

哺乳动物早期胚胎体外发育阻滞的研究进展

王敏康^{1,2,3}, 刘冀琰¹, 陈永福³, 陈大元¹

(1. 中国科学院动物研究所计划生育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. 中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要:哺乳动物胚胎在体外培养中普遍存在早期发育阻滞的现象。对此, 人们用形态学、生物化学、分子生物学、显微操作等手段开展了磷酸、葡萄糖、次黄嘌呤和细胞质因素对早期胚胎发育阻滞的影响的研究。本文综合分析了共培养系统的优缺点。说明了采用完全成分已知的培养液对进行有关研究的必要性。列出了有效运用于克服小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猪、羊、牛、猴等动物早期胚胎阻滞的成分已知的培养液名称。

关键词:二细胞阻滞; 葡萄糖; 磷酸; 阻滞机理; 共培养; 简单培养液

中图分类号: Q813.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2001)04-0391-05

Progress on Developmental Block in Early Stage of Mammalian Embryos Cultured *in vitro*

WANG Min-kang^{1,2,3}, LIU Ji-long¹, CHEN Yong-fu³, CHEN Da-yuan¹

(1. State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. Department of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China;

3. College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The early embryo developmental block is a common phenomenon in mammal when embryos are cultured *in vitro*. Many studies of phosphorus, glucose, hypoxanthine and cytoplasmic factors on early embryo developmental block carried out by different methods such as morphology, biochemistry, molecular biology and micromanipulation have been reviewed. The merit and shortcoming were analyzed and the necessity of using simple or components limited media overcoming early embryo developmental block were also reviewed. Media that have been shown effective in overcoming early embryo developmental block in mouse, rat, hamster, rabbit, pig, sheep, cattle and monkey were listed.

Key words: 2-cell block; phosphorus; glucose; mechanism of embryo developmental block; co-culture; simple media

哺乳动物早期胚胎发育阻滞的现象是 20 世纪 80 年代以前一段时期在进行胚胎的体外培养研究中观察到的普遍现象。人们在使用合成培养液培养不同动物的胚胎时发现小鼠和大鼠在二细胞阶段, 兔和猪在四细胞阶段, 牛、绵羊等在八至十六细胞阶段都会出现发育停止的现象。由于此方面的问题不仅涉及发育与代谢的基础理论问题, 而且克服这一现象具有广泛和重要的应用价值, 因此, 20 世纪 80 年代中期以后, 人们对此进行了多方面的研究。

哺乳动物的体外培养与三方面的因素有关: 即胚胎种类、培养液成分和培养条件。由于物种的不同, 基因型的不

同决定了物种间代谢类型和代谢途径既有共性又有差异, 也决定了它们对培养条件的不同需求。通过研究葡萄糖与磷酸对仓鼠和小鼠早期胚胎发育的影响, 人们发现两者对不同种类的胚胎具有广泛的毒害作用。不同作者从不同角度对小鼠等动物的早期胚胎发育阻滞现象进行了研究, 取得了很多进展。

1 早期胚胎发育阻滞机制的研究

1.1 分子生物学和生物化学途径的研究

Haraguchi 等^[1,2]从分子生物学的角度对磷酸导致小鼠

收稿日期: 2000-07-04; 修回日期: 2000-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(No. 39360028)资助项目。

作者简介: 王敏康(1961.7-), 男, 汉族, 云南昆明市人, 博士, 副教授, 专业: 生殖生物学。 E-mail: wangmk1998@yahoo.com。

胚胎二细胞期的阻滞现象进行了研究。他们采用定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)测量了与成熟促进因子(MPF)有关的周期蛋白 B (cyclin B) 和 cdc25B 两种因子的 mRNA 的变化。结果指出,在一细胞晚期至二细胞早期即受精后的 10~20h 和第 1 次分裂后的 0~12h 的胚胎暴露于磷酸后将导致二细胞期的阻滞。这一时期正是合子活动的起始期。周期蛋白 B 和 cdc25B 的 mRNA 水平在一细胞期并无显著变化,但在二细胞早期下降到一半。比较培养于含有和没有磷酸的不同培养液中的胚胎 mRNA 的变化,发现虽然两者的 mRNA 的量在二细胞阻滞出现后相等,但在含有磷酸的培养液中,受精后 33h 却出现了 mRNA 水平的显著降低。以上研究表明,磷酸并不直接抑制 MPF 的活动,并且在出现二细胞阻滞的胚胎中仍然有周期蛋白 B 和 cdc25B 的出现。磷酸的有害作用并不影响周期蛋白 B 的合成。因此,根据实验结果推测磷酸在胚胎基因活动起始的关键时期所产生的抑制效应是小鼠二细胞期阻滞的原因。

Matsumoto 等^[3]在大鼠的实验中发现,大鼠的晚二细胞阶段胚胎暴露于含 1.19 mol/L KH_2PO_4 的培养液中 6h 后,能发育到囊胚阶段的数目(2%~8%)与对照组(97%)相比显著降低,若暴露时间为 18 h,则所有的胚胎都停滞于二至四细胞期。胚胎阻滞的时期对应于第二个细胞周期的 $G_2 \sim M$ 期。由于 MPF 控制细胞的分裂,而其本身受磷酸化级联的调控。MPF 的激酶活动是细胞进入 M 期所需的。然而,组蛋白 H1 激酶的活动水平和 cdc25B 的磷酸化状态在有发育阻滞的胚胎中是相同的。由于 MPF 在发育阻滞的胚胎是活动的,所以磷酸化引起的大鼠二细胞胚胎发育阻滞并不是由于 MPF 的活动或其磷酸化级联引发的。

Dienhart 等^[4]认为次黄嘌呤诱导的胚胎发育阻滞依赖于次黄嘌呤的摄入和利用,以及和磷酸核糖焦磷酸(PRPP)的消耗水平有关。次黄嘌呤的摄入在二细胞阶段增加并在葡萄糖存在的情况下加剧。采用高压液相色谱证明次黄嘌呤被摄取并转化为 ATP 和 GTP,在三至四细胞阶段转移并产生更多的鸟苷酸。在次黄嘌呤-鸟嘌呤摄取酶磷酸核糖基转移酶无效突变的小鼠胚胎中,次黄嘌呤并不被胚胎摄取所以也不阻止胚胎发育。葡萄糖的存在是次黄嘌呤诱导产生发育阻滞的前提。它可使 PRPP 的水平在二细胞期胚胎增加 5.3 倍。这种增加可被次黄嘌呤消除。因此可以得出结论,次黄嘌呤到核苷酸的代谢通过对 PRPP 合成的负反馈调节途径对植入前小鼠胚胎产生抑制作用。

Loutradis 等^[5]分析了将小鼠胚胎培养于含有可增加 cAMP 的化合物如 FSH、hMG、IBMX(磷酸二酯酶抑制剂)hCG 或抑制 cAMP 的物质如 GnRH 类似物中对逆转次黄嘌呤导致的二细胞阻滞的可能性。将胚胎培养于含有上述任一种化合物而无次黄嘌呤的 Ham-10 培养液中,则不出现二细胞阻滞,胚胎可发育至囊胚阶段。在含次黄嘌呤的培养液中加入 GnRH 或 FSH 后,胚胎的囊胚形成率与只含次黄嘌呤

时的结果一致。与此不同,加入 IBMX 或 hMG 可逆转次黄嘌呤导致的发育阻滞。加入 2 mg/ml 的 hCG 也无逆转效应。添加 GnRH 类似物和 IBMX 的结果显示,与在卵母细胞中观察的不同,cAMP 的刺激可逆转次黄嘌呤诱导的胚胎阻滞,FSH 和 hCG 也对胚胎产生与不同于卵母细胞的效应。还不清楚为什么 hMG(FSH + LH)可逆转阻滞。也许较高的 cAMP 水平或较低的分解速率可解释这一现象。更进一步的证据也表明次黄嘌呤诱导的胚胎分裂停止与其诱导的卵母细胞减数分裂停止具有不同的作用机制。

1.2 细胞质因素的研究

Muggleton-Harris 等^[6]采用显微注射法将无二细胞阻滞的胚胎细胞质注射到有早期发育阻滞胚胎的细胞质中,可克服胚胎发育阻滞。表明细胞质因子的直接流动和传递包含在阻滞和克服阻滞的反应机制中。

Sekirina 等^[7]采用胚胎细胞聚合研究表现二细胞阻滞的 BALB/c 小鼠的胚胎在不同时期采用植物凝集素(PHA)聚合后对胚胎进一步发育的影响。结果发现,二细胞早期阶段的胚胎(即会发生二细胞阻滞的胚胎)与同种的 4~5 个处于二至八细胞期的胚胎(即不发生二细胞阻滞的胚胎)聚合后可在 72 h 发育至囊胚;取自二细胞早期的胚胎相互聚合后则仍然出现发育阻滞。在二细胞阶段将有二细胞阻滞的胚胎与无二细胞阻滞的胚胎相互聚合,则聚合的胚胎可发育至囊胚。Sekirina 等^[8]的实验表明,只有晚期的 BALB/c 小鼠二细胞胚胎可在体外发育至囊胚,这种发育不受培养液中是否存在 EDTA 的影响。将培养过无阻滞现象的(CBA × C57BL) F_2 小鼠从二细胞到八细胞的胚胎的培养液用于培养有二细胞阻滞的胚胎结果不能克服其二细胞阻滞。即使用 F_2 小鼠的胚胎与有阻滞的胚胎共同培养,仍然不能克服胚胎发育阻滞。亚显微分析结果表明借助 PHA 形成的紧密接触的细胞有几个微米长的连接。

1.3 细胞结构水平的研究

Barnett 等^[9]从细胞的结构水平研究了葡萄糖和磷酸对仓鼠胚胎的毒害作用。采用特异性的线粒体染料罗丹明(Rhodamine 123),观察在含有葡萄糖和磷酸两种成分的培养液中二细胞胚胎的线粒体分布情况。结果表明,在正常情况下即无二细胞阻滞的胚胎,线粒体成串分布于核的周围;而经葡萄糖和磷酸处理后出现发育阻滞的胚胎,线粒体则主要分布于细胞核与细胞膜之间的中间部分,而减少了在核周围的分布。因此可以肯定葡萄糖可引起线粒体的重新分布。此外,葡萄糖和磷酸还可减少胚胎细胞内 FITC 标记的鬼笔环肽(FITC phalloidin)染上的肌动蛋白微丝量。

2 培养系统方面的研究

有人从培养系统方面分析了培养条件对产生胚胎发育阻滞的作用。Dawson 和 Baltz^[10]的实验中通过添加 NaCl 和棉子糖证明渗透压的升高可抑制小鼠胚胎的发育。如果培

培养液中含有任何一种被证明是甘氨酸或 β 转运系统的底物,小鼠的胚胎发育在升高的渗透压环境中将得到保护。在大部分甘氨酸或 β 转运系统底物存在的条件下,小鼠的合子将越过二细胞阻滞而发育为到囊胚。最有效的渗透保护剂有甘氨酸、谷氨酰胺、甜菜碱、脯氨酸、 β -丙氨酸和亚牛磺酸。甘氨酸的有效剂量是 $50\mu\text{mol/L}$,大大低于另一个标准底物 β -丙氨酸的 1.3mmol/L 。这两种物质的保护作用是叠加的。很可能分裂阶段的小鼠胚胎在很大程度上把这些化合物用作有机渗透调节剂。Edwards研究了细胞内部pH变化对胚胎发育的影响^[11]。将小鼠的胚胎与非代谢的弱酸二甲基恶唑(DMO)共同培养,结果在合子期、二细胞期、四细胞期和八至十六细胞期的细胞内部发生显著酸化。在多种氨基酸存在的情况下,由DMO导致的酸化直到四细胞期都显著地减少,其中非必需氨基酸和谷氨酰胺对缓冲早期胚胎内部pH的能力最强。而在八至十六细胞期后,氨基酸的缓冲能力就不明显了。将胚胎培养于 30mmol/L 的DMO中,在存在非必需氨基酸和 1mmol/L 谷氨酰胺的情况下,胚胎可突破二细胞阻滞发育至扩张囊胚。

3 早期胚胎发育阻滞的克服

虽然我们在前面从不同层次和角度分析了早期胚胎发育停滞的原因,但仍有很多问题直到现在也不清楚。不断地探索,假设和实践不仅给胚胎培养提供了很多选择途径,而且也有助于我们对胚胎阻滞机制进行更为深入的研究和阐述。以下是几种有效克服胚胎发育阻滞的方式。

3.1 结扎输卵管培养法

一种有效的克服胚胎早期发育阻滞的方法是将受精卵或胚胎移入结扎的同种或异种动物的输卵管中进行培养。因为体内环境最符合胚胎发育的需要,直到现在还在采用这一方法。

3.2 共培养方法

由于哺乳动物从受精至胚胎着床前期的发育都在输卵管内进行,因此在体外采用输卵管上皮特别是输卵管膨大部分的上皮与早期胚胎进行共培养,可使大多数动物的胚胎发育至囊胚阶段。

3.3 培养液及培养系统的改进

共培养系统中有许多未知成分,影响因素复杂。为进行有关实验和分析,需要将胚胎置于成分限定或清楚的人工合成或配制的培养液中进行培养,并可在原有的培养液配方基础上,加减某些成分以克服胚胎发育早期的阻滞现象。现分述如下。

3.3.1 小鼠

小鼠是最为广泛利用的实验动物之一。与其他动物相比较,小鼠的品种最多,使用的培养液也很多。由于胚胎发育现象与小鼠的品系、培养液成分和培养条件有关,所以有关工作也集中在这三方面。最早用于小鼠胚胎培养的成分

限定的培养液为Whitten氏液,它可很好地支持从二细胞胚胎至着床前的发育。Abramczuk首先在Whitten氏液中加入EDTA使培养的远交系ICR小鼠的一细胞期胚胎达到囊胚期^[12]。其中EDTA在 $0.8\mu\text{mol/L}$ 的浓度时,可使囊胚率达70%。他们认为EDTA很可能与螯合一些金属离子而不是 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 有关。Chatot等于1989年推出了CZB培养液^[13],在5% CO_2 、5% O_2 和90% N_2 的培养条件下,它可支持一细胞期CF-1 \times B6SJL F_1 /J小鼠胚胎经72h培养后到达桑椹胚阶段。如果在三至四细胞阶段用含葡萄糖的培养液洗后至96h有48%的胚胎可达到囊胚阶段。CZB培养液的特点是含有谷氨酸并有较高的乳酸丙酮酸比值。随后Chatot等^[14]证明采用CZB培养不同品系的小鼠一细胞期胚胎,48h后加入葡萄糖或转移到含葡萄糖的CZB培养液中继续培养,分别使79%的CF-1 \times B6SJL F_1 /J、87%的DBA/2J \times B6SJL F_1 /J、95%的B6D2 F_1 /J和50%的CD-1 \times B6SJL F_1 /J小鼠胚胎发育为囊胚。

Spindle^[15-16]研究了适用于远交系小鼠合子发育的培养液,发现TE培养液可支持CD-1和CF-1小鼠的1细胞胚胎发育至囊胚阶段。他认为牛血清白蛋白(BSA)在培养液中的作用很小,而牛磺酸具有很好的效果。

昆明白小鼠是国内使用最为广泛的实验动物。因其胚胎发育中也存在严重的二细胞阻滞现象,我们对此进行了较为全面而系统的研究。发现通过增减几种培养液的成分可支持体外培养的昆明白小鼠(KM \times KM)及(C57B \times KM)小鼠一细胞期胚胎发育至囊胚。我们发现采用TE、mM16、mCZB和M16+ET均能有效克服上述两种胚胎的二细胞阻滞,并且囊胚率可分别达到85%、85%、67%和65%。另外,用PVA聚乙烯醇代替TE培养液中的BSA也可获得同样的效果^[17]。

在研究中我们发现牛磺酸在克服昆明白小鼠的二细胞阻滞中起决定性作用,而EDTA具有良好的协同作用。随后,我们进一步发现,在M16培养液基础上,添加EDTA和牛磺酸(ET, EDTA and taurine),可支持昆明白小鼠从体外受精到囊胚的发育。M16+ET的培养液配制和使用十分方便^[18]。

3.3.2 仓鼠(金黄地鼠)

Bavister的实验室在仓鼠胚胎的体外培养方面进行了大量的工作,他们指出亚牛磺酸、牛磺酸和泛酸对仓鼠的一细胞胚胎发育有重要作用^[19-20]。20世纪80年代以来提出了多种配方,其中HECM-3^[21]或HECM-6加入多种氨基酸和泛酸后可克服金黄地鼠的二细胞阻滞并发育至囊胚^[22]。

3.3.3 大鼠

Miyoshi等^[23]将在仓鼠的一细胞胚胎培养液H1ECM加以改进,获得了可支持大鼠一细胞胚胎发育至囊胚的R1ECM培养液。Oh等把R1ECM中的NaCl浓度提高到100~130mmol/L,可支持大鼠的体外受精并发育到囊胚

(91% ~ 94%)^[24]。

3.3.4 兔

Carney 等^[25]采用 RD 培养液,即按 1:1 混合 RPMI1640 和 DMEM 而成的培养液再添加胰岛素、转铁蛋白、硒和表皮生长因子,并使 BSA 的浓度达到 15mg/ml 或用 1mg/ml 的 PVA 代替 BSA 培养兔的合子期胚胎均可使其发育到囊胚。Li 等添加 2.5 ~ 10 mmol/L 的牛磺酸可使发育至扩张囊胚的比例增加至 70% ~ 78%^[26]。

3.3.5 猪

采用 mKRB^[27]和 TLH^[28]可使猪的一细胞胚胎发育至囊胚。PF-TCM^[29]可支持猪的卵母细胞体外成熟、体外受精和使 13% 的一细胞胚胎发育至囊胚。

3.3.6 羊

Garden 等^[30]采用 SOFaa + BSA 可使羊的一细胞胚胎发育至囊胚。

3.3.7 牛

适用于牛的培养液有由 Rosenkrans 和 First 推出的 CR1aa^[31]和 Tertit 介绍的 SOF^[32]培养液。Holm 等^[33]在 SOF 培养液中添加柠檬酸钠和肌醇可获得 42% ~ 45% 的囊胚率。

3.3.8 猴

Schramm 和 Bavister^[34]采用单独的 HECM-6 培养液和 CMRL-BCS 培养液及其他组分进行一步法和二步分段培养法(二步法)培养体外受精的猕猴原核期胚胎,结果在一步法中 22% 的猕猴胚胎在 HECM-6 中可发育至囊胚;在 CMRL-BCS 中囊胚的比例为 48%。采用 HECM-6 + CMRL-BCS 的二步法可获得 61% 的囊胚。

参考文献(References):

- [1] Haraguchi S, Naito K, Sato E. Phosphate exposure during the late 1-cell and early 2-cell stages induces a time-specific decrease in cyclin B and cdc25B mRNAs in AKR/N mouse embryos *in vitro* [J]. *Zygote*, 1999, 7: 87 ~ 93.
- [2] Haraguchi S, Naito K, Azuma S, et al. Effects of phosphate on *in vitro* 2-cell block of AKR/N mouse embryos based on changes in cdc2 kinase activity and phosphorylation states [J]. *Biol Reprod*, 1996, 55: 598 ~ 603.
- [3] Matsumoto H, Sugawara S. Effect of phosphate on the second cleavage division of the rat embryo [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13: 398 ~ 402.
- [4] Dienhart M K, O'Brien M J, Downs S M. Uptake and salvage of hypoxanthine mediates developmental arrest in preimplantation mouse embryos [J]. *Biol Reprod*, 1997, 56: 1 ~ 13.
- [5] Loutradis D, Drakakis P, Michalas S, et al. The effect of compounds altering the cAMP level on reversing the 2-cell block induced by hypoxanthine in mouse embryos *in vitro* [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1994, 57: 195 ~ 199.
- [6] Muggleton-Harris A, Whittingham D G, Wilson L. Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse [J]. *Nature*, 1982, 299: 460 ~ 462.
- [7] Sekirina G G, Neganova I E. Overcoming the "2-cell block" in mouse embryos in aggregation chimeras [J]. *Ontogeny*, 1996, 27: 361 ~ 70.
- [8] Sekirina G G, Neganova I E. The microenvironment created by non-blocking embryos in aggregates may rescue blocking embryos via cell-embryo adherent contacts [J]. *Zygote*, 1995, 3: 313 ~ 24.
- [9] Barnett D K, Clayton M K, Kimura J, et al. Glucose and phosphate toxicity in hamster preimplantation embryos involves disruption of cellular organization, including distribution of active mitochondria [J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 48: 227 ~ 37.
- [10] Dawson K M, Balts J M. Organic osmolytes and embryos: substrates of the Gly and beta transport systems protect mouse zygotes against the effects of raised osmolarity [J]. *Biol Reprod*, 1997, 56: 1550 ~ 1558.
- [11] Edwards L J, Williams D A, Gardner D K. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13: 3441 ~ 8.
- [12] Abramczuk J, Solter D, Koprowski H. The beneficial effect EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium [J]. *Dev Biol*, 1977, 61: 378 ~ 83.
- [13] Chatot C L, Ziomek C A, Bavister B D, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro* [J]. *J Reprod Fertil*, 1989, 86: 679 ~ 88.
- [14] Chatot C L, Lewis J L, Torres I, et al. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium [J]. *Biol Reprod*, 1990, 42: 432 ~ 40.
- [15] Spindle A. *In vitro* development of one-cell embryos from outbred mice: influence of culture medium composition [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, 26: 151 ~ 6.
- [16] Spindle A. Beneficial effects of taurine on mouse zygotes developing in protein-free culture medium [J]. *Theriogenology*. 1995, 44: 761 ~ 772.
- [17] 王敏康, 张田, 田晓燕, 李劲松, 康莉, 陈大元. 几种克服昆明种小鼠胚胎 2-细胞滞育的培养液研究 [J]. *动物学报*, 2000, 46(1): 81 ~ 87.
- [18] 王敏康, 刘冀珑, 李光鹏, 康莉, 江一平, 张田, 陈大元. M16 添加牛磺酸和 EDTA 支持昆明小白鼠体外受精并发育至囊胚 [J]. *遗传*, 2000, 22(5): 301 ~ 302.
- [19] Schini S A, Bavister B D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose [J]. *Biol Reprod*, 1988, 39: 1183 ~ 92.
- [20] Barnett D K, Bavister B D. Hypotaurine requirement for *in vitro* development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocysts, and production of term offspring from *in vitro*-fertilized ova [J]. *Biol Reprod*, 1992, 47: 297 ~ 304.
- [21] McKiernan S H, Bavister B D, Tancos R J. Energy substrate requirements for *in vitro* development of hamster 1- and 2-cell embryos

- to the blastocyst stage[J]. Hum Reprod, 1991, 6: 64-75.
- [22] McKiernan S H, Bavister B D. Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production[J]. Hum Reprod, 2000, 15: 157-64.
- [23] Miyoshi K, Tanaka N, Niwa K. Penetration *in vitro* of naturally ovulated rat eggs and the development of eggs in a chemically defined medium[J]. J. Mamm Ova Res, 1995, 12: 35-39.
- [24] Oh S H, Miyoshi K, Funahashi H. Rat oocytes fertilized in modified rat 1-cell embryo culture medium containing a high sodium chloride concentration and bovine serum albumin maintain developmental ability to the blastocyst stage[J]. Biol Reprod, 1998, 59: 884-889.
- [25] Carney E W, Foote R H. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium[J]. J Reprod Fertil, 1991, 91: 113-123.
- [26] Li J M, 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.
- [27] Davis D L, Day B N. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*[J]. J Anim Sci, 1978, 46: 1043-53.
- [28] Hagen D R, Prather R S, Sims M M, *et al.* Development of one-cell porcine embryos to the blastocyst stage in simple media. [J] J Anim Sci, 1991, 69: 1147-50.
- [29] Abeydeera L R, Wang W H, Prather R S, *et al.* Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. [J] Biol Reprod. 1998, 58: 1316-20.
- [30] Gardner D K, Lane M, Spitzer A, Batt P A. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. Biol Reprod, 1994, 50: 390-400.
- [31] Rosenkrans C F, First N L. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effect of amino acids and vitamins[J]. Theriogenology, 1991, 35: 266.
- [32] Tervit H R, Whittingham D G, Rowson L E. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J Reprod Fertil, 1972, 30: 493-497.
- [33] Holm P, Booth P J, Schmidt M H, *et al.* High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins[J]. Theriogenology, 1999, 52: 683-700.
- [34] Schramm R D, Bavister B D. Development of *in vitro*-fertilized primate embryos into blastocysts in a chemically defined, protein-free culture medium[J]. Hum Reprod, 1996, 11: 1690-7.

·会议通知·

第一届北京国际干细胞研究与应用学术研讨会通知

生物学技术在干细胞研究领域发挥着越来越重要的作用。为了促进国内外专家相互交流研究成果和经验,兹定于2001年11月28日~30日在北京海淀区太平路军事医学科学院召开干细胞研究与应用学术研讨会,特邀裴雪涛教授出任中方大会主席;另请国外著名学者出任外方大会主席;特聘李龄松教授出任大会副主席。

我们的办会宗旨:企业家搭台,科学家唱戏。办会目的:提供干细胞研究领域专家与企业的学术交流机会。会后将组织常规细胞株、人体正常细胞及胚胎干细胞培养研究技术讲座及培训,建立筹备国内国际干细胞研究机构及细胞品种交流网络,并陆续组织国外专家学者到中国共同探讨交流干细胞生物学研究、应用技术和发展。

会议内容:

1. 干细胞分离鉴定、培养、扩增与分化(技术、方法、产品)
2. 干细胞增殖分化调控(理论、模型、技术、产品)
3. 干细胞治疗技术与应用(神经、上皮、内皮、骨、软骨、肌肉、心肌、角膜、肝脏、血液……)
4. 生物芯片、基因组学、蛋白质组学、生物信息学等技术在干细胞研究中的应用。

主办单位:军事医学科学院血液所;毕龙转基因动物研究所

承办单位:毕龙转基因动物研究所

协办单位:中国科学院遗传所《遗传》杂志等

大会特别得到美国规模最大的 Clonetics 人体正常细胞及胚胎干细胞标准品和细胞培养基生产商的支持和赞助。论文摘要汇编成会议专刊,中选论文在《遗传》杂志等刊物全文发表。投稿时请注明“会议征文”。

报名与投稿联系地址:北京:中国科学院遗传研究所《遗传》编辑部 邮编:100101

联系人:李绍武 电话/传真:010-64889348 E-mail:swli@genetics.ac.cn