

家养双峰驼卵巢卵母细胞的体外受精与早期发生的初步研究

旭日干 庞也非 张锁链 薛晓光

(内蒙古大学实验动物研究中心, 呼和浩特市 010021)

摘要 本研究将采自屠宰母驼的卵巢卵母细胞在含有促性腺激素和胎牛血清的 M199 培养液中培养成熟后, 将公驼附睾精子于含有咖啡因和牛血清蛋白的 BO 培养液中进行获能培养 2 小时, 然后将成熟卵母细胞移入经过培养的精子悬液中, 6—7 小时以后将卵子移入含有胎牛血清及丙酮酸钠的 M199 中继续培养。结果表明: 经过成熟培养后有 46.7% (14/30) 的卵母细胞发育为成熟卵子, 并获得了 43.2% (16/37) 的体外受精率, 实验证明以本研究建立的方法首次使家养双峰驼卵巢卵母细胞在体外培养成熟并完成了体外受精, 并且发育为 8—16 细胞期胚胎。

动物的体外受精研究自 19 世纪末期开展以来, 到目前已有 21 种哺乳动物的体外受精研究获得了成功 (实验动物 15 种, 家畜 4 种, 灵长类 2 种), 其中有 10 种动物得到了移植后产仔的结果。但迄今为止还未见到有关骆驼体外受精的报告。本研究探讨了家养双峰驼 (*Camelus bactrianus*) (以下简称家驼) 的卵巢卵母细胞体外培养成熟, 以附睾精子进行体外受精及受精后发育的基本方法, 并得到了初步结果。

材料和方法

(一) 卵巢的采集与卵母细胞的成熟培养

家驼卵巢采自距实验室 50—100 公里的屠宰场。家驼被宰杀后立刻开腹, 剪开卵巢囊, 可见到球状卵巢以卵巢柄连接于子宫韧带上, 表面布满凸起的卵泡。剪下的卵巢浸于含有抗菌素的 37℃ 生理盐水中, 于 2 小时之内带回实验室。用装有 18 号针头的塑料注射器从卵巢表面直径 2—3mm 的卵泡中抽取卵母细胞。吸卵液为含有 3mg/ml 牛血清蛋白 (日本生化学株式会社) 的磷酸缓冲液。在立体显微镜下选择细胞质均匀并包有致密卵丘细胞层的卵母细胞, 用培养液充分洗涤后, 以 10—15 枚卵子为一组

培养于液体石蜡覆盖下的培养液微小滴中 (0.1ml), 在 39℃, 5%CO₂ 的培养箱内培养 24—26 小时。成熟用培养液为含有 10% 胎牛血清, 20μg/ml hCG (人绒毛膜促性腺激素) (日本持田制药), 1μg/ml 雌二醇 (Sigma 制品), 并以 10mmol/L HEPES (Sigma 制品) 缓冲的 TCM199 (Gibco 制品)。成熟培养结束后, 将成熟卵母细胞用于体外受精或制成整体标本, 经固定染色后, 于相差显微镜下检查培养结果。

(二) 精子的诱导获能及授精处理 将屠宰公驼的睾丸连用附睾一起自基部剪下, 置于 37℃ 生理盐水中保温, 并于 3 小时之内带回实验室。采精时将剥离出的附睾管剪断, 用经过灭菌的玻璃针挑取一滴浓密的精液, 放入含有 1mmol/L 咖啡因 (Sigma 制品) 以及 20mg/ml 牛血清蛋白的 BO 培养液^[3]微小滴 (约 0.2ml) 中, 浓度约为 20—30 × 10⁶ 精子/ml, 上面覆盖液体石蜡, 于 39℃, 5%CO₂, 95% 空气的条件下进行获能培养 2 小时。从培养成熟的卵母细胞中挑选卵丘细胞明显扩张的卵子, 以 10—20 枚为一组, 分别移入经获能培养的精子悬液微小滴中, 在同样的条件下共同培养 6—7 小时, 进行体外受精。

(三) 授精处理后卵子的发育培养 授精处

理6—7小时后将卵子移入发育用培养液,即含有10%胎牛血清以及120 μ g/ml丙酮酸钠的TCM199培养液中继续培养,于授精后48小时将卵子制成整体标本,固定染色后在相差显微镜下检查受精及卵裂情况;或将受精卵继续培养数天,以观察胚胎的发育情况。

结果与讨论

(一) 实验一 总共将30枚卵巢卵母细胞进行了成熟培养。培养后对卵子标本进行了镜检,分别统计了成熟卵子及未成熟卵子的比例。结果表明,成熟卵子为14枚,占培养卵子总数的46.7%,其中TI期(后期I)1枚, MII(中期I)13枚。而未成熟的卵子(仍处于生发泡阶段)16枚,占培养卵子总数的53.3%(见表1)。

表1 家驼卵巢卵母细胞的体外培养成熟结果

检查卵子数	成熟卵子数				未成熟卵子数 (%)
	总计(%)	MI	AI	TI MII	
30	14(46.7)	0	0	1 13	16(53.3)

(二) 实验二 将经过受精处理的卵子移入发育培养液后,18小时开始出现2细胞胚胎,授精处理后约48小时发育至4—8细胞期,将培养卵子制成标本后镜检,结果表明:总共检查的37枚卵子中,有16枚卵子为受精卵,占43.2%;其中穿入精子的头部呈膨大状态(ESH)的有3枚,处于原核期(PN)的受精卵5枚,而处于2—16细胞期的胚胎有8枚,占受精卵总数的50%。其余的21枚卵子为未受精及异常卵(见表2)。

表2 家驼体外成熟卵母细胞的体外受精及发育结果

检查卵子数	受精卵子数			未受精及 异常卵子数 (%)
	总计(%)	ESH	PN 2—16细胞	
37	16(43.2)	3	5 8	21(56.8)

从形态上看,家驼卵巢的表面布满了直径约3mm的卵泡突起,但采卵结果表明采得的

卵母细胞数量并不多,这可能是由于有相当一部分卵母细胞尚处于幼稚阶段而无法吸出。而牛卵巢上接近成熟的卵泡是可通过卵泡直径和突起程度加以识别的。

从实验一体外成熟培养的结果来看,家驼卵巢卵母细胞的体外成熟率明显地低于牛、羊卵巢卵母细胞的体外培养结果^[1,4]。这说明本研究所采用的牛卵用成熟培养液似不完全适合于家驼卵母细胞的体外培养成熟。还需要进行进一步的实验探索,以寻找最佳的成熟培养液。

实验二的结果表明了将牛体外受精用培养液用于家驼卵子,其受精率也明显低于牛卵子的体外受精率^[2],而且受精后的卵裂卵表现为发育阻滞现象,均停止在8—16细胞期。虽然牛的胚胎在体外培养时也有着类似的现象,但尚有相当一部分胚胎能够突破体外发育阻滞而发育为桑椹胚和囊胚^[2]。由于本实验中培养卵子的数目偏少,所以还不能得出牛体外受精的处理方法不适合于家驼卵子的结论。

利用屠宰公畜的附睾精子进行体外受精的研究尚无报道。而本研究首次利用屠宰公驼的附睾精子通过获能培养后进行体外受精获得了成功。由于附睾精子几乎不含有“去获能因子”,因此在实验方法上则有别于射出精子,省去了精子的离心洗涤等处理步骤,同样也获得了较好的受精效果。

由于家驼的屠宰量很有限,所以获得的供研究卵子也比较少,无法进行大量的对照实验以确定最佳的受精及发育条件。从本研究的结果可以看出:屠宰家驼的卵巢卵母细胞可以在体外条件下培养至成熟阶段,并可以用经获能处理的屠宰公驼附睾精子进行体外受精而发育为8—16细胞期胚胎;牛体外受精及发育用培养系统可以用于家驼体外成熟卵的体外受精及发育培养,但受精率及卵裂率均相对较低,而且未能突破“8—16细胞期阻滞”;尽管本研究成功地进行了家驼的体外受精,但实验的各个环节及胚胎的培养条件等仍需要进一步的研究加以改进和完善。

参 考 文 献

- 1 旭日干 张锁链 薛晓先等 1989 屠宰母牛卵巢卵母细胞体外受精与发育的研究 畜牧兽医学报 20(3): 193-198.
- 2 旭日干 张锁链 薛晓先等 1989 屠宰母牛卵巢卵母细胞体外受精与早期发生 内蒙古大学学报(自然科学版) 20 (3): 407-414.
- 3 Brackett B. G. and G. Oliphant 1975 Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology Reproduction*. 12: 260-274.
- 4 Bou Shorgan Zhang Suolian Xue Xiaoxian et al. 1990 In vitro development of ovine oocytes matured and fertilized in vitro and lambing after embryo transfer. *Japanese Journal Animal Reproduction*. 36 (4): 225-230.

PRELIMINARY STUDY ON THE IN VITRO FERTILIZATION OF DOMESTIC CAMEL (*CAMELUS BACTRIANAS*)

BOU Shorgan PANG Yefei ZHANG Suolian XUE Xiaoxian

(Research Centre for Laboratory Animal Science, Inner Mongolia University Huhhot 010021)

ABSTRACT In present study, the follicular oocytes collected from ovaries of slaughtered domestic female camel were cultured in TCM199 containing fetal calf serum (FCS) and gonadotrophin. After maturation, the oocytes were inseminated with epididymis semen after being capacitated by culturing in BO medium (Brackett and Oliphant, 1975) containing caffeine and bovine serum albumin (BSA) for 2 hours. After 6-7 hours of insemination, the oocytes were transferred to TCM199 containing FCS and sodium pyruvate for further development. The results indicated that the maturation rate of oocytes cultured was 46.7% (14/30), and fertilization rate was 43.2% (16/37). The study demonstrated that the domestic camel oocytes can be successfully matured and fertilized in vitro, the fertilized eggs can develop to 8-16-cell stage embryos.