

体细胞核移植生产转 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat-1* 克隆猪

潘登科^{①*}, 张莉^{①†}, 周艳荣^{②†}, 冯冲^①, 龙川^①, 刘晓^①, 董恩球^③, 王树臣^③
万荣^④, 张健^④, 陈红星^{②*}

① 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 畜禽遗传资源与利用农业部重点实验室, 北京 100193;

② 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071;

③ 河北省玉田种猪场, 玉田 064104;

④ 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193

* 联系人, E-mail: pandengke@yahoo.com.cn; hongxingchen@yahoo.com.cn

† 同等贡献

收稿日期: 2008-12-23; 接受日期: 2009-02-24

国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02Z113)、国家基本科研业务费(批准号: ywf-td-1)和中国农业科学院科技经费资助项目

摘要 转 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因猪在优质猪培育及研究 ω -3 不饱和脂肪酸预防心血管和癌症疾病中的作用方面有着重大的应用. 本研究首次通过体细胞核移植制备了转线虫 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat-1* 猪. 将 *sFat-1* 基因转染到大白猪胎儿成纤维细胞, 获得转基因阳性细胞克隆, 然后以转基因细胞为核供体、体外成熟的猪卵母细胞为核受体构建克隆胚胎, 胚胎体外培养或进行移植. 先后移植了 1889 枚 1~4 细胞期克隆胚胎到 10 头受体母猪的输卵管内, 28 天 B 超检测 9 头受体母猪妊娠 (90%), 7 头妊娠足月 (70%) 分娩产下 21 头仔猪, 体细胞克隆猪的效率为 1.1% (出生仔猪/移植胚胎). 体细胞克隆猪效率的提高, 主要是对克隆胚胎的移植环节进行了改进, 比较了受体母猪排卵状况对胚胎移植效率的影响. 当受体母猪卵泡发育处于即将排卵或正在排卵阶段, 能够获得较高的妊娠率和妊娠足月率 (100%), 而排卵后移植妊娠足月率为 0%. 对健康存活 15 头克隆猪进行了 PCR 和 Southern 检测, 证实 13 头为转基因猪, 转基因阳性率为 87%. RT-PCR 检测 13 头转基因猪, 12 头表达 *sFat-1* 基因. 以上结果表明, 利用优化的体细胞转基因结合核移植技术, 可以成功地批量生产转 *sFat-1* 基因的克隆猪.

关键词

体细胞核移植

ω -3 脂肪酸去饱和酶基因

排卵状况

转基因猪

ω -3 多不饱和脂肪酸 (ω -3 polyunsaturated fatty acids, ω -3 PUFAs) 是一种具有广泛生物学功能的多不饱和脂肪酸. 因其在预防和治疗心脑血管疾病、癌症等多种疾病方面有着重要作用^[1,2], 而成为近年的研究热点. 然而人和哺乳动物自身因为缺少 ω -3 脂肪酸

去饱和酶基因, 因此无法合成此类不饱和脂肪酸, 必须从食物中获得^[3]. 目前其主要来源——深海鱼资源很有限, 因此通过基因工程等手段大规模获取 ω -3 PUFAs 越来越受到关注.

1997 年, Spsychalla 等人^[4]克隆了来源于线虫

(*Caenorhabditis elegans*)的 ω -3 去饱和酶基因*Fat-1*, 在哺乳动物细胞中发现*Fat-1* 蛋白能催化以 ω -6PUFAs为底物产生 ω -3PUFAs. 2006年, Lai等人^[5]报道了转线虫*Fat-1* 基因克隆猪诞生. 这种猪体内 ω -3 PUFAs含量较普通猪有大幅度提升, 但所合成的 ω -3 PUFAs中价值更大的²²C的 ω -3 PUFAs(如 docosapentaenoic acid, DPA和 docosahexaenoic acid, DHA)水平仍然很低. 2008年, Zhu等人^[6]克隆了来源于另外一种线虫*Caenorhabditis Briggsae*的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因, 即*sFat-1* 基因, 转基因小鼠的脂肪酸检测显示, *sFat-1* 基因除能完全发挥其 ω -3 去饱和酶作用外, 还能产生更多的长链DHA和DPA. 转*sFat-1* 基因的克隆猪目前还没有报道, 为此, 本研究以转染*sFat-1* 基因的大白猪胎儿成纤维细胞为核供体, 通过体细胞核移植构建胚胎, 然后进行胚胎移植, 生产一种富集高价值 ω -3 脂肪酸的克隆猪.

目前, 体细胞克隆猪的效率还很低, 平均不足1%^[7]. 胚胎移植的受胎率低是主要原因之一, 转基因克隆猪胚胎移植的受胎率更低. 为此, 本研究比较了受体母猪排卵状况对克隆胚胎移植效率的影响, 优化了体细胞克隆技术胚胎移植环节, 批量地生产了我国首批转基因*sFat-1* 克隆猪.

1 材料和方法

除特别说明外, 所有化学试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司; 细胞培养相关耗材为 BD Falcon 公司产品; 卵母细胞及胚胎培养耗材为 Nunc 公司产品; *sFat-1* 线性化基因由军事医学科学院生物工程研究所提供.

1.1 表达载体 pCAGGS-*sFat1*-Neo 的构建

sFat-1 基因和哺乳动物全身表达载体 pCAGGS-*sFat1*-Neo 由军事医学科学院生物工程研究所合成和构建. 使用 *EcoR* 从 T 载体上切下 *sFat-1* 基因, 克隆入 pCAGGS-Neo 的 *EcoR* 位点中. pCAGGS-*sFat1*-Neo 表达载体中(图 1), *sFat-1* 基因的转录由 CAG 启动子驱动, *Neo* 抗性基因由 pGK 启动子驱动. 其中 CAG 启动子包含有多个组分, 分别为: CMV 增强子、鸡 β -actin 启动子、鸡 β -actin Exo1(不翻译)、鸡 β -actin Intron1 的 5'部分(包含有强增强子)、兔 β -globin

Intron2 的 3'部分(提供拼接位点)、兔 β -globin Exo3 的 5'部分(ATG 之前的部分). *sFat-1* cDNA 置于 CAG 启动子之下, 在 *sFat-1* cDNA 的下游紧邻兔 β -globin polyA 终止子.

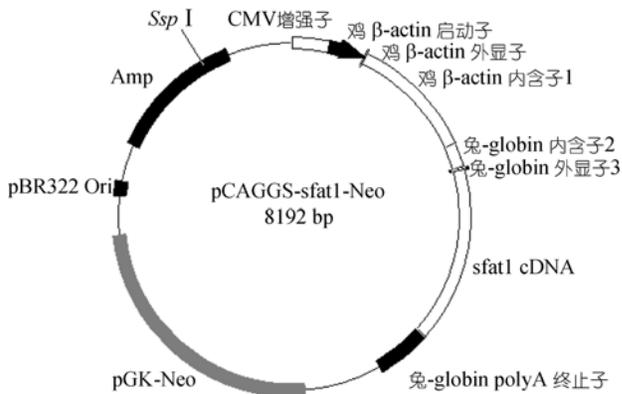


图 1 表达载体 pCAGGS-*sFat1*-Neo 示意图

1.2 供体细胞的转染和筛选

大白猪胎儿成纤维细胞系的建立参照文献[8]. 细胞培养液为添加 66 μ g/mL 青霉素, 100 μ g/mL 硫酸链霉素, 10%(体积比)胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, Gibco)的高糖 DMEM(Gibco). 转染前将原代细胞接种至六孔板中, 待细胞长至 80%~90%汇合时, 利用脂质体(lipofectamineTM 2000, Invitrogene)介导的方法, 将线性化的载体 pCAGGS-*sFat1*-Neo 转染至大白猪胎儿成纤维细胞. 经 600 μ g/mL G418(Gibco)筛选 6 天后, 降低 G418 的浓度至 200 μ g/mL 再维持 1 周, 扩增培养后阳性细胞液氮冷冻保存.

1.3 转基因细胞的分子生物学鉴定

解冻克隆点细胞扩增并提取基因组 DNA 进行转基因鉴定. 进行 PCR 鉴定前把各个细胞克隆的基因组 DNA 浓度调整为一致, PCR 检测引物序列为 p1: 5'-GTG CTG GTT GTT GTG CTG TCT CAT C-3' 和 p2: 5'-GCG TGA TGC AGT TTG TGA CTC TTC TG-3'. 扩增片段长度为 494 bp. PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min.

RT-PCR 检测: 使用 Trizol 方法提取细胞总 RNA, 并将各个细胞克隆的总 RNA 浓度调整一致, 使用

oligo dT 作为引物进行反转录: 42°C 1 h, 75°C 15 min. 反应结束后以此为模板, 进行下一步的 PCR 反应, 使用引物 p3: 5'-CTC TGA CTG ACC GCG TTA CTC CCA C-3' 和 p2: 5'-GCG TGA TGC AGT TTG TGA CTC TTC TG-3'. PCR 反应条件为: 94°C 4 min, 94°C 30 s, 66°C 30 s, 72°C 1 min, 30 循环, 72°C 10 min. 扩增片段长度为 512 bp.

1.4 卵母细胞体外成熟(*In vitro* maturation, IVM)

从屠宰场采集初情期前母猪卵巢, 放入含青链霉素的 35°C 生理盐水中, 2 h 内运回实验室. 用配有 18 号针头的 10 mL 注射器抽吸卵巢上 3~6 mm 的卵泡. 体视镜下挑选卵丘包裹 3 层以上、致密、胞质均匀的卵丘细胞-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte-complexes, COCs), 卵母细胞体外成熟液(IVM 液)为 NCSU-23 添加 10% 猪卵泡液(PFF)、0.57 mmol/L 半胱氨酸、10 ng/mL 表皮生长因子(EGF)、10 IU/mL 人绒毛膜促性腺激素(hCG)和 10 IU/mL 孕马血清促性腺激素(eCG), 培养条件为 38.5°C, 5%CO₂, 95% 空气的气体环境, 饱和湿度. 将 COCs 先在 IVM 液中培养(20±2) h, 之后转移到无 hCG, eCG 的 IVM 液中继续培养(20±2) h. 在 IVM 中 40~44 h 后, 将 COCs 转移到含 1 mg/mL 透明质酸酶中脱去卵丘细胞, 挑选排出第一极体、卵黄膜完整、卵周隙清晰、胞质均匀的 M 卵母细胞为受体.

1.5 体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)

采用显微操作盲吸法去核和电融合法进行体细胞核移植, 简单过程如下: 显微操作液为添加 7.5 μg/mL 细胞松弛素 B(CB)的 HEPES 缓冲的无钙 NCSU-23. 盲吸法先去除 M 卵的纺锤体及第一极体, 选取一个转基因体细胞注射到透明带下, 并使之与卵母细胞质膜紧密接触, 用 ECM2001 融合仪(BTX)施加 1 DC, 2.0 kV/cm, 30 μs 的直流电脉冲诱导融合并同时激活, 融合/激活液为 0.28 mol/L 甘露醇、0.1 mmol/L CaCl₂, 0.1 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L HEPES 及 0.01% PVA 组成. 融合的重构胚放入含 10 μg/mL CB 和 10 μg/mL 放线菌酮(Cycloheximide, CHX)的胚胎培养液 PZM-3 溶液中进行 2 次激活处理 4 h, 最后

转入胚胎培养液 PZM-3 内培养, 体外发育到囊胚或进行早期移植.

1.6 胚胎移植和妊娠检测

转基因克隆胚胎体外培养 1~2 天后, 挑选形态和发育较好的胚胎进行移植, 自然发情第 1 或第 2 天的后备母猪用作受体(以出现压背静立反射为发情的第 0 天), 受体母猪品种为加系大白、长白或杜洛克, 移植方法为手术法输卵管深部移植, 每头受体移植约 200 多枚胚胎.

受体母猪排卵状况的判定. 手术时暴露卵巢, 根据卵泡排卵情况分为以下两个阶段: (1) 即将排卵或正在排卵阶段(Just prior to ovulation & Ovulating, JPO&IO), 卵巢上卵泡 5~6 cm、充血预破或部分卵泡正在排卵; (2) 排完卵阶段(after ovulation, AO), 受体母猪卵巢上的优势卵泡已经排完, 估计排卵完成 1 天以上.

胚胎移植后 28~30 天, 进行超声波妊娠检测. 对受体母猪卵泡发育阶段与克隆胚胎移植效率之间的关系进行分析, 包括 28 天妊娠率、妊娠足月率和产仔数等. 结果以统计分析软件 SAS 8.02 的 *t* 检验进行分析, *P* < 0.01 差异极显著.

妊娠母猪 30 天后每月检测一次, 跟踪胎儿发育情况, 调整饲养管理, 直至转基因克隆猪出生.

1.7 转基因猪的 DNA 鉴定

(1) PCR 鉴定. 取出生小猪尾尖部分, 抽取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 以受体母猪的基因组 DNA 作为阴性对照. PCR 检测上述转基因阳性细胞.

(2) Southern blot 鉴定. 出生小猪基因组 DNA, 使用 *EcoR* 酶切 12 h 以上, 25 V 电泳过夜, 凝胶中的 DNA 转移到尼龙膜上, 紫外交联后备用. 使用 *EcoR* 酶切 T-*sFat-1* 载体, 回收 1.4 kb 的 *sFat-1* 基因作为模板, 使用 Prime-a-gene 随机引物标记试剂盒标记探针过夜, 探针经 G50 柱纯化. 使用 Roche 的 fast-hybridization buffer, 68°C 预杂交 30 min, 加入纯化后的探针, 68°C 杂交 1 h. 使用 2×SSC, 0.1% SDS, 68°C 洗膜两次, 再换用 0.1×SSC, 0.1% SDS, 68°C 洗膜两次, 压片 3 天后显影.

1.8 转基因克隆猪 *sFat-1* 基因的表达

取出生小猪尾尖部分液氮研磨并用 Trizol 方法提取总 RNA, 其他部分同上述转基因阳性细胞克隆的 RT-PCR 鉴定.

2 结果

2.1 大白猪胎儿成纤维细胞 *sFat-1* 基因的转染、筛选及鉴定

大白猪胎儿成纤维原代细胞转染 48 h 后传至 24 孔板中, 恢复 48 h 后开始加入 G418 进行筛选, 记为第 0 天. 3 天后开始有大量细胞死亡, 第 6 天阴性细胞基本被杀死, 开始有克隆点出现. 在筛选的第 10 天进行传代, 共获得了 18 个 G418 抗性细胞株. PCR 检测结果(图 2)显示, 18 号克隆点未检测到目的基因; 3, 6, 12, 16 及 17 号克隆点细胞, 虽检测到目的基因的存在

但含量很小, 可能混有较多阴性细胞; 剩余 12 个为转基因阳性; 再利用 RT-PCR 检测这 12 个阳性克隆点的 RNA 表达水平, 发现泳道 3 的 4 号克隆点的 RNA 表达量极低(图 3), 认定其为转基因阴性.

2.2 受体母猪排卵状况对体细胞克隆猪的胚胎移植效率的影响

受体母猪的排卵状况(图 4)对胚胎移植后着床和发育的影响见表 1. 即将排卵或正在排卵时的 7 头受体母猪, 28 天时 B 超检测全部妊娠, 妊娠率为 100%, 与排完卵阶段(67%)无显著差异($P>0.05$), 但是其妊娠足月率与排完卵阶段相比(100% vs 0%), 差异极显著($P<0.01$). 即将排卵或正在排卵的 7 头受体母猪全部产仔, 共 21 头, 体细胞克隆猪的效率为 1.5%(出生仔猪/移植胚胎). 而排卵后移植的 3 头受体母猪妊娠足月率为 0%.

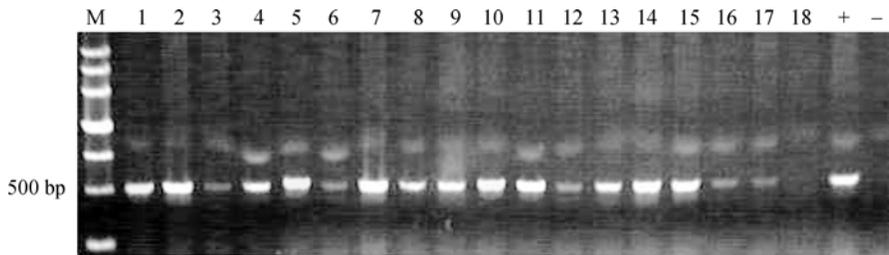


图 2 转 *sFat-1* 基因细胞克隆 PCR 鉴定

M 为 Marker ; +示质粒; -示阴性对照; 泳道 1~18: 不同克隆点细胞

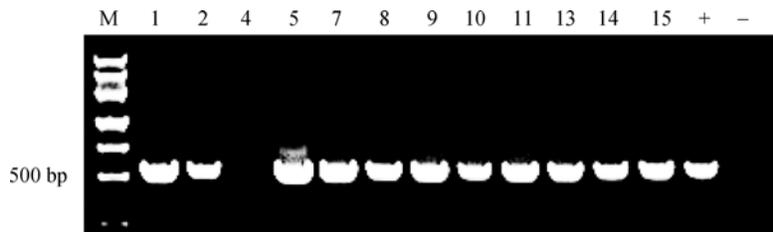


图 3 转 *sFat-1* 基因细胞 RT-PCR 检测

M 为 Marker ; +示质粒阳性对照; -示阴性对照; 泳道 1~12: PCR 阳性细胞克隆

表 1 受体母猪排卵状况对体细胞克隆猪的胚胎移植效率的影响^{a)}

受体母猪排卵阶段	受体母猪数	移植胚胎数	28 天妊娠数(%)	妊娠足月数(%)	产仔数 (出生仔猪/移植胚胎)(%)
即将排卵或正在排卵	7	1388	7 (100)	7 (100) ^a	21 (1.5) ^a
排卵结束后	3	501	2 (67)	0 (0) ^b	0 ^b

a) 同一栏内上标不同字母示差异极显著($P<0.01$)

2.3 转基因克隆胚胎移植后的体内发育和转基因克隆猪的效率

先后将 1889 枚 1~4 细胞阶段的胚胎移植到 10 头自然发情的后备母猪输卵管内, 28 天后 B 超检测 9 头受体母猪妊娠(90%), 7 头受体妊娠足月(70%)。经

剖腹产或自然产仔 21 头, 体细胞克隆猪的效率为 1.1%(出生仔猪/移植胚胎)。分娩存活 19 头(表 2), 死产 2 头, 单窝产仔存活最高达 7 头。出生后 2 周 4 头仔猪死亡, 主要原因是剖腹产出生时仔弱, 2 头仔猪上颌发育不完全。两个月后健康存活 15 头(图 5)。



图 4 受体母猪卵巢卵泡排卵状况
(A),(B) 即将排卵或正在排卵阶段; (C) 排卵结束

表 2 转基因克隆胚胎移植后的体内发育和出生结果

受体母猪编号	移植胚胎数	28 天妊娠(%)	妊娠足月(%)	产仔数(%)	分娩存活个体数	2 个月存活个体数
144903	239	+	+	1(0.4)	1	1
131603	225	+	+	7(3.1)	6	6
138409	115	+	+	3(2.6)	2	2
102607	181	+	+	4(2.2)	4	2
139604	153	+	-	-	-	-
78806	224	+	+	3(1.3)	2	2
127506	202	+	-	-	-	-
58401	146	-	-	-	-	-
134403	207	+	+	2(1.0)	2	2
129904	197	+	+	2(1.0)	2	0
合计 n=10	1889	9 (90)	7(100)	21 (1.1)	19	15

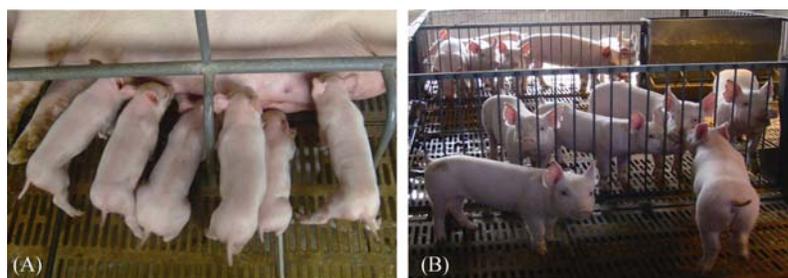


图 5 转 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat-1* 克隆猪
(A) 单窝产仔存活 6 头; (B) 2 个月龄的转基因克隆猪

2.4 转基因克隆猪的 DNA 鉴定

(1) PCR 鉴定. 使用的鉴定引物位于 pCAGGS-*sFat1*-Neo 表达载体中 *sFat-1* 起始密码子上游 25 bp 处, 而 *PsFat-1* 位于起始密码子下游 443 bp 处, PCR 条带应为 494 bp. 对 19 个样品进行了 PCR 鉴定(图 6), 其中 1, 2 号样品均为受体母猪, 4~18 号样品为健康存活的 15 头的克隆仔猪, 从结果可以看出, 受体母猪均为阴性, 克隆小猪 4~16 号 13 个个体均为阳性, 17~18 号 2 个个体为阴性. 这 2 头阴性猪均使用同一克隆的猪胎儿成纤维细胞作为核供体, 很可能此细胞克隆严重不纯, 其中只含有少量阳性细胞而大多数细胞为阴性.

(2) Southern blot 鉴定. pCAGGS-*sFat1*-Neo 表

达载体使用 *Ssp* 线性化后整合入猪胎儿成纤维细胞, 当使用 *EcoR* 酶切阳性克隆猪的基因组 DNA 后, 将会释放出 1.4 kb 的 *sFat-1* 基因, 以 *sFat-1* 基因作为模板标记探针, 将会检测出整合在阳性克隆猪基因组 DNA 中的 *sFat-1* 基因. 对 13 个 PCR 阳性的克隆猪样本进行了 Southern blot 鉴定, 其中泳道 1~2 为受体母猪, 泳道 3~15 为 PCR 阳性的 4~16 号个体. 结果显示, 受体母猪为阴性, 13 个 PCR 阳性克隆猪样本均检测出 1.4 kb 的 *sFat-1* 基因片段, 证实这 13 头克隆小猪均为转基因猪.

2.5 克隆猪的 RT-PCR 鉴定

sFat-1 基因的转录与否是 *sFat-1* 克隆猪制备的一个重要关键点. 对 13 个阳性克隆猪样本进行

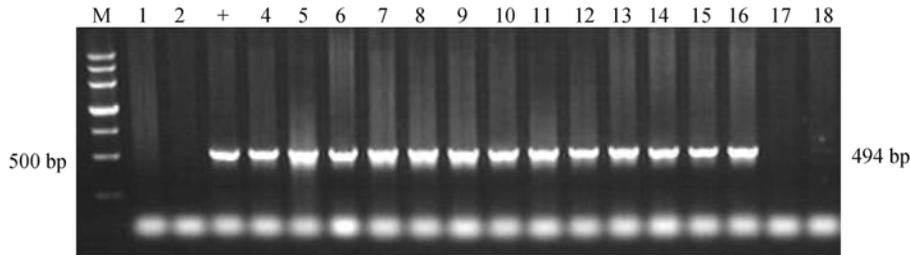


图 6 转基因猪的 PCR 鉴定

M 为 Marker ; 泳道 1,2: 受体母猪; + 示质粒; 泳道 4~18: 克隆仔猪. 受体母猪均为阴性, 克隆仔猪 4~16 均为阳性, 克隆仔猪 17~18 为阴性

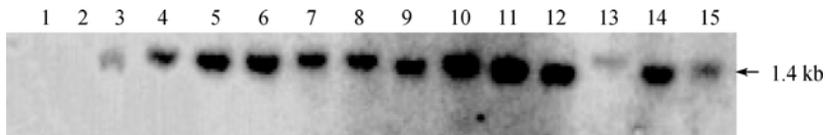


图 7 转基因克隆猪 Southern blot 鉴定

泳道 1,2: 受体母猪, 阴性对照; 泳道 3~15: PCR 阳性的 4~16 号克隆小猪, 均为阳性

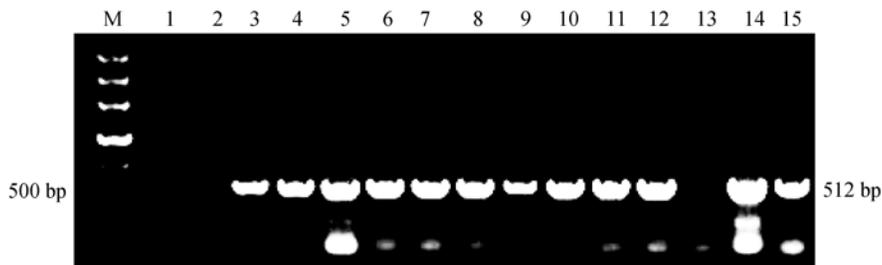


图 8 转基因克隆猪 *sFat-1* 基因在尾组织的表达

泳道 1,2: 受体母猪, 阴性对照; 泳道 3~15: 转基因阳性克隆小猪

了 RT-PCR 鉴定, 其中 1, 2 号样本为两个受体母猪. 结果显示, 受体母猪均为阴性, 13 个克隆猪样本中除 13 号泳道样本外, 其余均为 RT-PCR 阳性.

3 讨论

本研究通过体细胞核移植首次获得了转线虫 *Caenorhabditis Briggsae* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat-1* 克隆猪. 先后共移植了 1889 枚转 *sFat-1* 基因的 1~4 细胞期克隆胚胎到 10 头受体母猪, 7 头受体母猪妊娠足月并分娩产下 21 头仔猪, 妊娠足月率为 70%, 体细胞克隆猪的效率为 1.1%(出生仔猪/移植胚胎), 而以往体细胞克隆猪的效率大部分低于 1%^[9-11]. 出生后 2 个月存活 15 头, PCR 和 Southern 检测证实 13 头为转基因猪, 转 *sFat-1* 阳性率为 87%.

体细胞核移植结合体细胞转基因技术是生产 ω -3 脂肪酸去饱和酶转基因猪的一种有效方式. 利用 SCNT 技术生产转基因动物的最大优势在于: 将转基因完成于体细胞阶段, 并采用已确定为转基因的体细胞进行核移植, 这样生产转基因动物的效率能接近 100%. 因此, 供体细胞的转染及筛选对通过 SCNT 技术生产转基因动物至关重要. 筛选时所使用的药物浓度会影响到转基因阳性率及细胞状态. G418 浓度过高会对细胞产生较大的毒性; 过低又会影响到细胞的阳性率. 猪胎儿成纤维细胞转基因药物筛选一般使用 200~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 筛选 2~3 周. 本研究采用较高浓度的 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 经 6 天连续筛选, 获得了较高的阳性率. 有文献^[12]报道, 对转基因细胞进行长时间的药物筛选会降低体细胞克隆效率, 本研究采取高浓度短时间筛选, 发现转基因与非转基因克隆胚胎的发育能力并无显著差异(未发表资料). 虽然理论上筛选出的细胞应全部为阳性, 但从本研究克隆仔猪转基因阳性率为 87% 可知, 在鉴定为阳性的细胞克隆中, 可能也会混杂有阴性细胞. 本研究所筛选出的一些细胞克隆点 PCR 检测结果信号较弱, 可能混有阴性细胞. 2 个阴性猪均使用同一克隆点的猪胎儿成纤维细胞作为核供体, 很可能此细胞克隆

严重不纯, 其中只含有少量阳性细胞, 而大多数细胞为阴性. 因此, 今后在对克隆点细胞进行传代培养时, 可以适当加入低浓度的 G418 以维持细胞纯度.

胚胎移植是转基因克隆猪高效生产体系的关键环节, 也是检测体外生产胚胎质量的有效途径之一. 有关提高体细胞克隆胚胎的胚胎移植研究报道较少. 本研究比较了受体母猪排卵状况对胚胎移植效率的影响. 体外培养 1~2 天的胚胎进行移植时, 受体母猪卵泡发育处于即将排卵或刚刚开始排卵阶段, 能够获得较高的妊娠率和妊娠足月率 100%, 而排卵后移植妊娠足月率为 0%. Petersen 等人^[13]采用体细胞克隆猪胚胎的发育程度与受体母猪的排卵状况不同步时(移植后 24 h 排卵)进行胚胎移植, 12 头受体母猪 25 天的妊娠率为 75%, 妊娠足月率为 75%. Harrison 等人^[14]采取受体母猪的发情比胚胎迟 1 天的胚胎移植方案, 10 头受体母猪 4 头妊娠足月(40%)并产仔 18 头. 本研究中, 胚胎移植的妊娠率明显优于以上研究, 其可能的原因是, 将受体母猪卵泡发育状况作为判断体细胞克隆胚胎移植时机的标准, 可以较准确找出输卵管和子宫的环境适应体细胞克隆猪胚胎移植的最佳时机, 从而提高其受孕率.

克隆胚胎体外发育延迟, 要想提高体细胞克隆猪胚胎移植的受孕率, 移植的克隆胚胎发育阶段与受体猪子宫或输卵管发育的不同步性, 将是关键的一步. 本研究认为, 体细胞克隆猪胚胎的发育程度与受体母猪的排卵状况的不同步有利于提高胚胎移植效率. 体细胞克隆猪胚胎在受体母猪排卵前进行胚胎移植可使体细胞克隆猪胚胎适应输卵管和子宫的环境, 增加其受孕率. 最佳时期是受体母猪卵泡发育处于即将排卵时进行胚胎移植, 排卵后的受体母猪不适合作为培养 1~2 天胚胎的移植受体.

总之, 本研究成功地批量生产了转 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat-1* 克隆猪, 这为制备富含 ω -3 脂肪酸猪的培育奠定了前期基础, 并可为研究 ω -3 不饱和脂肪酸预防心血管和癌症疾病中的作用提供了一个大动物模型.

致谢 感谢中国农业科学院北京畜牧兽医研究所赵克斌研究员在建立纯种大白猪胎儿成纤维细胞系、北京第五肉联厂刘国哲主任和北京顺鑫鹏程食品分公司彭仲革主任在猪卵巢收集、北京东方联鸣公司

王少华工程师在受体母猪妊娠 B 超检测上、河北玉田种猪场徐厚刚总经理及有关技术人员在胚胎移植和克隆猪接生方面给予的帮助。

参考文献

- 1 Kris-Etherton P M, Hecker K D, Binkoski A E. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Nutr Rev*, 2004, 62: 414—426
- 2 Mozaffarian D, Ascherio A, Hu F B, et al. Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*, 2005, 111(4): 157—164[DOI]
- 3 McLennan P L, Abeywardena M Y, Charnock J S. Dietary fish oil prevents ventricular fibrillation following coronary artery occlusion and reperfusion. *Am Heart J*, 1988, 116: 709—717[DOI]
- 4 Spsychalla J P, Kinney A J, Browse J. Identification of an animal ω -3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(4): 1142—1147[DOI]
- 5 Lai L, Kang J X, Li R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(4): 435—436[DOI]
- 6 Zhu G M, Chen H X, Wu X J, et al. A modified n-3 fatty acid desaturase gene from *C. Briggsae* produces high proportion of DHA and DPA in transgenic mice. *Transgenic Res*, 2008, 17(4): 717—725[DOI]
- 7 Vajta G, Zhang Y, Machaty Z. Somatic cell nuclear transfer in pigs: recent achievements and future possibilities. *Reprod Fertil Dev*, 2007, 19: 403—423[DOI]
- 8 张运海, 潘登科, 孙秀柱, 等. 利用体细胞核移植技术生产表达绿色荧光蛋白的猪转基因克隆胚胎. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35(5): 439—445
- 9 Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 86—90[DOI]
- 10 Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289: 1188—1190[DOI]
- 11 Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol*, 2000, 18, 1055—1059[DOI]
- 12 Zakhartchenko V, Mueller S, Alberio R, et al. Nuclear transfer in cattle with nontransfected fetal or cloned transgenic fetal and post-natal fibroblasts. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(3): 362—363[DOI]
- 13 Petersen B, Lucas-Hahn A, Oropeza M, et al. Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10(3): 355—362[DOI]
- 14 Harrison S, Boquest A, Grupen C, et al. An efficient method for producing alpha (1,3)-galactosyltransferase gene knock out pigs. *Cloning Stem Cells*, 2004, 6: 327—331[DOI]