

## 用改进的细胞核移植方法构建重构胚

# Reconstruction of Embryo Using an Improved Nuclear Transfer Method

吴克良, 时永香\*, 白增亮\*, 田海滨, 张楠, 刘兰兰, 刘昌彬

WU Ke-Liang, SHI Yong-Xiang\*, BAI Zeng-Liang\*, TIAN Hai-Bin, ZHANG Nan, LIU Lan-Lan and LIU Chang-Bin

山东大学生命科学院, 济南 250100

*School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China*

**摘 要** 为了能够找出一种既容易操作, 又不需要特殊设备的核移植方法, 对以前的操作进行了改进。首先以预先吸有细胞核或细胞的注射针在固定于持卵针上的卵母细胞透明带上穿刺两个孔, 然后一边缓慢地将注射针回拨至卵周隙中, 一边逐渐增加持卵针中的负压, 直至极体与目标核质被完整吸入持卵针中而完成去核, 最后在不拔出注射针的情况下直接注射细胞核或完整细胞进而完成重构胚的构建。用此方法对 200 个卵母细胞进行注核和注细胞操作, 平均完成一个重构胚的构建各自耗时约 40s 和 30s, 成功率分别为 62.6% 和 86.0%。用核染料 Hoechst 33342 对卵母细胞的去核效率进行验证, 去核成功率达到 73.3%。实验证明, 用此方法可以在只有倒置显微镜和显微操作仪的条件下一次性快速完成去核和注核, 大大提高了细胞核移植的效率和重构胚成活率, 更重要的是该方法操作简单, 新手可以很快掌握该技术, 易于在实际工作中推广应用。

**关键词** 细胞核移植, 重构胚, 去核, 注核

中图分类号 Q813.3 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0161-05

**Abstract** Previous methods used for nuclear transplantation were further investigated to develop a method that was both easy to carryout and did not require any special apparatus, such as Piezoimpact or Spindle-View. Following the puncture of zona pellucida with two holes by injection pipette that contained donor nuclei or cells, the injection pipette was pulled back to the perivitelline space while the negative pressure was increased in the holding pipette until the polar body and karyoplasm were wiped off completely. Then a reconstructed embryo was completed by the direct injection of the donor nucleus or cell without pulling out the injection pipette. 200 oocytes were manipulated using this method and it cost about 40 seconds with nucleus injection and about 30 seconds with cell injection to complete a reconstructed embryo. The success rates were 62.6% and 86.0%, respectively, and enucleation rate was about 73.3% validated by Hoechst 33342. Using this method, the nucleus was completely eliminated and another was injected using the microscope and micromanipulator. Moreover, the efficiency of nuclear transplantation and survival rate of reconstructed embryos were greatly improved. Furthermore, it is very easy to manipulate and popularize in practice.

**Key words** nuclear transplantation, reconstructed embryo, nuclear wiped off, nuclear injection

Received: July 20, 2006; Accepted: August 8, 2006.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30370692).

\* Corresponding author. Tel: +86-531-88364889; E-mail: shiyx@sdu.edu.cn; zengliangbai@sdu.edu.cn

国家自然科学基金资助(No. 30370692)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

克隆羊“多利”的诞生,使得体细胞核移植技术在细胞工程中显现出日益重要的地位。近年来应用此技术已成功地克隆出小鼠<sup>[1]</sup>、牛<sup>[2]</sup>、山羊<sup>[3]</sup>、猪<sup>[4]</sup>、兔<sup>[5]</sup>、猫<sup>[6]</sup>以及大鼠<sup>[7]</sup>等,此为遗传学、发育生物学及生物经济学等领域的研究与发展起到了重要的推动作用。我国在此领域进展很快,如陈大元<sup>[8,9]</sup>等在异种动物克隆方面的成就,周琪<sup>[7]</sup>等通过对卵母细胞激活时间与核移植时间的巧妙调节在世界上首次克隆成功大鼠,谭景和<sup>[10,11]</sup>等在克隆小鼠、山羊及其相关问题的研究,苟克勉等利用胞浆内精子注射法获得小鼠<sup>[12]</sup>等。但克隆技术现今必须接受的残酷事实是获得良好的重构胚的效率仍然很低,而且在操作过程中需要熟练的技术和特殊的设备,这严重影响着该技术的推广和应用。探索一种简单、快速、有效的细胞核移植方法,无疑可使该技术在科学研究和生产中发挥更重要的作用。为此我们研究获得了一种不需要借助于特殊设备而能有效构建重构胚的方法,并对去核效率和重构胚发育潜能进行了验证。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

种鼠 C57BL/6 与 DBA/2 皆购自上海斯莱克实验动物中心,杂交一代 B6D2F1(C57BL/6 × DBA/2)小鼠作为卵母细胞供体。

### 1.2 试剂

孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)购自宁波第二激素厂,配制培养液

KSOM 和操作液 H-KSOM 所需药品、细胞松弛素 B、Hoechst 33342 购自 Sigma 公司。

### 1.3 MII 期卵母细胞的收集

雌性 B6D2F1 小鼠,腹腔注射 PMSG 5IU,46h ~ 48h 后注射 HCG 5IU,13 ~ 15h 后颈椎脱臼法处死。从输卵管壶腹部取出卵母细胞-颗粒细胞复合体,置于含有 0.1mg/mL 透明质酸酶的 HEPES-KSOM 培养基中,待卵母细胞周边的颗粒细胞全部分散为单个细胞时,停止消化。将卵母细胞转移到 KSOM 培养基中,37.0℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至去核前。

### 1.4 供体颗粒细胞的制备

将从卵母细胞-颗粒细胞复合体中消化下来的颗粒细胞用新鲜的 KSOM 液清洗 3 遍,然后小心将其移到显微操作小室中的 PVP 液滴中,用注射针轻轻吸入颗粒细胞后吹出,使颗粒细胞的细胞膜破裂。然后依次将细胞膜破裂的颗粒细胞在注射针中排成一排。

### 1.5 核质重组

(1)在操作小室的一滴 H-KSOM 液中放入 10 ~ 20 个脱去颗粒细胞的卵母细胞。

(2)显微镜下用持卵针以 9 点钟的方向牢牢固定住卵母细胞,将注射针针尖放在卵母细胞的正下方(6 点的位置)(图 1-A)。

(3)将注射针上移,挤压卵母细胞使其在注射针和持卵针之间形成透明带皱褶,至与持卵针开口位置对齐。

(4)将注射针刺进并穿透透明带皱褶,进入持卵

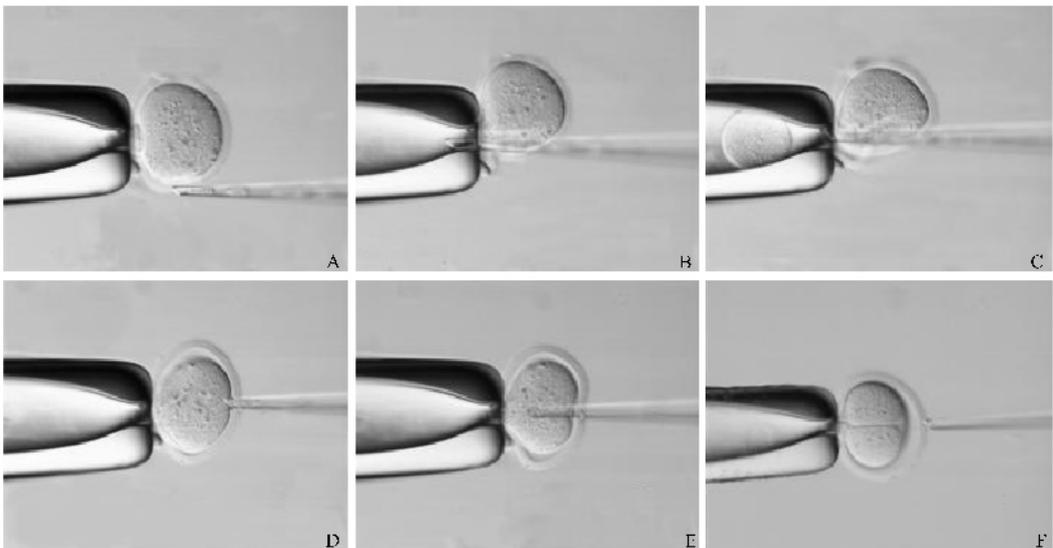


图 1 重构胚的构建(×300)

Fig. 1 Constitution of reconstructed embryo(×300)

A~C: enucleation of oocytes; D~F: injection of donor cell.

针的开口中(图 1-B),这样便能在透明带的位置扎上两个孔;

(5)降低持卵针内的负压,使其正好能支持卵母细胞止,一边将注射针拨回至卵周隙中,一边缓慢增加持卵针内的负压,直到极体与目标核质被吸进持卵针止(图 1-C),此时持卵针的针尖还留在透明带内,以利于下一步的注核。

(6)降低持卵针内的负压至持卵针与卵母细胞脱离,以上述在卵周隙中的注射针为支点,用持卵针重新调整卵母细胞的位置,使其中心与注射针针尖在同一水平线上,然后增加持卵针内的负压,重新固定卵母细胞(图 1-D)。

(7)将事先吸到注射针中的颗粒细胞注入到细胞质中(图 1-E、F),然后拔出显微注射针。

(8)注射过颗粒细胞后的卵母细胞在室温条件下放置 5~10min。然后用新鲜的 KSOM 培养液清洗并培养重构卵母细胞至用激活液激活时为止。

### 1.6 去核效率的鉴定

挑选出来的 MII 期卵母细胞先培养在含有 5 $\mu$ g/mL Hoechst 33342 的 H-KSOM 培养液中 5min,然后再转移到新鲜的 H-KSOM 培养液中。以空注射针用上述方法对卵母细胞进行去核,然后在荧光显微镜下验证去核效率。

### 1.7 重构胚的激活

在 5% CO<sub>2</sub> 和 37 $^{\circ}$ C 的条件下,将重构胚放入不含有 Ca<sup>2+</sup> 但含有 2.5~10mmol/L SrCl<sub>2</sub> 以及 5 $\mu$ g/mL 细胞松弛素 B 的 KSOM 液中进行激活 1h 后,将其放入含有 5 $\mu$ g/mL 细胞松弛素 B 的 KSOM 液中培养 5h,再用新鲜的 KSOM 培养液将重构胚清洗 3 遍,然后将其放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养,最后在显微镜下对重构胚的发育效果进行观察。

## 2 结果与分析

用上述方法一次性进行去核和注核,平均完成一个重构胚的构建大约需要 40s 的时间。如果采用融合法进行重构胚的构建,只需要把受体细胞直接注射到卵周隙中。实际操作显示,用该方法可以使时间缩短到大约 30s(完成去核和颗粒细胞的注射)。在技术熟练的情况下,我们也运用了 Zhou<sup>[13]</sup> 所介绍的方法用玻璃针对卵母细胞直接去核,用此方法对一个卵母细胞去核需用大约 25s 的时间;之后再对去核的卵母细胞进行直接注核,成功注射一个细胞核大约需要 25s 的时间。我们对以上三种方法比较(见表 1),发现与去核然后注核的二步核移植方法相比,该方法可以明显减少操作时间并可以在很大程度上提高最后的操作成功率。

表 1 不同操作方法成功率与所用时间

Table 1 Succeed rate and time spent about different way of manipulation

Way of manipulation	Enucleate and then inject donor cell directly	Enucleate and then inject donor cell into the perivitelline space	The way stated by Zhou
Total number of oocytes	107	93	95
The number of well conditioned oocytes after manipulation	67	80	29
Success rate of manipulation	62.6%	86.0%	30.5%
Time spent to get a reconstructed embryo	(40 $\pm$ 2)s	(30 $\pm$ 2)s	(25 $\pm$ 2)s+(25 $\pm$ 2)s

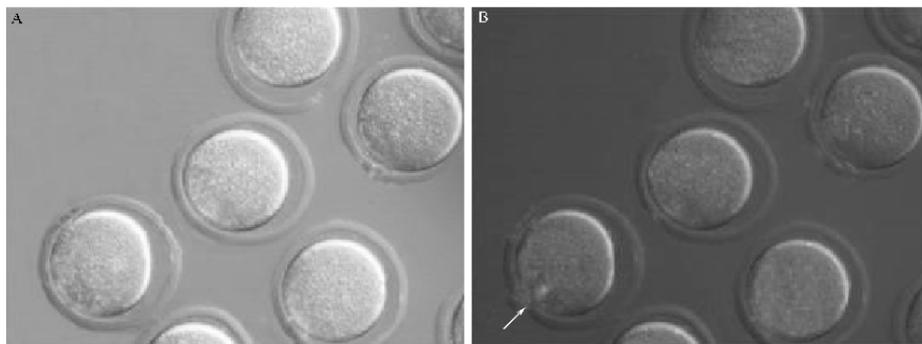


图 2 用 Hoechst 3342 对 MII 期卵母细胞去核效率的鉴定( $\times$ 300)

Fig. 2 Evaluation of enucleation rate about mature MII oocytes by Hoechst 3342( $\times$ 300)

A: enucleated oocytes through improved way of micromanipulation;

B: enucleation rate was evaluated by Hoechst 33342, blue fluorescence(arrow) indicate nuclear, oocytes without blue fluorescence indicate successfully enucleated ones.

在不进行注核的情况下我们直接用注射针以上述方法进行去核,然后利用核染料 Hoechst 33342 进行去核效率的鉴定,结果发现用该方法对 60 个卵母细胞进行去核,成功的有 44 个,去核效率大约 73.3%,其中细胞核与极体位置偏差很大的卵母细胞去核不是很成功(见图 2)。

我们采用一次性去核和注核的方法进行重构胚的构建(没有采用融合的方法),将经过激活的重构

胚放入 KSOM 培养液中进行培养,以观察重构胚的发育潜能。激活处理以后状态良好的重构胚中,36h 内能够发育到 2 细胞期的比率为 60.8%(31/51),48h 内到达 4-8 细胞期的比率为 51.0%(26/51)。但目前发育到 8 细胞期后的重构胚比率明显较低(5/51),很少重构胚能够发育到超过 16 细胞期(见图 3)。



图 3 重构胚的发育( $\times 300$ )

Fig. 3 Development of reconstructed embryo

A : 2-cell embryo ; B : 4-cell embryo ; C : 4 ~ 8-cell embryo.

### 3 讨论

以细胞核移植为手段的细胞改造在细胞工程中起着日益重要的作用。目前细胞核移植方法主要有借助脉冲(Piezoinject)装置直接去核和注核的方法、化学诱导去核然后注核的方法和 Spindle-View 系统辅助去核然后注核的方法等。但以上方法的实施需要借助于特殊的装置(如 Piezoinject 装置、Spindle-View 偏振光系统)或对卵的后期发育有明显副作用。沈新明等<sup>[14]</sup>报道了用改进的去核方法高效率地去除细胞核,然后在透明带开口的地方注入细胞核的核移植方法。该法虽然可以省去特殊装置的使用,但弊端较大。如在进行穿孔的时候会使细胞质部分发生较大的变形及位移,这样开始的定位可能到后来就不精确,通过负压挤压透明带的方法去除细胞质部分时力度不好掌握,如果力度太小无法将目标核质去除,如果太大就会去除过多的细胞质,很难找到恰当的力度。还有一个很重要的缺陷就是在进行移核的时候还要进行换针和开口重新对位,这样在操作过程中将会浪费过多时间。

虽然在本实验中,重构胚的发育潜能不是很高,但并不能否定此方法的可行性。发育潜能低的主要原因可能是培养液配制的质量有待提高,此次所用的所有培养液都是自己配制的,血清或配制用水尚需进一步优化。研究表明,该方法可以在很大程度上解决当前技术上存在的问题,同当前的显微操作

核移植方法相比较具有显著的优越性(1)不需要借助于特殊的装置,只要配备倒置显微镜和显微操纵仪即可(2)可以准确高效地去除目标核质(3)对卵母细胞透明带的损伤较小(4)卵母细胞质不会受强烈挤压而解体(5)对重构胚的后期发育没有副作用(6)力度比较好控制,新手也容易掌握等。而且最重要的是该方法可以一次性完成去核和注核两个步骤,减少了显微操作的时间,这对提高重构胚的成活率至关重要。

影响细胞核移植成功的因素很多,如卵母细胞和供体细胞的细胞周期、印记基因的甲基化模式<sup>[15]</sup>、基因组再程序化的效率和核移植胚胎的外遗传记忆(Epigenetic Memory)<sup>[16]</sup>等等。但细胞核移植技术无疑是其成功的关键,通过对当前核移植方法的改进,有助于加快细胞核移植基础研究的步伐,促进克隆技术在实际生产中的应用。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, et al. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**: 369 - 374.
- [2] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, **282**(5396): 2095 - 2098.
- [3] Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 456 -

- [ 4 ] Polejaeva IA , Chen SH , Vaught TD , *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* , 2000 , **407** : 86 – 90.
- [ 5 ] Chesne P , Adenot PG , Viglietta C , *et al.* Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* , 2002 , **20** : 366 – 369.
- [ 6 ] Shin T , Kraemer D , Pryor J , *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* , 2002 **415** : 859.
- [ 7 ] Zhou Qi , Renard Jean-Paul , Fricc Le Gaelle , *et al.* Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* , 2003 , **302**( 5648 ) : 1179.
- [ 8 ] Chen T , Zhang YL , Chen DY , *et al.* Interspecies nuclear transfer reveals that demethylation of specific repetitive sequences is determined by recipient ooplasm but not by donor intrinsic property in cloned embryos. *Mol Reprod Dev* , 2006 , **73**( 3 ) : 313 – 317.
- [ 9 ] Wen DC , Bi CM , Chen DY , *et al.* Hybrid embryos produced by transferring panda or cat somatic nuclei into rabbit MII oocytes can develop to blastocyst in vitro. *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol* , 2005 , **303**( 8 ) : 689 – 697.
- [ 10 ] Han D , Lan GC , Tan JH , *et al.* Factors affecting the efficiency and reversibility of roscovitine ( ROS ) block on the meiotic resumption of goat oocytes. *Mol Reprod Dev* , 2006 , **73**( 2 ) : 238 – 246.
- [ 11 ] Zhou JB , Wu YG , Tan JH , *et al.* Effects of sperm and oocyte quality control on intracytoplasmic sperm injection ( ICSI ) in goats. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica* , 2004 , **37**( 5 ) : 367 – 374.
- [ 12 ] Yan AY ( 严阿勇 ) , Li M ( 李明 ) , Gou KM ( 苟克勉 ) , *et al.* Normal mice derived from oocytes following intracytoplasmic sperm injection ( ICSI ). *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) 2005 **21**( 2 ) 305 – 310.
- [ 13 ] Zhou Q , Boulanger L , Renard JP. A simplified method for the reconstruction of fully competent mouse zygotes from adult somatic donor nuclei. *Cloning* , 2000 , **2**( 1 ) : 35 – 44.
- [ 14 ] Shen XM ( 沈新明 ) , Qiao GL ( 乔贵林 ) , Jiang PZ ( 江培洲 ) , *et al.* A modified method of nuclear transfer for investigating early development of mouse embryos reconstructed with cumulus cell nuclei. *J First Mil Med Univ* ( 第一军医大学学报 ) 2005 **25**( 6 ) : 613 – 618
- [ 15 ] Mellissa RWM , Young GC , Leisha DN , *et al.* Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biology of Reproduction* , 2003 , **69** : 902 – 914
- [ 16 ] Ray KN , John BG. Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. *PNAS* , 2005 , **102** ( 6 ) : 1957 – 1962.