

行政院所屬各機關出國報告

出國類別：研習

### 山羊胚體外生產與應用之研究

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所台東種畜繁殖場

出國人員職稱：助理研究員

姓名：章嘉潔

出國地點：法國國家農業研究院生殖生理實驗室

出國其期間：2003年11月2日到11月11日

報告日期：2003年11月27日

系統識別號:C09204807

公 務 出 國 報 告 提 要

頁數: 13 含附件: 否

報告名稱:

山羊胚體外生產與應用之研究

主辦機關:

行政院農業委員會

聯絡人/電話:

蔡慶雄/23126988

出國人員:

章嘉潔 行政院農業委員會畜產試驗所 台東種畜繁殖場 助理研究員

出國類別: 研究

出國地區: 法國

出國期間: 民國 92 年 11 月 02 日 -民國 92 年 11 月 11 日

報告日期: 民國 92 年 11 月 27 日

分類號/目: F10/畜牧業 F10/畜牧業

關鍵詞: 山羊,胚,體外生產

內容摘要: 山羊生殖技術之研究為中法農業合作之主要項目之一，過去雙方在山羊精液冷凍保存及胚移植技術之合作方面，一直有良好的互動與成果表現，目前雙方在自然環境與公羊精液生產相關之研究，與胚保存冷凍及胚體外生產等技術方面仍保持密切之聯繫與合作中。有關山羊胚體外生產之研究，本實驗室過去所獲得結果，卵母細胞成熟率約50%左右，而發育至囊胚、桑椹胚比例卻明顯偏低，相較於法國國家農業研究所獲得的成效，仍有極大的差距。歸咎其主要原因為國內體外培養系統仍未完善建立，亟需借助先進實驗室之經驗快速取得改進方法。此外，目前畜試所進行家畜基因轉殖研究，山羊胚體外生產正可提供研究與應用所需之材料，而法國為世界上在山羊人工生殖技術研究領域最為先進之國家，值得我方借鏡與合作。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

行政院所屬各機關出國報告

出國類別：研習

山羊胚體外生產與應用之研究

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所台東種畜繁殖場

出國人員職稱：助理研究員

姓名：章嘉潔

出國地點：法國國家農業研究院生殖生理實驗室

出國其期間：2003年11月2日到11月11日

報告日期：2003年12月01日

目次

壹、出國目的	.....2
貳、研習過程	.....3
行程安排	.....3
內容重點	.....5
參、結果與討論	.....6
肆、結論與建議	.....9
伍、參考文獻	.....10

## 壹、出國目的:

本計畫之目的乃自今年十一月二日起至十一月十一日止，赴法國國家農業研究院生殖生理實驗室研習山羊胚體外生產與應用之研究為期十日。山羊生殖技術之研究為中法農業合作之主要項目之一，過去雙方在山羊精液冷凍保存及胚移置技術之合作方面，一直有良好的互動與成果表現，目前雙方在自然環境與公羊精液生產相關之研究，與胚保存冷凍及胚體外生產等技術方面仍保持密切之聯繫與合作中。有關山羊胚體外生產之研究，本實驗室過去所獲得結果，卵母細胞成熟率約50%左右，而發育至囊胚、桑椹胚比例卻明顯偏低，相較於法國國家農業研究院所獲得的成效，仍有極大的差距。歸咎其主要原因為國內體外培養系統仍未完善建立，亟需借助先進實驗室之經驗快速取得改進方法。此外，目前畜試所進行家畜基因轉殖研究，山羊胚體外生產正可提供研究與應用所需之材料，而法國為世界上在山羊人工生殖技術研究領域最為先進之國家，值得我方借鏡與合作。

## 貳、研習過程:

### 行程安排:

十一月二日(日) 23:55 搭乘長榮(BR087)台北到巴黎。

十一月三日(一) 7:00 抵達至法國巴黎，由法國國家農業院研究人員接待至實驗室，參觀訪問。

十一月四日(二) 研習與討論山羊胚體外生產技術及應用之研究：包含山羊卵母細胞體外成熟、體外受精及體外培養等技術。

1.山羊卵丘卵母細胞取得方式，卵母細胞之來源包括自屠宰場之卵巢及不同動情週期或經荷爾蒙處理之活體母羊，以直接或外科手術人工採卵等方式取得與鑑別品質之方法。

2.體外成熟培養系統：培養條件(溫度與氣相)，培養液成份比較(血清與其他蛋白質來源、濾泡液，使用何種共培養方式(卵丘細胞、懸浮顆粒細胞、輸卵管上皮細胞)，如何評估成熟發育階段。

十一月五日(三) 研習與討論山羊胚體外生產技術及應用之研究：包含山羊卵母細胞體外成熟、體外受精及體外培養等技術。

1.精子獲能：獲能方法(培養液之pH、血清、濾泡液、抗凝血劑添加)，新鮮或冷凍精液獲能不同處理方式，如何評估有效的獲能作用(染色法)。

2.體外受精：精液品質之評估，受精使用精子數目，如何操作體外成熟卵進行受精，體外培養使用何種共培養方式(卵丘細胞、懸浮顆粒細胞、輸卵管上皮細胞)，精子與卵共培養時間條件，如何評估有效受精過程。

十一月六日(四) 研習與討論山羊胚體外生產技術及應用之研究：包含山羊卵母細胞體外成熟、體外受精及體外培養等技術。

體外培養系統：培養液成份，共培養方式(卵丘細胞、懸浮顆粒細胞、輸卵管上皮細胞)系統之建立，鑑定發育階段染色方式。

十一月七日(五) 研習與討論山羊胚體外生產技術及應用之研究：包含山羊卵母細胞體外成熟、體外受精及體外培養等技術。

體外培養系統：培養液成份，共培養方式(卵丘細胞、懸浮顆粒細胞、輸卵管上皮細胞)系統之建立，鑑定發育階段染色方式。

十一月八日(六) 研習與討論山羊胚體外生產技術及應用之研究

十一月九日(日) 資料整理回法國巴黎機場

十一月十日(一) 11:20 搭乘長榮(BR088)法國到台北。

十一月十一日(二) 7:50 抵達台灣。

## 內容重點:

研習與討論山羊胚體外生產技術及應用之研究：包含山羊卵母細胞體外成熟、體外受精及體外培養等技術。

- 1.山羊卵丘卵母細胞取得方式，卵母細胞之來源包括自屠宰場之卵巢及不同動情週期或經荷爾蒙處理之活體母羊，以直接或外科手術人工採卵等方式取得與鑑別品質之方法。
- 2.體外成熟培養系統：培養條件(溫度與氣相)，培養液成份比較(血清與其他蛋白質來源、濾泡液，使用何種共培養方式(卵丘細胞、懸浮顆粒細胞、輸卵管上皮細胞)，如何評估成熟發育階段。
- 3.精子獲能：獲能方法(培養液之 pH、血清、濾泡液、抗凝血劑添加)，新鮮或冷凍精液獲能不同處理方式，如何評估有效的獲能作用(染色法)。
- 4.體外受精：精液品質之評估，受精使用精子數目，如何操作體外成熟卵進行受精，體外培養使用何種共培養方式(卵丘細胞、懸浮顆粒細胞、輸卵管上皮細胞)，精子與卵共培養時間條件，如何評估有效受精過程。
- 5.體外培養系統：培養液成份，共培養方式(卵丘細胞、懸浮顆粒細胞、輸卵管上皮細胞)系統之建立，鑑定發育階段染色方式。

## 參、結果與討論

本計畫之目的乃自今年十一月二日起至十一月十一日止，赴法國國家農業研究院生殖生理實驗室研習山羊胚體外生產與應用之研究技術期十日。法方山羊胚體外生產與應用方面的技術已相當成熟穩定，整體試驗步驟非常值得我方學習參考。

### 卵母細胞之體外成熟

自屠宰場取得之山羊卵巢，在實驗室中以無菌操作採取 2~6 mm 濾泡中之卵丘卵母細胞複合體(COCs)，完整之 COCs 清洗 3 次後，每 10 個 COCs 培養於 50 $\mu$ L 培養液中，覆蓋礦物油。培養液為含 2.2 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> 及 50 $\mu$ g/mL gentamicin 之 M199，另補充 10% 胎牛血清、100 $\mu$ m cysteamine。卵母細胞於 5% CO<sub>2</sub>、95% 空氣、38.5 °C 之恆溫培養箱培養 24 小時。

### 精子獲能與體外受精

獲能培養基、體外受精培養基使用 SOF。受精力經檢定合格之努比亞公羊冷凍精液，精液解凍後，使用 Percoll 密度梯度方式以 500 x g 離心 10 分鐘，精子沈澱物 SOF 培養液稀釋，調整精子濃度為 10<sup>7</sup> cells/mL，於 SOF 培養液進行浮游培養 1 小時，於 38.5 °C 恆溫培養箱中進行獲能。經體外成熟培養完成之卵母細胞，去除卵丘細胞後，每



10 個 COCs 培養於 100  $\mu$ L SOF 培養液中，導入獲能完成之精子，調整精子濃度為  $10^6$  cells/mL，上覆礦物油並於 5%  $\text{CO}_2$ 、38.5  $^\circ\text{C}$  進行體外受精 18 小時。

#### 受精卵之體外培養

受精 18 小時後，每 10 個受精卵移入 50 $\mu$ L 合成輸卵管液(SOFaa) 上覆礦物油，培養條件為：38.5  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、5%  $\text{O}_2$  及 90%  $\text{N}_2$ 。培養期間每 48 小時更換一次培養液。

#### 受精卵分裂檢查

受精卵於 acetic acid:alcohol(1:3)固定 24 小時，玻片待乾，使用 10% Giemsa 染色 10 min，400 $\times$ 之相位差顯微鏡觀察分裂比率檢查。

在家畜胚移置與基因轉殖技術領域中，均需要大量的卵母細胞及早期胚之配合，雖然應用超級排卵和人工授精技術可增加一部分卵母細胞及胚的來源，但是在數量上及經濟上仍受相當限制；例如羊隻體內胚之取得，仍以外科手術或犧牲之方式來達成，且在試驗過程中需消耗諸多人力與財力。台灣地區，依據養羊協會調查國內九十一年一月至六月山羊供應屠宰頭數為七零零九一頭，推估全年肉羊供應屠宰頭數為一四零一八二頭。若能自屠宰場收集擬廢棄之卵巢，將可取得大量卵母細胞。因此，卵母細胞之體外成熟和體外受精技術，尤其顯得具有意義。

此次研習至法國國家農業研究院生殖生理實驗室，研習山羊胚體外生產，於法國試驗期間山羊卵母細胞體外成熟率高達百分之九十以上，經體外受精發育至八細胞高達百分之八十以上，結果相當令人滿意。經觀察發現實驗步驟與流程與以往文獻上有許多出入，表示新的技術不斷更新與改進，法方技術之建立，可供我們進一步學習對後續研究之重要依據及價值。

同時也參訪山羊胚體外生產技術應用（如使用腹腔鏡胚移置、生殖細胞冷凍、超級排卵、現場飼養管理等）。此次出國研習相關之畜產生物技術，藉由與先進國家之科技交流，對於本所在基因轉殖家畜之研究上將有莫大的助益。同時，做為本所基因轉殖研究及分子農場先導牧場研發之基礎，也開啟中法雙邊畜產科技合作之良好基礎。

## 肆、結論與建議

完善之卵母細胞之體外成熟、受精與體外培養系統為各類卵子與胚操作，包括產製基因轉殖動物之基礎。因卵子與胚於各發育階段之生理與組成之變化甚大，故欲發展一系列之良好體外培養系統，需進一步瞭解正常之卵子與胚胎生理、代謝與發育所需之營養成分，若能完成以簡單化學成分組成之培養液取代血清、蛋白質添加物或細胞共培養系統為優先發展之選擇。法方在過去幾年的研究皆朝此方向努力改善，所以此次藉由與先進國家之科技交流，吸取技術上之寶貴經驗及成果，受益匪淺。

全世界發展生物技術已超過 25 年，隨著人類基因圖譜的完成，使得生技產業邁入另一新的里程碑。我國政府目前已將生技產業列為「兩兆雙星」中的雙星之一，也是未來策略性的新興工業。近年來國際畜產生物科技的研發方向，以動物複製、基因轉殖與幹細胞科技等三個重點為主軸。畜產試驗所在畜禽人工生殖科技方面已經有相當的研究成果，例如在牛胚與豬胚體內外生產系統(包括卵子體外成熟、體外受精及胚之體外培養)的建立、胚移置與胚之性別鑑定、以及利用生殖細胞及體細胞進行核轉殖等複製 (cloning) 研究，已獲重大成果，更甚者，為基因轉殖研究亦已開發。而研究的腳步不容遲緩，必須持續執行始能有更大突破，如此方能使我國的家畜人工生殖科技達到國際水準，以提昇我國畜產研究的國際競爭力。與先進國家保持密切交流，透過研究人員之短期研習計畫進行國際交流，將能獲益良多

## 參考文獻

中加農業科技合作研討會論文集。2000。(The Bilateral workshop on agricultural technology between Taiwan and Canada). TFRI Extension Series.No.127.

黃政齊、溫上湘、謝瑞春、鄭登貴。1989。山羊卵體外受精及其早期胚培養之研究。畜產研究 22(1)：39-46。

Baldassarre H, Wang B, Kafiidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN, 2003. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*. 59(3-4):831-839.

Baldassarre H, Wang B, Kafiidi N, Keefer C, Lazaris A, Karatzas CN, 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using Laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*. 57(1):275-284.

Bernardi, M.L.,J.E. Flechon and C. Delouis, 1996. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized in vitro.*J.Reprod.Fertil.*106:161-167.

Bormann CL, Onger EM, Krisherr RL, 2003. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential in vitro.*Theriogenology*. 2003. 59(5-6):1373-1380.

Cox, J. F., F. Saravia, M. Briones and A. Santa Maria, 1995. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 44:451-460.

Fukui, Y., Y. Kikuchi, H. Kondo and S. Mizushima, 2000. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogenology* 52:1553-1565.

Gall, L., V. De Smedt, N. Crozet, S. Ruffini and C. Sevellec, 1996. Meiotically incompetent and competent goat oocytes: Timing of nuclear events and protein phosphorylation. *Theriogenology* 46:825-835.

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.

Izquierdo, D, Villamediana P, Lopez-Bejar M, Paramio MT, 2002. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57(5):1431-41.

Kruip, T. A. M., M. M. Bevers and B. Kemp, 2000. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 53:611-618.

Martino, A., T. Mogas, M. J. Palomo and M. T. Paramio, 1995. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43:473-485.

Martino, A., M. J. Palomo, T. Mogas and M. T. Paramio, 1994. Influence

of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 42:859-873.

Matos, D. G. and C.C. Furnus, 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53:761-771.

Mogas, T. M. J. Palomo, M. D. Izquierdo and M. T. Paramio, 1997. Developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology* 47:1189-1203.

Ohkoshi K, Takahashi S, Koyama S, Akagi S, Adachi N, Furusawa T, Fujimoto J, Takeda K, Kubo M, Izaike Y, Tokunaga T, 2003. In vitro oocyte culture and somatic cell nuclear transfer used to produce a live-born cloned goat. *Cloning Stem Cells*. 5(2):109-115

Palomo, M. J., D. Izquierdo, T. Mogas and M. T. Paramio, 1999. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 51:927-940.

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.

Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Mertens MJ, Paramio MT, 2003. Effects on in vitro embryo development and intracellular

glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol Reprod Dev.* 65(4):446-453.

Samake, S., E. A. Amoah, S. Mobini, O. Gazal and S. Gelaye, 2000. In vitro fertilization of goat oocytes during the non-breeding season. *Small Rum. Res.* 35:49-54.

Yadav, P. S., A. Saini, A. Kumar and G. C. Jain, 1998. Effect of oviductal cell coculture on cleavage and development of goat IVF embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 51:301-306.

Younis, A. I., K. A. Zueike, K. M. Happer, M. A. I. Oliveira and B.G. Brackett, 1991. In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* 44:1177-1182.

Urdaneta A, Jimenez AR, Izquierdo D, Paramio MT, 2003. Effect of the addition of glutathione and glucose to the culture medium on embryo development of IVM-IVF prepubertal goat oocytes. *11(2):131-138.* Adeola, O. 1999. Nutrient management procedures to enhance environmental conditions: An introduction. *J. Anim. Sci.* 77:427-429.