

山羊腹腔鏡卵母細胞採集技術之建立⁽¹⁾

康定傑⁽²⁾⁽⁶⁾ 曾楷屏⁽²⁾ 林彥均⁽²⁾ 陳裕信⁽³⁾ 曲鳳翔⁽³⁾ 林信宏⁽⁴⁾ 沈朋志⁽⁵⁾

收件日期：109 年 12 月 18 日；接受日期：110 年 8 月 6 日

摘 要

本研究主要目的為建立山羊腹腔鏡卵母細胞採集技術，並與傳統外科手術取卵方式進行比較。試驗使用臺灣黑山羊恆春品系及努比亞羊隻各 10 頭。山羊卵母細胞於採集後，接續進行體外成熟、體外受精及體外培養以觀察卵母細胞成熟率、卵裂率、囊胚率及囊胚細胞數。體外成熟率之評估結果顯示，無論何種卵母細胞採集方法，卵母細胞經 24 小時體外成熟培養後，細胞核可成功發育並停滯在第二次減數分裂中期 (Metaphase II, MII) 者無顯著差異 ($74.88 \pm 2.00\%$ vs. $81.14 \pm 7.00\%$)。體外受精培養 24 小時後之受精卵續進行 48 小時培養後可以觀察到卵裂。不同卵母細胞收集方法 (外科手術 vs. 腹腔鏡法) 卵裂率 ($73.93 \pm 1.90\%$ vs. $68.30 \pm 3.99\%$) 及受精後第 7 天之囊胚率 ($42.87 \pm 1.26\%$ vs. $42.65 \pm 3.83\%$) 均無顯著差異；但囊胚細胞數則以外科手術法顯著高於腹腔鏡法 (76.41 ± 1.29 vs. 69.00 ± 8.91 , $P < 0.05$)。本研究成功建立了腹腔鏡卵母細胞收集技術，收集到的卵母細胞經體外培養後之囊胚發育能力不遜於外科手術收集者，腹腔鏡卵母細胞採集技術確實可用於山羊卵母細胞收集。

關鍵詞：山羊、腹腔鏡卵母細胞收集、囊胚率。

緒 言

腹腔鏡的應用是建立在現代人工輔助生殖技術基礎上，可將試驗動物利用最大化，並減少試驗動物使用的數量，其應用包括胚移植、子宮深部及子宮角人工授精、動物排卵及黃體觀察等 (Baldassarre, *et al.*, 2003; 2018; Luo *et al.*, 2019)。越來越多人對非外科手術的腹腔鏡卵母細胞採集方式 (Laparoscopic oocytes pick up, LOPU) 感到興趣，不同物種之卵母細胞收集及胚移植研究報告量亦增加，該技術往後應用於動物繁殖輔助技術上將更加多元與廣泛 (Menchaca *et al.*, 2016)。隨著山羊及綿羊胚體外生產技術成熟，卵母細胞的採集變成一個常態性的操作。以往體外胚生產的卵母細胞來源通常是屠宰場，此一來源的卵母細胞有著量大易取得的優點，但是由於無法確認品種及來源，且具有疾病傳佈之風險，仍不是一個安全之卵母細胞取得方式。另一個較為可靠及穩定的方法便是使用外科手術，針對活體動物進行卵母細胞之收集。然而外科手術麻醉風險高、對動物體的傷害較大、術後照顧較耗時耗力。此方法常在術後之子宮角、輸卵管或卵巢發生沾黏，導致動物使用年限降低；雖然可收集到來源資訊完整之卵母細胞，但在常態性收集的條件下，仍非便利之方法 (de Souza-Fabjan *et al.*, 2014; Paramio and Izquierdo, 2016)。活體動物腹腔鏡卵母細胞採集為一方便且快速的方法，手術過程幾乎無出血，在卵母細胞採集過程中經過簡單的卵巢固定便可直接抽吸卵巢表面之濾泡 (Stangl *et al.*, 1999)，過程中對動物體傷害小。操作會有 2 – 3 個不到 1 cm 的傷口，術後動物恢復亦相當快速。然而腹腔鏡並非沒有缺點，如超排處理個體差異、硬體設備昂貴、取得之卵母細胞後續發育能力不穩定以及對操作人員的經驗要求較高等。

本研究嘗試建立山羊腹腔鏡卵母細胞採集技術，除將臺灣腹腔鏡輔助繁殖技術接軌國際與世界同步外，也為將來商業化山羊胚生產模式之建立奠定基礎。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2673 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生理組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。

(5) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(6) 通訊作者，E-mail: tckang@mail.npust.edu.tw。

材料與方法

I. 本試驗所使用之動物經過行政院農業委員會畜產試驗所實驗動物照護及使用小組審查同意，同意書編號畜試恆動字第 109007。

II. 動物及發情同期化處理

本研究共使用 20 頭年齡介於 1.5 – 3 歲齡之臺灣黑山羊恆春品系 (10 頭) 及努比亞 (10 頭) 母羊。每次試驗處理羊隻 5 頭，每次試驗使用之羊隻品種均包含臺灣黑山羊恆春品系及努比亞，比例為 2:3 或 3:2，試驗中卵母細胞採集方法之安排，若第一次為腹腔鏡法 3 頭，外科手術法 2 頭，則下一次處理則換為腹腔鏡法 2 頭，外科手術法 3 頭。發情同期化處理使用 CIDR® (Controlled internal drug release, CIDR®, EAZI-breed, Rydalmere, Australia) 搭配孕馬血清激性腺素 (Pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG, Prospec-Tany, Israel) 及前列腺素 F2α (Prostaglandin F2α, PGF2α, analogue cloprostenol, Estrumate, Vet Pharma Friesoythe GmbH) 進行。CIDR 植入陰道為第 0 天，第 9 天肌肉注射 PGF2α (5.3 mg/0.5 mL) 及 PMSG 500 IU，第 11 天移除 CIDR，並於 CIDR 移除後 12 小時以外科手術或腹腔鏡法進行卵母細胞收集。

III. 腹腔鏡設備

試驗中使用之所有設備包括二氧化碳打氣系統、影像系統、光源系統、窺鏡、穿刺器及爪鉗均為德國 KARL STORZ 公司之產品。

IV. 動物麻醉

每頭母羊於術前肌肉注射 0.2 mg/kg xylazine (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany) 與 0.025 mg/kg 硫酸阿托品 (Atropine sulfate, 信東生技股份有限公司, 臺灣)，先行基礎鎮靜 10 分鐘後，續以靜脈注射 0.75 mg/kg 之舒泰 50® (Zoletil 50, Zolazepam base, 25 mg/mL, Virbac, French) 進行先導麻醉，後以異氟醚 (Isoflurane, Piramal Healthcare, India) 進行氣體麻醉。

V. 外科手術及腹腔鏡卵母細胞採集

(i) 外科手術法

將羊隻手術區域 (手術切開區域為中心往外輻射放大約 15 – 20 cm 範圍) 之體毛剃除乾淨，並於清洗後以優碘與 75% 酒精消毒整個剃毛區域。於腹中線切開 (長度約 10 cm) 後將卵巢裸露，直接以 21G 針頭搭配 3.5 mL 針筒針對直徑大於 3 mm 濾泡進行抽吸以採集卵母細胞。

(ii) 腹腔鏡法

將羊隻進行手術區域之體毛剃除乾淨，清潔及消毒方法同外科手術法。欲進行腹膜穿刺之區域於皮下注射 20 mg/mL 之利都卡因 (Lidocaine, 臺裕化學製藥廠股份有限公司, 臺灣) 2 – 3 mL，等待約 5 分鐘後以手術刀於距左右乳頭前 2 – 3 cm 處及相對正三角形頂點位置處將皮膚劃開 1 cm 長、深度達肌肉層之創口 (不穿透腹膜)，續以腹膜穿刺器 (Trocars) 刺穿腹膜。三個端點的創口，分別放入攝像頭及 2 支爪鉗或採卵針 (Robertson standard pipette, Minitube, Germany)，後端接以 3.5 mL 針筒組裝而成。經以爪鉗固定腹腔內之卵巢後，收集直徑大於 3 mm 濾泡內之卵母細胞。

VI. 卵丘卵母細胞複合體 (Cumulus oocytes complexes, COCs) 分級

收集之山羊 COCs，予以進行品質分級。一級：卵母細胞外圍有兩層以上之完整卵丘細胞，且胞質分布均勻；二級：卵母細胞外圍有兩層以上之完整卵丘細胞；三級：卵母細胞部分裸露，無完整卵丘細胞包圍及四級：卵母細胞完全裸露。本次試驗所使用之卵母細胞均為 3 級以上 (混合培養)，唯並無單獨評估卵母細胞分級後各級卵母細胞之後續發育能力。

VII. 卵母細胞體外成熟 (In vitro maturation, IVM) 培養

(i) 山羊卵母細胞體外成熟培養液

配方係參考 Joanna *et al.* (2014)，以 M-199 (Invitrogen 12340-030) 為基礎培養液，加入 10 ng/mL EGF (Sigma-Aldrich, E5036) 與 100 mM cysteamine (Sigma-Aldrich, 30070) 配製而成。

(ii) 體外成熟培養

COCs 先以體外成熟培養液清洗 4 次，將之轉移到四孔盤中 (Nunc, Roskilde, Denmark)，每 500 μL/孔成熟培養液中放置 40 – 50 個 COCs。COCs 隨後在 38.8°C、5% CO₂ 及 100% 濕度條件之培養箱進行 24 小時的成熟培養。

VII. 卵母細胞成熟率評估

經過 24 小時成熟培養後之 COCs，取出總數量 20% 之 COCs 放入含 0.1% hyaluronidase (Sigma-Aldrich, H-3506) 之 DPBS 清洗液短暫浸泡處理，接著利用適當口徑之玻璃吸管，以機械式連續吸吐方式完全移除外圍包被之卵丘細胞，經成熟培養液清洗數次後移入含有 10 $\mu\text{g/mL}$ 之 Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, 382061) 之 M-199 染色液中進行染色 (10 分鐘)，染色後之卵母細胞於紫外光下觀察。當卵母細胞內之染色質呈均勻擴散分佈，且被侷限於圓形結構之核膜時，則判定為 GV 期；若卵母細胞內之染色質呈現濃縮狀態，且第一極體已排出核膜外則判定為 MII 期。體外成熟培養後發育中止 (無觀察到第一極體) 的卵母細胞數則歸類為退化 (Degenerated) 的卵母細胞，亦記錄之。

IX. 精子準備及卵母細胞體外受精 (*In vitro* fertilization, IVF)

冷凍精液 (與試驗中供卵母羊品種相同之自行生產冷凍精液) 解凍後放入 2 mL 之 45%/90% Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 中以 700 $\times g$ 離心 15 分鐘。以體外受精培養液將精子濃度調整到 30×10^6 spermatozoa/mL。成熟培養後的 COCs 移至有受精培養液的培養皿洗滌數次後放置在體外受精培養液中。清洗及受精培養液為含有 10% 去補體之山羊血清 (Goat serum, Invitrogen, 16210-064) 及 4 $\mu\text{g/mL}$ 健大黴素 (Gentamicin, Sigma-Aldrich, G1272) 之合成輸卵管液 (Synthetic oviduct fluid, SOF)。合成輸卵管液之配置方法參考 Souza *et al.* (2013) 之方法。配製好之體外受精培養液調整 pH 至 7.3，滲透壓為 280 mOsm。精子獲能液配製方法同受精培養液，但多加了 5 $\mu\text{g/mL}$ 肝素 (Calbiochem, 375095)。每 45 – 50 個 COCs 放置於每孔含有 450 μL 精子獲能液的四孔盤中，再放入 50 μL 含有精子的體外受精培養液，使精子最終濃度為 6×10^6 spermatozoa/mL。將混有精子與 COCs 的四孔盤移入 38.8°C、5% CO_2 及 100% 濕度條件之培養箱進行 24 小時的體外受精培養。

X. 胚體外發育 (*In vitro* culture, IVC) 培養

卵母細胞與精子經過 24 小時受精培養後，以含 3 mg/mL 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich, A7030) 的 SOF 體外發育培養液清洗數次以除去多餘的精子。於四孔盤中預先製作 75 μL 的小滴，並覆蓋 700 μL 的礦物油 (Mineral oil, Sigma-Aldrich M-8410)。清洗好的受精卵每 25 個 (懸浮於 25 μL 體外發育培養液) 移入一個小滴中。並於 38.8°C、5% O_2 、5% CO_2 及 90% N_2 的培養箱中進行 7 天之體外發育培養。受精後 48 小時，在體外發育培養液小滴中加入 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FCS, Sigma-Aldrich, F7524)。受精後 48 小時進行卵裂率計算，受精後 7 – 8 天計算囊胚率並以 H33342 (Sigma-Aldrich, 382065) 染色後在紫外光下進行囊胚細胞數計算。

XI. 資料統計

以 SAS (Statistical analysis system, SAS, 2012) 套裝軟體進行單因子 (One way) 變異分析 (Analysis of variance, ANOVA)，若達顯著水準，再以鄧肯多變域分析法 (Duncan's multiple range test) 比較各組平均值間之差異顯著性，並以 $P < 0.05$ 為顯著水準。

結果與討論

本研究主要目的為建立山羊腹腔鏡卵母細胞採集技術，並與傳統外科手術所取出之卵母細胞進行比較，觀察採集後之卵母細胞經過體外成熟、體外受精及體外培養後之卵母細胞成熟率、卵裂率、囊胚率及囊胚細胞數之差異。表 1 結果顯示，無論以何種卵母細胞採集方法，卵母細胞經 24 小時體外成熟培養後，細胞核發育至第二次減數分裂中期 (Metaphase II, MII) 者 (可否觀察到第一集體排出) 無顯著差異 ($74.88 \pm 2.00\%$ vs. $81.14 \pm 7.00\%$)。卵母細胞經體外成熟培養後旋即進行 24 小時之體外受精培養。經過體外受精培養後之受精卵續進行體外培養。體外受精後 48 小時可以觀察到卵裂。由表 2 之結果顯示，不同卵母細胞收集方法 (外科手術 vs. 腹腔鏡法) 所得之卵母細胞在卵裂率 ($73.93 \pm 1.90\%$ vs. $68.30 \pm 3.99\%$) 及受精後第 7 天之囊胚率 ($42.87 \pm 1.26\%$ vs. $42.65 \pm 3.83\%$) 均無顯著差異；但在囊胚細胞數則以外科手術法顯著優於腹腔鏡法 (76.41 ± 1.29 vs. 69.00 ± 6.23 , $P < 0.05$)。

Jarosław *et al.* (2020) 試驗中注射高劑量之 PMSG (1,000 IU) 容易誘發抗體反應而導致產仔率下降之風險 (Baril *et al.*, 1993; Ucar *et al.*, 2005)。腹腔鏡採卵針的直徑較小時，吸取卵母細胞會對卵母細胞產生較大的壓力，較容易使附著在卵母細胞周圍的卵丘細胞脫落，影響到卵母細胞後續發育能力。使用 18G 的針頭進行卵母細胞收集時之回收率較 19G 及 21G 的針頭為佳 (Bols *et al.*, 1997)。針尖長度較短者，由濾泡吸取卵母細胞至針筒間的距離較短，因此減少了抽吸壓力與撞擊管壁導致的傷害，也可得到較佳之卵母細胞品質。應用於山羊時，一般真空度的範圍維持在

25 – 70 mmHg，真空度低於 25 mmHg 時回收率會下降，高於 100 mmHg 則使卵母細胞品質下降。但有研究指出真空度在 30 mmHg 時可達到 84% 的卵母細胞回收率 (Baldassarre *et al.*, 2003; Koeman *et al.*, 2003)。在山羊及綿羊，若要降低操作成本，也可利用子宮內授精管後面接上針筒取代真空馬達 (Morton *et al.*, 2008)。本研究便是使用腹腔鏡人工授精管 (針頭直徑同 21 G 針頭) 後接 3.5 mL 針頭進行卵母細胞抽吸 (圖 1 及圖 2)，唯沒有進行抽吸真空度的測量。在相同的抽吸壓力下，採卵針直徑越小，則流速越慢。一般而言，流速的測定方法是測量每分鐘可以吸取多少毫升的水來計算 (mL/min)。在綿羊試驗中發現，吸取流速越低時，回收之卵母細胞品質越佳。山羊使用之流速介於 7 – 7.5 mL/min 時可得到最佳之卵母細胞品質 (Avelar *et al.*, 2012)，本研究為初步建立腹腔鏡採卵技術，嗣後將更進一步就各項參數的影響進行試驗設計以提高卵母細胞回收率及品質。

表 1. 不同收集方式所得之卵母細胞經 24 小時體外成熟培養後對成熟率之影響

Table 1. Effects of different collection methods on the maturation rate of oocytes after 24 hours of *in vitro* maturation cultures

Oocytes origin	Total oocytes retrieved [#]	GV (%)	MII (%)	Degenerated (%)
Surgical	159	30 (18.53 ± 0.02%) ^a	119 (74.88 ± 2.00%)	10 (6.21 ± 1.29%) ^b
Laparoscopy	44	4 (5.70 ± 0.03%) ^b	35 (81.14 ± 7.00%)	5 (11.12 ± 2.27%) ^a

[#] 4 replications of collection.

Means ± SE.

GV: germinal vesicle; MII: metaphase II; Degenerated: no first polar body observed.

^{a, b} Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).



圖 1. 以 Robertson Standard Pipette 搭配腹腔鏡進行卵母細胞收集。

Fig. 1. Using Robertson Standard Pipette collocation with laparoscope for oocyte collection.

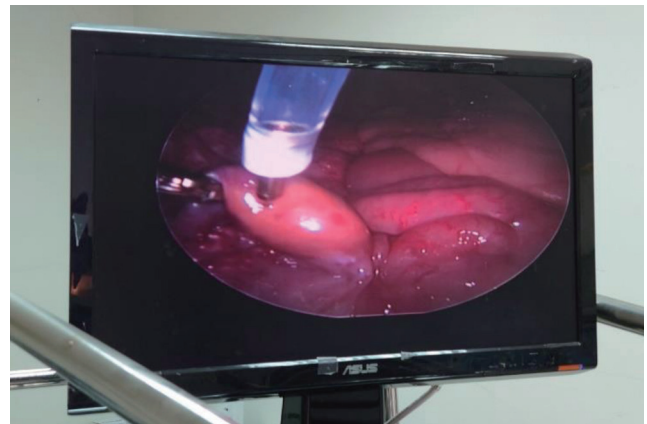


圖 2. 以 Robertson Standard Pipette 直接由濾泡收集卵母細胞。

Fig. 2. Collect oocytes directly from follicles with Robertson Standard Pipette.

以往要收集活體動物之卵母細胞均是利用開腹手術將整個卵巢摘除後再於實驗室中由卵巢上之濾泡收集卵母細胞，以此方法收集卵母細胞，母羊就只有一次提供卵母細胞之機會，摘除卵巢的母羊，於術後恢復及抗生素停藥期屆滿後便安排淘汰。在本研究中同樣利用外科手術打開腹腔，唯不同之處為不將卵巢摘下，而是直接以 21G 針頭搭配 3.5 mL 針筒抽吸卵巢上之濾泡 (圖 3 及圖 4)，卵母細胞回收率可達 $88.51 \pm 2.2\%$ 。可獲得不錯之卵母細胞回收率，亦可重複使用該供卵動物 (試驗中部分母羊進行 2 次以上之重複卵母細胞採集)，相對降低了試驗動物使用數量。腹腔鏡卵母細胞收集時之影像是經由攝像頭將影像傳至螢幕，攝像頭之裝設具有方向性，若裝設不當將導致操作移動與影像移動不同而影響操作直覺性，除此之外，攝像頭與爪鉗之開口位置亦需要注意，需避免位置太近而在腹腔中操作時互相碰撞。

本試驗的卵母細胞體外成熟培養液為 M-199 搭配 10 ng/mL EGF 與 100 mM cysteamine，以腹腔鏡法取得之卵母細胞經過 24 小時體外成熟培養後之成熟率為 $81.14 \pm 7.00\%$ ，此結果與 Joanna *et al.* (2014) 同樣利用腹腔鏡法取得卵母細胞後分別進行 18 及 22 小時體外成熟培養之成熟率 $87 \pm 3.2\%$ 及 $90 \pm 0.4\%$ 相較下有些許差距。原因除了體外成熟培養液配方不同外，本試驗之腹腔鏡卵母細胞收集時為求盡量收集到多量之卵母細胞，對於濾泡直徑 (3 mm) 的要求較低 (一般為 5 mm 以上者最佳)。然而濾泡直徑影響卵母細胞後續發育甚鉅，濾泡直徑 2 – 3 mm、3.1 – 5

mm 及大於 5 mm 者，其卵母細胞成熟發育能力分別為 70%、83% 及 97% (Crozet *et al.*, 1995)，本試驗中外科手術及腹腔鏡法所取之卵母細胞直徑下限是 3 – 5 mm 之濾泡，成熟率為 $74.88 \pm 2.00\%$ 及 $81.14 \pm 7.00\%$ ，此一結果正落在 Crozet *et al.* (1995) 研究中 2 – 3 mm、3.1 – 5 mm 濾泡所得之成熟率之間。



圖 3. 直接由卵巢上濾泡收集卵母細胞。

Fig. 3. Collecting oocytes directly from follicles on the ovary.

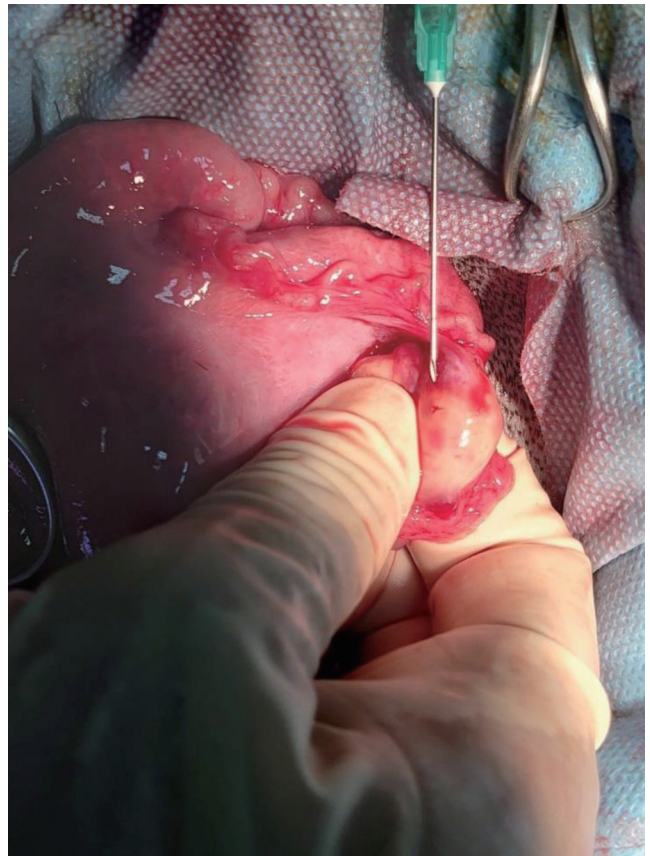


圖 4. 抽吸完成後濾泡呈現塌陷狀態。

Fig. 4. After suction is completed, the follicle appears collapsed.

由腹腔鏡法取得之卵母細胞經體外受精後之卵裂率為 $68.30 \pm 3.99\%$ ，此一結果與同樣以腹腔鏡採卵後進行體外受精試驗之 $72 \pm 7\%$ 卵裂率結果相近 (Baldassarre *et al.*, 2007)；另有研究在賀爾蒙處理後 60 小時進行腹腔鏡卵母細胞收集，之後再以單一精子注入法 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 授精，所得之卵裂率為 $70.9 \pm 8.4\%$ ，此一結果亦與本研究相近 (Abdullah *et al.*, 2008)。

其他影響腹腔鏡卵母細胞收集效率的原因亦相當多，除了發情同期化處理外，個體的體型分數評等 (Cognié *et al.*, 2004)、品種及年齡 (Paramio, 2010; Romaguera *et al.*, 2011) 也左右了回收的卵母細胞數量與品質。事實上，每頭羊的個體反應是影響超量排卵處理的極重要因素之一。有研究發現牛隻以同樣的超量排卵處理後，不同個體所可收集到之卵母細胞數量介於 0 到 128 個之間 (Pontes *et al.*, 2011)；山羊經處理後觀察到之濾泡數為 4 到 33 個，卵母細胞回收數則為 2 至 12 個 (Gibbons *et al.*, 2008)。此現象說明了個體反應的差異性相當大，而且是一個難以克服的瓶頸 (Pontes *et al.*, 2011)。山羊年齡直接影響了濾泡的大小，由尚未性成熟女羊收集而來的卵母細胞，其後續發育能力較取自性成熟羊隻者為低 (Paramio, 2010)。此外，有研究指出未性成熟女羊的卵母細胞在超顯微結構及功能上均有缺陷 (Paramio, 2010)，因此其於體外系統培養後之發育能力較為低下。Baldassarre *et al.* (2007) 研究指出，具優良性能，但是經過連續人工授精處理皆無法成功懷孕的老母山羊，亦可使用 LOPU 技術採取卵母細胞而增加其優良遺傳性狀的保存或應用。處於繁殖季節的母山羊，利用傳統外科手術方式取得之卵母細胞品質較非繁殖季節時佳。但有研究發現一個有趣的現象，在非繁殖季節中，利用 LOPU 取得來自屠宰場之綿羊卵母細胞，經體外培養後，其囊胚率皆較繁殖季節高 (Vazquez *et al.*, 2010)。在水牛的研究則指出，卵母細胞於受精後之卵裂率及囊胚率在秋季會高於春季，而夏季及冬季的卵母細胞品質則介於秋及春季之間 (Francesco *et al.*, 2011)；牛隻除了日本黑牛外，在熱季時卵母細胞品質均不佳 (Takuma *et al.*, 2010)。在綿羊，於皮下植入褪黑激素，可以改善卵母細胞於非繁殖季節的發育能力。關於季節的影響，目前有許多技術可以應用來克服此一問題，例如，綿羊於非繁殖季節利用控制光照時

間，便可以有效的調節羊隻發情及卵母細胞品質 (Vazquez *et al.*, 2010)。

本研究成功建立了腹腔鏡卵母細胞收集技術，並與外科手術方法取得之卵母細胞進行體外成熟、體外受精及體外培養中各個關鍵點之比較評估，結果顯示，經由腹腔鏡方法取得之山羊卵母細胞經過體外培養系統培養後，雖然囊胚總細胞數在統計上顯著低於外科手術法收集者，但可以順利發育至囊胚，且囊胚率與外科手術法取得者相似，足以證明具備發育至囊胚階段之能力。

表 2. 不同收集方式所得之卵母細胞經體外受精培養後對卵裂率、囊胚率及囊胚細胞數之影響

Table 2. Effects of different collection methods on the cleavage rate, blastocyst rate and cell number of blastocyst after *in vitro* fertilization culture of oocytes

Oocytes origin	Total oocytes retrieved [#]	Cleavage (%)	Day 7 blastocysts (%)	Total cell no.
Surgical	165	105 (73.93 ± 1.90%)	61 (42.87 ± 1.26%)	76.41 ± 1.29 ^a
Laparoscopy	46	32 (68.30 ± 3.99%)	20 (42.65 ± 3.83%)	69.00 ± 6.23 ^b

[#] 4 replications of collection.

Means ± SE.

^{a, b} Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

參考文獻

- Abdullah, R. B., S. L. Liow, A. N. M. A. Rahman, W. K. Chan, W. E. Wan-Khadijah, and S. C. Ng. 2008. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. *Theriogenology* 70: 765-771.
- Avelar, S. R. G., R. R. Moura, F. C. Sousa, A. F. Pereira, K. C. Almedia, C. H. S. Melo, A. C. A. Teles-Filho, G. Baril, L. M. Melo, D. I. A. Teixeira, and V. J. F. Freitas. 2012. Oocyte production and in vitro maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. *Animal Reproduction*. 9: 1-7.
- Baldassarre, B. B., Wang, N. Kafidi, M. Gauthier, N. Neveu, J. Lapointe, L. Sneek, M. Leduc, F. Duguay, and J. F. Zhou. 2003. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 59: 831-839.
- Baldassarre, B., K. M. Rao, N. Neveu, E. Brochu, I. Begin, E. Behboodi, and D. K. Hockley. 2007. Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 612-616.
- Baril, G., B. Leboeuf, and J. Saumande. 1993. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 40: 621-628.
- Bols, P. E., M. T. Ysebaert, A. Van Soom, and A. de KRUIF. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*. 47: 1221-1236.
- Cognié, Y., N. Poulin, Y. Locatelli, and P. Mermillod. 2004. State of the reproduction, conservation, and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fertil.* 16: 437-445.
- Crozet, N., M. Ahmed-Ali, and M. P. Dubos. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fert.* 103: 293-298.
- de Souza-Fabjan, J. M., B. Panneau, N. Duffard, Y. Locatelli, J. R. de Figueiredo, V. J. Freitas, and P. Mermillod. 2014. In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. *Theriogenology* 81: 1149-1162.
- Fonseca, J. F., J. M. Souza-Fabjan, M. E. Oliveira, C. R. Leite, P. M. Nascimento-Penido, F. Z. Brandão, and K. C. Lehloeny. 2016. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 86: 144-151.
- Francesco, S. D., B. Lucia, C. Giuseppe, D. P. Rossella, V. Domenico, N. Gianluca, Z. Luigi, and G. Bianca. 2011. The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.* 123: 48-53.
- Gibbons, A., F. P. Bonnet, M. I. Cueto, M. Catala, D. F. Salamone, and A. Gonzalez-Bulnes. 2008. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 423-426.

- Jarosław, W., J. Koseniuk, M. Skrzyszowska, and M. Cegła. 2020. L-OPU in goat and sheep—different variants of the oocyte recovery method. *Animals* 10: 658.
- Joanna, M. G., S. Fabjan, Y. Locatelli, N. Duffard, E. Corbin, J. L. Touzé, C. Perreau, J. F. Beckers, V. José, F. Freitas, and P. Mermillod. 2014. In vitro embryo production in goats: Slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up—derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. *Theriogenology* 81: 1021-1031.
- Koeman, J., C. L. Keefe, H. Baldassarre, and B. R. Downey. 2003. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semidefined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* 60: 879-89.
- Kühholzer, B., S. Müller, M. I. Prokofiev, L. K. Ernst, U. Besenfelder, and G. Brem. 1998. Laparoscopic techniques for the recovery and transfer of microinjected goat zygotes. *Theriogenology* 49: 245.
- Luo, J., W. Wang, and S. Sun. 2019. Research advances in reproduction for dairy goats. *Asian-Australia J. Anim. Sci.* 32: 1284-1295.
- Menchaca, A., N. Barrera, P. C. dos Santos Neto, F. Cuadro, and M. Crispo. 2016. Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats. *Anim. Reprod.* 13: 273-278.
- Morton, K. M., W. M. C. Maxwell, and G. Evans. 2008. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 106-110.
- Paramio, M. T. and D. Izquierdo. 2016. Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology* 86: 152-159.
- Paramio, M. T. 2010. In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Rumin. Res.* 89: 144-148.
- Pontes, J. H. F., F. A. Melo Sterza, A. C. Basso, C. R. Ferreira, B. V. Sanches, K. C. P. Rubin, and M. M. Seneda. 2011. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 75: 1640-1646.
- Romaguera, R., X. Moll, R. Morató, M. Roura, M. J. Palomo, M. G. Catalá, A. R. Jiménez-Macedo, S. Hammami, D. Izquierdo, T. Mogas, and M. T. Paramio. 2011. Prepubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy than those from adult goats. *Theriogenology* 76: 1-11.
- SAS. 2012. SAS User's guide: Statistics. Version 7.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA.
- Stangl, M., B. Kuhholzer, U. Besenfelder, and G. Brem. 1999. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology* 52: 709-716.
- Souza J. M. G., N. Duffard, M. J. Bertoldo, Y. Locatelli, E. Corbin, and A. Fatet. 2013. Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization on the in vitro production of goat embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 138: 82-89.
- Takuma, T., S. Sayoko, E. Daisuke, I. Hitoshi, J. Takaomi, K. Yukine, N. Takashi, and O. Takeshige. 2010. Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. *J. Reprod. Dev.* 56: 55-59.
- Ucar, O., M. Kaya, S. Yildiz, F. Onder, M. Cenesiz, and M. Uzun. 2005. Effect of progestagen/PMSG treatment for qeustrus synchronization of tuj Ewes to be bred after the natural breeding season. *Acta Vet. Brno.* 74: 385-393.
- Vazquez, M. I., F. Forcada, A. Casao, J. A. Abecia, C. Sosa, and I. Palacin. 2010. Undernutrition and exogenous melatonin can affect the in vitro developmental competence of ovine oocytes on a seasonal basis. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 677-684.

Establishment of goat laparoscopic oocytes pick-up technology ⁽¹⁾

Ting-Chieh Kang ⁽²⁾⁽⁶⁾ Kai-Fei Tseng ⁽²⁾ Yen-Chun Lin ⁽²⁾ Yu-Hsin Chen ⁽³⁾
Fung-Hsiang Chu ⁽³⁾ Hsin-Hung Lin ⁽⁴⁾ and Perng-Chih Shen ⁽⁵⁾

Received: Dec. 18, 2020; Accepted: Aug. 6, 2021

Abstract

The aims of this study were to establish the technique of laparoscopic oocytes pick-up and compare the techniques with the traditional surgical oocytes collection methods of goat. Twenty goats were used in this study (10 Hengchun line of Taiwan Black Goat and 10 Nubian goat), followed by conducting in vitro maturation, insemination, and maturation rate to observe cleavage rate, blastocyst rate and total cell number of blastocysts, after oocyte collection. The results showed no significant differences observed in maturation rate with the nuclear development arrested in the MII stage ($74.88 \pm 2.00\%$ vs. $81.144 \pm 7.00\%$), after the culture for maturation. After insemination, the fertilized zygotes were continuously developed in the in vitro culture system, and cleavage were observed 48 hours after insemination. The two different oocyte collection methods (surgical vs. laparoscopic method), showed no difference in the cleavage rate ($73.93 \pm 1.90\%$ vs. $68.30 \pm 3.99\%$) and the blastocyst rate on the 7th day after fertilization ($42.87 \pm 1.26\%$ vs. $42.65 \pm 3.83\%$); however the surgical method had a higher total cell number of blastocysts (76.41 ± 1.29 vs. 69.00 ± 8.91). In this study, a laparoscopic oocyte pick-up technology was established with success. The blastocyst development capacity of the collected oocytes after in vitro culture was similar to that of surgical collect group. The laparoscopic oocyte pick-up technology can indeed be used for goat oocytes collection.

Key words: Goat, Laparoscopic oocytes pickup, Blastocyst rate.

(1) Contribution No. 2673 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(3) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, Pingtung 91247, Taiwan, R. O. C.

(5) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, 91201, Taiwan, R. O. C.

(6) Corresponding author, E-mail: tckang@mail.tlri.gov.tw.