



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108024849 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201680052779.9

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所  
11517

(22)申请日 2016.07.13

代理人 赵昊 孙倩

(30)优先权数据

62/192,544 2015.07.14 US

(51)Int.Cl.

A61D 19/04(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 5/073(2006.01)

2018.03.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2016/001112 2016.07.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/009713 EN 2017.01.19

(71)申请人 吉纳斯公司

地址 美国威斯康辛州

(72)发明人 B·V·桑切斯

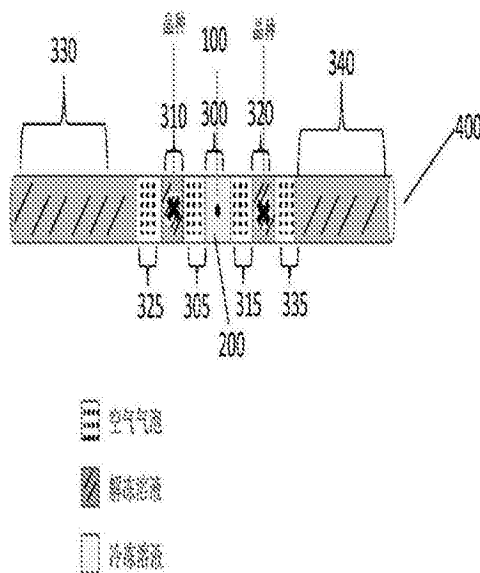
权利要求书4页 说明书18页 附图2页

(54)发明名称

冷冻保存有蹄类动物胚胎

(57)摘要

描述了用于移植到受体雌性的冷冻保存有蹄动物胚胎的技术。



1. 包括以下步骤的方法：  
获得体外生产的 (IVP) 有蹄类动物胚胎  
冷冻保存所述胚胎；和  
将胚胎移植到受体有蹄类动物中，进行所述冷冻保存和移植以实现至少约10%的妊娠率。
2. 如权利要求1所述的方法，其中获得体外生产的胚胎的所述步骤包括以下步骤：  
从雌性中回收卵母细胞；  
体外成熟卵母细胞；  
用精液使成熟的卵母细胞受精，从而产生受精卵；和  
剥露和孵育所述受精卵。
3. 如权利要求2所述的方法，其中所述精液是性别分离的。
4. 如权利要求2所述的方法，其中所述精液不是性别分离的。
5. 如权利要求2的方法，其中体外成熟卵母细胞的所述步骤包括：  
在选自由温度、气体的存在或量、湿度，pH、渗透压及其组合组成的所述组的至少一种条件的生理相关范围内孵育卵母细胞。
6. 如权利要求5所述的方法，其中气体的所述存在或所述量选自由O<sub>2</sub>和CO<sub>2</sub>的组成的所述组。
7. 如权利要求2的方法，其中体外成熟卵母细胞的所述步骤包括：在35-40℃下用3-9% CO<sub>2</sub>和饱和湿度孵育卵母细胞。
8. 如权利要求2所述的方法，其中剥露和孵育受精卵的所述步骤包括在35-40℃下用含有5% CO<sub>2</sub>的空气和饱和湿度孵育所述受精卵。
9. 如权利要求8所述的方法，其中剥露和孵育受精卵的所述步骤还包括以5% O<sub>2</sub>孵育所述受精卵。
10. 如权利要求1所述的方法，其中冷冻保存胚胎的所述步骤包括以下步骤：  
在包含冷冻保护剂的溶液中孵育胚胎；和  
将所述胚胎浸入液氮中。
11. 如权利要求1所述的方法，其中冷冻保存所述胚胎的所述步骤包括以下步骤：  
在约10℃至约38℃范围内的第一温度下，在含有1.0-4M乙二醇的冷冻溶液中孵育胚胎5-30分钟；  
将所述胚胎装载到容器中，其中在等渗稀释培养基中，气泡从含有乙二醇的解冻溶液中分离胚胎；  
将所述胚胎暴露于在约-2至约-10℃范围内的温度，约1分钟至约60分钟范围内的时间段；  
以每分钟约-0.2至大约-0.8℃的范围内的速度降低所述温度，直到达到约-30至约-36℃范围的第二温度；和  
将所述胚胎浸入液氮中储存。
12. 如权利要求11所述的方法，其中所述乙二醇以约0.2至约1.3摩尔的范围内的最终浓度存在。
13. 如权利要求10所述的方法，其中将胚胎冷冻保存以直接移植到受体雌性中。

14. 如权利要求1所述的方法,其中移植胚胎包括以下步骤:  
在矿物油作用下,在补充有牛血清白蛋白(BSA)的培养基中孵育胚胎约5至约9天范围内的时间段;和  
将所述胚胎转移到受体有蹄类动物中。
15. 如权利要求14所述的方法,其中所述培养基选自由C4培养基、S0F培养基、S0Faa培养基及其组合组成的所述组。
16. 如权利要求14的方法,其中所述胚胎处于选自由包括桑葚胚、早期胚泡、胚泡和扩张囊胚组成的所述组的发育阶段。
17. 如权利要求1所述的方法,其中同步所述受体有蹄类动物。
18. 如权利要求1所述的方法,其中所述受体有蹄类动物处于自然发情期。
19. 如权利要求1所述的方法,其中所述胚胎是新鲜的、玻璃化的或冷冻的。
20. 如权利要求1所述的方法,其中所述有蹄类动物是牛。
21. 如权利要求20所述的方法,其中所述胚胎选自包括普通牛、瘤牛和瘤牛-普通牛的杂交品种的牛的种类。
22. 通过包括以下步骤的方法生产的冷冻保存的胚胎:  
获得体外生产的(IVP)有蹄类动物胚胎;  
在一定条件下冷冻保存所述胚胎,以便当所述冷冻保存的胚胎移植到受体有蹄类动物时,实现至少约10%的妊娠率。
23. 如权利要求22所述的胚胎,其中获得体外生产的胚胎包括以下步骤:  
从雌性中回收卵母细胞;  
体外成熟的卵母细胞;  
用精液使成熟的卵母细胞受精;和  
剥露和孵育受精卵。
24. 如权利要求23所述的胚胎,其中体外成熟卵母细胞包括在至少一种选自由温度、气体的存在或量、湿度、pH、渗透压及其组合组成的所述组的生理相关范围内孵育卵母细胞。
25. 如权利要求22的所述的胚胎,其中移植胚胎包括以下步骤:  
在矿物油作用下,在补充有牛血清白蛋白(BSA)的培养基中孵育胚胎约5至约9天范围内的时间段;和  
将所述胚胎移植到受体有蹄类动物中。
26. 如权利要求25的所述的胚胎,其中所述培养基选自由C4培养基、S0F培养基、S0Faa培养基及其组合组成的所述组。
27. 如权利要求25所述的胚胎,其中所述胚胎处于选自由桑葚胚、早期胚泡、胚泡和扩张胚泡组成的所述组的发育阶段。
28. 装置包括:  
容器;  
位于所述容器的第一区域内,在冷冻保存溶液中的冷冻保存的胚胎,所述第一区域的侧面为:  
第二区域和第三区域,每个区域含有空气,所述第二区域和第三区域的侧面为:  
第四区域和第五区域,每个区域都含有解冻溶液,第四区域和第五区域的侧面为:

第六区域和第七区域,每个区域都含有空气,第六区域和第七区域的侧面是:  
第八区域和第九个区域,每个区域都含有解冻溶液。

29.如权利要求28所述的装置,其中所述区域中的一个或多个为腔室,其中所述腔室由物理分隔实体界定,所述物理分隔实体提供所述腔室与其相邻的至少一个其他区域之间的屏障。

30.如权利要求28所述的多个所述装置。

31.一种方法,包括以下步骤:

冷冻保存多个有蹄动物胚胎;和

将所述多个胚胎移植到受体有蹄类动物中,其中进行所述冷冻保存和移植使得实现至少30%的受孕率。

32.如权利要求31所述的方法,其中在容器的第一区域内,在冷冻保存溶液中冷冻保存定位每个胚胎的步骤,所述第一区域的侧面为:

第二区域和第三区域,每个区域含有空气,所述第二区域和第三区域的侧面为:

第四区域和第五区域,每个区域含有解冻溶液,所述第四区域和第五区域的侧面为:

第六区域和第七区域,每个区域含有空气,所述第六区域和第七区域的侧面是:

第八区域和第九个区域,每个区域含有解冻溶液。

33.冷冻胚胎的方法,包括:

将有蹄类动物胚胎暴露于在35°C下含有1.0-4M乙二醇的冷冻溶液(SC)10分钟;

将每个胚胎放置在尺寸为吸管的容器中的冷冻溶液(SC)中,使得冷冻溶液中的所述胚胎被四列解冻溶液(SD)围绕,并且在它们之间由空气柱交织,其中所述解冻溶液包含0.75M乙二醇;

将容器暴露在稳定在约0°C至约-10°C范围内的温度的温度条件下;

放置在所述冷冻机中两分钟后在所述胚胎上方和下方结晶柱;

在约0°C至约-10°C范围内的温度下保持所述胚胎1至60分钟;

以每分钟约-0.2至约-0.8°C的范围内的速度降低所述,直到达到约-30至约-36°C范围内的第二温度;和

将所述冷冻的胚胎浸入液氮中。

34.解冻胚胎的方法,包括:

将含有位于所述容器第一区域内的冷冻保存溶液中冷冻胚胎的容器暴露,所述第一区域的侧面为:

第二区域和第三区域,每个区域含有空气,所述第二区域和第三区域的侧面为:

第四区域和第五区域,每个区域含有解冻溶液,所述第四区域和第五区域的侧面为:

第六区域和第七区域,每个区域含有空气,所述第六区域和第七区域的侧面是:

第八区域和第九区域,每个区域在第一时间段内包含容纳室温空气的解冻溶液,所述第一时间段足以开始解冻所述冷冻的胚胎;

将所述容器暴露于以约10°C至约38°C范围内的解冻温度为特征的解冻环境第二时间段,所述第二时间段足以解冻所述冷冻溶液;和

在所述容器内混合所述解冻溶液、所述冷冻溶液和所述胚胎。

35.如权利要求34所述的方法,其中所述第一时间段在约10°C至约38°C的范围内。

36. 如权利要求34或权利要求35所述的方法,其中所述第二时间段在约20℃至约38℃的范围内。

37. 如权利要求34所述的方法,其中所述解冻环境是或包括液体浴。

38. 如权利要求34所述的方法,其中所述解冻温度在约10℃至约38℃的范围内。

39. 如权利要求34所述的方法,其中所述混合步骤是通过轻轻搅动所述容器来实现的。

40. 如权利要求34所述的方法,还包括将所述胚胎移植到受体有蹄类动物中的步骤。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述移植与所述暴露步骤或所述混合步骤同时或之后进行。

42. 如权利要求40所述的方法,其中所述移植步骤包括移植所述受体有蹄类动物的子宫角。

## 冷冻保存有蹄类动物胚胎

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2015年7月14日提交的美国临时申请序列号62/192,544的优先权,其公开内容通过引用整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 体外胚胎生产是牛育种的主要组成部分。通常生产的胚胎多于植入的胚胎。尽管在玻璃化体外胚胎生产(IVP)的胚胎移植(ET)中,最近已经实现超过30%的受孕率,但玻璃化后的这些胚胎的复苏的复杂过程仍然是该技术的商业应用的障碍。牛胚胎冷冻保存需要新的、有效的方案。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了用于冷冻保存的牛胚胎和/或使用冷冻保存的牛胚胎实现受精的技术。本发明还提供了冷冻保存的胚胎、这些冷冻保存的胚胎的种群以及用于生产和/或储存它们的系统等。

[0005] 此外,本发明还包括利用用于冷冻保存的胚胎的胚胎移植的某些可用技术,特别是用于复苏(例如解冻、植入等)冷冻保存的胚胎的问题源的识别。例如,本发明认识到根据许多标准技术复苏有活性的冷冻保存的胚胎所需的人员和时间引起关于其商业适用性的顾虑。

[0006] 此外,本发明内容还认识到,相对于使用冷冻保存的胚胎的大多数标准技术,需要实现改进的受孕率的冷冻保存的胚胎的移植技术,应当理解的是,这样的标准技术通常实现低于使用新鲜胚胎所实现的受孕率。除此之外,本发明内容提供了实现冷冻保存的胚胎的期望(例如,约10%或更多)受孕率的技术。

[0007] 在一些实施例中,本发明提供了包括以下步骤的方法,例如:获得体外生产的(IVP)有蹄类动物胚胎;冷冻保存胚胎;并且将胚胎移植到受体有蹄类动物中,进行冷冻保存和移植,从而实现至少约10%的妊娠率。

[0008] 在一些实施例中,获得一个或多个体外生产的胚胎包括以下步骤,例如:从雌性中回收一种或多种卵母细胞;体外成熟一个或多个卵母细胞;用精液或一个或多个分离的精子细胞使一个或多个成熟的卵母细胞受精,从而产生一个或多个受精卵;并且剥露和孵育一个或多个受精卵。在一些实施例中,使用的精液是性别分离的。在一些实施例中,精液不是性别分离的。

[0009] 在一些实施例中,体外成熟卵母细胞包括例如:在至少一个选自由温度、气体的存在或量、湿度、pH,渗透压及其组合组成的组的条件的生理相关范围内孵育卵母细胞。在一些实施例中,气体的存在或量选自由O<sub>2</sub>和CO<sub>2</sub>组成的组。在一些实施例中,体外成熟卵母细胞的步骤包括:在35-40℃下、3-9%CO<sub>2</sub>和饱和湿度孵育卵母细胞。在一些实施例中,剥露和孵育受精卵的步骤包括在35-40℃、含5%CO<sub>2</sub>的空气和饱和湿度下孵育受精卵。在一些实施例中,剥露和孵育受精卵的步骤还包括以5%O<sub>2</sub>孵育受精卵。

[0010] 在一些实施例中,冷冻保存胚胎包含以下步骤,例如:在包含冷冻保护剂的溶液中孵育胚胎;并将胚胎浸入液氮中。在一些实施例中,冷冻保存胚胎的步骤包括以下步骤:在约10°C至约38°C范围内的第一温度下,在由1.0-4M乙二醇组成的冷冻溶液中孵育胚胎5-30分钟;将胚胎装载到容器中,其中气泡在渗稀释培养基中将胚胎从包含乙二醇的解冻溶液分离;将胚胎暴露于约-2至约-10°C的温度范围内约1分钟至约60分钟范围的时间段;以约每分钟-0.2至大约-0.8°C的范围内的速度降温,直到达到约-30至约-36°C范围内的第二温度;并将胚胎浸入液氮中储存。在一些实施例中,乙二醇以约0.2至约1.3摩尔的范围内的最终浓度呈现。

[0011] 在一些实施例中,将胚胎冷冻保存以直接移植到受体雌性中。

[0012] 在一些实施例中,移植胚胎包括以下步骤:在矿物油作用下,在使用牛血清白蛋白(BSA)补充的培养基中孵育胚胎约5至约9天范围的时间段;并将胚胎移植到受体有蹄类动物中。在一些实施例中,培养基选自由C4培养基、SOF培养基、SOFaa培养基及其组合组成的组。在一些实施例中,培养基补充有血清、胎牛血清、牛血清白蛋白和/或一种或多种氨基酸中的一种或多种。

[0013] 在一些实施例中,移植的胚胎处于选自由桑椹胚、早期胚泡、胚泡和扩张胚泡组成的组的发育阶段。

[0014] 在一些实施例中,同步受体有蹄类动物。在一些实施例中,受体有蹄类动物处于自然发情期。在一些实施例中,胚胎是新鲜的、玻璃化的或冷冻的。在一些实施例中,有蹄动物是牛。在一些实施例中,物种的胚胎选自普通牛、瘤牛以及普通牛与瘤牛的杂交。

[0015] 在一些实施例中,本发明提供了通过包括以下步骤的方法生产的冷冻保存的胚胎,例如:获得体外生产的(IVP)有蹄动物胚胎;在一定条件下冷冻保存胚胎,以便当冷冻保存的胚胎移植至受体有蹄类动物时,实现至少约10%的妊娠率。在一些实施例中,获得体外生产的胚胎包括以下步骤,例如:从雌性中回收卵母细胞;体外成熟卵母细胞;用精液使成熟的卵母细胞受精;剥露和孵育受精卵。在一些实施例中,体外成熟卵母细胞包括在至少一个选自由温度、气体的存在或量、湿度、pH,渗透压和其组合组成的组的条件的生理相关范围内孵育卵母细胞。在一些实施例中,移植胚胎包括以下步骤:在矿物油作用下,在补充有牛血清白蛋白(BSA)的培养基中孵育胚胎约5至约9天范围的时间段;并将胚胎移植到受体有蹄类动物中。

[0016] 在一些实施例中,根据本发明使用的培养基是或包含选自由C4培养基、SOF培养基、SOFaa培养基及其组合组成的组的培养基。在一些实施例中,培养基补充有血清、胎牛血清、牛血清白蛋白和/或一种或多种氨基酸中的一种或多种。

[0017] 在一些实施例中,根据本发明冷冻保存和/或移植的胚胎处于选自由桑椹胚、早期胚泡、胚泡和扩张囊胚组成的组的发育阶段。

[0018] 在一些实施例中,本发明提供一种装置,其包括:容器;位于容器的第一区域内的冷冻保护剂溶液中的冷冻保存的胚胎,第一区域的侧面是:第二区域和第三区域,每个区域含有空气,第二区域和第三区域的侧面是:第四区域和第五区域,每个区域含有解冻溶液,第四区域和第五区域的侧面是:第六区域和第七区域,每个区域含有空气,第六区域和第七区域的侧面是第八区域和第九区域,每个区域含有解冻溶液。在一些实施例中,一个或多个区域是腔室,其中腔室由物理分隔实体界定,该物理分隔实体在它至少一个与其相邻的

其他区域之间提供屏障。在一些实施例中,本发明提供了多个装置。

[0019] 在一些实施例中,本发明提供了包括以下步骤的方法:冷冻保存多个有蹄类动物胚胎;并且将多个胚胎移植到受体有蹄类动物中,其中进行冷冻保存和移植,从而实现至少30%的受孕率。在一些实施例中,将冷冻保存溶液中的每个胚胎冷冻保存的步骤:将胚胎定位在容器的第一区域内,第一区域的侧面为:第二区域和第三区域,每个区域含有空气,第二和第三区域的侧面为:第四区域和第五区域,每个区域含有解冻溶液,第四区域和第五区域的侧面是:第六区域和第七区域,每个区域含有空气,第六区域和第七区域的侧面为:第八区域和第九区域,每个区域含有解冻溶液。

[0020] 在一些实施例中,本发明提供冷冻胚胎的方法,例如包括:使有蹄类动物胚胎在35℃下暴露于由约1至约4M乙二醇组成的冷冻溶液(SC)10分钟;将每个胚胎放置到吸管尺寸的容器内的冷冻溶液(SC)中,使得冷冻溶液中的胚胎被四列解冻溶液(SD)围绕,并且在它们之间由空气柱穿插,其中解冻溶液包含约0.75M的乙二醇;将容器暴露在稳定在约0℃至约-10℃范围内的温度的温度条件下;放置在冷冻机中两分钟后在胚胎上方和下方结晶柱;在约0℃至约-10℃范围内的温度下保持胚胎1至60分钟;以每分钟约-0.2℃至约0.8℃的速度降温,直到达到约-30℃至约-36℃范围内的第二温度;并将冷冻的胚胎浸入液氮中。在一些实施例中,容纳冷冻胚胎的容器在达到约-30℃至约-36℃范围内的第二温度后浸入液氮中。

[0021] 在一些实施例中,本发明提供解冻胚胎的方法,例如包括:暴露含有冷冻保存的胚胎的容器,胚胎在容器的第一区域内的冷冻保存溶液中,第一区域的侧面是:第二区域和第三区域,每个区域含有空气,第二区域和第三区域的侧面是:第四区域和第五区域,每个区域含有解冻溶液,第四区域和第五区域的侧面是:第六区域和第七区域,每个区域含有空气,第六区域第七区域的侧面是:第八区域和第九区域,每个区域包含解冻溶液以在第一时间段容纳室温空气,第一时间段足以开始解冻冷冻胚胎;将容器暴露于以约10℃至约38℃范围内的解冻温度为特征的解冻环境第二时间段,第二时间段足以解冻冷冻溶液;并在容器内混合解冻溶液、冷冻溶液和胚胎。在一些实施例中,第一时间段在约10℃至约38℃的范围内。在一些实施例中,第二时间段在约20℃至约38℃的范围内。在一些实施例中,解冻环境是或包含液浴。在一些实施例中,解冻温度在约10℃至约38℃的范围内。在一些实施例中,混合步骤通过轻柔搅拌容器来实现。在一些实施例中,解冻方法还包括将胚胎移植到受体有蹄类动物中的步骤。在一些实施例中,移植与暴露步骤或混合步骤同时或之后进行。在一些实施例中,移植步骤包括将胚胎移植至受体有蹄类动物的子宫角。

## 附图说明

[0022] 图1描绘了在胚胎直接移植中,使用冷冻胚胎的加载方案。如该图所示,冷冻溶液中的胚胎可以排列在溶液区域被空气区域分隔开的装置中(例如,每个装置一个胚胎)。例如,如图1所示,冷冻溶液200中的胚胎100位于柱状装置400(例如吸管)的第一区域300(图1中呈灰色)内。紧接在第一区域的侧面是包含空气的两个区域(第二区域305和第三区域315,在图1中每个区域被点画),接着含有解冻溶液两个区域(第四区域310和第五区域320,在图1中每个区域被点画),接着是含有空气的另外两个区域(第六区域325和第七区域335,其中每个区域在图1中被点画),接着是包含解冻溶液的两个更多区域(第八区域330和第九



区域340,在图1中每个区域被点画)。图1中描绘的特定装置是放置在中央柱上的0.25mL吸管;冷冻溶液是1.5M乙二醇;并且解冻溶液是冷冻溶液在DPBS中1:1稀释,使得在DPBS中是0.75M乙二醇。

[0023] 图2A和B(都包括图2)描绘了如本发明的示例中概述的冷冻(图2A)和解冻(图2B)方案的概述。

[0024] 定义

[0025] 为了使本发明更易于理解,下面定义了某些术语。本领域技术人员将认识到,可以在说明书的其他地方提供某些术语的定义,和/或将从上下文中清晰。

[0026] 大约:如本文所使用的,用于一个或多个感兴趣值的术语“大约”或“约”是指与所述参考值相近的值。在某些实施例中,术语“大约”或“约”是指落在25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小的范围内,在所述参考值的任何一个方向上(或大于或小于)除非另有说明或从上下文中另外显而易见(除非该数字超过可能值的100%)。

[0027] 人工授精(AI):如本文所用,术语“人工授精(AI)”是指通过人的手将精液引入雌性牛的子宫中以实现妊娠。在许多实施例中,AI被用于育种,例如使得所产生的怀孕被(或被准备)带到临产。在一些实施例中,AI用收集的精液进行。在一些实施例中,AI是用提取的精液进行的。在一些实施例中,AI用已经处理的精液进行;例如,在一些实施例中,精液已经具有性别,从而使其仅富集一种性别的精子。本领域技术人员将认识到。除非另外明确指出,否则术语“AI”不包括胚胎移植程序,其中例如精液可以被引入母牛以生产用于移植的胚胎。

[0028] 囊胚:如本文所用,术语“囊胚”是指在哺乳动物的早期发育中形成的结构。它具有随后形成胚胎的内细胞团(ICM)。滋养层是囊胚细胞的外层。该层围绕内细胞团(其是胚胎干细胞的来源)和被称为囊胚腔的充满流体的腔。滋养层产生胎盘。将囊胚用于体外受精(IVF)涉及在将受精卵植入牛子宫之前孵育受精卵。

[0029] 品种:如本文所用,术语“品种”是指具有共同祖先和/或具有与其他品种有蹄类动物不共享的某些可分辨性状的一组有蹄类动物(例如,牛)。本领域技术人员熟悉品种标准和/或特征。在许多实施例中,通过将特定的经鉴定的一个或多个父母(例如,特定的公畜与特定的母畜或者与特定母畜品系的任何一个母畜)相互配种来生产和/或保持特定的品种。

[0030] 可比较的:术语“可比较的”在本文中用于描述彼此足够相似的两组(或更多组)的条件、环境、个体或种群,以允许获得的结果或观察到的现象的比较。在一些实施例中,条件、环境、个体或种群的对照组具有多个基本上相同的特征和一个或少量的变化的特征的特征。本领域的普通技术人员将理解,当以具有足够数量和类型的基本上相同的特征为特征时,情境、个体或种群的集合是可比较的,以保证得到合理结论,即在或使用不同的环境、个体或种群获得结果或观察到的现象归因于或者表明那些特征的变化。本领域技术人员将会理解,本文中使用的语言(例如,增强、激活、减少、抑制等)通常将指在可比较的条件下进行的比较。

[0031] 杂交:如本文所用,术语“杂交”是指从不同品种或不同种类的有蹄类动物(例如牛)的配子生产的有蹄类动物(例如,牛)。与亲本品种相比,杂交育种通常在奶牛养殖中进行以生产更健康、更高产的牛。杂交是将来自不同品种或品系的动物的人为配种;在许多实

施例中,杂交繁殖被设计为利用杂种优势(杂种优势)来获得像产量、生育力和寿命等特征。在一些实施例中,本发明内容包括以下认识:可以利用与人工授精和/或体外受精相关的最新进展在奶牛业中通常没有被采用可以用于启用和/或提供关于生产和/或保持如本文所述的奶牛杂物品系的特定优势。如本文所述,特别感兴趣的杂交有蹄动物是杂合体,其中50%的动物体细胞染色体来自一个品种或品系,50%来自不同的品种或品系(即,通过将来自彼此相异的第一和第二品种/品系的个体杂交F0形成。但是本领域的普通技术人员将会理解,术语“杂交”可以在一些实施例中(从上下文中可以清楚地看出)用于指基因组作为杂交的结果的任何个体,而不是100%源自任何单一品种。二倍体细胞,如本文所用,术语“二倍体细胞”是指具有其每个常染色体的同源对的细胞,具有每个常染色体的两个拷贝(2n)。

[0032] 发育阶段:如本文所用,术语“发育阶段”是指胚胎发育的阶段。在一些实施例中,发育阶段包括:桑葚胚、早期胚泡、胚泡和扩张胚泡。

[0033] 直接移植:如本文所用,术语“直接移植”是指缓慢冷冻保存胚胎的方法。在包含冷冻保护剂(例如乙二醇或甘油)的冷冻溶液中孵育胚胎,并且暴露于逐渐降低的温度下,直到胚胎冷冻并且随后浸入液氮中。在一些实施例中,将冷冻溶液内的胚胎装载到暴露于冷冻温度的吸管上。冷冻保存的直接移植方法也被称为慢速冷冻。

[0034] 胚胎:如本文所使用的,术语“胚胎”是指为即刻植入雌性有蹄类动物内而制备或储存用于最终植入雌性有蹄类动物体内的受精卵(卵)。

[0035] 新鲜移植:如本文所用,术语“新鲜移植”用于指在受精后一避免冷冻保存将胚胎植入受体有蹄类动物(例如牛)的方法。在一些实施例中,胚胎在植入受体雌性之前体外孵育数天。

[0036] 配子:如本文所用,术语“配子”用于指具有单倍体染色体数量的生殖细胞(例如精子或卵母细胞),尤其是能够与异性配子融合的成熟精子或卵子以生产受精卵。配子是通过减数分裂过程产生的。

[0037] 性别分离的精液:如本文所用,术语“性别分离的精液”是指已被操控以选择仅一个优选性别的精母细胞的精液。在一些实施例中,性别分离的精液也被称为性控精液。在一些实施例中,性别分离的精液是“性别富集的精液”,是指精液已经被操控仅富集一种优选性别的精母细胞。在一些实施例中,性别富集的精液包含至少约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%仅一种优选性别的精母细胞。

[0038] 基因组谱:如本文所用,术语“基因组谱”是指包含在基因组内的全部信息的代表性子集。通常,在一组特定的多态基因座处基因组谱包含基因型。在一些实施例中,基因组谱可以与例如特定动物、品系、品种或杂交种群的特定特征,性状或其集合特征相关联。

[0039] 基因型:如本文所用,术语“基因型”是指给定细胞或生物体中给定遗传基因座或相关基因座组的等位基因的二倍体组合。纯受精卵携带两个拷贝的同一等位基因,并且杂受精卵携带两个不同的等位基因。在具有两个等位基因“A”和“a”的基因座的最简单情况下,可以形成三种基因型:A/A、A/a和a/a。

[0040] 基因分型:如本文所用,术语“基因分型”是指用于在一个或多个明确定义的基因座上区分个体基因型的实验、计算或观察方案。本领域技术人员将意识到可以有用地且有效地进行基因分型的各种技术。在一些实施例中,基因分型涉及核酸或核酸序列的直接检

测。在一些实施例中，基因分型涉及核酸或核酸序列的间接检测，例如通过检测或分析与核酸或核酸序列的存在度相关的代理标记或事件。

[0041] 单倍体细胞：如本文所用，术语“单倍体细胞”是指染色体具有单组(1n)染色体的细胞-体细胞数量的一半。

[0042] 青年母牛：如本文所用，术语“青年母牛”是指尚未产生任何犊牛的雌性牛。

[0043] 杂交：如本文所用，术语“杂交”是指由于来自不同品种或品系或有蹄类动物系的雄性和雌性配子杂交而生产的有蹄类动物(例如，牛)。因此，杂种的常染色体基因组(例如体细胞基因组)的50%通常来自第一品种/品系，而50%来自第二品种/品系。如本文所述，特别感兴趣的是其中50%的体细胞染色体来自第一品种且50%来自第二品种的杂种。

[0044] 体外受精(IVF)：如本文所用，术语“体外受精”是指在活体动物的体外使用精子使卵子受精的方法。IVF是通过精子在体外受精的过程(即，体外，在字面上翻译为“在玻璃里”，但在本领域中被理解是指例如在实验室或其他人工装置)。在一些实施例中，IVF过程可以涉及监测和/或刺激雌性的排卵过程，从雌性卵巢移除一个或多个卵母细胞或卵母细胞(一个或多个卵)，和/或使精子和卵母细胞在实验室中彼此接触(例如在流体培养基里)实现受精。在一些实施例中，IVF涉及在生长培养基中孵育受精卵(合子)和/或将其植入雌性子宫或将其储存用于未来的分析和/或移植。在一些实施例中，IVF可能涉及对受精卵进行分选以获得特定的期望属性(例如，性别)。

[0045] 品系：如本文所使用的，术语“品系”是指通过选择性育种而发育和保持的，来自共同祖先父母的一系列后代牛。

[0046] 配种：如本文所用，术语“配种”是指通常由两种异性配子形成胚胎的过程。在一些实施例中，配种涉及自然交配。在一些实施例中，配种涉及人工授精。在一些实施例中，配种涉及IVF。在本文描述的许多实施例中，利用配种生产混合子代。在许多实施例中，利用配种来产生杂交子代。

[0047] 桑椹胚：如本文所用，术语“桑椹胚”是指胚胎发育的阶段。桑椹胚是包含在透明带内的细胞球(称为卵裂球)组成的早期胚胎通过一系列分裂产生。通过细胞分化和空化，桑椹胚产生囊胚。一旦充满液体的空腔开始在桑椹胚中开放，胚胎发育的囊胚阶段开始。在囊胚形成期间，桑椹胚细胞分化成在囊胚腔内部生长的内细胞团和在外部长生的滋养层细胞。

[0048] 自然交配：如本文所用，术语“自然交配”是指没有人工授精或基于IVF的技术的配对雄性和雌性的传统的牛育种。

[0049] 容器：如本文所用，术语“容器”是指用于容纳一个或多个冷冻保存的胚胎的装置。容器可以包含一系列区域或腔室，用于容纳：空气、解冻溶液或冷冻保存溶液中的胚胎。在一些实施例中，容器是或包括吸管。

[0050] 基本上：如本文所使用的，术语“基本上”是指呈现感兴趣的特性或特征的总体或近似总体的程度或度的定性条件。生物领域的普通技术人员将会理解，生物和化学现象很少会完成和/或继续完成或达到或避免绝对结果。因此，术语“基本上”用于捕捉许多生物和化学现象固有的潜在缺乏完整性。

[0051] 性状：如本文所用，术语“性状”是指个体的可检测属性。典型地，特定性状的表达可能完全或部分受个体遗传成分的影响。在一些实施例中，性状是特定个体、品系、品种或

杂交品种的特征,例如可以依赖(单独或作为一组的一部分)来区分该个体、品系、品种或杂交品种。

[0052] 有蹄类动物:如本文所用,术语“有蹄类动物”是指包括马、牛/奶牛、猪,山羊、水牛、绵羊、长颈鹿、骆驼、鹿和河马在内的各种各样的大型哺乳动物。大多数陆生有蹄类动物使用它们的脚趾,通常蹄,以支撑它们的整个体重,当移动的时候。在一些实施例中,该术语大体上是指“有蹄”或“有蹄动物”。

[0053] 玻璃化:如本文所用,术语“玻璃化”是指冷冻保存卵细胞(卵母细胞)和胚胎的方法。在一些实施例中,将胚胎暴露于包含冷冻保护剂(例如乙二醇或甘油)的平衡和玻璃化溶液中,并且作为冷冻保存过程的一部分浸入液氮中。

[0054] 受精卵:如本文所用,术语“受精卵”是指当通过有性繁殖结合两个配子细胞时形成的细胞。这是胚胎发育的最早阶段。受精卵是由两个配子结合而成,代表了独特生物发育的第一个阶段。受精卵是通过两个单倍体细胞(卵子(雌性配子)和精子细胞(雄性配子))之间受精产生的,它们结合形成单一的二倍体细胞。

### 具体实施方式

[0055] 本发明部分基于以下发现:相对于大多数标准技术而言,有可能冷冻保存具有提高的受孕率的有蹄类动物胚胎,受孕率远低于用鲜胚实现的受孕率。

[0056] 在一些实施例中,本发明提供了包括以下步骤的方法:获得体外生产的胚胎;冷冻保存胚胎;并将胚胎移植到受体有蹄类动物中,进行冷冻保存和移植,从而实现至少约10%的妊娠率。在一些实施例中,本发明提供了通过所公开的方法冷冻保存的胚胎。在一些实施例中,本发明提供用于冷冻、储存和解冻冷冻保存的胚胎的容器。

#### [0057] 体外生产的胚胎

[0058] 在过去十年中,体外生产的胚胎(IVP)的使用大大增加(Hasler, 2014)。这种增长主要发生在巴西。在2013年,超过393,000 IVP胚胎被移植到受体,其中78%在南美洲生产。同年,从移植总数中,只有8.9%的IVP胚胎被冻结;对于体内胚胎,这个比例是59%(Perry, 2013)。

[0059] 与体内胚胎相比,IVP胚胎对冷冻保存的抗性较低,加入到胚胎培养基中的胎牛血清(FBS)可以提供更多的胞质内脂质胚胎的积累(Mucci等,2006),它是导致IVP胚胎对冻结敏感性增加的因素之一。

[0060] 目前,最常用于IVP胚胎的冷冻保存技术是玻璃化(Dode等,2013),因为其简单、快速和低成本。然而,这种技术使用高浓度的冷冻保护剂,并且需要经过培训的人员和实验室架构才能在移植之前回收胚胎(Vajta等,1998),限制了它在现场和大规模的使用。

[0061] 另一方面,尽管具有稍高的操作成本,但是用于后续直接移植的胚胎的慢速冷冻允许使用较低浓度的冷冻保护剂,因此胚胎的毒性较低(Voelkel和Hu,1992)。

[0062] 在一些实施例中,本发明提供了移植血清中孵育的牛胚胎的改进方法。接受先前在胎牛血清(FBS)中孵育的受精胚胎的牛具有与事先未接触过FBS的胚胎相似的受孕率。在一些实施例中,本发明是一种以如下方式冷冻保存牛胚胎的方法:受体牛具有类似于新鲜移植的胚胎的受孕率。接受新鲜受精胚胎的牛具有与玻璃化胚胎和直接移植/慢速冷冻胚胎类似的受孕率。这表明胚胎冷冻保存的直接移植/慢速冷冻方法与玻璃化方法一样可行。

为了方便,直接移植/慢速冷冻是玻璃化方法的适当替代。

[0063] 在一些实施例中,在受精和冷冻保存之前,卵母细胞可以经历体外成熟。在一些实施例中,卵母细胞在氧(O<sub>2</sub>)存在下孵育。在一些实施例中,卵母细胞在二氧化碳(CO<sub>2</sub>)存在下孵育。在一些实施例中,卵母细胞在3-9%CO<sub>2</sub>存在下孵育。在一些实施例中,卵母细胞在5%CO<sub>2</sub>的存在下孵育。在一些实施例中,卵母细胞在5%O<sub>2</sub>的存在下孵育。

#### [0064] 传统的牛畜牧业

[0065] 畜牧业是为了利益,人类对农场动物的管理和照顾,其中被认为对人类有利的遗传品质和行为被进一步开发。这个术语可以指有选择地养殖和饲养家畜以促进动物的所期望的,实用、运动、娱乐和研究的特征。

[0066] 动物饲养通过将历史悠久的实践和现代科学知识融入提供动物福利并且提供安全和有效的动物管理和处理的系统,将动物饲养的艺术和科学相结合。随着科学家、农业专家和与动物有关的其他人学习新技术或逐步淘汰那些不再必要或不适宜的技术,畜牧业的实践将发生变化。畜牧业的实践从奶牛除角到防止对畜群和农场的伤害,到给牲畜提供居所,提供充足的营养和设计育种策略的方法。

[0067] 已经开发的诸如人工授精和胚胎移植的技术,可以用于促进育种。例如,因为这种技术允许母畜生产不是她自己的胚胎,所以可以用它们确保来自特定高质量母畜(或母畜品系)的大量胚胎可以植入较低质量的替代中,从而扩大了高质量母畜可以生产的子代的数量。这种做法可以极大地增加少量最佳质量的亲本动物的选择可能产生的后代数量。然而,如本文所讨论的,这样的技术通常没有用于奶牛。除此之外,它们往往被认为太贵而不能保证用于奶牛。此外,如果它们倾向于扩大群体内的特定遗传特性,则会降低群体内的遗传多样性,增加某些疾病暴发的严重性以及其它风险。除其他之外,本发明包括这样的见解,即,与常规方法相比,这种技术,特别是当与杂交育种策略组合时,可以在奶牛饲养上提供显著的优势。

#### [0068] 胚胎和受精技术

[0069] 已经开发和改善的各种技术允许人们可选地在没有动物性交(例如自然交配)或甚至动物接触的情况下控制和/或实现动物配种。代表性的这类技术包括例如体外受精、人工授精、配子或胚胎的冷冻保存(冷冻)、诱导多次排卵、胚胎移植,精子或胚胎的性别决定、核移植、克隆等。

[0070] 反刍动物胚胎的体外生产是涉及卵母细胞成熟、卵母细胞受精和体外孵育的三步过程。只有30-40%的这种卵母细胞到达囊胚阶段,在这个阶段,它们可以移植到受体或冷冻以供将来使用。卵母细胞的质量可以显著影响形成囊胚的未成熟卵母细胞的比例,而受精后孵育环境对囊胚的质量有重大影响。在一些实施例中,使用特定性别的精子与体外胚胎生产相结合是获得所需性别的后代的潜在有效手段。关于使用性精液技术的担忧包括分拣的精子明显降低生育能力、冷冻保存后分选精子的存活率较低以及在特定时间段内可以分离的精子数量减少。胚胎质量的评估是一个挑战。形态学评估是目前移植前最常用的胚胎选择方法。其他非侵入性评估方法包括与发育能力相关的第一次卵裂分裂的时间。定量检测基因表达是评估孵育胚胎活力的另外有价值的工具。大量的证据表明,胚胎暴露的孵育条件,特别是在受精后阶段,可能对胚胎中基因表达的模式产生干扰效应,并且可能具有重要的长期后果。

[0071] IVF是通过从生殖系统抽吸的方法从供体奶牛提取卵母细胞的技术。然后将选择的卵母细胞孵育24小时的时间段;这就是所谓的成熟期。成熟后,共孵育18至22小时后使卵受精。胚胎停留在培养基中直到第7天,它们准备移植时。与传统体内胚胎收集相比,该技术具有三个主要优点。使用IVF,没有必要使母牛超数排卵,也没有必要使它们同步。这是一个重大的突破,因为供体奶牛没有暴露在可能影响动物生殖健康的激素,她们可以在没有程序的预先准备的时间工作。胚胎产量平均约为收获的卵母细胞的30%,尽管这个数量取决于品种、供体牛以及配种。体外受精的另一个优点是,动物可以每20天吸一次,而不是像体内胚胎收集那样每60天吸一次。体外受精的另一个好处是可以在很小的时候收获动物;这将对育种选择产生重大影响,因为它减少了具有特定理想性状的动物的世代间隔。

[0072] 已经使用人工授精(AI)从遗传上优异的雄性获得超过200年的后代。众所周知的冷冻保存(冷冻)和储存精液的方法已经使更多的家畜生产者能够使用AI。与精液的冷冻保存相同,胚胎冷冻可以使遗传品质高的动物全球商业化。来自公牛的精液特别适合冷冻和长期储存。在密集管理大量奶牛的奶业中,人工授精简单、经济、成功。人工受精使美国超过60%的奶牛繁殖。然而,肉牛的情况是不同的,通常饲养种群通常保持在牧区或牧场条件下。在美国牛肉产业中,人工授精只占不到5%的授精。

[0073] ET技术的发展允许生产者从遗传上优异的雌性获得多个后代。受精胚胎可以通过手术或非手术技术从具有优异遗传价值的雌性(也称为胚胎供体)中回收。遗传上优异的胚胎然后移植到遗传价值较低的雌性(也称为胚胎受体)。就牛而言,有效的技术可以在不进行手术的情况下复苏受精胚胎,但是在每个正常的生殖周期中只生产一个或者有时两个胚胎。为了增加从遗传上优异的雌性中可以复苏的胚胎的数量,将胚胎供体用激素方案处理以诱导多次排卵或超数排卵。

[0074] 美国的牛肉工业更喜欢雄性犊牛,当将其放置在用于肉类生产的生长和完成阶段的饲料场时,雄性犊牛往往具有较高的体重和较高的饲料效率(与雌性或青年母牛相比)。相比之下,奶业更喜欢青年母牛,后者最终会产生可供食用的后代和牛奶。因此,需要确定精子或胚胎性别的方法,以便生产者能够控制其家畜后代的性别。

[0075] 自20世纪80年代中期以来,已经开发了将取自早期的细胞(可能是未分化的卵裂期胚胎)或体细胞(成纤维细胞、皮肤、心脏,神经或其他身体细胞)卵裂球的核移植到去核的卵母细胞(未受精的雌性卵细胞,去除细胞核)。这种“核移植”产生的动物本身几乎与其他动物(转基因动物、遗传上优异的动物或产生大量牛奶或具有其他所需特性的动物等)几乎相同的动物的多个拷贝。这个过程也被称为克隆。迄今为止,体细胞核移植已用于克隆牛、绵羊、猪、山羊、马、骡、猫、兔、大鼠和小鼠。

[0076] 该技术涉及从待克隆动物的适当组织(成纤维细胞)孵育体细胞。然后将来自孵育的体细胞的细胞核显微注射到从相同或紧密相关种类的另一个个体获得的去核的卵母细胞中。通过尚未被理解的过程,来自体细胞的细胞核被重新编程为适合指导胚胎正常发育的基因表达模式。在体外进一步孵育和发育后,将胚胎移植至受体雌性,最终结果是活的后代诞生。通过核移植繁殖动物的成功率通常低于10%,取决于许多因素,包括种类、受体卵的来源、供体核的细胞类型、核移植前供体细胞的处理以及核移植使用的技术等。

[0077] 本发明内容显示了用于冷冻和解冻有蹄类动物胚胎的改进的冷冻保存技术的有效性。本发明证明,这样的技术可以为奶牛业提供显著的益处。

[0078] 在一些实施例中,可以将保存的胚胎供应到其他农场和企业,例如使它们能够产生杂交子代和/或杂交群。在一些实施例中,本发明允许使用其父母的F0配子通过选择性育种来筛选杂交牛和重建高效杂交牛的商业方法。

#### [0079] 防冻剂

[0080] 本文所述,本发明提供了用于冷冻保存牛胚胎和/或使用冷冻保存的牛胚胎实现受精的技术。在一些实施例中,根据本发明使用的冷冻保护剂是或包含细胞内冷冻保护剂。在一些实施例中,根据本发明使用的冷冻保护剂是或包含细胞外冷冻保护剂。在一些实施例中,示例性的冷冻保护剂(例如,用作细胞内冷冻保护剂)可以是或包括:二甲基亚砷(DMSO)、甘油、聚乙二醇(PEG)及其组合。在一些实施例中,示例性的冷冻保护剂(例如,用作胞外冷冻保护剂)可以是或包含:蔗糖、海藻糖、右旋糖及其组合。在一些具体的实施例中,根据本发明使用的冷冻保护剂可以是或包含丙二醇。

#### [0081] 胚胎发育阶段

[0082] 在一些实施例中,在发育的各个阶段可以将胚胎冷冻保存。在一些实施例中,胚胎可以在选自由桑葚胚、早期胚泡、胚泡和扩张囊胚组成的组的发育阶段冷冻保存。囊胚形成后,胚胎准备植入子宫壁。在一些实施例中,早期胚泡阶段的特征在于空腔刚刚开始形成并且胚泡细胞尚不能区分。在一些实施例中,扩展胚泡阶段的特征在于完全形成的腔。

#### [0083] 冷冻保存装置

[0084] 本发明提供了用于冷冻保存胚胎的装置。在一些实施例中,装置包括位于装置内的第一区域内的冷冻保存溶液中的冷冻保存的胚胎,第一区域的侧面为:第二区域和第三区域,每个区域含有空气组成,第二区域和第三区域的侧面为:第四区域和第五区域,每个区域含有解冻溶液,第四和第五区域的侧面为:第六区域和第七区域,每个区域含有空气,第六和第七区域的侧面为:第八区域和第九区域,每个区域含有解冻溶液。在一些实施例中,装置的一个或多个区域是腔室。

[0085] 在一些实施例中,本发明提供了用于冷冻胚胎的多个装置。在一些实施例中,每个多个装置包含来自单次配种的胚胎。

[0086] 在一些实施例中,本发明提供了包括制备多个胚胎的步骤的方法;冷冻保存多个胚胎;并以约40%的受孕率移植胚胎。在一些实施例中,将胚胎在冷冻保存和移植至受体牛之间可选地储存一段时间。在一些实施例中,冷冻保存和移植至受体牛之间的时间段可以是分钟、数小时、数天、数周、数月、数年或更长(例如其倍数)。在一些实施例中,将胚胎储存少于约40年、约35年、约30年、约25年、约20年、约15年、约10年、约9年、约8年、约7年、约6年、约5年、约4年、约3年、约2年或约1年的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存少于约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、约2、约1个月或更少的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存小于约6周、约5周、约4周、约3周、约2周、约1周或更短的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存小于约7天、约6天、约5天、约4天、约3天、约2天或约1天的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存一段时间,时间少于约24小时、约20小时、约16小时、约12小时、约8小时、约4小时、约3小时、约2小时或约1小时。在一些实施例中,将胚胎储存小于约60分钟、约50分钟、约40分钟、约30分钟、约20分钟、约10分钟、约5分钟、约4分钟、约3分钟、约2分钟或约1分钟的时间段。

[0087] 在一些实施例中,在移植至受体牛之前,胚胎可以保存数分钟、数天或数年。在一

些实施例中,胚胎可以被保存的时间段可以是数分钟、数小时、数天、数周、数月、数年或更长(例如其倍数)。在一些实施例中,将胚胎储存少于约40年、约35年、约30年、约25年、约20年、约15年、约10年、约9年、约8年、约7年、约6年、约5年、约4年、约3年、约2年或约1年的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存少于约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、约2、约1个月或更少的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存小于约6周、约5周、约4周、约3周、约2周、约1周或更短的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存小于约7天、约6天、约5天、约4天、约3天、约2天或约1天的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存一段时间,时间少于约24小时、约20小时、约16小时、约12小时、约8小时、约4小时、约3小时、约2小时或约1小时的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存小于约60分钟、约50分钟、约40分钟、约30分钟、约20分钟、约10分钟、约5分钟、约4分钟、约3分钟、约2分钟或约1分钟的时间段。

[0088] 在一些实施例中,冷冻保存的步骤包括在装置中进行。根据本文公开的方法可以将胚胎冷冻保存在装置内。在一些实施例中,冷冻保存的步骤包括冷冻保存多个胚胎,每个在它自己的装置中,从而产生一组装置。在一些实施例中,多个装置被保持第一时间段。在一些实施例中,在第一时间段之后,将至少一个胚胎移植至受体牛;并且可选地将剩余的胚胎保持第二时间段。在一些实施例中,第二时间段可以长达40年。在一些实施例中,胚胎可以在移植至受体牛之前存储数分钟、数天或数天。在一些实施例中,胚胎可以被储存的第二时间段可以是数分钟、数小时、数天、数周、数月、数年或更长(例如其倍数)。在一些实施例中,将胚胎储存少于约40年、约35年、约30年、约25年、约20年、约15年、约10年、约9年、约8年、约7年、约6年、约5年、约4年、约3年、约2年或约1年的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存少于约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、约2、约1个月或更少的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存小于约6周、约5周、约4周、约3周、约2周、约1周或更短的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存小于约7天、约6天、约5天、约4天、约3天、约2天或约1天的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存一段时间,时间少于约24小时、约20小时、约16小时、约12小时、约8小时、约4小时、约3小时、约2小时或约1小时的时间段。在一些实施例中,将胚胎储存小于约60分钟、约50分钟、约40分钟、约30分钟、约20分钟、约10分钟、约5分钟、约4分钟、约3分钟、约2分钟或约1分钟时间段。

[0089] 在一些实施例中,该装置包括用于容纳一个或多个冷冻保存胚胎的容器。在一些实施例中,容器包括用于容纳侧面是气泡,溶液中的胚胎的区域或腔室。在一些实施例中,容器包括用于将胚胎与其他胚胎分隔的区域或腔室。在一些实施例中,容器包括吸管。

[0090] 示例

[0091] 本研究的目的是比较新鲜、玻璃化或冷冻的ETIVP牛胚胎直接移植后获得的妊娠率。选择通过采卵Girolando雌性复苏的卵母细胞( $n=3171$ ),在 $38.5^{\circ}\text{C}$ , $5\%\text{CO}_2$ 的空气和饱和湿度下,进行24小时的IVM。体外受精是由5只Holstein公牛进行解冻的,性控精液完成的。体外受精后,在IVM和IVF的温度和湿度相同的条件下, $5\%\text{CO}_2$ 和 $5\%\text{O}_2$ 的条件下,将假定受精卵剥露并孵育7天。将BL或BX的阶段I级胚胎移植到新鲜的、玻璃化的或冷冻用于直接移植(DT)中。胚胎被移植到以前同步的受体。新鲜胚胎的受精率为 $51.35\%$ ( $133/259$ ),玻璃化胚胎的受精率为 $34.62\%$ ( $84/234$ ),直接移植胚胎的受精率为 $42.11\%$ ( $96/228$ )。  $p<0.05$ 的概率水平被认为是显著的。从IVP胚胎玻璃化和直接移植获得的受精率表明IVP胚胎的冷冻保存产生与移植新鲜IVP胚胎后获得的相似的结果。突显了IVP胚胎冷冻保存的可能性以



及直接移植方便性的积极方面。

[0092] 示例1:材料和方法

[0093] 除另有说明外,所有试剂均购自Sigma (St.Louis,MO,USA)。示例4和5使用示例1-3中描述的滤泡抽吸程序、体外成熟和体外受精。

[0094] 示例2:卵母细胞的收集和体外成熟

[0095] 在超声波引导下,在Gir和Holstein杂交的36个雌性供体1/2血液中完成112次取卵(OPU),完成该工作。抽吸结束后,将卵母细胞(n=3171)在使用

[0096] 补充有10%胎牛血清(FBS)(GIBCOBRL,GrandIsland,NY)、0.20mM丙酮酸钠和83.4mg/mL丁胺卡那霉素(BIOCHIMICO研究所,RiodeJaneiro,Brazil)的Hepes缓冲的TCM-199培养基(GIBCOBRL,GrandIsland,NY)洗剂。预先选择卵母细胞并将其分类到农场设置的移动实验室中。选择卵母细胞后,将它们运送到BDFalcon5mL聚苯乙烯管上,管包含400 $\mu$ L补充了10%FBS、1mg/mLFSH(Folltropin<sup>TM</sup>,BionicheAnimalHealth,Belleville,加拿大),350 $\mu$ L矿物油覆盖的50mg/mLhCG(Profasi<sup>TM</sup>,Serono,SãoPaulo,Brazil)和雌二醇(1mg/mL)、丙酮酸钠0.20mm和83.4mg/mL丁胺卡那霉素的TCM-199培养基。将复苏的卵母细胞运送到位于MogiMirim/SP的实验室,并且保存在具有成熟培养基的同一输送管中24小时,从OPU那一刻算起。

[0097] 示例3:精液的制备和体外受精(IVF)

[0098] IVF使用Holstein公牛(n=5)雌性精液进行。将精液解冻(35 $^{\circ}$ C,30秒),并通过在补充有0.2mM丙酮酸盐和83.4g/mL阿米卡星,用10mMHepes缓冲的1mLTALP中离心(6000rpm,5min)洗涤两次。精液浓度调整为 $2 \times 10^6$ 精子(sptz)mobile/mL。在矿物油下,每滴50 $\mu$ L TALP-FIV(TALP补充有10 $\mu$ g/mL肝素、18 $\mu$ M青霉素、10 $\mu$ M和8 $\mu$ Mhipotaurina肾上腺素)中添加10微升( $10^5$ sptz)。后来每次滴加25-30个卵母细胞。在38.5 $^{\circ}$ C的孵育箱中用5%CO<sup>2</sup>和最大湿度在空气中孵育20-24小时。

[0099] 实施例4:实验I--在胎牛血清(FBS)存在或不存在下孵育后移植的新鲜IVP胚胎

[0100] 在体外孵育(IVC)的胚胎中

[0101] 在超声引导下通过卵泡抽吸从Girolando供体(n=25)收集卵母细胞(n=665)。这些卵母细胞与来自同一Holstein公牛的性控精液体外受精,组间卵母细胞的偶然分布。

[0102] 使用FBS的组一在矿物油作用下,在补充有2.5%FBS+0.5%牛血清白蛋白(BSA)的100 $\mu$ LSOF(合成输卵管液)(Wells等,1999)中孵育假定的受精卵(n=303)。在IVC的第三天(D3)和第五天(D5),用新的培养基(“喂食”)代替50%的滴体积。在早期胚胎发育中使用“喂食”相同培养基孵育的培养基。

[0103] 没有使用FBS的组一在矿物油作用下,在不含FBS且只补充0.5%牛血清白蛋白(BSA)+10 $\mu$ MEDTA的100 $\mu$ SOF液中孵育假定受精卵(n=362)。在IVC的第三天(D3)和第五天(D5),用新的培养基(“喂食”)代替50%的滴体积。在早期胚胎发育中使用“喂食”相同培养基的孵育培养基。

[0104] 在孵育7天后,将具有(n=82)或不具有FBS(n=88)的组的胚胎移植到先前同步的受体牛中。在哺乳期的前三分之一雌性用作受体。为了使受体同步,使用以下方案:

[0105] 一第0天(D0)-2mg雌二醇苯甲酸酯(Sincrodiol<sup>®</sup>)+阴道内植入物安放(GIDR<sup>®</sup>)

[0106] 一第七天 (D7) -5mL前列腺素F2 $\alpha$ (Lutalyse<sup>®</sup>)

[0107] 一第九天 (D9) -去除植入物和施加1mg的环戊丙酸雌二醇(ECP<sup>®</sup>)

[0108] 一第十八天 (D18) -胚胎移植

[0109] 在实验1中,在补充或不补充FBS的两种不同培养基中孵育的胚胎中比较受孕率。从表1可以看出,两组之间没有差异。这个例子表明,在FBS补充培养基中生长的新鲜胚胎具有与不在FBS中生长的胚胎相似的生存力和受孕率。

[0110] 表1. 使用FBS或不使用FBS生长的新鲜胚胎的受孕率。

[0111]

组	卵母细 胞	移植的 胚胎	受孕率 30天(%)	受孕率 60天(%)
2.5%FBS	303	82	33(37,5 %) <sup>a</sup>	31(35,2 %) <sup>a</sup>
NoFBS	362	88	38(46,3 %) <sup>a</sup>	30(36,5 %) <sup>a</sup>

[0112] <sup>a</sup>p<0.05

[0113] 示例5:用于直接移植的新鲜的、玻璃化或冷冻转移的IVP胚胎的受孕率的比较

[0114] 在体外孵育(IVC)的胚胎中

[0115] 按照实施例2和3中所述的程序,在孵育器(具有5%CO<sub>2</sub>的38.5°C和空气最大湿度)下,将假定的受精卵与颗粒细胞共孵育(每滴25个卵母细胞的偶然组)。将新鲜或玻璃化移植的胚胎在矿物油下,在补充有2.5%FBS+0.5%牛血清白蛋白(BSA)的100 $\mu$ LSOF(Well's等,1999)中孵育。在IVC的第三天(D3)和第五天(D5),用新的培养基(“喂食”)代替50%的滴体积。“喂食”的培养基是早期胚胎发育中使用的相同培养基。在孵育的第三天(D3)评估卵裂率。

[0116] 将用于直接移植冷冻的胚胎在100 $\mu$ L不含FBS修改的SOF滴液中孵育,并仅在矿物油下补充0.5%牛血清白蛋白(BSA)+EDTA10 $\mu$ M。在IVC的第三天(D3)和第五天(D5),用新的培养基(“喂食”)代替50%的液滴体积。“喂食”的培养基是早期胚胎发育中使用的相同培养基。在孵育的第三天(D3)评估卵裂率。

[0117] 在孵育期结束时(D7),将分类为1级的扩大的囊胚装载并移植到新鲜的先前同步的受体中。在所有生产胚胎的受体不存在的情况下,按照SANCHES等人描述的方案将剩余的胚胎玻璃化。(2013年)或冻结以供以后直接移植。

[0118] 胚胎玻璃化

[0119] 在这项工作中,根据先前由SANCHES等,2013描述的方案,将胚胎冷冻保存用于玻璃化方法。

[0120] 简言之,将胚胎(Bx,n=234)在平衡溶液(SE=10%EG)+10%二甲基亚砷(DMSO)中暴露1分钟,然后在玻璃化溶液中(VS=20%EG+20%DMSO)20秒钟。在暴露玻璃化液20秒期

间,将胚胎安置在Cryotop® (Kitazato-Shizuoka-Japan),每个Cryotop3至5个胚胎并且立即置于液氮中。胚胎玻璃化是基于由KUWAYAMA等(2005年)描述的技术Cryotop。这种方法使用最小体积的概念,其中胚胎放置在一个非常薄的塑料薄膜中,塑料薄膜附加到用于方便操作塑料杆。使用的玻璃化溶液在四孔板(NUNCS/A,Roskilde,丹麦)中制备。TCM-HEPES培养基(TCM-199+25mMHepes+10%FBS)是制备含有EG和DMSO的溶液的基础,并且仅在使用时加入。在两组中,平衡溶液(ES)补充有20%FBS,玻璃化溶液(VS)添加0.5M蔗糖。首先,将胚胎置于保持培养基(TCM-HEPES)上,在那里将它们移除(每次3-5个),并进入含有ES的孔1中。在这个溶液中,胚胎保留一分钟,不久之后被移植到含有VS的孔2中,暴露20秒。因此,将胚立即吸取并置于Cryotop尖端的塑料膜上,并将样品浸入液氮中。

#### [0121] 玻璃化胚胎的解冻

[0122] 为了解冻玻璃化的胚胎,将包含胚胎的Cryotops暴露于空气中4秒,然后浸泡在加热溶液(TCM-Hepes+蔗糖0.3摩尔)中,温度大约为35°C。在传递到保持培养基TCM-Hepes(Vieira等2002;Mezzalira等,2004)之前,分别以0.3M蔗糖和0.15蔗糖的梯度进行两次暴露时间(每次5分钟)去除玻璃化溶液。

#### [0123] 胚胎的缓慢解冻

[0124] 总体而言,通过之前针对体内获得的胚胎所描述的慢速冷冻方法将胚胎(n=228)冷冻保存(Voelkel和Hu,1992)。将囊胚和扩张囊胚暴露于由1.5M乙二醇组成的冷冻溶液(SC - solução de congelamento)10分钟。包含SC和胚胎的孵育皿在此期间保持在加热的孵育板上至35°C。将胚胎装入0.25ml的吸管中,将胚胎置于由1.5M乙二醇溶液组成的中央柱上,由四个柱解冻溶液(SC - solução de congelamento)包围,相互之间穿插着空气柱(图1)。解冻溶液(SD)由0.75MEG组成,EG1.5M在DPBS(Nutricell-Campinas-Brazil)中以1:1的比例稀释。装载后,胚胎被放置在先前稳定在-6°C的冷冻机(TK1000®-Uberaba-Brazil)中。放入机器两分钟后,立即在胚柱上方和下方进行结晶(“播种”)。胚胎在-6°C保持10分钟。

[0125] 开始冷冻曲线,以每分钟0.5°C降低温度直至达到-32°C的水平。在冷冻曲线结束时,将胚胎直接浸入液氮中,在移植到受体前将其储存在那里。另见图2A的概述。

#### [0126] 解冻和直接移植

[0127] 在移植用于直接移植的冷冻保存胚胎时,从液氮容器中取出胚胎,在室温下暴露于空气中10秒,然后浸入35°C的热水中30秒。用纸巾干燥吸管并且轻轻搅拌,直到内部的5个柱子被混合。目标是将4个解冻溶液柱与冷冻溶液柱混合,使得吸管内已经开始再水化。混合柱后,将胚胎移植到受体的子宫角。总体参见图2B。

[0128] 用作新鲜胚胎、玻璃化或直接移植受体的雌性处于泌乳期的第一个三分之一。同步方案与例4相同。

#### [0129] 统计分析

[0130] 把同步方案变量、受体年龄、动物类别(泌乳期或干期)和用于体外受精的公牛作为固定效应。通过IBMSPSSStatistics22版(IBM Inc.,Armonk,NY)的二项式Logistic回归分析30和60天的受孕率。概率水平 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

#### [0131] 结果

[0132] 在示例5中,比较新鲜胚胎移植、玻璃化或冷冻的直接移植在30天和60天时的受孕率(表2)。在这种情况下,新鲜胚胎移植51.35% (133/259) 与使用冷冻保存的两组比较存在差异。然而,与直接移植胚胎42.11% (96/228) 相比,玻璃化胚胎的受孕率没有差异( $p < 0.05$ ) 34.62% (84/234)。

[0133] 表2:新鲜、玻璃化或冷冻直接移植的IVP胚胎在30和60天间胚胎受孕率与同期3组胚胎损失率的比较。

[0134]

胚胎	移植的胚胎	受孕率 30 天 (%)	受孕率 60 天 (%)	%损失率 (30-60 天)
新鲜	259	133 (51.	112 (43.	15.8%

[0135]

		4%) <sup>a</sup>	2%) <sup>a</sup>	
玻璃化	234	84 (34.6 %) <sup>b</sup>	73 (31.2 %) <sup>b</sup>	9.9%
直接移 植	311	125 (40. 19%) <sup>b</sup>	108 (34. 72%) <sup>b</sup>	13.6%

[0136] <sup>a,b</sup> $p < 0.05$

[0137] 讨论

[0138] 详述了新鲜的、玻璃化的或冷冻的直接移植中移植的IVP胚胎的受孕率的比较。这是第一个这样的研究,特别是对于在瘤牛-普通牛中移植的胚胎数量一致的研究。

[0139] Perry (2014) 提供的2013年数据显示全世界只有8.9%的移植IVP胚胎被冷冻保存。不希望受任何特定理论束缚,我们提出,这种低比率可能是由于这些冷冻保存的胚胎与新鲜的冷冻胚胎相比具有更高的敏感性和/或更低的生存力(例如,当暴露于胚胎复苏和/或移植技术时);这一低比率是大多数商业实验室使用这种技术的限制方面(George, 2008)。然而,鉴于IVP胚胎生产数量的增加,寻找体外冷冻胚胎的适当策略已变得至关重要。

[0140] 当考虑遗传物质、供应、材料和工艺时,世界处置超过90%体外生产的胚胎(Perry, 2014),这反映了更广泛的损失。此外,当需要仅使用新鲜胚胎工作时,管理植入受体的胚胎的后勤工作变得更为重要。所有这些缺点,剩余胚胎的处置增加了技术的成本,使其盈利能力和竞争力下降。根据PONTES (2013) 的观点,体外巴西公司在2002年至2008年之间因为没有完善的冷冻保存方案而驳回了大约25,000个IVP胚胎。

[0141] 除了与冷冻保存和/或使用冷冻保存的胚胎相关的挑战之外,在适用于不同种族

的牛类动物的技术方面存在相当大的差距。据了解,普通牛动物和瘤牛动物之间存在各种繁殖差异。例如,一个区别是细胞器的特征。VISINTIN等人(2002)使用体内胚胎工作,证明了瘤牛和普通牛胚胎之间的特定特征,特别是胞质内脂质的量。考虑到巴西的气候和地理条件,这项工作的目标使用源自普通牛-瘤牛奶牛群的胚胎,包括供体Girolando发生。由于在牧场上的牛奶生产适应性好,而且成本较低,这种杂交承担了巴西80%的牛奶产量(Girolando,2015)。

[0142] 对Girolando雌性胚胎生产的兴趣近年来提供了几个出版物。PONTES等人(2010)比较了Holstein、Gir和Gir供体卵泡期的胚胎产量。在这项研究中,我们观察到Gir奶牛、Holstein奶牛的胚胎/抽吸产量较高(分别为3.2和2.2)。然而,与其他两个品种相比,Girolando的胚胎产量平均高出两倍(5.5个囊胚)。本发明认识到,在IVP普通牛-瘤牛胚胎中的这种优异的性能允许开发改进的胚胎冷冻保存技术,例如根据可行性实验中的样品丰富度并且获得妊娠。

[0143] 与体内胚胎相比,IVP胚胎具有较低的冷冻耐受性(Abe等,2002),并且这种增加的敏感性的原因主要归因于在IVP胚胎的细胞质中发现的细胞内脂质的更高积累(Abe等,2002;Rizos等,2002;Sudano等,2011)。在这种情况下,作为培养物中所用培养基的补充物的胎牛血清(FBS)被鉴定为造成冷冻后较低的胚胎存活(Diez等,2001;Abe等,2002;Lonergan等,2003)的原因。然而,胞质内脂滴浓度最高不能被认为是冷冻保存的唯一有害因素,其中一个问题是多因素的,在IVP的各个阶段都涉及到严格的质量控制,带有冷冻保存观点获得胚胎质量(Sudano等,2013)

[0144] 在实施例4中,在同一组供体中进行滤泡抽吸,并且在不存在或存在FBS的情况下孵育胚胎。目的是比较两组移植新鲜胚胎的妊娠率(有或没有FBS)。有一些报道(George等,2008),用FCS(FetalCalfSerum)孵育的胚胎与用BSA孵育的IVP胚胎相比,胚胎和胎盘的伸长率更高。

[0145] 这些工作之间的直接比较是有价值的,例如因为大多数其他工作仅评估胚胎的再扩张率和孵化率,而没有延伸到移植生产的胚胎。另外,在每一个这些研究中,培养基的组成和孵育条件之间存在许多差异。

[0146] 示例4中描述的研究中,组之间没有观察到妊娠差异( $P < 0.05$ ),这使得我们可以推断配发FBS用于体外孵育导致与不使用FBS一致的若干受孕。

[0147] 本发明认识到,除了考虑FBS和孵育条件之外,还有另一个重要方面需要考虑:防冻剂。冷冻保存方案应该能够阻止细胞内冰晶的形成,并且试图将冷冻过程中对细胞的毒性和渗透应力降到最低(Campos-Chillon等,2006)。因此,许多防冻剂如甘油和乙二醇(EG)对胚胎有毒性(Dochi等,1988)。减少胚胎在冷冻前和冷冻后暴露于这些冷冻保护剂的时间可以减少毒性效应,从而获得更高的解冻后胚胎存活力(Sommerfield和Niemann,1999)。

[0148] 在20世纪90年代早期,Voelkel和Hu(1992)证明,使用乙二醇作为冷冻保护剂可以替代冷冻-解冻胚胎的直接移植,受孕率比用新鲜胚胎获得的略低(VoelkelHu,1992,Leibo和Mapletoft,1998)。直接移植方法使解冻后胚胎细胞中的再水化步骤可以简化,从而使其更容易获得,并且可以在现场进行简单的技术。从那时起,直接移植已被广泛接受用于超排卵供体收集的体内生产的胚胎冷冻。

[0149] 然而,对于IVP胚胎,IVP胚胎冷冻最广泛使用的方法是玻璃化(Morató和Mogas,

2014),主要归因于冷冻的速度和低成本。这使得胚胎移植成为效率更高的技术,不再取决于同步受体的可用性。无论是冷冻法、玻璃化法还是直接移植,受孕率都低于新鲜胚胎(Leibo和Mapletoft,1998)。玻璃化的缺点是需要合格的胚胎学家进行再加热胚胎,这超出了实验室所要求的最低结构—使其在现场和大规模应用进一步复杂化(Morató和Mogas,2014)。

[0150] 在本研究中,我们使用1.5M乙二醇作为胚胎冷冻保护剂的慢冷冻(直接移植)胚胎的方案。然而,在我们团队之前进行的实验中,我们发现当胚胎在1.5M乙二醇的中心柱中冷冻,侧柱仅由DPBS组成时,胚胎解冻后孵化率较低。不希望被任何特定的理论所束缚,我们建议对我们的观察的一种解释是胚胎与解冻后DPBS直接接触时非常快地被再水化。

[0151] 我们选择检查在胚胎两侧排列成四列,由0.75M乙二醇组成的解冻溶液的使用。用这种方式,流进胚胎细胞的流量可以更缓慢地发生,保持其完整性。类似的策略被提出来体内冷冻胚胎,使用朝向胚胎的侧柱,由被称为“持有培养基”溶液组成,“持有培养基”由0.37摩尔乙二醇组成(Voekel和Hu,1992年)。在这项工作中,实验组的受孕率与对照组(50%)相同。尽管受孕率相对较低,约为40%,但重要的是要考虑到体内胚胎对其发育的较低压力支持并且提供较高的妊娠率。因此,体外生产的瘤牛-普通牛胚胎的包策略可以被认为是成功的。

[0152] 在这一研究中观察到的另一个重要的观点是,与分类为胚泡和扩大的囊胚的胚胎相比,当它们在紧密的桑椹胚阶段是被冷冻保存的IVP胚胎冷冻后,胚胎存活率最低。作者检查桑椹胚和囊胚的孵化率发现相似的结果,作为通过慢方法(PollardandLeibo,1993)在冷冻保存后胚胎存活率指标,但是对胚胎冷冻保存的最佳阶段没有共识(Saragusty和Arav,2011)。

[0153] 与通过玻璃化(34.6%)和直接移植(40.19%)冷冻保存的IVP胚胎获得的受孕率相比,IVP新鲜胚胎移植(51.4%)30天时的受孕率更高( $P>0.05$ )。这些结果高于LIM等人(2008)获得的结果。无血清条件下孵育的IVP胚胎通过慢速冷冻(22.9%)冷冻保存也高于使用开放式拔管技术(Vajta等人,1998)通过玻璃化冷冻保存的IVP胚胎。

[0154] 不希望受任何特定理论的束缚,我们提出将不含FBS的孵育加上将胚置于吸管装置中的加载策略的组合可能是我们的方案成功的原因。妊娠期60天的受孕率也得到了评估,移植的新鲜胚胎(43.2%)更高( $P>0.05$ ),比较结果与Hasler等人(1995)发表的结果类似,他在受精后7天移植获得IVPtaurus42%设计受孕率。

[0155] 与本文进行的玻璃化相比,本文的发现证明了某些直接移植(例如,慢速冷冻)方法的优越性。在本发明的一些实施例中,可能需要制造一组胚胎(例如使用直接移植/慢速冷冻技术),例如可以保持在第一位置(例如生产的位置)。在一些实施例中,这些保持的胚胎的移植可能比使用玻璃化技术更加实用。

[0156] 在一些实施例中,本文描述的技术利用性别分离的精液;通常认为IVP是允许最高效地使用性别分离精液的方法,在奶牛养殖中尤其有价值。

[0157] 在一些实施例中,可以采用一种或多种变化或改善,例如以减少在本文描述的某些研究中观察到的早期胚胎损失率(例如,在比较30天和60天妊娠时)。

[0158] 此外,本发明提供了通过IVP胚胎的冷冻保存获得妊娠的成就和进步。我们得出这样的结论:体外生产的瘤牛-普通牛胚胎可以在冷冻保存后通过玻璃化方法或者慢速冷冻/

直接移植提供约40%的妊娠率。阅读本发明内容的本领域普通技术人员将会理解,将其教导应用于不同的背景(例如不同的品种、不同的物种、不同的亚种、不同的杂交和/或不同的杂种等)将会合理预计达到至少约10%、约11%、约12%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%或者约50%,在每种情况下都大大高于使用现有技术通常观察到的妊娠率(例如,约9%)。

[0159] 特别值得注意的是,通过特别改善和或启动(例如,通过允许达到至少30%的受孕率)有效的慢速冷冻/直接移植策略,本文所述的技术代表了胚胎的体外生产的重要的步骤,成为在畜牧业中广泛使用的生物技术。

[0160] 等同

[0161] 本领域技术人员将认识到,或仅仅使用常规实验就能够确定本文描述的本发明的具体实施例的许多等同物。本发明的范围并不限于上述说明,而是如所附权利要求所述。

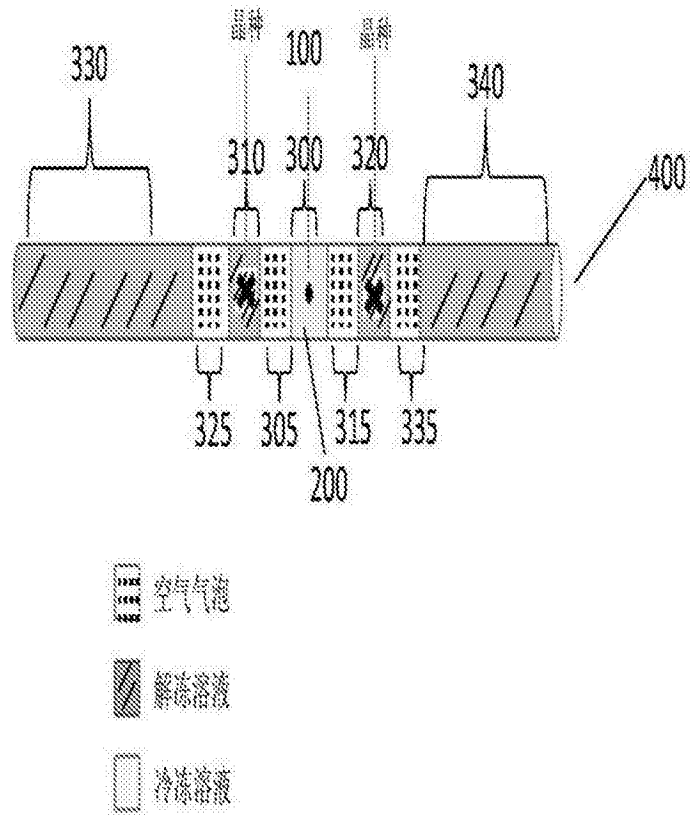


图1



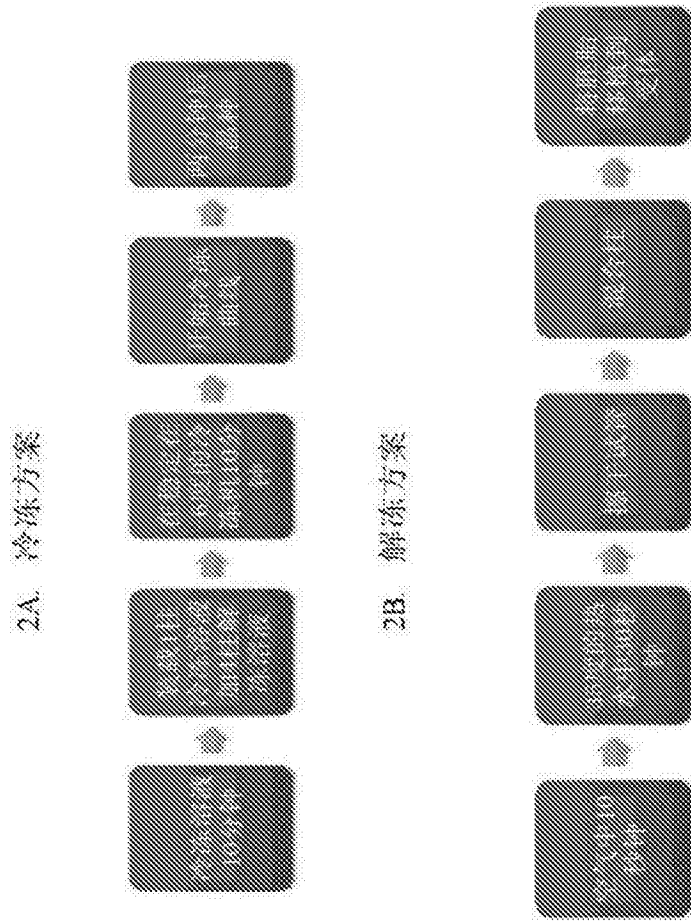


图2