

# 显微外科切割家兔胚泡产生同卵双胎

马玉斌

(西北大学生物系, 西安)

庄海博

(陕西省动物研究所, 西安)

杜 森 李光三

(中国科学院发育生物研究所, 北京)

本文介绍外科切割家兔胚泡产生同卵双胎。各期胚泡是从自然排卵的家兔采得的。移植切割早期胚泡的8只受体母兔, 2只妊娠, 怀孕率为25%; 移植切割中期胚泡的7只母兔, 3只妊娠, 怀孕率47%; 移植切割晚期胚泡的6只母兔, 3只妊娠, 怀孕率50%, 共产仔兔七窝。总共移植83对同卵半胚, 获仔兔24只, 其中7对同卵双胎。实践证明, 应用胚泡切割获得家兔同卵双胎的途径是可行的。

**关键词** 家兔; 分割胚泡; 半胚; 同卵双胎

业已证实, 在小鼠、家兔、猪、羊、牛、马等哺乳动物中, 16细胞以前的早期胚胎, 经人工分割后的每一个分裂球, 都有可能发育为一个完整的个体<sup>[1-8]</sup>。卵裂期的早期胚胎的同卵双胎或多胎, 通常是采用显微操作, 将分割的分裂球吸出, 存入预先制备的空透明带里, 进行体外或体内培养, 选择其中发育正常的胚胎, 移植给受体母畜或行自体移植, 获得幼仔, 但其操作程序烦琐, 设备要求较高, 而且技术非常熟练, 这就影响它的应用与发展。近年来, 正在探索更加简便有效的分割方法, 并寻找与之相适应的比较合适的发育阶段, 所以开展了切割小鼠、猪、羊、牛等动物的桑椹胚、囊胚(胚泡)以及孵化胚泡的研究, 获得了同卵双胎<sup>[9-15]</sup>。采用胚泡或孵化胚泡制取半胚, 一般无需另行培养, 可以直接移植, 实验简便易行, 技术难度不大, 对良种大家畜的扩增具有

重要经济意义。近几年来, 国内虽已开展了小鼠、牛、羊等动物的胚胎分割课题研究, 但得率不高, 而且也是借助高级显微操作器来完成的, 这就今后很难推广应用了。为了简化胚胎切割的操作程序, 我们采用简易的徒手外科切割技术; 为了深入探索兔胚内细胞团的发育能力, 我们选用各期胚泡为研究对象, 以便为今后开展家畜胚胎分割的课题研究提供必要的经验和手段。

## 材 料 和 方 法

### (一) 胚泡分期

选用大耳白、青紫蓝短毛兔和安哥拉

本文于1988年12月26日收到。

本研究为国家自然科学基金资助课题。

参加试验的还有王效涵、郭春林、雷颖虎同志。

长毛兔为供体,于自然交配后的 $3\frac{1}{2}$ — $4\frac{1}{4}$ 天采集早期胚泡,  $4\frac{1}{2}$ —5天采集中期胚泡, 5—6天采集晚期胚泡。胚泡的分期,主要是根据胚胎的形态发育变化而划分的。早期胚泡,胚胎尚未明显增大,透明带外的粘蛋白层较厚,内细胞团显著,它占据胚泡腔的一角,囊胚腔已有所扩大(图版 I-1)。中期胚泡,胚胎已经膨大为明亮的圆形囊泡,其体积已几倍于早期胚泡,内细胞团已呈盘状,囊胚腔显著扩大(图版 I-2),但胚外的粘蛋白层和透明带仍清晰可辨。晚期胚泡,胚胎呈特大圆球形或椭圆形的囊泡;肉眼可见。随着胚胎体积的显著增大,粘蛋白层和透明带因而变薄,二者的界限已难以区分,紧包围在胚泡之外。此时内细胞团呈浅帽状,由于重心关系,它常常位于胚泡的下方。不久,晚期胚泡的粘蛋白层与透明带变得极度微薄,胚胎已临近孵化。胚胎若破膜而出者为孵化胚泡。

## (二) 胚胎采集

本试验是应用手术法采集兔胚的,  $3\frac{1}{2}$ 天的胚泡由冲洗输卵管采得,而4天以后的各期胚泡均由冲洗子宫角获得。将采到的胚泡迅速移入培养液中,更换1—2次,然后转入含蛋白酶的消化液中,  $37^{\circ}\text{C}$ , 3—5 min 即可消除粘蛋白层和透明带,一俟胚泡脱出卵膜,立即移入手术液皿内,更液2—3次后才可进行切割。

## (三) 胚胎切割

切割胚泡是在室温条件下,借助立体显微镜进行徒手操作的。切割工具是用自行拉制的玻璃微针,烧成一定的角度。不同的胚泡选用不用粗细的微针。切割时将胚泡拨到合适的位置,使内细胞团位于胚泡的上方,然后将玻璃微针通过内细胞团的正中央,垂直下切,平分胚泡,最好能一次切成,切口齐平。半胚切成后,静置

片刻,待切口稍稍收合,即可进行移植(图版 I-3)。

## (四) 半胚移植

本试验切成的半胚不另行培养,而是直接移植。移植前将每个胚泡切成的半胚分开,一半用于移左子宫角,一半移右子宫角。每只受体母兔可移半胚3—4对,但多则可移6—8对,少则移植2对。移植是用手术法进行的。选用与供体发情同步的假孕短毛兔或长毛兔为受体。剖腹之后,首先检查每只母兔卵巢的排卵状况,有明显排卵斑者才能用作受体。

## (五) 用液的制备

冲卵液为 PBS+0.5%兔血清,培养液则加20%兔血清,0.5%链霉蛋白酶的 Hank 氏液用作消化液,而手术液则为 Hank 氏液+20%兔血清。

本研究是在1986年9月至1987年8月间进行的。

# 结 果

## (一) 胚泡切割与半胚移植

表1约有80%的早期胚泡,64%的中期胚泡以及78%的晚期胚泡可选择用于显微操作切成半胚。

在早期胚泡中,将25对半胚分别移植给8只受体母兔,2例妊娠,这2只怀孕母兔,共移半胚5对,产仔兔7只。中期胚泡中,将30对半胚移植给7只受体母兔,3只妊娠,其中2只产仔母兔,共移7对半胚,产仔兔2只。在晚期胚泡中,将28对半胚移植给6只受体母兔,3例妊娠,共移半胚13对,获仔兔15只。

## (二) 妊娠与产仔

表2中,7只产仔的受体母兔,怀孕周期为30—32天,配种同步差范围为+1—-1天。孕期基本正常。

表 1. 家兔胚泡切割和半胚移植结果  
Table 1 Results of blastocysts bisected and demi-embryos transferred in rabbits

	胚泡发育分期 Stages of blastocysts development		
	早期胚泡 Early blastocyst 3½—4¼ days	中期胚泡 Metaphase blastocyst 4½—5 days	晚期胚泡 Late blastocyst 5—6 days
采到胚胎数 Nos. of embryos collected	31	47	36
切割胚胎数 Nos. of embryos bisected	25	30	28
移植半胚数 Nos. of demi-embryos transferred	2×25	2×30	2×28
移植母兔数 Nos. of transfer recipient rabbits	8	7	6
怀孕母兔数(%) Nos. of pregnant recipient rabbits	2(25)	3(47)	3(50)
产仔母兔移植半胚数 Nos. of demi-embryos transferred of producing young recipient	10	14	26
产仔母兔数 Nos. of producing young recipient	2	2	3
仔兔数(%) Nos. of young obtained	7(70)	2(14.3)	15(57.7)

表 2 移植家兔胚泡半胚妊娠和产仔结果  
Table 2 Results of gestation and young born after transfer of demi-blastocysts in rabbits

胚泡分期 Stages of blastocyst	孕兔编号 Pregnant rabbit No.	移植半胚数 Nos. of demi-embryos transferred	产仔兔数 Nos. of young born	怀孕天数 Duration of pregnancy(days)	配种同步差 Mating synchronization	仔兔性别 Sexuality of young
早期胚泡 Early blastocyst	309	6	3	31 $\frac{1}{2}$	+ $\frac{1}{2}$	1♀, 2♂
	308	4	4	32	+ 1	2♀, 1♂
中期胚泡 Metaphase blastocyst	1—5	8	1	30	0	1♀
	330	6	1	30	0	1♂
晚期胚泡 Late blastocyst	205	16	6	30	0	1♀, 1♂
	213	4	3	32	- 1	1♀, 2♂
	334	6	6	31	0	2♀, 4♂

早期胚泡半胚移植怀孕的 2 例中, 1 例移植半胚 3 对, 产仔兔 1 雌 2 雄; 1 例移植半胚 2 对, 产仔兔 4 只, 但其中有 1 仔兔被母兔咬坏, 无法进行检查。中期胚泡半胚移植妊娠的 2 例中, 共移半胚 7 对, 仅获仔兔 2 只, 晚期胚泡半胚移植的 3 例中, 1 例移植半胚 8 对, 产仔兔 6 只, 其中 4 只仔兔被母兔咬死, 无法进行性别鉴别; 1 例移植半胚 2 对, 获仔兔 3 只, 其中 1 雌 2 雄; 另 1 例中, 移植半胚 3 对, 产仔兔 6 只 (图版 I-4)。

## 讨 论

表 I 表明, 本研究早中晚期胚泡的半胚移植均可获得成功, 这证明了家兔卵子也属于典型的调整型卵, 这种卵子不仅在早期各卵裂阶段发育上具有调整能力<sup>[3]</sup>, 而且发育至晚期胚泡阶段, 还具有一定的调整能力。因此可以认为家兔胚泡的内细胞团在发育上也是全能性的。

本研究应用家兔胚泡制取半胚获得同卵双胎的试验基本上是成功的。应用胚泡比应用早期卵裂期的胚胎制取半胚有很多优点, 最突出的是切成的半胚不需另行培养, 可以直接移植, 这样, 不但可以不必依赖于精良的仪器设备, 大大地简化操作程序, 而且技术难度不大, 移植易于成活。所以, 选择这个发育阶段的胚胎制取半胚还是比较合适的。

兔胚和其他哺乳动物的胚胎不同, 当处于各个早期发育阶段时, 在其透明带之外, 包有一层厚薄不同的特异性粘蛋白层, 据了解, 这种粘蛋白层的存在对胚泡的种植有重要作用。但从技术上, 由于这种粘蛋白层的存在, 对显微切割制取半胚时造成很大的不便, 我们采用酶法消除, 终于能够较好地切成半胚; 获得同卵双胎。我们这种去膜半胚移植成功, 却也表明了这种粘蛋白层对兔胚的子宫种植似乎并无多大的实际意义。

## 参 考 文 献

- [1] Tarkowski, A. K. et al.: *J. Embryol. Exp. Morph.*, 18:155—180, 1967.
- [2] Fiser, P. S. et al.: *Can. J. Anim. Sci.*, 56:33—36, 1976.
- [3] Moore, N. W. et al.: *J. Reprod. Fert.*, 17:527—531, 1968.
- [4] Moore, N. W. et al.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 22:979—982, 1969.
- [5] Willadsen, S. M. et al.: *Nature.*, 277:298—300, 1979.
- [6] Willadsen, S. M. et al.: *J. Reprod. Fert.*, 59:357—362, 1980.
- [7] Willadsen, S. M. et al.: *Vet. Rec.*, 108:211—213, 1981.
- [8] Allen, W. R. et al.: *J. Reprod. Fert.*, 71:607—613, 1984.
- [9] Nogashima, H. et al.: *J. Reprod. Fert.*, 70:357—362, 1984.
- [10] Rorie, R. W. et al.: *Louisiana Agriculture.*, 28:(2), 3, 1984—1985.
- [11] McFarland, C. W. et al.: *Louisiana Agriculture*, 28(3), 1985.
- [12] Tsunoda, T. et al.: *Theriogenology.*, 24:337—343, 1985.
- [13] Ozil, J. P. et al.: *Vet. Rec.*, 110:126—127, 1982.
- [14] Williams, T. J. et al.: *Theriogenology.*, 17:114, 1982.
- [15] Yang Xiangzhong. et al.: *Biol. Reprod.*, 37:1007—1014, 1987.

# PRODUCTION OF MONOZYGOTIC RABBIT TWINS BY MICROSURGICALLY BIASECTED BLASTOCYSTS

Ma Yubin

(Department of Biology, Northwestern University, Xian)

Zhuang Haibo

(Shaanxi Institute of Zoology, Xian) \*

Du Miao Li Guangsan

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing)

The present paper showed that the monozygotic twins in rabbit were produced by mens of bisected blastocyst in manual operation. The embryos of blastocyst stages were recovered from naturally ovulated rabbit. Two of eight recipient rabbit, which received bisected blastocysts in early stage, became pregnant, the pregnancy rate made up 25 per cent of the total, three of seven rabbits became pregnant after transfer of bisected blastocysts in intermediate stage, the pregnancy rate was 47%, three of six does became pregnant by transfer bisected blastocysts in late stage, the pregnancy rate was up to 50%, and seven births were performed in total. Of the total of 83 monozygotic pairs of demi-embryo transferred, twenty-four young animals were obtained, and 7 pairs of young rabbits were identical twin rabbits. The present study indicated that it is a possible way appropriately bisected blastocyst for implantation for the purpose of producing monozygotic rabbit twins.

## Key words

Rabbit, bisected blastocyst, demi-embryo, monozygotic(identical) twin

## 图 版 说 明

### Explanation of plate

1. 早期胚泡：交配后的四天，采自子宫角，胚外已剥除粘蛋白层和透明带，胚泡边缘白色加厚的部分为内细胞团  
Early blastocysts were recovered on days 4 after mating from the rabbit uterine horn. The mucin coat and zonae pellucida out of embryo has removed. The white thicken area on blastocyst margin was the inner cell mass
2. 中期胚泡：交配后的五天，采自子宫角，粘蛋白层和透明带已被剥除，胚泡囊胚腔靠近边缘处有隐约可见的细胞团（白箭头）为内细胞团  
Metaphase blastocysts were recovered on days 5 after mating from the uterine horn. The mucin coat and zonae pellucida has been removed. There is a inappreciable plate on the margin of blastocyst blastocoele where the cell mass (white arrow) was the inner cell mass
3. 经玻璃微针切割而成的半胚  
Demi-embryos were bisected by glass microneedle
4. 半胚移植的受体母兔及其所生的同卵双生的仔兔  
Recipient rabbit and himself yeild of identical twin young animals by demi-embryo transfer

