

# 不同激活方法对猪体外成熟卵母细胞 孤雌发育的影响

刘国世<sup>1</sup>, 曾申明<sup>1\*</sup>, 吴中红<sup>1</sup>, 邢凤英<sup>2</sup>, 田见晖<sup>1</sup>, 林平<sup>1</sup>, 姜午旗<sup>1</sup>, 刘敬浩<sup>1</sup>, 朱士恩<sup>1</sup>, 张忠诚<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 2. 上海第二医科大学发育生物学重点实验室, 上海 200025)

**摘要:** 研究了猪体外成熟卵母细胞的电激活、离子霉素激活和乙醇激活的方法。3种不同激活方法筛选试验表明, 猪卵母细胞电激活最佳参数为电场强度130 V/min, 脉冲时程80  $\mu$ s的1次脉冲激活, 即130 V/mm-80 $\mu$ s-1次, 其囊胚(发育)率为18.92% $\pm$ 8.48%( $P>0.05$ ); 离子霉素激活的最佳条件为15  $\mu$ mol/L、激活时间40 min, 其囊胚率为21.27% $\pm$ 8.54%( $P>0.05$ ); 乙醇激活最佳参数以9%乙醇激活处理3 min, 囊胚率为13.33% $\pm$ 7.64%。进一步对比试验表明, 电激活和离子霉素激活处理的囊胚率和囊胚细胞数无显著差异( $P>0.05$ ), 电激活的卵裂率明显高于乙醇激活( $P<0.05$ ), 而囊胚率和细胞数差异不显著( $P>0.05$ )。

**关键词:** 猪; 卵母细胞; 体外成熟; 电激活; 离子霉素激活; 乙醇激活

**中图分类号:** S828.3; Q492.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0366-6964(2004)06-0615-06

哺乳动物卵母细胞的孤雌激活及发育研究始于19世纪30年代。近十几年来随着核移植技术的发展, 孤雌激活研究也不断深入。受体卵母细胞的有效激活, 是核移植重构胚发育的关键。受体卵母细胞激活及其发育能力研究, 对提高核移植效率及进行胚胎孤雌发育的研究有重要意义。卵母细胞激活方法很多, 可分为物理激活和化学激活, 物理激活有电脉冲、机械刺激、改变温度等; 化学激活有钙离子载体(A23187和离子霉素)、乙醇、乙基汞硫代水杨酸钠、酶处理、改变渗透压、麻醉剂、蛋白合成抑制剂(6-二甲氨基嘌呤6-DMAP、亚胺环己酮CHX、丁酸内酯-1 BL-1、星形孢菌素)等。应用电激活<sup>[1~3]</sup>和化学激活(离子霉素 $\rightarrow$ 6-DMAP)<sup>[4]</sup>已经获得了体细胞核移植的活仔猪, 但效率较低, 仅为1%~2%。本研究对猪的卵母细胞电激活、离子霉素和乙醇激活条件进行了筛选, 以获得较佳的孤雌激活方法, 为卵母细胞成熟体系、胚胎发育体系的建立, 以及体细胞核移植试验提供有效激活参数。

## 1 材料和方法

### 1.1 猪卵母细胞的采集与体外成熟培养

从屠宰场收集刚屠宰的猪卵巢, 用16号针头的

10 mL一次性注射器抽取卵巢表面直径2~8 mm的卵泡。成熟培养液为NCSU23(或TCM199)+10%卵泡液(PFF)+0.1 mg/mL半胱氨酸+10 ng/mL EGF+10 IU/mL PMSG+10 IU/mL hCG。成熟培养在5% CO<sub>2</sub>的空气、38.5℃、饱和湿度的二氧化碳培养箱(Forma, USA)条件下进行。

### 1.2 卵母细胞的孤雌激活

将培养44 h的卵丘-卵母细胞复合体(COCs)移入0.1%透明质酸酶中消化, 震荡1 min, 除去颗粒细胞。电激活用电融合仪(Embryo cell fusion system, Fujira Industry Co. Ltd, Japan)进行。电激活: 电激活液为0.3 mol/L甘露醇(D-mannitol, Sigma), 0.05 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>。激活后立即将卵子移入NCSU23+4 mg/mL BSA+7.5  $\mu$ g/mL细胞松弛素B+10  $\mu$ g/mL放线菌酮中清洗并培养, 4 h后移入NCSU23+4 mg/mL BSA中培养6~7 d。离子霉素激活: 卵子先移入15  $\mu$ L离子霉素洗2遍, 然后分别处理10~70 min, 或15~25  $\mu$ L离子霉素处理10~40 min, 再移入2 mmol/L的DMAP清洗并培养3.5 h, 最后移入NCSU23+4 mg/mL BSA的发育液中培养6~7 d。乙醇激活: 将卵子分别移入不同浓度乙醇(含3 mg/mL BSA的TL-HEPES配制)激活液中5 min, 再分别移入2 mmol/L DMAP(NCSU23+4 mg/mL BSA配制)培养3.5 h, 最后分别移入NCSU23+4 mg/mL BSA培养6~7 d。移入9%乙醇中洗2遍并处理5 min, 后分3种处理方法, 前2种处理是将卵子分别

收稿日期: 2003-10-28

基金项目: 中国博士后科学基金(2001年)资助

作者简介: 刘国世(1972-), 男, 山东即墨市人, 博士, 副教授, 主要从事动物配子和胚胎生物工程的教学与科研工作

\* 通讯作者: 曾申明, E-mail: zengsm@cau.edu.cn

移入2 mmol/L DMAP 培养3.5 h 和7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  细胞松弛素 B(CB, NCSU23+4 mg/mL BSA+7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  细胞松弛素B+10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  放线菌酮)中培养4 h,然后分别移入NCSU23+4 mg/mL BSA 培养6~7 d;第3种处理是激活后的卵子直接移入NCSU23+4 mg/mL BSA 培养6~7 d。将卵子移入9%乙醇中,分别处理不同时间;然后,分别移入7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CB 培养3.5 h;最后分别移入NCSU 23+4 mg/mL BSA 培养6~7 d。

在其它条件相同的情况下,用本试验筛选的130 v/mm-80 $\mu\text{s}$ -1次最佳电激活条件分别与15  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、40 min 最佳离子霉素激活条件,以及9%乙醇、3 min、CB $\rightarrow$ NCSU23 最佳乙醇激活培养条件对同一批卵进行激活和培养,44~48 h 观察卵裂情况,记录卵数和卵裂数;6~7 d 观察囊胚情况,记录囊胚数。最终比较它们之间卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数。

### 1.3 卵子激活后的发育培养

发育培养液为NCSU23+4 mg/mL BSA,每滴50  $\mu\text{L}$ ,可放10~15枚胚胎,上盖石蜡油,在5%  $\text{CO}_2$ 、38.5 $^\circ\text{C}$ 、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养。44~48 h 观察卵裂情况,记录卵数和卵裂数;第6~7天观察囊胚情况,记录囊胚数。囊胚用10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst33342 染色,压片,在荧光显微镜下,观察囊胚的内细胞团(ICM)和滋养层细胞(TE)的细胞核数,统计囊胚的细胞数。

### 1.4 数据处理

试验数据用SAS软件DUNCAN的AVONA和GLM的方差分析进行统计。试验每一次重复均为同一批次试验,相同的卵巢来源和试验条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 电激活参数的确定

不同脉冲次数对猪体外成熟卵母细胞激活后的卵裂率和囊胚率差异不显著( $P>0.05$ ),但2次和3次脉冲处理的囊胚率低于1次脉冲处理;囊胚细胞数之间无显著差异( $P>0.05$ ),但1次比3次脉冲的囊胚细胞数明显高( $P<0.05$ )(见表1)。由此表明,1次脉冲的电激活效果优于多次脉冲的电激活,增加脉冲次数不能提高卵子激活后的发育效率。

不同场强或不同脉冲时程11种组合中(见表2),87 V/mm-40 $\mu\text{s}$ -1次处理的卵裂率,除略低于109 V/mm-40 $\mu\text{s}$ ( $P>0.05$ ),明显低于其它9种组合( $P<0.01$ )。11种处理的囊胚率无显著差异( $P>0.05$ ),即单次脉冲,场强在90~150 V/mm之间、脉冲时程在40~160  $\mu\text{s}$ 之间,卵母细胞激活后的囊胚率差异不显著( $P>0.05$ )。场强130 V/mm、脉冲时程40~80  $\mu\text{s}$ 处理的囊胚率较高,130 V/mm-80 $\mu\text{s}$ 处理的囊胚率最高。各处理的囊胚细胞数无显著差异( $P>0.05$ )。由此表明,130 V/mm-80 $\mu\text{s}$ -1次脉冲是本试验的最佳电激活参数。

### 2.2 离子霉素(Ionomycin)激活条件的确定

15、20和25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的离子霉素对猪体外成熟卵母细胞激活后的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数无显著差异( $P>0.05$ )(见表3)。说明在处理时间相同的情况下,15~25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 离子霉素激活效果相似。

15  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 离子霉素7个时间处理组的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数无显著差异( $P>0.05$ )(见表4),囊胚率从10 min处理的16.03% $\pm$ 7.78%升高到40 min处理的21.27% $\pm$ 8.54%,再降低到70 min处理的14.18% $\pm$ 7.12%。由此表明,15  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 离子霉素40 min是本试验离子霉素激活的最佳方法。130 V/mm-80 $\mu\text{s}$ -1次电激活与15  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、40 min离子霉素激活处理的卵裂率、囊

表1 不同电脉冲次数对猪体外成熟卵母细胞孤雌激活效果的影响\*

Table 1 Effect of different times of pulse on parthenogenetic activation of *in vitro* matured porcine oocytes

脉冲次数 Number of pulses	卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst	囊胚细胞数 Cell number of blastocyst
1	267	58.43 $\pm$ 16.78****	13.17 $\pm$ 9.89 <sup>a</sup>	16.00 $\pm$ 4.41 <sup>a</sup> (32)**
2	227	60.47 $\pm$ 11.24 <sup>a</sup>	8.95 $\pm$ 2.63 <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 2.50 <sup>ab</sup> (21)
3	228	59.96 $\pm$ 9.16 <sup>a</sup>	6.76 $\pm$ 5.18 <sup>a</sup>	13.12 $\pm$ 3.46 <sup>b</sup> (17)

\* 场强87 V/mm,脉冲时程40  $\mu\text{s}$ 。Field strength 87 V/mm,pulse duration 40  $\mu\text{s}$

\*\* 此列括号是统计囊胚细胞数的囊胚数量。The numbers in the brackets are numbers of the blastocysts observed

\*\*\* 表内同列上标有不同字母者差异显著( $P<0.05$ )。下表同

Values with different superscripts within the same column are significantly different( $P<0.05$ ). The same below

表 2 不同场强和不同脉冲时程 1 次脉冲对猪体外成熟卵母细胞孤雌激活效果的影响

Table 2 Effect of a pulse on parthenogenetic activation of *in vitro* matured porcine oocytes

场强-脉冲时程/(V/mm-μs) Field strength-pulse duration	卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocysts	囊胚细胞数 No. of cells in blastocysts
87-40	416	47.81±17.23 <sup>Bc</sup>	12.09±9.48 <sup>a</sup>	15.27±4.79 <sup>a</sup> (49) <sup>*</sup>
87-160	409	63.34±6.79 <sup>Ab</sup>	11.40±5.66 <sup>a</sup>	14.58±4.38 <sup>a</sup> (48)
109-40	407	57.38±7.21 <sup>ABbc</sup>	15.96±11.54 <sup>a</sup>	15.32±5.27 <sup>a</sup> (63)
109-80	422	70.02±15.71 <sup>Aa</sup>	17.86±8.15 <sup>a</sup>	15.16±4.78 <sup>a</sup> (73)
109-120	419	65.92±8.00 <sup>Ab</sup>	15.90±11.83 <sup>a</sup>	15.64±4.76 <sup>a</sup> (64)
109-160	425	66.19±9.28 <sup>Ab</sup>	13.33±9.09 <sup>a</sup>	14.58±4.16 <sup>a</sup> (57)
130-40	435	67.60±11.00 <sup>Ab</sup>	18.04±11.20 <sup>a</sup>	14.04±3.55 <sup>a</sup> (80)
130-80	405	67.18±13.75 <sup>Ab</sup>	18.92±8.48 <sup>a</sup>	15.08±4.51 <sup>a</sup> (75)
130-120	388	65.64±11.78 <sup>Ab</sup>	16.97±12.24 <sup>a</sup>	15.32±6.07 <sup>a</sup> (62)
130-160	362	68.23±9.06 <sup>Ab</sup>	16.23±6.29 <sup>a</sup>	13.47±3.85 <sup>a</sup> (57)
152-40	413	69.31±10.13 <sup>Ab</sup>	16.50±11.78 <sup>a</sup>	15.00±4.52 <sup>a</sup> (70)

表内同列上标有不同小写字母者差异显著( $P<0.05$ )。表内同列上标有不同大写字母者差异极显著( $P<0.01$ )。下表同  
Values with different superscripts lowercase within the same column are significantly different ( $P<0.05$ ). Values with different superscripts capital letter within the same column are greatly significantly different ( $P<0.01$ ). The same below

表 3 不同离子霉素浓度对猪体外成熟卵母细胞孤雌激活效果的影响

Table 3 Effect of ionomycin treatment concentration on parthenogenetic activation of *in vitro* matured porcine oocytes

浓度/(μmol/L) Concentration	处理时间/min Treatment time	卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst	囊胚细胞数 No. of cells in blastocysts
15	10	43	46.51	23.26	16.70(10) <sup>**</sup>
	20	43	32.56	6.98	15.33(3)
	30	44	43.18	6.82	23.67(3)
	40	43	48.84	16.28	16.43(7)
	Means±SD		42.77±7.19 <sup>**</sup>	13.34±7.96 <sup>*</sup>	18.03±3.80 <sup>*</sup>
20	10	43	41.86	9.30	27.25(4)
	20	42	31.80	9.52	21.25(4)
	30	42	50.00	14.29	20.00(6)
	40	44	47.33	15.91	16.43(7)
	Means±SD		44.42±5.43 <sup>*</sup>	12.25±3.35 <sup>*</sup>	21.23±4.50 <sup>*</sup>
25	10	45	53.33	6.67	15.33(3)
	20	43	55.81	9.30	14.25(4)
	30	42	40.48	19.05	19.38(8)
	40	42	35.71	14.29	20.67(6)
	Means±SD		46.33±9.76 <sup>*</sup>	12.38±5.48 <sup>*</sup>	17.41±3.10 <sup>*</sup>

表 4 离子霉素处理时间对猪体外成熟卵母细胞孤雌激活效果的影响

Table 4 Effect of ionomycin treatment duration on parthenogenetic activation of *in vitro* matured porcine oocytes

处理时间/min Treatment time	卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst	囊胚细胞数 No. of cells in blastocysts
10	256	65.05±11.58 <sup>**</sup>	16.03±7.78 <sup>*</sup>	19.86±7.35 <sup>a</sup> (40) <sup>**</sup>
20	284	68.67±6.98 <sup>*</sup>	18.06±5.39 <sup>*</sup>	22.69±9.92 <sup>a</sup> (52)
30	285	66.72±9.08 <sup>*</sup>	16.37±9.11 <sup>*</sup>	20.38±8.40 <sup>a</sup> (46)
40	296	68.82±9.81 <sup>*</sup>	21.27±8.54 <sup>*</sup>	20.26±8.45 <sup>a</sup> (59)
50	283	66.66±13.30 <sup>*</sup>	20.19±6.92 <sup>*</sup>	21.90±9.82 <sup>a</sup> (49)
60	252	69.30±13.73 <sup>*</sup>	19.91±7.85 <sup>*</sup>	19.4±10.65 <sup>a</sup> (58)
70	213	62.39±9.70 <sup>*</sup>	14.18±7.12 <sup>*</sup>	21.00±8.84 <sup>a</sup> (29)

胚率和囊胚细胞数无显著差异( $P>0.05$ ),电激活处理的卵裂率和囊胚率略高于离子霉素激活(见表5)。由此说明,电激活效果要略优于离子霉素激活。

### 2.3 乙醇激活条件的确定

不同浓度乙醇对猪卵子激活5 min处理后,1%、3%、11%和13%乙醇处理组没有发育到囊胚,

而9%乙醇处理的囊胚率明显高于5%乙醇( $P<0.05$ ),也略高于7%乙醇处理的囊胚率,但没有显著差异( $P>0.05$ );5%、7%和9%乙醇处理的囊胚细胞数没有显著差异( $P>0.05$ ),其中7%和9%的略高一些(见表6)。因此,在激活时间相同的情况下,本试验9%乙醇处理的囊胚率最高,效果最好。

表5 电激活和离子霉素对猪体外成熟卵母细胞孤雌激活效果的影响

Table 5 Effect of electrical and ionomycin activations on parthenogenetic activation of *in vitro* matured porcine oocytes

激活方法 Activation method	卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst	囊胚细胞数 No. of cells in blastocysts
电激活	211	71.18±8.72 <sup>a</sup>	32.70±13.55 <sup>a</sup>	21.49±8.75 <sup>a</sup>
离子霉素激活	214	67.68±16.94 <sup>a</sup>	26.58±13.83 <sup>a</sup>	22.36±8.89 <sup>a</sup>

表6 不同乙醇浓度对猪体外成熟卵母细胞孤雌激活效果的影响

Table 6 Effect of different concentration of ethanol on parthenogenetic activation of *in vitro* matured porcine oocytes

乙醇浓度/% Ethanol concentration	卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst	囊胚细胞数 No. of cells in blastocysts
1	93	7.71±1.77 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	
3	90	14.03±2.02 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	
5	88	12.60±2.84 <sup>bc</sup>	1.96±3.39 <sup>b</sup>	18.00±1.41 <sup>a</sup> (2)*
7	92	30.43±4.85 <sup>abc</sup>	3.23±3.23 <sup>ab</sup>	25.67±8.62 <sup>a</sup> (3)
9	96	38.28±9.39 <sup>ab</sup>	6.26±3.05 <sup>a</sup>	21.00±5.10 <sup>a</sup> (6)
11	69	43.47±8.09 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	
13	35	42.22±24.11 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	

在相同乙醇浓度和处理时间,即9%乙醇5 min处理的情况下,乙醇处理后的种培养条件的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数均无显著差异( $P>0.05$ ),但CB→NCSU23处理组的囊胚率高一些(见表7)。因此,本试验猪卵母细胞乙醇处理后先移入CB(NCSU23+CB+放线菌酮),4 h后再移入NCSU23+4 mg/mL BSA培养的效果最好。

9%乙醇3、5和11 min对猪卵母细胞处理后的卵裂率明显高于13 min处理的卵裂率( $P<0.05$ );而3 min处理的囊胚率13.33%±7.64%明显高于9、11和13 min处理( $P<0.05$ ),也高于5和7 min处理的囊胚率( $P>0.05$ )(见表8)。因此,在浓度相同的乙醇

激活下,3 min处理的效果最好。通过表6、表7和表8结果统计分析说明,在乙醇激活中9%乙醇对猪体外成熟卵母细胞处理3 min,之后移入CB液(细胞松弛素B,NCSU 23+4 mg/mL BSA+7.5 μg/mL细胞松弛素B+10 μg/mL放线菌酮),4 h后再移入NCSU 23+4 mg/mL培养的囊胚发育率最高,效果最好,为最佳乙醇激活条件。

在其它条件相同的情况下,电激活(130 V/mm-80 μs-1)的卵裂率明显高于乙醇激活(9%、3min)( $P<0.05$ );而囊胚率(13.21%±6.05%)和细胞数也分别高于乙醇激活的囊胚率(5.00%±1.80%)和细胞数,但二者差异不显著( $P>0.05$ )(见表9)。因此,

表7 不同培养条件对猪体外成熟卵母细胞乙醇激活效果的影响

Table 7 Effect of different culture conditions on ethanol activation *in vitro* matured porcine oocytes

培养条件 Culture condition	卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst	囊胚细胞数 No. of cells in blastocysts
DMAP→NCSU23	89	37.26±5.74 <sup>a</sup>	2.52±2.18 <sup>a</sup>	23.5±4.95 <sup>a</sup> (2)*
CB→NCSU23	80	35.5±6.09 <sup>a</sup>	5.00±1.80 <sup>a</sup>	13.75±2.99 <sup>a</sup> (4)
NCSU23	85	25.03±11.32 <sup>a</sup>	1.59±2.75 <sup>a</sup>	21.00 <sup>a</sup> (1)

表 8 不同乙醇处理时间对猪体外成熟卵母细胞孤雌激活效果的影响

Table 8 Effect of different ethanol activation duration on parthenogenetic activation of *in vitro* matured porcine oocytes

激活时间/min Activation time	卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst	囊胚细胞数 Cell No. of blastocyst
3	60	60.00±8.66 <sup>a</sup>	13.33±7.64 <sup>a</sup>	13.88±3.48 <sup>ab</sup> (8)*
5	65	58.56±8.33 <sup>a</sup>	4.69±4.76 <sup>ab</sup>	18.00±2.65 <sup>ab</sup> (3)
7	62	54.84±11.91 <sup>ab</sup>	6.35±7.28 <sup>ab</sup>	12.25±2.06 <sup>b</sup> (4)
9	65	54.45±12.51 <sup>ab</sup>	1.54±2.75 <sup>b</sup>	23.00 <sup>a</sup> (1)
11	57	63.36±7.30 <sup>a</sup>	1.85±3.21 <sup>b</sup>	19.00 <sup>ab</sup> (1)
13	77	40.24±6.91 <sup>b</sup>	2.90±5.02 <sup>b</sup>	11.50±0.71 <sup>b</sup> (2)

表 9 电激活和乙醇激活对猪体外成熟卵母细胞孤雌激活的效果影响

Table 9 Effect of electrical and ethanol on parthenogenetic activation of *in vitro* matured porcine oocytes

激活方法 Activation method	卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst	囊胚细胞数 Cell No. of blastocyst
电激活 Electrical	92	51.99±6.40 <sup>a</sup>	13.21±6.05 <sup>a</sup>	18.17±5.01 <sup>a</sup> (12)*
乙醇激活 Ethanol	80	35.00±6.09 <sup>b</sup>	5.00±1.80 <sup>a</sup>	13.75±2.99 <sup>a</sup> (4)

电激活比乙醇激活的效果好。

### 3 讨论

Ca<sup>2+</sup>浓度升高是卵母细胞被激活的信号,电脉冲引起细胞内化学物质变化,导致卵母细胞活化,电脉冲使卵母细胞出现微孔,Ca<sup>2+</sup>释放,引起卵母细胞活化。本试验条件下,电激活的最佳参数是130 V/mm-80μs-1次,与Kure-bayashi等<sup>[5]</sup>报道的150 V/mm、100 μs,基本一致;而与Lee等<sup>[6]</sup>报道的最佳电激活条件180 V/mm、30 μs不同。

细胞外(激活液)Ca<sup>2+</sup>对诱导卵母细胞Ca<sup>2+</sup>激活卵母细胞是必需的,激活刺激使得细胞内游离的Ca<sup>2+</sup>水平提高,引起细胞内Cyclin B减少,导致MPF水平下降或消失,引起卵子激活。乙醇、电脉冲、离子霉素、氯化铯等均能引起卵内Ca<sup>2+</sup>的升高。蛋白合成抑制剂-亚胺环己酮(CHX)与乙醇、电脉冲及氯化铯联合使用对猪IVM卵母细胞的激活具有显著的协同促进作用<sup>[7]</sup>,CHX引起卵母细胞激活是通过抑制有关蛋白质的合成起作用的。本试验使用的电激活液CaCl<sub>2</sub>为0.05 mmol/L,也有使用0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>进行孤雌激活和核移植重构胚的激活<sup>[1]</sup>。Ca<sup>2+</sup>水平过高虽然能提高激活率,但会影响卵母细胞激活后发育潜力。

人为单次脉冲或乙醇激活只能引起单次波动。有些学者报道2次脉冲效果较好,也有认为3次脉冲效果较好。本试验结果为1次脉冲略优于多次脉冲效果,与Prochazka<sup>[8]</sup>的观点一致。

Betthausen等<sup>[4]</sup>采用15 μmol/L离子霉素20

min,1.9 mmol/L 6-DMAP 3~4 h的化学激活,获得了2窝4头克隆猪。本试验认为15 μmol/L离子霉素40 min,2.0 mmol/L 6-DMAP处理3~4 h的激活效果较好,离子霉素处理时间较前者长。

乙醇通过刺激质膜上IP<sub>3</sub>(三磷酸肌醇)形成从而使IP<sub>3</sub>介导的Ca<sup>2+</sup>释放加速。采用10%乙醇5 min与CHX(10 h)联合处理猪卵子激活率较高;Hyun等<sup>[9]</sup>认为乙醇/6-DMAP可有效激活猪卵母细胞。本试验结果表明9%乙醇处理3 min,再用CB+放线菌酮培养4 h激活的囊胚发育率较高(13.33%±7.64%)。本试验猪卵母细胞电激活(电脉冲/CB+放线菌酮)后的囊胚发育率、细胞数与离子霉素激活(离子霉素/6-DMAP)无显著差异(P>0.05),只是前者的囊胚率略高(高出6.02%)。因此,认为电激活的效果略好。而Tao等<sup>[10]</sup>和Koo等<sup>[11]</sup>的试验发现,猪卵母细胞电激活的囊胚率显著高于A23187/6-DMAP激活的囊胚率。

本试验猪卵母细胞电激活的卵裂率显著高于乙醇激活(乙醇/CB+放线菌酮)卵裂率(P<0.05),而两者囊胚率和细胞数虽然统计学上无显著差异,但电激活较高(分别高出8.21%和4.42%)。因此认为电激活的效果好于乙醇激活。这与Jiang等<sup>[12]</sup>对大鼠的研究结果一致。

### 参考文献:

- [1] Polejaeva I A, Chen S H, Vanght T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature, 2000, 407:86~90.

- [2] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. *Science*, 2000, 289:1188~1190.
- [3] Bondioli K R, Ramsoondar J J, Mamsoondar J J, et al. Production of cloned pigs by somatic cell nuclear transfer[J]. *Theriogenology*, 2002, 57(1): 398 (Abstract).
- [4] Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from *in vitro* systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18:1055~1059.
- [5] Kure-bayashi S, Miyake M, Okada K, et al. Successful implantation of *in vitro*-matured electro-activated oocytes in the pig [J]. *Theriogenology*, 2000, 53: 1105~1119.
- [6] Lee S J, Pursel V G, Chung K S. Effects of fusion media, voltage and micromanipulation on the activation of pig oocytes and blastomere development[J]. *Theriogenology*, 1993, 39: 257.
- [7] 李光鹏, 孟庆刚, 魏 鹏, 等. 蛋白质合成抑制剂亚胺环己酮(CHX)对猪卵母细胞体外成熟的影响. *动物学报*, 2001, 47(6): 684~690.
- [8] Prochazka R, Kanka J, Sutovsky P, et al. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse[J]. *J Reprod Fertil* 1992, 96: 725~734.
- [9] Hyun S H, Lee G S, Kin D Y, et al. Electrical activation with or without chemical activation as an efficient method for parthenogenetic activation of pig oocytes [J]. *Theriogenology*, 2001, 55(1): 453.
- [10] Tao T, Machaty Z, Boquest A C, et al. Optimisation of porcine oocytes activation following nuclear transfer [J]. *Zygote*, 2000, 8(1): 69~77.
- [11] Koo D B, Kang Y K, Choi Y H, et al. Developmental potential and transgenic expression of porcine nuclear transfer embryos using somatic cells[J]. *Mole Reprod Deve*, 2001, 58: 15~21.
- [12] Jiang J Y, Mizuno S, Mizutani E, et al. Parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes *in vitro* [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(1): 120~125.

### Effect of Different Activation Methods on the Development of Porcine Oocytes Matured *in vitro*

LIU Guo-shi<sup>1</sup>, ZENG Shen-ming<sup>1</sup>, WU Zhong-hong<sup>1</sup>, XING Feng-ying<sup>2</sup>, TIAN Jian-hui<sup>1</sup>,  
LIN Ping<sup>1</sup>, JIANG Wu-qi<sup>1</sup>, LIU Jing-hao<sup>1</sup>, ZHU Shi-en<sup>1</sup>, ZHANG Zhong-cheng<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Shanghai Laboratory of Development Biology, Shanghai Second Medicine University, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** Electrical, ionomycin and ethanol activation of porcine oocytes matured *in vitro* were performed in this study to establish an effective activation protocol for parthenogenetic porcine oocytes. Oocytes were parthenogenetically activated by one of three stimuli: (1) optimal electric (electrical field strength and the pulse duration 130 V/mm-80  $\mu$ s with blastocyst development rate of 18.92% $\pm$ 8.48%), (2) optimal ionomycin (15  $\mu$ mol/L ionomycin for 40 min with blastocyst rate of 21.27% $\pm$ 8.54%), (3) optimal ethanol (9% ethanol for 3 min followed, resulting in blastocyst rate of 13.33% $\pm$ 7.64%). It was proved that in the same circumstance no obvious difference existed in the blastocyst rate (32.70% $\pm$ 13.55% vs. 26.58% $\pm$ 13.83%) and cell number of blastocyst between electrical activation (130 V/mm-80 $\mu$ s-1) and ionomycin activation (15  $\mu$ mol/L, 40 min). Moreover, electrical activation achieved higher ( $P < 0.05$ ) rate of post-activation cleavage than ethanol activation; the blastocyst rate (13.21% $\pm$ 6.05% vs. 5.00% $\pm$ 1.80%) and cell number of blastocyst showed no difference ( $P > 0.05$ ). Therefore, among the three kinds of activation methods, electrical activation was the best.

**Key words:** porcine; oocyte; *in vitro* maturation; electrical activation; ionomycin activation; ethanol activation