

供核细胞来源对猪克隆胚胎发育的影响

马 红

(黑龙江省农业科学院,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为研究不同组织来源的供核细胞对猪体细胞核移植胚胎发育能力的影响,分别采用颗粒细胞、耳成纤维细胞和尾成纤维细胞作为供核细胞,移入体外成熟的猪去核卵母细胞中形成重构胚,培养后对比其卵裂率和囊胚率。结果表明:以耳成纤维细胞作为供核细胞的重构胚的囊胚率最高,为 17.8%,显著高于颗粒细胞(11.4%)($P<0.05$)。在卵裂率方面,两者无显著差别,分别为 65.6%和 61.9%($P>0.05$)。猪尾尖成纤维细胞的发育能力最差,卵裂率仅为 20.2%且未获得囊胚,与其它两组差异显著($P<0.05$)。因此,耳组织来源的成纤维细胞作为供核细胞组织来源丰富且细胞易于传代和保存,以此为供核细胞的重构胚发育能力强,适合作为供核细胞。

关键词:颗粒细胞;成纤维细胞;体细胞核移植;囊胚率

中图分类号:S828

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)12-0054-04

体细胞核移植技术自 1997 年出现至今已有近 20 a 的历史,通过该技术能够迅速繁殖优良动物个体并避免其优良基因或基因组合在有性繁殖过程中丢失,最大程度保存优良个体的遗传资源,尤其在家畜育种方面有着广阔的应用前景。到目前为止,国内外已有包括猪、牛、绵羊、马和骡等家畜在内的 20 个物种被克隆成功^[1-2]。但该技术本身仍存在许多问题,如克隆效率较低、克隆胚胎发育能力差,平均只有不到 5%的克隆胚胎能够获得出生的后代^[3],而且出生胎儿畸形率也偏高。

猪作为一种重要的经济动物和医学模式动物,亟需通过克隆或转基因技术来加快其育种速度,以保存品种资源并建立疾病模型,但与其它动物的克隆效率相比,猪的克隆效率更低,这大大影响了体细胞核移植技术在猪育种和保种中的应用^[4]。影响猪克隆效率的原因很多,其中包括供核细胞的组织来源和猪的品种,培养体系中的培养液、营养物质和生长因子等众多因素^[5]。其中,供核细胞的组织来源对克隆效率具有非常大的影响,这是由于不同组织来源的供核细胞的重编程潜力不同,因此移入去核卵母细胞后重构胚的发育能力也有很大差别,而这种差异是无法通过改善操作技术和培养环境来改善的。因此,确定一

种或几种克隆效率高的组织细胞对于提高猪的克隆效率具有重大意义。该研究分别采用来自于仔猪的耳成纤维细胞、尾成纤维细胞以及卵母细胞成熟后脱落的颗粒细胞为供核细胞,对两种成纤维细胞的生物学特征进行了初步研究,并对比 3 种来源的细胞对重构胚发育的影响。希望通过该研究为优化猪体细胞核移植技术体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清(FCS)购自 Hyclone 公司,其它化学药品如无特殊说明,均购自 Sigma。

猪卵巢采自哈尔滨市某屠宰场屠宰母猪。

抽卵/清洗液为 DPBS+0.1%(质量体积比)聚乙烯醇(Polyvinylpyrrolidone,PVA);卵母细胞体外成熟液为 TCM-199+10%(体积比)猪卵泡液(PFF)+0.57 mmol·L⁻¹ L-半胱氨酸(L-Cysteine)+10 ng·mL⁻¹ 表皮生长因子(Epidermal Growth Factor,EGF);含激素成熟液为在成熟液基础上添加 10 IU·mL⁻¹ 孕马血清(PMSG)和 10 IU·mL⁻¹ 人绒毛膜促性腺激素(hCG);融合/激活液为 0.28 smol·L⁻¹ 甘露醇+0.1 mmol·L⁻¹ 氯化钙+0.1 mmol·L⁻¹ 硫酸镁+0.5 mmol·L⁻¹ N-2 羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES)+0.01% PVA;胚胎培养液为北卡罗林纳州大学 23 培养液(NCSU-23);供核细胞培养液为 DMEM/F12+10%(体积比)胎牛血清(FBS)。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞体外成熟及判断 屠宰场收集

收稿日期:2013-07-19

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008 ZX08006-003)

作者简介:马红(1974-),女,黑龙江省哈尔滨市人,博士,副研究员,从事动物遗传育种研究。E-mail: mahong_ok@163.com。

屠宰母猪卵巢,置于 37℃ 左右的 0.9% 灭菌生理盐水中,4 h 内运回实验室。抽取卵巢中的卵母细胞,挑选含有多层颗粒细胞的卵母细胞(COCs),用清洗液清洗 3 次,再用含激素的成熟培养液清洗 3 次,移入含激素的成熟液中培养 22 h,再转入无激素培养液中培养至 44 h,消化下的卵母细胞周围的颗粒细胞作为供核细胞,同时挑选排出第一极体有清晰卵周隙的卵母细胞用作受体。

1.2.2 供核细胞处理 剪取出生 7 d 以内的仔猪耳尖和尾尖组织,切成 1 mm³ 左右的组织块,铺在 35 mm 培养盘中,加入少量细胞培养液,在 CO₂ 培养箱中(5% CO₂、38℃ 饱和湿度)培养过夜。第 2 天更换培养液,以后每 2 d 换 1 次培养液。当成纤维细胞从组织块中生长并达到 80% 汇合后消化传代。将传代 3 次的细胞培养至接触抑制。核移植前用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,用操作液离心清洗 2 次去上清,0.02 mL 操作液重悬沉淀的细胞备用。

采用体外成熟的卵母细胞消化下来的颗粒细胞作为供核细胞的颗粒细胞,清洗备用。

1.2.3 体细胞核移植 操作前将卵母细胞和供核细胞置于 100 μL 含 7.5 μg·mL⁻¹ CB 的显微操作液滴中。去核针吸出卵母细胞第一极体及其附近约 1/4 的胞质,选择形态好的供核细胞,注入透明带下,注射针轻压透明带,使供核细胞膜与卵母细胞质膜贴合,组成重构胚。将重构胚放入 NC-SU-23 中,置于 CO₂ 培养箱中恢复培养 30 min。

1.2.4 融合、激活及胚胎培养 恢复培养后的重构胚在融合液中清洗 3 次,置于铺满融合液的融合槽中。调整融合仪参数至 2 kV·cm⁻¹、30 ms、1 次电融合。电融合后移入含卵母细胞移入含 5 μg·mL⁻¹ 6-二甲氨基嘌呤(6-D)的操作液中激活 4 h。最后移到胚胎培养液中,在 38.5℃、5% CO₂ 最大饱和湿度的培养箱中培养 48 h,检查卵裂率,7 d 检查重构胚的囊胚率。

1.2.5 数据分析 试验数据用(Mean±SE)表示。用 SPSS 17.0 软件方差分析法进行数据处理,每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 供核细胞生物学特征研究

2.1.1 组织块培养情况观察 耳部和尾部来源的组织块在培养过程中,无论是在生长速度或镜

下观察的生物学特征方面均无显著差别。新鲜的耳或尾组织块贴壁培养 24 h 后,有部分组织块周围游离出个别成纤维细胞,72 h 后成纤维细胞呈优势生长(见图 1)。游离出来的细胞逐渐向周围铺开,长成单层。细胞多呈梭形、细长条状或不规则长条形,大量细胞形成旋涡状或放射状排列。

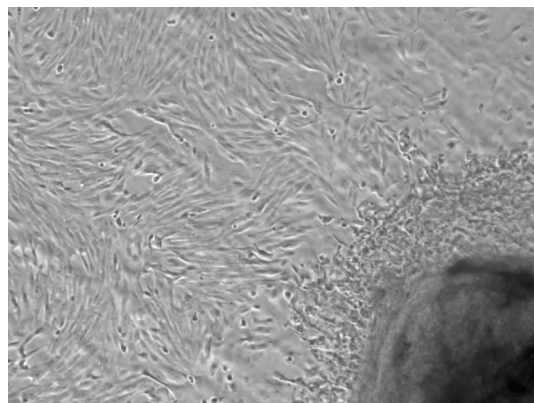


图 1 原代培养 3 d(100×)

Fig. 1 Primary culture for 3 d(100×)

2.1.2 传代细胞 当原代细胞铺满瓶底 80% 左右时进行传代培养,新鲜传代后两种细胞贴壁和增殖都较原代快,生命力旺盛,传代 2~3 h 即开始贴壁,24 h 后大部分细胞已贴壁并开始生长,在 1~2 d 内开始旺盛生长。7 d 左右成纤维细胞汇合铺满皿底,继续培养则出现接触抑制现象(见图 2),接触抑制 3 d 的成纤维细胞经消化清洗后,可作为供核细胞。

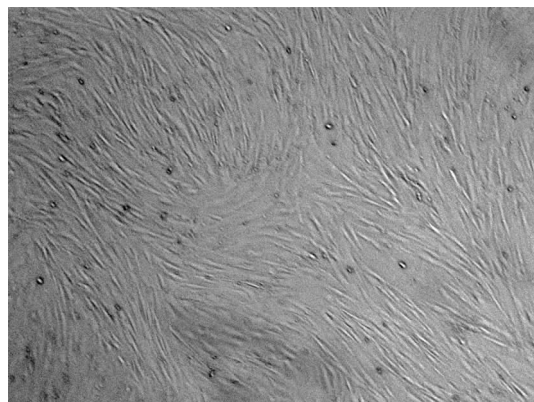


图 2 传代培养 7 d(100×)

Fig. 2 Subculture for 7 d(100×)

2.2 不同来源供核细胞对重构胚发育能力的影响

不同来源的供核细胞对重构胚发育能力的影响很大。在该试验中,初生仔猪耳成纤维细胞作

为核供体时的重构胚发育率最高,48 h 观察卵裂,7 d 观察统计囊胚数(见图 3),卵裂率为 $65.6\% \pm 3.3\%$,囊胚率为 $17.8\% \pm 2.2\%$;初生仔猪尾成纤维细胞作为供体的发育率最低,卵裂率为 $20.2\% \pm 3.1\%$,囊胚率为 0;卵丘颗粒细胞供体发育率居中,卵裂率为 $61.9\% \pm 2.7\%$,囊胚率为 $11.4\% \pm 0.9\%$ 各组间差异显著($P < 0.05$)(见表 1)。

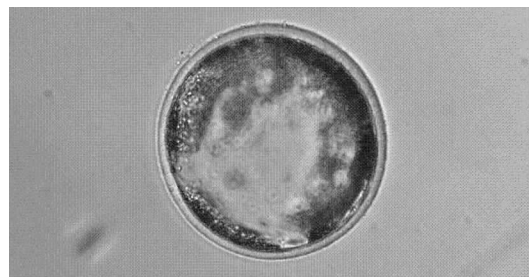


图 3 重构胚囊胚(50×)

Fig. 3 Reconstructed blastocysts(50×)

表 1 供核细胞来源对胚胎早期发育的影响

Table 1 The effect of the source of nucleated cells on early embryonic development

| 处理 Treatments | 胚胎数 Embryos | 卵裂数/% Cleavage number | 囊胚数/% Blastocyst number |
|--------------------------------|----------------|--------------------------|----------------------------|
| 卵丘颗粒细胞 Cumulus granulosa cells | 105 | 65(61.9±2.7) a | 12(11.4±0.9) b |
| 耳成纤维细胞 Ear fibroblasts cells | 90 | 59(65.6±3.3) a | 16(17.8±2.2) a |
| 尾成纤维细胞 Tail fibroblasts cells | 94 | 19(20.2±3.1) b | 0(0±0) c |

注:不同小写字母为差异显著性($P < 0.05$)。

Note; Different letters mean significant difference at 0.05 level.

3 结论与讨论

3.1 供核细胞

可被用作核移植供体的细胞种类很多,但不同来源细胞的核移植效率明显不同,在经试验的多种不同来源和种类的供体细胞中,只有少数获得了克隆后代。这是因为重构胚的发育能力主要取决于作为供体的细胞核的发育潜力,只有发育潜力大的细胞种类作为核供体才能获得克隆后代^[6]。目前用作核移植供体的细胞根据其来源大致可以分为成年个体生殖系统的细胞、生殖系统以外的细胞、终末分化细胞和来自于胎儿的细胞四大类。每种来源的细胞都有获得克隆后代的细胞类型,但克隆效率差异很大^[7]。

常用作核供体并获得克隆后代的细胞包括成纤维细胞、肌肉细胞、输卵管上皮细胞及颗粒细胞等^[8]。在该研究中,采用了来自耳和尾的成纤维细胞以及卵母细胞成熟后分离的颗粒细胞。这 3 种细胞在促进重构胚发育方面的能力相差较大,以初生仔猪耳成纤维细胞为核供体的重构胚发育率最高,卵丘颗粒细胞次之,初生仔猪尾成纤维细胞作为核供体,只有少量重构胚能卵裂,但没有得到囊胚。

3.2 核移植效率

影响核移植效率的因素很多,其中供体体细

胞核和受体卵母细胞质的相互作用过程是否协调,是其中一个非常关键的因素^[9]。有研究认为,选择处于 G0/G1 期或 G1/S 交界点的细胞作为供核细胞有利于核的重编程并进一步促进重构胚的发育。颗粒细胞是自然处于 G0/G1 期的细胞,最容易被重编程,加之其来自于卵母细胞周围,作为供核细胞时与受体卵母细胞间互作更加协调^[10]。因此,理论上说颗粒细胞作为供核细胞时,其重构胚会有较高的囊胚率,很多研究者在不同动物的克隆研究中也得到了类似的结论^[6]。但在该研究中颗粒细胞作为供核细胞的囊胚率低于耳成纤维细胞作为供核细胞的囊胚率,也许是因为在核移植前对颗粒的处理方式或整个试验体系不同所致。

由于在克隆或转基因研究过程中需要有大量持续稳定的供核细胞,因此在供核细胞的选择上,要求在不影响供体动物健康的前提下能够方便、多次取材。动物的皮肤来源方便,其中的成纤维细胞能够耐受长期的体外培养,染色体倍性变异小,重编程能力相对较强,而且具有易于传代和保存,可以进行转基因等遗传操作的特点。该试验通过组织块法建立了能在体外正常培养和传代的大白猪仔猪耳和尾成纤维细胞系。通过传代获得较纯的成纤维细胞,并用接触抑制法使大多数细

胞停留在 G0 期作为供核细胞。虽然同为皮肤成纤维细胞,耳源成纤维细胞作为供核细胞的囊胚率较高,而尾源的细胞为供核细胞则未得到囊胚。但也有研究者利用尾成纤维细胞作为核供体并获得成功的,如 Wakayama 等^[11]就利用小鼠的尾成纤维细胞经血清饥饿后作为核供体获得了克隆小鼠,但未见有用猪尾部成纤维细胞获得克隆猪的报道,这可能是种属差异造成的。

参考文献:

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(1): 3-7.
- [2] Galli C, Lagutina I, Perota A, et al. Somatic cell nuclear transfer and transgenesis in large animals: current and future insights[J]. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47(3): 2-11.
- [3] Niemann H, Tian X C, King W A, et al. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning [J]. *Reproduction*, 2008, 135(2): 151-163.
- [4] Swindle M M, Smith A C. Comparative anatomy and physiology of the pig[J]. *Scand J. Lab Anim Sci.*, 1998, 25: 11-21.
- [5] Kurome M, Geistlinger L, Kessler B, et al. Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set[J]. *BMC Biotechnol*, 2013, 20: 13-43.
- [6] 张德福, 刘东, 汤琳琳, 等. 不同供体细胞及其处理对猪核移植重构胚体外发育的影响[J]. *遗传*, 2007, 29(2): 211-217.
- [7] 姚雅馨, 李向臣, 张勇, 等. 不同处理牛卵丘/颗粒细胞作为核供体对克隆胚发育的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(5): 645-651.
- [8] 吕自力, 石国庆, 王亮. 牛输卵管上皮细胞的纯化培养与生长特性研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(5): 19-23.
- [9] 刘海军, 刘灵, 刘玉堂, 等. 受体卵母细胞来源和供体细胞类型对山羊体细胞核移植融合率的影响[J]. *华北农学报*, 2008, 23(1): 41-44.
- [10] 郭磊, 李慧, 韩之明. DNA 甲基化和组蛋白修饰在克隆动物发育过程中的作用[J]. *遗传*, 2010, 32(8): 762-768.
- [11] Wakayama T. Production of cloned mice and ES cells from adult somatic cells by nuclear transfer: how to improve cloning efficiency[J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53(1): 13-26.

Effects of Donor Cells with Different Sources on the Development of Porcine Cloned Embryos

MA Hong

(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to study the effect of donor cells with different sources on the ability of somatic cell nuclear transfer embryos development, the granular cells from COCs, fibroblast cells from ears or tails were obtained as materials, and they were transferred into enucleated porcine oocytes separately, the development of cloning embryos were compared. The results showed that the blastocyst rate was the highest about 17.8% when the ear fibroblast cells were used as donor cells, and the blastocyst rate was 11.4% when the granular cells were used. However the cleavage rate were 65.6% and 61.9% respectively ($P < 0.05$), there had no significant difference between them. The cleavage rate was only 20.2% and no blastocyst was obtained when the tail fibroblast cells were used as donor cells, there had significantly difference with others ($P < 0.05$). In conclusions, because of the rich source and the convenience of extending and saving, fibroblasts derived from ears could be used as the donor cells for porcine nuclear transfer with strong development ability.

Key words: granular cells; fibroblast cells; somatic cell nuclear transfer; blastocyst rate