

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<sup>[1-2]</sup>,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<sup>[3]</sup>,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<sup>[4]</sup>。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,以期为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% CO<sub>2</sub>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<sup>[5]</sup>进行,Pb I活性鉴定参照刘文华等的方

法<sup>[6]</sup>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 °C 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 °C 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 °C 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 °C 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 (°C)	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<sup>[6]</sup>;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<sup>[7]</sup>;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<sup>[8]</sup>。在本试验中,39 °C 条件下保存时,猪 Pb I 很快退化致使活性丧失;在 4 °C 低温和 -20 °C 条件下,Pb I 存活时间则较长;在 -196 °C 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.