



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103667181 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201310654177. 9

(22) 申请日 2013. 12. 06

(71) 申请人 青岛农业大学

地址 266109 山东省青岛市城阳区春阳路青
岛农业大学(72) 发明人 梁桂金 刘京才 赖方祯 秦训思
程顺峰 沈伟(74) 专利代理机构 青岛高晓专利事务所 37104
代理人 隋臻玮

(51) Int. Cl.

C12N 5/075(2010. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

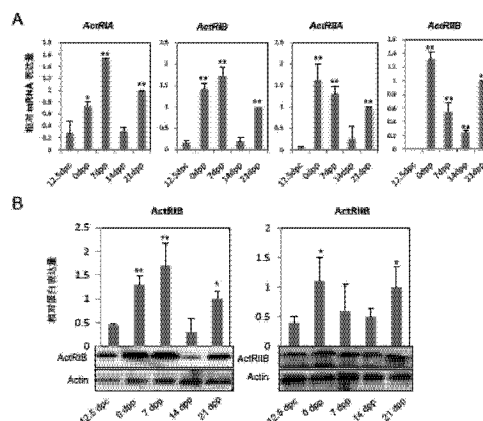
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种激活素 A 促进原始卵泡库形成的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种激活素 A 促进原始卵泡库形成的方法,操作步骤如下:1) 利用体内和体外实验确定激活素 A 发挥作用的关键时期是出生前 12 天到出生后 7 天;2) 利用细胞荧光染色和 western blot 检测减数分裂相关蛋白的表达情况,确定激活素 A 促进雌性生殖细胞第一次减数分裂的进程;3) 利用免疫荧光组化的方法统计各组中原始卵泡形成情况,激活素 A 促进原始卵泡库的建立。本发明方法原理可靠,操作简单,激活素 A 在卵母细胞发生早期起重要作用,它使雌性生殖腺中保持相对高浓度的视黄酸,视黄酸在雌性生殖细胞中促进了 Stra8 基因的表达,加速了雌性生殖细胞减数分裂启动及进程,促进了原始卵泡的形成。



1. 一种激活素 A 促进原始卵泡库形成的方法,其特征在于按照如下步骤操作:1) 利用体内和体外实验确定激活素 A 发挥作用的关键时期是出生前 12 天到出生后 7 天;利用机械法分离 12.5dpc 的胎鼠卵巢组织在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱里培养,培养液每两天换半液,培养液 A 包含 88% α -MEM,10% 胎牛血清,1% 丙酮酸钠,1% 青链霉素,10mIU 促卵泡素;培养分为四个阶段,每个阶段 7 天,共 28 天;在每个阶段分别设置不添加激活素 A 组,培养到 28 天时,收集胎鼠卵巢,并撕成碎小的组织块,0.25%胰酶,0.2%胶原酶 IV,37℃处理 10min,加入 10% 的胎牛血清 +90% 的 DMEM 配成的终止液后洗涤 3 次后,用口吸管收集裸卵,在磷酸盐缓冲液中反复洗涤,直至收集的样品中不再含有颗粒细胞;然后统计不同组的卵母细胞数目和直径大小;发现激活素 A 从小鼠出生前 12 天开始到出生后 7 天都发挥作用;2) 利用细胞荧光染色和 western blot 检测减数分裂相关基因和蛋白的表达情况,确定激活素 A 促进雌性生殖细胞第一次减数分裂的进程:12.5dpc 胎鼠生殖嵴的体外培养按照如下步骤操作:生殖嵴分离出来培养的当天定为 0 天,分离出的 12.5dpc 胎鼠生殖嵴,在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱里培养,培养液每两天换半液,贴壁培养 4 天,培养液包含 88% α -MEM,10% 胎牛血清,1% 丙酮酸钠,1% 青链霉素,10mIU 促卵泡素,100ng/ml 激活素 A;通过实时荧光定量 PCR、细胞荧光染色和 western blot 检测手段,确定激活素 A 加速第一次减数分裂的进程;3) 利用免疫荧光组化的方法统计各组中原始卵泡的形成情况,激活素 A 促进原始卵泡库的建立:12.5dpc 胎鼠生殖嵴的体外培养按照如下步骤操作:分离出 12.5dpc 胎鼠生殖嵴,在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱里培养,培养液成分同步骤 2);每两天换半液,悬浮培养 4 天后转为体外立体培养 6 天,通过荧光免疫组化检测发现激活素 A 促进在体外培养条件下的原始卵泡库形成;结果表明,激活素 A 加速体内原始卵泡库的建立;4) 激活素 A 对雌性生殖细胞第一次减数分裂相关基因和蛋白的影响:利用 RT-qPCR 方法检测减数分裂相关基因 Stra8、Dazl、Scp3、Rec8、Spo11 和 Dmc1 的变化,激活素 A 处理组的 Stra8 表达量极显著升高,Dazl、Scp3 和 Dmc1 表达量显著升高;借助免疫细胞化学检测技术,利用 MVH 标记生殖细胞后检测了生殖细胞 DAZL 和 STRA8 的阳性率,发现激活素 A 显著增加了表达 DAZL 和 STRA8 的生殖细胞比例;同时,Western blot 结果显示,添加激活素 A 后,DAZL、SCP3 和 STRA8 减数分裂相关蛋白都显著升高。

2. 根据权利要求 1 所述的一种激活素 A 促进原始卵泡库形成的方法,其特征在于:为了更准确地了解激活素 I 型和 II 型受体在整个卵巢发生过程中的定位和表达模式,分别采用定量 PCR 和蛋白印迹方法对其转录和翻译水平的表达量进行分析:定量 PCR 结果表明:在 12.5dpc 的胎鼠卵巢中检测到激活素受体 IA、IB、IIA 和 IIB 的表达,且随着卵母细胞发育,激活素受体 IA 和 IB 在 7dpp 时表达量达到峰值,与出生前卵巢中激活素受体 IA 和 IB 的表达量相比差异极显著;而激活素受体 IIA 和 IIB 表达量到 0dpp 时达到峰值,与出生前卵母细胞中的表达量相比差异显著;检测 7dpp 的卵巢发现激活素受体 IIA 和 IIB 表达呈现下降的趋势,但相较其它时期仍处于较高表达水平;卵巢发育到 14dpp 时,激活素受体 IA、IB、IIA 和 IIB 表达水平都降到最低值,与 0dpp 或 7dpp 时相比差异显著;蛋白印迹分析结果显示,激活素受体 IB 和 IIB 在翻译水平的表达趋势与转录水平一致。

一种激活素 A 促进原始卵泡库形成的方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种激活素 A (Activin A) 促进雌性生殖细胞第一次减数分裂进程的方法, 从而促进哺乳动物原始卵泡库的建立, 特别是涉及一种激活素 A 促进原始卵泡库形成的方法。属于生殖医学的生物医学技术领域。

背景技术：

[0002] 随着全球工业化的急剧发展和环境污染的持续加重, 不孕不育夫妇的比例逐渐增加, 胎儿出生缺陷发生率居高不下。我国女性不孕不育、卵巢早衰及先天出生缺陷等疾病发生率也呈现逐渐升高的趋势。研究者对不孕不育和先天出生缺陷的发病原因进行了大量的探索研究后发现, 这些卵巢性生殖疾病发生的主要原因之一是卵子发生过程中减数分裂发生或染色体分离异常从而导致原始卵泡库中卵母细胞的数目降低。然而, 最初人们主要关注出生后卵泡的生长、发育与成熟, 而对减数分裂启动以及原始卵泡形成的调控机制还了解很少。另外, 原始卵泡形成的数量及其消耗的效率决定了雌性动物的繁殖使用时间的长短。因此, 为了尽早地启动动物繁殖周期、开发大量的原始卵泡或推迟女性更年期的来临、治疗卵巢功能性不育, 研究卵母细胞发生过程中减数分裂启动、原始卵泡形成和募集显得非常重要。

[0003] 激活素 A 是 TGF- β 超家族成员, 在哺乳动物卵子发生过程中发挥着重要的作用, 在不同时间调节多种细胞中相关基因的表达。近年的研究主要集中在激活素 A 调节卵泡颗粒细胞增殖, 激活素 A 可刺激卵巢颗粒细胞增生和成熟, 用己烯雌酚处理未成熟大鼠颗粒细胞表明, 激活素 A 可增强 FSH (促卵泡素), 刺激芳香酶的活性, 促进孕酮及抑制素的产生 (Eppig et al, 1994)。用激活素 A 处理卵巢碎片可刺激卵原细胞的增殖 (Martins da et al, 2004) 等。目前, 在激活素 A 参与调节减数分裂前生殖细胞形成原始卵泡库方面还未有研究报道。本研究借助胎鼠生殖嵴体外发育模型, 深入研究激活素 A 与雌性生殖细胞原始卵泡库形成之间的关系, 具有很大的实际应用价值。

发明内容：

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的缺点, 提供一种激活素 A 促进原始卵泡库形成的方法, 使激活素 A 在体内和体外条件下都可以促进动物原始卵泡库的形成。

[0005] 为了实现上述发明目的, 本发明方法利用免疫组织化学、定量 PCR 及蛋白印迹技术检测了激活素 A 的 I 型和 II 型受体在 12.5dpc、0dpp、7dpp、14dpp 和 21dpp 小鼠卵巢发育过程中的定位和表达变化, 结果显示激活素 A 的 I 型和 II 型受体在 12.5dpc 到 7dpp 小鼠卵巢中有明显的表达峰; 再利用 12.5dpc 雌性胎鼠生殖嵴体外培养, 在 12.5dpc 到 7dpp 期间持续添加激活素 A 显著提高卵母细胞数量、直径和质量 ($P < 0.05$); 在 12.5dpc 雌性胎鼠生殖嵴体外培养过程中, 激活素 A 可促进卵母细胞第一次减数分裂前期的进程 ($P < 0.05$), 使减数分裂相关基因 Stra8、Dazl、Dmc1 和 Scp3 在基因水平表达量显著升高 ($P < 0.05$), Stra8、Scp3 和 Dazl 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$)。对妊娠第 10d 的母鼠静脉注射激活素

A, 激活素 A 促进卵原细胞第一次减数分裂前期进程, 减数分裂相关基因表达量也显著升高 ($P < 0.05$)。12.5dpc 小鼠卵巢体外培养 10 天后, 激活素 A 促进生殖细胞 Cyst 的解聚和原始卵泡形成。

[0006] 本发明的一种激活素 A 促进原始卵泡库形成的方法, 按照如下步骤操作:

[0007] 1) 利用体内和体外实验确定激活素 A 发挥作用的关键时期是出生前 12 天到出生后 7 天: 利用机械法分离 12.5dpc 的胎鼠卵巢组织在 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱里培养, 培养液每两天换半液, 培养液 A 包含 88% (α -MEM), 10% 胎牛血清 (FCS), 1% 丙酮酸钠, 1% 青链霉素, 10mIU 促卵泡素 (FSH); 培养分为四个阶段, 每个阶段 7 天, 共 28 天; 在每个阶段分别设置不添加激活素 A 组, 培养到 28 天时, 收集胎鼠卵巢, 并撕成碎小的组织块, 0.25% 胰酶, 0.2% 胶原酶 IV, 37°C 处理 10min, 加入终止液 (10% 的胎牛血清 +90% 的 DMEM) 后洗涤 3 次后, 用口吸管收集裸卵, 在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中反复洗涤, 直至收集的样品中不再含有颗粒细胞; 然后统计不同组的卵母细胞数目和直径大小; 发现激活素 A 从小鼠出生前 12 天开始到出生后 7 天都发挥重要作用; 为了更准确地了解激活素 I 型和 II 型受体在整个卵巢发生过程中的定位和表达模式, 分别采用定量 PCR 和蛋白印迹方法对其转录和翻译水平的表达量进行分析: 定量 PCR 结果表明: 在 12.5dpc 的胎鼠卵巢中可检测到激活素受体 IA、IB、IIA 和 IIB 的表达, 且随着卵母细胞发育, 激活素受体 IA 和 IB 在 7dpp 时表达量达到峰值, 与出生前卵巢中激活素受体 IA 和 IB 的表达量相比, 差异极显著 ($P < 0.01$); 而激活素受体 IIA 和 IIB 表达量到 0dpp 时达到峰值, 与出生前卵母细胞中的表达量相比, 差异极显著 ($P < 0.05$); 检测 7dpp 的卵巢发现激活素受体 IIA 和 IIB 表达呈现下降的趋势, 但相较其它时期仍处于较高表达水平; 卵巢发育到 14dpp 时, 激活素受体 IA、IB、IIA 和 IIB 表达水平都降到最低值, 与 0dpp 或 7dpp 时相比差异显著 ($P < 0.05$); 另外, 蛋白印迹分析结果显示, 激活素受体 IB 和 IIB 在翻译水平的表达趋势与转录水平基本一致;

[0008] 所述胎鼠卵巢组织的分离按照如下步骤操作: 胎鼠卵巢来源于 12.5dpc 的孕鼠, 孕鼠的判定以见栓为 0.5dpc, 利用机械分离法从胎鼠体内分离出卵巢, 并转移到磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.2) +10% 胎牛血清 (FCS) 的操作液中, 在操作液中洗 3 次, 并利用手术镊子去掉与卵巢连接在一起的中肾组织, 在新鲜培养液 88% α -MEM, 5% 胎牛血清 (FCS), 1% 丙酮酸钠, 1% 青链霉素, 10mIU/ml 的促卵泡素 (FSH) 中将卵巢洗 3 次;

[0009] 2) 利用细胞荧光染色和 western blot 检测减数分裂相关基因和蛋白的表达情况, 确定激活素 A 促进雌性生殖细胞第一次减数分裂的进程: 12.5dpc 胎鼠生殖嵴的体外培养按照如下步骤操作: 生殖嵴分离出来培养的当天定为 0 天, 分离出的 12.5dpc 胎鼠生殖嵴, 在 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱里培养, 培养液每两天换半液, 贴壁培养 4 天, 对照组培养液包含 88% (α -MEM), 10% 胎牛血清 (FCS), 1% 丙酮酸钠, 1% 青链霉素, 10mIU 促卵泡素 (FSH); 激活素 A 组培养液包含 88% (α -MEM), 10% 胎牛血清 (FCS), 1% 丙酮酸钠, 1% 青链霉素, 10mIU 促卵泡素 (FSH), 100ng/ml 激活素 A; 激活素 A 加抑制剂组培养液包含 88% (α -MEM), 10% 胎牛血清 (FCS), 1% 丙酮酸钠, 1% 青链霉素, 10mIU 促卵泡素 (FSH), 100ng/ml 激活素 A, 5 μM SB431542; 妊娠 10 天的母鼠通过静脉注射二甲基亚砜 (DMSO)、60ng/kg 和 100ng/kg 的激活素 A, 4 天后检测, 通过实时荧光定量 PCR、细胞荧光染色和 western blot 检测手段, 确定激活素 A 加速第一次减数分裂的进程;

[0010] 3) 利用免疫荧光组化的方法统计各组中原始卵泡的形成情况, 激活素 A 促进原始

卵泡库的建立:12.5dpc 胎鼠生殖嵴的体外培养按照如下步骤操作:分离出 12.5dpc 胎鼠生殖嵴,在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱里培养,培养液成分同步骤 2);每两天换半液,悬浮培养 4 天后转为体外立体培养 6 天,通过荧光免疫组化检测发现激活素 A 促进在体外培养条件下的原始卵泡库形成;妊娠 10 天的母鼠通过静脉注射 DMSO、60ng/kg 和 100ng/kg 的激活素 A,待出生后 3 天通过荧光免疫组化检测原始卵泡库的形成情况,结果表明,激活素 A 加速体内原始卵泡库的建立。

[0011] 4) 激活素 A 对雌性生殖细胞第一次减数分裂相关基因和蛋白的影响

[0012] 为了进一步确定激活素 A 对第一次减数分裂的影响,利用 RT-qPCR 方法检测减数分裂相关基因 Stra8、Dazl、Scp3、Rec8、Spo11 和 Dmc1 的变化,结果发现:激活素 A 处理组的 Stra8 表达量极显著升高(P<0.01),Dazl、Scp3 和 Dmc1 表达量显著升高(P<0.05)。另外,借助免疫细胞化学检测技术,利用 MVH 标记生殖细胞后检测了生殖细胞 DAZL 和 STRA8 的阳性率,发现激活素 A 显著增加了表达 DAZL 和 STRA8 的生殖细胞比例(P<0.05)。同时,Western blot 结果显示,添加激活素 A 后,DAZL、SCP3 和 STRA8 等减数分裂相关蛋白都显著升高(P<0.05)。

[0013] 综上所述,本发明方法原理可靠,操作简单,激活素 A 在卵母细胞发生的早期起重要作用,它使雌性生殖嵴中保持相对高浓度的视黄酸(RA),RA 在雌性生殖细胞中促进了 Stra8 基因的表达,进而加速了雌性生殖细胞减数分裂启动及进程,进一步促进了原始卵泡的形成。

附图说明:

[0014] 图 1 为激活素 A 在雌性生殖嵴体外培养过程中的作用时间示意图。

[0015] 图 2 为激活素 A 对雌性生殖细胞第一次减数分裂染色体联会变化的影响示意图。

[0016] 图 3 为激活素 A 对原始卵泡库形成的影响示意图。

具体实施方式:

[0017] 下面通过具体实施例和附图对本发明方法做进一步阐述。

[0018] 实施例 1、

[0019] 本发明的激活素 A 促进原始卵泡库形成的操作步骤如下:

[0020] 1) 利用体内和体外实验确定激活素 A 发挥作用的关键时期是出生前 12 天到出生后 7 天:利用机械法分离 12.5dpc 的胎鼠卵巢组织在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱里培养,培养液每两天换半液,培养液 A 包含 88% (α-MEM), 10% 胎牛血清(FCS), 1% 丙酮酸钠, 1% 青链霉素, 10mIU 促卵泡素(FSH);培养分为四个阶段,每个阶段 7 天,共 28 天;在每个阶段分别设置不添加激活素 A 组,培养到 28 天时,收集胎鼠卵巢,并撕成碎小的组织块,0.25% 胰酶,0.2% 胶原酶 IV, 37℃处理 10min,加入终止液(10% 的胎牛血清 +90% 的 DMEM) 后洗涤 3 次后,用口吸管收集裸卵,在磷酸盐缓冲液(PBS) 中反复洗涤,直至收集的样品中不再含有颗粒细胞;然后统计不同组的卵母细胞数目和直径大小;发现激活素 A 从小鼠出生前 12 天开始到出生后 7 天都发挥重要作用;

[0021] 激活素 A 受体在体内的表达变化:为了更准确地了解激活素 I 型和 II 型受体在整个卵巢发生过程中的定位和表达模式,分别采用定量 PCR 和蛋白印迹方法对其转录和翻

译水平的表达量进行分析。定量 PCR 结果表明:在 12.5dpc 的卵巢中便可以检测到激活素受体 IA、IB、IIA 和 IIB 的表达,且随着卵母细胞发育,激活素受体 IA (ActRIA) 和激活素受体 IB (ActRIB) 在 7dpp 时表达量达到峰值,与出生前卵巢中激活素受体 IA (ActRIA) 和激活素受体 IB (ActRIB) 的表达量相比,差异极显著 ($P < 0.01$);而激活素受体 IIA (ActRIIA) 和激活素受体 IIB (ActRIIB) 表达量到 0dpp 时达到峰值,与出生前卵母细胞中的表达量相比,差异极显著 ($P < 0.05$),之后检测 7dpp 的卵巢发现激活素受体 IIA (ActRIIA) 和激活素受体 IIB (ActRIIB) 表达呈现下降的趋势,但相较其它时期仍处于较高表达水平;卵巢发育到 14dpp 时,激活素受体 IA (ActRIA)、激活素受体 IB (ActRIB)、激活素受体 IIA (ActRIIA) 和激活素受体 IIB (ActRIIB) 表达水平都降到最低值,与 0dpp 或 7dpp 时相比差异显著 ($P < 0.05$);另外,蛋白印迹分析结果显示,激活素受体 IB 和激活素受体 IIB 在翻译水平的表达趋势与转录水平基本一致 (图 1A 和图 1B)。

[0022] 2) 利用细胞荧光染色和 western blot 检测减数分裂相关基因和蛋白的表达情况,确定激活素 A 促进雌性生殖细胞第一次减数分裂的进程:12.5dpc 胎鼠生殖嵴的体外培养按照如下步骤操作:生殖嵴分离出来培养的当天定为 0 天,分离出的 12.5dpc 胎鼠生殖嵴,在 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱里培养,培养液每两天换半液,贴壁培养 4 天,对照组培养液包含 88% (α -MEM),10% 胎牛血清 (FCS),1% 丙酮酸钠,1% 青链霉素,10mIU 促卵泡素 (FSH);激活素 A 组培养液包含 88% (α -MEM),10% 胎牛血清 (FCS),1% 丙酮酸钠,1% 青链霉素,10mIU 促卵泡素 (FSH),100ng/ml 激活素 A;激活素 A 加抑制剂组培养液包含 88% (α -MEM),10% 胎牛血清 (FCS),1% 丙酮酸钠,1% 青链霉素,10mIU 促卵泡素 (FSH),100ng/ml 激活素 A,5 μM SB431542;妊娠 10 天的母鼠通过静脉注射二甲基亚砜 (DMSO)、60ng/kg 和 100ng/kg 的激活素 A,4 天后检测,通过实时荧光定量 PCR、细胞荧光染色和 western blot 检测手段,确定激活素 A 加速第一次减数分裂的进程;

[0023] 图 2 表示减数分裂相关的蛋白因为激活素 A 的添加其表达量明显升高,从而整个减数分裂的进程被加速。(图 2A) 是实验过程中检测到的各个时期有代表性的卵原细胞联合会复合体图片。(图 2B) 对照组、激活素 A 组和激活素 A+ 抑制剂组的卵原细胞都可以进入减数分裂但其进程却有显著的差异,对照组处于各时期的比例分别细线期 $56.16 \pm 3.2\%$,偶线期 $56.16 \pm 3.2\%$,粗线期 $9 \pm 2.75\%$,双线期 $2 \pm 6\%$;激活素 A 组各时期的比例分别是细线期 $39.9 \pm 4.24\%$,偶线期 $40.2 \pm 2.48\%$,粗线期 $16.95 \pm 3.89\%$,双线期 $3.12 \pm 4.24\%$,终变期 $0.9 \pm 3.88\%$ 。激活素 A+ 抑制剂组各时期比例分别细线期 $53.18 \pm 8.48\%$,偶线期 $36.94 \pm 4.95\%$,粗线期 $6.85 \pm 7.78\%$,双线期 $1.523 \pm 1.414\%$,从这些数据可以看出整个减数分裂进程都被加速了。激活素 A 组进入减数分裂的阳性细胞数比对照组也显著提高 ($28.3 \pm 3.28\%$ VS $16 \pm 4.12\%$, $P < 0.05$)。

[0024] 3) 利用免疫荧光组化的方法统计各组中原始卵泡的形成情况,激活素 A 促进原始卵泡库的建立:12.5dpc 胎鼠生殖嵴的体外培养按照如下步骤操作:分离出 12.5dpc 胎鼠生殖嵴,在 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱里培养,培养液成分同步骤 2);每两天换半液,悬浮培养 4 天后转为体外立体培养 6 天,通过荧光免疫组化检测发现激活素 A 促进在体外培养条件下的原始卵泡库形成;妊娠 10 天的母鼠通过静脉注射二甲基亚砜 (DMSO)、60ng/kg 和 100ng/kg 的激活素 A,待出生后 3 天通过荧光免疫组化检测原始卵泡库的形成情况,结果表明,激活素 A 加速体内原始卵泡库的建立。

[0025] 如图 3A 所示 12.5dpc 卵巢体外培养 10 天后经固定,脱水,包埋后切片做出的荧光免疫组化图。其中绿色的是 MVH 抗体的特异着色,红色为 PI 染得细胞核。分析统计数据发现激活素 A 处理组卵母细胞处于生殖细胞簇时期的比例($27.14 \pm 4.56\%$)显著低于对照组($47.85 \pm 7.97\%$),卵母细胞处于卵泡时期的比例显著高于对照组($P < 0.05$) (图 3B)。给妊娠 10 天的母鼠体内注射激活素 A,在仔鼠出生后 3 天检测对照组卵母细胞处于生殖细胞簇时期的比例为 $48.14 \pm 3.76\%$,60ng/kg 组的比例为 $34.85 \pm 2.97\%$,100ng/kg 组的比例是 $32.66 \pm 2.64\%$,差异极显著($P < 0.01$)。(图 3C)。这说明激活素 A 可以促进活体卵巢内原始卵泡的形成。

[0026] 4) 激活素 A 对雌性生殖细胞第一次减数分裂相关基因和蛋白的影响

[0027] 为了进一步确定激活素 A 对第一次减数分裂的影响,利用 RT-qPCR 方法检测减数分裂相关基因 Stra8、Dazl、Scp3、Rec8、Spo11 和 Dmc1 的变化,结果发现:激活素 A 处理组的 Stra8 表达量极显著升高($P < 0.01$),Dazl、Scp3 和 Dmc1 表达量显著升高($P < 0.05$)。另外,借助免疫细胞化学检测技术,利用 MVH 标记生殖细胞后检测了生殖细胞 DAZL 和 STRA8 的阳性率,发现激活素 A 显著增加了表达 DAZL 和 STRA8 的生殖细胞比例($P < 0.05$)。同时,Western blot 结果显示,添加激活素 A 后,DAZL、SCP3 和 STRA8 等减数分裂相关蛋白都显著升高($P < 0.05$)。

[0028] 相关基因的定量检测:

[0029] 1、RNA 的提取:

[0030] 本实验采用 Aidlab 试剂公司的 RNA 提取试剂盒(艾德莱,北京,中国)提取 RNA,具体操作如下所述:

[0031] (1) 轻弹管底使细胞分开,加入 350 μ l 裂解液 RL (使用前请加入 β -巯基乙醇,终浓度为 1%),用一次性注射器或超声波破碎仪将组织打碎,涡旋振荡或用移液器混匀。

[0032] (2) 加入 1 倍体积(350 μ l) 70% 乙醇,用移液器立即吹打混匀。

[0033] (3) 将所有溶液及沉淀全部转移至吸附柱 CR1 上,轻柔地盖上管盖,12000rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1min,弃废液,将吸附柱 CR1 放回收集管中。

[0034] (4) 向吸附柱 CR1 中加入 350 μ l 去蛋白液 RW1,12000rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CR1 放回收集管中。

[0035] (5) 向吸附柱的中心滴加 50 μ l DnaseI,在室温反应 15 分钟。

[0036] (6) 向吸附柱 CR1 中加入 500 μ l 漂洗液 RW,室温静置 2min,12000rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1min,弃废液,将吸附柱 CR1 放回收集管中,重复步骤 6。

[0037] (7) 12000rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 2min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CR1 置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

[0038] (8) 将吸附柱 CR1 放入一个新的 RNase-free 离心管中,向膜中央加入 11 μ l RNase-free ddH₂O,轻柔地盖上管盖,室温放置 2min。12000rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1min,所得溶液即为 RNA 溶液。

[0039] (9) 测定 RNA 的浓度,准备进行反转录。

[0040] 2、RT-PCR

[0041] 反应液的配置(反应液在冰上配置):

[0042]

5×PrimeScript™Buffer	2ul
Random 6 mers (100uM) *1	0.5ul
[0043]	
PrimeScript™RT Enzyme Mix 1	0.5ul
OLigo dT Primer(50uM)*1	0.5ul
Total RNA	X ul
RNase Free ddH ₂ O	up to 10ul
Total	10ul

[0044] 3、实时定量 PCR

[0045] 本实验使用 **SYBR®** Premix Ex Taq™ II kit 和 Roche LightCycler480II 型 PCR 仪,采用 β -actin 和 mvh 作为内参基因。分别对减数分裂基因 Stra8, Dazl, Scp3, Dmc1 等基因的引物进行特异性的扩增

[0046] 反应体系:cDNA, 1 μ L; **SYBR®** Premix Ex Taq™ II (2 \times), 5 μ L; RNase-free water, 3.6 μ L; Forward primer, 0.2 μ L (20 μ M); Reverse primer, 0.2 μ L (20 μ M); 共计 10 μ L。

[0047] 反应条件:95℃, 10min; 95℃, 15sec, 60℃, 1min, 后两部循环 40 次。

[0048] 根据各个基因和内参基因的 CT 值各基因相对于内参基因的相对表达量, 计算公式为: $2^{-(\text{目的基因 CT 值} - \text{内参基因 CT 值})}$ 。计算所用数据均进行了中值标准化, 平均数和标准差来源于 3-6 个重复测量结果, 并且样品基因的相对表达量均进行了绘图。所有的试验均重复了三次, 并用平均值 \pm 标准差的形式呈现。

[0049] 4、联会复合体分析:

[0050] (1) 样品消化:以每个卵巢 20 μ L 的量向离心管中加入胰酶-EDTA, 挑取样品于离心管中, 每管 4 个卵巢。

[0051] (2) 终止消化:加入与胰酶总体积相同的含 10%FCS 的终止消化液终止消化, 并吹打均匀。

[0052] (3) 低渗处理:加入与总胰酶体积相同的 37℃预暖的 1% 柠檬酸三钠低渗溶液, 吹打均匀, 37℃静置 20min。(期间取出湿盒调至水平, 擦好片子, 保证干净)。

[0053] (4) 样品固定:向低渗后的细胞液中加入与胰酶总体积相同的 1% 的 PFA, 快速吹打, 充分混匀。

[0054] (5) 铺展:使用移液器吸出固定好的样品, 立即铺展于湿盒内已水平放置的玻片上, 让其自然铺展。关上湿盒, 保持水平静置 8 小时。

[0055] (6) 晾片:取出片子室温(气温较低时可以置于 37℃热台)水平放置晾干或风干, 镜检看是否有细胞, 晾干后在载玻片背面用记号笔圈出有细胞的区域。

[0056] (7) 去水渍:用 Photo-Flo 刷洗一下(大概 10~20 秒), 后在吸水纸上吸去余液。

[0057] (8) 封闭一抗:每张玻片滴加 100ul ADB, 加封口膜, 室温在湿盒内封闭 30min, 之后用镊子一次迅速揭去封口膜。

[0058] (9) 一抗孵育:封闭完成后, 将片子上的 ADB 倒在吸水纸上, 滴加 20ul 以上的兔抗

鼠 SCP3 一抗 (用 ADB 进行 1:200 稀释), 加盖玻片, 不能产生气泡, 并用 Rubber cement 封平周边。将片子放于湿盒中, 置于封口袋内并封口, 37℃ 恒温孵育 8 小时。

[0059] (10) 取出片子, 用镊子揭掉 Rubber cement, 要揭干净, 在 TBS 中泡掉盖玻片。

[0060] (11) 在 TBS 中洗 3 次以去除未结合的一抗, 三个染缸分别为: 10min、20min、20min。

[0061] (12) 封闭: 将 TBS 倒在吸水纸上, 每张玻片滴加 100ul ADB, 加封口膜, 于湿盒内室温封闭 30min (期间取出二抗, 并稀释好)。以后操作在暗室中进行。

[0062] (13) 二抗孵育: 封闭完成后, 用镊子一次迅速揭掉封口膜, 将片子上的 ADB 倒在吸水纸上。滴加 15ul 以上 PE 标记的山羊抗兔二抗 (用 ADB 进行 1:50 稀释), 加封口膜, 置于封口袋内并封口, 37℃ 恒温箱孵育 1.5 小时。

[0063] (14) 孵育完成后, 用 TBS 洗三次以去除未结合的二抗, 分别 10min、20min、20min。

[0064] (15) 衬染: 将 TBS 倒在吸水纸上, 加大于 15ul 的 Hoechst33342, 加封口膜, 室温孵育 2min。

[0065] (16) PBS 中洗掉封口膜。

[0066] (17) 每张玻片滴加 5~10ul 的 Vectashield, 加盖玻片盖好, 避免产生气泡, 并用 Rubbrcement 封平周边。尽快镜检或 4℃ 避光保存。

[0067] 5、Western Blot 检测:

[0068] (1) Western Blot 样品的收集 12.5dpc 培养 3 天的卵巢, 每个卵巢组织加入 20 μ l PIPA 裂解液和 0.02 μ l 的蛋白酶抑制剂, 在冰上处理 30min, 处理过程中每隔 10min, 悬浮震荡 1~2min, 裂解后, 再加入 5 μ l SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X), 沸水处理 5min, 10000~14000g 离心 3~5min, 未进行实验的样品可以置 -20℃ 保存。

[0069] (2) 胶的制备 10% 的分离胶配方 (10ml): 水, 4ml; 30% 丙烯酰胺混合液, 4.8ml; 1.5mol/L Tris, 2.25ml; 10% SDS, 120 μ l; 10% 过硫酸铵, 220 μ l; TEMED, 5 μ l。5% 的浓缩胶配方 (5ml): 水, 3.4ml; 30% 丙烯酰胺混合液, 830 μ l; 1mol/L Tris, 630 μ l; 10% SDS, 50 μ l; 10% 过硫酸铵, 50 μ l; TEMED, 5 μ l。

[0070] (3) 电泳分离胶电泳为恒压 100V, 浓缩胶电泳为恒压 120V。

[0071] (4) 根据预染 Marker 切胶, 将凝胶于转膜缓冲液中室温平衡 30min。

[0072] (5) 准备 PVDF 膜, 在甲醇中放置 10s, 使之从不透明到透明, 放入超纯水中 2min, 然后在转膜缓冲液中平衡 15min。准备 whatman 滤纸两张, 用转膜液浸泡 3min。

[0073] (6) 从负极到正极依次是滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸, 注意除去气泡, 夹紧各层, 放入电转槽中, 胶在负极, 膜在正极, 恒流 220mA, 2h。

[0074] (7) 转膜后, 将做好标记的 PVDF 膜在 TBST 中洗 3 次, 每次 5min。

[0075] (8) 将 PVDF 膜放入平皿中, 加封闭液, 4 度摇床过夜。

[0076] (9) TBST 洗膜 5 次, 每次 5min。

[0077] (10) 加入一抗: STRA8 (1:1000); DAZL (1:1000); MVH (1:1000), 4℃ 孵育 2h。

[0078] (11) 一抗收集备用, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5min。

[0079] (12) 加入二抗, 辣根过氧化物标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 和辣根过氧化物标记山羊抗兔 IgG (H+L), 各按 1:2000 稀释, 室温孵育 1h。

[0080] (13) TBST 洗膜 3 次, 每次 5min, 蒸馏水洗膜 2 次, 每次 5min。

- [0081] (14) 按照发光试剂盒说明,加入发光液曝光。
- [0082] 6、荧光免疫组织化学:
- [0083] (1) 取出已经切好的石蜡切片即白片,将白片放入 60℃烘箱烘 2h。
- [0084] (2) 经两次二甲苯每次 15min 将切片上的石蜡脱净。即将切片放入染缸中,以下的步骤中,一般的溶液体积都是 40mL。
- [0085] (3) 脱蜡后经无水酒精及各级酒精下行至水,过程是:
- [0086] 无水酒精,5min → 95%酒精,5min → 90%酒精,5min → 80%酒精,5min → 70%酒精,5min → 50%酒精,5min → PBS,10min。
- [0087] (4) 将复水的切片放入柠檬酸抗原修复液中,96℃,修复 15min。应先将抗原修复液加热至 96℃之后,再将片子放入,放入后开始计时。在加热过程中,采用不锈钢杯子装 500mL 的热修复液直接放在电磁炉上加热,温度到达 96℃后,将电磁炉火力调至中档。10min 后将不锈钢杯子从电磁炉上拿下,在室温下冷却至室温。注意:在该过程中,片子不能从不锈钢杯子中取出。
- [0088] (5) 修复液冷却至室温后,将片子取出后,放在水平湿盒内,用铅笔在组织切片的区域做好标记,之后将片子放入 TBS 中洗 5min,再转入 TBST 中洗 5min。
- [0089] (6) 加上 BDT (3%BSA 和 10%山羊血清溶于 TBS) 封闭,大约的量为每张片子 100 μ L。之后加封口膜在切片区域。室温放置 30min。做好标记误动。
- [0090] (7) 将封口膜揭掉,将片子上多余的封闭液倒在吸水纸上。加适量一抗于切片位置,一般为 20 μ L。
- [0091] (8) 用封口膜封一抗,注意不能有气泡,尤其在组织切片位置。
- [0092] (9) 将载玻片放入湿盒内,用封口袋封住,37℃孵育 1h。
- [0093] (10) 一抗孵育结束后,取出片子,将片子泡入 TBST 中。一共洗三次,每次 10min。封口膜要在 TBST 中泡掉,不能强行用镊子直接揭下。
- [0094] (11) 将片子上的 TBST 倒在吸水纸上,加上荧光标记的二抗,一般加 20 μ L 的量。
- [0095] (12) 用封口膜封住二抗后,放入湿盒内,用封口袋封住,37℃孵育 15min。
- [0096] (13) 孵育结束后,将片子取出,揭掉封口膜, TBST 洗三次,分别为 10min,20min,20min。
- [0097] (14) 将片子上多余的 TBST 倒在吸水纸上,滴加适量的 Hoechst33342,一般为 10 μ L。
- [0098] (15) 在切片位置添加封口膜,常温孵育 3min,染色时间要控制好,切片染色要明显快于细胞染色。
- [0099] (16) 将封口膜揭掉, PBS 洗 3 次,每次 5min。
- [0100] (17) 将多余的 PBS 倒在吸水纸上。
- [0101] (18) 加 Vectashield 封片,加的量视片子上组织的面积而定,一般情况下加 5 ~ 10 μ L 即可。注意不要直接滴加在组织上,应滴在组织切片边上,再用盖玻片盖住片子。(19) 做好的切片置于干盒中,套上封口袋防止切片凝水,4℃保存,镜检观察。注意不能置于湿盒中。

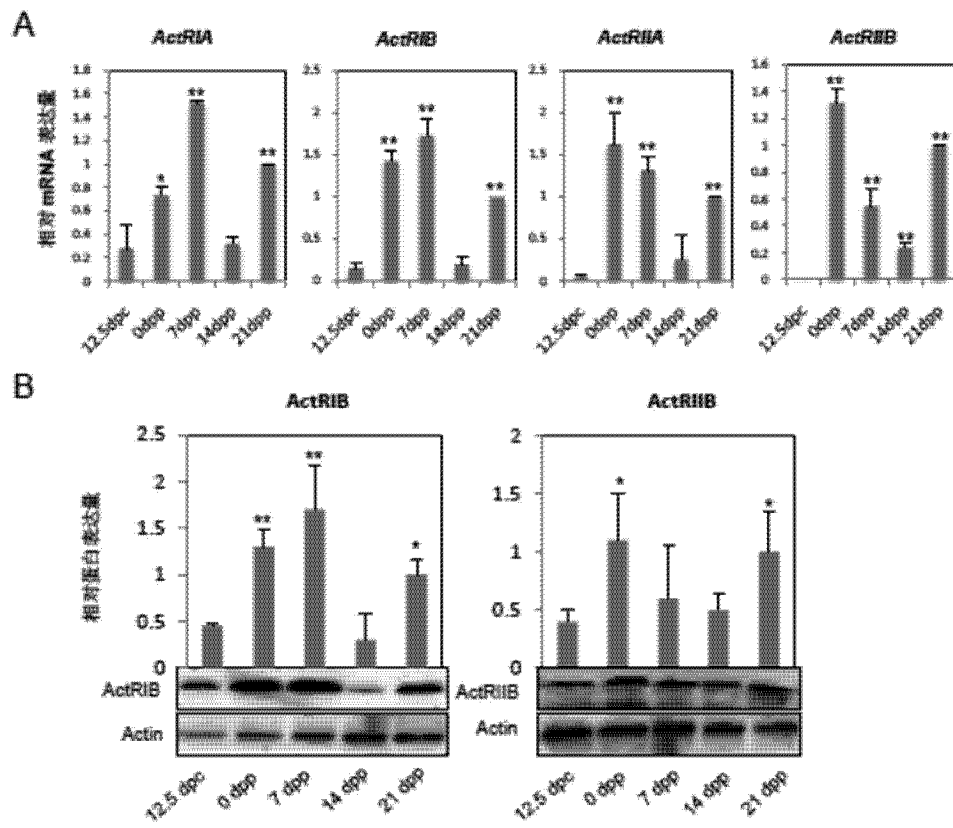


图 1

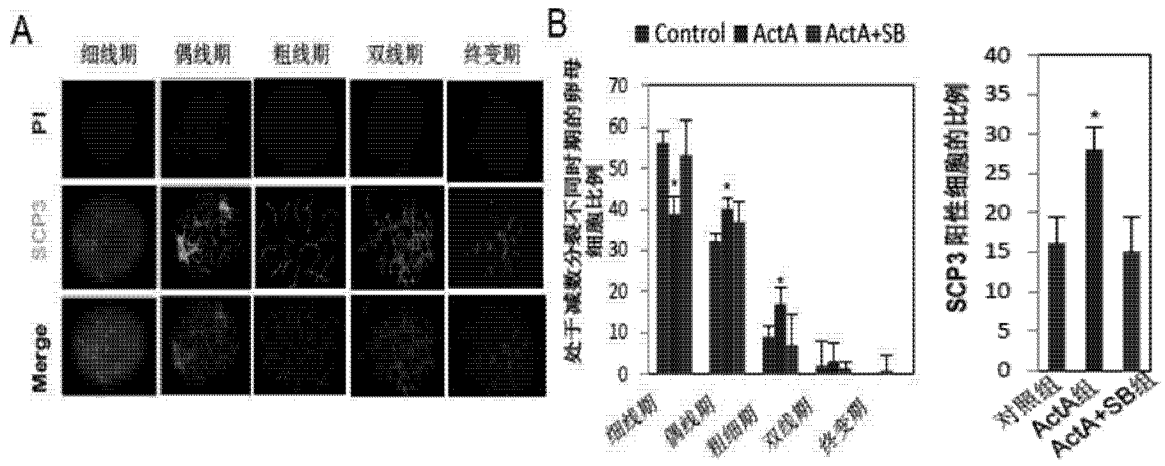


图 2

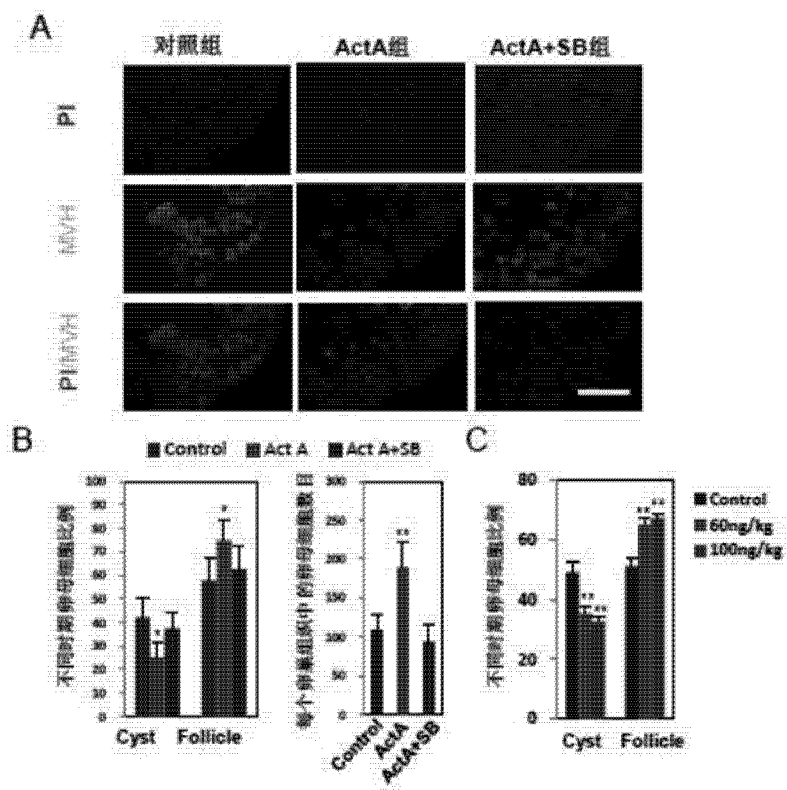


图 3

专利名称(译)	一种激活素A促进原始卵泡库形成的方法		
公开(公告)号	CN103667181A	公开(公告)日	2014-03-26
申请号	CN201310654177.9	申请日	2013-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	青岛农业大学		
申请(专利权)人(译)	青岛农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	青岛农业大学		
[标]发明人	梁桂金 刘京才 赖方秬 秦训思 程顺峰 沈伟		
发明人	梁桂金 刘京才 赖方秬 秦训思 程顺峰 沈伟		
IPC分类号	C12N5/075 C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种激活素A促进原始卵泡库形成的方法，操作步骤如下：
 1) 利用体内和体外实验确定激活素A发挥作用的关键时期是出生前12天到出生后7天；
 2) 利用细胞荧光染色和western blot检测减数分裂相关蛋白的表达情况，确定激活素A促进雌性生殖细胞第一次减数分裂的进程；
 3) 利用免疫荧光组化的方法统计各组中原始卵泡形成情况，激活素A促进原始卵泡库的建立。本发明方法原理可靠，操作简单，激活素A在卵母细胞发生早期起重要作用，它使雌性生殖嵴中保持相对高浓度的视黄酸，视黄酸在雌性生殖细胞中促进了Stra8基因的表达，加速了雌性生殖细胞减数分裂启动及进程，促进了原始卵泡的形成。

