

王士勇, 杨月春, 郑军军, 等. 秋水仙胺诱导牛卵母细胞显核的研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 228–230.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.081

秋水仙胺诱导牛卵母细胞显核的研究

王士勇^{1,2}, 杨月春³, 郑军军¹, 刘宗岳¹, 方大雨⁴, 杨福合¹

(1. 中国农业科学院特产研究所, 吉林长春 130112; 2. 延边大学农学院, 吉林延吉 133002;
3. 吉林农业科技学院动物科学学院, 吉林吉林 132101; 4. 吉林省长春市动植物公园, 吉林长春 130022)

摘要:为了观察秋水仙胺(demecolcine, DEME)诱导牛卵母细胞的显核效果,从吉林省长春市某屠宰场收集牛卵巢后采用抽吸法获取卵泡液,在体视显微镜下选择卵丘完整、胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(COCs),微滴法体外成熟(*in vitro* mature, IVM)培养 19~22 h,在 0.3% 透明质酸酶中漩涡振荡去除卵母细胞周围的卵丘细胞,挑选排出第一极体的卵母细胞随机分组,分别进行 DEME 浓度和作用时间诱导牛卵母细胞显核的研究。结果表明,DEME 处理 60、90、120 min 组间显核率差异不显著($P>0.05$),但是 60、120 min 组的显核率显著高于 DEME 处理 30 min 组($P<0.05$)。当 DEME 浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,显核率最高,为 78.9%,显著高于 0.3、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 组($P<0.05$),但是与 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 组差异不显著($P>0.05$)。牛的 COCs 经 IVM 培养 19、20、21、22 h,结果发现培养 22 h 组显核率最高,显著高于培养 19 h 组($P<0.05$),但是与培养 20、21 h 组差异不显著($P>0.05$)。可见牛卵母细胞经 IVM 培养 20~22 h 后,用 0.5 $\mu\text{g/mL}$ DEME 处理 60 min 可以有效诱导其显核。

关键词:地美可辛;牛;卵母细胞;体外成熟;化学辅助去核

中图分类号:S823.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0228-03

自 1997 年第 1 只体细胞核移植动物——“多莉”诞生^[1]以来,体细胞核移植技术已经发展十几年的时间,由于其在核质互作、濒危动物保护方面具有深远的应用前景^[2],同时可利用的大量濒危动物卵母细胞通常很难获得,而屠宰场屠宰后的母牛卵巢方便获取且易获得大量卵母细胞作为受体胞质,利用其进行种间体细胞核移植技术研究在当前较广泛。但是包括牛在内的家畜卵母细胞不像鼠科动物的卵母细胞在光学显微镜下可以直接看到细胞核^[3],所以通常去核时采用盲吸法^[4]、荧光辅助法^[5]或秋水仙胺(demecolcine, DEME)诱导显核法^[6]。利用盲吸法去核时为了提高去核效率通常要去除较大体积的胞质,之后还需要在紫外光下照射以确定去核成功率,这会给受体胞质造成不可逆的伤害,而荧光辅助法去核法同样需要对卵母细胞进行紫外光照射,具有同样或更重的伤害^[7]。DEME 诱导显核法利用 DEME 对受体卵母细胞处理后能够破坏其微管稳定性、干扰染色体的正常分离和纺锤体的功能促进核内所有染色质聚集在胞质表面形成一个突

起,去核时仅去除极少量的胞质即可达到完全去核的目的,去核后在没有 DEME 的培养液中培养时即可恢复微管的聚集^[8]。本试验就牛卵母细胞经过微滴法体外成熟(*in vitro* mature, IVM)不同时间后用 DEME 处理对其显核情况进行研究,旨在确定 DEME 诱导去核时的适宜浓度和处理时间,以满足体细胞核移植研究需要,为其进一步应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

DEME 和丙酮酸钠购自西格玛奥德里奇公司,人绒毛膜促性腺激素(hCG)和孕马血清促性腺激素(PMSG)购自浙江省宁波市三生药业有限公司,其余试剂均购自生命科技公司。

1.2 卵巢的获取及卵母细胞的收集

卵巢采集于吉林省长春市某屠宰场,母牛屠宰后立即采取卵巢将其放入含有双抗的 25~35 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水中,8 h 内带回实验室。将收集的卵巢剪去附着的系膜和输卵管,用灭菌生理盐水清洗 3 次后,用带有 16 号针头的 10 mL 注射器抽吸法收集卵泡液,在体视显微镜下选择卵丘完整、胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte-complexes, COCs)用含 5% FBS 的 PBS 洗净。

1.3 卵母细胞体外成熟

将挑选好的 COCs 用成熟液洗 3 次,然后移入平衡 2 h 以

收稿日期:2014-01-15

基金项目:国家科技基础条件平台项目(编号:2005DKA21102);吉林省自然科学基金(编号:20130101107JC)。

作者简介:王士勇(1980—),男,吉林永吉人,博士研究生,讲师,主要从事动物繁殖生物技术的研究。E-mail: wangshiyong@caas.cn。

通信作者:杨福合,研究员,博士生导师。E-mail: yangfh@126.com。

[16] Lafond G P, Derksen D A. Row spacing and seeding rate effects in wheat and barley under a conventional fallow management system [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1996, 76 (4): 791–793.

[17] 岳民勤, 王志明, 虎凌云, 等. 不同播种行距对岷山红三叶种子产量的影响[J]. 内蒙古草业, 2009, 21(4): 42–44.

[18] Lafond G P. Effects of row spacing, seeding rate and nitrogen on yield of barley and wheat under zero-till management[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1994, 74(4): 703–711.

[19] Teich A H, Welacky T, Hamil A, et al. Row-spacing and seed-rate effects on winter wheat in Ontario [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1993, 73(1): 31–35.

上的微滴成熟液中,放入 38.5 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养。卵母细胞成熟培养液组成为 90% M199 + 10% FBS + 10 μg/mL PMSC + 10 μg/mL hCG + 0.33 mmol/L 丙酮酸钠,成熟培养 19 ~ 22 h 后置于含 3 mg/mL 透明质酸酶的 DPBS 中,涡旋混合器振荡去掉卵母细胞周围的卵丘细胞,检查成熟情况,以体视显微镜下观察到卵丘细胞扩展(图 1)及排出第一极体(图 2)视为成熟。

1.4 试验设计

试验一:IVM 培养 21 h 后,挑选成熟的卵母细胞随机分组,洗净后放入含 0.4 μg/mL DEME 和 10% FBS 的 M199 微滴培养液中,在 38.5 ℃、饱和湿度 CO₂ 培养箱中培养 30、60、90、120 min,在体视显微镜下观察显核情况(图 3)。

试验二:IVM 培养 21 h 后,挑选成熟的卵母细胞随机分组,洗净后放入含 0.3、0.4、0.5、0.6 μg/mL DEME 和 10% FBS 的 M199 微滴培养液中,在 38.5 ℃、饱和湿度 CO₂ 培养箱中培养 60 min,在体视显微镜下观察显核情况(图 3)。

试验三:IVM 培养 19 ~ 22 h 后,挑选成熟的卵母细胞洗净后放入含 0.5 μg/mL DEME 和 10% FBS 的 M199 微滴培养液中,在 38.5 ℃、饱和湿度 CO₂ 培养箱中培养 60 min,在体视显微镜下观察显核情况(图 3)。

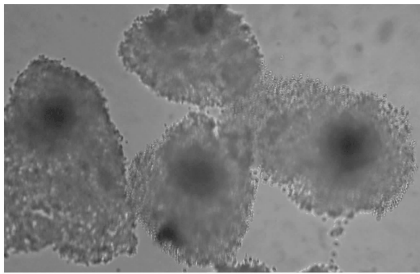


图1 牛卵母细胞体外成熟 22 h 后卵丘细胞扩展

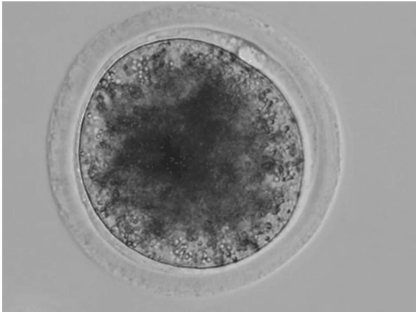
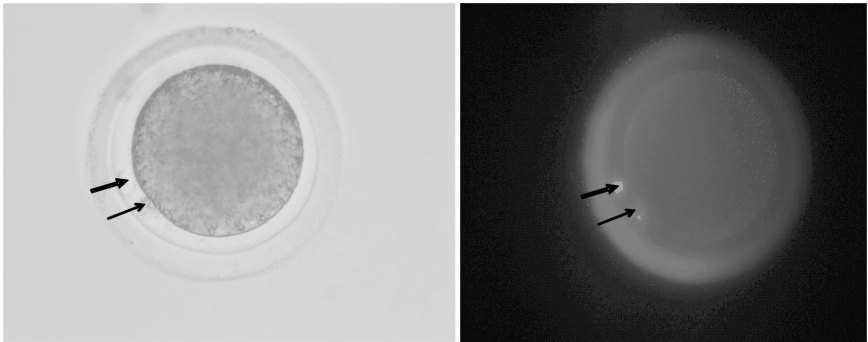


图2 牛卵母细胞体外成熟 22 h 后排出第一极体



A.可见光下卵母细胞显核情况 B. Hoechst 33342 染色后紫外光下显核情况
粗箭头指示的是第一极体,细箭头指示的是核物质所在的包突突起

图3 DEME 诱导牛卵母细胞显核情况

1.5 统计分析

结果以“平均值 ± 标准差”表示,数据经 SPSS 21.0 软件进行方差分析和多重比较,差异显著标准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 DEME 处理时间对牛卵母细胞显核效果的影响

牛卵母细胞经 0.4 μg/mL DEME 处理不同时间之后,显核结果如表 1 所示,60、90、120 min 组间显核率差异不显著 ($P > 0.05$),但是 60、120 min 组的显核率显著高于 30 min 组 ($P < 0.05$)。

表 1 DEME 处理时间对牛卵母细胞显核效果的影响

DEME 处理时间 (min)	供试卵数 (枚)	重复数 (次)	显核数 (枚)	显核率 (%)
30	40	4	22	55.0 ± 5.0b
60	40	4	28	70.0 ± 7.0a
90	40	4	27	67.5 ± 2.5ab
120	39	4	28	71.9 ± 1.9a

2.2 DEME 浓度对牛卵母细胞显核效果的影响

牛卵母细胞经不同浓度 DEME 处理 60 min 之后,显核结果如表 2 所示,当 DEME 的浓度为 0.5 μg/mL 时,显核率最高,为 78.9%,显著高于 0.3、0.4 μg/mL 组 ($P < 0.05$),但是与 0.6 μg/mL 组差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 DEME 浓度对牛卵母细胞显核效果的影响

DEME 浓度 (μg/mL)	供试卵数 (枚)	重复数 (次)	显核数 (枚)	显核率 (%)
0.3	54	5	29	53.7 ± 2.7c
0.4	55	5	37	67.3 ± 2.2b
0.5	57	5	45	78.9 ± 2.1a
0.6	52	5	40	77.1 ± 1.4a

注同表 1。

2.3 IVM 时间对 DEME 诱导牛卵母细胞显核效果的影响

牛 COCs 经 IVM 不同时间之后,DEME 诱导显核结果如表 3 所示,其中 19 h 组显核率最低,且显著低于 21、22 h 组 ($P < 0.05$),但是与 20 h 组差异不显著 ($P > 0.05$);22 h 组显核率最高,与 20、21 h 组差异不显著 ($P > 0.05$)。

注:同列数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

表 3 IVM 时间对 DEME 诱导牛卵母细胞显核效果的影响

IVM 培养时间 (h)	供试卵数 (枚)	重复数 (次)	显核数 (枚)	显核率 (%)
19	473	4	257	52.1±6.0b
20	798	6	481	61.0±4.2ab
21	754	6	485	65.3±3.1a
22	841	6	558	66.7±3.0a

注同表 1。

3 结论与讨论

体细胞核移植技术的一个关键步骤就是受体卵母细胞的去核,去核的成功率直接影响核移植的整体效率,传统的盲吸法对操作者的技术熟练水平要求较高,并且去除胞质较多,不利于核移植胚胎后期的发育。利用 DEME 进行化学诱导去核不仅去除胞质量较少,而且化学诱导剂作用时间较短,所以对核移植胚胎的后期发育并无明显不良影响,近年来成为采用较多的一种主流方法。应用 DEME 诱导去核通常采用 2 种方式:一种是将激活处理后的卵母细胞在一定浓度的 DEME 中处理相应的时间,使同源染色体随着第二极体排出胞质,这种方式在鼠^[9]、山羊^[9]、兔^[10]、牛^[11]上都有研究报道;另一种是将减数第二次分裂中期卵母细胞经过 DEME 处理后,染色质在卵母细胞胞质表面形成一个包状的突起,在显微镜下利用显微操作去掉突起,同样可以达到去核的目的,主要应用在猪^[6]、牛^[12]等家畜方面。

DEME 诱导去核的方法在不同动物和不同试验体系下所采用的浓度及作用时间各不相同,Russell 等报道,在牛上用 DEME 诱导去核时采用 0.6 μg/mL 浓度处理 90 min 较好^[7];Meng 等采用 0.4 μg/mL 浓度处理 30~40 min 较好^[3],而本研究发现浓度为 0.5 μg/mL 时显核率最高,且显著高于 0.4 μg/mL 组($P<0.05$),这与王强等在小鼠上的研究结果^[13]一致。本研究发现,随着处理时间延长,有些在前段时间没有胞质突起的在后来会出现胞质突起,所以笔者认为化学诱导去核作为一种辅助的手段在实际应用过程中应根据各自的试验条件探索适宜体系,一般进行体细胞核移植研究时都会根据受体卵母细胞数量而进行多批次的去核操作,这样就可以分别在 30、60、90 min 等时间点(或根据试验进度)多次挑选具有胞质突起的卵母细胞进行去核操作。

由于卵母细胞的细胞核位置会随着 IVM 时间的延长而远离第一极体^[14],所以笔者研究了 IVM 时间对 DEME 诱导牛卵母细胞显核效果的影响,结果显示 22 h 组显核率最高,但是与 20、21 h 组差异不显著($P>0.05$),说明在牛卵母细胞 IVM 20~22 h 这段时间里进行 DEME 处理效果较适宜,同时在试验过程中发现随着时间的延长,DEME 诱导的胞质突起距离第一极体较远的概率增高,这与李裕强等的报道^[14-15]一致。

参考文献:

[1] Wilmut I, Schnieke A E, Mcwhir J, et al. Viable offspring derived

from fetal and adult mammalian cells [J]. Nature, 1997, 385 (6619): 810-813.

[2] Kaedei Y, Fujiwara A, Tanihara F, et al. In vitro development of cat interspecies nuclear transfer using pig's and cow's cytoplasm [J]. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2010, 54 (3): 405-408.

[3] Meng Q G, Wu X, Bunch T D, et al. Enucleation of demecolcine-treated bovine oocytes in cytochalasin-free medium; mechanism investigation and practical improvement [J]. Cellular Reprogramming, 2011, 13 (5): 411-418.

[4] Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Chan A W, et al. Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocytes [J]. The Journal of Reproduction and Development, 2008, 54 (5): 306-313.

[5] Bordignon V, Smith L C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer [J]. Molecular Reproduction and Development, 1998, 49 (1): 29-36.

[6] Yin X J, Tani T, Yonemura I, et al. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes [J]. Biology of Reproduction, 2002, 67 (2): 442-446.

[7] Russell D F, Ibáñez E, Albertini D F, et al. Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos in vitro [J]. Molecular Reproduction and Development, 2005, 72 (2): 161-170.

[8] Costa-Borges N, Paramio M T, Calderón G, et al. Antimitotic treatments for chemically assisted oocyte enucleation in nuclear transfer procedures [J]. Cloning and Stem Cells, 2009, 11 (1): 153-166.

[9] Costa-Borges N, Paramio M T, Santaló J, et al. Demecolcine- and nocodazole-induced enucleation in mouse and goat oocytes for the preparation of recipient cytoplasts in somatic cell nuclear transfer procedures [J]. Theriogenology, 2011, 75 (3): 527-541.

[10] Yin X J, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells [J]. Reproduction, 2002, 124 (1): 41-47.

[11] 王玉涵, 朱玉霞, 尹多, 等. 化学辅助去核法对延边黄牛卵母细胞去核率及其重构胚发育率的影响 [J]. 江西农业大学学报, 2011, 33 (2): 340-344.

[12] Song K, Hyun S H, Shin T, et al. Post-activation treatment with demecolcine improves development of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs by modifying the remodeling of donor nuclei [J]. Molecular Reproduction and Development, 2009, 76 (7): 611-619.

[13] 王强, 安志兴, 顾玲, 等. 脱羧秋水仙碱诱导昆明白小鼠卵母细胞去核的研究 [J]. 遗传, 2004, 26 (5): 653-657.

[14] 李裕强, 张琇, 安志兴, 等. 牛卵母细胞的去核与激活 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32 (11): 6-10.

[15] 严兴荣, 雷安民, 沈文正, 等. 小鼠不同卵龄卵母细胞纺锤体位置及对去核效率的影响 [J]. 中国农学通报, 2005, 21 (5): 9-12.