



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 119752779 B

(45) 授权公告日 2025. 12. 19

(21) 申请号 202411762712.7

(22) 申请日 2024.12.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 119752779 A

(43) 申请公布日 2025.04.04

(73) 专利权人 上海市农业科学院
地址 201106 上海市闵行区新虹街道北翟
路2901号

(72) 发明人 徐皆欢 戴建军 何孟纤 李荷然
吴彩凤 高骏 孙玲伟 张德福
张树山

(74) 专利代理机构 北京思元知识产权代理事务
所(普通合伙) 11598
专利代理师 余光军 陶霞娟

(51) Int.Cl.

C12N 5/075 (2010.01)

A01N 1/125 (2025.01)

A01N 1/126 (2025.01)

(56) 对比文件

CN 119242567 A, 2025.01.03

审查员 王琳

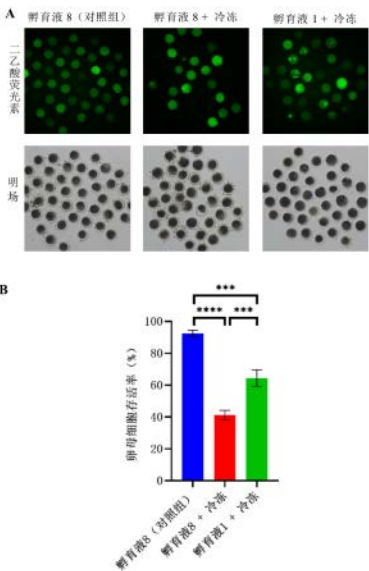
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷
冻存活率的方法

(57) 摘要

本发明公开了降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率的方法,所述方法包括:
(1) 将孵育液预热;将卵母细胞在预热后的孵育液中进行孵育;(2) 将孵育后的卵母细胞进行冷冻、解冻;其中,所述的孵育液是通过在含有10wt%胎牛血清的培养基199中加入苯扎贝特和胆酸制备得到。本发明提供的方法中所使用的孵育液与常规含有10wt%胎牛血清的培养基199相比,因所添加的苯扎贝特和胆酸具有协同降脂的作用,使得该方法能够显著降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率。本发明在降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率等方面具有应用前景。



1. 一种降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率的方法,其特征在于,包括:
(1) 将孵育液预热;将卵母细胞在预热后的孵育液中进行孵育;(2) 将孵育后的卵母细胞进行冷冻、解冻;其中,所述的孵育液是通过在基础细胞培养基中加入苯扎贝特和胆酸制备得到;所述的卵母细胞是成熟的猪卵母细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所述的孵育液预热的方法包括:将上覆矿物油的孵育液置于39℃、5%二氧化碳、饱和湿度环境下预热1 h。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的基础细胞培养基是含有10wt%胎牛血清的培养基199。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的孵育液中苯扎贝特和胆酸的浓度均为100 μM 。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所述的孵育时间是3-5 h。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述的孵育时间是4 h。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所述的孵育条件包括:孵育温度37-39.5℃、4-6%二氧化碳、饱和湿度。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所述的孵育条件是:孵育温度39℃、5%二氧化碳、饱和湿度。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(2)中所述的冷冻方法包括:将孵育后的猪卵母细胞转移至39℃的玻璃化冷冻液I中维持3 min再转移至39℃的玻璃化冷冻液II中维持10 s,投入液氮中冷冻;所述的玻璃化冷冻液I含7.5wt%乙二醇、7.5wt%二甲基亚砷和20wt%胎牛血清的培养基199;所述的玻璃化冷冻液II含15wt%乙二醇、15wt%二甲基亚砷和20wt%胎牛血清的培养基199。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(2)中所述的解冻方法包括:将冷冻载杆提出液氮,卵母细胞装载端立即浸入39℃的解冻液I中使卵母细胞脱离冷冻载杆,卵母细胞在解冻液I中维持5 min,转移至39℃的解冻液II中维持5 min,转移至上覆矿物油且含10wt%胎牛血清的培养基199中孵育4 h;其中,所述的孵育条件包括:孵育温度39℃、5%二氧化碳、饱和湿度;所述的解冻液I含300 μM 蔗糖和20wt%胎牛血清的培养基199;所述的解冻液II含150 μM 蔗糖和20wt%胎牛血清的培养基199。

降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及降低动物细胞脂质含量或提升动物细胞冷冻存活率的方法,尤其涉及降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率的方法,属于猪卵母细胞的冷冻保存领域。

背景技术

[0002] 卵母细胞是雌性动物的生殖细胞。成熟的猪卵母细胞与精子结合后形成受精卵,并在母猪子宫内着床,发育为胎儿个体。卵母细胞在母猪排卵前分布于卵巢表面的卵泡内,可通过手术或屠宰后取出卵巢的方式获取。

[0003] 卵母细胞冷冻保存技术主要通过将卵母细胞在极低温度的条件下保存,能够长期维持其活力和发育潜力,是家畜繁殖育种与家畜种质资源保护的主要组成部分之一。目前,冷冻卵母细胞已在多个动物种属的繁殖上获得存活后代。然而,在猪上,胞内大量脂质制约了猪卵母细胞冷冻保存的效果。猪卵母细胞的高脂质含量是种属相关的细胞特性。猪卵母细胞冷冻保存中,胞内大量脂质阻碍冷冻保护剂的渗透,限制玻璃化效果,造成冷冻解冻后细胞活性与受精后发育为胚胎的潜能丧失,是猪繁殖与种质资源保护中的技术难题。

发明内容

[0004] 本发明的主要目的是提供一种降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率的方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明所采取的技术方案包括:

[0006] 一种降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率的方法,包括:(1)将孵育液预热;将卵母细胞在预热后的孵育液中进行孵育;(2)将孵育后的卵母细胞进行冷冻、解冻。

[0007] 本发明一种优选的具体实施方式,步骤(1)中所述的孵育液通过在基础细胞培养基中加入苯扎贝特和胆酸制备得到。

[0008] 本发明一种优选的具体实施方式,步骤(1)中所述的卵母细胞是成熟的猪卵母细胞。

[0009] 本发明一种优选的具体实施方式,步骤(1)中所述的孵育液预热的方法包括:将上覆矿物油的孵育液置于39℃、5%二氧化碳、饱和湿度环境下预热1h。

[0010] 本发明一种优选的具体实施方式,步骤(1)中所述的基础细胞培养基是含有10wt%胎牛血清的培养基199。

[0011] 本发明一种优选的具体实施方式,步骤(1)中所述的孵育液中苯扎贝特和胆酸的浓度均为100μM。

[0012] 本发明一种优选的具体实施方式,步骤(1)中所述的孵育时间是3-5h;优选的,所述的孵育时间是4h。

[0013] 本发明一种优选的具体实施方式,步骤(1)中所述的孵育条件包括:孵育温度37-

39.5℃、4-6%二氧化碳、饱和湿度；优选的，所述的孵育条件是孵育温度39℃、5%二氧化碳、饱和湿度。

[0014] 本发明一种优选的具体实施方式，步骤(2)中所述的冷冻方法包括：将孵育后的猪卵母细胞转移至39℃的玻璃化冷冻液I中维持3min再转移至39℃的玻璃化冷冻液II中维持10s，投入液氮中冷冻；其中，所述的冷冻液I是在培养基199中加入7.5wt%乙二醇、7.5wt%二甲基亚砷和20wt%胎牛血清得到的培养基；所述的冷冻液II是在培养基199中加入15wt%乙二醇、15wt%二甲基亚砷和20wt%胎牛血清得到的培养基。

[0015] 本发明一种优选的具体实施方式，步骤(2)中所述的解冻方法包括：将冷冻载杆提出液氮，卵母细胞装载端立即浸入39℃的解冻液I中使卵母细胞脱离冷冻载杆，卵母细胞在解冻液I中维持5min，转移至39℃的解冻液II中维持5min，转移至上覆矿物油且含10wt%胎牛血清的培养基199中孵育4h；其中，所述的孵育条件包括：孵育温度39℃、5%二氧化碳、饱和湿度；所述的解冻液I是在培养基199中加入300μM蔗糖和20wt%胎牛血清得到的培养基；所述的解冻液II是在培养基199中加入150μM蔗糖和20wt%胎牛血清得到的培养基。

[0016] 本发明提供的方法中所使用的孵育液与常规含有10wt%胎牛血清的培养基199相比，因所添加的苯扎贝特和胆酸具有协同降脂的作用，使得该方法能够显著降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率。本发明在降低卵母细胞脂质含量或提升卵母细胞冷冻存活率等方面具有应用前景。

附图说明

[0017] 图1为孵育液1-8孵育猪卵母细胞4h的降脂效果；其中，图1-A为卵母细胞内脂滴的荧光定量检测图；图1-B为孵育液1-3,8对猪卵母细胞的降脂效果统计学分析；图1-C为孵育液1,4-8对猪卵母细胞的降脂效果统计学分析；****:P<0.0001；

[0018] 图2为孵育液1孵育4h的猪卵母细胞在冷冻解冻后的细胞存活率检测；其中，图2-A为卵母细胞活细胞图，卵母细胞经二乙酸荧光素染料孵育，荧光显微镜下显色的判定为活细胞；图2-B为卵母细胞存活率统计学分析图。

具体实施方式

[0019] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但是应理解所述实施例仅是范例性的，不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改或替换均落入本发明的保护范围。

[0020] 实施例1猪卵母细胞的孵育液的制备

[0021] (1) 取10mL胎牛血清加入90mL培养基199中，培养基199是从赛默飞世尔科技(中国)有限公司购买的货号为12340030的Gibco培养基199。

[0022] (2) 取0.0036g苯扎贝特溶解于1mL无水胆酸(10mM in DMSO)中。

[0023] (3) 将以上两种溶液混合，即为孵育液1。

[0024] 试验例1猪卵母细胞降脂以及提升猪卵母细胞冷冻存活率的试验

[0025] 1试验方法

[0026] 1.1供试验用的孵育液：

[0027] (1) 孵育液1: 实施例1制备的孵育液1; (2) 孵育液2: 除了没有胆酸, 其他的成分以及制备方法均与实施例1制备的孵育液1完全相同; (3) 孵育液3: 除了没有苯扎贝特, 其他的成分以及制备方法均与实施例1制备的孵育液1完全相同; (4) 孵育液4: 将实施例1制备的孵育液1中苯扎贝特替换为同浓度的L-肉碱得到的孵育液; (5) 孵育液5: 将实施例1制备的孵育液1中苯扎贝特替换为同浓度的烟酸得到的孵育液; (6) 孵育液6: 将实施例1制备的孵育液1中胆酸替换为同浓度的L-肉碱得到的孵育液; (7) 孵育液7: 将实施例1制备的孵育液1中胆酸替换为同浓度的烟酸得到的孵育液; (8) 孵育液8: 实施例1中步骤(1)所制得的孵育液(含10wt%胎牛血清的培养基199), 作为对照组。

[0028] 1.2 试验方法

[0029] (1) 成熟猪卵母细胞的获取: 自母猪体内取出卵巢, 使用10mL注射器刺入卵巢表面的卵泡中, 吸取卵泡液, 置于体式显微镜下镜检, 挑出卵泡液中的卵丘-卵母细胞复合体, 置于常规的猪卵母细胞体外成熟培养液中培养44h, 培养条件为39℃、5%二氧化碳与饱和湿度。44h后, 将卵丘-卵母细胞复合体置于0.1%透明质酸酶溶液中约1min, 并用移液器反复吹打, 使卵丘与卵母细胞分离。将卵母细胞转移至培养基199中并在显微镜下观察, 排出第一极体的即为成熟卵母细胞。

[0030] (2) 孵育: 将上覆矿物油的孵育液置于39℃、5%二氧化碳和饱和湿度环境下预热1h。将成熟的猪卵母细胞置于孵育液中孵育4h, 孵育条件: 39℃、5%二氧化碳和饱和湿度。4h后, 将卵母细胞依次转移至3个培养基199液滴中, 以充分洗去孵育液, 然后进行冷冻。

[0031] (3) 冷冻: 卵母细胞转移至39℃的玻璃化冷冻液I中维持3min, 转移至39℃的玻璃化冷冻液II中维持10s, 装载至冷冻载杆上, 投入液氮中。

[0032] 冷冻液I: 含7.5wt%乙二醇、7.5wt%二甲基亚砷和20wt%胎牛血清的培养基199。

[0033] 冷冻液II: 含15wt%乙二醇、15wt%二甲基亚砷和20wt%胎牛血清的培养基199。

[0034] (4) 解冻: 将冷冻载杆提出液氮, 卵母细胞装载端立即浸入39℃的解冻液I中使卵母细胞脱离冷冻载杆, 卵母细胞在解冻液I中维持5min, 转移至39℃的解冻液II中维持5min, 转移至上覆矿物油且含10wt%胎牛血清的培养基199中孵育4h, 孵育条件: 39℃、5%二氧化碳和饱和湿度。

[0035] 解冻液I: 含300μM蔗糖和20wt%胎牛血清的培养基199。

[0036] 解冻液II: 含150μM蔗糖和20wt%胎牛血清的培养基199。

[0037] (5) 降脂效果评价: 利用尼罗红荧光染料对卵母细胞内的脂滴染色, 利用激光扫描共聚焦显微镜拍摄并定量卵母细胞内的脂滴, 采用Image J软件将图像数据化, IBM SPSS Statistics软件执行单因素ANOVA分析确定组间显著性, 结果以平均值±标准差表示, ****代表组间差异 $P < 0.0001$ 。

[0038] (6) 冷冻效果评价: 使用二乙酸荧光素对卵母细胞进行染色, 二乙酸荧光素能进入细胞, 并在活细胞的酶作用下被转化为带绿色荧光的代谢物, 利用荧光显微镜拍摄, 显示绿色荧光的细胞判定为活细胞, 统计各组存活率, IBM SPSS Statistics软件执行单因素ANOVA分析确定组间显著性, 结果以平均值±标准差表示, ***代表组间差异 $P < 0.001$, ****代表组间差异 $P < 0.0001$ 。

[0039] 2 试验结果

[0040] 2.1 降低猪卵母细胞内的脂质含量试验结果

[0041] 由图1-A,图1-B可知,孵育液1孵育卵母细胞4h,与孵育液8(对照组)相比,显著降低了卵母细胞内脂质含量。孵育液2或孵育液3孵育卵母细胞4h,细胞内脂滴含量均显著高于孵育液1孵育的卵母细胞,即单一降脂药剂的降脂效果显著弱于两种降脂药剂联合应用。因此,实施例1制备的孵育液1中苯扎贝特与胆酸的联合应用对猪卵母细胞降脂有协同增效作用。

[0042] 由图1-A,图1-C可知,发挥降脂作用的药剂配伍是苯扎贝特和胆酸时,孵育后的卵母细胞内脂质含量显著低于各种替代配伍孵育液组($P<0.0001$),与孵育液4-7相比,孵育液1降脂效果最高。当苯扎贝特与胆酸中任意一种被替代时,孵育后的猪卵母细胞脂质含量均与新鲜对照无显著差异,降脂效果不如实施例1制备的孵育液1。

[0043] 2.2提升猪卵母细胞冷冻存活率的试验结果

[0044] 分别对孵育液1孵育的卵母细胞或孵育液8孵育的卵母细胞(对照组)进行冷冻、解冻与存活率检测。由图2-A,图2-B可知,经孵育液8孵育的卵母细胞(对照组)在冷冻后存活率显著降低,证实冷冻会引起较大比例的卵母细胞死亡或失去生物学活性;而孵育液1孵育的卵母细胞在冷冻后存活率显著高于孵育液8孵育后冷冻的卵母细胞。因此,孵育液1通过降低猪卵母细胞脂质含量,显著提高卵母细胞冷冻存活率。

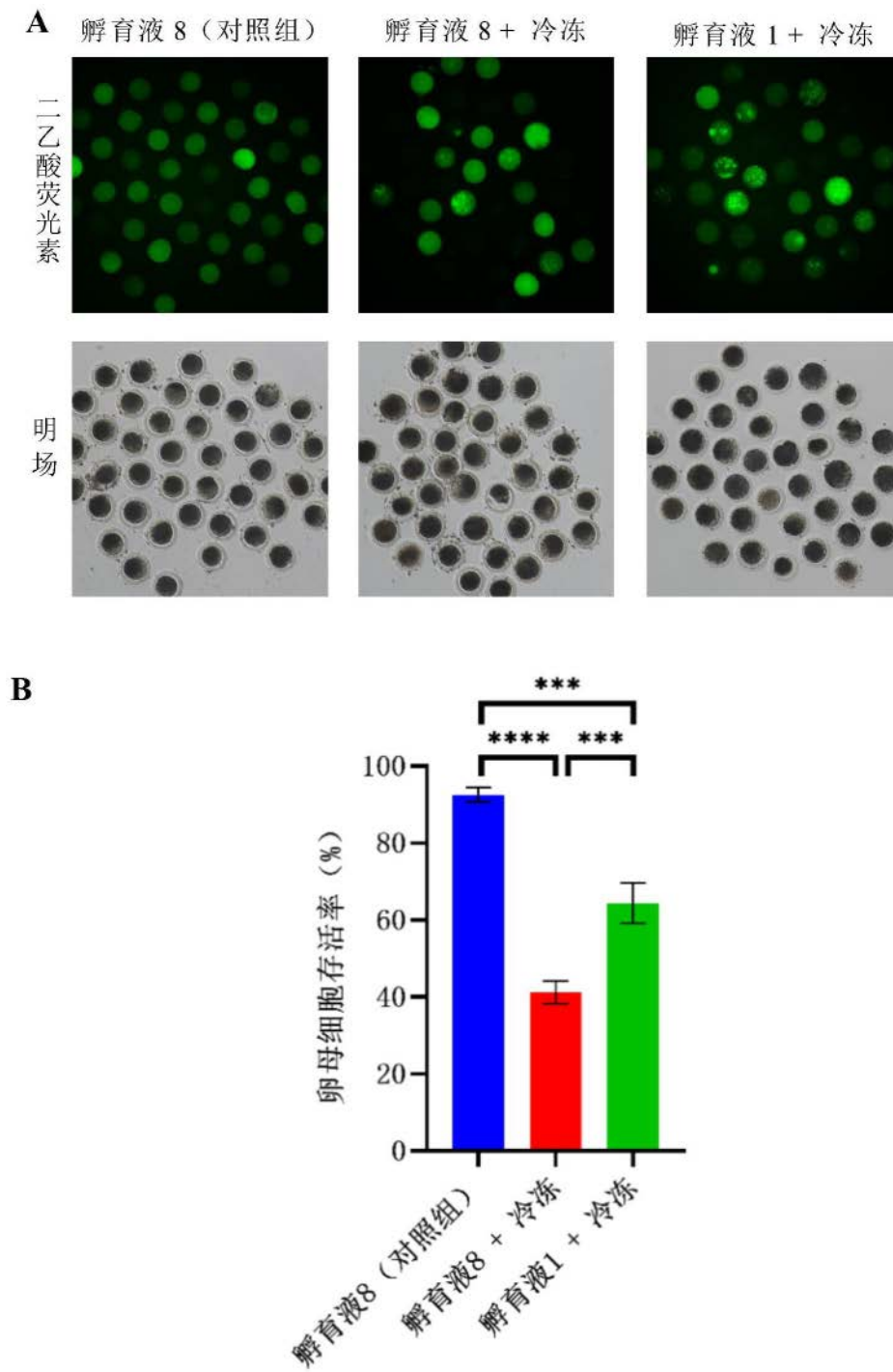


图2