

小鼠桑椹胚 OPS 管内解冻和直接移植

刘满清¹ 杨其恩¹ 索伦¹ 刘霖¹ 牛晔¹ 朱士恩^{1,2}

(1. 中国农业大学 动物科学技术学院, 北京 100094; 2. 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 本实验对昆明白系小鼠的桑椹胚实施 OPS 法玻璃化冷冻, 研究不同管内解冻程序对胚胎体外发育的影响, 旨在为小家畜胚胎冷冻、解冻和移植提供技术参数。采用 OPS 冷冻两步法(10%(体积分数)EG+10%(体积分数)DMSO 溶液中平衡 30 s, 移入 EDFS30 平衡 25 s)保存小鼠桑椹胚。一步法解冻是将 OPS 直接插到盛有 0.5 mol/L 蔗糖的离心管中分别平衡 1、2、3、4、5 和 6 min, 解冻后经体外培养结果表明, 平衡 2~4 min 组囊胚发育率(93.58%~97.22%)与对照组(100%)无显著差异($P>0.05$); 实施两步法解冻时将 OPS 先后插入 0.5 和 0.25 mol/L 蔗糖中, 体外培养结果显示, 先后平衡 3 和 2 min 组囊胚发育率(100%)最佳, 同对照组无显著差异($P>0.05$)。将以上方法管内解冻最佳组的胚胎用 OPS 管作移植导管, 直接移植到受体子宫角中, 其妊娠产仔率(38.57%)和管外解冻组(42.86%)及新鲜对照组(51.19%)均无显著性差异($P>0.05$)。证明 OPS 玻璃化冷冻的小鼠桑椹胚可以进行管内解冻和直接移植, 为小家畜胚胎移植提供了模型。

关键词 玻璃化冷冻; 管内解冻; 昆明白小鼠; 桑椹胚; OPS(open pulled straws); 直接移植
中图分类号 Q 813 **文章编号** 1007-4333(2006)06-0023-04 **文献标识码** A

In-straw dilution and direct transfer of OPS vitrified mouse morulae

Liu Manqing¹, Yang Qien¹, Suo Lun¹, Liu Lin¹, Niu Ye¹, Zhu Shien^{1,2}

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. State key laboratory Agrobiotechnology, Beijing 100094, China)

Abstract In the present research, Kunming mouse morulae was vitrified by OPS (open pulled straw) method to investigate the effect of the different in-straw dilution protocol on in vivo and in vitro developmental potential of mouse embryos. The aim of this work was to provide technical details for embryo transfer and cryopreservation/thawing in small ruminant. Embryos were vitrified by two-step OPS method (embryos were equilibrated with 10%EG and 10%DMSO for 30 s, then with EDFS30 for another 25 s). In the one-step thawing method, the OPS was directly plunged into tube filled with 0.5 mol/L sucrose solution for 1, 2, 3, 4, 5 and 6 min to dilute. After in vitro culture, the results showed that the embryos from 2 - 4 min groups could develop to blastocyst stage (93.58% - 97.22%) as the control ($P>0.05$). When embryos were thawed by two-step method, the OPS was placed into 0.25 mol/L sucrose solution followed by equilibration in 0.5 mol/L sucrose solution. The in vitro development results showed that when OPS was equilibrated in 0.5 mol/L sucrose for 3 min, then in 0.25 mol/L sucrose for 2 min, the recovered embryos showed normal blastocyst rate (100%). Embryos were transferred to the receipts using OPS as the catheter, the fetus developmental rates (38.57%) in the best in-straw dilution group showed no significant difference ($P>0.05$) from the conventional group (42.86%) and the control (51.19%). The above results showed that OPS vitrified mouse morulae could be successfully diluted and transferred by in-straw method, and it will provide a model for ET in small ruminant.

Key words vitrification; in-straw dilution; Kunming mouse; morulae; OPS (open pulled straws); embryo direct transfer

1985 年 Rall 等^[1]发明了玻璃化冷冻技术, 并成功地对 8-细胞小鼠胚胎进行了玻璃化冷冻保存。该项技术具有操作程序简单、时间短、速度快、成本

低廉, 且胚胎冷冻后存活率高的特点。尤其是 1997 年 Vajta^[2]发明开放式拉管法 (OPS, open pulled straw), 使得玻璃化冷冻速度和效率得到明显改善。

收稿日期: 2006-08-14

作者简介: 刘满清, 硕士研究生; 朱士恩, 教授, 通讯作者, 主要从事胚胎生物技术研究, E-mail: zhushien@cau.edu.cn

该法冷冻液的含量只需 1~1.5 μL , 冷冻速度可达 20 000 /min, 它使用 OPS 的毛细现象将极微量的冷冻液连同胚胎一起吸入管内直接投入液氮。目前利用 OPS 法已成功地冷冻保存了许多种动物的胚胎和卵母细胞^[3]。采用 OPS 法冷冻保存胚胎和卵母细胞有 2 个优势, 一是与传统玻璃化冷冻相比更具有简单、省时、高效、便于操作的优点; 其次是提高了降温速率, 减少了冷冻造成的细胞损伤^[4]。

目前冷冻家畜胚胎时程序化冷冻技术居主导地位, 玻璃化冷冻方法有待推广, 其原因是程序化冷冻保存的胚胎可以直接进行管内解冻和直接移植, 简化了操作过程, 减少了解冻时仪器的使用和胚胎的丢失机率, 而玻璃化冷冻过程中由于使用了高浓度抗冻保护剂, 抗冻保护剂的化学毒性使得玻璃化冷冻胚胎管内解冻和直接移植存在很大困难。即便如此, 有报道证实, 细管法玻璃化冷冻的牛胚胎可以进行管内解冻直接移植, 并获得了 44.5% 的妊娠率^[5]。通过改善装管方法和选择合适的冷冻保护剂, 细管法玻璃化冷冻的小鼠胚胎管内解冻移植妊娠率达 90% 以上, 妊娠产仔率达 58.3%^[6]。2003 年, 针对绵羊等动物需要使用手术法进行胚胎移植的特点, 报道了 OPS 玻璃化胚胎进行管内解冻和直接移植的方法^[7]。随后 Cuello 等^[8]在猪上作了尝试并获得了成功。但是, 以上研究未提供胚胎在管内解冻的最佳程序, 管内解冻平衡的时间范围等。

本实验选用小鼠桑椹胚为材料, 研究 OPS 管内一步法和两步法解冻程序及解冻平衡时间对胚胎体内、外发育的影响。旨在为羊、猪等小家畜胚胎解冻后直接移植建立有效的模型。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

超排激素 PMSG 和 hCG 购自天津华孚高生物技术公司, 其余试剂除特殊说明外均为 Sigma (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 公司产品。

1.2 胚胎的收集

选用 7~11 周龄的昆明白系雌鼠(中国科学院遗传所实验动物中心), 自由采食和饮水, 室温(20 \pm 2), 控光(光照 14 h/d)。每只小鼠间隔 48 h 后分别腹腔注射 PMSG 和 hCG 10 IU 进行超数排卵, hCG 注射后与性成熟同系公鼠合笼, 次日有阴道栓雌鼠于 hCG 注射后 76~78 h 处死, 摘除子宫, 用 PBS 液冲洗子宫获取桑椹胚。

1.3 胚胎的冷冻保存

1) 溶液配制。冷冻胚胎所用预处理溶液为 10% (体积分数, 下同) EG + 10% (体积分数, 下同) DMSO; 玻璃化溶液为 EDFS30; 胚胎解冻液为 0.5 和 0.25 mol/L 蔗糖; 胚胎体外培养液为改进的 CZB (mCZB)。

2) OPS 的制备。将 0.25 mL (I. V. M., France) 塑料细管一段的棉栓捅出, 从细管中部加热, 变软后拉成 OPS。OPS 细端直径为 0.15~0.19 mm, 长度约为 2.5 cm, 管壁厚度约为 0.05 mm。

3) 胚胎的玻璃化冷冻。实验开始前 2 h, 将室温调到 (25 \pm 0.5), 实验所用液体和器具充分平衡, 实验操作在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温台上进行。采用 OPS 两步法进行冷冻保存, 即胚胎在 10% EG + 10% DMSO 预处理溶液中预平衡 30 s, 然后移入 EDFS30 玻璃化溶液中平衡 25 s 后直接投入液氮保存。每支 OPS 装入 6~7 枚胚胎。

1.4 胚胎的 OPS 管内解冻

1) 一步法管内解冻。将 OPS 从液氮中取出直接插入盛有 1 mL 0.5 mol/L 蔗糖溶液的离心管中分别平衡 1、2、3、4、5 和 6 min, 然后将胚胎直接吹到 PBS 液中洗 3 次, 移入预先平衡好的 mCZB 培养液小滴, 置于二氧化碳培养箱 (5% (体积分数) CO_2 , 温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 100%) 中培养, 观察胚胎发育情况。

2) 二步法管内解冻。将 OPS 从液氮中取出直接插入盛有 1 mL 0.5 mol/L 蔗糖溶液中的离心管中分别平衡 1、2、3、4 和 5 min, 再移到盛有 1 mL 0.25 mol/L 蔗糖溶液的离心管中平衡 2 min, 然后同一步法。

1.5 管内解冻胚胎的直接移植实验

选择体重为 30~35 g 的发情母鼠, 与同品系结扎公鼠交配。次日检查有阴道栓雌鼠为假孕第 1 天 (D1) 受体, 于 D3 进行胚胎移植。移植时以 OPS 管作移植导管, 胚胎在管内解冻后连同解冻液一起吹入受体子宫角。D17~18 记录产仔数。管外解冻组和新鲜胚胎组用 OPS 作导管移植作为对照。

1.6 数据统计分析

采用 t^2 检验法。

2 结果

2.1 一步法 OPS 管内解冻不同平衡时间对胚胎体外发育的影响

管内解冻结果表明, 当 OPS 在 1 mL 0.5 mol/L

蔗糖中平衡 2~3 min, 体外培养获得的囊胚及孵化囊胚发育率均和对照组无显著差异 ($P > 0.05$); 平衡时间为 1 或 5 min 时, 其囊胚率 (90.91%、92.18%) 明显下降, 与对照 (100%) 有显著差异 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 一步法 OPS 管内解冻不同平衡时间对胚胎体外发育的影响

Table 1 Effects of different thawed time using one step OPS in-straw thawed method on *in vitro* development of vitrified embryo

解冻方法	平衡时间/min	冷冻胚胎数	存活胚胎数/胎率/%	囊胚率/%	孵化囊胚率/%
管内	1	66	100 a	90.91 b	36.40 b
管内	2	78	100 a	93.58 a	69.23 a
管内	3	72	100 a	97.22 a	65.28 a
管内	4	84	100 a	96.43 a	53.57 b
管内	5	64	100 a	92.18 b	57.81 b
管内	6	71	100 a	83.10 b	50.70 b
管外	对照	78	100 a	100 a	76.92 a

注: 同列字母相同表示数据间差异不显著 ($P > 0.05$), 字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$); 下表同。

2.2 两步法 OPS 管内解冻不同平衡时间对胚胎体外发育的影响

采用两步法解冻, 当 OPS 先后插入到 0.5 和 0.25 mol/L 蔗糖中分别平衡 2~3 和 2 min, 胚胎体外发育率与对照无显著差异 ($P > 0.05$); 当 OPS 在 0.5 mol/L 蔗糖中平衡 1 或 4 min, 其孵化囊胚率 (51.61%、52.94%) 与对照 (76.92%) 有显著性差异 ($P < 0.05$), 而平衡时间达 5 min 时囊胚率 (88.33%) 明显下降, 与对照组 (100%) 有显著差异 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 两步法 OPS 管内解冻不同平衡时间对胚胎体外发育的影响

Table 2 Effects of different thawed time using two step OPS in-straw thawed method on *in vitro* development of vitrified embryo

平衡时间/min	冷冻胚胎数	胚胎存活率/%	囊胚率/%	孵化囊胚率/%
0.5 mol/L * 0.25 mol/L				
1	2	62	100 a	95.16 a
2	2	52	100 a	98.08 a
3	2	66	100 a	100 a
4	2	68	100 a	95.58 a
5	2	60	100 a	88.33 b
管外对照	78	100 a	100 a	76.92 a

注: *为蔗糖浓度。

2.3 OPS 管内解冻胚胎移植结果

根据体外发育结果, 采用管内最佳解冻组的胚

胎直接移植。结果表明, 管内解冻组胚胎移植妊娠产仔率与管外解冻组及新鲜对照组无显著差异 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 OPS 管内解冻胚胎直接移植结果

Table 3 *In vivo* development of OPS in-straw thawed embryos after direct transfer

胚胎移植类型	移植妊娠受体率/%	移植胚胎总数	妊娠受体移植胚胎数	妊娠产仔率/%
管内解冻组	62.5	112	70	38.57 a
管外解冻组	60.0	140	84	42.86 a
新鲜对照组	75.0	112	84	51.19 a

3 讨论

1) 随哺乳动物胚胎冷冻技术研究的不断发展, 玻璃化冷冻技术在人、家畜和实验动物胚胎冷冻上的应用不断扩大。但仍存在一些问题, 如玻璃化冷冻采用的高浓度抗冻保护剂制约了管内解冻和直接移植技术的发展^[9]。抗冻保护剂分为渗透性和非渗透性 2 种, 在选择抗冻保护剂时, 要求所用保护剂保护效果好、化学毒性低、解冻后便于脱除。本实验采用乙二醇、DMSO 为抗冻保护剂, 乙二醇是渗透性抗冻保护剂, 分子质量较小、易渗入胚胎细胞、化学毒性较小, 在胚胎冷冻中乙二醇越来越多地被选用^[3]。DMSO 与乙二醇相比, 分子质量大、渗透性稍差、化学毒性较大, 但形成玻璃化状态好。这 2 种抗冻剂配合使用, 既可以提高抗冻剂的渗透性, 又可以缓解 DMSO 的化学毒性, 玻璃化状态形成的比较彻底, 实验证明联合效果较单独使用乙二醇好^[10]。同样本实验结果表明小鼠桑椹胚 OPS 玻璃化冷冻管内、外解冻后存活率均达 100%, 管内解冻组胚胎解冻后孵化囊胚率最高达 77.27%, 与管外对照组 (76.92%) 无显著差异。说明乙二醇和 DMSO 联合可用于 OPS 冷冻的胚胎管内、外解冻。

2) 解冻程序也是影响胚胎成活率的关键因素, 玻璃化冷冻解冻一般采用较高浓度的非渗透性保护液一步或经多步脱除, 目前以蔗糖为溶质使用较多。本实验选用 0.5 和 0.25 mol/L 蔗糖为解冻液进行 OPS 管内解冻, 体外发育结果表明, 采用一步和两步法管内解冻其效果无显著差异 ($P > 0.05$), 说明以蔗糖为解冻液时, 采用一步或两步逐步稀释都能充分脱出胚胎内部的抗冻保护剂。2 种方法解冻后的囊胚发育率, 均在解冻液中一定的处理时间范围内, 随时间的延长而呈上升趋势, 即一步法解冻在

0.5 mol/L 蔗糖平衡 1 min 时,囊胚发育率低,2 种解冻方法均 3 min 时,囊胚发育率和孵化囊胚率最高,当继续延长到 4 min 以后,胚胎发育率开始下降。可能原因:蔗糖溶液在稀释细胞内保护剂时起缓冲渗透压的作用,维持了细胞外液较高的渗透压,使细胞内保护剂渗出的同时,控制细胞外水分渗入的速度和渗入量,从而防止因水分的迅速渗入而导致细胞过度膨胀,减少细胞渗透性休克和细胞破裂现象的发生。然而蔗糖也可能对冷冻解冻后的胚胎造成损伤^[12],Kasai 等^[13]报道,低温状态下糖对胚胎无毒性影响;但有研究证明,较高温度和较高浓度条件下糖对胚胎发育有一定的毒害作用^[14]。聚蔗糖(Ficoll)是非渗透大分子物质,早期的研究表明大分子物质具有促进细胞外液玻璃化作用,可降低冷冻过程中压力所造成的物理性损伤^[15]。因此,在本实验中如果 OPS 管在 0.5 mol/L 蔗糖解冻液中平衡时间过短(1 min),则抗冻保护剂可能没完全脱出,对胚胎产生毒害;过长(4 min 以上),则高浓度的蔗糖在较高温度下可能会对胚胎产生毒害作用导致囊胚率降低;所以平衡时间以 3 min 为佳。

3)影响冷冻胚胎移植效率的因素较多,如胚胎冷冻解冻技术、胚胎移植操作技术及受体质量等,只要是影响 OPS 管外解冻胚胎移植技术的因素均可影响管内解冻胚胎的移植。此外,管内解冻还受高浓度玻璃化液的影响,在移植过程中蔗糖和部分冷冻液会随胚胎一起移入子宫角或输卵管,这可能降低胚胎的发育能力^[12]。本实验中 OPS 管内解冻胚胎移植后的受体妊娠产仔率达到 38.57%以上,与管外解冻及新鲜对照均无显著差异,这可能是由于随胚胎一起移入子宫角的溶液比较少(1~1.5 μ L),移入子宫后可快速的被子宫吸收或稀释,胚胎浸泡于子宫分泌液中继续正常发育。虽然本实验显示管内解冻胚胎移植效率与管外没明显差异,目前仍然需要对解冻时糖的最佳浓度和解冻条件进行研究以保证移植效率的提高。

实验结果证明,以小鼠桑椹胚为模型采用 OPS 法冷冻,管内一步和两步法解冻均可行,并可为小家畜胚胎管内解冻后直接移植提供有效的理论和技术参考。

参 考 文 献

[1] Rall W F, Fahy G M. Ice-free preservation of mouse embryos at -196 degree C by vitrification[J]. Nature, 1985,

313: 573-575

- [2] Vajta G, Holm P, Greve T, et al. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method[J]. Acta Vet Scand, 1997, 38: 349-352
- [3] Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, et al. Tucker. Potential importance of vitrification in reproductive medicine[J]. Biol Reprod, 2002, 67: 1671-1680
- [4] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos[J]. Molecular Reproduction and Development, 1998, 51(1): 53-58
- [5] Wagtendonk-de Leeuw A M, van Daas J H G, den Rall W F. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution[J]. Theriogenology, 1997, 48: 1071-1084
- [6] 杨中强,朱士恩,周光斌,等.不同冷冻和解冻方法对小鼠桑椹胚发育的影响[J].中国畜牧杂志,2006,42(1):5-7
- [7] Isachenko V, Alabart J L, Dattena M, et al. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos[J]. Theriogenology, 2003, 59(5-6): 1209-1218
- [8] Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botte F, et al. Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts[J]. Animal Reproduction Science, 2005, 85(3-4): 275-286
- [9] Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems[J]. Theriogenology, 2006, 65(1): 236-244
- [10] Vicente J S, Garcia-Ximenez F. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae[J]. Theriogenology, 1994, 42: 1205-1215
- [11] Kasai M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification[J]. Reproduction Medicine and Biology, 2002(1): 1-9
- [12] Cuello G, Gil M A, Parrilla I, et al. In vitro development following one-step dilution of OPS vitrified porcine blastocysts[J]. Theriogenology, 2004, 62: 1144-1152
- [13] Kasai M, Niwa K, Iritani A. Protective effect of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0 deg C[J]. Reprod Fertil, 1983, 68(2): 377-380
- [14] Kuleshova L L, MacFarlane D R, Trounson A O, et al. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes[J]. Cryobiology, 1999, 38(2): 119-130
- [15] Kasai M, Komi J H, Takakamo A, et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability[J]. Reprod Fertil, 1990, 89, 91-97