

猪精子提取物对猪卵母细胞的孤雌激活效果

谭世俭, 谢忠君, 石德顺, 谢体三, 李辉, 邓彦飞, 刘继龙

(广西大学 动物繁殖研究所, 广西 南宁 530005)

摘要:3个试验分别就猪精子提取物提取方法、精子蛋白质量浓度以及显微注射剂量对猪卵母细胞的孤雌激活效果进行了研究。结果表明,采用液氮反复冻融法和超声波破碎法提取的猪精子提取物对猪卵母细胞都有显著的孤雌激活效果;采用猪精子提取物显微注射孤雌激活猪卵母细胞的适宜注射剂量为2~4 pL;猪精子蛋白质量浓度在1.35 mg/mL以上,注射剂量为2~4 pL时均可有效激活猪卵母细胞。

关键词:猪; 精子提取物; 卵母细胞; 显微注射; 孤雌激活

中图分类号:S814.8

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)04-0078-04

Effects of Porcine Oocyte Activation Induced by a Cytosolic Sperm Factor

TAN Shi-jian, XIE Zhong-jun, SHI De-shun, XIE Ti-san, LI Hui, DENG Yan-fei, LIU Ji-long

(Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Effects of porcine sperm cytosolic factor (different extraction methods, different albumen concentrations and different micro-injection doses) on parthenogenetic activation (PA) of porcine oocytes were investigated in 3 experiments. The results showed that there was a significant activation effect of oocytes after injection of cytosolic sperm factor extracted either by repeated frozen-thawed or ultrasonic fragmentation method. The optimal micro-injection dose for PA was 2~4 pL per oocyte. Porcine oocytes could be effectively activated by micro-injection of 2~4 pL porcine sperm extract, in which albumen concentration was above 1.35 mg/mL.

Key words: pig; sperm extract; oocyte; micro-injection; parthenogenetic activation

目前,通过体细胞核移植技术已成功地克隆出多种动物个体如绵羊、小鼠、牛、山羊和猪等^[1],但是核移植效率仍然低下,其中重构胚能否有效激活是一个重要的影响因素。常用的激活方法有电脉冲法和离子霉素联合六-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)法^[2]。但采用化学或物理方法激活产生的克隆胚胎,其后续的发育异常率显著高于精子激活(体外受精或超数排卵)胚胎。有人分析,缺乏精子的参与可能是造成目前克隆胚胎发育异常的一个重要因素。最近有研究报道,将大鼠^[3]、小鼠^[4]、猪^[5]、马^[6]、牛^[7]和绵羊^[8]的精子提取物注入卵母细胞具有孤雌激活作用。为进一步探讨验证精子提取物对卵母细胞的激

活机制,为今后提高克隆胚胎的质量提供一种有效的方法,本文就猪精子提取物的不同提取方法、注射剂量以及不同的精子蛋白浓度对猪卵母细胞孤雌激活的效果进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪精液及卵巢 猪精液从广西畜牧研究所种猪厂原种杜洛克猪新鲜采集;猪卵巢从广西南宁市周边屠宰场收集青年母猪卵巢,将其置于30~35℃生理盐水的保温瓶内,在4~5 h内送达实验室。

1.1.2 试剂 TCM-199为GIBCO公司生产;犊牛血

收稿日期:2009-04-21

作者简介:谭世俭(1953—),男,研究员,E-mail:tansj@gxu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30460090);广西科学基金(桂科自0832039)

清(FCS)、猪卵泡液(PFF)为广西大学动物繁殖研究所制;蛋白抑制剂PMSF和Leupeptin以及Centricon-30超滤管均为美国Amresco公司产品;其他无机盐和生物化学试剂均为美国Sigma公司生产。

1.2 精子提取物的制备及浓缩

1.2.1 液氮反复冻融法 将新鲜精液加入无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液(DPBS⁻)中,于4 000 r/min离心10 min,弃上清液,用DPBS⁻重悬后重复离心3次,得到的沉淀物用裂解缓冲液(EB,内含120 mmol/L KCl,1 mmol/L EDTA,7.8 mmol/L Na₂HPO₄,2.6 mmol/L NaCl,1.4 mmol/L KH₂PO₄,pH 7.3)重悬后离心1次,弃上清液,得到的沉淀物用含精子提取物抑制剂的裂解液(EB+1 mmol/L PMSF,100 μmol/L Leupeptin,1 mmol/L DTT)将精子密度分别稀释至 5×10^8 、 10×10^8 和 $20 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,然后分装于1.5 mL EP管中,通过直接投放到液氮中,停留5 min后5 ℃水浴解冻,反复冻融4次,使精细胞充分裂解。

1.2.2 超声波破碎法 精子的清洗及裂解前处理同1.2.1法。将3种不同密度的猪精子置于4 ℃水浴的超声波仪上,每裂解2~3 min,暂停1 min,重复8~10次,总裂解时间为25~35 min。

以上2种方法得到的精子裂解产物均于4 ℃,13 500 r/min离心50 min获取上清液,然后分装于小管,-80 ℃冷冻保存,显微注射前室温解冻待用。

精子提取物的浓缩:将 $10 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 密度精子裂解离心后的上清液再用Centricon-30超滤管浓缩,使其终蛋白质量浓度为5~6 mg/mL,制备成含精子提取物的EB缓冲液,分装于小管,-80 ℃冷冻保存,显微注射前室温解冻待用。

采用紫外分光光度法测定精子提取物中的精子蛋白质量浓度。

1.3 卵母细胞的采集和成熟培养

用注射器抽吸法采集卵巢表面直径2~8 mm卵泡内的卵母细胞。卵母细胞先在含有促卵泡素(FSH)的TCM-199成熟培养液中培养20~22 h后,换成不含FSH培养液继续培养至42~46 h。培养条件为38.5 ℃、CO₂体积分数为5%的空气、相对饱和湿度。

1.4 精子提取物的显微注射

在显微操作仪上用外径为120 μm的固定管固定卵母细胞,然后用外径为7 μm、内径为5 μm的注射针按试验设计吸取适量的精子提取物,缓慢地注入卵子胞质内。注射后的卵母细胞移入显微操作微滴的另一端,然后补充添加精子提取物液滴,再重复相同的步骤直至完成各个卵母细胞的显微注射

操作。

1.5 激活处理后培养与观察

将经显微注入精子提取物的卵母细胞置入NC-SU23培养液微滴中,每个微滴约25枚,在CO₂培养箱中培养8 d,期间每隔72 h半量换液。48 h后检查卵裂情况并计算卵裂率,第6~8 d检查桑椹胚/囊胚发育情况,计算桑椹胚/囊胚发育率。

1.6 试验设计

1.6.1 精子提取物注射剂量的比较 将体外成熟的猪卵母细胞随机分成4组:空白对照组只向卵母细胞显微注射裂解缓冲液(EB)2~4 pL,其他3组则分别注射采用液氮法提取,精子密度为 $20 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 的猪精子提取物 $2 \sim 4$ 、 $5 \sim 7$ 和 $8 \sim 10$ pL。检查卵裂率及桑椹胚/囊胚发育情况。

1.6.2 液氮法与超声波法提取猪精子提取物孤雌激活效果比较 精子的密度为 $20 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,分别采用液氮法和超声波法提取精子提取物。将成熟的卵母细胞随机分成3组:第1组为对照组,卵母细胞孤雌激活采用常规离子霉素联合6-DMAP处理;第2组注射2~4 pL液氮法提取的精子提取物;第3组注射2~4 pL超声波法提取的精子提取物。然后将各组的卵母细胞置于NCSU23培养液微滴中培养。检查卵裂率及桑椹胚/囊胚发育情况。

1.6.3 不同猪精子蛋白浓度对卵母细胞的孤雌激活效果 比较液氮法提取不同密度的猪精子蛋白以及经超滤浓缩的高质量浓度精子蛋白对卵母细胞孤雌激活效果的影响。试验分为4组,1~3组分别注射精子密度为 5×10^8 、 10×10^8 和 $20 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 的精子提取液;第4组的注射液为Centricon-30超滤管浓缩的精子蛋白液,各组的注射剂量均为2~4 pL。然后将卵母细胞置于培养液微滴中培养。检查卵裂率及桑椹胚/囊胚发育情况。

1.7 统计分析

所有试验均重复5次,试验数据用卡方检验进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 不同注射剂量的激活效果

经紫外分光光度法测定,采用液氮法提取,精子密度为 $20 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 的猪精子提取物注射液,猪精子蛋白质量浓度为1.35 mg/mL。接受注射2~10 pL精子提取物的猪卵母细胞其后卵裂率(52.6%~71.2%)和桑椹胚/囊胚率(21.9%~36.8%)均显著地高于空白注射的对照组($P < 0.05$)。随着猪精子提取物注射剂量的加大,卵裂率及桑椹胚/囊胚率均呈

下降的趋势,注射2~4 pL组的卵裂率(71.2%)及发育到桑椹胚/囊胚的比例(36.8%)显著高于注射8~10 pL组($P < 0.05$),与注射5~7 pL组差异不显著($P > 0.05$),结果见表1。

表1 显微注射不同剂量猪精子提取物对猪卵母细胞的孤雌激活效果¹⁾

Tab. 1 Effect of different doses of porcine sperm extract on parthenogenetic activation of porcine oocytes

注射剂量/pL	卵子数	卵裂率/%	桑椹胚/囊胚率/%
0(对照)	168	30.4a	7.7a
2~4	125	71.2c	36.8c
5~7	123	60.2bc	26.0bc
8~10	137	52.6b	21.9b

1)同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$,卡方检验)

2.2 不同裂解方法提取猪精子提取物效果比较

结果表明,采用液氮法提取的精子蛋白质量浓度(1.35 mg/mL)比超声波法(1.22 mg/mL)略高,前者对卵母细胞孤雌激活的效果无论是卵裂率还是桑椹胚/囊胚率也较后者高,但2组间的结果差异不显著($P > 0.05$,见表2)。与采用常规方法激活的对照组比较,3组间卵裂率差异不显著;桑椹胚/囊胚率液氮法提取物组与对照组差异不明显,但超声波提取物组则显著低于对照组。

表2 不同提取方法的精子提取物对卵母细胞孤雌激活的效果¹⁾

Tab. 2 Effect of porcine sperm cytosolic factors extracted by different methods on parthenogenetic activation of porcine oocytes

处理	卵子数	卵裂率/%	桑椹胚/囊胚率/%
常规激活	216	73.1a	46.8a
液氮法提取物	125	71.2a	36.8ab
超声波法提取物	107	65.4a	30.8b

1)同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$,卡方检验)

2.3 不同猪精子蛋白质量浓度对卵母细胞的孤雌激活效果

试验结果表明,精子密度为 5×10^8 、 10×10^8 和 20×10^8 mL⁻¹的精子提取液中精子蛋白质量浓度分别为0.42、0.79和1.35 mg/mL;将 10×10^8 mL⁻¹密度精子提取液再用Centricon-30超滤管浓缩后的精子蛋白质量浓度为5.80 mg/mL。由表3可见,当注射剂量固定(2~4 pL)时,随着猪精子蛋白质量浓度的增加,对卵母细胞的孤雌激活效果在增强,表现在卵裂率和桑椹胚/囊胚率的逐步升高。蛋白质量浓度为5.80 mg/mL组的卵裂率及发育到桑椹胚/囊胚的比

例均显著高于0.42 mg/mL组($P < 0.05$),与0.79 mg/mL组、1.35 mg/mL组差异不显著($P > 0.05$)。

表3 不同猪精子蛋白质量浓度对卵母细胞孤雌激活的效果¹⁾

Tab. 3 Effect of different albumen concentrations in porcine sperm extract on parthenogenetic activation of oocytes

ρ (精子蛋白)/(mg · mL ⁻¹)	卵母细胞数	卵裂率/%	桑椹胚/囊胚率/%
0.42	101	50.5a	18.8a
0.79	120	62.5ab	30.0ab
1.35	125	71.2b	36.8b
5.80	98	73.5b	37.8b

1)同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$,卡方检验)

3 讨论

在正常受精过程中,精子起着引入父方基因和协同起动发育的作用。100多年来,精子是如何激活卵子的问题一直困扰着生殖和发育生物学家。经过反复地探索,人们相继提出了精子通道假说^[9]、受体控制假说^[10-11]和精子因子假说^[12-14]。随着对受精机制的深入研究,科学家们倾向于精子因子假说来解释精子如何在受精时引起卵母细胞内Ca²⁺释放,进而激活卵母细胞。该假说认为,精子与卵母细胞融合后精子因子被释放并扩散到卵胞质内,经过适当的信号通路使卵母细胞内Ca²⁺释放并引起游离Ca²⁺波动。Swann等^[3]从1990年开始致力于寻找特定精子因子的研究,他们发现哺乳动物诱导卵子Ca²⁺振荡的精子提取物对胰蛋白酶和热敏感,表明精子因子可能是一种蛋白质。他们发现,注射牛或鼠精子提取物可使鼠卵母细胞的钙离子释放和胞浆钙离子的增加,同时他们还发现卵膜的超极化反应,这与卵子受精时发生的膜反应相似。当研究者把从哺乳动物精子中提取出来的可溶性物质注入到大鼠、小鼠、猪、马、人等动物卵子中时,发现均可引起Ca²⁺振荡,从而激活卵母细胞孤雌发育。Saunders等^[15]发现磷脂酶C(Phospholipase C, PLC)的一种类型——PLC ζ 在小鼠精子中特定表达,注射编码PLC ζ 的cRNA在成熟小鼠卵内引起Ca²⁺振荡,激活卵母细胞孤雌发育。

精子提取物适宜的注射剂量是影响卵母细胞激活及体外发育的重要因素之一。本试验研究结果表明,每个猪卵母细胞注入2~4 pL为适宜的注射剂量。随着精子提取物注射剂量的加大,卵裂率及桑椹胚/囊胚率均呈下降的趋势,可能原因是注射溶液过

多,对卵母细胞造成的注射损伤相应增加,从而使卵子发育受阻.Gianpiero 等^[16]报道在小鼠卵母细胞内注射不同剂量的人精子提取物,研究发现注射 1 pL 引发卵内 Ca^{2+} 波动强度明显高于 5 pL,而且还有持续的 Ca^{2+} 波动. 赛务加甫等^[8]发现,在绵羊卵母细胞内注射 2~4 pL 的绵羊精子提取物的卵裂率要显著高于 8~10 pL 组,与本试验的结果相符. 由于猪卵母细胞容易受非生理刺激而激活,对照组虽然只注射 EB 缓冲液,也有 30.36% 卵裂率和 7.74% 桑椹胚率(无囊胚),但与任何一个试验组相比激活效果显著降低.

精子提取物是否能有效激活卵子,很大程度与精子蛋白因子活性高低有直接的联系. 目前提取精子蛋白一般主要采用液氮法或超声波法. 由于采用超声波法裂解精子细胞会产生相当的热量,可能会引起部分蛋白质变性,加速蛋白质水解,结果导致精子蛋白因子活性的降低. 所以采用超声波法提取时,应间隔冷却裂解. 液氮法提取反应比较温和,需要反复多次冻融,期间难免也会造成部分蛋白质失活. 本试验研究结果表明 2 种方法提取的猪精子提取物孤雌激活效果差异不显著,都可以用于精子提取物试验研究.

精子提取物中的有效蛋白质量浓度也是影响卵母细胞激活及其体外发育的重要因素之一. Knott 等^[17]在牛卵母细胞内分别注入蛋白质量浓度为 1、5 和 15 mg/mL 猪精子提取物,发现牛卵母细胞的原核形成率分别为 30%、82% 和 40%. 而且注射 5 mg/mL 猪精子提取物试验组,诱发卵内 Ca^{2+} 振荡间隔多次,接近受精时卵内 Ca^{2+} 振荡水平. 同样,Choi 等^[6]在马卵母细胞内分别注射 59、176、293、和 1 375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的马精子提取物,发现 59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的孤雌激活效果显著低于其他试验组. 本试验结果表明,当注射剂量固定时,随着猪精子蛋白质量浓度的增加,对卵母细胞的孤雌激活效果在增强,表现在卵裂率和桑椹胚/囊胚率的逐步升高,以 5.80 和 1.35 mg/mL 猪精子蛋白激活效果较好. 猪精子蛋白 5.80 mg/mL 组是使用超滤膜 Centricon-30 浓缩后而获得的,操作过程比其他质量浓度精子蛋白组增加了一个步骤,此过程中难免会引起部分蛋白失活,这也可能是尽管其蛋白质量浓度扩大了几倍,激活效果没有预期好的原因之一. 具体的原因需要在以后的试验中进一步探讨.

参考文献:

- [1] 桑润滋. 动物繁殖生物技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 322-345.
- [2] KAUFMAN M H. Early mammalian development: pathogenetic studies [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983: 20-83.
- [3] SWANN K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster oocytes [J]. Development, 1990, 110: 1295-1302.
- [4] HOMA S T, SWANN K. A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes [J]. Human Reproduction, 1994, 9: 2356-2361.
- [5] MACHATY Z, BONK A J, KUHHOLZER B, et al. Porcine oocyte activation induced by a cytosolic sperm factor [J]. Mol Reprod Dev, 2000, 57: 290-295.
- [6] CHOI Y H, LOVE C C. Production of horse NT embryo activation by cytosolic injection with horse sperm factor [J]. Theriogenology, 2002, 58: 771-774.
- [7] TANG T S, DONG J B, HUANG X Y, et al. Ca^{2+} oscillations induced by a cytosolic sperm protein factor are mediated by a maternal machinery that functions only once in mammalian eggs [J]. Development, 2000, 127: 1141-1150.
- [8] 赛务加甫, 张立, 彭新荣, 等. 绵羊精子提取物对卵母细胞的孤雌激活作用 [J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(7): 9-12.
- [9] JAFFE L A, TERASAKI M. Structural changes of the endoplasmic reticulum of sea urchin eggs during fertilization [J]. Dev Biol, 1993, 156: 566-573.
- [10] FOLTZ K R, SHILLING F M. Receptor mediated signal transduction and egg activation [J]. Zygote, 1993, 1: 276-279.
- [11] SCHULTZ R M, KOPF G S. Molecular basis of mammalian egg activation [J]. Curr Topics Biol, 1995, 30: 35-62.
- [12] DALE B, DEFELICE L J, EHRENSTEIN G. Injection of a soluble sperm fraction into sea-urchin eggs triggers the cortical reaction [J]. Experientia, 1985, 41: 1068-1070.
- [13] SWANN K. The soluble sperm oscillogen hypothesis [J]. Zygote, 1993, 1: 272-279.
- [14] FISSORE R A, CORDO A C, HUA W. Activation of development in mammals: Is there a role for a sperm cytosolic factor? [J]. Theriogenology, 1998, 49: 43-45.
- [15] SAUNDERS C M, LARMAN M G, PARRINGTON J, et al. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development [J]. Development, 2002, 129: 3533-3544.
- [16] GIANPIERO D G, AVRECH O M, COLOMERO L T, et al. Human sperm cytosolic factor triggers Ca^{2+} oscillations and overcomes activation failure of mammalian oocytes [J]. Molecular Human Reproduction, 1997, 34: 367-374.
- [17] KNOTT J G, POOTHAPILLAI K, WU H, et al. Porcine sperm factor supports activation and development of bovine nuclear transfer embryos [J]. Biology of Reproduction, 2002, 66: 1095-1103.