

冷凍保護劑與平衡時間對微滴玻璃化冷凍之山羊 早期胚後續發育之影響⁽¹⁾

王得吉⁽²⁾ 林信宏⁽³⁾ 康定傑⁽⁴⁾ 黃政齊⁽²⁾⁽⁵⁾

收件日期：103 年 12 月 17 日；接受日期：104 年 6 月 3 日

摘 要

本試驗目的是利用微滴玻璃化冷凍 (micro-drop vitrification) 技術進行山羊早期胚冷凍保存之研究，增加冷凍早期胚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。經產母羊經超級排卵 (superovulation) 處理及配種後之第 2 – 3 天，以外科手術自輸卵管回收早期胚進行玻璃化冷凍。試驗一以濃度 16.5% EG + 16.5% DMSO 冷凍保護劑進行不同發育階段早期胚微滴玻璃化冷凍。試驗二比較不同濃度冷凍保護劑進行 8 細胞期胚之玻璃化冷凍。試驗三評估不同冷凍保護劑配方進行 4 細胞期胚之玻璃化冷凍。試驗四探討第一階段不同平衡時間繼之以 20.0% EG + 20.0% DMSO 冷凍保護劑進行 4 細胞期胚之玻璃化冷凍效果。試驗一之結果顯示，4 細胞期之山羊胚於解凍後無法繼續發育，而 8 細胞期之山羊胚於解凍後發育至桑椹胚者為 22.2%，16- 細胞期之山羊胚於解凍後發育至桑椹胚者為 50.0%，而各細胞期之山羊胚均未發育至囊胚階段。於試驗二，利用 16.5% EG + 16.5% DMSO 進行 8 細胞期山羊胚之玻璃化冷凍再解凍後，發育至桑椹胚為 9.1%，但未發育至囊胚；利用 20.0% EG + 20.0% DMSO 進行 8 細胞期山羊胚之玻璃化冷凍再解凍後，發育至桑椹胚為 20.0%，而囊胚率為 6.7%。於試驗三，利用 20.0% EG + 20.0% DMSO 進行早期胚之玻璃化冷凍再解凍後，發育至 8 細胞期為 26.1%，而囊胚率為 4.3%；利用 25.0% EG + 25.0% glycerol 進行早期胚之玻璃化冷凍再解凍後，發育至 8 細胞期為 11.1%，並未發育至囊胚。於試驗四，利用 20.0% EG + 20.0% DMSO 進行早期胚之玻璃化冷凍前，於低濃度冷凍保護劑 (10.0% EG + 10.0% DMSO) 下平衡時間 45 秒再解凍後，發育至 8 細胞期為 25.0%，而無囊胚發育；平衡時間若縮減為 35 秒，其再解凍後發育至 8 細胞期者為 33.3%，而囊胚率為 12.8%。證實預平衡時間為 35 秒且繼之以 20.0% EG + 20.0% DMSO 冷凍保護液進行山羊早期胚微滴玻璃化冷凍保存，可成功發育至囊胚期。

關鍵詞：山羊、早期胚、微滴玻璃化冷凍、胚發育能力。

緒 言

生殖細胞與胚之冷凍保存應用於優良品種與珍貴瀕危動物或任何個體基因庫得以長期保存。此外冷凍保存胚可隨時解凍，以配合胚胎外生產等相關生殖試驗之進行，解決時間與空間的限制。在 1980 年時，動物或家畜胚大多以慢速降溫冷凍保存，此冷凍方式雖具有使用保護劑濃度較低，毒性較小之優勢，但必須依賴價格昂貴之電腦程式降溫儀，及所需冷凍時間較長之缺點，而不適合田間操作使用。以此種方式冷凍保存較易於細胞內外形成冰晶而產生傷害，以致透明帶、細胞膜及細胞骨架受損 (Liebermann *et al.*, 2002)。反之，玻璃化冷凍法具有快速、設備成本低與對生殖細胞傷害低等優點。Rall *et al.* (1985) 首度使用該技術成功的保存小鼠 8 細胞期胚，之後 Massip *et al.* (1987) 完成牛胚的冷凍保存後，該技術即被廣泛應用在人工生殖領域上。儘管該技術應用於各種動物桑椹胚與囊胚之冷凍保存已相當成熟，但在較早期胚冷凍的成功率仍然偏低。許多研究皆指出，囊胚受玻璃化冷凍與解凍所造成不利之影響較早期胚為低，其可能原因為囊胚的細胞膜對滲透壓與毒性等有較佳的抵抗性；且囊胚之滋養層細胞已開始分化並增加 Na/K ATP 酶的活性等變化，可能因而增加了冷凍保護劑的運輸 (Watson and Kidder, 1988)。此外胚葉細胞的體積減小可能為另一原因，因早期胚之胚葉細胞較囊胚期者為大，可能使其對於移除與滲透冷凍保護劑所

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2303 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。

造成之滲透壓改變更為敏感 (Tachikawa *et al.*, 1993)，而造成細胞內胞器之不可逆損傷 (Overstrom *et al.*, 1993)。本分所近年來針對桑椹胚與囊胚已可成功以玻璃化冷凍保存技術保存 (Huang *et al.*, 2008)，因此本試驗擬利用微滴玻璃化冷凍技術，進行山羊早期胚冷凍保存之研究，期能藉由此項技術，增加該等胚解凍後之存活率與後續發育之能力，以利將來進行人工生殖相關技術之研發與種原保存工作。

材料與方法

I. 山羊早期胚之採集

本試驗選用體況評分 (Villaquiran *et al.*, 2007) 為 2.5 以上之經產雜交 (波爾 × 努比亞 × 本地山羊) 母羊作為供胚母羊。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，每日補充肉羊精料 0.4 kg。發情同期化利用陰道內孕酮釋放器 CIDR® (AHI Plastic Molding Co., New Zealand) 在陰道中留置 11 日，並於處理後 9 – 11 天，以劑量遞減方式，每隔 12 h 肌肉注射總量為 20 mg 之豬濾泡刺激素 (Sigma-Aldrich) 進行超量排卵。待母羊發情後，每隔 4 h 以雜交 (波爾 × 努比亞 × 本地山羊) 公羊進行自然配種一次，持續至母羊穩定發情完畢。供胚母山羊於配種後第 2 – 3 日，先行肌肉注射 0.11 mg/kg xylazine (Rompun®, Bayer, Germany) 鎮靜，10 min 後靜脈注射 5.5 mg/kg ketamine (順順®, 永信製藥, 臺灣) 進行全身麻醉，由腹中線切開處牽引出子宮及卵巢，經檢視黃體數目後，以腸鉗鉗緊子宮體基部，以固定卵巢與輸卵管端於體外，並以雙向式沖胚方法，自宮管交接處以 4 – 5 mL PBS 沖洗向輸卵管繖部。回收之沖洗液在 15 mL 離心管中短暫靜置後，以吸管吸取底部約 1 – 2 mL 液體，於立體顯微鏡下搜尋早期胚。

II. 早期胚之微滴玻璃化冷凍與解凍

微滴玻璃化冷凍與解凍方式主要依據 Huang *et al.* (2008) 及林等 (2006) 所述之方式進行。將早期胚移至第一階段冷凍保護液進行平衡，再移至第二階段冷凍保護液平衡後，利用微玻璃管於管開口端製成 2 μ L 體積之微滴 (每一微滴內含 3 顆胚) 直接投入液態氮中，製成玻璃珠狀微粒。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。解凍時將含早期胚之微粒直接投入 38.5°C 含 0.25 M 蔗糖之 20% FCS M-199 培養液 (500 μ L) 中解凍並保持 1 min，再轉移至含 0.15 M 蔗糖之 20% FCS M-199 (500 μ L) 中 5 min，最後移入含 20% FCS M-199 (500 μ L) 中 5 min，隨後進行體外培養。

III. 不同冷凍保護劑與平衡時間之試驗設計

試驗設計如表 1 所示。

表 1. 不同冷凍保護液與平衡時間之組成

Table 1. The composition of various cryoprotectants and equilibration times

Group	1st equilibration	2nd equilibration
A	10.0% EG + 10.0% DMSO, 45 sec	16.5% EG + 16.5% DMSO + 0.5M sucrose, 25 sec
B	10.0% EG + 10.0% DMSO, 45 sec	20.0% EG + 20.0% DMSO + 0.5M sucrose, 25 sec
C	10.0% glycerol + 20.0% EG, 5 min	25.0% glycerol + 25.0% EG + 0.5M sucrose, 30 sec
D	10.0% EG + 10.0% DMSO, 35 sec	20.0% EG + 20.0% DMSO + 0.5M sucrose, 25 sec

EG: Ethylene glycol; DMSO: Dimethylsulfoxide.

試驗一乃利用 A 組冷凍保護劑配方，探討 4、8 及 16 細胞期山羊胚冷凍 - 解凍後發育能力之影響；試驗二係比較不同濃度之 A、B 組冷凍保護液配方進行 8 細胞期胚之冷凍 - 解凍後發育能力；試驗三則評估 B、C 組冷凍保護液配方進行 4 細胞期胚之冷凍 - 解凍後發育能力；試驗四乃探討第一階段不同平衡時間之 B、D 組冷凍保護液配方進行 4 細胞期胚之冷凍 - 解凍後發育能力。

IV. 羊胚體外培養

早期胚經冷凍 - 解凍後，每 20 個胚移入 25 μ L 自配合成輸卵管液 (synthetic oviduct fluid plus amino acid, SOFaa) 上覆礦物油 (Cat. No. 8410, Sigma-Aldrich)，培養於 38.5°C、5% CO₂、5% O₂ 及 90% N₂ 條件下 (Gardner

et al., 1994)。SOFaa 培養液成分包含 107.70 mM 氯化鈉 (NaCl)、7.16 mM 氯化鉀 (KCl)、1.19 mM 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)、1.71 mM 氯化鈣 (CaCl_2)、0.49 mM 氯化鎂 (MgCl_2)、25.07 mM 碳酸氫鈉 (NaHCO_3)、3.30 mM 乳酸鈉 (sodium lactate)、0.33 mM 丙酮酸鈉 (sodium pyruvate)、1.50 mM 葡萄糖 (glucose)、32 mg 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)、100 單位/mL 青黴素、50 μg /mL 鏈黴素、45 μL /mL 必需氨基酸以及 5 μL /mL 非必需氨基酸 (Gandhi *et al.*, 2000)。

VI. 統計分析

各個性狀於不同處理組間之比較採用 Chi-square test (Snedecor and Cochran, 1980) 測定，顯著性差異設定為當 P 值小於 0.05。

結果與討論

以固定濃度的冷凍保護劑配方 (16.5% EG + 16.5% DMSO) 進行不同早期胚之玻璃化冷凍保存試驗，解凍後之體外發育率結果顯示 (表 2)，4 細胞期之山羊胚於解凍後並無繼續發育者，而 8 細胞期之山羊胚於解凍後其發育至桑椹胚為 22.2%，16 細胞期之山羊胚於解凍後其發育至桑椹胚為 50.0%。顯示本冷凍保護劑配方在此濃度下，對 4 細胞期胚之保存效果不佳。但隨著胚期增加其解凍後之發育率有增加之趨勢 (22.2% 與 50.0%)。黃等 (2005) 以發育後期胚玻璃化冷凍保存之研究指出，使用 16.5% EG + 16.5% DMSO 冷凍保存山羊胚 (包括桑椹胚 20 個、囊胚 18 個及擴張囊胚 11 個)，解凍後經短期培養，存活率分別為 80.0%、88.9% 與 90.9%。顯示此冷凍保護劑配方在此濃度下，對後期胚 (桑椹胚、囊胚及擴張囊胚) 之冷凍保護效果較本試驗所使用之早期胚為佳。然而各細胞期之早期胚以此法冷凍解凍後均未發育至囊胚。

表 2. 不同發育期別山羊胚經微滴玻璃化冷凍後之發育潛能*

Table 2. Development of frozen-thawed caprine embryos vitrified at different developmental stages*

Embryonic stages	No. of vitrified embryos	No. of morula (%)	No. of blastocyst (%)
4-cell	28	0 (0.0)	0 (0.0)
8-cell	18	4 (22.2)	0 (0.0)
16-cell	4	2 (50.0)	0 (0.0)

* Means of embryo development after equilibrated in 10.0% EG + 10.0% DMSO for 45 sec and then in 16.5% EG + 16.5% DMSO for 25 sec before vitrification.

Leibo *et al.* (1996) 研究指出，利用 8 M EG + 7.5% polyvinylpyrrolidone (PVP) + 0.25 M galactose 之冷凍保護劑配方，進行體外生產牛胚玻璃化冷凍，發現經解凍後 8 – 16 細胞期胚與早期桑椹胚無發育至孵化囊胚，而緊實桑椹胚與擴張囊胚則分別有 13% 與 75% 可達孵化囊胚期。反之相較於以相同配方應用於體內桑椹胚解凍後卻有 90% 可發育為孵化囊胚，顯示不同胚期甚至體內或體外來源胚之抗凍能力，均存在著極大的差異，此結果與 Garcia-Garcia *et al.* (2005) 於綿羊早期胚所得的結果相似。另於 Begin *et al.* (2003) 研究指出，利用冷凍環 (cryoloop vitrification, CLV) 與固體表面 (solid surface vitrification, SSV) 等不同玻璃化冷凍方式進行山羊早期胚 (2 – 4 細胞) 之冷凍結果顯示，在解凍後胚之存活率雖無統計上之差異，但仍以冷凍環玻璃化冷凍法者較高 (88% vs. 39%)，在後續體外培養之囊胚率亦有相似的結果。進行玻璃化冷凍法皆需使用承載胚之容器，當這些器具被浸入液態氮中時將在此容器周圍產生蒸氣而阻礙胚的降溫速率。因此，理論上不需藉助任何承載容器的微滴玻璃化冷凍法能使水氣發生狀況降至最低，而使降溫速率大幅增加 (Riha *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 2008)。微滴玻璃化冷凍法亦已被證明可成功冷凍保存山羊卵母細胞 (王等, 2010)，因此該法在山羊胚冷凍上具有其應用與發展的價值。惟不同胚期冷凍保護劑之選擇、濃度與平衡時間等為未來探討之重點。

玻璃化法所使用之冷凍保護劑一般皆為混合性配方，可大致區分為滲透性與非滲透性者，滲透性冷凍保護劑的成分主要為有機溶劑，其功能是在細胞降溫前與回溫過程保護細胞內胞器 (Bautista and Kanagawa, 1998)，而 EG、DMSO 與 polyethylene glycol 是最常被使用者。非滲透性抗凍劑的成分一般為巨分子物質與醣類，諸如 PVP、蔗糖與海藻糖等，其主要作用為降低細胞冰晶之形成 (Bautista and Kanagawa, 1998)，有助於細胞降溫前之脫水並保護細胞膜之完整 (Arav *et al.*, 1993)。本試驗所使用之 EG、DMSO 與蔗糖之配方於 Begin *et al.* (2003) 研究中已證實可作

為山羊早期胚冷凍之基礎配方，惟 16.5% EG + 16.5% DMSO 之濃度可能因冷凍保護效果不佳而致影響早期胚之後續發育。

以不同濃度的冷凍保護劑配方進行 8 細胞期胚之微滴玻璃化冷凍保存其解凍後發育至囊胚之結果如表 3 所示。利用 16.5% EG + 16.5% DMSO 進行 8 細胞期之玻璃化冷凍再解凍後，經體外培養發育至桑椹胚為 9.1%，但無發育至囊胚者，而利用 20.0% EG + 20.0% DMSO 進行玻璃化冷凍者，發育至桑椹胚者為 20.0%，囊胚率為 6.7%。此顯示以較高濃度之冷凍保護劑配方具有較佳之冷凍保護效果。Begin *et al.* (2003) 指出，以 20.0% EG + 20.0% DMSO 玻璃化冷凍保存山羊早期胚，其後續發育至桑椹胚與囊胚者分別為 27% 與 13%，與本研究結果相似。Le Gal (1996) 研究指出，冷凍保護劑對山羊卵母細胞之毒性較低緩，而由本試驗得知提昇冷凍保護劑之濃度對早期胚之發育有著較佳的影響，顯示以該濃度進行山羊早期胚的冷凍保存較為適宜。Yavin and Arav (2007) 研究亦指出，增加冷凍保護劑濃度將減少細胞降溫過程中冰晶形成，加上早期胚細胞大且數量少，適量提高冷凍保護劑濃度將利於早期胚細胞損害降低。

表 3. 不同濃度冷凍保護劑對 8 細胞期山羊胚玻璃化冷凍後發育之影響 *

Table 3. Effect of different concentrations of cryoprotectants on the subsequent development of vitrified-thawed 8-cell goat embryos *

Concentration of cryoprotectants	No. of vitrified embryos	No. of morula (%)	No. of blastocysts (%)
16.5% EG + 16.5% DMSO	22	2 (9.1)	0 (0.0)
20.0% EG + 20.0% DMSO	30	6 (20.0)	2 (6.7)

* Means of embryos equilibrated in 10.0% EG + 10.0% DMSO for 45 sec and then in 16.5% EG + 16.5% DMSO and 20.0% EG + 20.0% DMSO for 25 sec before vitrification.

以不同冷凍保護劑配方冷凍保存 4 細胞期胚，並觀察其解凍後發育能力之結果如表 4。利用 20.0% EG + 20.0% DMSO 進行玻璃化冷凍再解凍後，可發育至 8 細胞期之百分率為 26.0%、囊胚率為 4.3%；而於 25.0% EG + 25.0% glycerol 之組別者可發育至 8 細胞期者為 11.1%，但無發育至囊胚期者。此說明以 20.0% EG + 20.0% DMSO 之冷凍保護劑配方對 4 細胞期胚有較佳之保護效果。Hopkins *et al.* (2012) 研究指出，不同冷凍保護劑之降溫與解凍後回溫速率將會對細胞內冰晶形成與再結晶化造成影響，而甘油無論於降溫抑或回溫速率皆低於 DMSO，是否因此造成早期胚胚葉細胞之損害仍待進一步之研究。

表 4. 不同冷凍保護劑配方對 4 細胞期山羊胚玻璃化冷凍保存後發育之影響

Table 4. Effect of different cryoprotectants on the development of 4-cell goat embryos after vitrification

Cryoprotectant	No. of vitrified embryos	No. of 8-cell embryos (%)	No. of 16-cell embryos (%)	No. of morula (%)	No. of blastocyst (%)
20.0% EG + 20.0% DMSO *	23	6 (26.1)	5 (21.7)	3 (13.0)	1 (4.3)
25.0% EG + 25.0% glycerol **	18	2 (11.1)	2 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)

* Embryos were equilibrated in 10.0% EG + 10.0% DMSO for 45 sec and then in 20.0% EG + 20.0% DMSO for 25 sec before vitrification.

** Embryos were equilibrated in 10.0% glycerol, 10.0% glycerol + 20.0% EG for 5 min and then in 25.0% glycerol + 25.0% EG (0.5M Sucrose) for 30 sec before vitrification.

以固定濃度的冷凍保護劑配方冷凍保存 4 細胞期胚，於解凍後經體外培養之存活率與後續發育至囊胚之百分率結果 (表 5) 顯示，利用 20.0% EG + 20.0% DMSO 進行玻璃化冷凍前，先於第一階段冷凍保護劑 (10.0% EG + 10.0% DMSO) 中平衡 45 sec 冷凍解凍後，可發育至 8 細胞期者為 25%，而無囊胚形成；若平衡時間縮減為 35 sec 再解凍，其冷凍解凍後之 8 細胞期者為 33.3%，而其囊胚率為 12.8%。以上結果顯示第一階段冷凍保護劑之平衡 35 sec，再以 20.0% EG + 20.0% DMSO 進行微滴玻璃化冷凍保存，對 4 細胞期山羊胚具有較佳之冷凍保護效果，且有囊胚之發育。在 Rall (1987) 的研究指出，於胚玻璃化冷凍過程中過度脫水，將導致胚葉細胞內鹽類濃度增加而損害蛋白質結構之完整性。此可能是本試驗中，減少第一階段冷凍保護劑之平衡時間進而降低早期胚胚葉細胞過度脫水，因而具有較佳囊胚率之重要原因。

表 5. 經不同平衡時間處理後早期山羊胚玻璃化冷凍後再解凍之存活率與囊胚率

Table 5. Effects of various equilibration times prior to vitrification on the subsequent development of vitrified-thawed 4-celled goat embryos

Cryoprotectant	No. of 4-celled embryos	No. of 8-cell embryos (%)	No. of 16-cell embryos (%)	No. of morula (%)	No. of blastocysts (%)
B	20	5 (25.0)	3 (15.0)	1 (5.0)	0 (0.0)
D	39	13 (33.3)	13 (33.3)	9 (23.0)	5 (12.8)

B: Embryos were equilibrated in 10.0% EG + 10.0% DMSO for 45 sec and then in 20.0% EG + 20.0% DMSO for 25 sec before vitrification.

D: Embryos were equilibrated in 10.0% EG + 10.0% DMSO for 35 sec and then in 20.0% EG + 20.0% DMSO for 25 sec before vitrification.

結 論

山羊早期胚利用 10.0% EG + 10.0% DMSO 之冷凍保護液預先平衡 35 sec，再以 20.0% EG + 20.0% DMSO 進行微滴玻璃化冷凍保存較之於其他配方具有較佳之存活率與囊胚率。試驗結果之囊胚發育率雖低於先前所進行之後期胚冷凍研究，但卻是我國冷凍之山羊早期胚 (4 細胞期) 可於解凍培養後發育至囊胚期之首例。

參考文獻

- 王得吉、林信宏、康定傑、黃政齊。2010。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。畜產研究。43(4)：327-337。
- 林信宏。2006。冷凍方式與冷凍保護劑組合及容積對源自體內發育山羊囊胚解凍後發育能力之影響。國立屏東科技大學畜產系。碩士論文。
- Arav, A., D. Shehu and M. Mattioli. 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification or immature bovine oocytes. J. Reprod. Fertil. 99: 353-358.
- Bautista, J. A. and H. Kanagawa. 1998. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. Jpn. J. Vet. Res. 45: 183-191.
- 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 and solid-surface vitrification methods. Theriogenology 59: 1839-1850.
- Garcia-Garcia R. M., A. Gonzalez-Bulnes, V. Dominguez, A. Veiga-Lopez and M. J. Cocero. 2005. Culture of early stage ovine embryos to blastocyst enhances survival rate after cryopreservation. Theriogenology 63: 2233-2242.
- Gandhi, A. P., M. Lane, D. K. Gardner and R. L. Krisher. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. Hum. Reprod. 15: 395-401.
- 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.
- Hopkins, J. B., R. Badeau, M. Warkentin and R. E. Thorne. 2012. Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions. Cryobiology 65: 169-178.
- 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.
- 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.
- La Gal, F. 1996. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage. Theriogenology 45: 1177-1185.

- Massip, A., P. Van Der Zwalmen and F. Ectors. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27: 69-79.
- Overstrom, E. W., R. T. Duby, J. R. Dobrinsky, J. M. Robl, A. Baguisi, P. Lonergan, P. Duffy, J. H. Walsh, J. F. Roche and M. P. Boland. 1993. Cytoskeletal damage in vitrified and frozen embryos. *Theriogenology* 39: 276.
- Rall, W. F. and G. M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573-575.
- Rall, W. F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24: 387-402.
- 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 embryo survival after nonsurgical transfer. *Zivoc. Vir.* 26: 113-120.
- Snedecor, G. W. and W. G. Cochran. 1980. *Statistical Methods*. Iowa State University. Press, Ames, Iowa.
- Tachikawa, S., T. Otoi, S. Kondo, T. Machida and M. Kasai. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 266-271.
- Villaquiran, M., T. Gipson, R. C. Merkel, A. Goetsch and T. Sahl. 2007. Body Condition Scores in Goats. in *Proc. 22nd Ann. Goat Field Day*, Langston University, Langston, OK. pp: 125-131.
- Watson, A. J. and G. M. Kidder. 1988. Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na/K ATPase during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* 126: 80-90.
- Yavin, S. and A. Arav. 2007. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 67: 81-89.

Developmental competence of early caprine embryos vitrified 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: Dec. 17, 2014; Accepted: Jun. 3, 2015

Abstract

The objective of this study is to examine the effects of different cryoprotectant formulas on the development of post-thawed caprine embryos vitrified at early developmental stage. Early stages of embryos were collected from the oviducts of superovulated does by surgical method on days 2-3 after natural mating. In Experiment 1, 4-, 8- and 16-cell stage embryos were vitrified in solution containing 16.5% EG + 16.5% DMSO. In Experiment 2, 8-cell stage embryos were vitrified in solution containing 16.5% EG + 16.5% DMSO or 20.0% EG + 20.0% DMSO. In Experiment 3, 4-cell stage embryos were vitrified in solution with 20.0% EG + 20.0% DMSO or 25.0% EG + 25.0% DMSO. In Experiment 4, 4-cell stage embryos were equilibrated with various period time before vitrification in 20.0% EG + 20.0% DMSO. The morula rates of vitrified-thawed embryos at 4, 8 and 16-cell stages in Experiment 1 were 0, 22.0 and 50.0%, respectively. No embryos developed to the blastocyst stage. In Experiment 2, the morula and blastocyst rates of 8-celled embryos vitrified in 16.5% EG + 16.5% DMSO and 20.0% EG + 20.0% DMSO were 9.1% and 0% and 20.0% and 6.7%, respectively. In Experiment 3, the cleavage and blastocyst rates of 4-celled embryos vitrified in the solution containing 20.0% EG + 20.0% DMSO and 25.0% EG + 25.0% glycerol were 26.1% and 4.3%, 11.1% and 0%, respectively. In Experiment 4, the cleavage and blastocyst rates of 4-celled embryos balanced for 45 and 35 seconds prior to vitrification in the solution containing 20.0% EG + 20.0% DMSO were 25% and 0%, 33.3% and 12.8%, respectively. These results indicate that early stage embryos are able to successfully develop to the blastocyst stage after vitrification in the solution containing 20.0% EG + 20.0% DMSO and equilibrating for 35 seconds prior to vitrification.

Key word: Goat, Early stage embryo, Micro-drop vitrification, Developmental competence of embryo.

(1) Contribution No. 2303 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, Neipu 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.