

转人 t-PA 指形区缺失基因的山羊体细胞核移植及其继代核移植 Somatic Nuclear Transplantation and Serial Nuclear Transplantation of Human Finger-domain Lacking t-PA Gene in Goat

赵晓娥, 马保华, 武 浩, 郑月茂, 张 涌*

ZHAO Xiao-E, MA Bao-Hua, WU Hao, ZHENG Yue-Mao and ZHANG Yong*

西北农林科技大学动物科技学院生物工程研究所 杨凌 712100

College of Animal and Technology, Bio-engineering institute, Northwest University of A & F, Yangling 712100, China

摘 要 为了探索转基因体细胞核经连续核移植后的发育潜力,以转人组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)指形区缺失基因的山羊胎儿成纤维细胞为核供体,III 期的卵母细胞质为核受体,利用胞质内注射法构建原代核移植胚胎(G_0),并进行了原代核移植胚胎的继代核移植研究。比较原代和继代核移植胚胎在体外发育能力上的差异,在 G_1 、 G_2 代核移植试验过程中,比较了供体胚胎细胞的发育阶段对核移植胚胎体外发育的影响。结果表明,原代核移植胚胎的卵裂率($76.45\% \pm 1.17\%$)与继代核移植胚胎的卵裂率($72.18\% \pm 1.97\%$, $76.05\% \pm 2.38\%$, $75.99\% \pm 2.84\%$)无显著性差异($P > 0.05$)。但原代核移植胚胎的桑葚胚率($47.20\% \pm 2.93\%$)、囊胚率($11.00\% \pm 1.42\%$)显著高于 G_1 、 G_2 、 G_3 代核移植胚胎的桑葚胚率($34.99\% \pm 2.66\%$, $28.23\% \pm 2.00\%$, $23.34\% \pm 1.99\%$)、囊胚率($3.87\% \pm 0.67\%$, $2.08\% \pm 1.66\%$, 0)。在 G_1 、 G_2 中,当用 16-细胞期核移植胚胎作为核供体时的桑葚胚率($29.57\% \pm 1.53\%$, $24.43\% \pm 1.87\%$)、囊胚率($1.96\% \pm 1.31\%$, $2.01\% \pm 1.34\%$)低于用 32~64-细胞时期的核移植胚胎的桑葚胚率($34.32\% \pm 1.31\%$, $29.76\% \pm 1.66\%$)、囊胚率($3.86\% \pm 1.03\%$, $3.48\% \pm 0.34\%$),但无显著性差异($P > 0.05$)。由此得出结论:转基因体细胞核移植胚胎不宜进行多代克隆,胞质内注射法构建核移植胚胎,用 32~64-细胞期的胚胎作为核供体构建的核移植胚胎的体外发育率高于用 16-细胞期的胚胎作为核供体构建的核移植胚胎的体外发育率。

关键词 山羊, t-PA, 转基因核移植胚胎, 继代克隆, 发育率

中图分类号 Q813.3 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1037-05

Abstract In order to research developmental competence of transgenic somatic cell by serial nuclear transplantation, goat cloned embryos were compared with re-cloned embryos in ability of *in vitro* development. Fetal fibroblasts including human finger-domain lacking t-PA gene was microinjected into cytoplasm of the MII oocytes. Goat embryos (G_0) were cloned by this procedure. A single blastomere from 16~64-cell goat cloned embryos (G_0) was microinjected into Intracytoplasm of the MII oocytes. Goat embryos (G_1) were cloned by this procedure. Goat embryos (G_2 , G_3) were re-cloned by using 16~64-cell re-cloned embryos. The developmental time of donor embryo affected the developmental rate of re-cloned embryos (G_1 , G_2). The results show: the cleavage rate of cloned embryos (G_0) ($76.45\% \pm 1.17\%$) was no difference significantly with re-cloned

Received: February 6, 2007; Accepted: March 13, 2007.

This work was supported by the grants from the National High Technology Research and Development Program (863, No. 2004AA213072) and Scientific Research Foundation for Doctor of North-west A&F University (No. 01140506).

* Corresponding author. E-mail: zhangy@public.xa.sn.cn

国家“863”高科技资助项目“体细胞克隆技术和哺乳动物卵母细胞高效冷冻技术”(No. 2004AA213072); 西北农林科技大学博士研究启动费 (No. 01140506)

embryos($G_1\ G_2\ G_3$)($72.18\% \pm 1.97\%$, $76.05\% \pm 2.38\%$, $75.99\% \pm 2.84\%$); the developmental rate of morulae and blastocysts of cloned embryos($47.20\% \pm 2.93\%$, $11.00\% \pm 1.42\%$) were higher than these of reclone embryos($34.99\% \pm 2.66\%$, $28.23\% \pm 2.00\%$, $23.34\% \pm 1.99\%$)($3.87\% \pm 0.67\%$, $2.08\% \pm 1.66\%$,0); the morulae rate($29.57\% \pm 1.53\%$, $24.43\% \pm 1.87\%$) and blastocysts rate($1.96\% \pm 1.31\%$, $2.01\% \pm 1.34\%$) of reclone embryos ($G_1\ G_2$) from 16-cell reclone embryos were lower than those($34.32\% \pm 1.31\%$, $29.76\% \pm 1.66\%$ and $3.86\% \pm 1.03\%$, $3.48\% \pm 0.34\%$) from 32 ~ 64-cell reclone embryos ($P > 0.05$). In conclusion , nuclear transfer embryos should not were reclone mostly ; and the embryos reclone by using 32 ~ 64-cell embryos achieved higher developmental ability compared with using 16-cell embryos .

Key words goat , t-PA ,transgenic cloned embryos , reclone ,developmental rate

在胚胎核移植方面 ,连续核移植具有两方面优点 ,一是有利于分化的细胞重新编程 ,二是可以扩增胚胎数量^[1] . 到目前为止连续核移植经历了 2 个重要的发展阶段 ,即胚胎细胞核移植阶段和体细胞核移植阶段 . 连续核移植技术已用于牛^[2]、羊^[3,4]等家畜的克隆 ,大大增加了胚胎的数量 . 胚胎最高已连续克隆到第 10 代 ,并获得了第 3 代犊牛和第 5 代克隆山羊^[4,5] ,1 枚牛的胚胎连续克隆已获得 190 枚胚胎 . 中国在山羊的胚胎核移植方面处于国际领先水平 ,胚胎可连续克隆到第 5 代 ,并获得后代 ,1 枚胚胎经 5 次连续克隆最多可获得 298 枚胚胎 . 在体细胞克隆方面 ,应用连续核移植技术已获得了体细胞克隆小鼠^[6-8] . 但体细胞核移植的成功率极低 ,许多问题有待解决 . Campbell 和 Wilmut^[9]认为 ,连续核移植使供核多次暴露在卵胞质环境中 ,有利于核的重新编程 ,从而提高重构胚的发育率 . 但连续核移植技术对哺乳动物体细胞核全能性的保持与恢复是否有相似的作用 ,还有待于进一步的研究 . 本文通过转入 t-PA 指形区缺失基因的山羊胎儿成纤维细胞为核供体构建转基因体细胞核移植胚 ,并进行了体细胞核移植的继代核移植研究 ,旨在探索转基因体细胞核经连续核移植后的发育潜力 ,并期望通过继代核移植提高转基因胚胎的生产效率 .

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

显微操作仪 (Nikon) , 倒置相差显微镜 (Oltympus) ,CO₂ 培养箱 (Forma) , 细胞松弛素 B (CB) , 离子霉素 (Ionomycin) , 6-二甲氨基嘌呤 (6-DMAP) , 聚乙烯醇 (PVA) , 透明质酸酶 , 链霉蛋白酶 , 胰蛋白酶等均为 Sigma 公司产品 . 胎牛血清 FBS (Hyclone) . 卵母细胞成熟液 OM 液配制 , 胚胎培养液 SOFaa 培养液成分、颗粒细胞单层培养和牛卵泡液的制备见文献^[10] . 细胞用培养液 :DMEM/F12 +

10%(V/V) FBS + 10ng/mL E2 + 1%(V/V) ITS + 10ng/mL EGF.

1.2 山羊卵巢

山羊卵巢采集于陕西省西安市某屠宰场 . 将卵巢置于 20℃ ~ 30℃ 含 0.32mg/mL 硫酸庆大霉素的生理盐水的保温瓶内 ,6h 左右运回实验室 .

1.3 山羊卵母细胞的回收及体外成熟培养

用切割法采集山羊卵巢卵母细胞 . 将采集的卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complexes , COCs) 在 38.5℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 20h ~ 22h ,用透明质酸酶处理除去 COCs 的卵丘细胞 ,在体视显微镜下检出具有第一极体的卵母细胞 ,备用 .

1.4 山羊卵母细胞的去核

将体外培养 20h ~ 22h 成熟的并去掉卵丘细胞的山羊卵母细胞置于含 7.5μg/mL 细胞松弛素 B (CB) 的显微操作液微滴中 . 每个液滴移入 30 枚左右山羊成熟卵母细胞 ,置于 Nikon 显微操作仪上进行去核显微操作 . 固定卵母细胞时 ,把极体摆放在相当于时钟 4 ~ 5 点左右的位置进行去核 ,去核针从 3 点钟位置进入 ,注射针下压接近极体时 ,吸取极体及周围的部分胞质 ,吸取的胞质最好不要超过三分之一 .

1.5 供体细胞的获得

用于构建原代核移植胚胎的供体细胞 转入 t-PA 指形区缺失基因的山羊胎儿成纤维细胞的转染、鉴定及培养见参考文献^[11] . 待转染的细胞长满皿底的 80%时 ,用血清饥饿法处理 2d 后 ,1000r/min 离心 5min 中 ,吸取上清液 ,加入 10% PVA 液 ,用吸管吹打混匀 ,制成构建原代核移植胚胎的细胞悬液 ,备用 .

将转入 t-PA 指形区缺失基因的山羊胎儿成纤维细胞注入到 M II 期的卵母细胞质中发育的胚胎为原代核移植胚 (G₀) ,用 G₀ 发育来的 16 ~ 64-细胞期胚胎作供体 ,M II 期卵母细胞为受体发育来的胚胎

为 G₁ 代 ;用 G₁ 发育来的 16 ~ 64-细胞期胚胎作供体 ,M II 期卵母细胞为受体发育来的胚胎为 G₂ 代 ;依次类推 ,直克隆到 G₃ 胚胎出来。将 G₀、G₁、G₂ 发育来的 16 ~ 64-细胞期胚胎放入含 0.25% 链霉蛋白酶的无钙、镁-PBS(PBS-)溶液内处理去除透明带 ,再在 PBS-内用细管吹打分散成单个卵裂球。1000 r/min离心 5min 中 ,吸取上清液 ,加入 50μL 的 10% PVA 液 ,用吸管吹打混匀 ,制成构建继代核移植胚胎的细胞悬液 ,备用。

1.6 核移胚构建

将去核的卵母细胞按 15 ~ 20 枚/批置于含 7.5 μg/mL CB 的显微操作液微滴中 ,然后吸取 20μL ~ 30μL 供体细胞悬液(10% PVA)在其后面制作成供体单细胞操作液滴 ,用石蜡油覆盖 ,置显微操作仪(Nikon)下注核。采用胞质内注射法构建核移植胚胎^[11]。

1.7 核移植胚胎的激活及体外培养

用离子霉素(Ionomycin)联合 6-DMAP 激活核移

植胚胎^[10,11]。

核移植胚胎激活处理后 ,采用 SOFaa 培养液进行培养 ,胚胎培养都采用与颗粒细胞共培养法 ,先用胚胎培养液清洗胚胎 3 次 ,然后移入含 SOFaa 液的颗粒细胞单层上培养 ,培养皿上覆盖矿物油 ,置 CO₂ 培养箱中 ,5% CO₂、38.5℃和饱和湿度下培养。在培养的第 3 天加入 10% 的 BFF。培养 2d 后观察卵裂率 ,培养 5d ~ 9d 时 ,观察记录发育到桑囊胚阶段的胚胎数 ,评定早期胚胎发育能力。所有实验都重复 3 ~ 5 次 ,实验数据用卡方 χ^2 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 G₀ ~ G₃ 代胚胎的体外发育情况

比较了原代核移植胚胎及其继代核移植胚胎的体外发育结果 ,原代核移植胚胎(G₀)及其继代核移植胚胎(G₁ ,G₂ ,G₃)的体外发育结果见表 1。

表 1 G₀ ~ G₃ 代胚胎的体外发育结果

Table 1 The result of G₀ ~ G₃ generation embryos in vitro development

Generation	No. of oocytes	Cleavage rate/%	Morulae rate/%	Blastocyst rate/%
G ₀	203	76.45 ± 1.17	47.20 ± 2.93 ^a	11.00 ± 1.42 ^a
G ₁	211	72.18 ± 1.97	34.99 ± 2.66 ^b	3.87 ± 0.67 ^b
G ₂	196	76.05 ± 2.38	28.23 ± 2.00 ^{bc}	2.08 ± 1.66 ^b
G ₃	232	75.99 ± 2.84	23.34 ± 1.99 ^c	0

a ,b :P < 0.05 ; a ,bc :P < 0.01 ; a ,c :P < 0.01 ; b ,bc :P > 0.05 ; bc ,c :P < 0.05.

由表 1 可见 ,原代核移植胚胎的卵裂率与继代核移植胚胎的卵裂率无显著差异。但原代核移植胚胎的桑葚胚率、囊胚率显著高于 G₁、G₂、G₃ 代核移植胚胎的发育结果。而且 ,随着核移植胚胎代数的上升 ,对核移胚的卵裂率影响不大 ,但核移植早期胚胎的发育率随着代数的上升而下降。

2.2 供体胚胎细胞的发育阶段对继代核移胚体外发育的影响

在 G₁、G₂ 代核移植试验过程中 ,分别用 16-细胞期胚胎的内细胞和 32 ~ 64-细胞期胚胎的内细胞为核供体 ,比较了供体胚胎细胞的发育阶段对继代核移植胚胎体外发育的影响 ,结果见表 2。

表 2 供体细胞的发育阶段对继代核移植胚胎体外发育的影响

Table 2 The effect of developing time of donor embryos on recloned embryo in vitro development

Generation	No. of oocytes	No. of embryo	Cleavage rate/%	Morulae rate/%	Blastocyst rate/%
G ₁	128	16	76.68 ± 1.51	29.57 ± 1.53	1.96 ± 1.31
G ₁	136	32 ~ 64	75.12 ± 1.85	34.32 ± 1.31	3.86 ± 1.03
G ₂	133	16	77.42 ± 0.56	24.43 ± 1.87	2.01 ± 1.34
G ₂	118	32 ~ 64	73.74 ± 1.24	29.76 ± 1.66	3.48 ± 0.34

由表 2 可见 ,在 G₁、G₂ 代中 ,当用 16-和 32 ~ 64-细胞期核移植胚胎作为核供体时 ,其卵裂率差异不显著。用 16-细胞期核移植胚胎作为核供体时的桑葚胚率、囊胚率低于用 32 ~ 64-细胞时期的核移植胚胎的桑葚胚率、囊胚率 ,但差异不显著。

3 讨论

3.1 供体细胞类型及其所处的细胞周期对核移植胚胎体外发育的影响

本实验用于原代核移植的供体细胞为体细胞 ,对体细胞进行了同期化处理 ,使供体细胞停留在

G_0/G_1 期 G_0/G_1 期核在受体胞质中 DNA 的变化与正常受精卵相似,因而 MPF 对染色体形态的有害影响较小,核移植胚胎具有较高的发育潜力^[4]。然而关于细胞周期的作用现仍旧争议较大。最初,Dolly 的主要研究者 Wilmut 和 Campbell 等认为血清饥饿诱导细胞进入 G_0 期是他们获得成功的不可缺少的环节。之后,随着人们相继利用其他的方案获得 G_1 、 G_2/M 期细胞的克隆后代,Campbell 表示,他从来就没说过处于其他细胞周期阶段的细胞就不能得到克隆后代,而只是说 G_0 期有利于得到克隆动物^[12]。尽管有 G_1 、 G_2/M 期细胞的克隆后代,但人们一致认为 G_0 期有利于得到克隆动物,本实验用于继代核移植的供体细胞为早期卵裂球,未进行同期化处理,可能处于周期的任一时期(G_1 、S、 G_2/M),继代核移植胚胎的体外发育能力低于原代核移植胚胎可能与上述原因有关。再者,继代核移植胚胎的供核体本身来自于转基因体细胞核移植胚胎,其发育能力相对低下是导致继代核移植胚胎的体外发育能力低的另一原因吧。

3.2 供体胚胎细胞的发育阶段、分化程度对核移植胚胎体外发育的影响

李雪峰等报道^[13],以体外发育来的 8~32-细胞期的原代核移植胚胎作为供体,用原代核移植相同的方法进行牛胚胎的继代核移植。继代核移植胚胎的卵裂率与原代核移植胚胎相似(76.0%与76.2%),但继代核移植胚胎体外发育到桑椹胚和囊胚的比率却显著低于原代核移植胚胎(7.6%与28.0%, $P < 0.001$)。章志国^[14]以山羊-兔异种克隆桑椹胚卵裂球为核供体,兔卵母细胞为受体进行连续核移植研究,获得继 I 代重构胚 58 枚,继 II 代重构胚 14 枚,卵裂率分别为 75.9%和 28.6%,差异显著($P < 0.05$)。继 I 代重构胚囊胚率达到 10.2%,继 II 代重构胚最终未能发育至囊胚。以上报道与本实验的结果一致,本研究原代核移植胚胎的体外发育率高于继代核移植胚胎的体外发育率,随着克隆代数的提高,其核移植胚胎体外发育到桑椹胚和囊胚的比率在逐渐下降。邹贤刚^[4]在山羊的继代核移植试验中,核供体用 8~32-细胞或早期囊胚,随着代数的上升其分裂率、发育率无明显差异。本研究的结果与邹贤刚报道的结果不一致,产生不一致的原因可能是本实验所用于继代核移植的供体胚胎为转基因体细胞核移植胚胎而不是发育潜力好的正常胚胎。因此,根据本实验的结果显示,在用体细胞的核移植

作为继代核移植胚胎的核供体时,不宜进行多代核移植研究。

供体细胞的分化程度也是影响核移植效果的重要因素之一。分化程度越低的细胞越容易发生发育程序重编,它们构建的重组胚胎的发育潜力越大。根据理论,用 16-细胞核移植胚胎为核供体时,核移植胚胎的发育潜力应该高于用 32~64-细胞期核移植胚胎的发育潜力。但本实验用 16-细胞期核移植胚胎为核供体时,核移植胚胎的发育体外率较低,实验结果与理论不一致。其实不难理解,胚胎发育到 32~64-细胞时,已经克服了山羊胚胎的体外发育阻滞期(16-细胞期),与 16-细胞期的胚胎相比,它们已是发育比较好的胚胎,由发育能力强的胚胎内细胞团构成的继代核移植胚胎发育率自然就高。另一方面,本实验采用的是胞质内注射法构建核移植胚胎,供体细胞大小不同,要求的注射针管径粗细不同,对卵母细胞的损伤程度也不同。注射针管本身会造成细胞膜和细胞骨架等细胞器的损伤。16-细胞比较大,要求的显微注射针的管径比较粗,针越粗,对卵母细胞的伤害越大。有人比较了显微注射针的管径的粗细对显微受精胚胎发育率的影响。对人卵的胞质内注射,要求以 $5\mu\text{m} \sim 7\mu\text{m}$ 为宜(Payne,1995)^[15];在兔,有使用 $5\mu\text{m}$ 针管的报道^[16],李子义^[17]用外径 $7\mu\text{m}$ 针尖注射卵的存活率、受精率和卵裂率显著高于用外径 $9\mu\text{m}$ 注射针。本实验中,16 细胞比 32~64-细胞大,要求的显微注射针的管径比较粗,因此对卵母细胞的细胞质及细胞骨架损伤大,必然影响胚胎的后期发育。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Li JS(李劲松),Chen DY(陈大元),Han ZM(韩之明), et al. Effect of serial nuclear transplantation on inter-species nuclear transplantation Panda embryos *in vitro* development. *Chinese Science Bulletin(科学通报)* 2001, **46**(22):1899-1901.
- [2] Takano H, Kozai C, Shimizu S, et al. Cloning of bovine embryo by multiple nuclear transfer. *Theriogenology*, 1997, **47**:1365-1373.
- [3] Zhang Y, Li YQ. Nuclear-cytoplasmic interaction and developmental goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. *Biology of Reproduction*, 1998, **58**:266-269.
- [4] Zou XG(邹贤刚),Li GS(李光三),Wang YG(王玉阁), et al. The study of development potential on goat (*Capra hircus*) embryo by serial nuclear transfer. *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 1995, **40**(3):264-267.
- [5] Peura TT, Trounson AO. Recycling bovine embryos for nuclear transfer. *Reproduction Fertility and Development*, 1998, **10**(7-8):

- [6] Wilmut I, Paterson L. Somatic cell nuclear transfer. *Oncology Research*, 2003, **13**(10): 303 – 307.
- [7] Ono Y, Shimozaawa N, Ito M, *et al.* Cloned mice from fetal fibroblasts cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 2001, **64**(1): 44 – 50.
- [8] Sato K, Hosaka K, Ohkawa M, *et al.* Cloned transgenic mouse fetuses from embryonic stem cells. *Human Cell*, 2001, **14**(4): 301 – 304.
- [9] Campbell KHS, Wilmut I. Recent advances *in vitro* culture and cloning of ungulate embryos. In: the 5th World Congress on Genetics as Applied to Livestock, 1994, **20**: 180 – 187.
- [10] Zhao XF(赵晓娥), Lu J(鲁进), Liu FJ(刘凤军), *et al.* Goat oocytes fertilization by intracytoplasmic sperm injection and *In vitro* embryo culture. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2005, **13**(4): 507 – 511.
- [11] Zhao XF(赵晓娥), An ZX(安志兴), Ma BH(马保华), *et al.* Study of transfer t-PA gene to the goat fetal fibroblasts and nuclear transfer. *Journal of Northwest A & F University* (Nat. Sci. Ed.) (西北农林科技大学学报), 2007, **35**(1): 1 – 5.
- [12] Pan DK(潘登科), Zhang YH(张运海), Sun XZ(孙秀柱), *et al.* Effects of donor cells on *in vitro* development of porcine cloned embryos. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*(畜牧兽医学报), 2006, **37**(4): 331 – 336.
- [13] Li XF(李雪峰), Tan SJ(谭世俭), Shi DS(石德顺). A preliminary comparison between bovine cloned and re-cloned embryos. *Chinese Journal of Veterinary Science*(中国兽医学报), 2000, **20**: 77 – 79.
- [14] Zhang ZC(章志国), Zhang XR(章孝荣), Liu Y(刘亚), *et al.* Study of serial nuclear transfer on goat (bore)-rabbit inter-species cloned embryo. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2005, **38**(3): 601 – 605.
- [15] Payne D. Intracytoplasmic sperm injection: instrumentation and injection technique. *Reprod Fertil Dev*, 1995, **7**: 185 – 196.
- [16] Luo J(罗军), Fan BQ(范必勤). Study on microfertilization of rabbit ova. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*(江苏农业学报), 1993, **9**(2): 1 – 5.
- [17] Li ZY(李子义), Zhou Q(周琪), Zou XH(邹啸环), *et al.* Affecting factors of microfertilization and ultrastructure of microfertilized embryos in rabbits. *Chinese Journal of Veterinary Science*(中国兽医学报), 1997, **17**: 563 – 599.