

兔体细胞核移植的初步研究*

侯健 安晓荣 苟克勉 关宏 柏家林 李瑞国 崔秀宏 陈永福**

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

摘要: 实验以胎儿成纤维细胞为核供体,对兔体细胞核移植技术的融合、激活和发育等环节进行了初步研究。实验通过比较不同电场强度对兔 2 细胞胚胎卵裂球融合以及卵母细胞激活的影响,证实 200 和 260 V/mm 的电场强度可有效地诱导 2 细胞胚胎的融合和兔卵母细胞的孤雌激活。然后将 200 和 260 V/mm 电场强度用于体细胞核移植,融合率分别为 44.4% 和 48.4%,卵裂率分别为 58.8% 和 53.8%,桑椹胚/囊胚发育率分别为 5.9% 和 5.5%。但 112 枚核移植胚胎移植到 5 只受体后没有幼子出生。结果表明,实验中所建立的程序至少可以支持兔体细胞克隆胚胎的早期发育。

关键词: 兔;胎儿成纤维细胞;核移植;孤雌激活

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2002)06-25-04

Preliminary Study of Rabbit Somatic Cell Nuclear Transfer

HOU Jian AN Xiao-Rong GOU Ke-Mian GUAN Hong BAI Jia-Lin

LI Rui-Guo CUI Xiu-Hong CHEN Yong-Fu

(National Key Laboratory for Agrobiotechnologies, China Agricultural University Beijing 100094, China)

Abstract: The experiments described in this paper aimed to establish a basic protocol for somatic cell nuclear transfer in the rabbit. By testing the effects of different electric pulses (EP) on fusion of rabbit 2-cell embryo blastomeres and activation of rabbit oocytes, it was found that 200 and 260 V/mm EP were effective. When employed in nuclear transfer using rabbit fetal fibroblast cells as donors, 200 and 260 V/mm EP resulted in 44.4% and 48.4% fusion, 58.8% and 53.8% cleavage, 5.9% and 5.5% morulae/blastocysts, respectively. However, the transfer of 112 reconstructed rabbit embryos to 5 recipient rabbits did not result in a single successful pregnancy. The results indicate that the protocol established in this study can support the early development of cloned embryos from rabbit fetal fibroblast cells.

Key words: Rabbit; Fetal fibroblast cell; Nuclear transfer; Parthenogenetic activation

体细胞克隆技术已经在绵羊^[1]、牛^[2,3]、山羊^[4]、猪^[5,6]、小鼠^[7]和猫^[8]等多种动物上取得成功。但兔的体细胞克隆困难较大^[9,10],直到最近才有兔体细胞克隆成功的报道^[11]。兔是小型家畜,同时也是一种重要的模型动物,因此兔体细胞克隆研究有着重要的意义。本文以兔胎儿成纤维细胞为核供体,对兔体细胞核移植技术进行了初步研究。

供体细胞与受体卵母细胞的融合以及卵母细胞的激活是体细胞核移植技术中的关键步

* 国家“863”计划资助项目(No. Z21-01-01);

** 通讯作者, E-mail: xra@mail.cau.edu.cn;

第一作者介绍 侯健,男,29岁,讲师,博士;研究方向:动物生物技术; E-mail: houjian@hotmail.com。

收稿日期:2002-01-25,修回日期:2002-09-20

骤。使用直流电脉冲诱导融合并激活卵母细胞是目前最常用的方法,但在不同实验条件下,所用电脉冲的最佳电场强度可能不同,因此本实验着重对核移植技术程序中的融合和激活步骤进行了探索。诱导兔 2 细胞卵裂球融合的电脉冲参数与核移植中所用参数接近,因此本实验首先通过对兔 2 细胞胚胎卵裂球的融合实验找出一个合适的电场强度范围,并检验了用这个电场强度来激活兔卵母细胞的效果,然后将合适的电场强度用于兔体细胞核移植实验,检测它们对重构胚胎融合、激活及发育的影响,为兔体细胞克隆的进一步研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与培养皿 实验试剂除特殊表明外均为 Sigma 公司产品;培养皿为 Nunc 或 Corning 公司产品。

1.2 供体细胞的采集、培养与核型分析 取 17 日龄加利福尼亚兔胎儿成纤维细胞作为核供体细胞,培养及核型分析方法参见文献^[12]。培养 5 ~ 15 代细胞作为核供体,细胞在含有 0.5% 胎牛血清(FCS)的培养液 DMEM 中饥饿培养 2 ~ 7 d 后用于核移植。

1.3 兔 2 细胞胚胎的采集 对性成熟新西兰母兔连续 3 d 6 次颈部皮下注射总量 0.9 mg FSH(中国科学院动物研究所),耳缘静脉注射 100 U HCG(南京动物激素厂)诱发排卵,自然配种。HCG 后 24 ~ 26 h 手术采集 2 细胞胚胎。

1.4 兔 2 细胞胚胎的融合 将欲融合的 2 细胞胚胎放入融合液(含有 0.3 mol/L 甘露醇,0.1 mmol/L $MgSO_4$, 0.05 mmol/L $CaCl_2$, 0.5 mmol/L HEPES, 0.05% BSA)中平衡 5 min,然后将单个胚胎放置于融合槽(融合仪为 ECM2001)的两个电极之间(电极距离 1 mm),用吸卵管调整胚胎,使其两个卵裂球接触面与电极平行,施以 40 μs 、2 个脉冲、一定电场强度(160 ~ 280 V/mm)的直流电压诱导融合。操作完的胚胎放入操作液 H199(含 20 mmol/L HEPES 的 TCM199)中。15 min 后观察是否融合,未融合的再重复一次。融合的胚胎转移到培养微滴中培养。

1.5 兔卵母细胞的准备 超排处理的母兔在注射 HCG 14 h 后处死,从输卵管内冲出卵母细胞。将收集到的卵母细胞在 0.2% 透明质酸酶溶液中吹打除去卵丘细胞,置 H199 溶液中备用。

1.6 兔卵母细胞的孤雌激活 在 HCG 后 18 ~ 20 h,用不同方法对卵母细胞进行孤雌激活。

1.6.1 电激活法 将欲激活的卵母细胞在融合液中平衡 5 min 后,放入融合槽内,施以 40 μs 、2 个脉冲、一定电场强度(200 V/mm 或 260 V/mm)的直流电激活卵子。

1.6.2 化学激活法 将卵母细胞放入含有化学激活剂(10 $\mu mol/L$ A23187 或 5 $\mu mol/L$ ionomycin)的 H199 中静置 5 min,然后放入 2 ml H199 中充分洗涤卵子,终止激活。

激活操作后的卵子在含有 2 mmol/L 6-DMAP 的 TCM199 中培养 4 h,然后转移到培养小滴中继续培养。

1.7 核移植 参照安晓荣等的方法进行去核和细胞注射^[13],参照步骤 1.4 进行电融合同时激活。融合/激活后的重构胚胎在含有 2 mmol/L 6-DMAP 的 TCM199 中培养 4 h,然后转移到 TCM199 培养液中继续培养。

1.8 胚胎体外培养及移植 胚胎在培养液 TCM199 + 10% FCS(Hyclone)中培养 9 d,培养条件为 38.5 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 。分别在培养后 24 h 和第九 d 统计胚胎卵裂率和发育率。或者,将激活的重构胚或 2 ~ 4 细胞胚胎经手术移入受体兔两侧输卵管内,观察受孕情况。

1.9 统计分析 对所得数据(融合率、分裂率以及发育率)进行卡方(χ^2)独立性检验,当 $P < 0.05$ 时,记为差异显著。

2 结果

2.1 细胞培养及染色体核型 实验共分离培养了 3 个兔胎儿的成纤维细胞,经性别鉴定,有 2 个胎儿为雄性,一个为雌性^[12]。细胞在培养 15 代后仍增殖旺盛,汇合后呈火焰放射状生长,具有明显的方向性,是典型的成纤维细胞形态。而且,3 个胎儿成纤维细胞系在培养过程

中染色体倍性维持正常(数据未列),选其中一个雄性胎儿细胞系用于核移植。

2.2 兔 2 细胞胚胎的融合 从表 1 中可知,适宜的融合电场强度在 200 ~ 260 V/mm 之间,融合率在 76.0% ~ 95.0% (各组间差异不显著, $P > 0.05$),而且融合后的囊胚率(61.9% ~ 75.0%)与对照组(81.6%)差异不显著($P > 0.05$)。太低(160 V/mm)或太高(280 V/mm)的电场强度均使融合率显著下降(分别为 33.3% 和 50.0%)。

表 1 不同电场强度对 2 细胞胚胎融合及发育的影响

电场强度 (V/mm)	2 细胞 胚胎数	融合数 (%)	裂解数	囊胚数(%)
160	18	6 (33.3) ^a	0	4 (66.7) ^a
200	14	12 (85.7) ^b	0	9 (75.0) ^a
220	20	19 (95.0) ^b	0	11 (73.3) ^a
240	25	19 (76.0) ^b	1	14 (73.7) ^a
260	25	21 (77.8) ^b	2	13 (61.9) ^a
280	14	7 (50.0) ^a	4	2 (28.6) ^b
对照	38	-	-	31(81.6) ^a

囊胚率以融合胚胎数为基数。同一列中相同字母标记为差异不显著;实验重复 2 次

2.3 兔卵母细胞的孤雌激活 从表 2 知,电激活处理组和 Ca^{2+} 载体 A23187 处理组均获得了较高的分裂率(90%、95.1% 和 89.2%, $P > 0.05$),显著高于 ionomycin 激活法(58.6%) (P

< 0.05)。而且,电激活处理组的囊胚率(26.6% 和 31.7%)明显高于 ionomycin 处理组(6.9%) ($P < 0.05$),但统计分析显示,电激活处理组的囊胚率与 A23187 处理组的囊胚率(14.2%)没有差异($P > 0.05$)。200 V/mm 和 260 V/mm 两种电场强度处理在分裂率和囊胚率上没有差别,但二者的囊胚率均显著低于原核期体内受精卵(78.6%, $P < 0.05$)。

表 2 不同激活方法对兔卵母细胞的激活作用

激活方法	卵母细胞数	卵裂数(%)	囊胚数(%)
200 V/mm 电场强度	30	27(90.0) ^a	8(26.6) ^a
260 V/mm 电场强度	41	39(95.1) ^a	13(31.7) ^a
ionomycin	29	16(58.6) ^b	2(6.9) ^b
A23187	28	25(89.2) ^a	4(14.2) ^{ab}
DMAP	15	2(13.3) ^c	0 ^b
原核期体内受精卵	28	28(100) ^a	22(78.6) ^c

囊胚率以卵母细胞总数为基数;实验重复 3 次;不同字母标记示差异显著, $P < 0.05$

2.4 兔胎儿成纤维细胞核移植实验 从表 3 可知,200 V/mm 和 260 V/mm 两种电场强度的融合率(44.4% vs 48.4%)、分裂率(58.8% vs 53.3%)以及发育率均没有差别($P > 0.05$)。虽然 260 V/mm 电场强度融合胚有 2.2% 发育到囊胚,而 200 V/mm 电场强度融合胚则无一发育到囊胚阶段,但二者差异不显著($P > 0.05$)。

表 3 兔胎儿成纤维细胞核移植胚胎的体外发育

电场强度	去核卵/体细胞总数	融合数(%)	卵裂数(%)	8 细胞数(%)	桑椹胚(%)	囊胚(%)
200	117	51(44.4) ^a	30(58.8) ^a	6(11.8) ^a	3(5.9) ^a	0 ^a
260	188	91(48.4) ^a	49(53.8) ^a	14(15.4) ^a	3(3.3) ^a	2(2.2) ^a

发育率以融合胚胎总数为基数;实验重复 7 次;相同字母标记示差异不显著, $P > 0.05$

2.5 胚胎移植结果 112 枚原核期或 2 ~ 4 细胞期胚胎移植到 5 只受体后,没有幼仔出生。

3 讨论

融合、激活以及培养等程序的建立是体细胞核移植技术的基本环节。融合/激活的电场参数在不同实验报道中不尽相同。在本实验条件下,诱导兔 2 细胞胚胎卵裂球融合的最佳电场强度在 200 ~ 260 V/mm 之间(表 1),核移植中

所用的参数也应该在这一范围内。因此参照这一数值,在体细胞核移植中使用了 200 和 260 V/mm 的电场强度用于电融合,二者融合率差异不明显(44.4% vs 48.3%, $P > 0.05$)(表 3),这和其他研究者所使用的电场强度范围大致接近^[9,10,14]。但总的融合率仍然偏低,这可能是由于个别实验批次中体细胞的生理状态较差造成的,而电场强度大小在一定范围内似乎并非主要影响因素。使用 200 和 260 V/mm 的电场强

度还可以有效的激活兔卵母细胞。两个电场强度处理组均获得较高的分裂率(90.0% vs 95.1%)和囊胚率(26.6% vs 31.7%, $P > 0.05$) (表2)。Ca²⁺载体 A23187 处理组与电刺激处理组效果相近($P > 0.05$)。而 ionomycin 对激活兔卵母细胞效果不佳($P < 0.05$) (表2), 其他研究者也报道过类似的结果^[14]。不过需要指出的是, 本实验使用 ionomycin 激活的程序是参照在牛和绵羊上的方法, 而有研究表明, 用 ionomycin 激活猪卵母细胞时, 所需的 ionomycin 浓度和刺激时间与牛羊不同^[15], 因此用 ionomycin 来激活兔卵母细胞是否也需要调整激活时间和使用浓度, 还需实验进一步证实。总之, 激活实验的结果表明, 在核移植中, 当施以 200 或 260 V/mm 的电场强度用于电融合时, 重构胚胎也随之被激活, 而不需要再施以额外的刺激。此外, 虽然蛋白激酶抑制剂 6-DMAP 本身不能激活卵母细胞, 但它可以显著地提高激活后卵母细胞的分裂率和发育率, 若激活后的卵母细胞不在 6-DMAP 中短暂培养, 会使卵母细胞的分裂率和发育率降低一倍(未发表资料), 因此使用 6-DMAP 进行激活后的培养无疑是有益的。

融合/激活的重构胚胎有 50% 可以卵裂, 并有少部分发育到桑椹胚/囊胚阶段(表3, 图1)。虽然与 260 V/mm 处理组相比, 200 V/mm 处理组没有胚胎发育到囊胚, 但这可能和实验规模有关。为了尽量减少体外不利环境对胚胎发育的影响, 将 112 枚发育早期的重构胚胎移植到受体, 但未见幼子出生。其他研究者在兔体细胞核移植研究中也未能使克隆胚胎建立妊娠^[9], 或发育到期^[10], 原因尚不清楚。Chesne 等研究表明, 由于克隆胚胎发育迟缓, 所以推迟受体母兔的发情诱导时间会使受体母兔的生理状态更好地适应克隆胚胎的发育, 从而显著地提高了克隆胚胎的着床率和全程发育率^[11], 因此, 这可能是今后研究值得尝试的办法之一。总之, 本实验建立的融合及激活程序可以支持兔胎儿成纤维细胞重构胚胎至少可以在体外发育到囊胚, 但体外发育率及全程发育率仍有待于进一步研究提高。

参 考 文 献

- [1] Willmut I, Schnieke A E, McWhir J *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**: 810 ~ 813.
- [2] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, **289**: 1 256 ~ 1 258.
- [3] Kato Y, Tani T, Tsunoda Y *et al.* Eight calves cloned from somatic cells of single adult. *Science*, 1998, **282**: 2 095 ~ 2 098.
- [4] Baquiss A, Behboodi E, Melican D T *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 456 ~ 461.
- [5] Polejaeva J, Chen S H, Vaught T D *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, **407**: 505 ~ 509.
- [6] Onishi A, Iwamoto M, Akita T *et al.* Pig cloned by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, **289**: 1 188 ~ 1 190.
- [7] Wakayama T, Perry A C F, Yanagimachi R *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **384**: 370 ~ 374.
- [8] Shin T, Kraemer D, Pryor J *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, **415**: 859.
- [9] Dinnyes A, Dai Y, Yang X *et al.* Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: effect of activation treatment and donor cell preparation. *Biol Reprod*, 2001, **64**: 257 ~ 263.
- [10] Yin X J, Tian T, Kato Y *et al.* Development of rabbit parthenogenetic oocytes and nuclear transfer oocytes receiving cultured cumulus cells. *Theriogenology*, 2000, **54**: 1 460 ~ 1 476.
- [11] Chesne P, Adenot P, Viglietta C *et al.* Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology*, 2002, **20**: 366 ~ 369.
- [12] 侯健, 安晓荣, 苟克勉等. Sry-PCR 法快速鉴定体外培养兔胎儿成纤维细胞系的性别. 农业生物技术学报, 2001, **9**(2): 191 ~ 193.
- [13] 安晓荣, 苟克勉, 陈永福. 体细胞克隆法生产绵羊转基因囊胚. 科学通报, 2001, **46**(10): 820 ~ 823.
- [14] Mitalipov S M, White K L, Farrar J *et al.* Development of nuclear transfer and parthenogenetic rabbit embryos activated with inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Biol Reprod*, 1999, **60**: 821 ~ 827.
- [15] Bethausen J, Forsberg E, Augenstein M *et al.* Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 1 055 ~ 1 059.