

提高牛体外受精核移植胚胎发育率的研究

廬洪武 李荣凤 旭日干

(内蒙古大学实验动物研究中心 呼和浩特 010021)

摘要 本研究以体外成熟的、去核的牛卵母细胞为受体,以发育为 8—32 细胞期的牛体外受精胚胎为供体进行了核移植实验,着重探讨了激活方法和供体胚龄对移核胚发育的影响。结果表明:对去核受体进行三重激活(一、75V × 80 μ s / 2 次电刺激;二、用含有 10 μ g / ml 放线菌酮的 TCM199 处理 6 小时;三、用 5 μ mol / L 的钙离子载体 A23187 处理 5 分钟)的移核胚囊胚的发育率为 19.3% (22 / 114)、高于一重激活(一)和二重激活(一和二)的发育率 15.4% (16 / 104) 和 10.6% (13 / 123)、但无显著差异;分别以体外受精后第 2、3、4、5 天的胚胎(8—32 细胞)作为供体所获得的移核胚,均能够发育为囊胚,发育率为 4.8%—11.7%、无明显差异。实验结果证明:本研究采用的方法对以体外成熟卵为受体,以体外受精胚为供体的牛细胞核移植是有效的;对去核受体卵子进行有效的激活处理,可以提高移核胚胎的发育率;供体胚的胚龄对移核胚的发育无明显影响。

关键词 体外受精 核移植 牛

80 年代以来,随着动物胚胎工程技术的迅速发展,哺乳动物核移植的研究取得了很大的进展。先后在小鼠^[1]、绵羊^[2]、牛^[3]、家兔^[4]和猪^[5]等动物的核移植研究中获得成功。该技术的发展和应用于畜牧业生产,尤其是对于优良品种的性别控制、选育和快速繁殖具有重要的应用价值。

从经济和实用的角度来看,利用体外成熟的卵子为受体和体外受精的胚胎为供体,对于家畜核移植具有成本低和来源充足的特点。另外,用体外成熟或体内成熟的卵子为受体,通过核移植后产生的克隆胚胎之发育率没有明显差异^[6]。Nagai 等^[7]报道,通过延长卵母细胞的培养时间,并且对受体卵子进行激活处理,可以提高移核胚的发育率。Ware 等^[8]和 Kono 等^[9]的研究结果也证明了通过激活受体,可以有效地促进移核胚的发育。在供体胚龄对移核胚发育作用方面,Collas 等^[10]证明,对于家兔,以 8 细胞期胚胎为供体的移核胚的发育率最高,其次为 32 细胞期胚胎。

近几年来,国内在核移植研究方面也做了大量的工作,分别在山羊、家兔和绵羊的核移植

研究中获得成功。但是,有关牛的核移植至今未见成功的报道。

本研究从屠宰场回收牛卵母细胞,以体外成熟的卵子为受体,以体外受精的胚胎为供体,通过对受体卵子进行不同的激活处理,以及利用不同胚龄的胚胎为核供体,对核移植胚胎的进一步发育进行了研究,探索影响核移植胚胎发育的诸因素,提高牛核移植胚胎的发育率。

1 材料和方法

1.1 受体卵母细胞的准备 从屠宰场采集母牛卵巢,在 3 小时内带回实验室。从卵巢表面 2—8mm 的卵泡中吸取卵母细胞。选择带有数层致密卵丘细胞的卵子,置于液体石蜡覆盖下的培养液小滴 TCM199+10% D₀OCS(发情当天母牛血清)中,在 38.5℃、5% CO₂ 的条件下培养 23—24 小时,然后用 0.1% 透明质酸酶的培养液消化卵丘细胞,并用吸管来回吹吸将卵丘细胞去除干净。挑选有极体的卵子用作受体。

1.2 供体胚胎的准备 牛卵母细胞的体外成熟(IVM)、体外受精(IVF)、体外发育(IVC)的

实验过程按照作者等曾报道的方法^[1]。发育为8—32细胞期的胚胎用于核移植供体。在本研究中的体外受精结果,卵裂率70%以上,8细胞胚胎的发育率50%以上,囊胚的发育率20%以上。利用显微操作器将供体胚胎的透明带环状切开,或者用0.5%的链酶蛋白酶去除透明带。将无透明带的胚胎移入含有EDTA的无钙培养液中,用玻璃吸管来回吹吸,将卵裂球分离开。单个的卵裂球即作为供体。

1.3 显微操作 将受体卵子置于PBS+20%FCS中,在倒置显微镜下,利用显微操作器将受体卵子的透明带靠近极体的一侧,用玻璃微针(直径为10—20 μm)割开约1/3—1/4的口,然后将开口的卵子移入PBS+20%FCS+10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的细胞弛素B中去核。一端将卵子固定,另一端用一斜面微管(直径为30—40 μm)从透明带的开口处插入,吸出极体附近的细胞质(约占整个卵质的1/4)。去核后的卵子放回培养箱内培养一段时间,使剩下的胞质得以恢复。用斜面微管吸入卵裂球,通过透明带的开口将卵裂球注入去核受体卵子与透明带之间的空隙中,即完成了移核过程。

1.4 激活和融合 将去核卵子置于0.05mol/L CaCl_2 、0.1mol/L MgCl_2 、0.3mol/L甘露醇的融合液中,在1mm的白金丝融合槽内,施以75V \times 80 μs 的电脉冲两次,进

行电刺激的第一重激活,然后移入TCM199+10% D_0OCS +10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 放线菌酮(Cycloheximide),在38.5 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内培养6小时,进行第二重激活。第三重激活是用含有5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 离子载体(A23187)的TCM199(不含血清)处理5分钟。在实验1中,所谓的一重激活只进行电刺激激活,二重激活包括电刺激和放线菌酮激活。

细胞融合在卵子成熟培养32小时左右进行,在融合前1小时左右移核。融合条件与前者电刺激激活相同。

1.5 重构胚的发育 将融合后的重构胚胎移入TCM199+5% D_5OCS (发情第5天母牛血清)+牛输卵管上皮的培养液中进一步体外发育。统计其卵裂率、8细胞及囊胚的发育率。

2 结果

以体外受精后第2—3天的胚胎(8—16细胞)为供体,对受体卵子分别进行一重激活(电刺激)、二重激活(电刺激和放线菌酮)、三重激活(电刺激、放线菌酮和离子载体),其细胞融合率(83.2%—84.6%)、融合胚的卵裂率(61.0%—79.8%)和囊胚的发育率(10.6%—19.3%)均无显著差异,但总的来看,三重激活的卵裂率(79.8%)、8细胞胚的发育率(50.0%)和囊胚发育率(19.3%)均高于其他两个处理组。说明受体卵子的激活对核移植胚胎的发育有促进作用(见表1)。

表1 不同激活方法对牛体外受精核移植胚胎发育的影响

激活方法	操作卵数	融合卵数(%)	卵裂卵数(%)	8细胞数(%)	囊胚数(%)
一重激活	123	104(84.6)	75(72.1)	38(36.5)	16(15.4)
二重激活	147	123(83.7)	75(61.0)	34(27.6)	13(10.6)
三重激活	137	114(83.2)	91(79.8)	57(50.0)	22(19.3)

表2 不同发育阶段的供体对牛体外受精核移植胚胎发育的影响

供体胚龄(小时)	操作卵数	融合卵数(%)	卵裂卵数(%)	8细胞数(%)	囊胚数(%)
8细胞 (54)	95	79(83.2)	51(64.6)	19(24.0)	9(11.4)
8—16细胞 (78)	89	77(86.5)	54(70.1)	33(42.8)	6(7.8)
16细胞 (102)	89	83(93.2)	55(66.3)	22(26.5)	4(4.8)
16—32细胞 (126)	78	77(98.7)	55(71.4)	30(39.0)	9(11.7)

以二重激活(电刺激和放线菌酮)处理受体卵子,以体外受精后第2天(54小时)、3天(78小时)、4天(102小时)和5天(128小时)的胚胎为供体进行核移植的结果表明,无论是在融合率(83.2%—98.7%)、卵裂率(64.6%—71.4%)、8细胞胚的发育率(24.0%—42.8%),还是囊胚的发育率(4.8%—11.7%),均无明显差异。结果(见表2)。

以上结果表明,激活受体能够提高移核胚的发育率,以8—32细胞期的胚胎为供体,胚龄的不同并不影响移核胚的发育。

3 讨论

牛卵母细胞可以采取不同的方法进行人工激活,如电刺激、酒精、钙离子载体和放线菌酮等^[12-14]。电刺激使细胞膜在瞬间的高压电击下产生很多微孔,使得溶液中的 Ca^{2+} 通过微孔进入细胞质,呈现细胞内 Ca^{2+} 的升高,从而引发一系列的生理、生化反应,使卵子激活。 Ca^{2+} 载体的作用也是通过载体将外源性 Ca^{2+} 转入细胞内,从而使细胞内 Ca^{2+} 含量升高,卵子激活。在卵母细胞的成熟过程中,在蛋白质类因子如促成成熟因子(Promoting Maturation Factor, PMF)和细胞静止因子(Cyto-static Factor, CSF)的作用下,细胞分裂停滞在第二次成熟分裂中期(MII)。这些因子对 Ca^{2+} 相当敏感,当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高到一定水平,使PMF和CSF的作用失活,细胞分裂重新开始,卵子激活。另外,使用蛋白质抑制剂,如放线菌酮等,可以直接抑制这些蛋白质的合成,使得卵母细胞从MII的状态下解脱出来,恢复第二次成熟分裂。鉴于以上机理,本研究结合电刺激、放线菌酮和 Ca^{2+} 载体三种激活方法处理受体卵子(目前的报道均采用单一方法激活卵子),尽量模拟体内卵子激活过程,提高了核移植胚胎的发育率。

根据Johnson和Rao^[15]报道,将间期细胞核与分裂期细胞进行融合可产生间期细胞核的提早凝缩,这种现象称之为成熟前染色体凝缩(Premature Chromosome Condensation,

PCC),而PCC是导致染色体损伤的主要原因。在细胞核移植中,PCC的形成与供体核细胞周期有关。Collas等^[16]报道, G_1 期的供体核融入去核卵子后,明显地增加重构胚的发育率,而晚S期的核所组成的重构胚的发育率却非常低。这主要是由于晚S期细胞核融入MII受体后形成PCC,造成染色体的损伤。Barnes等^[17]的结果表明,供体核与受体卵子细胞周期的同步程度直接影响重构胚的发育率。将S期供体核移入S期受体卵子可以大大提高核移植胚的发育率。Stice和Keefe^[18]指出,对于未知细胞周期的供体核,与激活的卵子进行融合,可以提高移核胚的发育率。这是由于与激活卵子融合,可以防止PCC的形成。本研究正是根据这一理论依据,将不同发育阶段的卵裂球同激活卵子进行融合,得到了较高的移核胚的发育率。

许多研究报道,延长卵母细胞的成熟培养时间,可以增加卵子的激活率^[8,19]。但随着成熟时间的延长,卵子的去核率却随之下降。Yang等报道,成熟培养22—24小时牛卵子的去核率为69%,30小时下降为40%,40小时仅为35%。这主要是由于老龄卵子的极体已经发生了移动。本研究采用成熟培养23—24小时的卵子去核,之后进行电刺激激活,继续培养6小时后(即成熟培养共30小时),再进行激活。这样即能保证卵子的去核率,又能提高卵子的激活率。

Collas等^[10]以家兔为材料,采用不同发育阶段的胚胎细胞核与去核卵子融合,其结果表明,8细胞胚的细胞核发育能力最高,囊胚的发育率为42%,其次为32细胞的核,囊胚率为33%,而以囊胚内胚团为供体核,重构胚的发育率仅为17%。张勇等^[20]在山羊核移植的研究中证明,利用4、8、16和32细胞期的卵裂球为供体,对核移植胚胎的发育率无明显影响(57%—63%)。本研究的结果也证明了这一点,分别以体外受精后第2、3、4和5天的胚胎为供体,即8—32细胞期胚胎的卵裂球,同去核受体融合后,重构胚发育为囊胚的比率为

4.8%—11.7%。由此认为,对于牛细胞核移植,桑椹胚(32细胞)以前的供体胚龄并不是影响核移植发育的主要原因。

参 考 文 献

- McGrath J. and D. Solter. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science*. NY 1983, 220: 1300—1302.
- Willadsen S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 1986, 320: 63—65.
- Prather R.S., F. L. Barnes, M.M. Sims et al. Nuclear transplantation in the bovine embryos: Assessment of donor nuclear and recipient oocytes. *Biol. Reprod.*, 1987, 37: 859—866.
- Stice S. L. and J.M. Robl. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 1988, 39: 657—664.
- Prather R.S. et al. Nuclear transplantation in early porcine embryos. *Biol. Reprod.* 1989 41: 123—132.
- Yang X.Z., S.E. Jiang, P. Farrell et al. Nuclear transfer in cattle: Effect of nuclear donor cell, cytoplasm age, co-culture, and embryo transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 1993, 35: 29—36.
- Nagai T. Parthenogenic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete Res.*, 1987, 16: 243—249.
- Ware C. B., F. L. Barnes, M. Maiki—Laurila et al. Age-dependence of bovine oocytes activation. *Gamete Res.*, 1989, 22: 265—275.
- Kono T., Y. Sotomaru, F. Aono et al. Effect of ooplasm activation on the development of nuclear transfer bovine embryos. *Theriogenology*. 1993, 39: 248 (abstr.)
- Collas P. and J.M. Robl. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 1991, 45: 455—465.
- 廖洪武, 庞也非, 薛晓先等. 牛体外受精卵发育培养的研究. 高技术通讯, 1993, 3(1): 19—21.
- Aoyagi Y., K. Kameyama and T. Takeda. Artificial activation of bovine oocytes matured in vitro by electric shock or exposure to ionophore A23187. *Theriogenology*, 1992, 37: 188(abstr.)
- Moraghan L., X. Yang and S. Jiang. Ethanol and electric pulse induced activation of bovine oocytes matured 23—24 hours in vitro. *Theriogenology*, 1992, 37: 262 (abstr.)
- First N.L., M.L. Leibfried—Rutledge, D. L. Northey et al. Use of in vitro matured oocytes 24hr of age on bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 1992, 37: 211 (abstr.)
- Johnson R. T. and P. N. Rao. Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*, 1970, 226: 717—722
- Collas P., J. J. Balis and J. M. Robl. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 1992b, 46: 492—500.
- Barnes F.L., P. Collas, R. Powell et al. Influence of recipient oocytes cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 1993, 36: 33—41.
- Stice S. L. and C. Keefer. Improved developmental rate for bovine nucleus transfer embryos using cold shock activated oocytes. *Biol. Reprod.*, 1992, 46 (suppl 1): 166.
- Yang X., S. Jiang and R. H. Foote. Age-dependent activation, enucleation and nuclear transfer of bovine oocytes matured in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.*, 1991, 44: 141 abstr.
- 张勇, 王建辰, 钱菊汾等. 山羊卵核移植的研究. 国外畜牧学—草食家畜(增刊), 1992, 118—122.

STUDY ON ENHANCEMENT OF DEVELOPMENT RATE OF NUCLEAR TRANSFERRED BOVINE EMBRYOS

CHAN Hongwu LI Rongfeng BOU Shorgan

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

ABSTRACT Nuclear transfer was carried out by using enucleated bovine oocytes (recipient cells), and blastomeres from in vitro fertilized embryos with 8—32 cells. The proportion of blastocysts from nuclear transferred embryos by three steps activation (electric pulse→cycloheximide→Ionophore A23187) of the recipient cytoplasm was 19.3% (22/114), higher than 15.4% (16/104) from the two

steps activation (electric pulse→cycloheximide), and 10.6% (13 / 123) from one step activation (electric pulse), ($p > 0.05$). The percentages of blastocysts after nuclear transfer with the donor cells from the in vitro fertilized embryos in different stages (day2—day5) were 4.8%—11.7%. The results suggest that the treatment of recipients and the selection of donor in this study are effective. sufficient activation of the recipient oocytes is important, but selection of different stages of the in vitro fertilized embryos for donors appears no apparent influence on the results.

Key words In vitro fertilization Nuclear transfer Cattle.