

Spindle-view 系统在猪卵母细胞去核中的应用 Application of Spindle-view in the Enucleation Porcine of Oocytes

杨 宇^{1 2 4}, 戴建军^{1 2}, 张廷宇^{1 2 4}, 吴华莉^{1 2}, 陈学进³, 张德福^{1 2*}, 马恒东⁴
YANG Yu^{1 2 4}, DAI Jian-Jun^{1 2}, ZHANG Ting-Yu^{1 2 4}, WU Hua-Li^{1 2}, CHEN Xue-Jin³,
ZHANG De-Fu^{1 2*} and MA Heng-Dong⁴

1 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106

2 上海农业遗传育种重点实验室动物遗传工程研究室, 上海 201106

3 上海交通大学医学院上海发育生物学重点实验室, 上海 200092

4 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014

1 Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

2 Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-genetic and Breeding, Shanghai 201106, China

3 Center of Developmental Biology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China

4 Animal Sci&Technology College, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014, China

摘 要 应用 Spindle-view 对体外成熟培养 36、42、44 和 48h 的猪体外成熟卵母细胞减数分裂纺锤体进行去核操作, 并与传统去核方法(McGrath-Solter 去核法, 挤压去核法)相比较, 结果表明: ①在 42~48h 之间利用 Spindle-view 得到的猪卵纺锤体影像与极体的相对位置没有明显的变化; ②Spindle-view 适合用于猪体外成熟卵母细胞减数分裂纺锤体的观察及去核; 去核效率与其他两种方法相比差异极显著(95.5%、42.1%、74.2%, $P < 0.01$); ③纺锤体成像是否清晰可用于猪卵母细胞的质量监控。

关键词 Spindle-view, 猪卵母细胞, 去核, 减数分裂纺锤体

中图分类号 Q959 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-1140-06

Abstract The Spindle-view, a specialized instrument for observing spindle image, was applied to observe the meiotic spindles of *in vitro* matured porcine oocytes at 36, 42, 44, 48h, and enucleation from porcine, comparing to the previously methods (McGrath-Solter's method and two-step-squeezing method) in the enucleated. The results showed that: ① there was no noticeable differences at vicinity of spindle images and 1st polar body among *in vitro* matured porcine oocytes at 40~48h under the instrument; ② Spindle-view is suitable for the observation of meiotic spindles of matured oocytes and enucleation from porcine; the modified Spindle-view method for enucleation is significantly better than McGrath-Solter's method and two-step-squeezing method in the enucleated rates (95.5%, 42.1%, 74.2%, $P < 0.01$) of absolutely removing nuclei matter; ③ the spindle images could be used to monitor the oocyte qualities.

Key words Spindle-view, porcine oocytes, enucleation, meiotic spindle

Received: January 16, 2007; Accepted: March 22, 2007.

This work was supported by a grant from Shanghai Agriculture Committee, China (No. 2005-3-5).

* Corresponding author. Tel: +86-21-62200389; E-mail: zhangdefu10@yahoo.com.cn

上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 No. 2005-3-5)

细胞核移植研究中,成熟卵母细胞去核操作,即去除卵母细胞的纺锤体,是核移植程序的重要环节。卵母细胞去核操作,要求既要完全去核,又要尽可能减少胞质损失,同时还要尽可能缩短操作时间。目前,常用去核方法为 McGrath-Solter 去核法^[1]和挤压去核法^[2],由于两种方法存在一定的缺点,人们一直在寻求更好的方法^[3]。用蔗糖高渗溶液对牛卵子进行短时培养,大部分卵子的纺锤体部位突出于卵膜表面,指示去核操作^[4];将山羊的卵子在室温下短时培养,大部分卵子的纺锤体部位亦可突出于卵膜表面。这些都对卵子的去核操作方法进行了一定的改进。哺乳动物纺锤体观测仪 Spindle-view 的出现,不但保证卵母细胞去核操作速度和 100% 的去核效率,同时不需要对卵子进行特殊处理,对卵子没有损伤^[5];此外因 spindle-view 利用偏振光折射直接获取纺锤体镜像,不需染色就能观察到卵母细胞内纺锤体^[6]。

目前 Spindle-view 主要用于人类辅助生殖医学 IVF 和 ICSI 临床观察卵母细胞纺锤体^[7],同时还用于鉴定卵母细胞的质量^[8],在实验动物小鼠、牛^[9]家兔^[10]有应用报道,而在家畜上的应用甚少。本研究试图应用 Spindle-view 系统于猪卵母细胞的去核,以提高其效率。

1 材料与方法

1.1 猪卵母细胞的采集与准备

上海长宁区复兴屠宰场采集卵巢,放入 30 ~ 35℃ 添加双抗的生理盐水中,2h 内带回实验室;用 18 号针头,20mL 的注射器抽吸直径在 3 ~ 6mm 的卵泡,放入 50mL 的试管中;将试管中的卵泡液倒入捡卵杯,用 TL-HEPES 操作液冲洗、洗涤过滤杂质;在体视显微镜下用口吸管挑选 B 级以上(卵母细胞外包裹 3 层以上颗粒细胞)卵丘卵母细胞复合体(COCs),将挑出的 COCs 用操作液反复洗 3 ~ 5 遍;挑选出颗粒细胞致密的卵母细胞用成熟液(NCSU23 + 激素和因子)洗 3 ~ 5 遍;COCs 放入已经在培养箱内平衡 4h 的成熟液中(每 400 μ L 滴放 80 ~ 90 枚卵)在 NCSU-23 中培养 22 ~ 24h,将 COCs 换入无激素的 NCSU-23 成熟液中继续培养至 44h^[11]。

1.2 显微操作

1.2.1 McGrath-Solter 去核法 利用 McGrath-Solter 去核法进行成熟卵母细胞去核,即在直径 60mm 培养皿盖中央做一个 50 μ L 显微操作液滴,再用矿物油覆盖。在装配有显微操作仪及恒温台的倒置显微镜上用固定吸管(内径 10 ~ 20 μ m,外径 100 ~ 120 μ m)吸持

卵母细胞,用内径 15 ~ 25 μ m 的去核/注射针使第一极体处于钟表 1 点钟位置,接着从 3 点钟处进针,吸取第一极体及其临近 10% ~ 20% 可能含有卵母细胞核的胞质。挑选直径 15 ~ 20 μ m、折光性强、圆形光滑的体细胞,从去核切口放入卵周隙,用注射针点压透明带,使供体细胞与受体卵的胞膜接触紧密。每批操作 30 个卵母细胞左右,每次分 4 ~ 5 批操作(图 A)。

1.2.2 挤压去核法^[12] 先用固定针固定卵母细胞,使第一极体(或卵周隙扩大的一侧)位于固定针的正上方或下方(即时钟的 12 点或 6 点钟处)。将玻璃针在第一极体两侧(或卵周隙扩大部分)1/5 ~ 1/4 卵周长处,沿第一极体(或卵周隙扩大部分)刺穿透明带,挑开透明带或在固定针管壁摩擦,在透明带上形成 1/5 ~ 1/4 卵周长的切口。将穿刺针换成钝端去核管后,调整卵母细胞的透明带切口方向,使其位于固定针的正上方或下方,直接用钝端去核管在透明带切口斜下方推挤卵母细胞,使第一极体连同其附近的 1/4 ~ 1/3 胞质溢出透明带,然后用钝端去核管吸除溢出透明带的第一极体及连同其附近的胞质(图 B、C)。

1.2.3 spindle-view 法 采用水平显微注射技术系统^[13]。用成熟培养液在 mm 培养皿内做滴,在操作液滴周边加入灭菌石蜡油,用口吸管(外径 1mm)把 CB 液里的卵母细胞吸入滴内,然后放在偏振光显微镜下进行卵母细胞纺锤体的观察。卵母细胞放入液滴后,未调整卵母细胞极体位置前可见纺锤体的数目为一次性可见纺锤体数,然后用显微操作针逐个调整卵母细胞极体位置,使极体清晰可见,再次统计可见纺锤体卵母细胞数目,即为实际可见纺锤体数目。观察到纺锤体后,按照盲吸法相同的步骤进行去核操作(图 D)。

1.3 hoechst33342 染色观察去核率

将去核后的卵母细胞移到含 5 μ g/mL hoechst33342 的 Medium199(含 10% NCS, V/V)液滴中孵育 15 ~ 20min,然后在荧光显微镜下检验去核效果。如无荧光,证明卵母细胞内的染色质已被完全除去;如有荧光,证明染色质未被去除或部分未被去除(图 E、F)。

1.4 利用 Spindle-view 观察结果对卵子进行分类

根据观察,将猪卵纺锤体成像明亮、集中,直径范围在 30 μ m 以内判断为纺锤体清晰;将纺锤体成像较暗、成像范围超过 30 μ m 以外,不能准确判断纺锤体具体位置者,判断为纺锤体模糊;将完全不能看

见纺锤体者,判断为纺锤体不可见。对 44h 成熟卵按纺锤体清晰、模糊和看不见 3 组分别进行孤雌激活培养,培养 48h 后检查分裂情况。根据分裂情况将卵子分为分裂卵和不分裂卵,分裂卵中 2-4 细胞分裂卵定为正常卵裂,6 细胞以上卵定为异常分裂(图 G、H)。

根据纺锤体清晰猪卵母细胞中极体和纺锤体夹角 α 以卵子球心为顶点,其与极体和纺锤体连线之夹角大小将纺锤体清晰的卵母细胞分为 A、B、C 和 D4 类^[14]:A 类,卵母细胞中极体和纺锤体夹角为 5° ; B 类,纺锤体与极体夹角为 $6^\circ \sim 45^\circ$; C 类,极体与纺锤体夹角 $46^\circ \sim 90^\circ$; D 类,纺锤体与极体夹角大于 90° 。

1.5 数据分析

利用 χ^2 法对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 成熟培养时间对猪成熟卵母细胞纺锤体观察结果的影响

从表 1 可以看出,成熟时间在 36~48h 之间的猪卵母细胞纺锤体可见率发生明显变化,纺锤体成像模糊主要原因在于引起偏振光折射的微丝、微管等组织的有序性和致密性降低。从表 1 可看出在成熟培养 44h,纺锤体清晰的比例最高(63.4%),而 42 和 48h 的纺锤体清晰的比例有所下降(数据统计差异不显著)。原因可能为 36/42h 的卵子尚未排出或刚刚排出第 1 极体,留在卵细胞中的染色体尚未完全形成 M II 纺锤体,部分卵子微管和微丝排列的有序性和致密性尚未达到最大,因此纺锤体成像模糊比例较 44h 的卵子稍大,而 48 的卵子随着 M II 纺锤体形成时间的延长,结构趋于松散,纺锤体成像模糊比例也较 44h 的卵子稍大。

从表 2 结果可以看出减数分裂纺锤体清晰卵子的纺锤体与第 1 极体位置关系未随卵子成熟时龄发生明显变化,纺锤体与第 1 极体的夹角均在 45° 以内。从表 2 中还可看出,44 时龄卵子纺锤体与第 1 极体夹角在 5° 以内的比例达到了 95.5%,在 $6^\circ \sim 45^\circ$ 之间的比例仅为 4.5%,而 48 时龄卵子纺锤体与第 1 极体夹角在 5° 以内的比例下降到 80% 左右,其余均在 $6^\circ \sim 45^\circ$ 之间。这一结果与人类卵子研究结果类似^[15],90% 左右的人类卵子纺锤体位于第 1 极体附近位置,在人类卵子显微注射受精多用第 1 极体作为卵母细胞纺锤体位置的定位参照。

表 1 不同成熟时龄猪卵母细胞纺锤体观察结果

Table 1 Spindle observation of porcine oocytes at different maturation times

Maturation time/h	Oocyte No.	Clear spindle/%	Illegible/%	Unobservable/%
36	102	3(35.3%) ^a	4(45.1%) ^b	2(19.6%) ^b
42	87	4(47.1%) ^a	18(20.7%) ^b	28(32.2%) ^b
44	112	7(63.4%) ^a	2(19.6%) ^b	1(17%) ^b
48	71	3(43.7%) ^a	1(22.5%) ^b	24(33.8%) ^b

Significantly difference between a and b ($P < 0.05$); significantly difference between a and c ($P < 0.1$); no significantly difference between b and c ($P > 0.05$).

表 2 纺锤体与第 1 极体位置关系

Table 2 Location relation between spindle and first polar body

Oocytes No. (maturation time)	Angle between spindle and first polar body			
	A/%	B/%	C/%	D/%
48(36)	First polar body was not released			
7(42)	6(87.5%) ^a	1(12.5%) ^b	0	0
6(44)	6(95.5%) ^a	1(4.5%) ^b	0	0
3(48)	3(82.1%) ^a	1(17.9%) ^b	0	0

A $0^\circ \sim 5^\circ$; B $6^\circ \sim 5^\circ$; C $46^\circ \sim 90^\circ$; D $> 90^\circ$.

Significantly difference between a and b ($P < 0.5$); significantly difference between a and c ($P < 0.1$).

2.2 不同去核方法对去核率与重构胚后期发育的影响

在去核成功率上,由于可以对纺锤体位置直观的进行观测,spindle-view 的去核效率显著高于 McGrath-Solter 去核法和挤压去核法(表 3-1),在操作中,spindle-view 法对卵母细胞的损伤也最小,相对于另两种去核法所得重构胚的后期发育也出现显著差异(表 3-2)(图 1)。

表 3-1 去核方法对去核效果的影响表

Table 3-1 Effect of enucleation method of oocytes on efficiency in enucleation

Enucleation method	Enucleation oocytes No.	Successful rate of enucleation/%
McGrath-Solter method	306	12(42.1%) ^a
Extrusion method	345	25(74.2%) ^a
Spindle-view method	172	164(95.5%) ^a

Significantly difference between a and b ($P < 0.05$); significantly difference between a and c ($P < 0.01$).

表 3-2 去核方法对核移植胚胎发育能力的影响

Table 3-2 Effect of enucleation method on the development capacity of nuclear transfer embryos

Enucleation method	Fusion embryo No.	Embryo development		
		Cleaved	Morula	Blastocyst
McGrath-Solter method	74	42(56.7%) ^a	8(10.8%) ^a	5(6.8%) ^a
Extrusion method	175	101(57.7%) ^a	19(10.9%) ^a	11(6.3%) ^a
Spindle-view method	135	11(88.15%) ^a	3(27.4%) ^a	14(10.4%) ^a

Significantly difference between a and b ($P < 0.05$); significantly

2.3 Spindle-view 观察结果与卵子质量的关系

为研究 Spindle-view 观察结果与卵子质量的关系,对 44h 成熟培养组的卵子按照纺锤体观察结果分为纺锤体清晰、纺锤体模糊和纺锤体看不见 3 组进行孤雌激活培养,以 48h 后的卵裂率和分裂卵的形态作为指标,判断卵子质量,结果见表 4。结果显

示,看不见纺锤体组的卵裂率明显低于可见纺锤体组,纺锤体清晰组与纺锤体模糊组的卵裂率没有差异,但是纺锤体模糊组的卵子异裂比例显著高于纺锤体清晰组,因此根据纺锤体是否可见和纺锤体是否清晰可以对卵子质量进行初步的评定。

表 4 Spindle-view 观察结果与卵子质量的关系(成熟 44h 卵)
Table 4 Relation of oocytes quality and Spindle-view result(44h of maturation)

Figure of spindle	Oocyte No.	Cleavage No./%	Normal No./%	Abnormal No./%	Uncleavage No./%
clear	56	45(80.4%) ^b	39(69.6%) ^b	6(10.8%) ^b	11(19.6%) ^b
Illegible	52	29(55.8%) ^{ac}	17(32.7%) ^{ac}	6(11.5%) ^b	23(44.2%) ^{ac}
Unobservable	46	16(34.8%) ^b	9(19.6%) ^b	7(15.2%) ^b	30(65.2%) ^b

Significantly difference between a and b ($P < 0.05$); significantly difference between a and c ($P < 0.01$).

3 讨论

3.1 Spindle-view 对猪卵母细胞分裂纺锤体观察的适用性

偏振光显微镜(spindle-view)是采用电子光学硬件和计算机数据处理程序,利用有序高分子对偏振光的折射现象来观察细胞内的高分子结构。卵母细胞内减数分裂纺锤体是高分子物质如微丝微管、肌动蛋白细丝环等物质有序排列而成。这些物质均可以使偏振光发生折射,因此偏振光通过卵母细胞减数分裂纺锤体时发生折射,这种折射可以被检偏器捕捉,并通过偏振光显微镜观察^[6]。与牛、羊等家畜和小鼠、家兔等实验动物的卵子细胞质较为清亮,纺锤体易于观察相比,由于猪的卵母细胞中颗粒性物质(如脂肪微滴等阻光物质)较多,对纺锤体观察影响较大。但通过极体位置辅助寻找可以确定纺锤体位置。

3.2 几种去核方法的比较

本试验认为,McGrath-Solter 去核法虽然操作简便、迅速,但在去核过程中,往往使卵母细胞第一极体的位置发生改变,改变了极体与细胞核的相对位置,影响去核效果。同时,去核针进入细胞质,破坏卵母细胞的微结构,可能会影响重构胚的发育。McGrath-Solter 去核法去核操作步骤多,钝端去核管进入卵黄周隙的操作耗费时间较长,难以达到满意的操作速度。挤压去核法去核时,制作的固定针直径略小于猪卵母细胞直径,操作时,穿刺针可直接从

卵母细胞上方将其刺破,省去了在固定针上摩擦划破细胞膜的步骤,但两步法去核需要更换钝头针用于挤压,在实际操作中,如果是两台以上显微镜配合进行,效果较好,单台显微镜操作效率较低^[2]。在 Spindle-view 直观的观测下,去核率可以达到 95% 以上,而且相对传统去核方法,其对卵母细胞本身的损伤最小,有利于重构胚的后期发育。

3.3 Spindle-view 观察在猪卵母细胞质量监控上的作用

在以往的猪核移植卵母细胞质量评定中,一般只能以光镜下肉眼观察的形态学进行判断,较为粗略。采用组织学方法(超微结构、组织染色)得到的仅是一个总体评定,因为样品卵在检测中已经丧失生理活性。本研究以 spindle-view 观察猪卵子减数分裂纺锤体的不同结果对卵母细胞进行分类激活培养,结果显示,纺锤体结构紧凑,成像明显的卵子发育能力较好。这种质量评定可以在核移植操作过程针对单个卵母细胞实时监控,同时不损伤卵母细胞质量,相对于其他方法而言具有不可替代的优越性。当然这种判定方法可能还有一定的局限,但随着该系统使用时间延长和经验积累,利用 Spindle-view 观察对卵子进行质量监控的方法会越来越完善。

本实验还显示,在 42 ~ 48h 之间利用 Spindle-view 所得到的猪卵母细胞纺锤体影象与极体的相对位置没有明显变化,这一结果提示,在 42 ~ 48h 之间采用 McGrath-Solter 去核时,以极体位置作为纺锤体位置标识是可行的,但在 44h 最为准确。

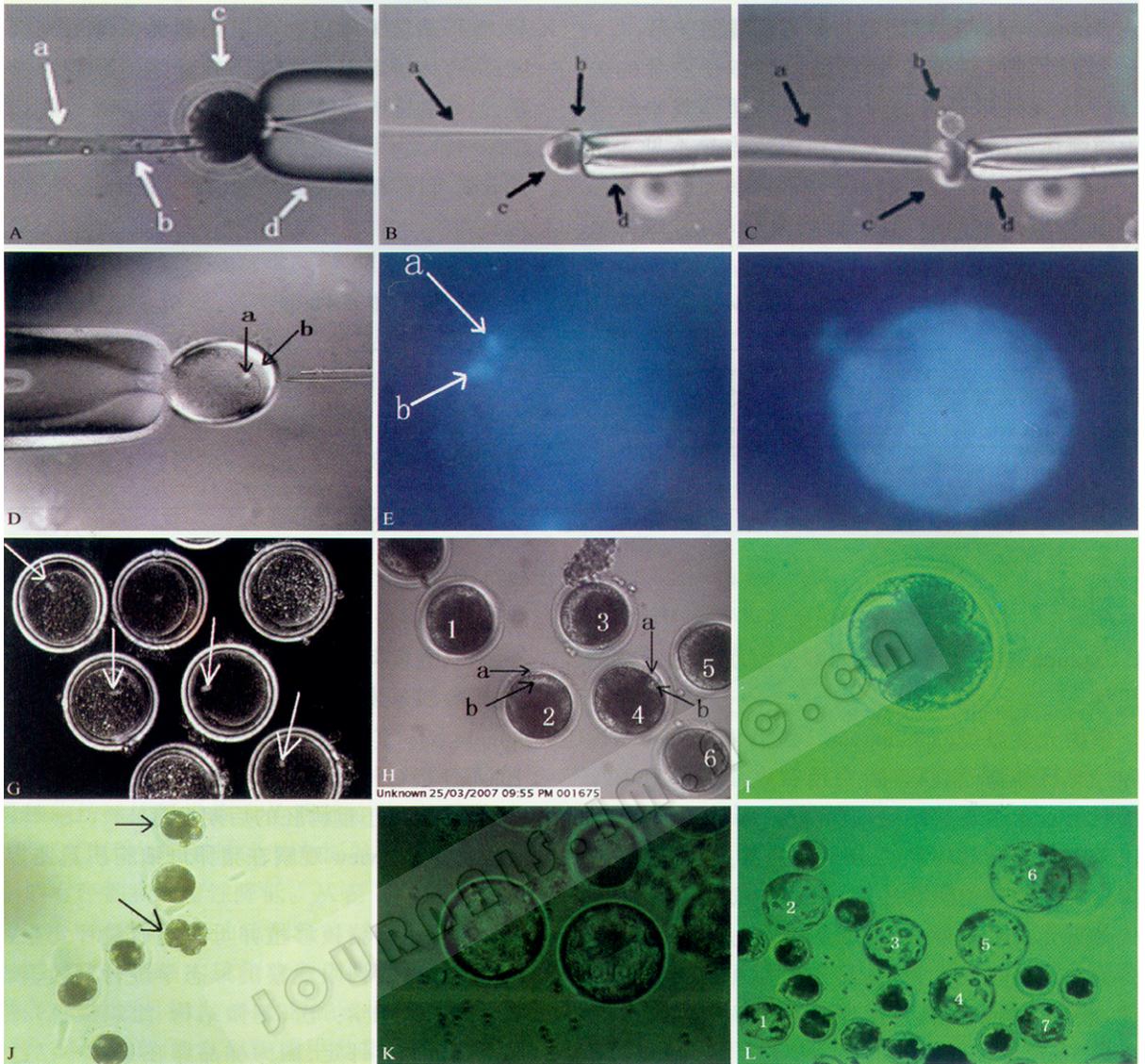


Fig. A The method of McGrath-Solter's enucleation(200×)

a :enucleating pipette of fine tip b :pbI c : oocyte d : holding pipette.

Fig. B one step of the squeezing method of enucleation :splitting the ZP(100×)

a : glass needle b : pbI c : oocyte d : holding pipette

Fig. C Next step of the squeezing method of enucleation :enucleating(100×).

a : enucleation pipette of dull tip b : pbI and its surrounding part of cytoplasm.

Fig. D The method of spindle-view enucleation(the angle between spindle images and pbI is $\leq 5^\circ$, 200×)

a : spindle-view picture of oocyte's spindle image ; b : pbI.

Fig. E Matured oocyte for 44h under fluorescer(200×)

a : pbI b : MII phase chromosome mass.

Fig. F Oocyte of succeeding in manipulation of enucleation under fluorescenc(200×)

Fig. G The clear spindle-view image(arrow , 200×)

Fig. H The spindle-view image of No.2,4 is illegible and No.1,3,5,6 is unobservable

a : pbI ; b : MII phase chromosome mass.

Fig. I Normal cleavage oocytes after parthenogenetic activation(4cell 200×)

Fig. J Abnormal cleavage oocytes after parthenogenetic activation(arrow)

Fig. K The blastocysts after parthenogenetic activation which are clear to observe the spindle(200×)

Fig. L NT blastocysts(arrow is the normal blastocysts)

REFERENCES (参考文献)

- [1] Liu J L, Sun LY, Barber M, *et al.* Hypertonic medium treatment for location of nuclear material in bovine metaphase II oocytes. *Biology of Reproduction*, 2002 **66**:1342 – 1349.
- [2] Liu IX (刘东), Zhang DF (张德福). Modification on enucleation method of porcine oocytes. *Shanghai Laboratory Animal Science* (上海实验动物科学) 2004 **24**(3):134 – 137.
- [3] Liu L, Oldenbourg RA, Trimarchi JR. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. *Nature-Biotechnology* 2000b **18**:223 – 225.
- [4] Guo JI (郭继彤). Cloned goats (*Capra hircus*) from adult ear cells. *Science in China, Ser. C* (中国科学 C 辑), 2002, (01): 79 – 85.
- [5] Dominko T, Chan A, Simerly C, *et al.* Dynamic imagine of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: Implications for enucleation efficiency- verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biology of Reproduction* 2000 **62**:150 – 154.
- [6] Lei AM, Lin SQ, Dou ZY. Application of spindle-view in the observation of meiotic spindles of oocytes. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005 **13**(3):335 – 340.
- [7] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, *et al.* Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by polscope before insemination. *Human Reproduction* 2001a **16**:1464 – 1468.
- [8] Wang WH, Keefe DL. Prediction of chromosome misalignment among *in vitro* matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. *Fertility and Sterility* 2002 **78**:1077 – 1081.
- [9] Liu L, Trimarchi JR, Oldenbourg R, *et al.* Increased birefringence, in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living oocytes. *Biology of Reproduction* 2000b **63**:251 – 258.
- [10] Li SQ (李善刚). Rabbits produced from somatic and embryonic stem cells by nuclear transfer, Center of Developmental Biology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine, Ph. D Dissertation (上海交通大学医学院博士论文), 2005, **6**:31 – 32.
- [11] Zhang DF (张德福), Wang Y (王英), Chen Y (陈莹), *et al.* Some factors affecting *in vitro* development of porcine embryo reconstitution from somatic cells nuclear transfe. *Acta Biologica Experimentalis Sinica* (实验生物学报), 2003 **36**(1):49 – 53.
- [12] Dong YJ (董雅娟), Bo XJ (柏学进), Li JI (李建栋). Investigation of bovine somatic cell nuclear transfer. *Chinese Journal of Veterinary Science* (中国兽医学报) 2002 **22**(4):347 – 350.
- [13] Guo Y, Ni H, Yang WS, *et al.* Improvement of the microinjection system for transgenic rabbit embryos. *Scientia Agricultura Sinica*, 1998 **31**(5):69 – 74.
- [14] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, *et al.* The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertility and Sterility* 2001 **75**:348 – 353.
- [15] Luo HN (罗海宁), Liu Q (刘群), Zhu GX (朱桂金). The influence of the first polar body position at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development. *Journal of Huazhong University of Science and Technology* (Health Sciences) (华中科技大学学报 (医学版)) 2002 **31**:430 – 432.