



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112118736 A

(43) 申请公布日 2020.12.22

(21) 申请号 201980002421.9

(22) 申请日 2019.07.18

(30) 优先权数据

10-2019-0045801 2019.04.19 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2019/008861 2019.07.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/213789 KO 2020.10.22

(71) 申请人 艾牧克生物技术有限责任公司

地址 韩国大田广域市

申请人 忠南大学校产学协力团

(72) 发明人 金敏奎 南润哲 朴江善 池国斌

李智慧

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理

有限公司 51258

代理人 洪玉姬 金相允

(51) Int.Cl.

A01N 1/02 (2006.01)

C12N 5/075 (2006.01)

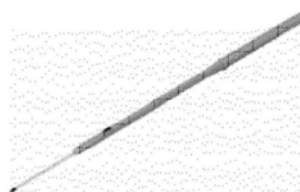
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法
及冷冻解冻卵子

(57) 摘要

本发明涉及玻璃化冷冻并解冻用于体细胞克隆的动物的卵子的方法,更详细地,涉及一种玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法及根据该方法的冷冻解冻卵子。与现有的狗玻璃化冷冻卵子生产技术由于发情周期不同难以同步实验日程相反,本发明的玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法及根据该方法的冷冻解冻卵子,即使在不同的日子发情,也可将采取的卵子通过玻璃化冷冻技术来同步实验日程,能够显示出高的核移植及受精的效果。



1. 一种玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法,执行如下所述过程:
采取犬科动物的成熟卵子的过程(1过程),
执行玻璃化冷冻上述采取的卵子的过程(2过程);
并包括:
准备混合液、平衡液、玻璃化溶液的过程(2过程-1);
去除所述回收的卵子的卵丘细胞的过程(denuding)(2过程-2);
用在室温下平衡的混合液处理所述去除卵丘细胞的成熟的卵子的过程(2过程-3);
在含有所述卵子的混合液添加平衡液并处理后,再添加平衡液处理的过程(2过程-4);
再次用平衡液处理经过所述处理的卵子的过程(2过程-5);
将经过处理的卵子移到玻璃化溶液并处理的过程(2过程-6)及将卵子放到卵子冷冻工具并去除玻璃化溶液后立即浸渍到液氮中保存的过程(2过程-7)。
2. 根据权利要求1所述的玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法,其特征在于,包括:
执行解冻玻璃化冷冻卵子的过程(3过程);
并包括:
准备解冻液、稀释溶液、洗涤液、恢复培养基的过程(3过程-1);
在恒温箱中将解冻液(Thawing Solution)加热至35~40℃的过程(3过程-2);
在恒温箱将恢复培养基(Recovery medium)加热至35~40℃的过程(3过程-3);
拿出保存在液氮中的卵子冷冻工具(CryoTop)并放入加热的解冻液中,并将附着在卵子冷冻工具(CryoTop)的卵子分离并处理的过程(3过程-4);
将所述分离的卵子移到在常温下平衡的稀释溶液并处理的过程(3过程-5);
将所述处理的卵子移到在常温下平衡的两个洗涤液并依次处理的过程(3过程-6);及
在上述过程后,为恢复培养,在所述预培养的恢复培养基中培养的过程(3过程-7)。
3. 一种根据权利要求1或2所述的方法形成的冷冻解冻卵子。

玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法及冷冻解冻卵子

技术领域

[0001] 本发明涉及一种玻璃化冷冻并解冻用于体细胞克隆的动物的卵子的方法,更详细地,涉及一种玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法及根据该方法的冷冻解冻卵子。

背景技术

[0002] 体细胞克隆是指,去除卵子的核之后,移植想要克隆的体细胞的核,从而制备具有与体细胞相同的遗传信息的克隆生物。体细胞克隆是一种无需卵子和精子结合的受精过程也能够通过体细胞核移植诞生生命体的划时代的技术。目前,体细胞克隆技术已广泛用于有用动物生产、用于昂贵药物生产的转化动物的生产、濒危动物物种的克隆、宠物克隆及再生医学等。

[0003] 体细胞克隆需要在体外长时间利用微操纵器进行精细的机械技术和化学处理,如:从供体卵去除核的脱核(enucleation)过程;将体细胞移植到脱核的供体卵的核移植(nuclear transfer)过程;体细胞和供体卵的细胞融合(cell fusion)过程;诱导细胞融合的供体卵的细胞质活性的卵活性(ovum activation)过程及培养(culture)已处理所有过程的体细胞克隆受精卵的过程等。其中,作为基本材料需要供体卵子和具有想要克隆的遗传信息的体细胞。Wilrnut等人于1997年在英国首次报道了绵羊的体细胞克隆动物生产后,也相继报告了对家鼠(Wakayama等,1998)、山羊(Baguisi等,1999)、猪(Polejaeva等,2000)、兔子(Chesne等,2002)、猫(Shin等,2002)等多个物种的研究结果,并在1998年由Kato等人 and Cibelli等人对克隆牛的生产进行了研究结果报告,在韩国,Im等人(2001)和Kim等人(2010)对克隆韩牛的生产进行了报告。然而,已知,体细胞克隆动物生产效率为不足5%(Heyman等,2002;Yang等2008)。

[0004] 为体细胞克隆,只要事先冷冻保存体细胞,即可在需要时解冻并随时使用,且能够通过增殖过程获得多个细胞,即使损失一部分,也能够用于克隆。这是由于体细胞冷冻方法已被普及,并且存活率高,在确保用于体细胞克隆的细胞数方面没有困难。

[0005] 相反,由于供体卵卵子仅可在屠宰时获得的卵巢中回收,当发生如口蹄疫等突发性自然灾害时或难以进行屠宰而无法获得卵巢时,无法获得新鲜的卵子,因此,无法用于体细胞克隆。因此,为卵子的持续供给,需要冷冻保存未受精卵子。另外,全世界正在努力保护并恢复由于环境污染或自然破坏而濒临灭绝的动物或繁殖力低下的动物,如果能够实现挑选并保存优质的卵子,不仅可用于体细胞克隆研究,还可以随时用于需要卵子的其他研究。

[0006] 这种冷冻保存的核心技术在于处理在细胞内占据约90%的水。水在冷冻过程中形成尖锐的冰结晶,这会使细胞膜受损,解冻后导致细胞死亡。与普通体细胞或精子相比,哺乳类的卵子的大小约为120~150 μm ,这大约是5万倍以上,与其他细胞相比,细胞内不仅存在大量的水,尤其,就成熟的卵子而言,将其与染色体分离的染色体裂解机构直接暴露于细胞质内,难以进行冷冻保存。因此,需要即使经过冷冻过程也能够安全地保护卵子的技术,附加地,还需要在冷冻及解冻后也能够提高卵子的存活率的技术。

[0007] 尤其,与哺乳类不同,作为犬科动物的狗具有独特的繁殖生理系统,排出未成熟的

卵子并在输卵管中2~3天后成熟受精,体内卵子的采取时期决定实验成果。由此,在无法确保同一时期发情的实验犬时,需要通过玻璃化冷冻确保充分数量的卵子的技术,但目前,这种实验结果及技术非常短缺。

发明内容

[0008] 发明要解决的问题

[0009] 与哺乳类不同,作为犬科动物的狗具有独特的繁殖生理系统,排出未成熟的卵子并在输卵管中2~3天后成熟,然后受精,体内卵子的采取时期决定实验成果。由此,在无法确保同一时期发情的实验犬时,需要通过玻璃化冷冻确保充分数量的卵子的技术,但目前,这种实验结果及技术非常短缺。

[0010] 另外,迄今为止,已尝试冷冻狗的未成熟卵子,但由于体外成熟系统仍然不足,成熟卵子的玻璃化冷冻技术的应用价值显著降低,导致狗的体细胞克隆的应用性不周。

[0011] 因此,本发明提供一种采取狗的成熟卵子并能够进行玻璃化冷冻的犬科动物的玻璃化冷冻卵子生产方法,另外,还提供根据这种生产方法的冷冻卵子。

[0012] 用于解决问题的方案

[0013] 为解决上述目的及要求,本发明提供一种玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法,执行如下所述的过程:

[0014] 采取犬科动物的成熟卵子的过程(1过程),

[0015] 执行玻璃化冷冻上述采取的卵子的过程(2过程);

[0016] 并包括:

[0017] 准备混合液、平衡液、玻璃化溶液的过程(2过程-1),

[0018] 所述混合液是在100重量份的10~30%血清替代补充剂(Serum Substitute Supplement, SSS)中混合300~1000重量份的改良的HTF培养基-含庆大霉素的HEPES (Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin, mHTF)而得的,

[0019] 所述平衡液由6.5~8.5% (v/v)的甘醇(Ethylene glycol)、6.5~8.5% (v/v)的二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide)、10~30%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)及含有25~45μg/mL的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液构成,

[0020] 所述玻璃化溶液(Vitrification Solution)由5~25% (v/v)的甘醇(Ethyleneglycol)、5~25% (v/v)的二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide)、10~30%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、0.3~0.6M的蔗糖(Sucrose)、含有25~45μg/mL的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液构成;

[0021] 经过去除所述回收的卵子的卵丘细胞的过程(denuding)的过程(2过程-2);

[0022] 用在室温下平衡的混合液处理所述去除卵丘细胞的成熟的卵子的过程(2过程-3);

[0023] 在含有所述卵子的混合液添加平衡液并处理后,再添加平衡液处理的过程(2过程-4);

[0024] 再次用平衡液处理经过所述处理的卵子的过程(2过程-5);

[0025] 将处理的卵子移到玻璃化溶液并处理的过程(2过程-6);

[0026] 将卵子放到卵子冷冻工具并去除玻璃化溶液后立即浸渍到液氮中保存的过程(2过程-7)。

[0027] 另外,本发明提供玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法,其特征在于,包括:

[0028] 执行解冻玻璃化冷冻卵子的过程(3过程);

[0029] 执行准备解冻液、稀释溶液、洗涤液、恢复培养基的过程(3过程-1);

[0030] 解冻液(Thawing Solution)由0.5~1.5M的蔗糖(Sucrose)、10~30%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)和含有25~45 μ g/mL的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液构成,

[0031] 稀释溶液(Dilution Solution)由0.3~0.7M的蔗糖(Sucrose)、10~30%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)和含有25~45 μ g/mL的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液构成,

[0032] 恢复培养基(Recovery medium)由混合HEPES缓冲溶液、丙酮酸钠(Sodium pyruvate)、硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)而构成,

[0033] 在恒温箱中将解冻液(Thawing Solution)加热至35~40℃的过程(3过程-2);

[0034] 在恒温箱中将恢复培养基(Recovery medium)加热至35~40℃的过程(3过程-3);

[0035] 拿出保存在液氮中的卵子冷冻工具(CryoTop)并放入加热的解冻液中,并将附着在卵子冷冻工具(CryoTop)的卵子分离并处理的过程(3过程-4);

[0036] 将所述分离的卵子移到在常温下平衡的稀释溶液并处理的过程(3过程-5);

[0037] 将所述处理的卵子移到在常温下平衡的两个洗涤液并依次处理的过程(3过程-6);

[0038] 在上述过程后,为恢复培养,在所述加热恢复培养基中培养的过程(3过程-7)。

[0039] 另外,本发明提供以如上所述的玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法形成的冷冻解冻卵子。

[0040] 发明效果

[0041] 由于混合液、平衡液、玻璃化溶液的技术特性及玻璃化冷冻方法,本发明的玻璃化冷冻犬科动物的卵子的方法,能够防止冷冻过程中卵子内的冰结晶形成,能够去除细胞内的相当一部分的水,另外,由于使用立即放入液氮中冷冻的超极速冷冻法,能够防止冰结晶以保护细胞壁和膜,能够显著降低毒性并显著提高存活率。

[0042] 另外,由于解冻液、稀释溶液、洗涤液、恢复培养基的技术特征及解冻方法的特征,本发明的玻璃化冷冻犬科动物的卵子的方法,具有能够显著提高冷冻解冻卵子的存活率的效果,由此,本发明的冷冻解冻卵子能够显示出高的核移植培养效果。

[0043] 另外,与现有的狗玻璃化冷冻卵子生产技术由于发情周期不同难以同步实验日程相反,本发明的玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法及根据该方法的冷冻解冻卵子,即使在不同的日子发情,也可将采取的卵子通过玻璃化冷冻技术来同步实验日程,能够显示出高的核移植及受精的效果。

附图说明

[0044] 图1是关于本发明的一实施例的卵子冷冻工具CryoTop(Kitazato, Japan)。

- [0045] 图2是关于在玻璃化冷冻并解冻狗的成熟卵子的过程中的成熟卵子的状态的照
片。
- [0046] 图3是关于在玻璃化冷冻并解冻狗的成熟卵子的过程中的成熟卵子的状态的照
片。
- [0047] 图4是关于在玻璃化冷冻并解冻狗的成熟卵子的过程中的成熟卵子的状态的照
片。
- [0048] 图5是关于在玻璃化冷冻并解冻狗的成熟卵子的过程中的成熟卵子的状态的照
片。
- [0049] 图6是关于在玻璃化冷冻并解冻狗的成熟卵子的过程中的成熟卵子的状态的照
片。
- [0050] 图7是关于在玻璃化冷冻并解冻狗的成熟卵子的过程中的成熟卵子的状态的照
片。

具体实施方式

[0051] 本发明涉及玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法,执行如下所述过程:采取犬科动物的成熟卵子的过程(1过程),执行玻璃化冷冻上述采取的卵子的过程(2过程);包括:准备混合液、平衡液、玻璃化溶液的过程(2过程-1);去除所述回收的卵子的卵丘细胞的过程(denuding)(2过程-2);用在室温下平衡的混合液处理所述去除卵丘细胞的成熟的卵子的过程(2过程-3);在含有所述卵子的混合液添加平衡液并处理后,再添加平衡液处理的过程(2过程-4);再次用平衡液处理经过所述处理的卵子平衡液的过程(2过程-5);将经过处理的卵子移到玻璃化溶液并处理的过程(2过程-6)及将卵子置于卵子冷冻工具并去除玻璃化溶液后立即浸渍到液氮中保存的过程(2过程-7)。

[0052] 以下,将参考附图对本发明进行详细说明。

[0053] 本发明提供犬科动物的玻璃化冷冻卵子生产方法及根据这种玻璃化冷冻卵子生产方法的犬科动物的冷冻卵子。

[0054] 本发明首先执行采取犬科动物的成熟卵子的过程(1过程)。

[0055] 本发明中犬科动物指狐狸、貉子、狼、野狗、家犬(畜犬)等,代表性的指狗。

[0056] 本发明执行从1~5龄的杂交发情犬以手术的方法回收成熟的卵子的方法。

[0057] 尤其,本发明自观察到发情之日起,每天进行采血并利用Vetchroma(Anivet, Korea)测量血清内孕酮(P4)。将孕酮浓度为10ng/mL以上的日子定为排卵日,并在接下来的72小时后通过外科手术在体内回收(采取)成熟的受核卵子。

[0058] 采取受核卵子的过程,以5~7mg/mL,优选为6mg/mL的氯胺酮(ketamine)麻醉发情犬后,以1.5~2.5%,优选为2%的异氟烷(isoflurane)维持麻醉,并进行手术。

[0059] 开腹并拿出子宫固定后,通过形成卵巢的囊的缝隙,在输卵管的起点安装冲洗针(flushing needle)。在邻近输卵管接合部的输卵管插入血管内导管(IV catheter)并使用冲洗液回收成熟的卵子。

[0060] 本发明执行玻璃化冷冻上述采取的卵子的过程(2过程)。

[0061] 本发明的玻璃化冷冻上述采取的卵子的过程以下述的详细过程执行。

[0062] 本发明的技术特征在于用于下述的玻璃化冷冻过程的混合液、平衡液、玻璃化溶

液的结构。

[0063] 本发明在所述混合液、平衡液、玻璃化溶液存在技术特征,使用这种混合液、平衡液、玻璃化溶液玻璃化的冷冻卵子具有如下效果:能够防止冷冻过程中卵子内的冰结晶形成;能够去除细胞内的相当一部分的水;能够保护细胞壁和膜;毒性显著降低并显著提高存活率。

[0064] 本发明在执行玻璃化冷冻过程之前,执行准备混合液、平衡液、玻璃化溶液的过程(2过程-1)。

[0065] 本发明的混合液指混合血清替代补充剂(Serum Substitute Supplement,SSS)、改良的HTF培养基-含庆大霉素的HEPES(Modified HTFMedium-HEPES with Gentamicin,mHTF)而组成的液体。

[0066] 本发明的混合液在100重量份的10~30%血清替代补充剂(SerumSubstitute Supplement,SSS)中混合300~1000重量份的改良的HTF培养基-含庆大霉素的HEPES(Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin,mHTF)为宜。

[0067] 优选准备在20%的血清替代补充剂(Serum Substitute Supplement,SSS)中混合改良的HTF培养基-含庆大霉素的HEPES(ModifiedHTFMedium-HEPES with Gentamicin,mHTF)的混合液。

[0068] 本发明的平衡液(Equilibration Solution)包含甘醇(Ethylene glycol)、二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide)、葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)及含有硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液而组成。

[0069] 本发明在执行玻璃化冷冻过程之前,执行准备混合液、平衡液、玻璃化溶液的过程(2过程-1)。

[0070] 本发明的混合液指混合血清替代补充剂(Serum Substitute Supplement,SSS)、改良的HTF培养基-含庆大霉素的HEPES(ModifiedHTFMedium-HEPES with Gentamicin,mHTF)而组成的液体。

[0071] 本发明的混合液在100重量份的10~30%血清替代补充剂(SerumSubstitute Supplement,SSS)中混合300~1000重量份的改良的HTF培养基-含庆大霉素的HEPES(Modified HTF Medium-HEPES with Gentamicin,mHTF)为宜。

[0072] 优选准备在20%的血清替代补充剂(Serum Substitute Supplement,SSS)中混合改良的HTF培养基-含庆大霉素的HEPES(ModifiedHTFMedium-HEPES with Gentamicin,mHTF)的混合液。

[0073] 本发明的平衡液(Equilibration Solution)包含甘醇(Ethylene glycol)、二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide)、葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)及含有硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液而组成。

[0074] 本发明执行准备平衡液(Equilibration Solution)并平衡的过程,所述平衡液包含6.5~8.5%(v/v)的甘醇(Ethylene glycol)、6.5~8.5%(v/v)的二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide)、10~30%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、含有25~45μg/mL的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液构成。

[0075] 在本发明中所述的含有硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液可使用以TCM199(商品名)的名称通用的溶液。

[0076] 本发明更优选地准备由7.5% (v/v) 的甘醇 (Ethylene glycol)、7.5% (v/v) 的二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide)、20% 的葡聚糖血清补充剂 (Dextran Serum Supplement)、含有35 μ g/mL 的硫酸庆大霉素 (gentamicin sulfate) 的HEPES缓冲溶液 (TCM199, 商品名) 构成的平衡液 (Equilibration Solution) 并平衡。

[0077] 本发明执行准备由甘醇 (Ethylene glycol)、二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide)、葡聚糖血清补充剂 (Dextran Serum Supplement)、蔗糖 (Sucrose)、含有硫酸庆大霉素 (gentamicin sulfate) 的HEPES缓冲溶液构成的玻璃化溶液 (Vitrification Solution) 并在常温下平衡的过程。

[0078] 本发明执行准备由5~25% (v/v) 的甘醇 (Ethylene glycol)、5~25% (v/v) 的二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide)、10~30% 的葡聚糖血清补充剂 (Dextran Serum Supplement)、0.3~0.6M 蔗糖 (Sucrose)、含有25~45 μ g/mL 的硫酸庆大霉素 (gentamicin sulfate) 的HEPES缓冲溶液构成的玻璃化溶液 (Vitrification Solution) 并在常温下平衡0.5~2小时的过程。

[0079] 优选执行准备由15% (v/v) 的甘醇 (Ethylene glycol)、15% (v/v) 的二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide)、20% 的葡聚糖血清补充剂 (Dextran Serum Supplement)、0.5M 的蔗糖 (Sucrose)、含有35 μ g/mL 的硫酸庆大霉素 (gentamicin sulfate) 的HEPES缓冲溶液 (TCM199) 构成的玻璃化溶液 (Vitrification Solution) 并在常温下平衡0.5~2小时的过程。

[0080] 所述平衡是指, 放置混合试剂使其浓度均匀且类似于常温状态, 以能够在常温下使用。

[0081] 本发明执行利用透明质酸酶 (hyaluronidase) 去除 (denuding) 所述回收的卵子的卵丘细胞的过程 (2过程-2)。

[0082] 本发明执行利用0.01~0.2% 的透明质酸酶 (hyaluronidase) 去除 (denuding) 所述回收的卵子的卵丘细胞的过程。

[0083] 优选地, 利用0.1% 透明质酸酶 (hyaluronidase) 执行卵丘细胞去除过程 (denuding) 并检测卵子是否成熟, 以能够使用成熟的卵子。

[0084] 本发明执行将去除所述卵丘细胞的成熟的卵子在以室温平衡的混合液10~30 μ L 液滴 (drop) 中处理0.5~2分钟的过程 (2过程-3)。

[0085] 本发明中使用的液滴 (drop) 是指水滴状的液滴。

[0086] 优选地, 执行将去除所述卵丘细胞的成熟的卵子在以室温平衡的混合液 (含有20% 血清替代补充剂的改良的HTF培养基-含庆大霉素的HEPES溶液) 20 μ L 液滴 (drop) 中处理1分钟的过程。

[0087] 本发明实施在包含所述的卵子的混合液中添加10~30 μ L 液滴 (drop) 平衡液处理1~3分钟后, 再添加10~30 μ L 液滴 (drop) 平衡液并再处理1~3分钟的过程 (2过程-4)。

[0088] 优选地, 执行在包含卵子的混合液中添加20 μ L 液滴 (drop) 平衡液处理2分钟 (共40 μ L) 后, 再添加20 μ L 液滴 (drop) 平衡液处理2分钟 (共60 μ L) 的过程。

[0089] 本发明执行再次用平衡液处理所述经过处理的卵子5~7分钟的过程 (2过程-5)。

[0090] 优选地, 将经过所述处理的卵子用20 μ L 液滴 (drop) 平衡液处理6分钟。

[0091] 图2是示出卵子的玻璃化冷冻前的照片, 图3是示出用平衡液处理的卵子的照片。

[0092] 本发明执行将所述经过处理的卵子移到玻璃化溶液处理0.5~3分钟的过程(2过程-6)。

[0093] 优选地,将所述经过处理的卵子移到50 μ L液滴(drop)玻璃化溶液处理1分钟。

[0094] 图4示出用玻璃化溶液处理的卵子的照片。

[0095] 本发明在所述过程后,执行将卵子放到卵子冷冻工具并将玻璃化溶液去除到最少后,立即浸渍到液氮中保存的过程(2过程-7)。

[0096] 本发明的将卵子放到卵子冷冻工具并将玻璃化溶液去除到最少是指,适当地去除卵子周边的玻璃化溶液。

[0097] 所述卵子冷冻工具是指在末端放上卵子并浸渍到液氮中冷冻的工具,作为卵子冷冻工具可使用CryoTop (Kitazato, Japan)。

[0098] 如图1所示,CryoTop (Kitazato, Japan)是指用于冷冻卵子的工具。

[0099] 本发明执行解冻以如上所述的方法执行的玻璃化冷冻卵子的过程(3过程)。

[0100] 本发明中解冻的过程指解除冷冻的过程。

[0101] 本发明执行准备解冻液、稀释溶液、洗涤液、恢复培养基的过程(3过程-1)。

[0102] 本发明的技术特征在于所述的解冻液、稀释溶液、洗涤液、恢复培养基,使用这种解冻液、稀释溶液、洗涤液、恢复培养基解冻的玻璃化冷冻卵子(冷冻解冻卵子)的存活率显著地提高,由此本发明的冷冻解冻卵子能够显示出高的核移植培养效果。

[0103] 本发明的解冻液(Thawing Solution)包含蔗糖(Sucrose)、葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、含有硫酸庆大霉素(gentamicinsulfate)的HEPES缓冲溶液而构成。

[0104] 本发明的解冻液(Thawing Solution)包含0.5~1.5M的蔗糖(Sucrose)、10~30%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、含有25~45 μ g/mL的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液而构成。

[0105] 优选地,当解冻液(Thawing Solution)包含1.0M的蔗糖(Sucrose)、20%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、含有35 μ g/mL的硫酸庆大霉素(gentamicinsulfate)的HEPES缓冲溶液而构成时,有效。

[0106] 本发明的稀释溶液(Dilution Solution)包含蔗糖(Sucrose)、葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、含有硫酸庆大霉素(gentamicinsulfate)的HEPES缓冲溶液而构成。

[0107] 本发明的稀释溶液(Dilution Solution)包含0.3~0.7M的蔗糖(Sucrose)、10~30%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、含有25~45 μ g/mL的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液而构成。

[0108] 优选地,当稀释溶液(Dilution Solution)包含0.5M的蔗糖(Sucrose)、20%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)和含有35 μ g/mL的硫酸庆大霉素(gentamicinsulfate)的HEPES缓冲溶液而构成时,有效。

[0109] 本发明的洗涤液(Washing Solution)包含葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、含有硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液而构成。

[0110] 本发明的洗涤液(Washing Solution)包含15~25%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、含有25~45 μ g/mL的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)

的HEPES缓冲溶液而构成。

[0111] 优选地,当洗涤液(Washing Solution)包含20%的葡聚糖血清补充剂(Dextran Serum Supplement)、含有35 μ g/mL的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)的HEPES缓冲溶液(商品名TCM199)而构成时,有效。

[0112] 本发明的恢复培养基(Recovery medium)混合HEPES缓冲溶液、丙酮酸钠(Sodium pyruvate)、硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)而组成。

[0113] 优选地,恢复培养基(Recovery medium)在100重量份的HEPES缓冲溶液中混合0.5~2重量份的丙酮酸钠(Sodium pyruvate)、0.5~2重量份的硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate)、2~10重量份的胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)而制备。

[0114] 本发明执行将解冻液(Thawing Solution)置于25~45mm皿中,并在恒温箱中加热至35~40℃的过程(3过程-2)。

[0115] 优选地,将解冻液(Thawing Solution)置于35mm皿中,并在恒温箱中以2~5ml的量加热至37~38℃的过程。

[0116] 本发明执行将恢复培养基(Recovery medium)放入恒温箱中加热的过程(3过程-3)。

[0117] 优选地,将恢复培养基(Recovery medium)分株到4孔盘中,并在恒温箱中以37~38℃加热20~40分钟。

[0118] 本发明执行拿出保存在液氮中的所述卵子冷冻工具(CryoTop)并放入加热的解冻液中,并将附着在卵子冷冻工具(CryoTop)的卵子分离并处理1分钟的过程(3过程-4)。

[0119] 优选地,拿出保存在液氮中的卵子冷冻工具CryoTop并放入加热的解冻液中,并将附着在CryoTop的卵子分离并处理1分钟。

[0120] 本发明执行将所述分离的卵子移到在常温下平衡的30~50 μ L液滴(drop)稀释溶液并处理3~5分钟的过程(3过程-5)。

[0121] 优选地,将所述分离的卵子移到在常温下平衡的40 μ L液滴(drop)稀释溶液并处理4分钟。

[0122] 本发明执行将所述经过处理的卵子移到在常温下平衡的两个30~50 μ L液滴(drop)洗涤液中,并依次处理3~5分钟的过程(3过程-6)。

[0123] 优选地,将处理的卵子移到在常温下平衡的两个40 μ L液滴(drop)洗涤液中,并依次处理4分钟。

[0124] 本发明在所述解冻过程后,为恢复培养,执行在所述加热的恢复培养基中培养1~3小时的过程(3过程-7)。

[0125] 优选地,在所述解冻过程后,为恢复培养,在恢复培养基中培养2小时为宜。

[0126] 图5是示出用解冻液处理卵子的照片。

[0127] 图6是示出用稀释溶液处理的照片。

[0128] 图7是示出用洗涤液处理卵子的照片。

[0129] 本发明对以所述过程用玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法处理的冷冻解冻卵子实行了存活性检查(冷冻解冻卵子的存活性检查),获得了如下[表1]所示的结果。

[0130] [表1]

[0131]	玻璃化冷冻卵子数	解冻后卵子存活率	恢复培养后卵子存活率
	59	56 (95%)	53 (90%)

[0132] 可知,在总玻璃化冷冻卵子中,解冻后卵子存活率非常高,为95%,尤其,恢复培养后的卵子存活率也超过90%,能够看出存活率显著提高的效果。

[0133] 另外,恢复培养后,通过体细胞核移植实验,比较了能够用于实验的约90%的成熟卵子(冷冻解冻卵子)和新鲜卵子,从而比较了表2所示的效率性。

[0134] [表2]

[0135]	对照组	培养	分化 (%)	8细胞 (%)	16细胞 (%)	胚盘胞 (%)
	新鲜卵子	115	101 (87.8)	77 (67.0)	51 (44.4)	9 (7.8)
	解冻后卵子	50	29 (58.0)	23 (46.0)	19 (38.0)	3 (6.0)

[0136] [通过核移植实验的新鲜卵子和解冻后卵子(冷冻解冻卵子)的效率性比较]

[0137] 如上所述,本发明的冷冻解冻卵子与利用新鲜卵子的结果相比,在实验过程中没有发现重大的缺陷,并得出了与新鲜卵子的结果相近的研究结果,可知,本发明的冷冻解冻卵子具有显著高的核移植培养效果。

[0138] 即,在胚盘胞步骤中得出新鲜卵子和本发明的冷冻解冻卵子的存活(%)比例相近的研究结果,可知,本发明的冷冻解冻卵子具有显著高的核移植培养效果。

[0139] 本发明提供由所述功能和效果构成的玻璃化冷冻并解冻犬科动物的卵子的方法及根据该方法的冷冻解冻卵子。

[0140] 工业实用性

[0141] 本发明对生产、制备、销售、流通、研究用于体细胞克隆的动物的卵子的工业非常有用。

[0142] 尤其,本发明对生产、制备、销售、流通、研究玻璃化冷冻并解冻用于体细胞克隆的动物的卵子的技术和装置非常有用。



图1

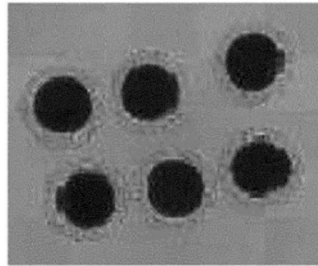


图2

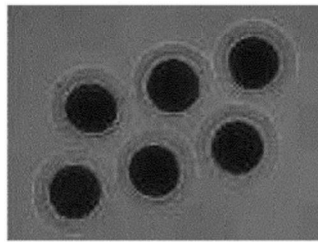


图3

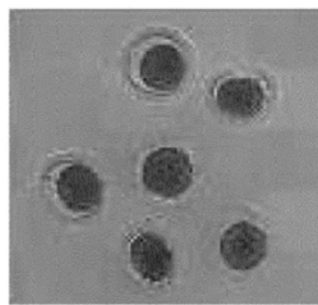


图4

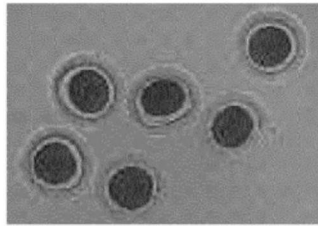


图5

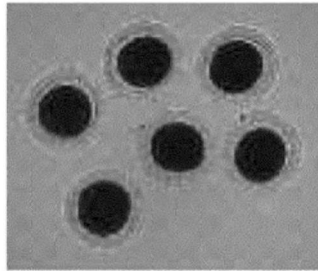


图6

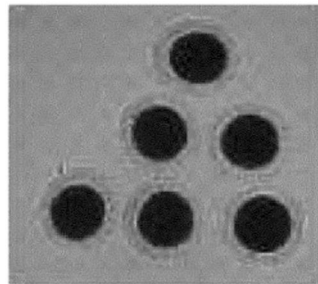


图7