

小鼠早期胚胎的 EFS20 /4Q EFS4Q DAP213和 GP25玻璃化法冷冻保存

梁 洋,杜文敬,王春生,朴善花,安铁洙*

(东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 为了筛选适合用于小鼠不同发育时期胚胎的玻璃化冷冻方法,采用 EFS20/4Q EFS4Q DAP213和 GP25法分别冷冻保存不同发育期的小鼠胚胎。结果表明,采用 EFS20/4Q法冷冻的 2细胞期胚经解冻后发育至扩张囊胚的比率(93%)显著高于 EFS4Q DAP213和 GP25法(分别为 70.9%、39.1%和 11.1%)($P < 0.01$);采用 EFS20/4Q法冷冻保存小鼠 4~8细胞期胚时,与 EFS4Q相比,解冻后发育至扩张囊胚的比率差异不显著(分别为 86.2%和 90.0%),但与 DAP213(64.5%, $P < 0.05$)和 GP25法(47.8%, $P < 0.01$)相比其扩张囊胚率显著增高。此外,虽然 EFS4Q法与 EFS20/4Q法冷冻保存小鼠桑椹胚解冻后的扩张囊胚率差异不显著(分别为 68.9%和 70.8%),但均显著高于 DAP213(38.9%)和 GP25法(37.5%)($P < 0.01$)。结果表明,EFS20/4Q法适合用于小鼠的 2细胞期冷冻保存,而 EFS20/4Q和 EFS4Q法均适合用于 4~8细胞期胚和桑椹胚的冷冻。

关键词: 小鼠;早期胚胎;玻璃化冷冻保存;体外培养

中图分类号: Q813.7 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)06-1248-05

Cryopreservation of Early Mouse Embryos by Vitrification Using EFS20/4Q, EFS4Q, DAP213 or GP25 Methods

LIANG Yang DU Wen-Jing WANG Chun-sheng PIAO Shan-Hua AN Tie-zhu*

(College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract Different developmental stages of mouse embryos were vitrified using EFS20/4Q EFS4Q Nakagata-DAP213 or Schefen-GP25 method respectively to filter the most suitable vitrification scheme. The results showed that the blastocyst formation rate by EFS20/4Q method (93%) was significantly higher than those by EFS4Q Nakagata-DAP213 and Schefen-GP25 methods (70.9%: 39.1%: 11.1%) after vitrification-thawing 2-cell embryos. After vitrification-thawing 4~8 cell embryos, the blastocyst formation rates were not significantly different between EFS20/4Q and EFS4Q methods (86.2%: 90.0%), but that by EFS20/4Q method was better than that by the method of DAP213 (64.5%; $P < 0.05$) or GP25 (47.8%; $P < 0.01$). In addition, blastocyst formation rates were not significantly different between EFS20/4Q and EFS4Q methods (68.9%: 70.8%), but they were significantly higher than the methods of Nakagata-DAP213 and Schefen-GP25 after vitrification-thawing Morula embryos (38.9%: 37.5%; $P < 0.01$). These results indicated that EFS20/4Q method was the most suitable for the 2-cell stage mice cryopreservation and EFS 20/4Q or EFS 4Q methods were suitable for 4~8-cell stage embryo and morula vitrification.

Key words mouse; early embryo; vitrification; culture in vitro

收稿日期: 2010-06-30 修回日期: 2010-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771538)

作者简介: 梁洋(1974-),女,工程师,博士生,主要从事动物胚胎工程研究, E-mail liang11yang@yahoo.com.cn * 通

讯作者: 安铁洙,教授,博士生导师, E-mail antiezh@tom.com.

自 Whittingham 等^[1]首次冷冻保存小鼠胚胎获得成功以来,胚胎冷冻保存技术获得了不断改良和完善,其中, Raik Fahy^[2]发明的小鼠胚胎玻璃化(vitrification)冷冻方法因其具有简便、快速和易于推广的特点而备受关注。Chiu-Sung Ko 等^[3]对小鼠的卵母细胞的玻璃化冷冻的结果显示,冷冻对小鼠卵母细胞的染色体、纺锤体及其细胞膜造成不同程度的损伤而降低卵母细胞的存活率。已有的研究证实,良好的冷冻保存技术,是提高胚胎存活率的先决条件^[4]。此外,据 Zhang JQ 和 Zhou GB 等^[5-6]的研究表明,小鼠等动物的不同发育期胚胎具有不同的耐冻特性。因此,本研究依次采用 Kasai 等的 EFS40 法^[7]及 EFS20/40 法^[8]〔用乙二醇(ethylene glycol EG)、聚蔗糖 70(Ficoll 70)、和蔗糖(sucrose)制备冷冻保护液〕、Nakagata 等^[9]的 DAP213 法(用 DMSO、乙酰胺(acetamide)和丙二醇(propylene glycol)制备冷冻保护剂)和 Schefen 等^[10]的 GP25 法(用甘油和丙三醇制备冷冻保护液),分别对小鼠不同发育期胚胎进行冷冻保存,并观察冷冻胚胎在解冻后的体外发育能力,以其筛选适用于小鼠不同发育时期胚胎的最佳冷冻保存方法。

1 材料与方 法

1.1 早期胚胎的采集

选择性成熟(6~8月龄)CR系,以48h的间隔分别注射10IU PMSG和5IU hCG后,与同系雄性小鼠交配,对2d见有阴道栓的雌性小鼠,在注射hCG后的第42h和第66h采用颈椎脱臼法处死后采取输卵管。在实体显微镜下,用PB1液进行灌流,分别采集形态正常的2细胞期胚和4细胞期胚(图1),或者在注射hCG后的第90h,采取双侧子宫角,并在实体显微镜下用PB1液灌流子宫角,采集形态正常桑椹胚(图1)。

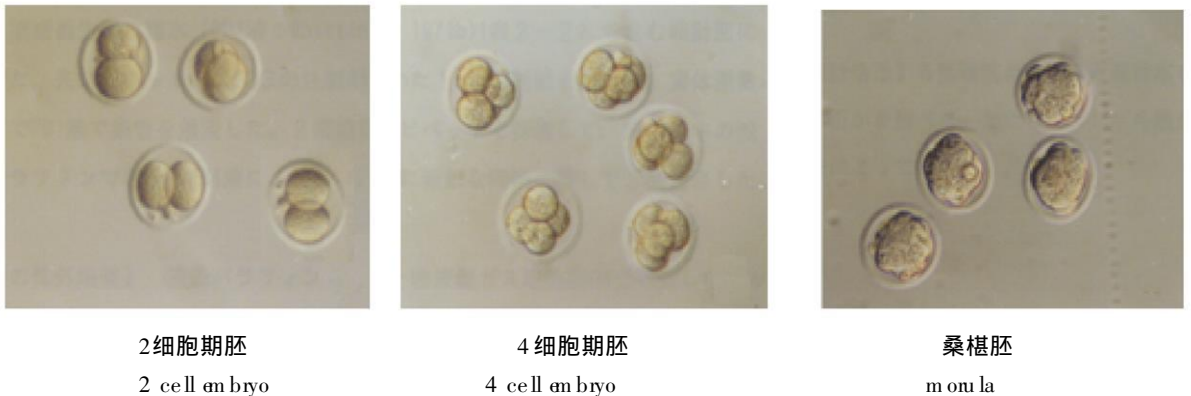


图 1 小鼠不同发育期胚胎($\times 200$)

Fig 1 Embryo of mouse different development period

1.2 预处理液、冷冻保护液和解冻液的配制

1.2.1 预处理液 ① EFS20液:用 PB1 溶液^[6]配制含 20% 乙二醇(V/V)、18% Ficoll 70(W/V)和 3 mol/L 蔗糖的溶液;② GP10液:用 PB1 溶液配制含 10% 甘油(V/V)和 20% 丙二醇(V/V)的溶液。

1.2.2 冷冻保护液的配制 ① DAP213液:用 PB1 溶液配制含 2 mol/L DMSO、1 mol/L 乙酰胺和 3 mol/L 丙二醇的溶液;② GP25液:用 PB1 溶液配制含 25% 甘油(V/V)和 25% 丙二醇(V/V)的溶液;③ EFS40液:用 PB1 溶液配制含 40% 乙二醇(V/V)、18% Ficoll 70(W/V)和 3 mol/L 蔗糖的溶液。

1.2.3 解冻液 用 PB1 液配制含有 0.5 mol/L 蔗糖的溶液。

将已配制的上述溶液,用 0.45 μ m 微孔过滤器过滤后,在 4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.3 早期胚胎的玻璃化冷冻和解冻

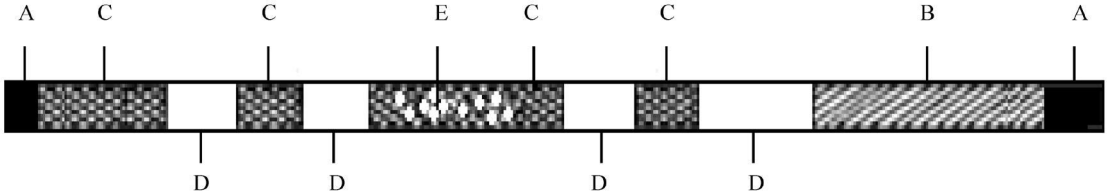
1.3.1 胚胎的冷冻 将上述获得的 2 细胞期胚、4 细胞期胚和桑椹胚,在 20~23 $^{\circ}$ C 室温条件下,分别采用如表 1 所示的方法处理各类胚胎并装入 0.25 冷冻细管(图 2)后,直接投入液氮中保存。

1.3.2 冷冻胚胎的解冻 将冷冻细管从液氮中取出后,在约 35 $^{\circ}$ C 温水中快速解冻,然后将管内的胚胎导入 0.5 mol/L 蔗糖溶液中并保持 5 min,将胚胎移入 PB1 液并用其清洗 3 次后进行体外培养。

表 1 胚胎在各种玻璃化冷冻保护剂中处理程序

Tab 1 Embryo vitrification treatment process in a variety of protective agents

冷冻方法 Freezing method	预处理 Pretreatment		冷冻保存液处理 Cryoprotectant processing	
	预保护液	处理时间 /min	冷冻保护液	处理时间 /s
	Pre-protection fluid	Processing time	Cryoprotectant	Processing time
EFS20/40 ^[2]	EFS20	2	EFS40	30
EFS40 ^[3]			EFS40	30
AP213 ^[4]			DAP213	10
GP25 ^[5]	10	GP25	25	



A. 栓; B 0.5 mol/L 蔗糖; C. 冷冻保护液; D. 空气; E 胚胎
A. cotter B 0.5 mol/L sucrose C. Cryoprotectant D. air E. embryo

图 2 冷冻细管 (0.25 mL) 溶液配置示意图

Fig 2 Frozen thin tube (0.25 mL) cryoprotectant drawing

1.4 早期胚胎的体外培养

将经冷冻-解冻的 2 细胞期胚、4~8 细胞期胚和桑椹胚, 导入在二氧化碳培养箱 (37 °C, 5% CO₂, 95% 空气, 100% 湿度) 预平衡 12 h 的 35 mm 培养皿内的改良 M16 培养液^[6]液滴 (200 μL) 中, 并置于二氧化碳培养箱中进行培养, 观察发育至扩张囊胚 (图 3) 的能力。

1.5 统计学处理

用 χ^2 检验法对数据进行显著性检验。

2 结果

2.1 不同玻璃化冷冻法保存的小鼠 2 细胞期胚的体外发育

表 2 结果显示, 当用 EFS20/40 DAP213 和 GP25 3 种方法冷冻保存小鼠 2 细胞期胚胎时, 解冻后的正常胚胎回收率差异不显著 (分别为 93.4%、92.0% 和 90.0%)。但是, 经 EFS20/40 法冷冻胚胎的小鼠 2 细胞期胚, 经体外培养后的扩张囊胚率 (93.0%) 显著高于 EFS40 DAP213 和 GP25 法 (分别为 70.9%、39.1% 和 11.1%) ($P < 0.01$)。

表 2 不同玻璃化冷冻法保存的小鼠 2 细胞期胚的体外发育

Tab 2 Development of two-cell embryo using different vitrification preservation method in vitro

冷冻方法 Freezing method	回收正常胚数 / 冷冻胚数 % Number of recycle the normal embryo / freezing embryo	扩张囊胚率 % Expanded blastocyst rate
EFS20/40	71/76 (93.4)	66/71 (93.0)
EFS40	62/66 (93.9)	44/62 (70.9)*
DAP213	46/50 (92.0)	18/46 (39.1)*
GP25	36/40 (90.0)	4/36 (11.1)*

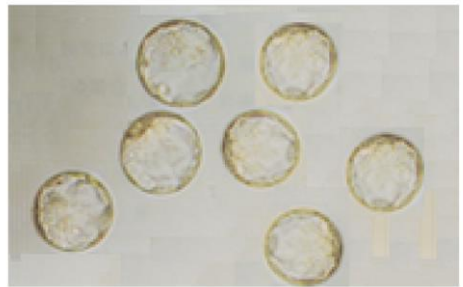


图 3 体外培养的扩张囊胚 (×200)

Fig 3 The expansion of the blastocyst in vitro

* : $P < 0.01$ 与 EFS20/40 法相比差异极显著。* ($P < 0.01$) compares with the EFS20/40 method
© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 不同玻璃化冷冻法保存的小鼠 4~8 细胞期胚的体外发育

表 3 结果显示,用 EFS20/40 法和 DAP213 法冷冻保存的小鼠 4~8 细胞期胚,经解冻后获得正常胚胎的比率显著高于 EFS40 法和 GP25 法(分别为 100%、93.9% 和 80.0%、57.5%) ($P < 0.01$)。此外,与 EFS40 法相比,EFS20/40 法冷冻保存的小鼠 4~8 细胞期胚的扩张囊胚率差异不显著(分别为 86.2% 和 90%),而与 DAP213 法和 GP25 法(分别为 64.5% 和 47.8%)相比其扩张囊胚率显著增高 ($P < 0.01$)。

表 3 采用不同玻璃化冷冻法冷冻保存的小鼠 4~8 细胞期胚的体外发育

Tab 3 Development of 4-8 cell embryo using different vitrification preservation method in vitro

冷冻方法 Freezing method	回收正常胚数/处理数 % Number of recycle the normal embryo / freezing embryo	扩张囊胚率 % Expanded blastocyst rate
EFS20/40	58/58(100)	50/58(86.2)
EFS40	40/50(80.0)**	36/40(90.0)
DAP213	31/33(93.9)	20/31(64.5)*
GP25	23/40(57.5)**	11/23(47.8)**

与 EFS20/40 法相比差异显著* ($P < 0.05$) 和** 差异极显著 ($P < 0.01$)。Compares with the EFS20/40 method * ($P < 0.05$) and** ($P < 0.01$).

2.3 不同玻璃化冷冻法保存的小鼠桑椹胚体外发育

表 4 结果显示,与 EFS20/40 法相比,用 DAP213 法冷冻保存小鼠桑椹胚的正常胚胎回收率差异不显著(分别为 96.3% 和 84.0%) ($P < 0.01$)。此外,采用 EFS20/40 法冷冻保存的小鼠桑椹胚的扩张囊胚率(70.8%)与 EFS40 法相比差异不显著,但显著高于 DAP213 法和 GP25 法(分别为 38.9% 和 37.5%) ($P < 0.01$)。

表 4 采用不同玻璃化冷冻法冷冻保存的小鼠桑椹胚的体外发育

Tab 4 Development of morula using different vitrification preservation method in vitro

冷冻方法 Freezing method	回收正常胚数/处理数 % Number of recycle the normal embryo / freezing embryo	扩张囊胚率 % Expanded blastocyst rate
EFS20/40	77/80(96.3)	51/70(72.8)
EFS40	46/50(92.0)	31/46(67.4)
DAP213	54/60(90.0)	21/54(38.9)**
GP25	42/50(84.0)*	15/42(35.7)**

与 EFS20/40 法相比差异显著* ($P < 0.05$) 和** 差异极显著 ($P < 0.01$)。Compares with the EFS20/40 method * ($P < 0.05$) and** ($P < 0.01$).

3 讨论

玻璃化(vitrification)是指高浓度的溶液(6 mol/L 以上)由 0℃ 以上温度直接投入液氮的急速冷却过程中所发生的,由液态变为半固态再过渡为固态且呈现透明状态的物理现象。Rall & Fahy^[2]首次利用高浓度的 DMSO、乙酰胺和丙二醇制备的玻璃化液冷冻小鼠胚胎获得成功。但是,采用该方法难以获得稳定的研究结果^[11-12]。近年来,该方法获得了不断的完善。研究显示,采用对胚胎毒性较低的冷冻保护剂,显著提高了冷冻胚胎的生存率^[13]。与此同时,Kuwayanama 等^[14-15]采用玻璃化冷冻人的卵母细胞也有较高的效率。上述结果表明,玻璃化冷冻方法可广泛应用于卵母细胞和胚胎的冷冻保存。

目前,小鼠胚胎玻璃化冷冻包括采用不同冷冻保护液的 Kasa 的 EFS40 法^[7]、EFS20/40 法^[8]、Nakagata 的 DAP213 法^[9]和 Schefen 的 GP25 法^[10]等。为了筛选适合于不同发育时期小鼠胚胎的玻璃化冷冻方法,本研究采用上述 4 种玻璃化法冷冻保存了小鼠 2 细胞期胚、4~8 细胞期胚和桑椹胚,其结果显示,采用 EFS20/40 法可获得较稳定的正常形态胚胎回收率(分别为 93.4%、100% 和 95.3%)。与 EFS40、DAP213 和 GP25 法相比,当采用 EFS20/40 法时,冷冻保存的 2 细胞期胚经解冻后发育至扩张囊胚的比率显著增高 ($P < 0.01$); 当采用 EFS20/40 法冷冻保存小鼠 4~8 细胞期胚和桑椹胚时,虽然与

EFS40法相比,冷冻胚胎解冻后的扩张囊胚率差异不显著,但显著高于 DAP213法和 GP25法($P < 0.01$)。上述结果表明,聚蔗糖和毒性较小的乙二醇联合使用作为玻璃化冷冻保护剂,对胚胎的伤害更小,可提高小鼠胚胎的冷冻解冻后的存活率。因此利用 Kasai等提出的 EFS40法及 EFS20/40法适合小鼠不同时期胚胎的冷冻保存,其中 EFS20/40法适合用于小鼠的 2细胞期胚冷冻保存,而 EFS20/40和 EFS40法均适合用于 4~8细胞期胚和桑椹胚的冷冻。

综上所述,EFS40法及 EFS20/40法适合用于小鼠的早期胚胎冷冻保存。有关该方法是否适合牛、绵羊等胚胎的冷冻保存有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1]Whittingham D G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing[J]. Nature, 1971, 233: 125-126
- [2]Rall W F, Fahy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification[J]. Nature, 1985, 313: 573-575
- [3]Ko C S, Ding D C, Chu T W, et al. Changes to the meiotic spindle and zona pellucida of mature mouse oocytes following different cryopreservation methods[J]. Animal Reproduction Science, 2008, 105: 272-282
- [4]Gabor V, Zsolt P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory[J]. Reproductive Biomedicine, 2006, 12: 779-796
- [5]Zhang J Q, Cui J, Ling X E, et al. Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method[J]. J Assist Reprod Genet, 2009, 26: 621-628
- [6]Zhou G B, Zhu S E, Hou Y P, et al. Vitrification of mouse embryos at various stages by Open-pulled Straw (OPS) method[J]. Anim Biotechnol, 2005, 16: 153-163
- [7]Kasai M, Kon i J H, Takakano A, et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability[J]. J Reprod Fert, 1990, 89: 91-97
- [8]Mukai T, Wada S, Takahashi K, et al. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for cell mouse embryos[J]. Human Reproduction, 1998, 13(10): 2874-2879
- [9]Nakagata N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification[J]. Reproduction, 1989, 87: 479-483
- [10]Scheffen B, Zwahlen P, Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification[J]. Cryo-letters, 1986, 7: 260-269
- [11]An T Z, Ikegami K, Edashige K, et al. Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death[J]. Cryobiology, 1999, 38(1): 27-34
- [12]Hsh T, Yananoi J, Ogawa S. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method[J]. Jpn J Anim Reprod, 1986, 32: 29-32
- [13]Kumasaki Y, Kumon M, Utsunomiya T, et al. Successful pregnancy after the vitrification of zygotes using commercial vitrification solutions and conventional straws to protect against infections in liquid nitrogen[J]. J Assist Reprod Genet, 2005, 22: 33-35
- [14]Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos—the cryotop method[J]. Theriogenology, 2007, 67: 73-80
- [15]Kuwayama M, Vajta G, Kato O, et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes[J]. Reprod Biomed Online, 2005, 11: 300-308