

# 受体母猪排卵状况对体细胞克隆胚胎移植效率的影响

罗学明<sup>1,2</sup>, 张卫红<sup>1,2</sup>, 冯冲<sup>2</sup>, 龙川<sup>2</sup>, 闫军<sup>2</sup>,  
赵会静<sup>2</sup>, 张兆旺<sup>1</sup>, 张子军<sup>1,3</sup>, 潘登科<sup>1,2\*</sup>

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院 甘肃省草食动物生物技术重点实验室, 兰州 730070;  
2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业部畜禽遗传资源与利用重点开放实验室, 北京 100193;  
3. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

**摘要:** 为了确定猪体细胞克隆胚胎的受体母猪最佳发情阶段, 本研究比较了供受体同期化方案对猪体细胞克隆胚胎输卵管内移植后 30 d 受胎率和妊娠足月率的影响。将体外培养 2 d 的猪体细胞克隆胚胎, 移植到发情第 1~2 天的受体母猪。根据受体母猪卵泡发育与排卵状况将受体猪群分为 2 个类别: 卵泡发育处于即将排卵或正在排卵阶段(组一); 卵泡发育处于排卵前阶段或完全排卵阶段(组二)。结果发现: (1) 组一 6 头受体母猪胚胎移植后 30 d 受胎率为 100%; 而组二 10 头受体母猪受胎率为 40%, 二者差异显著( $P < 0.05$ )。 (2) 组一 6 头受体母猪全部产仔, 妊娠足月率为 100%; 组二 10 头受体母猪 2 头产仔, 妊娠足月率为 20%, 二者差异极显著( $P < 0.01$ )。以上结果表明: 体外培养 2 d 的猪体细胞克隆胚胎发育阶段与即将排卵或正在排卵的受体母猪的子宫环境同期性最好, 得到了理想的胚胎移植效率。

**关键词:** 猪体细胞克隆; 胚胎移植; 排卵状况; 受胎率; 妊娠足月率

中图分类号: S828.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0366-05

## Effect of Ovulation Status on Efficiency of the Transplant in Recipient Gilts Transferred with Somatic Cloned Embryos

LUO Xue-ming<sup>1,2</sup>, ZHANG Wei-hong<sup>1,2</sup>, FENG Chong<sup>2</sup>, LONG Chuan<sup>2</sup>, YAN Jun<sup>2</sup>,  
ZHAO Hui-jing<sup>2</sup>, ZHANG Zhao-wang<sup>1</sup>, ZHANG Zi-jun<sup>1,3</sup>, PAN Deng-ke<sup>1,2\*</sup>

(1. *Gansu Key Laboratory of Herbivorous Animal Biotechnology, College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China*; 2. *The Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*; 3. *College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China*)

**Abstract:** In this study, the effect of different ovulation status on pregnancy rates in surrogate recipient gilts receiving somatic nuclear transfer embryos was evaluated, in order to determine the optimal stage of the estrus cycle to achieve the highest pregnancy rates. Porcine somatic cell cloned embryos on 2 d *in vitro* were transplanted into the 1-2 d estrous recipient gilts. Recipient gilts were divided into two categories according to follicular development and ovulation status: just prior to ovulation or ovulating (Group 1); per-ovulation or after ovulation (Group 2). The results were as follows: (1) pregnancy rate on 30 d of six recipient gilts from Group 1 was 100%;

收稿日期: 2009-03-03

基金项目: 国家“863”项目(2008AA101003)资助

作者简介: 罗学明(1983-), 男, 山西运城人, 硕士生, 主要从事猪胚胎生物技术研究, E-mail: luoxm521@126.com; 张卫红(1981-), 男, 山西运城人, 硕士生, 主要从事猪胚胎生物技术研究, E-mail: sxjszwh@163.com, 二者并列为第一作者

\* 通讯作者: 潘登科, E-mail: pandengke@yahoo.com.cn

and the pregnancy rate on 30 d of ten recipient gilts from Group 2 was 40%, the data significantly different between Group 1 and Group 2 ( $P < 0.05$ ); (2) For the full-term pregnancy rate of recipient gilts, extremely significant difference was observed between Group 1 and Group 2 (100% vs. 20%,  $P < 0.01$ ). These results suggested that development stage of porcine somatic cloning embryos on 2 d *in vitro* with recipient gilt's womb environment of ovulation status of just prior to ovulation or ovulating was the best in the same period. It may achieve the best efficiency of embryo transfer.

**Key words:** porcine somatic cloning; embryo transfer; ovulation status; pregnancy rate; full-term pregnancy rate

体细胞克隆猪已经在多个国家和地区相继获得成功<sup>[1-3]</sup>,但克隆效率(产仔数/移植胚胎)还较低,移植到每头受体猪子宫或输卵管的克隆胚胎数目一般都在 100 枚以上<sup>[4-6]</sup>,但仅有 1% 的移植胚胎能发育成新生个体,少数几个实验室的效率稍高于 1%<sup>[7-9]</sup>,这严重制约着体细胞克隆猪的实际应用。

影响猪体细胞克隆效率的因素很多,胚胎移植效率低是主要因素之一。猪体细胞克隆胚胎移植后的受胎率从 29%~100% 不等<sup>[2]</sup>,一般在 30%~50%。移植的胚胎发育阶段与受体母猪子宫或输卵管发育阶段的不匹配,是导致胚胎着床失败的主要因素。为提高猪体细胞克隆胚胎移植效率,本研究比较了供受体同期化方案对体细胞克隆胚胎输卵管内移植后受胎率和妊娠足月率的影响。同时对受体母猪卵泡发育阶段与克隆胚胎移植效率之间的关系进行了分析,以期为提高猪体细胞克隆胚胎移植效率提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

除特别注释外,所有化学试剂均购自 Sigma 公司;卵母细胞体外成熟以及胚胎培养耗材分别为 NUNC 和 Greiner (German)公司产品;受体母猪为 7~8 月龄、体质量 150 kg 左右、膘情适中的纯种大白猪。

### 1.2 主要溶液

抽卵液为无钙的杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)添加 0.1% (质量体积比)聚乙烯醇(Polyvinylpyrrolidone, PVA)配成;卵母细胞体外成熟液为无牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的北卡罗林纳州大学 23 培养液(North Carolina State University-23, NCSU-23)添加 10% (体积比)猪卵泡液(Porcine follicular fluid, pFF),  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF),  $10 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  人绒毛膜促性

腺激素(Human chorionic gonadotropin, hCG)和  $10 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  孕马血清促性腺激素(Pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG);融合/激活液由  $0.28 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘露醇、 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钙、 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸镁、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  N-2 羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)以及 0.01% PVA 组成;胚胎培养液为猪合子培养基(PZM) + 0.3% BSA; 0.1% 透明质酸酶。

### 1.3 试验方法

1.3.1 猪卵母细胞体外成熟(*In vitro* maturation, IVM) 从屠宰场取初情期前母猪卵巢,放入  $30 \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$  含青霉素和硫酸链霉素的生理盐水中,2 h 内运回实验室。用配有 18 G 针头的 20 mL 注射器抽吸卵巢上直径 3~6 mm 的卵泡,经 PVA-DPBS 洗涤 3 遍后挑选卵丘包裹 3 层以上,致密且胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(COCs),再用 IVM 培养液洗涤 3 遍。将洗涤好的 COCs 转入 IVM 培养液中培养。COCs 在  $39 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 100% 湿度的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 40~42 h 后,用 0.1% 透明质酸酶脱去卵丘细胞,挑选排出第一极体且卵黄膜完整、卵周隙明显的卵母细胞<sup>[3]</sup>。

1.3.2 体细胞核移植显微操作 利用盲吸法进行成熟卵母细胞去核,即在直径 60 mm 培养皿盖中央做一个矩形的  $50 \mu\text{L}$  显微操作液滴,再用矿物油覆盖。把猪胎儿成纤维细胞和成熟卵母细胞同时转入其中于  $39 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 100% 湿度培养箱平衡 15 min,然后在装配有显微操作仪及恒温台的倒置显微镜上用固定吸管吸持卵母细胞,用内径  $15 \sim 25 \mu\text{m}$  的去核/注射针使第一极体处于钟表 01:00 点钟位置,接着从 03:00 点钟处进针,吸取第一极体及其临近 10%~20% 可能含有卵母细胞核的胞质。挑选直径  $15 \sim 20 \mu\text{m}$ 、折光性强、圆形光滑的体细胞,从去核切口放入卵周隙,用注射针点压透明带,使供体细胞与受体卵的胞膜接触紧密。每批操作

30~40 个卵母细胞, 结束后将重构卵转移到 HEPES 缓冲的 NCSU-23 中, 在 39 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 湿度培养箱中恢复 1.5 h。

**1.3.3 重构卵融合与激活** 将恢复好的重构卵分批转移到融合液中平衡 1 min, 洗涤 3 遍后, 每批 5 个放入已经铺满融合液的融合槽内(美国 BTX), 使供体细胞—受体卵细胞膜接触面与电极平行, 用 ECM 2001 融合仪(美国 BTX)施加一个 30 μs、2.0 kV·cm<sup>-1</sup> 的直流电脉冲诱导融合同时激活, 再用 PZM-3 洗涤 3 遍, 立即转入矿物油覆盖的胚胎培养液中, 在 39 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 湿度培养箱中培养 1~2 h 后取出, 在体视显微镜下判定融合。将融合的重构胚转入预先平衡 4 h 的矿物油覆盖的胚胎培养液滴内继续培养。

**1.3.4 胚胎移植** 猪体细胞克隆胚胎体外培养 2 d 后, 挑选形态较好的体细胞克隆胚胎, 装入麦管, 灭菌铝箔包裹, 置于 39 °C 恒温胚胎运输箱 3 h 内运至受体猪场手术室进行胚胎移植。受体母猪选择 7~8 月龄、体质量 150 kg 左右、膘情适中的纯种大白猪。给自然发情 1~2 d 的受体母猪(以出现压背静立反射为发情的第 0 天)耳静脉注射氯胺酮和犬眠宝使其全身麻醉, 固定在手术架上, 沿腹中线切开, 找出并固定输卵管, 观察卵巢排卵状态, 移植管从输卵管伞探入约 5 cm 左右处, 放置胚胎, 缝合切口。

**1.3.5 受体母猪排卵状况的判定** 猪从发情开始到排卵的时间间隔较长, 一般在 24~72 h, 不同品种、年龄、胎次等都会影响准确判断受体母猪的排卵时间。为了准确评价受体母猪的发情状况对体细胞克隆胚胎移植后胚胎发育的影响, 本研究根据受体母猪卵泡发育与排卵状况将受体母猪分为以下 2 个组别:

组一: 即将排卵或正在排卵阶段(Just prior to ovulation & ovulating, JPO & IO): 压背静立反射明显, 外阴红肿充分, 阴道分泌物多且稀薄透明。受体母猪处于即将排卵阶段时卵泡直径 5~7 mm, 容积增大并凸出于卵巢表面, 凸出卵巢表面的卵泡壁中心呈透明的无血管区; 处于正在排卵阶段时, 排卵点膨胀或即将破裂, 见图 1。

组二: 排卵前阶段或完全排卵阶段(Per-ovulation & after ovulation, PO & AO): 受体母猪处于排卵前阶段时, 将于 1~2 d 以后排卵, 卵泡直径为 3 mm 左右; 处于完全排卵阶段时, 卵巢上的优势卵泡已经排完, 将要或已经形成黄体, 见图 2。

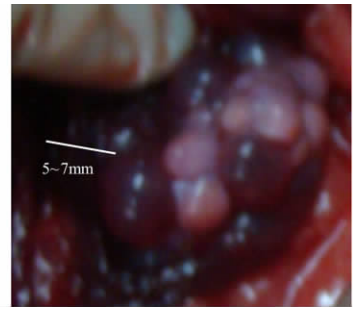


图 1 即将排卵或正在排卵

Fig. 1 Just prior to ovulation & ovulating(JPO & IO)

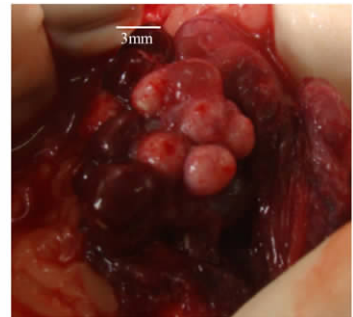


图 2 排卵前阶段或排完卵阶段

Fig. 2 Per-ovulation or after ovulation (PO & AO)

**1.3.6 妊娠诊断及饲养管理** 胚胎移植后, 对未返情的受体于 30 d 进行首次超声波妊娠检测。之后每周定时检测 1 次, 跟踪胎儿发育情况, 调整饲养管理, 直至克隆猪出生。

**1.3.7 体细胞、克隆猪和受体母猪的微卫星 DNA 鉴定** 常规方法提取体细胞、克隆猪耳组织和代孕母猪的耳组织 DNA, 选取位于不同染色体上的 10 对分布于不同染色体的荧光标记的微卫星多态性位点作为遗传标记, 进行遗传一致性的检测, 按优化的反应条件对上述基因组 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物在扩增后通过 ABI 9700 自动荧光测序仪凝胶电泳, Peak Scanner 软件进行图像收集和分析, 计算出微卫星等位基因片段大小。

#### 1.4 数据处理

数据采用 SAS 6.0 的 GLM 模型单因素方差进行分析,  $P < 0.05$  时认为差异显著,  $P < 0.01$  时认为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 受体母猪的排卵状况对胚胎移植后 30 d 妊娠率的影响

将 3 216 枚猪体细胞克隆胚胎移植到 16 头受

受体母猪中,平均每头 201 枚胚胎,受体母猪的排卵状况按照 1.3.5 的标准进行分组。在移植后的第 30 天,用超声波进行早期妊娠检测。处于即将排卵或正在排卵阶段的 6 头受体母猪,其 30 d 的妊娠率为

100%;处于排卵前阶段或排完卵阶段的 10 头受体母猪中 6 头受体母猪返情,4 头妊娠,30 d 的妊娠率为 40%,两者差异显著(100% vs. 40%,  $P < 0.05$ ),结果见表 1。

表 1 受体母猪的排卵状况对克隆胚胎移植 30 d 妊娠率的影响

Table 1 Effect of ovulation status on pregnancy rate on day 30 in recipient gilts

组别	受体母猪数	移植胚胎数	30 d 妊娠数	30 d 受胎率/%
Group	No. of recipient gilts	No. of transplant embryos	No. of pregnancy day 30	Pregnancy rate day 30
组一	6	1 276	6	100 <sup>a</sup>
组二	10	1 940	4	40 <sup>b</sup>

同列数据后所标字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )

Different letters in the same column mean significant difference between the treatments( $P < 0.05$ )

## 2.2 受体母猪的排卵状况对妊娠足月率的影响

16 头受体母猪中有 8 头母猪在手术后 2 个动情期内没有返情,经 B 型超声波检测均可见清晰孕囊,足月共产仔 24 头。其中受体母猪排卵状况处于即将排卵或正在排卵阶段的 6 头母猪全部妊娠到

期并产仔 19 头,其中 1 头受体母猪单窝产仔 7 头,存活 6 头,妊娠足月率为 100%;排卵状况处于排卵前阶段或排完卵阶段的受体母猪只有 2 头妊娠到期,产仔 5 头,妊娠足月率为 20%,两者差异极显著(100% vs. 20%,  $P < 0.01$ )。

表 2 受体母猪的排卵状况对克隆胚胎移植妊娠足月率的影响

Table 2 Effect of ovulation status on full-term pregnancy rate in recipient gilts

组别	受体母猪数	妊娠足月母猪数	母猪妊娠足月率/%	产仔数
Group	No. of recipient gilts	No. of full-term pregnancy	Full-term pregnancy rate	Delivered piglets
组一	6	6	100 <sup>a</sup>	19
组二	10	2	20 <sup>b</sup>	5

同列数据后所标字母相异表示差异极显著( $P < 0.01$ )

Different letters in the same column mean extremely significant difference between the treatments( $P < 0.01$ )

## 2.3 克隆猪的微卫星 DNA 鉴定

对供体细胞、24 头克隆猪中存活的 15 个个体及有存活仔猪的 5 头受体母猪进行了遗传鉴定,11

个微卫星位点检测结果见表 3。结果表明所有的克隆猪个体均与供核细胞具有相同的微卫星多态性,而与 5 头受体母猪无亲缘关系。

表 3 克隆猪、供核细胞和代孕母猪微卫星检测结果

Table 3 Microsatellite analysis results from cloned piglets, donor cell lines and surrogate gilts

	S0026	S0226	Sw830	Sw24	Sw936	Sw72	Sw840	S0155	Sw122	S0070	Sw857
Dc	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
1	97/97	182/194	189/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
2	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
3	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
4	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
5	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
6	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
7	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
8	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
9	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
10	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
11	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
12	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
13	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
14	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
15	97/97	182/194	180/190	103/109	108/108	106/114	117/125	146/146	114/116	271/293	140/152
R1	91/95	179/179	179/179	108/114	92/95	97/107	125/135	156/158	106/110	272/292	135/151
R2	91/91	182/210	178/180	115/115	108/108	106/108	117/125	146/158	106/116	267/293	150/156
R3	91/97	210/210	178/180	103/103	96/110	106/106	125/125	158/158	106/118	273/293	150/150
R4	97/97	194/210	180/190	115/115	96/108	106/108	117/125	156/158	110/116	263/281	144/148
R5	91/97	180/210	178/180	103/103	96/110	98/108	125/125	156/158	106/106	263/293	136/136

DC. 为供体细胞;R1~R5. 为受体母猪;1~15. 为克隆猪

DC. Donor cell; R1-R5: Recipient gilts; 1-15. Cloned pigs

### 3 讨 论

猪体细胞克隆胚胎在体外发育阶段落后于体内同期胚胎的发育阶段,因此移植的猪体细胞克隆胚胎发育阶段与受体母猪子宫或输卵管发育阶段的相匹配性,是提高胚胎移植效率的至关重要的影响因素。本研究将受体母猪卵泡发育阶段作为猪体细胞克隆胚胎移植时间的判断标准,排除了猪的品种、年龄、胎次等因素对猪体细胞克隆胚胎移植效率的影响。结果表明,当受体母猪卵泡发育处于即将排卵和正在排卵阶段时,进行猪体细胞克隆胚胎的移植,其 30 d 的妊娠率为 100%,6 头受体母猪全部妊娠到期并产仔 19 头,其中 1 头受体母猪单窝产仔 7 头,存活 6 头,妊娠足月率为 100%。

Petersen 等<sup>[10]</sup>认为猪体细胞克隆胚胎移植后受体母猪在 24 h 内排卵,此时输卵管环境更利于维持重构胚的后续发育。试验结果为 12 头受体母猪 25 d 的妊娠率为 75%,妊娠足月产仔率为 75%。Harrison 等<sup>[7]</sup>采用受体母猪的发情周期比胚胎发育迟 1 d 的移植方案,10 头受体母猪妊娠足月 4 头(妊娠足月率 40%),产仔 18 头。与他们相比,本试验获得了较高的 30 d 的妊娠率和妊娠足月率,主要是本研究将受体母猪卵泡发育状况作为判断体细胞克隆胚胎移植时间的标准,可以较准确判断出输卵管和子宫的环境适应体细胞克隆猪胚胎移植的最佳时机,受体母猪卵泡发育处于即将排卵和正在排卵阶段是本研究体细胞克隆猪胚胎移植的最佳时期,增加了受胎率和产仔率。

总之,本研究建立了一个高效的体细胞克隆猪的胚胎移植平台,能获得较高的受胎率和产仔率,这将促进体细胞克隆猪在转基因猪生产和小型猪疾病模型建立等方面的应用。

### 4 结 论

体外培养 2 d 的猪体细胞克隆胚胎发育阶段与即将排卵或正在排卵的受体母猪的子宫环境同期性最好,得到了理想的胚胎移植效率。

#### 参考文献:

[1] 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(6800): 86-90.

[2] VAJTA G, ZHANG Y, MACHATY Z. Somatic cell nuclear transfer in pigs: Recent achievements and future possibilities[J]. *Reprod, Fertil and Develop*, 2007, 19(2): 403-423.

[3] 潘登科,张运海,孙秀柱,等. 低氧培养早期胚胎克隆小型猪[J]. *科学通报*, 2006, 51(4): 415-419.

[4] DAI Y, VAUGHT T D, BOONE J, et al. Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3): 251-255.

[5] KAWAKAMI M, TANI T, YABUUCHI A, et al. Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes [J]. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5(4): 379-387.

[6] YIN X J, TANI T, YONEMURA I, et al. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes[J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(2): 442-446.

[7] HARRISON S, BOQUEST A, GRUPEN C, et al. An efficient method for producing alpha(1,3)-galactosyltransferase gene knockout pigs [J]. *Cloning Stem Cells*, 2004, 6(4): 327-331.

[8] LAGUTINA I, LAZZARI G, GALLI C. Birth of cloned pigs from zona-free nuclear transfer blastocysts developed *in vitro* before transfer [J]. *Cloning Stem Cells*, 2006, 8(4): 283-293.

[9] MCGREGOR C G, TEOTIA S S, BYRNE G W, et al. Cardiac xenotransplantation: progress toward the clinic [J]. *Transplantation*, 2004, 78(11): 1569-1575.

[10] PETERSEN B, LUCAS-HAHN A, OROPEZA M, et al. Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts [J]. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10(3): 355-362.