

猪囊胚的体外生产技术

卢晟盛, 卢克焕

(广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西大学 动物繁殖研究所, 广西 南宁 530005)

摘要: 利用屠宰场猪卵巢卵母细胞经体外成熟、体外受精后, 体外培育至囊胚阶段, 并以体外生产的猪囊胚细胞数来衡量囊胚质量。试验共对5 849枚猪卵母细胞进行体外成熟、体外受精, 其中3 974枚卵母细胞在体外受精后发生卵裂, 卵裂率为 $66.4\% \pm 1.6\%$, 2 136枚发育形成囊胚, 占卵裂胚数的 $56.2\% \pm 2.4\%$, 占卵母细胞数的 $36.7\% \pm 1.3\%$; 检查了98枚囊胚, 其平均细胞数为 41.6 ± 1.8 ; 另外又检查了47枚囊胚, 其平均内细胞团细胞数为 3.85 ± 0.56 、滋养层细胞数为 44.70 ± 2.87 。

关键词: 猪; 卵母细胞; 体外成熟; 体外受精; 胚胎培养

中图分类号: Q813.7; Q959.842; S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)02-0118-03

In vitro production technique of porcine blastocysts

LU Sheng-sheng, LU Ke-huan

(Guangxi Key Laboratory for Subtropical Bio-resource Conservation and Utilization,
Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Oocytes obtained from abattoirs were subjected to *in vitro* maturation and fertilization to produce porcine blastocysts, the quality of which was determined by checking their cell numbers. Of the 5 849 porcine oocytes treated, 3 974 putative zygotes cleaved 48 h after *in vitro* insemination (cleavage rate = $66.4\% \pm 1.6\%$), and 2 136 zygotes developed to the blastocyst stage (blastocysts/cleaved = $56.2\% \pm 2.4\%$; blastocysts/oocytes = $36.7\% \pm 1.3\%$). The average cell number of the blastocysts was 41.6 ± 1.8 ($n=98$), the average inner mass cell number 3.85 ± 0.56 and trophectoderm cell number 44.70 ± 2.87 ($n=47$).

Key words: swine; oocytes; *in vitro* maturation; *in vitro* fertilization; embryo culture

猪体外受精技术作为一项基本技术, 可为猪的胚胎细胞和体细胞核移植、转基因和性别控制技术提供廉价成熟卵母细胞和高效的胚胎培养体系。猪体外受精技术对农业和生物医药研究的应用在于: 显著减少所耗试验动物的数量; 降低试验成本; 为用于试验和生产的胚胎提供更多的一致性; 为生产转基因猪和用性别分离的精子生产仔猪提供高效的平台^[1]。在西方国家, 猪体外受精技术已相当成熟^[2~5]。但在国内, 猪体外受精技术由于受到各种条件和环境的限制, 发展缓慢, 也不成熟。国内报道猪卵母细胞经体外成熟、体外受精后成功培育至囊胚阶段的, 效率也低。本研究在美国密苏里—哥伦比亚大学动物科学系进行, 目的是利用屠宰场猪卵

巢卵母细胞在体外成熟、体外受精后, 在体外培育至囊胚阶段, 并通过检查体外生产的猪囊胚细胞数来衡量囊胚质量, 以建立高效的猪囊胚体外生产技术, 给国内工作者提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试剂和培养液

配制培养液用水均为美国自来水经二次蒸馏、经美国 Culligan (Aqua-Summa) 反渗透、去离子和过滤系统处理后的超纯水。基础成熟培养液为添加 1 g/L PVA 的改良 TCM-199, 洗卵液为改良 TL-Hepes-PVA 液, 受精液为改良 Tris 缓冲液 (mTBM), 胚胎培养液为 NCSU-23, 洗精子液为 Dubecco 氏磷酸缓冲液

收稿日期: 2004-05-31

作者简介: 卢晟盛(1971—), 男(壮族), 副研究员, 博士; E-mail: sslu@gxu.edu.cn

基金项目: 广西科技攻关资助项目(桂科攻0330004-14); 广西大学谭锦球青年科研基金资助项目(X022050); 广西大学2003

年博士科研启动基金资助项目

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

(DPBS). 改良 TCM-199 液、改良 TL-Hepes-PVA 液、DPBS、mTBM 和 NCSU-23 液的成分见先前的报道^[6].

1.2 猪囊胚的体外生产

成熟液、受精液和胚胎培养液使用之前在含体积分数为 5% CO₂ 的空气、最大饱和湿度的 39 °C 培养箱中预热、平衡 4 h 以上. 洗卵液和洗精子液使用之前在不含 CO₂ 的 39 °C 恒温箱中预热 4 h 以上. 猪卵母细胞的体外成熟和体外受精及受精卵的体外培养过程均在含体积分数为 5% CO₂ 的空气、最大饱和湿度的 39 °C 培养箱中进行.

从当地屠宰场收集初情期前的小母猪卵巢, 置于 25 °C 的生理盐水中 5 h 内运回实验室, 用生理盐水冲洗 3 次. 用带 12 号针头的 10 mL 注射器抽取卵巢表面上直径 3 ~ 6 mm 卵泡中的卵母细胞, 在实体显微镜下挑选含有 2 层以上卵丘细胞、胞质均匀的卵母细胞, 在洗卵液中洗 3 次, 再在成熟液中洗 3 次. 之后, 以 50 枚卵母细胞为一组, 移到每孔含 500 μL 成熟液的四孔培养板中, 加入终质量浓度为 0.5 μg/mL 的 FSH (Sigma F-2293) 和 LH (Sigma L-5269), 成熟培养 20 ~ 22 h, 再移到无 FSH 和 LH 的成熟液中成熟培养 20 ~ 22 h.

完成成熟培养后, 将卵母细胞与 1 g/L 透明质酸酶混合, 在旋涡震荡器上震荡除去卵丘细胞, 用受精液清洗裸卵 3 次, 最后以每 30 ~ 35 枚卵母细胞为一组, 置于 100 μL 受精液中, 等待受精.

在 37 °C 下用添加 1 g/L BSA 的 DPBS 解冻猪冷冻颗粒精液, 在 DPBS 中以 3 000 r/min 离心 5 min 3 次, 然后以 3 × 10⁵ 精子/mL 为最终精子数量加入含卵母细胞的受精液中受精.

精子和卵子共孵育 5 ~ 6 h 后, 在 NCSU-23 中洗 3 次, 受精卵以 40 ~ 50 枚为一组移至每孔含 500 μL 添加 4 g/L BSA 的 NCSU-23 的 Nunc 四孔培养板中培养 6 d. 第 2 d 检查卵裂率, 第 6 d 检查囊胚率.

1.3 囊胚细胞数的检查

将部分批次的第 6 d 囊胚捡入含 500 μL 培养液/孔的四孔培养板中, 加入 5 μL 质量浓度为 2 μg/μL 的 Hoechst 33342, 将四孔培养板置于培养箱中 0.5 h. 之后取出囊胚, 在改良 TL-Hepes-PVA 中洗 2 次, 放在载玻片上, 轻轻盖上盖玻片, 在荧光显微镜下检查囊胚细胞数.

1.4 囊胚内细胞团和滋养层的细胞数检查

将部分批次的囊胚从培养液中检出, 用 1 g/L 蛋白酶消化囊胚的透明带, 再放入含 4 g/L BSA 的 NCSU-23 中洗 5 min. 将无透明带的囊胚和盖矿物油的 1:5 稀释的兔抗猪血清一起在 37 °C 恒温箱中孵育 1 h, 再放入洗卵液洗 3 次, 每次洗 5 min. 随后将囊胚

放入 1:10 稀释的豚鼠血清中, 再添加最终质量浓度为 160 μg/mL 的 Hoechst 33342 和 Propidium Iodide, 孵育 1 h. 最后将囊胚取出, 在洗卵液中洗 2 次, 在荧光显微镜下检查细胞数. Hoechst 33342 可将囊胚的所有细胞核染色, 而 Propidium Iodide 只能将细胞膜破损的细胞核染色. 在荧光显微镜下, 囊胚的滋养层细胞核被 Hoechst 33342 和 Propidium Iodide 双重染色, 呈现红色或粉红色; 而内细胞团细胞核只能被 Hoechst 33342 染色, 呈现兰色.

2 结果

试验重复了 48 次, 结果如下(数据用平均值 ± 标准误表示): 共使用了 5 849 枚猪卵母细胞进行体外成熟、体外受精. 大部分卵母细胞的卵丘细胞在 40 ~ 44 h 成熟培养后出现扩散, 其中 3 974 枚卵母细胞在体外受精后卵裂, 卵裂率为 66.4% ± 1.6%; 其中有 2 136 枚卵裂球形成囊胚(图 1), 占卵裂胚数的 56.2% ± 2.4%, 占卵母细胞数的 36.7% ± 1.3%; 检查了 98 枚囊胚, 其平均细胞数为 41.6 ± 1.8; 另外又对 47 枚囊胚进行了双重染色, 其平均内细胞团细胞数为 3.85 ± 0.56、滋养层细胞数为 44.70 ± 2.87(见图 2).

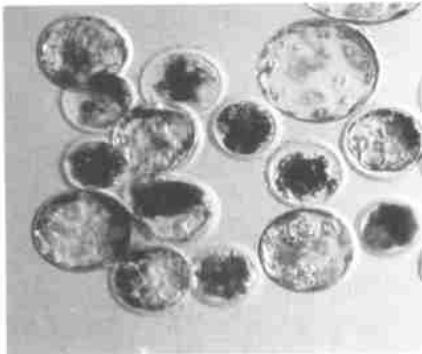


图1 体外受精第6 d 的猪囊胚

Fig. 1 Porcine blastocysts produced in vitro



图2 经 Hoechst 33342 和 Propidium Iodide 染色的单个猪囊胚
Fig. 2 A porcine blastocyst stained with Hoechst 33342 and Propidium Iodide

3 讨论

囊胚率的高低是衡量体外受精系统效率的一项重要指标,而囊胚细胞数多少则是衡量胚胎质量的主要指标.利用NCSU-23培养液培育的第6d猪囊胚细胞数介于24~29之间,内细胞团细胞数介于3~9之间,滋养层细胞数介于21~22之间;第6d体内猪囊胚细胞数介于54~60之间,内细胞团细胞数介于18~23之间,滋养层细胞数介于32~37之间^[7].本研究中第6d囊胚的细胞数和滋养层细胞数均高于Machaty等^[7]所报道的猪体外囊胚的指标,囊胚滋养层细胞数甚至高于体内囊胚滋养层细胞数,但囊胚的细胞数和内细胞团细胞数低于体内囊胚的指标.据Abeydeera等^[9]报道,猪卵母细胞体外成熟和体外受精后的卵裂率介于52%~69%,体外受精卵经体外培养后囊胚率介于22%~37%,囊胚细胞数介于25~41.本研究的猪卵母细胞经体外成熟和体外受精后的卵裂率、囊胚体外发育率和囊胚细胞数均达到或接近Abeydeera等^[5]报道的上限指标,说明本研究所采用的体外受精系统是高效的,当然,最终结果还需通过胚胎移植来检验.

参考文献:

[1] PRATHER R S, DAY B N. Practical considerations for the *in*

vitro production of pig embryos[J]. *Theriogenology*, 1998, 49 (1): 23—32.

[2] ABEYDEERA L R, JOHNSON L A, WELCH G R et al. Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry[J]. *Theriogenology*, 1998, 50(7): 981—988.

[3] ABEYDEERA L R, WANG W H, PRATHER R S et al. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 1998, 58: 1 316—1 320.

[4] ABEYDEERA L R, WANG W H, CANTLEY T C, et al. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51: 395—401.

[5] ABEYDEERA L R, WANG W H, CANTLEY T C, et al. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor[J]. *Theriogenology*, 2000, 54(5): 787—797.

[6] 卢晟盛, 卢克焕. 猪早期胚胎无蛋白质培养液的建立[J]. *广西农业生物科学*, 2003, 22(1): 41—45.

[7] MACHATY Z, DAY B N, PRATHER R S. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biol Reprod*, 1998, 59: 451—455.

【责任编辑 柴 焰】