



滩羊卵母细胞体外成熟和孤雌激活试验

杨文琳¹, 许斌¹, 李冉², 张秀陶¹, 李生虎¹

(1 宁夏职业技术学院, 宁夏银川 750021; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为建立滩羊卵母细胞体外成熟和孤雌激活培养体系, 对离体卵巢来源的滩羊卵母细胞进行体外成熟培养, 并用化学激活法进行孤雌激活。结果显示: 滩羊离体卵巢平均得卵数为 3.07 枚, 卵母细胞成熟率为 54.78%, 卵裂率为 61.92%, 囊胚率为 17.72%, 试验各重复之间差异不显著 ($P > 0.05$)。研究认为, 本试验建立的培养体系较稳定, 适合滩羊卵母细胞体外成熟培养, 为体外受精卵和克隆胚生产奠定实验基础。

关键词: 滩羊; 卵母细胞; 体外成熟培养; 产业发展

[中图分类号] S813.2 [文献标志码] A [文章编号] 1004-6704(2024)-06-0029-05

In Vitro Maturation and Parthenogenetic Activation Test of Tan Sheep Oocytes

YANG Wenlin¹, XU Bin¹, LI Ran², ZHANG Xiutao¹, LI Shenghu¹

(1. Ningxia Polytechnic, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To establish an in vitro maturation and parthenogenetic activation culture system for Tan sheep oocytes, Tan sheep oocytes derived from ex vivo ovaries were subjected to in vitro maturation culture and parthenogenetic activation was performed using chemical activation method. The results showed that the average number of eggs obtained from detached ovaries of Tan sheep was 3.07, the maturation rate of oocytes was 54.78%, the cleavage rate was 61.92%, and the blastocyst rate was 17.72%. There was no significant difference between the replicates of the experiment ($P > 0.05$). In summary, the culture system established in this experiment is relatively stable and suitable for the in vitro maturation culture of Tan sheep oocytes, laying a laboratory foundation for the production of in vitro fertilized embryos and cloned embryos.

Key words: Tan sheep; oocytes; in vitro maturation culture; industrial development

滩羊是我国特有的地方良种绵羊, 主要分布于宁夏平原。滩羊抗逆性强, 肉裘兼用, 肉质细嫩, 味道鲜美, 凭借优良的肉质入选 G20 杭州峰会国宴食材, 也因此获中国国际农产品交易会金奖。滩羊皮毛颜色洁白细润, 毛穗自然成绺, 驰名中外^[1-2]。滩羊产业在地方经济发展中占据举足轻重的地位。2022 年宁夏提出“六新六特六优”产业振兴战略, 推动农业高质高效发展, 滩羊产业是“六特”产业之一。滩羊为单胎动物, 繁殖力低, 生长发育速度缓慢^[3], 这一特性对滩羊产业的规模化、产业化发展有所制

约。加强饲养管理、提升营养水平可以增加产肉量, 从种质资源保护、繁殖育种方面改善滩羊生产性能才是解决问题的根本策略, 如培育快长型和多胎型滩羊, 生产体外受精胚胎, 克隆优良个体等, 这些方法都需要从胚胎工程技术着手。因此, 滩羊卵母细胞体外成熟培养成了首要问题。本研究尝试对滩羊卵母细胞进行体外成熟培养, 并孤雌激活观察卵裂情况, 为滩羊体外胚胎生产研究奠定技术基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

滩羊卵巢采自银川市某屠宰场, 新鲜屠宰的母羊开膛后用灭菌手术剪从卵巢系带上剪下, 置于盛

有双抗盐水的保温瓶保存,保存温度 22~30 °C,4 h 内运回实验室。

1.2 主要试剂

TCM-199、胰岛素-转铁蛋白-硒 (ITS) (Gibco 公司);新生牛血清 (NBS) (Hyclone 公司)、胎牛血清 (FBS) (Hyclone 公司);人尿促性激素 (HMG) (丽珠制药有限公司);谷胺酰胺、丙酮酸钠 (Amersco 公司);4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、雌激素 (17 β -E₂)、表皮生长因子 (EGF)、尿嘧啶 (Uracil)、牛血清白蛋白 (BSA)、肝素钠、透明质酸酶、6-二甲氨基嘌呤 (6-DMAP)、离子霉素 (Ionomycin)、矿物油 (Sigma 公司);青霉素 (哈尔滨制药六厂);链霉素 (华北制药股份有限公司);卵裂培养基、囊胚培养基 (Sage 公司);生理盐水 (自配);磷酸盐缓冲液 PBS (自配)。

1.3 溶液配制

洗卵液:90 mL PBS + 10 mL NBS + 1 mL HEPES + 50 IU 肝素钠,0.22 μ m 孔径滤器过滤,4 °C 冰箱冷藏保存,用时提前 2 h 置于培养箱进行孵育平衡。

成熟培养液^[4]:TCM-199 + 10% BSA + 2.5 μ g/mL 丙酮酸钠 + 2 mmol/L 谷胺酰胺 + 50 μ L/mL ITS + 0.1 IU/mL HMG + 1 μ g/mL E₂ + 10 ng/mL EGF,现用现配,用时提前 2 h 加入培养皿,并置于培养箱进行孵育平衡。

操作液:TCM-199 + 10% FBS,现用现配,用时提前 2 h 置于培养箱进行孵育平衡。

2 试验方法

2.1 卵母细胞培养

卵巢运回实验室后剪去卵巢系带,用含青链霉素的生理盐水清洗 3 遍,将清洗处理后的卵巢夹入盛放有洗卵液的 60 mm 培养皿中,每皿约 20 个卵巢,用手术刀片剖割直径 2~6 mm 的卵泡,使卵母细胞随卵泡液流入洗卵液,然后在体视显微镜下挑选并收集有三层以上卵丘细胞-卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complexes, COCs),将挑选的 COCs 用孵育好的成熟培养液中清洗 3 遍,最后将 COCs 放入成熟培养液中,每皿放入 50~60 枚 COCs,培养箱培养条件为 38.5 °C、5% CO₂ 和饱和湿度,COCs 放入培养箱时记为 0 h,成熟培养时间为 24 h。

2.2 成熟卵母细胞挑选

COCs 经过 24 h 成熟培养后移入透明质酸酶中消化 5 min 后,用移液器轻轻吹打以使卵丘细胞

与卵母细胞充分分离,挑出卵母细胞至操作液中,用操作液清洗 3 次后在体视显微镜下挑出成熟卵母细胞至新鲜操作液继续培养,以卵周隙内带有第一极体作为卵母细胞成熟的依据。

2.3 成熟卵母细胞的孤雌激活

将成熟的卵母细胞在培养至 28 h 时孤雌激活,将离子霉素加入操作液中配制成浓度为 5 μ mol/L 激活液,将卵母细胞移入激活液,避光作用 5 min,用操作液洗 3 遍后移入含 2.5 mmol/L 6-DMAP 的操作液中处理 4 h。

2.4 孤雌激活胚胎的培养

将卵裂培养基在 35 mm 培养皿中滴成多个 30 μ L 的微滴,用矿物油覆盖对培养基微滴进行固定制成微滴培养基,培养箱中提前孵育 2 h。卵母细胞在 6-DMAP 中作用完毕后用卵裂培养基清洗 3 次,然后移入孵育好的微滴培养基进行培养,每个微滴放入 10 枚左右的孤雌激活胚胎,培养 72 h 后观察和统计卵裂情况。以同样的方法制作微滴囊培养基,挑出卵裂的孤雌胚胎移入微滴囊培养基,在其中培养 96 h 观察和统计囊胚发育情况。

2.5 数据统计与计算

得卵数(枚):采卵时计数采卵的卵巢个数,采卵后计数获得的 COCs 枚数。

得卵数 = COCs 数 / 卵巢数

成熟率(%):对成熟卵母细胞计数作为分子,成熟与未成熟卵母细胞的和作为分母,其比值作为成熟率。

成熟率 = 成熟卵母细胞数 / (成熟卵母细胞数 + 未成熟卵母细胞数) \times 100%

死卵以及成熟卵母细胞、卵丘细胞未能脱净造成成熟情况无法判断的卵母细胞弃之不用,也不进行计数。

卵裂率 = 卵裂的孤雌胚胎数 / (卵裂的孤雌胚胎数 + 未卵裂的孤雌胚胎数);其中卵裂培养过程中的死胚不进行计数。

囊胚率 = 囊胚数 / (囊胚数 + 未发育至囊胚的孤雌胚胎数);囊胚培养过程中的死胚不进行计数。

重复进行 3 批试验,计算平均得卵数、平均成熟率、平均卵裂率和平均囊胚率。对数据进行方差分析,以判断试验条件是否稳定。

3 结果与分析

3.1 平均得卵数

本试验中 3 批共采集滩羊卵巢 259 个,经剖割后获得 COCs 共 795 枚,平均每个卵巢能获得 3.07

枚卵母细胞(表1)。

3.2 卵母细胞成熟率

3批COCs体外成熟培养后成熟率分别为53.77%、54.55%和56.04%，平均成熟率为54.78%。经方差分析,3批试验成熟率差异不显著($P>0.05$),表明成熟培养试验条件稳定。同时发现烂卵(卵母细胞胞质模糊,细胞膜不清楚的死亡卵母细胞)较多,统计3批试验的烂卵率分别为41.11%、36.47%和36.36%,平均烂卵率为37.98%(表2)。烂卵因无法知晓其成熟情况,故在统计成熟率时不计入内。

3.3 卵裂率

对成熟的卵母细胞进行孤雌激活,3批试验的卵裂率分别为59.57%、62.16%和62.75%,平均卵裂率61.92%(表3)。经方差分析,批次间差异不显

著($P>0.05$),表明卵裂培养条件稳定。

3.4 囊胚率

卵裂胚经囊胚培养基培养后,3批试验的囊胚率分别为18.52%、17.65%和17.74%,平均囊胚率为17.72%(表4)。经方差分析,批次间差异不显著($P>0.05$),即囊胚培养条件稳定。

表1 剖割法获取滩羊卵丘细胞-卵母细胞复合体情况

Table 1 Acquisition of cumulus oocyte complexes in Tan sheep by sectioning method

批次	卵巢数 /个	COCs数 /枚	平均得卵数 /枚
1	80	180	2.25
2	93	329	3.54
3	86	286	3.33

表2 滩羊卵母细胞体外成熟培养情况

Table 2 In vitro maturation culture of Tan sheep oocytes

批次	COCs数 /枚	成熟卵数 /枚	未成熟卵数 /枚	烂卵数 /枚	成熟率 /%	烂卵率 /%
1	180	57	49	74	53.77a	41.11
2	329	114	95	120	54.55 a	36.47
3	286	102	80	104	56.04 a	36.36

注:同一列数据上标字母不同表示差异显著($P<0.05$),下同。

表3 滩羊孤雌激活胚胎卵裂发育情况

Table 3 Development of cleavage in activated parthenogenetic embryos of Tan sheep

批次	成熟卵数 /枚	卵裂数 /枚	未卵裂数 /枚	烂胚数 /枚	卵裂率 /%
1	57	28	19	10	59.57a
2	114	69	42	3	62.16a
3	102	64	38	0	62.75a

表4 滩羊孤雌激活胚胎囊胚发育情况

Table 4 Development of blastocysts in activated parthenogenetic embryos of Tan sheep

批次	卵裂胚数 /枚	囊胚数 /枚	烂胚数 /枚	囊胚率 /%
1	28	5	1	18.52a
2	70	12	2	17.65a
3	64	11	2	17.74a

好,为滩羊体外受精胚胎和克隆胚的生产等胚胎工程操作奠定了基础。

5 讨论

5.1 卵母细胞采集

卵母细胞的采集有抽吸法和剖割法,牛和猪的卵巢因体积和卵泡直径大,卵泡数量较多,用抽吸法效果较好;羊卵巢体积小,用抽吸法不便于操作,且获得卵母细胞质量较差。朱广香等^[5]比较了抽吸法和切割法采集奶山羊卵母细胞的效果,其结果表明切割法更适用,崔子龙等^[6]在多浪羊的研究中也得出同样结论。奶山羊平均每个卵巢可获得3.99枚卵母细胞^[7],陕北白绒山羊平均每个卵巢可获得3.18枚卵母细胞^[8],与本试验平均得卵数3.07枚

4 结论

本试验建立了离体卵巢来源滩羊卵母细胞体外成熟培养与孤雌激活体系,培养条件稳定,效果良

相近。

5.2 卵母细胞体外成熟

卵母细胞成熟过程中激素对其调控是非常重要的,有研究认为添加 FSH 和 LH 有助于卵丘细胞的扩张和卵母细胞成熟^[9]。刘春霞等^[10]向培养体系中添加 10%~15% 发情绵羊血清、10 μg/mL FSH、20 μg/mL LH 和 1.5 μg/mL 17β-E₂, 其成熟率达到 73.6%。对于体外成熟培养体系的研究大都集中在向培养液中添加激素、白蛋白、生长因子、维生素和氨基酸等成分以期获得较高的成熟率和质量。培养体系的优化工作从未间断,近年来有学者向培养体系中加入花青素^[11]、α-硫辛酸^[12]、甘草酸单铵盐^[13]、丹皮酚^[14]等成分,在提高成熟率方面取得一定的效果。

此外,供体的年龄与营养状况、卵巢运输时间、保存温度、COCs 级别^[15]、培养时间、人员操作习惯等诸多因素都会对体外成熟产生影响,发情与非发情季节的卵母细胞成熟率也有显著差异^[16]。

本试验还统计出平均烂卵率为 37.98%, 烂卵没有使用价值, 过多就会导致成熟率下降, 结合笔者滩羊胚胎移植经历, 鲜胚移植时发现可用胚率较低, 烂卵数量也较多, 这很有可能与供体营养状况差有关, 关于烂卵尚未见相关报道。

5.3 卵母细胞的激活

卵母细胞成熟后经过某些刺激完成减数分裂, 并开始有丝分裂形成胚胎。一般用卵裂率和囊胚率用来衡量激活效果。离子霉素是用于哺乳动物卵母细胞的化学激活剂, Quintana-vehi 等^[17]的研究结果表明离子霉素的激活效果最好, 需要与蛋白质合成抑制剂 6-DMAP 组合才能使用。李青等^[18]、汪保等^[19]发现成熟培养液中添加半胱胺和胱氨酸能显著提高第 3 天优胚率和优质囊胚形成率。贾振伟^[20]通过 C 型钠肽结合半胱胺体外成熟处理牛卵母细胞提高了卵母细胞发育潜能, 可用于优化卵母细胞体外成熟培养体系。

5.4 胚胎工程技术与滩羊产业

20 世纪 90 年代开始, 宁夏封山禁牧, 改放牧为舍饲, 养殖成本增加, 滩羊因其繁殖率低生长慢等特性, 同时受外来高产品种引进和推广的影响, 滩羊养殖效益下降, 存栏数量锐减, 加上杂交繁育方式, 滩

羊品种纯度和遗传多样性也受到严重影响^[21]。

胚胎工程技术在滩羊生产中的应用将有利于羊群的快速扩繁, 大大缩短世代间隔和育种进程, 充分利用离体卵巢等遗传资源, 使优势群体的配子细胞得到最大限度地利用, 发挥其在滩羊繁殖改良和遗传育种中的作用, 推动宁夏滩羊产业的发展。

参考文献:

- [1] 李向龙, 陶金忠, 丁伟, 等. 滩羊二毛期羊毛性状分析及其相关性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(2): 442-448.
LI X L, TAO J ZH, DING W, et al. Analysis of wool traits and its relationship in Tan sheep during the Er-Mao period[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(2): 442-448.
- [2] 额尔和花, 丁伟, 李颖康, 等. 滩羊毛皮特性及毛囊发育相关基因的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(5): 18-20.
Eerhehua, DING W, LI Y K, et al. Research progress in fur properties and hair follicle development-related genes of Tan sheep[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2010, 31(5): 18-20.
- [3] 云华, 李颖康. 宁夏滩羊及其品种选育[J]. 当代畜牧, 2008(3): 41-43.
- [4] 杨文琳, 安鹏, 李伟, 等. 超表达 Cdc20 基因不影响牛卵母细胞第一极体排出[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(6): 546-554.
YANG W L, AN P, LI W, et al. Over-expression of Cdc20 gene has No effect on bovine oocytes first polar body extrusion[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 28(6): 546-554.
- [5] 朱广香, 马恒东, 张华. 成熟培养液中胎牛血清添加量对山羊卵母细胞体外培养成熟的影响[J]. 四川动物, 2014, 33(4): 588-592.
ZHU G X, MA H D, ZHANG H. Effect of supplemented FBS to the maturation medium on the external maturation culturing of oocyte from goats[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2014, 33(4): 588-592.
- [6] 崔子龙, 罗瑞, 李娜, 等. 新疆多浪羊卵母细胞体外受精研究[J]. 中国奶牛, 2018(10): 13-16.
CUI Z L, LUO R, LI N, et al. Study on in vitro fertilization of oocyte about Duolang sheep of Xinjiang[J]. China Dairy Cattle, 2018(10): 13-16.
- [7] LEE H S, SEO Y I, YIN X J, et al. Effect of follicle

- stimulation hormone and luteinizing hormone on cumulus cell expansion and in vitro nuclear maturation of canine oocytes[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2007, 42(6):561-565.
- [8] 屈雷,雷安民,闫海龙,等. 陕北白绒山羊种公羊的体细胞克隆[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2012, 40(9):29-34.
- QU L, LEI A M, YAN H L, et al. Somatic cell cloning of Shaanbei white Cashmere goat[J]. *Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition)*, 2012, 40(9):29-34.
- [9] MOUROT M, DUFORT I, GRAVEL C, et al. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, 73(11):1 367-1 379.
- [10] 刘春霞,赵瑞媛,周欢敏,绵羊卵母细胞体外受精培养体系的建立与优化[J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2014, 35(1):67-72.
- LIU CH X, ZHAO R Y, ZHOU H M. Establishment and optimization of sheep oocytes in Vitro fertilization culture system[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2014, 35(1):67-72.
- [11] 李厚儒,白佳琛,王晶晶,等. 原花青素对青春期前羔羊卵母细胞体外成熟的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2024, 60(3):172-176.
- [12] 高悦悦,顾浩,陈矾,等. α -硫辛酸对猪卵母细胞体外成熟及孤雌胚胎发育的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59(11):204-209.
- [13] 张碧菡,赵宝宝,高静,等. 甘草酸单铵盐对猪卵母细胞体外成熟及胚胎发育能力的影响[J]. *中国兽医学报*, 2023, 43(11):2 361-2 367.
- ZHANG B H, ZHAO B B, GAO J, et al. Effects of monoammonium glycyrrhizinate on oocyte maturation and embryonic development in porcine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(11):2 361-2 367.
- [14] 张春强,田荆华,王守福,等. 丹皮酚对大鼠卵母细胞体外成熟体系氧化应激的调控[J]. *菏泽医学专科学校学报*, 2024, 36(1):11-16.
- ZHANG CH Q, TIAN J H, WANG SH F, et al. The regulatory effect of paeonol on oxidative stress in the rat oocytes in vitro maturation system[J]. *Journal of Heze Medical College*, 2024, 36(1):11-16.
- [15] SCHOEVERS E J, COLENBRANDER B, ROELEN B A J. Developmental stage of the oocyte during antral follicle growth and cumulus investment determines *in vitro* embryo development of sow oocytes[J]. *Theriogenology*, 2007, 67(6):1 108-1 122.
- [16] 李国超,朱新远,赵珊珊,等. 卵泡大小、COCs形态和IGF-1、 E_2 添加对驴卵母细胞体外成熟的影响[J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2023, 40(4):257-264.
- LI G CH, ZHU X Y, ZHAO SH SH, et al. Effects of follicle size, COCs morphology and IGF-1 and E_2 addition on donkey oocyte maturation *in vitro*[J]. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 2023, 40(4):257-264.
- [17] QUINTANA-VEHÍ A, MARTNEZ M, ZAMORA M J, et al. Significant differences in efficiency between two commonly used ionophore solutions for assisted oocyte activation (AOA): A prospective comparison of ionomycin and A23187[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2023, 40(7):1 661-1 668.
- [18] 李青,赵海滨,张传鑫,等. IVM培养液中添加半胱胺、胱氨酸改善人卵母细胞胚胎发育潜能的研究[J]. *生殖医学杂志*, 2019, 28(12):1 474-1 478.
- LI Q, ZHAO H B, ZHANG CH X, et al. Addition of cysteamine and cystine to IVM culture medium improves developmental potential of human oocyte embryos[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2019, 28(12):1 474-1 478.
- [19] 汪保,王晶晶,刘显成,等. 半胱胺对羔羊卵母细胞体外成熟及胚胎发育的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59(9):259-263.
- [20] 贾振伟. C型钠肽和半胱胺前成熟处理对牛卵母细胞发育能力的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2018, 54(9):68-71.
- JIA ZH W. Effect of pre-IVM with C-type natriuretic peptide combined with cysteamine on developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2018, 54(9):68-71.
- [21] 吴晓强,饶天师. 盐池县滩羊产业存在的问题与发展对策[J]. *现代农业科技*, 2016(13):274-280.