

利用电极盘进行猪卵母细胞电激活

张玲^{1,2}, 黄友防², 何若钢¹, 卢晟盛², 许惠艳², 兰宗宝², 房慧伶², 潘天彪², 蓝海恩², 黄敏瑞², 卢克焕^{2*}

(1. 广西大学广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西南宁530005; 2. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁530005;

3. 广西畜牧研究所, 广西南宁530001)

摘要 [目的] 研究不同电激活参数以及电脉冲联合6-DMAP对猪卵母细胞孤雌激活效果的影响。[方法] 使用电极盘, 测定不同场强(1.1, 1.3, 1.5, 1.7, 1.9 kV/cm), 不同脉冲时程(30, 50, 70, 90, 110 μs), 1次脉冲下猪卵母细胞囊胚率的变化。[结果] 结果表明, 脉冲强度以1.5和1.7 kV/cm效果最好, 在80 μs时其猪卵母细胞囊胚率分别达到(22.35 ± 5.16)%和(20.59 ± 9.41)%; 脉冲强度1.5 kV/cm, 1次电脉冲后4 h联合6-DMAP激活卵母细胞, 当脉冲时程达到70和90 μs时, 囊胚率分别达到(21.65 ± 9.95)%和(23.10 ± 16.27)%。[结论] 在试验条件下, 使用电极盘的最适电激活参数为脉冲强度1.5~1.7 kV/cm, 脉冲时长80 μs, 1次脉冲电激活。

关键词 猪; 卵母细胞; 孤雌激活

中图分类号 S828 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)15-06999-02

Electrical Activation of Porcine Oocytes with Electropolar Plates

ZHANG Ling et al. (Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract [Objective] The research aimed to study the effects of different field strength and electricity combined with 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) on the parthenogenetic development of porcine oocytes using electropolar plate. [Method] Porcine oocytes blastocyst rates were measured under the situations of different field strength (1.1, 1.3, 1.5, 1.7, 1.9 kV/cm), and different pulse duration (30, 50, 70, 90, 110 μs), one times of pulse with electropolar plate. [Result] The results showed that, 1.5 and 1.7 kV/cm field strength were better, and the porcine oocytes blastocyst rates was (22.35 ± 5.16)% and (20.59 ± 9.41)% with duration of 80 μs. Treated with 1.7 kV/cm field strength, one times of pulse and combined with 6-DMAP 4 h later, the porcine oocytes blastocyst rates was (21.65 ± 9.95)% and (23.10 ± 16.27)% when pulse duration was 70 and 90 μs. [Conclusion] In conclusion, the best electrical parameters for porcine oocyte parthenogenesis was 1.5 - 1.7 kV/cm with one 80 μs pulse when using electropolar plate.

Key words Porcine; Oocyte; Parthenogenetic activation

猪体外成熟卵母细胞的激活是猪体细胞核移植的关键技术环节, 也是提高猪卵母细胞浆内单精子注射(Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI)效率的首要工作。早期研究表明, ICSI越过了正常受精时精子所需经过的环节, 往往不能使卵母细胞完全激活, 另外对于一些经过ICSI后自然激活效果不是很明显的物种(如牛、猪、马)的卵母细胞, 有必要在注射精子后再进行人工激活^[1]。目前, 卵母细胞常用的激活方法可分为物理激活法、化学激活法和物理与化学联合激活法3类。物理激活方法中, 因电脉冲刺激法具有激活率高、稳定性强、重复性好而普遍采用。Zhang等将人ICSI发育失败的卵子用电脉冲激活后有8%~11%的囊胚出现^[2]。卢晟盛等采用垂直电极槽, 以电场强度1.7 kV/cm, 50 μs的脉冲时程处理时, 猪卵母细胞囊胚率达到(12.4 ± 3.7)%^[3]。为提高猪卵母细胞的激活效率, 笔者拟采用电极盘, 研究不同电激活参数以及电脉冲联合6-DMAP对猪卵母细胞孤雌激活效果的影响, 以找到最适的激活参数, 为ICSI技术平台打好基础。

1 材料与方

1.1 培养液 成熟液为改良的TCM199, 洗卵液为TL-Hepes, 培养液成分参见文献[4]。电激活液为浓度0.3 mol/L甘露醇, 浓度0.1 mmol/L Mg²⁺, 浓度0.1 mmol/L Ca²⁺, 浓度0.5 mmol/L Hepes, 0.27% BSA。

1.2 卵母细胞的准备 猪卵巢来自当地屠宰场, 放在25~35℃的无菌生理盐水(浓度0.9% NaCl)中, 于5 h内运回实

验室。卵巢在无菌生理盐水中洗2遍之后, 剪去卵巢周围组织, 再次用生理盐水洗净, 用12号针头、10 ml一次性注射器抽出卵丘-卵母细胞复合体。选带有3层以上颗粒细胞、细胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体, 在TL-Hepes中洗3遍后, 再在成熟液中洗2遍, 放入成熟液中成熟培养。100 μl的成熟培养液滴中放25~30个卵母细胞, 覆盖矿物油, 于39℃、最大饱和湿度5% CO₂培养箱中培养44~46 h。

1.3 卵母细胞的电激活 将体外成熟培养44~46 h的卵母细胞放入含有浓度0.1%透明质酸酶的洗卵液中, 轻轻地用吸管吹打去掉颗粒细胞。在TL-Hepes中洗3次后, 移到电激活液滴中, 将卵母细胞清洗3~5次之后, 放入含有电激活液的电极盘(美国BTX ECM2001电融合仪配套电极盘, 电极距离0.5 mm)内, 在体视显微镜下将卵母细胞拨到两电极线之间, 细胞之间不要重叠, 按照试验设计进行电脉冲激活。

试验 : 利用不同场强(1.1, 1.3, 1.5, 1.7, 1.9 kV/cm), 80 μs, 1次脉冲进行猪卵母细胞电激活。重复10次。

试验 : 利用不同脉冲时程(30, 50, 70, 90, 110 μs), 1.5 kV/cm脉冲强度, 1次电脉冲激活卵母细胞, 于NCSU23培养滴中培养4 h后, 再用6-二甲基嘌呤(6-DMAP)激活卵母细胞3 h。重复10次。

1.4 卵母细胞电激活后的体外培养 人工激活后的卵母细胞以NCSU23液洗涤3~5次后, 移入覆盖有矿物油, 预平衡4 h以上的50 μl NCSU23培养液滴中(添加浓度0.4% BSA)进行培养。分别于第48小时观察卵裂情况, 第168小时观察囊胚形成情况。

1.5 数据处理 将卵裂率和囊胚形成率进行反正旋转换, 再用SAS 8.0的一般线性模型Duncan's多重比较进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同电场强度对猪卵母细胞孤雌激活的影响 由表1

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30660127); 广西科学研究与技术开发计划资助项目(桂科能0815011-6-3); 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室开放课题基金资助项目(SE0701)。

作者简介 张玲(1981-), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 研究方向: 动物胚胎生物技术。* 通讯作者, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: khlu@gxu.edu.cn。

收稿日期 2009-02-27

可见,随着场强的增大,猪卵母细胞囊胚率逐渐提高,尽管各组之间差异不显著。当场强达到 1.5 和 1.7 kV/cm 时,囊胚率分别为(22.35 ± 5.16) % 和(20.59 ± 9.41) %,较其他各组

高;当场强继续增大时,囊胚率下降。过高的脉冲强度不仅不会促进激活效果,反而对细胞有损伤作用。

表1 不同场强对猪体外成熟卵母细胞早期孤雌发育的影响

Table 1 Effects of different field strength on the pathogenic development of porcine oocytes matured in vitro

场强 kV/cm	卵细胞数 个	卵裂数	卵裂率 %	囊胚数	囊胚率 %
Field strength	Oocytes number	Cleaved number	Cleaved rate	Blastocyst number	Blastocyst rate
1.1	195	142	71.98 ± 18.33 ^a	20	11.37 ± 12.52 ^a
1.3	176	135	76.54 ± 13.21 ^a	22	13.03 ± 9.15 ^a
1.5	196	138	76.98 ± 9.28 ^a	44	22.35 ± 5.16 ^a
1.7	181	157	79.12 ± 12.48 ^a	39	20.59 ± 9.41 ^a
1.9	204	160	77.69 ± 10.82 ^a	35	16.94 ± 8.47 ^a

注:试验电脉冲时程为 80 μs,脉冲次数为 1 次。

Note: The duration of electrical pulse in the experiment is 80 μs and the pulse times was once.

2.2 不同脉冲时程联合 6 DMAP 对猪卵母细胞孤雌激活的影响 由表 2 可见,当脉冲时程为 30 μs 时,猪卵母细胞囊胚率仅为(14.35 ± 14.17) %;当脉冲时程达到 70 和 90 μs 时,囊胚率分别达到(21.65 ± 9.95) % 和(23.10 ± 16.27) %;而脉冲

时程达到 110 μs 时,卵母细胞的卵裂率和囊胚率都明显下降,分别为(84.18 ± 11.94) % 和(14.02 ± 11.09) %。由此可见,脉冲时程过高,会降低卵母细胞继续发育的能力。

表2 不同脉冲时程联合 6 DMAP 对猪卵母细胞孤雌激活的影响

Table 2 Effects of different electrical pulse activation combined with 6 DMAP on the pathogenic development of porcine oocytes matured in vitro

脉冲时程 μs	卵细胞数 个	卵裂数	卵裂率 %	囊胚数	囊胚率 %
Pulse duration	Oocytes number	Cleaved number	Cleaved rate	Blastocyst number	Blastocyst rate
30	100	93	93.18 ± 5.27 ^a	15	14.35 ± 14.17 ^a
50	96	90	93.74 ± 6.79 ^a	17	17.29 ± 12.66 ^a
70	98	88	90.26 ± 6.33 ^a	22	21.65 ± 9.95 ^a
90	96	83	87.26 ± 7.88 ^a	20	23.10 ± 16.27 ^a
110	103	88	84.18 ± 11.94 ^a	16	14.02 ± 11.09 ^a

注:试验电场强度为 1.5 kV/cm,脉冲次数为 1 次。

Note: The electric intensity in the test is 1.5 kV/cm and the pulse times is once.

3 结论与讨论

自然情况下,多数哺乳动物排出的卵母细胞是次级卵母细胞,并停留在第二次减数分裂中期,受精后得到精子的激活后才完成第二次减数分裂,排出第二极体并过渡到第一次卵裂^[5]。由于精子显微注射避开了传统受精的精卵结合激活卵母细胞的过程,因此,与传统的受精过程不同。单纯显微注射的机械刺激并不能完全激活猪的卵母细胞,必须通过人工激活。而电刺激是目前应用最广泛的卵母细胞激活方式,其原理是电脉冲引起细胞内化学物质的变化,导致卵母细胞活化,电脉冲使卵母细胞膜上生成可逆的微孔,引起 Ca²⁺ 释放,从而激活卵母细胞^[6]。在卵母细胞的活化过程中,细胞内 Ca²⁺ 节律性地脉冲升高起关键的介导作用^[7-8],卵子胞质 Ca²⁺ 升高可使 MPF 和 CSF 失活或消失,从而启动成熟分裂器,促使 M 期卵继续第二次成熟分裂^[9]。脉冲强度的大小与空洞的生成有关,若强度过大则将造成空洞不可逆,细胞受到损伤,活化率反而下降^[10],张德福等^[11]、刘国世等^[12]的研究结果也证实当场强过大时,囊胚率显著下降。

Zhu 等对成熟 44 h 的猪卵母细胞采用 1.0 kV/cm、时程 80 μs 的 3 次直流连续脉冲进行电脉冲激活,所获得的孤雌囊胚形成率最佳^[13]。在绵羊上采用 1.25 kV/cm 场强、脉冲时程 80 μs、1 次电脉冲,也得到了较高的激活率^[14]。张德福等的研究认为将成熟卵母细胞置于 BTX-ECM2001 电融合仪两电极之间的电激活溶液中进行激活,电场强度以 1 250 ~

1 500 V/cm 为优^[11]。曹胜兰等应用宁波新芝公司的 CRY-3 型细胞融合仪和配套的电极板(间距 0.5 mm),采用 1.3 kV/cm 电场强度,80 μs 脉冲时程和 1 次脉冲激活体外成熟的猪卵母细胞,其激活率、卵裂率和孤雌胚的囊胚率分别为 71.07 % (86/121)、75.58 % (65/86) 和 21.54 % (14/65)^[15]。吴中红等采用型号为 Embryo Cell Fusion System (FUJI RAINDUSTRY CO. L TD, JAPAN) 电融合仪,将卵子放入两平行电极间距离为 0.46 mm 的电融合仪小室进行激活,认为电激活最佳场强和脉冲时程为 130 V/mm 和 80 μs,其囊胚发育率为 (20.12 ± 8.18) %^[16]。卢晟盛等采用 BTX-ECM 电融合仪配套垂直电极槽对猪卵母细胞进行电脉冲激活,囊胚率达到 (12.4 ± 3.7) %^[3]。试验中,采用 BTX-ECM2001 电融合仪配套的电极盘激活,脉冲强度为 1.5 和 1.7 kV/cm 时,囊胚率为 (22.35 ± 5.16) % 和 (20.59 ± 9.41) %,但再延长脉冲强度至 1.9 kV/cm,并不能有效提高卵裂率、囊胚率,其反而下降,原因主要是场强过高,细胞受到损伤,造成微孔不可逆。与卢晟盛等^[3]的研究相比较,使用 BTX-ECM 电融合仪配套电极盘显著提高了猪卵母细胞的囊胚率;试验中电脉冲场强参数 1.5 ~ 1.7 kV/cm 比曹胜兰等^[15]、吴中红等^[16]的研究相对较高。这与激活液的配制、试验操作过程、试验环境的不同有关。

猪卵母细胞电激活后 4 h 再用 6-DMAP 激活,产生的囊胚大部分为单倍体,该方法适于猪卵母细胞 ICSI 的激活^[17]。

(下转第 7003 页)

表2 不同还原糖反应物参比卷烟的感官评价

Table 2 Sensory evaluation of Millard reaction products of different kinds of reducing sugar

评价项目 Item	得分 Score			
	参比卷烟 Reference cigarette	葡萄糖反应物 MRPs of glucose	果糖反应物 MRPs of fructose	木糖反应物 MRPs of xylose
香气特性 Aroma characteristics				
香气质 Aroma quality	3.000	3.000	3.000	3.000
香气量 Aroma amount	3.000	3.000	3.167	3.167
杂气 Offensive odor	2.500	2.250	3.000	3.000
透发性 Volatility	3.000	3.000	3.250	3.250
烟气特性 Smoke characteristics				
劲头 Strength	3.500	3.500	3.500	3.500
浓度 Concentration	3.000	3.000	3.000	3.000
细腻柔和程度 Smooth	3.000	3.000	3.500	3.500
口感特性 Taste characteristics				
刺激程度 Irritancy	2.500	2.333	2.833	2.833
干燥程度 Dryness	2.500	2.500	2.750	2.750
回甜 Sweetness	3.000	3.000	3.000	3.000
余味 Aftertaste	3.000	3.000	3.250	3.250

3 小结

该研究表明,3 种还原糖与小麦水解蛋白 Millard 的反应活性依次为木糖 > 葡萄糖 > 果糖;不同还原糖反应物醚溶性成分不同,在该试验条件下,果糖反应物中检测出了葡萄糖与木糖反应物中所没有的吡 类化合物;果糖和木糖反应物对参比卷烟的感官品质有较好的改善作用,可提高卷烟香气量和透发性,减小其刺激程度和干燥度,改善卷烟余味,且在降低卷烟杂气量和提高烟气细腻柔和程度方面具有明显作用。

参考文献

- [1] 大连轻工业学院,华南理工大学.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [2] 谢剑平,宗永立,屈展,等.单体香料在卷烟中作用评价方法的建立与应用[J].烟草科技,2008(4):5-9,13.

(上接第7000页)

6-DMAP 对卵母细胞的激活作用主要是维持 P34^{cd2} 的磷酸化和抑制 cydinB 的磷酸化使 MPF 活性下降,从而进一步激活停滞在 MI 期的卵母细胞。试验 采用电场强度为 1.5 kV/cm,1 次脉冲联合 6-DMAP 激活卵母细胞,当脉冲时程达到 70 和 90 μ s 时,囊胚率分别达到 (21.65 \pm 9.95) % 和 (23.10 \pm 16.27) %,验证了试验 中 1.5 ~ 1.7 kV/cm 场强,80 μ s、1 次脉冲的激活参数比较合适。同时,试验 中联合 6-DMAP 获得的囊胚率与试验 相比,效果不显著,说明当电脉冲场强达到一定高度时,6-DMAP 使 MPF 活性下降,进一步激活卵母细胞的作用已不显著。

在该试验条件下,使用电极盘进行猪卵母细胞电脉冲激活最适宜参数是脉冲强度 1.5 ~ 1.7 kV/cm、脉冲时程 80 μ s、1 次脉冲。

参考文献

- [1] 尚江华.猪卵母细胞的体外成熟和单精注射研究[D].北京:中国农业科学院,2001.
- [2] ZHANG J, WANG C W, BLASZCZYKA. Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection[J]. Fertil Steril, 1999, 72(3): 509-512.
- [3] 卢晟盛,魏凤,房慧伶,等.不同化学激活方法和电激活参数对猪体外成熟卵母细胞早期孤雌发育的影响[J].中国兽医学报,2008,28(4):469-474.
- [4] 卢晟盛,张艳玲,石德顺,等.在成熟过程中添加牛血清和猪卵泡液对猪卵母细胞核成熟及体外受精后早期胚胎发育的影响[J].黑龙江畜

- [3] LERITTIKUL W, BENAKUL S, TANAKA M. Characteristics and antioxidative activity of Millard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH[J]. Food Chemistry, 2007, 100: 669-677.
- [4] DOYON L, SMYRL T G. Interaction of thiamine with reducing sugars[J]. Food Chemistry, 1983, 12: 127-133.
- [5] CHEVALIER F, CHOBERT J M, POHNEAU Y, et al. Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the Millard reaction is related to the nature of the sugar[J]. International Dairy Journal, 2001, 11: 145-152.
- [6] JING H, KITIS D D. Antioxidant activity of sugar-lysine Millard reaction products in cell free and cell culture systems[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 429: 154-163.
- [7] NARANJO G B, MALEC L S, MIGO M S. Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment[J]. Food Chemistry, 1998, 62(3): 309-313.
- [8] JING H, KITIS D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar Millard reaction products[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40: 1007-1015.
- [9] 李和,李佩文.食品香料化学——杂环香味化合物[M].北京:中国轻工业出版社,1992:69.

- [5] 袁水桥,罗光彬,张晓华,等.哺乳动物卵母细胞孤雌激活的研究进展[J].动物科学与动物医学,2004,21(12):1-3.
- [6] 赵浩斌,陈乃清,魏庆信.猪卵母细胞的电激活[J].西北农业学报,1999,8(1):15-19.
- [7] SHICE S L, ROBL J M. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm[J]. Molecular Reproduction Development, 1990, 25(3): 272-280.
- [8] SWANN K. Cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs[J]. Development, 1990, 110(4): 1295-1302.
- [9] KLINE D. Calcium dependent events at fertilization of the frog egg: injection of a calcium buffer blocks ion channel opening, exocytosis, and formation of pronuclei[J]. Developmental Biology, 1988, 126(2): 346-361.
- [10] 陈乃清,赵浩斌.小鼠 2-细胞期胚胎细胞电融合的研究[J].武汉大学学报:自然科学版,2000,46(2):243-245.
- [11] 张德福, KARL SCHELLANDER. 猪卵母细胞电激活参数的研究[J].上海交通大学学报:农业科学版,2001,19(4):254-257.
- [12] 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.
- [13] ZHU J, TELFER E E, FLETCHER J, et al. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes[J]. Biology of Reproduction, 2002, 66(3): 635-641.
- [14] LEDDA S, LO P, BOGHILOLLI, et al. The effect of 6-dimethylamino-purine (6-DMAP) on DNA synthesis in activated mammalian oocytes[J]. Zygote, 1996, 4(1): 7-9.
- [15] 曹胜兰,李跃民,刘贞伟.电激活对猪卵母细胞孤雌发育的影响[J].畜禽业,2006,194(6):33-35.
- [16] 吴中红,邢凤英,刘国世,等.猪体外成熟卵母细胞的电激活及其激活后的体外培养[J].中国农业科学,2002,35(12):1537-1542.
- [17] 蔡元,张兆旺,田见晖,等.电脉冲与化学激活联合处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响[J].中国农业大学学报,2004,9(3):21-24.