

山羊体外成熟卵母细胞去核时间及方法 对去核效率的影响

刘海军, 郑梓, 王儒, 张金龙

(天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112)

摘要: 在山羊卵母细胞体外成熟的不同时间, 进行荧光(Hochest33342)染色, 一是确定极体和细胞核染色体的位置关系, 二是分别采用盲吸法和荧光指导法去核, 观察去核率。结果表明: 在体外成熟培养 18 20 22 24 h A类卵母细胞所占比例分别为 72.7%, 43.7%, 27.5%, 16.7%, B类卵母细胞分别为 9.1%, 31.3%, 47.8%, 55.6%, C类卵母细胞分别为 18.2%, 25%, 24.6%, 27.7%; 在体外成熟培养的 18 20 22 24 h去核, 盲吸法的去核率分别为 69.1%, 58.2%, 50.7%, 45.8%, 而荧光指导法去核率均为 100%。

关键词: 山羊; 卵母细胞; 去核

中图分类号: S827.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)02-0090-04

The Effect of Enucleation Time and Method on the Enucleation Efficiency Using in vitro Matured Goat Oocytes

LIU Hai-jun, ZHENG Zi, WANG Ru, ZHANG Jin-long

(Tianjin Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin 300112, China)

Abstract: Oocytes were stained with Hochest33342 at the different time during in vitro maturing of goat oocytes. The first aim was to determine the location relationships between polar body and nucleus chromosome, the second aim was to compare the enucleation efficiency when using two different enucleation methods: blind-aspiration and fluorescence guiding. The result showed that at the 18 20 22 24 h during in vitro maturing of goat oocytes, the rate of type A oocytes was 72.7%, 43.7%, 27.5%, 16.7%, type B oocytes was 9.1%, 31.3%, 47.8%, 55.6%, type C oocytes was 18.2%, 25%, 24.6%, 27.7%. When enucleating at the 18 20 22 24 h during in vitro maturing of goat oocytes, the enucleation efficiency were 69.1%, 58.2%, 50.7%, 45.8% for blind-aspiration method, however, all the enucleation efficiency were 100% when fluorescence guiding method used.

Key words: Goat Oocytes; Enucleation

核移植涉及技术环节多, 每一个环节出问题, 都会影响核移植的总体效率。去核是核移植中的第一步, 是非常重要的, 去核的好坏直接影响以后的注核、融合等核移植环节的效率以及重构胚的正常发育。

传统的去核方法采用的是盲吸法^[1], 以成熟卵母细胞排出的第一极体作指示, 极体刚排出时, 细胞核染色体就在极体附近。用去核管去掉极体及其附近 1/3~1/4 的细胞质, 就能把核去掉。但随着成熟时间的延长, 极体的位置会发生变化, 从而指示细胞核染色体的位置不准确, 造成去核率下降。

为了提高去核率, 后来在小鼠上率先发展了荧

光指导法去核^[2], 用荧光染色确定细胞核染色体的位置, 去核率可达 100%。

本研究对山羊卵母细胞体外成熟培养不同时间极体与细胞核的相对位置关系, 以及不同的去核方法(盲吸法、荧光指导法)对卵母细胞去核率的影响进行了研究。旨在选择山羊卵母细胞最佳去核方法及去核时间提供依据。

1 材料和方法

1.1 卵母细胞的采集与体外成熟

1.1.1 屠宰场山羊卵巢的采集 山羊卵巢取自天

收稿日期: 2010-12-05

基金项目: 天津市科技支撑计划重大项目资助(08ZCZDNC02100)

作者简介: 刘海军(1967-)男, 内蒙古赤峰人, 研究员, 博士, 主要从事动物胚胎生物技术研究。

津附近屠宰场。山羊屠宰后立即摘除卵巢，放入 30~35℃加有青、链霉素的生理盐水中保存，于 5 h 内运至实验室。

1.1.2 卵母细胞的采集与体外成熟 采用抽吸法进行采卵，用 10 mL 注射器抽吸卵巢表面 2~6 mm 卵泡，选择含有一层以上致密卵丘细胞，细胞质均匀的卵母细胞用于成熟培养。卵母细胞成熟培养液为 TCM199 (Gibco) + 10% FCS (Hyclone) + 10 μg/mL FSH (宁波激素制品厂) + 20 μg/mL LH (宁波激素制品厂) + 1 μg/mL 17β-E₂ (Sigma)。于 38.5℃, 5% CO₂, 95% 空气, 饱和湿度下分别培养 18 20 22 24 h

1.2 成熟卵母细胞的分类

体外成熟培养 18 20 22 24 h 的卵母细胞，用 0.5% 透明质酸酶处理 5 min 吸管吹打去掉卵丘细胞。以排出第一极体作为卵母细胞成熟的标志。成熟卵母细胞在含有 5 μg/mL Hoechst 33342 和 5 μg/mL 细胞松弛素 B (Sigma) 的 TCM199 中孵育 10~15 min 在倒置显微镜下用紫外光照射，极体和细胞核染色体发出蓝色荧光。按极体与染色体的连线所构成角的大小，把卵母细胞分成三类：A 类，夹角为 0~30°；B 类，夹角为 30~60°；C 类，夹角为 60~90°。统计不同成熟时间三类卵母细胞所占比例。

1.3 卵母细胞去核方法

体外成熟培养 18 20 22 24 h 的卵母细胞，选

择排出第一极体，形态正常的卵母细胞进行去核。采用盲吸法和荧光指导法两种方法去核。成熟卵母细胞在含有 5 μg/mL Hoechst 33342 和 5 μg/mL 细胞松弛素 B (Sigma) 的 TCM199 中孵育 10~15 min 然后在倒置显微镜 (Nikon) 下用显微操作仪 (Narishage) 去核，操作液为添加 20 mmol/L Hepes 的 TCM199 (Gibco) + 10% FCS (Hyclone)。

1.3.1 盲吸去核法 用去核针吸去卵母细胞第一极体及其下方 1/3~1/4 的胞质，去核后的卵母细胞用紫外光照射，确定染色体是否已经去掉，统计去核率。

1.3.2 荧光指导去核法 荧光瞬间照射确定 MII 卵母细胞染色体的位置，然后用去核针插入卵周隙，吸掉包含有染色体的小部分细胞质及第一极体，荧光检测去核。

1.4 数据统计分析

试验重复 3 次以上，用 χ² 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同成熟培养时间极体和染色体位置的关系 分别在卵母细胞体外成熟培养的 18 20 22 24 h 结束成熟培养，Hoechst 33342 染色，荧光照射确定染色体和极体的位置关系 (图 1~3)，结果见表 1。

表 1 不同成熟培养时间极体和染色体位置的关系

Tab 1 Location relationships between polybody and chromosome at the different time during the in vitro maturing of goat oocytes

成熟时间 /h Culturing time	卵子总数 No. of oocytes	A 类 Type A	B 类 Type B	C 类 Type C
18	55	40 (72.7%)	5 (9.1%)	10 (18.2%)
20	64	28 (43.7%)	20 (31.3%)	16 (25%)
22	69	19 (27.5%)	33 (47.8%)	17 (24.6%)
24	72	12 (16.7%)	40 (55.6%)	20 (27.7%)

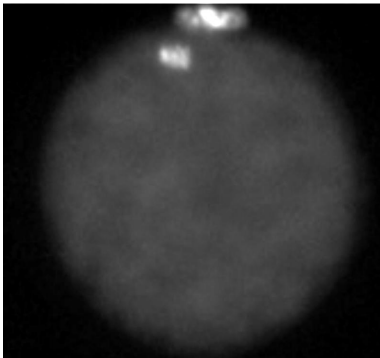


图 1 A 类卵母细胞
Fig 1 Type A oocyte

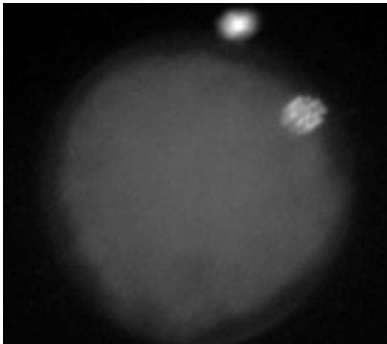


图 2 B 类卵母细胞
Fig 2 Type B oocyte

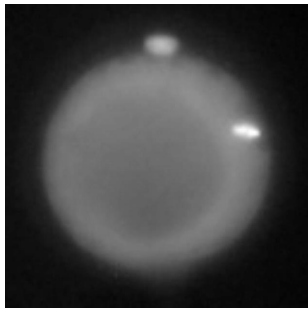


图 3 C 类卵母细胞
Fig 3 Type C oocyte

结果表明,随着成熟培养时间延长,A类卵母细胞所占比例逐渐下降,而B类、C类卵母细胞逐渐增加,表明染色体和第一极体的距离随培养时间延长逐渐增大。培养 18 h A类卵母细胞所占比例最大,可达 72.7%;培养 24 h A类卵母细胞所占比例降至最低,仅为 16.7%。

2.2 成熟培养时间对卵母细胞盲吸法去核率的影响
分别在卵母细胞体外成熟培养的 18 20 22 24 h 结束成熟培养,分别用盲吸法和荧光指导法去核,去核后荧光照射检测卵母细胞去核率,结果见表 2

表 2 成熟培养时间及去核方法对去核率的影响

Tab 2 The effect of culturing time and enucleation method on enucleation efficiency

成熟时间 /h Culturing time	盲吸去核法 Blind-aspiration		荧光指导去核法 Fluorescence guiding	
	卵子总数 No of oocytes	去核数 Enucleated	卵子总数 No of oocytes	去核数 Enucleated
18	42	29 (69.1%) a	53	53 (100%)
20	67	39 (58.2%) ab	75	75 (100%)
22	73	37 (50.7%) ab	63	63 (100%)
24	48	22 (45.8%) b	58	58 (100%)

注:同一栏内标字母不同者,表示差异极显著(P<0.01)

Note: Different small letters within same row represent significant difference at 1% level

结果表明,用盲吸法去核,随着成熟培养时间延长,去核率逐渐下降,18 h与 20 22 h之间差异不显著,18 h与 24 h的去核率差异显著。表明采用盲吸去核法去核,山羊卵母细胞的适宜去核时间为 18~22 h 不宜超过 22 h。采用荧光指导法去核,去核率可达 100%,而盲吸法去核率最高仅为 69.1%,表明荧光指导法优于盲吸去核法。

3 讨论

受体卵母细胞的完全去核是保证核移植胚胎发育的基本条件。传统的去核方法采用的是盲吸法^[1],以成熟卵母细胞排出的第一极体作指示。本研究的结果表明,随着山羊卵母细胞体外成熟培养时间的延长,盲吸去核率下降,原因是作为去核标志的极体位置发生变化,不能准确地指示染色体的位置。本研究体外成熟培养 18 h的山羊卵母细胞去核率最高,可达 69.1%,而成熟培养 24 h的卵母细胞去核率仅为 45.8%。这与前人的研究结果相似,Takano等^[3]对牛卵母细胞在体外成熟培养的 16~18, 22~24, 28~30, 40~42 h的去核率分别为 88%, 85%, 74%, 75%;杨素芳等^[4]对水牛卵母细胞在体外成熟培养的 16~18 19~21, 22~24 h 去核率分别为 75%, 59.8%, 47.1%。

尽管盲吸去核法操作简便、快速,但去核率仅能达到 70%左右,那么约 30%的卵母细胞并未去掉染色体,用这部分卵母细胞构建的重构胚不能产生正

常的二倍体胚胎。
为提高卵母细胞去核效率,后来发展了荧光指导法去核。就是先用 Hoechst 33342 对卵母细胞进行染色,Hoechst 33342 可以特异性地结合在 DNA 中的腺嘌呤和胸腺嘧啶上,在紫外光激发下发出荧光,显示出卵母细胞染色体的位置,从而指导去核操作,荧光指导法的去核率可达到 100%。Westhusin 等^[5]试验表明,Hoechst33342 染色和紫外线短时照射不会影响卵母细胞维持供体核发育到出生的能力,这一结果为应用荧光指导法去核奠定了基础。国外在山羊上应用荧光指导法去核的较多^[6,7],而国内仅见刘海军等^[8,9]采用用荧光指导法去核,并成功获得了胚胎克隆的波尔山羊。

尽管盲吸去核后可采用荧光染色验证去核,确认去核的卵母细胞用于核移植,而弃掉未去除细胞核的卵母细胞,但这样仍然浪费掉约 30%的卵母细胞,这对充分利用核受体卵母细胞是不利的,尤其当卵母细胞来源不足,或获取卵母细胞成本高时(如来自经 FSH 超排的家畜卵巢),而荧光指导法去核可以避免这一弊端。

Liu 等^[10]报道,利用 MII 期卵母细胞的细胞质和纺锤体对光的不同折射特性,在显微镜光学系统上附加偏振光学系统,并将该系统捕获的图像用计算机进行图像处理,显示出 MII 期染色体所处的位置,并通过显微操作进行去核,可以有效地去除小鼠、仓鼠、牛及人卵母细胞的核,而且可以把创伤降

到最低。但这种方法需要较昂贵的设备,限制了其在核移植中的应用。

曾有人担心 Hoedhst 33342染色,紫外照射时间过长,会对卵母细胞造成伤害,这个问题可通过缩短紫外照射时间来解决,如紫外照射时间不超过 10 s

本研究结果表明,随着成熟培养时间的延长,山羊卵母细胞第一极体与染色体的距离逐渐变远,二者夹角在 0~30°以成熟培养 18 h比例最高,成熟培养 24 h这类卵母细胞所占比例降至最低,仅为 16.7%,这也与本研究盲吸法去核随着培养时间延长,去核率逐渐下降是吻合的。

不同成熟培养时间极体和染色体的位置关系,对荧光指导法去核也有重要的意义,尽管荧光指导法可做到 100%去核,但是如果染色体和极体距离近,可降低操作难度,这样即可加快去核速度,又可减少去掉的细胞质的量,从而有利于卵母细胞去核的质量。

参考文献:

[1] Prather R S Barnes F L Smies M L et al Nuclear transfer in the bovine embryo assessment of donor nuclei and recipient oocytes[J]. Biology of Reproduction 1987 37 859—866

[2] Tsunoda Y Shioda Y Onodera M et al Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoedhst staining and ultraviolet irradiation[J]. J Reprod Fert 1988 82 173—178

[3] Takano H koyama Kozzi G et al Effects of aging of recipient oocytes in the development of bovine nuclear transfer embryos in vitro[J]. Theriogenology 1993 39 909—917.

[4] 杨素芳,石德顺,韦精卫,等.水牛卵母细胞去核方法的摸索[J].草食家畜,2003(4):19—22

[5] Westhusin M E Levanduski M J Scarborough R et al Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoedhst stained enucleated demioocytes of cows[J]. J Reprod Fert 1992 95(2): 475—480

[6] Reggio B C James A N Green H L et al Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries[J]. Biol Reprod 2001 65 1528—1533

[7] Keefer C L Keyston R Lazaris A et al Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells[J]. Biol Reprod 2002 66 199—203

[8] 刘海军,刘 灵,冯建忠,等.波尔山羊胚胎克隆的研究[J].华北农学报,2007 22(4):71—75

[9] 刘海军,刘 灵,刘玉堂等.受体卵母细胞来源和供体细胞类型对山羊体细胞核移植融合率的影响[J].华北农学报,2008 23(1):41—44

[10] Liu L Oldenbourg R Trinathi J R et al A reliable noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes[J]. Nat Biotech 2000 18 223—225