DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.1995.03.016

牛的体外受精未受精卵长时间保存方法的研究

刘积凤

（吉林省农科院畜牧分院，公主岭 136100）

提　要　牛的体外受精所使用的卵巢一般需要从屠宰场运送到实验室，本试验探讨未受精卵长时间运送时的保存方法。试验1：经6小时运送保存时，体外受精后胚的发生率；试验2：在不同温度条件下培养，温度对未成熟卵成熟培养的影响；试验3：在试验2的基础上，采用细胞培养输送器，进行未成熟卵的边培养、边运送，对体外受精后胚的发生率的影响，结果表明：卵巢在2小时及6小时保存时，胚盘胞的发生率分别为16.1%，18.9，差异不显著。温度对未成熟卵的成熟率影响35，37，38.5，40℃分别为21.7%，74.1%．94.1%和86.7%，35～37℃没有获得高成熟率，使用细胞培养输送器胚盘胞的发生率为17.8%，比对照组的18.6%差异不显著。由此表明，在卵巢运送条件下，至少可保存6小时而不影响体外受精后胚的发生率；在更长时间运送时，可将卵子采取，边成熟培养边运送，最长运送时间可达24小时。

关键词　牛；体外受精；未受精卵；保存方法

1　目　的

牛的体外受精技术是利用屠宰场废弃的卵巢制作受精卵，继而生产仔牛的一项新兴的生物技术。即：从卵巢内采取未成熟卵，经过24小时的成熟培养后，在培养皿内进行体外受精，再进行8天培养直至发育成可供移植的受精卵，然后，移植于母牛的子宫内生产仔牛。

牛屠宰之后，卵巢内的卵子随着时间的延长就会发生变性和退化，因此，采取后的卵子要尽快地进行体外培养。但是，屠宰场和实验室大多数都是距离较远，卵巢必须要进行运送和保存，本实验探讨未受精卵的长时间保存方法。

2　材料及方法

试验1：卵巢的保存时间对体外受精后胚的发生率的影响

将屠宰场采取的牛卵巢在室温下保存运送到实验室，进行2小时运送的为对照组；到达实验室后再继续进行4小时保存，即：屠宰后进行6小时运送的为试验组。未成熟卵胞卵子的采取使用21G针头的10mL注射器吸引，把采取后的未成熟卵按每50个一组加入500μL的成熟培养液内进行22小时的成熟培养。成熟培养液是由25mM组织培养液（TCM199）中添加5%的仔牛血清组成。培养条件是38.5℃、2%CO_2、100%湿度，体外受精时使用的是日本黑色和牛的冷冻精液，精液融解后，用10mM咖啡因加BO液进行二次洗净，浓度调整为2000万/mL，用含有10iv/mL肝磷脂和10mg/mL BSA的BO液进行等量稀释，然后将获

收稿日期　1995－04－17

＊ 该论文试验材料为作者赴日研修期间所完成，指导先生高田直，在此表示感谢。

得受精能的精子悬浊液在液体石蜡下制成 100μL 的微粒，再将体外成熟卵每 50 个一组导入精子悬浊液中进行媒精，媒精 6 小时后，将卵子返回发生用的培养基内，采用与卵丘细胞共培养方法进行为期 8 天的培养，在媒精后 3～4 天，观察记录胚的发育状况，同时，除掉未分割卵。媒精后 7～8 天，再次观察，记录胚盘胞发育数量。

试验 2：温度对未成熟卵成熟培养的影响

将每 20 个卵胞卵子导入装有 2mL 成熟培养液的试管内，密封后分别放入 35，37，38.5 和 40℃的孵卵器内进行 22 小时的培养，成熟培养液与试验 1 相同。培养结束，将试管内卵子取出固定、染色后进行显微镜检查，卵子的核发育到 M Ⅰ 阶段的为成熟卵，计算出成熟率。

试验 3：用细胞培养输送器进行未成熟卵的成熟培养，体外受精后胚的发生率及其影响

能准确控制温度并携带方便的细胞培养输送器，长 20cm，宽 25cm，高 20cm，重量约 2kg，内装 12V 直流电池，可连续运转 48 小时，并可进行温度调控。试验方法与试验 2 相同，把未成熟卵子每 50 个装入试管，放入温度设定在 39℃的细胞培养输送器内，进行 22 小时成熟培养的为试验组，对照组按常法，用二氧化碳培养器培养。成熟培养后的体外受精，体外发生培养与试验 1 方法相同。

3 结　果

试验 1：卵巢在不同保存时间下，体外受精后胚的发生率

表 1　　卵巢的保存时间对胚盘胞发生率的影响

保存时间	供试卵数	分割卵数（%）	胚盘胞		胚盘胞数（%）
			第 7 天	第 8 天	
2 时间组	180	112(62.2)	17	12	29(16.1)
6 时间组	190	131(68.9)	13	23	36(18.9)

从表 1 可以看出媒精后第 4 天 2 细胞期以上的卵割率对照组为 62.2%，试验组为 68.9%。媒精后第 8 天的胚盘胞发生率对照组为 16.1%，试验组为 18.9%。卵巢的保存时间对胚的发生率影响没有明显的差异，但是，在 2 小时保存组出现的所有胚盘胞中，58.6%(17/29)的胚盘胞是在媒精后第 7 天出现的，而 6 小时保存组仅有 36.1%(13/36)，6 小时保存组胚的发育速度呈现迟缓的倾向。

试验 2：不同温度条件下未成熟卵的成熟率

表 2 表明，其成熟率分别为 35.℃为 21.7%，37℃为 74.1%，38.5℃为 94.1%，40℃为86.7%。35℃和 37℃组的成熟率偏低，表明未成熟卵的成熟培养需要严格的温度条件。

表 2　温度对未成熟卵成熟培养的影响

处理温度	供试卵数	成熟卵数	成熟卵率(%)
35℃组	23	5	21.7
37℃组	54	40	74.1
38.5℃组	17	16	94.1
40℃组	30	26	86.7

试验 3：用细胞培养输送器进行未成熟卵的体外成熟培养，体外受精后胚的发生成绩

表 3 结果表明媒精后第 3 天 2 细胞期以上的卵割率对照组为 62.4%，试验组为 64.9%，两组差异不显著。此外，媒精后第 8 天胚盘胞的发生率对照组为 18.6%，试验组为 17.8%，不同成熟培养条件下胚的发生率差异不显著，但是，在对照组出现的所有胚盘胞中，57.7%(30/52)的胚盘胞是在媒精后第 7 天出现的，而试验组仅有 42.4%(14/33)，试验组胚的

发育速度呈现迟缓倾向。

表 3 用细胞培养输送器进行未成熟卵的成熟培养体外受精后胚盘胞的发生率

处理	供试卵数	分割卵数(%)	胚盘胞		胚盘胞数(%)
			第7天	第8天	
对照组	279	174(62.4)	30	22	52(18.6)
试验组	185	120(64.9)	14	19	33(17.8)

4 讨论

4.1 牛屠宰后,卵巢在室温条件下6小时保存组和2小时保存组体外受精后胚的发育成绩差异不显著,由此表明,在进行体外受精研究及开发时,卵巢至少可进行6小时的运送而不影响体外受精成绩。

4.2 未成熟卵的体外成熟如不在牛的体温(38.5℃)条件下培养,则不会获得较高的成熟率,但是,如果温度控制严密,将卵子装入试验管内,在空气下进行成熟培养也是可能的。

4.3 使用细胞培养输送器进行未成熟卵的成熟培养与常法培养相比,体外受精后胚的发育成绩差异不显著。由此表明,使用细胞培养输送器进行未成熟卵的体外培养是可行的,而且可边培养、边运送,运送最长时间可达24小时。

参考文献

1 安部茂树.盐谷康生.牛卵巢の输送温度が体外成熟,体外受精卵の胚发生へ及ぼす影响.日本畜产学会报.1993,64:第1号32—37

2 花田 章等.家畜人工授精讲习会テキスト(家畜体外受精卵移植编).日本家畜人工授精师协会.1993,3:90—126

欢迎订阅《玉米科学》

《玉米科学》是吉林省农业科学院主办的玉米专业期刊。本刊是理论与实践相结合,普及与提高相结合的刊物。主要报道科技新成果、推广新经验、新技术。内容涉及玉米的遗传育种、耕作栽培、土壤肥料、植物保护等专业。适合科研、教学、生产以及管理等方面人员参考。本刊为季刊,国内、外公开发行,定价2.50元,全年10.00元。邮发代号:12—137,全国各地邮局(所)均可订阅。漏订者可直接向吉林省公主岭市西兴华街6号,吉林省农业科学院《玉米科学》编辑部补订。

邮 编:136100。

《玉米科学》编辑部