



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113151159 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 202110491728.9

(22) 申请日 2021.05.06

(71) 申请人 内蒙古大学

地址 010000 内蒙古自治区呼和浩特市玉泉区昭君路24号内蒙古大学

(72) 发明人 戴雁峰 任敬宇 郝玉春 刘展鹏

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 42222

代理人 常海涛

(51) Int. Cl.

G12N 5/075 (2010.01)

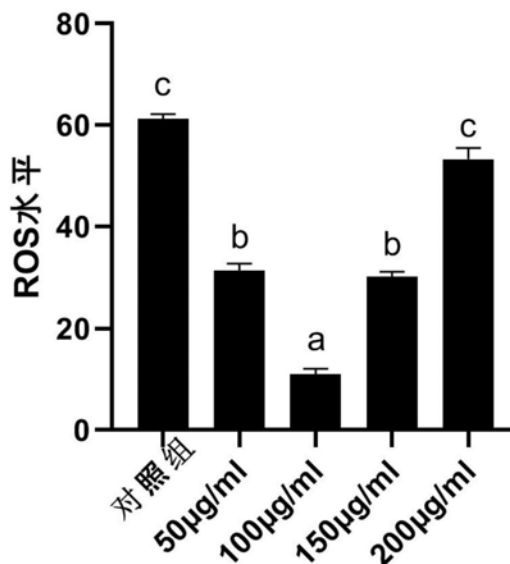
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种卵母细胞体外成熟培养液添加剂及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种卵母细胞体外成熟培养液添加剂及其应用,属于生物技术领域。本发明发现了乳铁蛋白,可以显著提高卵母细胞第一极体排出率、显著降低卵母细胞ROS含量,显著提高体外受精后胚胎囊胚率,进而可以显著提高卵母细胞的成熟率和质量,其可用于制备卵母细胞体外成熟培养液添加剂或卵母细胞体外成熟培养液。本发明可应用在胚胎工程技术上,提高胚胎工程的成功率和质量。



1. 乳铁蛋白在提高卵母细胞体外成熟率和质量中的应用。
2. 乳铁蛋白在制备卵母细胞体外成熟培养液添加剂中的应用。
3. 乳铁蛋白在制备卵母细胞体外成熟培养液中的应用。
4. 一种卵母细胞体外成熟培养液添加剂,其特征在於:所述的添加剂包含乳铁蛋白。
5. 一种卵母细胞体外成熟培养液,其特征在於:所述的培养液包含权利要求4所述的添加剂。
6. 根据权利要求5所述的培养液,其特征在於:所述的培养液包含:卵母细胞基础培养液、2mM谷胱甘肽、100 $\mu$ M半胱氨酸、0.3mM丙酮酸钠、1 $\mu$ g/mL雌二醇、10ng/mL表皮生长因子、体积分数10%胎牛血清、10IU/mL孕马血清促性腺激素和10IU/mL人绒毛膜促性腺激素、乳铁蛋白。
7. 权利要求4所述的卵母细胞体外成熟培养液添加剂或权利要求5或6所述的卵母细胞体外成熟培养液在胚胎工程技术上的应用。
8. 根据权利要求1-3任一项所述的应用、权利要求4所述的卵母细胞体外成熟培养液添加剂、权利要求5或6所述的卵母细胞体外成熟培养液或权利要求7所述的应用,其特征在於:所述的乳铁蛋白的浓度为50-200 $\mu$ g/mL。
9. 根据权利要求1-3任一项所述的应用、权利要求4所述的卵母细胞体外成熟培养液添加剂、权利要求5或6所述的卵母细胞体外成熟培养液或权利要求7所述的应用,其特征在於:所述的乳铁蛋白的浓度为100 $\mu$ g/mL。

## 一种卵母细胞体外成熟培养液添加剂及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种卵母细胞体外成熟培养液添加剂及其应用。

### 背景技术

[0002] 哺乳动物的体外受精胚胎、克隆胚胎、孤雌胚胎以及转基因胚胎广泛应用于遗传改良、胚胎早期发育机理研究、表观遗传调控等胚胎工程技术领域,卵母细胞体外培养质量是决定胚胎发育的关键因素,但至今卵母细胞体外培养的成熟效率和质量未得到较大的提升。活性氧(reactive oxygen species,ROS)是影响卵母细胞体外培养的一个重要因素。ROS是生物有氧代谢的一种产物,包括氧离子、超氧离子、羟基自由基和过氧化氢等。在平衡状态下,ROS作为信号分子在激素信号、细胞内氧化还原调节和胚胎发育等生理过程中发挥着有益的作用。然而,体外培养是一个静态的环境,没有营养物质和代谢产物的更换,容易造成ROS的累积,从而改变了它们的功能并损害细胞存活。因此,ROS对卵母细胞的活力、基因表达、蛋白质合成和分子信号传导产生负面影响,影响了卵母细胞的成熟和发育能力。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种卵母细胞体外成熟培养液添加剂及其应用,以解决上述问题。

[0004] 本发明的一个方面,提供了乳铁蛋白在提高卵母细胞体外成熟率和质量中的应用,乳铁蛋白可以显著提高卵母细胞第一极体排出率、显著降低卵母细胞ROS含量,显著提高体外受精后胚胎囊胚率,由此可以大大提高卵母细胞的成熟率和质量。基于此,乳铁蛋白还具有制备卵母细胞体外成熟培养液添加剂或卵母细胞体外成熟培养液的应用。

[0005] 本发明的一个方面,提供了一种卵母细胞体外成熟培养液添加剂,该添加剂包含乳铁蛋白。由此,可以显著提高卵母细胞第一极体排出率、显著降低卵母细胞ROS含量,显著提高体外受精后胚胎囊胚率,由此可以大大提高卵母细胞的成熟率和质量。

[0006] 在某些实施方式中,所述的卵母细胞体外成熟培养液添加剂中乳铁蛋白的浓度为50-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由此,含该浓度范围乳铁蛋白的添加剂,培养的卵母细胞成熟率更高,质量更好。

[0007] 在某些实施方式中,所述的卵母细胞体外成熟培养液添加剂中乳铁蛋白的浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由此,添加100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的乳铁蛋白体外培养的卵母细胞的成熟率最高,质量最好。

[0008] 本发明的另一个方面,提供了一种卵母细胞体外成熟培养液,该培养液包括乳铁蛋白;优选的,该培养液包含50-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乳铁蛋白;更为优选的,该培养液包含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乳铁蛋白。由此,使用包含乳铁蛋白/或50-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乳铁蛋白/或100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乳铁蛋白的卵母细胞体外成熟培养液,可以大大提高卵母细胞体外成熟率和体外成熟质量。

[0009] 在某些实施方式中,所述的卵母细胞体外成熟培养液包含:卵母细胞基础培养液、

2mM谷胱甘肽、100 $\mu$ M半胱氨酸、0.3mM丙酮酸钠、1 $\mu$ g/mL雌二醇、10ng/mL表皮生长因子、体积分数10%胎牛血清、10IU/mL孕马血清促性腺激素和10IU/mL人绒毛膜促性腺激素、乳铁蛋白。由此,该培养液,可以大大提高卵母细胞体外成熟率和体外成熟质量。

[0010] 在某些实施方式中,所述的卵母细胞体外成熟培养液包含:卵母细胞基础培养液、2mM谷胱甘肽、100 $\mu$ M半胱氨酸、0.3mM丙酮酸钠、1 $\mu$ g/mL雌二醇、10ng/mL表皮生长因子、体积分数10%胎牛血清、10IU/mL孕马血清促性腺激素和10IU/mL人绒毛膜促性腺激素、50-200 $\mu$ g/mL乳铁蛋白。由此,该培养液,可以大大提高卵母细胞体外成熟率和体外成熟质量。

[0011] 在某些实施方式中,所述的卵母细胞体外成熟培养液包含:卵母细胞基础培养液、2mM谷胱甘肽、100 $\mu$ M半胱氨酸、0.3mM丙酮酸钠、1 $\mu$ g/mL雌二醇、10ng/mL表皮生长因子、体积分数10%胎牛血清、10IU/mL孕马血清促性腺激素和10IU/mL人绒毛膜促性腺激素、100 $\mu$ g/mL乳铁蛋白。由此,该培养液,对提高卵母细胞体外成熟率和体外成熟质量的效果最佳。

[0012] 本发明的再一个方面,提供了一种上述卵母细胞体外成熟培养液添加剂或上述卵母细胞体外成熟培养液在胚胎工程技术上的应用。由此,可以大大提高卵母细胞的体外成熟率和质量,进而应用在体细胞克隆技术上,可以提高体细胞克隆胚胎的成功率和质量。

[0013] 在某些实施方式中,应用于体细胞克隆技术的卵母细胞体外成熟培养液添加剂或卵母细胞体外成熟培养液中乳铁蛋白的浓度为50-200 $\mu$ g/mL。由此,可以大大提高卵母细胞的体外成熟率和质量,进而应用在体细胞克隆技术,可以提高体细胞克隆胚胎的成功率和质量。

[0014] 在某些实施方式中,应用于体细胞克隆技术的卵母细胞体外成熟培养液添加剂或卵母细胞体外成熟培养液中乳铁蛋白的浓度为100 $\mu$ g/mL。由此,可以最佳效果的提高卵母细胞的体外成熟率和质量,进而应用在体细胞克隆技术上,可以提高体细胞克隆胚胎的成功率和质量。

[0015] 本发明的有益效果:

[0016] 1、卵母细胞成熟培养液中添加乳铁蛋白,可以显著提高卵母细胞第一极体排出率、显著降低卵母细胞ROS含量,显著提高体外受精后胚胎囊胚率,由此可以大大提高卵母细胞的成熟率和质量。

[0017] 2、含乳铁蛋白的卵母细胞成熟培养液,可以显著提高卵母细胞第一极体排出率、显著降低卵母细胞ROS含量,显著提高体外受精后胚胎囊胚率,由此可以大大提高卵母细胞的成熟率和质量。

[0018] 3、乳铁蛋白应用在胚胎工程技术中,其作为卵母细胞成熟培养液的添加剂,可以显著提高卵母细胞第一极体排出率、显著降低卵母细胞ROS含量,显著提高体外受精后胚胎囊胚率,由此可以大大提高卵母细胞的成熟率和质量,进而应用在胚胎工程技术上,可以提高胚胎工程的成功率和质量。

## 附图说明

[0019] 图1是不同浓度乳铁蛋白处理对卵母细胞ROS水平影响的荧光图。

[0020] 图2是不同浓度乳铁蛋白处理对卵母细胞ROS水平影响的结果图。

## 具体实施方式

[0021] 以下实施例用于进一步说明本发明,但不应理解为对本发明的限制,本发明的保护范围不限于下述的实施例。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

### [0022] 实施例1

#### [0023] 1、卵母细胞收集和成熟培养

[0024] 从屠宰场获取绵羊卵巢,放入34℃生理盐水内运回实验室,使用添加200IU青链霉素的生理盐水冲洗3遍后,用配有18G针头的10mL注射器抽取2-8mm的卵泡,卵泡液收集于50mL锥形离心管,自然沉淀10min后弃上清,将沉淀重新悬浮在含有0.1%PVA (Polyvinyl alcohol, 聚乙烯醇) 的DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, 杜氏磷酸盐缓冲液) 中,体视显微镜下收集包裹卵丘细胞3层以上且均匀胞质的卵丘-卵母细胞复合体 (Cumulusoocyte complexes, COCs), 在成熟培养液中清洗三次后,将COCs转移到含有500μL 下述不同分组的成熟培养液且已在38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中平衡2h的Nunc四孔培养皿中,50个COCs一孔,培养皿放入38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱成熟培养24h。将卵丘卵母细胞复合体移入0.1% (w/v) 透明质酸酶中作用5min,用适当口径吸管反复吹打,去除卵丘细胞,在体视显微镜下对卵母细胞进行挑选,卵周隙明显且无杂质、胞质均匀、明显排出第一极体的卵母细胞为成熟卵母细胞,无卵周隙、胞质发散视为死亡的卵母细胞。

[0025] 成熟培养液为:TCM-199 (Gibco) 基础液,添加2mM谷胱甘肽、100μM半胱氨酸、0.3mM丙酮酸钠、1μg/mL雌二醇、10ng/mL表皮生长因子、体积分数10%胎牛血清、10IU/mL孕马血清促性腺激素 (PMSG) 和10IU/mL人绒毛膜促性腺激素 (hCG)。COCs的成熟培养分为五组:对照组 (未添加乳铁蛋白的成熟培养液, control)、50μg/mL组 (加入50μg/mL乳铁蛋白的成熟培养液)、100μg/mL组 (加入100μg/mL乳铁蛋白的成熟培养液)、150μg/mL组 (加入150μg/mL乳铁蛋白的成熟培养液)、200μg/mL组 (加入200μg/mL乳铁蛋白的成熟培养液)。经24h成熟培养后,100μg/mL组细胞第一极体的排出率显著提高 ( $P < 0.05$ ), 添加100μg/mL乳铁蛋白的成熟培养液可显著提高卵母细胞的成熟率 ( $P < 0.05$ ), 结果见表1。

#### [0026] 表1乳铁蛋白对卵母细胞成熟的影响

组别	培养卵数	卵母细胞死亡率	第一极体排出率
对照组	328	61 (18.60%)	229(69.82±3.22%) <sup>a</sup>
[0027] 50μg/mL	361	69 (19.11%)	260(72.02±4.69%) <sup>ab</sup>
100μg/mL	341	49 (14.37%)	258(75.66±5.27%) <sup>b</sup>
150μg/mL	363	63 (17.36%)	264(72.73±3.08%) <sup>ab</sup>
200μg/mL	319	64 (20.06%)	225(70.53±5.15%) <sup>a</sup>

[0028] 备注:统计分析3次重复试验的数据,同一列的不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

#### [0029] 2、成熟卵母细胞ROS水平检测

[0030] 使用ROS检测试剂盒 (Sigma-Aldrich) 检测卵母细胞内ROS水平。卵母细胞在含10μMDCFH-DA (2,7-Dichlorodi-hydrofluorescein diacetate) 的H-SOF (Hepes-synthetical

Oviductal fluid, HEPES缓冲的合成输卵管液, SOF合成输卵管液; 0.3mM丙酮酸钠, 25mM碳酸氢钠, 5.4mM乳酸钠, 108mM氯化钠, 7.2mM氯化钾, 1.2mM磷酸二氢钾, 1.8mM氯化钙, 1.5mM氯化镁, 1.3 $\mu$ g/mL酚红, 4mg/mL牛血清白蛋白) 中避光孵育30min后, 用H-SOF清洗卵母细胞1-2次, 在激光共聚焦显微镜上检测荧光信号并拍照, 用ImageJ软件分析卵母细胞的荧光强度的相对比值。五组卵母细胞检测都遵循相同的程序, 包括孵育、清洗、成像。卵母细胞成熟培养24h后, 和对照组相比, 添加100 $\mu$ g/mL乳铁蛋白的成熟培养液(100 $\mu$ g/mL组) 最大程度地降低了胞质内%的ROS含量, 结果见附图1-2。

[0031] 3、卵母细胞体外受精、体外培养与囊胚细胞计数

[0032] 将五组成熟的卵母细胞在受精液中洗3次再移入提前放入培养箱预平衡2小时装有500 $\mu$ L/每孔受精液(SOF+2%发情绵羊血清+2mM丙酮酸钠+10 $\mu$ g/mL肝素+1mM咖啡因)的四孔板中, 每孔中放入40枚成熟的卵母细胞。采用杜泊绵羊冻精, 用90%Percoll和45%Percoll(受精液稀释)梯度离心分离活力好的精子, 2100rpm离心15分钟。取离心管底部精子用受精液稀释后加入到受精孔中, 使最终受精孔中精子密度达到 $1 \times 10^6$ 个/mL。将受精孔板置于38.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中, 受精18-24h。

[0033] 将受精24h后的胚胎从受精液中移出放入H-SOF中, 反复吹打去除附着在胚胎表面的精子。在培养液(SOF+4mg/mL BSA+2%必需氨基酸(Thermo Fisher)+1%非必需氨基酸(Sigma Aldrich)+2mM谷胱甘肽+1mM丙酮酸钠)中洗3次后移入装有7个60 $\mu$ L液滴且覆盖矿物油的培养皿中, 每滴放入6-10枚胚胎, 并将培养皿置于38.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中。受精48h后观察卵裂, 第3、5、7天半量换液(培养液中添加10%FBS), 发育至第7天观察囊胚率(受精为第0天)。

[0034] 挑选已发育到囊胚的体外受精胚胎用4%多聚甲醛固定10min, 再用10mg/mL Hoechst33342染色10min, 压片后在荧光显微镜下观察记录囊胚细胞数。成熟培养液中添加100 $\mu$ g/mL乳铁蛋白组培养成熟的卵母细胞, 体外受精后胚胎囊胚率显著高于对照组(P<0.05), 结果见表2。

[0035] 表2乳铁蛋白添加组培养成熟卵母细胞体外受精胚胎的发育和质量

组别	卵母细胞体外受精数/个	卵裂率/%	囊胚率/%	囊胚细胞数
对照组	245	68.16 <sup>a</sup>	29.94 <sup>a</sup>	86.33 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>
[0036] 50 $\mu$ g/mL	230	74.78 <sup>a</sup>	33.72 <sup>a</sup>	94.33 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>
100 $\mu$ g/mL	242	79.75 <sup>b</sup>	39.38 <sup>b</sup>	113.67 $\pm$ 3.21 <sup>b</sup>
150 $\mu$ g/mL	226	73.01 <sup>ab</sup>	33.94 <sup>ab</sup>	92.67 $\pm$ 0.58 <sup>ab</sup>
200 $\mu$ g/mL	255	70.59 <sup>a</sup>	31.67 <sup>a</sup>	89.67 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>

[0037] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解, 本发明不受上述实施例的限制, 上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理, 在不脱离本发明精神和范围的前提下本发明还会有各种变化和进步, 这些变化和进步都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等同物界定。

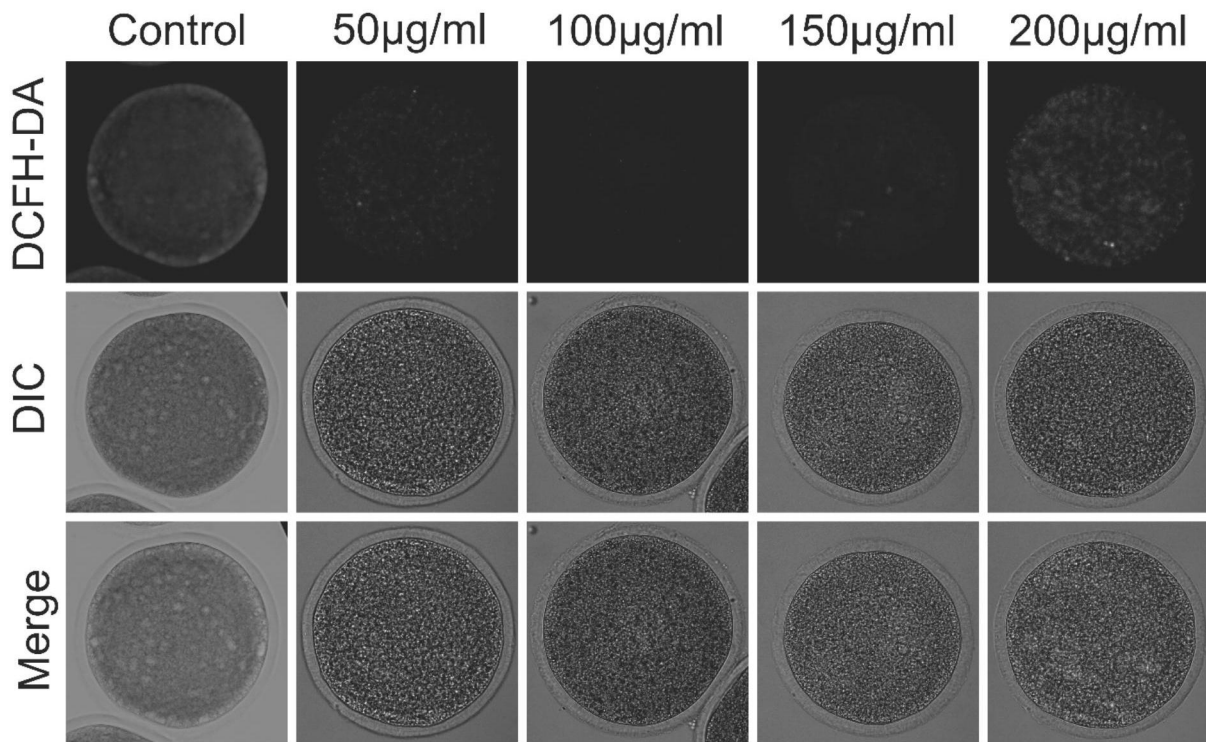


图1

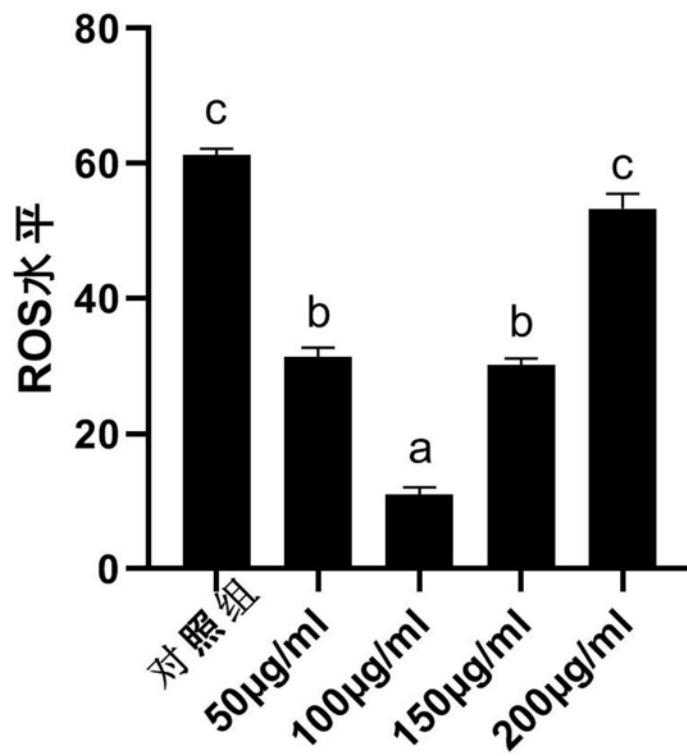


图2