添加物和消化液对牛和小鼠类胚胎干细胞克隆效率的影响*

安立龙[1,2], 高志敏[1], 杨 奇[1], 冯秀亮[1], 窦忠英[1], 雷安民[1], 杨春荣[1], 邱 怀[1]

(1 西北农林科技大学 家畜生殖内分泌与胚胎工程农业部重点开放实验室, 陕西 杨陵 712100;
2 湛江海洋大学 农学院, 广东湛江 542000)

[摘 要] 研究了犊牛血清、饲养层、培养液、添加物和消化液对牛和小鼠类胚胎干细胞克隆效率的影响。结果表明, 在 24 h 内使小鼠胚胎贴壁率达 86% 以上的犊牛血清可用于小鼠和牛胚胎干细胞的分离和克隆; 在 ES 细胞培养液中, 犊牛血清体积分数以 15%～20% 为宜, 在 DMEM (L) 培养液中添加 0.1 μmol/L Na_2SeO_3 + 0.1 mmol/L β-巯基乙醇 + 10 ng/mL IGF + 1 000 ng/mL LIF, 能显著提高牛 ES 细胞分离与克隆效率; 低糖 DMEM 比 TCM 199 和高糖 DMEM 更适宜于牛 ES 细胞的分离。优秀胚胎形成的团状 ICM 更适宜于分离与克隆 ES 细胞, 在 37 ℃用低体积分数消化液处理 ICM 或 ES 细胞集落, 再以机械将其离散为细胞小块, ES 细胞克隆效率最高。

[关键词] 牛; 小鼠; 胚胎干细胞; 内细胞团; 克隆效率
[中图分类号] S827.36; Q954.432 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2782(2001)05-005-06

胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ES 细胞)是从早期哺乳类动物胚胎或原始生殖细胞分离的具有全能性的细胞系。在体外分化抑制培养条件下, 具有保持未分化的状态及无限增殖的能力。自 Evans 和 Kaufman 首次建立小鼠 ES 细胞系以来, 各种动物 ES 细胞分离与克隆成为国际生物科学领域的热点课题之一[1]。ES 细胞可广泛应用于嵌合体的制备[2]和克隆动物的生产[3]。利用 ES 细胞遗传操作, 可生产转基因动物[4], 进行细胞基因结构与功能的关系以及细胞分化机制的研究[5]。有关牛类 ES 细胞分离与克隆的研究已取得很大进展[6～10], 分别从牛鲜胚内细胞团(Inner cell mass, ICM), 原始生殖细胞(Primary germ cell, PGCs)、体外受精胚胎和核移植胚胎中分离获得牛类 ES 细胞。但牛 ES 细胞分离与克隆效率低, 制约了该项技术在动物遗传育种及生物医药领域的应用。前文[8]已报道了牛胚胎干细胞分离与克隆的基本方法, 本文重点阐述血清、饲养层类型、培养液、白血病抑制因子(Leukemia inhibitoryfactor, LIF)、胰岛素生长因子(Insulin growth factor, IGF)等添加物以及消化液等关键因子对牛 ES 细胞分离与克隆效率的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 小鼠胚胎的采集 选取发情静止期(外阴呈白色)成年昆白小鼠(购于第四军医大学试验动物中心)于晚 20:00 腹腔注射 PMSG(10 ng/只), 48 h 后腹腔注射 HCG(10 ng/只), 按 1∶1 公母比例合笼, 次日上午 8:00 以前检查, 若母鼠有阴道栓, 确认其交配受精, 在见栓后 84～96 h 内, 用常规方法从子宫冲取胚胎。

1.1.2 牛胚胎采集 选取健康经产黑白花奶牛母牛采胚。在牛自然发情或用氯前列烯醇处理诱发发情后 9～12 d 进行直肠检查, 对有周期黄体且黄体弹性良好者进行超数排卵, 在进行第 1 次人工授精后第 6～8 天非手术法从子宫冲取胚胎, 方法参考文献[11]。

* [收稿日期] 2000-09-12
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670359); 国家"九五"攻关项目(96-C0103); 西北农林科技大学青年教师专项基金资助项目(5210818)
[作者简介] 安立龙(1966-), 男, 陕西渭南人, 副教授, 博士后。主要从事哺乳动物生殖生物学与胚胎工程研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 试验方法

1.2.1 溶液配制 胚胎操作液、饲养层细胞培养液、丝裂霉素液、细胞消化液、PBS 配制方法参考文献[12]。

1.2.2 饲养层制备 选择妊娠 12～16 日龄昆明系小白鼠胎儿制备原代小鼠胎儿成纤维细胞(Primary Murine Embryonic feeder),选取新生犊牛睾丸制备牛成纤维细胞,小鼠胎儿成纤维细胞和犊牛睾丸成纤维细胞制备与传代方法参考文献[12]。

1.2.3 胚胎处理和胚胎培养条件 基础培养液为 DMEM(低糖)+体积分数为 15%NBS+0.1 mmol/L β巯基乙醇+0.1 μmol/L Na_2SeO_3。小鼠胚胎及 ES 细胞培养条件为 37 ℃、体积分数 5% CO_2、饱和湿度。牛胚胎及 ES 细胞的培养条件为 38 ℃、体积分数 5% CO_2 和饱和湿度。

1.2.4 ICM 初次传代 体外培养 ICM 细胞 6～7 d,当细胞数量增殖到一定程度后,选择生长集中、隆起明显、呈鸟巢状,形态上仍保持未分化的 ICM 集落进行传代。具体程序是,用玻璃针剥离 ICM 表面覆盖的滋养层细胞,再将 ICM 挑出,用无钙镁离子 PBS 洗涤 1 次,置于质量分数为 0.125%胰蛋白酶+质量分数为 0.02% EDTA 消化液中,在 37 ℃条件下处理,再转入含体积分数为 15%的血清培养液中,用毛细管玻璃针拨离,吹打,制备细胞团悬液(每个细胞含 3～10 个 ICM 细胞)。将 ICM 细胞团悬液接种于铺有新制备饲养层(提前 12～24 h 制备)的 4 孔板中。在 38 ℃,饱和湿度和体积分数 5% CO_2 的条件下培养,每 2 d 更换 1 次培养液。

1.2.5 ES 细胞继代克隆 培养 3～5 d 后,当饲养层表面出现类 ES 细胞集落时,弃去培养液,加入无钙镁 PBS 冲洗 2～3 次。用玻璃针拨离隆起明显、细胞排列紧密的 ES 样细胞集落,使其脱离 PMEF 饲养层。用吸管将集落转移至消化液中,37 ℃处理。再将集落移入培养液中,用毛细管玻璃针拨离集落,制成 ES 细胞块悬液。将 ES 细胞接种于新鲜饲养层表面,加入培养液,以后每 3～5 d 传代 1 次。

1.2.6 ES 细胞的鉴定 AKP 染色法、体外分化试验、体内分化试验和细胞核移植等方法参考文献[12,13]。

2 结果与分析

2.1 白血病抑制因子和胰岛素生长因子

在低糖 DMEM 基础培养液中,分别添加 1 000 ng/mL LIF,10 ng/mL IGF 和 1 000 ng/mL LIF+10 ng/mL IGF,研究 LIF,IGF 及其组合对牛胚胎桑椹胚生长及 ES 细胞克隆的影响,结果如表 1 所示。

表 1 IGF 和 LIF 对牛胚胎生长及 ES 细胞克隆的影响

Table 1 The effect of LIF and IGF on bovine embryos growth and cloning of embryonic stem cell

组别 Group	胚胎数/枚 Number of embryos	贴壁胚胎数/枚 Attached embryos	ICM 增殖高峰期/h Time of ICM growth top	胚胎体外培养 5 d ICM 直径/μm ICM diameter of embryo cultured in vitro for 5 days	形成 ES 细胞集落胚数/枚 Number of embryos produced by ES cell	ES 细胞最大传代数/代 Maxium of ES cell clone
对照组 Contrast group	12	8(66.7)	120～144	218±15	2(33.3)	2
IGF 组 IGF group	12	10(83.3)	96～120	325±16	3(50.0)	4
LIF 组 LIF group	12	10(83.3)	120～144	256±13	3(50.0)	5
IGF+LIF IGF+LIF group	12	12(100)	96～120	368±18	6(75)	6

注:括号中数字为百分率,下同。

Note: The number in bracket are percentage, the following tables are the same as this

由表 1 可见,与对照组相比较,单独添加 LIF 和 IGF 均能提高 ES 细胞克隆率,增加 ES 细胞克隆代数;同时添加 LIF 和 IGF,则能显著提高 ES 细胞克隆率和显著增加 ES 细胞克隆代数。

2.2 消化液

在离散 ICM 和 ES 细胞集落时,分别用质量分数 0.25%胰蛋白酶+质量分数 0.04% EDTA 消化液(1 组),质量分数 0.125%胰蛋白酶+质量分数 0.02% EDTA 消化液(2 组)和质量分数 0.05%胰蛋酶+质量分数 0.010% EDTA 消化液(3 组)处理 ICM,结果如表 2 所示。

由表 2 可见,用低体积分数消化液长时间处理内细胞团或 ES 细胞集落,将细胞集落离散为 3～5 个细胞团,ES 细胞克隆效率最高。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　消化液体积分数及作用时间对牛 ES 细胞形成率的影响

Table 2　The effect of digestant concentration and digestion time on efficiency of Bovine ES cell cloning

消化液 Digestant	温度/℃ Temperature	作用时间/min Digestion time	ICM 数量/枚 Number of ICM	ICM 集落离散状况 Scatter of ICM	形成 ES 细胞集落数/枚 ES clone produed by ICM	ES 细胞传代数/代 Passage of ES cell
1	37	2	1	小细胞团块 Small mass of cell	8～10	4
		4	1	2～10 个细胞群 2～10 cell population	2～3	2
		6	1	单个细胞 Single cell	0	0
2	37	2	1	中细胞团块 Middle mass of cell	6～9	4
		4	1	小细胞团块 Small mass of cell	10～15	5
		6	1	2～10 个细胞群 2～10 cell population	2～3	1
3	37	2	1	大细胞团块 Big mass of cell	3～6	3
		4	1	中细胞团块 Middle mass of cell	6～9	4
		6	1	小细胞团块 Small mass of cell	10～15	6

2.3　胚胎质量

将试验牛桑椹胚按质量优劣分为 3 类: 第 1 类为优秀胚胎, 该类胚胎为球形, 细胞排列紧密, 无分散, 透明带完整; 第 2 类为良好胚胎, 该类胚胎卵裂球细胞排列紧密, 但有少数细胞突出或卵裂球形成许多彼此相隔离的细胞小块; 第 3 类为劣质胚胎, 卵裂球细胞松散。体外培养观察 3 种胚胎 ICM 形态及 ES 细胞克隆情况, 结果如表 3 所示。

表 3　牛胚胎质量对 ICM 生长及 ES 细胞分离的影响

Table 3　The effect of bovine quality on clone of ES cells

胚胎类型 Type of embryos	供试胚数/枚 Embryos for experiment	附着数/枚 Atttachment embryos	形成 ICM 胚胎数/枚 Embryos producing ICM	ICM 形态 Shape of ICM	形成 ES 细胞胚数/枚 Embryos producing ES cell
优秀 Excellence	6	6(100)	6(100)	团状 Mass	5(83.3)
良好 Nicer	6	4(66.6)	4(66.6)	条状、网状 Strip, netlike	2(33.3)
劣等 Poor	6	2(33.3)	1(16.6)	散状 Scatter shape	0(0)

由表 3 可见, 桑椹胚或囊胚质量与胚胎培养形成 ICM 的形状密切相关。优秀胚胎形成的 ICM 呈团状, 这种 ICM 细胞具有全能性, 分离和克隆 ES 细胞的成功率高; 良好胚胎形成的 ICM 呈条状或网状, 部分细胞已具有分化的趋势, 其分离 ES 细胞的成功率不及团状 ICM 高; 劣等胚胎所形成的 ICM 多呈分散状, 其分离 ES 细胞的成功率最低。大部分劣质胚胎生活力差, 体外培养增殖缓慢或不增殖, 这种胚胎不宜用于分离 ES 细胞。

2.4　培养液

TCM 199, DMEM (高糖, 4.5 g/L 葡萄糖) 和 DMEM (低糖, 1.0 g/L 葡萄糖) 3 种基础培养基对小鼠囊胚生长以及 ES 细胞克隆效率的影响列于表 4。

表 4　培养液对小鼠胚胎及 ES 细胞分离与克隆的影响

Table 4　The effect of culture medium on clone seperation of Bovine and Murine ES cell

培养液 Culture medium	供试胚数/枚 Embryos for experiment	附着胚胎数/枚 Attachment embryos	形成 ICM 胚胎数/枚 Embryos producing ICM	不同代 ES 细胞胚胎数/枚 Embryos producing ES cell					
				1	2	3	4	5	6
TCM 199	46	32	24	10	5	0	0	0	0
DMEM (H)	48	44	40	15	8	4	0	0	0
DMEM (L)	44	42	36	34	24	18	14	10	7

由表 4 可见, 以 TCM 199 作基础培养液, 胚胎生长缓慢, 所形成的 ICM 细胞数量少, 体积小((110±12) μm), 体外培养 120 h 开始形成 ICM 集落, 传代获得 2 代 ES 细胞集落。以 DMEM (高糖) 作基础培养液, 胚胎附着率和 ICM 形成率都较高, ICM 生长迅速, ICM 细胞集中排列, 呈团状生长且 ICM 体积大(直径(316±18) μm), 胚胎培养 96 h, 开始形成 ICM。但 ICM 开始分化的时间早(胚胎培养 120 h), 分化的 ICM 数量多, ES 细胞形成率低。以 DMEM (低糖) 作基础培养液, 胚胎附着率和 ICM 形成率较都大。

与高糖 DMEM 组相比较, 低糖组 ICM 生长缓

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

慢,培养 108 h 开始形成 ICM 集落,ICM 体积小(直径(256±13) μm),ICM 开始分化的时间晚(胚胎体外培养 148 h)。但就 ES 细胞形成率而言,低糖组明显高于高糖组。因此,低糖 DMEM 更适宜于牛 ES 细胞分离与克隆。

2.5 犊牛血清质量与数量

不同批次的犊牛血清对胚胎贴壁及 ES 细胞分离与克隆有重要影响(表 5)。

表 5 犊牛血清对小鼠胚胎贴壁生长及 ES 细胞分离的影响

Table 5 The effect of quality of new bovine serum on growth of murine embryos and ES cells seperation

批次 Group	胚胎数/枚 Embryos number	24 h 贴壁胚胎数/枚 Embryos attached for 24 hour	48 h 贴壁胚胎数/枚 Embryos attached for 38 hour	72 h 贴壁胚胎数/枚 Embryos attached for 72 hour	传至 5 代 ES 细胞胚胎数/枚 Embryos producing 5 passage ES cell
1	48	45(93.7)	48(100)	0	0
2	50	43(86.0)	45(95.0)	50(100)	4(8.0)
3	43	26(60.1)	35(81.3)	39(90.0)	8(18.6)

在 24 h 内使小鼠囊胚贴壁率达到 85% 以上的血清,可用于小鼠和牛 ES 细胞的分离与克隆。血清体积分数对胚胎生长和 ES 细胞分离的影响见表 6。

在试验中还发现,培养液中血清体积分数过高或过低,ICM 细胞和 ES 细胞增殖缓慢,都不利于胚胎细胞增殖和 ES 细胞分离。牛胚胎与小鼠胚胎生物学特性有许多相似之处。因此,在牛胚胎体外培养和 ES 细胞分离过程中,培养液中 NBS 体积分数应不小于 15%。

表 6 血清体积分数对小鼠 ICM 细胞生长和 ES 细胞分离效果的影响

Table 6 The effect of concentration of new bovine serum on growth of murine embryos and ES cells seperation

犊牛血清体积分数/% NBS	供试胚胎数/枚 Embryos for experiment	附植胚胎数/枚 Attachment embryos	形成 ICM 胚胎数/枚 Embryos producing ICM	形成 ES 细胞胚胎数/枚 Embryos producing ES cell
5	14	6(42.8)	6(42.8)	0(0)
10	12	8(66.6)	8(66.6)	2(16.6)
15	11	8(72.7)	8(72.7)	4(36.4)
20	14	10(71.4)	10(71.4)	6(42.5)

2.6 饲养层

用 PMEF(小鼠胎儿成纤维细胞)和 BTF(牛睾丸成纤维细胞)2 种饲养层培养牛桑椹胚,研究 ICM 生长及 ES 细胞分离情况。发现在 PMEF 表面生长的牛胚胎,体外培养 72 h 即可见明显增殖。增殖高峰期发生于培养 108~144 h。培养在 BTF 上的胚胎 96 h 后才可见明显增殖,其增殖高峰发生于 120~158 h。当继续培养,生长在 PMEF 表面的牛胚胎形成的 ICM 体积比在 BTF 表面形成的体积大。就分化速度而言,在 PMEF 饲养层表面形成的 ICM 易分化。ICM 开始出现分化时间,BTF 和 PMEF 分别为 168 h 和 156 h。生长在 PMEF 表面的 ICM 传代后获得的集落比 BTF 多。从 BTF 饲养层表面获得的 ES 样细胞集落在连续传代 2 次后消失。就 ES 细胞分离和克隆效果而言,BTF 饲养层并未表现出明显优势。

2.7 类 ES 细胞的鉴定

以小鼠和牛 ICM 作阳性对照进行碱性磷酸酶染色,小鼠和牛类 ES 细胞呈紫红色,表现为阳性。体外培养牛类 ES 细胞,分化形成类胚体,神经样细胞组织。以牛类 ES 细胞为供体,以去核卵母细胞为受体进行细胞核移植,重构胚分裂率为 50%~60%,发育至桑椹胚的比率为 20%。这说明,所分离的类 ES 细胞具有发育全能性的潜力。

3 讨 论

3.1 添加物

Strojek[14] 以 DMEM 作基础培养液,添加体积分数为 10% 胎牛血清、体积分数为 10% 犊牛血清、质量分数为 0.04% 牛胰岛素和 0.1 mmol/L β-巯基乙醇,从猪 ICM 分离出类 ES 细胞。Booth[15] 分离猪 ES 细胞时,在无血清 DMEM 基础培养液中添加 10 μg/mL 胰岛素和 10 mg/mL hLIF,获得了类 ES 细胞。在牛 ES 细胞分离与克隆的过程中,常用的添加物为 1 000 ng/mL hLIF,体积分数为 0.1% 必需氨基酸、10 mg/mL 胰岛素和 0.1 mmol/L β-巯基乙醇。笔者仅用 DMEM + 体积分数为 15% NBS+ 0.1 mmol/L β-巯基乙醇+ 0.1 μmol/L Na_2SeO_3 培养液和 PMEF 饲养层获得传 5 代的小鼠 ES 细胞,而加入 1 000 ng/mL LIF,有利于小鼠 ES 细胞的维持。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在分离牛 ES 细胞的过程中, 添加 LIF, IGF 和 LIF + IGF, 能显著提高 ES 细胞的克隆率, 增加 ES 细胞的传代数。这与 Durcova-hills[16] 对猪的研究结果相类似。LIF 提高 ES 细胞克隆率的主要原因是抑制 ICM 和 ES 细胞分化, 保持其全能性。IGF 提高 ES 细胞克隆率的主要原因是通过促进细胞中的 DNA 和蛋白质合成来提高细胞分裂速度。

3.2　饲养层

胎儿成纤维细胞饲养层既能促进 ES 细胞生长又可抑制 ES 细胞分化。因此, 在 ES 细胞建系过程中, 胚胎、ICM 及 ES 细胞必须附着在饲养层上生长。胚胎附着饲养层是启动 ICM 快速增殖的信号, 推迟胚胎附着可无限地延迟 ICM 快速增殖的启动[15]。本试验中发现, 在 48 h 内尚未贴壁的胚胎, 其 ICM 细胞生长缓慢。成纤维细胞促进 ICM 和 ES 细胞增殖和抑制其分化的主要原因在于成纤维细胞膜表面分泌 IGF 和 LIF。在分离各种动物 ES 细胞过程中, 大多数试验都采用小鼠胎儿成纤维细胞为饲养层, 其主要原因在于小鼠胎儿取材方便, 试验费用小。胡立新[17] 比较 PMEF 和 STO 细胞饲养层分离小鼠 ES 细胞的效果, 发现 STO 饲养层细胞分离的 ES 核型异常率高。Piedrahita[18] 在分离猪 ES 细胞过程中, 用猪胎儿成纤维细胞和子宫上皮细胞作饲养层, 未分离到猪类 ES 细胞, 而采用 PMEF 或 STO 细胞作饲养层, 获得了猪类 ES 细胞。Meinecke-Tillamann[19] 在分离绵羊和山羊类 ES 细胞过程中, 发现 BFLF (牛肝成纤维细胞) 比 STO 或 PMEF 细胞饲养层更具有优势。赖良学[20] 比较 STO, PMEF 和兔胎儿成纤维细胞分离 ES 细胞的效率, 认为 STO 和 PMEF 更有利于 ES 细胞的分离。本试验比较 MEF 和 BTF 的作用, 发现 MEF 促进 ES 细胞增殖的作用优于 BTF, 但其抑制 ES 细胞分化的能力则不及 BTF; 就 ES 细胞分离与克隆效果而言, MEF 优于 BTF。

3.3　培养液

Saito[6] 在分离牛 ES 细胞时, 培养胚胎的培养基为 TCM 199, 培养 ES 细胞的培养基则为 MEM-α, 获得了传 5 代的牛类 ES 细胞。DMEM 是分离 ES 细胞过程中使用较为普遍的培养基。胡立新[17] 比较高糖和低糖 DMEM 对小鼠 ES 细胞分离的影响, 认为高糖 DMEM 有利于小鼠 ES 细胞的分离。笔者比较 TCM 199、高糖 DMEM 和低糖 DMEM 分离牛 ES 细胞的效率, 低糖 DMEM ES 细胞克隆率最高, 虽然高糖 DMEM 使 ICM 和 ES 细胞增殖迅速, 但细胞分化也迅速。

3.4　消化液

ICM 或 ES 细胞集落的消化与离散是分离与克隆 ES 细胞的重要环节。消化液作用时间过长, 体积分数过大会损伤细胞, 使 ES 细胞死亡; 消化液体积分数过低, 作用时间短暂, 细胞难以离散, 集落中已分化细胞诱发 ES 细胞分化。在 ES 细胞的传代过程中, 不同作者所用消化液的体积分数与作用时间不同, 如 Saito[6] 用质量分数为 0.25% 胰蛋白酶+ 质量分数为 0.04% EDTA 在 37 ℃条件下, 处理集落 2～3 min; Strojek[14] 用 200 ng/mL 胶原蛋白酶+ 质量分数为 0.05% 胰蛋白酶+ 质量分数为 0.02% EDTA 在 37 ℃处理 ES 细胞集落 5 min; Piedrahita[18] 用质量分数为 0.05% 胰蛋白酶+ 质量分数为 0.02% EDTA 在 20～25 ℃处理集落 15～20 min。本试验比较了 3 种体积分数的胰蛋白酶消化液分别作用 2, 4 和 6 min 的效果, 发现低质量分数 (质量分数为 0.06% 胰蛋白酶+ 质量分数为 0.01% EDTA) 消化液作用较长时间 (6 min) 时, ES 细胞分离与克隆效果最好, 这与 Parnpai 的结果相类似[21]。本试验及前人的研究都显示, 不同试验室所用消化液的体积分数、作用时间和作用条件不完全相同, 消化液的体积分数和作用时间等参数只能作为参考, 重要的是试验者应在实践中把握消化离散 ICM 和 ES 细胞的最佳时机, 用低体积分数消化液处理细胞集落, 并通过机械方法分割使其成为细胞小块, 能成功离散 ICM 和 ES 细胞集落。

[参考文献]

[1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(9): 154-156.

[2] Stephen A W, Nick P A, Janet R, et al. No-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras[J]. Nature, 1993, 365: 97-89.

[3] Campbell K H S, Wilmut A E. Totipotence or multipotentiality of cultured cells: applications and progress[J]. Theriogenology, 1997; 47: 63-67.

[4] 杜宪兴, 施渭康. LIF 基因转染的 ES 细胞生长与分化特性的研究[J]. 实验生物学报, 1996, 29(4): 413-421.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[5] Wheeler M B. Development and validation of swine embryonic stem cells[J]. Reprod Fertil Dev, 1994, 6: 563- 568.
[6] Saito T. Bovine embryonic stem cell-like culture over several passages[J]. Reprod Dev Biol, 1992, 20(3): 134- 141.
[7] Robert A. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells[J]. Reprod fertil, 1994, 6: 569- 575.
[8] 安立龙, 杨 奇, 窦忠英, 等. 牛和猪胚胎干细胞的分离与克隆[A]. 叶鑫生主编. 干细胞与发育生物学[C]. 北京: 军事医学出版社, 2000. 42- 47.
[9] Ito T. Influence of stage and derivation of bovine embryos on formation of embryonic stem (ES) like colonies[J]. Journal of Reproduction and Development, 1996, 42(5): 129- 133.
[10] Cibelli J B, Stice S L, Kane J J, et al. Production of germLine Chimeric bovine fetues from transgenic embryonic stem cells [J]. Theriogenology, 1997, 47: 241(abstract).
[11] 高志敏, 窦忠英, 王新庄. 超数排卵对奶牛产奶量及繁殖能力的影响[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(增刊): 62- 65.
[12] 安立龙. 牛胚胎干细胞分离与克隆[D], 陕西杨陵: 西北农业大学畜牧兽医学院, 1999.
[13] 雷安民. 牛细胞核移植研究[D]. 陕西杨陵: 西北农业大学畜牧兽医学院, 1999.
[14] Strojek R M A. Method for culturing morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts [J]. Theriogenology, 1990, 33: 901- 913.
[15] Booth P J, Perreau C, Hochereau de Revier. TEC- 1 characteritation of porcine embryonic cells from day 11 embryonic pisc cultured in serum-free medium [J]. Theriogenology, 1997, 47(1): 240- 247.
[16] Durcova G, Tokunaga T, Takahasis, et al. Immunomagnetic Isolation of mouse embryonic stem cells form heterogeneous cell population [J]. Thereigenology, 1997, 47(1): 243- 248.
[17] 胡立新, 尚克刚. 6 个小鼠 ES 细胞系的建立和鉴定[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1996, 32(2): 248- 253.
[18] Piedrahita J A, Anderson G B, Bondurant R H. On the isolation of embryonic stem cell: Comparative Behavior of murine, porcine, ovine embryos[J]. Thereiogenology, 1990, 34(5): 879- 901.
[19] Meineck-tillmann, Meinecke B. Isolation of ES-like cell lines from ovine and caprine preimplantation embryos [J]. J Animal Breed genetic, 1996, 113: 413- 416.
[20] 赖良学, 郑瑞珍, 辛 剑. 家兔胚胎在饲养层上的增殖行为[J]. 动物学报, 1998, 44(3): 335- 340.
[21] Parnpai R, Minami N, Yamada M, et al. A suitable passaging technique for the establishment of bovine embryonic stem (ES) like cell lines[J]. Theriogenology, 1998, 49(1): 241- 246.

The influence of supplement and digestant on isolation and clone of bovine and murine embryonic stem like cells

AN Li-long[1,2], GAO Zhi-min[1], YANG Qi[1], FENG Xiu-liang[1], DOU Zhong-ying[1], LEI An-min[1], YANG Chun-rong[1], QIU Huai[1]

(1 *Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Agricultural Ministry of China, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*; 2 *College of Agronomy, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, Guangdong* 542000, *China*)

Abstract: The effect of new bovine serum, feeders, culture medium, additives and digestive juice on efficiency of isolation and clone of bovine embryonic stem cells (ESC) was studied through bovine embryos and murine embryos. The results showed: First, the high efficiency of isolation and clone of bovine ES cell was obtained by supplementing with 15% super NBS (the ration of mouse embryo hatched are more than 86% within 24 h culture). Second, the ration of bovine ES colonies cultured in DMEM (low glucose) were more than those cultured in DMEM (high glucose) and TCM 199. Third, super Bovine embryos formed mass ICM, the efficiency of ES cell clone-derived mass ICM was higher than that of stream ICM and net ICM derived normal embryos. Forth, the ration of clone of bovine ES cell was highest in DMEM (low glucose) culture medium supplemented with 15% NBS, 0.1 μmol/L Na_2SeO_3, 0.1 mol/L β-mercaptoethanol (Sigma), 1 000 ng/mL LIF and 10 ng/mL IGF. Last, when ICM or ES cell colonies were treated with 0.05% trypsin and 0.01% EDTA for long period (6 min), the efficiency of clone of bovine ES cell was highest in this research.

Key words: bovine; murine; embryonic stem cell; inner cell mass; efficiency of clone

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net