

# 水牛体细胞核移植方法的研究

陆凤花, 石德顺\*, 韦英明, 潘红平

(广西大学动物繁殖研究所, 南宁 530005)

**摘要:** 探讨电融合参数对水牛体细胞核移植效果的影响。体外成熟培养 22~24 h 的水牛卵母细胞, 在含有 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  细胞松弛素的操作液中进行去核, 然后将经 0.1  $\text{mg}/\text{L}$  Aphidicolin (APD) 处理 1 d, 再用 0.5% FBS 培养 2~9 d 的水牛耳皮成纤维细胞或颗粒细胞注射到去核的卵母细胞卵周隙中, 再经电融合形成重构胚。重构胚经 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  离子霉素激活处理 5 min 并在 2  $\text{mmol}/\text{L}$  的 6-DMAP 中培养 3 h 后, 在含有颗粒细胞单层细胞的微滴中 (30  $\mu\text{L}$ ) 培养 7~9 d, 观察其卵裂和胚胎发育情况。当电融合的电场强度为 1500  $\text{V} \cdot \mu\text{s}/\text{mm}$  (电压 100  $\text{V}/\text{mm} \times$  脉时 15  $\mu\text{s}$ ) 时, 电脉冲 3 次, 颗粒细胞核移植的融合率为 74.18%, 分裂率为 71.82%, 囊胚发育率为 10%, 融合率显著高于 2 次电脉冲 (52.03%,  $P < 0.05$ ), 卵裂率显著高于 4 次电脉冲 (53.95%,  $P < 0.05$ ); 当电脉冲次数为 3 次时, 电场强度为 2000  $\text{V} \cdot \mu\text{s}/\text{mm}$  的分裂率 (53.54%) 显著低于 1500  $\text{V} \cdot \mu\text{s}/\text{mm}$ , 2500  $\text{V} \cdot \mu\text{s}/\text{mm}$  的融合率 (62.0%) 和分裂率 (53.23%) 均显著低于 1500  $\text{V} \cdot \mu\text{s}/\text{mm}$  ( $P < 0.05$ )。采用耳皮成纤维细胞作供核的融合率 (59.75%) 和分裂率 (57.45%) 均显著低于颗粒细胞。染色体组型分析显示, 66.7% 的核移植胚胎具有正常的供体细胞二倍体核型。将来自 1 头 22 岁的摩拉公牛耳皮成纤维细胞的 2 枚冻胚移植给受体母牛, 妊娠到 215 d 时发生流产。结果表明, 高龄水牛的体细胞核移植胚胎能发育到妊娠晚期; 水牛体细胞核移植的适宜电融合参数为 100  $\text{V}/\text{mm}$ , 15  $\mu\text{s}$ , 3 次电脉冲; 颗粒细胞的电融合核移植效果优于耳皮成纤维细胞。

**关键词:** 水牛; 体细胞; 核移植; 电融合

**中图分类号:** S814.8; S823

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0366-6964(2005)02-0127-06

电融合技术是体细胞核移植技术中的关键环节之一。当体细胞核移入除去细胞核的成熟卵内时, 体细胞仍然由独自的细胞膜包围着, 只有通过细胞融合, 二者才能成为一个完整细胞继续培养发育。当前, 在细胞融合的方法中, 电融合的应用比较普遍, 而所用的电融合的参数, 对融合率及培养发育产生的影响是细胞融合技术中不可忽视的环节。近年来, 运用电融合技术进行体细胞的核移植研究已分别在绵羊、山羊、牛、猪和小鼠等动物取得成功<sup>[1-5]</sup>。但是, 关于水牛体细胞核移植的研究报道很少, 特别在水牛体细胞适宜电融合条件的研究方面需进一步探讨。因此, 本研究采用水牛体细胞作为供核细胞, 对水牛核移植过程中的电融合参数进行系统研究, 以期建立一套水牛体细胞核移植的电融合方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 卵母细胞的收集及体外成熟

从屠宰场收集水牛卵巢, 置于含有  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 35~37  $^{\circ}\text{C}$  生理盐水保温瓶, 4 h 内送到实验室。洗净后用带有 12 号针头的 10 mL 注射器抽取卵巢上 2~6 mm 卵泡的卵母细胞。在实体显微镜下挑选出细胞质均匀、并带有完整卵丘细胞层的卵母细胞, 清洗后放入 TCM-199 + 5% OCS + 0.1  $\text{mg}/\text{mL}$  FSH 的成熟培养液中, 在 38.5  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  和最大饱和湿度的培养箱中培养 22~24 h。

### 1.2 供体细胞的制备

采取 22 岁摩拉水牛耳部的一小块组织, 消毒后去掉毛和软骨, 将剩余的皮肤剪碎至 2~3  $\text{mm}^3$  小块。然后依次用 0.25% 胰蛋白酶和 0.2% 胶原酶消化 30 min 和 45 min。消化好的细胞离心 (300 g, 5 min) 清洗 2 次, 最终用 10% FBS 的 DMEM 培养液稀释成  $1 \times 10^6$  个/ $\text{mL}$  的浓度, 接种于 60  $\text{mm} \times 15$  mm 的塑料培养皿中进行贴壁培养 7~10 d。待细胞相互汇合形成单层细胞时, 以 0.25% 胰蛋白酶 38.5  $^{\circ}\text{C}$  消化 3~5 min, 进行传代培养 2~5 代。然后, 做成 16  $\mu\text{L}$  的微滴培养, 待其形成单层细胞并相

收稿日期: 2003-10-28

基金项目: 国家“863”高科技研究发展计划项目 (2002AA206651)

作者简介: 陆凤花 (1973-), 女, 壮族, 广西武鸣人, 讲师, 博士生, 主要从事动物胚胎生物工程的研究。

\* 通讯作者: ardsshi@gxu.edu.cn

互汇合时,用 0.1 mg/L APD 培养处理 1 d,再用 0.5% FBS 饥饿培养 2~9 d 作为核移植供核。颗粒细胞供核选一质量好的卵巢抽取卵母细胞,检出其中的卵母细胞,把剩下的液体和颗粒细胞混合液进行离心清洗 2 次,培养方法同上(见图 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>)。

### 1.3 卵母细胞的去核、注核及融合

将体外成熟 22~24 h 的 MII 卵母细胞放在 0.1% 的透明质酸酶中除去卵丘细胞。将具有第一极体的成熟卵母细胞移入含有 5 μg/mL 细胞松弛素 B 的操作液中,在 Nikon 倒置显微操作仪下用盲吸法进行去核。去核后的卵母细胞放入 CM 中培养 30 min,使其形态恢复,然后用去核管吸取已准备好的供核细胞并沿去核时在透明带留下的孔进去,先吸取少量细胞质,再将细胞质连同供体细胞一起注入卵周隙中,使供体细胞与卵膜紧贴在一起,以便有利于融合(见图 B<sub>1</sub>)。

所用的电融合仪为 ECM-2001,电极为两根自制的可活动的铂金丝。注核胚先在融合液(0.28 mol/L 甘露醇+0.05 mmol/L CaCl<sub>2</sub>+0.1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>+5 mmol/L Hepes+0.1% BSA+5 mg/L 酚红)中平衡 2 min,再移到电极间的融合滴中,用其中一根铂金丝轻轻拨动细胞,使待融合的两质膜平面与电场方向垂直,然后进行电脉冲刺激(电融合参数由试验设计而定),诱导体细胞与卵母细胞质的融合(见图 B<sub>2</sub>)。30 min 后检查其融合情况。

### 1.4 核移植重组胚的激活及体外培养和胚胎移植

融合后的重组胚用 5 μmol/L 的离子霉素激活处理 5 min,然后用 2 mmol/L 的二甲氨基嘌呤(G-DMAP)培养 3 h。激活处理后的重组胚置于已准

备好的颗粒细胞单层微滴中,在 38.5 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 7~9 d。培养液每隔 48 h 更换 1 次,培养 48 h 后检查分裂率,7 d 后记录发育的囊胚率(见图 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、D<sub>1</sub>)。将发育到囊胚的新鲜或冷冻/解冻胚胎用非手术法移植到同期发情的受体水牛子宫角中,移植后 2~3 个月进行直肠检查,以确定妊娠情况。

### 1.5 核移植囊胚的细胞计数及核型检查

发育到囊胚的胚胎用最终浓度为 0.5 μg/mL 秋水仙素培养液继续在培养箱中培养 4~6 h 后,移入预温至 37 °C 的 0.075 mol/L KCl 溶液,在温箱静置 20 min。然后将胚胎放在干净的玻璃片上,待准备干时滴加新鲜的 1:3 醋酸、甲醇固定液,轻轻吹气,使细胞或染色体充分扩展,然后令其自然干燥。再用 10% Giemsa 染液染色 10 min。水洗后对胚胎细胞计数及观察染色体数目是否正常。

### 1.6 统计分析

试验数据均用卡方进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 电脉冲次数对水牛核移植胚的融合及体外发育的影响

当电场强度一定时,脉冲次数由 2 次增加到 3 次的融合率极显著提高( $P < 0.01$ )。当脉冲次数增加到 4 次时,融合率略有提高( $P > 0.05$ ),但分裂率则显著下降( $P < 0.05$ )。各组之间的囊胚发育率无显著差异,见表 1。这一结果表明,当电场强度为 1 500 V·μs/mm 时,电脉冲 3 次较为合适。

表 1 电脉冲次数对水牛核移植效果的影响

Table 1 Effect of electric pulse number on the fusion and development of buffalo NT embryos

电压 × 脉冲时间 Voltage × duration /(V · μs/mm)	脉冲次数 No. of pulses	核移植卵数 NT oocytes	融合卵数 Oocytes fused/ %	分裂卵数 Cleaved/ %	囊胚发育率 BL devel/ %
1 500	2	123	64 (52.03) <sup>a</sup>	46 (71.88) <sup>a</sup>	8.70(4/46)
1 500	3	244	181 (74.18) <sup>b</sup>	130 (71.82) <sup>a</sup>	10.00(13/130)
1 500	4	102	76 (74.51) <sup>b</sup>	41 (53.95) <sup>b</sup>	7.32(3/41)

a, b 同列内不同肩标表示差异显著( $P < 0.05$ ),下表同

a, b Different superscripts in a column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). The same below

### 2.2 脉冲电场强度对核移植胚的融合和体外发育的影响

当脉冲次数相同时,随着脉冲电场强度的增加,

其融合率和体外发育率也随之增加,当增加到 1 500 V·μs/mm 时,其融合率和卵裂率(分别为 74.18% 和 71.82%)达到最高;但当电场强度再增加时其融

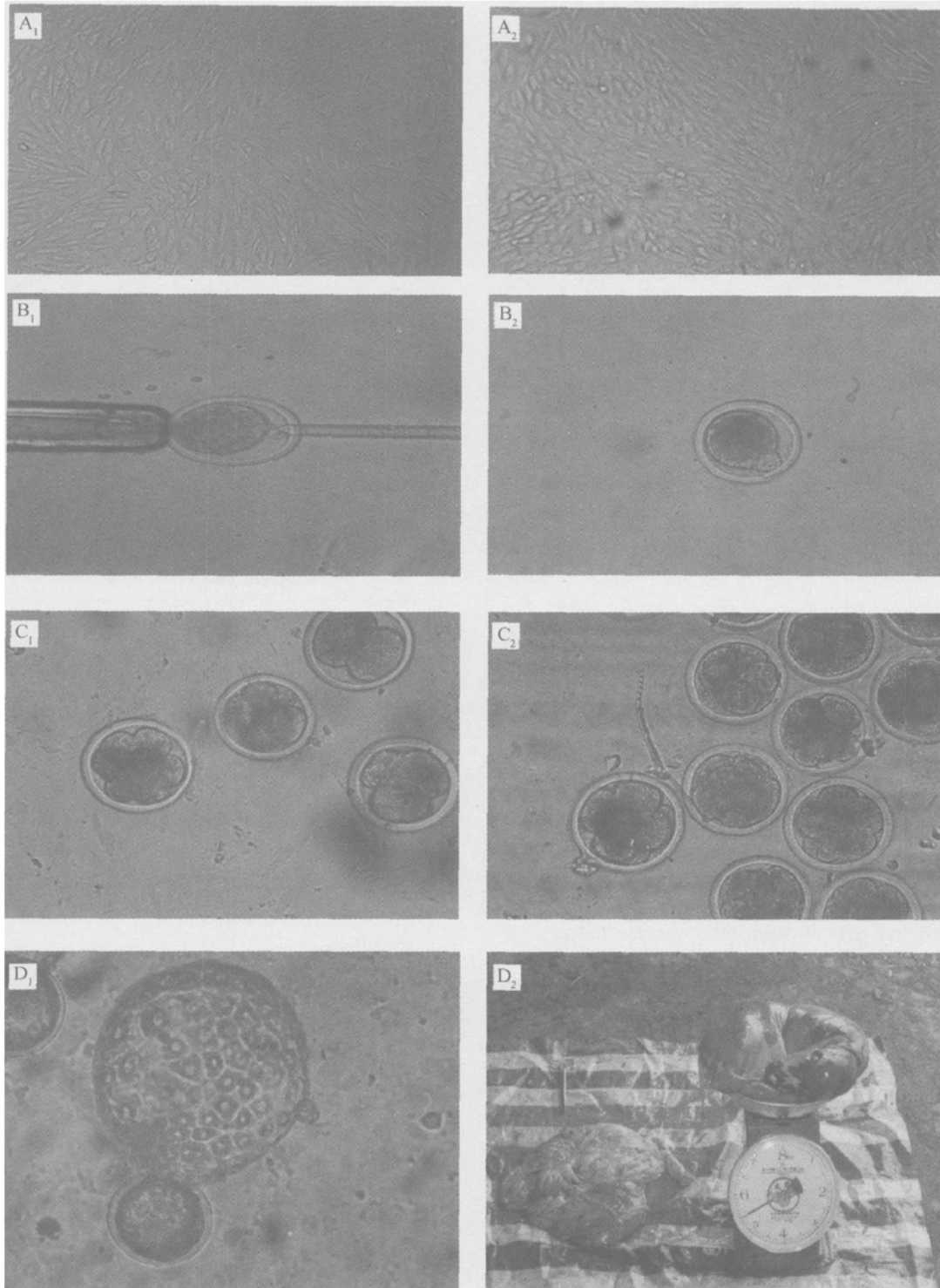


图 A<sub>1</sub> APD 处理培养的水牛颗粒细胞(100×); 图 A<sub>2</sub> APD 处理培养的成年水牛耳部成纤维细胞(100×);  
 图 B<sub>1</sub> 水牛体细胞带下注核(200×); 图 B<sub>2</sub> 体细胞与卵胞质融合过程(200×); 图 C<sub>1</sub> 培养的核移植胚胎(2 d, 200×);  
 图 C<sub>2</sub> 培养的核移植胚胎(5 d, 200×); 图 D<sub>1</sub> 孵化的核移植囊胚(200×); 图 D<sub>2</sub> 流产的 7 个月胎儿  
 Fig. A<sub>1</sub> Buffalo granulosa cells treated with APD (100×); Fig. A<sub>2</sub> Adult buffalo ear fibroblasts treated with APD (100×)  
 Fig. B<sub>1</sub> Subzonal injection of donor cell (200×); Fig. B<sub>2</sub> The fusion process of donor cell with oocyte cytoplasm(200×)  
 Fig. C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> Development of NT embryos (2, 5 days respectively, 200×); Fig. D<sub>1</sub> Development of NT blastocysts(200×)  
 Fig. D<sub>2</sub> The abort of cloned male fetal produced by nuclear transfer from adult buffalo ear fibroblast

合率和体外发育率呈下降的趋势, 见表 2。由此表明, 电场强度以 1 500 V · μs/mm 较为适宜。

表 2 电场强度(电压 × 脉冲时间)对水牛核移植效果的影响

Table 2 Effect of electric field intensity on the fusion and development of buffalo NT embryos

电压 × 脉冲 脉时 Voltage × duration (V · μs/ mm)	核移植 次数 No. of NT oocytes	融合卵数 Oocytes fused/ %	分裂卵数 Cleaved/ %	囊胚 发育率 BL developed/ %
1 000	3	158 (70.25) <sup>ab</sup>	77 (69.37) <sup>ab</sup>	12.99(10/77)
1 500	3	244 (74.18) <sup>a</sup>	130 (71.82) <sup>a</sup>	10.00(13/130)
2 000	3	184 (69.02) <sup>ab</sup>	68 (53.54) <sup>b</sup>	2.94(2/68)
2 500	3	100 (62.00) <sup>b</sup>	33 (53.23) <sup>b</sup>	3.03(1/33)

2.3 供体细胞种类的核移植效果比较

当采用 100 V/mm、15 μs、3 次电脉冲电融合参数时, 颗粒细胞做供体其融合率和卵裂率均显著的高于耳部成纤维细胞的融合率及卵裂率 (P < 0.05), 见表 3。所以采用电融合进行核移植时, 颗粒细胞做供核较为合适。

表 3 不同类型的供体细胞对融合和融合胚体外发育的影响

Table 3 Comparison of development of NT embryos derived from different types of donor cells by electric fusion

供核细胞 Donor cells	核移植 卵数 NT oocytes	融合卵数 Oocytes fused / %	分裂卵数 Cleaved / %	囊胚发 育数 BL developed / %
耳部成 纤维细胞 Fibroblast cells	236	141(59.75) <sup>a</sup>	81(57.45) <sup>a</sup>	6(7.41)
颗粒细胞 Granulosa cells	244	181(74.18) <sup>b</sup>	130(71.82) <sup>b</sup>	13(10.00)

2.4 融合胚囊胚细胞计数及核型检查

核移植囊胚中二倍体囊胚的细胞数(116 ± 8.6)显著的高于非整倍体囊胚细胞数(62 ± 6.2) (P < 0.05)。研究发现 4 倍体和非整倍体的囊胚无明显的内细胞团。将 12 枚核移植后发育到囊胚的胚胎进行染色体制片后观察表明, 核移植囊胚具有多种核型。其中 8 枚(66.7%)为二倍体(n = 48), 2 枚

(16.7%)四倍体(n = 96)和 2 枚(16.7%)非整倍体, 包括单倍体以及一些粉碎性染色体。

2.5 水牛体细胞核移植胚胎移植结果

将来自卵巢颗粒细胞的 6 枚(4 枚新鲜、2 枚冷冻)核移植胚胎移植到 3 头受体水牛, 一个情期过后都陆续出现返情, 未仔细观察, 也未进行直肠检查。来自 22 岁水牛耳部成纤维细胞的 2 枚冷冻核移植胚胎移植给 1 头受体水牛, 3 个月未见返情, 直肠检查确定妊娠, 215 d 时流产, 产下 5.4 kg 的死雄性胎儿。由于胎儿的性别与供体细胞一致, 故未作进一步的遗传鉴定。结果表明, 建立的水牛体细胞核移植方法生产的核移植胚胎移植后可以发育到妊娠后期(见图 D<sub>2</sub>)。

表 4 水牛体细胞核移植胚胎移植结果

Table 4 Results of transferring NT embryos derived from buffalo somatic cells

供体细胞类型 Types of donor cells	鲜胚/ 冻胚 Fresh/ Frozen	移植胚 胎数 No.	受体数 No. recipient	受体妊 娠情况 Pregnancies
颗粒细胞 Granulosa cells	鲜胚 Fresh	4	2	未妊娠 Unpregnant
	冻胚 Frozen	2	1	未妊娠 Unpregnant
成年耳部 成纤维细胞 Adult ear fibroblasts	冻胚 Frozen	2	1	妊娠 215 d 流产 Aborted at 215 days of gestation

3 讨论

本研究表明, 来自高龄水牛体细胞的核移植胚胎移植后能够发育到妊娠后期。

在核移植技术中, 核移植胚的融合率直接影响着核移植的效率。其中, 电融合所使用的电场强度、脉冲次数等, 对核移植胚的融合率及体外培养发育率影响很大。小鼠、山羊、猪、兔和牛的核移植研究发现, 电融合条件对核移植胚的融合和体外发育均有明显影响<sup>[6,7]</sup>。本研究的结果显示, 当电场强度(电压 × 脉时)为 1 500 V · μs/mm 时, 脉冲次数由 2 次增加到 3 次, 水牛核移植胚的融合率由 52.03% 提高到 74.18%, 分裂率无显著差异。当脉冲增加

到 4 次, 融合率略有增加(74.51%), 但分裂率则显著下降(53.95% 比 71.82%)。在同一电场强度下, 脉冲次数增加, 待融颗粒细胞与卵母细胞质膜间接触面的微孔数也增多, 从而有助于细胞融合。但如果形成的微孔数量超过一定数量或形成一些不可逆性的微孔, 融合胚在培养过程中就会裂解死亡, 从而导致分裂率下降。在电场强度一定 ( $1\ 500\ \text{V} \cdot \mu\text{s}/\text{mm}$ ), 选择适宜的脉冲次数尤为重要, 本研究的结果也证实了这一点。

本研究发现: 当电场强度由  $1\ 000\ \text{V} \cdot \mu\text{s}/\text{mm}$  增加到  $1\ 500\ \text{V} \cdot \mu\text{s}/\text{mm}$  时, 核移植胚的融合率和分裂率均随之提高。但当电场强度进一步增加到  $2\ 000$  和  $2\ 500\ \text{V} \cdot \mu\text{s}/\text{mm}$  时, 融合率和发育率则随之降低。这表明, 适宜的电场强度有利于核移植胚的融合与发育。过高的电场强度则导致水牛核移植胚的裂解, 并对其随后的发育产生明显的有害作用。通常在电融合过程中, 过大的电场强度, 会使细胞膜形成较大的孔道而发生不可逆破裂, 从而导致细胞受损。本研究的这一结果亦与有关小鼠<sup>[8]</sup>、猪<sup>[6]</sup>、和牛<sup>[7]</sup> 胚胎细胞核移植以及牛体细胞核移植<sup>[9]</sup> 报道的结果一致。

本研究结果表明, 不同的供体细胞类型对融合率及核移植胚胎的发育影响十分显著。在采用相同受体卵龄及融合条件下, 融合率与供核体积的大小, 受体胞质与供体核接触面积和紧密程度有关。本研究培养的成纤维细胞比颗粒细胞的体积小, 因此注入卵周隙后与卵膜的接触面积以及紧密程度较小, 两者的接触面不能有效穿孔或穿孔面积数量不够, 从而不能诱导有效的融合。然而, Westhusin 等的研究发现, 细胞的大小不是影响融合效果的直接因素, 融合结果并不因细胞大小不同而变异<sup>[10]</sup>。Chesne 等在兔体细胞核移植的研究中却发现卵丘细胞作供体时融合率显著低于胎儿成纤维细胞, 而重组胚的囊胚发育率明显高于胎儿成纤维细胞构建的重组胚<sup>[11]</sup>。Kubota 等在牛体细胞核移植研究中, 成年动物成纤维细胞与去核卵母细胞的融合率仅为 36%~41%<sup>[3]</sup>。这也许与不同的试验条件及方法有关。

一般而言, 大多数胚胎细胞融合在 20~30 min 内完成, 本研究水牛体细胞的融合时间大多数发生在电脉冲处理后 15~30 min 内。由于体细胞与卵母细胞的体积相差较大, 细胞间的接触面较小, 故其融合要比胚胎细胞困难得多。因此, 核移植胚在电

极中位置很重要, 供体细胞与卵质膜间的接触面必须与电流方向相垂直; 同时受体胞质的成熟质量也很关键, 否则融合率下降, 融合过程延缓, 并可影响融合胚的发育能力。本研究的预备试验采用了  $50\ \text{V}/\text{mm}$ 、 $100\ \text{V}/\text{mm}$ 、 $150\ \text{V}/\text{mm}$  进行不同脉冲时间和不同脉冲次数的比较, 结果发现  $100\ \text{V}/\text{mm}$ 、 $15\ \mu\text{s}$  3 次脉冲处理的效果较理想, 颗粒细胞核移植的融合率为 74.18% (181/244)、分裂率为 71.82% (130/181)。电融合率较高这一结果说明本试验所采用的电融合条件和电融合系统是可行的。然而, 本试验对核移植囊胚的细胞数以及胚胎核型检查的结果表明, 核移植胚中有相当比例的胚胎具有不正常染色体数目的核型。卵母细胞去核的不完全以及供体核与受体胞质之间细胞周期的不同步性可能是导致核型异常的原因, 其机理有待于深入研究。

核移植重构胚胎移植后妊娠率低且流产率高是导致体细胞核移植技术效率低的主要原因之一。由于体外培养系统不完善以及核移植操作程序中存在的某些缺陷, 都会影响供体细胞核发生完全的发育程序重编, 从而导致核移植胚胎在早期胚胎期、胎儿期或胎盘发育过程中的基因表达错误, 最终引起胎儿死亡或流产等<sup>[12]</sup>。据报道, 胎盘发育异常或功能发育不全, 子叶数量不足或变少变大、尿囊积液和胎膜水肿等原因, 都会导致胎儿后期死亡和流产<sup>[1, 13]</sup>。本研究中, 用 22 岁水牛耳部成纤维细胞构建的核移植胚胎移植后经直肠检查确定妊娠, 215 d 时流产, 胎儿的性别与供体水牛的性别是一致的, 但未做进一步鉴定。经剖检, 发现除肝脏肿大外, 其他指标均正常。这一结果表明, 我们建立的水牛体细胞核移植方法所生产的核移植胚胎移植后可以发育到妊娠后期。至于造成胎儿发育到 7 个月后流产的原因还有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Willmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, 1997, 385: 810~813.
- [2] Baguis A, Behboodi E, Melican D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer [J]. *Nature Biotechnol*, 1999, 17: 456~461.
- [3] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term cultured [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (3): 990~995.

- [4] 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.
- [5] Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, et al. Full term development of mice from nucleated oocyte injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature*, 1998, 394: 369~ 374.
- [6] 陈乃清, 赵浩斌, 苟德明, 等. 猪 2-细胞胚胎细胞的电融合[J]. *中国兽医学报*, 1999, 19(1): 89~ 91.
- [7] Tatham B G, Gilian K J, Trounson A O. Electrofusion parameters for nuclear transfer predicted using isofusion contours produced with bovine embryonic cells[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1996, 43: 306~ 312.
- [8] Cheong H T. Effect of various electric field on the fusion and *in vitro* development of mouse two-cell embryo[J]. *Theriogenology*, 1991, 36: 875~ 885.
- [9] 张明新, 及川俊德, 沼也. 牛体细胞核移植细胞融合电压力强度对融合效果及胚胎发育的影响[J]. *当代畜牧*, 2000, 5: 4~ 5.
- [10] Westhusin M E, Pryor J H, Bondioli K R. Nuclear transfer in the bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryo[J]. *Mol Reprod Dev*, 1991, 28: 119~ 123.
- [11] Chesne P, Adenot P G, Boulanger L, et al. Somatic nuclear transfer in rabbit[J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 260.
- [12] 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(6790): 1066~ 1069.
- [13] De Lille A J A E, Anthony R V, Seidel G E. Characteristics of placental and fetal tissues from day 75 nuclear cloned bovine pregnancies[J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 263.

### Studies on the Methods of Buffalo Somatic Cells Nuclear Transfer

LU Feng-hua, SHI De-shun\*, WEI Ying-ming, PAN Hong-ping

(*Institute of Animal Reproduction, Guangxi University, Nanning 530005, China*)

**Abstract:** Effects of electrofusion parameters and donor cell types on the nuclear transfer of buffalo somatic cells were investigated in this study. Buffalo oocytes obtained from ovaries at slaughter were matured *in vitro* for 22~ 24 h, and then enucleated in manipulation medium containing 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cytochalasin B. Fibroblasts or granulosa cells cultured in DMEM supplemented with 0.1  $\mu\text{g}/\text{L}$  Aphidicolin (APD) for 24 h and following in 0.5% FBS for 2~ 9 days were transferred into enucleated oocytes by electronic fusion. The reconstructed embryos were activated by exposing them to 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  ionomycin for 5 min and then culturing in 2 mmol/L 6-DMAP for 3 h. After activation, embryos were cultured in 30  $\mu\text{L}$  drop of granulosa cell monolayers for 7~ 9 days. When granulosa cells were used as donor cells and the direct current field intensity was fixed at 1 500 V  $\cdot$   $\mu\text{s}/\text{mm}$  applied, 3 pulses resulted in a significantly higher fusion rate (74.18%) compared with 2 pulses (52.03%) ( $P < 0.05$ ), and a significantly higher cleavage rate (71.82%) in comparison with 4 pulses (53.95%) ( $P < 0.05$ ). When the number of pulses was fixed at 3, increasing the direct current field intensity from 1 500 V  $\cdot$   $\mu\text{s}/\text{mm}$  to 2 000 or 2 500 V  $\cdot$   $\mu\text{s}/\text{mm}$  resulted in a significant decrease in either fusion rate or cleavage rate. The fusion rate (59.75%) and cleavage rate (57.45%) of fibroblast cells were significantly lower than that of granulosa cells. Karyotyping analysis showed that 66.7% of reconstructed embryos have normal diploid karyotype (48 XY), which was identical to that of donor cells. One recipient received 2 frozen/thawed embryos derived from the ear fibroblasts of a Murra bull aged at 22 years became pregnant and aborted at 215 days of gestation. These observations suggest that embryos derived from old buffalo somatic cells can develop to the late stage of gestation; the suitable electrofusion parameters on buffalo somatic cells nuclear transfer are 100 V/mm, 15  $\mu\text{s}$  and 3 pulses; and granulosa cells are better than fibroblast cells used as donor karyoplasts for electrofusion in buffalo cloning.

**Key words:** buffalo; electrofusion; somatic cells; nuclear transfer

\* Corresponding author