

水貂卵巢卵母细胞体外培养的初步研究*

MATURATION IN VITRO OF THE OVARIA OOCYTES OF THE MINK (*Mustela vison*)

冯恒亮
刘建民 2959.838

对水貂 (*Mustela vison*) 卵巢卵母细胞的体外培养, 国内外尚未见报道。本研究的目的在于观察水貂卵母细胞是否具有体外成熟的能力, 为水貂的体外受精提供科学依据。

1. 材料与方法

卵母细胞的收集和培养 1990年12月10—25日, 从中国农科院左家特产研究所水貂场采集80个卵巢 (40只水貂), 将其放入30—38℃的温生理盐水(加双抗)中带回实验室, 运输时间为6—8小时。在实验室用尖刀从卵巢的0.5—1毫米的卵泡内切割出未成熟的卵母细胞, 在实体显微镜下将其分检成两种类型, 即AB型(具完整卵丘细胞层的卵母细胞, 和卵丘细胞部分脱落的卵母细胞)和C型(卵丘细胞全部脱落的裸化卵母细胞)。然后把每种类型再分成两组, 分别放在两种不同的培养液中: 1. 组织培养液-199(Tissue culture medium, TCM-199) + 小牛血清(Fetal calf serum, FCS) + 人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotrophin, HCG); 2. 组织培养液-199(TCM-199) + 小牛血清(FCS)。在5%CO₂、95%的空气、38.5℃和100%湿度的CO₂培养箱内培养24—48小时。

卵母细胞体外成熟发育的评价 经体外成熟发育的卵母细胞, 在倒置显微镜下观察卵丘卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complexes, COC)的扩展数目。部分卵母细胞放入1%的柠檬酸钠溶液, 经机械振动除去卵丘细胞, 然后用酒精-冰醋酸(Alcohol-acetic acid 3:1, V/V)固定24小时, 用1%的间苯二酚蓝(Lacmoid)染色, 在Olympus显微镜观察卵母细胞核的发育情况。未成熟的卵母细胞其核大而位于中央, 随后逐渐迁移到质膜下, 此时称为生发泡(Germinal vesicle, GV); 当核膜破裂, 有放出的第1极体存在, 胞质内并有染色体像时, 此时称为生发泡破裂(Germinal vesicle breakdown, GVBD); 若有显而易见的染色体像存在时, 此为卵母细胞第二次成熟分裂的中期阶段, 称为MI(Metaphase I, MI), 即为成熟的卵母细胞。经染色处理, 观察和统计GVBD的百分数和MI的情况。

2. 结果

AB型卵母细胞分别培养于含HCG和不含HCG的两组培养液内, 培养时间为24、30、40和48小时。含有HCG的处理组内COC扩展率分别为82.96(112/135)、83.33%(35/42)、91.45%(107/117)和100%(85/85), GVBD率分别为62.50%、75.00%、88.89%和93.30%; 不含HCG的培养组, 各培养时间的扩展率分别为8.89%(4/45)、17.39%(4/23)、40.91%(18/44)和76.92%(10/13), GVBD率分别为40.00%、58.33%、58.33%和66.67%。各组间的扩展率和GVBD率均存在着显著差异(P<0.05)。

C型卵母细胞同样也分别置于含有HCG和不含HCG的两组培养液内, 培养24、30、40和48小时。含有HCG处理组的GVBD率分别为50.00%、60.00%、87.50%和87.50%; 不含HCG处理组的GVBD率分别为45.00%、50.00%、66.67%和70.00%, 两培养组各培养时间的GVBD率之间均差异不显著(P>0.05)。另外, 培养40小时后, AB型和C型含HCG组和AB型不含HCG组均可见到第二次成熟分裂中期的情况(MI)。由此可见,

* 国家教委博士点基金项目。

本文于1991年1月20日收到, 1991年8月25日修回。

下转56页

no any pregnant femals in the same age class of the high-density population.

There was difference in age structure between the two populations. In August, only 8.86% of population were of age class I and 26.58% of that were of class II in high-density population whill in low-density population they were 17.42% and 12.88%, respectively. Therefore the population of the youngs in the high-density population was less than that in the low-density population.

There was no significant difference in relative fatness between the two populations. It suggests that the two populatins share the same nutritional condition. So, the factor which causes suppression of reproduction in the high-density population is social factor of high-density rather than shortage of food resources. The fatness in age class I of the high-density population was less than that of the low-density population. It might due to social stress of high density resulted in worse parental care.

Key words: Brandt's vole (*Microtus brandti*); Population density; Reproduction; Relative fatness

上接78页

(1) 应用 TCM-199 + FCS + HCG 培养液可以使水貂卵巢卵母细胞体外成熟。但由于所采集的卵母细胞是从未发情的水貂(发情为2—3月份)而来,因此,体外成熟的时间较长。

(2) 在培养液内添加 HCG可以促进颗粒细胞发育和卵母细胞核的发育(GVBD的发生)。尽管HCG对COC的影响机制尚不完全清楚,但是COC的出现是和核的发育成熟相平行的,这就表明 COC可以作为判断水貂卵母细胞体外成熟的标志。

关键词 水貂; 卵巢; 卵母细胞

Key words Mink (*Mustelo vison*); Ovaria; Oocytes

冯怀亮 秦鹏春 谭景和 (东北农学院生物工程系, 哈尔滨, 150030)

刘建民 张仁成 (中国解放军兽医大学, 长春)