畜產研究 51(2)：126-133, 2018

冷凍方式對源自體內發育山羊囊胚解凍後發育能力之影響 [1]

林信宏 [2][3] 黃政齊 [4] 康定傑 [4] 王得吉 [5] 郭廷雍 [6] 康獻仁 [2]
劉世賢 [3] 劉炳燦 [7] 彭劭于 [7] 沈朋志 [7][8]

收件日期：106 年 10 月 3 日；接受日期：106 年 11 月 9 日

摘 要

本研究旨在探討不同冷凍方法對山羊胚冷凍效率之影響。以評估源自體內發育山羊囊胚經不同冷凍方式冷凍解凍後之發育能力，藉以建立簡便有效之山羊胚冷凍保存技術。結果顯示，利用微滴 (microdrop) 與開放式拉製麥管 (open pulled straw, OPS) 法所玻璃化冷凍之山羊囊胚，經解凍後于體外培養 24 h 期間再恢復至囊胚之比例與分別為 66.1 － 81.8% 與 47.4 － 75.0%，均顯著優於利用慢速冷凍法者 (8.0 － 34.0%) ($P < 0.001$)；且培養 72 h 後發育至孵化期囊胚之比例，亦以微滴法之 81.4% 與 OPS 法之 72.7% 玻璃化冷凍者，顯著高於慢速冷凍法之 41.1% ($P < 0.05$)。為進一步評估冷凍－解凍山羊囊胚經胚移置後之體內發育能力，本研究利用微滴玻璃化冷凍之山羊囊胚之懷孕率 (68.7 *vs.* 61.5%) 與胚移置效率 (56.2 *vs.* 53.8%)，均與未冷凍之新鮮胚移置者相近 ($P > 0.05$)。應用微滴玻璃化冷凍法所產製之山羊冷凍囊胚，其於解凍後之發育能力明顯較應用慢速冷凍法所產製者為佳；且微滴玻璃化冷凍囊胚經解凍後之移置後效率與新鮮胚相近，顯示微滴玻璃化冷凍法可應用於山羊囊胚之冷凍保存。

關鍵詞：山羊、囊胚、玻璃化冷凍。

緒 言

胚冷凍保存 (embryo cryopreservation) 技術之應用價值，除可加速畜群改良與提高家畜商業應用價值，以及利於種源進出口疾病管制外，在人工生殖技術方面，亦可提供胚體外生產、胚移置、核轉置和基因轉殖動物研究之技術平臺；且胚冷凍保存技術可使優良品種、珍稀哺乳類動物或任何個體的基因庫得以長期保存，提高家畜種原多樣性，並可促使體外與體內生產家畜胚在進行胚移置時不受時間和空間的限制，進而達成快速擴大優良畜群之目的。Whittingham (1971) 首度以慢速冷凍 (slow freezing) 將小鼠胚成功冷凍保存，並成功獲得冷凍－解凍小鼠胚移置之子代。惟生產各種家畜胚或卵之冷凍效率，仍受冷凍保護劑毒性 (toxicity of cryoprotectants)、細胞內冰晶 (intracellular ice)、碎裂傷害 (fracture damage) 和滲透壓改變 (osmotic swelling) 等各種因素影響。商業化冷凍胚之生產，於牛及羊較為成功，豬胚對低於 15℃低溫敏感，其冷凍耐受性較其他家畜差。哺乳動物胚之玻璃化冷凍 (vitrification) 技術開發，乃由 Rall and Fahy (1985) 將 8 細胞期小鼠胚經高濃度冷凍保護劑處理後而首度成功。此法之優點乃在其較不受動物種別及胚發育期別之限制，已成功應用玻璃化冷凍技術而產仔之動物種別包括果蠅 (Steponkus *et al.*, 1990)、山羊 (Yuswiati *et al.*, 1990)、兔 (Kasai *et al.*, 1992)、豬 (Vajta *et al.*, 1997a)、乳牛 (Vajta *et al.*, 1997b)、小鼠 (Rall and Fahy, 1985; Kong *et al.*, 2000)、馬 (Oberstein *et al.*, 2001)、駱馬 (Aller *et al.*, 2002)、西伯利亞虎 (Crichton *et al.*, 2003) 及貂 (Piltti *et al.*, 2004) 等。

就胚玻璃化與慢速冷凍法間之效益比較而言，已有研究顯示，利用 OPS 玻璃化冷凍法所冷凍者，其於解凍後之胚發育能力顯著優於利用一般麥管慢速冷凍者 (Lopez-Bejar and Lopez-Gatius, 2002; Naik *et al.*, 2005)。此乃由於玻璃化冷凍法具有較低毒性、較佳滲透保護能力與降溫速率所致 (Vajta *et al.*, 1998)。然而，在胚玻璃化冷凍法中，仍

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2579 號。
(2) 行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。
(3) 國立屏東科技大學獸醫學系。
(4) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。
(5) 桃園市政府農業局。
(6) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。
(7) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。
(8) 通訊作者，E-mail：pcshen@mail.npust.edu.tw。

有多數方法需搭配盛胚載具使用。就製程步驟而言，OPS 玻璃化法於胚進行冷凍前，以 OPS 作為盛胚載具，先將含胚之冷凍保護劑吸入其中，再直接投入液態氮中進行冷凍 (Naik *et al.*, 2005)；而微滴法者則是將含胚之冷凍保護劑，以球狀微滴直接置入液態氮中 (Kouji *et al.*, 2003)，其優點除不需胚載具外，另具有更佳之冷凍速率 (Liebermann *et al.*, 2002)，且因微滴之體積較小，可降低玻璃化冷凍之快速降溫過程中，微滴表面與核心間之溫度差異，因而減少微滴碎裂 (cracking) 的發生，此有助於降低胚透明帶 (zona pellucida) 及細胞質膜裂解 (lysis) 之現象，進而提升冷凍胚或卵解凍後之存活率與發育能力 (Dinnyes *et al.*, 2000)，因此微滴法已成胚玻璃化冷凍法之主流。目前已成功應用微滴法進行玻璃化冷凍之哺乳動物種別包括小鼠胚 (Landa and Tepla, 1990)、牛胚 (Riha *et al.*, 1991) 與牛卵 (Papis *et al.*, 2000) 等。

目前雖已有許多研究證實玻璃化冷凍法所冷凍胚經解凍後之發育能力優於慢速冷凍法，惟截至目前，同時比較胚玻璃化冷凍法中之微滴法、OPS 法及慢速冷凍法三者間對山羊胚冷凍效益之差異則尚未被報導。因此於本研究擬以源自體內發育之山羊囊胚為材料，探討上述三種胚冷凍法對山羊囊胚冷凍解凍後發育能力之影響，藉以建立最佳之山羊胚冷凍保存技術。

材料與方法

I. 供胚山羊之超數排卵處理與配種

供胚母山羊之超數排卵處理，係修正自黃等 (1997) 之方法，即將各試驗母羊先於陰道埋植含 0.3 g progesterone CIDR (controlled internal drug release, CIDR®, EAZI-breed, Rydalmere, Australia) 11 日，以埋植日為第 0 日，於第 11 日移除 CIDR；期間於第 9 日肌肉注射 125 μg PGF2α (Estrumate®, Schering-Plough, Australia)，第 9 至 11 日連續 3 日每日上、下午間隔 12 h 各一次給予肌肉注射濾泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH, Sigma-Aldrich F-2293) 共注射 6 次，其注射劑量依序為 4 mg, 4 mg, 2 mg, 2 mg, 2 mg, 2 mg 之逐漸遞減 (合計為 16 mg)；並於注射最後兩劑 FSH 後，各注射 1.7 units 黃體素 (luteinizing hormone, LH, Sigma-Aldrich L-5269) 共 3.4 units 之劑量。經上述處理之母羊即予以持續觀察發情，待母羊發情後，以性成熟健康公羊進行自然配種，以迄發情結束。

II. 體內發育山羊胚之取得與培養

(i) 沖胚液之配製

沖胚液之製備，係將 990 mL 之 DPBS (Dulbecco’s phosphate-buffered saline; Invitrogen 21300-025) 溶液，添加 10 mL 之胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Invitrogen 10270-106) 及 100 μL 含 50 mg/mL 之 gentamicin 溶液 (Sigma-Aldrich, G-1397) 配製而成，並經 0.22 μm 之濾膜過濾 (Minisart®, Sartorius) 後分裝冷藏 (4℃) 備用。

(ii) 胚培養液之配製

將 9.5 mL 之 M-199 (Invitrogen, 12340-030) 培養液，添加 0.5 mL 之 FBS 及 1 μL 含 50 mg/mL 之 gentamicin 配製而成，其後，經 0.22 μm 之濾膜過濾後分裝冷藏 (4℃) 備用。

(iii) 外科手術沖胚與體外培養

上述經超數排卵處理之試驗母山羊，於供胚羊發情 (第 0 日) 後之第 7 日進行腹中線外科手術，首先檢視卵巢外觀，以觀察超量排卵之效果，並以含 1% FBS 之 DPBS 沖胚液沖洗兩子宮角，並分別匯集於 15 mL 無菌離心試管中靜置沈澱，以無菌吸管吸取其下層含沉澱物液體，移置於立體顯微鏡下鏡檢。收集之體內發育山羊胚，復經含 5% FBS 之 M-199 至少清洗 3 次後，依據 Putney *et al.* (1988) 所述之胚品質分級標準將屬於一級及二級桑椹胚 (morula) 或囊胚 (blastocyst)，逢機分配至於各試驗處理組。其中已發育至囊胚期之山羊胚隨即進行冷凍步驟，而桑椹胚者，則先置入含 5% FBS 之 M-199 培養液滴中，於 38.5℃、5% CO_2 及 100% 濕度條件之培養箱中進行體外培養，待胚發育至囊胚期時，即予以進行冷凍保存。

III. 山羊胚之微滴玻璃化冷凍與慢速冷凍

(i) 玻璃化冷凍劑之配製

此冷凍液之配製方法係修正自 Vajta *et al.* (1998)，其中，第一階段冷凍保護液之組成分為 10% 乙二醇 (ethylene glycol, EG, Sigma-Aldrich, 293237) + 10% 雙甲基磺氧化物 (dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma-Aldrich, D-8418) + 20% FBS 之 M-199；第二階段冷凍保護液為 16.5% EG + 16.5% DMSO + 20% FBS + 0.5 M sucrose (Sigma-Aldrich, S-1888) 之 M-199。前述各階段冷凍保護劑各別經充分混勻及濾菌後冷藏 (4℃) 備用。

(ii) 傳統慢速冷凍液之配製

此冷凍液之配製係依據 Le Gal *et al.* (1993) 方法，其中第一階段冷凍液之組成分為 0.5 M EG + 4% FBS 之

DPBS，第二階段冷凍液為 1.0 M EG + 4% FBS 之 DPBS，第三階段冷凍液則為 1.5 M EG + 4% FBS + 0.1 M sucrose 之 DPBS。前述各階段冷凍液經添加冷凍保護劑充分混勻及濾菌後冷藏 (4℃) 備用。

(iii) 微滴玻璃化冷凍步驟

胚微滴玻璃化冷凍步驟係修正自 Vajta *et al.* (1998) 方法，即回收之一級與二級山羊囊胚均放置於含 20% FBS 之 M-199 中，隨後移入 10% EG + 10% DMSO + 20% FBS 之 M-199 培養液 (第一階段冷凍保護劑) 中平衡 30 sec，再移入 16.5% EG + 16.5% DMSO + 20% FBS + 0.5 M sucrose 之 M-199 培養液 (第二階段冷凍保護劑) 中平衡 25 sec。最後將內含 2 － 4 個胚之每一微滴 (2 μL) 直接投入液態氮中，而製作成固態之玻璃化微粒。其後，將此微粒放入冷凍管內置入液態氮桶中保存。

(iv) 開放式拉製麥管玻璃化冷凍步驟

此法所使用之冷凍保護液及胚於冷凍前之平衡步驟鈞悉同上法所述，惟胚之裝載容器乃改將 2 － 4 個胚吸入 OPS (內徑約 0.9 mm) 後再直接投入液態氮中。

(v) 慢速冷凍 (slow-cooling) 步驟

係依據 Le Gal *et al.* (1993) 之方法，將回收之一級與二級山羊囊胚先置入含 0.5 M EG + 4% FBS 之 DPBS 溶液中 5 min 後，再置入含 1.0 M EG + 4% FBS 之 DPBS 中 5 min，最後則隨即置入含 1.5 M EG + 4% FBS 之 DPBS 中 5 min。其後將 2 － 4 個胚吸入 0.25 mL 麥管 (IMV, L'Aigle, France) (內徑約 2.0 mm) 後，再置入已預先降溫至 20℃之電腦程式降溫儀 (Firstek, B405-F40, Taiwan) 中，並以 4℃/min 之降溫速度降至 -7℃，5 min 後進行植冰 (seeding)，植冰 5 min 後，再以 0.3℃/min 之降溫速率降至 -30℃且保持 15 min 後予以投入液態氮中保存。

IV. 山羊冷凍胚之解凍方法與體外培養

(i) 冷凍胚之解凍操作與體外培養

微滴玻璃化法與 OPS 產製之冷凍胚的解凍步驟係修正自 Vajta *et al.* (1998) 之方法，即將含胚之微粒於液態氮桶取出後旋即投入 38.5℃含 0.5 M sucrose + 20% FBS 之 M-199 後 5 min，再移至 38.5℃含 0.25 M sucrose + 20% FBS 之 M-199 中 5 min，其後，再移至 38.5℃含 0.15 M sucrose + 20% FBS 之 M-199 中培養 5 min，最後再移入含 5% FBS 之 M-199 胚培養液中，於 38.5℃、5% CO_2 及 100% 濕度條件之培養箱中進行 72 h 培養，開始培養後之第 2、4、8、12 與 24 h 分別記錄解凍胚之發育狀態，並於開始培養 72 h 後觀察囊胚孵化情形。慢速冷凍法所產製冷凍胚之解凍步驟，則將 0.25 mL 麥管於液態氮桶取出後旋即投入 37℃水中 20 sec 後，利用前述解凍液與解凍步驟以及培養條件進行解凍胚發育能力之評估。

V. 受胚母羊之發情同期化處理

受胚母山羊之發情同期化處理步驟與供胚羊者相似；其 CIDR 之埋植和移除以及 125 μg PGF2α 注射之時間與方法均同於供胚羊之處理方法，惟於此過程中受胚羊並未經 FSH 及 LH 處理，但於 CIDR 埋植後第 9 天 (08：00) 肌肉注射 500 IU 之馬絨毛膜激性腺素 (equine chorionic gonadotropin, eCG; 中國化學製藥，臺灣)，並於 CIDR 埋植後第 19 天 (發情後第 7 天) 開始進行冷凍胚之胚移置。

VI. 冷凍胚之移置

將解凍恢復存活之山羊胚，利用外科手術法將發情同期化處理之受胚母山羊由腹中線切開約 5 公分創口，手指插入骨盆腔拉出卵巢，先檢視卵巢，確定受胚母山羊有排卵且黃體發育正常，將胚移置到與排卵卵巢同側的子宮角內。受胚母羊於胚移置 45 天後，以超音波掃描儀 (Aloka, SSD-500, Japan) 配合直腸穿透型探棒 (Aloka, Transrectal probe, linear type, 3.5 MHz, Japan)，診斷其懷孕與否，經由子宮腔內宮阜與胎兒影像確診懷孕之母羊予以集中飼養以迄分娩。

Ⅶ. 統計分析

本研究各試驗處理組之冷凍山羊胚經解凍後發育率之評估，係以發育至各胚期之胚數除以該組之總胚數。各值於處理組別間之差異，均以卡方分析法 (Chi-square analysis) 測定，並使用統計分析系統 (statistical analysis system, SAS 9.1, 2005) 之套裝軟體執行分析。

結果與討論

玻璃化冷凍是一種簡單、高效率的胚冷凍方式，其中最早被廣泛成功應用之技術乃為 OPS (Vajta *et al.*, 1997b) 方式。有關 OPS 麥管之製備，乃將 0.25 mL 麥管以加熱板加熱至柔軟程度，再逐漸予以拉長，使麥管之內徑由 2.0

mm 縮減為 0.8 － 0.9 mm，而麥管壁厚度則由 0.15 mm 薄化成 0.07 mm；其後待麥管冷卻固定後再截取所需長度使用 (Vajta *et al.*, 1998)。目前利用此法能成功克服許多物種胚的低溫敏感性問題，尤其是豬胚，以往利用慢速冷凍法並無法有效凍存囊胚期豬胚，經利用 OPS 玻璃化冷凍則已能成功冷凍保存豬的早期與擴張期囊胚 (Berthelot *et al.*, 2000)。因此在胚玻璃化冷凍研究，多以 OPS 玻璃化冷凍法與慢速冷凍法進行試驗比較。在家兔胚冷凍研究中，以源於體內發育之兔桑椹胚，進行 OPS 玻璃化冷凍法，顯示使用 OPS 玻璃化冷凍法之桑椹期兔胚於解凍培養後之胚形態完整性 (91 *vs.* 81%) 與後續發育至囊胚之百分比 (71 *vs.* 55%)，均明顯優於以慢速冷凍法產製者 (Naik *et al.*, 2005)。此結果與本研究中所顯示，囊胚期山羊胚經微滴與 OPS 兩種玻璃化法冷凍－解凍後，分別於體外培養 2 (66.6 and 47.7 *vs.* 8.0%)、4 (66.6 and 59.0 *vs.* 22.0%)、8 (66.6 and 68.1 *vs.* 24.0%)、12 (72.7 and 68.1 *vs.* 28.0%) 與 24 h (81.8 and 75.0 *vs.* 34.0%) 後再恢復至囊胚期之百分比亦皆優於利用慢速冷凍法產製者 (P < 0.001，表 1)；且體外繼續培養 72 h 後發育至孵化期囊胚百分比 (81.4 and 72.7 *vs.* 41.1%) 亦均以兩種玻璃化冷凍法所產製者優於利用慢速冷凍法產製者 (P < 0.05，表 2) 之結果相符。此結果說明利用玻璃化冷凍法所產製之山羊囊胚於解凍後之發育能力確實優於利用慢速冷凍法所產製者。此乃可能導因於在進行胚玻璃化冷凍過程中，冷凍前胚在胚冷凍保護液中之平衡時間極短 (兩階段平衡時間合計 55 sec)，因此雖使用之冷凍保護劑濃度高於傳統慢速冷凍法者，但對胚產生的毒性作用則較傳統三階段慢速降溫冷凍小，且高濃度之冷凍保護劑有助於使胚快速脫水與提高滲入性的保護效果，因此具有較佳之冷凍效益 (Vajta *et al.*, 1998)。此外，另有研究使用玻璃化冷凍法在相同條件下，比較 OPS 麥管 (直徑約 0.9 mm、管壁厚度 0.07 mm) 與一般 0.25 mL 麥管 (直徑約 2 mm、管壁厚度 0.15 mm) 對胚冷凍效率之影響，其結果均顯示以 OPS 麥管冷凍者之胚發育能力顯著優於利用一般麥管冷凍者 (Lopez-Bejar and Lopez- Gatius, 2002; Naik *et al.*, 2005)；此乃因 OPS 麥管具有較小內徑與較薄管壁，且吸取胚時一併吸入之冷凍液亦以 OPS 麥管 (0.5 － 1 μL) 者少於一般麥管約 (5 μL)，因此在進行玻璃化冷凍步驟中將含胚麥管直接置入液態氮時，OPS 麥管之降溫速率可達 20,000℃/min 以上，而一般麥管者則僅有約 2,438 － 2,550℃/min (Vajta *et al.* 1998)。上述學理即可能是本研究中因玻璃化冷凍法 (微滴與 OPS 法) 具有較低毒性、較佳滲透能力與降溫速率，因而較慢速冷凍法具有較佳解凍後胚發育率之關鍵原因。

表 1.　冷凍方式對冷凍－解凍山羊囊胚經不同時距培養後囊胚恢復率之影響

Table 1.　Effect of cryopreservation methods on the resumed rate of the frozen-thawed caprine blastocysts after culture for various durations

Cryopreservation methods	No. of frozen blastocysts	No. (%) of blastocyst resumed after culture duration, h				
		2	4	8	12	24
Vitrification						
Microdrop	33	22 (66.6)[a]	22 (66.6)[a]	22 (66.6)[a]	24 (72.7)[a]	27 (81.8)[a]
OPS[(1)]	44	21 (47.7)[a]	26 (59.0)[a]	30 (68.1)[a]	30 (68.1)[a]	33 (75.0)[a]
Slow freezing	50	4 (8.0)[b]	11 (22.0)[b]	12 (24.0)[b]	14 (28.0)[b]	17 (34.0)[b]

[a, b] Values without same superscripts in the same column are significantly different (P < 0.001).

[(1)] Open pulled straw.

表 2.　冷凍方式對冷凍－解凍山羊囊胚經體外培養 72 小時後囊胚孵化率之影響

Table 2.　Effect of cryopreservation methods on the hatching rate of the frozen-thawed caprine blastocysts after culture *in vitro* for 72 h

Cryopreservation methods	No. of resumed blastocysts	No. (%) of blastocysts developed to HB [(2)]
Vitrification		
Microdrop	27	22 (81.4)[a]
OPS[(1)]	33	24 (72.7)[a]
Slow freezing	17	7 (41.1)[b]

[a, b] Values without same superscripts in the same column are significantly different (P < 0.05).

[(1)] Open pulled straw.

[(2)] Hatching blastocyst.

利用 OPS 玻璃化法進行胚冷凍時，需將胚吸入 OPS 中，以此作為盛胚載具，再置入液態氮進行冷凍，此過程液態氮之低溫需透過 OPS 管壁及冷凍保護劑始能傳遞至胚使之玻璃化凍結；相較於微滴玻璃化冷凍法 (無盛胚載具)，液態氮之低溫僅需透過冷凍保護劑即能傳遞至胚使之玻璃化，因此具有更快之降溫速率。此也反映本研究中利用微滴玻璃化冷凍法所產製山羊囊胚於解凍培養後 2 h 後再恢復至囊胚之百分率 (66.6 *vs.* 47.7%) 稍優於 OPS 玻璃化冷凍法者 (表 1)。此種冷凍胚於解凍短時間培養後即能快速恢復為囊胚形態，可能有助於胚移置時，供胚期別與受胚母畜子宮環境能掌控於同期化而提升懷孕率。

本研究中利用微滴玻璃化法所冷凍－解凍之山羊囊胚於胚移置後的懷孕率 (68.7 *vs.* 61.5%) 與分娩仔羊數所評估之胚移置效率 (56.2 *vs.* 53.8%) 均與移置新鮮胚者相近 (表 3)。就以同樣源於體內發育之山羊囊胚進行玻璃化冷凍－解凍後之胚移置效率而言，本研究與 El-Gayar and Holtz (2001) 之 64% 結果相近，但優於 Cognie (1999) 之 37% 與 Guignot *et al.* (2006) 之 35% 的結果，這說明本研究之胚微滴玻璃化冷凍技術已臻成熟。在前人之研究中曾指出，聯合一種以上之冷凍保護劑，以及冷凍溶液中添加大分子物質 (macromolecules) 或糖類等方式，能降低冷凍保護劑對胚的毒性 (Ishimori *et al.*, 1992; Ishimori *et al.*, 1993)；且合併使用 EG 與 DMSO 具有促進較佳玻璃化結構的形成 (Ali and Shelton, 1993)，以及藉由第二種滲透性冷凍保護劑的存在能提高整體玻璃化冷凍保護劑滲透性的優點 (Vicente and Garcia-Ximenez, 1994)。然而 Pugh *et al.* (2000) 之研究將體外生產之桑椹期及擴張期牛胚以聯合兩種成分 (EG + DMSO) 為冷凍保護劑所產製之冷凍胚，經解凍後胚之存活率及後續培養發育至孵化囊胚之百分率，均較僅使用單一成分 (EG) 為冷凍保劑所冷凍者為高；相同地，Silvestre *et al.* (2003) 以兩種冷凍保護劑 (EG 與 DMSO) 將 32 細胞期兔胚進行玻璃化冷凍，其解凍後發育至囊胚期百分率亦明顯優於使用單一冷凍保護劑 (EG) 者，此證實聯合兩種成分作為冷凍保護劑進行胚冷凍確能提升胚解凍後之發育能力；已有許多研究學者利用 EG 與 DMSO 之組合進行胚玻璃化冷凍，均能成功應用於哺乳動物胚之冷凍 (Vajta *et al.*, 1998; Kong *et al.*, 2000; Oberstein *et al.*, 2001; Silvestre *et al.*, 2003; Isachenko *et al.*, 2003; Begin *et al.*, 2003; Piltti *et al.*, 2004; Hochi *et al.*, 2004)。於本研究中微滴玻璃化法所使用之冷凍保護劑組合也是 EG + DMSO，且第二階段冷凍保護劑中另有添加蔗糖，此可能是本研究利用微滴玻璃化法之山羊囊胚於胚移置後之的懷孕率與胚移置效率與新鮮胚移置者相近之重要緣由。

表 3. 玻璃化冷凍－解凍山羊胚經胚移置後之懷孕率與胚移置效率

Table 3. Pregnancy rates and embryo survival after transfer of fresh or vitrified caprine blastocysts

Embryos	No. of blastocysts transferred	No. of recipients	No. (%) of recipient pregnancy [a,3]	Efficiency of embryo Transfer, % [a,4]
Fresh[1]	26	13	8 (61.5)	53.8 (14/26)
Vitrified[2]	32	16	11 (68.7)	56.2 (18/32)

[a] No significant difference between treatment groups (P > 0.05).
[1] Fresh caprine embryos.
[2] Microdrop.
[3] No. of recipient pregnancy / no. of recipients, based on ultrasonography of the cotyledon on day 45 after ET.
[4] No. of offspring / no. of embryos transferred.

綜合本研究之結果，微滴與 OPS 玻璃化冷凍方法較慢速冷凍法更能明顯提升山羊囊胚解凍後之發育能力，且具有縮短解凍後恢復至囊胚期之時距，使其經胚移置後之受胚母羊懷孕率接近於對照組之新鮮胚者。

參考文獻

黃政齊、楊鎮榮、謝瑞春。1997。稀釋液與冷凍保護劑對臺灣黑山羊精液與胚冷凍保存效果之影響。畜產研究 30(4)：371-377。

Ali, J. and N. Shelton. 1993. Design of vitrification solution for the cryopreservation of embryos. J. Reprod. Fertil. 99: 471-477.

Aller, J. F., G. E. Rebuffi, A. K. Cancino and R. H. Alberio. 2002. Successful transfer of vitrified Ilama (*Lama glama*) embryos. Anim. Reprod. Sci. 73: 121-127.

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.

Bertheloti, F., F. Martinat-Botte, A. Locatelli, C. Perreau and M. Terqui. 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. Cryobiology 41: 116-124.

Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep- goat embryo transfer. Theriogenology 51: 105-116.

Crichton, E. G., E. Bedows, A. K. Miller-Lindholm, D. M. Baldwin, D. L. Armstrong, L. H. Graham, J. J. Ford, J. O. Gjorret, P. Hyttel, C. E. Pope, G. Vajta and N. M. Loskutoff. 2003. Effical of porcine gonadortropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and *in vitro* embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (Panthera tigris altaica). Biol. Reprod. 68: 105-113.

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 tansfer. Biol. Reprod. 63: 513-518.

El-Gayar, M. and W. Holtz. 2001. Technical note: vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. J. Anim. Sci. 79: 2436-2438.

Guignot, F., A. Bouttier, G. Baril, P. Pignon, J. F. Beckers, J. L. Touze, J. Cognie, A. S. Traldi, Y. Cognie and P. Mermillod. 2006. Improved vitrification method allowing durect transfer of goat embryos. Theriogenology 66: 1004-1011.

Hochi, S., T. Terao, M. Kamei, M. Kato, M. Hirabayashi and M. Hirao. 2004. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. Theriogenology 61: 267-275.

Isachenko, V., J. L. Alabart, M. Dattena, F. Nawroth, P. Cappai, E. Isachenko, M. J. Cocero, J. Olivera, A. Roche, C. Accardo, A. Krivokharchenko and J. Folch. 2003. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. Theriogenology 59: 1209-1218.

Ishimori, H., Y. Takahashi and H, Kanagawa. 1992. Factors affecting survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. Theriogenology 38: 1175-1185.

Ishimori, H., K. Saeki, M. Inai, Y. Nagao, J. Itasaki, Y. Miki, N. Seike and H. Kainuma. 1993. Vitrification of bovine embryos in mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. Theriogenology 40: 427-433.

Kasai, M., Y. Hamaguchi, S. E. Zhu, T. Sakurai and T. Machida. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-base solution by a simple method. Biol. Reprod. 46: 1042-1046.

Kong, I. K., S. I. Lee, S. G. Cho and C. S. Park. 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) *vs.* lass micropipette (GMP) vitrification in mourse blastocysts. Theriogenology 53: 1817-1826.

Kouji, M., M. Suzuki, S. Sato and N. Saito. 2003. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. Theriogenology 60: 253-260.

Landa, V. and O. Tepla. 1990. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. Folia Biological 36: 153-158.

Le Gal, F., G. Baril, J. C. Vallet and B. Leooeuf. 1993. *In vivo* and vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. Theriogenology 40: 771-777.

Liebermann, J., F. Nawroth, V. Isachenko, E. Isachenko, G. Rahimi and M. J. Tucker. 2002. Potentil importance of vitrification in reproductive medicine. Biol. Reprod. 67: 1671-1680.

Lopez-Bejar, M. and F. Lopez-Gatius. 2002. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. Theriogenology 58: 1541-1552.

Naik, B. R., B. S. Rao, R. Vagdevi, M. Gnanprakash, D. Amarnath and V. H. Rao. 2005. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. Anim. Reprod. Sci. 86: 329-338.

Oberstein, N., M. K. Odonovan, J. E. Bruemmer, G. E. Seidel, E. M. Carnevale and E. L. Squires. 2001. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. Theriogenology 55: 607-613.

Papis, K., M. Shimizu and Y. Izaike. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitfified in droplets. Theriogenology 54: 651-658.

Piltti, K., H. Lindeberg, J. Aalto and H. Korhonen. 2004. Live cubs born after transfer of OPS vitrified-warmed embryos in the farmed European polecat (*Mustela putorius*). Theriogenology 61: 811-820.

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 vivo* following transfer. Anim. Reprod. Sci. 58: 9-22.

Rall, W. F. and G. M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196ºC by vitrification. Nature 313: 573-575.

Riha, J., V. Landa, J. Kneissl, J. Matus, J. Jindra and Z. Kloucek. 1991. Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryos survival after nonsurgical transfer. Zivoc. Vyr. 36: 113-119.

Silvestre , M. A., A. M. Saeed, M. J. Escriba and F. Garcia-Ximenez. 2003. Vitrification of *in vitro* cultured rabbit morulae. Anim. Reprod. Sci. 76: 113-124.

Steponkus, P. L., S. P. Myers, D. V. Lynch, L. Gardner, V. Bronshteyn, S. P. Leibo, W. F. Wall, R. E. Pitt, T. T. Lin and R. J. MacIntyre. 1990. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. Nature 345: 170-172.

Vajta, G., P. J. Booth, P. Holm, T. Greve and H. Callesen. 1997a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo-Letters 18: 191-195.

Vajta, G., P. Holm, T. Greve and H. Callesen. 1997b. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. Acta. Vet. Scand. 38: 349-352.

Vajta, G., P. Holm, M. Kuwayama, P. J. Booth, H. Jacobsen, T. Greve and H. Callesen. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol. Reprod. Dev. 51: 53-58.

Vicente, J. S. and F. Garcia-Ximenez. 1994. Osmotic and cryoprotective effects of amixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. Theriogenology 42: 1205-1215.

Whittingham, D. G. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature 233: 125.

Yuswiati, E. and W. Holtz. 1990. Successful transfer of vitrified goat embryos. Theriogenology 34: 629-632.

Effects of cryopreservation method on the development of caprine *in vivo* blastocysts [1]

Hsin-Hung Lin [2] [3] Jang-Chi Huang [4] Ting-Chieh Kang [4] De-Chi Wang [5]
Ting-Yung Kuo [6] Shann-Ren Kang [2] Shyh-Shyan Liu [2] Bing-Tsan Liu [7]
Shao-Yu Peng [7] and Perng-Chih Shen [7] [8]

Received: Oct. 3, 2017; Accepted: Nov. 9, 2017

Abstract

The aim of this study was to evaluate the developmental capability of caprine blastocysts by means of different freezing and thawing approach and to establish a simple and effective technique for cryopreservation of caprine embryos. Results indicated that the resumed rates of frozen-thawed caprine embryos vitrifying by either microdrop (66.6-81.8%) or open pulled straw (OPS) (47.4-75.0%) were significantly greater than that of slow-freezing (8.0-34.0%) during a period of 24 h culture *in vitro* (P < 0.001). In the case of hatching rate, both microdrop and OPS to be superior to slow-freezing (81.4 and 72.7 *vs.* 41.1%) on cultured frozen-thawed caprine blastocysts *in vitro* were demonstrated (P < 0.05). Moreover, the pregnant rate (68.7 *vs.* 61.5%) and embryos transfer efficiency (56.2 *vs.* 53.8%) of caprine blastocysts vitrifying by the microdrop were similar to those of unvitrified blastocysts (P > 0.05) subsequent of resumed blastocysts transferring to the recipient females. These results indicated that vitrification of embryos in a microdrop was a promising technique with commercial potential for cryopreservation of caprine embryos.

Key words: Caprine, Blastocyst, Vitrification.

---

(1) Contribution No. 2579 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
(2) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, Pingtung 91247, Taiwan, R. O. C.
(3) Department of Veterinary Medicine, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung 91201, Taiwan, R. O. C.
(4) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.
(5) Department of Agricalture, Taoyuan City Government.
(6) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Tainan 71246,Taiwan, R. O. C.
(7) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung 91201, Taiwan, R. O. C.
(8) Corresponding author, E-mail: pcshen@mail.npust.edu.tw.