

猪胚胎开放式拉长细管玻璃化冷冻保存研究

Study on Vitrification of Porcine Embryos by Open Pulled Straw Method

张德福^{1,2*}, 刘 东^{1,2}, 吴华丽^{1,2}, 郑筱峰³, 王昭凯⁴, 王少兵⁴

ZHANG De-Fu^{1,2*}, LIU Dong^{1,2}, WU Hua-Li^{1,2}, ZHENG Xiao-Feng³, WANG Zhao-Kai⁴ and WANG Shao-Bing⁴

1 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106

2 上海市农业遗传育种重点实验室动物遗传工程研究室, 上海 201106

3 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

4 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095

1 Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

2 Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

3 Animal Medicine College, Nanjing Agriculture University, Nanjing 252100, China

4 Animal Sci&Technology College, Nanjing Agriculture University, Nanjing 252100, China

摘 要 从 20 头供体母猪获得的 291 枚可用胚胎(囊胚/桑葚胚)采用二步法开放式拉长细管(OPS, open pulled straw)玻璃化冷冻技术进行保存,即胚胎首先在冷冻液 I(TCM199 + 20% FBS + 10% EG + 10% DMSO)中平衡 3min,然后立即转入冷冻液 II(TCM199 + 20% FBS + 20% EG + 20% DMSO + 0.4mol/L SUC)中并在 1min 内装管,直接投入液氮保存,3 个月后解冻移植给 8 头受体母猪,其中 1 头怀孕产仔(8 头活仔),在我国首次获得猪胚胎超低温(-196℃)冷冻后代。

关键词 猪, 冷冻胚胎, 玻璃化冷冻

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)05-0845-05

Abstract 291 embryos(Blastocyst/Morula) from 20 donor sows were vitrified by two step method with OPS(open pulled straw) in solution I(TCM199 + 20% FBS + 10% EG + 10% DMSO)for 3min, and solution II(TCM199 + 20% FBS + 20% EG + 20% DMSO + 0.4mol/L SUC)for 1min, stored in liquid nitrogen for 3 months, and transferred into 8 recipient sows after warming, one recipient sow was pregnant and 8 alive piglets were born. This is the first paper to report getting alive piglets by vitrification in China.

Key words pig, frozen embryos, vitrification

哺乳动物胚胎的冷冻保存开始于 1972 年,由 Whittingham 等(1972)首先发明了慢速冷冻法(常规冷冻法)在小鼠上取得胚胎冷冻成功^[1];1977 年 Willadson 等^[2]对上述方法进行了改良,发明了快速

冷冻法,相继在大鼠、牛、兔、山羊、绵羊等 16 种动物上获得成功。但这些方法冷冻程序较繁琐、费时,而且冷冻过程中需要昂贵的程序降温仪;1985 年 Rall 等^[3]首次发明了玻璃化冷冻方法,对小鼠 8-细胞胚

Received: March 28, 2006; Accepted: May 31, 2006.

This work was supported by a grant from Shanghai Agriculture Committee, China(No. 2003-14-1).

* Corresponding author. Tel: 86-21-62200389; E-mail: zhangdefu10@yahoo.com.cn

上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2003)第 14-1 号)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

胎冷冻保存取得成功。此后研究者不断改进,使这项技术日趋成熟,有逐渐替代传统方法的趋势。

猪的胚胎冷冻保存技术,由于猪胚胎脂肪含量较高等原因,相对其它动物一直进展较为缓慢,直到1989年才获得成功(-35℃)^[4],至1990年常规液氮冷冻保存(-196℃)也相继成功^[5],近年来国外利用玻璃化冷冻技术,在猪胚胎超低温冷冻保存研究上取得了突破^[6-11]。国内有关猪胚胎冷冻保存的报道较少,冯书堂(1993)^[12]首先报道了在-20℃下短期冷冻保存猪胚胎移植产仔的消息,王祖昆(1998)^[13]、徐晓波等(1996)^[14]也进行了胚胎冷冻方法的研究,但总的来说冷冻保存效果不甚理想。本研究试图在前人研究工作基础上,利用玻璃化冷冻技术,开展猪胚胎冷冻保存的研究,旨在为地方猪种的长期保存提供一种有效方法。

1 材料与方法

实验中所用的试剂除特别说明外,均来自Sigma公司。

1.1 试验动物与试剂

供体猪系广西巴马小型猪(BM),体重在30~50kg,年龄在8~10个月,由上海市农业科学院畜牧兽医研究所试验猪场提供。受体母猪系成年枫泾猪(FJ)和巴马小型猪,枫泾猪由上海市金山区种猪场提供。

TCM199培养液购自Gibco公司;胎牛血清(FBS)购自上海生物制品公司;乙二醇(EG)购自上海试剂一厂;二甲基亚砜(DMSO)购自Merck公司;蔗糖(SUC)购自上海试剂一厂;氯前列烯醇(PG)购自上海市计划生育科学研究所;孕马血清促性腺激素(PMSG)购自天津实验动物中心;人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波市激素制品厂。

1.2 超排处理

PG+PMSG+hCG法:于小型猪发情周期的16~17d肌注PG 0.2mg和PMSG 1000IU,小型猪发情后与公猪自由交配,并在首次配种后肌注hCG 500IU。

1.3 胚胎的手术回收

首次配种日计为第0天,于第5~6天回收胚胎。

1.3.1 小型猪的麻醉与保定:采用耳静脉注射2.5%戊巴比妥钠30~50mL、8%水和三氯乙醛(含5%硫酸镁)50~100mL进行全身麻醉,仰卧保定。

1.3.2 手术冲胚:采用常规外科手术方法在猪倒数第1、2对乳头之间沿腹中线切开7~8cm,暴露一侧

子宫角,并沿子宫角、输卵管取出该侧卵巢,观察排卵点情况。从子宫角距尖端1/2~2/3部位朝子宫角方向插入牛用冲卵管或胚胎回收针(自制)并固定;用注射器吸取60mL冲卵液(添加2%新生牛血清的杜氏磷酸盐缓冲液)从宫管结合部子宫角尖进针,缓缓注入冲卵液及少许空气,将含胚冲卵液收集于50mL带盖离心管内,以相同方法冲洗另一侧子宫角。

1.3.3 胚胎运送:将上述带盖离心管盖严后置于37℃保温瓶内,10min内送回实验室。

1.3.4 检卵:含胚液在离心管中静置10min后,吸取下层液体至培养皿内,在实体显微镜下检取。

1.3.5 开放式拉长麦管(open pulled straw; OPS)的制备:用自制小酒精等,明火将0.25mL的麦管(France)拉成外径约为0.7mm的开放式小管。

1.4 胚胎冷冻

1.4.1 程序化冷冻:冷冻保护剂的配置:冷冻保护剂EG用PBSS(PBS+20%失活胎牛血清,pH7.4)配置,浓度为1.5mol/L,胚胎在其中停留10min,装管置入程序冷冻仪(型号:CL-5500,澳大利亚Cryologic公司生产)。

冷冻程序:胚胎在室温下,按1℃/min的速率下降到-6.5℃,平衡10min,植冰(ice seeding)。随后按0.3℃/min速率降至-35℃,按0.1℃/min速率降至-36℃,投入液氮。胚胎解冻后,置于NCSU-23培养液中培养。

1.4.2 玻璃化冷冻:胚胎冷冻及解冻参照Berthelot等(2001)^[7]的方法并略有改进。胚胎冷冻的操作均在室温下进行,胚胎先在冷冻液1(TCM199+20%FBS+10%EG+10%DMSO)中平衡3min,然后胚胎立即转入冷冻液2(TCM199+20%FBS+20%EG+20%DMSO+0.4mol/L SUC)中1min,在这1min里,要尽快将胚胎吸入OPS(每管2~6枚),投入液氮,保存3个月。解冻液的温度均为37℃,解冻液的基础液均为TCM199+20%FBS。解冻时,将OPS胚胎放入0.13mol/L SUC溶液,1min后将胚胎转移到相同浓度SUC溶液中平衡5min,再将胚胎转入0.075mol/L SUC溶液中平衡5min,最后将胚胎保存在37℃、5%CO₂、饱和湿度下的基础液中等待移植。

1.5 胚胎死活鉴定

采用FDA(二乙酸荧光素)染色法:将培养胚胎放到5%FDA染色液中,37℃染色3min,放到TCM199中洗涤3~5次,立即拿到荧光显微镜下观察。发荧光的胚胎视为有活力,不发荧光视为死亡。

1.6 胚胎移植

解冻胚胎移植至发情周期第7天的受体母猪。子宫角暴露前的手术操作与胚胎手术回收相同。一侧子宫角暴露后,插入自制注胚针,将胚胎吹入一侧子宫。

1.7 数据处理

实验中所得的数据用 SPSS 统计软件统计分析,进行显著性分析。

2 结果

2.1 供体实验猪的超数排卵

采用 PG + PMSG + hCG 法超排处理广西巴马小

型猪 20 头次(其中 4 头母猪采胚 2 次),共采集可用胚胎 291 枚(囊胚/桑葚胚),平均每次得到 15 枚左右,最高一次获得可用胚胎数达 26 枚。

2.2 程序化冷冻和玻璃化冷冻方法对猪胚胎冷冻的影响

选用部分胚胎(囊胚)冻后进行胚胎培养试验,以比较玻璃化冷冻法和程序化法对胚胎存活率的影响(见表 1)。

试验结果表明,使用玻璃化冷冻法对猪胚胎冷冻效果要优于程序化法的冷冻效果,其 24h 的胚胎存活率、孵化率两方法间差异极显著($P < 0.01$)。

表 1 不同冷冻方法对猪胚胎冷冻的影响

Table 1 Effect of two different freezing methods on pig embryo cryopreservation

	No. of embryos	Stage of embryo	Survival at 24h/%	Hatched rate/%
Programmed freezing method	20	Blastocyst	0(30.0)	0(10.0)
Vitrification method	20	Blastocyst	16(80.0)**	10(50.0)**

** Values in the same columns differ significantly($P < 0.01$)

2.3 冷冻胚胎移植

用于冷冻的胚胎为 203 枚(囊胚/桑葚胚),移植于受体母猪 8 头,每头移植 25~26 枚。移植结果详见表 2。结果 4 头第一情期返情;2 头第二情期返情;1 头手术失败;1 头受体母猪(BM)妊娠产仔 10 头,其中 8 头存活(图 1、2),2 头死亡;产仔受体母猪(BM)发情日、移植日、产仔日分别为 2005 年 4 月 11 日、4 月 18 日和 8 月 4 日,目前胚胎冷冻后代生长良好。

表 2 冷冻胚胎移植结果

Table 2 The results after transfer of vitrified porcine embryos

Sow ID	Parity	No. of transferred embryos	Results
1(BM)	1	26	8 Alive, 2 Dead
2(BM)	1	26	Returned
3(BM)	2	26	Returned
4(BM)	1	25	Returned
5(FJ)	1	25	Breakdown
6(FJ)	2	25	Returned
7(FJ)	3	25	Returned
8(FJ)	1	25	Returned

3 讨论

猪胚胎超低温冷冻对地方猪种的长期保存意义重大。长期以来,由于猪胚胎脂质含量较高等原因,进展一直较为缓慢(相对于牛、羊等动物)^[15,16]。玻璃化冷冻技术(特别是 OPS 玻璃化冷冻技术)的突破,使猪胚胎超低温冷冻保存成功率大幅度提高^[8]。但总体上讲,猪胚胎冷冻成功率还是相对偏低,离实



图 1 1 日龄玻璃化冷冻胚胎后代

Fig.1 Piglets(at 1 day) born after vitrification of embryos



图 2 4 月龄玻璃化冷冻胚胎后代

Fig.2 Piglets(at 4 month) born after vitrification of embryos

以往的研究表明^[17],猪胚胎随着发育的进行,胚胎细胞的脂肪滴颗粒逐渐减少,发育到孵化囊胚阶段,脂肪含量降到最低,冷冻存活率较高。但从实际应用来看,在此阶段胚胎不宜进行冷冻保存,按照国际胚胎移植协会(IETS)国际间胚胎交流的规定,必须采集冷冻保存透明带完整的胚胎^[18],因为透明带能保护胚胎免受病原体的侵袭,据此本研究采集处于桑椹胚、囊胚阶段透明带完整的胚胎。

超低温冷冻胚胎的存活取决于渗透性抗冻保护剂通透性的快慢、化学毒性的大小和非渗透性抗冻保护剂的渗透压作用及有无冰晶生成。以往传统的冷冻方法采用浓度为1.5mol/L DMSO或EG为主体的渗透性抗冻保护剂,因其浓度低、对细胞的化学毒性较小,故冻前需较长的降温冷却时间,另外还需要人工植冰过程,由于冰晶的生成对细胞造成物理性的损伤而影响其活力。本研究采用胚胎玻璃化冷冻保存,其中渗透性抗冻保护剂EG、DMSO分子量较小,通过胚胎细胞膜的速度较快^[19],在1min内使细胞内外达到平衡程度,即投入液氮中冷冻保存。而添加大分子物质聚蔗糖的作用是,当溶液急速冷却后,溶液由液态变为半固态,最后成为玻璃化固态。在此急速冷却过程中由于玻璃化溶液首先形成半固态现象,加之此溶液不生成冰晶,因此在冷冻过程中对胚胎的压力能够得到缓冲,使胚胎免受膨胀造成物理性的损伤^[3]。玻璃化溶液中添加蔗糖主要是提高胚胎细胞外液渗透压作用,冷冻过程中使胚胎脱水,同时使渗透性抗冻保护剂渗透到胚胎内部。而解冻时蔗糖的渗透压作用又能脱出细胞内部的抗冻剂,解除其对胚胎的化学毒性作用^[20,21]。研究表明EG的分子量(62.07)较小、对细胞膜的通透性较强、化学毒性较小,但玻璃化形成的状态稍差些,而DMSO的分子量为78.14,渗透性较乙二醇差,化学毒性较大,但是形成玻璃化状态要好一些,将两种抗冻剂混合后,既提高了抗冻剂的渗透性,又缓解了DMSO的化学毒性,玻璃化状态形成得比较彻底^[19],混合后起到了互补作用。

猪胚胎对低温十分敏感,因此本研究改细管冷冻法为OPS法,使冷冻速度超过细管法的10倍^[22]。由于提高了降温速度,可减少冷冻损伤;又因为胚胎与高浓度的玻璃化溶液接触时间小于1min,从而大大减小了化学毒性和渗透性的损伤。

近年来国外利用OPS玻璃化冷冻猪胚胎取得了令人满意的结果。Berthelot等(2000)^[6]将400枚OPS玻璃化冷冻胚胎(囊胚)移植给20头受体猪(20

枚/头),结果11头妊娠,产仔38头;Berthelot等(2001)^[7]又将200枚OPS玻璃化冷冻胚胎(囊胚)移植给10头受体猪,结果8头妊娠,产仔59头。Berthelot等(2003)^[8]综合了近几年猪胚胎的冷冻保存结果,将1237枚OPS玻璃化冷冻猪胚胎移植到56个受体猪,结果28头妊娠,产仔128头。澳大利亚学者Cameron RDA等采用OPS玻璃化冷冻技术将568枚大白猪冷冻胚胎移植到21头SPF商品猪,结果15头产仔(妊娠率75%),产仔123头(其中活仔115头),平均每头产8.2头,接近实际生产应用水平^[9~11]。

我们利用巴马小型猪作为实验动物,一是其手术操作方便,二是其超排效果比其他小型猪好^[23]。

本研究采用OPS玻璃化冷冻技术,获得猪冷冻(-196℃)胚胎产仔,系国内首次报道。目前8头冷冻胚胎后代,长势良好,无异常表现。与国外同类研究相比还有一定的差距,下一步的工作要进一步完善各个试验环节,提高受胎率,使这一技术逐渐具备实用性。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*, 1972, **178** (59): 411-414.
- [2] Willadsen SM. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In "The Freezing of Mammalian Embryos", London: Butterworths Press, 1977, pp. 175-200
- [3] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 1985, **313**: 573-575
- [4] Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno T *et al.* Birth of piglets from frozen embryos. *Vet Rec*, 1989, **125** (2): 43-44
- [5] Kashiwaki N, Ohtani S, Nagashima H. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *Theriogenology*, 1990, **35**: 221
- [6] Berthelot F, Martinat-Butte F, Locatelli A *et al.* Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*, 2000, **41**: 116-124
- [7] Berthelot F, Martinat-Butte F, Perreau C *et al.* Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reprod Nutr Dev*, 2001, **41**: 267-272
- [8] Berthelot F, Martinat-Butte F, Gabor V *et al.* Cryopreservation of porcine embryos: state of the art. *Livestock Production Science*, 2003, **83** (1): 73-83
- [9] Cameron RDA, Beebe LFS, Blackshaw AW *et al.* Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *Theriogenology*, 2004, **61**: 1533-1543
- [10] Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW *et al.* Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts.

- [11] Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW *et al.* Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer. *Theriogenology*, 2005 **64**: 879 - 890
- [12] Feng ST(冯书堂), Liu DK(刘殿魁). Piglets delivered from freezer(-20°C) embryos. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*(畜牧兽医学报), 1993 **24**(1): 41 - 44
- [13] Wang ZK(王祖昆), Zhang SQ(张守全). Study on collection of swine hatched-embryos and freezing methods. *Journal of Guangdong Animal Husbandry and Veterinary Medicine*(广东畜牧兽医科技), 1998 **23**(4): 13 - 14
- [14] Xu XB(徐晓波), Matusmoto T(小岛敏之). Some factors affecting efficiency of swine embryo freezing. *Acta Agriculturae Jiangsu*(江苏农业学报), 1996 **12**(4): 41 - 46
- [15] Zhang DK(张德福), Liu D(刘东), Tang LI(汤琳琳). Research on techniques of long-term conservation for local pig breeds. *Acta Agriculturae Shanghai*(上海农业学报), 2005 **21**(2): 104 - 107
- [16] Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 2002 **57**: 282 - 302
- [17] Nagashima H, Yamakawa H, Nieman H. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology*, 1992, **37**: 839 - 850
- [18] Tringfellow DA, Seidel GE. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS): A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary precautions. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988
- [19] Zhu SE(朱士恩). Permeability measurement of expanded mouse blastocysts to various cryoprotectants. *Journal of China Agricultural University*(中国农业大学学报), 1998, **3**(5): 110 - 113
- [20] Kasai M, Nishimoli M, Zhu SE *et al.* Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol based solution after exposure to the solution at various temperatures. *Biology of Reproduction*, 1992, **47**: 1134 - 1139
- [21] Zhu SE, Kasai M, Otoge H *et al.* Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol based solutions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, **98**: 139 - 145
- [22] Vajta G, Holm P, Kuwayama M *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, **51**: 53 - 58
- [23] Wang ZH(王占贺), Xie GZ(解广周), Feng SX(冯书堂) *et al.* Oestrous synchronization and superovulation in Wuzhishan minipigs. *Journal of Beijing Agricultural College*(北京农学院学报), 2000 **15**(1): 33 - 36

发挥微生物技术生产乙醇的优势

目前,将燃料乙醇作为替代能源大有发展之势。美国通用汽车公司认为,每年生产 2500 亿升~4050 亿升乙醇可替代每年 5300 亿升汽油需求的一半。法国投资 10 亿欧元建 10 家生物燃料生产厂,预计 2008 年消耗生物燃料所占比例为 5.75%,到 2010 年为 7%,2015 年为 10%。瑞典计划到 2020 年成为全球不依赖石油的国家,主要是靠发展燃料乙醇(生物酒精)产业,以一切有机废弃物为原料通过发酵途径生产乙醇,经加工后成为燃料乙醇,15 年后将成为瑞典汽车主要燃料。我国已着手从农业秸秆等(大约年产 10 亿吨,可供开发利用的生物质资源)发酵生产乙醇,近年发展较快,已形成乙醇产业,其产量超过 100 万吨/年。安徽省生产乙醇突破了最大的瓶颈,降低了生产成本,他们以农业秸秆等为原料(五碳糖),应用纤维素水解酶“工程菌”菌株,乙醇产量得到很大提高。通过试验显示,每 4 吨秸秆(玉米、麦草)可生产 1 吨乙醇,同时可获饲料酶等副产品,预计 2007 年上半年可进行工业化中试,若运行正常的话,秸秆等发酵生产乙醇会带来巨大商机。在发酵生产乙醇中选育高效菌种是生物乙醇工业化生产的基础,有报道粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)具有直接转化底物生产乙醇的能力,一般是两步法,先要将原料经酶法降解生成单糖,尔后利用酿酒酵母进行糖发酵生产乙醇。*N. crassa* 的优越性在于既能降解纤维素、半纤维素,又能发酵葡萄糖、木糖生产乙醇,但其转化效率尚需进一步提高。基因工程技术为改造菌种、提高乙醇产率提供了可能,这方面工作也需进一步探究。在美国,曾用现代生物技术改造细菌遗传性获得新菌种,能利用含木质纤维废弃物,以其为原料发酵生产乙醇。在英国,建构一种“工程嗜热脂肪芽孢杆菌”能使 30% 纤维素类物质转化为乙醇。还有一种运动发酵单胞菌,在以细胞固定化技术发酵生产乙醇上优于酵母。我国台湾研究者将运动发酵单胞菌生产乙醇的两种关键酶基因同时引入大肠杆菌中而获得表达,此“工程大肠杆菌”能同时达到糖化和发酵生产乙醇的目的,30°C、10% 葡萄糖底物发酵 145h,乙醇产量为 6.1%(W/V),糖转化率 96%。总之,燃料乙醇作为替代能源之一是有潜力的:不存在原料源供应问题,安全无毒害。其研发的关键在于提高乙醇生产菌的活力和转化效率以及它的稳定性,生产替代能源时因地制宜。

(柯为)