

猪卵母细胞线粒体分布及线粒体 DNA 拷贝数变化

成文敏^{1,2*}, 霍金龙^{1,2}, 信吉阁^{1,2}, 潘伟荣^{1,2}, 黄言², 魏红江^{1,2}, 曾养志²

(1. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201; 2. 云南农业大学 云南省版纳微型猪近交系重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 本研究旨在观察猪卵母细胞线粒体分布及线粒体 DNA 拷贝数变化, 以期作为判定哺乳动物卵母细胞胞质成熟的指标, 同时也为今后克隆技术的发展和相关基因表达调控的研究提供基础。运用线粒体分子探针标记技术检测体外成熟不同时期卵母细胞中线粒体的分布变化, 运用实时荧光定量 PCR 技术检测其线粒体 DNA 拷贝数的变化趋势, 揭示线粒体分布、线粒体 DNA 拷贝数变化与卵母细胞发育潜能的关系。结果表明, 猪卵母细胞成熟前后, 线粒体分布由未成熟的周边分布变为成熟后的均匀分布, 并且线粒体簇变大, 着色变深。卵母细胞成熟 0、11、22 h 的 mtDNA 拷贝数分别为(2 519.52±940.39)、(3 421.47±345.71)和(9 747.58±1 928.24), 他们之间无显著性差异($P > 0.05$)。卵母细胞成熟 33 h 的 mtDNA 拷贝数为(39 913.61±1 180.26), 显著高于成熟 0、11 和 22 h 的 mtDNA 拷贝数($P < 0.05$)。卵母细胞成熟 44 h 的 mtDNA 拷贝数为(130 074.30±78 119.45), 显著高于成熟 33 h 的 mtDNA 拷贝数($P < 0.05$)。由此可见, 随着卵母细胞成熟进程的推进, 线粒体活性增强, 线粒体 DNA 拷贝数明显增加。

关键词: 猪卵母细胞; 体外成熟; 线粒体分布; 线粒体 DNA 拷贝数。

中图分类号: S828; Q343.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)05-0635-06

Mitochondrial Distribution and Mitochondrial DNA Copy Number in Porcine Oocyte at Different Periods during *in vitro* Maturation

CHENG Wen-min^{1,2*}, HUO Jin-long^{1,2}, XIN Ji-ge^{1,2}, PAN Wei-rong^{1,2}, HUANG Yan², WEI Hong-jiang^{1,2}, ZENG Yang-zhi²

(1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Key Laboratory of Banna Mini-pig Inbred Line of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: To observe mitochondrial distribution and mitochondrial DNA copy number changes in porcine oocytes at different periods during *in vitro* maturation. Mito-Tracker Green and real-time Quantitative PCR were used to respectively detect the mitochondrial distribution and mitochondrial DNA copy number in porcine oocytes. The results showed that the mitochondrial distribution was gradually translocated from the cortex to the perinuclear area of oocytes, and then spread in the cytoplasm thoroughly, and mitochondrial clusters became larger, stain became deeper. Mitochondrial DNA copy number of 0, 11, 22 h were (2 519.52±940.39), (3 421.47±345.71), (9 747.58±1 928.24), respectively, and there was no significant difference ($P > 0.05$) among them. Mitochondrial DNA copy number of 33 h was (39 913.61±1 180.26), which was significantly higher than those of 0, 11, 22 h ($P < 0.05$). Mitochondrial DNA copy number of 44 h was (130 074.30±78 119.45), which was significantly higher than that of 33 h ($P < 0.05$). In con-

收稿日期: 2011-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800785); 云南省教育厅科学研究基金重点项目(0920042)

作者简介: 成文敏(1980-), 女, 山西交城人, 博士, 讲师, 主要从事动物胚胎生物技术研究

* 通讯作者: 成文敏, E-mail: cheng_8097@163.com

clusion, as the oocyte maturation process forward, mitochondrial activity enhanced and mitochondrial DNA copy number increased.

Key words: porcine oocyte; *in vitro* maturation; mitochondrial distribution; mitochondrial DNA copy number

线粒体(Mitochondrion)是存在于大多数真核生物细胞中的一种重要和独特的细胞器,其主要功能是进行氧化磷酸化,合成 ATP,为细胞生命活动提供直接能量。哺乳动物卵母细胞成熟过程中,胞质内的线粒体会经历阶段性的空间再分布^[1],因此线粒体在胞质中重新分布是胞质成熟的标志,与卵子发育潜能密切相关。线粒体中含有的线粒体 DNA(mtDNA),是独立于细胞核 DNA 之外的遗传物质,其长度约有 16.5 kb,分为编码区和非编码区,编码区共编码 37 个基因,即 22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和 13 种蛋白多肽;非编码区即线粒体基因组的控制区,包括 HV(Hypervariable region)区、D-Loop 区及复制转录区,调控 mtDNA 的复制和转录。mtDNA 完整性和拷贝数变化都可以影响呼吸链功能干扰卵子的正常成熟^[2]。目前,关于活性线粒体在不同动物卵母细胞体外成熟培养过程中分布及 mtDNA 拷贝数的相关研究已见报道,但国内在猪上的研究较少。

本试验以猪体外成熟卵母细胞为材料,运用分子探针标记技术检测体外成熟不同时期卵母细胞质中 mt 的分布变化;运用 real-time PCR 技术检测体外成熟不同时期卵母细胞质中 mtDNA 拷贝数的变化趋势,揭示线粒体分布、mtDNA 拷贝数变化与卵母细胞发育潜能的关系,使之成为判定哺乳动物卵母细胞胞质成熟的一个重要的指标,同时也为今后克隆技术的发展和相关基因表达调控的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

用于卵母细胞成熟、线粒体分子探针标记等所涉及的生化试剂除标注的外均购自 Sigma 公司。DNA Taq 酶、10×Taq buffer、dNTP 购自宝生物公司(TaKaRa)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 Mitto-Tracker Green 购自北京百泰克生物技术有限公司。配制各种液体所用的水均为经 MilliQ 过滤的超纯水。

1.2 猪卵母细胞的采集和培养

从屠宰场收集卵巢放入 37 ℃ 的生理盐水带回

实验室,用带有 18 号针头的 10 mL 注射器抽取卵巢表面 2~6 mm 卵泡中的卵丘卵母细胞复合体(COCs)。抽取的混合液注入到 37 ℃ 水浴锅中预热的 15 mL 尖底离心管中,待 COCs 自然沉降后,除去上清,用含有 0.3% BSA(Roche 公司,下同)的 TL-Hepes(Tyrode's lactate-Hepes medium)液洗涤 2 次,在体视显微镜下挑选有 3 层以上卵丘细胞包裹、胞质均一的 COCs 进行培养。培养前 COCs 用成熟培养液洗 3 次,然后放入新鲜培养滴中,每滴 100 μL 培养液中放入 25~30 枚 COCs,覆盖矿物油,在 39 ℃、5% CO₂ 的空气、饱和湿度条件下培养。培养不同时间后,用 1 mg·mL⁻¹ 的透明质酸酶吹打脱去颗粒细胞,置于 HEPES-M199 液中待用。

1.3 猪卵母细胞线粒体分子探针标记

预先将 TCM-199 在 37 ℃ 培养箱中平衡 3 h,用此培养液将线粒体荧光分子探针稀释为 12.5 μmol·L⁻¹。在 37 ℃ 条件下,卵母细胞在稀释后的分子探针中孵育 30 min 后,细胞在 4 ℃ mPBS 中漂洗 2 次,每次 5 min。最后将细胞置于载玻片上,荧光显微镜下观察。

1.4 标准品制备

参照《分子克隆实验指南》第 3 版的方法^[3]提取血液基因组 DNA,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法双重检测其纯度和浓度,稀释成 25 ng·μL⁻¹ 浓度作为 PCR 扩增的模板。根据 GenBank 上公布的标准序列(NC_000845)设计引物,构建 PCR 反应体系,特异性扩增由线粒体基因组编码的 ND1 基因(正向:CTCAACCCTAGCAGAAACCA,反向:TTAGTTGGTTCGTATCGGAATCG)。PCR 反应总体系为 50 μL,其中 DNA 模板 25 ng,10×Buffer 5 μL,dNTP 8 μL,Taq 酶 0.5 μL(5 U·μL⁻¹),上下游引物各 1 μL。反应条件为:95 ℃ 预变性 15 min;94 ℃ 变性 10 s,56 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 20 s,50 个循环;72 ℃ 延伸 7 min;4 ℃ 终止反应。PCR 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测效果。将 PCR 产物经凝胶回收试剂盒进行回收纯化,连接到质粒载体上,并进行克隆和提取重组质粒,计算出质粒 DNA 的拷贝数,作为 real-time PCR 的标准品。

1.5 猪卵母细胞线粒体 DNA 拷贝数检测

已知浓度的标准品进行一连串的稀释(100倍)。将卵母细胞置于 0.2 mL Eppendorf 离心管中,加入 20 μL 灭菌的超纯水,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下反复冻融以提取卵母细胞中的 DNA。real-time PCR 反应体积为 15 μL ,其中包含 2 μL 标准品或样品、7.5 μL ABsoluteTM QPCR SYBR[®] Green Mix、引物各 0.1 μL (50 pmol \cdot μL^{-1}),使用 AB Applied Biosystems 和其相连的软件准备好所有的 15 μL 反应体系,然后使用 AB 7500 fast real time PCR 仪进行 real-time PCR 扩增,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 激活 DNA 聚合酶;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 变性,56 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 退火,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s 延伸,40 个循环,数据由 Sybr 通道获得。标准品使用同样的引物在相同条件下检测。

在每个 real-time PCR 反应结束时执行分析,PCR 产物通过每次淬灭(1 $^{\circ}\text{C}$)进行变性,每个温度检测荧光。融化数据由 Sybr 通道获得,使用 AB 7500 fast real time PCR software (Version 2.0.1) 进行分析,每个产物出现时会出现一个峰值,样品峰值和标准品峰值出现的温度一致,且每个样品起始

模板 DNA 浓度被量化前不能出现杂峰^[4]。

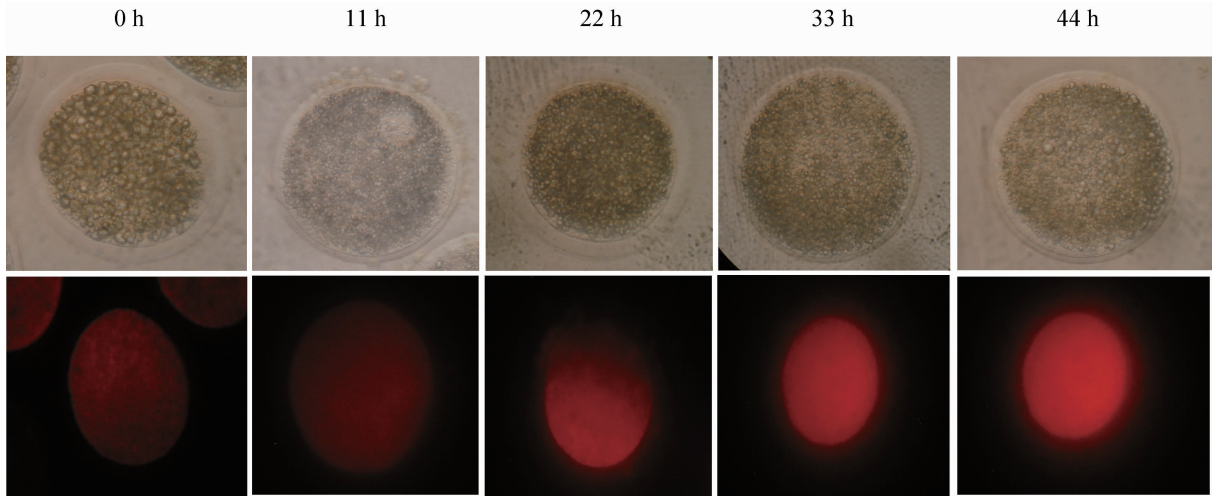
1.6 统计分析

所有数据结果用“ $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ”,数据采用 SAS8.0 统计软件中的 One-way ANOVA 进行检验, $P < 0.05$ 视为 2 个数据差异显著。

2 结果

2.1 不同成熟时期卵母细胞内线粒体分布

图 1 中,0 h 属于 GV 期,11 h 是 GVBD 期以前,22 h 属于 GVBD 发生后,33 h 属于 M I 后期,44 h 是 M II 期。可见,GV 期的卵母细胞线粒体呈周边分布,GVBD 期、M I 中期的卵母细胞呈半周边分布,M I 后期的卵母细胞线粒体基本呈均匀分布,但是线粒体簇较小,着色较浅;M II 期的卵母细胞线粒体呈均匀分布,而且细胞质中央的线粒体簇变大,着色变深。由此看出,猪卵母细胞成熟前后,线粒体分布发生了明显的变化,由未成熟的卵母细胞中以周边分布变为成熟卵母细胞中的均匀分布,并且线粒体簇变大且其自身着色变深。随着卵母细胞成熟进程的推进,线粒体活性增强。



第 1 行是显微镜明场照片,第 2 行是对应的荧光照片

The figures in the first row are the bright-field photographs in microscope, the figures in the second row are the corresponding fluorescent photographs

图 1 成熟不同时期卵母细胞线粒体分布(400 \times)

Fig. 1 Distribution of oocyte mitochondria in different periods of maturity (400 \times)

2.2 不同成熟时期卵母细胞内 mt DNA 拷贝数变化

PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,ND1 基因扩增出 254 bp 大小的片段(图 2),与预期结果相符,扩增出的条带清晰、明亮且无拖带。PCR 产物经回收后可用于制备标准品。

将制备的标准品与样品经 real-time PCR 反应

后,得到的标准曲线见图 3 所示,标准曲线斜率为 -3.335 , R^2 值为 0.983,在适宜的范围内($R^2 > 0.98$),可用于量化样本中的 mtDNA 拷贝数。

对成熟不同时期卵母细胞 mtDNA 拷贝数进行量化分析,结果见图 4,卵母细胞成熟 0、11、22 h 的 mtDNA 拷贝数分别为(2 519.52 \pm 940.39)、

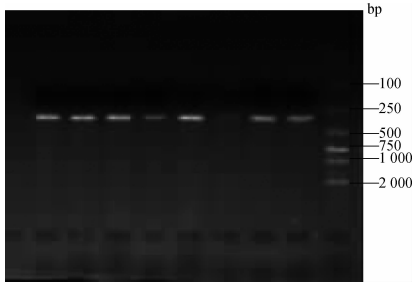


图2 常规 PCR 扩增 ND1 基因片段
Fig. 2 The PCR results of ND1 gene by 2% agarose gel electrophoresis

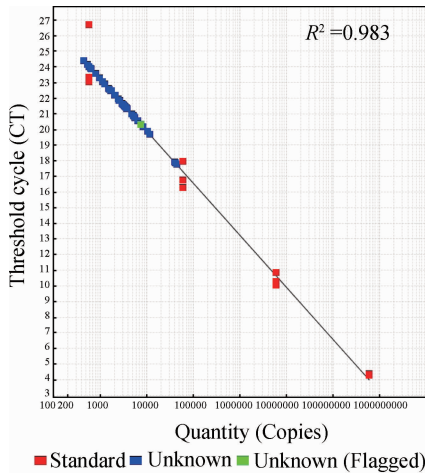


图3 用于 mtDNA 拷贝数分析的标准曲线
Fig. 3 Standard curve for mtDNA copy number analysis

($3\,421.47 \pm 345.71$)和($9\,747.58 \pm 1\,928.24$),他们之间无显著性差异($P > 0.05$)。卵母细胞成熟 33 h 的 mtDNA 拷贝数为($39\,913.61 \pm 1\,180.26$),显著高于成熟 0、11 和 22 h 的 mtDNA 拷贝数($P < 0.05$)。卵母细胞成熟 44 h 的 mtDNA 拷贝数为($130\,074.30 \pm 78\,119.45$),显著高于成熟 33 h 的 mtDNA 拷贝数($P < 0.05$)。由此可见,随着卵母细胞成熟进程的推进,mtDNA 拷贝数逐渐增加。

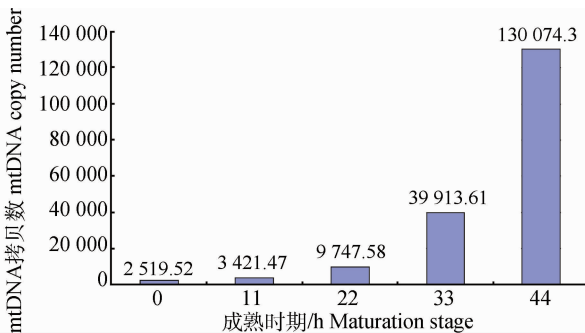


图4 卵母细胞成熟不同时期 mtDNA 拷贝数
Fig. 4 mtDNA copy number of oocyte at different maturation stage

3 讨论

3.1 线粒体分布变化

哺乳动物卵母细胞成熟过程中,胞质内的线粒体会经历阶段性的空间再分布。Stojkovic 等研究了不同形态的牛卵母细胞在体外成熟培养前后线粒体的分布变化,结果表明未成熟卵与成熟卵在线粒体分布上有显著的区别^[5]。体外成熟之前,线粒体簇较小,线粒体活性低,弥散分布于细胞质的周边;体外成熟以后,线粒体簇变大,着色变深,且在细胞质中央也有线粒体的分布。Tarazona 等也指出在未成熟牛卵母细胞中活性线粒体的含量特别低,而且分散存在,成熟的卵母细胞中活性线粒体的含量高,而且聚集在一起^[6]。Nishi 等对小鼠卵母细胞的研究认为,线粒体的核周聚集是细胞质成熟的一部分,缺乏线粒体在核周区域的聚集会导致小鼠卵母细胞成熟阻滞^[7]。Brevini 等发现线粒体在大部分未成熟卵子的细胞质中呈现周边分布,体外成熟以后,发育潜能较高的卵子的线粒体在细胞质中多呈均匀分布,但在大部分发育潜能较低的卵子中,未发生线粒体的重新分布^[8]。Hales 等指出 GV 期猪卵子中活性线粒体聚集于细胞质周边部位,IVM 16 h 左右线粒体向细胞质中央移位,GVBD 以后线粒体分布于核周区域^[9]。Velilla、汤连升等指出了山羊卵母细胞成熟过程中线粒体的迁移趋势是由外围逐步的向染色体周围聚集^[10-11]。

以上研究结果均表明线粒体在胞质中重新分布是胞质成熟的标志,与卵子发育潜能密切相关。卵母细胞成熟过程中,线粒体逐步向生发泡靠近,并且供能,促使核仁的消失和生发泡膜破裂,完成 GVBD。卵母细胞从 MI 期发育到 MII 期,为染色体分离、第一极体形成及排放的过程,也需要大量的能量。MI 期线粒体形成聚集体或成簇存在,而且还紧密的围绕在染色体的周围,这样的分布可能更有利于集中供能,为染色体的改装和分离提供保障。MI 期后卵母细胞胞质内的各种细胞器已经成熟,至 MII 期染色体线粒体的分布更加集中,几乎全部与染色体同位,这可能与受精时染色体迁移需要能量有关;而且第一极体内含有强标记线粒体,可能与卵母细胞极体排出有关。因此,线粒体准确的空间分布保证了能量供应,有助于减数分裂过程中染色体的正确分离。

本试验中采用线粒体荧光分子探针对成熟不同

时期的卵母细胞进行线粒体分布变化的观察,结果表明,猪卵母细胞在成熟前后线粒体分布发生了明显的变化,成熟 0 和 11 h 的猪卵母细胞的线粒体呈周边分布,着色很浅;GVBD 发生后卵母细胞中线粒体呈半周边分布;MI 后期的卵母细胞线粒体基本呈均匀分布,但是线粒体簇较小,着色较浅;MII 期的卵母细胞线粒体呈均匀分布,而且细胞质中央的线粒体簇变大,着色变深。此结果与前人的研究结果相一致,说明线粒体的分布主要围绕卵母细胞成熟所需能量的变化而变化分布。

3.2 线粒体 DNA 拷贝数变化

mtDNA 完整性和拷贝数变化都可以通过影响呼吸链功能从而影响卵母细胞的成熟。卵母细胞内的 mtDNA 在卵母细胞成熟过程中不断复制,卵母细胞成熟后复制停止,直到囊胚才恢复复制,保证了早期胚胎中 mtDNA 分子长度和成分的一致性^[12]。mtDNA 拷贝数是影响卵母细胞受精能力和早期胚胎发育潜能的重要因素。Santos 等对人卵母细胞进行体外受精研究,结果表明正常受精的卵母细胞内 mtDNA 平均拷贝数高于受精失败的卵母细胞和退化的卵母细胞的 mtDNA 平均拷贝数^[13]。黄睿等检测人卵母细胞和胚胎 mtDNA 4 977 bp 的缺失对体外受精效果的影响,研究结果表明卵母细胞 mtDNA 4 977 bp 的缺失与受精失败相关^[14]。Hsieh 等认为,高龄妇女卵母细胞发育潜能低可能是由于卵母细胞中完整的 mtDNA 拷贝数下降,或者 mtDNA 转录水平下降所致^[15]。

mtDNA 拷贝数的变化情况与卵母细胞成熟所需能量变化情况也是一致的。Santos 等分别对小鼠、猪、人的研究表明 mtDNA 的拷贝数可能是评价一个卵母细胞的能力指标^[13]。在卵母细胞成熟过程中,mtDNA 拷贝数越高,线粒体活性越高,卵母细胞成熟越好,受精能力越强,胚胎发育潜能越高。

本试验的研究结果表明,随着卵母细胞成熟进程的推进,mtDNA 拷贝数逐渐增加,与前人的结果相一致,说明 mtDNA 拷贝数可影响卵母细胞的发育潜能,其机制可能涉及卵的发育、受精过程及胚胎发育 3 个层面。首先,线粒体在细胞减数分裂及有丝分裂中位于纺锤体附近,并为中心体、细胞骨架、染色体活动提供能量,线粒体产生的 ATP 不足可干扰纺锤体的聚合和解聚,进而引起染色体的不分离形成非整倍体。其次,正常受精过程是耗能的过程,因此卵母细胞的 ATP 含量直接与受精率相关,

过高或过低的 ATP 含量均可引起受精的失败,因为 ATP 含量过低不能完成受精,而过高则发生多精受精。第三,在胚胎的早期发育中,合子基因组尚未激活,胚胎发育所需的能量供给及调控因子都来自母源的基因表达产物,故早期胚胎所有耗能活动主要依赖于卵母细胞所携带的线粒体提供^[16]。因此 mtDNA 拷贝数是卵母细胞成熟发育情况的重要指标。

4 结 论

4.1 采用线粒体荧光分子探针对成熟不同时期的卵母细胞进行线粒体分布变化检测,猪卵母细胞在成熟前后线粒体分布发生明显的变化,由成熟前的周边分布逐渐变化为成熟后的均匀分布,且随着成熟进程的推进,线粒体活性逐渐增强。

4.2 采用实时荧光定量 PCR 对成熟不同时期卵母细胞进行 mtDNA 拷贝数变化检测,猪卵母细胞在成熟前后 mtDNA 拷贝数发生明显变化,随着成熟进程的推进,mtDNA 拷贝数明显增加。

参考文献:

- [1] 林翠英,王世鄂.线粒体与卵母细胞和早期胚胎发育[J].解剖学研究,2008,30(5):385-389.
- [2] 陈 慧,苏迎春,孙迎璞.线粒体在卵子和早期胚胎发育中的研究[J].国外医学计划生育/生殖健康分册,2007,26(2):60-63.
- [3] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W,黄培堂.分子克隆实验指南(上册)[M].第 3 版.北京:科学出版社,2002:483-485.
- [4] SPIKINGS E C. Mitochondria DNA replication in pre-implantation embryonic development [D]. Birmingham: The University of Birmingham, 2007.
- [5] STOJKOVIC M, MACHADO S A, STOJKOVIC P, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64: 904-909.
- [6] TARAZONA A M, RODRÍGUEZ J I, RESTREPO L F, et al. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro* [J]. *Reprod Dom Anim*, 2006, 41: 5-11.
- [7] NISHI Y, TAKESHITA T, SATO K, et al. Change

- of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during *in vitro* maturation [J]. *J Nippon Med Sch*, 2003, 70: 408-415.
- [8] BREVINI T A, VASSENA R, FRANCISCI C, et al. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72: 1218-1223.
- [9] HALES K G. The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution, and emerging connections to apoptosis [J]. *Mitochondrion*, 2004, 4: 285-308.
- [10] VELILLA E, RODRÍGUEZ-GONZALEZ E, VIDAL F, et al. Mitochondrial organization in prepubertal goat oocytes during *in vitro* maturation and fertilization [J]. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73: 617-626.
- [11] 汤连升, 张磊, 高立坤, 等. 山羊卵母细胞体外成熟过程中线粒体的动态分布[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 304-307.
- [12] THUNDATHIL J, FILION F, SMITH L C. Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71: 405-413.
- [13] SANTOS T A, EI SHOURBAGY S, ST JOHN J C. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85: 584-591.
- [14] 黄睿, 舒益民, 黄敏珍, 等. 人卵母细胞和胚胎线粒体 DNA 缺失的研究[J]. 生殖与避孕, 2006, 26(2): 125-128.
- [15] HSIEH R H, AU H K, YEH T S, et al. Decreased expression of mitochondrial genes in human unfertilized oocytes and arrested embryos [J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(Suppl 1): 912-918.
- [16] HIENDLEDER S, WOLF E. The mitochondrial genome in embryo technologies [J]. *Reprod Dom Anim*, 2003, 38: 290-304.

(编辑 郭云雁)