

不同化学激活方法对山羊卵母细胞激活效果的研究

敖红¹ 王海² 连正兴² 李宁³ 夏国良⁴

(1. 中国农业科学院 畜牧研究所,北京 100094; 2. 中国农业大学 动物科技学院,北京 100094;
3. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室,北京 100094; 4. 中国农业大学 生物学院,北京 100094)

摘要 激活是体细胞核移植技术的关键步骤。本研究对常用化学激活剂乙醇、钙离子载体 A23187 和离子霉素以及添加 6-二甲氨基嘌呤(6-Dimethylaminopurine, 6-DMAP) 和放线菌酮(cycloheximide, CHX) 对山羊卵母细胞的激活效果以及不同卵龄的卵母细胞激活后体外发育效果进行了比较。结果表明:离子霉素处理组激活率显著高于乙醇和 A23187 处理组(89.6% vs 63.5%, 68.7%; $P < 0.05$);离子霉素 + 6-DMAP 处理组激活率显著高于离子霉素 + CHX 和离子霉素 + CHX + 细胞松弛素 D 处理组(90.1% vs 58.9%, 63.7%; $P < 0.01$);体外成熟 24、26、28 h 组桑椹胚率分别为 16.0%、20.6% 和 33.3%, 30 h 组桑椹胚率下降(13.8%)。以上结果说明,在本研究的激活条件下,山羊卵母细胞适宜的激活方法为:成熟起始后 28 h 使用离子霉素和 6-DMAP 进行联合激活。

关键词 绵羊; 卵母细胞; 化学激活

中图分类号 Q 492.2

文章编号 1007-4333(2003)05-0018-03

文献标识码 A

Effects of chemical methods on activation of goat oocytes

Ao Hong¹, Wang Hai², Lian Zhengxing², Li Ning³, Xia Guoliang⁴

(1. Institute of Animal Science, Beijing CAAS 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. State Key Laboratory of Agribiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 4. College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Activation is a key step of somatic cell cloning. In this study, the effects of several chemical activation reagents such as ethanol, calcium ionophore A23187 and ionomycin followed by either phosphorylation inhibitor 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) or cycloheximide (CHX) on activation of goat oocytes were compared. In addition, the development ability of aging oocytes after activation was also studied. The results show: 1) ionomycin group had higher activation rate than ethanol and A23187 groups (89.6% vs 63.5%, 68.7%; $P < 0.05$). 2) the activation rate of ionomycin + 6-DMAP group was significantly higher than ionomycin + CHX or ionomycin + CHX + cytochalasin D group (90.1% vs 58.9%, 63.7%; $P < 0.01$). 3) the morula rates of 24, 26, 28 hour groups were 16.0%, 20.6% and 33.3% respectively, while decreased in 30 hours (13.8%). These results suggest that ionomycin combined with 6-DMAP at 28 hour after maturation is the optimal condition for goat oocytes activation.

Key words sheep; oocytes; chemical activation

卵母细胞的人工激活是体细胞克隆和单精注射受精技术的关键环节。人工激活的方法有物理方法(电刺激、温度刺激和机械刺激)和化学方法(乙醇、钙离子载体、蛋白合成抑制剂等)。化学激活方法相对于物理激活方法而言操作简便,激活率高,重复性好,因而普遍采用。乙醇、钙离子载体 A23187 和离子霉素是常用的化学激活剂。近年来,一些蛋白酶抑制剂如 CHX 和磷酸化抑制剂 6-DMAP 与激活剂的联合使用对牛、小鼠的卵母细胞激活有良好效

果^[1,2]。目前国内外有关山羊卵母细胞化学激活的报道较少,本研究比较了几种常用的化学激活方法以及卵龄对山羊卵母细胞激活的影响,为山羊体细胞克隆等研究提供卵母细胞激活的适宜条件参数。

1 材料与方法

1.1 材料

卵巢取自屠宰厂宰杀的内蒙古山羊。

TCM199 购自 Gibco,胎牛血清(FBS)购自 Hy-

收稿日期:2003-04-01

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2002AA206111)

作者简介:敖红,博士,副研究员,主要从事胚胎生物技术研究;李宁,教授;博士生导师,联系作者,主要从事动物分子遗传研究, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

clone, 甲醇和醋酸为国产试剂, 其余试剂均购自 Sigma。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的采集和体外成熟 从屠宰厂收集山羊卵巢, 保存在 25~30℃ 生理盐水中 2~3 h 内运回实验室。选取直径 3~6 mm 的卵泡, 用有 HEPES-TALP 采卵液的 16 G 针头注射器采集卵母细胞。体视显微镜下检卵, 选择形态正常的卵丘-卵母细胞复合体 (COC) 用成熟培养液洗涤 3 次, 移入 60 μ L 成熟培养液滴中, 38.5℃, 5% CO_2 和饱和湿度条件下培养, 然后用 0.3% 的透明质酸酶处理 COC 2 min, 用玻璃吸管反复吹打, 将卵丘细胞去除后放入 TCM199 + 10% FBS 的培养液中待用。成熟液: TCM 199 + 10% FBS + FSH 10 IU \cdot mL⁻¹ + LH 5 IU \cdot mL⁻¹ + E₂ 1 μ g \cdot mL⁻¹ + EGF 1 μ g \cdot mL⁻¹ + 丙酮酸钠 0.25 mmol L⁻¹。

1.2.2 激活方法 卵母细胞分别在含 7% 乙醇、A23187 5 μ mol L⁻¹、离子霉素 2 μ mol L⁻¹ 的 SOF 培养液中处理 4 min, 用 SOF 培养液洗 3 次, 平衡 5 min 后移入含 6-DMAP 1.9 mmol \cdot L⁻¹ 6-DMAP 或 CHX 10 μ g \cdot mL⁻¹ 和细胞松弛素 D 2 μ g \cdot mL⁻¹ 的培养液中培养 4 h。激活结束后 6 h, 卵母细胞放入甲醇和醋酸体积比为 3:1 固定液中固定 10 min, 压片后用 0.5% Hoechst33342 染液进行染色, 荧光显微镜下观察, 以形成原核作为判断激活标准。本实验中激活剂的浓度和处理时间参考小鼠和其他家畜的相关研究报道^[1~4]。

1.2.3 卵龄对激活效果的影响 卵母细胞成熟培养 24、26、28、30 h 后分别进行离子霉素 + 6-DMAP 激活, 然后移入 SOF 培养液培养 36 h 检查卵裂情况, 5~6 d 检查桑椹胚发育情况。

1.3 统计分析

实验结果采用 χ^2 检验, 统计差异显著性。

2 结果

2.1 不同激活剂对山羊卵母细胞激活效果的比较

乙醇组和钙离子载体 A23187 组激活率无显著差异 (63.5% vs 68.7%), 离子霉素处理组的激活率达 89.6%, 显著高于乙醇组和 A23187 组 (表 1), 结果表明离子霉素激活效果优于乙醇和 A23187。

表 1 不同激活剂对山羊卵母细胞激活效果

Table 1 Effects of varies chemical reagents on activation of goat oocytes

激活剂种类	卵母细胞数	1PN*	2PN	3PN	总激活率/%
乙醇	52	21	9	3	63.5 a(33/52)
A23187	32	16	5	1	68.7 a(22/32)
离子霉素	48	19	23	1	89.6 b(43/48)

注: ab, 差异显著, $P < 0.05$; *PN 为原核。下同。

2.2 离子霉素与 6-DMAP 和 CHX 联合激活效果的比较

离子霉素与 6-DMAP 或 CHX 联合激活效果均显著高于单独使用离子霉素处理的激活效果 (90.1%, 58.9%, 63.7% vs 34.5%, $P < 0.01$) (表 2), 说明激活时添加磷酸化抑制剂和蛋白酶抑制剂能够进一步提高激活率。添加 6-DMAP 组激活率显著高于添加 CHX (90.1% vs 58.9%), 而添加 CHX 处理组进一步添加 CD, 激活率略有提高但统计学差异不显著。以上结果说明, 使用 6-DMAP 与离子霉素联合激活效果优于 CHX 或 CHX + CD 与离子霉素联合激活。

表 2 离子霉素、6-DMAP 及 CHX 联合激活山羊卵母细胞效果

Table 2 Effects of ionomycin combined with 6-DMAP or CHX on activation of goat oocytes

处理方法	卵母细胞数	1PN	2PN	3PN	总激活率/%
离子霉素	29	3	7	0	34.5 a(10/29)
离子霉素 + 6-DMAP	51	20	25	1	90.1 b(46/51)
离子霉素 + CHX	56	25	8	0	58.9 c(33/56)
离子霉素 + CHX + CD	58	26	10	1	63.7 c(37/58)

注: ab, ac, 差异极显著 ($P < 0.01$); bc, 差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 卵龄对激活卵母细胞体外发育效果的影响

成熟 24、26、28 和 30 h 的卵母细胞激活后的卵

裂率无显著差异, 但 24、26 和 28 h 组的桑椹胚和囊胚的形成率呈现递增趋势 (16.0%、20.6%、

33.3%) ,30 h 组桑囊率显著下降 (13.8%) (表 3)。结果显示,经成熟 28 h 的激活效果优于其他处理。

表 3 不同卵龄的卵母细胞激活体外发育效果

Table 3 Effects of Aging on developmental ability of parthenogenetic oocytes

体外成熟时间/h	卵母细胞数	卵裂率/%	桑椹胚率/%
24	25	72.0(18/25)	16.0 a(4/25)
26	39	71.8(28/39)	20.6 a(6/39)
28	45	73.6(33/45)	33.3 b(24/45)
30	36	75.0(27/36)	13.8 c(5/36)

注:ab, bc 差异显著 ($P < 0.05$), ac 差异不显著。

3 讨论

目前一般认为卵母细胞的激活是由于细胞外钙离子内流和细胞内质网和肌浆网钙库释放储存钙离子导致 Ca^{2+} 水平升高,卵母细胞内高活性的成熟促进因子 MPF 活性迅速下降,卵母细胞排出第二极体完成减数分裂。A23187 和离子霉素同属钙离子载体,当细胞外环境中存在其存在时,引起 Ca^{2+} 内流使胞内水平迅速升高而激活卵母细胞。本研究中不同激活剂激活结果显示离子霉素激活率显著高于 A23187,可能是由于离子霉素对 Ca^{2+} 的转运能力强于 A23187。乙醇能够进入卵母细胞内引起胞内储存钙的释放,升高 Ca^{2+} 水平。从试验结果分析,乙醇激活效果低于离子霉素可能是离子霉素引起 Ca^{2+} 内流促 Ca^{2+} 水平的升高强于内源性钙释放。Loi 等^[4]通过比较离子霉素、乙醇和电激活对绵羊卵母细胞的孤雌激活效果认为,离子霉素诱导原核形成的作用与乙醇相近 (95% vs 96%),二者均显著高于电激活效果,但离子霉素处理组囊胚率明显高于乙醇组 (58% vs 19%)。

卵母细胞激活后,MPF 低活性的维持需要抑制其结构亚单位 cyclinB 合成或特殊蛋白质的磷酸化 (如 cdc2)。用钙离子载体单独处理卵母细胞,MPF 水平下降一段时间后,由蛋白质合成和特殊蛋白磷酸化的所用, cyclinB 和 cdc2 水平又有所升高。如果激活体系中加入蛋白合成抑制剂如放线菌酮和蛋白磷酸化抑制剂如 6-DMAP 能够抑制蛋白激酶的功能,防止 MPF 的积累,启动有丝分裂和加速原核的形成,从而改善卵母细胞激活效率。本研究中离子

霉素和 6-DMAP 激活结果也证明,6-DMAP 和 CHX 与离子霉素联合激活的效果显著好于离子霉素单独作用结果。这一结果与牛^[3,5]、绵羊^[4]和小鼠^[6~8]的报道一致。Liu 等^[1]认为,牛卵母细胞最佳激活方案为:化学激活剂 + 6-DMAP 或蛋白合成抑制剂 CHX + CD。在本实验中,添加 $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ CD 对于山羊的双原核形成和激活率无相助促进作用,这与杨素芳等^[9]对水牛卵母细胞激活效果结论不一致,由此推论可能与 CD 浓度有关。

多数研究报道显示,老化的卵母细胞更易被激活,但卵龄过高影响激活率和体外发育率^[6~8]。本实验采用成熟 24、26、28 和 30 h 的山羊卵母细胞激活卵裂率并无显著差异,但 24~28 h 桑囊率提高,30 h 又下降,以 28 h 激活效果最为理想。因此,在克隆过程中,激活处理宜在卵母细胞成熟后 28~30 h 内完成。

参 考 文 献

- [1] Lin Liu, Yang X. Interplay of maturation-promoting factor and nitroger-activated kinase inactivation during metaphase to interphase transition of activated bovine oocytes [J]. Biol Reprod, 1999, 61 (1) : 1~7
- [2] Jilek F, Hutteleva R, Petr J, et al. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide [J]. Anim Reprod Sci, 2000, 63 (1) : 101~111
- [3] Van De Velde A, Liu L, Bols P E, et al. Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos [J]. Mol Reprod Dev, 1999, 54 (1) : 57~62
- [4] Loi P, Ledda S, Fulka J Jr, et al. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols [J]. Biol Reprod, 1998, 58 (5) : 1177~1187
- [5] Leal CL, Liu L. Differential effects of kinase inhibitor and electrical stimulus on activation and histone H1 kinase activity in pig oocytes [J]. Anim Reprod Sci, 1998, 52 (1) : 51~56
- [6] 李裕强,张涌,王新庄. 乙醇和电场激活小鼠早期卵母细胞的研究 [J]. 西北农业大学学报, 1999, 27 (2) : 58~60
- [7] 谭景和,刘忠华,孙兴参,等. 脉冲次数和卵龄对小鼠卵母细胞电活化效果的影响 [J]. 中国兽医学报, 1995, 14 (4) : 341~346
- [8] 寇全安,李裕强,张美佳,等. 小鼠卵母细胞的孤雌激活及体外发育 [J]. 西北农业大学学报, 1997, 25 (3) : 82~86
- [9] 杨素芳,石德顺. 水牛卵母细胞孤雌激活方法研究 [J]. 西南农业学报, 2000, 13 (2) : 99~103