

73-76

第25卷 第3期  
1997年6月西北农业大学学报  
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 25 No. 3  
Jun. 1997

# 牛卵母细胞电激活参数的研究

王新庄 张涌 张美佳

(西北农业大学发育生物学研究室, 陕西杨陵 712100)

**摘要** 分析了影响牛体外成熟卵母细胞电激活的主要参数,初步建立了电激活的实验程序。结果表明,卵母细胞激活率随着卵龄的延长、电场强度的增加以及电脉冲次数的增多而升高,含 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 离子的电激液显著高于非电解质液,以 $0.3 \text{ mol/L}$ 甘露醇+ $100 \mu\text{mol/L}$   $\text{CaCl}_2$ + $100 \mu\text{mol/L}$   $\text{MgCl}_2$ 为电激液,施加 $1.6 \text{ kV/cm}$ 、 $160 \mu\text{s}$ 、3次电脉冲间隔 $15 \text{ min}$ ,激活率、卵裂率、囊胚发育率分别为 $86.0\%$ 、 $86.5\%$ 及 $48.9\%$ 。

**关键词** 激活率, 体外成熟, 牛, 卵母细胞

**中图分类号** S823.36, S814.6

休止于第二次减数分裂中期(M I)的卵母细胞可以通过多种物理化学因素,如温度、电刺激、渗透压、酶、钙离子载体  $\text{A}_{23187}$ 等激活<sup>[1]</sup>。其中电激活是影响哺乳动物胚胎细胞核移植成功率的关键技术环节。前人曾报道了电压、脉冲持续时间及不同液体对小鼠卵母细胞电活化效果的影响<sup>[2]</sup>;Collas等研究了场强、卵龄、脉冲次数和电场形状对小鼠卵母细胞电活化的影响<sup>[3]</sup>;国内也有关于卵龄、场强、脉冲宽度及脉冲次数对小鼠和家兔卵母细胞电激活及孤雌发育影响的报道<sup>[4]</sup>。目前,有关牛卵母细胞电激活的报道较少。本研究拟对影响牛体外成熟卵母细胞电刺激孤雌激活诸因素予以研究,为牛核移植成功率的提高提供详实的实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

从西安屠宰场取回牛卵巢,吸取直径为 $2\sim 6 \text{ mm}$ 卵泡卵母细胞并进行常规的体外成熟培养<sup>[5]</sup>。成熟培养液采用含体积份数为 $10\%$ 发情牛血清(OCS)和 $25 \text{ mmol/L}$  HEPES的TCM-199培养液(GIBCO),激活卵体外培养液为体积分数 $10\%$ 犊牛血清(NCS)的TCM-199液,透明质酸酶(SIGMA)。CE-450型电融合仪(由中科院发育生物学研究所制造);电刺激室(自制),由两块 $0.4 \text{ mm} \times 2.0 \text{ mm} \times 30.0 \text{ mm}$ 的铜片粘于载玻片上构成,间距为 $0.5 \text{ mm}$ ;  $\text{CO}_2$ 培养箱为日本产。激活液采用含或不含 $100 \mu\text{mol/L}$   $\text{CaCl}_2$ + $100 \mu\text{mol/L}$   $\text{MgCl}_2$ 的 $0.3 \text{ mol/L}$ 甘露醇液。细胞松弛素B(CB, SIGMA)。

### 1.2 方法

**卵母细胞处理** 将培养 $20, 22, 24$ 和 $26 \text{ h}$ 的卵母细胞,分别以含 $2 \text{ g/L}$ 透明质酸酶的TCM-199液处理 $5\sim 7 \text{ min}$ ,结合微玻璃管吹吸的机械作用,去除卵丘细胞,观察成熟情况。并将成熟的卵母细胞随机分为两组用于电激活试验。

收稿日期 1996-10-29

课题来源 杨陵科技开发基金资助项目

作者简介 王新庄,男,1963年生,助理研究员,硕士

**电刺激处理** 将成熟卵母细胞置于两电极之间的电激活液中,平衡 2 min,以不同条件的电脉冲进行电激活,多次脉冲试验组,脉冲间隔为 15 min. 电刺激后的卵母细胞放入培养液中,盖上石蜡油,体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、38.5℃ 进行微滴培养。

**活化检查** 培养 8 h 后,用光学显微镜(倒置)检查卵母细胞活化情况。只有出现 1 原核 1 极体(1PN, 1PB), 1 原核 2 极体(1PN, 2PB), 2 原核 1 极体(2PN, 1PB) 或卵裂的卵母细胞判断为激活。进而统计体外发育的卵裂率及囊胚发育率。

统计分析,试验结果用 *t* 检验进行差异显著性检验。

## 2 结 果

### 2.1 卵母细胞培养时龄(卵龄)对激活的影响

表1 不同卵龄卵母细胞电激活效果

卵龄(h)	卵数	场强(kV/cm)	脉宽(μs)	脉冲次数	激活数	
					数目	激活率(%)
20	50	1.6	160	1	18	36 aA
22	40	1.6	160	1	16	40 aA
24	40	1.6	160	1	20	50 bA
26	40	1.6	160	1	30	75 cB

从表1中可以看出,随着卵龄的增加,在同等条件下,卵母细胞激活率随之升高。

### 2.2 电场强度对卵母细胞激活及孤雌发育的影响

在试验卵龄 26 h, 脉冲宽度 160 μs, 3 次脉冲, 间隔 15 min, 融合液为含 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 的甘露醇液条件下, 研究电场强度对卵母细胞激活及孤雌发育的影响(表 2), 结果表明, 各组间囊胚发育率差异不显著。即电场强度为 1.6 kV/cm 时, 卵母细胞激活率及 2~8 细胞发育率明显高于其他 3 组。

表2 电场强度对卵母细胞激活及孤雌发育的影响

组别	电场强度(kV/cm)	卵母细胞数	激活卵		发育至 2~8 cell		囊胚	
			数目	激活率(%)	数目	发育率(%)	数目	百分率(%)
I	0.8	40	19	47.5 aA	9	47.4 aA	1	11.0
II	1.2	50	28	56.0 aA	21	75.0 abA	5	23.8
III	1.6	50	42	84.0 cB	35	83.3 cB	14	40.0
IV	2.0	40	28	70.0 abA	21	75.0 abA	9	42.9

### 2.3 电脉冲次数对卵母细胞激活及孤雌发育的影响

选用场强为 1.6 kV/cm, 其余条件同 2.2, 脉冲次数分别为 1, 2, 3 次, 结果见表 3。由表 3 可知: 体外培养, 各组间差异均不明显。表明 3 次脉冲卵母细胞激活率最高。

表3 电脉冲次数对卵母细胞激活及孤雌发育的影响

脉冲次数	卵母细胞数	激活卵		发育至 2~8 cell		囊胚	
		数目	百分率(%)	数目	发育率(%)	数目	百分率(%)
1	60	33	55.0 a	27	73.0	6	22.0
2	80	48	60.0 a	42	87.5	10	23.8
3	80	60	75.0 b	51	85.0	21	41.0

#### 2.4 融合液中 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对卵母细胞激活及孤雌发育的影响

在其他条件不变(卵龄1.6 kV/cm、160  $\mu\text{s}$ 、3次脉冲间隔15 min),融合液中含及不含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ,观察卵母细胞激活及发育(表4)。结果表明,采用含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子电激活液能明显提高卵母细胞激活率和囊胚发育率。

表4  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对卵母细胞电激活及孤雌发育的影响

组别	卵母细胞数	激活卵		发育至2~8 cell		囊胚	
		数目	激活率(%)	数目	发育率(%)	数目	百分率(%)
含 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$	120	104	86.7 A	90	86.5	44	48.9 a
不含 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$	80	32	40.0 B	24	75.0	6	25.0 b

### 3 讨论

**卵龄对卵母细胞电激活的影响** 适宜的电激参数是保证卵母细胞激活和孤雌发育的先决条件。Web 等认为,随着卵龄的延长和卵母细胞质的老化,维持减数分裂阻断的物质的降解,其越易被激活<sup>[6]</sup>。本研究表明,卵龄为26 h时,激活率为75%,明显高于20,22 h。

**$\text{Ca}^{2+}$ 对卵母细胞电激活的影响** 电脉冲引起膜穿孔导致外界  $\text{Ca}^{2+}$  内流,直接或通过激活  $\text{IP}_3$  系统诱导细胞内钙库释放  $\text{Ca}^{2+}$  来激活卵母细胞。本试验采用含  $\text{Ca}^{2+}$  离子电激活液时的激活率及囊胚发育率明显高于无  $\text{Ca}^{2+}$  的电激活液<sup>[7]</sup>。即卵母细胞激活依赖于激活液内  $\text{Ca}^{2+}$  离子。

**电场强度对卵母细胞电激活的影响** Yang 等<sup>[8]</sup>证实,随着电刺激强度的增加,卵母细胞激活率明显上升。这是由于强的电刺激引起强的  $\text{Ca}^{2+}$  内流,进而引发了更强的激活信号。但过度的电脉冲会导致染色体解离,出现核和染色体不正常构建。本研究采用1.6 kV/cm、160  $\mu\text{s}$  的电脉冲强度,卵母细胞激活率和卵裂率分别为84%和83.3%。当场强升高到2.0 kV/cm时,激活率、卵裂率有下降的趋势。Collas 认为,多次电脉冲引发多次钙离子内流,较真实地模仿了精、卵融合激发的卵内  $\text{Ca}^{2+}$  的波动,从而导致卵母细胞彻底激活。因而增加脉冲次数,其激活率明显升高,并以3次脉冲为最佳。

卵母细胞质的激活是影响核移植成功率的关键因素之一,建立完善的电激活程序以彻底激活卵母细胞质会显著提高核移植成功率。研究结果表明,在本实验室条件下,牛体外成熟卵母细胞电激活的最适条件为:成熟培养26 h、场强1.6 kV/cm、脉冲宽度160  $\mu\text{s}$ 、含100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子的0.3 mol/L 甘露醇液,3次电脉冲,间隔15 min。

#### 参 考 文 献

- 1 邓满齐,范必勤.小鼠卵孤雌激活过程中胞质游离  $\text{Ca}^{2+}$  的变化及孤雌发育研究.实验生物学报,1994,27(3):289~295
- 2 Onodera M, Tsunoda Y. Parthenogenetic Activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation in vitro. Gamete Research, 1989, 22: 277~288
- 3 Collas P. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol Reprod, 1990, 43: 877~884

- 4 谭景和,秦鹏春. 卵龄和脉冲持续时间对小鼠卵母细胞电活化效果影响的研究. 动物学报, 1995(3), 17~21
- 5 吴光明,廖和模,李雪峰等. 牛胚胎体外生产技术的简化研究. 畜牧兽医学报, 1996, 27(1): 1~6
- 6 Web M, Kowlett S K, Marot B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. J Embryo Exp Morphol, 1986, 95, 131~145
- 7 Ozil J P. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. Development, 1990, 109, 117~127
- 8 Yang X X, Jiang S E, Kovacs A et al. Nuclear totipotency of cultured Rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. Biol Reprod, 1992, 47, 635~643

## Electro-Activation Parameter of Bovine Oocytes

Wang Xinzhuang Zhang Yong Zhang Meijia

(Laboratory of Development Biology, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract** In this paper, the factors affecting electrical pulsing activation were analyzed, and the experimental procedure for activation was established. The results indicated that the electro-activation rate became higher with the increase of the oocyte age, field strength and pulse times, and also significantly higher in the electrolyte medium than that in nonelectrolyte medium. When the oocytes were pulsed in the medium of 0.3 mol/L mannitol + 100  $\mu$ mol/L CaCl<sub>2</sub> + 100  $\mu$ mol/L MgCl<sub>2</sub> with the pulsing parameters: duration of 160  $\mu$ s, field strength of 1.6 kV/cm, 3 pulses at 15 min intervals, the activation rate, cleavage rate, developmental rate of blastocyst were 86.0%, 86.5% and 48.9% respectively.

**Key words** activation rate, in vitro maturation, bovine, oocyte