

超低温冷冻保存技术在养牛业上的应用

王晓阳

(吉林省农业科学院畜牧分院,公主岭 136100)

提 要 本文概述了防冻剂在 5 种牛胚胎冷冻保存方法中的应用,即常规冷冻、玻璃化冷冻、一步脱防冻剂冷冻、一步细管法冷冻和半胚冷冻。随着胚胎冷冻和解冻方法的不断改进,不断简化和逐渐适应现场条件,这一技术将会象人工授精一样普及推广。

关键词 胚胎冷冻;防冻剂;养牛业;超低温冷冻

欧洲和北美的养牛业历史较长,技术水平较高,发展也很快,其中有两大飞跃,即家畜人工授精和胚胎移植,而这些应归功于一类重要的化合物——防冻剂。

1780 年,意大利生物学家 Spallazani 教授成功的用狗进行了人工授精试验。1890 年,法国兽医 Repiquent 做了马匹人工授精。1950 年,英国的 Polge 和 Smith 等人发现了甘油用于冷冻保存牛精液,并于 1951 年授精产下世界上第一头用冻精液受孕的牛犊^[1],这是超低温冷冻保存技术在养牛业上应用的第一个飞跃。1890 年,英国的 Wotter Heape 首次报道在实验室生出第一窝胚胎移植的家兔^[2]。1932 年,Warwick 和 Berry 移植成活一只羊羔。到了 40 年代,通过对牛的胚胎采集和移植的研究,第一头胚胎移植成功的牛犊于 1951 年生于美国的维斯康辛州。1972 年,Whittingham 等首先报道鼠胚胎冷冻成功,同年晚些时候,Wilmot 也报道了鼠胚胎冷冻成功^[1]。1973 年,Wilmot 和 Rowson 又在 -196°C (液氮温度)下冷冻牛胚胎成功,但妊娠率较低,这是超低温冷冻保存技术在养牛业中应用的第二次飞跃。此项技术的一系列应用大大加快了养牛业的发展。

1 常规冷冻

冷冻精液和冷冻胚胎试验成功间隔了 20 多年,这是一个很有趣的实例,即在基础研究和应用研究之间需要相互促进。冷冻精液的成功,部分是经验(不太了解冷冻伤害的机制),部分是侥幸(偶然发现了甘油的显著保护作用),但是对冷冻胚胎,只凭经验和侥幸就不够了,这需要了解低温生物学的原理及其发展情况。冷冻时,细胞必须两次通过致死温度区($-15^{\circ}\text{C} \sim -50^{\circ}\text{C}$)。一次是冷冻,一次是解冻,如何在不杀死细胞的情况下,把细胞冷冻到 -196°C ,并解冻到常温,是超低温冷冻保存技术在养牛业进一步应用的关键。

一般情况下,哺乳动物的细胞冷冻到 -20°C 以下时极难存活,这主要取决于冷冻速度。对大多数细胞存在一种最适宜的冷冻速度,超过这一速度,细胞内结冰和解冻时再次形成冰晶的结果,引起细胞死亡。低于这一速度,因冰晶形成所产生的水溶液变化较大,同样引起死亡,而添加防冻剂,则可以大大减少冷冻部分,而且可以降低未冷冻部分和细胞内电解质

的浓度。

哺乳动物细胞常用的两种防冻剂是甘油和二甲基亚砜(DMSO)。动物种类不同,所用防冻剂的种类及浓度也不同,一般用 1.0~1.5 mol/L DMSO 和 1.0~4.0 mol/L 的甘油冷冻胚胎的效果较好。有研究表明:甘油和 DMSO 对胚胎的冷冻保护效果无差异^[3]。另有研究认为:用甘油冷冻胚胎的存活率高于用 DMSO。还有一种研究结果认为二者混合应用(1.0mol/L 甘油 + 0.5mol/L DMSO)时不如单独使用效果好。Biton 和 Morre 认为,单独使用甘油为最佳冷冻保护剂,因为它比 DMSO 毒性小^[3],目前持这种看法者较普遍。

防冻剂的添加方法最初为四步或六步,每步间隔 10 min,使防冻剂充分渗透到胚胎细胞中,以后为三步添加法,不降低胚胎存活率,最后为一步添加法,即将胚胎直接放入最终浓度的冷冻液中,同样获得理想的冷冻效果,目前普遍采用此法。解冻后的胚胎需除去防冻剂才能移植,最初使用六步降低防冻剂浓度,每步停留 10 min,使之逐渐从细胞中渗出,而后有人使用三步脱防冻剂的方法,结果两种方法无显著差异。我院从 1985 年开始采用此种方法,受体牛受胎率较高。

2 玻璃化冷冻

1984 年, G. M. Fahy 等人报道了玻璃化保存胚胎的成功例证^[2], 此法操作简单, 冷冻速度快, 不需要昂贵的冷冻仪, 但防冻剂毒性较大, 目前正处于研究开发之中。

早期的玻璃化液以二甲基亚砜(DMSO)、乙酰胺(AA)、丙二醇(PG)、聚乙二醇(PEG)等作为保护剂, 这些溶液毒性较大, 平衡过程复杂且需要时间较长。M. Kasai 等人对上述溶液和乙二醇(EG)、甘油(G)、水溶性聚蔗糖(FIC)、蔗糖(Suc)作了毒性对比试验^[6], 结果 EG 是 5 种可透过性保护剂(DMSO、AA、PG、EG、G)中毒性最低的一种, 3 种非透过性成份(PEG、FIC、Suc)在平衡期间对胚胎均无毒性, 而 Suc 具有高渗透压效应。据此, M. Kasai 等人设计了 4 种组合溶液, 分别为 EP、EPS、EF、EFS, 用小鼠的桑椹胚做试验, EFS 溶液是最好的胚胎防冻剂, 平衡 5 min, 培养至扩张囊胚的百分率为 98%, EPS 为 90%, EF 为 52%, EP 为 5%。用体内成熟体外受精的牛囊胚对 EFS 溶液做试验, 平衡 1 或 2 min, 解冻后能进一步扩张的囊胚比例高达 74%~77%, 培养后有 55% 的胚胎能从透明带中孵化出来, 移植后已产犊。

胚胎存活率的变化基本原于 EFS 溶液的毒性和细胞内冰晶的形成, 乙二醇的透过量是其关键。乙二醇的透入量过大, 则加大了对细胞的毒性, 乙二醇的透入量小, 细胞内形成冰晶。而乙二醇的透过量又与环境温度和平衡时间有关, 室温高, 细胞膜通透性好, 短时间便有足量的乙二醇进入细胞, 相反所需平衡时间较长。

J. R. Dobrinsky 等也做过同类试验^[7]。采用超排供体牛 6 d 胚胎, 处于晚期桑椹胚和早期囊胚, 在 20℃平衡液(dPBS + 10%甘油 + 25%丙二醇 + 4%牛血清白蛋白)中脱水 7 min, 同玻璃化液(dPBS + 25%甘油 + 25%乙二醇 + 4%牛血清白蛋白)装入 0.25 mL 细管, 迅速(2~3 s)放入液氮中, 20℃水浴解冻 5~10 min, 移入 DM-1 液(dPBS + 1 mol/L 蔗糖 + 4%牛血清白蛋白)中 7 min, 再移入 DM-2 液(dPBS + 0.5 mol/L 蔗糖 + 4%牛血清白蛋白)中 4 min, 然后移入 dPBS 中体外培养, 结果为: 7 个玻璃态的桑椹胚有 4 个发育为扩张囊胚, 移植受体 51 d 后, 超声波诊断有一头牛妊娠。

Massip 等报道, 玻璃化法冷冻牛桑椹胚和早期囊胚 60 d 时, 妊娠率为 53%(7/13)^[4], 但晚期囊胚体内培养时不存活, 胚胎在平衡液(dPBS + 10%甘油 + 20%乙二醇)中室温平衡 10 min, 然后将玻璃化液(dPBS + 25%甘油 + 25%乙二醇)和胚胎装入 0.25 mL 细管, 慢慢投入

液氮。

Van Der Zwalman 等描述了玻璃化法冷冻囊胚的程序。胚胎先置于 PBS 配制的 3.4 mol/L 甘油(25%)中,室温下放置 13 min 后,移入含 3.4 mol/L 甘油和 0.25 mol/L 蔗糖的 PBS 中 10 min,最后移入预冷 4℃,含 3.4 mol/L 甘油和 3.4 mol/L 乙二醇的细管中,30 s 内投入液氮,解冻后移植于 14 头受体牛,60 d 后有 7 头妊娠。

3 一步脱防冻剂冷冻

Leibo(1982 年)首先发明了用蔗糖溶液在细管内一步稀释防冻剂的冷冻方法^[7],使冻胚移植程序更为简化。以后,Massip 和 Van Der Zwalman(1984 年)又作了将甘油和蔗糖混合冷冻胚胎的一步解冻法试验。最近有人用丙二醇(Suzuki,1990 年)或乙二醇(Voelkel 和 Hu,1992a,1992b,Lange,1995 年)单独作防冻剂冷冻牛胚胎,解冻后直接在 PBS 中脱去防冻剂。

阳年生等人(1996 年)设计了 3 组防冻剂^[10]:(1)1.5 mol/L 甘油 + 0.25 mol/L 蔗糖;(2)1.5 mol/L 乙二醇;(3)1.5 mol/L 丙二醇。把胚胎分别放入含上述防冻剂的 PBS/FCS 中平衡 5 min,装入 0.25 mL 细管,按常规冷冻,在 37℃ 水中解冻,胚胎直接排入 PBS/FCS 中,10 min 后,在新鲜 PBS/FCS 中清洗一次,经培养后的孵化情况是:第一组存活率为 77.27%(102/132),第二组为 73.24%,第三组为 47.90%,第一组和第二组极显著地高于第三组($P < 0.01$)。此试验表明,用甘油 + 蔗糖和乙二醇做防冻剂用于一步解冻法好于丙二醇。另外,Suzuki 等(1993 年)用 1.8 mol/L 乙二醇和 1.6 mol/L 丙二醇冷冻牛体外受精胚胎,培养后的孵化率分别为 74%和 40%,乙二醇好于丙二醇。其原因可能是胚胎对乙二醇的通透性高于丙二醇,直接在 PBS 中脱防冻剂时,前者可迅速渗出而不会对胚胎造成损伤,后者通透性差,则引起胚胎渗透性损伤。但也有人认为丙二醇作防冻剂好于乙二醇^[11]。

4 一步细管法冷冻

铃木达行等(1983 年)报道了用一步细管法移植 5 头受体牛,有 2 头妊娠^[11]。具体做法是:用 0.25 mL 细管吸入含 20%牛血清的 0.3 mol/L 蔗糖液(I 层)、含有胚胎的 1.0 mol/L 甘油的保存液(II 层)、含 20%牛血清的 0.3 mol/L 蔗糖液(III 层),各层比例为 3:1:2,常规冷冻,37℃ 恒温水浴解冻 2~3 min,III 层向上,用手捏住 I、II 层间气泡,让 II、III 层混合 2~3 min 后,捏住 III 层顶端摇动,使之与 I 层混合,由于甘油的比重轻于蔗糖,所以,甘油逐渐上浮到细管顶端,胚胎一边脱去甘油,一边下降到蔗糖液中,而后,剪去细管甘油部分,进行移植。1986 年,铃木达行再一次报道日本长崎等六县相继用一步细管法移植成功,受胎率可达到 40%左右^[12]。但也有人认为一步细管法的防冻剂种类、添加浓度及冷冻——解冻程序必须是最佳的,否则效果较差^[10]。

5 半胚冷冻

Lehn Jensen 和 Willadsen(1983 年)采用琼脂包埋法首先获得了冷冻半胚移植犊牛^[13],但此法操作较繁琐,容易丢失胚胎,Niemann 等(1986 年)获得了牛半胚裸露冷冻产犊成功^[14],但受胎率较低。Herr 等(1991 年)冷冻经过显微操作的无透明带胚胎,获得较高的移植受胎率(63%)^[14]。1996 年,柏学进等人报道,奶牛半胚裸露冷冻的培养存活率为 82.4%(14/17)^[15],以 5%G + 5%P + 0.05 mol/L S 和 10%G + 10%P + 0.1 mol/L S 两步加入防冻剂,每步 10 min,冻前培养 1.0 h,在 25℃ 水浴解冻,1.0 mol/L G + 0.3 mol/L S、0.5 mol/L G + 0.3 mol/L

LS和0.5 mol/L S三步脱防冻剂的效果最好。

6 结束语

随着研究工作的不断深入,超低温冷冻保存技术在养牛业中的应用将会越来越广泛,越来越深入,将会有更多种化合物做为防冻剂进入胚胎冷冻的行列,使之冻胚移植象冻精配种一样简便、迅速、高效。

参 考 文 献

- 1 陈玉琦译.关于哺乳动物和胚胎细胞冷冻的情况.草食家畜,1981,3:1-8
- 2 张爱民编译.牛胚胎移植的现状 & 展望.草食家畜,1994,2:27-29
- 3 孙青原译.家畜胚胎冷冻保存的现状.草食家畜,1992,6:23-30
- 4 Billon R J, Moor N W. In vitro culture, store and transfer of goat embryo. Austr. J. Biol. Sci. 1976, 29:125-129
- 5 李玉欣摘译.哺乳动物胚胎玻璃化冷冻保存方法优化试验.国外畜牧科技,1996,2:23-25
- 6 张富春译.牛胚胎的玻璃态冷冻保存.草食家畜,1992,5:50
- 7 Leibo, S. P. Proc. Inter. Congr. Embryo Transfer in Mammal (Annecy) 1982, 98 (Abc)
- 8 Massip, A and Van Der Zwalman. Vet. Rec. 1984, 29:327-328
- 9 阳年生等.牛体外受精胚胎一步脱防冻剂方法的研究.中国畜牧杂志,1996,2:9-11
- 10 王新庄等.影响哺乳动物胚胎冷冻效果的因素分析.黄牛杂志,1996,2:40-42
- 11 李德远摘译.用一步细管法移植牛冷冻胚胎.草食家畜,1984,4:50
- 12 白天宝摘译.牛胚胎冷冻保存技术及其新进展——一步细管法.草食家畜,1987,6:27-28
- 13 富永敬一郎.家畜人工授精,1990,(1):26-38
- 14 C. M. Herr et al. Theriogenology. 1991, 35:45-54
- 15 柏学进等.奶牛半胚裸露冷冻保存试验.中国畜牧杂志,1996,1:13-14