

脱羧秋水仙碱(DM)辅助去牛卵母细胞核的研究

李向臣¹, 吴月红¹, 马毅², 山灵¹, 张涌^{1*}

(1. 西北农林科技大学生物工程研究所, 杨凌 712100;

2. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112)

摘要: 受体细胞去核是核移植关键步骤之一。利用脱羧秋水仙碱(Demecolcine, DM)显示牛卵母细胞染色体的位置进行去核, 主要从以下几个方面进行了试验: 卵母细胞在 DM 中孵育浓度、卵母细胞在 DM 中孵育时间及卵母细胞成熟时间对显示效果的影响。结果表明: (1) 成熟牛卵母细胞用离子霉素激活 5 min, DM 孵育 2 h 完全诱导去核, 结果没有见到完全去核的卵母细胞; (2) 挑选有第一极体的成熟牛卵母细胞, 在浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DM 中孵育 2 h 显示率可达 76.54%; (3) 牛卵母细胞在成熟 18 h 可以获得 73.86% 的显示效果。 (4) 在没有去卵丘细胞的卵母细胞中添加 DM 取得了更好的显示效果(80.82%), 囊胚的发育率也较其它组高, 可达 18.60%, 说明未去卵丘细胞的卵母细胞添加 DM 更有利于显示染色体的位置, 而且更有利于囊胚的发育。利用 DM 显示染色体的位置不仅可以高效快速的去核, 同时也避免了传统去核时荧光对卵母细胞的照射。

关键词: 牛; 显示去核; 脱羧秋水仙碱(Demecolcine, DM); 核移植; 卵母细胞

中图分类号: S823.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)06-0537-05

Demecolcine Assisted Enucleation of Bovine Oocyte

LI Xiang-chen¹, WU Yue-hong¹, MA Yi², SHAN Ling¹, ZHANG Yong^{1*}

(1. *Institution of Bio-Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;*

2. *Tianjin Institute of Animal Science and Veterinary, Tianjin 300112, China*)

Abstract: Enucleating is one of the most important protocols for successive nuclear transfer. In this experiment the location of bovine oocyte chromosome was displayed with Demecolcine(DM) to enucleate. It focuses on the influence of the concentration of DM handling oocytes, the time of oocytes incubating in DM, and oocytes maturation time on displaying effect. The result showed that ①Matured bovine oocytes were activated with ionomycin for 5 minutes, and incubated in DM for 2 h to enucleate completely, but no oocyte was completely enucleated. ②Matured bovine oocytes with first polar incubating in DM(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 h, the displaying rate is 76.54%. ③Bovine oocytes matured for 18 h, the displaying rate is 73.86%. ④The displaying efficiency would be better(80.82%) while adding DM to cumulus cells-oocyte, and development rate of blastula (18.60%) was higher than that of other groups. It indicates that adding DM to cumulus cell-oocyte is good to show the position of chromosome, and good to blastula development. Displaying chromosome position with DM can not only enucleate fast and effectively, but avoid fluorescence illumination on oocyte while using traditional enucleating methods.

Key words: bovine; displayed enucleation; Demecolcine; nuclear transfer; oocyte

1997 年 Dolly 的诞生揭开了哺乳动物体细胞核 移植的序幕, 该技术在绵羊、小鼠、牛、猪、猫等很多

动物上都获得了成功。核移植的方法主要有：“Dolly方法”，这一方法是在胚胎克隆方法的基础上进行改进，用血清饥饿恢复体细胞的全能性，电融合使供体细胞与受体卵母细胞进行融合；火奴鲁鲁方法，这一方法是火奴鲁鲁夏威夷大学的 Wakayama 等^[1] 1998 年对 Dolly 路线做了改进，使它更适宜于小鼠体细胞核移植，即火奴鲁鲁方法，它是应用 PIEZO—显微操作仪来完成去核和注核过程，注核时直接将供体细胞注入去核卵母细胞胞质中，不需电融合这一过程。不论采用什么核移植方法去核过程多采用盲吸法，即用去核管吸出极体及极体附近部分细胞质来去核，通过荧光染料 Hoechst-33342 染色，在荧光显微镜下确定染色体的位置，然后去除染色体及尽量少的细胞质，检查确证去核后的卵母细胞用于核移植；或者先去除极体及周围部分细胞质，再在荧光显微镜下检查去核情况，确证去核的卵母细胞用于核移植^[2]。上述去核方法过程均由物理方法完成，这是目前制备克隆动物普遍采用的方法。这样的去核方法为了验证是否已经将染色体完全去除，要将卵母细胞置于荧光显微镜下检验去核是否完全，同时为了去核效率高吸出的胞质也比较多。对卵母细胞的利用率很有限，同时过多的吸出胞质不利于重组胚的发育。本试验利用 DM 显示染色体的位置进行去核，使去核的效率更高、更准确，减少操作时间。

1 材料和方法

1.1 材料

从西安屠宰场采集的牛卵巢置于 25~35℃ 生理盐水中，3~5 h 内运回实验室。试剂除特别说明均购自 Sigma 公司，荧光显微镜 (Nikon Eclipse TE300)。

1.2 卵母细胞体外成熟

用灭菌的生理盐水洗涤卵巢 2~3 次，抽吸法取卵母细胞，用 12# 针头抽取直径为 2~8 mm 卵泡的卵泡液，PBS 缓冲液稀释，在体视显微镜下，收集形态正常和结构完整的 A、B 级卵母细胞，用平衡 2 h 以上的卵母细胞成熟液洗两次后用于成熟培养，培养条件为：38.5℃，5% CO₂ 和饱和湿度。卵母细胞成熟培养液组成为 M199 9.5 g/L，Hepes 10 mol/L，丙酮酸钠 1 mol/L，L-谷氨酰胺 2.5 mol/L，HMG 0.075 U/mL (Serono)，17β-E₂ 1 μg/mL，10% (v/v) FBS (Gibico)，成熟培养。之后置于含 0.1% (v/v) 透明质酸酶的无 Ca²⁺，Mg²⁺ 的 PBS 中，用吸管反复吹打去掉卵母细胞表面的颗粒细胞，检查成熟率。胚胎培养。

1.3 试验设计

所有的试验均是选择成熟有第一极体的卵母细胞进行。

诱导去核：诱导去核是在激活 5 min 后放入不同浓度含 DM 的 SOF 培养液并置于 38.5℃，5% CO₂ 的培养箱中孵育 0.5~2 h，再经 5 μg/mL Hoechst33342 染色 10 min，在紫外光照射下检查去核情况。

显示去核：是在成熟不同时间的牛卵母细胞中添加不同浓度的 DM 处理，在显微镜下见到卵母细胞膜上类似“芽孢”样的突起，利用显微操作仪将其吸出，Hoechst33342 染色检查去核率。同时也在成熟培养液中培养不同时间没有去除颗粒细胞的卵母细胞中添加 DM 进行试验。

1.4 数据分析

所有试验重复 3 次以上，试验数据用 χ^2 进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 诱导去核

表 1 DM 浓度对诱导去核的影响

Table 1 DM density influences to induced enucleation

DM /(μg/mL)	卵母细胞数/枚 No. of oocytes	去核率/% Rate of enucleation	重组胚数/枚 No. of recombined embryos	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚发育率/% Rate of blastocysts
0	79	—	—	—	—
0.4	67	—	—	—	—
0.5	86	—	—	—	—
0.6	93	—	—	—	—

同一列中标注不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)；— 表示没有测得，下表同

Figures with different letters in the same column show significant difference, $P < 0.05$, The following tables are the same

表 2 DM 孵育时间对诱导去核的影响

Table 2 Influence on revealing enucleation of DM incubation time

时间/h	卵母细胞数/枚	去核率/%	重组胚数/枚	卵裂率/%	囊胚发育率/%
Time	No. of oocytes	Rate of enucleation	No. of recombined embryos	Rate of cleavage	Rate of blastocysts
0.5	68	—	—	—	—
1	96	—	—	—	—
1.5	82	—	—	—	—
2	56	—	—	—	—

试验对体外成熟 20 h 的牛卵母细胞进行了去核研究,首先用 0.1% 透明质酸酶去除颗粒细胞,挑选成熟有第一极体的牛卵母细胞,用离子霉素激活 5 min,放入添加 0、0.4、0.5、0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DM 的 SOF 培养液中孵育 1.5 h 诱导去核,同时也对激活后在 DM 中孵育时间上进行了比较研究,无论是以上 3 种浓度中的任何一种未见到能完全诱导将牛卵母细胞核去除的;将牛卵母细胞即使有第二极体的排出也没有见到完全去核的卵母细胞。

2.2 显示去核

加入 DM 之后都均能使牛成熟卵母细胞染色

体以一种类似“芽孢”样的方式凸出于卵母细胞的胞膜上,极大的提高了卵母细胞的去核效率。本试验参照国内外化学诱导去核的浓度,对诱导显示去核的浓度进行了试验,比较了 0.4、0.5、0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DM,与对照组相比,均有极显著差异($P < 0.01$),而在这 3 组试验中以 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DM 较优,与其他两组相比有显著差异($P < 0.05$)。对重组胚的卵裂率及囊胚发育率的数据分析表明,以显示的卵母细胞去核作为受体细胞,3 组试验之间差异不显著($P > 0.05$)。

表 3 DM 浓度对显示去核的影响

Table 3 DM density influences to reveal enucleation

DM	卵母细胞数/枚	显示率/%	重组胚数/枚	卵裂率/%	囊胚发育率/%
/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	No. of oocytes	Maturation rate	No. of recombined embryos	Rate of cleavage	Rate of blastocysts
0	67	0.04 ^a (3/67)	—	—	—
0.4	66	54.54 ^b (36/66)	32	78.13 ^a (25/32)	12.00 ^a (3/25)
0.5	84	61.90 ^c (52/84)	48	79.17 ^a (38/48)	13.16 ^a (5/38)
0.6	78	44.87 ^b (35/78)	33	78.79 ^a (26/33)	11.54 ^a (5/26)

表 4 DM 作用时间对显示去核的影响

Table 4 Influence on revealing enucleation of DM function time

时间/h	卵母细胞数/枚	显示率/%	重组胚数/枚	卵裂率/%	囊胚发育率/%
Time	No. of oocytes	Maturation rate	No. of recombined embryos	Rate of cleavage	Rate of blastocysts
0	56	0.05 ^a (3/56)	—	—	—
0.5	74	56.76 ^b (42/74)	40	82.50 ^a (33/40)	9.09 ^b (3/33)
1	49	67.34 ^b (33/67)	33	78.79 ^a (26/33)	7.69 ^b (2/26)
2	81	76.54 ^c (62/81)	61	77.05 ^a (47/61)	6.82 ^b (4/44)

成熟牛卵母细胞在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DM 中的孵育时间对显示染色体的显示效率有一定的影响。牛成熟卵母细胞在 DM 中分别孵育 0.5、1、2 h,以孵育 2 h 的显示效率最高(76.54%),与 0.5、1 h 相比差异显著($P < 0.05$)。

卵母细胞的成熟程度对胚胎的发育有一定的影

响,故本试验设计了在牛卵母细胞不同成熟时间来添加 DM,以期获得更高的显示效率,更高效地利用卵母细胞。试验分别对成熟 14、16、18、20 h 的牛卵母细胞利用透明质酸酶去除颗粒细胞,添加 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DM 孵育 2 h,比较显示率,结果表明,成熟 18 h 组极显著的高于 14 h 和 16 h 组($P < 0.01$),

与 20 h 成熟组相比没有显著的差异。说明在成熟 18 h 后添加 DM 较好,有利于显示去核的效率,卵裂率相比,18 h 成熟组要显著高于 14 h 组和 16 h

组($P < 0.05$),这与卵母细胞的成熟程度有一定的关系。此时的卵母细胞没有完全达到胞质的成熟,不利于胚胎的发育。

表 5 卵母细胞成熟时间对显示去核的影响

Table 5 Oocyte maturation time influence on revealing enucleation

卵母细胞成熟时间/h	卵母细胞数/枚 No. of oocytes	显示率/% Maturation rate	重组胚数/枚 No. of recombined embryos	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚发育率/% Rate of blastocysts
14	18	11.11 ^a (2/18)	7	14.29 ^a (1/7)	—
16	45	33.33 ^b (15/45)	14	50.00 ^b (7/14)	—
18	88	73.86 ^c (65/88)	65	89.23 ^c (58/65)	13.79 ^a (8/58)
20	75	65.33 ^c (49/75)	48	81.25 ^c (39/48)	10.26 ^a (4/39)

表 6 未去颗粒细胞添加 DM 的时间对显示去核的影响

Table 6 Granular cell existence and add DM influence on revealing enucleation

时间/h	卵母细胞数/枚 No. of oocytes	显示率/% Maturation rate	重组胚数/枚 No. of recombined embryos	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚发育率/% Rate of blastocysts
12	15	0.13 ^a (2/15)	—	—	—
14	42	42.86 ^b (18/42)	18	55.56 ^a (10/18)	—
16	86	73.26 ^c (63/86)	54	68.52 ^b (37/54)	13.33 ^a (5/37)
18	73	80.82 ^c (59/73)	50	86.00 ^c (43/50)	18.60 ^a (8/43)

本试验在成熟的时候就添加 DM,此时并没有去除颗粒细胞,继续成熟,成熟 20 h 后去除颗粒细胞,检查显示率、卵裂率及囊胚发育率。数据统计分析说明,在成熟 18 h 后添加 DM 既能提高其显示去核的效率同时与其他组相比也对囊胚发育率有所提高,18 h 组、16 h 组与 14 h 组相比差异显著;18 h 组在卵裂率上也显著高于其他组,同时在囊胚发育率上也比较高,尽管与 16 h 组相比差异不显著($P > 0.05$)。说明在不去除颗粒细胞时添加 DM 来显示卵母细胞染色体的位置比在成熟 18 h 以前添加好,同时也有利于囊胚的发育。

3 讨论

卵母细胞的去核是核移植研究中重要的一步,卵母细胞的完全去核是保证核移植胚胎正常发育的先决条件,其去核效率的高低,直接影响重组胚的发育。高效、快速准确的去核也能更好、更有效的利用卵母细胞。因此,很多科研工作者对卵母细胞的去核进行了广泛的研究,目前的克隆方法中更多的是采用盲吸去核法,但是这一方法不仅对卵母细胞体外成熟时间有所要求,而且随卵母细胞体外成熟时间的延长其去核率也逐渐下降^[3]。去核效率低,而

且对卵母细胞的利用率也很差,同时去核之后还要用 Hoechst33342 染色,Hoechst33342 可以特异性地结合在 DNA 的腺嘌呤和胸腺嘧啶上,哺乳动物的卵母细胞或早期胚胎用它染色后,在荧光显微镜 UV 光的激发下可以发出荧光,故可以清楚地显示出染色体的位置,但过高浓度的染料以及常时间暴露于 UV 光下会影响卵母细胞及胚胎的发育^[4]。Gasparrini 等^[5]采用 Demecolcine 诱导去核法,获得了克隆小鼠,说明化学去核卵母细胞质同样支持供体基因组的重编程和胚胎发育满期的能力,但是其效率很低。受到利用 DM 诱导去核的启发,很多实验室也相继利用 DM 诱导其他哺乳动物去核的研究,如山羊、牛、小鼠^[6~8]等。Russell 等^[8]利用 Demecolcine 对成熟牛卵母细胞诱导去核的研究,证实了 Demecolcine 也能对牛卵母细胞诱导去核。本试验也对牛卵母细胞进行了诱导去核研究,未见到诱导现象的产生,可能与各个试验室的试验条件不同有关。笔者认为:诱导去核进行的激活处理,使卵母细胞进入 T 期而不是 M II 期。胞质中的成熟促进因子(MPF)在 M 期卵母细胞中活性最高,它能影响供体核染色体的结构和 DNA 的复制。Campbell^[9]认为供核暴露在受体胞质 MPF 活性高的环

境中,可促进染色质的凝集,这将加速胞质中有关因子与核的交换,可以改善随后的发育。这可能也是化学诱导去核在其它哺乳动物里很少成功的原因之一。

本试验利用脱羧秋水仙碱显示染色体的位置,可以借助显微操作仪准确的去除细胞内的遗传物质,首先进行了去除颗粒细胞,选择有第一极体的牛卵母细胞进行研究,结果表明在 SOF 培养液中添加 $0.5 \mu\text{g/mL}$ DM 孵育 2 h 显示染色体的显示率高达 76.54%,可以很有效的利用操作仪进行完全去核。同时又进行了不去卵丘细胞的显示研究,目的是卵母细胞可以在有颗粒细胞包裹的情况下继续成熟, Li 等^[10]研究证实,颗粒细胞的存在与贴壁生长不仅有助于卵母细胞的体外成熟和受精,而且对后来的发育也有重要的作用。因此本试验在牛卵母细胞成熟 18 h 时添加 DM,待成熟 20 h 去颗粒细胞不但可以得到很高的显示率,同时囊胚的发育率也较去卵丘细胞在 DM 中孵育 2 h 的高(分别为 18.60% 和 10.26%),说明完全可以在没有去颗粒细胞且正成熟的卵母细胞中添加 DM,获得更高的发育率。

显微操作作为传统的核移植方法,也在逐步的改进和完善中,逐步简化试验方法,本试验通过卵母细胞在 DM 中的孵育可以大大提高去核效率,并使重组胚的发育率得到进一步的提高。

参考文献:

[1] Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature*, 1998, 394: 369~374.

[2] Westhusin M E, Levanduski M J, Scarborough R, *et al.* Viable embryos and normal calves after nuclear

transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows[J]. *J Reprod Fertil*, 1992, 95(2): 475~480.

- [3] Takano H, Koyama K, Kozai C, *et al.* Effect of aging of recipient oocytes on the development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro* [J]. *Theriogenology*, 1993, 39: 909~917.
- [4] Critser E S, First N L. Use of a fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos[J]. *Stain Technology*, 1986, 61: 1~5.
- [5] Gasparini B, Gao S, Ainslie A, *et al.* Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 1 259~1 266.
- [6] Ficsher D, Ibanez E, Albertini D F, *et al.* Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos *in vitro* [J]. *Biol Reprod Dev*, 2005, 72: 161~170.
- [7] Ibanez E, Albertini D F, Overstrom E W. Demecolcine induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interrections, and second polar body extrusion[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 1 249~1 258.
- [8] Russell D F, Ibanez E, Albertini D F, *et al.* Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos *in vitro* [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 72(2): 161~170.
- [9] Campbell K H S. Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle[J]. *Cloning*, 1999, 1(1): 3~15.
- [10] Li R, Norman R J, Armstrong D T, *et al.* Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63: 839~845.