

冷凍保護液配方及平衡時間對山羊體外成熟 卵母細胞玻璃化冷凍解凍後存活與後續發育 能力之影響⁽¹⁾

王得吉⁽²⁾ 林信宏⁽³⁾ 康定傑⁽⁴⁾ 黃政齊⁽²⁾⁽⁵⁾

收件日期：99年2月11日；接受日期：99年8月5日

摘要

本計畫目的是探討不同冷凍保護劑與平衡時間對體外成熟山羊卵母細胞，經冷凍-解凍後其存活率及後續發育能力之影響。自卵巢表面直徑 2-6 mm 之濾泡中取得卵丘卵母細胞複合體，隨即進行體外成熟作用。在玻璃化冷凍前，體外成熟卵母細胞利用二階段平衡方式，分別以 7.5% EG (ethylene glycol) + 7.5% DMSO (dimethyl sulfoxide) 7 分鐘、10% EG + 10% DMSO 45 秒及 1.6 M EG 6 分鐘與 12 分鐘進行第一階段平衡後，再分別以 16.5% EG + 16.5% DMSO 25 秒、20% EG + 20% DMSO 25 秒及 6.8 M EG 30 秒進行第二階段短暫平衡後，於玻璃細管尖端形成之每一微滴含 5 個卵母細胞的方式，直接投入液態氮中進行玻璃化冷凍與長期保存。解凍後卵母細胞分別觀察其恢復正常外觀比率及經體外受精後體外培養至囊胚之比率，以評估其存活率及後續發育能力。試驗結果顯示，體外成熟後之卵母細胞利用 7.5% EG + 7.5% DMSO 之冷凍保護劑預先平衡 7 分鐘，再轉移至 16.5% EG + 16.5% DMSO 冷凍保護劑平衡 25 秒後進行微滴玻璃化冷凍保存，其解凍後形態恢復比例顯著 ($P < 0.05$) 高於其他處理組，而在後續發育能力亦有較佳之趨勢。

關鍵詞：山羊、卵母細胞、玻璃化冷凍、囊胚。

緒言

生殖細胞與胚之冷凍保存可以使優良品種、珍貴稀有瀕危動物或任何個體的基因庫，得以長期保存；且冷凍保存，可隨時解凍，以配合胚體外生產等相關生理試驗之進行，解決時間與空間的限

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1598 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高雄種畜繁殖場。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

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

制。在山羊人工生殖科技研發過程中，卵母細胞為提供體外繁殖的基礎來源，其成功的冷凍保存技術，將成為發展人工生殖科技與種原保存中不可或缺之重要工作項目之一。但至目前為止，卵母細胞及發育早期之胚的冷凍保存技術仍有待克服。微滴（microdrop）玻璃化（vitrification）冷凍技術是一種具有多種優點的生物細胞冷凍保存方法。自 1980 年開始，動物的胚，尤其是家畜的胚，傳統上是以慢速降溫冷凍保存，這樣的冷凍方式所使用的保護劑濃度較低，毒性小，但是在冷凍過程中必須依賴電腦程式降溫的冷凍器；惟這套設備價格昂貴，且所需冷凍時間也較長，不適合田間操作使用。此外此種方式對於細胞內外液會產生冰晶而對細胞產生破壞，導致透明帶、胚細胞及細胞骨架受損（Liebermann *et al.*, 2002）。因此，採用慢速冷凍保存胚技術仍有改善的必要。為了改善傳統冷凍技術的缺點，過去有許多研究都致力於如何減少冷凍所需的時間及揚棄昂貴的電腦程式降溫設備，其中的一個方式就是採用玻璃化冷凍技術。1996 年 Martino 等人初次成功地採用玻璃化方法保存牛的卵母細胞，並在解凍之後能順利完成受精並發育到囊胚階段。1999 到 2000 年間，採用玻璃化冷凍及解凍後的牛及人類卵子經受精及胚移植後已陸續成功地懷孕及分娩（Kuleshova *et al.*, 1999; Vajta *et al.*, 1997）。此後，有關以玻璃化技術成功冷凍保存卵母細胞報告，即不斷在期刊上被刊載，且在技術上亦相當的進步。本分所近年來針對發育較末期的桑椹胚與囊胚已成功研發一套玻璃化冷凍保存技術（Huang *et al.*, 2008）。本試驗目的，即是利用本分所已成功建立之微滴玻璃化冷凍技術（Huang *et al.*, 2008），進行卵母細胞冷凍保存之研究；期藉由此項技術，增加卵母細胞解凍後之存活與後續發育之能力，以利將來人工生殖相關技術研發及種原保存工作之進行。

材料與方法

I. 羊卵丘-卵母細胞複合體取得

本試驗所使用之卵巢，取自淘汰肉羊雜交（波爾×努比亞×本地山羊）母羊。試驗羊隻圈飼於個別羊欄，欄舍內提供飲水、礦鹽及乾草任食，每日並補充肉羊精料 0.4 kg。陰道內孕酮釋放器 CIDR®（AHI Plastic Molding Co., New Zealand）在陰道中留置 11 日，於第 9-10 天，也就是抽除 CIDR® 之前 2 日，每隔 12 小時分別肌肉注射 4 mg 之 pFSH（Sigma, Saint Louis, USA）以提升生長濾泡之數量。於 CIDR 移除當日採用腹中線剖腹術摘除卵巢。母羊先行肌肉注射 0.11 mg/kg xylazine（Rompun®, Bayer, Germany）鎮靜，十分鐘後靜脈注射 5.5 mg/kg ketamine（順順®, 永信製藥，台灣）進行全身麻醉。子宮及卵巢由腹中線切開處牽引出腹壁，於肉眼檢視濾泡數目與大小之後，以腸鉗夾住卵巢下方之靜脈叢並利用手術縫線縫緊後將卵巢切下。取下之卵巢先以生理鹽水洗淨，繼之噴灑 70% 之酒精淨菌後，再以生理鹽水洗淨。其後以無菌手術刀片切割卵巢表面直徑約 2-6 mm 的濾泡，逐一沖洗卵濾泡之內容物，並選取卵丘卵母細胞複合體（COCs, cumulus oocyte complexes）備供體外成熟培養之用。

II. 卵子體外成熟培養

於進行培養前，事先於 35 mm 之培養皿中製作 4 滴均含 80 μ l 之培養液滴，並覆蓋礦物油，再置於 38.5°C 含 5% CO₂、95% 空氣及飽和濕度條件之培養箱中，進行至少 4 小時之平衡。其後，再將前述所收集具良好品質羊之 COCs，以 10-20 個不等之數量平均移入上述備妥之體外成熟培養液滴中，並於相同培養環境下，進行 22 小時體外成熟培養。

III. 卵母細胞玻璃化冷凍與解凍

微滴玻璃化冷凍與解凍方式主要依據 Huang *et al.* (2008) 所述之方式進行。將體外成熟之羊卵母細胞移至第一階段冷凍保護劑進行平衡，再移至第二階段冷凍保護劑平衡後，利用微玻璃管於管開口端製作成 $2\ \mu\text{l}$ 體積之微滴（每一微滴內含 5 顆 COCs）並直接投入液態氮中瞬間冷凍，製作成玻璃珠狀微粒。當其掉落於液態氮下方特殊之傾斜金屬溝槽收集後，再將之存放於預冷的冷凍管（Nunc CryoTubes™, cat. # 373514, Thermo Fisher Scientific Inc.）保存於液態氮中。解凍時將含卵母細胞之微粒直接投入 38.5°C 含 $0.25\ \text{M}$ 蔗糖之培養液（ $500\ \mu\text{l}$ ）中解凍並保持 1 分鐘，再轉移至含 $0.15\ \text{M}$ sucrose 20% FCS M-199（ $500\ \mu\text{l}$ ）中 5 分鐘，最後移入含 20% FCS之M-199（ $500\ \mu\text{l}$ ）中 5 分鐘。隨後分別進行體外短暫培養，以評估冷凍-解凍後 COCs 存活率。COCs 存活評估方式主要依據 Hou *et al.* (2005) 所述，於顯微鏡下直接觀察冷凍-解凍後 COCs 之膜完整性與透明帶之型態。因膜完整性之喪失將導致型態上原本清晰可見的卵膜變的模糊及胞質形態之改變（變得較白或無色或胞質完全消失）。

IV. 不同冷凍保護劑與平衡時間之試驗設計

表 1. 不同冷凍保護劑與平衡時間之配方如下表所示：

Tab. 1. The formulae of different cryoprotectants and equilibration times

Group	1 st equilibration	2 nd equilibration
A	7.5% EG + 7.5% DMSO 7 min	16.5% EG + 16.5% DMSO + 0.5M sucrose 25 sec
B	10% EG + 10% DMSO 45 sec	16.5% EG + 16.5% DMSO + 0.5M sucrose 25 sec
C	10% EG + 10% DMSO 45 sec	20.0% EG + 20.0% DMSO + 0.5M sucrose 25 sec
D	1.6 M EG 6 min	6.8 M EG + 0.5M sucrose 30 sec
E	1.6 M EG 12 min	6.8 M EG + 0.5M sucrose 30 sec

試驗中先比較 A、B、C、D 及對照組其體外成熟後卵母細胞冷凍-解凍後存活率與後續發育至囊胚之比率。其次再比較上述有著較佳後續發育結果之A組與E組其體外成熟後卵母細胞冷凍-解凍後存活率與後續發育至囊胚之比率。

V. 體外受精與羊胚體外培養

移除包被外圍之卵丘細胞後，裸露卵母細胞（10-20 個）經 3 次清洗後，即置入已獲能作用之精液小滴內，並移入恆溫培養箱中進行體外受精。卵母細胞經 16 小時之體外受精後，利用微玻璃管吸取於成熟培養液中，以機械式連續吸吐移除包被外圍之精子，並經培養液清洗 3 次。卵母細胞經體外受精後，每 20 個受精卵移入 $25\ \mu\text{L}$ 自配合成輸卵管液（synthetic oviduct fluid plus amino acid, SOFaa）上覆礦物油，於 38.5°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $5\% \text{O}_2$ 及 $90\% \text{N}_2$ 低氧條件下進行體外培養與觀察（Gardner *et al.*, 1994）。

VI. 統計分析

試驗期間所收集之資料均以套裝統計分析系統〔Statistical Analysis System (SAS), 1998〕進行分析，而測定值以平均值±標準偏差 (Mean ± SD) 表示，並以學生式紐曼-柯爾測定法 (Student-Newman-Keuls' test) 比較各處理組間之差異顯著性 (Steel and Torrie, 1980)。

結果與討論

以不同濃度及種類的冷凍保護劑配方進行體外成熟卵母細胞之微滴玻璃化冷凍保存試驗，於解凍後進行體外培養並分別觀察其解凍後之恢復正常外觀比率，結果如表 2 所示。體外成熟後卵母細胞分別以濃度 7.5% EG + 7.5% DMSO (A 組) 以及 10% EG + 10% DMSO (B 組) 冷凍保護劑進行第一階段平衡 7 分鐘與 45 秒後，再以 16.5% EG + 16.5% DMSO 進行第二階段平衡 25 秒，隨之進行微滴玻璃化冷凍，於解凍後進行體外培養。結果顯示，以 A 組之冷凍保護劑濃度與平衡時間，對成熟卵母細胞經冷凍-解凍後，其回復正常形態比率顯著高於 B 組 ($100\% \pm 0.0$ vs $81.0 \pm 1.7\%$, $P < 0.05$)。利用與 B 組相同第一階段平衡之冷凍保護劑濃度與平衡時間，再以 20% EG + 20% DMSO (C 組) 進行第二階段平衡 25 秒，隨之進行微滴玻璃化冷凍，於解凍後進行體外培養。結果顯示，以 C 組之冷凍保護劑濃度與平衡時間，對已成熟卵母細胞經冷凍-解凍後，其回復正常形態比率相較於 B 組 ($79.4 \pm 5.1\%$ vs $81.0 \pm 1.7\%$) 並無顯著差異，但仍顯著 ($P < 0.05$) 低於 A 組。在 Begin *et al.* (2003) 使用 20% EG + 20% DMSO 進行體外成熟山羊卵母細胞玻璃化冷凍保存研究，顯示卵母細胞解凍後存活率亦與本試驗結果相似。Yang *et al.* (2002) 研究顯示，利用微滴玻璃化冷凍法進行牛之卵母細胞冷凍保存後，於解凍後存活率顯著高於麥管裝填之方式，另於其他研究 (Atabay *et al.*, 2004; Dinnyes *et al.*, 2000) 中亦指出牛之卵母細胞以微滴玻璃化冷凍法進行冷凍保存有著高比率的存活率 (79-85%)。Chian *et al.* (2004) 於體外成熟牛之卵母細胞以 7.5% EG + 7.5% DMSO 預先平衡 5 分鐘後，再於 15% EG + 15% DMSO 短暫培養 0.75-1 分鐘隨即進行玻璃化冷凍保存，於解凍後結果顯示其存活率達 $91.8 \pm 6.7\%$ ，與本試驗結果相似。此外，於冷凍保護劑中添加特殊的巨分子 (ficoll, PVP 等) 或醣類等非滲透性物質將可改變冷凍保護劑之滲透能力，增加卵母細胞周圍溶液之滲透壓力 (Arva *et al.*, 1993)。相較於可滲透性的冷凍保護劑，非滲透性冷凍保護劑保持在細胞外部，促進細胞內的自由水擴散至細胞外，從而使細胞內的空間呈脫水狀態。因此，當它們被用來結合可滲透性的冷凍保護劑，可滲透性的冷凍保護劑淨濃度於細胞內的空間增加，而進一步防止冰晶體的形成 (Jain and Paulson, 2006)。卵母細胞於解凍時醣類亦有助於其抵消滲透壓所造成之膨脹，降低卵母細胞回水 (re-hydration) 時之傷害 (Hou *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008)。由以上結果顯示，體外成熟山羊卵母細胞於第一階段平衡時，利用較低濃度之冷凍保護劑進行較長時間之平衡，將有助於該卵母細胞經冷凍-解凍後其外觀型態之恢復，而第二階段冷凍保護劑濃度提高則對卵母細胞冷凍保護無顯著效果。此外，利用 1.6 M EG 進行第一階段平衡 6 分鐘，及利用 6.8 M EG (D 組) 進行第二階段平衡 0.5 分鐘後，隨之進行微滴玻璃化冷凍，於解凍後進行體外培養。結果顯示，相較於 B 組與 C 組，其外觀形態恢復比率亦無顯著差異。MII 期之卵母細胞因其紡錘體對溫度敏感且易遭受冷凍傷害，而遠較胚難以冷凍保存 (Shaw *et al.*, 2000)。因此必需使用高濃度之可滲透性冷凍保護劑以及極為快速之降溫方式才可成功進行玻璃化冷凍。在本試驗中利用微滴玻璃化冷凍之方式免除一般載體之限制，利用微滴與液態氮直接接觸之方式，提升降溫或解凍時升溫之速率，因此在解凍後有著高的存活率。

表 2. 不同冷凍保護劑配方對山羊體外成熟卵母細胞玻璃化冷凍再解凍後存活率之效果

Table 2. Effect of different cryoprotectants formulae on the viability of vitrified-warmed caprine *in vitro* mature oocytes

Group	No. of oocyte (3 replicates)	1 st equilibration	2 nd equilibration	No. (Mean \pm SD %) of vitrified-warmed oocytes with normal morphology
A*	38	7.5% EG + 7.5% DMSO 7 min	16.5% EG + 16.5% DMSO 25 sec	38 (100.0 \pm 0.0) ^a
B*	32	10% EG + 10% DMSO 45 sec	16.5% EG + 16.5% DMSO 25 sec	26 (81.0 \pm 1.7) ^b
C*	55	10% EG + 10% DMSO 45 sec	20.0% EG + 20.0% DMSO 25 sec	44 (79.4 \pm 5.1) ^b
D*	46	1.6 M EG 6 min	6.8 M EG 30 sec	35 (76.8 \pm 3.7) ^b
Control	54	-	-	-

^{a, b} Values without the same superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

* Means oocytes were *in vitro* matured for 22 hours before vitrification.

以不同濃度及種類的冷凍保護劑配方進行體外成熟後卵母細胞之微滴玻璃化冷凍保存試驗，於解凍後進行體外培養並分別觀察其後續發育之能力，結果如表 3 所示。經不同濃度及種類的冷凍保護劑配方處理並於冷凍-解凍後，隨即進行體外授精，結果顯示各處理組在卵裂率皆顯著 ($P < 0.05$) 低於對照組，在處理組間則以 A 組 ($28.3 \pm 4.4\%$) 顯著 ($P < 0.05$) 高於 B 組、C 組與 D 組 ($11.7 \pm 1.4\%$ 、 $11.3 \pm 0.4\%$ 及 $21.4 \pm 6.4\%$)。在後續發育能力方面，除了在 8-16 細胞期及桑椹胚期仍維持上述顯著性 ($P < 0.05$) 趨勢外，於囊胚期之比率在處理組間則無顯著差異。但在使用 A 組之冷凍保護劑濃度與平衡時間，對成熟卵母細胞經冷凍-解凍後，其後續發育能力似乎有著較佳之效果。Chian *et al.* (2004) 於體外成熟牛之卵母細胞之試驗結果亦與本試驗結果相似。先前研究指出，卵母細胞冷凍保存時在快速降溫及冷凍保護劑作用下，卵母細胞仍不免遭受其結構上之變化。在小鼠及人類的卵母細胞發現經過冷凍後有過早皮質顆粒釋放的現象發生 (Schalkoff *et al.*, 1989)。皮質顆粒是在正常受精過程中阻斷多精入卵的重要物質，其過早釋放將導致此一功能瓦解，造成卵母細胞在後續受精時多精入卵的比例增加，乃至多倍體之產生 (Fuku *et al.*, 1995)。此外，卵母細胞透明帶中之醣蛋白結構上亦發生改變，導致透明帶硬化的現象發生 (Mandelbaum, 1991; Schalkoff *et al.*, 1989; Pickering *et al.*, 1991; Matson *et al.*, 1997; Ghetler *et al.*, 2006)，其結果將使得卵母細胞於正常體外受精過程中，精子之穿過透明帶的比率下降。本試驗中不論利用何種冷凍保護劑配方與平衡時間，其體外受精後之卵裂率皆顯著較對照組為低，應與上述論點有關。此外，Larman *et al.* (2006) 於近來之研究指出，於小鼠 MII 期卵母細胞使用 DMSO 與 EG 將誘發胞內鈣離子濃度短暫性增加的現象，且其量相當於正常受精時之結果。自培養基中移除胞外鈣離子並無法降低 DMSO 所誘發之鈣離子濃度短暫性增加，但卻可有效降低 EG 誘發鈣離子濃度增加之效果。這些研究指出 DMSO 誘發胞內鈣離子濃度短暫性增加的現象是源自於胞內鈣離子儲存池，而 EG 誘發胞內鈣離子濃度短暫性增加則是因促進胞外培養基中之鈣離子穿過胞膜而注入卵母細胞

內。利用無鈣離子之培養基進行卵母細胞之冷凍將減少透明帶硬化之結果，而增加受精率，且對胚胎後續發育無顯著負面影響（Larman *et al.*, 2006）。因此，是否需降低冷凍保護劑中所含之鈣離子濃度值得進一步深入探討。

表 3. 不同冷凍保護劑配方對山羊體外成熟卵母細胞玻璃化冷凍再解凍後發育能力之效果

Table 3. Effect of different cryoprotectants formulae on the developmental competence of vitrified-warmed caprine *in vitro* mature oocyte

Group	No. (Mean \pm SD %) of vitrified-warmed oocytes with IVF (3 replicates)	No. (Mean \pm SD %) of cleavage	No. (Mean \pm SD %) of 8-16 cell	No. (Mean \pm SD %) of morula	No. (Mean \pm SD %) of blastocyst
A*	38	11 (28.3 \pm 4.4) ^a	11 (28.9 \pm 4.4) ^a	5 (13.1 \pm 0.5) ^a	1 (2.2 \pm 3.8) ^a
B*	26	3 (11.7 \pm 1.4) ^c	2 (7.5 \pm 6.6) ^c	0 (0.0 \pm 0.0) ^c	0 (0.0 \pm 0.0) ^a
C*	44	5 (11.3 \pm 0.4) ^c	3 (5.7 \pm 5.6) ^c	1 (1.9 \pm 3.2) ^c	0 (0.0 \pm 0.0) ^a
D*	35	7 (21.4 \pm 6.4) ^b	5 (14.5 \pm 2.1) ^b	2 (7.5 \pm 7.2) ^b	0 (0.0 \pm 0.0) ^a
Control	54	39 (72.4 \pm 2.5) ^d	26 (47.9 \pm 3.6) ^d	18 (33.4 \pm 5.0) ^d	8 (14.7 \pm 2.1) ^b

^{a, b, c, d} Values without the same superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

* Means oocytes were *in vitro* matured for 22 hours before vitrification.

依上述之試驗結果，再以不同種類的冷凍保護劑配方進行體外成熟後卵母細胞之微滴玻璃化冷凍保存試驗，於解凍後進行體外培養並分別觀察其解凍後之恢復正常外觀比率，結果如表 4 所示。卵母細胞利用上述較佳之配方 A 以及另一種類與平衡時間的冷凍保護劑配方 E 處理後，於冷凍解凍後其外觀形態恢復比例（90.5 \pm 2.6% vs 97.8 \pm 3.9%）有著顯著性（ $P < 0.05$ ）差異，可顯示在此試驗中，使用高濃度 EG 作為冷凍保護劑之單一來源，若於第一階段平衡時，增加平衡所需之時間（相同配方於表 1 之 D 組及表 3 之 E 組，由 6 分鐘增至 12 分鐘），將有利於體外成熟後卵母細胞之微滴玻璃化冷凍-解凍後形態之恢復。EG 在胚、卵的玻璃化冷凍過程中相較於其他的冷凍保護劑，有著高的滲透率及移除快速等優點。在小鼠胚之相關研究上，EG 相較於甘油與 PROH（propylene glycol）有著較低的毒性（Kasai *et al.*, 1990）。因此增加 EG 於第一階段之平衡時間，應有助於其充分之滲透及降低卵母細胞冷凍之損害。

表 4. 不同冷凍保護劑配方對山羊體外成熟卵母細胞玻璃化冷凍再解凍後存活率之效果

Table 4. Effect of different cryoprotectants formulae on the viability of vitrified-warmed caprine *in vitro* mature oocytes

Group	No. of oocyte (3 replicates)	1 st incubation	2 nd incubation	No. (Mean \pm SD %) of vitrified-warmed oocytes with normal morphology
A*	42	7.5% EG + 7.5% DMSO 7 min	16.5% EG + 16.5% DMSO 25 sec	38 (90.5 \pm 2.6) ^a
E*	36	1.6 M EG 12 min	6.8 M EG 30 sec	35 (97.8 \pm 3.9) ^b

^{a, b} Values without the same superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

* Means oocytes were *in vitro* matured for 22 hours before vitrification.

以不同種類的冷凍保護劑配方進行體外成熟後卵母細胞之微滴玻璃化冷凍保存試驗，於解凍後進行體外培養並分別觀察其後續發育之能力，結果如表 5 所示。以 A 組之冷凍保護劑配方進行體外成熟後卵母細胞之微滴玻璃化冷凍保存試驗，於解凍後於卵裂率及 8-16 細胞期比率與 E 組間有著顯著性 ($P < 0.05$) 差異，但於後續桑椹胚期及囊胚期卻無顯著性差異。儘管如此，有較高之趨勢，且最終有囊胚產出。

表 5. 不同冷凍保護劑配方對山羊體外成熟卵母細胞玻璃化冷凍再解凍後發育能力之效果

Table 5. Effect of different cryoprotectants formulae on the developmental competence of vitrified-warmed caprine *in vitro* mather oocyte

Group	No. (Mean \pm SD %) of vitrified-warmed oocytes with IVF (3 replicates)	No. (Mean \pm SD %) of cleavage	No. (Mean \pm SD %) of 8-16 cell	No. (Mean \pm SD %) of morula	No. (Mean \pm SD %) of blastocyst
A *	38	8 (21.1 \pm 6.3) ^a	6 (15.1 \pm 4.5) ^a	3 (8.3 \pm 2.5)	1 (2.4 \pm 4.1)
E *	35	3 (9.7 \pm 8.7) ^b	2 (6.9 \pm 6.4) ^b	1 (2.8 \pm 4.8)	0 (0.0 \pm 0.0)

^{a, b} Values without the same superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

* Means oocytes were *in vitro* matured for 22 hours before vitrification.

可滲透性之冷凍保護劑，諸如甘油、DMSO 及 PROH 已廣泛使用在卵母細胞與胚之玻璃化冷凍過程中，以避免細胞內冰晶形成所致之傷害。DMSO 及 PROH 滲透性較甘油為佳。然而，有報告指出 DMSO 將增加多精入卵可能性以致卵母細胞內紡錘體發生聚合現象 (Glenister *et al.*, 1987)。此外，DMSO 對於卵母細胞與胚之毒性，與其暴露之時間及溫度極具相關，因此降低暴露於 DMSO 時之溫度將減少其毒性所造成之損害 (Johnson and Pickering, 1987)。PROH 相較於 DMSO 有著低毒性及高滲透性 (Renard and Babinet, 1984)，且其在兔胚 (Vincent *et al.*, 1990)、小鼠與人類 (Gook *et al.*, 1994) 成熟之卵母細胞中使用，並不會改變核型異常或異常受精狀況。Chian *et al.* (2004) 於體外成熟牛之卵母細胞玻璃化冷凍試驗中顯示，利用 PROH 取代 DMSO 將有助於受精後囊胚形成比率 (7.4 ± 4.1 vs 1.7 ± 3.0)。此外，Attanasio *et al.* (2009) 於水牛成熟卵母細胞玻璃化冷凍試驗中，利用不同濃度之冷凍保護劑及回溫之方式中顯示，卵母細胞解凍後存活率與囊胚率雖無顯著差異，但在卵裂率方面，利用多步驟的回溫方式較兩步驟者有較高的趨勢。因此，在山羊卵母細胞冷凍方面，利用其他較低毒性之冷凍保護劑或 (與) 評估平衡時溫度與時間之影響，仍待進一步深入之探討。

結論

本試驗中，山羊體外成熟卵母細胞利用 7.5% EG + 7.5% DMSO 之冷凍保護劑預先平衡 7 分鐘，再以 16.5% EG + 16.5% DMSO 冷凍保護劑配方進行微滴玻璃化冷凍保存，具有較佳之冷凍保護效果。利用微滴玻璃化冷凍保存技術證實可成功運用於山羊卵母細胞之冷凍保存。

參考文獻

- Arav, A., D. Shehu and M. Mattioli. 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification or immature bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 99: 353-358.
- Atabay, E. C., Y. Takahashi, S. Katagiri, M. Nagano, A. Koga and Y. Kanai. 2004. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 61: 15-23.
- Attanasio, L., L. Boccia, G. Vajta, M. Kuwayama, G. Campanile, L. Zicarelli, G. Neglia and B. Gasparrini. 2009. Cryotop vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) *in vitro* matured oocytes: Effects of cryoprotectant concentrations and warming procedures. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 997-1002.
- Begin, I., B. Bhatia, H. Baldassarre, A. Dinnyes and C. L. Keefer. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59: 1839-1850.
- Brebion, P., G. Baril, Y. Cognie and J. C. Vallet. 1992. Embryo transfer in sheep and goat. *Ann. Zoot.* 41: 331-339.
- Chian, R. C., M. Kuwayama, L. Tan, J. Tan, O. Kato and T. Nagai. 2004. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *J. Reprod. Dev.* 50: 685-696.
- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep and goat embryo transfer. *Theriogenology* 51: 105-116.
- Dinnyes, A., Y. Dai, S. Jiang and X. Yang. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation., *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 63: 513-518.
- Enright, B. P., P. Lonergan, A. Dinnyes, T. Fair, F. A. Ward, X. Yang and M. P. Boland. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54: 659-73.
- Fuku, E., L. Xia and B. R. Downey. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 32: 139-156.
- Gardner, D. K., M. Lane, A. Spitzer and P. A. Batt. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50: 390-400.
- Ghetler, Y., E. Skutelsky, I. B. Nun, L. B. Dor, D. Amihai and R. Shalgi. 2006. Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. *Fertil. Steril.* 86: 210-216.
- Glenister, P. H., M. J. Wood, C. Kirby and D. G. Whittingham. 1987. Incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res.* 16: 205-216.
- Good, D. A., S. M. Osborn, H. Bourne and W. I. Johnston. 1994. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosome. *Hum. Reprod.* 9: 684-691.
- Hou, T. P., Y. P. Dai, S. E. Zhu, H. B. Zhu, T. Y. Wu, G. C. Gong, H. P. Wang, L. L. Wang, Y. Liu, R. Li, R. Wan and N. Li. 2005. Bovine oocytes vitrified by the open pulled straw method and used for somatic cell cloning supported development to term. *Theriogenology* 64: 1381-1391.
- Huang, J. C., H. H. Lin, J. S. Wu, P. H. Tang, D. C. Wang, B. T. Liu and L. R. Chen. 2008. Vitrification of caprine embryos in microdrops. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.* 37: 145-156.
- Ishimori, H., K. Saeki, M. Inai, Y. Nagao, J. Itasaka, Y. Miki, N. Seike and H. Kainuma. 1993. Vitrification of

- bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology* 40: 427-433.
- Jain, J. K. and R. J. Paulson. 2006. Oocyte cryopreservation. *Fertil. Steril.* 86: 1037-1046.
- Johnson, M. H. and S. J. Pickering. 1987. The effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development* 100: 313-324.
- Kasai, M., J. H. Komi, A. Takakamo, H. Tsudera, T. Sakurai and T. Machida. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.* 89: 91-97.
- Kuleshova, L., L. Gianaroli, C. Magli, A. Ferraretti and A. Trounson. 1999. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum. Reprod.* 14: 3077-3079.
- Larman, M. G., C. B. Sheehan and D. K. Gardner. 2006. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction* 131: 53-61.
- Leibo, S. P., A. Martino, S. Kobayashi and J. W. Pollard. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 45-53.
- Liebermann, J., F. Nawroth, V. Isachenko, E. Isachenko, G. Rahimi and M. J. Tucker. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.* 67: 1671-1680.
- Mandelbaum, J. 1991. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 3: 662-667.
- Martion, A., N. Songsasen and S. P. Leibo. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54: 1059-1069.
- Matson, P. L., J. Graefling, S. M. Junk, J. L. Yovich and W. E. Edirisinghe. 1997. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an *in vitro* fertilization programme. *Hum. Reprod.* 12: 1550-1553.
- Pickering, S. J., P. R. Braude and M. H. Johnson. 1991. Cryoprotection of human oocytes: inappropriate exposure to DMSO reduces fertilization rates. *Hum. Reprod.* 6: 142-143.
- Pugh, P. A., H. R. Tervit and H. Niemann. 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 9-22.
- Renard, J. P. and C. Babinet. 1984. High survival of mouse embryos after freezing and thawing inside plastic straws with 1,2-propanediol as cryoprotectants. *J. Exp. Zool.* 230: 443-448.
- Saha, S., R. Rajamahendran, A. Boediono, C. Sumantri and T. Suzuki. 1996. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology* 46: 331-343.
- Schalkoff, M. E., S. P. Oskowitz and R. D. Powers. 1989. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol. Reprod.* 40: 379-393.
- Shaw, J. M., A. Oranratnachai and A. O. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53: 59-72.
- Shaw, J. M., I. Kola, D. R. MacFarlane and A. O. Trounson. 1991. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J. Reprod. Fertil.* 91: 9-18.
- Silvestre, M. A., J. Yaniz, I. Salvador, P. Santolaria and F. Lopez-Gatius. 2006. Vitrification of pre-pubertal ovine cumulus-oocyte complexes: Effect of cytochalasin B pre-treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 176-182.

- Steel, R. G. D and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. McGraw-Hill Press, New York. pp. 172-194.
- Titterton, J. L., J. Robinson, S. R. Killick and D. M. Hay. 1995. Synthetic and biological macromolecules: Protection of mouse embryos during cryopreservation. Hum. Reprod. 10: 649-653.
- Vajta, G., P. J. Booth, P. Holm, T. Greve and H. Callesen. 1997. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo-Lett 18: 191-195.
- Vajta, G., N. Rindom, T. T. Peura, P. Holm, T. Greve and H. Callesen. 1999. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. Theriogenology 52: 939-948.
- Vincent, C., G. Preliere, E. Pajot-Augy, E. Campion, V. Garnier and J. P. Renard. 1990. Effects of cryoprotectants on actin filaments during the cryopreservation of one-cell rabbit embryos. Cryobiology 27: 9-23.
- Yang, B. C., B. S. Yang, H. H. Sung, S. K. Im, S. B. Park, W. K. Chang and C. K. Lee. 2002. Studies on the viability of *in vitro*-matured bovine oocytes vitrified by microdrop and straw methods. Kor. J. Anim. Sci. 44: 701-710.
- Yang, B. C., G. S. Im, D. H. Kim, B. S. Yang, H. J. Oh, H. S. Park, H. H. Seong, S. W. Kim, H. H. Ka and C. K. Lee. 2008. Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. Anim. Reprod. Sci. 103: 25-37.

The viability and subsequent developmental competence of *in vitro*-matured caprine oocytes vitrified in solutions with various cryoprotectant formulae and equilibrium time ⁽¹⁾

De-Chi Wang⁽²⁾ Hsin-Hung Lin⁽³⁾ Ting-Chieh Kang⁽⁴⁾
and Jan-Chi Huang⁽²⁾⁽⁵⁾

Received : Feb. 11, 2010 ; Accepted : Aug. 5, 2010

Abstract

The objective of this study was to examine the effects of cryoprotectants and equilibrium time on the survival rate and the developmental potential of vitrified-warmed caprine oocytes matured *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained from 2-6 mm follicles on the surface of ovaries were cultured *in vitro* for maturation. Before vitrification, two-step of equilibration of *in vitro* matured oocytes in solutions containing different concentration of cryoprotectants for different time were adopted, i. e., 7.5% EG+7.5% DMSO for 7 min, 10% EG+10% DMSO for 45 sec and 1.6 M EG for 6 min or 12 min and then to 16.5% EG+16.5% DMSO for 25 sec, 20% EG+20% DMSO for 25 sec and 6.8 M EG for 30 sec. A group of five oocytes in a 2 μ l microdrop of the vitrification solution generated from the tip of a glass pipette were eventually flipped into liquid nitrogen for vitrification and long-term cryopreservation. The survival rate and developmental competence of vitrified-warmed oocytes were evaluated by the morphology of oocytes after warming and the blastocyst formation rate following fertilize and culture *in vitro*. The results indicated that *in vitro* matured oocytes equilibrated in solution containing 7.5% EG+7.5% DMSO for 7 min and then transferred to 16.5% EG+16.5% DMSO for 25 sec resulted in the highest survival rate ($P < 0.05$) and tended to have better developmental competence to blastocyst than that in the rest of treatments.

Key word : Goat, Oocyte, Vitrification, Blastocyst.

(1) Contribution No. 1598 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hengchun Branch Institute, COA-LRI, Hengchun, Pingtung 946, Taiwan, R. O. C.

(3) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, Pingtung 912, Taiwan, R. O. C.

(4) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R. O. C.

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

