

乙型脑炎病毒核酸(RNA)的研究

III. 病毒核酸对鸡胚的感染性*

陈立德 許兆祥 汪 媛 柳元元

(中国医学科学院病毒系)

前已报导,曾从流行性乙型脑炎病毒受染鼠脑組織成功地提取出对小白鼠有感染性的 RNA^[1]。此外,改进了提取方法并选择适宜的稀释剂,从而提高了脑炎病毒 RNA 的感染滴度^[2]。

在嗜神經病毒中,除了曾从受染神經組織提取 RNA 外^[3,4],尚有从受染小白鼠腹水瘤細胞^[5]、組織培养^[6]、乳鼠脑組織^[7]和鸡胚組織^[8]等提取对实验动物或組織培养有感染性的病毒 RNA。从未适应于鸡胚的脊髓灰白質炎病毒 Mahoney 株提出的病毒 RNA 能在鸡胚羊膜腔中繁殖^[9]。

Portocala 等报导流感病毒 RNA 接种于鸡胚尿囊腔后,虽然能引起感染,但生成的病毒在形态、抗原性及对小白鼠的致病力等方面都有所改变。而 Massab^[11] 报告流感病毒 RNA 只能感染鸡胚腎細胞而不能感染絨毛尿囊膜或尿囊腔。有些病毒尚未能成功地提取出有感染性的 RNA^[12,13]。

为了了解流行性乙型脑炎病毒的核酸是否能感染鸡胚;以及在鸡胚繁殖时,鸡胚病毒核酸是否和鼠脑病毒核酸一样具有感染性;以便进一步对病毒核酸感染鸡胚后所生成病毒的生物学性质作深入的研究,因此进行了本实验。

一、材料和方法

(一) 材料

1. 病毒株 所用病毒为流行性乙型脑炎病毒京卫研₁株,在鼠脑传了 27—35 代。鸡胚病毒则为用該病毒在鸡胚传 3—9 代者。

2. 实验试剂和动物

石炭酸: 为分析純试剂,用前均經重新蒸餾一次。提取 RNA 所用的石炭酸浓度为 90% 及 75%。

乙醚: 为化学純或分析純试剂。

RNA 酶: 为純 RNA 酶結晶。

小白鼠: 正常健康的 3—4 周龄小白鼠。

(二) 实验方法

1. 核酸的提取

(1) 受染鼠脑病毒 RNA 的提取見前篇报告^[1,2]。

* 本文 1962 年 3 月 15 日收到。

(2) 受染鸡胚病毒 RNA 的提取: 将受染鸡胚病毒收获, 除去脑、四肢和内脏, 取皮肤肌肉组织, 用乳钵研磨, 以 0.5M 氯化钠加 0.02M 磷酸缓冲盐水 (pH 7.2) 制成 20% 悬液, 在冷冻离心机中 (0℃—10℃) 以 3,000 转/分沉淀 20 分钟。取上清病毒悬液, 加入等量 90% 石炭酸, 用低频率发生器处理 8 分钟, 低温下 3,000 转/分离心沉淀 20 分钟。吸上清液加入等量 75% 石炭酸, 同样以低频率发生器处理 5 分钟, 低温下 3,000 转/分沉淀 20 分钟。最后吸出上清液, 用等量乙醚反复洗涤 4 次。通空气除去残留乙醚, 然后低速沉淀 (1,000 转/分) 2—3 分钟。吸出清晰的液体即为提取的 RNA 制剂, 其稀释度相当于 2×10^{-1} 。整个过程均在冰浴中进行。

2. 病毒 RNA 及病毒感染力的滴定 加入等量含 0.8M 氯化钠的 0.02M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 于提取出的 RNA, 使其浓度相当于 10^{-1} 的组织悬液, 而最后的氯化钠浓度为 0.65M。然后用同样稀释液 10 倍递进稀释之, 分别注射于三周小白鼠脑腔内, 每稀释度接种 4 鼠, 每鼠 0.03 毫升。观察两周, 计算其对小白鼠的 LD_{50} 滴度 (均以对数/0.03 毫升表示)。此外, 并以 RNA 制剂接种入肉汤, 检查染菌情况。滴定鼠脑或鸡胚病毒时则用 10% 脱脂牛奶生理盐水稀释。

3. 用病毒 RNA 感染鸡胚的方法 将 0.2 毫升 10^{-1} 的病毒 RNA 分别通过绒毛尿囊膜、羊膜腔、卵黄囊及尿囊等途径接种于鸡胚。按不同途径使用不同日龄的鸡胚: 卵黄囊用 8—9 天龄、羊膜腔 9—11 天、尿囊及绒毛尿囊膜 10—12 天。接种后将鸡胚放在 36—37℃ 温室孵育。

分别在接种 RNA 后第 2、3、4、5、6 或第 7 天收获鸡胚, 滴定其病毒的感染滴度及观察鸡胚的受染率。滴定时用无菌手续取出鸡胚, 将皮肤肌肉组织用 10% 脱脂牛奶生理盐水制成 10^{-1} 悬液进行滴定。因该病毒系得自 RNA 感染, 故以下均称为 RNA 病毒。

4. RNA 的鉴定

(1) RNA 酶处理: 在一定量的 10^{-1} 病毒 RNA 溶液中加入 RNA 酶溶液, 使 RNA 酶的最后浓度为 2 微克/毫升, 在冰浴中放置 5 分钟后经脑内注射于小白鼠。在本实验中凡经 RNA 酶处理过的 RNA 制剂, 对小白鼠脑内注射均失去致病力。

(2) 紫外光分光光度计测定: 不论从受染鼠脑或鸡胚组织提取的 RNA 均用 0.02M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 稀释成 1%, 以 Unicam 紫外光分光光度计测定其光密度, 并计算 D_{260}/D_{280} 之值。结果 D_{260}/D_{280} 之值在 2.0 左右。

二、实验结果

(一) 鼠脑病毒 RNA 经不同途径感染鸡胚后, 鸡胚的受染率及 RNA 病毒滴度的比较

1. 经不同途径接种病毒 RNA 后鸡胚受染率的比较 由于将病毒 RNA 通过任何一种途径接种于鸡胚后, 均观察到有一部分鸡胚不受感染, 因此本实验对每种途径均接种了数目较多的鸡胚, 以便观察其受染率。表 1 表明, 羊膜腔、卵黄囊和绒毛尿囊膜三种途径的受染率差别不大。但在接种后 2—4 天内均以经卵黄囊接种的受染率略高, 其他二种途径较低。这三种途径均以接种病毒 RNA 后第 3、4 天的受染率较高。总计通过绒毛尿囊膜感染的三次实验结果, 其受染率随着培养的时间有一定的增长, 在实验中以第 4、5 天较高, 达 80% 和 75%; 而第 2 天则为 45.5%。因此, 用鼠脑病毒 RNA 接种鸡胚, 一般

表 1 鼠脑病毒 RNA 經不同途径感染后雞胚的受染率

	RNA 滴度 ¹⁾	鸡 胚 受 染 数 ²⁾				受染比例	受 染 率 (%)
		2 天	3 天	4 天	5 天		
羊 膜 腔	5.77	1/8	5/6	2/4	—	8/18	44.4
卵 黄 囊	5.77	5/9	7/8	5/8	—	17/25	68
絨毛尿囊膜	5.77	3/10	9/10	2/4	—	14/24	58.3
	4.67	3/7	3/7	5/6	3/4	14/24	58.3
	4.66	4/5	3/4	5/5	3/4	15/18	83.3
受 染 比 例		10/22	15/21	12/15	6/8	43/66	
受 染 率 %		45.5	71.4	80	75		65.2

1) 为 LD₅₀/0.03 毫升对数。
2) 分母表示所用鸡胚数;分子表示受染鸡胚数。

在感染后 3—5 天内收获病毒为宜。

2. 經不同途径接种病毒 RNA 后,鸡胎 RNA 病毒的繁殖曲綫 在同一批实验中,以等量的鼠脑病毒 RNA 經不同途径接种到一定胎龄的鸡胚中,于不同時間間隔滴定生成病毒的滴度。在表 2 的实验 1 是用单个鸡胚滴定的結果。不論通过何种途径接种,均不易使鸡胚全部受感染。在另一試驗中,接种 RNA 的滴度为 3.18,結果只有个别鸡胚受感染。为了得到比較完整的病毒繁殖曲綫,同时用数目較多的鸡胚进行滴定。实验 2 是2—

表 2 鼠脑病毒 RNA 經不同途径感染雞胚后其 RNA 病毒的繁殖情况

感染途径	实 驗	RNA 滴 度	RNA 病 毒 滴 度					
			2 天	3 天	4 天	5 天	6 天	7 天
絨毛尿囊膜	1	4.18	—	3.37	0	0	0	0
	2	4.77	4.42 (6)	4.29 (10)	4.51 (10)	4.38 (6)	—	—
羊 膜 腔	1	4.18	—	5.17	6.67	5.76	>5.50	>4.50
	2	4.37	—	5.30 (7)	5.49 (6)	5.88 (5)	—	—
卵 黄 囊	1	4.18	—	5.38	0	>6.50	4.38	0
	2	4.88	4.95 (5)	5.94 (5)	>6.0 (2)	6.50 (2)	—	—
尿 囊		4.18	—	>5.50	>5.50	>5.50	5.50	0

“0”表示没有感染;“—”表示没有滴定。
实验 1 为单个鸡胚的滴定結果。 在实验 2 中,絨毛尿囊膜为四批受染鸡胚的平均值;羊膜腔为五批,卵黄囊为二批实验的平均值。括号内数字为该滴定所用的受染鸡胚总数。

5 次实验滴定結果。由于鸡胚受染鸡胚数目不等(2—10 只),因此表中各天的 RNA 病毒滴度为该天的受染鸡胎的滴度的平均值。 可以看出, RNA 病毒的感染滴度在第二天已达一定的高度,但在第 4、5 天到达更高的水平。 这滴度和本病毒在鸡胚繁殖的最高滴度相近。在这实验中,通过羊膜腔、卵黄囊及尿囊感染后, RNA 病毒的最高滴度差别不大;

但通过绒毛尿囊膜感染时,其感染滴度則較低。

(二) 鸡胚病毒 RNA 与鼠脑病毒 RNA 感染滴度的比較

鼠脑病毒 RNA 虽然可以通过不同途径使一部分鸡胚受感染,但受染率較低,也不規律。因此观察了是否可能从受染鸡胚中提出感染性較高的 RNA 以及从这两种組織提取的病毒 RNA 的感染滴度有无差別。

表 3 鼠脑病毒 RNA 与雞胚病毒 RNA 感染滴度的比較

实 驗	鸡 胚 組 織		鼠 脑 組 織		鸡 胚 組 織	
	原病毒滴度	RNA 滴度 ¹⁾	原病毒滴度	RNA 滴度 ²⁾	原病毒滴度	RNA 滴度 ²⁾
1	6.38	1.83	8.50	5.57	4.17	2.63
2	5.22	1.17	7.00	4.67	4.31	3.50
3	6.63	2.38	6.67	4.66	5.50	1.83
4	4.50	1.00	6.33	4.33	3.50	2.50
5	5.74	1.63	8.67	4.66	5.17	1.55
6	4.31	1.47	8.00	5.00		
7	5.62	1.75				
平均滴度	5.48	1.64	7.53	4.83	4.53	2.40
原病毒滴度和 RNA 滴度之差		3.84		2.70		2.13

1) 用含 0.14M 氯化鈉的 0.02M 磷酸緩冲液(pH 7.2)稀释 RNA。
2) 用含 0.8M 氯化鈉的 0.02M 磷酸緩冲液(pH 7.2)稀释 RNA。

首先观察鸡胚病毒 RNA 的感染滴度。在表 3 中証实从感染了乙型脑炎病毒的鸡胚組織中,用石炭酸方法能成功地提取对小白鼠有感染性的 RNA。用 0.14M 氯化鈉磷酸緩冲液稀释所提得的 RNA,进行滴定,其感染滴度平均为 1.64。 仅为其原病毒平均滴度(5.48)的 1/7,000 左右。

表 3 同时列举了鸡胚病毒 RNA 与鼠脑病毒 RNA 滴度的比較。在这些实验中 RNA 均用 0.8M 氯化鈉磷酸緩冲液稀释后滴定。 結果当鼠脑病毒与鸡胚病毒的平均滴度分別为 7.53 和 4.53 时,其相应的 RNA 滴度为 4.83 和 2.40。鼠脑組織 RNA 滴度为其原病毒滴度的 1/500;鸡胚組織 RNA 滴度为其原滴度的 1/140。

(三) 稀释液中氯化鈉的浓度对鸡胚病毒 RNA 感染滴度的影响

表 4 不同氯化鈉濃度对雞胚病毒 RNA 感染滴度的影响

实 驗	病毒滴度	病 毒 RNA 滴 度			
		0.02M 磷酸緩冲液+ 0.8M 氯化鈉	0.02M 磷酸緩冲液+ 0.14M 氯化鈉	0.02M 磷酸 緩冲液	三次蒸餾水
1	5.63	3.48	—	1.83	—
2	5.50	2.67	—	2.63	2.17
3	4.31	3.50	1.47	—	—
4	5.63	2.50	1.75	—	1.83
平 均	5.27	3.04	1.61	2.23	2.00
病毒滴度和 RNA 滴度之差		2.23	3.66	3.04	3.27

用不同氯化鈉浓度的溶液与浓度相当于 2×10^{-1} 的 RNA 溶液等量相加制成 10 % 的 RNA 溶液, 10 倍稀释后滴定, 結果見表 4。可以看出, 用 0.8M 氯化鈉磷酸緩冲液稀释时所表現的感染滴度最高, 平均达 3.04, 为原病毒滴度的 1/200 左右。因此在本文的实验中, 除特別注明者外, 均以这种緩冲液稀释 RNA, 进行滴定的。

(四) 鸡胚病毒 RNA 經不同途径感染鸡胚后, 鸡胚的受染率及 RNA 病毒繁殖滴度的比較

由于鸡胚病毒滴度比鼠脑病毒低得多, 鸡胚病毒 RNA 的滴度也比鼠脑病毒 RNA 低几百倍至一千倍。为了了解鸡胚病毒 RNA 及鼠脑病毒 RNA 对鸡胚感染率的差别, 以及感染鸡胚后所合成的 RNA 病毒滴度的水平, 因此进行下面的实验:

将 0.2 毫升 10^{-1} 的鸡胚病毒 RNA 溶液(氯化鈉浓度为 0.65M) 接种于鸡胚絨毛尿囊膜和卵黄囊, 感染后 2—4 天滴定鸡胚組織 RNA 病毒的滴度, 結果列在表 5。可以看出, 病毒在第 2 天已繁殖至一定水平, 并于第 3、4 天达到相当高的滴度——6.33 和 5.25。但經这二种途径接种鸡胚后, 仅有一小部分鸡胚受感染, 甚至有全部不受感染的。在第三批实验中, 經絨毛尿囊膜接种的鸡胚受染总数为 5/62, 受染率平均为 8.06%; 其中以第 4 天最高, 但受染数也仅达 4/16, 且在第 2 天未能查出有任何鸡胚受感染。通过卵黄囊接种时, 鸡胚于两次实验的受染总数为 5/69, 受染率平均为 7.24%。因此在这次实验内未能得到鸡胚 RNA 病毒的繁殖曲线。

表 5 鸡胚病毒 RNA 經絨毛尿囊膜和卵黄囊感染鸡胚后, RNA 病毒的繁殖情况和受染率

实 验	RNA 滴度	感 染 途 径	RNA 病毒滴度			鸡胚受染数				受染比例	受染率 (%)
			2 天	3 天	4 天	2 天	3 天	4 天	6 天		
1	2.50	絨毛尿囊膜	0	0	5.63	0/12	0/12	1/6	0/3	1/33	3.33
		卵 黄 囊	3.33	5.50	5.25	2/12	2/12	1/10	—	5/34	14.7
2	1.55	絨毛尿囊膜	0	6.33	0	0/8	1/8	0/6	—	1/22	4.54
		卵 黄 囊	0	0	0	0/11	0/12	0/12	—	0/35	0
3	1.83	絨毛尿囊膜	—	0	4.63	—	0/3	3/4	—	3/7	42.9

絨毛尿囊膜受染率平均为 8.06%; 卵黄囊为 7.24%。

三、討 論

流行性乙型脑炎病毒在鸡胚繁殖的病毒滴度比在小白鼠脑內低。在受染鸡胚中, 鸡胚組織的病毒滴度比在尿液或絨毛尿囊膜高^[4]。从西方馬脑脊髓炎鸡胚病毒提取的 RNA, 其感染滴度平均为原病毒滴度的万分之一^[8]。

我們在相同的实验条件下, 無論从受染鼠脑組織或鸡胚組織都能提出对小白鼠具有較高感染性的 RNA。根据若干作者的报告, 用高浓度氯化鈉盐溶液作为稀释剂可提高 RNA 的感染滴度。但对不同的病毒 RNA 应该选择何种浓度較好, 目前尚研究得很少。曾报告用 Mengo 病毒 RNA 感染組織培养, 以 0.64M 氯化鈉溶液作为稀释液时的滴度較高^[15]。在脊髓灰白质炎病毒 RNA 則以 1M 氯化鈉溶液稀释时滴度最高^[6]。

在前一篇报告中^[2], 曾采用 0.5M 氯化鈉磷酸緩冲液作为稀释 RNA 滴定小白鼠; 本实

驗則用較高浓度的氯化鈉磷酸緩冲液(0.8M)作为稀释液,并得到較滿意的結果,但由于高浓度氯化鈉溶液对小白鼠脑內注射有強烈的刺激作用,因此对更高氯化鈉盐浓度的作用在本實驗中未能进行观察。

根据本實驗的結果,無論用滴度較低的鸡胚病毒 RNA 或用滴度較高的鼠脑病毒 RNA 經不同途径感染鸡胚后,都不能使鸡胚全部受感染。这种現象在用少量脑炎鼠脑病毒感染鸡胚时是不会遇到的。實驗証明,用滴度較低的鸡胚病毒 RNA 經絨毛尿囊膜接种鸡胚后,于第 4 天的感染率最高,但只达 25%。用高滴度的鼠脑病毒 RNA 接种,在第 4 天的受染率也仅达 80%。以較高滴度的鼠脑病毒 RNA 經各种途径接种于鸡胚,結果以經絨毛尿囊膜或卵黄囊接种时的受染率較高——58.3%、68%;而經羊膜腔接种的較低——44.4%。用鸡胚病毒 RNA 接种时,似乎以通过絨毛尿囊膜接种的結果比較稳定;通过卵黄囊接种时則不易受感染。但是,由于未能使用較大量的鸡胚进行观察,因此尚难断言哪一种途径的受染率最高。

至于病毒 RNA 不能使鸡胚全部受染的原因,目前还了解得很少,有待于进一步研究。感染鸡胚 RNA 的量仍起一定的作用,如表 5 所示,接种用的 RNA 滴度为 1.50 与 2.50 时,对卵黄囊的感染率有明显的差异。此外,病毒核酸对組織的适应性,鸡胚体内 RNA 酶及其他非特异性物質的作用,鸡胚个体的差异以及組織細胞的屏障作用等都是可能存在的原因。

Mountain^[9]在他的工作中証实,鸡胚羊水不含 RNA 酶,因此选择羊膜腔来接种脊髓灰白質炎病毒 RNA。我們曾观察到鸡胚卵黄囊在試管中对乙型脑炎病毒 RNA 的灭活作用比羊水或尿液強。如果这是由于卵黄囊中 RNA 酶的作用比其他部分強,那么經絨毛尿囊膜和羊膜腔接种时应能避免遭受 RNA 酶的破坏,但通过羊膜腔接种时鸡胚受染率并没有比經卵黄囊接种者高,而經絨毛尿囊膜接种的受染率与經卵黄囊接种者相接近。因此除 RNA 酶以外,还应当考虑由于提取出的 RNA 失去了蛋白質外壳的保护作用,物理化学性質比較不稳定,因此容易为鸡胚的各种非特异性物質——如体液中各种抑制素(包括高分子 DNA^[10])的作用而受到抑制。有些非特异性蛋白質可能与病毒 RNA 結合成为某种核蛋白,使其失去感染性。如果非特异性物質对鸡胚的受染率起着决定性作用,那么采取絨毛尿囊膜途径接种病毒 RNA 时,鸡胚的受染率应当比通过卵黄囊或其他途径有明显的提高,但是實驗結果未能証实这种情况。由此可見 RNA 酶和非特异性物質对病毒 RNA 的灭活作用不可能認為是构成鸡胚不受染的仅有的原因。

我們在實驗中观察到通过絨毛尿囊膜感染时,胚龄較大,鸡胚 RNA 病毒对于胚龄較大的鸡胚的滴度較低。这可能是由于鸡胚个体的差异和伴随着鸡胚的生长而发生的新陈代謝改变,因而使其对病毒 RNA 的感受力发生了改变。

最后还要考虑到組織細胞的屏障作用。由于卵黄液是鸡胚生长发育的营养物質,病毒 RNA 可能随着卵黄液的輸送而直接侵入鸡胚,引起感染。相反,經絨毛尿囊膜或羊膜腔接种,虽然病毒 RNA 可不經稀释或稀释較少,亦可避免 RNA 酶的破坏,但是可能要通过某些屏障——血管內皮細胞、組織細胞等的阻碍始能侵入鸡胚敏感細胞內进行繁殖,輸入比較困难,因而感染率也未見提高。关于組織細胞屏障的本質,尚有待进一步研究。

四、总 结

从感染了乙型脑炎病毒的鸡胚组织提取的 RNA, 以高浓度氯化钠磷酸缓冲液稀释时, 其感染滴度可达原病毒滴度 1/200 左右。

实验中观察到用鼠脑病毒 RNA 经不同途径感染鸡胚, 病毒可在鸡胚繁殖, 但对鸡胚的感染率一般仅为 44.4%—68%, 有时则不感染。

从受染的鸡胚组织提取的 RNA 也能感染鸡胚, 但对鸡胚的感染率一般仅为 7.24—8.06%, 比鼠脑病毒 RNA 为低。

本文对病毒 RNA 的感染滴度以及鸡胚对病毒 RNA 不完全受感染的原因等问题进行了讨论。

参 考 文 献

- [1] 柳元元等, 微生物学报, 8(3): 231—235, 1962。
- [2] 柳元元等, 微生物学报, 8(3): 236—243, 1962。
- [3] Wecker, E., & Schäfer, W., *Zeit. Naturforsch.*, 12b: 415—417, 1957.
- [4] Colter, J. S., Bird, H. H., Moyer, W., & Brown, R. A., *Virology*, 4: 522, 1957.
- [5] Colter, J. S., Bird, H. H., & Brown, R. A., *Nature*, 179: 859, 1957.
- [6] Alexander, H. E., Koch, G., & Mountain, I. M., Van Damme, O., *J. Exp. Med.* 108: 493, 1958.
- [7] Cheng, Ping-Yao, *Nature*, 181: 1800, 1958.
- [8] Wecker, E., *Zeit. Naturforsch.* 15b: 71, 1960.
- [9] Mountain, I. M., & Alexander, H. E., *Pro. Soc. Exp. Bio. Med.* 101: 527, 1959.
- [10] Portocala, R., Boern, V., Samuel, I., *Acta Virologica*, 3: 172, 1959.
- [11] Maassab, H. F., *Pro. Nat. Acad. Sci. U. S.* 45: 877, 1959.
- [12] Sokol, F., & Szurmam, J., *Acta Virologica*, 3: 175—180, 1959.
- [13] Ada, G. L., Lind, P. E., Larkin, L., & Burnet, F. M., *Nature*, 184: 360—361, 1959.
- [14] Warren, J., Hough, R. G., *Pro. Soc. Exp. Bio. Med.*, 61: 109—113, 1946.
- [15] Ellem, K. A. O., Colter, J. S., *Virology*, 11: 434—443, 1960.
- [16] Franklin, R., Wecker, E., & Henry, C., *Virology*, 7: 220, 1959.

STUDIES ON THE RIBONUCLEIC ACID (RNA) OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

III. INFECTIVITY OF THE VIRAL RNA ON CHICK EMBRYOS

CHEN LI-TE, SHÜ CHAO-SHIANG, WANG IAN AND LIU YÜAN-YÜAN

(Laboratory of Biochemistry, Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences)

Infectious RNA was isolated from chick embryos infected with the Peking strain of Japanese B encephalitis virus as well as from the infected mouse brains.

Both chick embryo-virus RNA and mouse brain-virus RNA were found to be infectious to the embryonated eggs when they were introduced through different routes. However, no hundred percent infection rate was observed even when a very large quantity of the viral RNA was inoculated.

The possibility that some inhibitory factors other than RNAase might be present in the embryos was discussed.