

培养条件对牛卵母细胞体外受精后胚胎发育的影响^{*}

禹学礼^{1,2}, 邓 雯¹, 庞有志¹, 咎林森²

(1 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以屠宰场牛卵巢为材料, 采用体外成熟、体外受精、早期胚胎的体外培养等方法, 研究了牛卵泡液(BFF)浓度、颗粒细胞单层(GCM)和培养微滴大小对牛卵母细胞体外发育潜力的影响。结果表明: (1)与未添加BFF的对照组相比, 成熟培养液中分别加入10%、20%和40%的混合BFF, 均可明显促进卵母细胞受精后的发育($P < 0.05$), 但20%组和40%组出现卵母细胞或胚胎粘连。因此, 成熟培养液中以添加10%的混合BFF较为适宜。(2)添加GCM对1级卵母细胞的卵裂率、6~8细胞发育率和囊胚率无显著影响($P > 0.05$); 但添加GCM的2级、3级卵母细胞受精后的卵裂率、6~8细胞发育率和囊胚率分别显著高于未添加组($P < 0.05$)。(3)将取自每头牛的约20枚卵母细胞, 分别置于不同大小的微滴(30, 50, 100和200 μL)中培养、受精, 结果表明, 30和50 μL 组的囊胚发育率显著高于100和200 μL 组($P < 0.05$)。

[关键词] 牛; 卵母细胞; 培养条件; 体外受精; 胚胎发育

[中图分类号] S823.3⁺5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0016-05

近年来, 人们对牛卵母细胞的体外成熟(NM)、体外受精(IVF)和早期胚胎的体外培养(IC)进行了大量研究, 建立了比较系统的方法^[1,2]。但是, 由于影响牛胚胎体外生产(IVP)的因素非常复杂, 经过NM后大部分的卵母细胞可以成熟, 而经过IVF和IC后, 只有30%~40%可以发育至囊胚阶段^[3]。总的来说, 生产水平还比较低, 浪费了有限的高产优质牛卵巢资源, 影响了试管牛生产的产业化。为此, 本实验分别研究了牛卵泡液(BFF)浓度、颗粒细胞单层(GCM)以及培养微滴大小对牛卵母细胞体外受精及其发育的影响, 以期充分利用优良母牛的卵母细胞, 提高胚胎的体外生产水平。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 卵巢来源和保存 牛卵巢采自洛阳市春都清真牛羊屠宰有限公司, 牛宰杀后30 min内取出卵巢, 置于30℃左右的保存液中, 于3 h内运回实验

室。卵巢保存液为改良磷酸盐缓冲液(mPBS)+20 mmol/L Hepes+300 IU/mL青霉素+0.3 mg/mL链霉素+50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素。

1.1.2 主要试剂和设备 犊牛血清(BSA), 购自天津市正江高科技公司; TCM-199, Gibco公司出品; Peco液, Pharmacia; 促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH), 宁波市激素有限公司生产; Hepes, 华美生物工程公司生产; 表皮生长因子(EGF)、FCS、矿物油、咖啡因、肝素、透明质酸酶等试剂, 均为美国Sigma公司生产; 倒置显微镜, 日本尼康公司生产, Nikon 2000-U型; CO₂培养箱, 美国热电公司生产, Forma 311型。

1.2 方 法

1.2.1 实验方法 以本实验室建立的卵丘卵母细胞(COCs)的NM, IVF和IC为基础实验方法^[4]。

NM: 将采出的COCs连同卵泡液放入培养皿中, 置于体视显微镜下检出COCs, 用冲卵液清洗4遍, 在体积分数5% CO₂、相对湿度100%、39℃培养箱中成熟培养22~24 h。冲卵液为mPBS液+4

* [收稿日期] 2005-04-27

[基金项目] 国家“十五”科技攻关计划奶类重大专项(2002BA518A17); 河南省洛阳市科技攻关重大专项(030218)

[作者简介] 禹学礼(1963-), 男, 河南汝阳人, 副教授, 硕士, 主要从事动物胚胎生物技术研究。现在西北农林科技大学在职攻读博士学位。E-mail: yx14282333@sina.com

[通讯作者] 咎林森(1963-), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物生长发育调控及牛的遗传育种与繁殖研究。E-mail: Zanls@yahoo.com.cn

g/L BSA + 300 IU/mL 青霉素+ 0.3 mg/mL 链霉素+ 50 μg/mL 庆大霉素; NM 液为 TCM-199+ 25 mmol/L Hepes+ 100 mL/L FCS+ 0.5 μg FSH+ 10 μg LH+ 10 ng/mL EGF。VF: 首先, 在直径 35 mm 的培养皿中制备 VF 微滴, 39 的 CO₂ 培养箱中平衡 2 h 后备用; 而后, 用不连续密度梯度的 Percoll 液和上游法筛选精子, 用获能受精液调节精子浓度为 10⁷ mL⁻¹, 放入 CO₂ 培养箱备用; 最后, 经成熟培养的 COCs 用受精液清洗 4 遍, 然后移入准备好的受精微滴中, 将准备好的精液加入受精微滴中, 使微滴中精子的最终浓度达到 10⁶ mL⁻¹, 在体积分数 5% CO₂ 39 的培养箱中精卵共同培养 10~ 12 h。精子获能与受精液为 BO 液+ 6 mg/mL BSA + 10 μg 肝素+ 5 mmol/L 咖啡因。VC: 体外受精后 10~ 12 h, 用发育培养液清洗 4 遍, 然后移入发育培养液滴中, 置于体积分数 5% CO₂ 39 的培养箱中培养, 每 24 h 更换一半培养液。体外发育培养液配方为 TCM-199+ 25 mmol/L Hepes+ 体积分数 10% FCS。

1.2.2 实验设计 实验 1: 在 NM 微滴中分别加入 0(对照组), 10%, 20% 和 40% BFF, 共 4 个处理组, 重复 3 次。BFF 为从直径大于 2 mm 的所有卵泡中抽取卵泡液的混合液。比较各处理的卵裂率和囊胚率, 以确定卵母细胞成熟培养液中混合 BFF 的最佳添加浓度。

实验 2: 按照卵母细胞外面被卵丘细胞的层数, 将 COCs 分为 1 级(≥ 4 层)、2 级(2~ 3 层)和 3 级(0~ 1 层), 每级的 COCs 均分别随机分为 2 组, 其中 1 组的 NM 和 VC 微滴中添加 10⁶ mL⁻¹ 颗粒细胞, 另 1 组不添加, 重复 5 次, 以探索 GCM 对包

被不同层数卵丘细胞的卵母细胞 NM 及受精后发育的影响。颗粒细胞单层制备: 采集完 COCs 后, 取检卵平皿中剩余的含颗粒细胞的卵泡液 1 mL, 加 2 mL 0.2% 透明质酸酶消化 3~ 5 min 后, 用等量培养液(TCM-199+ 体积分数 10% FCS)终止消化后离心(1 500 r/min, 5 min), 沉淀物用 5 mL 培养液悬浮, 再离心(1 500 r/min, 5 min), 最终的沉淀物用培养液悬浮, 加入培养液滴, 并将其最终浓度调整为 10⁶ mL⁻¹。分别进行体外成熟、体外受精和体外培养, 比较其卵裂率和囊胚率。

实验 3: 将 NM, VC 微滴分别做成 30, 50, 100, 200 μL, 加入颗粒细胞, 并将颗粒细胞在微滴中的浓度调整为 10⁶ mL⁻¹, 提前 2 h 置于培养箱中备用; 而后将源自不同供体牛的卵母细胞分别进行体外成熟、体外受精和体外培养, 比较其卵裂率和囊胚率, 重复 5 次。

1.2.3 统计分析 数据以平均数 ± 标准误表示, 用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 BFF 浓度对牛卵母细胞 VF 后发育潜力的影响

从表 1 可以看出, 3 个处理的卵裂率、囊胚率均显著高于对照组($P < 0.05$), 说明添加不同浓度的混合 BFF 均可促进卵母细胞的成熟、受精及胚胎发育; 40% BFF 处理的卵裂率显著低于 10% 和 20% BFF 处理($P < 0.05$); 同时还发现, 成熟培养液中添加 10% 的混合 BFF 时细胞间无明显粘连, 20% 组开始出现粘连, 40% 组粘连最严重。

表 1 BFF 浓度对牛卵母细胞 VF 后发育潜力的影响

Table 1 Effect of BFF concentration on the developmental competence of bovine oocytes following VF

BFF/%	总 COCs 数 No. of COCs	卵裂数 Cleavages	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚数 Blastocysts	囊胚率/% Blastocyst rate
0(CK)	299	96	58.7 ± 1.3 a	68	22.9 ± 3.4 a
10	296	191	83.0 ± 2.2 b	125	42.9 ± 3.9 b
20	272	175	82.0 ± 3.7 b	116	42.4 ± 2.6 b
40	201	165	71.8 ± 2.3 c	74	37.0 ± 4.0 b

注: 同一列中标不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。
Note: Values in same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). The following tables are the same

2.2 颗粒细胞对牛 VF 胚胎发育的影响

从表 2 可以看出, 对于外层卵丘细胞 ≥ 4 层的 1 级 COCs, 添加颗粒细胞对卵裂率、6~ 8 细胞发育率和囊胚率无显著影响($P > 0.05$); 对于外层卵丘细胞为 2~ 3 层的 2 级 COCs, 添加颗粒细胞的卵裂

率、6~ 8 细胞发育率和囊胚率显著高于未添加组($P < 0.05$); 而对于外层卵丘细胞为 0~ 1 层的 3 级 COCs 或裸卵, 只有添加颗粒细胞才能发育至囊胚阶段($P < 0.05$)。在均添加颗粒细胞条件下, 从不同级 COCs 的卵裂率、6~ 8 细胞发育率、囊胚率对比

可以看出, 卵母细胞外围的卵丘细胞越少, 颗粒细胞对其影响越大, 当向外层卵丘细胞 2~ 3 层的 2 级 COCs 组添加颗粒细胞时, 其卵裂率和 6~ 8 细胞发育率接近 1 级组 ($P > 0.05$); 当向 2 级、3 级组加入

颗粒细胞时, 囊胚率仍显著低于 1 级组 ($P < 0.05$). 表明卵母细胞自身的质量对其发育至囊胚的能力起重要作用。

表 2 颗粒细胞对牛 IVF 胚胎发育的影响

Table 2 Effect of granulosa cells on development of embryo after IVF in bovine

COCs 分类 Categ. of COCs	颗粒细胞 GCM	总 COCs 数 No. of COCs	卵裂率/% Cleavage rate	6~ 8 细胞发育率/% 6- 8 cell development rate	囊胚率/% Blastocyst rate
1 级 Grade 1	-	123	73.0 ± 5.3 a	52.3 ± 3.0 a	28.7 ± 6.7 a
	+	125	73.5 ± 2.4 a	55.4 ± 8.5 a	31.9 ± 5.4 a
2 级 Grade 2	-	73	48.2 ± 5.6 b	22.5 ± 5.0 b	11.1 ± 3.5 c
	+	75	72.1 ± 2.5 a	51.6 ± 8.5 a	22.3 ± 4.5 b
3 级 Grade 3	-	34	23.9 ± 7.2 c	8.3 ± 7.0 c	0 d
	+	38	42.1 ± 8.2 b	21.5 ± 7.5 b	10.6 ± 9.1 c

注: “-”代表未加颗粒细胞的处理; “+”代表添加颗粒细胞的处理。

Note: “-” is no GCM; “+” is GCM.

2.3 培养微滴大小对 IVF 胚胎发育的影响

表 3 结果表明, 在每个微滴中放入 20 枚左右的卵母细胞 IVM 并受精后, 200 μL 微滴中的卵裂率 (68.7%) 显著低于 30 μL (81.2%), 50 μL (81.6%)

和 100 μL (78.1%); 100 μL 组低于 30, 50 μL 组, 但差异不显著。IVC 后, 30 μL 微滴中的囊胚率 (40.9%) 和 50 μL (42.2%) 明显高于 100 μL (30.0%) 和 200 μL (27.4%), 差异显著 ($P < 0.05$)。

表 3 培养微滴大小对 IVF 胚胎发育的影响

Table 3 Effect of culture medium drop size on development of embryo after IVF in bovine

培养微滴大小/ μL Culture medium drop size	总 COCs 数 No. of COCs	卵裂数 Cleavages	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚数 Blastocysts	囊胚率/% Blastocyst rate
30	106	86	81.2 ± 4.0 a	43	40.9 ± 4.6 a
50	110	90	81.6 ± 3.5 a	47	42.2 ± 5.4 a
100	108	84	78.1 ± 4.2 a	32	30.0 ± 5.3 b
200	109	75	68.7 ± 3.9 b	30	27.4 ± 3.9 b

3 讨论

3.1 BFF 浓度对牛卵母细胞 IVF 后发育潜力的影响

在体内, 卵母细胞是在卵泡内发育成熟的, 作为卵母细胞生长环境的卵泡的大小及其卵泡液 (BFF), 对卵母细胞的成熟和受精后发育潜力起着至关重要的作用^[5]。在牛胚胎的体外生产 (IVP) 中, 一种简单便捷的操作方法是将直径大于 2 mm 的所有卵泡一起抽取, 共同培养, 而后将检出卵母细胞的混合卵泡液离心后制作 BFF, 添加于 IVF 液中; 但来源于不同大小卵泡的 BFF 成分存在差异, 因此, 对卵母细胞的受精及受精后发育影响亦存在差异^[6]。本研究采用直径大于 2 mm 的所有卵泡的混合 BFF, 结果表明添加不同浓度的混合 BFF 均可明显促进卵母细胞的成熟、受精及胚胎发育; 但 40% BFF 组的卵裂率显著低于 10% 和 20% BFF 组 ($P < 0.05$), 说明添加 40% BFF 过量; 同时还发现,

成熟培养液中添加 10% 的混合 BFF 时, 细胞间无明显粘连, 添加 20% 开始出现粘连, 添加 40% 时粘连最严重。因此, 在以 TCM-199 为基础培养液的牛胚胎体外生产中, 成熟培养液中以添加 10% 的混合 BFF 为宜。

3.2 颗粒细胞和卵丘细胞对牛 IVF 胚胎发育的影响

在牛胚胎的体外生产中, 颗粒细胞和卵丘细胞起着重要作用。这是因为颗粒细胞和卵丘细胞可以促进卵母细胞分泌谷胱甘肽等物质, 进而促进卵母细胞核、细胞质成熟, 而卵母细胞的成熟是受精后雄原核形成和胚胎早期发育所必需的^[7~9]。本研究结果表明, 在 IVF 和 IVC 微滴中添加 GCM 虽然未能提高 1 级 COCs 的卵裂率, 6~ 8 细胞发育率和囊胚率, 但可以明显提高 2、3 级卵母细胞的受精后发育率, 使卵丘细胞只有 2~ 3 层的 2 级卵母细胞的囊胚率达到 22.3%, 使卵丘细胞只有 0~ 1 层的 3 级卵母细胞的囊胚率达到 10.6%, 从而有利于充分利用

优秀种牛有限的卵母细胞, 在生产上很有利用价值。至于 GCM 未能提高外层卵丘细胞 ≥ 4 层的 1 级 COCs 的受精后发育率, 原因可能在于卵母细胞外层已经有了足以维持其发育的卵丘细胞, 甚至有人还认为, 过多的加入卵丘细胞会消耗营养, 同时代谢产物会对胚胎发育产生不良影响^[10]。因此, 在生产中对于 1 级 COCs 可以不添加 GCM。

3.3 培养微滴大小对 NF 胚胎发育的影响

在牛胚胎的体外生产中, 为了清楚地记录后代的系谱, 需要将源自每头供体牛的卵母细胞分别进行 NM, NF 和 NC, 通常从每头供体牛两个卵巢上采得的卵母细胞数约为 20 枚。在实验中发现, 由于每个微滴中培养的卵母细胞和胚胎数量有限, 较大的微滴中培养效果较差, 为了提高牛胚胎 NP 的

效果, 设计了本试验以确定分头培养时适宜的微滴大小。结果发现, 30 和 50 μL 微滴中的培养效果优于 100 和 200 μL 微滴, 但由于 30 μL 微滴太小, 更换培养液时容易将覆盖其上的矿物油混入, 从而增加操作难度, 因此可以认为, 每个微滴中分头培养 20 枚左右的卵母细胞和胚胎时, 以 50 μL 为佳, 即每枚卵母细胞或早期胚胎 2 μL 左右的培养液。

4 结 论

在以 TCM-199 为基础培养液的牛胚胎 NP 中, 成熟培养液中可以添加 10% 的混合 BFF; 卵母细胞外面包被的卵丘细胞越少, GCM 对其受精后发育的促进作用越明显; 分头进行牛胚胎体外生产时, 培养微滴大小以 50 μL 为佳。

[参考文献]

- [1] Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, et al Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts[J]. Theriogenology, 1990, 34: 749- 759
- [2] Lu K H, Gordon I, Chen H B, et al Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques[J]. Vet Rec, 1988, 122: 539- 540
- [3] Hazeleger N L, Hill D J, Stubbing R B, et al Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocyte to their developmental potential *in vitro*[J]. Theriogenology, 1995, 43: 509- 522
- [4] 禹学礼, 邓 雯, 庞有志, 等 开放式拉长细管冷冻法对牛卵母细胞体外受精后发育的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(3): 221- 224
- [5] Barnes F L, Looney C R, Westhusin M E. Embryo cloning in cattle: the current state of technology[J]. Embryo Transfer Newsletter, 1991, 6(6): 1- 6
- [6] Leroy J L M R, Vanholder T, Delanghe J R, et al Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cow's early post partum [J]. Theriogenology, 2004, 62: 1131- 1143
- [7] Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, et al Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of NM-NF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration[J]. Theriogenology, 1996, 45: 574- 581
- [8] Chian R, Nwa K, Sirard M. Effect of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*[J]. Theriogenology, 1994, 41: 1499- 1508
- [9] Sirard M, Parrish J, Ware C, et al The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos[J]. Biol Reprod, 1989, 40: 720- 728
- [10] Hadj K, Abdelhaq A, Ahmed T. Production of dromedary embryos by NM and NF and co-culture with oviductal or granulosa cells[J]. Theriogenology, 2004, 62: 1175- 1185

Effects of culture system on developmental competence of bovine oocytes following maturation, fertilization and culture *in vitro*

YU Xue-li^{1,2}, DENG Wen¹, PANG You-zhi¹, ZAN Lin-sen²

(1 College of Animal Science and Technology, Henan University of Sci-Tech, Luoyang, Henan 471003, China;

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

Abstract Experiments were conducted to study the effects of bovine follicular fluid (BFF) concentration, granulosa cell monolayer (GCM) and medium drop size on developmental competence of bovine

oocytes derived from abattoir ovaries following *in vitro* maturation, fertilization and culture. In experiment 1, BFF of (10%, 20%, and 40%) different concentrations from all follicles (> 2 mm) were supplemented to the maturation medium. The results show that different concentration's of BFF could support *in vitro* maturation of COCs and subsequent development capacity, however, 20% and 40% BFF could seriously cause oocytes and embryos to adhere together. Therefore, adding 10% of mixing BFF in maturation medium could be the best choice. Experiment 2 shows that the presence of granulosa cells during maturation and culture did not affect the cleavage rate, 6-8 cells rate and blastocyst rates ($P > 0.05$) of oocytes in grade 1. However, the cleavage rate, 6-8 cells rate and blastocyst rates in grade 2 and grade 3 were higher ($P < 0.05$) when COCs were cultured in the presence of GCM than when cultured in the absence of GCM. In experiment 3, about 20 oocytes derived from every cow were cultured and fertilized in different sizes of medium drops (30, 50, 100 and 200 μL). The blastocyst developmental rates of 30 and 50 μL groups were higher than 100 and 200 μL treatments ($P < 0.05$).

Key words: bovine; oocyte; culture system; *in vitro* fertilization; embryonic development

(上接第 15 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)08-0012-EA

The research on the relation between weight of ovary and quantity of the porcine oocytes

HUANG De-bao¹, HU Jian-hong¹, LI Qing-wang^{1, 2a},
FENG Tao¹, DING Hai-rong¹, YANG Zhi-qing¹, DONG Wen-su^{2b}

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

2 a College of Environment and Chemistry Engineering, b The Affiliated Middle School, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: Aspiration and dissection were used to dispose 132 collected pig ovaries in this paper. The ovaries were divided into three classes ($m \leq 2000$ g, $2000 \text{ g} < m < 4000$ g, $m > 4000$ g) according to the weight (m) and the quantity of oocytes. Then the data were analysed. The result demonstrated, at $m > 4000$ g, the quantity of A-class oocytes and ovary weight had a negative correlation ($r_A = -0.2770$); 2000 - 4000 g, the quantity of A-class oocytes and ovary weight had a positive correlation obviously, $r_A = 0.3827$ ($P < 0.01$). In the weight range, the average of the oocytes from each ovary or the percent of the Class-A were more than other weight ranges; at $m \leq 2000$ g, the quantity of A-class oocytes and ovary weight had a positive correlation. Ovaries with the weight of $2000 \text{ g} < m < 4000$ g should be collected, so that more Class-A oocytes can be obtained.

Key words: porcine; weight of the ovary; quantity of oocytes; relation