

化学辅助去核法对延边黄牛卵母细胞去核率及其重构胚发育率的影响

王玉涵, 朱玉霞, 尹多, 李钟淑, 方南洙*

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133000)

摘要: 为提高延边黄牛体细胞克隆的效率, 采用化学辅助去核法——化学诱导剂脱羰秋水仙碱 (Demecolcine, 简称 Deme) 处理体外成熟的 M II 期延边黄牛卵母细胞, 经显微操作构建重构胚后观察发育情况。试验研究了 Deme 的处理浓度、作用时间对延边黄牛卵母细胞去核效果及其重构胚发育的影响。结果显示: 体外成熟的卵母细胞在 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Deme 溶液中处理 45 min, 显核率与去核率无显著差异, 去核率达 100%, 但是 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组的囊胚发育率显著高于其他处理组; 45 min 处理组的显核率显著高于 30 min、60 min 处理组, 45 min 处理组的囊胚率高于其他处理组; 化学辅助去核法的囊胚率显著高于盲吸法。化学辅助去核能够准确定位去除细胞核, 并提高了延边黄牛体细胞克隆的去核率及重构胚的体外发育率。

关键词: 延边黄牛; 核移植; 脱羰秋水仙碱; 化学辅助去核

中图分类号: S823.8⁺12 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)02-0340-05

Effects of Chemically Assisted Enucleation on the Enucleation Rate of Yanbian Cattle Oocytes and the Development of their Reconstructed Embryos

WANG Yu-han, ZHU Yu-xia, YIN Duo, LI Zhong-shu, FANG Nan-zhu*

(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract: In order to enhance the efficiency of somatic cell nuclear transfer, M II oocytes of Yanbian cattle were treated by demecolcine. Nucleus of oocytes were deleted by micromanipulation. These oocytes were prepared for the nuclear transfer receptor. The effects of the concentration of demecolcine, the incubation time of oocytes in demecolcine on the enucleation rates and the development of reconstructed embryos were studied. The results showed that: There were no significant differences in the rates of cytoplasm protrusion and enucleation in vitro mature oocytes incubated in demecolcine of 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 45 min, the rate of cytoplasm enucleation was 100%, the 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group blastocyst rate was significantly higher than those of other concentrations. The group treated for 45 min had significantly higher cytoplasm protrusion rate than the groups treated for 30 min and 60 min. The group treated for 45 min had higher blastocyst rate than other groups. The blastocyst rate of chemically assisted enucleation was significantly higher than that of blind enucleation. These results demonstrated that the chemically assisted enucleation can precisely locate and

收稿日期: 2010-11-11 修回日期: 2011-01-23

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

作者简介: 王玉涵(1986—), 男, 硕士生, 主要从事动物繁殖与生物技术研究, E-mail: wangyuhan257@163.com; * 通讯作者: 方南洙, 教授, 博士生导师, E-mail: nzfang@ybu.edu.cn。

enucleate the nuclear, and enhance the enucleation rate of Yanbian cattle oocytes and the early development of reconstructed embryos in vitro.

Key words: Yanbian cattle; nuclear transfer; demecolcine; chemically assisted enucleation

体细胞核移植技术虽有着广泛的应用前景,但其效率一直很低,限制了该技术的实际应用。受体细胞的去核是影响核移植效率的一个十分重要的环节。卵母细胞去核是否完全,直接影响着整个核移植实验的结果,卵母细胞去核不完全,会直接导致重组胚染色体非正倍性,出现卵裂异常,发育受阻和胚胎早期死亡等现象^[1]。

对于大多数动物,如绵羊,山羊,牛和猪等^[2],主要通过盲吸法去除第一极体及其周围大量的细胞质来完成去核^[3],但该法由于去除的细胞质较多,因而降低了核移植重构胚的发育能力;通过激活卵母细胞去除末期卵母细胞染色体的方法也是有效的^[4],但激活后,随着卵母细胞内成熟促进因子(Maturation - Promoting Factor, MPF)活性的降低,其重编程体细胞核的能力也随之降低^[5]。

化学诱导法在小鼠、山羊、牛、猪等动物卵母细胞上进行了应用研究,化学诱导法是在卵母细胞减数分裂的过程中添加化学诱导剂,破坏纺锤体微管的功能,使得极体排除时不能与核染色体发生分离,因此与核染色体一起被排到卵周隙,以达到去核的目的,其整个去核过程不需要显微操作仪。该方法简单、易于操作,但研究发现利用不同的化学诱导剂诱导去核后,胞质支持重构胚发育的能力不同,且发育率较低,限制了该方法的广泛应用^[6-7]。在此基础上,Yin等^[8]和Tani等^[9]以猪和牛的卵母细胞为试验材料对化学诱导去核进行了改进,用化学诱导剂 Deme 处理成熟排除第一极体的卵母细胞,使卵胞质中含染色体的部分形成一个胞质突起,用以确定核所在位置,然后通过显微操作,将核及第一极体一并去除,达到去核目的,此法成为化学辅助去核法。该法由于化学诱导剂作用时间短,减少了对胞质的毒副作用,胞质去除量少,可得到较高的重构胚发育率,有望推广应用在其他动物上。

本实验是首次利用 Deme 对延边黄牛卵母细胞进行化学辅助去核,并在延边黄牛体细胞核移植上与传统的盲吸法进行对比研究,旨在为延边黄牛核移植建立一套操作简便,对卵母细胞损伤少,高效稳定的去核方法,为进一步提高延边黄牛核移植效率打下良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

除特别说明外,本实验所用药品均购自 Sigma 公司。

1.1.1 卵母细胞的来源及其体外成熟 试验所用卵巢来自延吉市屠宰场,置于 38 ℃生理盐水中,4~6 h 内运至实验室,用带有 16 号针头的注射器抽取卵巢表面 2~8 mm 的卵丘卵母细胞复合体(COCs)。沉淀 12~15 min 后,选择外有 3 层以上未扩展的卵丘细胞的 COCs,将这些 COCs 用含有 5% 胎牛血清(FBS)的 TCM199 冲卵液洗涤 3 次,放入成熟液(体积分数为 10% 胎牛血清 + 10 IU/mL PMSG + 15 IU/mL hCG 的 TCM199)小滴中,在 38.5 ℃、 $\varphi(\text{CO}_2) = 5\%$ 和最大饱和湿度的培养箱中培养 21~23 h。

1.1.2 受体卵母细胞的准备 将成熟的 COCs 置于含有 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的透明质酸酶的 PBS 中,漩涡振荡 5~6 min,去掉卵丘细胞。挑选形态正常,细胞质均匀的卵母细胞备用。

1.2 试验方法

1.2.1 卵母细胞的去核 化学辅助去核法 将成熟的卵母细胞置于添加有 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Deme 的 CR1aa 中分别处理 30 min,45 min 和 60 min,以确定其适合的处理时间。然后将成熟的卵母细胞分别置于含有 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Deme 的 CR1aa 中,以确定其最适合浓度。经处理后,挑选出卵母细胞膜上具有“包”状的突起的卵母细胞,在含有 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞松弛素(CB)的 PBS 液(CB 操作液)中通过显微操作,切开突起所在位置的透明带,将突起、极体连同附近 1/9 - 1/8 的细胞质一同挤出。去核后在培养箱中培养 60 min 后,以备注核。

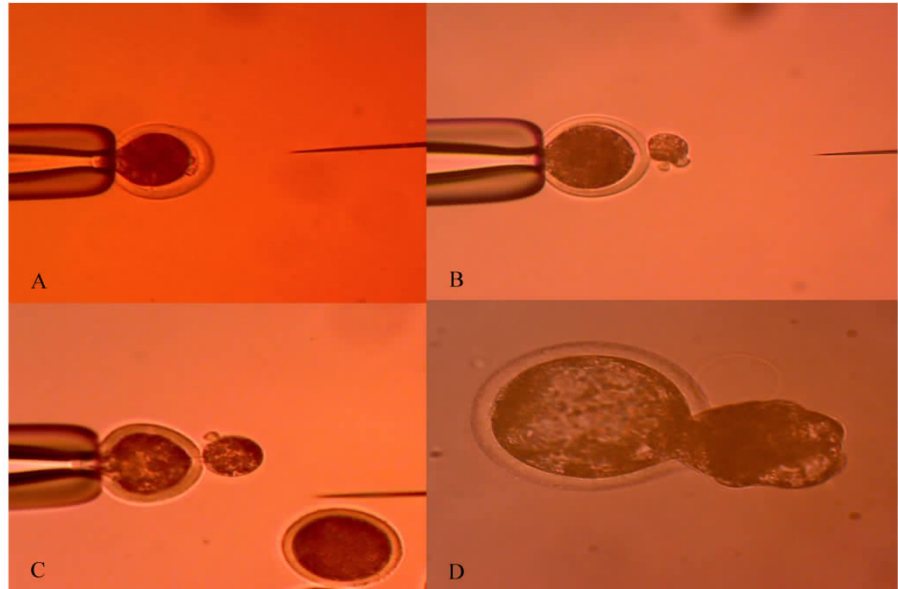
盲吸法去核:将成熟的卵母细胞分批放入 CB 液中,通过显微操作,切开极体所在位置的透明带,将极体连同附近的 1/3 - 1/4 的细胞质一同挤出。去核后在培养箱中培养 60 min 后,以备注核。

1.2.2 显核率及去核率的检测 在显微操作仪下观察用 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Deme 处

理的卵母细胞,细胞膜上出现突起的情况,并计数,以求显核率。将部分去核操作后的卵母细胞移入 H33342 染色液(含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst33342 的 CR1aa 染色液)中处理 15 min,在荧光显微镜下观察去核情况。

1.2.3 卵母细胞的注核、融合、激活以及重构胚的体外培养

将去核的卵母细胞采用透明带下注核,沿透明带的切口将供核体细胞直接注入到卵母细胞的卵周隙内。将注核后的卵母细胞在培养箱中培养 2 ~ 3 h,然后融合,使用浓度为 0.30 mmol/L



A 与 B 为化学辅助去核法在延边黄牛卵母细胞中的去核过程; C 为盲吸法去核; D 为化学辅助去核法所得囊胚。由图可以看出化学辅助去核法的细胞质去除量更少。

A and B : Process of demecolcine chemically assisted enucleation of Yanbian cattle oocytes; C: Blind Enucleation; D: Reconstructed blastocysts produced by chemically assisted enucleation. The cytoplasm removed by chemically assisted enucleation was less.

图 1 化学辅助去核法与盲吸法的对比

Fig. 1 Contrast of chemically assisted enucleation and blind enucleation

的蔗糖溶液,用间隔 1 s 的 1 100 V/cm20 μs 的 1 次电脉冲诱导体细胞和卵母细胞融合。融合后用培养液(含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FBS 的 CR1aa)洗 3 次,放入培养液小滴中培养 1 h,然后用离子霉素预激活 5 min,再放入 DMAP 培养液(2 mmol/L 6 - Dimethylamino purine, 6 - DMAP + 5% FBS + 95% CR1aa)中培养 4 h 后换 C + B 培养液(3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛血清白蛋白 BSA 的 CR1aa),培养 24 h 观察卵裂率,每 48 h 采用半量换液法更换 C + B + G 培养液(含 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, 0.03% 谷胱甘肽 GSH 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FBS 的 CR1aa)。

1.3 统计分析

试验数据以“平均数 \pm 标准差”表示,应用 SPSS11.5 软件进行比较分析,确定差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 Deme 处理浓度对化学辅助去核法去核率及重构胚发育能力的影响

体外成熟 21 ~ 23 h 的延边黄牛卵母细胞,分别用 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Deme 溶液显核处理 45 min,第一极体附近会出现包状凸起,显微操作去除第一极体,包状凸起及周围很少量的细胞质,去核率达到 100%。结果显示,0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理组的显核率最高。重组胚的后期发育中,0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组的卵裂率及囊胚率均高于其他实验组(表 1)。

表 1 Deme 处理浓度对化学辅助去核法去核率及囊胚率的影响

Tab. 1 Effects of demecolcine concentrations on the enucleation rate and blastocyst rate of oocytes by chemically assisted enucleation

Deme 处理浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Deme concentration	卵母细胞数 Oocytes	显核率 / % Protrusion rate	卵裂率 / % Cleavage rate	囊胚率 / % Blastocyst rate
0.2	71 (5)	81.61 \pm 3.05	81.83 \pm 4.65	21.38 \pm 5.27
0.3	79 (5)	83.59 \pm 3.08	80.43 \pm 7.83	19.86 \pm 2.46
0.4	79 (5)	83.34 \pm 2.96	78.47 \pm 4.51	16.68 \pm 2.49

2.2 Deme 处理时间对化学辅助去核法去核率及重构胚发育能力的影响

体外成熟 21 ~ 23 h 的延边黄牛卵母细胞, 在 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Deme 溶液中显核处理 30 min, 45 min, 60 min, 显微操作去除第一极体, 包状凸起及周围少量的细胞质, 达到去核目的。结果显示, 45 min 组的显核效果显著高于 30 min, 60 min 组, 但 30 min 组高于 60 min 组。重组胚的后期发育中, 45 min 组的卵裂率及囊胚率均显著高于其他实验组, 60 min 组的囊胚发育率最低(表 2)。

表 2 Deme 处理时间对化学辅助去核法去核率及囊胚率的影响

Tab. 2 Effects of demecolcine treatment duration on the enucleation rate and blastocyst rate of oocytes by chemically assisted enucleation

Deme 处理时间/min Deme processing time	卵母细胞数 Oocytes	显核率/% Protrusion rate	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚率/% Blastocyst rate
30	89(5)	81.99 \pm 2.80a	68.79 \pm 9.21	18.98 \pm 5.77b
45	81(5)	84.89 \pm 2.55b	76.12 \pm 8.01	19.04 \pm 3.75b
60	85(5)	80.07 \pm 1.80a	67.18 \pm 5.95	10.91 \pm 6.45a

同列不同肩标字母之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Within columns, values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

2.3 两种去核方法对核移植重组胚体外发育率的影响

两种去核方法得到了相似的卵裂率和囊胚率, 化学辅助去核法的卵裂率与囊胚率均高于盲吸法(表 3)。

表 3 盲吸法与化学辅助法对囊胚率的影响

Tab. 3 Effects of blastocyst rate by chemically assisted enucleation and blind enucleation

去核方法 Methods of enucleation	卵母细胞数/% Oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚率/% Blastocyst rate
盲吸法	74(5)	74.67 \pm 3.14B	14.05 \pm 3.32
化学辅助法	79(5)	83.34 \pm 2.38A	20.35 \pm 5.51

同列不同肩标字母之间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different big letters in the same columns was significant difference obviously ($P < 0.01$).

3 讨论与结论

研究表明, 辅助去核实验组的重构胚的后期发育至囊胚的能力均高于对照组——盲吸法。目前研究普遍采用的去核方法是盲吸去核法^[9-12], 盲吸法去核, 是利用 MII 期卵母细胞作为受体, 以第一极体为标志引导去除第一极体及其周围大量的细胞质来完成去核。通常第一极体随着卵龄的增加, 第一极体通常会发生漂移或者分裂, 这样就不能准确地确定细胞核的位置, 使得去核率降低^[13-14]。影响去核效率高低的另一个因素就是去核操作过程中细胞质去除数量的多少。通常在同一条件下, 细胞质去除的数量越多, 其去核成功率也越高; 细胞质去除数量越少, 其去核成功率就越低。显微机械操作去核过程中会损失部分的细胞质, 一般 5% ~ 50%, 减少细胞质的损失将提高核移植重组胚的囊胚发育率^[15-16]。

化学辅助去核法, 利用脱羧秋水仙处理成熟排除第一极体的卵母细胞, 使卵胞质中含染色体的部分形成一个胞质突起, 用以确定核所在位置, 然后通过显微操作, 将核及第一极体一并去除, 达到去核目的, 这样就增大了去核时对核的准确定位, 减少了胞质的去除量, 提高了去核效率, 同时脱羧秋水仙碱处理使胞质内 MPF 活性升高^[17], 增大了对体细胞核移植重组胚后期发育的支持, 提高体细胞克隆的效率。试验还发现, 在 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度中处理 60 min 的囊胚发育率低于盲吸法, 可能是 Deme 处理时间过长, Deme 对卵母细胞毒副作用过大造成。

本实验通过对 Deme 处理浓度、处理时间对延边黄牛卵母细胞辅助去核的影响的研究发现, 将 Deme 的使用浓度低至 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、作用时间控制在 45 min, 能够达到很好的去核效果, 同时减少了

Deme 的毒副作用及对重构胚后期发育的不利影响,明显提高了延边黄牛卵母细胞的核移植效率,有望得到进一步地深入研究及应用。

参考文献:

- [1] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 369-374.
- [2] Li G P, White K L, Bunch T D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: State of the art [J]. *Clonig Stem Cells*, 2004, 6(1): 5-13.
- [3] Tsunoda Y, Kato Y. The recent progress on nuclear transfer in mammals [J]. *Zool Sci*, 2000, 17(9): 1177-1184.
- [4] Bordignon V, Smith L C. Telophase enucleation: An improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49(1): 29-36.
- [5] Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64(1): 324-330.
- [6] Elsheikh A S, Takahashi Y, Hishinuma M, et al. Developmental ability of mouse late 2-cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes in vitro [J]. *J Vet Med Sci*, 1997, 59(2): 107-113.
- [7] Elsheikh A S, Takahashi Y, Katagiri S, et al. Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide [J]. *Jpn J Vet Res*, 1998, 45(4): 217-220.
- [8] Yin X J, Tani T, Yonemura I, et al. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(2): 442-446.
- [9] 潘晓燕, 杨梅, 张寒莹, 等. 盘羊供体细胞对异种核移植效率的影响 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(9): 2798-2805.
- [10] 吴克良, 时永香, 白增亮, 等. 用改进的细胞核移植方法构建重构胚 [J]. *生物工程学报*, 2007, 23(1): 161-165.
- [11] 张林, 华松, 张涌, 等. 牛-牛及山羊-牛克隆胚胎体外培养条件的优化 [J]. *生物工程学报*, 2007, 23(4): 662-666.
- [12] Critser E S, First N L. Use of a fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos [J]. *Stain Technol*, 1986, 61(1): 1-5.
- [13] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult [J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2095-2098.
- [14] Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, et al. Adult cloning in cattle: Potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54(3): 264-272.
- [15] Zakhartchenko V, Stojkovic M, Brem G, et al. Karyoplast-cytoplasm volume ratio in bovine nuclear transfer embryos: effect on developmental potential [J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 48(3): 332-338.
- [16] Tecirlioglu R T, Cooney M A, Lewis I M, et al. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2005, 17(5): 573-585.
- [17] Tani T, Shimada H, Kato Y, et al. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning [J]. *Cloning Stem Cells*, 2006, 8(1): 61-66.