

## 牛体细胞核移植显微操作环节的优化

雷安民<sup>1</sup>, 马晓玲<sup>1</sup>, 高志敏<sup>1</sup>, 胡勇策<sup>1</sup>, 隋进强<sup>1</sup>, 黄伟伟<sup>1</sup>, 咎林森<sup>2</sup>, 窦忠英<sup>1</sup>

1 西北农林科技大学动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

2 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

**摘要:** 本研究从牛卵母细胞去核方法(纺锤体观测仪法 & Hoechst 33342 染色法)、供体细胞核引入去核卵细胞质的方法(卵细胞质注射法和电融合法)和重构胚胎电融合(3 组参数)等 3 个环节对牛体细胞核移植的显微操作过程及相关参数进行了筛选优化。以核移植胚胎的卵裂率、囊胚发育率作为检测指标, 对不同的方法所获得的克隆胚胎的卵分裂率与囊胚发育率进行比较, 最后筛选获得 1 个优化的牛体细胞核移植操作程序, 即采用 Spindle view 系统对牛卵母细胞进行去核操作, 将供核体细胞注射到卵周隙, 然后通过电融合法将供体核引入去核卵细胞质(电融合参数为 1.9 kV/cm, 脉冲时程 10  $\mu$ s, 方波 2 次间隔 2 s)。以此核移植程序进行牛体细胞核移植实验, 自获得克隆胚胎中筛选 80 枚优质囊胚移植到 33 头受体牛子宫内, 最后 2 头母牛产下 2 头克隆牛犊, 结果表明利用该优化的显微操作环节进行牛体细胞核移植可以获得体细胞克隆牛犊。

**关键词:** 去核方法, spindle-view 系统, 电融合

## Program optimization for bovine somatic cells nuclear transfer

Anmin Lei<sup>1</sup>, Xiaoling Ma<sup>1</sup>, Zhimin Gao<sup>1</sup>, Yongce Hu<sup>1</sup>, Jinqiang Sui<sup>1</sup>, Weiwei Huang<sup>1</sup>, Linsen Zan<sup>2</sup>, and Zhongying Dou<sup>1</sup>

1 Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

2 College of Animal Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

**Abstract:** To optimize program of bovine somatic nuclear transfer, we used two different enucleation procedures (by Spindle-view system & Hoechst 33342 staining), two different procedures to introduce donor nuclei (by ooplasm microinjection & electrofusion), and three different group electrofusion parameters (group 1: 1.9 kV/cm, 10  $\mu$ s, two; group 2: 1.5 kV/cm, 25  $\mu$ s, two; group 3: 0.6 kV/cm, 100  $\mu$ s, one) to reconstruct bovine cloned embryos. The cleavage rates and blastocyst development rates of cloned embryos were used to assess the efficiency of different operational procedure. Finally, the best combination of operational procedure, that the spindle-viewer system was used for oocytes enucleating, and donor cell was electrofused into ooplasm by electrical pulse (1.9 kV/cm, 10  $\mu$ s, two) to reconstruct bovine cloned embryos. Then the excellent blastocysts were transferred to fosters for producing cloned cattle 80 high-quality cloned blastocysts were transferred into 33 fosters, two cloned calves were produced. According to the results, the optimized program could be used to produce cloned cattle.

**Keywords:** enucleation procedures, spindle-view system, electrofusion

**Received:** March 6, 2009; **Accepted:** July 11, 2009

**Supported by:** National Key Technology Research and Development Program (No. 2006BAD04A11-1120).

**Corresponding author:** Anmin Lei. Tel: +86-29-87080068; E-mail: anminleiryan@nwsuaf.edu.cn

国家科技支撑计划(No. 2006BAD04A11-1120)资助。

牛体细胞核移植的操作环节多、实验过程时间长,对于克隆结果的影响因素也很复杂,因此建立一套规范、可靠的操作程序,有助于更好地完善该技术,便于同行之间的交流,也有利于体细胞克隆技术的产业化应用。将核移植过程中涉及的环节尽可能地进程序化控制,是该技术向实用化转变的必须过程。牛的体细胞核移植基本包含3大基本环节,分别是牛卵母细胞的体外成熟(供体细胞的培养)、显微操作重构核移植胚胎及其核移植胚胎的体外培养技术(胚胎移植技术)。上述环节中,显微操作重构核移植胚胎环节的技术性操作要求高,其操作方法需要进行很好的程序化控制,因此本研究着重于对该环节进行优化筛选。

本研究分为前后衔接的几项内容,具体研究内容设计如下3个环节:

**实验内容 1:** 在卵母细胞成熟方案不变的情况下,单独改变去核方法,即分别以 Spindle-view 法和 Hoechst 33342 染色法进行去核,2种去核方法得到的去核卵母细胞均以电融合法构建核移植胚胎,电融合参数为(电融合参数为 1.5 kV/cm, 脉冲时程 25  $\mu$ s, 方波 2 次间隔 2 s),对融合后的胚胎进行培养并统计卵分裂率、囊胚率。本实验环节主要目的是比较不同去核方法对牛体细胞克隆胚胎发育率的影响。

**实验内容 2:** 在卵母细胞成熟方案和去核方法(Spindle-view 去核法)不变的情况下,部分去核卵母细胞采用电融合法引入供体核(1.5 kV/cm, 25  $\mu$ s, two),另一部分去核卵母细胞采用细胞质内直接注射引入供体核,对构建成功的胚胎进行培养并统计分裂率、囊胚率。本实验环节主要目的是比较供体细胞引入去核卵母细胞的方法对克隆胚胎发育率的影响。

**实验内容 3:** 在卵母细胞成熟方案和去核方法(Spindle-view 去核法)不变的情况下,改变电融合的参数[参数 1: (1.9 kV/cm, 10  $\mu$ s, two); 参数 2: (1.5 kV/cm, 25  $\mu$ s, two); 参数 3: (0.6 kV/cm, 100  $\mu$ s, one)],本实验环节主要目的是比较不同融合参数对克隆胚胎发育率的影响。

在上述研究基础上,筛选出优化实验方案,进行批量体细胞核移植实验,将获得体细胞核移植胚

胎移植给受体牛,最终获得体细胞核移植个体。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

本实验所用材料和试剂如无特殊说明,均购买自 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 牛卵母细胞的采集

牛卵巢采自西安市屠宰场,采后放入 37°C 含双抗的生理盐水中,6 h 内运回实验室。之后将卵巢用 35°C~37°C 的加有双抗灭菌生理盐水清洗 3 次,灭菌吸水纸揩净水珠后,用带有 12 号针头的 5 mL 注射器吸卵巢表面直径为 2~5 mm 卵泡的卵泡液。将抽吸物缓慢注入检卵杯中,静置、检卵。

将检出的牛卵丘卵母细胞复合体分为 A、B、C 3 级。A 级: 颗粒细胞层完整且紧密,一般为 4~6 层,胞质均匀; B 级: 颗粒细胞层较少,一般为 2~4 层,胞质均匀; C 级: 颗粒细胞层不全或为裸卵。只选择 A、B 级卵丘卵母细胞复合体用于成熟培养。

#### 1.2.2 牛卵母细胞的成熟培养

牛卵母细胞成熟培养条件为 5% CO<sub>2</sub>、39°C、饱和湿度(以下均同)。成熟培养前 2 h 制作微滴,上盖石蜡油后置 CO<sub>2</sub> 培养箱中平衡。培养液为 TCM199 液内添加 0.22 mg/L 丙酮酸钠、10 mmol/L HEPES、0.10 IU 人尿促性素(HMG) 1 mg/mL 17 $\beta$ -E2、10 g/L BSA; 同时添加转铁蛋白-胰岛素-亚硒酸钠(ITS)、EGF 以及尿嘧啶。按实验需求在体外成熟培养 22 h 时开始剥离卵母细胞外围的颗粒细胞层,具体方法是用口吸管将卵丘卵母细胞复合体移入无钙镁的 PBS 缓冲液,连续换液清洗 3 次,再移入含 0.25% 透明质酸酶的培养液内,39°C 停留 5~10 min。之后用口吸管反复吹打卵母细胞,去除卵母细胞的颗粒层,在含 10% 新生牛血清(NBS)的 PBS 缓冲液里清洗 3~4 次以完全除去颗粒细胞。对得到的裸卵母细胞进行镜检,可见第一极体的卵母细胞用于构建核移植重组胚胎。

#### 1.2.3 牛成熟卵母细胞的去核

**Spindle-view 去核法:** 成熟卵母细胞放入含 10  $\mu$ g/mL CB (细胞松弛素 B)的培养液里培养 15 min

后, 在 Spindle-view 系统下眼观进行去核操作。卵母细胞的筛选以可以在 Spindle-view 系统下清晰看见纺锤体为准, 观察不到纺锤体者弃去不用。去核操作后, 培养箱内孵育 30 min, 形态结构完整的用于构建克隆胚胎<sup>[1]</sup>。图 1 显示的就是利用 Spindle-view 去核法进行去核的过程。

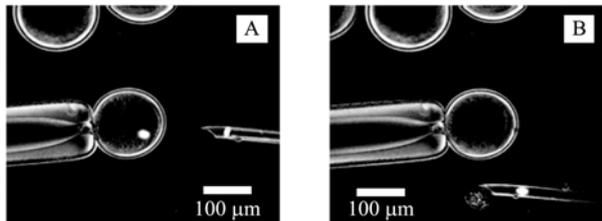


图 1 采用 Spindle-view 系统对牛卵母细胞进行去核操作的过程

Fig. 1 Enucleating process of bovine oocytes under the Spindle-view system. (A) Spindle imaging of bovine oocytes under the Spindle-view system. (B) Bovine oocytes spindle was taken out.

Hoechst 33342 染色去核法: 成熟卵母细胞放入含 10 μg/mL CB 的培养液(同时含 10 μg/mL 的 Hoechst-33342)中培养 15 min, 在荧光显微镜视野下进行去核操作, 染色体结构紧凑, 清晰可见者去核后用于下一步构建重组胚胎, 对于核染色不明显者弃去不用。

#### 1.2.4 牛供体细胞的准备

对牛耳尖部预取样部位剃毛, 并进行严格的外科消毒, 然后用灭菌的不锈钢耳号钳剪取耳缘部约 0.5 cm<sup>2</sup> 面积大小的皮肤组织块, 将皮肤组织块移入含 40 μg/mL 庆大霉素的 PBS 缓冲液中。组织块带回实验室后, 在超净工作台内将其分割为 2 mm<sup>2</sup> 左右的小组织块进行培养。原代培养液为含 50% 血清的 TCM-199 培养液(含 40 μg/mL 庆大霉素)。首次溶液添加量以溶液刚好淹没皮肤组织块为佳。3~5 d 后, 观察组织块贴壁和细胞的增殖情况, 将未贴壁的组织块弃去; 对于细胞生长已经超出组织块边缘者, 换液继续培养, 第 2 次的培养液为含 20% 血清的 TCM-199 培养液(不含庆大霉素)。待原代细胞长至 80%~90% 连接成片时, 用 0.25% 胰酶消化, 并用含 10% FBS 的 TCM-199 培养液进行传代培养, 每 2 d 换液 1 次。一般 3~5 d 传代 1 次, 传代时细胞密度调至 1×10<sup>5</sup>~2×10<sup>5</sup>/mL 即可。传代

至 3~5 代后, 大量的冻存细胞、冻存剩余部分继续传代并作为供核细胞与牛去核卵母细胞构建核移植胚胎。供核细胞传至 10 代后丢弃, 然后解冻先期冻存细胞使用。

#### 1.2.5 牛去核卵母细胞与供体细胞构建核移植胚胎

卵细胞质内直接注射法: 将供核细胞吸入到注射核管管口, 利用 Piezo 给一个振动, 这样供核细胞的细胞膜破裂, 然后将供核细胞从管口吐出, 吸取细胞核及周围的部分细胞质(统称为核胞体), 然后将核胞体直接注射到去核的卵细胞质内(图 2 显示了供核体细胞核质体直接注射到去核卵细胞质的过程)。注射完成后的重组胚胎在培养箱内继续培养, 待成熟 26~28 h 采用化学方法激活重构胚。

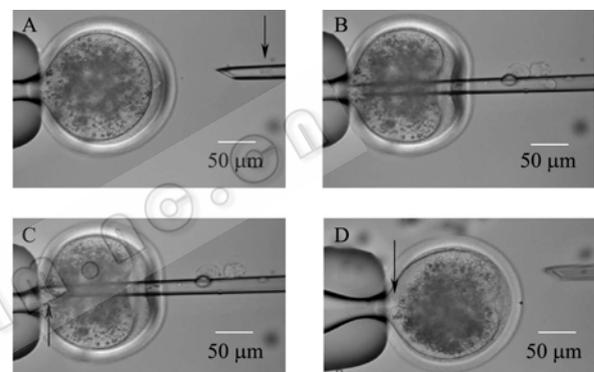


图 2 利用 ICSI 法将供体细胞核质体直接注射到牛去核卵细胞质

Fig. 2 Donor nucleoid was microinjected directly into the bovine ooplasm. Images A, B, C, D show the donor nuclei microinject process, the black arrows was the donor nuclei location.

电融合法: 将供核体细胞注射到卵周隙内, 然后采用电脉冲将供核细胞引入卵母细胞质内。在第 1、第 2 实验组过程中, 选用的电融合参数为: 场强 1.5 kV/cm, 脉冲时程 20 μs, 每次给予 2 个脉冲, 间隔 2 s; 在主脉冲发动前后各给予 10 s 的强度为 100 V/cm 的交流电场。融合仪为美国 Cyto-pause 4000, 融合采用该仪器配套的专用融合液(Cytofusion Medium-Formula C)。在筛选融合参数时, 各组参数设定为: 组 1, 1.5 kV/cm, 脉冲时程 20 μs, 方波 2 次(间隔 2 s); 组 2, 1.9 kV/cm, 脉冲时程 10 μs, 方波 2 次, 间隔 2 s; 组 3, 0.6 kV/cm, 脉冲时程 100 μs, 方波 1 次。融合后的克隆胚移入 M199

中洗3次, CO<sub>2</sub>培养箱中培养30 min, 待成熟26~28 h用化学方法激活重构胚。

### 1.2.6 克隆重组胚胎的激活

无论是细胞质内注射法还是电融合法构建的核移植胚胎, 最后完整的重组胚胎均采用化学激活法进行激活处理。具体方法为: 重构胚在含5 μmol/L ionomycin的培养液中作用5 min, 然后移入含10 μg/mL 6-甲氨基嘌呤(6-DMAP)+5 μg/mL 细胞松弛素B(CB)的培养液中培养4 h。培养后形态完整的克隆胚进行体外培养。

### 1.2.7 核移植胚胎的体外培养

将完成化学激活的重组克隆胚胎移入G1培养液中进行体外培养。48 h后, 检查卵裂情况, 将形态良好的分裂卵移入G2培养液中, 继续培养至第7天, 检查囊胚期胚胎数目。

### 1.2.8 核移植胚胎向受体牛的移植

采用Spindle view系统对牛卵母细胞进行去核操作, 将供核体细胞注射到卵周隙后通过电融合法将供体核引入去核卵细胞质(电融合参数为1.9 kV/cm, 脉冲时程10 μs, 方波2次间隔2 s)。利用这种优化操

作构建克隆胚胎, 在重组克隆胚胎的第7天选择优质囊胚, 经非手术法移植到受体牛子宫角内。受体牛为自然发情的、健康的奶牛或者秦川黄牛。

### 1.2.9 克隆牛犊的微卫星分析

本研究借鉴国内外克隆牛个体微卫星分析研究结果, 筛选BM1824、ETH225、BMS 875、BM203、BMS1290、BMS 574、BMS1004、FCB 11、BM 2113和TGLA227等10对引物, 对最后出生的克隆犊牛进行了微卫星分析(表1)。

### 1.2.10 实验数据的统计分析

本实验中对于实验数据采用卡方( $\chi^2$ )检验, 以0.01<P<0.05为差异显著, 以P<0.01为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 去核方法对克隆效率的影响

在其他实验条件不变的情况下, 本实验首先对去核方法进行了比较, 利用Spindle-view去核法和Hoechst 33342染色去核法获得克隆胚胎发育情况见表2。

表1 克隆牛鉴定所用微卫星名称、序列及其在染色体的定位

Table 1 Microsatellites were chosen to analyze the clone calf

Locus	Chromosome	Primers(5'-3')	Annealing temperature (°C)
BM 1824	1	Forward: GCAAGGTGTTTTCCAATC Reverse: CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG	62
ETH 225	9	Forward: GATCACCTTGCCACTATTTCCCT Reverse: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	60
BMS 875	22	Forward: TCCAGCTTGAATCCCTTCC Reverse: AAGCAAAGGCTGGGAACAC	60
BM 203	27	Forward: GGGTGTGACATTTTGTTCCTC Reverse: CTGCTCGCCACTAGTCCTTC	60
BMS1290	9	Forward: TTGGCACTTACTACCTCATATGTT Reverse: TTTTCTGGATGTTGAGCCTATT	59
BMS 574	1	Forward: ATGTTCTTTGACCACATGGATT Reverse: GAACAAGCATTCTGACCATAGC	59
BMS1004	15	Forward: TTAAAAGTCAGAAAGGGAAGCC Reverse: CTCGACCTCACATACTCAAAGC	59
FCB 11	2	Forward: GCAAGCAGGTTCTTTACCACTAGCACC Reverse: GGCCTGAACTCACAAGTTGATATATCTATCAC	60
BM 2113	2	Forward: GCTGCCTTCTACCAAATACCC Reverse: CTTCTGAGAGAAGCAACACC	60
TGLA227	18	Forward: CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT Reverse: ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA	60

表 2 卵母细胞去核方法对于重组胚胎发育的影响

Table 2 Effect of enucleate methods on the development of reconstructed embryos

Nucleate methods	Numbers of oocytes	Numbers of survival embryos	Numbers of cleavage	Numbers of blastocyst
Enucleate by Spindle-view	560	348(62.1%) <sup>a</sup>	270(77.6%) <sup>a</sup>	93(34.4%) <sup>a</sup>
Enucleate by Hoechst33342	395	159(44.3%) <sup>c</sup>	119(74.8%) <sup>a</sup>	33(27.7%) <sup>a</sup>

Note: the same letters in the same vertical column means no significant difference between the treatments ( $P>0.05$ ). Letter "a" and "c" of the same vertical column means significant difference between the treatments ( $P<0.01$ ).

实验数据统计结果表明, 对于克隆胚胎的构建效率(操作后的存活完整胚数)而言, Spindle-view 去核法极显著优于 Hoechst33342 染色去核法。但 2 种去核方法对于克隆胚胎的分裂率及囊胚发育率没有显著影响。总体而言, 在存活胚胎内, 2 种去核方法获得克隆胚胎的分裂率与发育率没有显著性差异, 但是由于 Hoechst33342 染色去核法已显著地降低了重构胚胎的融合率, 因此从整体上影响了核移植的效率。在后面的实验中, 均采用 Spindle-view 去核法对卵母细胞进行去核操作。

## 2.2 供体核引入卵母细胞方法对克隆胚胎发育的影响

实验的第 2 部分探讨了供体和引入受体卵母细胞的方法对于克隆胚胎发育的影响。实验中分别采用了供核质体向卵细胞质内直接注射法和电融合法。一般情况下, 在小鼠的体细胞核移植研究中, 多采用供核质体向卵细胞质内直接注射法, 在牛的体细胞核移植中一般采用电融合法。为摸索本研究室条件下较为适宜的供体核引入方法, 本实验对 2 种

方法进行了对比, 实验结果参见表 3。对实验数据的统计分析显示, 不同供体细胞核引入方法对克隆效率没有明显的影响。

## 2.3 电融合法中融合参数的优化筛选

在确认选用电融合法进行体细胞核移植研究后, 进一步对融合参数进行了筛选。根据实验室的研究并借鉴文献报道, 选用了 3 组融合参数, 对其融合效果进行了比对, 实验结果参见表 4。

从数据的统计分析可以看出, 电融合参数的变化对于重构胚胎融合率的影响非常显著, 高低组参数间的融合效率相差一倍有余(70.05% Vs 33.07%), 结果显示细胞融合对于电压变化的敏感性。表 4 实验数据说明, 在核移植重构胚胎可承受的范围内, 采用高电压、短时程的电融合参数更有利于重构胚胎的电融合与其后克隆胚胎的发育。这一结果也提示对于融合参数的筛选还需要细化, 以获得更好的融合效果。

## 2.4 利用优化的克隆程序进行克隆牛的生产

最终依照筛选优化的克隆程序, 即采用 Spindle-

表 3 供体核细胞引入卵母细胞方法对克隆胚胎发育的影响

Table 3 Effects of different injection methods for donor cells on the development of reconstructed embryos

Microinjection methods	Numbers of oocytes	Numbers of survival embryos	Numbers of blastocyst
Perivitelline space/fused	250	93/209 (44.5%) <sup>a</sup>	18/93 (19.4%) <sup>a</sup>
Microinject into ooplasm	140	61/112 (54.5%) <sup>a</sup>	10/61 (16.4%) <sup>a</sup>

Note: the same letters in the same vertical column means no significant difference between the methods ( $P>0.05$ ).

表 4 不同电融和参数对牛重构胚融合及发育的影响

Table 4 Effect of electric fusion conditions on the fusion and development of NT embryos

Parameter for fusion	Numbers of NT oocytes	Numbers of fused embryos	Numbers of cleavage	Numbers of blastocyst
1.9 kV/cm, 10 $\mu$ s, two	197	138(70.05%) <sup>a</sup>	125(91.92%) <sup>a</sup>	47(37.6%) <sup>a</sup>
1.5 kV/cm, 25 $\mu$ s, two	153	91(59.48%) <sup>b</sup>	84(93.33%) <sup>a</sup>	17(20.24%) <sup>cb</sup>
600 V/cm, 100 $\mu$ s, one	127	42(33.07%) <sup>c</sup>	37(90.24%) <sup>a</sup>	7(18.92%) <sup>bc</sup>

Note: the same letters in the same vertical column means no significant difference between the methods( $P>0.05$ ); between letter "a" and "c" or "b" and "c" of the same vertical column means significant difference( $P<0.01$ ); between letter "a" and "b" means difference( $0.01<P<0.05$ ); between letter "a" and "bc" means difference ( $P<0.05$ ); between letter "a" and "cb" means significant difference( $P<0.01$ ); no significant difference between Letter "bc" and "cb".

view 系统对牛卵母细胞进行去核操作, 将供核体细胞注射到卵周隙, 然后通过电融合法将供体核引入去核卵细胞质(电融合参数为 1.9 kV/cm, 脉冲时程 10  $\mu$ s, 方波 2 次间隔 2 s)。利用这种优化操作构建克隆胚胎, 在重组克隆胚胎的第 7 天选择优质囊胚。将筛选的 80 枚优质囊胚移植到 33 头受体牛(其中奶牛 19 头, 黄牛 14 头, 均为自然发情牛)的子宫内。最终黄牛、奶牛各有 1 头受体完成妊娠产下克隆牛犊, 但 2 头克隆牛产后均以呼吸衰竭死亡。

从 28 对微卫星序列中筛选出 10 对引物序列, 利用这 10 对引物对 2 头克隆牛进行了微卫星分析, 克隆牛与供体细胞的微卫星条带(图 3)比对显示, 克隆牛与供核体细胞同源。

### 3 讨论

在哺乳动物体细胞核移植的研究中, 对于培养液(卵母细胞成熟培养液、克隆胚胎的体外培养液)体系的研究结果相对较为一致, 研究结果的参考性较高。对于具体的核移植技术操作环节, 文献报道得不多, 论述得不太详细, 另外报道结果也不一致。其主要原因在于显微操作受到操作人员个人技术水平、个人操作嗜好的影响, 此外不同实验室的仪器

条件等因素也影响显微操作的结果。本实验对牛核移植显微操作环节进行了优化, 并利用该优化的操作程序, 成功获得了体细胞核移植牛犊, 说明该优化程序对核移植技术的程序化应用及对该技术进一步完善都有一定参考意义。

#### 3.1 关于去核方法的改进对于核移植效率的影响

卵母细胞去核操作一直以来都是影响核移植效率的关键环节之一, 目前普遍认为去核完全与减少去核操作时间是这一环节的关键所在。为保证完全去除卵母细胞的核物质, 现在常用的办法是通过 Hoechst33342 染色, 然后在荧光显微镜下进行去核操作<sup>[2]</sup>; 还有一种办法就是利用 Spindle-view 观察确认卵母细胞纺锤体的位置(图 1), 然后进行去核操作<sup>[3]</sup>。2 种方法原理不同, Hoechst33342 染色法去核过程中, 需要紫外光对 Hoechst33342 染料进行激发以指示卵核物质的所在位置, 卵母细胞在紫外光下的暴露可能会对卵母细胞造成一定损伤, 影响其构建的克隆胚胎的发育。而 Spindle-view 这种仪器是通过纺锤体致密结构对于偏振光的折射现象来确认卵核物质位置所在, 因此在理论上这种偏振光不会像紫外光一样对卵母细胞造成较大伤害, 因此利用该系统得到的去核卵细胞质更有利于所构建核移植

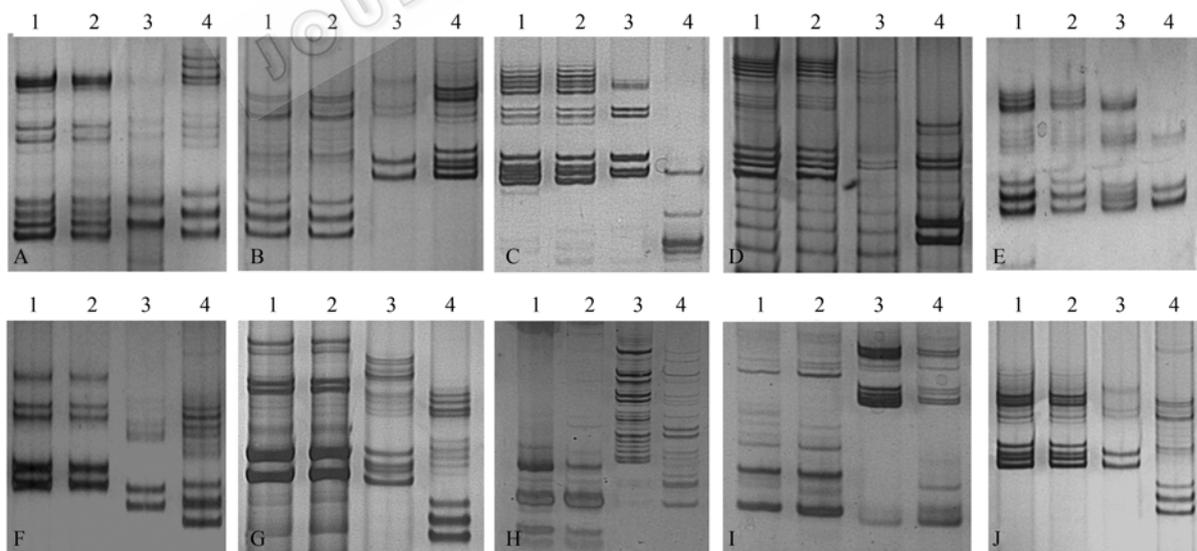


图 3 克隆牛与供体细胞以及代孕母牛的微卫星条带比对

Fig. 3 Silver stained demonstrating the genetic origin of the cloned calf using microsatellite DNA markers BM1824, ETH225, BMS 875, BM203, BMS1290, BMS 574, BMS1004, FCB 11, BM 2113, and TGLA227, respectively. 1: clone calf; 2: donor cow; 3: recipient cow; 4: control cow.

胚胎的发育<sup>[4-5]</sup>。本研究的结果也显示 2 种去核方法对于克隆胚胎的融合效率的确有极显著的差异。尽管数据分析结果显示 2 种方法对于克隆胚胎的分裂率及囊胚发育率之间没有显著性影响,但是由于在融合环节的差异导致了整体核移植效率的下降。造成 2 种方法有差异的原因可能在于 Hoechst33342 除了结合卵母细胞核物质外,还可以与线粒体内遗传物质结合,这样紫外光下的照射就会对于线粒体产生一定的损伤。线粒体的损伤可能影响了重构胚胎融合过程中对于膜系统的能量供给,降低了融合效率。而采用 Spindle-view 去核法,则没有这种负面的影响。此外,利用 Spindle-view 去核法还可以达到对卵细胞质量进行筛选的作用<sup>[6-7]</sup>。

因此笔者认为在有条件的情况采用 Spindle-view 去核,与 Hoechst33342 染色法相比可以得到较高的克隆效率。如果没有条件使用 Spindle-view 进行去核,那么尽量减少卵母细胞在紫外光下的照射时间也是一个可行的方案。

### 3.2 关于供体核不同引入方法对于克隆胚胎发育的影响

本研究比较了供体核直接注射法引入卵细胞质内和通过卵周隙注射后经电融合介导法引入卵细胞质内 2 种方法在构建核移植胚胎效率上的差异,结果表明,两者之间没有显著性差异。在实际操作过程中,细胞质内直接注射法需要提前对供体细胞进行破膜处理<sup>[8-9]</sup>,以得到注射所用的核质体。制备过程需要利用注射管反复吸吐核质体,核质体非常粘,往往容易粘附在注射针管口,使操作速度大大减慢,此外该方法需要显微操作技术人员具有非常熟练的操作技术(图 2)。在克隆实验操作中,为提高操作速度,采用此法时往往需要 2 个以上的显微操作人员进行配合衔接;而通过卵周隙注射后的电融合介导法尽管还需要多出电融合这一步操作,但是该法操作速度快,顺利的时候可以达到每分钟完成 8~10 个供体细胞的注射动作,并且 1 个显微操作人员就可以很快地完成实验过程。为了节约卵细胞质直接注射法中对供核体细胞处理所需时间,直接将没有经过破膜处理的完整供体细胞直接注射到受体卵细胞质内,结果获得了体细胞核移植猪<sup>[10]</sup>。本实验曾经利用该法尝试性地进行了几批实验,发现完整的细

胞注射后,克隆胚胎的分裂率与发育率不好(数据未显示),因此没有对该法进一步研究。通过对文献的追踪检索,尚未见到利用牛完整细胞的注射法进行体细胞核移植的研究报道。

尽管本研究条件下的对照实验显示 2 种核移植方法没有显著性差异,但在核移植操作过程中,为节约操作时间和在短时间内构建更多的核移植胚胎,本研究采用了卵周隙注射法将供体细胞核引入去核卵母细胞内。因此进一步对电融合参数进行了选择优化,以提高这一方法的效率。

### 3.3 融合参数对于核移植胚胎发育的影响

采用卵周隙注射法将供体细胞核引入去核卵母细胞内,融合效率的高低就成为制约克隆效率的关键。前人的实验研究表明,采用低电压、长时程的脉冲方波,与采用高电压、短时程的脉冲方波可以达到相近的电融合效果<sup>[11]</sup>。现有的实验数据也表明,核移植重构体可以承受的最大电场强度在 2.2~2.5 kV/cm 之间<sup>[12]</sup>,因此设定最高电融合参数是 1.9 kV/cm,脉冲时程定为 10  $\mu$ s(微秒),连续给 2 次方波,将最低的电融合参数设定为 0.6 kV/cm,脉冲时程定为 100  $\mu$ s,这种方波只激发 1 次。

电融合的原理就是利用高压电场在卵细胞膜和供核细胞膜上同时击出一些微孔,这样紧贴在一起的卵细胞膜和供核细胞膜就通过这些微孔发生融合,最终将供核引入去核卵细胞质内<sup>[12-13]</sup>。本研究的实验数据显示,高电压、短时程的电融合参数更有利于重构胚胎的电融合与其后克隆胚胎的发育。前人的研究表明,融合效率并非一直随着电场强度增高而上升,由于核移植重构体对于电场强度有一个最高的耐受值,所报道的这种最大电场强度在 2.2~2.5 kV/cm 之间,在这一范围内,核移植重构体被高压电场击破的比例大大上升。

影响融合的另外一个因素就是融合液的选择。在进行体细胞核移植研究的早期阶段,都是自己配制电融合液,融合效果不是很好,融合结果也不稳定。在购置 Cyto-pause 4000 融合仪后,采用其配套专用的融合液(Cytofus medium-Formula C),利用上述优化融合参数后,融合效率一直相对稳定,克隆胚胎的发育也很稳定,这也是能够获得体细胞核移植牛犊的重要原因之一。

此外需要指出的是, 上述 3 个不同影响因素的筛选实验, 均为独立完成的, 同一研究内容数据都是同步实验获得。不同研究内容之间的数据可比性不高, 例如在第 1 阶段对去核方法的优化实验时, 克隆胚胎的卵裂率均在 70%附近, 但在第 3 阶段对融合参数进行优化筛选时, 克隆胚胎的卵裂率稳定在 90%附近。分析追踪本研究的实验记录, 这种差异主要由季节变化引起, 同时可能和操作者的更替变化有关。但是因为同一研究内容的筛选结果均为同步实验获得, 因此对于实验方法的优化选择仍有指导意义。

#### 3.4 移植受体选择及其克隆牛犊的微卫星检测及克隆牛出生异常与产后死亡

本研究中分别选用自然发情的奶牛和秦川黄牛作为克隆胚胎移植受体, 结果奶牛和秦川黄牛各有 1 头受体完成妊娠, 均顺产得到克隆牛犊。奶牛受体产出的胎儿体重过大, 为 69.4 kg; 黄牛受体所产胎儿体重为 42 kg, 基本在正常范围内。第 1 例克隆牛犊为奶牛受体所产, 产期正常, 胎儿出生时出现难产, 经过人工助产娩出; 出生后胎儿仅出现有限的几次呼吸动作后就以呼吸衰竭死亡。胎儿除了体重过大外, 还存在后肢挛缩, 解剖后发现膝关节异位、心肌肥厚并有出血点等异常现象。第 2 例克隆牛受体为黄牛, 在其妊娠 5 月后, 限制了受体牛的采食量, 加强了运动护理。克隆牛犊出生时间比正常时间略有提前(1 周左右), 出生后天气寒冷, 生产单位对于克隆牛的护理不是很好, 克隆牛出生 0.5 h 后死亡。对其解剖后, 没有发现明显的组织器官发育异常。

对于第一头克隆牛的体重过大, 文献报道较多, 认为是体细胞克隆动物综合征的一个表现, 主要是由于胎盘发育异常导致; 在第 2 例克隆牛妊娠过程中, 特意限制了受体牛的采食量, 加强了运动护理。这种处理的初衷是避免妊娠后期胎儿的过度生长, 最后的结果表明第 2 头克隆牛与第 1 头相比, 体重过大和发育畸形现象消失。这种结果提示, 对于妊娠受体进行科学的饲养管理有助于减少克隆牛的发育异常。

自从“Dolly”降生后, 利用微卫星分析法对克隆动物个体的核遗传物质进行检测, 以确认其来源已经成为克隆动物检测的必需过程<sup>[14]</sup>。根据国内外

对于牛微卫星检测引物的报道<sup>[15-17]</sup>, 从 28 对引物中筛选出 10 对用于克隆个体的检测验证。该结果提示在不同的国家地区间, 适用于检测个体差异的微卫星分析引物可能存在不同, 因此对于前人的报道进行验证与选择是完成检测所必需的一个过程。此外, 通过对比 2 头克隆牛与供核牛外貌体征, 发现克隆个体被皮黑白斑块与供体牛大体一致, 但是并不完全吻合; 2 个克隆个体间也有一些细微差异。因此本研究认为克隆动物的被皮斑块受到表遗传变化的影响。

## REFERENCES

- [1] Lei AM, Lin SQ, Dou ZY. Application of Spindle-view in the observation of meiotic spindles of oocytes. *J Agri Biotechnol*, 2005, **13**(3): 335-340.  
雷安民, 林少青, 龚忠英. 应用 Spindle-view 观察哺乳动物成熟卵的纺锤体. *农业生物技术学报*, 2005, **13**(3): 335-340.
- [2] Tsunoda Y, Shioda Y, Onodera M, *et al.* Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. *J Reprod Fertil*, 1988, **82**(1): 173-178.
- [3] Dominko T, Chan A, Simerly C, *et al.* Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biol Reprod*, 2000, **62**(1): 150-154.
- [4] Liu L, Oldenbourg R, Trimarchi JR, *et al.* A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. *Nature Biotechnol*, 2000, **18**: 223-225.
- [5] Lin L, James R, Trimarchi R, *et al.* Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living oocytes. *Biol Reprod*, 2000, **63**: 251-258.
- [6] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, *et al.* The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril*, 2001, **75**(2): 348-353.
- [7] Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, *et al.* Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod*, 2004, **19**(3): 655-659.
- [8] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**: 369-374.
- [9] Satoshi K, Sayaka W, Nguyen V, *et al.* Production of

- cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat Protoc*, 2006, **1**(1): 125-138.
- [10] Jang-WL, Shin C, Wu X, *et al*. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol Reprod*, 2003, **69**: 995-1001.
- [11] Van Stekelenburg-Hamers AE, Van Inzen WG, Van Achterberg TA, *et al*. Nuclear transfer and electrofusion in bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos: effect of media and electrical fusion parameters. *Mol Reprod Dev*, 1993, **36**: 307-312.
- [12] Zhu J, Telfer EE, Fletcher J, *et al*. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biol Reprod*, 2002, **66**: 635-641.
- [13] Zhang LS, Bi CM, Li JS, *et al*. Effect of electrofusion parameters on the development of preimplanted embryo during cattle cloning. *Prog Natural Sci*, 2005, **14**(5): 581-584.  
张利生, 毕春明, 李劲松, 等. 克隆牛过程中电融合条件对附植前胚胎发育的影响. *自然科学进展*, 2005, **14**(5): 581-584.
- [14] Ashworth D, Bishop M, Campbell K, *et al*. DNA microsatellite analysis of Dolly. *Nature*, 1998, **394**: 329.
- [15] MacHugh DE, Shriver MD, Loftus RT, *et al*. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of Taurine and Zebu Cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*, 1997, **146**: 1071-1086.
- [16] Gong GC, Dai YP, Fan BL, *et al*. Produce transgenic cattle by somatic cells nuclear transfer. *Chin Sci Bull*, 2003, **24**: 2528-2533.  
龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 利用体细胞核移植技术生产转基因牛. *科学通报*, 2003, **24**: 2528-2533.
- [17] Zheng XF, Huang YH, Lin FJ, *et al*. DNA test for a cloned cattle. *For Sci Technol*, 2003, **1**: 26-28.  
郑秀芬, 黄银花, 凌凤俊, 等. 克隆牛的 DNA 鉴定. *刑事技术*, 2003, **1**: 26-28.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 现代医学分子生物学双语精编

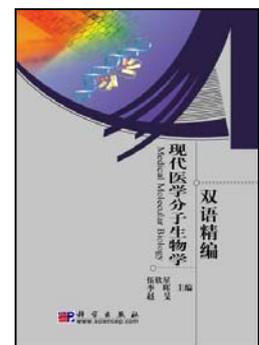
伍欣星 李晖 赵旻 主编

978-7-0-025153-4 ¥55.00 2009年8月 出版

#### 内容简介

本书的编写具有鲜明特色, 采用了中、英文双语形式, 共精编了 11 章内容, 分别用中、5 英文阐述了当前医学分子生物学的基础知识和前沿进展, 包括基因组、转录组、蛋白质组学的基本概念, RNA 及非编码 RNA、基因表达的调控、细胞周期与细胞凋亡、细胞信号转导、肿瘤分子生物学及生物信息学等基本原理和应用。

本书是为帮助我国医学院校高年级学生(七年制、八年制)和硕士、博士研究生学习医学分子生物学的基础知识, 熟练运用专业英语查阅国外文献, 从事科学研究而专门编写的教材, 旨在帮助那些具备一定英语基础并初步掌握医学分子生物学知识的人士提高生物医学专业水平及专业英语水平。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目