

两种小鼠卵母细胞的核成熟检验方法比较

王建英 万发春 宋恩亮 张秀美 *

(山东省农业科学院畜牧兽医研究所畜禽疫病防治和繁育重点实验室, 济南 250100)

摘要 将生发泡(GV)期小鼠卵母细胞置于M2培养液中培养, 分别在培养0 h、4 h、8 h和12 h收集卵母细胞, 采用SYTO染色和免疫荧光标记方法进行小鼠卵母细胞的核成熟检验, 并将结果进行比较。可以发现: SYTO染色和免疫荧光标记方法都可用于小鼠卵母细胞的核成熟检验, 二者的结果没有显著性差异, 但是, SYTO染色法更为快速、简便、廉价, 可用于活体染色, 适合于大规模检测, 可应用于哺乳动物卵母细胞的核成熟检验。

关键词 小鼠; 卵母细胞; 核成熟; SYTO探针; 免疫荧光标记

哺乳动物出生前后, 初级卵母细胞停滞在第一次减数分裂的双线期, 即生发泡(germinal vesicle, GV)期。这些卵母细胞在适宜的信号刺激(促性腺激素或其他因子)下, 恢复和完成第一次减数分裂的过程称为卵母细胞的减数分裂成熟过程^[1,2]。卵母细胞的减数分裂成熟过程对于维持基因组的完整性起重要作用, 为了避免出生缺陷, 在辅助生殖过程中需要研究同源染色体是否正确分离。卵母细胞的减数分裂成熟过程包括细胞核成熟和细胞质成熟, 因为现在还没有一种有效的方法判断细胞质的成熟状态, 所以人们一般以细胞核的成熟状况来划分卵母细胞的减数分裂成熟过程的各个时期。

小鼠是研究生殖机制较常用的实验动物, 因为人们在体视显微镜下只能根据GV和第二极体判断是否处于GV期和第二次减数分裂的中期, 而对于其他时期就很难判断, 因此需要有一种简便易行的方法用于小鼠卵母细胞的核成熟阶段检验。现在常对卵母细胞的减数分裂纺锤体和染色体进行免疫荧光染色, 然后再通过激光共聚焦显微镜观察, 根据纺锤体和染色体的形态进行核相分析。我们以前的研究中用SYTO染色的方法进行了小鼠卵母细胞的核成熟检验^[3], 在这里我们比较了两种方法进行小鼠卵母细胞核相分析的优缺点。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的采集

本实验选用6~8周龄雌性昆明小鼠。动物被注射10 IU 孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)促进卵泡发育。前期卵母细胞, 又叫做GV期的未成熟卵母细胞, 是在注射

PMSG 48 h 后培养液中用针刺破卵泡而从卵巢上采集到的。所有卵母细胞均置于M2培养液中培养, 在培养0 h、4 h、8 h和12 h, 分别收集卵母细胞样品。

1.2 SYTO染色

SYTO染色方法参照文献^[3]。将各个时段的卵用活细胞核酸探针SYTO-11 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, 1:1 000)进行染色, 室温下作用1 h后, 处理完毕的细胞置于载玻片上, 滴加适量防淬灭剂(0.5% n-没食子酸丙酯、90% 甘油/20 mmol/L Tris, pH 8.0)后, 利用无色指甲油封片。样品检测采用激光共聚焦荧光显微镜技术(Leica, TCS-4D)进行, 实验重复3次。核成熟期分为生发泡期(GV)、前期I(Pro M-I)、中期I(M-I)、后期I(A-I)、末期I(T-I)和中期II(M-II)^[4]。

1.3 纺锤体和染色体的免疫荧光标记

免疫荧光标记方法参考文献^[5]并略作修改。首先将各个时段的卵母细胞在酸性M2培养液中去除透明带, 然后在含4%多聚甲醛的PBS中固定30 min, 经含0.5% Triton X-100的PBS溶液37℃透膜过夜。然后在含0.1% Tween 20和0.01% Triton的PBS(清洗液)中洗涤3次, 每次5 min。用含1% BSA的PBS封闭液封闭1 h, 然后与1:300的微管蛋白抗体(Sigma)4℃温育过夜。卵母细胞再用清洗液洗涤3次, 每次5 min, 然后与1:100 FITC标记的二抗

收稿日期: 2008-04-23 接受日期: 2008-07-15

山东省农业科学院创新基金(No.2006YCX021)和山东省农业良种工程“地方良种肉牛提纯与肉牛新品系(配套系)培育”(No.2006LZ11-01)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0531-88606845, Fax: 0531-88978476, E-mail: zxm820410@163.com

温育 1 h。然后再洗涤 3 次, 每次 5 min, 最后在 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI (Sigma) 中温育 5 min, 然后在含 DABCO 的防荧光淬灭剂中封片。用激光共聚焦扫描显微镜观察。每个试验至少重复 3 次, 每次大约观察 40 个卵

母细胞。核成熟期的划分如上所示。

2 结果

2.1 SYTO 染色结果

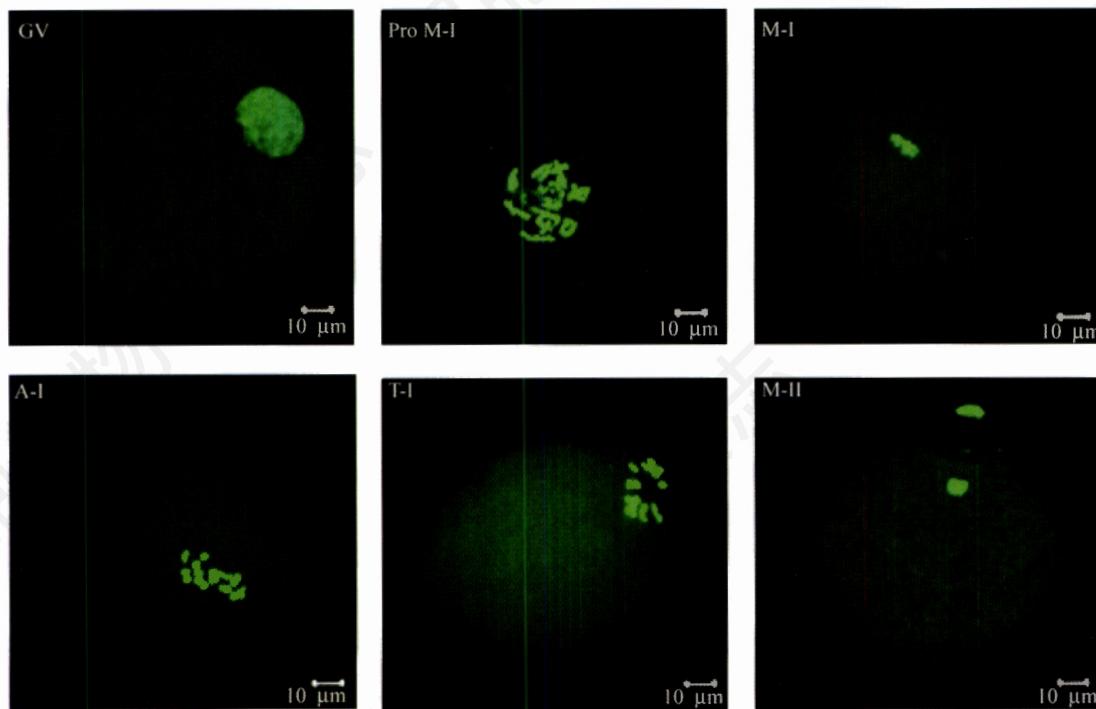


图 1 小鼠卵母细胞减数分裂成熟过程中各时期的典型 SYTO 图象

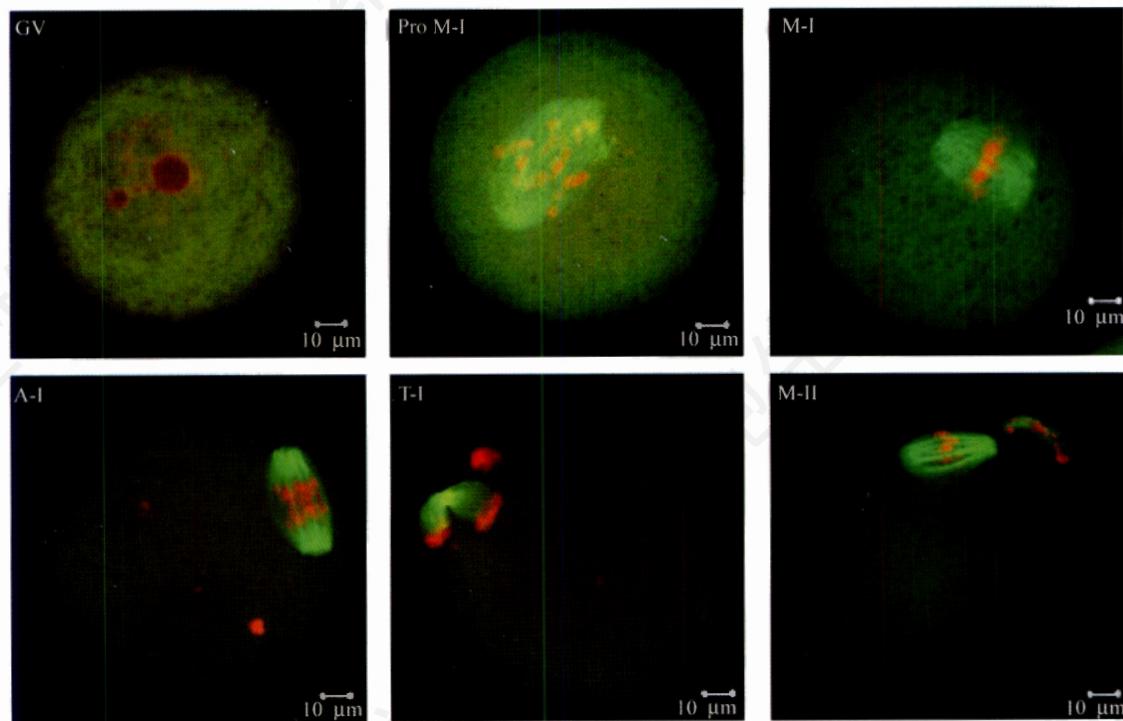


图 2 小鼠卵母细胞减数分裂成熟过程中微管免疫荧光标记的典型图象

如图1所示, GV期染色质在核中随机分布, GV破裂标志着前中期(Pro M-I)的开始, GV破裂后, 染色质发生凝集, 同源染色体向赤道板移动, 在第一次减数分裂的中期(M-I)染色体排列在赤道板上, 随后同源染色体向两极移动, 并最终在第二次减数分裂的中期(M-II)分布于两个子细胞中。

2.2 微管免疫荧光标记的结果

在图2中, 长的微管无方向地分布在GV期卵母细胞中, 在GV附近的分布比其他部位更加密集。GV破裂以后从凝集的染色体发出短的微管来代替长的胞质微管, 凝集的染色体向两极移动, 但是它们之间仍然由短的微管束相互疏松连接。M-I期微管已经初步组装成纺锤体的形状, 染色体基本处于纺锤体赤道面。随后同源染色体分离, 排出第一极体(Pb1)并停滞在第二次减数分裂中期(M-II), M-II期纺锤体显著小于M-I期纺锤体。

2.3 SYTO染色和免疫荧光标记的核成熟检验结果

我们的实验结果表明, SYTO染色和免疫荧光标记的结果基本一致(表1), 经t检验, 两组无显著性差异($P>0.05$)。在培养0 h, 分别有95.33% (204/214)和95.56% (172/180)的卵母细胞处在GV期; 到4 h时, 78.57% (132/168)和77.93% (113/145)的卵母细胞经历生发泡破裂(GVBD)进入Pro M-I期。培养8 h时M-I期的卵母细胞比例为84.38% (135/160)和84.25% (107/127)。到12 h时, 70.90% (134/189)和72.73%

(128/176)的卵母细胞到达M-II期, 这时仍有部分卵处于GV期(11/189, 6.88% 和10/176, 5.68%)和M-I期(38/189, 20.11% 和35/176, 19.89%)。

3 讨论

3.1 SYTO染色法的特点和应用展望

SYTO探针是一种细胞通透性的核酸染料, 与核酸结合后能产生非常强的绿色荧光信号, SYTO探针能与存活的或死的真核细胞以及格兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的RNA和DNA结合, 所以它除了可以用于核相分析外, 可能还可以用于细胞凋亡的检测中^[6]。到目前为止, 已经有人用其进行了肿瘤细胞^[7,8]和精子^[9]等凋亡方面的研究工作, 但是还没有用于哺乳动物卵母细胞凋亡的成功报道。

3.2 试验结果和图像效果分析

从试验结果来看, SYTO染色以及纺锤体和染色体的免疫荧光标记结果没有明显的差异, 两种方法都可以用于小鼠卵母细胞的核相分析; 从所获得图像的效果来看, 纺锤体和染色体的免疫荧光标记应用更广泛些, 因为它除了可以标记染色体的状态, 还可以标记与染色体的分离密切相关的纺锤体。

3.3 试验方法及所需时间及费用

从试验方法上看, SYTO染色步骤少且简单方便, 比较容易为初学者掌握, 纺锤体和染色体的免疫荧光标记则需要经过繁琐的去透明带、固定、透膜、封闭、标记等步骤; 从试验所需时间和仪器看, SYTO

表1 体外培养过程中小鼠卵母细胞的核成熟

培养时间(h)	方法	各个时期受检的卵母细胞数 ^a					受检卵母细胞总数 ^a
		GV (%) ^b	Pro M-I (%) ^b	M-I (%) ^b	A-I-T-I (%) ^b	M-II (%) ^b	
0	SYTO	204	10	-	-	-	214
	MT	95.33±0.3053	4.67±0.3053	-	-	-	180
4	SYTO	172	8	-	-	-	168
	MT	95.56±0.3874	4.44±0.3874	-	-	-	145
8	SYTO	36	132	-	-	-	160
	MT	21.43±2.2681	78.57±2.2681	-	-	-	127
12	SYTO	32	113	-	-	-	132
	MT	22.07±5.2182	77.93±5.2182	-	-	-	189
	SYTO	12	11	135	2	-	176
	MT	7.5±0.7319	6.88±0.9003	84.38±0.5248	1.25±0.5954	-	128
	SYTO	10	8	107	2	-	132
	MT	7.87±0.4968	6.30±0.9390	84.25±0.9939	1.57±0.7514	-	128
	SYTO	13	2	38	4	-	176
	MT	6.88±0.3866	1.06±0.5135	20.11±0.7202	2.12±0.4698	69.84±1.6339	128
	SYTO	10	1	35	2	-	132
	MT	5.68±0.2067	0.57±0.49	19.89±0.7884	1.14±0.5427	72.73±1.055	128

SYTO和MT分别代表SYTO染色和免疫荧光标记方法; a: 3次重复实验所用的卵母细胞总数; b: 各时期的卵母细胞占受检卵母细胞总数的比例(平均数±标准误), 3次重复实验的结果。

染色方法只需1 h, 而纺锤体和染色体的免疫荧光标记往往需要数个小时甚至过夜; 从所需费用来看, SYTO 染色的成本大大降低; 要想获得完美的图片, 二者均需借助于激光共聚焦显微镜, 但是如果仅仅是为了进行核相分析的话, SYTO 染色后可直接在荧光显微镜下观察结果, 比纺锤体和染色体的免疫荧光标记更简便快捷。

3.4 应用范围

从应用的范围看, 纺锤体和染色体的免疫荧光标记只能对固定的死细胞进行染色; 而 SYTO 探针除了可以标记死细胞, 还可进行活体染色用于动态观察。这对卵子活体染色或多重免疫荧光染色时需要把DNA染成绿色提供了一种可靠的方法, 对许多读者都可有借鉴作用。

3.5 应用的宽度

纺锤体的组装、旋转和延长对于同源染色体的正确分离至关重要。从应用的宽度来看, 纺锤体和

染色体的免疫荧光标记应用更广泛, 因为它除了可以应用于卵母细胞的核相分析外, 还可以应用于一些纺锤体相关蛋白的定位分析。研究人员在实验过程中, 可以根据具体需要, 选择适当的方法。

因此, SYTO 染色法快速, 操作简单, 可用于活体染色, 较容易进行大规模检测, 完全可以用于哺乳动物卵母细胞的核成熟检验。

参考文献(References)

- [1] 陈大元等. 受精生物学, 北京: 科学出版社, 2000, 22
- [2] Wang WH *et al. Front Biosci*, 2006, 11: 620
- [3] Wang JY *et al. Mol Reprod Dev*, 2007, 74: 116
- [4] Zhang D *et al. Biol Reprod*, 2004, 71: 740
- [5] 范衡宇等. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31: 54
- [6] Frey T. *Cytometry*, 1995, 21: 265
- [7] Li X *et al. Anal Biochem*, 2007, 367: 219
- [8] Wlodkowic D *et al. Cytometry A*, 2008, 73: 563
- [9] Perticarari S *et al. Hum Reprod*, 2007, 22: 485

Comparison of Two Methods for the Nucleus Maturity Test in Mouse Oocytes

Jian-Ying Wang, Fa-Chun Wan, En-Liang Song, Xiu-Mei Zhang*

(Key Lab of Animal Disease Control and Breeding, Animal Husbandry/Vet Institute, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China)

Abstract To select a simple, fast and sensitive method for the nucleus maturity detection in mammalian oocytes, GV-stage oocytes were cultured in M2 culture medium, at 0 h, 4 h, 8 h and 12 h of culture, oocytes were collected and used for nucleus maturity test by SYTO staining and immunofluorescence technique respectively. The results were compared. We found that both SYTO dyeing and immunofluorescence technique can be used for the nucleus maturity detection in mouse oocytes, and there is none distinct difference, but SYTO dyeing method is faster, cheaper and more simple for nucleus maturity detection, and it also suits to vital staining and large-scale examination, thus SYTO dyeing can be used for the nucleus maturity detection in mammalian oocytes.

Key words mouse; oocyte; nucleus maturity; SYTO probe; immunofluorescence technique

Received: April 23, 2008 Accepted: July 15, 2008

This work was supported by the Innovation Funds of Shandong Academy of Agricultural Sciences (No.2006YCX021) and the Shandong Provincial Agricultural Seed Improvement Project “Local Pure Beef Breeds Purification & New Beef Strain Breeding” (No.2005LZ11-01)

*Corresponding author. Tel: 86-531-88606845, Fax: 86-531-88978476, E-mail: zxm820410@163.com