

分类号_____

密级_____

UDC_____

学 位 论 文

哺乳动物胚胎体外培养和玻璃化 冷冻保存的研究

Research on the In Vitro Culture and Vitrification
of Mammalian Embryos

李建华

指导教师 张兆旺 教授 甘肃农业大学 兰州 730070

郭志勤 教授 新疆畜牧科学院绵羊中心

乌鲁木齐 830000

申请学位级别 硕 士 专业名称 动物遗传育种与繁殖

论文提交日期 2002年5月 论文答辩日期 2002年6月

学位授予单位和日期 甘肃农业大学 2002年6月

答辩委员会主席_____

评阅人_____

2002年6月

致 谢

本论文是在张兆旺教授和郭志勤教授的悉心指导下完成的。值此论文付梓之际，对二位导师的无私关怀和辛勤培养表示衷心的感谢！

二位导师丰富的人生阅历，渊博的专业知识，严谨求实、精益求精的科学态度以及对事业无私奉献的精神，给我留下了深刻的印象，是我今后学习和工作的榜样。张兆旺教授在日常生活和学习方面对我关怀备至，在学业上悉心教授，严格要求，精神上热情鼓励。郭志勤先生在论文选题和实验设计方面倾注了大量的心血，为我顺利完成学业投入了大量的时间和精力，使我有幸涉足胚胎工程研究领域，并顺利完成本论文。

本论文的实验工作是在新疆畜牧科学院农业部畜牧兽医生物技术重点开放实验室完成的。实验室不仅为本实验提供了研究经费，而且为本人提供了良好的工作、学习和生活环境。实验室黄俊成、刘明军、杨梅、武坚、李文蓉、史洪才、杨冬梅和玛依拉等老师在工作 and 生活中给予了我无私的关心和帮助，谨致由衷的敬意和感谢。

中国农业大学王立虎博士和新疆农业大学施巧婷博士在实验过程中给予了许多具体指导和帮助，新疆大学 99 级硕士生王红梅和新疆农业大学 99 级硕士生段新华不仅在学习上给了我热情的帮助和鼓励，而且在生活上给了我无微不至的关心，石河子大学 99 级硕士生李辉和新疆农业大学 2000 级硕士生王旭光在实验过程中给予了极大的帮助，在此向他们表示衷心的感谢。

日本国山口大学的铃木达行教授就部分实验给予了耐心的指导和建议。

论文制作过程中，得到了权凯和蔡原同学的大力帮助。

感谢我的父母及全家，论文的完成也包含着他们的心血，凝结着他们的辛勤劳动。

谨以此文献给所有关心支持我的老师、亲人和朋友们！

李建华

二零零二年夏于兰州

目 录

缩略词表

中文摘要

引言

第一部分 哺乳动物胚胎体外培养和玻璃化冷冻保存研究—昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养和体外培养桑椹胚及早期囊胚的玻璃化冷冻

一、克服昆明小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞的培养液研究.....	1
1. 材料与方法.....	2
1.1 实验动物.....	2
1.2 主要仪器与试剂.....	2
1.3 实验方法.....	3
2. 实验结果.....	4
2.1 实验 1: 不同工作液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响.....	4
2.2 实验 2: 不同的 M2 培养液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响.....	5
2.3 实验 3: 不同的 M16 培养液对克服昆明小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞的影响.....	5
3. 讨论.....	6
3.1 不同工作液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响.....	6
3.2 谷氨酰胺、EAA 和 NEA 对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外发育的影响.....	6
3.3 牛磺酸和 EDTA 对克服昆明白小鼠胚胎 2-细胞发育阻滞的影响.....	7
4. 小结.....	7
二、显微注射、培养环境和工作液对小鼠 1-细胞胚胎发育的影响.....	8
1. 材料与方法.....	8
1.1 实验动物.....	8
1.2 主要仪器与试剂.....	8
1.3 实验方法.....	8
2. 实验结果.....	9
2.1 实验 1: 显微注射对小鼠 1-细胞胚胎体外发育的影响.....	9
2.2 实验 2: 比较了注射后 1-细胞胚胎体外培养和中间受体体内培养的效果.....	9
2.3 实验 3: 比较了用 M2 和 mM2 工作液对显微注射胚胎移植的影响.....	10
3. 讨论.....	10
3.1 显微注射对小鼠 1-细胞胚胎体外发育的影响.....	10
3.2 体外培养和中间受体体内培养对注射后 1-细胞胚胎的效果.....	10
3.3 显微注射及移植工作液对妊娠率的影响.....	11
4. 小结.....	11

二、小鼠桑椹胚和早期囊胚玻璃化冷冻保存的研究	12
1. 材料与方法	13
1.1 实验动物	13
1.2 主要仪器与试剂	13
1.3 实验方法	13
2. 实验结果	14
2.1 实验 1: 一步法冷冻	14
2.2 实验 2: 二步法冷冻	15
2.3 实验 3: 体内培养与体外培养早期囊胚玻璃化冷冻效果比较	15
3. 讨论	16
3.1 一步法与二步法冷冻对不同发育阶段胚胎的保存效果	16
3.2 体外培养与体内培养对胚胎玻璃化冷冻效果的影响	16
4. 小结	16

图片

第二部分 哺乳动物胚胎体外培养和玻璃化冷冻保存研究——绵羊卵母细胞的体外受精、体外培养及早期囊胚的玻璃化冷冻

一、受精前卵丘细胞的剥离程度对卵母细胞体外受精和胚胎发育的影响	17
1. 材料与方法	17
1.1 主要仪器与试剂	17
1.2 实验方法	18
2. 实验结果	19
受精前卵丘细胞剥离处理对卵母细胞体外受精和胚胎发育的影响	19
3. 讨论	20
3.1 卵丘细胞与受精的关系	20
3.2 卵丘细胞与胚胎发育的关系	20
二、绵羊卵母细胞体外受精及受精卵的体外培养	21
1. 材料与方法	22
1.1 主要仪器与试剂	22
1.2 实验方法	22
2. 实验结果	23
2.1 实验 1: 不同浓度的肝素、咖啡因及受精时间对卵裂率的影响	23
2.2 实验 2: 牛磺酸对绵羊胚胎发育的影响	23
3. 讨论	24
3.1 不同浓度的肝素、咖啡因及受精时间对卵裂率的影响	24
3.2 不同浓度的牛磺酸对绵羊胚胎早期发育的影响	25

4. 小结.....	26
三、绵羊体外受精胚胎的冷冻保存.....	27
1. 材料与amp;方法.....	27
1.1 主要仪器与试剂	27
1.2 实验方法.....	28
2. 实验结果.....	29
2.1 实验 1: 体外受精胚胎的冷冻效果.....	29
2.2 实验 2: 不同解冻方法对绵羊体外受精早期囊胚玻璃化冷冻保存的影响.....	29
3. 讨论.....	30
3.1 不同冷冻方法对绵羊体外受精早期囊胚冷冻保存效果的影响.....	30
3.2 一步与二步解冻法对绵羊体外受精早期囊胚玻璃化冷冻保存的影响.....	30
4. 小结.....	30
图片	
结论.....	31
参考文献.....	32
英文摘要.....	37
附录 SOF 培养液配方.....	39
综述 简易高效的玻璃化冷冻保存技术.....	40

缩略词表
List of Abbreviations

缩略词	英文名称	中文名称
BSA	bovine serum album	牛血清白蛋白
COC	cumulus oocytes complex	卵丘卵母细胞复合体
DMSO	dimethyl sulphoxide	二甲基亚砷
EG	ethylene glycol	乙二醇
EDTA	editic acid	乙二胺四乙酸
EAA	essential amino acid	必需氨基酸
17 β -E ₂	17 β -estradiol	17 β -雌二醇
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
FCS	fetal calf serum	胎牛血清
Fic	Ficoll 70	聚蔗糖
FSH	follicle-stimulating hormone	促卵泡素
HCG	human chorionic gonadotrophlin	人绒毛膜促性腺激素
IVC	in vitro culture	体外培养
IVF	in vitro fertilization	体外受精
IVM	in vitro maturation	体外成熟
IVP	in vitro production	胚胎体外生产
LH	luteinizing hormone	促黄体素
NEA	nonessential amino acid	非必需氨基酸
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PMSG	pregnant mare serum gonadotrophlin	孕马血清促性腺激素
PVA	polyvinyl alcohol	聚乙烯醇
PVP	polyvinyl pyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
Suc	sucrose	蔗糖
SOF	synthetic oviductal fluid	合成输卵管液
TCM	tissue culture medium	组织培养液

哺乳动物胚胎体外培养和玻璃化冷冻保存的研究

专业：动物遗传育种与繁殖 研究方向：动物繁殖

硕士研究生：李建华

导师：张兆旺教授 郭志勤教授

摘 要

本文对小鼠和绵羊胚胎体外培养及玻璃化冷冻保存技术进行了研究。在改善胚胎发育环境的基础上，成功地对小鼠和绵羊体外培养胚胎进行了玻璃化冷冻保存。

小鼠胚胎体外培养过程中，存在典型的 2-细胞阻滞现象。在培养液 M2 和 M16 的基础上，除去葡萄糖和磷酸盐后添加果糖、牛磺酸、EDTA、谷氨酰胺、EAA 和 NEA，得到的 Δ mM2（不添加谷氨酰胺、EAA 和 NEA）、mM2（添加谷氨酰胺、EAA 和 NEA）、mM16 培养液均可有效克服 2-细胞阻滞现象。mM16 效果最好，可支持 80% 的 2-细胞发育至囊胚阶段，与其它各组差异显著（ $P < 0.01$ ）。mM2 比 Δ mM2 提高了 2-细胞胚胎的囊胚发育率（分别为 50% 和 46%），但差异不显著。M16+TE（M16 中同时添加 2.5mM 牛磺酸和 0.127 mM EDTA）组的囊胚率（63%）比 M16+T（M16 中添加 2.5mM 牛磺酸）（19%）显著提高（ $P < 0.01$ ），M16 中无一例可超过 8-细胞期。实验表明，谷氨酰胺、EAA 和 NEA 对胚胎的发育有促进作用，牛磺酸对克服昆明小鼠胚胎 2-细胞阻滞起决定性作用，而 EDTA 具有很好的协同作用。实验研究了影响小鼠显微注射胚胎发育的几个因素，结果表明，显微注射后 1-细胞胚胎体外发育的囊胚率为 35%，比未注射组（46%）降低，但无显著差异（ $P > 0.05$ ）；注射后胚胎体外培养（72h）的囊胚率（25%）比中间受体体内培养（72h）（38%）低，但差异不显著（ $P > 0.05$ ）；用 mM2 培养液作为显微注射及移植工作液，小鼠妊娠率为 62.5%，比用 M2 培养液（35.9%）显著提高（ $P < 0.05$ ）。用 EFS30 和 EFS40 玻璃化溶液对小鼠桑椹胚和早期囊胚进行了玻璃化一步法和二步法冷冻保存的研究，结果是早期囊胚用 EFS30 二步法平衡 2 分钟后直接投入液氮冷冻，胚胎解冻后获得的发育率最高（88.9%）；早期囊胚的发育率比桑椹胚好；二步法与一步法玻璃化冷冻保存相比，差异不显著（ $P > 0.05$ ）；体内培养获得的早期囊胚用二步法冷冻保存，解冻后胚胎的发育率与 1-细胞胚胎体外培养获得的早期囊胚相比，无显著差异（ $P > 0.05$ ）。

绵羊体外受精胚胎的发育阻滞发生在 8-16 细胞期。含有正常卵丘细胞的卵母细胞经成熟培养后, 受精前卵丘细胞的剥离程度对卵母细胞体外受精及胚胎发育无显著影响。卵母细胞在 10IU/ml 肝素与 10mmol/ml 咖啡因组受精 6h 移至培养液时, 受精效果最好, 囊胚率达 32.1%。牛磺酸对绵羊胚胎发育有促进作用, 5mM 牛磺酸适合绵羊胚胎体外发育的要求。mSOF 培养液与 TCM-199 相比, 囊胚率无显著差异。研究了不同冷冻方法对绵羊体外受精胚胎的保存效果和不同解冻方法对胚胎玻璃化冷冻效果的影响, 一步法玻璃化冷冻囊胚的存活率为 50%, 比二步法和慢速冷冻效果明显降低 ($P<0.05$); 二步法和慢速冷冻效果较好, 胚胎的存活率分别为 73%和 81%, 两者无显著差异; 玻璃化冷冻胚胎后, 一步解冻与二步解冻方法的胚胎发育率无显著差异 (分别为 76.5%和 80.0%)。

关键词: 发育阻滞; 体外培养; 玻璃化冷冻; 小鼠; 绵羊

引 言

哺乳动物体外受精及胚胎超低温冷冻保存技术是胚胎移植、胚胎分割、转基因和克隆等胚胎生物技术不可分割的组成部分。

1 体外受精的内容及意义

体外受精 (in vitro fertilization, IVF) 是指在体外环境完成精卵结合的过程。

目前, 受精过程的各个步骤都可在体外成功进行。例如, 卵母细胞的体外成熟、精子的体外获能、成熟卵母细胞和获能精子的体外受精、受精卵的体外培养以及配子和胚胎的冷冻保存等。体外受精研究的深入开展, 一方面加深了人们对受精机制的认识, 另一方面为动物育种、治疗人类不孕症提供了有利手段。

2 胚胎慢速冷冻和玻璃化冷冻保存技术的内容及意义

哺乳动物胚胎的慢速冷冻方法反映了最基本的低温生物学原理。当细胞内液体与冷冻保护液达到平衡后, 随着温度的下降冰晶就会形成。在正常情况下, 溶液在达到冰点时不结冰, 待降到冰点以下一定温度时才结冰, 这种现象叫过冷现象。在胚胎冷冻过程中, 过冷现象的产生会损伤胚胎。倘若出现过冷现象, 溶液在过冷状态下较低的温度温度结冰, 则水分子由于运动速度放慢, 可以逐渐排列成整齐的冰晶, 生成大的冰晶, 对细胞造成严重的损伤。为了防止过冷现象的发生, 可以在适当的温度诱发结晶。

玻璃化是指利用物理学原理将高浓度的冷冻保护剂急速降温后, 由液态转化为外形类似玻璃状的稳定而透明的非晶体化固体状态。玻璃化的固体保留了液体正常的分子和离子分布, 可以视为一种极为黏稠的超冷液体。玻璃化固体可以避免在细胞内形成冰晶而对细胞产生伤害。玻璃化冷冻法快速简单而高效。

3 胚胎体外培养和超低温冷冻保存中存在的问题

人们在使用合成培养液培养不同动物的胚胎时发现小鼠和大鼠在 2-细胞阶段, 兔、猪在 4-细胞阶段, 牛、绵羊等在 8-16 细胞都会出现发育停止的现象。为克服发育阻滞, 用体细胞 (输卵管上皮、颗粒细胞等) 与早期胚胎进行体外共培养, 在大多数动物上都可使胚胎发育至囊胚阶段。但共培养系统中有许多未知成分, 影响因素复杂。为进行有关实验和分析, 人们对培养液及培养系统加以改进, 将胚胎置于成分限定或清楚的人工合成或配制的培养液中进行培养, 并可在原有的培养液基础上, 加减某些成分以克服胚胎发育早期的阻滞现象。

常规的慢速冷冻法需诱发结晶, 按一定速率降温, 程序复杂费时间 (需要几小时),

而且还得使用价值昂贵的胚胎冷冻仪。玻璃化冷冻法与传统的冷冻方法相比,操作简便,冷冻处理时间大大缩短,而且不需要昂贵的控温冷冻仪。但是,玻璃化冷冻的适当条件也存在种间差异,胚胎的特性,例如大小、形状、细胞膜的特性和对抗冻剂毒性的敏感性不同而使冷冻效果不稳定。家畜胚胎的玻璃化冷冻保存技术目前还没有实现商业化生产,但这种冷冻方法有很大的潜力,提高胚胎存活率,冷冻、解冻和移植过程简化。

4 本研究的内容、目的和意义

本文分两部分,分别以小鼠和绵羊为实验动物,对胚胎体外培养和玻璃化冷冻保存技术进行了研究,寻找能够克服胚胎发育阻滞的培养液,进一步探讨不同动物玻璃化冷冻技术的最佳条件。

第一部分是昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养和胚胎的玻璃化冷冻保存研究。在这部分中,对培养系统进行优化,寻找到了能够克服 2-细胞胚胎发育阻滞的培养液,成功地克服了小鼠胚胎的发育阻滞现象;研究了显微注射、体内和体外培养环境及工作液对早期胚胎发育的影响,获得了可贵资料;采用玻璃化一步法和二步法对小鼠桑椹胚和早期囊胚进行冷冻保存,获得了较好的结果。小鼠实验的成功进行,为进一步对绵羊胚胎体外培养和冷冻保存奠定了基础。

第二部分是绵羊卵母细胞的体外受精、受精卵的体外培养及体外受精胚胎的冷冻保存研究。探讨了受精前卵丘细胞的剥离程度对卵母细胞体外受精和胚胎发育的影响;在体外受精实验中,研究了肝素和咖啡因不同浓度组合对受精的影响,筛选出了最佳获能和受精条件;对体外受精胚胎的培养过程中,以小鼠的实验结果为基础,研究了不同浓度的牛磺酸对胚胎发育的影响,优化了体外培养系统;在绵羊体外受精胚胎的冷冻保存实验中,对玻璃化冷冻方法与常规慢速冷冻法进行了比较,获得了较好的玻璃化冷冻结果。

胚胎体外培养环境的研究以及如何克服胚胎体外发育阻滞现象,将体外受精卵培养成生命力强的桑椹胚或囊胚一直是胚胎体外培养的重点。通过对小鼠和绵羊胚胎的玻璃化冷冻保存技术的研究,为胚胎冷冻保存技术提供科学依据。

第一部分 哺乳动物胚胎体外培养和玻璃化冷冻保存研究

——昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养和体外培养

桑椹胚及早期囊胚的玻璃化冷冻

一、克服昆明小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞的培养液研究

二、显微注射、培养环境和工作液对小鼠 1-细胞胚胎

发育的影响

三、小鼠桑椹胚和早期囊胚玻璃化冷冻保存的研究

一、克服昆明小鼠胚胎 2-细胞发育阻滞的培养液研究

摘要 实验对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养系统进行了优化,通过对胚胎体外操作工作液和培养液的改进,比较了几种培养液对克服昆明小鼠 2-细胞发育阻滞的效果。实验结果证明,在工作液 M2 及培养液 M16 的基础上,加减几种成分得到的改进 M2 培养液和改进的 M16 培养液(用 mM16 表示)均能有效克服 2-细胞阻滞现象。除去 M2 和 M16 中的葡萄糖和磷酸盐后添加 5.55mM(1g/L)果糖、2.5mM 牛磺酸、0.127mM EDTA、2mM 谷氨酰胺和 2%必需氨基酸(EAA)及 1%非必需氨基酸(NEA),均可支持体外培养的昆明小鼠 1-细胞胚胎发育至囊胚和孵化囊胚阶段。改进的 M2 分为 Δ mM2(不添加谷氨酰胺、EAA 和 NEA)和 mM2(添加谷氨酰胺、EAA 和 NEA)两种。实验 1 比较了不同工作液对 1-细胞胚胎体外培养的影响,结果表明,改进的工作液 mM2 提高了 1-细胞胚胎的体外发育率,但与对照组 M2 差异不显著。实验 2 比较了改进的 M2 培养液对克服昆明小鼠胚胎 2-细胞阻滞的效果, mM2 和 Δ mM2 显著提高了 2-细胞胚胎的囊胚发育率(分别为 50%和 46%),与对照组(囊胚率为 17%)差异显著($P<0.01$)。实验 3 比较了改进的 M16 培养液对克服昆明小鼠胚胎 2-细胞阻滞的效果,除去 M16 中的葡萄糖和磷酸盐后添加 5.55mM(1g/L)果糖、2.5mM 牛磺酸、0.127mM EDTA、2mM 谷氨酰胺和 2%必需氨基酸(EAA)及 1%非必需氨基酸(NEA),得到的 mM16 培养液对克服昆明小鼠胚胎 2-细胞阻滞的效果最佳,桑椹胚和囊胚发育率达 80%,与其它各组差异显著($P<0.01$)。M16+T(M16 中添 2.5mM 牛磺酸)和 M16+TE(M16 中同时添加 2.5mM 牛磺酸和 0.127 mM EDTA)均可支持体外培养的 1-细胞胚胎发育至囊胚,对照组 M16 中无一例可超过 8-细胞期。M16+TE 组的桑椹胚和囊胚率(64%和 63%)显著高于用 M16+T 培养液(39%和 19%)($P<0.01$)。通过比较分析认为,谷氨酰胺、EAA 和 NEA 对胚胎的发育有促进,牛磺酸对克服昆明小鼠胚胎 2-细胞阻滞起关键作用,而 EDTA 具有很好的协同作用。

关键词: 昆明白小鼠; 2-细胞阻滞; 谷氨酰胺; EAA 和 NEA; 牛磺酸; EDTA

哺乳动物早期胚胎发育的阻滞现象和克服阻滞及有关机理的研究一直受到关注,国内外学者作了大量的工作(Bavister et al.,1983;Chatot et al.,1989)。昆明白小鼠是国内研究工作最为广泛使用的实验动物之一,已被用于各方面的研究,但其早期胚胎发育中也存在典型的 2-细胞阻滞现象(尹海林等,1989),给有关的胚胎学工作带来一定的困难。为克服 2-细胞阻滞,在培养液中添加输卵管上皮(庞也非等,1990)或在 CZB 中培养仅能达到桑椹胚,经换液与输卵管上皮共培养后才能达到囊胚期(张守全等,1995)。因此有必要研究简单的、成分确定的可支持昆明白小鼠 1-细胞胚胎发育至囊胚的培养液。本实验为此进行了研究,发现了几种可有效克服昆明白小鼠胚胎 2-细胞发

育阻滞的培养液。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物

昆明白小鼠，5-8 周龄，新疆畜牧科学院农业部畜牧兽医生物技术重点开放实验饲养。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器

超纯水仪（法国 MILLIQ 公司） 渗透压仪（美国 ANC 公司）
电子天平（德国 Sartorius 公司）体视显微镜（日本 Olympus 公司）
倒置显微镜（德国 LEICA） CO₂ 培养箱（日本 BIO-LABO 公司）
干热灭菌箱（德国 Heraeus 公司）高压灭菌锅（上海医疗器械厂）
超净工作台（苏州医用器械厂）

1.2.2 试剂

BSA（美国 Sigma 公司） Hepes（美国 Sigma 公司）
石蜡油（美国 Sigma 公司） 乳酸钠（美国 Sigma 公司）
透明质酸酶（美国 Sigma 公司） 牛磺酸（美国 Sigma 公司）
EAA 和 NEA（美国 Gibco 公司）丙酮酸钠（天象人生物工程有限责任公司）
谷氨酰胺（华美生物工程公司） EDTA（武汉市化学试剂公司）
PMSG（天津市华孚高新生物技术公司） HCG（宁波市激素制品厂）

1.2.3 培养液及添加成分

所用培养液共 6 种：

A: M2;

B: Δ mM2，即在 M2 的配方中除去葡萄糖和磷酸盐，添加 5.55mM（1g/L）果糖、2.5mM 牛磺酸、0.127mM EDTA;

C: mM2，即在 Δ mM2 的配方中加入 2mM 谷氨酰胺，2%（V/V）EAA 和 1%（V/V）NEA;

D: M16;

E: M16+T，即在 M16 的配方中加入 2.5mM 牛磺酸;

F: M16+TE，即在 M16+T 中加入 0.127mM EDTA;

G: mM16, 即在 M16 的配方中除去葡萄糖和磷酸盐, 添加 5.55mM (1g/L) 果糖、2.5mM 牛磺酸、0.127mM EDTA、2mM 谷氨酰胺、2% (V/V) EAA 和 1% (V/V) NEA。

培养液配方见表 1。以上培养液用超纯水配制, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

表 1 几种基本的小鼠胚胎培养液组成

Table 1 Components of the media used for culturing of mouse embryos(mg/100ml)

成分	分子量	培 养 液						
		M2*	Δ mM2*	mM2*	M16*	M16+T*	M16+TE*	mM16*
NaHCO ₃	84.02	4.15/34.9			25.0/210.1			
Hepes	238.3	20.85/496.9			-			
葡萄糖	198.17	5.56/110.2	-	-	5.56/110.2	5.56/110.2	5.56/110.2	-
KH ₂ PO ₄	136.1	1.19/16.2	-	-	1.19/16.2	1.19/16.2	1.19/16.2	-
牛磺酸	125.1	-	2.50/31.3	2.50/31.3	-	2.50/31.3	2.50/31.3	2.50/31.3
EDTA	292.25	-	0.127/2.9	0.127/2.9	-	-	0.127/2.9	0.127/2.9
果糖	180.16	-	5.55/100	5.55/100	-	-	-	5.55/100
谷氨酰胺	146.15	-	-	2.00/29.2	-	-	-	2.00/29.2
EAA(50x)2%(V/V)	-	-	-	2%(V/V)	-	-	-	2%(V/V)
NEA(100x)1%(V/V)	-	-	-	1%(V/V)	-	-	-	1%(V/V)

*mmol/(mg/100ml)

附: 培养液中相同成分的分子量及浓度 (mmol/ (mg/100ml)):

NaCl (58.45, 94.66/553.3), KCl (74.56, 4.78/35.6), CaCl₂ (147.2, 1.71/25.2),

MgSO₄ (246.5, 1.19/29.3), 60%乳酸钠 (112.1, 23.28/0.35ml), 丙酮酸钠 (110, 0.33/3.6), BSA (-, 400mg), 青霉素 (6.0mg), 链霉素 (5.0mg), 1% (酚红)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物的处理

供试鼠饲养条件为人工控温 22-26 $^{\circ}$ C, 14L: 10D 光照, 自由饮水采食。取 5-8 周龄的雌鼠经腹腔注射 7.5-10IU 的 PMSG, 间隔 46h 后腹腔注射同样剂量的 HCG, 注射 HCG 后与公鼠合笼, 次日上午检查阴栓, 有栓者于注射 HCG 后 19-23h 断颈处死, 分离取出输卵管部分。分别置于工作液中, 撕开膨大部, 使卵丘卵母细胞复合体 (COC) 团流出,

分别经含 300IU/ml 透明质酸酶的 mM2 和 Δ mM2 工作液处理, 吹打并经胚胎吸管移入 3 次各 0.5ml 的工作液洗后就可进行培养。

1.3.2 1-细胞胚胎的培养

1.3.2.1 实验 1: 不同工作液对 1-细胞胚胎体外培养的影响

用 M2 和 mM2 工作液收集的胚胎, 分别加入经 CO₂ 培养箱平衡 2h 的 mM16 培养液中。胚胎培养用 $\Phi=35\text{mm}$ 培养皿 (Nunc 公司出品) 覆盖 30ul 石蜡油的培养液小滴中放入 15-20 枚胚胎, 于 37°C, 5%CO₂, 95%空气, 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 72-96h, 每 24 小时取出观察记录 1 次发育情况。

1.3.2.2 实验 2: 不同的 M2 培养液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响

收集洗净的用 mM2 处理的 1-细胞随机分组, 分别加入经过 CO₂ 培养箱平衡 2h 的 A、B 和 C 培养液中, 培养条件同实验 1。

1.3.2.3 实验 3: 不同的 M16 培养液对昆明小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞的影响

收集洗净的用 mM2 处理的 1-细胞随机分组, 分别加入经过 CO₂ 培养箱平衡 2h 的 D、E、F 和 G 培养液中, 培养条件同实验 1。

1.4 统计方法

实验 1 重复 3 次, 实验 2 和 3 重复 5 次。结果用 X² 检验进行统计学处理。

2 实验结果

2.1 实验 1: 不同工作液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响

比较了不同工作液 mM2 和 M2 对 1-细胞胚胎体外培养的影响, 结果见表 2:

表 2 不同工作液对 1-细胞胚胎体外培养的影响 (96-120h)

Table 2 Effects of different operation media on the development of 1-cell mouse embryos in vitro(96-120h)

培养液	工作液	培养胚胎数	发育阶段 (%)			
			2 细胞	4 细胞	桑椹胚	囊胚
mM16	mM2	80	75(94)a	68(85)a	64 (80) a	61(76)a
	M2	76	62(82)a	52(68)a	61 (76) a	49(64)a

注: 同一列相同字母标记表明差异不显著 ($P>0.05$); 不同字母标记表明差异显著 (a:b($P<0.05$),a:c($P<0.01$)), 下同。

从表 2 可以看出,用 mM2 作为胚胎收集和清洗工作液,可以提高 1-细胞胚胎的体外发育率,但与对照组无显著差异 ($P>0.05$)。

2.2 实验 2: 不同的 M2 培养液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响

比较了不同 M2 培养液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响,结果见表 3:

表 3 改进的 M2 培养液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响

Table3 Effects of different M2 media on the development of 1-cell mouse embryos in vitro(96-120h)

培养液	培养胚胎数	发育阶段(%)			
		卵裂胚数/培养胚数		胚胎数/卵裂胚数	
		2 细胞	4 细胞	桑椹胚	囊胚
mM2	113	98/113 (87) a	80/98 (82) a	57/98 (58) a	55/98 (56) a
Δ mM2	134	114/134 (85) a	88/114 (77) ab	57/114 (50) a	52/114 (46) a
M2	106	84/106 (79) a	52/84 (62) c	16/84 (19) c	14/84 (17) c

a:b($p<0.05$) a:c($p<0.01$)

从表 3 可以看出,采用 mM2 和 Δ mM2 培养液均能克服昆明小鼠胚胎的 2-细胞阻滞现象,两种培养液的桑椹胚和囊胚发育率均显著高于对照组 ($P<0.01$), mM2 培养液比 Δ mM2 的桑椹胚和囊胚发育率高,但无显著差异。

2.3 实验 3: 不同的 M16 培养液对克服昆明小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞的影响

比较了不同 M16 培养液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响,结果见表 4:

表 4 改进的 M16 培养液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养的影响

Table4 Effects of different M16 media on the development of 1-cell mouse embryos in vitro(96-120h)

培养液	培养胚胎数	发育阶段(%)			
		卵裂胚数/培养胚数		胚胎数/卵裂胚数	
		2 细胞	4 细胞	桑椹胚	囊胚
MM16	170	157/170 (92) a	146/157 (93) a	126/157 (80) a	126/157 (80) a
M16+TE	244	220/244 (90) a	197/220 (90) a	141/220 (64) c	139/220 (63) c
M16+T	107	95/107 (89) a	46/95 (48) c	37/95 (39) e	18/95 (19) e
M16	152	112/152 (74) c	28/112 (25) e	0	0

从表 4 可以看出, mM16, M16+TE 和 M16+T 均能使小鼠 1-细胞胚胎发育至囊胚, 对照组 M16 中无一例可超过 8-细胞期; mM16 效果最佳, 可支持 80%的 2-细胞胚胎发育至囊胚, 桑椹胚和囊胚率显著高于其他组 ($P<0.01$); M16+TE 中, 2-细胞胚胎的桑椹胚和囊胚发育率 (64%和 63%) 显著高于 M16+T 培养液 (39%和 19%) ($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 不同工作液对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外发育的影响

本研究的目的是优化昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养系统, 寻找能够克服 2-细胞胚胎体外发育阻滞的培养液。实验 1 用不同工作液进行胚胎体外收集和清洗, 结果表明, 1-细胞胚胎的体外发育受工作液的影响, 改进的工作液 mM2 提高了 1-细胞胚胎的体外发育率。小鼠的胚胎在 2-细胞阶段会出现发育停止的现象, 因此胚胎体外操作所用工作液对胚胎越过阻滞期影响较大。Schini 等 (1998) 认为, 磷酸和葡萄糖是导致仓鼠胚胎 2-细胞阻滞的直接因素。也证实大鼠 1-细胞胚胎, 暴露于磷酸和葡萄糖后, 也不能发育至 8-细胞阶段。Sakas 等 (1993) 用果糖代替 M16 培养液中的葡萄糖培养远交系和近交系小鼠的 2-细胞胚胎可突破 2-细胞阻滞。王敏康 (2000) 在进行 1-细胞胚胎体外培养时, 用除去葡萄糖和磷酸盐的 M2 工作液进行胚胎体外收集和清洗。

3.2 谷氨酰胺、EAA 和 NEA 对昆明小鼠 1-细胞胚胎体外发育的影响

Riger 等 (1991) 认为谷氨酰胺对于胚胎的代谢和囊胚的形成起重要作用。Matsumoto 和 Sugawara (1995) 用不含磷酸和葡萄糖的 HECM 培养液 (仓鼠胚胎培养液) 在添加 EAA 和 NEA 后, 可很好地支持大鼠 1-细胞胚胎在体外发育至囊胚阶段。添加 EAA 和 NEA 后, 大鼠 1-细胞胚胎体外发育的囊胚率可达 60% (Miyoshi et al., 1995)。在培养液中单独加入 EAA (不加谷氨酰胺) 对小鼠、仓鼠、绵羊和牛胚胎有抑制作用 (Gardner lane, 1993c; Bavister, 1993; Thompson et al., 1991; ZiShu liu, 1995a)。但是 Spindle 和 Pederson (1972) 报道, 培养液中除去组氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、色氨酸和缬氨酸, 小鼠的胚胎孵化率下降, 而这些氨基酸都是 EAA 中的成分。Zhang 和 Armstrong (1990) 报道, 在基础液中加入 1X EAA 有利于大鼠胚胎的发育。Thompson et al. (1991) 报道在无血清的 SOF 培养液中加入 NEA 促进绵羊囊胚的形成并可增加囊胚细胞数。本实验也证实, 在 Δ mM2 中加入 2mM 谷氨酰胺、2%EAA (50 \times) 和 1% (100 \times) NEA 浓度组合, 得到的 mM2 提高了 1-细胞胚胎的体外发育率, 桑椹胚率从 50%提高到 58%, 囊胚发育率从 46%提高到 56%, 但差异不显著。

3.3 牛磺酸和 EDTA 对克服昆明白小鼠胚胎 2-细胞发育阻滞的影响

在体外培养系统中,各种因子与胚胎之间的相互作用和影响非常复杂,这是由于正常体内胚胎生长环境的复杂性和不断变化的各种因素所决定的。牛磺酸的作用具有普遍性,牛磺酸及亚牛磺酸对体外培养的仓鼠、小鼠、兔和猪等胚胎发育均有促进作用,而且在母畜生殖道内和胚胎中的浓度都很高(Meizei, 1980; Miller 和 Schultz, 1987)。Spindle (1995)认为,牛磺酸可能具有三方面的作用:(1)通过减弱有毒物质或通过渗透调节保护细胞膜;(2)抗诱变的效应;(3)可以和胰岛素受体结合起胰岛素样作用。EDTA 对小鼠和大鼠通过 2-细胞阻滞有积极作用(Abramczuck et al., 1977; Mehtla 和 Kiessling, 1993; Mehtla, 1990; 张守全等, 1993)。高建明等(1996)也发现 EDTA 可以促进牛囊胚发育。实验 3 在 M16 中添加牛磺酸和 EDTA 可突破昆明小鼠 2-细胞阻滞的实验结果也说明,由于葡萄糖和磷酸引起的 2-细胞阻滞可能在牛磺酸和 EDTA 存在下可被减弱和抵消;在 M16 中仅添加牛磺酸也可支持 19%的 2-细胞胚胎发育至囊胚。证实了牛磺酸对克服胚胎发育阻滞的重要性,而 EDTA 具有很好的协同作用,并促进胚胎发育。因此, M16 中除去葡萄糖和磷酸盐,添加果糖、牛磺酸、EDTA、2mM 谷氨酰胺、EAA 和 NEA 得到的 mM16 对克服 2-细胞胚胎发育阻滞的效果最好,与王敏康(2000)的实验结果相近。这种培养液成分质与量相互作用与影响的现象,也反映了胚胎发育与环境相互作用的复杂性。

在有助于克服昆明白小鼠和和其它小鼠 2-细胞阻滞的牛磺酸和 EDTA 作用下,原本阻碍 2-细胞胚胎发育的磷酸和葡萄糖,并不表现阻碍作用,且在后期阶段有利胚胎的发育。这从实验 2 M16+TE 组中胚胎发育的速度在接近桑椹胚阶段明显快于不含磷酸盐和葡萄糖的 mM16、mM2 和 Δ mM2 培养液组中得到证明。因此可以认为较低浓度的磷酸,有利于胚胎的后期发育。

4 小结

4.1 胚胎体外操作工作液影响 1-细胞胚胎的发育,改进的工作液 mM2 提高了体外胚胎发育率。

4.2 谷氨酰胺、EAA 和 NEA 对胚胎发育有促进作用。

4.3 牛磺酸在克服昆明小鼠胚胎发育的 2-细胞阻滞中起关键作用,而 EDTA 具有很好的协同作用,并且可提高胚胎的发育率。

二、显微注射、培养环境和工作液 对小鼠胚胎发育的影响

摘要 实验研究了影响小鼠显微注射 1-胚胎发育的几个因素。实验结果表明,显微注射后 1-细胞胚胎体外发育的囊胚率为 35%,比未注射组(46%)降低,但无显著差异($P>0.05$);注射后胚胎体外培养(72h)的囊胚率(25%)比中间受体体内培养(72h)(38%)低,差异不显著($P>0.05$);用 mM2 培养液作为显微注射及移植工作液,小鼠妊娠率为 62.5%,比用 M2 培养液(35.9%)显著提高($P<0.05$)。

关键词: 显微注射 培养环境 工作液 1-细胞胚胎 小鼠

运用原核显微注射法生产转基因动物是国内外使用最多的一种方法。该方法最先用于培育转基因小鼠。自 Gordon (1980) 成功地将外源基因注射到小鼠受精卵的雄原核,并获得转基因小鼠以来,许多报道相继证明利用显微注射法可以将外源基因稳定地整合到家畜基因组(Krimpenfort, 1991; Hill, 1992; Wall, 1992)。近年来,越来越多的实验室开展小鼠转基因的研究,以期促进基因治疗的临床应用。但影响显微注射胚胎发育的因素很多,显微注射胚胎移植后妊娠、产仔率不高,影响转基因的效率。本实验从显微注射对小鼠胚胎体外发育的影响、体外培养和体内培养以及不同工作液对显微注射及移植的影响三个方面进行了研究,以期对生产转基因动物提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 (同一)

1.2 主要仪器与试剂 (同一)

1.3 实验方法

1.3.1 显微注射

用于显微注射的基因是乳球蛋白调控序列与人胰岛素原基因组成,线性 DNA 溶解于 10mM Tris-HCl (pH8.0) 和 0.15mM EDTA 缓冲液中,浓度为 2ng/ul,于-20℃分装储存。在微分干涉相差倒置显微镜下选择原核清晰的 1-细胞胚胎进行注射,注射后的胚胎移入 Δ mM2 培养液中进行培养或待移植。

1.3.2 体外培养

胚胎加入经过 CO₂ 培养箱平衡 2h 的 Δ mM2 培养液中,未注射胚胎为对照组,胚

胎培养方法和条件同一。

1.3.3 受体小鼠处理及胚胎移植

供试受体小鼠为 6 周-5 个月已产仔并成功的小鼠，与供体在相同时间注射 5IU 剂量的激素，注射 HCG 后与结扎公鼠合笼。注射 HCG 后第二天上午检查阴栓，有栓受体待胚胎显微注射后进行移植。将受体麻醉，把胚胎移入输卵管，每只移 20-30 枚，第 4 天 (72h) 冲胚，记录发育情况。

1.4 统计方法

实验重复三次，结果用 X^2 检验进行统计学处理。

2 实验结果

2.1 实验 1：显微注射对小鼠 1-细胞胚胎体外发育的影响

研究了显微注射对小鼠 1-细胞胚胎体外发育的影响，结果见表 1：

表 1 显微注射对小鼠 1-细胞胚胎体外发育的影响

Table 1 in vitro development of DNA-injected VS non-treated mouse zygotes

组别	培养胚胎数	囊胚数 (%)
显微注射组	125	44 (35) a
对照组	134	61 (46) a

从表 1 可以看出，显微注射组的囊胚率 (35%) 比对照组的 (46%) 有所下降，但差异不显著 ($p>0.05$)。

2.2 实验 2：注射后 1-细胞胚胎体外培养和中间受体体内培养的效果

比较了注射后 1-细胞体外培养和中间受体体内培养效果，结果见表 2：

表 2 注射后 1-细胞体外培养和中间受体体内培养效果比较 (72h)

Table 2 in vitro vs in vivo culture of DNA-injected 1-cell mouse embryos

组别	培养胚胎数	发育阶段 (%)			
		2-细胞	4-细胞	桑椹胚 (%)	囊胚 (%)
体外培养	93	79 (85)	76 (82) a	47 (51) a	23 (25) a
体内培养	55	53 (96)	51 (93) a	33 (60) a	21 (38) a

从表 2 可以看出，1-细胞胚胎体外培养和体内培养囊胚率没有差异 (25%和 38%， $p>0.05$)，但体外培养的囊胚率低。

2.3 实验 3: 用 M₂ 和 mM₂ 工作液对显微注射胚胎移植效果的影响

比较了结果见表 3:

表 3 用 M₂ 和 mM₂ 培养液作为显微注射及移植工作液妊娠、产仔结果

Table 3 Effects of different microinjection and transfer operation media on the pregnant rate

工作液	移植受体数	妊娠受体数	产仔总数	妊娠率	平均产仔数
mM ₂	24	15	67	62.5% ^a	4.47 ^a
M ₂	64	23	137	35.9% ^b	5.96 ^a

a:b(p<0.05)

从表 3 可以看出, 用改进的培养液 mM₂ 作为显微注射及移植工作液, 妊娠率为 62.5%, M₂ 组的妊娠率为 35.9%, mM₂ 显著提高了移植妊娠率 (p<0.05); mM₂ 组平均产仔数为 4.5, 比 M₂ 组 (5.96) 低, 但差异不显著 (p>0.05)。

3 讨论

3.1 显微注射对 1-细胞胚胎体外发育的影响

实验 1 中, 注射外源 DNA 后, 小鼠受精卵体外发育到囊胚的能力有所下降, 但与未注射组相比无显著差异, 以前的研究中有类似的报道 (Krimpenfort, 1991; Hyttinen, 1994; Han, 1996; Ito, 1998)。在原核注射外源 DNA 的过程, 会对胚胎造成一些物理损伤, 如对透明带和细胞质膜的损伤。但也有报道表明这些损伤及外源 DNA 的缓冲溶液不会影响胚胎的发育 (Peura, 1995), 这些不同的结果可能是由于不同的实验方法和标准所致。据报道, 用显微注射法将外源 DNA 注入到小鼠受精卵原核时, 60%-70%的胚胎可以成活, 移植后 10%-15%可以产出小鼠, 在这些小鼠中约 25%具有外源基因。本实验中用于注射胚胎的体外培养液是 Δ mM₂, 囊胚率为 35%, 根据一 (2.2 和 2.3) 的研究结果, 注射后 1-细胞体外培养的囊胚率还可随着培养液的改进而提高。

3.2 体外培养和中间受体体内培养对注射后 1-细胞胚胎的效果

为提高转基因效率, 近期目标是改进目前的转基因技术程序, 如利用体外受精技术降低胚胎生产成本, 建立阳性胚胎选择技术, 降低胚胎移植受体和后代的检测成本。实验 2 中注射后 1-细胞胚胎体外培养的囊胚发育率比体内培养低, 但无显著差异, 而且体外培养的囊胚率还可随着培养液的改进而提高。这可为生产转基因动物, 提高转基因效率提供参考。

3.3 显微注射及移植工作液对妊娠率的影响

实验 3 中,用改进的培养液 mM2 作为显微注射及移植工作液显著提高了移植妊娠率。小鼠胚胎发育中存在典型的 2-细胞阻滞现象。Schini 等(1995)认为,磷酸和葡萄糖是导致仓鼠胚胎 2-细胞阻滞的直接因素。Matsumoto 和 Sugawara(1995)也证实大鼠 1-细胞胚胎,暴露于磷酸和葡萄糖后,也不能发育至 8-细胞阶段。一(2.1 和 2.2)的结果显示,改进的培养液 mM2 作为工作液可以提高 1-细胞胚胎的体外发育率, mM2 用于体外培养小鼠 1-细胞胚胎,其囊胚发育率显著高于用 M2 培养液。实验 3 进一步证实了磷酸和葡萄糖对胚胎发育的阻滞作用,工作液影响胚胎的发育。

4 小结

- 4.1 小鼠 1-细胞胚胎原核显微注射外源 DNA 后的发育能力下降,但无显著影响。
- 4.2 体外培养可以代替中间受体培养小鼠显微注射 1-细胞胚胎。
- 4.3 改进的工作液 mM2 显著提高了显微注射胚胎的移植妊娠率。

三、小鼠桑椹胚和早期囊胚玻璃化冷冻保存的研究

摘要 用 EFS30 和 EFS40 玻璃化溶液对小鼠桑椹胚和早期囊胚进行了玻璃化冷冻保存的研究。1-细胞胚胎体外培养获得的桑椹胚和早期囊胚,用 EFS30 和 EFS40 分别进行一步法和二步法冷冻。结果是早期囊胚在 10%EG (乙二醇) 溶液中预先处理 5min, 然后移入预先配制好含有 EFS30 的 0.25ml 塑料细管中, 平衡 2min 后直接投入液氮冷冻, 胚胎解冻后获得的发育率最高 (88.9%)。早期囊胚的发育率比桑椹胚好。二步法与一步法玻璃化冷冻保存相比, 差异不显著 ($P>0.05$)。体内培养获得的早期囊胚用两步法冷冻保存, 解冻后胚胎的发育率与 1-细胞胚胎体外培养获得的早期囊胚相比, 无显著差异 ($P>0.05$)。

关键词: 早期囊胚; 玻璃化冷冻; 乙二醇; 小鼠

哺乳动物胚胎的超低温冷冻保存技术, 不仅对动物种质资源的保存和良种家畜的国际交流提供了简单有效的手段, 而且还是胚胎移植、体外受精、转基因和克隆等胚胎生物技术不可分割的组成部分。但是, 传统的胚胎冷冻方法需诱发结晶, 按一定速率降温, 不仅程序复杂费时间 (需几小时), 而且需要价格昂贵的胚胎冷冻仪。因此, 探索简单高效的胚胎保存技术一直是冷冻生物学研究的前沿课题之一。Rall 等 (1985) 发明了胚胎玻璃化冷冻方法, 胚胎先在高浓度抗冻剂 (6mol/L) 溶液中脱水 and 抗冻剂渗入后, 直接投入液氮中保存。在急速降温的过程中, 抗冻液变得粘稠, 形成无冰晶的玻璃化状态。与传统的冷冻方法相比, 这种方法操作简便, 冷冻处理时间大大缩短。但用 DMSO (二甲基亚砷)、乙酰胺、丙二醇、聚乙二醇等作为抗冻剂, 溶液的毒性较大, 胚胎需在低温下多步平衡后, 才能投入液氮中保存, 并且结果不稳定。Kasai 等 (1990) 利用化学毒性较低的乙二醇作为细胞内液抗冻剂, 聚蔗糖和蔗糖作为细胞外液抗冻剂配制而成的玻璃化溶液 EFS40, 成功地对小鼠桑椹胚和扩张囊胚进行了冷冻保存。Zhu 等 (1993) 采用乙二醇作为预处理液, 二步法对小鼠囊胚进行冷冻保存, 解冻后胚胎发育率达 94%。Tachikawa 等 (1993) 用该玻璃化溶液进行了牛体外受精囊胚冷冻保存获得成功, 但移植妊娠率不高。目前, EFS40 抗冻液已成功用于小鼠的原核至扩张囊胚 (Miyake et al., 1993)、家兔桑椹胚 (Kasai et al., 1992)、牛体外受精囊胚 (Tachikawa et al., 1993; Mahmoudzadeh et al., 1995) 和 马的囊胚 (Hochi et al., 1994) 等的冷冻保存。本实验根据朱士恩等的上述方法, 在室温 (22℃) 下采用玻璃化一步法和二步法, 将小鼠胚胎于不同的 EFS 溶液中平衡不同时间后, 直接投入液氮中, 对胚胎的一步法和两步法冷冻保存技术

作进一步研究，为玻璃化冷冻保存技术提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物（同一）

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 仪器（同一）

1.2.2 试剂

乙二醇（EG）（美国 Sigma 公司） 聚蔗糖（Ficoll 70）（美国 Sigma 公司）

蔗糖（Suc）（北京化工厂）

其它同一

1.2.3 有关溶液配制

配制玻璃化溶液的基础液 mPBS: PBS +0.3+0.3mM 丙酮酸钠+3.3mM 葡萄糖

玻璃化溶液 EFS30: 30%（V/V）EG+30%（W/V）Fic+0.5M Suc+mPBS

玻璃化溶液 EFS40: 40%（V/V）EG+30%（W/V）Fic+0.5M Suc+mPBS

0.5M 蔗糖溶液: 3.424g Suc+10%（V/V）FCS+20ml mPBS

10%EG: 10%（V/V）EG+10%（V/V）FCS+ mPBS

1.2.4 胚胎来源

1.2.4.1 体外培养胚胎的获得（同一）

1.2.4.2 体内胚胎的获得

5-8 周龄的雌鼠分别用 10 IU PMSG 和 HCG 隔 46h 腹腔注射后，与公鼠合笼，注射 HCG 后 84-96h，断颈处死，将子宫分离后用冲胚，体视显微镜下收集胚胎，移入 mM2 中备用。

1.3 实验方法

1.3.1 一步法冷冻 将胚胎直接移入预先配制玻璃化溶液 0.25ml 的塑料细管中，平衡 1min 或 2min 后，直接投入液氮中。

1.3.2 二步法冷冻 胚胎在在 10%EG 溶液中预先平衡 5min，然后将胚胎移入预先配制含 0.25ml 玻璃化溶液的塑料细管中，平衡 30s 或 2min，投入液氮中。

1.3.3 体内培养与体外培养 1-细胞胚胎获得的早期囊胚玻璃化冷冻效果比较 用 EFS30 二步法平衡 2min 冷冻。

1.3.4 解冻 将冷冻细管从液氮中取出，迅速投入 37℃ 水中，解冻约 10s 取出（当蔗糖溶液部分由乳白变为透明时取出），用吸水纸将细管水珠拭净，剪掉细管两端的栓部，

用 1ml 的注射器把细管中的胚胎冲出, 置于盛有 0.5M 蔗糖溶液的表面皿中, 平衡 5min, 再用 mM2 洗净待培养。

1.3.5 培养 胚胎解冻脱抗冻剂后, 经观察形态正常者, 移入在 CO₂ 培养箱中平衡 2h 覆盖石蜡油的 30ul mM16 培养液小滴中, 培养 24-48h, 培养条件同一, 记录胚胎发育情况。

1.4 统计分析

百分数之间的比较用 X² 检验。

2. 实验结果

2.1 实验 1: 一步法冷冻

胚胎在 EFS30 溶液中的冷冻效果比在 EFS40 中好。其中桑椹胚在 EFS30 中平衡 2min 后冷冻保存, 解冻后的胚胎发育率为 78.9%, 高于早期囊胚 EFS30 中平衡 2min 后冷冻的效果 (发育率为 67.5%)。结果见表 1 和表 2:

表 1 小鼠桑椹胚用 EFS30 和 EFS40 一步法冷冻后的发育率

Table 1 Development rate of mouse morulae after one-step vitrification with EFS30 and EFS40

玻璃化溶液	平衡时间	回收胚胎数/冷冻胚胎数	发育胚数 (%)	孵化囊胚数 (%)
EFS30	1min	41/44	31 (75.6) a	11 (26.8) a
	2min	38/42	30 (78.9) a	16 (42.1) a
EFS40	1min	40/43	29 (72.5) a	12 (30.0) a
	2min	43/45	29 (67.4) a	13 (30.2) a

表 2 小鼠早期囊胚用 EFS30 和 EFS40 一步法冷冻后的发育率

Table 2 Development rate of mouse early blasycysts after one-step vitrification with EFS30 and EFS40

玻璃化溶液	平衡时间	回收胚胎数/冷冻胚胎数	发育胚数 (%)	孵化囊胚数 (%)
EFS30	1min	33/67	21 (63.6) a	8 (24.2) a
	2min	40/44	27 (67.5) a	11 (27.5) a
EFS40	1min	35/38	21 (60.0) a	10 (28.6) a
	2min	40/45	22 (55.0) a	9 (22.5) a

2.2 实验 2: 二步法冷冻

将胚胎在 10%EG 溶液中预先平衡后, 再移入 EFS30 和 EFS40 处理不同时间后, 投入液氮中保存, 其中早期囊胚在 EFS30 中平衡 2min 冷冻效果最佳, 发育率达 88.9%, 孵化率也上升到 66.7%。结果见表 3 和表 4:

表 3 小鼠桑椹胚用 EFS30 和 EFS40 二步法冷冻后的发育率

Table 3 Development rate of mouse morulae after two-step vitrification with EFS30 and EFS40

预处理	时间	玻璃化溶液	平衡时间	回收胚/冷冻胚数	发育胚数 (%)	孵化囊胚数 (%)
10%EG	5min	EFS30	1min	29/32	20(68.9)a	11(37.9)a
			2min	32/36	23(71.9)a	13(40.6)a
		EFS40	1min	40/45	28(70.0)a	13(32.5)a
			2min	35/38	23(65.7)a	9(25.7)a

表 4 小鼠早期囊胚用 EFS30 和 EFS40 二步法冷冻后的发育率

Table 4 Development rate of mouse early blasycysts after two-step vitrification with EFS30 and EFS40

预处理	时间	玻璃化溶液	平衡时间	回收胚/冷冻胚数	发育胚数(%)	孵化囊胚数(%)
10%EG	5min	EFS30	1min	36/40	32 (88.9) a	24 (66.7) a
			2min	35/37	25 (71.4) ab	12 (34.3) c
		EFS40	1min	38/43	28 (73.7) ab	12 (31.6) c
			2min	32/35	20 (62.5) b	9 (28.1) c

2.3 实验 3: 体内培养与体外培养早期囊胚玻璃化冷冻效果比较, 结果见表 5:

表 5 体内培养/体外培养早期囊胚玻璃化冷冻后的发育率

Table 5 Development rate of early blastocysts in vitro vs in vivo after vitrification

组别	回收胚/冷冻胚数	发育胚胎数 (%)	孵化囊胚数 (%)
体内	27/30	25 (93) a	19 (70) a
体外	30/35	25 (83) a	19 (63) a

体外培养 1-细胞胚胎获得的早期囊胚用 EFS30 二步法, 平衡 2min 后进行玻璃化冷冻, 胚胎发育率 (93%) 比体内培养 (83%) 降低, 两组间无显著差异 ($P>0.05$),

3 讨论

3.1 一步法与二步法冷冻对不同发育阶段胚胎的保存效果

本实验采用分子量小、渗透性强、化学毒性较低的乙二醇作为细胞内液抗冻剂, 不可渗的低分子量蔗糖和大分子量聚蔗糖作为细胞外液抗冻剂配制的玻璃化溶液 EFS30 和 EFS40 进行冷冻。不论是一步法还是二步法玻璃化冷冻胚胎, 随着胚胎在 EFS40 溶液中平衡时间的延长, EFS40 溶液对胚胎的毒性增大。EFS30 对胚胎的毒性 EFS40 低, EFS30 二步法冷冻获得了较高的胚胎发育率。这与 Mahmoudzaden 等 (1995) 的结果一致。因为乙二醇浓度高时, 渗透压的作用使过多的乙二醇迅速通过细胞膜, 高浓度的冷冻剂会对胚胎细胞的骨架造成不可逆转的损害, 特别是对于低级阶段的胚胎 (Overstrom, 1993; Dobrinsky, 1996)。本实验结果也表明, 胚胎的发育阶段不同, 玻璃化冷冻的效果不同。早期囊胚二步法冷冻效果较好, 造成这种结果的原因可能是桑椹胚的细胞要比囊胚细胞大, 使它们更易受渗透压损伤 (Tachikawa, 1993), 而且囊胚腔形成后, 胚胎的细胞膜对渗透压损伤和毒害的抵抗力增强。

3.2 体外培养与体内培养对胚胎玻璃化冷冻效果的影响

2.3 的结果表明, 体外培养 1-细胞胚胎获得的早期囊胚用 EFS30 二步法冷冻, 胚胎发育率与体内培养获得的早期囊胚相比, 无显著差异 ($P>0.05$), 但有所下降。说明经体外培养 1-细胞胚胎获得的囊胚, 对冷冻解冻的敏感性没有受到明显的影响, 质量没有明显下降。

4 小结

4.1 平衡时间延长, 玻璃化液对胚胎的损伤增加。

4.2 低浓度的玻璃化液 EFS30 降低了对胚胎的毒性伤害。

4.3 二步法玻璃化冷冻胚胎可以减弱抗冻保护剂的化学毒性, 提高胚胎的发育率。

4.4 体外培养 1-细胞胚胎获得的囊胚对冷冻解冻的敏感性与体内培养相比, 无显著差异。

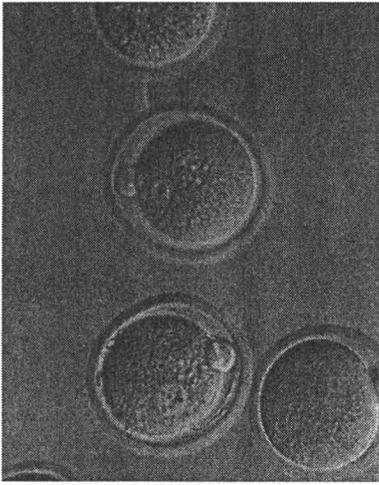


图1 小鼠体内受精
1-细胞胚胎

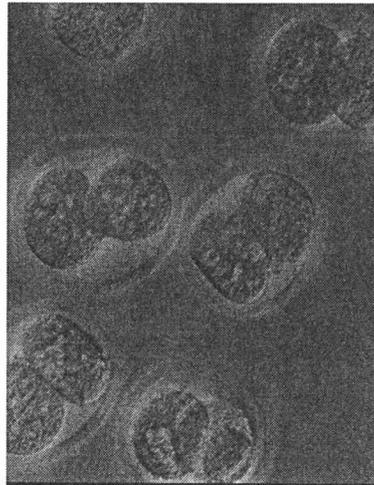


图2 体外培养的小鼠
2-细胞

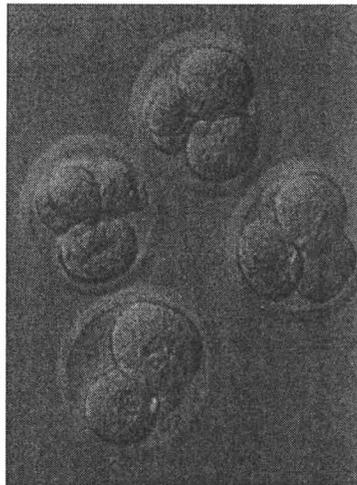


图3 体外培养的小鼠
4-细胞

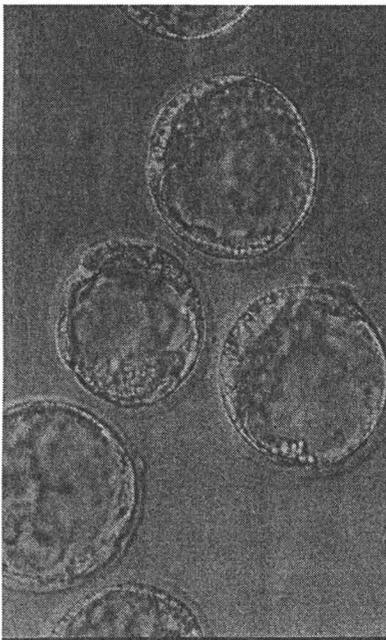


图4 体外培养的小鼠
小鼠囊胚

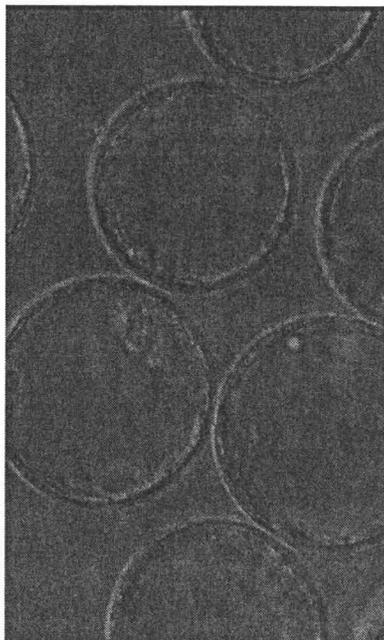


图5 体外培养的小鼠
扩张囊胚



图6 体外培养的小鼠
孵化囊胚

16-1

第二部分 哺乳动物胚胎体外培养和玻璃化冷冻保存研究

——绵羊卵母细胞的体外受精、体外培养及

早期囊胚的玻璃化冷冻

一、受精前卵丘细胞的剥离程度对卵母细胞体外受精和胚胎

发育的影响

二、绵羊卵母细胞体外受精及受精卵的体外培养

三、绵羊体外受精胚胎的冷冻保存

一、受精前卵丘细胞的剥离处理对卵母细胞体外

受精和胚胎发育的影响

摘要 本实验探讨了含有正常卵丘细胞的卵母细胞经成熟培养后,受精前卵丘细胞的剥离程度对卵母细胞体外受精及胚胎发育的影响。对含有2-6层卵丘细胞的成熟卵母细胞进行不同程度的剥离,按剥离程度分为3组:(1)全部剥离,有第一极体排出;(2)含2-3层卵丘细胞;(3)仅剩放射冠。受精后各组的卵裂率分别为83%,69%和70%;囊胚率分别为32%,29%和27%,各组间卵裂率和囊胚率都无显著差异。

关键词: 卵母细胞 卵丘细胞 剥离程度 卵裂率 囊胚率 绵羊

体外受精是指哺乳动物的精子和卵子在体外人工控制的环境下完成受精的过程。体外受精技术包括卵母细胞的体外成熟、精子的体外获能、成熟卵母细胞与获能精子的体外受精和受精卵的体外培养。

随着体外受精技术的发展,卵母细胞的体外成熟显得越来越重要。许多实验表明,体外受精囊胚期前的胚胎代谢活动主要由母源性基因及其代谢产物如mRNA、rRNA和蛋白质等所调控。因此卵母细胞的体外成熟情况是决定卵裂率及囊胚发育率高低的关键。在体外培养体系中,卵泡颗粒细胞及其单层细胞对卵母细胞的成熟,受精和发育有促进作用。卵丘细胞在卵泡发育过程中及排卵后的一定时间内始终包裹在卵母细胞周围。从卵巢上卵泡中收集到的卵母细胞也有多层卵丘细胞所包裹,直到受精后的44-48h才从卵母细胞中挑出。卵丘细胞在卵母细胞离体后至受精前的成熟培养期间对卵母细胞自身的成熟起着很大作用,从而影响到随后的受精及卵裂过程。而这个作用是随着卵丘细胞层数的增加而提高。一般来说,卵母细胞只要达到核成熟,精子便可穿透,甚至可以进行第一或第二次卵裂。然而,只有细胞核与细胞质均成熟的卵母细胞方能继续发育至囊胚阶段。因为卵母细胞的成熟更重要的是生理生化上的变化,包括蛋白质的合成、氨基酸的转移及碳水化合物的代谢等。而这些变化的发生,卵丘细胞起着重要的作用。本实验通过观察卵母细胞的受精及胚胎的早期发育能力,探讨了卵丘细胞对卵母细胞的体外培养效果的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 仪器

离心机（北京医用离心机厂）其它同第一部分

1.1.2 试剂

TCM-199（美国 GIBCO-BRL 公司） 肝素钠（美国 Sigma 公司）
雌二醇（ 17β -E₂）（美国 Sigma 公司） Hoechst 33342（美国 Sigma 公司）
透明质酸酶（美国 Sigma 公司） FCS（美国 Sigma 公司）
EGF（北京邦定泰克生物技术公司） FSH（中科院动物所）
LH（中科院动物所）
其它同第一部分

1.1.3 有关溶液配制

吸卵液：TCM-199+2%FCS+10Mm Hepes+5IU/ml 肝素钠

成熟液：TCM-199+10%FCS+3.6ug/ml FSH+6 ug/ml LH+1 ug/ml 雌二醇+20ng/ml EGF

受精基础液：SOF+5mg/ml BSA+10IU/ml 肝素钠+10mmol/ml 咖啡因

受精液：SOF+20%FCS+10IU/ml 肝素钠+10mmol/ml 咖啡因+20ng/ml EGF

培养液：SOF+2%EAA+1%NEA+1mM 谷氨酰胺+5ug/ml 胰岛素+5mM 牛磺酸
+0.127mM EDTA+20ng/ml EGF+10%FCS

1.1.4 实验材料

所用卵母细胞来自当日屠宰绵羊卵巢，精子用当日屠宰公羊附睾精子。

1.2 实验方法

1.2.1 卵母细胞的收集

卵巢采自当地屠宰场，从刚宰杀的绵羊体内剪下卵巢，立即放入 30℃左右的加入青霉素和链霉素的灭菌生理盐水中，3h 内运回实验室。卵巢用 75%酒精清洗一次，再用灭菌生理盐水清洗三次，放入灭菌烧杯中，保持温度在 30℃左右。在超净工作台内，用带有 12 号针头的 10ml 一次性无菌注射器，从卵巢表面上直径为 2-8mm 的卵泡中吸取卵母细胞，吸卵前在注射器内预先吸入 4ml 吸卵液，在显微镜下挑选出含有完整卵丘细胞层且胞质均匀的卵丘卵母细胞复合体（COC）。

1.2.2 卵母细胞的体外成熟

将挑选出的 COC 用吸卵液和成熟液各洗三遍，放入成熟液液滴中。成熟液液滴

为 50ul, 上盖石蜡油, 在 CO₂ 培养箱中平衡 2h。每个液滴放入 15-20 枚卵母细胞, 于 38.6℃, 5%CO₂, 培养箱中培养 23-25h。

1.2.3 体外受精

1.2.3.1 精子处理

本实验所用的精子为绵羊附睾精子。采集方法如下: 将屠宰场刚宰杀的绵羊睾丸剪下, 带回实验室。在超净工作台内剖开睾丸, 取出附睾, 将附睾尾部剪碎, 把碎片放入受精基础液, 在 39℃的 CO₂ 培养箱中悬浮 30-50min 使精子完全游出。滴片检查精子活力, 高于 0.6 即可用于体外受精。把悬浮液移入 10ml 试管中。

1.2.3.2 精子获能

用受精基础液将精子悬浮液离心洗涤两次 (5min, 1500 转/分), 然后用受精液重悬浮精子, 并在 38.6℃下孵育 30min, 使精子获能。

1.2.3.3 成熟卵母细胞的处理

将成熟 23-24h 的卵母细胞在 600IU/ml 的透明质酸酶中洗涤, 并用细的玻璃管反复吹吸, 按卵丘细胞剥离程度将卵母细胞分为 3 组: A, 在倒置显微镜下观察到第一极体排出的裸卵; B, 放射冠外有 2-3 层卵丘细胞; C, 仅剩放射冠细胞。

1.2.3.4 体外受精

将处理好的卵母细胞分别用受精液洗涤三次, 放入覆盖石蜡油, 在培养箱中平衡 2h 的受精液液滴中。每个液滴 50ul, 放入 15-20 枚卵母细胞, 然后加入孵育后的精子至 5×10^6 精子/ml, 于 38.6℃, 5% CO₂, 95% 空气, 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.4 胚胎培养

精卵共培养 12h 后, 将卵用培养液洗涤三次, 并用吸管反复吹吸, 去除吸附的多余精子后, 移入 50ul 培养液液滴 (平衡 2h, 上盖石蜡油)。每个液滴中放入 15-20 枚受精卵。每隔 48h 换 2/3 培养液, 并观察胚胎发育情况, 受精后 48h 统计卵裂率, 第 6-8 天统计囊胚发育率。培养条件为 38.6℃, 5% CO₂, 95% 空气, 饱和湿度。

1.2.5 统计分析

实验重复三次, 所得数据用 X² 检验进行分析。

2 实验结果

由表 1 可见, 将含 2-6 层卵丘细胞的卵母细胞经成熟培养及剥离处理后, 各组间分别受精后卵裂率及囊胚发育率差异不显著 (P>0.05), A 组的囊胚率较高。

表 1 受精前卵母细胞剥离处理对体外培养的影响

Table 1 Effect of mechanically stripped matured oocytes by repeatedly micropipetting before fertilization on in vitro culture

组别	卵母细胞数	卵裂胚数(%)	桑椹胚数 (%)	囊胚数 (%)
A	92	76(83)a	33/76(43)a	24/76(32)a
B	85	59(69)a	26/59(44)a	17/59(29)a
C	141	98(70)a	37/98(38)a	26/98(27)a

3 讨论

3.1 卵丘细胞与受精的关系

实验结果表明, 卵母细胞成熟后, 卵丘细胞存在与否对受精后的卵裂率影响不大。完全无卵丘细胞的卵母细胞的卵裂率高于有卵丘细胞组, 但无显著差异。这说明卵丘细胞对卵母细胞受精与卵裂的影响只表现在卵母细胞成熟阶段而不在受精阶段。A 组中用于体外受精的卵母细胞为成熟后在倒置显微镜下观察到有第一极体排出的卵, 卵母细胞的第一极体排出率为 84% (92/110), 卵裂率高于其它两组。说明第一极体排出与否影响卵母细胞的受精与卵裂。一般判定卵母细胞成熟与否是以核成熟为主要指标, 而核成熟的主要标志是第一极体的排出。哺乳动物的核成熟过程即使在体外简单的培养条件下也能自发地进行, 但卵母细胞能否获得正常的受精卵裂及随后的胚胎发育能力则主要与细胞质与细胞核的同步成熟有关 (Crozet, 1991; Gliedt, 1996)。成熟 20h 的卵母细胞第一极体排出率与成熟 24h 没有差别, 但其受精率及囊胚发育率明显降低, 而成熟 16h 的卵母细胞就能获得正常的受精及卵裂能力, 但卵母细胞第一极体排出率、卵裂率及囊胚发育率均比较低 (施巧婷, 2001)。谭世俭等 (1992) 证明成熟 24h 的卵母细胞卵裂率最高, 超过 24h 卵裂率明显下降, 说明培养时间延长, 导致卵子老化而影响卵裂率。

3.2 卵丘细胞与胚胎发育的关系

本实验结果表明, 卵丘细胞在受精前的剥离程度对卵母细胞受精后的发育没有影响。与杨膺白等 (1994) 的实验结果不一致, 认为卵丘细胞在受精前的剥离程度对牛卵母细胞受精后的囊胚发育率有影响, 完全剥离卵丘细胞的卵母细胞受精后囊胚发育率显著降低。这个问题有两种解释, 一种是在受精时卵母细胞周围的卵丘细胞的存在对其随后的胚胎发育可能是必须的; 另一种解释可能是人为操作时造成的差异。在将卵母细胞周围的卵丘细胞剥离时, 是用吸管反复吹吸使其脱落, 卵丘细胞脱落越完全, 吹吸次数就越多, 在此过程中, 可能对卵母细胞造成机械性伤害, 从而影响随后的胚胎发育。本实验中裸卵的囊胚发育率比其余两组高, 但无差异。

二、绵羊卵母细胞体外受精及受精卵的体外培养

摘要 本实验采用两种肝素浓度（10IU/ml, 20IU/ml）与两种咖啡因浓度（5mmol/ml, 10mmol/ml）的交叉组合，以无咖啡因组受精液为对照，探讨肝素和咖啡因对绵羊卵母细胞体外受精的影响，并确定受精后将卵母细胞移至培养液的合适时间。并比较了不同浓度的牛磺酸对绵羊早期胚胎发育的影响。结果表明，卵母细胞在 10IU/ml 肝素与 10mmol/ml 咖啡因组受精 6h 移至培养液时，受精效果最好，囊胚率达 32.1%。5mM 牛磺酸适合于绵羊胚胎体外发育的要求。mSOF 培养液与 TCM-199 相比，囊胚率无显著差异。

关键词：肝素 咖啡因 牛磺酸 体外受精 体外培养 绵羊

体外受精技术于 20 世纪 50 年代获得成功，在最近 20 年迅速发展，已日趋成熟成为一项重要而常规的动物繁殖生物技术。体外受精技术可用于研究哺乳动物配子发生、受精和胚胎早期发育机理。在家畜品种改良中，可提供廉价且品种优良的胚胎，缩短家畜繁殖改良周期。并在治疗人类不孕症以及濒危动物保护上有重要意义。目前，受精过程的各个步骤都可以在体外进行。

精子获能是体外受精的关键步骤之一，与离子强度、钙离子浓度和肝素等多种理化因子密切相关（Aalseth E P et al., 1989; Park C K et al., 1989）。而肝素是常用的获能剂，适宜浓度的咖啡因也能促进精子获能，提高受精率，而且肝素和咖啡因还有协同作用（Niwa K et al., 1988）。然而，咖啡因对卵母细胞或早期胚胎发育有不良影响，与精卵作用时间有很大关系（Rosenkranz, 1997）。本实验旨在寻找受精液中肝素钠和咖啡因的最佳浓度组合，并确定卵母细胞在受精液中的适宜停留时间，以在保证受精的前提下，降低受精液中的咖啡因对卵母细胞的不良影响。

哺乳动物早期胚胎发育阻滞的现象是在进行胚胎的体外培养研究中观察到的普通现象。人们在使用合成培养液培养不同动物的胚胎时发现小鼠和大鼠在 2-细胞阶段，兔和猪在 4-细胞阶段，牛和绵羊等在 8-16 细胞都会出现发育阻滞的现象。牛磺酸和亚牛磺酸对体外培养的仓鼠、小鼠和兔等胚胎发育均有促进作用。第一部分的结果表明牛磺酸在克服昆明小鼠胚胎发育的 2-细胞阻滞中起关键作用，本实验比较了不同浓度的牛磺酸对绵羊早期胚胎发育的影响。胚胎培养液分为复杂和化学成分明确的培养液，复杂培养液如 TCM-199 成分复杂，而且有血清的影响，不能够很好地判定各种成分对胚胎发育的影响（Keskin-tepe, 1995），本实验中采用 mSOF 简单培养液探讨其是否能够代替复杂培养液对绵羊胚胎进行体外培养。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和试剂

1.1.1 仪器（同一）

1.1.2 试剂（同一）

1.1.3 有关溶液的配制

受精基础液：SOF+5mg/ml BSA+10 IU/ml 肝素钠

受精液：SOF+20%FCS+10 IU/ml 肝素钠+20ng/ml EGF

mSOF 培养液：SOF+2%EAA+1%NEA+20ng/ml EGF +1mM 谷氨酰胺+5ug/ml 胰岛素+0.127mM EDTA +10%FCS

TCM-199 培养液：TCM-199+10%FCS+5ug/ml 胰岛素+2%EAA+1%NEA +20ng/mlEGF

吸卵液和成熟培养液同一

1.1.4 实验材料

所用卵母细胞来自当日屠宰绵羊卵巢，精子用当日屠宰公羊附睾精子

1.2 实验方法

1.2.1 卵母细胞体外成熟和体外受精（同一）

1.2.2 胚胎体外培养（同一）

1.2.3 实验 1：不同浓度的肝素、咖啡因及受精时间对卵裂率的影响

将精液分为五份，分别放入不同实验组获能，将成熟的卵母细胞随机分组，精卵作用 6h 或 12h，对照组仅含有肝素钠，受精时间为 12h。每个受精液液滴中 10-15 枚卵母细胞，精子浓度 5×10^6 /ml，液滴上覆盖石蜡油。然后分别放入培养液中，培养条件同第一章。培养液为 mSOF 培养液+5mM 牛磺酸。各组实验安排见表 1：

表 1 受精液中肝素、咖啡因浓度及受精时间

Table 1 Concentration of heparin and caffeine in fertilization medium and insemination time

组别	肝素 (IU/ml)	咖啡因 (mmol/ml)	受精时间 (h)
第一组	10	5	6
第二组	20	5	12
第三组	10	10	6
第四组	20	10	12
第五组	10	0	6

1.2.4 实验 2: 牛磺酸对绵羊胚胎发育的影响

以 mSOF 培养液为对照组, 比较了不同浓度 (5mM, 10mM) 的牛磺酸对绵羊早期胚胎发育的效果, 并与 TCM-199 培养液对比。

1.2.5 囊胚细胞计数

在受精后第 7 天将囊胚在含 10ug/ml Hoechst 33342 的 DPBS 液中孵育 20min, 然后在载玻片上压片, 在荧光显微镜下观察细胞核数。

1.3 统计分析

对实验数据用 X^2 检验进行统计学处理。

2 实验结果

2.1 实验 1: 不同浓度的肝素、咖啡因及受精时间对卵裂率的影响

为了检验不同浓度的肝素钠和咖啡因对精子获能的影响及精卵作用时间对卵裂率及囊胚发育率的影响, 其结果见表 2。

表 2 肝素、咖啡因及受精时间对卵裂率的影响

Table 2 Effects of different concentration of heparin and caffeine and fertilization time on cleavage rate

组别	培养卵数	卵裂胚数 (%)	囊胚数 (%)
第一组	67	43/67 (64.2) a	11/43 (25.6) ab
第二组	65	43/65 (66.1) a	9/23 (20.9) b
第三组	75	53/75 (70.7) a	17/53 (32.1) a
第四组	68	44/68 (64.7) a	11/44 (25.0) ab
第五组	70	36/70 (51.4) b	10/36 (27.8) a

由表 2 可知, 含有咖啡因各实验组卵裂率 (64.2-70.7%) 显著高于对照组 (51.4%) ($P<0.05$)。精卵作用 12h 组 (第二组与第四组) 卵裂率显著高于对照组, 但囊胚率比对照组低。20IU/ml 肝素组与对照组囊胚率差异显著 ($P<0.05$)。精卵作用 6h 组卵裂率与对照组相比差异显著 ($P<0.05$), 但囊胚率无显著差异 ($P>0.05$)。综合三种因素考虑, 以第三组为精子最佳获能条件和最佳受精时间。

2.2 实验 2: 牛磺酸对绵羊胚胎发育的影响

以 mSOF 培养液 (含 0 mM 牛磺酸) 为对照组, 比较了不同浓度 (5mM 和 10mM) 的牛磺酸对绵羊早期胚胎发育的效果, 并检测简单培养液 mSOF 能否代替复杂培养液 TCM-199, 结果见表 3:

表 3 牛磺酸对绵羊胚胎发育的影响

Table 3 Effect of different taurine concentration on the development of sheep embryos

组别	培养胚数	囊胚数 (%)	孵化囊胚数 (%)
mSOF+5mM 牛磺酸	57	18 (31.5) a	11/18 (61.1) b
mSOF+10mM 牛磺酸	46	12 (26.1) ac	5/12 (41.7) a
mSOF+0mM 牛磺酸	55	6 (10.9) c	0 d
TCM-199	42	11 (26.1) ac	6/11 (54.5) ab

从表 3 可知, 牛磺酸显著提高了体外受精胚胎的囊胚率和囊胚孵化率。5mM 牛磺酸组的囊胚率 (31.5%) 显著高于其它组, 与对照组 (10.9%) 差异极显著 ($P < 0.01$), 与其它两组无显著差异; 5mM 牛磺酸组囊胚孵化率 (61.1%) 显著高于 10mM 牛磺酸组 (41.7%) ($P < 0.05$), 高于 TCM-199 组 (54.5%), 但差异不显著; mSOF 培养液中不加牛磺酸, 囊胚未能发育至孵化囊胚阶段。

3 讨论

3.1 不同浓度的肝素、咖啡因及受精时间对卵裂率的影响

咖啡因及其盐类主要通过抑制环腺苷酸酶来提高细胞内的 cAMP 水平, 增强精子的活动能力 (Park, 1989; Gehlaut, 1987; Ball, 1983; David, 1971; Crister, 1986) 并与肝素协同作用促进精子的获能 (Niwa, 1988)。由于咖啡因本身及死亡精子释放的胺类等代谢物质对胚胎有毒害作用, 而颗粒单层细胞及其代谢产物对胚胎有良好的促进作用。因此, 在受精液中加入适宜浓度的咖啡因, 并将受精卵适时移入颗粒细胞单层非常重要。本实验受精前处理卵母细胞时留有部分颗粒细胞, 可以创造一个共培养环境。由本实验结果可以看出受精液中适宜浓度的肝素与咖啡因组合, 能较好的促进绵羊卵母细胞的体外受精及以后的胚胎体外发育能力; 当卵母细胞与精子接触时间较短时, 即将卵母细胞在受精后 6h 移入培养液中, 需要在受精液中加入一定浓度的咖啡因来迅速激活精子及提高其穿透能力, 在没有加入咖啡因的对照组中卵母细胞分裂率很低 (51.4%) 与加有咖啡因各组 (64.2-70.7%) 相比差异显著。6h 加咖啡因处理组比 24h 处理组获得

较高的囊胚率,说明受精液中的咖啡因对卵母细胞或早期胚胎有不良影响。咖啡因特别是高浓度咖啡因虽然能够更充分激活精子、促进受精,但同时使对受精卵有不良影响,从而影响到早期胚胎的质量及随后的发育能力(文国艺等,1994)。Gliedt(1996)认为,肝素与精卵作用时间有最合适的搭配。处理时间较长时,卵裂率虽然高,但胚胎后期发育不理想,囊胚率降低。在受精液滴中加入10IU/ml肝素、10mmol/ml咖啡因,并且在受精后6h移入培养液滴中,既可以激活精子提高精子穿透率,又能够获得较多的及高质量的囊胚。

3.2 不同浓度的牛磺酸对绵羊胚胎早期发育的影响

牛磺酸及其前体物亚牛磺酸在母畜生殖道内和胚胎中的浓度都很高(Meizel,1980; Miller和Schultz,1987),这表明牛磺酸对于胚胎的正常发育是重要的。牛磺酸的作用具有普遍性,其作用主要有:(1)促进了胚胎的新陈代谢(Miller和Schultz,1987; Ho et al.,1994);(2)抵抗K⁺浓度过高引起的损害(Ho et al.,1994);(3)抗氧化剂作用。在5%CO₂的培养条件下,牛磺酸可以促进小鼠、兔子和猪等的胚胎发育(Dumoulin et al.,1992; Li et al.,1993; Petters et al.,1991)。Zishu Liu等(1995)在对牛胚胎的培养过程中发现,在5%CO₂:95%空气的培养条件下,牛磺酸可以明显地促进牛胚胎发育,而在5%CO₂:5%O₂的培养条件下,牛磺酸的作用不明显,这表明牛磺酸主要是作为一种抗氧化剂,它可以抑制高氧条件下毒素物质产生的氧化物,从而起到保护作用。第一部分在M16中加入2.5mM牛磺酸能支持小鼠2-细胞胚胎发育至囊胚阶段,进一步证实了牛磺酸对克服胚胎发育阻滞的关键作用。本实验在第一部分结果的基础上,研究牛磺酸对绵羊胚胎体外发育的作用。结果表明,牛磺酸能促进胚胎发育,5mM牛磺酸显著提高了囊胚率和孵化囊胚率,对绵羊胚胎体外发育比较适宜。

3.3 不同培养液对绵羊胚胎早期发育的影响

本研究探讨了用mSOF代替常用的复杂培养液TCM-199的可能性。TCM-199的成分复杂,SOF是Tervit(1972)设计的一种简单培养液,它具有一些TCM-199所没有的特点。本实验中将SOF培养液加以改进,加入谷氨酰胺、胰岛素、牛磺酸、EDTA、EAA和NEA、EGF和FCS等。谷氨酰胺对于早期胚胎发育是重要的能量来源,对胚胎的代谢和囊胚的形成起重要作用(Riger等,1991)。胰岛素可增加胚胎的细胞数,促进囊胚腔的形成和孵化(Gandffia)。EGF是单链多肽,是非胚胎产生的促进胚胎发育的因子,可提高小鼠体外培养胚胎的囊胚率(Paria,1990),刺激囊胚腔的扩展

(Dardik,1991;Kobayashi,1994)。IVC 阶段, 胚胎对血清的需要更为重要。实验结果表明, mSOF 培养液与 TCM-199 相比, 囊胚率和囊胚孵化率无差异, 而且比 TCM-199 的培养效果好。细胞数是胚胎活力的一个重要标志 (Papaioannou 和 Ebert, 1986), 体内囊胚随着细胞数减少, 质量下降 (Wurth et al., 1988)。本实验对囊胚进行了荧光染色, 证明体外培养的囊胚细胞数, 在数值上可以达到体内培养囊胚的细胞数。

4 小结

- 4.1 受精液中, 10IU/ml 肝素和 10mmol/ml 咖啡因浓度组合时精卵作用时间以 6h 为宜。
- 4.2 牛磺酸能促进绵羊胚胎体外发育, 浓度以 5mM 为宜。
- 4.3 mSOF 培养液可以代替复杂的 TCM-199 培养绵羊早期胚胎。

三、绵羊体外受精胚胎的冷冻保存

摘要 本实验研究了不同冷冻方法对绵羊体外受精胚胎的保存效果和不同解冻方法对胚胎玻璃化冷冻效果的影响。结果表明,一步法玻璃化冷冻囊胚的存活率为 50%,比二步法和慢速冷冻效果明显降低 ($P<0.05$);二步法和慢速冷冻效果较好,胚胎的存活率分别为 73%和 81%,两者无显著差异;玻璃化冷冻胚胎后,一步解冻与二步解冻方法的胚胎发育率无显著差异(分别为 76.5%和 80.0%)。

关键词: 体外受精 早期囊胚 玻璃化冷冻 绵羊

Willadsen 等(1976)首次报道用 DMSO 为冷冻保护剂,通过慢速冷冻和慢速解冻的方法将绵羊胚胎冷冻保存成功。随后人们用不同的冷冻液和不同的方法对绵羊胚胎冷冻保存并获得成功(McGinis, 1993; Schiewe, 1991; Czlonkowska, 1991; Heyman, 1987; Herry, 1984; Ware, 1987)。胚胎的快速冷冻无需冷冻仪,且减少冷冻的时间。自从 Rall 等(1985)用 DMSO、乙酰胺等冷冻剂对小鼠的胚胎进行玻璃化冷冻保存获得成功以来,许多学者对这一种方法进行了细致的研究,并设计了各种玻璃化冷冻液(见综述)。用乙二醇和丙三醇为抗冻剂,对绵羊体内受精胚胎进行玻璃化冷冻,取得了较高体内和体外发育率(Ali,1993;Naitana,1995;Martinez,1997),但有关绵羊体外受精胚胎的冷冻研究只在最近才有报道(Walmsley et al., 1999; Traldi et al., 1999; Cognie, 1999; Zhu et al,2000)。

1 材料与方方法

1.1 主要仪器和试剂

1.1.1 仪器(同一)

1.1.2 试剂

乙二醇(EG)(美国 Sigma 公司) 聚蔗糖(Ficoll 70)(美国 Sigma 公司)

蔗糖(Suc)(北京化工厂)

其它同一

1.1.3 有关溶液的配制

慢速冷冻冷冻液: PBS +3mg/mlBSA+1.8M 乙二醇+0.05M 海藻糖

配制玻璃化溶液的基础液 m PBS: PBS+0.3mM 丙酮酸钠+3.3mM 葡萄糖

玻璃化溶液 EFS40: 40% (V/V) EG+30% (W/V) Fic+0.5M Suc+m PBS

0.5M 蔗糖溶液: 3.424g Suc+10% (V/V) FCS+20ml m PBS

0.25M 蔗糖溶液: 1.712g Suc+10% (V/V) FCS+20ml m PBS

10%EG: 10% (V/V) EG+10% (V/V) FCS+m PBS

其它同一

1.1.4 实验材料

所用卵母细胞来自当日屠宰绵羊卵巢, 精子用当日屠宰公羊附睾精子

1.2 实验方法

1.2.1 卵母细胞体外成熟和体外受精 (同一)

1.2.2 胚胎体外培养 (同一)

1.2.3 胚胎冷冻

1.2.3.1 慢速冷冻

冷冻方法: 胚胎在室温下于冷冻液中停留 5 min 后装入 0.25ml 的细管, 将细管放入冷冻仪。启动冷冻程序, 从 0°C 以 1°C/min 降到 -6.7°C, 植冰后平衡 10min。然后以 0.3°C/min 降到 -30°C, 直接投入液氮中保存。

解冻方法: 将细管从液氮中取出, 在空气中停留 5s, 然后放入 37°C 水浴 10s, 随后将胚胎直接移入培养液中。胚胎用培养液洗涤三次后, 于培养液滴中继续培养 48h 并观察发育情况。

1.2.3.2 玻璃化冷冻

1.2.3.2.1 冷冻方法

一步法冷冻: 将胚胎直接移入预先配制玻璃化溶液 0.25ml 的塑料细管中, 平衡 1min 后, 直接投入液氮中。

二步法冷冻: 胚胎在 10%EG 溶液中预先平衡 5min, 然后将胚胎移入预先配制玻璃化溶液 0.25ml 的塑料细管中, 平衡 30s, 投入液氮中。

1.2.3.2 解冻方法

一步法: 将冷冻细管从液氮中取出, 迅速投入 37°C 水中, 解冻约 10s 取出 (当蔗糖溶液部分由乳白变为透明时取出), 用吸水纸将细管水珠拭净, 剪掉细管两端的栓部, 用 1ml 的注射器把细管中的胚胎冲出, 置于盛有 0.5M 蔗糖溶液的表面皿中, 平衡 5min, 再用培养液洗涤三次后继续培养。

二步法: 按一步法将置于盛有 0.5M 蔗糖溶液的表面皿中, 迅速检出胚胎移入 0.25M 蔗糖溶液中平衡 5min, 再用培养液洗涤三次后继续培养。

1.2.4 培养

胚胎解冻脱抗冻剂后, 经观察形态正常者, 移入在 CO₂ 培养箱中平衡 2h 覆盖石蜡

油的 30ul mSOF 培养液滴中，培养条件同一。

1.2.5 统计分析

所得数据用 X^2 检验进行统计分析。

2 实验结果

2.1 实验 1：体外受精胚胎的冷冻效果

比较了绵羊体外受精早期囊胚玻璃化冷冻和慢速冷冻的保存效果，结果见表 1。

表 1 不同冷冻方法对绵羊体外受精早期囊胚冷冻保存效果

Table 1 Effects of different freezing methods on IVP early blastocysts of sheep

组别	冷冻胚胎数	发育胚胎数 (%) *	孵化囊胚数 (%)
一步法	32	16 (50) a	5 (16) a
二步法	30	22 (73) ab	9 (30) a
慢速冷冻	27	22 (81) b	10 (37) a

*发育至扩张囊胚

一步法玻璃化冷冻囊胚的存活率为 50%，比二步法冷冻效果 (73%) 降低 ($P>0.05$)，比慢速冷冻效果 (81%) 显著降低 ($P<0.05$)；孵化囊胚率各组间无显著差异，但一步法比二步法和慢速冷冻效果低。

2.2 实验 2：不同解冻方法对绵羊体外受精早期囊胚玻璃化冷冻保存效果影响

比较了不同解冻方法对绵羊体外受精早期囊胚玻璃化冷冻保存的效果，结果见表 2：

表 2 不同解冻方法对绵羊体外受精早期囊胚玻璃化冷冻保存效果

Table 2 Effects of different thawing methods on sheep IVP early blastocysts of vitrification

组别	冷冻胚胎数	发育胚胎数 (%) *	孵化囊胚数 (%)
一步解冻	34	27 (76.5) a	12 (35.2) a
二步解冻	30	24 (80.0) a	11 (36.7) a

*发育至扩张囊胚

从表 2 可以看出，玻璃化冷冻胚胎后，一步解冻与二步解冻方法的胚胎发育率无显著差异（分别为 76.5% 和 80.0%）；囊胚孵化率分别为 35.2% 和 36.7%，两组间无差异。

3 讨论

3.1 不同冷冻方法对绵羊体外受精早期囊胚冷冻保存效果的影响

体外生产的胚胎对低温的敏感性较强,许多标准的方法是将胚胎慢速冷冻到生理温度之下,这一过程会对体外生产的胚胎造成严重的损伤。不同的冷冻方法,例如慢速冷冻和玻璃化冷冻对胚胎造成的损伤也不同。实验 1 的结果表明,玻璃化二步法和慢速冷冻法保存绵羊体外受精早期囊胚,二者的效果相同,说明通过玻璃化法的快速冷冻会减少胚胎所受的损伤,与 Dinnyes (1996) 的结果一致。玻璃化一步法比慢速冷冻法的保存效果显著降低 ($P < 0.05$),一步法比二步法冷冻胚胎的存活率降低。表明一步法冷冻时,在足够的乙二醇渗透前,胚胎受到毒性伤害,可能是乙二醇进入了囊胚腔,而胚胎置于 EFS40 前,首先平衡在一个稀释的乙二醇溶液中,然后移入 EFS40 中短暂平衡后投入液氮,这种二步冷冻法提高了胚胎存活率,与 Zhu 等 (1993) 报道的一致。

3.2 一步与二步解冻法对绵羊体外受精早期囊胚玻璃化冷冻保存效果影响

玻璃化冷冻中用低毒的乙二醇作为快速渗透性试剂,乙二醇的这些特点在冷冻过程中具有非常重要的意义,一方面可以尽量减少冷冻剂对胚胎的作用时间,降低了冷冻剂的毒害作用;另一方面,在解冻时由于快速的渗透性,从胚胎中置换出冷冻剂就不会造成渗透压损伤。为了降低渗透压损伤,通常将胚胎悬浮在蔗糖溶液中 (Kasai et al., 1980; Leibo, 1983),但是蔗糖的浓度必须足够高。防止这种损伤的有效方法是在将胚胎放入蔗糖液之前,悬浮在含有抗冻剂和蔗糖的混合溶液中,使胚胎收缩 (Kasai et al., 1980)。用 EFS 溶液进行玻璃化冷冻过程中,含蔗糖的溶液促进收缩,降低了稀释前胞质内乙二醇的数量。乙二醇的快速渗透性使它迅速地从细胞中扩散出去。但是,用蔗糖作为渗透压缓冲剂可能会对胚胎造成毒害作用 (Leibo, 1983; Mcwilliams, 1991)。实验 2 中用二步法进行解冻,将胚胎置于 0.5M 蔗糖溶液后迅速检出移入 0.25M 蔗糖溶液中平衡 5min。二步解冻法的胚胎发育率比一步法高,但无显著差异。因此,一步解冻法可以将胚胎直接在 0.5M 蔗糖液中脱抗冻剂从而有效地受到保护而免受渗透压损伤。

4 小结

4.1 玻璃化二步冷冻与慢速冷冻绵羊体外受精早期囊胚效果相同,二步法比一步冷冻法的保存效果好。

4.2 一步解冻法可以直接将玻璃化冷冻绵羊体外受精早期囊胚脱防冻剂,使胚胎有效地受到保护而免受渗透压损伤。

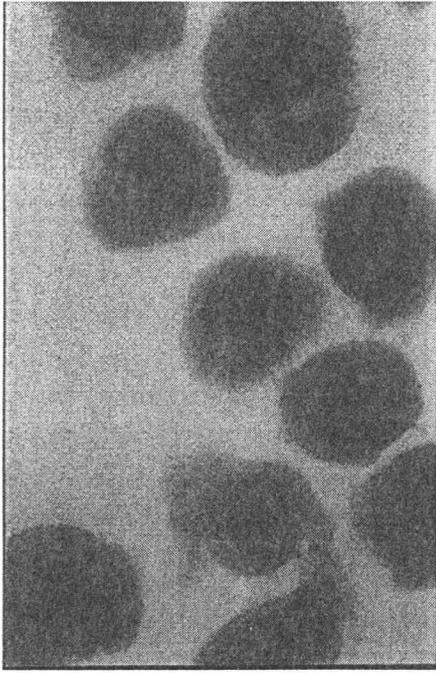


图 1 未成熟绵羊卵母细胞



图 2 体外成熟 24h 的绵羊卵母细胞

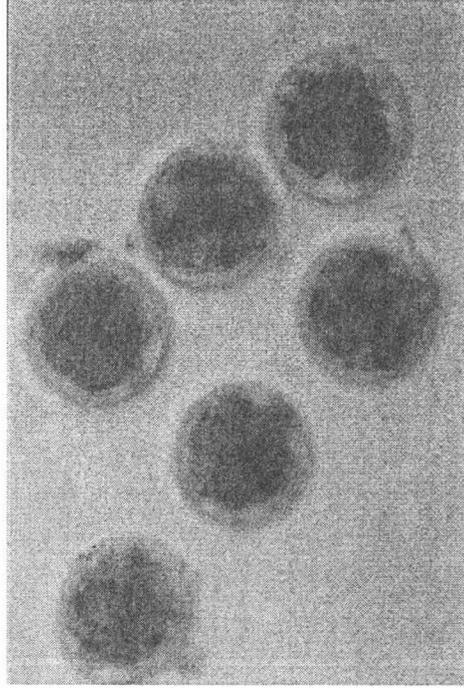


图 3 培养第 6d 形成的桑椹胚

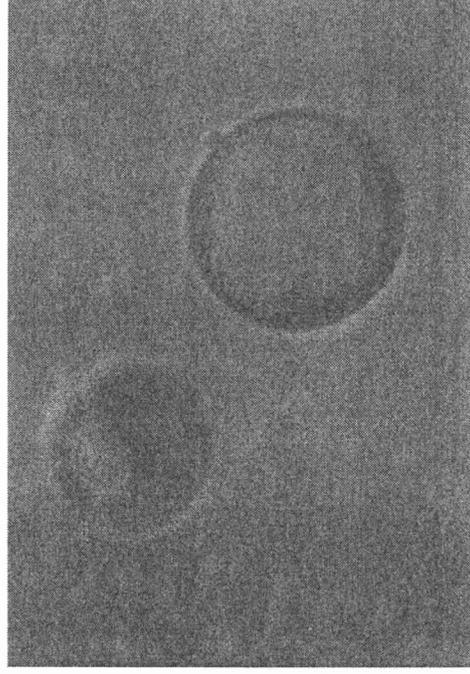


图 4 培养第 7d 的囊胚

1-04

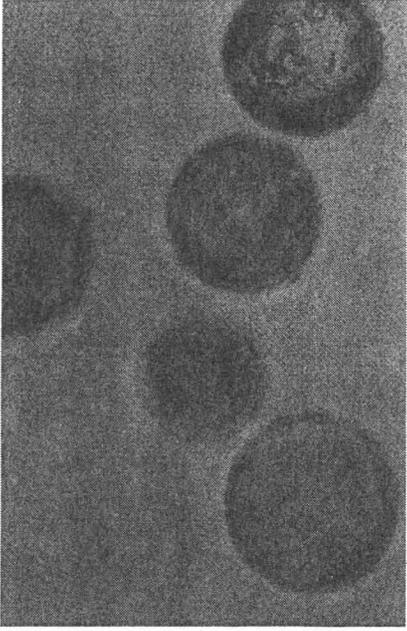


图 5 冷冻液中平衡的囊胚



图 6 孵化囊胚



图 7 扩张囊胚和孵化囊胚



图 8 体外受精囊胚细胞数

结 论

通过对小鼠 1-细胞胚胎体外培养和玻璃化冷冻保存的研究, 得出以下结论:

1. mM16 培养液能有效地克服昆明小鼠胚胎 2-细胞发育阻滞现象, 囊胚发育率达 80%。
2. mM2 作为工作液, 不仅可以提高小鼠胚胎体外发育率, 而且可以提高 1-细胞胚胎显微注射后的移植妊娠率; 作为培养液, 可以使 2-细胞胚胎的囊胚发育率达 50%。
3. 谷氨酰胺、EAA 和 NEA 对小鼠胚胎发育有促进作用; 牛磺酸对克服 2-细胞发育阻滞起决定性作用, EDTA 具有很好的协同作用, 进一步提高了囊胚发育率。男男
4. 显微注射对小鼠 1-细胞胚胎的体外发育无显著影响, 但注射后胚胎的囊胚发育率有所降低。
5. 在胚胎的玻璃化冷冻保存中, 平衡时间延长, 玻璃化液对胚胎的损伤增加; EFS30 比 EFS40 降低了对胚胎的毒性伤害; 体外培养 1-细胞胚胎获得的囊胚对冷冻解冻的敏感性与体内培养相比, 无显著差异, 但冷冻效果有所降低。

通过对绵羊体外受精胚胎的体外培养和玻璃化冷冻保存的研究, 得出如下结论:

1. 卵母细胞在 10IU/ml 肝素与 10mmol/ml 咖啡因组受精 6h 移至培养液时, 受精效果较好, 囊胚率达 32.1%。
2. 牛磺酸对绵羊胚胎发育有促进作用, mSOF+5mM 牛磺酸适合绵羊胚胎体外发育的要求。
3. mSOF 可以代替复杂的 TCM-199, 使绵羊体外受精胚胎发育至囊胚阶段
4. 对绵羊早期囊胚冷冻时, 玻璃化二步法和慢速冷冻效果较好, 胚胎的存活率分别为 73%和 81%, 两者无显著差异; 一步法比二步法和慢速冷冻效果显著降低。二步法玻璃化冷冻胚胎可以减弱抗冻保护剂的化学毒性, 提高胚胎的冻后存活率。

本实验虽然获得了预期的结果, 但是在胚胎体外培养和玻璃化冷冻保存中, 影响因素较多, 哺乳动物体外胚胎发育阻滞导致体外受精囊胚率远低于体内发育; 玻璃化冷冻的适当条件也存在种间差异, 胚胎的特性, 例如大小、形状、细胞膜的特性和对抗冻剂毒性的敏感性不同而使冷冻效果不稳定。因此, 改善胚胎体外培养系统, 研究玻璃化冷冻的适当条件仍是今后的重要任务。

参考文献 (References):

- 陈大元, 2000.受精生物学-受精机制与生殖工程, 北京: 科学技术出版社
- 郭志勤, 1998.家畜胚胎工程, 北京: 中国科学技术出版社
- 菅原七郎著, 张志超, 徐春生主译, 1992.哺乳动物发育工程实验方法, 南京: 南京大学出版社
- 蒋和生, 卢克焕, 1994.牛体外胚胎质量检测与评价, 广西农业大学学报, 13: 49-54
- 刘冀珑, 李光鹏, 廉莉, 江一平, 张田, 陈大元, 2000.M16 添加牛磺酸和 EDTA 支持昆明小鼠体外受精并发育至囊胚, 遗传, 22: 301-302
- 桑润滋等, 1999.牛胚胎玻璃化冷冻保存研究初报.中国畜牧杂志, 35 (5): 24-25
- 王敏康, 张田, 王晓燕, 李劲松, 廉莉, 陈大元, 2000.几种克服昆明种小鼠胚胎 2-细胞发育滞育的培养液研究, 动物学报, 46: 81-87
- 文国艺, 卢克焕, 1994.受精液中肝素和咖啡因的组合对牛卵母细胞体外受精的影响, 广西农业大学学报, 13: 27-31
- 严云勤, 李光鹏, 郑小民, 1994.发育生物学原理与胚胎工程, 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社
- 杨膺白, 卢克焕, 1994.卵丘细胞对牛卵母细胞体外成熟和体外受精的影响, 广西农业大学学报, 13: 16-20
- 张守全, 1993.昆明小鼠单细胞胚胎体外培养的研究, 华南农业大学学报, 14 (!): 10-15
- 张守全, 孙拓, 1995.昆明小鼠 1-细胞胚胎体外培养系统的研究, 动物学报, 41: 432-438
- 张家新, 1997.氨基酸和牛磺酸对绵羊体外受精胚胎无血清培养的影响, 硕士学位论文
- 张家新, 2001.转基因绵羊相关及相关生物技术的研究, 博士学位论文
- 朱士恩等, 2000.绵羊体内外受精胚胎玻璃化冷冻保存.中国兽医学报, 20 (3): 302-305
- Abramczuk J, Solter D, Koprowski H, 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol*, 61: 378-383
- Ali J, Shelton JN, 1993. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. *J Reprod Fertil*, 99: 65-70
- Atkinson PW, Hines ER et al., 1991. Association of foreign DNA with cattle and insert spermatozoa in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 29: 1-5
- Bamett DK, Bavister BD, 1992. Hypotaurine requirement for in vitro development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocysts and production of term offspring from in vitro-fertilized ova. *Bio Reprod.*, 47: 297-304
- Bamett DK, Clayton MK, Kimura J, Bavister BD, 1997. Glucose and phosphate toxicity in hamster preimplantation embryos involves disruption of cellular organization, including distribution of active mitochondria. *Mol Reprod Dev*, 48: 227-37
- Bavister BD, Leibfried ML, Liberman G, 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Bio Reprod*, 28: 235-247

- Bishop JO,Smith P,1989.Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA.Mol Biol Med,6:283-298
- Bondioli KR et al., 1996.positive selection of transgenic bovine embryos in culture. Theriogenology, 46(abstract)
- Burdon TG,Wall RJ,1992.Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryos.Mol Reprod Dev,33:436-442
- Chatot CL,Lewis JL,TorresI,Ziomek CA,1990.Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium.Biol Reprod,42:432-40
- Canseco RS et al.,1994.Gene transfer efficiency during gestation and the influence of non-manipulated embryos on production of transgenic mice.Transgenic Research, 3:20-25
- Chan AWS et al.,1999.Timing of DNA integretion,transgenic mosaicism and pronuclear microinjection.Mol Reprod Dev,52:406-423
- Cognie Y,1999.State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology, 51: 105-106
- Davreker F,Harey K,1997.Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos in vitro.Bio Reprod,57:921-928
- Dienhart MK,Downs SM,1997.Uptake and salvage of hypoxanthine mediates developmental arrest in preimplantation mou embryos.Bio Reprod,56:1-13
- Dinnyes A et al.,1996.Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid.Theriogenology,46:1425-1439
- Ewards LJ,Williams DA,Gardner DK,1998.Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo:amino acids act as buffers of intracellular pH.Hum Reprod,13:3441-8
- Fahy GM,MacFrlane DR et al.,1984. Vitrification as an approach to cryopreservation . Cryobiology,21:407-426
- Gagne MB et al.,1995.Effect of microinjection time during postfertilization S-phase in bovine embryonic development.Mol Reprod Dev,41:184-194
- Gardner DK,Lane M,Batt PA,1993.Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep pre-attachment embryos developed in vitro.Mol Reprod Dev,313-3198
- Gardner DK et al.,1993.Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture.Bio Reprod ,48:177-185
- Gardner DK et al.,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
- Gardner DK,Lane M,1996.Alleviation of the 2-cell block and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos:role of amino acids,EDTA and physical parameters.Hum Reprod, 11:2703-12

- Gordon JW et al.,1980.Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA.PNAS,USA,77:738-784
- Haraguchi S, Naito K, Azuma S,Sato E,Nagahama Y,Yamashita M,Toyoda Y,1996 .Effects of phosphate on in vitro 2-cell block of AKR/N mouse embryos based on changes in cdcv2 kinase activity and phosphorylation states.Biol Reprod,55:598-603
- Haraguchi S,Naito K,Sato E,1999.Phosphate exposure during the late 1-cell and early 2-cell stages includes a time specific decrease in cyclin B and cdc25B mRNAs in AKR/N mouse embryos in vitro.Zygote,7:87-93
- Herry DA et al.,1984.One step sucrose dilution of frozen thawed sheep embryos. Theriogenology, 22:433-443
- Hogan B et al.Manipulating the Mouse embryo,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY
- Holm P,Booth PJ,Schmidt MH,Greve T,Callesen H,1999.High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serumproteins. Theriogenology, 52: 683-700
- Hochi S,Fujimoto,T et al.,1994.Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification.Theriogenology,42:483-488
- Ishimori H,Takahashi Y,Kanagawa,H,1992.Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures.Theriogenology,37:481-487
- Kasai M,Komi JH et al.,1990.A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability.J Reprod Fertil, 89: 91-97
- Kasai M,Nishimori M,Zhu SE et al.,1992a.Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures.Biol Reprod, 47: 1134-1139
- Kasai M,Hamaguchi y,Zhu SE,Miyake et al.,1992b.High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method.Biol Reprod, 46: 1042-1046
- Li JM,Foote RH,Simkin M,1993.Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase,taurine,or superoxide dismutase.Bio Reprod,48:33-37
- Mahmoudzadeh AR et al.,1993.A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in vitro survival of vitrified bovine embryos. Theriogenology, 39:1291-1302
- Matsumoto H,Sugawara S,1998.Effect of phosphate on the second cleavage division of the rat embryo.Hum Reprod,13:398-402
- Mazur P,Schneider U,1986.Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications.Cell Biophys,8:259-284

- McGinis LK et al.,1993.Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol.*Anim Reprod Sci*,30:273-280
- Mckierman SH,Bavister BD,Tasca RJ,1991.Energy substrate requirements for in vitro development of hamster 1- and 2-cell embryos to the blastocyst stage.*Hum Reprod*, 6: 64-75
- Miyake T,Kasai M,Zhu SE,Sakurai T,Machina T,1993.Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method.*Theriogenology*,40:121-134
- Naitana S,Dattena M,Gallus M et al.,1995.Recipient synchronization affects viability of vitrified ovine blastocysts.*Theriogenology*,43:1371-1378
- Rall W F,1987.Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*,24:387-402
- Rall W F,Fahy GM,1985.Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification.*Nature*,313:573-575
- Rall W F,Meyer TK,1989.Zone fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*,31:683-692
- Rall W F,Reid DS,Polge C,1984.Analysis of slow warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods.*Cryobiology*,21:106-121
- Riger D,Loskutoff NM,Betteridge KJ,1992.Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose,glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro.*Reprod Fertil Dev*,4:547-557
- Rsenkkrans CF,First NL,1991.Culture of bovine zygote to the blastocyst stage:effect of amino acids and vitamins.*Theriogenology*,35:266
- Saito N et al.,1994.Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*,41:1053-1060
- SakKas D,Urner F,Menezo Y,Leppes G,1993.Effects of glucose and fructose on fertilization,cleavage,and viability of mouse embryos in vitro.*Bio Reprod*,49:1288-1992
- Schiewe M C,Rall WF,Stuart LD,Wildt DE,1991.Analysis of cryoprotectant,cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos.*Theriogenology*,36:279-293
- Schini S,Bavister BD,1988.Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose.*Biol Reprod*,39:1183-1192
- Schramm RD,Bavister BD,1996.Development of in-vitro-fertilized primate embryos into blastocysts in a chemically defined,protein-free culture medium.*Hum Reprod*,11:1690-7
- Splinde A,1995. Beneficial effects of taurine on mouse zygotes developing in protein-free culture medium.*Theriogenology*,44:761-772
- Takahashi Y et al.,1993.Successful vitrification of bovine blastocysts devied by in vitro maturation and fertilization.*Mol Reprod Dev*,34:266-271
- Vajta G,et al.,1996.Factors

- affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim Reprod Sci*,45:191-200
- Thompson JG,Simpson AC,Pugh PA,Tervit HR,1992.Requirement for glutamine during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*,31:253-257
- Traldi A S,Leboeuf B,Cognie Y et al.,1999.Comprative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology*, 51: 175 (abstract)
- Walker SK,Heard TM,Seamark RF,1992.In vitro culture of sheep embryos without co-culture:success and perspectives. *Theriogenology*,37:559-569
- Walmsley S E,Pollard J W,Randall A E et al.,1999.Survical of in vitro produced ovine embryos of different development stages after vitrification in EFS40. *Theriogenology*, 51: 177(abstract)
- Zielke HR,Zielke CL,Ozand PT,1984.Glutamine:a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed Proc*,43:121-125
- Zhu S E,Kasai M et al.,1993.Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fertil*,98:139-145

Research on the In Vitro Culture and Vitrification of Mammalian Embryos

Speciality: Animal Genetics and Breeding and Reproduction
Special Field of Study: Animal Reproduction
Master Candidate: Li Jianhua
Superisors: Prof.Zhang zhaowang
Prof.Guo Zhiqin

ABSTRACT

In vitro culture and vitrification of mouse and sheep IVP embryos were studied in this paper. Based on improvement of culture system, IVP embryos from mouse 1-cell embryos and IVF oocytes of sheep were cryopreserved successfully.

The embryos of Kunming mouse show 2-cell block in vitro. The effects of several culture media on overcoming the 2-block in embryo development were studied. The modified M2 and M16, in which glucose and phosphate were excluded and 5.55mM (1g/l) fructose, 0.127mM EDTA, 2.5mM taurine, 2mM glutamine and 2% essential amino acid (EAA, 50 \times) and 1% nonessential amino acid (NEA, 100 \times) were added, were shown to overcome the 2-cell block and support the development to blastocyst stage. mM16 showed highest blastocyst rate in 80% of the 2-cell embryos, significantly higher than that of other groups ($p < 0.01$). mM2 (glutamine, EAA and NEA were added) improved blastocyst rate compared to Δ mM2 (without glutamine, EAA and NEA), 50% and 46% respectively, but no difference found. M16+TE (2.5mM taurine and 0.127mM EDTA were added in M16) and M16+T (2.5mM taurine were added in M16) were also shown to be effective to overcome the 2-cell block, and 63% and 19% of 2-cell developed to blastocyst stage after 96 hours culture. We concluded that glutamine, EAA and NEA have beneficial effect and taurine play an important role in overcoming the 2-cell block during Kunming mouse embryo development. Factors affecting the development of micro-injected mouse embryos were studied. The results show that blastocyst rate of microinjected 1-cell embryos was 35%, lower than non-treated group (46%), but no significant difference ($p > 0.05$); blastocyst rate of micromanipulated embryos cultured in vitro (72h) was lower than that of embryos cultured in vivo (72h), 25% and 38% respectively, no difference found ($p > 0.05$); mM2, as a microinjection and transfer operation medium, improved pregnant rate (62.5%) than M2 (35.9%) ($p < 0.05$). Mouse morula and early blastocysts were vitrified with EFS30 and EFS40. The results show that two-step vitrification of early blastocysts with EFS30 got highest development rate after

thawing(88.9%);The development rate of early blastocysts cultured in vitro had no difference compared to embryos cultured in vivo with two-step vitrification.

IVF embryos of sheep also show development block,happening in 8-16-cell stage. Stription degree of cumulus cells of matured oocytes with normal cumulus cells before insemination had no significant effect on IVF of oocytes and development of embryos in vitro.The optimal concention of heparin and caffeine in fertilization medium was 10IU/ml heparin+10mmol/ml caffeine when oocytes were transfered to culture medium at 6h after insemination.In which,blastocyst rate was 32.1%,higher than other group.Taurine could improve development of sheep embryos ,5mM suitable for the requirement of sheep embryos.The blastocyst rate in simple medium mSOF had no difference with that in TCM-199.Different freezing and thawing methods of sheep embryos were studied.Survical rate of one-step vitrified blastocysts was 50%,significant lower than two-step and slow freezing($p<0.05$);two step and slow freezing shew same effect and survival rates were 73% and 81% respectively,without difference ; development rates of vitrified embryos with one-step and two-step thawing had no difference(76.5% and 80.0% respectively).

Key Words: development block; in vitro culture; vitrification; Kunming white mouse; sheep

附录 S0F 培养液配方

成分	分子量	浓度 (mM)	mg/100ml
NaCl	58.44	107.28	629
KCl	74.56	7.17	53.4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	1.53	26.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.5	0.74	18.2
KH ₂ PO ₄	136.09	1.17	16.2
NaHCO ₃	84.01	25	210
丙酮酸钠	110.04	0.32	3.5
乳酸钠 (60%糖浆)	112.1	32.8	0.56ml
青霉素			10000IU
酚红			1

综述

简易高效的哺乳动物胚胎玻璃化冷冻保存

摘要 玻璃化冷冻技术大大地简化了胚胎冷冻保存的降温程序,减少了胞质外冰晶对胚胎造成的伤害。但是,胚胎受各种因素的影响,如溶液的毒性,胞质内冰晶,物理损伤和渗透压损伤等。简单有效的玻璃化冷冻胚胎技术通过减少这些因素中每一个因素的影响,已成功地应用于小鼠胚胎的冷冻保存。

关键词: 玻璃化; 冷冻保存; 胚胎; 乙二醇; 小鼠

1 前言

如果胚胎能被有效地冷冻保存,这种技术便可以运用到一系列哺乳类胚胎中,如家畜,实验动物,野生动物和人类。然而,胚胎在程序降温过程中,或保存的胚胎在生理盐溶液中解冻时,它们都冒着被不同的因素所伤害的危险。这些因素包括(1)抗冻剂的毒性;(2)低温打击;(3)胞质外冰晶的物理损伤;(4)浓缩电解质的毒性;(5)胎质内冰晶的形成和生长;(6)破裂损伤;(7)渗透压增加。通过排除这些障碍,已经有许多方法对移植前不同种类不同阶段的哺乳动物胚胎进行了冷冻保存。但是在方法上还极需改进,因为解冻后胚胎的存活是可变的,它依赖于胚胎的品种、品系、发育阶段和胚胎质量。

Whittingham et al. (1972)用可控慢速冷冻方法,对在 1.5M 抗冻剂中平衡的胚胎缓慢降温,使胞质内容物通过胎质外冻晶的形成而导致逐步脱水而浓缩。当胚胎在液氮中降温时,细胞质连同胞质外浓缩的部分由于玻璃化液粘性极速增加,在无冰晶形成的情况下而转变成玻璃态。这种慢速冷冻方法的缺点在于程序降温耗时长,且需要昂贵的设备。

慢速冷冻哺乳动物胚胎的方法反映了最基本的低温生物学原理,这种冷冻方法与不同抗冻动物抵抗低温的保护机理相似(Schneider,1986;Storey,1996)。近几年在对抗冻动物保护机制的研究中发现,大多数的抗冻动物可以合成许多小分子量的低温保护物质,例如葡萄糖和甘油及其它一些醇类和糖类(Baust,1981;Somme,1982;Bowler,1987),这些可渗透的物质可以防止冷冻和解冻过程中细胞内冰晶的生成,从而维持了细胞的正常

结构 (Bowler,1987;Schneider,1986)。

当细胞内液体与冷冻保护液达到平衡后,随着温度的下降冰晶就会形成。在正常情况下,溶液在达到冰点时不结冰,待降到冰点以下一定温度时才结冰,这种现象叫过冷现象。在胚胎冷冻过程中,过冷现象的产生会损伤胚胎。倘若出现过冷现象,溶液在过冷状态下较低的温度温度结冰,则水分子由于运动速度放慢,可以逐渐排列成整齐的冰晶,生成大的冰晶,对细胞造成严重的损伤。为了防止过冷现象的发生,可以在适当的温度诱发结晶 (Dumen,1982)。

如果将胚胎悬浮在 0°C 或 0°C 以上,在液氮中能形成玻璃化的高浓度深液中,在液氮中直接降温,那么随着胞质外溶液和细胞质的玻璃化,胚胎有望存活。玻璃化为在冷冻液处于完全玻璃化状态下冷冻保存细胞、组织或器官 (Rall,1985)。为在一定冷冻速度下形成玻璃化 (直接投入液氮, $-2500^{\circ}\text{C}/\text{分}$),需要使用高浓度的可渗低温保护剂,然而浓度过高会对细胞有毒害作用。从理论上讲,如果以 $-1500^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 的速率进行降温,那么, 1.5 M 的任何低温保护剂都可以形成玻璃化,但这需要昂贵而复杂的仪器。近几年,人们通过减少冷冻液的体积和冷冻液与冷冻和解冻直接接触的方法来提高冷冻和解冻速度,从而最大限度低地减少冷冻液对胚胎的损害,其中 OPS 法 (Vajta, 1998a; 1198b) 和 MDS 法 (Arav, 1997; Martino, 1996; Papis, 2000) 获得较好的效果。

Rall and Fahy(1985)设计了一种用于小鼠保存胚胎的玻璃化冷冻方法。这种方法不仅简化了降温程序,减少了胞质外冰晶产生的各种物理和化学损伤,而且快速越过危险温度区从而减轻了在许多哺乳类胚胎中存在的低温打击现象。但是,胚胎还会受到溶液的毒性、胞质内冰晶形成、破裂损伤和渗透压损伤。简易而高效的玻璃化冷冻方法通过降低对胚胎造成伤害的各种机会而被发明了。在玻璃化冷冻中,首要的障碍是低温保护剂的毒性。

2 低毒玻璃化溶液

为在胚胎冷冻和解冻过程中形成一个完全无冰的环境,人们广泛地研究了各种抗冻物质的化学结构和抗冻特性 (Franks, 1987; Fahy, 1987; Boutron, 1990)。在玻璃化

冷冻中, 溶液抑制冰晶形成的能力是关键; 当温度降低后, 整个溶液变得非常粘稠, 最终进入一种玻璃化状态。各种溶液形成玻璃化的特性是不同的, 这是由于各种溶质与水分子相互作用时, 其促进玻璃化或抑制凝固的能力不同 (Macfarlane, 1986; 1990), 例如: 1,2 和 1,3-丙二醇达到玻璃化的浓度不同 (分别为 44%和 51%)。

在实际应用的冷冻速度下, 高的溶质浓度 (30%以上) 才可形成玻璃化, 因此必须考虑所用溶质的特性 (Arakawa, 1990)。目前研究的热点是找到一些能形成玻璃化而又没有毒性的溶质。减少高浓度溶液对胚胎的毒害主要有几个措施: 1) 通过二步平衡胚胎 (Kasai, 1990); 2) 缩短平衡时间 (Palasz, 1995); 3) 降低平衡温度 (Rall, 1992); 4) 使用蔗糖、海藻糖和聚蔗糖等抗毒性的物质 (Fahy, 1983; Boutron, 1994)。

2.1 渗透性冷冻保护剂

玻璃化溶液中最重要成份是渗透性试剂。一般为小分子物质, 在 0°C 以上很容易通过细胞膜进入细胞质。加入后, 细胞内部冰晶形成温度显著降低。此外, 保护剂与水分子结合形成氢键, 减低冻结部分电解质浓度, 因而减少对细胞的损伤。Rall 和 Fahy (1985) 用含有 6.5M (占总量) 的 DMSO (分子量 78.14)、乙酰胺和丙二醇 (分子量 90.12) 作为渗透性试剂。自他们报道后, 又发现了许多玻璃化液, 用单一的或组合的低温保护剂作为渗透性成份 (表 1)。渗透性试剂具有一定的毒性 (Kasai, 1992a), 在小鼠桑椹胚上对 5 种试剂的相对毒性进行了对比试验。在 20°C, 将胚胎悬浮在含 30% (V/V) 抗冻剂的 PBS 中 20min。实验结果表明, 乙二醇 (分子量 62.07) 毒性最小 (成活率 98%), 其次是甘油 (分子量 92.1) (成活率 88%)、DMSO (成活率 68%)、丙二醇 (成活率 16%), 乙酰胺毒性最强 (成活率 0%) (Kasai, 1994)。

评价抗冻剂的另一个重要特性是其渗透性。一般地, 快速渗透性试剂效果好, 因为在快速降温前的平衡时间可以缩短, 而且能迅速扩散到细胞外, 这样阻止了渗透压造成的伤害。为了比较抗冻剂的渗透速度, 观察了小鼠桑椹胚在 5 种低温保护剂溶液中悬浮 5 分钟的体积变化。如 Fig.1(a), 所示, 胚胎在乙二醇溶液中收缩最小, 恢复到原体积的速度最快, 说明在这 5 种试剂中, 乙二醇是渗透速度最快的抗冻剂。

如果考虑抗冻剂的毒性和渗透特性, 对小鼠桑椹胚而言, 乙二醇是作为玻璃化液

渗透成分的最佳选择试剂，甘油次之。

表 1 哺乳动物胚胎玻璃化冷冻保存溶液

Table 1 Vitrificati solutions used for the cryopreservation of mammalian embryos

Reference	Cryoprotective additives		
	Permeating agents (%,v/v)	Non-permeating agents	
		Macromolecules (%,w/v)	Saccharides (M)
Rall and Fahy,1985	18.6D+13.4A+9.6P	6PEG	-
Rall and Fahy,1985	16.7D+12A+8.7P	5.4PEG	-
Scheffen et al.,1986	25G+25P	-	-
Rall ,1987	40.3P	6PEG	-
Rall ,1987	47.4G	6PEG	-
Nakagata,1989	14.2D+5.1A+22P	-	-
Smorage et al.,1989	35G+35P	-	-
Liehman et al.,1990	50G	-	-
Landa and Tepla,1990	30G	-	1.0Suc
Kasai et al.,1990	40EG	18Ficoll	0.3Suc
Schiewe et al.,1991	47.4G	6BSA	-
Ishimori et al.,1992	25EG+25D	-	-
Leibo and Oda,1993	44EG	7.5PVP	-
Tachikawa et al.,1993	40G	18Ficoll	0.3Suc
Yoshino et al.,1993	40EG	18Ficoll	0.3Treha
Zhu et al.,1993	30EG	21Ficoll	0.35Suc
Tada et al.,1993	19.5D+20.2P	-	1.0Suc
Ali and Schelton,1993	31EG	-	1.0Suc
Saito et al.,1994	20EG+20G	-	0.75(Suc+Glc)
kaida et al.,1998	25EG+25G	-	1.7Gal
Sang Runzi et al.,1999	40EG	18Ficoll	0.3Suc
Zhu et al.,2000	40EG	18Ficoll	0.3Suc

Serum and BSA are not shown.

D,dimethyl sulphoxide; A, acetamide; P, propylene glycerol; EG, ethylene glycerol; PEG, polyethylene glycol; BSA, bovine serum album; Suc,sucrose; Treha,trehalose; Glc,glucose;Gal, galactose.

血清和 BSA 未列出。

D,二甲基亚砷 (DMSO);A, 乙酰胺; P,丙二醇; EG,乙二醇; PEG,聚乙二醇; BSA,牛血清白蛋白; Suc,蔗糖; Treha,海藻糖; Glc,葡萄糖; Gal,半乳糖。

2.2. 非渗透性冷冻保护剂

能溶于水，但不能进入细胞。主要通过改变渗透压引起细胞脱水，发挥非特异性保护作用，又称为细胞外冷冻保护剂。

2.2.1 大分子物质

大分子量(250000 道尔顿以上)不可渗物质例如聚蔗糖 Ficoll 70 (Kasai, 1990), 透

明质酸钠 (Palasi, 1993) 或温度滞后蛋白 (Rubinsky, 1992) 可以促进溶液的玻璃化形成 (Fahy et al., 1984), 也可以防止在解冻时的去玻璃化。大分子物质是低毒性的, 在一个毒性试验中发现 Ficoll 70 与 40% (V/V) 乙二醇混合时比丙二醇的毒性小 (Kasai, 1994)。其他大分子物质, 如聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP) (Fahy et al., 1984; Leibo 和 Oda, 1993)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (Schiewe et al., 1991)、聚乙烯醇 (PVA)、羟乙基淀粉及其他一些聚合物也用于玻璃化溶液中。但是 Palasz (1992) 报道, 在没有任何玻璃化促进分子的存在下, 使用乙二醇-蔗糖冷冻液也可以很好地玻璃化冷冻牛体外受精胚胎。在这种情况下解冻时冷冻液发生去玻璃化, 然而解冻时去玻璃化对胚胎活力没有影响 (Palasz, 1993)。因此, 冷冻时玻璃化溶液中形成的冰晶, 以及解冻时出现冰晶化可能不会损伤胚胎, 这表明细胞外形成冰晶, 而胚胎细胞内仍为稳定的玻璃化状态。

2.2.1 糖类

作为非渗透性试剂, 蔗糖 (分子量 342.3) 产生相当的渗透压效应。在含 40% (V/V) 乙二醇和 18% (V/V) 聚蔗糖的玻璃化液中, 发现蔗糖的参与降低了玻璃化溶液的毒性, 可能是由于胞质内抗冻剂的数量被降低 (Kasai et al., 1990)。这种有益的效应不是蔗糖特有的, 海藻糖 (分子量 378.3) (Yoshino et al., 1993) 也具有一定的渗透压效应。葡萄糖 (分子量 181.1)、果糖 (分子量 180.16) 和半乳糖 (分子量 180.2) 也是无毒性的糖类

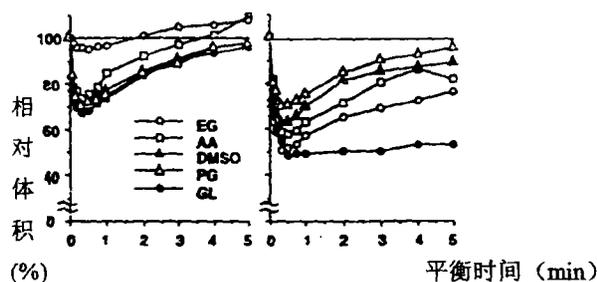


Fig. 1.(a) 桑椹胚

Fig. 1.(b) 1-细胞胚胎

Fig.1 20℃, 小鼠桑椹胚和 1-细胞胚胎在不同渗透性试剂 (10%(V/V)) 中平衡不同时间的体积变化

EG, 乙二醇; AA, 乙酰胺; DMSO, 二甲基亚砷;
PG, 丙二醇; GL, 甘油

(Kasai,1986)。

尽管这些低温保护剂的作用目前还未完全弄清,但它们在胚胎冷冻和解冻所起的作用是不同的。低分子量的可渗物质是必需的,它们可将胚胎细胞内的水分置换出来,在缓慢的冷冻过程中减少体积的变化并减少细胞内冰晶的体积或不致生成冰晶。低分子量不可渗物质的作用主要是促进胚胎冷冻前脱水,从而减少冷冻过程中冰晶的生成。所以低分子量不可渗物质必须和低分子量可渗物质结合才能有效地保护胚胎细胞。大分子量不可渗物质可使冰晶的大小和形状发生改变,从而减少在冷冻解冻过程中对胚胎的损害。

在实际应用中,常规的方法只使用一种冷冻保护剂,例如甘油、乙二醇或丙二醇(Schneider,1986;Suzuki,1990;Voelkel,1992)。然而,快速冷冻和玻璃化冷冻常应用多种低温保护剂,甘油和乙二醇,甘油和丙二醇或者乙二醇和丙二醇,再加入蔗糖,葡萄糖或半乳糖(Leibo, 1993;Rall,1987; Rayos,1992; Scheffen, 1986; Shaw, 1991; Széll,1994),甘油可调节细胞脱水并保护蛋白结构,而对于糖类,例如,海藻糖可以保持膜结构,甘油本身并不能保持细胞膜结构,但在高浓度和高温下可以诱发膜融合(Wommersley,1986),因此,解冻后须尽快除去甘油。这些不同低温保护剂的特性表明,它们是以不同方法来保护胚胎细胞免受冷冻损伤,有效的低温保护液应该各种低温保护剂的特性结合起来。近年来,乙二醇由于其低毒,渗透性快的特点受到人们的重视。利用乙二醇设计出许多有效的抗冻保护剂溶液(表2)。低温保护液通常用缓冲的PBS液来配制,且保持7.2-7.4的pH值,也有人使用简单的生理盐水或TCM-199来配制低温保护液。

2.4 玻璃化液的组成

经过对每一类低温保护剂中不同试剂特性的研究,发明了玻璃化液。精心设计的EFS40,含40%(V/V)乙二醇,18%(V/V)聚蔗糖和0.3M蔗糖(Kasai et AL.,1990),配制这种溶液的详细步骤也作了描述(Kasai,1995)。此后又研究了玻璃化溶液GFS40,用40%(V/V)甘油代替了40%(V/V)(Tachikawa et al.,1993;Zhu et al.,1994)。同样的溶液也被开发中40%GLYAROL代替了40%。EFS30是一种毒性更低的玻璃化溶液,它的乙二醇浓度有所降低(30%(V/V)),聚蔗糖和蔗糖的浓度未变(Zhu et al.,1993)。但是,这种溶液在解冻过程中会产生去玻璃化。

表 2 以乙二醇为冷冻保护剂的主要研究进展

Table 2 Research progress on ethylene glycol as cryoprotectant

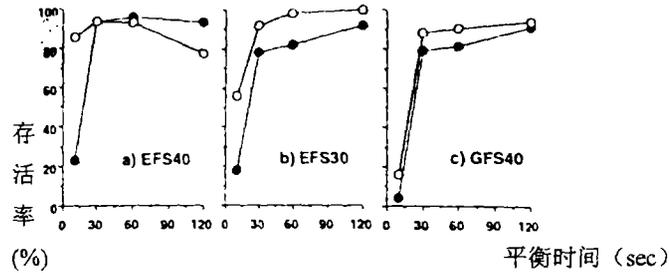
时间	作者	动物	发育阶段	冷冻液
1977	Miyamoto	mouse, rat	8 cell	2.0M EG 20.5%DMSO, 15.5%acetamide
1985	Rall	mouse	8 cell	10%propylene glycol 6%polyethelene glycol (VS1)
1986	Leibo	cattle, sheep	morula,	2.0M EG 40%EG30%Fic
1990	Kasai	mouse	morulae	0.5M Suc(EFS)
1991	Voelkel	bovine	blastocyst	1.5M EG
1992	Valdez	mouse	blastocyst	20%EG 20%DMSO 10%1,3butanediol
1992	Ishimori	mouse	blastocyst	25%EG 25%DMSO 5.5M EG+2.5M glycerol
1993	Ali	mouse	all stages	6.0M EG+1.8M glycerol 5.5MEG+1M Suc
1993	Ali	sheep	blastocyst	5.5M EG+2.5M glycerol 6.0M EG+1.8M glycerol 5.5MEG+1M Suc
1993	Tachikata	bovine	blastocyst	EFS
1993	Mahmoudzade	bovine	compact morula, early blastocyst	VS1
1994	Hochi	equine	compact morula, early blastocyst	EFS
1994	Zhu	mouse	expanded blastocyst	50% glycerol 30%Fic 0.5M Suc
1994	Szell	sheep	compact morula, early blastocyst	3.5M glycerol 4.5M EG
1995	Mahmoudzade	bovine	compact morula to expanded blastocyst	EFS
1995	Naitana	sheep	compact morula to expanded blastocyst	3.4M glycerol 4.6M EG+20%FCS
1997	Bautista	mouse	8 cell	7M EG+10%FCS
1998	Kobayashi	pig	blastocyst	8.0M EG+7%PVP
1998	Kaidi	bovine	blastocyst	25%EG10% glycerol 1.7M galactose 20%FCS
1999	Sang Runzi	bovine	morulae, blastocyst	40%EG 18%Fic 0.3M Suc
2000	Zhu	sheep	blastocyst	40%EG 18%Fic 0.3M Suc

3 溶液的毒性和胞质内冰晶的形成

3.1 平衡时间

避免玻璃化溶液毒性的方法之一是缩短胚胎在溶液中平衡的时间。但是，如果平衡时间太短，抗冻剂的渗透不充分，而且会形成胞质内冰晶而胞质外无冰晶形成。因此，成功的玻璃化冷冻所需的适当的平衡时间应该是在降低溶液毒性伤害和阻止胞质内冰晶形成之间的协调。

将小鼠桑椹胚在 20°C，EFS40 中平衡后进行玻璃化冷冻，得到了相当高的存活 Fig.2(a)；Kasai,1994)，而且平衡的时间范围大(30s—5min)。而在含 DMSO,乙酰胺和丙二醇等毒性高的溶液中，胚胎要存活，在这些溶液中只能暴露 10s



●小鼠桑椹胚在 20°C 平衡不同时间进行玻璃化冷冻
○小鼠桑椹胚在 25°C 平衡不同时间进行玻璃化冷冻

Fig. 2 小鼠桑椹胚在 20°C 和 25°C 平衡不同时间玻璃化冷冻后的存活率

(Nakagata, 1989)。这些结果表明小鼠桑椹胚的细胞质能快速收缩而且对 EFS40 的毒性并不十分敏感。另一方面，用同样的步骤玻璃化冷冻小鼠扩张囊胚，最高存活率仍可达 57% (Miyake et al., 1993)，表明在足够的乙二醇渗透前，胚胎受到毒性伤害，可能是乙二醇进入了囊胚腔。在这种情况下，二步法提高了存活率 (Zhu et al., 1993)：胚胎在置于 EFS40 前，首先平衡在一个稀释的乙二醇溶液中。这样，适当的平衡时间和程序随着进行玻璃化冷冻时胚胎的发育阶段而不同。从不同抗冻剂的渗透性对小鼠 1-细胞胚胎影响的实验中进一步验证了胚胎发育阶段的重要性。如图 1 (b) 所示；多数试剂在 1-细胞胚胎中的渗透速度比在桑椹胚中慢；而且渗透模式也与从对桑椹胚的实验中观察到的不同，表明即使最佳抗冻剂也会由于发育阶段不同而产生不同的作用特点。

胚胎玻璃化冷冻的适当条件也存在种间差异，因为胚胎的特性，例如大小、形状、细胞膜的特性和对抗冻剂毒性的敏感性不同。EFS40 的有效性已在小鼠的原核到扩张囊胚 (Miyake et al, 1993; ZHU et al.,1993)、家兔桑椹胚(Kasai et al.,1992b)、体外生产的牛囊胚(Tachikawa et al.,1993; Mahmoudzadeh et al.,1993)和 马的囊胚(Houchi et al.,1994)上得到证实。

3.2 平衡温度

抗冻剂的渗透性和毒性在很大程度上受温度的影响,降低温度可以减小毒性(Rall and Fahy,1985)。玻璃化冷冻小鼠桑椹胚在 EFS40 中平衡的适宜温度为 5℃(Kasai et al.,1992a)。但是,对于小鼠的扩张囊胚,降低平衡温度并没有提高存活率,可能由于低温不能使乙二醇充分渗透(Zhu et al.,1993)。在这种情况下,升高平衡温度,缩短平衡时间似乎可行,因为小鼠囊胚在 30℃平衡 30 秒进行玻璃化冷冻后得到 93%(108/116)的存活率,胚胎存活率随着平衡时间延长而显著下降(Zhu,1995)。

3.3 其他玻璃化液

小鼠桑椹胚在 20℃, EFS30 中平衡 2 分钟后进行玻璃化冷冻,存活率和用 EFS40 冷冻的效果一样。正如我们期望, EFS30 比 EFS40 毒性小,但需较长的平衡时间和更高的温度来获得高存活率(Fig, 2 (b))。GFS40 是一种抗冻剂的渗透性比 EFS40 低的玻璃化液,也得到了与 EFS30 相同的效果(Fig, 2 (c))。

4 破裂损伤

玻璃化冷冻后,偶尔发现破裂胚胎。这种物理损伤被认为是在相变期间溶液不均一的体积变化引起,称为破裂损伤(Rall 和 Meyer, 1989)。在常规冷冻中,50%以上的胚胎受到物理损伤,在这方面做了努力减少这种伤害(Rall and Meyer, 1989; Landa, 1982)。在玻璃化冷冻中,尽管降温和解冻相当迅速,但物理损伤的几率比常规冷冻低的多,可能由于没有冰晶形成。在用 EFS40 进行玻璃化冷冻,小鼠桑椹胚透明带损伤的比率为 1.6%,家兔桑椹胚为 3.6%(Kasai et al.,1992b)。为了研究玻璃化过程中的物理损伤,对小鼠囊胚进行了 10 个循环的玻璃化冷冻和快速解冻,结果 75%的胚胎发现透明带损伤。由于快速相变是由快速降温和解冻引起,第二个试验中,将胚胎悬浮于液氮蒸汽(3min)或室温下(15s)使其更慢地通过相变发生的温度区(-110—-130℃)(Rall et al.,1984;Rall,1987)。慢速降温后进行快速解冻或快速降温后慢速解冻,经过十轮玻璃化冷冻-解冻后,透明带损伤胚胎的百分率分别为 41%和 16%,表明破裂损伤在两种过程中都发生,但在解冻过程中损伤更多。最后,降温和解冻都缓慢进行,即使经过十轮玻璃化冷冻-解冻,100%胚胎保持透明带完整。因此,通过缓冲越过危险温度区冷冻和解冻速率,完全可以阻止破裂损伤。这种方法对家兔胚胎尤其有效,因为完整的透明带是家兔胚胎在体内发育所必需的。

5 渗透损伤

由于玻璃化液有毒性,解冻后必须使溶液快速稀释。当渗透了抗冻剂的胚胎直接放入等渗溶液中,他们就会受到渗透压增大的威胁而受伤害,因为水的渗透速度比抗冻剂扩散的速度快(Jackowski et al.,1980)。为了抵抗过多的水渗入,通常将胚胎悬浮在蔗

糖溶液中 (Kasai et al.,1980;Leibo,1983) .但是蔗糖的浓度必须足够高以阻挡任何对胚胎形成膨胀的因素。防止这种损伤的有效方法是在将胚胎放入蔗糖液之前, 悬浮在含有抗冻剂和蔗糖的混合溶液中, 使胚胎收缩 (Kasai et al.,1980)。用 EFS 溶液进行玻璃化冷冻过程中, 含蔗糖的溶液促进收缩, 减低了稀释前胞质内乙二醇的数量。乙二醇的快速渗透性使它迅速地从细胞中扩散出去。因此, 胚胎可以直接在 0.5M 蔗糖液中脱抗冻剂从而有效地受到保护而免受渗透压损伤。

Mazur 和 Schneider(1986)发现小鼠和牛的新鲜胚胎在等渗溶液中, 当体积增大到原来的 2 倍仍能存活。超过 80% 的新鲜小鼠囊胚在 25℃, 0.3x 等渗溶液中, 能存活 30min. 玻璃化冷冻后的小鼠囊胚置于高渗溶液中, 只有 12% 的胚胎存活。这些结果表明, 冷冻后的胚胎比新鲜胚胎对渗透压损伤更敏感。

有些动物的某些发育阶段的胚胎还没有得到有效的冷冻保存。卵母细胞对低温的敏感性比胚胎强 (Parks and Ruffing,1992) 对这些胚胎和卵母细胞进行成功的玻璃化冷冻, 渗透损伤可能是最大的困难, 因为形态正常的细胞在等渗溶液中, 有时观察到它们失去清晰的轮廓和退化。

6 结论

低毒玻璃化液, 精心设计的 EFS, 综合了三种不同种类试剂的特点, 也就是说, 乙二醇作为毒性小、渗透性快的低温保护剂, 大分子物质聚蔗糖和低分子量双糖蔗糖作为非渗透性低温保护剂。玻璃化液对许多哺乳动物的胚胎在室温下短时间平衡后, 进行玻璃化冷冻都是有效的。但是, 适宜的平衡时间决定于 (1) 乙二醇浓度 (2) 温度 (3) 胚胎的种类和发育阶段。如果胚胎在抗冻剂充分渗入前有被伤害的可能, 那么二步法可以提高存活率。破裂损伤完全可以通过缓慢降温和解冻防止。对许多胚胎, 用蔗糖液能有效脱去渗入的乙二醇, 因为 EFS 中的蔗糖液促进了收缩。冷冻过的细胞对渗透压增大比新鲜细胞敏感, 因此对一些胚胎和卵母细胞而言, 渗透损伤仍是一大障碍。

Abstract

Vitrification greatly simplifies the cooling process for embryo cryopreservation, and eliminates any injuries caused by extracellular ice. However, embryos may be injured by various factors, such as the toxicity of the solution, intracellular ice, fracture damage and osmotic swelling. By minimizing the effect of each of these factors, refined procedures for simple and efficient vitrification have been developed for mouse embryos.

Keywords: Vitrification; Cryopreservation; Embryo; Ethylene glycol; Mouse