

电激活参数和培养液对猪卵母细胞孤雌发育的影响

潘伟荣¹, 魏太云¹, 信吉阁¹, 张崇义², 卿玉波¹, 魏红江^{1*}

(1.云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2.呈贡县动物卫生监督所, 云南 昆明 650500)

摘要:为优化电激活和胚胎培养的相关技术体系,研究电激活参数和培养液对猪卵母细胞孤雌胚胎发育的影响。结果表明:在脉冲电压为 150 V(以每 1 mm 电激槽宽计,下同)、脉冲持续时间为 100 μ s、脉冲 1 次的电激活条件下,猪卵母细胞孤雌激活的效果较好;在脉冲持续时间和脉冲次数恒定的条件下,脉冲电压 150 V 组的囊胚率显著高于 100 V 组和 125 V 组($P < 0.05$),达 46.3%;在脉冲电压和脉冲次数恒定的条件下,脉冲持续时间 100 μ s 的囊胚率显著高于 75、125 μ s 组($P < 0.05$),达 50.5%;在脉冲电压和脉冲持续时间恒定的条件下,1 次脉冲的卵裂率和囊胚率显著高于 2 次脉冲组($P < 0.05$),分别达 82.7%、50.3%;PZM3 和 NCSU23 培养液对猪孤雌激活胚胎发育的影响差异不显著($P > 0.05$),但 PZM3 培养液组的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数均略高于 NCSU23 组。

关键词:猪卵母细胞;孤雌发育;激活参数;培养液

中图分类号: S188 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)04-0415-04

Effect of the different electrical activation parameters and culture media on parthenogenesis of porcine oocytes

PAN Wei-rong¹, WEI Tai-yun¹, XIN Ji-ge¹, ZHANG Chong-yi², QING Yu-bo¹, WEI Hong-jiang^{1*}

(1.Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2.Animal Health Inspection Institution of Chenggong City, Kunming 650500, China)

Abstract: In order to optimize electrical activation and oocytes culture condition, the effect of different electrical activation parameters and culture media on parthenogenetic activation of porcine oocytes was investigated. The result indicated that one-time pulse electrical activation under pulse voltage of 150 V/mm and pulse duration of 100 μ s was the best condition for parthenogenesis of porcine oocytes. The blastocyst rate in the group treated with a pulse voltage of 150 V/mm reached up to 46.3%, which was significantly higher than that in the groups treated with pulse voltages of 100 V/mm and 125 V/mm respectively under the same condition of pulse duration and pulse times ($P < 0.05$). And the blastocyst rate in the group treated with pulse duration of 100 μ s reached up to 50.5%, which was significantly higher than that in the other two groups treated with pulse duration of 75 μ s and 125 μ s respectively under the same condition of pulse voltage and pulse times ($P < 0.05$). The cleavage rate and the blastocyst rate in the group treated with one-time pulse reached up to 82.7% and 50.3% respectively, which was significantly higher than that in the group treated with two-time pulse under the same condition of pulse voltage and pulse duration ($P < 0.05$). The activated parthenogenetical development of porcine oocytes in groups cultured in media PZM3 and NCSU23 respectively showed no significant difference ($P > 0.05$), but cleavage rate, blastocyst rate and blastocyst cell number in the group cultured in medium PZM3 were a little higher than that in the group cultured in medium NCSU23.

Key words: porcine oocytes; parthenogenetic development; activation parameters; culture medium

激活处理及培养体系对胚胎的后期发育非常关键,也是猪体细胞核移植技术所要解决的难点之一。

收稿日期: 2011-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060308)

作者简介: 潘伟荣(1973—),男,云南宁蒗人,硕士,实验师,主要从事胚胎生物技术研究, pwr2000@sina.com; *通信作者, hongjiangwei@126.com

与其他哺乳动物相比,猪的体细胞核移植难度较大,直至2000年才获得了体细胞克隆猪^[1-3],且克隆的总体效率仅为1%~2%^[4]。重构胚的激活及培养体系等很多因素影响猪核移植技术的效率。猪的重构胚体外发育能力低^[5],优化重构胚激活方法是提高克隆效率的重要方面。North Carolina University 23 Medium (NCSU23)和Porcine Zygote Medium-3 (PZM3)是猪胚胎体外培养较为成功的2种培养基。利用这2种培养基均获得了克隆后代^[2,3,6]。NCSU23是被公认的效果确切和稳定的猪胚胎培养基;PZM3是近年来发展起来的培养基,更接近于猪体内的生理环境。关于这2种培养基对猪胚胎体外培养的效果有不同的看法^[7-15]。笔者研究电激活参数和培养基对猪卵母细胞孤雌发育的影响,旨在筛选出较好的猪卵母细胞孤雌激活的条件参数和培养体系,为提高猪近交系体细胞核移植效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的来源及采集

猪卵巢采自云南省昆明市盘龙区白龙寺屠宰场。所用试剂除特殊标注外均购自Sigma公司。将屠宰场获取的猪卵巢放入盛有36~38℃生理盐水的保温瓶中,尽快送回实验室,用加100 IU/mL Penicillin-Streptomycin的37℃生理盐水洗3遍,去掉血污。用带有20G针头的注射器从卵巢表面抽取直径3~8 mm的卵泡,抽取液放入15 mL尖底离心管,置于37℃水浴锅中,待卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex, COCs)沉淀后,用洗卵液(添加有100 mg/mL Kanamycin和0.11 mmol/L 丙酮酸的hepes-TALP)洗涤2次,显微镜下挑取A、B级的COCs。

1.2 卵母细胞的体外成熟培养

COCs的体外成熟培养采用微滴培养法,提前4 h配制添加0.1 mg/mL Pyruvic Acid、0.1 mg/mL L-半胱氨酸盐酸、10%的PFF、10 ng/mL EGF的成熟培养液TCM-199,放入5%CO₂、38.5℃的CO₂培养箱中平衡。将A、B级COCs先用成熟培养液洗2次,每个微滴中放入50个COCs后置入5%CO₂、38.5℃

的CO₂培养箱中进行体外成熟培养。38~42 h后将卵母细胞用0.1 mg/mL透明质酸酶去除包裹在卵母细胞外围的卵丘细胞,挑取卵周隙明显、卵细胞膜完整、胞质均匀且排出第一极体的成熟卵母细胞。

1.3 试验设计

在细胞融合仪(ET3 悟空, Fujihira Indusrt Co., Ltd, 日本)脉冲持续时间为100 μs、脉冲1次、脉冲电压为100 V(以每1 mm电激槽宽计,下同)的条件下,将成熟卵母细胞放入浸泡在激活液(含0.25 mol/L D-Sorbitol、0.01 mmol/L Ca(C₂H₃O₂)₂、0.05 mmol/L Mg(C₂H₃O₂)₂和0.1 mg/mL BSA)中的电极槽内进行激活处理。激活后将卵母细胞转入含2.2 μg/mL细胞松弛素B(cytochalasin B, CB)的PZM3培养液中处理2 h。CB处理结束后移入PZM3培养液,在5%CO₂、5%O₂、38.5℃的CO₂培养箱中进行体外培养,计算培养2 d的卵裂率和培养7 d的囊胚率,并用5 μg/mL Hoechst33342对囊胚进行染色,测定囊胚的细胞数。

按照上述方法,改变脉冲电压,比较在脉冲电压分别为100、125、150 V条件下的试验结果,确定适宜脉冲电压。

按照上述方法,在适宜脉冲电压和脉冲1次的条件下,改变脉冲持续时间,比较在75、100、125 μs条件下的试验结果,确定适宜脉冲持续时间。

按照上述方法,在适宜脉冲持续时间、适宜脉冲电压的条件下,改变脉冲次数,比较在脉冲1次和2次条件下的试验结果,确定适宜脉冲次数。

在适宜脉冲电压、适宜脉冲持续时间、适宜脉冲次数的条件下,改变培养液,比较PZM3和NCSU23的试验结果,确定适宜培养液。

1.4 数据分析

采用SPSS12.0统计软件进行数据显著性分析;采用邓肯氏法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 脉冲电压对猪体外成熟卵母细胞孤雌激活的影响

由表1可见,在脉冲持续时间为100 μs、脉冲

1 次的恒定条件下, 脉冲电压 100、125、150 V 的卵裂率间和囊胚细胞数间的差异均不显著 ($P>0.05$), 150 V 的囊胚率显著高于 100 V 和 125 V 的, 但 100 V 与 125 V 间的差异不显著 ($P>0.05$)。这说明脉冲电压的增加提高了猪卵母细胞孤雌激活的囊胚率, 当脉冲电压为 150 V 时对猪卵母细胞孤雌激活的效果较好。

表 1 脉冲电压对猪卵母细胞孤雌激活的影响

Table 1 Effect of different pulse voltage on parthenogenesis of porcine oocytes

脉冲电压/V	成熟卵母细胞数/个	卵裂率/%	囊胚率/%	囊胚细胞数/个
100	445	79.1±3.4	(33.8±3.8)a	38.4±5.6
125	452	79.6±5.7	(34.7±3.3)a	42.1±8.9
150	451	78.9±4.1	(46.3±3.5)b	40.9±7.8

2.2 脉冲持续时间对猪卵母细胞孤雌激活的影响

由表 2 可见, 在脉冲电压为 150 V、脉冲 1 次的恒定条件下, 对应于脉冲持续时间 75、100、125 μs 的孤雌激活胚胎的卵裂率间的差异和囊胚细胞数间的差异均不显著 ($P>0.05$)。脉冲持续时间 100 μs 组的囊胚率最高, 达 50.5%, 显著高于其他 2 组 ($P<0.05$), 因此, 脉冲持续时间为 100 μs 时对猪卵母细胞孤雌激活的效果较好。

表 2 脉冲持续时间对猪卵母细胞孤雌激活的影响

Table 2 Effect of different pulse duration on parthenogenesis of porcine oocytes

脉冲持续时间/ μs	成熟卵母细胞数/个	卵裂率/%	囊胚率/%	囊胚细胞数/个
75	442	75.1±7.4	(39.7±4.3)a	40.3±5.9
100	439	78.2±8.3	(50.5±3.0)b	39.9±6.8
125	426	64.6±5.0	(28.4±5.4)a	37.8±6.4

2.3 脉冲次数对猪卵母细胞孤雌激活的影响

在脉冲电压为 150 V、脉冲持续时间为 100 μs 的恒定条件下, 脉冲 1 次的卵裂率和囊胚率分别为 82.7% 和 50.3%, 分别显著高于脉冲 2 次的 62.8% 和 29.2% ($P<0.05$); 脉冲 1 次和脉冲 2 次的囊胚细胞数分别为 42.4、39.7 个, 二者差异不显著 ($P>0.05$)。这说明 1 次脉冲就可以使猪体外成熟的卵母细胞充分激活并得到较高的孤雌胚发育率, 增加脉冲次数反而会降低其激活率和孤雌胚的发育率, 因此, 脉

冲 1 次时对猪卵母细胞孤雌激活的效果较好。

2.4 培养液对猪孤雌激活胚胎发育的影响

由表 3 可见, 在脉冲电压为 150V、脉冲持续时间为 100 μs 、脉冲 1 次的恒定条件下, PZM3 培养液组的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数均略高于 NCSU23 组, 但各指标的组间差异均不显著。相对而言, PZM3 培养液对猪卵母细胞孤雌发育的效果较好。

表 3 培养液对猪卵母细胞孤雌激活的影响

Table 3 Effect of different culture media on parthenogenesis of porcine oocytes

培养液	成熟卵母细胞数量/个	卵裂数	卵裂率/%	囊胚率/%	囊胚细胞数/个
PZM3	450	361	80.2±2.1	48.7±4.9	36.2±4.6
NCSU23	450	355	78.9±3.9	47.0±1.6	35.8±4.5

3 结论与讨论

本研究结果表明, 脉冲电压为 150 V、脉冲持续时间为 100 μs 、脉冲 1 次时猪卵母细胞孤雌激活胚胎的发育效果较好。这与 Onish 等^[2]、Kure-bayashi 等^[16]的研究结果一致。卵母细胞电激活的效果取决于电刺激中脉冲电压、脉冲时间以及脉冲次数的组合作用, 这些参数的整体作用过小时不足以激活重构胚; 过大时不但使卵裂率和囊胚率下降, 而且会对重构胚造成不可恢复的伤害, 卵母细胞死亡率也会明显升高^[10-11]。由于电激活所用仪器的型号和各实验室的条件不同, 其激活核移植胚所用参数的差异也较大。Koo 等^[12]的研究表明: 在脉冲电压、脉冲持续时间分别为 120 V、30 μs 条件下激活核移植卵母细胞的囊胚发育率高于 150 V、30 μs 的。赵浩斌等^[13]的研究表明: 在脉冲电压、脉冲持续时间分别为 125 V、40~60 μs 时对猪体外成熟卵母细胞的激活效果较好, 1 次脉冲激活率可达 80%, 增加脉冲次数并不能显著提高激活率。李光鹏等^[14]的研究表明: 脉冲电压为 150 V、脉冲持续时间为 30 μs 时对于猪体外成熟卵母细胞的激活效果较好, 1 次脉冲激活率可达 71%。刘国世等^[15]认为: 在脉冲电压、脉冲持续时间分别为 130 V、40~80 μs 时对猪体外成熟卵母细胞的激活效果较好。可见, 选择适合试验条件的电激活参数对激活胚的发育至关重要。

PZM3 和 NCSU23 培养液对猪卵母细胞孤雌激活胚胎发育的影响差异不显著,但采用 PZM3 培养液得到的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数均略高于 NCSU23 培养液。这与 Gi-Sum 等^[8]和张震等^[21]研究结果一致。猪核移植胚胎和体外受精胚胎细胞数明显低于体内同期胚胎的主要原因可能是体外培养系统不完善^[17]。目前,猪胚胎的培养液有多种,其中以 NCSU23 和 PZM 系列(PZM3、PZM4、PZM5)最常用,而且这 2 种都成功获得了克隆后代^[2-3]。有研究^[2,17-19]表明,NCSU23 比较适合于猪早期胚胎的体外培养,也有研究^[7,20-21]表明,其他一些培养液适合于猪胚胎体外培养。据报道^[8],在低氧环境下,PZM3 类培养基的培养效果明显优于 NCSU23^[8]类培养基的。

参考文献:

- [1] Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from *in vitro* system[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 1055-1059.
- [2] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. Science, 2000, 289: 1188-1190.
- [3] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature, 2000, 407: 86-90.
- [4] Nanassy L, Lee K, Javor A, et al. Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos[J]. Anim Reprod Sci, 2008, 104: 264-274.
- [5] Naruse K, Quan Y S, Kim B C, et al. Brief exposure to cycloheximide prior to electrical activation improves *in vitro* blastocyst development of porcine parthenogenetic and reconstructed embryos[J]. Theriogenology, 2007, 68: 709-716.
- [5] Lai L, Kolber-Simonds D, Park K, et al. Production of a-1, 3 Galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning[J]. Science, 2002, 295: 1089-1092.
- [6] Gi-Sun Im, Jin-Sung S, In-Sun H, et al. Nuclear transfer cloning and stem cells development and apoptosis of preimplantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals[J]. Mol Reprod Dev, 2004, 73: 1094-1101.
- [7] Yoshioka K, Suzuki T, Tanaka A, et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium[J]. Biol Reprod, 2002, 66: 112-119.
- [8] Gi-Sun Im, Liang Xue-lai, Liu Z, et al. *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres[J]. Theriogenology, 2004, 61: 1125-1135.
- [9] 张运海. 利用体细胞核移植技术生产猪克隆胚胎的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [10] Tan Jing-he, Zhou Qi, Yang Chan-yun, et al. Effects of egg age and pulse duration on electrical activation of mouse oocytes[J]. Acta Zool Sin, 1995, 41(3): 327-331.
- [11] 王新庄, 张涌, 张美佳. 牛卵母细胞电激活参数的研究[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(3): 73-76.
- [12] Koo D B, Kang Y K, Choi Y H, et al. *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer[J]. Bio Reprod, 2000, 63: 986-992.
- [13] 赵浩斌, 陈乃清, 魏庆信. 猪卵母细胞的电激活[J]. 西北农业大学学报, 1999, 8(1): 15-19.
- [14] 李光鹏, 孟庆刚, 魏鹏, 等. 亚胺环己酮对猪卵母细胞人工孤雌激活作用的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(5): 416-420.
- [15] 刘国世, 曾申明, 吴中红, 等. 不同激活方法对猪体外成熟卵母细胞孤雌发育的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(6): 615-620.
- [16] Kure-bayashi S, Miyake M, Okada K, et al. Successful implantation of *in vitro*-matured, electro-activated oocytes in the pig[J]. Theriogenology, 2000, 53: 1105-1119.
- [17] Long C R, Dorbrinsky J R, Johnson L A. *In vitro* production of pig embryos: Comparison of culture media and boars[J]. Theriogenology, 1999, 51(7): 1375-1390.
- [18] Machaty Z, Day B D, Prather R S. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*[J]. Biol Reprod, 1998, 59: 451-455.
- [19] Swain J E, Bormann C L, Krisher R L. Development and viability of *in vitro* derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium[J]. Theriogenology, 2001, 56: 459-469.
- [20] Dorbrinsky J R, Johnson L A, Rath D. Development of a culture medium(BECM-3) for porcine embryos: Effects of bovine serum albumin and fetal bovine on serum on embryo development[J]. Biol Reprod, 1996, 55: 1069-1074.
- [21] 张震, 王钦, 薛林涛, 等. 猪孤雌激活胚胎体外培养影响因素[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(4): 523-528.

责任编辑: 王赛群