

绵羊-绵羊和山羊-绵羊体细胞克隆胚 的构建及体外发育研究

马利兵^{1,2}, 潘建刚², 华松¹, 曹俊伟^{1,3}, 王凤梅⁴, 张涌¹

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 内蒙古科技大学 生物与化学工程学院, 内蒙古 包头 014010;

3 内蒙古农业大学 生物工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 4 包头农牧学校, 内蒙古 包头 014030)

[摘要] **【目的】**以绵羊卵母细胞为受体, 构建绵羊-绵羊和山羊-绵羊体细胞克隆胚, 比较其体外发育能力, 探讨绵羊卵母细胞对异种体细胞核的再程序化能力。**【方法】**以体外成熟的绵羊卵母细胞为核受体, 分别以绵羊及山羊胎儿成纤维细胞为核供体, 经卵母细胞去核、注核、重构胚电融合、激活等一系列操作, 构建同种绵羊-绵羊及异种山羊-绵羊体细胞的克隆胚, 比较其体外发育能力。**【结果】**同种间克隆胚的囊胚发育率(16.0%)高于异种间克隆胚(7.4%)。异种间克隆胚在 8-细胞到 16-细胞及 16-细胞到桑椹胚期间的发育能力显著低于同种间克隆胚。2 种克隆胚在 2-细胞到 8-细胞期间的发育速度基本相同, 但异种间克隆胚在 8-细胞到囊胚期间的发育速度明显低于同种间克隆胚, 两者相差 12~24 h。**【结论】**绵羊卵母细胞对异种体细胞核具有再程序化能力, 但这种再程序化能力明显低于其对同种体细胞核的再程序化能力。

[关键词] 体细胞核移植; 体外发育; 绵羊; 山羊

[中图分类号] Q492.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)02-0001-05

Construction sheep-sheep and goat-sheep somatic cell cloned embryos and their development *in vitro*

MA Li-bing^{1,2}, PAN Jian-gang², HUA Song¹, CAO Jun-wei^{1,3},
WANG Feng-mei⁴, ZHANG Yong¹

(1 Institute of Biotechnology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 School of Biological and Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China; 3 College of Biotechnology,

Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China;

4 Baotou Agriculture-Husbandry School, Baotou, Inner Mongolia 014030, China)

Abstract: **【Objective】** Sheep-sheep and goat-sheep somatic cell cloned embryos were constructed, their developmental capacity *in vitro*, was compared, so as to investigate the capacity of sheep oocytes reprogramming interspecies somatic nucleus. **【Method】** Using *in vitro* matured sheep oocytes as nuclear recipient and sheep- (SFFs) or goat fetal fibroblasts (GFFs) as nuclear donor, intra- sheep-sheep and interspecies goat-sheep cloned embryos were constructed after series of manipulations of enucleated oocytes, injecting donor cell, electrofusing and activating constructed embryos; in addition, their developmental capacity *in vitro* were compared. **【Result】** The rate of intra-blastocyst (16.0%) was higher than that of interspecies blastocyst (7.4%). The developmental ability of interspecies cloned embryos was lower than that of intraspecies cloned embryos during 8-cell to 16-cell stage and 16-cell to morula stage. Moreover, during 2-cell to 8-cell stage, the developmental speeds of two cloned embryos were identical; however, during 8-cell to

* [收稿日期] 2008-03-17

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2004AA213072); 内蒙古科技大学科研基金项目

[作者简介] 马利兵(1973—), 男, 内蒙古包头市人, 副教授, 博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。E-mail: mlb-xn2004@163.com

[通信作者] 张涌(1956—), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程及发育生物学研究。

blastocyst stage, the developmental speed of inter was 12—24 h slower than that of intraspecies cloned embryos. 【Conclusion】 Sheep oocytes have the capacity of reprogramming interspecies nucleus, but the capacity of sheep oocyte reprogramming interspecies nucleus was lower than that of sheep oocyte reprogramming intraspecies nucleus.

Key words: somatic cell nuclear transfer; development *in vitro*; sheep; goat

依据核供体与核受体亲缘关系的远近可将体细胞核移植技术分为同种间和异种间体细胞核移植。异种间体细胞核移植是将某一物种的体细胞核移入另一物种去核后的卵母细胞中构建克隆胚。这一技术不仅为保护濒危动物提供了一条新的途径,而且与胚胎干细胞、组织工程等技术结合后,还可为组织或器官移植提供充足的细胞来源。异种间体细胞核移植一般采用来源充足的体内或体外成熟的家畜卵母细胞为核受体,以珍惜濒危动物的体细胞为核供体,构建异种间克隆胚,经体外培养后可获取胚胎干细胞或克隆动物。以往的异种间体细胞核移植大多采用牛、兔的卵母细胞作为核受体,并成功获得了绵羊-牛、猪-牛及猴-牛^[1]、牦牛-牛和羚牛-牛^[2]、短尾猿-兔^[3]、野山羊-兔^[4]、骆驼-兔和藏羚羊-兔^[5]等异种间体细胞克隆囊胚及大熊猫-兔^[6]异种间体细胞克隆胎儿和印度野牛-家牛^[7-9]异种间体细胞克隆后代。以上结果说明,牛、兔的卵母细胞对多种类型的异种体细胞核具有去分化能力。以绵羊的卵母细胞为核受体,欧洲盘羊的体细胞为核供体,所构建的异种间体细胞克隆胚能完成全程发育并最终产下克隆动物^[10],表明绵羊卵母细胞对欧洲盘羊的体细胞核具有去分化能力。但目前关于绵羊卵母细胞对亲缘关系较远的异种体细胞核是否同样具有去分化能力尚未见报道。为此,本实验以体外成熟的绵羊卵母细胞为核受体,分别以绵羊及山羊胎儿成纤维细胞为核供体,构建同种和异种间体细胞克隆胚,通过体外培养,探讨同种和异种间体细胞克隆胚在发育能力和发育速度方面的差异,研究绵羊卵母细胞对亲缘关系较远的异种体细胞核的去分化能力,以期为种间克隆技术拯救濒危动物研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

安哥拉山羊胎儿及陕北土种绵羊胎儿和卵巢均采自陕西省西安市动物屠宰场。

1.2 试剂及仪器

胎牛血清(FBS)为 hyClone 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)和 DMEM 购自 Gibco 公司。其他试

剂均购自 Sigma 公司。

电融合约(EP-1, Voltain, Australia),显微操作仪(NT-88NE, Nikon-Narishige, Japan),二氧化碳培养箱(Thermo Forma, America)。

1.3 胎儿成纤维细胞的分离与培养

山羊和绵羊胎儿成纤维细胞的分离及原代培养、冷冻、解冻等操作参照 Keefer 等^[11]的方法进行。

将从屠宰场获得的山羊和绵羊胎儿置于 38 ℃ 的生理盐水中,在保温状态下于 3~6 h 内带回实验室,经 D-Hanks 液多次洗涤后,去掉头蹄及内脏,剩余的组织用剪刀充分剪碎,备用。

取 9~12 个组织块,将其排布于 60 mm 的塑料培养皿中,于 38 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下放置 1~2 h,待组织块处于半干状态时,每皿加入 2 mL 含体积分数 20% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养液,继续培养,每 3 d 更换 1 次培养液。待原代培养的胎儿成纤维细胞迁移出来并铺满 70% 培养皿底部时,吸出培养液,用 D-Hanks 液清洗 1 次,加入 2 mL 含 0.5 g/L 胰蛋白酶和 0.5 g/L EDTA 的 D-Hanks 液消化细胞(3~5 min),待其变圆时,加入等体积的上述 DMEM 培养液终止消化,轻轻吹打使细胞脱离培养皿底部。收集胎儿成纤维细胞悬液于 5 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入适量含体积分数 10% DMSO、体积分数 90% FBS 的细胞冷冻液,轻轻吹打使细胞均匀悬浮,调整细胞密度为 1×10^6 mL⁻¹ 左右,分装于 1.5 mL 冷冻管中,迅速置于 4 ℃ 冰箱中 1 h,然后置于 -70 ℃ 冰箱中过夜,最后置于液氮罐中长期保存。从液氮罐中取出山羊胎儿成纤维细胞(GFFs)和绵羊胎儿成纤维细胞(SFFs),解冻后铺于 96 孔培养板中,在上述条件下培养。待 GFFs 和 SFFs 铺满培养板底部时,改用低血清 DMEM 培养液(含体积分数 0.5% FBS)培养,饥饿处理 3~5 d,诱导细胞进入 G0 期。核移植前,采用上述含 0.5 g/L 胰蛋白酶和 0.5 g/L EDTA 的 D-Hanks 液消化细胞,用含体积分数 10% FBS 的 Hepes 缓冲的合成输卵管液(Hepes-buffered synthetic oviduct fluid, H-SOF)洗涤 2 次后,置于 H-

SOF 中用于核移植。

1.4 绵羊卵母细胞的分离与体外成熟培养

将从屠宰场收集的绵羊卵巢置于 30~38 ℃ 的生理盐水中,保温状态下于 3~6 h 内带回实验室。取出绵羊卵巢,用 PBS 液洗涤 3 次后置于添加体积分数 5% FBS 和 0.054 mg/mL 肝素钠的 PBS 液中,用手术刀片切开卵巢表面直径 1~5 mm 的卵泡,收集有多层卵丘细胞围绕的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-oocyte complexes,COCs),用卵母细胞成熟液(Oocyte maturation,OM)洗涤 2~3 次后,置于 OM 液中,于 38.5 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下成熟培养 22~24 h。收集成熟后的 COCs,移入含 2 g/L 透明质酸酶的无 Ca²⁺、Mg²⁺ PBS 液中作用 3~5 min,同时反复吹吸,脱去卵丘细胞,收集卵母细胞于 PBS 液中。于实体显微镜下选取排出第一极体且形态规则、胞质均一的卵母细胞,置于含体积分数 10% FBS 的 H-SOF 中,备用。

1.5 绵羊-绵羊和山羊-绵羊重构胚的构建与体外培养

将用于核移植的绵羊卵母细胞在含 7.5 mg/mL 细胞松弛素 B(cytochalasin B,CB)、10 mg/mL Hoechst 33342 和体积分数 10% FBS 的 H-SOF 中孵育 15 min 后,置于装备有荧光系统的显微操作仪上,用微固定管(外径 100~150 mm,内径 20~30 mm)于极体对面固定卵母细胞,用微去核管(外径 20~25 mm,内径 15~18 mm)吸取第一极体及其附近的部分卵胞质,紫外光照射吸出的卵胞质团检查去核情况,完全去除第一极体及染色体的卵母细胞用于核移植。用微去核管吸取 1 个 GFF 或 SFF,注入去核的绵羊卵母细胞透明带下。核质复合体在电融合液中平衡 3 min,然后置于含有相同电融合液的电融合槽内,手工排列核质复合体(使电

流方向与核质接触面垂直)后,用电融合仪给予 2 个直流电脉冲,脉冲参数为:1.25 kV/cm、80 ms^[12]。将核质复合体置于含体积分数 10% FBS 的 H-SOF 中等待融合完成,没有融合的核质复合体在 1 h 后给予第 2 次电脉冲,脉冲参数同上。将融合后的重构胚置于含体积分数 10% FBS 和 5 mmol/L 离子霉素的 H-SOF 中作用 5 min,然后迅速移入含体积分数 10% FBS 和 2 mmol/L 6-DMAP 的 SOF 中,培养 4 h。激活后的重构胚经 SOFaa 洗涤 2 次后,置于 SOFaa 中,于 38.5 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下继续培养,每 24 h 观察并统计重构胚的发育情况,SOFaa 每 48 h 半量换液 1 次。

1.6 数据分析

试验数据用 χ^2 检验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 绵羊-绵羊和山羊-绵羊克隆胚的构建

以去核的绵羊卵母细胞为核受体,分别以 GFFs 和 SFFs 为核供体,经 15 次核移植操作共获得绵羊-绵羊克隆胚 376 枚,山羊-绵羊克隆胚 421 枚。所有克隆胚胎均于体外培养,其中处于不同发育阶段的部分山羊-绵羊克隆胚被用于测定供受体来源的线粒体 DNA 含量。

2.2 同种及异种间克隆胚的体外发育率

从表 1 可以看出,2 种克隆胚在体外均可发育到囊胚阶段;山羊-绵羊克隆胚的体外囊胚发育率为 7.4%(40.1%×78.7%×80.4%×52.5%×64.7%×85.7%),明显低于绵羊-绵羊克隆胚的体外囊胚发育率 16.0%(47.1%×81.4%×86.1%×71.0%×83.0%×82.2%);山羊-绵羊克隆胚在 16-细胞及桑椹胚时的发育能力显著低于绵羊-绵羊克隆胚($P<0.05$)。

表 1 绵羊-绵羊和山羊-绵羊克隆胚的体外发育情况比较($n=15$)

Table 1 Comparison of developmental capacity of sheep-sheep and goat-sheep cloned embryos ($n=15$)

克隆胚 Cloned embryo	胚胎数 The number of cultured embryos	2-细胞胚率/% 2-cell embryorate	4-细胞胚率/% 4-cell embryorate	8-细胞胚率/% 8-cell embryorate	16-细胞胚率/% 16-cell embryorate	桑椹胚率/% Morulate	囊胚率/% Blastulate
山羊-绵羊克隆胚 Goat-sheepcloned embryo	421	40.1(165/411)	78.7(122/155)	80.4(90/112)	52.5(42/80)d	64.7(22/34)d	85.7(12/14)
绵羊-绵羊克隆胚 Sheep-sheepcloned embryo	376	47.1(177/376)	81.4(144/177)	86.1(124/144)	71.0(88/124)c	83.0(73/88)c	82.2(60/73)

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Within the same column,different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

2.3 同种及异种间克隆胚的体外发育速度

从表 2 可以看出,绵羊-绵羊及山羊-绵羊克隆

胚在 2-细胞胚到 8-细胞胚期间的发育速度基本相同(发育到 2-细胞胚、4-细胞胚、8-细胞胚所需的时间

分别为 0~48,24~72,48~96 h);但山羊-绵羊克隆胚在 8-细胞胚到囊胚期间的发育速度明显低于绵羊-绵羊克隆胚,绵羊-绵羊克隆胚发育到 16-细胞胚、桑椹胚、囊胚所需的时间分别为 72~120,96~144,120~189 h,而山羊-绵羊克隆胚需要的时间分别为 72~144,120~189,144~189 h,前者较后者快 12~24 h。

表 2 绵羊-绵羊和山羊-绵羊克隆胚的体外发育速度比较

克隆胚		发育胚数 The number of developed embryos <i>in vitro</i>					
Cloned embryo	发育时间/h The developed time	2-细胞胚 2-cell embryo	4-细胞胚 4-cell embryo	8-细胞胚 8-cell embryo	16-细胞胚 16-cell embryo	桑椹胚 Morula	囊胚 Blastula
绵羊-绵羊 克隆胚 Sheep-sheep cloned embryo	0~24	51(28.8%)	—	—	—	—	—
	24~48	123(69.5%)	43(30.0%)	—	—	—	—
	48~72	3(1.7%)	96(66.7%)	59(47.6%)	1(1.1%)	—	—
	72~96	—	5(3.5%)	65(52.4%)	23(26.1%)	—	—
	96~120	—	—	—	64(72.7%)	35(47.9%)	—
	120~144	—	—	—	—	38(52.1%)	—
	144~189	—	—	—	—	—	24(40.0%)
山羊-绵羊 克隆胚 Goat-sheep cloned embryo	0~24	52(31.5%)	—	—	—	—	—
	24~48	113(68.5%)	43(35.2%)	1(1.1%)	—	—	—
	48~72	—	77(63.1%)	38(42.2%)	—	—	—
	72~96	—	2(1.6%)	46(51.1%)	6(14.3%)	—	—
	96~120	—	—	5(5.6%)	26(61.9%)	2(9.1%)	—
	120~144	—	—	—	10(23.8%)	13(59.1%)	2(16.7%)
	144~189	—	—	—	—	7(31.8%)	10(83.3%)

注:括号中的数据为发育率。
Note:The data in brackets indicate the rates of development.

3 讨 论

3.1 同种及异种间体细胞克隆胚的体外发育率

多种异种间体细胞核移植囊胚的成功构建^[1-5]及异种克隆动物的出生^[7-9]表明,卵母细胞对体细胞核的去分化及再程序化作用不具有种属特异性,但相同条件下构建并培养的异种间克隆胚的发育能力往往低于同种间克隆胚。Li 等^[2]以牛的卵母细胞为核受体,分别以牛、牦牛、羚牛的体细胞为核供体,采用相同的核移植操作过程所构建的克隆胚体外囊胚发育率分别为 48%,28%和 5%,彼此之间差异极显著($P<0.01$)。Murakami 等^[13]以牛的卵母细胞为核受体,分别以牛、牦牛、狗的体细胞为核供体,所构建的同种及异种间克隆胚的体外囊胚发育率分别为 39.8%、10.9%及 0.4%,彼此之间差异显著($P<0.05$);但同种及异种间克隆胚在 8-细胞前的发育能力差异不显著($P>0.05$)。在本试验中,山羊-绵羊异种间体细胞克隆胚的体外囊胚率也低于绵羊-绵羊同种间体细胞克隆胚,这种差异主要是由异种间克隆胚在 8-细胞到 16-细胞及 16-细胞到桑椹胚期间的发育能力显著低于同种间克隆胚所造成的。其可能的原因是,在早期 2 种克隆胚的合子型基因没有被激活,其发育依靠的物质基础是卵母细胞在成熟过程中积累的蛋白质、mRNA 等(在此期间 2 种克隆胚的发育不受核供体的影响),发育能力

相同;但当克隆胚发育到一定时期时,卵母细胞中的母源性物质被消耗尽,此时合子型基因被激活(ZGA),胚胎发育依靠的物质基础是核基因编码的 mRNA 及 mRNA 指导下合成的蛋白质,在此期间异种间克隆胚由于核质相互作用不协调从而影响其进一步的发育。ZGA 发生的时间因动物品种的不同而异,山羊是在 8-细胞期^[14],绵羊是在 16-细胞期^[15]。以上结果说明,在进行异种间体细胞核移植时,不同的核质搭配对异种间体细胞克隆胚在 ZGA 发生后的发育能力影响很大,但目前对核质搭配所应遵循的规律还知之甚少,还有待于进一步研究。

3.2 同种及异种间体细胞克隆胚的体外发育速度

在克隆胚的早期发育过程中,卵母细胞中的母源性因子对其发育速度起着决定性作用;ZGA 发生后,克隆胚进一步发育的速度可能与核质相互作用、供体核重新编程等诸多因素有关。目前,有关同种与异种间克隆胚早期发育速度方面的报道不是很多。Dominko 等^[1]以牛的卵母细胞为核受体,分别以牛、绵羊、猪、猴、大鼠的皮肤成纤维细胞为核供体构建同种和异种间克隆胚,经体外培养发现,同种与异种间克隆胚最早几次卵裂所需的时间大致相同,但随着胚胎的进一步发育,发育速度出现明显差异,异种克隆胚逐渐按照其供体细胞来源物种特有的胚胎发育速度进行。在本试验中,同种与异种间克隆胚在 2-细胞到 8-细胞发育期间的发育速度基本相

同,但异种间克隆胚在 8-细胞到囊胚期间的发育速度明显低于同种间克隆胚。说明异种克隆胚后期的发育并不是完全按照其供体细胞来源物种特有的胚胎发育速度进行,还可能受其他因素的影响,如供、受体物种胚胎 ZGA 发生的时间、核质间的相互作用等。有关异种间体细胞克隆胚发育速度的规律及机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1]

Dominko T,Mitalipova M,Haley B,et al. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nucleat transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species [J]. Biol Reprod,1999,60:1491-1502.

[2]

Li Y,Dai Y,Du W,et al. Cloned endangered species takin (*Budorcas taxicolor*) by interspecies nuclear transfer and comparison of the blastocyst development with yak (*Bos grunniens*) and bovine [J]. Mol Reprod Dev,2006,73:189-195.

[3]

Yang C X,Kou Z H,Wang K,et al. Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed by rabbit oocytes [J]. Biol Reprod,2004,127:201-205.

[4]

Jiang Y,Chen T,Nan CL,et al. *In vitro* culture and mtDNA fate of ibex-rabbit nuclear transfer embryos [J]. Zygote,2005,13:233-240.

[5]

Zhao Z J,Ouyang Y C,Nan C L,et al. Rabbit oocyte cytoplasm supports development of nuclear transfer embryos derived from the somatic cells of the camel and Tibetan Antelope [J]. Journal of Reproduction and Development,2006,52(3):449-459.

[6]

Chen D Y,Wen D C,Zhang Y P,et al. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos [J]. Biol Reprod,2002,67:637-642.

[7]

Lanza R P,Cibelli J B,Diaz F,et al. Cloning of endangered species (*Bosgaurus*) using interspecies nuclear transfer [J]. Cloning,2000,2:79-90.

[8]

Meirelles F V,Bordignon V,Watanabe Y. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte [J]. Genetics,2001,158(1):351-356.

[9]

Steinborn R,Schinogl P,Wells D N,et al. Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones [J]. Genetics,2002,162:823-829.

[10]

Loi C P,Ptak G,Barboni B,et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells [J]. Nat Biotechnol,2001,19:962-964.

[11]

Keefer C L,Baldassarre H,Keyston R,et al. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes [J]. Biol Reprod,2001,64:849-856.

[12]

Beaujean N,Taylor J,Gardner J,et al. Effect of Limited DNA Methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer [J]. Biol Reprod,2004,71:185-193.

[13]

Murakami M,Otoi T,Wongsrikeao P,et al. Development of interspecies cloned embryos in yak and dog [J]. Cloning Stem Cells,2005,7(2):77-81.

[14]

Pivko J,Grafenau P,Kopecny V. Nuclear fine structure and transcription in early goat embryos [J]. Theriogenology,1995,44:661-671.

[15]

Crosby I M,Gandolfi F,Moor R M. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos [J]. J Reporod Fertil,1988,82:769-775.