

分类号:
密 级:

单位代码: 10019
学 号: B02282

中国农业大学

博士学位论文

利用体细胞核移植技术生产猪克隆胚胎的研究

Protocol optimization for production of porcine cloned
embryos by somatic cell nuclear transfer

研 究 生: 张 运 海

指 导 教 师: 李 宁 教 授

申请学位门类级别: 理学 博士

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

研 究 方 向: 动物分子遗传学

所 在 学 院: 生 物 学 院

二零零五年六月

博士学位论文

利用体细胞核移植技术生产猪克隆胚胎的研究

张运海

指 导 老 师	李宁教授
申请学位类别	理学博士
论文提交日期	2005 年 6 月
论文答辩日期	2005 年 6 月
学位授予单位	中国农业大学

本研究由
国家重点基础研究发展规划—“973”项目资助
(项目编号: G20000161)

北京市自然科学基金重大项目资助
(项目编号: 5030001)

Funded by Major State Basic Research Development
Program of China (G20000161)

and

Natural Scientific Foundation of Beijing
(5030001)

PROTOCOL OPTIMIZATION FOR PRODUCTION OF
PORCINE CLONED EMBRYOS BY SOMATIC CELL
NUCLEAR TRANSFER

by

Yun-Hai ZHANG

Supervised by Professor Ning LI

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of

Doctor of philosophy
(Biochemistry and molecular biology)

at the
China Agricultural University

June 2005

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：张运海

时间：2005 年 6 月 23 日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解中国农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：张运海

时间：2005 年 6 月 23 日

导师签名：李宇

时间：2005 年 6 月 23 日

摘 要

猪是人异种器官移植理想的器官来源。体细胞核移植为人们生产不引起免疫排斥以及无内源性病毒的猪提供了可能。本研究系统地研究了猪体细胞克隆相关技术环节,旨在搭建一个能有效生产猪克隆胚的平台。主要内容如下:

利用组织块培养法建立了中国实验用小型猪 9 个 40d 胎儿成纤维细胞系和 1 个成体成纤维细胞系。利用血清饥饿以及接触抑制对细胞进行细胞周期同期化处理,发现细胞同期到 G0/G1 期的效率相同,而且在处理 2d 之后,G0/G1 期细胞比例不再有显著增加。结果表明胎儿成纤维细胞对血清饥饿以及接触抑制的反应相当,同期处理 2d 即可为核移植提供足够的供体细胞。

比较了不同培养基,氧分压以及添加胰岛素和 LIF 对猪卵母细胞体外成熟,成熟后孤雌激活发育的影响,首次尝试将一种新的胚胎培养基 PZM-3 用于猪卵母细胞体外成熟,还探索了猪体外成熟卵母细胞孤雌激活方案。结果如下:NCSU-23 中,卵母细胞核成熟明显优于在 TCM199 中成熟的效果 ($p<0.05$); 1.4kV,100 μ s,1DC 电激活后,卵母细胞死亡率明显高于 2.0kV/cm,30 μ s,1DC 和 2.0kV/cm,60 μ s,1DC 处理组。但激活后三组间胚胎卵裂率(分别为: 72.6% vs. 85.9%, 73.2%) 和囊胚率(分别为: 32.1% vs. 49.4%, 39.0%) 相似;化学激活后,胚胎卵裂以及囊胚率都明显不如电激活处理(卵裂率 14.4% vs. 72.8%; 囊胚率 3.3% vs. 31.5%);以 NCSU-23 为基础培养基,高氧核成熟显著优于低氧;以改进的 PZM-3 成熟卵母细胞,核成熟上仍然是高氧优于低氧。若不考虑气相影响,PZM-3 的成熟效果明显不如 NCSU-23;添加 5 μ g/ml 胰岛素后卵母细胞成熟效果显著提高,但是成熟后激活发育没有显著改善。而添加 1000 IU/ml LIF 卵母细胞核成熟率不但没有明显提高,反而孤雌激活后囊胚率急剧下降,尽管卵裂率以及囊胚细胞总数都没有明显改变。上述结果表明①NCSU23 是猪卵母细胞比较理想的培养基,其成熟卵在 2.0kV/cm,30 μ s,1DC 或者 2.0kV/cm,60 μ s,1DC 电击参数激活下发育比较好;②高氧对卵母细胞核成熟有利,但附植前孤雌胚胎发育具有培养基依赖性;③添加 Insulin 可以改善卵母细胞核成熟,而添加 LIF 对卵细胞质成熟有害;④PZM-3 如果应用于卵母细胞体外成熟还需要进一步优化。

比较了 IVF, PA 以及 SCNT 胚胎的发育率和囊胚质量。三者发育率相似(囊胚率分别为:11.0%, 22.6%和 16.9%),但是在囊胚质量即 ICM/总细胞数比例上,IVF 和 SCNT 胚优于 PA 胚。比较了 PZM-3 和 NCSU-23 培养对孤雌激活胚以及克隆胚发育的影响。对 PA 胚来讲,PZM-3 明显好于 NCSU-23(囊胚率 35.4% vs.22.6%, $p<0.05$);而对 SCNT 胚,PZM-3 明显不利于卵裂,但对囊胚发育影响不大(21.1% vs. 26.6%, $p>0.05$)。在 NCSU-23+4 mg/ml BSA 中添加 5 μ g/ml 胰岛素对胚胎发育没有明显促进作用,而添加 1000 IU/ml LIF 也没发现有损害早期发育的情况。上述结果表明,对孤雌胚或者体外受精胚理想的培养基,当用于克隆胚胎培养时却不一定是最佳的选择;孤雌胚胎在体内发育能力差,可能和 ICM/总细胞数很低有关。添加 5 μ g/ml Insulin 或者 1000IU/ml LIF 对孤雌激活胚胎早期发育没有显著影响。

利用脂质体转染技术建立了转 GFP 的猪胎儿成纤维细胞系,尝试了生产转 GFP 胚胎的可能性,同时系统研究了供体细胞转染与否、传代次数、准备方式、细胞周期同期化、细胞年龄、细胞形态以及细胞性别等对克隆胚胎早期发育的影响。结果如下:用转 GFP 的细胞获得克隆胚胎

卵裂率为 61.2%(90/147),囊胚率为 9.5%(14/147);结果和非转基因组卵裂率(63.5%)以及囊胚率(16.7%)相似。传代次数在 6-9 之间的供体细胞克隆胚卵裂率高于传代 10 次(73.0% vs. 51.3%, $p<0.05$)以上的组,但囊胚率没有明显差异(14.0% vs. 11.2%);在融合率上,光滑圆形细胞明显高于表面粗糙的细胞组(76.8% vs. 47.8%, $p<0.05$),但克隆胚卵裂率以及囊胚率没有显著的差异;用液氮冻存复苏的细胞做供体可以得到克隆囊胚(4.2%),但其效率明显不如胰蛋白酶现场消化法(14.9%)和 4℃冷藏法(17.9%);不同性别或者不同年龄供核体细胞克隆胚早期发育结果相近;接触抑制法提供体细胞所得克隆胚卵裂率最高(81%),而 70%汇合且分裂旺盛时期收获的细胞做供体时克隆胚卵裂率(64.4%)居中,血清饥饿处理组最低(50.5%)。但在囊胚率上三种方案所得结果相似(分别为:12.5%, 19.6%和 12.7%)。上述结果表明:①转 GFP 的猪胎儿成纤维细胞克隆胚胎可以发育到囊胚;②血清饥饿对克隆胚早期发育来说不是必需的;③在挑选供体细胞时,选择圆形光滑的细胞有利于提高融合率;④传代 6-9 次的细胞作供体较好。⑤细胞性别以及年龄对克隆胚早期发育影响不大。⑥最后,4℃冷藏的猪胎儿成纤维细胞可以用于核移植供体并且能有效支持克隆胚胎的早期发育

选择 3 头自然发情经产母猪作克隆胚移植受体,共移植 231 枚克隆胚,移植后 33d 用 B 超检测有 2 头有妊娠信号。比较了高氧和低氧、TA 与 AFS、胚胎培养基中添加 1000IU/ml LIF、全细胞注射法同细胞融合法等对克隆胚体外发育的影响。结果如下:NCSU-23+BSA 培养时,两种气相得到的克隆胚卵裂率以及囊胚率都没有显著差异;TA 可以显著提高卵裂率(80.1%),但囊胚率上也没有得到较大改善;添加 LIF 后,克隆胚卵裂以及囊胚形成都没有明显提高;全细胞胞质内注射法得到的克隆胚卵裂率虽然不如融合法,但是没有统计学上的显著差异,另外在囊胚形成方面,两种重构策略效率相近(9.1% vs. 7.7%, $p>0.05$)。上述结果表明①本研究平台所生产的克隆胚胎可以在受体子宫内建立妊娠,进行附植后发育;②胚胎体外培养时低氧对克隆胚的帮助不明显。③同样添加 LIF 也是如此。④TA 法可以促进卵裂。⑤全细胞注射法可以有效生产克隆囊胚。

总之,本研究以妊娠40d中国实验用小型猪胎儿成纤维细胞作为供核体细胞,以屠宰场初情期青年母猪COCs体外成熟MII卵母细胞去核后作为受体,构建的克隆胚胎可以在代孕母猪子宫内建立妊娠,进行附植后发育;本实验首次在猪上将4℃冷藏的细胞用作供核,成功获得了猪的克隆囊胚,该方法在核移植实践中的应用有助于节约细胞,降低成本。

关键词

猪 体细胞核移植 早期发育 胚胎移植

Abstract

Pigs are considered as ideal organ donor for human future xenotransplantation. Somatic cell nuclear transfer provides an opportunity for producing HAR and endoviruses free pigs. Up to date, there is no somatic cloned pig produced in mainland of our country. So the current research was designed to study main items of pig somatic nuclear transfer systematically such as somatic donors, recipient oocyte, culture of cloned embryos and embryo transfer. It consists of 5 independent experiments.

Experiment 1. Nine fetal fibroblast cell lines were set up from 9 fetus of Chinese miniature experimental pigs at 40d of gestation and 1 adult ear skin fibroblast cell lines was set up from fetuses' mother by using explant-seeding method. Cell cycle stage was synchronized by either serum starvation or contact inhibition. No significant difference of population at G0/G1 between them and no further increases of G0/G1 cell population after extension of synchronization beyond 2d. It is concluded that fetal fibroblasts responded to serum starvation and contact inhibition at similar degree and that synchronization for 2d is enough.

Experiment 2. Effects of basic maturation media, oxygen tension, insulin and LIF supplementation on nuclear maturation of prepubertal gilts oocytes and subsequent development after parthenogenetic activation were studied. Effect of different activation method on in vitro development of parthenogenetically activated oocytes was also studied. Results are: 1) the rate of nuclear maturation was significant higher after cultured in NCSU-23 than in TCM199; 2) when cultured in NCSU-23, significant higher maturation rate was observed under high oxygen tension (20% O₂) than low oxygen tension (7% O₂). When cultured in a novel maturation media-PZM, 20% O₂ was better than 7% O₂ also. Regardless of oxygen tension, NCSU-23 supported nuclear maturation better than PZM. 3) Improved maturation rate was obtained after supplementation of insulin, although no significant increase in rates of cleavage and blastocyst after parthenogenetic activation was observed. LIF supplementation did not improve maturation rate. The rate of blastocyst formation decreased drastically after culture in LIF-containing media although no significant influence on cleavage rate and total cell number of blastocyst were observed. 4) No significant differences among 1.4kv/cm-100 μ s-1DC, 2.0kv/cm-30 μ s-1DC, 2.0kv/cm-60 μ s-1DC activation groups as for the rates of cleavage and blastocyst formation. However, 1.4kv/cm-100 μ s-1DC treatment was significant higher than 2.0kv/cm-30 μ s-1DC or 2.0kv/cm-60 μ s-1DC as for death rate of oocytes treated. 5) Chemical activation using Ionomycin and 6-DMAP was poorer than electrical activation using either 2.0kv/cm-30 μ s-1DC or 2.0kv/cm-60 μ s-1DC. These results indicated that 1) NCSU-23 is an ideal maturation media and 2.0kv/cm-30 μ s-1DC or 2.0kv/cm-60 μ s-1DC electrical activation parameters could effectively activate MII oocytes. 2) High oxygen tension is beneficial to oocytes maturation while preimplantation of PAEs are media dependent. 3) Insulin is beneficial while LIF is detrimental to

nuclear maturation of oocytes. 4) A novel media-PZM could be used as maturation media but further studies to optimize it are needed

Experiment 3. In the current experiment, in vitro development potential and blastocyst quality of IVFEs, PAEs and NTEs were studied. Preimplantation development competence was similar among IVFEs, PAEs and NTEs. However, with regard to blastocyst quality i.e. ratio of ICM to total cell number, IVFEs and NTEs were superior to PAEs. Effects of culture media including PZM-3 and NCSU-23 on in vitro development potential of PAEs and NTEs were studied. For PAEs, PZM-3 was significant better than NCSU-23. For NTEs, PZM-3 was detrimental to cleavage rate while it had no obvious influence on blastocyst formation. When PAEs cultured in NCSU-23+4 mg/ml BSA supplemented with 5 μ g/ml Insulin or 1000 IU/ml LIF, no significant improvements of Insulin or no detrimental influence of LIF was observed. Results show that 1) an ideal culture media that is suitable to PAEs does not necessarily ideal to NTEs. 2) Poorer postimplantation development competence of PAEs may be correlated to aberrant ratio of ICM to total cell number of blastocyst. 3) 5 μ g/ml Insulin or 1000 IU/ml LIF has no beneficial effects on PAEs preimplantation development.

Experiment 4. The present study was designed to evaluate the feasibility of producing pig transgenic blastocysts expressing enhanced green fluorescent protein (GFP) and to examine the effects of shape and preparation methods of donor cells on in vitro developmental ability of pig nuclear transferred embryos (NTEs). Effects of passage number, cell cycle synchronization, cell age and cell sex identity on in vitro development of nuclear cloned embryos were also investigated. The results are as follows: For the cleavage and blastocyst rates, no significant difference was observed between NTEs derived from transfected and non-transfected donors. For the cleavage rate, there were no statistical significances among three preparation methods. For the blastocyst rate, donor cells treated once at 4°C and those freshly digested cells are similar to each other (26.3% vs. 17.9%). Lowest blastocyst rates (5.88%) were observed when -196°C cryopreserved cells were used as donors. The cleavage rate of cycling cell-derived NTEs were much better than that of serum starve cell-derived ones (64.4% vs. 50.5%, $p < 0.05$), but no significant difference was observed between the two groups for blastocyst rate. The fusion rate for rough cell derived couplets was poorer than that observed in round smooth cell derived ones (47.8% vs. 76.8%, $p < 0.05$). However, there were no significant difference observed for the cleavage rate and blastocyst rate. Significant higher cleavage rate of NTEs derived from cells at passage 6-9 than that from cells at passage 10 and beyond was observed. No obvious differences existed between male and female cell cloned embryos, or between fetus and adult fibroblasts cloned embryos. In conclusion, these results suggest that i) refrigerated pig GFP-transfected cells could be effectively dedifferentiated and develop to blastocyst; ii) serum starvation is not required for preimplantation development of pig NTEs; and iii) rough surface of donor cells affects fusion rate negatively but has no such influence on cleavage and blastocyst formation rate of pig NTEs.

Experiment 5. The current research was aimed to carry out cloned embryos transfer and evaluate effects of oxygen tension, activation protocols, culture media supplementaion with

1000IU/ml LIF and whole cell intracytoplasmic injection on in vitro development competence of NTEs. Total of 231 NTEs were transferred to 3 natural cycling sows. Two of them became pregnant after ultrasound B examination at 33d after embryo transfer. When cultured in NCSU-23+4mg/ml BSA, no significant difference was observed between low oxygen tension and high oxygen tension. Greatly improvement in cleavage rate was obtained when reconstructed embryos were activated by two-step activation method while no such benefits to blastocyst formation. When the culture media of NTEs was added with LIF, no obvious increasing of the rates of cleavage and blastocyst was observed. Whole cell intracytoplasmic injection method could effectively produce cloned embryos the same as fusion method. All results suggest that cloned embryos produced by our platform could establish pregnancy after in vivo at least to 35d after embryo transfer. No beneficial roles of low oxygen on in vitro development of NTEs with regard to basic culture media: NCSU-23. LIF at concentration 1000IU/ml has no obvious influence. Two-step activation could improve cleavage rate of NTEs. Whole cell intracytoplasmic injection could effectively produce cloned embryos.

In summary, pig fetuses fibroblast cell lines could be dedifferentiated at least to establish pregnancy in our platform.

Key words: pig, somatic nuclear transfer, early development, embryo transfer

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT	III
英文缩略词表	IX
第一部分 文献综述	1
第一节 哺乳动物体细胞核移植(克隆)研究进展.....	1
1.1 体细胞克隆简要回顾.....	1
1.2 体细胞核移植技术的应用价值.....	2
1.3 体细胞克隆相关技术环节的发展现状.....	4
1.3.1 体细胞制备方法:	4
1.3.2 受体卵母细胞:	6
1.3.3 构建重组胚的方法:	6
1.3.4 卵母细胞的去核方法:	7
1.3.5 融合与激活方法:	8
1.3.6 胚胎的培养:	9
1.3.7 胚胎移植:	10
1.3.8 妊娠期监护与分娩护理:	11
1.4 异种体细胞克隆.....	11
1.5 我国的体细胞克隆简介:	11
第二节 猪卵母细胞体外成熟和胚胎体外培养研究进展	13
2.1 卵母细胞体外成熟.....	13
2.2 胚胎培养:	16
第三节 体细胞克隆相关机理研究现状	18
3.1 供核体细胞与受体卵母细胞的细胞周期协调:	18
3.2 卵母细胞:	19
3.3 体细胞来源:	19
3.4 体细胞克隆效率:	20
第四节 猪的体细胞克隆方案	22
4.1 供体细胞.....	22
4.2 受体卵母细胞.....	23
4.3 卵母细胞成熟.....	23
4.4 体细胞克隆胚胎构建.....	24
4.4.1 卵母细胞去核:	24
4.4.2 重构卵方案:	24
4.5 融合与激活.....	24
4.6 克隆胚胎的体外培养.....	25
4.7 胚胎移植.....	25
第五节 体细胞克隆动物与核重编程	26

5.1 遗传学变化:.....	26
5.2 端粒和端粒酶:.....	27
5.3 线粒体命运:.....	29
5.4 表观遗传学重新程序化	29
5.4.1 DNA 甲基化:	29
5.4.2 基因组印记:.....	32
5.4.3 X-染色体失活:.....	34
5.4.4 组蛋白修饰与染色质重塑:.....	34
5.5 体外培养与基因表达:.....	36
5.6 早期发育的重要基因的表达:.....	37
5.7 展望	38
第二部分 实验内容.....	41
第六节 供核体细胞系建立.....	41
摘要.....	41
1 前言	41
2 材料与方法	41
3 结果	46
4 讨论	49
第七节 猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活参数研究.....	51
摘要.....	51
1 前言	51
2 材料与方法	52
3 结果	58
4 讨论	61
第八节 猪 IVFEs、PAEs 和 NTEs 的体外培养.....	64
摘要.....	64
1 前言	64
2 材料与方法	65
3 结果	73
4 讨论	75
第九节 猪体细胞核移植胚胎的体外发育:供体细胞因素.....	78
摘要.....	78
1 前言	78
2 材料与方法	79
3 结果	82
4 讨论	85
第十节 体细胞核移植胚胎的体外发育以及体内发育.....	90
摘要.....	90
1 前言	90

2 材料与方法..... 91

3 结果..... 93

4 讨论 96

结论 99

参考文献..... 100

致谢 116

个人简历 118

英文缩略词表

缩写	英文全称	中文对照
α -1,3-GalT	α -1,3-galactyltransferase	α -1,3半乳糖苷转移酶
6-DMAP	6-Dimethylaminopurine	6-二氨基甲基嘌呤
AFS	Simultaneous activation and fusion	融合同时激活
AI	Artificial insemination	人工授精
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CB	Cytochalasin B	细胞松弛素B
CHX	Cycloheximide	放线菌酮
COCs	Cumulus oocytes complexes	卵丘-卵母细胞复合体
DC	Direct current	直流电
DMSO	dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
DNMT	DNA methyltransferase	DNA甲基转移酶
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
EAA	Essential amino acid	必需氨基酸
ECG	Equine chorionic gonadotropin	马绒毛膜促性腺激素
EGF	Epidermal growth factor	表皮生长因子
ESC	Embryo stem cell	胚胎干细胞
FBA	Fusion before activation	融合后激活
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FSH	Follicle stimulating hormone	促卵泡素
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
HAE	Hyaluronidase	透明质酸酶
HAR	Hyper acute rejection	超急性排斥
HCG	Human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
HEPES	[4-(2-hydroxyethyl),-1-piperazineethane sulphonic acid]	N-2 羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸
HMC	Hand made cloning	徒手克隆
ICM	Inner cell mass	内细胞团
ICNI	Intracytoplasmic nuclear injection	胞质内细胞注射
IVF	In vitro fertilization	体外受精
IVFE	In vitro fertilized embryos	体外受精胚胎
IVM	In vitro maturation	体外成熟
IVP	In vitro production	体外生产
LH	Luteinizing hormone	促黄体素
LIF	Leukemia Inhibitory Factor	白血病抑制因子
LOS	Large offspring syndrome	巨胎症
MAPK	Mitogen-activated protein kinases	有丝分裂原活化蛋白激酶
mGM-CSF	Mouse granulocyte colony-stimulating factor	小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子

MPF	Maturation promotion actor	成熟促进因子
MPN	Male pronuclear	雄原核
NCSU-23	North Carolina university 23 medium	北卡大学23培养基
NEAA	Nonessential amino acid	非必需氨基酸
NEBD	Nuclear envelope breakdown	核膜破裂
NTE	Nuclear transfer embryos	核移植胚胎
OPS	Open pulled straw	开放式拉管
PA	Parthenogenetic activation	孤雌激活
PAE	Parthenogenetically activated embryos	孤雌激活胚
PAF	Platelet activating factor	血小板活化因子
PCC	Premature chromosome condensation	早熟染色体凝集
PFF	Porcine follicle fluid	猪卵泡液
PGCs	Primordial germ cells	原生殖细胞
PI	propidium iodide	碘化丙啶
PMSG	Pregnant mare stimulating gonadotropin	孕马血清促性腺激素
PVA	Polyvinyl alcohol	聚乙烯醇
PZM—3	Porcine zygote medium-3	猪受精卵培养基—3
SCNT	Somatic cell nuclear transfer	体细胞核移植
TA	Two step activation	两步激活
TCM199	Tissue culture medium	组织培养液199
TE	Trophoblast	滋养外胚层

第一部分 文献综述

第一节 哺乳动物体细胞核移植(克隆)研究进展

体细胞核移植克隆是指利用一定的设备和技术手段,将动物的体细胞与已经去除细胞核遗传物质的卵母细胞体外重组胚胎,然后再于特定的发育时期将重组胚移植到代孕母体的子宫内,完成发育,生产与体细胞供核体遗传上同质后代的过程。

20 世纪 90 年代中期世界上首例成年体细胞克隆动物—绵羊 “dolly” (Wilmut *et al.* 1997)诞生宣告了哺乳动物体细胞克隆时代的开始。此后相继又有小鼠(Wakayama *et al.* 1998),牛(Cibelli *et al.* 1998; Kato *et al.* 1998),山羊(Baguisi *et al.* 1999),猪(Betthauser *et al.* 2000; Onishi *et al.* 2000; Polejaeva *et al.* 2000),猫(Shin *et al.* 2002),兔(Chesne *et al.* 2002),骡子(Woods *et al.* 2003),马(Galli *et al.* 2003),大鼠(Zhou *et al.* 2003)等动物的体细胞克隆后代出生。而同时还有一些异种克隆动物如欧洲盘羊(Loi *et al.* 2001),爪哇野牛,非洲野猫(Gomez *et al.* 2004)等诞生。这些事实进一步说明”Dolly”的成功不是偶然,而且更加使人们确信:已经分化的体细胞仍保留有发育为完整个体所需的全部遗传信息。体细胞克隆技术的成功使现代生物技术翻开了崭新的一页。它已经向世人昭示了其在畜牧业生产,疾病治疗和医药生产,生物学基础理论研究以及野生濒危动物保护等诸多领域所蕴藏的巨大应用价值。但是,目前克隆技术的发展还存在很多问题,如现今流行的克隆设备比较昂贵,技术要求比较高,克隆成功的效率还不理想,克隆胚胎移植后流产率高,胎儿围产期死亡率高,出生后成活率低,后代生理异常发生频繁等等。这些都极大限制了克隆技术的商业化应用。而阐明导致这些问题的根源,有助于我们更深入的了解一些生物学基础理论如生命发生,发育,生长和分化以及重新程序化,核质互作等的分子机制,从而最终提高克隆效率。

1.1 体细胞克隆简要回顾

核移植技术的起源可以追溯到 1914 年 Spemann 在蝾螈上的实验,不仅开创了原始的核移植研究,并且提出在当时看来非常奇特的设想:将较高发育阶段的细胞核放到去除遗传物质的受精卵内,进而研究在细胞分化过程中遗传物质所扮演的角色以及确定在细胞发育分化过程中遗传信息是否发生丢失和失活。而由于当时各种客观条件如显微操作设备等的限制,直到 1952 年,真正意义上的核移植克隆试验才由 Briggs R 和 King T 在两栖动物—豹蛙上获得成功,他们得到了囊胚细胞核移植克隆后代。从此拉开了两栖动物细胞核移植研究的序幕,进入了两栖动物克隆时代。

最早进行哺乳动物胚胎细胞核移植尝试的是 Bromhall(Solter 2000),用显微注射和仙台病毒诱导融合法将兔桑椹胚细胞移入去核的兔卵中,重构胚发育到桑椹期。而在二十世纪 80 年代初期,Illmensee 和 Hoppe (1981)合作宣称获得胚胎细胞克隆小鼠,但是至今未能有人重复。1983 年 McGrath 和 Solter(1983)成功获得小鼠胚胎细胞核移植克隆后代,开创了哺乳动物胚胎细胞克隆的时代。尤其是 1986 年,Willadsen(1986)在绵羊上取得胚胎细胞克隆成功,此后,相继有胚胎细胞克隆的大鼠,山羊,牛,猪,兔,猴等诞生(杨彩侠 2004),更是为今天的体细胞克隆方案奠定了坚实的基础。

1996年—1997年英国科学家开创性的连续用胚胎成纤维细胞(Campbell *et al.* 1996),成年动物乳腺上皮细胞(Wilmut *et al.* 1997)获得了克隆绵羊。“Dolly”的出生为体细胞克隆时代的来临拉开了序幕。从此,体细胞克隆开始全面深入的为许多技术注入了新的活力。体细胞克隆技术和转基因技术结合,可以更高效,低成本的生产转基因动物(Schnieke *et al.* 1997)。使得生产基因组修饰如打靶大家畜成为现实(Kuroiwa *et al.* 2004);而体细胞克隆技术和胚胎干细胞技术结合,成功建立了小鼠(Wakayama *et al.* 2001),人(Hwang *et al.* 2004)的胚胎干细胞系,为治疗性克隆打下了坚实的基础;而和现代胚胎生物技术以及动物育种结合,为家畜品种改良提供了新的选择。具体综述如下:

1.2 体细胞核移植技术的应用价值

1.2.1 体细胞克隆技术在畜牧业生产中的应用。人们已经在优秀性状个体扩繁,优质遗传资源的保护等方面进行了有益的尝试。利用体细胞克隆技术,结合胚胎移植等已经非常成熟的生物技术,人们可以节约大量生产种牛的时间和费用,同时,完成对高产,优秀奶牛的扩群。越来越多的资料表明,克隆奶牛的牛奶,克隆肉牛的肉质和自然交配生产的后代对照之间并没有什么不同,完全可以放心食用(Norman and Walsh 2004; Takahashi and Ito 2004; Tian *et al.* 2005; Tome *et al.* 2004)。另外,还有人利用此项技术克隆本地已经濒临灭绝的牛种,实现了对该品种一定程度的保护(Wells *et al.* 1998)。有研究表明,克隆技术应用于生产,保护家畜以及其它动物,与遗传多样性的减少之间并没有必然联系(Steinborn *et al.* 2002)。应用该技术可通过对家畜体细胞基因组进行修饰或结合转基因技术生产对某些疾病具有抗性的后代,如已经有人在绵羊(Denning *et al.* 2001),牛上尝试利用基因敲除技术生产抗疯牛病的羊,牛;还可以改良牛奶,减少或去除牛奶中对人不利的成分,使牛奶入乳(Barry *et al.* 2003)。在养猪生产中,饲料转化效率高,肉质好,产肉量高,生产周期短,繁殖力强而且具有一定抗病性等都是生产者始终较为关心的性状指标。体细胞克隆结合遗传修饰技术可以在传统遗传育种技术的基础上培育猪的新品种,扩大猪群数量的强有力的辅助工具,而逐渐受到重视。对猪的基因组进行修饰也许可以改变胴体组成,使猪肉成为更加卫生的健康食品;亦可能有助于更快,更有效的生产猪肉;或者生产对特定疾病具有抗性的猪;再者减少常发生在怀孕第一个月时的胚胎死亡;有利于生产更为环保型的猪(Lai and Prather 2003)。

1.2.2 体细胞克隆技术对转基因动物生产的影响。流行的转基因动物制备方法如原核显微注射法,精子载体法等生产转基因动物的效率低,成本高,周期长,而且基因随机整合,表达水平不能实现精确定点。体细胞克隆技术的应用,将转基因操作步骤提前在体细胞阶段实施,阳性细胞筛选完成后用于核移植,理论上说所得到的克隆后代应该 100%都是转基因动物。如果再结合基因打靶(gene targeting)技术,则可以解决这些长期困扰转基因动物生产的难题。从实践来看,完全可以提高准确性,实现定位修饰,缩短生产周期,从而提高了生产效率。如果要利用原核显微注射法生产一头转基因牛,就要注射 500 多枚胚胎;而利用体细胞核移植技术,只需给 4 头奶牛移植 9 枚胚胎就能达到相同的目的(Cibelli *et al.* 1998)。同样,在绵羊上的研究也显示,体细胞克隆技术在生产转基因动物上比传统方法具有优越性。当前条件下,在猪上获得基因打靶后代唯一有效的方法就是体细胞克隆(Prather *et al.* 2003)。

1.2.3 体细胞克隆技术在医疗临床(疾病,细胞替代疗法)上的可能应用。利用体细胞克隆

可以生产干细胞:最近中美科学家(Wang *et al.* 2005)联手建立了牛的胚胎干细胞系,其中就有来自 SCNT 胚胎的。当然,还需要进一步观察所建的牛 ES 细胞系,因为它虽然和人,小鼠 ES 细胞特异的分子标记非常接近,但对胰蛋白酶消化比较敏感。而在其它几种家畜中,尚未见到有真正意义上的 ES 细胞系的建立。令人兴奋的是,将体细胞克隆技术和人的胚胎干细胞分离建系技术结合起来,理论上完全可以建立,保存每个人自己的胚胎干细胞系,在患者需要组织,器官移植时,可以诱导其自身的胚胎干细胞系分化成目的组织器官进行移植,可以避免免疫排斥,达到治疗疾病的目的。目前,人们已经利用体细胞克隆技术获得了小鼠—小鼠(Wakayama *et al.* 2001),人—兔(Chen *et al.* 2003),人—人(Hwang *et al.* 2004) ES 细胞系。并已经在小鼠模式上开展了如帕金森氏症等神经退行性疾病的治疗尝试(Barberi *et al.* 2003)。目前,包括绝大部分从事克隆研究的科学家在内,都反对人的生殖性克隆。但许多国家的政府,科研机构都支持治疗性克隆的研究。2005 年 5 月 19 日,韩国和美国科学家合作利用来自病人的皮肤细胞成功的建立了该患者的胚胎干细胞系,人类治疗性克隆又迈出了坚实的一步(Hwang *et al.* 2005)。体细胞克隆技术的进一步发展成熟,必将导致人们搞清重新程序化(reprogramming)的分子机制,从而实现在体外对体细胞的直接处理,逆转形成干细胞,从而用于细胞替代疗法(cell replacement therapy)。当前,全球等待器官移植的患者越来越多,而提供,捐献器官的人非常有限,远远无法满足医疗机构的需要。鉴于猪的器官在大小,功能上和人的比较接近,所以,人们希望能利用猪来提供人所需要的各种器官,开展异种器官移植(Xenotransplantation)(Piedrahita and Mir 2004)。但猪的基因组上有表达 α -1,3-半乳糖苷转移酶这种人和灵长类动物所没有的基因,这样,一旦移植将导致超急性排斥(HAR)(Piedrahita 2000)。再者,猪的基因组内还可能整合一些对人有潜在危险的内源性病毒基因。所以,就有必要寻找去除这些危险因素的方法。人们已经找到了一个似乎是当前条件下的首选方法,基因打靶结合体细胞克隆生产转基因猪(Dai *et al.* 2002; Lai *et al.* 2002)。而且现在已经得到了敲除 α -1,3-Gal 双拷贝的克隆猪(Kolber-Simonds *et al.* 2004; Phelps *et al.* 2003)。

1.2.4 体细胞克隆技术对动物保护的启示。人们在尝试对家畜进行克隆的同时,也在进行着对高度濒危物种的保护性克隆研究。由于这些濒危物种的数量有限,卵巢卵母细胞,胚胎代孕母体的数量都限制了同种克隆的应用。于是有人开始尝试利用这些濒危物种的体细胞体外培养建系,冷冻保存,用来自其他常见动物如牛,兔的卵母细胞作为胞质受体重组胚胎的种间或亚种间克隆。目前,已经得到了爪哇野牛(gaur)(Lanza *et al.* 2000),欧洲盘羊(Loi *et al.* 2001),非洲野猫(Gomez *et al.* 2004)等物种的克隆,还有很多实验室正在利用异种克隆技术进行老虎,大熊猫,熊,羚羊等动物的异种克隆。我们实验室也在进行牦牛,羚牛的异种克隆(李彦欣 2004)。异种体细胞克隆技术丰富了野生濒危动物扩群,保种的方法。牛(Dominko *et al.* 1999),兔(Chen *et al.* 2002; Yang *et al.* 2003),绵羊(Loi *et al.* 2001)的卵母细胞都已经被证明可以重新程序化来自异种动物的体细胞核。但尚不清楚猪的卵母细胞是否有此能力。

1.2.5 体细胞克隆技术在医药生产方面的价值。将体细胞克隆技术与生物反应器的生产制作技术结合,可以对体细胞进行转基因或基因组修饰后,制作生产生物反应器,利用动物的乳腺,膀胱等器官,生产人类疾病治疗,保健所需的蛋白。许多在全球很有影响的生物技术企业尤其看重体细胞克隆技术在这些方面的应用价值,纷纷投资科研机构开展研究。实际上第一个体细胞克隆动物——绵羊‘多莉’的诞生就是这种动机的直接产物。

1.2.6 体细胞克隆对帮助阐明一些生物学基础问题的价值。体细胞克隆技术除了在上述生产

实践中具有极大的价值之外,就是它还许多生物学基础问题的研究揭示提供了一个强大的技术平台(Galli *et al.* 2003)。体细胞克隆技术本身涉及到细胞生物学,发育生物学,胚胎生物学,遗传学,分子生物学,生物化学等诸多学科的理论问题。利用这一技术对人们进一步深入认识发育,分化,生长,衰老,肿瘤发生等长期困扰人们的常见的生物学现象提供了可能。如 Li 等(2004)。利用小鼠嗅觉神经元得到了克隆小鼠后代,证明了细胞分化过程中基因表达本身是不可逆的。但是,经过核移植技术可以重新设置。Jaenisch 研究组连续利用黑色素瘤细胞(Hochedlinger *et al.* 2004)和畸胎瘤细胞(Blelloch *et al.* 2004)进行核移植,结果前者可以得到成活后代,而后者尽管在建立 ES 细胞系上看不出什么问题,但是所形成的胎儿细胞也容易发生类似供体细胞的肿瘤化。从而证明,有些癌细胞的发生可能是表观遗传方面发生改变所致,通过核移植可以纠正,但有些可能由于基因组发生突变引起,而核移植无法纠正;还为人们开展细胞核与细胞质相互作用,对线粒体遗传学,表观遗传学(epigenetics)等的发展,干细胞全能性以及体细胞重新程序化的分子机制的揭示,对胚胎发生发育的早期,细胞学,分子生物学水平上信号转导/传递,以及基因表达调控网络的了解都会有帮助。哺乳动物基因组印记的提出和发现直接受益于 80 年代初小鼠胚胎细胞克隆的研究(Solter 2000)。

1.2.7 其它

最近的研究中,Kono 等(2004)用体细胞核移植技术与基因敲除等技术成功获得世界上首例孤雌生殖小鼠的后代。

1.3 体细胞克隆相关技术环节的发展现状

经历了两栖动物,哺乳动物胚胎细胞的克隆,上世纪末克隆技术发展到了体细胞克隆阶段,其方法不断地从繁琐到简单,克隆成本也在不断下降(Faber *et al.* 2004)。但由于物种间的差异,对一种动物有效的克隆程序拿到另外一种动物上却不一定有效。所以,很多研究者结合各种动物自身的特点,不断尝试着建立适于具体物种的克隆方法。

1.3.1 体细胞制备方法:

构成哺乳动物机体的细胞大约有 200 多种,到现在,已经被人们用来进行体细胞克隆试验的还不到 5%。获得成活后代的有卵丘/颗粒细胞,输卵管上皮细胞,皮肤成纤维细胞,肌肉细胞,子宫细胞,肝脏细胞,未成熟塞托利细胞(Sertoli),神经元细胞,淋巴细胞(Hochedlinger and Jaenisch 2002),白细胞,星型胶质细胞(Takahagi *et al.* 2005)等。这些细胞有来自胎儿的,成年动物的,也有来自已经死亡的动物的体细胞(Obach and Wells 2002)。甚至还有人利用肿瘤细胞作供核得到了克隆囊胚或者成活后代(Blelloch *et al.* 2004)。当然,有些细胞,如巨噬细胞,脾细胞,脑细胞和成熟塞托利细胞都不能发育到附植阶段(Wakayama and Yanagimachi 2001)。有人认为分化程度较低的细胞如胚胎干细胞,成体干细胞等作供体时,克隆效率会好些(Liu 2001)。的确,在小鼠上,ES 细胞克隆小鼠后代成活率比卵丘细胞克隆时高 10-20%。但是,在其它物种上,由于还没有成熟,稳定,可靠的 ES 细胞系,所以只好选用成体干细胞,在猪上的资料(Zhu *et al.* 2004)表明,成体干细胞获得早期囊胚的效率是比较高的。但不知其后期发育结果。另外,在小鼠上,选用胚胎期 10.5d 的原始生殖细胞可以得到克隆后代,而选用 12.5-13.5d 的没有获得成功。再者,利用牛的 PGCs 细胞还没有得

到克隆后代(Zakhartchenko *et al.* 1999)。

对体细胞进行转染或者其它的基因组修饰,来生产转基因或基因打靶家畜的研究中,体细胞将经历体外培养在内的转染,筛选等操作,这些操作一般被认为对克隆效率有不利的影响。但是现在有两种相矛盾的观点。即有人说没有显著的负面影响(Hyun *et al.* 2003),有人说会使克隆效率下降(Oback and Wells 2003)。但被大家较为普遍接受的是,转染或者打靶之后的筛选对细胞本身确实不好的影响(Kuhholzer *et al.* 2000)。

用于体细胞克隆的供核体时,细胞周期一般处于 G0/G1 期或者 G2/M 期,并已经形成了血清饥饿法,接触抑制法,Roscovitine(Gibbons *et al.* 2002)等化学试剂处理等同步化 G0/G1 期的方法;抖落法(shake-off)法,化学试剂处理同期到 G1 期的方法;以及 Nocodazole,colchicine(Lai *et al.* 2001)处理同期到 G2/M 期的方法。

有人尝试了一些改变供核体细胞表观遗传状态的处理,如 55℃或 75℃水浴,使细胞处于非生理温度,蛋白质高级结构变性,用这种方法还得到了克隆绵羊后代(Loi *et al.* 2002)。另外有人在牛上使用一些抗癌药物如 5-Aza(一种去甲基化试剂),TSA(促进乙酰化的试剂)处理牛的体细胞,改变供核的表观遗传学状态,结果使用 TSA 处理的供核克隆胚胎体外发育到囊胚的比例提高(Enright *et al.* 2005)。最近,Sullivan 等(2004)。建立了一种新的体细胞处理方法,在核移植前对供体细胞进行重塑,通过在 Streptolysin O 中渗透处理 30min,再用含 ATP 能量系统的有丝分裂药物细胞提取物(Mitotic extract+ATP)处理 45min 使染色体凝集以及除去核成分(nuclear components not nuclear; 注:不是核物质)。然后用 2mM 氯化钙封闭处理 2h;之后再用作供体移入卵胞质。这种方法获得的克隆牛成活率较高。

目前,在体细胞克隆时准备供核体细胞的方案基本上可分为:罗斯林方案,即血清饥饿法(Wilmot *et al.* 1997),使细胞处于 G0 期;檀香山方案,即使用新鲜分离或者处于活跃分裂期的细胞(Wakayama *et al.* 1998);北京方案,即将体细胞在 4℃冷藏一段时间用于克隆(Liu *et al.* 2001);ACT(Advanced cell technology)方案,即接触抑制的细胞准备方案(Cibelli, Stice *et al.*)。还有一种就是-70℃或者液氮冻存的细胞直接复苏后用作供体(Dai *et al.* 2002; Lai *et al.* 2002)。其中使用最为广泛的是罗斯林方案。

人们一直在探寻一种能在体外长期培养却又不发生转化的细胞系,尽管在小鼠和人上已经建立了胚胎干细胞系,但其它动物上还没有得到真正的胚胎干细胞系。鉴于端粒和端粒酶可能是维持细胞寿命的生物钟,所以有人尝试了将人的端粒酶催化亚基转移到绵羊的体细胞中,获得了一个在体外可以培养 200 到 500 天不等的成纤维细胞系。用该细胞系进行克隆试验,尽管怀孕不到 40 天就都流产了,但是囊胚发育,胚胎附植,器官形成方面都比对照组明显的好(Cui *et al.* 2003)。

目前在体细胞克隆中,由于胎儿成纤维细胞在体外培养时增殖期限长,便于基因修饰,转移后的筛选后不至于很快衰老。人们常常选择它,在体外进行基因转染,基因组修饰(如基因打靶)等处理。此外,也有人对颗粒细胞(安晓荣等, 2001),输卵管细胞进行基因转染处理,用于克隆。我们实验室则成功的利用输卵管上皮细胞(龚国春等, 2003)在世界上首次得到了转基因克隆牛。

1.3.2 受体卵母细胞:

在克隆动物实践中,已经有用原核期受精卵(Polejaeva, Chen *et al.* 2000),MII 期成熟卵母细胞,TII 期卵母细胞(Baguisi *et al.* 1999),2-细胞期卵裂球细胞等作为受体胞质。其中应用最普遍的是 MII 期卵母细胞。鉴于经济原因以及操作容易和大规模生产等诸多因素的需要,人们倾向于从来自屠宰场获取卵巢,抽吸卵泡,挑选卵丘细胞-卵母细胞复合体(COCs),在体外成熟培养使其达到 MII 期。此外还可利用超声波诱导活体采集技术,从遗传背景清晰的母畜卵巢上抽吸卵母细胞进行体外成熟。再就是用激素处理,诱导动物超数排卵,获取体内成熟的卵母细胞。卵母细胞的提供者可以是性成熟之后的动物,也可以是初情期之前的动物。卵母细胞质量是决定克隆胚胎发育的关键因素,体外培养条件在很大程度上可以帮助卵母细胞实现作用。许多的研究表明体内成熟的卵要比体外成熟的卵好;性成熟后动物的卵往往优于初情期以前动物的卵,尤其是在支持后期发育方面。

目前在准备卵母细胞时,有先行激活处理,使细胞内的 MPF 活性下降,从而可以接受处于任何周期阶段的供体细胞(Campbell *et al.* 1996)。另外一种就是不进行预先激活,而这样的卵母细胞可能对供体细胞的重新程序化有利,目前流行的做法就是这一种。

卵母细胞在体外成熟时培养时间,培养气相环境,培养基等对受体的质量有较大影响。各个物种在体外成熟时间一般是根据各自在发情后的生理排卵时间来确定的。成熟时间较长的老龄卵,极体与卵细胞核中期板相对位置相距变化大,去核时容易不彻底。成熟时间短的年轻卵子,虽然第一极体与卵细胞核位置接近,容易除去,但是细胞质成熟不理想。所以,在不同动物,卵受体成熟终止时间都有一个比较好的“窗口期”。比如在牛上是 IVM 开始后的 17-24h;猪上为 42-44h。

1.3.3 构建重组胚的方法:

A 融合法:该技术发源于上世纪 70 年代,最初是利用灭活的仙台病毒介导膜融合,而后逐渐被毒性较低的聚乙烯乙二醇诱导融合(Campbell *et al.* 2001)。与化学诱导膜融合同时发展起来的电融合技术直到 1986 年才有 Willadsen 等利用电刺激的方法(Willadsen 1986),成功的胚胎细胞克隆绵羊。这奠定了当今世界克隆领域最常用的电融合法的技术基础。Jan Tesarik 等改良了 PEG 诱导融合法,从而避免不必要的激活。电融合技术容易操作,稳定而可靠。因而目前比较流行。但是融合时的场强,融合液也又增添了一些变数。Li GP 等(2002)在融合液中添加 CB 处理后使得融合效率提高。

B 胞质内注射:由于小鼠卵胞质膜较脆,抗电击能力差,而且小鼠体细胞较小,因此电融合率较低;再者,小鼠胚胎基因组激活发生在 2 细胞期,甚至在受精卵后期就开始表达,留给移入核的重新程序化时间短。因此,1998 年 Wakayama 利用 Piezo 驱动的注射装置,将小鼠的体细胞注射到卵母细胞质内,重组胚胎,最终得到了克隆小鼠以及继代连续克隆小鼠 50 多只(Wakayama *et al.* 1998)。现在人们用此法得到了牛(Renard *et al.* 2002),猪(Onishi, Iwamoto *et al.*),马(Galli *et al.* 2003),骡子(Woods *et al.* 2003),大鼠(Zhou *et al.* 2003)的体细胞克隆后代。另外,还有人不使用 Piezo 驱动,而就使用普通的显微操作设备注射,也得到了山羊(郭继彤等 2002),小鼠(Zhou *et al.* 2001),猪(Lee *et al.* 2003)的克隆后代。胞质内注射重组胚胎技术强调在注射前,要将供核体细胞的细胞膜擦破,然后再行注射;而有研究表明这也不是必须的,用全细胞注射同样得到了克隆猪,虽

然 4 头小猪出生后 6 个月之前都死了。此法可以省略融合的步骤。有人在猪的克隆时对 piezo 驱动胞质内注射和融合法进行了比较,发现两者差异不明显。但前者需要另外添加设备,尽管可以省略融合步骤(Kurome *et al.* 2003)。不过,也有研究(Chen *et al.* 2004)表明在小鼠上,胞质内注射法比较好,因为对卵的伤害较轻。值得指出的是,Zhou Q 等(2000)建立的胞质内注射法比传统的方法有所改进,他们是先将体细胞注入到卵胞质内,在撤针时才把细胞核吸出。

C 去透明带-显微操作仪辅助去核法:克隆研究和生产中,绝大部分都是利用显微操作仪获得成功的。鉴于显微操作设备价格昂贵,对操作者的技能要求也高,人们也在不断尝试一些新的方法,以简化克隆操作步骤,减少对显微操作的依赖性,实现操作的批量进行。已经有利用无透明带——显微操作辅助的重组胚方案,并且在牛上取得了极大的成功(Obach *et al.* 2003);

D 去透明带手工克隆方案:其中最值得注意的是,Vajta 等(2001;2004;2003)建立了一种手工的体细胞克隆方案(HMC),不用显微操作仪得到了克隆牛后代,尽管效率仍然很低,而且也存在各种异常表型(Tecirlioglu *et al.* 2004)。在猪上,利用无透明带法也取得了囊胚,但效率不高(Booth *et al.* 2001; Kragh *et al.* 2004)。

E 连续核移植:应用于克隆的连续核移植方案主要有两种,其一就是以首次成功克隆猪(Betthausen *et al.* 2000; Onishi *et al.* 2000; Polejaeva *et al.* 2000)试验为代表的,先构建初级克隆胚胎,再用此胚胎作供核,移植到原核期去核遗传物质的受精卵内,构建二级重组胚。这一方案始于小鼠的胚胎干细胞克隆(Kato and Tsunoda 1995)。第二种方案是先构建克隆胚胎,于体内外培养发育到囊胚期以前的各个阶段,分离卵裂球作供核,再移植给去除核遗传物质的卵母细胞,重组胚胎的方法;实际上是先进行体细胞克隆生产胚胎,再用这些胚胎的卵裂球进行胚胎细胞核移植克隆(李劲松 *et al.* 2001)。

F 其它:美国 Whitehead 研究所 Jaenish R 研究组利用四倍体胎盘补偿法,克隆胚内胚团卵裂球形成未来的胎儿,由四倍体滋养外胚层细胞构成胎盘,可以耐受免疫排斥。分别得到了来自小鼠成熟 B,T 细胞(Hochedlinger and Jaenisch 2002),嗅觉神经元细胞(Eggan *et al.* 2004)以及黑色素瘤细胞(Blalloch *et al.* 2004)的克隆小鼠。

1.3.4 卵母细胞的去核方法:

A 示核法:传统的 Hoechst33342 示核法(Tsunoda and Kato 1993),短波激发荧光,可以显示极体与卵母细胞中期板的相对位置,从而可以作为判断去核是否成功的标志。采用这种方法,需要使用紫外光照射,紫外线对卵母细胞可能会造成不同程度的伤害,从而会影响克隆胚胎的后续发育。所以,人们也在积极寻找新的方法。在小鼠,牛的卵母细胞成熟的一定阶段,加入不同浓度的蔗糖(Wang *et al.* 2001),可以帮助去核。另外,有人用长波激发光染料如 X-罗丹明-微管蛋白指示剂以及 Sybr14 示核法帮助去(Dominko *et al.* 2000)核,这些染料对卵母细胞的毒害小。但操作起来可能比较麻烦。

B 盲吸法:最初利用 Hoechst33342 示核建立去核经验,之后采用盲吸法去核,去核的效率也在 90% 以上。不需要荧光,也避免了 Hoechst33342 可能对卵母细胞的不利影响(Lai and Prather 2003)。

C 化学法:上述两种方法虽然常用,但每次只能处理一个卵母细胞,而且操作的技能要求高,

去除的胞质体积大,对卵母细胞常常造成机械性的伤害。有人利用一些化学试剂在卵母细胞成熟期间添加到成熟液中,造成卵母细胞分裂,分离的动力系统发生改变,使得中期板和极体一同排出,从而达到去核的目的。目前,人们在小鼠,猪上进行了尝试,并且已经获得了克隆后代。用于化学去核的物质和方案主要有(Li *et al.* 2004):Etoposide+CHX,DC+CHX,Democolcine+sucrose 等组合(Savard *et al.* 2004)。这种方法可以成批处理卵母细胞。我们实验室利用这种方法在小鼠上进行了尝试,已获得发明专利(杜卫华 2004)。

D 离心法:由于卵母细胞核与细胞质,极体之间的质量不同,可以利用梯度离心法处理,细胞核,极体一同排出。但还没有见到获得克隆后代的报道(Savard *et al.* 2004)。

E 功能法:目前,使用较少。利用物理或化学处理,使卵母细胞的核变性,失去功能。从而达到类似去核的目的。韩国的科研人员(Kim *et al.* 2004)用 X-射线照射牛卵母细胞,这种非机械法去核得到的克隆囊胚率以及胚胎细胞遗传学,核型以及微管组成都和常规机械法处理没有太大的区别。

F 半卵法:用显微分割刀将卵母细胞一分为二,选择无核物质的一半,同供核体细胞融合重组胚胎。这也是绵羊首次胚胎克隆成功(Willadsen 1986)应用的方法。缺点是卵胞质去除体积量大,机械伤害也大,如果将两个无核物质的半卵同一个体细胞重构卵,则造成浪费。现今此方法使用较少。

G 末期去核法(Baguisi *et al.* 1999):在减数分裂第二次成熟分裂的末期,以第二极体为指示,去除与其相邻的部分胞质,去除的胞质少,效率高。可以获得后代。

H 极化显微镜法:可以不用任何染料,普通光路下即可看到清晰的极体以及中期板,在小鼠和水牛上已经进行了尝试,但没有关于成活克隆后代的报道。

I 挤压法:在卵母细胞成熟的一定阶段,如在牛的卵母细胞体外培养 16-17 个小时,在多数卵的第一极体即将排出的时候,在极体附近挑破透明带,然后挤压使极体排出,由于此时极体尚未完全与中期板分开,从而可以带着相邻的核一同排出。这种方法已经在牛,猪上进行了尝试,并且取得了成功(Hyun *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003)。

1.3.5 融合与激活方法:

电激活 电刺激可产生显著的跨膜 Ca^{2+} 内流。一般认为短而高的直流电脉冲可导致真核生物物质膜脂双层不稳定。这种可逆的不稳定使得质膜瞬间产生小孔洞,便于细胞内外离子和大分子的交换。孔洞的大小受质膜电位变化,脉冲时程,培养液离子强度以及细胞类型等多个因素影响。质膜在温度高时恢复快,这与膜脂和蛋白质的流动性有关,也因细胞种类而异。在细胞外 Ca^{2+} 存在时,电穿孔可在多种动物上诱导卵母细胞活化。如兔卵被刺激激活的效果取决于操作液中 Ca^{2+} 的有无,这表明是 Ca^{2+} 内流而非电刺激本身具有直接的激活作用。根据在核移植前或后进行激活而分为融合前激活,融合激活,融合后激活。A 融合前激活:万能受体,首例体细胞克隆山羊就是通过这种方案取得(Baguisi *et al.* 1999)成功的。B 融合同时激活; C 融合后激活:多数研究都是采用 B,C 两种方法得到克隆后代的,尤其认为融合后激活法,可以使供核与卵胞质充分的相互作用,有利于供核的重新程序化(Wilmot *et al.* 2002)。Wells 等(1999)在克隆牛研究中比较了 3 者对重组胚发育的影响。发现:在融合后延迟激活,增加休眠期供体细胞核曝露在受体卵胞质的时间,1-3

级囊胚率显著高于融合与激活同时。他们认为这样的处理可能促进了供体核的重编程。

化学激活 常用于化学激活的试剂有 7%乙醇:把需激活的重组卵放入含 7%乙醇的培养液中,在 37℃,CO₂ 培养箱中处理 5min 或室温下处理 7min,洗净后进行培养; Ionomycin(离子霉素):使用浓度为 5mol/L,处理时间为 4-5min; ,钙离子载体 23187:使用浓度 5mol/L,处理时间 5min; 6-DMAP 使用浓度 1.9-2mmol/L,处理时间为 3h-5h 或更长; 或者将 Cycloheximide(放线菌酮)与上述试剂联合使用(王敏康 2000)。人们在猪上还使用了二硫苏糖醇(DTT),柳硫汞等(Tao *et al.* 1999)进行激活。

激活处理策略

单纯的化学激活剂之间联合处理:重组卵融合后先培养 2—3 个小时,再用含钙离子载体 23187 或 Ionomycin 的培养液滴处理 5 分钟,然后再移入含 6-DMAP 或 CHX 的培养液滴处理 3-5 个小时或更长。应用此方案已经有人在山羊、牛、绵羊以及猪(Betthausen *et al.* 2000)的体细胞克隆上用此方案获得成功。

电刺激结合化学激活:先以电刺激激活,然后再放入含 CHX 的培养液滴培养一段时间,进一步维持 MPF 活性处于低水平。为了减少重编程期间对供核染色体的过度作用。一般是作用 3-5h 后放入不含 CHX 的相同培养液滴中培养。已有研究表明电激活结合化学处理,可以提高重组胚的发育力(Roh and Hwang 2002)。

重组胚的激活是哺乳动物核移植成功的关键环节之一。上述的激活方案中最为常用的是电刺激诱导融合,在融合的同时往往就完成了激活,而且电激活法比较简单,容易操作。有人认为电激活的效率低,而且电激活常常依赖于卵母细胞成熟后时间。化学激活的应用使克隆的效率得到显著提高。郭继彤等(2002)用离子霉素联合 6-DMAP 激活山羊克隆胚胎,获得了较高的激活率,而且还得到了克隆后代。Loi 等证明,采用离子霉素处理重构胚后再用 6-DMAP 处理 3h,可避免出现 PCC,并且明显增加羊重组胚的发育率和克隆后代出生率。

激活后处理

有人认为,已经融合的重组卵可在含 5 或 7.5μg/ml 的 CB 培养液中预培养 1-3h,然后再移入不含 CB 的培养液中继续培养,这样可提高一些动物胚胎如羊和鼠的发育率。Knott JG 等的研究表明了猪精子因子对牛 SCNT 胚胎激活及发育有支持作用。

目前比较流行的电激活仪器是美国 BTX 公司的 ECM2001 细胞融合仪,0.5mm 或者 1mm 电极宽度的融合槽。而融合/激活液一般有 0.25~0.3M 的甘露醇或者 0.25M 山梨醇,含 0.05~1.0mM CaCl₂,0.1mM MgCl₂,0.5mM HEPES,0.03%BSA。和 Zimmermann's 融合液。因物种不同而电场强参数也有差异。在猪上电刺激的场强一般在 100~200V/mm,一个或多个持续 30~100 微秒不等的直流脉冲激发。

1.3.6 胚胎的培养:

体外系统:和体内胚比较,体外生产的胚胎染色体倍型的异常率高出许多,rRNA 基因的活性明显不同,许多蛋白质因子基因的表达情况存在差异。体外培养系统的缺陷也是导致胚胎吸收,死亡,流产,死胎或出生后死亡,以及胎儿过大综合症的一个重要的原因。经过人们不断深入的探索,随着对胚胎早期发育对环境的需求及自身的代谢特征的认识不断增加,根据不同发育阶段营

养和代谢特征的不同,一些序列培养系统得以建立(表 1.1),如序列培养基 G-III 胚胎培养液广泛应用于各种动物重构胚的培养而且效果都很好。

发育阻滞是胚胎体外培养中存在的一个主要困难,用体细胞作为饲养层或用体细胞条件培养液是克服发育阻滞的主要方法,即共培养。通常用输卵管上皮细胞,颗粒细胞或胎鼠成纤维细胞等作为胚胎培养饲养层或制作条件培养液。培养基中的能量,氨基酸,维生素,无机盐等以及 pH 值,渗透压等都对胚胎发育有深远的影响。

体外培养主要是将重组胚放到培养液内,置于 CO₂ 培养箱中,5%CO₂, 95%空气或 5%CO₂,88%N₂,7%O₂,100%湿度,37℃~39℃,进行培养。使用的培养基有含血清或 BSA(牛血清白蛋白)的或者是无蛋白的化学限定培养基。在猪上,最常用的是 NCSU-23+0.4%BSA 了(Lai and Prather 2003),有人开发了 PZM-3+0.3%BSA, PZM-4+0.4%PVA 等新的培养基(Yoshioka *et al.* 2002)。有研究认为,培养气相中氧分压低对胚胎的体外发育有利,因为低氧条件下活性氧自由基少,对重构胚的氧化损伤较轻。

表 1.1 不同动物重组胚培养基

动物	培养基	培养温度	液滴体积
小鼠	CZB/TE/mM16/HECM/KSOM	37℃	10-20 μ l
大鼠	R ₁ ECM	37℃	100-500 μ l
兔	RD/M199/M2	38-39℃	50-100 μ l
牛	CR1aa/M199/SOFaa/IVD101	39℃	50-100 μ l
猪	NCSU23/NCSU37/PZM,	39℃	50-100 μ l
羊	M199/G3/SOFaa	39℃	50-100 μ l
猫	CR1aa/MK1	38℃	50-100 μ l

体外培养使用的培养系统主要是微滴培养。此外,还有人建立了培养无透明带重组胚的孔中孔(Well-to-Well, WOW)(Vajta G, 2000)法和玻璃输卵管(Glass oviduct,GO)(Thouas G,2003)和等新的培养策略。试验发现,后两种方法可以提高胚胎的发育质量。在猪上有人使用流体培养法进行卵母细胞成熟以及胚胎培养。早先,还有人尝试过建立一种不用 CO₂ 培养箱的培养体系。

1.3.7 胚胎移植:

重组克隆胚胎在体外发育至一定阶段,就可以移植到同期发情处理过的代孕母体输卵管或子宫内。牛,小鼠,山羊,绵羊等主要在囊胚期移植到子宫内。而猪则是在 2 细胞或 4-8 细胞阶段移植到输卵管内,而且移植的质量好的胚胎数量不能少于 4 枚。目前在大家畜上,非手术法移植技术已经成熟,而在一些中小家畜上如山羊,猪还处于初级阶段。有意思的是,在这两种动物上,或许是克隆胚胎较早就进行了移植,体外培养时间较短,克隆后代出现的各种生长异常就比较少。再者,如今随着克隆技术的不断发展,牛克隆胚胎产量不断增加,成本的降低九要求在进行移植时尽量减少移植的胚胎数量。

由于克隆胚胎的生长动力学和天然的体内胚不同,往往表现为发育迟滞,所以在开展胚胎移植时,如何掌握好受体动物的发情时间,确定移植最佳时机就显得比较重要。如在猪上,人们认为将胚胎移植给比供体发情稍迟 1d-2d 的受体,妊娠率比较高。也就是“老胚胎(old embryo)”和

“年轻子宫(young uterus)”的兼容性比“年轻胚胎(young embryo)”与“老子宫(old uterus)”之间要好(Hazeleger and Kemp 2001)。

1.3.8 妊娠期监护与分娩护理:

为了使移植代孕母体的胚胎能够顺利安全的维持怀孕状态,还要对其进行一些保护处理如外源激素 hCG 和 PMSG 注射,维持黄体功能。增加营养,适当运动。

1.4 异种体细胞克隆

由于珍稀濒危动物种群数量有限,生殖细胞和胚胎的数量少,基础生殖生理学研究不够深入。所以用来自同种动物的卵母细胞进行克隆保种就存在很多问题。于是人们就把目光转向用比较容易得到的其它种动物(如牛和兔的卵母细胞)卵母细胞作为受体,尝试种间体细胞核移植的可能性。1999 年,Dominko 等把绵羊、猪、猴和大鼠体细胞核移植到牛卵母细胞中,构建的核移植胚胎能够在体外发育到囊胚(Dominko *et al.* 1999)。White 等把一种亚洲盘羊的皮肤成纤维细胞分别与家牛和绵羊的去核卵母细胞融合产生了核移植胚胎,其中与羊卵母细胞融合产生的胚胎 80%可以发育到 16 细胞期-32 细胞期,把其中的 28 个胚胎植入 6 个受体绵羊中,有 1 个怀孕到 59 天。Loi P 等(2001)将从死后的欧洲盘羊获得的颗粒细胞注入到去核的一种家养绵羊的卵母细胞,再将发育到囊胚阶段的克隆胚移植给代孕绵羊,有两头妊娠,并获得一个明显正常的存活后代。Westhusin 等(2001)将狗的体细胞移入到牛的卵母细胞中构建重组卵,有 38%的分裂至 2 细胞-4 细胞期,43%的分裂至 8 细胞-16 细胞期,将 47 枚这样的重组胚移植给 4 条代孕母狗,其中有一条怀孕至 20 天。陈大元等(1999)将体外培养的大熊猫骨骼肌,子宫上皮和乳腺细胞分别作为供体核移入家兔的去核卵母细胞中构建种间重组胚,体外培养获得孵化囊胚。刘冀琰采用新鲜分离的小鼠卵丘细胞直接注入到受体牛的去核卵母细胞中,经激活后体外培养,结果有 57%的重组胚可进行分裂。同年,他将 4℃冷藏 1d-7d 的大熊猫体细胞移入 TII 期去核的牛卵母细胞中,经电融合构建重组卵,发育到囊胚期的比例达 18%。我们实验室利用牦牛和羚牛的体细胞作供体,黄牛的卵母细胞作受体进行了异种克隆的尝试。得到囊胚没有问题,但移植的胚胎没有发育满期而分娩的。

1.5 我国的体细胞克隆简介:

在多莉诞生之后,我国的科学家奋起直追,经过不懈努力,我国的体细胞克隆研究,尤其在牛(Chen *et al.* 2003; 陈大元等, 2003),山羊(郭继彤等, 2002; 王玉阁等, 1999)上达到了国际先进水平,在利用体细胞生产转基因牛(Gong *et al.* 2004),转基因山羊(Wang *et al.* 1999)上取得了令世人瞩目的成就。最近,我们实验室在世界上首次克隆出了转岩藻糖基因,转人乳铁基因,转溶菌酶基因等各种转基因牛,此外,我们成功的获得了加拿大政府赠给前总理朱镕基的种公牛‘龙’的克隆后代:大隆和二隆(龚国春 2004)。另外,我国在异种动物克隆方面也处于世界前列。我们实验室和中科院动物所陈大元研究组分别在牦牛(李彦欣 2004),大熊猫(杨彩侠 2004)等珍稀物种的异种克隆方面取得了可喜的进展(陈大元 2000);上海二医大的盛惠珍教授的课题组,在世界上首次利用人兔异种克隆胚胎分离建立了胚胎干细胞系(陈莹等, 2003)。但应该看到,我们国家在猪、

绵羊、小鼠等动物的克隆上还和美国、英国、日本、韩国、德国、法国以及新西兰等国家存在很大的差距；目前,在我国大陆本土成功克隆的只有山羊与牛，尚未获得体细胞克隆猪。最近，有消息称广西大学石德顺教授课题组成功获得水牛的克隆后代，这也是世界上首例水牛成功的报道。

第二节 猪卵母细胞体外成熟和胚胎体外培养研究进展

现代胚胎生物技术在农业、医学以及生物学基础研究方面已经或者正在发挥非常大的作用。而猪的胚胎工程更是为畜牧业上品种改良,培育抗病猪种,提高肉质,生产环保型猪;为医学研究如生产转基因或者基因组修饰猪,制备人类疾病模型,为器官移植提供异源器官,生产药物蛋白等以及为研究发育机理如解决早期妊娠阶段胚胎大量死亡等提供了一个现实可行的技术平台(Lai and Prather 2003)。卵母细胞体外成熟和胚胎体外培养是胚胎工程的重要组成部分(Coy and Romar 2002)。体外成熟卵母细胞受精后支持发育的能力比体内卵差,说明了体外成熟培养条件还远没有达到体内的生理水平(Sun and Nagai 2003)。体内胚在体外培养后,胚胎质量明显不如体内发育,也说明了胚胎的体外培养条件不如体内的真实环境(Abeydeera *et al.* 1998)。

卵母细胞处于体外胚胎生产的上游环节,因此其质量优劣则很大程度上决定了后期的结果是否理想。而优质卵母细胞功能要想得以最大限度的发挥,还要依赖于体外培养条件的优化。正是出于这些考虑,许多的研究者纷纷把目光主要放在如何解决好这一难题。

2.1 卵母细胞体外成熟

卵母细胞质量的好坏,最直接的体现是支持后期发育和产生后代的效率上。现有成熟方案在支持卵母细胞核成熟上达到了我们预期的水平,但是在细胞质成熟上还有很大的变数,不稳定,不理想。影响卵母细胞成熟的主要因素如下所述。

卵母细胞来源:当前最常见的是从屠宰场取卵巢,然后从卵巢上直径为 3-6mm 的卵泡中获取卵丘细胞—卵母细胞复合体;初情期前青年母猪卵巢卵母细胞体外成熟后可以得到 IVP 后代,但效率不如经产母猪卵巢体外成熟母细胞。即使是性成熟后还没有怀孕经历,但是发情周期渐趋正常的青年母猪其卵母细胞在支持后期发育上也比初情期前青年母猪好(Coy and Romar 2002)。

Hyun SH 等(2003)认为经产猪比初情期前母猪卵好,但是 Kuhholzer 等(2000)等认为 SCNT 时经产母猪以及初情期前母猪卵对发育影响不大;有人发现超排初情期前母猪卵 IVF 发育及活力不如初情期后的成年母猪或者经产母猪卵。在成熟前后,初情期前母猪卵质直径都比成年猪卵的小;来自初情期前母猪卵的孤雌激活胚以及核移植胚的囊胚率都比成年猪的低;这说明,初情期前母猪卵发育能力弱可能是细胞质成熟不完全所致;其直径小也暗示绝大部分卵正处于生长阶段,且胞质未成熟;如何建立更好的成熟方案来充分利用屠宰场丰富的资源是摆在研究者面前诱人而富有挑战性的课题。

卵泡中 COCs 的获取方式:目前主要有抽吸法和手术刀片切割法。对二者进行比较的研究比较少,但是也有人认为后者好于前者,因为刀片切割收获的卵成熟后核成熟以及卵裂率都高于抽吸法(Coy and Romar 2002)。

卵巢的运输,保存温度:常规方法是从屠宰场取得卵巢后,放入含抗生素(青霉素+链霉素)的生理盐水中,28-35℃,2h 内运回实验室开始下一步试验。曾经有人在牛上报道过,把牛的卵巢放在 10℃保存 12h 后 IVM 以及支持后期发育的能力没有受到明显影响。Pimprapar Wongsrikeao 比

较了把猪卵巢分别在 4℃、15℃、25℃和 35℃保存 0h,3 h,6 h 和 9h 后 IVM 后核成熟,IVF 后受精卵发育以及卵泡液 pH 值的变化。发现在 35℃保存,pH 值随保存时间延长而下降,表示凋亡的 DNA 片段化增加;而保存 35℃6 h,9 h 或 12h 则卵成熟率显著降低;保存在 4℃、15℃、25℃、35℃中 6h,发现超过 15℃保存 pH 值下降,DNA 片段化卵增加;4℃保存的卵巢卵没有能到达 MII 的;15℃处理组 IVF 受精率以及胚胎发育下降;不过和 25℃,35℃处理组没有明显差别;所以 25℃-35℃保存 6h 仍可以有效维持猪卵的发育能力;尽管发育率比 35℃保存 3h 低; Tong 等(2004)研究了屠宰过程中,体内温度升高对猪卵母细胞体外成熟以及孤雌激活之后发育的影响;因为在有些屠宰场屠宰过程会有一段时间用热水烫刚处死的猪(30min 左右),使猪的体内温度升高到 41-42℃;这种温度升高对猪卵的成熟以及发育的影响有: IVM 后第一极体形成正常;而免疫细胞化学染色发现细胞骨架破坏严重;成熟卵在孤雌激活后发育能力急剧下降;

卵泡大小: 卵胞质减数分裂到完全成熟以及随后支持发育的潜力都随着卵泡的生长而获得。 Machal R 等比较了来自小卵泡 (<3mm), 中等卵泡 (3-5mm) 和大卵泡 (>5mm)的卵成熟效果。发现直径小于 3mm 卵泡来源的卵母细胞减数分裂成熟能力不完全,细胞质也不足以支持受精卵进一步发育(Marchal *et al.* 2002)。

如前所述,卵的质量是 IVP 成功的关键,而体外成熟培养所用的培养基则是提供优质成熟卵的保障。和体外培养相关的如培养基成分,培养外部环境如气相条件等都是人们乐此不疲进行改良的目标。

基础培养基:较普遍应用的主要有 NCSU-23(无 BSA)(Coy *et al.* 1999), TCM199(Lai and Prather 2003)和 NCSU-37(Funahashi and Day 1997)。根据添加成分中是否有胎牛血清或蛋白复合物如卵泡液而区分为非化学限定培养基和化学半限定培养基,完全限定培养基。研究表明在基础培养基中添加激素,生长因子,维生素,能量低物,渗透压调节剂,卵泡液等对卵母细胞成熟质量有较大影响。而完全限定培养基有助于研究添加成分的真实作用,利于寻找培养成熟的最佳条件和减少实验室间的差异(Kishida *et al.* 2004; Yoshioka *et al.* 2002)。

在培养基中添加 pFF、EGF 对卵母细胞的成熟以及后期发育有利。如今在各种培养液中都不约而同的添加了它们。在培养基中添加激素如 FSH/LH 或者 hCG/PMSG 等也是很多研究组使用的方法。添加 FSH、LH 卵成熟高于未添加组;添加 EGF,核成熟未有明显改善(Abeydeera *et al.* 1998),但是 MPN 形成却明显提高,说明添加生长因子确实促进了细胞质成熟

在体内,成熟卵的排出是在排卵前促黄体素 LH 峰值出现之后的 38-42h。因此,人们进行体外成熟培养时一般也控制在这个时间。不过有的研究只培养 24h 就进行下一步试验(Miyoshi *et al.* 2002),此时 MII 期的卵占 30%左右。培养 36h 左右,大部分卵就已经到 MII 期。当然,为了更好的使细胞质也成熟,也有人尝试过将培养时间延长到 48h 甚至 50h。

此外,在成熟基础液中添加其它物质,如分子量小的硫化合物,L-半胱氨酸,外源性谷胱甘肽等都对改善原核形成有利。说明这些物质在一定浓度和环境下可以提高细胞质成熟的质量(Day 2000)。

Omran 等 (2004)研究了不同大小卵泡取得的卵泡液对卵母细胞成熟的影响以及卵泡液和 FSH 之间的互作。发现当没有 FSH 存在时,来自 5-8mm 直径卵泡的大卵泡液可以促进改善卵丘细胞扩散, COCs 核成熟率明显高于小卵泡液(2-4mm 直径);而添加 FSH 后,大小卵泡液对卵丘扩散,核成熟影响相当。 Schoevers EJ 等发现 FSH 可以促进经产母猪卵母细胞的核,质成熟。

从卵裂率和囊胚率来看,在卵母细胞成熟培养的前 20 h 添加 FSH 最好。

由于屠宰场猪卵巢上卵泡大小不一,即使从 3-6mm 直径卵泡中获取 COCs 之后再经挑选,此时的卵发育时期也不一致。所以,有人在体外培养的第一个阶段 20-22h 内在 NCSU37 培养液中添加 dbcAMP 以使 GV 期 COCs 同步,然后在第二阶段 20-22h 内撤去 dbcAMP 可以显著提高成熟质量,有利于改善原核形成率。现在日本的研究者多喜欢用这种方法。

此外,有人尝试在培养液中添加 IGF-1,发现对卵母细胞的核成熟以及随后的发育都没有明显的促进作用,但此前的报道得到相反的结果(Xia *et al.* 1994)。最近有报道称在牛卵成熟时添加 BDGF 可以改善后期发育,但是前期的核成熟却受到损害。有研究表明体外成熟时添加 EAA 和 NEAA 对后期发育有利。已知卵胞质内 GSH 含量可以作为评价卵细胞质成熟程度的一个指标。所以在成熟液中添加能促进 GSH 合成或者减少其降解的物质,或许可以改善后期发育。在成熟液中添加 L-半胱氨酸就是个成功的例子。此外,人们发现添加外源的 GSH 也有助于促进细胞质成熟。

培养气相:体外培养时 COCs 所处的环境和体内生理环境大相径庭,而卵母细胞为了更好的生存,势必会调动一些机制来适应,负担增加,精力分散后也势必影响最后的成熟。由于体内卵所处环境氧浓度比空气中的分压低得多。因此,有人尝试利用低氧分压,在 CO₂ 培养箱中培养 COCs。卵母细胞的核成熟受影响不明显,但体外受精以及孤雌激活胚都得到了不错的后期发育(Karja *et al.* 2004)。当然,目前这方面还有争议,如有人就认为高氧时 IVF 胚发育好。因此,有必要开展更深入的研究。为了减少体外培养期间活性氧自由基的损伤,还可以在成熟液中添加一些抗氧化的物质,如维生素 C 和维生素 E 等。陶勇(陶勇 2004)用猪的裸卵开展体外成熟,比较了添加 Vc、Ve 后卵母细胞内的凋亡发生情况,发现添加相应浓度的 Vc、Ve 后,活性氧损伤确实降低。但是在其研究中没有进一步跟踪后期发育情况。

有研究利用添加有机分子,降低无机盐如 NaCl 的量以调节成熟液的渗透压也取得了较好的效果。如在 Whitten's medium 中添加山梨醇,囊胚率显著提高。有机分子的添加,可以更好的保持细胞内的离子强度,即使在细胞外有较高浓度的 NaCl 存在。添加小分子硫化化合物如 12.5 或者 25 μ M 的 β -巯基乙醇也可以显著提高胞质内 GSH 含量,提高后期囊胚发育率(Day *et al.* 1999)。

卵丘细胞:在有腔卵泡中包裹在卵母细胞周围的一群紧紧挨在一起的颗粒细胞;在一定程度上,卵丘扩展可以作为卵母细胞核、胞质成熟是否成功的一个标志。排卵前,卵丘细胞支持卵母细胞成熟,排卵期间,帮助卵母细胞进入输卵管,排卵后不久,参与精子接近卵子的复杂的调控机制;在人上,授精前,去除卵丘细胞可以提高生殖力差的卵母细胞的受精能力;但在猪和牛,IVF 前去除卵丘,使精子穿透率和/或雄原核形成下降;卵母细胞成熟期间卵丘对卵子及其四周的卵泡细胞之间的细胞间通讯,有着非常重要的意义。卵丘参与使卵阻滞在减数分裂前期 I,而后在排卵时刺激其恢复减数分裂;卵丘细胞通过间隙连接在卵丘之间,卵与卵丘之间相互通讯;在牛上,IVM 之前如果去除卵丘,则卵母细胞成熟会受到破坏;因此认为卵丘在卵母细胞成熟上有如下作用:使卵子维持在成熟分裂阻滞;参与诱导减数分裂恢复;支持细胞质成熟;这些关键作用的发挥得益于其精密的间隙连接网络,以及其特异的代谢能力;而在受精时期可以帮助吸引,捕获以及选择精子入卵;促进精子获能,顶体反应以及精子穿透防止透明带硬化。在猪上也进行了裸卵受精研究。在开始培养时就脱去卵丘或培养 24 小时脱去卵丘的处理组,发现胚胎卵裂率显著降低,也都不能发育到囊胚;研究表明,卵母细胞上带有卵丘细胞(成熟培养以及体外受精期间)对

支持卵母细胞核成熟,受精以及随后的发育都非常重要;尤其 IVF 时,有卵丘细胞的卵促进了胚胎的发育。

有一些研究尝试着将 COCs 和卵泡壳(Shell)细胞共同培养(Day *et al.* 1999),发现可以提高卵成熟质量,显著促进后期囊胚形成。检查发现此方案成熟卵胞质内 GSH 含量高。但尚不知其确切的作用机制。不过有人推测可能卵泡壳细胞(follicle shell)参与维持处于卵丘细胞和卵母细胞之间的通讯连接,然后借助这种通讯方式交换信息,再将成熟液中的 GSH 合成前体 L-半胱氨酸运送到胞质内。

2.2 胚胎培养:

早期人们在进行猪体内胚体外培养时常常遇到 4 细胞阻滞。随着异体输卵管培养,体细胞共培养,添加输卵管液等改进的方法相继建立,4 细胞阻滞问题在一定程度上得到了克服。

猪胚胎体外培养液有:Modified Whitten's medium,mWM, North Carolina state university 23 medium, NCSU-23;Iowa state university medium, ISU; Beltsville embryo culture medium 3, BECM-3;G1/G2 sequential culture medium; Synthetic oviductal fluid, SOF; Porcine zygote medium, PZM; HEPES buffered NCSU-23;

体外培养猪胚胎发育比体内胚胎发育差,主要可能是由于受卵母细胞成熟质量尤其是细胞质成熟不足所致(Day *et al.* 1999)。近来发现,体外培养可以在一定程度上影响胚胎的后期发育。体内胚在体外培养发育效果明显不如体内的事实,十分明白的告诉我们胚胎的体外培养体系还不十分完美(Suboptimal),还需要继续深入研究并建立更好更接近生理环境的培养系统。

不同类型的胚胎可能会有不同的营养需求,因此可能会对培养基表现有选择性。已经发现牛的体外受精胚和克隆胚在体外培养时就是如此(Mastromonaco *et al.* 2004)。小鼠克隆胚胎对带有体细胞特征的培养基比较适应(Gao *et al.* 2003)。这也提醒我们,在探索猪克隆胚最适培养基时先利用孤雌激活胚或者体外受精胚做预试验的做法可能需要重新考虑。

上述不同培养基建立的依据都是来自猪输卵管内生理环境中所含的各类物质的大致水平。但有些非常微量却可能扮演重要角色的物质常被忽略掉。输卵管内氧含量较低,促使一些研究者在体外设计培养基的配套培养气相时首选低氧来进行。在多种动物上的试验似乎有一个得到多数研究支持的认识,即低氧条件下胚胎发育质量要比在高氧条件下好。原因可能是高氧条件下活性氧自由基对胚胎的损伤也大。而对于 NCSU-23,目前使用最为流行的猪胚胎培养基,究竟是何种氧分压下成熟效果好呢?比较有争议。但是对于 PZM-3 和 PZM-4 新开发的猪胚胎培养基,多数研究认为在低氧条件下效果优于高氧条件。而且,在 IVF 胚胎,SCNT 胚胎培养上,PZM-3 培养所得囊胚质量显著好于 NCSU-23,不管氧分压高低。低氧有利于胚胎早期发育缘于 H_2O_2 产生量下降;DNA 片断化减轻;胚胎发育改善。

最近,有研究比较了 NCSU-23 和在人上比较成功的一种序贯分阶段培养的培养基 G1.2/G2.2 在培养猪 IVF 胚上的效果(Swain *et al.* 2001)。发现序列分阶段培养基可以在不降低胚胎发育的基础上支持猪胚胎体外发育,但是效果不如 NCSU-23。

在牛、小鼠、大鼠上的研究表明培养液中葡萄糖浓度高对早期胚胎发育不利。在猪上表现不明显(Medvedev *et al.* 2004)。但是,如果降低葡萄糖浓度,同时再添加一些其它的能量底物如乳

酸盐/丙酮酸盐,早先的研究认为不利于胚胎。尤其是在前几个细胞周期中,乳酸盐/丙酮酸盐对胚胎发育不利。但是,PZM 的成功却与此相矛盾。Swain 等(2002)研究了早期胚胎的能量代谢,发现所有猪胚胎在发育阶段都大量利用葡萄糖糖酵解获得能量。IVP 胚胎到 8 细胞期糖酵解活性显著增加,而体内胚则是在囊胚期才开始明显增加,糖酵解率比体外胚高。通过三羧酸循环利用葡萄糖则是在囊胚期显著增加。另外猪 IVP 胚胎在整个发育阶段利用 Glutamine 的量比较一致。而体内胚在 8 细胞之后利用 Glutamine 增加;所有胚胎利用乳酸盐都比较少,而囊胚后显著增加。体内胚三羧酸循环利用乳酸盐, Glutamine 以及葡萄糖比体外胚高。由此,可以看出现有的体外培养条件改变了猪胚胎的新陈代谢活动,而这极有可能导致胚胎存活力下降。最近 Im 等(2005)在胚胎培养液添加山梨醇或者蔗糖,增加 PZM-3 渗透压处理胚胎 48h 提高了卵裂率,囊胚率,减轻了碎裂的发生。

已知在体外胚,孤雌胚或者克隆胚的体外培养期间,在培养液中添加生长因子如 EGF(Cui and Kim 2003), PAF(Lee *et al.* 2004)以及 mGM-CSF(Cui *et al.* 2004)可以提高后期囊胚发育质量和发育率。IGF-I 通过改变凋亡相关基因(Cui *et al.* 2005)减轻猪孤雌激活胚胎体外发育中的凋亡发生 2 细胞胚胎,在 BSA 有或无时添加 10 或者 100ng/ml 到 NCSU23 并没有明显改善孤雌囊胚发育率;但是,在有 BSA 时,IGF-I 增加了囊胚的细胞数;同样,IGF-I 自己不影响囊胚凋亡,而和 BSA 联合时,却能减轻凋亡发生;RT-PCR 分析发现,IGF-I 明显使与凋亡相关的基因 mRNA 表达比例(Fas/Bcl-xL 和 Bak/Bcl-xL)降低;在猪孤雌激活胚中,IGF-I 能协同 BSA 作为有丝分裂原以及凋亡存活因子。体外培养时,培养基中添加 GnRH 拮抗剂(Nam *et al.* 2005)可以促进胚胎囊胚形成,IVF 胚胎质量提高;多胺可以抑制猪孤雌激活胚胎的凋亡从而使胚胎净存活力提高(Cui and Kim 2005)

当然,也有一些物质添加后没有起到促进作用,甚至还产生对发育不利的负面作用(Van Thuan *et al.* 2002)。非极性氨基酸如缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸以及甲硫氨酸在开始 48h 添加严重阻碍分裂的发生以及抑制越过 4 细胞的发育;NEAA 在 4 细胞之后添加可以创造一个囊胚扩张较理想的条件(33%)开始 48h 培养时添加非极性氨基酸造成 4 细胞发育阻滞;

我们在开展猪的克隆胚和孤雌胚体外培养时,尝试了添加胰岛素或者白血病抑制因子(LIF)。结果卵母细胞成熟,后期发育都没有明显的改善。此前,有研究报道在牛上和小鼠上早期胚胎培养添加胰岛素有利,而添加 LIF 不利于胚胎发育,甚至造成不利。

猪胚胎早期培养开始时添加血清可能会不利于胚胎发育,但是在培养后期如胚胎培养的第 4 天(受精时为 0 天),在培养液中添加 10%的 FBS (对照组为含 BSA 的无血清 NCSU-23),到培养的第 6 天,将优质囊胚用 OPS 法冷冻。解冻后,把胚胎在含 10%FBS 的培养液中恢复 18 h。发现与无血清培养组相比,添加 FBS 培养的胚胎冷冻/解冻后存活能力提高,而且细胞数增加。本研究进一步证实了在猪体外生产胚胎过程中添加 FBS 有利于提高囊胚的耐冻性。另外,有研究显示,添加血清有利于促进后期囊胚的孵化。

第三节 体细胞克隆相关机理研究现状

在克隆成功的动物名单上,物种在不断增加;人们在不断尝试各种新的克隆方法,改进,简化克隆操作的各个步骤;曾经被认为很难克隆的动物逐一被成功克隆。但我们不得不承认:目前的体细胞克隆成功率仍然很低,如果按照出生后代占操作的卵母细胞数来算,大概只有不到 4%的效率(Wilmut *et al.* 2002)。尽管各个实验室之间在技术方案上存在差异,尽管大家普遍认为是体细胞核的重新程序化,尤其是表观遗传的重新程序化不彻底可能是导致克隆胚胎在各个发育时期死亡,流产,胎儿畸形等的主要原因。我们知道胚胎干细胞作供核时,克隆动物的出生率和成活率会提高 1-2 倍,然而遗憾的是现在在家畜上真正意义上的胚胎干细胞系还很有限(Hochedlinger and Jaenisch 2003)。于是,很多从事克隆研究的实验室也把目光投向了克隆相关机理的研究,希望通过增加对机理的了解,提高克隆效率,减少后代发生死亡,异常表型的机会。

3.1 供核体细胞与受体卵母细胞的细胞周期协调:

由于第一个成功进行体细胞克隆的研究者将其成功的主要原因归结为使用了血清饥饿的方法诱导供核体细胞进入休眠期 (G0) (Wilmut *et al.* 1997),所以其他的很多研究都纷纷效仿。但是,也有人这么认为。经试验证实,血清饥饿至 G0 期并不是取得克隆成功所必需的。人们利用 G1 期(Urakawa *et al.* 2004),G2/M(Lai *et al.* 2002),M(Zhou *et al.* 2001)期的体细胞也纷纷得到了克隆的后代。不用血清饥饿,而是随机选择正处于分裂期的细胞,或者利用接触抑制以及化学试剂诱导同期获得 G0/G1 期细胞等也获得了克隆的成功。克隆绵羊多莉的主要制作者之一 Campbell KH 博士也说:我一直很谨慎的说 G0 期细胞对克隆有利,但没说其它时期的细胞就不能得到克隆动物(Aldhous 2000)。

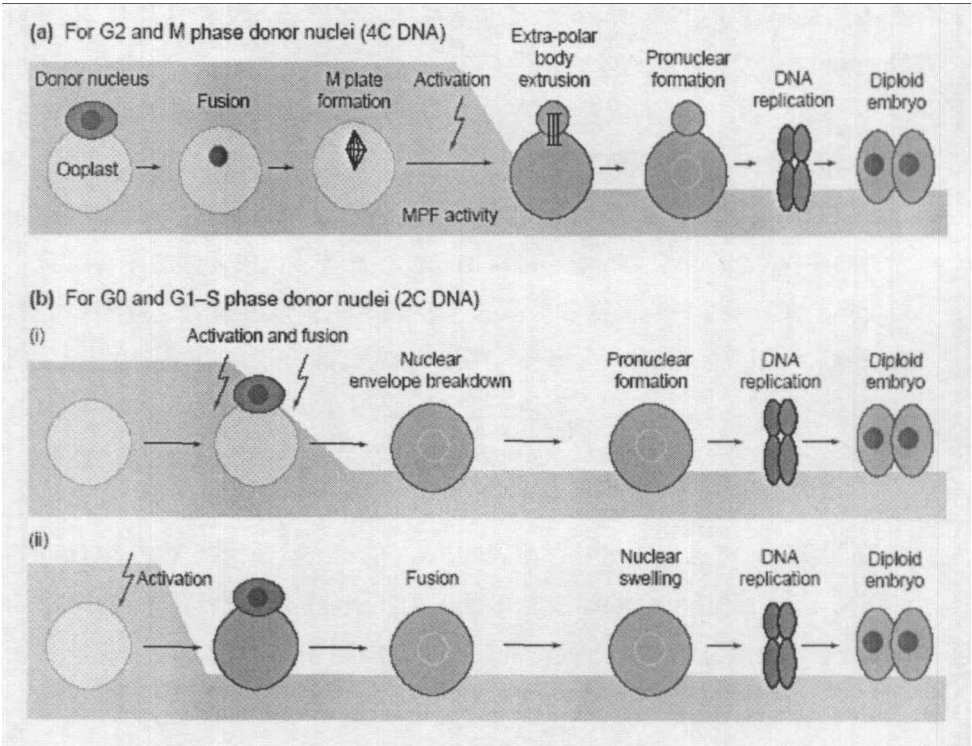


图 3.1 供体—受体细胞周期协调维持胚胎正常的染色体倍性

a 先融合后激活,当供体为 G2/M 时可以排出极体以维持倍性正常;b 先激活再融合,万能受体可以接受来自任一周期阶段的细胞. 摘自 Kono T 1997.

卵母细胞中的有丝分裂/成熟/中期促进因子 (Mitosis/Maturation/metaphase promote factors,MPF) 对供核细胞在胞质中的构型变化起着非常重要的作用(Campbell 1999)。MI 期和 MII 期的卵胞质中 MPF 水平相对较高,体细胞处于高水平的 MPF 环境中,将会发生核膜破裂与早熟染色体凝集等现象,然后启动 DNA 复制。供核体细胞与受体卵胞质的细胞周期同步协调将对重组卵/胚胎的后续发育产生深远的影响。激活的卵母细胞,MPF 下降,此时的供核体细胞不论处于细胞周期的哪个阶段,移植到卵胞质中都可以正常进行后续的细胞生长,增殖事件。此种胞质受体被成为“万能受体”(Universal recipient) (Campbell 2002; Campbell *et al.* 1996)。高水平的 MPF 可能对供核的重新程序化有益。但此时的体细胞只能是来自除了 S 期之外的其他时期的细胞。供核在这种环境下发生核膜破裂 (nuclear envelope breakdown,NEBD) 和早熟染色体凝集 (Premature chromosome condense,PCC),发生活跃的核质间物质交换(Kono 1997)。但这种受体对供核 DNA 的损伤也很大(Tani *et al.* 2001)。不过 MPF 和 MAPK 在供核的重新程序化方面可能不是最关键的调节者(Tani *et al.* 2003)。

鉴于此,很多研究往往在融合之后,适当延长核质相互作用时间(Wells *et al.* 1999)。另外对于 G2/M₁ 期的供核,与此种受体重组卵/胚胎之后,含一套遗传物质的类极体结构的排出也很重要,因此在激活液中不能添加抑制类极体结构排出的试剂(Wakayama and Yanagimachi 2001)从而使克隆胚胎的染色体倍性保持正常。

3.2 卵母细胞:

Peura 等研究了卵母细胞提供者的营养状况对绵羊重组胚发育的影响(Peura *et al.* 2003)。发现高营养组在妊娠率,附植的胎儿显著优于低营养组。高营养组胎儿发育到期比低营养组多,但统计学上不显著。卵母细胞的来源及其体外成熟的质量严重影响克隆效率。在猪上的研究表明,来自体内的卵母细胞比体外成熟的卵重组胚发育明显好些。另外来自性成熟母畜提供的卵也似乎比初情期前的母畜提供的卵在支持供核的重新程序化上有显著的优势(Hyun *et al.* 2003)。

不同物种的卵母细胞内一些影响细胞分裂的动力结构与细胞核之间的相对位置不尽相同,在去核操作过程中,这些物质去除的量可能会影响克隆胚胎的发育。如在灵长动物卵母细胞去核时,在去核时往往会连同 NuMA,HSET 等影响纺锤体功能的蛋白质去除,导致克隆胚胎的分裂不能正常进行。研究者认为,人的繁殖性克隆可能也会遇到类似的问题(Simerly *et al.* 2003)。但是,最近,韩国的科学家在 Science 上发表文章声称利用人的克隆胚胎获得了胚胎干细胞系(Hwang *et al.* 2004)。这起码说明,在人上,获得早期克隆囊胚的难度,或许不象灵长动物克隆那样大。有意思的是,最近 Simerly 等(2004)和韩国科学家合作已经可以得到猴的克隆囊胚了。

3.3 体细胞来源:

从体细胞克隆成功那一天开始,人们就产生了一个疑问,克隆的成功究竟是来自终末分化的体细胞,还是来自分布于体细胞群体中不到 5% 的体干细胞? 究竟那些细胞的克隆效率最高? 现在普遍认为,随着细胞分化程度的增加,细胞的克隆效率下降。动物有机体有 200 多种细胞类型,现在得到克隆后代的不过十多种(Oback and Wells 2002)。用早期胚胎卵裂球细胞,或胚胎干细胞作供核,克隆效率,得到胎儿的比率是一般的体细胞作供核时的 2 倍还多,克隆后代的异常也少得

多。因此,有人认为,如果单纯的进行优良性状家畜个体的扩群,还不如就用早期胚胎卵裂球细胞作供核。

3.4 体细胞克隆效率:

目前,描述克隆效率的方法主要有两种(Yanagimachi 2002)。一为出生存活后代和总的操作卵数之间的比值,参考 Wilmut 研究组(Wilmut and Peterson 2002)统计按照出生健康后代和总操作卵之间的比值计算,各种动物的总克隆效率分别是,牛大致在 0-5%,绵羊为 0.4-4.3%,山羊为 0.7-7.2%,小鼠为 0.2-5.8%,猫为 0.3%,兔 0.3%,大鼠为 0.2%,猪为 0.1-0.9%,骡子为 0.9%,马为 0.2%;二为出生存活后代和移植给代孕母亲的胚胎数之间的比值。当然,后一种比前一种得到的效率高。但是,有些研究中不是把所有的克隆胚胎都移植给代孕母亲,许多只选部分进行移植。所以,前一种方法也不尽合理。再者,鉴于如今克隆技术的囊胚率已经赶上甚至超过体外受精和人工授精,而且在猪和山羊,猫等的克隆时,研究人员偏好用早期也就是 8 细胞之前的胚胎进行移植。所以,在体外发育的囊胚率参考性就不比以前了。

猪被认为是比较难以进行体细胞克隆的动物之一。原因除了克隆技术本身相关的技术之外,还因为猪的卵母细胞体外成熟尤其是细胞质的成熟不理想。再者,猪的早期胚胎妊娠信号的建立必需有不少于 4 个优质胚胎的参与(Polejaeva *et al.* 2000)。令人高兴的是美国科学家最近成功建立了猪卵母细胞,早期胚胎的 cDNA 文库,将为研究猪早期胚胎发育的相关分子机制提供一个较好工具,尤其是猪克隆效率仍然很低的时候,尽快开展在猪上的早期发育机理研究将有助于我们更深入的了解猪的生理特征,建立起更适合猪的一些操作方案。猪的胚胎移植技术目前还没有完善的非手术法建立。而已经成功应用于牛胚胎的常规冷冻技术在猪上的效果还不令人满意。尽管如此,人们还是在 2000 年同时看到 3 家实验室宣布克隆猪的诞生。

首先宣布这一消息的是 PPL 公司旗下的科研小组(Polejaeva *et al.* 2000)。他们利用连续核移植的方法,同时避免不必要的人工激活,获得了猪的克隆后代。但是,遗憾的是他们的文章在日本 Onishi 等(2000)之后才得以发表。Onishi 等利用了和夏威夷大学克隆小鼠相似的胚胎构建方案获得一头克隆猪。然而这两篇文章都是利用了体内超排所得的卵母细胞获得后代的。就在这一年早些时候, Betthauser J 等(2000)则完全改良了克隆猪的方案,得到了从体外成熟卵母细胞来的克隆猪后代。这一研究所采用的方案后来广为流行。

猪的IVP效率这些年已经取得了很大进步,尽管多精受精现象严重以及雄原核形成率低仍然严重限制该技术的推广。如今,猪的IVM/IVF胚胎的囊胚率处于10-30%,产生后代的效率约为20-35%(Nagashima *et al.* 2003)。Yoshioka 等(2002)利用新开发的化学限定培养基PZM-3培养体外受精的胚胎,囊胚率约为42-66%;而NCSU-23培养的IVF胚胎囊胚率为6-12%。将99枚胚胎移植给6个受体母猪,30d后有5头怀孕,直到分娩,共产下33个小猪(33/99, 33.3%),有24头存活(24/99, 24.2%)。Betthauser J 等(2000)得到的IVF囊胚率为19%(270/1401),孤雌激活囊胚发育率为23% (235/1028)而核移植囊胚率为7% (72/995)。

猪的孤雌激活胚胎的囊胚发育率一般为20-60%(Lee *et al.* 2004; Zhu *et al.* 2002); 移植给受体后最长可以怀孕到第55d,到现在还没有得到孤雌生殖成活后代。

猪的体细胞核移植胚胎的早期发育率如卵裂率一般在30-90%,而囊胚发育在5-40%;胚胎移植

后产子存活率在0.3%-0.9%。从如下的研究中可以看出(表3.1)。

Lai 等(2002)等首次获得敲除 α -1,3, GalT 的克隆猪。虽然效率很低。在 Prather RS 研究组(Lai and Prather 2003), 利用 IVM 卵母细胞为受体, 胎儿成纤维细胞供体, 运用电刺激激活。则克隆胚胎在体外培养 24-36h 卵裂率为 60-80%; 7d 后囊胚率 10-40%, 囊胚总细胞数在 25-35%。胚胎移植后, 25d 怀孕率为 50-80%; 大部分胎儿在 25d 和 45d 之间发生死亡; 胎儿也逐渐退化并最终消失。大约 20-30% 的代孕母猪可以怀孕到期, 并生下后代。Lee 等(2003)利用全细胞注射法得到了克隆猪, 不过在生活了 4 个月后, 4 头克隆猪不明原因突然死亡。他们共采集了 1036 个卵母细胞, 去核成功 893 枚, 注射了 801 枚, 培养 718 枚胚胎, 取 685 枚胚胎移植给 9 头受体猪, 6 头怀孕 (6/9, 67%), 3 头到期分娩产下 4 头小猪 (4/685, 0.59%)。Walker 等(2002) 的高效率克隆猪研究, 将 511 枚克隆胚胎移植给 5 头受体, 第 28d 怀孕率为 100%, 4 头母猪怀孕到期分娩, 产下 28 头克隆小猪 (28/511, 5.5%)。

第四节 猪的体细胞克隆方案

4.1 供体细胞

目前,流行的做法(Lai and Prather 2003)是用怀孕 24-70d 的胎儿建立胎儿成纤维细胞系。因为来自胎儿的成纤维细胞系在体外培养增值周期比来自成年动物的时间长,活力旺盛。而且成纤维细胞培养比较容易。其次,人们还选用了卵丘/颗粒细胞作供体,这种细胞属于生殖系统,可能有利于在卵母细胞内脱分化。再者,还有人选用成年动物的皮肤成纤维细胞,生殖腺细胞,肾脏细胞,心脏细胞,星型胶质细胞得到了克隆猪的后代。虽然已经有资料(Zhu *et al.* 2004)显示猪的皮肤干细胞对克隆胚胎附植前早期发育有利如可提高囊胚率,但是还没有见到从其得到克隆后代的信息。

在猪的体细胞克隆上,供体细胞细胞周期同期化研究表明,血清饥饿以及接触抑制都是有效的方法(Boquest *et al.* 1999; Kues *et al.* 2000)。但是,如果延长血清饥饿时间到 2d 以后,细胞内 DNA 片段化—凋亡的前兆就会增多(Boquest *et al.* 1999; Kues *et al.* 2000)。猪的不同组织的细胞系对各种同期化方法敏感性不一致。当前,两种方法都得到了克隆后代。而 Lai 等(Lai *et al.* 2002)利用秋水仙碱同期处理供体细胞到 G2/M 期,也获得了克隆猪。这表明,血清饥饿不是获得克隆猪必需要做的。

体外培养条件对猪体细胞的生长特征有一定影响。我们的资料显示,在体外培养期间,频繁更换胎牛血清使细胞系衰老提前,染色体倍性变化。不同类型的细胞系在体外培养过程中传代,冻存/复苏要求的密度颗粒细胞都比成纤维细胞高。有资料显示,在低氧气相下培养猪的细胞可以使其体外生命周期延长(Harrison *et al.* 2004)。猪的胎儿成纤维细胞在体外培养条件一般是:基础培养基为 DMEM,然后添加 10-20%FCS, 1%非必需氨基酸,1%的 β -巯基乙醇;培养气相为 5%CO₂,不过也有人在进行基因打靶细胞培养时选用 3%的 CO₂;培养温度多数在 39℃,其次为 37℃;培养湿度:100%。

由于在猪上还没有建立起真正的胚胎干细胞系,体细胞克隆技术就成为当前条件下生产基因打靶猪的唯一途径。加之猪的胎儿成纤维细胞在体外培养的增值寿命没有牛的长。所以在转染后尽快筛选出阳性细胞就显得比较关键。但是,最近有研究(Watanabe *et al.* 2005)表明:在猪上,转基因之后,可以不去筛选,而直接挑取含报告基因—绿色荧光蛋白编码基因(蓝光激发下发绿色)细胞进行克隆,也能得到含目的基因的克隆猪。还有人用组织块刚消化下来的细胞进行转基因,经低浓度 puromycin 筛选,得到阳性细胞,进而构建克隆胚,移植后取得了成功。这样就为基因修饰相关操作多提供了一些时间。

来自同一细胞系的不同的阳性克隆株的克隆效率也不一致(Kuhholzer *et al.* 2001)。说明随机的基因转染导致了不同的遗传/表观遗传变化,进而影响了克隆效率。

4.2 受体卵母细胞

来源:最初的两例克隆猪用的都是体内冲取的超排成熟卵母细胞(Onishi *et al.* 2000; Polejaeva *et al.* 2000)。而 Betthauser 等(2000)使用的是体外成熟经产母猪卵母细胞。环顾取得克隆猪的试验,绝大多数都是用的经产母猪卵母细胞体外成熟后作为受体。已知体内成熟的卵母细胞比体外成熟的卵母细胞质量好;而经产母猪卵母细胞体外成熟后支持发育的能力也比初情期前小母猪的卵能力强。如今在屠宰场大规模屠宰的猪都是来自商品猪场,一般都是处于初情期以前的6月龄的青年母猪。的确,这些猪卵巢上的卵泡大小不一,尽管只抽取那些3-6mm直径的卵泡中的COCs,并选取胞质均匀,卵丘至少3层以上包裹致密的卵母细胞用来成熟。但也无法与经产母猪或体内卵的成熟质量相比,尤其是细胞质成熟方面。

4.3 卵母细胞成熟

由于猪是在体内正常情况下出现发情迹象后38h-42h左右开始排卵。所以人们在体外成熟时就按42-44h来培养。现有的成熟培养体系一般核成熟率,即成熟结束后第一极体排出率都已经可以保证在80%左右的水平了。但是,细胞质成熟不理想。这在猪的体外受精上表现的特别明显。细胞质成熟不理想导致雄原核形成率低。许多研究者纷纷尝试添加生长因子或细胞因子,激素,卵泡液,dbcAMP,L-半胱氨酸或者与卵泡壳细胞共培养等方法得到了一些积极的结果。尤其是在培养基中添加外源性的谷胱甘肽,可以提高卵母细胞支持后期发育的能力。因此,GSH在胞质内的含量已经被用作衡量细胞质成熟的标志。

现在应用于猪卵母细胞成熟的基础培养基有NCSU-23(不含BSA),NCSU-37,TCM199。有人(Hyun *et al.* 2003)比较了NCSU-23和TCM199两种培养基的效果。发现在卵核成熟上没有明显差异。

我们也分别尝试使用了NCSU-23,TCM199两种培养基,在核成熟方面二者差异不显著。但是在支持克隆胚后期发育上,后者明显不如前者。

猪的卵母细胞体外成熟所需时间比其它动物都长,一般在42-44h。所以,在如此长的时间内,如果一直维持相同浓度的激素水平,将对卵母细胞的成熟尤其是细胞质成熟不利。在添加hCG和PMSG(eCG)进行成熟培养时,一般只在第一阶段的20-22h内添加。而后面的20-22h不加。有人在FSH添加培养时,也发现前半段加,后半段不加对后期发育有利。Myoshi等(2002)利用成熟培养只有24h的卵母细胞也得到了克隆猪的后代?而Niemann研究组比较了成熟38h,40h和42h的卵母细胞作受体时克隆胚胎的发育情况。发现40hIVM比较好。还得到了1头克隆猪。我们比较了成熟38h和42h的卵母细胞,前者极体卵周隙较小,极体能见度不如后者。而且在操作后死亡率比后者高。虽然二者在支持克隆胚囊胚形成方面差异不显著。

Ikeda等(Ikeda and Takahashi 2001)比较了体外成熟33h和44h卵母细胞支持克隆胚发育的结果。前者显著优于后者,不论是克隆胚卵裂还是形成囊胚。

目前,在猪上只有首例(Polejaeva *et al.* 2000)成功的克隆研究中利用连续核移植方案,在构建二级克隆胚时使用了去除核遗传物质的受精卵—预先激活的万能受体。猪卵特别容易被激活(Polejaeva *et al.* 2000),因此在克隆胚激活之前,有效避免不必要的激活是很多实验室所追求的,他们分别采用先在不钙操作液中构建重构卵,无钙融合液中融合(De Sousa *et al.* 2002; Walker *et al.*

2002)。当然,提高融合液钙离子浓度从而激活重构胚,也得到了克隆猪(Lai and Prather 2003)。

4.4 体细胞克隆胚胎构建

4.4.1 卵母细胞去核:

人们已经用 Hoechst33342 指示去核法(Onishi *et al.* 2000),盲吸法(Lai and Prather 2003),挤压法(Lee *et al.* 2005)获得了克隆猪。而半卵法只得到转基因克隆囊胚;另外大规模的去核方法如离心法,化学法都还没有见进一步的报道。

4.4.2 重构卵方案:

主要有融合法,这是目前比较普遍使用的方法。其次是胞质内注射法,Onishi 等 (2000) 受克隆小鼠的启发,是首个借助 Piezo 装置获得克隆猪的小组;Lee JW 等 (2003)则未用 Piezo 方法直接将全细胞(不破坏细胞膜)注射到 MII 卵母细胞质内。改良了该法。上述两种方法已经成为当前克隆猪研究中的绝对主力。但值得指出的是,Vajta G 研究组正在尝试借助去透明带的 HMC 方案克隆猪。他们利用该法已经得到了转 GFP 克隆猪囊胚。

4.5 融合与激活

如前所述,猪卵容易被激活,所以为了保持 MII 卵胞质内的 MPF 活性,采用延迟激活,从而利于将来的重新程序化,其它动物如牛上的试验也表明延迟激活对克隆胚发育有利。有研究(Wells *et al.* 1999)主张利用 FBA(融合后激活,延迟激活)方案。分别进行融合(融合液中无钙或钙浓度很低)和激活(含钙融合/激活液)。用该方案已经成功获得了普通的或者基因打靶体细胞的克隆猪。另外一些研究者则采用融合同时激活的方法,即在融合液中同时添加高浓度钙离子,以在融合同时有效激活重构卵。另外有些研究则采用两步激活法,即第一次普通浓度的钙镁离子融合液在融合同时激活卵母细胞,第二次是判定融合之后,再一次于同一种融合液电击重构胚,以确保 MPF 活性降低。

电击融合激活时,融合液一般有含山梨醇的融合液 (0.25M Sorbitol, 0.1mM Mg^{2+} , 0.05-0.1mM Ca^{2+} , 0.01%BSA/PVA)(Betthausen *et al.* 2000), 含甘露醇的融合液(0.25-0.3M Mannitol, 0.1mM Mg^{2+} , 0.05-0.1mM Ca^{2+} , 0.01%BSA/PVA) (Lai and Prather 2003)。电击参数根据不同的方案,不同的电融合设备而不同。一般情况下,对 FBA:融合场强为 2.0kv/cm, 30-50 μ s, 1DC 脉冲或者 1.6kv/cm, 40-100 μ s, 1DC;激活时场强稍低为 1.2kv/cm, 30 μ s, 1DC 脉冲或者 1.0kv/cm, 30 μ s, 1DC;而对融合同时激活来说,高钙方案:2.0kv/cm, 30 μ s, 2DC 脉冲;两步激活:第一步, 2.0kv/cm, 30-50 μ s, 1DC 脉冲,第二步, 1.2kv/cm, 30 μ s, 1DC 脉冲。

日本的研究者将重构卵融合后放入含 5 μ g/ml 的 NCSU-23 中孵育 1.5h-3h 内才开始第二次激活。他们的理由是此处理对激活后原核的正常形成有利(Fujimura Dr. Tatsuya *et al.* 2004)。

有研究(Betthausen *et al.* 2000)则在电激活后,先将重构胚放入含 CB 或 DMAP 抑或 CHX 的 NCSU-23 中作用 3h-6h。从而巩固激活结果。但是,有资料(Kim *et al.* 2005)显示,虽然电激活

后 DMAP+NCSU23 预培养显著促进了囊胚发育,但是这些囊胚细胞中染色体倍性异常也有明显增加。

在猪的体细胞克隆中,Betthauser 等 (2000)就是利用化学激活法对克隆胚胎进行活化处理的。他们先把电融合了的重构胚放入到 $15\mu\text{M}$ 的离子霉素+NCSU23 中作用 20min,而后再于含 2mM 6DMAP 的 NCSU-23 中培养 4h。然后再把胚胎转移到 NCSU-23+4mg/ml BSA 中培养。

4.6 克隆胚胎的体外培养

如今成功应用于猪体细胞克隆胚胎移植中的培养基(Lai and Prather 2003)主要有 NCSU-23+4mg/mlBSA;PZM-3,一般是现在 CO_2 培养箱中的上述液体内培养一定时间,进行胚胎移植或者早期发育比较。

4.7 胚胎移植

在生产克隆猪的实践中,人们常常选择发育处于 1-4 细胞期的胚胎进行移植。尽量减少体外培养对后期发育所可能造成的不利影响。猪的胚胎移植中受体常常选择一些大于 8 月龄的后备母猪(Hyun *et al.* 2003)。胚胎移植受体母猪有选择药物处理同期发情的。也有选择自然发情母猪的。在猪的胚胎移植上,选择发情不完全同步,而是比胚胎稍迟 1d 发情的母猪做受体比较好(Brussow *et al.* 2000)。猪在正常情况下妊娠信号建立要求在子宫内至少不低于 4 个优质囊胚同时附植。而克隆胚胎的质量一般又不如体内胚,所以人们往往把大量的克隆胚一起移入受体输卵管或子宫内。此外,还有人将孤雌激活胚胎作为辅助胚胎和克隆胚一同移植来增强妊娠信号取得了成功。另外有人把克隆胚移植给已经自然配种过的猪。在猪上,发情后的第 11d-14d 往往容易发生妊娠信号减弱,所以,此时可以施以外源激素如 hCG 和 PMSG 或者雌激素等来维持黄体的功能。帮助胚胎度过这一难关(Betthauser *et al.* 2000)。

第五节 体细胞克隆动物与核重编程

为了提高克隆效率,得到更多更健康符合人们要求的克隆动物,人们一直没有放弃对克隆的追求。从技术层面到具体动物的生理基础方面,研究者们不断尝试,并且取得了一些突破。如在骡子克隆过程中, Woods 等(2003)设法将胚胎操作液,培养液中的钙离子浓度提高到骡子体内血液循环中的生理浓度,获得了克隆骡子的成功。Zhou Q 等(2003)利用 MG132 竞争性抑制 MPF 下降,从而延长大鼠卵母细胞在体外 MII 期阻滞的时间,为核移植显微操作赢得了足够的时间,获得了克隆大鼠后代。Hwang WS 等(2004)则改进了挤压去核法以及人胚胎早期培养系统,成功得到了人的克隆胚胎并发育到囊胚,从而成功的建立了人的胚胎干细胞系。而此前 Simerly 等(2003; 2004)根据他们在猴子上的试验推测现有克隆方案获得人的克隆干细胞也许和猴子一样困难。

在目前的条件下,获得克隆动物离不开卵母细胞。由于卵母细胞内的某些未知因子使体细胞能够从终末分化状态逆转为胚胎状态,重新启动个体发育程序,最终形成一个新的个体。所以,可以想象,为什么到目前,不管研究者利用哪一种体细胞作供体,得到的克隆效率都是非常接近的。虽然有人推测成体干细胞的克隆效率可能会比终末分化的细胞高。但是目前在牛和猪上的研究还缺乏有说服力的证据,尤其是猪上用皮肤体干细胞尚未得到克隆后代,尽管克隆胚胎的基因表达和 IVF 对照组非常接近(Zhu *et al.* 2004)。不过,供体的遗传背景可能对克隆效率有关键影响。纵观克隆牛的研究文献,不难发现日本黑毛和牛似乎是最容易被克隆的(Kato *et al.* 1998; Kato *et al.* 2000; Kubota *et al.* 2000)。

据不完全统计,目前世界上七大洲除了南极洲外都有克隆牛诞生。遍布 20 多个国家的 130 多家实验室在从事克隆研究,将近有 75%的研究组在开展家畜(牛,山羊,绵羊,猪)的克隆。不到 10%的小组则在从事小鼠的克隆研究,余下的研究组则开展另外 20 多种动物的克隆(Oback and Wells 2003)。这些克隆家畜的实验室没有哪两家的克隆技术,程序是完全一致的。因此,可以想象为何各个组得出的结果多少都会有些不同了。

如今,在各种克隆动物中,不论来自哪个研究组,都有很多相似的地方。那就是克隆牛在妊娠期流产率高,围产期死亡率高,出生后死亡率高。胎儿生长过大,胎盘发育异常,肾脏,肺脏,大脑,心脏,肝脏等多个器官不正常(Cibelli *et al.* 2002)。克隆牛的表型异常是报道最多的。与此不同的是山羊和猪的克隆后代出现生长发育不正常的案例较少(Rhind *et al.* 2003)。不过,这两年,猪的表型异常也在逐渐增多(Archer *et al.* 2003; Carter *et al.* 2002; Kolber-Simonds *et al.* 2004)。

那么,究竟是什么导致了这些反常表型的出现呢? 克隆小鼠的肥胖(Tamashiro *et al.* 2002)在其后代中没有再现,双拷贝 α -1,3GalT 失活的克隆猪异常表型(一只眼睛失明)也没有传给后代(Kolber-Simonds *et al.* 2004)。这提示我们,克隆动物所出现的各种不正常极有可能是发生在克隆-培养-怀孕各个时期表观遗传重新程序化的错误或者不充分所致,使得一些基因的表达时空模式发生改变,进而影响一些器官发育。

5.1 遗传学变化:

最近,Jaenisch R 研究组(Blelloch *et al.* 2004)利用小鼠畸胎瘤细胞作供体,发现在生产克隆囊

胚以及从这些囊胚分离胚胎干细胞建系时,效率都比较高。当把这些胚胎移入代孕母鼠体内发育时,尽管使用了四倍体胎盘补偿法也没有得到克隆后代。而且当进行肿瘤以及嵌合体形成检测时发现,后代细胞很象供体,容易发生肿瘤。而此前,该研究组利用黑色素瘤细胞(Hochedlinger *et al.* 2004)作供体,获得了胚胎干细胞再克隆,体内发育可以满期,产下成活后代。这一方面说明了有些癌症的发生可能是表观遗传学修饰变化所致,另一方面说明发生在遗传学水平上的变化,无法通过重新程序化来纠正。细胞在体外培养过程中,因应于各种应激而会发生一些染色体水平或者基因水平上的变化,甚至突变,这都可能导致胚胎在早期发生死亡或后期异常。而由于供体细胞和受体卵细胞周期上的不相容,可能导致染色体发生错误分离或者断裂(Campbell *et al.* 1996)。Bureau 等 (2003)证实,携带大量染色体条数不正常的颗粒细胞得到的胚胎出现染色体异常的机率也大大多于正常细胞得到的克隆胚胎。用这些颗粒细胞进行的克隆胚胎移植后没有得到克隆后代,相反,用正常成纤维细胞却得到了后代。说明供体细胞的染色体异常对克隆的效率有着极大的影响。Shi W 等(2004)也发现在家兔上,克隆胚胎形成后有丝分裂的错误足以导致克隆失败。Koo 等(2002)比较了牛克隆胚胎,体外受精胚胎与体内囊胚内细胞团以及滋养层细胞数。发现在克隆的囊胚和体外受精囊胚的总细胞数以及 TE 数都明显少于体内囊胚。而 ICM 却相当。这表明 SCNT 胚胎囊胚期 TE 细胞数较少可能会导致形成较小的胎盘,最终造成胎儿死亡。他们最近(Koo *et al.* 2004)又对猪的克隆胚,体外受精胚,体内胚囊胚总细胞数以及 ICM,TE 细胞所占比重进行了比较,发现 IVF 和 SCNT 囊胚的总细胞数明显比体内胚少,而且 ICM:TE 比例也没有体内胚的高。说明猪的 SCNT 和 IVF 胚在体外发育能力也在一定程度上决定了其在体内的发育力不高。

有意思的是,细胞有活力与否并不是 SCNT 成功所绝对必需的。从一个死亡 18-24h 的成年雌性绵羊分离其卵巢上没有活力的细胞作供核,获得了成活的总体来讲正常的后代(Loi *et al.* 2001)。另外用加热变性(55℃-75℃)的颗粒细胞可在 SCNT 后,重新激活,发育到囊胚,并可进一步获得存活的后代(Loi *et al.* 2002)。

不过,自发永生化的牛乳腺上皮不能支持重构胚的发育,尽管染色体分析显示多数细胞核拥有正常核型。仅仅有非常少的克隆胚能发育到 12-16 细胞期(Atabay *et al.* 2003)。还不清楚永生细胞不能被重新程序化是否是因为遗传或表观遗传的原因而造成的。

5.2 端粒和端粒酶:

端粒是位于染色体上的特异 DNA 蛋白质复合体,在体内外,随细胞的分裂,端粒在后代细胞中逐渐缩短。真核线性染色体末端的重复非编码 DNA 序列,保护染色体不发生降解,促进染色体 DNA 复制的完成,引导核内染色体定位,保持染色体的稳定。端粒长度的进行性缩短最终将导致细胞 DNA 复制能力损失,细胞衰老。Schaetzlein 等(2004)研究了胚胎期端粒长度调节;检测了克隆牛,小鼠早期胚胎端粒,端粒酶。发现胚胎期克隆牛端粒长度恢复,不管其供体细胞的端粒长短;胚胎期端粒延长是端粒酶依赖的,因为,端粒酶缺陷的小鼠不能发生;端粒长度决定于桑椹胚到囊胚过渡期内,由端粒酶所控制的机制;来自成体成纤维或胎儿成纤维细胞的克隆桑椹胚端粒比 IVF 或体内桑椹胚都显著缩短了;而与体内或 IVF 相应胚胎相比,克隆囊胚中有很强的端粒酶活性上调,(比之于桑椹胚)恢复克隆囊胚中端粒长度;不过与同龄对照比,在胎儿或成体细胞克隆牛 1-2 岁时,没有发现端粒长度的延长了,;因此,取决于物种的复杂的端粒重塑和端粒酶调

控(发生在核重编程期间)可能调节克隆后代的端粒长度;

世界上第一个体细胞克隆动物:绵羊“Dolly”的端粒丢失了约 20%(Shiels *et al.* 1999),在其出生后 5 年,开始出现骨关节炎症状,使人们产生了克隆动物是否继承其祖先细胞缩短的端粒,并最终导致早衰及所可能发生的发育问题这样的疑问。

但随后的研究打消了人们的疑虑。在克隆牛上的研究表明,SCNT 后端粒长度可以被矫正。来自培养体细胞的克隆牛胎儿,成年牛与同龄对照没有明显的差异,有时候,可能更长一些(Betts *et al.* 2001; Jeon *et al.* 2005; Kato *et al.* 2000; Schaetzlein *et al.* 2004; Tian *et al.* 2000)。再者端粒长度与出生后克隆的存活能力并无直接相关。克隆胚胎端粒酶活性在附植前发育过程中逐渐增加,到囊胚期增加明显。不过,与 IVF 胚胎相比,克隆胚胎端粒酶活性的出现推迟,IVF 胚胎 8-16 细胞期端粒酶活性水平相对较高。利用接近衰老的牛胎儿细胞作为供核时,端粒长度和细胞寿命在克隆后代得以恢复甚至延长(Lanza *et al.* 2000)。

在小鼠上,连续克隆 6 代之后,也没有发现端粒缩短的迹象。不过,克隆小鼠的寿命因供体细胞种类不同而各异(Wakayama *et al.* 1998)。最近的一篇报道指出(Clark *et al.* 2003),从克隆动物身上分离细胞进行培养,再克隆,发现新的细胞系具有和供体细胞系相同的增殖能力和端粒缩短率,端粒和端粒酶活性以及细胞增值期限都是受物种本身固有的遗传特性决定的。

最近,Kubota 等(2004)对早先他们获得的克隆牛重新建立细胞系开展克隆,再克隆。其中第一代,第二代都得到了克隆后代,检查这些克隆,再克隆公牛的端粒,都在正常范围。不过,不知是何种原因,他们第三代再克隆牛没有成功。

Jeon HY 等(2005)对其研究组的克隆牛和克隆猪的端粒进行了检测。克隆或转基因猪,平均端粒长比核供体胎儿成纤维细胞以及同龄对照正常猪相比加长了;在克隆牛,没有发现端粒长度增加;在端粒酶活性方面,成年或新生猪和牛的供体细胞以及正常组织活性明显,而且猪的组织中端粒酶活性比牛组织中高;克隆牛犊以及猪崽端粒酶活性与其相应供体细胞相似;另外,正常猪与转基因克隆猪之间端粒酶活性无差别;但是,在猪 SCNT 囊胚,端粒酶活性比供体核以及体外受精胚胎囊胚有增加;认为用培养的胎儿成纤维细胞作供体得到的克隆猪,其端粒长度被重建或延长了。这和此前的一个关于克隆猪的端粒研究结果相似。Jiang 等(2004)研究克隆的转基因猪端粒长度,比较了克隆猪,自然繁殖的猪的心脏,肺脏,肝脏,肾脏,性腺,皮肤六大器官;不同器官,胎儿时期端粒长度保持不变;出生后呈组织特异型缩短;6 头 4 月龄克隆猪皮肤与同龄对照猪皮肤端粒无显著差异;2 头出生后就死亡的克隆猪皮肤端粒长度与其它存活的猪皮肤端粒长短相当;结果表明不同的组织端粒长短不同;端粒重新程序化在猪核移植过程后重建。

克隆动物的出生以及其它发育到成年强烈表明来自成年动物细胞的端粒可以在 SCNT 后很大程度上得以恢复,尽管对其机制了解不多。因此,目前,还很难确定区分成体克隆动物的健康问题是否是克隆程序本身固有的还是有其它的因素如遗传背景或环境影响所造成的(Shi *et al.* 2003)。

克隆动物端粒长度的恢复归因于早在克隆胚囊胚期发生的重新程序化的端粒酶活性。从肌肉细胞,输卵管细胞,乳腺上皮细胞及耳部皮肤细胞得到的克隆牛上发现端粒长度存在显著的变异(Miyashita *et al.* 2002)。上皮细胞克隆牛犊端粒长度明显短于同龄对照。而肌肉细胞及成纤维细胞似乎具有正常的端粒长度,因而,端粒的变化可能是由于端粒酶的细胞特异性的敏感性引起。

当然,体细胞(除上皮细胞之外)克隆动物端粒恢复或延长与“Dolly”及其它的一些克隆

动物不一致,可认为是供体细胞不同所引起的。有意思的一个解释是如果体细胞组织中有干细胞样的细胞或者相对未分化的细胞被选作供核,将可以导致克隆动物正常或延长的端粒。(Shi *et al.* 2003)不过至今还没有有效的技术对供核细胞的端粒状态进行追踪。

5.3 线粒体命运:

哺乳动物的线粒体 DNA (mtDNA) 大小约 16-17Kb,编码 13 种蛋白质,22 种 tRNAs 和 2 种 rRNAs。是细胞功能发挥的“动力工厂”。线粒体与衰老,凋亡,疾病以及一些重要的生产性状:产奶,产仔等有关。如果它出现异常,将会导致能量,ATP 等的产生异常,将影响到一些细胞内依赖 ATP 的基因表达调控,表观遗传学修饰的正常进行(Shi *et al.* 2003)。

核质互作主要是指线粒体和核的相互协调,是指导对供核进行重新程序化并发育到期的前提。只有当 mtDNA 编码的基因和核 DNA 编码的线粒体基因均正常表达并相互协调才能使线粒体生理功能正常行使。健康成活克隆动物的供核与受体线粒体的共存,说明线粒体异质性在一定程度上是可以耐受的(Steinborn *et al.* 2002)。但是,在那些出现异常的动物中,mtDNA 与核 DNA 的互作,mtDNA 与 mtDNA 的互作究竟是何种状态,人们还知之甚少。

体细胞克隆是通过将供核体细胞与受体卵母细胞融合或是将供核体细胞注射到卵母细胞内,形成重构胚,生产后代的无性繁殖技术。因此,克隆胚应该含有供体细胞,受体卵母细胞的线粒体。在克隆绵羊细胞质线粒体主要来自受体卵母细胞,而供体细胞的线粒体似乎在克隆胚胎最初几次卵裂期间逐渐迅速消失,到囊胚期几乎检测不到(Evans *et al.* 1999)。也有些供核体细胞线粒体与受体卵母细胞线粒体共存的例子(Steinborn *et al.* 2002; Takeda *et al.* 1999)。来自于遗传关系较近,物种间克隆的后代,线粒体也是仅来自受体卵母细胞(Meirelles *et al.* 2001)。但在尝试异种克隆大熊猫(Chen *et al.* 2002)的研究时有个让人惊奇的发现:胚胎附植前,在克隆胎儿的细胞中,来自大熊猫体细胞的线粒体占绝对优势,来自卵母细胞的母源线粒体很少,到附植之后就检测不到了。出现这种现象的原因可能是大熊猫与家兔遗传关系较远,来自大熊猫的体细胞供核支持大熊猫线粒体的生物发生,但不支持家兔卵的线粒体。该现象在远缘异种克隆中是否普遍还需要进一步的证实。不过,mtDNA 检测方法的敏感性也影响观察结果。我们课题组在异种克隆牦牛胚胎中发现供体与受体细胞 mtDNA 共存是在使用了 2 次 PCR 才发现的(未发表资料)。

5.4 表观遗传学重新程序化

5.4.1 DNA 甲基化:

普遍存在于哺乳动物中的 DNA 甲基化在决定细胞命运,细胞特异基因表达方面发挥着重要的作用。关于 DNA 甲基化在哺乳动物各个不同时期所扮演的十分重要的角色,最近有一些较大的综述(Meehan 2003; Santos *et al.* 2002),尤其是对早期发育如胚胎发育阶段,配子发生时期的作用进行了回顾和分析。此处不再赘述。本文仅就当前一个阶段人们在克隆动物方面得到的一些成果作一总结。

目前,人们已经在小鼠,牛克隆后代或胚胎附植前发育时期的全基因组甲基化,某些特定基因或序列的甲基化水平开展了研究,与正常的受精胚胎进行比较,发现了一些或许能解释克隆动物,

胚胎发育异常,克隆效率低的有价值线索。

在牛上,供核体细胞与去核卵母细胞融合后,主要由于被动去甲基化效率的降低,重组胚可能会产生无法辨别的亲本染色体甲基化模式,并且在后面的发育中继续维持体细胞模式。桑椹胚和囊胚期,染色体常染色质区域似乎频繁出现非甲基化,而异染色质区域仍保持比一般正常胚胎多的甲基化。克隆胚胎在整个附植前发育阶段,呈现出时间依赖性的甲基化事件异常可显著干扰表观遗传重新程序化,引起妊娠期间或出生后的生理异常(Bourc'his *et al.* 2001)。

韩国的研究人员发现,牛克隆胚胎在基因组许多区域都出现了高度异常的甲基化模式。克隆囊胚与供核体细胞基因组甲基化整体水平十分相似,而与 IVP 胚胎或体内胚囊胚相比差别很大。再者,Bov-B LINE 序列甲基化只有在正常胚胎中才有,在克隆胚胎中没有。供核细胞的体细胞型甲基化模式在克隆胚胎附植前发育期间没有被清除,所以说克隆胚胎出现的发育异常可能起因于供核体 DNA 表观遗传重新程序化不彻底。再者,卫星 1 序列甲基化异常发生在囊胚的 TE 细胞群内 (Lineage),可能与克隆牛的胎盘功能紊乱有关(Kang *et al.* 2001)。

正常情况下,在牛,大鼠和猪的受精卵中,父本的基因组都会发生主动去甲基化(Dean *et al.* 2001)。牛从合子开始发生卵裂到 8 细胞期这一段时间内,甲基化逐步减少;而在 16 细胞期胚胎则重新甲基化。对牛克隆胚来说,在 1 细胞期还呈现主动去甲基化,在后续的发育时期内进一步的去甲基化没有了(图 5.1)。另外,在许多克隆胚中重新甲基化都提前开始而形成类似与已分化细胞细胞核甲基化状态。在桑椹胚期,克隆胚胎的所有卵裂球细胞核都呈高度甲基化,而且和供核成纤维细胞

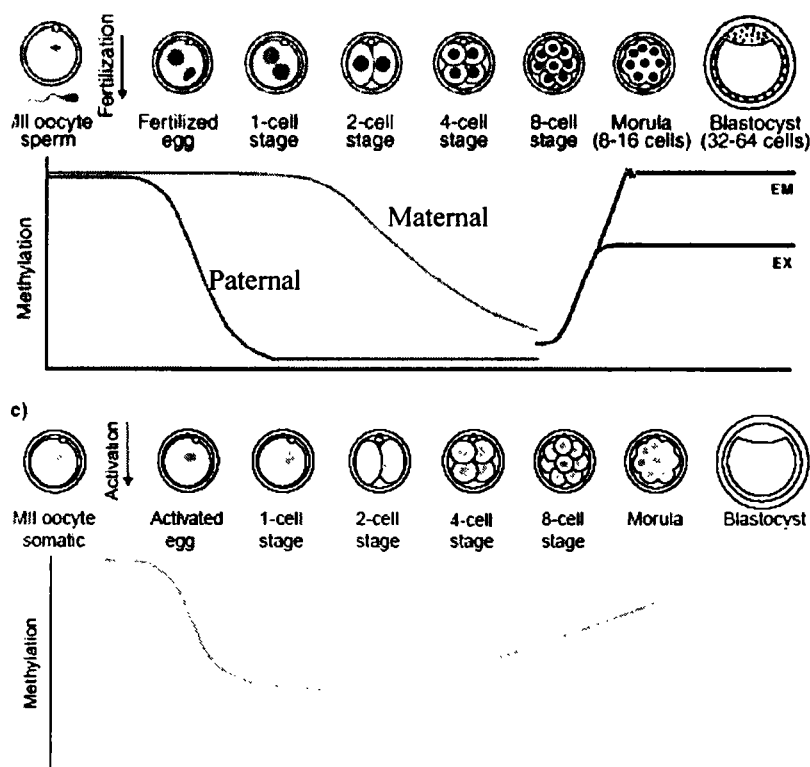


图 5.1 牛核移植胚胎与体外受精胚 DNA 甲基化模式示意图

Figure 5.1 schematic diagram of DNA methylation reprogramming pattern of bovine cloned embryos vs. IVP embryos. Dean *et al.*(Dean *et al.* 2003)

相近。而正常 IVF, AI 对照胚胎没发生这种情况。因此,在大多数克隆胚胎都发生了表观遗传重新程序化的异常,克隆胚胎的基因组似乎是由正常的和异常的甲基化序列组成的混合物。这也提示我们:重新程序化不彻底可能是引起克隆效率低下的主要原因。Cezar 等(2003)比较了 9 头自发流产克隆牛胎儿,7 头正常人工终止妊娠的克隆牛胎儿,4 头体外受精牛胎儿,6 头人工受精的牛胎儿,11 头成年克隆牛,4 头自然繁殖牛的全基因组甲基化。发现自发流产胎儿 DNA 甲基化严重

不足;而对那些存活的克隆胎儿其甲基化水平也呈显著下降趋势,和体内产生的胎儿比。但是在成年克隆牛和自然繁殖牛之间没有明显差异。这说明克隆牛的存活力和全基因组甲基化状态有密切关系。而 Kang 等则发现一个编码神经多肽 Galanin 的基因在克隆牛早期胚胎中可以精确的进行甲基化重编程,推测将来或许可以用来作为监测克隆胚胎质量的一个线索(Kang *et al.* 2003)。

Hiendleder Stefan 等 (2004)比较了妊娠 80d 得到的 AI, IVF 和 SCNT 胎儿。表型和全基因组胞嘧啶 5'甲基化水平之间的关系。SCNT 胎儿的肝脏甲基化程度比 AI 对照低的多。IVF 则介于其中。胎儿组织中甲基化水平低导致了 SCNT 和 IVF 胎儿表型异常。这与此前关于胎儿组织高度甲基化,胎盘甲基化水平造成了 SCNT 和 IVF 后代畸形的结论正好相反。 作者认为,这和他们采集胎儿的时间不同有一定的关系。而在小鼠上,日本的学者发现 *Sall3* 基因座位甲基化异常与克隆小鼠常见的一个异常表型胎盘过大有高度相关性(Ohgane *et al.* 2004)。

猪克隆胚胎在卵裂过程中,供体基因组的重复序列发生了典型的去甲基化,其模式和受精产生的对照胚胎相近。如在着丝粒和 PRE-1 SINE 序列,尽管在 4-8 细胞期,此二者甲基化均比 IVF 胚更广泛。显然,这还不足以排除其它 DNA 序列甲基化异常的可能。最近 Archer 等(2003)对正常克隆猪的 DNA 甲基化检测后发现个体之间还是存在很大的变异,虽然这种变异比起自然交配的群体要小。而且他们还发现克隆猪的 *PRE-1* SINE CpG13 过度甲基化。

当前,人们对频发于克隆动物甲基化重编程异常的根源尚缺乏足够的认识。当然,很多研究组已经开始注意与 DNA 甲基化有关的酶,如维持型甲基转移酶 Dnmt1,构建型甲基转移酶 Dnmt3a,3b 等。其中 Dnmt1 主要参与维持组织特异性甲基化模式。而 Dnmt1o(卵子特异性的 Dnmt1)则为附植前胚胎发育印记的维持所必需,在卵子和野生型附植前胚胎中可检测到。对 Dnmt3L(Dnmt3a,3b 的同型物)来说,虽然缺乏酶活性,但可以与 Dnmt3a,3b 互作来调节雌雄配子印记基因重新甲基化(Hata *et al.* 2002);与此相符,Dnmt3L 只出现在附植前胚胎和基因组印记建立时期的生殖细胞中。供体细胞含有 Dnmt1,但缺乏 Dnmt3L。因此,当把体细胞移入卵母细胞中,在重构的克隆胚胎中,体细胞核与早期胚胎卵胞质的预存的 DNA 甲基化体系这种不兼容可能是导致克隆动物甲基化重新程序化异常和发育畸形的一个原因。也许 Dnmt1o 和 Dnmt3L 可以作为 SCNT 重新程序化发生的信号(Li 2002)。最近 Kang 等(2005)研究牛附植前克隆胚胎在各发育时期的微卫星重复序列 I,II 和 α 甲基化水平变化。发现三个序列的表现不大一样:4-8 细胞期, α 序列快速恢复甲基化(类似被动的甲基化),而 I, II 两个微卫星重复序列没有这样的变化。说明体内,不同区域的甲基化监控机制不同,不是所有的微卫星序列都对甲基化有抵抗。 推测 8 细胞期是决定被动甲基化在克隆胚胎中是否正常进行的最初时期;有意思的是,在克隆囊胚中,同一微卫星序列在不同的区域有不同的甲基化水平;所以,在全基因组甲基化压力下,不同的各个微卫星序列可能具有不同的甲基化模式;提示存在甲基化局部调控机制调控早期牛胚胎的微卫星甲基化;鉴于已分化的供体细胞细胞核 DNA 往往呈现高度甲基化,而且在克隆胚中的去甲基化不足常导致后期发育失败,有人开始尝试用 DNA 甲基化转移酶抑制剂如 5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-dC)处理体细胞或许可以帮助提高克隆效率(Enright *et al.* 2003)。事实上,5-az-dC 处理后,确实可以使体细胞的 DNA 甲基化水平降低。但是,在随后的克隆胚胎上却没有显示出有什么特别之处。供体细胞在体外培养阶段进行血清饥饿处理,来自成年牛的成纤维细胞和来自胎儿的成纤维细胞甲基化水平无显著差异。不过成体成纤维细胞 DNA 甲

基化水平在饥饿前 2d 成立方增加,而到了 5-7d 又逐渐下降。有实际意义的是可以尝试建立一种短平快的细胞甲基化检测方法,以帮助提高克隆效率(Jones and Tarochione-Utt 2004)。

然而目前摆在我们面前还有很多问题,如我们还不知道究竟甲基化重编程多大程度上决定克隆后代的命运?克隆动物可以耐受何种水平的甲基化异常?有没有可能找到一个体细胞处理方案,使其降到一个可行的临界水平,从而保证有个较好的克隆结局?

5.4.2 基因组印记:

克隆动物最常见的表型异常有:胎盘畸形,胎儿过度生长及出生后死亡。用胚胎干细胞 (ES) 获得的克隆小鼠胎盘及胎儿体重增加,而通过 ES 聚合法或者注射法得到的后代没有这些表型,说明可能是克隆操作直接导致了这些异常(Rideout *et al.* 2001)。由于同样的异常表型也是自然地及定向地印记基因突变造成的特征表现,所以认为印记基因表达失常可能引起克隆动物畸形。不过,在存活的克隆山羊和猪的胎盘还没有发现这种异常(Wilmut *et al.* 2002)。

在哺乳动物中,父源和母源基因都是胚胎正常发育所必须的。他们功能上的不平衡是通过基因组印记调节的。所谓基因组印记是指特定基因的表达取决于其来源于父亲还是来源于母亲。父源基因组对胚外组织的发育相对更重要,而母源的基因

则对胚胎本身的发育影响更大(Mann 2001)。正常动物基因印记的周期循环如图 5.1 所示。至今,已经发现的在人和小鼠上大约 60 多个印记基因(Wells *et al.* 2004),这些基因可调控生殖,胎盘形成,能量平衡,泌乳以及行为有关的关键过程。牛 PGCs/生殖细胞印记改变的关键时期可能就在第 50 天左右(Shi *et al.* 2003)。

克隆动物的印记缺陷:

到目前为止,在哺乳动物上除了最近日本科学家报道了孤雌生殖小鼠(Kono *et al.* 2004)尚没有获得其它成活的孤雌生殖后代。Kono 等(2004)创造性的将印记基因修饰与核移植技术结合起来,最终获得了孤雌生殖的后代。猪的孤雌生殖后代在体内怀孕最长可以到第 55d(Zhu *et al.* 2002),但还都没有得到成活后代。

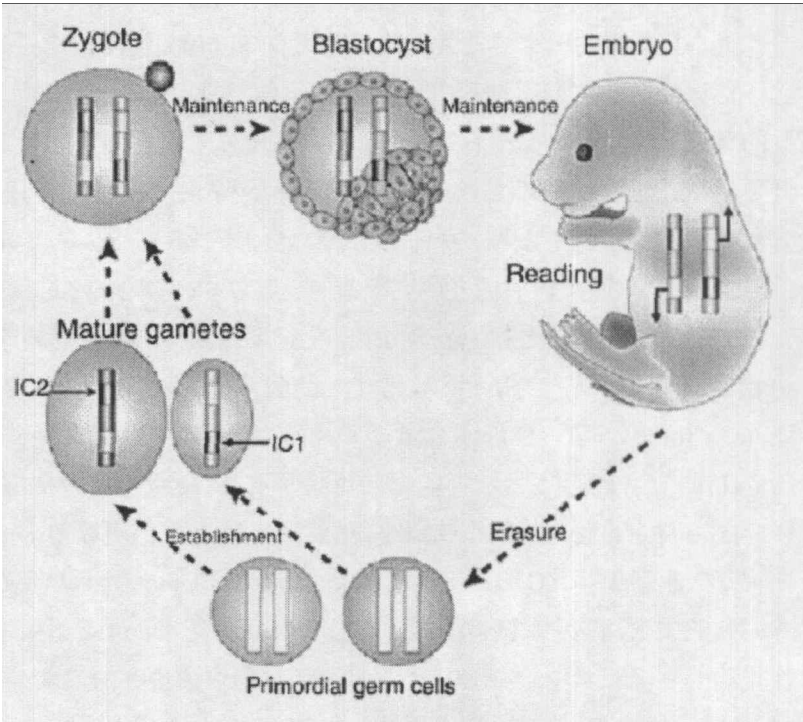


图 5.1 基因印记循环

Figure 5.1 the life cycle of imprints. Reik *et al.*(Reik *et al.* 2003)

由于在附植前发育过程中等位基因特异性的印记基因对基因组去甲基化有抵抗作用,所以预计体细胞核的印记基因在移入去核卵母细胞之后受到的影响不大。然而,不排除体细胞核所拥有的保护体系没有自然受精过程中形成的更有效。因此,有些情况之下有些印记也可能被去除,导致胎儿及胎盘生长不正常。DNA 甲基化和染色质的包装均已经被证明是印记标记,但对其形成及维持却知道的不多。故而将体细胞核移入去核卵后,印记基因差异甲基化区域(DMRs)的甲基化模式需要得到充分保护而不发生去甲基化,才能维持在克隆动物中印记的完整性。体细胞 SCNT 过程所导致的重新程序化可能干扰印记的正常维持,供体基因组也没有经历生殖细胞的重新程序化,它们在存活及体外操作期间积累的异常印记模式可能没有被擦除而传递给 NTE,这部分地解释了动物克隆的效率低的原因(Jeanisch *et al.* 2002)。

分析来自 ES 细胞的克隆动物的印记基因表达时,发现所有被检测的印记基因存在大量不同,即使有也只是少数可正常表达(Humpherys *et al.* 2002)。还没发现哪一个特殊的印记基因座位表达改变与其它印记座位表达有相关性,这表明印记基因表达失调归因于随机的过程。在一些克隆小鼠,并没有发现任何单个印记基因表达和异常胎儿过度生长程度之间有本质上的关联。但是克隆胎儿和胎盘过度生长可能由若干印记基因表达失调效应累加所导致,这些印记基因之间可能对胎儿生长有相反的影响。故而认为单个印记基因的作用不足以与生长失常发生实质上关联。

附植前胚胎体外操作或者非生理的胚胎培养环境可导致家畜胎儿发育程序出现故障,破坏卵子和供体细胞的印记基因表达,突出说明印记标记对环境影响的易感性。尤其在存活的克隆动物,印记基因频繁的错误表达也证明发育可以容忍印记的大量错误。该结论得到表达谱方法初步证据支持,该证据表明来自体细胞和 ES 细胞的克隆动物个体之间印记,非印记基因有很大变化。研究 SCNT 克隆动物表型异常是否可以追溯到具体的基因或重新程序化错误是否可导致许多基因的随机失调将很重要(Humpherys *et al.* 2001)。

在绵羊和牛上,LOS 可能因为胚胎体外培养尤其是在有血清或血清成分时,破坏 DMR2 甲基化及 IGF2R 的表达。同样的培养条件已被证实影响 H19 的印记状况。附植前胚胎在含血清的培养基中培养可影响若干与生长相关的印记基因的调控,从而导致胎儿生长发育异常(Khosla *et al.* 2001)。体外培养对基因表达的影响将在后面专门介绍。

不过,在包括人类在内的灵长动物中没有 IGF2R 印记(Shi *et al.* 2003)。IGF2R 在绵羊、猪、牛以及啮齿动物发育过程中建立印记。而一个单独的突变就可导致 IGF2R 基因沉默,而此时已经有一个等位基因灭活了。故此这几种动物由于 IGF2R 突变遭受的后果要比灵长类严重得多。由于许多克隆是由于 IGF2R 表达不正常而表现出分娩时出现 LOS,于是推测通过克隆获取的人克隆胚胎出现 LOS 的危险性可能降低,因为人类没有 IGF2R 印记。不过还不清楚 IGF2R 是否是造成胎儿过度生长的关键基因,尽管克隆动物和 Igf2r 敲除动物的表型非常接近。

Inoue 等(2002)分析克隆小鼠的印记基因后得到的结论是,所检测的印记基因在经过克隆后忠实的表达了。但是 Ogawa 等(2003)分析 8 个印记基因在克隆小鼠(胚胎干细胞为供体细胞)胚胎和胎盘中的表达情况,发现了 H19 和 IGF2 的异常表达以及 H19 和 IGF2R 基因的异常甲基化状态;而且还发现 IGF2 的异常表达可能导致了胚胎和胎盘的过度生长。在另一篇报道中也发现了 H19 和 IGF2 在胚胎和胎盘中的异常表达以及 H19 和 Snprn 基因的 DMR 区域的异常甲基化状态(Mann *et al.* 2003)。研究克隆羊中 H19-IGF2 和 IGF2R 基因,同样发现了 IGF2R 第 2 个内含子的 DMR 区域和 H19 上游含有多个 CTCF 结合位点的 DMR 区域的异常甲基化状

态(Young *et al.* 2003)由此可见, 印记基因位点的异常重编程可导致克隆动物的表型异常。在核移植动物中, 有关克隆动物表型异常是否与特定基因相联系, 以及供体核的异常重编程是否导致一些基因的随机异常表达的研究很重要。另外, 由于在雄性克隆动物上也常出现上述类似的异常表型, 不知该如何解释。

5.4.3 X-染色体失活:

一般地, 雌性哺乳动物个体细胞内都含有 2 个 X 染色体, 雄性个体的细胞则只含单个 X 染色体。X 染色体携带许多与生命活动密切相关的基因。然而, 尽管雌性动物细胞的 X 染色体数是雄性动物细胞中的 2 倍, 但在雄性和雌性个体细胞中由 X 染色体编码的酶的含量却基本相等, 这种平衡机制即剂量补偿。哺乳动物 X 染色体的剂量补偿主要是通过雌性个体细胞中的一条 X 染色体失活 (XCI) 实现的。X 失活是通过一系列事件包括: Xist RNA 覆盖染色体, DNA 甲基化, 组蛋白修饰等将 X 染色体从活性常染色质转变成转录沉默, 高度凝缩的异染色质

使用 X 染色体携带标记的体细胞作供核开展 SCNT, 克隆小鼠外胚层细胞 X 染色体失活是随机的, 但在 TE 中则不。因此, 体细胞中区分活性染色体 (Xa) 和失活染色体 (Xi) 的遗传标记, 在 SCNT 后的胚胎细胞谱系中 2 条 X 染色体上可随机地被删除和重建。相反, 在克隆胚的 TE 细胞, 表现为非随机的失活模式, 该模式受供体细胞 X 染色体失活状态的支配, 且和正常 TE 细胞中印记 X 染色体失活相似。因此, 认为小鼠 X 染色体失活在雌性克隆胚胎得以忠实地再现 (Eggan *et al.* 2000); 但是最近 Senda 等 (2004) 分析了 6 只成年克隆母鼠 (B6C3F1) 的 X-染色体失活。分析来自 8 个自然繁殖小鼠和来自 11 个克隆小鼠的肾脏。虽然说两个组都有 X 失活上的差异, 但在各组内的分布却存在显著不同。尤其是, 11 只克隆鼠中有 2 只呈现严重的 X 染色体失活失常。同样在小肠中, 10 只克隆鼠有 1 只比例失调。X-染色体失调现象在不同组织, 不同个体中不同程度出现, 这说明克隆鼠中的 X 失活失调是由二次细胞选择和初次选择时的随机错误所共同导致的。

在牛上, 研究了 9 头雌性克隆犊牛中 X 连锁的 A 型一元胺氧化酶 (MAOA) 的等位基因专一性表达及另外 9 个 X 连锁基因表达, 发现 10 个 X 连锁基因中有 9 个表达不正常, 而且, 死亡的克隆牛其器官中 Xist 甲基化不足。对自然繁殖牛胎盘 MAOA 表达的分析还揭示了父源的 X 染色体优先失活的印迹 XCI; 相反死去的克隆牛胎盘 XCI 是随机地, 并且在尚存活的克隆牛 XCI 也是完全不对称的。故此认为不彻底地重编程可能会导致异常的表现遗传标记出现在克隆牛 X 染色体上, 进而随机地发生印记 XCI (Xue *et al.* 2002)。

目前, 关于 X 染色体失活和克隆动物异常之间的关系研究还不多。如果上述研究可以部分解释发生在雌性克隆动物上的问题, 那发生在雄性动物后代上类似的表型反常又该怎样解释呢? 因此, 单就 X-失活自身而言, 尚难得出导致克隆动物如此多问题存在让人信服的证据, 因为, 还不知道 X-失活是在上游还是处于下游, 还是只起到放大病理现象的出现呢? 这些都是今后着重研究的方面。

5.4.4 组蛋白修饰与染色质重塑:

真核生物的染色质由基因组 DNA, 组蛋白, 非组蛋白等包装成的高级结构。其基本结构单元为核小体: 核心组蛋白形成 8 聚体 (H2A, H2B, H3, H4), 上面缠绕着 146bp 的 DNA, 各核小体之间

通过连接 DNA 相连,上面有连接组蛋白 H1 隔开。在发育及分化过程中,染色质结构处于高度的动态变化之中,除了作为 DNA 的包装元件之外,还通过呈递容易被接近的核小体结构或形成独特的高级结构以阻止其它成分接近内部的 DNA,参与遗传信息调控。

基因表达调控区染色质解凝缩以及核小体结构重塑很可能是转录活化的先决条件。实现这些变化有两个重要的策略:核小体核心组蛋白的 N-末端尾巴上的共价修饰;利用 ATP 水解能量改变核小体空间结构和/或位置的(依赖 ATP 性重塑)机制(Li 2002)。

核小体结构成分之一的组蛋白修饰变化有乙酰化,脱乙酰化,甲基化,磷酸化和泛素化等。不同的组蛋白修饰可产生和那些与染色质结合的蛋白相协同或拮抗的互作。从而反过来调控染色质结构在转录活跃与转录沉默之间的动态变化。组蛋白乙酰化松弛染色质,与转录活化正相关;脱乙酰化则和转录抑制相关,脱乙酰化时,组蛋白核心尾巴和阻遏蛋白结合。相反,乙酰化的核心组蛋白尾巴与溴结构域(一种在促进染色质重塑和活化的特定因子中发现的基序)结合(Shi *et al.* 2003)。

组蛋白的甲基化,可发生在尾巴的 Arg 和 Lys 残基上。在 H3 和 H4 的 N-末端特定位置,选择 Lys 甲基化。组蛋白甲基化与乙酰化,磷酸化相反,似乎是一种相对稳定的修饰,从而为染色质状态的长期保持提供了一个理想的表观遗传标记。组蛋白 H3 的第 9 位的 Lys 甲基化(H3-K9),形成了一个异染色质成分 HP1 优先结合的位点,被标记的不仅有组成型的异染色质,还有包括失活的 X 染色体上的兼性染色质。在整个有丝分裂过程中,H3-K9 得以保留,说明它有可能为失活 X 染色体的维持提供了表观遗传信号,已经发现一些组蛋白甲基化酶(Suv39h,G9a),催化组蛋白的甲基化(Shi *et al.* 2003)。

DNA 甲基化如何与组蛋白甲基化之间发生联系,至今已经提出了三种模型(Li 2002),分别是 DNA 甲基化指导组蛋白甲基化模型,组蛋白甲基化指导 DNA 甲基化模型以及组蛋白重塑驱动 DNA 甲基化模型。有一种模型认为,Dnmt 可能只作用于 H3-K9 甲基化的,且和 HP1 结合了的染色质(Fuks *et al.* 2003)。然后,由 MBD 识别甲基化的 DNA 和募集 HDACs,以维持转录抑制状态。因而,看起来 DNA 甲基化是先通过组蛋白脱乙酰化建立染色质抑制状态,阻止其它物质靠近转录装置,尽管当前还不知道甲基化的最初模式是如何从头建立的。

在体细胞移入去核卵母细胞时,发生细胞核与细胞质的染色质蛋白交换。移植入的 *Xenopus* 的核失去了自身超过 85%的蛋白,而同时又从卵胞质内插入大量蛋白质。尤其是连接组蛋白 H1,牛的体细胞型 H1 在供体细胞注入卵子后即消失,而到了 8-16 细胞期重现,而核心组蛋白(尤其是 H3,H4)和 DNA 仍很好的结合着。另外还发生了非组蛋白选择性地释放或进入。如基础转录因子 TATA 结合蛋白 TBP 释放,这可能受 SWI2/SNF2 超家族 ISWI 染色质重塑蛋白的作用。

在体细胞克隆中,关于组蛋白乙酰化的研究还不是很多。Santos 等(2003)研究了甲基化和乙酰化在体细胞克隆牛植入前胚胎中的状态。在正常的胚胎中,组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸(H3-K9)的甲基化和 DNA 的甲基化变化是平行的;而在克隆牛的植入前胚胎中,H3-K9 的过高甲基化伴随 DNA 的过高甲基化,说明在哺乳动物的胚胎中, DNA 的甲基化和组蛋白的甲基化有机械的联系。Enright 等(2003)发现不同的细胞类型,细胞周期的不同阶段以及不同的处理过程均影响供体细胞的组蛋白乙酰化(组蛋白 H3 第 18 位赖氨酸,组蛋白 H4 第 8 位赖氨酸和连接组蛋白 H1)水平。为了促进核重排,用一种组蛋白去乙酰化抑制剂(Trichostatin-A, TSA)和 DNA 甲基化转移酶抑制剂(5-氮-2'-脱氧胞苷, 5-aza-dC)处理供体核,分别用来增加供体核的组蛋白乙酰化水平和降低供

体核的DNA甲基化水平,结果发现,用组蛋白去乙酰化抑制剂TSA处理可以提高囊胚率;用另一种组蛋白去乙酰化抑制剂丁酸钠(NaBu)处理供体细胞核,得到了同样的结论(Shi *et al.* 2003)。以上研究表明,体细胞克隆胚胎中,组蛋白乙酰化的重编程是不完全的,组蛋白去乙酰化抑制剂的加入可以促进供体细胞的重编程。而有关体细胞克隆中组蛋白乙酰化的研究是一个有待深入探索的领域。

最近的报道表明,小鼠体细胞克隆胚胎在融合与激活之后,体细胞特异型H1组蛋白(H1s)和卵母细胞特异型H1组蛋白(H1foo)之间在特定的胚胎发育阶段可以进行活跃的交流。克隆胚胎都能真实重现H1转变的正常顺序,而这并不代表克隆胚胎的发育能力就强。在小鼠2-细胞胚胎,H1s如果很少,可以导致受精卵基因转录提前,在克隆胚胎则呈现明显的体细胞特征。H1foo的高流动性可能会造成胚胎中染色质结构的快速变化以及稳定性降低。从而影响克隆胚胎的发育和后代的表型(Gao *et al.* 2004; Teranishi *et al.* 2004)。克隆研究中,体细胞组蛋白H1在移植后不久在大多数小鼠中丢失,供体与受体细胞的细胞周期影响丢失率,从而影响蛋白交换以及早期基因激活的提前发生,造成重编程不完全。

在牛上,体细胞注入卵子后,体细胞核中的连接组蛋白H1就检测不到了,到了8-16细胞才又出现,这与正常的受精胚胎相似。因此,体细胞组蛋白H1可被用于判别重新程序化的标记(Shi *et al.* 2003)。

各种染色质修饰和重塑蛋白在维持染色质结构与活性上的相互影响仍将是人们关注的一个焦点。在此过程中发挥作用的许多重要成分,尤其是帮助染色质修饰酶定位到特异基因组位点上的RNA和蛋白质因子等待人们去发现。从上述资料所反映的事实来看,DNA甲基化,基因组印记,X-失活和组蛋白修饰以及染色质修饰之间都存在十分密切的关系。在今后的研究中,系统研究它们之间存在的沟通(Crosstalking)应该也是一个有意义的方向。

5.5 体外培养与基因表达:

体外培养环境及操作等影响或改变表观遗传状态(Young *et al.* 2001)。克隆动物尤其是小鼠,牛,绵羊上常见,胎儿过度生长,即临床所称的“巨胎症”(Large offspring syndrom, LOS),与对照相比,胎儿表达IGF2R少了30-60%,表达的变化和DNA甲基化损失有关。IGF2R表达下降,导致IGF-II的清除障碍,Igf2r-无义突变小鼠血清IGF-II水平比野生型的多4倍。而IGF-II的升高造成出生重增加35%。然而表观遗传状态有多大程度上受到体外操作,培养的扰乱还不清楚,可能会涉及到大量基因。检查了E19.5d的克隆小鼠胎儿胎盘,皮肤和肾的甲基化模式,研究的1500个基因座位有99%的正确。不过,在所有的克隆小鼠中有几个CpG呈现异常甲基化,而不同个体的甲基化异常程度也不同。据推测,1000个座位中约有2-5个有异常(Rideout *et al.* 2001)。

Humpherys等(2002)利用基因芯片技术比较了不同供体细胞克隆小鼠胎盘,肝脏的mRNA的表达。克隆胎盘中所检测的10000多个基因有约4%的明显出现异常。而大部分反常表达不管是来自胚胎干细胞还是来自卵丘细胞都有。当然在二者之间还有小部分是不同的。克隆小鼠肝脏也出现基因表达异常,但程度比胎盘轻。因此,克隆所导致的基因表达异常大部分在克隆来讲是普遍的。而有些看上去是由供体细胞所使然。

在绵羊和牛上,LOS可能因为胚胎体外培养尤其是在有血清或血清成分时,破坏DMR2甲基

化及 IGF2R 的表达。同样的培养条件已被证实影响 H19 的印记状况。附植前胚胎在含血清的培养基中培养可影响若干与生长相关的印记基因的调控,从而导致胎儿生长发育异常(Young *et al.* 2001)。相比于 ES 细胞克隆小鼠,新鲜分离的卵丘细胞克隆后代中印记表达看上去更为忠实,说明可能主要是体外培养扩大了印记错误增强。因此,培养期间 ES 细胞表观遗传改变不断积累可能是造成畸形的主要原因。用新鲜分离的卵丘细胞开展 SCNT,用基因芯片技术分析克隆小鼠的胎盘,肝脏的 RNA,发现许多印记基因的表达水平不正常。因而,供体细胞的 IVC 不是导致克隆动物中印记基因表达紊乱的唯一原因(Rideout *et al.* 2001)。

在猪的异常表型中没有见到 LOS 的报道。有研究也似乎为此提供了支持:猪克隆囊胚不出现高度的异常甲基化模式,而保持和 IVF 相近的水平,如在着丝粒和 PRE-1 SINE 序列,尽管在 4-8 细胞期,此二者甲基化均比 IVF 胚更广泛。但是,不能排除存在其它的 DNA 序列甲基化异常的可能(Kang *et al.* 2001)。值得指出的是,在山羊和猪上之所以出现比较少的表型异常,可能跟它们的胚胎在体外培养时间短(一般在 8 细胞期前移植)有一定联系。

克隆胚胎在体外培养时对能量底物的需求已经和 IVF 胚胎以及体内胚胎发生了一些变化。如在小鼠上的试验,对葡萄糖的需要摄取。克隆胚胎对培养液,培养气相条件的应激反应和 IVP 对照之间都有一定程度的差别(Gao *et al.* 2003)。

最近,Fernandez-Gonzalez 等(2004)研究了在体外长期培养时添加10% FCS或者1g/l BSA对小鼠出生后发育,行为学等方面的影响。首先,在含FCS的培养基重获得的囊胚有些印记基因的mRNA表达发生了极大变化。再者,FCS组来的小鼠断奶前8项检测指标有2项以及一些与神经主宰的发育如行动能力出现推迟。34周后,母鼠体重显著高于对照。另外,在5月龄和15月龄小鼠的定位能力发生改变。20月龄解剖病理学和组织学分析发现,该年龄的小鼠有些器官较大而且病理现象增多。FCS培养胚胎获得的小鼠有焦虑行为上特异变化,固有的记忆力不足。因此,早期胚胎培养于不理想的培养环境,可造成胚胎发生后期发育,生长,生理学等不可逆的受损。

5.6 早期发育的重要基因的表达:

研究发现 Oct4, Nanog(Cavaleri and Scholer 2003; Mitsui *et al.* 2003)等基因的表达对维持囊胚的多能性具有十分重要的作用。Daniels 等研究了 IVF 胚和颗粒细胞克隆胚发育早期 6 个重要基因 Oct4, IL6, FGF2, FGF4, FGFR2, 和 gp130 的表达。其中有 Oct4, FGF2, 和 gp130 的转录模式在 IVF 和 SCNT 胚之间相似。但许多桑椹胚,囊胚期克隆胚 IL6, FGF4, 和 FGFR2 表达异常。而这三个基因在小鼠上,在胚胎着床,着床后早期发育方面起着十分重要的作用。因此,在克隆胚发生的这种异常可能使得胚胎质量下降,活力减弱以致发育失败(Daniels *et al.* 2000)。

在克隆小鼠时,发现用卵丘细胞作供核构建的重组胚在 Oct4 基因的分布,以及一些与 Oct4 相关的基因表达要比 IVF 以及以胚胎干细胞作供核时的重组克隆胚明显异常(Boiani *et al.* 2002; Bortvin *et al.* 2003)。最近发现的保持囊胚内胚团细胞多能性的一个转录因子 Nanog,尚不知它在克隆囊胚中的表达谱情况。研究包括一些卵母细胞中母源影响因子 Zarl(Wu *et al.* 2003), NPM2(Burns *et al.* 2003)等在内的一些因子在早期克隆胚胎的发育中的动态变化也很有意义。

有人在小鼠克隆时,将 3—4 个不等的 2 细胞,4 细胞胚胎体外聚合培养构成新的胚胎,然后检测这些胚胎的 Oct4 表达,发现和体外受精的基本相似。虽然这种方法囊胚率没有提高,但是后代

的出生率明显提高。这可能是不同的卵裂球之间发生了表观遗传互补,使得如 Oct4 等一些早期发育重要基因正常表达导致(Boiani *et al.* 2003)。

我们课题组对 *PCAF*, *Xist*, *FGFR2*, *PDGFR α* , *FGF10*, *BMP4*, *Hsp70.1*, 和 *VEGF* 重要的发育相关基因在刚刚出生就死亡的克隆牛的心,肝,脾,肺,肾和大脑 6 大器官中的表达进行了研究。对照组为 AI 新生牛。心脏是异常最严重的器官,有 5 个基因出现反常,肾脏则最轻。所有被检测的器官中,这几个基因都是失调的。而大部分基因呈上调趋势,仅有 *PDGFR α* 是下调的。具体到每个基因,则呈现组织特异性的改变。这些变化可能参与导致了新生死亡克隆牛器官畸形的发生(Li *et al.* 2005)。

5.7 展望

人们在进行动物体细胞克隆实践中,不断遇到的一个困扰就是克隆效率很低,克隆动物常出现异常表型。这似乎成了该技术发展的瓶颈。为了从分子机制上分析导致这些异常的原因,很多从事克隆研究的实验室开始关注克隆机理,期望能得到有助于提高效率,降低异常的信息。根据目前的有限资料来看,上述的重新程序化的各个方面似乎有着相互的影响,它们之间可能发生互作,如基因组 DNA 甲基化与基因印记,X 染色体失活,染色质修饰与重塑之间。体细胞供核在卵母细胞内的重新程序化主要靠卵母细胞内的因子来发动。因此,卵母细胞与供核细胞的周期,状态的协调对克隆的效率影响很大。在体外,对供核细胞及受体卵母细胞进行预处理,可能比较有意义。人们一直在寻找最适于 SCNT 的供核体细胞,目前已经发现胚胎干细胞,卵丘细胞相对比较理想。人们也尝试了延长重新程序化的时间:连续继代克隆(李劲松等, 2001),延迟激活(Campbell *et al.* 2001; Wells *et al.* 1999),先融合后去核再激活(Peura 2003)等方案,并取得了积极的效果。在小鼠上还建立了四倍体胎盘补偿法(Eggan *et al.* 2002):克服供体细胞基因组操作带来的影响。值得一提的是,目前除了在人(Thomson *et al.* 1998),非人灵长类(Cibelli *et al.* 2002)和小鼠上(Evans and Kaufman 1981)成功地建立了胚胎干细胞系之外,在家畜上只获得了类胚胎干细胞系。不过,最近中美科学家联手宣称成功建立了牛的胚胎干细胞系(Wang *et al.* 2005)。这些细胞系来自体外受精胚胎和核移植克隆胚胎。所建的 ES 细胞系表现了一些和小鼠,人相似的特征,但是对胰蛋白酶消化敏感,很容易分化。所以在家畜克隆研究时,探索可以帮助体细胞体外直接重新程序化的因子,提高体细胞重新程序化的效率将非常有意义。这样我们就不必再把体细胞再移入卵母细胞,而直接用一些重编程培养基诱导细胞横向分化为目的组织的细胞,开展细胞替代治疗。因此进一步阐明重新程序化的分子机理,有助于未来开展的干细胞治疗疾病或治疗性克隆。再者体细胞克隆在一些动物如猴子,狗等上都还没有成功。最近有一篇报道阐述了灵长类动物克隆可能要比预想中的难度大得多:在猴的卵母细胞中,有两种关键的有丝分裂纺锤丝蛋白 NuMA 和 HSET 由于同细胞核结合非常紧密,在去核操作时一起被除去(Simerly *et al.* 2003),导致重构胚无法正常分裂发育;来自该研究组最新的一篇报道显示,他们与韩国科学家合作已经可以得到克隆猴的囊胚了(Simerly *et al.* 2004),但是移植后仍未得到后代。

体细胞克隆技术在动物育种和拯救濒危动物方面具有广泛的应用价值,尤其是应用体细胞克隆技术生产转基因动物来制备高效表达外源基因的各种生物反应器,使克隆动物变成了“制药工厂”,这为医药蛋白的生产提供了一条经济有效的途径(李世杰等, 2004)。本课题组已经建立起

以不同类型的转基因细胞为核供体生产转基因克隆牛胚胎的技术(Gong *et al.* 2004), 目前已经得到转人的乳铁蛋白(lactoferritin)基因和转人的岩藻糖转移酶(fucosyltransferase)基因的体细胞克隆牛,转人的溶菌酶(lysozyme)基因和转人的 α -乳清蛋白(α -lactalbumin)基因的体细胞克隆牛也已出生。另外,我们还得到了加拿大政府赠送给前总理朱镕基的种公牛“龙”的克隆后代: 大隆和二隆。为今后开展奶牛品种改良提供了新的选择。

随着人类基因组计划的完成,其它动物的基因组研究的进行,各种功能基因组学,蛋白质组学研究技术的发展,如RNAi,DNA Microarray 以及 Protein Chip 技术等,将有助于我们借助它们进行高通量的研究上述重新程序化事件,从而系统全面地了解它们之间的相互联系。为克隆技术走出实验室,为转基因动物生物反应器生产,濒危野生动物保护以及治疗性克隆等服务。

综上所述,体细胞克隆还存在很多未解之谜。体细胞克隆要成功的实现产业化则还面临很多的挑战,如:克隆效率低,成本高,胚胎,胎儿异常率,死亡率高,流产率,围产期死亡率高,表型异常率高,基因表达,表观遗传标志的变化反常等等。虽然,我们很多人都在尝试新的克隆方法:实现徒手操作,更高通量,对设备的依赖进一步降低,不需要特殊技能,适用于现场操作等。

开展体细胞克隆猪研究,并最终获得转基因,基因组修饰的克隆猪后代,对我国来说意义很大,不仅仅意味着我们掌握了这门技术,更重要的是为将来在我国开展异种器官移植奠定坚实的基础。据推测,我国每年需要器官移植的患者比美国还多,而且是逐年增长。目前,掌握并成功克隆出猪的只有美国、英国、日本、澳大利亚、韩国和德国。

We are only beginning to understand the molecular changes involved in nuclear reprogramming, yet this line of basic research may result in some of the most beneficial applications to humans. It might permit us to de-differentiate mature cells and re-differentiate them into specific cell types required for tissue repair.

(Di Berardino, 1999)

表 5.1 猪体细胞克隆效率统计表

移植重组 胚胎数	妊娠个体（代孕 母猪数）	出生（%移植胚 胎数）	存活后代(% 移植胚胎)	总体克隆 效率（%）	参考文献
>401	2（10）	5（0.8）	5	0.1	Polejaeva 等，2000
	2（5）	2（0.9）	2	0.9	Bondioli 等，2001
367	2（6）	11	8(2.2)		Yin 等，2002
	1（5）	4（0.9）	2	?	Park 等，2002
110	（4）	1（0.9）	1(0.9)	0.2	Onishi 等，2000
	3（9）	1	1	0.1	De Sousa 等，2002
	5（10）	2（0.3）	1	0.2	Boquest 等，2002
511	5（5）	28（5.5）	26(5.1)		Walker 等，2002
2918	7（20）	12	6(2.1)		Ramsoondar 等，2003
7800	25（52）	5	2		Hyun 等，2003
483		4（0.7）	4(0.8)	0.5	Betthauser 等，2000
		5	5		Park 等，2001
200	3（4）	1	1(0.5)		Lai 等，2002
1097	7（6）	6	5(0.46)		Dai, YF 等，2002
338	3	4	4(1.0)		Lai 等，2002
2672	7(10)	7	4(0.1)		Kawakami 等，2003
	10（16）	9	8		Phelps 等，2003
685	6（9）	4	4(0.6)	0.4	Lee 等，2003
	17(48)	6	4		Kolber-Simonds 等， 2004
1485	4(8)	3	2(0.1)		Fujimura 等， 2004
928	4(10)	18(1.9)			Harrison 等， 2004
4742	7(25)	22	4(0.08)		Park 等， 2004
1680	4(14)	9(0.53)	1(0.06)		Wanatable 等， 2005
213	11(11)	4(1.9)	3(1.4)		Wanatable 等， 2005
91	2(4)	5			Hoshino 等， 2005
3179	12(19)	12	10(0.3)		Lee 等， 2005
633	2(6)	2(0.3)	2(0.3)		Takahagi 等，2005
599	2(4)	4	2(0.3)		Holker 等，2005

第二部分 实验内容

第六节 供核体细胞系建立

摘要

利用组织块培养法建立了中国实验用小型猪 9 个 40d 胎儿成纤维细胞系和 1 个成体成纤维细胞系。绘制了一株细胞系的生长曲线,利用血清饥饿以及接触抑制对细胞进行细胞周期同期化处理。血清饥饿以及接触抑制使细胞同期到 G0/G1 期的效率相同。在处理 2d 之后,G0/G1 期细胞比例不再有显著增加。结果表明胎儿成纤维细胞对血清饥饿以及接触抑制的反应相当,同期处理 2d 即可为核移植提供足够的供体细胞。

1 前言

体细胞核移植后代的相继诞生(Wakayama *et al.* 1998; Wilmut *et al.* 1997);(Cibelli *et al.* 1998; Kato *et al.* 1998); (Baguisi *et al.* 1999); (Bethausen *et al.* 2000; Onishi *et al.* 2000; Polejaeva *et al.* 2000) (Shin *et al.* 2002);(Chesne *et al.* 2002; Woods *et al.* 2003); (Galli *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2003), 为农业动物品种改良,转基因动物以及基因组精确定位修饰动物的生产和动物生物反应器的制作,胚胎干细胞生产以及医学临床疾病治疗等的发展提供了一个新工具,也为生物学基础研究提供了一个强大的技术平台。虽然人们已经利用动物的若干体细胞进行克隆研究(Oback and Wells 2002), 能产生成活后代的细胞类型非常有限,而且获得克隆动物的效率也非常低(Wilmut *et al.* 2002)。虽然到目前为止,还没有找到最适于克隆的细胞类型,在科研试验中,人们还是倾向于使用动物的胎儿成纤维细胞作核移植供体细胞。这主要是因为(Campbell *et al.* 2001)胎儿成纤维细胞在体外生长寿命长,易培养,还可以承受一定程度的遗传修饰筛选处理。尤其是当前大动物上还没有十分理想,真正的 ES 细胞系。最近中美科学家联手获得了牛(Wang *et al.* 2005)的 ES 细胞系,但是尚未有关于用其进行克隆研究的报道。在各种家畜中,猪是被认为最适于为人器官移植提供异源器官的供体(Prather *et al.* 2003), 因为猪和人的器官在形态,功能上都非常接近,再者,猪繁殖周期短,易于饲养管理。猪的克隆效率很低,困难比其它几种家畜都大,到目前克隆猪的总效率不到 1%(Martinez Diaz *et al.* 2003)。我国已经得到了克隆牛(Chen *et al.* 2003; 陈大元等, 2003),山羊(郭继彤等, 2002; 王玉阁等, 1999)和绵羊(安晓荣 2001),小鼠和水牛的后代,但是仍没有得到克隆猪,尽管已经做出了一些很出色的工作(孙兴参 2001; 吴中红 2002) (张德福等, 2004)。本研究用中国农业大学昌平实验站培育的中国实验用小型猪,建立胎儿成纤维细胞系,并对不同细胞周期同期化处理的效果进行了比较。同时我们还建立了达兰猪的各种细胞系以及商品猪(大白×长白)的颗粒细胞系。以便为开展猪的体细胞克隆相关研究提供丰富的供体细胞。

2 材料与方法

2.1 材料

实验取材:妊娠 40d,4 岁中国实验用小型猪购自中国农业大学昌平实验站,共获得 9 个胎儿;1 月龄雌性达兰猪购自中国-荷兰养猪示范种猪场;卵巢购自北京市周边屠宰场。

2.2 溶液配制:

所用化学试剂除特别说明外,均购自 Sigma-aldrich 公司;

2.2.1 DMEM (高糖, GIBCO) 溶液: 将 DMEM 粉末溶于 900 ml Milli-Q 超纯水中,再按产品说明要求加 3.7g/L 的 NaHCO_3 后,再另外添加 0.11g/L 丙酮酸钠, 3.57g/L HEPES, 66mg/L 青霉素钠和 100mg/L 的硫酸链霉素, 调 pH 至 7.2~7.4,然后定容至 1 L. 0.20 μm 滤膜(Gelman)过滤除菌,分装后储于 4℃ 备用.使用前添加 10%-20%的 FBS (Gibco/Hyclone/Greiner), 1%NEAA 构成细胞完全培养基。

2.2.2 无钙镁 DPBS 液 (DPBS): 分别取 0.20 g/L KCl, 0.20 g/L KH_2PO_4 , 8.00 g/L NaCl, 2.16 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 溶于 900ml Milli-Q 超纯水中,调 PH 至 7.2~7.4,然后,定容至 1 L. 0.20 μm 滤膜过滤除菌,或高压灭菌,分装后储于 4℃ 备用。

2.2.3 胰蛋白酶细胞传代消化液 0.1%(w/v) : 取 0.1 g Trypsin (1:250, GIBCO), 0.02 g EDTA, 用上述 DPBS 定容至 100 ml 后用 0.20 μm 滤膜过滤除菌,分装后储于 -20℃ 备用。

2.2.4 0.25%(w/v) 胰蛋白酶组织消化液 : 取 0.25 g Trypsin (1:250, GIBCO) 0.038 g EDTA, 用上述 DPBS-定容 100 ml 后用 0.20 μm 滤膜过滤除菌,分装后储于 -20℃ 备用。

2.2.5 KCl 低渗溶液 (0.075M) : 取 5.592 g KCl 适量蒸馏水溶解后定容至 1 L。

2.2.6 卡诺氏固定液: 甲醇 (A.P.):冰乙酸 (A.P.)=3:1 (注:现用现配)。

2.3 仪器:

洁净工作台 (北京古威超净设备公司);

CO_2 培养箱 (Model 3111/3131, Forma Scientific, Inc. 美国);

低速自动平衡微型离心机 (LDZ4-0.8 型, 北京医用离心机厂);

电热恒温水浴锅 (HH-SY11-Ni 2C, 北京市长风仪器仪表厂);

紫外线杀菌灯车 (ZSZ-30W, 空后高温复合材料厂);

倒置显微镜 (Nikon Eclipse TE2000-U 或 TE300, 日本);

超纯水净化装置 (Biocell, Milli-Q[®], 美国);

恒流泵 (Millipore, catalog No. XX80EL005);

数码相机 (Nikon Coolpix 4500, 日本);

配置有 CCD (Penguin 150CL, Pixera, 美国) 的显微镜 (Nikon E800, 日本)

离心机 (Eppendorf Centrifuge 5810R, 德国)

2.4 耗材

细胞培养瓶: T25, T75, (Costar Corning, USA; Falcon, BD, France)

细胞培养皿: 30mm, 60mm, 100mm, (Falcon, BD, France)

细胞培养板: 6 孔, 24 孔, (Costar Corning, USA; Falcon, BD, France)

细胞冻存管: 1.5ml; (Costar Corning, USA)

离心管: 15ml, 50ml (Falcon, BD, France)

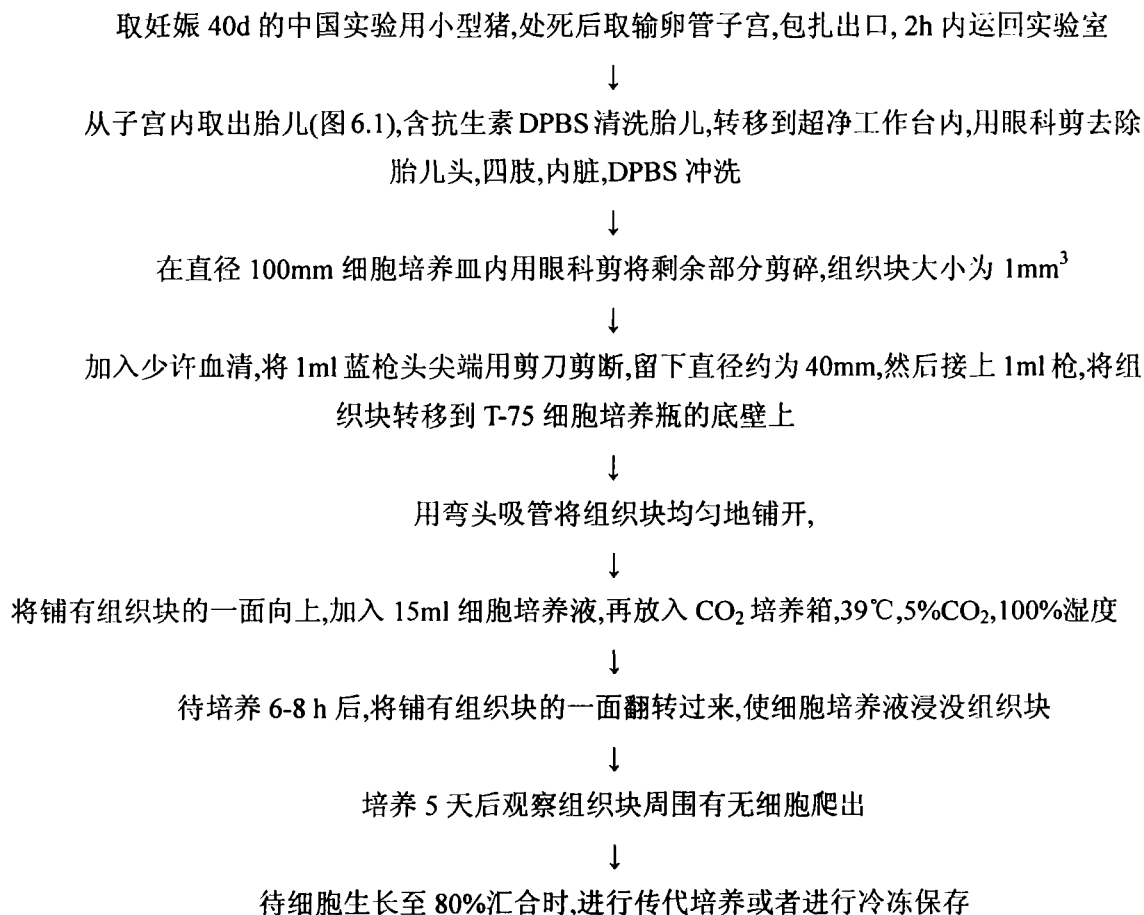
带胶头的弯头吸管: 改装自胶头滴管, 北京玻璃仪器厂

玻璃套管:北京玻璃仪器厂

2.5 方法

2.5.1 各种供核体细胞原代细胞培养

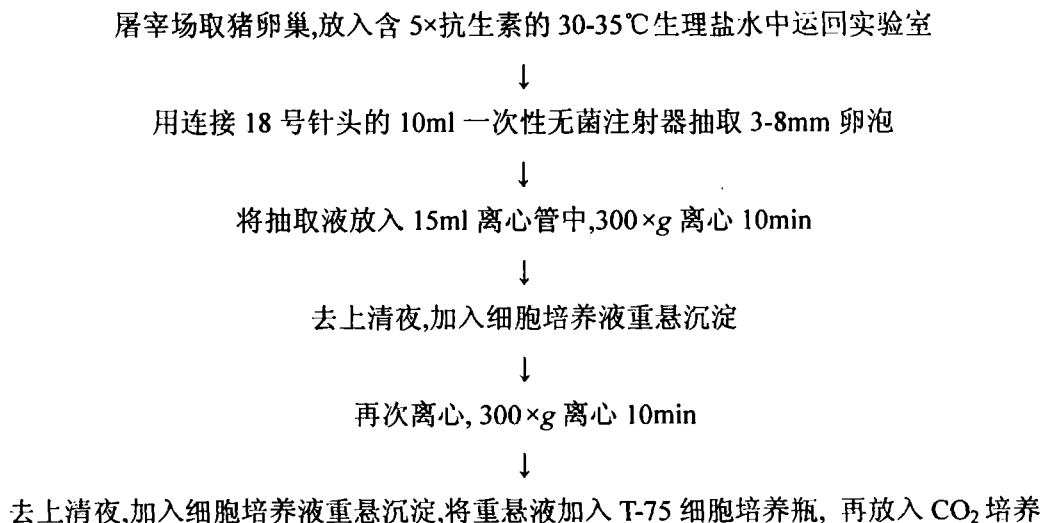
2.5.1.1 胎儿成纤维细胞系建立



2.5.1.2 成年猪耳皮肤成纤维样细胞系建立

剪取成年香猪耳部边缘组织块 $2\times 3\text{cm}^2$ 大小,在超净工作台内先去除其上的毛发,而后按照上述方法进行组织块接种培养,建立细胞系。

2.5.1.3 猪卵丘/颗粒细胞系建立



箱,39℃,5%CO₂,100%湿度



待细胞生长至 80%汇合进行传代培养或者冻存

2.5.1.4 猪子宫细胞系建立

将达兰猪子宫按照组织块法进行接种建系

2.5.1.4 猪输卵管细胞系建立

将达兰猪输卵管按照组织块法接种建系

2.5.2 细胞传代培养

组织块接种培养的细胞生长至 80%汇合时,用弯头吸管吸出原来的培养液



加入 DPBS 洗涤 2 遍,然后每个 T-75 瓶中加入 3ml 消化液, 39℃消化 5min



待>80%细胞脱壁后,加入 6ml 细胞培养液终止消化,用弯头吸管吹打贴壁细胞



将消化后的细胞混合液转移到 15ml 离心管中,1200rpm,离心 5min



去上清,加入 1ml 细胞培养液,进行细胞计数



计数后,调整细胞密度,按 1×10^5 个/ml,接种到新的细胞培养瓶内,39℃,5%CO₂,100%湿度培养



培养 2d 后,弃去原有培养液,加入新的培养液,以后每 2 天更换一次培养液



待细胞生长至 80%汇合,进行传代/冻存/核移植供体

2.5.3 供体细胞液氮冷冻储存

组织块接种培养的细胞生长至 80%汇合时,用弯头吸管吸出原来的培养液



加入 DPBS 洗涤 2 遍,然后每个 T-75 瓶中加入 3ml 消化液, 39℃消化 5min



待>80%细胞脱壁后,加入 6ml 细胞培养液终止消化,用弯头吸管吹打贴壁细胞



将消化后的细胞混合液转移到 15ml 离心管中,1200rpm,离心 5min



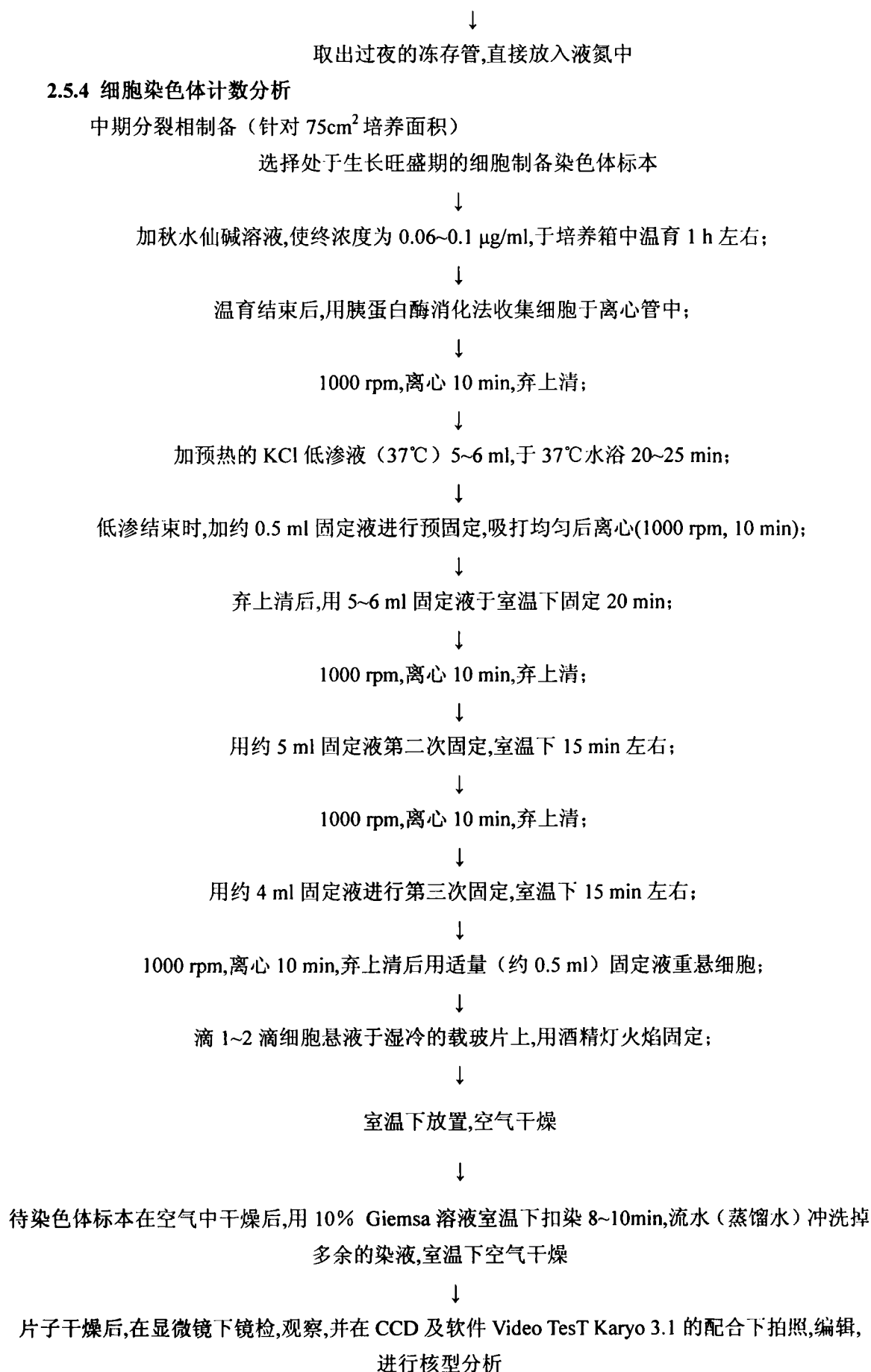
去上清,加入 1ml 细胞冻存液,进行细胞计数



调整细胞密度,按 1×10^5 个/ml,分装到细胞冻存管内,



将标记好的冻存管放入细胞冻存盒(或者将细胞冻存管放入聚乙烯泡沫盒中,密封之后 4℃冰箱中置 30min),再放入-80℃冰箱过夜



2.5.5 细胞生长曲线

将细胞悬液接种 1×10^4 /ml 到 24 孔培养板中,每天同一时间胰蛋白酶消化 3 孔后红血球记数板记数,最后将 7 天中的细胞数值绘成图,即生长曲线。

2.5.6 供体细胞细胞周期同期化

2.5.6.1 血清饥饿: 细胞接种, 1×10^5 个/ml, DMEM+10%FBS+antibiotics 培养 2d, 将培养液更换为 DMEM+0.5% FBS+Antibiotics, 继续培养 5-10d。

2.5.6.2 接触抑制: 接种之后,每 3 天更换一次培养液,直到细胞长满,100%汇合。

2.5.6.3 流式细胞分析样品制备

将经上述处理的细胞先吸去旧的细胞培养液,再用无钙,镁离子的 DPBS 洗涤 3 遍,

↓

添加 (T25: 1ml, T75: 2ml)0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA 使细胞脱壁,

↓

加入酶液 3 倍体积的含血清的细胞培养液终止消化,

↓

1000rpm,8min 离心去上清液,

↓

按每管 10^6 个细胞分装到 15ml 离心管中,用无钙,镁离子的 DPBS 悬浮洗涤 2 次,

↓

用约 500 μ L 无钙,镁离子的 DPBS 重新悬浮细胞,

↓

边振荡,边缓慢加入 3ml 4°C 预冷的 75%乙醇或者无水乙醇,过夜固定 (4°C , >12h),样品可以保存 2 周以上,

↓

1000rpm, 8min 离心去乙醇,之后用无钙,镁离子的 DPBS+1%BSA(或 FBS)沉淀,重悬洗涤 2 遍,用 200 μ L 无钙,镁离子的 DPBS 重新悬浮细胞

↓

加入含 0.2~1mg/ml RNase 的无钙,镁离子的 DPBS 1 ml, 37°C , 30min,

↓

1000 rpm, 8min 离心留沉淀,用 200 μ L 无钙,镁离子的 DPBS 重悬细胞,

↓

加入含 100 μ g/ml PI, 0.1% Triton X-100 的无钙,镁离子的 DPBS 1ml,室温下 5~10 min 即可上机检测, 上机前用 500 目 (30 μ m) 细胞筛过滤

2.6 统计分析:

用 SPSS(Version 11.0)对细胞周期检测结果进行方差分析,当 $p < 0.05$ 时认为有显著差异。

3 结果

3.1 胎儿成纤维细胞系:

用组织块培养法接种,得到了9个胎儿个体的细胞系(图 6.2-6.4); 在接种的第 5d, 30%的组织块周围开始有细胞爬出,呈典型的成纤维状.随机挑选三个个体的细胞进行体外传代培养, 在传代 10 次之前, 2 倍体细胞比例都在 90% (13/14) 以上。

3.2 胎儿成纤维细胞生长曲线(图 6.5):

随机挑选传代 9 次的一株细胞系, 细胞群体倍增一代的时间约为 13 个小时, 生长增值特征正常,说明这一段时间内培养条件比较合适。

3.3 胎儿成纤维细胞染色体数目(图 6.6):

在 10 次传代之前,选择 14 个分裂相计数染,色体数目正常比例在 90% (13/14)以上,说明二倍体细胞占优势。

3.4 胎儿成纤维细胞细胞周期(图 6.7-6.8)

利用两种目前较流行的细胞周期同期化处理方法: 血清饥饿法和接触抑制法诱导细胞进入 G0/G1 期。结果如表 6.1 所示. 方差分析发现各组间不存在显著差异。而处理 2d 以上时, G0/G1 期细胞比例也没有明显增加。

表 6.1 不同方法处理不同时间的胎儿成纤维细胞的细胞周期处于 G0+G1 期情况 (平均数±标准差)

Table 6.1 Cell cycle stages of porcine fibroblasts after cultured in different durations between two different

synchronization treatments (Mean±SD).	
周期同期化处理组 Cell cycle synchronization treatments	G0+G1 期 Cell cycle at G0+G1 stage
血清饥饿 2d 2d serum starvation	89.84±2.17
血清饥饿 4d 4d serum starvation	88.56±0.84
接触抑制 2d 2d contact inhibition	88.86±3.53
接触抑制 4d 4d contact inhibition	91.39±0.50

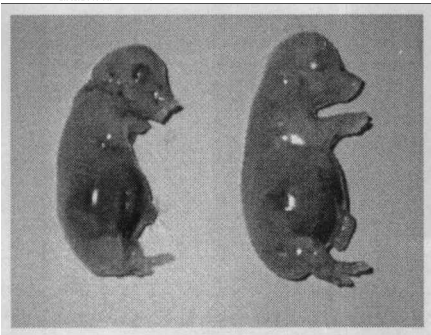


图 6.1 处于妊娠期第 40d 中国实验用小型猪胎儿
Figure 1.1 pig fetuses at 40d of gestation

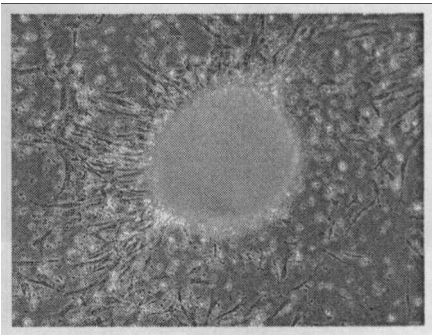


图 6.2 原代培养时组织块周围细胞生长 40×
Figure 1.1 Outgrowth of cells from explants of pig
fetuses 40×

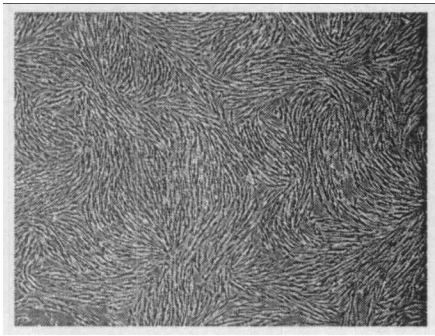


图 6.3 猪胎儿成纤维细胞 40×
Figure 6.3 pig fetal fibroblast cells
40×

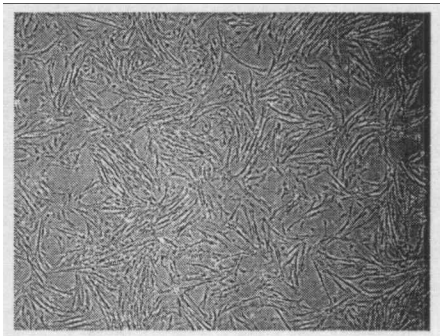


图 6.4 猪颗粒细胞 40×
Figure 6.4 pig granulosa cells
40×

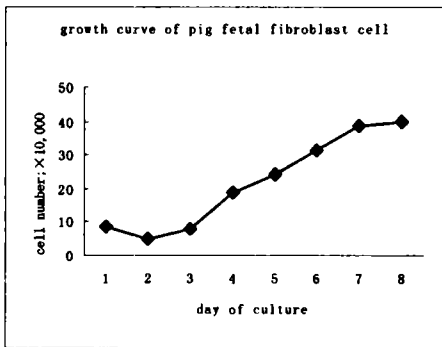


图 6.5 胎儿成纤维细胞生长曲线
Figure 6.5 Growth curve of pig fetal fibroblast
cell

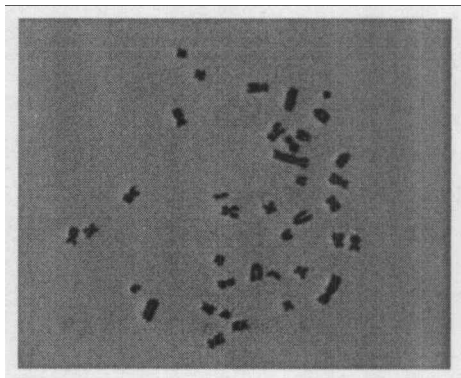


图 6.6 胎儿成纤维细胞染色体 400×
Figure 6.6 Chromosome of pig fetal fibroblast
cells 400×

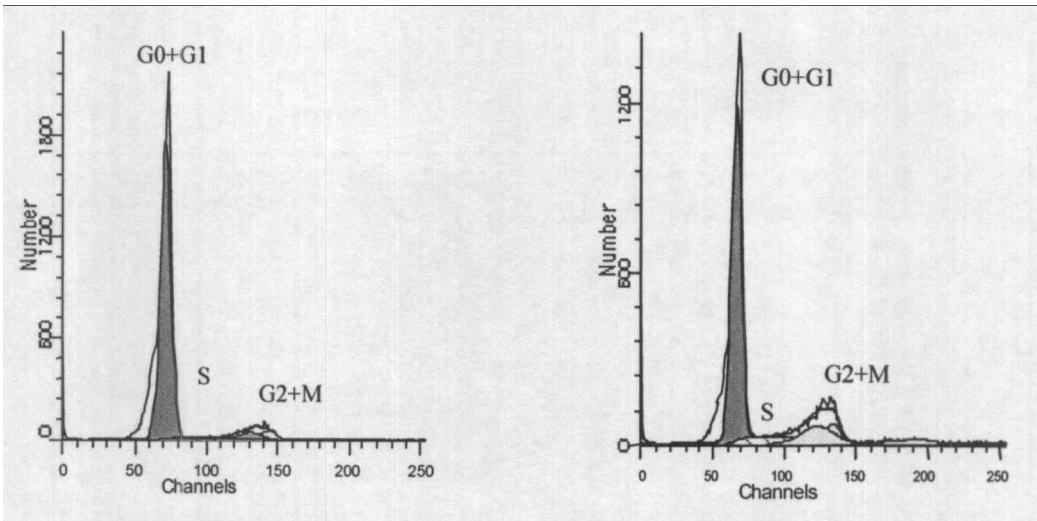


图 6.7 血清饥饿 2d 细胞周期分布图 G0 为静止期,G1 为间歇期 1,S 为合成期,G2 为间歇期 2,M 期为中期

Figure 6.7 Cell cycle distributions after
synchronization by 2d serum starvation

图 6.8 血清饥饿 4d 细胞周期分布图 G0 为静止期,G1 为间歇期 1,S 为合成期,G2 为间歇期 2,M 期为中期

Figure 6.8 Cell cycle distributions after
synchronization by 4d serum starvation

4 讨论

4.1 关于细胞系的建立。目前,建立细胞系常用的方法(薛庆善 2002)有胰蛋白酶消化接种培养法和组织块法(又称为植块法)。两种方法各有优势,在大量建立原代细胞系时,后者可能更有优势。首先,其操作简单,所需时间少,成本低。但后者得到的原代细胞纯度往往不如前者。本实验利用组织块法成功的建立了9个小型猪胎儿成纤维细胞系,1个小型猪成体耳部成纤维细胞系,1个达兰猪输卵管细胞系,1个达兰子宫细胞系,1个达兰猪软骨细胞系。另外,我们还建立了1头商品猪的颗粒细胞系。在培养实验中,我们发现颗粒细胞体外增殖速度慢,传代接种密度要求比其它几种细胞高,与吴中红(2002)的报道相似。可能本实验所用的培养系统不适于颗粒细胞的体外生长。因此,还需要进一步探索猪颗粒细胞体外培养的最佳条件。

4.2 体细胞的准备是核移植克隆中非常重要的一个环节。体细胞的倍性是否正常直接影响克隆的结局(Oback and Wells 2002)。体外培养的影响因素,都可能影响细胞的生长,增殖以及细胞染色体倍性等。培养温度,培养气体环境,培养液中血清浓度,所用基础培养基,换液间隔,传代频率,接种密度等都可能使细胞在体外的生长动力学发生改变(薛庆善 2002)。本实验培养的一株胎儿成纤维细胞传到第15代,就表现出转化倾向,很可能是频繁的更换血清所致。由于疯牛病的出现,美国血清被严禁进口。所以在培养到第12代时只能使用国产血清或者德国血清。这也和细胞逐渐发生形态衰老,染色体异倍性增加出现的时间相吻合(资料未显示)。染色体异倍性增加将直接导致克隆效率下降或者就不能用于核移植(Oback and Wells 2002)。所以,对已经液氮冷冻保存的细胞系来讲,在体外培养时,一定要注意经常观察细胞状态,使用优质血清,及时传代,避免培养条件的急剧变化,维持培养环境的相对稳定,以减少操作上人为的对细胞的伤害。

4.3 各种细胞类型用于克隆的效率。在已经被用于成功获得克隆动物的供核体细胞中,胎儿成纤维细胞是应用最广的。尤其在生产转基因,基因敲除等基因组修饰的大动物克隆时,胎儿成纤维则是首选。因为胎儿成纤维细胞在体外培养生长寿命长,可以在较长时间内保持正常的染色体倍性而不发生转化,留给人们较充裕的时间进行转基因操作以及阳性细胞筛选。Lee等(2003)等比较了输卵管上皮细胞,颗粒细胞以及胎儿成纤维细胞和成体成纤维细胞的克隆胚胎发育,认为胎儿成纤维细胞最适于做猪体细胞克隆供体细胞。

4.4 体细胞与受体卵母细胞的细胞周期阶段协调是克隆成功的最关键因素之一;体细胞与去除核物质的卵母细胞构成克隆胚胎后,保持正常倍性至关重要,因为只有倍性正常才能进一步发育。Dolly羊的制作者 Wilmut 等(1997)坚持认为血清饥饿诱导细胞进入G0期对重新程序化有益。尽管这种处理不是获得克隆动物所必需的。目前,人们已经利用了除S期之外的其它阶段的细胞得到了后代。诱导体外培养细胞进入G0/G1期的方法有多种,其中最流行的有血清饥饿法和接触抑制法。Kues等(2000)发现血清饥饿2d后再进行饥饿,G0/G1期细胞比例不会再有显著增加,反而,会造成许多细胞走向凋亡,或染色体异倍性增加。接触抑制是一种高效,简单的G0/G1同期化方法。但是不同类型细胞或不同来源细胞对其敏感性不一。我们的结果比较了这两种方法诱导G0/G1期的效率。发现二者差异不显著;另外血清饥饿2d和4d差异不明显,同样接触抑制2d和4d差异也不显著。这提示我们,在诱导G0/G1期时,处理2d就行了。当然,同期处

理时间长短对克隆效率的影响还需要进一步深入研究。

总之,本实验用常规组织块法建立了猪胎儿成纤维细胞系,并进行了液氮冻存。经体外培养发现至少在传 10 代之前的细胞中染色体倍性仍是正常的占优势。完全可以用作普通克隆的核供体。

第七节 猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活参数研究

摘要

比较了不同的培养基、氧分压以及添加 Insulin 和 LIF 对猪卵母细胞体外成熟、成熟后孤雌激活发育的影响。本研究首次尝试将一种新的胚胎培养基应用于猪卵母细胞体外成熟。另外本实验还探索了猪体外成熟卵母细胞孤雌激活方案。结果如下：(1) NCSU-23 中，卵母细胞核成熟(到 MII)明显优于在 TCM199 中成熟的效果 ($p < 0.05$)；(2) 1.4kV, 100 μ s, 1DC 电激活后，卵母细胞死亡率明显高于 2.0kV/cm, 30 μ s, 1DC 和 2.0kV/cm, 60 μ s, 1DC 处理组。但激活后胚胎卵裂率和囊胚率相似；(3) 使用 Ionomycin+6-DMAP 处理后，胚胎卵裂以及囊胚率都明显不如电激活处理；(4) 以 NCSU-23 为基础培养基，高氧分压 (20% O_2) 成熟后，MII 卵母细胞显著多于低氧分压 (7% O_2) 成熟；以改进的 PZM-3 成熟卵母细胞，核成熟上 20% O_2 优于 7% O_2 。如果不考虑气相的影响，PZM-3 的成熟效果明显不如 NCSU-23；(5) 添加 5 μ g/ml Insulin 后卵母细胞成熟效果显著提高，但是成熟后激活发育与非添加组没有显著改善。而添加 1000IU/ml LIF 卵母细胞核成熟率不但没有明显提高，孤雌激活后囊胚率急剧下降，而卵裂率以及囊胚细胞总数都没有明显改变。上述结果表明①NCSU23 是猪卵母细胞比较理想的培养基，其成熟卵在 2.0kV/cm, 30 μ s, 1DC 或者 2.0kV/cm, 60 μ s, 1DC 电击参数激活下发育比较好；②低氧对卵母细胞核成熟不利，但附植前孤雌胚胎发育具有培养基依赖性；③添加 Insulin 可以改善卵母细胞核成熟，而添加 LIF 对卵细胞质成熟有害；④PZM-3 如果应用于卵母细胞体外成熟还需要进一步优化。

1 前言

卵母细胞体外成熟是动物胚胎体外生产技术以及体细胞核移植生产克隆动物技术中十分重要的环节。尤其对家畜来说，利用屠宰场取得的卵巢来获取大量卵母细胞，可以为胚胎生物技术研究及生产实践提供丰富的原材料(Coy and Romar 2002)。近几年，猪的卵母细胞体外成熟得到了广泛关注。为了解决猪胚胎体外生产中的两个主要难题：细胞质成熟不充分以及多精受精现象，人们首先将目光放在如何提高卵母细胞体外成熟质量上(Funahashi and Day 1997)。卵母细胞的质量是决定猪胚胎体外生产效率的一个限速步骤。目前认为，卵母细胞的成熟不单纯是指核成熟，还包括了细胞质的成熟(Day 2000)。在培养基中添加生长因子(Abeydeera *et al.* 2000)，激素(Marchal *et al.* 2003)，卵泡液(Tatemoto *et al.* 2004)以及和卵泡细胞共培养(Hoshino Yoichiro *et al.* 2005)等许多旨在提高细胞质成熟效率的方法相继建立。

猪卵母细胞在体外成熟之后，施加一定的电刺激，可以诱导其进行胚胎发育，即孤雌生殖。孤雌生殖可在一定程度上帮助检验卵母细胞的成熟质量。也是生物学基础研究一个重要的平台。目前，将猪的孤雌激活胚胎移植到受体猪，已经可以建立妊娠，并发育为 55 天的胎儿(King *et al.* 2002)。至今尚未有得到孤雌生殖的猪成活后代，但最近日本科学家借助核移植技术，同时结合基

因操作技术获得了孤雌生殖的小鼠后代(Kono *et al.* 2004)。也许将来可以利用相似的技术得到猪的孤雌生殖后代。

本实验主要目的是建立猪卵母细胞较理想的成熟体系和激活策略,以为后期开展核移植提供足量,优质的卵母细胞和高效,稳定的激活方法。

2 材料与方法

2.1 材料

各种溶液配制

2.1.1 冲卵液:TL-HEPES-PVA

6.663 g NaCl, 0.237 g KCl (Sigma, P4504), 0.168 g NaHCO₃ (Sigma, S8875), 0.041 g NaH₂PO₄ (Sigma, S5011), 1.868 ml Na Lactate (Sigma, L7900), 0.102 g MgCl₂·6H₂O (Sigma, M0250), 2.383 g HEPES (Sigma, H3784), 0.065 g penicillin G, 0.010 g phenol Red (Sigma, 5530), 0.294 g CaCl₂·2H₂O (Sigma, C7902), 0.100 g polyvinyl alcohol (PVA, Sigma, P8136), 2.186 g sorbitol (Sigma, S1876), 0.05 g streptomycin sulfate, 0.022 g sodium pyruvate (Sigma, P4562). 先用 100ml Milli-Q 水加热溶解 PVA,待 PVA 溶解且冷却至室温后,加入 700ml Milli-Q H₂O,再分别加入上述成分。调 pH 为 7.2- 7.4 后用 Milli-Q H₂O 定容至 1000 ml, 使渗透压为 295-310 mOsm.,0.22 μm 滤器过滤分装,放于 4℃ 保存,2-3 周内用完。用于冲取 COCs。

2.1.2 DPBS-PVA

先用 100ml Milli-Q 水加热溶解 PVA,待 PVA 溶解,冷却后再取 9.55gDPBS 粉末,添加 Milli-Q 水,使之溶解,并定容至 1L。用于冲洗 COCs 和配制脱卵丘液。

2.1.3 NCSU-23 (North Carolina State University) medium

先取 300ml Milli-Q 水, 再按顺序加入 3.178 g NaCl, 1.053 g NaHCO₃, 0.178 g KCl, 0.081 g KH₂PO₄ (Sigma; P5655), 0.147 g MgSO₄·7H₂O (Sigma, M1880), 0.125 g CaCl₂·2H₂O (Sigma, C7902), 0.500 g D—Glucose, 0.073 g Glutamine (Sigma, G7029), 0.438 g Taurine (Sigma, T7146), 0.273 g Hypotaurine Sigma, H1384), 0.033 g Penicillin G, 0.025 g Streptomycin.调 pH 为 7.2- 7.4 后用 Milli-Q H₂O 定容至 500 ml, 使渗透压为 295-310 mOsm, 用于卵母细胞体外成熟基础培养基或者胚胎培养基。0.22 μm 滤器过滤分装,放于 4℃ 保存,2-3 周内用完。

2.1.4 成熟培养液:

NCSU-23(无 BSA)+10%pFF+10IU/ml hCG+10IU/ml PMSG+ 0.1mg/ml L-半胱氨酸,或者 TCM199+10% pFF+10 IU/ml hCG+10 IU/ml eCG+ 0.1 mg/ml L-半胱氨酸。

2.1.5 脱卵丘液:

取 50ml DPBS-PVA, 称取 100 mg/mL 透明质酸酶,缓慢搅拌,使之溶解并用 DPBS-PVA 定容

至 100ml, 0.20 μ m 针头滤器在超净台内过滤, 分装到 1.5 ml 离心管(Eppendorf 管)内, -20℃ 保存备用。用前 39℃ 预温。

2.1.6 融合/激活液:

0.25-0.28 M (4.555 g-5.002 g/100ml) Mannitol, 0.1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (先配成 14.7 mg/L, 10×母液, 再取 10ml 母液), 0.1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (先配成 20.33 mg/L, 100×母液, 再取 1ml 母液), 0.5mM HEPES (先配成 119.15mg/L, 100×母液, 再取 1ml 母液), 0.01% PVA(w/v), 用 Milli-Q 水定容至 100ml, 超净台内 0.20 μ m 滤器过滤分装, 4℃ 保存, 用前 39℃ 预温。

2.1.7 胚胎培养液:

取上述 NCSU-23 20ml, 称取 200mg 无脂肪酸的 BSA, 轻轻搅拌使之溶解, 然后再用 NCSU-23 定容至 50ml, 0.20 μ m 滤器过滤分装, 4℃ 保存备用。

2.1.8 显微操作液 无钙 H-NCSU-23:

0.76965g NaCl, 0.0168g NaHCO_3 , 0.0356g KCl, 0.0162g KH_2PO_4 (Sigma, P5655), 0.0293g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, M1880), 0.1g Glucose, 0.0146g Glutamine (Sigma, G7029), 0.15012g Taurine (Sigma, T7146), 0.2383g HEPES, 0.4g BSA, 0.0065g Penicillin G, 0.005g Streptomycin, Milli-Q H_2O 溶解定容至 100ml。将上述成分按顺序加入混匀。调 pH 为 7.2-7.4 渗透压为 260-290 mOsm., 0.20 μ m 滤器过滤分装, 4℃ 保存备用。

2.1.9 地衣红染液:

工作浓度为 1%, 先配制 45% 的醋酸溶液(取 45ml 醋酸, 用水定容至 100ml), 称取 1g 地衣红溶解其中。常温保存备用。

2.1.10 生理盐水:

0.9% 的氯化钠溶液, 称取 9g 氯化钠, 用蒸馏水溶解, 并定容至 1L, 高压湿热灭菌。

2.1.11 无水乙醇:冰醋酸:

卵母细胞核相染色固定用, 现用现配。比例 3:1(v/v)。

2.1.12 冰醋酸:甘油:dd H_2O :

用作卵母细胞核相染色脱色液, 按体积比=1:1:3, 现用现配。

2.1.13 离子霉素

0.27ml DMSO 溶解, 分装于 1.5ml 离心管中, 每管 10 μ L, -20℃ 冻存; 使用时加 9.99ml 胚胎培养液, 过滤除菌, 分装到 1.5ml 离心管内, 4℃ 保存备用。

2.1.14 6-DMAP

100× 的储存液; 加 15.3ml DMSO 溶解 500mg 的 6-DMAP, 每 5ml 分装于 15ml 离心管中,

余下的 0.3ml 则分装到 1.5ml 离心管中, -20℃ 冻存。每管 0.1ml, 工作浓度为 2mM, 作用时间 3-5 小时。使用时, 每 1ml 培养液 9 中添加 10 μ L。

2.1.15 细胞松弛素 B

Cytochalasin B, 加 2.5ml DMSO 溶解 5mg 的 CB, 分装到 1.5ml 离心管, 每管 0.1ml, -20℃ 冻存。工作浓度为 5 μ g/ml~7.5 μ g/ml, 作用时间 15min。

2.1.16 放线菌酮(Cycloheximide, CHX)

Sigma 原装浓度 100mg/ml; 取 100 μ L, 用 DMSO 稀释到 1ml, 则浓度为 10mg/ml, -20℃ 冻存。如果工作浓度为 10 μ g/ml, 则每毫升溶液中可加入储存液 1 μ L(1000 \times)。

2.1.17 Hoechst33342

储存液用超纯水过滤后, 10ml 溶解 100mg, 浓度为 10mg/ml, -20℃ 冻存; 取此浓度溶液 1ml, 稀释到 10ml, 浓度为 1mg/ml; 如果工作浓度为 5 μ g/ml 时, 则每毫升溶液添加 5 μ L。

2.1.18 PMSG/eCG:

1ml 生理盐水溶解 1000IU, -20℃ 冻存; 如果工作浓度为 10IU/ml, 则每 ml 成熟基础液中加 10 μ L。 100 \times 。

2.1.19 hCG

1ml 生理盐水溶解 1000IU, -20℃ 冻存; 如果工作浓度为 10IU/ml, 则每 ml 成熟基础液中加 10 μ L。 100 \times 。

2.1.20 EGF

1000 \times , -20℃ 冻存; 工作浓度为 10ng/ml。

2.1.21 Insulin

1000 \times , -20℃ 冻存; 工作浓度为 5 μ g/ml。

2.1.22 PZM

取 200ml Milli Q 纯水, 按顺序加入以下成分: 3.156 g NaCl, 1.053 g NaHCO₃, 0.373 g KCl, 0.024 g KH₂PO₄, 0.049 g MgSO₄·7H₂O, 0.308 g Ca-lactate·5H₂O, 0.011 g Na-pyruvate, 0.073 g L-glutamine, 0.273 g hypotaurine, 10 ml BME amino acid solution, 5 ml MEM non-essential amino acid solution, 0.033 g penicillin G, 0.025 g streptomycin, 混匀后再用容量瓶添加 Milli Q 纯水定容至 500ml。调节 pH 为 7.2-7.4, 渗透压为 288 \pm 2 mOsm., 4℃ 冻存。

2.2 主要仪器:

融合仪: Electro-cell manipulator, ECM2001, BTX, USA

融合槽: BTX, USA

体视显微镜: SMZ1000, Nikon, Japan

体视热台: Tokai, Japan

倒置显微镜: Nikon E800, Japan;

数码图像采集系统: Pixera, USA

数码照相机: CP4500, Nikon, Japan

2.3 实验耗材

离心管: 50ml,

注射器: 10ml 或者 20ml 带 18 号针头

35mm 和 60mm 直径细菌培养皿:

胚胎吸管: 用 1 根长度为 10cm, 直径为 2.5mm, 在酒精灯上拉制成 2 根细端直径为 200 μ m, 长 2cm;

染色缸, 载玻片, 盖玻片和暗盒等。

2.4 实验方法

2.4.1 猪卵母细胞体外成熟

从屠宰场取卵巢, 放入 28°C-35°C, 含青霉素和硫酸链霉素的生理盐水中, 2 h 内运回实验室

↓
用配有 18 号针头的 20mL 注射器抽吸卵巢上 3-6 mm 的卵泡

↓
将抽取液放于 50mL 离心管中, 37°C 水浴静置 15min

↓
去上清, 加入 PVA-TL-HEPES 重悬沉淀, 再静置 15min, 重复一次

↓
将重悬液放入直径 60 mm 的塑料培养皿中, 在体式显微镜下, 用口吸管挑选

↓
卵丘包裹 2 层以上, 致密, 而且胞质均匀的卵丘细胞-卵母细胞复合体 (Cumulus-Oocyte-complexes, COCs), 用成熟培养液洗涤 3 遍(图 7.1 A, B)

↓
转入在培养箱中至少已经平衡 4 h 的培养液滴内(每 100 μ L 液滴放 25 枚). 每一直径 35 mm 的塑料培养皿中做 4 个液滴, 用胚胎级矿物油覆盖.

↓
将 COCs 先在成熟培养液中培养 20 \pm 2 h

↓
然后转移到无 hCG 以及 eCG 的成熟液中继续培养 20 \pm 2 h

2.4.2 pFF 的制备:

抽取卵巢上 4-8 mm 直径的卵泡, 将抽取液放入 50 mL 离心管, 1600 \times g 离心 30 min

↓
取上清液, 用 0.45 μ m 针头滤器过滤

↓
分装到 1.5 mL 离心管中

↓
放入 -20°C 保存备用

2.4.3 成熟培养后 COCs 上卵丘细胞的去除:

成熟 42-44h 的, 用含 1mg/ml 透明质酸酶的 DPBS 脱卵丘:

↓

80-100 个 COCs/200 μ l HAE, 100 μ l 移液器吹打 3min,

↓

再用末端直径与卵母细胞相近(约为 120-130 μ m)的胚胎吸管反复吸吐仍带卵丘细胞的卵,
彻底除去卵丘细胞;

↓

在 DPBS-PVA 或者无 Ca^{2+} , Mg^{2+} HEPES 缓冲 NCSU-23 洗涤 3 遍备用。

2.4.4 卵母细胞核相染色

取上述已经彻底除去卵丘细胞的成熟卵母细胞

↓

将卵母细胞转移到事先准备好的载玻片上(注意液滴不能太大,也不能太小)排列成直线

↓

在直线液条上下各做二条平行的凡士林(使每边的两条紧挨着,充分利用载玻片边缘)

↓

在卵母细胞所在液滴条与凡士林条之间各滴上一排生理盐水,体式镜下盖上盖玻片,用铅笔
或者注射器针尖轻轻点压(注意力度均衡)

↓

在标记好之后,用生理盐水洗(在载玻片一侧滴上生理盐水,另一侧用吸水纸吸)

↓

固定:放入盛满固定液(冰醋酸:无水乙醇=1:3)的染缸或烧杯中,固定 48h 以上

↓

无水乙醇洗涤,除去固定液(一侧滴,另一侧用吸水纸吸)

↓

1%地衣红 (溶于 45%的冰醋酸水溶液中,用之前 10,000 rpm,至少离心 5min,取上清)染色: 在
载玻片一侧滴上,另一侧用吸水纸吸, 染色 5-10min

↓

脱色液(醋酸:甘油:超纯水=1:1:3)充分脱色

↓

指甲油封片,相差显微镜下观察

2.4.5 卵母细胞孤雌激活

2.4.5.1 电刺激:

成熟 42-44h 并且已经脱去卵丘细胞后,选择卵周隙明显, 卵细胞膜完整,且排出第一极体的
卵母细胞(图 7.1 D)

↓

先用 39℃ 预温且上覆石蜡油的激活液洗涤 3 遍, 并在其中平衡 5min

↓

将平衡好的卵母细胞转移到已经铺满激活液的融合槽中,融合槽电极宽度 0.5mm



电融合仪参数为 1 个 AC, 10v, 5s 而后是 1 个 DC, 1.2-2.0kv/cm, 30-100 μ s. 进行电刺激



电刺激 1min 之后,将卵母细胞用 NCSU-23+4mg/ml+5 μ g/ml CB 洗涤 5 遍,



洗涤后将卵母细胞转移到石蜡油覆盖并预先在 CO₂ 培养箱中平衡至少 2h 的
NCSU-23+4mg/ml+5 μ g/ml CB 液滴内 39℃, 5% CO₂, 100%湿度培养 3-5h。

2.4.5.2 化学激活

成熟 42-44h 并且已经脱去卵丘细胞后,选择卵周隙明显,卵细胞膜完整,且排出第一极体的
卵母细胞



先用含 15 μ M 离子霉素的 NCSU-23+4mg/ml BSA 液滴洗涤 3 遍,再于其中, 39℃, 5% CO₂,
100%湿度培养 20min,



洗涤后转移到含 2.0mM 6-DMAP 的 NCSU-23+4mg/ml BSA 液滴内洗涤 3 遍后,再于其中
39℃, 5% CO₂, 100%湿度培养 4-6h

2.4.6 孤雌激活后胚胎培养

将激活处理的卵母细胞取出,在 NCSU-23+4mg/ml 中洗涤 3 遍,



转入石蜡油覆盖并预先在 CO₂ 培养箱中平衡至少 2h 的 NCSU-23+4mg/ml 液滴内培养,



液滴大小为 20-50 μ L;每个液滴中放 10-15 个卵



39℃, 5% CO₂, 100%湿度培养 48h 和 168h 观察记录卵裂率和囊胚形成率。

2.4.7 囊胚细胞计数

取出各种处理的囊胚,在含 3.7%多聚甲醛的 DPBS 中洗涤 3 遍后再固定 10min



将固定后的囊胚转移到含 10 μ g/ml Hoechst33342 (bisbenzimidazole) 的 DPBS 中避光的暗盒中
室温孵育 10 分钟



染色结束后,将囊胚转移到载玻片上,尽量少带液体,



尽快用 9:1 (3:1) 的凡士林/石蜡油在其四角点四个柱,盖上盖玻片,



在实体显微镜下小心按压盖玻片,使卵受压后稍微膨大但不至于破碎为宜,用指甲油封片,

↓
Nikon E800 显微镜, 紫外光激发下观察,照相,计数。

2.5 试验设计

试验一 COCs 体外成熟培养基基础培养基的影响。 同一批抽取的合格 COCs 随机分别在 NCSU-23 和 TCM199 基础培养基(添加成分相同)中培养成熟,通过地衣红核相染色确定 MII 卵母细胞数量,比较对核成熟的影响。

试验二 旨在确定理想的电激活参数,因此挑选三个参数组合: 2.0kv/cm,30μs,1DC; 2.0kv/cm,60μs,1DC; 1.4kv/cm,100μs,1DC。选取排出第一极体的 MII 期卵母细胞进行电激活。比较对卵裂,囊胚发育的影响。 在开展电激活的同时,选择同批次的 MII 期卵利用化学激活处理,以研究电击和化学处理的影响,哪一种更好。

试验三 体外成熟时培养气相中氧分压对卵母细胞体外成熟以及成熟卵孤雌激活发育的影响。将 COCs 在高氧(20%O₂)和低氧(7%O₂)分压, 放入不同 NCSU-23 中进行成熟。同时,本实验首次尝试利用 PZM-3 开展卵母细胞成熟。本实验按照 2×2 因素设计。

试验四 研究以 NCSU-23 为基础培养基的成熟体系中添加 1000 IU/ml LIF 或者 5 μ g/ml Insulin 对卵母细胞成熟以及孤雌后早期发育的影响。

2.6 统计与分析

对于卵裂率,囊胚率,使用 SPSS(Version 11.0)进行 χ^2 检验,p<0.05 时即认为差异显著。对于囊胚总细胞数以及 ICM/总细胞数比值利用方差分析检验有无显著差异,同样 p<0.05 时认为有明显差异。

3 结果

3.1 不同的基础培养基对猪卵母细胞体外成熟的影响

如表 7.1 在 NCSU-23 中,卵母细胞核成熟(到 MII,地衣红核相染色如图 7.1 H)明显优于在 M199 中成熟的效果(58.4% vs. 90.3%, p<0.05)。

表 7.1 卵母细胞体外成熟培养基的成熟效果

Table 7.1 Effects of basic culture media on nuclear maturation of oocytes		
培养基 basic media	培养 COCs No. COCs cultured	MIII 期卵(%) No. MII oocytes (%)
M199	154	90(58.4) ^a
无 BSA 的 NCSU-23	154	139(90.3) ^b

核减数分裂成熟率=MIII 卵数/培养数 nuclear maturation rate=No. oocytes at MII stage/ No. oocytes IVM
同一栏内上标不同意味着有显著差异 different superscripts at the same column means significant differences exist.

3.2 不同的电激活参数处理后猪卵母细胞发育

利用 1.4kv,100μs,1DC 处理后, 卵母细胞在激活后的卵裂率和囊胚率上没有明显不同(见表 7.2),但是该参数处理后卵母细胞死亡率明显高于其它两组 (30.6% vs. 11.8%, 6.6%)。

表 7.2 不同电击参数对卵母细胞孤雌发育的影响

Table 7.2 effect of different electric parameter combination on development of PAEs

电激活参数	接受电击卵数	死卵数(%)	有效卵数	卵裂数(%)	囊胚数(%)
electric parameters	No. oocytes electrically stimulated	No. dead oocytes	No. stimulated oocytes cultured	No. embryos cleaved	No. blastocyst
2.0kv/cm,30us,1DC	91	6(6.6) ^a	85	73(85.9)	42(49.4)
2.0kv/cm,60us,1DC	127	15(11.8) ^a	112	82(73.2)	37(39.0)
1.4kv/cm,100us,1DC	121	37(30.6) ^b	84	61(72.6)	27(32.1)

卵死亡率=死卵数/总处理卵数 death rate=oocyte=No. dead oocyte/total oocytes treated

卵裂率=卵裂数/有效卵数 cleavage rate=No. oocytes cleaved/no oocytes cultured

囊胚率=囊胚数/有效卵数 blastocyst rate=No. blastocyst/no. oocytes cultured

同一栏内上标不同说明存在显著差异 different superscripts in the same column mean significant difference exist.

3.3 不同激活方法处理后胚胎发育

Ionomycin+6-DMAP 处理后,胚胎卵裂以及囊胚率都明显不如电激活处理。如表 7.3。

表 7.3 不同激活方法对胚胎发育的影响

Table 7.3 effect of different activation protocols on in vitro development potential of PAEs

激活策略	处理卵数	卵裂数(%)	囊胚数(%)
activation protocols	oocytes treated	No. oocytes cleaved(%)	No. blastocyst(%)
化学激活	153	22(14.4) ^a	5(3.3) ^a
chemical activation			
电激活	232	169(72.8) ^b	73(31.5) ^b
electrical activation			

卵裂率=卵裂数/处理卵数 cleavage rate=No. oocytes cleaved/No. oocytes treated

囊胚率=囊胚数/处理卵数 blastocyst rate=No. blastocyst/No. oocytes treated

同一栏内上标不同说明存在显著差异 different superscripts in the same column mean significant difference exist.

3.4 不同氧分压环境对猪卵母细胞体外成熟的影响

如表 7.4 所示,以 NCSU-23 为基础培养基: 20%的氧分压成熟后,MII 卵母细胞显著多于 7% 氧分压成熟;同样,我们使用的另外一种基础培养基 PZM 成熟时也是高氧优于低氧。如果不考虑气相的影响,PZM-3 的成熟效果明显不如 NCSU-23。

表 7.4 不同氧气培养环境对卵母细胞成熟及孤雌激活胚发育的影响

Table 7.4 effect of oxgen tension on oocytes IVM and subsequent in vitro development of PAEs

培养基	氧气分压	培 养	MII 期卵	激活处理卵	卵裂胚胎数	囊胚数(%)	囊胚总细胞数
basic	oxygen	COCs	(%)	数	(%)	No.	Total cell
culture	tension	No.	No. oocytes	No.oocytes	No. embryos	Blastocyst(%) ^b	number of BL
media		COCs	arrived at	activated	cleaved(%) ^a		(mean±S.D.)
		cultured	MII				
			stage(%)				
PZM-3	20%	260	193(74.2) ^c	175	89(50.9)	20(11.4) ^c	30±10 (n=6)
	7%	146	82(54.2) ^d	102	49(48.0)	24(23.5) ^d	29±7 (n=8)
NCSU-23	20%	237	210(88.6) ^c	111	67(60.4)	26(23.4)	34±11 (n=23)
	7%	244	195(79.9) ^d	116	78(67.2)	24(20.7)	35±10 (n=10)

核减数分裂成熟率=MII 卵数/培养数 nuclear maturation rate=No. oocytes at MII stage/ No. oocytes IVM
卵裂率=卵裂数/处理卵数 cleavage rate=No. oocytes cleaved/No. oocytes treated
囊胚率=囊胚数/处理卵数 blastocyst rate=No. blastocyst/No. oocytes treated
同一栏内上标不同说明存在显著差异 different superscripts in the same column mean significant difference exist.

3.5 添加 LIF 或者 Insulin 对卵母细胞体外成熟以及后期孤雌发育的影响

如表 7.5 所示,当添加 5μg/ml Insulin 成熟效果显著提高,成熟后激活再发育与非添加组相近。添加 1000IU/ml LIF 处理后,卵母细胞核成熟率不但没有明显提高,而且孤雌激活后囊胚率急剧下降,但对卵裂率以及囊胚总细胞数影响不大。

表 7.5 添加成分对卵成熟以及激活后发育的影响

Table 7.5 effect of LIF and Insulin supplementation on oocytes nuclear maturation and development of PAEs

添加物	培养 COCs	MII 期卵(%)	培养胚胎数	卵裂数(%)	囊胚数(%)	囊胚细胞数
factors	No. COCs	No. MII	No. embryos	No.	No.	Total cell
supplemented	cultured	oocytes(%)	cultured	cleaved(%)	blastocyst(%)	number(mean±SD)
Insulin	122	114(93.4) ^a	98	81(82.7)	47(48.0) ^a	39.8±18.2(9)
LIF	170	125(73.5) ^b	28	20(71.4)	4(14.3) ^b	36.0±13.0(9)
对照	186	142(76.3) ^b	43	38(88.4)	22(51.2) ^a	39.3±9.7(9)

核减数分裂成熟率=MII 卵数/培养数 nuclear maturation rate=No. oocytes at MII stage/ No. oocytes IVM
卵裂率=卵裂数/处理卵数 cleavage rate=No. oocytes cleaved/No. oocytes treated
囊胚率=囊胚数/处理卵数 blastocyst rate=No. blastocyst/No. oocytes treated
同一栏内上标不同说明存在显著差异 different superscripts in the same column mean significant difference exist.

4 讨论

4.1 关于培养基

在猪的体外胚胎生产技术各个环节中,卵母细胞质量非常关键,而其关键作用的最终体现离不开理想的体外成熟培养环境(Coy and Romar 2002)。许多研究发现体外卵成熟到 MII 后支持进一步发育的能力明显不如体内成熟的卵,至少部分说明体外培养条件还不完善(Day 2000)。体外培养最重要的就是培养基的选择。NCSU-23 和 TCM199 是当前应用最广,也可以说是最成功的两种培养基,此外还有一种较好的培养基 NCSU-37(Funahashi and Day 1997)。在构成完全成熟培养液时,还要添加一些生长因子,激素,卵泡液或者其它成分。基础培养基和这些物质搭配后的互作对卵母细胞的生长成熟影响很大(Abeydeera *et al.* 2000)。我们首先比较了在添加相同成分,其它条件一致的情况下,NCSU-23 和 TCM199 对卵成熟的影响。结果发现前者比后者理想。首先体现在核成熟上,到达 MII 期的卵母细胞前者明显多于后者。我们的结果和王海等(王海等, 2002)人的不一致,他们认为 TCM199 比 NCSU-23 好;另外,Hyun 等(2003)发现两种培养基成熟效果接近。这可能是跟大家所用的激素以及生长因子或者添加的卵泡液不同有一定的关系。来自大卵泡的 pFF 支持卵成熟比来自小卵泡的效果好。我们还尝试了一种新的成熟培养基 PZM-3,该培养基是日本学者在猪体外生产胚胎培养上首先使用的(Yoshioka *et al.* 2002)。至今,尚未有人尝试用其来进行卵母细胞 IVM。虽然 PZM-3 的成熟效果不如 NCSU-23 好,但是 PZM-3 中成熟的卵仍可以在孤雌激活后发育到囊胚。有必要进一步优化 PZM-3 的成熟配方以及其它条件。

4.2 关于培养环境

最近的研究表明,在低氧分压下成熟,猪卵母细胞孤雌激活后发育能力明显得到提高(Iwamoto *et al.* 2005)。还有研究认为在低氧(5%-7%O₂)气相下,成熟的卵母细胞体外受精胚胎发育能力得以提高,而且低氧环境可能通过减少活性氧自由基对卵的伤害以及改善细胞质成熟而促进后期的发育。不过就这一结论还有其它意见,如 Park 等(2005)发现高氧分压(20%O₂)成熟卵体外受精胚胎发育好于低氧成熟卵体外受精。我们设想是不是培养基对氧分压存在偏好。所以我们分别用 NCSU-23 和 PZM-3 为基础培养基,比较了两种氧分压下卵母细胞核成熟。结果表明在高氧下两种培养基的成熟都比低氧下核成熟好。但是对激活胚胎的发育来说,PZM-3 在低氧下有利于孤雌胚的囊胚发育,但卵裂没有明显改善。而 NCSU-23 无论氧分压高低对孤雌胚后期发育都没有显著影响。所以,可能培养基和添加成分之间的或者和环境之间的相互作用影响了卵母细胞成熟的质量,进而表现在后期发育上的效率不尽相同。

4.3 关于激活策略

目前,化学激活和电激活都是在核移植以及显微受精(田见晖 2003)或者孤雌生殖(吴中红 2002)研究中常用的方法。自然受精状态下,精子进入卵子激发卵子内的钙震荡,引发 MPF 活性降低,从而发动卵胞质对精子的各种作用,开展信息交流,为即将开始的胚胎发育提供物质信息保障。为了模拟这种自然的激活,人们分别利用电刺激或者化学试剂处理来达到引发胞质内钙离子急剧升高的过程激活卵母细胞,以获得进一步发育。化学激活处理,可以同时处理大规模的卵子,但是化学试剂一般都有毒性。而电激活操作简单,不过需要专门的仪器,然而电激活结果稳定,无毒性。在开展猪的核移植过程中,使用电激活的居多数。电刺激效果因场强,电击持续时间,脉冲次数等不同影响激活效果。一般认为,激活时如果场强高,那么持续时间要相对短些,脉冲次数不

宜超过 2 个;而如果场强低,则持续时间相对长些,脉冲次数也不宜超过 3 个。研究发现,电刺激场强在 1.6~2.2kv/cm 时,1 个直流脉冲足以激活卵母细胞,而且还可以得到比较高的囊胚发育率。如今获得囊胚率最好的时候能超过 50%的研究有 Zhu J 等(2002)和 Lee JW 等(2004)。我们分别比较了 3 种电激活参数: 2.0kv/cm,30 μ s,1DC; 2.0kv/cm,60 μ s,1DC 和 1.4kv/cm,100 μ s,1DC 的激活效果,发现 3 组间在激活胚卵裂以及囊胚形成方面没有明显差异,但是 1.4kv/cm,100 μ s,1DC 处理组死卵率明显高于其它两组。我们所得到的囊胚率接近 Zhu J 等 (2002)和 Lee JW 等(2004)的平均水平。而化学激活处理后胚胎发育下降明显。结果和 Betthauser 等(2000)的不同,这可能是由于卵的来源不同所致,我们用的是初情期前青年母猪的卵,而他们用的是经产母猪的卵。也有可能是由于卵成熟培养基不同所致。

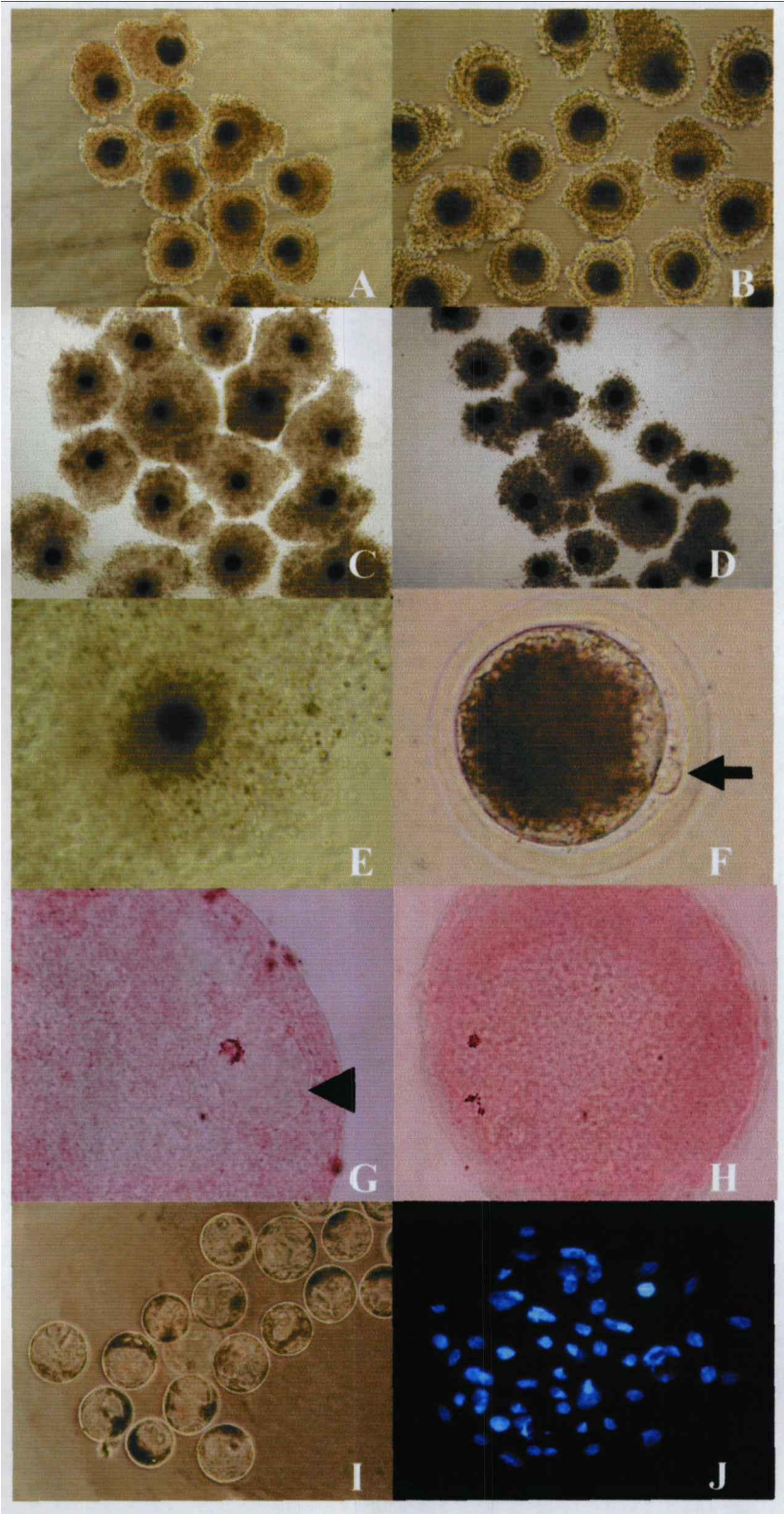
4.4 关于添加成分

卵母细胞成熟时添加生长因子、激素、卵泡液以及小分子量硫化合物等可以改善猪卵母细胞的细胞质成熟,从而促进体外胚胎的发育,减少多精受精等(Day 2000)。在牛的卵母细胞成熟中添加 Insulin 可以促进孤雌以及体外受精胚胎的发育。添加 LIF 可以改善小鼠(Tsai *et al.* 2000)、牛(Marquand-Le *et al.* 1993)和人(Dunglison *et al.* 1996)的体外囊胚发育,孵化以及附植后发育。我们添加分别 LIF 和 Insulin 到成熟培养基中,发现 Insulin 可以显著提高卵的核成熟,虽然在其中成熟的卵支持后期发育的能力和对照组相差不明显。而添加 LIF 后,核成熟无显著变化,但是后期囊胚形成受到极大影响。此前,在牛上发现高浓度 LIF 对囊胚发育有不利影响(Sirisathien *et al.* 2003)。有可能添加 LIF 对卵母细胞细胞质成熟会造成伤害。Eckert 等发现猪体内胚进行体外培养时添加 LIF 亦不能促进囊胚形成(Eckert *et al.* 1997)。猪卵裂球体外培养时添加 Insulin (10 μ g/ml 或者 100 μ g/ml)极大的促进了囊胚率的提高(Saito and Niemann 1991)。

综上所述,各种结果暗示 NCSU23 是猪卵母细胞比较理想的培养基,其成熟的卵在 2.0 kv/cm,30 μ s,1DC; 2.0kv/cm,60 μ s,1DC 电击参数激活下发育比较好。低氧对卵母细胞核成熟不利,但附植前孤雌胚胎发育具有培养基依赖性。添加 Insulin 可以改善卵母细胞核成熟,而添加 LIF 对卵细胞质成熟有害。

图 7.1 初情期前青年母猪卵母细胞体外成熟及随后孤雌发育。A: A 级 COCs, 150 \times ; B: B 级 COCs,200 \times ;C: A 级 COCs IVM 22h 后卵丘细胞扩散,150 \times ;D: B 级 COCs IVM 22h 后卵丘细胞扩散,150 \times ;E: IVM44hCOCs 卵丘细胞扩散,200 \times ;F 为排出第一极体(箭头)的脱卵丘 MII 卵母细胞,300 \times ;G:地衣红染色示生发泡,400 \times ;H:地衣红染色示 MII 卵母细胞,400 \times ; I: MII 卵母细胞孤雌后发育到囊胚期,200 \times ; J: Hoechst33342 染色示孤雌激活胚胎的总细胞数,400 \times 。

Figure 7.1 *In vitro* maturation and development of oocytes obtained from prepubertal gilts. A: grade A COCs, 150 \times ; B: grade B COCs, 200 \times ; C: cumulus expansion of grade A COCs after 22h of IVM start, 150 \times ; D: cumulus expansion of grade B COCs after 22h of IVM start, 150 \times ; E: expansion of COCs after 44h of IVM start, 200 \times ; F: oocyte at metaphase with polar body I, 400 \times ; G: oocyte at germ vesicle stage after oocin staining, 400 \times ; H: oocyte at mepaphase stage after oocin staining, 400 \times ; I: blastocyst of parthenogenetically activated MII oocytes, 200 \times ; J: total cell number count by hoechst33342, 400 \times ;



第八节 猪 IVFEs、PAEs 和 NTEs 的体外培养

摘要

本研究比较了 IVF、PA 以及 SCNT 胚胎的发育率和囊胚质量。三者发育率相似,但是在囊胚质量即 ICM/总细胞数比例上,IVF 和 SCNT 胚优于 PA 胚。比较了 PZM-3 和 NCSU-23 培养对孤雌激活胚以及克隆胚发育的影响。对 PA 胚来讲,PZM-3 明显好于 NCSU-23;而对 SCNT 胚,PZM-3 明显不利于卵裂,但是对囊胚发育影响不大。在 NCSU-23+4mg/ml BSA 中添加 $5\mu\text{g/ml}$ Insulin 对胚胎发育没有明显促进作用,而添加 1000IU/ml LIF 也没发现有损害早期发育的情况。上述结果表明,对孤雌胚或者体外受精胚理想的培养基,当用于克隆胚胎培养时却不一定是最佳的选择;孤雌胚胎在体内发育能力差,可能和 ICM/总细胞数很低有关。添加 $5\mu\text{g/ml}$ Insulin 或者 1000IU/ml LIF 对孤雌激活胚胎早期发育没有显著影响。

1 前言

猪体外胚胎生产(IVP)、体细胞核移植(SCNT)以及孤雌激活(PA)等现代胚胎生物技术对于开展抗病育种、提高肉质、增加猪肉产量、生产转基因或者基因组修饰猪为人类器官移植开辟来源供体、制备人类疾病模型以及生物学基础研究诸多方面的探索提供了强大的技术支撑。

体外培养是猪 IVP 的关键环节。尽管,近年来在体外成熟/体外受精、孤雌激活以及体细胞核移植各种方式生产的胚胎培养方面已经取得了很大的进展。但是,和体内生产的胚胎相比,发育率还很低。这说明体外培养各个环节还不如体内的发育环境理想(Abeydeera 2001)。

体细胞核移植胚胎和体外受精胚胎由于生产方式不同,在合子内发生的各种事件也不尽相同。因此,很容易让人猜想,他们对各种培养环境的反应以及适应能力也不会完全相同。研究表明,在牛上,IVF 和 SCNT 胚胎对培养基的需求不同(Mastromonaco *et al.* 2004)。而 Gao SR 等(2003)在小鼠上发现克隆胚胎在类体细胞培养的培养基里发育效率比常规的 IVF 胚培养基高。当前,在猪上,关于各种胚胎体外培养的比较较少。有研究(Machaty *et al.* 1998)认为,虽然囊胚细胞数的高低影响胚胎移植后的体内发育,但是体外培养的胚胎仍可以发育到期。Koo 等比较了牛(2002)体外受精囊胚和克隆囊胚的总细胞数,内胚团细胞与滋养层细胞数间的比例。发现克隆胚胎的总细胞数,内胚团:滋养层细胞数比例都明显低于体外受精胚胎。认为体细胞克隆效率低的原因之一可能是克隆囊胚的这种异常发育。最近他们又比较了猪(Koo *et al.* 2004)的体外受精胚以及克隆胚胎之间的囊胚构成。和牛上不大一样的是,发现克隆胚胎以及 IVF 胚胎的细胞数相似,都明显低于体内胚胎;NTE 和 IVFE 内胚团细胞数:滋养层细胞数比例也差不多,也不如体内胚高。这也可能反应了猪的体外培养体系不理想,或者胚胎发育物种差异的客观存在。同时对猪体外受精胚胎、孤雌激活胚胎以及体细胞核移植克隆胚胎三者进行系统研究的还不多。

本研究比较了猪体外受精胚胎、孤雌激活胚胎以及体细胞核移植克隆胚胎的早期附植前发育效率以及囊胚质量。期望能找到相对比较适合各种胚胎体外培养条件,以利于将来生产足够的

胚胎进行移植。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 主要仪器

显微操作仪: 成茂公司(*Narishg* 成茂公司 *e* ltd.),日本

倒置显微镜: TE300 和 TE2000U, Nikon,日本

体视显微镜: SMZ1000, Nikon, 日本

拉针仪: PN30,成茂公司,日本

磨针仪:EG-400,成茂,日本

烧针仪:MF900,成茂,日本

超净工作台:北京古威超净设备。

离心机:Centrifuge 5810R, Eppendorf,德国

培养箱:ThermoForma, SeriesII water jacketed CO₂ incubator, 3111 和 3131,美国

体视热台:东海公司(Tokai),日本

倒置热台:东海公司,日本

恒温热台: model260s 精密热台, CBL 光电技术,北京

数码照相机: CP4500,Nikon,日本

涡旋振荡器: IKA Minishaker, 德国

恒温水浴锅: 北京市长风仪器仪表公司

2.1.2 耗材

离心管: 1.5ml(eppendorf), 15ml, 50ml(BD Falcon,法国)

培养皿: 直径 30mm, 60mm(浙江 五洲)

玻璃管: 直径 2.5mm, 直径 1.0mm 薄壁, 北京正天易科贸有限责任公司。

2.1.3 工具制备:

2.1.3.1 注射针和固定针的制备参考了廉莉等报道的方法(廉莉等, 2003), 稍有改动。

2.1.3.2 制针前玻璃管处理:

将购买的国产,直径 1mm,长度 15cm 的玻璃管先用清洁液即强酸洗液(重铬酸钾 63g,浓硫酸 1000ml,和 200ml 蒸馏水)浸泡 1d;

↓

取出用自来水冲洗,反复注满水,倒空达 10 次以上;

↓

用 Milli-Q 水浸洗 2-3 次,放入烘箱, 56℃烘干;

↓

冷却后, 取出放于放入烧杯中, 用牛皮纸盖上, 避免灰尘落入。

2.1.3.3 显微操作去核针

拉针:

先打开拉针仪开关,调节各参数如下: 拉针工作温度, 80-90℃; subforce, 28-31; mainforce, 90-105



取已经清洁处理的玻璃管, 安装到拉针仪上



按下“start”, 系统运行后小心卸下拉好的针管, 放入针盒内以备集中进行断针

断针:

打开断针仪开关, 首次操作先在加热丝上做一个直径 120 μm 大的玻璃珠, 即把一个拉好的针先在 4 \times 物镜下调好针尖与加热丝之间的相对位置,



10 \times 物镜下使针管尖端细部靠住加热丝, 调节加热温度至 70℃左右, 踩下脚控开关, 当加热丝上玻璃珠直径达到要求时, 立即提起玻璃管, 反复几次, 即可做好玻璃珠。



玻璃珠做好后, 即可开始为锻制注射针做准备。利用第一步方法, 调整好玻璃针位置, 在 10 \times 物镜下, 将玻璃管尖端内径 15-20 μm 部与玻璃针刚好接触, 似接非接。



将加热温度调整到 20℃左右, 踩下脚控开关, 当看到玻璃针和玻璃珠粘在一起, 而且玻璃管尖端有变弯的倾向时, 松开脚控开关, 由于降温收缩, 玻璃珠即可断开玻璃管的尖端。从而得到了符合要求的内径在 15-20 μm 的平口针。

磨针:

打开磨针仪开关, 先用水浸湿磨石, 并将磨石上方注水管内放满蒸馏水



将磨针角度定位在 45-55℃范围内, 将断好的尖端内径为 15-20 μm 的玻璃针管安装到固定柄上



旋动粗螺旋, 使针管快速下降, 到快要接近磨石的时候, 停下



换用细螺旋, 通过目镜观察, 小心将针管落在磨石上



调节磨石转速为 30rpm, 30s 后再使针管往磨石上落, 当看到尖端有变弯的倾向时停下;



持续 1min 后, 即可升起针管, 通过显微镜观察尖端是否已经形成斜口, 如果没有, 可以落下继续磨; 如果已经形成, 则可以撤下,



将撤下的针管, 连接到接在 20ml 注射器的内径为 1mm 的硅胶管上,

↓
首先将针管放入 20%氢氟酸水溶液中洗涤, 注意, 从放入之前, 就要一直推动注射器往外排气, 以免氢氟酸进入, 破坏尖端内壁, 堵塞针管。

↓
然后依次在 MilliQ 水中洗涤 5 遍, 之后放入针盒, 自然风干。

拔尖:

将磨好并且风干的针管安装到断针仪上, 按照前面的步骤调节好玻璃管和玻璃珠相对位置, 避免操作时相互碰到一起, 使磨好的针断裂。

↓
在 10×物镜下, 使针尖位于玻璃珠上方, 该位置在启动加热, 加热丝膨胀到无法触到为好,

↓
踩下脚控开关, 使加热温度在 20℃左右, 调节细螺旋, 轻轻的使针尖落下, 接触玻璃珠后当发现其尖端有粘在玻璃珠上的迹象时, 快速升起玻璃针, 同时松开脚控开关。

↓
拔出的尖长度应该不超过 5 μm。

↓
根据显微操作需要, 在断针仪上调整好针管位置, 用记号笔做上标记, 表明针尖所在面. 以备制作操作针弯曲角度时参考。

2.1.3.4 显微操作固定针

猪卵母细胞操作固定针管内径 20-30 μm, 外径 100-120 μm. 目前, 有两种方法来制备。

手工拉制:

点燃自制小酒精灯(青霉素瓶制), 取上述清洁好的针管, 在火焰上待针管变红时, 快速拉开, 在体视显微镜下观察直径 120-150 μm, 大致所在部位, 用小砂轮在上述大致部位断开针管, 而后在小酒精灯下焰烤若干下, 使尖端烧平滑, 内径 20 μm, 外径 100-120 μm。

机械拉制:

拉针过程同注射针, 只是拉制参数调整为: 加热温度 80℃, subforce 22-24, mainforce 50-80;

断针:

和注射针不同之处在于将玻璃针管细端直径在 120-150 μm 处与玻璃珠接触断针。

调节加热温度为 20-25℃, 踩下开关, 当在目镜下看到二者接触粘到一起, 松开开关, 即可获得复合要求的针管,

↓
将尖端直径在 120-150 μm 的平口针管升起, 调整使其尖端和玻璃珠在一个视野内, 并且在玻璃珠的正上方, 但在玻璃珠膨胀所触及的范围之外。

↓

调节加热温度至 50-70℃, 踩下开关, 并落下针管, 观察到针尖变平滑, 且内径在 30 μm 左右, 停止加热, 同时升起固定针, 放入针盒备用。

2.1.3.5 移卵/胚口吸管参考王敏康的方法(王敏康等, 1999)

在酒精灯上, 看到玻璃管变红时, 轻轻抬起同时用力拉开, 使细端长度为 4-8cm, 从中部断开, 即可得到两根移卵/胚口吸管。

2.1.3.6 融合判定拨卵针

在自制小酒精灯上将实心玻璃针拉开, 使细端长度约为 1-2cm, 直径在 20-40 μm 左右。

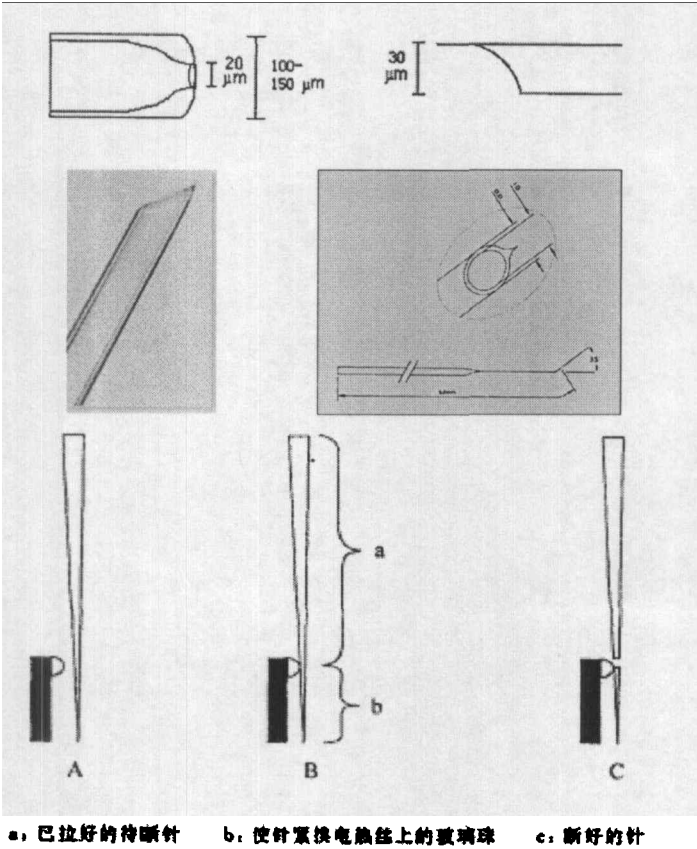


图 8.1 显微操作固定针管和去核/注射针管规格以及断针过程图示。

Figure 8.1 schematic representation of holder and injector pipette and breaking of microtubes for making of micromanipulation tools.

2.1.4 试剂

溶液配制

冲卵液

PVA-TL-HEPES 同第七节 2.1.1

卵母细胞成熟基础培养基

NCSU-23(无 BSA), PZM(无 BSA)同第七节 2.1.3 和 2.1.23.

胚胎培养液

NCSU-23, PZM-3 同第七节 2.1.7

卵母细胞脱卵丘细胞液:

含 1mg/ml 透明质酸酶的 PBS 液, 同第七节 2.1.5

卵母细胞显微操作液:

HEPES 缓冲的 NCSU-23,同第七节 2.1.8

取 3.2ml 200×CB 母液（工作浓度为 7.5μg/ml）加到 1ml 上述溶液中,即显微操作液。

融合/激活液:

0.25M 甘露醇+0.1mM Ca²⁺+0.1mM Mg²⁺+0.5mM HEPES+0.01%BSA,同第七节 2.1.6;

精子洗涤液:

含 0.1% (w/v) BSA 的 DPBS: 取 100 mg BSA,先用 80 ml DPBS 轻轻搅拌溶解,而后定容至 100 ml, 0.22 μm 的滤膜过滤除菌后 4℃保存备用;

体外受精液 mTBM: 按照下表配方进行配制(Abeydeera et al., 1997)

In vitro fertilization media: modified Tris-Buffered medium (mTBM) (100ml Milli-Q 水中含)

Ingredients	Amounts	g/100ml
NaCl	113.1mM	0.6611
KCl	3.0mM	0.0224
CaCl ₂ · 2H ₂ O	7.5mM	0.1102
Tris (free base, Fisher)	20mM	0.2324
D-Glucose	11.0mM	0.1982
Sodium Pyruvate	5.0mM	0.0550

Milli-Q水定容至100 ml后, 不用调pH值。0.22 μm的滤膜过滤除菌后4 ℃保存, 为体外受精培养液。受精前>48 小时取20 ml mTBM, 加入0.04 g BSA (Fraction V, 0.1%)和0.0136 g 苯甲酸钠咖啡因 (2.5 mM), 过滤除菌后放入CO₂ 培养箱中平衡>40 h以便使pH在7.2-7.4之间。

2.1.5 差异染色所需溶液:

含 0.1%PVA 的 PBS 或 TL-HEPES: 同第七节 2.1.1.

0.5%的(w/v) 链酶蛋白酶(pronase): 称取 100 mg 链酶蛋白酶, 用 PBS 溶解并定容至 20 ml,过滤分装,-20℃保存备用;

1:5 稀释的兔抗猪全血清(rabbit anti-pig whole serum): 将 1 倍体积的兔抗猪全血清和 4 份体积的 TL-HEPES-PVA 或者 PBS-PVA 相混合;

1:10 稀释的豚鼠补体(guinea pig complement):将 1 份豚鼠补体和 9 份 TL-HEPES-PVA

或者 PBS-PVA 相混合;

10 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (碘化丙啉, PI): 配制此浓度的 100 \times 母液,即: 取 10ml Milli-Q 水溶解 10mg PI, 分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用;使用时,取 10 μL 加到 1mlPBS-PVA 中即可。

10 $\mu\text{g/ml}$ bisbenzimidazole: 配制此浓度的 200 \times 母液,即: 取 10ml Milli-Q 水溶解 20 mg Hoechst33342, 分装后-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存;使用时,取 10 μL 加到 1 ml PBS-PVA 中即可。

2.2 实验方法

2.2.1 猪卵母细胞体外成熟

同第七节 2.4.1

2.2.2 卵母细胞孤雌激活

电刺激操作同第七节 2.4.5.1,参数为 1DC, 30 μs , 2.0kv/cm; 激活液 2.1.6;

2.2.3 体外受精

精液保存:从北京中荷示范种猪场购得新鲜采集的两个达兰猪精液,经常使用冰和水来调节保温瓶温度基本维持在17 $^{\circ}\text{C}$,这样可以存放一周。

体外受精前精液的预处理

将两个猪的精液各取出5 ml混合,用含抗生素的DPBS(含0.1% BSA,fraction V) 400 \times g, 4min离心洗涤;

↓

取出少许精子沉淀,进行精子计数;

↓

用不含抗生素的mTBM稀释为 $10 \times 10^6/\text{ml}$, 39 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 ,100%湿度孵育90min。

卵母细胞准备

将IVM 42-44 h的COCs卵丘用1 mg/ml透明质酸酶作用,100ml移液器轻轻吹打去除卵丘细胞;

↓

选择卵细胞膜完整,卵周隙清晰的卵母细胞;

↓

IVF前,将这些卵母细胞转移到在5% CO_2 ,100%湿度的培养箱中预先平衡至少48 h,石蜡油覆盖的 50 μL 大小的mTBM液滴内培养30 min。

精卵共培养受精:

将经上述处理的精子转移到卵母细胞所在的受精液滴内;

↓

使mTBM液滴内精子密度为 $1.5-5 \times 10^5$ 个/ml,共培养6 h。

2.2.4 体细胞核移植

2.2.4.1 体细胞准备:

血清饥饿法

将传代 5-10 次的细胞待其生长至 80%汇合时,进行血清饥饿处理,

↓
即把培养液中的 FBS(Gibco, Life Technologies)浓度从 20%降至 0.5%继续培养 2-5 d,

↓
按常规方法消化,离心洗涤,最后加 1mL 显微操作液重悬细胞沉淀备用。

接触抑制法

或者让细胞长满,接触抑制 2d-5d 后,

↓
常规消化,离心洗涤,

↓
最后的细胞沉淀用 DPBS 或者显微操作液重悬用作核供体。

2.2.4.2 受体卵母细胞去核

利用盲吸法进行成熟卵母细胞去核,即

在直径 60mm 培养皿盖中央做一个“8”字型,长 1.5cm,宽 20-30mm 的 100 μ l 显微操作液滴,再用矿物油覆盖。

↓
把供体细胞以及成熟卵母细胞同时转入其中于 39%, 5%CO₂, 100%湿度平衡 15min,

↓
然后在装配有显微操作仪及恒温台的倒置显微镜上用固定吸管(内径 25-35 μ m, 外径 100-120 μ m)吸持卵母细胞,

↓
用内径 15-25 μ m 的去核/注射针使第一极体处于钟表 1 点钟位置,

↓
接着从 3 点钟处进针,吸取第一极体及其临近 10-20%可能含有卵母细胞核的胞质。

↓
挑选直径 15-20 μ m,折光性强,圆形,光滑的体细胞,从去核切口放入卵周隙,用注射针点压透明带,使供体细胞与受体卵的胞膜接触紧密。

↓
每批操作 30 个卵母细胞,结束后将供体细胞-卵胞质构成的细胞对(重构卵)转移到 NCSU-23+4 mg/ml BSA 中,在 39℃, 5%CO₂, 100%湿度培养箱中恢复 1.5 h。

2.2.4.3 融合与激活

将恢复好的重构卵分批转移到融合液中平衡 3 min,

↓
用融合/激活液洗涤 3 遍后,每批 5 个放入已经铺满融合液的融合槽内,

↓
用拉制的且尖端很细的实心玻璃针拨动重组卵,使供体细胞-受体卵细胞膜接触面与电极平行,

↓
用 ECM2001 融合仪施加一个 30 μ s, 2.0kv/cm 的直流电脉冲诱导融合同时激活,

↓

用 NCSU-23%+4mg/ml BSA 洗涤 5 遍, 立即转入矿物油覆盖的胚胎培养液中, 39℃, 5%CO₂, 100% 湿度培养 0.5 h~1 h 后取出, 在体视显微镜下判定融合。

2.2.4.4 胚胎培养

在开始显微操作前至少 4h 预先做好培养液滴:

在超净台内取 35mm 细菌培养皿, 做 6-8 个 30μL 大的液滴,

↓

小心加入 2.5-3ml 矿物油覆盖,

↓

做好标记后放入 CO₂ 培养箱内平衡

↓

将上述融合的重构胚用胚胎培养液洗涤 5 遍后转入,

↓

每个 30μL 的液滴培养 8-10 个重构胚,

↓

培养 48h 和 168h 时记录卵裂和囊胚形成结果。

2.2.4.5 囊胚差异染色:

将囊胚放入 0.5% pronase 中作用 <1min 去透明带,

↓

去透明带后用 PVA-TL-HEPES 或者 PBS-PVA 洗涤 3 遍, 5min,

↓

再放入 1:5 稀释的兔抗猪全血清中作用 1h,

↓

取出在 PVA-TL-HEPES 或者 PBS-PVA 中洗涤 3 遍, 5min,

↓

放入含 10 μg/ml PI 和 10 μg/ml bisbenzimidide 的 1:10 稀释的豚鼠补体液滴内作用 1 h,

↓

接着用 PVA-TL-HEPES 或者 PBS-PVA 中洗涤 3 遍,

↓

将上述染色处理的胚胎转移到干净的载玻片上的甘油液滴内, 尽量少带原液,

↓

以胚胎所在处为中心, 在盖玻片大小范围内的四角做 4 个由凡士林/石蜡油组成的柱,

↓

盖上盖玻片, 再轻轻压盖玻片, 最后用指甲油封片。

↓

然后在 Nikon E800 荧光显微镜下利用 UV 激发, 照相, 记录, 计数。

↓
ICM 呈蓝色,TE 呈粉红色到红色

2.3 试验设计

- 试验一 不同来源的猪胚胎体外早期发育能力以及囊胚质量的比较。选择同批 MII 卵母细胞分别进行 IVF, SCNT 和 PA。培养 2d 和 7d 分别统计卵裂以及囊胚效率,并对囊胚进行差异染色,计算 ICM/总细胞数比例。
- 试验二 比较了不同的胚胎培养基对孤雌激活胚的体外发育之影响。分别将同一激活方法处理的 MII 卵母细胞分别放在 PZM-3 和 NCSU-23 中培养。比较卵裂以及囊胚率以及囊胚质量即 ICM/总细胞数。
- 试验三 比较不同培养基对克隆胚胎的体外早期发育之影响。设计同试验二。
- 试验四 比较 NCSU-23+BSA 的胚胎培养基中添加 Insulin 或者 LIF 对孤雌激活胚胎发育的影响。

2.4 统计与分析

对于卵裂率,囊胚率,使用 SPSS(Version 11.0)进行 χ^2 分析, $p<0.05$ 时即认为差异显著。对于囊胚总细胞数以及 ICM/总细胞数比值利用方差分析检验有无显著差异,同样 $p<0.05$ 时认为有明显差异。

3 结果

3.1 不同类型胚胎的体外发育以及囊胚(图 8.1)质量比较

如表 8.1 所示, 体外培养的各种胚胎的卵裂,囊胚形成基本接近,囊胚总细胞数也相差无几。而在囊胚的细胞分布上,体外受精囊胚的 ICM/总细胞数比例和克隆囊胚相近,二者都明显高于孤雌激活囊胚。

表 8.1 不同类型胚胎的体外发育以及囊胚质量比较
Table 8.1 Effects of embryos origin on in vitro developmental competence and on integrity of Blastocysts

胚胎类型 Embryos resource	培养数 No. embryos cultured	卵裂数 No. embryos cleaved(%) ^a	囊胚数 No. blastocyst (%) ^b	总细胞数 Total cell number of BL (mean±S.D.)	ICM/总细胞数 比例 Ratio of ICM to total cell number (mean±S.D.)
克隆胚 NTEs	526	334(63.5)	89(16.9)	32±10(n=25)	0.356±0.079(n=6) ^c
孤雌胚 PAEs	716	472(66.0)	162(22.6)	34±11(n=40)	0.122±0.117(n=10) ^d
体外受精 胚 IVFEs	210	151(72.0)	24(11.0)	35±9(n=12)	0.448±0.086(n=6) ^c

a 卵裂率=卵裂数/培养数 Percentage of cleaved embryos to embryos cultured
b 囊胚率=囊胚数/培养数 percentage of Blastocysts to embryos cleaved

同栏内上标不同表示有显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different

3.2 不同胚胎培养基对孤雌胚体外发育的影响

PZM-3 培养孤雌胚胎可以使囊胚率以及总细胞数都有明显提高。如表 8.2 所示.虽然卵裂率没有明显改善。

表 8.2 不同胚胎培养基对孤雌胚体外发育的影响

Table 8.2 Effects of embryo culture media on PAE’s in vitro developmental competence

基础培养基 Basic culture media	激活处理卵数 No.oocytes activated	卵裂胚数 No. embryos cleaved(%) ^a	囊胚数 No. Blastocyst(%) ^b	囊胚总细胞数 Total cell number of BL (mean±S.D.)
PZM+BSA	557	356(63.9)	197(35.4) ^c	49±17 (n=44) ^c
NCSU-23+BSA	716	472(65.9)	162(22.6) ^d	34±11 (n=40) ^d

a 卵裂率=卵裂数/激活处理数 Percentage of cleaved embryos to oocytes activated
b 囊胚率=囊胚数/激活处理数 Percentage of Blastocysts to oocytes activated
同栏内上标不同表示有显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different

3.3 不同胚胎培养基对克隆胚体外发育的影响

PZM-3 培养胚胎卵裂率明显低于 NCSU-23 的培养效果,尽管到囊胚阶段的发育相近。如表 8.3 所示, NCSU-23 培养克隆囊胚比 PZM-3 高,虽然没有统计学意义上的差异。

表 8.3 不同胚胎培养基对克隆胚体外发育的影响

Table 8.3 Effects of culture media on in vitro developmental competence of pig NTEs

胚胎培养基 Embryo culture media	培养胚胎数 No. embryos cultrued	卵裂胚数 No. embryos cleaved(%) ^a	囊胚数 No. Blastocysts(%) ^b
PZM-3	40	19(47.5) ^c	4(21.1)
NCSU-23	526	334(63.5) ^d	89(26.6)

a 卵裂率=卵裂数/培养数 Percentage of cleaved embryos to embryos cultured
b 囊胚率=囊胚数/培养数 percentage of Blastocysts to embryos cleaved
同栏内上标不同表示有显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different

3.4 添加 Insulin 对孤雌胚胎早期发育的影响

如表 8.4 所示, NCSU-23 胚胎培养基中添加 Insulin 对孤雌胚的附植前发育如卵裂,囊胚形成没有明显帮助作用。

表 8.4 胚胎培养基添加 Insulin 对孤雌胚胎早期发育的影响

Table 8.4 Effect of Insulin supplement on development of parthenogenetically activated embryos

添加因子	培养胚胎数	卵裂数(%)	囊胚数(%)
supplemented or not	embryos cultured	No.cleavaged embryos(%) ^a	No. blastocyst(%) ^b
添加胰岛素 Insulin supplemented	97	80(82.5)	33(34.0)
不添加对照 no supplemented	104	78(75.0)	27(26.0)

a 卵裂率=卵裂数/培养数 cleavage rate=No.embryos cleaved.No. embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养数 blastocyst rate=No. blastocyst: No. embryos cultured

3.5 加 LIF 对孤雌胚胎早期发育的影响

如表 8.5 所示, 添加 LIF 到胚胎培养基中,孤雌胚的卵裂和囊胚形成提高不明显。

表 8.5 胚胎培养基添加 LIF 对孤雌胚胎早期发育的影响

Table 8.5 effect of LIF supplementation on in vitro development competence of PAEs

添加 LIF 与否	培养胚胎数	卵裂胚数(%)	囊胚数(%)
LIF supplemented or not	No. embryos cultured	No. embryos cleaved(%) ^a	No. blastocyst(%) ^b
添加 LIF	65	52(80.0)	21(32.3)
Supplement with LIF			
非添加组 Non- supplemented	83	66(79.5)	25(30.1)

a 卵裂率=卵裂数/培养数 cleavage rate=No.embryos cleaved.No. embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养数 blastocyst rate=No. blastocyst: No. embryos cultured

4 讨论

4.1 关于体外培养

本研究比较了 NCSU-23+4 mg/mlBSA 培养所获体外受精胚、孤雌激活胚和核移植克隆胚的发育情况,三者之间在卵裂率,囊胚率方面差异不显著,但囊胚细胞分布即内胚团细胞(ICM)占总细胞数的比例不同:体外受精囊胚和核移植囊胚比例相近,都比孤雌激活囊胚高(图 8.2)。在 Koo 等.(2004)的研究中,体外受精胚和核移植胚也无论是囊胚率还是总细胞数都没有差异,但是都比体内胚胎的囊胚率,总细胞数以及 ICM/总细胞数比例差。关于孤雌细胞细胞数研究的比较多,但是就其细胞分布(ICM/总细胞数比例)研究较少。本实验发现孤雌激活囊胚的 ICM 细胞数变化很大,有的胚胎甚至在染色后观察不到。所以,孤雌胚胎在体内发育能力差可能和 ICM 很少,不稳定有关。

4.2 关于不同来源胚胎的发育

本研究所得到的体外受精胚囊胚率为 11%。此结果和 Betthausen J 等(2000) 14%的囊胚率相近。卢晟盛(2003)用 PVA 取代 BSA 添加到 NCSU-23 中,体外受精胚囊胚率为 34-38%, 囊胚细胞数为 41-48。但卢晟盛在国内用 FBS 添加到 NCSU-23 中,IVF 胚囊胚率也只有 4%-6%。

在孤雌激活方面,我们的培养体系 NCSU-23+BSA 支持胚胎卵裂为 65.9%,囊胚率为 22.6%。

而吴中红等(吴中红等, 2003)得到的卵裂率为 73%,囊胚率为 25%。Lee JW et al.(2004)的囊胚率曾经达到 56.3%; Zhu J et al.(2002)也得到过 50%的孤雌激活囊胚率。当然,孤雌激活发育的结果不仅仅受胚胎培养体系的影响,还在很大程度上取决于卵母细胞质量、体外成熟的优劣以及激活方式或者电激活参数等等(吴中红 2002)。

核移植胚胎发育方面,我们得到了 63.5%的卵裂率和 16.9%的囊胚发育率,总细胞数为 32 左右。而在密苏里哥伦比亚大学 Prather RS 研究组(Lai and Prather 2003), 利用 IVM 卵母细胞为受体, 胎儿成纤维细胞供体, 运用电刺激激活, 则克隆胚在体外培养 24-36h 卵裂率为 60-80%; 7d 后囊胚率 10-40%,囊胚总细胞数在 25-35。Betthausen J et al.(2000)得到核移植囊胚率为 4-8% (72/995)。

4.3 关于培养基

我们比较了不同培养基对孤雌激活胚胎发育以及体细胞核移植胚胎发育的影响。发现对孤雌激活胚胎来讲,PZM-3(PZM+3mg/ml BSA)培养的卵在激活后卵裂率虽然和 NCSU-23+4mg/mlBSA 相近,但是随后的囊胚率以及囊胚总细胞数都有明显增加。而在培养体细胞核移植胚胎时,我们发现 PZM-3 培养时卵裂率显著下降,而囊胚率虽然看上去也比 NCSU-23 低,虽然没有统计学意义。Im 等. (2004) 比较了 NCSU-23 和 PZM-3 培养孤雌胚和克隆胚的效果,在孤雌激活胚上的结果是 PZM-3 好于 NCSU-23, 和我们的结果相似。但他们发现在克隆胚培养上,PZM-3 仍然要优于 NCSU-23,这与我们的结果不一致。推测可能是由于我们在卵母细胞成熟,胚胎培养所用的 BSA 批号,以及克隆胚胎电激活方面都不同所致。就我们的结果而言,似乎培养基在支持胚胎发育上具有依赖性。因此,在今后的试验中,利用孤雌激活胚来检验胚胎培养基的优劣时应保持谨慎。因为在牛上的研究(Mastromonaco *et al.* 2004)表明,克隆胚和体外受精胚对胚胎营养的需求不同,而 Gao SR 等. (2003)也在小鼠克隆胚胎培养上发现核移植胚对培养基的反应和体外受精胚不一致。所以,有可能对孤雌胚或者体外受精胚理想的培养基,当用于克隆胚胎培养时却不一定是最佳的选择。

4.4 关于培养基中添加 Insulin 和 LIF

已知在猪胚胎体外培养时添加EGF(Cui and Kim 2003), PAF(Lee *et al.* 2004)或者IGF-1(Cui *et al.* 2005)对减少胚胎凋亡,促进发育有益。在小鼠和牛上的研究发现,添加Insulin对胚胎的早期发育有帮助。LIF在早期胚胎发育中发挥着重要作用(Dunglison *et al.* 1996)。人和鼠的LIF被认为对于维持胚胎干细胞全能性至关重要。人的LIF可以增加小鼠PGCs体外增殖率。另外(Eckert *et al.* 1997) mLIF或者hLIF可以促进小鼠,家兔胚胎附植,以及在体外促进绵羊胚胎发育。增强牛冷冻/复苏,孤雌激活的体内体外胚胎的发育。而在猪上关于LIF的作用研究较少。Eckert 等.(1997)发现高浓度(1000 IU/ml)的LIF不利于猪囊胚发育。但是这种不利还因应于培养基中蛋白的成分。本实验中,添加高浓度LIF后没有发现这种负面作用,可能是由于培养基的成分不同所致。而添加5 μ g/ml Insulin之后,胚胎卵裂率以及囊胚率都比对照组高,但是没有统计学上的显著差异。本试验只比较了2个固定的浓度,因此还有必要进一步研究不同浓度的Insulin或者LIF添加后对猪克隆胚胎或者孤雌激活胚胎的影响。

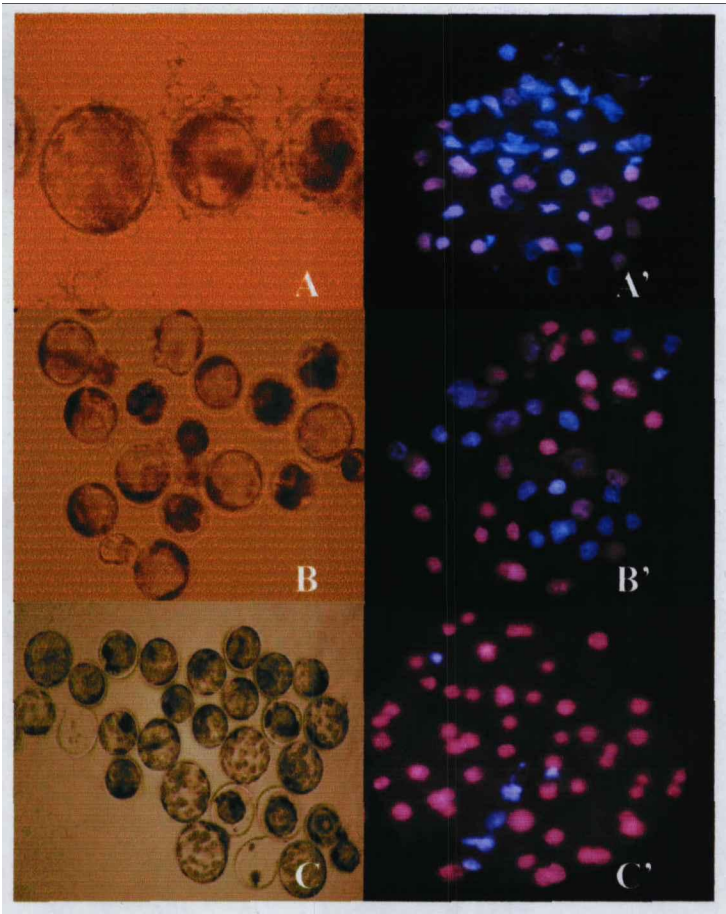


图 8.2 通过 IVF, SCNT 以及 PA 方式获得的囊胚以及各种囊胚的差异染色. A: IVF 囊胚, 300×; A': IVF 囊胚差异染色, 400×; B: SCNT 囊胚, 200×; B': SCNT 囊胚差异染色, 400×; C: PA 囊胚, 200×; C': PA 囊胚差异染色, 400×. 蓝色表示内细胞团细胞; 粉红色示滋养外胚层细胞.

Figure 8.2 Blastocyst derived from IVF, SCNT and PA and differential staining of them. A: IVF blastocyst, 300×; A': differential staining of IVF blastocyst, 400×; B SCNT blastocyst, 200×; B': differential staining of SCNT blastocyst, 400×; C: PA blastocyst, 200×; C': differential staining of PA blastocyst, 400×. Blue are inner cell masses and Pink are trophoblast cells.

第九节 猪体细胞核移植胚胎的体外发育:供体细胞因素

摘要

利用脂质体转染技术建立了转 GFP 的猪胎儿成纤维细胞系,尝试了生产转 GFP 胚胎的可能性,同时系统研究了供体细胞转染与否、传代次数、准备方式、细胞周期同期化、细胞年龄、细胞形态以及细胞性别等对克隆胚胎早期发育的影响。结果如下:(1)用转 GFP 的细胞获得克隆胚胎卵裂率为 61.2%(90/147),囊胚率为 9.5%(14/147);结果和非转基因卵裂率(63.5%)以及囊胚率(16.7%)相似。(2)传代次数在 6-9 之间的供体细胞克隆胚胎卵裂率高于传代 10 次(73.0% vs. 51.3%, $p<0.05$)以上的组,但囊胚率没有明显差异(14.0% vs. 11.2%);(3)在融合率上,光滑圆形细胞明显高于表面粗糙的细胞组(76.8% vs. 47.8%, $p<0.05$),但克隆胚胎卵裂率以及囊胚率没有显著的差异;(4)用液氮冻存复苏的细胞做供体可以得到克隆囊胚,但其效率明显不如胰蛋白酶现场消化法和 4℃ 冷藏法;(5)不同性别或者不同年龄供体细胞克隆胚胎早期发育结果相近;(6)接触抑制法提供体细胞所得克隆胚胎卵裂率最高(81%),而 70%汇合且分裂旺盛时期收获的细胞做供体时克隆胚胎卵裂率(64.4%)居中,血清饥饿处理组最低(50.5%)。但在囊胚率上三种方案所得结果相似。上述结果表明:①转 GFP 的猪胎儿成纤维细胞克隆胚胎可以发育到囊胚;②血清饥饿对克隆胚胎早期发育来说不是必需的;③在挑选供体细胞时,选择圆形光滑的细胞有利于提高融合率;④传代 6-9 次的细胞作供体较好。⑤细胞性别以及年龄对克隆胚胎早期发育影响不大。⑥最后,4℃ 冷藏的猪胎儿成纤维细胞可以用于核移植供体并且能有效支持克隆胚胎的早期发育

1 前言

体细胞核移植克隆动物的相继诞生,使人们更加确信了细胞在分化的过程中仍保留重新发育一个个体所需要的全部遗传信息。该技术的成功为农业、医学以及生物学基础研究和动物保护等提供了强大工具。而克隆猪的降生,使人们对利用猪作为人异种器官移植中异源器官供体充满憧憬。此外,在农业方面克隆技术还可以帮助我们改良品种,提高猪肉品质、增加产量、培育抗病猪种、降低妊娠期第一个月内的胎儿死亡以及制备低污染或无污染猪;在医学上,可以制备比小鼠更理想的人类疾病的动物模型,生产重组蛋白和治疗性药物(Prather *et al.* 2003)。

尽管有限的几个国家已经得到了克隆猪的后代,但和其它物种相似,效率低下的问题非常突出。极大限制了该技术向实践中的推广。供核体细胞是影响核移植效率的关键因素之一(Oback and Wells 2002)。组成哺乳动物身体的细胞有200多种,而如今被用于克隆实验的只有十几种,其中能够获得克隆动物的细胞类型不超过10种。至今,人们仍未发现哪一种细胞最适合于克隆。在小鼠上,用胚胎干细胞做供体,移植胚胎后克隆后代出生效率比体细胞供体克隆胚胎高10-30%(Liu 2001);但至今,仍没有建立真正意义猪胚胎干细胞的报道。

已知许多因素如不同实验室、卵来源与质量、核供体类型、核移植前供体细胞处理、胚胎培养方法、基因组印记异常以及激活不充分等都影响克隆的效率(Polejaeva *et al.* 2000)。

目前,人们已经利用胎儿成纤维细胞,肾脏细胞,心脏细胞,星形细胞,颗粒细胞,成体猪皮肤成纤维细胞等成功得到克隆猪后代,更有研究(Lee *et al.* 2003)指出胎儿成纤维细胞比较适于克隆猪。体细胞和卵母细胞细胞周期协调更是体细胞核移植最为关键的环节(李劲松等, 2002)。Wilmot 等.(Wilmot and Campbell 1998)认为血清饥饿诱导G0期是首例哺乳动物体细胞核移植克隆得以成功的必需步骤。但不久,有很多研究利用(Kasinathan *et al.* 2001) 其它方法诱导细胞进入G1, G2/M等时期(Lai *et al.* 2002),也能得到克隆后代,这说明血清饥饿不是克隆必需的。然而,有意思的是,很多研究者在尝试新物种克隆时,首先还是选用血清饥饿处理供体细胞(Woods *et al.* 2003)。

猪的克隆比其它家畜难度大的原因还在于,猪的胚胎妊娠信号建立必需不少于4个优质胚胎同时着床。另外,猪的胚胎移植技术还得借助于手术。在上述许多因素中,和供体细胞相关的许多细节如细胞形态、来源、性别、准备方法、传代多少以及提供细胞的个体年龄等往往容易被忽视。至今,尚未有报道系统的对上述细节进行比较。虽然有些研究涉及了其中一两个方面 (Lee *et al.* 2003)。

增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因是应用非常广泛的报告基因。已经被成功的用于识别阳性克隆胚胎的标志。用含EGFP报告蛋白的基因转染体细胞,经一定策略筛选得到的发绿色荧光的细胞再用于克隆,得到的胚胎以及动物在理论上将100%是转基因的(Uhm *et al.* 2000)。

近来我国在体细胞克隆方面进展喜人,已经得到了体细胞核移植克隆普通或转基因山羊(Guo *et al.* 2002),牛(Chen *et al.* 2003; Gong *et al.* 2004; Gong *et al.* 2004)以及小鼠、大鼠(Zhou *et al.* 2003)等。尤其是最近,传来水牛克隆成功的消息。

本文旨在研究体细胞类型、形态、同期处理方法、准备方案、性别、年龄以及转基因与否对克隆胚胎早期发育的影响进行比较。

2 材料与方法

2.1 材料

细胞培养液: 同第六节 2.2.1

细胞消化液: 同第六节 2.2.3

细胞冷藏液: DMEM (高糖) 添加 5%FBS

细胞冻存液: DMEM+10%DMSO+20%FBS

卵母细胞成熟培养液: 同第七节 2.1.4

脱卵丘液: 同第七节 2.1.5

显微操作液: 同第七节 2.1.8

重构卵恢复液: 同第七节 2.1.8

融合/激活液: 同第七节 2.1.6

胚胎培养液: 同第七节 2.1.7

2.2 实验仪器和耗材

同第七节 2.1.1 和 2.1.2

2.3 实验方法

2.3.1 供体细胞准备

2.3.3.1 液氮冷冻保存细胞准备

同第六节 2.5.3

2.3.3.2 冷藏细胞准备

取 T-75 瓶或 30mm 细胞培养皿中生长至>80%汇合的细胞



常规消化,离心获得传 5-10 代的胎儿成纤维细胞沉淀



用 1ml 不含血清的细胞培养液重悬细胞后,转移到 1.5ml 离心管



放入 4℃ 冰箱保存备用

2.3.2 细胞周期同期化

2.3.2.1 血清饥饿

同第六节 2.5.6.1

2.3.2.2 接触抑制

同第六节 2.5.6.2

2.3.3 转染绿色荧光蛋白基因胎儿成纤维细胞准备:

2.3.3.1 质粒:

pEGFP-N1,购自 Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)。

2.3.3.2 转染试剂

试剂盒脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 invitrogene(life technologies,USA)

2.3.3.3 操作步骤

按照试剂盒操作指南进行.

转染前一天,将传代 2-4 代且已经长至汇合的胎儿成纤维细胞常规消化,计数,接种到 6 孔培养板中



待细胞生长至 90%汇合,开始下一步转染操作



取 500μL 无血清培养基 DMEM 来稀释 4μg pEGFP-N1 和 10μL lipofectamine™ 2000,



室温孵育 20min 后,向 6 孔培养板的每个孔内添加 500μL 上述液体,



将培养板前后轻轻晃动混匀,培养 6-8h 后更换培养液为完全细胞培养基,



同时加入 G418 筛选 10-14d,



待撤去 G418再培养至细胞汇合后,常规消化,离心收获细胞进行冷冻保存或者接种传代用作克隆供体,

↓

在荧光显微镜下挑选呈绿色的直径在 15-20 μ m 之间的细胞作克隆供体

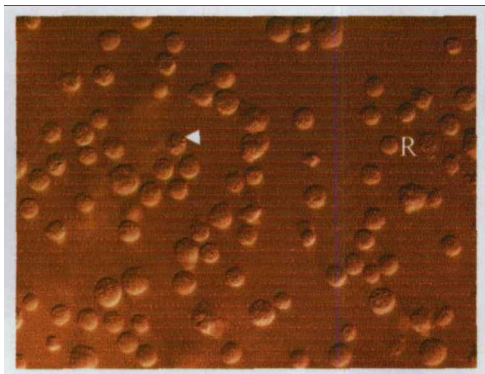


图 9.1 示供体细胞形态. 箭头所指为表面粗糙的体细胞; R 左侧细胞为表面光滑的圆形细胞.300×。

Figure 9.1 Morplogy and surface of pig fetal fibroblast nuclear donor cells. Arrow is referred to rough surface cells. Round smooth cell lies in the left of 'R'.300×

2.3.4 猪卵母细胞体外成熟

同第七节 2.4.1

2.3.5 体细胞核移植(图 9.2)

成熟 40-44h 猪卵母细胞,脱卵丘后选择胞质均匀,卵周隙清晰,胞膜完整的卵母细胞放入无 Ca^{2+} , Mg^{2+} HEPES 缓冲 NCSU-23 备用

↓

转移到显微操作液滴内: 核移植前 1h 做好,直径 60mm 细胞培养皿盖中央 (液滴 50-80 μ l, 2-3 mm 宽,8-10 mm 长,石蜡油覆盖),作用 15-30 min

↓

将供核体细胞转移到卵母细胞所在同一液滴中

↓

安装显微固定管以及去核/注射针,调节好操作系统位置

↓

在倒置显微镜下,40×用固定管吸持卵母细胞,用去核/注射针拨动卵母细胞,使第一极体处于钟表 1 点钟位置

↓

200×下,从钟表 3 点处将去核/注射针刺过透明带,吸出第一极体及其附近少许细胞质

↓

退出去核/注射针,将第一极体以及少许胞质吐出

↓

200×下用去核/注射针吸取一个供体细胞,从去核进针处将体细胞注射到透明带下的卵周隙内

↓

用注射针点压透明带,使供体细胞与受体卵胞质的细胞膜彼此紧密接触

↓

每批 25-30 个卵母细胞,构建完成后,将重构卵转移到恢复液中,39℃,5%CO₂,100%湿度修复 1-2h

2.4 试验研究

试验一：细胞传代多少的影响

将原代培养细胞视作第 0 代，一般每隔 3 天传代培养一次。按传代多少分为 3 组，A 组为 0-5 代，B 组为 6-9，C 组为 10-15；分别用这 3 组细胞做核供体，比较它们对核移植克隆胚胎在体外发育的影响,即比较克隆胚胎的卵裂率以及囊胚率之间是否有差异。

试验二：细胞形态

体外培养收获用于核移植供体的细胞,其形态分为圆形光滑的和圆形但表面粗糙的(图 9.1)。比较这两种细胞做供体细胞时核移植胚胎体外卵裂以及囊胚形成的效率。

试验三：细胞准备方式

参考刘亚等的报道，分别采用胰蛋白酶现消化法,离心收获细胞做供体的现场消化法;液氮冻存细胞复苏法;4℃冷藏法准备供体。比较三者得到克隆胚胎卵裂及囊胚率的差异。

试验四 性别影响

分别用全同胞公母个体的细胞做供体,比较它们的克隆胚胎早期发育。

试验五 细胞周期同期化处理

分别用血清饥饿法和接触抑制法诱导供体细胞进入 G0/G1 期,以 70%汇合度的细胞做对照。比较它们的克隆胚胎卵裂及囊胚率的差异。

试验六 转基因的影响

分别用转了 EGFP 编码基因的体细胞和来自同一株细胞的非转基因细胞做供体,比较二者间克隆胚胎早期发育效率。

试验七 提供细胞个体年龄的影响

以成年母猪耳部皮肤成纤维细胞和其女儿胎儿成纤维细胞做供体,分析所得克隆胚胎早期卵裂和囊胚形成的差异。

2.5 统计与分析：

对于卵裂率和囊胚率,使用 SPSS(Version 11.0)进行 χ^2 分析, $p<0.05$ 时即认为差异显著。

3 结果

3.1 试验一细胞传代多少的影响

如表 9.1 所示,就克隆胚卵裂率来讲，B 组(6-9 代)显著高于 C 组(10-15 代),分别为 73%和 51.3%;但是,A 组(0-5 代)介于 B,C 组之间并且和 B,C 组之间都不存在明显差异，为 62.7%。在囊胚率方面 3 组之间也没有统计学意义上的不同。

表 9.1 供体细胞体外培养传代多少对克隆胚胎发育的影响

Table 9.1 Effects of donor cells' passage number on in vitro developmental ability of pig NTEs

传代次数 Passage	培养胚胎数 No. embryos	卵裂数 No. embryos	囊胚数 No. blastocyst
number	cultured	cleaved(%) ^a	(%) ^b
≤5	75	47(62.7) ^{ad}	8(10.7)
6-9	293	214(73.0) ^c	41(14.0)
≥10	339	174(51.3) ^d	38(11.2)

a 卵裂率=卵裂数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos from embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts from embryos cultured

同一栏内上标不同表示存在显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$)

3.2 试验二：细胞形态

尽管在融合率上，光滑圆形细胞明显高于表面粗糙的细胞组，如表 9.2。在克隆胚胎的卵裂以及囊胚形成上却没有显著的差异。

表 9.2 供体细胞形态对融合, 克隆胚早期发育的影响

Table 9.2 Effects of donor cells' morphology on preimplantation NTEs' developmental ability in pig					
细胞形态 Cell morphology	构建重构卵数 No.	融合卵数 No.	培养数 No.	卵裂数 No.	囊胚数 No.
	couplets	couplets fused	embryos	embryos	blastocyst
	reconstructed	(%)	cultured	cleaved(%) ^a	(%) ^b
表面粗糙 Rough surface	136	65(47.8) ^c	46	25(54.3)	5(10.9)
表面光滑 Round and smooth	246	189(76.8) ^d	189	103(54.5)	21(11.1)

a 卵裂率=卵裂数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos from embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts from embryos cultured

同一栏内上标不同表示存在显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$)

3.3 试验三：细胞准备方式.

尽管用液氮冻存复苏的细胞做供体依然可以得到克隆囊胚,但是其效率明显不如现场消化法和冷藏法。在卵裂上 3 组间没有统计意义上的显著差异,虽然看上去现场消化法要比其它 2 组高,见表 9.3。

表 9.3 供体细胞准备方式对克隆胚胎发育的影响

Table 9.3 Effects of preparation methods on preimplantaion developmental competence of NTEs			
准备方式 Preparation methods	培养胚数 No. embryos	卵裂数 No. embryos cleaved(%) ^a	囊胚数 No. Blastocyst(%) ^b
	cultured		
新鲜消化 Fresh trypsinized	181	151(83.4)	27(14.9) ^c
冷藏 Freezing at 4℃	117	81(69.2)	21(17.9) ^c
冷冻 Freezing at -70℃	24	17(70.8)	1(4.2) ^d

a 卵裂率=卵裂数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos from embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts from embryos cultured

同一栏内上标不同表示存在显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$)

3.4 试验四 性别影响

如表 9.4 来自不同性别供体细胞的克隆胚卵裂以及囊胚形成没有明显差别。

表 9.4 供体细胞性别对早期克隆胚胎发育的影响

Table 9.4 Effects of donors sex on in vitro developmental competence of pig NTEs

供体性别 Donors' sex	培养胚数 No. embryos	卵裂胚数 No. embryos	囊胚数 No. blastocyst (%) ^b
	cultured	cleaved(%) ^a	
雄性 Male	170	132(77.6)	28(16.5)
雌性 Female	159	118(74.2)	28(17.6)

a 卵裂率=卵裂数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos from embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts from embryos cultured

同一栏内上标不同表示存在显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05)

3.5 试验五 细胞周期同期化处理

如表 9.5 所示,接触抑制提供体细胞所得胚胎卵裂率最高(81%),而使用 70%汇合分裂旺盛时期收获的细胞做供体时克隆胚卵裂率(64.4%)居中,血清饥饿处理组最低(50.5%).但是在囊胚形成方面,接触抑制(12.5%)与 70%汇合组(19.6%)以及血清饥饿组(12.7%)相近,虽然 70%汇合组看上去高于其它两组,但是没有统计学意义。

表 9.5 不同细胞周期同期化处理供体细胞克隆胚胎早期发育

Table 9.5 Effects of cell cycle synchronization treatment on in vitro development ability of pig NTEs

同期化方法	培养数 No. embryos	卵裂数 No. embryos	囊胚数 No. blastocyst (%) ^b
Synchronization treatment	cultured	cleaved(%) ^a	
血清饥饿 SS 2-5d	457	231(50.5) ^c	59(12.7)
接触抑制 CI	247	200(81.0) ^d	31(12.5)
周期分裂中 Cycling	163	105(64.4) ^e	32(19.6)

a 卵裂率=卵裂数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos from embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts from embryos cultured

同一栏内上标不同表示存在显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05)

3.6 试验六 转 GFP 对克隆胚胎早期发育(图 9.3)的影响

从表 9.6 可以看出,转 GFP 细胞做供体时,克隆胚胎卵裂率以及囊胚率都没有明显下降。虽然看上去比非转基因组低。

表 9.6 基因转染与否对克隆胚胎早期附植前发育的影响

Table 9.6 Effects of gene transfection on developmental ability of pig preimplantaion embryos

转染与否 Transfected	培养胚胎数 No. embryos	卵裂胚胎数 No. embryos	囊胚数 No. blastocyst
or not	cultured	cleaved(%) ^a	(%) ^b
转染 Transfected	147	90(61.2)	14(9.5)
非转染 Nontransfected	126	80(63.5)	21(16.7)

a 卵裂率=卵裂数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos from embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts from embryos cultured

3.7 试验七 提供细胞个体年龄的影响

如表 9.7 所示,母亲和女儿的细胞做供体,克隆胚卵裂和囊胚形成基本相似。不过,看上去胎儿成纤维细胞克隆囊胚率比成体耳皮肤成纤维的高。

表 9. 7 体细胞供体年龄对克隆胚胎早期发育的影响

Table 9.7 Effects of donors age on in vitro developmental potential of pig NTEs

供体年龄 Donors' age	培养胚数 No. embryos	卵裂胚数 No. embryos	囊胚数 No. blastocyst (%) ^b
	cultured	cleaved(%) ^a	
成年 Adult	23	19(82.6)	4(17.4)
胎儿 Fetus	126	80 (63.5)	21(16.7)

a 卵裂率=卵裂数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos from embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts from embryos cultured

同一栏内上标不同表示存在显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05)

4 讨论

体细胞核移植克隆在多种动物包括各种家畜上的成功, 为长期从事转基因动物和胚胎干细胞等方面的研究者带来了梦寐以求的工具。 已有的研究充分展现了体细胞克隆技术在这些方面的应用价值和优势。利用SCNT技术可以帮助人们解决长期困扰转基因大动物生产中的效率低下,随机整合,表达不确定,所需时间长,成本高的难题(Seidel 2004)。尤其是当前,在还没有得到真正意义上的胚胎干细胞的情况下, SCNT更是生产基因打靶家畜的唯一有效途径。 最近,我校校友美籍华人科学家杨向中教授和中科院动物所段恩奎研究员联手建立了牛的胚胎干细胞系(Wang *et al.* 2005)。不过,该细胞系有些表现如对酶消化作用敏感而分化,和小鼠,人的胚胎干细胞系不同。所以,还需要深入试验, 评价其建立的ES细胞系的克隆效率以及基因打靶情况。当然这也鼓励人们尝试建立猪的胚胎干细胞系。在本文中,我们获得了表达绿色荧光蛋白的猪体细胞克隆囊胚。而且转基因克隆囊胚的卵裂和囊胚形成都和非转基因细胞的普通克隆相当。

4.1 关于供体细胞准备方式

目前,在SCNT研究中,体细胞准备的方法主要有以下几种:组织新鲜分离细胞法, 又被称为夏威夷方案 (Wakayama *et al.* 1998); 体外培养细胞现场消化法,又被称为马萨诸塞(ACT)方案 (Cibelli *et al.* 1998), 液氮冷冻细胞复苏法, 此处暂称为密苏里方案(Lai *et al.* 2002), 4℃冷藏法, 被称为北京方案(Guo *et al.* 2002; Liu *et al.* 2001)。

Liu 等(2001)发现牛的体细胞在冷藏2-5d后仍可以支持囊胚。Guo等 (2002)成功的得到了冷藏细胞克隆来的山羊后代。尽管这些细胞支持囊胚的发育效率没有对照组好。本研究发现在猪上冷藏的细胞支持囊胚发育效率没有受到不利影响。可以想象,细胞冷藏如果与其它几种方法联合使用,或许可以减少节约克隆中细胞的浪费,这在珍稀的或者不容易得到的动物上尤其有意义。

就目前所知,我们是首例用冷藏的猪体细胞得到表达绿色荧光蛋白克隆囊胚的实验室。

4.2 关于细胞周期同步

关于细胞周期的作用现仍旧争议较大。最初,Dolly的主要制作者Wilmut和Campbell等认为血清饥饿诱导细胞进入G0期是他们获得成功的不可或缺的环节(Wilmut *et al.* 1997)。之后,随着人们

相继利用其它的方案获得G1, G2/M期细胞的克隆后代, Campbell表示(Aldhous 2000), 他从来就没说过处于其它细胞周期阶段的细胞就不能得到克隆后代,而只是说G0期有利于得到克隆动物。有意思的是,血清饥饿仍是当前进行克隆研究的学者们的最流行的方法。再者截至目前,尚未有任何一种同期化方案可以提供100%同期到某一细胞周期阶段细胞(Boquest *et al.* 1999)。

在猪上,已经有证据表明饥饿48h即可使80%的细胞同步到G0/G1期。和我们的结果相似,延长饥饿时间并不能显著提高G0/G1细胞的比例。更值得注意的是,饥饿超过48h, 细胞出现大规模DNA片段化(这意味着凋亡的发生)的比例增加(Kues *et al.* 2000)。

和Ku^hholzer 等 (2001), Hyun 等(2003) and Koo 等 (2000)的结果相同, 我们的研究也表明血清饥饿处理对囊胚的早期发育影响没有明显的促进。不过还需要深入的研究以弄清楚血清饥饿对附植后体内发育是否有好处。

尚不知这些细胞周期同期化处理后对体细胞的一些表观遗传学机制是怎样的影响。在牛上, 已经有人注意用一些表观遗传学修饰试剂处理后检测了体细胞的DNA甲基化以及组蛋白乙酰化水平。所以,将来可以进一步利用类似的方法来监测细胞周期同期化之后, 除了染色体倍性外的表观遗传学变化, 以建立预测克隆胚胎命运的模式(Enright *et al.* 2003; Enright *et al.* 2003)。

4.3 关于供体细胞形态

Wang 等 认为粗糙的细胞使重构卵的融合率下降(Wang *et al.* 1999)。Tao等(2000) 也发现表面粗糙的细胞克隆胚胎的原核形成率明显降低。我们的结果似乎不支持Tao等的结论,我们发现,圆形而且表面粗糙的细胞做供体只影响融合效率,而卵裂,囊胚形成和圆形光滑细胞组相差不大。这可能是由于我们和Tao等所用的激活/融合方案不同所致。

4.4 关于供体细胞传代次数

在牛上, Kubota 等(2000) 等发现在体外经过多次传代的细胞有助于克隆胚胎的发育。而在猪上, Lee Gab-sang 等(2003) 经1-10次传代培养的细胞支持重组胚发育的效率比经历10次以上的更高。这可能是物种间的差异,也可能是由于成年动物以及胎儿成纤维细胞在体外培养的生长动力学不完全一致所引起的。我们的研究也表明,细胞经历10次以上之后支持克隆胚胎在体外发育的能力明显不如传代10次以内的细胞。而在10次以内的传代细胞, 6-9次传代培养的细胞又显著高于5次以内的。这可能是由于5代之内成纤维细胞的纯度以及一致性不如6-9代细胞。

4.5 关于供体细胞性别

从报道来看,在Dolly诞生之后的一段时间内,获得的克隆动物清一色从雌性动物生殖系统细胞得来的雌性后代。 这难免让人产生疑问:雄性动物的细胞可否也能支持克隆胚胎发育直至产生后代呢? (Miyoshi *et al.* 2003)。 Wakayama等用小鼠的尾巴尖细胞得到了雄性克隆小鼠(Wakayama and Yanagimachi 1999), 却没有得到足细胞的克隆后代。在牛上, 来自公牛和母牛细胞的克隆胚胎发育率相当(Kato *et al.* 2000)。 我们发现来自公猪的细胞和来自母猪的细胞在支持重构胚的早期发育方面差异不大。

4.6 关于供体细胞年龄

和Kato 等(2000)的结果相似, 我们发现成体猪耳部皮肤成纤维细胞作供体时克隆胚胎早期发育效率和其女儿的细胞得到的没有多大差别。当然,成年动物体细胞克隆胚胎的体内发育是否不同于胎儿成纤维细胞还有待于深入研究。Kato等发现成体细胞克隆胚怀孕后期流产率高。

结论：本研究表明转EGFP的猪胎儿成纤维细胞克隆胚胎可以发育到囊胚；血清饥饿对克隆胚早期发育没有必要；在挑选供体细胞时，选择圆形光滑的细胞有利于提高融合率。传代6-9次的细胞作供体较好。冷藏细胞可以成功实现重编程发育到囊胚。细胞性别以及年龄对克隆胚胎早期发育影响不大。

图 9.2: 转 GFP 猪胎儿成纤维细胞核移植胚胎构建过程。 A-C: 普通明场; A'-C': UV 激发蓝光下观察; A- A': 注射针吸取转 GFP 细胞; B-B': 将转 GFP 体细胞注入到卵周隙透明带下; C-C': 构建的卵母细胞质-转 GFP 细胞复合体; 200×

Figure 9. 2 Construction of cytoplasm-karyoplast couplets using pig fetal fibroblasts transfected with GFP gene. A-C: Normal light; A'-C': donor cells under fluorescein isothiocyanate filters to identify EGFP; A -A': selecting a nuclear donor; B-B': donor cell was injected in perivitellin space of oocyte; C- C': cytoplasm-karyoplast couplets; 200×

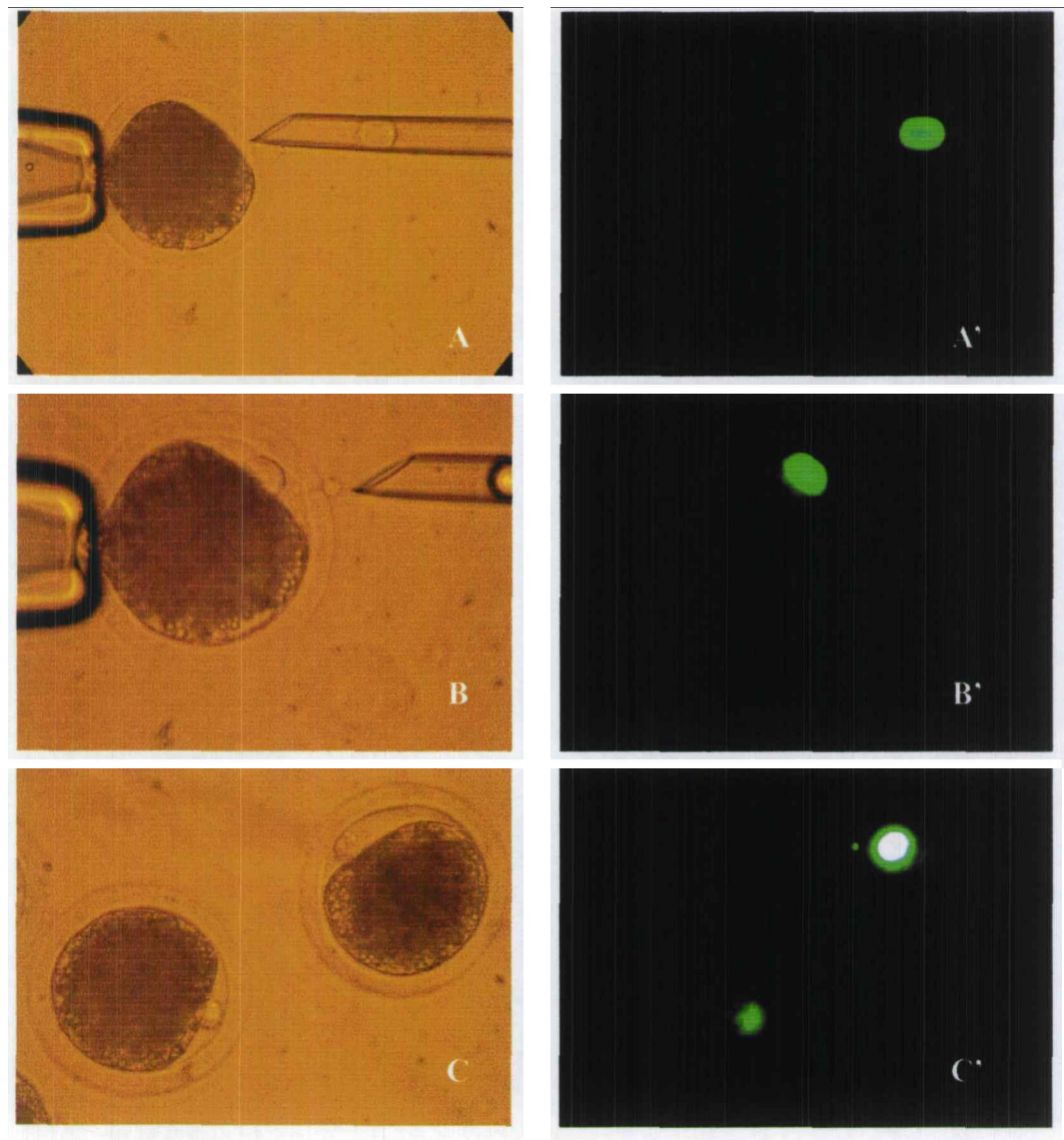
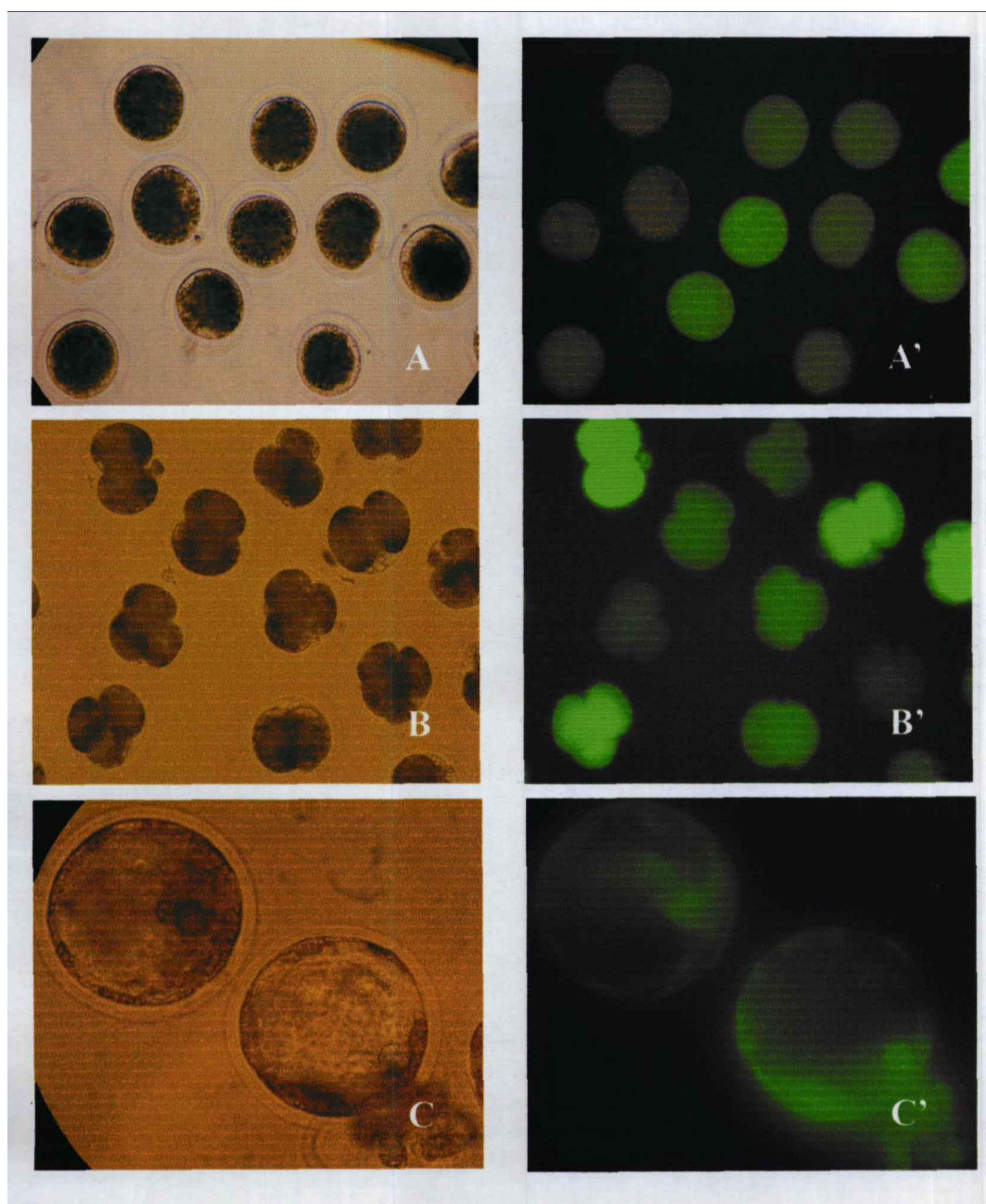


图 9.3: 转 GFP 克隆胚胎体外发育。A-C: 普通明场; A'-C':UV 激发蓝光下观察; A-A': 1-细胞期, 200 \times ; B-B': 2-4 细胞期, 200 \times ; C-C': 囊胚期, 300 \times 。

Figure 9.3: In vitro development of pig transgenic embryos. A-C: Embryos under normal light; A'-C': Embryos under fluorescein isothiocyanate filters to identify EGFP; A-A': 1-cell stage, 200 \times ; B-B': 2-4 cell stage, 200 \times ; C-C': blastocyst stage, 300 \times .



第十节 体细胞核移植胚胎的体外发育以及体内发育

摘要

本研究选择 3 头自然发情的经产母猪作为克隆胚胎移植受体,共移植 231 枚克隆胚,移植后 33d 用 B 超检测有 2 头有妊娠信号。比较了高氧分压和低氧分压, 两步激活与融合同时激活, 培养基中添加 1000IU/ml LIF, 全细胞注射法同细胞融合法等对克隆胚胎体外附植前发育的影响。结果如下: (1) NCSU-23+BSA 培养时,两种气相得到的克隆胚卵裂率以及囊胚率都没有显著差异; (2)两步激活法可以显著提高卵裂率,但囊胚率上也没有得到较大改善; (3)添加 LIF 后,克隆胚卵裂以及囊胚形成都没有明显提高; (4)全细胞胞质内注射法得到的克隆胚卵裂率虽然不如融合法,但是没有统计学上的显著差异, 另外在囊胚形成方面,两种重构策略效率相近。上述结果表明 ①本研究平台所生产的克隆胚胎可以在受体子宫内建立妊娠, 进行附植后发育; ②胚胎体外培养时低氧对克隆胚的帮助不明显。③同样添加 LIF 也是如此。④TA 法可以促进卵裂。⑤全细胞注射法可以有效生产克隆囊胚。

1 前言

体细胞核移植克隆技术为农业、医学和生物学基础研究提供了革命性的工具。对于猪的克隆来说,人们尤为关注的是开展人—猪异种器官移植。由于猪的器官在生理以及形态上与人的器官都非常接近,而且猪还是多胎动物,繁殖周期相对较短,饲养容易等诸多原因,长期以来,猪就被认为是为人提供器官移植的异源供体(Piedrahita and Mir 2004)。但是,由于猪的基因组含有 α -1,3-GalT 编码一种半乳糖苷转移酶,而在人和灵长类动物细胞表面没有,所以如果一旦将猪的器官移植给人,就容易引起超急性免疫排斥,后果严重。当然,猪的基因组中可能还整合有一些内源性病毒编码基因,可能存在传递人畜共患病的潜在危险(Hawley 2002)。所以,第一步要做的工作就是先生产不含 α -1,3-GalT 的猪。由于在猪上还没有真正意义上的胚胎干细胞,从而不可能象小鼠那样利用 ES 细胞来生产敲除后代。体细胞核移植技术的成功尤其是在牛(Kuroiwa *et al.* 2004), 绵羊(Denning *et al.* 2001)上的转基因克隆后代的诞生更是激发了人们利用该技术生产敲除猪的斗志。2002 年内就有两个组宣布获得敲除单拷贝 α -1,3-GalT 的克隆猪(Dai *et al.* 2002; Lai *et al.* 2002)。随后,人们又得到了双拷贝 α -1,3-GalT 灭活的克隆猪(Kolber-Simonds *et al.* 2004; Phelps *et al.* 2003)。

猪的体细胞克隆是各种家畜中难度相对较大的。原因是许多环节影响克隆胚胎的生产尤其是胚胎激活,体外培养以及胚胎移植。在猪上,至少有 4 个优质胚胎同时附植,才能诱发足够的妊娠信号。再者,猪怀孕早期胚胎的死亡率非常高,达到 40%左右。所以,开展猪克隆胚胎移植时人们倾向一次移植大量的胚胎,或者搭配孤雌激活胚,体外受精胚作为助手(Lai and Prather 2004)。

本试验目的就是为了探索建立猪的克隆胚生产,克隆胚胚胎移植的平台,为将来大规模开展克隆猪生产提供依据。

2 材料与方法

2.1 生产克隆胚所需仪器

同第八节 2.1.1

2.2 生产克隆胚所需实验耗材

同第八节 2.1.2

2.3 克隆胚胚胎移植所需材料

2.3.1 耗材 手术服,手术用无粉乳胶手套,50ml 注射器,酒精灯,酒精棉球,碘酒棉球,放手术器械的白瓷盘,一次性口罩,保定用绳子,缝合丝线,肥皂,输液器头皮针,无菌纱布,无菌脱脂棉,生理盐水,硫喷妥纳,地西洋,H-NCSU-23,青霉素,红霉素眼膏。

2.3.2 受体母猪 河北三河明慧养猪场自然发情后备母猪,主要有 PIC 种猪或者长白×大白二元杂;

2.3.4 手术器械: 手术刀(柄,刀片),手术剪,止血钳,创巾镊,敷料镊,三棱皮肤缝合针,软组织圆缝合针;

2.3.5 胚胎移植器械 美国农科,输卵管胚胎移植用管,连接 1ml 注射器针筒;

2.3.6 胚胎运输器械 2.5ml 麦管,法国卡苏;

2.3.7 细胞质内全细胞注射针的制备: 拉制参数为 heater 90℃, subforce 为 50, main force 为 90-105, sensor length 为 5-7cm, 其它制作过程均同前;

2.4 实验方法

2.4.1 供体细胞准备

胎儿成纤维细胞, 颗粒细胞准备同第六节 2.5.6

2.4.2 猪卵母细胞体外成熟

同第七节 2.4.1

2.4.3 显微操作

2.4.3.1 去核

同第八节 2.2.4.2

2.4.3.2 透明带下注射细胞

同第八节 2.2.4.2

2.4.3.3 融合

同第八节 2.2.4.3

2.4.3.4 细胞质内全细胞注射

将在无钙 H-NCSU-23 中恢复 1-2h 的已经去除核物质的卵母细胞以及供体细胞转移到同一个含 3%PVP,但不含 CB 的显微操作液滴内

↓

用固定针管吸持受体卵,注射针吸取一个直径 10-15 μm 的供体细胞

↓
从去核处将注射针刺入卵胞质接近固定针管口,但不要刺穿固定针所吸持的卵细胞膜

↓
先吸取部分细胞质,而后将细胞质以及体细胞一同注入细胞质

↓
10 个一批,注射后放入 NCSU-23+0.4% BSA 的液滴内恢复 2h

2.4.3..5 激活

取出上述融合或者显微注射得到的重构卵进行激活,具体操作同前

2.4.3..6 胚胎培养

同第八节 2.2.4.4

2.4.3..7 胚胎移植

用公猪试情或者观察压背反应,挑选自然发情母猪,一般在构建克隆胚的当天

↓
将在 CO₂ 培养箱中培养 12-30 h 的 1-2 细胞克隆胚取出,装入 2.5ml 细管内

↓
用灭菌的锡箔纸包装好,做好标记,放到腋窝下或者贴身的口袋中 1.5h 运到猪移植地点

↓
用 40-60ml (1mg/100kg 体重) 生理盐水溶解 1-1.5mg 硫喷妥钠和地西洋,耳静脉注射 20ml,

↓
待受体猪初步麻倒后,将其抬到手术架上仰卧(青年后备母猪, 图 10.1 A)或者侧卧(经产母猪, 图 10.1 B)保定

对后备母猪:在腹部下面第 1 对和第 2 对乳头之间,腹中线局部 15×10cm² 面积内清洁刮毛后先碘酒消毒,后酒精棉脱碘(对经产母猪: 在腹部脐窝部 15×10cm² 的范围内清洁,刮毛,碘酒消毒后酒精脱碘)

↓
在准备动刀切开腹中线之前,把前面余下的麻醉药再酌情注射 20-30ml,

↓
沿腹中线切开一个长约 8-10cm 的口,打开腹腔,探进去一支受取出卵巢后用润湿的灭菌脱脂纱布盖上(而对经产母猪:沿侧腹部做一个与腹中线面垂直的长约 10cm 的切口)

↓
在手术人员即将取出卵巢,调整好输卵管伞之际,将装在吸管内的胚胎取出放在热台上,

↓
体视显微镜下将胚胎装入移植管内

↓
手术人员和胚胎移植人员相互协调(图 10.1 C),将移植管从输卵管伞部探入输卵管至少 5cm 大致到了壶腹-峡部结合处,一边推动注射器,以便外撤移植管

↓
移植后体视镜下观察胚胎是否仍滞留在移植管内,确认没有后,开始卵巢回位,术口缝合



胚胎移植后第 10d 肌肉注射 800IU hCG,13d 注射 500IU PMSG

2.5 试验设计

试验一 胚胎培养气相对克隆胚胎体外附植前发育的影响

将核移植所得到的克隆胚分别放在 NCSU-23+4 mg/ml BSA 培养液中,然后再于两种气相环境下培养:A 组,高氧分压: 5%CO₂, 空气, 100%湿度;B 组,低氧分压:5%CO₂, 7%O₂, 88%N₂,100%湿度。分别在培养后 48 h 和 168 h 记录卵裂以及囊胚数,然后比较 A,B 两组之间的差异。

试验二 不同的激活方案对克隆胚胎的体外早期发育之影响

将重构好的卵胞质-供体细胞复合体先用含钙镁离子的融合/激活液中融合同时激活,待 30min~90min 后判定融合结果,一部分放入胚胎培养液中直接进行下一步培养(Simultaneous activation and fusion, AFS);另一部分再进行一次电击激活(Two step activation,TA),接着再开始体外培养。比较两组之间重构卵融合率,重构胚卵裂,囊胚形成是否不同。

试验三 添加 LIF 对克隆胚早期发育的影响

同一处理的克隆胚,随机挑选一部分放入添加 1000 IU/ml LIF 的 NCSU-23+4 mg/ml BSA 培养基中,另一部分放入不添加 LIF 的培养液中,比较对克隆胚的影响。

试验四 不同的核移植胚胎构建方式对克隆胚附植前发育的影响

参考 Lee JW 等. (2003)建立的全细胞胞质内注射法,构建重构胚;同时利用同一批成熟的卵母细胞,开展传统的融合法构建重构胚。比较两种克隆胚胎构建方式对胚胎早期发育的影响。

试验五 克隆胚胎移植

将来自中国实验用小型猪胎儿成纤维细胞的克隆胚胎,在培养 12-30h 后,也就是胚胎处于 1-2 细胞阶段,通过手术法移植到自然发情的后备青年母猪或者经产母猪的输卵管壶腹部-峡部结合处。通过观察返情与否或者 B 超检测判断妊娠情况,评价本试验平台所生产的克隆胚是否可以体内发育。

2.6 统计与分析

对于卵裂率和囊胚率,使用 SPSS(Version 11.0)进行 χ^2 分析, $p<0.05$ 时即认为差异显著。

3 结果

3.1 试验一 胚胎培养气相对克隆胚胎体外附植前发育的影响

如表 10.1 所示,当使用 NCSU-23+BSA 培养时,两种气相得到的克隆胚卵裂率以及囊胚率都没有显著差异。

表 10.1 胚胎培养气相对克隆胚胎体外附植前发育的影响

Table 10.1 Effects of culture gas environment on in vitro development of NTEs of pig

培养气相环境 Gas environment	培养胚胎数 No. embryos cultured	卵裂胚数 No. embryos cleaved(%) ^a	囊胚数 No. Blastocyst (%) ^b
5%CO ₂ , 7%O ₂ , 88%N ₂	94	50(53.2)	10(10.6)
5%CO ₂ in air	90	42(46.2)	6(6.7)

a 卵裂率=卵裂胚数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos to embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts to embryos cultured

3.2 试验二 不同的激活方案对克隆胚胎的体外早期发育之影响

如表 10.2 所示,两步激活法(TA)可以显著提高卵裂率,虽然融合率看上去高于 AFS 组,但是没有显著差异,另外囊胚率上也没有较大改善。

表 10.2 不同的激活方案对克隆胚胎的体外早期发育之影响

Table 10.2 Effects of different fusion and activation methods on in vitro developmental potential of pig NTEs

融合激活方案 Fusion and activation	重构卵数 No. couplets reconstructed	融合卵数 No. fused (%)	培养胚胎数 No. embryos cultured	卵裂胚数 No. embryos cleaved(%) ^a	囊胚数 No. Blastocyst (%) ^b
两步法 Two step activation	251	181 (76.7)	181	145(80.1) ^c	35 (19.3)
融合激活同时法 Simultaneous activation and fusion	177	105 (59.3)	99	64(64.6) ^d	19(19.2)

a 卵裂率=卵裂胚数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos to embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts to embryos cultured

同栏内上标不同表示有显著差异 Values with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05)

3.3 试验三 添加 LIF 对克隆胚早期发育的影响

如表 10.3 所示,添加 LIF 后,克隆胚卵裂以及囊胚形成都没有明显改善。

表 10.3 胚胎培养液添加 LIF 对克隆胚胎发育的影响

Table.10.3 effect of LIF on in vitro development competence of pig NTEs

胚胎培养添加 LIF 与否 supplement with LIF or not	培养 No. embryos cultured	卵裂(%) No. embryos cleaved(%) ^a	囊胚(%) No. blastocyst(%) ^b
含 LIF 组 with LIF	41	30(73.2)	1(2.4)
不含 LIF 组 without LIF	47	39(83.0)	3(6.4)

a 卵裂率=卵裂胚数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos to embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts to embryos cultured

3.4 试验四 不同的核移植胚胎构建方式对克隆胚附植前发育的影响

如表 10.4 所示,全细胞胞质内注射法得到的克隆胚卵裂率虽然不如融合法,但是没有统计学上的显著差异;另外在囊胚形成方面,两种重构策略效率相近。

表 10.4 克隆胚胎体外重建策略对 NTEs 早期发育的影响

Table 10.4 effect of reconstruction protocols on preimplantation development of pig NTEs			
构建方式	培养	卵裂(%)	囊胚(%)
reconstruction protocols	No. embryos cultured	No. embryos cleaved(%) ^a	No. blastocyst(%) ^b
胞质内注射	33	21(63.6)	3(9.1)
intracytoplasmin injection of nuclear			
融合法	26	22(83.6)	2(7.7)
cell couplets fusion			

a 卵裂率=卵裂胚数/培养胚胎数 Percentage of cleaved embryos to embryos cultured

b 囊胚率=囊胚数/培养胚胎数 percentage of Blastocysts to embryos cultured

3.5 试验五 克隆胚胎移植后体内发育情况

如表 10.5 所示, 预试验中移植的 10 头受体青年母猪再胚胎移植均已经返情。最近移植的 3 头经产母猪,在移植后 33d 用 B 超检测确定有 2 头怀孕。其中有一头是移植前已经配种的.可以确定其中的一头是克隆胚的(图 10.1 D)。

表 10.5 胚胎移植后受体母猪妊娠状况跟踪

Table 10.5 pregnancy or not of recipients after embryo transfer.						
胚胎移植时间	克隆胚个数	克隆胚发育阶段	孤雌激活胚个数	受体猪	返情时间	排卵与否
2004 年 12 月 27 日	43	1cell	50	后备 P1759	35d	未/戳破
2004 年 12 月 30 日	50	1cell	38	后备 P1763	一直没有发现	有
2005 年 1 月 10 日	44	2cell	30	后备 B1035 已配种	32d(2-12)	部分
2005 年 1 月 13 日	95	1cell	73 个	后备 1783 公猪 试情已过	55d(3-30)	未
2005 年 1 月 17 日	23+90 个	1-2cell	27+42 个	后备 LD150		
2005 年 1 月 20 日	45 个	1cell		LD153 移植前 已经配种	3-3 超声波检测怀孕(分娩无 NT 猪)	未
2005 年 1 月 24 日	26+110 个	1-2cell	29 个	P1797 发情过		已排
2005 年 1 月 28 日	32+110	1-2cell	0	B1048	已返情	未/戳破
2005 年 1 月 31 日	100+57	1-2cell	0	后备 P8321	已返情	未
2005 年 4 月 11 日	150 个	1cell	0	B792 经产	怀孕(5 月 13 日 B 超检测)	未
2005 年 4 月 11 日	20 个	1cell	0	B790 经产 ET 前 已配种	怀孕	排/已配种
2005 年 4 月 14 日	61 个	1cell	0	P1652 经产		未

4 讨论

4.1 关于克隆猪妊娠

在 2004 年 12 月 27 日到 2005 年 1 月 31 日之间,我们共移植了 10 头自然发情的后备母猪,起初通过观察有无返情现象来确定是否妊娠。在 2005 年 3 月 3 日,我们用 B 超仪对几头尚未返情的代孕母猪进行妊娠检测,发现都呈阴性。其中有一头移植前配种的猪有很强的妊娠信号,但是在 2005 年 5 月 11 日分娩后,没有黑色毛发的猪胎儿。在 2005 年 4 月 11 日到 2005 年 4 月 14 日,我们又选择 3 头自然发情的经产母猪作为受体,全部移植克隆胚胎。2005 年 5 月 13 日上午 B 超检查发现 4 月 11 日移植的其中 1 头有妊娠信号(图 10.1),确定怀孕。另外 1 头移植前配种的也有强妊娠信号。影响猪胚胎体内发育的因素很多,其中胚胎的质量,数量都对能否附植成功并维持较强的妊娠信号至为关键。在猪上,一般在发情的第 11-14d 期间,黄体功能有下降的趋势(Youngs 2001)。需要至少 4 个优质胚胎同时附植,才能产生有效的妊娠信号。所以,在进行克隆胚胎移植时,很多研究组都分别移植大量的克隆胚(Dai *et al.* 2002),或者用孤雌激活胚胎作为辅助(De Sousa *et al.* 2002),也有的研究用自然交配后的发情母猪为受体(Onishi *et al.* 2000),以及在受体发情后第 11d-14d 注射雌二醇或者 hCG/PMSG 以维持黄体功能,使妊娠信号不减弱(Lai and Prather 2003)。利用上述策略都已经成功取得了克隆猪的后代。我们也在去年底今年初分别尝试了上述方法,结果没有一头妊娠到期。另外,通过观察返情与否来判定妊娠状况是非常粗放的办法,结果不可靠。我们的结果也进一步说明了猪的体细胞克隆难度很大。有必要开展更深入系统的研究,以期得到更优化的生产克隆猪的技术平台。

4.2 关于克隆胚胎的激活

在牛上的研究(Wells *et al.* 1999)表明,融合后延迟激活有利于卵母细胞对供体细胞的重编程,从而有利于后期发育。在猪上 Harrison 等(2004)利用延迟激活的方法得到了敲除单拷贝 α -1,3-GalT 的克隆猪,而且效率不低。Walker S 等(2002)建立的高效克隆猪平台中,延迟激活是其成功的重要环节。而日本学者(Fujimura Dr. Tatsuya *et al.* 2004)则利用 TA 法以及 AFS 法都得到了克隆猪。Cheong 等(2002)则倾向于利用 AFS 法,用高钙融合/激活液处理重构胚,克隆胚卵裂率为 60-90%,囊胚率在 10-40%。我们的结果显示 TA 法对卵裂有利,但是对囊胚形成没有明显改善作用。两种激活方案都可以有效得到囊胚。

4.3 关于胚胎构建

我们尝试着将胎儿成纤维细胞直接注射得到了 63.6%的卵裂以及 9.1%的囊胚率。和传统的融合法结果相似。目前生产猪克隆胚胎的方案已经报道的主要有融合法(Lai *et al.* 2002),piezo 协助的胞质内注射法(Onishi *et al.* 2000),全细胞胞质内注射法(Lee *et al.* 2003)以及无透明带融合法(Booth *et al.* 2001)。其中前三种方法都已经取得了克隆猪的后代。融合法比较流行,piezo 注射法需要另外购买昂贵的 piezo 仪器,另外注射细胞前还要把供体细胞膜撞破。而全细胞注射法操作简单,直接将细胞注入细胞质内。Galli 等(2002)比较了细胞融合法与胞质内注射法在构建牛克隆胚胎方面的效率发现 Piezo 胞质内注射法构建得到的胚胎数量多于细胞融合法,但是融合法得到的囊胚明显比胞质内注射法多。Kawano 等(2004)在猪上将猪胎儿成纤维细胞利用胞质内注射法和融合法构建克隆胚的效率,发现胞质内注射法重构成功率明显高于融合法,而在胚胎发育到囊胚上没有显著差异。和我们的结果相似。Chen 等(2004)在小鼠上发现 Piezo 注射法对卵胞质的

伤害小,而且操作所需时间少于融合法。但是在囊胚形成以及细胞数上相似。Lee 等(2003)利用全细胞注射法,将猪克隆研究中常用的3种体细胞:卵丘细胞,成纤维细胞以及颗粒细胞直接注入去核卵胞质内,同时不用紫外光验证去核,得到了高达37%的囊胚率。

4.4 关于胚胎培养气相

我们比较氧分压对克隆胚体外附植前发育的影响。没有发现低氧的明显优势。这和Im 等(2004)的结果相矛盾。他们发现在低氧条件下,NCSU-23培养的胚胎囊胚率显著高于高氧(12.4% vs. 7.2%)培养组。而Booth 等(2005)认为氧分压影响如何取决于胚胎类型。这种不同可能是由于激活溶液,激活参数以及胚胎培养液中BSA不同所致。有许多研究(Karja *et al.* 2004; Kitagawa *et al.* 2004)表明,低氧有利于胚胎的发育以及质量改善。但是在猪上的研究还存有争议(Im *et al.* 2004)。有些培养基可能是基于低氧设计的,比如PZM-3(Yoshioka *et al.* 2002),而有的培养基可能对不同类型的胚胎如孤雌激活胚,体外受精胚又会产生依赖性(Booth *et al.* 2005),即对孤雌激活胚可能低氧好,而对于体外受精胚可能高氧好。但是,公认的是,体外培养条件还远远达不到体内生理条件下的环境,因此,有必要不断尝试探索新的培养方案。为了尽量减少体外培养对胚胎的影响,以及更多借助体内的天然环境,人们通常在克隆胚胎发育到最多8细胞之前就开展胚胎移植,甚至这边刚在激活后培养2-3h就移植。

4.5 关于胚胎培养基中添加LIF

LIF在小鼠和人的胚胎干细胞全能性维持过程中扮演着重要角色。在小鼠(Tsai *et al.* 2000)和人(Dunglison *et al.* 1996)以及牛(Marquand-Le *et al.* 1993)的早期胚胎培养上,LIF都有一定的帮助。但是在猪体内胚卵裂球(来自于4细胞)培养中,添加高浓度LIF(1000IU/ml)对囊胚发育有害(Eckert *et al.* 1997)。我们在培养孤雌胚胎时添加了此浓度的LIF,没有观察到明显的损害。同样,在培养克隆胚时,添加此高浓度的LIF没有明显负面影响。本研究只使用了一种浓度,因此,有必要进一步比较其它浓度的LIF添加看是否有利于克隆胚的发育,尤其是可否促进胚胎移植后的附植以及后期发育到满期。

结果表明①本研究平台所生产的克隆胚胎可以在受体子宫内建立妊娠,进行附植后发育;②胚胎体外培养时低氧对克隆胚的帮助不明显。③同样添加LIF也是如此。④TA法可以促进卵裂。⑤全细胞注射法可以有效生产克隆囊胚。

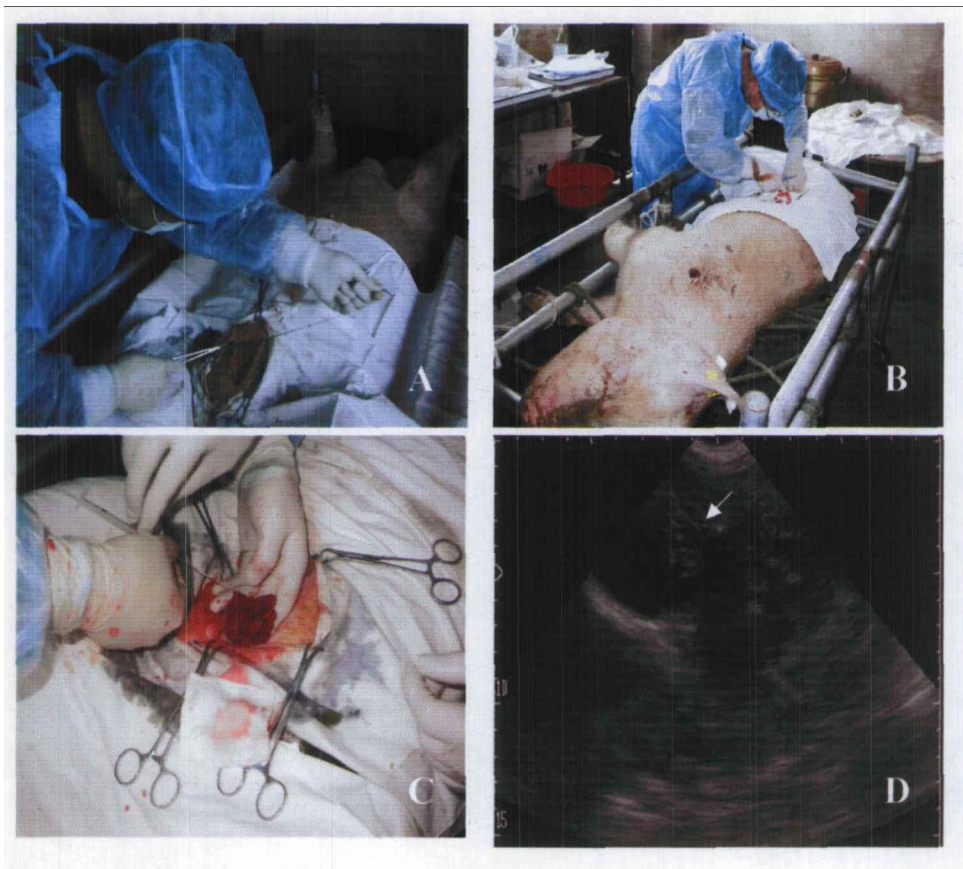


图 10.1 克隆胚胎手术法移植以及 B 超妊娠检测结果.A,青年后备受体母猪仰卧,腹中线切口.B 经产受体母猪侧卧腹部切口.C,输卵管移植胚胎.D,超声波妊娠检测,箭头所指即胎儿.

Figure 10.1 surgical embryo transfer of cloned embryos and ultrasound B examination. A, mid-ventral incision of natural cycling recipient gilt. B, side-ventral incision of natural cycling recipient sow. C, embryos transfer into oviduct using catheter. D, pregnancy confirmation with ultrasound B exam, to the right of the arrow is a fetus.

结论

本研究以妊娠40d中国实验用小型猪胎儿成纤维细胞作为供核体细胞,以屠宰场初情期青年母猪COCs体外成熟MII卵母细胞去核后作为受体,构建的克隆胚胎可以在代孕母猪子宫内建立妊娠,进行附植后发育;

本实验首次在猪上将4℃冷藏的细胞用作供核,成功获得了猪的克隆囊胚;该方法在核移植实践中的应用有助于节约细胞,降低成本;

我们首次尝试把猪的胚胎培养基PZM-3稍作改进后用于猪卵母细胞体外成熟,虽然效果不如NCSU-23理想,但是也可以支持发育到囊胚;

本实验系统的研究了氧分压高低对猪卵母细胞成熟,早期胚胎发育的影响,发现高氧分压(20%O₂)对卵母细胞的核成熟有帮助;但是对克隆胚胎体外发育来讲,氧分压影响不明显。

此外本研究还表明:

- 1 添加胰岛素(Insulin)可以改善卵母细胞核成熟,而添加LIF对卵细胞质成熟有害。
- 2 对孤雌胚来讲比较理想的培养基,当用于克隆胚胎培养时却不一定是最佳的选择而孤雌胚胎在体内发育能力差,可能和ICM/总细胞数很低有关。添加5 μg/ml Insulin或者1000IU/ml LIF对孤雌激活胚胎早期发育没有显著影响。
- 3 转GFP的猪胎儿成纤维细胞克隆胚胎可以发育到囊胚;血清饥饿对克隆胚早期发育没有必要;在挑选供体细胞时,选择圆形光滑的细胞有利于提高融合率;传代6-9次的细胞作供体较好。细胞性别以及年龄对克隆胚胎早期发育影响不大。在猪上,冷藏细胞可以重新编程发育到囊胚。
- 4 胚胎体外培养时低氧分压对克隆胚的帮助不明显。而添加1000IU/ml 的LIF未能促进胚胎的体外发育。两步激活法可以促进卵裂;全细胞胞质内注射法可以有效生产克隆囊胚。

参考文献

- [1] Abeydeera LR (2001) In vitro fertilization and embryo development in pigs. *Reprod Suppl* **58**, 159-73.
- [2] Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN, Prather RS, Day BN (2000) Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* **54**, 787-97.
- [3] Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN (1998) Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* **51**, 395-401.
- [4] Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN (1998) Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol Reprod* **58**, 1316-20.
- [5] Aldhous P (2000) Cloning's owners go to war. *Nature* **405**, 610-2.
- [6] Archer GS, Dindot S, Friend TH, Walker S, Zaunbrecher G, Lawhorn B, Piedrahita JA (2003) Hierarchical phenotypic and epigenetic variation in cloned swine. *Biol Reprod* **69**, 430-6.
- [7] Atabay EC, Katagiri S, Nagano M, Takahashi Y (2003) Effect of activation treatments of recipient oocytes on subsequent development of bovine nuclear transfer embryos. *Jpn J Vet Res* **50**, 185-94.
- [8] Baguisi A, Behboodi E, *et al.* (1999) Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* **17**, 456-61.
- [9] Barberi T, Klivenyi P, *et al.* (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* **21**, 1200-7.
- [10] Betthausen J, Forsberg E, *et al.* (2000) Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol* **18**, 1055-9.
- [11] Betts D, Bordonon V, Hill J, Winger Q, Westhusin M, Smith L, King W (2001) Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1077-82.
- [12] Blelloch RH, Hochedlinger K, Yamada Y, Brennan C, Kim M, Mintz B, Chin L, Jaenisch R (2004) Nuclear cloning of embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13985-90.
- [13] Boiani M, Eckardt S, Leu N, Scholer H, McLaughlin K (2003) *EMBO J* **22**, 5304-5312.
- [14] Boiani M, Eckardt S, Scholer H, McLaughlin K (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev* **16**, 1209-19.
- [15] Booth PJ, Holm P, Callesen H (2005) The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology* **63**, 2040-52.
- [16] Booth PJ, Tan SJ, Holm P, Callesen H (2001) Application of the zona-free manipulation technique to porcine somatic nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* **3**, 191-7.
- [17] Booth PJ, Tan SJ, Reipurth R, Holm P, Callesen H (2001) Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique. *Cloning Stem Cells* **3**, 139-50.
- [18] Boquest AC, Day BN, Prather RS (1999) Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol Reprod* **60**, 1013-9.
- [19] Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, Jaenisch R (2003) Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei.

- Development* **130**, 1673-80.
- [20] Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard JP, Viegas-Pequignot E (2001) Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol* **11**, 1542-6.
 - [21] Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G (2003) Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol* **21**, 157-62.
 - [22] Brussow KP, Torner H, Kanitz W, Ratky J (2000) In vitro technologies related to pig embryo transfer. *Reprod Nutr Dev* **40**, 469-80.
 - [23] Bureau WS, Bordignon V, Leveillee C, Smith LC, King WA (2003) Assessment of chromosomal abnormalities in bovine nuclear transfer embryos and in their donor cells. *Cloning Stem Cells* **5**, 123-32.
 - [24] Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE, Eppig JJ, Matzuk MM (2003) Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* **300**, 633-6.
 - [25] Campbell KH (1999) Nuclear transfer in farm animal species. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 245-52.
 - [26] Campbell KH (2002) A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *J Anat* **200**, 267-75.
 - [27] Campbell KH, Alberio R, Lee JH, Ritchie WA (2001) Nuclear transfer in practice. *Cloning Stem Cells* **3**, 201-8.
 - [28] Campbell KH, Loi P, Otaegui PJ, Wilmut I (1996) Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod* **1**, 40-6.
 - [29] Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* **380**, 64-6.
 - [30] Carter DB, Lai L, Park KW, Samuel M, Lattimer JC, Jordan KR, Estes DM, Besch-Williford C, Prather RS (2002) Phenotyping of transgenic cloned piglets. *Cloning Stem Cells* **4**, 131-45.
 - [31] Cavaleri F, Scholer HR (2003) Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* **113**, 551-2.
 - [32] Cezar GG, Bartolomei MS, Forsberg EJ, First NL, Bishop MD, Eilertsen KJ (2003) Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* **68**, 1009-14.
 - [33] Chen DY, Li JS, Han ZM, Lei L, Liu ZH, Kou ZH, Ma SY, Du QK, Sun QY (2003) Somatic cell bovine cloning: Effect of donor cell and recipients. *Chinese Science Bulletin* **48**, 549-554.
 - [34] Chen DY, Wen DC, *et al.* (2002) Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod* **67**, 637-42.
 - [35] Chen SU, Chao KH, Chang CY, Hsieh FJ, Ho HN, Yang YS (2004) Technical aspects of the piezo, laser-assisted, and conventional methods for nuclear transfer of mouse oocytes and their efficiency and efficacy: Piezo minimizes damage of the ooplasmic membrane at injection. *J Exp Zool Part A Comp Exp Biol* **301**, 344-51.
 - [36] Chen Y, He ZX, *et al.* (2003) Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Res* **13**, 251-63.
 - [37] Cheong HT, Park KW, Im GS, Lai L, Sun QY, Day BN, Prather RS (2002) Effect of elevated Ca(2+) concentration in fusion/activation medium on the fusion and development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev* **61**, 488-92.
 - [38] Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP (2002) Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* **20**, 366-9.

- [39] Cibelli JB, Campbell KH, Seidel GE, West MD, Lanza RP (2002) The health profile of cloned animals. *Nat Biotechnol* **20**, 13-4.
- [40] Cibelli JB, Grant KA, *et al.* (2002) Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* **295**, 819.
- [41] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM (1998) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* **280**, 1256-8.
- [42] Clark AJ, Ferrier P, *et al.* (2003) Proliferative lifespan is conserved after nuclear transfer. *Nat Cell Biol* **5**, 535-8.
- [43] Coy P, Romar R (2002) In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reprod Fertil Dev* **14**, 275-86.
- [44] Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos I, Gadea J (1999) Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology* **51**, 799-812.
- [45] Cui W, Wylie D, Aslam S, Dinnyes A, King T, Wilmot I, Clark AJ (2003) Telomerase-immortalized sheep fibroblasts can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development. *Biol Reprod* **69**, 15-21.
- [46] Cui XS, Jeong YJ, Jun JH, Kim NH (2005) Insulin-like growth factor-I alters apoptosis related genes and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing in vitro. *Theriogenology* **63**, 1070-80.
- [47] Cui XS, Kim NH (2003) Epidermal growth factor induces Bcl-xL gene expression and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing in vitro. *Mol Reprod Dev* **66**, 273-8.
- [48] Cui XS, Kim NH (2005) Polyamines inhibit apoptosis in porcine parthenotes developing in vitro. *Mol Reprod Dev* **70**, 471-7.
- [49] Cui XS, Lee JY, Choi SH, Kwon MS, Kim T, Kim NH (2004) Mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances viability of porcine embryos in defined culture conditions. *Anim Reprod Sci* **84**, 169-77.
- [50] Dai Y, Vaught TD, *et al.* (2002) Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* **20**, 251-5.
- [51] Daniels R, Hall V, Trounson AO (2000) Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod* **63**, 1034-40.
- [52] Day B, Abeydeera L, Prather R (1999) Recent progress in pig embryo production through in vitro maturation and fertilization techniques. In 'proceedings IV international conference on boar semen preservation'. (Ed.s LaG Johnson, HD.) pp. 81-92
- [53] Day BN (2000) Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Anim Reprod Sci* **60-61**, 161-72.
- [54] De Sousa PA, Dobrinsky JR, *et al.* (2002) Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod* **66**, 642-50.
- [55] Dean W, Santos F, Reik W (2003) Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 93-100.
- [56] Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W (2001) Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13734-8.
- [57] Denning C, Burl S, *et al.* (2001) Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol* **19**, 559-62.

- [58] Di Berardino M Cloning: Past, Present, and the Exciting Future. In '**Breakthroughs in Bioscience** <http://www.faseb.org/opar>'. (Federation of American Societies for Experimental Biology, Office of Public Affairs)
- [59] Dominko T, Chan A, Simerly C, Luetjens C, Hewitson L, Martinovich C, Schatten G (2000) Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocyte: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biol Reprod* **62**, 150-154.
- [60] Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, First NL (1999) Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod* **60**, 1496-502.
- [61] Dunglison G, Barlow D, Sargent I (1996) Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod* **11**, 191-196.
- [62] Eckert J, Tao T, Niemann H (1997) Ratio of Inner Cell Mass and Trophoblastic Cells in Blastocysts Derived from Porcine 4- and 8-Cell Embryos and Isolated Blastomeres Cultured In Vitro in the Presence or Absence of Protein and Human Leukemia Inhibitory Factor. *Biol Reprod* **57**, 552-560.
- [63] Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout W, 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R (2000) X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* **290**, 1578-81.
- [64] Eggan K, Baldwin K, Tackett M, Osborne J, Gogos J, Chess A, Axel R, Jaenisch R (2004) Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* **428**, 44-9.
- [65] Eggan K, Rode A, *et al.* (2002) Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. *Nat Biotechnol* **20**, 455-9.
- [66] Enright BP, Jeong BS, Yang X, Tian XC (2003) Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. *Biol Reprod* **69**, 1525-30.
- [67] Enright BP, Kubota C, Yang X, Tian XC (2003) Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod* **69**, 896-901.
- [68] Enright BP, Sung LY, Chang CC, Yang X, Tian XC (2005) Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod* **72**, 944-8.
- [69] Evans MJ, Gurer C, Loike JD, Wilmut I, Schnieke AE, Schon EA (1999) Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat Genet* **23**, 90-3.
- [70] Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-6.
- [71] Faber DC, Ferre LB, Metzger J, Robl JM, Kasinathan P (2004) Agro-economic impact of cattle cloning. *Cloning Stem Cells* **6**, 198-207.
- [72] Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, Perez-Crespo M, Ramirez MA, Rodriguez De Fonseca F, Pintado B, Gutierrez-Adan A (2004) Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5880-5.
- [73] Fujimura Dr. Tatsuya, Kurome Mayuko, *et al.* (2004) Cloning of the Transgenic Pigs Expressing Human Decay Accelerating Factor and N-Acetylglucosaminyltransferase III. *Cloning and Stem Cells* **6**, 294-301.
- [74] Fuks F, Hurd P, Deplus R, Kouzarides T (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1

- and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **31**, 2305-12.
- [75] Funahashi H, Day BN (1997) Advances in in vitro production of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* **52**, 271-83.
- [76] Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G (2003) Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* **424**, 635.
- [77] Galli C, Lagutina I, Lazzari G (2003) Introduction to cloning by nuclear transplantation. *Cloning Stem Cells* **5**, 223-32.
- [78] Galli C, Lagutina I, Vassiliev I, Duchi R, Lazzari G (2002) Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle. *Cloning Stem Cells* **4**, 189-96.
- [79] Gao S, Chung YG, Parseghian MH, King GJ, Adashi EY, Latham KE (2004) Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev Biol* **266**, 62-75.
- [80] Gao S, Chung YG, Williams JW, Riley J, Moley K, Latham KE (2003) Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei. *Biol Reprod* **69**, 48-56.
- [81] Gibbons J, Arat S, Rzuclido J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, Venable A, Stice S (2002) Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol Reprod* **66**, 895-900.
- [82] Gomez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL (2004) Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* **6**, 247-58.
- [83] Gong G, Dai Y, *et al.* (2004) Production of transgenic blastocyst by nuclear transfer from different types of somatic cells in cattle. *Sci China C Life Sci* **47**, 183-9.
- [84] Gong G, Dai Y, *et al.* (2004) Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* **69**, 278-88.
- [85] Guo JT, An ZX, Li Y, Li XF, Li YQ, Guo ZK, Zhang Y (2002) Cloned goats (*Capra hircus*) from adult ear cells. *SCIENCE IN CHINA (Series C)* **45**, 260-267.
- [86] Harrison S, Boquest A, *et al.* (2004) An efficient method for producing alpha(1,3)-galactosyltransferase gene knockout pigs. *Cloning Stem Cells* **6**, 327-31.
- [87] Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**, 1983-93.
- [88] Hawley RJ (2002) Genetic modification of pigs by nuclear transfer. *Xenotransplantation* **9**, 159-60.
- [89] Hazeleger W, Kemp B (2001) Recent developments in pig embryo transfer. *Theriogenology* **56**, 1321-31.
- [90] Hiendleder S, Mund C, Reichenbach HD, Wenigerkind H, Brem G, Zakhartchenko V, Lyko F, Wolf E (2004) Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod* **71**, 217-23.
- [91] Hochedlinger K, Blelloch R, Brennan C, Yamada Y, Kim M, Chin L, Jaenisch R (2004) Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev* **18**, 1875-85.
- [92] Hochedlinger K, Jaenisch R (2002) Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* **415**, 1035-8.
- [93] Hochedlinger K, Jaenisch R (2003) Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* **349**, 275-86.

- [94] Hoshino Yoichiro, Uchida Masaki, Shimatsu Yoshiki, Miyake Masashi, Nagao Yasumitsu, Minami Naojiro, Yamada Masayasu, Hiroshi ID (2005) Developmental Competence of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Reconstructed from Oocytes Matured In Vitro with Follicle Shells in Miniature Pig. *Cloning and Stem Cells* 7, 17-26.
- [95] Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R (2002) Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12889-94.
- [96] Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM, 3rd, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R (2001) Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 293, 95-7.
- [97] Hwang WS, Roh SI, *et al.* (2005) Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts. *Science*.
- [98] Hwang WS, Ryu YJ, *et al.* (2004) Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 303, 1669-74.
- [99] Hyun S, Lee G, *et al.* (2003) Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod* 69, 1060-8.
- [100] Hyun SH, Lee GS, *et al.* (2003) Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology* 59, 1641-9.
- [101] Ikeda K, Takahashi Y (2001) Effects of maturational age of porcine oocytes on the induction of activation and development in vitro following somatic cell nuclear transfer. *J Vet Med Sci* 63, 1003-8.
- [102] Illmensee K, Hoppe P (1981) Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23, 9-18.
- [103] Im GS, Lai L, Liu Z, Hao Y, Wax D, Bonk A, Prather RS (2004) In vitro development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology* 61, 1125-35.
- [104] Inoue K, Kohda T, *et al.* (2002) Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 295:297.
- [105] Iwamoto M, Onishi A, *et al.* (2005) Low oxygen tension during in vitro maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage. *Theriogenology* 63, 1277-89.
- [106] Jaenisch R, Eggan K, Humpherys D, Rideout W, Hochedlinger K (2002) Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning Stem Cells* 4, 389-96.
- [107] Jeon HY, Hyun SH, *et al.* (2005) The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. *Mol Reprod Dev* 71, 315-20.
- [108] Jiang L, Carter DB, Xu J, Yang X, Prather RS, Tian XC (2004) Telomere lengths in cloned transgenic pigs. *Biol Reprod* 70, 1589-93.
- [109] Jones KL, Tarochione-Utt KD (2004) DNA methylation in bovine adult and fetal fibroblast cells. *Cloning Stem Cells* 6, 259-66.
- [110] Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM (2001) Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet* 28, 173-7.
- [111] Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Kim HN, Chang WK, Lee KK, Han YM (2001) Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *J Biol Chem* 276, 39980-4.

- [112] Kang YK, Lee HJ, *et al.* (2005) Varied patterns of DNA methylation change between different satellite regions in bovine preimplantation development. *Mol Reprod Dev* **71**, 29-35.
- [113] Kang YK, Yeo S, *et al.* (2003) Precise recapitulation of methylation change in early cloned embryos. *Mol Reprod Dev* **66**, 32-7.
- [114] Karja NW, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T (2004) Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology* **62**, 1585-95.
- [115] Kasinathan P, Knott JG, Moreira PN, Burnside AS, Jerry DJ, Robl JM (2001) Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos in vitro. *Biol Reprod* **64**, 1487-93.
- [116] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* **282**, 2095-8.
- [117] Kato Y, Tani T, Tsunoda Y (2000) Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* **120**, 231-7.
- [118] Kato Y, Tsunoda Y (1995) Germ cell nuclei of male fetal mice can support development of chimeras to midgestation following serial transplantation. *Development* **121**, 779-83.
- [119] Kawano K, Kato Y, Tsunoda Y (2004) Comparison of in vitro development of porcine nuclear-transferred oocytes receiving fetal somatic cells by injection and fusion methods. *Cloning Stem Cells* **6**, 67-72.
- [120] Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R (2001) Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* **64**, 918-926.
- [121] Kim TM, Hwang WS, Shin JH, Park HJ, Han JY, Lim JM (2004) Development of a nonmechanical enucleation method using x-ray irradiation in somatic cell nuclear transfer. *Fertil Steril* **82**, 963-5.
- [122] Kim YS, Lee SL, Ock SA, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ (2005) Development of cloned pig embryos by nuclear transfer following different activation treatments. *Mol Reprod Dev* **70**, 308-13.
- [123] King TJ, Dobrinsky JR, *et al.* (2002) Embryo development and establishment of pregnancy after embryo transfer in pigs: coping with limitations in the availability of viable embryos. *Reproduction* **123**, 507-15.
- [124] Kishida R, Lee ES, Fukui Y (2004) In vitro maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* **62**, 1663-76.
- [125] Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T (2004) Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* **62**, 1186-97.
- [126] Kolber-Simonds D, Lai L, *et al.* (2004) Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7335-40.
- [127] Kono T (1997) Nuclear transfer and reprogramming. *Rev Reprod* **2**, 74-80.
- [128] Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Seo JS, Ogawa H (2004) Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* **428**, 860-4.
- [129] Koo DB, Kang YK, *et al.* (2000) In vitro development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* **63**, 986-92.
- [130] Koo DB, Kang YK, *et al.* (2002) Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod* **67**, 487-92.

- [131] Koo DB, Kang YK, Park JS, Park JK, Chang WK, Lee KK, Han YM (2004) A paucity of structural integrity in cloned porcine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* **62**, 779-89.
- [132] Kragh PM, Vajta G, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Callesen H (2004) Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reprod Fertil Dev* **16**, 315-318.
- [133] Kubota C, Tian XC, Yang X (2004) Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* **22**, 693-4.
- [134] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X (2000) Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 990-5.
- [135] Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J, Niemann H (2000) Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod* **62**, 412-9.
- [136] Kuhholzer B, Hawley RJ, Lai L, Kolber-Simonds D, Prather RS (2001) Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pigs. *Biol Reprod* **64**, 1695-8.
- [137] Kuhholzer B, Tao T, Machaty Z, Hawley RJ, Greenstein JL, Day BN, Prather RS (2000) Production of transgenic porcine blastocysts by nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* **56**, 145-8.
- [138] Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyasalan J, Sullivan EJ, Kakitani M, Tomizuka K, Ishida I, Robl JM (2004) Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat Genet* **36**, 775-80.
- [139] Kurome M, Fujimura T, Murakami H, Takahagi Y, Wako N, Ochiai T, Miyazaki K, Nagashima H (2003) Comparison of electro-fusion and intracytoplasmic nuclear injection methods in pig cloning. *Cloning Stem Cells* **5**, 367-78.
- [140] Lai L, Kolber-Simonds D, *et al.* (2002) Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* **295**, 1089-92.
- [141] Lai L, Park KW, *et al.* (2002) Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev* **62**, 300-6.
- [142] Lai L, Prather RS (2003) Creating genetically modified pigs by using nuclear transfer. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 82.
- [143] Lai L, Prather RS (2003) Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning Stem Cells* **5**, 233-41.
- [144] Lai L, Prather RS (2004) A method for producing cloned pigs by using somatic cells as donors. *Methods Mol Biol* **254**, 149-64.
- [145] Lai L, Tao T, Machaty Z, Kuhholzer B, Sun QY, Park KW, Day BN, Prather RS (2001) Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors. *Biol Reprod* **65**, 1558-64.
- [146] Lanza R, Cibelli J, Diaz F, Moraes C, Farin C, Hammer C, West M, Damiani P (2000) Cloning of endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* **2**, 79-80.
- [147] Lanza R, Cibelli J, MD. W (1999) Human therapeutic cloning. *Nat. Med.* **5**, 975-977.
- [148] Lanza RP, Cibelli JB, *et al.* (2000) Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* **288**, 665-9.
- [149] Lee GS, Hyun SH, *et al.* (2003) Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology* **59**, 1949-57.

- [150] Lee GS, Kim HS, *et al.* (2005) Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology* **63**, 973-91.
- [151] Lee JW, Tian XC, Yang X (2004) Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol Reprod Dev* **68**, 51-7.
- [152] Lee JW, Wu SC, *et al.* (2003) Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol Reprod* **69**, 995-1001.
- [153] Lee SH, Kim DY, *et al.* (2004) Role of messenger RNA expression of platelet activating factor and its receptor in porcine in vitro-fertilized and cloned embryo development. *Biol Reprod* **71**, 919-25.
- [154] Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**, 662-73.
- [155] Li GP, Chen DY, Lian L, Han ZM, Zhu ZY, Seidel GE, Jr. (2002) Rabbit cloning: improved fusion rates using cytochalasin B in the fusion buffer. *Mol Reprod Dev* **61**, 187-91.
- [156] Li GP, White KL, Bunch TD (2004) Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. *Cloning Stem Cells* **6**, 5-13.
- [157] Li J, Ishii T, Feinstein P, Mombaerts P (2004) Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. *Nature* **428**, 393-9.
- [158] Li S, Li Y, Du W, Zhang L, Yu S, Dai Y, Zhao C, Li N (2005) Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. *Biol Reprod* **72**, 258-65.
- [159] Liu JL, Wang MK, Sun QY, Zhang XR, Jiang LK, Chen DY (2001) Refrigeration of donor cells in preparation for bovine somatic nuclear transfer. *Reproduction* **122**, 801-8.
- [160] Liu L (2001) Cloning efficiency and differentiation. *Nat Biotechnol* **19**, 406.
- [161] Loi P, Clinton M, Barboni B, Fulka J, Jr., Cappai P, Feil R, Moor RM, Ptak G (2002) Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biol Reprod* **67**, 126-32.
- [162] Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J, Jr., Cappai P, Clinton M (2001) Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* **19**, 962-4.
- [163] Machaty Z, Day BN, Prather RS (1998) Development of early porcine embryos in vitro and in vivo. *Biol Reprod* **59**, 451-5.
- [164] Mann J (2001) Imprinting in the germ line. *Stem Cells* **19**, 287-294.
- [165] Mann MR, Chung YG, Nolen LD (2003) Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod* **69**, 902-914.
- [166] Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gerard N, Mermillod P, Goudet G (2003) Effect of growth hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol Reprod* **69**, 1013-22.
- [167] Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P (2002) Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* **57**, 1523-32.
- [168] Marquant-Le G, Humbolt P, Guillon N, Thibier M (1993) Murine LIF improves the development of IVF cultured bovine morulae. *J Reprod Fertil Abstr* **12**, 61.
- [169] Martinez Diaz MA, Suzuki M, Kagawa M, Ikeda K, Takahashi Y (2003) Effects of cycloheximide treatment on in-vitro development of porcine parthenotes and somatic cell nuclear transfer embryos. *Jpn J Vet Res* **50**, 147-55.
- [170] Mastromonaco GF, Semple E, Robert C, Rho GJ, Betts DH, King WA (2004) Different culture

- media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reprod Domest Anim* **39**, 462-7.
- [171] McGrath J, Solter D (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* **220**, 1300-1302.
- [172] Medvedev S, Onishi A, Fuchimoto D, Iwamoto M, Nagai T (2004) Advanced in vitro production of pig blastocysts obtained through determining the time for glucose supplementation. *J Reprod Dev* **50**, 71-6.
- [173] Meehan R (2003) DNA methylation in animal development. *Seminars in cell & development biology* **14**, 53-65.
- [174] Meirelles FV, Bordonon V, Watanabe Y, Watanabe M, Dayan A, Lobo RB, Garcia JM, Smith LC (2001) Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics* **158**, 351-6.
- [175] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631-42.
- [176] Miyashita N, Shiga K, *et al.* (2002) Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol Reprod* **66**, 1649-55.
- [177] Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, Stice SL (2002) Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig. *Biol Reprod* **67**, 540-5.
- [178] Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, Stice SL (2003) Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod* **68**, 1079-86.
- [179] Nagashima H, Fujimura T, *et al.* (2003) Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Theriogenology* **59**, 95-106.
- [180] Nam DH, Lee SH, *et al.* (2005) The role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor in development of porcine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization. *Theriogenology* **63**, 190-201.
- [181] Norman HD, Walsh MK (2004) Performance of dairy cattle clones and evaluation of their milk composition. *Cloning Stem Cells* **6**, 157-64.
- [182] Oback B, Wells D (2002) Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. *Cloning Stem Cells* **4**, 147-68.
- [183] Oback B, Wells DN (2003) Cloning cattle. *Cloning Stem Cells* **5**, 243-56.
- [184] Oback B, Wiersema AT, *et al.* (2003) Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells* **5**, 3-12.
- [185] Ogawa H, Ono Y, Shimozaawa N (2003) Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction* **126**, 549 ~557.
- [186] Ohgane J, Wakayama T, *et al.* (2004) The *Sall3* locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells* **9**, 253-60.
- [187] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC (2000) Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* **289**, 1188-90.
- [188] Park JI, Hong JY, Yong HY, Hwang WS, Lim JM, Lee ES (2005) High oxygen tension during in vitro oocyte maturation improves in vitro development of porcine oocytes after fertilization. *Anim Reprod Sci* **87**, 133-41.
- [189] Peura TT (2003) Improved in vitro development rates of sheep somatic nuclear transfer embryos by using a reverse-order zona-free cloning method. *Cloning Stem Cells* **5**, 13-24.
- [190] Peura TT, Kleemann DO, Rudiger SR, Nattrass GS, McLaughlan CJ, Walker SK (2003) Effect of

- nutrition of oocyte donor on the outcomes of somatic cell nuclear transfer in the sheep. *Biol Reprod* **68**, 45-50.
- [191] Phelps CJ, Koike C, *et al.* (2003) Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* **299**, 411-4.
- [192] Piedrahita JA (2000) Gene targeting in domestic species: a new beginning. *Transgenic Res* **9**, 261-2.
- [193] Piedrahita JA, Mir B (2004) Cloning and transgenesis in mammals: implications for xenotransplantation. *Am J Transplant* **4 Suppl 6**, 43-50.
- [194] Polejaeva IA, Chen SH, *et al.* (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**, 86-90.
- [195] Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L, Greenstein JL (2003) Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* **59**, 115-23.
- [196] Reik W, Santos F, Dean W (2003) Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology* **59**, 21-32.
- [197] Renard JP, Zhou Q, LeBourhis D, Chavatte-Palmer P, Hue I, Heyman Y, Vignon X (2002) Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. *Theriogenology* **57**, 203-22.
- [198] Rhind SM, Taylor JE, De Sousa PA, King TJ, McGarry M, Wilmot I (2003) Human cloning: can it be made safe? *Nat Rev Genet* **4**, 855-64.
- [199] Rideout WM, 3rd, Eggan K, Jaenisch R (2001) Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* **293**, 1093-8.
- [200] Roh S, Hwang WS (2002) In vitro development of porcine parthenogenetic and cloned embryos: comparison of oocyte-activating techniques, various culture systems and nuclear transfer methods. *Reprod Fertil Dev* **14**, 93-9.
- [201] Saito S, Niemann H (1991) Effects of Extracellular Matrices and Growth Factors on the Development of Isolated Porcine Blastomeres. *Biol Reprod* **44**, 927-936.
- [202] Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* **241**, 172-82.
- [203] Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W (2003) Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol* **13**, 1116-21.
- [204] Savard C, Novak S, Saint-Cyr A, Moreau M, Pothier F, Sirard MA (2004) Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* **67**, 70-6.
- [205] Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP, Niemann H, Rudolph KL (2004) Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8034-8.
- [206] Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmot I, Colman A, Campbell KH (1997) Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* **278**, 2130-3.
- [207] Seidel GE (2004) Review of animal transgenesis and cloning. *Cloning Stem Cells* **6**, 57.
- [208] Senda S, Wakayama T, Yamazaki Y, Ohgane J, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K (2004) Skewed X-inactivation in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 38-44.
- [209] Shi W, Dirim F, Wolf E, Zakhartchenko V, Haaf T (2004) Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol Reprod* **71**, 340-7.
- [210] Shi W, Hoeflich A, Flaswinkel H, Stojkovic M, Wolf E, Zakhartchenko V (2003) Induction of a

- p>senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos.
- Biol Reprod*
- 69**
- , 301-9.
- [211] Shi W, Zakhartchenko V, Wolf E (2003) Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation* **71**, 91-113.
- [212] Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH, Waddington D, Wilmut I, Colman A, Schnieke AE (1999) Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* **399**, 316-7.
- [213] Shin T, Kraemer D, *et al.* (2002) A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* **415**, 859.
- [214] Simerly C, Dominko T, *et al.* (2003) Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* **300**, 297.
- [215] Simerly C, Navara C, *et al.* (2004) Embryogenesis and blastocyst development after somatic cell nuclear transfer in nonhuman primates: overcoming defects caused by meiotic spindle extraction. *Dev Biol* **276**, 237-52.
- [216] Sirisathien S, Hernandez-Fonseca H, Bosch P, Hollet B, Lott J, Brackett B (2003) Effect of leukemia inhibitory factor on bovine embryos produced in vitro under chemically defined conditions. *Theriogenology* **59**, 1751-1763.
- [217] Solter D (2000) Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet* **1**, 199-207.
- [218] Steinborn R, Schinogl P, Wells DN, Bergthaler A, Muller M, Brem G (2002) Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics* **162**, 823-9.
- [219] Sullivan EJ, Kasinathan S, Kasinathan P, Robl JM, Collas P (2004) Cloned calves from chromatin remodeled in vitro. *Biol Reprod* **70**, 146-53.
- [220] Sun QY, Nagai T (2003) Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev* **49**, 347-59.
- [221] Swain JE, Bormann CL, Clark SG, Walters EM, Wheeler MB, Krisher RL (2002) Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro. *Reproduction* **123**, 253-60.
- [222] Swain JE, Bormann CL, Krisher RL (2001) Development and viability of in vitro derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. *Theriogenology* **56**, 459-69.
- [223] Takahagi Y, Fujimura T, Miyagawa S, Nagashima H, Shigehisa T, Shirakura R, Murakami H (2005) Production of α 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III. *Mol Reprod Dev*.
- [224] Takahashi S, Ito Y (2004) Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. *Cloning Stem Cells* **6**, 165-71.
- [225] Takeda K, Takahashi S, Onishi A, Goto Y, Miyazawa A, Imai H (1999) Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J Reprod Fertil* **116**, 253-9.
- [226] Tamashiro KL, Wakayama T, *et al.* (2002) Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat Med* **8**, 262-7.
- [227] Tani T, Kato Y, Tsunoda Y (2001) Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod* **64**, 324-30.
- [228] Tani T, Kato Y, Tsunoda Y (2003) Reprogramming of bovine somatic cell nuclei is not directly regulated by maturation promoting factor or mitogen-activated protein kinase activity. *Biol Reprod* **69**, 1890-4.
- [229] Tao T, Boquest AC, Machaty Z, Peterson AL, Day BN, Prather R (2000) Development of Pig

- Embryos by Nuclear Transfer of Cultured Fibroblast Cells. *cloning* **1**, 55-62.
- [230] Tao T, Machaty Z, Boquest AC, Day BN, Prather RS (1999) Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into in vitro matured oocytes. *Anim Reprod Sci* **56**, 133-41.
- [231] Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada T (2004) Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod* **71**, 1150-7.
- [232] Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Korfiatis NA, Hall VJ, Ruddock NT, Cooney MA, Trounson AO (2004) Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod Fertil Dev* **15**, 361-6.
- [233] Teranishi T, Tanaka M, Kimoto S, Ono Y, Miyakoshi K, Kono T, Yoshimura Y (2004) Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer. *Dev Biol* **266**, 76-86.
- [234] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-7.
- [235] Tian XC, Kubota C, *et al.* (2005) Meat and milk compositions of bovine clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6261-6.
- [236] Tian XC, Xu J, Yang X (2000) Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet* **26**, 272-3.
- [237] Tome D, Dubarry M, Fromentin G (2004) Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning Stem Cells* **6**, 172-7.
- [238] Tsai H, Chang C, Hsieh Y, Hsu L, Chang S, Lo H (2000) Effect of different concentrations of recombinant leukemia inhibitory factor on different development stage of mouse embryo in vitro. *J Assist Reprod Genet* **17**, 352-355.
- [239] Tsunoda Y, Kato Y (1993) Nuclear transplantation of embryonic stem cells in mice. *J Reprod Fertil* **98**, 537-40.
- [240] Uhm SJ, Kim NH, Kim T, Chung HM, Chung KH, Lee HT, Chung KS (2000) Expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and neomycin resistant (Neo(R)) genes in porcine embryos following nuclear transfer with porcine fetal fibroblasts transfected by retrovirus vector. *Mol Reprod Dev* **57**, 331-7.
- [241] Urakawa M, Ideta A, Sawada T, Aoyagi Y (2004) Examination of a modified cell cycle synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells. *Theriogenology* **62**, 714-28.
- [242] Vajta G, Bartels P, Joubert J, de la Rey M, Treadwell R, Callesen H (2004) Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the Handmade Cloning (HMC) and the Submarine Incubation System (SIS). *Theriogenology* **62**, 1465-72.
- [243] Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO (2001) Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning* **3**, 89-95.
- [244] Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H (2003) Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol Reprod* **68**, 571-8.
- [245] Van Thuan N, Harayama H, Miyake M (2002) Characteristics of preimplantational development of porcine parthenogenetic diploids relative to the existence of amino acids in vitro. *Biol Reprod* **67**,

- 1688-98.
- [246] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **394**, 369-74.
- [247] Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P (2001) Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* **292**, 740-3.
- [248] Wakayama T, Yanagimachi R (1999) Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat Genet* **22**, 127-8.
- [249] Wakayama T, Yanagimachi R (2001) Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* **122**, 49-60.
- [250] Wakayama T, Yanagimachi R (2001) Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev* **58**, 376-83.
- [251] Walker SC, Shin T, Zaunbrecher GM, Romano JE, Johnson GA, Bazer FW, Piedrahita JA (2002) A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using in vitro-matured oocytes. *Cloning Stem Cells* **4**, 105-12.
- [252] Wang L, Duan E, Sung LY, Jeong BS, Yang X, Tian XC (2005) Generation and Characterization of Pluripotent Stem Cells from Cloned Bovine Embryos. *Biol Reprod*.
- [253] Wang MK, Liu JL, Li GP, Lian L, Chen DY (2001) Sucrose pretreatment for enucleation: an efficient and non-damage method for removing the spindle of the mouse MII oocyte. *Mol Reprod Dev* **58**, 432-6.
- [254] Wang YG, Zhou XG, Liu JL, al. e (1999) Cloned goats (*Capra hircus*) from foetal fibroblast cell lines. *Chinese Science Bulletin* **45**, 34-38.
- [255] Watanabe S, Iwamoto M, et al. (2005) A novel method for the production of transgenic cloned pigs: electroporation-mediated gene transfer to non-cultured cells and subsequent selection with puromycin. *Biol Reprod* **72**, 309-15.
- [256] Wells DN, Forsyth JT, McMillan V, Oback B (2004) The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells* **6**, 101-10.
- [257] Wells DN, Misica PM, Tervit HR (1999) Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* **60**, 996-1005.
- [258] Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH (1998) Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* **10**, 369-78.
- [259] Westhusin ME, Burghardt RC, Ruglia JN, Willingham LA, Liu L, Shin T, Howe LM, Kraemer DC (2001) Potential for cloning dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 287-93.
- [260] Willadsen SM (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* **320**, 63-5.
- [261] Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE (2002) Somatic cell nuclear transfer. *Nature* **419**, 583-6.
- [262] Wilmut I, Campbell KH (1998) Quiescence in nuclear transfer. *Science* **281**, 1611.
- [263] Wilmut I, Peterson LA (2002) Somatic cell nuclear transfer (cloning) efficiency. In.
- [264] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-3.
- [265] Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ (2003) A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* **301**, 1063.
- [266] Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM (2003) Zygote arrest I (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet* **33**, 187-91.

- [267] Xia P, Tekpetey FR, Armstrong DT (1994) Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Mol Reprod Dev* 38, 373-9.
- [268] Xue F, Tian XC, *et al.* (2002) Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet* 31, 216-20.
- [269] Yanagimachi R (2002) Cloning: experience from the mouse and other animals. *Mol Cell Endocrinol* 187, 241-8.
- [270] Yang CX, Han ZM, Wen DC, Sun QY, Zhang KY, Zhang LS, Wu YQ, Kou ZH, Chen DY (2003) In vitro development and mitochondrial fate of macaca-rabbit cloned embryos. *Mol Reprod Dev* 65, 396-401.
- [271] Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S (2002) Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 66, 112-9.
- [272] Young LE, Fernandes K, *et al.* (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27, 153-4.
- [273] Young LE, Schnieke AE, *et al.* (2003) Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev* 120, 1433-42.
- [274] Youngs CR (2001) Factors influencing the success of embryo transfer in the pig. *Theriogenology* 56, 1311-20.
- [275] Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, *et al.* (1999) Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle. *Mol Reprod Dev* 52, 421-6.
- [276] Zhou Q, Boulanger L, Renard J (2000) A simplified method for the reconstruction of fully competent mouse zygotes from adult somatic donor nuclei. *Cloning* 2, 35-44.
- [277] Zhou Q, Jouneau A, Brochard V, Adenot P, Renard JP (2001) Developmental potential of mouse embryos reconstructed from metaphase embryonic stem cell nuclei. *Biol Reprod* 65, 412-9.
- [278] Zhou Q, Renard JP, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J (2003) Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302, 1179.
- [279] Zhu H, Craig JA, Dyce PW, Sunnen N, Li J (2004) Embryos derived from porcine skin-derived stem cells exhibit enhanced preimplantation development. *Biol Reprod* 71, 1890-7.
- [280] Zhu J, Telfer EE, Fletcher J, Springbett A, Dobrinsky JR, De Sousa PA, Wilmut I (2002) Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biol Reprod* 66, 635-41.
- [281] 安晓荣 (2001) 利用体细胞核移植技术生产转基因牛和绵羊的研究. [博士学位论文]中国农业大学.
- [282] 安晓荣, 苟克勉, 陈永福 (2001) 体细胞克隆法生产绵羊转基因囊胚. *科学通报*, 820-823+883.
- [283] 陈大元 (2000) 克隆大熊猫取得阶段性成果. *中国科学院院刊*, 1398-1400.
- [284] 陈大元, 李劲松, 韩之明, 雷蕾, 刘忠华, 寇朝辉, 马世援, 杜启科, 孙青原 (2003) 体细胞克隆牛:供体细胞和受体的影响. *科学通报*, 14-17.
- [285] 陈大元, 孙青原, *et al.* (1999) 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育. *中国科学C 辑* 03, 101-107.
- [286] 陈莹, 何志旭, *et al.* (2003) 体细胞起源的人胚胎干细胞. *细胞生物学杂志*, 60-62.
- [287] 杜卫华 (2004) 小鼠化学去核卵母细胞支持供体细胞核体外发育的研究. [博士学位论文]中国农业大学.
- [288] 龚国春 (2004) 利用体细胞核移植技术生产转基因牛. [博士学位论文]中国农业大学.
- [289] 龚国春, 戴蕴平, *et al.* (2003) 利用体细胞核移植技术生产转基因牛. *科学通报* 24, 32-37.
- [290] 郭继彤, 李煜, 安志兴, 李雪峰, 李裕强, 郭泽坤, 张涌 (2002) 成年耳细胞克隆山羊(Capra

- hircus). *中国科学C 辑*, 81-85.
- [291] 李劲松, 陈大元 (2002) 哺乳动物核移植中供核与受体卵胞质细胞周期的相互关系. *生物化学与生物物理进展*, 99-104.
- [292] 李劲松, 陈大元, *et al.* (2001) 连续核移植对异种克隆大熊猫胚胎发育的影响. *中国科学(C 辑)* 46, 1899-1901.
- [293] 李世杰, 杜卫华, 李宁 (2004) 体细胞克隆中核的重编程. *科学通报* 49, 721-726.
- [294] 李彦欣 (2004) 异种克隆牦牛、羚羊及相关机理研究. [博士学位论文] 中国农业大学.
- [295] 廉莉, 李光鹏, 廉颖, 吴昱琪, 朱子玉, 徐营, 高文学, 陈大元 (2003) 实验用显微操作作用针的制备与应用. *生殖与避孕*, 20-22.
- [296] 卢晟盛, 卢克焕 (2003) 早期胚胎无蛋白质培养液的建立. *广西农业生物科学*, 41-43.
- [297] 孙兴参 (2001) 猪体细胞核移植及几个相关问题的研究. [博士学位论文] 东北农业大学.
- [298] 陶勇 (2004) 一氧化氮与猪卵母细胞减数分裂成熟. [博士学位论文] 中国农业大学.
- [299] 田见晖 (2003) 猪体外成熟卵母细胞孤雌激活及胞质内单精子注射技术研究. [博士学位论文] 中国农业大学.
- [300] 王海, 曾申明, 朱士恩, 吴中红, 张忠诚 (2002) 培养介质、卵丘细胞和卵泡直径对猪卵母细胞体外成熟的影响. *中国畜牧杂志*, 15-17.
- [301] 王敏康 (2000) 小鼠克隆及核质关系的研究. [博士学位论文] 中国农业大学.
- [302] 王敏康, 张田, 刘冀琰, 陈大元 (1999) 一种改进的胚胎吸管. *动物学杂志*, 35-36.
- [303] 王玉阁, 邹贤刚, *et al.* (1999) 由胎儿成纤维细胞而来的克隆山羊(*Capra hircus*). *科学通报*, 81-85.
- [304] 吴中红 (2002) 猪卵母细胞孤雌激活及体细胞核移植技术的研究. [博士学位论文] 中国农业大学.
- [305] 吴中红, 邢凤英, 曾申明, 刘国世, 朱士恩, 张忠诚 (2003) 猪体外成熟卵母细胞激活方法的比较. *自然科学进展*, 50-52.
- [306] 薛庆善 (2002) '体外培养的原理与技术.' (科学出版社: 北京)
- [307] 杨彩侠 (2004) 猕猴重构胚和大熊猫异种克隆研究. [博士学位论文] 中国科学院研究生院.
- [308] 张德福, 刘东, 王英, 芮荣, 鲍世民, 张平, 李震 (2004) 猪胚胎细胞核移植重组胚发育能力的研究. *上海农业学报*, 32-37.

致谢

值此论文付梓之际,我谨向导师李宁教授献上最崇高的敬意和诚挚的谢意!三年前,慕导师之名,怀着满腔热情,来到农大。三年里,导师在生活上、学习上都给予了我无微不至的关怀,尤其是导师实事求是、光明磊落的治学、为人处世态度,不断激励着我完善自身,将使我终身受益;导师为我们创造了非常好的学习环境,在实验室内营造了宽松、活跃、团结、争鸣的学术氛围;不断鼓励我们勤于思考、勇于创新、团结务实、大胆实验;不仅教我做学问,更教我如何做人。正是导师兢兢业业的工作态度,饱满的工作热情,丰富的科研经验和人生阅历,使我受到严格的训练和培养。本试验从选题到试验设计无不倾注着导师的辛苦,本文更是在导师的悉心指导下才得以完成的。再次感谢恩师李宁教授。

特别感谢戴蕴平老师在论文选题,试验设计以及具体操作环节等方面给予的指导和无私帮助。戴老师见多识广,经验丰富,总能在我们遇到困难时提供及时的支持和鼓励。费菁老师在试验试剂,仪器耗材准备方面提供了非常及时的帮助,没有费老师的帮助,本试验难以顺利完成。感谢连正兴教授非常热情的帮助联系胚胎移植受体猪场,并经常针对试验提出许多建设性的建议。感谢曾申明教授在试验的关键环节上给予的无私帮助。特别感谢张晓兰老师和邓学梅老师在试验取材,胚胎移植猪场联系方面提供大量有帮助的信息。感谢农业生物技术国家重点实验室的张帆老师、候健老师给予的帮助。感谢生物学院冯丽华的关心和帮助。

本试验的顺利进行离不开潘登科博士废寝忘食的劳动,共同工作的日子里,是师兄、朋友,他严谨求实的治学态度,勤勉敬业的奉献精神,朴实无华的生活作风,为人率直的态度深深地感染着我。在我遇到困难时给我鼓励,在学习上、生活上都给了我极大的帮助。感谢实验室在读研究生赵永辉、孙秀柱、孙国杰、王晓波、赵定胜、徐慰倬、袁晶、田兴华以及龚国春博士在试验进程中的慷慨相助和鼓励。特别感谢师兄刘晓辉博士在猪胎儿性别鉴定上提供的帮助,以及与课题有关的有益交流。深深感谢师兄张磊博士、昔奋功博士、师姐李彦欣博士、杜卫华博士、袁建霞博士、李世杰博士、黄银花博士、方昌阁博士等对本研究的关心和帮助。感谢在读研究生张坤、林桐辉、王少华等在论文撰写过程中提供的有益帮助。感谢刘华贵师兄、张瑾师弟、赵玉龙师弟、于舒洋博士等三年里的鼓励,关心和帮助;感谢在读博士研究生张莹、金渭武、韩建永、曹更生、林莉、杨阳、师科荣、卢伟等同学对课题的关心和鼓励。

嘉洁康宁公司的李燕直接参与了我们的试验,为本试验的顺利进行付出了辛勤的劳动,在此表示衷心感谢。非常感谢李元元副总,熊红英主任对非常本课题关心和提供大量的帮助。特别感谢王刚冒严寒,顶酷暑,不怕脏累苦,深入到屠宰场为我们取卵巢。谢谢王莉莉老师、王海萍老师、汤波、郑敏、刘颖、谢媛、李荣、王美丽、李京和丁方荣等,他们都非常关心和支持我们的工作,并且经常给予无私的帮助。非常感谢张爱真、罗杰、蒋雪琴、贾春霞在实验用品的准备上提供的大力支持,由于你们的辛勤劳动,才使得本试验得以顺利进行。

非常感谢动物医学院附属动物医院院长林德贵教授、张健大夫在胚胎移植上给予的帮助。感谢河北三河市明慧养猪集团宋志明董事长、李继阳厂长、张富生厂长和技术员李政、徐峰等在提供胚胎移植受体以及照看移植后母猪等方面所给予的全力配合。

特别感谢已毕业的王海博士、陶勇博士在本试验的各个时期提供的建设性建议和有益帮助。感谢来自安徽农大的殷宗俊博士、姜润深博士给予的鼓励和帮助。感谢动物科技艳萍博士、李慧峰博士、生院许守明博士、张翼翔博士、农学生物技术学院余柏胜博士等同学的关心帮助。非常感谢中科院动物所计划生育生殖生物学国家重点实验室马伟博士、征曰良博士、张刚博士、张雁玲博士所给予的热情帮助。特别感谢动物硕博连读生李和军、万荣同学给予的无私帮助。

衷心感谢我硕士导师章孝荣教授对我多年的关怀和帮助。

本研究得到了国家重点基础研究发展计划“973”项目和北京市自然科学基金的支持。

对以上师长和同学的指导与帮助及基金支持一并表示最衷心的感谢！

特别感谢我的父亲和我已故的母亲，是他们多年来一直呕心沥血抚养，教育呵护我成长。感谢我的爱人、岳父、岳母对我学业的支持，是他们照顾我年幼可爱的女儿，免除了我的后顾之忧。

最后，再次向所有关心和帮助过我的同学、老师、朋友及家人致以深深的谢意！

张运海

2005年6月于中国 北京

个人简历

姓 名	张运海	性 别	男
出生年月	1973 年 8 月	民 族	汉 族
籍 贯	安徽省 涡阳县	政治面貌	中共党员

◆ 求学经历

➤2002 年 9 月至今：中国农业大学生物学院，生物化学与分子生物学专业，动物分子遗传学方向，师从李宁教授攻读博士学位；

➤1999 年 9 月—2002 年 7 月：安徽农业大学动物科技学院，动物遗传育种与繁殖专业，哺乳动物胚胎工程方向，师从章孝荣教授，获农学硕士学位；

➤1992 年 9 月—1996 年 7 月：安徽农业大学畜牧兽医系，兽医专业，获农学学士学位

◆ 工作经历

1996 年 9 月—1997 年 2 月：安徽涡阳育才私立初级中学，主讲初中化学

1997 年 3 月—1999 年 8 月：安徽阜阳市黄牛改良中心，主管牛羊冷冻精液生产以及兽医治疗

◆ 获奖情况

农业生物技术国家重点实验室授予“畜禽基因组学与分子数量遗传学”创新群体 2004 学术年会“最佳墙报奖”，2001 年于安徽农业大学获得“安科生物”研究生奖学金一等奖。

◆ 发表论文情况

- 1 Zhang Yun-Hai, Pan Deng-Ke, Sun Xiu-Zhu, Sun Guo-Jie, Liu Xiao-Hui, Wang Xiao-Bo, Tian Xing-Hua, Li Yan, Dai Yun-Ping, Li Ning. In Vitro Developmental Competence of Pig Nuclear Transferred Embryos: Effects of GFP-transfection, Refrigeration, Cell Cycle Synchronization, and Shapes of Donor Cells. (Submitted to *Zygote*)
- 2 Zhang Yun-Hai, Pan Deng-Ke, Sun Guo-Jie, Sun Xiu-Zhu, Wang Xiao-Bo, Liu Xiao-Hui, Li Yan, Dai Yun-Ping, Li Ning. Production of transgenic cloned embryos by somatic nuclear transfer in pig. (Submitted to *Science in China: series C- Life science*)
- 3 Liu Xiao-Hui, Zhao Yong-Hui, Zhang Yun-Hai, Liu Wei and Li Ning. Cloning and mapping of *MC1R* gene on chromosome 16 in Giant Panda. *Animal genetics*, (Accepted in March 2005)
- 4 张运海, 章孝荣, 刘亚, 锯书存, 金仁桃, 章美玲, 汪存利. 波尔山羊及黄牛耳部皮肤成纤维细胞的体外培养. *安徽农业大学学报*, 2002, 29(4): 387-390.
- 5 张运海. 牛卵泡发育及其调控. *动物科学与动物医学*, 2000, 17 (4): 15-18
- 6 张运海, 章孝荣. 山羊胚胎移植研究进展. *黑龙江动物繁殖*, 2001, 9 (3): 6-12
- 7 Liu Ya, Zhang Xiao-Rong, Chen Da-Yuan, Zhang Yun-Hai, Zhang Zhi-Guo, Jin Ren-Tao, Wang Cun-Li, Zhang Mei-Ling, Li Dong-Wei, Li Bin, Zhao Huan and Cheng Li-Zi. In vitro developmental potential of cloned embryos derived from bovine somatic cells and rabbits oocyte. *Agricultural Sciences in China*, 2003, 2(12): 1393-1397
- 8 Zhang Xiao-Rong, Liu Ya, Zhang Yun-Hai, Chen Da-Yuan, Lian Li, Li Jing-Song, Jin Ren-Tao, Zhang Zhi-Guo, Zhang Mei-Ling and Wang Cun-Li. Effect of some factors on the fusion rate of bovine-rabbit interspecies reconstructed eggs. *Journal of agricultural biotechnology*, 2002, 11(6): 620-623. (In Chinese)
- 9 Liu Ya, Zhang Xiao-Rong, Zhang Yun-Hai, Jin Ren-Tao, Zhang Mei-Ling, Wang Cun-Li. Cryopreservation and Cold Storage of Fibroblast Cells in Goat and Cattle. *Chinese journal of veterinary science*, 2004, 24(2): 197-198. (In Chinese)

-
- 10 Fang Fu-Gui, Zhang Xiao-Rong, **Zhang Yun-Hai**, Yuan Yun-Sheng, Liu Ya, Tao Yong. Influences of Active Immunization against GnRH-Tandem-Dimer on Gonad in Male Rabbits. Chinese journal of veterinary science, 2002, 22(4): 373-374. (In Chinese)
 - 11 Fang Fu-Gui, Zhang Xiao-Rong, **Zhang Yun-Hai**, Yuan Yun-Sheng, Liu Ya and Tao Yong. effects of active immunization against GnRH-tandem-dimer on testosterone of male rabbits. Heilongjiang Journal of animal reproduction, 2004, 12(1): 3-5. (In Chinese)