

猪手工体细胞核移植电融合/激活参数的优化

任子利^{1,2}, 赵彦玲^{1,2}, 杨小淦¹, 陆阳清¹, 卢晟盛^{1*}, 卢克焕^{1*}

(1. 广西大学动物科学技术学院 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530004;

2. 西藏农牧学院动物科学技术学院, 林芝 860000)

摘要: 通过对猪体细胞核移植中电融合及联合化学激活对猪重构胚发育能力进行探讨, 为广西巴马小型猪的手工克隆搭建平台。利用手工克隆(HMC)技术对猪体细胞核移植胚胎采用不同的电融合方法和融合后化学激活不同时间, 研究猪手工克隆胚胎的发育能力。结果表明:(1) 对重构胚进行一步法电融合时, 参数 2(180 V·mm⁻¹, 30 μs×1 次)与参数 1(160·mm⁻¹, 30 μs×1 次)两组间的融合率差异显著(65.31% vs 58.33%, $P<0.05$);(2) 对重构胚进行两步法融合时, 参数 3(第一次:180 V·mm⁻¹, 10 μs×1 次, 融合 60 min 后进行第二次融合;第二次:85 V·mm⁻¹, 80 μs×1 次)和参数 4(第一次:200 V·mm⁻¹, 10 μs×1 次, 融合 60 min 后进行第二次融合;第二次:85 V·mm⁻¹, 80 μs×1 次)两组间的总融合率差异不显著(75.88% vs 81.20%, $P>0.05$);(3) 采用参数 4 与采用参数 2 融合的重构胚其分裂率和囊胚率均差异不显著((79.98% vs 72.66%) 和 (13.14% vs 9.36%), $P>0.05$);(4) 在电激活和 CHX+CB 联合激活 4、5、6 h 这 3 组中, 其分裂率和囊胚率均差异不显著($P>0.05$)。相对而言, 重构胚采用参数 4 的两步融合法和 CHX+CB 激活 5 h 效果较好。

关键词: 猪; 卵母细胞; 手工克隆; 体细胞核移植

中图分类号: S828.3; S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)10-1246-07

Optimization of Electrofusion and Artificial Activation Protocols of Porcine Handmade Somatic Cell Nuclear Transfer

REN Zi-li^{1,2}, ZHAO Yan-ling^{1,2}, YANG Xiao-gan¹, LU Yang-qing¹, LU Sheng-sheng^{1*}, LU Ke-huan^{1*}

(1. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-Resource Conservation and Utilization, Animal Science and Technology College, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Faculty of Animal Science and Technology, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China)

Abstract: The objective of this study was to explore the optimal conditions of electrofusion combined with artificial activation influencing the development of zona-free porcine cloned embryos, and to lay the foundation for Bama-mini pig somatic cell nuclear transfer embryo by handmade cloning (HMC). Cloning embryos were fused by one-step or two-step electrofusion and activated in CHX+CB for 4, 5 and 6 h, then cultured in WOWs for 7 d to observe the fusion and embryo development. The results were as follows:(1) The fusion rate of oocytes subjected to one-step electrofusion with parameter 2 (180 V·mm⁻¹, 30 μs×1) was higher than that with parameter 1 (160 V·mm⁻¹, 30 μs×1) (65.31% vs 58.33%, $P<0.05$). (2) There was no significant difference (75.88% vs 81.20%, $P>0.05$) in fusion rate between the groups of oocytes subjected to one-step electrofusion with parameter 3 (the first: 180 V·mm⁻¹, 10 μs×1; the second: 85 V·mm⁻¹, 80 μs×1 with an interval of 60 minutes) and parameter 4 (the first: 200 V·mm⁻¹, 10

收稿日期: 2009-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30860039); 农业部“转基因生物新品种培育重大专项”项目(2009ZX08010-023B); 广西科学研究与技术开发计划资助项目(桂科能 0815011-6-3)

作者简介: 任子利(1969-), 男, 河南卫辉人, 讲师, 博士, 主要从事胚胎生物技术研究, E-mail: zlrn0925@163.com

* 通讯作者: 卢克焕, E-mail: khlu@gxu.edu.cn; 卢晟盛, E-mail: sslu@gxu.edu.cn

$\mu\text{s}\times 1$; the second: $85\text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$, $80\ \mu\text{s}\times 1$ with an interval of 60 minutes). (3) There was no significant difference in cleavage and blastocyst rates of cloned embryos between the groups of oocytes subjected to electrofusion with the parameter 4 and parameter 2 ((79.98% vs 72.66%), (13.14% vs 9.36%), $P>0.05$). (4) There was no significant difference in the rate of cleavage and blastocyst development from oocytes, which were subjected to electrofusion, activated by CB+CHX for 4, 5 and 6 h ($P>0.05$). The results revealed that the procedure with parameter 4 of electrofusion activated by CB+CHX for 5 h was relatively suitable.

Key words: porcine; oocytes; handmade cloning; somatic cell nuclear transfer

体细胞核移植作为生命科学的研究热点,已在多种哺乳动物获得了令人瞩目的进展。在首例克隆动物绵羊“Dolly”诞生以来^[1],核移植的方法也得到不断的发展和完善,并已成功克隆出许多物种^[2],然而,这些克隆动物多为基于显微操作及其繁琐程序的传统核移植。手工克隆(handmade cloning, HMC)技术是避开显微操作及其繁琐程序的新的核移植技术,它的出现又掀起了核移植的新篇章。卵母细胞最外层透明带的去除使细胞融合不再借助于显微操作,并首先获得胚胎细胞克隆牛^[3]。Vajta等^[4]成功应用HMC方法获得了体细胞核移植牛(两步融合法),随后,其他物种也取得了新的进展, Du等^[5]和 Li等^[6]相继得到了手工克隆猪,2009年, Kragh等^[7]利用HMC法获得了阿尔茨海默病模型的7头转基因哥廷根小型猪,同年, Shah等^[8]等利用HMC法得到了水牛克隆胚胎,胚胎移植后最长的妊娠到201 d。与传统核移植方法相比, HMC技术在卵母细胞的去核、注核及供体与受体的融合上不使用显微操作仪,这不仅降低了成本,也简化了核移植程序。

克隆广西巴马小型猪为建立服务于人类异种器官移植的转基因体细胞克隆猪搭建了试验技术平台。自2004年以来,我们一直在进行广西巴马小型猪体细胞克隆技术体系的探索,并于2007年10月产下核移植雄性后代^[9]。利用HMC法克隆广西巴马小型猪,不仅可以降低成本,而且为保护这一地方良种提供新的方法。

影响核移植效率的因素很多,其中重构胚的融合和激活是关键的一步。为了将HMC法技术进一步简化、完善,以建立一套适合于猪去透明带卵母细胞体细胞核移植的技术程序,本研究以去核的猪卵母细胞为受体,颗粒细胞为供体,对HMC法核移植的电融合和化学激活参数进行了优化,为进一步研究广西巴马小型猪手工克隆胚胎的体外发育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 猪卵母细胞的采集和体外成熟

从南宁市屠宰场收集猪卵巢,置于 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右添加抗菌素的生理盐水中,4 h内运回实验室,除去卵巢上附着的输卵管等组织,用生理盐水冲洗干净。用带有18号针头的10 mL无菌注射器,抽取直径 $3\sim 6\text{ mm}$ 卵泡中的卵母细胞,1 h内抽完。将抽取液缓慢注入置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温锅的15 mL尖底离心管中,使卵母细胞自然沉降。沉降15 min左右可看到明显的界限,弃上清液,然后将沉淀用洗卵液稀释,在实体显微镜下迅速挑出胞质均匀的且有3层以上完整致密的卵丘细胞包裹的卵母细胞,用洗卵液洗涤2~3次,再用成熟培养液(TCM199+10%卵泡液+ $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 促卵泡素FSH+ $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 促黄体素LH+ $3.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-葡萄糖+ $0.91\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠+ $0.57\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 半胱氨酸+ $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 表皮生长因子+ $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素+ $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素)洗涤3次后进行成熟培养。液滴式培养,液滴大小为 $100\ \mu\text{L}$,每滴内培养20~30枚卵母细胞,培养条件为 $39\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 的空气,饱和湿度。培养22 h后换液,换成仍含同样成分和激素的成熟培养液继续培养20~22 h。

1.2 猪供体细胞(体细胞)的准备

颗粒细胞的准备:从屠宰场采集母猪卵巢后,放入含有 K^+ 、 Mg^{2+} 和抗生素(青、链霉素)的 $30\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生理盐水的保温瓶内,尽快运送回实验室。将卵巢用含青、链霉素抗生素(Sigma, $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸链霉素)的DPBS彻底清洗3遍,再用75%酒精快速清洗5遍,然后,用连接12号针头的10 mL一次性无菌注射器抽取 $3\sim 8\text{ mm}$ 卵泡,将抽取液放入15 mL离心管中,静置沉淀,备用。 $1\ 200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃去上清液,加入DPBS重悬沉淀,再次离心,弃去上清液,加入

DMEM 培养液重悬沉淀,离心洗涤细胞后,调整细胞密度,接种于 60 mm 的培养皿,再放入 CO₂ 培养箱,39 °C、5% CO₂ 和 100% 湿度待细胞生长至 80% 汇合进行传代培养或者冻存。

本试验所用的供体细胞为第三代颗粒细胞。在移核操作前 1 h,将用血清饥饿法(核移植前 3~5 d 将培养液中的 FBS 浓度降到 0.5%)处理的供体细胞用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化处理,离心洗涤,再用 2% 牛血清的操作液将细胞沉淀重新悬浮,室温存放备用。

1.3 卵母细胞透明带的部分消化和去核

将胞质均匀的成熟卵母细胞,放入链霉菌蛋白酶溶液(浓度 0.33%)中,当观察到卵母细胞变形时,迅速将其转移到含 20% 牛血清的洗卵液中洗 4 遍,然后放入含 20% 牛血清的洗卵液微滴中,用矿物油覆盖约 10 min,等到卵母细胞恢复圆形时,用口径比卵母细胞直径大一倍约 220~300 μm 的优质玻璃吸管轻轻转移透明带变薄的卵母细胞至切割液滴(2.5 μg·mL⁻¹ 细胞松弛素 B 的操作液)中,挑选那些胞质均匀,质膜完整的卵母细胞用于去核。

卵母细胞的去核是用随机切割法。在无菌培养皿盖中做 20 μL 大小的液滴,并覆盖预热的矿物油,每滴 6~9 个卵母细胞在体视显微镜下将卵母细胞随机切成两半,用 Hoechst33342 染色,UV 照射,挑出无核半卵备用。

1.4 供/受体细胞的融合/激活

具体融合方法参照 Vajta 等^[10-11] 的融合方法,略有改进。

无核半卵体在含有植物凝集素(500 μg·mL⁻¹ PHA)的 2% 成年牛血清的操作液滴处理 1~2 s,迅速移入含有体细胞的液滴中,使供体和受体一对一黏结,然后在融合液(0.25 mol·L⁻¹ 甘露醇+0.5 mmol·L⁻¹ HEPES,0.1 mmol·L⁻¹ MgCl₂·6H₂O+0.01% PVA)液滴中洗 5~6 遍,移到融合槽中进行电融合,施加交流电场(1 个 10 V·mm⁻¹、8 μs 交流电脉冲),自动排序,其中半卵胞质紧挨电极的一端,体细胞位于融合槽的中间,使胞质体-供体细胞的接触面与电场方向垂直,电融合参数以试验设计而定。电激后的重构胚移入含有 20% 成年牛血清的操作液中,洗 3 遍后,在 38.5 °C 的培养箱中培养 60 min,然后在显微镜下检查其融合情况。

激活:融合 60 min 后,将融合的重构胚在含 5 μg·mL⁻¹ 细胞松弛素 B 和 10 μg·mL⁻¹ 放线菌酮

的 NCSU-23+4 mg·mL⁻¹ BSA 中清洗,为了预防无透明带卵相互之间的粘连,作 5 μL 的微滴,上盖石蜡油,每滴放 1 枚胚胎,在此激活液中培养 5 h。

1.5 重构胚胎培养

将激活后的重构胚胎用 NCSU-23+4 mg·mL⁻¹ BSA 洗涤 3 遍,然后转移到石蜡油覆盖并预先在 CO₂ 培养箱中平衡至少 4 h 的 NCSU-23+4 mg·mL⁻¹ BSA 的微穴中,微穴的制备参照 Vajta 等^[12] 的方法,略有改进:在 60 mm 细胞培养皿(BD-Falcon)作 30 μL 的培养滴,每个培养滴中作 10~15 个圆锥形小凹,小凹的底部直径约为 120 μm,上口直径约 250 μm,深度约为 250 μm。每个微穴放入 1 枚胚胎,39 °C、5% CO₂、100% 湿度培养,观察重构胚胎发育情况。

1.6 试验设计

试验一:一步法电融合不同参数的比较,主要探讨一步法电融合中不同场强对重构胚融合效果的影响。具体参数为:参数 1:160 V·mm⁻¹,30 μs,一次脉冲;参数 2:180 V·mm⁻¹,30 μs,一次脉冲。结果以融合率高低来评定。

试验二:两步法电融合不同参数的比较,主要探讨不同场强对重构胚融合效果的影响。具体参数为:参数 3:第一次:180 V·mm⁻¹,10 μs,一次脉冲;融合 60 min 后进行第二次融合,第二次:85 V·mm⁻¹,80 μs,一次脉冲。参数 4:第一次:200 V·mm⁻¹,10 μs,一次脉冲;融合 60 min 后进行第二次融合,第二次:85 V·mm⁻¹,80 μs,一次脉冲。结果以各次的融合率以及总融合率的高低来评定。

试验三:不同融合方法进行克隆效果的比较,在试验一、二基础上,选用参数 2 和 4 构建重构胚,结果以胚胎发育能力来评定。

试验四:探讨电融合后联合化学激活不同时间对无透明带手工核移植胚胎发育的影响。

将采用参数 4 进行电融合后的重构胚胎随机分为 3 组,分别移入含 5 μg·mL⁻¹ 细胞松弛素 B 和 10 μg·mL⁻¹ 放线菌酮的 NCSU-23+4 mg·mL⁻¹ BSA (CB+CHX)中作用 4、5、6 h,比较这 3 个激活时间对猪无透明带手工核移植胚胎发育的不同影响。

1.7 数据统计与分析

所得数据由 SAS 软件 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 认为差异显著, $P > 0.05$ 差异不显著。试验每一次重复均为同一批次试验,相同的卵巢来源和试验条件。所有试验均重复至少 5 次。

2 结果

2.1 一步法电融合不同参数的比较

由表 1 可看出,在其他电融合条件不变的前提

下,场强 $160 \text{ V} \cdot \text{mm}^{-1}$ 组与 $180 \text{ V} \cdot \text{mm}^{-1}$ 组相比,2 组对重构胚融合的作用差异显著 ($58.33\% \text{ vs } 65.31\%$, $P < 0.05$)。

表 1 一步法电融合参数的比较 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Table 1 Effect of different parameters on cells electrofusion by one-step ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

参数 Parameter	重构胚胎数/个 No. of reconstructed embryos	融合数/融合率/% Fused embryo
参数 1 Parameter 1	120	70/(58.33±4.08) ^a
参数 2 Parameter 2	121	79/(65.31±2.60) ^b

融合率=融合后重构胚数/融合前半卵的对数。列内具不同上标的值差异显著 ($P < 0.05$),下同

The rate of fusion=No. of reconstructed oocytes/(No. oocytes $\times 1/2$). The values within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$). The same as below

2.2 两步法电融合不同参数的比较

试验结果显示,两步法融合时,第一次融合参数 DC 180 V, 10 μs , 一次脉冲,提高到 DC 200 V, 10

μs , 一次脉冲,第二次融合参数不变,可提高第一次的融合率,从而提高总融合率,但总融合率差异不显著 ($75.88\% \text{ vs } 81.20\%$, $P > 0.05$),结果见表 2。

表 2 两步法电融合参数的比较

Table 2 Effect of different parameters on cells electrofusion by two-step

参数 Parameter	首轮融合数/操作数/融合率/% First fused	再次融合数/操作数/融合率/% Second fused	总融合数/操作数/总融合率/% Total fused embryos
参数 3 Parameter 3	115/141(81.56±7.46) ^a	107/112/(94.37±4.37) ^b	107/141/(75.88±5.33) ^c
参数 4 Parameter 4	122/139(87.66±8.44) ^a	113/120/(95.68±4.50) ^b	113/139/(81.20±7.34) ^c

2.3 不同融合方法进行克隆的效果比较

采用(两步法)融合参数 4(第一次:200 V \cdot mm⁻¹, 10 μs , 一次脉冲;融合 60 min 后进行第二次融合,第二次:85 V \cdot mm⁻¹, 80 μs , 一次脉冲)与采用(一

步法)融合参数 2(180 V \cdot mm⁻¹, 30 μs , 一次脉冲),二者的重构胚其分裂率和囊胚率均差异不显著 ((79.98% vs 72.66%) 和 (13.14% vs 9.36%)), $P > 0.05$),如表 3。

表 3 不同融合方法进行克隆的效果比较

Table 3 Effect of different fusion methods on the developmental capacity of reconstructed embryos *in vitro*

参数 Parameter	处理卵数/个 No. of oocytes	分裂数/分裂率/% No. of cleavage	囊胚数/囊胚率/% No. of blastocytes
参数 2 Parameter 2	139	101/(72.66 ± 11.82) ^a	13/(9.36 ± 1.93) ^b
参数 4 Parameter 4	142	115/(79.98 ± 8.47) ^a	19/(13.14 ± 5.18) ^b

2.4 探讨电融合后联合化学激活不同时间对无透明带核移植胚胎发育的影响

采用(两步法)融合参数 4(第一次:200 V \cdot mm⁻¹, 10 μs , 一次脉冲;融合 60 min 后进行第

二次融合,第二次:85 V \cdot mm⁻¹, 80 μs , 一次脉冲)进行电融合后,在 CHX+CB 中激活 4、5、6 h 这 3 组中,其分裂率和囊胚率均差异不显著 ($P > 0.05$)。相对而言,重构胚采用参数 4 的两步融和法和 CHX

+CB 激活 5 h 效果较好。无透明带核移植胚胎的体外培养结果见图 1、图 2。

表 4 CHX+CB 处理时间对无透明带核移植胚胎卵裂率和囊胚率的影响

Table 4 Effect of treatment time of CHX+CB on the rates of cleavage and blastocyst of zona-free reconstructed embryos *in vitro*

处理时间/h Treatment time	处理卵子数/个 No. of reconstructed embryos	卵裂数/卵裂率/% No. of cleavage	囊胚数/囊胚率/% No. of blastocysts
4	126	104/(83.16±7.05) ^a	12/(9.51±2.79) ^b
5	137	106/(77.63±8.09) ^a	19/(13.83±3.46) ^b
6	144	113/(78.91±9.13) ^a	17/(11.87±5.62) ^b

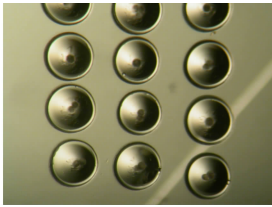


图 1 2-细胞阶段重构胚 (50×)

Fig. 1 The handmade cloned embryo of two-cells(50×)

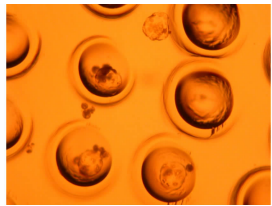


图 2 微穴法培养的第 7 天核移植囊胚 (100×)

Fig. 2 Day 7 blastocysts in the well of well(100×)

接触与细胞定位,同时膜-膜接触面垂直于电场,从而提高融合率。陆凤花等^[17]在水牛核移植的研究中发现,交流电对于直径为 20~30 μm 的供体细胞的融合率无显著影响;但对于直径小于 15 μm 的供体细胞,能显著提高其融合率。而无透明带两个半卵融合能达到体细胞和卵母细胞质之间的完全接触,这正是融合率高的必需条件。在常规克隆中有透明带重构胚的融合率在 60%~80%^[18],无透明带两个半卵与体细胞间的融合率却能达到 90%以上^[19]。

本研究的结果显示,对于猪 HMC 体细胞克隆技术中的细胞融合,当采用一步法融合方式,选择参数 2 时的融合效果较好,融合率达到 (65.31±2.60)%,但当用两步法融合选择参数 4,总体融合率达 (81.20±7.34)%。在牛上,谭世俭等^[20]用经过盲吸法得到的双半卵与一个体细胞进行电融合,其融合率可达 95.7%,在本试验中与田国富^[11]在牛上的研究接近。用两步法进行融合时,参数 4 的总体融合率达到 (81.20±7.34)%,高于参数 2 的结果。Booth 等^[21]运用 HMC 技术进行猪的体细胞克隆试验,采用一步法融合,融合率达 85.0%;Li 等^[22]用二步法融合率达 (87±7)%。Vajta 等^[23]报道采用 2 步法融合牛的半卵时,第一次融合率为 94%,第二次为 95%,总体融合率达到 89.3%。本试验中,用两步法电融合结果低于上述报道,进行两步法融合时,第 1 步融合非常关键,要求半卵体细胞接触面尽可能垂直电场方向,但由于操作过程不是很好控制,不能确保每对细胞都能垂直电场方向,因而影响到融合效果。

本研究发现用参数 2 和 4 得到重构胚的分裂率差异不显著 (72.66% vs 79.98%, $P>0.05$),参数 4 的囊胚率高于参数 2,但差异不显著 (13.14% vs 9.36%, $P>0.05$),表明在本研究中两次性的融合

3 讨论

3.1 不同融合方法对无透明带核移植胚胎发育的影响

随着核移植技术的发展,传统核移植技术已经逐渐显露出其局限性^[13],手工核移植技术效率是传统核移植的两倍,而所需费用仅占传统核移植方法费用的十分之一^[11]。因此,手工核移植技术正逐渐显现出其优越性,并逐步得到广大研究者的认同和接受^[14-16]。

无透明带克隆胚胎的体外培养是手工核移植的前提条件^[14-16],而融合又是核移植的关键步骤,融合率的高低直接影响到核移植的总效率。目前动物核移植的最佳融合方法是电融合法。

在直流脉冲前施加交流电脉冲的方法已在细胞融合研究中得到广泛的应用^[17]。融合时施加交流电,细胞会产生极化,偶极的形成促使细胞膜间紧密

效果好于一次融合效果。Vajta 等^[23]用两步融合法融合牛的克隆胚,在 WOW 系统和 GO 系统中培养,囊胚率分别为 18% 和 36%。Booth 等^[21, 24]运用 HMC 技术进行猪和牛的体细胞克隆试验,经过一步法电融合囊胚率分别为 4.8% 和 37.6%。非洲第一头克隆牛也是用 HMC 技术经过融合两次得到的,经过潜水艇法培养其囊胚率为 12%。本研究得到的克隆胚囊胚率高于 Booth 等^[21]得到的结果,原因一方面可能与卵母细胞的选择有关,另一方面可能与我们培养系统的优化有关系。

3.2 不同激活时间对无透明带核移植胚胎发育的影响

本研究中,用电激活和 CHX+CB 联合激活 4、5、6 h,处理 5 h 组的分裂率和囊胚率分别是(77.63±8.09)% 和 (13.83±3.46)%,略高于 4 h 和 6 h 组,说明联合激活 4~6 h,对无透明带重构胚胚胎激活作用是有效的,它可以起到激活猪卵母细胞的作用。放线菌酮是常用的蛋白质合成抑制剂,它抑制 MPF 和 CSF 等蛋白类细胞因子的合成,使卵子从 MII 苏醒,恢复第二次成熟分裂。通常用物理、化学和生物激活 3 种方法来进行卵母细胞的激活处理,也可以用两种方法结合起来进行联合激活,有效地激活卵母细胞。不同的动物及不同的试验条件,卵母细胞的激活处理效果与电激活液离子浓度、场强、脉冲时间和脉冲次数等有关^[25]并存在差异。

田见暉等^[26]对有带猪卵母细胞采用电激活和化学激活联合激活的方法研究其对猪卵母细胞激活后发育的影响,结果表明,CB+CHX 和 CB+DMAP 的卵裂率和囊胚率分别为 78.46% vs 75.84% 和 33.13% vs 39.12%,囊胚率显著高于其它 3 组($P < 0.05$)。Li 等^[22]用电激活和 CHX+CB 联合激活,在 CHX+CB 中处理 4 h,手工克隆猪重构胚卵裂率和囊胚率最高,分别为 87% 和 21%。而本试验中发现,在 CHX+CB 中处理 5 h 组,其重构胚胎的卵裂率和囊胚率最高,分别为 77.63% 和 13.83% ($P > 0.05$)。

4 结 论

本试验研究了不同融合方法和不同激活时间对猪体细胞手工克隆技术的影响。通过对试验结果进行统计分析,得出以下结论:①融合方式上,一步法优于两步法;②重构胚采用融合参数 4 (200 V·mm⁻¹, 10 μs, 一次脉冲;融合 60 min 后进行第

二次融合,第二次:85 V·mm⁻¹, 80 μs, 一次脉冲)联合 CHX+CB 激活 5 h 效果较好。

参考文献:

- [1] WILLADSEN S M. Nuclear transplantation in sheep embryos [J]. *Nature*, 1986, 320(6057): 63-65.
- [2] 马利兵, 王凤梅, 潘建刚. 哺乳动物体细胞克隆技术的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2009, (5): 51-54.
- [3] PEURA T T, LEWIS I M, TROUNSON A O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 50(2): 185-191.
- [4] VAJTA G, BARTELS P, JOUBERT J, et al. 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) [J]. *Theriogenology*, 2004, 62(8): 1465-1472.
- [5] DU Y, KRAGH P M, ZHANG Y, et al. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation[J]. *Theriogenology*, 2007, 68(8): 1104-1110.
- [6] LI J, SVARCOVA O, VILLEMOES K, et al. High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos [J]. *Theriogenology*, 2008, 70(5): 800-808.
- [7] KRAGH P M, NIELSEN A L, LI J, et al. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw [J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(4): 545-558.
- [8] SHAH R A, GEORGE A, SINGH M K, et al. Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Theriogenology*, 2009, 71(8): 1215-1219.
- [9] 卢晟盛, 吕培茹, 刘红波, 等. 广西巴马小型猪克隆胚的构建及胚胎移植[J]. *动物学杂志*, 2008, 43(6): 147-153.
- [10] VAJTA G, LEWIS I M, TECIRLIOGLU R T. Handmade somatic cell cloning in cattle[M]. *Methods Mol Biol*, 2006, 348: 183-196.
- [11] 田国富. 牛 HMC 法体细胞克隆技术的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2007.
- [12] VAJTA G, KOROSI T, DU Y, et al. The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development [J]. *Reprod Biomed Online*,

- 2008, 17(1): 73-81.
- [13] 李光华, 叶绍辉. 动物体细胞克隆技术的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(4): 1-5.
- [14] BRONSON R, MCLAREN A. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida [J]. *J Reprod Fertil*, 1970, 22(1): 129-137.
- [15] MODLINSKI J. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs *in vivo* [J]. *J Embryol Exp Morph*, 1970, 23(3): 539-547.
- [16] TROUNSON A O, MOORE N W. The survival and development of sheep eggs after partial or complete removal of the zona pelete removal of the zona pellucida [J]. *J Reprod Fertil*, 1974, 41(1): 97-105.
- [17] 陆凤花, 石德顺, 韦英明, 等. 不同融合条件对水牛体细胞核移植效果的影响[J]. 广西农业生物科学, 2005, 24(1): 1-5.
- [18] KATO Y, TANI T, TSUNODA Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows[J]. *J Reprod Fertil*, 2000, 120(2): 231-237.
- [19] TECIRLIOGLU R T, FRENCH A J, LEWIS I M, et al. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2004, 15(7): 361-366.
- [20] 谭世俭, QIAN L M, 石德顺. 牛去透明带卵体细胞核移植技术的应用研究[J]. 广西农业生物科学, 2003, 22(3): 201-206.
- [21] BOOTH P J, TAN S J, HOLM P, et al. Application of the zona-free manipulation technique to porcine somatic nuclear transfer[J]. *Cloning Stem Cells*, 2001, 3(4): 191-197.
- [22] LI J, DU Y, ZHANG Y H, et al. Chemically assisted handmade enucleation of porcine oocytes[J]. *Cloning Stem Cells*, 2006, 8(4): 241-250.
- [23] VAJTA G, LEWIS I M, HYTTTEL P, et al. Somatic cell cloning without micromanipulators[J]. *Cloning*, 2001, 3(2): 89-95.
- [24] BOOTH P J, TAN S J, REIPURTH R, et al. Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique[J]. *Cloning Stem Cells*, 2001, 3(3): 139-150.
- [25] ONODERA M, TSUNODA Y. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro* [J]. *Gamete Res*, 1989, 22(3): 277-283.
- [26] 田见晖, 刘国世, 曾申明, 等. 电脉冲激活对体外成熟猪卵母细胞卵裂率和囊胚率的影响[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 401-407.

(编辑 郭云雁)