

影响奶牛体细胞手工克隆技术因素的研究

张 诺¹,杜卫华¹,郝海生¹,王 栋¹,武 坤^{1,2},朱化彬^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,北京 100193;

2. 中国农业科学院草原研究所,呼和浩特 010010)

摘 要:旨在优化奶牛的手工体细胞克隆技术方案,本试验以牛卵母细胞为材料研究了2个半卵不同粘合交流电压、重构胚不同激活方法和不同的COCs采集方法对奶牛手工体细胞克隆胚发育的影响。结果表明,(1)降低2个半卵粘合交流电压能显著提高其随后的卵母细胞融合率($P<0.05$);(2)A23187+6-DMAP组激活的无透明带重构胚分裂率和囊胚率显著高于 Ionomycin+6-DMAP组($P<0.05$);(3)真空蠕动泵抽吸法和刀片切割法获得的卵母细胞总数显著高于注射器抽吸法($P<0.05$),而切割法获得的1和2级卵母细胞百分数显著高于其它2种方法($P<0.05$)。因此,采用真空蠕动泵抽吸法获得COCs,用较低的粘合交流电压进行半卵粘合,采用A23187+6-DMAP激活法进行融合后的激活能显著提高奶牛手工体细胞克隆效率。

关键词:牛;体细胞克隆;手工克隆;无透明带卵母细胞

中图分类号:S823.91;S814.8

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)08-1315-05

Study on Handmade Somatic Cell Cloning in Dairy Cattle

ZHANG Nuo¹, DU Wei-hua¹, HAO Hai-sheng¹, WANG Dong¹, WU Shen^{1,2}, ZHU Hua-bin^{1*}

(1. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing*

100193, China; 2. *Grassland Research Institute, Chinese Academy of*

Agricultural Sciences, Hohhot 010010, China)

Abstract: To optimize the technique of handmade somatic cell cloning in dairy cattle, based on bovine oocytes, the different alternating current (AC) voltage, different activation methods of reconstructed embryos and different collection methods of cumulus-oocyte complexes (COCs) were used. The results showed that: (1) The fusion rate of oocytes increased significantly with the decreasing of AC voltage ($P<0.05$). (2) The cleavage rates and blastocyst rates of reconstructed embryos treated with A23187 + 6-DMAP was significantly higher than that treated with ionomycin + 6-DMAP ($P<0.05$). (3) The total number of oocytes collected by negative-pressure aspiration and by cutting ovaries was significantly higher than that collected by injector aspiration ($P<0.05$), and the proportion of COCs of grade 1-2 got by cutting ovaries was higher ($P<0.05$). In conclusion, using lower AC voltage, choosing A23187 + 6-DMAP for reconstructed embryos activating, aspirating COCs with negative-pressure aspiration can significantly improve the handmade somatic cell cloning efficiency of dairy cattle.

Key words: bovine; somatic cell cloning; handmade cloning; zona-free oocytes

自从1997年体细胞克隆羊“多莉”诞生以来^[1], 动物体细胞克隆(Somatic cell nuclear transfer, SC-

收稿日期:2008-04-03

基金项目:奶牛产业技术体系项目(nycyt-x-10);“十一五”科技支撑奶业专项(2006BAD04A02-06);中国农科院基本科研业务费科技创新团队项目(ywfd-1)

作者简介:张 诺(1980-),女,河北石家庄人,硕士,主要从事胚胎工程研究, E-mail: nuozhang@yahoo.com.cn

* 通讯作者:朱化彬, E-mail: zhuhuabin@iascaas.net.cn

NT)技术研究取得了巨大进展,已经获得了多种哺乳动物体细胞克隆后代^[2],但是常规体细胞克隆技术需要昂贵的设备和熟练的操作技术,限制了SC-NT的推广应用。手工克隆(Handmade cloning, HMC)技术是在体视镜下手工切割去除卵母细胞核,然后在2枚去核后的半卵中间放置供体细胞,融合后体外培养发育生产克隆胚胎。HMC技术简化了显微操作技术受体卵母细胞去核和注核供体细胞操作,降低了生产成本。1998年,Peura等^[3]首次报道并建立了牛胚胎细胞手工克隆方法,2001年,Vajta等^[4]进一步完善了HMC技术方法,获得了牛体细胞核移植后代^[5-7],2007年,Du等利用HMC技术成功得到了猪的体细胞克隆后代^[8]。

本试验研究了牛HMC过程中交流电压大小、不同激活液及卵巢卵母细胞不同采集方法对牛体细胞手工克隆胚胎体外发育的影响,旨在提高利用奶牛HMC技术生产体细胞克隆胚胎的效率,为进一步对牛体细胞手工克隆胚胎体外发育的研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 卵母细胞采集与体外成熟

于屠宰场采集牛卵巢,置于30℃生理盐水中,2h内运回实验室。分别采用真空蠕动泵抽吸法(Negative-pressure aspiration)、注射器抽吸法(Syringe aspiration)和切割法(Cutting method)收集卵母细胞。注射器抽吸法是用18G针头抽取卵巢表面2~8mm卵泡内的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-oocyte complexes, COCs);真空蠕动泵抽吸法是采用真空蠕动泵控制抽吸速度,使其保持在 $0.5\text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$,用18G针头抽取卵巢表面2~8mm卵泡内COCs;切割法是将卵巢置于盛有采卵液的90mm培养皿中,用镊子固定卵巢,然后用灭菌的手术刀片进行致密的纵横切割,然后采用尼龙筛(500 μm)去除采卵液中大的卵巢组织块,将采卵液全部倒入50mL离心管中沉淀备用。

体视显微镜下用巴氏管将带有3~4层颗粒细胞完整致密的COCs检出,用含0.01%PVA的无钙镁PBS溶液洗2遍后,用含有10%FBS的TCM199洗3遍后移入平衡2h的成熟培养液(TCM199+10%FBS+ $0.01\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ FSH+ $0.01\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ LH+ $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ E₂)小滴中,50~60枚COCs/500 μL 培养液,然后放置于38.5℃、

5%CO₂、最大饱和湿度的培养箱培养(以下的培养条件相同)。

1.2 供体细胞系的建立与培养

选择健康高产的成年奶牛,将从卵巢中采集并检出的COCs用含0.1%双抗的无钙镁PBS清洗2遍,800~1000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5min,弃去上清后用含0.1%双抗的无钙镁PBS清洗2遍,显微镜下用巴氏管反复吹打COCs,使颗粒细胞和卵母细胞分离,吸出卵母细胞,然后加20%FBS的DMEM培养液悬浮后接种于培养瓶,放入37℃、5%CO₂最大饱和湿度的培养箱中培养。12h后观察,待细胞长至90%汇合时传代,每3d换液传代1次。

本试验供体细胞为传代培养6代的颗粒细胞,试验前用含5%FBS的DMEM饥饿处理7d后,用0.1%胰蛋白酶液消化供体细胞单层,挑选中等大小体积、恢复圆形的外表光滑的细胞作为供体细胞。

1.3 卵母细胞的去核

卵母细胞体外成熟18h后,用0.1%透明质酸酶处理去除颗粒细胞后,移入含 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 脱羧秋水仙碱(Demecolcine, DC)的成熟液中培养2h,挑选细胞质均一、第一极体刚突出胞质的卵母细胞,用0.5%链酶蛋白酶消化透明带5min,在体视显微镜下切除胞质突起部分,以去除卵母细胞核。

1.4 粘附与融合

切割去除细胞核的半卵,在 $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 植物凝集素(PHA)液滴中处理3~4s后,移入含有体细胞的液滴中一对一的粘附体细胞,然后置于融合液($0.27\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇+ $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl₂·2H₂O+ $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂·6H₂O+ $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hepes+0.01%PVA)中静置平衡后,分别用15、5、3V交流电压(AC)进行2个半卵的粘附。首先在融合槽内使体细胞-半卵复合体的排列方向与电极垂直,然后将另一个半卵粘附在复合体上,使其排列顺序为半卵-体细胞-半卵,并保证其排列方向与电极垂直。最后施以 $50\text{ V}\cdot\text{min}^{-1}$,9 μs ,1个脉冲的直流电(DC)对其进行电融合。观察在不同交流电压下2个半卵的融合率。

1.5 激活

将融合的重构胚移入含有 $5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ionomycin或者 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ A23187中作用5min,清洗2次,移入 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-DMAP中继续培养6h。

1.6 重构胚的培养

重构胚激活后移入mCR1aa液中进行体外培

养。重构胚培养同样采用微穴培养法(Well of wells, WOWs),每个 50 μL 培养滴内做 30~40 个微穴,每个微穴内放 1 个重构胚,微穴直径 200~300 μm ,深 150~300 μm 。重构胚培养 48 h 后换液,并检查卵裂率,6、7 和 8 d 检查囊胚发育情况,统计囊胚率。

1.7 数据统计与分析

试验数据以统计软件 SAS V8.0 的 ANOVA 过程进行分析,用 Duncan's multiple-range 检验方法判定处理间的差异显著性。

表 1 不同粘合交流电压(AC)对融合率的影响

Table 1 Effect of the different AC voltage on the fusion rate

交流电压/V AC voltage	重复次数 No. of replications	融合前半卵对数/对 No. of oocytes	融合后重构胚数/个 No. of reconstructed oocytes	融合率/% Fusion rate
15	3	86	48(16 \pm 7.9)	55.51 \pm 1.3 ^C
5	3	91	66(22 \pm 8.0)	72.17 \pm 1.9 ^B
3	3	111	105(35 \pm 14.9)	93.83 \pm 3.8 ^A

融合率=融合后重构胚数/融合前半卵的对数。同列不同字母表示不同组间差异显著($P<0.05$),下表同

The fusion rate=No. of reconstructed oocytes/(No. of oocytes \times 1/2). Values with different superscripts in a column have significant difference($P<0.05$), the same as below

2.2 不同激活方法对重构胚发育的影响

手工克隆奶牛无透明带核移植重构胚分别在 Ionomycin 和 A23187 激活后,在 mCR1aa 液中体外培养的分裂率和囊胚率见表 3、图 2 和图 3。结果表

2 结果

2.1 粘合交流电压对融合率的影响

半卵-供体细胞-半卵复合体分别在 15、5、3 V 交流电压(AC)粘附后,施以相同的直流电(DC)融合体外培养结果见表 1 和图 1。结果表明,随着粘合交流电压的降低卵母细胞的融合率逐渐提高,交流电压为 3 V 时,卵母细胞融合率(93.83 \pm 3.8)%显著高于其它 2 组($P<0.05$)。随后试验中的粘合交流电压均为 3 V。

明,A23187 激活组重构胚的分裂率(88.7 \pm 7.9)%和囊胚率(37.4 \pm 11.6)%显著高于 Ionomycin 组($P<0.05$)。

表 2 不同激活方法对牛无透明带核移植重构胚发育的影响

Table 2 Effect of different chemical activation methods on the developmental capacity of bovine reconstructed embryos *in vitro*

激活液 Activation media	重复次数 No. of replications	激活数/个 No. of oocytes	分裂数/分裂率/% No. of cleavage	囊胚数/囊胚率/% No. of blastocysts
Ionomycin	4	173	79/(43.6 \pm 10.8) ^B	16/(19.9 \pm 5.6) ^B
A23187	4	217	189/(88.7 \pm 7.9) ^A	71/(37.4 \pm 11.6) ^A

2.3 不同采集方法对卵母细胞回收的影响

真空蠕动泵抽吸法、注射器抽吸法和切割法 3 种牛卵母细胞采集方法对获得的卵母细胞数量的影响结果见表 3。采集到的卵母细胞通常分为 2 个等级,分别为 1~2 级 COCs(图 4 为放入成熟液中的 1~2 级 COCs,图 5 为成熟后颗粒细胞发生扩散的 1~2 级 COCs)和 3~4 级 COCs。其中的 1~2 级 COCs 为卵母细胞外层包裹 5 层以上致密颗粒细胞,是成熟较好的 COCs;而 3~4 级 COCs 则是卵母细胞外面包裹 5 层以下较稀薄颗粒细胞,是成熟较次的 COCs。结果表明,真空蠕动泵抽吸法和切

割法得到的 COCs 总数显著高于注射器抽吸法获得的 COCs 的总数($P<0.05$),但这 2 种采卵方法之间无显著差异($P>0.05$)。通过 3 种方法得到的 1~2 级 COCs 的数量之间均呈显著差异($P<0.05$),其中刀片切割法得到的 1~2 级 COCs 的数量最多。后 2 种方法平均每个卵巢能取 9 个 COCs,显著高于第 1 种方法($P<0.05$)。试验结果表明,真空蠕动泵抽吸法和切割法得到的 COCs 总数显著高于注射器抽吸法,而刀片切割法得到的 1~2 级 COCs 的数量显著多于真空蠕动泵抽吸法和注射器抽吸法。

表 3 不同采集方法对获得的卵母细胞数量的影响

Table 3 The effect of the different collective methods on the number of oocytes collected

采集方法 Collection method	重复次数 No. of replications	COCs 总数/个 Total No. of COCs	1-2 级 COCs 数/个 No. of grade 1-2 COCs	3-4 级 COCs 数/个 No. of grade 3-4 COCs	卵巢数量/个 No. of ovary
注射器抽吸 Syringe aspiration	3	658(219±9.5) ^B	259(86±3.5) ^C	399(133±9.7) ^{AB}	5.48 ^B
仪器抽吸 Negative-pressure aspiration	3	1080(360±13.1) ^A	624(208±4.4) ^B	456(152±16.4) ^A	9.00 ^A
刀片切割 Cutting method	3	1083(361±11.0) ^A	699(233±10.5) ^A	384(128±4.7) ^B	9.03 ^A

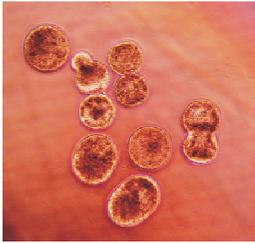


图 1 正在融合的细胞(100×)
Fig. 1 The fusing embryos(100×)



图 2 4-细胞期的胚胎(100×)
Fig. 2 4-cell embryo(100×)

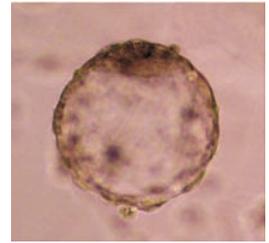


图 3 囊胚(200×)
Fig. 3 Blastocyst(200×)

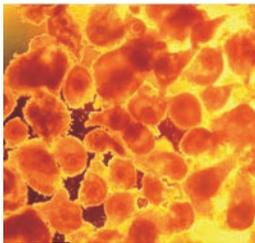


图 4 成熟前 COCs(40×)
Fig. 4 Immatured COCs(40×)

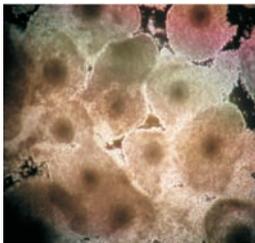


图 5 成熟后 COCs(40×)
Fig. 5 *In vitro* matured COCs(40×)

3 讨论

重构胚融合是核移植的关键步骤之一,由于供体细胞相对于受体卵细胞体积很小,常规去核后的卵周隙较大,体细胞注射后不容易和卵母细胞胞质贴合,可能会影响随后重构胚的融合。在常规克隆中,有透明带重构胚的融合率在 60%~80%^[9-11]。而无透明带半卵-供体细胞-半卵在粘合交流电压下能达到体细胞和卵母细胞胞质之间的完全接触,融合率较高,试验表明,无透明带 2 个半卵与体细胞间

的融合率可以达到 90% 以上^[4, 12-14]。但是,粘合交流电压的大小影响随后的融合效率。本研究结果表明,不同大小的交流电压均能使 2 个半卵粘合,但随着交流电压的降低,重构胚融合率上升,3 V 时融合率最高,这可能是较低的交流电压对卵母细胞的损伤较小。

目前常用化学激活方法激活牛重构胚,且组合激活方法效率较好。Wang 等^[15]采用 Ionomycin+6-DMAP 组合激活牛卵母细胞,其孤雌胚的分裂率较高(69.2%),刘春霞等^[16]用同样方法得到的卵裂率(72.3%)显著高于其它处理。但本研究用 A23187 与 6-DMAP 组合激活无透明带重构胚的分裂率显著高于 Ionomycin+6-DMAP 的组合,并获得较高的囊胚率。这可能与重构胚有无透明带有关,A23187+6-DMAP 组合可能更适用于无透明带牛胚胎的激活^[17]。

卵母细胞采集方法不仅影响从牛卵巢上采集的 COCs 数量,而且影响获得 1~2 级 COCs 的数量。郭宪等^[18]用注射器抽吸法从每个白牦牛卵巢中平均获得 4.7 个 COCs,叶荣等^[19]用同样方法得到的奶牛卵母细胞为 8.04 个/卵巢。而用刀片切割法切割卵巢表面皮质可获得高数量的 COCs,在山羊^[20]和猪^[21]也获得类似的结果。本研究中蠕动泵抽吸法和刀片切割法得到 COCs 总数多于注射器抽吸法,而刀片切割法得到的 1~2 级 COCs 数量显著高于蠕动泵抽吸法。但是刀片切割法所需时间较长,

切割出来的 COCs 长时间暴露在空气中,增加了污染的机会,液体中组织碎块较多,影响了体视镜下 COCs 的收集;蠕动泵抽吸法中 COCs 不与外界接触,降低了采卵过程中卵母细胞污染的可能性。另外,蠕动泵抽吸速度固定,与注射器抽吸相比降低了抽吸力量不稳定对卵母细胞的损伤。因此,蠕动泵抽吸法是采集 COCs 较好的方法。

4 结 论

本试验研究了粘合交流电压大小、不同激活方法和不同采集方法对牛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随着粘合交流电压的降低卵母细胞的融合率逐渐提高,而且在 2 V 时产生的吸附作用较差,因此选择 3 V 作为该试验的交流电压;②A23187+6-DMAP 组激活重构胚的分裂率和囊胚率显著高于 Ionomycin+6-DMAP 组;③真空蠕动泵抽吸法和切割法得到的 COCs 总数显著高于注射器抽吸法得到的 COCs 总数。

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] 程金华, 朱化彬, 戴蕴平, 等. 我国体细胞克隆牛的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26: 77-82.
- [3] PEURA T, LEWIS I, TROUNSON A. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, 50: 185-191.
- [4] VAJTA G, LEWIS I, HYTTTEL P, et al. Somatic cell cloning without micromanipulators[J]. *Cloning*, 2001, 3: 89-95.
- [5] TECIRLIOGLU R, FRENCH A, LEWIS I, et al. Birth of a cloned calf derived from a vitrified handmade cloned embryo[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2003, 15: 361-366.
- [6] 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: 1465-1472.
- [7] VAJTA G, PEURA T, HOLM P, et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, 55: 256-264.
- [8] DU Y, KRAGH P, ZHANG Y, et al. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation[J]. *Theriogenology*, 2007, 68: 1104-1110.
- [9] KATO Y, TANI T, TSUNODA Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2000, 120: 231-237.
- [10] DOMINKO T, RAMALHO-SANTOS J, CHAN A, et al. Optimization strategies for production of mammalian embryos by nuclear transfer [J]. *Cloning*, 1999, 1: 143-152.
- [11] WELLS D, MISICA P, TERVIT H. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells[J]. *Biology of Reproduction*, 1999, 60: 996-1005.
- [12] VAJTA G, LEWIS I, TROUNSON A, et al. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro* [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68: 571-578.
- [13] TECIRLIOGLU R, FRENCH A, LEWIS I, et al. Birth of a cloned calf derived from a vitrified handmade cloned embryo[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2004, 15: 361-366.
- [14] BOOTH P, HOLM P, VAJTA G, et al. Effect of two activation treatments and age of blastomere karyoplasts on *in vitro* development of bovine nuclear transfer embryos[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, 60: 377-383.
- [15] WANG Z G, YU S D, XU Z R. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos[J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105: 292-301.
- [16] 刘春霞, 王文龙, 周欢敏. 牛卵母细胞孤雌激活及马-牛异质克隆胚构建[J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28: 893-896.
- [17] PEURA T T, VAJTA G. A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer [J]. *Cloning and Stem Cells*, 2003, 5: 257-277.
- [18] 郭 宪, 阎 萍, 许保增, 等. 白牦牛卵母细胞的采集方法及卵巢贮存条件对其体外成熟的影响[J]. *畜牧兽医杂志*, 2006, 25(6): 13-15.
- [19] 叶 荣, 陈学进, 杨利国, 等. 牛卵母细胞的采集方法和卵巢贮存条件对其体外成熟的影响[J]. *苏州大学学报(自然科学版)*, 2004, 20(3): 78-82.
- [20] 王建锋, 张 勇, 赵兴绪. 不同采卵方式对绵羊卵母细胞质量、体外成熟及体外受精的影响[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(8): 51-54.
- [21] 陈晓宇, 刘 东, 李青旺, 等. 不同收集方法对猪卵母细胞体外成熟培养的影响[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2003, (1): 24-25.