

小鼠冻胚分割试验

张 涌 王建辰

(西北农业大学兽医系, 陕西杨陵·712100)

摘 要 研究了分割所用溶液、冷冻前胚胎发育时期和分割后将半胚是否装入透明带对冻胚分割效果的影响。结果证明:①将解冻囊胚分割后, 无论是否将半胚装入透明带对冻胚分割的效果均无显著影响 ($P>0.05$); ②在 PBS 中分割解冻桑椹胚和囊胚的效果无显著差异 ($P>0.05$); ③与分割解冻桑椹胚相比, 在蔗糖液中分割解冻囊胚可显著提高冻胚分割效果 ($P<0.05$)。将在蔗糖液中分割冻囊胚获得 10 对半胚移植于 5 只受体, 结果有 2 只妊娠, 共获得半胚仔鼠 6 只, 其中 2 对为同卵双生。

关键词 冻胚分割 小鼠

中图分类号 S814.6, S814.1

自 80 年代初家畜胚胎分割成功以来, 国外许多学者已开始了冻胚分割研究。但截止目前, 成功的报道仍很少。Suzuki 等将解冻牛胚分割为二后进行移植, 结果获得同卵双生犊牛。他的研究证明, 和 PBS 相比, 在蔗糖液中分割后, 将两枚半胚留在原透明带中进行体外培养或移植, 均可提高分割解冻牛胚的效果^[1]。但在蔗糖液中将解冻胚胎分割后, 把半胚分别装入透明带或不装入透明带进行培养 (或移植) 的效果如何? 在蔗糖液中分割哪个时期的胚胎更为有效? 对如此问题尚需进一步研究证明。实际上, 弄清这些问题对了解蔗糖液在分割冻胚过程中的作用, 改进冻胚分割技术, 提高其成功率有十分重要的价值。

本研究的目的是围绕上述问题, 研究分割小鼠冻胚的适宜条件, 初步建立哺乳动物冻胚分割的“实验模型”, 为将此项技术应用于家畜奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 超排和采胚

用 PMSG 和 hCG 诱导雌性青年昆明小鼠超排。于注射 hCG 后, 立即将母鼠和同品种公鼠放在一起过夜^[2]。于见栓 (0 d) 后第 3 d 早晨和下午, 杀死供体鼠, 用含 10% 犊牛血清 (FCS) 的磷酸缓冲液 (PBS) 从子宫回收桑椹胚、早期囊胚和扩张囊胚。

1.2 胚胎冷冻

在含 10% 甘油的 PBS 中平衡 20 min, 将胚胎装入塑料细管。在 RPE 简易冷冻仪 (美国产) 的控制下, 将细管置于液氮罐口颈部进行冷冻。先以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度降温

文稿收到日期: 1991-07-04.

* 国家教委“资助优秀年轻教师基金”项目。

至 -7°C 。诱发结晶后,以 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度缓慢降温 10 min 之后,再以 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度继续降温。在 -30°C ,将冷冻细管投入液氮中。 $3\sim 15\text{ d}$ 后,将冷冻细管取出,立即置于 37°C 的水浴中解冻。将解冻胚胎依次移入含 7.5% 、 5% 、 2.5% 和 0% 甘油的PBS中分别平衡 6 min 、分4步去除甘油。选择形态良好的解冻胚胎进行分割。

1.3 冻胚分割

将1滴 12% 蔗糖液或PBS和数枚解冻胚胎置于分割板上,在显微操作仪的控制下,采用下述两种方法将胚胎切割为二:①在蔗糖液中,用吸管固定胚胎后,将显微手术刀水平刺入透明带中,并将胚细胞群分割为二,但仍将两枚半胚留在原透明带内;②在蔗糖液或PBS中,用显微手术刀垂直下切,将胚胎连同透明带切割为二。

1.4 半胚培养

将半胚置于含 15% FCS的PBS中,在 37°C 的条件下进行体外培养。 24 h 后,观察和记录发育为囊胚的半胚数。用卡方和方差分析法对半胚体外培养结果进行统计学处理。

1.5 半胚移植

选择见栓后第 3 d 的“615”假孕母鼠作受体。手术切开腹壁,暴露双侧子宫。用玻璃细管将2对半胚移入两侧子宫(每侧移植2枚)。

2 结 果

2.1 半胚体外培养

①装透明带与否对冻胚分割效果的影响 将解冻早期囊胚分割后,根据是否装入透明带,将半胚分组进行体外培养,其结果见表1。表1表明,A组和B组的半胚体外发育率无显著差异($P>0.05$)。

表1 透明带对冻胚分割效果的影响

组 别	装透明带与否	培养半胚数(枚)	半胚发育数(枚)	半胚发育率(%)
A	+	90	65	72
B	-	80	55	69

②分割所用溶液和冷冻前胚胎发育时期对冻胚分割效果的影响 根据分割所用溶液和冷冻前胚胎发育时期,将半胚(不装入透明带)分组进行培养,其结果见表2。表2

表2 分割液和胚胎发育时期对冻胚分割效果的影响

组 别	分割所用溶液	胚胎发育时期	培养半胚数(枚)	半胚发育数(枚)	半胚发育率(枚)
A	蔗糖	桑椹胚	40	24	60^a
B	蔗糖	早期囊胚	80	55	69^b
C	蔗糖	扩张囊胚	80	59	74^b
D	PBS	桑椹胚	40	23	58^a
E	PBS	早期囊胚	60	36	60^a
F	PBS	扩张囊胚	80	50	63^a

注: $b; a = P < 0.05$

表明, B组和C组的半胚体外发育率显著高于其它4组 ($P < 0.05$)。

2.2 半胚移植结果

将表2B组发育为囊胚的10对半胚(附图-1)移植于5只假孕受体。其中2号、4号和5号受体于移植后9~11d返情, 其余2只妊娠(40%), 共获得半胚仔鼠6只(30%), 其中2对为同卵双生(20%)。这2只妊娠受体的产仔情况是: 1号受体鼠产公鼠1只, 母鼠2只(附图-2); 3号受体鼠产公鼠2只, 母鼠1只(附图-3)。



附图 分割解冻胚胎和移植半胚

1 经体外培养、发育为囊胚的一对同卵半胚(150×); 2~3 两只妊娠受体及其所产的半胚仔鼠, 其中两对为同卵双生(60、65日龄)

3 讨论

Niemann等在PBS中将4枚解冻牛胚分割后, 分别移植于5只受体, 结果无1只妊娠^[3]。同年, Suzuki等对在蔗糖液和PBS中分割解冻牛胚的效果进行了比较, 证明在蔗糖液中分割解冻胚胎可阻止留在同一透明带内的两枚半胚融合, 显著提高冻胚分割效果^[1]。本研究证明, 在蔗糖液中分割解冻囊胚后, 将半胚留在同一透明带内进行体外培养或不装入透明带在相同条件下培养裸半胚, 两者的半胚体外发育率并无显著差异 ($P > 0.05$); 和PBS相比, 在蔗糖液中分割解冻后的早期囊胚和扩张囊胚可获得更高的半胚体外发育率 ($P < 0.05$); 但比较在上述两种溶液中分割解冻桑椹胚的效果, 其差异不显著 ($P > 0.05$); 在蔗糖液中, 将解冻后的桑椹胚、早期囊胚和扩张囊胚分割后, 进行体外培养, 后两者的半胚体外发育率显著高于前者 ($P < 0.05$); 但在PBS中分割上述3个发育时期的解冻胚胎, 其效果无显著差异 ($P > 0.05$)。上述情况说明, 在分割后, 无论是否将半胚装入透明带对分割解冻早期囊胚的效果无显著影响; 和PBS相比, 在蔗糖液中分割解冻囊胚可显著提高冻胚分割效果; 但采用蔗糖液则不能提高分割解冻桑椹胚的成功率。

目前, 对在蔗糖液中分割解冻囊胚可显著提高冻胚分割效果的确切机理尚不清楚。但从实验情况来看, 在蔗糖液中, 解冻囊胚呈现轻微收缩状态。作者认为, 在这种情况下分割可能有两个优点: ①处于轻微收缩状态的囊胚内压较小, 在分割过程中不易造成大的机械性损伤; ②在收缩状态下, 囊胚的内细胞团更为明显, 便于对称分割。上述两点很可能是在蔗糖液中分割解冻囊胚可显著提高冻胚分割效果的主要原因。

本研究在移植组获得的受体妊娠率、半胚体内存活率和同卵双生率分别为40%, 30%和20%。但迄今为止, 在国内外未曾见到获得小鼠冻胚分割后代的报道。

参 考 文 献

- 1 Suzuki T, Shimohira I. Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose. *Theriogenology*, 1986; 26: 333~339
- 2 张 涌, 钱菊汾, 王建辰. 小鼠胚胎分割方法及同卵双生试验. 西北农业大学学报, 1987, 15: 10~16
- 3 Niemann H, Brem G, Sacher B *et al*. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. *Theriogenology*, 1986; 25: 519~524

Bisection of Frozen-Thawed Mouse Embryos

Zhang Yong Wang Jianchen

(Veterinary Science Department, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract Effect of solution used for bisection, embryo development before freezing and coating demi-embryos with or without zona pellucida(ZP) after bisection on bisection of frozen-thawed embryos was studied. The results showed that there was no significant effect of coating demi-embryos with or without ZP on the viability of frozen-thawed blastocysts bisected in sucrose solution ($P>0.05$); there was no significant difference in viability of frozen-thawed morulae and blastocysts bisected in PBS ($P>0.05$); in comparison with bisection of frozen-thawed morulae, bisection of frozen-thawed blastocysts in sucrose solution can improve survival rate of demi-embryos ($P<0.05$). Ten pairs of demi-embryos produced by bisecting frozen-thawed blastocyst in sucrose solution were transferred. Of five recipients, two became pregnant and produced 6 demi-embryo young at delivery, including two pairs of monozygotic twins.

Key words bisect of frozen-thawed embryo, mouse