

家兔胚胎一步冷冻试验*

One Step Freezing Of Rabbit Embryos

朱璧科 王光亚 王建辰

Zhu Bike Wang Guangya Wang Jianchen

(家畜生殖内分泌研究室)

(Laboratory of Reproductive Endocrine in Domestic Animals)

主题词 卵子移植/一步冷冻, 家兔

Subject words ovum transfer/one step freezing, rabbit

自从 Whittingham(1971)在小鼠胚胎冷冻上首次获得成功以后,国外在牛(1973)、绵羊(1974)、家兔(1974)、大鼠(1975)、山羊(1976)、马(1982)、羚羊(1983)、人(1983)、狒狒(1984)的胚胎冷冻方面陆继成功。在国内,对绵羊(1979)、小鼠(1980)、家兔(1980)、牛(1983)及山羊(1988)的胚胎冷冻亦相继成功。近十几年来,随着胚胎冷冻技术的不断改进和在生产上的推广应用,对冷冻程序和除去冷冻剂的方法越来越要求简化。

在家兔胚胎冷冻方面, Bank等(1974)用慢冻法和 Renard(1984)用两步冷冻法均获成功,在国内,谭丽玲等和陈秀兰等的缓慢冷冻和快速冷冻亦相继产仔。但并未见到一步冷冻法的研究报道。本研究的目的是,建立家兔胚胎一步冷冻方法,并寻求一种较理想的除去防冻剂的方法,为家畜胚胎一步冷冻提供基本理论和实践依据。

我们从27只超排母兔中获得182枚优良胚胎,分别用于以下试验:(1)除去防冻剂的不同方法对解冻兔胚存活的影响;(2)一步冷冻对不同发育阶段胚胎存活的影响。将胚胎加入防冻液,装进0.25mL细管,在液氮气中停留2min,使温度从室温降至 -116°C 后,直接投入液氮,保存5~30d。于 37°C 或 $20\sim 21^{\circ}\text{C}$ 水浴中解冻1min,用1.0M蔗糖或依次用1.0, 0.75, 0.5, 0.25M蔗糖PBS两种方法除去防冻剂。将形态完整的胚胎移植给发情同期化的受体母兔,结果是当2.8M甘油+0.5M蔗糖和25%甘油+25%1.2丙二醇PBS以及冷冻解冻方法不变时,四步除去防冻剂得到的形态完整胚胎数(87.3% 75%)和妊娠率[42.9%(3/7), 40%(2/5)]较一步法的结果[24.5%, 66.7%; 0(0/3), 0(0/3)]为高,且用25%甘油+25%1.2-丙二醇PBS,四步除去防冻剂移植产仔率为13.3%(4/30);当25%甘油+25%1.2-丙二醇PBS,冷冻方法和四步

*文稿收到日期:1989-04-27。

*本研究是国家自然科学基金资助项目“家畜胚胎移植研究”的内容之一。

除去防冻剂方法不变时,用早期囊胚和桑椹胚得到的形态完整胚胎数无显著差异 ($P>0.05$),但移植产仔率,前者[30% (3/9)]高于后者[6.7% (1/15)]。本试验证明,用25%甘油+25%1、2-丙二醇PBS作防冻剂,选用早期囊胚进行一步冷冻,四步除去防冻剂移植后可获得妊娠和产仔(附表;图1,图2)。

附表 不同防冻剂和除去防冻剂的不同方法对胚胎发育及存活的影响

冷冻剂	除去防冻剂方法	解冻数/冷冻数	解冻后完整胚	受体数	妊娠数(%)	移植数	产仔数(%)
2.8M甘油 + 0.5M蔗糖	一步法	52/53	13 (24.5)	3	0	13	0
	四步法	71/71	62 (87.3)	7	3 (42.9)	62	0
4.0M甘油 + 0.5M蔗糖	一步法	31/31	24 (77.4)	4	1 (25.0)	24	0
25%甘油 + 25% 1, 2-丙二醇	一步法	18/18	12 (66.7)	3	0	12	0
	四步法	40/40	30 (75)	5	2 (40.0)	30	4 (13.3)
25%甘油 + 25% 1, 2-丙二醇	桑椹胚	18/22	15 (68.2)	2	1 (50.0)	15	1 (6.7)
	早期囊胚	15/15	9 (60)	2	1 (50.3)	9	3 (33.3)

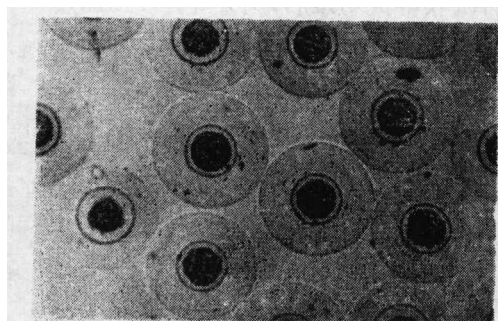


图1 除去防冻剂以后的桑椹胚($\times 20$)



图2 1988.3.5产下的小兔(40天)及受体母兔(白)

家兔胚胎一步冷冻的首次成功,使胚胎冷冻方法更加简易,便于推广应用,也为家畜胚胎的简易冷冻和推广提供了重要参考资料。但移植产仔率较低(13.3%),有待进一步研究提高。

芮荣、马保华及郝志明同志曾协助进行手术,谨致谢意。