

不同类型核受体对小鼠体细胞重构胚胎发育能力的影响

雷 蕾^{①②} 刘忠华^{①③} 朱子玉^{①④} 寇朝辉^① 吴昱琪^① 徐 营^①
文端成^① 毕春明^① 夏国良^① 陈大元^{①*}

(^①中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; ^②中国农业大学生物学院, 北京 100094; ^③东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030; ^④苏州大学生命科学学院, 苏州 215006. * 联系人, E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn)

摘要 为探讨昆明白小鼠不同类型的卵胞质对小鼠体细胞核移植胚胎发育的影响, 采用 C57BL/6 小鼠耳成纤维细胞为核供体, 昆明白小鼠卵母细胞为核受体进行单次核移植, 同时采用将重构胚类合子核移入去核合子、重构胚 2-细胞卵裂球细胞核移入去核 MⅡ期卵的方法进行连续核移植, 通过将重构胚 2-细胞卵裂球与正常昆明白小鼠 2-细胞胚胎卵裂球交换融合得到四倍体胚胎. 对所得胚胎进行体外培养, 结果发现, 以去核的昆明白小鼠 MⅡ期卵母细胞为核受体进行单次核移植所得到的重构胚胎发育率很低, 且只能发育到 8-细胞阶段. 两种连续核移植重构胚发育率均有所提高, 但仅重构胚类合子核移入去核合子时有囊胚出现, 囊胚发育率为 1.9%. 重构四倍体胚胎囊胚发育率却很高(62.3%), 染色体分析表明其中 51.5%为真正的四倍体. 结果表明, 昆明白小鼠不同类型核受体对重构胚胎的发育能力有显著影响, 其去核卵母细胞胞质对体细胞核重编程的能力较弱, 而当其与正常受精卵胞质共同作用时可较好地对体细胞核重编程.

关键词 体细胞 核移植 连续核移植 四倍体 昆明白小鼠

哺乳动物体细胞核移植已在多种动物取得了成功. 根据核移植的技术程序可以分为两类, 一类为单次核移植, 取得成功的例子有: 绵羊^[1]、小鼠^[2]、牛^[3]等; 另一类为连续核移植, 即将单次核移植所得重构胚胎发育至不同阶段的卵裂球作为核供体再进行核移植, 成功的例子有: 猪^[4]、小鼠^[5,6]. 连续核移植所用的核供体及胞质受体在不同的实验中也有所不同, 常见的有: 将重构胚胎卵裂球移入去核 MⅡ期卵^[7], 将重构胚胎的类合子核移入去核合子中^[4], 将重构胚胎 2-细胞卵裂球移入去核的 2-细胞胞质中^[8]. Campell 和 Wilmut 认为^[1], 连续核移植使供体核多次暴露在卵胞质环境中, 有利于核的重新编程, 从而提高重构胚胎的发育率. 本实验以 C57BL/6 小鼠耳成纤维细胞为核供体, 以昆明白小鼠的去核 MⅡ期卵为胞质受体, 对单次核移植以及不同方法的连续核移植进行对比, 探讨了连续核移植对重构胚胎发育的影响.

1 材料与方法

(i) 供核细胞的获取. 耳成纤维细胞取自 C57/

BL6 成年雄鼠耳尖. 取小块耳尖组织经 75%乙醇浸泡灭菌清洗 3 次后, 再经无菌生理盐水浸洗 3 次, 充分剪碎, 用 0.25%胰蛋白酶(Sigma)4℃消化过夜; 消化的组织在含 20%胎牛血清(Gibco)的 DMEM/F12(Sigma)培养液中进行培养. 将具有典型梭形形状的细胞进行传代, 传代培养的细胞经免疫组化分析证明为成纤维细胞. 核移植前将贴壁生长至接触抑制的细胞用 0.25%胰蛋白酶进行消化备用.

(ii) 卵母细胞、原核期胚胎及 2-细胞胚胎的获取. 8 周龄以上昆明白雌鼠腹腔注射 PMSG 10 IU/只, 间隔 48 h 腹腔注射 hCG 10 IU/只进行超数排卵. 部分雌鼠于 hCG 注射后与雄鼠合笼过夜, 次日晨检栓. 未合笼雌鼠于注射 hCG 后 13 h 断颈椎处死, 取出输卵管置于 M₂ 培养液(Sigma)中, 用细针切开壶腹部取卵丘团, 经透明质酸酶(300 IU/mL, Sigma)处理 2~3 min 去除卵丘细胞, 卵母细胞经 M₂ 培养液洗 3~5 次后备用. 合笼见栓雌鼠分别于注射 hCG 后 24 h 和 38~42 h 断颈椎处死, 以 M₂ 培养液冲输卵管, 即可获得原核期胚胎和 2-细胞胚胎.

1) Campell K H S, Wilmut I. Recent advances *in vitro* culture and cloning of ungulate embryos. In: Vth World Congress on Genetics as Applied to Livestock, 20. 1994. 180~187

(iii) 单次核移植操作过程. 将卵母细胞置于含 5 $\mu\text{g/mL}$ CB(细胞松弛素 B)和 1%蔗糖的 M_2 操作液中预处理 5~10 min, 移入操作液滴中, 将供核细胞加入 M_2 培养液滴中, 上盖石蜡油. 用固定管(内径 25~35 μm , 外径 80~100 μm)吸住卵母细胞, 调整卵母细胞使核位于时钟 12 点位置, 用实心玻璃针在核区上部的透明带上切口, 长度为透明带圆周的 1/5~1/4; 所有卵母细胞均切口完毕后, 改用去核针(平口, 内径 15~20 μm)从透明带切口处进针吸取核及核区周围少量胞质, 从而达到去核目的, 然后用去核管吸取供核细胞从同一切口注入到透明带下. 将此重构的卵母细胞-供核细胞经 M_2 洗 3 次, 置于电融合液(0.28 mol/L 甘露醇 + 0.1 mmol/L MgSO_4 + 0.1 mg/mL PVA + 3 mg/mL BSA)中, 平衡 1~2 min 后, 用 ECM2001 电融合仪(BTX 公司)以 1.8 kV/cm, 10 μs 一次直流电脉冲诱发融合. 电融合完成后将卵母细胞移入石蜡油覆盖的 CZB 培养液滴中, 37.5 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 30 min 后检查融合结果. 融合的重构胚胎移入含 10 mmol/L SrCl_2 和 5 $\mu\text{g/mL}$ CB(Sigma)的无 Ca^{2+} M_{16} 培养液中, 置培养箱培养 6 h, 进行活化处理. 将见到类合子核的重构胚胎移入 CZB 培养液中进行培养或直接用于连续核移植供核.

(iv) 连续核移植操作过程.

(1) 重构胚胎类合子核移入去核合子. 合子透明带切口、去核及重构胚胎类合子核的取出方法与卵母细胞去核相同, 重构胚胎类原核注入去核合子透明带下与单次核移植注核法基本相同, 但上述过程中所用操作液均为 M_2 + 5 $\mu\text{g/mL}$ CB, 操作过程中应注意重构胚胎类原核取出要完整. 电融合条件为 1.4 kV/cm, 20 μm , 2 次脉冲. 融合的重构胚胎移入 CZB 培养液中进行培养.

(2) 重构胚胎 2-细胞卵裂球细胞核移入去核 $M\text{II}$ 期卵. 卵母细胞透明带切口及去核法如前述, 重构胚胎 2-细胞卵裂球细胞核的吸取与重构胚胎类原核的吸取方法相同, 操作液、电融合条件及重构胚胎培养均与上面所述相同.

(v) 正常胚胎与重构胚胎杂合四倍体的制作. 取正常昆明白小鼠 2-细胞胚胎置于操作液(M_2 + 5 $\mu\text{g/mL}$ CB)中, 用实心尖针在透明带极体位置切口, 用斜口针(内径 35~45 μm , 斜口为 45 $^{\circ}$)取出一个卵裂球, 同时取出重构胚胎 2-细胞胚胎的一个卵裂球, 将这两个卵裂球互换, 即将正常胚胎取出的卵裂球注

入到只剩余一个卵裂球的重构胚胎透明带内, 同样将重构胚胎取出的卵裂球也移入到只剩余一个卵裂球的正常胚胎透明带内, 从而得到两个由两种不同卵裂球构成的 2-细胞胚胎. 依此法对所有胚胎的卵裂球置换完毕, 将胚胎移入电融合液(0.28 mol/L 甘露醇 + 0.1 mmol/L MgSO_4 + 0.05 mmol/L CaCl_2)中, 以 1.0 kV/cm, 80 μm , 3 次脉冲诱发融合, 融合后的胚胎移入 CZB 液中培养.

(vi) 染色体计数. 四倍体胚胎发育到囊胚时在培养液中加入秋水仙素(5 $\mu\text{g/mL}$, Sigma), 继续培养 6 h, 再取出胚胎移入 1%柠檬酸钠中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 最大湿度的培养箱中低渗处理 30 min. 取胚胎置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的载玻片上, 注意尽量少带液体, 滴加固定液(甲醇: 冰乙酸 = 3: 1)使卵裂球及染色体散开, 晾干后 Giemsa 染色, 计染色体数.

(vii) 统计分析. 采用百分数 t 检验进行.

2 结果

2.1 重构胚胎与正常胚胎组成的四倍体胚胎的发育情况

四倍体胚胎的发育情况见表 1.

胚胎种类	融合数	培养胚胎数	发育阶段		
			2-细胞(%)	4-细胞(%)	囊胚(%)
四倍体胚胎	53	53	50(94.3)	43(81.1)	33(62.3)
昆明白小鼠胚胎	-	106	100(94.3)	100(94.3)	77(72.6)

互换卵裂球以后得到的 2-细胞胚胎进行电融合时融合率达 100%, 融合后的发育率也较高, 囊胚发育率为 62.3%, 与昆明白小鼠原核期胚胎体外培养的发育率差异不显著($P>0.05$). 对发育到囊胚期的四倍体胚胎进行染色体计数检测, 结果表明有 51.5%的胚胎为四倍体(图 1).

2.2 以耳成纤维细胞为核供体的单次、二次核移植重构胚胎的发育情况

3 组实验中, 重构胚胎类合子核移植组融合率最高, 为 91.2%, 显著高于其他两组($P<0.05$); 3 组实验中重构胚胎发育到 2-细胞时发育率无显著差异($P>0.05$); 以重构胚胎类合子核、重构胚胎 2-细胞核为核供体的重构胚胎发育到 8-细胞时发育率显著高于以成纤维细胞为核供体的重构胚胎($P<0.05$); 以成

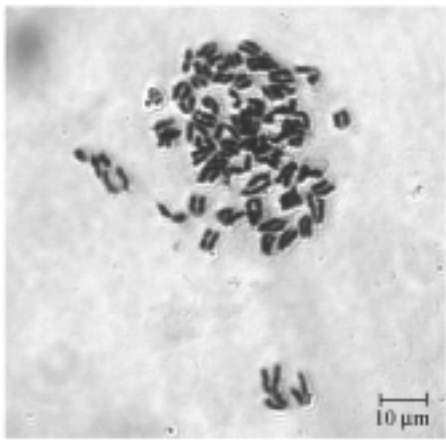


图 1 正常胚胎与体细胞重构胚胎的杂合四倍体(4n = 80)

纤维细胞为核供体的重构胚胎可发育至 8-细胞, 以重构胚胎 2-细胞核为核供体的重构胚胎可发育至桑葚胚, 而以重构胚胎类合子核为核供体的重构胚胎可发育至囊胚见表 2.

表 2 单次和二次核移植重构胚胎的发育情况 ^{a)}					
组别	核供体	核受体	次数	总数	融合数(%)
1	成纤维细胞	去核 MⅡ期卵	20	472	298(63.1) ^a
2	重构胚胎类合子核	去核合子	5	57	52(91.2) ^b
3	重构胚胎 2-细胞核	去核 MⅡ期卵	3	32	17(53.1) ^a

组别	发育阶段			
	2-细胞(%)	8-细胞(%)	桑葚胚(%)	囊胚(%)
1	110(36.9)	1(0.3) ^a		
2	19(36.5)	2(3.8) ^b	2(3.8)	1(1.9)
3	3(17.6)	1(5.9) ^b	1(5.9)	

a) 同一列中数据的上标不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

3 讨论

体细胞核移植小鼠早已有多例出生, 而且无论单次核移植还是连续核移植均有成功出生小鼠个体的报道^[2,5,6]. 但采用昆明白小鼠卵母细胞作为胞质受体而达到发育到期个体的实验还未见报道, 本实验以 C57BL/6 小鼠耳成纤维细胞为核供体, 昆明白小鼠卵母细胞为胞质受体进行单次核移植发现, 重构胚发育率很低, 且只能发育到 8-细胞阶段; 而将重构胚 2-细胞卵裂球与正常昆明白小鼠 2-细胞胚胎卵裂球交换融合得到的四倍体胚胎, 囊胚发育率却很高, 通过染色体计数证实 51.5%的囊胚为真正的四倍体, 即表明约有 30%左右的重构胚核进行了正常的复制和分裂, 并参与指导胚胎的发育, 体细胞核得到了有效重新编程. 因此, 我们认为可能单纯昆明白小

鼠的卵母细胞胞质不能使体细胞核完全重新编程, 而正常受精的昆明白小鼠胚胎胞质则可以补充完成这一过程, 从而使部分体细胞核参与了重构胚的发育, 且含有重构胚细胞核的囊胚发育比例与其他研究者报道的小鼠体细胞核移植囊胚发育率相似^[2,5,6].

连续核移植使供体核多次暴露在卵胞质环境中, 有利于核的重新编程, 从而提高重构胚的发育率. 本工作中重构胚 2-细胞卵裂球连续核移植实验也证明了这一点, 但提高的程度并不很大, 且发育阶段也仅到桑葚胚期. 而重构胚类合子核连续核移植的重构胚发育比单次核移植有明显提高, 重构胚可发育到囊胚, 其原因我们认为与前述四倍体相似, 是由昆明白小鼠卵胞质的性质决定, 体细胞核在去核 MⅡ期卵胞质中仅能得到初步重新编程, 之后又在合子胞质中得以进一步重新编程, 从而才使得重构胚发育率有所提高, 这一点在体细胞克隆猪的实验中也有所体现^[4]. 上述原因还有待进一步验证.

致谢 本工作为中国科学院知识创新重大项目(批准号: KSCX1-05-01)、国家“攀登”计划(批准号: 95-专-08)和国家自然科学基金资助项目(批准号: 3983028).

参 考 文 献

1 Wilmut I, Schnicke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810~813

2 Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394: 369~374

3 Kato Y, Tani T, Sotomara Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282: 2095~2098

4 Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 505~509

5 Amano T, Tani T, Kato Y, et al. Mouse cloned from embryonic stem (ES) cells synchronized in metaphase with nocodazole. *J Exp Zool*, 2001, 289: 139~145

6 Ono Y, Shimazawa N, Ito M, et al. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2001, 64: 44~50

7 李劲松, 陈大元, 韩之明, 等. 连续核移植对异种克隆大熊猫胚胎发育的影响. *科学通报*, 2001, 46(22): 1899~1901

8 Kato Y, Yabuuchi A, Motosugi N, et al. Developmental potential of mouse follicular epithelial cells and cumulus cells after nuclear transfer. *Biol Reprod*, 1999, 61: 1110~1114

(2002-08-26 收稿, 2002-10-28 收修改稿)