）。卵實質充實而圓滿，呈均勻之暗褐色調。二細胞期尚存有附著精子或穿入透明帶之精子，透明帶內的分溝細胞 (blastomere)呈大小相近似之球形且做依三度空間排列緊湊而整齊，分溝細胞上有脂質顆粒均勻分佈使之呈典型的暗褐色調。極體可能直到四細胞期才會消失。退化胚為胚外觀變形情況十分明顯；構造不正常程度達 40% 的胚體以上。豬胚採集效率可以用胚回收率表示之，即以回收胚數佔黃體數百分率表示之。

結果與討論

第一次配種後 48~50 小時與 66~68 小時豬胚發育階段頻率分佈如表 1 所示。本試驗共採得 297 個豬卵，其中單細胞胚者有 47 個；檢出現單細胞胚卵者集中在排卵數超過 24 個以上的母豬。以新女豬配種後的 297 個回收率來計算其受精率為 84.2%。配種後 48-50 小時的胚有 5% 單細胞胚、49.3% 為二細胞胚、45.70% 為四細胞胚、0% 為八細胞胚。配種後 66-68 小時的胚有 47.4% 單細胞胚、10.5% 為二細胞胚、40.8% 為四細胞胚、1.3% 為八細胞胚。二細胞期分別在第一次配種後 48~50 小時與 66~68 小時進行外科手術取胚，大約相當超級排 hCG 注射後 62~64 小時與 80~82 小時；此階段豬卵巢正值血體至黃體期，黃體數較不易數，再加上排卵數點多，易靠近不易區分，故回收胚數比黃體數多。賈等 (1994) 應用雌素二醇與人類絨毛膜激性腺素誘導新母豬排卵，發現 12 頭未發身新母豬經雌素二醇與 hCG 處理後，前 3 日新母豬卵巢並無排卵現象，至第 4 日方有血體之出現，顯示豬隻卵巢濾泡發育至排卵發生，約需 3 日之時間，當豬卵子從卵泡中排出，空了的卵泡立即塌陷、出血、形成血體。

表 1. 第一次配種後48~50與66~68小時豬胚發育階段頻率分佈

Table 1. Proportion of porcine embryos developing to various stages when embryo collections were performed at 48~50 and 66~68 hours after the first mating

Item	Hours after the first mating	
	48-50	66-68
Number of gilts	12	3
Number of corpora lutea	209	53
Number of embryos recovered	221	76
Stage of embryos	Frequency, %	
1-cell*	5.0	47.4
2-cell	49.3	10.5
4-cell	45.7	40.8
8-cell	0.0	1.3

*single-cell embryo and unfertilized egg included.

第一次配種後 78~80、89~91 及 95~97 小時豬胚發育階段頻率分佈如表 2 所示，胚回收率為 90% 以上者有 1 頭，回收率為 80 至 89% 之間的豬有 3 頭。若以回收率高於 70% 計之，則十頭供胚豬有 70% 的豬回收順利，僅有 1 頭豬之回收率低於 30%，此與歐美國家報告比較相差相不遠（Polge, 1982）。本試驗共採得 159 個豬卵，其中單細胞胚者有 20 個，受精後發育終止而退化者有 13 個，其出現單細胞胚卵的豬集中在排卵數超過 24 個以上的母豬。若以受精的豬胚佔採得胚總數百分比計算，則受精率為 87.4%。根據前人之研究報告指出於正常情形下，豬的受精率高且個體差異不大，平均都在 95 到 100% 之間（Pope and First, 1985），本試驗的受精率較前人之報告結果稍低，其原因可能本試驗使用超級排卵，使卵未成熟即排出，造成精子無法受精。

表 2. 第一次配種後 78~80、89~91 及 95~97 小時豬胚發育階段頻率分佈

Table 2. Proportion of porcine embryos developing to various stages when embryo collections were performed at 78~80, 89~91 and 95~97 hours after the first mating

Item	Hours after the first mating		
	78-80	89-91	95-97
Number of gilts	4	3	3
number of corpora lutea	89	71	71
number of embryos recovered	74	54	31

Stage of embryos	Frequency, %		
1-cell*	4.1	31.5	0.0
2-cell	1.4	3.7	0.0
4-cell	77.0	35.2	0.0
8-cell	14.8	9.3	22.6
16-cell	0.0	0.0	16.1
Morula	0.0	0.0	61.3
Degenerated	2.7	20.4	0.0

*single-cell embryo and unfertilized egg included.

配種後 78~80 小時的胚有 4.1% 單細胞胚、1.4% 為二細胞胚、77.0% 為四細胞胚、14.8% 為八細胞胚、2.7 % 為退化胚。配種後 89~91 小時的胚有 31.5 % 單細胞胚、3.7% 為二細胞胚、35.2% 為四細胞胚、9.3% 為八細胞胚、20.4% 為退化胚。配種後 95~97 小時的胚 22.6% 為八細胞胚、16.1% 為十六細胞胚、61.3% 為桑椹胚。1991 年陳及吳發展豬胚外科採集技術時，亦使用藍瑞斯種女豬 21 頭作為試驗豬隻，讓其自然發情後配種，在配種後 1~7 日進行外科手術採集豬胚，其平均黃體數為 11.6 個，本試驗高繁殖力藍瑞斯種豬後裔之平均黃體數為 17 個以上。由表 2 之豬胚發育情形，顯示豬胚在母體生殖道環境內之發育隨著配種後時間之加長而步調漸不一致，其可能原因為豬為多胞胎動物，由於排卵時間的先後，造成完成受精之時間差異，且延續到胚的發育過程中，由於細胞溝裂速率之快速增加而更顯著。這種同胎豬胚間發育整齊性及型態上的差異，已知與其後續的存活率有關（Wilde *et al.*, 1988）。

綜合表1與2結果，二細胞期與八細胞期豬胚比率分別在 48~50 小時者 (n=12) 為 49.3 及 0 %、在 66~68 小時者 (n=3) 為 10.4 及 1.3%、在 78~80 小時者 (n=4) 為 1.4 及 14.8%、在 89~91 小時者 (n=3) 為 3.7 及 9.3%、在 95~97 小時者 (n=3) 為 0 及 22.6%。此結果顯示二細胞期豬胚外科採集時間在第一次配種後 48~50 小時較佳，而八細胞期豬胚外科採集時間在第一次配種後 95~97 小時較佳。陳及吳 (1991) 報告，種女豬自然發情配種後 1 日的胚有 89% 為單細胞胚與 8% 為二細胞胚；配種後 2 日的胚有 80% 為二細胞胚與 12% 為四細胞胚。杜等 (1998) 的研究顯示豬隻經超級排卵 hCG 注射後 56~60 小時手術時，比 52~54 小時達 2 細胞期或以上之豬胚最多，本試驗女豬於 hCG 注射後翌日上午八時三十分~九時與下午三時三十分~四時予以複次配種，二細胞期分別在第一次配種後 48~50 小時與 66~68 小時進行外科手術取胚，大約相當超級排 hCG 注射後 62~64 小時與 80~82 小時。本試驗二細胞期豬胚外科採集時間在第一次配種後 48~50 小時較佳與陳及吳 (1991) 與杜等之研究相符合。陳及吳 (1991) 報告亦指出豬隻配種後三日的胚有 79% 為四細胞胚及 14% 為八細胞胚；配種後四日的胚有 5% 為八細胞胚、33% 為十六細胞胚及 59% 為桑椹胚，本試驗八細胞期豬胚外科採集時間在第一次配種後 95~96 小時較佳，比陳及吳 (1991) 之研究略晚一天，顯示八細胞期胚外科採集時間不易準確掌握，值得再深入探討。

參考文獻

- 杜清富、馬春祥、鄭登貴。1998。不同取胚時間對豬原核胚回收率與不同相對離心力對其原核顯露比例及胚存活率之影響。中畜會誌 27 (1):49-58。
- 林安仲、林明輝、吳和光、馬春祥。1989。早期豬胚移置於子宮最後段之研究。國立台灣大學農學研究報告 28(2):71-76。
- 陳立人、吳明哲。1991。豬胚外科採集技術與胚整齊度之分析。中畜會誌 20 (2):175-187。
- 賈玉祥、莊啟芳、黃錦源。1994。外源性內泌素在豬隻生殖之應用：貳、雌激素二醇與人類絨毛膜激性腺素誘導新母豬排卵受胎之影響。科學農業 42 (9/10):297-301。
- 菅原七郎、佐久間勇次、政木淳二。卵子の検査法正常と發生能の判定。圖說哺乳動物の發生工學實驗法, pp.99-114。學會出版センター。
- Day, B. N. 1979. Embryo transfer in swine. *Theriogenology* 11:27-31.
- Dziuk, P. J. and R. D. Baker. 1962. Introduction and control of ovulation in swine. *Anim. Reprod. Sci.* 1:697-699. Cited by Laurincik *et al.*, 1994. *Theriogenology* 41:447-452.
- Hunter, R. H. F. 1972. Fertilization in the pig: sequence of nuclear and cytoplasmic events. *J. Reprod. Fert.* 29:395-406.
- Hunter, R. F. 1980. *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*. Academic Press. London.
- Hunter, R. H. F. 1990. Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 40 (Suppl) :211-226.
- Laurincik, J., P. Hyttel, D. Rath and J. Pivko, 1994. Ovulation, fertilization and pronucleus development in superovulated gilts. *Theriogenology* 41:447-452.
- Polge, C. 1978. Fertilization in the pig and horse. *J. Reprod. Fertil.* 54:461-470.
- Polge, C. 1982. Embryo transplantation and preservation. In *Control of Pig Reproduction* (D. J. A. Cole and G. R. Foxcroft, Eds.), pp. 277-291. Butterworth Scientific, London.
- Pope, W. F. and N. L. First. 1985. Factors affecting the survival of pig embryos. *Theriogenology* 23:91-105.
- Schultz, R. M. 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioassays* 15:531-538.
- Wilde, M. H., S. Xie, M. L. Day and W. F. Pope. 1988. Survival of small and large littermate blastocysts in swine after synchronous and asynchronous transfer procedure. *Theriogenology* 30:1069-1074.
- Zuccotti, M., M. Boiani, R. Ponce, S. Guizzardi, R. Scandrogli, S. Garagna and C. A. Redi. 2002. Mouse Xist expression begins at zygotic genome activation and is timed by a zygotic clock. *Mol. Reprod. Dev.* 61:14-20.

Surgical timing for embryos of 2-cell and 8-cell stages collected from highly reproductive Landrace gilts ⁽¹⁾

Neim Tsu Yen⁽²⁾⁽⁵⁾ Jenn Fa Liou⁽²⁾ Lih Ren Chen⁽²⁾
Lien Chun Cheng⁽³⁾ Chun Thong Lin⁽²⁾ Hsiu Luan Chang⁽⁴⁾
and Ming Che Wu⁽²⁾

Received : Apr. 2, 2007 ; Accepted : Feb. 13, 2008

Abstract

The purposes of this study were to determine suitable surgical collection timing of porcine embryos of 2-cell and 8-cell stage. Estrus synchronization of Landrace gilts at seven months of age or older were performed by feeding with 20 mg/gilt/day of Regumate for fourteen days. Then each gilt received 2000 IU PMSG and 1500 IU hCG, respectively, 24 hrs and 72 to 78 hrs after withdrawal of Regumate. Artificial insemination was then performed at 24 h and 30 h after hCG injection. Five different surgical time windows (48 to 50 h, 66 to 68 h, 78 to 80 h, 89 to 91 h and 95 to 97 h after the first artificial insemination) were compared to determine the optimum timing for recovering 2-cell and 8-cell stage embryos. The frequency of 2-cell and 8-cell stage embryos recovered at five different surgical time windows were 49.3 and 0% at 48 to 50 h (n=12), 10.4 and 1.3% at 66 to 68 h (n=3), 1.4 and 14.8% at 78 to 80 h (n=4), 3.7 and 9.3% at 89 to 91 h (n=3) and 0 and 22.6% at 95 to 97 h (n=3), respectively. The results showed that the proper timing for recovering porcine 2-cell embryos was 48 to 50 h after insemination. The recovery rate of 8-cell stage porcine embryos was fairly low in this trial. The proper timing for collecting embryos deserves further study.

Key Words: Porcine embryo stage, High reproductivity, Surgical collection timing.

(1) Contribution No. 1418 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Division of Breeding and Genetics, COA-LRI, Tainan 712, Taiwan, R. O. C.

(3) Miaoli County Government, Miaoli, Taiwan, R. O. C.

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

(5) Corresponding author, E-mail: ntyen@mail.tlri.gov.tw.