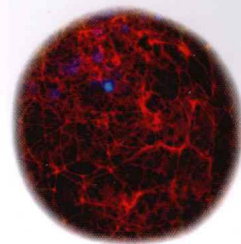


“十一五”国家重点图书出版规划项目



应用生物技术大系

Comprehensive Series of Applied Biotechnology



动物配子与胚胎 冷冻保存原理及应用

朱士恩 主编



科学出版社



“十三五”国家重点图书出版规划项目

兽医生物制药学（第2版）

（本科教材）



动物配子与胚胎 冷冻保存原理及应用

王 颖 主编

“十一五”国家重点图书出版规划项目

应用生物技术大系

动物配子与胚胎 冷冻保存原理及应用

朱士恩 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

动物配子与胚胎冷冻保存技术是生命科学的重要组成部分,是开展动物胚胎生物技术研究不可或缺的基本保障。本书共分5章,主要内容包括动物配子与胚胎冷冻保存原理及操作方法,即动物早期胚胎、卵母细胞、精液、卵巢组织与干细胞的冷冻保存等,是一本集配子、胚胎、卵巢组织、干细胞冷冻保存原理与应用为一体的系统专著,对从事相关领域的教学和科研工作人员具有理论指导作用和实践参考价值,特别适合于相关专业的大专院校和科研院所从事生殖生物学、低温生物学、动物胚胎学、发育生物学、细胞生物学和临床医学等相关专业研究的师生及科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用/朱士恩主编. —北京:科学出版社, 2012

(应用生物技术大系)

ISBN 978-7-03-033442-8

I. ①动… II. ①朱… III. ①动物-配子 ②动物-冷冻胚胎 IV. ①Q954.4 ②S814.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 015154 号

责任编辑:王海光 刘 晶/责任校对:宣 慧

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年2月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年2月第一次印刷 印张:15 插页:4

字数:335 000

定价:58.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》

编委会名单

主 编 朱士恩 中国农业大学

副主编 周光斌 四川农业大学
侯云鹏 中国农业大学
李俊杰 河北农业大学
傅祥伟 中国农业大学
史文清 北京市畜牧兽医总站
余文莉 北京安伯胚胎生物技术中心
范志强 中国农业大学

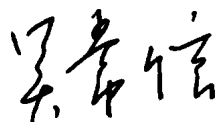
编 委	朱士恩	周光斌	侯云鹏	李俊杰	傅祥伟	史文清
	余文莉	范志强	吴国权	王 亮	杜 明	贾宝瑜
	吴通义	田树军	李树静	洪琼花	孟庆刚	权国波
	索 伦	李秀伟	裴 燕	王彦平	张清靖	杨其恩
	赵学明	刘 颖	任 康	阿布力孜·吾斯曼		徐振军
	曾 艳	刘 霖	王晓旭	周艳华	杨中强	闫长亮
	梁 莹	莫显红	程柯仁	郑天威	袁佃帅	胡麦顺
	岳明星	夏 威	房 义	周 崇	谭鸿明	金 方
	刘满清	唐国梁	付静涛	胡辛怡	杨宏远	李 松

序

近年来，随着低温生物学研究的逐步深入，动物配子与胚胎冷冻保存研究取得了突破性进展，如家畜的精液与胚胎、实验动物的卵母细胞与胚胎，乃至人类精液、卵母细胞与胚胎的冷冻保存技术的应用，展现了该项技术不仅在实验研究和畜牧业生产中发挥了重要作用，而且在人类医学上也具有广阔的应用前景。

二十余年来，该书主编朱士恩教授领导的团队一直从事动物配子与胚胎冷冻保存方面的科研与教学工作，不论是理论水平还是实践经验，均能与国际相接轨，在国内外相关刊物上发表了多篇有学术价值的科研论文，并取得了丰硕的研究成果。《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》一书即是在此基础上编写而成的。综观整体，该书具有如下特色：①系统性强，全书以动物配子与胚胎冷冻保存原理与应用技术为主线，系统介绍了包括家畜、实验动物、人类乃至鱼类配子与胚胎冷冻保存原理及基本操作方法；②内容新颖，全书较为全面地阐述了动物配子与胚胎冷冻保存在国内外的最新方法、研究成果及其前景；③图文并茂，全书收录了大量图片，力争图文并茂、简明扼要、生动直观地勾勒出一些基本原理和操作方法。希望该书的问世能为农业和综合性院校及科研院所从事动物繁殖学、低温生物学、生殖生物学、发育生物学、动物胚胎学、细胞生物学及人类临床医学等相关专业的师生及科研人员提供重要的理论与技术参考。

《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》一书的出版必将对我国动物繁殖生物技术及相关学科的教学和科研发挥重要作用，特予以推荐，并作序。



中国科学院院士

中国农业大学教授

2011年8月

前 言

动物配子与胚胎的冷冻保存技术是现代生物技术的重要组成部分,在畜牧学、生命科学及临床医学等领域发挥着越来越重要的作用,其研究与开发已经成为科研热点与焦点,国内外越来越多的科技工作者开始或正在从事此方面的工作,某些工作已经取得了显著的成果。但是目前国内关于动物配子与胚胎冷冻保存的书籍甚少,虽然在有些书籍中涉及此方面的内容,但是范围比较窄,阐述得比较浅,难以全面体现动物配子与胚胎冷冻保存技术的知识体系。更重要的是,至今我国还未曾出版动物配子与胚胎冷冻保存方面的专门书籍。鉴于上述原因,在我国急需一部能全面且系统地反映动物配子与胚胎冷冻保存基本原理、技术方法和最新进展的书籍,以供广大的教学和科研工作者参考。因此,为满足上述领域教学、科研和生产的发展需要,特编写了《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》一书献给广大读者。

2009年5月,本书主编朱士恩召集编写人员,在广泛征求意见的基础上,拟定了编写大纲初稿,并于2009年8月1~2日在中国农业大学召开了编委会会议。出席此次会议的有来自全国各地的编委及在校研究生共计30余人,会上编委们围绕着编写大纲展开了热烈讨论,经认真修订,最终完成了编写大纲的终稿,确定了编委,对章节内容进行详细分工并统一了编写要求。在各自完成初稿撰写的基础上,于2010年10月6~7日在中国农业大学召开了《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》审稿会,对撰写的初稿进行审查,并对写作格式、内容、参考文献等进行规范和统一。2011年5月7~16日再次召开书稿审定会,会上对各部分内容进行了审定、查重和删减,采用分章负责制进行统稿和修订,具体分工为:第一章由侯云鹏、李俊杰负责;第二章由傅祥伟、孟庆刚、吴国权、周光斌负责;第三章由吴国权、周光斌和李俊杰负责;第四章由杜明、贾宝瑜负责。2011年7月8~25日召开了最终书稿审定会,会上通读书稿,逐句修改,朱士恩主编及主要编委重点对修订后的章节进行讨论,经充分润色、完善,达成一致意见后定稿,并决定交由科学出版社出版。

本书共分5章,各章编写内容与具体分工如下:绪论(朱士恩);第一章配子与胚胎冷冻保存原理及方法概论(侯云鹏、李俊杰、朱士恩);第二章动物早期胚胎冷冻保存(傅祥伟、孟庆刚、吴国权、余文莉、朱士恩等);第三章动物卵母细胞冷冻保存(吴国权、周光斌、李俊杰、王亮、史文清、田树军等);第四章动物精液冷冻保存(杜明、贾宝瑜、范志强等);第五章动物卵巢组织与干细胞冷冻保存(周光斌、权国波、索伦);国内外相关专利(吴通义);英汉词语对照(吴国权)。

本书的编写在注重系统性的同时,突出了一个“新”字,共查阅了国内外参考文献上千篇(部),综述了国内外的最新研究方法、成果和进展;同时为达到图文并茂的效果,全书收录插图45幅。

为使读者查阅方便,将动物配子与胚胎冷冻保存主要专业名词的英汉词语对照和国

内外相关专利附于正文后。

本书得以与读者及时见面，是与广大编委的努力分不开的，是集体智慧的结晶。在此，首先对在书稿的编写与校对工作中付出辛勤劳动的编者们表示衷心的感谢！对中国科学院吴常信院士为本书作序表示衷心感谢！对本书出版给予大力支持的科学出版社表示衷心的感谢！

尽管我们在编写工作中团结协作、兢兢业业，尽了最大努力，但由于作者掌握的知识面和水平有限，而本研究领域发展又极为迅速，书中仍难免会存在不妥甚至错误之处，恳请广大读者批评指正，以便再版时予以补充和修订。

编著者

2011年8月

目 录

序

前言

绪论	1
第一章 配子与胚胎冷冻保存原理及方法概论	3
第一节 配子与胚胎冷冻保存的意义与发展概况	3
一、精液冷冻保存的意义与发展概况	3
二、卵母细胞冷冻保存的意义与发展概况	4
三、胚胎冷冻保存的意义与发展概况	6
第二节 配子与胚胎冷冻保存原理	8
一、精液冷冻保存原理	8
二、卵母细胞与胚胎冷冻保存原理	10
第三节 配子与胚胎冷冻保存方法	17
一、冷源及容器	17
二、抗冻保护剂	19
三、精液冷冻保存方法	21
四、卵母细胞与胚胎冷冻保存方法	23
参考文献	35
第二章 动物早期胚胎冷冻保存	43
第一节 家畜	43
一、胚胎生物学特性	43
二、冷冻对胚胎细胞及亚细胞结构的影响	44
三、家畜胚胎冷冻保存研究进展	45
四、实验操作程序	49
第二节 啮齿类动物	53
一、胚胎生物学特性	53
二、啮齿类胚胎冷冻保存研究进展	54
三、实验操作程序	56
第三节 灵长类动物	61
一、灵长类动物胚胎冷冻保存研究进展	61
二、灵长类动物胚胎冷冻保存的安全性	64
三、问题与展望	64
四、实验操作程序	65
参考文献	69

第三章 动物卵母细胞冷冻保存	78
第一节 家畜	78
一、卵母细胞生物学特性	78
二、猪卵母细胞冷冻保存研究进展	80
三、牛卵母细胞冷冻保存研究进展	84
四、羊卵母细胞冷冻保存研究进展	88
五、问题与展望	91
六、实验操作程序	92
第二节 啮齿类动物	102
一、小鼠卵母细胞生物学特性	102
二、小鼠卵母细胞冷冻损伤	103
三、小鼠卵母细胞冷冻保存技术改进	109
四、问题与展望	111
五、实验操作程序	112
第三节 灵长类动物	116
一、卵母细胞生物学特性	116
二、灵长类动物卵母细胞冷冻保存研究进展	117
三、实验操作程序	123
参考文献	126
第四章 动物精液冷冻保存	140
第一节 家畜	140
一、精子的生物学特性	140
二、牛精液冷冻保存研究进展	141
三、羊精液冷冻保存研究进展	143
四、猪精液冷冻保存研究进展	145
五、实验操作程序	148
第二节 灵长类动物	154
一、人和猴精子的生物学特性	154
二、人精液冷冻保存研究进展	155
三、猴精液冷冻保存研究进展	159
四、实验操作程序	162
第三节 小鼠	167
一、小鼠精子的生物学特性	167
二、小鼠精液冷冻保存研究进展	169
三、实验操作程序	172
第四节 鱼类	173
一、鱼类精子的生物学特性	173
二、鱼类精液冷冻保存研究进展	174

三、实验操作程序	177
参考文献	180
第五章 动物卵巢组织与干细胞冷冻保存	191
第一节 哺乳动物卵巢组织	191
一、卵巢组织冷冻保存研究进展	191
二、实验操作程序	192
第二节 脐带血造血干细胞	199
一、脐带血造血干细胞生物学特性	199
二、脐带血造血干细胞冷冻保存研究进展	200
三、实验操作程序	201
第三节 胚胎干细胞	202
一、胚胎干细胞生物学特性	203
二、胚胎干细胞检测	203
三、胚胎干细胞冷冻保存研究进展	205
四、实验操作程序	208
参考文献	210
附录 1 低温保存专利	216
一、冷冻保存方法	216
二、冷冻保存溶液	220
三、冷冻保存装置	222
附录 II 英汉词语对照	224
图版	

绪 论

动物配子与胚胎冷冻保存是生命科学的重要组成部分，是研究其长期保存不可或缺的生物技术，具体来说，就是将配子或胚胎保存于超低温状态下，使细胞的新陈代谢和分裂速度暂时停止，一旦恢复到正常的发育温度时，又能再继续发育的技术。

近年来，因受疫病和人类活动以及环境破坏的影响，全球物种灭绝的速度已远远超过了新物种的进化速度。有资料表明，全球 6165 个畜禽品种中，有 12% 已经灭绝、8.16% 濒临灭绝和 17.71% 已成为濒危动物，因此，各国政府对动物遗传种质资源的保护均给予了高度重视。但活体保种因维持成本高、突发自然灾害（疫病、火灾、洪水、干旱等）等原因，很难实现对全部濒危物种的有效保存。近年来，随着生物技术的快速发展，配子与胚胎冷冻保存正逐步成为替代活体保种的最有效方式。在畜牧业生产上，配子与胚胎的冷冻保存技术也发挥着越来越重要的作用。许多国家利用冷冻保存的方法建立了遗传种质资源库，即“精子库”、“卵子库”、“胚胎库”和“体细胞库”等。据美国农业部统计，冷冻精液人工输精技术的实施对美国奶牛群体遗传改良的贡献率高达 97%；美国胚胎移植学会统计数据表明，2008 年美国有 97% 以上的牛胚胎移植均采用冷冻胚胎。在人类医学领域，冷冻精液、卵子和胚胎技术逐渐被推广应用，配子与胚胎的冷冻保存可以用来保存青年夫妇的生殖潜力，从而避免了因老化或疾病而导致的生育能力下降或丧失。以人卵母细胞为例，自 1986 年以来，全球范围内利用冷冻卵母细胞出生的婴儿数逐年增加，截止到 2008 年已有 900 多例婴儿诞生。

总之，配子与胚胎冷冻保存技术不仅在畜牧生产、临床医学及胚胎生物技术等领域发挥了重要作用，而且也展现了其广阔的应用前景。但是，我们必须充分地认识到，除冷冻精液、冷冻胚胎技术在牛生产中得到广泛应用和推广外，大部分动物配子与胚胎的冷冻保存仍存在这样或那样的问题，与实际应用还有一定的距离，需要进一步深入研究。

动物配子与胚胎冷冻保存的主要研究内容即配子与胚胎冷冻保存原理与方法。其中，冷冻保存原理主要包括慢速冷冻和玻璃化冷冻保存原理；冷冻方法主要包括筛选高效、低毒的抗冻保护剂和开发新型的冷冻载体。为此，本书分以下内容进行阐述。

第一章：配子与胚胎冷冻保存原理及方法概论。全面系统地阐述了动物配子与胚胎冷冻保存的意义、原理、发展概况及抗冻保护剂的种类，尤其对配子与胚胎冷冻保存的原理和冷冻方法进行了详细介绍。

第二章：动物早期胚胎冷冻保存。分别对家畜（猪、牛、羊）、啮齿类动物（小鼠和大鼠）、灵长类动物（猕猴和人）的胚胎生物学特性、研究进展及实验操作程序与应用进行了较为系统的阐述，尤其对家畜（猪、牛、羊）胚胎冷冻保存的操作程序与应用进行了详细的描述。

第三章：动物卵母细胞冷冻保存。系统阐述了家畜（猪、牛、羊）、啮齿类动物

(小鼠和大鼠)和灵长类动物(猕猴和人)的卵母细胞生物学特性、研究进展及实验操作程序与应用;重点对家畜(猪、牛、羊)卵母细胞的冷冻保存方法进行了描述,尤其是玻璃化冷冻保存方法作为卵母细胞冷冻保存最具发展前景的方法之一,对其操作方法与应用进行了详尽的描述。

第四章:动物精液冷冻保存。分别对家畜(猪、牛、羊)、啮齿类动物(小鼠和大鼠)、灵长类动物(猕猴和人)和低等模式生物(如斑马鱼等)的精子生物学特性、研究进展及实验操作程序与应用进行了较为系统的阐述,重点对家畜(牛、羊)精液冷冻保存的操作程序与应用进行了详细的描述。

第五章:动物卵巢组织与干细胞冷冻保存。分别对动物卵巢组织、脐带血造血干细胞、胚胎干细胞冷冻保存的研究进展及实验操作程序进行了阐述。

(朱士恩)

第一章 配子与胚胎冷冻保存原理及方法概论

配子和胚胎的冷冻保存，是指将配子（精子和卵子）和胚胎保存于超低温状态下，使细胞新陈代谢和分裂速度减慢或停止，一旦恢复正常生理温度又能继续发育。该技术对于畜牧生产、动物遗传资源保存和配子与胚胎生物技术应用均具有重要意义。

第一节 配子与胚胎冷冻保存的意义与发展概况

一、精液冷冻保存的意义与发展概况

（一）意义

1. 充分提高优良种公畜的利用率

近年来，随着人工授精技术的推广与普及，精液的长效保存显得尤为必要。一方面，它可以最大限度地提高优良种公畜的利用效率，保证群体母畜的定期配种需要；另一方面，人工授精技术与精液冷冻保存技术相结合，对于加快畜群品种改良步伐、推进育种工作进程具有重要意义。

2. 便于开展国际间种质交流

精液冷冻保存技术使优良种公畜的种质资源在国际上的广泛交流成为可能，避免了活畜引种带来的高额费用和疫病传播。

3. 使发情母畜配种不受时间与地域的限制

由于我国畜牧业规模化程度较低，多为农户散养，很难实现集约化养殖的同期发情和集中配种，而精液冷冻保存技术使优良种公畜在规模化程度低的养殖场的利用成为可能。

4. 建立动物精液基因库

建立动物精液基因库即建立“精子库（sperm bank）”。近年来随着全球生态环境的变化及人类活动的影响，大量珍稀及地方优良畜禽品种处于灭绝或濒临灭绝状态，动物保种刻不容缓，然而目前常用的活体保种因成本高、效率低和疫病高发等原因，很难实现对所有品种的有效保存，而“精子库”的建立为上述品种的长效保存提供了可能。在人类医学领域，“精子库”的建立对于那些因患病必须应用某些药物、放射或手术治疗而产生绝育影响者，或因某种职业（如接触放射物质）而影响生育者，可预先贮藏精液备用。

5. 防止疾病的传播

家畜通过交配传播的疫病很多,在自然交配情况下,家畜因交配被传染上疾病的机会很大,但冷冻精液的应用使公母畜互不接触,大大减少了公母畜交互传播疾病的概率。在人类医学领域,20世纪80年代,人们认识到艾滋病(AIDS)可以通过精液传播的危险性,由于AIDS的检疫期限为6个月,因此,为了保证人工授精的安全性,大多数国家禁用新鲜精液,强制性使用冻存6个月后的精子(滕若冰,2010)。

(二) 发展概况

精液低温保存的历史始于18世纪末至19世纪初,研究人员偶然发现将人精液埋藏于冰雪中,在0℃以下的严寒环境下保存,用适当方法复温后,某些精子竟然仍然存活,但这一发现当时并未引起人们的重视。1886年Mouteyazza在-15℃的条件下冻存精液取得成功,并首次提出“精子库”的概念(滕若冰,2010)。但由于当时条件所限,低温冷冻的精子大多死亡,其冻存精子复苏后未能取得理想的效果,难以达到实际应用程度。1949年精液冷冻技术出现重大突破,Polge等用含甘油的稀释液在乙醇干冰中冷冻鸡精液,发现可使精子保持原活率,树立了低温生物学发展的里程碑。1951年Stewart报道用甘油冷冻牛精液且输精后出生了一头犊牛。1954年,Bunge和Sherman首次报道用甘油作保护剂,用干冰(-79℃)为制冷源,将冷冻精液用于临床人工授精,获得世界上第一例冷冻精液人工授精的婴儿(Bunge and Sherman, 1954)。随后以甘油作为抗冻保护剂,成功冷冻保存了大鼠和猪的精液(Colas, 1975; Wilmut and Polge, 1977)。但是,该项技术在实践中大量应用只是在20世纪60年代中期以后,而且仅限于牛。20世纪70年代以来,美国、加拿大、澳大利亚等一些畜牧业发达国家的牛冷冻精液利用率已达100%。目前我国奶牛冷冻精液的使用率也已达100%,冷冻精液人工授精总受胎率可达85%~95%。尽管其他畜禽及野生动物冷冻精液的研究进展也很快,但受胎率偏低,目前仍处于试验或中试阶段。

(侯云鹏 李俊杰 朱士恩)

二、卵母细胞冷冻保存的意义与发展概况

(一) 意义

1. 便于珍稀濒危动物和优良地方品种畜禽种质资源的长期保存

利用超低温冷冻保存方法,将珍稀濒危动物和优良地方品种畜禽的卵母细胞保存起来,建立“卵子库”,可以实现动物种质资源的长期保存,同时也为遗传资源在国际和国内长距离的运输提供了可能。

2. 为胚胎生物技术的研究提供充足的卵源

20 世纪 80 年代以来,随着各项胚胎生物技术,如卵母细胞的体外成熟、体外受精、核移植、转基因动物生产、干细胞培养和嵌合体技术的迅速发展,卵母细胞的全年、均衡供应显得尤为重要。但由于受季节、疫病等因素的影响,上述愿望很难实现。随着卵母细胞冷冻保存技术的提高和完善,将为胚胎生物技术的开展解除卵母细胞供应带来的时间和空间上的限制。

3. 为某些因病理或其他原因而推迟生育的妇女提供生育机会

在人类医学领域,卵母细胞的冷冻保存可为某些因手术、放射线治疗、化学治疗失去卵巢功能的患者,或者因工作生活的原因而推迟怀孕的妇女保留生育能力;在人类辅助生殖领域,少数情况下取卵手术当日取精失败的患者为避免放弃治疗周期,以及卵母细胞捐赠均需要应用卵母细胞冷冻保存技术。

(二) 发展概况

Tsunoda 等 (1976) 对卵母细胞的冷冻保存进行研究。1977 年,Whittingham 首次成功地冷冻保存了小鼠的成熟卵母细胞,受精后获得了后代。迄今为止,卵母细胞的冷冻保存以小鼠、牛作为主要对象,其冷冻方法趋于成熟,冷冻后的卵母细胞形态正常率、受精率、胚胎发育率及移植后的产仔率等方面均取得了一定进展。20 世纪 80 年代以来,人们已对多种动物的成熟卵母细胞进行冷冻保存,并将解冻后经体外受精获得的胚胎进行移植,家兔 (Al-Hasani et al., 1989) 和肉牛 (Fuku et al., 1992) 均获得了后代。Nakagata (1989) 用玻璃化冷冻保存的小鼠卵母细胞,经体外受精后能继续发育,胚胎移植后产仔率高达 45.8%; Vajta 等 (1998) 采用 OPS (open pulled straw) 法玻璃化冷冻保存牛成熟卵母细胞,目的是提高降温速度,由细管法的 2000℃/min 提高到约 20 000℃/min,解冻后的卵母细胞经体外受精,获得了 13% 的囊胚发育率,且胚胎移植后获得了犊牛。但与成熟卵母细胞相比,未成熟卵母细胞的冷冻相对困难。Candy 等 (1994) 对小鼠 GV 期卵母细胞进行了慢速冷冻,解冻后进行体外成熟 (IVM) 和体外受精 (IVF),对获得的 25 枚 2-细胞胚胎进行移植,仅产活仔鼠 13 只。Aono 等 (2005) 通过对小鼠 GV 期卵母细胞进行玻璃化冷冻,解冻后存活率、成熟率及 IVF 囊胚发育率分别达 98.6%、92.6% 和 42.9%,移植后仅获得 10.0% 的产仔率。

可见,未成熟卵母细胞对冷冻更敏感。但随着研究的深入、抗冻保护剂的筛选及冷冻载体的改进,未成熟卵母细胞的冷冻保存也取得了显著的进展。Suzuki 等 (1996) 对牛冷冻-解冻后的 GV 期卵母细胞进行 IVM 和 IVF,将获得的 6 枚囊胚移植给 3 头受体母牛,全部妊娠,其中 2 头受体产下足月犊牛。Vajta 等 (1998) 改用 OPS 法玻璃化冷冻体外培养 6h 的牛卵母细胞,结果受精后囊胚发育率高达 25%。国内朱士恩等 (2002) 采用乙二醇和 DMSO 为主体抗冻保护剂,OPS 法冷冻保存牛体外培养 6h 的卵母细胞,解冻后经化学激活,囊胚发育率达 22%;而成熟培养 22h 的卵母细胞冷冻-解

冻后,经体外受精,囊胚发育率达17%,胚胎移植后获得7头犊牛。可见,玻璃化冷冻是目前卵母细胞冷冻保存较为理想的方法。在未成熟卵细胞的低温生物学特性方面,Suo等(2009)采用OPS法对小鼠GV期和GVBD期卵母细胞进行了玻璃化冷冻保存研究,发现小鼠GVBD期卵母细胞冷冻后较GV期卵母细胞具有较高的卵丘细胞膜完整性及发育能力,是比较理想的小鼠未成熟卵母细胞保存阶段。这可能是因为GVBD期卵母细胞在体内正常完成了减数分裂的恢复、核质结构的变化,并激活细胞中与减数分裂和成熟相关蛋白的合成,大大降低了体外培养过程对卵母细胞减数分裂及成熟的影响。但也有研究表明,牛GVBD期卵母细胞对冷冻的敏感性较高(Men et al., 2002),这可能是由于种属差异造成的,与牛卵母细胞发育相关的转录和翻译大多发生在GVBD期卵母细胞(Men et al., 2003; Rzucidlo et al., 2001)。

(侯云鹏 李俊杰 朱士恩)

三、胚胎冷冻保存的意义与发展概况

(一) 意义

1. 适应于胚胎移植产业化

超数排卵技术能够获得较多的胚胎,同时也需要更多的同期发情的母畜进行胚胎移植,费时、费力且成本高。若将胚胎冷冻保存起来,等待发情后适宜的受体进行移植,不仅可使胚胎移植不受时间和空间的限制,而且能严格筛选受体,保证受体的质量,提高受胎率,大大降低了成本,促进了胚胎移植技术在生产中的应用与推广,是胚胎移植产业化重要技术保障。

2. 便于胚胎运输

胚胎冷冻保存可解决引种和运输种畜的困难,同时可减少或防止传染病的传播;还可广泛地进行国内外优良品种的交流,加速家畜优良品种的扩繁和改良的进程。

3. 建立胚胎基因库

胚胎的冷冻保存是动物保种、建立基因库不可缺少的必要手段之一。利用基因库(胚胎库)可以长期保存珍稀或濒危动物和优良品种家畜的遗传资源,还可以避免因自然灾害、战争和传染性等疾病等突发事件造成不可抗拒的打击而使动物品种灭绝。基因库的建立对诸如组织胚胎学、发育生物学、遗传育种学、动物繁殖学、生殖生物学和胚胎生物技术的基础理论研究具有重要的价值。

4. 防止疾病传播

目前世界上许多国家和地区疫情发生比较严重,在进行繁殖和直接进口活畜过程中,通过接触等途径有可能传播传染病,从而加大引进活畜的风险。但研究表明,由于胚胎的透明带具有阻止细菌、病毒入侵的作用,加之冷冻胚胎前需要用酶进行洗涤,可