

# 体细胞核移植生产转 $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶基因 (*sFat-1*) 的猪胚胎

冯冲<sup>1,2</sup>, 周艳荣<sup>3</sup>, 龙川<sup>2</sup>, 刘晓<sup>2</sup>, 陈红星<sup>3\*</sup>, 潘登科<sup>2\*</sup>, 杨博辉<sup>4</sup>

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 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实验室, 北京 100193; 3. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071; 4. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730050)

**摘要:** 本研究通过脂质体介导的方法将来源于线虫 *C. Briggsae* 的  $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶基因 (*sFat-1*) 转染至大白猪胎儿成纤维细胞。采用  $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  G418 药物浓度, 经连续 10 d 筛选及 PCR、RT-PCR 鉴定, 获得 11 个转基因阳性细胞克隆。以体外成熟 42 h 的猪卵母细胞与转基因细胞构建重构胚。经体外培养后观察, 转基因克隆胚胎与非转基因胚胎的卵裂率 ( $76.6\% \pm 4.1\%$  vs.  $81.6\% \pm 3.1\%$ ) 和囊胚率 ( $10\% \pm 1.97\%$  vs.  $9.7\% \pm 1.4\%$ ) 均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。采用放线菌酮进行化学二次激活时, 胚胎的囊胚率显著高于采用电二次激活胚胎 ( $20.6\% \pm 0.89\%$  vs.  $10\% \pm 1.97\%$ ,  $P < 0.05$ ), 但二者的卵裂率并无显著差异 ( $72.4\% \pm 4.96\%$  vs.  $76.6\% \pm 4.1\%$ ,  $P > 0.05$ )。研究表明, 通过脂质体介导的方法, 可以获得转 *sFat-1* 基因大白猪胎儿成纤维细胞系; 以该细胞系为核供体构建的转基因克隆胚胎与非转基因克隆胚胎的发育能力无显著差异; 二次激活采用放线菌酮进行化学激活能够显著提高胚胎的囊胚发育率。

**关键词:** 猪; *sFat-1* 基因; 胎儿成纤维细胞; 体细胞核移植

中图分类号: S828.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0633-06

## Production of $\omega$ -3 Fatty Acid Desaturase Gene (*sFat-1*) Transgenic Embryos by Somatic Cell Nuclear Transfer in Pig

FENG Chong<sup>1,2</sup>, ZHOU Yan-rong<sup>3</sup>, LONG Chuan<sup>2</sup>, LIU Xiao<sup>2</sup>,

CHEN Hong-xing<sup>3\*</sup>, PAN Deng-ke<sup>2\*</sup>, YANG Bo-hui<sup>4</sup>

(1. 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. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 4. Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceutics, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

**Abstract:** In this study, fetal fibroblast cells of Large White pig were transfected with *sFat-1* gene from round-worm *C. Briggsae* by lipofectamine mediated transfection. After selected by  $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  G418 for 10 days and analyzed by PCR, RT-PCR, 11 positive transgenic cell clones were collected. Reconstructed embryos were combined by porcine oocytes which were matured for 42 h and transgenic cells. After culture, the cleavage percentage of embryos ( $76.6\% \pm 4.1\%$  vs.  $81.6\% \pm 3.1\%$ ) and blastula ( $10\% \pm 1.97\%$  vs.  $9.7\% \pm 1.4\%$ ) have no significant difference be-

收稿日期: 2008-12-05

基金项目: 国家“863”项目(2006AA02Z113); 中国农业科学院院长基金资助

作者简介: 冯冲(1981-), 男, 硕士生, 主要从事猪胚胎生物技术研究, E-mail: fengchong81358247@163.com

\* 通讯作者: 潘登科, 副研究员, 博士, 主要从事胚胎生物技术研究, E-mail: pandengke@yahoo.com.cn; 陈红星, 副研究员, 博士, 主要从事基因工程研究, E-mail: hongxingchen@yahoo.com.cn

tween the transgenic cloning embryos and non-transgenic cloning embryos ( $P > 0.05$ ). In assistant activation, CHX was used and make a higher ( $20.6\% \pm 0.89\%$  vs.  $10\% \pm 1.97\%$ ,  $P < 0.05$ ) percentage of blastula than the electrical activation, but the cleavage percentage was insignificant between them ( $72.4\% \pm 4.96\%$  vs.  $76.6\% \pm 4.1\%$ ,  $P > 0.05$ ). As a result, fetal fibroblast *sFat-1* transgenic cell line of Large White pig can be obtained by lipofectamine mediate transfection, and the cell line used as nuclear donors make no significant difference in the development of the transgenic cloning embryos and non-transgenic cloning embryos; Then using CHX in assistant activation can significantly raise the percentage of blastula.

**Key words:** porcine; *sFat-1* gene; fetal fibroblast; somatic cell nuclear transfer

$\omega$ -3 多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids,  $\omega$ -3 PUFAs)是一种具有广泛生物学功能的多不饱和脂肪酸。因其在预防和治疗心脑血管疾病、癌症等方面有着重要作用,而成为近些年来研究的热点。然而人体自身不能合成,对它的需要必须依靠从食物中获取,且来源有限<sup>[1]</sup>。猪肉中所含的 PUFAs 以  $\omega$ -6 PUFAs 为主,  $\omega$ -3 PUFAs 含量很低。因此,生产一种富含  $\omega$ -3 PUFAs 的转基因猪,可以丰富  $\omega$ -3 PUFAs 的来源<sup>[2]</sup>。1997年, Spychalla 等<sup>[3]</sup>首次克隆了动物去饱和酶基因 *Fat-1*, 经研究发现 *Fat-1* 基因可作用于含 16~20 碳的 PUFAs, 并以  $\omega$ -6 PUFAs 为底物催化产生  $\omega$ -3 PUFAs。Lai 等<sup>[4]</sup>报道了转 *Fat-1* 基因克隆猪的诞生。这种猪体内  $\omega$ -3 PUFAs 含量较普通猪有大幅度的提升,但所合成的  $\omega$ -3 PUFAs 中价值较大的 22 碳  $\omega$ -3 PUFAs (如 DPA 和 DHA) 水平仍然很低。Zhu 等<sup>[5]</sup>克隆了来源于线虫 *C. Briggsae* 的  $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶基因即 *sFat-1* 基因,并用于转基因小鼠的制备。脂肪酸检测显示, *sFat-1* 基因除能完全发挥其  $\omega$ -3 去饱和酶作用外,还能产生更多长链的且更有价值的 DHA 以及 DPA。

体细胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer, SCNT) 技术是高效生产转基因动物的方法之一。转 *sFat-1* 基因小鼠已成功诞生,但国内外尚无有关生产转 *sFat-1* 基因克隆猪及胚胎的文献报道。本研究以转染了 *sFat-1* 基因的大白猪胎儿成纤维细胞为核供体,以体外成熟 (*in vitro* maturation, IVM) 的猪卵母细胞为受体构建重构胚,并研究了不同的二次激活方法对转基因克隆胚胎发育能力的影响,优化了转基因克隆胚胎的生产条件,为利用 SCNT 技术生产转 *sFat-1* 基因克隆猪奠定了基础。

## 1 材料与方法

除特别注明外,所有化学试剂均购自 Sigma-

Aldrich 公司;细胞培养相关耗材为 BD Falcon 产品;卵母细胞体外成熟以及胚胎培养耗材为 Nunc 公司产品。*sFat-1* 线性化基因由军事医学科学院生物工程研究所提供。

### 1.1 主要溶液

细胞培养液为添加了  $66 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素,  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  硫酸链霉素,  $10\%$  (v/v) 胎牛血清 (FBS) 的高糖 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium); 抽卵液为添加了  $0.1\%$  (m/v) 聚乙烯醇 (PVA) 的杜氏磷酸缓冲液 (DPBS); 卵母细胞的体外成熟液为添加了  $10\%$  (v/v) 猪卵泡液 (pFF),  $0.57 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的半胱氨酸,  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  表皮生长因子 (EGF),  $10 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 和  $10 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  孕马血清促性腺激素 (PMSG) 的 NCSU-23; 显微操作液为添加了  $7.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  细胞松弛素 B (CB) 的 HEPES 缓冲的 NCSU-23; 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,  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES 以及  $0.01\%$  牛血清白蛋白 (BSA) 组成; 胚胎培养液为添加了  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  BSA 的猪合子培养基-3 (PZM-3)。

### 1.2 大白猪胎儿成纤维细胞对 G418 毒性敏感性检测

大白猪胎儿成纤维细胞按  $5 \times 10^4$  个  $\cdot$  孔<sup>-1</sup> 解冻至 24 孔板中,分为 8 组,每组 3 个重复。待细胞生长至  $80\% \sim 90\%$  汇合时,加入 G418,浓度依次为 0、100、200、400、600、800、900 和  $1\ 000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每 2 d 换 1 次培养液并补加 G418,培养 2 周并记录细胞死亡情况。

### 1.3 供体细胞的培养、转染及筛选

大白猪胎儿成纤维细胞系的建立(图 1A)参照文献[6]。转染前将细胞接种至 6 孔板中,待细胞长至  $80\% \sim 90\%$  汇合时,利用脂质体 (lipofectami-

neTM 2000) 介导的方法,将线性化的载体 pCAGGS-sfat1-Neo 转染至大白猪胎儿成纤维细胞。采用  $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  G418 进行连续 10 d 的筛选,然后将出现的克隆点细胞传代 1 次后冻存(图 1B)。

#### 1.4 卵母细胞体外成熟

从屠宰场取初情期前母猪卵巢,放入含青霉素和硫酸链霉素的生理盐水中,保持温度在  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  以上,2 h 内运回实验室。用配有 18 号针头的 20 mL 注射器抽取卵巢上 3~6 mm 的卵泡。挑选卵丘包裹 2 层以上、致密且胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(COCs),用 IVM 液洗涤 3 遍后,转入  $\text{CO}_2$  培养箱中预先平衡的 IVM 微滴内。待 IVM 终止后,将 COCs 转移到含  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  透明质酸酶的 DPBS 中,用  $200 \mu\text{L}$  移液器吹打 2~5 min 脱去卵丘细胞。挑选排出第一极体且卵黄膜完整、卵周隙清晰的卵母细胞作为受体<sup>[6]</sup>。

#### 1.5 体细胞核移植显微操作

在直径为 60 mm 的培养皿盖中央做 1 个长方形的  $50 \mu\text{L}$  显微操作液滴,用矿物油覆盖。将供体细胞以及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(内径 25~35  $\mu\text{m}$ ,外径 100~120  $\mu\text{m}$ )吸持卵母细胞,用内径 15~25  $\mu\text{m}$  的去核/注射针使第一极体处于 01:00 位置,接着从 03:00 处进针,吸取第一极体及相邻的 10%~20% 可能含有卵母细胞核的胞质。挑选直径 15~20  $\mu\text{m}$ ,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细胞膜接触紧密。每批操作 30~40 个卵母细胞,结束后将供体细胞-卵胞质构成的细胞对(重构卵)转移到添加了  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  BSA 的 NCSU-23 中,在  $39 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ ,100% 湿度培养箱中恢复 1.5 h。

#### 1.6 重构卵融合、激活和体外培养

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 5 个为一批放入已经铺满融合液的融合槽内(电极宽度为 500  $\mu\text{m}$ ),用实心玻璃针使供体细胞-受体卵细胞膜接触面与电极平行,用 ECM2001 融合仪施加 1 次 30  $\mu\text{s}$ ,2.0  $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$  的直流电脉冲诱导融合并同时激活。然后将重构胚放入含  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CB 和  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  放线菌酮(CHX)的 PZM-3 溶液中进行二次激活处理 4 h<sup>[7]</sup> 或于融合后 1~2 h 进行电二次激活,并比较二者对克隆胚胎发育的影响。

融合的重构胚,经二次激活后转入胚胎培养液培养。每 50  $\mu\text{L}$  的液滴培养 20~30 个重构胚,在培养的第 48 和 172 小时记录卵裂和囊胚形成结果。

#### 1.7 转基因细胞的分子生物学检测

转 s*Fat-1* 基因细胞的分子生物学检测方法参考文献[5]。PCR 检测引物序列为:上游 5'-GTGCTG-GTTGTTGTGCTGTCTCATC-3';下游 5'-GCGT-GATGCAGTTTGTGACTCTTCTG-3'。PCR 反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,64  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。预期扩增片段长度为 494 bp。RT-PCR 检测:将提取的细胞总 RNA,以 Oligo dT 作为引物进行反转录,条件为:42  $^{\circ}\text{C}$  1 h,75  $^{\circ}\text{C}$  15 min。反应结束后以此为模板进行 PCR 扩增,引物序列为:上游 5'-CTCTGACTGACCGCGTTACTC-CCAC-3';下游 5'-GCGTGATGCAGTTTGTGACTC-TTCTG-3'。PCR 反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,66  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。预期扩增片段长度为 512 bp。

#### 1.8 数据处理

试验均重复 3 次,数据处理用 SPSS 13.0 软件进行 *t* 检验,当  $P < 0.05$  时认为差异显著。

## 2 结 果

### 2.1 大白猪胎儿成纤维细胞对 G418 敏感性检测

培养液中加入不同浓度的 G418 进行 2 周培养,观察发现,加入  $1\,000$ 、 $900$  及  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 G418 对细胞产生较大毒性,所有细胞在 3~5 d 内全部死亡; $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 G418 对细胞的毒性过小,13 d 左右将细胞全部杀死;加入  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 G418,细胞生长状况良好,未见明显细胞毒性;而加入  $400 \sim 600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 G418,可以在 7~8 d 内将细胞全部杀死(表 1)。为了不使细胞因过高浓度的 G418 伤害而影响染色体倍性、细胞状态,同时表 1 大白猪胎儿成纤维细胞对 G418 耐受检测结果

Table 1 G418 tolerance of Large White pigs fetal fibroblasts

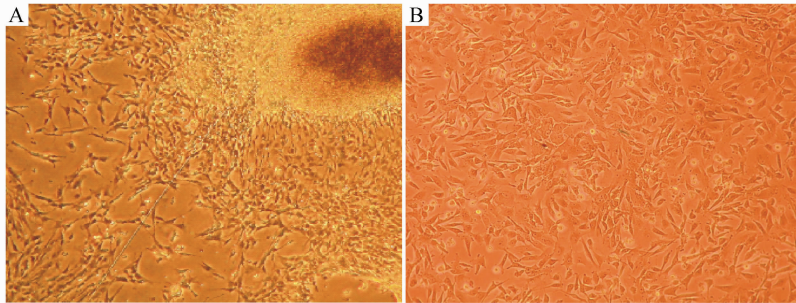
G418 浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞全部死亡时间/d
Concentration of G418	Time of cells death
0	—
100	—
200	13
400	8
600	7
800	5
900	4
1 000	3

又具有较高的转基因效率,因此采用  $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 G418 进行连续 10 d 的筛选。

### 2.2 大白猪胎儿成纤维细胞 *sFat-1* 基因的转染、筛选及鉴定

大白猪胎儿成纤维细胞转染 48 h 后转至 24 孔板中,恢复 48 h 后开始加入 G418 进行筛选,计为第 0 天(图 1A)。3 d 后开始有大量细胞死亡,第 6 天阴性细胞基本被杀死,开始有克隆点出现。在筛

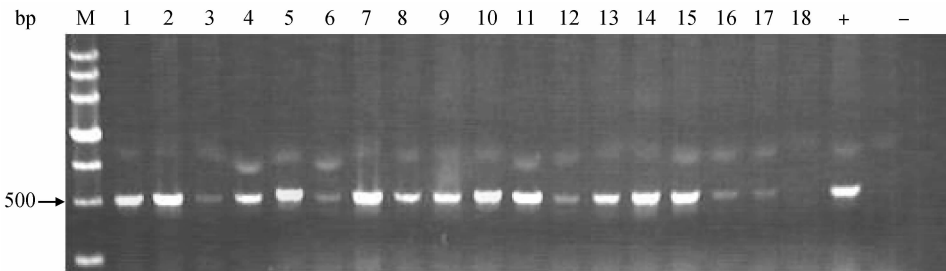
选的第 10 天进行传代、扩增(图 1B),共获得了 18 个 G418 抗性细胞株。PCR 检测结果显示,18 号克隆点未检测到目的基因;3、6、12、16 及 17 号克隆点细胞,虽检测到目的基因的存在但含量很小,可能混有较多阴性细胞;剩余 12 个为转基因阳性(图 2);再利用 RT-PCR 检测这 12 个阳性克隆点的 RNA 表达水平,发现 4 号克隆点的 RNA 表达量极低(图 3),认定其为转基因阴性。



A. 猪胎儿成纤维原代细胞 40×; B. 转染 9 d 后的猪胎儿成纤维细胞 100×  
A. Primary cultured fetal fibroblast of Large White pigs 40×; B. Porcine fetal fibroblast after 9 days transfection 100×

图 1 转基因细胞系的建立

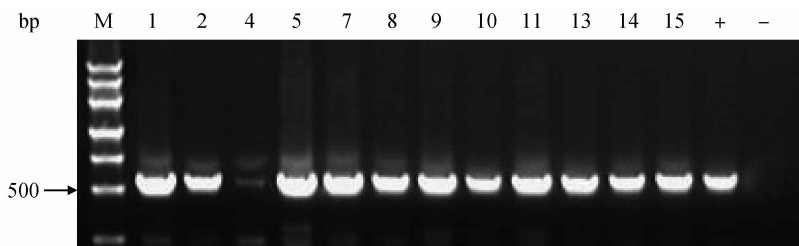
Fig. 1 Establishment of transgenic cell line



M. Marker III (天根); +. 为阳性对照, - 表示阴性对照; 1~18. 表示不同克隆点细胞  
M. Marker III (TianGen); +. Positive; - . Control; 1-18. Different cell clones

图 2 转 *sFat-1* 基因细胞系 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of *sFat-1* transgenic cell line



M. Marker III (天根); +. 为阳性对照, - 表示阴性对照; 1~15. 代表不同克隆点细胞  
M. Marker III (TianGen); +. Positive; - . Control; 1-15. Different cell clones

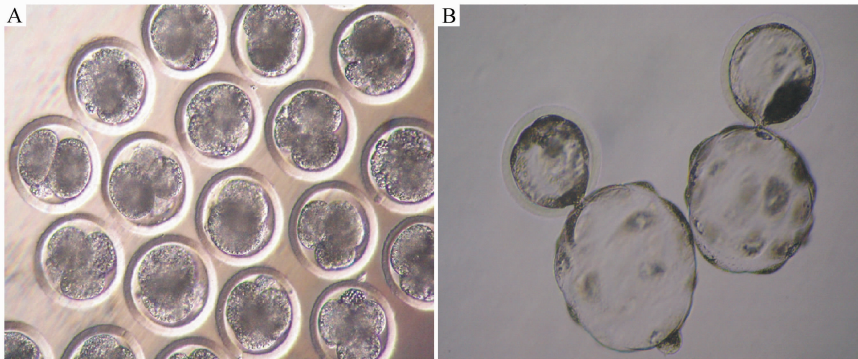
图 3 转 *sFat-1* 基因细胞系 RT-PCR 检测

Fig. 3 RT-PCR analysis of *sFat-1* transgenic cell line

### 2.3 转基因与非转基因克隆胚胎体外发育能力的比较

以转基因细胞为核供体未对胚胎发育造成不良影响,转基因克隆胚胎能够正常发育(图 4)。转基

因克隆胚胎与非转基因克隆胚胎的卵裂率( $76.6\% \pm 4.1\%$  vs.  $81.6\% \pm 3.1\%$ )及囊胚率( $10\% \pm 1.97\%$  vs.  $9.7\% \pm 1.4\%$ )两者相比,差异不显著( $P > 0.05$ ),见表 2。



A. 转基因克隆 2~4 细胞胚胎;B. 转基因克隆囊胚

A. 2~4 cell of transgenic cloned embryos; B. Transgenic cloned blastocysts

图 4 转基因克隆胚胎 150 $\times$

Fig. 4 Transgenic cloned embryos 150 $\times$

表 2 转基因与非转基因克隆胚胎体外发育能力

Table 2 The development of the transgenic and non-transgenic cloned embryos *in vitro*

供体细胞	培养胚胎数	卵裂数(% $\pm$ SE)	囊胚数(% $\pm$ SE)
Donor cell	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved	No. of blastocyst
转基因	279	214 ( $76.6 \pm 4.1$ ) <sup>a</sup>	27 ( $10 \pm 1.97$ ) <sup>b</sup>
非转基因	266	217 ( $81.6 \pm 3.1$ ) <sup>a</sup>	26 ( $9.7 \pm 1.4$ ) <sup>b</sup>

同一栏内上标不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下表同

Values with different superscript letters within a column are significantly different ( $P < 0.05$ ), the same as below

### 2.4 不同二次激活方法对转基因克隆胚胎体外发育能力的影响

由表 3 可知,与电激活相比,利用 CHX 进行化学激活虽然未提高胚胎的卵裂率( $72.4\% \pm 4.96\%$

vs.  $76.6\% \pm 4.1\%$ ,  $P > 0.05$ ),但却使胚胎的囊胚发育率提高了 2 倍以上( $20.6\% \pm 0.89\%$  vs.  $10\% \pm 1.97\%$ ,  $P < 0.05$ )。

表 3 不同二次激活方法对胚胎发育能力的影响

Table 3 Effect of different methods of activation on the development of the embryos

二次激活方式	培养胚胎数	卵裂数(% $\pm$ SE)	囊胚数(% $\pm$ SE)
Type of second time activation	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved	No. of blastocyst
电激活	279	214 ( $76.6 \pm 4.10$ ) <sup>a</sup>	27 ( $10.0 \pm 1.97$ ) <sup>b</sup>
CHX 化学激活	252	184 ( $72.4 \pm 4.96$ ) <sup>a</sup>	51 ( $20.6 \pm 0.89$ ) <sup>c</sup>

## 3 讨论

利用 SCNT 技术生产转基因动物的最大优势在于,将转基因完成于体细胞阶段,并采用已确定为转基因的体细胞进行核移植,这样生产出的动物必定为转基因动物。因此,供体细胞的转染及筛选对

通过 SCNT 技术生产转基因动物至关重要。筛选时所使用的药物浓度会影响到转基因阳性率及细胞状态。G418 浓度过高会对细胞产生较大的毒性;过低又会影响到细胞的阳性率。本研究采用  $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  G418 进行筛选,既获得了较高的阳性率,又保证了细胞状态的良好。有文献报道,对转基

因细胞进行长时间的药物筛选会降低体细胞克隆效率<sup>[8-9]</sup>,但本研究未出现这种情况,且转基因与非转基因克隆胚胎的发育能力并无显著差异,这可能与使用细胞系的不同有关。虽然理论上筛选出的细胞应全部为阳性,但从本研究的结果看,会有一些阴性细胞因克隆耐受了 G418 的毒性而存活。由此可推断,在鉴定为阳性的细胞克隆中,可能也会混杂有阴性细胞。本研究所筛选出的一些细胞克隆点可能混有阴性细胞,因此 PCR 检测结果显示其表达较弱。因此,在对克隆点细胞进行传代培养时,可以适当加入少量的筛选药物,以维持细胞纯度。

虽然使用 SCNT 技术生产转基因动物可以获得较高的转基因效率,而且通过该技术已经成功培育出转基因绵羊、牛和基因定点修饰的绵羊与猪等<sup>[10-14]</sup>。但克隆动物的生产效率仍然较低,这严重限制了 SCNT 技术在实际生产中的应用。早期胚胎囊胚发育率及受体怀孕率低是造成克隆猪生产效率低的重要原因,因为猪的妊娠需要有 4 个以上的囊胚着床才能建立<sup>[15]</sup>。为了增加有效囊胚数量,研究者们尝试了诸如孤雌与克隆胚胎混合移植、增加移植胚胎数量等方法<sup>[16]</sup>,并在一定程度上提高了怀孕率。但这些方法还不足以使克隆效率得到显著提高。提高猪早期胚胎的囊胚发育率,不但可以为胚胎着床提供足够数量的囊胚,且对提高产仔数会起到促进作用,使克隆效率得到提高。为此,本研究比较了电二次激活与 CHX 化学二次激活对克隆胚胎发育的影响。结果显示,采用 CHX 辅助激活可以将转基因克隆胚胎的囊胚率提高 2 倍以上,这为从根本上解决克隆猪怀孕率及产仔数低的问题做了有益的尝试。

综上所述,本研究通过脂质体介导的方法,建立了转 *sFat-1* 基因大白猪胎儿成纤维细胞系;并通过优化克隆胚胎的激活方法,建立了较高效率的生产转基因克隆胚胎平台,为转 *sFat-1* 基因克隆猪的诞生奠定了坚实的基础。

#### 参考文献:

- [1] KANG J X. The importance of omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cell function. The gene transfer of omega-3 fatty acid desaturase[J]. *World Rev Nutr Diet*, 2003, 92: 23-36.
- [2] 潘登科,陈红星,冯书堂,等. 富含  $\omega-3$  多不饱和脂肪酸克隆猪制备的关键技术研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(5): 22-25.
- [3] SPYCHALLA J P, KINNEY A J, BROWSE J. Identification of an animal  $\omega-3$  fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(4): 1142-1147.
- [4] LAI L, KANG J X, LI R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(4): 435-436.
- [5] ZHU G M, CHEN H X, WU X J, et al. A modified n-3 fatty acid desaturase gene from *C. Briggase* produces high proportion of DHA and DpA in transgenic mice [J]. *Jransgenic Res*, 2008, 17(4): 717-725.
- [6] 张运海,潘登科,孙秀柱,等. 利用体细胞核移植技术生产表达绿色荧光蛋白的猪转基因克隆胚胎[J]. *中国科学 C 辑*, 2005, 35(5): 439-445.
- [7] YOSHIOKA K, SUZUKI C, TANKA A, et al. Birth of piglet derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(1): 112-119.
- [8] OGURA A, INOUE K, OGONUKI N, et al. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(6): 1579-1584.
- [9] ZAKHARTCHENKO V, MUELLER S, ALBERIO R, et al. Nuclear transfer in cattle with nontransfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts [J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(3): 362-363.
- [10] SCHIEKE 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.
- [11] CIBELLI J B, STICE S L, GOLUEKE P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science*, 1998, 289: 1256-1258.
- [12] MCEATH 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.
- [13] LAI L, KOLHER-SIMONDS D, PARK K W, et al. Production of alpha 1-3 galactosyltransferase knock-out pigs by nuclear transfer cloning [J]. *Science*, 2002, 295: 1089-1092.
- [14] DAI Y, VAUGHT T D, BOONE J, et al. Targeted disruption of the alpha 1-3galactosyltransferase gene in cloned pigs [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3): 251-255.
- [15] VAJTA G, ZHANG Y, MACHATY Z. Somatic cell nuclear transfer in pig: Recent achievements and further possibilities [J]. *Reprod, Fertil and Dev*, 2007, 19: 403-423.
- [16] 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: 415-419.