

徐小波,于建宁,王公金,等.猪第一极体的排出规律及其保存过程中的活性变化[J].江苏农业科学,2018,46(17):194-195.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.051

猪第一极体的排出规律及其保存过程中的活性变化

徐小波,于建宁,王公金,谭小东

(江苏省农业科学院畜牧研究所/农业部种养结合重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:从屠宰后的母猪卵巢中吸取卵母细胞进行体外成熟培养(IVM),对成熟卵母细胞第一极体(Pb I)排出时间与形态进行统计分析,结合台盼蓝细胞染色法,探讨不同温度保存条件下 Pb I 存活情况。结果表明,卵泡卵母细胞体外成熟培养 40 h 后发现大量高活性 Pb I;39 ℃ 条件下大多数 Pb I 存活时间仅有 4 h,4 ℃ 条件下保存 40 h 存活率可达 85.0%,−20 ℃ 保存 1 周达 95.0%;而超低温冷冻长期保存存活率、形态正常率分别达 89.1%、97.8%。
关键词:猪卵母细胞;体外成熟培养;第一极体;保存;活性;超低温冷冻长期保存;存活率;形态正常率
中图分类号:S828.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)17-0194-02

哺乳动物卵泡中的卵母细胞是一个初级卵母细胞,在排卵前不久进行第 1 次减数分裂,产生 1 个次级卵母细胞,排出 1 个第一极体(Pb I)。与次级卵母细胞相比,Pb I 细胞质很少,但 Pb I 作为一种特殊而又有着完整细胞功能的细胞,其生物学功能和利用价值亦受到人们重视。极体的生殖功能已经被 Wakayama 等证明^[1-2],小鼠 Pb I 和第二极体(Pb II)均能获得有生殖能力的后代;小鼠 Pb II 和雌原核已被成功冷冻并重组产生后代^[3],但尚未见其他动物极体研究的报道。
猪卵母细胞和胚胎冷冻保存相当困难,主要原因是猪卵的细胞质中含有较大的脂肪颗粒,在冻融过程中极易造成细胞破裂,而极体胞质很少,冷冻保存相对容易,通过极体重组可有效解决猪母本种质资源难以保存的难题^[4]。本研究试图揭示猪卵母细胞体外培养条件下 Pb I 排出规律、形态学以及不同保存条件下存活状态等特征,以期极体核重组猪卵母细胞等研究提供一定的理论与技术参考依据。

1 材料与方法

1.1 猪卵巢卵母细胞的采集与成熟培养

从刚屠宰的母猪采集新鲜卵巢,在无菌实验室及时用注射器抽吸 3~6 mm 的卵泡液,于实体镜下捡取包被着 3~4 层颗粒细胞的卵丘卵母细胞复合体(COCs),经 TCM199 预平衡 2 h 后,选取形态正常的 COCs,进行成熟培养(含 5% CO₂ 的空气,饱和湿度,39 ℃)24~72 h,于倒置显微镜下观察卵丘细胞扩散状态。

1.2 Pb I 的排出、形态分级和活性鉴定

取不同时间段体外成熟培养的 COCs,在倒置显微镜下用显微操作针拨动卵母细胞,观察 Pb I 的排出情况,并进行极体形态学分级统计和活性鉴定。Pb I 的形态学评估标准参照 Ebner 等的方法^[5]进行,Pb I 活性鉴定参照刘文华等的方

法^[6]进行。

1.3 Pb I 的保存方法

1.3.1 常温及低温保存 去除卵丘细胞后,卵母细胞在 TCM199 改良培养液中清洗 3 次,根据形态分类选取含 1~2 级 Pb I 的卵母细胞移入预平衡的培养液微滴中,分别在 4~10 ℃ 及 39 ℃ 2 种温度条件下培养,每隔一段时间取部分卵母细胞染色,对其 Pb I 进行活性鉴定。

1.3.2 冷冻和超低温冷冻保存 将含 1~2 级 Pb I 的卵母细胞移入 EG20 冷冻液中,平衡 7 min;再移至 EG40 冷冻液并装入直径 200~300 μm 的微管中;装管完成后,分别立即置于冰箱−20 ℃ 冰室和直接投入液氮(−196 ℃)冷冻保存。每隔一段时间,取样解冻,进行 Pb I 活性鉴定。

1.4 数据分析

Pb I 的排出率、形态正常率及存活率等采用 SPSS 11.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同体外成熟培养时间下的 Pb I 排出率

由表 1 可见,在卵母细胞数体外成熟培养过程中,卵丘细胞逐渐扩散,在培养 32~36 h 后开始排出 Pb I,培养 40 h 扩散率最高,Pb I 排出率也达到最高,为 66.7%;随着培养时间的继续延长,卵丘细胞慢慢脱落,扩散率降低,Pb I 的排出率逐步下降。

表 1 不同体外成熟培养时间下的 Pb I 排出率

培养时间 (h)	卵母细胞数	卵丘扩散率 (%)	Pb I 排出率 (%)
32	230	43.9b	0
36	457	53.6bc	38.5a
40	478	86.8e	66.7cd
44	460	70.0de	47.8ab
48	346	63.6cd	56.6bc
52	264	22.7a	64.0cd

注:同列数据后标注不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。表 2 同。

2.2 不同体外成熟培养时间下 Pb I 的形态和活性

卵母细胞体外培养 32~36 h 间开始有 Pb I 排出,且发现

收稿日期:2017-04-26
基金项目:农业部种养结合重点实验室项目;转基因生物新品种培育科技重大专项(编号:2011ZX08006-004)。
作者简介:徐小波(1964—),男,江苏镇江人,研究员,主要从事猪质资源保存利用与开发。E-mail:xiaoboxu@sohu.com。

开始排出的 Pb I 中 1~2 级比例不高。而培养 40~44 h 排出的 Pb I 的形态质量较高,其中培养 40 h 的 1~2 级比例高达 51.7%,3 级占 30.7%,4 级和 5 级只有 17.6%。随着培养时间的延长,Pb I 的形态完整率明显降低,到 52 h 时 1 级和 2

级 Pb I 比例只有 14.8% (表 2)。通过形态分级与活性鉴定结果比较发现,1~2 级 Pb I 大多具有生物活性,3 级以下的活性较差。

表 2 不同体外成熟培养时间下的 Pb I 形态分级

培养时间 (h)	Pb I 数量 (个)	不同 Pb I 形态分级的比例(%)				
		1 级	2 级	3 级	4 级	5 级
36	176	25.6b	11.9b	43.2a	19.3b	0
40	319	35.1a	16.6ab	30.7b	17.6b	0
44	220	20.5bc	20.0a	40.0a	13.2b	1.8c
48	185	13.5cd	14.6ab	27.0b	35.7a	9.2ab
52	135	1.5d	13.3b	25.2b	45.2a	14.8a

2.3 不同保存温度下 Pb I 的形态和活性

由表 3 可见,39℃ 条件保存 2 h,Pb I 的形态正常且活性良好,保存 4 h 形态尚正常,但活性显著下降,保存 6 h 形态开始不正常,且活性基本丧失;4℃ 条件保存 20~40 h 期间,形态完整率差异不显著,存活率差异显著,Pb I 仍然保持良好的形态和活性,但保存 60 h 时,细胞已崩解或消失,完全丧失活性;-20℃ 冷冻保存 1 周,多数 Pb I 形态完整有活性,保存 2~4 周形态完整率与活性均呈现显著下降趋势;-196℃ 超低温冷冻保存后,极体形态完整率为 97.8%,存活率为 89.1%,均保持在较高水平。

表 3 不同保存温度下 Pb I 的存活率和形态完整率

保存温度 (℃)	保存时间	形态完整率 (%)	存活率 (%)
39	2 h	100a	96.7a
	4 h	100a	63.3b
	6 h	85.5b	18.2c
4	20 h	100a	98.3a
	40 h	95.0a	85.0b
	60 h	30.5b	0c
-20	1 周	98.3a	95.0a
	2 周	80.5b	55.0b
	4 周	55.6c	27.8c
-196		97.8	89.1

注:相同温度不同保存时间处理数据后标注不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

3 讨论

Pb I 的排出时间因物种不同有较大差异。从屠宰场摘取的牛卵巢卵母细胞大多在体外培养 16~24 h 开始排出 Pb I^[6];注射绒促性素(HCG)后 12 h 小鼠排出卵母细胞,这是 Pb I 排出的高峰时段^[7];本试验中猪卵巢卵母细胞在体外培养 32~36 h 开始排出 Pb I,40 h Pb I 排出率达 66.7%。伴随着体外培养时间的延长,部分卵母细胞出现退化现象,卵周隙明显增大,超大或超小 Pb I 增多。由于从卵巢吸取的卵母细胞本身成熟度不一致,可以认为通过严格选择卵泡大小和卵母细胞的成熟度,并改善与控制体外培养条件,可望进一步

提高卵母细胞成熟的同步性,在体外培养 40~44 h 时或其他时段能获得更多优质的 Pb I。

Choi 等在小鼠上发现 *Mos/MAPK* 基因调控着 Pb I 的大小、活性、退化与生物学功能^[8]。在本试验中,39℃ 条件下保存时,猪 Pb I 很快退化致使活性丧失;在 4℃ 低温和 -20℃ 条件下,Pb I 存活时间则较长;在 -196℃ 超低温条件下保存,能更好地保持 Pb I 的活性。可以推断,低温和超低温可有效降低基因的调控作用,延缓 Pb I 凋亡进程。

参考文献:

[1]Wakayama T, Hayashi Y, Ogura A. Participation of the female pronucleus derived from the second polar body in full embryonic development of mice [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1997,110(2):263-266.

[2]Wakayama T,Yanagimachi R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice [J]. Biology of Reproduction,1998,59(1):100-104.

[3]He Z,Liu H C,Rosenwaks Z. Cryopreservation of nuclear material as a potential method of fertility preservation[J]. Fertility and Sterility, 2003,79(2):347-354.

[4]范必勤. 哺乳动物第一和第二极体的研究[J]. 农业生物技术学报,2000,8(2):103-105.

[5]Ebner T, Moser M, Yaman C, et al. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy [J]. Fertility and Sterility,1999,72(4):599-603.

[6]Park Y S,Kim S S,Kim J M,et al. The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos[J]. Theriogenology,2005,64(1):123-134

[7]刘文华,孙 洁,王公金,等. 小鼠卵母细胞第一极体的采集与保存[J]. 江苏农业学报,2006,22(1):42-45.

[8]Choi T, Fukasawa K, Zhou R, et al. The *Mos*/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degeneration of the first polar body in maturing mouse oocytes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1996, 93 (14): 7032-7035.