

CCB、蔗糖及成熟时间对山羊卵母细胞去核效果的影响*

高立功,山 灵,刘凤军,赵小娥,张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所,陕西 杨凌,712100)

[摘 要] 分离培养山羊卵母细胞,采用盲吸法去核,研究不同成熟培养时间(18,22 和 26 h)不同细胞松弛素 B (CCB)浓度(5,7.5,10,15 mg/L)和不同蔗糖浓度(20,25,30 g/L)对卵母细胞去核效果的影响。结果表明,山羊卵母细胞最佳去核条件为:卵母细胞体外成熟时间为 22 h,去核时操作液中 CCB 质量浓度为 7.5 mg/L,蔗糖质量浓度为 20 g/L。

[关键词] 山羊卵母细胞;细胞松弛素 B;蔗糖;去核;核移植

[中图分类号] Q813.1⁺¹

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0006-03

Effect of cytochalasin-B and sucrose and mature time on goat oocytes enucleation

GAO Li-gong, SHAN Ling, LIU Feng-jun, ZHAO Xiao-e, ZHANG Yong

(Institute of Bio Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Goat oocytes were separated and cultured, and then enucleated under the different situation of maturing time, cytochalasin-B and sucrose concentration. The results showed that the optimum enucleation conditions were as follows: goat oocytes maturing time was 22 h; the cytochalasin-B concentration was 7.5 mg/L; the sucrose concentration was 25 g/L. Therefore, the best enucleation effects could be achieved by using cytochalasin-B together with sucrose.

Key words: goat oocyte; cytochalasin-B; sucrose; enucleation; nuclear transfer

卵母细胞去核是细胞核移植的重要环节,去核效率的高低及去核质量的好坏直接关系到重构胚能否正常发育。在山羊卵母细胞核移植研究中,应用最多的去核方法是盲吸去核法,其具体过程是:先用细胞松弛素 B 或秋水仙素对经过体外成熟的卵母细胞进行处理,然后将微吸管插入卵周隙靠近第一极体的位置,将第一极体连同其附近部分细胞质一起吸除^[1]。适宜浓度的细胞松弛素 B 会破坏细胞的微管微丝系统,使质膜变得柔韧,在去核吸管撤离时,由于细胞膜的柔韧性构成细胞膜的磷脂分子发

生重排,细胞膜又恢复了其完整性^[2-4],这样就可大大减小去核操作对受体胞质的损伤。卵母细胞在等渗的情况下进行去核操作,极体暴露一般不够明显,而且很难区分卵母细胞质量的优劣,而在显微操作液中再加入适宜质量浓度的蔗糖,使卵母细胞处于适宜的高渗环境中,即可有效提高去核的效率及去核质量^[5]。关于卵母细胞成熟时间、细胞松弛素和蔗糖浓度对于小鼠卵母细胞去核效果的影响,已有学者进行过研究报道,但在山羊上未见这方面的报道。本试验研究了山羊卵母细胞不同体外成熟时间

* [收稿日期] 2006-03-14

[基金项目] 国家“863”高技术研究与发展计划项目(2003AA744051)

[作者简介] 高立功(1977-),男,陕西白水人,在读硕士,主要从事胚胎工程及分子生物学研究。

[通讯作者] 张 涌(1956-),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士生导师,主要从事动物胚胎工程和发育生物学研究。

及去核操作液中细胞松弛素 B (CCB) 和蔗糖质量浓度对去核效果的影响, 以为山羊卵母细胞去核研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 山羊卵巢 奶山羊卵巢采集于西安市屠宰厂, 置于盛有 20 ~ 30 生理盐水 (含 0.32 mg/mL 硫酸庆大霉素) 的保温瓶内, 6 ~ 8 h 运回实验室。

1.1.2 试剂 培养用 TCM199 由 Gibco 公司生产, 成熟用胎牛血清 (FBS) 由 Hyclone 公司生产, 其余试剂均为 Sigma 公司生产。

1.2 山羊卵丘卵母细胞复合体的回收和体外成熟

将山羊卵巢置于含有 D-PBS 的培养皿中, 用手术刀片切开卵巢表面 1 ~ 5 mm 的卵泡, 在显微镜下采集 A 级和 B 级卵丘卵母细胞复合体 (Cumulus-ocyte complexes, COCs)。将收集的 A 级和 B 级 COCs 置于预先平衡约 2 h 的成熟液 (OM, M199 + 10mmol/L HEPES + 0.38mmol/L 丙酮酸钠 + 50 mL/L 硫酸庆大霉素 + 体积分数 10% FBS + 5 mmol/L NaHCO₃ + 0.2 mmol/L 谷氨酰胺 + HMG) 中进行体外成熟培养, 培养条件为 38.5 、体积分数 5% CO₂、饱和湿度。

1.3 山羊卵母细胞的去核

分别将体外成熟培养 18, 22 和 26 h 的 COCs, 置于含 2 g/L 透明质酶的 D-PBS 中进行消化 (必要时用玻璃细管吹吸 COCs 几次), 使卵母细胞周围的卵丘细胞脱落。然后用平衡好的 H-M199 洗 3 次, 检出裸卵, 置体视显微镜下观察卵母细胞的成熟情况。吸取排出第一极体的卵母细胞, 分别置于含有 5, 7.5, 10 和 15 mg/L CCB 的 PBS 缓冲液做成的显微操作液微滴中, 每个微滴移入约 30 枚卵母细胞。最后在显微操作仪上进行去核, 固定卵母细胞时, 把极体摆放在相当于时钟 4 ~ 5 点的位置进行去核, 去核针斜面向下从 3 点钟位置进入, 去核针下压吸取极体及周围的部分胞质, 吸取的胞质不要超过三分之一。比较各种操作液的去核效果, 确定 CCB 的质量浓度。以最佳浓度的 CCB 为基础液, 加入蔗糖, 配制成蔗糖质量浓度分别为 20, 25 和 30 g/L 的去核操作液进行去核试验, 研究不同蔗糖浓度对去核效率的影响。

1.4 山羊卵母细胞去核效果检测

1.4.1 破溃率 将去核后的山羊卵母细胞置于 OM 液中, 在 38.5 、体积分数 5% CO₂、饱和湿度

条件下平衡 4 ~ 6 h, 显微镜下检测, 统计卵母细胞破溃率。胞质松散发黑, 胞膜破裂者为死亡卵母细胞。

1.4.2 去核率 将去核后的山羊卵母细胞置于含 5 μg/mL Hoechst33342 的 M-199 液中, 38.5 、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度下孵育 15 min, 于荧光镜下检查去核情况, 无白绿色亮点的卵为去核彻底卵, 统计去核率。

1.5 数据统计分析

试验结果采用 ² 检验分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 山羊卵母细胞体外成熟时间对去核率的影响

分别在山羊卵母细胞成熟 18, 22 和 26 h 进行卵母细胞的去核操作, 卵母细胞成熟时间对去核率的影响结果见表 1。

表 1 体外成熟时间对山羊卵母细胞去核率的影响

Table 1 Effects of mature time of oocytes on rate of enucleation

卵母细胞成熟时间/h Mature time of oocytes	去核卵数 No. of enucleated oocytes	荧光染色去核率/% Rate of enucleation
18	248	84.3(209/248) a
22	276	84.8(233/276) a
26	284	76.5(217/284) b

注: 不同小写字母表示差异显著 (P < 0.05)。

Note: Different small letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

由表 1 可知, 山羊卵母细胞成熟培养 22 h 的去核率 (84.8%) 高于 18 h, 显著高于 26 h (P < 0.05)。表明, 山羊卵母细胞的去核时间以成熟培养 22 h 为宜。

2.2 CCB 浓度对山羊卵母细胞去核率的影响

由表 2 可知, 含 CCB 7.5 mg/L 的操作液的卵母细胞去核成功率 (84.4%) 极显著高于对照组 (70.7%) (P < 0.01), 也高于其他各组, 破溃率 (9.8%) 低于对照组及其他各组。由表 2 还可以看出, 去核平均操作时间随 CCB 浓度的增加而减少。

2.3 蔗糖浓度对山羊卵母细胞去核效率的影响

从表 3 可以看出, CCB 操作液中蔗糖质量浓度为 25 g/L 时, 山羊卵母细胞的去核成功率显著高于对照组 (P < 0.05), 也高于其他各组去核率, 卵母细胞的破溃率低于对照组及其他各组 (P > 0.05)。从表 3 还可看出, 卵母细胞去核的平均操作时间随蔗糖质量浓度的增加而缩短。

表 2 CCB 浓度对山羊卵母细胞去核率的影响

Table 2 Effects of CCB concentration on rate of enucleation

CCB 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Mass concentration	去核卵数 No. of enucleated oocytes	去核成功率/ % Rate of enucleation	卵母细胞破溃率/ % Rate of fragmented oocytes	平均操作时间/ min Average enucleation time
5	224	78.6(176/224) a	14.7(33/224) a	1.79
7.5	276	84.4(233/276) b	9.8(27/276) a	1.55
10	187	78.6(147/187) a	15.5(29/187) a	1.51
15	193	73.6(142/193) a	15.5(30/193) a	1.40
对照组 Control group	164	70.7(116/164)	14.0(23/164)	1.96

注: a 与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$); b 与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。下表同。

Note: The letter "a" means no significant difference at 0.05 level compared with control group; the letter "b" means highly significant difference at 0.01 level compared with control group. It is the same for the following table.

表 3 蔗糖浓度对山羊卵母细胞去核率的影响

Table 2 Effects of sucrose concentration on rate of enucleation

蔗糖浓度/ (g · L ⁻¹) Sucrose concentration	去核卵数 No. of enucleated oocytes	去核成功率/ % Rate of enucleation	卵母细胞破溃率/ % Rate of fragmented oocytes	平均操作时间/ min Average enucleation time
20	223	89.2(199/223) a	8.1(18/223) a	1.32
25	269	91.4(246/269) b	6.3(17/269) a	1.28
30	288	89.6(258/288) a	6.6(19/288) a	1.25
对照组 Control group	276	84.4(233/276)	9.8(27/276)	1.55

3 讨论

3.1 卵母细胞成熟时间对去核效率的影响

卵母细胞体外成熟时间长短直接影响去核效率及去核质量。在去核时,盲吸法往往是以 M 期卵母细胞第一极体的位置来判断中期染色体(细胞核)的位置。然而,第一极体与细胞核的距离随卵母细胞体外成熟时间的延长而逐渐加大。若去核时间较晚,需去除较多的细胞质,才能达到去核的目的,且去核成功率较低^[6]。所以适宜的去核时间是提高去核效率及质量的关键。在本实验中,去核时间从体外成熟 18 h 延长至 26 h,去核率随成熟时间的延长而显著下降(从 84.3% 降至 76.5% ($P < 0.05$)),同时考虑到卵母细胞体外成熟(核成熟及胞质成熟)所需的时间,认为山羊卵母细胞的去核时间以成熟培养 22 h 为宜。

3.2 CCB 对山羊卵母细胞去核率的影响

在核移植的研究中,受体卵去核普遍采用的方法是先用 CCB 处理后,再用去核针吸出中期染色体及其附近部分胞质。CCB 处理的目的,是使细胞骨架松弛而质膜不易破碎,增加细胞膜的韧性,在去核时卵母细胞膜不易被撕破,去核后卵胞膜可以借助磷脂双层的流动性而很快得到修复,从而保持完整的膜结构。同时 CCB 破坏了纺锤丝的形成,抑制了极体的形成和染色体的排出,保证了核移植胚胎的染色体倍数^[7]。本研究结果表明,在含 CCB 操作液

中,卵母细胞的去核率较高,最主要的原因是 CCB 减小了去核操作时对卵母细胞的损害作用。在不含 CCB 的操作液中,卵母细胞膜的脆性大,去核操作比较难,操作时间也长,这些因素也是造成核移植胚胎体外发育能力下降的原因。本试验结果还表明,CCB 的浓度过高会影响去核的效果,使卵母细胞的破溃率升高,这可能是高浓度的 CCB 对卵胞膜作用过于强烈,细胞骨架严重破坏,磷脂双层结构的弹性和粘性减弱,修复能力降低,影响重组胚胎的构建。因此,在采用盲吸法去核时,选择合适的 CCB 浓度,可以获得较高的去核率。本实验结果显示,当 CCB 浓度质量浓度为 7.5 g/L 时,去核率最高。

3.3 蔗糖对山羊卵母细胞去核效率的影响

蔗糖有使细胞收缩和轻微地增加细胞渗透性的作用^[5],在细胞膜完好的情况下对细胞无任何不良的影响,而对质量不好的卵母细胞(如细胞质少、外形不规则的卵母细胞),由于缺乏良好的渗透调节功能,CCB 和蔗糖可加速其破坏程度,并使其与正常卵母细胞区别开来。在操作液中添加蔗糖不但可以直接判断卵母细胞的质量,同时由于添加蔗糖使卵母细胞渗透性增加、胞膜收缩,使极体充分显现^[8-9],从而使去核的准确率提高,操作时间减少。本试验结果表明,向 7.5 g/L 的 CCB 去核操作液中加入质量浓度为 25 g/L 的蔗糖,能够显著提高去核率,降低卵母细胞的破溃率,并且能够缩短去核操作时间。

(下转第 13 页)

越到胚胎发育后期,表现为“阳性”的胚胎数量越少。Page 等^[9]的研究结果显示,显微注射 2-细胞期和 4-细胞期小鼠胚胎外源基因滞留率分别为 88% 和 44%,但他认为不严格控制实验条件,单纯 PCR 检测的结果并不可靠。由此可知,本试验 PCR 结果并不能完全排除假阳性胚胎,但从对大量胚胎检测结果的统计分析发现,越到胚胎发育后期表现为“阳性”的胚胎数量越少,这一结果与 Lu 等^[10]的研究结论相符。所以,对早期显微注射转基因胚胎进行移植前 PCR 筛选,就单个胚胎而言并不能完全确定其是否为转基因阳性,但对数目庞大的显微注射胚胎来讲,PCR 确实可以筛除大量阴性胚胎,这对提高转基因动物生产效率具有一定的作用。

[参考文献]

- [1] Biggers J D, Gwatkin R B L, Brinster R L, et al. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium [J]. *Nature*, 1962, 194: 747-749.
- [2] Eyestone W H, First N L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium [J]. *J Reprod Fertil.*, 1989, 85(2): 715-20.
- [3] Kidson A, Schoevers E, Langendijk P, et al. The effect of ovi-

duct epithelial cell co-culture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development [J]. *Theriogenology*, 2003, 59(9): 1889-903.

- [4] 马春杰,朱伟杰. 输卵管特异性蛋白质的性质及其对配子和胚胎的影响[J]. *生殖与避孕*, 2002, 22(2): 123-125.
- [5] Lane M, Gardner D K. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acid[J]. *J Reprod Fertil*, 1997, 109(1): 153-64.
- [6] Reischl J, Prella K, Schol H, et al. Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells in vitro[J]. *Cell Tissue Res*, 1999, 296(2): 371-83.
- [7] Tan X W, Ma S F, Yu J N, et al. Effects of species and cellular activity of oviductal epithelial cells on their dialogue with co-cultured mouse embryos [J]. *Cell Tissue Res*. 2007, 327(1): 55-66.
- [8] Shen H, Liu C J, Gu Z, et al. Rabbit oviductin“DPf1-1”is tissue specific but not species specific[J]. *Developmental and Reproductive Biology*, 1996, 5(2): 26-32.
- [9] Page R L. Transgene detection during early murine embryonic development after pronuclear microinjection [J]. *Trans Res*, 1995, 4(1): 12-17.
- [10] Lu Y F, Tian C, Deng J X, et al. Studies on foreign gene integration during embryo early development [J]. *Yi Chuan Xue Bao*, 1998, 25(6): 485-90.

(上接第 8 页)

王敏康等^[10]采用在 CCB 操作液中加 30 g/L 蔗糖的方法进行小鼠卵母细胞去核操作,并将重构的胚胎进行电融合、IVF 和胚胎移植,结果得到了正常的克隆小鼠,说明添加适宜质量浓度的蔗糖对重构胚的后期发育是安全的。因此,采用盲吸法进行山羊卵母细胞去核时,在选择合适 CCB 浓度的同时,加入质量浓度 25 g/L 的蔗糖,能够获得更好的去核效果。

[参考文献]

- [1] Kono T, Kwon O Y, Nakahara T. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei [J]. *J Reprod Fertil*, 1991, 93: 165-170.
- [2] McGrath J, Solter D. Nucleocytoplasmic interaction in the mouse embryo [J]. *Embryo Exp Morphol*, 1986, 97(suppl): 277-289.
- [3] Robl J M, Prather R, Barnes F, et al. Nuclear transplantation in bovine embryos [J]. *J Anim Sci*, 1987, 64: 624-647.
- [4] Wang M K, Liu J L, Li G P, et al. Sucrose pretreatment for enucleation: an efficient and non-damage method for removing

the spindle of the mouse M II oocyte [J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 58(4): 432-436.

- [5] Saito N, Imai K, Tomizawa M. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro [J]. *Theriogenology*, 1994, 41: 1053-1060.
- [6] Sanfins A, Lee G Y, Plancha C E, et al. Distinctions in meiotic spindle structure and assembly during in vitro and in vivo maturation of mouse oocytes [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69: 2059-2067.
- [7] Longo J F. Gamete fusion and sperm incorporation [A]. Longo J F. *Fertilization*. London: Chapman & Hall, 1997: 49-65.
- [8] Levanduski M J, Westhusin M E. Effect of cytoskeletal inhibitor on fusion and development of bovine nuclear transfer embryos [J]. *Theriogenology*, 1990, 33: 273.
- [9] Smith I C, Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation [J]. *Bilo Repeo*, 1989, 40: 1027-1035.
- [10] 王敏康,陈大元,刘冀珑,等. 小鼠卵母细胞 MII 期核(纺锤体)移植后经体外受精正常产仔 [J]. *生殖医学杂志*, 2001, 10: 141-147.