

295-298

第18卷第3期
1998年5月中国兽医学报
Chinese Journal of Veterinary ScienceVol. 18, No. 3
May 1998

26

小鼠胚胎聚合法的几个技术环节

孙兴参 谭景和 刘中华 贺桂馨 秦鹏春 (东北农业大学畜牧系, 哈尔滨 150030)

摘要 结合细胞计数方法研究了胚胎聚合法的几个技术环节。结果:(1)8-细胞早期胚胎在0.03%的聚合液(PHA)中作用5、10、15 min, 胚胎聚合率和囊胚发育率差异不显著($P > 0.05$); (2)8-细胞早期胚胎, 在0.06% PHA和0.12% PHA中作用的胚胎聚合率显著高于在0.03% PHA中作用的($P < 0.05$), 而在0.03% PHA和0.06% PHA中作用的聚合胚的囊胚发育率显著高于在0.12% PHA中作用的($P < 0.05$); (3)PHA浓度(在0.03%~0.12%范围内)对8-细胞晚期聚合胚的发育率影响不大($P > 0.05$); (4)在相同条件下, 8-细胞晚期胚胎的聚合率显著高于8-细胞早期胚胎和桑椹期胚胎, 8-细胞晚期聚合胚的发育率也高于其他时期的, 因此8-细胞晚期是进行胚胎聚合的最佳时期; (5)8-细胞早期胚胎的聚合率和囊胚发育率随操作室温的降低而显著下降; (6)细胞计数分析表明, 链霉菌蛋白酶和酸性台氏液2种去透明带方法产生的聚合囊胚细胞数目没有差异, 但移植用链霉菌蛋白酶处理的聚合囊胚, 8只受体中无1例妊娠, 而移植用酸性台氏液处理的聚合囊胚, 5只受体中有1只妊娠; (7)向子宫的子宫颈方向移植聚合囊胚, 6只受体中有3只妊娠, 产仔10只; 而向子宫的输卵管方向移植聚合囊胚, 5只受体中只有1只妊娠。

关键词 小鼠 嵌合体 聚合技术 细胞计数**中图分类号** Q78

胚胎嵌合体是由2个或2个以上具有不同遗传性的胚胎结合在一起发育而成的个体^[1]。它是研究哺乳动物个体发育理想的实验材料, 遗传学研究的良好模型。近年来, 它在胚胎干细胞培养、转基因动物生产、胚胎种间移植及繁育纯系动物等研究领域显示了广泛的应用前景^[1]。

胚胎聚合作为制作嵌合体的常用方法之一, 由于其操作简便, 不需要特殊的仪器设备, 因而得到广泛应用。目前应用该方法已制作了小鼠、大鼠^[2]、兔^[3]、猪^[4]、绵羊^[5]、牛^[6]、小鼠一大鼠^[7]、小鼠多倍体胚胎同正常胚胎聚合的嵌合体^[8,9]和小鼠雌核发育胚胎同正常胚胎聚合的嵌合体^[10,11]等。但是与胚泡注射法相比, 聚合法的成功率较低。主要原因是有些技术环节和影响因素还没有搞清。因此有必要对其进行深入的研究, 以提高胚胎聚合技术的成功率, 并为把该项技术引入大家畜提供参考。

1 材料与方法

1.1 胚胎的获取 按常规方法对中国昆明小鼠进行超排。于小鼠见栓后不同时间收集4-细胞期、8-细胞早期、8-细胞晚期和桑椹期胚胎。

1.2 去透明带 用0.5%的链霉菌蛋白酶和酸性台氏液2种方法去除胚胎的透明带。

1.3 胚胎聚合及培养 将去除透明带的胚胎置于大滴(200~300 μ L)聚合液(植物血球凝集素, PHA)中, 用圆头玻璃棒使2枚胚胎相接触。粘合的胚胎置Whitten's培养液中, 在5%CO₂、37.5°C条件下培养。以发育为囊胚的数目计算发育率。

1.4 胚胎移植 以常规麻醉和手术方法将聚合囊胚移植给假孕受体。聚合囊胚向子宫颈和输卵管2个方向移植。

1.5 细胞计数 将准备计数的囊胚置0.5%的柠檬酸钠低渗液中作用5~10 min, 然后移入醋酸地衣红中染色1~5 min, 再按常规方法压片, 相差显微镜下计数。

1.6 数据处理 应用百分数t检验。

本文收到日期:1996-12-06

2 结果

2.1 聚合液作用时间对 8-细胞早期胚胎聚合和发育的影响 见表 1。8-细胞早期胚胎置 0.03% PHA 中,随作用时间延长,胚胎聚合率有所提高,囊胚发育率有所下降,但差异均不显著 ($P > 0.05$)。

表 1 0.03% PHA 作用不同时间的 8-细胞早期胚胎的聚合率和发育率

0.03% PHA 作用时间(min)	处理胚数 (个)	聚合胚数 及(%)	发育囊胚数 及(%)
5	46	33(71.7) ^a	25(75.8) ^b
10	50	43(86.0) ^a	32(73.0) ^b
15	62	52(83.9) ^a	36(69.2) ^b

注:同一竖栏中标注相同字母者为差异不显著 ($P > 0.05$),不同字母者为差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (下同)

2.2 聚合液浓度对胚胎聚合率和发育率的影响 见表 2。不同浓度的 PHA 对 8-细胞早期胚胎作用 5 min,其中 0.12% PHA 和 0.06% PHA 作用的胚胎聚合率显著高于 0.03% PHA 作用的胚胎 ($P < 0.05$); 0.03% PHA 和 0.06% PHA 作用的胚胎囊胚发育率显著高于 0.12% PHA 作用的胚胎 ($P < 0.05$)。

同样条件下,8-细胞晚期胚胎的囊胚发育率差异不显著 ($P > 0.05$),见表 3。

表 2 8-细胞早期胚胎在不同浓度 PHA 处理 5 min 的聚合率和发育率

PHA 浓度 (%)	处理胚数 (个)	聚合胚数 及(%)	发育囊胚数 及(%)
0.03	46	33(71.7) ^a	25(75.8) ^c
0.06	96	90(93.7) ^b	65(72.2) ^c
0.12	27	26(98.0) ^b	12(46.2) ^d

表 3 8-细胞晚期胚胎在不同浓度 PHA 中处理 5 min 的聚合率和发育率

聚合液浓度 (%)	处理胚数 (个)	聚合胚数 及(%)	发育囊胚数 及(%)
0.03	48	43(89.5) ^a	37(81.0) ^c
0.06	104	103(99.0) ^b	88(85.4) ^c
0.12	42	42(100.0) ^b	34(80.9) ^c

2.3 不同发育期胚胎的聚合率和发育率 见表 4。在同样聚合条件下,8-细胞晚期胚胎的聚合率显著高于 8-细胞早期胚胎和桑椹期胚胎的聚合率 ($P < 0.05$),但与 4-细胞期胚胎的聚合率差异不显著 ($P > 0.05$)。8-细胞晚期聚合胚的发育率也显著高于其他发育时期胚胎的发育率 ($P < 0.05$)。

2.4 室温对胚胎聚合率和发育率的影响 见表 5。相同聚合条件,在室温 22℃ 下操作的胚胎的聚合率和发育率都极显著高于 18℃ 下操作的胚胎 ($P < 0.01$)。

表 4 不同发育期胚胎在 0.06% PHA 中处理 5 min 的聚合率和发育率

发育时期	处理胚数 (个)	聚合胚数 及(%)	发育囊胚数 及(%)
4-细胞期	48	47(97.9) ^{ac}	23(47.9) ^c
8-细胞早期	96	90(93.7) ^{ab}	65(72.2) ^d
8-细胞晚期	104	103(99.0) ^c	88(85.4) ^a
桑椹期	37	34(91.9) ^{ad}	20(58.8) ^{cb}

表 5 不同室温条件下 0.03% PHA 处理 5 min 8-细胞早期胚胎的聚合率和发育率

室温 (℃)	处理胚数 (个)	聚合胚数 及(%)	发育囊胚数 及(%)
18	47	19(40.4) ^a	8(42.1) ^c
22	46	33(71.7) ^b	25(75.8) ^d

2.5 去透明带方法对聚合胚发育的影响 细胞计数分析表明,2 种去透明带方法对胚胎短期发育无显著影响,见表 6。

2.6 胚胎移植产仔情况 见表 7,8。

表 6 不同去带液处理的聚合囊胚的细胞数

去带液	处理胚数(个)	细胞数(个)
0.5% 链霉菌蛋白酶	21	63.3 ± 2.1(56~80) ^a
酸性台氏液(pH2~2.5)	19	67.8 ± 1.6(54~72) ^a

表 7 不同去带液处理的聚合胚移植产仔情况 (输卵管方向移植)

去带液	移植胚数 (个)	受体数 (只)	妊娠数 及(%)	产仔数 (只)
链霉菌蛋白酶	52	8	0	0
酸性台氏液	45	5	1(20)	咬死

表8 子宫不同方向移植产仔情况(酸性台氏液去带)

移植方向	移植胚数 (个)	受体数 (只)	妊娠数 及(%)	产仔数 (只)
输卵管	45	5	1(20)	0
子宫颈	53	6	3(50)	10

3 讨论

Mintz^[12]最先将PHA用于胚胎聚合,但各个实验室所使用的PHA浓度及其作用时间各不相同。本试验表明,PHA作用时间对胚胎聚合率和发育率影响不大。这与吴耀民等^[13]的研究结果一致。从本试验结果看,PHA浓度对8-细胞早期胚胎的聚合率和发育率有明显影响,采用0.06%的PHA效果较好。

目前国内外多采用8-细胞早期胚胎进行聚合^[14~16]。本试验观察到,PHA浓度对8-细胞晚期胚胎的聚合率影响不大。在相同条件下,8-细胞晚期胚胎的聚合率显著高于8-细胞早期和桑椹期胚胎,但与4-细胞期胚胎的聚合率差异不显著,8-细胞晚期聚合胚的发育率也明显高于其他发育时期。这可能与8-细胞晚期胚胎发生了致密化有关。因为致密化的胚胎比较粘^[17]。另外,此发育期的胚胎分裂球间建立了紧密连接和缝隙连接^[18]。此时进行细胞聚合,胚胎细胞间容易建立通讯联系,能很好地发育。我们认为,选择8-细胞晚期胚胎进行聚合最好。

本试验研究表明,低于正常室温时,8-细胞早期胚胎的聚合率和发育率明显下降。聚合率降低可能是由于胚胎在一般体温下粘合力最强^[12]的缘故,但低温使聚合胚发育不良的确切原因不清楚。李光鹏等^[19]证明,低温处理可延迟胚胎发育。

本试验细胞计数分析表明,用蛋白酶和酸性台氏液去透明带,其聚合胚发育至囊胚的比例无明显差异。但移植试验证明,用蛋白酶去透明带的聚合囊胚的移植妊娠率,低于用酸性台氏液的,说明蛋白酶去透明带对胚胎移植后的妊娠有不良影响。此与文献^[20~22]报道的研究结果一致。

参 考 文 献

1 初振辉,秦鹏春,孙育原. 哺乳动物嵌合体的研究进展及应用前景. 生物技术, 1994, 4(2): 1~6

2 Mayer J F, Fritiz H Ira. The culture of preimplantation rat embryos and the production of allphenic rats. *J Reprod Fert*, 1974, 39(1): 1~9

3 Xiang Zhong Yang, Foot R H. Production of chimeric rabbits from morulae by a single procedure. *Gamete Research*, 1988, 21(4): 345~351

4 冯怀亮. 哺乳动物胚胎工程. 长春: 吉林科学技术出版社, 1994. 187~188

5 Fehilly C B, Willadsen S M, Tuckev E M. Experimental chimerism in sheep. *J Reprod Fert*, 1984, 70: 347~351

6 Brem G, Tenbunberg H, Krausslich. Chimerism in cattle through microsurgical aggregation of morulae. *Theriogenology*, 1984, 22: 609~613

7 Zeilmaker G H. Fusion of rat and mouse morula and formation of chimeric blastocyst. *Nature*, 1973, 242: 115~116

8 Te-Yu lu, Markert C L. Manufacture of diploid/tetraploid chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 6012~6016

9 Sadahiro Azuma, Yoshinori Fukuda, Yuntaka Toyoda. Studies on the production of 2n ↔ 3n chimeric mouse embryos. *Jpn J Anim Reprod*, 1991, 37: 79~87

10 Stevens L C. Totipotent cells of parthenogenic origin in a chimaeric mouse. *Nature*, 1978, 276: 266~267

11 Charles J Epstein, Sandra A Smith, Teodosia Zamora *et al*. Production of viable adult trisomy 17 ↔ diploid mouse chimeras. *Nature*, 1982, 79: 4376~4380

12 Mintz B. Phytohemagglutinin-mediated blastomere aggregation and development of allphenic mice. *Dev Biol*, 1973, 31: 195~199

13 吴耀民, 秦忠英. 小鼠胚胎嵌合的研究. 西北农业大学学报, 1993, 21(2): 77~80

14 李幼兰, 李光三, 冯燕玲等. 制作小鼠嵌合体的简易方法. 细胞生物学杂志, 1982, 4(3): 34~36

15 Nakamura K, Tusnoda Y. Chimaeras obtained by the nuclear transplantation technique in the mouse. *Jan J of Animal Reprod*, 1987, 33(2): 82~87

16 Lucy M C, Petles R M. Production of chimeric mice by reciprocal exchange of split embryo halves. *Theriogenology*, 1987, 28(6): 899~906

17 谭景和, 秦鹏春. 胚胎显微操作技术进展及存在的问题. 东北农学院学报, 1991, 23(3): 300~305

18 Hogan B, Costantini F, Lacy F. Manipulation the mouse embryo, A laboratory manual. New York,

- Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. 42~43
- 19 李光鹏,许晓霁,张心田. 小鼠早期胚胎在 6℃不同贮存液中的保存研究. 动物学杂志, 1994, 29(3): 50~58
- 20 Tsunoda Y, McLaren A. Effect of various procedure on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. J Reprod Fertil, 1984, 71: 513~517
- 21 McLaren A. Transfer zona-free mouse eggs to uterine foster mothers. J Reprod Fertil, 1969, 19: 341~346
- 22 Broson R A, McLaren A. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. J Reprod Fertil, 1970, 22: 129~137

Several Main Procedures in the Aggregation Technique of Mouse Embryos for Making Chimeras

Sun Xingshen Tan Jinghe Liu Zhonghua He Guixin Qin Pengchun

(Northeast Agricultural University, Department of Animal Science, Harbin, China 150030)

Abstract Several procedures in the aggregation technique of mouse embryos were studied in the experiment. The results were as follows: 1. The rates of aggregation and blastocyst development were not significantly different ($P > 0.05$) when the 8-cell mouse embryos treated with 0.03% PHA for 5, 10 and 15 min. 2. The aggregation rates were significantly ($P < 0.05$) higher when the embryos treated with 0.06% and 0.12% PHA for 5 min than did with 0.03% PHA, the blastocyst development rate being significantly lower when did with 0.12% PHA. 3. The blastocyst development rates were not significantly different when the late 8-cell mouse embryos treated with 0.03%, 0.06% and 0.12% PHA. 4. Under the same conditions, the aggregation rates for late 8-cell mouse embryos were significantly higher than those at early 8-cell and morula stages, the blastocyst development rates of the late 8-cell embryos being also significantly higher than those at other stages. 5. The aggregation rates and blastocyst development rates were decreased markedly when room temperture went down from 22℃ to 18℃. 6. The cell number analysis showed that there was not significant difference in cell number between the blastocysts when the zona of late 8-cell embryos removed by pronase or Acid Tyode. When the aggregated embryos whose zona removed by pronase were transferred to 8 recipients, none of them became pregnant, but when those whose zona removed by Acid Tyrod were transferred to 5 recipient, one became pregnant. 7. When the aggregated embryos whose zona removed by Acid Tyrode were transferred to 6 recipientes with the transfer pipette pointing to the cervix, 3 became pregnant and 10 live young born; However, when those were transferred to 5 recipients with the pipette pointing to the oviduct, only one became pregnant.

Key words mouse; chimeras; aggregation; cell number