

包被方法对小鼠半胚冷冻效果的影响

张 涌 王建辰

(兽 医 系)

摘 要 将小鼠囊胚一分为二后,采用血清-琼脂法(A),透明带-琼脂法(B)和双层透明带法(C)包被半胚。在RPE冷冻仪的控制下,对包被半胚进行冷冻。解冻后将360枚半胚进行体外培养。A, B, C三组的半胚发育率分别为69.2% (83/120), 67.5% (81/120)和60% (72/120)。将12对在冷冻前用A法包被的解冻半胚移植于6只假孕母鼠,结果有3只妊娠,共产半胚鼠8只,其中3对为同卵双生。实验证明,本研究建立的血清-琼脂包被法操作简便,效果良好,便于应用,是一种较理想的包被半胚新方法。

主题词 卵子移植/半胚冷冻, 包被方法, 小鼠

近年,绵羊、牛及山羊半胚冷冻在国外已相继获得成功^[1-3],但未曾见到通过移植冷冻—解冻半胚获得小鼠同卵双生后代的报道。

由于半胚本身的特殊性,在冷冻前需采用一些特殊的保护措施,以减轻冷冻和解冻对其损伤。目前,在家畜上常采用的方法有两类:①将半胚装入透明带后再用琼脂^[3]或聚赖氨酸/藻酸盐^[4]包被;②用双层透明带包被^[2]。上述两种方法均需事先制备大量空透明带,而且将半胚装入空透明带需在显微操作仪的控制下进行,费时、费力、不便应用。所以有必要摸索一种新的简便包被法。

本研究的目的是通过与透明带-琼脂包被法和双层透明带包被法相比较,检验采用血清-琼脂包被法的半胚冷冻效果,建立一种简便有效的包被半胚新方法。

1 材料与方法

1.1 超排和采卵

用PMSG(长春生物制品研究所产,批号:873)和HCG(宁波激素制品厂产,批号:870012)诱导雌性小鼠(昆白和615)超排^[5]。于注射HCG后,立即将其与同品种公鼠放在一起过夜。于见栓后第三天下午杀死供体鼠,用含10%犊牛血清(FCS)的磷酸缓冲液(PBS)从子宫回收胚胎。在实体显微镜下选择形态良好的囊胚用于分割。

1.2 分 割

将胚胎和小滴含10%FCS的PBS液置于分割板上,在实体显微镜下(A)或在显微操作仪的控制下(B),用显微手术刀将胚胎分割为二。

1.3 包 被

采用下列三种不同方法包被半胚:(1)将用A法分割而成的半胚和小滴FCS移入降

文稿收到日期:1989-10-06。

本研究为国家教委“资助优秀青年教师基金”项目。

温至39℃的1.0%琼脂中,然后迅速将半胚吸入包被管的尖端。2~3 min后,将琼脂筒从包被管中驱出,移入含10%FCS的PBS液中修剪。每个琼脂筒的直径约0.3 mm,长度约1 mm。将琼脂筒放入(4)在显微操作仪的控制下,将用B法分割而成的半胚装入空透明带内,然后再将4~6枚装入透明带的半胚按上述方法包在一个琼脂筒内。(3)在显微操作仪的控制下,将用B法分割而成的半胚依次装入两层透明带内^[2]。这两个透明带切口的方向相反。

1.4 冷冻

将含有半胚的琼脂筒和装入双层透明带的半胚移入含10%甘油的PBS液中分别平衡40, 30 min。之后将其装入0.25 mL塑料细管。在RPE简易冷冻仪的控制下对上述细管进行冷冻。先以1℃/min的速度降温至-7℃。诱发结晶^[6]后,以0.1℃/min的速度缓慢降温10 min。然后再以0.3℃/min的速度继续冷冻至-35℃,将细管投入液氮。

1.5 解冻和去除甘油

2~5 d后,将冷冻细管从液氮中取出,投入35℃的水浴中解冻。将装有半胚的琼脂筒和双层透明带包被半胚移入含0.5 M蔗糖的PBS液中分别平衡40和30 min去除甘油。

1.6 培养

在实体显微镜下,用尖头异物针拨离琼脂,释放出半胚。按包埋方法,将半胚移入小滴含15%FCS的TCM-199液中,在37℃和5%CO₂, 95%空气的环境中分别进行培养。12~24 h后,观察和记录发育为囊胚的半胚数。

1.7 移植

选择情期与胚龄相符的假孕母鼠作受体。在移植前,用异戊巴比妥钠作全身麻醉。手术切开腹壁,暴露双侧子宫,用玻璃细管将在冷冻前用(1)法包被的解冻半胚移入两侧子宫内(每侧移1对半胚)。

1.8 观察与记录

术后注意受体是否返情,妊娠者待其足月生产。产后立即记录产仔数、妊娠期。半月后鉴别仔鼠性别。

1.9 统计分析

用方差分析法对半胚体外培养结果进行统计处理。

2 结果

2.1 分割结果

共分割196枚胚胎,其中192枚被分割为384枚体积相等、无明显损伤的半胚。分割成功率为97.9%。

2.2 解冻半胚体外培养结果

按包被方法,将360枚解冻半胚分组进行培养,各组的半胚发育情况见表1。

表1表明,A,B两组的半胚发育率均显著高于C组($P < 0.05$),但A组和B组相比,半胚发育率的差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 移植结果

将12对解冻半胚移植于6只受体,移植后8~12 d,有3只返情,其余3只妊娠

表1 包被方法对半胚冷冻效果的影响

组别	包被方法	半胚发育率 (发育数/培养数)		平均发育率 (发育数/总数)
A	血清-琼脂	66.7 (20/30)	70.0 (21/30)	69.2 (83/120)
		73.3 (22/30)	66.7 (20/30)	
B	透明带-琼脂	66.7 (20/30)	70.0 (21/30)	67.5 (81/120)
		70.0 (21/30)	63.3 (19/30)	
C	双层透明带	60.0 (18/30)	56.7 (17/30)	60 (72/120)
		63.3 (19/30)	60.0 (18/30)	

(50%), 产足月半胚鼠 8 只 (33.3%), 其中 3 对 (25%) 为同卵双生。3 只妊娠受体的妊娠及产仔情况见表 2。

表2 3只妊娠受体的妊娠及产仔情况

受体号	移植半胚数 (对)	妊娠期 (d)	产仔数 (只)	仔鼠性别	同卵双生数 (对)
1	2	22	1	1 ♂	
3	2	20	4	2 ♂ 2 ♀	2
6	2	21	3	2 ♂ 1 ♀	1

注: 1, 3, 6号受体的产仔时间分别为1988年的7月2日, 7月9日, 7月23日。

3 讨 论

目前, 国外学者常采用双层透明带或透明带-琼脂包被冷冻前家畜半胚。本研究根据半胚冷冻的特点, 建立了用血清-琼脂包被半胚的方法。此法和国外学者常用的两种方法相比, 可省去事先制备空透明带和在显微操作仪的控制下将半胚装入空透明带的过程, 在实体显微镜下, 仅用 1 min 左右即可将 4~6 枚小鼠半胚包在一个琼脂筒内。本研究通过比较不同实验组的半胚体外发育率, 证明血清-琼脂包被组的半胚冷冻效果略好于透明带-琼脂包被组, 显著好于双层透明带包被组。上述情况说明, 血清-琼脂包被法操作简便, 效果良好, 便于应用。

关于血清-琼脂膜保护半胚免受冷冻损伤的确切机理现在还不完全清楚。但可以设想, 用血清-琼脂包埋后, 半胚处于一个相对封闭的小环境中。这个小环境可能有以下两方面的作用: ①在冷冻和解冻过程中, 可使半胚细胞不会因受渗透压变化的影响而离散; ②可将半胚与周围环境隔开, 避免周围冰晶对半胚造成机械性损伤。琼脂对构成这一小环境无疑起关键作用。而位于琼脂筒内和半胚外周的微量血清则可降低脱离琼脂的难度, 减小异物针损伤半胚外周细胞的机率。

将解冻半胚移植后, 本研究获得的半胚体内发育率和同卵双生率分别为 33.3% 和 25%, 均略高于同实验室小鼠胚胎分割的相应结果 (28.6%, 21.4%)^[6], 但略低于国外小鼠胚胎分割的相应结果 (41.7%, 26.4%)^[7]。

参考文献

1. Willadsen S M. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *J. Reprod. Fert.*, 1980, 59: 357~362
2. Niemann H, Brem G et al. An approach to Successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. *Theriogenology*, 1986, 25: 519~524
3. Tsunoda Y, Tokunaga T et al. Beneficial effect of agar for the frozen storage of bisected embryos. *Theriogenology*, 1987, 28: 314~323
4. Hollingsworth T S, Page R D. The effect of microencapsulation on freezing bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 1988, 29: 262
5. 张涌, 钱菊汾, 王建辰等. 小鼠胚胎分割方法及同卵双生实验. 西北农业大学学报, 1987, 15 (2): 10~16
6. 芮荣, 王建辰等. 山羊胚胎筒梗快速冷冻试验. 待发表.
7. Nagashima H, Matui K et al. Production of monozygotic mouse twins from micro Surgically bisected embryos. *J. Reprod. Fert.*, 1984, 70: 357~362

Effect of Embedmental Methods on Freezing of Demi-Embryos in Mouse

Zhang Yong Wang Jianchen

(Department of Veterinary Medicine)

Abstract Blastocysts of mouse were bisected and demi-embryos were embedded by following methods: (A) demi-embryos without Zona Pellucida (ZP) were embedded with serum and agar; (B) demi-embryos inserted into ZP were embedded with agar; (C) demi-embryos with ZP were inserted into an additional ZP. The embedded demi-embryos were frozen. And after thawing, 360 demi-embryos were cultured in vitro. The proportion of demi-embryos that developed into blastocysts in group A, group B and group C was 69.2%(83/120), 67.5%(81/120) and 60%(72/120) respectively. Twelve pairs of frozen-thawed demi-embryos that were not cultured after removal of glycerol were transferred into 6 pseudopregnant recipients; 3 of which become pregnant, and 8 young mice were obtained, including 3 pairs of monozygotic twins. The present study demonstrated that high survival of frozen-thawed demi-embryos can be obtained by embedding demi-embryos without ZP with serum and agar before freezing.

Subject words oviduct transfer/freezing of demi-embryos, embedmental method, mouse