

牛卵母母细胞的体外成熟培养*

雷安民, 高志敏, 杨春荣, 窦忠英

(西北农林科技大学 家畜生殖内分泌与胚胎工程农业部重点开放实验室, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 1997-12~ 2001-08 共进行了 97 批牛卵母细胞体外成熟试验, 总成熟率为 70.75% (3 561/5 033)。其中培养液为 TCM 199+ 0.12 g/L 丙酮酸钠+ 10 mmol/L Hepes+ 体积分数 8% NCS+ 10 mg/L FSH+ 10 mg/L LH+ 1 mg/L E₂ (培养液 1 组) 组进行 50 批试验, 成熟率为 65.75% (1415/2152)。培养液 1 组有 5 批次未添加 Hepes 盐, 其成熟率为 75.21% (88/117); 另 45 批次添加 Hepes 盐, 成熟率为 65.21% (1327/2035)。培养液为 TCM 199+ 体积分数 8% 发情牛血清+ 0.12 g/L 丙酮酸 (培养液 2 组) 组进行 47 批次试验, 成熟率为 74.49% (2 146/2 881)。培养液 2 组中有 9 批次添加了 40 mg/L 的庆大霉素, 其成熟率为 72.15% (342/474); 另 38 批次未添加庆大霉素, 其成熟率为 74.95% (1 804/2 407)。试验同时表明, 激素来源对卵母细胞成熟率无显著影响。

[关键词] 牛; 卵母细胞; 体外成熟

[中图分类号] S823.3+6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)04-0095-03

1997 年, 英国罗斯林研究所科学家 Lan wilm ut 及其合作者, 以成年母羊的乳腺细胞为核供体, 克隆出一只绵羊, 取名 Dolly^[1]。克隆动物 Dolly 的问世, 拉开了全世界体细胞克隆研究的高潮。动物克隆研究目前存在的主要问题是成功率低和操作环节复杂, 因此提高克隆的成功率和建立简洁的实验操作程序是目前克隆研究的主要方向^[2]。由于动物克隆研究的操作环节多, 提高操作效率必须简化每一步操作, 同时又要保证效果可靠。在动物克隆实验中需要大量的去核卵母细胞作为核受体, 因此, 卵母细胞的体外成熟就是动物克隆研究中的一个重要环节。对牛的卵母细胞体外成熟简化操作的探索是简化动物克隆操作程序的组成部分。本研究对牛的卵母细胞体外成熟采用简化的培养方案, 进行了大量的研究并取得了良好的效果。

1 材料和方法

1.1 卵巢来源

卵巢采自西安市个体屠宰场, 采后放入 37℃ 含双抗生理盐水中, 6 h 内运回实验室。回到实验室后将卵巢用 35~ 37℃ 的灭菌生理盐水清洗 3 次, 灭菌吸水纸揩净水珠后, 用装有 12 号针头的 5 mL 注射器吸卵巢表面直径为 2~ 5 mm 卵泡的卵泡液。将抽吸物缓慢注入检卵杯中, 静置, 检卵。

1.2 卵丘卵母细胞复合体的筛选

将检出的卵丘卵母细胞复合体分为 A, B, C 3 级。A 级: 颗粒细胞层完整且紧密, 一般为 4~ 6 层, 胞质均匀; B 级: 颗粒细胞层较少, 一般为 2~ 4 层, 胞质均匀; C 级: 颗粒细胞层不全或为裸卵。只选择 A, B 级卵丘卵母细胞复合体用于成熟培养。

1.3 成熟培养

培养条件为体积分数 5% CO₂, 39℃, 饱和湿度 (以下均同)。成熟培养前 2 h 制作微滴, 上盖石蜡油后置 CO₂ 培养箱中平衡。培养液 1 组配方组成为 TCM 199+ 0.12 g/L 丙酮酸钠+ 体积分数 8% NCS + 10 mg/L FSH+ 10 mg/L LH+ 1 mg/L E₂。培养液 1 组分为添加 10 mmol/L Hepes 盐组和不添加 10 mmol/L Hepes 平衡盐组。培养液 2 组配方组成为 TCM 199+ 0.12 g/L 丙酮酸+ 体积分数 8% 发情牛血清 (为 4 头发情牛的混合血清)。培养液 2 组分为添加庆大霉素组和不添加庆大霉素组。将 A, B 级卵母细胞置平衡后的微滴中培养, 一般每个液滴置 20 个左右的卵母细胞, 培养时间为 19~ 22 h。

1.4 卵母细胞的成熟鉴定

将培养 19~ 22 h 的卵母细胞用 D-hank 液清洗 3 遍, 放入含有 0.3% 透明质酸酶的 D-hank 液内, 在培养箱中孵育 10 min 后用 150 μm 的毛细玻璃管轻轻吹打以除去颗粒细胞, 将得到的裸卵母细胞镜

* [收稿日期] 2001-08-26

[基金项目] 国家“九五”攻关项目 (96-C01-03-02-03)

[作者简介] 雷安民 (1970-), 男, 河南灵宝人, 助理研究员, 在读博士, 主要从事家畜胚胎工程研究。

检, 含有第一极体的定为成熟, 否则定为不成熟。

2 结果

2.1 Hepes 平衡盐对牛卵母细胞成熟率的影响

培养液 1 组共进行了 50 批试验, 其中 5 批未添加 Hepes 平衡盐(美国, Sigma)。添加 Hepes 平衡盐与否对卵母细胞成熟率的影响见表 1。对表 1 中数据进行 χ^2 检验(自由度 $n=1$, $\chi^2=4.78$), 结果表明, 两组间差异显著($P < 0.05$)。

表 1 Hepes 平衡盐对成熟率的影响

Table 1 Maturation rate influenced by Hepes

成熟培养液 Maturation media	成熟数/培养数 No. oocytes matured/ No. oocytes cultured	成熟率/% Rate of maturation
成熟培养液 1(+) Maturation media 1(+)	1 327/2 035	65.21
成熟培养液 1(-) Maturation media 1(-)	88/117	75.21
合计 Total	1 415/2 152	65.75

注: (+) 示添加 Hepes 平衡盐; (-) 示未添加 Hepes 平衡盐。

Note: (+) Added Hepes; (-) Without Hepes

2.2 庆大霉素对牛卵母细胞成熟率的影响

培养液 2 组共进行了 47 批试验, 其中有 9 批添加了抗菌素庆大霉素(西安制药厂, 40 mg/L), 38 批未添加。庆大霉素对卵母细胞成熟率的影响见表 2。对表 2 中数据进行 χ^2 检验(自由度 $n=1$, $\chi^2=1.63$), 结果表明, 两组间差异不显著($P > 0.05$)。

表 2 庆大霉素对成熟率的影响

Table 2 Maturation rate influenced by

Gentamycini Sulfas

成熟培养液 Maturation media	成熟数/培养数 No. oocytes matured/ No. oocytes cultured	成熟率/% Rate of maturation
成熟培养液 2(+) Maturation media 2(+)	1 804/2 407	74.95
成熟培养液 2(-) Maturation media 2(-)	342/474	72.15
合计 Total	2 146/2 881	74.49

注: * (+) 表示添加庆大霉素; (-) 表示未添加庆大霉素。

Note: * (+) Added Gentamycini Sulfas; (-) Without Gentamycini Sulfas

2.3 激素来源对牛卵母细胞成熟率的影响

培养液 1 组中未添加 Hepes 盐的 5 批试验与培养液 2 组中未添加庆大霉素组的 38 批试验相比较, 主要是激素来源不同。培养液 1 组中未添加 Hepes 盐的 5 批试验中激素来源为人工添加的外源激素(10 mg/L FSH + 10 mg/L LH + 1 mg/L E₂, 西德

Serva), 培养液 2 组中未添加庆大霉素组的 38 批试验激素来源为发情牛血清(体积分数 8% 的发情牛血清), 激素来源对卵母细胞成熟率的影响见表 3。对表 3 中数据进行 χ^2 检验(自由度 $n=1$, $\chi^2=0.0052$), 结果表明, 两组间差异不显著($P > 0.05$)。

表 3 激素对成熟率的影响

Table 3 Maturation rate influenced by Homones

激素来源 Source of homones	成熟数/培养数 No. oocytes matured/ No. oocytes cultured	成熟率/% Rate of maturation
外源激素 Quality homones	88/117	75.21
发情牛血清 Oestrus cow serum	1 804/2 407	74.95
合计 Total	1 892/2 524	74.96

3 讨论

3.1 成熟培养液添加 Hepes 平衡盐对卵母细胞成熟的影响

Hepes 盐是一种不依赖 CO₂ 的 pH 缓冲剂, 添加进培养液的目的主要是维持溶液 pH 值的稳定性。传统的成熟液配方一般都添加 Hepes 盐, 同时也添加 NaHCO₃ 用于维持培养液在培养箱 CO₂ 环境中的 pH 值的稳定。本试验中用 TCM-199 粉配制溶液的过程中发现加入 NaHCO₃ 后溶液的 pH 值一般都可保持在 7.2~7.4, 一旦加入 Hepes 盐后, 溶液的 pH 值立即下降到 6.8 以下, 此时再调整 pH 值比较繁琐。从理论上讲, 去除 Hepes 盐并不影响对成熟培养的效果, 因此在配液时设计未添加 Hepes 盐组以观察试验效果。试验结果表明, 未添加 Hepes 盐组的成熟率明显高于添加组。添加 Hepes 盐组成熟率低的原因, 可能在于调整溶液 pH 值过程中添加的盐酸标准液或氢氧化钠标准液, 在调整 pH 值的同时也轻度地改变了溶液的渗透压, 从而对成熟率产生了一定的影响。

3.2 培养液中激素来源对卵母细胞成熟的影响

1991 年, Coskun S 等^[3]的研究表明, 单独使用发情牛血清而不添加任何激素即可使卵母细胞体外成熟率达到 68.1%~78.0%。1989 年, 国内旭日干等^[4]研究表明, 在外源激素完全相同的情况下, 添加发情牛血清与添加胎牛血清及新生牛血清相比, 可以使卵母细胞获得更高的受精率和发育率。1993 年, 徐少甫等^[5]在羊上的研究也表明, 添加发情羊

血清可以获得更高的卵母细胞成熟率。以上的试验研究表明,发情牛血清中的激素水平可能类似于成熟排卵前的卵泡液,所以单独添加即可满足成熟的要求。试验过程中为防止牛个体激素含量差异的影响,同时采了4头以上的发情牛血清混合后使用。牛为常年发情家畜,因此采血时并未考虑季节的影响。本试验结果表明,两组间差异不显著,这就为牛卵母细胞的简化培养提供了试验依据。2000年,郭继彤^[6]采用成熟培养液内单独添加人绝经期绒毛膜促性腺激素(HMG, 0.075单位/mL)用于山羊卵母细胞的培养,获得了74.2%的极体率,这也为卵母细胞体外培养的简化操作提供了有价值的参考。

3.3 培养液中加庆大霉素对卵母细胞成熟的影响

本试验中卵母细胞的采集与成熟操作均在层流室中完成,一般情况下只要规范操作,不会产生外源性污染。但在炎热的季节,卵巢本身在采集时就已经

发生较为严重的污染,为防止培养过程中内源性的污染,本试验在培养液内添加庆大霉素。庆大霉素为水剂,可以直接分装,只要保存在0~8℃即可,使用非常简单。由于过高的抗菌素浓度在抑灭细菌的同时也会抑制卵母细胞中线粒体的分裂增殖^[7],影响了卵母细胞的成熟,因此选择恰当的使用浓度非常关键。从本研究结果看,为防止污染,在培养液内添加40 mg/L的庆大霉素对牛卵母细胞的成熟率没有显著影响。

4 小 结

本试验的研究结果表明,使用培养液2对牛的卵母细胞进行体外成熟培养完全可以满足核移植研究的需要。为防止污染,在培养液2内添加40 mg/L的庆大霉素对牛卵母细胞的成熟率没有显著影响。

[参考文献]

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature, 1997, 385: 810- 813
- [2] Gurdon J B, Colman A. The future of cloning[J]. Nature, 1999, 402: 743- 746
- [3] Coskun S, Sanbuisbo A, Lin Y C, et al Fertilizability and subsequent development ability of bovine oocytes matured in medium containing epidemal growth factor (EGF) [J]. Theriogenology, 1991, 36: 485- 496
- [4] 旭日干, 张锁连, 薛晓先, 等. 屠宰母牛卵巢卵母细胞的体外受精与早期发生[J]. 内蒙古大学学报, 1989, 20(3): 407- 414
- [5] 徐少甫, 成国祥, 成 勇, 等. 超排山羊卵母细胞体外成熟的初步研究[J]. 江苏农学院学报, 1993, 14(2): 61- 67.
- [6] 郭继彤. 成年体细胞克隆山羊研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2000
- [7] 汪堃仁, 薛绍白, 柳惠图, 等. 细胞生物学[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1998: 210

Maturation culture of bovine follicular oocytes in vitro

LEI An-min, GAO Zhi-min, YANG Chun-rong, DOU Zhong-ying

(Key Laboratory of Livestock Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology, Ministry of Agriculture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: During 1997-12- 2001-08, bovine follicular oocytes were cultured in vitro for 97 times, the total percentage of oocytes maturation was 70.75% (3561/5033). Among the total experiment, follicular oocytes were cultured in the medium 1 (TCM 199+ 0.12 g/L Pyruvic acid Na-salt+ 8% NCS+ 10 mg/L FSH+ 1 mg/L LH+ 1 mg/L β E₂) for 50 times, the maturation rate was 65.75% (1415/2152). Among the 50 times, follicular oocytes were cultured in the medium 1 without Hepes for 5 times, the maturation rate was 75.21% (88/117), the other 45 times follicular oocytes were cultured in the medium 1 with 10 mmol/L Hepes, the maturation rate was 65.21% (1327/2035). Follicular oocytes were cultured in the medium 2 (TCM 199+ 0.12 g/L Pyruvic acid Na-salt+ 8% OCS) for 47 times, the maturation rate was 74.49% (2146/2881). Among the 47 times, follicular oocytes were cultured in the medium 2 with 40 mg/L Gentamycini Sulfas for 9 times, the maturation rate was 72.15% (342/474), the other 38 times follicular oocytes were cultured in the medium 2 without Gentamycini Sulfas, the maturation rate was 74.95% (1084/2407). Influence to follicular maturation of hormones was not obvious (75.21% vs 74.95%).

Key words: bovine; oocytes; maturation in vitro