

绵羊精子提取物对卵母细胞的孤雌激活作用^{*}

赛务加甫^{1,2}, 张立^{1,3}, 彭新荣¹, 郭志林¹, 杨丽¹,
李向臣¹, 何宽军¹, 安志兴¹, 张涌¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 新疆石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003;

3 内蒙古家畜改良工作站, 内蒙古 呼和浩特 010011)

[摘要] 研究了绵羊精子提取物对绵羊卵母细胞的孤雌激活作用, 确定了绵羊精子提取物的最佳注射剂量, 并将其孤雌激活效果与离子霉素联合 6-DMA P 法的激活效果进行了比较。结果表明, 绵羊精子提取物对绵羊卵母细胞有孤雌激活作用, 最佳注射剂量为每个绵羊卵母细胞注入 2~4 μ L 浓度 5~6 mg/mL 的绵羊精子提取物; 绵羊精子提取物的孤雌激活效果与离子霉素联合 6-DMA P 法的激活效果差异不显著。

[关键词] 绵羊; 精子提取物; 卵母细胞; 孤雌激活; 显微注射

[中图分类号] S814.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)07-0009-04

目前, 通过体细胞核移植技术虽然已经成功地克隆出多种动物个体, 但影响核移植的因素很多, 其中卵母细胞的孤雌激活是影响核移植的重要因素之一。常用的卵母细胞孤雌激活方法有电脉冲法和离子霉素联合 6-DMA P 法^[1]。最近有研究报道, 大鼠^[2]、小鼠^[3]、猪^[4]、马^[5]和人^[6]的精子提取物对卵母细胞具有孤雌激活作用, 但有关绵羊精子提取物对绵羊卵母细胞的孤雌激活尚未见报道。本试验用绵羊精子提取物注射绵羊卵母细胞, 研究其对卵母细胞的孤雌激活作用及其最佳注射剂量, 并比较了绵羊精子提取物与离子霉素联合 6-DMA P 法的孤雌激活效果, 以期为进一步研究精子提取物对卵母细胞的孤雌激活作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 绵羊精液及卵巢 绵羊精液采自陕西杨凌科元公司道赛特种公羊; 卵巢采自陕西省西安市屠宰场, 将陕北土种绵羊屠宰后快速采集其双侧卵巢, 然后置于 20~30℃ 的保温瓶中(含 0.32 mg/mL 硫酸庆大霉素的生理盐水), 在 4~5 h 内运回实验室。

1.1.2 试剂 卵母细胞成熟液和胚胎培养液等

所用的化学试剂除特别指明外, 均为 Sigma 公司产品; PM SF 和 Leupeptin 为美国 Am resco 公司产品; Centricon-30 为美国 Am icon 公司生产。

1.2 精子提取物的制备

将采集的新鲜精液加入无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS (DPBS⁻) 中, 于 $5\,000\times g$ 离心 10 min, 弃上清液, 用 DPBS⁻ 重悬后重复离心 3 次, 得到的沉淀物用 EB 缓冲液(含 120 mmol/L KCl, 20 mmol/L Hepes, 200 mmol/L EDTA, 300 mmol/L PM SF, 10 mmol/L Leupeptin, pH 7.3)稀释至精子密度为 $1\times 10^9/\text{mL}$, 分装于冻存管中, 直接投放到液氮中, 间隔 1 h, 室温解冻, 反复冻融 3 次。得到的裂解产物于 $4\sim 16\,000\times g$ 离心 15 min, EB 缓冲液稀释后再次于 $16\,000\times g$ 离心 10 min, 最后将上清液用超滤膜 Centricon-30 浓缩, 使其终蛋白浓度为 5~6 mg/mL, 制备成含精子提取物的 EB 缓冲液(IE 液), 分装后投入液氮中冷冻保存, 显微注射前室温解冻待用。

1.3 绵羊卵泡卵母细胞的采集及体外成熟

绵羊卵巢用灭菌的生理盐水洗涤 2~3 次, 用手术刀片切开卵巢表面大小 1~5 mm 的卵泡。切割完成后, 将切割液置于体视显微镜下, 收集培养皿中胞

* [收稿日期] 2006-04-27

[基金项目] 国家“863”高技术研究发展计划项目(2001AA 213081)

[作者简介] 赛务加甫(1962-), 男, 新疆石河子人, 副教授, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程和发育生物学研究。

[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。

E-mail: zhangy1956@263.net

质均匀,卵丘细胞包裹完整的卵丘-卵母细胞复合体(COCs),将其用平衡 2 h 以上的卵母细胞成熟培养液冲洗 2 次后进行成熟培养,培养条件为 38.5℃、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度。将 COCs 体外成熟培养 24 h 后,在体视显微镜下观察并挑选排出第一极体的成熟卵母细胞分组备用。成熟培养液配方为:TCM 199 + 10 mmol/L Hepes + 0.38 mmol/L 丙酮酸钠 + 25 mmol/L 谷氨酰胺 + 1 μg/mL 17β雌二醇(17βE₂) + 5 μg/mL FSH + 1.0 IU/mL LH + 体积分数 10% 发情牛血清(OCs) + 50 U/mL 庆大霉素。

1.4 试验设计

1.4.1 绵羊精子提取物对卵母细胞的孤雌激活效果 将成熟卵母细胞随机分成 3 组: I 组每细胞注射 5~7 pL 不含 PM SF 和 Leupeptin 的 EB 缓冲液; II 组每细胞注射 5~7 pL 含精子提取物的 EB 缓冲液; III 组为对照组,每细胞注射 5~7 pL EB 缓冲液。将处理的卵母细胞进行体外培养,48 h 后统计卵裂率,第 8 天检查囊胚发育率,并对胚胎进行形态学检查。

1.4.2 绵羊精子提取物最佳注射剂量的确定 取成熟卵母细胞随机分成 3 组: I 组每细胞注射 2~4 pL 的 IE 液; II 组每细胞注射 8~10 pL 的 IE 液; III 组为对照组,每细胞注射 2~4 pL 的 EB 缓冲液。将处理的卵母细胞进行体外培养,观察,并统计卵母细胞的卵裂率和囊胚发育率,比较不同剂量绵羊精子提取物对卵母细胞的孤雌激活效果,以筛选出精子提取物的最佳注射剂量。

1.4.3 精子提取物与离子霉素联合 6-DMAP 法对卵母细胞孤雌激活效果的比较 取成熟卵母细胞随机分成 2 组: I 组用离子霉素联合 6-DMAP 法对卵

母细胞进行孤雌激活,基本操作步骤为:将卵母细胞先在含 5 μmol/L 离子霉素的 SoFaa 中处理 5 min,然后在含 2 mmol/L 6-DMAP 的 SoFaa 中培养 4 h,用培养液冲洗 3 次后进行体外培养; II 组用精子提取物对卵母细胞进行孤雌激活,方法为显微注射法。将处理的卵母细胞进行体外培养,观察,统计卵裂率和囊胚发育率。

1.5 精子提取物的显微注射

在显微操作仪上用外径为 120 μm 的固定管固定卵母细胞,然后用外径为 7 μm、内径为 5 μm 的注射针吸取精子提取物,穿过透明带进入卵母细胞胞质内,然后缓慢将液体注入胞质内,轻轻退出注射针。将注射过绵羊精子提取物的卵母细胞置于 SoFaa 微滴中与卵丘细胞培养,培养条件为 38.5℃、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度。卵母细胞孤雌激活的判断标准为:注射精子提取物 5~7 h 后卵母细胞排出第二极体,并形成原核,即卵母细胞被激活。

1.6 统计分析

所有试验均重复 5 次,试验数据用 χ^2 进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 绵羊精子提取物对卵母细胞的孤雌激活效果

由表 1 可知,II 组的卵裂率和囊胚发育率均极显著高于 I 组和 III 组($P < 0.01$)。I 组和 III 组在注射激活 12 h 后出现少数卵裂,但均未形成囊胚。形态学检查结果显示,注射精子提取物激活卵母细胞后,卵母细胞分别发育至桑椹胚(图 1)和扩张囊胚(图 2),且桑椹胚和扩张囊胚的发育均正常。以上结果表明,绵羊精子提取物能够有效地激活卵母细胞。

表 1 绵羊精子提取物对卵母细胞的孤雌激活效果

Table 1 Analysis of the effect of sheep sperm extract on oocytes parthenogenetic activation

分组 Group	卵母细胞数 No. oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚发育率/% Blastocysts rate
I	50	0.08 a (4/50)	0 a (0/50)
II	84	52.38 b (44/84)	21.43 b (18/84)
III	50	0.06 a (3/50)	0 a (0/50)

注:同列数据后标注不同小写字母者表示差异极显著($P < 0.01$),下表同。

Note: Values with different superscripts within same columns differ significantly ($P < 0.01$), the same as below tables

2.2 绵羊精子提取物的最佳注射剂量

由表 2 可知, I 组的卵裂率极显著高于 II 组和 III 组($P < 0.01$); I 组的囊胚发育率高于 II 组,但差异不显著; III 组的卵裂率极低,表明不含精子提取物的 EB 缓冲液不能激活卵母细胞,虽然有部分发生

卵裂,但这可能是由于操作过程中的机械刺激激活了小部分卵母细胞所致。以上结果表明,最佳注射剂量为每细胞注入 2~4 pL 5~6 mg/mL 精子提取物。

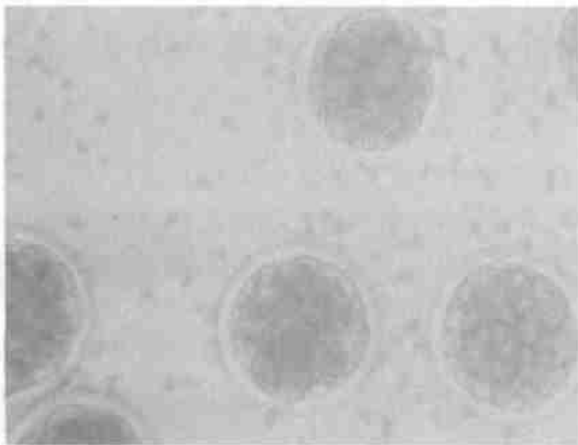


图 1 精子提取物注射后卵母细胞发育至桑椹胚(×200)

Fig 1 Oocytes' development to morula after injection of sperm extract

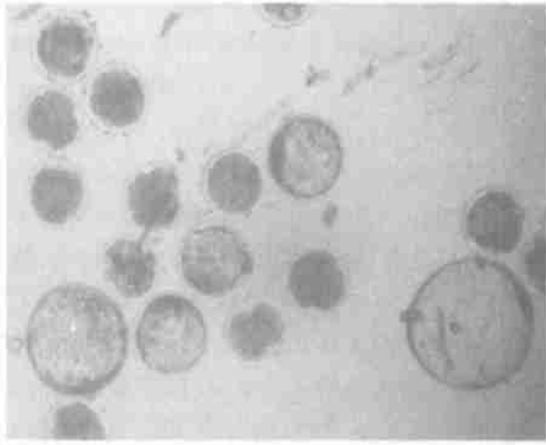


图 2 精子提取物注射后卵母细胞发育至扩张囊胚(×100)

Fig 2 Oocytes' development to extend blastula after injection of sperm extract

表 2 不同剂量绵羊精子提取物对卵母细胞的孤雌激活效果

Table 2 Effect of different doses of sheep sperm extract on parthenogenetic activation of oocytes

分组 Group	注射液种类 Injection type	注射剂量/ (pL · 细胞 ⁻¹) Injection dose	卵母细胞数 No. oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚发育率/% Blastocysts rate
I	IE	2~ 4	89	74 16 a(66/89)	34 83 a (31/89)
II	IE	8~ 10	78	35 90 b (28/78)	16 66 a (13/78)
III	EB	2~ 4	40	0 05 c (2/40)	0 b (0/40)

2 3 精子提取物与离子霉素联合 6-DMA P 法对卵母细胞孤雌激活效果的比较

由表 3 可知, II 组的卵裂率和囊胚发育率略高于 I 组, 但两者之间差异不显著($P > 0.05$)。说明精子提取物的孤雌激活效果与离子霉素联合 6-DMA P 法的孤雌激活效果相当。

表 3 精子提取物与离子霉素联合 6-DMA P 法对卵母细胞孤雌激活效果的比较

Table 3 Effect of activation by Ionomycin+ 6-DMA P or sperm extract on parthenogenetic development

组别 Group	卵母细胞数 No. oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚发育率/% Blastocysts rate
I	60	60 01a(36/60)	30 03a(18/60)
II	89	74 16a(66/89)	34 83a(31/89)

3 讨 论

在正常受精过程中, 精子起着引入父方基因和协同启动发育的作用。随着对受精机制的深入研究, 科学家们提出精子因子假说来解释精子如何在受精时引起卵母细胞内 Ca^{2+} 释放, 进而激活卵母细

胞^[7-9]。该假说认为, 精子与卵母细胞融合后精子因子被释放并扩散到卵胞质内, 经过适当的信号通路使卵母细胞内 Ca^{2+} 释放并引起游离 Ca^{2+} 波动。Dale 等^[10]的研究表明, 向未受精的海胆卵母细胞内注入海胆精子的胞质提取物可启动卵裂。Stice 等^[11]将兔精子提取物注入兔和小鼠的卵母细胞内, 结果观察到原核形成并发生卵裂。有研究表明, 向大鼠^[2]、小鼠^[3]、猪^[4]和人^[6]的卵母细胞内注入同物种精子提取物均可引起 Ca^{2+} 波动。Choi 等^[5]用不同剂量的马精子提取物注入马的卵母细胞获得 24%~ 51% 的卵裂率。Yamamoto 等^[12]在蝶螈上做同类试验获得 100% (18/18) 的卵裂率。Jones 等^[13]在研究海胆精子提取物的孤雌激活机理时发现, Ca^{2+} 释放与精子提取物中磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 的活性有关。Swann 等^[14]发现一种新的磷脂酶 C 亚型蛋白 PLC ζ 并对其作了纯化, 将该基因的 cDNA 在卵母细胞中表达可启动 Ca^{2+} 波动, 产生卵裂甚至能发育至囊胚, 推测精子提取物中的 PLC ζ 使卵母细胞内的 PIP_2 水解产生 IP_3 , 使卵母细胞内 Ca^{2+} 释放并引起 Ca^{2+} 振动, 激活卵母细胞。Suanders 等^[15]用小

鼠精子提取物激活小鼠卵母细胞时也发现 Ca^{2+} 波动。Knott 等^[16]在牛卵母细胞内分别注入 2~4 pL 1, 5 和 15 mg/mL 猪精子提取物, 牛卵母细胞的原核形成率分别为 30%, 82% 和 40%, 其中 5 mg/mL 的猪精子提取物的孤雌激活效果最佳。本试验采用绵羊精子提取物注入绵羊卵母细胞, 可以有效激活卵母细胞, 使其产生卵裂并发育至囊胚, 证实了精子提取物对卵母细胞有激活作用。本研究结果表明, 精子提取物浓度为 5~6 mg/mL, 每细胞注射 2~4 pL 精子提取物时, 卵裂率和囊胚发育率分别为 74.16% 和 34.83%; 每细胞注射 8~10 pL 精子提取物时, 卵裂率和囊胚发育率均明显下降 (35.90% 和

16.66%), 可能因为胞质内注射的精子蛋白过多, 类似于多精子受精使卵母细胞发育受阻, 导致大部分胚胎发育停止所致, 至于注射过多精子蛋白使卵母细胞发育受阻的机制尚需进一步探讨。

在本试验中, 精子提取物对卵母细胞的孤雌激活效果与离子霉素联合 6-DMAP 法的孤雌激活效果差异不显著, 用两种方法激活卵母细胞均可以获得桑椹胚和扩张囊胚。由此可知, 精子提取物将很有可能成为卵母细胞孤雌激活和重构胚激活的一种新的有效物质, 这为探索其激活机制以及对核移植胚的后继发育调控提供了新的方法。

[参考文献]

- [1] Kaufman M H. Early Mammalian Development: Pathenogenetic Studies[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983
- [2] Swann K A. Cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster oocytes[J]. Development, 1990, 110: 1295-1302
- [3] Homa S T, Swann K A. cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes[J]. Human Reproduction, 1994, 9: 2356-2361
- [4] Machaty Z, Bonk A J, Kuhholzer B, et al. Porcine oocyte activation induced by a cytosolic sperm factor[J]. Mol Reprod Dev, 2000, 57: 290-295
- [5] Choi Y H, Love C C. Production of horse NT embryo activation by cytosolic injection with horse sperm factor[J]. Theriogenology, 2002, 58: 771-774
- [6] Tang T S, Dong J B, Huang X Y, et al. Ca^{2+} oscillations induced by a cytosolic sperm factor are mediated by a maternal machinery that functions only once in mammalian eggs[J]. Development, 2000, 127: 1141-1150
- [7] Swann K. Ca^{2+} oscillations and sensitization of Ca^{2+} release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor[J]. Cell Calcium, 1994, 15: 331-339
- [8] Stricker S A. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals[J]. Dev Biol, 1999, 211: 157-176
- [9] Runft L L, Jaffe L A, Mehlmann L M. Egg activation at fertilization: where it all begins[J]. Developmental Biology, 2002, 245: 237-254
- [10] Dale B, Defelice L J, Ehrenstein G. Injection of a soluble sperm fraction into sea urchin eggs triggers the cortical reaction[J]. Experientia, 1985, 41: 1068-1070
- [11] Stice S L, Robl J M. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm [J]. Mol Reprod Dev, 1990, 25: 272-280
- [12] Yamamoto S, Kubota H Y, Yoshimoto Y, et al. Injection of a sperm extract triggers egg activation in the newt cynops pyrrhogaster[J]. Developmental Biology, 2001, 230: 89-99
- [13] Jones K T, Matsuda M, Parrington J, et al. Different Ca^{2+} releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs[J]. Biochemical Journal, 2000, 346: 743-754
- [14] Swann K, Laman M C, Saunders C M, et al. The cytosolic sperm factor that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLC ζ [J]. Reproduction, 2004, 127: 431-439
- [15] Saunders C M, Laman M G, Parrington J, et al. PLC ζ a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development[J]. Development, 2002, 129: 3533-3544
- [16] Knott J G, Poothapillai K, Wu H, et al. Porcine sperm factor supports activation and development of bovine nuclear transfer embryos[J]. Biology of Reproduction, 2002, 66: 1095-1103

(下转第 16 页)

- [9] Elfstrand L. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrums and the effects of processing[J]. International Dairy Journal, 2002, 12: 879-887.
- [10] 张渝辉, 刘 波. 奶牛初乳的热稳定性[J]. 安徽机电学院学报, 1998, 13(3): 61-64
- [11] 骆承痒. 乳与乳制品工艺学[M]. 北京: 农业出版社, 1992
- [12] 郭本恒. 牛初乳理化性质和生物活性物质的研究[D]. 北京: 国家图书馆, 1995
- [13] 杨严俊, 刘鹏龙. 牛初乳特性初步研究[J]. 粮食与油脂, 2003(8): 6-8

Studies on properties of Saanen goat colostrums

YANG Xiao-yu¹, WU Dong-dong¹, YANG Hua², CHEN Jin-ping¹, ZHANG Fu-xin¹

(1 Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China;

2 Department of Agronomy, Yangling Vocational Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This paper studied the physico-chemical properties and the thermostability of Saanen goat colostrum in different lactation periods. The results showed that the density, dipter and acidity were higher than those of common milk, but pH value was lower than that of mature milk, the contents of every indexes were more close to those of mature milk with the prolong of lactation; When boiled, Saanen goat colostrums coagulated before 48 h of lactation, but after 48 h of lactation, when boiled, Saanen goat colostrums didn't coagulated; The shorter the lactation period was, the poorer the thermostability was.

Key words: Saanen goat; colostrum; physico and chemical properties; thermostability

(上接第 12 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)07-0009-EA

Application of sheep sperm extract cytosolic injection in oocytes parthenogenetic activation

SAI Wu-jiafu^{1,2}, ZHANG Li^{1,3}, PENG Xin-rong¹, GUO Zhi-lin¹,

YANG Li¹, LI Xiang-chen¹, HE Kuan-jun¹, AN Zhi-xing¹, ZHANG Yong¹

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

2 College of Animal Science and Technology, Xinjiang Shihezi University, Xinjiang, Shihezi 832003, China;

3 Inner Mongolia Livestock Improvement Station, Hohhot, Inner Mongolia 010011, China)

Abstract: It was studied that sheep oocytes were parthenogenetic activated by cytosolic injection of sheep sperm extract. Activation effect of different injection doses of sheep sperm extract were compared to find a feasible injection dose. At the same time activation effect by Ionomycin and 6-DMAP was compared with cytosolic injection of sheep sperm extract. The result showed that oocytes could be parthenogenetically activated by cytosolic injection of sheep sperm extract, and the best feasible injection dose was 2-4 pL for every oocyte when its concentration was 5-6 mg/mL. There was no distinct difference on activation effect between sheep sperm extract activation group and Ion activation group.

Key words: sheep; sperm extract; oocyte; parthenogenetic activation; micro injection