

猪卵母细胞激活方法的研究

郝子悦¹, 刘忠慧², 刘吉宏¹, 陈学进³, 李碧春¹

(1 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009; 2 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏 泰州 225300;

3 上海交通大学 附属新华医院发育生物学研究中心, 上海 200092)

【摘要】【目的】探讨猪卵母细胞体外胚胎生产的最佳激活条件。【方法】以不同电场强度(100, 150, 200, 250 V/mm)、脉冲时间(2, 30, 40, 60, 80 μ s)、电脉冲次数(1, 2, 3次)的电激活方法及电激活(电场强度为 200 V/mm, 脉冲时间为 60 μ s, 激活次数为 1次)联合化学处理(NCSU-23 + CHX、NCSU-23 + 6-DMAP 和 NCSU-23 + CHX + 6-DMAP)方法对猪卵母细胞进行激活, 研究不同激活方法对猪卵母细胞孤雌活化的影响。【结果】电激活猪卵母细胞时, 在 200 V/mm、60 μ s、1次激活的条件下其卵裂率和囊胚率均最高。电激活联合 NCSU-23 + CHX、NCSU-23 + 6-DMAP、NCSU-23 + CHX + 6-DMAP 化学处理时, 在孤雌激活后期的卵裂率分别为 69.17%, 82.31% 和 79.67%, 囊胚率分别为 24.17%, 39.46% 和 39.84%, 在统计学上各处理间无显著差异。【结论】猪卵母细胞孤雌激活的最佳条件, 是在电场强度为 200 V/mm, 脉冲时间为 60 μ s, 激活次数为 1次的电激活后, 联合 NCSU-23 + 6-DMAP 处理 4 h, 再移入胚胎培养液 NCSU-23 + 4 g/L BSA 中继续孵育(40 \pm 4)h。

【关键词】 猪; 卵母细胞; 孤雌激活; 激活条件

【中图分类号】 S828.3⁺6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)06-0021-04

Study on electrical activation of porcine oocytes

HAO Zi-yue¹, LIU Zhong-hui², LIU Ji-hong¹, CHEN Xue-jin³, LI Bi-chun¹

(1 Yangzhou University College of Animal Sciences and Technology, Yangzhou, Jiangsu, 225009, China; 2 Jiangsu Animal Husbandry &

Veterinary College, Taizhou, Jiangsu 225300, China; 3 Center for Developmental Biology, Shanghai

Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract: 【Objective】The objective of this study was to determine the best method of activation to produce porcine embryo in vitro. 【Method】The porcine oocytes were activated by different electric field strengths(100, 150, 200 and 250 V/mm), different time(20, 30, 40, 60 and 80 μ s), different electric pulsing numbers (1, 2 and 3 times). The porcine oocytes were also activated by electrical pulses(200 V/mm, 60 μ s, 1 time) combined with chemical activation(NCSU-23 + CHX, NCSU-23 + 6-DMAP and NCSU-23 + CHX + 6-DMAP). 【Result】200 V/mm of electric field strength and 60 μ s of electric field duration one electric pulsing can get the higher rate of oocyte activation, cleavage and parthenogenetic embryo. There were no significant differences in the cleavage rates(69.17%, 82.31% and 79.67%) and blastocyst rates(24.17%, 39.46% and 39.84%) after parthenogenetic activation using NCSU-23 + CHX, NCSU-23 + 6-DMAP and NCSU-23 + CHX + 6-DMAP. 【Conclusion】The better method of activation is the activation of electrical pulses(200 V/mm, 60 μ s) combined with NCSU-23 + 6-DMAP in 4 h, then the oocytes are cultured in the embryo media NCSU-23 + 4 g/L BSA in (40 \pm 4) h, which can get a high cleavage rate and blastocyst rate.

Key words: pig; oocyte; parthenogenetic activation; activation method

* [收稿日期] 2007-09-03

[基金项目] 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2006)第5-3号]

[作者简介] 郝子悦(1978-), 男, 内蒙古赤峰市人, 在读硕士, 主要从事动物胚胎工程与生物技术研究。E-mail: zyhao2003@126.com

[通讯作者] 陈学进(1960-), 男, 河南柘城人, 副教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程与干细胞研究。

卵母细胞孤雌激活是胚胎工程和发育生物学的重要组成部分,是胚胎体外生产的上游环节^[1-2],其激活条件的优化,对后期的结果在很大程度上具有决定作用^[3]。从目前应用情况看,电脉冲刺激是应用最为广泛的卵母细胞激活方法^[4],其对小鼠、牛等动物的卵母细胞具有较高的激活效率^[5-6],但是关于应用直流电脉冲联合化学处理激活猪卵母细胞的研究,目前尚处于起始阶段,激活效率也不高。采用单纯电脉冲激活的卵母细胞孤雌发育胚胎,大部分为单倍体^[7],但其囊胚发育率很低。为了提高卵母细胞孤雌发育率,常将电脉冲激活与 6-DMAP 和 CHX 等化学物质联合使用^[8],但由于 6-DMAP 和 CHX 具有抑制卵母细胞第二极体排出的作用,导致孤雌发育的胚胎多为二倍体^[9],并且在一定场强范围内,随着场强的增加,激活卵母细胞的分裂率也相应增加,但电场强度高则会导致卵母细胞裂解率的相应增多^[10]。作为 Ca^{2+} 载体离子酶素的激活效率很高^[11-12],但是由于处理时间短,往往在试验中同时要其他试验,很难保证离子酶素处理时间的准确性^[13]。另外,孤雌激活还与卵龄^[13]、核供体细胞周期^[14]及去核、移核和融合^[15-16]之间有较为紧密的联系,因此使孤雌激活条件的准确确定变得较为困难。而一个优化的卵母细胞激活方案或许能够增强重构胚胎更好或完全地基因重组,进而提高克隆猪的成功率。因此,最适合的激活方法的研究,一直受到有关研究工作者的重视。本试验研究了不同电刺激参数及电激活联合化学刺激方法对猪成熟卵母细胞孤雌活化效果的影响,旨在筛选出猪卵母细胞体外胚胎生产的最佳激活条件,为猪核移植技术的完善和转基因猪的生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂及培养液

1.1.1 试剂 山梨醇、DMEM 和 BSA,购自 Gibco 公司;生理盐水,购自浙江医药股份有限公司新昌制药厂;其余试剂除特殊说明外均购自 Sigma 公司。

1.1.2 NCSU-23 基础培养液 先取 300 mL Milli-Q 水,再按顺序加入 3.178 g NaCl,1.053 g NaHCO_3 ,0.178 g KCl,0.081 g KH_2PO_4 ,0.147 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.125 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,0.500 g D-Glucose,0.073 g Glutamine,0.438 g Taurine,0.273 g Hypotaurine,0.033 g Penicillin 和 0.025 g Streptomycin 混匀。调 pH 为 7.2~7.4 后用 Milli-

Q H_2O 定容至 500 mL,使渗透压为 295~310 mOsm,用作卵母细胞体外成熟的基础培养基或者胚胎培养基。0.22 μm 滤器过滤分装,于 4 $^\circ\text{C}$ 保存,2~3 周内用完。

1.1.3 NCSU-23 成熟培养液 NCSU-23 (无 BSA) + 0.1 g/mL PFF + 10 IU/mL hCG + 10 IU/mL PMSG + 0.1 mg/mL L-半胱氨酸 + 0.05 mg/mL 谷氨酰胺 + 0.1 mg/mL 亚牛磺酸 + 10 ng/mL EGF。

1.2 卵母细胞的采集和体外成熟培养

从上海市长宁区屠宰场采集刚屠宰母猪的卵巢,放入 30~35 $^\circ\text{C}$ 的生理盐水(含双抗)中,2 h 内运回实验室。用 20 mL 无菌注射器抽吸卵巢上 3~6 mm 的卵泡,将抽取液放于离心管中,37 $^\circ\text{C}$ 水浴静置 15 min。重悬后弃上清,加入 TL-HEPES 冲洗、重悬沉淀,再静置。在体视显微镜下,挑选卵丘包裹 3 层以上、致密且胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(COCs),移入四孔培养板成熟培养液滴(在培养箱中平衡 4 h 以上)内,用胚胎级矿物油覆盖;将 COCs 在 NCSU-23 成熟培养液中培养(40 \pm 4) h。

1.3 卵母细胞的孤雌激活

1.3.1 电激活 在卵母细胞成熟 36~48 h 并已脱去卵丘细胞后,选取卵周隙明显、卵细胞膜完整且排出第一极体的卵母细胞,用 39 $^\circ\text{C}$ 预温的激活液(山梨醇)洗涤 3 遍,并在激活液中平衡 20 s,将平衡好的卵母细胞转移到已经铺满激活液的融合槽中(融合槽电极宽度 1 mm),设置不同电融合参数:电场强度分别为 100,150,200 和 250 V/mm,脉冲时间分别为 20,30,40,60 和 80 μs ,激活次数分别为 1,2 和 3 次;进行电刺激。电刺激 1 min 之后,将卵母细胞用 NCSU-23 + 4 g/L BSA + 2.0 mmol/L 6-DMAP 溶液洗涤 3~5 遍,然后将卵母细胞转移到石蜡油覆盖,并预先在 CO_2 培养箱平衡至少 4 h 以上的 NCSU-23 + 4 g/L BSA + 6-DMAP 液滴内,39 $^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度下培养 24 h。统计卵母细胞的卵裂率和囊胚率,试验重复 3 次,取平均值。

1.3.2 电激活联合化学处理 为了研究电激活后不同化学试剂处理对卵母细胞孤雌发育的影响,本研究在电激活参数为 200 V/mm、60 μs 、激活 1 次的条件下,电激活 M II 卵母细胞,然后将 M II 卵母细胞分别放入含有 CHX、6-DMAP 和 CHX + 6-DMAP 的 NCSU-23 胚胎培养液中培养 4 h,再移入 NCSU-23 胚胎培养液中培养(20 \pm 2) h,统计卵母细胞卵裂率和囊胚率,试验重复 3 次,取平均值。同

时设 NCSU-23 培养液对照组。

1.4 孤雌激活胚胎的培养

取激活处理的卵母细胞在 NCSU-23 + 4 g/L BSA 中洗涤 3 遍,转到石蜡油覆盖并预先在 CO₂ 培养箱中平衡至少 4 h 的 NCSU-23 + 4 g/L BSA 液滴内(液滴大小为 50 μL,每个液滴中放 10~15 个卵),于 39 °C,体积分数 5% CO₂ 中饱和湿度培养,分别在培养的 24 和 168 h 观察记录卵裂率和囊胚率。

1.5 Hoechst33342 染色计数

采用 10 μg/mL Hoechst 33342 染色压片,在荧光显微镜下观察囊胚细胞并计数。

1.6 数据统计分析

试验数据采用 SPSS(Version 11.0)进行 χ^2 检验。

2 结果与分析

2.1 不同电激活方法对猪卵母细胞孤雌激活效果的影响

对电场强度、脉冲时间、激活次数 3 个因素,按不同水平进行交叉激活效果研究,共得到 22 种结果,其中具有代表性的 10 种结果如表 1 所示。由表 1 可见,在相同脉冲时间和激活次数(脉冲时间为 30 μs,激活次数为 1 次)的条件下,电场强度为 200 V/mm 时猪卵母细胞的卵裂率、囊胚率最高;电场

强度为 250 V/mm 时卵母细胞死亡率明显增加,卵裂率和囊胚率下降;电场强度为 100 V/mm 时卵裂率和囊胚率最低。在电场强度和激活次数相同(电场强度为 200 V/mm,激活次数为 1 次)的条件下,脉冲时间为 40 和 60 μs 时的卵裂率、囊胚率高于 20 和 80 μs。在电场强度为 200 V/mm,脉冲时间为 60 μs 的条件下,脉冲次数为 1 和 2 次时的卵裂率和囊胚率均明显高于 3 次激活,但 1 和 2 次激活间无明显差异,且激活 2 次时的死卵率达 4.90%。

2.2 电激活联合化学处理对猪卵母细胞孤雌激活效率的影响

不同激活方法联合化学处理对猪卵母细胞激活效果的影响很大,在电场强度为 200 V/mm、脉冲时间为 60 μs、激活次数为 1 次的电激活条件下,将激活后的 MII 卵母细胞放入含有 CHX、6-DMAP 和 CHX + 6-DMAP 的 NCSU-23 胚胎培养液中培养 4 h,然后再放入 NCSU-23 胚胎培养液中培养,并以激活后直接放入 NCSU-23 液的 MII 卵母细胞为对照,统计结果(表 2)表明,电激活 + 6-DMAP 和电激活 + CHX + 6-DMAP 处理的卵裂率和囊胚率分别为 82.31%,79.67%和 39.46%,39.84%,均明显高于其他两组,但二者之间卵裂率和囊胚率的差异不显著。

表 1 不同电激活参数对猪卵母细胞孤雌激活的影响

Table 1 Effect of different activation protocols on development of PAEs

激活参数 Electric parameter			M II 卵母细胞个数 Oocytes	死卵率/% Rate of dead oocytes	卵裂胚率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst
电场强度/ (V · mm ⁻¹) Pulse strength	脉冲时间/μs Pulse time	激活次数 Pulse number				
100	30	1	86	0	15.17(13/86) a	2.32(2/86) a
150	30	1	97	0	37.11(36/97) b	7.22(7/97) ab
200	30	1	112	2.68(3/112)	60.71(68/112) c	16.96(19/112) c
250	30	1	106	16.04(17/106)	52.83(56/106) c	13.21(14/106) bc
200	20	1	113	0	43.36(49/113) a	10.62(12/113) a
200	40	1	109	1.83(2/109)	63.3 (69/109) b	18.35(20/109) ab
200	60	1	118	0	66.95(79/118) b	21.19(25/118) b
200	80	1	115	7.83(9/115)	62.6(72/115) b	15.65(18/115) ab
200	60	2	102	4.90(5/102)	68.63(70/102) b	21.56(22/102) a
200	60	3	116	12.93(15/116)	50(58/116) a	10.34(12/116) b

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

Note: Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$). The following table is the same.

表 2 电激活后不同化学处理对卵母细胞激活的影响

Table 2 Effect of different Chemical activation methods on development of PAEs

化学试剂 Chemical	M II 卵母细胞个数 Oocyte	卵裂胚率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst
NCSU-23+CHX	120	69.17(83/120) a	24.17(29/120) a
NCSU-23+6-DMAP	147	82.31(121/147) b	39.46(58/147) b
NCSU-23+CHX+6-DMAP	123	79.67(98/123) b	39.84(49/123) b
NCSU-23	132	66.67(88/132) a	18.94(25/132) a

3 讨论与结论

电激活效果会因电场强度、脉冲时间、脉冲次数等的不同而不同。本试验中发现,在电场强度不同而脉冲次数和脉冲时间相同的情况下,电场强度过低卵母细胞激活率也很低,在电场强度升高的过程中,卵母细胞的卵裂率和囊胚率随之增加,但当电场强度超过一定限度后,卵裂率和囊胚率下降,卵母细胞的死亡率明显升高,200 V/mm 是卵母细胞激活时较为合适的电场强度。而有关 1 次和多次激活对激活效果的影响以及多次脉冲间的最佳间隔时间的确定,还有待做进一步探讨。

本试验结果显示,采用电激活 + NCSU-23 + 6-DMAP 和电激活 + NCSU-23 + CHX + 6-DMAP 组合激活猪卵母细胞,可获得较高的卵裂率和囊胚率,分别为 82.31%,39.46% 和 79.67%,39.84%,显著高于其他 2 组。其原因可能是因为电激活只是部分地激活卵母细胞,因此要与蛋白合成抑制剂联合使用才能达到更为理想的激活效果,6-DMAP 或 CHX 等均是常用的蛋白合成抑制剂,其中 6-DMAP 是蛋白质磷酸化抑制剂,其通过诱导 C-mos 和 MAPK 的去磷酸化而抑制 MPF 的合成,并促进核膜的重建^[17];而 CHX 可以抑制 MPF 亚基 cyclin B 的合成。这两种物质作用缓慢,且主要抑制 MPF 的生成,对已有的 MPF 作用较小,所以单独使用时并不能激活猪卵母细胞,这与 Susko^[18]对牛卵孤雌激活的研究结果一致。而当电击激活和化学激活联合使用时,若先用电击激活降低 MPF 的水平,再用 6-DMAP 和 CHX 维持这个低水平,就能更加有效地激活卵母细胞。

本研究确立的猪卵母细胞孤雌激活的最佳体系为:体外成熟 44 h 的成熟卵母细胞,以山梨醇为激活液,在电场强度为 200 V/mm,脉冲时间为 60 μ s,激活次数为 1 次的条件下电激活后,联合 NCSU-23 + 6-DMAP 处理 4 h,再移入胚胎培养液 NCSU-23 + 4 g/L BSA 中继续孵育(40 \pm 4) h。

[参考文献]

[1] Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from in vitro systems [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(10):1055-1059.

[2] Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J, et al. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer [J]. *Int J Dev Biol*, 2001, 45(7):797-809.

[3] Prather R S, Eichen P A, Nicks D K, et al. Artificial activation of porcine oocytes matured in vitro [J]. *Molecular Reproduction Development*, 1991, 28:405-409.

[4] Zhu J, Telfer E, Fletcher J, et al. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes [J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 66:635-641.

[5] Wakayama T, Tateno H, Mombaerts P, et al. Nuclear transfer into mouse zygotes [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(2):108-109.

[6] Du F, Sung L Y, Tian X C, et al. Differential cytoplasm requirement for embryonic and somatic cell nuclear transfer in cattle [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 63(2):183-191.

[7] Loi P, Ledda S, Fulka L, et al. Development of parthenogenetic and doned ovine embryos; effect of activation protocols [J]. *Biology of Reproduction*, 1998, 58:1177-1187.

[8] Machaty Z, Prather R S. Strategies for activation nuclear transfer oocytes [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1998, 10: 599-613.

[9] Bing Y, Che L, Hirao Y, et al. Optimization of parthenogenetic activation and subsequent development of porcine oocytes activated by a combined electric pulse and butyrolactone I treatment [J]. *Reprod Dev*, 2003, 49(2):159-166.

[10] Nguyen V T, Kure-bayashi S, Harayama H, et al. Stage-specific effects of the osmolarity of a culture medium on the development of parthenogenetic diploids in the pig [J]. *Theriogenology*, 2003, 59(3-4):719-734.

[11] Sousa M, Barrors A, Tesarik J. The role of ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores in the Ca²⁺ oscillation machine of human oocytes [J]. *Mol Hum reprod* 1996, 2:265-272.

[12] Machaty Z, Funahashi H, Day B N, et al. Developmental changes in the intracellular Ca²⁺ release mechanisms in porcine oocytes [J]. *Biol Reprod*, 1997, 56:921-930.

[13] Zhu J, King T, Dobrinsky J, et al. In vitro and in vivo developmental competence of ovulated and in vitro matured porcine oocytes activated by electrical activation [J]. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5(4):355-365.

[14] Lee J W, Tian X C, Yang X. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine [J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 68(1):51-57.

[15] Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from in vitro systems [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(10):1055-1059.

[16] Kure B S, Miyake M, Katayama M, et al. Development of porcine blastocysts from in vitro matured and activated haploid and diploid oocytes [J]. *The oenology*, 1996, 46:1027-1036.

[17] Prather R S, Mayes M A, Murphy C N. Parthenogenetic activation of pig eggs by exposure to protein kinase inhibitors [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1997, 9(5):539-544.

[18] Susko P J L. 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(2):729-739.