

分类号:

密 级: 公 开

学 号: 20212013021

单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



绵羊 GV 期卵母细胞体外成熟及玻璃化冷冻的 研究

学 位 申 请 人	赵玉坤
指 导 教 师	曾维斌
申请学位门类级别	农学硕士
学 科、专 业 名 称	畜牧学
研 究 方 向	动物遗传育种与繁殖
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2024 年 6 月

学 号: 20212013021

单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



绵羊 GV 期卵母细胞体外成熟及玻璃化冷冻的 研究

学 位 申 请 人	赵玉坤
指 导 教 师	曾维斌
申请学位门类级别	农学硕士
学 科、专 业 名 称	畜牧学
研 究 方 向	动物遗传育种与繁殖
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2024 年 6 月

**In vitro maturation and vitrification of oocytes at GV stage in
sheep**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of

Master of Agriculture

By

Yukun Zhao

(Animal Genetics, Breeding and Reproduction)

Dissertation Supervisor:

Prof. Weibin Zeng

June 2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：赵玉坤

时间：2024年5月15日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：赵玉坤

时间：2024年5月15日

导师签名：曾维斌

时间：2024年5月15日

摘要

目的：以筛选绵羊卵母细胞体外成熟培养液中的抗氧化剂，GV 期卵母细胞玻璃化冷冻添加剂为目的，探究相对稳定成熟的操作流程，能够改善目前绵羊卵母细胞玻璃化保存成熟率低，囊胚率低的现状。为新疆绵羊卵子库的建设及种质资源保护提供一定的技术支持。

方法：(1)采集绵羊离体卵巢上的卵母细胞，将其放置在添加不同浓度的葡萄籽原花青素(OPC)的卵母细胞体外成熟(IVM)培养液中培养 24 h 统计第一极体排出率，并检测卵母细胞活性氧(ROS)浓度、谷胱甘肽(GSH)浓度以及线粒体膜电位的强度，用 RT-qPCR 技术检测卵母细胞抗氧化基因及卵丘颗粒细胞的卵丘扩张基因相对表达量；以此筛选出含最佳浓度 OPC 培养液后，再与含不同浓度绿原酸(CGA)组合筛选出最佳配比的卵母细胞培养液。(2)利用最佳培养液将培养成熟的卵母细胞进行玻璃化冷冻、复苏、孤雌激活，检测最终的卵裂率、囊胚率，以此作为评估在冷冻保护液中添加 CGA 及抗冻蛋白(AFGP)的最优配比；然后用最优配比的冷冻保护液对生发泡(GV)期卵母细胞进行玻璃化冷冻、复苏、体外成熟、孤雌激活，统计其成熟率、卵裂率及囊胚率，并检测冻后 GV 期卵母细胞的透明带硬度，形态变化以及纺锤体变化情况，用 RT-qPCR 技术对 GV 期卵母细胞冷冻前后的抗冻、抗氧化、抗凋亡、诱导凋亡以及卵丘颗粒细胞抗冷冻、扩张、抗凋亡、诱导凋亡等标志基因的相对表达量进行检测。

结果：(1)绵羊卵母细胞体外成熟培养液中添加 25 μ mol/L OPC，卵母细胞的成熟率达到了 51.42%，卵母细胞 ROS 含量显著低于对照组 ($P<0.05$)，GSH 含量及线粒体膜电位强度显著高于对照组 ($P<0.05$)。卵母细胞、卵丘颗粒细胞抗氧化基因 *SOD-2*、*GPX-3*，卵丘扩张基因 *PTX-3*、*HAS-2* 的表达量都显著高于对照组 ($P<0.05$)。而添加 25 μ mol/L OPC 与 30 μ mol/L CGA，其卵母细胞成熟率达到了 55.76%，卵母细胞 ROS 含量显著低于对照组 ($P<0.05$)，GSH 含量及线粒体膜电位强度显著高于对照组 ($P<0.05$)。卵母细胞、卵丘颗粒细胞抗氧化基因 *SOD-2*、*GPX-3*，卵丘扩张基因 *PTX-3*、*HAS-2* 的表达量都显著高于对照组 ($P<0.05$)。(2)添加 50 μ mol/L CGA 的玻璃化冷冻保护液，MII 期卵母细胞冷冻、复苏、孤雌激活后的卵裂率 37.67%、囊胚率 13.53%，均显著高于对照组 ($P<0.05$)。联合添加 50 μ mol/L CGA 及 15 μ g/mL AFGP 时其卵裂率 40.56%，囊胚率 15.73%，均显著高于对照组 ($P<0.05$)。GV 期卵母细胞玻璃化冷冻、复苏，体外成熟率 44.17%，孤雌激活卵裂率 37.63%、囊胚率 12.86%，均显著低于 MII 期卵母细胞 ($P<0.05$)。冻后 GV 期卵母细胞经过纺锤体染色，卵母细胞微管，染色质明显发生损伤甚至紊乱。形态正常率显著低于对照组 ($P<0.05$)。冻后 GV 期卵母细胞内部 *PRKG-1*、*ENPP-7*、*UCP-1*、*BCL-2*、*BAX*、*Caspase-3*、*FOXO* 基因显著高于未冷冻组 ($P<0.05$)，*SOD-2*、*GPX-3* 基因显著低于未冷冻组 ($P<0.05$)。*AKT* 基因与未冷冻组差异不显著 ($P>0.05$)。冻后卵丘颗粒细胞 *ENPP-7*、*PRKG-1*、*HAS-2*、*PTX-3*、*BCL-2*、*BAX*、*Caspase-3* 基因表达量显著高于未冷冻组 ($P<0.05$)，*AKT*、*UCP-1* 基因显著低于未冷冻组 ($P<0.05$)，*FOXO* 基因

与未冷冻组差异不显著 ($P>0.05$)。

结论：（1）绵羊卵母细胞体外成熟培养液中，联合添加 $25\mu\text{mol/L}$ OPC 与 $30\mu\text{mol/L}$ CGA 作为抗氧化剂时，可提高卵母细胞的成熟率。（2）绵羊 GV 期卵母细胞玻璃化冷冻保护液中联合添加 $15\mu\text{g/mL}$ AFGP 与 $50\mu\text{mol/L}$ CGA 分别作为抗氧化剂及非渗透性保护剂时有效提高了卵母细胞的冷冻效率。

关键词：绵羊；GV 期卵母细胞；体外成熟；玻璃化冷冻

Abstract

Purpose: The aim is to screen antioxidants in the in vitro maturation medium of sheep oocytes and to develop a protocol for vitrification of oocytes at the germinal vesicle (GV) stage, with the goal of improving the currently low maturation and blastocyst rates of sheep oocytes currently stored using vitrification. This study aims to provide technical support for the establishment of a sheep oocyte bank in Xinjiang and the conservation of genetic diversity.

Methods: (1) Sheep oocytes were collected from excised ovaries and cultured in in vitro maturation (IVM) medium containing different concentrations of grape seed proanthocyanidins (OPC) for 24 hours. The rate of the first polar body extrusion was recorded, and levels of reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), and mitochondrial membrane potential were measured. The relative expression levels of antioxidant genes in oocytes and cumulus cells, as well as expansion genes in cumulus cells, was evaluated using RT-qPCR to select the optimal concentration of OPC in the culture medium. Subsequently, the optimal combination of OPC and chlorogenic acid (CGA) was determined. (2) Oocytes matured in the optimal medium were subjected to vitrification, thawing, parthenogenetic activation, and evaluation of cleavage and blastocyst rates to determine the optimal ratio of CGA and antifreeze glycoproteins (AFGP) in the cryoprotectant. The cryopreservation efficiency of GV-stage oocytes was evaluated using the optimal cryoprotectant, and parameters such as maturation rate, cleavage rate, blastocyst rate, hardness of the zona pellucida of post-thaw GV-stage oocytes, morphological changes, and spindle morphology were assessed. RT-qPCR was used to analyze the relative expression levels of genes related to freezing resistance, antioxidation, anti-apoptosis, apoptosis induction in GV-stage oocytes, and genes related to freezing resistance, expansion, anti-apoptosis, and apoptosis induction in cumulus cells.

Results: (1) Adding 25 $\mu\text{mol/L}$ OPC to the in vitro maturation medium resulted in a maturation rate of 51.42% in sheep oocytes, with significantly lower ROS levels and higher GSH levels and mitochondrial membrane potential compared to the control group ($P<0.05$). The expression levels of antioxidant genes *SOD-2* and *GPX-3* in oocytes and expansion genes *PTX-3* and *HAS-2* in cumulus cells were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). When 25 $\mu\text{mol/L}$ OPC was combined with 30 $\mu\text{mol/L}$ CGA, the maturation rate reached 55.76%, with significantly lower ROS levels and higher GSH levels and mitochondrial membrane potential compared to the control group ($P<0.05$). The expression levels of *SOD-2* and *GPX-3* in oocytes and *PTX-3* and *HAS-2* in cumulus cells were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$). (2) Using a vitrification cryoprotectant containing 50 $\mu\text{mol/L}$ CGA, the cleavage rate and blastocyst rate of MII-stage oocytes after freezing, thawing, and parthenogenetic activation were 37.67% and 13.53%, respectively, significantly higher than those in the control group

($P < 0.05$). When 50 $\mu\text{mol/L}$ CGA and 15 $\mu\text{g/mL}$ AFGP were added together, the cleavage rate and blastocyst rate were 40.56% and 15.73%, respectively, significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). After vitrification and thawing of GV-stage oocytes, the in vitro maturation rate is 44.17%, and the parthenogenetic activation rate of oocytes is 37.63%, with an embryonic development rate of 12.86%, all significantly lower than those for MII-stage oocytes ($P < 0.05$). Following spindle staining of post-thaw GV-stage oocytes, it is evident that the microtubules and chromatin of oocytes are significantly damaged or even disordered. The rate of normal morphology is significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). Post-thaw, the expression levels of *PRKG-1*, *ENPP-7*, *UCP-1*, *BCL-2*, *BAX*, *Caspase-3*, and *FOXO* genes inside GV-stage oocytes are significantly higher than those in the non-frozen group ($P < 0.05$), whereas *SOD-2* and *GPX-3* genes are significantly lower ($P < 0.05$). The difference in *AKT* gene expression compared to the non-frozen group is not significant ($P > 0.05$). Post-thaw, granulosa cells of the cumulus-oocyte complex show significantly higher expression levels of *ENPP-7*, *PRKG-1*, *HAS-2*, *PTX-3*, *BCL-2*, *BAX*, and *Caspase-3* genes compared to the non-frozen group ($P < 0.05$), while *AKT* and *UCP-1* genes are significantly lower ($P < 0.05$), and the difference in *FOXO* gene expression in the non-frozen group is not significant ($P > 0.05$).

Conclusion: The addition of OPC and CGA to the in vitro maturation medium improved the maturation rate of sheep oocytes and enhanced their antioxidant capacity and developmental potential. The optimal combination of CGA and AFGP in the vitrification cryoprotectant improved the cleavage and blastocyst rates of MII-stage oocytes after thawing and activation. However, the cryopreservation efficiency of GV-stage oocytes was lower compared to MII-stage oocytes, with significant damage observed in post-thaw GV-stage oocytes. The gene expression analysis revealed changes in genes related to freezing resistance, antioxidation, apoptosis, and expansion in both oocytes and cumulus cells after vitrification.

Future studies should focus on further optimizing the cryopreservation protocol for GV-stage oocytes to minimize damage and improve developmental potential. Additionally, investigating the long-term effects of vitrification on the health and viability of the health and viability of the embryos and offspring resulting will be crucial for the successful establishment of a sheep oocyte bank and conservation of genetic resources.

Key words: sheep; GV stage oocytes; in vitro maturation; vitrification cryopreservation.

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略词表.....	VII
第一章 绪论.....	1
1.1 研究目的与意义.....	1
1.2 绵羊卵母细胞体外成熟及玻璃化冷冻国内外研究现状.....	2
1.2.1 卵母细胞体外成熟.....	2
1.2.2 绵羊卵母细胞的玻璃化冷冻.....	3
1.3 绵羊卵母细胞玻璃化冷冻分析.....	9
1.4 研究内容.....	10
1.5 技术路线.....	11
第二章 绵羊卵母细胞的体外成熟.....	12
2.1 材料与方法.....	12
2.1.1 材料.....	12
2.1.2 试验方法.....	15
2.2 结果与分析.....	17
2.2.1 形态学观察.....	17
2.2.2 OPC 对卵母细胞成熟率的影响.....	18
2.2.3 OPC+CGA 对卵母细胞成熟率的影响.....	18
2.2.4 OPC 对绵羊卵母细胞 ROS 水平的影响.....	19
2.2.5 OPC+CGA 对绵羊卵母细胞 ROS 水平的影响.....	19
2.2.6 OPC 对绵羊卵母细胞 GSH 水平的影响.....	20
2.2.7 OPC+CGA 对绵羊卵母细胞 GSH 水平的影响.....	20
2.2.8 OPC 对绵羊卵母细胞线粒体膜电位水平的影响.....	21
2.2.9 OPC+CGA 对绵羊卵母细胞线粒体膜电位水平的影响.....	21
2.2.10 OPC 对卵母细胞抗氧化相关基因的影响.....	22
2.2.11 OPC 对颗粒细胞卵丘扩张相关基因的影响.....	23
2.2.12 OPC+CGA 对卵母细胞抗氧化基因的影响.....	23
2.2.13 OPC+CGA 对颗粒细胞卵丘扩张基因表达的影响.....	24
2.3 讨论.....	24
2.3.1 OPC 及 CGA 对绵羊卵母细胞体外成熟的影响.....	24

2.3.2 OPC 及 CGA 对卵母细胞 ROS、GSH 和线粒体膜电位的影响	25
2.3.3 OPC 及 CGA 对卵母细胞及卵丘颗粒细胞相关基因表达的影响	26
2.4 小结	27
第三章 绵羊卵母细胞的玻璃化冷冻	28
3.1 材料与方法	28
3.1.1 材料	28
3.1.2 试验方法	32
3.2 结果与分析	34
3.2.1 CGA 对 MII 期卵母细胞玻璃化冷冻的影响	34
3.2.2 CGA+AFGP 对 MII 期卵母细胞玻璃化冷冻的影响	35
3.2.3 复苏后 GV 期卵母细胞成熟率	35
3.2.4 复苏后 GV 期卵母细胞卵裂率及囊胚率	36
3.2.5 冻后卵母细胞形态正常率及透明带硬度	36
3.2.6 卵母细胞纺锤体的变化	37
3.2.7 冻后卵母细胞及卵丘颗粒细胞 mRNA 表达量的变化	38
3.3 讨论	40
3.3.1 复苏后 GV 期卵母细胞成熟率、卵裂率、囊胚率	40
3.3.2 玻璃化冷冻对绵羊 GV 期卵母细胞超微结构的影响	40
3.3.3 玻璃化冷冻对绵羊 GV 期卵母细胞显微结构的影响	40
3.3.4 玻璃化冷冻对绵羊 GV 期卵母细胞及卵丘颗粒细胞相关基因表达的影响	41
3.4 小结	43
第四章 全文结论	44
第五章 论文创新点	45
参考文献	46
致谢	57
作者简介	58
在学期间主要参与的研究项目	58
导师评阅表	59

缩略词表

Abbreviation

英文缩写	英文全称	中文名称
AFGP	Antifreeze Glycoprotein	抗冻蛋白
BSA	Bovine albumin	牛血清白蛋白
CGA	Chlorogenic acid	绿原酸
COC	Cumulus-Oocyte Complex	卵丘-卵母细胞复合体
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EG	Ethylene glycol	乙二醇
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GLY	Glycerol	甘油
GSH	Glutathione	谷胱甘肽
GV	Germinal Vesicle	生发泡
IVC	In vitro culture of embryo	胚胎体外培养
IVM	In vitro maturation	体外成熟
MII	Metaphase of second meiosis	第二次减数分裂
mRNA	Messenger Ribonucleic acid	信使核糖核酸
OPC	Oligomeric proanthocyanidin complexes	葡萄籽原花青素
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
RT-qPCR	The quantitative RT-PCR	实时定量 PCR

第一章 绪论

1.1 研究目的与意义

绵羊作为一种重要的经济动物，在人们的餐桌上是不可缺少的一份子。在我国畜牧业经济中养羊业的地位十分重要。它也是衡量区域畜牧业竞争力不可或缺的一部分，是衡量畜牧业竞争力的重要指标^[1]。中国有着悠久的养羊历史，养殖数量和品种多样性位居世界前列。近年来我国养羊业蓬勃发展，新疆作为我国的五大牧区之一，绵羊的养殖是新疆畜牧业发展的重要组成部分。新疆地方绵羊具有地方品种多，成熟早，发情周期短，耐粗饲，适应性强等特点，且其肉质风味独特，性温热，滋阴补气在市场上被誉为“保健功能食品”^[2]。得益于新疆地方政府政策的大力支持，羊养殖业生产水平的提高，生产方式的改善，以及养殖生态环境得到修复和保护，各类疾病的防治措施持续提高，使得近年来新疆羊只的存栏量持续增加。然而新疆绵羊养殖目前存在养殖效益低，品种良种化水平低，繁育率低且羔羊死亡率高，饲草料供给不均衡，羊产品品牌效益不明显等问题^[3]。从遗传育种角度来讲，配子的有效保存对动物遗传育种与繁殖具有重要的意义。近年来，越来越多的研究者参与到绵羊精液及卵母细胞玻璃化冷冻的研究及应用领域。

虽然新疆羊产业近年来发展形势趋于蓬勃态势，但是新疆各地区地方种质资源的保护也迫在眉睫，肖海龙 2022 年指出^[4]：新疆有些地方品种的绵羊具有很高的繁殖能力，而且其肉质口感和营养水平均很优秀，由于没有得到相应的重视，没有投入足够的资金及有力的保护手段，导致这些良种资源被严重破坏甚至濒临灭绝。

近年来，随着胚胎工程逐步发展，卵母细胞玻璃化冷冻保存越来越成为人们研究的热点。事实上胚胎冷冻保存先于卵母细胞冷冻保存。自 1985 年 RALL^[5]发明玻璃化冷冻法以来，人们不断在玻璃化冷冻保存的方法、配方以及程序上进行完善，研制出大量针对各种动物的玻璃化冷冻液配方、冷冻程序以及冷冻设备等，在前人的基础上大大提高了冷冻效率。

以往的研究表明，由于绵羊卵母细胞内部脂质含量较高，亚细胞结构较为复杂，使绵羊卵母细胞对温度变化具有更高的敏感性，更易受到冷冻损伤。相较于牛或猪的卵母细胞冷冻保存技术研究绵羊卵母细胞的冷冻保存技术较为落后，主要表现在标准的冷冻程序亟待建立以及缺乏大量的实验数据支持。

生发泡期卵母细胞又称为 GV 期卵母细胞，此时的卵母细胞没有排出第一极体，是卵母细胞成熟的早期阶段。结合绵羊卵母细胞的玻璃化冷冻技术，GV 期卵母细胞的玻