

提高山羊卵丘细胞核移植效果的研究

李俊杰, 李俊, 孙洁, 桑润滋

(¹河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001; ²河北省牛羊胚胎工程技术研究中心, 河北保定 071001)

摘要: 【目的】提高山羊卵丘细胞核移植效果。【方法】采用秋水仙胺提高山羊卵母细胞去核率, 5-氮-2'-脱氧核苷(5-aza-dC)和曲古菌素 A (TSA) 影响山羊卵丘细胞核移植胚胎。【结果】0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 秋水仙胺处理山羊卵母细胞效果最好, 胞质突起率达 91.7% ($P < 0.05$); 通过比较盲吸去核法与化学辅助去核法的去核率及构建卵丘细胞核移植胚胎的体外发育能力发现, 化学辅助去核法的去核率达 100%, 所构建的重构胚体外发育能力较高, 桑椹胚率和囊胚率分别达 25.2% 和 13.1%, 显著高于盲吸去核法 ($P < 0.05$)。采用 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-aza-dC 处理山羊卵丘细胞, 核移植胚胎桑椹胚率和囊胚率分别达 30.4% 和 17.0%, 显著高于其它各组 ($P < 0.05$); 采用 400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA 处理山羊卵丘细胞, 核移植胚胎桑椹胚率、囊胚率分别达 31.5% 和 15.2%。【结论】化学辅助去核法的去核率显著高于盲吸去核法, 采用 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-aza-dC 或 400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA 处理山羊卵丘细胞, 效果最佳。

关键词: 山羊; 卵丘细胞; 核移植效果

Research on the Efficiency of Goat Cumulus Cell Nuclear Transfer Technique

LI Jun-jie, LI Jun, SUN Jie, SANG Run-zi

(¹College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei;

²The Research Center of Cattle and Sheep Embryonic Technique of Hebei Province, Baoding 071001, Hebei)

Abstract: 【Objective】 This study was performed to increase the efficiency of goat cumulus cell nuclear transfer. 【Method】 Based on the problem of low efficiency of goat somatic nuclear transplantation (SNT), the application of demecolcine was used to increase goat oocytes enucleation rate, the effects of 5-aza-dC and Trichostatin A (TSA) were also investigated when cumulus cells were treated with them on the development rate of goat cloned embryos. 【Result】 The optimum concentration of demecolcine for chemically assisted enucleation was 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the extrusion cones rate of goat oocytes was 91.67% ($P < 0.05$). Compared with blind enucleation method, the enucleation rate of demecolcine assisted-enucleation method was 100% and increased significantly ($P < 0.05$). Furthermore, the morula rate and blastula rate of cloned embryos reconstructed by demecolcine assisted-enucleation method were 25.23% and 13.08%, which were significantly higher than that of embryos reconstructed by blind enucleation method ($P < 0.05$). At the same time, it was found that the blastula rate and morula rate of goat cloned embryos reconstructed by cumulus cells treated with 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-aza-dC was 16.96% and 30.41%, which were extremely higher than that of other groups ($P < 0.05$). When the goat cloned embryos reconstructed by cumulus cells treated with 400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA, the rate of morula and blastula was 31.52% and 15.22%. 【Conclusion】 The enucleation rate of chemically assisted enucleation method was significantly higher than that of blind enucleation method. The effect of goat cloned embryos reconstructed by cumulus cells treated with 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-aza-dC or 400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA was the best.

Key words: goat; cumulus cell; nuclear transfer efficiency

收稿日期: 2008-09-12; 接受日期: 2009-01-07

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2005000200)

作者简介: 李俊杰 (1974—), 男, 河北易县人, 硕士, 研究方向为动物繁殖与胚胎工程。通信作者桑润滋 (1942—), 男, 河北滦南人, 教授, 研究方向为动物繁殖与胚胎工程。E-mail: rzsang@yahoo.com.cn

0 引言

【研究意义】自体细胞克隆羊“多莉”降生以来, 体细胞核移植技术对于动物育种、濒危动物保护、科学实验及发育生物学等基础理论问题的研究产生了深远影响, 但体细胞核移植的效率非常低, 只有低于 4% 的重构胚胎可发育成个体^[1]。本试验探索提高核移植效果的方法。【前人研究进展】核移植效率低, 主要体现在胚胎、胎儿或新生儿死亡率极高, 即使极少数可全程发育的个体也表现出超重、呼吸系统疾病等异常表型^[2]。影响体细胞核移植成功率的因素很多, 如去核、注核操作过程中卵母细胞的损伤和胞质的大量去除。Zakartchenko 等^[3]发现核移植时去除大量胞质后重构胚胎的体外发育能力明显下降。对克隆机理的研究表明: 在体细胞克隆中供体核的不完全重编程, 导致发育过程中具有重要作用的基因没有表达或异常表达, 是克隆效率低的主要原因^[4-7], 而供体核染色质 DNA 甲基化及核小体组蛋白乙酰化是两大重编程机制^[8], DNA 甲基化水平较低的体细胞用作核供体时克隆效率较高^[9-10], 组蛋白去乙酰化抑制剂-曲古菌素 A (TSA) 能够提高克隆猪供体细胞基因组的组蛋白乙酰化水平和克隆胚胎的囊胚发育率, 并用此方法得到了足孕的成活克隆猪^[11]。【本研究切入点】本试验从秋水仙胺化学辅助去核提高卵母细胞去核效率、5-氮-2'-脱氧核苷和 TSA 促进核移植胚胎的重编程等方面开展研究。【拟解决的关键问题】确定秋水仙胺处理山羊卵母细胞、5-aza-dC 和 TSA 处理山羊卵丘细胞的最佳剂量, 完善山羊体细胞核移植的技术体系, 提高山羊体细胞核移植效率。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与操作液

本试验所用试剂除非特殊说明均购自 Sigma 公司。TCM199 液体 (Gibco, 批号 1193387); 秋水仙胺 (D-1925); 5-氮-2'-脱氧核苷 (5-aza-dC, A-3656); TSA (T8552); DPBS (Gibco, D-8662); BSA (A-6003); 胎牛血清 (杭州四季青, 批号 20010512); FSH (日本, 批号 203221); LH (宁波市激素制品有限公司, 批号 030901); β -巯基乙醇 (E2758); L-谷氨酰胺 (G7513); 透明质酸酶 (H-3506)。

1.1.1 山羊采卵液 TCM199 +5 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ +10 mmol·L⁻¹ HEPES+10 mmol·L⁻¹ HEPES-Na +0.01 g·L⁻¹ 肝素钠+10 ml·L⁻¹ FBS +0.065 g·L⁻¹ 青霉素+0.05

g·L⁻¹ 链霉素;

1.1.2 卵母细胞成熟培养液 TCM199+10%FCS (v:v) +10 μ g·ml⁻¹ FSH+10 μ g·ml⁻¹ LH +1 μ g·ml⁻¹ E₂+20 ng·ml⁻¹ EGF;

1.1.3 去核操作液 DPBS+1% FCS;

1.1.4 卵母细胞化学去核前处理液 操作液+秋水仙胺;

1.1.5 电融合液 0.3 mmol·L⁻¹ D-甘露醇+0.05 mmol·L⁻¹ CaCl₂+0.1 mmol·L⁻¹ MgSO₄;

1.1.6 离子霉素激活液 操作液+2.5 μ mol·L⁻¹ 离子霉素;

1.1.7 6-DMAP 激活液 操作液+2 mmol·L⁻¹ 6-DMAP;

1.1.8 卵丘细胞培养液 DMEM +10% FCS;

1.1.9 克隆胚胎发育液 SOF+1% NEAA+1% EAA +10 ng·ml⁻¹ EGF+1 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺+ 8 mg·ml⁻¹ BSA。

1.2 卵母细胞的采集和体外成熟

从屠宰场采集山羊卵巢, 立即放入盛有灭菌并预热至 30℃ 的生理盐水 (含双抗) 的保温瓶中迅速运回实验室。将卵巢用 30℃ 生理盐水冲洗 2~3 次, 切割卵巢表面卵泡, 收集卵丘卵母细胞复合体 (COC), 选取卵丘细胞层完整、致密, 卵母细胞胞质均匀的 COC, 用采卵液清洗 3~4 次后于 38.7℃、5% CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱 (MCO-15AC, 日本) 培养。

1.3 供体卵丘细胞准备

将成熟卵母细胞用透明质酸酶消化, 收集脱落的卵丘细胞于 1.5 ml 离心管中离心弃上清, 加入含 10% FCS 的 DMEM 培养液离心洗涤, 重悬浮后分到 96 孔板培养。

1.3.1 应用 5-氮-2'-脱氧核苷 (5-aza-dC) 处理 将卵丘细胞分别于含 0、0.005、0.01、0.02 μ mol·L⁻¹ 浓度的 5-aza-dC 的 0.5% FCS 的 DMEM 培养 19 h, 条件为 38.5℃、5% CO₂、饱和湿度。使用前用 0.5% 胰蛋白酶消化处理 2~3 min, 用移液枪吹打成单个细胞。

1.3.2 应用曲古菌素 A (TSA) 处理 将卵丘细胞分别于含 0、100、200、400、1 000 nmol·L⁻¹ 浓度的 TSA 的 0.5% FCS 的 DMEM 培养 19 h, 其它操作同上。

1.4 卵母细胞的去核与注核

卵母细胞体外成熟 19 h 后取出 COC 置于含 0.1% 透明质酸酶的操作液中, 用口径略大于卵母细胞直径

的玻璃管反复吹打除去周围的卵丘细胞。挑选具有完整第一极体的卵母细胞移入到含秋水仙胺的操作液中处理 30 min, 选择具胞质突起的卵母细胞置于操作液中, 去除第一极体及突起的胞质(图 1, 图 2)。随机挑选去核后的卵母细胞用 $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Hoechst33342 染色 15 min 后在荧光显微镜下观察去核结果, 以有无蓝色亮点作为去核完全与否的标志, 统计去核率(图 3, 图 4); 卵丘细胞用 0.5%胰蛋白酶消化处理 2~3 min 后加入含血清的培养液中中止消化, 离心弃上清加入操作液重悬, 挑选大小适中、表面光滑的卵丘细胞, 将



图 1 秋水仙胺处理后的山羊卵母细胞形成胞质突起 ($\times 200$)

Fig. 1 Extrusion cones were found in the goat oocyte after treatment with demecolcine ($\times 200$)

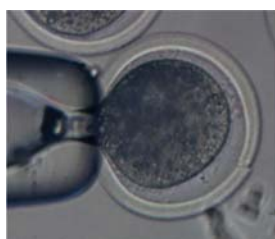


图 2 去核后的山羊卵母细胞 ($\times 320$)

Fig. 2 Enucleated goat oocyte ($\times 320$)

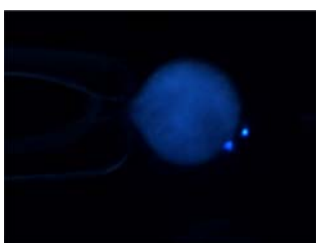


图 3 Hoechst33342 荧光染色判断染色体突起中 ($\times 200$)

Fig. 3 Chromatin was in the protrusions as confirmed by Hoechst 33342 staining ($\times 200$)

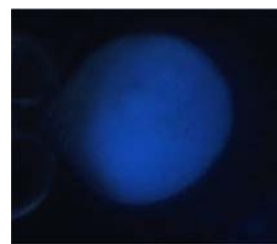


图 4 Hoechst33342 荧光染色判断去核结果 ($\times 320$)

Fig. 4 The result of enucleation was confirmed by Hoechst 33342 staining ($\times 320$)

其注入到胞质质膜与透明带之间, 使供体细胞膜与受体胞质膜紧密接触。

1.5 卵母细胞胞质与供体卵丘细胞的融合

去核卵母细胞胞质与卵丘细胞在电融合液中平衡 1~2 min 后, 移到充满融合液的电融合槽中, 使细胞接触面与场强方向垂直。融合条件为 1.25 kV/cm, 40 μs , 2 DC。电刺激后用操作液将复合体清洗数次后置于预先平衡好的发育液中于 38.5 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度的二氧化碳培养箱内培养 30 min 后观察融合结果。

1.6 核移植后卵母细胞的激活及处理

采用离子霉素+6-DMAP 联合激活法。将融合后的胚胎在 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 离子霉素中放置 5 min, 清洗 6~7 遍后, 放入 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-DMAP 中培养 2 h。

1.7 克隆胚胎的培养

克隆胚胎在添加 5-aza-dC 的发育液中培养。培养过程中每 48 h 半量换液。依据卵丘细胞和重构胚胎是否用 5-aza-dC 处理分为 4 组, 第 I 组供体卵丘细胞及激活后的重构胚均未用 5-aza-dC 处理; 第 II 组供体卵丘细胞用 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-aza-dC 处理, 而激活后的重构胚未用 5-aza-dC 处理; 第 III 组供体卵丘细胞未用 5-aza-dC 处理, 而激活后的重构胚用 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-aza-dC 处理; 第 IV 组供体卵丘细胞及激活后的重构胚均用 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-aza-dC 处理。

1.8 统计分析

以统计分析软件 SPSS10.0 的 ANOVA 进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同浓度秋水仙胺对卵母细胞形成突起的影响

由表 1 可知, 以 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 秋水仙胺处理山羊卵母细胞 0.5 h 后形成突起的效果最佳, 为 91.7%, 显著

表 1 不同浓度秋水仙胺处理山羊卵母细胞 0.5 h 后形成突起的情况

Table 1 Percentage of oocytes with extrusion cones at different concentrations of demecolcine

秋水仙胺 Demecolcine ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	处理卵母 细胞数 No. oocytes	具胞质突起的 卵母细胞数 No. oocytes with extrusion cones	突起率 Percentage of oocytes with extrusion cones(%)
0	108	22	20.4±1.6C
0.3	112	78	69.6±2.1B
0.5	120	110	91.7±2.3A
0.8	116	97	83.6±1.9AB
1.0	113	81	71.7±1.6B

同列标不同大写字母者差异极显著 ($P<0.01$), 标不同小写字母者差异显著 ($P<0.05$), 标相同字母者差异不显著, 下同
Means with the different capital letters within the same column differ significantly ($P<0.01$), means with the different lowercase letters within the same column differ significantly ($P<0.05$), means with the same letters within the same column do not differ ($P>0.05$). The same as below

表 2 不同去核方法对山羊卵母细胞去核率及核移植胚胎体外发育的影响

Table 2 Enucleation rate of goat oocytes and development rate of goat cumulus cell nuclear transferred embryos by different kinds of enucleation methods

去核方法 Methods of enucleation	卵母细胞数 No. oocytes	去核卵母细胞数(率) No. enucleated oocytes (rate, %)	胚胎融合数(率) No. embryos reconstructed (rate, %)	卵裂胚胎数(率) No. embryos cleaved (rate, %)	桑椹胚数(率) No. morula (rate, %)	囊胚数(率) No. blastocyst (rate, %)
盲吸去核法 Blind enucleation method	165	144(87.3±2.6) b	91(55.2±1.2)	69(75.8±2.2)	14(15.4±1.5)b	7(7.7±1.3) b
化学辅助去核法 Chemical induced enucleation method	169	169(100.0±0.0) a	107(63.3±1.8)	89(83.2±1.6)	27(25.2±1.1) a	14(13.1±1.1) a

表 3 不同浓度 5-aza-dC 培养山羊卵丘细胞对核移植胚胎体外发育的影响

Table 3 Development rate of embryos cloned from donor cells treated with 5-aza-dC

5-aza-dC ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	培养胚胎数 No. embryos fused	卵裂胚胎数(率) No. embryos cleaved (rate, %)	桑椹胚数(率) No. morula(rate, %)	囊胚数(率) No. blastocyst(rate, %)
0	153	116(75.8±3.1)	35(22.9±1.9)b	18(10.8±1.2)b
0.005	112	81(72.3±2.7)	23(20.5±2.1)b	12(10.7±1.8)b
0.01	171	126(73.7±2.1)	52(30.4±1.7)a	29(17.0±1.2)a
0.02	92	70(76.1±2.6)	19(20.7±1.6)b	9(9.8±1.1)b

率分别为 30.4%和 17.0%, 显著高于其它组 ($P<0.05$); 各组间的卵裂率差异不显著 ($P>0.05$)。

2.4 5-aza-dC 不同处理组合对核移植胚胎体外发育的影响

由表 4 可知, 第 II 组、第 III 组、第 IV 组的桑椹胚率和囊胚率显著高于第 I 组 ($P<0.05$), 这 3 个组合间的桑椹胚率和囊胚率差异不显著 ($P>0.05$)。

高于 0.3、1.0、0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 秋水仙胺浓度 ($P<0.01$), 但与 0.8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 组相比差异不显著 ($P>0.05$)。

2.2 不同去核方法对山羊卵母细胞去核率的影响

结果见表 2。利用盲吸去核法的去核率为 87.3%, 利用 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 秋水仙胺化学辅助去核法去核率可达 100%, 差异显著 ($P<0.05$)。利用化学辅助去核法得到的胚胎融合率、卵裂率、桑椹胚率和囊胚率分别为 63.3%、83.2%、25.2%和 13.1%, 高于盲吸去核法, 且桑椹胚率和囊胚率二者差异显著 ($P<0.05$)。因此化学辅助去核法的去核率和胚胎体外发育率显著高于盲吸去核法。

2.3 不同浓度 5-aza-dC 培养卵丘细胞对核移植胚胎体外发育的影响

由表 3 可知, 在体细胞培养液中分别加入不同浓度的 5-aza-dC, 0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的桑椹胚率与囊胚

2.5 不同浓度 TSA 处理山羊卵丘细胞对核移植胚胎体外发育的影响

由表 5 可知 400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA 处理组的胚胎卵裂率、桑椹胚率、囊胚率均处于最高水平, 分别为 85.9%、31.5%和 15.2%, 并且桑椹胚率显著高于 200、300、500 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 ($P<0.05$), 与 500 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组差异不显著 ($P>0.05$); 囊胚率显著高于 200、600 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

表 4 5-aza-dC 不同组合对核移植胚胎体外发育的影响

Table 4 Development rate of embryos treated with different combinations of $0.01\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-aza-dC

组别 Group	5-aza-dC ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	培养胚胎数 No. embryos fused	卵裂胚胎数(率) No. embryos cleaved (rate, %)	桑椹胚数(率) No. morula (rate, %)	囊胚数(率) No. blastocyst (rate, %)
I	0+0	109	80(73.4±3.1)	22(20.2±1.5)b	11(10.1±1.3)b
II	5-aza-dC+0	104	76(73.1±2.7)	29(27.9±1.8)a	18(17.3±1.6)a
III	0+5-aza-dC	113	81(71.7±2.2)	31(27.4±2.1)a	19(16.8±1.6)a
IV	5-aza-dC+5-aza-dC	112	85(75.9±2.6)	35(31.3±1.6)a	21(18.8±1.2)a

表 5 不同浓度 TSA 处理山羊卵丘细胞 19 h 对核移植后胚胎体外发育的影响

Table 5 *In vitro* development rate of goat NT embryos reconstructed by cumulus cells treated with different concentrations of TSA for 19 h

TSA 浓度 TSA ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	融合胚胎数 No. embryos cloned	卵裂胚胎数(率) No. embryos cleaved (rate, %)	桑椹胚数(率) No. morula (rate, %)	囊胚数(率) No. blastocyst (rate, %)
200	164	136 (82.9±3.2)	34 (20.7±1.8)b	12 (7.3±1.2)b
300	140	116 (82.9±2.7)	32 (22.9±1.3)b	16 (11.4±1.7)ab
400	184	158 (85.9±3.0)	58 (31.5±1.2)a	28 (15.2±1.1)a
500	192	160 (83.3±2.1)	50 (26.0±1.9)ab	22 (11.5±2.0)ab
600	144	116 (80.6±2.6)	28 (19.4±2.2)b	10 (6.9±1.6)b

组 ($P<0.05$), 与 300、500 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 秋水仙胺对山羊卵母细胞去核效果的影响

3.1.1 秋水仙胺化学辅助去核法的机理 秋水仙胺是一种破坏微管稳定的药物, 在破坏纺锤体结构的同时强化将来参与第二极体排出的微丝的作用, 使这部分微丝聚集而形成收缩环, 进而导致纺锤体胞质形成突起。本试验发现 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 秋水仙胺处理体外成熟山羊卵母细胞 0.5 h 后胞质突起率最高, 荧光染色后判断突起为卵母细胞染色体, 将卵母细胞第一极体及其附近的突起去除, 可将卵母细胞的核完全去除。

3.1.2 盲吸去核与秋水仙胺化学去核的比较 盲吸去核法是利用第一极体刚排出或排出后不久, 染色体就在极体附近的原理, 吸取极体附近部分胞质以去除细胞核。缺点是去核率受卵母细胞老化时间限制。一般认为在卵母细胞刚排出第一极体时, 极体与染色体相对位置较近, 此时去核率较高; 而卵母细胞老化一段时间后由于极体与染色体之间的相对位置较远, 此时利用盲吸去核法就不能去掉卵母细胞的染色体组^[12], 而且即使是在卵母细胞刚排出第一极体不久进行去核, 去核率也不能达到 100%, 此外盲吸去核法还需去除 25%左右的胞质, 影响了克隆胚胎的体外发

育能力^[13], Zakartchenko 等^[3]报道移植时去除大量的胞质后重构胚胎体外发育能力明显下降。化学辅助去核法可使核区在卵母细胞膜表面形成突起, 在此指示下进行去核所去除的胞质量很少, 从而可使供体细胞与受体卵母细胞质膜接触紧密, 有利于重构胚胎的融合, 对后续发育有利。研究证实化学辅助去核已应用于牛^[14]、猪^[15]、羊^[16]的体细胞克隆并得到了较高的去核率和囊胚发育率。Vajta 等^[17]发现牛卵母细胞在 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 秋水仙胺中培养 2 h, 形成突起的效率是 94%, 去核率为 98%, 重构胚囊胚发育率为 48%。本试验结果表明, 化学辅助去核法去核率可达 100%, 显著高于盲吸去核法。另外, 利用化学辅助去核法得到的胚胎融合率、卵裂率、桑椹胚率和囊胚率均高于盲吸去核法, 且桑椹胚率和囊胚率显著高于盲吸去核法。因此应用化学辅助去核法构建山羊卵丘细胞核移植胚胎的去核率、桑椹胚率和囊胚率显著高于盲吸去核法构建的重构胚胎。

3.2 5-aza-dC 对山羊卵丘细胞核移植效果的影响

3.2.1 5-aza-dC 对体细胞的影响 脱氧胞嘧啶类似物 5-aza-dC 被广泛用作 DNA 甲基化抑制剂, 以促进基因表达和细胞分化。DNA 甲基化对于哺乳动物的发育至关重要^[18], 一般甲基化水平较低的体细胞克隆效率较高, 而异常的 DNA 甲基化模式可能导致低质量克隆胚胎的出现, 并有可能影响动物的成功克隆^[19-20]。

Enright 等^[21]用 5-aza-dC 处理供体, 发现 $0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-aza-dC 可显著提高牛重构胚的融合率, 卵裂率和囊胚率也有所提高。本试验中使用 $0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-aza-dC 处理山羊卵丘细胞后, 桑椹胚率和囊胚率显著提高, 这是因为 5-aza-dC 处理卵丘细胞后, 抑制卵丘细胞中 DNA 甲基转移酶活性, 从而使已分化的卵丘细胞基因组甲基化水平降低, 同时使其处于 G0/G1 期, 这样卵丘细胞在移入去核的卵母细胞后, 胞质能够对卵丘细胞进行有效的重编程, 从而提高了体细胞核移植胚胎的发育能力。

3.2.2 5-aza-dC 对核移植重构胚发育能力的影响 由于体细胞和生殖细胞之间的表观遗传学差异, 使体细胞核对卵母细胞胞质的反应不同, 从而影响重构胚后续发育。也就是说, 正常受精时出现的雌原核和雄原核高度协调的去甲基化过程可能未在核移植重构胚中出现。Dean 等^[22]报道核移植牛桑椹胚处于细胞分裂中期的细胞核出现了较高的甲基化水平。Beaujean 等^[23]发现绵羊成纤维细胞核移植胚胎的 2-胞期~8-胞期染色体显示出过高的甲基化水平。表明体细胞核移植中供体细胞重编程不充分, 影响了核移植效率。本试验发现, 利用 5-aza-dC 分别处理卵丘细胞和重构胚以及二者均用 5-aza-dC 处理, 桑椹胚率和囊胚率显著高于不用 5-aza-dC 的处理组, 这主要是因为 5-aza-dC 的加入, 降低了重构胚的 DNA 甲基化水平, 提高了体细胞核移植胚胎的发育能力。

3.3 TSA 对山羊卵丘细胞核移植效果的影响

在真核基因组的整体表达方面, 组蛋白乙酰化发挥着极为重要的作用, 而克隆动物普遍存在着组蛋白乙酰化水平不足等表观重编程缺陷。组蛋白去乙酰化抑制剂—TSA 可使核小体组蛋白乙酰化水平升高、染色体结构松弛, 有利于转录因子的结合, 促使基因表达^[24]。Geiman 等^[25]发现, TSA 处理不仅可以提高组蛋白乙酰化水平, 还可刺激 DNA 发生去甲基化过程。研究表明, 利用 TSA 处理供体牛^[26]、绵羊^[27]、猪^[11]、鼠^[28]体细胞均可增加核的组蛋白乙酰化水平, 提高重构胚胎的囊胚发育率。本试验用 TSA 处理山羊卵丘细胞, 发现 $400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA 处理卵丘细胞 19 h 可提高重构胚胎的体外发育能力, 桑椹胚及囊胚发育率明显提高, 因此 $400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA 可改变山羊卵丘细胞的表观遗传状态, 提高核移植效率。

4 结论

4.1 以 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 秋水仙胺处理山羊卵母细胞效果

最好, 并且添加秋水仙胺的化学辅助去核法的去核率显著高于盲吸去核法;

4.2 采用 $0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-aza-dC 或采用 $400 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA 处理山羊卵丘细胞, 效果最佳。

References

- [1] Wilmut I, Beaujean N, De sousa P A, Dinnyes A, King T J, Paterson L A, Wells D N, Young L E. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2002, 419: 583-586.
- [2] Li S, Li Y, Du W, Zhang L, Yu S, Dai Y, Zhao C, Li N. Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. *Biology of Reproduction*, 2005, 72: 258-265.
- [3] Zakhartchenko V, Stoikovic M, Brem G, Wolf E. Karyoplast-cytoplast volume ratio in bovine nuclear transfer embryos: effect on developmental potential. *Molecular Reproduction and Development*, 1997, 48: 332-338.
- [4] Danials R, Hall V, Trounson A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulose cell nuclei. *Biology of Reproduction*, 2000, 63: 1034-1040.
- [5] Hiiragi T, Solter D. Reprogramming is essential in nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 2005, 70: 417-421.
- [6] Vassena R, Han Z, Gao S, Baldwin D A, Schultz R M, Latham K E. Tough beginnings: Alterations in the transcriptome of cloned embryos during the first two cell cycles. *Developmental Biology*, 2007, 304: 75-89.
- [7] Eilertsen K J, Power R A, Harkins L L, Misica P. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science*, 2007, 98: 129-146.
- [8] Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*, 2004, 147: 643-651.
- [9] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, Kind A J, Campbell K H S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-813.
- [10] Lucifero D, Suzuki J, Bordignon V, Martel J, Vigneault C, Therrien J, Filion F, Smith L C, Trasler J M. Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 *in vitro*-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biology of Reproduction*, 2006, 75(4): 531-538.
- [11] Li J, Svarcova O, Villemoes K, Kragh P M, Schmidt M, Bøgh I B, Zhang Y, Du Y, Lin L, Purup S, Xue Q, Bolund L, Yang H, Maddox-Hyttel P, Vajta G. High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*, 2008, 70: 800-808.

- [12] Miao Y L, Ma S F, Liu X Y, Miao D Q, Chang Z L, Luo M J, Tan J H. Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 2004, 69: 66-76.
- [13] Bordignon V, Smith L C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, 49: 29-36.
- [14] Li G P, Bunch T D, White K L, Aston K I, Meerdo L N, Pate B J, Sessions B R. Development, chromosomal composition, and cell allocation of bovine cloned blastocyst derived from chemically assisted enucleation and cultured in conditioned media. *Molecular Reproduction and Development*, 2004, 68: 189-197.
- [15] Li J, Du Y, Zhang Y H, Kragh P M, Purup S, Bolund L, Yang H, Xue Q Z, Vajta G. Chemically assisted handmade enucleation of porcine oocytes. *Cloning and Stem Cells*, 2006, 8: 241-250.
- [16] Lan G C, Wu Y G, Han D, Ge L, Liu Y, Wang H L, Wang J Z, Tan J H. Demecolcine-assisted enucleation of goat oocytes: Protocol optimization, mechanism investigation, and application to improve the developmental potential of cloned embryos. *Cloning and Stem Cells*, 2008, 10(2): 189-201.
- [17] Vajta G, Hyttel P M, Christina T S, Tecirlioglu R T, Peura T T, Lai L X, Murphy C N, Prather R S, Kragh P M, Callesen H. Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 2005, 17: 791-797.
- [18] Siedlecki P, Zielenkiewicz P. Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochimica Polonica*, 2006, 53: 245-256.
- [19] Yang J, Yang S, Beaujean N, Niu Y, He X, Xie Y, Tang X, Wang L, Zhou Q, Ji W. Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: comparison with counterparts produced *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 2007, 76(1): 36-42.
- [20] Brelloch B, Wang Z, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells*, 2006, 24: 2007-2013.
- [21] Enright B P, Sung L Y, Chang C C, Yang X, Tian X C. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-Deoxycytidine. *Biology of Reproduction*, 2005, 72: 944-948.
- [22] Dean W, Santoa F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 13734-13738.
- [23] Beaujean N, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 2004, 71: 185-193.
- [24] Wee G, Koo D B, Song B S, Kim J S, Kang M J, Moon S J, Kang Y K, Lee K K, Han Y M. Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatin in cloned embryos. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 6048-6057.
- [25] Geiman T M, Robertson K D. Chromatin remodelling, histone modifications and DNA methylation- How does it all fit together. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2002, 87: 117-125.
- [26] Enright B P, Jeong B S, Yang X, Tian X C. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. *Biology of Reproduction*, 2003, 69: 1525-1530.
- [27] Tang L S, Wang Q, Xiong B, Hou Y, Zhang Y Z, Sun Q Y, Wang S Y. Dynamic changes in histone acetylation during sheep oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Development*, 2007, 53: 555-561.
- [28] Li X, Kato Y, Tsuji Y, Tsunoda Y. The effects of trichostatin A on mRNA expression of chromatin structure-, DNA methylation-, and development-related genes in cloned mouse blastocysts. *Cloning and Stem Cells*, 2008, 10(1): 133-142.

(责任编辑 林鉴非)