

M16 添加牛磺酸和 EDTA 支持昆明白小鼠体外受精并发育至囊胚

王敏康^{1,2}, 刘冀珑¹, 李光鹏¹, 廉莉¹, 江一平³, 张田², 陈大元¹

(1. 中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; 2. 云南师范大学生命科学系, 昆明 650092; 3. 福建医科大学基础部, 福州 350004)

摘要: 在以往研究工作的基础上证明了通过添加 2.5mmol/L 的牛磺酸和 0.1mmol/L 的 EDTA 至 M16 培养液中, 可支持昆明白小鼠的体外受精 (IVF) 并支持受精卵突破 2-细胞阻滞发育至囊胚期。本研究进一步证明了牛磺酸和 EDTA 在昆明小鼠早期胚胎发育和克服 2-细胞阻滞中起关键作用。

关键词: 昆明鼠; 体外受精; 2-细胞阻滞; 牛磺酸; EDTA

中图分类号: Q344. +5

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)05-0301-02

M16 Added with Taurine and EDTA Can Support the IVF and *in vitro* Development to Blastocyst of Kunming Strain Mouse

WANG Min-kang^{1,2}, LIU Ji-long¹, LI Guang-peng¹, LIAN Li¹, JIANG Yi-ping¹, ZHANG Tian², CHEN Da-yuan¹

(1. National Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080, China; 2. Department of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming, 650092, China; 3. School of basic medicine, Fujian Medical University, Fuzhou, 350004, China)

Abstract: The results of our early experiments show that the 2-cell block can be overcome by culturing zygote in modified M16, modified CZB and TE medium. Our research shows that the taurine and EDTA play key role in overcoming 2-cell block in Kunming mouse. The results show that the addition of taurine and EDTA to M16 medium can support the IVF and development to blastocyst *in vitro* in Kunming strain mice. This is the first report that M16 medium added with taurine and EDTA can be used in both IVF and culture medium to overcome the 2-cell block of embryo development in Kunming strain mouse.

Key words: Kunming strain mouse; IVF; 2-cell block; taurine; EDTA

昆明白小鼠是国内研究工作最为广泛使用的实验动物之一, 已被用于各方面的研究。但其早期胚胎发育中也存在典型的 2-细胞阻滞现象^[1], 给有关的胚胎学工作带来一定的困难。已有报道表明, 为克服 2-细胞阻滞须添加输卵管上皮^[2], 一般在 CZB 中仅能达到桑椹胚期, 经换液及与输卵管上皮共培养后才能达到囊胚期^[3]。我们也对此进行了研究, 结果表明, 在 M16^[4]及 CZB^[5]培养液基础上, 加减几种成分得到的改进培养液 M16(用 mM16 表示)和改进的 CZB 培养液(用 mCZB 表示)均能有效克服 2-细胞阻滞现象。通过比较分析我们认为牛磺酸对克服

昆明白小鼠胚胎 2-细胞阻滞起关键作用^[6]。本研究进一步观察牛磺酸和 EDTA 能否支持昆明白小鼠的体外受精和植入前胚胎发育的全过程。

1 材料和方法

1.1 培养液及添加成分

所用培养液为: A: 改变的 M2, 即在 M2^[4] (Sigma 公司出品) 中添加 2.5mmol/L 牛磺酸和 100 μ mol/L 的 EDTA, 用 M2+ET 表示。B: 改进的 M16, 即在 M16 (Sigma 公司出品) 中添加 2.5mmol/L 牛磺酸和 100 μ mol/L 的 EDTA, 用 M16+ET 表示^[6],

收稿日期: 1999-10-22; 修回日期: 2000-02-23

基金项目: 国家自然科学基金(39360028)资助项目

作者简介: 王敏康(1961-), 男, 汉族, 云南昆明人, 博士, 副教授, 专业: 生殖生物学。E-mail: Wangmk1998@Yahoo.com

用于体外受精和胚胎培养。C 在 M16 + ET 中再加入 BSA 使其最终浓度提高到 14mg/ml, 该培养液仅用于体外受精。D :100 倍牛磺酸和 EDTA 储备液, 浓度分别为 31.3mg/ml 和 3.72mg/ml, 使用前加入 M16 中。以上培养液用三蒸水配制, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.2 实验动物及处理方法

供试鼠为雌雄昆明白小鼠 (KM \times KM)。饲养条件为人工控温 22~26 $^{\circ}$ C, 14L:10D 光照, 自由饮水取食。取 6~10 周龄昆明白雌鼠经皮下注射 7.5~10 IU 的 PMSG, 间隔 48h 后腹腔注射同样剂量的 hCG, 注射 hCG 后 15~17h 断颈处死, 分离取出输卵管部分置于清洁的卫生纸上除去血液, 然后置于含 300IU/ml 透明质酸酶的 M2 + ET 中, 撕开膨大部, 使卵丘团流出, 处理约 5min, 用 100 μ l 的移液器吹打并经胚胎吸管^[7]移入 3 次各 0.5ml 的 M2 + ET 洗后加入 50 μ l 的培养滴中, 每滴培养液加入 5~10 个卵母细胞, 然后等待加入获能的精子进行体外受精。

精子的获能: 取雄性成年小鼠断颈处死后打开腹腔, 取出睾丸。分离附睾尾部并剪开, 置于预温的 200 μ l M16 + ET 中, 于 37.5 $^{\circ}$ C, 5% 的 CO₂ 培养箱中培养约 30min, 使精子游出, 然后挑出附睾组织块并继续获能培养约 1h, 观察精子活力。用移液器取 20~50 μ l 获能的精子悬液, 加入到含卵母细胞的培养滴中进行受精培养。受精时精子的浓度为 5~10 \times 10⁵/ml。6~8h 后检查受精情况。取出有 2 个原核和极体的受精卵, 经 M2 + ET 洗 3 次后尽量除去附着的精子, 然后移入 M16 + ET 培养液滴 (20 μ l) 中培养 120h。胚胎培养用直径 35mm 培养皿, 每 20 μ l 覆盖石蜡油的微滴中放入 4~10 枚胚胎。每 24h 取出观察纪录一次发育情况。实验进行 4 次。

2 结果与分析

在 M16 + ET 和含高浓度 BSA (14mg/ml) 的 M16 + ET 两组受精液中的受精率没有差异。受精卵各阶段的发育情况见表 1。我们以往曾用 M16 进行过昆明白小鼠的 IVF 获得成功, 并且受精率可达 80% 左右, 所用卵母细胞未去卵丘细胞。但采用不经改进的 M16 不能克服昆明白小鼠胚胎发育的 2-细胞阻滞现象。在 45 个受精卵中, 有 42 (95%) 可发育至 2-细胞阶段, 但无一例可到达 4-细胞阶段 (未发表资料)。

牛磺酸及亚牛磺酸对体外培养的仓鼠、小鼠和

表 1 M16 + ET 对昆明种小鼠 1-细胞体外培养的影响

培养的受精卵数	发育至不同阶段的受精卵数 (%)				
	2-细胞	4-细胞	8-细胞	桑椹胚	囊胚
	2-cell	4-cell	8-cell	morula	blasto
34	34 (100)	27 (79)	24 (71)	16 (47)	16 (47)

兔等胚胎发育均有促进作用, 说明牛磺酸作用的普遍性, 而且小鼠的输卵管液中就存在牛磺酸^[8]。Spindle 认为^[9], 牛磺酸可能具有三方面的作用, 其一为通过减弱有毒物质或通过渗透调节保护细胞膜; 其二是抗诱变的效应; 其三是可以和胰岛素受体结合起胰岛素样作用。本实验中, 我们采用的牛磺酸浓度为 2.5mmol。这是根据 Li 等 (1993) 在兔胚胎培养中发现的最佳浓度^[10]。本实验的受精率范围在 10%~22% 之间, 平均受精率为 19%。受精率不高的原因可能是 (1) 与精子活力不高有关 (2) 所用卵为去卵丘细胞的卵。这是用同一种培养液完成昆明白小鼠的体外受精和发育至囊胚的首次报道。

参考文献:

- [1] 尹海林, 陈秀兰. 小鼠卵母细胞体外培养成熟及“试管小鼠”的研究[J]. 遗传, 1989, 11: 18~22.
- [2] 庞也非, 旭日干. 昆明小鼠卵子体外受精及发育的研究[J]. 细胞生物学杂志, 1990, 12: 175~180.
- [3] 张守全, 孙拓. 昆明白小鼠 1 细胞胚胎体外培养系统的研究[J]. 动物学报, 1995, 41: 432~438.
- [4] Chatot C L, A. Ziomek B D, Bavister J L, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 1989, 86: 679~688.
- [5] Hogan B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual[M]. Cold spring harbor laboratory USA, 1986, 250~253.
- [6] 王敏康, 张田, 王晓燕, 等. 几种克服昆明小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞的培养液研究[J]. 动物学报, 2000, 46(1): 31~37.
- [7] 王敏康, 张田, 刘冀珑, 等. 一种改良的胚胎吸管[J]. 动物学杂志, 1999, 34(6): 34~35.
- [8] Borland R M, Hazra S, Biggers J D, et al. The elemental composition of the environments of the gametes and preimplantation embryo during the initiation of pregnancy[J]. Biol Reprod, 1977, 16: 147~157.
- [9] Spindle A. Beneficial effects of taurine on mouse zygotes developing in protein-free culture medium. Theriogenology, 1995, 44: 761~772.
- [10] Li JM, Foote R H, Simkin M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase[J]. Biol Reprod, 1993, 48: 33~37.