

牛卵母细胞质内注射体细胞核移植胚的早期发育

李裕强, 安志兴, 张 王秀, 张 涌

(西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘 要: 研究牛皮肤成纤维细胞的处理方式对卵质内直接注射法构建的核移植胚胎发育的影响, 同时比较了M II期与T II期卵母细胞作为受体的效果。结果表明: 在细胞核注射前对供体细胞作低渗处理可明显提高胚胎构建的成功率和早期发育能力。牛皮肤成纤维细胞是否作G1/G0期同期化处理, 对核移植胚胎的发育没有明显的影响。发现供核细胞在悬浮情况下作休眠处理, 所得核移植胚胎的发育能力与贴附休眠的细胞基本相同, 且悬浮休眠3 d后的细胞无需再作低渗处理便可用作细胞核注射。M II期或T II期卵母细胞作为胞质内核注射受体, 对牛体细胞核移植胚胎的早期发育没有明显影响。

关键词: 牛; 皮肤成纤维细胞; 悬浮休眠; 核移植; 卵质内注射

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)01-0033-05

体细胞核移植的成功在理论上证明了哺乳动物的分化细胞仍具有全能性, 同时也为高效生产转基因动物、快速扩增濒危灭绝动物等提供了新的途径。虽然在绵羊^[1]、牛^[2,3]、小鼠^[4]、山羊^[5,6]、猪^[7]、野牛^[8]、马^[9]、猫^[10]等动物上克隆都取得了成功, 但动物克隆技术普遍存在成功率低、技术不稳定的问题。供体细胞与受体卵母细胞周期状态的协调与互作是其中的主要影响因素之一。对于M II期卵母细胞, 处于G1期的细胞核进入后才能维持正常的染色体倍型^[11]。休眠处理可使绝大部分培养细胞周期由G1期移出, 同期化于G0状态, 被认为对核移植胚的发育有利^[12]; 也有研究发现, 体外培养的细胞本身绝大部分就处于G1期, 休眠处理并不能提高核移植胚的发育^[13]。体细胞的体积较小, 加之细胞膜特性的差异, 与卵母细胞电融合的效率较低, 而卵胞质内直接注射细胞核用于构建体细胞核移植胚效果更好^[4]。胞质内直接注射技术的一个关键环节是体细胞膜的裂解和细胞核的分离, 低渗溶液或Triton X-100液短时处理可以使膜部分裂解, 易于获取细胞核^[4], 但会增加操作程序和污染的机会, 因而有必要寻求一种简便可行的供体细胞处理方式。本研究以牛皮肤成纤维细胞为供体, 以体外成熟的牛卵母细胞为受体, 研究了上述问题, 并比较了M II期A II/T II期卵母细胞用作细胞核直接注射受体

的效果。

1 材料与方 法

1.1 供体细胞的培养

牛皮肤成纤维细胞取自本实验室冷冻保存的细胞。分离和培养方法参见文献[16]。

1.2 供体细胞的处理

周期中细胞: 消化收集处于对数生长期的细胞, 直接用于核移植。

贴附休眠细胞: 处于对数生长期的细胞, 换用含0.5% FBS的TCM 199(Gibco BRL)培养3~5 d, 消化收集细胞用于核移植。

悬浮休眠细胞: 消化收集处于对数生长期的细胞, 先用TCM 199+10% FBS液38.5℃孵育2 h, 再悬浮于TCM 199+0.5% FBS液中, 置0.5 mL离心管, 38.5℃饱和湿度下CO₂培养箱保存备用。

细胞的低渗处理: 核移植前, 细胞用0.1%柠檬酸钠溶液处理20 s, 悬浮于TCM 199+10% FBS中备用。

1.3 卵母细胞成熟、去核、激活

牛卵巢采自西安屠宰场。用12号针头抽吸卵巢表面2~8 mm卵泡, 收集卵丘卵母细胞复合体(COC), COC置成熟培养液, 于38.5℃、5% CO₂、饱和湿度条件下, CO₂培养箱培养20 h。成熟培养液: TCM 199+10% FBS+10 mmol/L HEPES+0.5 mmol/L 丙酮酸钠(Sigma)+0.1 IU/mL HMG(丽宝生化制药公司)+1 μg/mL E₂(Sigma)^[17]。

成熟培养完成后, COC置0.1%透明质酸酶(Sigma) DPBS(无Ca²⁺、Mg²⁺)中, 漩涡振荡3~5

收稿日期: 2003-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(38830280)

作者简介: 李裕强(1969-), 男, 甘肃静宁人, 副研究员, 博士, 主要从事动物胚胎工程的研究。E-mail: yuqiangl@yahoo.com.cn

min, 去除卵丘细胞。挑选排出第一极体且形态正常、胞质均一的卵母细胞用于去核。以 10~ 15 枚为 1 组, 置 7.5 μg/mL 细胞松弛素 B (CB, Sigma) TCM199 液中孵育 20 min 后, 移入 50 μL TCM199 + 10% FBS + 7.5 μg/mL CB 液滴中, 石蜡油 (Sigma) 覆盖, 在显微操作仪 (Nikon) 下用外径 18~ 20 μm 的玻璃细管去核。Hoechst 33342 (Sigma) 染色, 荧光检测去核效果。

激活方法: 5 mmol/L Ionomycin (离子霉素, Sigma) TCM199 液处理 5 min, 洗涤后置 2 mmol/L 6-DMAP (6-二甲氨基嘌呤, Sigma) TCM199 液 CO₂ 培养箱培养 4 h。除注明外, 激活时间为核移植完成后 0.5 h。

1.4 细胞核移植

将去核的卵母细胞按 10~ 15 枚/批置 50 μL TCM199+ 10% FBS 的微滴中, 用石蜡油覆盖, 然后吸取 10~ 20 μL 供体细胞悬液加入操作液滴, 静置 5 min, 置显微操作仪下, 用外径 < 10 μm 的玻璃管反复吸取细胞, 破膜后把细胞核吸入注射管, 插入卵

母细胞, 轻轻将细胞核推入卵母细胞。

1.5 核移植胚的培养

核移植胚在 38.5 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下, 先用 100 μL 胚胎培养液 I 微滴 (石蜡油覆盖) 培养 3 d, 再换用胚胎培养液 II 培养至第 8 天。胚胎培养液 I: mSOF^[18] + 2% MEM naa (Gibco BRL) + 10 μg/mL Insulin (Sigma) + 10 μmol/L Na₂-EDTA + 1 mmol/L Glutathione (GSH, Sigma); 胚胎培养液 II: mSOF + 5% FBS + 2% MEM naa + 1% MEM aa (Gibco BRL) + 1 mmol/L GSH + 3.15 mmol/L Glucose (Sigma)。

1.6 数据处理

所得数据进行 t-检验或方差分析。

2 结果

2.1 供核细胞的低渗处理对牛核移植胚发育的影响

贴附休眠的牛皮肤成纤维细胞在核注射前先作低渗处理, 重构胚的发育情况见表 1。

表 1 供核细胞的低渗处理对牛核移植胚发育的影响

Table 1 The effect of hypotonic treatment of donor cells on bovine nuclear transfer embryonic development

细胞处理 Treatments	重构胚数 No. of reconstructed embryos	卵裂数/(% ±SD) No. of cleavage	8~ 16 细胞胚数/(% ±SD) No. of 8~ 16 cell embryos	囊胚数/(% ±SD) No. of blastocytes
低渗 Hypotonic	82	53(64.6 ±4.4) ^a	31(37.8 ±3.7) ^b	11(13.4 ±3.4) ^d
对照 Control	73	42(57.5 ±5.5) ^a	18(24.7 ±3.1) ^c	4(5.5 ±3.3) ^e

b: c, P < 0.05; d: e, P < 0.01

未作低渗处理的细胞(对照), 细胞膜张力大, 很难吸入注射管, 且膜难以破裂。相反, 经低渗处理的细胞, 容易吸入注射管, 吹吸 2~ 3 次, 膜即破裂。与此对应, 经低渗处理的细胞核移植胚的发育能力显著高于未作低渗处理的细胞(b: c, P < 0.05; d: e, P < 0.01)。

2.2 成纤维细胞周期对核移植胚发育的影响

周期中的和经血清饥饿休眠的牛皮肤成纤维细胞分别用于核移植, 其中周期中细胞和培养休眠细胞注射前低渗处理, 悬浮休眠 3 d 的细胞直接用于注射。重构胚的发育情况见表 2。

结果显示, 对于细胞质内注射法所构建的牛核移植胚, 供核细胞休眠处理与否对其发育能力没有显著影响(Cy cell vs. Aq cell, P > 0.05); 低血清培养液中悬浮休眠的细胞用作细胞核供体, 重构胚早

表 2 供核细胞周期对牛核移植胚发育的影响

Table 2 The effect of donor cell cycle on bovine nuclear transfer embryonic development

细胞周期 Donor cell cycle	重构胚数 No. of recon- structed embryos	卵裂数/(% ±SD) No. of cleavage	囊胚数 /(% ±SD) No. of blastocytes
周期中细胞 Cy cell*	87	55(63.2 ±3.1) ^a	11(12.6 ±2.7) ^b
贴附休眠细胞 Aq cell**	82	53(64.6 ±4.4) ^a	11(13.4 ±3.4) ^b
悬浮休眠细胞 (d3)Sq cell***	486	321(66.0 ±5.3) ^a	73(15.0 ±3.5) ^b

同上标数据之间无显著差异(P > 0.05); 下表同* Cy cell: cycling cell, log phase growing cell; ** Aq cell: attached quiescent cell, log phase cell cultured in 0.5% FBS TCM199 5 d; *** Sq cell: suspended quiescent cell, harvest log phase cell and suspended in 0.5% FBS TCM199 3 d. The same below

期发育能力与贴附培养细胞基本相同(Sq cell vs. Aq cell, $P > 0.05$), 且无需再作低渗处理便可用作细胞核注射。

2.3 细胞悬浮休眠时间对核移植胚发育的影响

悬浮休眠处理第 1 3 5 天的牛皮肤成纤维细胞, 分别用于组建核移植胚, 重构胚的发育情况见表 3。

表 3 供体细胞悬浮休眠时间对牛核移植胚发育的影响

Table 3 The effect of suspended quiescent time on the development of bovine nuclear transfer embryos

悬浮休眠时间 Suspended quiescent time/d	重构胚数 No. of reconstructed embryos	卵裂数 No. of cleavage /%	8/16 细胞胚数 No. of 8-16 cell embryos /%	囊胚数 No. of blastocytes /%
1	79	45(57.0±2.6) ^a	19(24.0±4.6) ^b	5(6.3±2.1) ^d
3	486	321(66.0±5.3) ^a	195(40.1±4.4) ^c	73(15.0±3.5) ^e
5	87	56(64.4±6.1) ^a	36(41.4±3.9) ^c	10(11.5±4.2) ^e

b: c, $P < 0.01$; d: e, $P < 0.01$

悬浮休眠处理 3 d 细胞核移植胚的囊胚发育率明显高于悬浮处理 1 d 的细胞(d: e, $P < 0.01$)。与悬浮休眠处理 3 d 比较, 悬浮休眠处理 1 d 低发育率的原因不仅是前期发育率低(b: c, $P < 0.01$), 两组间 8/16 细胞胚至囊胚的发育能力也有明显差异(37.4%: 22.2%, $P < 0.05$)。悬浮休眠处理 5 d 细胞核移植胚的前期发育率与 3 d 组基本相同, 但 8/16 细胞以后的发育能力有下降的趋势(27.8%: 37.4%)。可见悬浮休眠 3 d 是卵质内注射核移植供体细胞适宜的处理时间。

2.4 激活时间对核移植胚发育的影响

对悬浮休眠 3 d 的细胞所获得的重构胚, 采用 2 种激活时间, 用 Ionomycin+ 6-DMAP 激活。时间 1: 卵母细胞去核后, 用 5 μmol/L Ionomycin TCM 199 液处理 5 min, 洗涤后置胚胎培养液中培养 2 h, 然后进行核移植, 核移植后再用 6-DMAP 液培养 4 h, 转入胚胎培养液 I 培养。时间 2: 去核后的卵母细胞先进行核移植, 完成后用胚胎培养液 I 培养 0.5 h, 再用 Ionomycin 处理 5 min, 洗涤后用 6-DMAP 液培养 4 h, 转入胚胎培养液 I 培养。2 种激活程序对核移植胚发育的影响见表 4。

表 4 激活时间对核移植胚的影响

Table 4 The effect of oocytes meiosis stage on nuclear transfer embryonic development

激活时间 Oocytes phase	重构胚数 No. of recon- structed embryos	卵裂数 No. of cleavage /%	囊胚数 No. of blastocytes /%
核移植前(T II)	83	53(64.9±4.8) ^a	11(13.3±2.7) ^b
核移植后(M II)	486	321(66.0±5.3) ^a	73(15.0±3.5) ^b

可见, 无论是在核移植前, 还是在核移植后激活重构胚, 可获得基本相同的核移植胚发育率。

3 讨论

血清饥饿处理供体细胞被认为有利于核移植胚再程序化(reprogramming)的完成^[12], 而在体细胞克隆动物研究中较多采用^[1, 19, 20]。有研究认为, 体外培养的成纤维细胞, 绝大部分处于 G1 期, 休眠处理并不能提高移植胚的发育能力^[13]。本研究显示, 对于卵质内注射法构建的核移植胚, 供体细胞休眠处理的效果不明显, 这种结果可能与核移植方法有关。在融合法构建的核移植胚中, G0 期细胞有利于重构胚发育可能与供体细胞质的影响降低有关。G0 期细胞胞质成分减少、核糖体改变、mRNA 降解、转录活性下降, 进入卵母细胞后, 对核移植胚代谢和核质互作的影响也会减少, 从而使移入的细胞核能更充分的接受卵母细胞质的调节^[21]。在胞质内直接注射核移植胚中, 供体细胞质成分进入的很少, 胞质的影响也会被降低。

直接注射法构建核移植胚, 细胞膜的破裂是其中的关键环节。已报道的获得克隆后代的研究中, 均未明确指出对细胞膜进行特殊处理^[4, 22]。本研究发现, 消化收集的细胞直接用于细胞核注射, 细胞膜很难破裂, 不仅操作费时, 细胞核分离效果也不确切。Triton X-100 通透处理^[15]或用低渗溶液处理^[14]都可对膜部分裂解, 易于细胞核的分离。但这种处理过程增加了操作程序和污染机会。本研究发现, 细胞悬浮饥饿 3 d 后, 细胞膜的韧性和紧张度都会降低, 在吸入注射管的过程中细胞膜即可破裂, 再经 1~2 次吹吸, 便可分离吸取细胞核。这样就无需

对细胞膜进行处理而直接用于细胞核注射。这种方法程序简化,避免了细胞膜的处理过程可能对细胞造成的污染和其他副作用。悬浮休眠处理 1 d 的细胞和刚消化分离的细胞差异不大,如果不经过低渗处理,很难得到质量较好的核移植胚。试验表明,悬浮休眠处理的细胞核移植后可较好地完成早期发育。相同的研究未见报道,这种处理的细胞核移植胚是否可完成全程发育还需进一步验证。贴壁细胞血清饥饿 15 d 再经核注射后获得了体细胞克隆猪^[22],说明在贴壁情况下长时间的血清饥饿对细胞核结构和功能的影响是有限的。

核移植胚的激活时间与供核细胞的周期有关,在胚胎卵裂球细胞中,由于细胞进行着快速的周期运动,处于间期的时间很短,而 S 期和 G₂ 期的核进入 M II 期卵母细胞后由于 MPF 的作用,导致染色体倍型的紊乱。所以胚胎卵裂球细胞如果不做同期化处理,只有使用激活后的卵母细胞才能正常发育^[11]。体细胞在培养时处于 G₁ 期的时间很长,随机选择 G₁ 期细胞的比率很高,如果单纯从维持正常染色体倍型的角度而言,使用激活前(M II 期)和激活后(A II/T II 期)卵母细胞都可以。卵母细胞激活前后有许多变化,这些因素肯定也对细胞核产生影响。重组后激活在大多数研究中使用,原因被认为与 M II 期卵母细胞质中的一些因子对核重塑和基因再程序化有利^[4,23],但在绵羊核移植胚中重组与激活的时间对核移植胚的发育没有显著影响^[12],也有人用牛胚胎干细胞样细胞核移植时,在激活后重组的核移植胚中得到更好的发育效果^[24]。核质互作是一个受多种因素影响的过程,激活时间只是其中一个方面。这些不同的结论可能还与供体细胞的类型与处理方式、卵母细胞的成熟时间和成熟质量及激活方式等有关。本研究中,重组前后激活的核移植胚的发育情况基本相同,表明体细胞核进入 T II 期卵母细胞质也能实现再程序化。末期卵母细胞核移植能获得出生动物也说明这点^[12,25]。细胞移入 M II 期卵母细胞后放置一段时间再激活,还有在时间上保证再程序化完成的作用,6-DMAP 的使用可能会弥补重组前激活在这方面的不足。

参考文献:

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385: 810~ 813.
- [2] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. *Science*, 1998, 282: 2095~ 2098.
- [3] Kubota C, Yamakuchi H, Todorochi J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 990~ 995.
- [4] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature*, 1998, 394: 369~ 374.
- [5] 郭继彤, 安志兴, 李煜, 等. 成年耳细胞克隆山羊 (*Capra hircus*) [J]. *中国科学 C 辑*, 2002, 32(1): 77 ~ 83.
- [6] Keefer C L, Keystone R, Bhatia B, et al. Efficient production of viable goat offspring following nuclear transfer using adult somatic cells[J]. *Biol Reprod*, 2000, 62 (Suppl. 1): 192.
- [7] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. *Nature*, 2000, 407: 86~ 90.
- [8] Lanza R P, Cibelli J B, Diaz C, et al. Cloning of endangered species (*Bos Gaurus*) using interspecies nuclear transfer[J]. *Cloning*, 2000, 2: 79~ 90.
- [9] Galli C, Lagutina I, Crotti G, et al. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin[J]. *Nature*, 2003, 424: 635.
- [10] Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation[J]. *Nature*, 2002, 415: 859.
- [11] Campbell K H S, Ritchie W A, Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development[J]. *Biol Reprod*, 1993, 49: 933~ 942.
- [12] Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from cultured cell lines[J]. *Nature*, 1996, 380: 64~ 66.
- [13] Cibelli J B, Stice S L, Gloucke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. *Science*, 1998, 280: 1256~ 1258.
- [14] Rho G J, Hahnel A C, Betteridge K J. Production of bovine embryos by intracytoplasmic injection of nuclei isolated from primordial germ cells[J]. *Theriogenology*, 1999, 51: 213.
- [15] Rybouchkin A, Dhont M. Nuclear transfer into mouse oocytes by a conventional method of injection[J]. *Theriogenology*, 2000, 53: 241.
- [16] 李裕强, 张涌, 郭继彤, 等. 山羊皮肤组织细胞分离

- 与培养的研究[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(2): 133~ 137.
- [17] 李裕强, 张 涌, 张 12 等. 动物克隆中受体卵母细胞体外成熟[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2001, 31(专辑): 139~ 143.
- [18] Takahashi Y, First N L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acid and vitamins[J]. Theriogenology, 1992, 37: 963~ 978.
- [19] Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts [J]. Science, 1997, 278: 2130~ 2133.
- [20] McCreath K J, Howcroft J, Campbell K H, et al. Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells[J]. Nature, 2000, 405: 1066~ 1069.
- [21] Campbell K H S. Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle[J]. Cloning, 1999, 1: 2~ 15.
- [22] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei [J]. Science, 2000, 289: 1188~ 1190.
- [23] Well D N, Misica P M, McMillan W H, et al. Production of cloned bovine fetuses following nuclear transfer with cells from a fetal fibroblast cell line [J]. Theriogenology, 1998, 49: 330.
- [24] Urano K, Urakawa M, Aoyagi Y. Effect of post-fusion or pre-fusion activation on nuclear transfer results of bovine embryonic stem-like cells [J]. Theriogenology, 2001, 55: 295.
- [25] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 456~ 461.

Bovine Somatic Cell Nuclear Transplantation by Intraplasmic Injection

LI Yu-qiang, AN Zhǎ-xing, ZHANG Xiu, ZHANG Yong

(Animal Sci-tech College, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: The effect of donor cell cycle, cell hypotonic treatment and recipient oocytes meiosis phase on development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos was studied in the present experiment. Oocyte intraplasmic nuclear injection was used as embryo reconstruction method. The results indicated that: There was no significant effect of culturing bovine skin fibroblasts with 0.5% FBS media (attached quiescent cell) on the development of bovine nuclear transfer embryos as compared with non-quiescent cell ($P > 0.05$). Treatment of donor cells with 0.1% sodium citric acid 20 s before nuclear injection was beneficial for cell membrane breakdown and nuclear dissociation, as a result, the nuclear transfer embryos development rate to 8/16-cell stage and blastocytes was significantly higher than control ($P < 0.01$). It was found that donor cells suspended in 0.5% FBS TCM 199 3 d (suspended quiescent cell) could make it easily to dissociate nuclear without hypotonic treatment, and development ability of the nuclear transfer embryos was also promoted slightly. The T II oocyte (activation before nuclear injection) or M II oocyte (activation after injection) did not significantly affect the development of nuclear transfer embryos. Our findings suggest that donor nuclear dissociation efficiency was crucial to the success of oocyte intraplasmic injection, suspension quiescence was a proper donor cell treatment method, both T II oocytes and M II oocytes could be used as recipient.

Key words: bovine; skin fibroblast; suspension quiescence; nuclear transplantation; oocyte intraplasmic injection