

胚胎培养液的小白鼠胚胎培养检测法

王文英 仲跻峰 张俊功 宋杰 高运东 王庆国 刘文浩 马世援 常万存

(山东省农业科学院生物技术研究中心 250100)

胚胎移植实践中,经常将犍牛血清加入到 PBS 液中配制成冲卵液和培养液。但不同来源的犍牛血清或因保存时间、条件不同其生物活性可能有所不同,因此在正式试验前,通常用小白鼠胚胎培养法进行生物学活性评估。对新采用的培养液,为观察其培养效果有时也需应用胚胎培养法进行比较。

1 目的

利用 4~8 细胞阶段的小白鼠胚胎,观察在不同培养条件下小白鼠胚胎的培养效果,从而对该培养液进行评估。

2 小白鼠的超数排卵

2.1 试验动物

用“昆白”系成年小白鼠,雌鼠体重 22g 以上,2.5 月龄以上;雄鼠具有正常的繁殖配种能力。在室温下笼养,喂全价饲料。

2.2 超排药物

用孕马血清促性腺激素(PMSG)和绒毛膜促性腺激素(HCG)作为超排药物。各用生理盐水稀释成 20 单位/ml。稀释后立即使用,也可在冰箱中(5℃)保存,于当天使用。

2.3 超排处理程序

第 1 天上午 8:00 每只雌鼠腹腔注射 PMSG 0.5ml(10 个单位)。

第 3 天下午 5:00 每只雌鼠腹腔注射 HCG 0.5ml(10 个单位),然后,雌、雄鼠按 1:1 合笼过夜。

第 4 天上午 8:00 查阴道栓,有栓者假定为第 4 天“零”时配种(误差为±6 h)。

第 6 天上午、下午取 4~16 细胞胚胎。

2.4 取卵方法

欲取 4~16 细胞胚胎,取卵时间应为第 6 天上午、下午。用颈椎脱臼方法处死雌鼠。剖开腹腔,取出输卵管和子宫角,置于盛有冲卵液的表面皿中,仔细去掉卵巢和脂肪组织。

将输卵管和子宫角分开,转移到另一盛有冲卵液的表面皿中。从子宫角中可用冲卵法冲出胚胎;对于输卵管中的胚胎可用捣碎法获取。在实体镜下捡卵,并用相应的培养液冲洗胚胎。

3 小白鼠胚胎培养

3.1 培养液的配制

在自己配制培养液时,先按改进的杜氏磷酸缓冲液配方配制 PBS 1000ml(A:NaCl 8 000.0mg、KCl 200.0mg、CaCl₂·2H₂O 132.0mg、MgCl₂·6H₂O 213.0mg;B:Na₂HPO₄·12H₂O 2 898.0mg、KH₂PO₄ 200.0mg、丙酮酸钠 36.0mg、葡萄糖 1 000.0mg)。

配制好的 PBS 液,要用孔径为 0.45μm 的微孔滤膜过滤漏斗过滤除菌。

将欲检测的犍牛血清在 56℃ 下进行补体灭活处理 30 min。冲卵时向 PBS 液中加入 1% 犍牛血清(V/V),配制培养液时向 PBS 液中加入犍牛血清 20%(V/V)。如果检测其他未知培养液时,可直接应用欲测培养液。

3.2 培养方法

将石蜡油(Cp 级)用三蒸水清洗 3 次,然后离心分离。将洗好的石蜡油置于烤箱中,在 120℃ 下高温干烤消毒 2 h。胚胎培养通常在石蜡油覆盖下的微滴中进行。通常 50μl 微滴可培养 10~15 枚胚胎。培养温度为 37℃,相对湿度为 100%。

4 观察与分析

每隔 12 h 观察 1 次,连续 96 h,观察时作好记录。记录 4~6 细胞胚胎数。

桑椹胚阶段按 Taxyit 法估计细胞数,即桑椹胚为 32 细胞,早囊胚为 64 细胞,囊胚和孵化胚为 128 个细胞。此法估计的胚胎细胞数与实际有误差,只是近似的计算。

观察指标为平均分裂指数,胚胎膨胀率,胚胎孵化率。

$$\text{平均分裂指数} = \frac{\text{细胞分裂倍数之总和}}{\text{胚胎个数}} \times 100\%$$

$$\text{膨胀率} = \frac{\text{发育至囊胚阶段胚胎数}}{\text{胚胎个数}} \times 100\%$$

$$\text{孵化率} = \frac{\text{发育至孵化胚个数}}{\text{胚胎个数}} \times 100\%$$

检测未知培养液时,可用已知培养液作对照,即可评估被检培养液的培养效果。

(收稿日期:1999-08-16)