

家兔早期胚胎的活力测定*

石 杲

张哲敏**

白韶丽***

王达珍

廖友桂

(内蒙古赤峰市卫生防疫站)

(内蒙古大学生物系)

摘要 本文报告了用 0.04% 中性红及 0.125% 台盼蓝液测定家兔早期胚胎的活力,染色后着为浅粉色者为可发育胚胎,其培养回收发育率为 68% 和 90%; 移植发育率为 100%。着为蓝、紫色者为不发育胚胎。

在家畜改良中,早期胚胎的移植有着重要意义。胚胎移植成功与否受多种因素影响,其中移植前胚胎存活与否是关键因素之一。在国外对体细胞和早期胚胎的活力测定已有研究^[1,2],但国内迄今尚未开展研究。为此,我们于 1982 年 5—6 月在内蒙古商都县外贸公司冷冻厂用家兔早期胚胎开展此项研究,现报告如下。

材料与 方法

1. 早期胚胎的收集 在处死家兔两小时内获得受精卵及 2—8 细胞期的早期胚胎。

2. 培养液 TCM-199 液(日本产)。

3. 染色液 甲液: 0.04% 中性红-台氏液;

乙液: 0.125% 台盼蓝-台氏液——TCM-199 (0.5% 台盼蓝-台氏液: TCM-199 液=1:4)。

4. 双染色法 将早期胚胎移入试管,加入 0.75 毫升的 TCM-199 液和 0.25 毫升的甲液; 将其置入 37℃ 温箱内培养 10 分钟,再加入 0.5 毫升的乙液,继续培养 2—3 分钟(此法以下简称双染法)。然后用吸管弃去染液,加入培养液在解剖镜下观察。

5. 体外培养 染色的胚胎放入 4 × 100 毫米试管中,并加入培养液及灭活的同源血清各 1 毫升,在培养液表面加约 2 毫米厚的液体石蜡(石蜡与 PBI 平衡 24 小时)^[3],将其置入含

* 本文承王乃义先生审阅,并提出宝贵修改意见,在此深表感谢!

** 内蒙古糖厂; *** 内蒙古水产研究所。

5% CO₂ 气体的封闭容器中,在 37℃ 的条件下培养 13—24 小时,可发育胚胎在此期间内卵裂球增加一倍以上,但未进入桑椹胚期。

6. 胚胎移植 将着色不同的 8-细胞期胚胎用外科手术法分别置入经同步处理的各个受体输卵管内。15 天后剖腹观察结果,着床(胚胎已分化出四肢、头躯等)与否为判别发育指标。

结果与讨论

实验过程共收集兔卵及早期胚胎(2—8 细胞期) 239 个,染色后为浅粉色(以下简称粉色)的 201 个;蓝紫色(以下简称蓝色)的 14 个;丢

表 1 家兔早期胚胎染色结果与发育关系的比较

组别	着色状况	培养数	发育数	未发育数	丢失数	回收发育率
1	浅粉色	34	17	8	9	68.00%
2	浅粉色	12	9	1	2	90.00%
3	蓝、紫色	6	0	6	0	0.00%

1 组与 2 组 $\chi^2 = 1.81 P > 0.05$; 1、2 组与 3 组 $\chi^2 = 14.18, P < 0.01$

失 24 个。其回收率为 89.96%。早期胚胎染色后共培养 52 个(见表 1)、移植 26 个(见表 2)。

从表 1 看出,着色相同胚胎的回收发育率经卡方检验差异不显著,而着色不同的胚胎,其回收发育率差异非常显著。而且,着为蓝色者无一发育,着为粉色者可以发育,其发育率分别

表 2 家兔早期胚胎着色状况与移植后发育关系的比较

组别	着色状况	移植数	发育数	发育率	χ^2 检验	P
1	浅粉色	6	6	100%	12.30	$P < 0.01$
2	蓝、紫色	20	0	0%		

是 90.00% 和 68.00%。表 2 的移植结果仍然如此。因此,可认为用双染法可以判别家兔早期胚胎的活力,即双染法后着为粉色的胚胎为可发育胚胎,着为蓝色者为不发育胚胎。

关于早期胚胎活力测定,目前仅 Kardymowicz 氏^[2]用 1% 的中性红液测定了绵羊早期胚胎的活力,该法染色需 2 小时才能判定结果,而采用双染法仅用 12 分钟即可判定结果。关于染色机理尚不十分清楚,着色不同可能是细胞膜的选择性及细胞内 pH 变化所引起的。细胞的着色不仅仅是单纯的扩散作用,而且还有主动运输的过程。关于双染法在其它动物胚胎中的应用有待于今后进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] DeRenzi and Schechtman 1973 Staining by Neutral Red and Trypan Blue Sequence for Assaying Vrtal and Nonvital Cultured Cells. *Stain Technology* 48: 135—136.
- [2] Kardymowicz O. 1972 A Method of Vital Staining for Determining the Viability of Fertilize Sheep Ova Stored in Vitro. *Proc. 7th Int. Congr. Anim Reprod. A. I., Munich. 1: 503—506.*
- [3] Whittingham D. G. 1971 Culture of Mouse Ova. *J. Reprod. Fert. Suppl. 14: 7—21.*