

# 不同胚體外培養系統及卵母細胞亮甲酚藍染色分級對體外生產山羊胚後續發育能力之影響<sup>(1)</sup>

王得吉<sup>(2)</sup> 李平南<sup>(2)</sup> Pascal Mermillod<sup>(3)</sup> 黃政齊<sup>(2)(4)</sup>

收件日期：99 年 8 月 12 日；接受日期：100 年 4 月 1 日

## 摘要

本研究目的是探討不同胚體外培養系統及卵母細胞成熟前利用亮甲酚藍 (brilliant cresyl blue, BCB) 染色分級，對體外生產山羊胚後續發育能力之影響。自活體摘除所得之卵巢表面濾泡中收集卵丘卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs)，隨之進行體外成熟與體外受精作用後，將其分別培養在 TCM199 輸卵管上皮細胞共培養系統 (TCM199-goat oviduct epithelial cell, TCM199-GOEC) 與合成輸卵管液 (synthetic oviduct fluid plus amino acid, SOFaa) 培養系統。結果顯示在卵裂率部份，培養於 SOFaa 顯著 ( $p < 0.05$ ) 高於培養於 TCM199-GOEC 者，然而在囊胚率與囊胚平均細胞數方面，培養於 TCM199-GOEC 者則顯著 ( $p < 0.05$ ) 高於培養於 SOFaa 者。於卵母細胞染色分級試驗中，COCs 於體外成熟前經亮甲酚藍 (BCB) 染色篩選後，依卵胞質呈色狀態區分為 BCB+ 與 BCB-，將之分別進行體外成熟、體外受精作用後，培養在 TCM199-GOEC 系統。試驗結果顯示無論於卵裂率及囊胚率，BCB+ 組 ( $77.7 \pm 15.9\%$  and  $27.5 \pm 8.1\%$ ) 皆顯著 ( $p < 0.05$ ) 高於 BCB- 組 ( $42.5 \pm 14.3\%$  and  $3.9 \pm 7.8\%$ ,  $p < 0.05$ )。源自體外生產於 TCM199-GOEC 所得之 6 顆新鮮囊胚及 9 顆冷凍-解凍後囊胚，分別移置於 2 頭及 3 頭代孕母羊後，懷孕率分別為 50.0% (1/2) 及 33.3% (1/3)，胚存活率則分別為 16.7% (1/6) 及 11.1% (1/9)。試驗結果顯示，TCM199-GOEC 之體外培養系統為較佳之胚體外培養系統，且可成功產下健康的仔畜。卵母細胞成熟前利用 BCB 染色分級，可提升體外山羊胚生產效率。

關鍵詞：山羊、胚、體外生產、共培養、亮甲酚藍。

## 緒言

- 
- (1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1686 號。  
(2) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。  
(3) 法國國家農業研究院圖爾分院家畜生殖生理研究所。  
(4) 通訊作者，E-mail: jchuang@mail.tlri.gov.tw。

家畜育種過程中，使用輔助生殖技術 (assisted reproduction technologies, ART) 相較於自然繁衍方式，其最主要目的是增加優良家畜後代的可能性。發情同期化和人工授精則為目前被廣為應用的輔助生殖技術，然而超量排卵及胚胎移植技術 (multiple ovulation and embryo transfer, MOET) 卻未被廣泛運用；當中最主要的原因包含成本、技術需求性高及不可預測的結果等問題存在 (Baldassarre and Karatzas, 2004; Cognie, 1999; Cognie *et al.*, 2003)。小反芻獸研究領域中，胚體外生產 (in vitro production, IVP) 在發育生物學及生理學的基礎研究上，提供了廉價胚有效且優良的來源 (Cognie *et al.*, 2003)。近年來，有關提昇胚體外生產效率的研究已逐漸被發展；但儘管如此，其成功率仍遠低於源自體內 (in vivo) 的胚 (Kruip *et al.*, 2000)。許多研究指出，胚存活率可能因培養系統變得更複雜而相對的提昇；因此，體外胚生產過程中於受精後培養條件的修飾便成為了促進囊胚品質的決定因素 (Galli and Lazzari, 1996; Lonergan *et al.*, 2001)。許多研究致力於最適培養條件，亦有許多的人工合成培養液被建議用於支持體外生產胚之發育 (Lee *et al.*, 2000; Pawshe *et al.*, 1996; Urdaneta *et al.*, 2003)。合成輸卵管液 (synthetic oviduct fluid, SOF) 常被用來使用於牛、羊胚之體外培養，該培養液源於綿羊輸卵管液生化分析結果之基礎上被建立 (Tervit *et al.*, 1972) 的低氧培養系統；後來相關研究者陸續將該培養液加以修飾，包含添加必需與非必需胺基酸 (Gardner *et al.*, 1994)、檸檬酸 (Kesintape *et al.*, 1995)、去除葡萄糖成分 (Takahashi and First, 1992) 及在培養初期之 72 小時添加 EDTA (Gardner *et al.*, 1997) 等。此外，有研究指出利用細胞共培養系統，相較於無細胞支持之培養，顯著提昇囊胚之品質與存活力 (Rizos *et al.*, 2001; Tervit *et al.*, 1994)。輸卵管上皮細胞共培養則為另一常被用於牛、羊胚體外培養之系統，在山羊亦被證實可成功的獲得體外生產之囊胚 (Izquierdo *et al.*, 1999; Kątska-Książkiewicz *et al.*, 2004; Kątska-Książkiewicz *et al.*, 2007; Pawshe *et al.*, 1996)。體外胚生產技術廣泛應用的另一限制因素為低的耐凍能力，甚至在某些研究指出其後代有不正常之狀況 (Enright *et al.*, 2000; Galli and Lazzari, 1996)。在所有可用的冷凍技術中，玻璃化冷凍 (vitrification) 方法似乎是較適於對冷凍感受性較高的體外生產胚 (Cognie *et al.*, 2003)。另一方面，有些研究指出所使用的培養系統，將對冷凍 - 解凍胚之存活率有著決定性的影響 (Galli and Lazzari, 1996; Lonergan *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2001; 2002)。此外，冷凍 - 解凍過程後胚之存活率可作為評估體外生產胚其遭受冷凍傷害之程度，但最好的評估方式仍為胚移植後之懷孕率及存活率 (Leibo and Loskutoff, 1993; Lonergan *et al.*, 2001; Wright and Ellington, 1995)。

源自屠宰母畜所獲得之卵母細胞，已知在體外成熟後之發育潛力存在著極大的變異 (Gordon and Lu, 1990; Pujol *et al.*, 2004)。因此，正確、快速且非侵害性的成熟前卵母細胞品質評估方式便相形重要。利用亮甲酚藍 (brilliant cresyl blue, BCB) 已被證實在發身前豬、牛、羊等動物研究中可用來挑選適當的卵母細胞 (Hanet *et al.*, 2006; Jiménez-Macedo *et al.*, 2006; Roca *et al.*, 1998)。此外，BCB 亦被使用於源自屠宰成年母牛而來之卵母細胞挑選，以作為胚體外生產 (Alm *et al.*, 2005) 及體細胞複製 (Bhojwani *et al.*, 2007) 等研究上。未成熟卵母細胞已知可合成多種的蛋白質 (Wassarman, 1998)，其中包括 G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase)；此酶在生長中之卵母細胞內被活化 (Mangia and Epstein, 1975)，但卻於已生長完畢之卵母細胞內活性降低 (Wassarman, 1998)。BCB 被用來測定 G6PD 之活性，其原理為 G6PD 可將 BCB 染料自藍色轉為無色的能力 (Ericsson *et al.*, 1993)。G6PD 於卵母細胞生成過程中於卵母細胞內被合成，且其為 pentose phosphate cycle 之成分之一，主要提供核苷酸 (nucleotide) 與核酸 (nucleic acid) 合成過程中核糖之磷酸以及 NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 之利用。發身前山羊卵母細胞的研究顯示，較有發育能力之卵母細胞可用 BCB 染色進行篩選 (Rodriguez *et al.*, 2002; 2003)，在 BCB + (呈現藍色) 的卵母細胞其成熟率與受精率皆顯著高於 BCB- (無色) 者。

本試驗目的即是評估山羊卵丘 - 卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs) 經體外成熟及體外受精後，分別培養於不同之體外培養系統；成熟前 COCs 經 BCB 染色分級，對其後續發育能力之影響。在後續試驗中，則嘗試利用所生產之體外新鮮與冷凍 - 解凍後之囊胚進行胚移植，以評估仔羊生產之可

行性。

## 材料與方法

### I. 山羊卵丘 - 卵母細胞複合體取得

本試驗所使用之卵巢，取自淘汰雜交母山羊。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，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 COCs 備供體外成熟培養之用。

### II. BCB 染色

於染色試驗，經選取之 COCs 先於 37°C 含有 0.4% BSA (bovine serum albumin; A-7888, Sigma, Saint Louis, USA) 之 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) 緩衝液中清洗 3 次，再移入 100  $\mu$ l 含有 26  $\mu$ M BCB (B-5388, Sigma, Saint Louis, USA) 之 DPBS 緩衝液小滴中，置於 38.5°C 含 5% CO<sub>2</sub>、95% 空氣及飽和濕度條件之培養箱中，進行至少 1.5 小時之短暫培養。繼之吸取染色後之卵丘卵母細胞複合體於 37°C 含有 0.4% BSA 之 DPBS 緩衝液中清洗 3 次，完畢後於顯微鏡下依胞質染色狀態區分為 2 組：胞質呈現藍色者為 BCB<sup>+</sup>，反之無色為 BCB<sup>-</sup>。分組後之 COCs 則分別進行後續之體外成熟培養。

### III. 卵體外成熟培養

於進行培養前，事先於 4 孔盤之培養皿中製作 4 孔均含 500  $\mu$ l 之無覆蓋礦物油之成熟培養液 (TCM199 添加 10 ng/mL epidermal growth factor、100 mM cysteamine 及 40 mg/mL gentamycin)，再置於 38.5°C 含 5% CO<sub>2</sub>、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山羊之 COCs，以 40-50 個不等之數量平均移入上述備妥之體外成熟培養液中，並於相同培養環境下，進行 22 小時體外成熟培養。

### IV. 體外受精

山羊冷凍精液於液態氮中取出立即置於 37°C 水浴 1 分鐘，將解凍後之精液置於 15 ml 離心管內，加入 5 倍量之精子洗滌液混勻並於 1250 rpm (210  $\times$  g) 條件下離心 10 分鐘，去除上層液並重複洗滌、離心 1 次。殘留底部之精子團塊加入等量含肝素及咖啡因之精子洗滌液 (即獲能液) 混勻，置入 38.5°C 含 5% CO<sub>2</sub>、95% 空氣及飽和濕度條件之培養箱中 15 分鐘。經體外成熟後之卵母細胞移除大部份包被外圍之卵丘細胞後，殘留少數卵丘細胞的卵母細胞 (10-20 個) 經 3 次清洗後，即置入已獲能作用之 80  $\mu$ l 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，利用微玻璃細管吸取於獲能液中，以機械式連續吸吐移除包被外圍之精子，並經體外培養液 (SOFaa 或 TCM199) 清洗 3 次。

### V. 合成輸卵管液 (SOF plus amino acid, SOFaa) 體外培養系統

卵母細胞經體外受精後，每 20 個受精卵移入 25  $\mu\text{L}$  SOFaa 上覆礦物油，於 38.5°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub> 及 90% N<sub>2</sub> 低氧條件下進行體外培養與觀察 (Gardner *et al.*, 1994)。

VI. TCM199 輸卵管上皮細胞 (oviduct epithelial cell) 共培養體外培養系統 (TCM199-goat oviduct epithelial cell, TCM199-GOEC)

卵母細胞經體外受精後，每 20-50 個受精卵移入含單層底貼輸卵管上皮細胞之 500  $\mu\text{L}$  TCM199 培養液中，於 38.5°C 含 5% CO<sub>2</sub>、95% 空氣及飽和濕度條件之培養箱中，進行體外培養與觀察。

#### VII. 體外胚冷凍與解凍

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。經體外培養後之囊胚放置於含 20% FCS(fetal calf serum) 之 TCM199 備用，隨後移至含 10% EG(ethylene glycol) + 10% DMSO(dimethyl sulfoxide) 冷凍保護劑之 TCM199 培養液中進行 45 秒平衡，再分別移至含 16.5% EG、16.5% DMSO 及 0.5 M 蔗糖(sucrose) 冷凍保護劑之 TCM199 培養液中 25 秒培養，最後以每一微滴 (2  $\mu\text{L}$ ) 含 2-4 個胚，直接投入液態氮中瞬間冷凍，製成玻璃珠狀微粒。再將之存放於適當容器保存於液態氮中。解凍時，將含胚之微粒直接投入 38.5°C 含 0.25 M sucrose 之培養液中解凍並保持 5 分鐘，再轉移至含 0.15 M sucrose 及 20% FCS 之 TCM199 中 5 分鐘，最後移入含 20% FCS 之 TCM199 中 5 分鐘，並進行短時培養觀察，調查解凍後胚之存活率。

#### VIII. 胚移置於受胚母山羊

選擇經產的雜種肉用母山羊作為受胚羊，與供胚母羊同日在陰道塞入 CIDR® 並留置 11 日，但於第 9 日，即抽除 CIDR® 前 48 小時，每頭母羊注射 125  $\mu\text{g}$  前列腺素 cloprostenol 及 500 IU eCG (血清哥那，中國化學，台灣)，誘發與供胚母羊同期發情。受胚母羊於同期化發情後第 6-7 日，亦採用腹中線外科手術法，將回收之正常胚移置入與黃體同側的子宮角內。每頭受胚母羊移置 3 個胚。受胚母羊在胚移置後 40 日左右，以超音波掃瞄儀器 (SSD 500V, Aloka, Japan) 進行妊娠診斷，統計受胎率；母羊自然分娩後統計胚存活率。胚存活率 (%) = (總仔羊頭數 / 總移置胚數)  $\times$  100%。

#### IX. 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  $\pm$  標準偏差 (Mean  $\pm$  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)。

## 結論與建議

山羊 COCs 經體外成熟及體外受精後，分別培養於 SOFaa 與 TCM199-GOEC 之體外培養系統中，對其後續發育能力之影響，結果如表 1 所示。在卵裂率部份，培養於 SOFaa 者顯著 ( $p < 0.05$ ) 高於培養於 TCM199-GOEC 者 ( $81 \pm 11.3\%$  vs  $60.5 \pm 6.9\%$ )。在囊胚率與囊胚平均細胞數方面，培養於 TCM199-GOEC 者 ( $34.7 \pm 2.0\%$ ,  $122.7 \pm 11.1$ ) 則顯著 ( $p < 0.05$ ) 高於培養於 SOFaa 者 ( $16.7 \pm 3.4\%$ ,  $62.4 \pm 18.3$ )。Kątska-Książkiewicz *et al.* (2004) 於山羊胚體外生產的研究顯示，冷凍精液解凍後添加肝素進行獲能作用，卵母細胞經體外受精並培養於輸卵管上皮細胞共培養之體外培養系統中，所得之卵裂率及囊



胚率分別為 53.7% 及 40.0%，與本試驗於 TCM199-GOEC 之體外培養系統中之結果相似。而在囊胚細胞數方面，其所計算者為受精後第 9 天之已孵化囊胚，而本試驗為收集自 6-9 天之擴張囊胚，因此其較本研究中所得之結果為高 ( $167.6 \pm 23$  vs  $122.7 \pm 11.1$ )。另 Rodríguez-Dorta *et al.* (2007) 及 Keskinetepe *et al.* (1998) 於山羊胚體外生產的研究顯示，卵母細胞經體外成熟、體外受精並培養於 SOF 之體外培養系統中，所得之卵裂率及囊胚率分別為 83.0% 及 23.0%、60.0% 及 17.5%，亦與本試驗於 SOFaa 之體外培養系統中之結果相似 (81% 及 16.7%)。

身為生殖道組成之一，輸卵管提供了一有助於配子受精及早期胚發育的適當微環境；這些現象可從許多品種和科學家利用不同的技術去發現輸卵管的分泌、功能與組成成分分析等研究中獲得證實 (Killian, 2004)。輸卵管分泌的組成分析中顯示，輸卵管液為一生化組成，且其所含蛋白質為構成輸卵管分泌之主要成分。儘管輸卵管液中許多蛋白質皆可在其他組織中被發現，但在 1980 年代一種輸卵管特殊醣蛋白 (oviduct specific glycoproteins, OSG)，或稱為 ovidutins，被發現獨特的出現在輸卵管液中 (Sutton *et al.*, 1984; 1986)。該蛋白於排卵前後，於血漿中雌激素顯著增加之動情期中大量的被生產 (Verhage *et al.*, 1990)。在體外研究中顯示，OSG 對於精子的獲能、活力與存活率、卵的受精與胚的發育皆有著正面的影響 (Buhi, 2002; Killian and Goncalves, 2002; Nancarrow and Hill, 1995; Verhage *et al.*, 1998;)。此外，另一醣蛋白 osteopontin 亦發現於輸卵管液中 (Gabler *et al.*, 2003)，Osteopontin 在輸卵管上皮細胞被合成並分泌至輸卵管液中；該醣蛋白亦普遍存在於其他組織中，其主要功能為參與細胞黏合與訊息傳導等。牛的研究顯示，卵母細胞預先以自乳中純化的 osteopontin 處理後，對受精後的卵裂率與囊胚率皆有顯著提升之效果 (Goncalves *et al.*, 2003)。綜合以上結果顯示，輸卵管液確可提供生殖細胞展現各階段功能之適當環境，而在胚體外培養過程中使用輸卵管上皮細胞進行共培養，或許是利用細胞所分泌之已知或未知的蛋白質及生長因子，促進卵母細胞受精後後續發育至囊胚之能力。

表 1. 不同胚體外培養系統對體外生產山羊胚後續發育能力之影響

Table 1. Effect of different culture systems on the subsequent developmental capacity of *in vitro* produced caprine embryos (data from 4 replicates)

Culture system*	COCs No.	Cleavage rate %	Blastocyst rate %	Average cell No.
TCM199-GOEC	185	$60.5 \pm 6.9^b$	$34.7 \pm 2.0^a$	$122.7 \pm 11.1^a$
SOFaa	163	$81 \pm 11.3^a$	$16.7 \pm 3.4^b$	$62.4 \pm 18.3^b$

<sup>a, b</sup>Values without the same superscripts in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ )

\*TCM199-GOEC means tissue culture medium 199 plus goat oviduct epithelial cell.

SOFaa means synthetic oviduct fluid plus amino acid.

利用 BCB 進行山羊卵母細胞染色分類後，分析其經體外受精及體外培養於 TCM199-GOEC 之體外培養系統中，其後續發育之能力，結果如表 2 所示。在卵裂率部份，BCB+ 組與對照組並無顯著性差異存在 ( $77.7 \pm 15.9\%$  vs.  $76.3 \pm 16.0\%$ )，然而 BCB- 組 ( $42.5 \pm 14.3\%$ ) 則顯著 ( $p < 0.05$ ) 低於 BCB+ 組與對照組。而在囊胚率部份，亦呈現出相同之結果。Kątska-Książkiewicz *et al.* (2007) 於山羊卵母細胞的研究中顯示，一級 COCs 利用 BCB 進行染色分類後，在卵裂率部份 BCB+ 組與對照組並無顯著性差異存在 ( $55.5\%$  vs.  $61.7\%$ )，而 BCB- 組 ( $22.2\%$ ) 則顯著 ( $p < 0.05$ ) 低於 BCB+ 組與對照組。在囊胚率部份，BCB+ 組與對照組亦無顯著性差異存在 ( $13.3\%$  vs.  $19.1\%$ )，而 BCB- 組 ( $0\%$ ) 則顯著 ( $p < 0.05$ ) 低於 BCB+ 組與對照組，該研究與本試驗結果相符。此外，Rodríguez *et al.* (2002) 於發身前山羊卵母細胞的研究中亦顯示，經 BCB 進行染色分類後，BCB+ 組、BCB- 組與對照組 3 組間儘管於受精率上並無顯著之差異，但在桑椹胚及囊胚之比例上，BCB- 組與 BCB+ 組則具有顯著性 ( $p < 0.05$ ) 差異存在 ( $3.6\%$  vs  $12.0\%$ )，而 BCB+ 組與對照組間則無顯著差異存在 ( $12.0\%$  vs  $7.7\%$ )，與本試驗有著相似之結果。

綜合上述研究結果顯示，BCB+ 組與對照組間均無顯著差異存在，造成此結果可能原因為評估 COCs 品質除了依外觀（如細胞質均勻度及卵丘細胞包覆層數等）評定外，卵母細胞直徑大小亦為其後續發育能力之重要影響因子 (Hyttel *et al.*, 1997)。本試驗 COCs 源於約 2-6 mm 的濾泡，依 Crozet *et al.* (2000) 的研究中顯示，該階段濾泡所含之卵母細胞直徑雖約為 130  $\mu\text{m}$  以上，但直徑大小變異仍大，因此是否造成該結果則仍待進一步探討。

另 Rodriguez *et al.* (2002) 於發身前山羊卵母細胞的研究中顯示，一級 COCs 利用 BCB 進行染色分類後，BCB- 組顯示具有極高之比例（50.5%），此部分與本試驗及 Kątska-Książkiewicz *et al.* (2007) 之研究並不相同，亦即 BCB- 組卵母細胞之比例皆低於 BCB+ 組甚多。可能原因為未成熟卵母細胞已知可合成多種的蛋白質 (Wassarman, 1998)，其中包括 G6PDH。此酶在生長中之卵母細胞內被活化 (Magnia and Epstein, 1975)，但卻於已生長完畢之卵母細胞內活性降低 (Wassarman, 1998)。源自於發身前山羊的卵母細胞相較於成熟母羊卵母細胞，應含有極高比例生長中之卵母細胞 (Tian *et al.*, 1998)，以致造成卵母細胞經 BCB 染色後 BCB+ 組與 BCB- 組在數量比例上與本試驗結果相異之處。

表 2. 卵母細胞體外成熟前以 BCB 挑選後對體外生產山羊胚後續發育能力之影響

在 BCB 使用濃度方面，先前研究 (Rodriguez *et al.*, 2002; 2003) 中証實利用 26  $\mu\text{M}$  之 BCB 進行卵母細胞染色，對 BCB+ 組與 BCB- 組於成熟率及受精率之差異程度有著最佳之效果，而對卵母細胞不會有不利之影響，此部份於本試驗、Kątska-Książkiewicz *et al.* (2007) 於山羊之研究及 Manjunatha *et al.* (2007) 於水牛卵母細胞之研究中亦獲證實。

Oocyte classification	COCs No.	Cleavage rate %	Blastocyst rate %
BCB+	137	77.7 $\pm$ 15.9 <sup>a</sup>	27.5 $\pm$ 8.1 <sup>a</sup>
BCB-	71	42.5 $\pm$ 14.3 <sup>b</sup>	3.9 $\pm$ 7.8 <sup>b</sup>
Control	87	76.3 $\pm$ 16.0 <sup>a</sup>	24.3 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Values without the same superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.0$ ).

母細胞之染色篩選，對 BCB+ 組與 BCB- 組於成熟率及受精率之差異程度有著最佳之效果，而對卵母細胞不會有不利之影響，此部份於本試驗、Kątska-Książkiewicz *et al.* (2007) 於山羊之研究及 Manjunatha *et al.* (2007) 於水牛卵母細胞之研究中亦獲證實。

山羊 COCs 經體外成熟及體外受精後，培養於 TCM199-GOEC 之體外培養系統中，所得之擴張囊胚進行新鮮與微滴玻璃化冷凍 - 解凍後胚之胚移置，以評估吾等近來所建立之羊胚體外生產系統對實際生產仔羊之可行性，結果如表 3 所示。利用體外生產新鮮胚與冷凍 - 解凍胚在胚移置後懷孕率分別為 50.0% 及 33.3%，胚存活率則分別為 16.7% 及 11.1%。

許多因素影響著胚移置是否成功，包含胚移置之位置、每頭母羊移置之胚數、胚之年齡以及被移置胚與受胚母羊子宮內環境同步之程度 (Ishwar and Memon, 1996)。在子宮內早期胚胎死亡可因過度擠壓而昇高。先前於山羊之研究顯示，當受胚母羊移置僅 2 個胚胎，將有助於胚存活率之提升 (Armstrong and Evans, 1983; Tervit *et al.*, 1986)。本試驗中無論於新鮮胚或冷凍 - 解凍胚移置於受胚母羊皆為 3 個胚胎。另外，本試驗中體外生產新鮮胚是於非繁殖季節進行移置，是否當時之長光照環境會造成懷孕率下降仍不清楚，但確有研究指出長光照會影響母羊的受胎率 (Amoah, 1982; Amoah and Bryant, 1983)。

由上述結果顯示，TCM199-GOEC 之體外培養系統為較佳之胚體外培養系統，且可成功的產下健康的仔畜如圖 1 與圖 2。卵母細胞成熟前利用 BCB 染色分級，可提升體外山羊胚生產效率。

表3. 體外生產山羊胚移置後之結果

Table 3. Results of transfer of *in vitro* produced caprine embryos

Embryo resource	Embryo No.	Recipient No.	Pregnant rate (%)	Embryo survival rate (%)
Fresh IVP embryos	6	2	50.0	16.7
Frozen-thawed IVP embryos	9	3	33.3	11.1



圖1. 源自體外生產新鮮胚經胚移置後所生產之仔羊。

Fig. 1. The kid derived from transfer of fresh *in vitro* produced embryos.

圖2. 源自體外生產冷凍-解凍胚經胚移置後所生產之仔羊。

Fig. 2. The kid derived from transfer of frozen-thawed *in vitro* produced embryos.

## 參考文獻

- Alm, H., H. Torner, B. Lohrke, T. Viergutz, I. M. Ghoneim and W. Kanitz. 2005. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63:2194-2205.
- Amoah, E. A. 1982. Some aspects of reproduction in the female goat. Ph.D. dissertation. University of Reading, UK.
- Amoah, E. A. and M. J. Bryant. 1983. Gestation period, litter size and birth weight in the goat. *Anim. Prod.* 36:105-110.
- Armstrong, D. T. and G. Evans. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in goats. *Theriogenology* 19:31-42.
- Baldassarre, H. and C. N. Karatzas. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 2004:255-266.
- Bhojwani, S., H. Alm, H. Torner, W. Kanitz and R. Poehland. 2007. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 67:341-345.
- Buhi, W. C. 2002. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123:355-362.

- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51:105-116.
- Cognie, Y., G. Baril, N. Poulin and P. Mermillod. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59:171-188.
- Crozet, N., M. Dahirel and L. Gall. 2000. Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 118:367-373.
- Enright, B. P., P. Lonergan, A. Dinnyes, T. Fair, F. A. Ward and X. Yang. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* versus *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54:659-673.
- Ericsson, S. A., M. L. Boice, H. Funahashi and B. N. Day. 1993. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology* 39:214.
- Gabler, C., D. A. Chapman and G. J. Killian. 2003. Expression and localization of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the estrous cycle. *Reproduction* 126:721-729.
- Galli, C. and G. Lazzari. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 42:371-379.
- 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* the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50:390-400.
- Gardner, D. K., M. W. Lane and M. Lane. 1997. Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72 h of development from the zygote. *Theriogenology* 47:278.
- Goncalves, R. F., D. A. Chapman and G. J. Killian. 2003. Effect of osteopontin on *in vitro* bovine embryo development. *Biol. Reprod.* 68:336.
- Gordon, I. and K. H. Lu. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33:77-87.
- Han, Z. B., G. C. Lan, Y. G. Wu, D. Han, W. G. Feng and J. Z. Wang. 2006. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: A study using the well-in-drop culture system. *Reproduction* 132:749-758.
- 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.
- Hyttel, P., T. Fair, H. Callesen and T. Greve. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23-32.
- Ishwar, A. K. and M. A. Memon. 1996. Embryo transfer in sheep and goats: A review. *Small. Rumin. Res.* 19:35-43.
- Izquierdo, D., P. Villamediana and M. T. Paramio. 1999. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 52:847-861.
- Jiménez-Macedo, A. R., B. Anguita, D. Izquierdo, T. Mogas and M. T. Paramio. 2006. Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology* 66:1065-1072.
- Kątska-Książkiewicz, L., B. Ryńska, B. Gajda and Z. Smorag. 2004. Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of IVP in goats. *Theriogenology* 62:576-586.
- Kątska-Książkiewicz, L., J. Opiela and B. Ryńska. 2007. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology* 68:736-744.
- Keskinetepe, L., C. A. Burnley and B. G. Brackett. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro*



- conditions. *Biol. Reprod.* 52:1410-1417.
- Keskintepe, L., A. A. Simplicio and B. G. Brackett. 1998. Caprine blastocyst development after *in vitro* fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. *Theriogenology* 49:1265-1274.
- Killian, G. J. 2004. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:141-153.
- Killian, G. J. and R. F. Goncalves. 2002. Negative affect of antibodies to bovine osteopontin, lipocalin prostaglandin D synthase and serum albumin on *in vitro* embryo development of oocytes exposed to oviduct fluid. *Theriogenology* 57:520.
- Kruij, T. A. M., M. M. Bevers and B. Kemp. 2000. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 53:611-618.
- Lee, C. S., D. B. Koo, N. Fang, Y. Lee, S. T. Shin and C. S. Park. 2000. Potent and stage-specific action of glutathione on the development of goat early embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 57:48-54.
- Leibo, S. P. and N. M. Loskutoff. 1993. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 39:81-94.
- Loneragan, P., D. Rizos, F. Ward and M. P. Boland. 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:427-437.
- Mangia, F. and C. J. Epstein. 1975. Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Dev. Biol.* 45:211-220.
- Manjunatha, B. M., P. S. P. Gupta, M. Devaraj, J. P. Ravindra and S. Nandi. 2007. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology* 68:1299-1304.
- Nancarrow, C. C. and J. L. Hill. 1995. Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49:3-13.
- Pawshe, C. H., A. Palanisamy, M. Taneja, S. K. Jain and S. M. Totey. 1996. Comparison of various maturation treatments on *in vitro* maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. *Theriogenology* 46:971-982.
- Pujol, M., M. Lopez-Béjar and M. T. Paramio. 2004. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61:735-744.
- Rizos, D., F. Ward, M. P. Boland and P. Lonergan. 2001. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 56:1-16.
- Rizos, D., F. Ward, P. Duffy, M. P. Boland and P. Lonergan. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61:234-248.
- Roca, J., E. Martinez, J. M. Vázquez and X. Lucas. 1998. Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assay with the brilliant cresyl blue test. *Reprod. Fert. Dev.* 10:479-485.
- Rodríguez-Dorta, N., Y. Cognié, F. González, N. Poulin, F. Guignot, J. L. Touzé, G. Baril, F. Cabrera, D. Á lamo, M. Batista, A. Gracia and P. Mermillod. 2007. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos. *Theriogenology* 68:908-913.
- Rodriguez, G. E., M. B. López, E. Velilla and M. T. Paramio. 2002. Selection of prepuberal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57:1397-1409.
- Rodriguez, G. E., M. B. López, D. Izquierdo and M. T. Paramio. 2003. Developmental competence of prepuberal goat oocytes selected with brilliant sresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod. Nutr. Dev.* 43:179-187.

- Steel, R. G. D and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. pp. 172-194. McGraw-Hill Press, New york.
- Sutton, R., C. D. Nancarrow, A. L. C. Wallace and N. W. Ribgy. 1984. Identification of an estrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of sheep. J. Reprod. Fertil. 72:415-442.
- Sutton, R., C. D. Nancarrow and A. L. C. Wallace. 1986. Estrogen and seasonal effect on the production of an estrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of sheep. J. Reprod. Fertil. 77:645-653.
- Takahashi, Y and N. L. First. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology 37:963-978.
- Tervit, H. R., D. G. Whittingham and L. E. A. Rowson. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fertil. 30:493-497.
- Tervit, H. R., P. G. Gold and R. D. McKenzie. 1986. Development and effective of goat embryo transfer regime. Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod. 46:233-236.
- Tervit, H. R., P. A. Pugh, L. T. McGowan, A. C. S. Bell and R. W. Wells. 1994. The freezability of sheep embryos is affected by culture system and source (*in vivo* or *in vitro* derived). Theriogenology 41:315.
- Tian, W. N., L. D. Braunstein, J. Pang, K. M. Stuhlmeier, Q. C. Xi and X. Tian. 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. J. Biol. Chem. 273:10609-10617.
- Urdaneta, A., A. R. Jimenez-Macedo, D. Izquierdo and M. T. Paramio. 2003. Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test. Zygote 11:347-354.
- Verhage, H. G., P. A. Mavrogianis, M. L. Boice, W. Li and A. T. Fazleabas. 1990. Oviduct epithelium of the baboon: Hormonal control and the immunogold localization of oviduct-specific glycoproteins. Am. J. Anat. 18:81-90.
- Verhage, H. G., P. A. Mavrogianis, M. B. O'Day-Bowman, A. Schmidt, E. B. Arias, K. M. Donnelly, R. A. Boomsma, J. K. Thibodeaux, A. T. Fazleabas and R. C. Jaffe. 1998. Characteristics of an oviductal glycoprotein and its potential role in the fertilization process. Biol. Reprod. 58:1098-1101.
- Wassarman, M. 1998. The physiology of Reproduction. Raven Press. 1:69-102.
- Wright, R. W. and J. Ellington. 1995. Morphological and physiological differences between *in vivo*-and *in vitro*-produced preimplantation embryos from livestock species. Theriogenology 44:1167-1189.

# Effect of culture methods of embryos and brilliant cresyl blue staining of oocytes on developmental capacity of *in vitro* produced caprine embryos<sup>(1)</sup>

De- Chi Wang<sup>(2)</sup> Ping-Nan Lee<sup>(2)</sup> Pascal Mermillod<sup>(3)</sup> Jan- Chi Huang<sup>(2)(4)</sup>

Received : Aug. 12, 2010 ; Accepted : Apr. 1, 2011

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of different culture systems of embryos and brilliant cresyl blue (BCB) staining of oocytes prior to *in vitro* maturation (IVM) on subsequent developmental capacity of caprine embryos. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) collected from the follicles in the ovariectomized ovaries were subjected to maturation, fertilization and culture *in vitro*. The presumed zygotes were cultured either in TCM199 with monolayer of goat oviduct epithelial cell (TCM-GOEC) or in synthetic oviduct fluid plus amino acid (SOFaa). The mean cleavage rate of presumed zygotes cultured in SOFaa was significant higher ( $p < 0.05$ ) than that in TCM199-GOEC. However, the blastocyst rate and the cell number of blastocyst in TCM199-GOEC were significant higher ( $p < 0.05$ ) than those in SOFaa. Thereafter, the developmental capacity of embryos derived from BCB staining selected oocytes was evaluated with TCM199-GOEC culture system. The cleavage rate and blastocyst rate were significant higher in BCB+ group ( $77.7 \pm 15.9\%$  and  $27.5 \pm 8.1\%$ ) than those in BCB- group ( $42.5 \pm 14.3\%$  and  $3.9 \pm 7.8\%$ ,  $p < 0.05$ ). Six fresh blastocysts and 9 vitrified/thawed blastocysts derived from TCM199-GOEC culture system were transferred to two and three recipients, respectively, which resulted in 50% (1/2) and 33.3% (1/3) pregnancy rate. One kid was born in each of group. The results show that co-culture with oviduct epithelial cells is a superior culture method for *in vitro* produced caprine embryos in terms of subsequent developmental capacity of embryos. Selection of oocytes with BCB staining prior to IVM increases the efficiency of embryo production *in vitro*.

Key word: Goat, Embryo, *In vitro* production, Co-culture, Brilliant cresyl blue.

---

(1) Contribution No.1686 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6175, Inra-Cnrs-Université de Tours-Haras Nationaux, 37380 NOUZILLY, France.

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