



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102197130 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 21

(21) 申请号 200980142807. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 08. 28

C12N 5/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61D 19/04 (2006. 01)

61/190, 515 2008. 08. 29 US

A01K 67/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/055424 2009. 08. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02010/025404 EN 2010. 03. 04

(71) 申请人 密苏里大学管理者

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 R·S·普莱特尔 R·李

C·N·墨菲 L·斯佩德

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黄革生

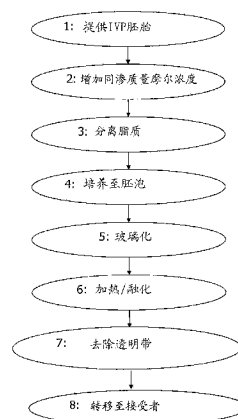
权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 4 页

(54) 发明名称

高通量和非侵袭性玻璃化猪胚胎的方法

(57) 摘要

本发明提供一种实用的、非侵袭性的、有效的低温保存体外制备的猪胚胎的方法。本发明方法是在压实之前将在单细胞或分裂期的 IVP (例如 IVF- 或 -NT- 衍生的) 胚胎在高同渗质量摩尔浓度的条件下处理,接着进行高速离心。高同渗质量摩尔浓度处理扩大了卵周隙,且离心能够使脂质从细胞质中分离。经过高同渗质量摩尔浓度处理后,脂质分离的胚胎被成功低温保存,后来被恢复和转移以产生活体后代。



1. 一种 IVP 猪胚胎的脂质分离的方法,包括:
 - (a) 在压实之前,在单细胞或分裂期制备 IVP 猪胚胎,
 - (b) 使这样的胚胎短时间暴露于具有预选择的同渗质量摩尔浓度的介质以制备凝缩的胚胎,以及
 - (c) 在预选择的速度下离心这样的凝缩的胚胎预选择的和时间期间,以制备脂质分离的胚胎。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的 IVP 猪胚胎是通过试管受精、核转移、或者其他体外方法制备的。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的介质的同渗质量摩尔浓度在约 300mOsmo 到约 500mOsmo 的范围内。
4. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述的离心条件是在 13,400× 克速度下离心约 6 到约 20 分钟。
5. 一种低温保存和恢复在体外制备的猪胚胎的方法,包括:
 - (a) 在压实之前,在单细胞或分裂期制备体外制备的猪胚胎,
 - (b) 使所述的胚胎短时间暴露于预选择的同渗质量摩尔浓度以制备凝缩的胚胎;
 - (c) 离心所述的凝缩的胚胎以制备脂质分离的胚胎,
 - (d) 培养所述的脂质分离的胚胎至胚泡期以制备脂质分离的胚泡,
 - (e) 通过玻璃化或冷冻低温保存所述的胚泡,
 - (f) 通过加热恢复所述的胚泡,再水合,并且去除透明带,以及
 - (g) 转移所述透明带去除后的胚泡至接受者。

高通量和非侵袭性玻璃化猪胚胎的方法

[0001] 授权申明

[0002] 本发明部分以来自国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 的许可 NO. R01RR013438 和 NO. U42RR018877 的政府支持下完成的。政府享有发明中的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种猪胚胎保存的方法, 尤其涉及一种新的和改进的体外制备的猪胚胎的保存方法。

背景技术

[0004] 早期哺乳动物胚胎的成功低温保存为种质保存以及全国性及国际性遗传学运动提供了机会。令人遗憾的是, 猪胚胎比很多哺乳动物胚胎难以低温保存。基于观察到猪胚胎对低温条件非常敏感、去除胞内脂质 (去脂) 可以减轻这种敏感性^[1-4], 成功低温保存猪胚胎已取得显著的进步。因为考虑与在体外制备胚胎相比更具发展竞争性, 大多数研究集中于体内制备胚胎。可选择的机械去脂法包括摇动细胞骨架^[5] 或改变玻璃化条件^[6-8]。

[0005] 根据早期低温保存在体内制备出的胚胎的研究, 猪卵母细胞或者具有完整透明带的胚胎在离心作用之后, 极化的脂质微滴往往与卵母细胞的细胞质或者胚的分裂球仍通过桥样结构保持连接^[11]。在随后培养或者低温保存过程中, 极化脂质微滴能再分配进入卵母细胞或者分裂球。如果卵周隙扩大, 在离心作用后桥样结构将破裂, 脂质微滴将不再分配进入卵母细胞的细胞质或者胚胎的分裂球, 但仍停留在完整的透明带里。因此在体内衍生的胚胎需要在离心作用之后立即低温保存, 以防止低温保存之前脂质再分配。

[0006] 之前的研究还发现, 猪胚胎初期有丰富的、大的脂质微滴, 在胚胎向胚泡期转化并超过时, 其尺寸和丰度逐渐下降^[15, 16]。有趣的是, 早期胚胎里的大脂质微滴比后期胚胎里较小脂质微滴更容易通过离心作用去除。

[0007] 在猪胚胎例如由试管受精 (IVF) 获得或者通过核转移 (NT) 衍生的胚胎的体外制备过程中, 已经用来建立疾病模型或者作为异体转移的潜在的器官捐献者。结果, 对在体外制备的胚胎进行有效的低温保存的需求已经大大增加。然而, 与在体内制备的配对物相比, 在体外制备的 (IVP) 胚胎对低温保存更敏感, 因此低温保存更难。

[0008] 迄今, 成功实现低温保存 IVP 胚胎是非常有限的。2006 年, 发明者实验室报告了由低温保存的 NT 胚胎制备出的两窝转基因小猪^[9]。后续, Nagashima 等^[10] 报告了由低温保存的 IVF 衍生的胚胎制备成的小猪。然而, 这两个成功的报告低温保存 IVF 或者 NT 衍生的胚都是通过离心和显微操作使用机械去脂法^[9, 10]。因为在显微操作期间能够予以透明带损害, 机械去脂大幅增加病原体传播的可能。这也是劳动密集和费时的。

[0009] 其他两组^[13, 14] 报告尝试使用部分酶消化而随后离心的方法改进猪单性生殖胚和手工克隆胚胎的低温保存的存活率。具体讲, 当胰蛋白酶, 链霉蛋白酶或者其他酶部分消化透明带后, 其尺寸膨胀, 这导致卵母细胞质膜和透明带之间的空间的量增加。因此当卵母细胞或者胚胎离心足够时, 出现可以使脂质完全分离的空间。然而, 当用于脂质分离时, 部分

酶消化处理存在一些缺点。例如,酶(例如胰蛋白酶或者链霉蛋白酶)能引起单性生殖的卵母细胞激活。另外,酶消化处理可能无法连续工作、并且需要小组紧密地观察和监督,因为酶处理的效果严重依赖于个体批次的酶。而且,两组都没有报告使用酶消化和离心作用方法的联合从低温保存的胚胎制备任何小猪。

[0010] 因此,需要发展一种实用的和非侵袭性的用于脂质分离和低温保存 IVP(例如 IVF- 衍生的或 NT- 衍生的)猪胚胎的方法,其适于研究和商业目的。

[0011] 发明概述

[0012] 在本发明的一个方面,描述一种新的和改进的从体外制备 (IVP) (试管受精 (IVF) 衍生的或者核转移 (NT) 制备的) 的猪胚胎细胞质中分离或者去除脂质的方法。本发明所述的脂质去除方法包括以下步骤:(1) 在单细胞或者分裂期(在压实之前)制备 IVP 猪胚胎,(2) 凝缩所述胚胎以制备凝缩的胚胎,以及 (3) 离心凝缩的胚胎以从细胞质中分离脂质,从而制备脂质分离的胚胎。

[0013] 根据本发明方法的一个实施例,胚胎的体积可通过高同渗质量摩尔浓度处理进行凝缩。特别是,在处于压实之前单细胞或者分裂期的 IVF 或者 NT 衍生的胚胎可暴露于具有预选择的高同渗质量摩尔浓度(比在前的培养基大)的介质中预定的较短时间期间。根据任何标准程序,介质的同渗质量摩尔浓度可以通过向介质中添加下列物质调节:盐,例如氯化钠,糖,例如蔗糖,棉白糖,果糖,甘露醇,ortrehalose 或者其他有机试剂,例如 DMSO 或者乙二醇。

[0014] 在本发明的另一个方面,描述一种新的和改进的低温保存和后续转移脂质分离的 IVF 或者 NT 衍生的猪胚胎的方法。脂质分离的猪胚胎可在胚胎进一步发育到胚泡期之后被低温保存,并且对其进行玻璃化。玻璃化的胚胎可以加热,它们的透明带去除,并且转移至接受者(例如代孕猪)。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 是本发明的低温保存和恢复过程的流程图。

[0017] 图 2(a) 到 (f) 是在高同渗质量摩尔浓度处理之后试管受精衍生的胚胎的发育过程的照片。

[0018] 图 3(a) 到 (f) 是在高同渗质量摩尔浓度处理之后 NT 衍生的胚胎的发育过程的照片。

[0019] 图 4 包括用不同的渗透性(通过氯化钠或者蔗糖调节)处理的胚胎照片(第 1 排)和离心处理后它们相应的及时胚胎照片(第 2 排)。

[0020] 发明详述

[0021] 除特殊情况外,本发明使用全部技术和科学术语属于本领域普通技术人员所理解通常的范畴。提及的全部出版物,专利申请,专利以及参考文献通过引用并入本文。

[0022] 本发明,在前期研究的基础上,教导在早期胚胎发育期脂质去除或者分离,对于低温保存 IVP (IVF- 或 -NT- 衍生的) 猪胚胎是关键的,并且另外通过部分酶消化来膨胀透明带,可以通过凝缩胚胎的体积以扩大 IVP 猪胚胎的卵周隙,从而能够使脂质去除/分离更容易。本发明还公开了将 IVP 胚胎暴露于高同渗质量摩尔浓度处理可以凝缩胚胎但仍然使胚胎保有活性。而且,和需要显微操作单个卵母细胞或胚胎的目前去脂方法相比,本发明的脂质分离方法可用于一次处理多个胚胎。

[0023] 参照图 1,其是通过本发明的胚胎凝缩方法来进行本发明的低温保存和恢复过程的流程图。图 1 的步骤 1 提供预选择的早期发育期、特别是在压实之前单细胞或者分裂期的 IVP 胚胎。适用任何标准 IVP 方法,例如 IVF 或 NT。

[0024] 根据本发明方法的一个实施例,体外受精过程可开始于从一个或多个猪卵巢的窦状滤泡中抽取卵母细胞。卵母细胞可在成熟培养基中培养至成熟一段时间,然后剥离。示例性成熟培养基可含有 TCM199(Gibco,31100035, Grand Island, 纽约),有 0.1% 的 PVA, 3.05mmol/L 葡萄糖,0.91mmol/L 丙酮酸钠,0.57mmol/L 半胱氨酸,0.5 μ g/mL 黄体生成素,0.5 μ g/mL 促滤泡激素,10ng/ml 黄体生成素表皮生长因子,75 μ g/mL 青霉素和 50 μ g/mL 链霉素。卵母细胞可在成熟培养基内、在 38.5℃、5% CO₂ 的湿空气中培养约 40-44 小时。成熟后,卵母细胞可在补充 0.1% 的 PVA 和 0.1% 的透明质酸酶的 TL-HEPES^[20] 中由通过旋涡一段时间例如约 4 分钟清除丘细胞后被剥离。被剥离的卵母细胞在授精之前可以被储存在很多不同的培养基里。良好的培养基可含有 TCM 199,有 0.6mmol/L 碳酸氢钠,2.9mmol/L HEPES,50 μ g/ml 青霉素,60g μ g/ml 链霉素,30mmol/L 氯化钠和 3mg/ml BSA^[26]。

[0025] 制备 IVP 胚胎可遵循任何标准授精方法。根据一个实施例,被剥离的有极体的卵母细胞可首先被转移到合适的 IVF 介质中与悬浮精子结合。示例性 IVF 介质可以含有改进 tris- 缓冲的培养基,有 113.1mmol/L 氯化钠,3mmol/L 氯化钾,7.5mmol/L 氯化钙,5mmol/L 丙酮酸钠,11mmol/L 葡萄糖,20mmol/L tris,2mmol/L 咖啡因和 2mg/ml BSA。

[0026] 根据本发明的另一个实施例,NT 衍生的胚胎可开始于核转移供体细胞和商业的卵母细胞。核转移供体细胞可以从转基因小猪或者通过野生型细胞的遗传修饰产生的细胞收集。在卵母细胞成熟后,在补充 0.1% 的 PVA 和 0.1% 的透明质酸酶的 TL-HEPES 中旋涡约 4 分钟清除丘细胞。来自这些卵母细胞的第一极体和相邻的细胞质在含有 7.0 μ g/ml 细胞松弛素 B 操作介质中被抽出。随后,供体细胞被转移进卵间隙。在两个 1.2Kv/cm 的 30 μ s 脉冲下、在融合 / 活化介质(例如 0.3M 甘露醇,1.0mM 氯化钙,0.1mM 氯化镁和 0.5mM HEPES)中,融合和活化同步完成。或者,融合和活化可以分步骤完成,首先在融合中暴露于只有低浓度钙的介质(例如,0.3M 甘露醇,0.1mM 氯化钙,0.1mM 氯化镁和 0.5mM HEPES),然后在暗处暴露于 200 μ M 硫柳汞中约 10 分钟,然后在 8mM DTT 中 30 分钟以活化^[21],或者其他任何合适的方法。

[0027] 在授精或者 NT 之后,IVP 胚胎培养至单细胞或者分裂期(受精卵,2 细胞或 4 细胞期,在压实之前)。可使用任何合适的培养方法。根据一个实施例,IVP 胚胎(由试管受精或者 NT 衍生)可以在 38.5℃、5% CO₂ 的空气中在多种不同的培养基内培养 28 到 30 小时,以选择 2 细胞期的胚胎。示例性培养基 PZM3^[27] 可以包含 108.0mmol/L 氯化钠,10.0mmol/L 氯化钾,0.35mmol/L 磷酸二氢钾,0.4mmol/L 七水硫酸镁,25.07mmol/L 碳酸氢钠,0.2mmol/L 丙酮酸钠,2.0mmol/L 五水二钙(乳酸盐),1.0mmol/L 谷氨酰胺,5.0mmol/L 亚牛磺酸,20ml/L BME 氨基酸溶液,10ml/L MEM 氨基酸溶液,0.05mg/ml 庆大霉素,3mg/ml BSA,渗透压 288 $\pm$ 2, pH 7.3 $\pm$ 2。

[0028] 图 1 中步骤 2 增加胚胎的同渗质量摩尔浓度以凝缩胚胎。可使用几种不同的介质配方增加同渗质量摩尔浓度,以凝缩卵母细胞或胚胎的体积。本发明提供使用在不同浓度(导致不同的同渗质量摩尔浓度)下氯化钠或者蔗糖的例子,但其他导致高同渗质量摩尔浓度和随后细胞体积收缩的配方应有效。

[0029] 根据本发明方法的一个实施例,可通过调整浸没胚胎的介质的同渗质量摩尔浓度来增加同渗质量摩尔浓度。例如,氯化钠或蔗糖可以以约 300mOsm (例如,300–310mOsm 的储备溶液,有 7.0 μg/ml 黄体生成素细胞松弛素 B 和 0.1mg/ml BSA) 添加到储备介质中,以获得具有各种同渗质量摩尔浓度的介质,例如 350,400,500,600 和 800–850mOsm。在离心之前,IVF 衍生的胚胎可暴露在预选择的高同渗质量摩尔浓度介质中较短时间,约 5 到 10 分钟。

[0030] 图 1 中的步骤 3 从凝缩的胚胎中分离脂质,通常通过离心进行。例如,在高同渗质量摩尔浓度介质中凝缩的胚胎可以以 13,400×g 离心约 6 到 20 分钟。离心条件(力或者时间)可以改变离心作用力和时间长短,只要足以实现全脂质分离同时保持胚胎的活性。如果力增大,处理时间可特别地缩短。同样如果使用较小的力,可需要更长的时间。过长时间暴露在高同渗质量摩尔浓度下可影响胚胎的活力。

[0031] 培养约 12 个小时后可检查脂质分离;在一些情况下(特别是 NT 衍生的胚胎,因为它们相对更有价值)可进行第二轮高同渗质量摩尔浓度处理和随后的离心以实现相对完全的脂质分离。第二轮高同渗质量摩尔浓度处理可是任选的,只要在压实之前胚胎保持在分裂期。

[0032] 图 1 中步骤 4,然后脂质分离的后胚胎允许进一步发育到胚泡期。具体讲,脂质分离的胚胎可以在 PZM3 里培养 3 到 6 天以使胚胎达到胚泡期。

[0033] 图 1 中步骤 5 是进一步发育的胚胎的玻璃化。胚胎可通过任何标准方法/工序玻璃化。根据一个实施例,通过使用改进的开放式拉长细管(“OPS”)法,可以使进一步发育的胚胎在胚泡期玻璃化。具体讲,进一步发育的胚胎可以短时间(例如约 2 分钟)放在平衡溶液里,然后暴露于玻璃化溶液,然后载入 OPS 细管中,立即投入液氮。示例性的平衡溶液可包含 10% 的乙二醇,10% 的二甲亚砜(“DMSO”),而示例性的玻璃化溶液可以包含 20% 的乙二醇和 20% 的 DMSO。在投入氮气之前,所述方法可在 38.5°C 加热期进行。从暴露于玻璃化溶液到投入氮气的时间通常为约 25 到 30 秒之间的较短范围。

[0034] 图 1 中步骤 6 至 8 是恢复被保存的胚胎并且把它转移到接受者中的步骤。具体讲,玻璃化的胚胎可通过在稍微高温(例如约 38.5°C)下浸没在缓冲溶液(例如蔗糖)中一段时间而融化。融化的胚胎可用 0.5% 的链霉蛋白酶处理软化并且去除透明带。脂质分离的和透明带去除的胚胎然后可被转移到接受者或者代孕物的输卵管或子宫中。

[0035] 图 2(a) 到 (f) 是在高同渗质量摩尔浓度处理(在 400mOsm,用氯化钠)之后 IVF- 衍生的胚胎的照片。图 2(a) 显示的是高同渗质量摩尔浓度处理和离心之后培养数小时的胚胎。图 2(b) 和 2(c) 显示的是在胚泡期的胚胎。图 2(d) 显示的是在玻璃化和加热之后胚胎。图 2(e) 显示的是在去除它们的透明带之后的胚胎。图 2(f) 显示的是在 BRL 细胞条件培养基体外培养后重新扩大的胚胎。

[0036] 图 3(a) 到 (f) 是用氯化钠或蔗糖高同渗质量摩尔浓度处理之后 NT- 衍生的胚胎的发育的照片。图 3(a) 和 3(b) 显示的是在高同渗质量摩尔浓度和离心处理后培养数小时的 NT- 衍生的胚胎;图 3(c) 和 3(d) 显示的是进一步培养至胚泡期的胚胎;图 3(e) 显示的是在玻璃化之后被加热的胚胎;以及图 3(f) 显示的是在 BRL 细胞条件培养基体外培养后重新扩大的胚胎。

[0037] 本发明进一步研究了不同试剂(调整同渗质量摩尔浓度),不同同渗质量摩尔浓

度和离心时间对脂质分离率的影响。本发明发现不同的试剂,例如氯化钠或蔗糖,对脂质分离有相似影响;脂质分离的理想范围的重量摩尔渗透压为从约 350 到约 500mOsm;在合适的离心力/速度下离心约 6 分钟到约 20 分钟的时间范围也对脂质分离率有积极作用。

[0038] 图 4 显示的是离心前后经过不同同渗质量摩尔浓度(用氯化钠或蔗糖调节)处理的体外受精胚胎的照片。第 1 排显示的是胚胎暴露于不同同渗质量摩尔浓度 300mOsm(对照)、400mOsm(用氯化钠调节)、600mOsm(用蔗糖调节)、以及 800mOsm(用蔗糖调节)下的照片,明显地显示出在提高的同渗质量摩尔浓度下凝缩(与对照相比)。第 2 排列出了在离心后胚胎相应的照片。在对照中可在离心之后观察到桥样结构(显示不完全脂质分离);在暴露于 400mOsm 的胚胎中可以观察完全脂质分离,而较大桥样结构存在于用 600 或 800mOsm 处理的胚胎中。图 2 表明在约 400mOsm 的同渗质量摩尔浓度下提供最完全的脂质分离,当同渗质量摩尔浓度增加到 600 及以上时,脂质分离被阻碍。

[0039] 本发明进一步定量评价不同的同渗质量摩尔浓度和离心条件对于脂质分离率、胚胎发育和孵化能力的影响。基于包括在表 1(IVF 衍生的胚胎,同渗质量摩尔浓度用氯化钠调节),2(IVF 衍生的胚胎,同渗质量摩尔浓度用蔗糖调节),以及 3(NT 衍生的胚胎,同渗质量摩尔浓度同时用氯化钠和蔗糖调节,全部 3 份表格附上)中的数据,脂质分离的优选条件是将 IVP 胚胎暴露在大于 300 到约 500mOsm 范围的同渗质量摩尔浓度,优选从约 350 到约 450mOsm,随后以 $13,400\times$ 克的速度离心约 6 到约 20 分钟。离心时间可缩短或者延长,这取决于离心速度。然而,延长离心时间可使胚胎长期暴露于高同渗质量摩尔浓度下,这可能会对胚胎的活性有不利的影响。而且,在表 3 中,对于 NT- 衍生的胚胎(在第一轮处理无法凝缩)进行第二轮高同渗质量摩尔浓度处理,这增加总的脂质分离率。第二轮高同渗质量摩尔浓度处理可进行,只要在胚胎仍处在压实之前的分裂期。

[0040]

表1 IVP* 开始18-20小时后、经过不同同渗质量摩尔浓度
处理和不同离心时间处理的IVP胚胎的脂类分离和发育

处理		处理胚 胎总数	脂质分离的胚胎		发育至胚胎期		
同渗质量 摩尔浓度	离心时间(分)		No.	平均数±SEM	No.	%	
						/ 脂质分离 平均数±SEM	/ 胚胎总量 平均数±SEM
6	300	216	106	49.1±6.0 ^f	15	14.2±5.8 ^{abc}	6.9±3.5 ^{cd}
	350	221	166	75.1±5.3 ^{de}	23	13.9±2.3 ^{abc}	10.4±1.6 ^{bcd}
	400	217	182	83.9±4.2 ^{cd}	36	19.8±3.7 ^a	16.6±3.2 ^{ab}
	450	223	200	89.7±2.4 ^{ab}	29	14.5±3.8 ^{ab}	13.0±3.5 ^{abc}
	500	228	195	85.5±2.2 ^{bc}	35	17.9±3.7 ^{ab}	15.4±3.4 ^{ab}
12	300	200	133	66.5±3.3 ^{de}	24	18.4±3.5 ^{ab}	12.0±2.6 ^{abcd}
	350	217	182	83.9±3.0 ^{cd}	33	18.1±3.6 ^{ab}	15.2±3.2 ^{ab}
	400	216	187	86.6±3.9 ^{bc}	21	11.3±1.8 ^{abc}	9.7±1.5 ^{bcd}
	450	213	192	90.1±3.4 ^{abc}	36	18.8±2.8 ^{ab}	16.9±2.9 ^{ab}
	500	211	200	94.8±1.2 ^{ab}	29	14.5±2.9 ^{ab}	13.7±2.7 ^{abc}
20	300	216	153	70.8±5.2 ^{de}	27	17.6±5.0 ^{ab}	12.5±3.9 ^{abcd}
	350	212	193	91.0±1.9 ^{abc}	29	15.0±2.9 ^{ab}	13.7±2.7 ^{abc}
	400	219	213	97.3±1.6 ^a	27	12.7±1.9 ^{abc}	12.3±1.9 ^{abcd}
	450	209	195	93.3±2.2 ^{abc}	21	10.8±2.5 ^{bc}	10.0±2.5 ^{bcd}
	500	223	206	92.4±1.5 ^{abc}	12	5.8±1.9 ^c	5.4±1.7 ^d
对照		262	-	-	47	17.9±2.1 ^{ab}	17.9±2.1 ^a

栏内 ^{abc,def} 不同上标差异性P<0.05
* 6次平行测定摘要

[0041]

表2 IVP* 18-20小时后、经过不同同渗质量摩尔浓度处理和离心6 分钟处理的
IVP胚胎的脂类分离和发育

处理		胚胎总量	脂质分离的胚胎		发育至胚泡期		
同渗质量 摩尔浓度	化学成分	No.	No.	%, 脂质分离的胚胎/ 总胚胎 平均数±SEM	No.	%	
						/脂质分离的胚胎 平均数±SEM	/胚胎总量 平均数±SEM
400	氯化钠	133	117	88.0±9.1 ^a	14	12.0±6.1 ^{ab}	10.5±3.5 ^{ab}
400	蔗糖	92	83	90.2±0.6 ^{ab}	14	16.9±8.1 ^a	15.2±7.2 ^a
500		133	97	73.0±8.1 ^b	7	7.2±1.2 ^{ab}	5.3±0.4 ^{abc}
600		94	23	24.5±13.0 ^c	1	4.3±12.5 ^{ab}	1.1±1.2 ^{bc}
800		125	1	0.8±0.8 ^c	0	0 ^b	0 ^c
对照		144	-	-	20	3.9±3.4 ^{ab}	13.9±3.4 ^a

* 3次平行测定摘要
栏内^{a,b,c} 不同上标差异性P<0.05

[0042]

表3 融合*14-18小时后、经过不同同渗质量摩尔浓度和离心时间处理后NT胚胎的脂质分离

处理		胚胎总量				脂质分离的胚胎				脂质分离的胚胎		
Osmo	用于制备高同渗质量摩尔浓度介质的化学成分	离心时间(分)	NT胚胎的活化和融合	第一轮高同渗质量摩尔浓度处理和离心		第一轮和第二轮同渗质量摩尔浓度处理和离心		No.	% (平均数± SEM)		/脂质分离的胚胎	/胚胎总量
				No.	% (平均数±SEM)	No.	% (平均数±SEM)					
400	蔗糖	6	低钙+Thi+DTT	336	63.3±2.5 ^d	444	83.6±0.9 ^c	73	16.4±2.1 ^{ab}		13.7±1.6	
400	蔗糖	6	通电	546	66.7±1.7 ^{bcd}	671	82.0±1.4 ^c	115	17.1±0.8 ^{ab}		14.1±0.8	
400	氯化钠	6	通电	67	61.5±0.4 ^{cd}	89	81.7±0.2 ^c	22	24.7±2.5 ^a		20.2±2.0	
400	氯化钠	12	通电	88	74.6±5.1 ^{abc}	100	84.7±0.7 ^{bc}	20	20.0±6.8 ^{ab}		17.0±5.7	
400	氯化钠	20	通电	415	75.5±2.3 ^{ab}	491	89.3±1.7 ^{ab}	62	12.6±2.3 ^b		11.3±2.1	
350	氯化钠	20	通电	570	80.1±2.9 ^a	653	91.7±0.7 ^a	116	17.8±2.5 ^{ab}		16.3±2.4	
对照				-	-	-	-	8	13.3±3.3 ^b		13.3±3.3	

* 2到6次平行测定摘要
栏内^{a,b,c,d}不同上标差异性P<0.05

[0043] 表 4 是 IVF 衍生的胚胎在经过高同渗质量摩尔浓度处理、离心和玻璃化后保存的妊娠和后代的评价数据。在表 4 包括的数据中,9 个之中的 3 个代孕者建立妊娠并且并且

产下正常后代。一个接受经过 350mOsm 同渗质量摩尔浓度处理的胚胎的代孕者产下 5 头小猪, 3 个雄性和 2 个雌性; 一个接受经过 400mOsm 同渗质量摩尔浓度处理的胚胎的代孕者产下 4 头小猪, 2 个雄性和 2 个雌性; 一个接受经过 450mOsm 同渗质量摩尔浓度处理的胚胎的代孕者产下 3 头小猪, 1 个雄性和 2 个雌性。

[0044]

表 4 在玻璃化和加热后衍生自高同渗质量摩尔浓度处理和离心的 IVP 胚胎的转移

ET 日期	Osmo. (mOsm)	化学成分	离心 (分钟)	转移胚胎数	玻璃化和加 热后带去除	接受者	妊娠	小猪数量	备注
6/14/2007	350	氯化钠	6	25	+	O089	+	5	3 雌性 2 雄性
6/14/2007	350	氯化钠	6	50	-	O090	-	19 天恢复 动情期	
6/28/2007	350	氯化钠	6	50	-	O105	-	27 天恢复 动情期	
7/5/2007	400	氯化钠	6	25	+	O082	-	21 天恢复 动情期	
7/13/2007	400	氯化钠	6	25	+	O112	+	4	2 雌性 2 雄性
11/1/2007	450	氯化钠	20	25	+	O174	-	25 天恢复 动情期	
11/8/2007	450	氯化钠	20	25	+	O188	+	3	2 雌性 1 雄性
11/9/2007	450	氯化钠	12	25	+	O128	-	24 天恢复 动情期	
12/12/2007	450	氯化钠	12	25	+	O185	+	20 天恢复 动情期	

[0045] 表 5 列出在经过高同渗质量摩尔浓度处理、离心和玻璃化后, NT 衍生的胚胎的转移、妊娠和后代的数据。3 种胚胎被转移被并且被记录。对于各转移, 80 到 90 个胚胎(透明带软化或通过链霉蛋白酶处理去除)被转移入代孕者。接受经过 400mOsm 同渗质量摩尔浓度处理、6 分钟离心的胚胎的 3 个之中的两个代孕者和接受经过 350mOsm 同渗质量摩尔浓度处理、20 分钟离心的胚胎 1 个代孕者导致妊娠, 前者产下一个雄性小猪。表 4 和 5 的数据证明本发明的方法, 特别是使用优选范围的同渗质量摩尔浓度(从约 350 到约 450mOsm)时, 是用于 IVP 胚胎的成功的低温保存方法。

[0046]

表5 玻璃化和加热后NT胚胎的转移 *

胚胎转移日期	高同渗质量摩尔浓度处理			胚胎转移量	玻璃化和加热后带去除	接受者		小猪序号	备注
	mOsm	化学成分	离心(分钟)			No.	怀孕的		
8/24/2007	400	蔗糖	6	83	+	O141	+	1 (雄性)	
11/16/2007	400	氯化钠	6-20	80	+	O184	-	-	在周期22天返回
12/6/2007	350	氯化钠	20	90	+	O214	+		在周期19天返回

* 一个生殖道感染的小母猪没有包括在以上数据中

[0047] 当发明经结合其具体的实施例描述时,应当理解,发明的方法可以进行进一步的修改。专利申请覆盖其任何变化,使用,或适用本发明的后续发明,通常,本发明的原理,包

括在本发明所公开内容的启示下结合本领域内公知常识或惯用手段以及应用本发明全部必要的技术特征均落入如下权利要求范围内。

[0048] 参考文献

- [0049] 1. Polge C, Wilmut I, Rowson LEA. The low temperature preservation of cow, sheep, and pig embryos. *Cryobiology* 1977 ;11 :560.
- [0050] 2. Wilmut I. The low temperature preservation of mammalian embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 1972 ;31 :513-514.
- [0051] 3. Dobrinsky JR. Cellular Approach to Cryopreservation of Embryos. *Theriogenology* 1996 ;45 :17-26.
- [0052] 4. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB. Removal of Cytoplasmic Lipid Enhances the Tolerance of Porcine Embryos to Chilling. *Biology of Reproduction* 1994 ;51 :618-622.
- [0053] 5. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction* 2000 ;62 :564-570.
- [0054] 6. Berthelot F, Martinat-Botte F, Perreau C, Terqui M. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reproduction, Nutrition, Development* 2001 ;41 :267-272.
- [0055] 7. Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB. Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology* 2002 ;57 :2155-2165.
- [0056] 8. Misumi K, Suzuki M, Sato S, Saito N. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 2003 ;60 :253-260.
- [0057] 9. Li R, Lai L, Wax D, Hao Y, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans RW, Turk JR, Kang JX, Witt WT, Dai Y, Prather RS. Cloned transgenic swine via in vitro production and cryopreservation. *Biology of Reproduction* 2006 ;75 :226-230.
- [0058] 10. Nagashima H, Hiruma K, Saito H, Tomii R, Ueno S, Nakayama N, Matsunari H, Kurome M. Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction* 2007 ;76 :900-905.
- [0059] 11. Nagashima H, Cameron RD, Kuwayama M, Young M, Beebe L, Blackshaw AW. Survival of porcine delipidated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification. *Journal of Reproduction and Development* 1999 ;45 :167-176.
- [0060] 12. Cameron RDA, Beebe LFS, Blackshaw AW, Keates HL. Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *Theriogenology* 2004 ;61 :1533-1543.
- [0061] 13. Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, Ushijima

H, Kuwayama M, Nagashima H. Cryopreservation of porcine embryos derived from invitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction* 2004 ;71 :432-437.

[0062] 14. Du Y, Zhang Y, Li J, Kragh PM, Kuwayama M, Ieda S, Zhang X, Schmidt M, Bogh IB, Purup S, Pedersen AM, Villemoes K, Yang H, Bolund L, Vajta G. Simplified cryopreservation of porcine cloned blastocysts. *Cryobiology* 2007 ;54 :181-187.

[0063] 15. Norberg HS. Ultrastructural aspects of the preattached pig embryo : cleavage and early blastocyst stage. *Z. Anat. Entwicklungsgesch* 1973 ;143 :95-114.

[0064] 16. Kikuchi K, Ekwall H, Tienthai P, Kawai Y, Noguchi J, Kaneko H, Rodriguez-Martinez H. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygote* 2002 ;10 :355-366.

[0065] 17. Nagashima H, Kato Y, Yamakawa H, Matsumoto T, Ogwa S. Changes in freezing tolerance of pig blastocysts in peri-hatching stages. *Jpn J Animal Reproduction* 1989 ;35 :130-134.

[0066] 18. Nagashima H, Yamakawa H, Niemann H. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology* 1992 ;37 :839-850.

[0067] 19. Li R, Hosoe M, Shioya Y, Bou S. The preliminary research on freezing viability of bovine in vitro fertilized embryos. *Chinese J Scientia Agricultura Sinica* 2002 ;35 :1125-1129.

[0068] 20. Tao T, Machaty Z, Boquest AC, Day BN, Prather RS. Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into in vitro matured oocytes. *Animal Reproduction Science* 1999 ;56 :133-141.

[0069] 21. Machaty Z, Wang WH, Day BN, Prather RS. Complete Activation of Porcine Oocytes Induced by the Sulfhydryl Reagent, Thimerosal. *Biology of Reproduction* 1997 ;57 :1123-1127.

[0070] 22. Niemann H, Rath D, Wrenzycki C. Advances in biotechnology : New tools in future pig production for agriculture and biomedicine [Review]. *Reproduction in Domestic Animals* 2003 ;38 :82-89.

[0071] 23. Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L, Greenstein JL. Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 2003 ;59 :115-123.

[0072] 24. Lai LX, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002 ;295 :1089-1092.

[0073] 25. Du Y, Kragh PM, Zhang X, Purup S, Yang H, Bolund L, Vajta G. High overall efficiency of porcine handmade cloning (HMC) combining partial zona digestion and oocyte trisection with sequential culture. *Cloning and Stem Cells* 2005 ;7 :199-205.

- [0074] 26. Kragh PM, Du Y, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Vajta G. Efficient in vitro production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. *Theriogenology* 2005 ;64 :1536-1545.
- [0075] 27. Collins JL, Baltz JM. Estimates of mouse oviductal fluid tonicity based on osmotic responses of embryos. *Biology of Reproduction* 1999 ;60 :1188-1193.
- [0076] 28. Li RF, Whitworth K, Lai LX, Wax D, Spate L, Murphy CN, Rieke A, Isom C, Hao YH, Zhong ZS, Katayama M, Schatten H, Prather RS. Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Molecular Reproduction & Development* 2007 ;74 :1228-1235.
- [0077] 29. Hwang I-S, Park M-R, Moon H-J, Shim J-H, Kim D-H, Yang B-C, Ko Y-G, Yang B-S, Cheong HT, Im GS. Osmolarity at early culture stage affects development and expression of apoptosis related genes (Bax-a and Bcl-xl) in preimplantation porcine NT embryos. *Molecular Reproduction & Development* 2008 ;75 :464-471.
- [0078] 30. Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 57(1 Special Issue 2002 ;57 :285-302.
- [0079] 31. Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Keates HL, Nottle MB. Assisted hatching improves post-warming in vitro viability of vitrified porcine embryos. *Reproduction, Fertility & Development* 2004 ;16 :164.

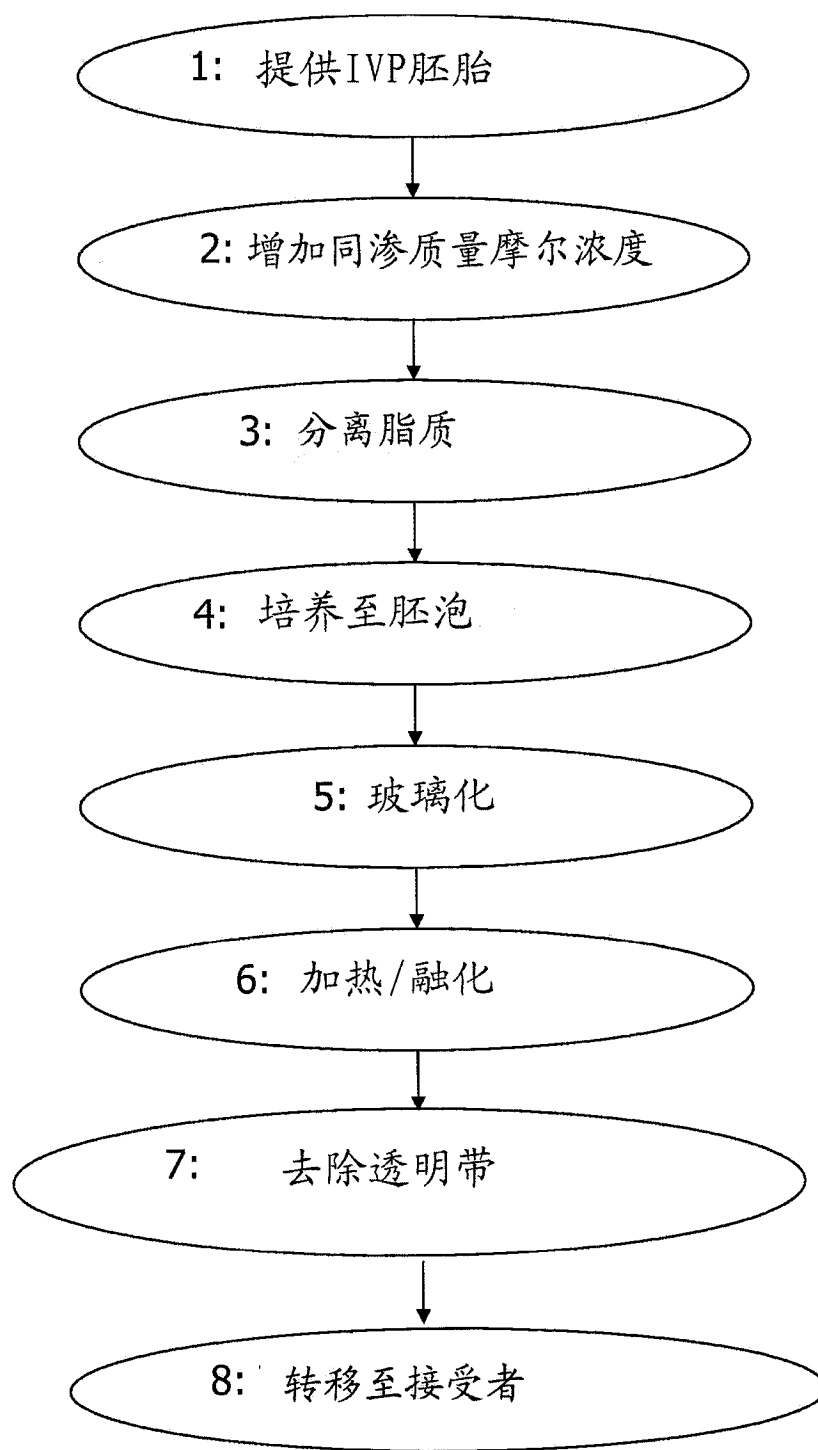


图 1

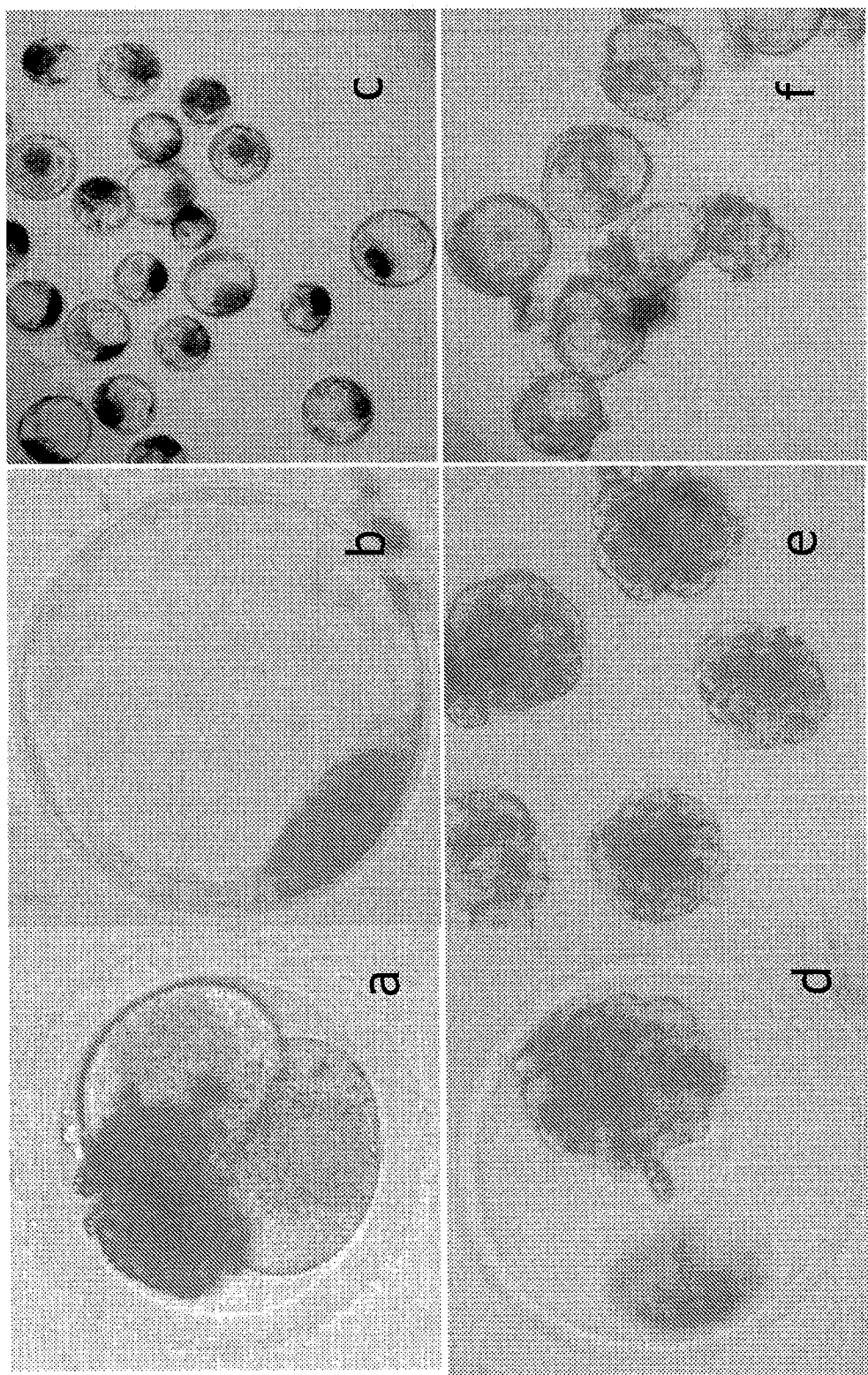


图 2

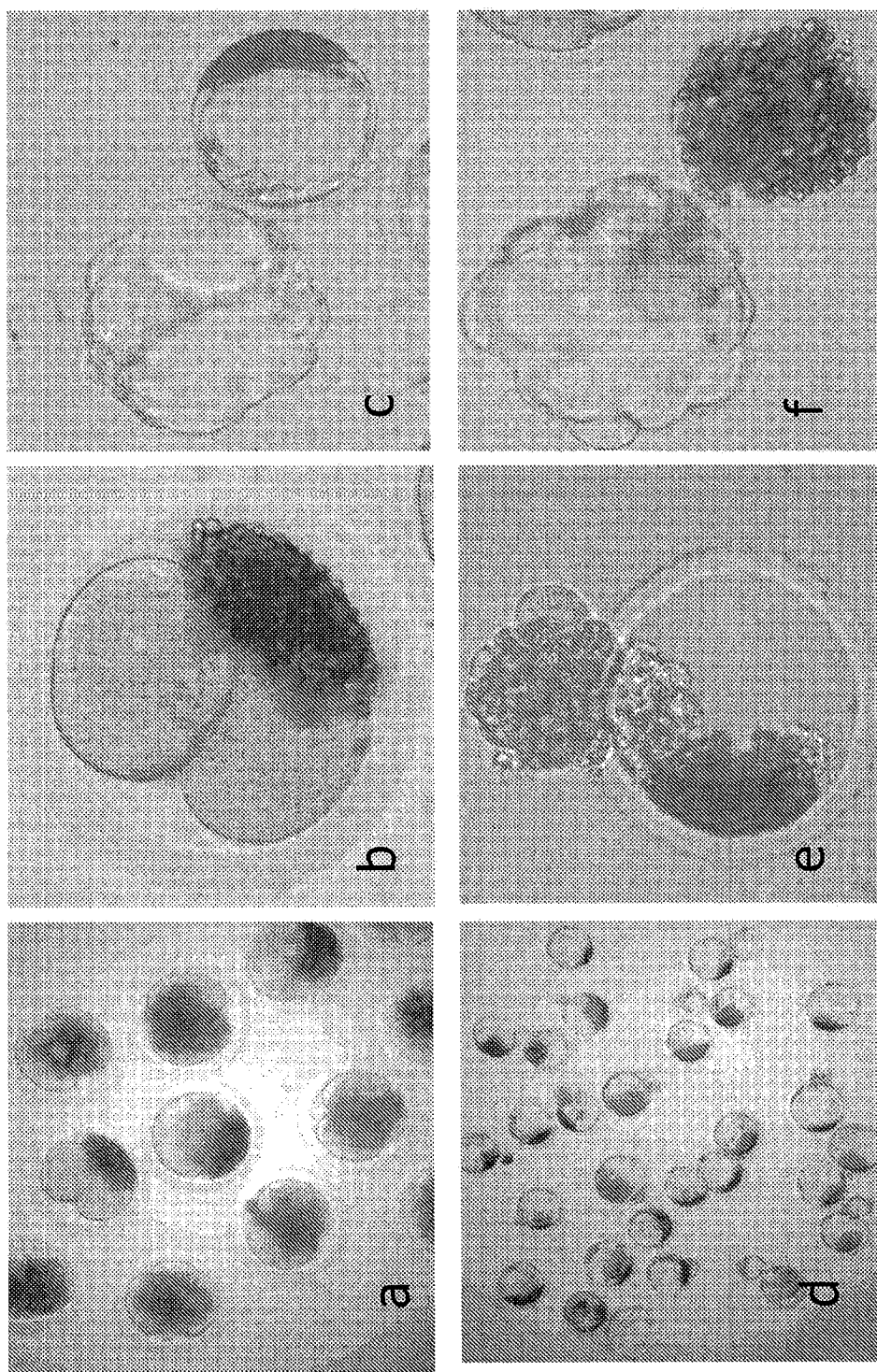


图 3

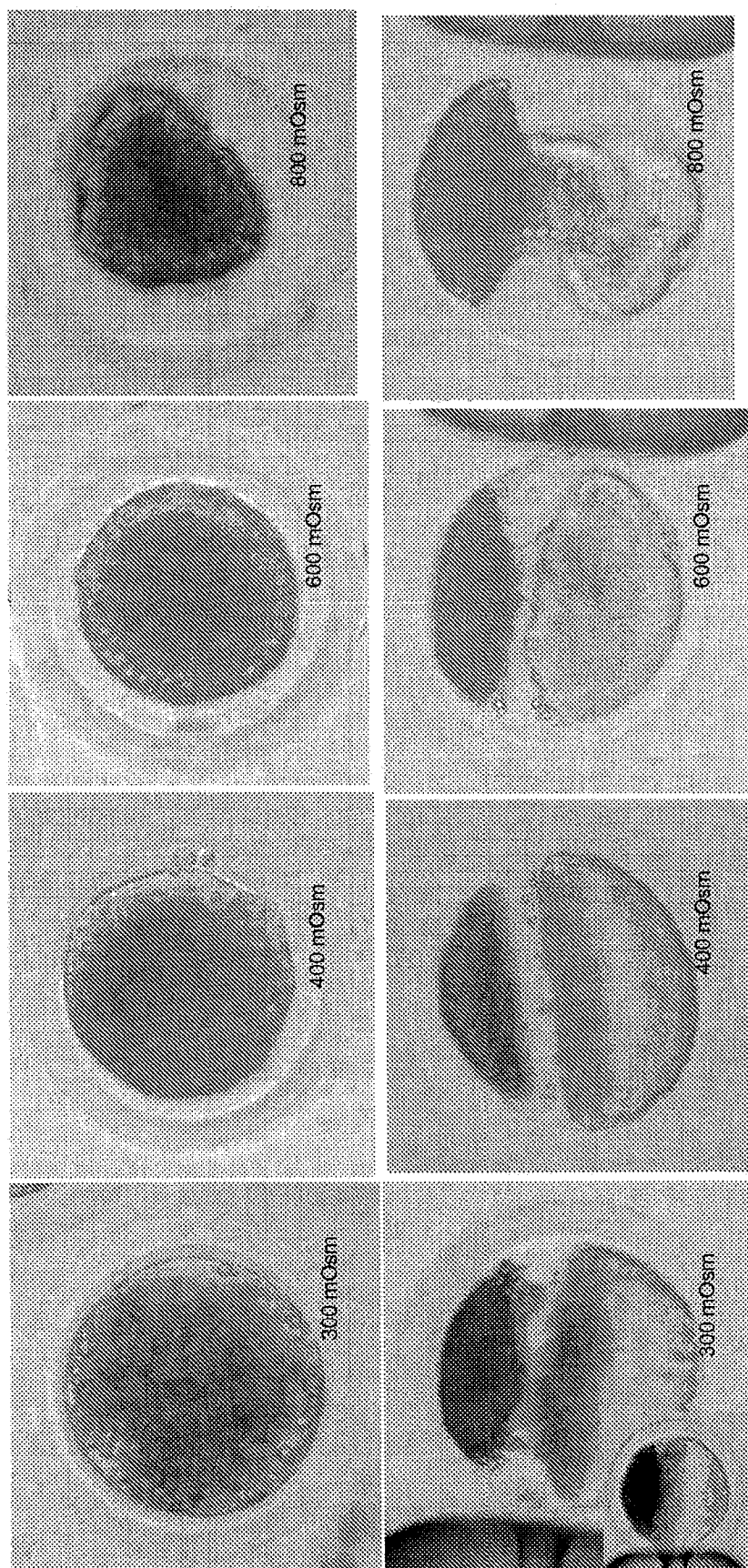


图 4