

奶牛胚胎一步冷冻保存的研究*

王新庄 窦忠英 唐铁山 高志敏 樊敬庄

(西北农业大学奶牛胚胎移植试验站, 陕西杨陵 712100)

摘要 用FSH+PGF₂超排黑白花奶牛22头,以非手术方法采得7~8日龄胚胎68枚,其中45枚胚胎用于一步冷冻试验。水浴解冻后共回收40枚胚胎。用1.0 mol/L蔗糖一步除去保护剂,胚胎形态完好率为90%(36/40),荧光染色阳性率为87.5%(7/8),体外培养发育率为75%(6/8),冻胚移植受体妊娠率为43.5%(10/23)。

关键词 一步冷冻,妊娠率,冷冻胚胎,奶牛

中图分类号 S814.6, S823.913.6

1984年,Takeda等^[1]首先采用甘油和蔗糖作为胚胎冷冻保护剂,将小鼠胚胎室温脱水后直接投入液氮冷冻保存,解冻后囊胚发育率为61%~65%。Chupin等^[2]用甘油、蔗糖作为冷冻保护剂,将牛胚胎直接投入液氮冷冻保存,解冻后胚胎发育率为50%;同样的处理,冻前胚胎在液氮罐颈部预冷5 min后投入液氮,解冻后胚胎发育率为67.7%。国内旭日干^[3]、王新庄^[4]、朱壁科^[5]及刘伯宗^[6]先后一步冷冻大鼠、小鼠、家兔及山羊胚胎均获得成功。本试验的目的是研究用甘油、蔗糖作为冷冻保护剂进行奶牛胚胎一步冷冻的方法,初步建立奶牛胚胎一步冷冻保存的程序。

1 材料与方法

1.1 材料

供体牛为西北农业大学奶牛胚胎移植试验站供体牛场饲养的成年健康黑白花奶牛。受体牛为武功镇农家黄牛和黑白花奶牛,健康。FSH(宁波:批号921023),15-甲基PGF₂ (上海:批号:920101),冲胚液(含1%犊牛血清的PBS),胚胎保存液(含20%犊牛血清的PBS,即PBSS),冷冻保护液A(含1.4 mol/L甘油的PBSS),冷冻保护液B(含2.1 mol/L甘油+0.25 mol/L蔗糖的PBSS),除甘油液(含1.0 mol/L蔗糖的PBSS),胚胎培养液(含10%犊牛血清的TCM-199液),荧光染色液1 mg/mL FDA的丙酮液,荧光显微镜(日本,Olympus),CO₂培养箱(美国,2300型),实体显微镜(日本,Olympus),液氮罐(河南30 L),奶牛非手术采胚移植器械(西德)。

1.2 方法

超排与采胚 采用常规方法(FSH+PG)超排处理供体牛,非手术方法从牛子宫采集7~8日龄胚胎。实体镜下,从回收的冲胚液中取出胚胎,移入保存液中评定。选择透明带完整、胚胎细胞结构紧密、颜色均匀的一级桑椹胚或囊胚用于冷冻保存^[7]。

冷冻方法 室温下,将形态正常的一级胚胎移至冷冻保护液A平衡20 min,再移入

收稿日期:1995-12-08

*农业部生物技术重点资助项目。

冷冻保护液 B 中 7 min 并装管。后按照程序 I 和程序 II 进行胚胎冷冻试验。程序 I: 将含有胚胎的塑料细管直接投入液氮中冷冻, 在液氮中将其装入提前预冷并标记供体牛号、胎龄、胚胎种类、公牛号及日期的粗塑料管内保存, 如图 1。程序 II: 将含有胚胎的细管在液氮罐颈部预冷 5 min 后投入液氮保存, 装入粗塑料管同程序 I。在程序 II 中, 胚胎应处于液氮面上方 $((2/3)d+1)$ cm 处 (“ d ”为液氮面距液氮罐口的距离, cm)^[2], 如图 2。

解冻及除去保护剂 从液氮罐内取出粗塑料管, 剪掉一端封口, 倒出细管并置于 30~37℃ 水浴解冻 10 s。剪去细管两端封口, 胚胎直接移入去除保护剂液内, 孵育 7 min, 再用 PBSS 洗 2 遍。在实体镜下计数、分类, 并作形态学评定。

1.3 冷冻效果评价

形态学观察 解冻后胚胎透明带完整、细胞结合较紧密、卵周隙适中、形态完整的胚胎为可用胚。如果透明带破损或分裂球砂粒样变, 细胞离散或细胞团部分脱出者为形态不完整胚, 不可应用。

荧光染色检查 将除去冷冻保护剂的胚胎清洗后移入含 5 μ L FDA 染色液的 2 mL PBSS 中, 38.5℃ 孵育 5 min。用 PBSS 洗 2 遍并移入盛有一滴 PBSS 的玻片上, 在荧光镜下观察。胚胎整个发强荧光者为阳性。计算荧光阳性率, 以此评估冷冻胚胎的活力。

体外培养 将清洗过的冻胚移入孵育好的 TCM-199 培养液中进行微滴培养 (5% CO₂, 38.5℃, 饱和湿度), 12 h 及 24 h 分别观察培养发育情况。统计胚胎体外发育率, 以判定冻胚的活力。

胚胎移植 采用非手术方法, 将解冻后可用胚胎移植到同期发情受体牛黄体侧子宫尖端。个别移 2 枚胚胎者, 两侧子宫角各移植 1 枚。

统计分析 试验结果用 t 检验进行差异的显著性检验。

2 结果

2.1 不同发育阶段胚胎冷冻效果

由表 1 可见, 桑椹胚同囊胚形态完整率无明显差异 ($P>0.05$); 胚移植后受体妊娠率亦无明显差异 ($P>0.05$)。

2.2 两种冷冻程序冷冻奶牛胚胎效果比较

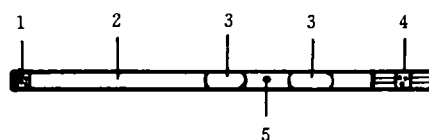


图 1 胚胎装管示意图

1. 聚乙烯粉; 2. 冷冻液; 3. 气泡; 4. 棉塞; 5. 胚胎

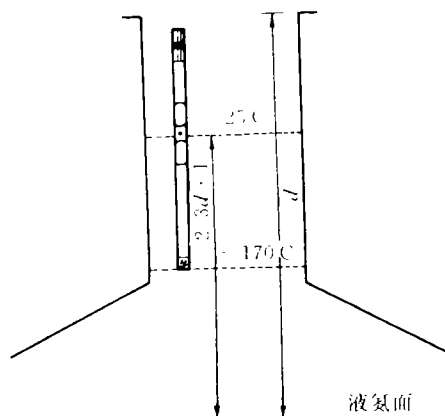


图 2 细管及胚胎在液氮罐内的位置

由表 2 可见,程序 I 所冻胚胎解冻后,形态完整率极显著优于程度 I ($P<0.01$);移植结果无明显差异。

表 1 不同发育阶段胚胎冷冻效果

胚胎发育阶段	冷冻胚 (枚)	回收胚 (枚)	形态完整胚 (%)	移植受体 (头)	妊娠头数 (%)	产犊 (头)
桑椹胚	22	19	17(89.5)	11	4(36.4)	4
囊胚	23	21	19(90.5)	12	6(50.0)	6
总计	45	40	36(90.0)	23	10(43.5)	10

表 2 两种程序冷冻奶牛胚胎的比较

程序	冷冻胚 (枚)	回收胚 (枚)	形态完整胚 (%)	移植受体 (头)	妊娠头数 (%)	产犊 (头)
I	23	19	15(71.4)	10	3(30.0)	3
II	22	21	21(100)	13	7(53.9)	7
总计	45	40	36(90.0)	23	10(43.5)	10

2.3 荧光染色检查

将 8 枚形态完整胚胎进行荧光染色,经荧光显微镜检查,其中 7 枚呈阳性,1 枚胚胎为阴性,冻胚荧光染色阳性率为 87.5%(7/8)。

2.4 体外培养

将 8 枚形态完整胚(含荧光染色阳性胚胎 5 枚)置于 TCM-199 液中微滴培养。24 h 后,5 枚胚胎发育为扩张囊胚,并有 1 枚胚胎孵化,体外培养发育率为 75%(6/8)。

2.5 胚胎移植

选择 25 枚形态完整胚移植给 23 头同期发情的受体牛子宫角尖端,结果有 10 头受体妊娠,受体妊娠率为 43.5%(10/23),并产下 10 头犊牛(7 公,3 母)。

3 讨 论

冷冻保护剂 超低温冷冻后,胚胎在冷冻保护剂中的存活由脱水程度和降温速率决定。室温下不能渗入细胞的微小颗粒如蔗糖能诱发胚胎脱水,通常把蔗糖和冷冻保护剂(如甘油)一起使用^[2]。Takeda 等^[1]用 0.25~0.50 mol/L 蔗糖配合 2.0~3.0 mol/L 甘油,冷冻 8 细胞小鼠胚胎获得了成功。Renard 等^[8]用 0.5 mol/L 的蔗糖冷冻兔胚得到 67.7%的存活率。Chupin 等^[2]认为蔗糖的最佳浓度为 0.25~0.50 mol/L,同时指出,0.25 mol/L 蔗糖几乎能用于各种动物胚胎的一步冷冻。Massip 等^[9]采用 1.4 mol/L 甘油+0.25 mol/L 蔗糖的组合,一步冷冻奶牛胚胎,移植后受体妊娠率为 38.1%。王新庄等^[4]选用 2.1 mol/L 甘油+0.25 mol/L 蔗糖作为冷冻保存液一步冷冻小鼠胚胎,冻胚体外培养发育率为 71.4%,受体妊娠率为 43.0%。本研究正是在此基础上,采用 2.1 mol/L 甘油+0.25 mol/L 蔗糖的 PBSS 一步冷冻奶牛胚胎。

冷冻程序 Takeda 等^[1]观察到小鼠胚胎室温脱水后直接投入液氮有较高的存活率。Chupin 等^[2]用同样的方法冷冻大鼠和奶牛胚胎获得成功。对比实验中,若在投入液氮前将液氮罐颈部预冷 5 min,能够提高冻胚存活率。如不预冷直接投入液氮冷冻解冻时,容易导致细管破裂而丢失胚胎。本研究中,试验 I 胚胎回收率为 82.6%,而试验 II 胚胎回收率为 95.5%,且未出现一例细管破裂现象。采用这两种程序冷冻胚胎,冻胚解冻后形态正

常率分别为71.4%和100%,两者间差异极显著($P<0.01$)。可见胚胎冷冻前预冷5 min 优于不预冷的直接冷冻。

去除冷冻保护剂的方法 胚胎冷冻采用的冷冻保护剂,对胚胎具有一定的毒害作用。因此,在胚胎解冻后必须尽快除去。传统的脱除方法是用保护剂浓度递减法逐渐稀释,最终移至无保护剂的培养液中,现多用非渗透性物质(如蔗糖)除去冷冻保护剂。Renard^[8]、Chupin^[2]、王新庄^[4]及刘伯宗等^[6]在对家兔、大鼠、奶牛、小鼠和山羊冷冻胚胎去除保护剂时,均采用1.0 mol/L 或0.5 mol/L 的蔗糖,取得良好效果。进而发现,用1.0,0.5 mol/L 蔗糖两步除去山羊一步冷冻胚保护剂,同用0.5 mol/L 蔗糖一步除去无差异^[6]。本研究采用1.0 mol/L 蔗糖一步除去保护剂取得了比较理想的效果,尤其在程序Ⅰ中,胚胎移植后受体妊娠率为53.8%,同常规奶牛胚胎冷冻结果相比无明显差异。

受体妊娠率 与冻胚荧光阳性率和体外培养发育率相比,移植受体妊娠率较低。这是因为荧光染色检查和体外培养,是在冻胚解冻后立即进行的,而胚胎移植的结果与胚胎体外保存时间受体同期化程度、受体状况、操作过程以及操作人员熟练程度等诸多因素密切相关。除此之外,本试验数目偏少,还有待于进一步的工作。

参 考 文 献

- 1 Takeda T, Elsden R P, Seidel Jr G E. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 1984, 21: 266 (Abstr.)
- 2 Chupin D. Quick freezing of rat and cow embryos after dehydration at room temperature. *Reproductive Physiology*, 1986, 37: 167~175
- 3 旭日干, 薛晓先, 张锁链等. 大鼠早期胚胎的快速冷冻保存. *内蒙古大学学报*, 1989, 20(1): 126~131
- 4 王新庄, 窦忠英, 樊敬庄等. 小鼠胚胎直接投入液氮冷冻保存试验. *西北农业大学学报*, 1993(增刊): 65~68
- 5 朱璧科, 王光亚, 王建辰等. 农业生物技术. 西安: 陕西科学技术出版社, 1990
- 6 刘伯宗. 山羊胚胎一步冷冻保存试验[学位论文]. 陕西杨陵: 西北农业大学动物医学系, 1992
- 7 窦忠英, 王新庄, 樊敬庄等. 奶牛胚胎一分为四分割移植试验. *西北农业大学学报*, 1992, 20(2): 1~4
- 8 Renard J. P. Two-step freezing of two cell stage rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.* 1984, 71: 573~580
- 9 Massip A. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol sucrose. *Ver Res*, 1984, 115: 327~328

One-Step Cryopreservation of Bovine Embryos

Wang Xinzhuang Dou Zhongying Tang Tieshan Gao Zhimin Fan Jingzhuang

(Experimental Station of Dairy Cattle Embryo Transfer, Northwestern
Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract 22 Donor Holsteins were superovulated with FSH+PGF_{2α} and 68 embryos taken non-surgically at 7~8 days. 45 embryos of which were used for the one-step freezing experiment. After thawed in water bath at 30~37℃, 40 embryos were recovered, and washed with PBSS solution of 1.0 mol/L sucrose to remove the glycerol off. The rate of the Morphological Intact embryos (MIES) was 90% (36/40); the positive rate of fluoresce staining 87.5% (7/8); the ectogenesis rate 75% (6/8); the Pregnancy rate of recipients 43.5% (10/23).

Key words one-step freezing, pregnancy rate, frozen embryo, dairy cattle