

不同血清对水牛早期胚胎性别比率的影响

武建中 李跃民*

(西南大学牧草与草食家畜重点实验室, 重庆 400715)

摘要 研究了不同血清对水牛早期胚胎性别比率的影响。结果表明, 同种血清不同批次对胚胎性别比率没有影响。添加胎牛血清组 3 个不同发育阶段雄性胚胎比率之间差异显著($P < 0.05$), 随着细胞数目的增加雄性胚胎比率不断增加。添加发情牛血清组 3 个不同发育阶段雄性胚胎比率之间差异显著($P < 0.05$), 但不同于胎牛血清组, 未出现随着细胞数目的增加而雄性比率不断增加的现象。无血清组两个细胞期雄性胚胎比率之间差异不显著($P > 0.05$)。

关键词 水牛; 早期胚胎; 血清; 性别比率

血清是哺乳动物早期胚胎体外培养中常用的蛋白质添加物, 其对胚胎的发育具有一定的促进作用^[1]。但血清种类的不同可能导致不同性别胚胎的发育速率有所不同。因此我们对在添加不同血清培养液中发育的水牛体外受精胚胎进行了性别鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

水牛卵巢采自重庆北碚屠宰场, 胎牛血清(无噬菌体、低内毒素特级胎牛血清)购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 3 个批次分别为(050314、050408、050421)。发情牛血清为实验室自制, 采自西南农业大学奶牛场。3 个批次分别为(050413、050521、050628)。其他试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 水牛体外受精胚胎的培养 (1)卵巢和卵母细胞的收集 屠宰场收集本地水牛卵巢, 保存于盛有 35~37 °C 生理盐水保温瓶中, 2 h 内运回实验室。PBS 洗涤 3 次, 消毒纱布吸干, 采用 10 ml 注射器抽吸卵巢上直径 2~8 mm 卵泡, 在体视显微镜下挑选形态正常, 细胞质均匀的 A、B、C 三级卵母细胞用于体外成熟培养。(2)卵母细胞的体外成熟培养(*in vitro* maturation, IVM) 将收集到的可用卵母细胞分别在洗卵液和成熟培养液中洗 3 遍, 置于覆盖灭菌石蜡油的成熟培养液中培养。培养箱条件为 39 °C, 100% 湿度、5% CO₂^[2]。(3)卵母细胞体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)

成熟培养 24 h 后用 0.1% 透明质酸酶去除卵丘细胞, 选取第一极体(PBI)清晰、形态规则的卵母细胞置于 CO₂ 培养箱中已预热平衡 2 h 受精液微滴中, 加

入制备好的鲜精于培养箱中培养^[3]。(4)胚胎培养(*in vitro* culture, IVC) 培养 24 h 后将受精卵在胚胎培养液中洗 3 遍, 转入胚胎培养液中培养, 胚胎培养液分别添加 5% 胎牛血清(FBS)、5% 发情牛血清(OCS)和无血清。每 48 h 观察卵裂情况, 并用新鲜胚胎培养液更换一半原培养液。将获得的早期胚胎用于性别鉴定^[4]。

1.2.2 引物设计及检测 (1)引物设计 根据NCBI 基因库已有的水牛 Sry 基因序列和牛 1.715 卫星 DNA 基因序列自主设计两对引物扩增公水牛特有的 Sry 基因和公母水牛共有的 1.715 卫星 DNA 序列。Sry 基因序列扩增产物长度为 350 bp, 1.715 卫星 DNA 序列扩增产物长度为 149 bp (表 1)。(2)水牛血液白细胞性别检测 应用设计的两对引物采取两步 PCR 法分别对两份公牛血液白细胞和两份母牛血液白细胞进行性别鉴定。在反应体系中先加入第一对引物进行 11 个循环, 再在反应体系中加入第二对引物, 进行 30 个循环。反应体系为 5 μl 10 × 缓冲液; 1 μl 10 mmol/L dNTP; 20 μmol/L 引物各 1 μl; 0.4 μl 5 U/μl Taq 酶; 2 μl 血液 DNA 模板; 3 μl 25 mmol/L Mg²⁺; 加水 36.6 μl 补足至 50 μl。反应条件为 94 °C 变性 5 min; 随后 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1.5 min 共进行 36 个循环; 而后 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。扩增结束后取 10 μl 产物在 2% 琼脂糖电泳上电泳检查结果。

1.2.3 水牛早期胚胎性别鉴定 为验证 1.2.2 节(2)中设计的两步 PCR 法和引物是否能够成功对水牛早

收稿日期: 2008-05-12 接受日期: 2008-07-17

通讯作者: Tel: 023-68251616, Fax: 023-68251616, E-mail:

lym@swu.edu.cn

表1 水牛早期胚胎性别鉴定引物序列

引物	水牛 Sry 基因序列	牛 1.715 卫星 DNA 基因序列
上游引物	5'-GCT GGG CTA TGA GTG G-3'	5'-ACT TTG TGG GTC GCA TCA-3'
下游引物	5'-CGG TGT TAT CCC ATT GTA-3'	5'-AGA ATC CCG CCG TAA CTC-3'

期胚胎进行性别鉴定, 选取 46 枚胚胎进行性别鉴定。在直径 60 mm 的塑料平皿中制作 100 μ l 液滴, 上面覆盖石蜡油。每个液滴放一个胚胎, 在显微操作仪上先用固定针将胚胎固定, 然后利用自制的抽吸针插入胚胎中, 将 3~4 个卵裂球吸出, 移入预先装有 8 μ l 灭菌超纯水的 PCR 管中, 移入管中的胚胎操作液应少于 2 μ l。再加 5 μ l 石蜡油覆盖, 煮沸 5 min 后冰浴 5 min, 14 000 r/min 高速离心 2 min, 上清液直接用于扩增。扩增结束后取 10 μ l 产物在 2% 琼脂糖电泳上电泳检查结果。

1.2.4 同种血清不同批次对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响 分别选取 3 个批次的胎牛血清和发情牛血清, 将添加每个批次血清的培养液中发育的胚胎分为 4 细胞组、8 细胞组和 16 细胞组, 每组 40 枚胚胎, 进行性别鉴定, 试验重复 3 次。统计同种血清不同批次培养基中各阶段胚胎的性别比率。

1.2.5 不同血清对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响 将在不同血清的培养液中发育的胚胎分为 4 细胞组、8 细胞组和 16 细胞组, 每组 120 枚胚胎, 进行性别鉴定, 试验重复 3 次。统计在不同血清培养基中各阶段胚胎的性别比率。

2 结果

2.1 水牛体外受精胚胎的培养

培养的卵母细胞第一极体清晰、胞质均匀(图 1), 经荧光染色后极体和核清晰可见(图 2)。体外受精(图 3, 图 4)后胚胎在添加 FBS 和 OCS 的培养液中均可发育到 16 细胞期(图 5~图 8), 无血清培养液只支持胚胎发育至 8 细胞期。

2.2 引物设计及检测

两对引物能够对不同性别水牛血液白细胞进行性别鉴定。对两份公水牛血液白细胞和两份母水牛血液白细胞的扩增结果显示公水牛血液基因组能够成功扩增出两个特异 DNA 片段(图 9, 1、3 泳道), 母水牛血样只有 1.715 卫星 DNA 片段能够被扩增出(图 9, 2、4 泳道)。

2.3 水牛早期胚胎性别鉴定

对 46 枚添加 OCS 发育至 16 细胞水牛胚胎进行性别鉴定, 46 枚胚胎中 27 枚为雄性胚胎, 19 枚为雌

性胚胎。图 10 为其中 8 枚胚胎性别鉴定结果。结果显示 2、3、4、5、6、7 泳道扩增出 350 bp 的雄性特有的 Sry 基因片段和 149 bp 的雌雄共有的 1.715 卫星 DNA 序列片段, 应判定为雄性胚胎。1、8 泳道仅扩增出 149 bp 的雌雄共有的 1.715 卫星 DNA 序列片段, 未见 350 bp 的雄性特有的 Sry 基因片段, 应判定为雌性。结果表明所设计的两对引物和两步 PCR 方法能够应用于水牛早期胚胎性别鉴定。以下试验均采用该方法和引物进行胚胎性别的检测。

2.4 同种血清不同批次对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响

2.4.1 胎牛血清不同批次对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响 共对分别添加 3 个批次的胎牛血清发育到 3 个不同发育阶段胚胎进行了性别鉴定, 结果表明并未出现随着胎牛血清批次的不同, 不同发育阶段胚胎的性别比率表现不同趋势的现象。3 个批次的胎牛血清都在一定程度上促进更高发育阶段的雄性胚胎比率增加(表 2, 图 11)。

2.4.2 发情牛血清不同批次对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响 共对分别添加 3 个批次的发情牛血清发育到 3 个不同发育阶段胚胎进行了性别鉴定, 结果表明并未出现随着胎牛血清批次的不同, 不同发育阶段胚胎的性别比率表现不同趋势的现象。胚胎在发育到 8 细胞阶段是雄性胚胎比率下降, 发育到 16 细胞阶段后雄性胚胎比率升高(表 3, 图 12)。

2.5 不同血清对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响

结果表明, 添加胎牛血清组在 3 个不同发育阶段雄性胚胎比率之间差异显著($P < 0.05$), 随着细胞数目的增加雄性胚胎比率不断增加。添加发情牛血清组 3 个不同发育阶段雄性胚胎比率之间差异显著($P < 0.05$), 但不同于胎牛血清组, 未出现随着细胞数目的增加而雄性比率不断增加的现象。无血清组两个细胞期雄性胚胎比率之间差异不显著($P > 0.05$) (表 4, 图 13)。

3 讨论

Avery 等^[5]认为, 体外受精后前 7 天时间体外培养的雄性胚胎比雌性胚胎发育快, 说明体外培养环境对雄性和雌性胚胎的发育有影响。李青旺等^[6]研究



图1 水牛成熟卵母细胞(400×)

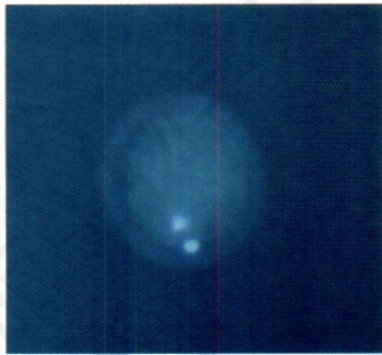


图2 荧光染色水牛成熟卵母细胞(400×)

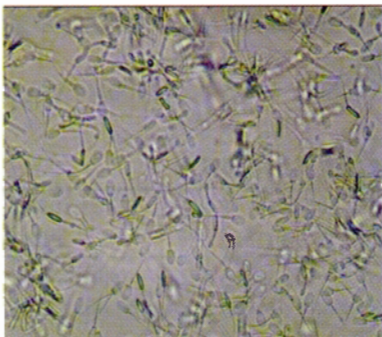


图3 水牛精子(400×)

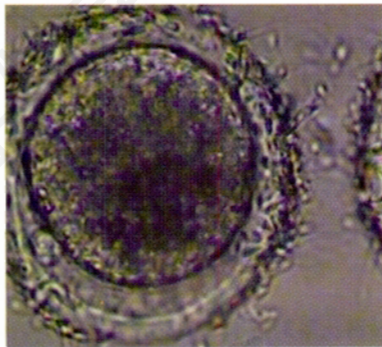


图4 受精过程中的卵母细胞(630×)



图5 体外受精2细胞胚(400×)

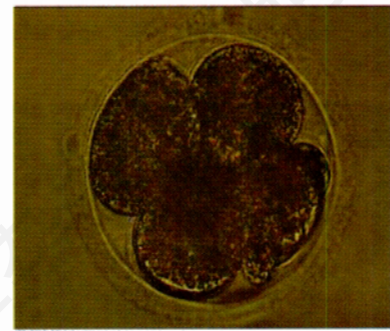


图6 体外受精4细胞胚(630×)

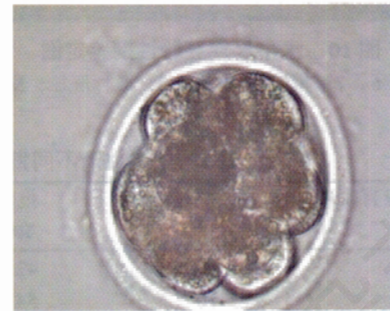


图7 体外受精8细胞胚(630×)



图8 体外受精16细胞胚(630×)

了体外生产的牛胚胎在不同发育期的性比,他们将体外受精第5天的胚胎根据发育期划分为3个组:16细胞期、多于16细胞期和桑堪期。在3个组中,雄

性胚胎所占百分率分别是32% (10/31), 53% (19/36)和63% (24/38);在体外受精的第7天,将胚胎根据发育期划分为4个组:桑堪期、早期囊胚期、囊胚期

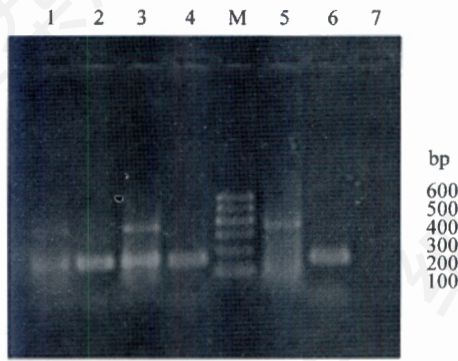


图9 水牛血液白细胞性别鉴定图

1、3: 公水牛基因组的扩增结果; 2、4: 两头母牛基因组的扩增结果; 5: Sry 基因; 6: 1.715 卫星 DNA 序列; 7: 空白对照; M: marker。

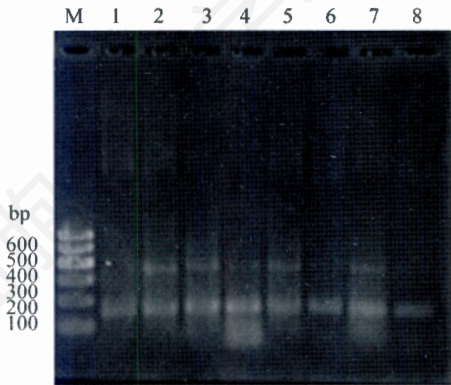


图10 水牛早期胚胎性别鉴定图

2、3、4、5、6、7: 雄性胚胎; 1、8: 雌性胚胎; M: marker。

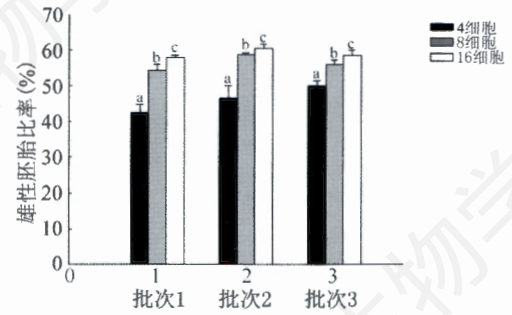


图11 胎牛血清不同批次对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响

同组不同上标表示两者差异显著($P < 0.05$), 相同上标表示差异不显著。

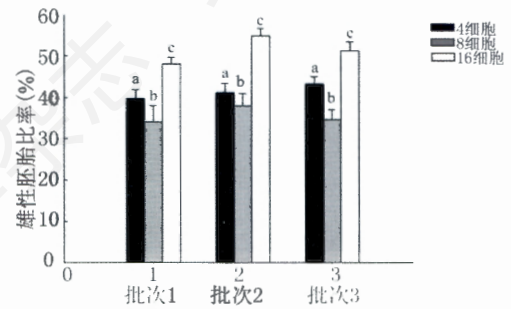


图12 发情牛血清不同批次对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响

同组不同上标表示两者差异显著($P < 0.05$), 相同上标表示差异不显著。

表2 胎牛血清不同批次对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响

不同发育阶段	n	批次 1 (050314) 雄性胚胎比率(%)	批次 2 (050408) 雄性胚胎比率(%)	批次 3 (050421) 雄性胚胎比率(%)
4 细胞	40	42.53±2.13 ^a	46.59±3.43 ^a	50.05±1.56 ^a
8 细胞	40	54.48±1.57 ^b	58.63±0.48 ^b	56.06±1.23 ^b
16 细胞	40	57.83±0.59 ^c	60.30±1.29 ^c	58.54±1.49 ^c

同列不同上标表示两者差异显著($P < 0.05$), 相同上标表示差异不显著。

表3 发情牛血清不同批次对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响

不同发育阶段	n	批次 1 (050413) 雄性胚胎比率(%)	批次 2 (050521) 雄性胚胎比率(%)	批次 3 (050628) 雄性胚胎比率(%)
4 细胞	40	39.76±2.14 ^a	41.18±2.35 ^a	43.20±1.89 ^a
8 细胞	40	34.12±3.86 ^b	37.96±2.98 ^b	34.57±2.61 ^b
16 细胞	40	48.07±1.62 ^c	54.81±1.78 ^c	51.26±2.04 ^c

同列不同上标表示两者差异显著($P < 0.05$), 相同上标表示差异不显著。

表4 不同血清对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响

发育阶段	n	胎牛血清 雄性胚胎比率(%)	发情牛血清 雄性胚胎比率(%)	无血清 雄性胚胎比率(%)
4 细胞	120	46.39±3.76 ^a	41.38±1.73 ^a	53.72±0.66 ^a
8 细胞	120	56.39±2.09 ^b	35.55±2.10 ^b	52.31±1.14 ^a
16 细胞	120	58.89±1.27 ^c	51.38±3.37 ^c	-

同列不同上标表示两者差异显著($P < 0.05$), 相同上标表示差异不显著。

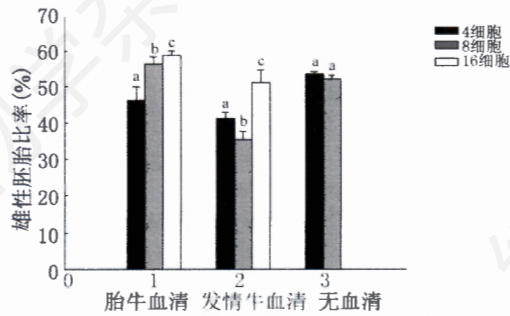


图13 不同血清对水牛早期胚胎不同发育阶段性别比率的影响
同组不同上标表示两者差异显著($P < 0.05$), 相同上标表示差异不显著。

和扩张囊胚期。在性别鉴定后, 发现4个组中雄性胚胎所占百分率分别是28% (5/18), 38% (8/21), 60% (15/25)和70% (16/23)。其结果表明: 牛早期胚胎在体外培养条件下, 雄性发育快于雌性。Gutierrez-Adan等^[7]把IVM/IVF牛受精卵放入绵羊输卵管培养不会改变胚胎的性比。辛晓玲等^[8]研究发现在体外培养系统中, 在囊胚形成的不同天数都存在有较明显的偏离正常性比的趋势。体外胚胎在第6、7天雄性与雌性的性比大于1, 而在第9天性比则相反, 并且总的雄性囊胚与雌性囊胚之比显著偏离了1:1 ($P < 0.05$)。因此, 在体外培养中出现的性比偏差应与体外培养系统有关。前面的学者只是对培养体系对胚胎的性别比率进行了研究, 且均是对16细胞期后胚胎进行研究, 未对培养体系中具体影响因子进行分析。因此本研究探讨了不同血清对16细胞期之前的发育胚胎性别比率的影响。结果显示添加不同批次的胎牛血清培养液中的胚胎均表现出随着细胞数目的逐渐增多雄性胚胎比率不断上升的趋势, 胎牛血清的批次对于不同发育阶段的胚胎性别比率没有影响。添加不同批次发情牛血清培养液中的胚胎在从4细胞阶段发育到8细胞阶段时雄性胚胎比率出现了下降, 越过8细胞阻滞阶段后, 16细胞阶段胚胎出现升高的现象。

我们认为造成这种差异的机制可能是胚胎对生

长因子或其他血清成分的不同反应影响了胚胎在IVC条件下的存活和发育。胎牛血清中的生长因子和血清成分更适合雄性胚胎的生长发育; 因此雄性胚胎表现出了更加旺盛的发育态势。而发情牛血清采自发情母牛, 其中不含有雄性胎牛特有的生长因子和血清成分, 因此从4细胞阶段8细胞阶段表现出雌性胚胎比率增加的趋势, 但越过8细胞阶段阻滞期后, 雄性胚胎表现出更强的发育能力, 可能雄性8细胞阶段胚胎的越过阻滞期向后发育的能力更强, 且在胚胎处理或长时间的IVC过程中胚胎发育早期雌性胚胎的优先丢失对性比也有影响, 因此在16细胞阶段雄性胚胎比率表现出升高的现象。

Ferry等^[9]报道在无血清培养基中培养出的囊胚比那些在添加血清的M199液中培养的囊胚在大小与发育阶段上更为一致。Girsart等^[10]研究发现无血清培养基中培养出的囊胚性比无大的偏差。我们对无血清培养基中发育的两个阶段胚胎的性别比率的试验也发现其性别比率变化不显著, 但不添加血清的胚胎无法正常通过8细胞阶段阻滞期。

综上所述, 我们认为胎牛血清对16细胞阶段前胚胎具有促进雄性胚胎发育的作用, 导致雄性胚胎比率不断增加。发情牛血清未表现出促进雄性胚胎发育的趋势, 但雄性胚胎具有更强的越过8细胞阶段阻滞期的发育能力。今后应发展更加理想的无血清培养基支持胚胎发育, 消除血清对胚胎不同发育阶段性别比率的影响。

参考文献(References)

- [1] 桑润滋主编. 动物繁殖生物技术, 北京: 中国农业大学出版社, 2002, 261
- [2] Lonergan P et al. *Biol Reprod*, 1996, 54: 1420
- [3] 谭世俭等. *广西农业大学学报*, 1998, 17: 312
- [4] Pinyopummintr T et al. *Biol Reprod*, 1991, 45: 736
- [5] Avery B et al. *Theriogenology*, 1989, 32: 139
- [6] 李青旺等. *西北农业大学学报*, 1997, 25: 33
- [7] Gutierrez-Adan A et al. *Theriogenology*, 1996, 46: 515
- [8] 辛晓玲等. *畜牧兽医学报*, 2006, 37: 1364

Effects of Different Sera on the Water Buffalo Preimplantation Embryo's Sex Ratio

Jian-Zhong Wu, Yue-Min Li*

(Chongqing Key Laboratory of Forage and Herbivore, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract The experiment was carried out to study the effects of different sera on the water buffalo preimplantation embryo's sex ratio. The results indicated that different batches of the same serum had no influence on the embryo's sex ratio, the sex ratio of male embryos within fetal bovine serum (FBS) were significantly different in these different cell stages ($P < 0.05$). Along with the increase of the number of blastomeres, the sex ratio of male embryos was higher. The sex ratio of male embryos within oestrus cow serum (OCS) were significantly different in these different cell stages ($P < 0.05$), but it is different from the former, the sex ratio of male embryos was not higher along with the increase of the number of blastomeres. The sex ratio of male embryos without serum was not significantly different in two different cell stages ($P > 0.05$).

Key words water buffalo; preimplantation embryo; serum; sex ratio

Received: May 12, 2008 Accepted: July 17, 2008

* Corresponding author. Tel: 86-23-68251616, Fax: 86-23-68251616, E-mail: lym@swu.edu.cn