

利用冷冻的 GV 期卵母细胞 制备延边黄牛核移植胚胎的研究

王士勇, 杨月春, 方南洙*, 李钟淑, 李福俊

(延边大学 农学院, 吉林 龙井 133400)

摘要: 研究使用玻璃化冷冻、程序化冷冻和超快速冷冻 3 种方法冷冻延边黄牛的卵母细胞, 确定适宜的延边黄牛核移植受体卵母细胞的冷冻方法。结果显示, 3 种冷冻方法处理的 GV 期卵母细胞在成熟率上相似, 玻璃化冷冻法得到的卵母细胞形态正常率要高于程序化冷冻和超快速冷冻法 ($P < 0.05$), 超快速冷冻法回收率最低。采用玻璃化冷冻法, 核移植重组胚卵裂率明显高于程序化冷冻和超快速冷冻法 ($P < 0.05$), 在融合率上, 3 种方法差异不显著。表明玻璃化冷冻方法对延边黄牛 GV 期卵母细胞冷冻效果优于程序化冷冻和超快速冷冻方法, 是一种较适合延边黄牛核移植的卵母细胞冷冻方法。

关键词: 延边黄牛; 卵母细胞; 冷冻保存; 核移植

中图分类号: S823.8⁺1; S814.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-2286(2010)02-0223-04

A Study on Preparation of Reconstructed Embryo in Yanbian Cattle Using Freezing GV Oocytes

WANG Shi-yong, YANG Yue-chun, FANG Nan-zhu*, LI Zhong-shu, LI Fu-jun

(Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China)

Abstract: In order to determine appropriate freezing method for oocyte used in nuclear transfer of Yanbian cattle, three methods were used to freeze oocyte, namely, vitrification, programmed and ultra-rapid freezing. The results showed that maturation rate of oocyte was similar in three treatment groups, morphologically normal rate of oocytes obtained from vitrification freezing method was higher than that from programmed freezing method and ultra-rapid freezing method ($P < 0.05$), and the recovery rate was lowest in the ultra-rapid freezing method. The cleavage rate of reconstructed embryo was significantly higher in the vitrification freezing method than those in the other freezing methods ($P < 0.05$), there was no significant difference in the fusion rate in three methods. It was shown that the vitrification freezing method is better than the programmed freezing and the ultra-rapid freezing method, and it is a more suitable freezing method for freezing oocyte for nuclear transfer in Yanbian cattle.

Key words: Yanbian cattle; oocyte; cryopreservation; nuclear transfer

体细胞克隆技术结合细胞冻存技术、体细胞培养等对于保护物种,特别是对珍稀、濒危物种来讲是一个福音。自 Wittingham^[1]冷冻保存小鼠卵母细胞获得活仔以来,研究者在人及家畜的卵母细胞冷冻保存方面进行了广泛探索,目前已经成功地冷冻保存小鼠^[1-2]、马^[3]、牛^[4]和人^[5]等卵母细胞。但由于牛卵母细胞体积大,水分多,低温敏感性强,冷冻后不易成活,使卵母细胞冷冻保存技术进展缓慢。目前

收稿日期: 2009-12-31 修回日期: 2010-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(30860184)和延边大学“211工程”三期建设项目

作者简介: 王士勇(1980-),男,硕士,助教,主要从事动物繁殖与生物技术研究, E-mail: shywang@ybu.edu.cn; *

通讯作者: 方南洙,教授,博士,博士生导师, E-mail: nzfang@ybu.edu.cn

最常见的冷冻方法有玻璃化冷冻方法、程序化冷冻方法、OPS法、电镜铜网法、微滴法、固体表面法和冷冻环法等^[6],其中玻璃化冷冻方法和程序化冷冻及超快速冷冻方法是使用比较普遍的 3 种方法。虽然卵母细胞冷冻的方法是借用了胚胎冷冻的方法,但其效果远远比不上胚胎冷冻的效果。牛卵母细胞冷冻保存的研究仍处于初级阶段,其有待于进一步深入。本试验将 GV 时期卵母细胞采用不同冷冻处理方法,探讨了冷冻保存效率以及其冻后的核移植后期发育能力,为建立有效的延边黄牛卵母细胞冷冻保存技术及体细胞核移植奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂与仪器 除胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司外,其它试剂均购自 Sigma 公司。主要仪器有显微操作仪(Leica, DM IRB)、拉针仪(Narishige, PN-30)、实体显微镜(Nikon, BK1000)、倒置显微镜(Nikon, TMS)、细胞融合仪(宁波新芝, CRY-3)等。

1.1.2 主要液体的配制 成熟培养液(百分数为体积分数,下同):TCM-199 + 10% FBS + 10 μ g/mL PMSG;玻璃化平衡液:TCM-199 + 200 g/L 甘油 + 0.5 mol/L 海藻糖 + 10% 乙二醇;玻璃化冷冻液:TCM-199 + 200 g/L 甘油 + 0.5 mol/L 海藻糖 + 40% 乙二醇;玻璃化解冻液:TCM-199 + 0.5 mol/L 海藻糖;程序化平衡液:TCM-199 + 20% FBS + 50 g/L 甘油;程序化冷冻液:TCM-199 + 20% FBS + 100 g/L 甘油;程序化解冻液:TCM-199 + 0.5 mol/L 蔗糖 + 0.67 mol/L 甘油;程序化解冻液:TCM-199 + 0.5 mol/L 蔗糖 + 0.33 mol/L 甘油;程序化解冻液:TCM-199 + 0.5 mol/L 蔗糖。超快速平衡液:TCM-199 + 10% 乙二醇;超快速冷冻液:TCM-199 + 25% 乙二醇;超快速解冻液:TCM-199 + 0.5 mol/L 蔗糖。

1.2 方 法

1.2.1 卵母细胞的准备 从延吉市屠宰场采集卵巢,置于含有青霉素和链霉素的生理盐水保温杯中,4~6 h 内运至实验室,用 38.5 的生理盐水冲洗干净,用 16 号针头从卵巢表面吸取 2~8 mm 卵泡中的卵泡液,收集卵丘卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COCs)。

1.2.2 供核细胞的准备 处理好的延边黄牛耳尖部组织块进行原代培养(培养基为含 15% FBS 的 DMEM),待有细胞游离出来后去掉组织。将成纤维细胞与上皮细胞系进行分离纯化,成纤维细胞进行传代培养。在注核前进行血清饥饿培养,培养好的成纤维细胞用胰蛋白酶消化,待细胞收缩变圆时,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化。将细胞吹打成悬液,吸取沉淀细胞用显微操作液洗 3 遍后放入注核操作液中以供注核。

1.2.3 冷冻及解冻方法 (1)玻璃化冷冻方法及解冻方法。将卵母细胞先用平衡液平衡 3 min,再转移到冷冻液中,三段式装管。将装好的管在液氮面上方 3 cm 处熏蒸 2 min,投入液氮中保存。解冻方法:从液氮中取出细管,在空气中停留 10 s,投入 37 温水中轻轻摇动 10 s 后,将内容物吹入玻璃化解冻液,平衡 5 min 备用。

(2)程序化冷冻方法及解冻方法。将卵母细胞在平衡液中平衡 10 min,再移入冷冻液中平衡 5 min,装管,放入胚胎冷冻仪,以 0.7 /min 从室温降至 -7 ,人工植冰,停留 5 min,再以 0.5 /min 降至 -35 ,投入液氮。解冻方法,从液氮中取出细管,在空气中停留 3~5 s,投入 37 温水中轻轻摇动 10 s 后,将内容物吹入解冻液 ,平衡 5~7 min;移入解冻液 ,平衡 5~7 min;移入解冻液 ,平衡 5~7 min,备用。

(3)超快速冷冻及解冻方法。将收集的卵母细胞先在平衡液中平衡 3 min,并将洗涤好的卵母细胞转移至冷冻液微滴中,再进行装管。然后再将装好管的卵母细胞在液氮面上方 3 cm 处熏蒸 2 min,并投入液氮。解冻方法,从液氮中取出细管,在空气中停留 10 s,投入 37 温水中轻轻摇动 10 s 后,将内容物吹入解冻液,平衡 5 min 备用。

1.2.4 体外成熟 将 3 种方法冷冻后的 GV 期卵母细胞进行解冻,回收,放入成熟培养液微滴中进行体外成熟培养,成熟培养液为 90% TCM-199 + 10% FBS + 10 μ g/mL PMSG 的制备液。

1.2.5 核移植 解冻后 GV 期的卵母细胞进行成熟培养,之后进行体细胞核移植试验。其方法同杨月春等^[7]。

1.3 统计分析

实验数据经 SPSS 14.0 进行统计、方差分析多重比较检验数据差异性,显著标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同冷冻方法对延边黄牛卵母细胞冷冻效果的影响

采用玻璃化冷冻方法得到的卵母细胞的形态正常率远高于程序化冷冻和超快速冷冻方法 ($P < 0.05$),成熟率水平上三者差异不显著,超快速冷冻方法在回收率水平上低于其它 2 种方法 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同冷冻方法对延边黄牛卵母细胞冷冻效果的影响

Tab 1 Effect of different freezing methods on freezing oocytes of Yanbian cattle

冷冻方法 Freezing method	检查的卵母细胞数 /n No. of oocytes examined	回收率 /% Rate of recovery	形态正常率 /% Rate of morphologically normal	成熟率 /% Rate of maturation
玻璃化冷冻 Vitrification Freezing	36 (6)	91.7 ±9.1a	85.0 ±7.5a	26.7 ±8.2a
程序化冷冻 Programmed freezing	36 (6)	90.4 ±8.6a	61.7 ±6.6b	23.2 ±9.5a
超快速冷冻 Ultra-rapid freezing	36 (6)	77.8 ±8.6b	67.5 ±12.5b	24.2 ±7.4a

同列肩标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Values with different superscripts within a column are significantly different ($P < 0.05$).

2.2 不同冷冻方法对延边黄牛体细胞克隆效率的影响

将解冻后的卵母细胞进行核移植试验,虽然 3 组融合率差异不显著,但是卵裂率上玻璃化冷冻法显著高于程序化冷冻和超快速冷冻方法 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同冷冻方法对延边黄牛体细胞克隆效率的影响

Tab 2 Effect of different freezing methods on efficiency of nuclear transfer in Yanbian cattle

冷冻方法 Freezing method	检查的卵母细胞数 /n No. of oocytes examined	融合率 /% Rate of fusion	卵裂率 /% Rate of cleavage
玻璃化冷冻 Vitrification Freezing	51 (9)	70.0 ±7.6a	25.6 ±18.8a
程序化冷冻 Programmed freezing	48 (9)	65.2 ±8.4a	15.7 ±15.8b
超快速冷冻 Ultra-rapid freezing	50 (9)	69.5 ±10.8a	13.9 ±12.4b

同列肩标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Values with different superscripts within a column are significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论

卵母细胞从卵巢表面卵泡中吸出之后,大多数处于 GV 期, GV 期的卵母细胞直接冷冻保存,而不经成熟培养阶段,这就大大减少了操作程序,使操作简单。试验采用了玻璃化冷冻、程序化冷冻和超快速冷冻方法 3 种冷冻方法对延边黄牛 GV 期卵母细胞进行冷冻试验。3 种冷冻方法对 GV 期卵母细胞成熟率相似,但是玻璃化冷冻方法得到的卵母细胞形态正常率要高于其它 2 种方法。在接下来的核移植实验中,采用玻璃化冷冻方法的卵裂率明显高于程序化冷冻和超快速冷冻方法,但 3 种方法的融合率差异不显著。

卵母细胞采用程序化冷冻时,细胞须经历低于 10 一段时间,这对解冻后发育潜力造成很大影响^[8]。本试验中采用该方法冷冻延边黄牛 GV 期卵母细胞,体外成熟率为 (23.2 ±9.5)%,但是卵裂率仅为 (15.7 ±15.8)%,显著低于玻璃化冷冻方法为 (25.6 ±18.8)%。另外在实验中我们观察到,程序化冷冻方法对卵丘细胞损伤比玻璃化冷冻方法严重,可能是由于玻璃化溶液在超低温下凝固成无规则的玻璃固体,保持了液态时的正常分子与离子分布,从而在细胞内发生玻璃化时能起到保护作用,减少了由于冰晶形成而造成透明带和卵母细胞质膜的损伤。采用超快速化冷冻方法,由于卵母细胞必须经历从室温直接降至 -196 的过程,极大地影响解冻后发育潜力,另外超快速冷冻法利用高浓度的冷冻

保护剂(甘油、乙二醇等),由于其膜渗透性低,会引起对细胞膜的严重渗透性损伤^[9],也是冷冻保存时致命的弱点。实验中,我们发现超快速冷冻的成熟率为(24.2 ± 7.4)%,这是因为在培养过程中加了激素 EMSG,这使得成熟率上有了提高。

玻璃化冷冻中冷冻速度是影响冷冻保存成败的关键因素之一^[10],玻璃化冷冻方法被广泛运用到牛卵母细胞冷冻保存研究中,并且获得了较为理想的效果^[11-12]。选择合适保护液对玻璃化冷冻成功十分重要。满足玻璃化的条件是溶液的粘度足够大或者是降温速率足够快。实验证明,在玻璃化溶液中添加一定量蔗糖,可以降低渗透性保护剂的用量,减弱保护剂毒性,促进溶液玻璃化效果。我们的实验结果表明玻璃化冷冻对延边黄牛卵母细胞低温保存比较适合,效果要好于程序化冷冻和超快速冷冻方法。

本研究比较了 3 种冷冻方法对牛 GV 期卵母细胞冷冻效果的影响,结果表明,玻璃化冷冻法冷冻延边黄牛 GV 期卵母细胞不论在形态正常率和核移植后期卵裂率上都优于其它两种,是适合延边黄牛 GV 期卵母细胞冷冻的方法。

参考文献:

- [1] Whittingham D G. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 degrees[J]. *Reprod Fertil*, 1977, 49(1): 89 - 94.
- [2] Wood M J, Barros C, Candy C J, et al. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethyl sulfoxide[J]. *Biol Reprod*, 1993, 49(3): 489 - 495.
- [3] Maclellan L J, Camevale EM, Coutinhodasilva M A, et al. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares[J]. *Theriogenology*, 2002, 58(5): 911 - 919.
- [4] Vieira A D, Mezzalana A, Barbieri D P, et al. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes[J]. *Cryobiology*, 2002, 45(1): 91 - 94.
- [5] Katayama K P, Stehlik J B S, Kuwayama M, et al. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy[J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(1): 223 - 224.
- [6] 彭礼繁, 罗光彬. 猪卵母细胞冷冻技术研究进展[J]. *天津农业科学*, 2008, 14(3): 27 - 29.
- [7] 杨月春, 王士勇, 李钟淑, 等. 延边黄牛体细胞克隆胚胎氧化损伤的初步研究[J]. *江西农业大学学报*, 2009, 31(6): 1069 - 1073.
- [8] 包华琼, 李跃民, 王新庄, 等. 牛 GV 期卵母细胞冷冻保存后发育潜力的研究[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(7): 77 - 78.
- [9] 刘海军. 山羊卵母细胞冷冻保存研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2000.
- [10] Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animal[J]. *Anita Reprod Sci*, 2000, 60/61: 357 - 364.
- [11] Martino A, Songsasen N, Leibo S P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling[J]. *Biol Reprod*, 1996, 54(5): 1059 - 1069.
- [12] Shinichi H, Akiyama M, Minagawa G, et al. Effect of cooling and warming rates during vitrification of in vitro matured bovine oocytes[J]. *Cryobiology*, 2001, 42(1): 69 - 73.