

牛卵母细胞的去核与激活*

李裕强, 张 琰, 安志兴, 张 涌

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 比较了 Ionomycin (离子霉素) 和乙醇及其与其他物质的组合激活牛卵母细胞的效果, 并研究了去核时间、细胞松弛素B、末期去核等对去核效率的影响。结果表明, 配合使用 6-二甲氨基嘌呤(6-DMA P) 或放线菌酮(CHX) 可显著提高 Ionomycin 或乙醇激活牛卵母细胞的效率, Ionomycin+ 6-DMA P 激活的牛孤雌胚在 8/16 细胞之后的发育率明显高于乙醇+ 6-DMA P (或 CHX)。牛卵母细胞的去核在成熟培养 20 h 或之前进行效果较好, 此时有较高比率的卵母细胞中第一极体与染色体位置靠近。牛卵母细胞在不含细胞松弛素 B 的操作液中可进行去核, 但所得核移植胚胎的卵裂率明显下降, 而对 8/16 细胞胚之后的发育没有明显影响。牛卵母细胞的末期去核率显著高于中期, 二者核移植胚胎的早期发育率基本相同。

[关键词] 卵母细胞; 牛; 去核; 激活

[中图分类号] S814.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)11-0006-05

自然状况下或体外受精时, 精子的进入会启动停滞于 M II 期的卵母细胞继续发育, 这一过程称为卵母细胞的激活。一些物理或化学因素也可以使卵母细胞活化。卵母细胞激活效率的高低对核移植胚的发育至关重要。Ionomycin (离子霉素) 配合蛋白激酶抑制剂或蛋白质合成抑制剂激活牛卵母细胞被证明作用效果比较确切, 而且操作程序简化^[1]。乙醇很早已证明可以激活卵母细胞, 但单独使用效果不稳定, 因此未被广泛使用, 有报道称配合使用蛋白质合成抑制剂可以提高乙醇对卵母细胞的激活效率^[2]。

卵母细胞去核效率的高低也与核移植胚的发育直接相关。广泛使用的卵母细胞去核方法是以第一极体为标志, 连同极体一起吸除极体附近的卵质^[3]。这种方式的去核效率与极体/染色质的相对位置有很大关系, 为此, 本研究观察了牛卵母细胞成熟培养不同时间染色质位置的移动, 以确定最佳的去核时间。近几年末期去核受到关注^[4]。所谓末期取核, 就是先对卵母细胞激活, 待第二极体排出后, 以第二极体为标志去核。末期去核的优点是时间同期化; 而且末期去核时选择的只是有确切的活化反应, 即排出第二极体的卵母细胞, 这样就可以筛选掉质量不高的卵母细胞, 增加核移植整个环节的效率。本研究比较了 Ionomycin 和乙醇及其与 6-二甲氨基嘌呤(6-

DMA P) 或放线菌酮(CHX) 的组合激活牛卵母细胞的效果, 研究了牛卵母细胞末期去核的效率及对核移植胚发育的影响。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的体外成熟

牛卵巢采自西安屠宰场, 运回实验室后, 用 12# 针头抽吸卵巢表面 2~8 mm 卵泡, 收集卵丘卵母细胞复合体(COC), 移入成熟培养液, 置 CO₂ 培养箱(Sanyo), 于 38.5 °C、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度中培养。成熟培养液: TCM 199(Gibco)+ 10% FBS(Gibco)+ 10 mmol/L Hepes+ 0.5 mmol/L 丙酮酸钠+ 0.1 IU/mL 尿促性素(HMG, 丽宝生化制药公司)+ 1 µg/mL E₂(Sigma)^[5]。孤雌激活用卵母细胞体外成熟培养(IVM) 24 h, 核移植用卵母细胞 IVM 20 h。

1.2 卵母细胞的激活

成熟培养后, COC 置含 0.1% 透明质酸酶(Sigma) 的 DPBS (无 Ca²⁺, Mg²⁺) 中, 漩涡振荡 3~5 min, 去除卵丘细胞。排出第一极体且形态正常、胞质均一的卵母细胞用于激活。所采用的激活方法如下:

① Ionomycin 含 5 µmol/L Ionomycin (Sigma) 的 TCM 199 液处理 5 min;

* [收稿日期] 2003-09-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39830280)

[作者简介] 李裕强(1969-), 男, 甘肃静宁人, 副研究员, 博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

② Ionomycin + 6-DMA P 含 5 $\mu\text{mol/L}$ Ionomycin 的 TCM 199 液处理 5 min, 洗涤后置含 2 mmol/L 6-DMA P (Sigma) 的 TCM 199 液中, CO_2 箱培养 4 h;

③ 乙醇 含体积分数 7% 乙醇的无血清 TCM 199 液处理 7 min;

④ 乙醇+ 6-DMA P 含体积分数 7% 乙醇的无血清 TCM 199 液处理 7 min, 洗涤后置含 2 mmol/L 6-DMA P 的 TCM 199 液中, CO_2 箱培养 4 h;

⑤ 乙醇+ CHX 含体积分数 7% 乙醇的无血清 TCM 199 液处理 7 min, 洗涤后置含 1 $\mu\text{g/mL}$ CHX (Sigma) 的 TCM 199 液中, CO_2 箱培养 6 h。

1.3 胚胎培养

孤雌激活胚或核移植胚完成操作后, 用胚胎培养液洗涤 3 次, 置培养液微滴中, 在 38.5 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% CO_2 , 饱和湿度条件下, 与卵丘细胞单层共同培养 8 d, 观察其卵裂及发育能力。胚胎培养液: mSOFaa+ 5% FBS+ 1 mmol/L GSH (谷胱甘肽, Sigma)+ 3.15 mmol/L 葡萄糖(Sigma)。

1.4 卵母细胞的去核

1.4.1 卵母细胞核的荧光染色 去除卵丘细胞的卵母细胞置含 5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 (Sigma) 的 TCM 199+ 10% FBS 液中, 于 CO_2 箱中 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 荧光显微镜下观察。

1.4.2 卵母细胞的去核 去除卵丘细胞的裸卵, 以 10~15 枚为 1 组, 置含 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 细胞松弛素 B (CB, Sigma) 的 TCM 199 液中孵育 20 min 后, 移入 50 μL TCM 199+ 10% FBS+ 7.5 $\mu\text{g/mL}$ CB 液滴中, 石蜡油 (Sigma) 覆盖, 在显微操作仪 (Nikon) 下

用外径 18~20 μm 的玻璃细管去核, 荧光检测去核效率。

1.5 细胞核移植

以体外培养的 5~10 代牛皮肤成纤维细胞作为供体细胞。在对数生长期消化收集后, 先悬浮于 TCM 199+ 10% FBS 液体中孵育 2 h, 离心后悬浮于 TCM 199+ 0.5% FBS 液中, 置 0.5 mL 离心管, 于 CO_2 培养箱保存 3 d 后使用。

将去核的卵母细胞按每批 10~15 枚置 50 μL TCM 199+ 10% FBS 微滴中, 用石蜡油覆盖, 然后吸取 10~20 μL 供体细胞悬液加入操作液滴, 静置 5 min, 置显微操作仪 (Nikon) 下注核。先用外径 < 10 μm 的显微注射管反复吸取供核细胞, 膜破裂后将细胞核吸入注射管, 然后将注射管插入卵母细胞, 轻轻将细胞核注入卵母细胞质。

1.6 数据处理

数据进行方差分析与 t -检验。

2 结果与分析

2.1 牛卵母细胞的激活效率

采用 5 种处理程序激活牛卵母细胞, 激活后的孤雌发育情况见表 1。就卵裂率而言, 各处理之间无显著差异, 发育能力在不同处理之间差异较大。Ionomycin 或乙醇处理后, 配合使用 6-DMA P 或 CHX, 能显著提高牛孤雌胚的发育能力。虽然总的囊胚发育率在乙醇+ 6-DMA P 与 Ionomycin+ 6-DMA P 处理之间无显著差异, 但后者发育更为稳定, 其 2-细胞胚到囊胚的发育率显著高于前者, 分别为 29.9% 和 24.5% ($P < 0.05$)。

表 1 不同激活方法对牛卵母细胞的激活效率

Table 1 Bovine oocytes activation efficiency after different treatments

激活方法 Treatments	处理卵子数 No. of oocytes	卵裂率/(% $\pm$ SD) Rate of cleavage	囊胚发育率/(% $\pm$ SD) Rate of blastocysts
Ionomycin	103	67.9 $\pm$ 6.1 a	5.7 $\pm$ 1.6 d
Ionomycin+ 6-DMA P	233	74.7 $\pm$ 3.9 a	22.3 $\pm$ 3.3 e
乙醇 Ethanol	147	74.8 $\pm$ 5.9 a	6.8 $\pm$ 3.1 d
乙醇+ 6-DMA P Ethanol+ 6-DMA P	126	77.8 $\pm$ 2.4 a	19.0 $\pm$ 2.9 e
乙醇+ CHX Ethanol+ CHX	130	78.5 $\pm$ 3.5 a	19.2 $\pm$ 3.6 e

注: 数据后字母相同表示无显著差异 ($P > 0.05$), 不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。表 3, 4 同。
Note: Data with same letter indicate there's no significant difference between them ($P > 0.05$); Data with different letters indicate there's significant difference between them ($P < 0.05$). It is the same in Table 3 and Table 4

2.2 成熟培养不同时间卵母细胞第一极体和染色质的相对位置

检测卵母细胞成熟培养 20, 22, 24, 26 h 时卵子中细胞核与第一极体的位置表明, 卵母细胞成熟后,

第一极体和核的位置关系分为 4 种, 见图 1。
成熟培养不同时间, 核与极体的位置关系及其比率见表 2。由表 2 可见, 随着卵母细胞成熟时间的延长, 卵母细胞 M II 期核与第一极体的相对距离变

大。在成熟培养 20 h 时,有较高比例的卵母细胞极体与M II 期核位置靠近。因此,在牛的细胞核移植中,去核应在成熟培养 20 h 前后进行,方可取得最佳的去核效果。

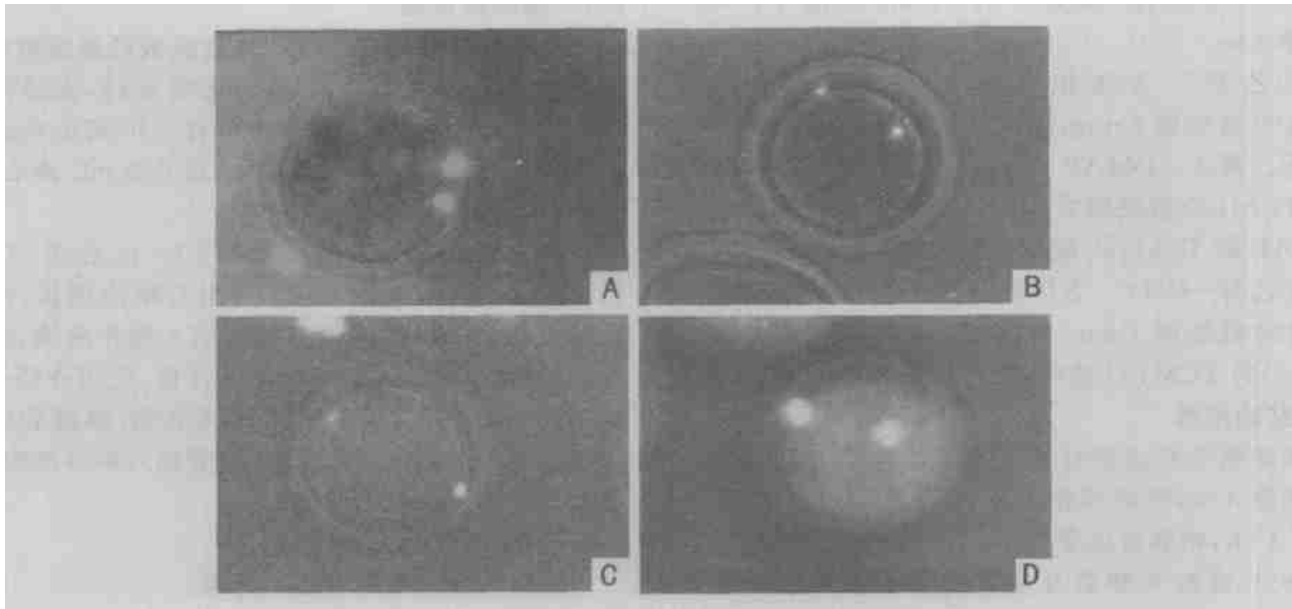


图 1 牛卵母细胞成熟培养不同时间核与极体的位置
A. 核位于细胞膜下,与第一极体的夹角在 90°以内;B. 中核与第一极体的夹角在 90°~150°;
C. 中核与第一极体的夹角在 150°~180°;D. 核移入胞质中央
Fig 1 Bovine oocytes' nuclear-1st polar body position at different VM time
A. The angle of nuclear-1st polar body: < 90°;B. The angle of nuclear-1st polar body: 90°~150°;
C. The angle of nuclear-1st polar body: 150°~180°;D. Nuclear in the centre of cytoplasm

表 2 牛卵母细胞成熟培养不同时期核与极体的关系

Table 2 Nuclear-1st polar body position relationship of bovine oocytes at different VM time					
培养时间/h VM time	检测卵子数 No. of oocytes	细胞核与极体的位置关系及其比率/% Nucleus-1st polar body position relationship (rate in all checked oocytes)			
		A	B	C	D
20	97	69.3	13.6	6.4	10.7
22	106	64.1	14.3	7.7	13.9
24	113	58.7	15.7	9.2	16.4
26	92	46.6	18.1	12.9	23.4

注:细胞核与极体的位置关系见图 1 注。
Note: Types of Nuclear-1st polar body relationship see Fig. 1.

2.3 去核操作液中 CB 的影响

试验中对不含细胞松弛素 B (CB) 去核操作液的去核效率进行了研究,其核移植胚的发育情况见表 3。由表 3 可以看出,含 CB 操作液去核的卵母细

胞所构建的胚胎,其卵裂率和囊胚发育率明显高于不含 CB 组($P < 0.01$),但从 8/16 细胞胚到囊胚的发育率没有显著差异(37.4% 和 36%)。

表 3 细胞松弛素(CB)对卵母细胞去核的影响

Table 3 Effect of CB on bovine oocytes enucleation efficiency				
去核操作液 Manipulation media	重组胚数 No. of reconstructed embryos	2-细胞胚率/(%±SD) Rate of 2-cell embryos	8/16 细胞胚率/(%±SD) Rate of 8/16-cell embryos	囊胚发育率/(%±SD) Rate of blastocysts
TCM 199+ FBS+ CB	486	66.0±5.3 a	40.1±4.4 c	15.0±3.3 e
TCM 199+ FBS	101	50.5±1.8 b	24.8±3.4 d	8.9±2.5 f

2.4 牛卵母细胞末期 II 去核的效率

成熟培养 24 h 的卵母细胞,脱卵丘细胞后置 5 μmol/L ibnomycin 的 TCM 199 液处理 5 min,洗涤

后再用胚胎培养液培养 2 h,然后挑取排出第二极体的卵母细胞去核,吸除第二极体及其附近 10%~20% 胞质,用于核移植。末期去核的效率及核移植胚

的发育情况见表 4。与 M II 期去核相比, 末期 II 去核率明显提高 ($P < 0.01$), 两者核移植胚的卵裂率和囊胚发育率基本一致, 说明末期去核牛卵母细胞可完全应用于构建细胞核移植胚。

表 4 牛卵母细胞末期 II 去核的效率

Table 4 Bovine oocytes telophase II enucleation efficiency				
去核时期 Meiosis stage at enucleation	去核率/(% ±SD) Enucleation rate	重组胚数 No. of reconstructed embryos	2-细胞胚率/ (% ±SD) Rate of 2-cell embryos	囊胚发育率/ (% ±SD) Rate of blastocysts
M II	63.7 ± 6.5 a (540/848)	486	66.0 ± 5.3 c	15.0 ± 3.3 d
T II	87.9 ± 2.1 b (80/91)	73	68.5 ± 3.9 c	13.7 ± 1.6 d

3 讨 论

成熟的卵母细胞阻滞在第二次减数分裂的中期 (M II 期), 受精子穿入或一些理化因素的作用而被再次唤醒, 进入发育过程, 称之为卵母细胞激活。卵母细胞的人工激活方式很多, 除传统的电刺激^[6]和乙醇^[7]外, Ionomycin/6-DMA P^[8]、钙离子载体 A 23187/6-DMA P^[9]、Sr²⁺^[10]、硫柳汞 (thimerosal)/二硫苏糖醇 (DTT)^[11] 等都被证明可以激活卵母细胞。Ionomycin 处理卵母细胞时, 可导致卵母细胞内 Ca²⁺ 库的瞬时钙释放, 启动卵母细胞的活化, 和 6-DMA P 配合使用, 可以增加激活胚正常发育的能力^[1]。本研究结果也证明了这一点。6-DMA P 是一种蛋白激酶抑制剂, 能够抑制丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 活性, 进而破坏 M II 期卵母细胞的微管结构, 抑制第二原核形成及第二极体排出, 促使形成二倍体的原核^[12]。对核移植胚而言, 6-DMA P 还可维持成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 的低活性状态, 防止早熟染色体凝集 (premature chromosome condensation, PCC) 的发生, 避免 PCC 对再程序化的影响^[13]。乙醇处理卵母细胞也可促使单波的钙释放而活化卵母细胞^[14]。在本研究中, 乙醇激活的卵母细胞 2-细胞胚至囊胚的发育率明显低于 Ionomycin 处理组, 其原因可能与二者对卵母细胞的损伤程度有关。Ionomycin 动用胞内钙库的钙, 而且钙水平较低, 而乙醇导致的钙波动包括胞外钙的内流和胞内钙库钙的动员, 钙水平也高, 这可能会导致对卵母细胞更大的毒性反应^[12]。

第一极体排出后, 通常会移离原来的位置, 染色体的位置也会发生变化^[15]。成熟培养的同批卵母细胞之间发育程度存在差异, 因而其成熟时间也不同, 所以在给定的去核时间点上, M II 期卵母细胞第一

极体的位置通常不能标识染色体的位置, 从而影响整批卵母细胞的去核效率。末期去核可以弥补上述缺陷, 激活处理后卵母细胞同期发育, 可以保证在所有卵母细胞中第二极体与染色质靠近或相连的时间实施去核, 达到很高的去核率。有报道认为^[15], 末期去核的卵母细胞所组建的核移植胚早期发育率和囊胚质量都与 M II 期去核基本相同。本研究结果也表明, 在体细胞核移植中, 末期去核核移植胚与中期去核核移植胚的早期发育能力基本相同。末期去核的卵母细胞核移植出生后代已见报道^[16]。

M II 期卵母细胞是目前广泛采用的卵母细胞去核时期。本研究结果表明, 随着成熟时间的延长, 第一极体与染色质位置发生变化的卵母细胞的比率也增加, 牛卵母细胞去核以成熟培养 20 h 为宜, 这一时期大部分卵母细胞中极体与核的相对位置较近, 去核效率会更高。细胞松弛素 B (CB) 处理能够增加细胞膜的韧性, 在去核时卵母细胞膜不易被撕破, 去核后仍能保持完整的膜结构, 在卵母细胞的去核中普遍应用。本研究结果还表明, 牛卵母细胞用不含 CB 的操作液完全可以进行去核, 去核针的插入及胞质的吸取都可顺利进行, 但核移植胚的卵裂及前期发育能力显著下降, 表明 CB 的保护作用主要表现在重构胚的前期发育。这可能有两个方面的原因, 一方面是受到损伤的卵母细胞卵裂能力下降, 另一方面可能是去核对卵母细胞的损伤程度与卵母细胞本身的质量有关。操作液中 CB 的存在与否不影响核移植胚 8/16 细胞以后的发育能力, 说明如果卵母细胞本身的质量较高, 可以较强地对抗去核所产生的损伤, 如果细胞松弛素在去核时更多的是保护质量较差的卵母细胞, 即使这些核移植胚能够完成早期发育, 也很难具有完成全程发育的能力。这一点有待于进一步试验验证。

[参考文献]

[1] Morgan A, Jacob R. Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- membrane[J]. *Biochem J*, 1994, 300: 665- 672
- [2] Tanaka H, Kanagawa H. Influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using young or aged oocytes[J]. *Anim Reprod Sci*, 1997, 49: 113- 123
- [3] Prather R S, Firt N L. Cloning embryos by nuclear transfer[J]. *J Reprod Fert*, 1990, 41(Suppl): 125- 134
- [4] Bordignon V, Smith L C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49: 29- 36
- [5] 李裕强, 张涌, 张琇, 等. 动物克隆中受体卵母细胞体外成熟[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2001, 31(专辑): 139- 143
- [6] Prather R S, Barnes F L, Sims M M, et al. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of donor nuclei and recipient oocyte[J]. *Biol Reprod*, 1987, 37: 859- 866
- [7] Cuthbertson K S R, Whittingham D G, Cobbold P H. Free calcium increases in exponential phases during mouse oocyte activation[J]. *Nature*, 1981, 294: 754- 757
- [8] Susko-Parrish J L, Leibfried-Rutledge M L, Northey D L, et al. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion[J]. *Dev Biol*, 1994, 166: 729- 739
- [9] Liu L, Ju J C, Yang X. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49: 298- 307
- [10] Bos-Mikich A, Swann K, Whittingham D G. Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse oocytes[J]. *Mol Reprod Dev*, 1995, 41: 84- 90
- [11] Machaty Z, Wang W H, Day B N, et al. Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal[J]. *Biol Reprod*, 1997, 57: 1123- 1127
- [12] Loi P, Leda S, Fulka J J, et al. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols[J]. *Biol Reprod*, 1998, 58: 1177- 1187
- [13] Loi P, Leda S, Cappai P. Nuclear dynamics and developmental potential of sheep nuclear transfer embryos treated with protein kinase inhibitor 6-dimethylamino purine[J]. *Theriogenology*, 1997, 47: 232
- [14] Shiina Y, Kaneda M, Matsuyama K, et al. Role of the extracellular Ca^{2+} on the Ca^{2+} changes in fertilized and activated mouse oocytes[J]. *J Reprod Fert*, 1993, 355: 353- 355
- [15] Mohamed Nour M S, Takahashi Y. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer[J]. *Theriogenology*, 1999, 51: 661- 666
- [16] Bordignon V, Keystone R, Lazaris A, et al. Transgenic cloned calves derived from *in vitro*-transfected somatic cells using telophase- and metaphase-enucleated host oocytes[J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 257

Bovine oocytes enucleation and artificial activation

L I Yu-qiang, ZHANG Xiu, AN Zhi-xing, ZHANG Yong

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Activation efficiency of ionomycin, ethanol and their association with 6-DMA P or CHX on bovine oocytes was compared in the present experiment. Telophase (T II) bovine oocytes enucleation, the effect of IVM time and cytochalasin B (CB) on metaphase (M II) enucleation were also studied. The results indicated that: The activation efficiency of bovine oocytes by Ionomycin + 6-DMA P or ethanol + 6-DMA P/CHX was significantly higher than Ionomycin or ethanol alone. The parthenogenetic development was more stable when bovine oocytes were activated by Ionomycin + 6-DMA P as compared with ethanol + 6-DMA P/CHX, especially from 8/16 cells stage to blastocyst. The distance of the first polar body from the chromosome became larger when oocytes *in vitro* maturation culture time increased. Bovine oocytes should be enucleated at/before IVM 20 h. The T II enucleation rate was significantly higher than M II enucleation; their nuclear transfer embryos had about same development ability. The enucleation manipulation could complete when bovine oocytes placed in media without CB, but the presence of CB in enucleation manipulation media could protect oocytes, the function was mainly exhibited in the early cleavage before 8/16 cells stage.

Key words: oocyte; bovine; enucleation; activation