

小鼠早期胚胎体外培养技术中 几种化学因素的影响*

韩贻仁 杨晓梅

(山东大学生命科学院)

摘要 与胚胎体外培养有关的一些化学物质,如液体石蜡、CO₂、乙醇和水质等,对小鼠早期胚胎发育有明显的影响.有的液体石蜡对胚胎有毒害作用,这种毒害作用与其比重和所含的硝基苯杂质无关.有的国产液体石蜡适合于做早期胚胎培养之用.培养液中混入乙醇对胚胎发育危害很大,浓度达到0.8%时,胚胎完全不发育,而浓度低于0.05%时,则无明显影响.酒精厂生产的CO₂粗制品,乙醇含量约为~0.18%,完全适合于做胚胎培养的CO₂气源.用三蒸水配制的培养液进行胚胎体外培养,可获得良好效果.

关键词 小鼠早期胚胎;胚胎培养;液体石蜡;乙醇

中图分类号 Q 132

早期胚胎体外培养技术在发育生物学、胚胎移植、转基因动物等领域的研究工作中都有很重要的作用.^[1~4]Whitten(1956)首先研制成功了小鼠早期胚胎体外培养的简单培养液,可使8细胞胚胎发育到囊胚.^[5]Whitten(1957)又将其培养液中增加乳酸钙,则可使2细胞晚期胚胎发育至囊胚.^[6]Brinster(1963)创用了液体石蜡(液蜡)覆盖液滴培养法,^[7]并于1965年改良培养液成分,增加了乳酸和丙酮酸,亦能使2细胞晚期胚胎发育至囊胚.^[8]小鼠早期胚胎体外发育中有'2细胞阻滞'现象,^[8]为了克服这种阻滞,Chatot等(1989)创用了'CZB'培养液,增加了EDTA成分,并提高了乳酸与丙酮酸的比例,1细胞胚胎在此培养液中发育至囊胚的比率达4.8%.^[9]

哺乳动物胚胎是在母体内发育到期,环境稳定,营养充分.体外胚胎培养则应最大限度地满足胚胎正常发育所必需的基本条件.^[10]目前早期胚胎体外培养技术主要有2种方法,①液蜡覆盖液滴法和②试管培养法.^[11]胚胎培养要使用许多化学物质,如培养液化学成分、溶剂水、CO₂、液蜡等.这些物质对早期胚胎体外发育有着直接影响.本文对其中的几种化学物质对胚胎发育的影响进行了分析.

1 材料和方法

1.1 动物和早期胚胎的收集

动物为昆明小鼠. 早期胚胎收集方法见前文.^[12] 起始培养的材料为雌鼠自然受孕后 39h 和 48h 的 2 细胞和 8 细胞胚胎.

1.2 培养液制备

采用 Whitten 培养液^[11] 配方, 用玻璃三次蒸馏水配制. 配好的培养液按 3g/l 的量加入小牛血清白蛋白组分 V (Fluka 产), 经微孔滤膜除菌, 分装后置 4℃ 下备用. 使用的试剂除 NaCl、乳酸钠和丙酮酸钠为 Sigma 产品外, 其他均为国产分析纯级试剂.

1.3 液体石蜡的处理

将液蜡置于分液漏斗中, 按 1 裂体体积加入 3 次蒸馏水, 摇匀, 静置分层后再次摇匀, 反复 3 次, 放掉水层. 如此处理 3 遍, 每遍用时 1d. 洗后的液蜡静置 5~6d 后, 勿需灭菌即可使用.

将培养效果不良的液蜡(齐鲁化工厂、天津化工厂和 Sigma 产), 用无水或 95% 乙醇洗 3 遍, 再用 3 次蒸馏水按上述方法洗 3 遍, 备用.

将用过 1 次的(上海大场化工厂产)液蜡水洗 3 遍, 用于检测回收液蜡的培养效果.

1.4 1/8 裂球的分散

将 8 细胞胚胎用 Tyrode 酸性液脱带.^[13] 脱带胚胎用 Whitten 液换洗 3 次后在无 Ca^{2+} M2 培养液^[14] 中培养 0.5h. 然后用内径约 80 μm 的微吸管吹吸胚胎几次, 直至分散成 1/8 裂球, 再用 Whitten 液换洗 2 次.

1.5 胚胎和 1/8 裂球培养方法

1.5.1 试管法

向 12mm × 75mm 试管中加入 0.6ml Whitten 培养液, 再向管内充入混合气(5% CO_2 、5% O_2 和 90% N_2) (北京综合仪器厂产) 10s, 迅即塞紧管口, 置 37℃ 下待用. 每管放入 7~10 个 8 细胞胚胎, 然后再次向管中充入混合气 10s, 塞紧管口, 37℃ 下培养.

将无水乙醇加入到 Whitten 培养液中, 配制成不同浓度的乙醇培养液, 检测胚胎在不同浓度的乙醇培养液中的发育状况.

1.5.2 液蜡覆盖液滴法

在 35mm 的硅化玻璃培养皿中制成 4 个 Whitten 培养液滴, 每滴约 50 μl , 随即向皿中注入液蜡, 完全覆盖液滴. 将制好液滴的培养皿放入 5% CO_2 的饱和湿度 CO_2 培养箱中, 37℃ 下待用. CO_2 为山东酒精总厂产品. 每滴移入 6~12 个 2 细胞胚胎后, 继续在 5% CO_2 培养箱中 37℃ 下培养.

1/8 裂球的培养方法与整体胚胎相同, 每一液滴中植入 3~5 个裂球.

由气瓶放出的 CO_2 带有酒精气味. 经气相色谱仪(GC-910 型, 上海科创色谱仪器公司产) 对 3 批 CO_2 产品测试表明, CO_2 气体中混有 ~0.18% 的乙醇. 为了降低进入培养箱的 CO_2 中的乙醇含量, 在输入之前经一次水滤. 由培养箱中取气样, 未测出含有乙醇.

2 结果

2.1 不同厂家液蜡的培养效果

对5种不同厂家生产的液蜡的胚胎培养效果列于表1. 上海宝山县大场化工厂和北京求贤化工厂的产品适合于胚胎培养使用, 其中以大场的产品效果最佳(图1A).

其他各厂的产品对胚胎均具有毒害作用, 在这些液蜡的覆盖下, 2细胞胚胎至多能分裂1次, 直至萎缩死亡(图1B).

Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ3种液蜡经无水乙醇或95%乙醇洗涤3遍, 再用3蒸馏水洗3遍, 经此处理后只有Ⅲ号产品的培养效果略有改善, 在117个8细胞胚胎中有14个(11.1%)发育到囊胚. 其他2种产品的培养效果无改善.

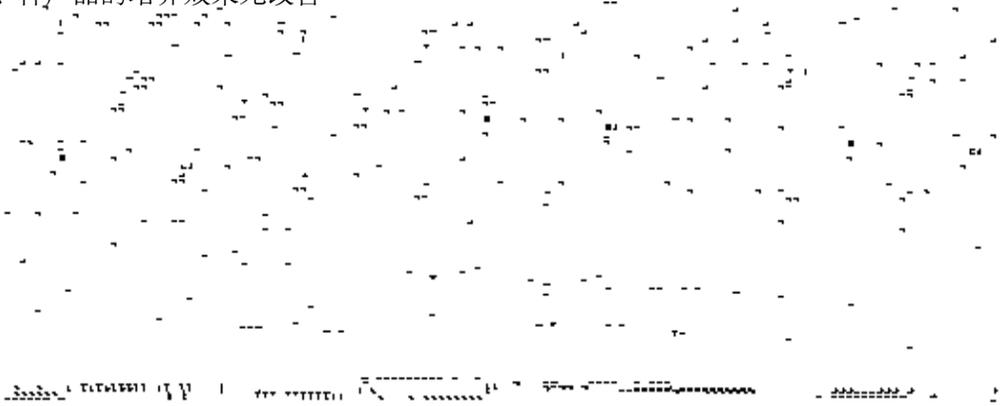


图1 体外培养的2细胞胚胎在大场(1A)和齐鲁(1B)2种液蜡分别覆盖下的不同发育命运
1A 中的胚胎已越过扩张囊胚阶段, 大部已脱带, 1B 中裂球分裂1次后死亡

Fig. 1 The differences of development of 2-cell embryos under two different kinds of liquid paraffin produced by Dachang Chemical Factory and Qilu Chemical Factory.
The former case, 94.7% of 2-cell embryos developed to blastocysts(1A). In the later case, the blastomeres of embryos can only divide once at most until death(1B).

表1 不同厂家的液体石蜡对早期胚胎体外培养的影响

Table 1 The effect of liquid paraffin from different sources on the development of early mouse embryos

sources	No. of embryos at different stage				
	2-cell	4-cell	8-cell	morula	blastula(%)
I	208	5	2	1	197(94.7)
II	197	7	2	2	182(92.3)
III	126	63	0	1	0
IV	96	47	1	0	0
V	130	11	0	0	0

Notes: name of factories specific gravity of
liquid paraffin

I :Dachang(Shanghai)	0.845	IV :Qilu	up to standard
II :Quxian(Beijing)	0.820~0.825	V :Sigma(M -3516)	0.84
III :Tianjin	0.835~0.890		

I 和 II 两种液蜡使用过一次回收,经3次水洗,再次用于胚胎培养,此种回收液蜡的培养效果明显下降。(表2)

表2 回收液蜡对体外培养的8细胞胚胎发育的影响

Table 2 The effect of recovery liquid paraffin on the development of early embryos invitro

Source of * liquid paraffin	No. of embryos at different stage		
	8-cell	morula	blastula(%)
I	104	10	34(32.7)
II	121	12	55(45.5)

* Notes are same as table 1

1/8裂球用 I 号液蜡进行液滴培养,在246个裂球中有184个(~84%) 发育为小胚泡或滋养层泡(图2) .效果理想.



图2 小胚泡(2A) 或滋养层泡(2B)

Fig. 2 Miniblastocysts(2A) or trophoblast vesicles(2B)

2.2 乙醇对胚胎发育的影响

当培养液中乙醇含量达到0.1%时,对胚胎发育有明显影响,使8细胞胚胎发育到囊胚的比率下降到73.9%.当含量达到0.8%以上时,胚胎均不能发育和存活.然而当乙醇含量低于0.05%时,则对8细胞胚胎的发育无明显影响(表3).

2.3 培养皿和水质

本实验用 Whitten 培养液是用玻璃器3次蒸馏水配制,培养皿为硅化玻璃皿.玻璃皿硅化的步骤是,将洁净玻璃皿真空喷涂二氯二甲基硅烷(Merck 产),170℃下干热2h,水洗3遍(每遍4h)待用.在此种培养皿中培养2细胞晚期胚胎,发育到囊胚阶段的比率为94.7%.在对比实验中,用 35mm 的塑料培养皿(Nunclon) 代替硅化玻璃皿培养2细胞晚期胚胎,经5次重复实验,在140个胚胎中有135个发育为扩张囊胚,比率为96.4%.这一比率高于 Whittingham(1971) 报道的结果(92.5%) .^[15]

表3 8细胞胚胎在不同浓度乙醇的培养液中的发育状况

Table 3 The development of 8-cell embryos in the media with different contents of alcohol

contents of alcohol(%)	No. of embryos at different stage		
	8-cell	morula	blastula(%)
0.01	112	4	106(94. 6)
0.05	104	5	97(93. 2)
0.1	115	25	85(73. 9)
0.2	112	10	74(73. 9)
0.3	134	19	80(59. 7)
0.4	157	61	36(22. 9)
0.6	177	35	25(14. 1)
0.8	48	0	0
1	32	0	0
control	255	13	239(93. 7)

3 讨论

在胚胎体外培养中,影响胚胎发育的因素很多,先前我们曾对国产二级试剂的培养效果进行过分析.^[16]本文表明,液蜡和乙醇对胚胎发育有重要影响.我们从5种液蜡产品中选出2种适合于进行体外胚胎培养,其中以上海大场产品最佳,无论对整体胚胎还是1/8裂球,均获得理想效果.说明有的国产液蜡的胚胎培养效果已达优质水平,这对国内开展工作很有参考价值.

所测试的5种液蜡具有不同的比重,结果表明液蜡的比重与其胚胎培养效果无相应关系.液蜡中含否硝基萘是其是否合格的化学质量标准.^[17]实验中用乙醇洗涤液蜡,除去硝基萘,但并未改善其培养效果.说明液蜡影响胚胎发育的因素与其比重和杂质硝基萘无关.

商品液蜡经水洗可改善其胚胎培养效果.未经水洗的上海大场厂产液蜡只能使2细胞胚胎发育到桑椹胚阶段.液蜡经水洗后需在室温下静置4~5d,使油水彻底分离.如果液蜡中混有雾状水滴,则可使胚胎不发育,这可能是由于影响了液蜡对CO₂的通透性.回收液蜡,培养效果不佳,原因待查.

培养液中含有0.1%乙醇即可使8细胞胚胎发育为囊胚的比率大为下降,含量达到0.8%,则胚胎不能存活.然而低于0.05%时,对胚胎发育无影响.

硅化玻璃培养皿的化合物为二氯二甲基硅烷,此物质有一定毒性,这可能是导致硅化玻璃培养皿的培养效果不如塑料皿好的原因.

致谢 山东省化学化工研究院杨天柱同志和山东大学实验中心邱琴同志为本研究使用的CO₂中的乙醇含量进行气相色谱分析,特致谢意.

参 考 文 献

- 1 Johnson M H·The Molecular and Cellular Basis of Preimplantation Mouse Development·Biol Rev, 1981;56:463~498
- 2 Gardner D K, Lane M·Amino Acids and Ammonium Regulate Mouse ova from Two-cell to Blastocyst·Biol Reprod, 1993;48(2):377~385
- 3 Miyoshi K, Abeydeera L R, Okuda K, *et al*·Effects of Osmolarity and Amino Acid in a Chemically Defined Medium on Development of Rat One-cell Embryos·J Reprod Fert, 1995;103(1):27~32
- 4 Kubisch H M, Hernandez-Ledezma J J, Larson M A, *et al*·Expression of Two Transgenes in *in vitro* Matured and Fertilized Bovine Zygotes after DNA Microinjection·J Reprod Fert, 1995;104(1):133~139
- 5 Whitten W K·Culture of Tubal Mouse ova·Nature, 1956;177:96
- 6 Whitten W K·Culture of Tubal Mouse ova·Nature, 1957;179:1081~1082
- 7 Brinster R L·Studies on the Development of Mouse Embryos *in vitro*·IV·Interaction of Energy Sources·J Reprod Fert, 1965;10(1):227~240
- 8 Brinster R L·A Method for *in vitro* Cultivation of Mouse ova from Two-cell to Blastocyst·Exp Cell Res, 1963;32(1):205~208
- 9 Chatot C L, Ziomek C A, Bavister B D, *et al*·An Improved Culture Medium Supports Development of Random-bred 1-cell Mouse Embryos *in vitro*·J Reprod Fert, 1989;86(2):679~688
- 10 Whitten W K·Nutrient Requirements for the Culture of Preimplantation Mouse Embryos *in vitro*·Adv Biosci, 1971;6:129~139
- 11 Cross P C, Brinster R L·The Sensitivity of One-cell Mouse Embryos to Pyruvate and Lactate·Exp Cell Res, 1973;77(1):57~62
- 12 韩贻仁, 蓝厚珍·昆明鼠早期胚胎发生的初步观察·山东大学学报(自然科学版), 1979;14(3):107~113
- 13 Hogan B, Costantini F, Lacy E·Manipulating the Mouse Embryo—a Laboratory Manual·Cold Spring Harbor Laboratory, 1986:276
- 14 Tarkowski A K·Methods in Mammalian Embryology (Daniel J C ed.), Freeman Press, 1971;172~185
- 15 Whittingham D G·Culture of Mouse ova·J Reprod Fert, Suppl, 1971;14:7~21
- 16 韩贻仁·国产试剂配制的培养液对小鼠早期胚胎培养效果的研究·山东大学学报(自然科学版), 1989;24(3):128~132
- 17 国外石油产品标准编译小组·国外石油产品标准汇编, 第四册, 1976:5~6

EFFECTS OF SOME FACTORS ON THE DEVELOPMENT OF THE EARLY MOUSE EMBRYOS IN VITRO

Han Yiren, Yang Xiaomei

(*School of Life Sci., Shandong Univ., Jinan*)

ABSTRACT

The effects of some chemicals involved in cultural procedures of early mouse embryos in vitro, such as liquid paraffin(LP), CO₂, alcohol and water were investigated. some of LP are toxic to early mouse embryos cultured in vitro. The harmful toxicity of LP on the embryos is not related to its specific gravity and the nitro-naphthalene mixed in it. Two products of LP produced by chinese factories were quite fine for the culture of embryos. The cultural medium mixed with alcohol by a higher concentration($\geq 0.8\%$) had significantly harmful effects on the development of embryos, all embryos in it would not survive. If the concentration of alcohol in medium decreased to 0.05% or below, it had no visible effects on the development of embryos. It showed that the cultural effects of plastic dishes were rather fine as compared with the siliconized glass dishes.

Key words early mouse embryo; embryonic culture; liquid paraffin; alcohol