山羊-绵羊种间体细胞核移植重构胚构建*

赛务加甫[1,2], 张 立[1,3], 杨 丽[1], 彭新荣[1], 郭志林[1],
李向臣[1], 权富生[1], 安志兴[1], 郑月茂[1], 赵 雪[1], 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 新疆石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003;
3 内蒙古家畜改良工作站, 内蒙古 呼和浩特 010011)

[摘 要] 以山羊皮肤成纤维细胞为供体细胞, 绵羊去核卵母细胞为受体细胞进行种间体细胞核移植, 构建山羊-绵羊重构胚, 并对其采用离子霉素联合6-DMAP法和胞质注射绵羊精子提取物法进行激活, 比较两种不同激活方法对山羊-绵羊种间体细胞核移植重构胚的激活效果。结果表明, 共构建获得山羊-绵羊重构胚238枚, 重构胚在体外能够发育至囊胚阶段; 离子霉素联合6-DMAP法激活的卵裂率为58.33% (70/120), 囊胚发育率为4.28% (3/70); 胞质注射绵羊精子提取物法激活的卵裂率为63.55% (75/118), 囊胚发育率为6.66% (5/75), 两种方法的激活效果差异不显著。

[关键词] 异种核移植; 成纤维细胞; 激活; 山羊; 绵羊
[中图分类号] S814.8 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)09-0017-04

1997年"Dolly"绵羊的诞生使体细胞核移植成为现实[1], 从此体细胞核移植技术得到了广泛的应用, 并成为挽救濒危动物的一个重要手段。Dominko等[2]将野牛、绵羊、猪以及大鼠的皮肤成纤维细胞与去核家牛卵母细胞融合, 结果发现, 除大鼠-牛杂种胚外, 其余杂种胚胎均发育至囊胚阶段。陈大元等[3]用大熊猫体细胞与兔卵母细胞构建的核移植胚能发育至囊胚阶段。其他物种体细胞核移植, 如黄牛-水牛[4], 小鼠-猪[5], 小鼠-牛[6], 猪-牛[7]等均得到了体外发育胚胎。目前, 虽然已有种间体细胞核移植动物出生, 但种间核移植仍面临着很大的困难, 需要寻找适宜的供受体细胞组合及早期胚胎发育环境。本试验以山羊皮肤成纤维细胞为供体细胞, 绵羊卵母细胞为受体细胞进行山羊-绵羊种间体细胞核移植研究, 以为动物种间核移植研究积累知识和经验。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 山羊耳部皮肤组织块 山羊耳部皮肤组织块取自杨凌科元生物工程有限公司种羊场提供的345号莎能山羊耳尖部, 皮肤剪毛消毒后剪取0.5 cm^2左右的皮肤块, 置4 ℃保存液中, 在2~3 h内带回实验室。

1.1.2 绵羊卵巢 采集于陕西省西安市动物屠宰场, 将陕北土种绵羊屠宰后快速采集其双侧卵巢, 置于20~30 ℃保温瓶(装有含0.32 mg/mL硫酸庆大霉素的生理盐水)中, 于4~5 h内运回实验室。

1.1.3 绵羊精液及精子提取物的制备 绵羊精液采自陕西杨凌科元公司道赛特种公羊。精子提取物的制备参考赛务加甫[8]等的方法。

1.1.4 试 剂 卵母细胞成熟液和胚胎培养液等所用的化学试剂除特别指明外, 均为Sigma公司产品。

1.2 山羊皮肤成纤维细胞的分离与培养

莎能奶山羊耳尖部皮肤运回实验室后, 用无菌生理盐水冲洗3~4次后, 用体积分数70%的酒精浸泡5 min, 再用无菌生理盐冲洗2~3次后剪碎, 接种于含体积分数15%胎牛血清(FBS, 四季清)、体积分数1%的必需氨基酸和体积分数0.5%非必需氨基酸的DMEM (GIBCO)培养液中培养。培养条件为37.5 ℃, 体积分数5% CO_2和饱和湿度。当细胞生长至铺满培养皿(Nuc, 15 mm×60 mm)底时, 用含2.5

* [收稿日期] 2006-04-27
[基金项目] 国家"863"高技术研究发展计划项目(2001AA213081)
[作者简介] 赛务加甫(1962-), 男, 新疆石河子人, 副教授, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程和发育生物学研究。
[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物胚胎工程和发育生物学研究。E-mail: zhangy1956@263.net

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

g/L 胰蛋白酶(GIBCO 公司产品)和0.2 g/L EDTA (sigma 公司产品)的无Ca^{2+},Mg^{2+}的PBS 液进行消化,用吸管反复吹打使贴壁细胞快速悬浮,并将悬浮液以1 000 r/min 离心5 min,弃上清液,沉淀用DMEM 培养液调整细胞浓度为1×10^6~10^7/L,然后接种于15 mm×60 mm 培养皿中进行传代培养。细胞传5代后,用培养液调整细胞浓度为1×10^6~10^7/L,再用含有体积分数15%二甲基亚砜(DMSO,sigma 公司产品)和体积分数30%胎牛血清的培养液进行冷冻,于-70 ℃保存备用。

1.3 绵羊卵母细胞的采集

将绵羊卵巢先用37 ℃无菌生理盐冲洗2~3次后,用体积分数75%的酒精冲洗1~2次,再用37 ℃生理盐冲洗2次,然后采用切割法(用手术刀片)切开卵巢表面2~5 mm 大小的卵泡,在体视镜下回收含3层以上颗粒细胞且胞质均匀的卵丘—卵母细胞复合体(COCs),用于体外成熟培养。

1.4 绵羊卵母细胞的体外成熟与去核

1.4.1 卵母细胞的体外成熟培养 将回收的COCs用在CO_2培养箱中平衡2 h以上的卵母细胞成熟培养液冲洗2~3次后,于38.5 ℃、体积分数5% CO_2和饱和湿度条件下在微滴(50 μL/滴,15~20个COCs/滴)中进行体外成熟培养21~23 h。成熟培养液配方为:TCM 199+10 mmol/L Hepes+0.38 mmol/L 丙酮酸钠+25 mmol/L 谷氨酰胺+1 μg/mL 17β-雌二醇(17β-E_2)+5 μg/mL FSH+1.0 IU/mL LH+体积分数10%发情牛血清(OCS)+50 U/mL 庆大霉素。

1.4.2 卵母细胞的去核 将成熟的卵母细胞置于含1 g/L 透明质酸酶的无Ca^{2+}、Mg^{2+}的PBS 液中反复进行吹打,去其周围的卵丘细胞,在体视显微镜下将第一极体形态良好的卵母细胞检出,分组备用。去核前卵母细胞以0.5 μg/mL 秋水仙碱处理2 h,以使第一极体位置明显突出,极体与核的位置易于观察。去核时将卵母细胞移入含7.5 μg/mL 细胞松弛素B (CB)的培养液中,在显微操作仪上用盲吸法去核,然后将去核卵母细胞用培养液冲洗2~3次后,在CO_2培养箱中培养1~2 h,作为体细胞核移植受体细胞。判断去核结果时可以随机抽取已去核的1/5卵母细胞,然后以5 μg/mL Hoechst 33342 染色检查其去核效果,无荧光的卵母细胞为去核成功。

1.5 山羊-绵羊种间体细胞核移植胚的构建与培养

1.5.1 山羊-绵羊种间体细胞核移植胚的构建 将供体细胞(山羊皮肤成纤维细胞)解冻后接种于24孔培养板中,在含体积分数0.5% FBS 的DMEM 培养液中培养3~5 d,用2.5 g/L 胰蛋白酶进行消化,消化后的细胞在含体积分数0.5% FBS 的DMEM 液内培养1 h以上。核移植前以1 000 r/min,离心5 min,沉淀用含体积分数10% PVP (360 K,sigma 公司产品)的PBS 重悬细胞,然后以外径为10~12 μm 的注核针反复吹打供体细胞,使供体细胞膜破裂成核胞体,并通过显微操作将核胞体直接注射到去核绵羊卵母细胞的细胞质内,注射后4~6 h检测卵母细胞的存活率。判断注核成功的标准为:用注核针将核胞体注射到无核的绵羊卵母细胞胞质中央,以没有出现供体细胞溢出卵母细胞质现象者确定为注核成功。每一去核卵母细胞注入一个核胞体,然后立即将重构胚移入胚胎培养液中体外培养。

1.5.2 山羊-绵羊种间体细胞核移植胚的激活 重构胚用培养液冲洗2~3次后移入羊输卵管液培养基(Sheep Oviduct Fluid Medium,SOFM)中,在体外培养3 h后分组备用。一组重构胚用5 μmol/L 离子霉素联合2 mmol/L 6-DMAP 法激活;另一组重构胚用胞质注射绵羊精子提取物法激活[8]。激活的重构胚立即移入胚胎培养液中培养,48 h时统计卵裂率,7~8 d统计囊胚发育率。

1.5.3 山羊-绵羊种间体细胞核移植胚的体外培养 将重构胚激活后移入SOFM 微滴中(50 μL/滴,10~15个重构胚/滴)与颗粒细胞单层共培养,培养条件为38.5 ℃、体积分数5% CO_2和饱和湿度。每48 h半量换液1次,每3 d更换1次颗粒细胞单层并加入体积分数10%发情牛血清5 μL。

1.6 统计分析

所有试验均重复5次,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 山羊-绵羊种间体细胞核移植胚构建结果

本试验以山羊皮肤成纤维细胞为核供体细胞,以绵羊卵母细胞为核受体细胞,构建重构胚238枚,并对其分别采用离子霉素联合6-DMAP 法和胞质注射绵羊精子提取物法进行激活。激活后5 d左右2种方法激活的重构胚均可发育至桑椹胚(图1)。用胞质注射绵羊精子提取物法激活的重构胚在其发育过程中细胞分布较离子霉素联合6-DMAP 法均匀,轮廓清晰,重构胚早期发育速度与体内胚胎发育速度基本一致,能发育至囊胚阶段(图2)。

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

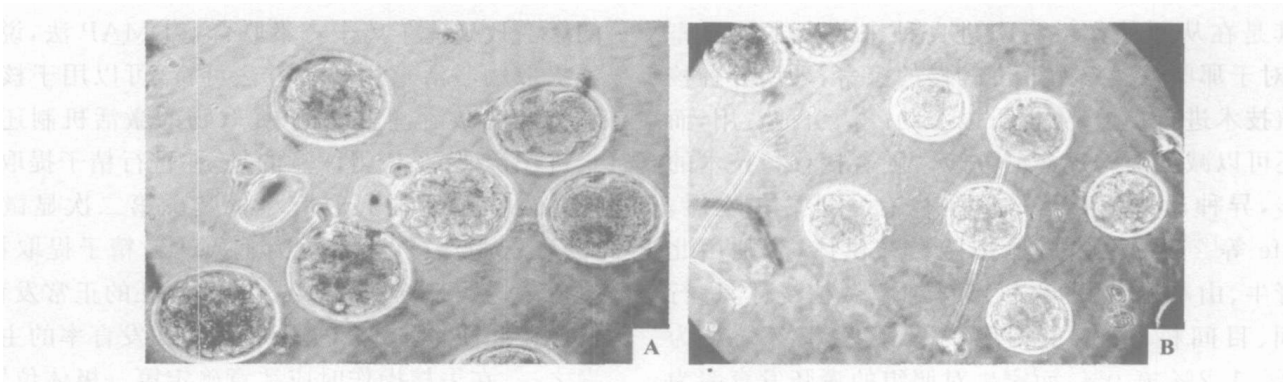

图1　不同方法激活的山羊-绵羊种间体细胞核移植桑椹胚(×100)

A. 离子霉素联合6-DMAP 激活; B. 精子提取物激活

Fig. 1　Goat-sheep heterogeneous reconstructed morulas by different activations (×100)

A. Activated by ionomycin+ 6-DMAP; B. Activated by sperm extract

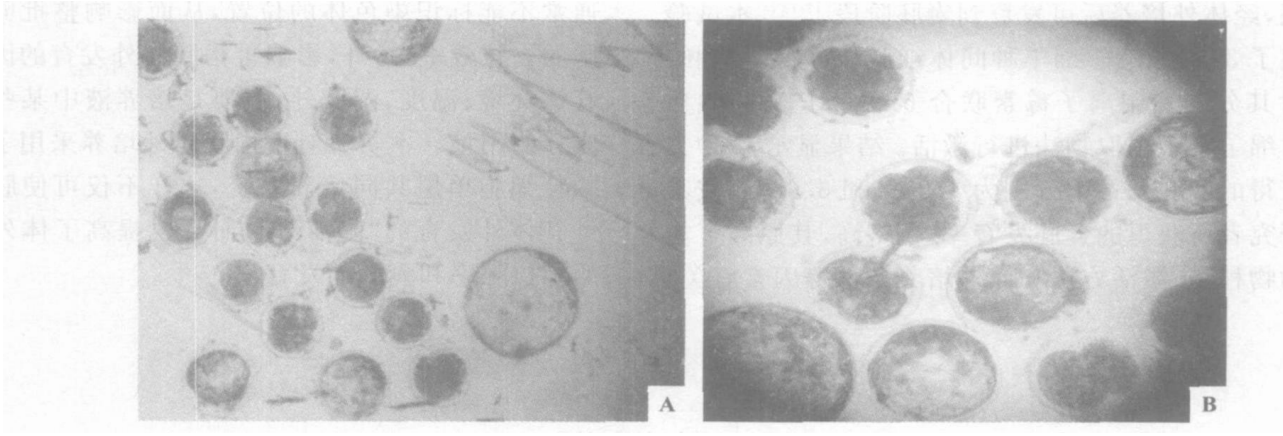

图2　不同方法激活的山羊-绵羊种间体细胞核移植囊胚(×100)

A. Ionomycin 联合6-DMAP 激活; B. 精子提取物激活

Fig. 2　Goat-sheep heterogeneous reconstructed blastocyst by different activations (×100)

A. Activated by ionomycin+ 6-DMAP; B. Activated by sperm extract

2.2　不同激活方法对重构胚卵裂率和囊胚发育率的影响

由表1 可知, 离子霉素联合6-DMAP 法与胞质注射绵羊精子提取物法激活的卵裂率, 桑椹胚率和囊胚发育率均差异不显著。表1 结果还表明, 两种激活方法均能有效激活重构胚, 并且激活的重构胚在体外均能发育至囊胚阶段。

表1　不同激活方法对山羊-绵羊种间体细胞核移植重构胚卵裂率和囊胚发育率的影响

Table 1　Rate of cleavage and development of reconstructed embryos by different activation methods

激活方法 Method	重构胚/枚 No. embryo	卵裂率/% Cleavage rate	桑椹胚率/% Hybrid rate	囊胚发育率/% Blastocysts rate
离子霉素联合6-DMAP Ionomycin+ 6-DMAP	120	58.33 a(70/120)	42.85 a(30/70)	4.28 a(3/70)
精子提取物胞质注射 Sperm extract	118	63.55 a(75/118)	44.0 a(33/75)	6.66 a(5/75)

注: 表中同一列数据后标注相同小写字母者表示差异不显著($P > 0.05$)。

Note: Values with same superscripts within same columns don't differ significantly ($P > 0.05$).

3　讨　论

哺乳动物异种核移植的发展历史虽然很短, 但其在畜牧、医学、生物学领域有着美好的发展前景和巨大的经济价值。首先, 该技术应用于畜牧领域, 将会进一步丰富优良家畜品种的选育、繁殖手段。利用优良动物品种的体细胞作核供体克隆动物, 可以避免自然条件下选种所受到的动物生殖周期和生育效

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

率的限制,从而大大缩短育种年限,提高育种效率。尤其是在从国外花巨资引进良种来改良本地家畜时,对于那些自然繁殖速度较慢的家畜,采用异种核移植技术进行扩繁,不但可以节约巨额引种费用,而且还可以减少引入疫病的危险。随着核移植技术的进步,异种动物核移植的实验也有了进一步发展。Wolfe等[9]利用家牛胚胎细胞做核供体,分别用北美野牛、山羊、仓鼠的去核卵母细胞做核受体,进行种间、目间核移植,重构胚的囊胚发育率分别为1.9%,1.2%,0.0%,而家牛对照组的囊胚发育率为19.4%,差异明显。White等[10]将藏绵羊皮肤成纤维细胞与牛去核卵胞质融合并激活后进行体外培养,结果得到囊胚率为1.56%,并且核型正常。另外,用人的体细胞作为核供体,与牛卵母细胞构建克隆胚,经体外培养后可发育到囊胚阶段[11-12]。本试验构建了328枚山羊-绵羊种间体细胞核移植重构胚,并对其分别采用离子霉素联合6-DMAP法和胞质注射绵羊精子提取物法进行激活。结果显示,2种方法获得的囊胚发育率分别为4.28%和6.66%,较其他研究者所获得的囊胚发育率[4-5]略高,其原因可能与动物种类、激活方法和体外培养条件等因素有关。

本研究发现,精子提取物胞质注射激活重构胚的激活效果优于离子霉素联合6-DMAP法,说明精子提取物激活重构胚的方法可行,可以用于核移植重构胚的激活,但对精子提取物的激活机制还有待于进一步研究。值得注意的是,在进行精子提取物胞质注射激活重构胚时应尽量减少第二次显微注射(第一次为注核,第二次为胞质注射精子提取物)所造成的透明带损伤,以免影响重构胚的正常发育。去核操作和注核技术亦是影响重构胚发育率的主要因素之一,在去核操作时应注意确定第一极体位置。第一极体排出后,通常会移离原来的位置,染色体的位置也会发生变化,即使是成熟培养的同批卵母细胞,其发育程度存在差异,成熟时间也不同,所以在给定的去核时间点上,MⅡ期卵母细胞第一极体的位置通常不能标识染色体的位置,从而影响整批卵母细胞的去核效率。另外,影响重构胚体外发育的因素除气体环境、温度、湿度外,主要是培养液中某些化学成分的用量。本实验对重构胚体外培养采用了卵丘颗粒细胞单层共同培养系统,这样不仅可使胚胎通过其体外发育的"阻滞"期,而且也提高了体外培养的桑椹胚率和囊胚的发育率。

[参考文献]

[1] Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. Nature, 1996, 380: 64.

[2] Domiko T, Mitalipova M, Haley B, et al. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer somatic cell nuclei from various mammalian species[J]. Biol Reprod, 1999, 60: 1496-1502.

[3] 陈大元, 孙青原, 刘翼珑, 等. 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育[J]. 中国科学(C辑), 1999, 29(3): 324-330.

[4] Kitiyanant Y, Saikhun J, Jaroensuwan M, et al. Nuclear transfer of buffalo fetal fibroblasts and oviductal cells into enucleated bovine oocytes and their subsequent development[J]. Theriogenology, 2000, 53: 226.

[5] Lee H T, Uhm S J, Chung H M, et al. *In vitro* development and remodeling of porcine nuclear transfer embryos with porcine or mouse fibroblast cells[J]. Theriogenology, 2001, 55: 278.

[6] Arat S, Keskintepe L, Gibbons J, et al. Ttransfer of mouse embryonic fibroblast cells to bovine oocytes[J]. Theriogenology, 2001, 55: 253.

[7] Yoon J T, Choi E J, Han K Y, et al. *In vitro* development of embryos produced by nuclear transfer of porcine somatic cell nucleo into bovine oocytes using tree different culture systems[J]. Theriogenology, 2001, 55: 298.

[8] 赛务加甫, 张 立, 彭新荣, 等. 绵羊精子提取物对绵羊卵母细胞的孤雌激活作用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(7): 9-12.

[9] Wolfe B A, Westhusin M E, Levanduski M J, et al. Preimplantation development of embryos produced by intergeneric nuclear transplantation[J]. Theriogenology, 1990, 33: 350.

[10] White K L, Bunch T D, Mitalipova, et al. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear embryos produced from the fusion of Argali (*Ovis amnion*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes[J]. Cloning, 1999, 1: 47-54.

[11] Lanza R P, Cibelli J B, West M D, et al. Human therapeutic cloning[J]. Nat Med, 1999, 5: 975-977.

[12] Lanza R P, Cibelli J B, West M D, et al. Prospects for the use of nuclear transfer in human transplantation[J]. Nat Biotech, 1999, 17: 1171-1174.

(下转第26页)

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

Effects of CLA under heat stress models on layer immunity function

Ⅰ changes of immunity index for cellular immunity and humoral immunity

GAO Yun-ying[1], LI Hao-bo[1], JIANG Yan-fen[1], LEI Jin-min[2], PAN Ya-feng[3], MA Qiu-ming[1], HUANG Jian-wen[1]

(1 *College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2 *Luochuan County Veterinarian Sanitary Supervision Examination Centerm, Luochuan, Shaanxi* 727400, *China*;
3 *Yintai Area Animal Husbandry and Veterinary Station, Tongchuan, Shaanxi* 727000, *China*)

Abstract: 120 25-week-age Hailan (brown) layers of conventionally immuned with ND and IBD were selected and divided into two groups according to factorial design, and put into two artificial climates room and caged with two steps and ladders type respectively. Experiment dietary was basis diet added with 20 g/kg conjugate linoleic acid (CLA), control group fed with basal dietary. The heat stress model was 22 ℃ for 5 d, 30 ℃ for 5 d, 32 ℃ for 5 d, 35 ℃ for 5 d, 22 ℃ for 5 d. Effect of CLA on the immunity function of the laying hen was experimented for 25 days. The results showed: in 30 ℃ 119 h, 32 ℃ 119 h, 35 ℃ 119 h, 22 ℃ 119 h, conversion rate of T and B lymphocyte, $CD4^+$ and $CD8^+$ subgroup of the T lymphocyte of the experimental group were significantly ($P < 0.01$) higher than those of control group, and blood serum ND, IBD antibody titer and IgG were significantly ($P < 0.01$) higher than those of control group. These data indicate that CLA could relieve the decline of layer immunity caused by high temperature and help restore the layer immunity.

Key words: conjugate linoleic acid; layer; heat stress; cellular immunity; humoral immunity

---

(上接第20页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)09-0017-EA

Goat-Sheep heterogeneous nuclear transplantation

SAI Wujiafu[1,2], ZHANG Li[1,3], YANG Li[1], PENG Xin-rong[1], GUO Zhi-lin[1], LI Xiang-chen[1], QUAN Fu-sheng[1], AN Zhi-xing[1], ZHENG Yue-mao[1], ZHAO Xue[1], ZHANG Yong[1]

(1 *Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2 *College of Animal Science and Technology, Xinjiang Shihezhi University, Shihezi, Xinjiang* 832003, *China*;
3 *Inner Mongolia Livestock Improvement Station, Huhhot, Inner Mongolia* 010011, *China*)

Abstract: Totally 238 heterogeneous embryos were reconstructed with goat skin fibroblasts as the donor cells and sheep enucleated oocytes as the recipient, and the effects of two activation methods (Ionomycin combined with 6-DMAP or injection of sperm extract) on the development of heterogeneous reconstructed embryos were compared. The results indicated that a total of 238 heterogeneous embryos were reconstructed, and sheep cytoplast supported mitotic cleavage of goat karyoplasts, and was capable of reprogramming the nucleus to achieve blastocyst stage embryos. The reconstructed embryos activated by Ionomycin combined with 6-DAMP reached 58.33% (70/120) oocyte cleavage rate and 4.28% (3/70) blastocysts rate, while activated by sperm extract reached 63.55% (75/118) oocyte cleavage rate and 6.66% (5/75) blastocysts development rate.

Key words: heterogeneous nuclear transfer; fibroblast cell; activation; goat; sheep

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